

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

**Síntesis y actividad antiprotozoaria contra
G. lamblia
de 5-clorobenzoxazoles 2-sustituidos**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB: Alejandro Luna González



TUTOR: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

AÑO: 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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	Dr. Eugene Bratoeff Tieff
Vocal	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Secretario	Dra. Martha Sonia Morales Ríos
Primer suplente	Dra. Lillian Yépez Mulia
Segundo suplente	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

El presente trabajo fue realizado en:

El Laboratorio 122 del edificio "E" de la Facultad de Química de la UNAM.

Tutor

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Supervisor técnico

MC. María Alicia Hernández Campos

Sustentante

QFB Alejandro Luna González

Dedicatorias

Dedico este trabajo de tesis a mi querida familia con mucho amor
Muchas gracias por su apoyo Lolita, Jorge y César

Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, la DGAPA con el proyecto IN202101, la Universidad de Guanajuato, CONACYT, PROMEP por apoyarme y permitir la conclusión de este trabajo.

Profundamente al Dr. Castillo por sus enseñanzas, amistad y consejos para poder terminar este trabajo y mejorar muchos aspectos de mi vida.

A la MC. María Alicia Hernández Campos, MC. Sergio Rodríguez, Dr. Francisco Hernández Luis, MC. Juan Gabriel Navarrete, todos los del laboratorio 122 y al personal del USAI muchas gracias por su amistad, ayuda y sus consejos.

Índice general	i
Índice de figuras	ii
Índice de cuadros	iii
Índice de esquemas	iv
Símbolos y abreviaturas	vi

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1. Introducción	6
2.2. Agentes antiprotozoarios	9
2.3. Resistencia a los fármacos antiparasitarios	10
2.4. Diseño de nuevos antiparasitarios	10
2.4.1. Método empírico por cernimiento	11
2.4.2. Método racional	13
2.4.2.1. Modificaciones moleculares	13
2.4.2.2. Diseño de fármacos basado en el mecanismo de acción	14
2.4.2.3. Sustitución isostérica	16
2.4.2.4. Técnicas combinadas	17
2.5. Actividad antiprotozoaria de nuevos bencimidazoles	17
2.6. Compuestos propuestos en el nuevo proyecto UNAM-Centro Médico	20
2.7. Métodos de síntesis de benzoxazoles	21
2.7.1. Obtención de 2-alkilbenzoxazoles	21
2.7.1.1. A partir de <i>o</i> -aminofenoles y ácidos carboxílicos	21
2.7.1.2. A partir de <i>o</i> -aminofenoles vía carboxamidas	23
2.7.2. Obtención de 2-mercaptobenzoxazoles	22
2.7.3. Obtención de 2-(metiltio)benzoxazoles	23
2.7.4. Obtención de 2-aminobenzoxazoles	24
2.7.5. Obtención de carbamatos de alquilo	24
Justificación y objetivo	25
3. Parte experimental	26
3.1. Parte Química	26
3.1.1. Instrumentación	26
3.1.2. Cromatografía	27
3.1.3. Sustancias y disolventes	27
3.1.4. Descripción breve del procedimiento sintético	27
3.2. Técnicas de laboratorio	28
3.2.1. <i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) formamida (2)	28
3.2.2. 5-Clorobenzoxazol (3)	29
3.2.3. <i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) acetamida (4)	29
3.2.4. 5-Cloro-2-metilbenzoxazol (5)	29
3.2.5. <i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil)acetamida (6)	30
3.2.6. 5-Cloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (7)	30
3.2.7. 5-Cloro-2-mercaptobenzoxazol (8)	30

3.2.8.	5-Cloro-2-metiltiobenzoxazol (9)	31
3.2.9.	2-Amino-5-clorobenzoxazol (10)	31
3.2.10.	(5-Clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo (11)	32
3.2.11.	(5-Clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo (12)	33
3.3.	Parte biológica	34
3.3.1.	Evaluación de actividad <i>in vitro</i> contra <i>G. Intestinalis</i>	34
4.	Resultados y discusión	35
4.1.	Parte química	35
4.1.1.	<i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) formamida (2)	36
4.1.2.	5-Clorobenzoxazol (3)	40
4.1.3.	<i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) acetamida (4)	42
4.1.4.	5-Cloro-2-metilbenzoxazol (5)	45
4.1.5.	<i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil)acetamida (6)	47
4.1.6.	5-Cloro-2-trifluorometilbenzoxazol (7)	49
4.1.7.	5-Cloro-2-mercaptobenzoxazol (8)	51
4.1.8.	5-Cloro-2-tiometilbenzoxazol (9)	53
4.1.9.	2-amino-5 clorobenzoxazol (10)	54
4.1.10.	(5-Clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo (11)	56
4.1.11.	(5-Clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo (12)	59
4.2.	Parte biológica	62
5.	Conclusiones	66
6.	Bibliografía	67
	Apéndice (espectros)	71

Índice de figuras

Figura 1. Giardia intestinalis

Pag.
6

Índice de cuadros

	Pag.
Cuadro 1. Estrategias para el control de parasitosis	4
Cuadro 2. Esquematización de la Ley de Grimm	16
Cuadro 3. Actividad de los 1 <i>H</i> -bencimidazoles contra <i>G.lamblia</i>	18
Cuadro 4. Actividad de los 1-Metilbencimidazoles contra <i>G.lamblia</i>	19
Cuadro 5. Benzoxazoles del nuevo proyecto UNAM-Centro Médico	20
Cuadro 6. Composición de sistemas de CCD	27
Cuadro 7. Propiedades y rendimientos de los productos 2-12	35
Cuadro 8. Actividad biológica de bencimidazoles y benzoxazoles	63
Cuadro 9. Resultados del cálculo de LogP	64

Índice de esquemas.

	Pag.
Esquema 1. Estadísticas de prevalencia de parasitosis a nivel mundial	3
Esquema 2. Estructura de algunos agentes antiprotozoarios	8
Esquema 3. Esquema de reducción del grupo nitro	9
Esquema 4. Intermediario tetraédrico para obtener bzx 2-sustituidos	22
Esquema 5. Intermediario para obtención de bzx con pentóxido de fósforo	22
Esquema 6. Adición-eliminación para obtener 2-alkilbenzoxazoles	23
Esquema 7. Obtención de 8	23
Esquema 8. Reacción de metilación para obtener 2-(metilito)benzoxazoles	24
Esquema 9. Reacción de obtención de 2-aminobenzoxazoles	24
Esquema 10. Intermediario tetraédrico en la obtención de 12	24
Esquema 11. Secuencia sintética para preparar los compuestos 2-7	28
Esquema 12. Secuencia sintética para preparar los compuestos 8 y 9	31
Esquema 13. Secuencia sintética para preparar los compuestos 10 y 11	32
Esquema 14. Secuencia sintética para preparar 12	33
Esquema 15. Mecanismo para obtención de 2	37
Esquema 16. Forma polar de 2	38
Esquema 17. Frecuencias de absorción de algunos carbonilos	38
Esquema 18. Denominación de protones en 2	40
Esquema 19. Mecanismo de reac. en la obtención de Bzx con P ₄ O ₁₀	41
Esquema 20. Denominación de protones en 3	42
Esquema 21. Forma polar de 5-cloro-2-hidroxiacetanilida 3	44
Esquema 22. Denominación de protones en 4	45
Esquema 23. Denominación de los protones en 5	47
Esquema 24. Denominación de protones en 6	49
Esquema 25. Denominación de protones en 7	50
Esquema 26. Representación de la reacción de obtención del producto 8	51
Esquema 27. Denominación de protones en 8	52
Esquema 28. Denominación de protones en 9	54
Esquema 29. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de 10	55
Esquema 30. Denominación de protones en 10	56
Esquema 31. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de 11	57
Esquema 32 Denominación de protones en 11	59
Esquema 33 Representación del mecanismo propuesto para la obtención de 12	60
Esquema 34 Denominación de protones en 12	62
Esquema 35 Se muestra la posible explicación de la actividad biológica	65

Símbolos y abreviaturas

γ	vibración de estiramiento
δ	vibración de deformación
ABZ	albendazol
AcetilCoA	acetilcoenzimaA
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	trifosfato de adenosina
ATP-PFK	ATPfosfatofruktocinasa
Bb	destilación de bulbo a bulbo (Kugelrohr)
BC	carbamatos bencimidazólicos
ccf	cromatografía en capa fina
CI ₅₀	concentración inhibidora al 50 por ciento
cm ⁻¹	número de onda en 1/cm
d	señal doble
DEN	desviación equivalente normal
EM	espectroscopia de masas
FT-IR	infrarrojo con transformada de Fourier
Hz	Hertz
IR	infrarrojo
m	señal múltiple
<i>m</i>	meta
m/z	relación masa carga
M	ion molecular
M+1, M+2	iones isotópicos
NCEs	nuevas entidades químicas
<i>o</i>	orto
OMS	Organización Mundial de la Salud
oop	vibración fuera del plano
<i>p</i>	para
p.f.	punto de fusión
PFOR	ferredoxin oxidoreductasa de piruvato
pH	potencial hidronio
PPDK	fosfatodicina de piruvato
PPi-PFK	fosfofructocinasa de pirofosfato
ppm	desplazamiento en partes por millón
probit	unidad de probabilidad
rf	relación de frentes
RMN ¹ H	resonancia magnética de protón
s	señal simple
sa	señal simple amplia
t	señal triple

Resumen

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios (protozoosis) siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo; principalmente, en los países con pobres condiciones sanitarias, de clima tropical y malos hábitos de higiene. Dentro de los protozoarios con mayor distribución mundial se encuentra la *Giardia intestinalis* con una incidencia de 280 millones de afectados al año. Para el tratamiento de la giardiasis se emplea el metronidazol como medicamento de primera elección; sin embargo, la aparición de resistencia a este derivado 5-nitroimidazólico ha sido demostrada tanto en condiciones experimentales como naturales. Además, los carbamatos bencimidazólicos (BC), como el albendazol (ABZ), son efectivos como agentes antiprotozoarios, en particular contra *Giardia* es altamente efectivo debido a la rica presencia de tubulina en su citoesqueleto y que el ABZ interacciona con esta proteína inhibiendo su agrupación en microtúbulos. Considerando lo anterior y la necesidad de contar con nuevas estructuras que aporten información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria, en especial contra *G. intestinalis* como modelo de protozoario, en esta tesis se describe la síntesis de los siguientes derivados: 5-clorobenzoxazol (**3**), 5-cloro-2-metilbenzoxazol (**5**), 5-cloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (**7**), 5-cloro-2-mercaptobenzoxazol (**8**), 5-cloro-2-metiltiobenzoxazol (**9**), 2-amino-5-clorobenzoxazol (**10**), (5-clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo (**11**) y (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo (**12**). También se describe la síntesis de los siguientes precursores *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil) formamida (**2**), *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil) acetamida (**4**) y *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil)acetamida (**6**). Los compuestos preparados se purificaron e identificaron por sus constantes espectroscópicas y espectrométricas de infrarrojo (IR), resonancia magnética protónica (RMN¹H) y espectroscopia de masas (EM). Cada derivado del benzoxazol se sometió a evaluación de su actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *G. intestinalis*. Los resultados obtenidos se compararon con sus análogos bencimidazólicos y con sus análogos benzoxazólicos no clorados. Los productos de estas evaluaciones indican que los compuestos 5-clorobenzoxazólicos fueron menos activos en comparación con sus análogos bencimidazólicos. Estos resultados sugieren que el nitrógeno en la posición 1 juega un papel muy importante en la actividad como donador de electrones y que esa capacidad disminuye al sustituir el N por O.

Abstract

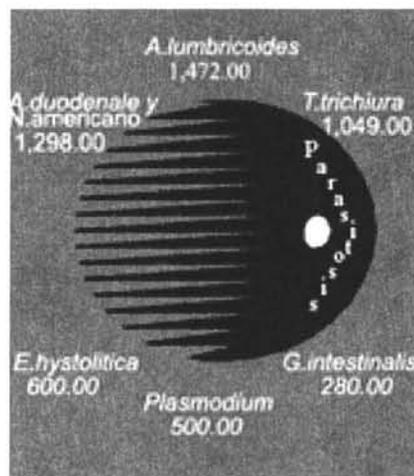
Parasitic infections, such as protozoosis, are still one of the major health problems all over the world, especially in developing countries. *Giardia intestinalis* is one of the worldwide distribution protozoa causing giardiasis, affecting to 280 millions of people annually. Metronidazole is the drug of choice for the treatment of giardiasis; however, resistance to this 5-nitroimidazole have been demonstrated in natural and experimental conditions. On the other hand, it has been found that the benzimidazole carbamates (BC), such as albendazole (ABZ), are effective as antiprotozoal agents; specially against *G. intestinalis*, since this protozoal has tubulin in its cytoskeleton and the BC inhibit the polymerization of this protein to form the microtubules. Considering the urgent need of new structures with antiparasitic activity, that could provide information about the structural requirements for antiprotozoal activity especially against *G. intestinalis*, in this thesis the synthesis of the following 5-chlorobenzoxazole derivatives is described: 5-chlorobenzoxazole (**3**), 5-chloro-2-methylbenzoxazole (**5**), 5-chloro-2-trifluoromethylbenzoxazole (**7**), 5-chloro-2-mercaptobenzoxazole (**8**), 5-chloro-2-methylthiobenzoxazole (**9**), 2-amino-5-chlorobenzoxazole (**10**), (5-chloro-benzoxazol-2-yl) methylcarbonate (**11**), and (5-chloro-benzoxazol-2-yl) methylcarbamate (**12**), and in addition the synthesis of the precursors *N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl) formamide (**2**), *N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl) acetamide (**4**), and *N*-(5-chloro-2-hydroxyphenyl) (trifluoromethyl)acetamide (**6**), is also described. The synthesized compounds were purified and identified by spectroscopic and spectrometric methods of analysis. Each benzoxazole derivative was tested *in vitro* against *G. intestinalis*. The results obtained indicate that none of the synthesized compounds showed good activity as the corresponding benzimidazole isostere. These results suggest an important role of the 1-nitrogen of the benzimidazole ring as an electron releasing group; this behavior is diminished in the benzoxazole series, since the oxygen at 1 position is not as good as a electron releasing group.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, tales como las helmintosis y protozoosis, tienen una distribución mundial (Kassai *et al.*, 1988), por lo que representan un grave problema, tanto en humanos como en animales; sobretodo en los países en vías de desarrollo, donde afectan principalmente a la infantil. Aunado a esta problemática se encuentra la severa limitación de los recursos disponibles para un control adecuado (WORLD HEALTH STATISTICS QUARTERLY 1992).

El impacto de las parasitosis se puede observar en las estadísticas (Esquema 1) donde vemos que las helmintosis representan el grupo más importante de infecciones sobre el planeta (Horton *et al.*, 1990), aunque son las protozoosis las responsables del mayor número de casos de mortalidad en seres humanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de un millón de niños mueren anualmente de malaria, una de las primeras causas de muerte en niños menores de 5 años. Mientras que por diarrea ocurre un elevado número de muertes en total que podría superar fácilmente la cifra anterior (Upcroft *et al.*, 2001).

Esquema 1. Algunas estadísticas de prevalencia de parasitosis a nivel mundial, parte superior helmintos mientras que en la sección inferior protozoarios (en millones por año)



Las helmintosis humanas de mayor prevalencia, consideradas como problemas de salud pública, tales como las causadas por *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*; *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*; sumadas acumularían más de la mitad de la población total del planeta. En el caso de las protozoosis, la malaria representa cerca de 500 millones de personas infectadas, mientras que por *Entamoeba* se estima un total de 600 millones y las causadas por *Giardia* se tasan en 280 millones (www.biosci.ohio-state.edu [01/10/03]) (Upcroft *et al.*, 2001).

La morbilidad por parasitosis es muy elevada sobre todo en niños menores de 5 años. Los problemas oscilan desde la desnutrición y anemia (dos causas importantes de mortalidad),

retardo en el crecimiento y deterioro cognoscitivo, hasta susceptibilidad a otras infecciones y obstrucción intestinal aguda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, EXECUTIVE BOARD, 2000)¹. Causado por la carencia de buenos hábitos de higiene, los cuales de tenerse podrían disminuir la carga parasitaria. La OMS estima que al menos una cuarta parte de la población mundial está crónicamente infectada por parásitos intestinales.

Entre las parasitosis por protozoarios cabe destacar la provocada por la *Giardia intestinalis*, la cual junto con la *Entamoeba histolytica* y *Tricomonas vaginalis* se estima afectan cerca de 1,000 millones de personas al año (Upcroft *et al.*, 2001). La giardiasis es la principal causa de enfermedad intestinal a nivel mundial. La diarrea es más común y peligrosa en niños, especialmente si están desnutridos. Es normalmente la principal enfermedad mortal infantil en países pobres, se estima que mueren al año por diarrea 5 millones de niños al año (Mathur *et al.*, 1983)

En el sector veterinario el impacto económico es notable. Las pérdidas por infecciones parasitarias en los animales domésticos se deben, entre otras, al pobre crecimiento por desnutrición, baja producción de carne, leche, deterioro de pieles, lana, perdidas por hígados decomisados, baja capacidad reproductiva y muerte por la baja capacidad inmunológica. Tan sólo en rumiantes, para el año de 1994 se calculaban pérdidas por 3,000 millones de dólares causados únicamente por fasciolosis (Sharma, S., 1994).

El control de parásitos en la población afectada puede comprender varios puntos o sitios de ataque del ciclo de vida de los parásitos (Montresor *et al.*, 1999). En el cuadro 1 se muestran los tipos de estrategia considerados más importantes.

Cuadro 1. Estrategias para el control de parasitosis

Estrategia.	Características.
Quimioterapia.	Reduce la carga parasitaria e interrumpe el ciclo de vida.
Condiciones sanitarias.	Reduce la contaminación por la tierra y el agua.
Educación sanitaria.	Promueve conductas saludables que impiden o reducen la infección.
Prevención.	Reduce la transmisión por vectores o de otro tipo, e interrumpe el ciclo de vida.
Erradicación y eliminación de parasitosis.	Cuando es factible permite tener como objetivo la eliminación constante y real del problema.

El uso de agentes quimioterapéuticos es la primera elección, y la más efectiva, para controlar un intervalo amplio de infecciones parasitarias. Los medicamentos son utilizados para tratamientos con fines profilácticos o preventivos, o bien, en un esfuerzo para curar la

¹ Se denomina morbilidad a las afecciones de la enfermedad o de la parasitosis en el individuo infectado.

infección. Los otros aspectos, como son el mejoramiento de las condiciones sanitarias, las cuales comprenden el uso de letrinas, acceder a fuentes de agua potable seguras, disposición adecuada de desechos; y la modificación de hábitos a través de educación en salud, tales como lavarse las manos con regularidad, evitar la geofagia, lavar bien los alimentos y el uso de calzado, son medidas de largo plazo que pueden ser consideradas dentro de las estrategias comunitarias importantes para combatir o controlar las parasitosis (Montresor *et al.*, 1999).

Aunque la quimioterapia tiene un papel muy importante como una de las medidas más efectiva para controlar una gama amplia de infecciones parasitarias, el uso continuo, indiscriminado e irracional de dichos agentes, origina en muchos casos el fenómeno de resistencia. Se conoce como resistencia la propiedad adquirida de los parásitos que le confiere la capacidad para sobrevivir a concentraciones del fármaco, las cuales previamente fueron determinadas como letales o tóxicas. Es diferente de la tolerancia la cual puede ser considerada como la habilidad innata del parásito para resistir la exposición a un fármaco sin efecto o daño notable (Medifox, BSc, 1997).

En el caso de *giardiasis*, el tratamiento de primera elección es con metronidazol el cual también es clínicamente efectivo contra la tricomoniasis y amebiasis, así también en una variedad de infecciones provocadas por bacterias anaerobias obligadas, incluyendo *Bacterioides fragilis*. Sin embargo, se ha demostrado resistencia al metronidazol en *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *E. histolytica* en condiciones experimentales y naturales (Cedillo-Rivera *et al.*, 2002). Dicha resistencia es considerada producida por la disminución de los niveles de la enzima piruvato:ferredoxin oxidoreductasa hasta una quinta parte y la de ferredoxinaI en las cepas de *Giardia* resistentes, de tal manera que disminuyen las concentraciones de derivados nitroso y otros radicales provenientes de la reducción del metronidazol, considerados responsables de la actividad (Upcroft *et al.*, 2001).

Tal facultad de desarrollar resistencia de los parásitos se ha convertido en un problema muy serio para el área médica y veterinaria, razón por la cual es muy importante el estudiar situaciones o agentes nuevos que resuelvan tal dificultad. En el caso de quimioterapéuticos es muy conveniente el buscar productos con distinta estructura o mecanismos de acción diferentes a los ya conocidos. Dicho argumento puede ser una base para justificar el estudio de nuevos compuestos con posible actividad antiprotozoario de naturaleza diferente a los que se usan en la actualidad e investigar las herramientas necesarias para controlar tales padecimientos y proporcionar una mejor calidad de vida a la población.

2. ANTECEDENTES

2.1. Introducción

La OMS estimó que cerca de 280 millones de personas son infectadas por el protozooario flagelado binuclear *Giardia intestinalis* (Farthing, M.J. G., 1996). Más recientemente estimó que cerca de 3,000 millones de personas viven en áreas carentes de drenaje en países en vías de desarrollo y que la tasa de incidencia de giardiasis (enfermedad causada por la *Giardia intestinalis* que puede manifestarse como una diarrea severa o ser asintomática) podría acercarse al 30 %, lo cual sugiere que podría haber casi 1,000 millones de casos de giardiasis en un determinado momento, contribuyendo a los 2.5 millones de muertes anuales por diarrea causadas por parásitos intestinales (Upcroft *et al.*, 2001).

En México, la giardiasis es endémica y los casos acumulados hasta la semana epidemiológica 39 del 2002, fueron de 39,618, de los cuales, 4,131 se reportan en el D.F. la entidad con mayor incidencia (www.salud.gov.mx[29/1/4]). Como sucede en la mayoría de las enfermedades parasitarias, las condiciones de higiene deficientes contribuyen a la presencia de esta parasitosis, por la cual los niños son los más vulnerables. Tal protozooosis es la más frecuentemente encontrada en asentamientos irregulares con una prevalencia del 30%, las condiciones socioeconómicas y la carencia de servicios favorecen la transmisión de la infección (www.biomédicas.unam.mx[29/1/4]).

La *G. intestinalis* es un flagelado patógeno perteneciente al *Phylum Sarcocystophora* y al *Subphylum Mastigophora*, pertenece a la clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonidae* y suborden *Diplomonadina* carente de aparato de Golgi (Bogitsh, *et al.*, 1998). Este protozooario se caracteriza por la presencia de flagelos en los trofozoítos y reproducción asexual por fisión binaria. La *Giardia* tiene simetría bilateral característica distintiva en relación con otros protozoarios. El trofozoíto es redondeado en un extremo, y se estrecha posteriormente; es aplanado dorsoventralmente, como puede observarse en la Figura 1. La superficie dorsal es convexa; la superficie ventral es usualmente cóncava pero ocasionalmente plana y está presente de forma predominante un disco adhesivo grande con un núcleo en el centro de cada mitad. El anillo exterior del disco adhesivo está apoyado por microtúbulos y fascículos de microfilamentos, y cuatro pares de flagelos surgen de cuerpos basales agrupados entre los dos núcleos. Son característicos del género *Giardia* dos cuerpos medios prominentes, ligeramente curvos. Su función es desconocida, aunque se ha sugerido que podrían actuar como estructuras de soporte.

Es un parásito protozooario multiflagelado amitocndrial que carece de un transporte electrónico mediado por citocromos y sin un proceso de fosforilación oxidativa. Este organismo vive extracelularmente, de manera similar a la *E. histolytica* y la *T. Vaginalis*. *G. intestinalis* se ha adaptado a sobrevivir bajo condiciones estrictamente anaeróbicas o bajo niveles de tensión de oxígeno muy bajos en la luz del estómago o el tracto vaginal del hospedadero. Son parásitos aerotolerantes que están presentes en su hábitat natural. Tal parece que el oxígeno no está involucrado en la producción de energía pero es usado como un medio para la destoxicación de materiales tóxicos o potencialmente nocivos en su medio ambiente.

Desde el punto de vista evolutivo es posible que evolucionaron en la época en que la vida era predominantemente anaeróbica y carecía de mitocondrias. Debido a esto y otras diferencias metabólicas existe la visión de que los eucariotes amitochondriales se separaron tempranamente del tronco principal de la evolución de los eucariotes. Es considerada una de las primeras ramas o más profundas, tal vez el eucariote más primitivo en existencia, por eso algunos científicos lo consideran el “eslabón perdido” en la evolución de células eucarióticas a partir de procarióticas. Estos organismos tienen ferredoxina oxidoreductasa de piruvato (PFOR) cuya función es como proteínas transportadoras de electrones (Mansour,T.E., 2002).

Figura 1. *Giardia intestinalis*



Giardia es un protozoo que como trofozoíto habita en la luz del intestino delgado, es posible que se fije al duodeno y al conducto biliar del hospedero a través de su gran disco adhesivo o bien que usen el flagelo para nadar rápidamente en la luz intestinal. Dicho disco tiene en su composición una gran cantidad de tubulina, lo cual explica la sensibilidad del protozoo hacia BC. Al pasar por el tracto gastrointestinal los trofozoítos se convierten a quistes en el colon. El estado de transmisión quístico es típicamente ovoide y con 11 μm de longitud en promedio. Causa un estado patológico que como se dijo anteriormente es denominado giardiasis, la cual es algunas veces una enfermedad diarreica severa. Ésta es transmitida por la ingestión de comida o agua contaminada con los quistes del parásito. La intensidad de la infección varía desde la asintomática hasta diarrea severa asociada con malestar abdominal y náuseas. La infección por *G. intestinalis* causa desórdenes intestinales severos y síntomas relacionados con desnutrición. La adhesión del trofozoíto a la superficie mucosa por medio del disco adhesivo causa acortamiento de las vellosidades del intestino delgado, inflamación de las criptas y lamina propia, y lesiones en la mucosa. En casos raros los trofozoítos pueden penetrar la mucosa. Debido a que la *G. intestinalis* no se ha sabido que produzca toxinas, parece que los síntomas resultan de la combinación de factores químicos y físicos. Las infecciones severas con *G. intestinalis* producen un síndrome de desnutrición caracterizado por la incapacidad del intestino delgado para absorber sustancias esenciales como los carotenos, vitamina B₁₂ y ácido fólico. Otros síntomas adicionales son diarrea, esteatorrea (cantidad anormal de grasa en las heces), distensión abdominal, náuseas, flatulencias, y pérdida de peso (Mansour,T.E., 2002).

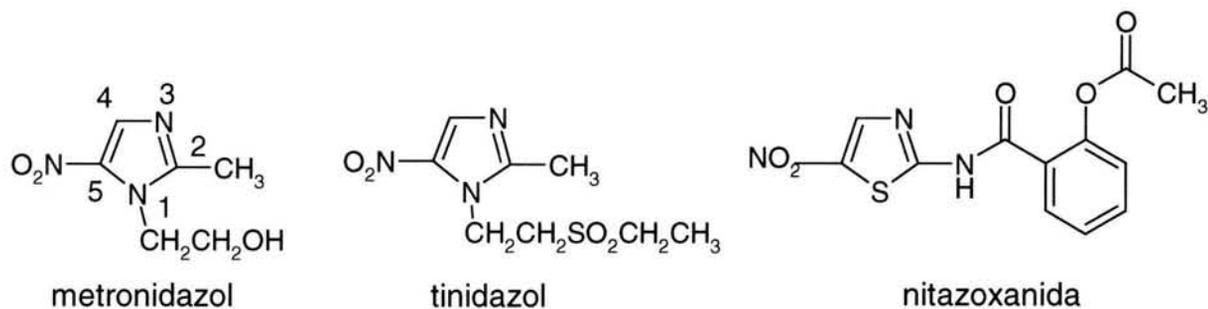
Este parásito metaboliza la glucosa vía las enzimas pirofosfato fructocinasa (PPi-PFK) y la fosfato dicinasa (PPDK) en lugar de la ATP-fosfatofructocinasa (ATP-PFK). La PFOR acoplada a ferredoxina es usada también para la descarboxilación oxidativa de piruvato. Los trofozoitos de *G. intestinalis* se adhieren al revestimiento mucoso de las células epiteliales del duodeno donde las condiciones varían desde anaeróbicas hasta bajos niveles de tensión de

oxígeno. La producción de los metabolitos, entre los que se incluyen acetato, etanol y CO₂, esta influenciada por los cambios en la tensión de oxígeno del microambiente de los trofozoitos. La rapidez de producción de acetato y CO₂ bajo condiciones anaeróbicas esta incrementada, mientras que la de etanol está reducida. Además de la necesidad de glucosa para crecer, la *G. intestinalis* usa arginina como una principal fuente de energía y para la formación de ATP. (Mansour,T.E., 2002).

Aparte de acetato, etanol y CO₂ se identificó alanina por RMN como principal producto metabólico de la *G. intestinalis* bajo condiciones anaeróbicas. Bajo condiciones aeróbicas es inhibida la producción de alanina y etanol, y es formado más acetato y CO₂. La espectroscopia de RMN usando glucosa marcada con ¹³C demostró que la alanina es un producto derivado del metabolismo de glucosa. Se ha postulado que la vía metabólica para la producción de alanina incluye la formación directa vía la deshidrogenasa de alanina a partir de piruvato y amoníaco(Mansour,T.E., 2002).

El tratamiento de primera elección de la giardiasis es con metronidazol. Ocurre la cura total en la primera semana después de iniciado el tratamiento. Sin embargo, pueden ocurrir recaídas si el conducto biliar o la glándula biliar están infectados. El tinidazol es un tratamiento de dosis única que es altamente efectivo, pero no aprobado en algunos países como E.U.A. El tratamiento con 5-nitroimidazoles es efectivo contra los tres tipos principales de protistas mitocondriales mencionados con anterioridad (Godman *et al.*, 1990).

Esquema 2. Estructura de algunos agentes antiprotozoarios



El efecto antiparasitario del metronidazol y sus congéneres depende de la presencia de un grupo nitro en la posición 5 del anillo imidazol. Los derivados sin el grupo nitro no tienen efecto antiparasitario. El metronidazol antes de la reducción por los parásitos mencionados carece de efecto tóxico sobre ellos, por lo cual es considerado un profármaco. La fuente de electrones para la reducción del metronidazol es la descarboxilación oxidativa de piruvato a acetilCoA por la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. Una vez que el nitroimidazol entra en la célula del parásito el grupo nitro, que tiene un potencial redox bajo, acepta electrones de la ferredoxina reducida (Muller *et al.*, 1983; Muller *et al.*, 1986). El efecto citotóxico parece ser debido a derivados anión radicales químicamente reactivos y lábiles, de acuerdo a la reacción presentada en el Esquema 3.

de la giardiasis y considerada obsoleta en el tratamiento de la teniasis, es posible que su efecto terapéutico sea debido a su capacidad de intercalación con el ADN. Para las haloacetamidas del tipo del furoato de diloxanida, al igual que los alcaloides provenientes de plantas del grupo de la emetina, parecen interferir con la síntesis de proteínas en los trofozoitos amebianos o de los quistes (Goodman y Gilman, 1985).

2.3. Resistencia a los fármacos antiparasitarios.

Un fenómeno alarmante que llama la atención en el tratamiento de las parasitosis, ya sea por helmintos o por protozoarios, es la incrementada resistencia de los parásitos a la quimioterapia. Algunos de los factores que la producen en parásitos del ganado son el tratamiento repetido con menos de un mes de intervalo usando la misma clase de parasiticida, lo cual predispone a la resistencia del parásito; además, el no alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco y la carencia o falta de rotación entre los tratamientos subsecuentes.

Por ejemplo, en el caso de la *Giardia* se ha demostrado que la PFOR y ferredoxina purificadas activan el metronidazol. Los niveles de PFOR en cepas de *G. intestinalis* son disminuidos hasta una quinta parte de los normales por retroregulación. Estos resultados son consistentes con la reducción en la activación del fármaco, en anaerobios al radical nitroso y otros similares como se muestra en el Esquema 3, por reacciones de transferencia electrónica de bajo potencial redox. Tales cambios en los niveles de PFOR no se presentaron en cepas de *Giardia* resistentes a furazolidona y además, esta cepa no fue afectada por la quinacrina. El siguiente aceptor de electrones en la cadena de transporte, la ferredoxina I, está disminuida hasta cerca de 7 veces, determinada por el ensayo *in vitro* en la misma cepa. También se considera involucrada la salida incrementada del metronidazol en el parásito (Upcroft *et al.*, 2001).

2.4. Diseño de nuevos antiparasitarios

Ocasionalmente, los nuevos fármacos se descubren por accidente. Más frecuentemente, se desarrollan como parte de un esfuerzo organizado para descubrir nuevas formas para tratar enfermedades específicas. El descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos ha evolucionado a través de los años y ha adicionado otras tecnologías a este proceso cada día más complejo (Hansch, C., 1990). En la actualidad, el diseño de fármacos es un método multidisciplinario que involucra áreas de las ciencias biológicas, genómica, química, estructura biomolecular, química computacional, ensayos farmacológicos y clínicos (Ryan, J.F., 2003). A continuación se presenta, de forma resumida, algunas de las posibles estrategias o métodos utilizadas para la obtención de fármacos:

2.4.1 Método empírico por cernimiento

El cernimiento para identificar posibles agentes quimioterapéuticos fue una novedosa estrategia utilizada por Paul Ehrlich (1854-1915); mediante la cual, se trata de encontrar compuestos capaces de ser tóxicos para el parásito, pero no para el hospedero. El

pensamiento de Paul Erlich, hace ya casi 91 años, fue grandemente influenciado por la especificidad de anticuerpos producidos como una reacción al contacto con antígenos provenientes de microorganismos infecciosos.

La mayoría de los agentes antiparasitarios usados actualmente han sido identificados como resultado del cernimiento al azar de un gran número de productos naturales, o bien, de compuestos químicos sintéticos relacionados con compuestos de reconocido valor terapéutico (Mansour, T.E. 2002). Tal es el caso de los bencimidazoles, como el albendazol, para el tema de nuestro trabajo. Otro ejemplo exitoso de este método es el caso del estudio de la obtención de agentes antimaláricos contra cepas resistentes a la cloroquina o a la pirimetamida, realizado por la armada de los Estados Unidos de América en el Instituto Walter Reed. Para esto fueron considerados un grupo de 4-quinolinmetanoles y de cuyas pruebas resultó la mefloquina (Mansour, T.E. 2002).

Aunque este método para el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos ha sido exitoso en el pasado, no es el ideal por cierto número de razones.

El mayor inconveniente del proceso de cernimiento, es el requerimiento de un procedimiento de tamizado adecuado. Aunque los fármacos son desarrollados por último en la clínica, es usualmente inapropiado administrar agentes químicos de eficacia desconocida directamente en humanos. Consecuentemente, se tienen que desarrollar otros sistemas. Normalmente, una batería de cernimiento es usada para seleccionar nuevos fármacos. Los candidatos potenciales, con actividad en un cernimiento inicial grueso, son los compuestos de alimentación en posteriores cernimientos más sofisticados. Los cribados iniciales son, a menudo, pruebas *in vitro* para alguna actividad fundamental, tal como capacidad para matar bacterias en disolución. En otros casos se han usado técnicas de cultivo *in vitro* para el cernimiento de actividad contra protozoarios y el estudio de mecanismos de acción. Además, se han realizado experimentos de cultivo *in vitro* con los protozoarios parásitos *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, en los que fue desarrollado un medio de cultivo específico para cada parásito. Los trofozoitos son recolectados para los experimentos de prueba de actividad de los fármacos cuando están a la mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Después es determinada la concentración letal mínima de los compuestos a ser probados (Upcroft et al., 1999).

En el caso de los helmintos existen limitaciones para las pruebas de cernimiento *in vitro* debido a las dificultades para establecer cultivos continuos de los parásitos específicos. Estas dificultades son originadas principalmente por lo complejo de su ciclo de vida y por otros problemas asociados a su naturaleza. Por lo tanto, las pruebas de cernimiento *in vitro* están usualmente limitadas a incubaciones de corto tiempo en presencia del agente de prueba, inmediatamente después que los parásitos fueron extraídos del hospedero. Los efectos de los fármacos probados pueden ser determinados por la supervivencia de los parásitos comparados contra controles por un tiempo limitado (Mansour, T.E., 2002).

Sin embargo, es posible mencionar la ventaja del uso de *Caenorhabditis elegans*, un nematodo de vida libre encontrado en el suelo de la mayoría de las regiones templadas de la

tierra, el cual puede ser cultivado casi como un microbio. Tiene la característica principal, para nuestros objetivos, de ser susceptible a todos los antihelmínticos comerciales disponibles en la actualidad a concentraciones razonables. Este hecho, aunado a sus características de ser simple su cultivo, además de tener un ciclo de vida rápido, lo hacen un modelo apropiado para el cernimiento de nuevos agentes con posible actividad antihelmíntica (Mansour, T.E., 2002).

Al final, sin embargo, se requieren cernimientos *in vivo* más aplicables. Este segundo nivel de cernimiento es llevado a cabo usando sistemas de modelos animales para la enfermedad. Algunas propiedades del modelo animal ideal son: su validez, su selectividad para la actividad terapéutica o biológica en cuestión, además de permitir la predicción de la actividad biológica, y, por último, la reproducibilidad de los resultados.

El cribado de fármacos tiene limitaciones inherentes. Primeramente se hacen cernimientos para un gran número de agentes químicos, y, después se seleccionan los más activos para ser evaluados en modelos más sofisticados. Es posible que un cernimiento primario no seleccione apropiadamente para una actividad, lo cual tiene como consecuencia que una estructura activa no sea evaluada como tal. El cernimiento secundario en sistemas de modelos animales tiene problemas adicionales, tales como: el modelo animal puede no reflejar adecuadamente la enfermedad humana; el agente químico podría ser extensivamente metabolizado a un compuesto diferente en el animal, antes de alcanzar su blanco; el agente químico podría no ser absorbido o distribuido como lo es en los humanos. En cada uno de estos casos, la estructura potencialmente activa, no será identificada (Perun *et al.*, 1989).

Otro serio problema con el proceso de cernimiento es que, debido a su naturaleza al azar, es inherentemente repetitivo y consumidor de tiempo para sólo encontrar un agente químico con la actividad deseada. Mas aún, los compuestos químicos descubiertos por este método, pueden no tener estructuras óptimas para modular el proceso biológico. Esto en cambio podría requerir la administración de grandes cantidades de fármaco y aumentar el riesgo de efectos secundarios indeseables (Perun *et al.*, 1989).

La principal ventaja del cernimiento es que no se requiere de una gran cantidad de información para llevar a cabo el proceso. No es necesario conocer la estructura del fármaco a estudiar. Tampoco es indispensable conocer la estructura del blanco sobre el cual actuará el fármaco. Más importante es poder realizar las pruebas sin conocer a fondo acerca del mecanismo del proceso de enfermedad. En el caso del uso de modelos animales, el cernimiento presenta la gran ventaja de observar los efectos del producto sobre los parásitos en un medio casi igual a su hábitat natural, además de proporcionar información temprana de las propiedades cinéticas y tóxicas (Warmuth, C., 1996).

2.4.2. Método racional

El método racional para buscar agentes antiparasitarios fue posterior a los trabajos de Ehrlich, y gradualmente se estableció como una estrategia para la búsqueda de agentes selectivamente tóxicos para el parásito y no para el hospedero, o con un efecto mínimo. Dicha actividad es conocida en la actualidad, como diseño racional de antiparasitarios. Con los

avances en Bioquímica, Biología molecular y en las técnicas de síntesis de nuevos compuestos orgánicos, se ha observado un importante progreso para lograr los objetivos planteados por Ehrlich (Mansour, T., 2002). Los blancos quimioterapéuticos ideales son aquellos que son únicos para los parásitos. Se puede mencionar el caso de la enzima tripanotion reductasa, la cuál tiene características únicas para el tripanosoma, debido a sus propiedades, es el blanco preferido para el cernimiento de agentes tripanocidas (Agabian, N. *et al*, 1990.).

2.4.2.1 Modificaciones moleculares

Una vez que el compuesto activo (prototipo) ha sido identificado y determinada su estructura química, es posible mejorar en éste la actividad y/o reducir efectos secundarios realizando cambios en la estructura química básica. Las modificaciones para intensificar la actividad son, a menudo, a través de medios químicos o biofermentativos para hacer cambios en la estructura prototipo o sus intermediarios. Alternativamente, para algunos productos naturales se puede usar ingeniería genética, para que el organismo productor sintetice el compuesto modificado directamente (Korolkovas, A., 1988)

Como con el cernimiento, el proceso de modificación molecular de un prototipo activo requiere que se conozca la estructura del compuesto. No se necesita conocer la estructura del blanco sobre el cual actúa el fármaco. Del mismo modo, no se requiere información acerca del proceso de enfermedad (Perun *et al.*, 1989).

Al igual que en el cernimiento, el proceso de modificación molecular está, a menudo, basado principalmente en un método de ensayo y error.

Debido a que se conoce más información, no obstante, este proceso puede ser realizado con mucha mayor probabilidad de éxito que un proceso puramente al azar. Un primer ejemplo del poder de este método es en el área de antimicrobianos, donde las modificaciones moleculares de cefalosporinas de primera generación condujeron a productos de segunda y tercera generación con características sustancialmente mejoradas.

Las limitaciones de este proceso son inherentes al hecho de que usa un solo prototipo como base para el posterior diseño de fármacos. Los mejoramientos son probables, no obstante, la posibilidad de algún gran adelanto en el desarrollo de nuevas entidades químicas (NCEs) es muy remota. Además, si falla el compuesto prototipo original para generar un fármaco deseable, se debe comenzar el proceso de nuevo, encontrando una nueva molécula prototipo.

2.4.2.2. Diseño de fármacos basado en el mecanismo de acción

Aunque algunos de los mejores antiparasitarios eran conocidos mucho antes del entendimiento de que la biología, y, específicamente, antes de que el metabolismo de los parásitos fuera mejor establecido, es importante el estudio del mecanismo de acción de dichos agentes. Es necesaria la elucidación del mecanismo de acción en blancos, usualmente no establecidos, que son factibles de estudios biológicos posteriores (Mansour, T.E., 2002).

Los recientes descubrimientos realizados en la década pasada en la fisiología y la bioquímica de protozoarios y helmintos, han elucidado muchos de los blancos tentativos que son únicos para ciertos parásitos. Hay más información biológica básica disponible que ha sido suficientemente explotada para la quimioterapia de parásitos (Mansour, T.E., 2002). El método racional de descubrimiento de nuevos agentes antiparasitarios debe identificar tantos blancos prospectivos como sea posible, para apuntar selectivamente los nuevos agentes químicos contra esos blancos.

Al tener disponible más información acerca de la base biológica de una enfermedad, es posible empezar a diseñar fármacos (moléculas) usando un método mecanístico para el proceso de enfermedad. Cuando el proceso de enfermedad es entendido a nivel molecular y las moléculas blanco están definidas, los fármacos pueden ser diseñados específicamente para interactuar con la molécula blanco, de tal forma que interrumpa la enfermedad (Perun *et al.*, 1989).

El diseño de fármacos basado en la estructura, se fundamenta en la comparación de estructuras tridimensionales del sitio activo de enzimas blanco, en el parásito y en el hospedero, y el subsecuente diseño de moléculas que se unen específicamente a las enzimas del parásito.

Un método racional para la selección de agentes antiparasitarios debe incluir la identificación de diferencias bioquímicas y moleculares entre parásitos y hospedero. Tales diferencias podrían manifestarse en la forma de una vía bioquímica o una enzima que es única en el parásito, la cual representa un blanco ideal para diseñar un agente antiparasitario (Mansour, T.E., 2002).

La quimioterapia de infecciones parasitarias es algo diferente a otros padecimientos, y posee un grupo de problemas inherentes característicos en el desarrollo de fármacos. En este caso se intenta eliminar un parásito que posee una bioquímica propia, la cual difiere de las células del hospedero. Los protozoarios, por ejemplo, causan un gran número de enfermedades humanas y animales, las cuales incluyen la tripanosomiasis (africana y americana), leishmaniasis, coccidiosis, toxoplasmosis y malaria (Mansour, T.E., 2002). Sólo hasta hace relativamente poco tiempo se apreció que el metabolismo de nucleótidos en estos protozoarios podría diferir marcadamente de las células del hospedero; y por lo tanto, presentar una oportunidad para la terapia como blancos para su ataque. Por ejemplo, los protozoarios parecen ser incapaces de realizar la síntesis de novo de purina y son dependientes del hospedero para el abastecimiento de bases púricas. Sin embargo, pueden afectar toda o parte de la síntesis de pirimidinas de novo y algunas son totalmente dependientes de la síntesis de novo. Además, la mayoría, si no todos, los parásitos protozoarios parecen combinar las actividades de hidrofolato reductasa y timidilato sintetasa en una sola proteína. Éstas, además de otras enzimas, pueden ofrecer blancos para el control quimioterapéutico, y las bioquímicas individuales pueden ser explotadas para la potenciación de un agente antiprotozoario (Hansch, C. 1990, p.323.).

Algunos de los blancos generales considerados para la quimioterapia antiparasitaria son: las enzimas encontradas solamente en los parásitos, las enzimas encontradas en el parásito y hospedero, pero indispensables solamente en el parásito y, las funciones bioquímicas comunes encontradas en el parásito y el hospedero, pero con propiedades farmacológicas diferentes.

Pertenece a la primera categoría, se tiene a la ferredoxina oxidoreductasa de protozoarios anaerobios, la cual es blanco de nitroimidazoles. Las enzimas limitantes de la rapidez de reacción en vías metabólicas esenciales o vitales para el parásito, pertenecientes a la segunda categoría, son blancos excelentes para el diseño de agentes antiparasitarios. En el caso de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof, (un buen ejemplo de la regulación de un sistema multienzimático) pueden ser consideradas 3 enzimas limitantes importantes de las 11 que la componen: hexocinasa, fosfofructocinasa y pirúvico cinasa (Mansour, T.E., 2002). La fosfofructocinasa ha sido considerada un buen blanco para inhibir la vía glicolítica, vitalmente importante para algunos parásitos, es limitante de la rapidez de reacción en la vía glicolítica en los protozoarios patógenos *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* y *Naegleria fowleri* (Mansour, T.E., 2002). Esta enzima es bastante diferente a la de los seres humanos; por lo cual, puede ser considerada como un blanco importante de agentes antiparasitarios (Carrie L. *et al*, 1997). También conviene considerar como blanco de ataque para la malaria, de la cual hay pocos, la vacuola alimentaria que es el sitio de acción de agentes del tipo de la cloroquina y otras quinolinas. Otro ejemplo de un blanco encontrado en el parásito y el hospedero es la tubulina, la cual se polimeriza a microtúbulos. Este proceso es inhibido por los bencimidazol 2-carbamatos de metilo (BC), como el albendazol, los cuales tienen mayor afinidad por la tubulina de helmintos, que por la tubulina de los mamíferos (Lacey, 1988). Este mismo blanco puede ser considerado para la actividad antiprotozoario de fármacos (Werbovetz, K.A., 2002).

Algunos otros blancos potenciales de ataque de los protozoarios son: las proteasas de cisteína, el metabolismo de la glucosa, el tránsito de proteínas y la integridad de membrana. Ejemplos de más fármacos activos frente a protozoarios, cuyo blanco de acción es relativamente conocido, son los inhibidores de dihidrofolato reductasa, los cuales actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos de forma similar que las sulfas, pero en diferente sitio de la vía metabólica. La artemisina tiene como sitio de ataque la red vacuolar alterando el transporte de proteínas de membrana. Además, conviene reiterar que la tubulina también es un blanco para algunos fármacos antiprotozoarios (Schmeister, J. *et al*. 1997).

Definitivamente, un método mecanístico para el diseño de fármacos requiere una gran cantidad de conocimientos. Además, procesar este conocimiento para desarrollar un nuevo fármaco es una tarea formidable. Sin embargo, es evidente que los mayores adelantos en el diseño de fármacos vendrán, más probablemente, vía el uso de este método. Debido a la cantidad masiva de información que debe ser aprovechada para desarrollar fármacos o esta técnica, es en esta área donde el diseño de fármacos asistido por computadora tendrá su mayor impacto. Se pueden mencionar como ejemplo algunos esfuerzos realizados para desarrollar agentes antimaláricos en este campo (Agabian, N. *et al*, 1990).

2.4.2.3. Sustitución isostérica

El diseño de fármacos ha utilizado un método muy eficaz y sencillo en el estudio y búsqueda de nuevos productos con potencial aplicación terapéutica, éste consiste en la sustitución isostérica. En el sentido estricto, la palabra isótero se refiere a grupos que tienen el mismo volumen, según la ley de Grimm de desplazamiento del hidruro, la cual dice que "los átomos de la tabla periódica que se encuentran hasta cuatro lugares antes de un gas inerte cambian sus propiedades adicionando desde uno hasta cuatro hidrógenos, de tal manera que las combinaciones resultantes se comportan como pseudoátomos, los cuáles son similares en sus propiedades a los elementos en los grupos 1 a 4 a su derecha, respectivamente; de tal forma que, aún teniendo diferente número de átomos, poseen la misma cantidad de electrones de valencia (Avendaño, C., 1997). En el Cuadro 2 se representa esquemáticamente dicha ley.

Cuadro 2. Esquematización de la Ley de Grimm para isósteros

C	N	O	F	Ne
	CH	NH	OH	FH
		CH ₂	NH ₂	OH ₂
			CH ₃	NH ₃
				CH ₄

De acuerdo a este principio, se pueden considerar isósteros los siguientes grupos: -O-, -NH-, -CH₂-.

Los bioisósteros son compuestos isostéricos que tienen ya sea propiedades similares, o bien, antagónicas. El obtener bioisósteros es de importancia debido a la propiedad que tienen estos de modular la actividad biológica, en virtud de las sutiles diferencias en sus propiedades fisicoquímicas; es decir, productos con el mismo tipo de actividad biológica, agonistas o antagonistas (La Voie, E.J., *et al.* 1996). Además de la capacidad para definir los requerimientos esenciales del farmacóforo para la acción antiparasitaria.

Se llama farmacóforo al arreglo tridimensional de átomos o grupos funcionales requerido para que un fármaco presente una respuesta particular. Son seleccionados como potenciales puntos farmacofóricos grupos cargados, grupos aceptores/donadores de electrones (formadores de puente de hidrógeno), grupos polares o aromáticos (Krosgaard-Larsen, 1991). Los estudios de las relaciones estructura actividad en series de homólogos permiten deducir la posición y propiedades de los puntos farmacofóricos. Por lo tanto, es deseable que los productos tengan cierta complementariedad estructural con el receptor, para unírsele con alta afinidad.

2.4.2.4. Técnicas combinadas

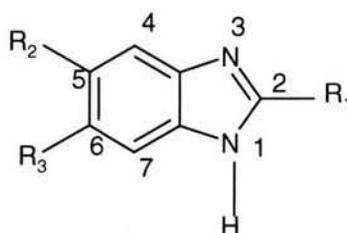
Al discutir las diversas técnicas para encontrar nuevos fármacos, es importante recordar que el descubrimiento de fármacos es un proceso acumulativo y reiterativo. Los fármacos potenciales desarrollados modificando una estructura prototipo, son seguros de ser remitidos a través de un proceso selectivo de cernimiento para confirmar la actividad y seleccionar el mejor candidato para posterior desarrollo. Del mismo modo, los fármacos desarrollados mecanísticamente, serán probablemente cribados y más tarde modificados para producir el mejor candidato (Perun *et al.*, 1989).

Además, cada nueva entidad química (NCE) que afecta el proceso de enfermedad, ya sea encontrada por accidente, cernimiento, modificación, o diseño mecanístico, proporciona información útil para desarrollar compuestos aún mejores. Todo lo anterior es cierto, si el agente químico aumenta la base de datos de información acerca de la interacción fármaco-enfermedad.

2.5. Actividad antiprotozoaria de nuevos bencimidazoles

Estudios recientes realizados en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, en colaboración con el Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, llevaron al diseño, síntesis y evaluación de actividad antiprotozoaria de los 1-*H* y 1-metilbencimidazoles enlistados en los Cuadro 3.y Cuadro 4. respectivamente

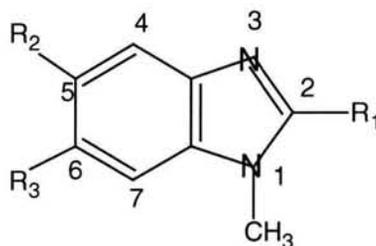
Cuadro 3. Actividad de los 1*H*-Bencimidazoles contra *G. intestinalis*



Clave	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ μM
1HB	H	H	H	0.008
2HB	CH ₃	H	H	0.317
3HB	CF ₃	H	H	0.107
4HB	SH	H	H	0.040
5HB	SCH ₃	H	H	0.045
6HB	NH ₂	H	H	1.902
7HB	NHCO ₂ CH ₃	H	H	0.057

8HB	H	Cl	H	0.282
9HB	CH ₃	Cl	H	0.156
10HB	CF ₃	Cl	H	1.282
11HB	SH	Cl	H	0.081
12HB	SCH ₃	Cl	H	0.005
13HB	NH ₂	Cl	H	0.030
14HB	NHCO ₂ CH ₃	Cl	H	0.066
15HB	H	Cl	Cl	0.358
16HB	CH ₃	Cl	Cl	0.065
17HB	CF ₃	Cl	Cl	0.078
18HB	SH	Cl	Cl	0.078
19HB	SCH ₃	Cl	Cl	0.227
20HB	NH ₂	Cl	Cl	0.218
21HB	NHCO ₂ CH ₃	Cl	Cl	0.127
Metronidazol				1.228
Nitazoxanida				0.013
Albendazol				0.037

Cuadro 4. Actividad de los 1-Metilbencimidazoles contra *G. intestinalis*



Clave	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ μM
1MB	CH ₃	H	H	0.089
2MB	NH ₂	H	H	1.360
3MB	SH	H	H	0.018
4MB	SCH ₃	H	H	0.033
5MB	CF ₃	H	H	0.064
6MB	CH ₃	Cl	H	0.144
7MB	NH ₂	Cl	H	0.242
8MB	SH	Cl	H	0.045
9MB	SCH ₃	Cl	H	0.028
10MB	CF ₃	Cl	H	0.042
11MB	CH ₃	H	Cl	0.044
12MB	NH ₂	H	Cl	0.132
13MB	SH	H	Cl	0.020
14MB	SCH ₃	H	Cl	0.122

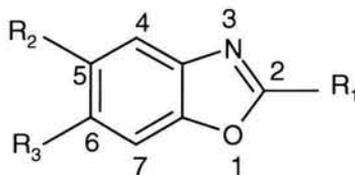
15MB	CF ₃	H	Cl	0.127
16MB	CH ₃	Cl	Cl	0.055
17MB	NH ₂	Cl	Cl	0.074
18MB	SH	Cl	Cl	0.008
19MB	SCH ₃	Cl	Cl	0.024
20MB	CF ₃	Cl	Cl	0.260
Metronidazol				1.228
Nitazoxanida				0.013
Albendazol				0.037

Como se puede apreciar, en estos compuestos se mantiene el núcleo del 1-*H* bencimidazol, o bien, está sustituido en la posición 1 con un grupo metilo. La posición 2 se sustituyó con grupos isostéricos (CH₃, NH₂, SH, SCH₃, CF₃), NHCO₂CH₃, o bien, se dejó sin sustituir. La evaluación biológica de dichos compuestos, empleando pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *G. intestinalis*, mostró que, a excepción de los derivados 2-NH₂, todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol, que es el fármaco de elección. Esta observación sugiere que el hidrógeno en la posición 1 del núcleo del bencimidazol no es indispensable para la actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia*, ya que ambos tipos de compuestos fueron activos.

2.6. Compuestos propuestos en el nuevo proyecto UNAM-Centro Médico

Con la finalidad de conocer la importancia que tiene el *N* en la posición 1 del núcleo del bencimidazol en la actividad antiprotozoaria contra *G. intestinalis*, se estructuró un nuevo proyecto de investigación por los mismos investigadores de la UNAM y el Centro Médico. En este nuevo proyecto, se diseñaron los compuestos que se muestran en el Cuadro 5. En estos compuestos se cambia el NH por su equivalente isostérico, un O de tal manera que el núcleo resultante es un benzoxazol. Se conservan los sustituyentes en la posición 2 (H, CH₃, CF₃, SH, SCH₃, NH₂, NHCO₂CH₃), con el mismo patrón de sustitución en las posiciones 5 y 6. En este trabajo se sintetizaron los compuestos **3** a **12** así como sus intermediarios, de los cuales se encontraron informes bibliográficos de la obtención y propiedades de **8** y **10**, sin embargo se carece de información acerca de su actividad antiparasitaria contra *G. intestinalis* de todos ellos.

Cuadro 5. Benzoxazoles diseñados en el nuevo proyecto de investigación de la UNAM-Centro Médico



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
3	H	Cl	H
5	CH ₃	Cl	H
7	CF ₃	Cl	H
8	SH	Cl	H
9	SCH ₃	Cl	H
10	NH ₂	Cl	H
12	NHCO ₂ CH ₃	Cl	H
13	H	H	H
14	CH ₃	H	H
15	CF ₃	H	H
16	SH	H	H
17	SCH ₃	H	H
18	NH ₂	H	H
20	NHCO ₂ CH ₃	H	H
21	H	H	Cl
22	CH ₃	H	Cl
23	CF ₃	H	Cl
24	SH	H	Cl
25	SCH ₃	H	Cl
26	NH ₂	H	Cl
28	NHCO ₂ CH ₃	H	Cl
29	H	Cl	Cl
30	CH ₃	Cl	Cl
31	CF ₃	Cl	Cl
32	SH	Cl	Cl
33	SCH ₃	Cl	Cl
34	NH ₂	Cl	Cl
36	NHCO ₂ CH ₃	Cl	Cl

Es de llamar la atención el hecho referido en la bibliografía (Lacey, E.,1988) de las relaciones estructura actividad antihelmíntica de bencimidazoles, en donde se establece el requerimiento estricto de la presencia de un hidrógeno en la posición 1, además, de un sustituyente en 5 y un grupo metil carbamato en 2, para la mayoría de los productos activos, aunque en ciertos casos dicha agrupación en 2 puede ser un grupo metiltio como en el triclabendazol. Sin embargo, tal protón en 1 no es indispensable para la actividad antiprotozoaria potente de algunos bencimidazoles (Navarrete-Vázquez, G., 2001; Valdez, J., 2002).

Esto sugiere la posibilidad de poder modular apropiadamente dicha posición hasta encontrar actividad potente de los derivados diseñados, o bien, la combinación adecuada en las modificaciones, la introducción de diversos grupos en 2 y obtener un producto con un perfil de

efectividad mejorado, como consecuencia del conocimiento básico de los requerimientos estructurales.

2.7. Métodos de síntesis de benzoxazoles

Los métodos para la obtención de benzoxazoles son diversos y muy variados. En la mayoría de los casos, es conveniente introducir los grupos funcionales en la materia prima, previo a la ciclación, generalmente oxidativa (Acheson, 1981), aunque también se presentan algunos ejemplos de la funcionalización después de formado el heterociclo, en condiciones que no lo hidrolizan, sobre todo, evitando disolventes altamente nucleofílicos.

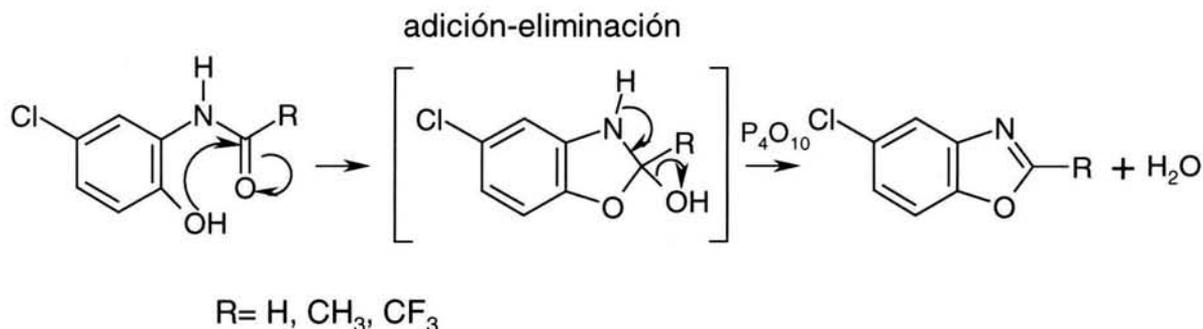
A continuación se presentan los métodos de obtención de benzoxazoles relacionados con esta tesis, los cuales son semejantes a los métodos de obtención de los análogos bencimidazólicos.

2.7.1. Obtención de 2-alkilbenzoxazoles

2.7.1.1 A partir de *o*-aminofenoles y ácidos carboxílicos

La reacción de adición-eliminación sobre carbono trigonal tal vez sea el tipo de reacción más importante, debido al gran número de métodos en los que se aplica. En esta estrategia se parte de *o*-aminofenoles, sustituidos o no; los cuales, se hacen reaccionar en caliente con ácidos alquilcarboxílicos, con catálisis por ácido polifosfórico PPA, ácido metanosulfónico, o pentóxido de fósforo, entre otros (Suto, M.J. *et al.* 1995). El uso del ácido polifosfórico ha sido uno de los medios más convenientes para la ciclación con la finalidad de obtener diversos heterociclos, entre ellos el del benzoxazol, además de otras aplicaciones en la química de polímeros (Suto, M.J. *et al.* 1995).

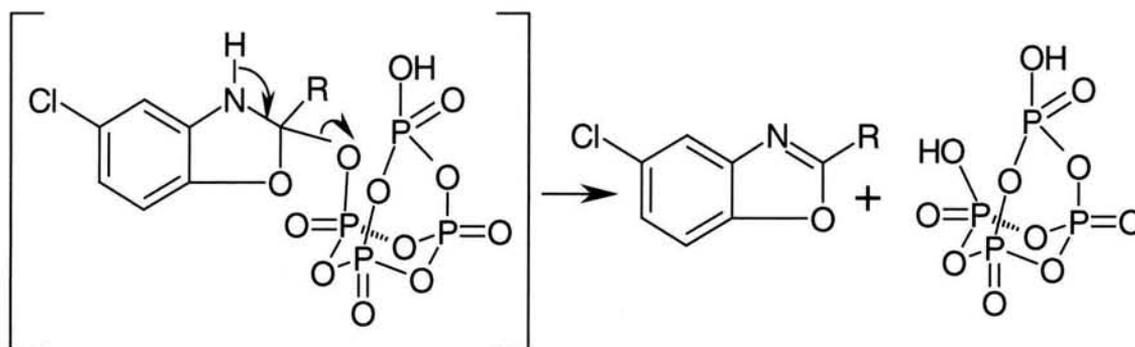
Esquema 4. Representación de un intermediario tetraédrico para obtener benzoxazoles sustituidos en 2



La participación del pentóxido de fósforo es como agente deshidratante a través de la formación de un buen grupo saliente con el hidroxilo y poder eliminar muy fácilmente agua. La molécula del pentóxido, en realidad se encuentra como P₄O₁₀, comprobado por

determinaciones de densidad de vapor y por difracción de rayos X, por lo cual se representa de esta manera en el Esquema 5 de reacción (Corbridge, D.E.C., 1990).

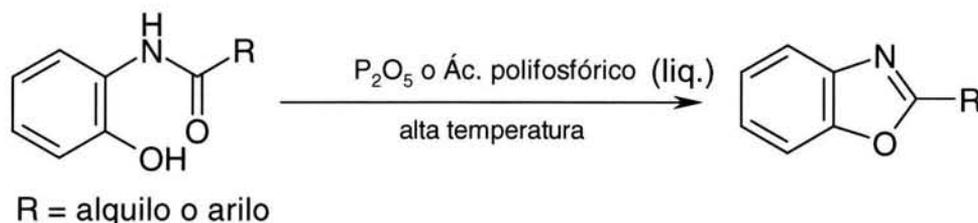
Esquema 5. Representación del intermediario propuesto para la obtención de benzoxazoles por deshidratación con pentóxido de fósforo



2.7.1.2. A partir de *o*-aminofenoles via carboxamidas

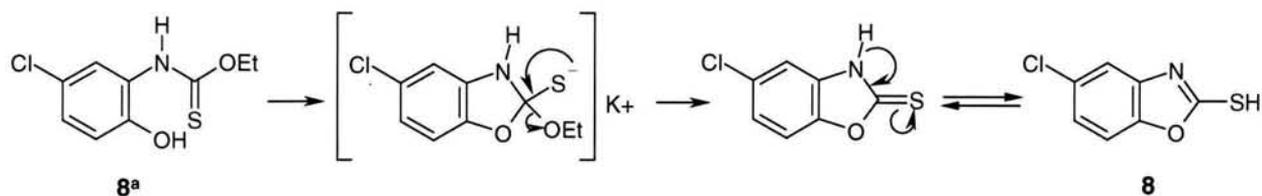
Los 2-alkilbenzoxazoles también se pueden obtener por deshidratación de los 2-carboxamidofenoles con pentóxido de fósforo o ácido polifosfórico en caliente., tal como se muestra en el Esquema 6, (Kim, S.S. *et al* 1990).

Esquema 6. Representación de una reacción de adición-eliminación para obtener 2-alkilbenzoxazoles

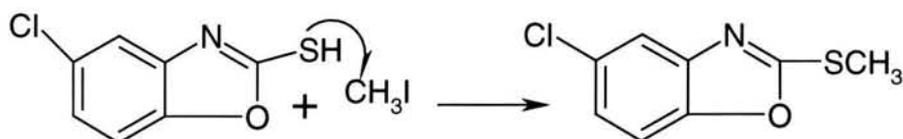


2.7.2. Obtención de 2-mercaptobenzoxazoles

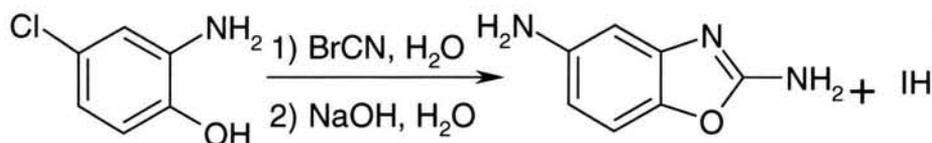
Otra reacción de esta categoría se presenta en la obtención del 5-cloro-2-mercaptobenzoxazol **8** por el método de Van Allan, 1963. Se realiza produciendo etilxantato de potasio *in situ*, a partir de disulfuro de carbono, alcohol etílico y potasa, el cual reacciona con un *orto* aminofenol. En este proceso, el éster etílico del ácido (5-cloro-2-hidroxifenil)tiocarbámico **8^a** (el cual no es aislado), produce rápidamente **8**, en las condiciones básicas de reacción; posiblemente, a través de un intermediario tetraédrico, con la eliminación de etoxilato (March, J., 2001).

Esquema 7. Obtención de 2-mercaptobenzoxazoles**2.7.3. Obtención de 2-(metiltio)benzoxazoles**

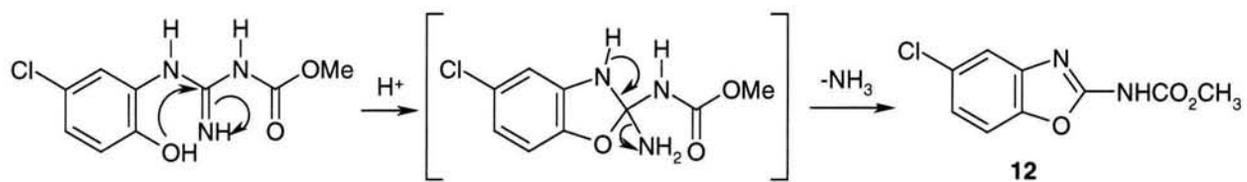
De manera análoga a la obtención de los 2-(metiltio)benzimidazoles (Iddon, 1992) (Sánchez, D. M. R., 1999) se pueden obtener los 2-metiltiobenzoxazoles por metilación de los correspondientes 2-mercaptobenzoxazoles con yoduro de metilo en medio básico (Arroyo S., V.M., 2003), según se muestra en el Esquema 8.

Esquema 8. Reacción de metilación para obtener 2-(metiltio)benzoxazoles**2.7.4. Obtención de 2-aminobenzoxazoles**

Un método fácil para obtener 2-aminobenzoxazoles es por tratamiento de los *o*-aminofenoles con bromuro de cianógeno, reacción que está bien estudiada para la obtención de los 2-aminobenzimidazoles (Leonard, N.J., 1947).

Esquema 9. Reacción de obtención de 2-aminobenzoxazoles**2.7.5 Obtención de carbamatos de alquilo**

También puede ser tomada en cuenta, dentro de esta categoría, la reacción de obtención del carbamato **12** (Raeymakers, A.H., 1978) a partir de la sal del éster metílico del ácido *N*-[1-imino-(5-cloro-2-hidroxianilinometil)]carbámico intermediario (el cual no se aísla).

Esquema 10. Intermediario tetraédrico de la obtención de **12**

De nueva cuenta, es posible proponer la reacción como una adición-eliminación, a través de un posible intermediario tetraédrico y presentar como producto el carbamato objetivo **12**, liberando amoníaco al realizarse la condensación .

Justificación y objetivo

Las infecciones y enfermedades producidas por parásitos protozoarios en humanos son de gran importancia médica; especialmente, en los países en vías de desarrollo. En la actualidad se considera el tratamiento quimioterapéutico de las enfermedades parasitarias como una de las mejores alternativas para su control. Sin embargo, en muchos casos éste no es efectivo, ya que se ha observado falla terapéutica, producción de efectos secundarios y resistencia a fármacos. Es por esto que instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de su “Drug Discovery Research group of WHO” tienen entre sus principales objetivos el diseño, la síntesis y la evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria.

En esta tesis se pretende ampliar el conocimiento sobre las relaciones estructura actividad antiprotozoaria de derivados del benzoxazol, isómeros de bencimidazoles que han mostrado actividad contra *G. intestinalis*.

Objetivo general

Determinar el potencial antiparasitario de derivados del benzoxazol, isómeros de bencimidazoles activos contra *G. intestinalis*.

Objetivos particulares

1. Sintetizar los derivados del benzoxazol que se muestran en el Cuadro 8, así como sus precursores no accesibles comercialmente.
2. Aislar, purificar y determinar las constantes físicas más importantes de cada uno de los compuestos sintetizados.
3. Caracterizar los compuestos preparados por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
4. Someter los compuestos benzoxazólicos a pruebas de actividad *in vitro* contra *G. intestinalis*.
5. Contribuir en la búsqueda de información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria.

3. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo que a continuación se describe se dividió en dos partes. En la primera, la parte química, se realizó la síntesis de los benzoxazoles **3**, **5**, **7-12**, así como de las amidas precursoras **2**, **4**, **6**. En la segunda, la parte biológica, se hicieron las pruebas de actividad *in vitro* contra *Giardia intestinalis*.

3.1 PARTE QUÍMICA

3.1.1 Instrumentación

El peso de la materia prima y productos se determinó en una balanza granataria Ohaus E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.

El punto de fusión de los productos se determinó en un aparato Büchi B-540 y no están corregidos.

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi R-114 con baño B-480 acoplado a una bomba de vacío marca Gast 0523-V47-6528DX ajustada a 50 mmHg y un condensador de alta eficiencia conectado a un enfriador VWR Scientific modelo 1107.

Para realizar las reacciones a temperatura constante se usó una parrilla con agitación y calentamiento marca IKA modelo IKAMAG Ret básica con controlador de temperatura ETS-D4 fuzzy, o bien, una parrilla con agitación y calentamiento marca Corning modelo PC 220, además de un baño de aceite.

Las destilaciones de bulbo a bulbo se realizaron en un aparato Kugelrohr Aldrich de 120v, para cantidades por arriba de 5 g, o bien, en un aparato Büchi de 210v para pequeñas cantidades. La presión se redujo hasta 4 mmHg mediante una bomba de vacío difusión Marathon Electric ZQC17D208OF.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600, en pastilla de bromuro de potasio, la frecuencia de las señales se reporta en cm^{-1} . Las vibraciones de estiramiento se representan por γ y las de deformación o alabeo por δ . Las vibraciones de deformación fuera del plano son representadas por el subíndice oop.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) se realizaron en un espectrómetro Varian modelo Unity Inova de 300 MHz usando tetrametilsilano como referencia interna, cloroformo o dimetilsulfóxido deuterados como disolventes y agua deuterada para el intercambio de hidrógeno. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. Las constantes de acoplamiento J se dan en Hertz. Los símbolos correspondientes a la multiplicidad de las señales son: s = simple, d = doble, dd = doble de doble, t = triple, m = múltiple, sa = simple amplia.

Los espectros de masas (EM) se realizaron por introducción directa en un espectrómetro de masas JEOL modelo JMS-SX102A acoplado a un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II, usando la técnica de impacto electrónico (IE). La simbología empleada es: m/z (masa/carga), M (ión molecular), M+1, M+2, M+4 (picos isotópicos).

3.1.2. Cromatografía

Para el seguimiento de las reacciones y el análisis de la pureza de los productos se utilizó la cromatografía en capa fina (ccf) en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F-254 de la casa Merck. La visualización de los productos se realizó con luz ultravioleta y/o por exposición a vapores de yodo. En la cámara cromatográfica se emplearon 10 mL del sistema en cuestión con dos gotas de hidróxido de amonio, la composición y proporción de los sistemas utilizados, fueron las siguientes:

Cuadro 6. Composición de sistemas de ccf

Sistema	Composición	Proporción	Volumen + NH ₄ OH
I	Cloroformo - metanol	90:10	10 mL + 2 gotas
II	Cloroformo - metanol	99.5:0.5	10 mL + 2 gotas
III	Cloroformo - metanol	95:5	10 mL + 2 gotas
IV	Cloroformo - metanol	98:2	10 mL + 2 gotas

3.1.3. Sustancias y disolventes

El 2-amino-4-clorofenol, el yoduro de metilo, el bromuro de cianógeno y el sulfato de *s*-metilisotiourea se adquirieron de Aldrich; el ácido fórmico al 97%, el ácido trifluoroacético, el anhídrido trifluoroacético, el disulfuro de carbono y el pentóxido de fósforo, de Merck; el anhídrido acético, de Baker; el hidróxido de sodio, HCl y los diferentes disolventes de grado reactivo se adquirieron en el almacén de la Facultad de Química y se emplearon sin purificación alguna.

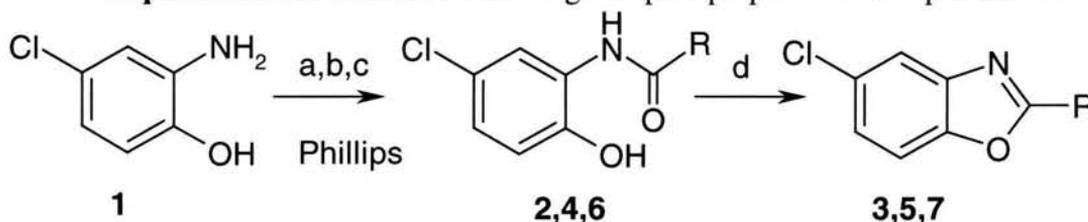
3.1.4. Descripción breve del procedimiento sintético

A continuación se describe, brevemente, el procedimiento que se siguió para la preparación de los benzoxazoles y sus intermediarios, de acuerdo a la secuencia sintética que se muestra en los **Esquemas 11,12,13 y 14**.

Se partió del 2-amino-4-clorofenol **1**, que sometido a reacción de *N*-acilación con ácido fórmico, anhídrido acético o anhídrido trifluoroacético llevó a las amidas intermedias **2,4,6** (Phillips, 1928). Cada una de las amidas anteriores se mezcló con P₂O₅ y la mezcla se destiló de bulbo a bulbo a presión reducida para dar los benzoxazoles **3,5,7** (técnica desarrollada en el laboratorio). Por otro lado, cuando **1** se trató con xantato de etilo, generado *in situ* a partir de CS₂, EtOH, KOH y posterior calentamiento, se obtuvo el 2-mercaptobenzoxazol **8** (Van Allan,

J.A. *et al.*, 1963); el cual, por tratamiento con CH_3I en medio básico llevó al 2-metilbenzoxazol **9** (Iddon, B. *et al.*, 1992). Para la síntesis del 2-amino-5-clorobenzoxazol **10**, se trató **1** con bromuro de cianógeno (Leonard, N.J. *et al.*, 1947), el producto obtenido llevó al carbonato **11** con cloroformiato de metilo, en vez del carbamato **12**. Para obtener **12** se siguió otro procedimiento (Raeymakers, A.H. *et al.*, 1978), consistente en adicionar **1** a una mezcla de reacción del sulfato de *s*-metilisotiourea con cloroformiato de metilo, y, posteriormente calentamiento para dar **12**.

Esquema 11. Secuencia sintética seguida para preparar los compuestos **2-7**



R= H en **2** y **3**; CH_3 en **4** y **5**; CF_3 en **6** y **7**

a) HCOOH , calor, b) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ / tolueno, c) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, tolueno,

d) P_2O_5 , destilación de bulbo a bulbo.

3.2. TECNICAS DE LABORATORIO

Las técnicas de preparación de cada uno de los compuestos fueron las siguientes:

3.2.1. *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)formamida (**2**)

En un matraz de bola de 250 mL con una boca 24/40, acondicionado con una columna Vigreux, atmósfera de nitrógeno y agitación magnética, se colocaron 10 g (0.0697 mol) de 2-amino-4-clorofenol (**1**) y se le adicionaron lentamente 20 mL de ácido fórmico; luego, se calentó a reflujo hasta el consumo de la materia prima, indicado por una ccf. La mezcla de reacción se suspendió en agua fría y el sólido resultante se separó por filtración con vacío. Se obtuvieron 10.4 g (87%) de un producto amorfo de color café rojizo (una sola mancha en la ccf) el cual se disolvió en etanol y trató con carbón activado a reflujo durante 30 min. A continuación se filtró sobre celita y la disolución resultante se diluyó con un volumen igual de agua a la misma temperatura. El producto cristalizó al enfriar. Este producto se recrystalizó de etanol dando cristales pequeños (una sola mancha por ccf, R_f 0.29, Sistema I), con un punto de fusión de 164-165 °C. IR (Espectro No. 2A): 3386 cm^{-1} (NH), 3172 cm^{-1} (OH), 2913 cm^{-1} (CH), 1683 cm^{-1} (CO), 1115 y 605 cm^{-1} (CCl). RMN ^1H (Espectro No. 2 B): 6.85 ppm (d, $J_o=8.4\text{ Hz}$, 1H, C3), 6.94 ppm (dd, $J_m=2.1$ y 2.7 Hz , $J_o=8.4$, 1H, C4), 8.16 ppm (d, $J_m=2.4\text{ Hz}$, 1H, C6), 8.27 ppm (d, $J=1.8\text{ Hz}$, 1H, C1'), 9.72 ppm (s, intercambia agua deuterada, 1H, NH), 10.32 ppm (s, intercambia agua deuterada, 1H, OH). EM (Espectro No. 2C): 171 (M), 143 (M-28, -CO, 100%), M+2 (33.78%).

3.2.2. 5 Clorobenzoxazol (3)

En un matraz de bola de 25 mL con una boca 14/20 se mezclaron 0.98 g (0.0057 mol) de **2** y 2.36 gramos (0.0124 mol) de pentóxido de fósforo al 75 % en un soporte inerte. Posteriormente, la mezcla se calentó a 100-120 °C en un horno Kugelrohr a presión reducida de 4 mm de Hg. El producto que destiló cristalizó inmediatamente. Se obtuvieron 263 mg (30%) de cristales blancos (una sola mancha por ccf, Rf 0.66, Sistema I), con un punto de fusión de 39-40 °C. IR (Espectro No. 3A): 3099 cm⁻¹ (CH), 3003 cm⁻¹ (CH), 1512 cm⁻¹ (CN), 1453 cm⁻¹ (CC), 1117 y 625 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 3B): 7.37ppm (dd, $J_o=8.7$ Hz, $J_m=2.1$ Hz, 1H, C6), 7.52 ppm (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_p=0.6$ Hz, 1H, C7), 7.79 ppm (dd, $J_m=2.1$ Hz, $J_p=0.3$ Hz, 1H, C4), 8.12 ppm (s, 1H, C2). EM (Espectro No. 3C): 153 (M, 100%); M+2 (37.114 %).

3.2.3. N-(5-cloro-2-hidroxifenil)acetamida (4)

En un matraz de bola de 50 mL con dos bocas 14/20, provisto de un termómetro, un condensador en posición de reflujo, embudo de adición y agitación magnética, se colocaron 5 g (0.0348 mol) de **1**. A continuación se adicionaron, gota a gota, 3.45 mL (0.0366 mol) de anhídrido acético. Durante la adición se observó que la temperatura subió espontáneamente hasta 70-80 °C. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 12 h, después de las cuales ya no se observó materia prima por ccf sino la aparición de un solo producto de Rf similar al del producto de partida, pero a diferencia de éste, no se oscureció con la luz ultravioleta. A continuación, la mezcla de reacción se vertió sobre agua fría y el sólido formado se separó por filtración con vacío, se lavó con agua fría hasta pH neutro y se dejó secar. Se obtuvieron 4.7 g (81 %) de un sólido de color rojizo oscuro (una sola mancha por ccf, Rf 0.36, Sistema I). Una muestra analítica se preparó por recristalización de tolueno y dio un sólido con un punto de fusión de 182-182.5 °C. IR (Espectro No. 4A): 3385 cm⁻¹(NH), 3078 cm⁻¹ (OH), 2872 cm⁻¹ (CH), 1664 cm⁻¹ (CO), 1117 y 651 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 4B): 2.07ppm (s, 3H, C2'), 6.83 ppm (d, $J_o=8.7$ Hz, 1H, C3), 6.93 ppm (dd, $J_o=8.5$ Hz, $J_m=2.7$ y 2.4 Hz, 1H, C4), 7.93 ppm (d, $J_m=2.7$ Hz, 1H, C6), 9.26 ppm (s, intercambia agua deuterada, 1H, NH), 10.13 ppm (s, intercambia agua deuterada, 1H, OH). EM (Espectro No. 4C): 185 (M), 143 (M -42, -CH₂CO, 100%), M+2 (34.48 %).

Este producto también se preparó empleando tolueno como disolvente. Se partió de 10 g (0.0697 mol) de **1** que se mezclaron con 50 mL de tolueno y la mezcla resultante se trató en frío con 7.5 mL de anhídrido acético. Se dejó agitando toda la noche. Después de purificar el producto siguiendo un procedimiento similar al anterior, se obtuvieron 7.3 g (56%) de **4** con un punto de fusión de 180-180.5 °C.

3.2.4. 5-Cloro-2-metilbenzoxazol (5)

En un matraz de bola de 25 mL con una boca 14/20 se colocaron 4.7 g (0.0253 mol) de **4** y se fundieron en un baño de aceite. A continuación, se armó un sistema de destilación de bulbo a bulbo y se calentó a 100-120 °C a una presión de 4 mm de Hg. El producto que destiló cristalizó inmediatamente. Se obtuvieron 1.08 g (26%) de cristales blancos de olor

característico (una sola mancha por ccf, Rf 0.82, Sistema I). De la misma manera se obtuvo **5**, con mejor rendimiento, cuando se mezcló **4** con pentóxido de fósforo y se destiló de bulbo a bulbo de manera similar a la de la obtención del compuesto **3**. IR (Espectro No. 5A): 3091 cm^{-1} (CH), 3052 cm^{-1} (CH), 2922 cm^{-1} (CH), 1607 cm^{-1} (CN), 1446 cm^{-1} (CC), 1049 y 700 cm^{-1} (CCl). RMN ^1H Espectro No. 5B): 2.64ppm (s, 3H, C2), 7.26 ppm (dd, $J_m=2.1\text{ Hz}$, $J_o=8.7\text{ Hz}$, 1H, C6), 7.39 ppm (dd, $J_o=8.7\text{ Hz}$, $J_p=0.6\text{ Hz}$, 1H, C7), 7.63 ppm (dd, $J_p=0.6\text{ Hz}$, $J_m=2.1\text{ Hz}$, 1H, C4). EM (Espectro No. 5C): 167 (M, 100%), M+ 2 (33%).

3.2.5. N-(5-cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil)acetamida (6)

En un matraz de bola de 100 mL con una boca 24/40 se mezclaron 10 g (0.0697 mol) de **1**, 80 mL de tolueno y 11.8 mL de anhídrido trifluoroacético (1.2 equivalentes). El matraz se cerró con un tapón esmerilado y se agitó durante 24 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre agua helada y el sólido resultante se separó por filtración con vacío y se dejó secar. Se obtuvieron 12.98 g (78 %) de un sólido que se recristalizó de la mínima cantidad de etanol. Se obtuvieron cristales en forma de escamas brillantes (una sola mancha por ccf, Rf 0.46, Sistema I) con un punto de fusión de $225\text{-}225.5^\circ\text{ C}$. IR (Espectro No. 6A): 3392 cm^{-1} (NH), 3237 cm^{-1} (OH), 1689 cm^{-1} (CO), 1159 cm^{-1} (CF), 1115 y 655 cm^{-1} (CCl). RMN- ^1H (Espectro No. 6B): 6.93 ppm (d, $J_o=9\text{ Hz}$, 1H, C3), 7.18 ppm (dd, $J_m=2.7\text{ Hz}$, $J_o=8.7\text{ Hz}$, 1H, C4), 7.42 ppm (d, $J_m=2.7\text{ Hz}$, 1H, C6), 10.28 ppm (s, intercambia con agua deuterada 1H, NH), 10.65 ppm (s, intercambia con agua deuterada, 1H, OH). EM (Espectro No. 6C) 239 (M), 170 (M-69, -CF₃, PB.), M+2 (32.9%).

3.2.6. 5-Cloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (7)

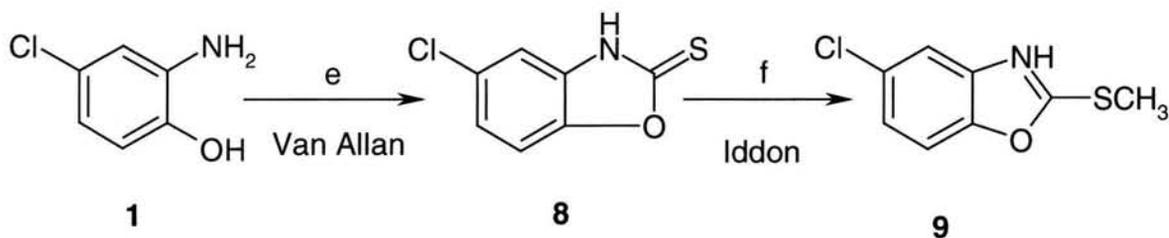
En un matraz de bola de 25 mL con una boca 14/20 se mezclaron perfectamente 3 g (0.0125 mol) de **6** con 4.6 g (0.0244 mol) de pentóxido de fósforo al 75 % en un soporte inerte. Posteriormente, la mezcla se calentó a $100\text{-}130^\circ\text{ C}$ en un horno Kugelrohr Aldrich a presión reducida de 4 mm de Hg. El producto que destiló cristalizó inmediatamente. Se obtuvieron 1.5 g (55%) de cristales blancos de olor agradable aromático anisado (una sola mancha por ccf, Rf 0.76, Sistema II) con punto de fusión de $27\text{-}28^\circ\text{ C}$. IR (Espectro N° 7A): 3098 cm^{-1} (CH), 3076 cm^{-1} (CH), 1615 cm^{-1} (CN), 1455 cm^{-1} (CC), 1212 cm^{-1} (CF), 1129 y 706 cm^{-1} (CCl). RMN ^1H (Espectro N° 7B) 7.54 (dd, $J_o=9\text{ Hz}$, $J_m=2.1\text{ Hz}$, 1H, C6), 7.63 (dd, $J_o=9\text{ Hz}$, $J_p=0.6\text{ Hz}$, 1H, C7), 7.89 (dd, $J_m=2.1\text{ Hz}$, $J_p=0.6\text{ Hz}$, 1H, C4). EM (Espectro No. 7C): 221 (M, 100%)

3.2.7. 5-Cloro-2-mercaptobenzoxazol (8)

En un matraz de bola de 100 mL con dos bocas 24/40, acondicionado con termómetro, condensador en posición de reflujo y en su extremo un globo con nitrógeno, embudo de adición y agitación magnética, se disolvieron 5g (0.0348 mol) de **1** en 25 mL de etanol, luego, se adicionaron 2.7 g (0.0482 mol) de potasa disueltos en 3.5 mL de agua y por último, 2.5 mL de disulfuro de carbono (0.0416 mol) y 10 mL más de etanol. La mezcla se calentó a 55° C hasta el consumo de la materia prima (3-4 h). A continuación, la mezcla de reacción se acidificó (pH 6) con suficiente ácido acético al 20%, y el precipitado resultante se separó por

filtración con vacío y se dejó secar. Se obtuvieron 4.67 g (72%) de un producto amarillo en forma de agujas muy poco densas las cuales mostraron una sola mancha en ccf. El producto se recristalizó de etanol con carbón activado dando agujas de color blanco (una sola mancha por ccf, Rf 0.12, Sistema I), con punto de fusión de 274-275 °C IR (Espectro No. 8A): 3107 cm⁻¹ (CH), 2961 cm⁻¹ (NH), 1715 cm⁻¹ (CH), 1596 cm⁻¹ (CN), 1436 cm⁻¹ (CH), 1286 cm⁻¹ (CS), 693 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 8B): 7.27 ppm (d, $J_o=9.0$ Hz, 1H, C7), 7.30 ppm (dd, $J_m=2.1$ Hz, $J_o=9.0$ Hz, 1H, C6), 7.51 ppm (dd, $J_m=2.4$ Hz, $J_o=9.0$ Hz, 1H, C4), 14.2 ppm (s, 1H, NH). EM (Espectro No. 8C) 185 (M, 100%), M+2 (37.73%), M+4 (1.87 %).

Esquema 12. Secuencia sintética para preparar 8 y 9



e) CS₂, EtOH, KOH, Calor ; f) CH₃I, EtOH, H₂O, KOH

3.2.8. 5-Cloro-2-metiltiobenzoxazol (9)

En un matraz de bola de 250 mL con dos bocas 24/40, acondicionado con agitación magnética, un globo con nitrógeno y un séptum de hule, se disolvieron 3.4 g (0.0183 mol) de **8** en 20 mL de etanol, luego se adicionaron 1.3 g (0.0232 mol) de potasa disueltos en 5 mL de agua y se inyectaron 1.2 mL (0.0193 mol) de yoduro de metilo. La mezcla anterior se dejó en agitación durante 12 h, y, después de comprobar el consumo de **8** por ccf, se vertió sobre agua fría. El sólido formado se separó por filtración con vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 3.32 g (91%) de cristales blancos pequeños brillantes (una sola mancha en la ccf, Rf 0.69, Sistema II). Recristalizado de etanol agua (50:50) dio cristales blancos con punto de fusión de 92-93 °C. IR (Espectro No. 9A): 3098 cm⁻¹ (CH), 3023 cm⁻¹ (CH), 2931 cm⁻¹ (CH₃S), 1497 cm⁻¹ (CN), 1467 cm⁻¹ (CC), 1450 cm⁻¹ (=N-arilo), 1109 y 699 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 9B): 2.8 ppm (s, 3H, SCH₃), 7.23 ppm (dd, $J_m=2.1$ Hz, $J_o=8.7$ ppm, 1H, C6), 7.37 ppm (dd, $J_o=8.5$ ppm, $J_p=0.3$ ppm, 1H, C7), 7.60 ppm (dd, $J_p=0.6$ ppm, $J_m=2.1$ ppm, 1H, C4). EM (Espectro No. 9C): 199 (M, 100%), M+2 (42.45%), M+4 (1.87%).

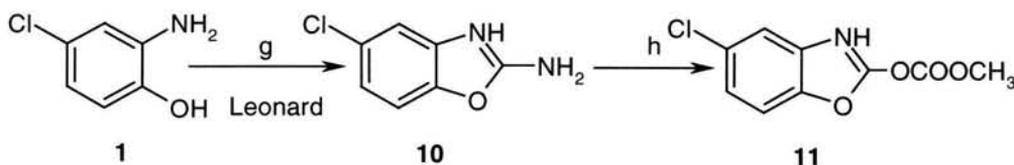
3.2.9. 2-Amino-5-clorobenzoxazol (10)

a) Método con etanol como disolvente.

En un matraz de bola de 250 mL con dos bocas 24/40, situado en una campana de extracción bien ventilada y acondicionado con condensador en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno y agitación magnética, se disolvieron 5.9 g (0.0411 mol) de **1** en 70 mL de etanol, luego se le adicionaron 4.6 g (0.0492 mol, 1.2 eqs.) de bromuro de cianógeno,

previamente pesados y contenidos en un vaso de precipitados tapado con papel parafilm, y la mezcla se dejó en agitación 12 h. Para pesar el bromuro de cianógeno, primeramente se taró el frasco con el reactivo y después, en una campana de extracción bien ventilada, se transfirió una cantidad a un vaso de precipitados que se selló con papel parafilm. Se volvió a pesar el frasco sellado y por diferencia de peso se determinó la cantidad pesada. Con base a esta cantidad se calculó la cantidad de **1** que se empleó en la reacción. Después del tiempo de agitación se comprobó el consumo de **1** por ccf, se adicionó agua fría y se neutralizó con carbonato de sodio. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 5.2 g (76%) de agujas brillantes, pequeñas, de color ligeramente amarillento. Una muestra se recrystalizó de benceno dando cristales (una sola mancha por ccf, Rf 0.38, Sistema I), con punto de fusión de 184-185 °C.

Esquema 13. Esquema sintético para preparar **10** y **11**



g) BrCN, EtOH, calor/agua ; h) ClCO₂CH₃, acetona/piridina, calor

b) Método con agua como disolvente.

En un matraz de bola de 250mL con tres bocas 24/40, acondicionado con un condensador de aire, termómetro, agitación magnética y un tapón de plástico, se suspendieron 8.5g (0.0591 mol) de **1** en 50mL de agua y se adicionaron, poco a poco, 6.58g (0.0707 mol, 1.2 eqs) de bromuro de cianógeno, manipulados de igual manera que en el método (a). La mezcla se calentó en un baño de agua durante 2 h a 55 °C. La ccf en el Sistema IV, sin hidróxido de amonio, mostró el consumo casi total de la materia prima. Se adicionó un poco más de agua y se filtró en un embudo Buckner. Las aguas madres del filtrado y las aguas de lavado del filtrado se neutralizaron con carbonato de sodio. Se obtuvieron 10.01g de producto crudo, húmedo, como un polvo ligeramente rosado, el cual se recrystalizó de benceno y dio el mismo producto anterior purificado. IR (Espectro No. 10A): 3471 cm⁻¹(NH), 3334 cm⁻¹ (CH), 3024 cm⁻¹sobretono, 1691 cm⁻¹ (CN), 1557 cm⁻¹ (C=C), 1465 cm⁻¹ (CC), 1102 y 714 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 10B): 6.96 ppm (dd, $J_m=2.4$ Hz, $J_o=8.4$, 1H, C6), 7.20 ppm (d, $J_m=2.1$ Hz, 1H, C4), 7.30 ppm (d, $J_o=8.4$ Hz, 1H, C7), 7.61 ppm (s, 2H, NH). EM (Espectro No. 10C) 168 (M), 100%), M+2 (42.5%).

3.2.10. (5-Clorobenzoxazol-2-il)carbonato de metilo (11)

a) Método con acetona como disolvente

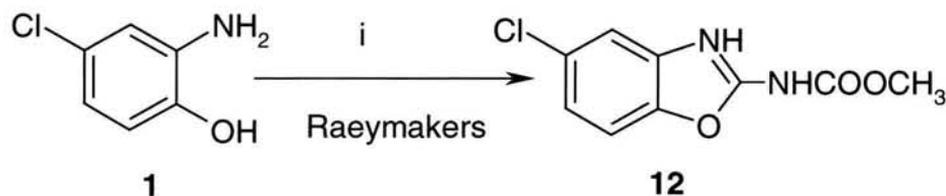
En un matraz de bola de 25 mL con dos bocas 14/20, acondicionado con embudo de adición y agitación magnética, se disolvieron 1.00g (0.0059 mol) de **10** en 10 mL de acetona y

se trataron con 0.5 mL (0.0065 mol) de cloroformiato de metilo, gota a gota. La reacción fue instantánea y precipitó un sólido. Se dejó con agitación hasta el día siguiente. Se vertió en agua fría y el producto se separó por filtración. El producto crudo se purificó por recristalización de etanol con carbón activado. Se obtuvieron 0.63 g (44 %) de un producto en forma de escamas brillantes, lustrosas, ligeras, de color blanco, con punto de fusión de 163-165°C.

b) Método con piridina como disolvente

En un matraz de bola de 25 mL con dos bocas 14/20, acondicionado con condensador de aire, globo con nitrógeno, embudo de adición y agitación magnética, se disolvieron 0.50 g (0.0030 mol) de **10** en 6 mL de piridina seca; la mezcla se enfrió a -5° C y se trató con 0.3 mL (0.0044 mol) de cloroformiato de metilo, gota a gota, con agitación vigorosa, sin que la temperatura subiera de 5 °C. Se formó una solución de color anaranjada y precipitó un sólido de color amarillento. Después de mantener el sistema en estas condiciones durante 15 minutos, se calentó durante 30 minutos más y se adicionó agua fría. El producto crudo se recolectó por filtración con vacío, se lavó con agua-etanol frío al 50% y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 0.70 g de un producto, todavía húmedo, con un punto de fusión relativamente muy bajo, no definido, de aproximadamente 150 °C. IR (Espectro No. 11A): 3118 cm⁻¹(CH), 2967 cm⁻¹ (CH), 1848 cm⁻¹ (CN), 1748 cm⁻¹ (CO) carbonato, 1105 y 767 cm⁻¹ (Cl). RMN ¹H (Espectro No. 11B): 4.11 ppm(s, 3H, CH₃), 7.15 ppm (dd, *J_o*=8.7, *J_p*=0.3, 1H, C7), 7.24 ppm (dd, *J_o*=8.6, *J_m*=2.1, 1H, C6), 7.92 ppm (dd, *J_m*=2.25, *J_p*=0.6, 1H C4). EM (Espectro No. 11C): 227(M), 168 (M-59, 100%), M+2 (32.6%).

Esquema 14. Secuencia sintética para obtener **12**



i) ClCO_2CH_3 , $[\text{CH}_3\text{SC}(\text{NH})\text{NH}_2]2\text{H}_2\text{SO}_4$, calor.

3.2.11. (5-Clorobenzoxazol-2-il)carbamato de metilo (**12**)

En un matraz de 250 mL con cuatro bocas, acondicionado con un termómetro, embudo de adición, un electrodo para determinar el pH en el seno de la reacción, un condensador en posición de reflujo, y agitación magnética, se suspendieron 15.17 g (0.0545 mol) de sulfato de metilpseudotiourea en 50 mL de agua y se enfriaron entre 0-5° con un baño de hielo-agua. Seguidamente, se adicionaron 8.2 mL (0.1061 mol) de cloroformiato de metilo; se agitó vigorosamente mientras se adicionó una solución de NaOH al 25% hasta que el pH de la reacción se mantuvo en 7 (aprox. 70 mL) y se formó un precipitado blanco esponjoso. La adición de la sosa se hizo de tal manera que el pH oscilara entre 7-7.5, lo cual se logró

mediante la adición lenta, gota a gota, de la base. La temperatura se controló entre 10-15 °C mediante un baño de hielo.

Por otro lado, en un matraz redondo de 1L con una boca 24/40; adaptado con un refrigerante en posición de reflujo en cuyo extremo se conectaron tres trampas de gases, la segunda y la tercera con solución comercial de hipoclorito de sodio al 6%; agitación magnética y canasta de calentamiento, se suspendieron 6.65 g (0.0463 mol) de **1** en 56.45 mL de una solución buffer de acetatos (12.36 mL de ác. acético, 4.41 g de acetato de sodio y 44.15 mL de agua). Seguidamente, se adicionó el contenido completo de la reacción arriba citada y la mezcla se llevó a reflujo con agitación vigorosa para disipar la espuma que se formó. Para terminar, se retiró la fuente de calor y la reacción se mantuvo en agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente. El sólido formado de color rosa pastel se separó por filtración con vacío y se lavó sucesivamente con hexano frío, etanol frío y finalmente con agua. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida con presión (flash) en una columna, cargada con 105 g de gel de sílice suspendida en cloroformo. La muestra de 3.5 g se aplicó disuelta en cloroformo:metanol 1:1 y se eluyó con tres porciones de 300 mL cada una de cloroformo-metanol al 2%, 3% y 5%. Se obtuvieron 0.27 g (3 %) de un producto en forma de polvo color beige, el cual se recrystalizó de metanol con carbón activado para dar 138.7 mg de un polvo blanco fino (una sola mancha por ccf, Rf 0.20, Sistema 4) con un punto de fusión de 244-245 °C. IR (Espectro No. 12A): 3437 cm⁻¹(NH), 2841 cm⁻¹ (CH), 1763 cm⁻¹ (CO), 1679 cm⁻¹ (CN), 1586 cm⁻¹ (CC), 1087 cm⁻¹ (CCl). RMN ¹H (Espectro No. 12B): 3.78 ppm (s, 3H, OCH₃), 7.27 ppm (dd, $J_o=8.7$ y $J_m=2.4$ Hz, 1H, C6), 7.62 ppm (d, $J_o=8.7$ Hz, 1H, C7), 7.63 ppm (d, $J_m=2.1$ Hz, 1H, C4), 11.77 ppm (s, intercambia con agua deuterada 1H, NH). EM (Espectro No. 12C): 226(M), 194 (M-32, M-MeOH, 100%), M+2, (32.85%).

3.3 PARTE BIOLÓGICA

3.3.1. Evaluación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *G. intestinalis*

Se siguió el método de subcultivos previamente descrito por Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992. Para ello se empleó la cepa: *G. intestinalis* IMSS:0989:1 Los trofozoítos de *G. intestinalis* se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovina. Se incubaron 5×10^3 trofozoítos/mL de *G. intestinalis* a 37 °C por 48 horas, con concentraciones crecientes de los diferentes benzoxazoles (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/mL), además del metronidazol, nitazoxanida y albendazol a las mismas concentraciones como controles positivos. Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de los benzoxazoles. Después de la incubación, los trofozoítos se lavaron y subcultivaron en medio fresco por otras 48 horas más. Al final de este periodo, los trofozoítos se contaron y mediante análisis probit se calculó la CI₅₀.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos. Primeramente se aborda la parte química y después la parte biológica.

4.1. Parte química

En este apartado se presentan los resultados de la obtención de los compuestos objetivo. Se inicia con una breve introducción donde se discuten aspectos generales; además, se incluye un cuadro de resultados donde se indica el punto de fusión obtenido para cada compuesto, el disolvente usado para la recristalización, el rendimiento de cada producto y el Rf/eluyente usado en la cromatografía en capa fina. Por otro lado, se interpretan los datos espectroscópicos y espectrométricos para confirmar la estructura de los productos obtenidos. Se discute, de manera relativamente extensa, la interpretación de los espectros de IR; y de manera más breve los de RMN ^1H y Masas, aunque en los compuestos reportados en la bibliografía reciente es más concisa.

Todas las vías de obtención planteadas, de acuerdo a los Esquema 11-14, fueron relativamente simples y fáciles de llevar a cabo. En cada secuencia se obtuvo como producto principal el compuesto esperado con un mínimo de impurezas, lo cuál facilitó enormemente el trabajo de laboratorio subsecuente de aislamiento y purificación.

A excepción de los compuestos **2**, **3**, y **12**, la mayoría de los productos se obtuvieron en cantidades apropiadas en la primera o segunda oportunidad en que se llevó a cabo el procedimiento de síntesis. En el caso del compuesto **3** se intentó la reacción directa de acilación-ciclación en benceno como disolvente, y los resultados no fueron satisfactorios, razón por la cual se procedió a llevarla a cabo en pasos, primero la acilación con ácido fórmico para dar **2** y después la ciclación lo cuál produjo mejores resultados. Todas las demás reacciones procedieron relativamente bien, fácil y rápidamente, con buenos rendimientos; en especial la obtención de **8**, **9**, **10**, y **11**.

Cuadro 7. Propiedades y rendimientos de los productos obtenidos **2-12**

Compuesto	Punto de fusión °C	Disolvente	Rendimiento %	Rf/eluyente ^b
2	164-165	Etanol	87	0.29/1
3	39-40(37-38)	Bb ^a	30	0.66/1
4	182-182.5	Tolueno	81	0.36/1
5	56-57(54-55)	Bb ^a	26	0.82/1
6	225-225.5	Etanol	78	0.46/1
7	28-28.5(28-28.5)	Bb ^a	55	0.76/2
8	274-275 (275-276)	Etanol	72	0.28/1
9	92-93(87-89)	Etanol-agua	91	0.69/2
10	184-185 (184-185)	Benceno	76	0.38/1
11	163-165	Metanol	75	0.60/4
12	244-245	Etanol-acetona	8	0.20/4

^adestilación de bulbo a bulbo.

^bver cuadro 9 para la composición de las mezclas de disolventes.

A pesar de que los rendimientos de **3**, **5**, **7** fueron relativamente bajos, el método de destilación de trayectoria corta (bulbo a bulbo) fue sencillo y rápido; además, el producto pudo obtenerse de tal pureza que no fue necesaria una purificación posterior. Los rendimientos y propiedades resultantes se pueden observar en el **Cuadro 7**. En ninguno de los casos se intentó optimizar el rendimiento ya que el interés principal fue contar con una cantidad suficiente para la identificación y posterior prueba biológica.

Los reactivos y materias primas usados fueron sencillos, económicos, fáciles de conseguir, de manejo simple, relativamente no tóxicos, a excepción del bromuro de cianógeno puro, con el cual se tomaron medidas de precaución adecuadas.

Los disolventes empleados fueron de uso común en los laboratorios, su empleo fue limitado, sin embargo, en algunos casos el mismo reactivo realizó la función de disolvente, como es el caso de las reacciones de obtención de **2**, **4**, y **6**.

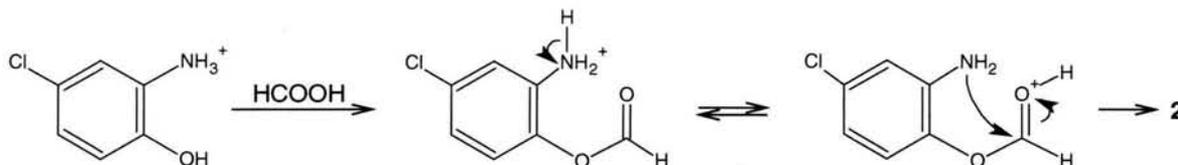
Para fines de la interpretación de los espectros de IR de **3**, **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, se tomó en cuenta que todos ellos son heterociclos aromáticos constituidos por C, H, O, N, Cl y en dos derivados, además azufre. En estos casos se consideró importante para la interpretación de los espectros, los datos reportados en la literatura para el tipo básico de núcleo. Se identificaron las absorciones del esqueleto del anillo, además se consideró el patrón de sustitución, el cuál puede ser reconocido a menudo, por la posición de las bandas clave. Se consideró aplicables las reglas especificadas para bencenos sustituidos. A primera vista, las bandas de deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno de la región de 1000-600 cm^{-1} proporcionan información acerca de los sustituyentes en el anillo. Además, en los benzoxazoles la señal C=N aparece en la región característica de 1600-1678 cm^{-1} , y si se compara con la señal de imidoésteres en 1666 cm^{-1} , aparece a relativamente menor frecuencia, posiblemente debido a la naturaleza cíclica y su carácter aromático. La intensidad oscila de débil a intensa (Colthup, N.B., 1990, Günzler, H., 2002). También se consideró importante en la interpretación de los espectros de los 5-clorobenzoxazoles la señal de dos protones adyacentes que originan frecuencias de vibración de coleo en fase fuera del plano de CH aromático en la región de 880-795 cm^{-1} . Además, debido a que los benzoxazoles no tienen plano de simetría, las vibraciones en el plano pueden interactuar con las fuera del plano.

4.1.1. Obtención y caracterización de N-(5-cloro-2-hidroxifenil)formamida (2)

En un principio se intentó la síntesis directa del compuesto **3** empleando benceno como disolvente a reflujo, según el método de Phillips; sin embargo, los resultados no fueron los esperados ya que se obtuvo una mezcla de **3** con una gran cantidad de materia prima difícil de separar. Por esta razón se procedió primero a la obtención de **2** usando como disolvente ácido fórmico. De tal forma que mediante este método se logró obtener la **2** con un 87% de rendimiento.

En esta reacción, el grupo amino se encuentra protonado en un elevado porcentaje debido al ácido fórmico, lo cual se muestra en el Esquema 15. Se podría explicar la formación de **2** mediante un ataque nucleofílico del hidroxilo fenólico sobre el ácido fórmico para presentar una, no muy facilitada, reacción de esterificación y producir el formiato intermedio; después podría ocurrir una transposición intramolecular del formilo hacia el grupo amino para producir **2**, el cual sí se aísla.

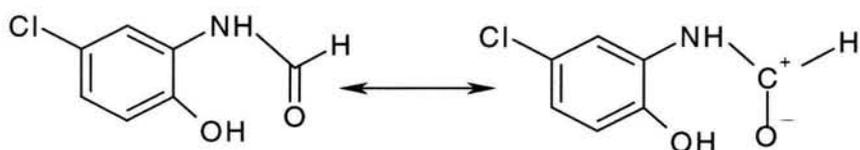
Esquema 15. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de **2**



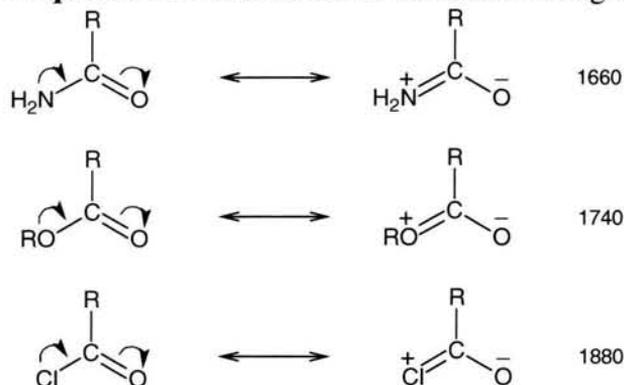
En el espectro de IR del compuesto **2** se observa una banda intensa, muy aguda y bien definida en la frecuencia de 3387 cm^{-1} , atribuida a la vibración de estiramiento del enlace nitrógeno-hidrógeno $\gamma(\text{N-H})$ de amida secundaria. Normalmente, esta banda debería estar acompañada de una señal débil cerca de 3100 cm^{-1} , originada por un sobretono de la señal de vibración de los átomos C-N-H de 1530 cm^{-1} . Dicho sobretono no se observa debido a la presencia de una señal muy ancha e intensa en 3172 cm^{-1} , atribuida a la vibración de estiramiento del O-H enlazado por puente de hidrógeno $\gamma(\text{OH}\cdots\text{H})$, característico de los fenoles. Esta frecuencia de vibración puede disminuir en los fenoles al aumentar la capacidad electroattractora del sustituyente en el anillo (Colthup, N.B., 1990). En la frecuencia de 1683 cm^{-1} , aparece la señal de mayor intensidad en el espectro, bien definida y muy característica, en la región de vibración de estiramiento de los carbonilos $\gamma(\text{C=O})$. Dicho pico está ubicado en la porción límite superior del intervalo presentado en la bibliografía de $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$, muy probablemente debido a que el protón unido al carbonilo no contribuye electrónicamente al predominio de la forma polar de la amida (Esquema 17), además, debido a la pequeña masa del sustituyente, es más fácil la vibración^{2,3}. Retomando la señal de 3172 cm^{-1} , es importante mencionar que puede ser el resultado de la presencia de la vibración del estiramiento del grupo N-H de la amida secundaria $\gamma(\text{N-H})$ además de la vibración del O-H.

² En los carbonilos la conjugación disminuye la frecuencia, mientras que los grupos electronegativos adyacentes al carbonilo elevan la frecuencia. Sin embargo no son estos los únicos factores que los afectan.

³ En el efecto mesomérico el heteroátomo unido al grupo carbonilo dona un electrón no enlazante y el oxígeno del grupo C=O atrae un electrón el cual debilita la constante de fuerza y disminuye la frecuencia.

Esquema 16. Forma polar de 2

La señal que aparece a 1596 cm^{-1} es posible asignarla a un modo de vibración que involucra principalmente un “estiramiento de cuadrante” de los enlaces $\text{C}=\text{C}$ aromáticos del anillo donde hay un poco de interacción con el alabeo (bending) en el plano. La señal de 1529 cm^{-1} se puede atribuir a una vibración C-N-H donde el nitrógeno y el hidrógeno se mueven en direcciones opuestas relativas al carbono, involucrando el alabeo del N-H y el estiramiento del C-N . También hay que considerar la contribución de sobretonos de esta señal para complicar la banda cercana a 3100 cm^{-1} . Por otro lado, es necesario tomar en cuenta la absorción de 1502 cm^{-1} , como originada por el “estiramiento de cuadrante” del enlace aromático $\text{C}=\text{C}$. Al revisar el espectro es posible observar la señal de 1431 cm^{-1} como el segundo pico de mayor intensidad, y atribuirla al “estiramiento de semicírculo” del enlace $\text{C}=\text{C}$ mezclada con el alabeo C-H de compuestos aromáticos, la cuál es independiente relativamente de la naturaleza de los sustituyentes. Así mismo, es posible identificar una señal a 1358 cm^{-1} , la cual confirma la presencia del grupo fenólico, y puede ser asignada a una frecuencia de vibración de deformación $\delta(\text{OH})$, además de algunas otras bandas de la vibración arilo-OH en la región de 1335 a 1165 cm^{-1} , las cuales presentan varios máximos de mediana intensidad. La banda de mediana intensidad, bien definida y aguda que aparece en 1250 cm^{-1} se puede atribuir a una vibración C-N-H , donde los átomos N y H se mueven en la misma dirección relativa al carbono. La señal observada en 1204 cm^{-1} es una señal relativamente fuerte, la cuál se atribuye a la deformación O-H y estiramiento C-O , las cuáles interactúan algo. En disolución, esta banda, al igual que la de 1358 cm^{-1} , se desplazan a menores frecuencias. La banda que aparece en 1116 cm^{-1} es posible asignarla a la vibración del estiramiento $\gamma(\text{C-Cl})$, además de la señal de muy baja intensidad apenas apreciable entre 1096 - 1034 cm^{-1} , característica del enlace aril-Cl.

Esquema 17. Frecuencias de absorción de algunos carbonilos

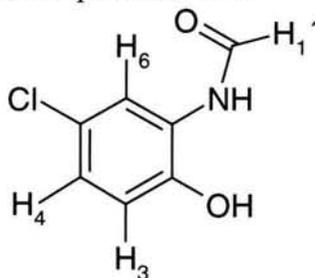
La señal que aparece a 858 cm^{-1} se puede asignar a la vibración de coleo (wag) fuera del plano, característica de un compuesto aromático con 2H adyacentes. En relación a la banda de intensidad débil, cuya frecuencia de vibración aparece en 726 cm^{-1} , es posible atribuirla al alabeo fuera del plano del anillo para compuestos 1,2,4 sustituidos. Mientras que el pico de intensidad media, localizado en 648 cm^{-1} , es particular de la deformación fuera del plano del enlace C-OH. Por último, en el caso de la señal ancha, de baja intensidad, bien definida en 690 cm^{-1} , se puede asignar a la vibración de coleo fuera del plano para el grupo N-H. De manera similar la absorción de intensidad media ubicada en 606 cm^{-1} , es posible atribuirla a una vibración de deformación fuera del plano del grupo hidroxilo fenólico $\delta(\text{O-H})$.

En el espectro de masas del compuesto **2** se observa el pico de la señal proveniente del radical iónico del ion molecular en m/z 171, el cuál corresponde con el peso molecular calculado del producto con la estructura química pretendida. Además, el pico M+2, con intensidad del 31.7%, corresponde aproximadamente con la abundancia esperada para una molécula con cloro en su estructura. Mediante una reacción del ion molecular se obtiene el pico base del cation con m/z 143 por pérdida de una molécula neutra de CO (M^+-28). Este fragmento puede ser obtenido a través de dos vías: la primera, que involucra la reacción de eliminación de una molécula neutra de CO en la cadena lateral del ion molecular para dar el radical iónico 2-amino-4-clorobenzofenol; y la otra, que involucra una tautomería ceto-enol, a partir de la cuál, es posible eliminar una molécula neutra de CO, proveniente de un carbono del benceno. El radical iónico 2-amino-4-clorofenol, mediante una reacción en la que pierde un protón del grupo amino (M-29), genera el ion con m/z 142, el cuál nuevamente presenta la tautomería ceto-enol y produce el ion con m/z 114, por otra pérdida de CO. De nueva cuenta, el radical iónico del pico base pierde ahora cloro (P.B.-35) para producir el ion con m/z 108, el cuál puede presentar nuevamente una tautomería para perder CO y originar el ion m/z 80.

El espectro RMN- ^1H de **2**, presenta un patrón característico ABX debido a la sustitución 1,2,4 del anillo. A 6.85 ppm muestra una señal doble que integra para un protón con una constante de acoplamiento *orto* única $J_o=8.4$, asignada al protón H₃, vecino al grupo hidroxilo, en la posición 2 del benceno sustituido. El desplazamiento de este protón, a campo relativamente alto, es explicable debido principalmente a la influencia electrodonadora por resonancia del grupo hidroxilo en *orto*. A continuación, se observa una señal doble de dobles en 6.94 ppm, que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento características: la de mayor magnitud *orto* $J_o=8.4\text{ Hz}$ y *meta* $J_m=2.1\text{ Hz}$ atribuible al protón denominado H₄ *orto* al cloro. En 8.16 aparece una señal doble que integra para un protón con constante de acoplamiento, *meta* $J_m=2.4\text{ Hz}$, asignable al protón H₆. La aparición a campo relativamente bajo es posible explicarla por la influencia electroattractora por inducción, del átomo de cloro vecino. Se observa la constante *orto* en el protón 3 debido al acoplamiento con el protón 4 cuya magnitud es influenciada por la mayor cercanía de los núcleos, una constante *orto* y otra *meta* en el protón 4 por acoplamiento con los protones 3 y 6, por último una *meta* en el protón 6. Después, se aprecia en 8.27 ppm una señal doble que integra para un protón, con una constante de acoplamiento $J=1.8\text{ Hz}$, el cuál no intercambia con agua deuterada, atribuible al protón H del grupo formamido. Enseguida, en 9.72 ppm aparece una señal simple que integra para un protón e intercambia con agua deuterada, la cuál es asignada al NH del grupo formamido. Por último, aparece una señal simple más ancha, en 10.32 (s) ppm, que integra

para un protón e intercambia con agua deuterada, el cuál es atribuida al hidroxilo fenólico. Tal señal se observa muy ancha debido a la velocidad de intercambio del protón que es muy rápida.

Esquema 18. Denominación de protones en **2**



4.1.2. Obtención y caracterización de 5-Clorobenzoxazol (3)

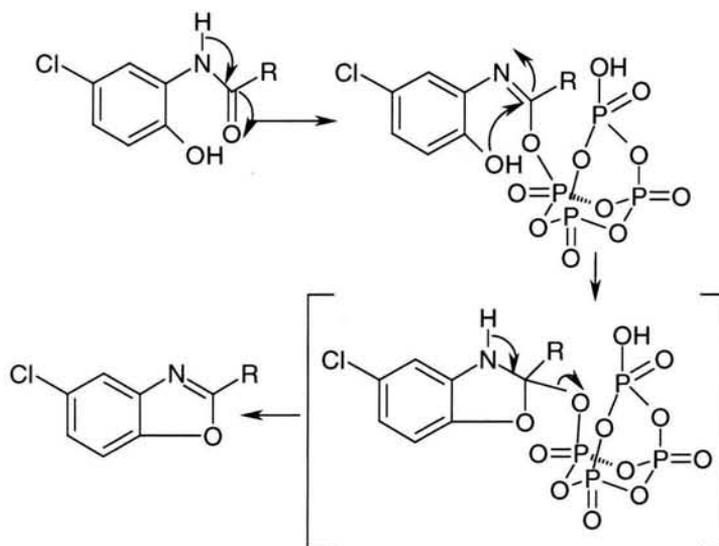
La obtención del producto **3** se realizó mediante una destilación de bulbo a bulbo de la materia prima **2** en presencia de pentóxido de fósforo. La única dificultad observada fue el rendimiento tan bajo del 30%, debido a la carencia de un sistema refrigerante más eficiente, la elevada capacidad de la bomba de vacío usada y el punto de fusión tan bajo de **3**. Sin embargo, el procedimiento de obtención puede considerarse apropiado porque se obtuvo la cantidad necesaria del producto puro para la caracterización y las pruebas biológicas.

La reacción general para la obtención de **3**, **5** y **7** se muestra en el Esquema 4. La deshidratación se facilita por el pentóxido de fósforo. El mecanismo propuesto para la obtención de los productos **3**, **5**, y **7**, mostrado en los Esquemas 4 y 19, involucra inicialmente la tautomerización de los productos **2**, **4**, y **6** para producir el iminoenol correspondiente, que ataca a la molécula de pentóxido de fósforo P₄O₁₀ y genera un buen grupo saliente, lo cual facilita notablemente la ciclocondensación; a continuación ocurre el ataque del grupo hidroxilo sobre el carbono del enol, para producir un intermediario tetraédrico (el cual no es aislado), eliminando rápidamente el buen grupo saliente y producir el 5-cloro-1,3-benzoxazol sustituido en **2**.

El espectro de IR del compuesto **3** presenta una señal intensa a 3100 cm⁻¹, característica de las vibraciones de estiramiento de (C-H) aromático, las cuáles dan lugar a múltiples bandas entre las que se encuentra otro pico sobresaliente a 3004 cm⁻¹. A continuación se observan dos señales de baja intensidad relativamente anchas en 1869 cm⁻¹ y 1802 cm⁻¹ en la región de sobretonos de las señales de deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno δ(C-H). En esta región se presentan patrones característicos de la sustitución, y corresponde al de compuestos "1,2,4 trisustituídos". En 1610 cm⁻¹ aparece una señal de baja intensidad, relativamente ancha, bien definida y característica de benzoxazoles, la cuál se puede atribuir a la combinación de las vibraciones C=N y C=C. En 1512 cm⁻¹ se observa una señal intensa, bien definida, atribuible a la frecuencia de vibración de estiramiento del enlace carbono-nitrógeno γ(C-N). Enseguida se encuentra otra señal ligeramente sobrepuesta a la anterior, de mayor intensidad, poco ancha, en 1454 cm⁻¹ asignable a la

frecuencia de estiramiento del enlace carbono-carbono aromático $\gamma(\text{C}=\text{C})$. En la región de estiramiento de anillo se observa una señal de poca intensidad y bien definida a 1329 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de enlace carbono-nitrógeno $\gamma(\text{C}=\text{N})$. Se observa también una señal de intensidad media, bien definida y aguda en 1296 cm^{-1} . Esta señal está ubicada en la región de $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ donde la frecuencia involucra vibraciones del alabeo (bending) del enlace carbono-hidrógeno algunas veces fuertemente mezclado con vibraciones C-C. En 1260 cm^{-1} aparece una señal de intensidad media bien definida, característica de la vibración de estiramiento $\gamma(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ al igual que la de 1071 cm^{-1} . Sin embargo, la vibración aril-O interactúa con las frecuencias del anillo y, por lo tanto, no son mecánicamente del todo independientes de otros enlaces unidos al anillo. Las bandas presentes en las frecuencias de 1118 cm^{-1} y 1049 cm^{-1} son peculiares de la vibración carbono-halógeno (C-Cl). Se observa también un pico de baja intensidad en 924 cm^{-1} , que podría deberse a una vibración de deformación del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}-\text{H})$. Es importante señalar las bandas de 862 cm^{-1} y 803 cm^{-1} , las cuáles pueden ser características de 5-clorobenzoxazoles, debido a que son originados por la vibración carbono-hidrógeno; en el primer caso, la señal es típica de la vibración de meneo de 1H aislado, mientras la siguiente originada por la deformación del enlace carbono-hidrógeno fuera del plano en fase para 2 protones adyacentes. Por último, aparece una señal de intensidad media, aguda, en 701 cm^{-1} , atribuible a la vibración de alabeo del anillo fuera del plano.

Esquema 19. Representación del mecanismo general de reacción para la obtención de algunos de los benzoxazoles sustituidos en 2 facilitada por el pentóxido de fósforo

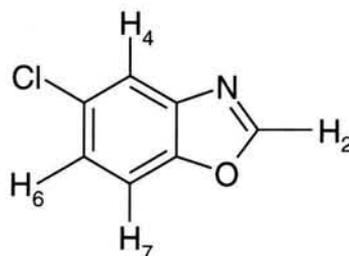


En el espectro de masas del compuesto **3** aparece el pico base con m/z 153, el cual corresponde a su vez al ion molecular del compuesto esperado. Tal pico presenta una señal M+2 con una intensidad relativa de 37.14%, al parecer un poco elevada para el cloro. Este último fragmento puede sufrir la apertura del anillo para dar un ion radical con un carbonilo

cíclico, el cuál, por pérdida de CO (M-28) resulta en el fragmento con m/z 125. A continuación, dicho radical iónico sufre una escisión en la cadena lateral para perder una molécula neutra de HCN y producir de nueva cuenta un radical iónico 98 (M-55). Para terminar, el fragmento anterior pierde un átomo de cloro, para dar el pico con m/z 63 (M-91).

El espectro de RMN- ^1H del producto **3** presenta las señales atribuibles a un sistema característico ABX, lo cuál es explicable debido a la presencia de protones en las posiciones 4, 6, y 7 del núcleo del 5-clorobenzoxazol. Este espectro muestra en 7.37 ppm una señal doble de dobles que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento *orto* $J_o=8.7$ Hz, y *meta* $J_m=2.1$ Hz características, de tal manera que permite designar inequívocamente al protón H_6 , ubicado en la posición 6 del benzoxazol. A continuación, en 7.52 ppm está presente otra señal doble de doble que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento características *orto* $J_o=8.4$ Hz, y *para* $J_p=0.6$ Hz, de tal manera que, el único protón con características tales puede ser el H_7 ubicado en la posición 7 del benzoxazol. Además, en 7.79 ppm aparece una señal doble de dobles que integra para un protón, en el cuál es posible encontrar dos constantes de acoplamiento *meta* $J_m= 2.1$ Hz y *para* $J_p=0.3$ Hz el cuál se puede atribuir al protón H_4 ubicado entre el nitrógeno y el cloro. El protón 6 presenta dos constantes debido a su acoplamiento con H_7 y con H_4 siendo la de mayor magnitud la resultante de la interacción más cercana y la de menor la *meta*. El protón H_7 presenta la constante *para* más pequeña al igual que H_4 . El desplazamiento de esta señal, a campo relativamente bajo, es posible explicarlo por la presencia de dos grupos electroattractores: el cloro por inducción y el $-\text{C}=\text{N}-$ por resonancia. Por último, en 8.12 ppm se observa una señal simple e intensa que integra para un protón, sin desdoblamiento alguno, atribuible al protón H_2 en la posición 2 del benzoxazol.

Esquema 20. Denominación de protones en **3**



4.1.3. Obtención y caracterización de *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)acetamida (**4**)

Inicialmente se realizó la síntesis de **4** directamente sin usar disolvente alguno. Se goteó anhídrido acético a **1** con agitación magnética, observándose la elevación espontánea de la temperatura de reacción, el rendimiento obtenido fue de 79 % de un producto casi puro que se cristalizó de tolueno para mostrar mediante cromatografía en capa delgada un solo producto con p.f. de 182-182.5 °C. Además, se observó que el producto recrystaliza bien de una disolución en etanol al 98%. También se intentó otra vía sintética, en la cual se usó como disolvente tolueno. En este procedimiento se obtuvo un 56% de rendimiento de un producto

que recristalizado de etanol da un producto con un punto de fusión relativamente bajo (180-180.5 °C).

La obtención de los compuestos N-(5-cloro-2-hidroxifenil)acetamida **4** y 5-cloro- N-(5-cloro-2-hidroxifenil)trifluoroacetamida **6** es diferente a la obtención de **2**. En la obtención de **4** y **6** se emplea anhídrido acético o trifluoroacético, por lo que el grupo amino de la materia prima utilizada no se protona como en el caso de la obtención de **2**. El grupo amino ahora ataca nucleofílicamente al carbono sp^2 del anhídrido para dar como producto las correspondientes amidas que se aislan y purifican para su identificación

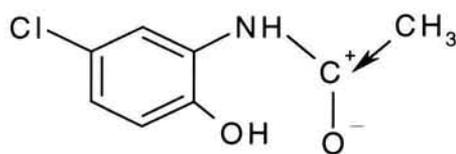
En el espectro IR de **4** se observa una señal de intensidad media a 3386 cm^{-1} , asignada a la vibración de estiramiento $\nu(\text{NH})$ de una amida secundaria.⁴ En la frecuencia de 3078 cm^{-1} se observa una señal muy ancha, fuerte y de intensidad media, atribuida a la vibración de estiramiento del OH enlazado por puente de hidrógeno $\nu(\text{OH}\cdots\text{H})$, característica de los fenoles⁵. En la frecuencia de 2873 cm^{-1} se aprecia una señal de pequeña intensidad, ancha, sobrepuesta a la señal del OH, la cuál se puede adjudicar al estiramiento asimétrico de grupo metilo $\nu(\text{CH}_3)$. Sin embargo, no es posible detectar la señal de estiramiento simétrico cercana a 2960 cm^{-1} . En 1664 cm^{-1} aparece la señal de mayor intensidad en el espectro, característica de los grupos carbonilos. En este caso con una absorción a menor frecuencia relativa al carbonilo de **2**, explicable por la presencia de un grupo ligeramente electrodonador, un metilo, pero dentro del intervalo establecido en la bibliografía, $\nu(\text{C}=\text{O})$ lo cuál permite un leve predominio de la forma polar de la amida representada en el Esquema 25. También es posible considerar la absorción en 1594 cm^{-1} y designarla a un tipo de vibración, la cuál involucra, en mayor parte, un “estiramiento de cuadrante” de los enlaces aromáticos $\nu(\text{C}=\text{C})$ del anillo, con poca interacción con el alabeo en el plano. De nueva cuenta en la frecuencia de 1536 cm^{-1} se observa una señal fuerte, intensa, atribuible a la vibración C-N-H, resultado del alabeo (bending) N-H y del estiramiento C=N. Además hay que tomar en cuenta la vibración que absorbe en 1510 cm^{-1} y considerarla originada por otro “estiramiento de cuadrante” $\nu(\text{C}=\text{C})$ del anillo aromático. Una señal de elevada intensidad se observa en 1418 cm^{-1} , el cual es el primero o segundo pico en magnitud de absorbancia, y es posible considerarlo como la vibración de “estiramiento de semicírculo” C=C sumado con el alabeo del enlace C-H de productos aromáticos. De manera similar, se detecta una señal de baja intensidad, un poco ancha, aproximadamente a 1380 cm^{-1} , sobrepuesta a otro pico de mayor intensidad; el primero atribuible a una vibración de deformación asimétrica $\delta(\text{C H}_3)$ y nuevamente no es posible detectar la vibración de deformación simétrica esperada en 1470 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_3)$. La señal localizada en 1249 cm^{-1} es posible asignarla, otra vez, a la vibración C-N-H, donde ahora los átomos N y H se mueven en la misma dirección en relación al carbono. Para la señal en 1198 cm^{-1} de mediana intensidad y aguda, es apropiado asignarla a la deformación OH $\delta(\text{OH})$ además del estiramiento C-O $\nu(\text{C}-\text{O})$. En relación a la señal aguda de baja intensidad en 1118 cm^{-1} es posible considerarla característica de la vibración de la banda sensible a halógenos X

⁴ El espectro IR de las amidas en estado sólido es altamente dependiente del pretratamiento de las muestras.

⁵ Los enlaces directamente involucrados en la formación de puente de hidrógeno son siempre afectados de tal forma que es posible reconocer el desplazamiento del OH y del C-O hacia frecuencias menores con el consecuente aumento del ancho de banda.

que involucra la vibración de estiramiento $\nu(\text{C-Cl})$. También, se espera una señal de intensidad apenas apreciable entre $1096\text{-}1034\text{ cm}^{-1}$, del aril-C. Conviene señalar la absorción en la frecuencia de 873 cm^{-1} , como originada por la vibración de coleo (wag) de C-H de arilo de dos protones adyacentes. La señal muy ancha, de baja intensidad, localizada en 744 cm^{-1} es posible designarla al coleo fuera del plano del grupo N-H. Para concluir, la señal de baja intensidad, aguda bien definida en 602 cm^{-1} es atribuible a la vibración de deformación fuera del plano del O-H fenólico $\nu(\text{OH})_{\text{oop}}$. De igual manera, y por último, la señal muy aguda de mediana intensidad ubicada en 652 cm^{-1} se puede asignar a la vibración de deformación fuera del plano del grupo hidroxilo fenólico.

Esquema 21. Forma polar de la *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)acetamida **4**

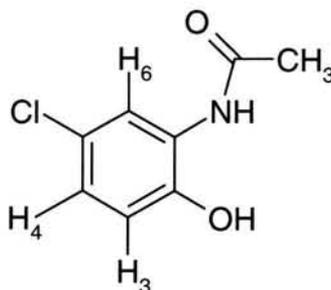


El espectro de masas del compuesto **4** presenta el ion molecular en m/z 185, el cuál corresponde con el peso molecular del producto esperado 185.67; además, el $M+2$ aparece con una intensidad relativa de 34.48%, la cuál, aunque un poco elevada, podría dar un indicio de la presencia de cloro en la estructura del producto. Proveniente del ión molecular, y por pérdida de una molécula de ceteno neutro ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$), se obtiene el fragmento radical iónico siguiente con una m/z de 143 ($M-42$), el cuál mediante la correspondiente tautomería ceto-enol queda preparado para perder otra molécula neutra CO ($M-71$) y generar el producto con m/z 114. Por último, con pérdida inicial de cloro del P B. y la subsecuente eliminación de una molécula de CO, se obtiene el fragmento con m/z 80.

El producto **4** muestra en el espectro de RMN- ^1H una señal simple en 2.07 ppm, que integra para 3 protones y que corresponde al metilo del grupo acetamido. A continuación, en 6.83 ppm aparece una señal doble, que integra para un protón y presenta una constante de acoplamiento *orto* $J_o=8.7\text{ Hz}$ de mayor magnitud debido a la cercanía de los núcleos, asignada al protón H_3 *orto* al hidroxilo. Al igual que en **2**, el desplazamiento a campo relativamente bajo es explicado por el carácter electrodonador por resonancia del grupo hidroxilo vecino. Después se observa, en el desplazamiento de 6.93 ppm, una señal doble de dobles con dos constantes de acoplamiento: *orto* $J_o=8.7\text{ Hz}$, *meta* $J_m=2.7\text{ Hz}$ ésta última de menor magnitud que la *orto*, que es asignada al protón H_4 , ubicado en *meta* al hidroxilo. El valor de dichas constantes de acoplamiento es debido a la distancia entre los núcleos que interaccionan de tal manera que la de mayor magnitud corresponde con la interacción *orto* y la de menor magnitud con la *meta*. Además, en 7.93 ppm aparece una señal doble, que integra para un protón, con una constante de acoplamiento *meta* de magnitud $J_m=2.7\text{ Hz}$ y atribuida al protón H_6 , ubicado en posición *orto* al grupo acetamido. Después, en 9.26 ppm aparece una señal única simple, intensa, que integra para un protón e intercambia con agua deuterada, y es atribuida al N-H del formamido, debido a la forma semiaguda que presenta, lo cual refleja en parte su rapidez de intercambio. Por último, aparece una señal simple muy ancha, en 10.13 ppm, que integra para

un protón e intercambia con agua deuterada, atribuible al OH. Es posible señalar, que en parte, debido a la velocidad de intercambio rápida, se observa ancha la señal.

Esquema 22. Denominación de protones en 4



4.1.4. Obtención y caracterización de 5-cloro-2-metilbenzoxazol (5)

La obtención del compuesto **5** se realizó mediante una destilación de bulbo a bulbo de **4**, en presencia de pentóxido de fósforo. La única dificultad observada fue el rendimiento tan bajo del 26%, debido a la carencia de un sistema refrigerante más eficiente y a la alta volatilidad de **5** por su bajo punto de fusión. Sin embargo, el procedimiento de obtención puede considerarse apropiado porque es sencillo y se obtiene la cantidad necesaria del producto puro para la caracterización y las pruebas biológicas.

El mecanismo propuesto para la obtención de **5** es similar al de la obtención de **3** que se discutió en párrafos anteriores y se mostró una parte en los Esquemas 4 y 19.

En el espectro IR de **5** se observa una señal aguda de muy débil intensidad en la frecuencia de 3091 cm⁻¹, característica de la vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno aromático $\gamma(\text{C-H})$. A continuación aparece otra señal débil, aunque ligeramente más intensa que la primera, con algunas señales sobrepuestas, no simétrica, en la frecuencia de 3053 cm⁻¹, atribuida a la vibración de deformación asimétrica del enlace carbono-hidrógeno del metilo.⁶ Además, en la misma región, pero ahora en la frecuencia de 2922 cm⁻¹ se aprecia una señal de muy débil intensidad, simétrica, originada por la vibración de estiramiento simétrico del enlace carbono-hidrógeno del grupo metilo. En la siguiente sección de suma de bandas y sobretonos, pueden mirarse dos bandas principales de intensidad débil y bien definidas en las frecuencias de 1857 cm⁻¹ y 1723 cm⁻¹, atribuidas a la vibración de sobretonos de deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$. A continuación se ve una banda de intensidad media, elevada, bien definida, casi simétrica, con un ancho de banda medio en la frecuencia de 1608 cm⁻¹, asignada a la vibración de estiramiento del enlace carbono-nitrógeno $\gamma(\text{C=N})$, la cuál, debido a la cercanía de la banda carbono-carbono, a menudo causa dificultad en su interpretación. La señal de mayor intensidad del espectro, relativamente aguda, simétrica, en la frecuencia de 1572 cm⁻¹, es adjudicada a la vibración de

⁶ Los grupos electronegativos aumentan la frecuencia de aparición de esta señal al igual que la del estiramiento asimétrico.

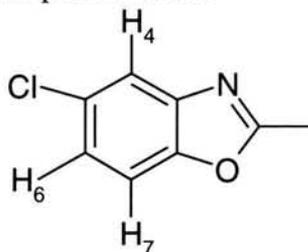
estiramiento del enlace carbono-carbono aromático. En la siguiente porción del espectro, son observadas varias señales muy cercanas que aparecen en una sola banda, muy ancha, donde la que aparece en 1458 cm^{-1} es originada por la vibración de deformación asimétrica del enlace carbono-hidrógeno de metilo $\delta_a(\text{CH}_3)$. Muy cerca, en 1447 cm^{-1} está presente una señal correspondiente al estiramiento del enlace carbono-carbono del anillo aromático $\gamma(\text{C}=\text{C})$. A continuación, en 1376 cm^{-1} se ve una señal característica de la deformación asimétrica del enlace carbono-hidrógeno. Enseguida, en la frecuencia de 1263 cm^{-1} aparece una señal de intensidad media, la cuál es atribuida a la deformación en el plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C-H})$, en las cuáles puede haber contribución de la vibración $\text{C}=\text{C}$. En la frecuencia de 1254 cm^{-1} se observa la banda de intensidad media, que es atribuida a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace aril-O $\gamma(\text{C-O-C})$. Respecto a la señal de intensidad media en la frecuencia de 1236 cm^{-1} se adjudica a la vibración de deformación en el plano del enlace carbono-hidrógeno característica de una sustitución 1,2,4. La banda presente en la frecuencia de 1166 cm^{-1} es atribuida a la vibración de estiramiento carbono-oxígeno $\gamma(\text{C-O-C}=\text{O})$. A continuación se observa en 1050 cm^{-1} una señal de intensidad media, relativamente ancha, característica de la vibración C-Cl en la región de bandas sensible a X. En la siguiente zona del espectro, se presentan varias señales que oscilan de fuerte a mediana intensidad, agudas, en las frecuencias de 923 cm^{-1} , 908 cm^{-1} y 892 cm^{-1} , las cuáles son originadas por vibraciones de deformación del enlace carbono-hidrógeno fuera del plano $\delta(\text{C-H})_{\text{oop}}$, las dos primeras características de la presencia de un protón aislado y de dos H adyacentes, respectivamente. En la frecuencia de 862 cm^{-1} se observa una señal de estiramiento carbono-carbono $\gamma(\text{C-C})$. También, en 801 cm^{-1} se detecta una señal intensa aguda bien definida, característica de la deformación fuera del plano del enlace carbono hidrógeno de 2H adyacentes. Por último en 701 cm^{-1} está presente la señal de intensidad media, aguda, resultado de la deformación del anillo fuera del plano por “sextantes”.

Para continuar, el espectro de masas de **5** presenta el ion molecular con m/z 167, el cuál corresponde con el pico base; además, no existe diferencia significativa con el peso molecular calculado para la estructura del producto esperado de P.M. 167.59. También hay que considerar la abundancia de la señal M+2 para detectar la presencia de halógenos a través de su abundancia relativa; en este caso es de 33%, y concuerda bien para confirmarla. El pico base sufre la apertura del anillo en el enlace carbono-oxígeno del heterociclo y presenta después la tautomería ceto-enol, así puede sufrir la pérdida de una molécula neutra de CO (M-28), para generar el radical iónico con m/z 139, el cuál, por reacción de la cadena lateral, pierde acetonitrilo y produce otro radical iónico, ahora con m/z 98. El ion molecular sufre otra reacción de la cadena lateral para perder acetonitrilo (M-41), para ocasionar la producción del fragmento con m/z 126, el cuál a su vez, pierde CO para originar otro fragmento, ahora con m/z 98 (M-69). Éste último sufre la reacción de pérdida de cloro para formar el fragmento con m/z 63.

El espectro RMN- ^1H del compuesto **5** presenta las señales atribuidas a un sistema característico ABX, lo cuál es explicable debido a la presencia de protones en las posiciones 4, 6, y 7 del núcleo del 5-clorobenzoxazol. Muestra en 2.64 ppm una señal muy intensa y aguda que integra para tres protones imputable al metilo en la posición 2 del benzoxazol. A continuación se observa en 7.26 ppm una banda que se identifica como un doble de dobles, la

cuál integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento: *orto* $J_o=8.7$ Hz y *meta* $J_m=2.1$ Hz, atribuibles al protón H₆ en la posición 6 del benzoxazol. Como se observa los valores de la constante de acoplamiento *orto* son de mayor magnitud que los de la *meta* debido a la cercanía de los núcleos. Después, en 7.39 ppm se visualiza una señal doble de dobles, que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o=8.7$ Hz y *para* $J_p=0.6$ Hz, por lo que se concede al protón H₇ vecino al oxígeno, siendo la constante *para* la más pequeña en magnitud debido a la lejanía de los núcleos.. El valor de la constante de acoplamiento *para* es el de menor magnitud debido a la distancia que hay entre los núcleos. Por último, en 7.63 ppm aparece una señal doble de doble que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *meta* $J_m=2.1$ Hz y *para* $J_p=0.6$ Hz, lo cuál permite asignarla al protón H₄ de la posición 4.

Esquema 23. Denominación de los protones en 5



4.1.5. Obtención y caracterización de N-(5-cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil)acetamida (6)

Inicialmente se realizó la síntesis de **6** directamente sin usar disolvente alguno. Se goteó anhídrido trifluoroacético a **1** con agitación magnética, observándose la elevación espontánea de la temperatura de reacción a 70 °C. El rendimiento obtenido fue aceptable; sin embargo, el producto presentó una impureza que después de suspender y lavar con tolueno no fue posible eliminar. Por consiguiente, se intentó otra vía sintética más adecuada, en la cual se usó como disolvente tolueno. El rendimiento obtenido fue del 60% de un producto que recristalizado de etanol tuvo un p.f. de 225-225.5 °C.

El mecanismo propuesto para la obtención de **6** es similar al de la obtención de **4** discutido brevemente con anterioridad.

El espectro IR de **6** muestra en la frecuencia de vibración de 3392 cm⁻¹ la banda característica de amidas secundarias, causada por el estiramiento γ (N-H) y desplazada ligeramente hacia mayor frecuencia relativa al producto **4** debido al grupo trifluorometilo por su carácter electrotractor. El grupo amida normalmente debería tener una banda más débil cerca de 3100 cm⁻¹ originada por un sobretono de la señal de 1559 cm⁻¹. También presentó una señal muy ancha y de intensidad media en 3237 cm⁻¹ típica de la frecuencia de vibración de estiramiento de un hidroxilo fenólico, enlazado por puente de hidrógeno; lo cuál es sugerido por sus características.⁷ En la frecuencia de 1689 cm⁻¹ se observa la señal de mayor

⁷ La frecuencia de vibración disminuye al aumentar la capacidad electrotractor en los sustituyentes del anillo.

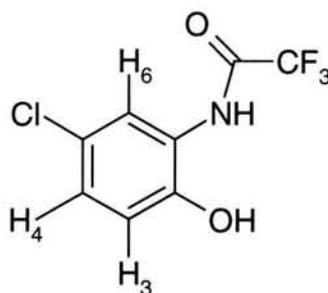
intensidad del espectro, bien definida y peculiar para la vibración de estiramiento de los carbonilos de amida $\nu(\text{C=O})$. En relación a la absorción de intensidad media con un pico bien definido en 1559 cm^{-1} es propia de la vibración C-N-H. La cual es resultado del alabeo N-H y del estiramiento C-N, donde el N y el H se mueven en direcciones opuestas, relativas al carbono. Además, se detectan dos señales más, de intensidad media, en la frecuencia de 1501 cm^{-1} y 1433 cm^{-1} , representativas de la vibración de estiramiento carbono-carbono $\nu(\text{C=C})$. La intensidad de la primera permite obtener conclusiones acerca de la sustitución, pues grupos electrodonadores la incrementan y puede no estar presente. También se advierte la presencia de dos señales en 1339 cm^{-1} y 1160 cm^{-1} , la primera de mediana intensidad, y la siguiente muy intensa, peculiares de la presencia de la vibración del trifluorometilo, además de otra en 734 cm^{-1} . La señal de débil intensidad, bien definida y localizada en 1286 cm^{-1} es atribuida a la frecuencia de vibración de deformación del enlace hidroxilo $\delta(\text{OH})$, la cuál puede interactuar algo con la de estiramiento $\nu(\text{OH})$. Localizada en 1264 cm^{-1} se aprecia una señal de muy baja intensidad bien definida, atribuida a la vibración C-N-H. En este caso el N y el H se mueven en la misma dirección relativa al carbono. Hay que señalar, además, la presencia de la absorción intensa en 1193 cm^{-1} característica de la vibración de estiramiento del enlace carbono-oxígeno $\nu(\text{C-O})$. En relación a la banda observada en 1115 cm^{-1} , es una señal de intensidad media, típica de la vibración de estiramiento de enlace arilo-Cl $\nu(\text{C-Cl})$. Es importante indicar la presencia de una señal de débil intensidad en 872 cm^{-1} , ya que corresponde a la absorción de la frecuencia de coleo fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno, característica de 2 protones adyacentes en un sistema aromático, originado por la sustitución en 5 del benzoxazol. En el caso de la señal de mediana intensidad en 814 cm^{-1} , ésta es atribuida a una vibración de estiramiento del enlace carbono-carbono $\nu(\text{C=C})$. Por último, la señal ancha en 656 cm^{-1} se puede asignar a la vibración de alabeo, fuera del plano, del grupo OH $\delta(\text{OH})$.

El espectro de masas de **6** muestra el ion molecular en una relación m/z de 239, que corresponde adecuadamente con el peso molecular de la estructura del producto esperado con P.M. 239.79. Además, la señal en M+2 es característica para confirmar la presencia de cloro, pues presenta una intensidad relativa del 32.9%. Esta señal corresponde adecuadamente con la presencia del halógeno, aunque podría esperarse algún cambio por la presencia del flúor. Para obtener el P.B, el ion molecular sufre una reacción inicial de pérdida del grupo radical trifluorometilo en la cadena lateral (M-69), para rendir el fragmento con m/z 170. Éste sufre la tautomería ceto-enol y pierde nuevamente una molécula neutra de CO para producir m/z 114, el cuál aún conserva el cloro, como es posible observar en el espectro, por la intensidad de M+2. Por último, para producir el fragmento con m/z 78 la especie anterior pierde una molécula de HCl (M-125).

El espectro de RMN- ^1H de **6** muestra en 6.93 una señal doble que integra para un protón, con una constante de acoplamiento: *orto* $J_o=9$, asignada al protón H₃. De acuerdo a lo esperado el valor de la constante de acoplamiento es mayor en posición *orto* y menor en *meta* característico para cada protón en el anillo. A continuación, en 7.18 se observa una señal doble de dobles que integra para un protón y muestra dos constantes de acoplamiento: *orto* $J_o=8.7$ y

meta $J_m = 2.7$, atribuido al protón H_4 de la posición 4 de **6**. Además, en 7.42 presenta una señal doble de dobles, con una constante de acoplamiento: *meta* $J_m = 2.7$, asignable al protón H_6 . Después, se aprecia en 10.28 una señal simple intensa, aguda que integra para 1 protón e intercambia con agua deuterada, atribuida al protón del grupo amida. Por último, en 10.65 se observa otra señal simple, ligeramente más ancha que intercambia con agua deuterada e integra para un protón y asignada al grupo hidroxilo fenólico.

Esquema 24. Denominación de protones en **6**



4.1.6. Obtención y caracterización de 5-Cloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (**7**)

La obtención de **7** se realizó mediante una destilación de bulbo a bulbo de la materia prima **6**, en presencia de pentóxido de fósforo. La única dificultad relativa observada fue el rendimiento bajo del 55%, atribuido a la carencia de un sistema refrigerante más eficiente, la elevada capacidad de la bomba de vacío usada y el punto de fusión tan bajo de **5**. Sin embargo, el procedimiento de obtención puede considerarse apropiado porque es sencillo y se obtiene la cantidad necesaria del producto puro para su caracterización y las pruebas biológicas.

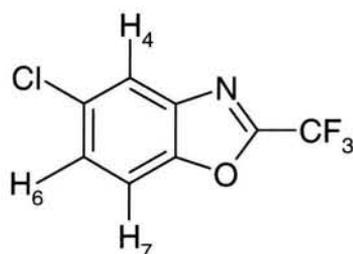
El mecanismo de obtención de **7** es similar al de la obtención de **3**, discutido con anterioridad.

En el espectro de IR del compuesto **7** se observa inicialmente una señal de baja intensidad y aguda en la frecuencia de 3098 cm^{-1} , particular de la vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno aromático $\gamma(\text{C-H})$. Después, en la frecuencia de 3076 cm^{-1} aparece una señal aguda y de baja intensidad; además de algunas otras más pequeñas, también consideradas frecuencias de vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno aromático $\gamma(\text{C-H})$. En la siguiente sección de suma de bandas y sobretonos se observan varias señales muy débiles de intensidad y relativamente anchas en su base, de las cuáles sobresale la de frecuencia de 1691 cm^{-1} . Ésta, de forma similar a las mencionadas, corresponde a vibraciones de sobretonos de deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C-H})$. La siguiente señal relativamente ancha y de intensidad media, presente en la frecuencia de 1615 cm^{-1} es asignada a la vibración de estiramiento del enlace doble carbono-nitrógeno $\gamma(\text{C=N})$. La cuál debido a la cercanía de la banda C=C causa dificultad en la interpretación, pero en este caso permite su distinción, debido a la mayor intensidad en relación a la señal C=C cercana a 1500 cm^{-1} . En la frecuencia de 1582 cm^{-1} se observa una señal de intensidad débil atribuida a la vibración de estiramiento de carbono-carbono $\gamma(\text{C=C})$ aromático. De forma similar, aparece

otra en 1455 cm^{-1} considerada representativa de derivados 1,2,4 sustituidos. Además, se distingue una señal de fuerte intensidad, aguda y bien definida en la frecuencia de 1364 cm^{-1} , considerada característica de la vibración del enlace carbono-nitrógeno ($\text{C}=\text{N}$) aromático. En el caso de la región de $1260\text{-}1057\text{ cm}^{-1}$ se observan varias señales muy intensas y anchas, lo cuál es explicable debido al fuerte acoplamiento entre la vibración de estiramiento del enlace carbono-fluor y el estiramiento C-C. Las señales de las frecuencias 1308 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} y 1213 cm^{-1} son asignadas al grupo trifluorometilo. La señal observada en 1150 es asignada a la vibración de estiramiento del enlace carbono-oxígeno ($\gamma(\text{C}=\text{O}-\text{C}=\text{O})$). Mientras que, la banda aguda de intensidad elevada localizada en la frecuencia de vibración de 1129 cm^{-1} es originada por la vibración de estiramiento del enlace carbono-cloro ($\gamma(\text{C}-\text{Cl})$). También, se deben considerar las señales de 944 cm^{-1} y de 890 cm^{-1} de intensidad media y débil respectivamente, imputadas a vibraciones de deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}-\text{H})$. Por último la señal de débil intensidad, aguda y localizada en 706 cm^{-1} es atribuida al alabeo fuera del plano.

El espectro de masas de **7** presenta un pico de m/z de 221, concordante con el ion molecular. Este sufre una reacción de pérdida del radical fluor ($\text{M}-19$) para dar el catión fragmento m/z 202. Además, puede ocurrir el rompimiento del anillo heterocíclico para sufrir una tautomería ceto-fenol y perder una molécula neutra de CO ($\text{M}-28$) y generar el fragmento m/z 193. También, a partir de la especie tautomerizada ceto-fenol $\text{M}-95$, pierde el fragmento (trifluorometil)acetonitrilo y da lugar a m/z 126. Éste último, por la subsecuente pérdida de CO ($\text{M}-28$) ocasiona la presencia del fragmento m/z 98. El fragmento anterior pierde cloro para producir el pico base con m/z 63. Además, se debe considerar que el fragmento con m/z 171 se obtiene a partir del ion molecular, mediante la pérdida de la porción CF_2 ($\text{M}-50$). Mientras que el fragmento m/z 152 se genera por la reacción de rompimiento homolítico de CF_3 ($\text{M}-69$). De manera similar el ion m/z 152 es producido por pérdida del radical trifluorometilo ($\text{M}-69$).

Esquema 25. Denominación de protones en **7**



El espectro de RMN^{-1}H de **7** muestra las señales atribuibles a un sistema característico ABX, lo cuál es explicable, debido a la presencia de protones en las posiciones 4, 6, y 7 del núcleo del 5-clorobenzoxazol. Presenta en 7.54 una señal en forma de una señal doble de dobles que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o=9$ y *meta* $J_m=2.1$. Tal señal es atribuida al protón H_6 del benzoxazol ya que ningún otro puede tener constante *meta* y *orto*. A continuación, en 7.63 está presente otra señal doble de dobles que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o=9$ y *para* $J_p=0.6$, el cuál puede ser correlacionado con el protón H_7 la menor magnitud de

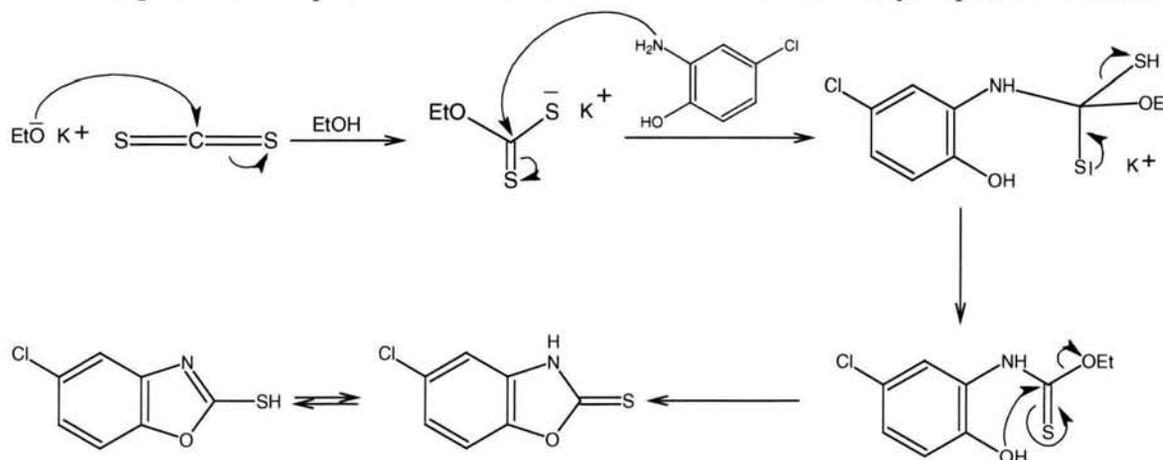
la constante para es debido a la lejanía de los núcleos. Además, en 7.89 aparece una señal en forma de una señal doble de dobles que integra para un protón en el cuál es posible identificar dos constantes de acoplamiento *meta* $J_m = 2.1$ y *para* $J_p = 0.6$, razón por la cuál es asignada al protón de la posición 4 del benzoxazol.

4.1.7. Obtención y caracterización de 5-Cloro-2-mercaptobenzoxazol (**8**)

El producto **8** se obtuvo de manera sencilla y rápida mediante la reacción de **1** en disolución etanólica; a la cual, se le adicionó hidróxido de potasio disuelto en agua y disulfuro de carbono. La mezcla se mantuvo con agitación, a la temperatura de 55 °C durante 12h. Después de lo cual se obtuvo un rendimiento del 90% de un producto que decolorado con carbón y recristalizado de metanol fue apropiado para su caracterización y pruebas biológicas.

Al revisar las características de la reacción de obtención del producto **8** mediante el método de Van Allan, representado en el Esquema 26, se puede considerar, primeramente, la formación del etilxantato de potasio *in situ* y la incorporación de éste a **1** para dar el tiocarbamato; en un segundo paso, un ataque nucleofílico del OH al carbonilo del tiocarbamato, seguido de la eliminación del SH y posterior adición de ácido acético hasta pH de 6 para dar la tiona, que está en equilibrio tautomérico con el 2-mercapto (Van Allan, *et al.*, 1963).

Esquema 26. Representación de la reacción de obtención de **8** y su posible mecanismo

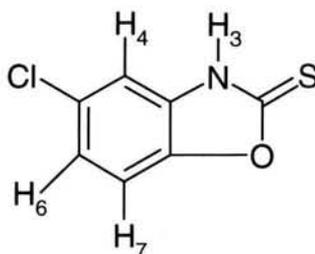


En el espectro de IR del compuesto **8** se observa una señal aguda y de muy baja intensidad en la frecuencia de 3107 cm^{-1} , característica de la frecuencia de vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno aromático $\gamma(\text{C-H})$. A continuación a 2961 cm^{-1} se observa una banda aguda y débil causada por la vibración NH de una tioamida, además de múltiples bandas de muy baja intensidad. En la siguiente región se observa en 1716 cm^{-1} la señal de mayor intensidad del espectro, fuerte, bien definida, ancha en su base y atribuida a la frecuencia de vibración del estiramiento del enlace carbono-azufre $\gamma(\text{C=S})$. Adicionalmente se observa una señal de débil intensidad en la frecuencia de 1597 cm^{-1} , asignada a la vibración CNH. La señal de la frecuencia de 1436 cm^{-1} , aguda, de intensidad media y bien definida, es

imputada a la mezcla de la vibración de estiramiento y la deformación del enlace carbono-hidrógeno $\gamma(\text{C-H})$. Mientras que la banda de 1384 cm^{-1} es causada por la vibración CNH. En 1287 cm^{-1} aparece una banda de intensidad elevada, no simétrica, bien definida y asignada a la frecuencia de estiramiento del enlace carbono-azufre $\gamma(\text{C=S})$. Ésta, debido a la interacción de la vibración C=S con C-O y C-N, a los cuáles está unido, puede presentar más de una señal de vibración de estiramiento $\gamma(\text{C=S})$. Por último, la señal de baja intensidad, aguda, bien definida en la frecuencia de vibración de 693 cm^{-1} es asignada a la vibración de alabeo del anillo fuera del plano por “sexante”.

El espectro de masas del producto **8** presenta su ión molecular en m/z 185, el cual a su vez corresponde con su pico base. Además, el M+2 tiene una intensidad relativa del 37.73%, demasiado elevada para confirmar la presencia del cloro. Tiene un M+4 de 1.87 para azufre. Se observa una pérdida inicial de H para producir m/z 184. A partir de este último fragmento puede sufrir la pérdida de CO (M-29) para producir el fragmento m/z 156. Por otro lado, también puede sufrir la reacción de fragmentación y pérdida de NCS (M -60) y producir el fragmento m/z 125. El pico base puede sufrir la pérdida de OCS (M -61) y producir de nueva cuenta m/z 125, el cual puede a su vez fragmentarse y perder HCN para producir el fragmento común y característico en todos los 5-clorobenzoxazoles m/z 98. Por último, el ion molecular sufre la reacción en la que pierde el ion CSH para producir el fragmento m/z 140.

Esquema 27. Denominación de protones en **8**



El espectro de RMN- ^1H de **8** presenta en 7.27 ppm una señal múltiple complicada de interpretar debido a su forma, pero es posible describirla como una señal doble que integra para un protón y con una constante de acoplamiento observable $J_o=9.0\text{ Hz}$ atribuida al protón H_7 . Enseguida, se observa una señal doble de dobles en 7.30 ppm, que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento: *meta* $J_m=2.1\text{ Hz}$ y *orto* $J_o=9.0\text{ Hz}$, cuya magnitud es relativamente baja, atribuida al protón de la posición 6 del benzoxazol. En 7.51 ppm se presenta una señal doble de dobles donde se podría esperar una constante de acoplamiento $J_o=9.0\text{ Hz}$ y *meta* $J_m=2.4\text{ Hz}$ atribuida al protón H_4 . Por último, en 14.04 ppm se observa una señal simple muy ancho y de baja intensidad que integra para un protón e intercambia con agua deuterada, asignado al $-\text{NH}-$ del producto **8**. Ésta es muy ancha debido a la rápida velocidad de intercambio del protón.

4.1.8. Obtención y caracterización de 5-Cloro-2-(metiltio)benzoxazol (9)

El producto **9** se obtuvo mediante la reacción de **8**, de acuerdo al Esquema 12, en disolución básica etanólica, con yoduro de metilo y agitación magnética. La reacción fue instantánea y presentó un excelente rendimiento del 91% de un producto que recristalizado de una disolución etanol:agua presentó un p.f. de 92-93 °C.

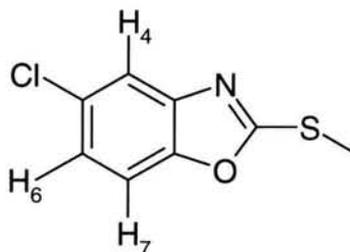
En relación al mecanismo propuesto para la obtención de 5-cloro-2-(metiltio)benzoxazol **9** por el método de Iddon, el azufre ataca al yoduro de metilo a través de una sustitución nucleofílica para desplazar al yoduro y producir **9** con buen rendimiento, como puede observarse en Esquema 8.

El espectro de IR del compuesto **9** presenta una serie de bandas múltiples muy débiles de intensidad y agudas; la de 3099 cm^{-1} es una señal atribuida a la vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno aromático $\gamma(\text{C-H})$, además, otra un poco más débil en 3023 cm^{-1} , de la misma naturaleza que la primera. A continuación, en 2931 cm^{-1} se observa una señal aguda y de muy débil intensidad, característica de la vibración de estiramiento asimétrico del enlace carbono-hidrógeno del grupo metiltio $\gamma(\text{CH}_3\text{-S-})$. En la frecuencia de 1735 cm^{-1} se observa una señal muy débil y aguda, atribuida a la vibración estiramiento simétrico del grupo metiltio, la cuál no se aprecia bien en la región de sobretonos de CH aromáticos. En la frecuencia de 1498 cm^{-1} se identifica una señal muy intensa, aguda y bien definida, correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace carbono-nitrógeno $\gamma(\text{C=N})$. La siguiente señal ubicada en la frecuencia de 1451 cm^{-1} es de intensidad media, aguda y bien definida, es originada por la vibración ($=\text{N-arilo}$). En 1318 cm^{-1} se aprecia una señal de muy débil intensidad, proveniente de la deformación simétrica del enlace carbono-hidrógeno del grupo metiltio $\delta(\text{S-CH}_3)$. En la frecuencia de vibración de 1267 cm^{-1} está presente otra señal, de intensidad débil y aguda, procedente de la vibración de estiramiento asimétrico del grupo C-O-C. La señal en la frecuencia de 1240 cm^{-1} de débil intensidad y aguda es causada por la vibración asimétrica del grupo anterior. Mientras que la banda ubicada en 1216 cm^{-1} es provocada por la vibración de estiramiento del enlace carbono-oxígeno $\gamma(\text{C-O})$. En relación a la señal de la frecuencia 1147 cm^{-1} aguda, de intensidad media y no simétrica, es atribuida a la vibración de deformación del enlace carbono-hidrógeno aromático $\delta(\text{C-H})$. La banda localizada en la frecuencia de 1110 cm^{-1} proviene del estiramiento del enlace carbono-azufre $\gamma(\text{aril-S})$ y de un cierto carácter de vibración aromática de la banda sensible a X. En la frecuencia de vibración en 928 cm^{-1} se presenta una señal de débil intensidad y bastante aguda causada por el meneo fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno. Mientras que, en la frecuencia de 916 cm^{-1} aparece una banda de intensidad media y aguda correspondiente al meneo en fase de vibraciones fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno aromático, característica de un protón aislado. En la frecuencia de 870 cm^{-1} aparece una señal de intensidad media y aguda originada por la vibración de meneo en fase fuera del plano del enlace C-H, aromático de dos protones adyacentes. Por último, en las frecuencias de 812 cm^{-1} y 718 cm^{-1} se presentan dos señales agudas provenientes de la vibración de meneo fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno y la segunda de la vibración de coleo del enlace carbono-hidrógeno de un protón aislado.

El espectro de masas de **9** presenta el ión molecular en m/z 199, el cual corresponde también con el pico base. Además, el pico (M+2) tiene una intensidad relativa de 42.45%, demasiado elevada para confirmar la presencia de cloro y la señal M+4 de 1.87% para azufre. Presenta una señal m/z 166 originada por la pérdida del ión SH (M-33). También, pierde el ión CH₃ (M-15) y produce el fragmento m/z 184, el cual, a su vez sufre la reacción de pérdida de una molécula neutra de CO (M-43) y produce el fragmento m/z 156. Este último pierde HCl y produce el fragmento (M-79) m/z 120, para perder subsecuentemente el ión NCS y produce el fragmento m/z 62. Por otro lado, el fragmento m/z 156 pierde el ion NCS y produce el fragmento característico de benzoxazoles m/z 98, (M-101).

El espectro de RMN-¹H de **9** muestra en 2.79 ppm una señal simple de elevada intensidad que integra para tres protones, el cual se asignó, sin lugar a dudas, al metilo. En 7.23 ppm está presente una señal doble de dobles, que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o= 8.7$ Hz y *meta* $J_m= 2.1$ Hz, atribuida al protón H₆, la de mayor magnitud debido a la menor distancia entre los núcleos acoplados. En 7.37 ppm aparece otra señal doble de doble que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o= 8.5$ Hz y *para* $J_p=0.3$ Hz, razón por la cuál se asignó al protón H₇ a causa de que ningún otro protón puede tener una constante *para* y otra *meta*. Por último, en 7.60 ppm aparece una señal doble de dobles que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *meta* $J_m= 2.1$ Hz y *para* $J_p= 0.6$ Hz, por lo cuál se atribuyó al protón H₄.

Esquema 28. Denominación de protones en **9**



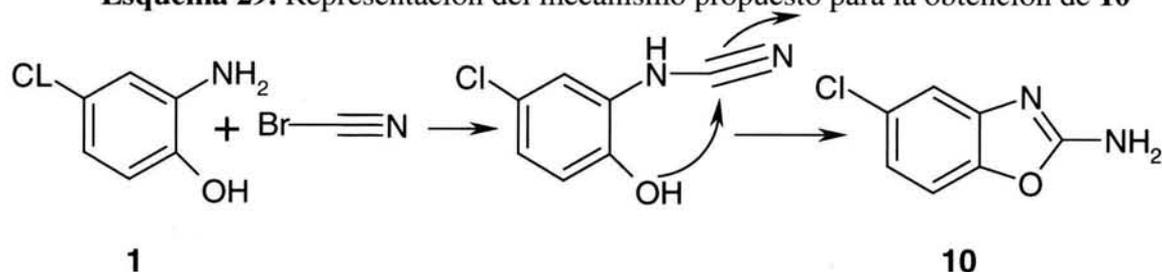
4.1.9. Obtención y caracterización de 2-Amino-5-clorobenzoxazol (10)

El compuesto **10** se obtuvo a partir de una disolución etanólica de **1** mediante la adición lenta de bromuro de cianógeno. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación hasta el día siguiente y se vigiló el término de la reacción por ccf. Para trabajar la reacción se adicionó agua fría y se neutralizó con carbonato de sodio. Se obtuvo el producto con un rendimiento del 76%; recristalizado de benceno tuvo un punto de fusión de 184-185 °C. La reacción se llevó a cabo, además, usando como disolvente agua con un buen rendimiento.

Para la obtención de **10** se aplicó el método de Leonard *et al.* Se partió de **1** y bromuro de cianógeno. De acuerdo al Esquema 29, el amino ataca nucleofílicamente al bromuro de cianógeno para producir el intermediario, el cual sufre inmediatamente un ataque nucleofílico

intramolecular del grupo hidroxilo sobre el carbono trigonal para dar producto 2-imino, el cual se tautomeriza a **10**.

Esquema 29. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de **10**



En el espectro de IR del compuesto **10** se observa una señal aguda de intensidad media, ubicada en la frecuencia de 3472 cm^{-1} característica del estiramiento asimétrico del grupo amino aromático primario.⁸ En las aminas primarias, se presentan vibraciones fundamentales simétricas y antisimétricas en solución diluida o en ausencia de asociación por puente de hidrógeno; por lo cual es posible mirar dos bandas bien separadas. La segunda, más débil y ancha, aparece en 3334 cm^{-1} y corresponde al estiramiento simétrico $\nu(\text{C-H})$, esperado teóricamente a 3391 cm^{-1} si se suponen equivalentes los H de la amina. En la frecuencia de 3025 cm^{-1} aparece una señal muy ancha y de intensidad media con dos hombros atribuible a la asociación por puente de hidrógeno. Las posibles señales del enlace carbono-hidrógeno aromático esperadas en esta región se encuentran mezcladas y superpuestas en esta banda. La señal de la frecuencia de 1692 cm^{-1} es la de mayor intensidad, media, ancha y bien definida; y debido a ser tan fuerte, es asignada a la vibración de estiramiento del enlace carbono-carbono $\nu(\text{C=N})$ que cae en la misma región del estiramiento $\nu(\text{C=C})$. Dicha absorción es el resultado parcial de efectos resonantes e influencias inductivas y de acoplamiento, en nuestro caso es útil para caracterizar los benzoxazoles. Respecto a la banda de intensidad media, un poco ancha, bien definida y localizada en la frecuencia de 1557 cm^{-1} es asignada a un componente de la vibración de “estiramiento de cuadrante” del anillo aromático $\nu(\text{C=C})$ con un poco de deformación del enlace carbono-hidrógeno en el plano $\delta(\text{C-H})$. También se observa la presencia de una señal de mediana intensidad en 1465 cm^{-1} originada por la frecuencia de vibración de “estiramiento de semicírculo” del enlace carbono-carbono aromático, mezclado con la deformación del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C-H})$. En 1102 cm^{-1} y 1051 cm^{-1} se presentan dos señales de baja intensidad ubicadas en la región de absorción del enlace carbono-cloro, la segunda correspondiente a la banda de la sección sensible a X. Por último, en la frecuencia de 714 cm^{-1} se observa un pico de débil intensidad, no simétrico y relativamente ancho, atribuible a la vibración de coleo (NH).

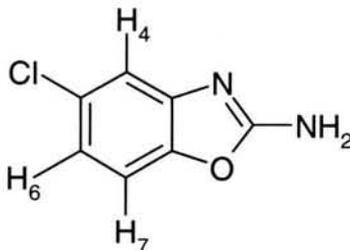
El espectro de masas del compuesto **10** presenta el ion molecular en m/z 168, el cuál es a la vez, el pico base. El pico M+2 es de 42.45% de abundancia, demasiado para confirmar la presencia de cloro. Este compuesto presenta dos rutas principales de fragmentación. La primera da inicio con la pérdida del radical protón para generar un catión de m/z 167, el cuál a

⁸ Se ha encontrado una cierta correlación entre la intensidad de la señal y la basicidad del grupo, de tal manera que se incrementa al disminuir la basicidad de acuerdo al orden siguiente aminas, anilinas, amidas y sales de aminas.

su vez, sufre la apertura del anillo heterocíclico en el enlace oxígeno-carbono con la subsecuente tautomería ceto-enol para sufrir la reacción de pérdida de una molécula neutra de CO y producir el fragmento de m/z 139. Éste último reacciona en la cadena lateral para perder el grupo $-N=C=NH$ y producir el fragmento m/z 98, a continuación pierde cloro y genera el pico m/z 63. La segunda ruta de fragmentación principia con la apertura del anillo heterocíclico en el enlace carbono-oxígeno y la subsecuente tautomería ceto-enol, donde pierde un carbonilo, como CO neutro, generando un fragmento radical iónico con m/z 140. Éste reacciona a través de la cadena lateral, para perder una molécula neutra de HCN y produce una especie radical iónica con m/z 113, la cuál pierde por último cloro y produce el fragmento con m/z 78.

El espectro de RMN- 1H de **10** presenta en 6.96 ppm una señal doble de dobles que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento: *orto* $J_o=8.4$ Hz y *meta* $J_m=2.4$ Hz, ésta última algo pequeña, de tal manera que es posible asignarla al protón H₆. A continuación, en 7.20 ppm se observa una señal doble que integra para un protón y se observa únicamente una constante: *meta* $J_m=2.1$ Hz, la cuál puede ser atribuido al protón H₄. Después, en 7.30 ppm se aprecia una señal doble que integra para un protón y presenta solamente una constante de acoplamiento: *orto* $J_o=8.4$ Hz, el cuál es originado por el protón H₇. Para finalizar, en 7.60 ppm aparece una señal simple intensa y aguda, muy ligeramente ancha en su base, que integra para dos protones e intercambia con óxido de deuterio, la cuál es asignada al grupo amino.

Esquema 30. Denominación de protones en **10**



4.1.10. Obtención y caracterización de *N*-(5-Clorobenzoxazol-2-il)carbonato de metilo (**11**)

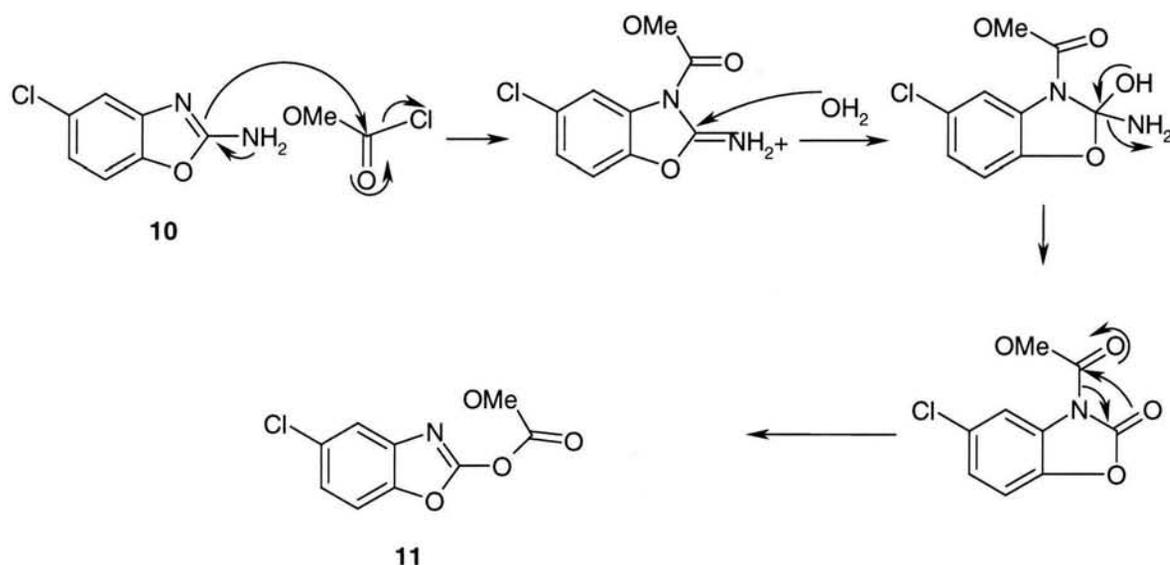
El producto **11** se obtuvo mediante la reacción de **10**, disuelto en acetona, a través de la adición lenta de cloroformiato de metilo. La reacción fue instantánea y de buen rendimiento, sin embargo, se dejó con agitación hasta el día siguiente. Se vertió sobre agua helada y el producto se recolectó por filtración. El cual se decoloró con carbón activado y se recrystalizó de etanol caliente, el compuesto resultante, con rendimiento del 75%, tuvo un p.f. de 184-185 °C. De tal manera que el uso de acetona como disolvente es apropiado para la obtener **11** en cantidad y pureza adecuadas para su caracterización y para las pruebas biológicas. También se obtuvo **11** por un tratamiento semejante de **10**, disuelto en piridina seca, con cloroformiato de metilo a una temperatura entre -5 °C y 5 °C, donde se mantuvo en frío por 15 min. Después se calentó durante 30 minutos a 70 °C y se adicionó agua fría. Se recolectó el precipitado por

filtración y se lavó con una mezcla etanol:agua 1:1 fría. Se obtuvo un rendimiento apreciable pero el producto tuvo un punto de fusión muy bajo, cercano a 150 °C.

Los resultados obtenidos fueron inesperados, ya que se pretendía obtener el carbamato **12** por un procedimiento reportado en la literatura (Montolin, J. S., 1977) para la obtención del *N*-(5-clorobencimidazol-2-il) carbamato de metilo. Se detectó que no era el producto esperado porque el pico del ion molecular tenía una unidad de masa mayor, esto es, 277 en vez de 276.

La obtención del carbonato **11** se puede explicar por medio del mecanismo propuesto en el Esquema 31. Considerando que el nitrógeno en la posición 3 de la materia prima **10** tiene su par de electrones no compartidos en un orbital sp^2 , perpendicular a los orbitales p del anillo, éstos no se deslocalizan y atacan al cloroformiato de metilo; mientras que los del nitrógeno del grupo amino en la posición 2 se encuentran en un orbital p , paralelo a los orbitales p del anillo y se deslocalizan. Lo anterior lleva a la acilación en 3, estabilizada por resonancia por el par de electrones del nitrógeno en 2. El intermediario formado sufre el ataque de una molécula de agua en la posición 2, pierde NH_3 y se forma la cetona en 2, la cual transpone al grupo acilo y da el carbonato **11**.

Esquema 31. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de **11**



El espectro de IR del compuesto **11** muestra en la vibración de 3118 cm^{-1} una señal de intensidad débil y aguda, asignable a la frecuencia de vibración de estiramiento del enlace carbono-hidrógeno $\gamma(\text{C-H})$ aromático. Aparece otra señal de muy débil intensidad en 2990 cm^{-1} originada por la vibración de estiramiento asimétrico del metilo del carbonato. También se aprecia en la frecuencia de 2967 cm^{-1} una banda muy débil y aguda atribuida a la vibración de estiramiento simétrica del enlace carbono hidrógeno del metoxilo $\gamma(\text{O-CH}_3)$. En relación a la banda muy intensa y ancha observada en 1848 cm^{-1} es asignada a la vibración $\text{C}=\text{N}$, debido a su menor intensidad relativa a la del carbonilo. En cuanto a la señal de 1748 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento simétrica del carbonilo del carbonato, cuya frecuencia es

disminuida ligeramente por el grupo metoxilo unido al carbonilo. En la frecuencia de 1628 cm^{-1} se encuentra otra señal muy débil de intensidad; atribuida a la frecuencia de vibración del enlace carbono-nitrógeno ($\text{C}=\text{N}$). A continuación, en 1604 cm^{-1} aparece una señal de muy débil intensidad asignada a una vibración de estiramiento del enlace carbono-carbono ($\gamma(\text{C}=\text{C})$). En relación a la señal de intensidad media ubicada en la frecuencia de 1487 cm^{-1} es ocasionada por la vibración de deformación en el plano del enlace carbono-hidrógeno, donde el carbono se mueve tangencialmente y el H contra las manecillas. Además, la señal de intensidad media de la frecuencia de 1443 cm^{-1} es causada por la deformación asimétrica del grupo metoxilo $\delta(\text{O}-\text{CH}_3)$. En la frecuencia de 1355 cm^{-1} aparece una señal muy intensa, aguda, completamente definida y relativamente angosta en su base, atribuida a la vibración asimétrica del grupo carbonato. Mientras que a continuación aparece en la frecuencia de 1272 cm^{-1} una señal aguda, de intensidad media y sobrepuesta a otra similar asignable a la vibración del grupo ($\text{O}-\text{C}-\text{O}$). Además, en la frecuencia de 1252 cm^{-1} se observa una banda aguda, de intensidad similar a las anteriores, la cuál es causada por la vibración asimétrica del grupo ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$). Respecto a la señal localizada en la frecuencia de 1147 cm^{-1} de intensidad media, aguda y no simétrica es provocada por la vibración de deformación en el plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}-\text{H})$. La banda de mediana intensidad en la frecuencia de 1106 cm^{-1} es ocasionada la vibración del enlace carbono-oxígeno ($\text{C}-\text{O}$). Las frecuencias de 1081 cm^{-1} y 1052 cm^{-1} son producidas por la vibración del enlace carbono-cloro. En relación con las señales ubicadas en las frecuencias de 1021 cm^{-1} y 927 cm^{-1} son causadas por la vibración respectiva del enlace ($\text{C}-\text{O}$) y ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$). A continuación, localizada en 874 cm^{-1} se observa una señal aguda, de intensidad débil y bien definida, atribuida a la vibración de coleo fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno ($\text{C}-\text{H}$), característica de un protón aislado. Mientras que en la frecuencia de 810 cm^{-1} se aprecia una banda de intensidad media, aguda y relativamente ancha, característica de la deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}-\text{H})$, la cuál es observada genéricamente en compuestos aromáticos con dos protones adyacentes. Por último, en la frecuencia de 767 cm^{-1} se localiza una señal de intensidad media débil y aguda, característica de la deformación fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}-\text{H})$ en compuestos con sustitución 1,2, 4.

Aunque se sospechaba de una posible reacción de transposición en la reacción de obtención del carbamato **12**, la confirmación de tal hecho se realizó hasta interpretar los espectros. En el caso del espectro de se esperaba la m/z 226 del carbamato; sin embargo, el espectro reveló una señal con una m/z de 227 para el ion molecular. Este resultado fue explicado satisfactoriamente mediante una reacción de transposición del grupo metilformiato. Una vez explicada satisfactoriamente la reacción, todos los datos concordaron adecuadamente con la estructura del carbonato **11**. El ion molecular observado para el carbonato **11** resultó con una m/z 227 que corresponde con el peso molecular de la estructura propuesta. Además, una señal $M+2$ de 32.6%, lo cuál corresponde exactamente con la cifra, para confirmar la presencia de cloro en la estructura de la molécula. A continuación sufre la pérdida de una molécula neutra de CO_2 para producir el radical iónico con m/z 183. Éste, a su vez pierde un radical metilo para generar un catión con m/z 168, el cuál corresponde con el pico base. El fragmento con m/z 227 pierde un radical metoxilo para producir el catión m/z 196. Éste último sufre una transposición para producir un isocianato, que puede reaccionar en la cadena lateral para eliminar el radical $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ y producir el catión con m/z 154. Otra vía para la generación

del fragmento que origina el pico base es la pérdida del radical metilformiloilo (COOCH_3) para producir el catión con m/z 168. El cual sufre una tautomerización ceto-enol para producir el catión 5-cloro-2-benzoxazolinona, la cuál pierde CO_2 y produce el fragmento con m/z 124. También puede perder CO para generar el fragmento con m/z 140. Por último, este fragmento tautomeriza en un catión cetoimina, el cuál pierde una molécula neutra de CO para producir el fragmento con m/z 112. Además, pierde subsecuentemente una molécula de HCl para generar el catión m/z 76.

El producto **11** muestra en el espectro de RMN^1H en 4.11 ppm una señal simple, intensa y aguda que integra para 3 protones, la cuál es posible atribuir al metilo del grupo carbonato. A continuación, en 7.15 ppm aparece una señal doble de dobles, que integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento: *orto* $J_o= 8.7$ Hz y *para* $J_p=0.3$ Hz, razón por la cuál puede ser atribuido al protón H_7 siendo la de mayor magnitud la orto debido a la cercanía del protón 6 con el que se acopla. Después, en 7.24 ppm se observa otra señal doble de dobles, la cuál integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o= 8.6$ Hz y *meta* $J_m= 2.1$ Hz, por lo que se asigna al protón en la posición 6 del benzoxazol ya que ningún otro protón puede tener esas constantes de acoplamiento. Por último, en 7.92 ppm se observa una señal doble de dobles, que integra para un protón, con dos constantes de acoplamiento: *meta* $J_m=2.3$ Hz y *para* $J_p=0.6$ Hz, por lo cuál puede asignarse al protón de la posición 4 del benzoxazol.

Esquema 32. Denominación de protones en **11**

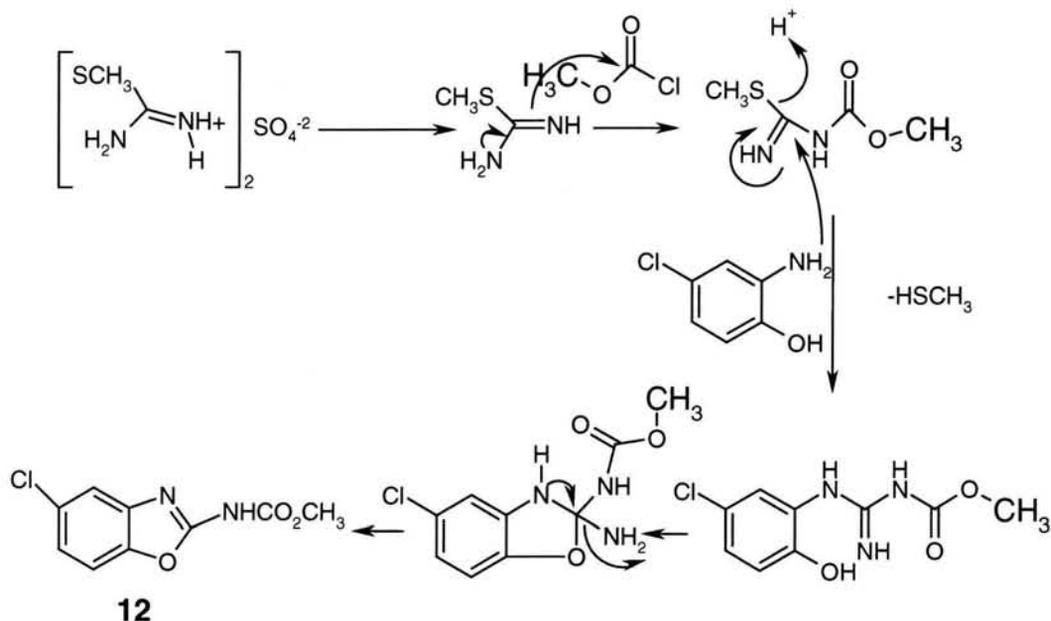


4.1.11. Obtención y caracterización del *N*-(5-Clorobenzoxazol-2-il)carbamato de metilo (**12**)

El producto **12** se obtuvo después de al menos dos intentos de reacción infructuosos. En éstos se hizo reaccionar **10** con cloroformiato de metilo en diferentes disolventes como acetona y piridina. En los cuales se obtuvo como producto principal **11**. La reacción que rindió el producto **12** fue aquella en la que se hizo reaccionar sulfato de *S*-metilpseudotiourea con cloroformiato de metilo. El pH se controló de tal forma que oscilara entre 7-7.5 y la temperatura se reguló entre 10-15°C. Después, esta mezcla se adicionó a una suspensión de **1** en un buffer de acetatos con pH 4.5. A continuación se calentó a reflujo con agitación vigorosa. El sistema se adaptó con al menos tres trampas de lavado de gases con hipoclorito de sodio al 6% para retener los gases de H_3CSH desprendidos en la reacción. A pesar de que **12** no fue el principal producto de la reacción, se obtuvo en la cantidad y pureza necesaria para la caracterización y pruebas biológicas después de una cromatografía flash. El método realizado para la obtención de **12** fue laborioso; sin embargo, es efectivo pues se logró el objetivo.

El mecanismo propuesto para la obtención del carbamato **12** por el método de Raeymakers se muestra en el Esquema 33. La adición lenta, y con control del pH a 7-7.5, de la base a la mezcla de sulfato de *S*-metilpseudotiourea y cloroformiato de metilo neutralizó a la primera, provocando un ataque nucleofílico al carbonilo del cloroformiato de metilo con eliminación del cloro. Si no se tiene la precaución de controlar el pH se hidroliza el cloroformiato y los rendimientos bajan considerablemente.

Esquema 33. Representación del mecanismo propuesto para la obtención de **12**



El intermediario formado se adicionó a una suspensión de **1** en una solución reguladora de pH de alrededor de 5. En estas condiciones el grupo amino de **1** realiza un ataque nucleofílico sobre un carbono del imino para dar el éster metílico del ácido *N*-[1-imino-1-(5-cloro-2-hidroxianilino)metil]carbámico. Éste sufre un ataque intramolecular por el hidroxilo fenólico sobre el carbono sp^2 de la cadena lateral, para dar como resultado el producto de la ciclación, el cual pierde amoníaco y genera el carbamato **12**.

El espectro de IR de **12** muestra en la región de 3437 cm^{-1} una señal de baja intensidad, muy ancha y definida, asignada a la frecuencia de estiramiento del enlace $\gamma(\text{N-H})$ del carbamato. La cual aparece acompañada de una señal, un poco más aguda y de débil intensidad en 3108 cm^{-1} , originada por un sobretono de la señal de vibración de la banda que aparece en 1586 cm^{-1} . Lo ancho de la primera señal sugiere que se encuentra asociada por formación de puente de hidrógeno (Colthup, 1990). En la frecuencia de 2841 cm^{-1} se observa, además de otras señales, una banda de intensidad media ancha, la cual se adjudica al estiramiento asimétrico del grupo metilo $\gamma(\text{CH}_3)$. Además, se detecta otra señal de estiramiento simétrico cercana a 2960 cm^{-1} . En 1764 cm^{-1} se localiza la señal de mayor

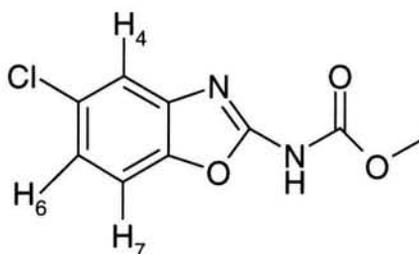
intensidad del espectro, aguda y bien definida, característica de la vibración de estiramiento simétrica del grupo carbonilo del carbamato. En este caso, la aparición a mayor frecuencia relativa se explica por la presencia de dos grupos electronegativos, aunque no es el único efecto porque existe la deslocalización de electrones y disminuye la frecuencia. A continuación, en 1679 cm^{-1} se encuentra otra señal, de elevada intensidad, bien definida, aguda y ancha en su base, pero de menor intensidad que la banda del carbonilo, atribuida a la frecuencia de vibración de estiramiento γ (C=N). Esta señal es importante para caracterizar apropiadamente los benzoxazoles. Enseguida aparece una banda de intensidad media, aguda y bien definida en 1586 cm^{-1} , asignada, sin lugar a dudas, a una vibración de estiramiento del enlace carbono-carbono γ (C=C). Esta vibración involucra principalmente el “estiramiento por cuadrante” del enlace C=C del anillo, pero presenta un poco de interacción con el alabeo C-H en el plano. Cuando el carbono se mueve tangencialmente, su hidrógeno lo hace en contra de las manecillas. Además, en 1465 cm^{-1} se observa una señal de débil intensidad, aguda y bien definida, atribuida al estiramiento carbono-carbono γ (C=C). En relación a la banda de intensidad media y aguda, sobrepuesta a una de mayor magnitud, que aparece en la frecuencia de 1447 cm^{-1} , se asigna a la vibración de deformación simétrica del grupo metoxilo δ (-OCH₃). A continuación, en la frecuencia de 1385 está presente una señal de intensidad media alta, bien definida y aguda, la cuál se atribuye a la vibración de estiramiento del enlace carbono-oxígeno γ (C-O). Respecto a la banda de intensidad elevada, bien definida, relativamente ancha y fuerte, que aparece en la frecuencia 1234 cm^{-1} , se atribuye a la vibración de estiramiento asimétrico (C-O-C), característico de un formiato, la cual está sobrepuesta a una vibración (C-N) de carbamato. Esta señal es importante para caracterizar adecuadamente el producto **12**. Enseguida aparece en la frecuencia de 1087 cm^{-1} una señal de intensidad media, bien definida y se adjudica a la vibración aril-Cl, al igual que la señal en la frecuencia de 1052 cm^{-1} , que se encuentra mezclada con una vibración de enlace único -OCH₃. En la frecuencia de 919 cm^{-1} aparece una señal de intensidad media, aguda y bien definida, la cual se atribuye a la vibración C-O-C. Respecto a la señal de intensidad media y aguda, que se observa en la frecuencia de 856 cm^{-1} se adjudica a la vibración de coleo fuera del plano del enlace carbono-hidrógeno (C-H), característica de un H aislado de la sustitución 1,2,4. La banda que aparece en la frecuencia de 810 cm^{-1} de intensidad media, aguda y simétrica, bien definida corresponde con la deformación fuera del plano δ (C-H), característica de 2H vecinos en la sustitución 1,2,4. Por último, en la frecuencia de 760 cm^{-1} está presente una banda de intensidad media, aguda, simétrica y bien definida atribuida a la deformación fuera del plano de un H aislado, también característico de la sustitución 1,2,4.

El espectro de masas de **12** muestra el ion molecular con una m/z de 226, igual al calculado. La intensidad relativa del pico M+2 es de 32.85%, y corresponde adecuadamente con la abundancia para el cloro. El ion molecular sufre una reacción de fragmentación y pierde una molécula neutra de metanol (M-32) para producir el radical iónico de m/z 194, que corresponde con el pico base. El ion molecular sufre la reacción de pérdida del fragmento NCO₂ (M-59) en la cadena lateral, para producir el radical iónico con m/z 167, el cual sufre la apertura del heterociclo entre las posiciones 1 y 2 para presentar la reacción de pérdida de CO (M-28) y generar el radical iónico m/z 139. Este último sufre la pérdida de CH₃CN y presenta como producto de la reacción el radical iónico m/z 98. El cual a su vez pierde un ion de cloro y produce el fragmento con m/z 63. Otra de las rutas de fragmentación se presenta a partir del

radical iónico m/z 139, que sufre la reacción de pérdida consecutiva de las moléculas neutras: de HCN y HCl, para producir los radicales iónicos m/z 112 y 76, respectivamente. El fragmento de m/z 139 también pierde una molécula neutra de HCl y produce el fragmento m/z 103.

El espectro de RMN- ^1H de **12** muestra en 3.78 ppm una señal simple intensa y agudo que integra para 3 protones, la cuál se atribuye al metilo del carbamato. Se ubica en campo relativamente más alto, debido a que por la mayor electronegatividad del oxígeno aumenta la densidad electrónica. A continuación, en 7.27 ppm aparece una señal doble de dobles, la cuál integra para un protón y presenta dos constantes de acoplamiento características: *orto* $J_o = 8.7$ Hz y *meta* $J_m = 2.1$ Hz, que se atribuye al protón H_6 . Después, en 7.62 ppm muestra una señal doble que integra para un protón y presenta una constante de acoplamiento característica: *orto* $J_o = 8.7$ Hz atribuida al protón H_7 . Enseguida, en 7.63 ppm se observa una señal doble que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento: *meta* $J_m = 2.1$ Hz originado por el protón H_4 . Por último, en 11.78 ppm aparece una señal relativamente ancha y de baja intensidad que intercambia con agua deuterada, proveniente del protón del NH.

Esquema 34. Denominación de los protones de **12**

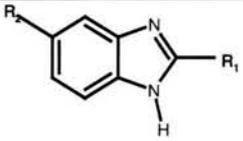
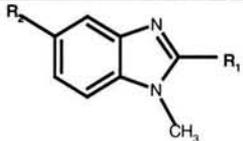
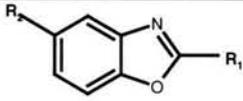


4.2. Parte biológica

La actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Giardia intestinalis* fue evaluada al determinar la concentración inhibidora al 50% (CI_{50}) del crecimiento del organismo y observar la susceptibilidad de los trofozoítos a los 5-clorobenzoxazoles sintetizados, tal susceptibilidad fue realizada por el método de subcultivos. Éste se basa en la capacidad de replicación de los trofozoítos los cuales se incuban inicialmente durante 48h a 37°C , en contacto con el agente de prueba o un control disuelto en diferentes niveles de concentración. Al final del período de tratamiento las células son lavadas y cultivadas en medio de cultivo libre del compuesto de prueba durante otras 48 h. Al término se determina visualmente el número de células mediante un hemacitómetro y se determina el porcentaje de inhibición para proceder a realizar el cálculo de la concentración inhibidora al 50% mediante el método de Probit (probability unit) (Finney, 1977). Este consiste en designar un valor de probit para cada nivel de dosis o concentración, el cual se puede consultar o calcular, corresponde al valor de la desviación equivalente normal (DEN) más 5 unidades y así evitar valores negativos. A continuación se elabora una gráfica de probits, o se realiza analíticamente, contra el logaritmo de concentración y se interpola el valor de la CI_{50} cuando el valor del probit sea de 5 (Goldstein *et al.*, 1974). Los resultados de las pruebas de actividad antiparasitaria *in vitro* contra *G. intestinalis* se muestran comparativamente en el Cuadro 11. Para conocer la efectividad antiparasitaria de los

compuestos evaluados se debe observar que a menor valor de la CI_{50} es más la actividad del producto correspondiente como antiparasitario contra *G. intestinalis*. Para comprender mejor cómo varía la actividad con los cambios estructurales se anexan los datos de los 1-H-, 1-metilbencimidazoles y benzoxazoles obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio Cuadro 8. Lo cual permitirá tener un panorama completo de los estudios realizados en este sentido.

Cuadro 8. Actividad biológica de bencimidazoles y benzoxazoles

											
Clave	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μ M)	Clave	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μ M)	Clave	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μ M)
1HB	H	H	0.008		H	H	nd	13	H	H	7.63
2HB	CH ₃	H	0.317	1MB	CH ₃	H	0.089	14	CH ₃	H	2.64
3HB	CF ₃	H	0.107	5MB	CF ₃	H	0.064	15	CF ₃	H	3.68
4HB	SH	H	0.040	3MB	SH	H	0.018	16	SH	H	7.74
5HB	SCH ₃	H	0.045	4MB	SCH ₃	H	0.033	17	SCH ₃	H	0.82
6HB	NH ₂	H	1.902	7MB	NH ₂	H	1.360	18	NH ₂	H	29.5
7HB	NHCO ₂ CH ₃	H	0.057		NHCO ₂ CH ₃	H	nd	20	NHCO ₂ CH ₃	H	0.68
									OCO ₂ CH ₃	H	
8HB	H	Cl	0.282		H	Cl	nd	3	H	Cl	nd
9HB	CH ₃	Cl	0.156	6MB	CH ₃	Cl	0.144	5	CH ₃	Cl	nd
10HB	CF ₃	Cl	1.282	10MB	CF ₃	Cl	0.042	7	CF ₃	Cl	nd
11HB	SH	Cl	0.081	8MB	SH	Cl	0.020	8	SH	Cl	10.3
12HB	SCH ₃	Cl	0.005	9MB	SCH ₃	Cl	0.122	9	SCH ₃	Cl	8.4
13HB	NH ₂	Cl	0.030	12MB	NH ₂	Cl	0.132	10	NH ₂	Cl	7.3
14HB	NHCO ₂ CH ₃	Cl	0.066		NHCO ₂ CH ₃	Cl	nd	12	NHCO ₂ CH ₃	Cl	3.6
								11	OCO ₂ CH ₃	Cl	36
Metronidazol											1.228
Nitazoxanida											0.013
Albendazol											0.037

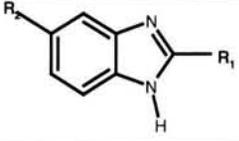
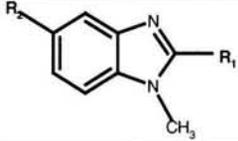
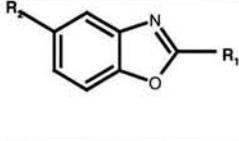
nd no determinado

En este cuadro se puede apreciar que los 1-metilbencimidazoles son más activos que los correspondientes 1H-bencimidazoles y que éstos son más activos que los benzoxazoles sustituidos en dos. Aún después de introducir un cloro en la posición 5 se observa dicho patrón. En general los benzoxazoles son menos activos contra *G. intestinalis*.

El máximo de actividad para los 1H-bencimidazoles, en la serie sin cloro en la posición 5, se presenta en el compuesto más sencillo: el 1H-bencimidazol. Mientras que para la serie de 1H-bencimidazoles con cloro en 5, el más activo fue el 5-cloro-2-(metiltio)bencimidazol. Para la serie de los 1-metilbencimidazoles se presenta el máximo de actividad en los compuestos 1-metil-2-mercaptobencimidazol y 5-cloro-1-metil-2-mercaptobencimidazol. En la serie de los benzoxazoles se presenta la mayor actividad en el compuesto 2-metiltio aunque no es comparable con la de los bencimidazoles. Mientras que para los 5-clorobenzoxazoles el producto más efectivo contra la *Giardia* fue el derivado con un carbamato en 2, aunque es necesario completar la actividad de algunos compuestos de la serie para tener resultados definitivos.

La actividad importante observada en algunos de los bencimidazoles sintetizados y estudiados en nuestro laboratorio, puede ser originada porque la afinidad del compuesto por algún posible receptor específico en *Giardia* es muy elevada, lo cual permite una interacción óptima o bien porque las propiedades fisicoquímicas son tales que permiten el paso perfecto a través de membranas celulares y producen niveles elevados del fármaco en su sitio de acción. Con el fin de auxiliarse a discriminar entre estas dos posibilidades para explicar la actividad de los bencimidazoles y benzoxazoles, se procedió a realizar el cálculo teórico del LogP de cada uno de estos compuestos Cuadro 9. A través de un método desarrollado por la compañía Molinspiration, en el cual se suman las contribuciones de los fragmentos y los factores de corrección apropiados.

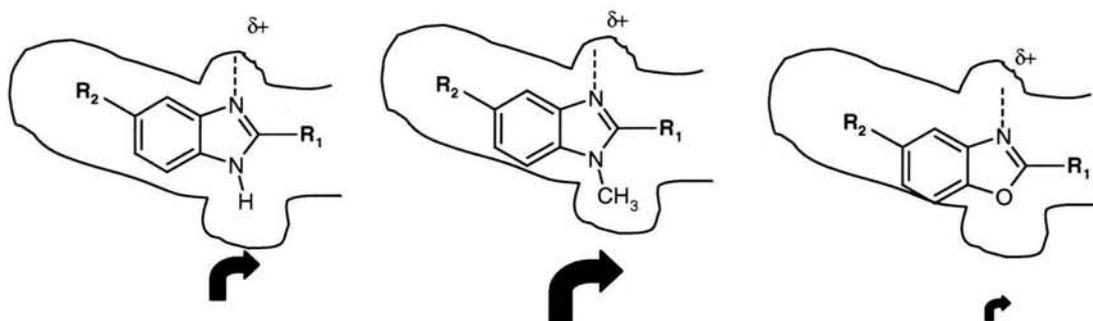
Cuadro 9. Resultados del cálculo de LogP para los bencimidazoles y benzoxazoles

											
Clave	R ₁	R ₂	LogP	Clave	R ₁	R ₂	LogP	Clave	R ₁	R ₂	LogP
1HB	H	H	1.31		H	H	1.66	13	H	H	1.99
2HB	CH ₃	H	1.45	1MB	CH ₃	H	1.80	14	CH ₃	H	2.56
3HB	CF ₃	H	2.11	5MB	CF ₃	H	2.46	15	CF ₃	H	3.22
4HB	SH	H	1.82	3MB	SH	H	2.17	16	SH	H	2.25
5HB	SCH ₃	H	2.35	4MB	SCH ₃	H	2.69	17	SCH ₃	H	2.78
6HB	NH ₂	H	1.05	7MB	NH ₂	H	1.40	18	NH ₂	H	1.37
7HB	NHCO ₂ CH ₃	H	1.59		NHCO ₂ CH ₃	H	1.94	20	NHCO ₂ CH ₃	H	1.92
	OCO ₂ CH ₃	H	0.56		OCO ₂ CH ₃		0.91		OCO ₂ CH ₃	H	1.24
8HB	H	Cl	1.94		H	Cl	2.29	3	H	Cl	2.61
9HB	CH ₃	Cl	2.08	6MB	CH ₃	Cl	2.43	5	CH ₃	Cl	3.19
10HB	CF ₃	Cl	2.74	10MB	CF ₃	Cl	3.09	7	CF ₃	Cl	3.85
11HB	SH	Cl	2.45	8MB	SH	Cl	2.80	8	SH	Cl	2.88
12HB	SCH ₃	Cl	2.98	9MB	SCH ₃	Cl	3.32	9	SCH ₃	Cl	3.40
13HB	NH ₂	Cl	1.68	12MB	NH ₂	Cl	2.02	10	NH ₂	Cl	2.00
14HB	NHCO ₂ CH ₃	Cl	2.22		NHCO ₂ CH ₃	Cl	2.56	12	NHCO ₂ CH ₃	Cl	2.54
	OCO ₂ CH ₃	Cl	1.19		OCO ₂ CH ₃	Cl	1.54	11	OCO ₂ CH ₃	Cl	1.87
Metronidazol											
Nitazoxanida											
Albendazol											

El comportamiento de estos resultados se pueden explicar considerando que el nitrógeno en la posición 3 de estos compuestos interactúa con un sitio electrofílico en el receptor del parásito, ya sea a través de un puente de hidrógeno o bien neutralizando una carga positiva o parcial positiva, de tal manera que entre más densidad electrónica del nitrógeno en 3 mayor interacción con el sitio electrofílico y mayor es la actividad observada. En el Esquema 35 se ejemplifica de manera sencilla dichas interacciones. Así, en los derivados 1-metilbencimidazoles se transmite mayor densidad electrónica al nitrógeno en 3 por efecto inductor del metilo en 1; además, del efecto de resonancia por el nitrógeno en 1. Estos efectos están disminuidos en los 1*H*-bencimidazoles, principalmente, por carecer del grupo metilo, aunque esté presente el efecto electrodonador del nitrógeno por resonancia. En la serie de los benzoxazoles, el efecto es más marcado ya que carece del metilo en 1 y del nitrógeno

electrodonador en 1, en su lugar hay un oxígeno, el cual, comparativamente, es menos electrodonador que el nitrógeno.

Esquema 35. Se muestra la posible explicación de la actividad biológica.



5. Conclusiones

Los métodos y procedimientos empleados para obtener los benzoxazoles y sus intermediarios son los más adecuados para las condiciones de nuestro laboratorio. Se logró la síntesis de los productos objetivo, con rendimientos relativamente buenos y en las cantidades apropiadas para realizar las pruebas biológicas subsecuentes y posibilitar el estudio de las relaciones estructura actividad, tan importantes para establecer conclusiones apropiadas acerca de la actividad antiparasitaria. Aunque, cabe la posibilidad de optimizarlos, no fue el objetivo principal de este trabajo.

En los casos de los productos **3**, **5** y **7**, obtenidos mediante la destilación de bulbo a bulbo en un aparato Kugelrohr, se puede explicar el bajo rendimiento debido a la alta eficiencia de la bomba de vacío y la falta de un sistema de refrigeración más eficiente para condensar y retener una mayor cantidad de producto resultante de la destilación. Los métodos de purificación de los productos e intermediarios fueron sumamente simples, sencillos, de corta duración y económicos de realizar.

Encontramos que las propiedades físicas resultantes de los benzoxazoles se pueden clasificar en 2 grupos, uno de bajo punto de fusión y solubles en disolventes orgánicos lipofílicos y el otro con alto punto de fusión y soluble en disolventes polares hidrofílicos.

En general, los derivados del 5-clorobenzoxazol fueron mucho menos activos contra *G. intestinalis* que sus análogos bencimidazólicos, aunque el producto **12** fue el que presentó mayor actividad en dicha serie. La afinidad de los compuestos estudiados en nuestro laboratorio es afectada por las características de densidad electrónica del anillo en la posición tres, la cual en este caso es modificada por el grupo en la posición 1 del anillo. A mayor capacidad electrodonadora del grupo mayor densidad electrónica y por lo tanto mayor fortaleza de la interacción del $-N=3$ con un posible grupo electrofílico del receptor del parásito. Esta situación es confirmada por la mayor actividad de los derivados 1 metilados >1H>>benzoxazoles. No se observó correlación entre la actividad biológica de los compuestos con el LogP calculado. Los compuestos sintetizados fueron diseñados bajo bases teóricas firmes y presentan el mismo tipo de actividad biológica que algunos bencimidazoles obtenidos en trabajos anteriores en nuestro laboratorio. Este trabajo permitió estudiar la influencia de algunos grupos en la actividad antiparasitaria, especialmente antiprotozoaria y es importante la propiedad electrodonadora del grupo en 1. Razón por la cual la obtención de los benzoxazoles (**3**, **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** y **12**) se considera importante para obtener información relevante y conclusiones en este sentido.

6. Bibliografía

Abboud, P., Léeme, V., Gargala, G. Brasseur, P., Ballet, J., Borsa-Lebas, F. & Favennec, L. **2001**. Successful treatment of metronidazole and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, 32: 1792-1794.

Acheson, R.M. **1981**, *Química Heterocíclica*, Ed. Publicaciones Cultural, S.A. México, pp 396-397.

Agabian, N., **1990** Cerami, A.(eds,) *Parasites molecular biology, drug and vaccine design*. Ed. Wiley-Liss.

Avendaño, C. **1997**, *Introducción a la Química Farmacéutica*, Ed. Mac Graw Hill, Interamericana, 3ª reimpresión pp 54-56.

Arroyo S., V.M. , **2003**, Síntesis de Benzoxazoles sustituidos en posición 2 con potencial actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Bogitsh, B.J.; Cheng, J.C. , **1998** Human Parasitology. Ed. Academic Press, 2nd ed.

Boreham, P.F.L.; Philips, R.E.; Sheperd, R.W.; **1988**, Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 104-106.

Bundy, D.A.P., Hall, A., Medley, G.F., Savioli L. (**1992**). Evaluating measures to control intestinal parasitic infections. *World Health Statistics Quarterly* 45: 168-179.

Carrie L. Byington, Roland L. Dunbrack, Jr.,† , Frank G. Whitby, Fred E. Cohen,§ and Nina Agabian. (**1997**) Entamoeba histolytica: Computer-Assisted Modeling of Phosphofructokinase for the Prediction of Broad-Spectrum Antiparasitic Agents. *Experimental Parasitology*, 87, 194–202.

Cedillo R., Muñoz, O. **1992**. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* 37: 221-224.

Cedillo-Rivera, R.; Chávez, B.; González-Robles, A.; Tapia, A.; Yépez-Mulia, L. **2002**, In Vitro effect of Nitazoxanida Against Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Tricomonas vaginalis Trophozoites. *J. Of Eukaryot. Microbiol.* 49(3), 201-208.

Colthup, N.B.; Daly, L.H.; **1990**, *Infrared and Raman Spectroscopy*. Ed. Academic Press, 3th ed., p 247. Günzler, H.; **2002**, *IR Spectroscopy*, Ed. Wiley-VCH, p 171. Socrates, G.; **1980** *Infrared Characteristic Group Frecuencies*. Ed. John Wiley.

Corbridge, D.E.C.; **1990**, *Phosphorus. An outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology*. Ed. Elsevier, pp63.

Del Villar M., R.I.; Guzman V., M., **1996** *Tesis de licenciatura* Q.F.B. UNAM.

Doumbo, O.; Rosignol, J.F.; Pichard, D.; Traore, H. Dembele, M.; Diakite, M.; Traore, F. & Diallo, D.; **1997**. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasite infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56: 637-639.

Farthing, M. J. G. **1996**. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **25**:493-515

Finney, D.L. **1977**. Probit analysis. Cambridge University Press, New York.

Goldstein, A.; Aronow, L.; Kalman, S.M. **1974** *Farmacología*. Ed. Limusa.

Goodman y Gilman. **1985** *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Ed. Médica Panamericana, 7ª ed..

Hansch, C. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Ed. Pergamon Press, 1st ed. 1990.

Horton, R.J. **1990**, *Parasitology Today*, 6, 106.

Iddon, B.; Kutschy, P.; Robinson, A.G.; Suschitzky, H.; Kramer, W.; Neugebauer, F. **1992**, *Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, 3129.

Kassai, T.; Cordero del Campillo, M.; Euseby, J.; Gaafar, G.; Heipe, Th. **1988**, "Standardized Nomenclature of Animal Parasite Diseases (SNDOAPAP)". *Veterinary Parasitology*, 29, 299).

Kim, S.S.; Pearce, E.M. **1989**, *Makromol. Chem. Suppl.* 15, 87.

Korolkovas, A. **1988**, *Essentials of Medicinal Chemistry*, Ed. John Wiley & Sons.

Krosgaard-Larsen, A. **1991**, *Textbook of Drug Design and Development*, Harwood Academic Publishers pp 61.

La Voie, E.J.; Patani, G.A. **1996**, Bioisoterism: A rational approach in Drug Design, *Chem. Rev.* 96, 3147-3176.

Lacey, E. **1988**, The Role of Cytoskeletal Protein, Tubulin in the Mode of Action and Mechanism of Drug Resistance to Benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885-936.

Leonard, N.J.; Curtin, D.Y.; Beck, K.M. **1947**, Sulfonate salts of substituted benzimidazoles. *J.Am.Chem.Soc.* 69,2459.

Mansour, T.E. **2002** *Chemoterapeutic targets in parasites*, Cambridge University Press.

March, J.; **2001**, *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th ed. Wiley-Interscience.

Medifox, BSc. **1997**, Drug Resistance in Gastrointestinal Nematodes, *Medical & Veterinary Parasitology*, 4,1-10.

Meingassner, J.G.; Mieth, H.; Czok, R.; Lindmark, D.G.; Muller, M.; **1978**, Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in *Trichomonas foetus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 13: 1-3.

Montresor, A.T.W. Gyorkos, D.W.T. Crompton, D.A.P. Bundy, and L.Savioli **1999** *I.MONITORING HELMINTH CONTROL PROGRAMMES*. WHO/CDS/CPC/SIP/99.3

Montolin, J. S., Patente española No. 450099 de **1977**; CA 88, 105344 de **1978**

Muller, M.; Gurrell, T.E.; **1983**, Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolated with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 24: 667-673.

Muller, M.; **1986**; Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol.* 35(1), 37-41.

Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Váldez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. (**2001**) Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 187-190.

Perun, T.J.; Prost, C.L. **1989**, *Computer-aided drug design*. Ed. Marcel Dekker, N.Y.

Philips, M.A., **1928**, *Journal of the Chemical Society*. 2393.

Raeymakers, A.H.; VanGeider, J.L.; Roevens, L.F.C.; Jansen, P.A.J. **1978**, *Arzneim Forsch.* 28, 586.

Reynoldson, J.A.; Thompson, R.C.; Horton, R. J. **1992**, *Parasitol. Today* , 9, 150.

Rodríguez M., S. **1995**, *Tesis de Licenciatura Q.F.B.*, UNAM.

Rossignol, J.F.; Cavier, R. **1976**, US Pat. 3,950,351.

- Rossignol, J.F.; Maisonneuve, H. **1984**, Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33, 511.
- Rossignol, J.F.; Dubreuil, I.; Houcke, Y.; Mouton,.; **1966**, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2266.
- Ryan, J.F., **2003**, Maps and Models, *Modern Drug Discovery*, 6, 7.
- Safak,C.; Erdogan,H.; Palaska, E. **1992**, Synthesis of 3-(2-Pyridylethyl)benzoxalinone Derivatives. Potent Analgesic and Antiinflammatory Compounds Inhibiting Prostaglandin E2. *J. Med, Chem.* 35, 1296-11299.
- Samarawickrema, N.A.; Brown, D.M.; Upcroft, J.A.; Thammapalerd, N.; Upcroft,P.; **1997**, Involvement of superoxide dismutase and piruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob.Chemother.*; 40: 833-840.
- Sánchez, D.M.R. **1999**, Síntesis de derivados del 1-Metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Schmeister, J. **1997**, Cysteine Proteases and their Inhibitors. *Chem. Rev.* 97, 133-171.
- Sharma, S. **1994**, *Adv. Drug Res.* 25, 103-172.
- Stoll,N. **1947** *Parasitol.* 33, 118.
- Suto,M.J.; Turner,W.R, **1995**, Synthesis of Boxazomycin B and related Analogs. *Tetrahedron Lett.* 36 , 7213-72116.
- Upcroft,P.; Upcroft, J.A.; **2001**, Drug targets and mechanism of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.*; 14: 150-164.
- Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. **2002**, Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*
- Van Allan, J.A.; Deagon, B.D.**1963** Wiley: New York, *Organic Sybtheses Collect.* Vol. IV, 569-570.
- Walsh, J.; Warren, K. **1979**, *New Eng. J. Med.* 301, 967-974.
- Warmuth, C. **1986**, *The Practice of Medicinal Chemistry.* Ed. Academic Press.

Werbovets, K.A.; **2002**, Tubulin as an Antiprotozoal Drug Target; *Minireviews in Med. Chem.* 2, 6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, EXECUTIVE BOARD, EB107/31, 107th Session, 27 October **2000**).

WORLD HEALTH STATISTICS QUARTERLY **1992** - VOLUME 45, NUMBER 2/3).

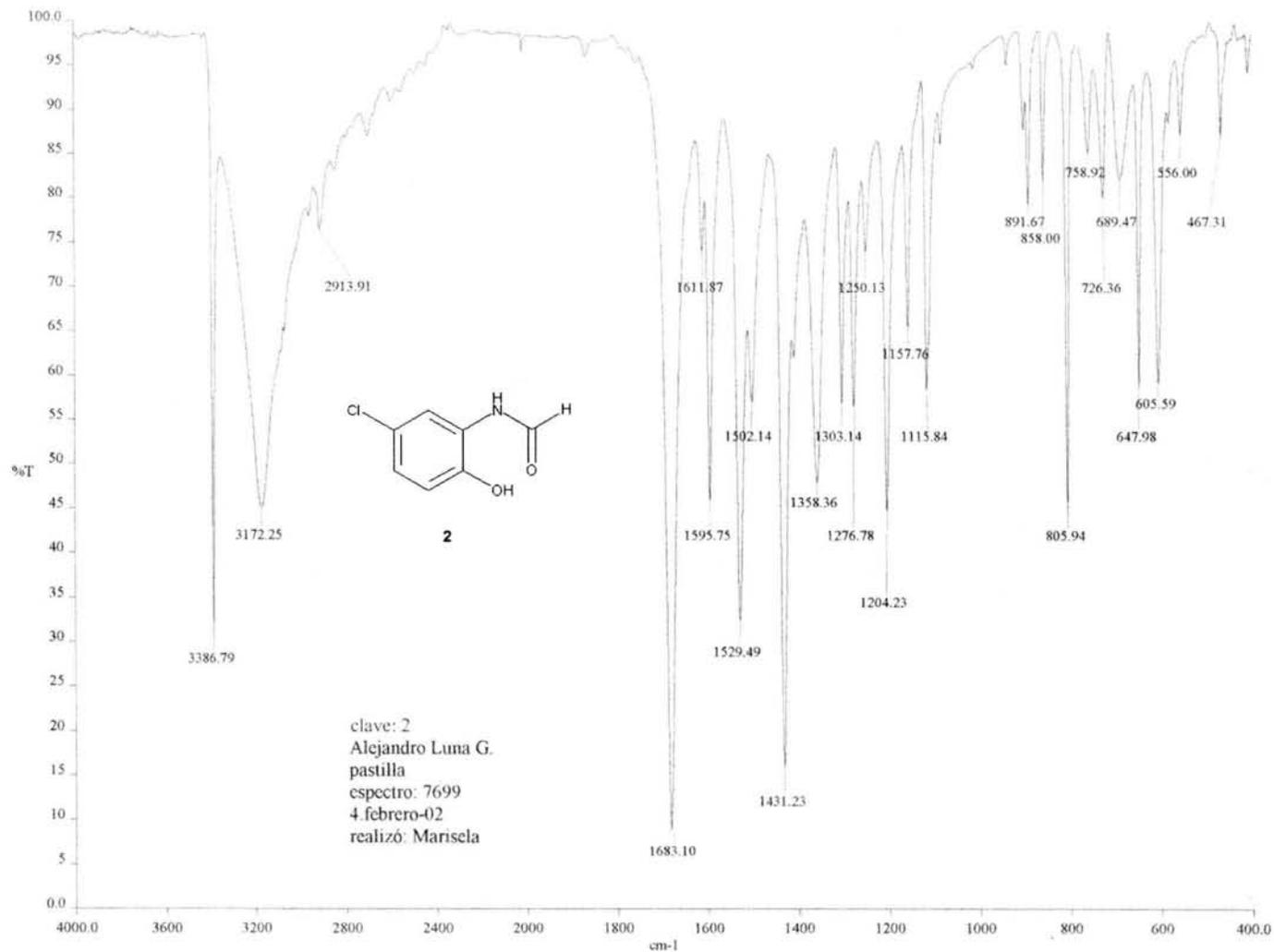
www.biosci.ohio-state.edu; www.npg.org (01/10/03).

www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su48tc.htm (23/11/03).

www.salud.gov.mx (29/1/4)

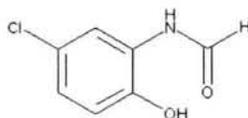
www.biomedicas.unam.mx (29/1/4)

Zhang, Y.-Q., Z.-Y. Wang, S.-Q. Lu, and M.-L. Feng. **1986**. A familial infection of giardiasis. *Chin. Med. J. (Engl. Ed.)* **99**:417-419.

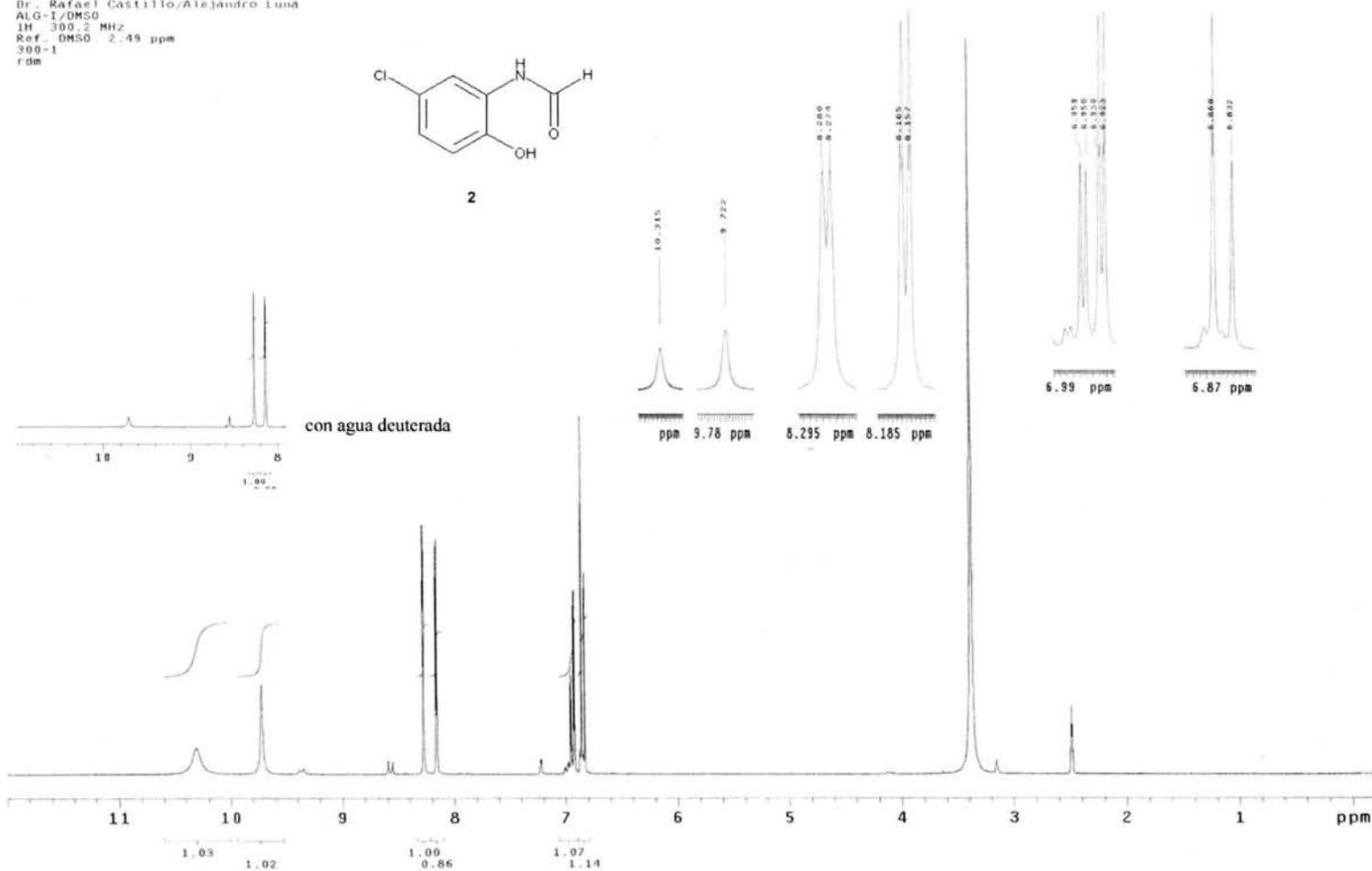


Espectro N°2a. Espectro IR(KBr) del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) formamida (2) .

USA1
11/FEBRERO/2002
Dr. Rafael Castillo/Alejandro Luna
ALG-1/DMSO
1H 300.2 MHz
Ref. OMSO 2.49 ppm
300-1
rdm

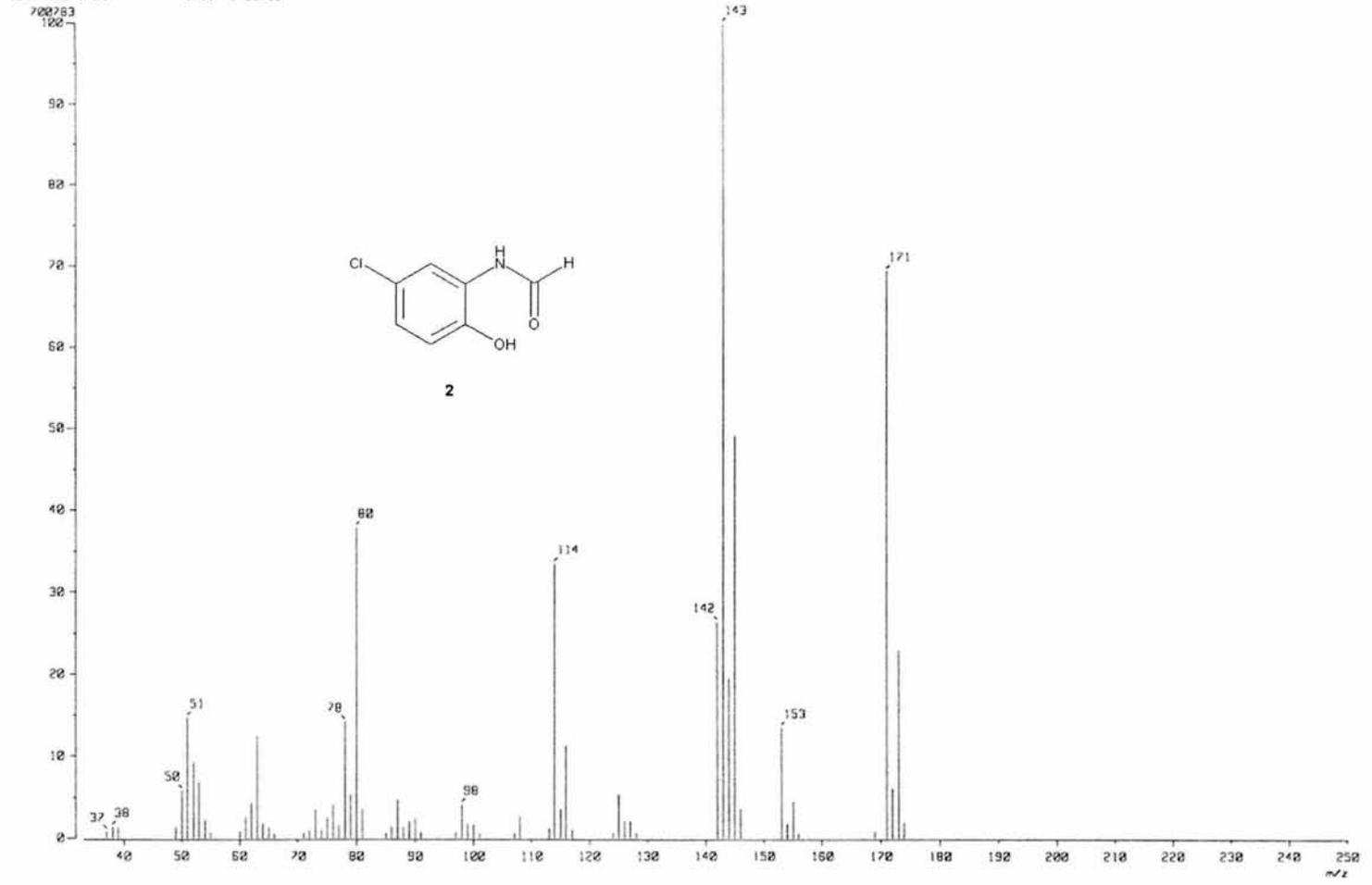


2

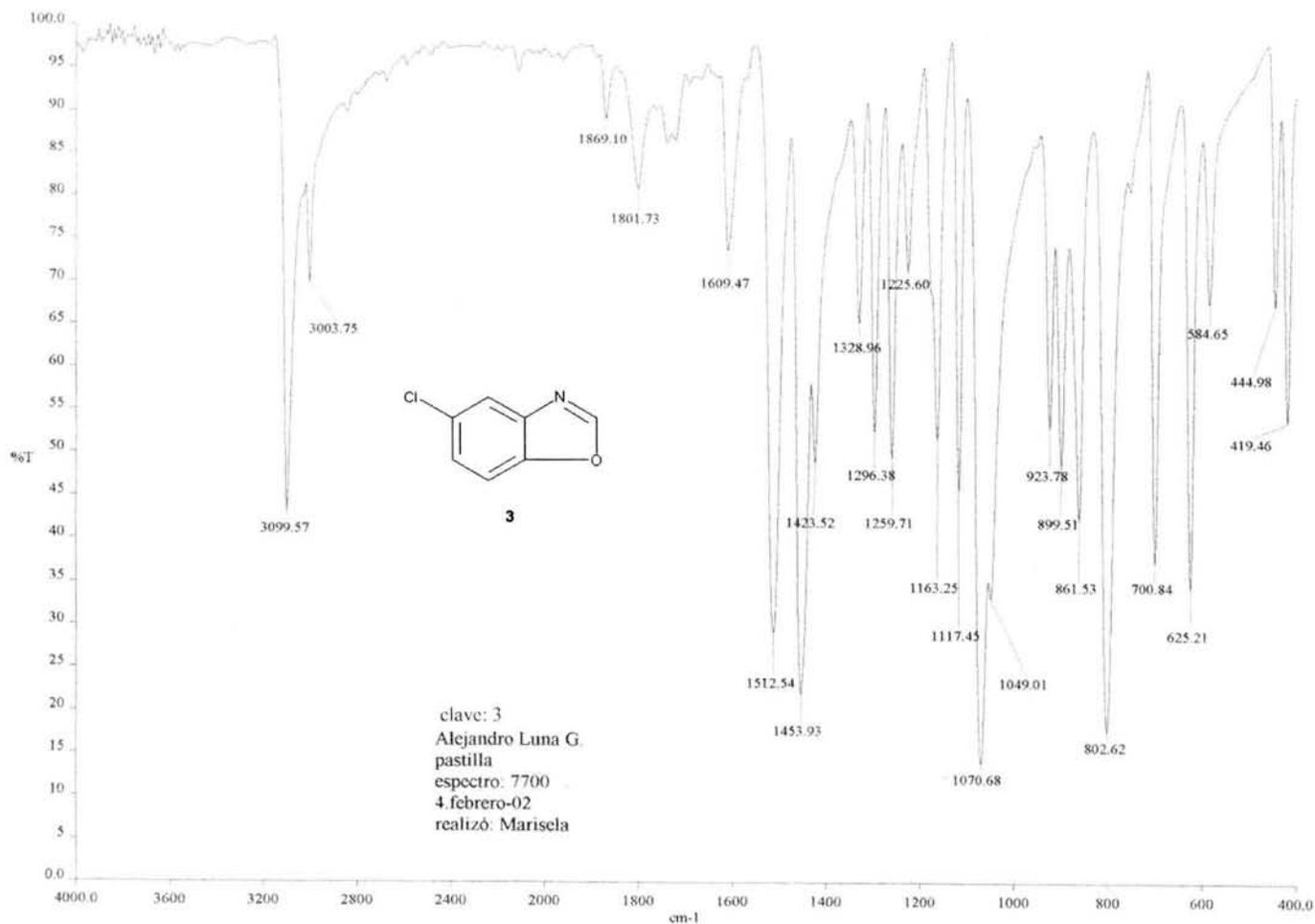


Espectro N°2b. Espectro RMN del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) formamida (2) .

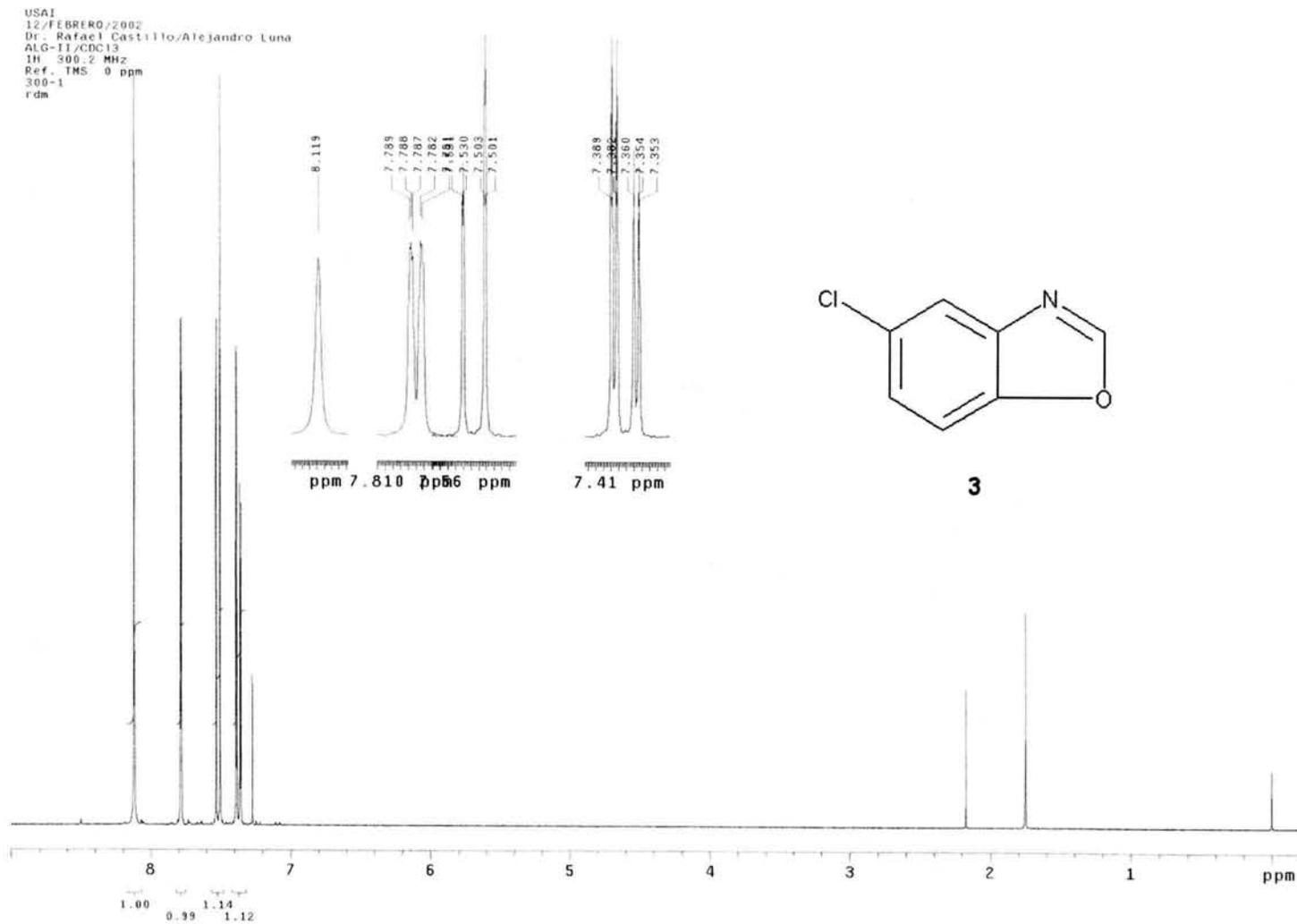
[Mass Spectrum]
RT : 0.35 min Scan# : (14,15)
Ion Mode : EI+ Int. : 66.83 Temp : 6.4 deg.C



Espectro N°2c. Espectro de masas del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) formamida (2) .



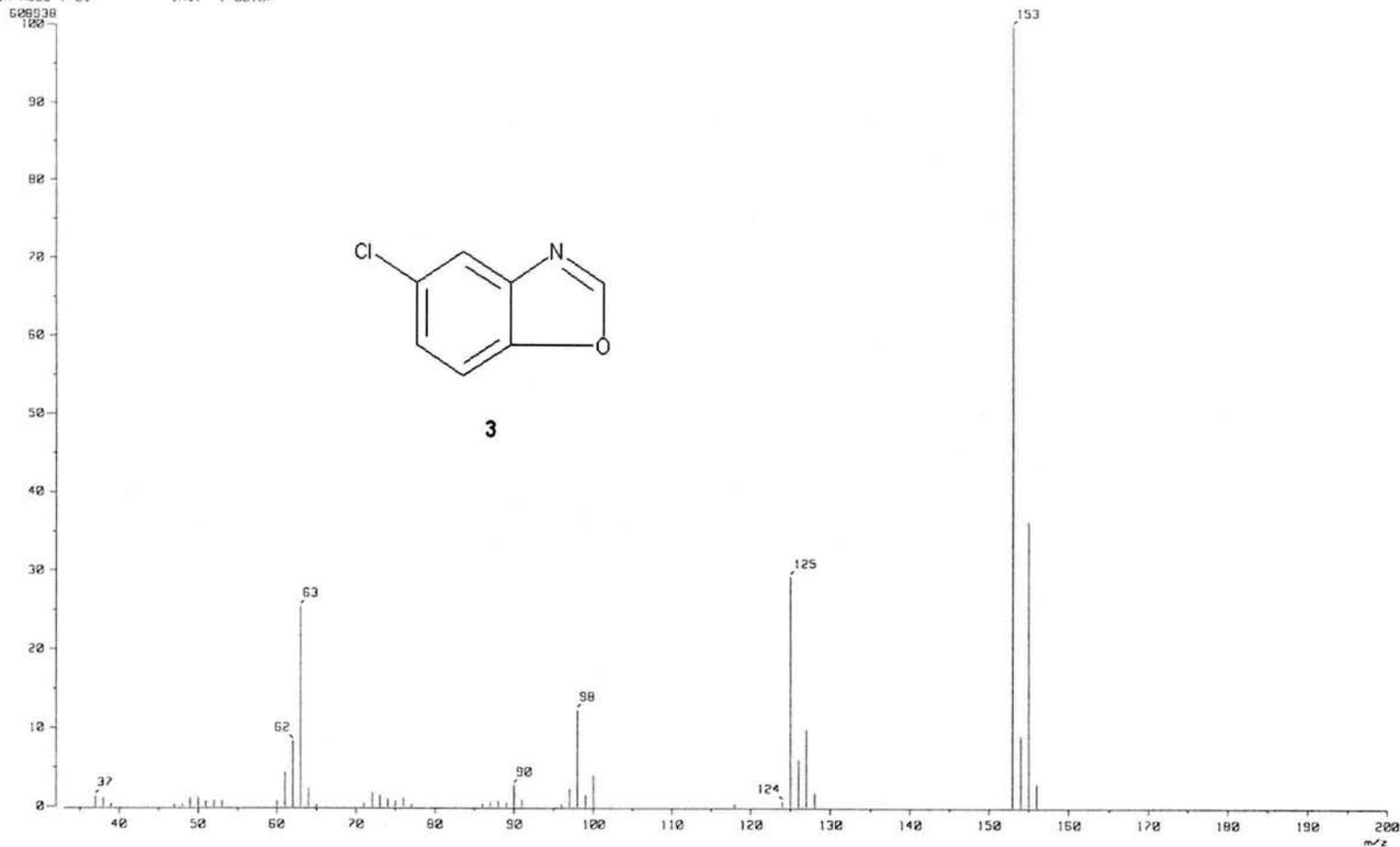
Espectro N° 3a. Espectro IR(KBr) del 5-clorobenzoxazol



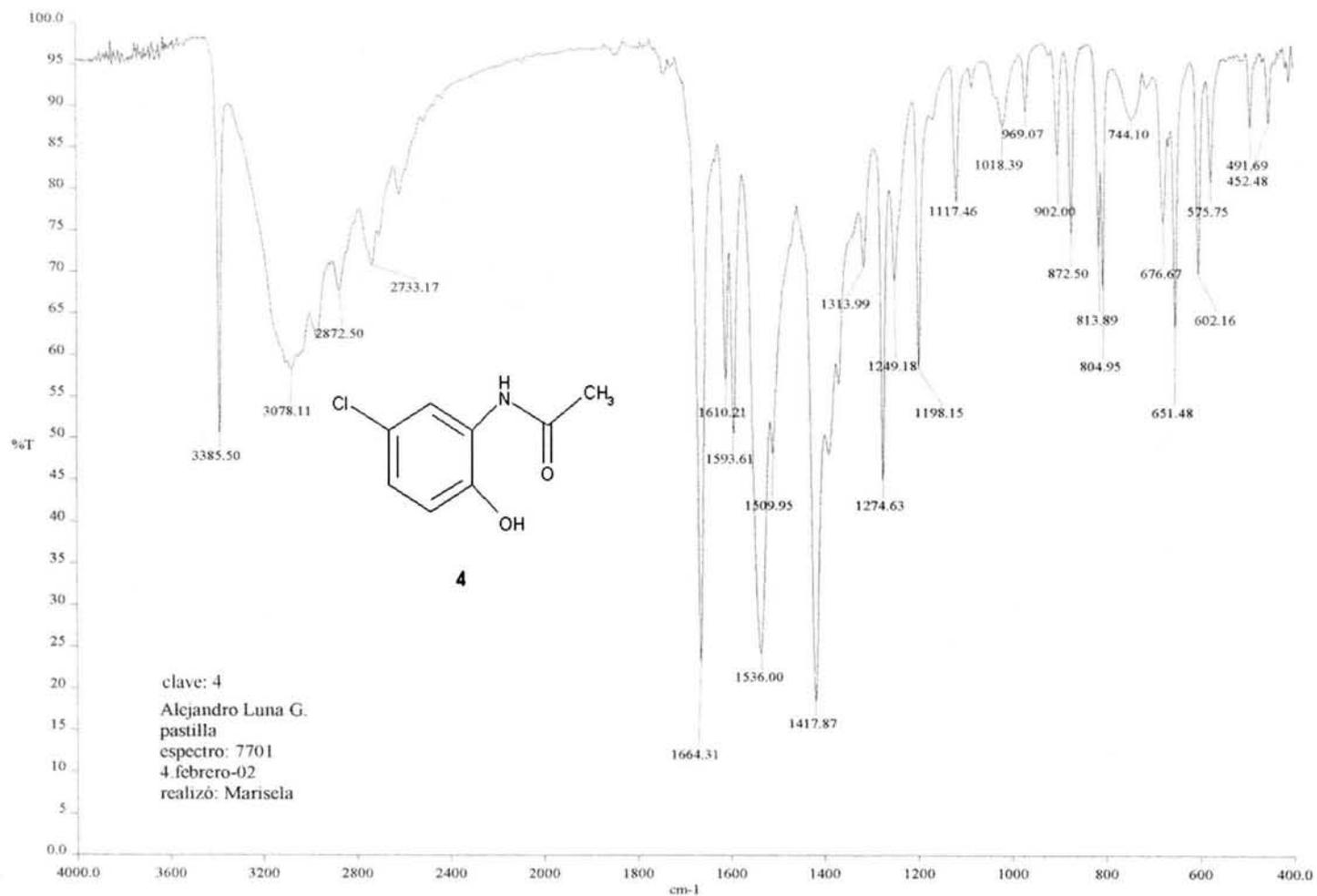
Espectro N° 3b. Espectro RMN del 5-clorobenzoxazol.

[Mass Spectrum]
RT : 3.29 min
Ion Mode : EI*

Scan# : 338-(388,470)-(227,294) Temp : 28.2 deg.C
Int. : 58.07

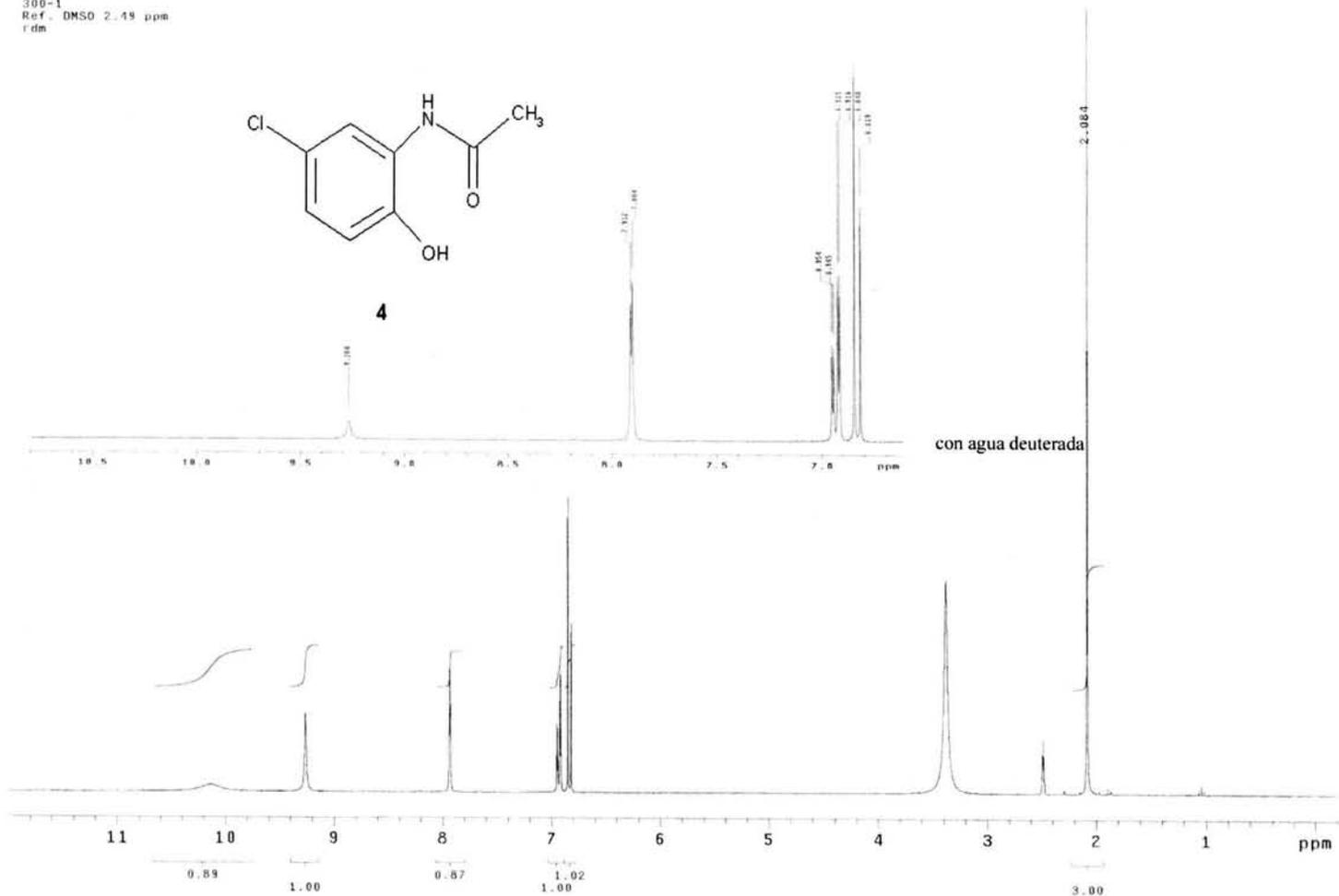


Espectro N° 3c. Espectro de masas del 5-clorobenzoxazol.



Espectro N° 4a. Espectro IR(KBr) del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) acetamida (4)

USA1
12/FEBRERO/2002
Dr. Rafael Castillo/Alejandro Luna
ALG-III/DMSO
1H 300.2 MHz
300-1
Ref. DMSO 2.49 ppm
rdm

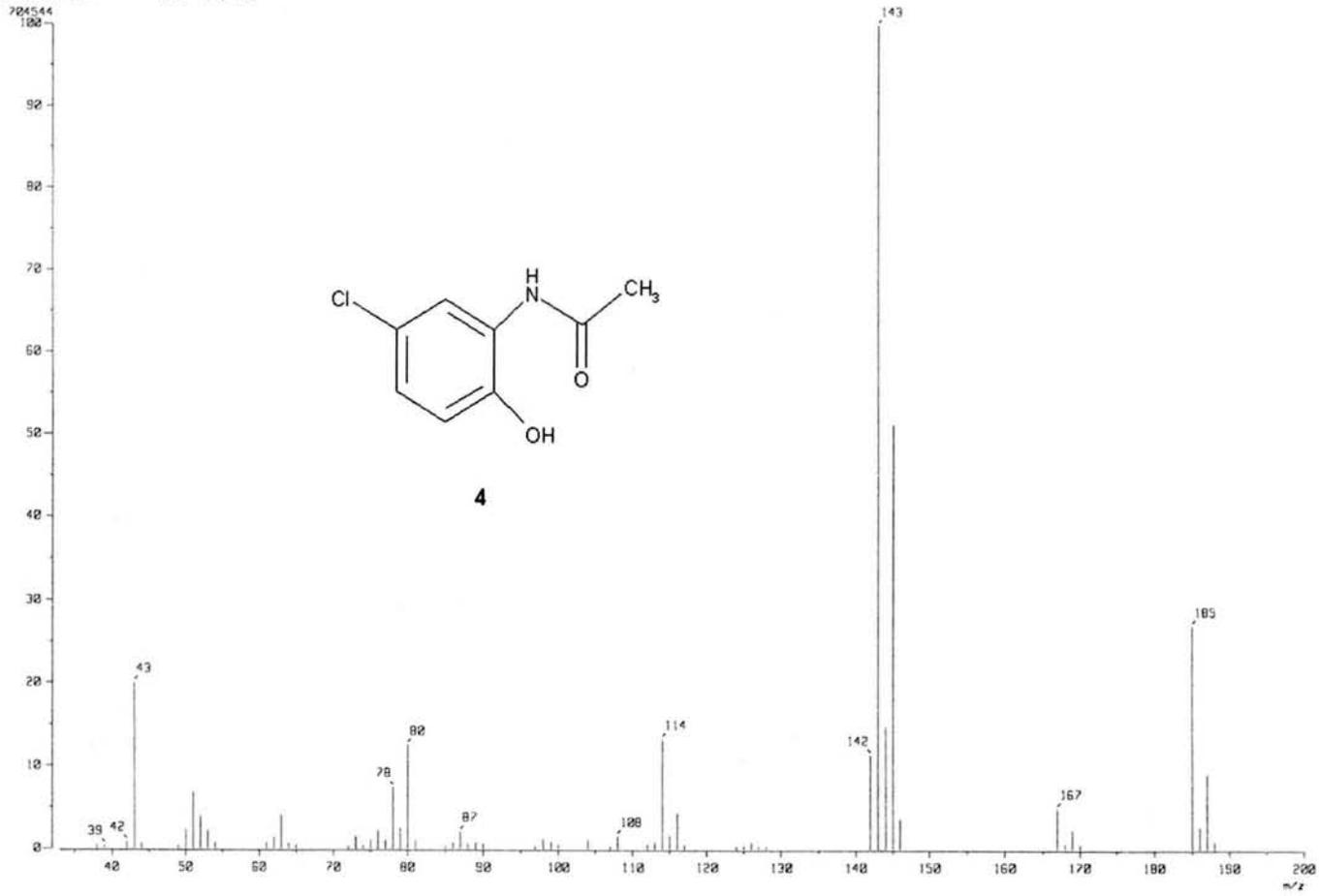


Espectro N°4b. Espectro RMN del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) acetamida (4) .

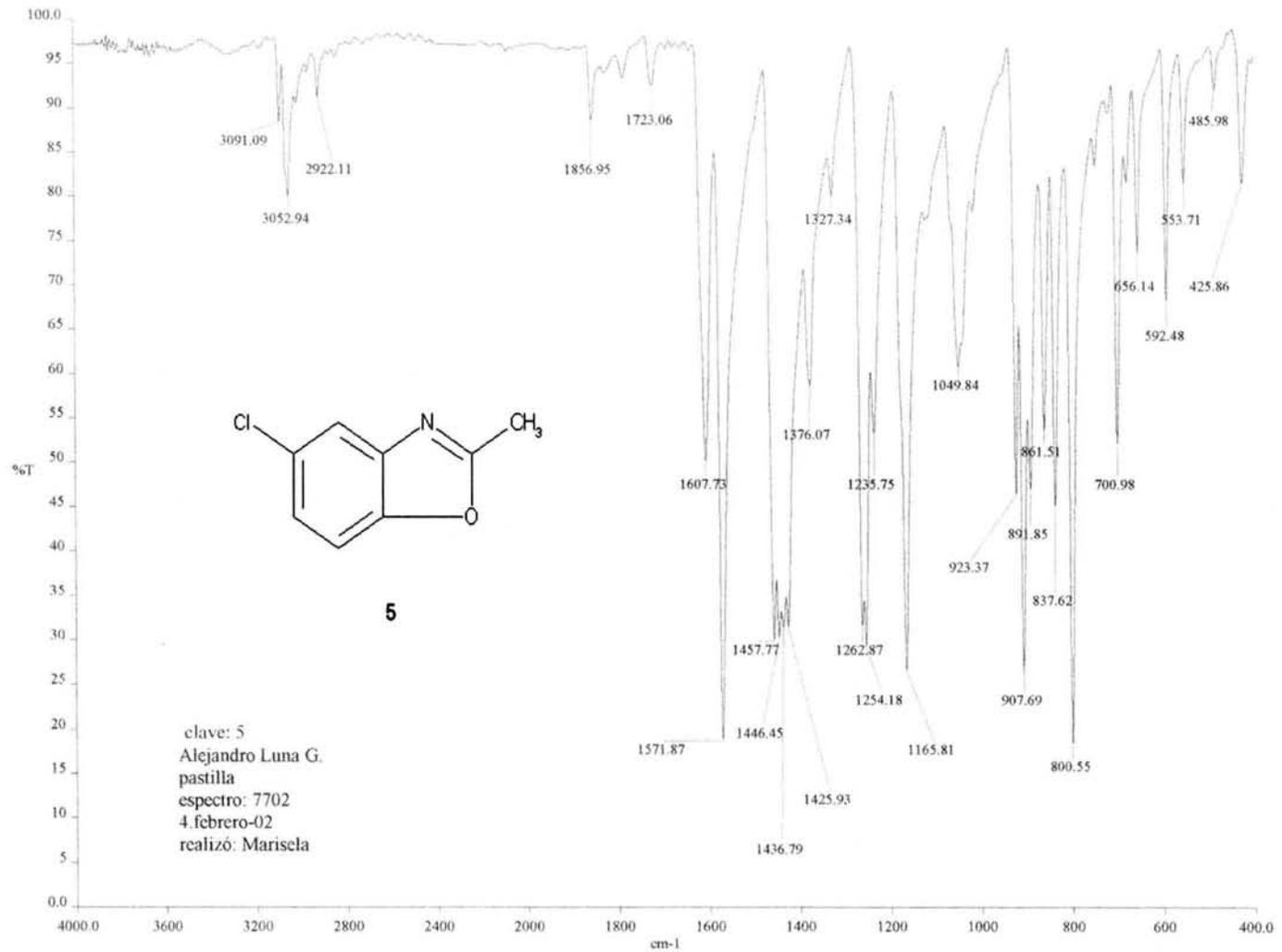
[Mass Spectrum]
RT : 8.39 min
Ion Mode : EI+

Scan# : (15,16)
Int. : 67.19

Temp : 23.0 deg.C

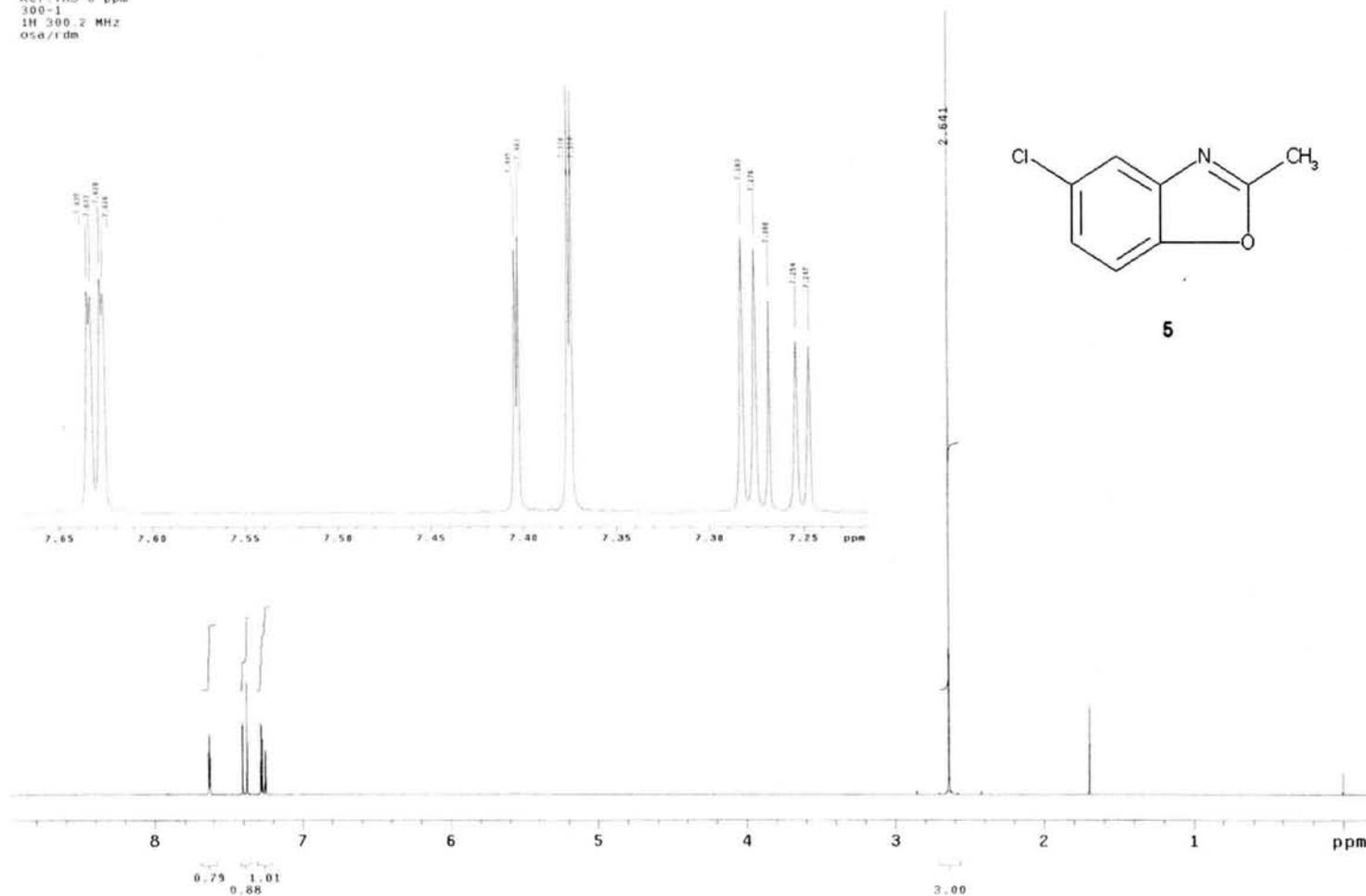


Espectro N° 4c. Espectro RMN del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) acetamida (4) .



Espectro N°5a. Espectro IR(KBr) del 5-cloro-2-metilbenzoxazol.

USA1
12/02/02
Dr. Rafael Castillo/Alejandro Luna
ALG-IV/CDC13
Ref TMS 0 ppm
300-1
1H 300.2 MHz
osa/r dm

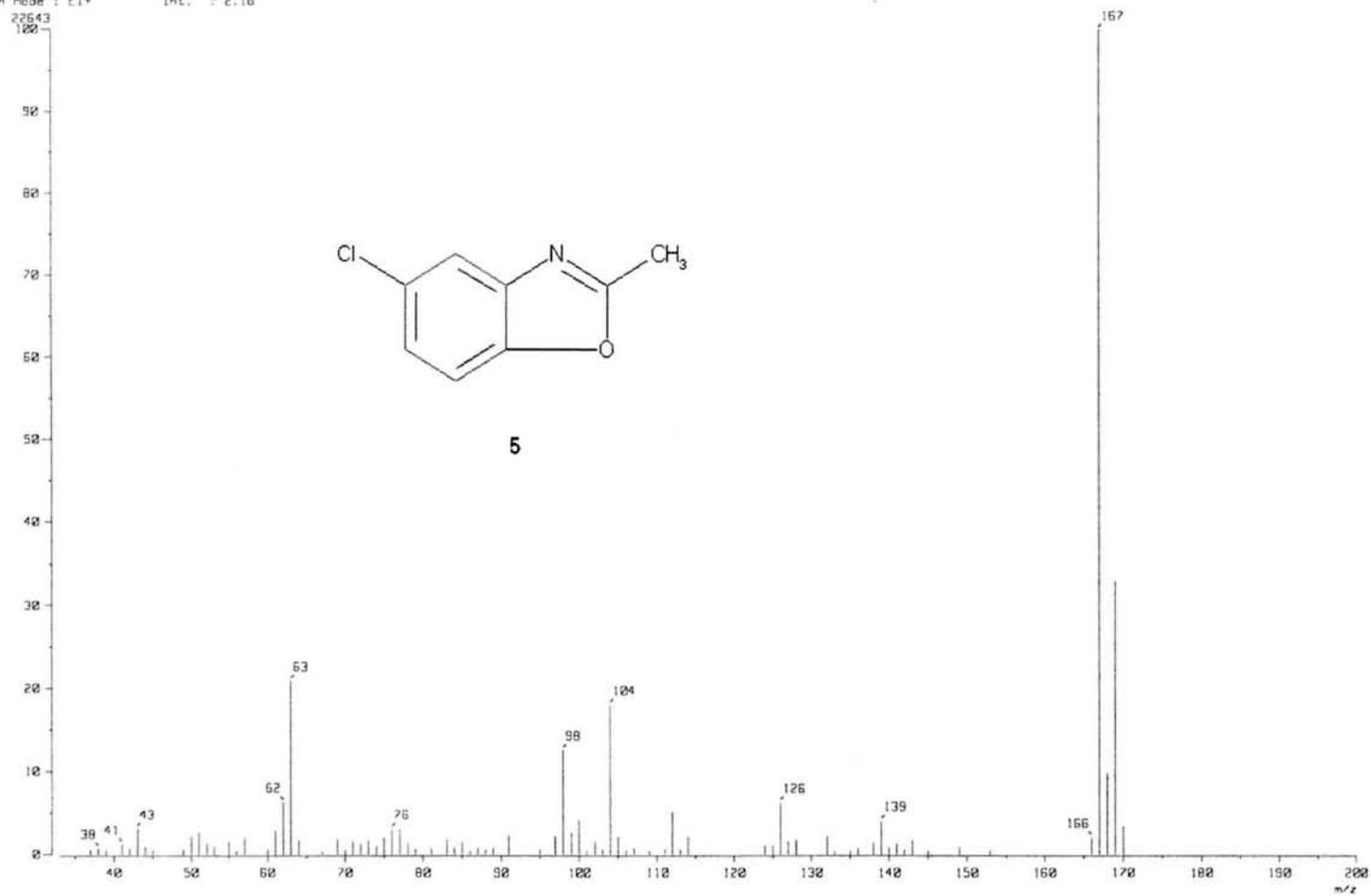


Espectro N° 5b. Espectro RMN del 5-cloro-2-metilbenzoxazol.

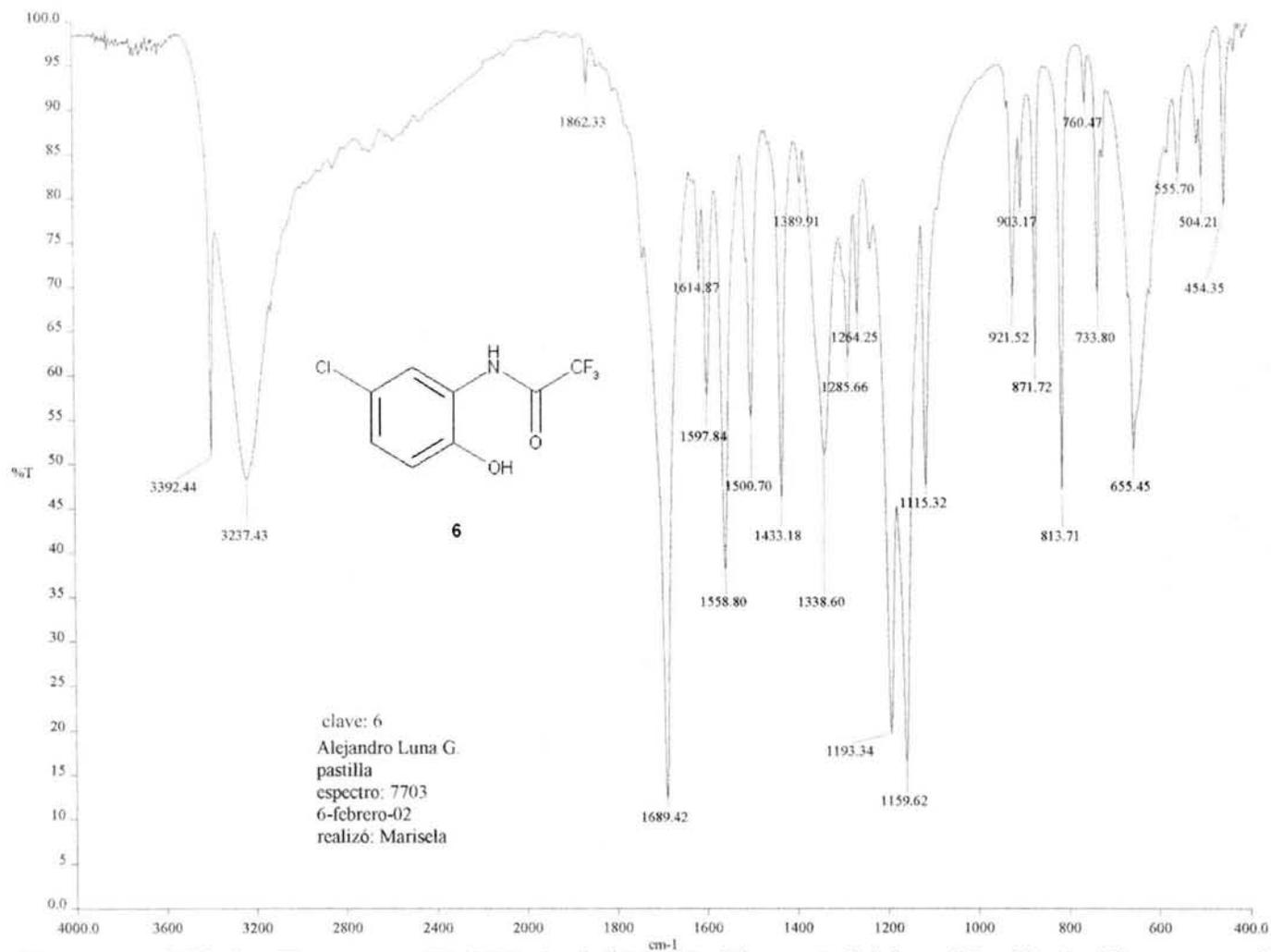
[Mass Spectrum]
RT : 8.39 min
Ion Mode : EI+

Scan# : 18,22
Int. : 2.16

Temp : 10.0 deg.C

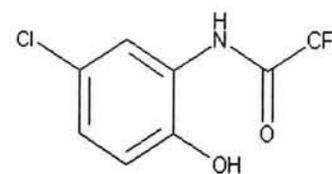
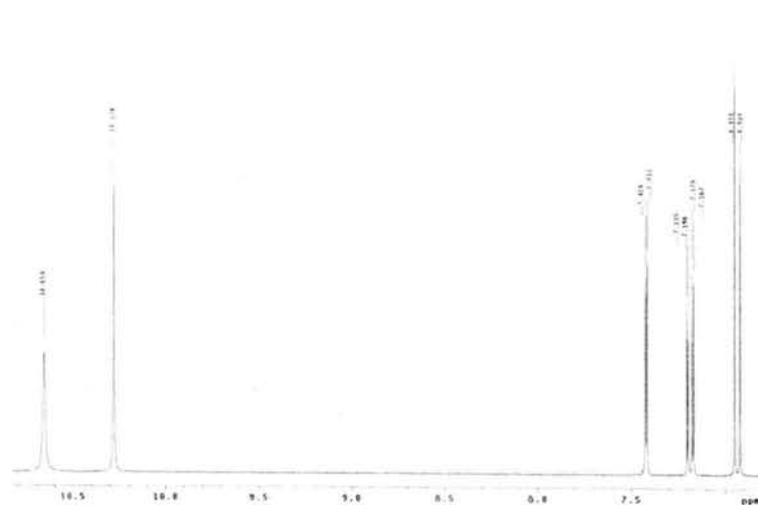


Espectro N° 5c. Espectro de masas del 5-cloro-2-metilbenzoxazol.

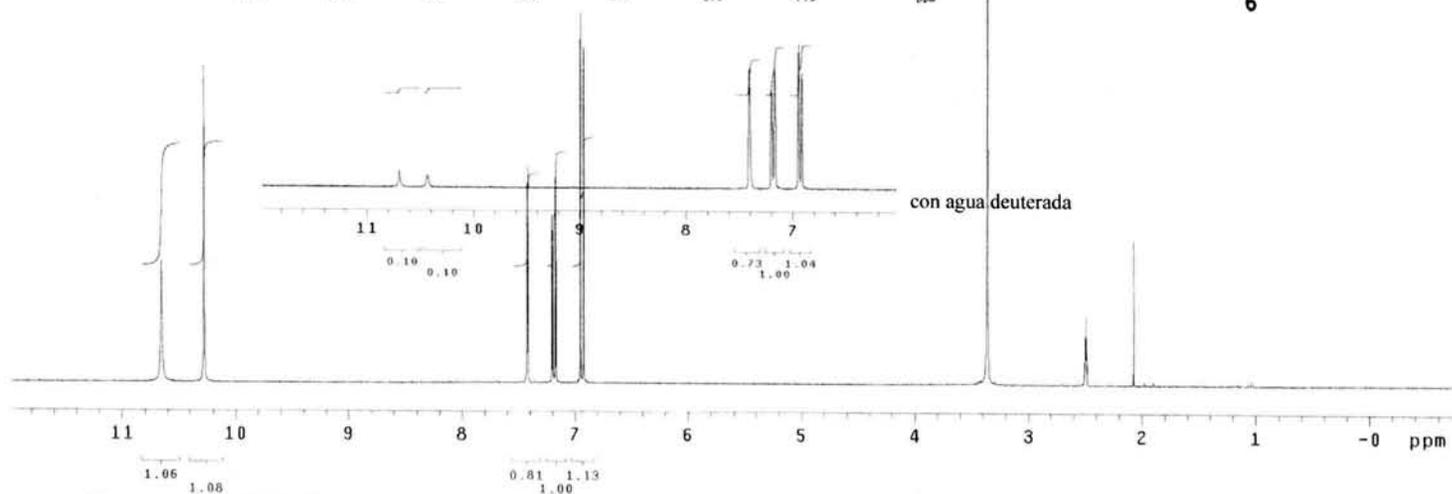


Espectro N° 6a. Espectro IR(KBr) del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil) acetamida (6)

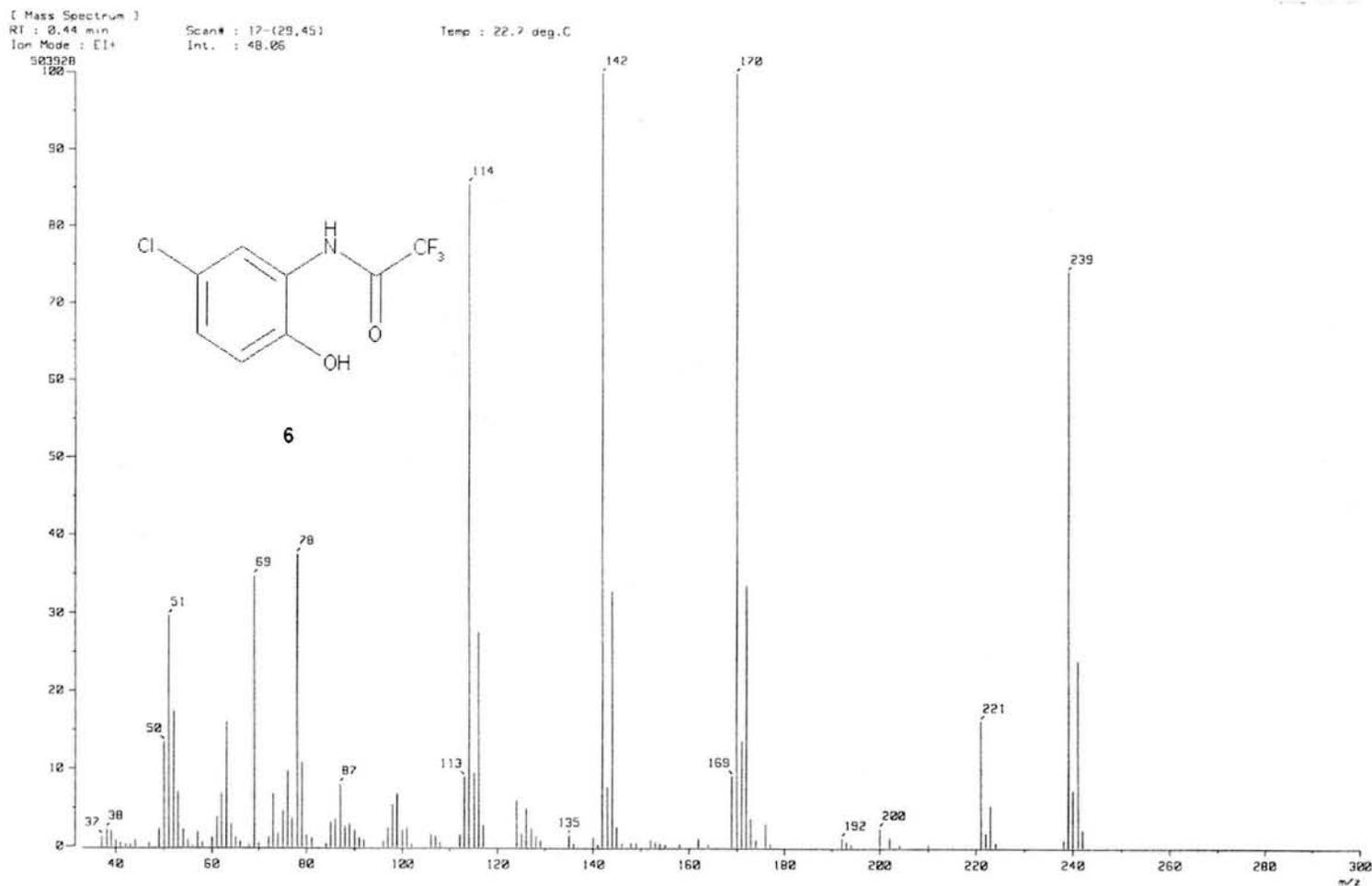
USAT
13/02/02
Dr. Rafael Castillo Castillo/Alejandro Luna
ALG-V /DMSO
Ref-TMS 0 ppm
300-1
1H 300.2 MHz
osa/rdm



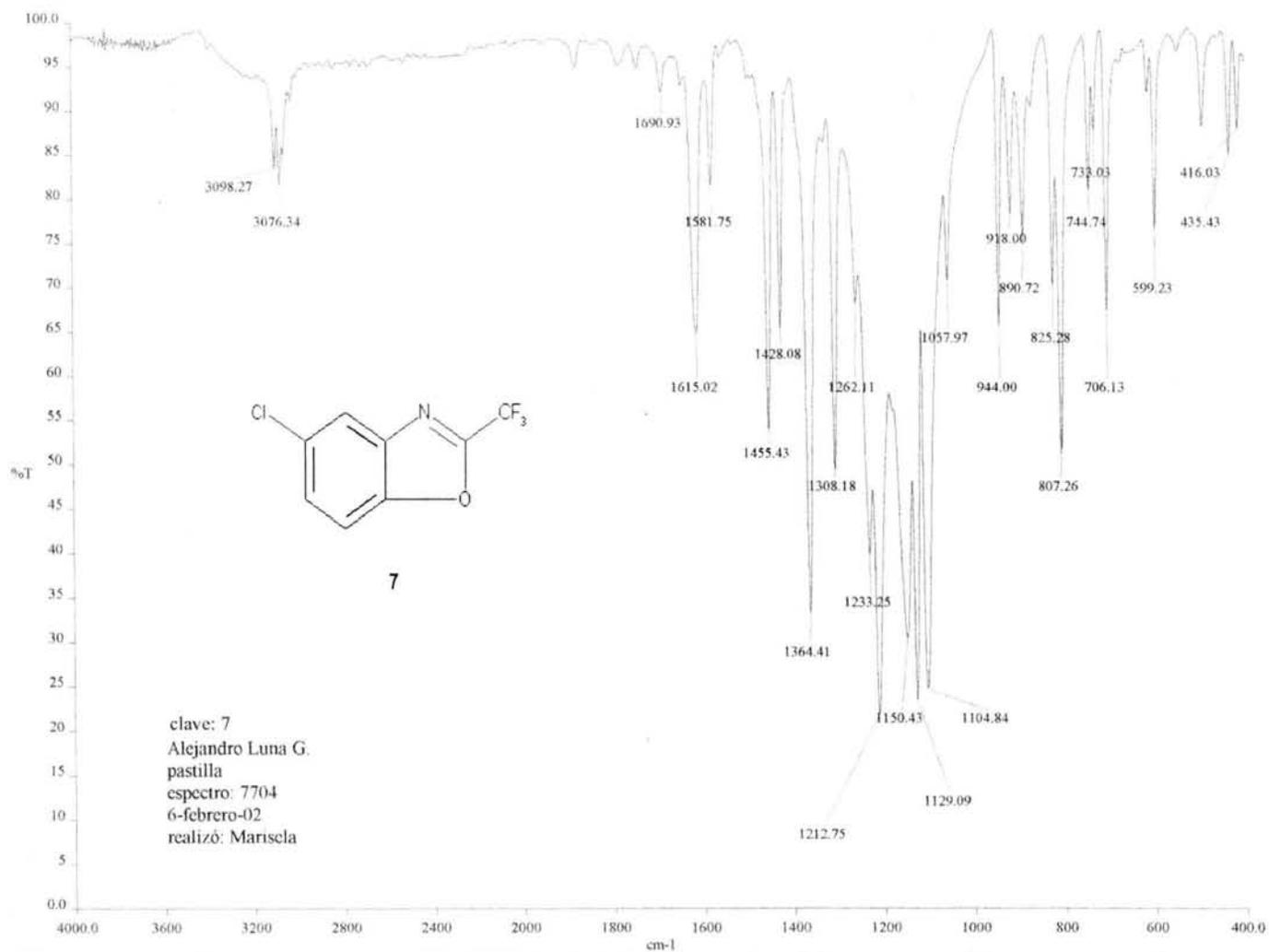
6



Espectro N°6b. Espectro RMN del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil) acetamida (6) .

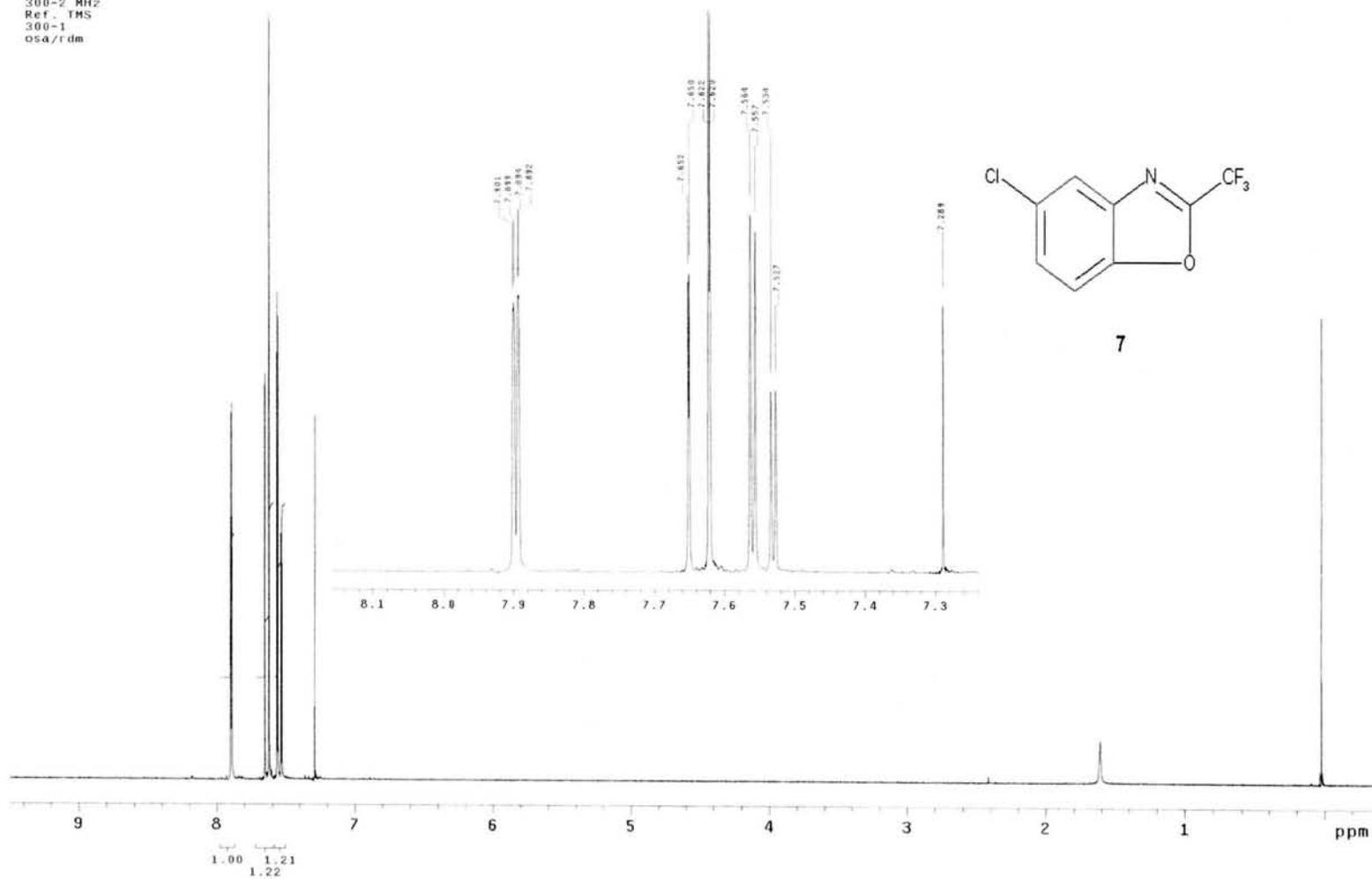


Espectro N°6c. Espectro de masas del N-(5-Cloro-2-hidroxifenil) (trifluorometil) acetamida (6) .



Espectro N°7a. Espectro IR(KBr) del 5-cloro-2-trifluorometilbenzoxazol.

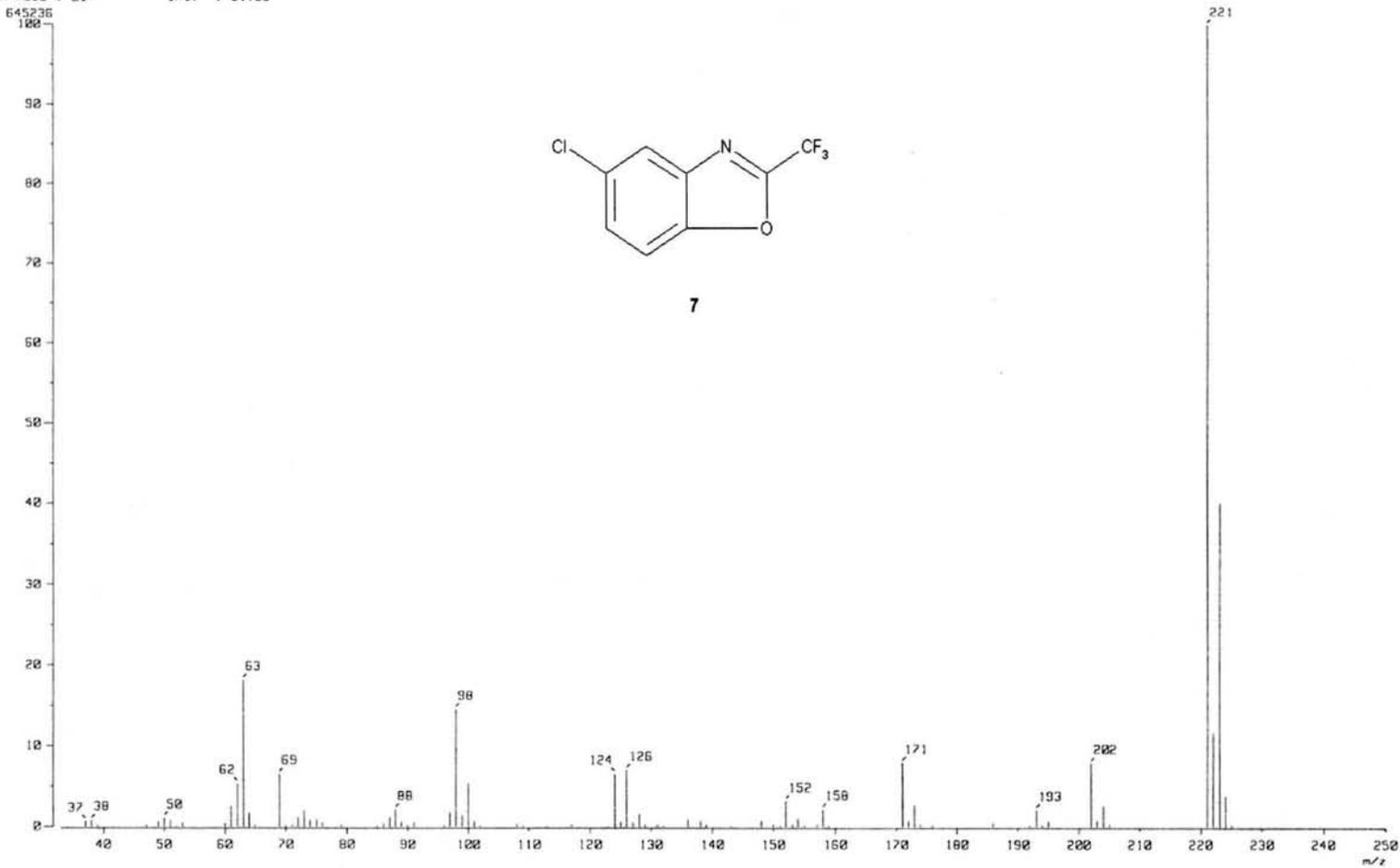
USA1
18/02/2002
Dr. Rafael castillo/Alejandro Luna
ALG-VI/CDC13
300-2 MHz
Ref. TMS
300-1
osa/rdm



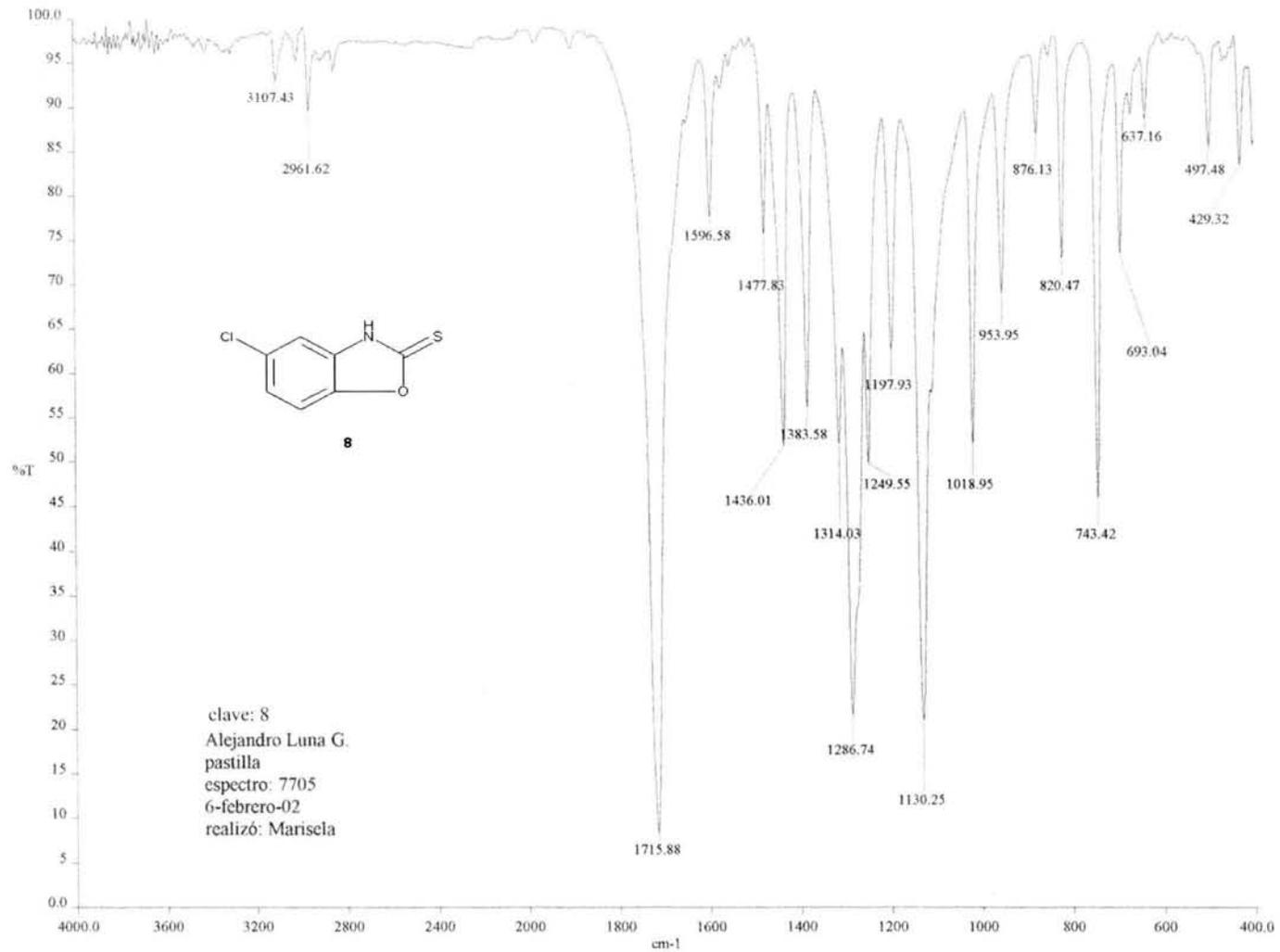
Espectro N°7b. Espectro de RMN del 5-cloro-2-trifluorometilbenzoxazol.

[Mass Spectrum]
RT : 7.63 min
Ion Mode : EI+

Scan# : (277,279)-(262,275)-(... Temp : 29.3 deg.C
Int. : 61.53

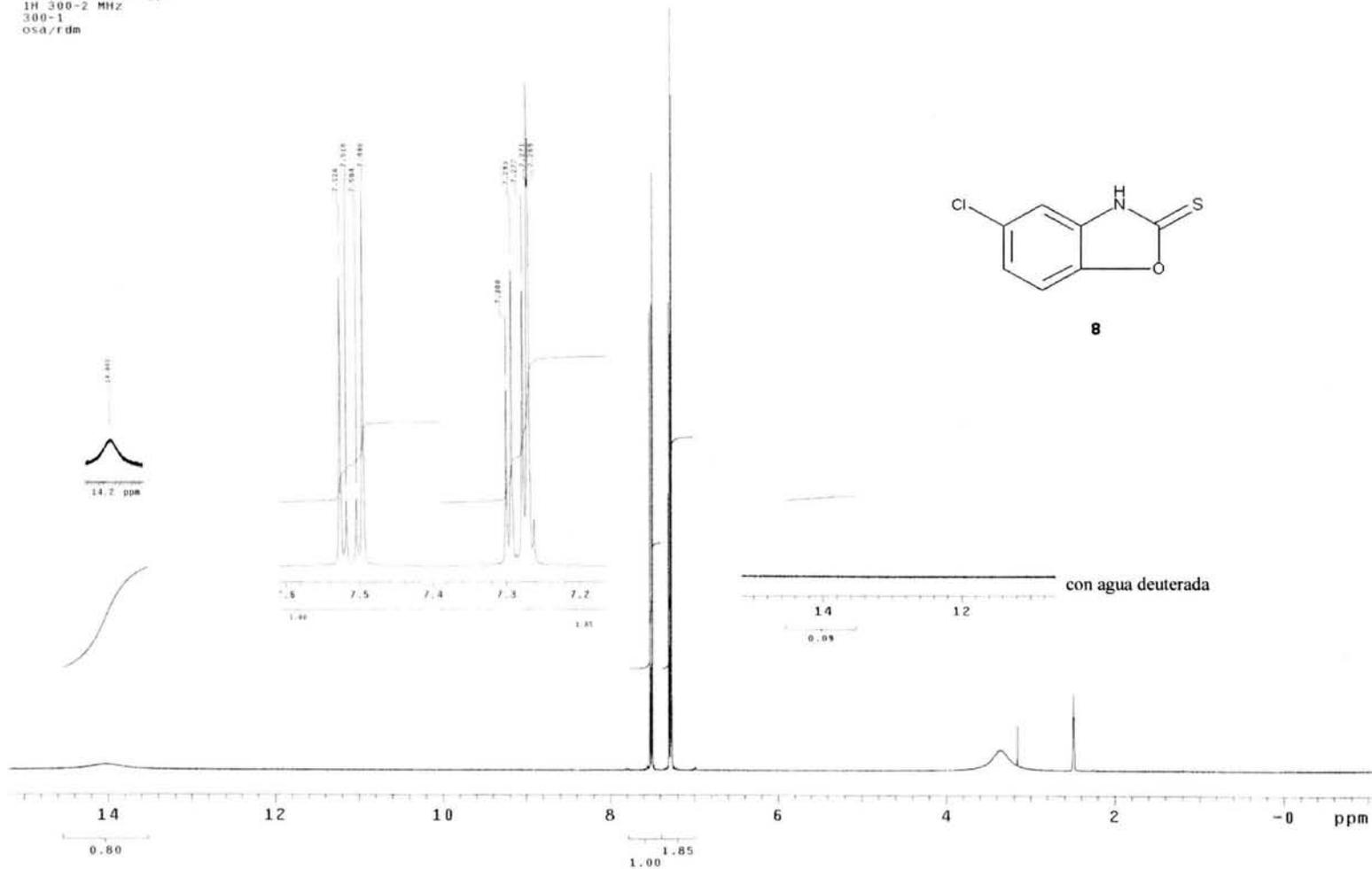


Espectro N°7c. Espectro de masas del 5-cloro-2-trifluorometilbenzoxazol



Espectro N°8a. Espectro IR(KBr) del 5-cloro-3-H-benzoxazol-2-tiona.

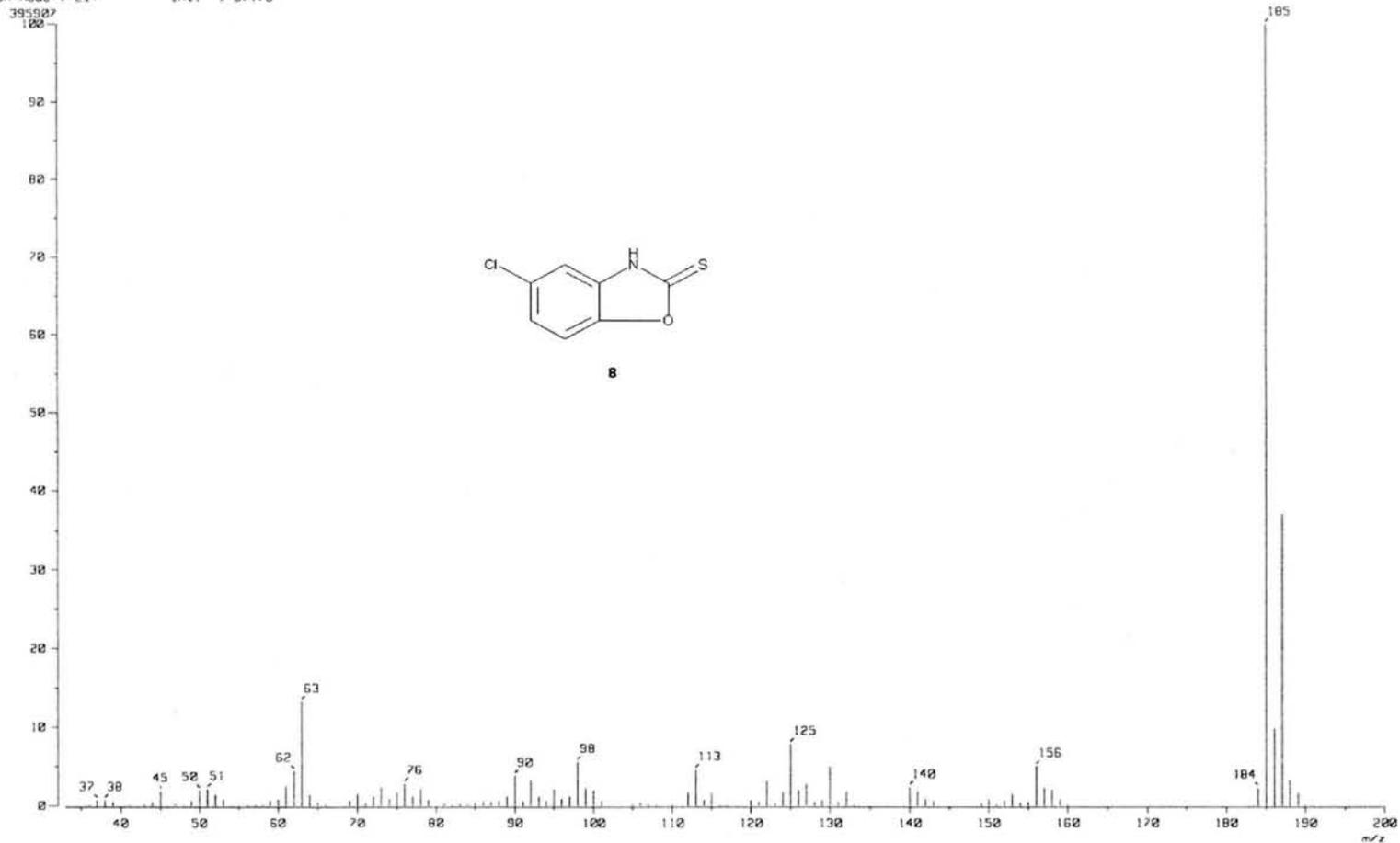
USAI
14/02/02
Dr. Rafael castillo/Alejandro Luna
ALG-VII/DMSO
Ref. DMSO 2.49 ppm
1H 300-2 MHz
300-1
osa/rdm



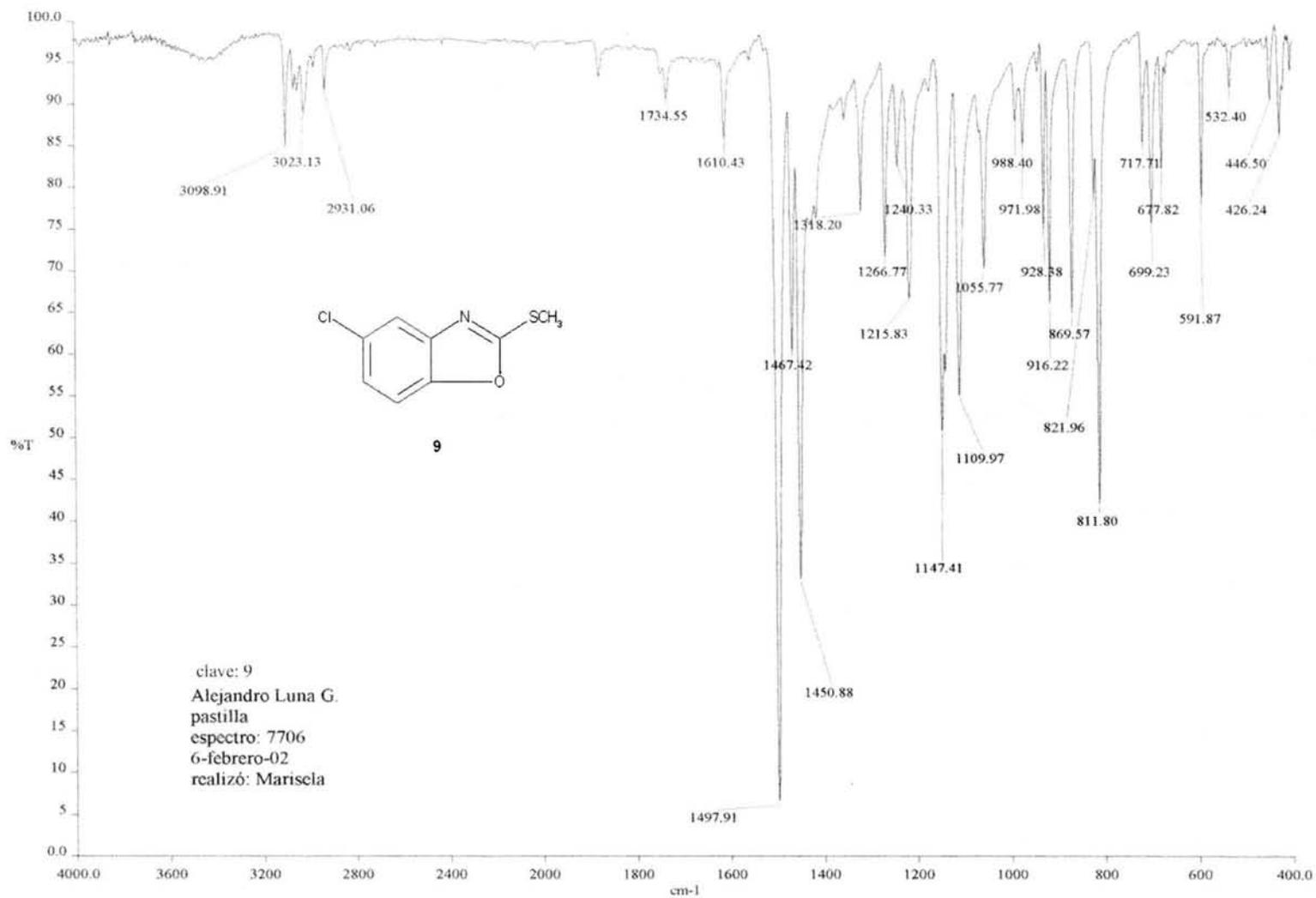
Espectro N°8b. Espectro RMN del 5-cloro-3-H-benzoxazol-2-tiona.

[Mass Spectrum]
RT : 8.55 min
Ion Mode : EI+

Scan# : (20,22)-(34,80)-15,8
Int. : 37.26
Temp : 24.0 deg.C

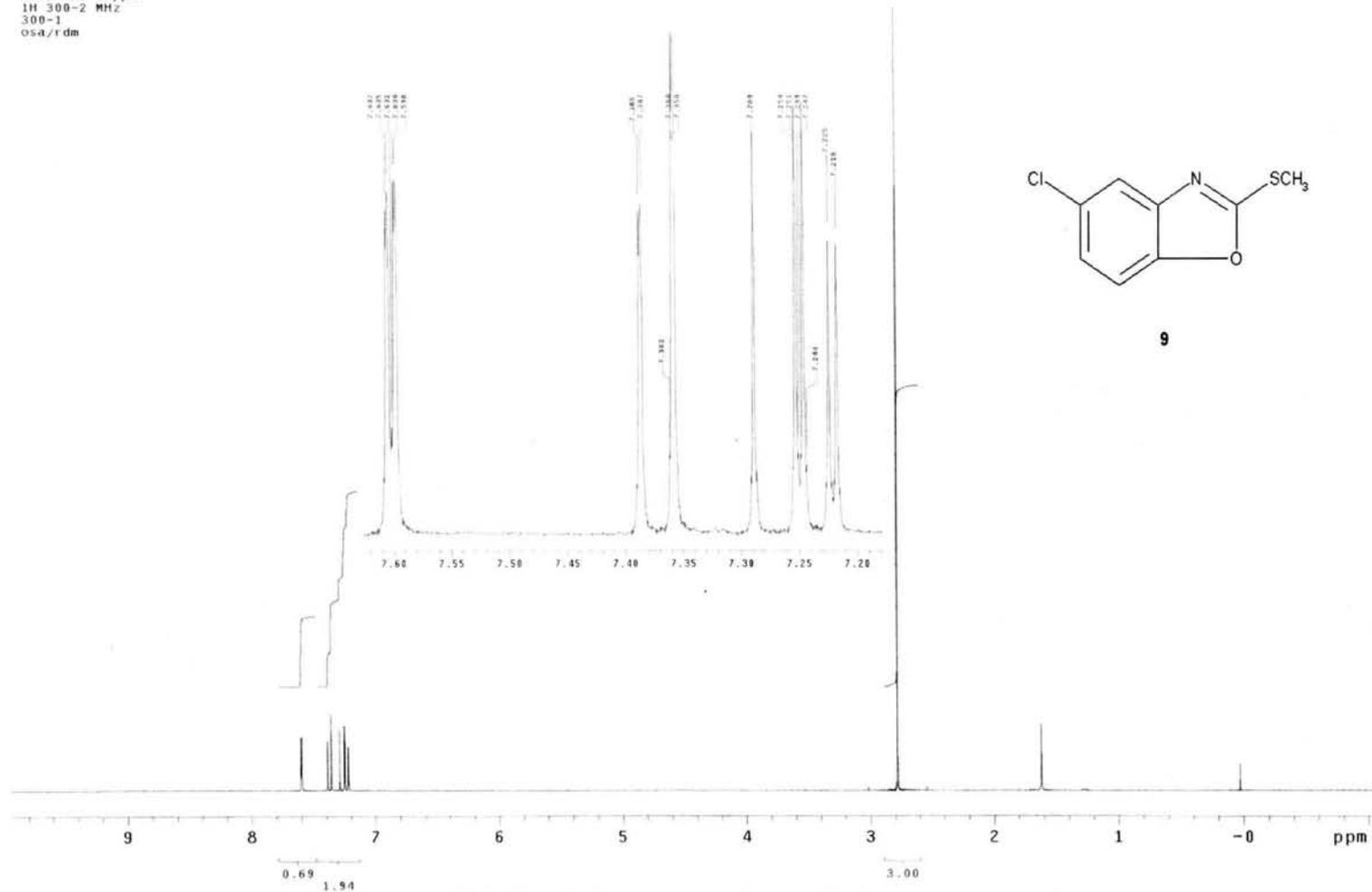


Espectro N°8c. Espectro de masas del 5-cloro-3-H-2-tiona-benzoxazol.



Espectro N°9a. Espectro IR(KBr) del 5-cloro-2-metiltio-benzoxazol.

USA1
14/02/02
Dr. Rafael Castillo/Alejandro Luna
ALG-VIII/CDC13
Ref. TMS 0 ppm
1H 300-2 MHz
300-1
osa/rdm



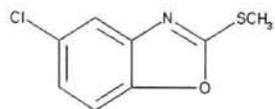
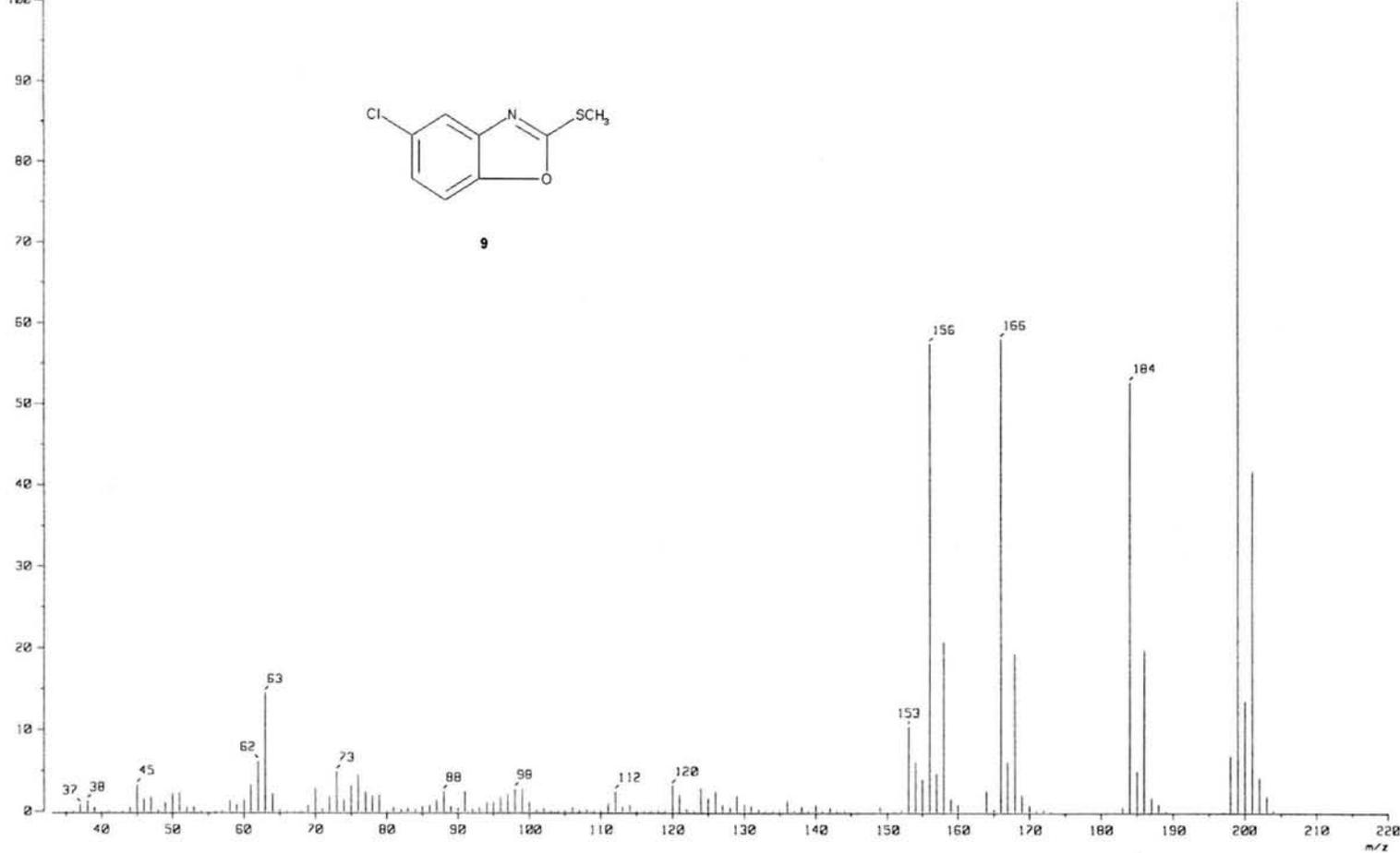
Espectro N°9b. Espectro RMN del 5-cloro-2-metiltiobenzoxazol.

[Mass Spectrum]
RT : 0.26 min
Ion Mode : EI+

Scan# : 3-(9,30)
Int. : 70.79

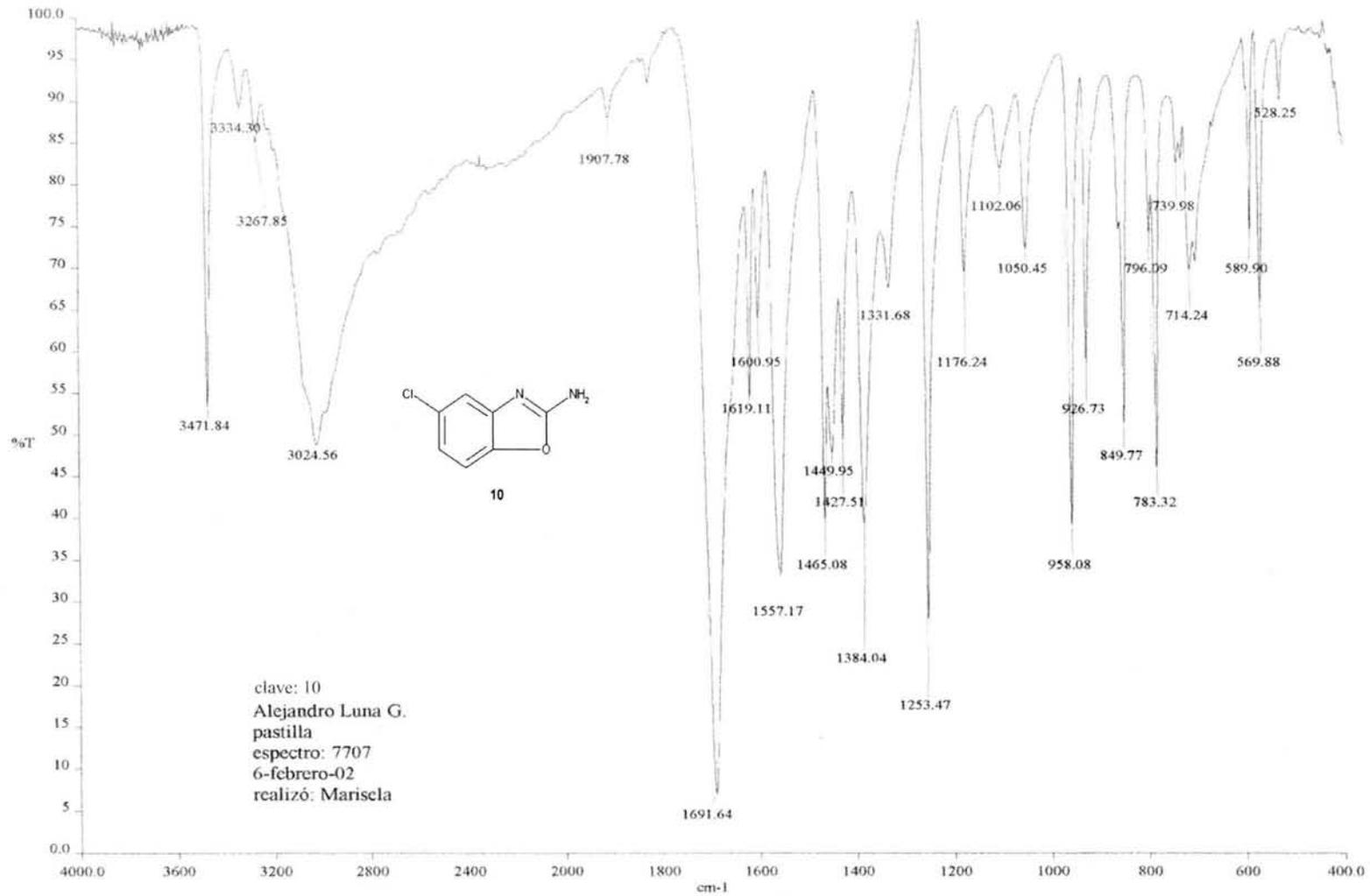
Temp : 19.1 deg.C

742316
100



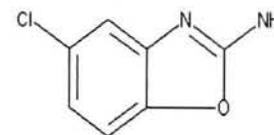
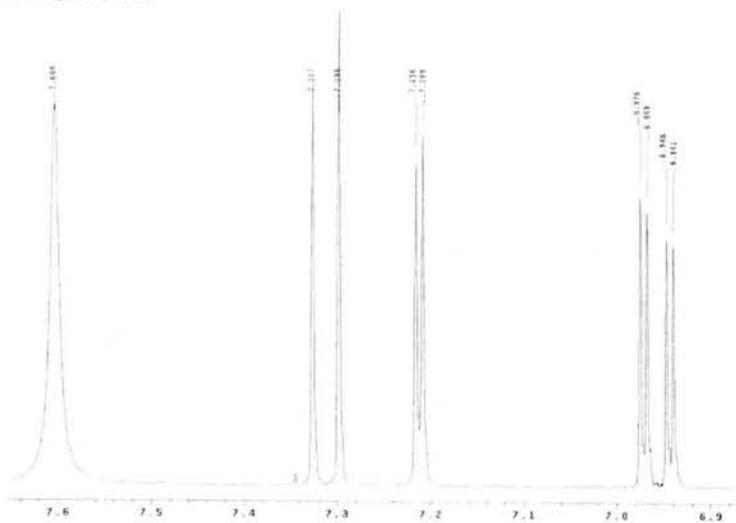
9

Espectro N°9c. Espectro de masas del 5-cloro-2-metiltiobenzoxazol.

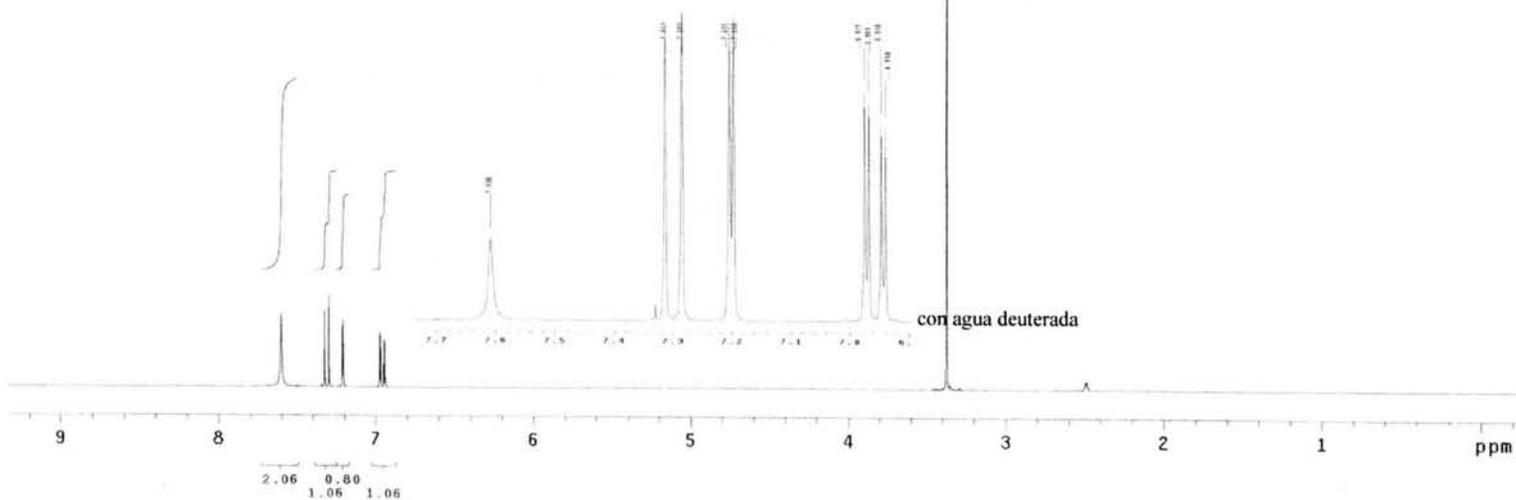


Espectro N°10a. Espectro IR(KBr) del 2-amino-5-clorobenzoxazol.

USA1
15/02/02
Dr. Rafael Castillo/Alejandro Luna
ALG-IX/DMSO
1H 300-2 MHz
300-1
OSA/Oym
ref. DMSO 2.49



10

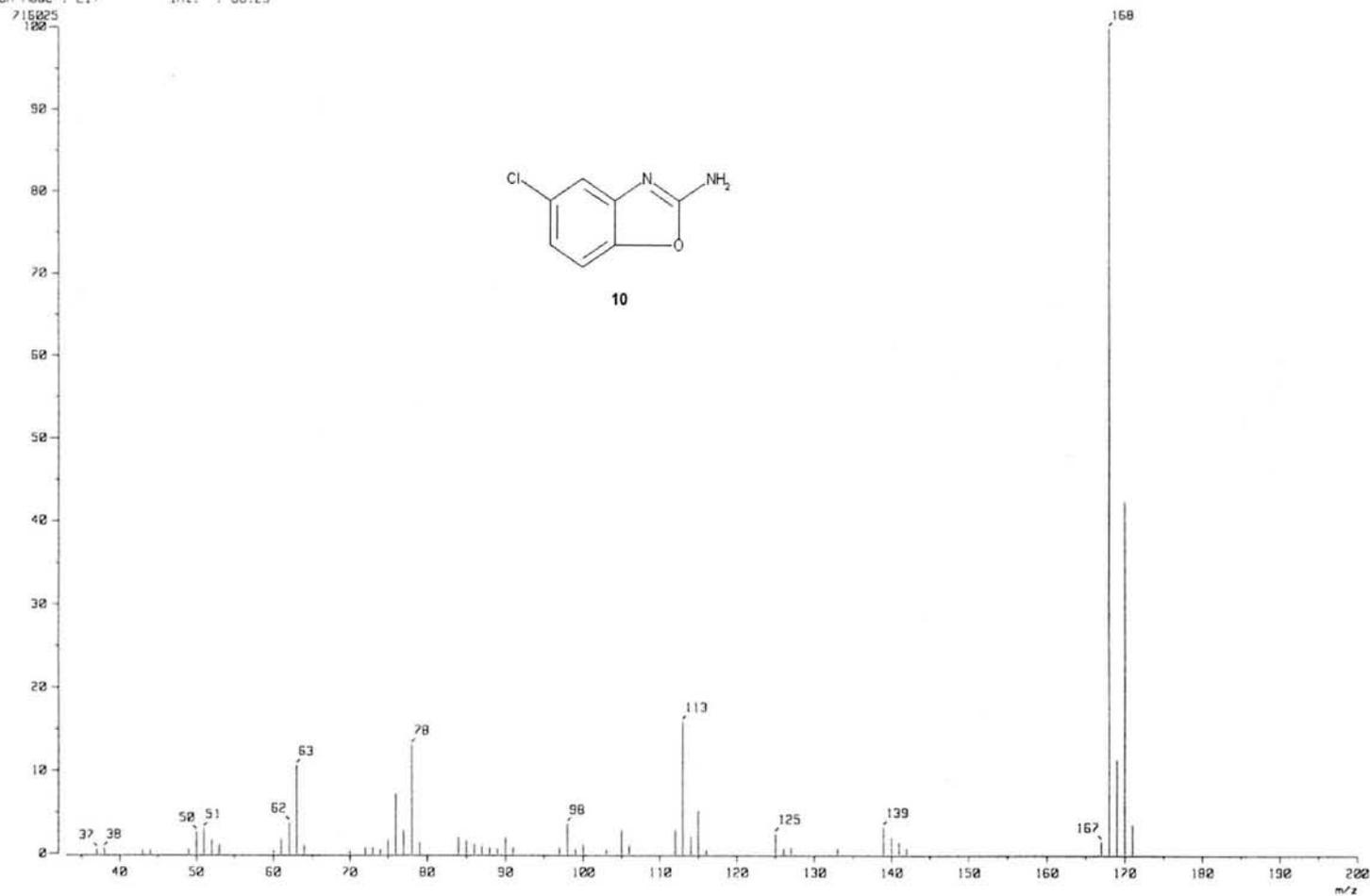


Espectro N°10b, Espectro RMN del 2-amino-5-clorobenzoxazol.

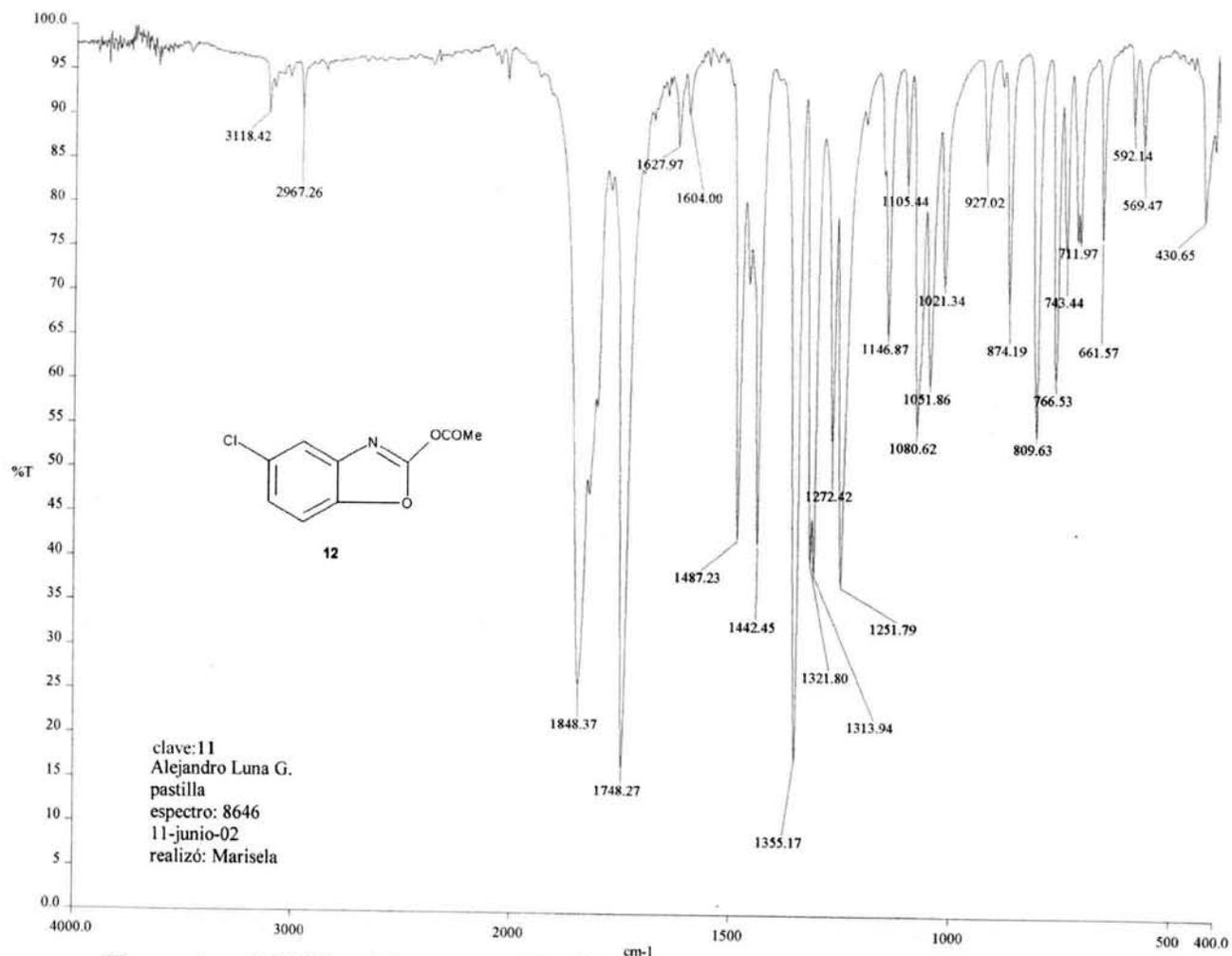
[Mass Spectrum]
RT : 0.12 min
Ion Mode : E1+

Scan# : 7-(25,83)-(23,51)
Int. : 68.29

Temp : 22.1 deg.C

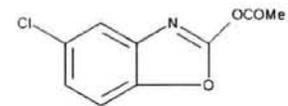
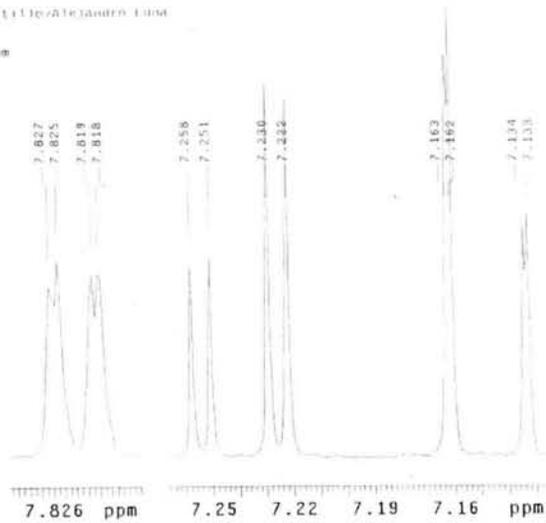


EspectroN°10c.Espectro de masas del 2-amino-5-clorobenzoxazol.

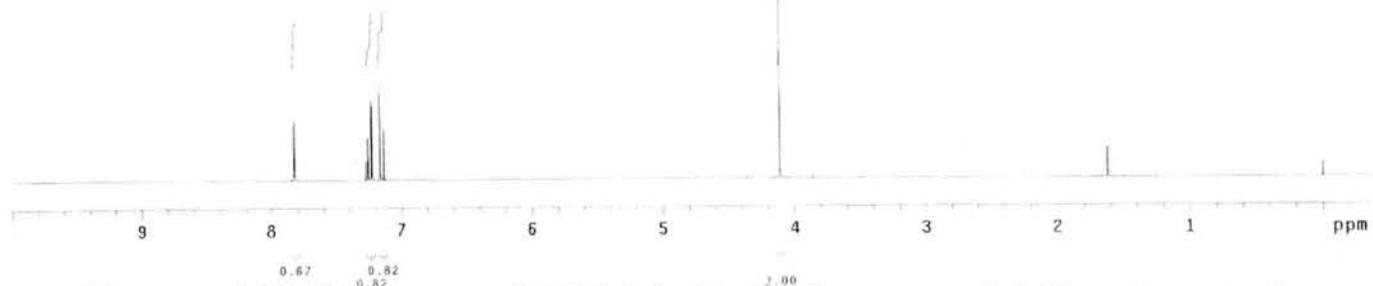


Espectro N°11a. Espectro IR del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo(11).

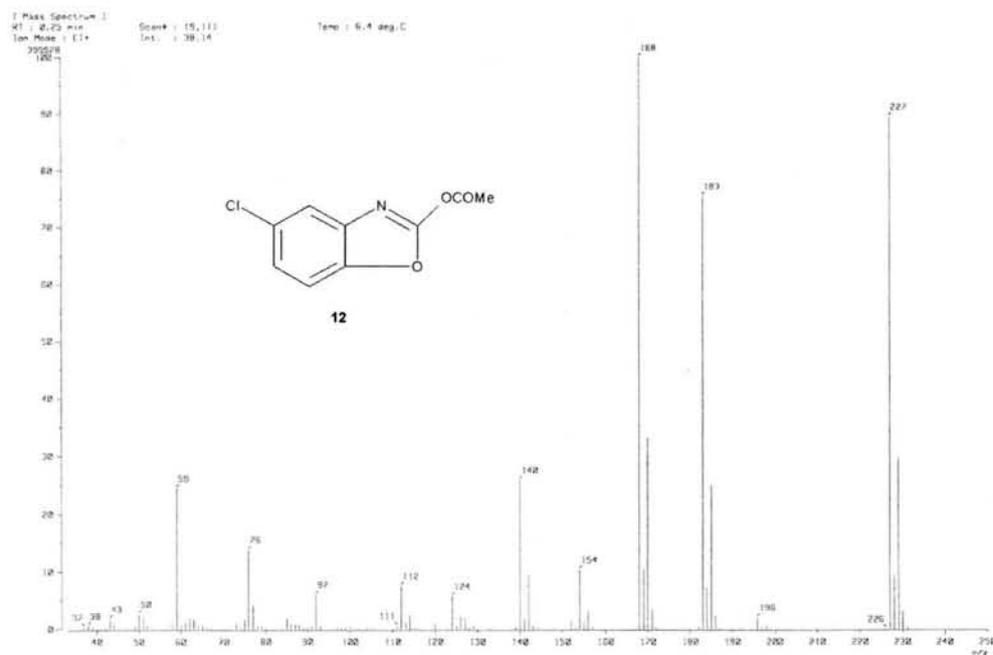
USA1
17 JUNIO 2002
Dr. Rafael Castilleja/Alejandro Luna
slawell/COC13
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
fda



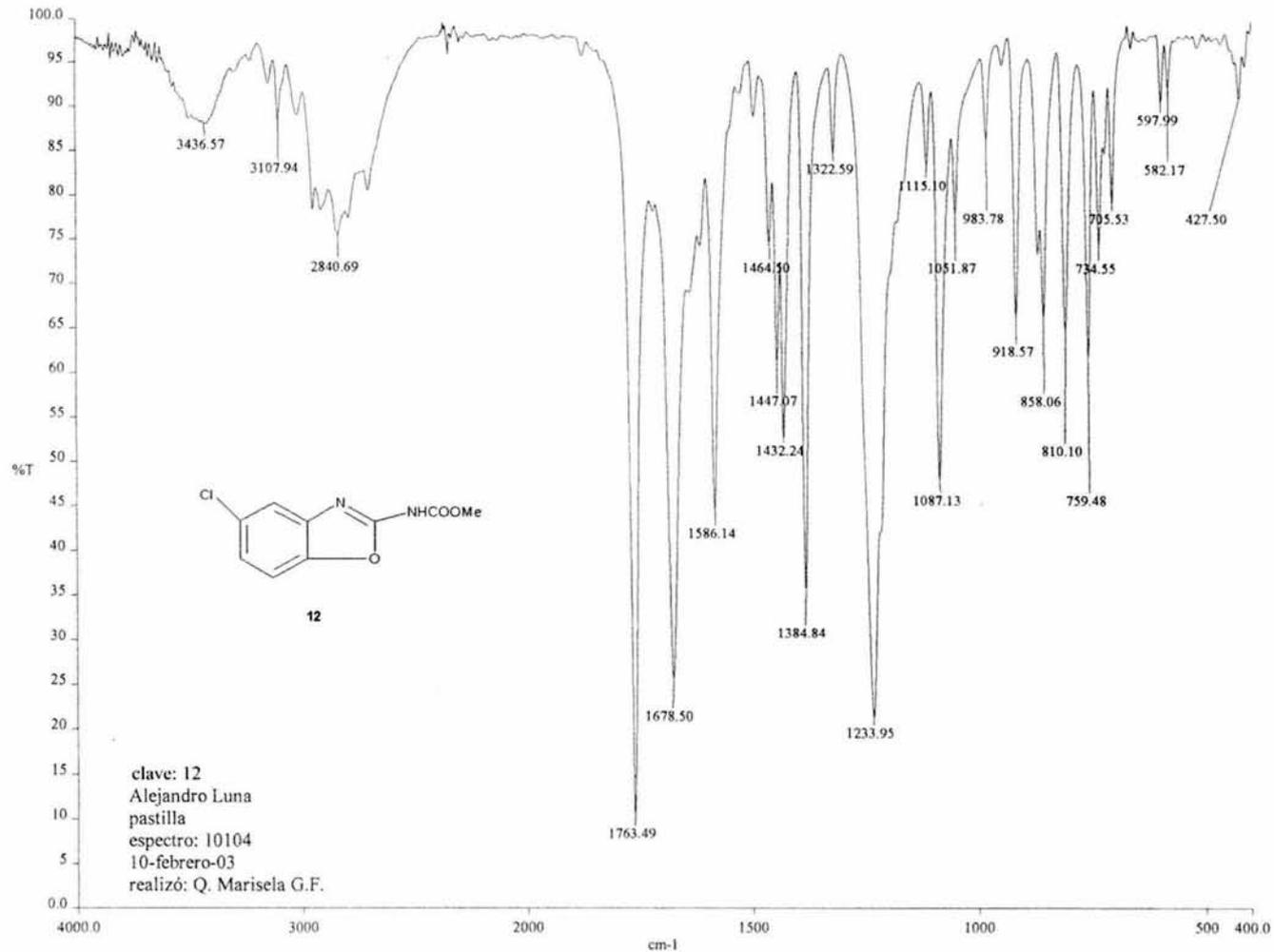
12



Espectro N°11b. Espectro RMN del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo.

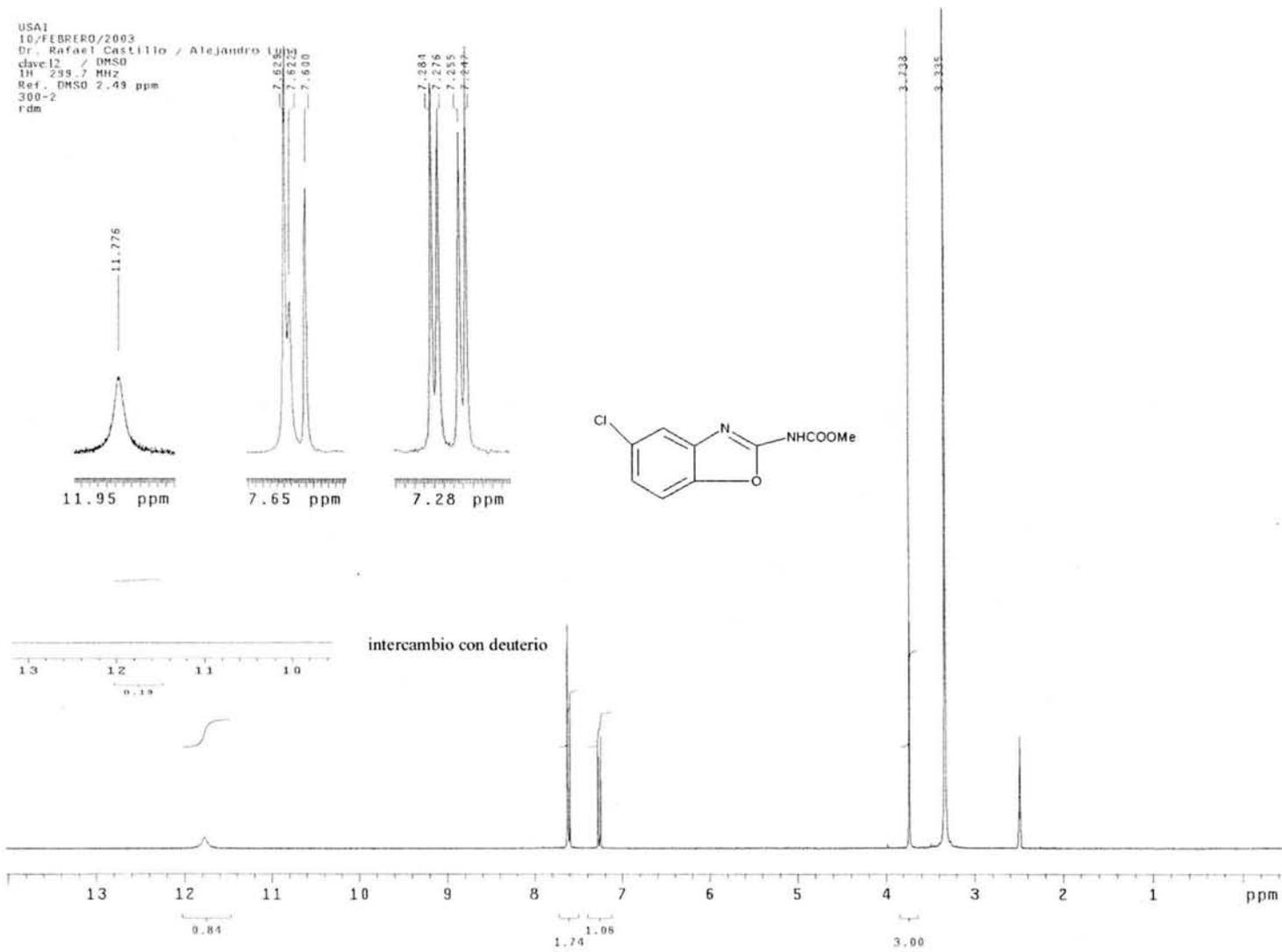


Espectro N°11c. Espectro de masas del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbonato de metilo.



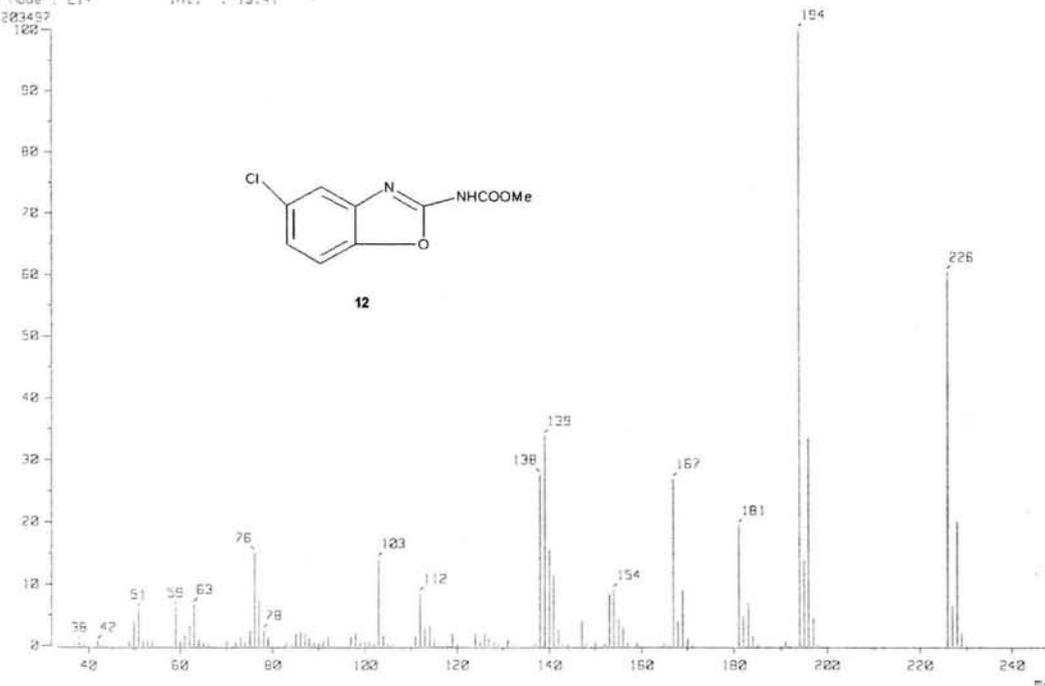
Espectro N°12a. Espectro IR(KBr) del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo.

USA1
10/FEBRERO/2003
Dr. Rafael Castillo / Alejandro L...
clave:12 / DMSO
1H 239.7 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-2
rdm

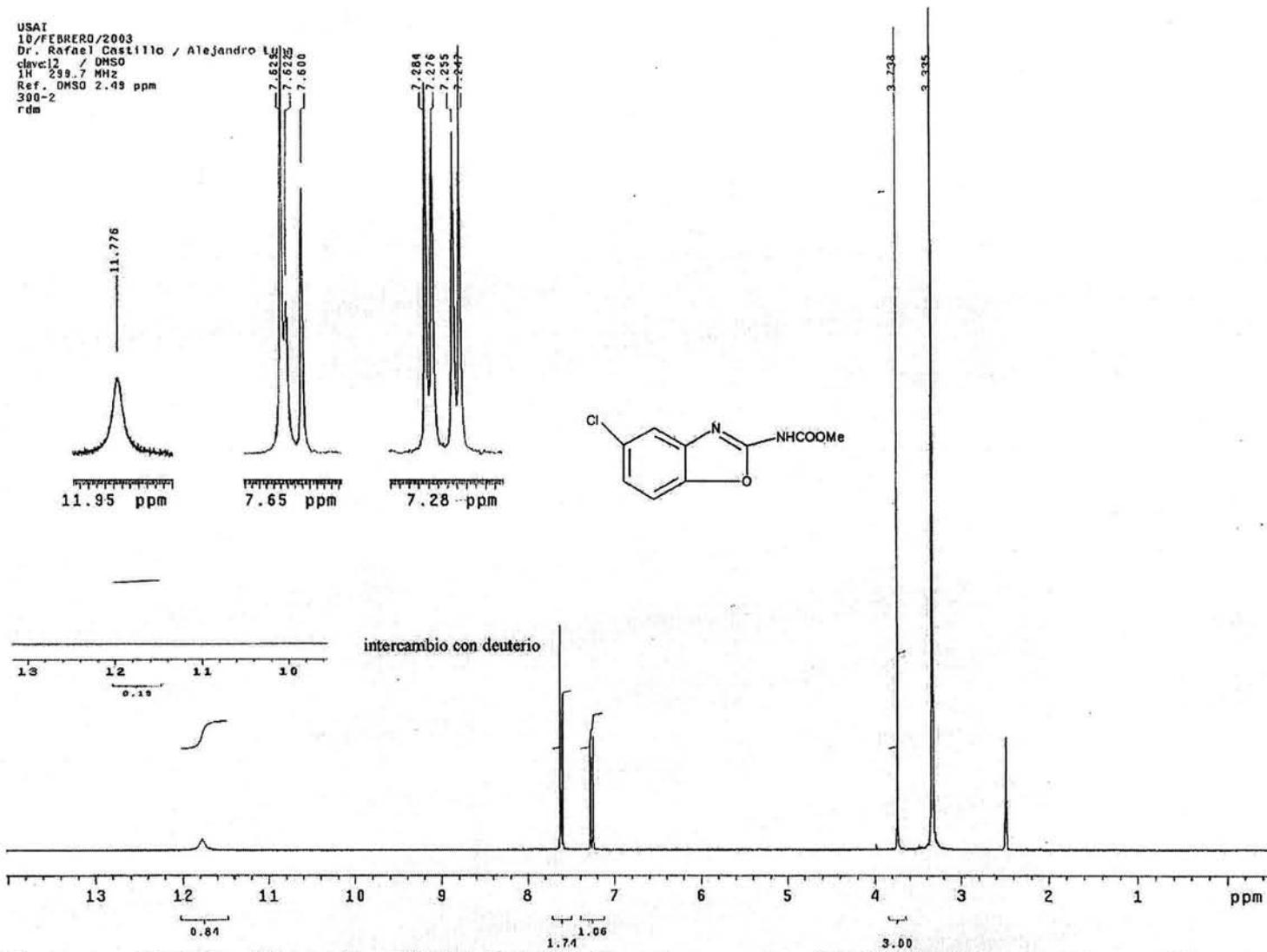


Espectro N°12b. Espectro RMN del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo.

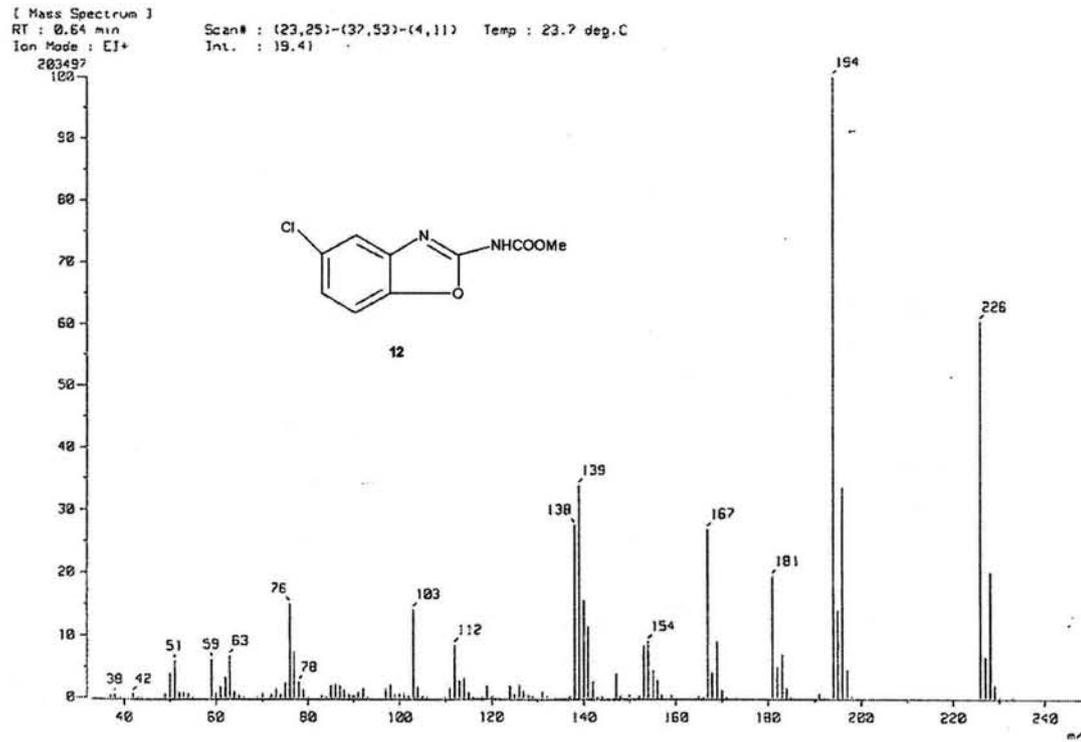
[Mass Spectrum]
RT : 0.64 min Scan# : (23,25)-(37,53)-(4,11) Temp : 23.7 deg.C
Ion Mode : EI+ Int. : 19.41



Espectro N°12c. Espectro de masas del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo.



Espectro N°12b. Espectro RMN del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo.



Espectro N°12c. Espectro de masas del (5-clorobenzoxazol-2-il) carbamato de metilo.