



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DEL 5-CARBOXI-2-(TRIFLUOROMETIL)-1 H-BENCIMIDAZOL, UN BIOPRECURSOR Y UN ANALOGO DE TIPO CARBOXAMIDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO P R E S E N T A FLOR NADHEISA SORIANO AGATON



EXAMENES PROFESIONALES MEXICO, D.F. FACULTAD DE QUIMICA

MARZO 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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: Yolanda Caballero Arroyo

VOCAL: Rosa Luz Cornejo Rojas

SECRETARIO: Francisco Hernández Luis

1er. SUPLENTE: Marco Antonio Becerril Flores

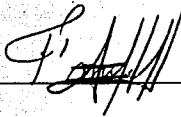
2do. SUPLENTE: Erick Cuevas Yañez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LAB. 122 DEL PARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

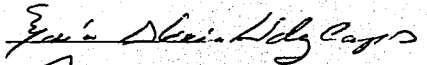
ASESOR DE TESIS:

Dr. Francisco Hernández Luis



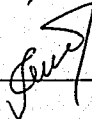
SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. María Alicia Hernández Campos



SUSTENTANTE:

Flor Nadheisa Soriano Agatón



DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A mis padres, porque es también producto de su esfuerzo y del gran apoyo que siempre me han brindado.

A mi hermana, por ser cómplice, amiga y compañera solidaria de toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Gracias:

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo; por su paciencia y emotividad para dirigirlo, pero sobre todo porque sus valiosos consejos influyeron en mi, motivándome a seguir adelante en mi formación profesional.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por toda su ayuda. Por compartir su experiencia y conocimientos con gran sentido del humor.

A la Maestra Alicia Hernández Campos, por asesorar técnicamente este trabajo y por hacer del laboratorio un lugar aún más agradable.

Al personal de la USAI: Rosa Isela del Villar, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez y Georgina Duarte, por el apoyo brindado en la realización de los espectros de IR, RMN y Masas.

Al personal del Hospital de Pediatría IMSS-Siglo XXI: Dra. Lilián Yepéz Mulia y Amparo Tapia, por su colaboración en los ensayos biológicos con *Giardia lamblia*.

A Sergio, Ceci, Gabriel y José Luis compañeros del laboratorio 122, por sus consejos y ayuda desinteresada.

A mis amigas de la Facultad Cindy y Marisela, porque juntas alcanzamos una meta importante en nuestras vidas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque me ha dado la oportunidad de crecer profesional y humanamente en todos sentidos.

Al Programa 127, por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A mis amigas Gina, Silvia, Claudia, Livier, Lili y Elizabeth, porque juntas hemos vivido y compartido momentos especiales para cada una de nosotras.

A Julio, por ser mi alma gemela, mi amigo entrañable de toda la vida. (Un saludo combativo).

A mis tías Naty, Ricela y Zoelia, por todo su cariño y solidaridad.

A mi papá Luis Soriano Martínez, por todo su amor, la confianza y el cariño que siempre me ha dado. Por regalarme una vida llena de música y alegría y por estar siempre a mi lado.

A mi mamá Floranelia Agatón Hernández, por permitirme soñar y hacer mis sueños realidad. Por compartir conmigo los momentos de alegría, pero también los difíciles. Por todo lo que me ha enseñado, pero sobre toda por la paciencia, el respeto y el gran amor con que ha construido nuestro hogar.

A mi hermana Dharaní Soriano Agatón, por hacer que la vida sea más divertida, por tomarme de la mano y caminar conmigo y porque crecer con ella es lo mejor que me ha pasado en la vida. (Te quiero mucho "carnis").

A Fred, por compartir conmigo todo su amor y ternura en esta nueva etapa de mi vida.

:

CONTENIDO

	página
Introducción	1
1. Antecedentes	3
2. Planteamiento del problema	18
3. Objetivos	19
4. Metodología	21
5. Resultados	24
6. Discusión	28
Conclusiones	37
Bibliografía	39
Apéndice A. Parte experimental	43
Apéndice B. Espectros	49

Introducción

De acuerdo con datos reportados actualmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS),¹ las parasitosis intestinales son consideradas las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo. Se encuentran especialmente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales en donde las condiciones de higiene y alimentación son precarias. Se estima que aproximadamente 3.5 millones de personas son infectadas y 450 millones están enfermas a causa de estas infecciones.¹

En México, tanto la amibiasis como la giardiosis (anteriormente conocida como giardiasis), son parasitosis intestinales que afectan principalmente a poblaciones de niños menores de diez años y comunidades en condiciones de vida insalubres. La giardiosis es una infección intestinal ocasionada por *Giardia lamblia*, parásito que habita en el intestino delgado del hombre y otros animales y se transmite a través de los alimentos o agua contaminada con materia fecal que contengan quistes -forma infectante del parásito. El modo de transmisión puede ser también directo de persona a persona cuando una de ellas padece la parasitosis y no lleva a cabo las medidas necesarias de higiene.

Para el tratamiento de la giardiosis, el fármaco de elección es el Metronidazol, cuya eficacia se manifiesta después de siete días de tratamiento. Aunque es un fármaco de bajo costo, en muchos pacientes presenta reacciones secundarias como dolor de cabeza, malestar estomacal, náuseas e intolerancia al alcohol; recientemente se ha informado que dicho compuesto provoca mutagenicidad.³ Adicionalmente algunos compuestos como la Quinacrina, y más recientemente

los bencimidazoles, han probado su efectividad contra *Giardia* por lo que han sido utilizados como una alternativa en su tratamiento.

En el área de la Química Farmacéutica se han buscado nuevas moléculas con actividad potencial no sólo como principios activos, sino también como bioprecusores y derivados biorreversibles que den lugar a la formación del compuesto activo mejorando sus propiedades físicas con el fin de lograr una mejor biodisponibilidad de los mismos.

En este contexto se ubica el presente trabajo, cuyo objetivo es la búsqueda de nuevas moléculas potencialmente activas contra *Giardia lamblia* que permitan aportar nuevos conocimientos y otras alternativas quimioterapéuticas hacia este padecimiento infeccioso.

1. Antecedentes.

Este apartado incluye la información que da sustento al planteamiento del problema y objetivos del presente trabajo de investigación. Dicha información se presenta en dos secciones generales, el primero relacionado con elegante parasitario *Giardia lamblia*, y el segundo al grupo de compuestos químicos de interés, los bencimidazoles antiparasitarios.

1.1. *Giardia lamblia*.

Giardia lamblia es el protozoo que provoca la giardiasis, padecimiento de interés en medicina humana y veterinaria.¹ Actualmente, este protozoo es considerado uno de los diez parásitos que mayormente infectan al ser humano en los países en vías de desarrollo.² En estos lugares, *Giardia*, al igual que el helminto *Ascaris intestinalis*, se distinguen por ser los parásitos intestinales más reportados en la clínica.²

1.1.1. Clasificación taxonómica de *Giardia lamblia*.

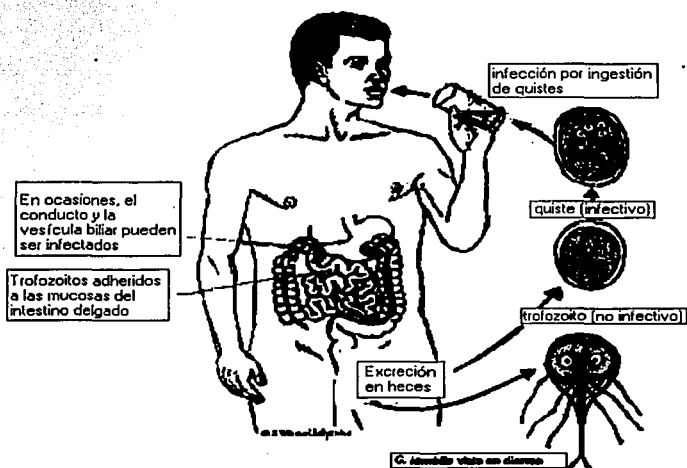
Los protozoarios se han clasificado dentro del subreino *Protozoa* que a su vez se divide en tres grandes phyllums: *Sarcomastigophora* (flagelos o pseudópodos), *Apicomplexa* (casi sin movimiento) y *Ciliophora* (ciliados). Dentro del primer phylum se incluye el género *Giardia* cuyas características han sido claramente definidas.³ De acuerdo con el sistema de clasificación utilizado por Filice, *Giardia* está dividida en tres grupos morfológicamente distintos, diferenciados principalmente por la forma de sus cuerpos medios. El más grande de estos grupos es el de *Giardia lamblia* y en él se ha concentrado la mayor atención debido a su importancia en la clínica tanto humana como veterinaria.⁴ La descripción taxonómica de *Giardia lamblia* se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Taxonomía de *Giardia lamblia*

Subreino	<i>Protozoa</i>
Phyllum	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphyllum	<i>Mastigophora (flagelos)</i>
Clase	<i>Zoomastigophorea.</i>
Orden	<i>Diplomonadida</i>
Suborden	<i>Diplomonadina</i>
Familia	<i>Hexamitidae</i>
Género	<i>Giardia</i>
Especie	<i>lamblia</i>

1.1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia lamblia* comprende dos etapas de desarrollo, la del trofozoito y la de quiste (Esquema 1).⁵ Aunque poco se sabe del ciclo celular de *Giardia*, se ha sugerido que puede estar controlado de manera diferente al de las células de los mamíferos.

Esquema 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.⁵

Aún no es claro si todos los quistes son inmediatamente infectivos cuando salen por las heces. Si las condiciones no son óptimas pueden resistir hasta dos meses en el medio ambiente.³

La reproducción asexual ocurre en los quistes ya sea antes o después de la formación de la pared. El resultado de este evento es un quiste con cuatro núcleos. La fisión se da hasta el desenquistamiento resultando en dos trofozoitos binucleados procedentes de un quiste tetranucleado. El desenquistamiento tiene lugar poco tiempo después de que los quistes dejan el estómago. El ambiente fuertemente ácido que ahí existe parece ser el factor principal para que esto suceda.³

Los trofozoitos colonizan principalmente el duodeno y el yeyuno del huésped. Se multiplican de manera asexual. La adherencia es una característica esencial en la relación huésped-parásito y la capacidad de adherencia *in vitro* es un indicador importante de la viabilidad de este parásito.⁶

El detonador para que los trofozoitos se enquisten aún no se comprende del todo, aunque este evento tiene lugar cuando los trofozoitos pasan a regiones posteriores del intestino delgado al parecer, debido a la presencia de sales biliares.⁷

1.1.3. Morfología y estructura.

Giardia lamblia es un organismo de apariencia y características morfológicas que lo distinguen de otros protozoarios. En su estado de trofozoito tiene forma de pera, es binucleado con ocho flagelos, un par de cuerpos medianos y un disco ventral —estructura única de *Giardia* (Esquema 2).⁸



Esquema 2. *Giardia lamblia* en su estado de trofozoito

La forma infectante del parásito es el quiste, el cual está rodeado de una pared fibrosa de proteínas. Dentro del quiste son visibles de dos a cuatro núcleos (según si la división nuclear ha sido completada), cuerpos basales, cuerpos medios y elementos estructurales del disco ventral y los flagelos.⁸

1.1.4. Metabolismo.

Giardia es un organismo eucariote que no posee mitocondria, por lo que depende predominantemente de las rutas catabólicas anaérobicas para mantener su energía y su homeostasis redox.^{3,8}

La ruta Embden-Meyerhof (REM) constituye la base de obtención de energía y el mantenimiento de la homeostasis redox, ya que al convertir la glucosa exógena (o algunos otros carbohidratos) a piruvato, las dos fosforilaciones que acompañan esta transformación, generan

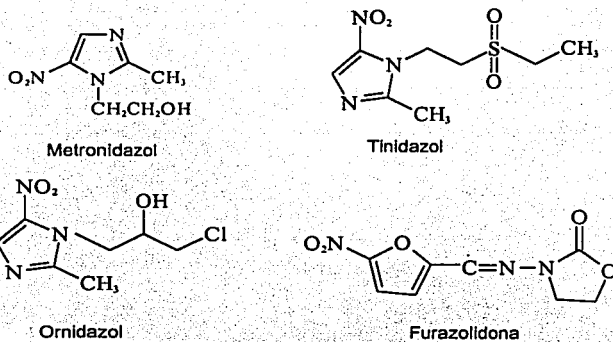
NADH como producto de la reducción del NAD^+ intracelular. El mantener los niveles óptimos en la concentración del par redox NADH/NAD^+ a través de esta ruta es vital para este organismo.^{3,8}

El piruvato que se genera vía REM puede dar lugar a la formación de acetato, propionato, lactato, etanol y CO_2 . Los tres primeros son importantes para mantener el pH intracelular y el último es producto de la descarboxilación del piruvato que la ferredoxin oxido-reductasa (PFOR) lleva a cabo.³

1.1.5. Fármacos para el tratamiento de la giardiosis.

A pesar de progresos notables en la obtención de vacunas, la quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y barato para controlar todas las parasitosis. El fármaco ideal para el tratamiento de estas enfermedades debe tener un amplio espectro de actividad contra todas las fases desarrollo de los parásitos infectantes, ser inocuo a dosis terapéuticas altas, químicamente estable y no tener acción como inductor de resistencia a otros fármacos, además de ser económicos. Pocos son los antiparasitarios que cumplen con estas características, pero son criterios que deben tomarse en cuenta en el diseño del fármaco.

Para el tratamiento de la giardiosis se cuenta con algunos fármacos como el Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol y la Furazolidona.⁵ Por su naturaleza estructural, los tres primeros pertenecen al grupo de los nitroimidazoles, y el último al grupo del nitrofurano (Esquema 3).⁹

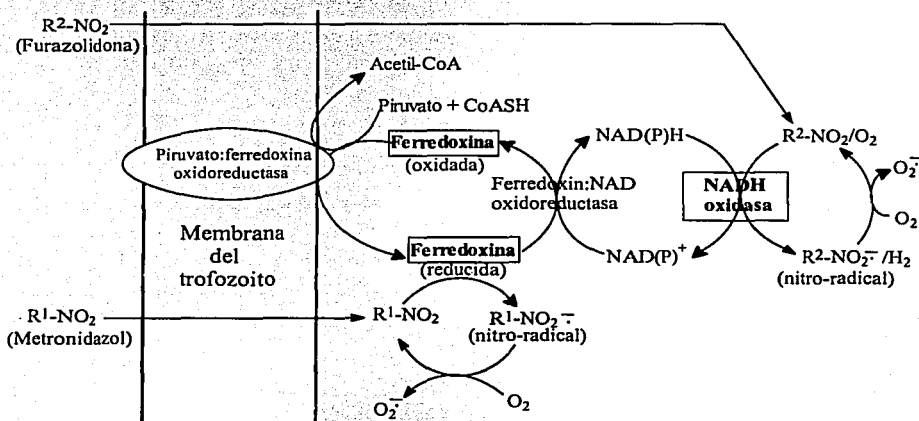


Esquema 3. Fármacos utilizados en el tratamiento contra la giardiosis.

El Metronidazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la giardiosis. Posee un amplio espectro de actividad antiprotozoaria. En general los pacientes responden bien al tratamiento después de su administración oral en dosis diarias de 750 mg por 10 días. Dentro de los efectos adversos que este compuesto presenta se encuentran dolor de cabeza, náuseas, vómito, diarrea y molestias abdominales.¹⁰ Sin embargo, se tienen reportes de que el Metronidazol a dosis altas y por largo tiempo, es mutágeno y carcinógeno en roedores;¹¹ aunque no hay datos que reporten que a dosis terapéuticas del fármaco conlleven a un riesgo notable de cáncer en seres humanos.¹⁰

El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se refleja en la toxicidad que poseen contra microorganismos anaerobios o microaerófilos. Podría considerarse al Metronidazol como un profármaco porque necesita de la activación metabólica por parte de los microorganismos sensibles a éste.¹²

Particularmente en el caso de *Giardia*, una vez que el compuesto se difunde en su interior, el grupo nitro se reduce gracias a la participación de la enzima Ferredoxina y de complejos de hierro y azufre. La actividad giardicida del Metronidazol es consecuencia de la formación de productos intermediarios lábiles y químicamente reactivos que se forman durante la reducción del nitro y que son altamente tóxicos para el microorganismo (Esquema 4). Algunos de estos productos como el anión radical-nitro han sido estudiados y aunque no se conoce de manera exacta cómo es que provocan daño a las células, se tienen reportes de que pueden generar la pérdida de la estructura helicoidal.¹²



Esquema 4. Interacción del Metronidazol en la cadena transportadora de electrones.

Actualmente, se tienen algunos reportes que indican que organismos como *Giardia* y otras bacterias anaerobias, presentan resistencia al Metronidazol.^{13,14} Los estudios a nivel molecular indican que esta resistencia es atribuida a modificaciones de la Ferredoxina.¹⁵

Otro de los nitroaromáticos activos contra *Giardia lamblia* es la Furazolidona. Según estudios hechos *in vitro* este compuesto se activa por una enzima distinta a la Ferredoxina, la NADP oxidasa (Esquema 4).¹² Este hecho lo hace interesante, para estudios con *Giardia* resistente al Metronidazol, aunque no se descarta la posibilidad de resistencia cruzada. La Furazolidona se administra por vía oral, no se absorbe bien en el tubo digestivo lo cual limita sus efectos sistémicos adversos, los cuales son similares al Metronidazol.⁷ Recientemente ha entrado al mercado la Nitazoxamida, la cual también pertenece al grupo de los nitroaromáticos. Hasta este momento no se le han reportado efectos adversos, tal vez por su reciente ingreso al uso terapéutico.

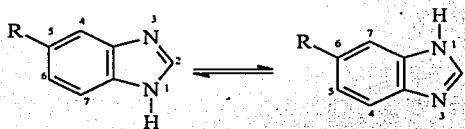
Un aspecto adicionalmente importante, es que hoy en día se ha informado que la giardiosis se ha complicado al presentarse cuadros clínicos en donde se asocia a *Giardia lamblia* y a *Helicobacter pylori*.¹⁶ Esto marca nuevos retos para el diseño, uso y formulación de nuevos compuestos ahora destinados para estos dos microorganismos de naturaleza distinta; *Giardia* como protozooario y *Helicobacter* como bacteria.

Aunque se cuenta con los fármacos antes mencionados se tiene información de que existen cepas resistentes a éstos, por lo que la necesidad de buscar nuevos agentes terapéuticos giardicidas, resulta imperante. Nuevos esfuerzos se realizan con principios activos de plantas medicinales,¹⁷ síntesis orgánica¹⁸ o fármacos utilizados contra otros microorganismos.¹⁶ En la búsqueda e investigación de dichos agentes se ha destacado la importancia del avance en el conocimiento de la fisiología y metabolismo de *Giardia*, aunque en este sentido se han logrado avances importantes,¹⁹ aún se desconocen aspectos tales como su metabolismo completo, los

mecanismos de resistencia a los fármacos, los mecanismos de patogénesis, por mencionar sólo algunos.³

1.2. Los bencimidazoles como antiparasitarios.

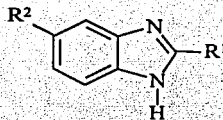
La estructura de la molécula de bencimidazol consiste en un sistema donde un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol. Presenta un comportamiento ácido-base y normalmente está en equilibrio tautomérico, lo que afecta a las posiciones 5 y 6 de la molécula monosustituída (Esquema 5).²⁰



Esquema 5. Equilibrio tautomérico de la molécula de bencimidazol.

El uso de los bencimidazoles como antihelmínticos data de los años sesenta y se considera al Tiabendazol como el primer bencimidazol utilizado contra diferentes helmintos tanto en humanos como en animales. Sin embargo, debido a que cuando se biotransformaba daba lugar a la formación de un metabolito inactivo (5-Hidroxitiabendazol), comenzaron a desarrollarse una serie de moléculas que dieron lugar a la familia de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo que hasta el día de hoy son utilizados en el tratamiento de diferentes parasitosis. (Tabla 2).²¹

Tabla 2. Bencimidazoles utilizados en el tratamiento de diferentes helmintosis.



Nombre	R ¹	R ²
Tiabendazol		H
Albendazol	NHCOOCH ₃	-S(CH ₂) ₂ CH ₃
Mebendazol	NHCOOCH ₃	COC ₆ H ₅

Los diferentes estudios de relación estructura actividad mostraron como uno de los requisitos indispensables para la actividad antihelmíntica, la presencia del grupo metoxicarbonilamino en posición 2. Asimismo, es indispensable que los bencimidazoles conservaran el átomo de hidrógeno en la posición 1. Lo que originalmente era un problema de protección metabólica al colocar grupos en posición 5(6), para evitar problemas similares al Tiabendazol, se convirtió en una alternativa para incrementar la eficacia de estos compuestos.²³

1.2.1. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.

Los bencimidazoles son conocidos por ser antihelmínticos de amplio espectro que ocasionan muchos cambios bioquímicos en nematodos sensibles, por ejemplo, inhibición de la fumarato reductasa de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de fosforilación oxidativa. Sin embargo, hay pruebas contundentes de que la acción primaria de estas moléculas resulta ser la inhibición de la polimerización de microtúbulos de la tubulina.²⁴

1.2.2. Los bencimidazoles como giardicidas.

Debido al buen comportamiento que los bencimidazoles-2-carbamato de metilo presentaban como antihelmínticos gastrointestinales y asumiendo su mecanismo de acción como inhibidores de la polimerización de tubulina,¹⁰ se pensó que estos compuestos podrían presentar actividad antiprotozoaria ya que algunos de estos organismos, como *Giardia lamblia* poseen una gran cantidad de esta proteína.²⁵

Con esta idea se evaluó la actividad *in vitro* e *in vivo* del Albendazol y el Metronidazol. Los resultados se muestran a continuación.²⁶

Tabla 3. Actividad giardicida del Metronidazol y Albendazol

Compuesto	<i>in vitro</i> CL ₅₀ , µM	<i>in vivo</i>	
		% eficiencia ^a	Dosis, mg/Kg/día (mmol/Kg/día) ^b
Metronidazol	1.220	90-95 (7 días)	15 (0.087)
Albendazol	0.037	90-95 (7 días)	15 (0.056)

^aevaluado según el número de quistes encontrados en heces fecales; ^badministración oral

Los datos mostrados en la tabla anterior indican que el Albendazol es 32 veces más activo *in vitro* que el Metronidazol. Sin embargo, cuando este bencimidazol se evaluó *in vivo*, su eficacia fue prácticamente la misma que la del Metronidazol; utilizando para ambos casos 7 días de tratamiento. La pregunta necesaria es ¿Por qué siendo el Albendazol más activo *in vitro* que el Metronidazol, requiere el mismo tiempo de tratamiento?. Al parecer la mayor actividad *in vitro* no correlaciona con la esperada mejor actividad *in vivo*. Por lo anterior, es necesario tomar algunas consideraciones para explicar el comportamiento del Albendazol en estas condiciones y como agente giardicida.

Uno de los primeros aspectos a mencionar es el tiempo de exposición del protozoario a los compuestos cuando el ensayo es *in vitro* e *in vivo*. La metodología de la prueba *in vitro* indica una exposición de 24 horas;²⁷ sin embargo *in vivo* el la permanencia de los compuestos por el duodeno y el yeyuno no cubre esta cantidad de horas. Es importante recordar que la *Giardia* infecta estas porciones del intestino delgado.

in vitro ————— 24 h

in vivo ————— 1 - 3 h

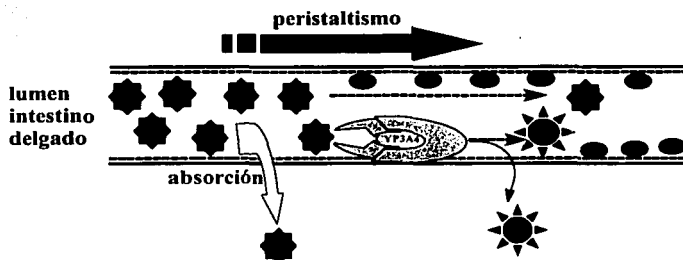
Esquema 6. Tiempo de exposición de *Giardia in vitro* e *in vivo*.

En la siguiente tabla se indican los diferentes tiempo de transito en los segmentos anatómicas del aparato digestivo, que corroboran lo antes mencionado para la permanencia de los compuestos en el duodeno y yeyuno.²⁸

Tabla 4. Area superficial, longitud, tiempo de residencia y pH del tracto digestivo

Segmento	Área superficial	Longitud, cm	Tiempo de residencia	PH del segmento
Boca	100 cm ²		segundos a minutos	6.5
Esófago	200 cm ²	23-25	segundos	
Estómago	3.5 m ²	0.25	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9 m ²	35	0.5-0.75 h	4.0-5.5
Yeyuno	184 m ²	280	1.5-2.0 h	5.5-7.0
Ileon	276 m ²	420	5-7 h	7.0-7.5
Cólon y recto	1.3 m ²	150	1-60 h	7.0-7.5

Un aspecto adicional a considerar son los factores que provocan la disminución de la concentración de los compuestos en el lumen intestinal a nivel de duodeno y yeyuno. Entre éstos, tres son los más importantes a mencionar: el peristaltismo, la absorción y el citocromo P-450 (Esquema 7).²⁹



F: fármaco; CYP3A4: citocromo P 450 3A4; M: metabolito

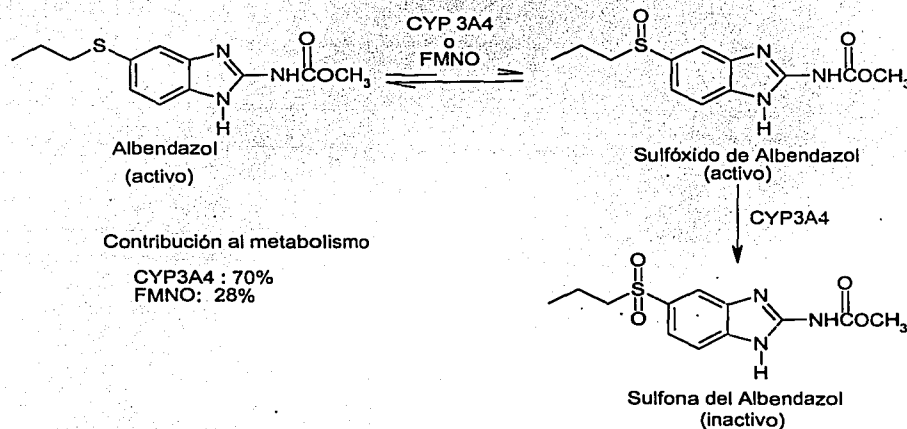
Esquema 7. Factores que disminuyen la concentración de fármacos a nivel de duodeno y yeyuno.

El peristaltismo se puede disminuir con fármacos utilizados para combatir la diarrea. Estos generalmente se administran en giardiosis. Los dos factores restantes presentan mayor dificultad para controlarlos *in vivo*. En el caso del Albendazol, este compuesto es poco absorbido, propiedad que sería una ventaja para la giardiosis. Sin embargo, tiene dos características que influyen en su respuesta, su poca solubilidad en agua y su extenso metabolismo intestinal.³⁰

Aunque la poca solubilidad en agua de este compuesto no es importante para combatir a los helmintos, esta propiedad sí es importante cuando se trata de protozoarios. Los helmintos son organismos pluricelulares con sistemas digestivos que pueden deglutir suspensiones; los protozoarios son organismos unicelulares, en donde el ingreso de principios activos tiene que ser por algunos de los mecanismos clásicos de transporte de sustancias, difusión simple, transporte

activo o endocitosis. En la difusión simple, la solubilidad en agua y liposolubilidad del compuestos son cruciales.²⁸

En lo que respecta al metabolismo, el Albendazol se oxida a sulfóxido, el cual sigue siendo biológicamente activo. Enseguida el sulfóxido se oxida a sulfona (Esquema 8). La primera oxidación, puede llevarse a cabo por la participación del citocromo P-450 o por la Flavin mono-oxigenasa (FMNO). La segunda oxidación de carácter irreversible, únicamente por el citocromo P-450.³¹ Al parecer el citocromo es muy eficiente en convertir la mayor parte del Albendazol en su sulfona correspondiente, con la pérdida de su eficiencia giardicida.



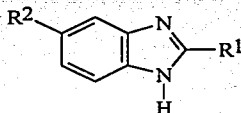
Esquema 8. Metabolismo del Albendazol

En este contexto, nuestro grupo de trabajo ha incursionado en la búsqueda de nuevos bencimidazoles con potencial actividad antiprotozoaria y específicamente giardicidas. En la

Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos *in vitro* contra *Giardia lamblia* para dos de estos compuestos, tomando como controles positivos al Albendazol y al Metronidazol.³²

De los esfuerzos realizados hasta ahora, se ha aprendido que para que un bencimidazol presente actividad contra *Giardia lamblia*, no requiere los clásicos requisitos estructurales establecidos para la actividad antihelmíntica de estos compuestos, tales como un sustituyente metoxicarbonilamino en posición 2 y un sustituyente propiltio o bencilo en la posición 5 (6). Por otro lado, aunque es importante la actividad giardicida intrínseca de la sustancia, es importante tomar en cuenta los factores adicionales que influyen en la eficiencia de su actividad terapéutica. Esto abre un margen de maniobra para iniciar la búsqueda de nuevos bencimidazoles con otro tipo de sustituyentes y evaluarlos como antiprotozoarios.

Tabla 5. Actividad giardicida de bencimidazoles clorados.



Compuesto	R ¹	R ²	CL ₅₀ , μM
5-Cloro-2-trifluorometil.-1 <i>H</i> -bencimidazol	CF ₃	Cl	1.282
5-Cloro-2-metoxicarbonilamino-1 <i>H</i> -bencimidazol	NHCOOCH ₃	Cl	0.066
Metronidazol			1.220
Albendazol	NHCOOCH ₃	C ₃ H ₇ S	0.037

2. Planteamiento del problema.

Para que un fármaco pueda producir sus efectos característicos debe alcanzar concentraciones adecuadas en los sitios donde actúa. Estas concentraciones, no sólo están en función de la dosis que se administre, también dependen de otros factores como son la absorción (cuando se administra por vía oral), distribución, biotransformación y excreción del compuesto administrado.

En el caso particular de *Giardia lamblia* es necesario recordar que se aloja principalmente en el duodeno y yeyuno del intestino delgado y permanece ahí gracias a que posee un disco sucturio que le permite adherirse fuertemente a estos sitios. Por lo que el tiempo de exposición a los compuestos químicos en esta porción del tracto gastrointestinal es de 2-3 h.

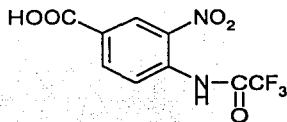
Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, nos enfrentamos al problema de tener que diseñar moléculas que: puedan permanecer principalmente en duodeno y yeyuno durante un tiempo de exposición suficiente para matar al parásito, no ser metabolizadas por el P. 450 y tener características de liposolubilidad/solubilidad para ser absorbidas por la membrana celular del protozoario.

¿Es posible incluir estos elementos para preparar compuestos del grupo de los bencimidazoles con perspectivas de ser utilizados como agentes giardicidas?

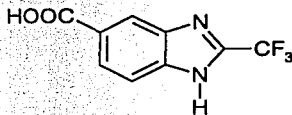
3. Objetivos.

El presente trabajo tiene como propósito

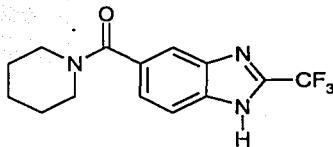
1.- Sintetizar los siguientes compuestos:



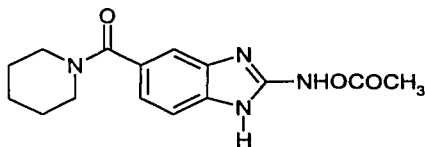
Acido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico (4)



5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (6)



5-(Piperidinilcarbonyl)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (7)

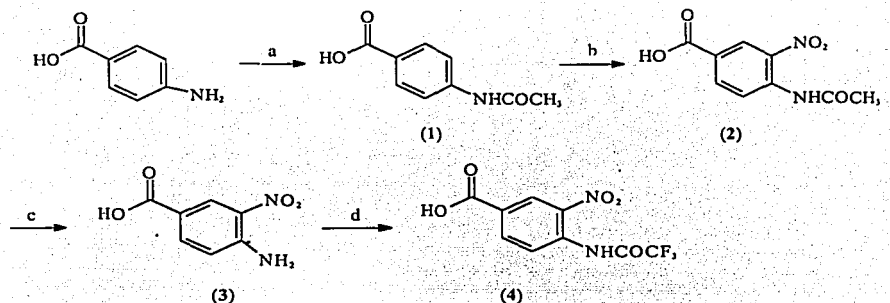


2-(Metoxicarbonyl)-5-piperidinilcarbonyl-1H-bencimidazol (9)

2. Aislar y purificar cada producto obtenido, así como los intermediarios que les dieron origen.
3. Identificar cada uno de los compuestos sintetizados, por métodos espectroscópicos (IR, masas, ^1H RMN) y determinar sus propiedades físicas como punto de fusión y R_f .
4. Registrar la actividad giardicida *in vitro* de los compuestos sintetizados

4. Metodología

En el presente capítulo se presentan en forma de esquemas las diversas rutas de preparación de los compuestos propuestos en los objetivos, así como una breve descripción de las mismas. Los detalles experimentales se describen más adelante en el apartado de procedimientos experimentales.



(a) $(\text{COCH}_3)_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$; (b) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, $0-10^\circ\text{C}$; (c) H_2SO_4 , 70°C ; (d) $(\text{COCH}_3)_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$

Esquema 9. Preparación del compuesto 4

Ácido 4-acetamidobenzóico (1)³³

Se utilizó ácido 4-aminobenzoico (Merck) como materia prima la cual se acetiló en el grupo amino mediante la adición de acetato de etilo (Baker) y anhídrido acético (Baker). La mezcla de reacción se colocó en reflujo en acetato de etilo y se separó por filtración. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 93% y p.f. $259.1-260.5^\circ\text{C}$.

Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (2)³³

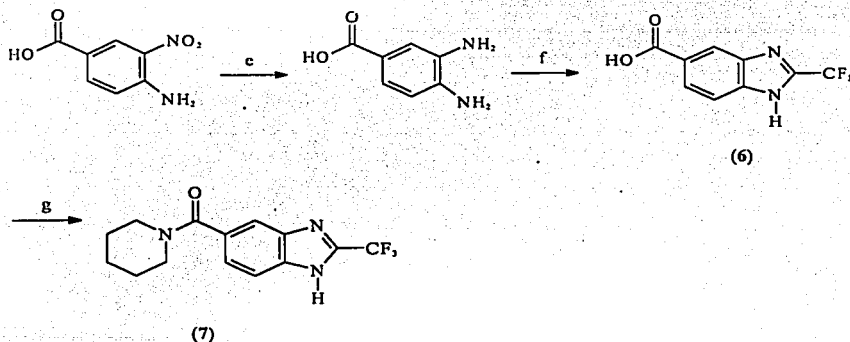
El compuesto (1) se nitró utilizando una mezcla sulfonítrica, manteniendo la temperatura menor a los 10°C. Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento del 95% y p.f. 210.4-211.9°C.

Ácido 4-amino-3-nitrobenzoico (3)³³

El compuesto (2) se hidrolizó, a una temperatura de 70°C y con catalisis ácida, utilizando H₂SO₄ (Baker). Se obtuvo un sólido amarillo, el cual se recrystalizó de acetonitrilo (Merck) con un rendimiento del 85% y p.f. de 284.0-285.4°C.

Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico (4)

El compuesto (3) se trifluoroacetiló en el grupo amino mediante la adición de anhídrido trifluoroacético (Baker). El compuesto obtenido se recrystalizó de CHCl₃ (Baker). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento del 70% y p.f. 173.5-175.2°C.



(e) H₂, C-Pd (5%); (f) HOOC-CF₃/HCl 6N, reflujo; (g) carbinildiimidazol/piperidina

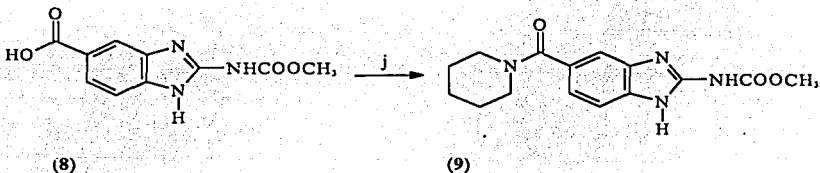
Esquema 10. Preparación del compuesto 6 y 7.

5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (6)

El compuesto (5) se sometió a condiciones fuertemente ácidas (HCl y ácido trifluoroacético)³⁴ para dar lugar a la formación del bencimidazol correspondiente una vez que se cicló. Se obtuvo un sólido blanco, con un rendimiento del 82% y p.f. 245.3-247.6°C

5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (7)

El compuesto (6) se hizo reaccionar con carbonildiimidazol y piperidina bajo condiciones anhidras³⁵ para formar la carboxamida correspondiente. Se obtuvo un sólido cristalino de p.f. 110-112°C



(j) carbonildiimidazol/piperidina

Esquema 11. Preparación del compuesto 11

2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (9)

El compuesto (8) sintetizado previamente en nuestro laboratorio³⁶ se hizo reaccionar con el carbonildiimidazol y piperidina bajo condiciones anhidras³⁵ para formar la carboxamida correspondiente. Se obtuvo un sólido cristalino de p.f. 297.2°C.

5. Resultados.

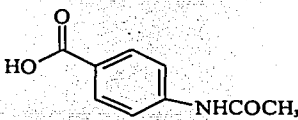
Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por determinación de algunas de sus propiedades físicas, así como también por sus espectros de IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN y masas. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Propiedades físicas de los compuestos sintetizados.

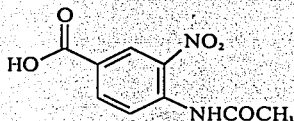
Comp.	R_f	Fase	p.f.	Descripción
1	0.34	I	259-260 °C	Polvo blanco fino
2	0.75	I	210-211 °C	Polvo fino color amarillo
3	0.75	I	284-285 °C	Polvo fino color crema
4	0.41	II	173-175 °C	Polvo fino color blanco
5	0.20	I	215-218 °C	Polvo fino color café
6	0.33	II	245-247.6 °C	Polvo fino color crema
7	0.38	II	110-112° C	Cristales blancos
9	0.72	I	296-297 °C	Polvo fino color crema

I: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15; II: $\text{CHCl}_3/\text{éter de petróleo}/\text{Ac. Acético}$ 10:6:15:0.6

Tabla 7. Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados.

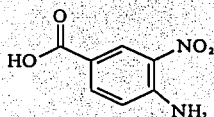
Comp.	Datos espectroscópicos
<p>Ácido 4-acetamidobenzoico (1)</p> 	<p>IR (KBr) ν 3459, (NH); 2822, 2550 (OH); 1665, (C=O); 1599, (Ar-COOH); 868, 855, 768 (Aromático) cm^{-1}</p> <p>M (IE) m/z 137 (M^+, 5%); 137 (100%); tr = 3.61 min</p>

Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico (2)



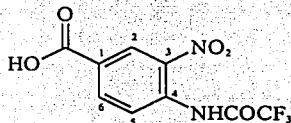
IR (KBr) ν 3324 (NH); 2914 (OH); 1716 (C=O); 1514, 1338, (ArNHCO); 1251 (NO₂); 857, 757, 696 (Aromático) cm⁻¹
 M (IE) m/z 224 (12%); 182 (100%); τ = 0.66 min.

Ácido 4-amino-3-nitrobenzoico (3)



IR (KBr) ν 3478, 3368 (NH); 2806, 2539 (OH); 1627 (C=O); 1253 (NO₂); 918, 830, 762 (Aromático) cm⁻¹
 M (IE) m/z 183 (M⁺, 10%); 182 (100%); τ = 3 min.

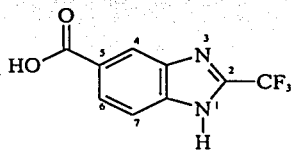
Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico (4)



IR (KBr) ν 3287 (NH); 3093, 2537 (OH); 1742 (C=O); 1701 (CONHX); 1272 (NO₂); 1143 (CF₃); 923, 856, 758 (Aromático) cm⁻¹

M (IE) m/z 278 (M⁺, 40%); 232 (100%); τ = 3.75 min.

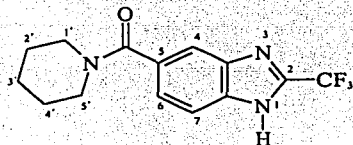
RMN ¹H (DMSO-*d*₆), δ 2.5 (s, 1H,); 7.8 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5); 8.3 (dd, J = 8.7, J = 2.0 Hz, 1H, H-6); 8.4 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-2) 12.0 (s, 1H, NH); 13.0 (s, 1H, OH); ppm.

5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 *H*-bencimidazol (6)

IR (KBr) ν 3584, (NH); 3088 (OH); 1686 (C=O); 1324 (Ar-NH-R); 1158 (CF₃) cm⁻¹

M (IE) m/z 231 (M⁺, 15%); 230 (100%); τ = 2.12 min

RMN ¹H (DMSO-*d*₆), δ 2.5 (s, 1H,); 3.7 (s, 1H, OH); 7.7 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7); 7.9 (dd, J = 8.7, J = 1.5 Hz, 1H, H-6); 8.3 (s, 1H, H-4) ppm.

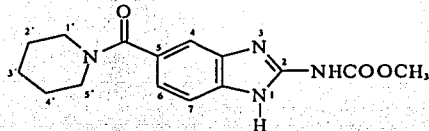
5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (7)

IR (KBr) ν 2941 (NH); 2857, 2712 (OH); 1603 (C=O); 1318 (Ar-NH-R); 1318, 1162, 1136 (CF₃) cm⁻¹

M (IE) m/z 297 (M⁺, 50%); 296 (100%); t_r = 7.17 min.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆), δ 1.5 (s, 4H, H-3', H-5'); 1.6 (s, 2H, H-4'), 3.3 (s, 2H, H-6'); 3.6 (s, 2H, H-2'); 7.4 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7); 7.7 (s, 1H, H-4); 7.8 (dd, J = 8.1 Hz, 1H, H-6); 14.2 (NH) ppm.

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆), δ 24.0, 25.6, 42.5, 48.2, 113.5, 132.5, 140.5, 142.0, 168.8 ppm.

2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (9)

IR (KBr) ν 3339 (NH); 2932, 2849 (OH); 1734 (COO); 1627, 1596 (C=O); 1423 (CH₃); 1237, 1259 (Ar-NH-R); cm⁻¹

M (IE) m/z 301 (M⁺, 50%); 269 (100%); t_r = 7.17 min.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆), δ 1.4 (s, 2H, H-4'); 1.6 (s, 4H, H-3', H-5'); 2.4 (s, 2H, H-6'); 2.5 (s, 3H, CH₃); 3.3 (s, 1H, NHCOO); 3.7 (s, 2H, H-2'); 7.0 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7); 7.4 (s, 1H, H-4); 11.67 (NH) ppm.

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆), δ 24.1, 25.7, 52.5, 112.4, 113.4, 120.1, 128.0, 148.3, 154.7, 169.8, ppm.

t_r : tiempo de retención en el cromatograma de gases.

Los resultados de la prueba de actividad *in vitro* contra los trofozoitos de *Giardia lamblia* de los compuestos 4, 6, 7, 8 y 9 utilizando Albendazol y Metronidazol como controles positivos se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 8. Actividad de 4,6,7,8 y 9 contra trofozoitos de *G. lamblia*

Comp..	CL ₅₀ (μM)	CL ₉₀ (μM)	CL ₉₀ /CL ₅₀
4	1.546	63.32	40.9
6	0.656	21.40	32.6
7	5.983	571.62	95.5
8	0.034	0.714	21.0
9	2.497	37.663	15.0
Albendazol	0.037	0.075	2.02
Metronidazol	1.220	7.47	6.12

CL₅₀: concentración letal media; CL₉₀: concentración letal párale 90% de la población.

6. Discusión.

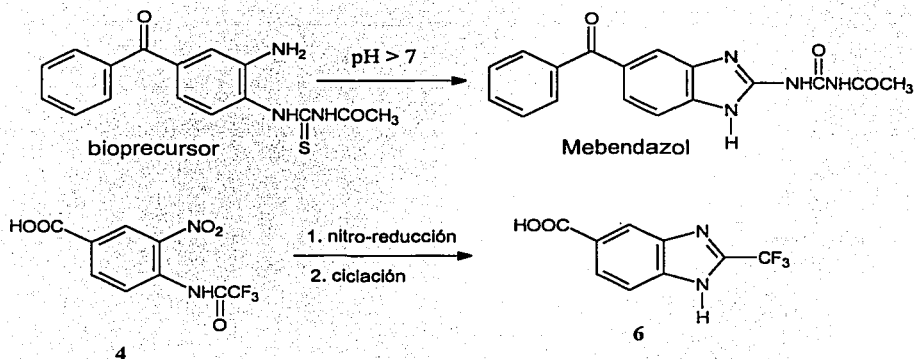
6.1. Consideraciones para el diseño.

Con la intención de adquirir mayor conocimiento sobre los efectos de las modificaciones estructurales en la actividad giardicida, se decidió preparar una serie de moléculas bencimidazólicas que:

1. Conservaran todas el átomo de hidrógeno en la posición 1, para tener un punto de comparación con respecto a los compuestos que se muestran en la Tabla 4.
2. Tuvieran sustituyentes carbamato de metilo y trifluorometilo en 2, pero modificando la posición 5(6) por un grupo carboxilo, con el propósito de contar con moléculas más solubles, resistentes a ser metabolizadas y susceptibles de poder adicionárseles alguna otra porción estructural que mejorase su actividad y /o eficiencia contra *Giardia lamblia*.

Aquí cabe mencionar que la porción estructural adicionada fue la piperidina, debido ya que se tienen reportes de carboxamidas alifáticas y aromáticas que presentaron actividad antiprotozoaria *in vitro*.³⁷ Las carboxamidas sintetizadas por su peso molecular y resistencia a ser hidrolizadas en el plasma podrían ser acarreadas por la circulación enterohepática, lo que daría una ventaja por el hecho de mantener altas concentraciones de estos compuestos en el lumen intestinal.

Por otro lado, con base en resultados previos de bioprecusores de bencimidazol-2-carbamatos de metilo que a pH básico dan lugar a su formación (Esquema 12),³⁸ se decidió preparar el bioprecursor 4 del compuesto 6 con intención de generarlo por la actividad de las enzimas nitro-reductasas que *Giardia* posee.



Esquema 12. propuesta de bioconversión de 4 en 6.

6.2. Parte Química.

La ruta sintética que se siguió partió del ácido 4-aminobenzoico, el cual se acetiló en el grupo amino mediante la adición de anhídrido acético, utilizándose como medio de reacción acetato de etilo; así se obtuvo el compuesto (1) con un rendimiento del 93%. El espectro de IR (KBr) mostró una banda intensa a 3305 cm^{-1} , característica del enlace NH; a 2822 y 2550 cm^{-1} aparecieron bandas características del enlace OH y a 1665 cm^{-1} apareció una banda característica del enlace C=O. Las señales a 868 y 855 cm^{-1} indican la sustitución en posición 4 del anillo aromático. En el espectro de masas, el ión molecular fue de m/z 180 y una abundancia relativa del 5%; el pico base apareció con m/z de 137 (100%) y equivale a la molécula cuando se rompe el enlace amida.

El compuesto (2) se obtuvo al nitrar (1). Ésto se logró utilizando una mezcla sulfonítrica que se fue adicionando lentamente cuidando siempre que la temperatura no rebasara los 10 °C pues se correría el riesgo de que la molécula se nitre más de una vez. El rendimiento de esta reacción fue del 95%. El espectro de IR (KBr) mostró una banda a 3324 cm^{-1} característica del enlace NH; a 3324 cm^{-1} apareció una banda ancha característica del enlace OH y a 1716 cm^{-1} presentó una banda característica del enlace C=O. Apareció además una señal en 1338 que corresponde al grupo ArNHCO y una señal intensa a 1251 cm^{-1} que corresponde al grupo NO₂. Las señales que aparecieron a 857, 757, 696 cm^{-1} corresponden al anillo de benceno que se encuentra trisustituido. En el espectro de masas, el ión molecular apareció con m/z de 180 y una abundancia relativa del 5%; el pico base apareció con m/z de 137 (100%) y equivale a la molécula cuando se rompe el enlace amida.

El compuesto (3) se obtuvo mediante la hidrólisis ácida del compuesto (2) utilizando H₂SO₄ como catalizador. Se calentó a una temperatura de 70°C durante 3 h y después se lavó con agua fría para precipitar y neutralizar al compuesto. El rendimiento de la reacción fue del 85%. El espectro de IR (KBr) mostró una banda a 3478 cm^{-1} característica del enlace NH; a 2839 y 2806 cm^{-1} aparecieron como bandas anchas características del enlace OH y a 1627 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al enlace C=O; a 1253 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al grupo NO₂. Las señales que aparecieron a 918, 830, 762 cm^{-1} corresponden al anillo de benceno que se encuentra trisustituido. En el espectro de masas, el ión molecular apareció con m/z de 182 y correspondió al pico base del mismo (100%), con m/z 183, y una abundancia relativa del 10%, apareció el ión [M⁺, +1]

El compuesto (4) se obtuvo mediante la trifluoroacetilación del grupo amino. Para la obtención de este compuesto se utiliza anhídrido trifluoroacético en acetato de etilo como medio de reacción. Dado que también se forma ácido acético, es necesario llevar la mezcla a pH no mayor a 6 antes de extraer, de lo contrario el ión carboxilato del compuesto se solubiliza en agua y el rendimiento disminuye considerablemente. Finalmente, se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento del 70%. El espectro de IR (KBr) mostró una banda a 3287 cm^{-1} característica del enlace NH, a 3093 y 2537 cm^{-1} aparecieron dos bandas anchas características del enlace OH y a 1742 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde el enlace C=O, a 1272 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al grupo NO_2 . A 1143 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al CF_3 y las señales que aparecieron a 918 , 830 , 762 cm^{-1} corresponden al anillo de benceno que se encuentra trisustituido. En el espectro de masas, el ión molecular apareció con m/z de 278 y una abundancia relativa del 40%; el pico base apareció con m/z de 232 (100%) y equivale a la molécula cuando se rompe el enlace del grupo nitro. El espectro de ^1H RMN mostró a 7.8 ppm una señal doble que integró para el H-5; a 8.3 ppm se observó una señal doble de dobles con $J = 8.7$ y $J = 2.0$ Hz que integró para el H-6; a 8.4 ppm se observó una señal doble con $J = 1.8$ Hz que integró para dos átomos de hidrógenos.

El compuesto (6) se obtuvo a partir del ácido 3,4-diaminobenzóico. Esta reacción se llevó a cabo en un medio fuertemente ácido y con calentamiento para ser favorecida, ya que el mecanismo de la misma implica el ataque nucleofílico de uno de los grupos amino al carbonilo del ácido trifluoroacético. El rendimiento en este caso fue del 80%.

Aquí cabe mencionar que también se exploró una síntesis alternativa de este mismo compuesto mediante la utilización de ditionita de sodio en medio básico.³⁹ Para ello, se utilizó el compuesto (4) que se colocó en un matraz con agitación magnética y agua, al que además se fue adicionando NaHCO_3 para basificar el medio. La reacción ocurrió mediante la reducción del grupo nitro a amino pues la ditionita de sodio actuó como agente reductor para después dar lugar a la formación del anillo del imidazol mediante un ataque nucleofílico al carbonilo de la trifluoroacetamida. Desafortunadamente esta reacción tuvo un rendimiento muy bajo ya que se llevó a cabo en agua y la extracción del compuesto fue complicada.

El espectro de IR (KBr) mostró una banda a 3584 cm^{-1} característica del enlace NH, a 3088 apareció una banda característica del enlace OH y a 1686 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al enlace C=O, a 1324 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde a la amina del imidazol y a 1158 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al CF_3 . En el espectro de masas, el ión molecular apareció con m/z de 230 y correspondió al pico base del mismo (100%), con m/z 231 y una abundancia relativa del 15% apareció el ión $[\text{M}^+, +1]$. El espectro de ^1H RMN mostró: un singulete a 3.7 ppm que integró para el OH; un doblete a 7.7 ppm ($J = 8.4$ Hz) que integró para 1 H y se asignó al H-7; una señal doble de dobles con $J = 8.7$ y $J = 1.5$ Hz a 7.9 ppm que se asignó al H-6; y un singulete a 8.3 ppm que se asignó al H-4.

El compuesto (7) se obtuvo a partir de (6) mediante el uso de carbonildiimidazol como agente acoplante. Hasta antes de la adición de la piperidina, la reacción debió llevarse a cabo en condiciones anhidras, y siempre fue necesario utilizar alguna técnica de CCF o CC para separar el compuesto pues ni la extracción ni la recristalización fueron suficientes para purificarlo. El

espectro de IR (KBr) mostró una banda a 2941 cm^{-1} característica del enlace NH, a 2857 y 2712 aparecieron bandas característica del enlace OH y a 1603 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde el enlace C=O, a 1318 cm^{-1} apareció una señal que corresponde a la amina del imidazol y a 1136 cm^{-1} apareció una señal intensa que corresponde al CF_3 . En el espectro de masas, el ión molecular apareció con m/z de 296 y una abundancia relativa del 15%; el pico base apareció con m/z de 231 (100%) y equivale a la molécula cuando se rompe el enlace de la amida. La región alifática de espectro de ^1H RMN mostró un singulete a 1.5 ppm que integró para 4 protones que se asignaron a los H-3, H-5 de la piperidina; un singulete a 1.6 ppm que integró para 2 protones que se asignaron al H-4 de la piperidina; un singulete a 3.3 ppm que integró para 2 protones que se asignaron al H-6 de la piperidina y un singulete a 3.6 ppm que integró para 2 protones que se asignaron al H-2 de la piperidina. La región aromática mostró una señal doble de $J = 8.4\text{ Hz}$ a 7.4 ppm que integró para el H-7; un singulete a 7.7 ppm que integró para el H-4; una señal doble de dobles con $J = 8.1\text{ Hz}$ a 7.78 ppm que integró para 6 átomos de hidrógeno; y un singulete a 14.2 ppm que correspondió al hidrógeno unido al nitrógeno. El espectro de ^{13}C RMN mostró las siguientes señales: 24.0, 25.6, 39, 42.5, 48.2, 113.5, 132.5, 140.5-142.0 y 168.8 ppm que correspondieron respectivamente a los carbonos de las posiciones indicadas: C-4', C-3' y 5', C-2, C-6', C2', C-7', C-5', $-\text{CF}_3$, $-\text{C}=\text{O}$

Los espectros de HETCOR ayudaron a determinar y confirmar la estructura de este compuesto ya que mostraron las señales correspondientes a la amina aromática y al carbono adyacente al grupo trifluorometilo que como se observa, muestra multiplicidad en la región de 40 ppm. La presencia del anillo aromático también se confirmó en las señales que aparecieron en 120/7 ppm.

El compuesto (9) se obtuvo con un rendimiento del 50%. El espectro de IR (KBr) mostró una banda a 3339 cm^{-1} característica del enlace NH, a 2932 y 2849 aparecieron bandas característica del enlace OH, a 1627 y 1596 cm^{-1} aparecieron señales intensas que corresponden al enlace C=O, a 1423 apareció una señal intensa que corresponde al CH_3 y a 1259 cm^{-1} apareció una señal que corresponde a la amina del imidazol. El espectro de masas mostró un ión molecular con m/z 301 que corresponde al pico base del mismo (100%), con m/z 269 apareció la señal del $[\text{M}^+, +1]$ con una abundancia relativa del 15%. La región alifática de espectro de ^1H RMN mostró un singulete a 1.4 ppm que integró para 2 protones y se asignó al H-4 de la piperidina; un singulete a 1.6 ppm que integró para 4 protones y se asignaron a H-3, H-5 de la piperidina; un singulete a 2.4 ppm que integró para 2 protones que se asignaron al H-6 de la piperidina; un singulete a 2.5 ppm que integró para los 3 protones del CH_3 ; un singulete a 3.3 ppm que integró para 1H del NHCOO ; y un singulete a 3.7 ppm que integró para 2 protones que se asignaron al H-2 de la piperidina.

La región aromática mostró una señal doble $J = 8.4\text{ Hz}$ a 7.0 ppm que integró para el H-7; un singulete a 7.4 ppm que integró para 1H del H-4; y un singulete a 11.7 ppm que corresponde al enlace NH.

Los espectros de HETCOR ayudaron a determinar y confirmar la estructura de este compuesto ya que mostraron las siguientes señales: 120 / 7.7 ppm lo que confirmó la presencia del anillo aromático, 20 / 1.5 ppm lo que confirmó la presencia de la amina aromática y 50 / 3.7 ppm lo que confirmó la presencia del grupo carbamato.

6.3. Parte biológica.

En esta evaluación, los compuestos sintetizados se probaron a concentraciones de 0.005, 0.010, 0.050, 0.100, y 0.500 mg/mL y se determinó la CL₅₀ y CL₉₀ contra trofozoitos de *Giardia lamblia*.

Aunque todos los compuestos mostraron actividad contra *Giardia lamblia* ninguno de ellos superó la relación (CL₉₀/CL₅₀) a los controles positivos, el Albendazol y el Mebendazol. Los valores de CL₅₀ indican que 4 y 9 fueron menos activos que el Metronidazol y por lo tanto carentes de interés como principios activos contra este protozoario. Cabe recordar en este punto que el compuesto (4) fue pensado como bioprecursor potencial de 6, lo que en cierta manera presupone una pobre actividad intrínseca, se esperaría que biotransformara dentro del protozoario por la presencia de las enzimas nitro-reductasas. Aunque el valor obtenido de CL₅₀ y CL₉₀ podrían indicar que esto pudo suceder, el compuesto (4) no superó la actividad intrínseca mostrada por el compuesto (6). Esto lamentablemente descarta la posibilidad de seguirlo estudiando, ya que el único sitio de bioconversión de 4 para generar 6 en el huésped es el intestino grueso, sitio distante del duodeno y yeyuno.

Al parecer la presencia del grupo carbamato sigue siendo importante pues le confiere una mayor actividad intrínseca con relación al grupo trifluorometilo. Cabe aquí mencionar que la solubilidad de los carbamatos es menor que la de los compuestos trifluorometilados. La solubilidad en agua es importante en estos casos ya que es recomendable que contar con compuestos solubles en el lumen intestinal (duodeno y yeyuno) que en suspensión para tener una mejor eficiencia en la respuesta giardicida *in vivo*.

Por otro lado, la presencia de carboxamidas cíclicas en la posición 5(6), parece sólo ser importante si lo que se desea es que las moléculas tengan posibilidad de entrar a la circulación enterohepática, pues no parecen incrementar significativamente la actividad giardicida de los bencimidazoles precursores.

Conclusiones.

- Los compuestos Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamido benzoico (4) y 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (6) se obtuvieron con buenos rendimientos y la purificación, aislamiento y determinación de su estructura química, fueron importantes para poder continuar con la síntesis de los demás.
- La obtención y caracterización del compuesto 5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1*H* bencimidazol (6) permitió confirmar que la presencia del grupo carboxilo le confiere solubilidad en agua.
- Los compuestos 5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (7) y 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (9), se obtuvieron con bajo rendimientos debido a que las condiciones en que estas reacciones se llevan a cabo dificultan el aislamiento y la purificación de los mismos. Sin embargo, estas carboxamidas se sintetizaron con el propósito de obtener compuestos bencimidazólicos liposolubles y de mayor peso molecular, lo cual permitiría que entraran al ciclo enterohepático, para mantener una mayor concentración intestinal de los mismos.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas biológicas, el compuesto Ácido 3-Nitro-4-trifluoroacetamido benzóico (4) diseñado como un bioprecursor de 6, presentó actividad *in vitro* similar a la del Metronidazol, lo que de entrada plantea la disyuntiva de seguir la investigación para resolver la interrogante de que dicho comportamiento se debe a la generación de 6 dentro del protozario o a una actividad intrínseca de 4. Sin embargo los datos de CL₅₀ y CL₉₀ obtenidos no lo hacen atractivo para utilizarlo como estrategia para incrementar la

eficiencia del compuesto **6** cuando se lleve a cabo la evaluación *in vivo*, ya que el otro sitio de posible nitro-reducción es el intestino grueso sitio distante de la infección por *Giardia*.

- Los compuestos 5-Carboxi-2-(trifluorometilo)-1 *H* benzimidazol (**6**) y 2-Metoxicarbonilamino-5-carboxi-1 *H* benzimidazol (**8**), presentaron una actividad *in vitro* de aproximadamente 2 y 36 veces mayor que el Metronidazol respectivamente, además de una mayor solubilidad en agua gracias a la presencia del carboxilo en la posición 5 (**6**). En el caso del compuesto (**8**) se observó que la presencia del grupo carbamato de metilo en la posición 2, sigue siendo importante pues la actividad de dicho compuesto es aproximadamente 19 veces más grande que la del (**6**).
- Los compuestos 5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1 *H* benzimidazol (**7**) y 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonil)-1-*H* benzimidazol (**9**) presentaron respectivamente una actividad *in vitro* de aproximadamente 5 y 2 veces menor que el Metronidazol, por lo que difícilmente podrían competir con éste, sin embargo estos resultados ayudaron a confirmar la importancia que la presencia del grupo carbamato de metilo en la posición 2 del anillo de benzimidazol tiene, pues le confiere una mayor actividad giardicida.

A manera de recomendación se sugiere la evaluación *in vivo* contra *Giardia lamblia* de los compuestos **6** y **8** para comprobar si presentan algún cambio en los periodos de administración con relación a los 10 días utilizados para el Metronidazol y el Albendazol.

Bibliografía.

1. <http://www.who.int/infl/>
2. Thompson, R.C.A. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal Parasitology* **2000**, *30*, 1259-127.
3. Thompson, R.C.A.; Reynoldson, J.A.. *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology* **1993**, *32*, 72-133.
4. Thompson, R.C.A. Hopkins, R.M., Homan, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today* **2000**, *16* (5), 210-213.
5. Gardner, T.B.; Hill, D.R. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, *14* (1), 114-128.
6. Markell J.K. Markell and Voge's Medical Parasitology. Eighth Edition. W.B. Saunders Company. USA. p 57.
7. Das, S.; Schteingart, C.D.; Hofmann, A.F.; Reiner, D.S.; Aley, S.B. Gillin, F.D. *Giardia lamblia*: Evidence for carrier-mediated uptake and release of conjugate bile acids. *Experimental Parasitology* **1997**, *87*, 133-141.
8. Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, *14* (3), 447-475.
9. Korolkovas, A. Essentials of Medicinal Chemistry. Segunda Edición. John Wiley and Sons. E.U.A. 1988. pp. 657-658, 675-676.
10. Rosentein, S.E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. **1995**. Edición 41, Ediciones PLM. E.U.A. pp 832-833, 868-869.
11. Zinder, R.D.; Green, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research* **2000**, *488*, 151-169.

12. Brown, D.M.; Upcroft, J.A.; Edwards, M.R.; Upcroft, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *International Journal Parasitology* **1998**, *28*, 149-164.
13. Jonson, P.J. Metronidazole and drug resistance. *Parasitology Today* **1993**, *9* (5), 183-186.
14. Upcroft, J. A.; Upcroft, P. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitology Today* **1993**, *9* (5), 187-189.
15. Liu, S.M.; Brown, D.M.; O'Donoghue, P.; Upcroft, P. Upcroft, J.A. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Molecular Biochemical Parasitology* **2000**, *108*, 137-140.
16. Sousa, M.C.; Pojares-da-Silva, J. Cytotoxicity induced by bismuth subcitrate in *Giardia lamblia* trophozoites. *Toxicology in Vitro* **1999**, *13*, 591-598.
17. McAllister, T.A.; Annett, C.B.; Cockwill, C.L.; Olson, M.E.; Wang, Y.; Cheeke, P.R. Studies on the use of *Yuca schidigera* to control giardiasis. *Veterinary Parasitology* **2001**, *97*, 85-99.
18. Campanati, L.; Gadelha, R.P.; Monteiro-Leal, L.H. Electron and video-light microscopy analysis of the *in vitro* effects of pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* **2001**, *97*, 9-14.
19. Walker, J.; Barret, J. Parasite sulphur amino acid metabolism. *International Journal Parasitology* **1997**, *27* (8), 883-897.
20. Katritzky, A.R.; Rachwal, S.; Ollman, R. New route to selectively methylated benzimidazole. *Journal Heterocycle Chemistry* **1994**, *31*, 775-779.
21. Singh, S.K.; Sharma, S. Current status of medicinal research in helminth disease. *Medicinal Research Review* **1991**, *11*, 581-615.

22. Sharma, S. Drugs filariasis: four decades of research. *Advances in Drug research* 1993, 24, 215-217.
23. Sharma S.. Design of new drugs for helminths diseases: Lead optimization. *Advances in Drug Research* 1994, 25, 104-163.
24. Lacey, E.; Watson T.R.; Structure-Activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin., in vitro. *Biochemical Pharmacology* 1985, 34, 1073-1077.
25. Upcroft, J.A.; Upcroft, P. Further therapeutic alternatives for combating anaerobic protozoa. *Parasitology Today* 1998 14 (6), 212-214.
26. Pungpak, S.; Singhasivanon, V. Bunnag, D.; Radomyos, B.; Nibaddasopon, P; Harinasuta, K.T. Albendazole as a treatment for Giardia infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1996, 90, 563-565.
27. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal Medical Microbiology* 1992, 37, 221-224.
28. Balimane, P.V., Saeho, Ch.; Morrison, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000, 44, 301-312.
29. Bozler, G.; Schmid, J.; Principles of Pharmacokinetics and drug metabolism . En *Modern Drug Research. Path to better and Safe drugs*. Editado por Connolly Martin. Medicinal Research Series. Marcel Dekker, Inc. USA. 1989, Vol.12. pp. 77-79.
30. Justel, A.; Alvarez, A.I.; Alonso, M.L.; del-Estal, J.L.; Villaverde, C.; Barrio, J.P.; Prieto, J.G. Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole . *Drug Alcohol Dependence* 1994, 36, 49-55.

31. Rawden H.C.; Kokwaro ,G.O.; Ward, S.A.; Edwards,G. Relative contribution of cytochrome P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal Clinical Pharmacology* 2000, 49, 313-322.
32. Navarrete-Vazquez, G. Cedillo, R.; Hernández, C.A.; Yopez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales,R. Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. *Biorganic Medicinal Chemistry Letters* 2001, 11, 187-190.
33. Garrido-Hernández, H. Síntesis de bioprecursosres potenciales del 5-carboxi-1H-benzimidazol-2-carbamato de metilo. Tesis. Facultad de Química, UNAM, 1997. pp 70-73.
34. Bishop,B.C.; Jones, A.S.; Tatlow, J.C. The synthesis of some perfluoroalkylbenzimidazoles. *Journal Chemical Society* 1964, 3076-3080.
35. Ohta, S.; Shimabayashi, A.; Aono, M.; Okamoto, M. A general convenient one-pot procedure for the conversion of carboxylic acids into their t-Butil ester, which is also applicable to aliphatic carboxylic acids. *Synthesis* 1982, 10, 833-834.
36. Alcantara, P.E. Síntesis de un compuesto filaricida del tipo bencimidazol-2-carbamato de metilo, un profármaco del mismo y la determinación de sus propiedades fisicoquímicas de interés farmacéutico. Tesis. Facultad de Química, UNAM. 1996.
37. Ram, S.; Wise, D.S.; Wotring, L.L.; McCall, J.W.; Townsed, L.B. Synthesis and biological activity of certain alkyl 5-(alkoxycarbonyl)-1H-benzimidazole-2-carbamate and related derivatives: A new class of potential antineoplastic and antifilarial agents. *Journal Medicinal Chemistry* 1992, 35, 539-547.
38. Dawson, M.; Watson, T.R. 4-Amino-3-(3'-methoxycarbonyl-2'-thioureido)benzophenone a prodrug of mebendazole. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1983, 8, 329-334.

Apéndice A. Parte experimental.

Instrumentación

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi modelo B-540, utilizándose capilares de vidrio.

Para concentrar las soluciones se empleó un rotavaporador marca Büchi R-114 con vacío generado por una bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F ajustada a 30 mm de Hg .

Para realizar la hidrogenación catalítica se utilizó un hidrogenador marca Parr modelo 391 EG con cargas de 60 lb/pg², utilizando hidrógeno en tanque marca Linde y como catalizador carbono (Aldrich) sobre Pd al 5%.

Cromatografía en capa fina.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F-254 con indicador fluorescente. Los compuestos orgánicos se revelaron con luz UV y/o con yodo.

Cromatografía en columna.

Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice 60 Merck con un tamaño de partícula 0.063-0.200 mm y malla ASTM 70-230.

Ácido 4-acetamidobenzóico (1).

Una solución agitada en condiciones anhidras de 15 g (0.109 moles) de ácido 4-aminobenzóico en 100 mL de acetato de etilo se colocó en un baño de hielo y se le adicionaron lentamente 15 mL

(0.159) moles de anhídrido acético. La mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente observándose la formación de un sólido blanco espeso con $R_f = 0.34$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15), el cual se colocó en reflujo de acetato de etilo durante 5 h. Dicho sólido se separó por filtración al vacío, secó durante toda la noche y finalmente se obtuvo un polvo blanco, muy fino, de p.f.: 259.1-260.5°C y con un rendimiento del 93%.

Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzónico (2).

Un vaso de precipitados de 500 mL provisto de termómetro y agitación magnética fue colocado en un baño de hielo seco-etanol y se le adicionaron 9 mL (0.162 moles) H_2SO_4 una vez que el ácido alcanzó una temperatura de -5°C , se adicionaron lentamente y con agitación 5 g (0.028 moles) de ácido 4-acetamidobenzónico (1) cuidando que la temperatura no sobrepasara lo 5°C . Por otro lado, se pusieron a enfriar, por separado, dos vasos de precipitados que contenían 3 mL (0.054 moles) de H_2SO_4 y 3 mL (0.050 moles) de HNO_3 respectivamente. Una vez que ambos alcanzaron una temperatura a 0°C se mezclaron lentamente para obtener la mezcla sulfonítrica la cual gota a gota y con ayuda de un embudo de adición de 10 mL se fue adicionando a la mezcla de reacción que se dejó en agitación durante 5 h más. En todo ese tiempo la temperatura nunca exedió los 10°C .

Posteriormente se adicionó hielo picado a la mezcla con lo que precipitó un compuesto amarillo con $R_f = 0.75$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15) que se separó por filtración al vacío, lavó con agua y secó durante 48 horas.

Finalmente se obtuvo un polvo amarillo de aspecto fino y p.f.: 210.4-211.9 °C con un rendimiento del 95%.

Ácido 4-amino-3-nitrobenzónico (3).

Una solución agitada de 4 g (0.018 moles) de ácido 4-acetamido-3-nitrobenzónico (2) en 10 mL de H₂SO₄ se calentó en un baño de aceite durante 4 h y dejó enfriar para después adicionar un poco de hielo picado con lo que precipitó un compuesto amarillo de $R_f = 0.75$ (CHCl₃/MeOH 85:15) que se separó por filtración al vacío, lavó con agua y secó durante 48 h a temperatura ambiente.

Finalmente se obtuvo un polvo amarillo de aspecto fino y p.f.: 284.0-285.4°C con un rendimiento del 85%.

Ácido 3-nitro4-trifluoroacetamidobenzónico (4).

A una solución agitada de 3 g (0.017 moles) de ácido 4-amino-3-nitrobenzónico (3) en 60 mL de acetato de etilo se le adicionaron lentamente 6 mL (0.014 moles) de anhídrido trifluoroacético disuelto en 30 mL de acetato d etilo.

La reacción se dejó en agitación durante 5 h y después se realizaron lavados con agua (3x75 mL), colectando la fase orgánica y lavándola con 50 mL de una solución de Na₂CO₃ al 5 %. Terminado este procedimiento, dicha fase se secó con Na₂SO₄ anhidro y concentró a sequedad en el rotavaporador para obtener un sólido amarillo de aspecto muy fino con $R_f = 0.41$ (CHCl₃/acetona/éter de petróleo/Ác. acético 10:6:15:0.6) y rendimiento del 70%.

El producto crudo se recrystalizó de CHCl₃ y los cristales formados se separaron por filtración al vacío y secaron resultando de un aspecto muy fino, amarillos y p.f.: 173.5-175.2 °C.

5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 H bencimidazol (6).

A una solución agitada con reflujo de 3 g (0.020 moles) de ácido 3,4-diaminobenzóico (5) en 20 mL de HCl 6N diluido en igual proporción con agua, se le adicionaron 2.5 mL (0.028 moles) de ácido

trifluoroacético. Después de 5 h de calentamiento, se observó la formación de un sólido grisáceo que se separó por filtración al vacío en matraz de vidrio poroso. Para su mayor purificación se disolvieron en una suspensión de carbón activado al 30%. Después de separar el carbono por filtración, la solución se concentró a sequedad en el rotavapor. El sólido se secó durante 24 h a temperatura ambiente.

Finalmente se obtuvo un sólido muy fino color crema cuya CCF mostró un $R_f = 0.33$ ($\text{CHCl}_3/\text{acetona}/\text{éter de petróleo}/\text{Ác. acético } 10:6:15:0.6$) con un rendimiento del 82% que se recrystalizó de benceno/MeOH formándose cristales muy finos, color blanco de p.f.: 245.3-247.6 °C

5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1 H bencimidazol (7).

A una solución agitada, con reflujo y bajo condiciones anhidras de 2 g (0.008 moles) del 5-carboxi-2-trifluorometil-1 H bencimidazol (6) se le adicionaron 2.1 g (0.013 moles) de carbonildiimidazol. Después de 6 h, se adicionaron 0.86 mL (0.009 moles) de piperidina y dejó en agitación durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados con agua (3x50 mL) y la fase orgánica se colectó, seco con Na_2SO_4 anhidro y concentró a sequedad en el rotavapor para obtener un semisólido café que resultó ser por CCF una mezcla de varios compuestos. La mancha principal con $R_f = 0.38$ se separó de las demás por cromatografía en columna obteniéndose un sólido de aspecto cristalino, color rosa muy tenue con p.f.: 110-112 °C

2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonil)-1 H-bencimidazol (9).

A una solución agitada con calentamiento en baño de aceite en condiciones anhidras de 1.5 g (0.006 moles) del 5-carboxi-1H-bencimidazol-2-carbamato de metilo, se le adicionaron 1.6 g (0.010 moles)

de carbonildiimidazol en 30 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 8 h se suspendió el calentamiento y dejó en agitación durante toda la noche. Se adicionaron entonces 0.76 mL (0.008 moles) de piperidina y 24 h después se adicionaron 100 mL de solución Brine con lo que se observó la precipitación de un sólido café que se extrajo con CHCl_3 (3x50 mL). La fase orgánica se colectó, secó con Na_2SO_4 anhidro y concentró a sequedad en el rotavapor, obteniéndose un líquido café (restos DMSO) que por CCF resultó ser una mezcla de varios compuestos. La mancha principal con $R_f = 0.72$ se separó de las demás recristalizando de tolueno/hexano (3:1) y los cristales obtenidos se separaron por filtración al vacío en matraz de vidrio poroso. Para su mayor purificación se disolvieron en una suspensión de carbón activado al 30%. Después de separar el carbono por filtración, la solución se concentró a sequedad en el rotavapor. El sólido obtenido se secó durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se obtuvo un sólido color crema, de aspecto muy fino con p.f.: 297.15 °C

Evaluación *in vitro* de la actividad de los compuestos 4, 6, 7, 8 y 9 contra *G. lamblia*.

Se empleó el método de subcultivo previamente estandarizado. Se incubaron 5×10^4 trofozoitos/mL de *Giardia lamblia* por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500 ng/mL de los diferentes compuestos, además del albendazol y el metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoitos en medio libre de fármacos. Además se tomaron 50 μL de los trofozoitos tratados y se cultivaron en medio fresco, ya sin los compuestos, y se incubaron por otras 48 h.

El número final de trofozoitos, se determinó en una cámara cuentaglobos. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit, se calculó la CL_{50} y la CL_{90} . Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron en dos ocasiones.

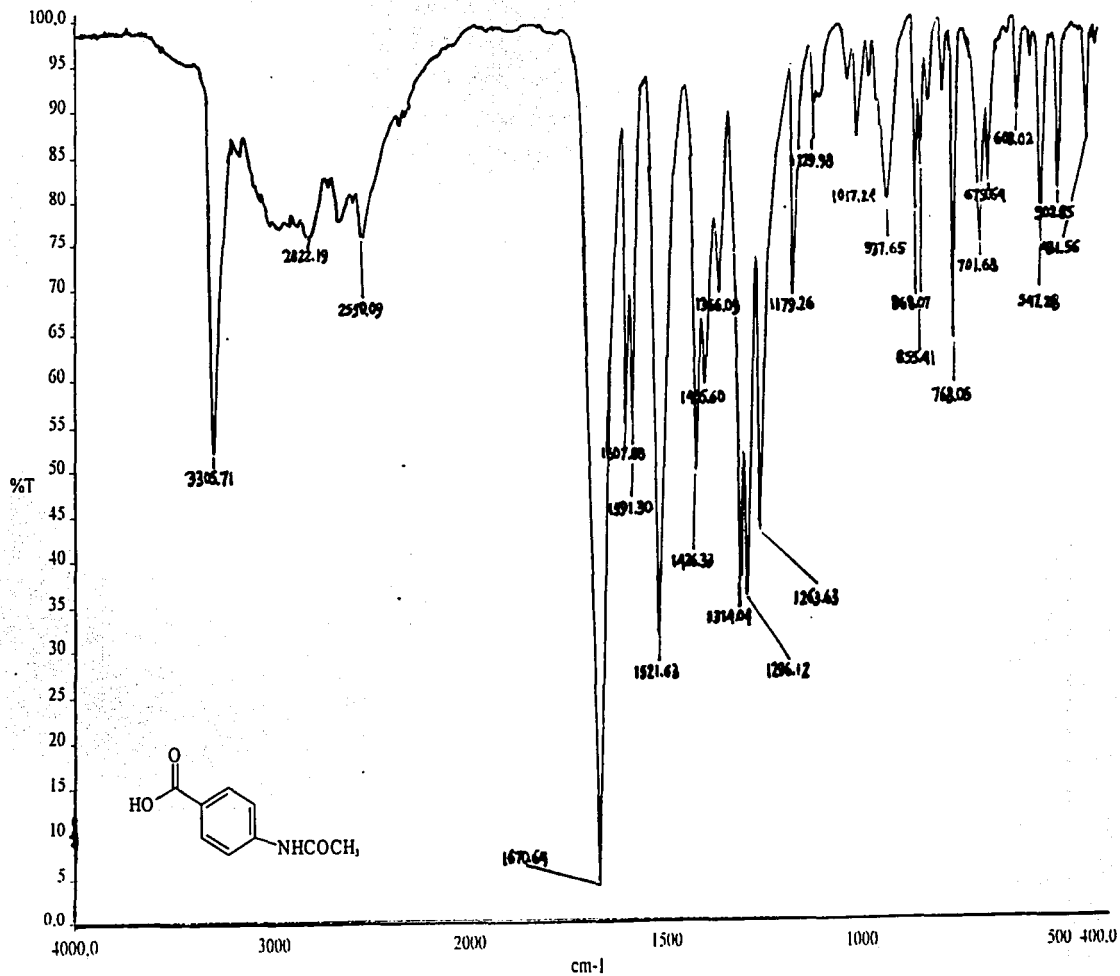
Apéndice B. Espectros

Instrumentación.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, modelo 1605, marca Perkin Elmer, en pastilla de bromuro de potasio y las señales se dan en cm^{-1} .

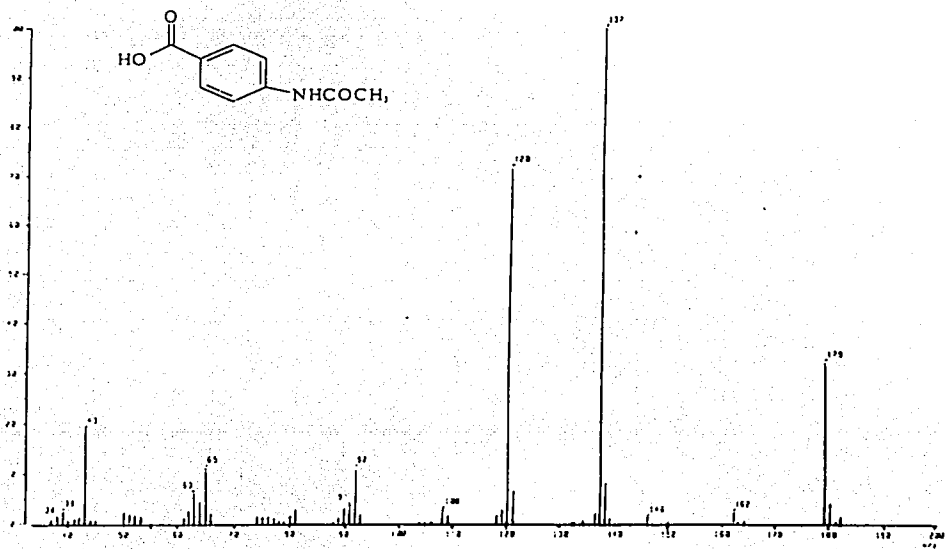
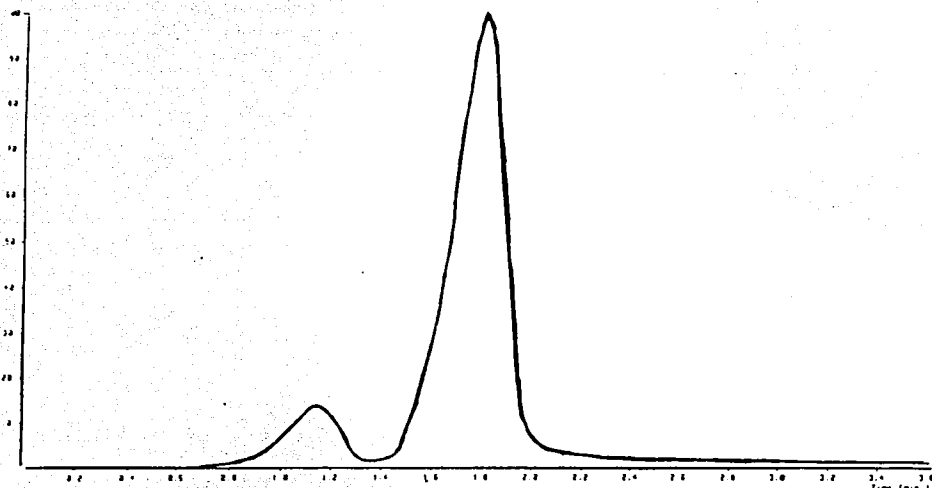
Los espectros de resonancia magnética protónica (^1H RMN) se determinaron en un equipo marca Varian a 300 MHz, utilizando dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm.

Los espectros de masas se determinaron por introducción directa de la muestra (ID) o por introducción con cromatografía de gases, con impacto electrónico (IE) en un aparato marca Jeol, modelo JMS-SX102A.

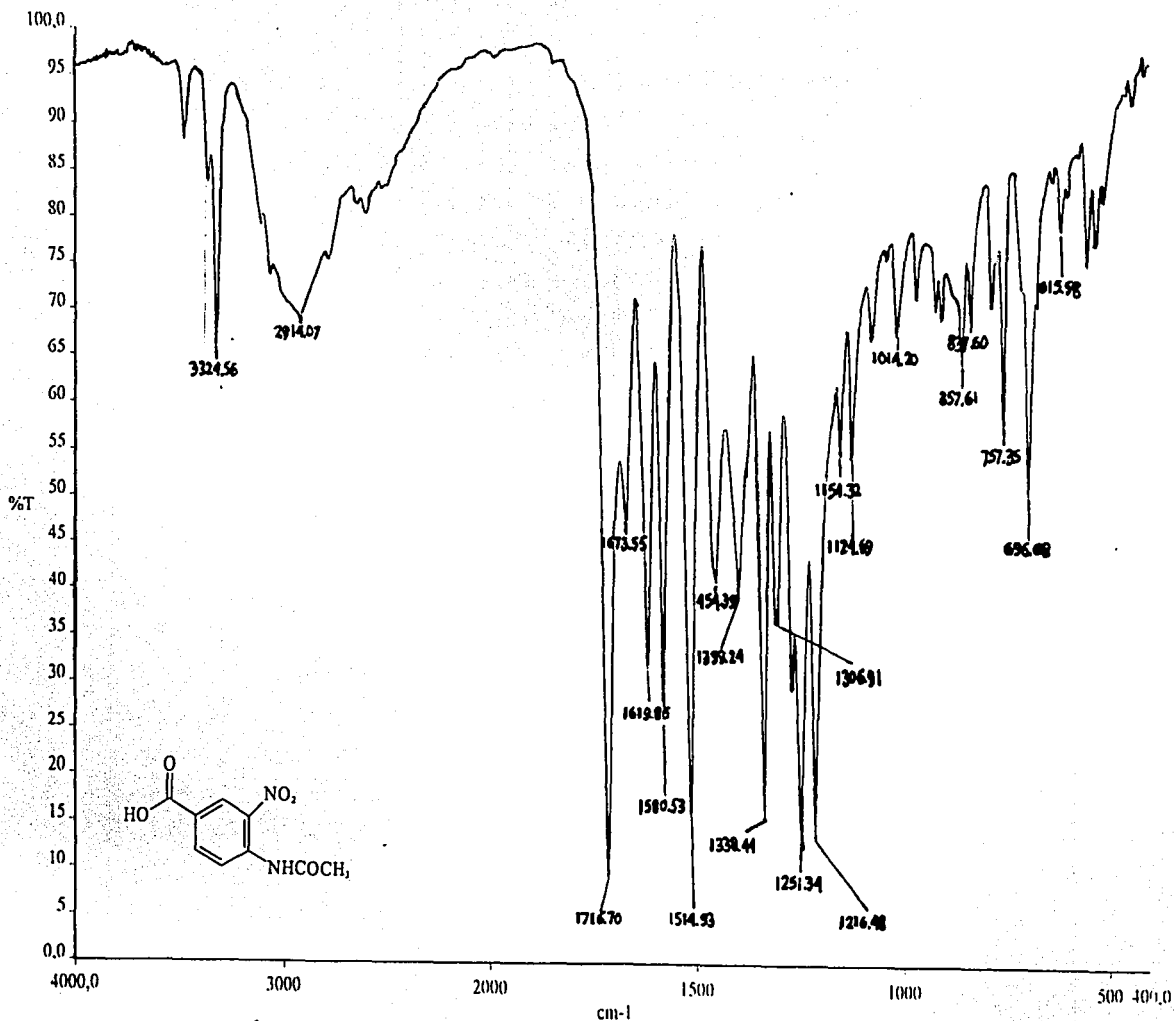


Espectro de IR del Ácido 4-acetamidobenzoico

Espectro de Gases-Masas del Ácido 4-acetamidobenzoico

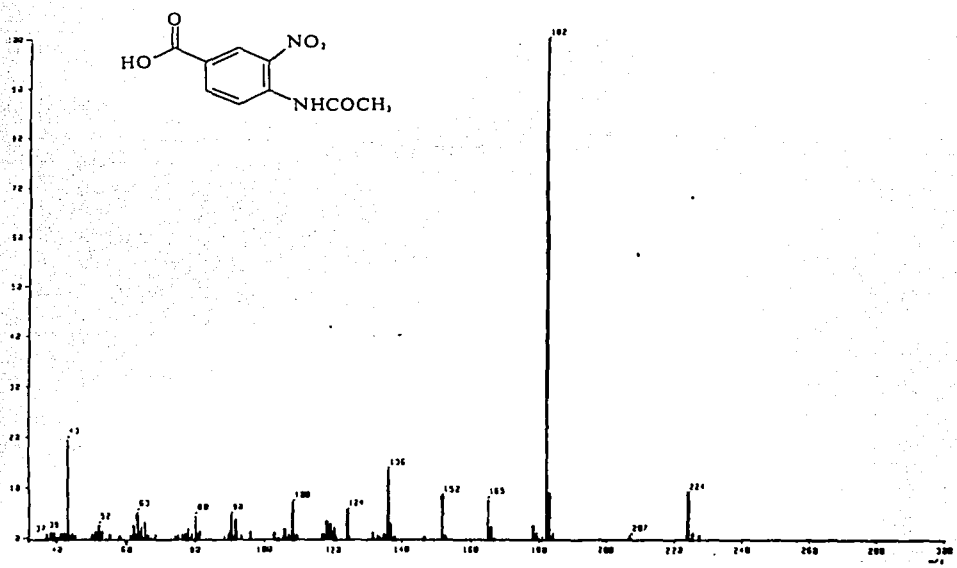
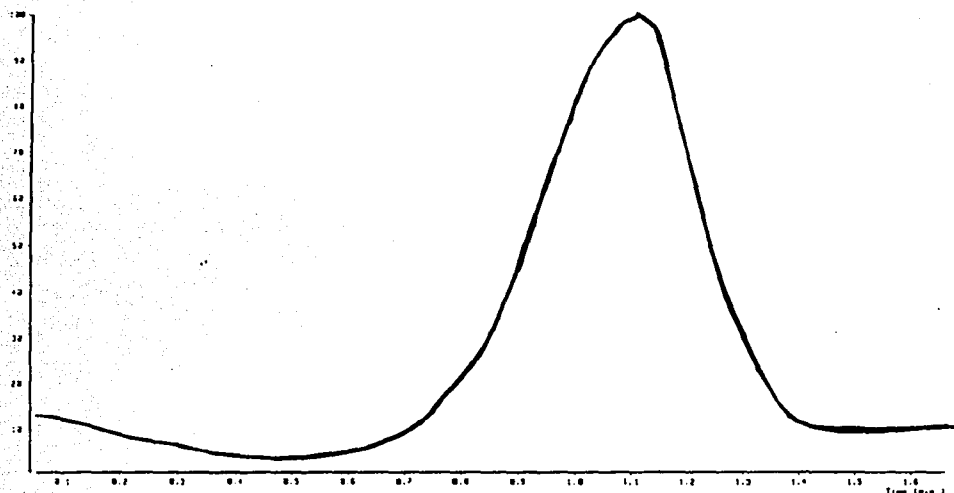


Espectro de Masas del Ácido 4-acetamidobenzoico

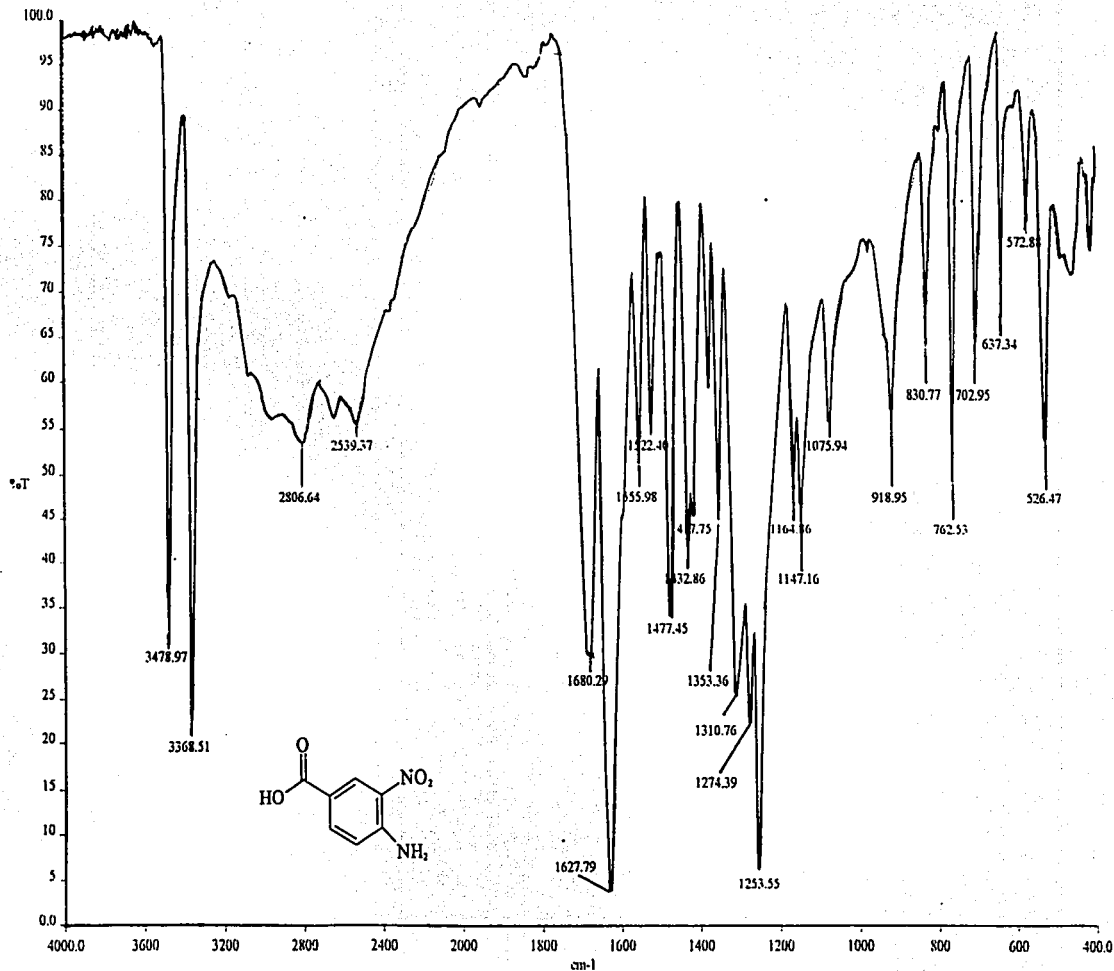


Espectro de IR del Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico

Espectro de Gases-Masas del Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico

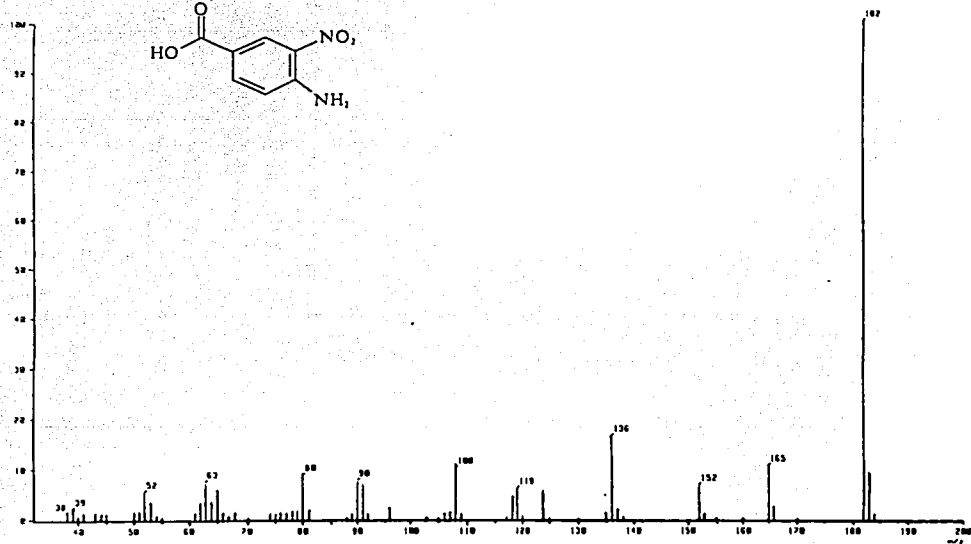
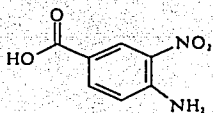
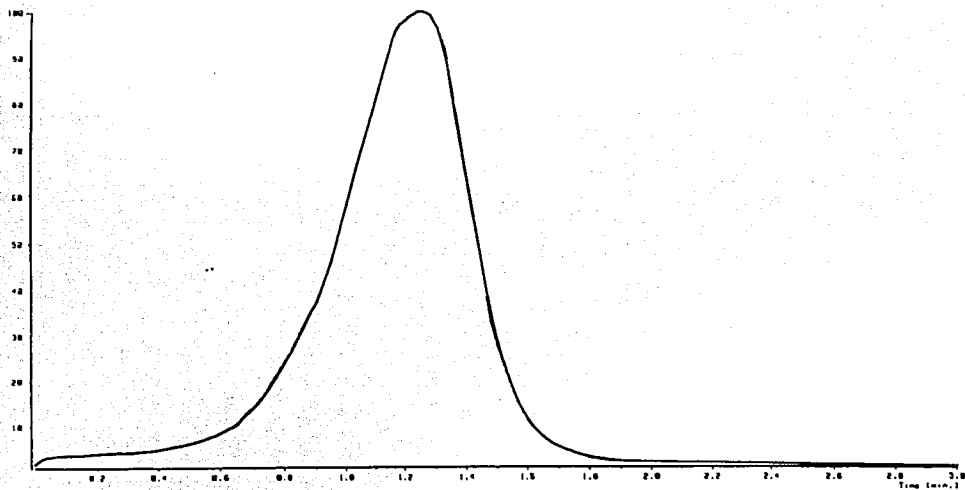


Espectro de Masas del Ácido 4-acetamido-3-nitrobenzoico

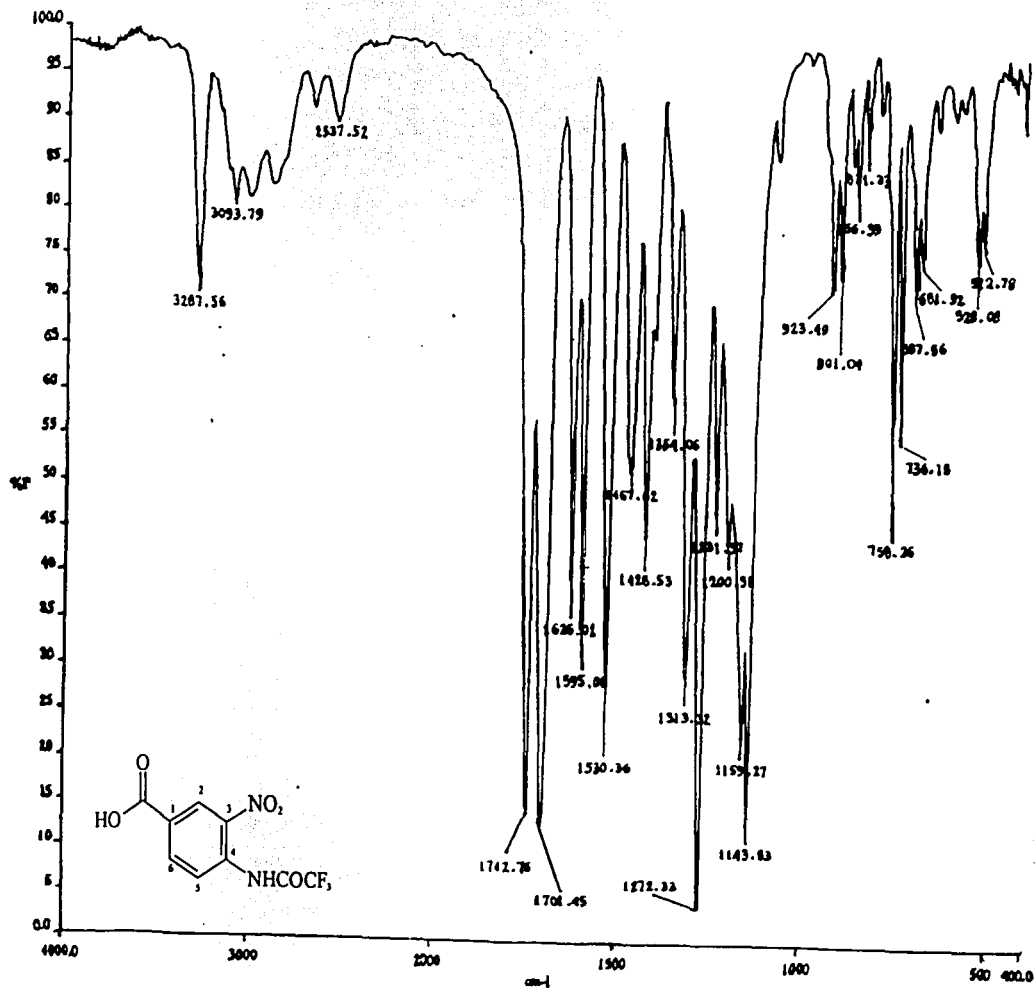


Espectro de IR del Ácido 4-amino-3-nitrobenzoico

Espectro de Gases-Masas del Ácido 4-amino-3-nitrobenzoico

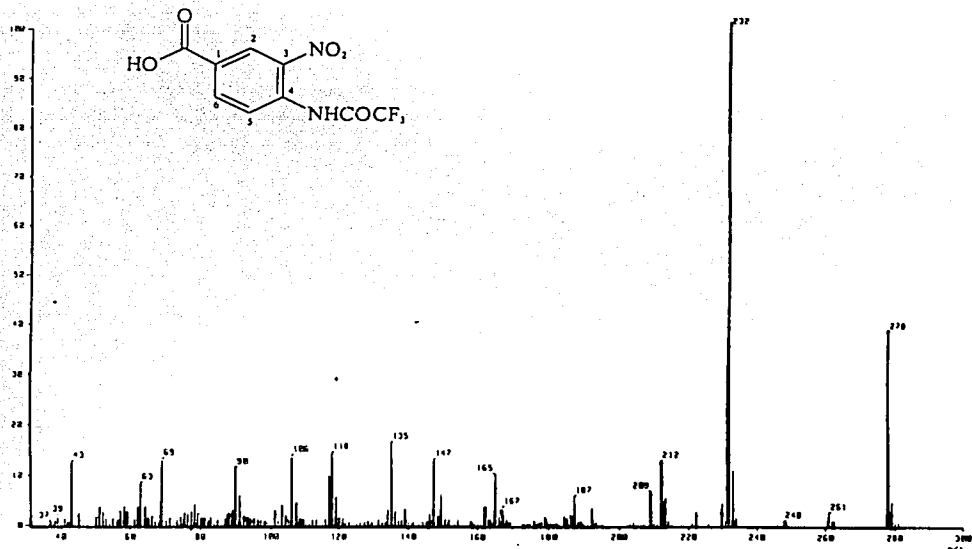
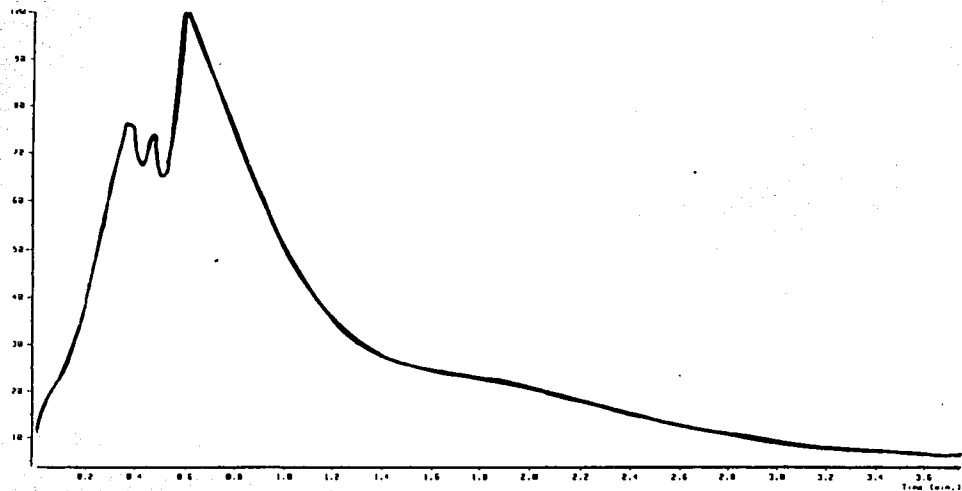


Espectro de Masas del Ácido 4-amino-3-nitrobenzoico

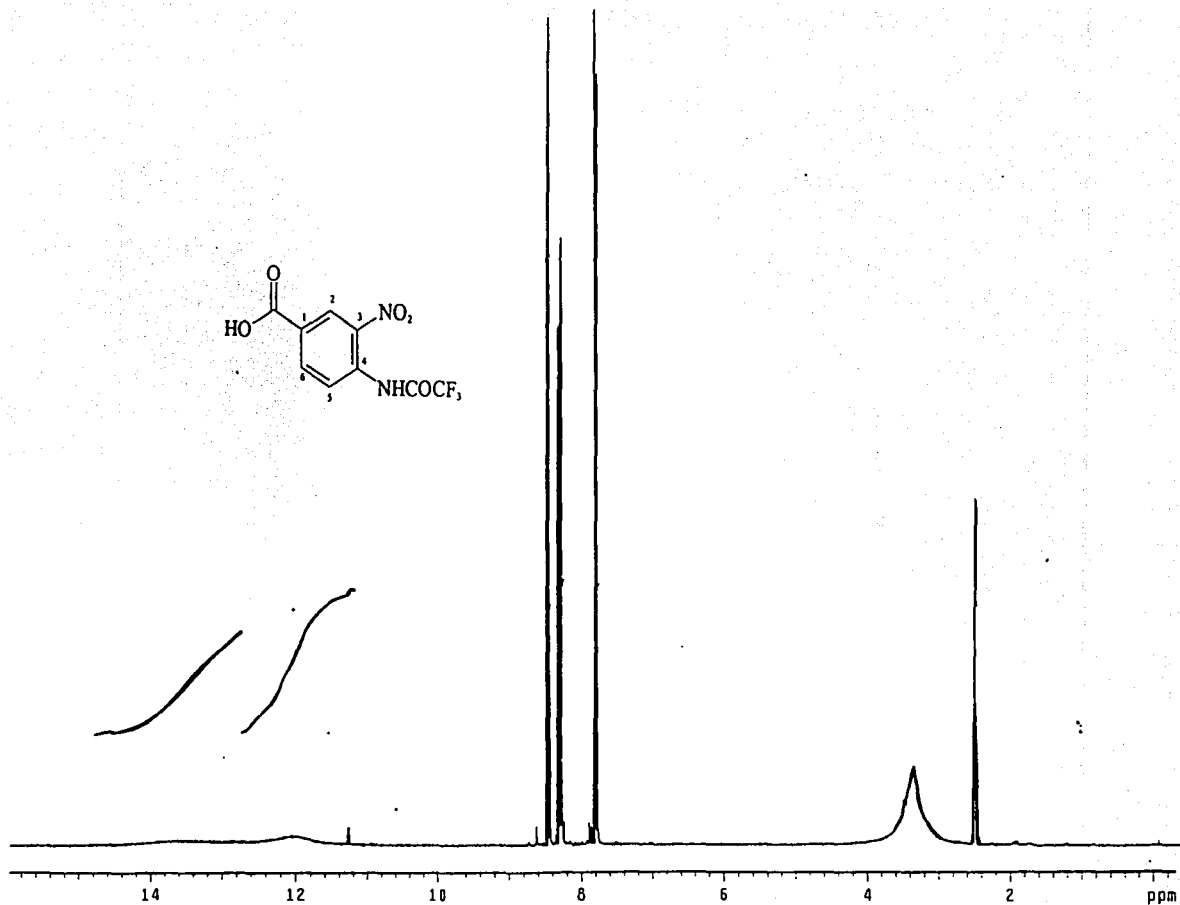
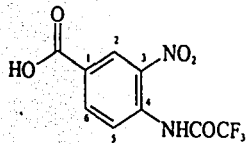


Spectro de IR del Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico

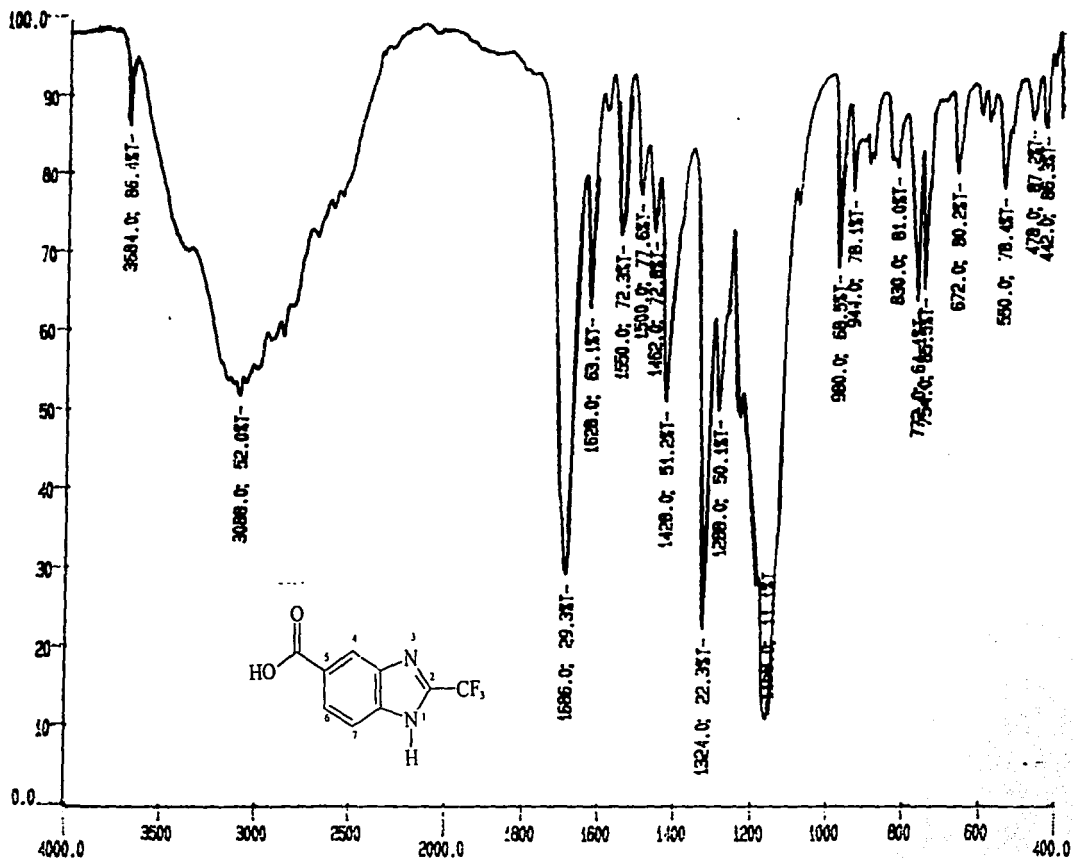
Espectro de Gases-Masas del Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico



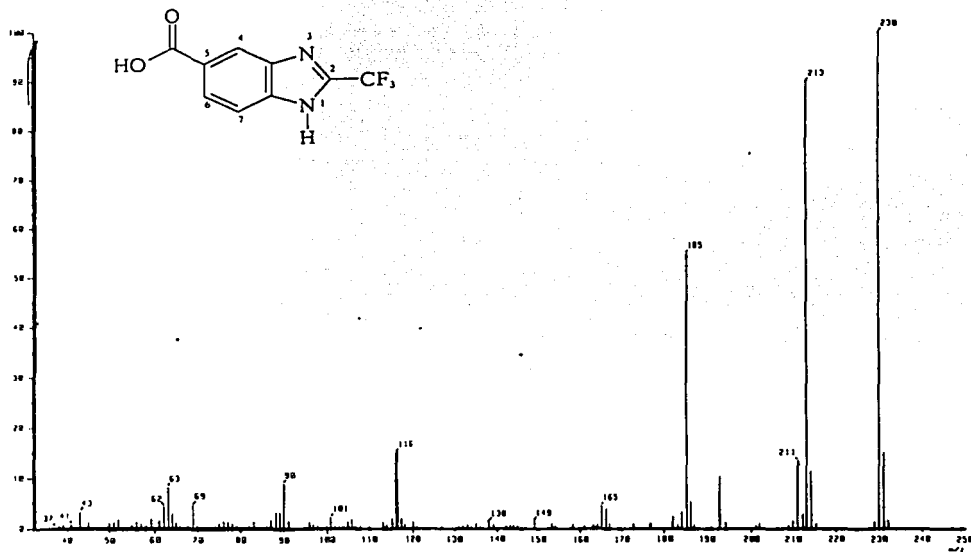
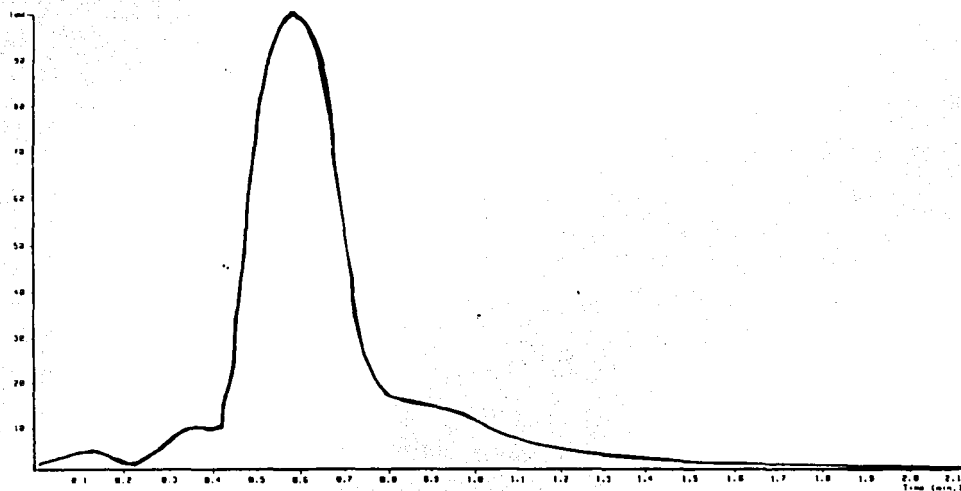
Espectro de Masas del Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico



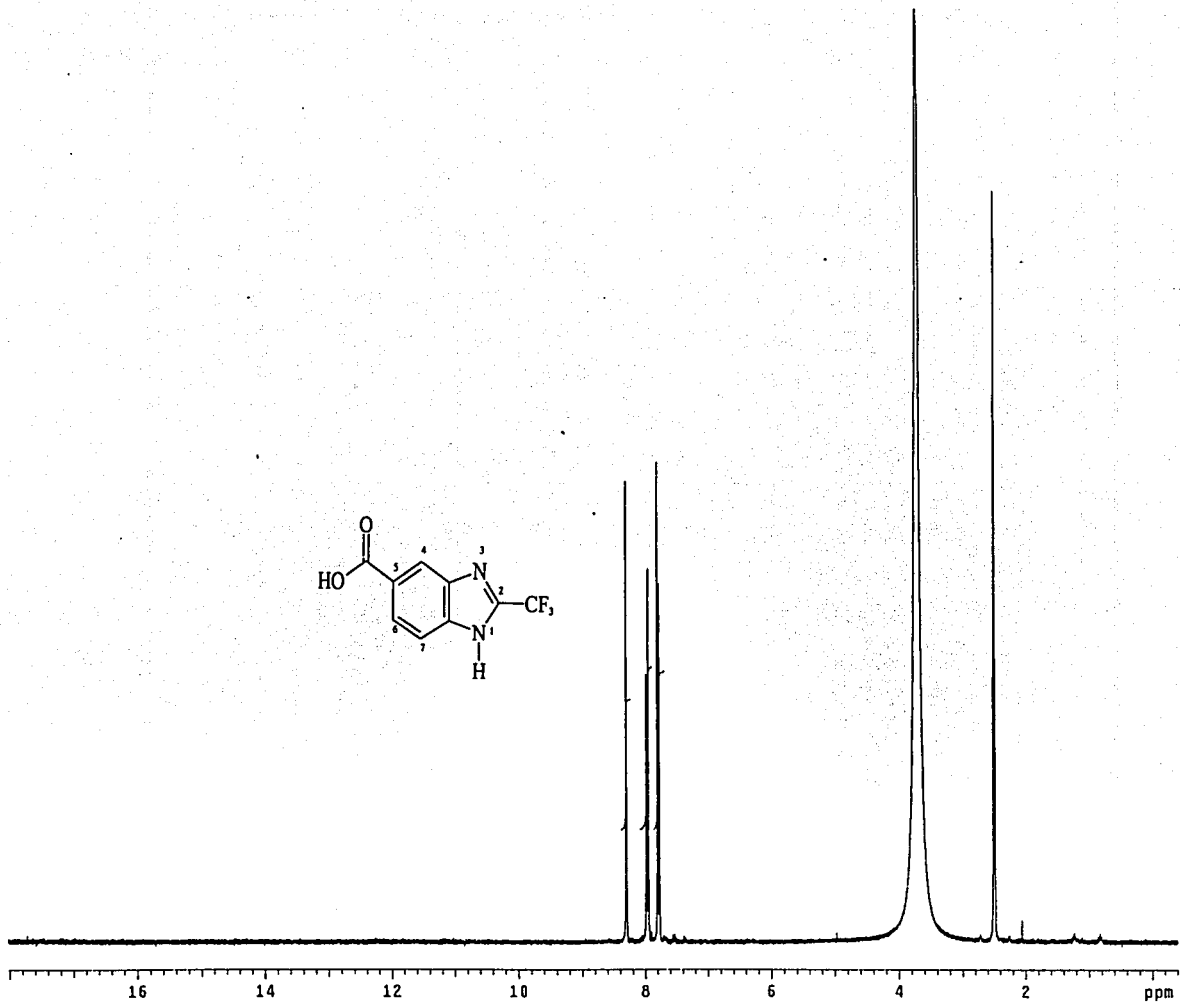
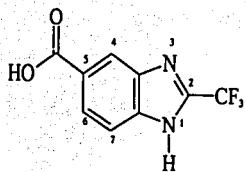
Espectro de ¹H RMN del Ácido 3-nitro-4-trifluoroacetamidobenzoico

Espectro de IR del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 *H*-benzimidazol

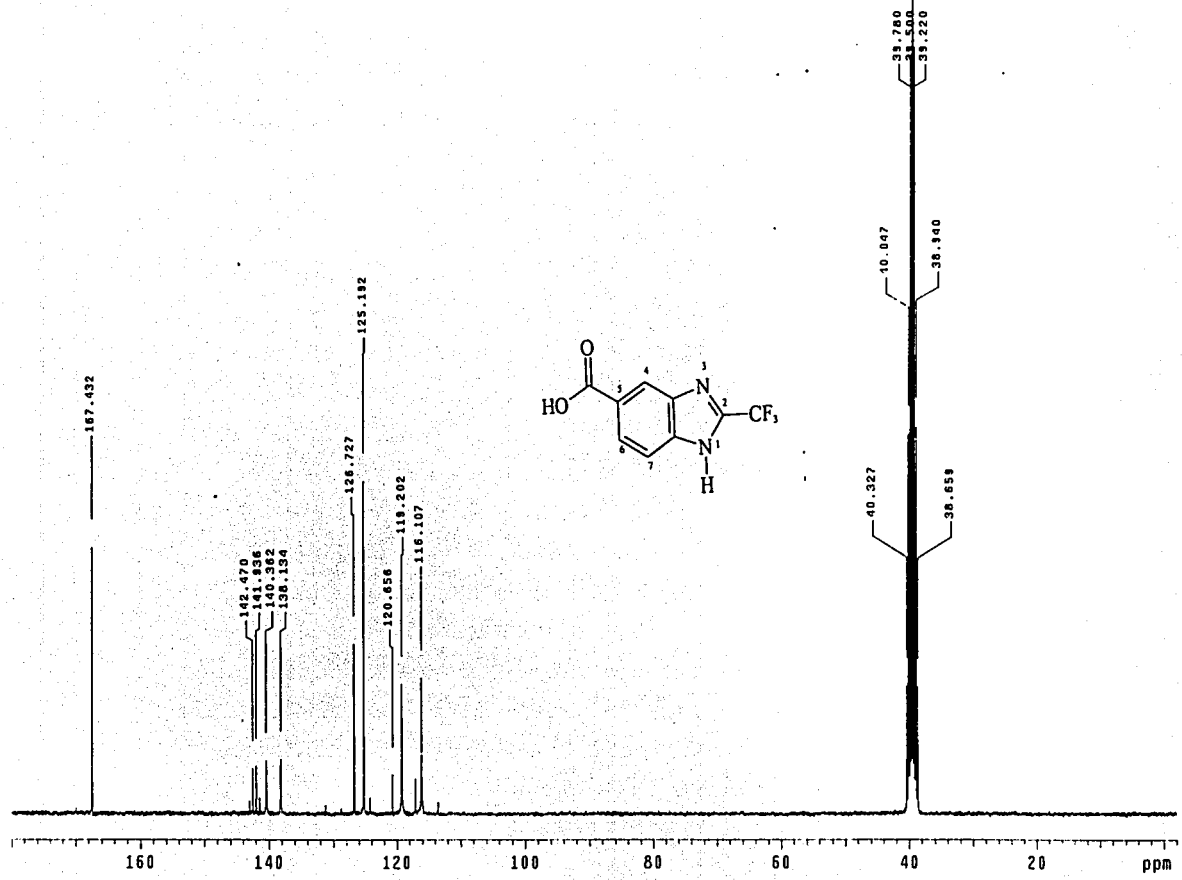
Espectro de Gases-Masas del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 *H*-bencimidazol



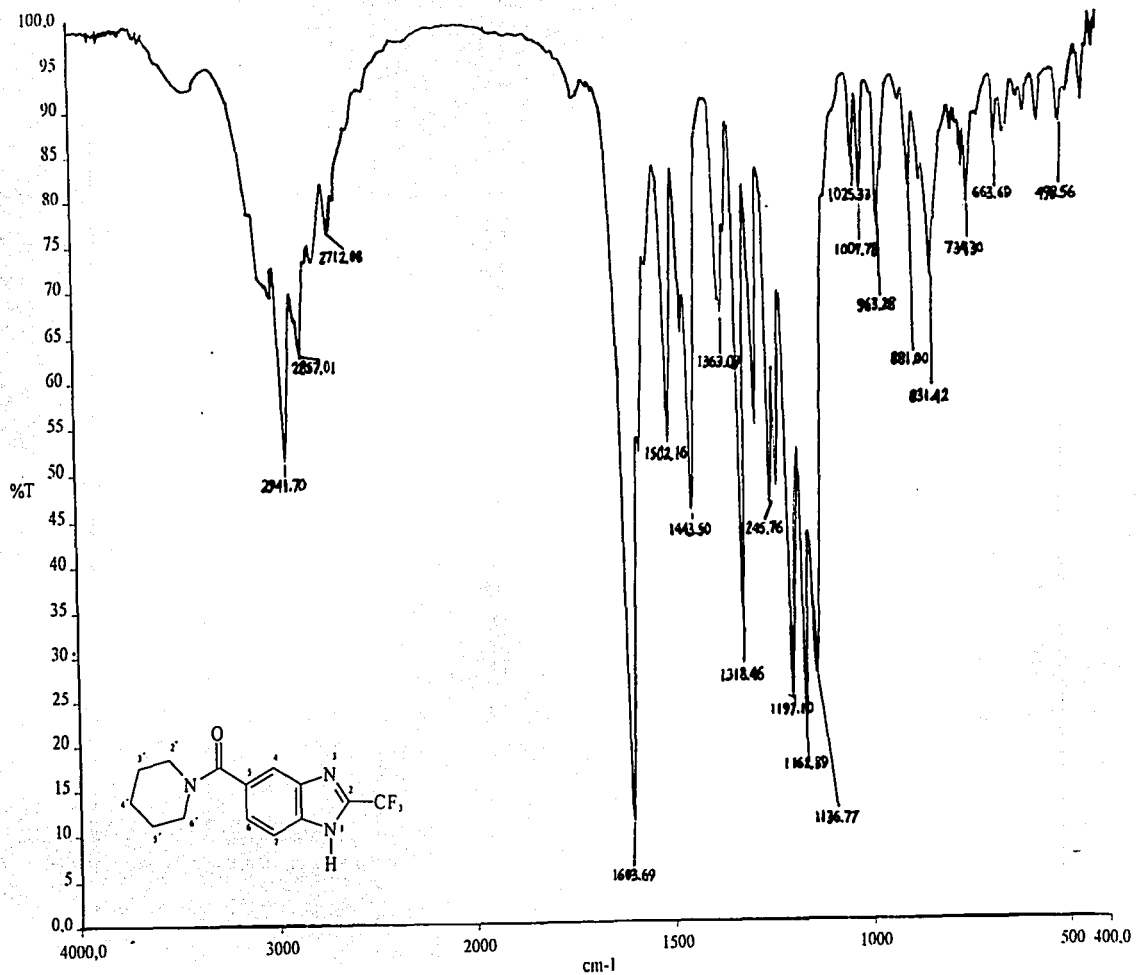
Espectro de Masas del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 *H*-bencimidazol



Espectro de ¹H RMN del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 *H*-bencimidazol

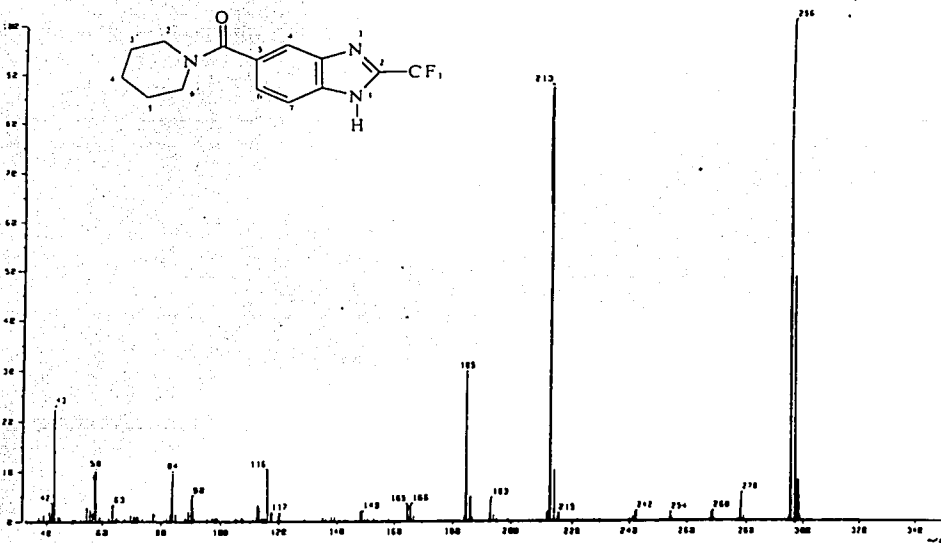
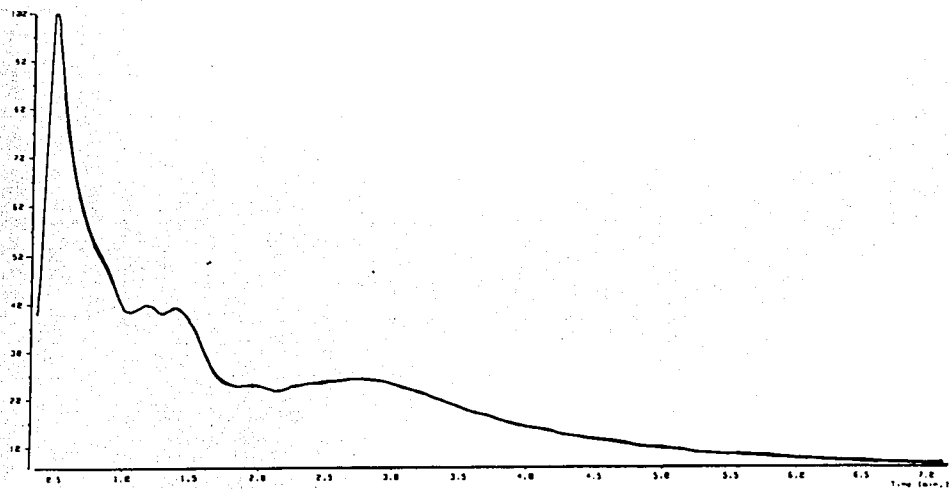


Espectro de ¹³C RMN del 5-Carboxi-2-(trifluorometil)-1 H-bencimidazol

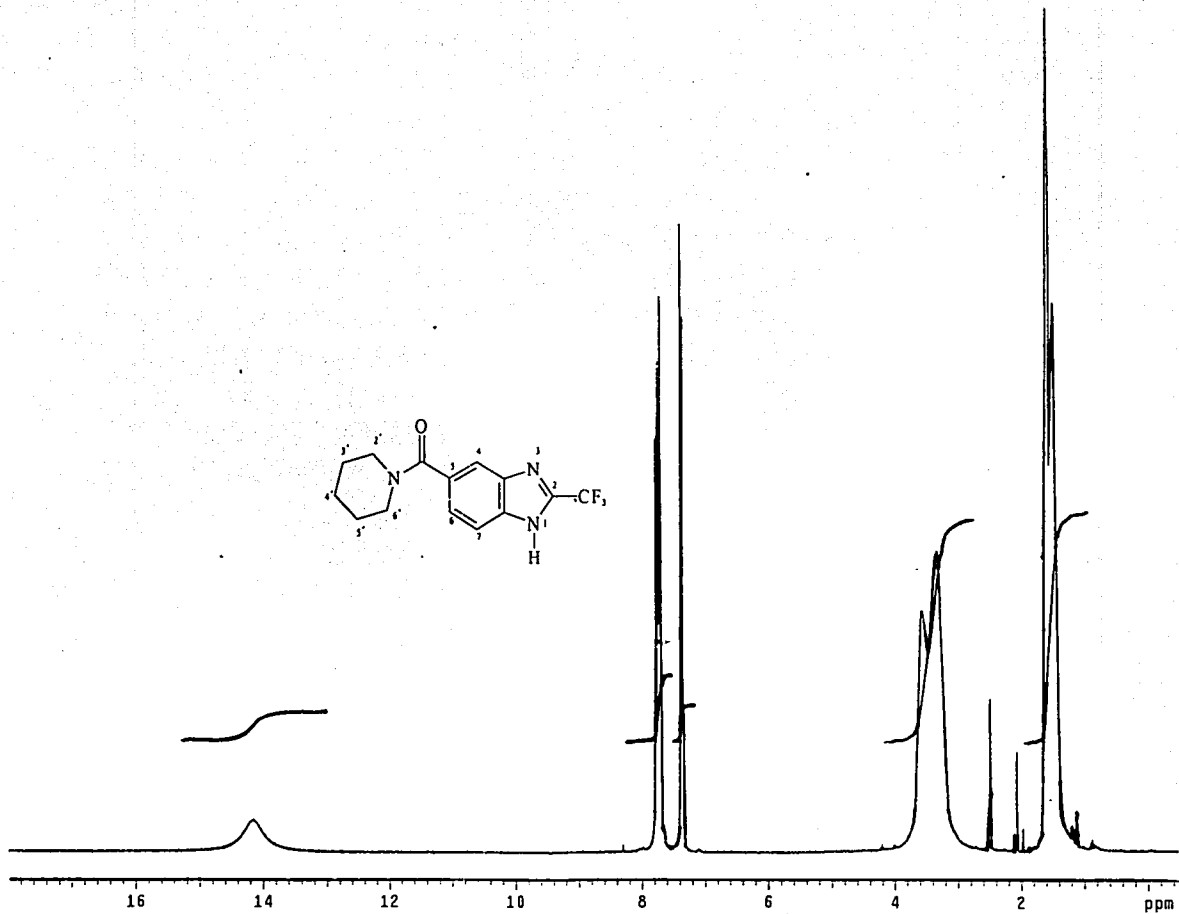


Espectro de IR del 5-Piperidinilcarbonyl-2-(trifluorometil)-1 H-benzimidazol

Espectro de Gases-Masas del 5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1 H-bencimidazol

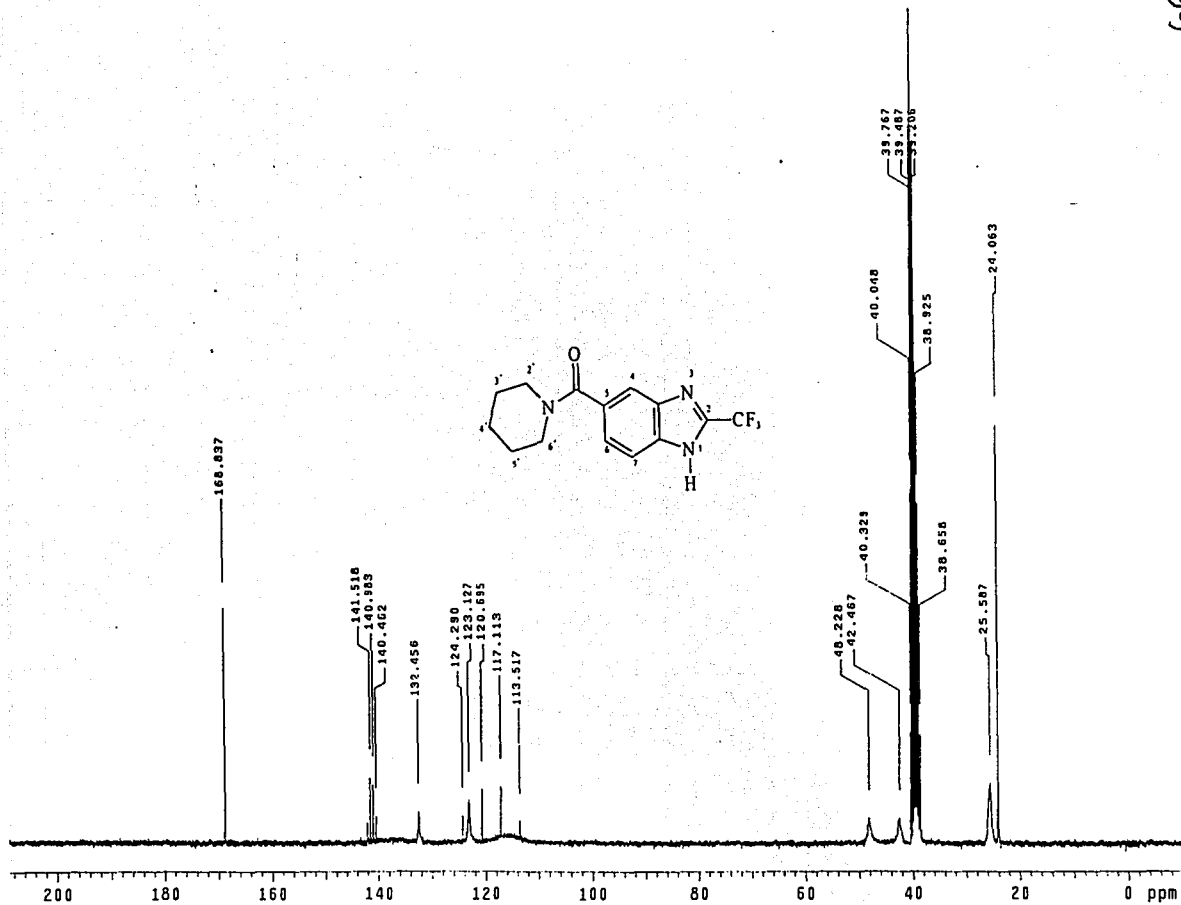


Espectro de Masas del 5-Piperidinilcarbonil-2-(trifluorometil)-1 H-bencimidazol

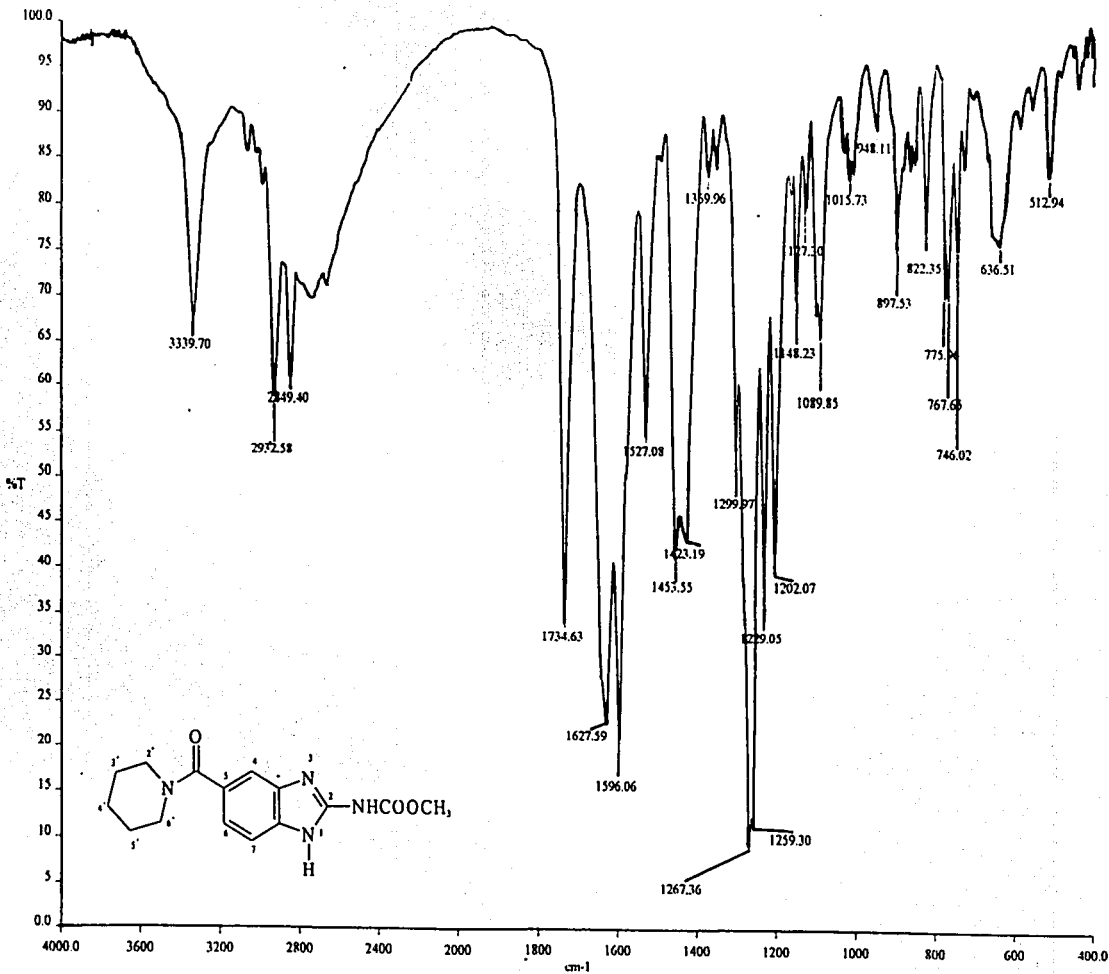


Espectro de ¹H RMN del 5-Piperidinilcarbonyl-2-(trifluorometil)-1 H-bencimidazol

65

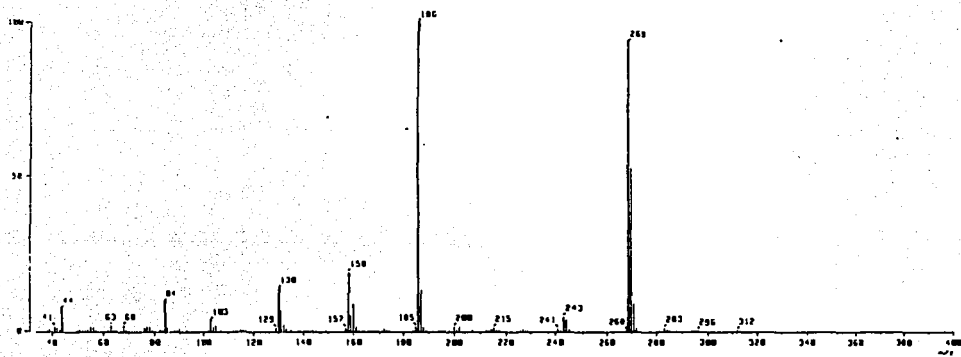
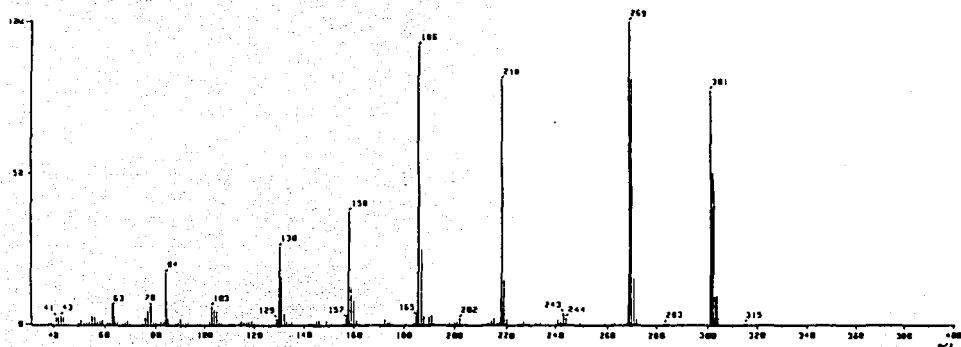
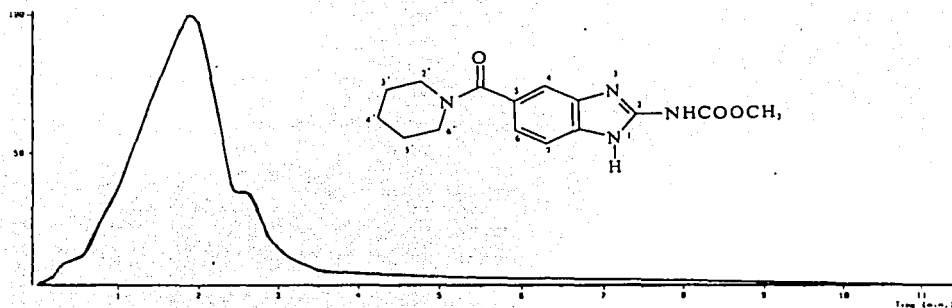


Espectro de ¹³C RMN del 5-Piperidinilcarbonyl-2-(trifluorometil)-1 H-bencimidazol

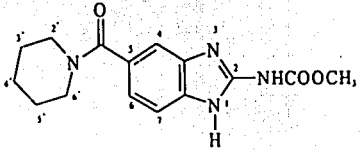
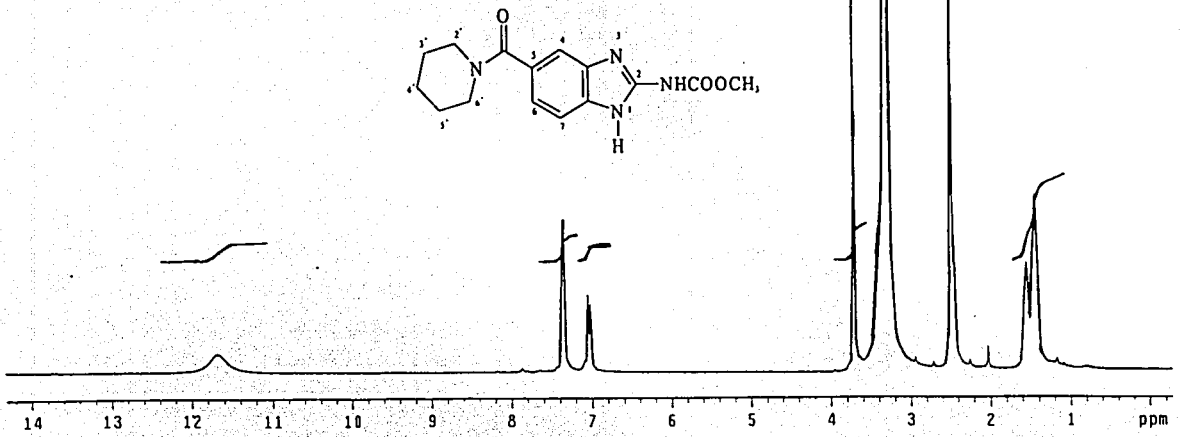


Espectro de IR del 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonyl)-1 H-bencimidazol

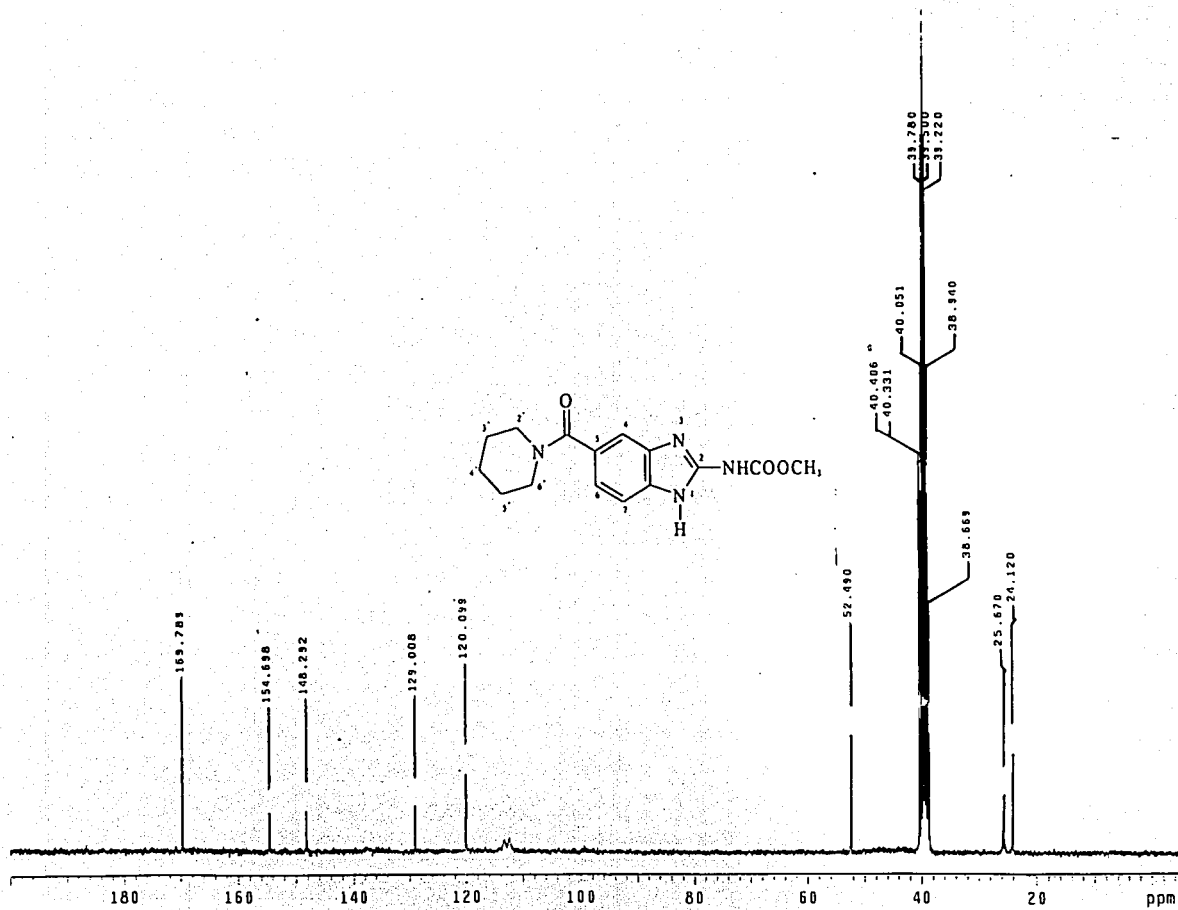
Espectro de Gases-Masas del 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonyl)-1H bencimidazol



Espectro de Masas del 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonyl)-1H bencimidazol



Espectro de ¹H RMN del 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonyl)-1 H benzimidazol



Espectro de ^{13}C RMN del 2-Metoxicarbonilamino-5-(piperidinilcarbonyl)-1H-benzimidazol