

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

**SÍNTESIS Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE DERIVADOS  
DICLORADOS DEL BENZOAZOL**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Q.F.B. JOSÉ GONZÁLEZ AGUILAR



TUTOR: Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA AÑO: 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido tener salud e inteligencia para alcanzar esta meta, por brindarme la dicha más grande que puede tener un ser humano: **una hermosa familia.**

A mis padres: Julio González Nuñez y Ma. Flora Aguilar Castro, por darme la vida y arriesgarse a invertir su tiempo y dinero en el negocio menos atractivo de esta vida, la educación de un hijo. Gracias por todo aquello que sacrificaron por mí, por las largas noches que les cause, por todo el trabajo extra que realizaron para ayudarme; no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que me han dado, que Dios los bendiga y los proteja por siempre.

A mis hermanos: Laura, Alberto y Patricia, por su comprensión y cariño, que hizo menos pesado mi andar, por soportar que no les brindará la atención que se merecen, por hacerme compañía, pero sobre todo, gracias por preocuparse por mí, porque sin ustedes esto no hubiera llegado a feliz término.

A Gonzalo y mis sobrinos Brenda y Julio Enrique, por alegrarme la vida con su inocencia y con sus risas.

A mis abuelos, tíos, primos y familia en general, por sus buenos deseos para que culminara mis estudios.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por la paciencia y buena mano para dirigirme y encausarme adecuadamente durante este trabajo, gracias por permitirme formar parte temporalmente de su grupo de investigación.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia por la solvencia y atinencia con que me ha guiado, por su agradable trato, por las facilidades que me brindo para concluir prontamente este trabajo, por la tolerancia cuando las cosas no estaban funcionando, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por seguir confiando en mí, muchas gracias.

Al personal del Lab. de Parasitología de la UIMEIP-Pediatría, CMN Siglo XXI-IMSS: Amparo, Jesús, Rosa María, Luz María y Nancy, así como a mis compañeros, Beatriz, Vanesa, Claudia, Miguel, Eduardo y Sandra por las facilidades y buenos momentos vividos durante la realización de este trabajo, en especial a la Bióloga Amparo Tapia por el tiempo y los conocimientos que amablemente brindo para mi adiestramiento.

A mis compañeros del Lab. 122 del Depto. de Farmacia Edificio E de la Facultad de Química UNAM: Patricia, Victor, Nayeli, Luis, Rafael, Carlos, Fabián, Dr. Francisco Hernández Luis, M. en C. Alicia Hernández Campos y en especial a Sergio, Eduardo, Marco Antonio, Miguel y Gabriel por sus consejos relacionados con la síntesis de mis compuestos.

A los Doctores, Ángel Guzmán Sánchez, Manuel Jiménez Estrada y Javier Rolando Ambrosio Hernández por sus críticas para el mejoramiento de este trabajo.

A la **DGEP** por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios.

Al **CONACYT** por apoyarme con la beca número **173248** para solventar mis estudios de Maestría.

A mi novia, la Srita. Haydeé Montes Hernández por compartir todo este proceso conmigo siempre con la disposición de colaborar, por ser mi motivación, el motor de mi existencia, esa chispa que toda persona necesita para desarrollarse plenamente. Gracias por las cosas que has sacrificado por apoyar mis decisiones, por cargar con mis imponderables y sacar el bote a flote, muchas gracias.

# ÍNDICE

---

Introducción.....	2
1. Antecedentes.....	4
1.1. Generalidades sobre los protozoarios.....	4
1.2. Epidemiología de la giardiasis.....	6
1.3. Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i> .....	6
1.4. Patogenia de <i>G. intestinalis</i> .....	7
1.5. Bioquímica de <i>G. intestinalis</i> .....	7
1.6. Tratamiento farmacológico contra <i>G. intestinalis</i> .....	8
1.7. Mecanismo de acción de albendazol y metronidazol.....	9
1.8. Epidemiología de la amebiasis.....	10
1.9. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	10
1.10. Patogenia de <i>E. histolytica</i> .....	10
1.11. Bioquímica de <i>E. histolytica</i> .....	11
1.12. Tratamiento farmacológico contra <i>E. histolytica</i> .....	11
1.13. Isosterismo.....	16
1.14. Métodos de síntesis para los benzoxazoles.....	18
1.14.1. Síntesis a partir de ácidos carboxílicos o de sus derivados..	19
1.14.2. Síntesis a partir de orto-ésteres.....	19
1.14.3. Síntesis a partir de precursores mono y diacilados.....	20
1.14.4. Síntesis de 2-aminobenzoxazoles.....	21
1.14.5. Síntesis de (benzoxazoles-2-il) carbamato de alquilo.....	22
1.14.6. Síntesis de 2-mercaptobenzoxazoles.....	23
1.14.7. Síntesis de 2-(metiltio)benzoxazoles.....	24
2. Planteamiento del Problema.....	26
3. Objetivos.....	27
4. Resultados y Discusión.....	28
5. Material y Métodos.....	49
5.1 Instrumentación.....	49

5.2. Cromatografía.....	50
5.3. Ruta de Síntesis Propuesta.....	51
5.4. Síntesis de materias primas.....	52
5.4.1. Síntesis de 3,4-Dicloro-2-nitrofenol (2).....	52
5.4.2. Síntesis de 2-Amino-4,5-diclorofenol (3).....	53
5.5. Síntesis de intermediarios N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)amidas.....	54
5.5.1. Síntesis de N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)formamida (4).....	54
5.5.2. Síntesis de N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)acetamida (5).....	55
5.5.3. Síntesis de N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)trifluoroacetamida (6).....	56
5.6. Síntesis de los benzoxazoles-2-sustituídos.....	57
5.6.1. Síntesis de 5,6-Diclorobenzoxazol (7).....	57
5.6.2. Síntesis de 5,6-Dicloro-2-metilbenzoxazol (8).....	58
5.6.3. Síntesis de 5,6-Dicloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (9).....	59
5.6.4. Síntesis de 5,6-Dicloro-2-mercaptobenzoxazol (10).....	60
5.6.5. Síntesis de 5,6-Dicloro-2-(metiltio)benzoxazol (11).....	61
5.6.6. Síntesis de 5,6-Dicloro-2-aminobenzoxazol (12).....	62
5.6.7. Síntesis de (5,6-Diclorobenzoxazol-2-il)carbamato de metilo (13).....	63
5.7. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos benzoxazólicos contra <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Entamoeba histolytica</i> .....	64
5.7.1. Parásitos.....	64
5.7.2. Fármacos.....	64
5.7.3. Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> para <i>G. intestinalis</i> y <i>E. histolytica</i> .....	64
6. Conclusiones.....	66
7. Referencias Bibliográficas.....	67
8. Apéndice.....	73

# INTRODUCCIÓN

---

De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002) más de la mitad de la población mundial padece de alguna infección parasitaria causada por helmintos y/o protozoarios. La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones a nivel mundial (Horton, 1990). En México, las infecciones por protozoarios intestinales del tipo de *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* continúan siendo un problema de salud pública, reportándose en el año 2002, 54236 casos de giardiasis y 1,151,507 casos de amebiasis (incluyen los casos por *E. histolytica* y *E. dispar*) (SSA, 2002). Según lo propuesto por expertos del Central Disease Control (CDC) de Atlanta y la OMS, una de las actividades encaminadas a solucionar la problemática de las enfermedades causadas por protozoarios es el control quimioterapéutico de éstas, a través de la implementación de tratamientos masivos (Colley, 2001).

El fármaco de elección en el tratamiento, tanto de la giardiasis como de la amebiasis, es el metronidazol. Sin embargo, la aparición de resistencia a este derivado 5-nitroimidazólico ha sido demostrada en *G. intestinalis* tanto en condiciones experimentales como naturales (Boreham *et al.* 1988; Meingassner *et al.* 1978; Muller *et al.* 1983; Samarawickrema *et al.* 1997; Upcroft *et al.* 2001). Dos de las principales causas generadoras de parásitos resistentes son la inapropiada exposición por tiempos cortos y la exposición, a niveles subletales, de metronidazol, ya que la mayoría de gente no concluye el tratamiento asignado (Upcroft *et al.* 2001).

Por otro lado, en investigaciones realizadas en el Laboratorio de Parasitología, UIMEIP-Hospital de Pediatría, Centro Médico del IMSS Siglo XXI se demostró que los bencimidazol-2-carbamatos, como el albendazol y el mebendazol, son activos contra protozoarios como *G. intestinalis* (Cedillo *et al.* 1992; Chávez *et al.* 1992).

A pesar de que los bencimidazol carbamatos son compuestos con una gama amplia de actividades biológicas, estos compuestos también han generado resistencia, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos compuestos antiparasitarios, tanto con actividad antiprotozoaria, como antihelmíntica.

En este proyecto de investigación, para la obtención del grado de Maestría, se propuso la síntesis y evaluación de 7 compuestos benzoxazoles diclorados cuya actividad biológica se evaluó empleando como modelos parasitarios a *G. intestinalis* y *E. histolytica*, llevando a cabo la parte química en el Laboratorio 122 del edificio E de la Facultad de Química, UNAM y la parte biológica en el Laboratorio de Parasitología de la UIMEIP-Pediatría, CMN Siglo XXI-IMSS. En este estudio, tomando como punto de referencia el núcleo del bencimidazol, se realizaron modificaciones racionales en la búsqueda de relaciones estructura

química-actividad biológica, que se considera permiten enriquecer los datos hasta ahora obtenidos para el diseño de nuevas moléculas con actividad antiprotozoaria.

# 1. ANTECEDENTES

---

## 1.1 Generalidades de los protozoarios

Las enfermedades parasitarias, tanto las protozoosis como las helmintosis, siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y principalmente en países en vías de desarrollo. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2002) más de la mitad de la población mundial padece de alguna infección parasitaria causada por helmintos y/o protozoarios. La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones a nivel mundial (Horton, 1990). Considerando la importancia de las enfermedades parasitarias hay una necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos para combatir estos padecimientos (Watkins, 2003).

Según lo propuesto por expertos del Central Disease Control (CDC) de Atlanta y la OMS, una de las actividades encaminadas a solucionar la problemática de las enfermedades causadas por protozoarios es el control quimioterapéutico de éstas a través de la implementación de tratamientos masivos (Colley, 2001). En nuestro país, la población infantil es la que se ve mayormente afectada por infecciones helmínticas, lo cual ha llevado a las campañas de desparasitación nacional como lo recomienda la OMS (Colley, 2001). Por otro lado, llama la atención que en México, para las infecciones causadas por protozoarios no se han implementado campañas similares (<http://www.ssa.gob.mx>).

**Protozoarios:** Los protozoarios son microorganismos unicelulares simples, con tamaño variable entre 2 y 100  $\mu\text{m}$ . El protoplasma está rodeado por una membrana celular y contiene numerosos organelos, como un núcleo rodeado por membrana, retículo endoplásmico, gránulos de almacenamiento de nutrientes y vacuolas, tanto contráctiles como digestivas. Los órganos de motilidad varían desde extensiones citoplásmicas simples hasta estructuras más complejas, como los cilios o flagelos. La reproducción se hace en general mediante fisión binaria simple, aunque el ciclo vital de algunos protozoarios incluye fases de fisión múltiple, alternando con un período de reproducción sexual (Boreham *et al.* 1988) (Tabla 1)

Las necesidades nutricionales de los protozoarios son en general simples y requieren la asimilación de nutrientes orgánicos. Los alimentos ingeridos pueden ser retenidos en gránulos o vacuolas intracitoplasmáticas. Las partículas no digeridas y los desechos se eliminan mediante liberación del material a través de la superficie celular. La respiración en la mayoría de los protozoarios parásitos se basa en procesos anaerobios facultativos. Para asegurar su supervivencia en condiciones difíciles o desfavorables, muchos protozoarios se transforman en un quiste, con menor actividad metabólica. El quiste está rodeado por una pared

celular externa gruesa, capaz de proteger al microorganismo frente a lesiones físicas y químicas potencialmente letales (Boreham *et al.* 1988).

**Tabla 1.** Transmisión y distribución de algunos parásitos patógenos del humano

Organismo	Forma infecciosa	Mecanismo de contagio	Distribución
<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste/trofozoito	Fecal-oral , venéreo	Mundial
<i>Giardia lamblia</i>	Quiste	Fecal-oral	Mundial
<i>Balantidium coli</i>	Quiste	Fecal-oral	Mundial
<i>Isospora belli</i>	Ooquiste	Fecal-oral	Mundial
<i>Cryptosporidium ssp</i>	Ooquiste	Fecal-oral	Mundial
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Trofozoito	Venéreo	Mundial
<i>Plasmodium ssp</i>	Esporozoito	Mosquito <i>Anopheles</i>	Áreas tropicales y subtropicales
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ooquistes y quistes tisulares	Fecal-oral, ingestión de carne	Mundial
<i>Leishmania ssp</i>	Promastigote	Simúlido <i>Phlebotomus</i>	Áreas tropicales y subtropicales
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tripomastigote	Chinche reduído	Norte, Centro y Sudamérica
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tripomastigote	Mosca tse-tsé	África

Tomado de Boreham *et al.* (1988).

Las infecciones causadas por protozoarios intestinales del tipo de ***Entamoeba histolytica*** y ***Giardia intestinalis*** continúan siendo un problema de salud pública. Estos parásitos son los agentes causales de la amebiasis intestinal, del absceso hepático amibiano y de la giardiasis respectivamente. Las estadísticas

muestran que el número de casos reportados en México va en aumento (Tabla 2), razón por la cual es necesario intensificar medidas de control (entre ellas el control quimioterapéutico) que permitan su erradicación.

Tabla 2. No. de casos reportados anualmente de *E. histolytica* y *G. intestinalis* en México

Parasitosis	2001	2002	2003	2004*
Absceso hepático Amebiano	2,432	3,396	3,748	837
Amebiasis intestinal	803,982	1,028,484	1,151,507	185,292
Giardiasis	35,820	50,029	54,236	8,494

Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/SSA.

\* Hasta la semana 9 del 2004

## 1.2 Epidemiología de la giardiasis

*Giardia intestinalis*. También se conoce como *G. lamblia* y/o *G. duodenalis*, es el protozooario flagelado que aparece con más frecuencia en el tracto gastrointestinal; afecta casi 280 millones de personas en el mundo, y mueren más de 10000 en el mismo lapso (Brown *et al.* 1998). En México se reportan alrededor de 40000 casos de giardiasis anualmente. Los trofozoítos se describieron por primera vez en 1681 por Leeuwenhoek en sus propias heces. Infecta alrededor de 40 diferentes especies animales. La OMS clasifica a la giardiasis como una enfermedad zoonótica. En climas fríos, el quiste, que es la forma infectiva del parásito, puede sobrevivir en reservas acuáticas durante varios meses. Por tal motivo, se han relacionado epidemias importantes con agua contaminada.

## 1.3 Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*

La giardiasis se transmite a través de la ingestión del quiste (forma inactiva), el cual se desenquista en su forma activa (trofozoíto) en el duodeno, después de pasar a través del medio ácido del estómago. Los trofozoítos se adhieren en la mucosa duodenal o yeyunal y se reproduce por fisión binaria, posteriormente se enquista, proceso que se cree es inducido por el paso a través del ambiente intestinal, incluyendo disminución de los niveles de colesterol (Gillin *et al.* 1996; Lujan *et al.* 1997).

## 1.4 Patogenia de *G. intestinalis*

La adquisición de *G. intestinalis* puede conducir a colonización asintomática (en aproximadamente el 50% de los individuos contagiados) o enfermedad sintomática, variable entre diarrea leve y un síndrome de malabsorción grave. El período de incubación previo a la enfermedad sintomática oscila entre 1 y 4 semanas (media de 10 días).

El comienzo del cuadro es súbito, con diarrea acuosa fétida, retortijones abdominales, flatulencia, esteatorrea, náuseas, vómitos y en ocasiones hay pérdida de peso. Las manifestaciones clínicas son el resultado de la infestación que el parásito causa, disminuyendo el lumen intestinal, microvellosidades y atrofia de las vellosidades, inmadurez de los enterocitos, deficiencia de enzimas lumbinales como la disacaridasa y malabsorción de electrolitos, una patogénesis multifactorial que no está del todo esclarecida (Buret, 1994; Hill, 1995).

## 1.5 Bioquímica de *G. intestinalis*

Por otra parte, *G. intestinalis* es un organismo asexual y sin mitocondrias, de tal forma, su metabolismo es glicolítico y fermentativo, la parte terminal de la vía glicolítica es ejecutada por una enzima homóloga a la que se encuentra en bacterias anaerobias la piruvato:ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) que reemplaza a la piruvato-deshidrogenasa que se encuentra en organismos aerobios, los electrones de PFOR son transferidos a ferredoxinas, de las cuales tres han sido descritas (Upcroft y Upcroft, 2001).

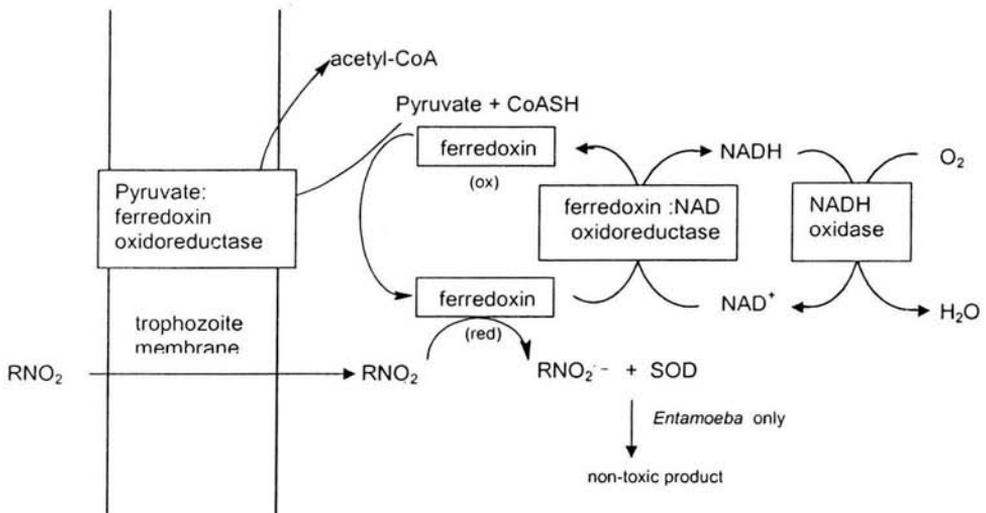
El ATP es generado por fosforilación a nivel de sustrato; la vía de los ácidos tricarbóxicos que se realiza en la mitocondria de organismos aerobios está ausente, sin embargo algunas malato-deshidrogenasas están presentes. No se han encontrado citocromos en *G. intestinalis*, sin embargo se ha descrito la presencia de una oxidasa terminal, la cual convierte el oxígeno directamente en agua, este proceso protege a la PFOR y a las ferredoxinas. Esta NADH-Oxidasa es la única enzima aeróbica descrita en *G. intestinalis*.

En *G. intestinalis*, PFOR es auxiliada por otra 2-cetoácido oxidoreductasa y por una arginina dihidrolasa que proporcionan rutas alternativas para obtener energía (Brown *et al.* 1998; Knodler *et al.* 1998; Upcroft y Upcroft 1999). Los productos finales del metabolismo fermentativo en *G. intestinalis* son: dióxido de carbono, acetato, alanina y etanol, las proporciones varían de acuerdo a las condiciones de crecimiento (Edwards *et al.* 1989; Pager *et al.* 1993). Los mecanismos convencionales para el manejo del estrés oxidativo que incluyen, superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa y glutatión, están ausentes en *G. intestinalis*. Estos son reemplazados por una tioredoxina de amplio espectro, semejante a la disulfuro reductasa de los procariontes, así como por

tioles de bajo peso molecular: cisteína, tioglicolato, sulfito y coenzima A, NADH-Oxidasa y una NADH-Peroxidasa asociada a la membrana plasmática (Brown *et al.* 1998).

## 1.6 Tratamiento farmacológico contra *G. intestinalis*

El fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis es el metronidazol. Sin embargo, la aparición de resistencia a este derivado 5-nitroimidazólico ha sido demostrada en *G. intestinalis* tanto en condiciones experimentales como naturales (Boreham *et al.* 1988; Meingassner *et al.* 1978; Muller *et al.* 1983; Samarawickrema *et al.* 1997; Upcroft *et al.* 2001). En cepas de *G. intestinalis* resistentes al metronidazol, la PFOR está disminuida alrededor de 5 veces. Esto ocasiona la disminución de la activación del fármaco para generar una serie de radicales (incluyendo el radical nitroso), mediante reacciones de transferencia de electrones de bajo potencial redox (Towson *et al.* 1996) (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo propuesto para la activación del metronidazol por *G. intestinalis* y *E. histolytica*. Tomado de Upcroft y Upcroft (2001).

PFOR no mostró estar disminuida en cepas resistentes a la furazolidona, motivo por el cual el proceso mencionado anteriormente es el más aceptado como responsable de la aparición de resistencia al metronidazol. El siguiente aceptor de electrones en la cadena de transporte es la ferredoxina I, la cual también se ve inhibida alrededor de siete veces, se cree que esta disminución contribuye en la resistencia a compuestos 5-nitroimidazólicos (Liu *et al.* 2000). También se ha reportado que un incremento en el eflujo del metronidazol está involucrado en la protección del parásito, aunque no está del todo esclarecido el mecanismo que

involucra este proceso (Upcroft y Upcroft 1993a; Upcroft y Upcroft 1993b; Upcroft y Upcroft 1999).

## 1.7 Mecanismo de acción de albendazol y metronidazol

El mecanismo de acción de los bencimidazoles (albendazol entre otros), ha sido revisado ampliamente, aún cuando no se conoce con precisión el mecanismo exacto de todos los bencimidazoles, actualmente se reconoce que los bencimidazoles pueden ejercer su efecto al inhibir el complejo enzimático succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa, la incorporación de glucosa por parte del parásito y/o inhibiendo la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos e inhibiendo la fosforilación oxidativa (Sharma y Abuzar, 1983; Boczon *et al.* 1984; Lacey, 1990; McCracken y Stillwell, 1993).

De estos mecanismos propuestos, el más revisado es el que implica la inhibición de la polimerización de la tubulina para la formación de microtúbulos. Actualmente se sabe que los bencimidazoles se unen irreversiblemente a la subunidad- $\beta$  de la tubulina, lo cual trae como resultado que no se puedan ensamblar más subunidades y que no se lleve a cabo la polimerización con la subunidad- $\alpha$ , lo cual evita la formación de los microtúbulos, indispensables para el transporte y desecho de nutrientes en los parásitos (Lacey, 1988; Kwa *et al.* 1993)

Para que exista un adecuado acoplamiento al sitio de unión con la tubulina, en la estructura química de los derivados bencimidazólicos es obligatoria la presencia de un átomo de hidrógeno en posición 1 del anillo bencimidazólico (Lacey, 1988) y un grupo carbamato de metilo en posición 2 (Navarrete *et al.* 2001).

Por otra parte, el mecanismo de acción del metronidazol incluye su activación reductiva. El grupo nitro de la molécula del metronidazol es reducido en el citoplasma de los trofozoítos, pasando por varios intermediarios. La PFOR es la responsable de este proceso, el cual sólo ocurre en condiciones ambientales reductivas (Brown *et al.* 1998; Upcroft y Upcroft, 2001). Los intermediarios reducidos del metronidazol interactúan con el DNA e impiden generar la plantilla para la síntesis del RNA (Goldman *et al.* 1986). Cuando el metronidazol reducido se une al DNA *in vitro*, hay pérdida de la estructura hélice, lo que genera una ruptura de dicha biomolécula (Ings *et al.* 1974; Knigth *et al.* 1978). Existe un reporte que sugiere que el metronidazol reducido se une a residuos de citosina y guanina (La Russo *et al.* 1977).

## 1.8 Epidemiología de la amebiasis

***Entamoeba histolytica***. Este parásito afecta a casi 50 millones de personas en el mundo, de las cuales 100 000 mueren cada año (Bharti *et al.* 2002). En México, la amebiasis intestinal es una de las principales infecciones parasitarias, reportándose cerca de un millón de casos por año (Sarti *et al.* 1999), si bien desconocemos qué proporción de esta cifra es causada por *E. dispar* y cual por *E. histolytica*.

## 1.9 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

El trofozoito de *Entamoeba histolytica* fue descrito por primera vez en 1875 por Lösch, la forma de quiste fue detallada por primera vez en 1893 por Quincke y Roos (Li y Stanley, 1996; Marshall *et al.* 1997). El quiste sobrevive tanto en agua como alimentos y es la forma infectiva después de ser ingerido. Un pH neutro o ligeramente alcalino genera el cambio de quiste a metaquiste (una forma metabólicamente más activa), el cual madura y se convierte en trofozoito dentro del intestino delgado. El ciclo se completa cuando se forma el quiste en el tracto intestinal.

Recientemente, *E. histolytica* fue dividida en dos especies, la no patógena y no invasiva *E. dispar* y la patógena e invasiva *E. histolytica*. Esta división fue propuesta inicialmente por Brumpt en 1925, pero fue necesaria la tipificación isoenzimática que fue soportada por datos de secuenciación genética para aceptar dicha propuesta. Esta conclusión también fue sustentada por estudios ultraestructurales y de citopatogenicidad hechos en dos cepas representativas (Diamond y Clark, 1993).

## 1.10 Patogenia de *E. histolytica*

El periodo de incubación posterior a la ingestión del quiste puede variar desde días hasta meses, inclusive puede llevarse más tiempo. Los síntomas pueden variar desde colitis amebiana aguda (la cual transcurre usualmente con heces sanguinolentas) y fiebre, con una duración de varias semanas, pasando por diarrea sanguinolenta profusa (con fiebre), ameboma con disentería y finalmente invasión de otros órganos. Esta última fase ha sido comparada con la metástasis de un tumor de colon (Stanley, 1997).

## 1.11 Bioquímica de *E. histolytica*

El metabolismo de *E. histolytica* parece ser similar al de *G. intestinalis*, anaeróbico y fermentativo. Sin embargo, este parásito ha sido recientemente descrito como aerotolerante o microaerotolerante, ya que es capaz de crecer en una atmósfera con un máximo de 5% de oxígeno (Martínez y Espinosa, 1998). El oxígeno y los productos de su ruptura son tóxicos para *E. histolytica*, sin embargo es capaz de reducirlo en agua cuando la concentración atmosférica no rebasa el nivel antes mencionado, para lograr esto, el parásito produce SOD, catalasa y peroxidasa para detoxificar (Tannich *et al.* 1991; Chen *et al.* 1996).

Algunas de las enzimas glicolíticas son reversibles y utilizan la energía del enlace pirofosfato y no del ATP (Mertens, 1993; Reeves, 1984). Se tienen registros de la existencia de una sola 2-cetoácido oxidoreductasa, la PFOR en *E. histolytica* y se encuentra predominantemente unida a la membrana (Samarawickrema *et al.* 1997; Upcroft y Upcroft 2001). Esta enzima también utiliza sustratos alternativos, tales como,  $\alpha$ -cetobutirato,  $\alpha$ -cetoglutarato y oxalacetato.

*E. histolytica* no muestra actividad de la enzima glutatión reductasa, por lo tanto no sintetiza glutatión (Fahey *et al.* 1984). El principal tiol de bajo peso molecular es la cisteína, sin embargo, recientemente se ha demostrado que *E. histolytica* puede asimilar el glutatión del medio de cultivo y lo convierte en Bisglutathionil-espermidina (tripanotona) (Ondarza *et al.* 1999), un derivado que contiene grupos tiol y que fue encontrado por primera vez en tripanosomas (Fairlamb y Cerami, 1992).

## 1.12 Tratamiento farmacológico contra *E. histolytica*

La inapropiada exposición por tiempos cortos y la exposición a niveles subletales de metronidazol son condiciones que se han mencionado como candidatos para inducir resistencia a dicho fármaco (Upcroft y Upcroft, 1993b). Estas condiciones también son usadas "in vitro" para generar cepas resistentes al metronidazol. Como ejemplos, *E. histolytica* de la cepa HM-IMSS (aislado de una úlcera rectal de un hombre adulto en la Ciudad de México en 1967) y la cepa HTH-56:MUTM (establecida en cultivo de un absceso amebiano de un adulto en Bangkok en 1992), actualmente son mantenidas en crecimiento con una concentración 10  $\mu$ M de metronidazol, una dosis que normalmente es letal para los parásitos "in vitro" (Gault *et al.* 1985). En cepas resistentes al metronidazol, se encontró incrementada la expresión de una SOD que contiene hierro, entre 3-5 veces de sus niveles normales en cepas resistentes al metronidazol, además de que la actividad de una segunda SOD desapareció (Samarawickrema *et al.* 1997). Wassmann *et al.* (1999) demostró con parásitos resistentes a 40  $\mu$ M de metronidazol un incremento en la expresión de la peroxiredoxina, mientras que la ferredoxina I se vio disminuida. A diferencia de lo que sucede con *G.*

*intestinalis*, la actividad de PFOR no se vio disminuida en *E. histolytica* (Samarawickrema *et al.* 1997).

Una alternativa en el tratamiento de la giardiasis y de la amebiasis ha sido el empleo de la nitazoxanida, un derivado del 2-Amino-5-nitroiazol. Se ha comparado la actividad *in vitro* de este fármaco con la del metronidazol, encontrándose que es 3 veces más efectivo contra *E. histolytica* y 50 veces más activo contra *G. intestinalis*. (Cedillo *et al.* 2002). En estudios clínicos, la eficacia de la nitazoxanida en el tratamiento de amebiasis intestinal y giardiasis varía de 70 a 100% (Dumbo *et al.* 1997; Romero-Cabello *et al.* 1997; Rodríguez *et al.* 1999). Asimismo, se ha demostrado que los bencimidazol-2-carbamatos, como el albendazol y el mebendazol, son activos contra protozoarios como *G. intestinalis* (Cedillo *et al.* 1992; Chávez *et al.* 1992) (Figura 2). Los ensayos clínicos, han mostrado que el albendazol es tan efectivo como el metronidazol en el tratamiento de la giardiasis (Rodríguez *et al.* 1996).

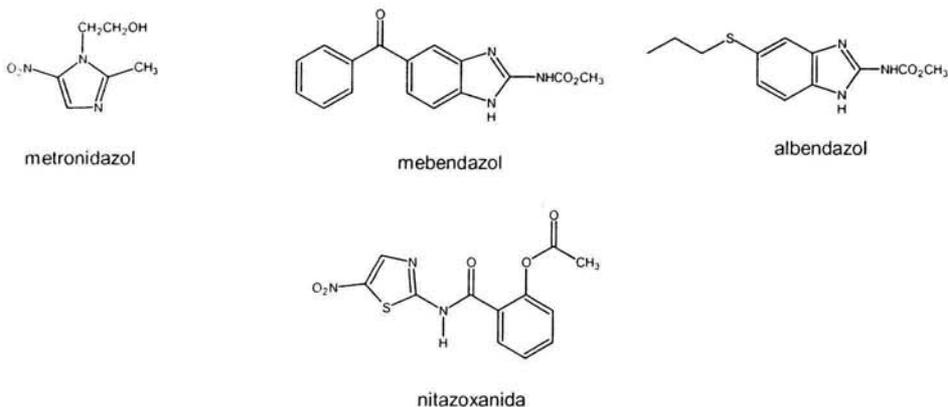
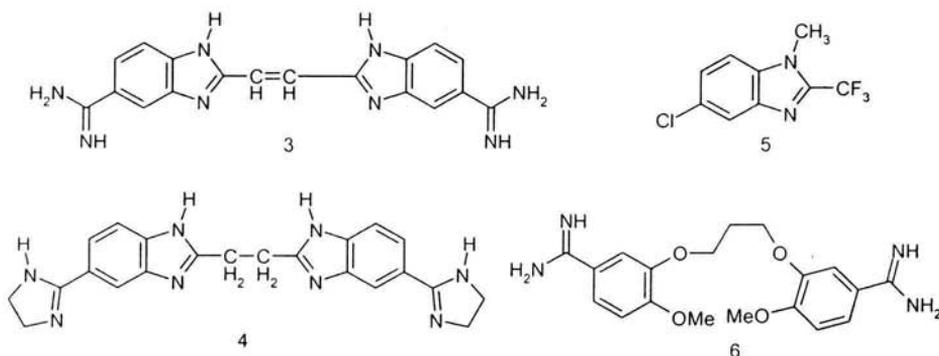


Figura 2. Fármacos con actividad anti-giardial.

Entre las nuevas moléculas con actividad contra *G. intestinalis*, se encuentran algunos análogos de pentamidina; en un estudio de 30 compuestos, el más potente fue el compuesto **6** que mostró una  $CI_{50}$  de 0.51  $\mu M$  en comparación con la del metronidazol (2.1  $\mu M$ ) y furazolidona (1.0  $\mu M$ ) (Edlind, 1989). Por otra parte, un agente antidepresivo, 3-Cloroimipramina, resultó ser 10 veces más potente que el metronidazol *in vitro* (Weinbach *et al.* 1992). En otro estudio, una lactona sesquiterpénica, Brevillina A mostró una actividad *in vitro* contra *G. intestinalis* con una  $CI_{50}$  de 16.1  $\mu M$  (Yu *et al.* 1994). También se ha reportado la actividad *in vitro* de varios flavonoides contra *G. intestinalis*, entre ellas las geraninas A y B, las cuales mostraron una  $CI_{50}$  de 2.4 y 6.0  $\mu g/mL$  respectivamente (Meckes *et al.* 1999); el kaempferol y la quercetina (flavonoides) tuvieron valores de  $CI_{50}$  de 26.47 y 8.73  $\mu g/mL$  respectivamente (Calzada *et al.* 1999); finalmente, la (-)-epicatequina y (-)-epigallocatequina mostraron una actividad *in vitro* de  $CI_{50}$  1.64 y 8.06  $\mu g/mL$  respectivamente (Calzada *et al.* 1999).

A pesar de los compuestos mencionados anteriormente, sin duda, los compuestos con mayor perspectiva a futuro, son los derivados bencimidazólicos, por ejemplo, algunas modificaciones estructurales realizadas de bis-bencimidazoles dieron como resultado compuestos con actividad contra *G. intestinalis in vitro*, con valores de  $CI_{50}$  de  $0.04 \mu\text{M}$  y  $0.21 \mu\text{M}$  para los compuestos **3** y **4** (Fig. 3) (Bellet *et al.* 1993). Por otra parte, derivados trifluorometilados fueron sintetizados y evaluados contra *G. intestinalis*, el compuesto más potente fue el número **5** con un valor de  $CI_{50}$  de  $0.042 \mu\text{M}$  (Fig. 3) (Navarrete *et al.* 2001).

Es importante resaltar que tanto en el tratamiento de la amebiasis y de la giardiasis, como en el de infecciones por otros parásitos protozoarios, en muchos casos, la quimioterapia no es efectiva, con la consiguiente falla terapéutica, producción de efectos secundarios y resistencia a fármacos. Por esto instituciones como la OMS tienen entre sus principales objetivos el diseño, la síntesis y la evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria.



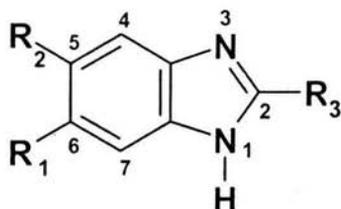
**Figura 3.** Ejemplos de moléculas con perspectivas contra *G. intestinalis*.

A este respecto, el reto es encontrar los mejores compuestos guías y llevarlos a través de un proceso de discernimiento biológico a la creación de un nuevo fármaco que sea realmente efectivo con mejores características fisicoquímicas que las de uso actual, de fácil síntesis y bajo costo y que perdure en beneficio de los pacientes (Watkins, 2003).

En relación con esto, se ha consolidado un grupo de investigación multidisciplinario, entre investigadores del Laboratorio de Parasitología, UIMEIP-Hospital de Pediatría, Centro Médico del IMSS Siglo XXI y la Facultad de Química de la UNAM y tomando como base a la molécula del bencimidazol, un heterociclo muy versátil, susceptible de un gran número de sustituciones químicas, se han desarrollado una gran variedad de compuestos con diferentes actividades biológicas y comportamientos farmacocinéticas. Entre los

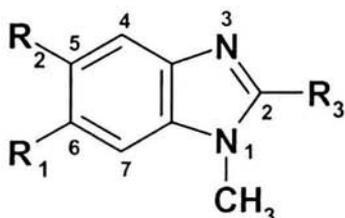
compuestos sintetizados, por este grupo de investigación encontramos a los 1-*H*-bencimidazoles que fueron evaluados *in vitro* contra *G. intestinalis* y *E. histolytica* (Tabla 3), así como los 1-metil-bencimidazoles, cuya actividad fue evaluada contra *G. intestinalis* (Tabla 4) (Sánchez, 1999; Navarrete *et al.* 2001; Valdez *et al.* 2002).

**Tabla 3. Estructura y Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los 1-*H*-bencimidazoles sobre los trofozoítos de *G. intestinalis* y *E. histolytica***



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Cl <sub>50</sub> (µM)	
				<i>G. intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>
1	H	H	H	0.008	0.042
2	H	H	CH <sub>3</sub>	0.317	0.007
3	H	H	SH	0.040	0.133
4	H	H	SCH <sub>3</sub>	0.045	0.393
5	H	H	NH <sub>2</sub>	1.902	0.114
6	H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.057	0.204
7	H	H	CF <sub>3</sub>	0.107	0.069
8	H	Cl	H	0.282	0.039
9	H	Cl	CH <sub>3</sub>	0.156	0.084
10	H	Cl	SH	0.081	0.005
11	H	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.005	0.192
12	H	Cl	NH <sub>2</sub>	0.030	0.125
13	H	Cl	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.066	0.350
14	H	Cl	CF <sub>3</sub>	1.282	0.022
15	Cl	Cl	H	0.358	0.096
16	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	0.065	0.025
17	Cl	Cl	SH	0.078	0.055
18	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.227	0.356
19	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>	0.218	0.059
20	Cl	Cl	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.066	0.350
21	Cl	Cl	CF <sub>3</sub>	0.078	0.011
<b>Metronidazol</b>				<b>1.228</b>	<b>0.350</b>
<b>Albendazol</b>				<b>0.037</b>	<b>56.600</b>

Tabla 4. Estructura y Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los 1-metilbencimidazoles sobre los trofozoitos de *G. intestinalis* y *E. histolytica*

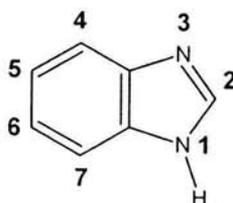


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> (μM) <i>G. intestinalis</i>	CI <sub>50</sub> (μM) <i>E. histolytica</i>
1	H	H	CH <sub>3</sub>	0.089	0.061
2	H	H	NH <sub>2</sub>	1.360	0.346
3	H	H	SH	0.018	0.006
4	H	H	SCH <sub>3</sub>	0.033	0.196
5	H	H	CF <sub>3</sub>	0.064	0.040
6	H	Cl	CH <sub>3</sub>	0.144	0.005
7	H	Cl	NH <sub>2</sub>	0.242	0.060
8	H	Cl	SH	0.045	0.010
9	H	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.028	0.037
10	H	Cl	CF <sub>3</sub>	0.042	0.046
11	Cl	H	CH <sub>3</sub>	0.044	0.204
12	Cl	H	NH <sub>2</sub>	0.132	0.247
13	Cl	H	SH	0.020	3.773
14	Cl	H	SCH <sub>3</sub>	0.122	0.569
15	Cl	H	CF <sub>3</sub>	0.127	0.008
16	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	0.055	0.013
17	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>	0.074	0.037
18	Cl	Cl	SH	0.008	0.128
19	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.024	1.048
20	Cl	Cl	CF <sub>3</sub>	0.260	0.033
<b>Metronidazol</b>				<b>1.228</b>	<b>0.350</b>
<b>Albendazol</b>				<b>0.037</b>	<b>56.600</b>

Los resultados hasta ahora obtenidos han permitido obtener información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria. Así, podemos concluir que no se requiere el hidrógeno en la posición 1 (Figura 4) para tener la actividad antiprotozoaria, además de que el sustituyente metilo en la misma posición no afecta de manera considerable la actividad antiprotozoaria

en comparación con sus análogos 1-*H*-Bencimidazoles (Sánchez, 1999; López, 1999); que los sustituyentes pequeños en el anillo bencenoide confieren una buena actividad contra *G. intestinalis* y que adicionalmente, la permeabilidad de los compuestos sintetizados es mayor que la del albendazol (Morales, 2000)

Sólo los compuestos que en la posición 1 y 2 tienen el átomo de H y el grupo carbamato de metilo respectivamente inhiben la polimerización de la tubulina de cerebro de rata (Valdez *et al.* 2002). Conjuntamente, los derivados del 2-trifluorometilbencimidazol tienen una buena actividad antiparasitaria, que puede ser antiprotozoaria o antihelmíntica dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes y el patrón de sustitución (Navarrete *et al.* 2003).

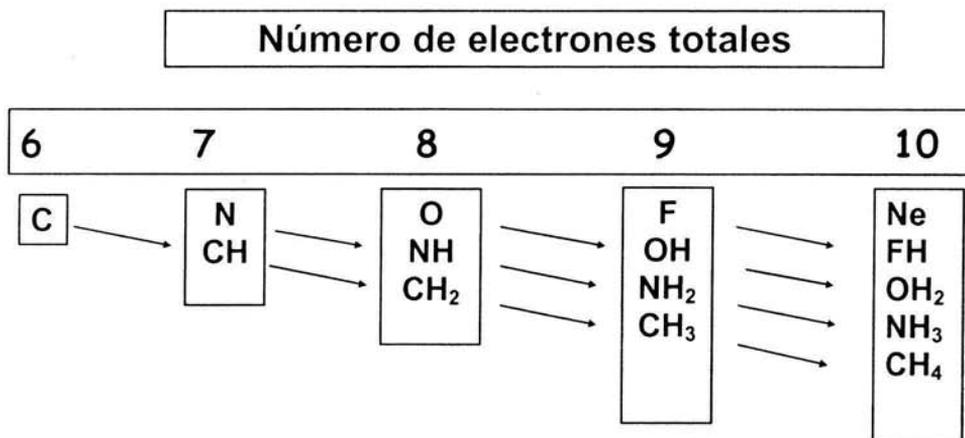


**Figura 4.** Numeración de las posiciones en el anillo del bencimidazol

Para proponer la estructura de nuevos compuestos químicos, son importantes las siguientes consideraciones:

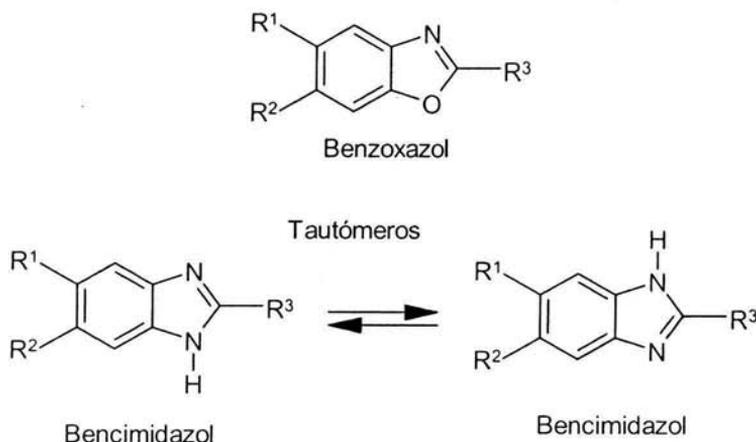
### 1.13 Isosterismo

El isosterismo es un concepto químico que se ha aplicado al desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica. En la definición de Langmuir este término se utilizó para describir similitudes en propiedades físicas y químicas de moléculas o iones con el mismo número de átomos y electrones de valencia. Este concepto se extendió a especies con diferente número de átomos pero que mantienen el mismo número de electrones en la capa de valencia (Korolkovas, 1970; Avendaño, 1993) (Figura 5).



**Figura 5.** Algunos ejemplos de átomos y grupos de átomos que son especies isósteras.

Considerando lo anterior, es posible reemplazar isostéricamente el  $-NH$  de la posición 1 de los bencimidazoles por un oxígeno, estos nuevos compuestos son benzoxazoles, que al igual que la molécula de los bencimidazoles, es un sistema anular bicíclico que tiene un anillo bencenoide fusionado a un heterociclo. En los benzoxazoles este heterociclo es un anillo de oxazol y tiene la ventaja de eliminar el tautomerismo que se presenta en los 1-*H*-bencimidazoles (Esquema 1) (Barton, 1994; Elguero, 1978; Horton, 1990; Sánchez, 1999).

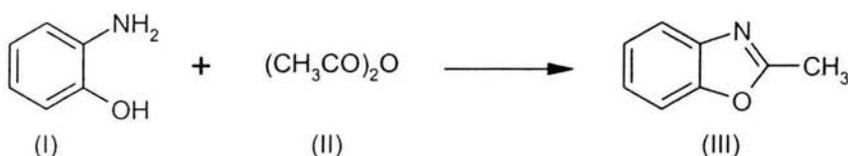


**Esquema 1.** Los benzoxazoles no presentan tautomería como los bencimidazoles

Con el propósito de continuar obteniendo información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria, resulta de interés la síntesis de benzoxazoles. Esto permitirá conocer la importancia del grupo -NH de la posición 1 del bencimidazol al reemplazarla por un oxígeno de manera isótera.

## 1.14 Métodos de síntesis para los benzoxazoles

En 1876, Landenburg fue el primero en sintetizar un benzoxazol, el 2-metilbenzoxazol (III), a partir del 2-aminofenol (I) por calentamiento con anhídrido acético (II), como se muestra en el esquema 2 (Katritzky, 1984).

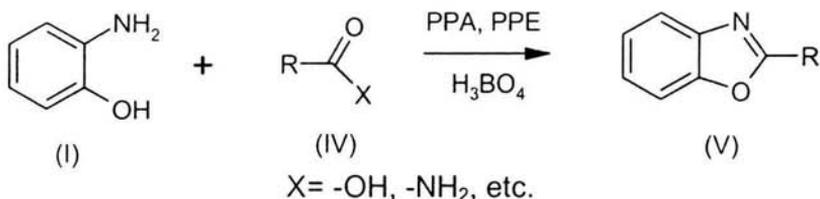


Esquema 2. Síntesis del primer benzoxazol

En la actualidad existe una gran variedad de métodos para la síntesis de benzoxazoles 2-alquil o 2-aril-sustituídos, no obstante, se continúa empleando el mismo método de Landenburg antes mencionado, con la modalidad de que ahora se pueden utilizar además de anhídridos, ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, ésteres, amidas, nitrilos, entre otros, empleando la misma materia prima de partida, a continuación se mencionan algunos de los métodos más relevantes en la síntesis de 2-alquil o 2-arilbenzoxazoles.

### 1.14.1 Síntesis a partir de ácidos carboxílicos o de sus derivados.

Los benzoxazoles 2-alquil o aril sustituidos (v) se sintetizan generalmente por la condensación de 2-aminofenol (I) con ácidos carboxílicos (IV) o con algún derivado del ácido carboxílico, por calentamiento prolongado. En algunas ocasiones se utilizan catalizadores tales como anhídrido fosfórico, ácido polifosfórico (PPA), éster polifosfato (PPE) o ácido bórico ( $H_3BO_4$ ) como se muestra en el esquema 3 (Hein, 1957; Hendrickson, 1989; Katritzky, 1984; Ören, 1998 y Uhlig, 1960).

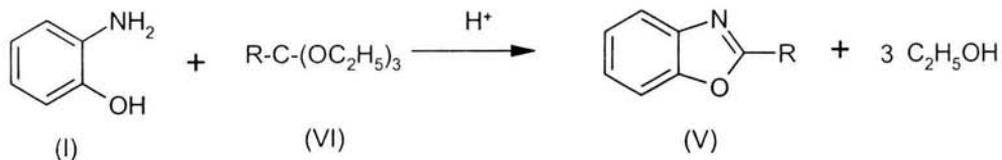


**Esquema 3.** Obtención de benzoxazoles a partir de 2 aminofenol, ácidos carboxílicos y un catalizador.

La reacción anterior se efectúa a temperaturas entre 110-140 °C para todos los catalizadores. Además, los tiempos de reacción varían según el catalizador, de 1-5h para el PPA, anhídrido fosfórico o PPE y de 24-48h para el ácido bórico; sin embargo, este último ha resultado ser el mejor de los cinco catalizadores en cuanto a rendimientos y facilidad de aislamiento de los productos.

### 1.14.2 Síntesis a partir de orto-ésteres.

En este procedimiento, el 2-aminofenol se hace reaccionar con orto-ésteres (VI) en presencia de ácido sulfúrico concentrado, dando lugar a la formación de benzoxazoles 2-sustituidos con rendimientos del 75-85% (Jenkins *et al.* 1961). Las temperaturas de reacción oscilan entre 115-130°C, dependiendo del alcohol que se destile (Esquema 4).

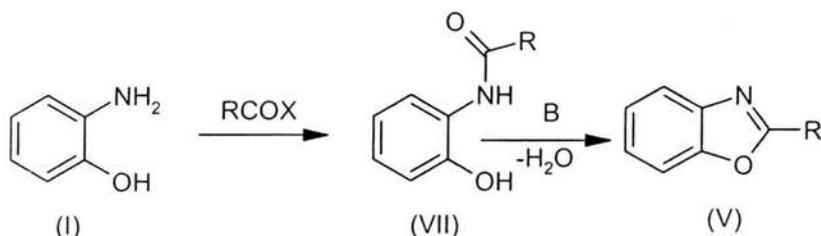


R= H, Alquilo, Arilo

**Esquema 4.** Obtención de benzoxazoles a partir de orto-ésteres.

### 1.14.3 Síntesis a partir de precursores mono y diacilados

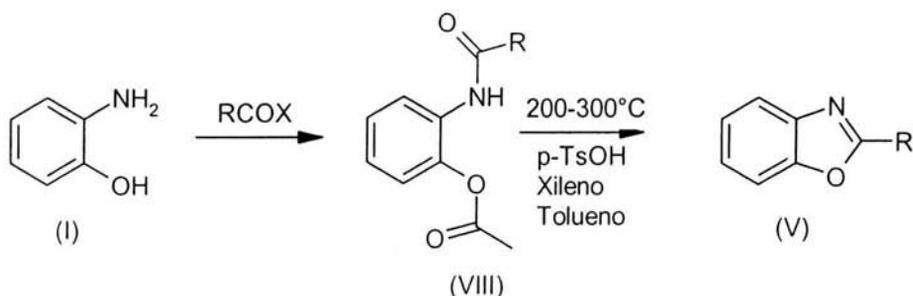
Otra ruta sintética comúnmente usada para obtener benzoxazoles 2-sustituidos es por medio de la monoacilación de 2-aminofenoles (Greiner *et al*, 1984). Estos compuestos se mezclan con un equivalente del cloruro de ácido apropiado para generar las (2-hidroxifenil)amidas (VII) y posteriormente son tratadas en diferentes condiciones deshidratantes para producir los benzoxazoles deseados (Esquema 5).



B= Condiciones deshidratantes

**Esquema 5.** Obtención de benzoxazoles a partir de N-(2-hidroxifenil)amidas.

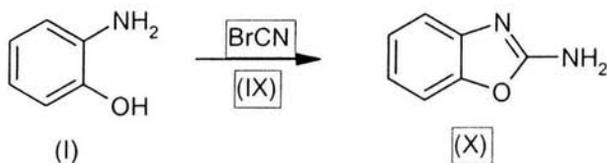
Alternativamente, existen otros métodos sintéticos que utilizan 2-aminofenoles *N*, *O*-diacilados (VIII) para producir benzoxazoles 2-sustituidos. Estos compuestos diacilados son tratados en condiciones pirolíticas a temperaturas entre 200-300 °C o bien, se usan catalizadores como el ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) en disolventes apróticos como el xileno o benceno (De Luca, 1997). Este último método es el de mejores rendimientos (Esquema 6).



**Esquema 6.** Obtención de benzoxazoles a partir de 2-aminofenol N,O-diacilado

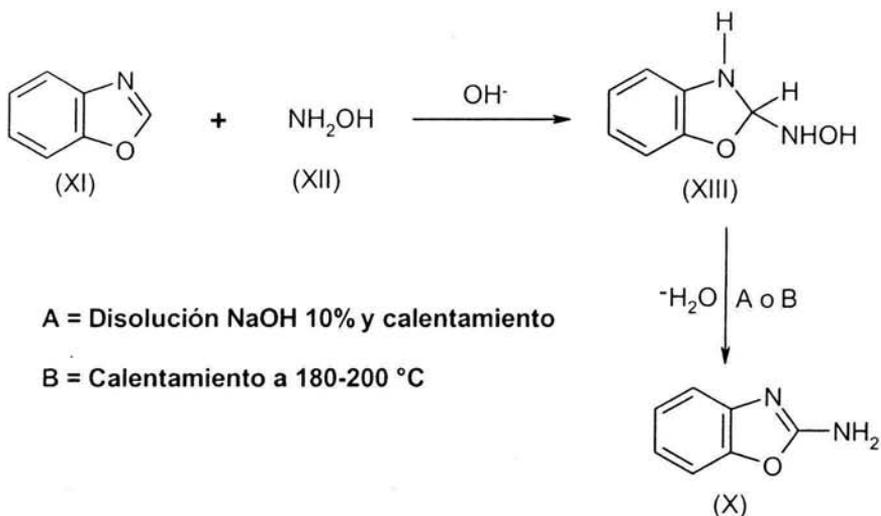
#### 1.14.4 Síntesis de 2-aminobenzoxazoles

Uno de los métodos para obtener 2-aminobenzoxazoles (X) es tratando el 2-aminofenol con bromuro de cianógeno (IX). Este método fue reportado por Leonard *et al* para la síntesis de 2-aminobenzimidazoles. No obstante, también es aplicable para la obtención de benzoxazoles como se muestra en el esquema 7 (Valdez, 2002).



**Esquema 7.** Obtención de 2-aminobenzoxazoles con bromuro de cianógeno.

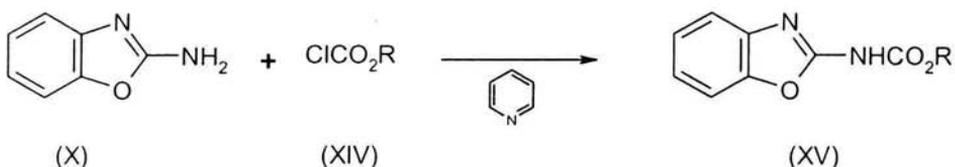
Otro método de obtención de 2-aminobenzoxazoles es a partir de la reacción del benzoxazol (XI) con hidroxilamina (XII) en medio alcalino formando un intermediario 2-hidroxilamino-2,3-dihidrobenzoxazol (XIII), el cual se transforma a 2-aminobenzoxazol al hervir en una disolución al 10% de hidróxido de sodio o de calentarse a una temperatura de 180-200 °C (Osman *et al*, 1982), como se muestra en el esquema 8.



Esquema 8. Obtención de 2-aminobenzoxazol con hidroxilamina.

#### 1.14.5 Síntesis de (benzoxazoles-2-il) carbamato de alquilo.

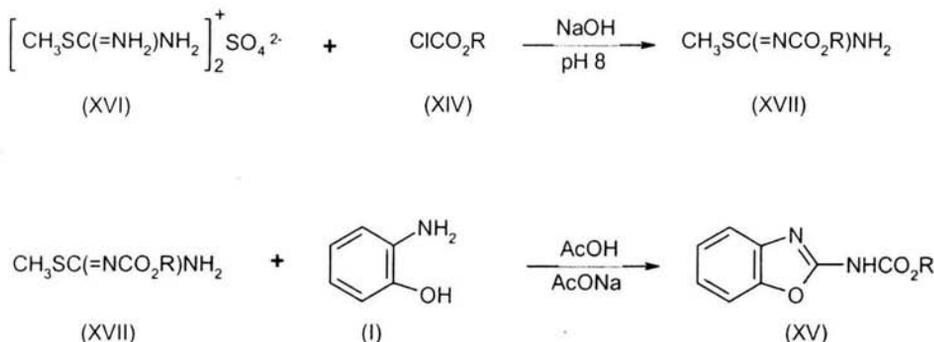
Una de las rutas de síntesis empleada para los 2-carbamato benzoxazoles (XV) es mediante el uso de 2-aminobenzoxazoles y posteriormente acilarlos con un cloroformiato de alquilo apropiado (XIV) usando como disolvente piridina (Hernández, 1990), como se muestra en el esquema 9.



Esquema 9. Obtención de los 2-carbamato benzoxazoles usando cloroformiato de alquilo

Una ruta de síntesis alternativa involucra tratamiento de sulfato de S-metilisotiurea (XVI) con un cloroformiato de alquilo (XIV) adecuado y una base, como por ejemplo, una disolución acuosa de álcali hasta pH 8. Con esto se logra la formación del carboxilato de alquil S-metilisotiurea (XVII). Este producto, sin

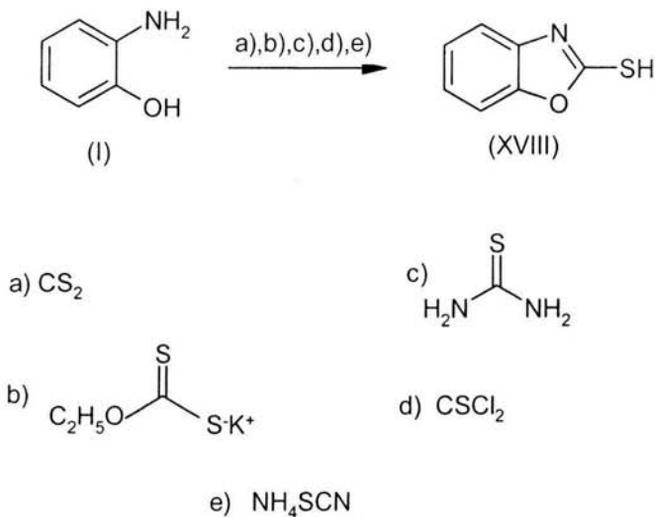
ser aislado, se hace reaccionar con 2-aminofenol generando el benzoxazol deseado, como se muestra en el esquema 10 (Valdez, 2002).



**Esquema 10.** Obtención de los 2-carbamatobenzoxazoles

#### 1.14.6 Síntesis de 2-mercaptobenzoxazoles

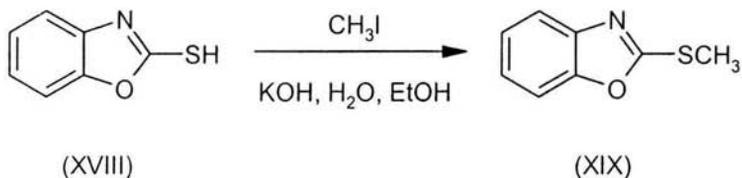
Existen varios procedimientos para la síntesis de los 2-mercaptobenzimidazoles que pueden ser aplicables para obtener los 2-mercaptobenzoxazoles (XVIII). En este caso la materia prima que se emplea es el 2-aminofenol en una mezcla con etil xantato de potasio, etanol y agua sometidos a calentamiento a reflujo, adicionando posteriormente una disolución de ácido acético para precipitar el producto. Algunos procedimientos alternativos incluyen tiourea y ácido clorhídrico en calentamiento a 170-180°C, tiocianato o tiofosgeno en cloroformo o bien el etil xantato de potasio puede sustituirse por hidróxido de potasio y disulfuro de carbono. Estos procedimientos generan buenos rendimientos de 80-90%, como se muestra en el esquema 11 (López, 2001; Van Allan, 1963).



**Esquema 11.** Obtención de 2-mercaptobenzoxazoles.

#### 1.14.7 Síntesis de 2-(metilitio)benzoxazoles

La manera más sencilla de obtener derivados del 2-metilthiobenzoxazol (XIX) es por medio de los 2-mercaptobenzoxazoles, al hacerlos reaccionar con yoduro de metilo en medio básico como se muestra en el esquema 12 (López, 2001; Sánchez, 1999 y Valdez, 2002).

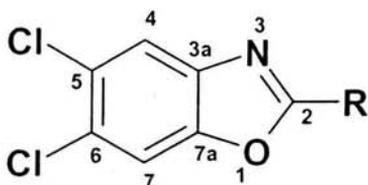


**Esquema 12.** Obtención del 2-(metilitio)-benzoxazol.

En la presente investigación se propone la síntesis de 7 compuestos benzoxazoles diclorados, tomando como punto de referencia el núcleo del bencimidazol y realizando modificaciones racionales en la búsqueda de

relaciones estructura química-actividad biológica, que permitan enriquecer los datos hasta ahora obtenidos para el diseño de nuevas moléculas (Tabla 5). La actividad biológica de los compuestos sintetizados será evaluada empleando como parásitos modelo a *G. intestinalis* y *E. histolytica*. La parte química de este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio 122, Facultad de Química, Edificio E, Departamento de Farmacia, UNAM y la parte biológica en el Laboratorio de Parasitología de la UIMEIP-Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS. Este estudio aportará mayor información sobre los requerimientos estructurales de moléculas con actividad antiprotozoaria.

**Tabla 5. Estructura de los 5,6-Diclorobenzoxazoles 2-sustituídos que se sintetizarán**



COMPUESTO	R
7	H
8	CH <sub>3</sub>
9	CF <sub>3</sub>
10	SH
11	SCH <sub>3</sub>
12	NH <sub>2</sub>
13	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las infecciones y enfermedades producidas por parásitos protozoarios y helmintos en humanos son de gran importancia médica, especialmente en los países en vías de desarrollo. En la actualidad se considera al tratamiento quimioterapéutico de las enfermedades parasitarias como una de las mejores alternativas de 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.

Por lo anterior, resulta necesario el diseño, síntesis y evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. Es recomendable que su síntesis sea fácil, de bajo costo y que los nuevos compuestos tengan mejores características físicoquímicas que reditúe en el beneficio de los pacientes. **Un aspecto de gran importancia en este proceso, es la selección de los compuestos en base a su actividad biológica *in vitro*, que permitirá posteriormente su evaluación empleando modelos experimentales y una vez que demuestren ser activos, el siguiente paso implica estudios clínicos.**

Este trabajo de tesis pretende aportar información básica realizando la síntesis de benzoxazoles 2-sustituídos, lo que permitirá conocer la importancia del grupo -NH de la posición 1 del bencimidazol al reemplazarla por un oxígeno de manera isótera. Este estudio aportará mayor información sobre los requerimientos estructurales de moléculas con actividad antiparasitaria.

### 3. OBJETIVO GENERAL

---

- ❖ Determinar la actividad antiprotozoaria "in vitro" de una serie de 5,6-Diclorobenzoxazoles con diferentes sustituyentes en la posición 2, para aportar información básica acerca de la influencia del reemplazo del grupo -NH en el anillo de imidazol del núcleo bencimidazólico, por un átomo de oxígeno.

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Sintetizar los 5,6-Diclorobenzoxazoles sustituidos en la posición 2 por métodos sencillos, a partir de materias primas accesibles.
- ❖ Aislar, purificar y determinar algunas de las constantes físicas más importantes de los compuestos sintetizados (punto de fusión y  $R_f$ ).
- ❖ Identificar y caracterizar los compuestos finales así como a sus precursores por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- ❖ Determinar la actividad *in vitro* de los compuestos que se sintetizaron, sobre los protozoarios *G. intestinalis* y *E. histolytica*.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 6 se observa que el rendimiento del compuesto 2 fue regular (50%) debido a que la síntesis del nitrofenol generó una mezcla de isómeros, la cual se separó por cromatografía en columna.

Tabla 6. Constantes físicas y rendimientos de los compuestos sintetizados

No.	Rendimiento (%)	Cristales	Estado Físico	$R_f$ (sistema+)	Pf °C	Pf reportado °C
2	49.80	Hexano	Agujas amarillas	0.30 (IV)	66.5-67.1	67 <sup>1</sup>
3	93.63	----	Polvo rojo-vino	0.33 (I)	169.2-170.6	171-172 <sup>1</sup>
4	75.30	Tolueno	Cristales café	0.36 (II)	208.7-209.2	209 <sup>1</sup>
5	72.81	Tolueno-Acetona	Agujas amarillas	----	----	----
6	64.96	Tolueno	Hojuelas blancas	0.40 (II)	224.8-225.3	----
7	39.43	Metanol	Agujas blancas	0.46 (IV)	117.7-118.4	118 <sup>2</sup>
8	54.46	Metanol	Agujas blancas	0.48 (IV)	152.6-153.2	153 <sup>2</sup>
9	53.52	Metanol	Agujas blancas	0.50 (IV)	78.4-79.1	----
10	80.40	Metanol	Cristales blancos	0.51 (II)	227.3-227.7	----
11	75.21	Metanol-Acetona	Agujas blancas	0.47 (III)	138.7-139.7	----
12	70.60	Benceno	Cristales naranjas	0.46 (II)	247.9-248.4	----
13	44.50	-----	Polvo blanco	0.32 (II)	239.7-240.3	----

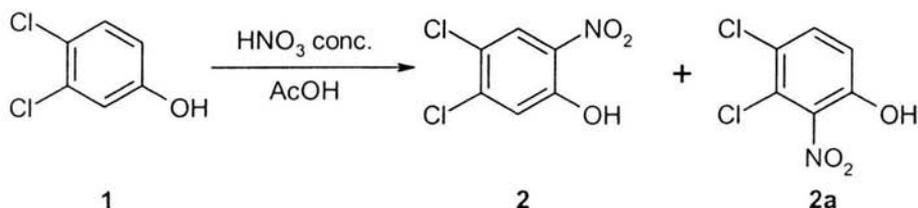
+ Sistema I CHCl<sub>3</sub>-MeOH 99 : 1  
Sistema III Hex.-AcOEt 95 : 5

Sistema II CHCl<sub>3</sub>-MeOH 90 : 10  
Sistema IV Hex.-AcOEt 85 : 15

- 1) Handbook of Chemistry and Physics, Vol. II, 3<sup>rd</sup> edition.
- 2) Chemical Abstrac 40, 12519 (1944).

Antes de establecer las condiciones de reacción mencionadas en la síntesis de materias primas (pág. 51) se realizaron algunas pruebas con el objetivo de mejorar el rendimiento de dicha reacción. Inicialmente, la reacción de nitración se realizó con mezcla sulfonítrica ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a una temperatura entre 0-5 °C, observándose la formación de dos fases heterogéneas bien definidas, una líquida y otra semisólida que se adhería al agitador magnético y no se obtuvo el resultado adecuado.

Un método alternativo consistió en utilizar ácido acético glacial como disolvente y ácido nítrico concentrado como agente nitrante entre 0-5 °C. En estas condiciones la reacción procedió en una sola fase (líquida), obteniéndose un 30% de rendimiento del compuesto deseado. El otro compuesto que se obtenía, era el isómero 3,4-Dicloro-2-nitrofenol **2a**, que era el compuesto no deseado (Esquema 13).



**Esquema 13. Isómeros obtenidos en la reacción de nitración.**

Finalmente, con el afán de mejorar el rendimiento arriba mencionado se repitió dicha reacción conservando el disolvente y la temperatura de reacción, sin embargo como agente nitrante se empleó  $\text{HNO}_3$  diluido (95, 90, 85, 80, 75, 70%) en agua, obteniéndose el 32, 37, 40, 50, 52 y 53% de rendimiento respectivamente, motivo por el cual la técnica que se empleó a mayor escala fue con  $\text{HNO}_3$  al 80% que fue donde se observó el cambio más drástico en cuanto a rendimiento.

Con respecto a los datos espectroscópicos, en el espectro de infrarrojo (No.1) se observó una banda característica de  $-\text{OH}$  que se encontró en  $3278\text{ cm}^{-1}$ . Ésta fue una banda ancha y de baja intensidad debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre los oxígenos del grupo nitro y el hidrógeno del grupo hidroxilo. Las bandas características del grupo nitro fueron dos, la primera apareció en  $1515\text{ cm}^{-1}$ , generada por un alargamiento asimétrico N-O y la segunda se encontró en  $1312\text{ cm}^{-1}$ , originada por el alargamiento simétrico N-O.

En lo que se refiere al espectro de masas (No.2) se observó el pico base con una relación  $m/z$  de 207 que corresponde al ión molecular, así como un pico  $m/z$  209 ( $M+2$ ) con una abundancia del 66% que es característico de la presencia de dos átomos de cloro<sup>a</sup>. Éste mostró la pérdida de los radicales  $-\text{OH}$  ( $M^+ -17$ ),  $-\text{NO}$  ( $M^+ -30$ ),  $-\text{NO}_2$  ( $M^+ -46$ ), generando los cationes con  $m/z$  190, 177 y 161 respectivamente, los últimos dos se fragmentaron perdiendo 28 unidades ( $-\text{CO}$ ) para formar los

caciones  $m/z$  149 y 133 respectivamente. El fragmento de  $m/z$  133 perdió un radical hidrógeno para dar el catión radical  $m/z$  132. Por último, el catión radical  $m/z$  132 perdió un radical  $-Cl$  ( $M^+ -35$ ) para generar el catión de  $m/z$  97. La abundancia de los picos fue menor al 30%.

a) Este ión ( $M+2$ ) se observó en los espectros de todos los compuestos sintetizados.

En el espectro de RMN  $^1H$  (No.3) aparecieron tres señales, que correspondieron a tres tipos de protones en ambientes electrónicos diferentes. La primera señal apareció en 7.33 ppm, integró para un protón y tuvo la forma de un doblete (d). Esta señal se asignó a H-6 porque está en posición *orto* al grupo hidroxilo que lo "protege", desplazándolo a campo alto. Este protón presentó acoplamiento con el protón H-3, con una constante de acoplamiento  $J_{para}$  de 0.3 Hz. La segunda señal apareció en 8.23 ppm, que integró para un protón con la forma de doblete (d). Esta señal se asignó a H-3 porque está en posición *orto* al grupo nitro que lo "desprotege" desplazándolo a campo bajo. Este hidrógeno mostró acoplamiento con el protón H-6, con una constante de acoplamiento  $J_{para}$  de 0.3 Hz. Finalmente, la tercera señal apareció en 10.47 ppm, integró para un protón y presentó la forma de singulete, el cual desapareció por intercambio con agua deuterada, este protón fue asignado al hidrógeno del grupo hidroxilo.

Para la reducción catalítica del compuesto **2** se empleó Niquel-Raney para evitar la descloración y etanol como disolvente. El tiempo de reacción fue relativamente corto (25 min.) y no fue necesario aplicar temperatura para que dicha reacción se llevara a cabo. El rendimiento obtenido fue del 93.63%

Con respecto a los datos espectroscópicos, en el espectro de masas (No.4) se observó el pico base con una relación  $m/z$  de 177, que pertenece al ión molecular, así como un pico  $m/z$  179 ( $M+2$ ) con una abundancia del 66% que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. El patrón de fragmentación mostró un pico de  $m/z$  176 ( $M^+ -1$ ), que correspondió a la pérdida del radical H. Este pico se fragmentó nuevamente perdiendo 28 unidades ( $-CO$ ) y generó la especie catiónica  $m/z$  148, sin embargo los picos del espectro son de baja abundancia relativa, menor al 20%.

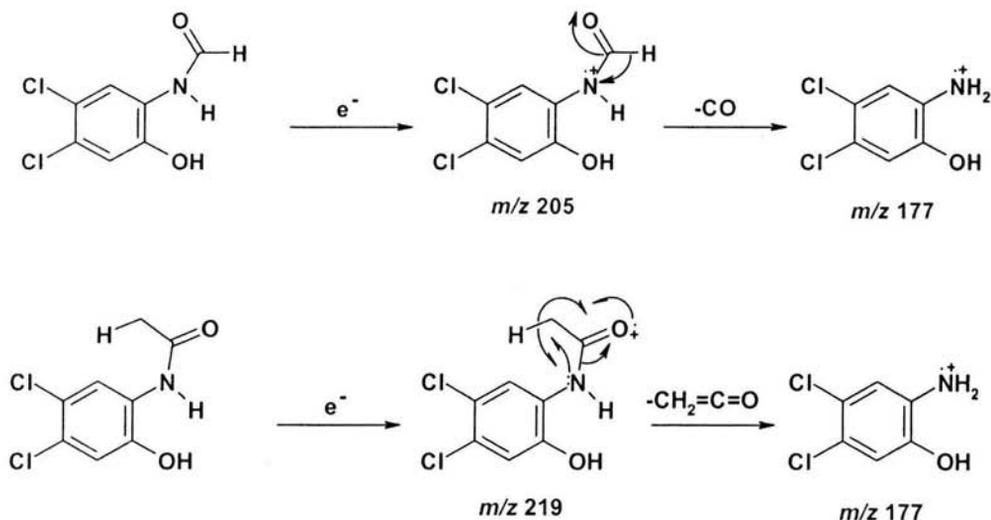
El espectro de RMN  $^1H$  (No. 5) mostró cuatro señales, que fueron asignadas de la siguiente manera: la primera señal se observó como un singulete en 4.63 ppm, que integró para 2 protones y desapareció por intercambio con agua deuterada, esta señal fue asignada a los protones del grupo amino. La segunda señal apareció en 6.82 ppm en forma de singulete, que integró para un protón y correspondió a H-3 porque tiene una posición *orto* al grupo amino, el cual "protege" a este hidrógeno y lo desplaza a mayor campo. La tercera señal se encontró en 6.84 ppm en forma de singulete, que integró para un protón y correspondió a H-6 puesto que tiene en posición *orto* al grupo hidroxilo (grupo electronegativo) que "desprotege" a este hidrógeno desplazándolo a menor campo. La última señal apareció en 8.73 ppm,

fue un singulete ancho que integró para un protón y desapareció por intercambio con agua deuterada, esta señal se asignó al protón del grupo hidroxilo.

Con respecto a la síntesis de los compuestos **7**, **8** y **9**, primero se prepararon las amidas **4**, **5** y **6** respectivamente a partir de **3** con los ácidos o anhídridos de ácido adecuados, una vez formadas, éstas se aislaron y caracterizaron con algunas constantes físicas (como se muestra en la Tabla No. 6), así como datos espectroscópicos y espectrométricos, que a continuación se describen.

En el espectro de infrarrojo del compuesto **4** (No.6) se observó la banda de 3389  $\text{cm}^{-1}$  generada por el alargamiento N-H. También la banda característica del grupo carbonilo en 1665  $\text{cm}^{-1}$ . Otra banda fue la formada por la flexión fuera del plano (N-H) que apareció en 1527  $\text{cm}^{-1}$ . En este espectro también se observó la ausencia de la banda en 3600  $\text{cm}^{-1}$ . En cambio, apareció una banda ancha y de baja intensidad en la región de 3070  $\text{cm}^{-1}$ , debido probablemente a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo y el nitrógeno de la amida.

En lo que se refiere al espectro de masas (No.7) se observó el ión molecular con una relación  $m/z$  de 205 y una abundancia del 45%, así como un pico  $m/z$  207 ( $M+2$ ) con una abundancia del 28% que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. El pico base mostró una relación  $m/z$  de 177 que se formó a partir de la fragmentación del ión molecular, por el desprendimiento de una molécula neutra de CO (Esquema 14).



**Esquema 14.** El compuesto **4** se ioniza generando el ión molecular con  $m/z$  205 que luego se fragmenta en una especie más estable  $m/z$  177, por la pérdida de una molécula neutra de monóxido de carbono.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.8) se observó la primera señal en 7.01 ppm la cual integró para un protón y tuvo la forma de un singulete. Esta señal se asignó al H-6 que apareció a campo más alto que H-3, por el efecto "protector" del grupo hidroxilo. La segunda señal apareció en 8.28 ppm, integró para un protón y fue asignado al protón del grupo aldehído. Esta señal apareció con la forma de doblete (d) por el acoplamiento con el protón de la amida, con una constante de acoplamiento  $J$  1.8 Hz; lo anterior se confirmó con el intercambio con agua deuterada, observándose la simplificación de la señal (singulete). La tercera señal apareció en 8.34 ppm, integró para un protón, presentó la forma de singulete y fue asignado al H-3, ya que apareció a campo más bajo por el efecto "desprotector" *orto* del grupo formamida. La siguiente señal apareció en 9.83 ppm, fue un singulete que integró para un protón y desapareció con el intercambio con agua deuterada, este protón fue asignado al hidrógeno de la amida. La última señal apareció en 10.84 ppm, fue un singulete que integró para un protón y desapareció por intercambio con agua deuterada, este protón fue asignado al hidrógeno del grupo hidroxilo.

En lo que se refiere al espectro de masas del compuesto **5** (No.9) el cual no se purificó, se observó el ión molecular con una relación  $m/z$  de 219 y una abundancia del 23%, así como un pico  $m/z$  221 (M+2) con una abundancia del 6%. El pico base mostró una relación  $m/z$  de 177 el cual se formó a partir de la fragmentación del ión molecular, por el desprendimiento de una molécula neutra de  $-\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$  (Esquema 14).

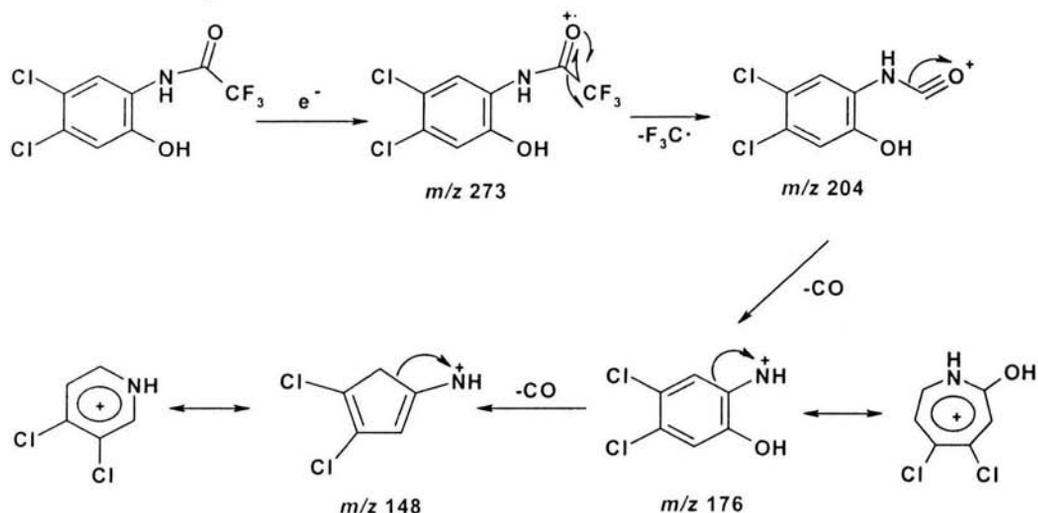
Adicionalmente se observó otro patrón de fragmentación en la que se observó el ión molecular con una relación  $m/z$  de 261 y una abundancia relativa del 2%, así como un pico  $m/z$  263 (M+2) con una abundancia del 0.5%. El pico base del espectro mostró una relación  $m/z$  de 177 que se formó a partir de la fragmentación del ión molecular por la pérdida consecutiva de dos moléculas neutras de  $-\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ . Con los datos aquí obtenidos se sugiere la presencia de la mezcla del compuesto monoacetilado (*N*-acetilado) con el compuesto diacetilado (*N,O*-diacetilado).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.10) se observó la primera señal en 2.08 ppm, integró para tres protones y tuvo la forma de un singulete. Esta señal se asignó al grupo metilo  $\alpha$  al carbonilo de la amida. La segunda señal apareció en 7.56 ppm, integró para un protón y tuvo la forma de singulete. Esta señal se asignó a H-3. La tercera señal apareció en 8.26 ppm, que integró para un protón y tuvo la forma de singulete. Esta señal se asignó a H-6. La siguiente señal apareció en 9.65 ppm, fue un singulete que integró para un protón y desapareció por el intercambio con agua deuterada, este protón fue asignado al hidrógeno de la amida.

Adicionalmente se observó una señal en 2.17 ppm, integró para tres protones y tuvo la forma de singulete. Esta señal se asignó al grupo metilo  $\alpha$  al carbonilo del acetilo. Esta señal, además de la ausencia de un protón intercambiable con agua deuterada (el del hidroxilo), refuerza la idea de que esta mezcla es la mencionada anteriormente.

En el espectro de infrarrojo del compuesto **6** (No.11) se observó la banda de 3385  $\text{cm}^{-1}$  generada por el alargamiento N-H. También la banda característica del grupo carbonilo en 1702  $\text{cm}^{-1}$ . Otra banda fue la formada por la flexión fuera del plano (N-H) que aparece en 1556  $\text{cm}^{-1}$ . En este espectro también se observó la ausencia de la banda en 3600  $\text{cm}^{-1}$ . En cambio, apareció una banda ancha y de baja intensidad en la región de 3248  $\text{cm}^{-1}$ , debido probablemente a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo y el nitrógeno de la amida. Además, presentó dos bandas de alargamiento asimétrico ( $\text{CF}_3$ ) en 1340 y 1197  $\text{cm}^{-1}$  y una de alargamiento simétrico ( $\text{CF}_3$ ) en 1163  $\text{cm}^{-1}$ .

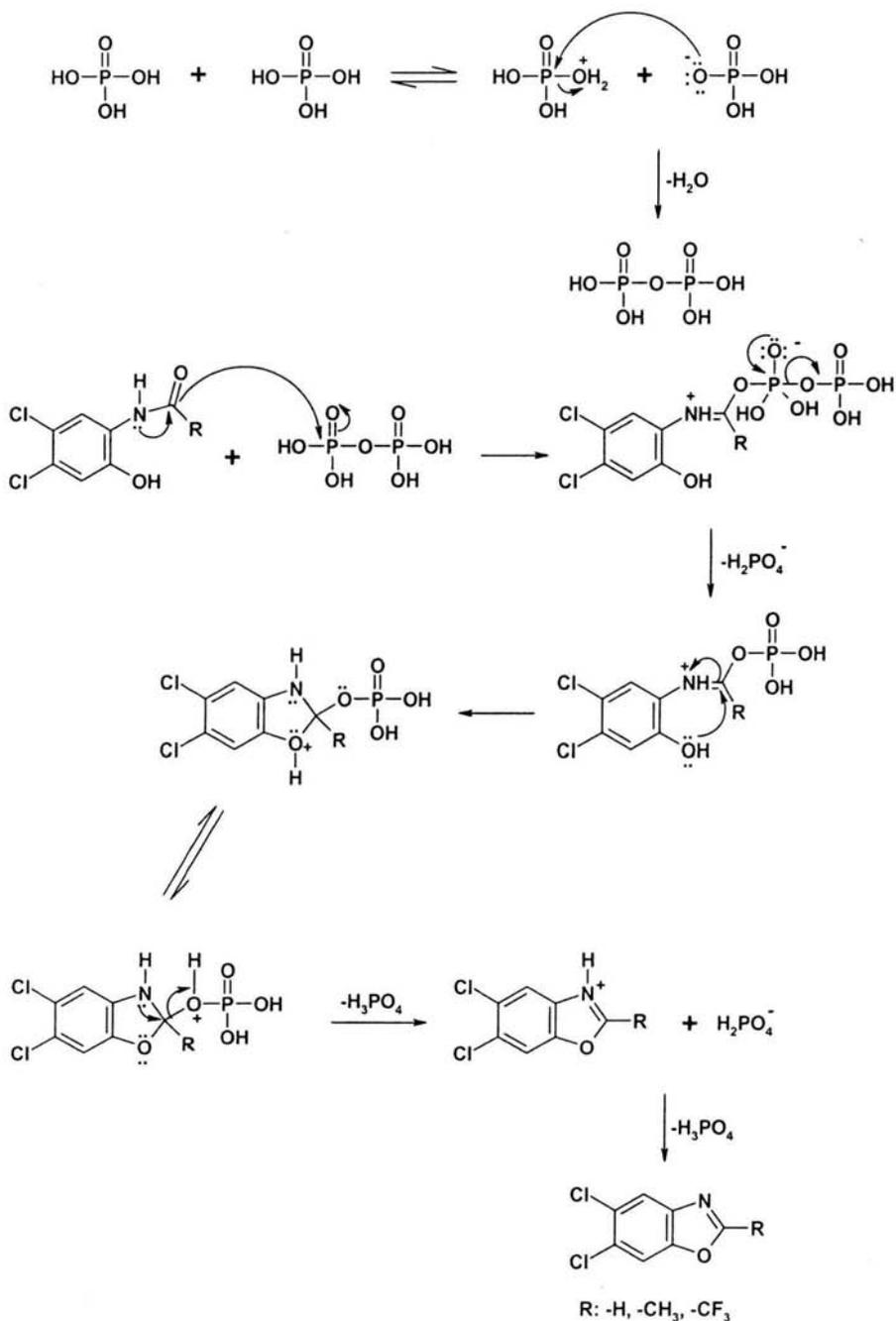
En lo que se refiere al espectro de masas (No.12) se observó el ión molecular que correspondió al pico base del espectro, con una relación  $m/z$  de 273, así como un pico  $m/z$  275 ( $M+2$ ) con una abundancia del 67% que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. Por otra parte, se presentó un pico con una abundancia relativa de 85% y una relación  $m/z$  de 204. Este pico se generó por la ruptura del grupo trifluorometilo  $\alpha$  al grupo carbonilo. El catión radical con una relación  $m/z$  de 177 no se formó por la ausencia de hidrógenos  $\alpha$  al grupo carbonilo, pero se produjo un catión con una relación  $m/z$  de 176 y una abundancia relativa del 83%. Este se formó a partir de la pérdida de una molécula neutra de CO del ión  $m/z$  de 204 y finalmente, este fragmento de  $m/z$  176 sufrió la pérdida de una molécula de CO para generar la especie catiónica de  $m/z$  148 y una abundancia relativa de 43% (Esquema 15).



**Esquema 15.** El compuesto **6** se ioniza generando el ión molecular de  $m/z$  273, que además es el pico base del espectro, para luego fragmentarse en una especie más estable de  $m/z$  204, esta a su vez, por la pérdida consecutiva de dos moléculas neutras de monóxido de carbono genera las especies  $m/z$  176 y 148 respectivamente.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.13) se observaron tres señales. La primera señal apareció en 7.11 ppm, integró para un protón y tuvo la forma de un singulete. Esta señal se asignó a H-6 ya que apareció a campo más alto que H-3, por el efecto "protector" del grupo hidroxilo. La segunda señal apareció en 7.63 ppm, que integró para un protón, apareció con la forma de singulete y fue asignado al H-3, ya que apareció a campo más bajo por el efecto "desprotector" orto del grupo trifluoroacetamida. La última señal apareció en 10.75 ppm, fue un singulete ligeramente ancho, que integró para dos protones y desapareció por intercambio con agua deuterada. Esta señal se asignó al protón de la amida y al protón del grupo hidroxilo. La razón de que el protón de la amida aparezca en un campo tan bajo se debe probablemente a la presencia del grupo trifluorometilo que lo desprotege.

Las amidas se trataron con un agente deshidratante (ácido polifosfórico) y se obtuvieron los 2-alquilbenzoxazoles **7**, **8** y **9**. La reacción consistió en una ciclodeshidratación, en la cual el oxígeno del carbonilo de la (4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)amida actuó como nucleófilo y atacó a uno de los átomos de fósforo del intermediario tipo ácido pirofosfórico. Después, el grupo hidroxilo atacó nucleofilicamente al carbono del carbonilo que se comporta más electrofílico por la presencia de una carga positiva aledaña a él, formándose un ciclo de cinco miembros que por equilibrios ácido base generó los benzoxazoles correspondientes (Esquema 16).



Esquema 16. Mecanismo de ciclodeshidratación de (4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)amidas para generar los benzoxazoles.

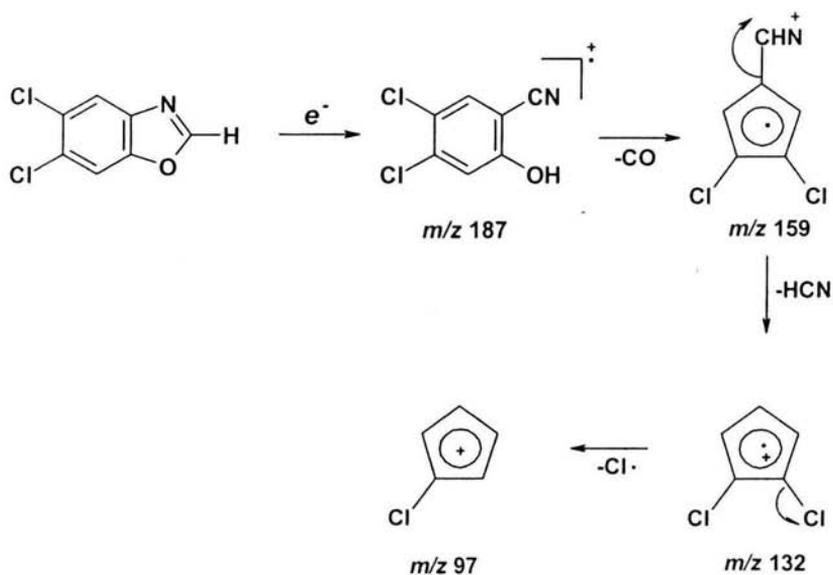
Esta ruta de síntesis tuvo la ventaja de ser fácil de trabajar y además se emplearon materias primas conocidas y reportadas en la literatura que fueron sencillas de sintetizar. La asignación de los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos **7**, **8** y **9** se describe a continuación.

Las bandas características comunes en los espectros de infrarrojo de los compuestos **7**, **8** y **9** (Nos.14, 17 y 20), que permitieron identificar algunos grupos funcionales fueron las siguientes: primero se observó la banda de 3070-3099  $\text{cm}^{-1}$ , característica de  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ; esta indicó la presencia de una olefina o un anillo aromático. La presencia de varias bandas alargadas y de intensidad media en la región de 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$  corroboraron la presencia del grupo fenilo. En la zona de 1720-1750  $\text{cm}^{-1}$  apareció una banda de baja intensidad generada probablemente por la deformación en el plano del enlace C-O ( $\text{N}=\text{CO}$ ). Finalmente, en 1260-1290  $\text{cm}^{-1}$  se observó una banda de base ancha y de gran intensidad, producida por el alargamiento C-O ( $=\text{C}-\text{O}$ ).

En el caso del compuesto **8**, adicionalmente, se observó en 3009  $\text{cm}^{-1}$  una banda angosta de baja intensidad formada por el alargamiento del enlace C-H del grupo metilo. Esta banda se confirmó con las bandas de deformación C-H de 1379 y 1446  $\text{cm}^{-1}$ .

Para el compuesto **9** se encontró en la región de 1150-1360  $\text{cm}^{-1}$  tres bandas alargadas y de gran intensidad, originadas por el alargamiento simétrico y asimétrico C-F.

En el espectro de masas del compuesto **7** (No.15) se observó el pico base con una relación  $m/z$  de 187, que pertenece al ión molecular, este se isomerizó a una especie catiónica radical (4,5-dicloro-2-hidroxibenzonitrilo) y perdió un fragmento de CO. En el patrón de fragmentación, este pico apareció con una abundancia relativa de 27% y una relación de  $m/z$  159. Esta especie se fragmentó con pérdida de HCN como molécula neutra, que dio lugar a otro catión radical con un  $m/z$  de 132 y una abundancia relativa del 10%. Finalmente, se fragmentó un radical cloro y se formó el catión de  $m/z$  97 con una abundancia relativa del 21% (Esquema 17).



**Esquema 17.** El compuesto 7 se ioniza generando el ión molecular con  $m/z$  187 que además es el pico base del espectro. Este sufre una transposición formando el (4,5-dicloro-2-hidroxibenzonitrilo), que pierde un fragmento neutro (CO) formando una especie estable con  $m/z$  159. Esta especie se vuelve a fragmentar perdiendo una molécula neutra de HCN, generando la especie catiónica radical con  $m/z$  132.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 7 (No.16) aparecieron tres señales que integraron para un protón cada una y fueron asignadas de la siguiente manera: en 8.15 ppm, un singulete asignado para H-4, fue la señal que apareció a campo más alto probablemente por el mayor efecto protector del átomo de nitrógeno del anillo oxazólico, que el generado por el átomo de oxígeno en el mismo anillo que desplaza a un campo un poco más bajo a H-7. Por tal razón, la señal que apareció en 8.23 ppm correspondió a H-7. Finalmente, la tercera señal que apareció como un singulete a 8.87 ppm se designó al hidrógeno de la posición 2 del anillo benzoxazólico.

Por otra parte, en el espectro de masas realizado por impacto electrónico (No.18) del compuesto 8, se observó que el pico base tuvo una relación  $m/z$  de 201, asignada al ión molecular. El patrón de fragmentación de este compuesto es similar al del compuesto 7, con pérdidas consecutivas de CO y HCN, generando los cationes radicales con  $m/z$  173 y 146 respectivamente, con una abundancia relativa

menor al 5%. Sin embargo, el fragmento de  $m/z$  173 sufre la pérdida de un radical cloro para generar la especie catiónica de  $m/z$  138 con una abundancia relativa del 26%.

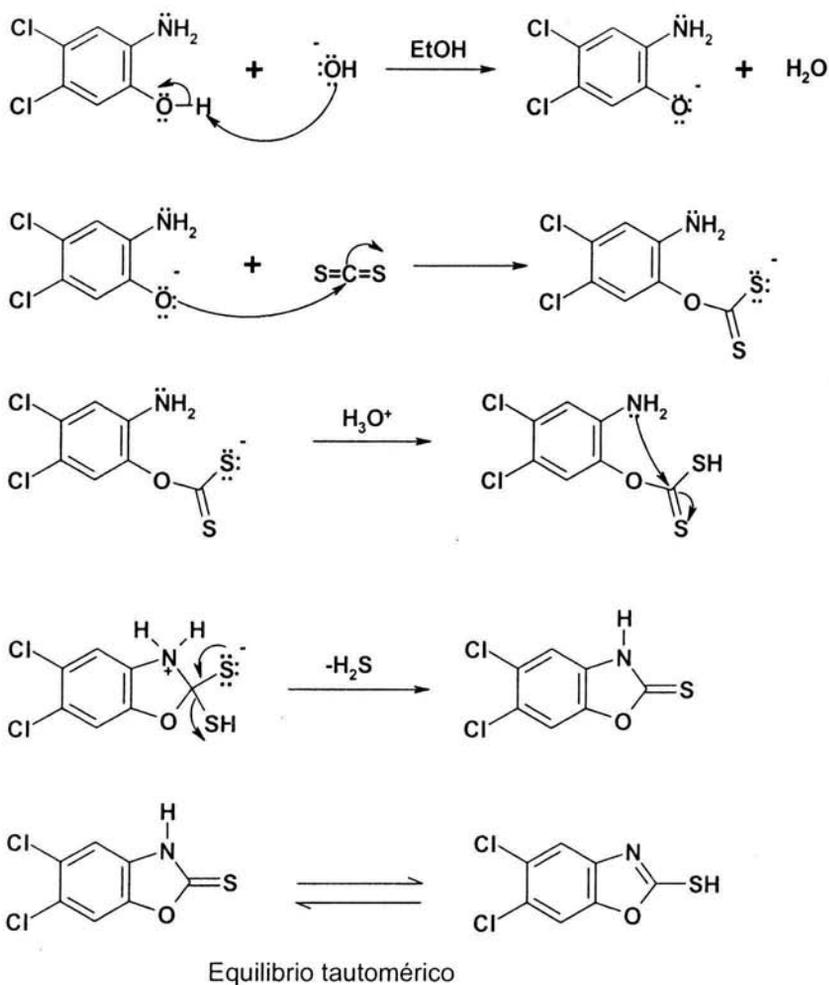
En el caso del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **8** (No.19) apareció una señal en 2.64 ppm (singulete), que integró para 3 protones y fue asignada a los hidrógenos del grupo metilo en la posición 2 del anillo de benzoxazol. La siguiente señal apareció en 7.60 ppm (singulete) que fue asignada a H-4. La última señal se encontró en 7.73 ppm. La asignación de estas dos últimas señales se hizo tomando en cuenta el mayor efecto protector del nitrógeno sobre el oxígeno (del anillo oxazólico) que "protege" más la señal de H-4 con respecto de H-7.

Para el espectro de masas del compuesto **9** (No.21) se observó que el pico base del espectro tuvo una relación  $m/z$  de 255 asignada al ión molecular. En el patrón de fragmentación se observó la pérdida de un radical flúor ( $\text{M}^+-19$ ) generando un catión de  $m/z$  236. También se observó la fragmentación característica de  $\text{CF}_2$  ( $\text{M}^+-50$ ) (Calderón, 1986), con transposición de un átomo de flúor. La abundancia relativa de estos picos fue menor del 15%.

En el caso del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **9** (No.22) aparecieron dos singuletes en 8.39 y 8.46 ppm, que integraron para un protón cada uno y fueron asignados a H-4 y H-7 respectivamente.

Para corroborar este espectro se realizó el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **9** (No.23), en el cual se observaron ocho señales. La primera señal apareció en 114.44 ppm y correspondió a C-4; la segunda señal se encontró en 116.24 ppm, correspondió al carbono del trifluorometilo, se observó como un cuádruplete por el acoplamiento con los tres átomos de flúor a un enlace de distancia, con una constante de acoplamiento  $J = 271.5$  Hz. La tercera señal apareció en 122.82 ppm, fue asignada a C-7; la cuarta señal se encontró en 129.19 ppm y se asignó a C-5; la quinta señal se encontró en 130.98 ppm, fue asignada a C-6; la sexta señal apareció en 138.77 ppm y correspondió a C3a; la séptima señal apareció en 149.05 ppm, correspondió al C-7a y por último la octava señal se encontró en 152.13 ppm, fue un cuádruplete por el acoplamiento de los átomos de flúor a dos enlaces de distancia, con una constante de acoplamiento  $J = 43.7$  Hz y fue asignada al C-2.

La reacción para obtener el compuesto **10** procedió sin dificultad y se obtuvo como un sólido cristalino con un rendimiento del 80.40%. Esta reacción consistió inicialmente en la formación *in situ* de un intermediario tipo xantato, que fue atacado intramolecular por el grupo hidroxilo formando un ciclo de 5 miembros que por equilibrio tautomérico generó el compuesto deseado (Smith y March, 2001). La reacción produjo un olor característico debido al sulfuro de hidrógeno liberado (Esquema 18).



**Esquema 18.** Mecanismo de reacción del 5,6-Dicloro-2-mercaptobenzoxazol

El espectro de infrarrojo del compuesto 10 (No.24) presentó varias bandas características que permitieron identificar algunos grupos funcionales como fueron: la banda ancha y de baja intensidad en la región de  $3435\text{ cm}^{-1}$  que correspondió al alargamiento  $-\text{SH}$ . Esta banda se traslapó con la banda característica del alargamiento  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$  de olefina o anillo aromático, por lo que dicha banda se asignó en  $3018\text{ cm}^{-1}$ . Se encontraron tres bandas de base ancha y de gran

intensidad generadas por el alargamiento =C-S en 1488, 1455 y 1328  $\text{cm}^{-1}$  (Lide, 1993). También se observaron varias bandas alargadas y de baja intensidad en la región 800-600  $\text{cm}^{-1}$  comunes en los mercaptanos. En este espectro también se observó la ausencia de la banda en 3600  $\text{cm}^{-1}$ .

En el espectro de masas (No.25) se observó el pico base del espectro en una relación  $m/z$  de 219 y se identificó como el ión molecular, así como un pico  $m/z$  221 (M+2) con una abundancia del 70%, que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. En el patrón de fragmentación se observaron las pérdidas de SCO ( $M^+-60$ ), CHO ( $M^+-29$ ) y HCS ( $M^+-45$ ), sin embargo, los picos fueron de baja abundancia relativa, menor al 10%.

En el caso del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.26) mostró tres señales, que fueron asignadas de la siguiente manera: la primera señal se observó como un singulete en 7.45 ppm, integró para un protón y se asignó a H-4. La segunda señal apareció en 7.91 ppm en forma de singulete, que integró para un protón y correspondió a H-7. La última señal apareció en 13.96 ppm, fue un singulete ancho que integró para un protón y desapareció por intercambio con agua deuterada, esta señal se asignó al protón del tiol.

El compuesto **11** se obtuvo fácilmente y con buen rendimiento (75.21%) a partir de **10** más yoduro de metilo. Este compuesto tuvo un punto de fusión menor que el de su análogo tiol.

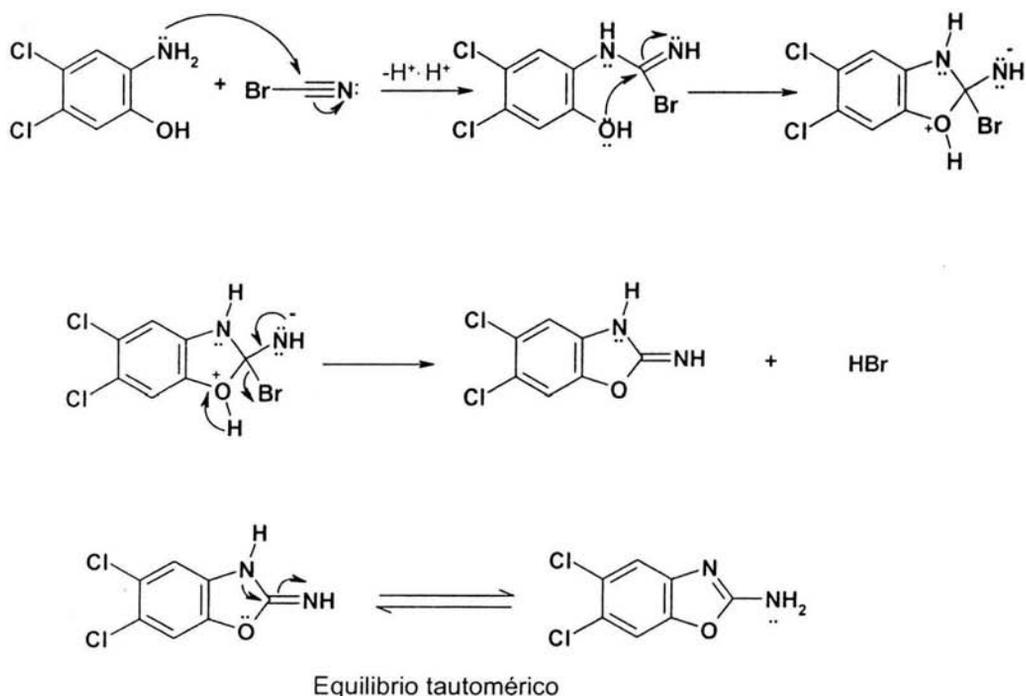
En la caracterización de este compuesto, el espectro de infrarrojo (No.27) presentó una banda en la región de 3047  $\text{cm}^{-1}$ , característica del alargamiento -C=C-H de olefina o anillo aromático. La presencia de varias bandas alargadas e intensas en la región 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$  corroboraron la presencia del anillo aromático. En 2920  $\text{cm}^{-1}$  se observó una banda angosta de baja intensidad, formada por el alargamiento C-H del grupo metilo. Esta banda se confirmó con las bandas de deformación C-H de 1325 y 1455  $\text{cm}^{-1}$ . Por último en 848  $\text{cm}^{-1}$ , se observó la banda de vibración C-S.

El espectro de masas (No.28) presentó un pico base con una relación  $m/z$  de 233 y se identificó como el ión molecular, así como un pico  $m/z$  235 (M+2) con una abundancia del 70% que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. En el patrón de fragmentación se observó un pico con una relación  $m/z$  de 218 y una abundancia relativa de 38%, este fragmento se originó por la pérdida del radical metilo. De este catión se fragmentó una molécula de CO para generar la especie catiónica con  $m/z$  de 190 y una abundancia relativa de 49%. También se observó un fragmento catiónico de  $m/z$  200 con una abundancia relativa del 73%, el cual se formó a partir del ión molecular con la pérdida del radical HS $\cdot$ .

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.29). En este se observó una señal en forma de singulete en 2.75 ppm, que integró para tres protones, esta se asignó a los hidrógenos del grupo metilo. La siguiente señal, en forma de singulete, apareció en 7.96 ppm, que integró para un protón y fue asignada para H-4. Por último, en 8.08

ppm se observó una señal en forma de singulete, que integró para un protón y que se designó para H-7.

El compuesto **12** se sintetizó con un 70.60% de rendimiento, dando un sólido cristalino. Esta reacción consistió en una sustitución nucleofílica sobre el bromuro de cianógeno, por parte de **3** (Esquema 19); esto formó un intermediario imino que fue atacado intramolecularmente por el grupo hidroxilo formando un ciclo de cinco miembros que por equilibrio tautomérico generó el compuesto esperado (Elguero *et al.* 1978).



**Esquema 19.** Mecanismo de reacción del 2-Amino-5,6-diclorobenzoxazol.

Las bandas características en el espectro de infrarrojo del compuesto 12 (No.30) fueron las siguientes: en 3468 y 3336  $\text{cm}^{-1}$  aparecieron dos bandas de intensidad media, generadas por los alargamientos asimétrico y simétrico ( $-\text{NH}_2$ ) del grupo amino. En la región de 3095  $\text{cm}^{-1}$  se encontró una banda característica de  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$  de olefina o anillo aromático. La presencia de varias bandas alargadas e intensas en la región de 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$  corroboraron la presencia del anillo aromático. En 1694  $\text{cm}^{-1}$  apareció una banda de base ancha y de gran intensidad, originada por el alargamiento  $-\text{C}=\text{N}-\text{H}$ .

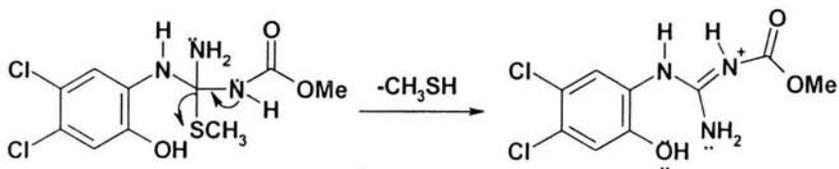
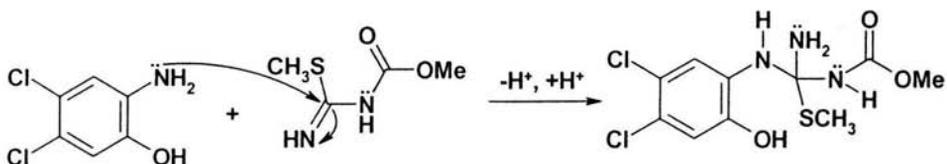
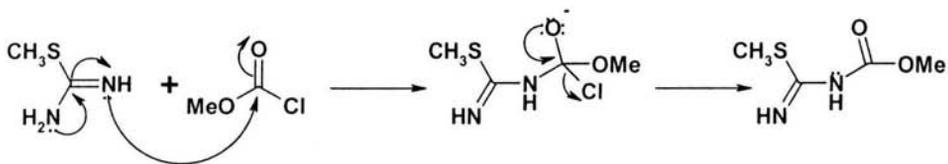
En el espectro de masas (No.31) se observó que el pico base del espectro tuvo una relación  $m/z$  de 202 y se identificó como el ión molecular, así como un pico  $m/z$  204 ( $\text{M}+2$ ) con una abundancia del 67%, que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. En el patrón de fragmentación se apreció la pérdida del radical CHO ( $\text{M}^+-29$ ), generando una especie catiónica de  $m/z$  173 (Calderón, 1986), además se observó la pérdida de OCNH ( $\text{M}^+-43$ ), no obstante los picos fueron de baja abundancia relativa, menor al 10% (Esquema 20).

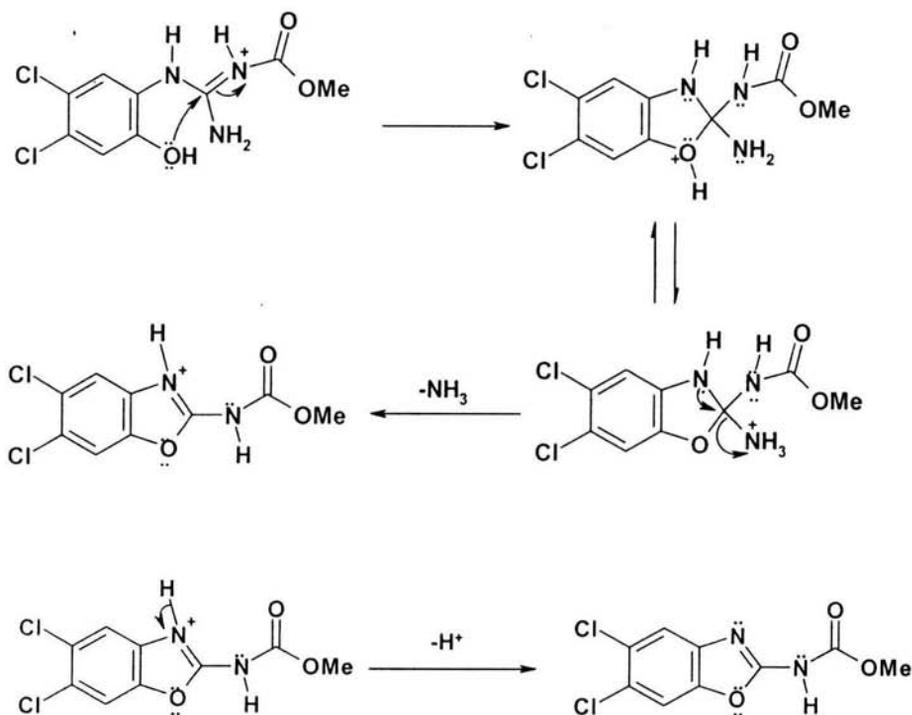


Esquema 20. Patrón de fragmentación característico del 2-Amino-5,6-diclorobenzoxazol.

En el caso del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (No.32) se observó una señal en 7.40 ppm en forma de  $\text{dd}$ , que integró para un protón y se asignó a H-4. La siguiente señal apareció en 7.69 ppm con la forma de singulete y que integró para un protón, fue asignada a H-7. Por último, se observó una señal en 7.76 que desapareció por intercambio con agua deuterada e integró para dos protones. Esta señal se asignó a los hidrógenos del grupo amino.

La ruta de síntesis para obtener el compuesto 13 consistió en formar un carboxilato de alquil *S*-metilisotiourea que junto con 3 dieron el producto deseado con un rendimiento 44.50%. En esta técnica fue necesario cuidar la temperatura y el pH de reacción, así como el uso de trampas de hipoclorito de sodio conectadas en serie, para evitar la fuga del metanotiol que se liberó en la reacción (Esquema 21).



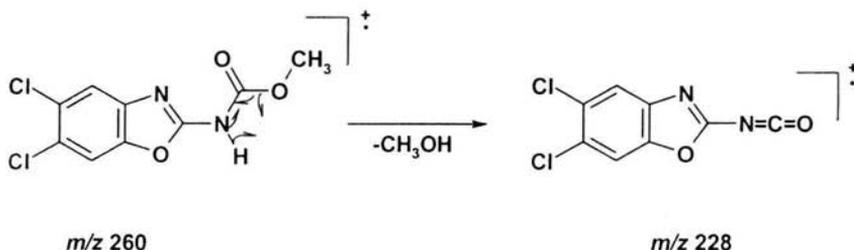


**Esquema 21.** Mecanismo de reacción del (5,6-Diclorobenzoxazol-2-il)carbamato de metilo

Las bandas características en el espectro de infrarrojo del compuesto 13 (No.33) fueron las siguientes: en  $2956\text{ cm}^{-1}$  se observó una banda de baja intensidad formada por el alargamiento C-H del grupo metilo. Esta banda se confirmó con las bandas de deformación C-H de  $1402$  y  $1446\text{ cm}^{-1}$ . En  $1635\text{ cm}^{-1}$  se observó una banda alargada y muy intensa que fue asignada a la tensión  $\text{N}=\text{C}-\text{NH}$ . En  $1743\text{ cm}^{-1}$  apareció una banda ancha y de gran intensidad originada por el grupo carbonilo del carbamato. En  $1230$  y  $1180\text{ cm}^{-1}$  se encontraron dos bandas anchas de gran intensidad generadas por el alargamiento asimétrico y simétrico  $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ .

El espectro de masas (No.34) mostró el pico base del espectro en una relación  $m/z$  de 228, que correspondió a la formación de un catión radical a partir del ión molecular, con pérdida de una molécula de metanol (Esquema 22). Esto confirmó la presencia del N-H del carbamato, ya que este hidrógeno formó parte de la molécula de metanol que se generó. Mientras que el ión molecular tuvo una relación  $m/z$  de 260 y una abundancia relativa del 87%, así como un pico  $m/z$  262 (M+2) con una abundancia del 59%, que es característico de la presencia de dos átomos de cloro. En el patrón de fragmentación se observó un pico con una relación  $m/z$  de 202 por la pérdida del radical  $M^+ -58$ .

Por último, en el espectro de RMN  $^1H$  (No.35) se observó una señal en forma de singulete en 3.92 ppm, que integró para tres protones, esta se asignó a los hidrógenos del grupo metilo. La siguiente señal en forma de singulete apareció en 7.09 ppm, que integró para un protón y fue asignada para H-4. Otra señal en forma de sigulete apareció en 7.19 ppm, que integró para un protón y correspondió a H-7. La última señal fue observada en 11.73 ppm con forma de singulete, que integró para un protón y desapareció por intercambio con agua deuterada. Esta señal se asignó al protón del nitrógeno del carbamato.



**Esquema 22.** El ión molecular se fragmenta perdiendo una molécula neutra de metanol y generando una especie catiónica radical de  $m/z$  228.

Con respecto a las pruebas de actividad biológica, en la Tabla 7 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *G. intestinalis* tratados con los compuestos 7-13, así como metronidazol y albendazol como controles positivos.

Se puede observar que la potencia de los siete compuestos evaluados es menor a la del albendazol; sin embargo, los compuestos 9 y 13 resultaron ser más potentes ( $CI_{50}$  0.357 y 0.949  $\mu$ M respectivamente) que el metronidazol ( $CI_{50}$  1.180  $\mu$ M).

**Tabla 7.** Actividad biológica de los compuestos 7-13 sobre los trofozoitos de *Giardia intestinalis*\*

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) (Límite de confianza)
7	11.480 (11.097-11.873)
8	6.796 (6.567-7.025)
9	<b>0.949</b> <b>(0.937-0.961)</b>
10	2.497 (2.406-2.589)
11	3.665 (3.627-3.704)
12	1.834 (1.812-1.856)
13	<b>0.357</b> <b>(0.354-0.360)</b>
Albendazol	0.037 (0.030-0.044)
Metronidazol	<b>1.180</b> <b>(1.158-1.205)</b>

\* Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces. Se reporta el valor promedio de los ensayos.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de las pruebas de inhibición de crecimiento *in vitro* sobre los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con los benzoxazoles 7-13, además de metronidazol y albendazol como controles positivos.

Los resultados muestran que todos los compuestos fueron más potentes que el albendazol, pero ninguno tuvo una potencia similar o mayor que el metronidazol.

**Tabla 8.** Actividad biológica de los compuestos 7-13 sobre los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*\*

<b>Compuesto</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µM) (Límite de confianza)</b>
7	3.251 (3.241-3.262)
8	1.256 (1.249-1.263)
9	0.786 (0.706-0.867)
10	1.616 (1.580-1.653)
11	2.017 (1.931-2.103)
12	8.636 (8.207-9.063)
13	10.578 (9.938-11.219)
Albendazol	56.550 (55.550-57.550)
<b>Metronidazol</b>	<b>0.292</b> <b>(0.269-0.316)</b>

\* Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces. Se reporta el valor promedio de los ensayos.

Los resultados de este estudio muestran que la potencia de los benzoxazoles sobre *E. histolytica* fue inferior en comparación con sus isómeros 1-*H*-benzimidazoles (Tablas 3 y 4). En relación con *G. intestinalis*, 2 de los compuestos benzoxazólicos (**9** y **13**) mostraron una potencia superior a la del metronidazol, sin embargo, esta fue inferior a la de sus isómeros (Tablas 3 y 4). En términos generales el reemplazo isostérico del grupo -NH en el núcleo benzimidazólico por el átomo de oxígeno (lo que genera benzoxazoles) trae como consecuencia un efecto negativo en la potencia de dichos compuestos.

Un aspecto a resaltar es el hecho de que al revisar los datos de actividad biológica de los siete benzoxazoles contra ambos parásitos, el compuesto **9** fue el más potente contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*, lo que concuerda con la actividad intrínseca detectada en estudios anteriores al grupo trifluorometilo en posición 2 (Navarrete *et al.* 2001; Navarrete *et al.* 2003).

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Esta sección inicia con la descripción de los instrumentos y materiales utilizados para la síntesis de los compuestos deseados, posteriormente se describen las técnicas experimentales para la obtención de los intermediarios y productos de interés. Por último se presenta la metodología seguida para determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos sintetizados.

### 5.1 Instrumentación

- Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi, modelo B-450, mediante un capilar y no se encuentran corregidos.
- Para eliminar el disolvente se utilizó un evaporador rotatorio marca Büchi RE 114 con vacío generado por una bomba y un condensador marca VWR Scientific Modelo 1107.
- La hidrogenación catalítica se realizó en un hidrogenador marca Parr modelo 3916G con 60 lb/plg<sup>2</sup>, utilizando hidrógeno (infra) y como catalizador Niquel-Raney al 30% en peso de la casa Aldrich.
- Las destilaciones de bulbo a bulbo se realizaron en un horno Kugelrohr marca Büchi modelo CH-9230 y la bomba de vacío usada fue de la marca Welch Chemstar modelo 1376N Skoke 1L 60077.
- Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de Transformada de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla de KBr, las señales se reportan en cm<sup>-1</sup>.
- Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN <sup>1</sup>H) de 300 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian, modelo Unity Inova. Como referencia interna se empleó tetrametilsilano (TMS). Los disolventes fueron dimetilsulfóxido-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>6</sub>) y deuterocloroformo (CDCl<sub>3</sub>). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).
- Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases-impacto electrónico (CG-IE) a 70 eV en un aparato JEOL-JMS-SX-102 A acoplado a un cromatógrafo marca Hewlett Packard Modelo 5890 serie II.

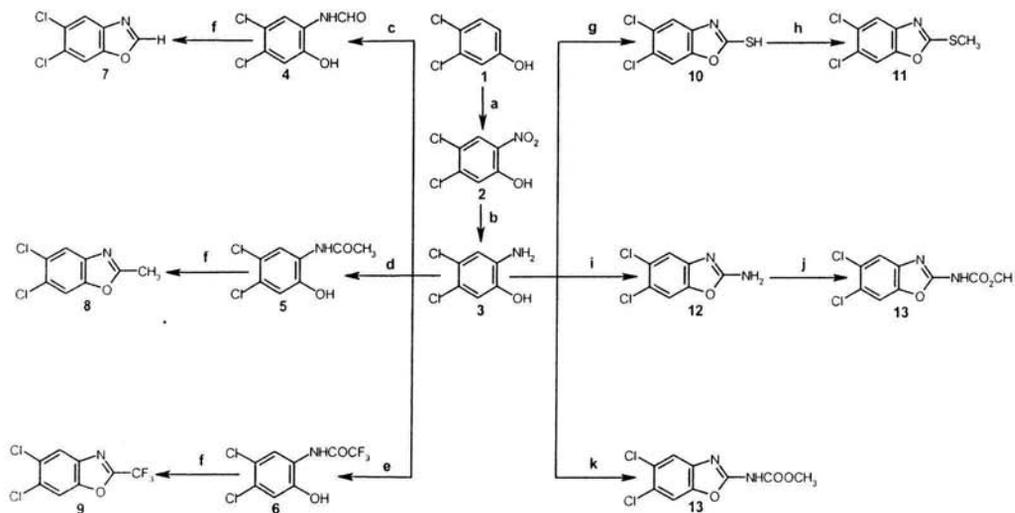
## 5.2 Cromatografía

- El avance de las reacciones se observó mediante cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (Merck 1.05715). Los compuestos orgánicos se visualizaron mediante una lámpara ultravioleta marca UVP, Inc. San Gabriel C.A. 01778 U.S.A. modelo UVGL-25 Mineralight y por exposición a vapores de yodo.
- Los sistemas de elusión empleados para la ccf se enlistan en la siguiente tabla.

**Tabla 9.** Sistemas de elusión empleados en la síntesis de los compuestos 2-13

<b>SISTEMA</b>	<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>PROPORCIÓN</b>
I	Cloroformo-Metanol	99:1
II	Cloroformo-Metanol	90:10
III	Hexano- Acetato de Etilo	95:5
IV	Hexano- Acetato de Etilo	85:15

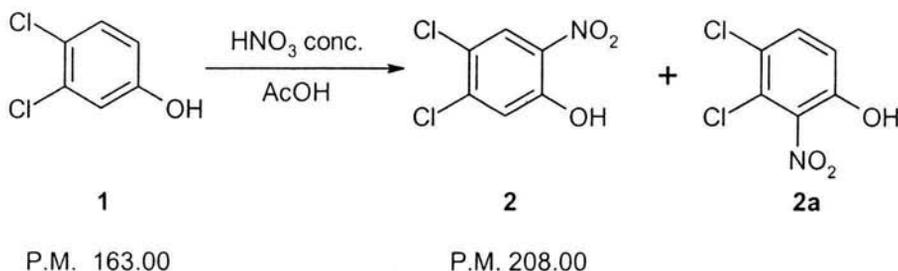
### 5.3 RUTA DE SÍNTESIS PROPUESTA



(a)  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $0-5^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{H}_2$ , Ni-Raney; (c)  $\text{HCOOH}$ , reflujo; (d)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , acetona; (e)  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ , acetona; (f) Tolueno,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , reflujo; (g)  $\text{CS}_2$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\text{KOH}$ , reflujo; (h)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{KOH}$ , acetona; (i)  $\text{BrCN}$ ,  $\text{EtOH}$ ; (j)  $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$ , piridina; (k)  $[\text{CH}_3\text{SC}(\text{=NH}_2)\text{NH}_2]_2^+ \text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{NaOH}$ .

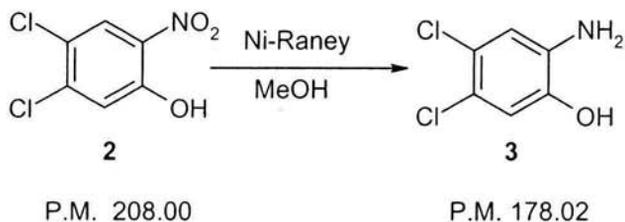
## 5.4 Síntesis de las materias primas

### 5.4.1 4,5-Dicloro-2-nitrofenol (2)



En un vaso de precipitados de 200 mL, acondicionado con agitación magnética y baño de hielo-sal, se disolvieron 5.00 g (30.70 mmol) de 1 en 50 mL de ácido acético glacial; la mezcla se enfrió a 0-5 °C. Por otra parte se enfriaron 5 mL de ácido nítrico concentrado (diluido al 90% con agua) hasta llegar a 5-10 °C y se adicionaron lentamente a la mezcla anterior, cuidando que la temperatura no fuera mayor a 5 °C. La reacción adquirió un color amarillo y con el paso del tiempo se tornó naranja. Después de 3 h se comprobó el consumo de 1 por cc, esta mostró dos manchas, una aproximadamente a la tercera parte de la placa y la otra pegada al origen. La mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de hielo-agua y precipitó un sólido amarillo, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua hasta pH casi neutro. El filtrado se extrajo con acetato de etilo (5X50mL), los extractos reunidos se lavaron con agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro y luego se concentraron con el rotaevaporador. El producto crudo se separó por cromatografía en columna, empleando 350 g de gel de sílice y como eluyente hexano. Se obtuvieron 3.18 g (49.80%) de un sólido color amarillo-limón. Este compuesto mostró una sola mancha en cc (R<sub>f</sub> de 0.30 en el sistema IV) y un pf de 66.5-67.1°C. Adicionalmente, se obtuvieron 1.60 g (25.06%) de un sólido color rojo que fue identificado como el isómero del compuesto 2 y cuya estructura se muestra arriba. IR 3278 (-OH), 1515 (-NO<sub>2</sub>), 1321 (-NO<sub>2</sub>). EM m/z: 207 (M<sup>+</sup>, 100%), 209 (M+2, 66%), 190 (M<sup>+</sup> -17), 177 (M<sup>+</sup> -30), 161 (M<sup>+</sup> -46), 149 (M<sup>+</sup> -30-28), 133 (M<sup>+</sup> -46-28), 132 (M<sup>+</sup> -46-28-1), 97 (M<sup>+</sup> -46-28-1-35). RMN <sup>1</sup>H δ: 7.33 (d, 1H, J= 0.3, H-6), 8.23 (d, 1H, J= 0.3, H-3), 10.47 (sa, OH).

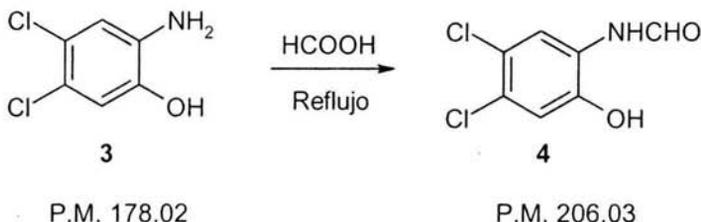
### 5.4.2 2-Amino-4,5-diclorofenol (3)



En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron 2.00 g (9.60 mmol) de 2 disueltos en 20mL de metanol y 600 mg de Ni-Raney (30% P/P), previamente lavado 3 veces con agua y 3 más con metanol. La botella se acopló al hidrogenador y se hidrogenó hasta consumir 23 lb/plg<sup>2</sup> en aproximadamente 40 min. La mezcla de reacción se filtró con succión sobre celita y se lavo varias veces con metanol. El líquido obtenido se concentró a sequedad en el evaporador rotatorio. Se obtuvieron 1.60 g (93.63%) de un sólido color rojo-vino. Este compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  de 0.33 en el sistema II) y un pf de 169.2-170.6 °C. **EM**  $m/z$ : 177 ( $M^+$ , 100%), 179 ( $M+2$ , 66%), 176 ( $M^+ -1$ ), 148 ( $M^+ -1-28$ ). **RMN** <sup>1</sup>H  $\delta$ : 4.63 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.82 (s, 1H, H-3), 6.84 (s, 1H, H-6), 8.73 (sa, OH).

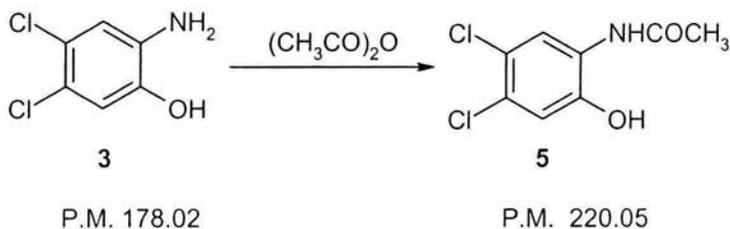
## 5.5 Síntesis de los intermediarios *N*-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)amidas

### 5.5.1 *N*-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)formamida (4)



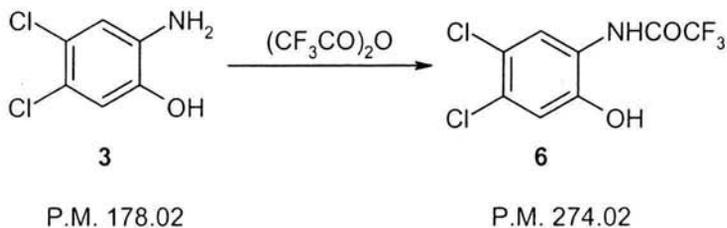
En un matraz de bola de 125 mL con una boca, provisto con refrigerante de agua en posición de reflujo, agitación magnética y canastilla de calentamiento con reóstato, se colocaron 1.50 g (8.4 mol) de **3** y 2 mL (9.00 mol) de ácido fórmico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo así durante 2 h. Al término de la reacción se vertió sobre hielo-agua formándose un sólido café, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó varias veces con agua fría. El producto se decoloró con carbón activado en acetato de etilo y se purificó por cromatografía en columna empleando cloroformo como fase móvil. Se obtuvieron 1.30 g (75.30%) de un sólido ligeramente café. Este compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  de 0.34 en el sistema II) y un pf de 208.7-209.2 °C. IR 3389 (-CO-NHR), 3070 (-OH), 1665 (-CO-NH-R), 1527 ( $\delta$ -NH). EM  $m/z$ : 205 ( $M^+$ , 45%), 207 ( $M+2$ , 28%), 177 ( $M^+ -28$ , 100 %). RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 7.01 (s, 1H, H-3), 8.28 (d, 1H,  $J=1.8$ , CHO), 8.34 (s, 1H, H-6), 9.83 (sa, 1H, NHR), 10.84 (sa, OH).

### 5.5.2 N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)acetamida (5)



En un matraz de fondo redondo de 25 mL con una boca y agitación magnética, se colocaron 1.50 g (8.40 mmol) de **3** y se le adicionaron 1.50 mL (15.79 mmol, 1.8 eq.) de anhídrido acético a 5-10 °C. La mezcla se agitó durante 48h. Se observaron 2 manchas por ccf, una con  $R_f$  similar al de la materia prima en menor proporción y otra, en mayor proporción con un  $R_f$  mayor (sistema cloroformo-metanol 90:10). La mezcla color violeta se llevó a sequedad en el rotaevaporador y el residuo se disolvió en 50 mL de acetato de etilo, se lavó (3X15 mL) con una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10% (V/V), se secó con sulfato de sodio anhidro, se decoloró con carbón activado y se recristalizó de acetona. Se obtuvieron 1.35 g (72.81%) de cristales en forma de agujas ligeramente amarillentas. Dicho compuesto mostró una mancha mayoritaria ( $R_f$  0.38 en el sistema II) y otra casi imperceptible, no se determinó el punto de fusión. Esta mezcla sin purificar se empleó para la síntesis del compuesto 8.

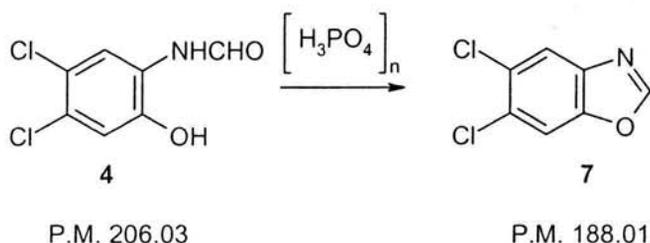
### 5.5.3 N-(4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)trifluoroacetamida (6)



En un matraz de fondo redondo de 25 mL con una boca y agitación magnética, se colocaron 1.50 g (8.40 mol) de **3** y se le adicionaron 1.50 mL (13.44 mmol, 1.6 eq.) de anhídrido trifluoroacético a 5-10 °C. La mezcla se agitó durante 48h; se observaron 2 manchas por ccf, una de similar R<sub>f</sub> al de la materia prima y otra de R<sub>f</sub> mayor (sistema cloroformo-metanol 90:10). La mezcla color violeta se evaporó a sequedad en el rotaevaporador y el residuo violáceo se disolvió en 50 mL de acetato de etilo; se lavo (3X15 mL) con una solución acuosa de ácido sulfúrico al 10% (V/V), se secó con sulfato de sodio anhidro, se decoloró con carbón activado y se recristalizó de tolueno. Se obtuvieron 1.50 g (64.96%) de cristales en forma de hojuelas blancas. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf (R<sub>f</sub> 0.40 en el sistema II) y un pf de 224.8-225.3 °C. IR 3385 (-CO-NHR), 3248 (-OH), 1702 (-CO-NH-R), 1340 (ν<sub>s</sub>CF<sub>3</sub>), 1197 (ν<sub>as</sub>CF<sub>3</sub>), 1163 (ν<sub>as</sub>CF<sub>3</sub>). EM m/z: 273 (M<sup>+</sup>, 100%), 275 (M+2, 67%), 204 (M<sup>+</sup> -69, 85%), 176 (M<sup>+</sup> -69-28, 83%), 148 (M<sup>+</sup> -69-28-28, 43%). RMN <sup>1</sup>H δ: 7.11 (s, 1H, H-3), 7.63 (s, 1H, H-6), 10.75 (sa, 2H, NHR y OH).

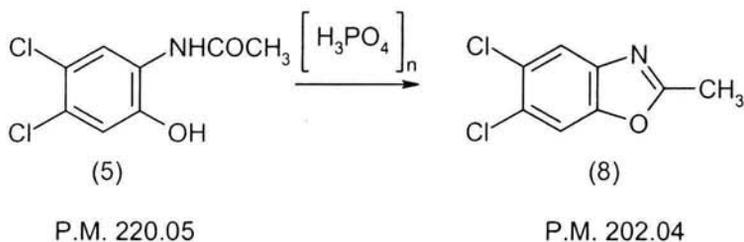
## 5.6 Síntesis de los benzoxazoles-2-sustituídos

### 5.6.1 5,6-Diclorobenzoxazol (7)



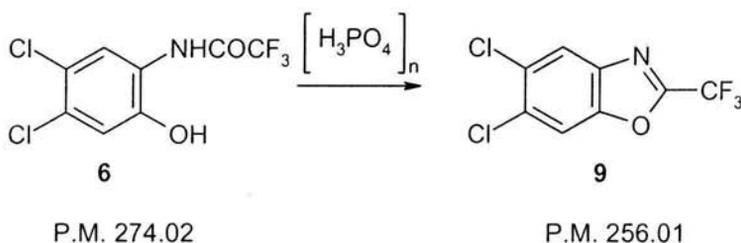
En un matraz de fondo redondo de 25 mL con una boca se colocaron 0.50 g (2.42 mmol) de **4** y 2.00 g (1.3 mL) de ácido polifosfórico. Posteriormente el matraz se colocó dentro de un horno Kugelrohr y se calentó entre 170-190 °C a una presión de 4 mmHg durante 2h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se adicionó agua fría y después una solución de carbonato de sodio al 10% (P/V), en estas condiciones se formó un precipitado blanco así como el desprendimiento de gas. Una vez que se alcanzó un pH entre 8-9 el sólido se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo se recrystalizó de metanol. Se obtuvieron 0.18 g (39.43%) de cristales en forma de agujas de color blanco. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  0.46 en el sistema IV) y un pf de 117.7-118.4 °C. IR 3099 (-C=CH), 1724 (-NC-O), 1290 ( $\nu$  =C-O). EM  $m/z$ : 187 ( $M^+$ , 100%), 189 ( $M+2$ , 70%), 159 ( $M^+ - 28$ ), 132 ( $M^+ - 28-27$ ), 97 ( $M^+ - 28-27-35$ ). RMN  $^1H$   $\delta$ : 8.15 (s, 1H, H-4), 8.23 (s, 1H, H-7), 8.87 (s, 1H, H-2).

### 5.6.2 5,6-Dicloro-2-metilbenzoxazol (8)



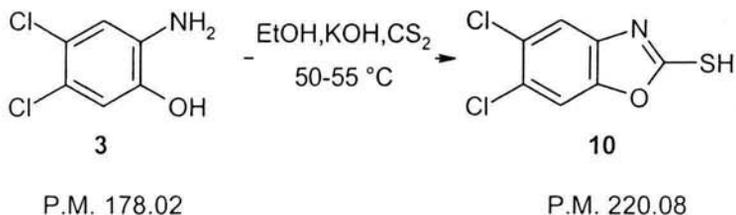
En un matraz de fondo redondo de 25 mL con una boca se colocó 1.00 g (4.54 mmol) de **5** y 4.00 g (2.6 mL) de ácido polifosfórico. Posteriormente, el matraz se colocó dentro de un horno Kugelrohr y se calentó a 250°C a una presión de 4 mmHg durante 2h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se adicionó agua fría y después una solución de carbonato de sodio al 10% (P/V), en estas condiciones se formó un precipitado blanco así como el desprendimiento de gas. Una vez que se alcanzó un pH entre 8-9 el sólido se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo se recristalizó de metanol. Se obtuvieron 0.50 g (54.46%) de cristales en forma de agujas de color blanco. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  0.48 en el sistema IV) y un pf de 152.6-153.2 °C. IR 3070 ( $\nu_{\text{C=CH}}$ ), 3009 ( $\nu_{\text{as}}-\text{CH}_3$ ), 1739 ( $\nu_{\text{NC-O}}$ ), 1446 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1379 ( $\delta_s-\text{CH}_3$ ), 1264 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ). EM  $m/z$ : 201 ( $M^+$ , 100%), 203 ( $M+2$ , 69%), 173 ( $M^+ -28$ ), 146 ( $M^+ -28-27$ ), 138 ( $M^+ -28-35$ ). RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ : 2.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.60 (s, 1H, H-4), 7.73 (s, 1H, H-7).

### 5.6.3 5,6-Dicloro-2-(trifluorometil)benzoxazol (9)



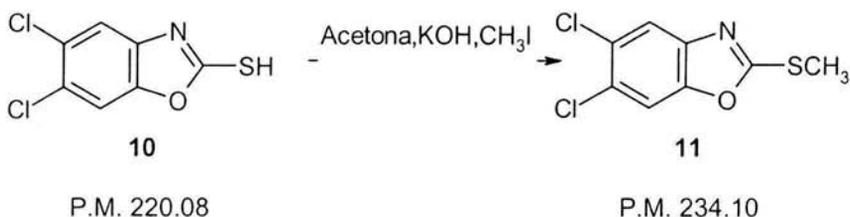
En un matraz de fondo redondo de 25 mL con una boca se colocó 1.00 g (3.65 mmol) de **6** y 4.00 g (2.6 mL) de ácido polifosfórico. Posteriormente, el matraz se colocó dentro de un horno Kugelrohr y se calentó entre 170-190 °C a una presión de 4 mmHg durante 2h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se adicionó agua fría y después una solución de carbonato de sodio al 10% (P/V), en estas condiciones se formó un precipitado blanco así como el desprendimiento de gas. Una vez que se alcanzó un pH entre 8-9 el sólido se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo se recrystalizó de metanol. Se obtuvieron 500 mg (53.52%) de cristales en forma de agujas de color blanco. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  0.50 en el sistema IV) y un pf de 78.4-79.1 °C. IR 3083 (-C=CH), 1747 (-NC=O), 1359 ( $\nu_s$  -CF<sub>3</sub>), 1284 ( $\nu$  =C-O), 1209 ( $\nu_{as}$  -CF<sub>3</sub>), 1165 ( $\nu_{as}$  -CF<sub>3</sub>). EM  $m/z$ : 255 (M<sup>+</sup>, 100%), 257 (M+2, 68%), 236 (M<sup>+</sup> -19), 205 (M<sup>+</sup> -50). RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 8.39 (s, 1H, H-4), 8.46 (s, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C  $\delta$ : 114.44 (C-4), 116.24 (c, J= 271.5, CF<sub>3</sub>), 122.82 (C-7), 129.19 (C-5), 130.98 (C-6), 138.77 (C-3a), 149.05 (C-7a), 152.13 (c, J= 43.7, C-2).

### 5.6.4 5,6-Dicloro-2-mercaptobenzoxazol (10)



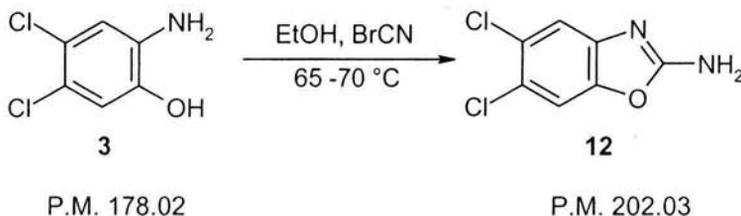
En un matraz de fondo redondo de 250 mL con una boca, adaptado con un refrigerante en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno y con agitación magnética, se colocaron 1.61 g (9.00 mmol) de **3**, posteriormente, se adicionaron 20 mL de etanol, 1 mL de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 77% (P/V) y 0.7 mL (12.00 mmol) de disulfuro de carbono. La mezcla se calentó en un baño de agua a una temperatura de 50-55 °C en durante 8 h. La reacción se monitoreó por ccf, se observó la formación de un nuevo producto con diferente *R<sub>f</sub>* al de la materia prima, así como una casi imperceptible presencia de ésta (sistema cloroformo-metanol 90:10). Concluida la reacción, ésta se vertió en 75 mL de agua fría y se llevó a un pH entre 5-6 con una solución acuosa al 10% (V/V) de ácido acético, en estas condiciones precipitó un compuesto sólido de color gris, se separo por filtración al vacío en un embudo Buchner y se le hicieron varios lavados con agua hasta pH cercano a la neutralidad. El sólido obtenido se decoloró con cabón activado en metanol y se recristalizó del mismo disolvente. Se obtuvieron 1.60 g (80.40%) de cristales de color blanco. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf (*R<sub>f</sub>* 0.51 en el sistema II) y un *pf* de 227.3-227.7 °C. **IR** 3435 (-SH), 1488, 1455 y 1328 ( $\nu = \underline{C-S}$ ), 800-600 (-SH). **EM** *m/z*: 219 ( $M^+$ , 100%), 221 ( $M+2$ , 70%), 190 ( $M^+ -29$ ), 174 ( $M^+ -45$ ), 159 ( $M^+ -60$ ). **RMN** <sup>1</sup>H  $\delta$ : 7.45 (s, 1H, H-4), 7.91 (s, 1H, H-7), 13.96 (sa, SH).

### 5.6.5 5,6-Dicloro-2-(metiltio)benzoxazol (11)



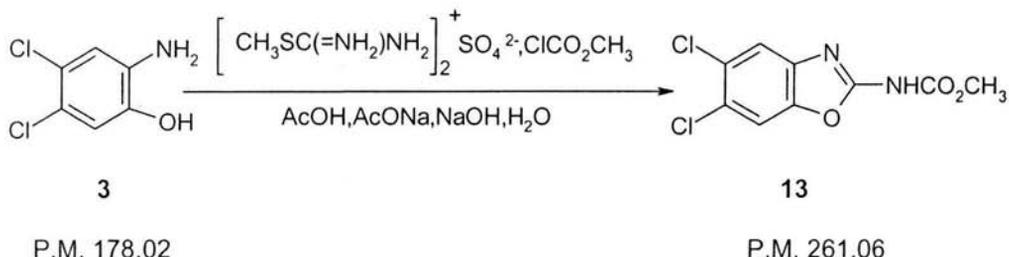
En un matraz de fondo redondo de 250 mL con una boca, adaptado con agitación magnética, se colocó 1.00 g (4.50 mmol) de **10**, 30 mL de acetona, 0.4 mL de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 77% (P/V) (7.70 mmol) y 0.4 mL de yoduro de metilo (0.0064 moles, 1.4 eq.). Al concluir la adición de este último comenzó a precipitar un sólido blanco; la mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y a temperatura ambiente durante 3h. La reacción fue monitoreada por ccf y se observó una casi imperceptible cantidad de materia prima, así como otro compuesto de *R<sub>f</sub>* superior. Al concluir la reacción se evaporó el disolvente en un evaporador rotatorio hasta sequedad. El sólido obtenido se recrystalizó de metanol-acetona. Se obtuvieron 0.80 g (75.21%) de cristales en forma de agujas color blanco de olor característico. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf (*R<sub>f</sub>* 0.47 en el sistema III) y un pf de 138.9-139.7 °C. IR 3047 (-C=CH), 2920 (*v*<sub>as</sub> -CH<sub>3</sub>), 1455 y 1335 (-CH<sub>3</sub>), 848 (*v* C-S). EM *m/z*: 233 (M<sup>+</sup>, 100%), 235 (M+2, 70%), 218 (M<sup>+</sup> -15), 200 (M<sup>+</sup> -33, 73%), 190 (M<sup>+</sup> -15-28). RMN <sup>1</sup>H δ: 2.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.96 (s, 1H, H-4), 8.08 (s, 1H, H-7).

### 5.6.6 5,6-Dicloro-2-aminobenzoxazol (12)



En un matraz de fondo redondo de 250 mL con una boca, adaptado con un refrigerante en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno, agitación magnética, canastilla de calentamiento y reóstato, se colocaron 2.00 g (11.2 mmol) de **3** disueltos en 30 mL de una solución acuosa de etanol al 60% (V/V). Posteriormente se adicionaron a la mezcla de reacción lentamente 1.40 g (13.65 mmol, 1.2 eq.) de bromuro de cianógeno. La reacción se mantuvo calentándose entre 65-70 °C durante 5h. El término de la reacción se comprobó mediante ccf (sistema cloroformo-metanol 90:10). Una vez concluida la reacción, ésta se vertió en una mezcla de hielo-agua y se alcalinizó con carbonato de sodio hasta un pH de 9, se dejó en agitación durante 30 min y el sólido obtenido se separó por filtración al vacío con un embudo Büchner. Posteriormente se decoloró con carbón activado en metanol. El producto se recrystalizó de benceno, obteniéndose 1.61 g (70.60%) de cristales de color ligeramente naranja. Dicho compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  0.32 en el sistema II) y un pf de 247.9-248.4 °C. IR 3468 ( $\nu_{as}$  -NH<sub>2</sub>), 3336( $\nu_s$  -NH<sub>2</sub>), 3095 (-C=C-H), 1694 (-C=NH). EM  $m/z$ : 202 ( $M^+$ , 100%), 204 ( $M+2$ , 67%), 173 ( $M^+$  -29), 159 ( $M^+$  -43). RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 7.40 (s, 1H, H-4), 7.69 (s, 1H, H-7), 7.76 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>).

### 5.6.7 (5,6-Diclorobenzoxazol-2-il)carbamato de metilo (13)



En un matraz Kontes "Taper" de 250 mL con cuatro bocas, acondicionado con termómetro, embudo de adición, agitación magnética, tapón séptum y tapón de rosca, se suspendieron 2.50g (8.70 mmol) de sulfato de *S*-metilisotiurea en 15 mL de agua, la suspensión se enfrió entre 0-5 °C con la ayuda de un baño de hielo. Posteriormente, se adicionaron rápidamente con una jeringa de vidrio 1.4 mL (17.40 mmol, 2 eq.) de cloroformato de metilo. Una vez concluida la adición se agregó una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 25% (P/V) con la ayuda del embudo de adición, a una velocidad de tres gotas cada tres minutos, monitoreándose el pH con papel pH. Una vez que el pH llegó a 6, la adición se realizó una gota cada tres minutos hasta alcanzar un pH de 7. El volumen final de hidróxido de sodio empleado fue de 10 mL, para lo cual se requirieron 5h, en estas condiciones se obtuvo un precipitado blanco esponjoso. Este intermediario se empleo sin ser aislado inmediatamente después de haberse formado.

Por otra parte, se acondicionó un matraz de bola de 250 mL con una boca, agitación magnética y condensador en posición de reflujo; el extremo del condensador se conectó a cuatro frascos que contenían una disolución de hipoclorito de sodio al 6%. En este matraz se disolvió en frío 1.00 g (0.0056 mol) de **3** en 22 mL de solución amortiguadora de acetatos (6.2 mL de ácido acético, 2.2g de acetato de sodio y 22 mL de agua) y se adicionó el contenido de la reacción arriba mencionada. La mezcla se calentó poco a poco y se mantuvo en reflujo durante tres horas, observándose el desprendimiento de gas. El sólido verde formado en el transcurso de la reacción se separó por filtración al vacío, se lavó con hexano frío, etanol frío y agua fría. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna, empleando 50g de gel de sílice y como eluyente cloroformo-metanol (99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5). Se obtuvieron 650 mg (44.50%) de un polvo blanco. Este compuesto mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  0.32, sistema II) y un pf de 239.7-240.3 °C. IR 2956 ( $\nu_s$  -CH<sub>3</sub>), 1743 (-N-CO-O), 1635 (-N=CNH), 1446 y 1402 ( $\delta_s$  -CH<sub>3</sub>), 1230 y 1180 (R-O-C=O). EM  $m/z$ : 260 ( $M^+$ , 87%), 262 ( $M+2$ , 59%), 228 ( $M^+$  -32, 100%), 202 ( $M^+$  -58). RMN <sup>1</sup>H  $\delta$ : 3.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.09 (s, 1H, H-4), 7.14 (s, 1H, H-7), 11.73 (sa, NHCOOR).

## 5.7 Evaluación de la actividad biológica de los compuestos benzoxazólicos contra *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*

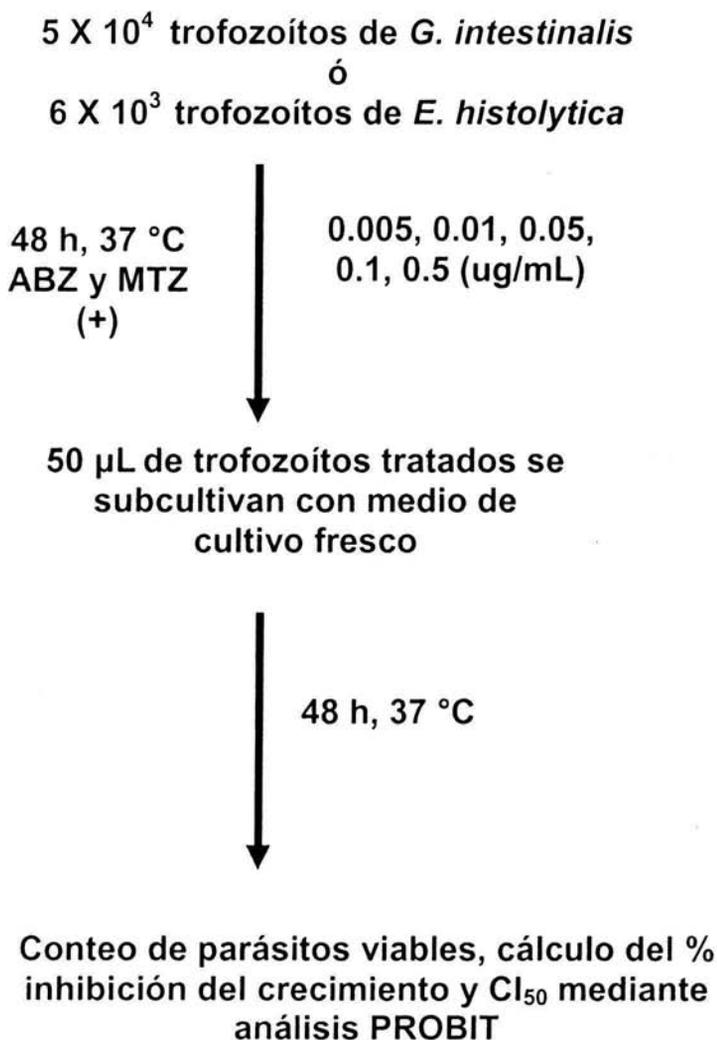
**5.7.1 Parásitos:** Se emplearon las cepas de *Giardia intestinalis* IMSS:0989:1 y *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33, suplementado con 10% de suero de ternera descomplementado (por calentamiento a 56°C durante 30 min.), 100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomycin. Los trofozoitos de *Giardia intestinalis* se cultivaron en medio TYI-S-33 modificado suplementado con 10% de suero fetal y bilis bovina. Los parásitos se subcultivaron 2 veces por semana para preservar la cepa (Cedillo y Muñoz, 1992 y Chávez *et al.* 1992).

**5.7.2 Fármacos:** Los compuestos puros que se emplearon como controles positivos (albendazol y metronidazol), se obtuvieron por donativo de la casa comercial Glaxo-Smith-Kline de México y Sigma Chemicals respectivamente.

### 5.7.3 Prueba de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*.

Se empleó el método de subcultivos, previamente estandarizado (Cedillo y Muñoz, 1992):  $5 \times 10^4$  trofozoitos de *Giardia intestinalis* y  $6 \times 10^3$  trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se incubaron por 48 h a 37°C, en tubos eppendorff con concentraciones crecientes de los diferentes benzoxazoles (0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 µg/mL). El albendazol (ABZ) y metronidazol (MTZ) sirvieron como controles positivos, a las mismas concentraciones mencionadas anteriormente. Como control negativo, se emplearon trofozoitos en medio libre de fármaco, el volumen final en cada tubo fue de 1.5 mL.

Después de la incubación, se inocularon en tubos eppendorff 0.05mL de trofozoitos tratados, en 1.45 mL de medio fresco (sin fármaco ni compuesto a evaluar) y se incubaron por 48 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a contar el número de trofozoitos viables, empleando una cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento en comparación con el control negativo. Finalmente, mediante análisis Probit se calculó la  $CI_{50}$  que corresponde a la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de los trofozoitos. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces (Esquema 23). Una vez concluido el ensayo, el material se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 24 h y se esterilizó en autoclave para posteriormente ser desechado.



Esquema 23. Ensayo para la determinación de la actividad antiparasitaria *in vitro*

## 6. CONCLUSIONES

---

- Se logró la síntesis de los 5,6-Diclorobenzoxazoles sustituidos en posición 2 por grupos de diferente polaridad.
- Se aislaron y purificaron siete 5,6-Diclorobenzoxazoles, tres intermediarios (4,5-Dicloro-2-hidroxifenil)amidas y dos materias primas (4,5-Dicloro-2-nitrofenol y 2-Amino-4,5-Diclorofenol).
- Los compuestos sintetizados se identificaron y caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, además, se determinaron algunas de sus constantes físicas más importantes (punto de fusión y  $R_f$ ).
- La actividad antiprotozoaria de los 5,6-Diclorobenzoxazoles se determinó *in vitro* empleando como parásitos modelo a *G. intestinalis* y *E. histolytica*.
- Contra *G. intestinalis* los compuestos **9** y **13**, que tienen en la posición 2 un grupo trifluorometilo y carbamato de metilo respectivamente, mostraron una potencia similar a la del metronidazol, sin embargo esta fue inferior a la de sus isómeros 1-*H*-bencimidazoles.
- Contra *E. histolytica* todos los compuestos evaluados tuvieron una potencia inferior a la de sus isómeros 1-*H*-bencimidazoles.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Hein D., Alheim R. and Leavitt J. **1957**. The use of Polyphosphoric Acid in the Synthesis of 2-Aryl- and 2-Alkyl-substituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**:427.

Uhlig F. and Zinder R. **1960**. *Advances in Organic Chemistry, Methods and Results*. Interscience Publishers, Inc. New York:48.

Van Allan A. and Deacon D. **1963**. 2-Mercaptobenzimidazole. *Organic Synthesis Collective*. **4**:569-570.

Korolkovas A. **1970**. *Essentials of Molecular Pharmacology, Background for Drug Design*. Wiley-Interscience. New York:57-61.

Ings R., McFadzean J. and Ormerod W. **1974**. *Pharmacol.* **23**:1421-1429.

LaRusso N., Tomasz M., Müller M. and Lipman R. **1977**. *Mol. Pharmacol.* **13**:872-882.

Knight R., Skolimowski I. and Edwards D. **1978**. *Biochem. Pharmacol.* **13**: 2089-2093.

Meingassner J., Mieth H., Czok R., Lindmark D. and Muller M. **1978**. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:1-3.

Band R. and Cirrito H. **1979**. Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide and oxygen. *J. Protozool.* **26**:282-286.

Osman A., Badr M., Mahmoud A. and Hezien Z. **1982**. Cyclocondensation and cycloaddition reactions on the unsaturated centre of arylidene-2-aminobenzoxazole. *J. Ind. Chem. Soc.* **59**:763.

Muller M. and Gurrell T. **1983**. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:667-673.

Sharma S. and Abuzar S. **1983**. The benzimidazole anthelmintics-chemistry and biological activity. *Prog. Drug Res.* **27**:85-161.

Boczon K., Olbaw W. and Olaszek M. **1984**. The influence of some anthelmintics on the bioenergetic metabolism of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Biochem. Pharmacol.* **33**(15):2523-2525.

Boreham P., Philips R. and Shepered R. **1984**. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. J. Antimicrob. Chemother. **14**:449.

Elguero J., Marzin C., Katritzky A. and Linda P. **1984**. The tautomerism of heterocycles. Academia Press. Mew York: 395-396, 425-426.

Fahey R., Newton G., Arrick B., Overdank T. and Aley S. **1984**. *Entamoeba histolytica*: an eukaryote without glutathione metabolism. Science. **224**:70-72.

Greiner O., Pastor R. and Cambon A. **1984**. Synthesis of F-Alkyl-2-benzoxazole. J. Fluor. Chem. **25**:513.

Katritzky A. and Rees C. **1984**. Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Vol. 6. Pergamon Press. Great Britain:177-179, 216-218.

Reeves R. **1984**. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. Adv. Parasitol. **23**:105-120.

Gault M., Reiner D. and Gillin F. **1985**. Tolerance of axenically cultured *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* to a variety antimicrobial agents. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **79**:60-67.

Lacey E. **1988**. The role of cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action an mechanism of drugs resistance to benzimidazole. Int. J. Parasitol. **18**:908-915.

Edlind T. **1989**. Antimicrob. Agenst Chemother. **33**:484-488.

Edwards M., Gilroy F., Jimenez B, and O'Sullivan W. **1989**. Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. Mol. Biochem. Parasitol. **37**:19-26.

Hendrickson J. and Hussoin S. **1989**. Phosponium Anhydrides. J. Organ. Chem. **54**:1144.

Hernández A. **1990**. Sintesis de bencimidazoles con actividad antihelmintica potencial. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

Horton R. **1990**. Bencimidazoles in a Wormy World. Parasitol. Today. **6**(2):106-111.

Lacey E. **1990**. Mode of action of benzimidazoles. Parasitol. Today. **6**(2): 112-115.

McCraken R. and Stillwell H. **1991**. A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. Int. J. Parasitol. **21**(1):99-104.

Tannich E., Bruchaus I., Walter R. and Horstmann R. **1991**. Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**:61-71.

Cedillo R. and Muñoz O. **1992**. *J. Med. Microbiol.* **37**:221-224.

Chávez B., Cedillo R. and Martínez A. **1992**. *J. Protozool.* **39**:510-515.

Farilamb A. and Cerami A. **1992**. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:695-700.

Weinbach E., Levenbook L. and Alling D. **1992**. *Comp. Biochem. Physiol.* **102C**:391-396.

Avendaño C. **1993**. Introducción a la Química Farmacéutica. McGraw-Hill Interamericana. España:54-58.

Diamond L. and Clark C. **1993**. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**:340-344.

Kwa M., Kooyman F., Boerseman J. and Roos M. **1993**. Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on  $\beta$ -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**:413-419.

Mertens E. **1993**. ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol. Today.* **9**:122-126.

Paget T., Kelly M., Jarroll E., Lindmark D. and Lloyd D. **1993**. The effects of oxygen on fermentation in the intestinal protozoal parasite *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**:65-72.

Uproft J. and Uproft P. **1993a**. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Uproft J. and Uproft P. **1993b**. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today.* **9**:417-418.

Barton D. and Ollis D. **1994**. *Comprehensive Organic Chemistry, The synthesis and reactions of organic compounds, Vol. 4.* Pergamon Press. London, England:962-963.

Buret A. **1994**. Pathogénesis-how does *Giardia* cause disease ?. In R. Thompson, J. Reynolds and A. Lymbery (ed.), *Giardia: from molecules to disease.* CAB International, Cambridge, U.K. 293-315.

Yu H., Wright C., Cai Y., Yang S., Phillipson J., Kirby G. and Warhurst D. **1994.** *Phytother. Res.* **8**:436-438.

Hill D. **1995.** *Giardia lamblia.* In G. Mandell, J. Bennett and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, N.Y. 878-880.

Chen J., Huang Y., Liu G. and Chen W. **1996.** Detoxicating enzymes of *Entamoeba histolytica* and their detoxifying roles. *Chin. Med. J. (Engl. Ed.)*. **109**:792-794.

Guillin F., Reiner D. and McCaffery J. **1996.** Cell biology of the premature eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:678-683.

Li E. and Stanley S. **1996.** Amebiasis. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **25**:471-480.

Rodríguez-García R., Aburto-Bandala M. and Sánchez-Maldonado M. **1996.** *Bol. Med. Infant. Mex.* **53**:173-177.

Townson S., Upcroft J. and Upcroft P. **1996.** Characterisation and purification of piruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**:183-193.

De Luca M. and Kerwin S. **1997.** The *para*-Toluensulfonic acid-promoted synthesis of benzoxazoles and benzimidazoles from diacylated precursors. *Tetrah.* **53**(2):453-457.

Doumbo O., Rossignol J., Pichard D., Traore H., Dembele M., Diakite M., Traore F. and Diallo D. **1997.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**:637-639.

Luján H., Mowatt M. and Nash T. **1997.** Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:294-300.

Marshall M., Naumovitz D., Ortega Y. and Sterling C. **1997.** Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:67-75.

Romero-Cabello R., Guerrero L., Muñoz-García M. and Geyne C. **1997.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:701-703.

Samarawickrema N., Upcroft J., Brown D., Thammapalerd N. and Upcroft P. **1997.** Superoxide dismutase and piruvate:ferredoxin oxidoreductase involvement in mechanism of metronidazol resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:833-840.

Stanley S. **1997.** Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:637-645.

Brown H., Upcroft J. and Edwards M. **1998**. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **28**:149-164.

Knodler L., Sekyere E., Stewart T., Schoefield P. and Edwards M. **1998**. Cloning and expression of prokaryotic enzyme, arginine deiminase, from a primitive eukaryote *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **273**:4470-4477.

Martínez A. and Espinosa M. **1998**. Intestinal amebae P. 157-167. *In* L. Collier, A. Balows and M. Sussman (ed.). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. 9th ed, vol.5: Parasitology. Arnold, London U.K.

Ören I., Temiz Ö., Yalcin I., Sener E. and Altanlar N. **1998**. Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2,5- and/or 6-substituted benzoxazole and benzimidazole derivatives. *Eur. J. Pharma. Scien.* **2(7)**:153.

Upcroft J. and Upcroft P. **1998**. My favourite cell: *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Calzada F., Meckes M. and Cedillo-Rivera R. **1999**. *Planta Med.* **65**:78-80.

Meckes M., Calzada F., Tapia-Contreras A. and Cedillo-Rivera R. **1999**. *Phytother. Res.* **13**:102-105.

Ondarza R., Iturbe A., Hurtado G., Tamayo E., Ondarza M. and Hernández E. **1999**. *Entamoeba histolytica*: an eukaryote with trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:47-52.

Rodríguez-García R., Rodríguez-Guzmán L. and Cruz A. **1999**. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **64**:122-126.

Sánchez R. **1999**. Síntesis de derivados del 1-Metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

Sarti E., Flisser A., Correa D., Sotelo J., Escobedo F., Tato P., Proaño J., Ambrosio J., Ávila G., Plancarte A., De Aluja A., Sciutto E., Laclette, J., Willms, K. and Álvarez R. **1999**. *En Diez Problemas Relevantes de Salud Pública*. De la Fuente J. y Sepúlveda J. Compiladores. Fondo de Cultura Económica. Colección Biblioteca de la Salud. México, D.F. 1999. 117-144.

Upcroft J. and Upcroft P. **1999**. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:150-164.

Wassmann C., Herberg A., Tannich E. and Bruchaus I. **1999**. Metronidazole resistance in the protozoa parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxido dismutase and peroxiredoxin

and decreased expression of ferredoxin I and flavin reductase. *J. Biol. Chem.* **274**:26051-26056.

Yépez L., Morales R., Viveros N., Cedillo R., Hernández F., Hernández A. and Muñoz O. **1999**. *Arch. Med. Res.* **30**:368.

Liu S., Broen D., O'Donoghue P., Upcroft P. and Upcroft J. **2000**. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**:137-140.

Colley D., LoVerde P. and Savioli L. **2001**. *Science* **293**:1437-1438.

López R. **2001**. Síntesis del 5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-trifluorometil-1*H*-bencimidazol, análogo del triclabendazol, análogo del triclabendazol, con potencial actividad antihelmíntica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Navarrete-Vázquez G., Cedillo R., Hernández-Campos A., Yépez L., Hernández-Luis F., Valdez J., Morales R., Cortés R., Hernández M. and Castillo R. **2001**. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**:187-190.

Upcroft P. and Upcroft J. **2001**. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Bharti N., Shailendra F., González G., Cruz D., Castro G., Saleem K., Naqvi F., Maurya M. and Azam A. **2002**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**:869-872.

Cedillo R., Chávez B., González A., Tapia A. and Yépez L. **2002**. In vitro effect of Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J. Euk. Microbiol.* **49**(3):2001-2008.

Hernández A., Ibarra F., Vera Y., Rivera N. and Castillo R. **2002**. *Chem. Pharm. Bull.* **50**:649-652.

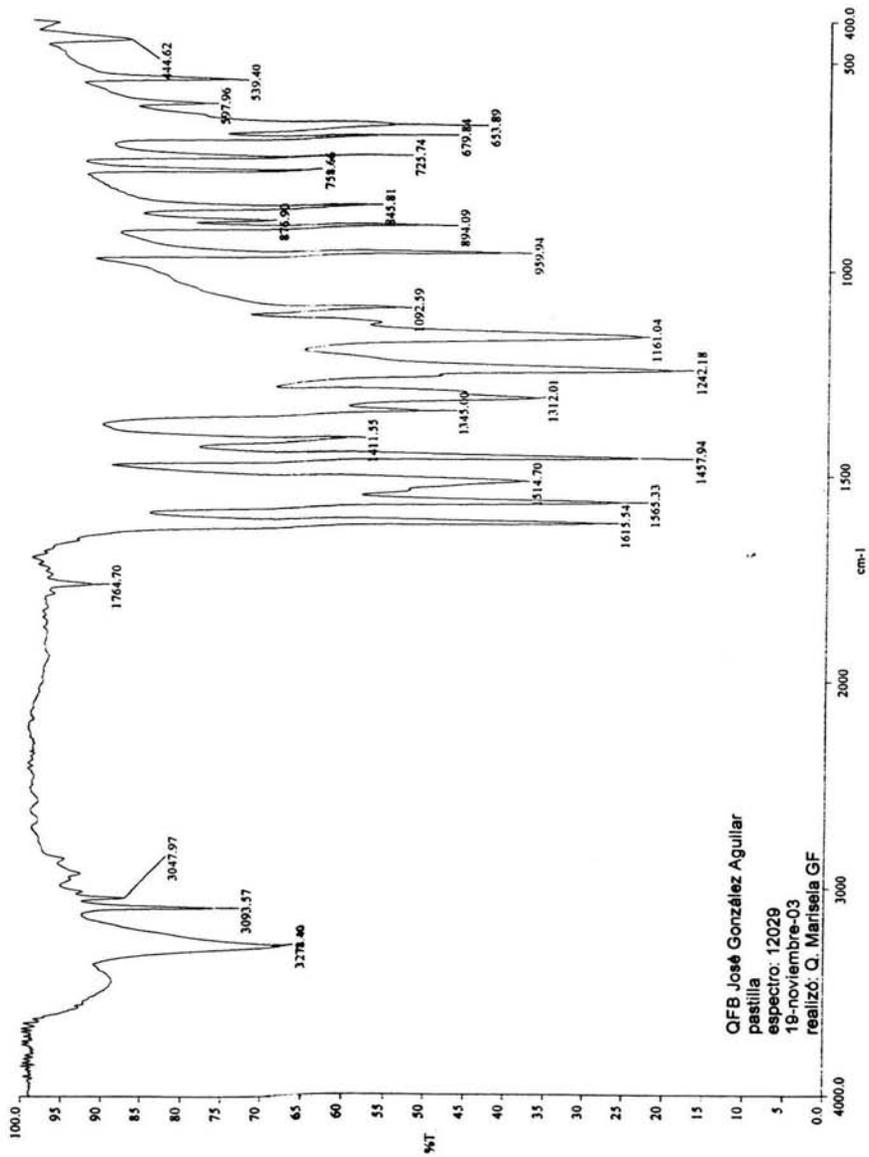
Valdez J., Cedillo R., Hernández A., Yépez L., Hernández F., Navarrete G., Tapia A., Cortés R., Hernández M. and Castillo R. **2002**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**:2221-2224.

WHO-World Health Organization **2002**. TDR Strategic emphases matrix for tropical disease research. Switzerland, Octubre.

Navarrete-Vázquez G., Yépez L., Hernández-Campos A., Tapia A., Hernández-Luis F., Cedillo R., González J., Martínez-Fernández A., Martínez Grueiro M. and Castillo R. **2003**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:1-8.

Watkins B. **2003**. *Trends Parasitol.* **19**(11):477-478.

## **8. APÉNDICE**



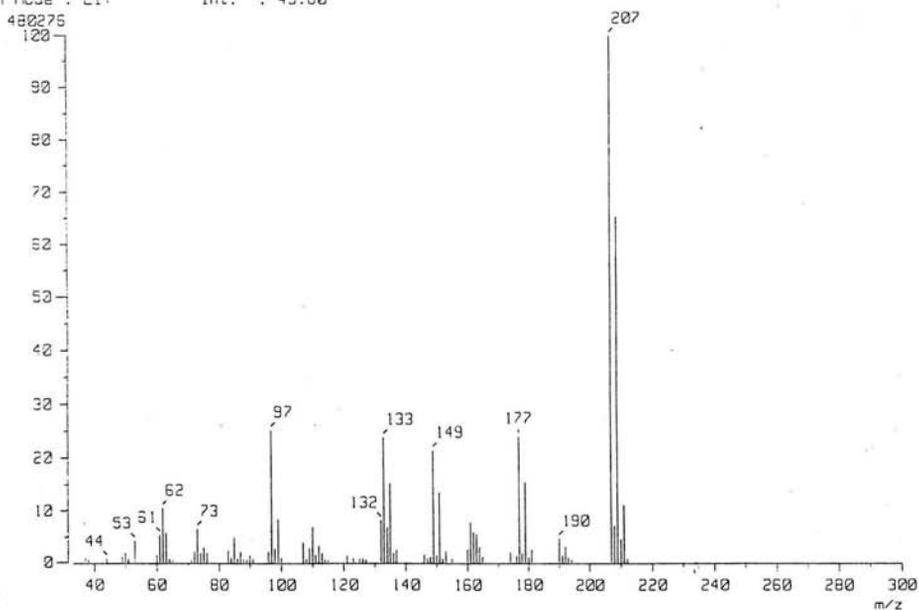
QFB José González Aguilar  
 pastilla  
 espectro: 12029  
 19-noviembre-03  
 realizó: Q. Marisela GF

Espectro 1: IR (KBr) del compuesto 2

[ Mass Spectrum ]  
RT : 14.14 min  
Ion Mode : EI+

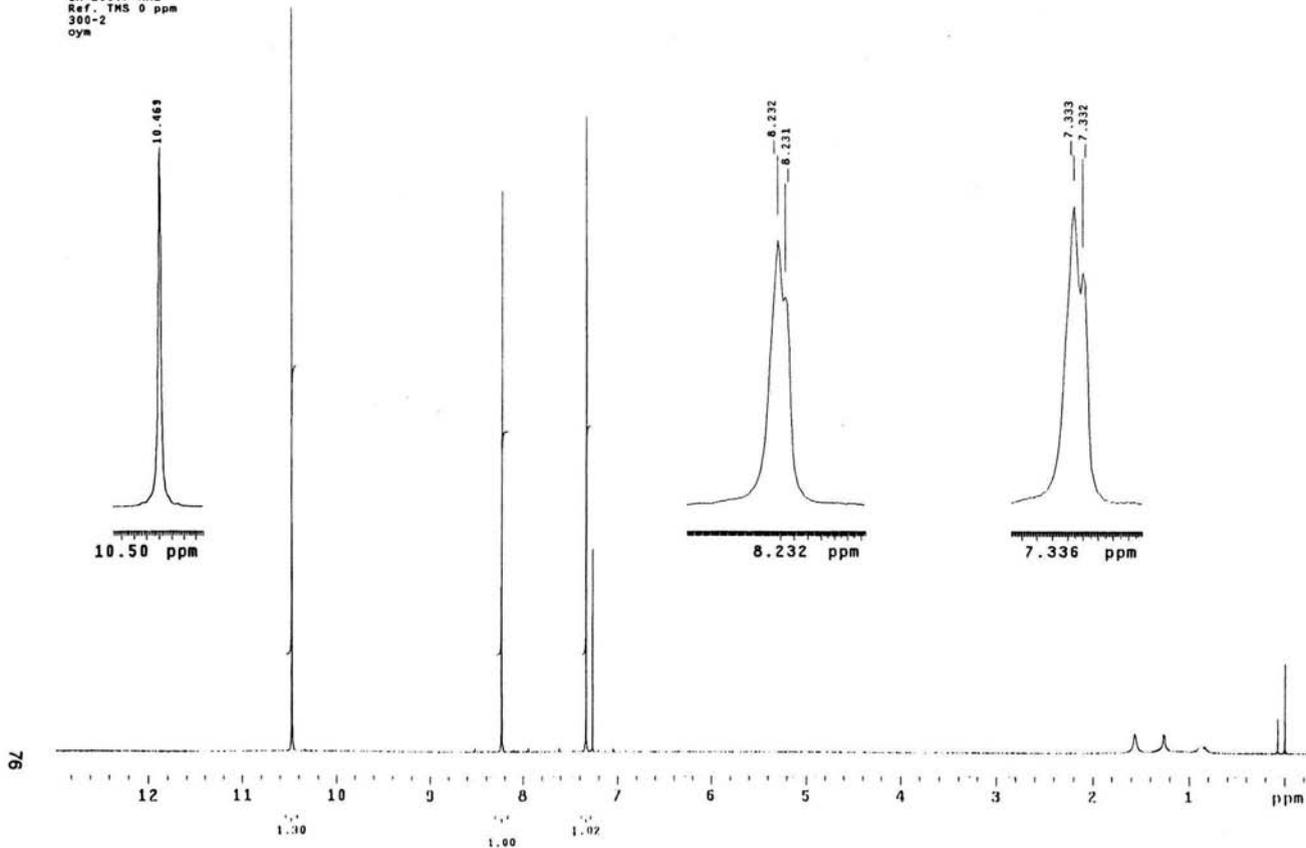
Scan# : (513,515)-(546,586)  
Int. : 45.80

Temp : 29.7 deg.C



**Espectro 2: EM (IE) del compuesto 2**

USAI  
11 julio 2003  
Dr. R. Castillo / J. Gonzalez  
JGA-1A / CDCl<sub>3</sub>  
1H 299.7 MHz  
Ref. TMS 0 ppm  
300-2  
oym



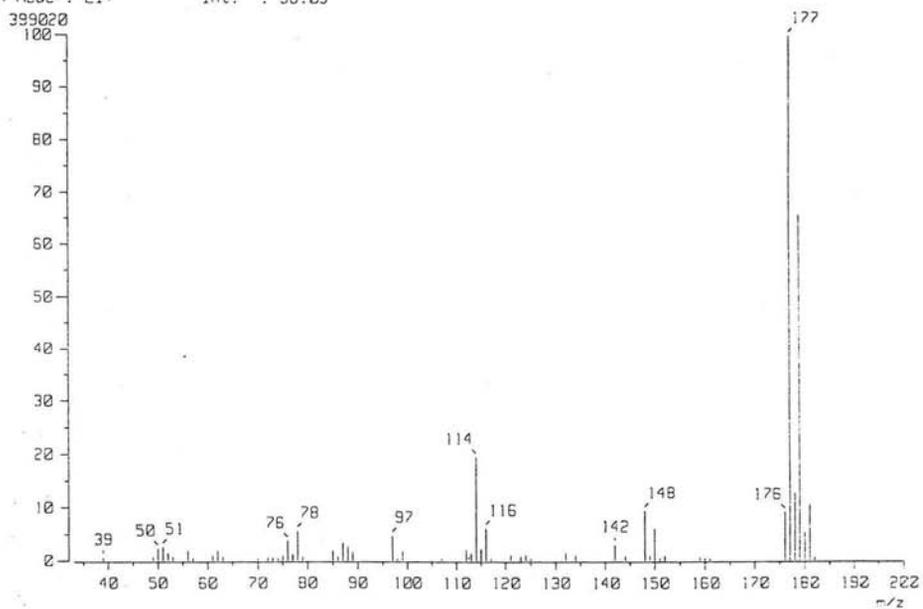
Espectro 3: <sup>1</sup>H RMN (TMS, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 2

[ Mass Spectrum ]

RT : 12.95 min  
Ion Mode : EI+

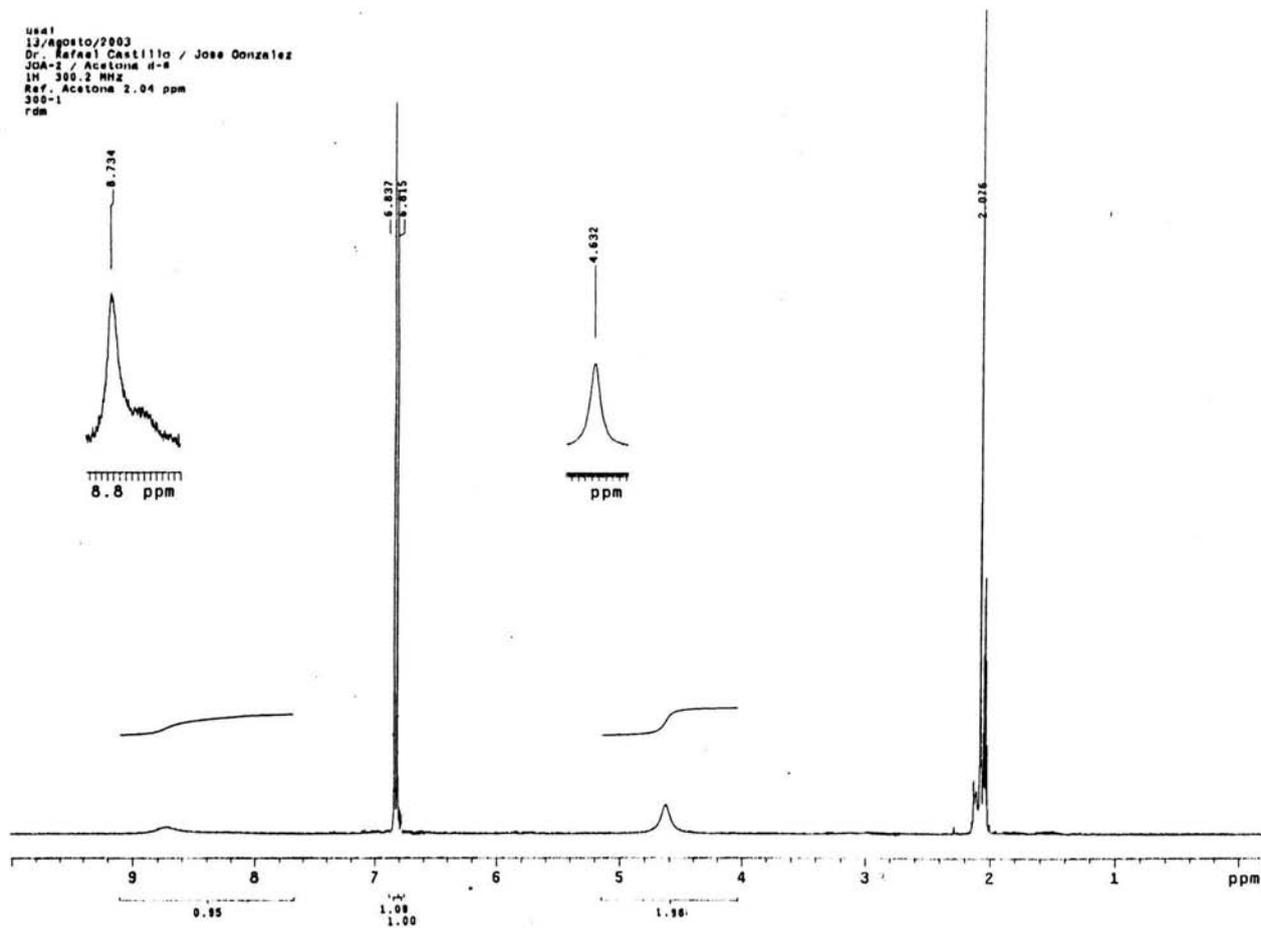
Scan# : (470,473)  
Int. : 38.05

Temp : 28.1 deg.C

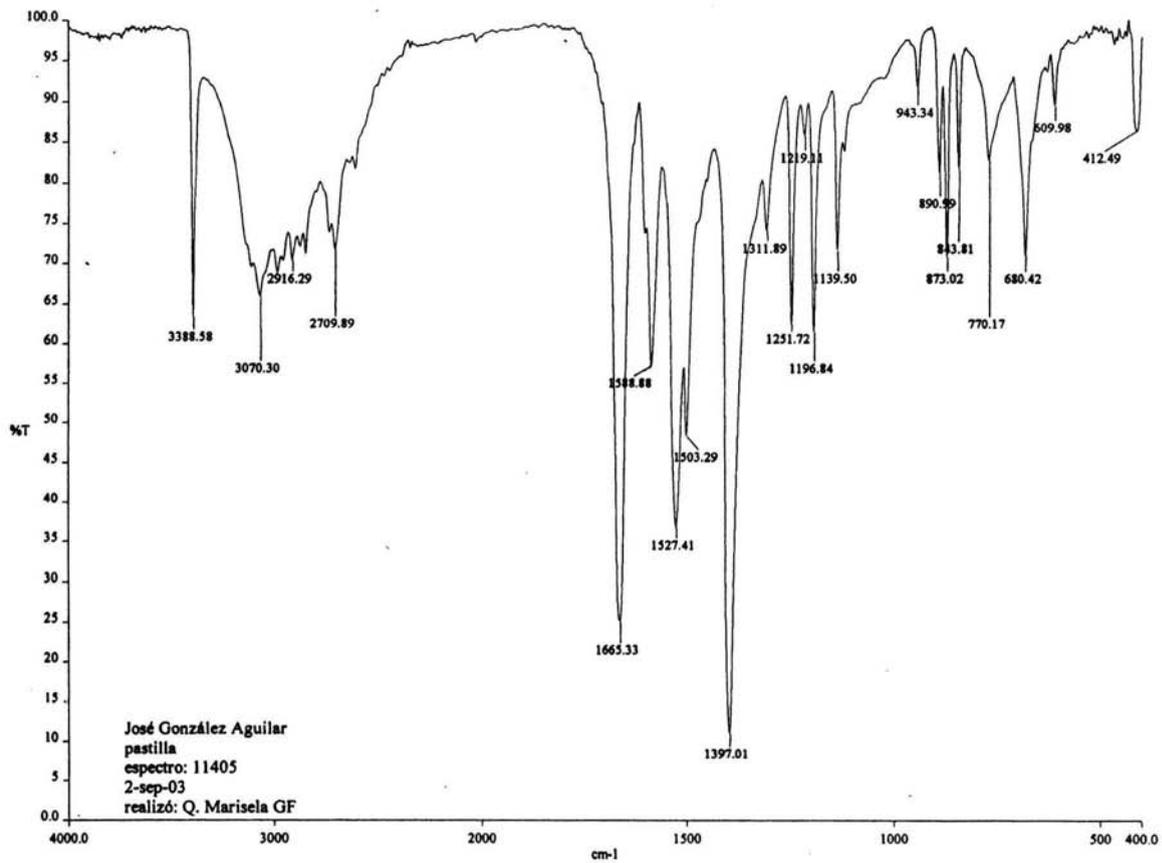


**Espectro 4: EM (IE) del compuesto 3**

usd1  
13/Agosto/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-1 / Acetona d-6  
1H 300.2 MHz  
Ref. Acetona 2.04 ppm  
300-1  
rdm



Espectro 5:  $^1\text{H}$  RMN (TMS, Acetona- $d_6$ ) del compuesto 3



**Espectro 6: IR (KBr) del compuesto 4**

[ Mass Spectrum ]

RT : 11.48 min

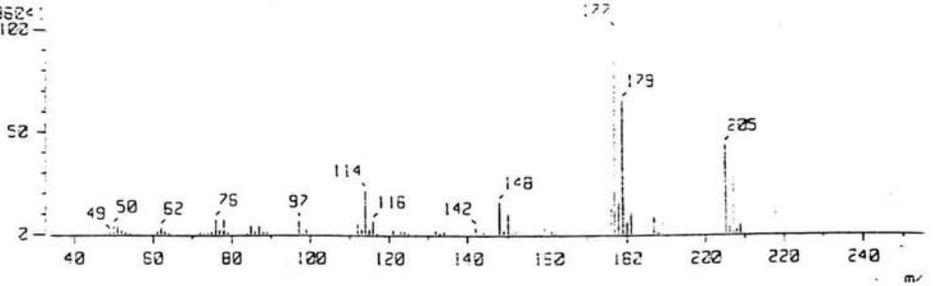
Scan# : (416,418)

Temp : 5.4 deg.C

Ion Mode : EI-

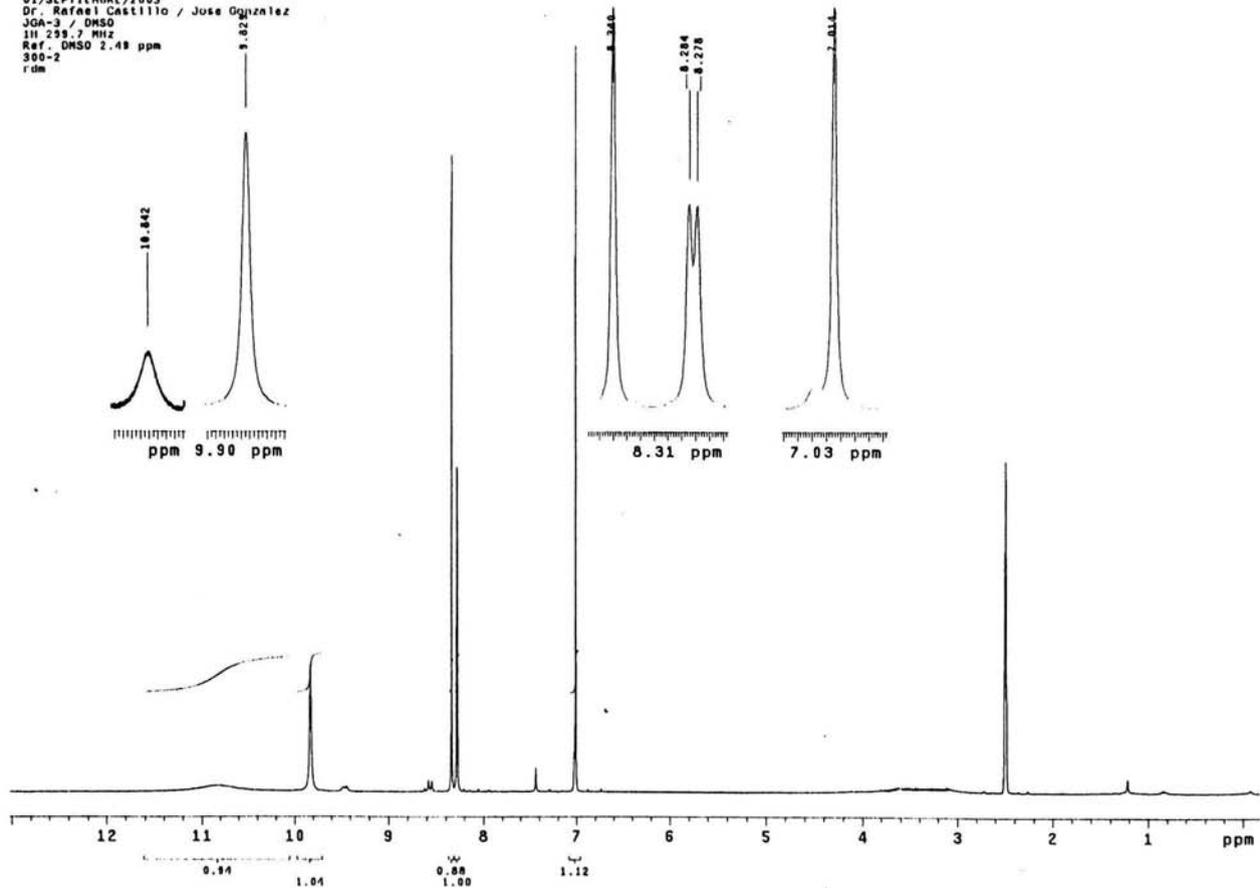
Int. : 22.51

236241  
122



**Espectro 7: EM (IE) del compuesto 4**

USA1  
01/SEPTIEMBRE/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-3 / DMSO  
101.259.7 MHz  
Ref. DMSO 2.49 ppm  
300-2  
rdm



81

Espectro 8:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del compuesto 4

[ Mass Spectrum ]

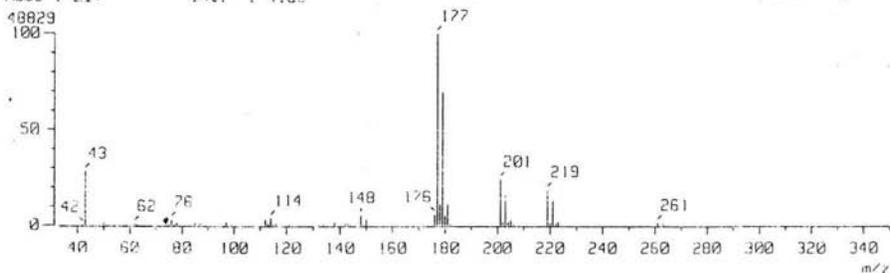
RT : 10.94 min

Scan# : 399

Temp : 26.9 deg.C

Ion Mode : EI+

Int. : 4.65



[ Mass Spectrum ]

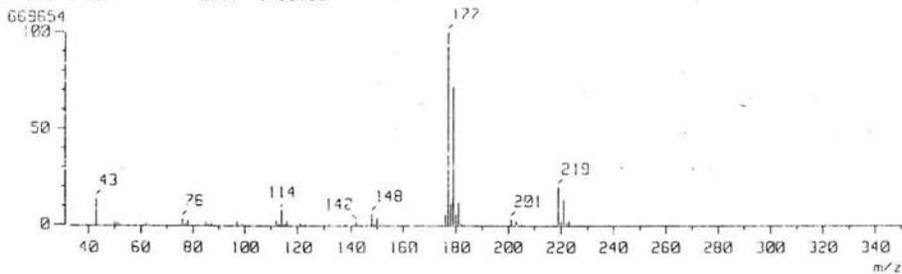
RT : 11.44 min

Scan# : 416

Temp : 29.7 deg.C

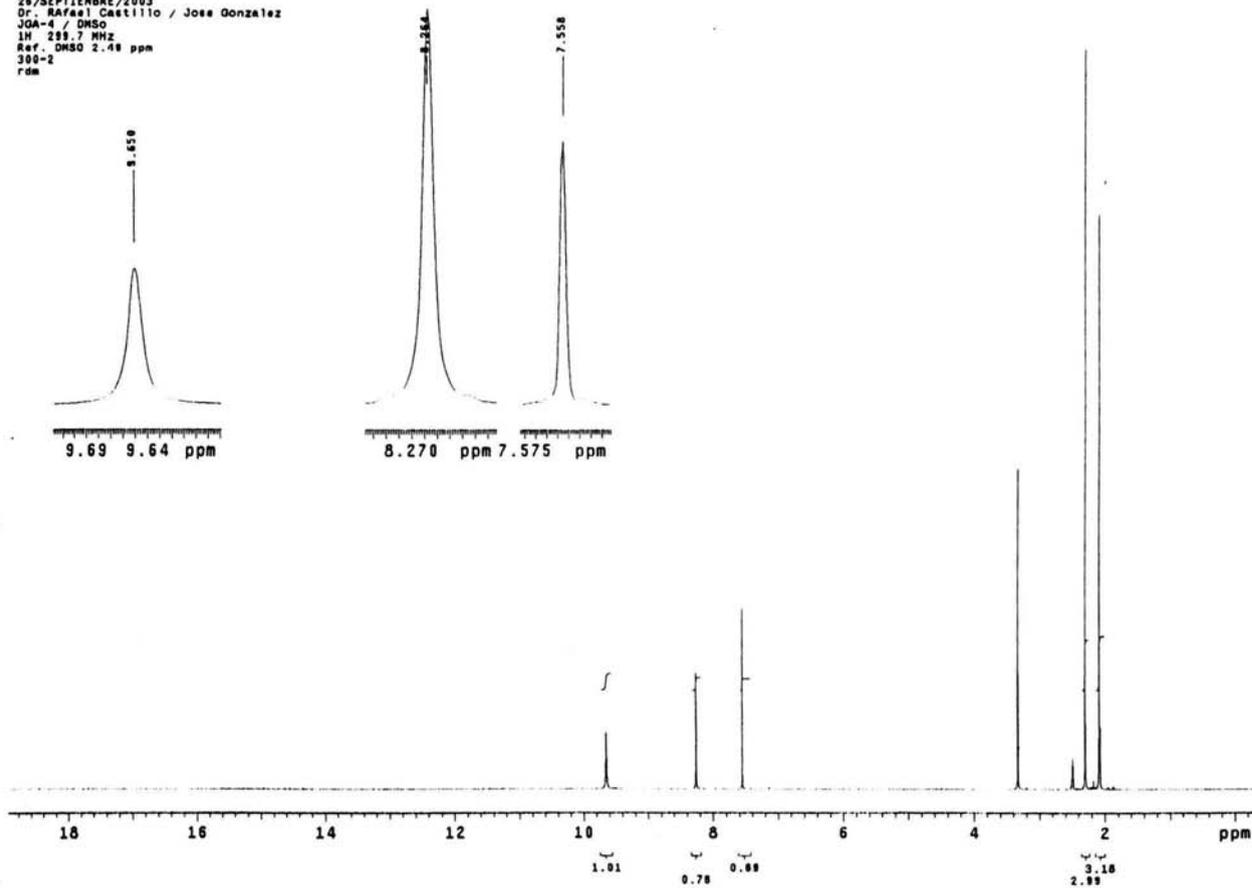
Ion Mode : EI+

Int. : 63.96

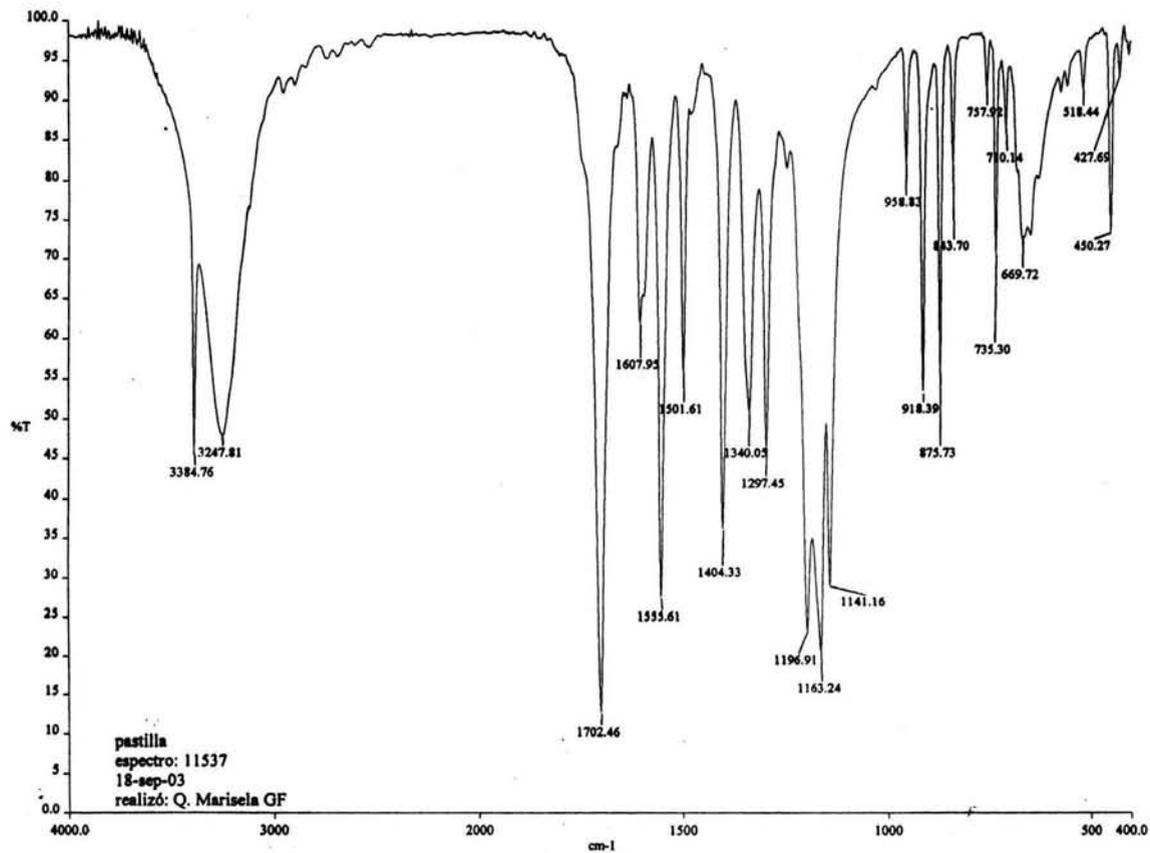


Espectro 9: EM (IE) del compuesto 5

USAI  
26/SEPTIEMBRE/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JQA-4 / DMSO  
1H 299.7 MHz  
Ref. DMSO 2.49 ppm  
300-2  
rdm



Espectro 10: <sup>1</sup>H RMN (TMS, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5



Espectro 11: IR (KBr) del compuesto 6

[ Mass Spectrum ]

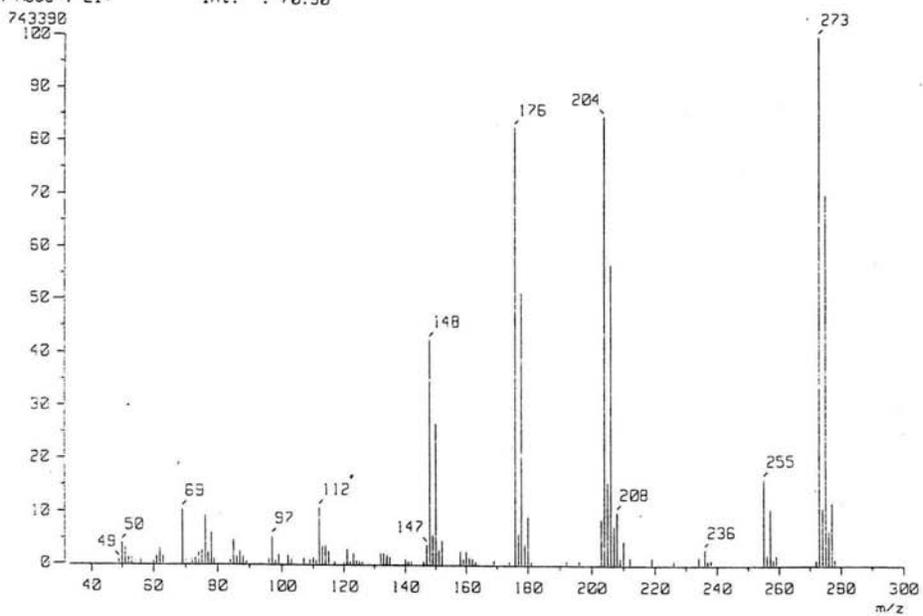
RT : 7.19 min

Scan# : 252-(376,571)

Temp : 29.7 deg.C

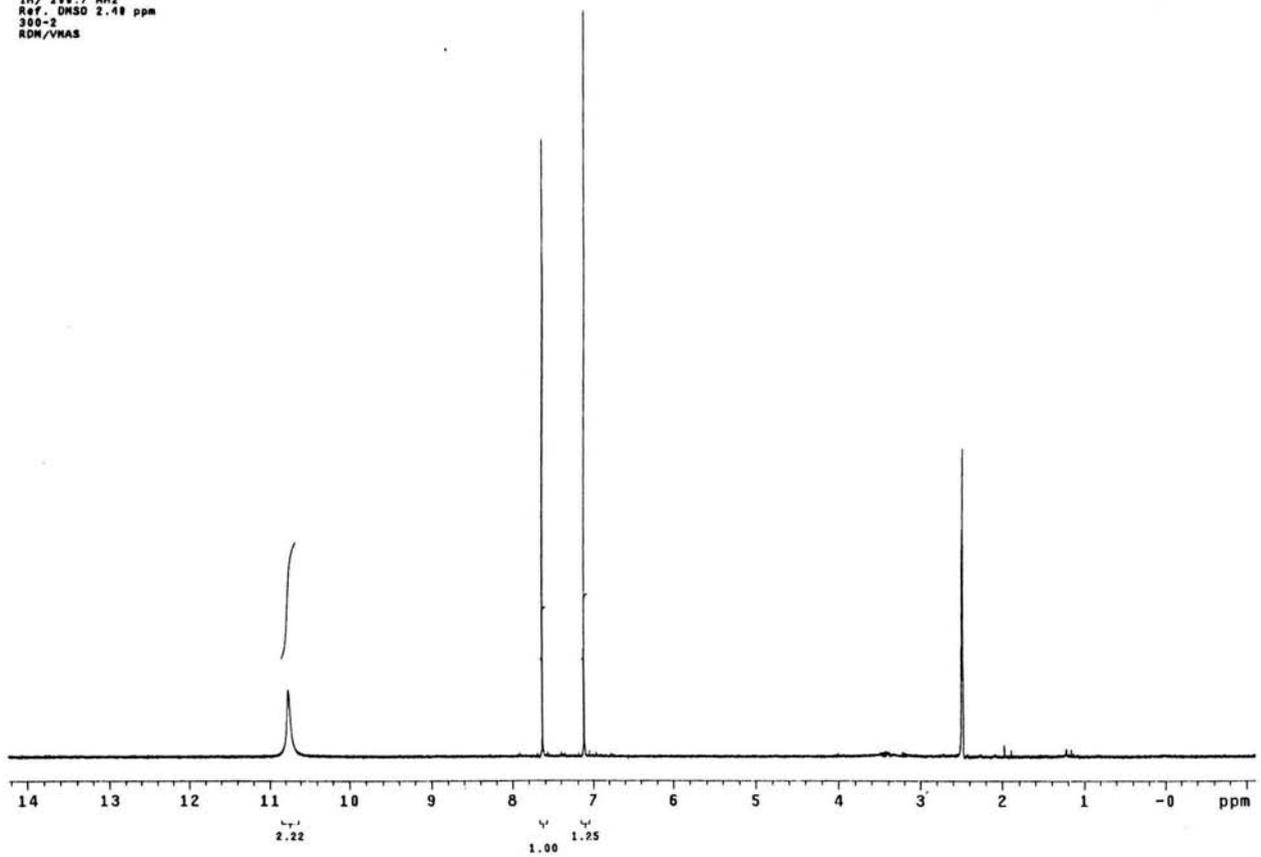
Ion Mode : EI+

Int. : 70.90



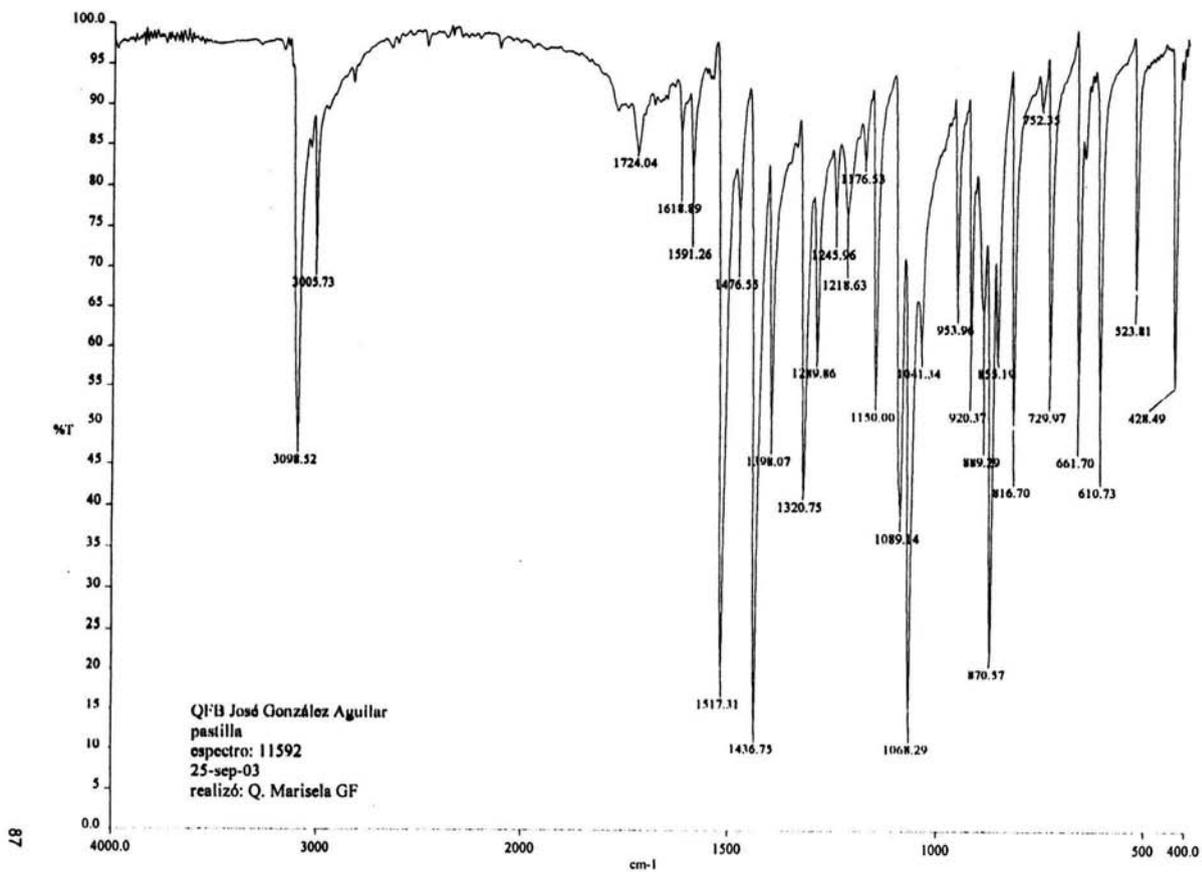
**Espectro 12: EM (IE) del compuesto 6**

USAI  
17/09/03  
Dr. Rafael Castillo/ Jose Gonzalez  
JGA-5/ DMSO  
1H/ 299.7 MHz  
Ref. DMSO 2.49 ppm  
300-2  
RDM/VHAS



98

Espectro 13: <sup>1</sup>H RMN (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) del compuesto 6

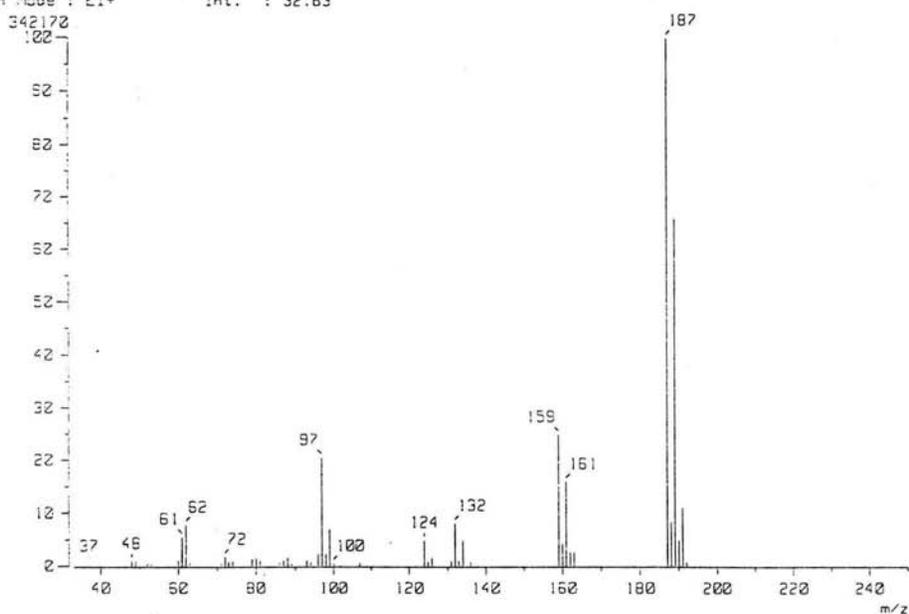


**Espectro 14: IR (KBr) del compuesto 7**

[ Mass Spectrum ]  
RT : 6.38 min  
Ion Mode : EI+

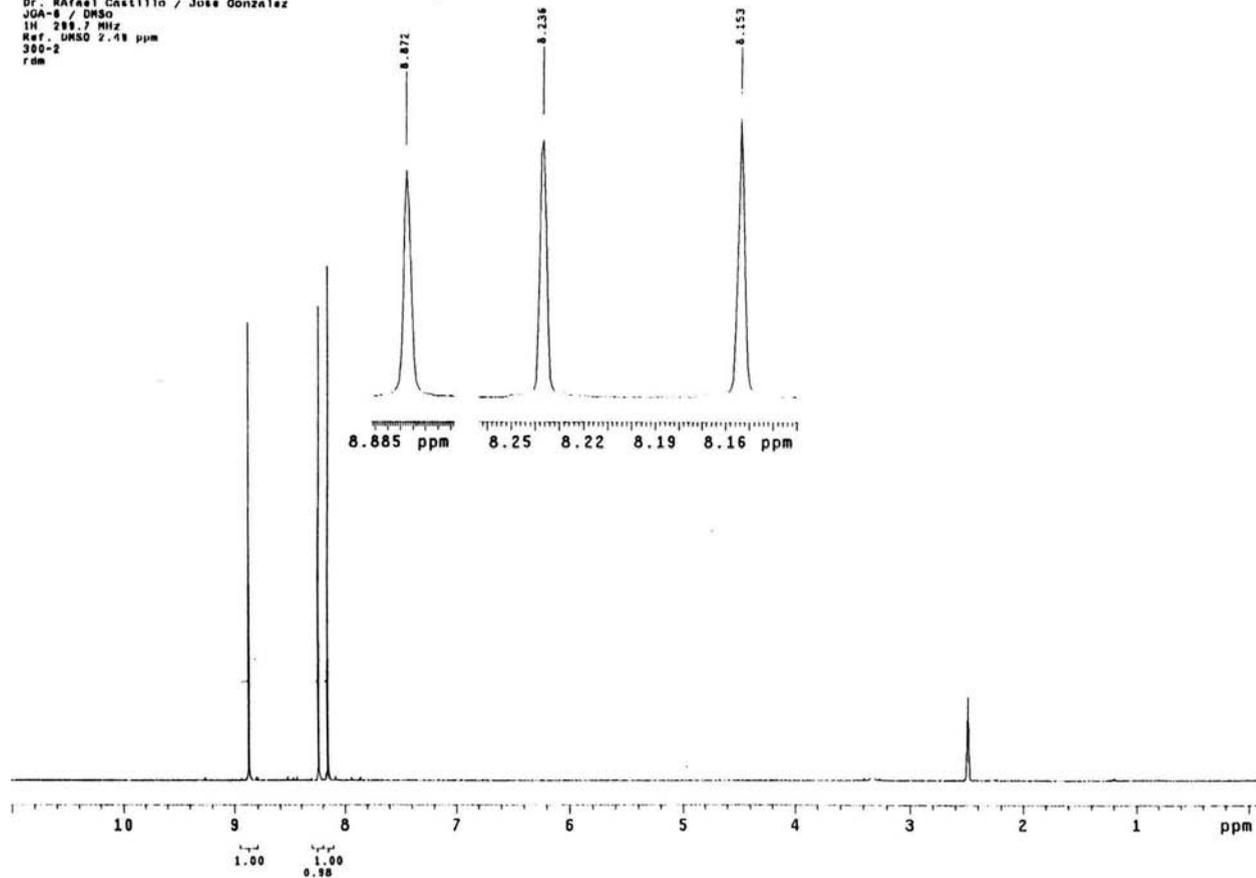
Scan# : 305  
Int. : 32.63

Temp : 27.9 deg.C



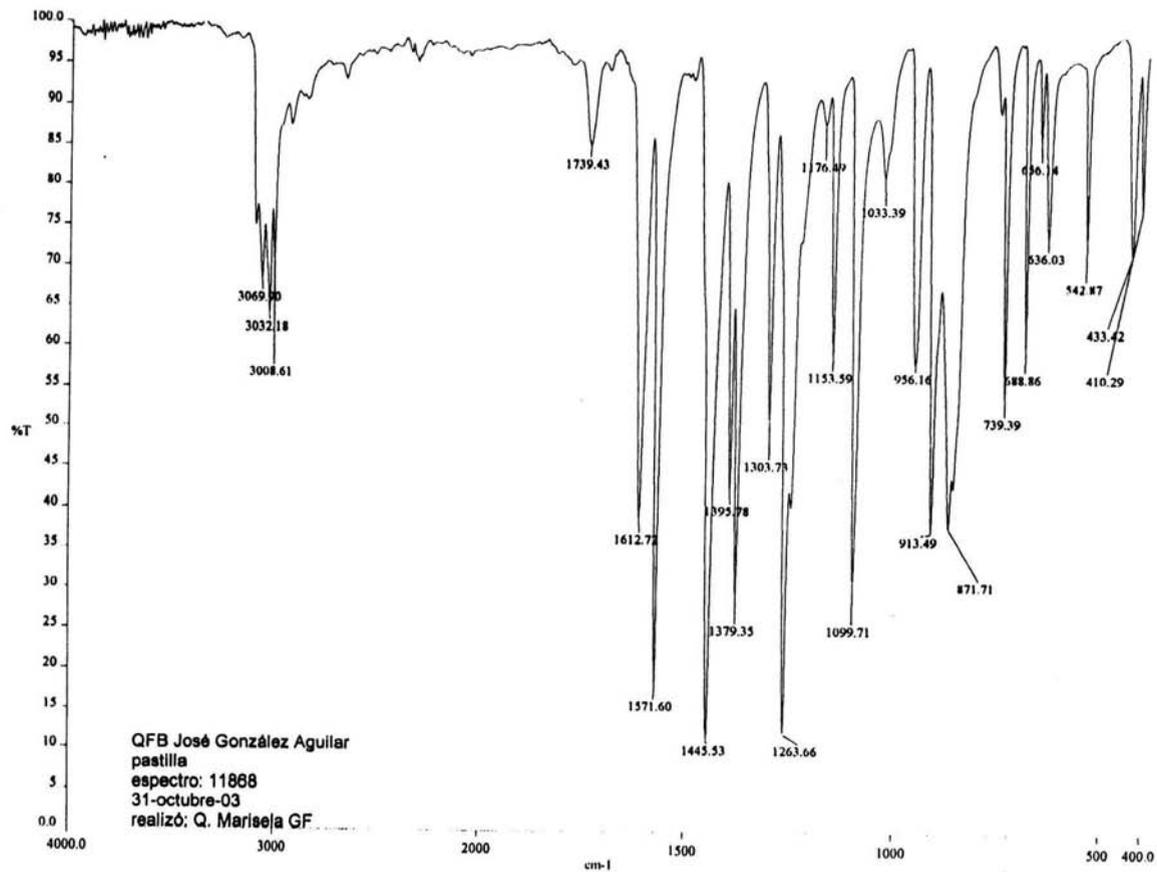
**Espectro 15: EM (IE) del compuesto 7**

USA1  
25/SEPTIEMBRE/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-8 / DMSO  
1H 200.7 MHz  
Ref. DMSO 2.48 ppm  
300-2  
rdm



68

Espectro 16:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto 7



Espectro 17: IR (KBr) del compuesto 8

[ Mass Spectrum ]

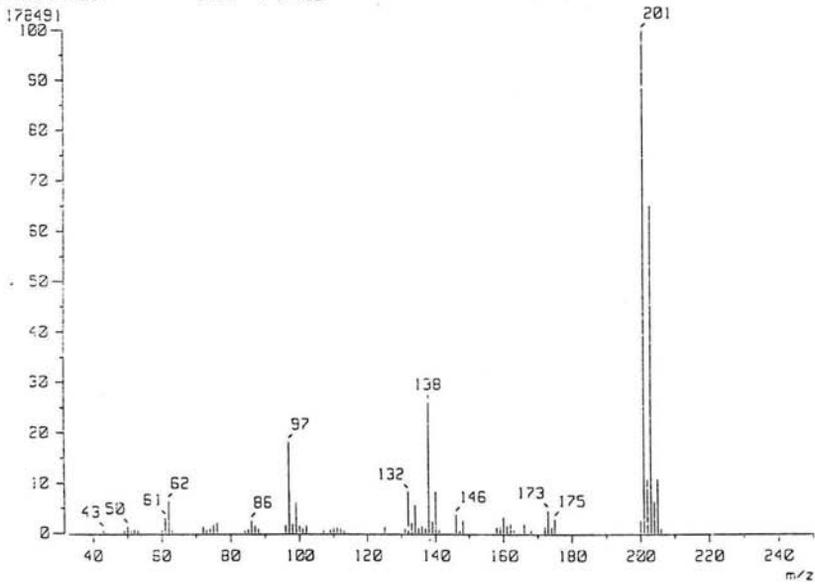
RT : 7.02 min

Scan# : 255-(285,308)

Temp : 28.9 deg.C

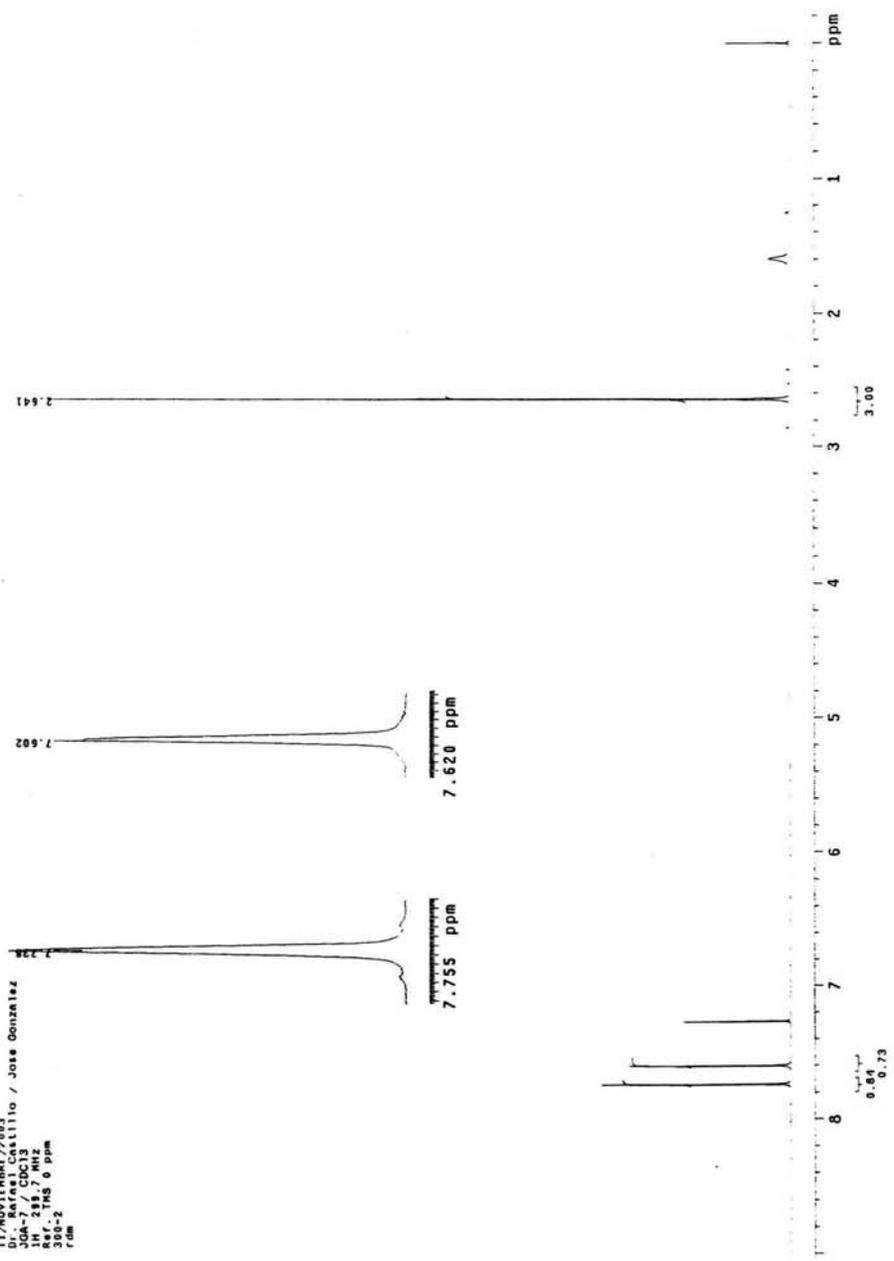
Ion Mode : EI+

Int. : 17.02

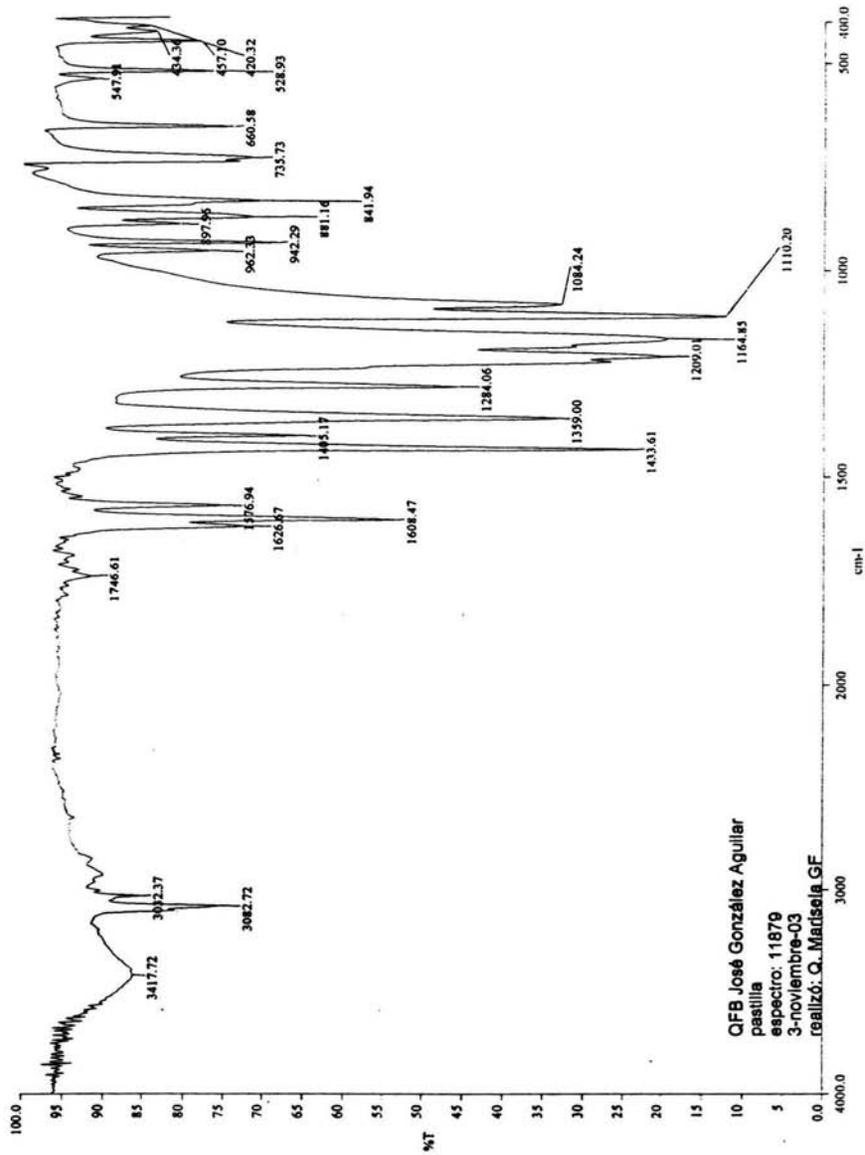


**Espectro 18: EM (IE) del compuesto 8**

USAI  
11/NOVIEMBRE/2003  
10:47:46  
JGA-7 / CDCl3  
1H - 299.7 MHz  
546.2 TMS 0 ppm  
f2d1



Espectro 19:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 8



Espectro 20: IR (KBr) del compuesto 9

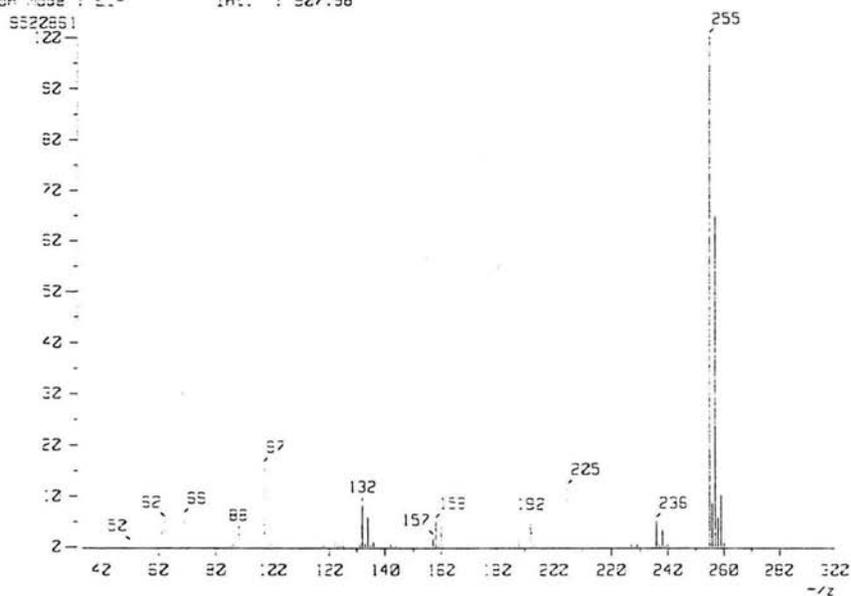
[ Mass Spectrum ]

RT : 5.68 min

Scan# : (226,208)-(221,265)-1... Temp : 29.8 deg.C

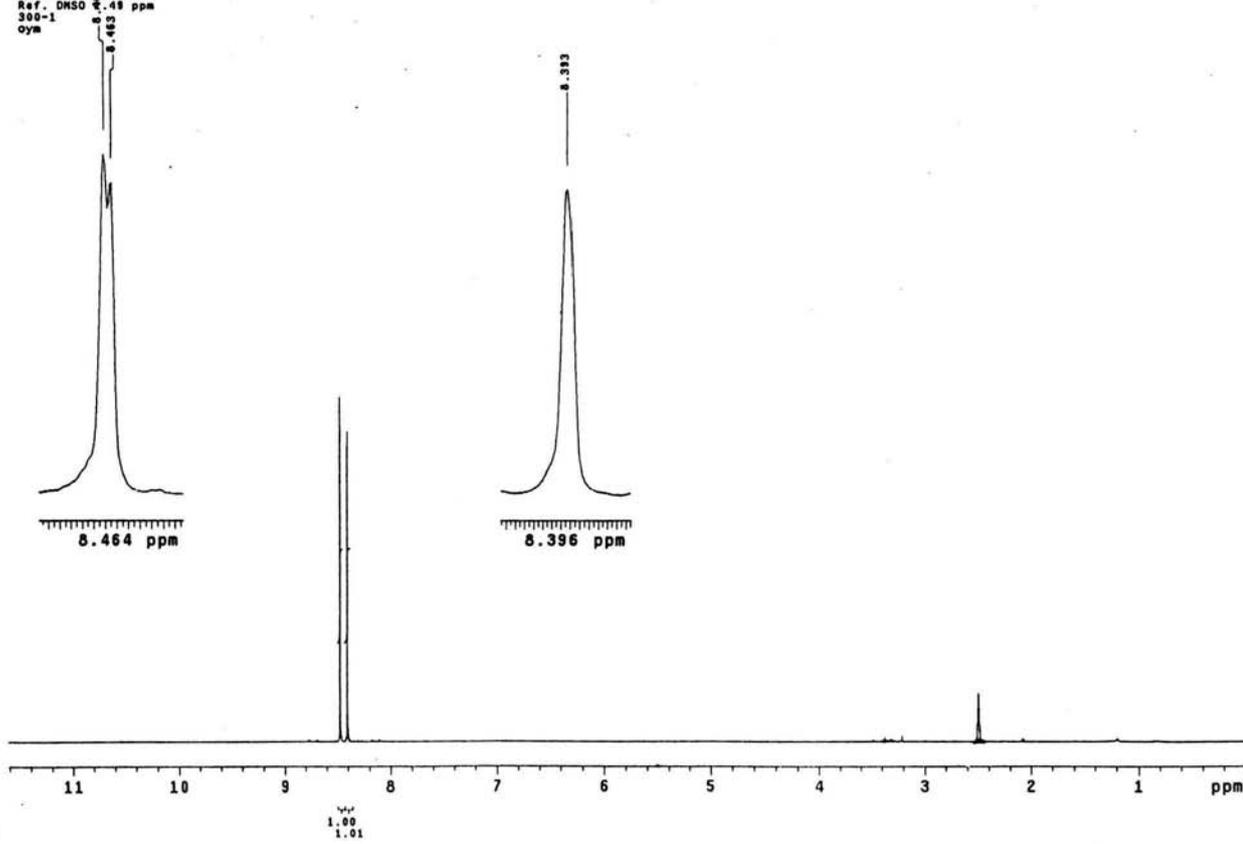
Ion Mode : EI-

Int. : 927.98



**Espectro 21: EM (IE) del compuesto 9**

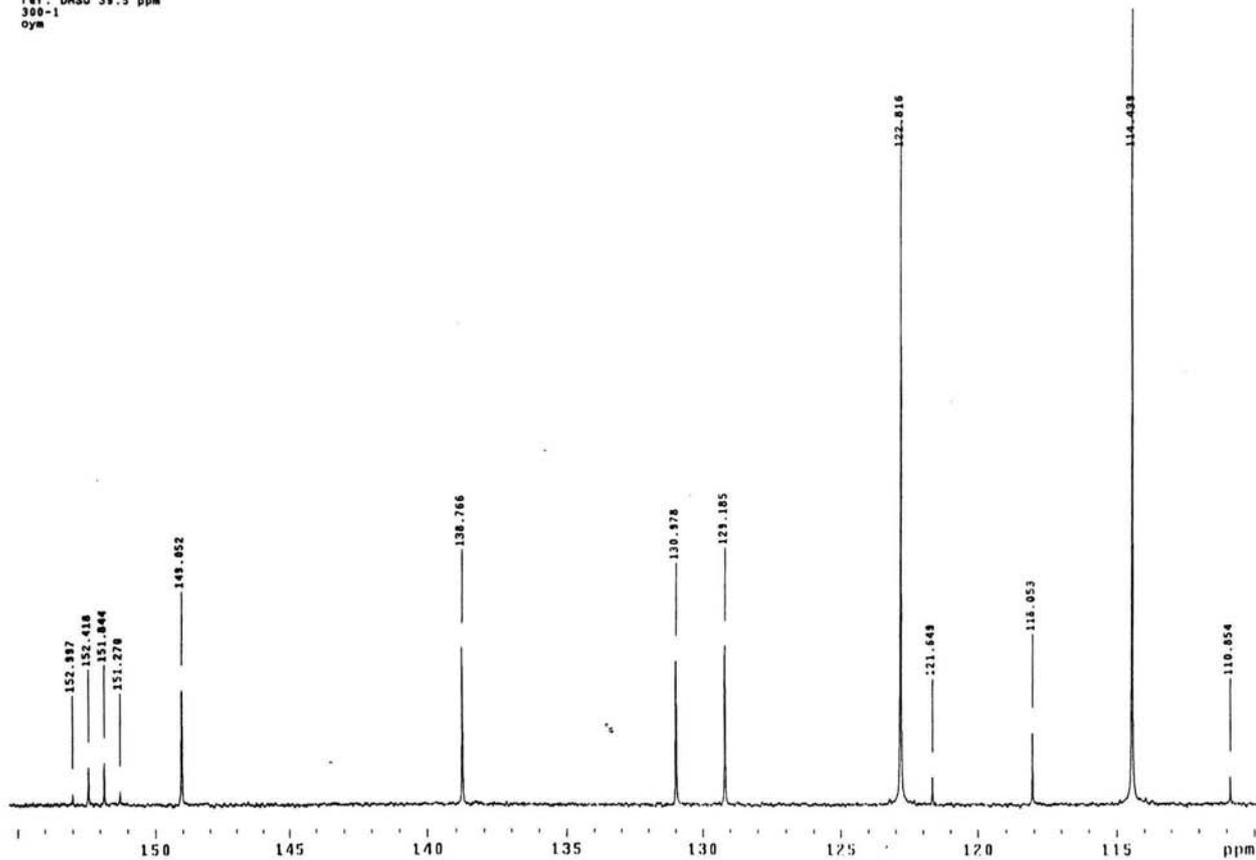
USAI  
5 noviembre 2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-8 / DMSO  
1H 299.7 MHz  
Ref. DMSO 1.49 ppm  
300-1  
oym



95

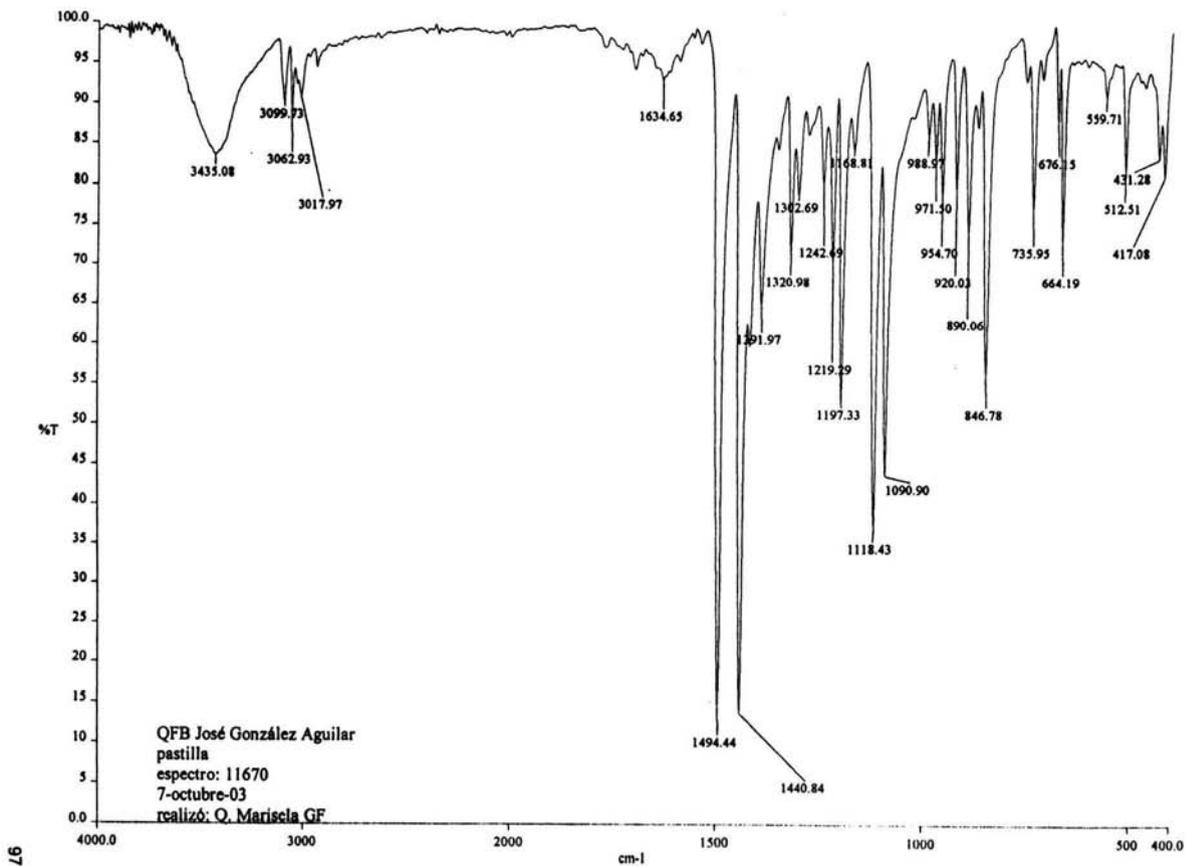
Espectro 22:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto 9.

USA1  
5 Noviembre 2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JUA-B / UNSO  
13C 75.5 MHz  
ref. DMSO 39.5 ppm  
300-1  
oym



96

Espectro 23:  $^{13}\text{C}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto 9

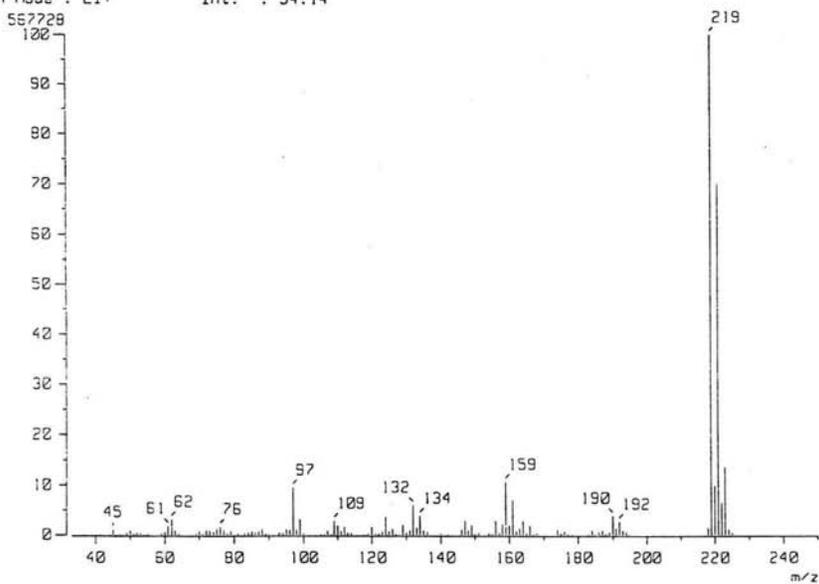


Espectro 24: IR (KBr) del compuesto 10

[ Mass Spectrum ]  
RT : 12.21 min  
Ion Mode : EI+

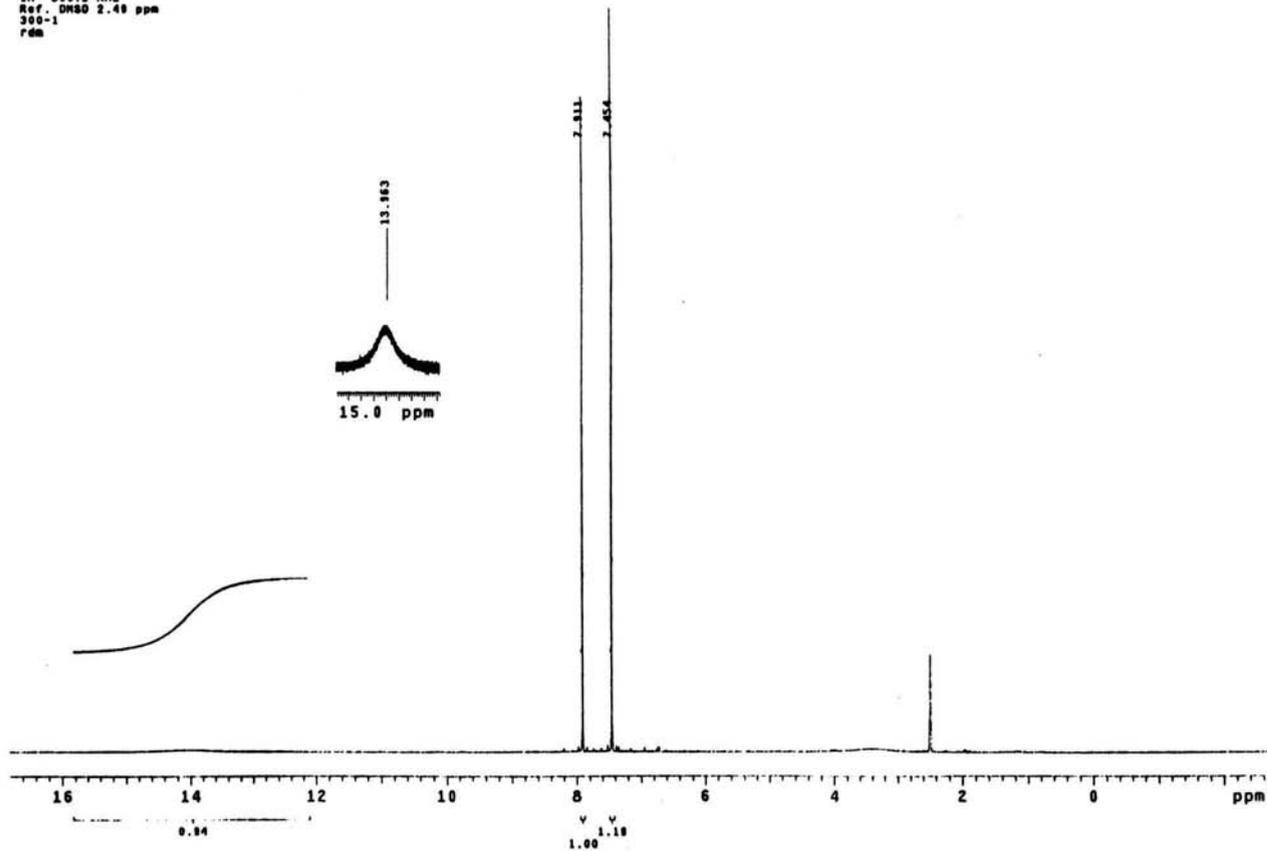
Scan# : 444-439-460  
Int. : 54.14

Temp : 27.4 deg.C



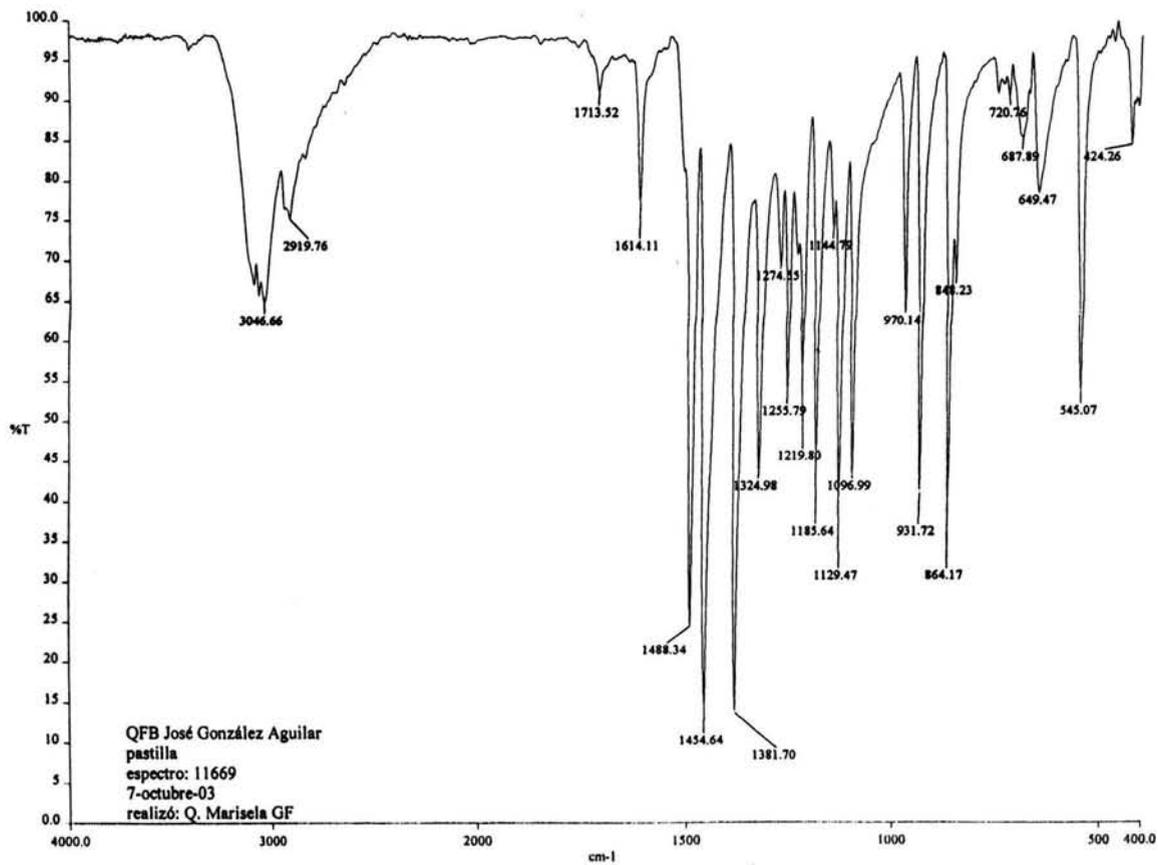
**Espectro 25: EM (IE) del compuesto 10**

USA1  
13/OCTUBRE/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-9 / DMSO  
1H 300.2 MHz  
Ref. DMSO 2.48 ppm  
300-1  
rdm



66

Espectro 26:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto 10



Espectro 27: IR (KBr) del compuesto 11

[ Mass Spectrum ]

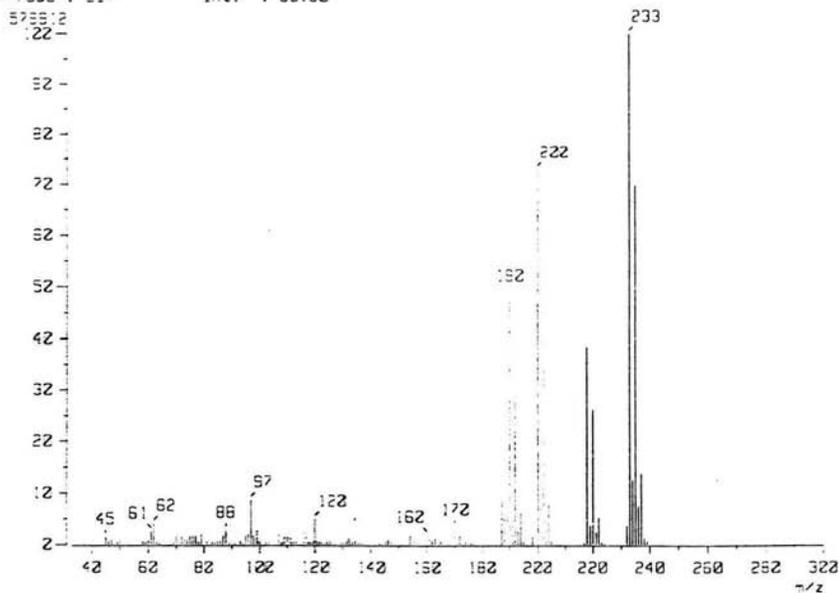
RT : 12.23 min

Ion Mode : EI+

Scan# : 365-382-378

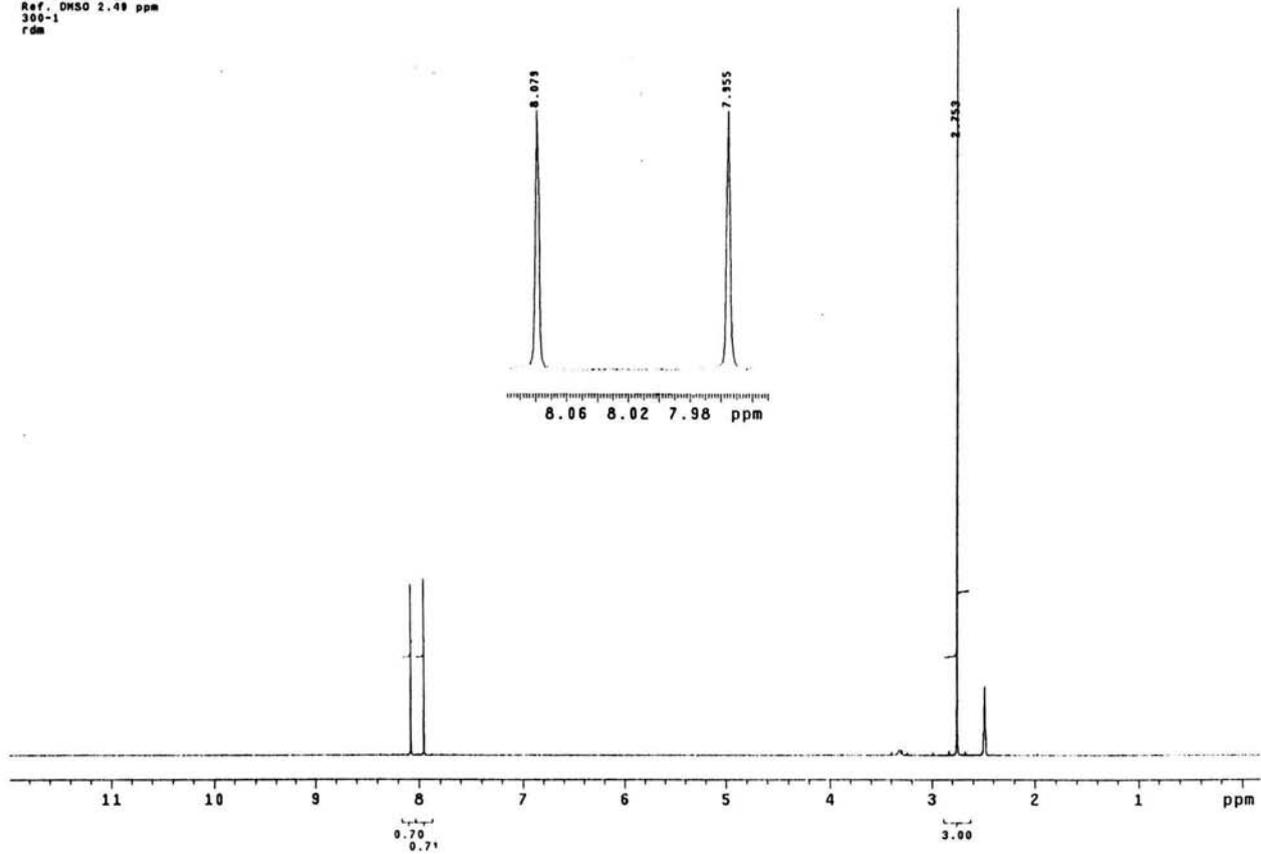
Int. : 55.32

Temp : 27.7 deg.C

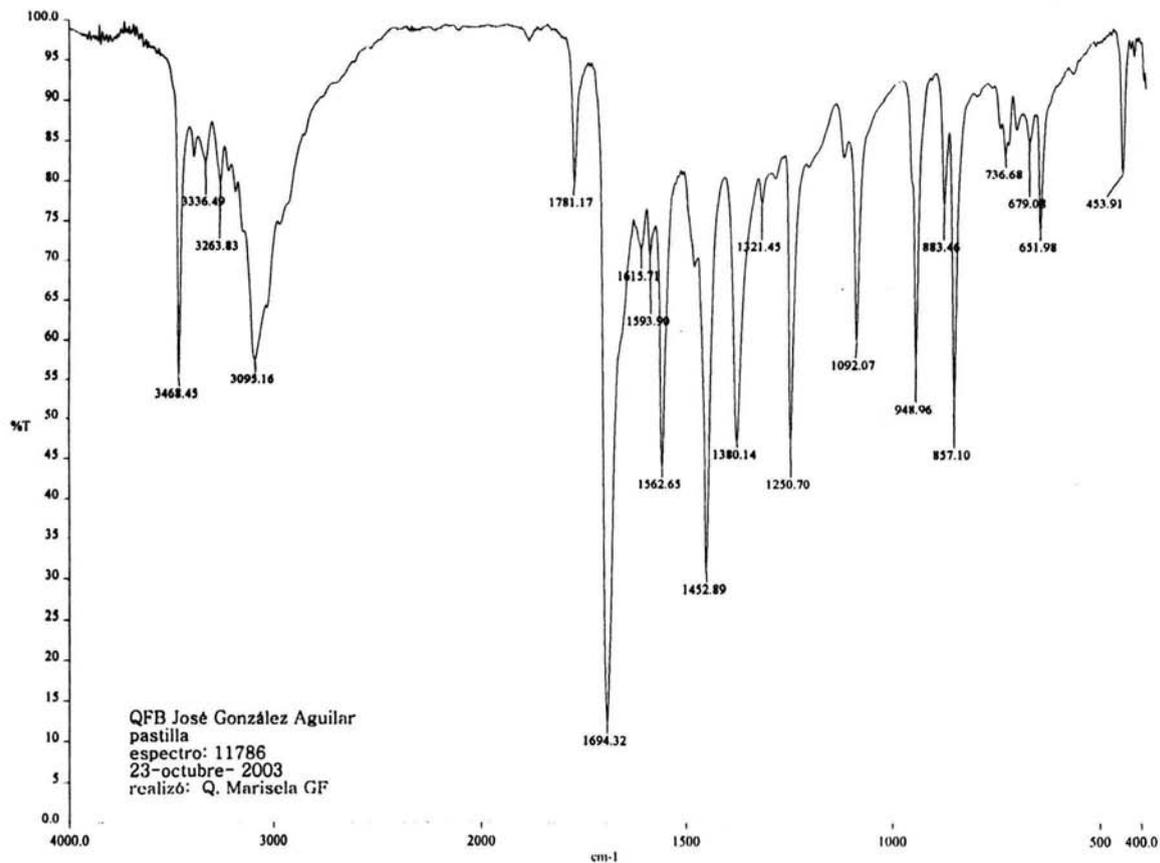


**Espectro 28: EM (IE) del compuesto 11**

USAI  
13/OCTUBRE/2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-19 / DMSO  
1H 300.2 MHz  
Ref. DMSO 2.49 ppm  
300-1  
rdm



Espectro 29:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto 11

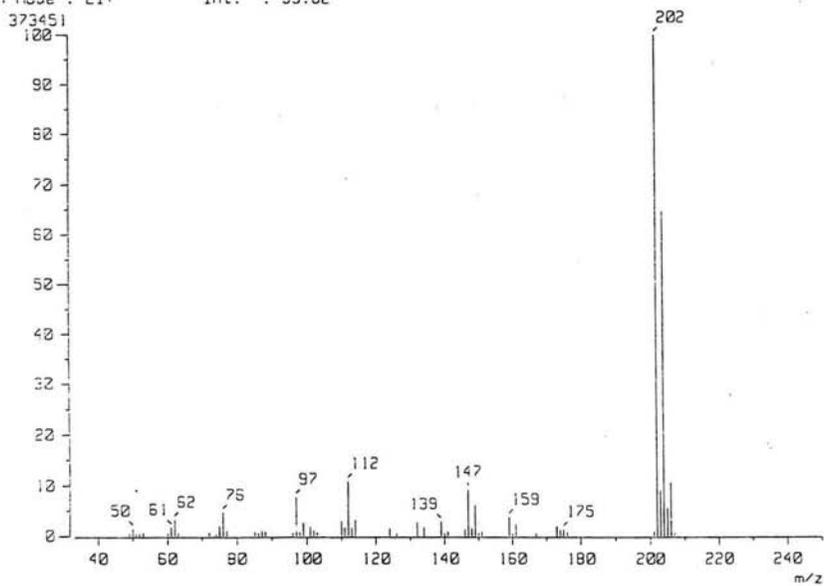


**Espectro 30: IR (KBr) del compuesto 12**

[ Mass Spectrum ]  
RT : 10.69 min  
Ion Mode : EI+

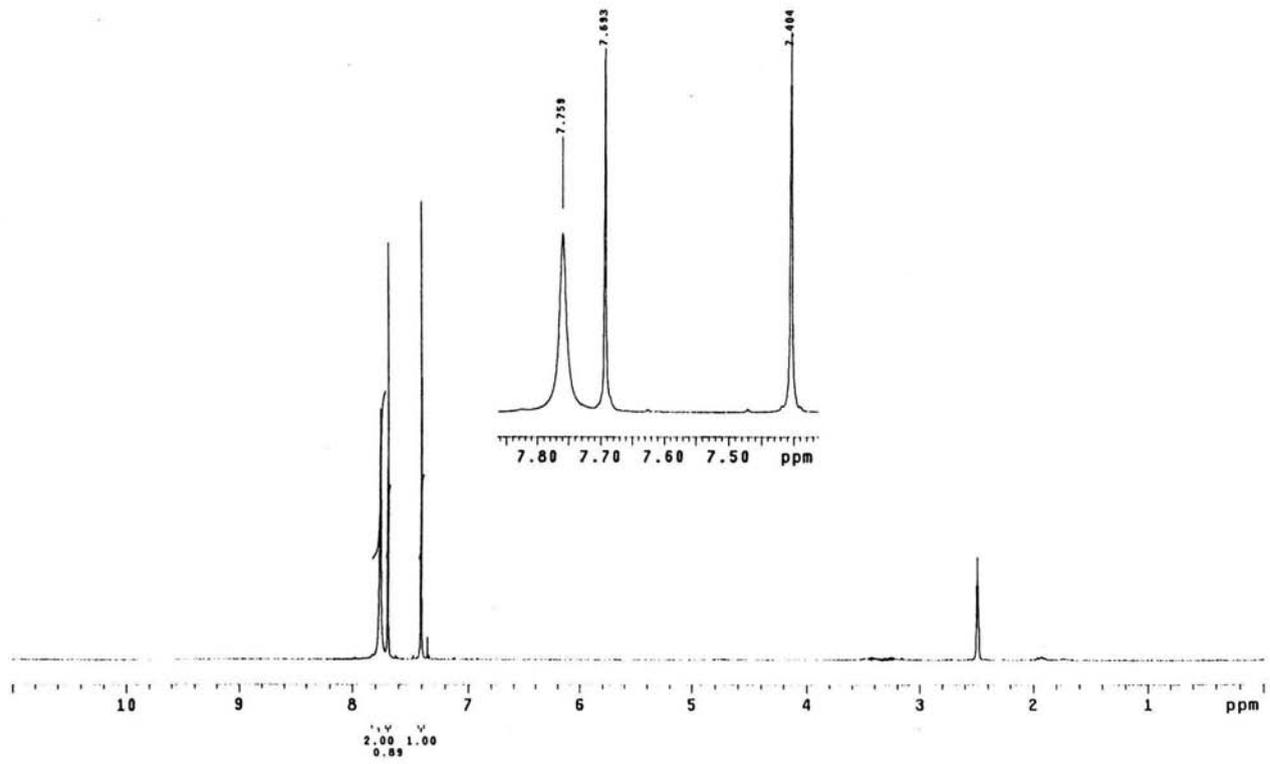
Scan# : 389-(482,647)  
Int. : 35.62

Temp : 28.6 deg.C

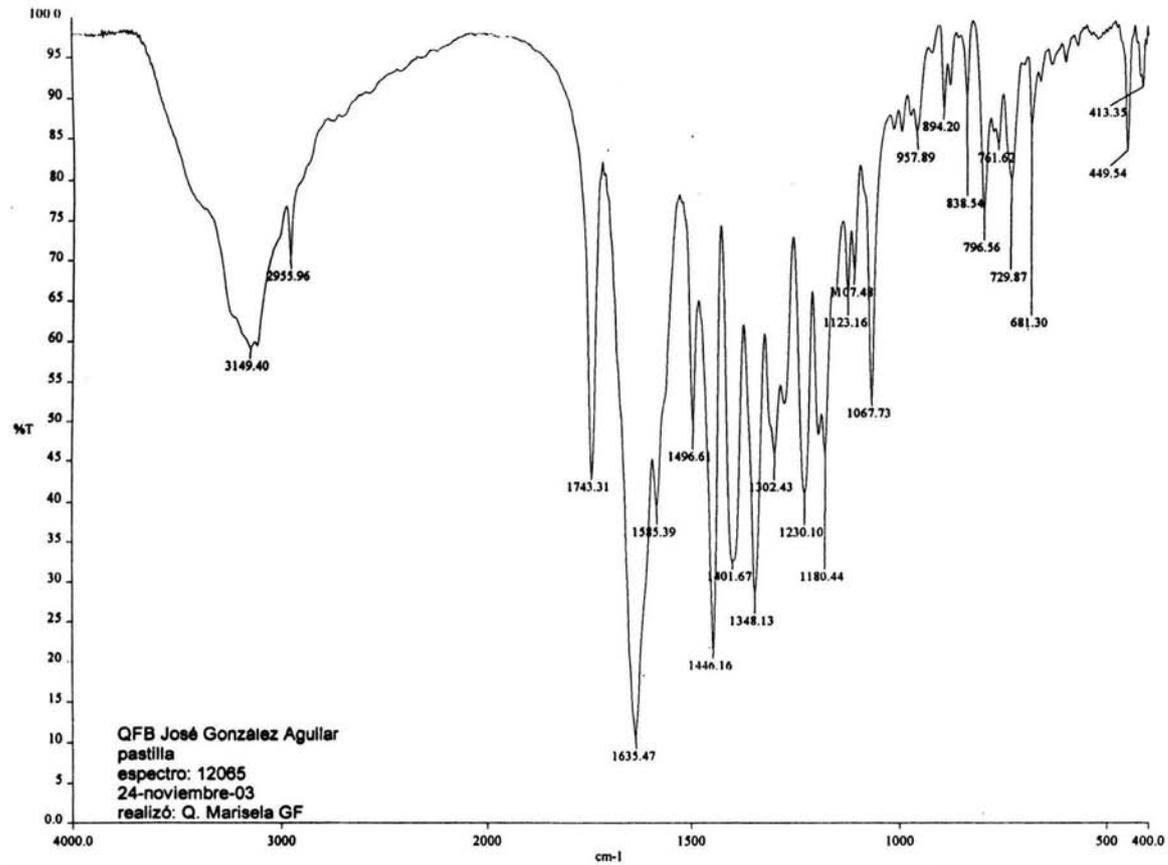


**Espectro 31: EM (IE) del compuesto 12**

USA1  
28 octubre 2003  
Dr. Rafael Castillo / Jose Gonzalez  
JGA-11 / DMSO  
1H 299.7 MHz  
ref. DMSO 2.48 ppm  
309-1  
oym



Espectro 32:  $^1\text{H}$  RMN (TMS, DMSO- $d_6$ ) del compuesto 12



QFB José González Aguilar  
 pastilla  
 espectro: 12065  
 24-noviembre-03  
 realizó: Q. Marisela GF

Espectro 33: IR (KBr) del compuesto 13

[ Mass Spectrum ]

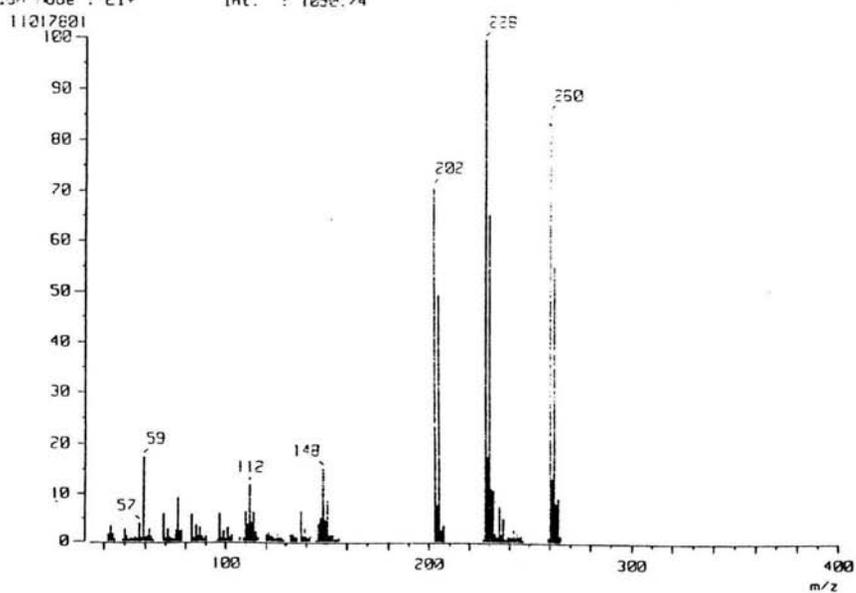
RT : 0.77 min

Ion Mode : EI+

Scan# : (29,30)-(43,51)

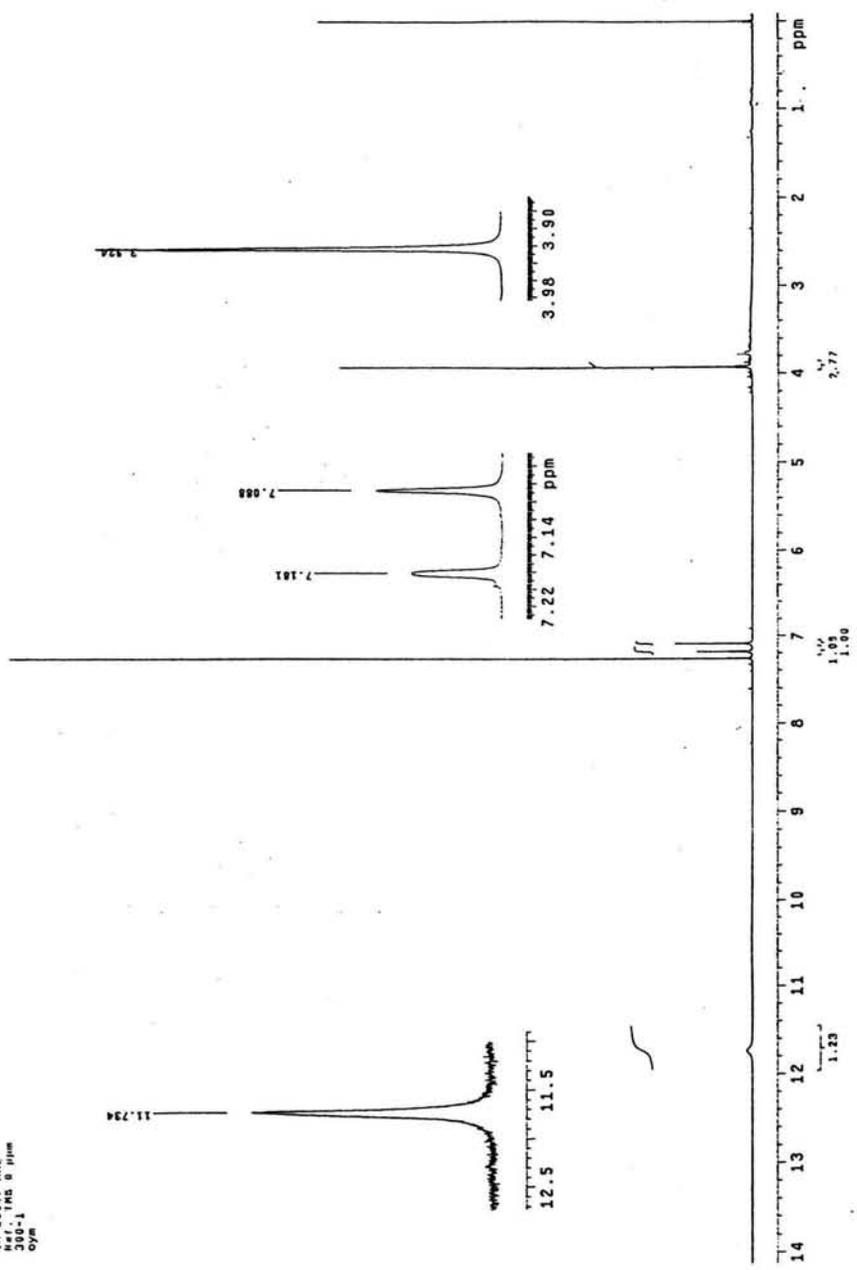
Int. : 1050.74

Temp : 25.0 deg.C



**Espectro 34: EM (IE) del compuesto 13**

UNN1  
28 noviembre 2003  
Laboratorio de Química Orgánica  
Alum.-14 / CUB14  
111.285,5 MHz  
200.-1 MS 5 ppm  
Dym



Espectro 35:  $^1\text{H}$  RMN (TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 13