

129
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE 1H-BENCIMIDAZOLES CON
POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA Y
ANTIPROTOZOARIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JUAN VALDEZ GARAY



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268444



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 GONZALEZ.
Vocal:	Prof.	RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA.
Secretario:	Prof.	ABEL GUTIERREZ RAMOS
1er. Suplente:	Prof.	BLAS FLORES PEREZ
2do. Suplente:	Prof.	HECTOR GARCIA ORTEGA

Asesor de tesis:



Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

Supervisor Técnico:



M en C MA. ALICIA HERNANDEZ CAMPOS

Sustentante:



JUAN VALDEZ GARAY

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres Juan Jesus Valdez Popoca y Alicia Garay Salazar por su apoyo y por darme todo y más.

A mis amigos de toda la vida Gina, Cintya, Vero y Mario.

A Patricia L Gamix por todo su amor.

A mis compañeros y amigos del laboratorios 122 por hacer agradable la estancia en éste.

A mis amigos: Karla, Xochitl, Meche, Israel, Trini, Hilda, Alberto, Xiuth, Celia, Ma. Eugenia, Gladis, Ribelino, Javier, Alejandro y los que faltan por ser nombrados pero que han compartido su tiempo con migo.

Al personal de la USAI, en especial a Rosa Isela del Villar Morales, Margarita Guzman Villanueva, Georgina Duarte Lisci y Jose Luis Gallegos Pérez por su apoyo en el registro de espectros.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera, Dra. Lilian Yopez, Amparo Tapia Contreras y Raul Morales Urtado por su ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, a la M. en C. Alicia Hernández Campos y al M. en C. Francisco Hernández Luis por ser los pilares de esta tesis.

A todos ellos mil gracias.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Doctor Rafael Castillo Bocanegra, con el apoyo del subprograma 127 de "Formación Básica en la Investigación" y de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

INDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCION.	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Los Parásitos	4
2.1.1. Los Protozoarios	4
2.1.2. Los Helmintos	5
2.2. Los Bencimidazoles	7
2.2.1. Bencimidazoles con actividad biológica	8
2.2.2. Bencimidazoles con actividad antiprotozoaria	11
2.2.3. Mecanismos de acción de los bencimidazoles	13
2.3. Agentes antiparasitarios	15
2.4. Información epidemiológica	16
2.5. Planteamiento del problema	17
2.6. Consideraciones para el diseño	17
2.7. Objetivos	19
2.8. Hipótesis	20
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1. Parte Química	21
3.1.1. Instrumentación	21
3.1.2. Cromatografía	24
3.1.3. Bencimidazol	24
3.1.4. 2-Metilbencimidazol	25
3.1.5. 2-Aminobencimidazol	25
3.1.6. 2-Mercaptobencimidazol	26
3.1.7. 2-Bencimidazolcarbamato de metilo	27
3.1.8. 2-Metiltiobencimidazol	28
3.1.9. 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol	28
3.1.10. 2-Amino-5(6)-clorobencimidazol	29
3.1.11. 2-Mercapto-5(6)-clorobencimidazol	30
3.1.12. 5(6)-Cloro-2-bencimidazolcarbamato de metilo	31
3.1.13. 5(6)-Cloro-2-metiltiobencimidazol	32
3.1.14. 4-Cloro-1,2-fenilendiamina	32
3.1.15. Bromuro de cianógeno	34
3.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS	
3.2.1. Material biológico	34
3.2.2. Ensayo in vitro (MTT/PMS) contra la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	35
3.2.3. Prueba de susceptibilidad in vitro para <i>Entamoeba histolytica</i> .	36
3.2.4. Prueba de susceptibilidad in-vitro para <i>Giardia lamblia</i>	36

4. RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1. Parte quimica	38
4.2. Parte biologica	
4.2.1. Efecto de los Bencimidazole sobre la larva nuscular de <i>Trichinella spiralis</i>	43
4.2.2. Efecto de los 1H-Bencimidazoles sobre el trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i>	46
4.2.3. Efecto de los 1H-Bencimidazoles sobre el trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i>	49
5. CONCLUSIONES.	52
6. BIBLIOGRAFIA.	53
7. ESPECTROS.	56

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la síntesis y actividad biológica de los siguientes derivados del bencimidazol: Bencimidazol (1); 2-Metilbencimidazol (2); 2-Aminobencimidazol (3); 2-Mercaptobencimidazol(4); 2-Bencimidazolcarbamato de metilo (5); 2-Metiltiobencimidazol (6); 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (7); 2-Amino-5(6)-clorobencimidazol (8); 5(6)-Cloro-2-mercaptobencimidazol (9); 5(6)-Cloro-2-bencimidazolcarbamato de metilo (10); 5(6)-Cloro-2-metiltiobencimidazol (11). Los compuestos 1-11 se purificaron por recristalización e identificaron por sus constantes físicas (pf y Rf); en el caso de los compuestos 5 al 11, se realizaron estudios espectroscópicos y espectrométricos.

Los compuestos 1-6 fueron sintetizados a partir de la 1,2-fenilendiamina 13 comercial, mientras que los compuestos 7-11 se sintetizaron a partir de la 4-cloro-1,2-fenilendiamina 14, preparada en el laboratorio.

La reducción del grupo nitro en la 4-Cloro-2-nitroanilina 12 con H₂, Ni-raney en THF, se obtuvo la correspondiente 4-cloro-1,2-fenilendiamina 14. Esta amina se obtuvo también mediante la reducción con SnCl₂·2H₂O en HCl conc.

La ciclación de 13 con ácido fórmico a 100°C y posterior neutralización con solución de hidróxido de sodio dio el Bencimidazol 1. Cuando se trató 13 y 14 de igual manera, pero con ácido acético, se formaron los correspondientes 2-Metilbencimidazoles 2,7.

El tratamiento de las diaminas 13 y 14 con disulfuro de carbono, etanol y sosa dio los respectivos 2-Mercaptobencimidazoles 4, 9. La posterior S-metilación con yoduro de metilo dio los compuestos 2-Metiltiobencimidazoles 6, 11.

El sulfato de S-metiltiopseudourea se trató con Cloroformiato de metilo y solución de hidróxido de sodio para formar un intermediario el cual se le agregó la 1,2-Fenilendiamina 13 o 14 para obtener los 2-Bencimidazolcarbamato de metilo 5 o 10 correspondientes.

Se realizaron ensayos *in vitro* contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Los resultados mostraron una alta actividad de los compuestos contra los dos protozoarios y escasa actividad contra *T. spiralis*.

1. INTRODUCCION

Tanto en nuestro país, como en otras partes del mundo, existe un considerable número de personas que padecen enfermedades causadas por parásitos, como los protozoarios y helmintos. Las infecciones por estos parásitos ocupa uno de los primeros lugares como causa de morbilidad, afectando principalmente a la población infantil.¹ Por este motivo, en muchos laboratorios de todo el mundo, se han dado a la tarea de desarrollar nuevos compuestos, que puedan mejorar a los ya existentes, para el tratamiento de estas enfermedades.

Los protozoarios son organismos unicelulares que desempeñan todas las funciones de un organismo vivo. Estos organismos se encuentran incluidos dentro del reino protista, es decir que son organismos que están dotados de un núcleo verdadero. Las protozoosis de mayor importancia a causa de su morbilidad son las entamoebosis (*Entamoeba histolytica*), giardiosis (*Giardia lamblia*) y cryptosporidiosis (*Cryptosporidium sp*) que se relacionan con diarreas agudas y crónicas e incluso con enfermedades invasivas.^{1,2,3}

Para el tratamiento de parasitosis como la giardiosis, el fármaco de elección es el metronidazol (ver Figura 2), cuya molécula tiene como núcleo un imidazol. Este fármaco puede ser utilizado también como amebicida y tricomonocida.⁴

Los helmintos, a diferencia de los protozoarios, son organismos pluricelulares, se reproducen sexualmente, y su morfología es muy variada dependiendo del grupo a que pertenecen. Entre las helmintosis del hombre que causan mayores estragos en salud pública se encuentran cisticercosis (*Taenia solium*), la trichinellosis (*Trichinella spiralis*), y la fasciolosis (*Fasciola hepatica*), las cuales provocan en el hombre enfermedades que pueden llegar a ser graves e incluso fatales.⁵

Por otro lado, los compuestos que tienen como núcleo al bencimidazol han mostrado tener actividad como herbicidas, insecticidas, fungicidas, agentes bacteriostáticos, agentes anticancerígenos, antihelmínticos y recientemente se ha demostrado *in vitro* la actividad antiprotozoaria.^{6,7,8}

El uso más común de los bencimidazoles en la medicina, desde la década de los sesentas, es como agentes antihelmínticos.^{9,10,11} Estos compuestos han demostrado una amplia eficacia y potencia en infestaciones gastrointestinales, pero su baja solubilidad en agua reduce en gran medida la capacidad de absorberse y por tanto su ineficacia en infecciones de tipo sistémicas.

Con respecto al mecanismo de acción de los bencimidazoles como antihelmínticos, se tiene evidencia que estos compuestos interfieren en la actividad de diversas enzimas implicadas en la captación de glucosa y metabolismo de la misma, causando interferencias en el sistema mitocondrial, afectando así la síntesis de ATP. La teoría más reciente del mecanismo de acción de los bencimidazoles está basada en la gran afinidad selectiva hacia la

tubulina de los helmintos.^{12,13} Estos compuestos se unen a la tubulina impidiendo su polimerización a microtúbulos, los cuales son esenciales para la replicación celular.

En estudios recientes sobre la actividad antiparasitaria de los bencimidazoles, muestran que el albendazol, flubendazol, fenbendazol, al igual que el metronidazol, inhiben *in vitro* el crecimiento de *Trichomonas vaginales*¹⁴ y *Giardia lamblia*.¹⁵⁻¹⁷

A pesar de que numerosos bencimidazoles 2, 5(6) disustituidos han mostrado ser potentes antihelmínticos, es importante el diseño racionalizado de otros bencimidazoles para delinear los requerimientos estructurales mínimos en las posiciones 2 y 5(6) del núcleo, así como conocer el papel de estos sustituyentes en la actividad como antihelmínticos y/o antiprotozoarios.

Considerando la importancia de las enfermedades causadas por helmintos y protozoos mencionadas anteriormente, es importante la creación de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas para resolver dichos problemas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los Parásitos¹⁸

2.1.1. Los Protozoarios

Los protozoarios son organismos unicelulares que desempeñan todas las funciones de un organismo vivo, se encuentran dentro del reino protista; es decir, organismos provistos de un núcleo verdadero.

Los protozoarios se pueden clasificar como integrantes del subreino protozoa dividido en siete *Phyla*. *Sarcomastigophora*, *Labyrinthomorpha*, *Apicomplexa*, *Microspora*, *Ascetospora*, *Mixospora* y *Ciliophora*; de éstos, son tres: *Sarcomastogophora*, *Apicomplexa* y *Ciliophora*, los que tienen importancia médica.

Giardia lamblia

Giardia lamblia es un protozoario, se encuentra dentro de la familia hexamitidae. Las especies de esta familia tienen simetría bilateral, tienen dos núcleos y de 6 a 8 flagelos, la mayoría son parásitos, aunque algunos tienen vida libre. La giardiosis puede llegar a producir síndrome de mala absorción. La giardiosis en México se encuentra ampliamente distribuida, con una frecuencia global del 18.98 %.

Entamoeba histolytica

Entamoeba histolytica: Es un protozooario, se encuentra dentro de la familia Endamoebidae. Este protozooario se encuentra prácticamente en todos los países del mundo. Se puede presentar en tres estadios morfológicos principales, el trofozoito, el prequiste y el quiste. Como trofozoito, es una célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60 μm de diámetro con forma variable y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos. Se puede localizar en la luz y pared del intestino grueso. Tiene la capacidad de invadir los tejidos, por lo que es factible encontrarla en casi todos los órganos del cuerpo principalmente en el intestino, hígado y piel.

2.1.2. Los Helmintos

Los helmintos, a diferencia de los protozoarios, son organismos pluricelulares, se reproducen sexualmente, por medio de huevos; su morfología es muy variada, dependiendo del grupo a que pertenecen. Entre los helmintos parásitos del hombre, existen dos *phyla*: *Plathyhelminthes* a la pertenecen dos clases: Cestoda y Trematoda, y *Aschelminthes* a la que pertenecen las clases Adenophorea (Aphasmidia) y Sescernentea (Phasmidia). Los organismos de las dos primeras clases son gusanos planos, mientras que los de las dos últimas son cilíndricos.

Clase Cestoda.- Gusanos planos, hermafroditas y polizoicos; los aparatos más evolucionados de estos parásitos son el reproductor masculino y femenino. Tienen una porción cefálica que se denomina escólex que varía de

femenino. Tienen una porción cefálica que se denomina escólex que varía de una especie a otra y el resto del cuerpo es una cadena de proglótidos los cuales forman el estróbilo o cadena estróbililar.

Clase Trematoda.- Gusanos planos y hermafroditas, más evolucionados que los cestodos. Aparato digestivo incompleto, sistema excretor más desarrollado. En general casi todos los trematodos que parasitan al humano tienen forma de hoja. Parte del ciclo vital tienen lugar en el agua y los hay que requieren dos o tres huéspedes para completarlo.

Clase Adenophorea y Sescermentea.- La primera conocida como Aphasmidia por la ausencia de quimiorreceptores caudales o fásmidas. La segunda o Phasmidia por presentarlos, a la que pertenecen casi todos los nematodos de importancia. Conocidos como gusanos cilíndricos. Reproducción por huevos. Los asquelmintos, por ser más evolucionados tienen aparato digestivo completo, sistema excretor, nervioso y sexual en diferentes individuos.

Trichinella spiralis.

Trichinella spiralis es un nematodo perteneciente a la familia *Trichuridae*. Los adultos machos y hembras habitan en el lumen intestinal mientras maduran sexualmente y se aparean, después de la fecundación los machos se eliminan en las heces y las hembras penetran la pared intestinal. Las larvas se localizan en músculo esquelético, diafragma y lengua.

Las larvas enquistadas de estos nematodos son hialinas, se encuentran enrolladas en espiral en el quiste, que mide de 300 a 400 μm de largo por 150 a 200 de ancho. Tienen una vaina elipsoidal que las cubre; su eje longitudinal es paralelo a las fibras musculares.

Los adultos son gusanos pequeños, delgados, con un tono blanco cremoso. El macho mide de 1.4 a 1.6 mm de longitud por 40 a 60 μm de ancho, sus extremidades anterior y posterior, son muy delgados; en la cauda, donde se encuentra la cloaca, tienen dos papilas genitales, tienen un solo testículo, por lo que son monótricos. La hembra mide de 3 a 3.6 mm de largo por 35 a 72 μm de ancho. La porción anterior termina en punta y la posterior es más ancha, la vulva se abre a un cuarto de distancia del extremo anterior, en la porción ventral; la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, que contiene en su porción anterior, larvas huevos; en la región posterior, atrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario; es opistodelfa, por presentar sus genitales en la parte posterior del cuerpo.

2.2. Los Bencimidazoles

La estructura de la molécula del bencimidazol consiste en un sistema anular bicíclico, donde un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol.¹⁹

La molécula del bencimidazol cuando no se encuentra N-sustituida se puede comportar como ácido o base y se puede encontrar en equilibrio tautomérico (ver Figura 1); este equilibrio intramolecular afecta a las posiciones 5 y 6 del anillo.¹⁹



Figura 1. Equilibrio tautomérico del bencimidazol.

2.2.1. Bencimidazoles con actividad biológica

La primera molécula de bencimidazol utilizada con fines de tratamiento contra parásitos fue el tiabendazol, descubierto por el grupo Merck en 1961.²⁰ Inicialmente su utilización se enfocó al área veterinaria para después pasar al uso en humanos. Aunque el tiabendazol muestra un amplio espectro en contra de diferentes helmintos en humanos y animales, tiene la limitante de ser metabolizado para dar el compuesto inactivo 5-hidroxitiabendazol.²¹

Posteriormente, apareció una nueva generación de bencimidazoles sustituidos; en posición 5, para evitar su metabolismo; y en la posición 2, un grupo carbamato de metilo para aumentar la vida media de los nuevos antihelmínticos, con la desventaja de ser pobremente absorbidos, lo que limita su acción a nivel sistémico. Ejemplo de estos compuestos son el mebendazol, albendazol y flubendazol (ver Figura 2).

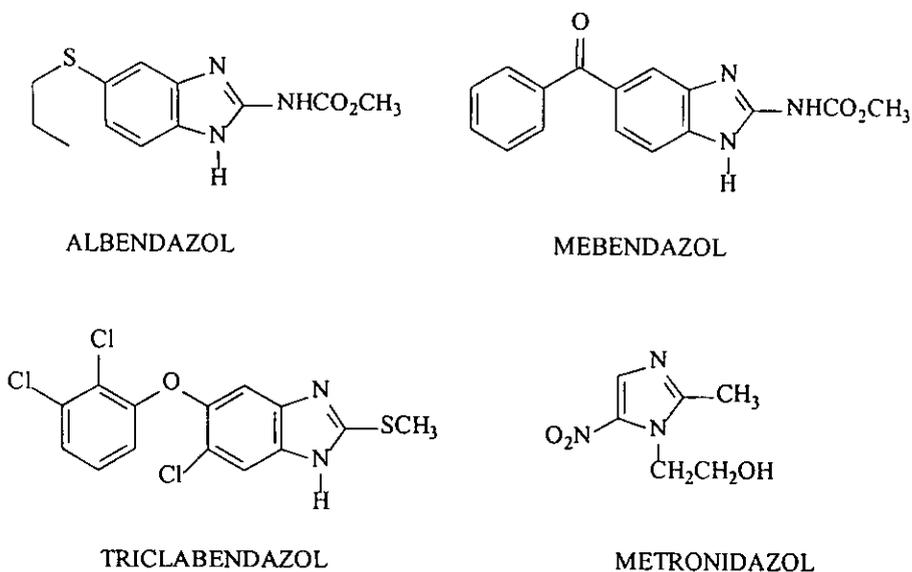


Figura 2. Compuestos antiparasitarios más comúnmente empleados.

Entre los bencimidazol carbamatos el albendazol tiene una mejor absorción a nivel intestinal, aunque sólo un 5 % de la dosis se absorbe. Se ha sugerido que la acción del albendazol se debe principalmente a su metabolito, el sulfóxido de albendazol, el cual tiene una mejor absorción.²²

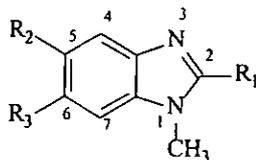
Por otro lado, se han sintetizado diferentes compuestos derivados de bencimidazoles y han sido probados en el tratamiento de diferentes infecciones por helmintos, entre ellas la trichinellosis.²³⁻²⁸ Sin embargo, la aplicación de algunos de ellos, como luxabendazol, durante la fase muscular de la *T. spiralis*, puede ocasionar reacciones adversas graves debido a la muerte masiva de los parásitos.²⁸

Estudios de estructura actividad²⁹ realizados a derivados del bencimidazol, indican que la introducción de un sustituyente en la posición 5 no necesariamente incrementa la potencia; los grupos sustituidos en dicha posición previenen la inactivación metabólica. En la posición dos, los bencimidazoles pueden estar sustituidos por metilcarbamatos (-NHCOOCH₃), o por un anillo aromático o un anillo heteroaromático, sin perder la potencia como antihelmínticos; sin embargo, dichos anillos son más tóxicos que los carbamatos. El remplazo del anillo del bencimidazol por otros anillos heterocíclicos, tales como azaindol o imidazopiridina, son usualmente menos activos. El anillo del bencimidazol ha sido objeto de modificaciones estructurales con el propósito de tener moléculas más activas y potentes. Las modificaciones han sido principalmente en las posiciones 2 y 5 de la molécula.

2.2.2. Bencimidazoles con actividad antiprotozoaria

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el Centro Médico Siglo XXI del Seguro Social, llevaron a la síntesis de los 1-metilbencimidazoles enlistados en la Tabla 1. La evaluación biológica de dichos compuestos empleando pruebas de susceptibilidad *in vitro* mostró que la mayoría de los 1-metilbencimidazoles fueron efectivos contra *G. lamblia* a concentraciones menores a 1µg/mL; dos de ellos, ambos monoclorados en posición 6 y con sustituyente amino o metilo en posición 2, tuvieron concentraciones inhibitorias menores que las del albendazol y metronidazol. En el caso de *T. spiralis*, sólo uno de los compuestos sin cloro en posición 5 y 6, con un metilo en posición 2; otro compuesto monosustituido con cloro en posición 5, y dos compuestos diclorados en posición 5 y 6 con metilo o metiltio en posición 2, mostraron actividad contra el organismo adulto (fase intestinal) y la larva muscular fase intrainestinal. Con respecto al organismo adulto, sólo los compuestos 7, 8 y 9 de la Tabla 1 redujeron la viabilidad del parásito. En estudios de microscopía electrónica y de barrido, se observó que los 1-metilbencimidazoles sintetizados causaron daño importante a la membrana del trofozoíto de *G. lamblia*, sin afectar el citoesqueleto, en comparación al daño ocasionado por el albendazol, en donde se observó alteración importante del disco succionario; esto podría sugerir un mecanismo de acción diferente. Asimismo los nuevos compuestos dañaron la cutícula del adulto de *T. spiralis*.

Tabla 1. Estructura de los 1-Metilbencimidazoles sintetizados previamente que han mostrado actividad contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*.



COMPUESTO	Cl ₅₀	R ₁	R ₂	R ₃
SERIE 1				
1	0.56	CH ₃	H	H
2	0.15	NH ₂	H	H
3	nd	SH	H	H
4	nd	SCH ₃	H	H
SERIE 2				
5	0.18	CH ₃	Cl	H
6	0.09	NH ₂	Cl	H
7	4.13	SH	Cl	H
8	0.14	SCH ₃	Cl	H
SERIE 3				
9	0.001	CH ₃	H	Cl
10	0.002	NH ₂	H	Cl
11	nd	SH	H	Cl
12	0.1	SCH ₃	H	Cl
SERIE 4				
13	0.15	CH ₃	Cl	Cl
14	0.19	NH ₂	Cl	Cl
15	0.09	SH	Cl	Cl
16	0.15	SCH ₃	Cl	Cl
Albendazol	0.01			
Metronidazol	0.21			

nd: no determinada

2.2.3. Mecanismos de Acción de los Bencimidazoles.

Los posibles mecanismos de acción que se han postulado hasta este momento para los bencimidazoles como antihelmínticos son:

- a) Inhibición de la fosforilación mitocondrial realizada por el complejo succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa;
- b) Decremento en la secreción de acetilcolinesterasa;
- c) Disminución de la incorporación de glucosa, alterando el uso de las reservas de glucógeno y actividad glucolítica enzimática;
- d) Interferencia del ensamble citoplasmático de la tubulina, por inhibición de la polimerización de la tubulina;
- e) Disminución del metabolismo de lípidos a cargo de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, (G-6-PDH), malato deshidrogenasa (MDH) y triacilglicerol lipasa (Tg-lipasa).

Se ha establecido algunas hipótesis acerca de la causa de la secreción de la acetilcolinesterasa por parte del parásito que incluyen: modulación del peristaltismo intestinal, acción anticoagulante por inactivación del factor activante de plaquetas, destrucción de antihelmínticos, proveerse de precursores para su metabolismo (colina y acetato) y modulación de la respuesta inmune del hospedero.³⁰

Algunos autores piensan que la acción antihelmíntica de los bencimidazoles es debida principalmente al efecto que tienen sobre la función de los microtúbulos por unión directa de la molécula de bencimidazol a los monómeros β de tubulina; esta alteración del equilibrio microtúbulos- β tubulina es visto como el inicio de una cascada de cambios fisiológicos y/o bioquímicos (incluyendo efectos inhibitorios en la incorporación de la glucosa y el sistema mitocondrial fumarato reductasa) que llevan a una pérdida de la homeostasis celular y por tanto a la muerte del parásito.

Los microtúbulos son una característica distintiva de las células eucariontes. Ellos son el mayor componente del huso mitótico y en algunas células son parte del citoesqueleto, flagelos o cilios. Los microtúbulos son formados por la polimerización de la tubulina, una proteína dimérica compuesta de subunidades de tubulina α y β , cada una de aproximadamente 440 aminoácidos, son proteínas heterogéneas, producto de varios genes y de modificaciones post-traduccionales. Cada subunidad se une a una molécula de GTP. El mecanismo que controla la rápida polimerización y despolimerización de microtúbulos antes y después de la mitosis es incierta.

2.3. Agentes antiparasitarios

Desde la introducción de la piperazina en 1900's y del tetracloruro de carbono en 1920's, para el tratamiento de las helmintiosis, se han desarrollado un gran número de compuestos antiparasitarios, algunos de ellos, se muestran en la Tabla 2.

Tabla No 2. Algunos antiparasitarios más utilizados en humanos y en animales.^{4,31}

PARASITOS	GRUPO QUIMICO	FARMACOS
Nematodos	Piperazinas Imidazoles Bencimidazoles Avermectinas Organofosfatos Salicilanilidas	Sales De Piperazina, Dietilcarbamazina, Tetramizol, Levamisol, Morantel, Pirantel, Tiabendazol, Mebendazol, Parbendazol, Fenbendazol, Ivermectina, Haloxon Triclorfon, Nitroscanate, Closantel.
Trematodos	Salicilanilidas Otros Bencimidazoles	Nitroxinil, Rafoxanide, Oxiclosanide, Brotianide, Diamfenetide, Niclofolan, Clorsulon, Triclabendazol, Albendazol.
Cestodos	Salicilanilidas Otros	Niclosamida, Prazicuantel, Bunamidina, Arecolina.
Protozoarios (giardiosis, amibiosis y tricomoniosis)	Imidazol Quinolina	Metronidazol, Diyodohidroxiquinolina, Ornidazol, Tinidazol, Hemezol, Secnidazol, Nitazoxanida.

2.4. Información epidemiológica en México

Tabla 3. Casos acumulados de algunas enfermedades parasitarias en México.³²

PARASITOSIS	No. CASOS 1997*	No. CASOS 1998*
Ambiosis Intestinal	946221	1061508
Absceso Hepático	5096	5194
Giardiosis	46374	49408
Oxyuriasis	87977	93126
Ascariosis	311703	336480
Taeniosi	2328	2504
Otras helmintiosis	521877	484817
Otras Debido a Protozoarios	66566	79195
Cisticercosis	545	580

*Casos reportados a la semana 39 del año correspondiente.

Como se puede observar en los datos de la tabla anterior, los casos de parasitosis en México son muy elevados, especial mente a los debidos por la amiba y helmintos como *Ascaris*. Estas cifras lejos de disminuir con el transcurso de los años, muestran un comportamiento de persistencia o incremento de acuerdo al año anterior.

2.5. Planteamiento del problema

Las enfermedades parasitarias representan un problema grave en salud pública. Los fármacos bencimidazólicos han ayudado en el tratamiento de muchas de estas enfermedades debido a su amplio espectro como antihelmínticos y antiprotozoarios. A pesar de las cualidades de estos compuestos, tienen desventajas en el aspecto farmacocinético debido a su baja absorción, además de ser inciertos los requerimientos estructurales para las acciones específicas de éstos. Por lo anterior, se considera la necesidad de la búsqueda de nuevas estructuras que puedan aportar información básica sobre los requerimientos estructurales para la acción; conociendo a fondo esta información se podrá estar en mejor posición para preparar fármacos más específicos, eficientes, seguros y de bajo costo.

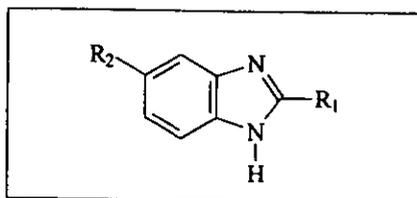
2.6. Consideraciones para el diseño

Conociendo algunos de los requerimientos estructurales para la actividad de los bencimidazoles como antihelmínticos,^{29,33} así como la información previa de su actividad como antiprotozoarios,³⁴ se han diseñado los compuestos del presente estudio (ver Tabla 4).

En el núcleo del bencimidazol se realizaron sustituciones diversas, conservando el hidrógeno en posición 1, el cual ha sido sugerido de importancia para la unión a tubulina. La posición 2 se sustituyó por algunos isómeros como -CH₃, -NH₂, -SH, además de otros grupos que han mostrado importancia en la actividad como -SCH₃ (triclabendazol) y -NHCOOCH₃

(albendazol). Las interacciones de estos grupos pueden ser por formación de puentes de hidrógeno fuertes ($-\text{NH}_2$, $-\text{NHCOOCH}_3$) débiles ($-\text{SH}$, $-\text{SCH}_3$), o hidrofóbicos ($-\text{CH}_3$). En la posición 5(6) puede o no estar sustituido por un cloro el cual puede bloquear el metabolismo temprano del bencimidazol por la hidroxilación de esta posición.

Tabla 4. Estructuras de 1*H*-Bencimidazoles del presente estudio



COMPUESTO	R ₁	R ₂
Serie A		
1	H	H
2	CH ₃	H
3	NH ₂	H
4	SH	H
5	NHCOOCH ₃	H
6	SCH ₃	H
Serie B		
7	CH ₃	Cl
8	NH ₂	Cl
9	SH	Cl
10	NHCOOCH ₃	Cl
11	SCH ₃	Cl

2.7. OBJETIVOS

Objetivos generales:

Considerando que la mayoría de los fármacos que derivan del bencimidazol poseen poca toxicidad en humanos, que tienen un amplio espectro de acción en infestaciones por gusanos, y tomando en cuenta la reciente actividad antiprotozoaria que se les ha atribuido a dichos compuestos, los objetivos del presente trabajo son:

- Diseñar 1*H*-bencimidazoles con potencial actividad antiprotozoaria y antihelmíntica (ver Tabla 4).
- Determinar el potencial antiprotozoario y antihelmíntico de una serie de derivados del 1*H*-bencimidazol disustituidos en las posiciones 2, 5(6) con grupos de diferente polaridad, con la finalidad de establecer cuales son los requerimientos estructurales necesarios para la acción biológica y la potencia relativa a los bencimidazoles "antiprotozoarios" y antihelmínticos conocidos, para poder contribuir en el desarrollo de nuevos fármacos.

Objetivos particulares:

- Sintetizar derivados del 1*H*-bencimidazol.
- Purificar e identificar los compuestos sintetizados.
- Evaluar la actividad antiprotozoaria y antihelmíntica de los compuestos sintetizados.
- Analizar los resultados obtenidos para determinar si hay alguna correlación cualitativa de la estructura química y actividad biológica mostrada.

2.8. Hipótesis

- Los compuestos diseñados presentarán actividad biológica como antiprótozoarios y antihelmínticos.
- La solubilidad de los compuestos diseñados será mayor a la del albendazol.
- Los compuestos con cloro en la posición 5(6) serán más activos contra los parásitos que sus análogos sin cloro, en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para mayor comprensión sobre el trabajo realizado, éste, se divide en dos partes. La primera, la parte química, comprende los métodos sintéticos seguidos en la preparación de los compuestos del presente estudio, de acuerdo al esquema de reacción 1. La segunda, la parte biológica, describe las pruebas de actividad antihelmíntica y antiprotozoaria a que fueron sometidos los compuestos preparados. Esta segunda parte se realizó en el Centro Médico del Seguro Social, siglo XXI.

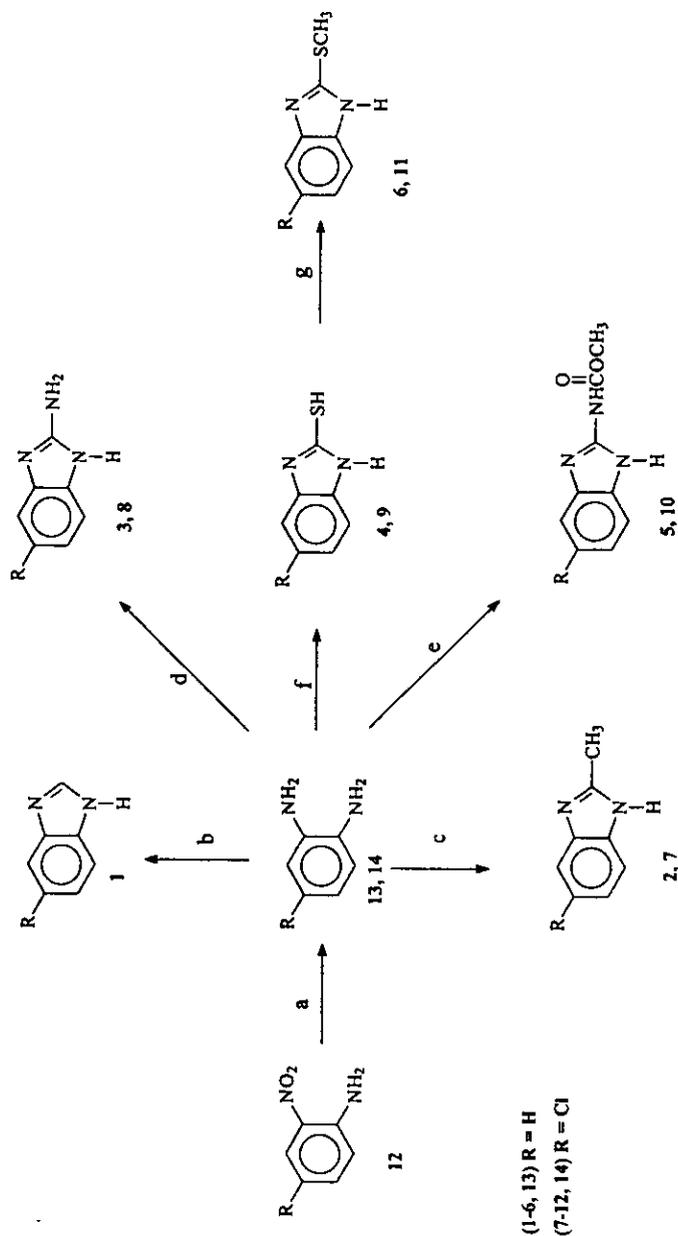
3.1. Parte química

3.1.1. Instrumentación

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida utilizando un rotaevaporador marca Büchi RE 111 con condensador de hielo seco. La presión reducida se logró con una bomba FELISA Modelo 1600, a 55 cm de Hg.

Los espectros de infrarojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 337, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales se reportan en cm^{-1} . Los símbolos de las señales son: w = banda débil, m = banda mediana, s = banda fuerte.

Esquema 1. Ruta de síntesis de los 1*H*-Bencimidazoles del presente estudios.



a) H₂, Ni-Raney/THF, b) HCOOH, c) CH₃COOH, d) BrCN/EtOH, e) BrCN/EtOH, NaOH ac; f) CS₂/KOH, g) CH₃/EtOH.

Los espectros de resonancia protónica de 300 MHz (RMN ^1H) fueron determinados en un espectrómetro Varian modelo VXR-300 MHz; utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, deuterocloroformo y dimetilsulfóxido deuterado como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. Los símbolos de las señales son: s = singulete, d = doblete, m = multiplete complejo, sa = singulete amplio, ma = multiplete amplio.

Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra en un aparato JEOL-JMS-AX505-HA. La simbología utilizada es: m/z= relación masa carga, M^+ = ion molecular y 100 % indica al pico base.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi Modelo 539 y no están corregidos.

Para realizar la hidrogenación catalítica se empleó un hidrogenador marca Parr Modelo 3916EG con 70 lb/plg² y 80°C como capacidad máxima, utilizando hidrógeno (INFRA) y como catalizador Ni-Raney al 50% (ALDRICH).

3.1.2. Cromatografía

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). Los compuestos orgánicos fueron visualizados con luz ultravioleta y por exposición a vapores de yodo.

Los sistemas de elución empleados fueron los siguientes:

SISTEMA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
I	Cloroformo:Metanol	80:20
II	Cloroformo:Metanol	90:10
III	Cloroformo:Metanol	95:5

3.1.3. 1*H*-Bencimidazol(1)

En un matraz de bola de 500 mL con dos bocas, provisto con termómetro, refrigerante de aire y agitación magnética, se colocaron 10.0 g (0.0959 mol) de 1,2-fenilendiamina (**13**) junto con 6.38 g (5.9 mL, 0.1388 mol, 1.5 eq.) de ácido fórmico. La mezcla se calentó a 100°C en un baño de aceite durante 90 minutos. Comprobado el término de la reacción por ccf, la mezcla se vació a un vaso de precipitados y enfrió en un baño de hielo. Posteriormente se adicionaron 40 mL de NaOH al 10 %, y agua helada. Se formó un sólido café, el cual se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua helada hasta pH neutro. El sólido crudo se recrystalizó de agua

con carbón activado. Se obtuvieron 9.05 g (80%) de agujas blancas, una sola mancha por ccf con Rf 0.30 (Sistema II), y pf de 170-171°C.

3.1.4. 2-Metilbencimidazol (2)

En un matraz de bola de 500 mL con dos bocas, provisto con termómetro, refrigerante de agua en posición de reflujo y agitación magnética, se colocaron 10.0 g (0.0959 mol) de 1,2-fenilendiamina junto con 8.63 g (8.12 mL, 0.1438 mol, 1.5 eq.) de ácido acético glacial. La mezcla se calentó a 100°C en un baño de aceite durante 2 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente en un baño de hielo. A la mezcla fría se le adicionaron 76 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10 % previamente enfriada. El sólido café claro obtenido se recristalizó de agua con carbón activado. Se obtuvieron 9.17 g (72.5%) de cristales blancos en forma de agujas, los cuales mostraron en ccf una sola mancha con Rf 0.20 (Sistema II, 10 mL con dos gotas de NH₄OH conc.), y pf 174-176°C.

3.1.5. 2-Aminobencimidazol (3)

En un matraz de bola de 500 mL con tres bocas, equipado con termómetro, refrigerante de aire, un tapón de teflón y agitación magnética, se colocaron 47.38g (0.4427 mol) de 1,2-fenilendiamina y 200 mL de etanol. A esta mezcla se le adicionó, poco a poco, 46.9 g (0.4427 mol, 1 eq.) de bromuro de cianógeno en una campana bien ventilada. En el momento de la adición se elevó la temperatura hasta 47°C y se disolvió la 1,2-fenilendiamina. Terminada la adición se dejó agitando por 1 hora, posteriormente, se gotearon

39 mL de una solución de sosa al 45 %. Se formó un sólido amarillento, el cual se separó por filtración al vacío lavó con agua fría. El sólido crudo se recrystalizó de agua para dar 29.4 g (50.0 %) de cristales blancos, los cuales en ccf presentaron una sola mancha con Rf 0.25 (sistema I, 10 mL con 2 gotas de NH₄OH concentrado), y pf de 225-229°C.

3.1.6. 2-Mercaptobencimidazol (4)

En una matraz de bola de 1000 mL con tres bocas, provisto con termómetro, refrigerante de agua en posición de reflujo, tapón de teflón y agitación magnética, se mezclaron 40 g (0.3699 mol) de 1,2-fenilendiamina, 23.4 g (0.4179 mol, 1.12 eq.) de KOH disueltos en 10 mL de agua, 90 mL de etanol, y 32.74 g (26 mL, 0.4302 mol, 1.16 eq) de disulfuro de carbono. En el extremo superior del refrigerante se colocó una llave de paso con un globo lleno de nitrógeno, se purgó el sistema y posteriormente se calentó a 60-65°C por 3 horas. Luego, se dejó enfriar a 35-40°C y la mezcla se llavó a pH 6 con una solución de ácido acético al 20 %. El contenido del matraz se vertió sobre un vaso de precipitados y enfrió en un baño de hielo durante 30 minutos. Se formaron cristales en forma de escamas, las cuales se separaron y recrystalizaron de DMF. Se obtuvieron 46.6 g (83.9 %) de cristales blancos los cuales en ccf mostraron una sola mancha con Rf de 0.64 (Sistema I, 10 mL con 2 gotas de NH₄OH concentrado), y pf 301-303°C.

3.1.7. 2-Bencimidazolcarbamato de metilo (5)

En un reactor de 250 mL con cuatro bocas; acondicionado con termómetro, embudo de adición, tapón séptum, agitación magnética y un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro, previamente calibrado con soluciones reguladoras de pH 4.1 y de 7.6; se suspendieron 25.7 g (0.0924 mol) de sulfato de S-metiltiopseudourea en 75 mL de agua, se agitó y enfrió a 5°C por medio de un baño de hielo seco-acetona. Enseguida, se adicionaron 17.47 g (14.4 mL, 0.1849 mol, 2 eq.) de cloroformiato de metilo con la ayuda de una jeringa. Se agitó vigorosamente y poco a poco se agregó, mediante el embudo de adición, una solución de NaOH al 25% a una velocidad tal que el pH oscilara entre 7-8 y la temperatura entre 10-15°C. Después de haber adicionado 75 mL de la solución de sosa en un lapso de dos horas, el pH permaneció constante a 7 y se formó un precipitado blanco esponjoso.

Por otro lado; se acondicionó un matraz de bola de 1000 mL con una boca, con agitación magnética y con un refrigerante de agua en posición de reflujo, en cuyo extremo superior se conectó a una trampa de hipoclorito de sodio. En el matraz se mezclaron en frío 10 g (0.1063 mol) de 1,2-fenilendiamina, 200 mL de agua y el contenido de la reacción anterior. La mezcla se calentó poco a poco, observándose el desprendimiento de gas, y llevó al reflujo donde se mantuvo por dos horas. Después, se retiró el calor y se dejó en agitación toda la noche (12 horas), se filtró al vacío y se lavó con etanol frío. El producto crudo se recrystalizó de etanol dando 10.6 g (65.41 %) de un sólido blanco, el cual en ccf mostró una sola mancha con Rf 0.74 (Sistema I), y pf 301-304°C.

3.1.8. 2-Metiltiobencimidazol (6)

En un matraz de bola de 500 mL con tres bocas, provisto con termómetro, refrigerante de agua en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno, un tapón séptum y agitación magnética, se disolvieron 18 g (0.1200 mol) de 2-mercaptobencimidazol en una solución de 20.34g (0.3625 mol, 3 eq.) de KOH, 180 mL de etanol y 21.6 mL de agua. Se formó una solución café rosada la cual se enfrió a -5°C en un baño de hielo, sal y metanol. Posteriormente, con una jeringa se adicionaron, gota a gota 7.63 mL (0.1200 mol, 1 eq.) de yoduro de metilo, sin permitir que la temperatura pasara de los 7°C . Después de la adición se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos manteniendo la agitación constante; posteriormente, se calentó a 50°C por 90 minutos. Se retiró el calor y se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche (12 horas). La mezcla de reacción se vertió sobre 180 mL de agua helada, se neutralizó con una solución de ácido acético al 20 %, se agitó y se formó un precipitado, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada. El producto crudo se recristalizó de etanol-agua dando 17.9 g (91.0 %) de cristales blancos, los cuales mostraron una sola mancha en ccf con R_f 0.49 (Sistema III), y pf $201-203^{\circ}\text{C}$.

3.1.9. 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (7)

En un matraz de bola de 125 mL con tres bocas, provisto con termómetro, refrigerante de aire, tapón séptum, agitación magnética y canastilla de calentamiento, se disolvieron 8.0 g (0.0568 mol) de 4-cloro-1,2-

feniendiamina (obtenida por reducción catalítica con H_2/Ni -Raney de la 4-cloro-2-nitroanilina) en 15.33 g (14.6 mL, 0.2556 mol, 4.5 eq.) de ácido acético glacial. La mezcla se calentó a $40^\circ C$ con agitación, durante 18 horas. Se dejó enfriar y se vertió sobre 150 mL de hielo, se neutralizó con una solución de NaOH al 20 % y se formó un sólido resinoso que al ser agitado con una varilla de vidrio dio un sólido color café. Se filtró al vacío y se lavó repetidas veces con agua helada. El sólido obtenido se disolvió en 175 mL de etanol en un matraz de bola de 500 mL, provisto con un refrigerante el cual tiene un globo con nitrógeno en la parte superior, se calentó con canastilla y al estar a reflujo se adicionó carbón activado y 1 g de bisulfito de sodio. Después de una hora, se filtró al vacío y concentró en el rotaevaporador. El residuo se recrystalizó de agua-acetona obteniéndose 7.47 g (80.0 %) de cristales blancos, los cuales en ccf mostraron una sola mancha con R_f 0.14 (Sistema III), y pf $209-211^\circ C$.

3.1.10. 2-Amino-5(6)-clorobencimidazol (8)

En un matraz de bola de 250 mL con tres bocas, adaptado con termómetro, refrigerante de aire, tapón de teflón y agitación magnética, se disolvieron 10.0 g (0.0701 mol) de 4-cloro-1,2-fenilendiamina (obtenida por reducción catalítica con H_2/Ni -Raney de la 4-cloro-2-nitroanilina) en una mezcla de 80 mL de THF y 100 mL de agua; se agregó poco a poco, 7.43 g (0.0701 mol, 1 eq.) de bromuro de cianógeno y la temperatura se incrementó a $58^\circ C$ manteniéndose el reflujo por una hora. Se concentró en el rotaevaporador hasta eliminar el THF, después se vertió sobre un vaso de precipitados de 250 mL y neutralizó con una solución de hidróxido de amonio.

Se formaron dos fases, al fondo un aceite café oscuro y arriba la acuosa, se calentó y se agregó agua hasta tener una sola fase. Por enfriamiento prolongado en refrigeración, se formó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua fría. Se obtuvieron 5.17 g (44 %) de un sólido blanco, el cual en ccf mostró una sola mancha con Rf de 0.23 (Sistema III), y un pf de 168-170°C.

3.1.11. 5(6)-Cloro-2-mercaptobencimidazol (9)

En un reactor Parr de acero inoxidable de 300 mL, acondicionado con agitación mecánica, canasta de calentamiento y un termopar, se mezclaron 10.32 g (0.0724 mol) de 4-clorofenilendiamina (obtenida por la reducción de 4-cloro-2-nitroanilina con cloruro estanoso), 100 mL de etanol, 4.87 g (0.0869 mol, 1.2 eq.) de KOH y 8.8 g (7 mL, 0.1159 mol) de disulfuro de carbono. Se cerró el reactor e inició la agitación y el calentamiento hasta llegar a 70°C donde se mantuvo por 90 minutos. Después se dejó enfriar y se liberó el exceso de presión, se abrió el reactor y la solución amarilla verdosa se vertió sobre 200 mL de agua fría y se ajustó el pH a 6 con solución de ácido acético al 20 %. El sólido formado se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua fría, se drenó bien y recristalizó de etanol-agua con carbón activado. Se obtuvieron 8 g (59.8 %) de cristales blancos nacarados, los cuales en ccf mostraron una sola mancha con Rf de 0.34 (Sistema III), y pf 305-307.

3.1.12. 5(6)-Cloro-2-bencimidazolcarbamato de metilo (10)

En un reactor de 250 mL con cuatro bocas; acondicionado con termómetro, embudo de adición, tapón séptum, agitación magnética y un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro, previamente calibrado con soluciones reguladoras de pH 4.1 y de 7.6; se suspendieron 16.5 g (0.0579 mol) de sulfato de S-metiltiopseudourea en 75 mL de agua, se agitó y enfrió a 5°C por medio de un baño de hielo seco-acetona. Enseguida, se adicionaron 10.95 g (8.95 mL, 0.1159 mol, 2 eq.) de cloroformiato de metilo con la ayuda de una jeringa. Se agitó vigorosamente y poco a poco se agregó, mediante el embudo de adición, una solución de NaOH al 25% a una velocidad tal que el pH oscilara entre 7-8 y la temperatura entre 10-15°C. Después de haber adicionado 75 mL de la solución de sosa en un lapso de dos horas, el pH permaneció constante a 7 y se formó un precipitado blanco esponjoso.

Por otro lado; se acondicionó un matraz de bola de 1000 mL de una boca, con agitación magnética y un refrigerante de agua en posición de reflujo, cuyo extremo superior se conectó a una trampa de hipoclorito de sodio. En el matraz se mezclaron en frío 8.26 g (0.0579 mol) de 4-cloro-1,2-fenilendiamina (obtenida por reducción catalítica con H_2/Ni -Raney de la 4-cloro-2-nitroanilina), 200 mL de agua y el contenido de la reacción anterior. La mezcla se calentó poco a poco, observándose el desprendimiento de gas, y llevó al reflujo donde se mantuvo por dos horas. Después, se retiró el calor y se dejó en agitación toda la noche (12 horas) se filtró al vacío y se lavó con etanol frío. El producto crudo se recrystalizó de etanol-DMF obteniéndose 7.37 g (56.3%) de escamas blancas nacaradas, los cuales en ccf mostraron una sola mancha con R_f 0.61 (sistema I), y pf de 296-297°C.

3.1.13. 5(6)-Cloro-2-metiltiobencimidazol (11)

En un matraz de bola de 50 mL con tres bocas, equipado con termómetro, tapón séptum, un globo con nitrógeno y agitación magnética, se colocaron 1.9 g (0.0102 mol) de 5(6)-cloro-2-mercaptobencimidazol, 15.3 mL de etanol, 1.15 g (0.0204 mol, 2 eq.) de KOH y 2 mL de agua. La solución color café ámbar se enfrió en un baño de hielo/sal/metanol hasta -7°C , en ese momento se adicionaron 1.44 g (0.63 mL, 0.0102 mol, 1 eq.) de yoduro de metilo. La temperatura se incrementó a -5°C , se dejó en agitación a esta temperatura por 10 minutos y 2 1/2 horas a temperatura ambiente, se neutralizó con ácido acético al 10 %, se filtró al vacío el sólido blanco que se formó y lavó repetidas veces con agua fría, se dejó secar. El producto crudo se recristalizó de tolueno dando 1.6 g (79 %) de cristales en forma de agujas color blanco, los cuales en ccf muestran una sola mancha con R_f 0.35 en el sistema III (corrida la placa tres veces), y pf 242-243°C.

3.1.14. 4-Cloro-1,2-fenilendiamina (14)

• Reducción con Ni-Raney

En una botella de hidrogenación de vidrio de 500 mL se colocaron 5g (0.0290 mol) de 4-cloro-2-nitroanilina, 1.2 g de Ni-Raney al 50% húmedo (el cual se lavó 3 veces con THF antes de agregar a la botella de hidrogenación), y 20 mL de THF. La botella se conectó al hidrogenador *Parr*, se eliminó el aire mediante la inyección y expulsión de H_2 (tres veces) y enseguida, se inició la reacción cargando la botella con 70 lb/plg². La reacción finalizó después de

consumir 61 lb/plg² de hidrógeno en un tiempo de 4 horas,³⁵ se filtró al vacío con papel Whatman No. 2 y se lavó con THF, el filtrado se concentró en un rotaevaporador, obteniéndose un sólido color café el cual en ccf mostró una sola mancha con Rf 0.25 (Sistema III). Este producto se empleó inmediatamente, sin purificación alguna para la síntesis de 7 y 8.

• **Reducción con cloruro estanoso dihidratado**

En un vaso de precipitados de 250 mL, provisto con un termómetro, agitación magnética y parrilla de calentamiento, se colocaron 12.52 g (28.2 mL, 0.3435 mol) de ácido clorhídrico concentrado y 21.57 g (0.0956 mol) de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la mezcla se calentó a 50°C con agitación moderada. En ese momento se adicionaron 5 g (0.0289 mol) de 4-cloro-2-nitroanilina y la temperatura se incrementó espontáneamente hasta 95°C. El vaso caliente se pasó a otra parrilla fría y se agitó hasta llegar a la temperatura ambiente. La solución de color amarillo se alcalinizó hasta pH 11 con solución de NaOH al 20 %, se extrajo con acetato de etilo (3x100 mL). Los extractos orgánicos se juntaron, lavaron con agua y secaron con Na_2SO_4 anhidro. Por concentración del filtrado a sequedad se obtuvo un sólido café claro, el cual mostró una sola mancha por ccf con Rf 0.25 (Sistema III). Este sólido fue idéntico al anterior y tampoco se purificó, empleándose inmediatamente para la síntesis de 9.

3.1.15. Bromuro de cianógeno

En un matraz de bola de 3 L con tres bocas, equipado con termómetro, agitador mecánico, embudo de adición y baño de hielo, se colocaron 500.0 g (160 mL, 3.1 mol) de bromo estratificados con 50 mL de agua, y adicionaron 170 g (3.4708 mol) de NaCN en 1.2 L de agua a 28°C. La mezcla de bromo en agua, de color rojo, se comenzó a tornar de color naranja y posteriormente se observó un precipitado blanco. El sistema se calentó con un baño de aceite y el producto destiló a 60-62°C.³⁶ Se obtuvieron 194.5 g (60 %) de un sólido blanco de olor pungente, el cual se guardó en varios viales ámbar en el refrigerador.

3.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

3.2.1. Material biológico

Se empleó la cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989:1 y la cepa de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS las cuales se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con suero de ternera descomplementado al 10 %.³⁷ Por otro lado, se empleó una cepa de *Trichinella spiralis* que fue aislada del cerdo por el Dr. Martínez Marañón del Instituto Nacional de Diagnósticos y Referencias Epidemiológica (INDRE). Con el objeto de mantener el ciclo de vida de este parásito, ratas de la cepa Sprague-Dawley, de dos a tres meses de edad, fueron infectadas con 3000 larvas musculares resuspendidas en Bacto agar al 0.02 %. La infección se realizó vía intragástrica con cánula y jeringa.

3.2.2. Ensayo *in vitro* (MTT/PMS) contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*

Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo a lo descrito anteriormente y se colocaron 1000 larvas por poso en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunclon) en medio RPMI 1640 conteniendo el fármaco a evaluar a una concentración de 1 µg/mL y 10 µg/mL. Los parásitos se incubaron tres días a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5 %, con cambio diario de medio más fármaco. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de albendazol y como control negativo se incluyeron larvas musculares sin tratamiento. Después de la incubación, se determinó la viabilidad de las larvas musculares mediante el método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bronuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán de acuerdo a lo descrito por Towson y cols.,³⁸ con algunas modificaciones³⁹. Así los parásitos cultivados con los diferente compuestos se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 mL y se centrifugaron a 2,500 rpm por 2 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con PBS (buffer de fosfatos) y se añadió 1 mL de una solución de MTT al 0.75 % (Sigma), 50 µL de una solución de metosulfato de fenazina al 5% (PMS, Sigma) como catalizador y 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Los tubos se incubaron a 37°C durante 50 minutos con agitación constante. Después de la incubación se realizó otro lavado con PBS y se agregaron 500 µL de DMSO, los parásitos se resuspendieron y se dejaron a temperatura ambiente por 1 hora. Al finalizar este tiempo los tubos se centrifugaron y se transfirió el

sobrenadante a una placa de ELISA, las cuales se leyeron a 492 nm. Se calculó el porcentaje de reducción de la densidad óptica en comparación con el control negativo y de acuerdo a eso se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad. Se realizaron 3 experimentos por duplicado cada uno de ellos.

3.2.3. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Entamoeba histolytica*

Se empleó el método de subcultivos previamente estandarizado: Se incubaron 6000 trofozoítos/mL por 48 horas a 37°C, en tubos con concentraciones crecientes de los diferentes 1H-bencimidazoles, además del nitazoxanida, albendazol y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos. El número final de trofozoítos se determinó en una cámara cuentaglóbulos. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit, se calculó la CI_{50} que correspondió a las concentraciones que inhibió al 50 % el crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron tres ocasiones.

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

Se empleó el método de subcultivos previamente estandarizado: Se incubaron 5×10^4 trofozoítos/mL por 48 horas a 37°C, en tubos con concentraciones crecientes de los diferentes 1H-bencimidazoles, además del nitazoxanida, albendazol y del metronidazol que sirvieron como compuestos

de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos. Después de la incubación se inocularon 50 μ L de los trofozoítos tratados, en medio fresco, ya sin la adición de los compuestos, y se incubaron por otras 48 horas. El número final de trofozoítos se determinó en una cámara cuentaglóbulos. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit, se calculó la CI_{50} que correspondió a las concentraciones que inhibió al 50 % el crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron tres ocasiones.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Parte química

Aunque los compuestos sintetizados en este trabajo de tesis son conocidos, la mayoría de ellos no están disponibles comercialmente, tampoco se encuentran reportados todas sus propiedades físicas y espectroscópicas. Estos datos son importantes para los estudios de relaciones de estructura, propiedades y actividad biológica que realiza el grupo de trabajo, por lo que se anexan estos datos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de constantes físicas y rendimientos obtenidos para los 1*H*-Bencimidazoles sintetizados. Principalmente se aprecia que los puntos de fusión encontrados son coincidentes con los puntos de fusión reportados para cada compuesto. Los rendimientos obtenidos para los compuestos recristalizados fueron altos en la mayoría de los casos y relativamente bajos para los compuestos 2-Amino (3 y 8) que dieron el 50 % y 44 % respectivamente; también se aprecia bajos rendimientos en los carbamatos de metilo 5 (65.4 %) y 10 (56.3 %), así como el 5(6)-Cloro-2-mercaptobencimidazol 9 (59.8 %). Cabe mencionar que aunque se trató de mejorar el rendimiento de todas las reacciones por medio de repeticiones de síntesis y recristalizaciones con diferentes disolventes, no se continuó el estudio para no extenderse en tiempo, ya que no era el objetivo principal de esta tesis la optimización de las rutas de síntesis, sino obtener los compuestos en cantidades suficientes para las pruebas de actividad biológica.

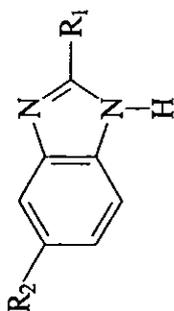
Por otro lado, se puede apreciar que los compuestos sintetizados son de polaridad relativa alta como lo muestra el R_f en sistemas polares y los puntos de fusión por arriba de los 200 °C en la mayoría de los casos. En la Tabla 6 se muestran los resultados de datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos. En el caso de los datos espectroscópicos de IR se aprecian las bandas de absorción características para cada estructura. Para el compuesto 5 las más importantes son: 3322 w del NH, 3000w junto con las de 1597s 1443m de anillo aromático, 2949w, 1465w y 1364w correspondientes al C-H_3 y sobretonos característicos en 2000-1600 junto con 732w (sustitución en orto); para el 6: 3200w (N-H), 3052m, 1618w y 1498m de anillo aromático con 738 s de sustitución en orto, 2957m, 1439s y 1357m del grupo metilo, 1326m (S- CH_3); para el 7: 3432w (N-H), 3000m, 1624w y 1545m de un grupo aromático con 850m y 807m (de sustitución 1, 2, 4), 2808m, 1456s y 1337w del metilo; para el 8: 3374w y 3260m señales de amina primaria, 3166s, 1628s y 1560m de grupo aromático y 845w, 805m (sustitución 1,2,4), 1210m (C-N); para el 9: 3142w (N-H), 3084s, 1613w y 1511m de un grupo aromático con 843w y 803m (sustitución 1, 2, 4), 2563w (S-H) ; para el 10: 3322m (N-H), 3000m, 1643s y 1595s de un grupo aromático con 843w, 802w (sustitución 1, 2, 4), 2954w, 1458m y 1326m del metilo, 1702m (C=O) ; para el 11: 3159w (N-H), 3029m, 1612w y 1581w de anillo aromático con 843 w y 795 w (sustitución 1, 2, 4), 2930m, 1428m y 1336m del metilo, 1320 s (S- CH_3).

En el espectro de RMN ^1H las señales importantes para el compuesto 5 son: a 3.7 ppm un singulete (3H del CH_3), a 7 y 7.3 ppm dos dobletes dobleteados (4H aromáticos), también se mostró a 11.6 ppm las señales del N-H que intercambió en agua deuterada; para el 6: a 2.7 ppm un singulete (3H

del CH₃), a 7.1 y 7.4 ppm los dos dobletes dobleteados (4 protones aromáticos) y a 9.2 la señal del N-H que intercambió con agua deuterada; para el 7: 2.4 ppm singulete (3H del CH₃), 7.1 ppm doblete dobleteado (1H aromático de la posición 6), 7.43 ppm doblete (H aromático de la posición 7), 7.5 ppm singulete (del hidrogeno en 4), y a 12.3 ppm la señal del N-H que intercambió con agua deuterada; para el 8: 7 ppm doblete dobleteado (H aromático de la posición 6), 7.18 ppm doblete (H aromático de la posición 7), 7.22 singulete (H aromático de 4) y a 7.4 ppm la señal de los 2H de N-H los cuales se intercambiaron con agua deuterada; para el 9: a 7.11 ppm multiplete (3H aromáticos), 12.66 ppm singulete amplio el cual intercambió con agua deuterada(2H de N-H y S-H); para el 10: a 3.74 ppm singulete (3H de CH₃), 7.06 ppm doblete dobleteado (H aromático de la posición 6), 7.37 ppm doblete (H aromático de 7), 7.40 ppm doblete (H aromático de 4) y en 11.67 ppm singulete amplio de la señal de los dos N-H los cuales se intercambian con agua deuterada; para el 11: 2.742 ppm singulete (3H de CH₃), 7.071 ppm doblete dobleteado (H aromático en 6), 7.35 ppm doblete (H aromático de 7), 7.42 ppm singulete (H aromático de 4), 12.177 ppm la señal del N-H el cual intercambió con agua deuterada.

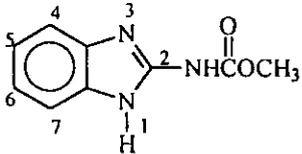
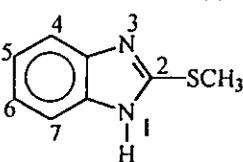
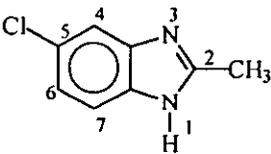
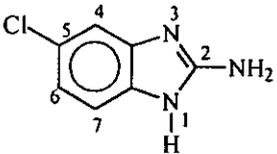
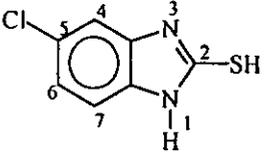
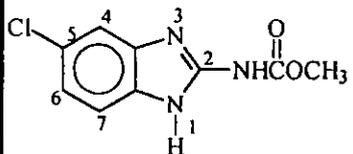
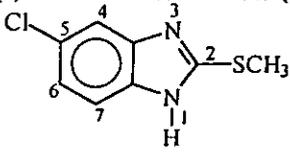
Los datos de espectrometría de masas muestran que en todos los casos se obtuvo M⁺ (100 %) igual al peso molecular del compuesto analizado debido a la estabilidad del ion aromático. En el caso de los compuestos 7 al 11 se observó el pico M+2 con intensidad relativa aproximada del 30 % para el isótopo de ³⁷Cl.

Tabla 5. Constantes Físicas de los 1*H*-Bencimidazoles sintetizados.



COMPUESTO	R ₁	R ₂	Recristalizado de:	Rendimiento compuesto puro (%)	Rf (Sistema)	pf (°C)	pf reportado (°C)
1	H	H	H ₂ O	80.0	0.30 (II)	170-171	170-171 ⁴⁰
2	CH ₃	H	H ₂ O	72.5	0.20 (II)	174-176	176-177 ⁴¹
3	NH ₂	H	H ₂ O	50.0	0.25 (I)	225-229	228-229 ⁴²
4	SH	H	DMF	83.9	0.64 (I)	301-303	301-305 ⁴¹
5	NHCO ₂ CH ₃	H	EtOH	65.4	0.74 (I)	301-304	305-307 ⁴³
6	SCH ₃	H	EtOH/H ₂ O	91.0	0.49 (III)	201-203	201-203 ⁴¹
7	CH ₃	Cl	Acetona/H ₂ O	80.0	0.14 (III)	209-2011	210-214 ⁴⁰
8	NH ₂	Cl	H ₂ O	44.0	0.23 (III)	168-170	167-168 ⁴²
9	SH	Cl	EtOH/H ₂ O	59.8	0.34 (III)	305-307	308-310 ⁴³
10	NHCO ₂ CH ₃	Cl	DMF	56.3	0.61 (III)	296-297	295-304 ⁴³
11	SCH ₃	Cl	Tolueno	79.0	0.35 (III)	242-243	240-242 ⁴³

Tabla 6

COMPUESTO	DATOS ESPECTROSCOPICOS Y ESPECTROMETRICOS
<p>2-Bencimidazolcarbamato de metilo (5)</p> 	<p>ESPECTRO 1: IR (KBr) $\nu = 3322\text{w}$ (N-H), 3000w (C-H de fenilo), 2949w (C-H alifatico), 1710w (N=C), 1630s (C=O), 1597s y 1443m (C-C aromático), 1465w y 1364w (CH₃), 732 (o-sustitución).</p> <p>ESPECTRO 2: RMN ¹H (TMS) $\delta = 3.7$ (s, 3H, de CH₃), 7 (dd, 2H aromáticos de 5 y 6), 7.3 (dd, 2H aromáticos de 4 y 7), 11.6 (sa, 2H de NH).</p> <p>ESPECTRO 3: EM (IE) M⁺ 191 (100%).</p>
<p>2-Metilbencimidazol (6)</p> 	<p>ESPECTRO 4: IR (KBr) $\nu = 3052\text{m}$ (C-H aromático), 2957n (C-H alifatico), 1618w y 1498m (C-C aromático), 1439s y 1357m (CH₃), 1316w (S-CH₃), 1219m (C-N), 738s (o-sustituido).</p> <p>ESPECTRO 5: RMN ¹H (TMS) $\delta = 2.7$ (s, 3H de CH₃), 7.1 (dd, 2H aromáticos de 5y 6), 7.4 (dd, 2H aromáticos de 4 y 7), 9.2 (sa, 1H de NH).</p> <p>ESPECTRO 6: EM (CG, IE) M⁺ 164 (100%).</p>
<p>5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (7)</p> 	<p>ESPECTRO 7: IR (KBr) $\nu = 3434\text{w}$ (N-H), 3000m (C-H aromático), 2808m (C-H alifatico), 1456s y 1337w (CH₃), 1212m (C-N), 850m y 807m (sustitución 1,2,4).</p> <p>ESPECTRO 8: RMN ¹H (TMS) $\delta = 2.4$ (s, 3H de CH₃), 7.1 (dd, 1H aromático de 6), 7.43 (d, H aromático de 7), 7.5 (s, H aromático de 4), 12.3 (sa, H de NH).</p> <p>ESPECTRO 9: EM (CG, IE) M⁺ 166 (100%), M+2 de Cl.</p>
<p>2-Amino-5(6)-clorobencimidazol (8)</p> 	<p>ESPECTRO 10: IR (KBr) $\nu = 3374\text{m}$ y 3260m (N-H), 3166s (C-H aromáticos), 1628s y 1560m (C-C aromáticos), 1210m (C-N), 845w y 805m (sustitución 1,2,4).</p> <p>ESPECTRO 11: RMN ¹H (TMS) $\delta = 7.0$ (dd, H aromático de 6), 7.18 (d, H aromático de 7), 7.22 (s, H aromático de 4), 7.4 (sa, 2H de NH).</p> <p>ESPECTRO 12: EM (CG, IE) M⁺ 167 (100%), M+2 de Cl.</p>
<p>5(6)-Cloro-2-Mercaptobencimidazol (9)</p> 	<p>ESPECTRO 13: IR (KBr) $\nu = 3084\text{s}$ (C-H aromáticos), 2563w (S-H), 1613w y 1511m (C-C aromático), 843m y 803m (sustitución 1,2,4), 1213w (C-N).</p> <p>ESPECTRO 14: RMN ¹H (TMS) $\delta = 7.11$ (m, 3H aromáticos de 4, 6 y 7), 12.66 (sa, 2H del SH y NH).</p> <p>ESPECTRO 15: EM (IE) M⁺ 184 (100%), M+2 de Cl.</p>
<p>5(6)-Cloro-2-bencimidazolcarbamato de metilo (10)</p> 	<p>ESPECTRO 16: IR (KBr) $\nu = 3322\text{m}$ (N-H), 3000w (C-H aromáticos), 2954w (C-H alifatico), 1702m (C=O), 1643s y 1595s (C-C aromáticos), 1458m y 1326m (CH₃), 854s y 802m (sustitución 1,2,4).</p> <p>ESPECTRO 17: RMN ¹H (TMS) $\delta = 3.74$ (s, 3H de CH₃), 7.06 (dd, H aromático de 6), 7.37 (d, H aromático de 7), 7.407 (d, H de 4), 11.67 (sa, 2H de los NH).</p> <p>ESPECTRO 18: EM (IE) M⁺ 225 (100), M+2 de Cl.</p>
<p>5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (11)</p> 	<p>ESPECTRO 19: IR (KBr) $\nu = 3159\text{w}$ (N-H), 3029m (C-H de fenilo), 2930m (C-H alifatico), 1612w y 1581w (C-C aromáticos), 1428m y 1336m (CH₃), 1320s (S-CH₃).</p> <p>ESPECTRO 20: RMN ¹H (TMS) $\delta = 2.747$ (s, 3H del CH₃), 7.071 (dd, H de aromático en 6), 7.35 (d, H aromático de 7), 7.42 (s, H aromático de 4), 12.177 (sa, 1H de NH).</p> <p>ESPECTRO 21: EM (CG, IE) M⁺ 198 (100%), M+2 de Cl.</p>

4.2. PARTE BIOLÓGICA

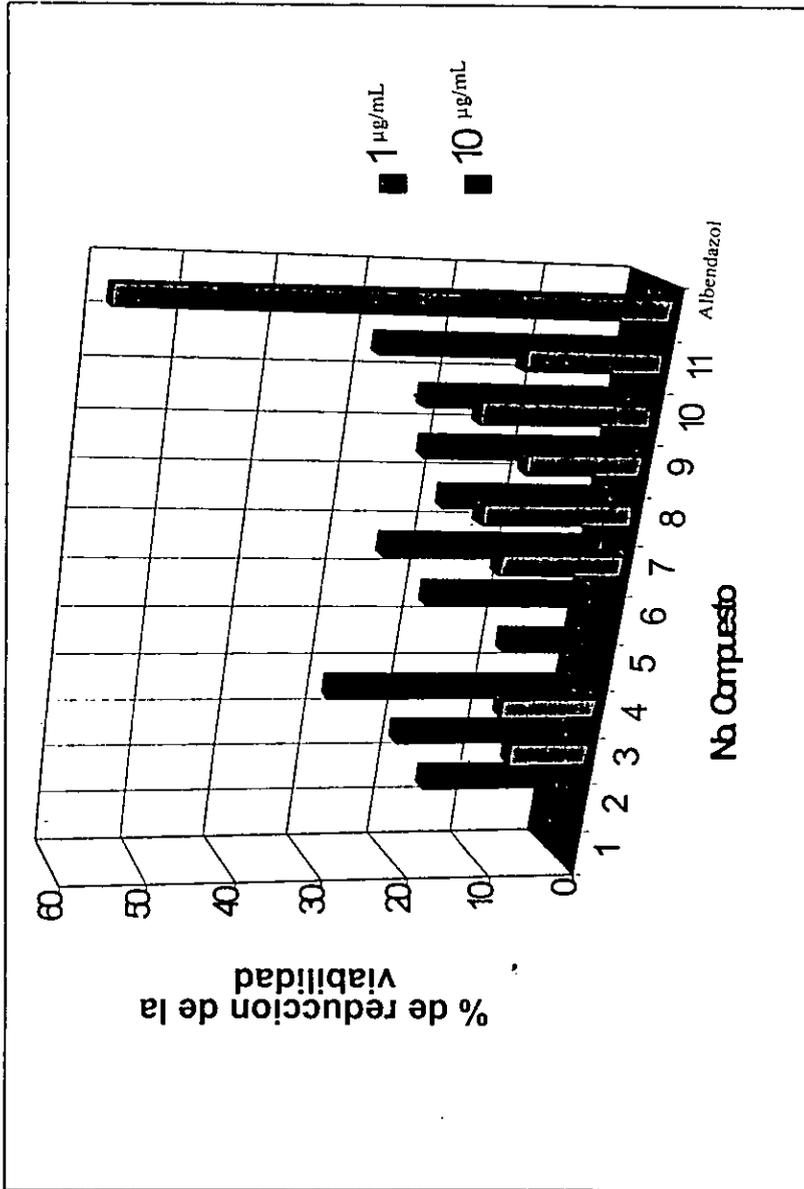
4.2.1. Efecto de los bencimidazoles sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Los resultados de las pruebas de actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados y del albendazol como control positivo, se muestran en la Tabla 8 y Gráfica 1. Todos los compuestos se probaron a 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$, no así el albendazol, que sólo se probó a 1 $\mu\text{g/mL}$ por su escasa solubilidad. En esta prueba se puede observar el efecto que tienen los diferentes sustituyentes en la posición 2 del anillo bencimidazólico, así como la presencia o ausencia de cloro en la posición 5(6). En general todos los compuestos sintetizados mostraron menor actividad que el albendazol, aún a concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$. Aunque a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ la actividad de los compuestos clorados es baja (< 20 %), ésta es mayor que la de los compuestos sin cloro, la cual fue nula para los compuestos 1, 2, 5, y 6, y muy baja (< 11 %) para 3 y 4. A concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ se aprecia un ligero incremento en la actividad y se hace menos evidente la diferencia en la reducción del % de morbilidad entre los compuestos clorados y no clorados. El compuesto 1, sin sustituyentes en 2 y 5(6) no mostró actividad a ninguna de las dos concentraciones que se probaron. Una característica de los compuestos 1-11, observada durante esta prueba, fue la escasa solubilidad que dificultó el ensayo.

Tabla 7. Susceptibilidad de la larva muscular de *Trichinella spiralis* a los 1*H*-Bencimidazoles sintetizados en el presente estudio

COMPUESTO	Susceptibilidad a 1 µg/mL		Susceptibilidad a 10 µg/mL	
	% morbilidad	[Molar]	% morbilidad	[Molar]
1	NR	8.47x10 ⁻³	NR	84.7 x10 ⁻³
2	NR	7.57 x10 ⁻³	16	75.7 x10 ⁻³
3	9 ± 7	7.51 x10 ⁻³	20	75.1 x10 ⁻³
4	11 ± 10	6.66 x10 ⁻³	29	66.6 x10 ⁻³
5	NR	5.23 x10 ⁻³	9	52.3 x10 ⁻³
6	NR	6.09 x10 ⁻³	19	60.9 x10 ⁻³
7	14 ± 3	6.00 x10 ⁻³	25	60.0 x10 ⁻³
8	17 ± 5	5.97 x10 ⁻³	19	59.7 x10 ⁻³
9	13 ± 7	5.42 x10 ⁻³	22	54.2 x10 ⁻³
10	19 ± 14	5.04 x10 ⁻³	23	50.4 x10 ⁻³
11	15 ± 5	4.44 x10 ⁻³	29	44.4 x10 ⁻³
Albendazol	60 ± 10	3.77 x10 ⁻³		

NR: No redujo



Gráfica 1. Actividad de los derivados del 1H-Benzimidazoles contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*

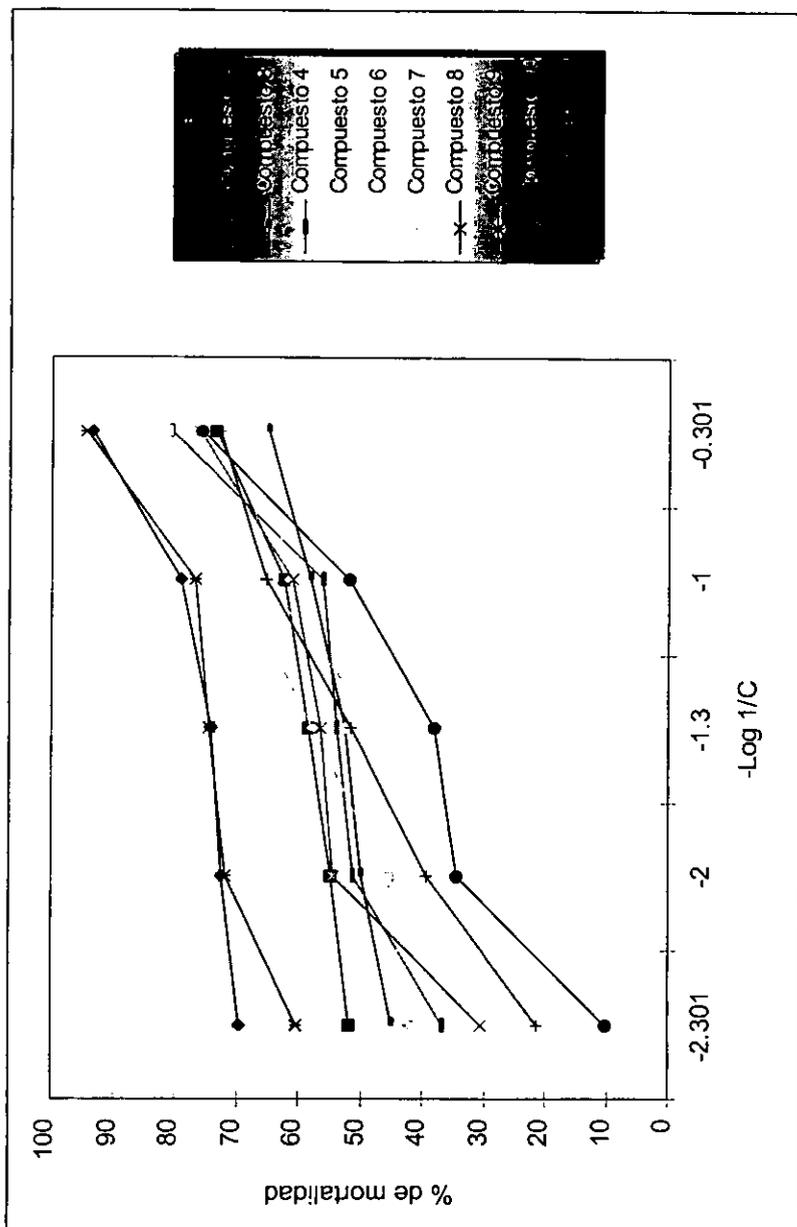
4.2.2. Efecto de los 1*H*-bencimidazoles sobre el trofozoíto de *Entamoeba histolytica*

Los resultados de las pruebas de actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. Histolytica* de los compuestos sintetizados y de nitazoxanida,⁴ albendazol y metronidazol, como controles positivos, se muestran en la Tabla 8 y Gráfica 2. En esta evaluación los compuestos sintetizados se probaron a concentraciones de 0.005, 0.010, 0.050, 0.100 y 0.500 $\mu\text{g/mL}$ y se determinó, mediante un análisis Probit, la CI_{50} , CI_{75} y CI_{90} . En general todos los compuestos sintetizados mostraron una buena actividad *in vitro* contra la amiba. Todos los compuestos probados mostraron una menor CI_{50} que el albendazol; los compuestos 1, 2 y 9 (con H, CH_3 y SH respectivamente en posición 2) mostraron menor CI_{50} que la nitazoxanida; comparando con el metronidazol los compuestos 2 y 9 (CH_3 y SH en posición 2) tuvieron una menor CI_{50} .

Con respecto al efecto dosis-respuesta, comparando los diferentes compuestos probados, se observa que a medida que se aumenta la dosis aumenta la respuesta, en todos los casos. En el caso de los compuestos 2 y 9 muestran ser más potentes ya que los valores de CI_{90} son relativamente bajos, mientras que los compuestos 1 y 3 incrementan considerablemente los valores en CI_{90} . No se observa una clara relación en forma global de la actividad entre los compuestos con y sin cloro, pues a pesar de que en general la CI_{50} de los no clorados es menor que la de los clorados, al comparar las CI_{75} y CI_{90} no se logra observar diferencia entre clorados y no clorados.

Tabla 8. Susceptibilidad de trofozoitos de *E. Histolitica* a los 1*H*-Bencimidazoles sintetizados en el presente estudio

COMPUESTO	CI ₅₀		CI ₇₅		CI ₉₀	
	µg/mL	[Molar]	µg/mL	[Molar]	µg/mL	[Molar]
1	0.005	0.042x10 ⁻³	1.622 ± 0.143	13.7x10 ⁻³	246.88 ± 45.156	2092.2x10 ⁻³
2	<< 0.005	<< 0.037x10 ⁻³	0.024 ± 0.001	0.182x10 ⁻³	0.77 ± 0.044	5.833x10 ⁻³
3	0.015 ± 0.001	0.113x10 ⁻³	11.225 ± 1.76	84.390x10 ⁻³	3181.268 ± 898.026	23317.1x10 ⁻³
4	0.020 ± 0.001	0.133x10 ⁻³	0.542 ± 0.024	3.613x10 ⁻³	8.995 ± 0.703	59.9x10 ⁻³
5	0.039 ± 0.001	0.204x10 ⁻³	0.339 ± 0.073	7.010x10 ⁻³	27.996 ± 2.637	146.5x10 ⁻³
6	0.070 ± 0.001	0.427x10 ⁻³	0.461 ± 0.013	2.811x10 ⁻³	2.324 ± 0.100	14.1x10 ⁻³
7	0.014 ± 0.001	0.0841x10 ⁻³	0.251 ± 0.009	1.507x10 ⁻³	2.905 ± 0.194	17.44x10 ⁻³
8	0.021 ± 0.001	0.125x10 ⁻³	0.532 ± 0.021	3.176x10 ⁻³	8.646 ± 0.632	51.6x10 ⁻³
9	0.001	0.005x10 ⁻³	0.036 ± 0.001	0.195x10 ⁻³	0.546 ± 0.025	2.954x10 ⁻³
10	0.079 ± 0.001	0.350x10 ⁻³	0.579 ± 0.019	0.359x10 ⁻³	3.181 ± 0.155	14.1x10 ⁻³
11	0.041 ± 0.001	0.206x10 ⁻³	0.471 ± 0.012	2.373x10 ⁻³	3.777 ± 0.152	19.0x10 ⁻³
Nitazoxanida	0.017	0.064x10 ⁻³				
Albendazol	15.0	56.6x10 ⁻³				
Metronidazol	0.060	0.035x10 ⁻³				



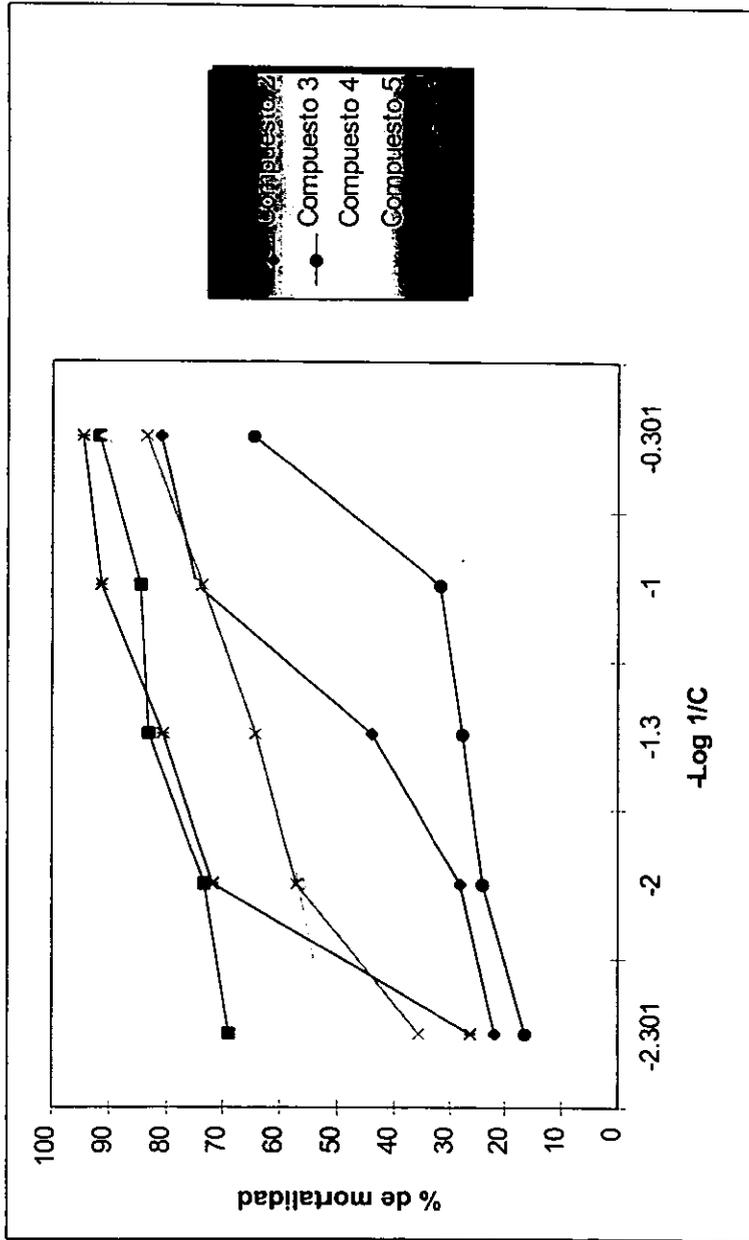
Gráfica 2. Relación de la concentración de los compuestos sintetizados y su actividad contra *Entamoeba histolytica*

4.2.3. Efecto de los 1*H*-Benzimidazoles sobre el trofozoíto de *Giardia lamblia*

Los resultados de la prueba de actividad *in vitro* antiprotozoaria contra *G. lamblia* de los compuestos 1-6, y nitazoxanida, albendazol y metronidazol, como controles positivos, se muestran en la Tabla 9 y Gráfica 3. En esta evaluación los compuestos sintetizados se probaron a concentraciones de 0.005, 0.010, 0.05, 0.100 y 0.500 $\mu\text{g/mL}$ y se determinó, mediante un análisis Probit, la CI_{50} , CI_{75} y CI_{90} para cada uno. Con respecto al metronidazol, la mayoría de los compuestos mostraron una menor CI_{50} , excepto el compuesto 3 (con un grupo amino en 2); el compuesto 1 (con H en posición 2) mostró una CI_{50} menor a la del albendazol, mientras que los compuestos 2, 4, 5 y 6 (con metilo, mercapto, carbamato y metiltio respectivamente) presentaron una CI_{50} mayor, pero dentro del mismo orden; el compuesto 1 presentó una mejor actividad que la nitazoxanida aunque no se logró calcular su CI_{50} por ser muy baja. Observando las tendencias en la gráfica, en la relación dosis-respuesta, el compuesto 6 (con grupo metiltio en 2) es el que muestra una mejor potencia, esto puede deberse a la actividad atribuida al sulfóxido, que es producto del metabolismo por el parásito, le sigue el compuesto 1.

Tabla 9. Susceptibilidad de trofozoito de *G. Lambia* a los 1*H*-Bencimidazoles sintetizados en el presente estudio.

COMPUESTO	CI ₅₀		CI ₇₅		CI ₉₀	
	µg/mL	[Molar]	µg/mL	[Molar]	µg/mL	[Molar]
1	<< 0.005	<< 0.042x10 ⁻³	0.015	0.127x10 ⁻³	0.361 ± 0.004	3.025x10 ⁻³
2	0.041	0.311x10 ⁻³	0.248 ± 0.001	1.818x10 ⁻³	1.153 ± 0.009	8.737x10 ⁻³
3	0.253 ± 0.002	1.902x10 ⁻³	3.632 ± 0.039	27.015x10 ⁻³	34.882 ± 0.555	262.270x10 ⁻³
4	0.006	0.040x10 ⁻³	0.099	0.660x10 ⁻³	1.069 ± 0.007	7.127x10 ⁻³
5	0.011	0.057x10 ⁻³	0.15 ± 0.001	0.785x10 ⁻³	1.437 ± 0.016	7.523x10 ⁻³
6	0.008	0.049x10 ⁻³	0.034	0.207x10 ⁻³	0.123 ± 0.001	0.750x10 ⁻³
Nitazoxanida	0.004	0.014x10 ⁻³				
Albendazol	0.010	0.037x10 ⁻³				
Metronidazol	0.210	1.220x10 ⁻³				



Gráfica 3. Relación de la concentración de los compuestos sintetizados con la actividad contra *Giardia lamblia*

5. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis, purificación e identificación de los compuestos diseñados en este trabajo.
- Los compuestos del presente estudio mostraron actividad como antiprotozoarios y como antihelmínticos.
- Los 1*H*-Bencimidazoles presentan muy buena actividad *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*.
- El compuesto **2** fue el más activo contra *Entamoeba histolytica*, con metilo en posición 2.
- Los derivados del 1*H*-Bencimidazol presentan buena actividad *in vitro* contra *Giardia lamblia*.
- Los compuestos más activos contra *Giardia lamblia* fueron el Bencimidazol y 2-Metilbencimidazol.
- Los 1*H*-Bencimidazoles presentan escasa actividad *in vitro* contra *Tichinella spiralis*.
- Compuestos clorados en posición 5(6) del bencimidazol presentan una mayor actividad como antihelmínticos.
- El efecto tautomérico de los 1*H*-bencimidazoles no parece afectar la actividad biológica.
- El tipo de sustituyente en la posición 2, no hay evidencias de ser decisivo en la actividad biológica.
- Es necesario realizar pruebas con un número mayor de derivados del 1*H*-bencimidazol para poder tener una mejor correlación de la estructura química con la actividad biológica.
- Los compuestos probados en este trabajo presentan grandes expectativas como agentes antiprotozoarios.

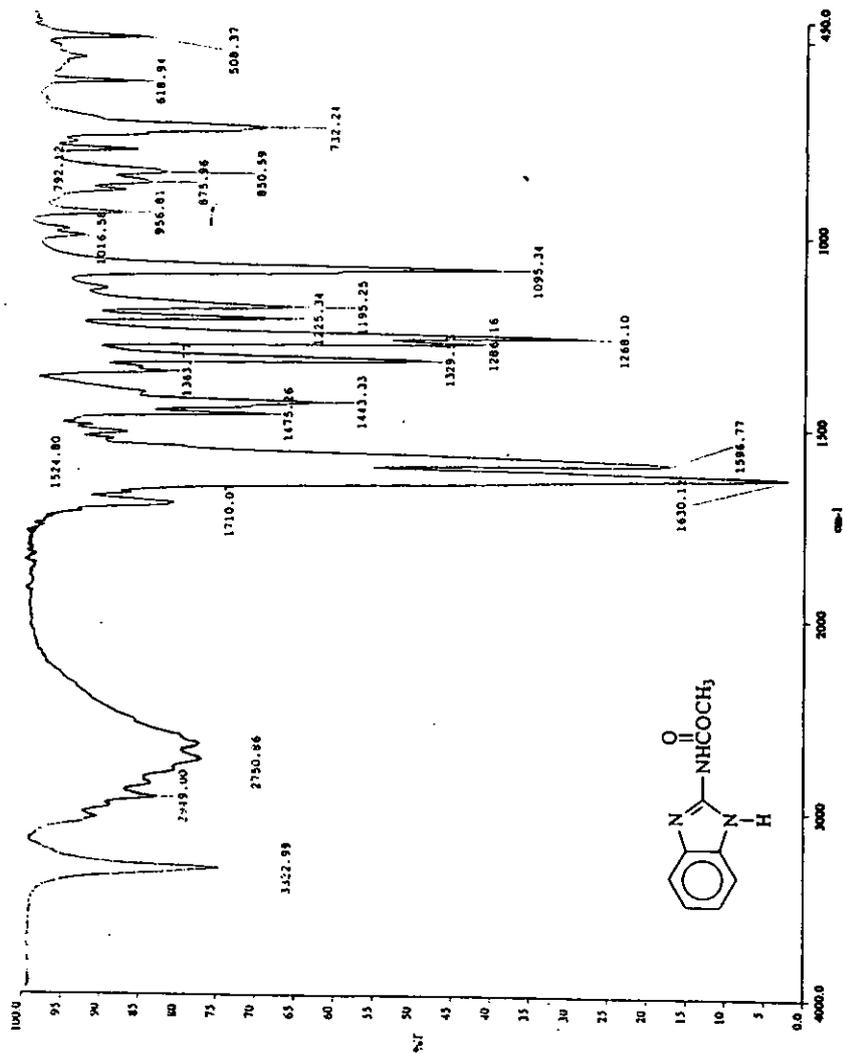
BIBLIOGRAFIA

1. Cedillo-Rivera, R. Parasitosis Intestinales. En: Kumate J, Gutiérrez G. Muños O, Santos J I. (Eds) Manual de Infectología, 12 edición, Ed. Francisco Méndez Cervantes, México, D.F., 1990, 99-109.
2. Cedillo-Rivera, R. ¿Es la giardiasis un problema real? Epidemiología (México) 1989; 4:1-6.
3. Gutiérrez, G, Muños, O. Epidemiology of amoebiasis. En: Kretschmer RD. (De): Amebiasis infection and disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press Inc, florida USA, 1190:173.
4. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 37ª edición., Editorial P.M.L., S.A. de C.V., 1991, pp. 318, 358, 701, 784, 656, 926, 117, 1134, 1656.
5. Kumate, J; Gutiérrez, G; Muñoz, O. Santos JI. (Eds). Manual de Infectología Clínica, 14ª edición, Mendez Editores, México, D.F. 1994.
6. Cedillo-Rivera, R. Muñoz, O. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemioterapeutic agents. J Med Microbiol, 1992; 37:221-224.
7. Chávez, B; Cedillo, Rivera, R; Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: Ultraestructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. J Protozool, 1992; 39:510-515.
8. Fears, S.D; O'Hare, J. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to fifty antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, 1998; 32:144-146.
9. Sharman, S. Design of New Drugs for Helminth Diseases. Advances in Drugs Research, 1994; 25:103-172.
10. Taylor, M. Bovine Anthelmintics: a overview of current thinking, Veterinary Practice, Feb. 1996, pp. 7-8.
11. Sharman, S; Abuzar, S. The Benzimidazole Anthelmintics-Chemistry and Biological Activity. Prog Drug Res, 1983; 27:85-161.
12. Friedman, P. A; Plazer, E. G. Internation of Anthelmintic Benzimidazoles with *Ascaris suum* Embryonic Tubulin. Biochim Biophys Acta, 1980; 630:271-278.
13. Lacey, E; Watson, T. R. Structure-Activity Relationship of Benzimidazoles Carbamates as Inhibitors of Mammalian Tubulin, *in vitro*. Biochem Pharmacol, 1985; 34:1073-1077.
14. Juliano, C; Martinotti M. G; y Cappuccinelli P. *In vitro* effect of microtubule inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. Microbiological, 1985, 8:31-42.

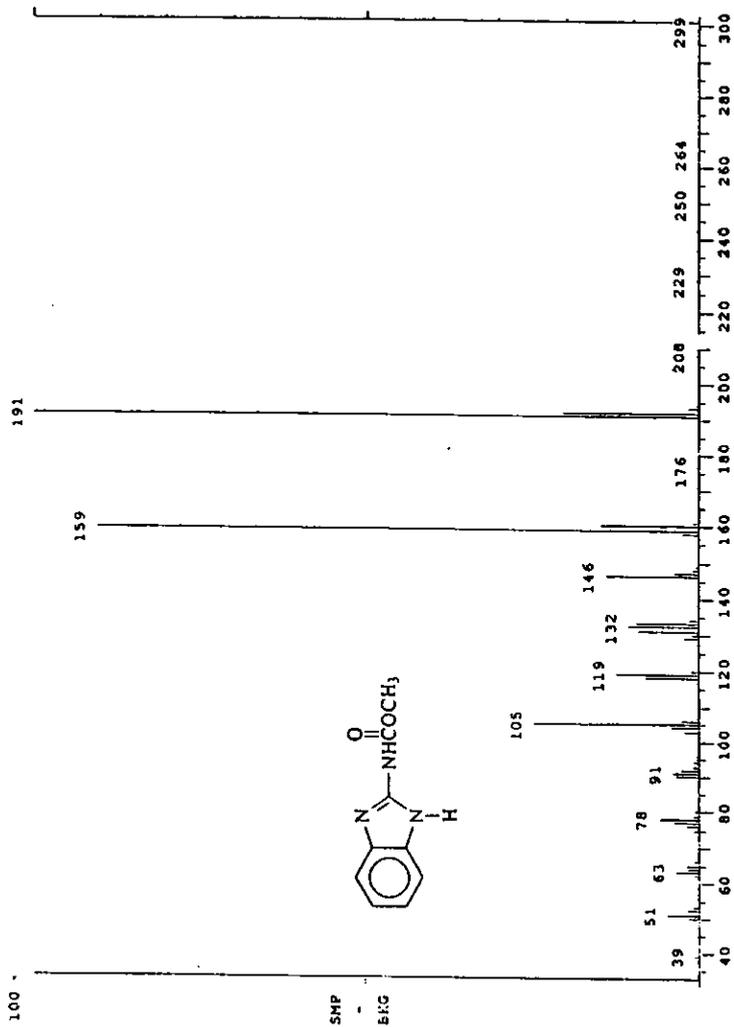
15. Edlin, T. D; Hang T. L; y Chakraborty P. R. Activity of the the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *J Infect dis*, 169:1408-1411.
16. Meloni, B. P.; Thompson, R. C; Reynoldson, J. A; y Seville, P. Albendazol: a more effective anti giardiasis agent *in vitro* than metronidazole and tidadole. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990; 84:375-379.
17. Morgan, U. M; Reynoldson, J. A; y Thompson, R. C. A. Activity of severals bencimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia spp* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37:328-331.
18. Haro, A. I; Salazar, S. P; Cabrera, B. M. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 2ª Ed. Editoriar Mendez; México, 1995.
19. Towsond, L.B; y Wise, D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology today*, 1990; 6:107-112
20. Brown, H. D; Matzuk, A. R; Ilves, I. R; Peterson, L. H; Harris, S. A; Sarret, L. H; Egerton, J. R; Yakstis, J. J; Campbell, W. C; Cuckler, A. C. Antiparasitic Drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-bencimidazole, A New Anthelmintic. *J Am Chem Soc*, 1961; 83:1764-1765.
21. Tocco, D. J. The Metabolic Fate of Thiabendazole in Sheep. *J Med Chem* 1964; 7:399-405.
22. Jung, H; Sanchez, M; Medina, M. T; Hurtado, M; Sotero. Pharcacokinetics of Albendazole in Patients whith Brain Cisticercosis. *J Clin Pharmacol*, 1992; 32:28-31.
23. Karanurakaran, C. S; Denham, D. A. A Comparision of the anthelmithics effects of oxfendazole and oxibendazole on *Trichinella spiralis* in mice. *J Parasitol*, 1980; 66(6):929-932.
24. Delatour P, Cure M C, Benoit E. Garnier F. Netobimin (Tatobin-Sch):Preliminary Investigations on Metabolism and Pharmacology. *J Vet Pharmacol Ther*, 1986; 9:230-234.
25. Wallchshofer, N; Delabre-Defayolle, I; Paris, J; Petavy, A. F. *In vivo* Morfological Damage Induced by New Benzimidazole Prodrugs in *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. *J Pharm Sci*, 1989; 79:606-608.
26. Grzwinski, I; Karmanska, K. Efficacy of luxabendazole against different Satages of *Trichinella spiralis*. Proceedings of the 7th International Conference in Trichinelosis. Edited by Tanner Ch, Martínez-Fernández A. Bolás-Fernández F. Consejo superior de investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 1988; p. 490-496.
27. Gutiérrez-Palomono, P; Hernández-Rodríguez, S. Muscuair Phase of *Trichinella spiralis* treated with Oxfendazole. Proceedings of the 7th International Conference in Trichinellosis. Edited by Tanner Ch,

- Martínez-Fernández A. Bolás-Fernández F. Consejo Superior de Investigación Científicas Press, Madrid, Spain.
28. Novak, N; Blackburn, B. J. Anthelmithic Activity of Several Sustituted Benzimidazolyl Carbamates Against *Hymenolepis nana* Cysticeroid. *Experientia*, 1981; 37:250-251.
 29. Korolkobas, Andrejus. *Essentials of medicinal chemistry*. 2ª Edicion, Ed. Wile-Interscience Publication, 1988; pp 599-628.
 30. Pritchard, D. I. Why Do Some Parasitic Nematodes Secrete Acetylcholinesterase (AchE)? *Inter J Pharasitol*, 1993; 23(5):549-550.
 31. Godman y Gillman. *Las Bases farmacológicas de la terapéutica*. 9º Edición, Vol. II, Ed. McGraw Hill Interamericana. 1996, pp 1021, 1023, 1073, 1077-1079, 1091.
 32. <http://www.ssa.gob.mx>
 33. Sharman, S; y Abuzar, Syed. The benzimidazole anthelmithics chemistry and biological activity. *Advance drug res*, 1986; 45:125-189.
 34. Katillard, K. S; Gordon, V. R; McLaughlin, G. L; y Edlind, D. T. Antiprotozoal Activities of benzimidazoles an correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrob Agents Chemothe*, 1994; 38:2086-2090.
 35. *Beilstein Organische Chemie*, Ed. Edwards Brothers, inc, 1944; XIII, 25
 36. *Organic syntheses, Collective vol.2*. Ed. John Wiley and sons, 1976, pp. 150-151.
 37. Cedillo-Rivera, R; Enciso-Moreno, J; Martínez-Palomo, A; y Ortaga-Pierrez, G. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in México. *Arch. Invest. Med*, 1991; 22:79-85.
 38. Townson, DH; Morris, D. L. *Echinococcus granulosus*: in vitro maintenance of whole cysts and the assessment of albendazole sulphoxide and praziquantel on the germinal layer, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988; 83:664-669.
 39. Cedillo-Rivera, R; Ramírez, A; Muños, O. A. Rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 1992; 23:59-61.
 40. *The Merck Index* 12ª Edición; 1996; pág. 1091.
 41. *Catalogo Aldrich*, 1988-1989, M2, 980-0 pág. 966, 17177-8, pág. 61, M320-5, pág. 927
 42. Leonard, N. J.; Curtin, D; y Beck, K. M. Sulfonate salts of substituted benzimidazoles. *J Am C S*, 1947; 69:2459-2460.
 43. Hernández, C. M. A., Tesis de maestria, Síntesis de benzimidazoles con actividad antihelmíntica potencial. FQ-UNAM, México, D. F. 1990.

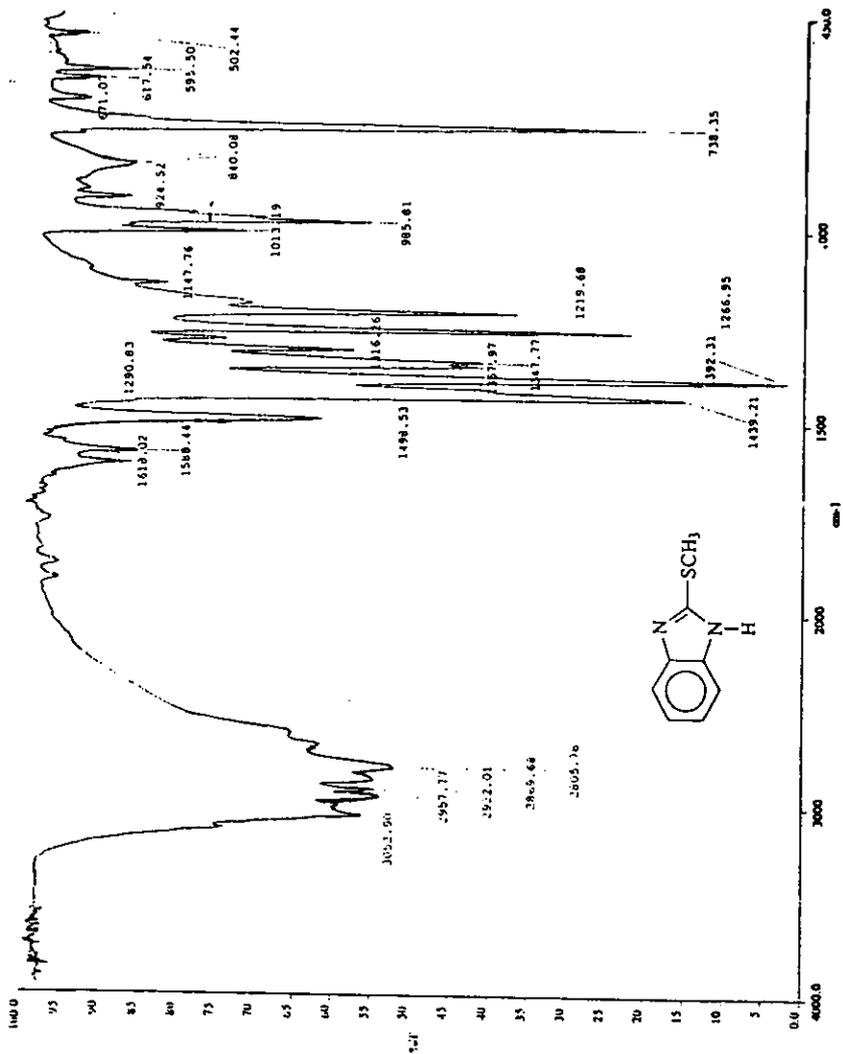
7. ESPECTROS



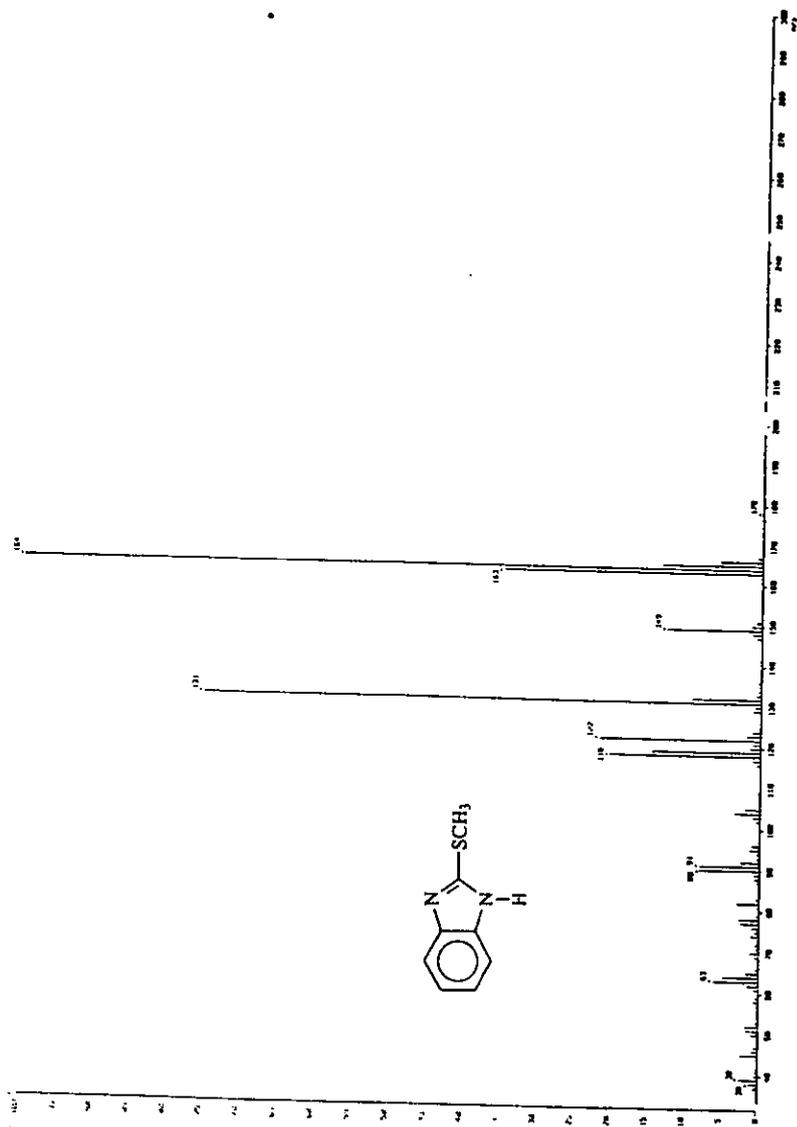
Espectro I. IR (KBr). 2-Bencimidazolcarbamato de metilo (5).



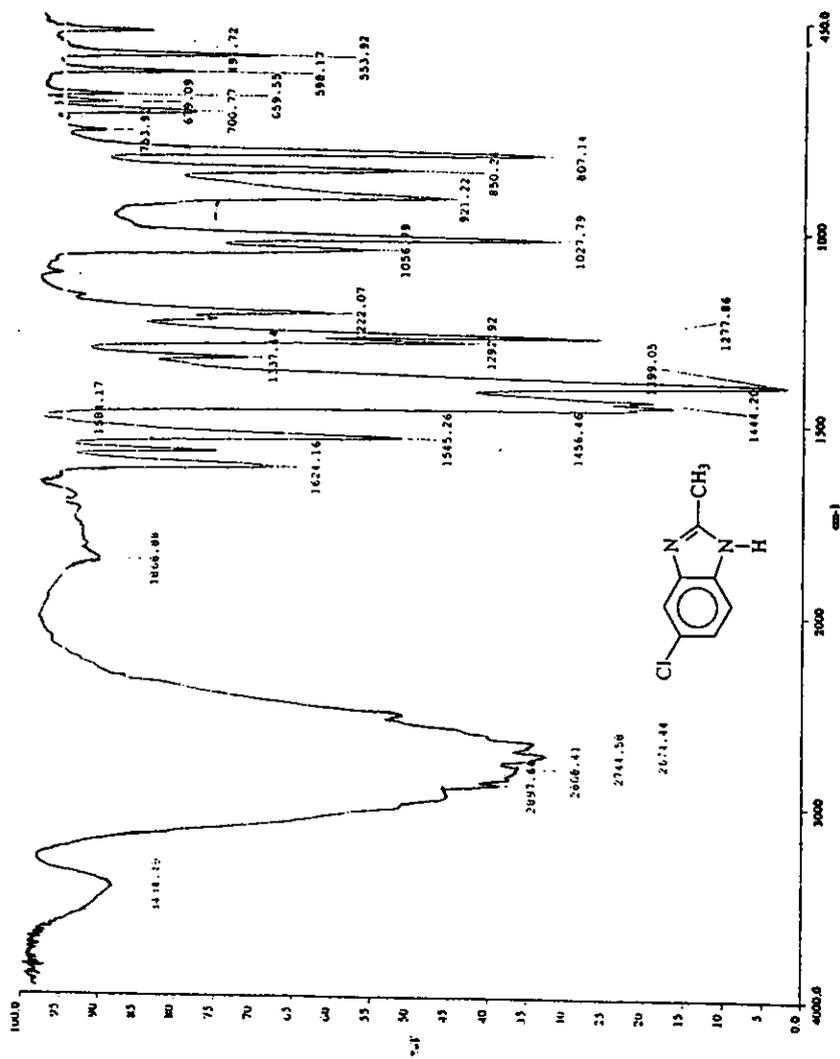
Espectro 3. EM (IE). 2-Bencimidazolcarbamato de metilo (5).



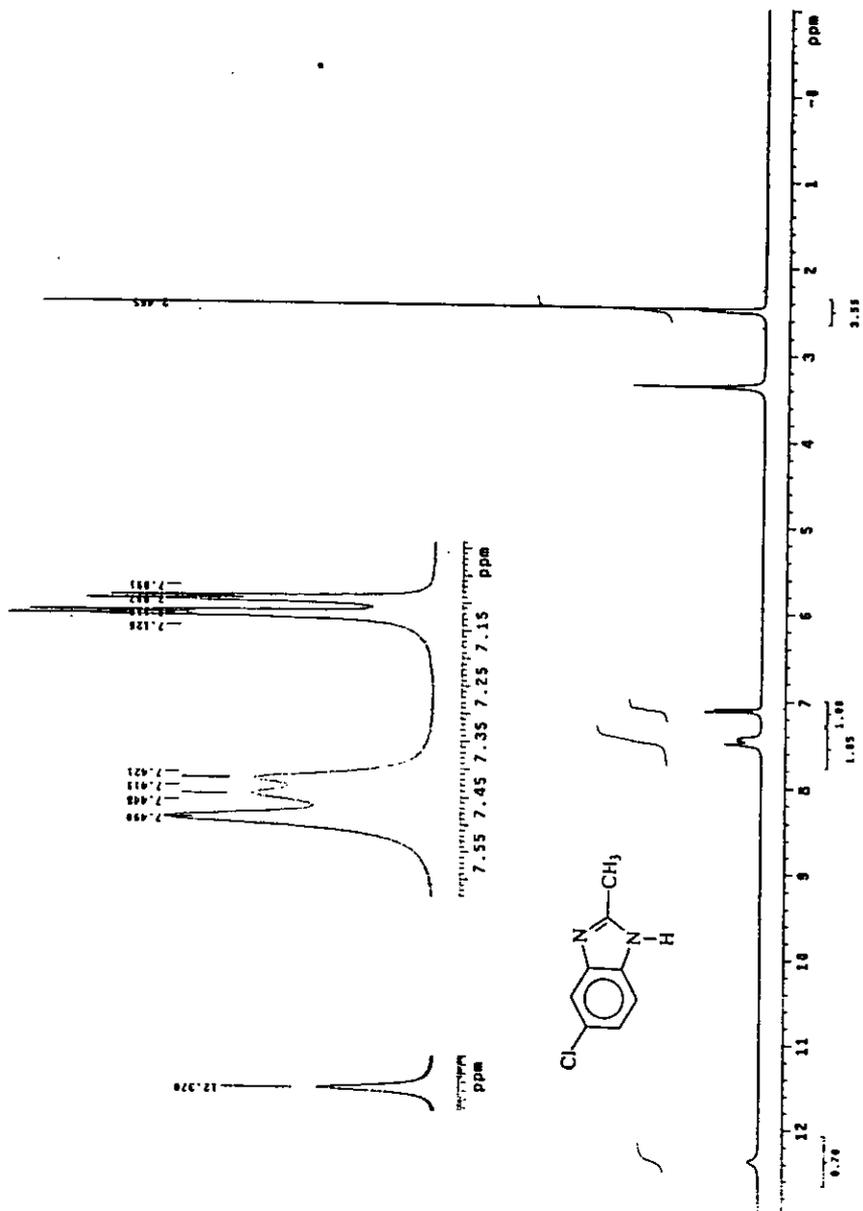
Espectr 4. IR (KBr). 2-Metiltiobenzimidazol (6).



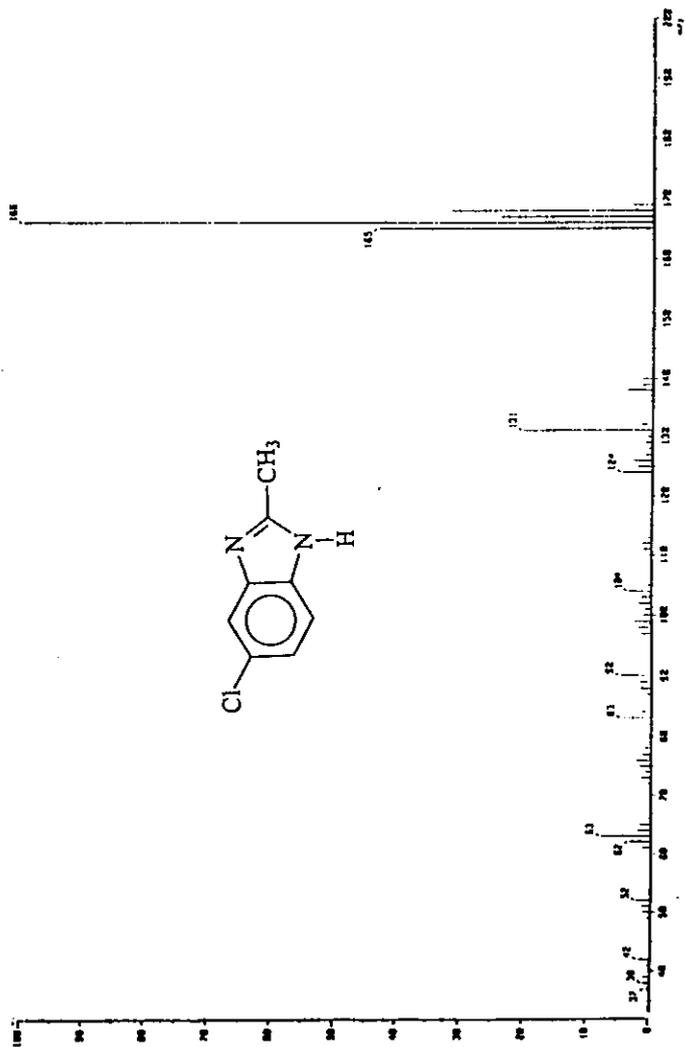
Espectro 6. EM (CG-IE). 2-Metiltiobenzimidazol (6).



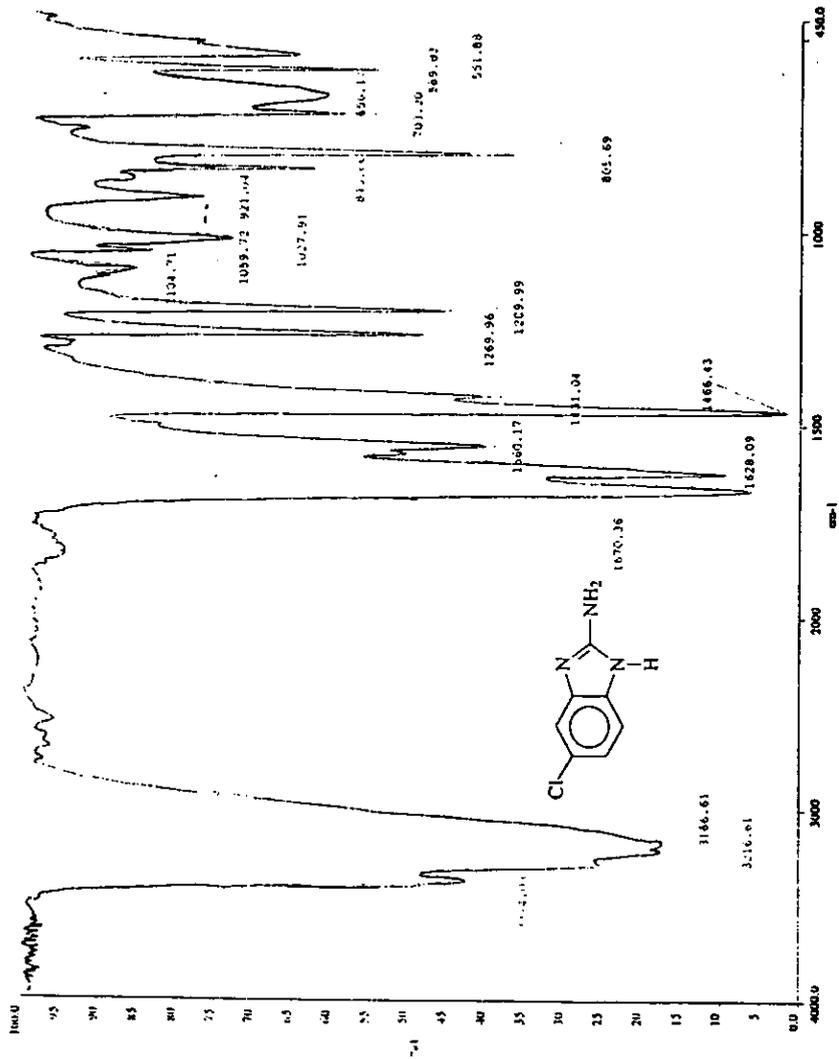
Espectro 7. IR (KBr).5(6)-Cloro-2-metilimidazol (7).



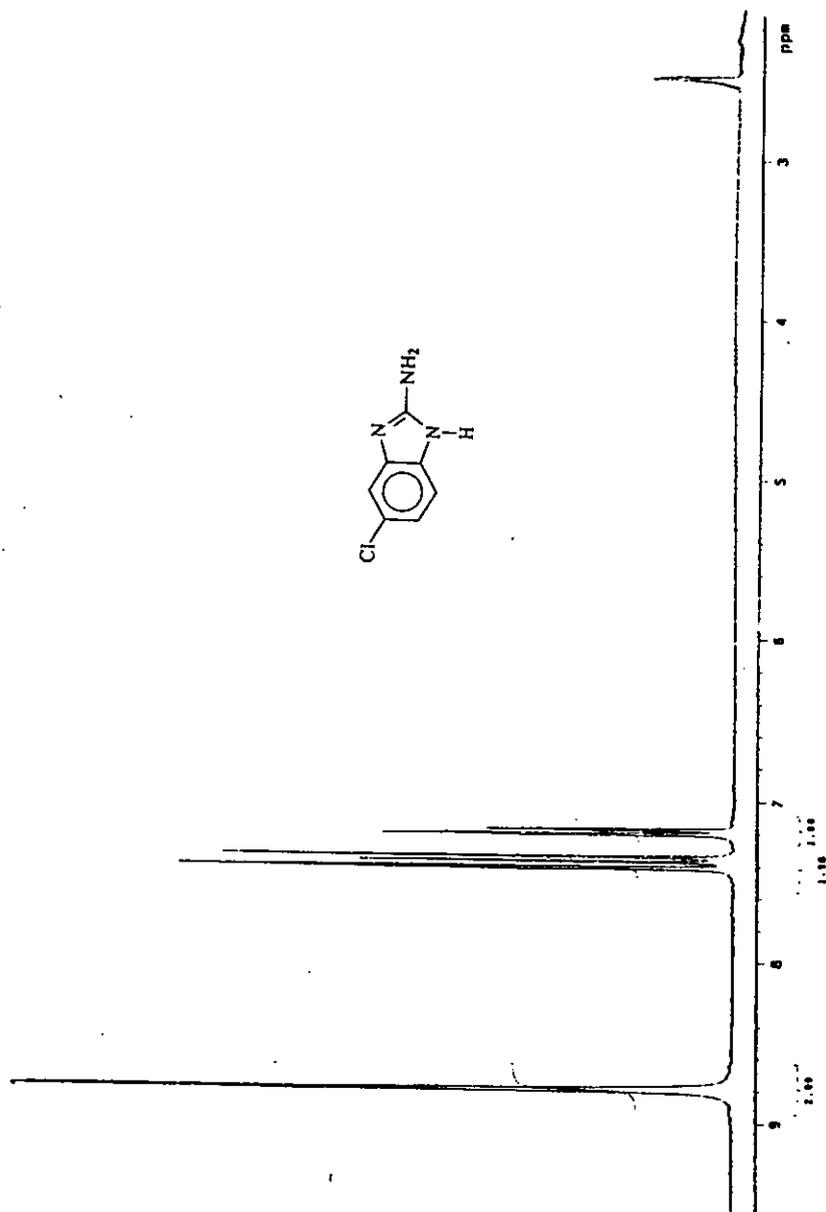
Espectro 8. RMN ¹H. 5(6)-Cloro-2-metilbenzimidazol (7).

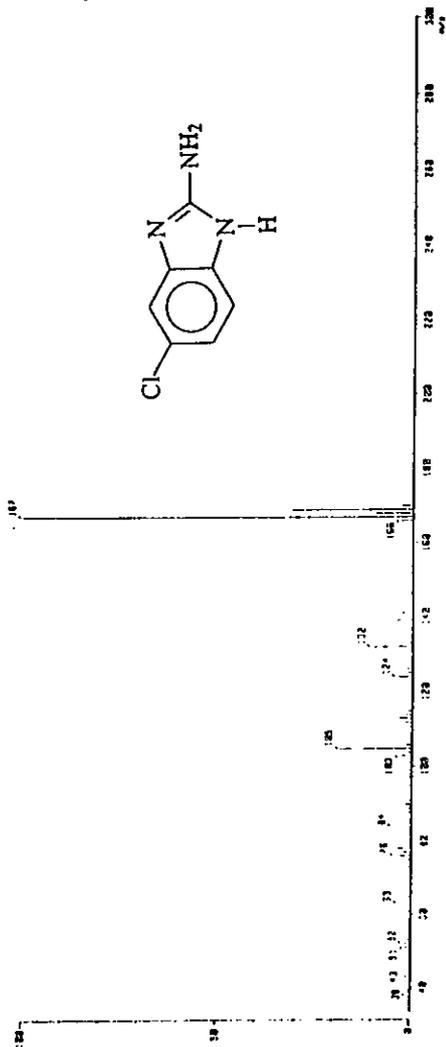


Espectro 9. EM (CG-IE). 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (7).

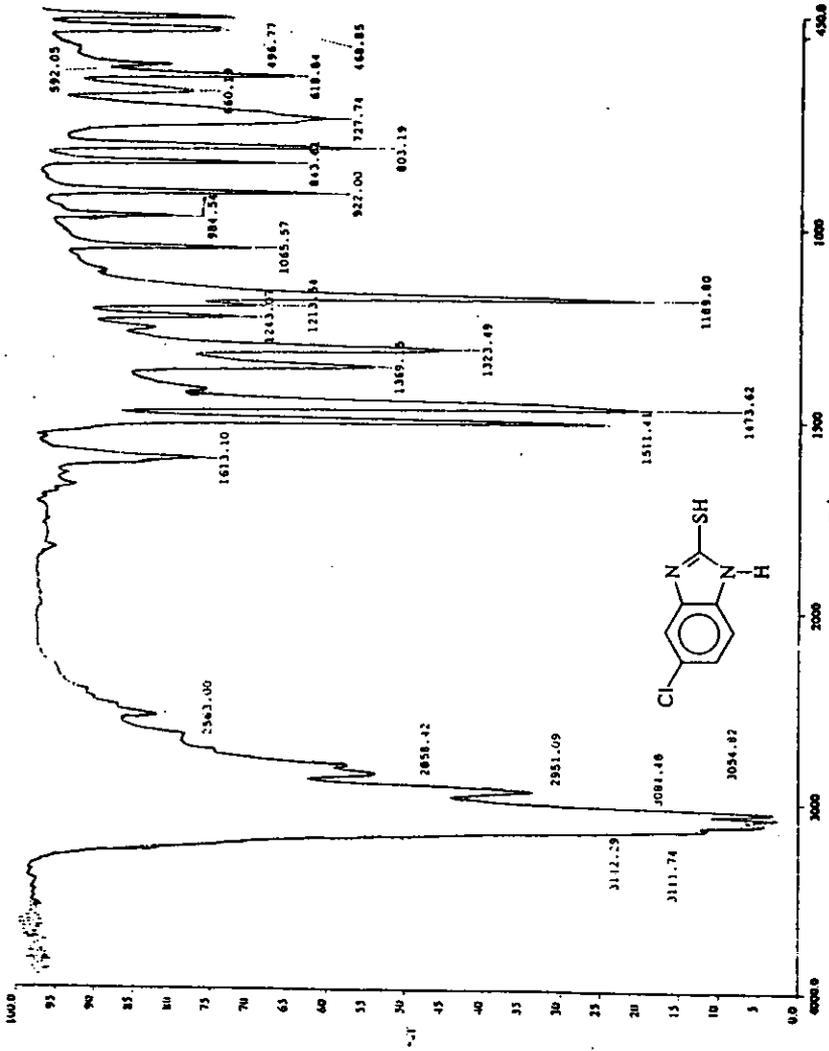


Espectro 10. IR (KBr). 2-Amino-5(6)-clorobenzimidazol (8).

Espectro 11. RMN ^1H . 2-Amino-5(6)-clorobenzimidazol (8).

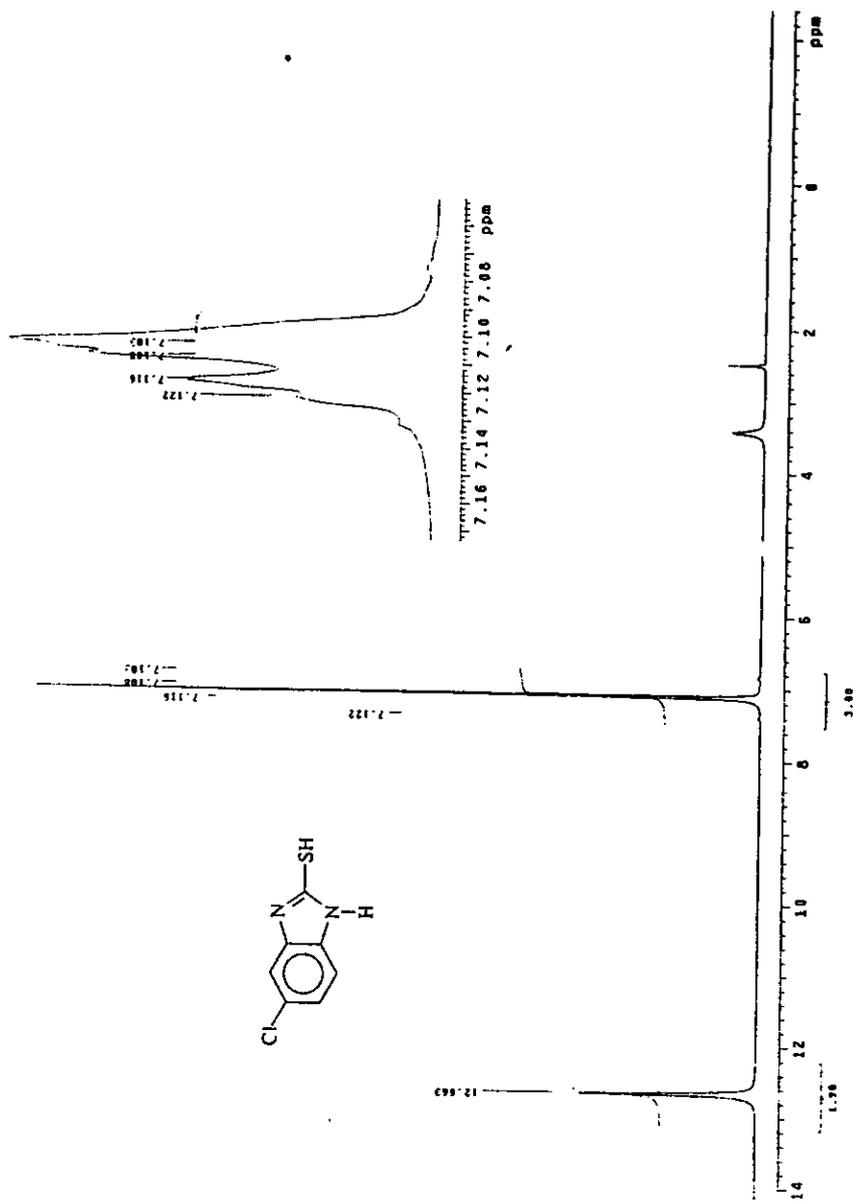


Espectro 12. EM (CG-IE) 2-Amino-5(6)-clorobencimidazol (8).

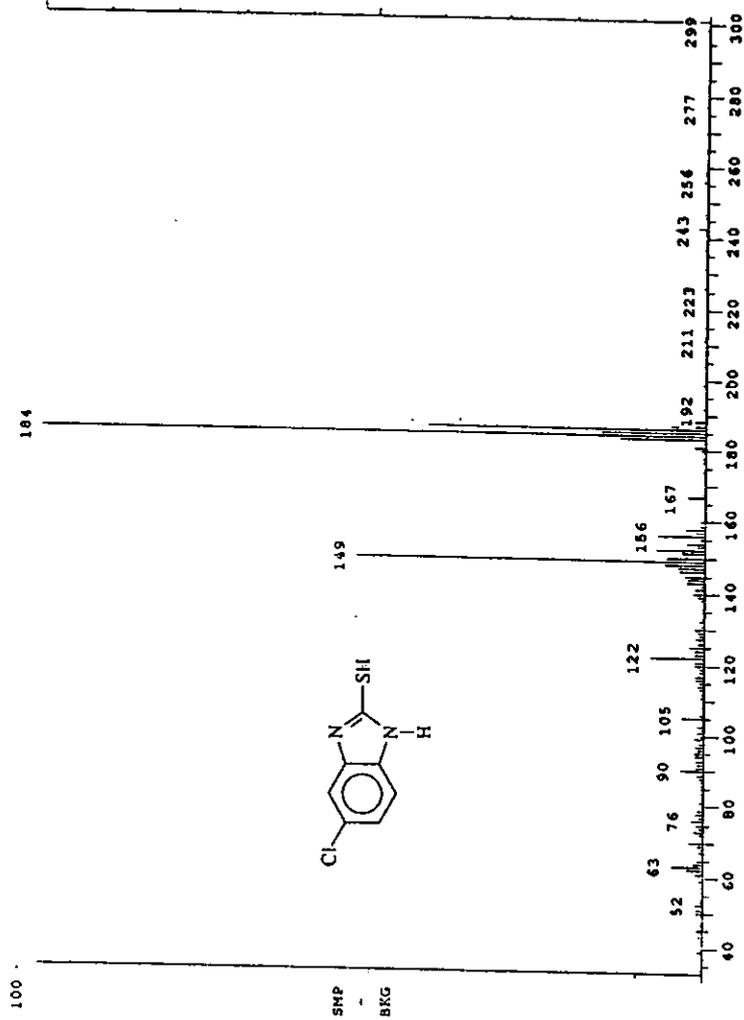


Espectro 13. IR (KBr). 5(6)-Cloro-2-mercaptobenzimidazol (9).

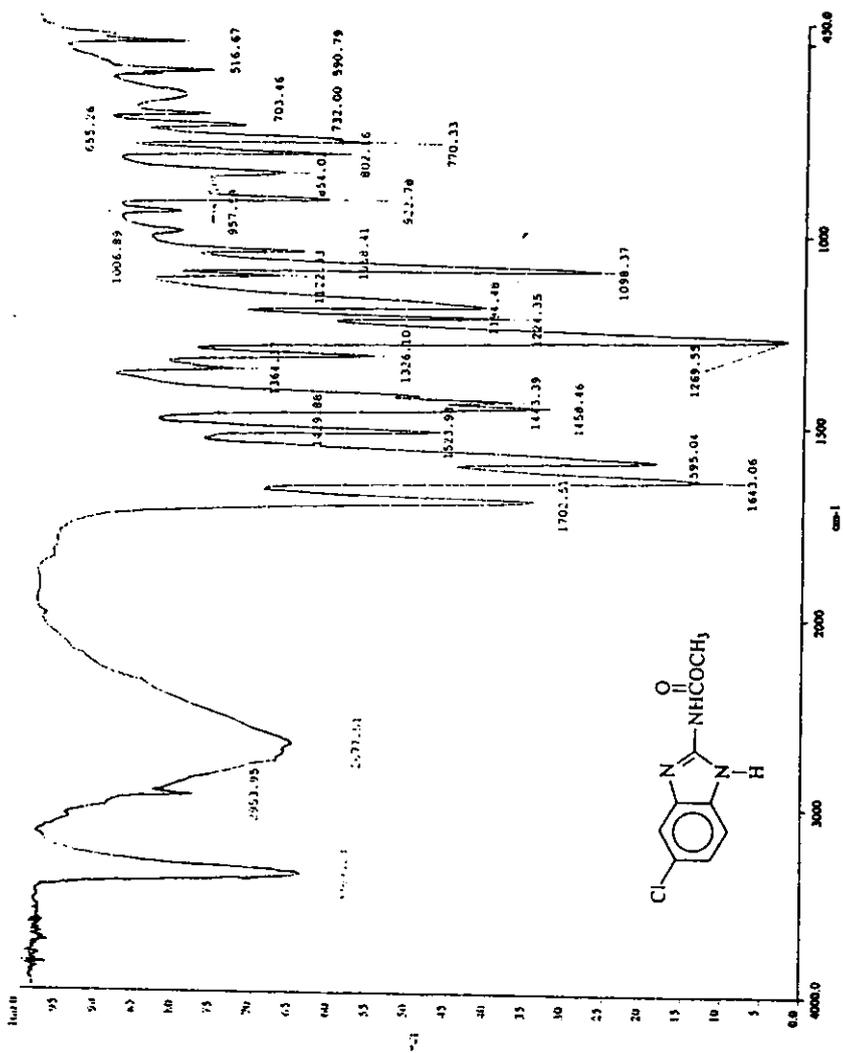
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



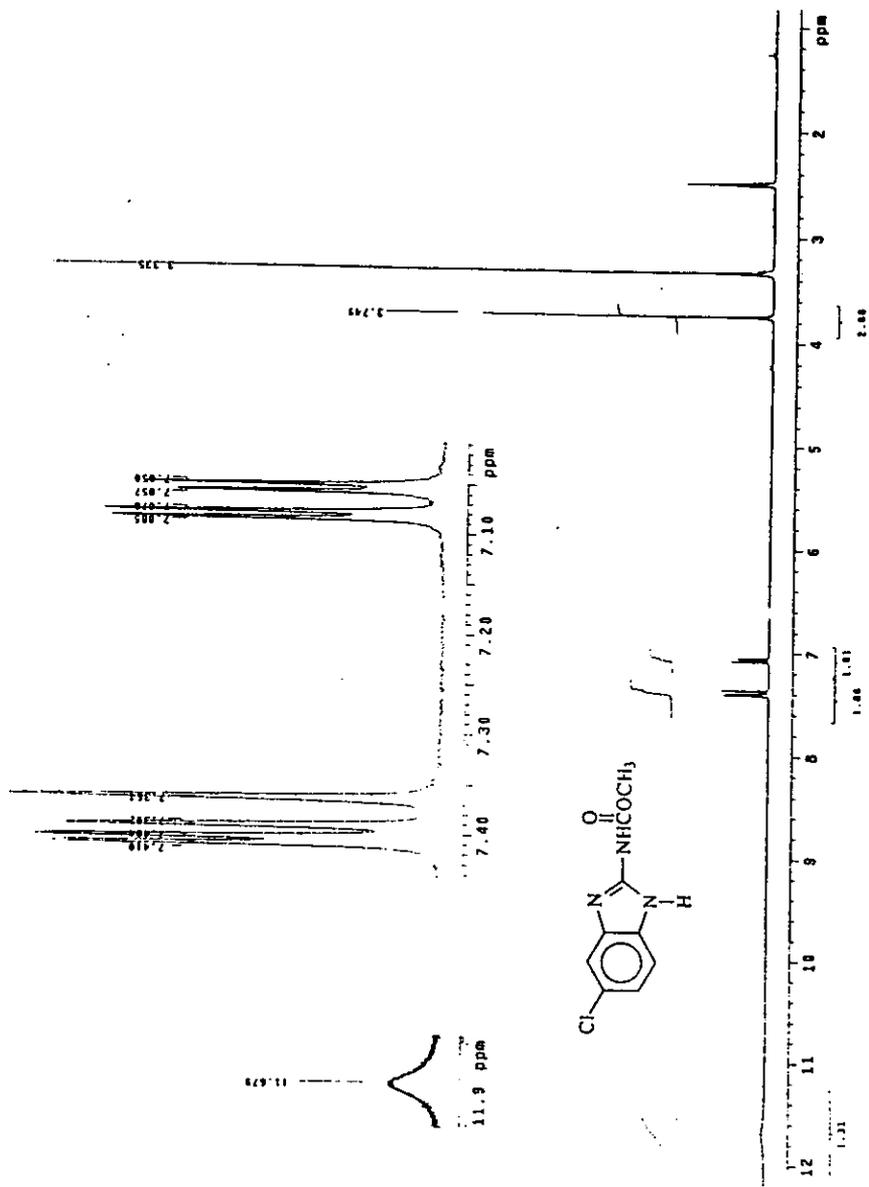
Espectro 14. RMN ¹H. 5(6)-Cloro-2-mercaptobenzimidazol (9).

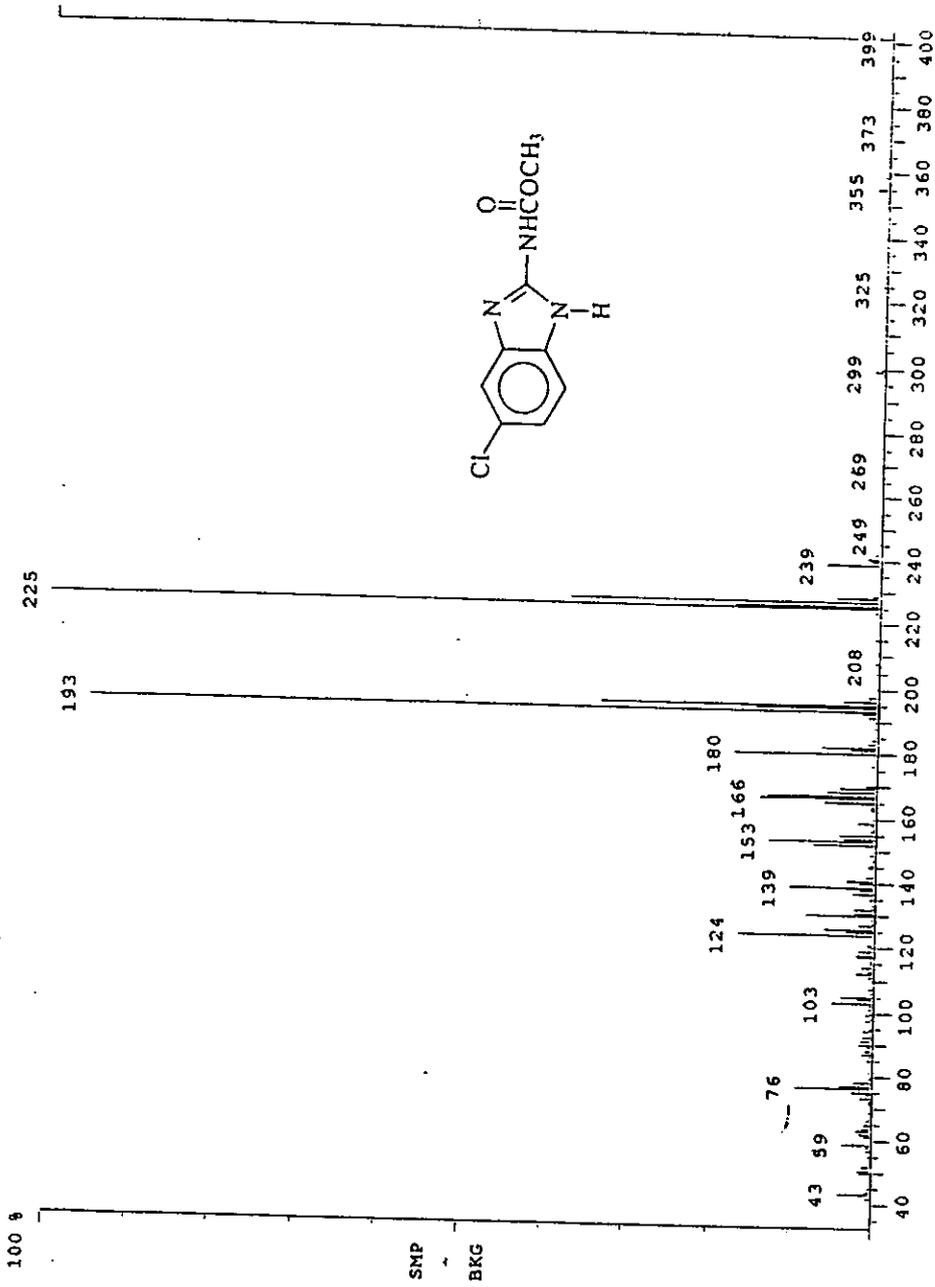


Espectro 15. EM (IE). 5(6)-Cloro-2-mercaptobenzimidazol (9).

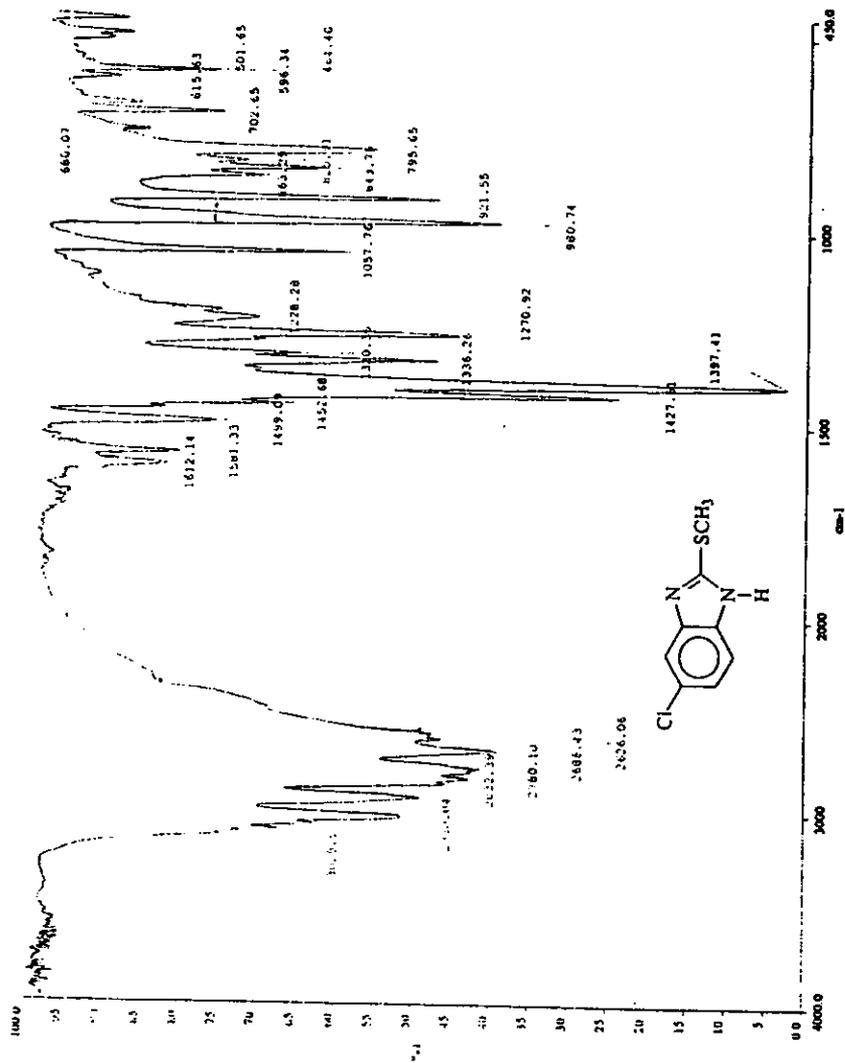


Espectro 16. IR (KBr). 5(6)-Cloro-2-benzimidazolcarbamato de metilo (10).

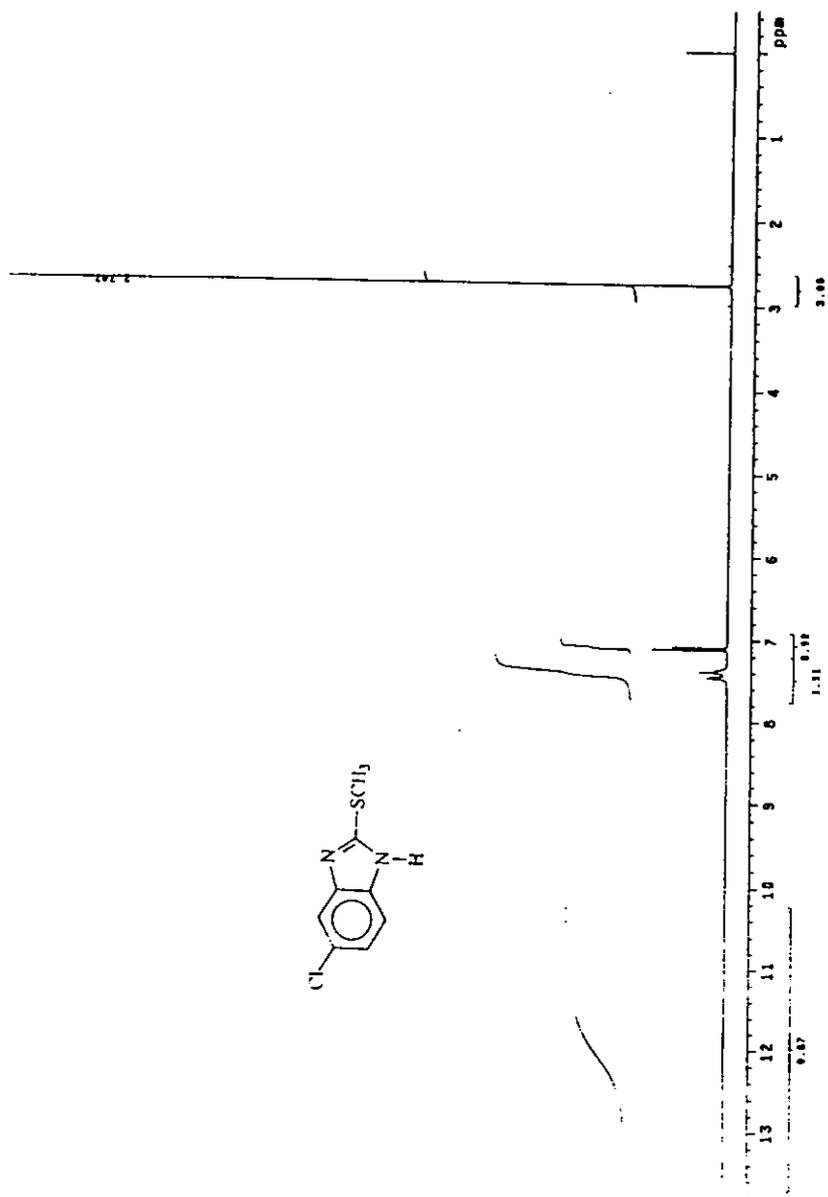
Espectro 17. RMN ¹H. 5(6)-Cloro-2-benzimidazolcarbamato de metilo (10).

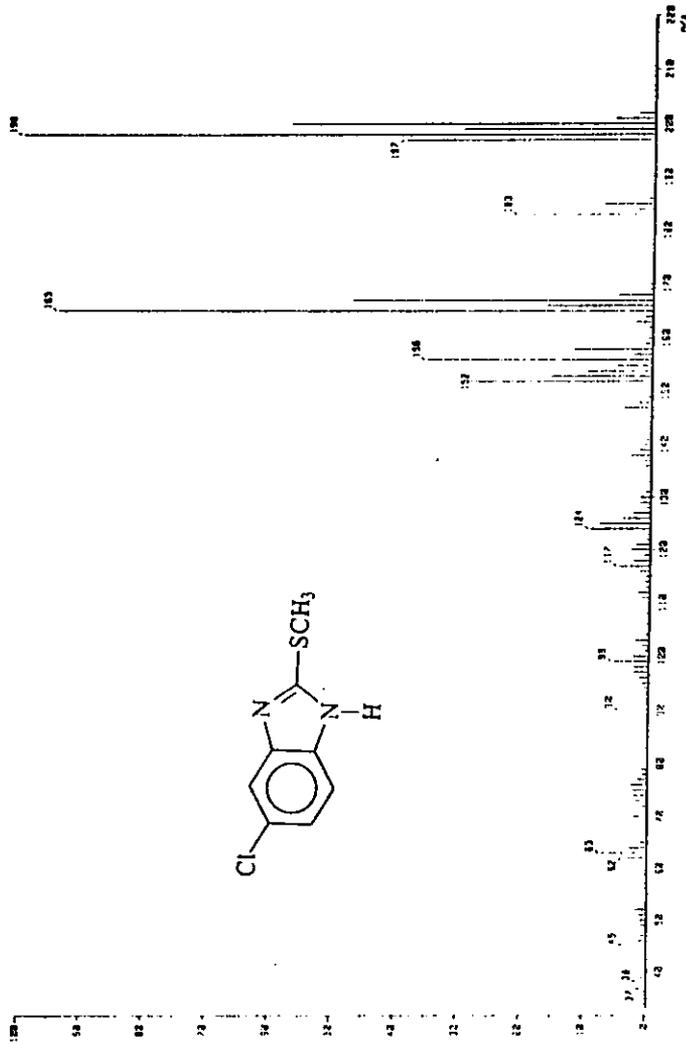


Espectro 18. EM (IE). 5(6)-Cloro-2-benzimidazolcarbamato de metilo (10).



Espectro 19. IR (KBr). 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (11).

Espectro 20. RMN ^1H . 5(6)-Cloro-2-metiltiobenzimidazol (II).



Espectro 21. EM (CG-IE). 5(6)-Cloro-2-metilbencimidazol (11).