



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE DERIVADOS  
BENCIMIDAZÓLICOS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

JARUMI FERNANDA FRAUSTO CASTORENA.



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Ana María Vázquez Álvarez
Vocal	M. en C. Alfonso Sebastián Lira Rocha
Secretario	Dra. Lilián Yépez Mulia
1er. Suplente	M.V.Z. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
2° Suplente	Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Parasitología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Asesor

---

Dra. Lilián Yépez Mulia

Supervisor Técnico

---

Dr. Francisco Hernández Luis

Sustentante

---

Jarumi Fernanda Frausto Castorena

## AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño a mis papas, por ser los mejores, por haberme educado, por enseñarme que lo más importante es el amor y el respeto para encontrar la felicidad. Por ser mis mejores amigos y apoyarme en todas mis decisiones. A mis abuelitos Consuelo y Gilberto, por enseñarme a enfrentar los problemas y amar la vida.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo académico y sobretodo por su paciencia y dedicación en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por todo su apoyo académico, por sus buenos consejos y por permitirme ser parte de su trabajo.

Al Q.F.B. Raúl Garza Velasco, por ayudarme a dar uno de los pasos más importantes al inicio de mi carrera, muchas gracias.

A la UNAM, porque siempre será parte de mí y lucharé para que siga siendo la mejor universidad. A todos mis profesores en la Facultad de Química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo, dentro del proyecto V43629-M.

A todos mis compañeros en el laboratorio de parasitología, Amparo, Rosa María, Jesús, Nancy, Leticia y Gabriel.

A mis amigos en la Facultad de Química, porque con ustedes aprendí a ser mejor cada día, logrando uno de los objetivos más importantes en mi vida.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Giardiosis.....	4
1.1.1. Taxonomía de <i>Giardia intestinalis</i> .....	5
1.1.2. Morfología .....	5
1.1.3. Metabolismo.....	7
1.1.4. Ciclo de vida.....	8
1.2. Tricomoniosis.....	10
1.2.1. Taxonomía.....	11
1.2.2. Morfología.....	11
1.2.3. Metabolismo.....	12
1.2.4. Ciclo de vida.....	14
1.3. Tratamiento empleado en la giardiosis y tricomoniosis.....	15
1.4. Mecanismo de acción de los compuestos bencimidazólicos y resistencia presentada por <i>Giardia intestinalis</i> .....	19
1.4.1. Mecanismo de acción de los compuestos nitroimidazólicos y resistencia presentada por <i>Giardia intestinalis</i> .....	20
1.5. Mecanismo de acción de los compuestos bencimidazólicos y resistencia presentada por <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	22
1.5.1. Mecanismo de acción de los compuestos nitroimidazólicos y resistencia presentada por <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	23
1.6. Generalidades de los compuestos bencimidazólicos .....	26
1.6.1 Relación estructura-actividad (SAR) en los compuestos bencimidazólicos.....	28

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares.....	35
5. METODOLOGÍA.....	35
5.1 Determinación de la curva de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	35
5.2 Evaluación de la actividad giardicida y tricomonicida de los nuevos derivados bencimidazólicos.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Curva de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .....	38
6.2. Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	39
6.3. Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> (μM)) de los nuevos derivados bencimidazólicos contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	41
6.4. Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> (μM)) de los nuevos derivados bencimidazólicos contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	47
7. CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO 1. Materiales y procedimiento experimental.....	64
REACTIVOS EMPLEADOS.....	64
EQUIPO.....	65
PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 MODIFICADO, PARA <i>Giardia intestinalis</i> .....	65

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S- 33 PARA <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	66
PRUEBA DE ESTERILIDAD.....	67
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS AL 10 % (v/v) (PBS 10X).....	67
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TROFOZOÍTOS/mL PARA EL INÓCULO INICIAL.....	68
MANTENIMIENTO DEL CULTIVO AXÉNICO DE <i>Giardia intestinalis</i> .....	69
MANTENIMIENTO DEL CULTIVO AXÉNICO DE <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	70
PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS.....	71
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TROFOZOÍTOS VIVOS EN LOS ENSAYOS.....	74
ANEXO 2. Tablas de resultados del número de trofozoítos vivos y muertos.....	75
2.1. Tablas correspondientes al número de trofozoítos vivos y muertos de <i>Giardia intestinalis</i> .....	75
2.2. Tablas correspondientes al número de trofozoítos vivos y muertos de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	81
ANEXO 3. Fórmulas empleadas en el análisis estadístico.....	87
3.1. Análisis estadístico referente a <i>Giardia intestinalis</i> .....	89
3.2. Análisis estadístico referente a <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de giardiosis por grupo de edad (Población general, año 2004).....	4
Figura 2. Número de casos de giardiosis por entidad federativa (Población general, año 2005).....	5
Figura 3. Quiste de <i>Giardia intestinalis</i> señalando sus estructuras.....	7
Figura 4. Trofozoíto de <i>Giardia intestinalis</i> señalando su morfología.....	7
Figura 5 Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i> .....	9
Figura 6 Distribución de tricomoniosis urogenital por grupo de edad (Población general, año 2004).....	10
Figura 7. Número de casos de tricomoniosis por entidad federativa (Población general, año 2005).....	11
Figura 8 Trofozoíto de <i>Trichomonas vaginalis</i> señalando su morfología.....	12
Figura 9 Metabolismo hidrogenosomal de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	13
Figura 10 Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	14
Figura 11 Mecanismo de acción de los compuestos derivados del carbendazim.....	19
Figura 12 Activación del grupo nitro en <i>Giardia intestinalis</i> .....	21
Figura 13. Activación del metronidazol en el hidrogenosoma de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	24
Figura 14 Modificaciones realizadas sobre el anillo bencimidazólico.....	28
Figura 15 Tautomerismo de la molécula de bencimidazol.....	29
Figura 16. Regioisómeros 1–metilados de la molécula de bencimidazol.....	29
Figura 17 Curva de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .....	38

Figura 18. Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	40
Figura 19. Actividad comparada de los compuestos <b>AHM-4</b> , <b>AHHM-11</b> , <b>AHM-17</b> y <b>AHM23</b> , evaluados contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	42
Figura 20. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra <i>Giardia intestinalis</i> , con respecto al albendazol.....	43
Figura 21 Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra <i>Giardia intestinalis</i> , con respecto al metronidazol.....	44
Figura 22 Actividad comparada de los compuestos <b>AHM-4</b> , <b>AHHM-11</b> , <b>AHM-17</b> y <b>AHM23</b> , evaluados contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	49
Figura 23. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra <i>Trichomonas vaginalis</i> , con respecto al albendazol.....	50
Figura 24 Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra <i>Trichomonas vaginalis</i> , con respecto al metronidazol.....	50
Figura 25. Cámara de Neubauer.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos empleados en el tratamiento de la giardiosis y tricomoniosis.....	17
Tabla 2. Valores de logP y solubilidad de los compuestos derivados del carbendazim.....	27
Tabla 3. Actividad biológica <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> μM) contra <i>Giardia intestinalis</i> , de algunos compuestos derivados del bencimidazol.....	29
Tabla 4. Actividad biológica <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> μM) de compuestos derivados del bencimidazol, contra <i>Giardia intestinalis</i> , y <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	31

Tabla 5. Compuestos propuestos para la evaluación de la actividad biológica contra <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	33
Tabla 6. Número de trofozoítos de <i>Giardia intestinalis</i> , obtenidos a diferentes tiempos de cultivo .....	38
Tabla 7. Número de trofozoítos de <i>Trichomonas vaginalis</i> , obtenidos a diferentes tiempos de cultivo.....	39
Tabla 8. Valores de $CI_{50}$ de los nuevos derivados bencimidazólicos, albendazol y metronidazol obtenidos por el método de subcultivo, contra <i>Giardia intestinalis</i> . .....	41
Tabla 9. Actividad biológica <i>in vitro</i> ( $CI_{50}$ $\mu$ M) de los derivados 1-metilbencimidazólicos contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	46
Tabla 10. Valores de $CI_{50}$ de los nuevos derivados bencimidazólicos, albendazol y metronidazol obtenidos por el método de subcultivo, contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	48
Tabla 11. Actividad biológica <i>in vitro</i> ( $CI_{50}$ $\mu$ M) de los derivados 1-metilbencimidazólicos contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	52
Tabla 12. Análisis de varianza.....	87
Tabla 13. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos para <i>Giardia intestinalis</i> .....	89
Tabla 14. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	90
Tabla 15. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y albendazol para <i>Giardia intestinalis</i> .....	92
Tabla 16. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y albendazol contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	93

Tabla 17. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y metronidazol para <i>Giardia intestinalis</i> .....	95
Tabla 18. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y metronidazol contra <i>Giardia intestinalis</i> .....	96
Tabla 19. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos para <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	99
Tabla 20. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	100
Tabla 21. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y albendazol para <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	102
Tabla 22. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y albendazol contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	103
Tabla 23. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y metronidazol para <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	105
Tabla 24. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los compuestos evaluados y metronidazol contra <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	106

#### ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Diluciones realizadas con cada uno de los compuestos.....	71
Diagrama 2. Diluciones realizadas para las diferentes concentraciones de los compuestos evaluados.....	73

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, las parasitosis son un problema de salud pública a nivel mundial y en especial en países en desarrollo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que alrededor de 3,500 millones de habitantes en el mundo están parasitados y aproximadamente 450 millones padecen alguna enfermedad parasitaria, siendo la más afectada la población infantil (Ximénez, 2002). Esta misma organización, en su informe sobre la salud en el mundo del año 2004, indicó que las enfermedades transmisibles presentaron un porcentaje de mortalidad del 32.1%, de este porcentaje el 19.1% fue debido a enfermedades infecciosas y parasitarias, considerando a un total de población de 6,224,985,000 de personas de ambos sexos, correspondientes a los 192 países miembros de esta organización ([www.who.int](http://www.who.int)).

En México, las parasitosis se encuentran dentro de las 20 principales causas de mortalidad. Durante el año 2005, la Secretaría de Salud reportó 5,628,994 casos de infecciones intestinales debidas a protozoarios en la población en general, entre las que se encuentra la giardiosis, la cual es una enfermedad provocada por el protozooario *Giardia intestinalis*. Éste es un parásito presente en el agua y alimentos contaminados, por lo que su transmisión es por vía oral, infecta a los humanos y otros animales, generando un cuadro diarreico severo. La giardiosis es de prevalencia mundial, sin embargo, las regiones más afectadas son: el sur y sureste de Asia, la región tropical de África, México y el oeste de Sudamérica. En Estados Unidos, es la parasitosis con el mayor número de casos reportados (Wolfe, 1992).

La tricomoniosis urogenital, es otra parasitosis, provocada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. En México, en el año 2005 se reportaron 170,586 casos (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, 2006).

La tricomoniosis urogenital es una enfermedad de transmisión sexual, se asocia con otras enfermedades como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en complicaciones que se presentan durante el embarazo y el nacimiento como: infección activa del líquido amniótico (corioamnionitis), parto prematuro y bajo peso del bebé al nacer (Cudmore et al., 2004). A nivel mundial, la población de entre 15 y 35 años es la más afectada y a pesar de su importancia, la información referente a su incidencia es limitada (Schwebke y Burgess, 2004).

En el tratamiento actual para la giardiosis y tricomoniosis se emplean metronidazol y nitazoxanida, como fármacos de primera elección. El albendazol es una alternativa en el tratamiento de la giardiosis, sin embargo, no siempre resulta efectivo (Lemée et al., 2000). En el tratamiento de ambas enfermedades con metronidazol, se han reportado casos de falla terapéutica. Esta falla puede deberse a la falta de continuidad en el tratamiento, ya que el régimen de dosis es muy prolongado y los efectos adversos mostrados por este fármaco, incluyen: dolor de cabeza, náusea, vértigo, sabor metálico y urticaria (Gardner y Hill, 2001). Además, se ha demostrado la presencia de aislados de estos parásitos con resistencia al metronidazol. Respecto al albendazol se han obtenido *in vitro*, cepas de *G. intestinalis* resistentes al fármaco (Upcroft y Upcroft, 2001).

Considerando lo anterior, se pone de manifiesto la necesidad de contar con alternativas para el tratamiento de estas parasitosis, por lo que se requiere la

síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria.

Con la finalidad de conocer más acerca de la relación estructura-actividad antiparasitaria, se ha empleado al núcleo del bencimidazol como esqueleto líder, añadiéndole sustituyentes diferentes, en posiciones diferentes.

De esta forma se han incorporado sustituyentes metilo ( $-\text{CH}_3$ ) en la posición 1, sustituyentes  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$ , en la posición 2 y en la posición 5 y/o 6 cloro e hidrógeno. Algunos de estos compuestos, han presentado buena actividad giardicida y tricomonocida (Navarrete et al., 2001; Sánchez, 1999). Con los resultados obtenidos se han diseñado nuevos compuestos con potencial actividad antiparasitaria.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Giardiosis

En México, en el año 2004 se presentaron 40,906 casos de giardiosis en todo el país, de los cuales 9,734 casos se presentaron en personas de 1 a 4 años de edad (Figura 1). En el año 2005 se presentaron 36,140 casos, siendo el Distrito Federal y el Estado de México, las entidades con el mayor número de casos (3,303 y 3,000 respectivamente) (Figura 2). Durante los dos primeros meses del año 2006, se han registrado 4,816 casos de giardiosis, cifra menor a la reportada en 2005 con 5,323 casos. La giardiosis afecta principalmente a niños en edad preescolar y escolar, provocando el Síndrome de malabsorción, esto debido a que la unión de los trofozoítos sobre el epitelio intestinal, atrofia las microvellosidades, induciéndose un déficit de la actividad enteropeptidásica de las hidrolasas peptídicas, consecuentemente hay una disminución en la absorción de nutrientes como la vitamina B<sub>12</sub> y grasas, lo que también provoca estratorrea (Wolfe, 1992).

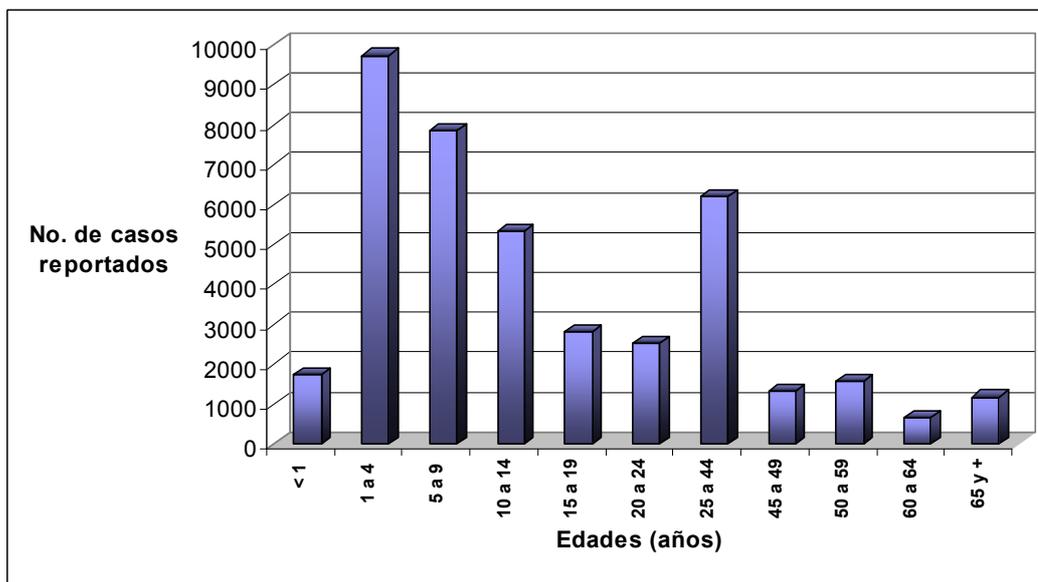


Figura 1. Distribución de giardiosis por grupo de edad (Población general, año 2004)  
Tomado de Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

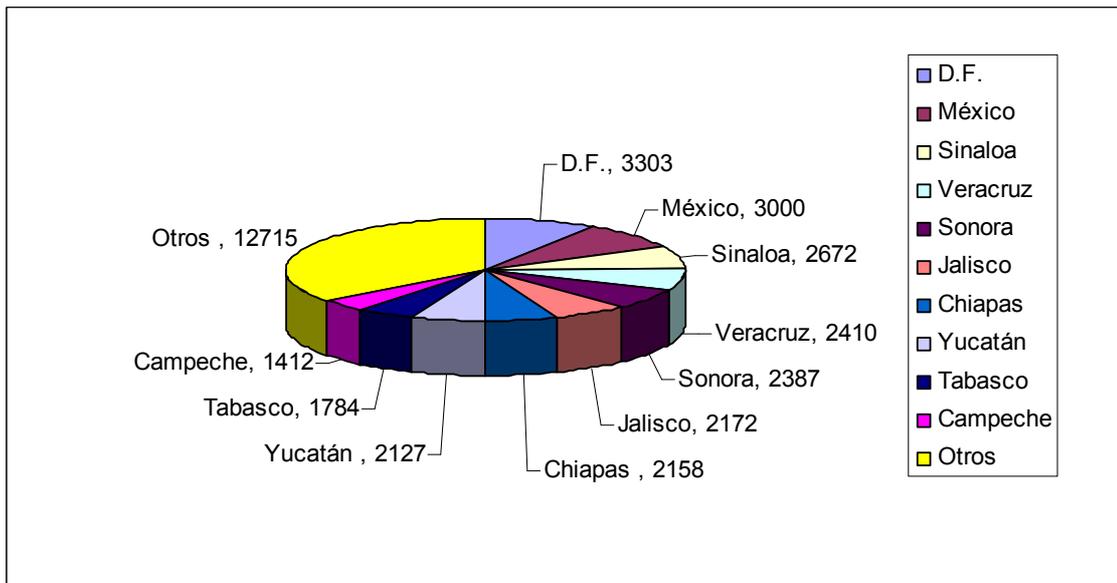


Figura 2. Número de casos de giardiasis por entidad federativa (Población general, año 2005). Tomado de Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

#### 1.1.1. Taxonomía de *Giardia intestinalis* (Smyth, 1994)

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Filo:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subfilo:	<i>Mastigophora</i>
Orden:	<i>Diplomonadida</i>
Familia:	<i>Hexamitidae</i>
Género:	<i>Giardia</i>
Especie:	<i>intestinalis</i>

#### 1.1.2. Morfología

En su ciclo vital, *G. intestinalis* se caracteriza por presentar dos morfologías, una forma vegetativa, llamada trofozoíto, y una más pequeña resistente a condiciones ambientales adversas, llamada quiste. El quiste mide de 9 a 12  $\mu\text{m}$  de largo y 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, en su estado maduro contiene cuatro núcleos, cuerpos medios curvados y axonemas lineales (Figura 3), (Schmidt y Roberts, 2000). El quiste, es la fase infectiva y puede sobrevivir en el agua hasta por tres meses, así como a concentraciones de hipoclorito de sodio, empleadas para la purificación del agua (Wolfe, 1992).

El trofozoíto tiene simetría bilateral, es periforme, con un extremo anterior ancho y un extremo posterior delgado, mide de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo. En la parte anterior tiene una estructura llamada disco ventral, con una parte central formada por grupos de microtúbulos que le confieren rigidez llamada cuerpo medio, presenta dos núcleos idénticos y ovalados. En la parte media se encuentran los cuerpos parabasales. Tiene cuatro pares de flagelos, que se nombran de acuerdo a su disposición como: anterior, posterior, ventral y caudal, éstos se generan a partir de estructuras llamadas blefaroblastos, al conjunto de blefaroblastos se nombra como quinetosoma (Figura 4). El disco ventral está conformado por proteínas estructurales llamadas: giardinas y tubulina, que forma a los microtúbulos, éstos últimos también son parte estructural de los flagelos. Su división celular es por fisión binaria longitudinal (Smyth, 1994; Schmidt y Roberts, 2000). En su citoplasma no presenta lisosomas ni retículo endoplásmico liso, y por mucho tiempo se consideró carente de mitocondrias, sin embargo, recientemente, se demostró la presencia de organelos llamados mitosomas. Estos organelos contienen proteínas estructurales encargadas de la biosíntesis de enzimas con sitios catalíticos [Fe-S], como la desulfurasa de cisteína (IscS), la cual filogenéticamente se ubica dentro de las mitocondrias e hidrogenosomas.

Los mitosomas contienen peptidasas que también están presentes en el hidrogenosoma de *T. vaginalis* y en las mitocondrias. En estos organelos se realiza la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), molécula empleada en el metabolismo del parásito (Tovar et al., 2003; Dolezal et al., 2005).

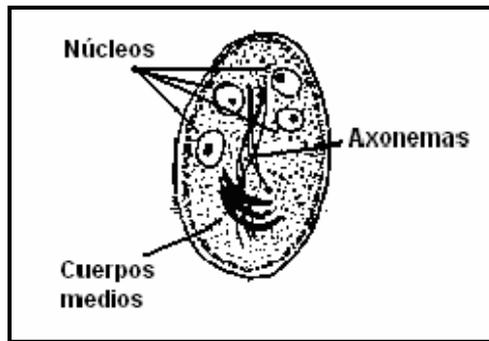


Figura 3. Quiste de *Giardia intestinalis* señalando sus estructuras. Tomada de [www.cdfound.to.it](http://www.cdfound.to.it)

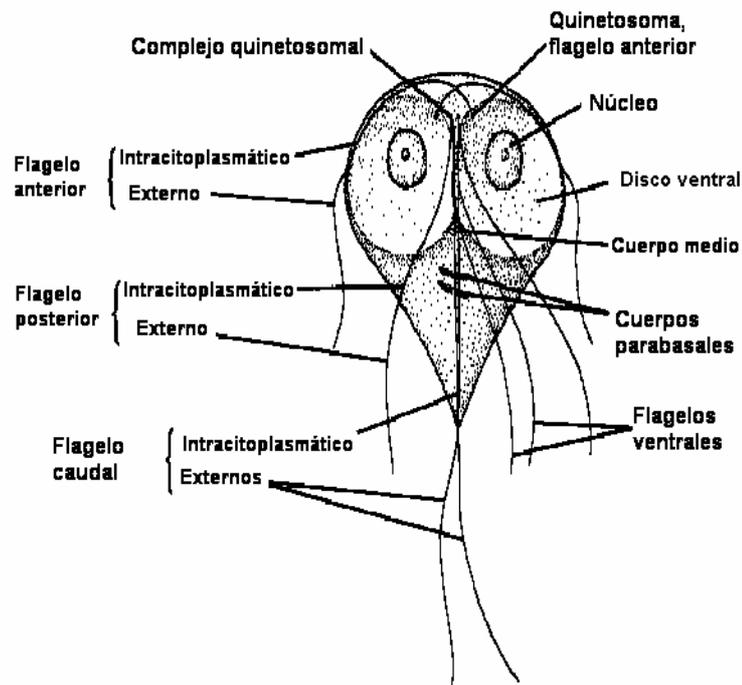


Figura 4. Trofozoíto de *Giardia intestinalis* señalando su morfología. Tomada de Schmidt y Roberts, 2000.

### 1.1.3. Metabolismo

*Giardia intestinalis* se considera un microorganismo microaerofílico (Upcroft y Upcroft, 2001). El parásito emplea como fuente de carbono la glucosa, sin embargo, se demostró que a bajas concentraciones de ésta, el parásito sigue produciendo sus principales metabolitos como son: el etanol, alanina, acetato y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por lo tanto se establece que la glucosa no es su única fuente de carbono (Schofield y Edwards, 1994). Uno de los principales complejos

enzimáticos de su metabolismo es la piruvato: ferredoxin-oxidorreductasa (PFOR) acoplada a la ferredoxina I, ferredoxin: NAD oxidorreductasa y a la NADH oxidasa. La PFOR cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato, durante este proceso se genera acetil coenzima A, coenzima A reducida, y agua (Upcroft y Upcroft, 2001). Los aminoácidos más importantes en el metabolismo de *G. intestinalis* son la alanina y la arginina, siendo la alanina el producto mayoritario de su metabolismo. Respecto a la formación de etanol, se produce a partir de una enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH + H<sup>+</sup> (Schofield y Edwards, 1994).

#### 1.1.4. Ciclo de vida

La forma infectante de *G. intestinalis* es el quiste, éste se encuentra viable tanto en el agua como en la materia fecal, por lo que el consumo de agua y alimentos contaminados con quistes del parásito, provoca que el protozoario se establezca en el organismo del hospedero (Figura 5). Una vez que el quiste se ingiere, ocurre la transformación de quiste a trofozoíto, en la parte superior del estómago. Debido a las condiciones ácidas en esta región y gracias a los movimientos peristálticos, el trofozoíto se traslada hacia el intestino delgado (duodeno – yeyuno), en donde el parásito se adhiere a las células epiteliales a través del disco ventral. Una vez establecido, se lleva a cabo la división celular por fisión binaria (Upcroft y Upcroft, 2001). En algunos casos los trofozoítos pueden propagarse por el interior de los conductos biliares y pancreáticos hasta llegar a la vesícula biliar, sin embargo no tiene la capacidad de penetrar la submucosa y mucosa del epitelio intestinal, así como establecerse en otros órganos (Brustenga, 1996). Los trofozoítos, cuando son arrastrados por el agua y movimientos peristálticos hacia el colon, se convierten en quistes, las principales características

de la transformación son: el acortamiento de los flagelos y la deshidratación de los trofozoítos. Las sales biliares como el glicolato y los ácidos grasos como el ácido mirístico a un pH ligeramente alcalino, promueven la formación del quiste (Gillin et al., 1988). Finalmente, los quistes son expulsados del organismo junto con la materia fecal y nuevamente se encuentran libres en el medio ambiente.

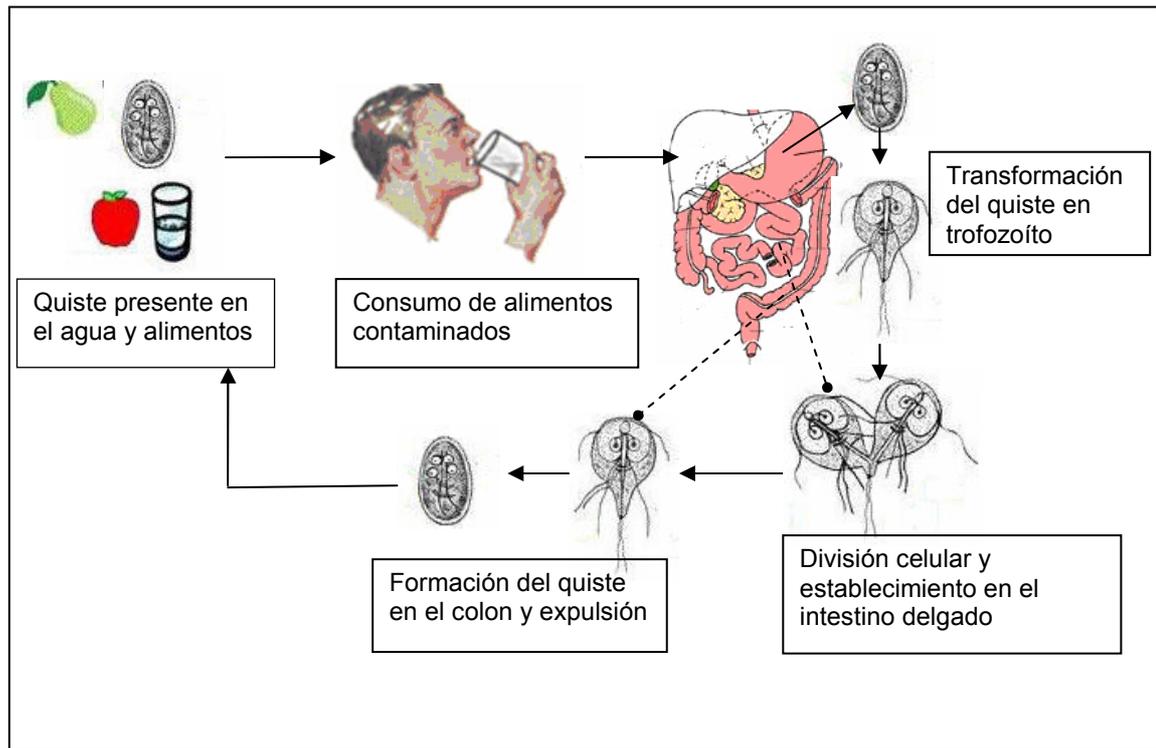


Figura 5. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*.

El período de incubación del microorganismo es de siete días en promedio, y la enfermedad en su fase aguda perdura de tres a cuatro días o más (Upcroft y Upcroft, 2001). Los síntomas varían dependiendo de la cepa, en algunos casos los pacientes suelen ser asintomáticos, sin embargo hay personas que presentan una intensa producción de moco intestinal, diarrea, deshidratación, dolor abdominal, flatulencia y pérdida de peso (Wolfe, 1992; Upcroft y Upcroft, 2001).

## 1.2. Tricomoniosis

De acuerdo al Boletín de Epidemiología emitido por la Secretaría de Salud, en el año 2004, el mayor número de casos de tricomoniosis se presentó en edades de 25 a 44 años (Figura 6). En el año 2005, los Estados de Veracruz y de México presentaron el mayor número de casos de esta enfermedad (26,107 y 14,978 respectivamente) (Figura 7). En los dos primeros meses del 2006, se han reportado 24,343 casos de tricomoniosis, cifra similar a la reportada en el 2005 para el Estado de Veracruz, lo que sugiere que en este año, el número de casos en México será mayor que en el 2005.

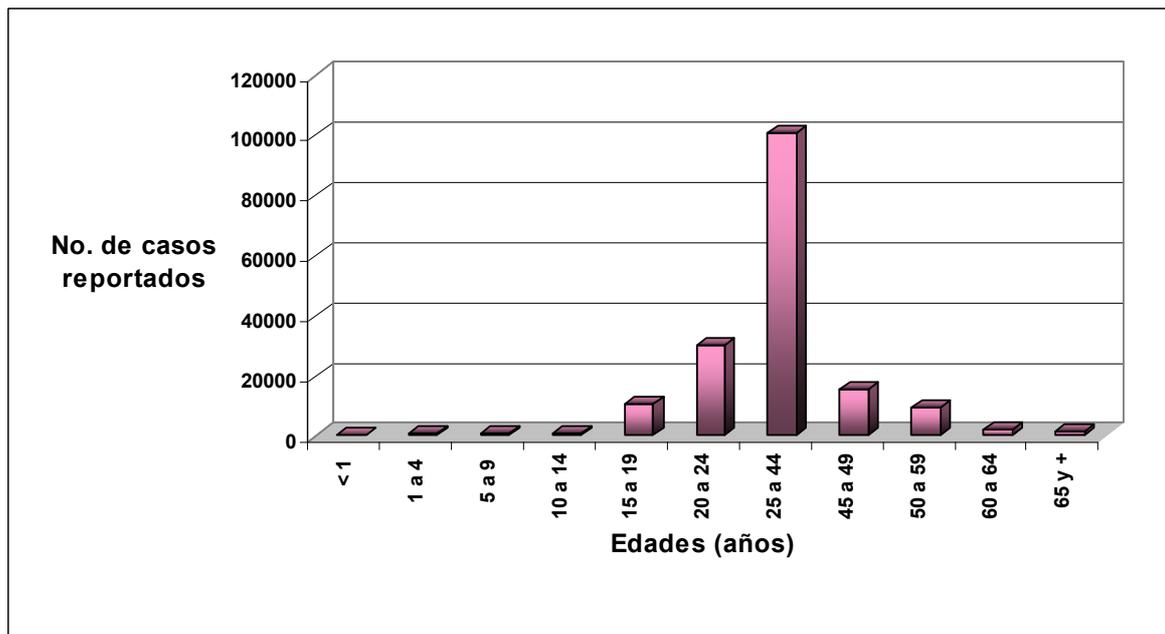


Figura 6. Distribución de tricomoniosis urogenital por grupo de edad (Población general, año 2004) Tomado de Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

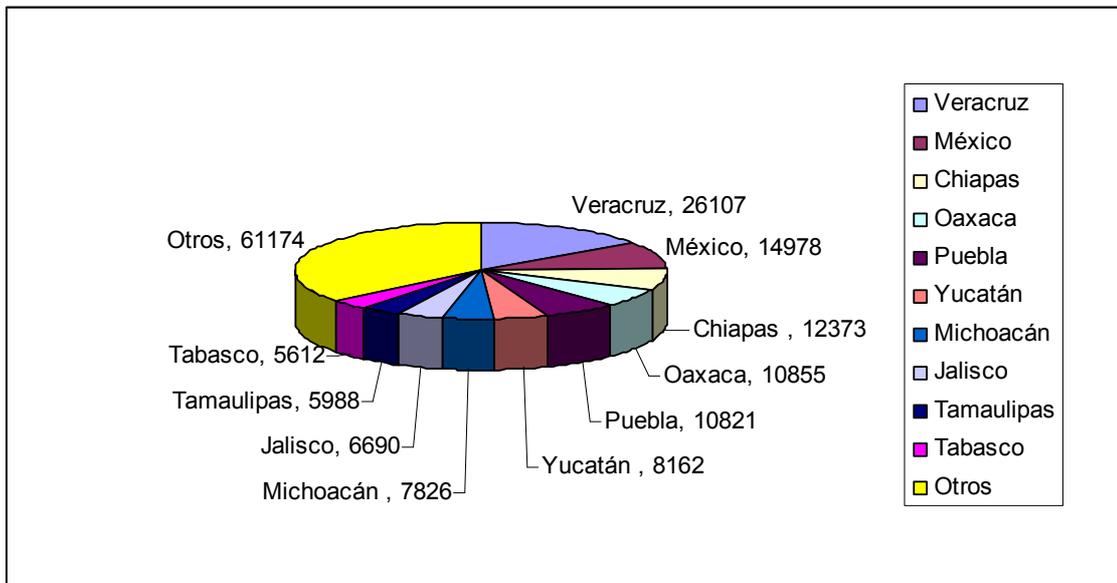


Figura 7. Número de casos de tricomoniasis por entidad federativa (Población general, año 2005). Tomado de Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

### 1.2.1 Taxonomía de *Trichomonas vaginalis* (Smyth, 1994)

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Filo:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subfilo:	<i>Mastigophora</i>
Orden:	<i>Trichomonadida</i>
Familia:	<i>Trichomonadidae</i>
Género:	<i>Trichomonas</i>
Especie:	<i>vaginalis</i>

### 1.2.2. Morfología

*Trichomonas vaginalis*, no presenta una fase de resistencia, sólo la fase de trofozoíto, éste mide de 7  $\mu\text{m}$  a 32  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 12  $\mu\text{m}$  de ancho, es de forma alargada y ovoide. Respecto a su morfología interna, contiene una parte central rígida llamada axostilo, a través del cual presenta una línea de organelos productores de energía llamados hidrogenosomas. En la parte anterior se localiza el núcleo, que tiene una membrana semipermeable similar a la de los organismos eucariontes, por arriba del núcleo se encuentra el blefaroblasto, a partir del cual se

generan las siguientes estructuras: una base rígida lineal denominada costa, que también presenta una serie de hidrogenosomas, cuatro flagelos anteriores y una porción delgada con movimiento llamada membrana ondulante, a partir de ésta se genera a su vez el flagelo posterior y contiene un cuerpo parabasal ubicado en la parte anterior (Figura 8). Además de estas estructuras presenta en su citoplasma gránulos de volutina y vacuolas. Su división celular es por fisión binaria longitudinal. Por ser un microorganismo reductor anaerobio, no presenta mitocondria ni complejos de citocromos (Schmidt y Roberts, 2000; Smyth, 1994).

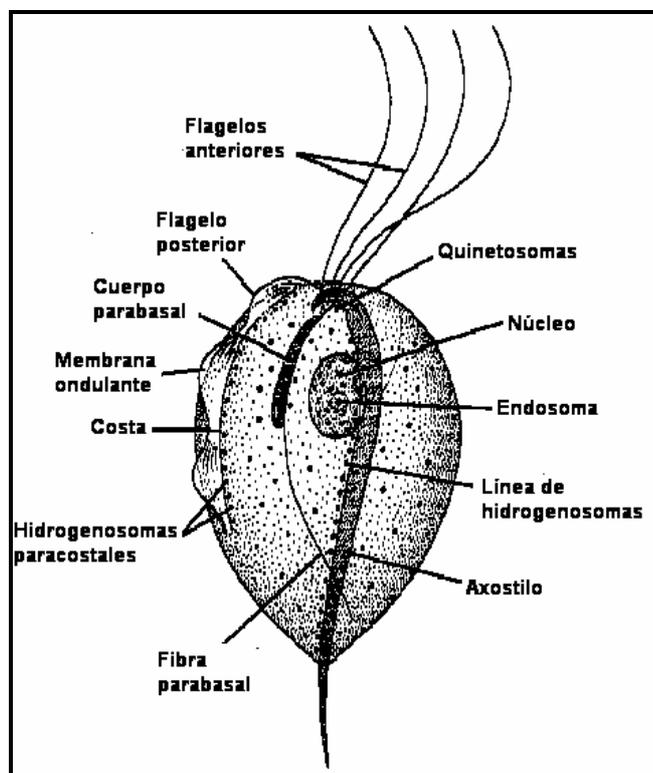


Figura 8. Trofozoíto de *Trichomonas vaginalis* señalando su morfología. Tomado de Schmidt y Roberts 2000.

### 1.2.3. Metabolismo

El parásito lleva a cabo la glicólisis en el citoplasma, generándose piruvato. En el hidrogenosoma finaliza la vía catabólica fermentativa y a partir de ésta obtiene los requerimientos energéticos necesarios. La piruvato: ferredoxin-oxidoreductasa (PFOR), enzima presente en el hidrogenosoma, cataliza la

descarboxilación oxidativa del piruvato hacia la formación de acetil coenzima A (acetil-Co A) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), esta vía está acoplada a la producción de ATP a nivel de sustrato, siendo el producto final el acetato de sodio. Los electrones liberados por la PFOR, son aceptados por la enzima ferredoxina, la cual, posteriormente, se oxida por la hidrogenasa. En esta oxidación, los protones se reducen para formar hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ), que es otro producto del metabolismo hidrogenosomal (Figura 9) (Rasoloson et al., 2002).

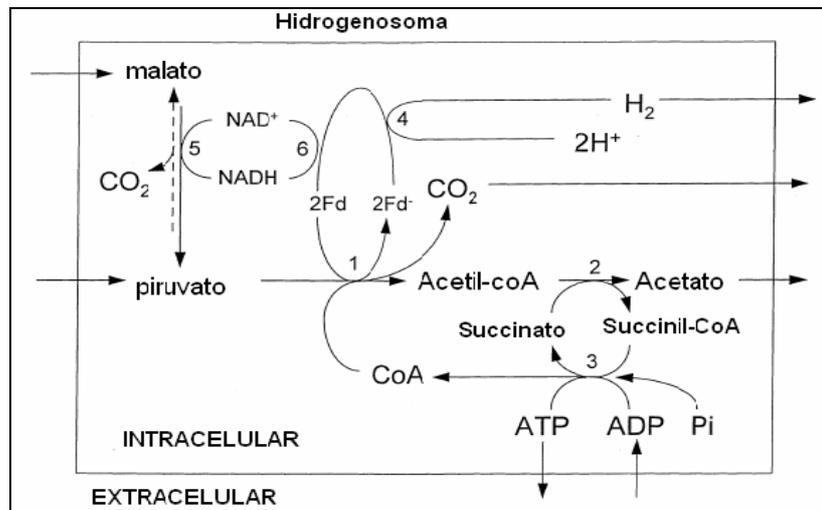


Figura 9. Metabolismo hidrogenosomal de *Trichomonas vaginalis*. Las enzimas implicadas se enumeran de la siguiente forma 1) piruvato: ferredoxin oxidoreductasa. (2) acetato: succinato-CoA transferasa. (3) succinato tiocinasa (succinil-CoA sintetasa). (4) hidrogenasa (5) NAD (P) enzima málica (L-malato: NAD (P) oxidoreductasa) (6) NAD: ferredoxin-oxidoreductasa. (Fd) ferredoxina. Tomado de Kulda, 1999.

Cabe mencionar que *T. vaginalis* no presenta las enzimas necesarias para sintetizar nucleótidos y lípidos *de novo*, aunado a esto, y considerando que su metabolismo fermentativo no es del todo eficiente, requiere de un medio rico en nutrientes para su crecimiento (Kulda, 1999).

#### 1.2.4. Ciclo de vida

*Trichomonas vaginalis* se presenta como forma infectante en el epitelio vaginal y sus secreciones, en el humano se transmite por contacto directo (Figura 10). A pesar de que se ha documentado la presencia de este protozooario en fomites, la tricomoniosis se considera una enfermedad que se adquiere únicamente por transmisión sexual (Schwebke y Burgess, 2004), a excepción de la tricomoniosis neonatal, que es la única que no se transmite por esta vía (Cudmore et al., 2004).

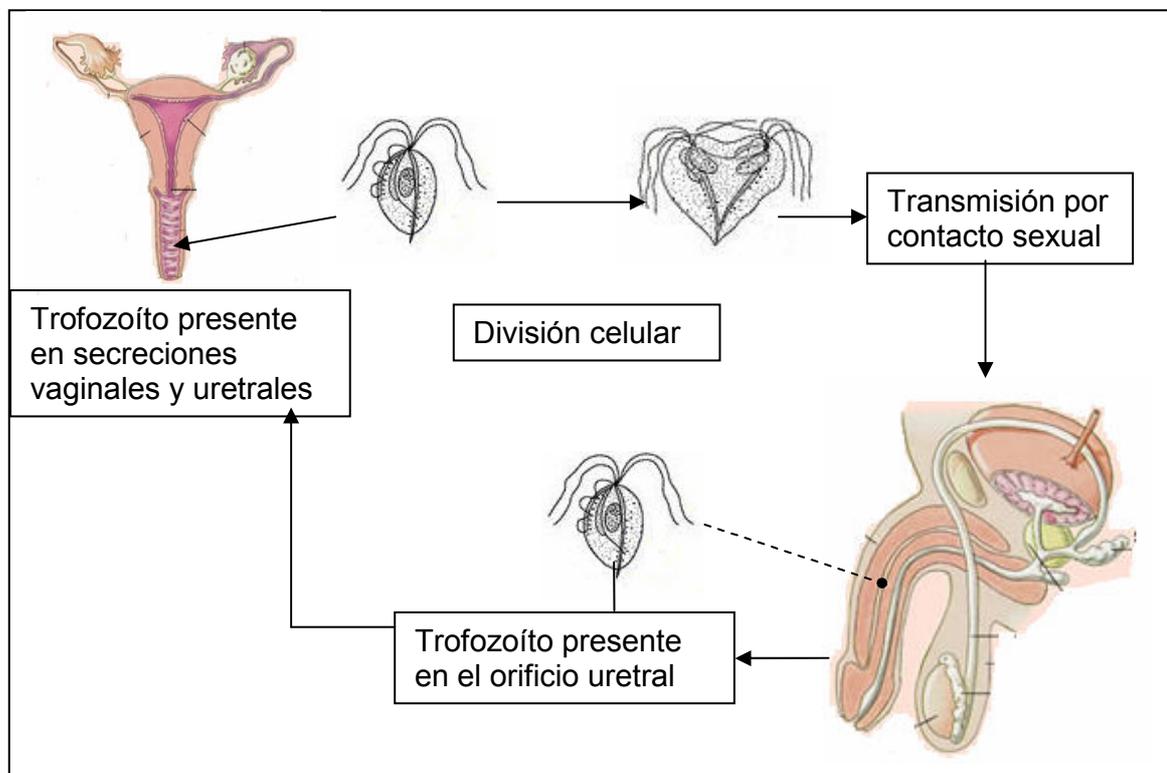


Figura 10. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*

Estudios *in vitro* sugieren que el período de incubación del protozooario es de cinco a veintiocho días (Schwebke y Burgess, 2004). Los síntomas de la tricomoniosis varían de acuerdo a la cepa infectante, los hombres suelen ser asintomáticos, o bien pueden presentar uretritis, balanopostitis, epididimitis, prostatitis e incluso infertilidad (Cudmore et al., 2004).

En las mujeres se presenta una inflamación intensa del epitelio vaginal con leucorrea, días después de la infección, se presenta una degeneración del epitelio seguida de un infiltrado de leucocitos, el cuadro clínico se acompaña de dolor abdominal, disuria y dispareunia. El pH vaginal es mayor de 4.5, llegando a ser de 7 en algunos casos, lo que genera un ambiente adecuado para el desarrollo del parásito sobre el epitelio (Cudmore et al., 2004). Al igual que en los hombres, algunos casos en las mujeres suelen ser asintomáticos.

*T. vaginalis* libera proteasas de cisteína, que le permiten su adhesión al epitelio vaginal. La unión del trofozoíto al epitelio vaginal, se presenta a partir de 4 adhesinas (Arroyo et al., 1992). La adhesión depende del pH, la temperatura y concentración de fierro, éste último provisto por: lactoferrina, citocromos y hemoglobina. También presenta enzimas con actividad de tipo tripsina (Petrin et al., 1998), así como un factor lítico con actividad de tipo fosfolipasa A<sub>2</sub> (Schwebke y Burgess, 2004).

### 1.3. Tratamiento empleado en la giardiosis y tricomoniosis

Los compuestos nitroimidazólicos como el metronidazol, tinidazol y ornidazol son efectivos *in vitro* e *in vivo* contra *G. intestinalis* (Argüello et al., 2004). El metronidazol, es el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis y tricomoniosis (Gardner y Hill, 2001).

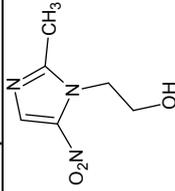
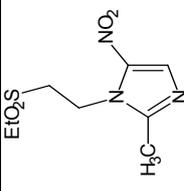
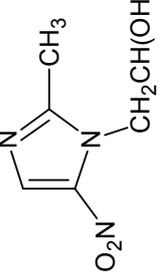
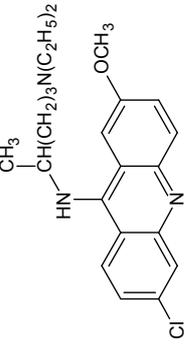
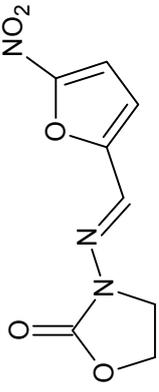
A pesar de que el albendazol no se emplea como fármaco de elección en el tratamiento de estas parasitosis, se considera como alternativa en la terapéutica de estas enfermedades, en especial cuando se presenta falla terapéutica a los medicamentos de elección (Gardner y Hill, 2001).

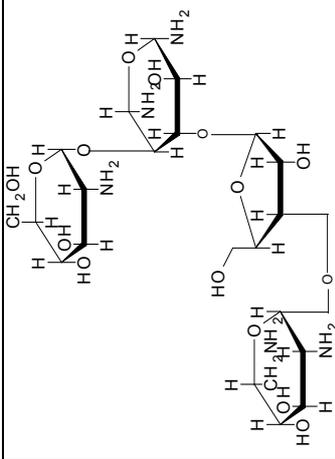
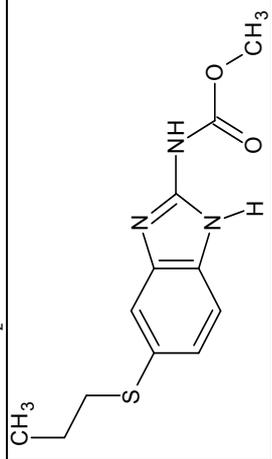
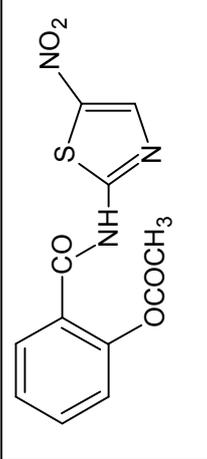
Respecto a la nitazoxanida, este es un compuesto que es tan efectivo

contra *G. intestinalis* como lo es el albendazol, también presenta actividad contra *T. vaginalis* y otros parásitos como *Cryptosporidium parvum* y *Entamoeba histolytica*. Considerando los valores de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) (concentración a la cual se obtiene el 50% de mortalidad de una población en estudio), se determinó que la nitazoxanida presenta una CI<sub>50</sub> de 0.004 µg/mL contra *G. intestinalis*, y 0.034 µg/mL contra *T. vaginalis* (Cedillo et al., 2002). Actualmente, también se emplea como fármaco de primera elección debido a su efectividad mostrada ya que generalmente no presenta efectos adversos tan significativos como los observados en los compuestos nitroimidazólicos (Fox y Saravolatz, 2005).

La Tabla 1 muestra algunos de los medicamentos empleados en el tratamiento de la giardiosis y tricomoniosis, la dosis a la cual se administran y sus efectos adversos (Gardner y Hill, 2001). En México, de acuerdo al cuadro básico y catálogo de medicamentos del año 2004, emitido por la Secretaría de Salud, los medicamentos empleados para el tratamiento de la tricomoniosis y giardiosis son: tinidazol, metronidazol y nitazoxanida, las dosis se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Medicamentos empleados en el tratamiento de la giardiasis y tricomoniosis.

Medicamento	Estructura química	Dosis en adultos	Dosis pediátrica	Efectos adversos
metronidazol		250 mg tres veces al día por 5 a 7 días 500 a 700 mg cada 8 horas por 10 días	5 mg/Kg tres veces al día por 5 a 7 días 35 a 50 mg/Kg por día, cada ocho horas por 10 días	Dolor de cabeza, vértigo, náusea, sabor metálico, urticaria. Raros: pancreatitis, toxicidad del sistema nervioso central, neutropenia reversible. No se ha demostrado su mutagenicidad y carcinogenicidad en humanos
tinidazol		2 g, dosis única	50 mg/Kg dosis única (máximo 2 g)	Los mismos que se presentan para el metronidazol
ornidazol		2 g, dosis única	40 a 50 mg/Kg dosis única (máximo 2 g)	Los mismos que se presentan para el metronidazol
quinacrina		100 mg tres veces al día por 5 a 7 días	2 mg/Kg tres veces al día, por 7 días	Nausea, vómito, mareo, dolor de cabeza, coloración amarilló-anaranjada de la piel y las mucosas. Raros: psicosis tóxica
furazolidona		100 mg cuatro veces al día por 7 a 10 días	2 mg/Kg cuatro veces al día por 10 días	Nausea, vómito, diarrea, coloración café de la orina, no debe administrarse con inhibidores de la MAO, hemólisis moderada en personas con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

paromomicina		500 mg tres veces al día por 5 a 10 días	30 mg/Kg/día en tres dosis por 5 a 10 días	Con administración sistemática se presenta ototoxicidad y nefrotoxicidad
albendazol		400 mg cuatro veces al día por 5 días	15 mg/Kg/día por 5 a 7 días (máximo 400 mg)	Anorexia Constipación Raros: neutropenia reversible y resultados elevados en pruebas de función hepática
nitazoxanida		7.5 mg/Kg cada 12 horas por tres días	7.5 mg/Kg cada 12 horas por tres días	Dolor abdominal, diarrea, mareo, cefalea, náusea. Presenta embriotoxicidad. Puede presentarse hipersensibilidad al fármaco y no debe administrarse a menores de dos años.

Tomada de: Gardner y Hill, 2001

#### 1.4. Mecanismo de acción de los compuestos bencimidazólicos y resistencia presentada por *G. intestinalis*

El mecanismo de acción del albendazol y el mebendazol (compuestos bencimidazólicos), consiste en la inhibición de la polimerización de la tubulina. Lacey, en 1985, indicó que la tubulina presenta sitios de unión específicos e inespecíficos, los específicos se nombran de acuerdo al ligando que actúa sobre ellos como: el sitio tipo colchicina, sitio tipo vinblastina y sitio tipo taxol; el albendazol y mebendazol actúan específicamente sobre el sitio colchicina. La presencia del grupo carbamato de metilo en la posición 2 en estos compuestos es necesaria para que se presente la inhibición de la polimerización de la tubulina de helmintos, debido a que el carbonilo de este grupo reacciona con los residuos de cisteína en los aminoácidos 239 y 354 de la  $\beta$ -tubulina. El mecanismo de acción es mediante un ataque nucleofílico del grupo tiol de la cisteína sobre el grupo carbonilo del sustituyente carbamato de metilo, lo que promueve un cambio estructural en la proteína (Figura 11) (Lacey, 1985).

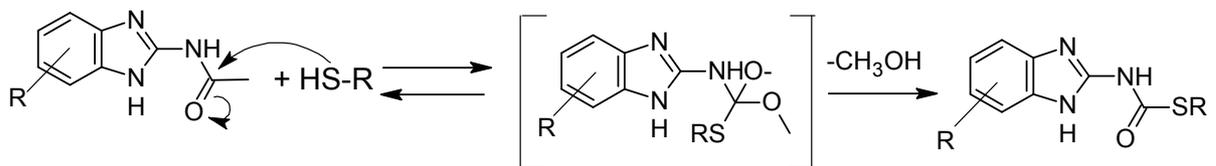


Figura 11. Mecanismo de acción de los compuestos derivados del carbendazim. R = CH<sub>2</sub>-CHNH<sub>3</sub><sup>+</sup>COO<sup>-</sup> Tomado de Lacey, 1985.

El albendazol y mebendazol, actúan destruyendo la organización del disco ventral de *G. intestinalis*, que está formado mayoritariamente por tubulina (Chávez et al., 1992a; 1992b). MacDonald y col., en el 2004, determinaron que los compuestos bencimidazólicos derivados del carbendazim, tienen afinidad por la  $\beta$ -tubulina de *G. intestinalis*, esto se demostró a partir de un método cinético, en el que se calculó la constante de asociación y disociación entre ambas moléculas.

En parásitos helmintos resistentes al albendazol, se han identificado mutaciones puntuales, particularmente la sustitución de tirosina por fenilalanina en el aminoácido 200 de la subunidad  $\beta$  de la tubulina. Sin embargo, en cepas de *G. intestinalis* obtenidas *in vitro* con resistencia hacia el albendazol, Upcroft y col. (1996), no encontraron modificaciones en la tubulina del parásito, pero, observaron un cambio estructural en el cuerpo medio de los trofozoítos. Por lo tanto, se infiere que el mecanismo de resistencia al albendazol se debe a una reorganización de los microtúbulos presentes en el cuerpo medio del parásito, lo que promueve su expansión, así como una reorganización en el disco ventral. Además se detectó un rearrreglo en el cromosoma 6 de *G. intestinalis*, durante su duplicación (Upcroft et al., 1996).

#### 1.4.1. Mecanismo de acción de los compuestos nitroimidazólicos y resistencia presentada por *Giardia intestinalis*

El grupo nitro de los compuestos nitroimidazólicos es activado al interior de los mitosomas del parásito. En estos organelos se lleva a cabo el transporte de electrones, y se encuentran presentes las enzimas implicadas en el metabolismo como la PFOR y ferredoxina I (Henze y Martin, 2003). En los mitosomas, la enzima ferredoxina I reduce el grupo nitro del metronidazol, formándose un radical libre, que se une a la doble cadena de ADN, promoviendo la ruptura de su estructura de doble hélice, ejerciendo así un efecto letal sobre el parásito (Figura 12) (Gardner y Hill, 2001). En el caso de la furazolidona, el grupo nitro es activado por la enzima NADH oxidasa, también presente en el mitosoma de *G. intestinalis*. (Brown et al., 1998).

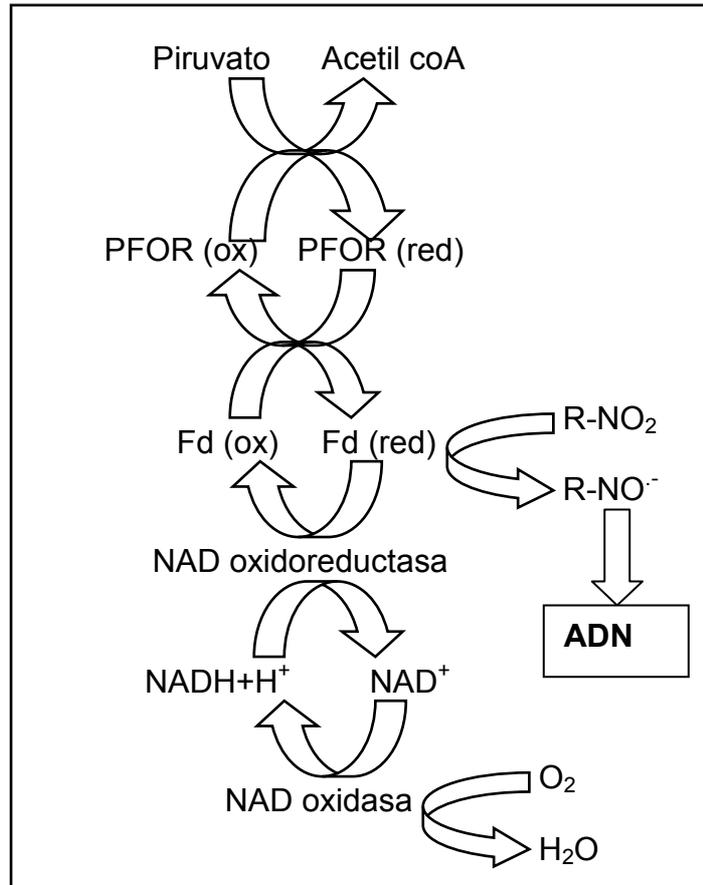


Figura 12. Activación del grupo nitro en *Giardia intestinalis*. PFOR: piruvato ferredoxin oxidoreductasa. Fd: ferredoxina

Varios estudios han demostrado la presencia de aislados clínicos de *G. intestinalis* resistentes al metronidazol (Boreham et al., 1988; Farthing, 1996). En un estudio realizado en Francia, se determinó que 11 aislados clínicos de este parásito, obtenidos de pacientes con falla terapéutica, mostraron resistencia hacia el metronidazol. Mediante un modelo de ratones neonatos, se determinó que 4 de los 11 aislados, requirieron una dosis inhibitoria 50 (DI<sub>50</sub>) superior a 120 mg/Kg, ésta dosis se propuso como referencia para distinguir a las cepas resistentes (Léeme et al, 2000). Sin embargo, en otro estudio realizado en Portugal, con 18 aislados clínicos y empleando un método de inhibición de la adhesión de los trofozoítos, se concluyó que no se presentó resistencia de este parásito hacia el

metronidazol (Cruz et al., 2003). En cepas resistentes al metronidazol se ha demostrado que también presentan resistencia cruzada hacia el tinidazol (Upcroft y Upcroft, 1993; Upcroft, 1998). El desarrollo *in vitro* de cepas resistentes de *G. intestinalis*, tiene como finalidad el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia de este protozooario (Upcroft et al., 1996; Argüello et al., 2004). Así, la resistencia de *G. intestinalis* hacia los compuestos nitroimidazólicos en especial el metronidazol, se ha asociado a una disminución en la actividad de las enzimas PFOR (presentando una actividad 5 veces menor a la normal) y ferredoxina I (actividad 7 veces menor a la normal), ambas están implicadas en el metabolismo del parásito y presentes en los mitosomas (Ellis et al., 1992; Townson et al., 1996). Al estar disminuida su actividad metabólica, las cepas resistentes de *G. intestinalis* emplean una vía alterna para sobrevivir, en ésta participa una enzima de tipo 2-oxoácido oxidorreductasa que en lugar de utilizar al piruvato como sustrato, emplea al 2-cetobutirato, de esta forma el parásito cubre sus requerimientos energéticos (Townson et al., 1996; Upcroft y Upcroft, 2001).

#### 1.5. Mecanismo de acción de los compuestos bencimidazólicos y resistencia presentada por *Trichomonas vaginalis*

Se ha demostrado que los compuestos bencimidazólicos como el mebendazol, flubendazol, nocodazol y fenbendazol presentan actividad *in vitro* contra *T. vaginalis*. Al igual que en *G. intestinalis*, los derivados bencimidazólicos actúan sobre la tubulina del parásito, observándose cambios en la morfología del trofozoíto de *T. vaginalis* (Katiyar et al., 1994). Sin embargo, los derivados bencimidazólicos no se emplean en la terapéutica de la tricomoniosis, por lo que no

se han reportado casos de resistencia asociada a este tipo de compuestos, en especial hacia el albendazol.

#### 1.5.1 Mecanismo de acción de los compuestos nitroimidazólicos y resistencia presentada por *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* presenta organelos unidos a su membrana llamados hidrogenosomas. En los hidrogenosomas se llevan a cabo procesos metabólicos como la descarboxilación oxidativa del piruvato (Kulda 1999). La enzima [2Fe-2S] ferredoxina, presente en este organelo, permite la reducción del grupo nitro de los derivados nitroimidazólicos como el metronidazol, posteriormente se forman radicales libres que interactúan con la molécula de ADN, sobre residuos de timina y adenina (Figura 13). Esto promueve la ruptura de la doble cadena y la muerte del parásito, dentro de un periodo de 8 h (Petrin y Delgaty, 1998). El efecto del metronidazol sobre el ADN es exclusivo de la formación del intermediario (radical libre del grupo nitro), ya que no se ha encontrado la formación de un complejo entre el ADN y el grupo nitro, en el que se presente una unión de tipo irreversible (Cudmore et. al., 2004). Este efecto citotóxico se considera selectivo, puesto que la molécula se activa específicamente en los microorganismos anaerobios, en *T. vaginalis*, dentro de los hidrogenosomas (Kulda 1999). La evidencia que demuestra que el grupo nitro es reducido en esta vía metabólica, es la falta de producción de hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>), en los parásitos tratados con derivados nitroimidazólicos (Land y Johnson, 1997).

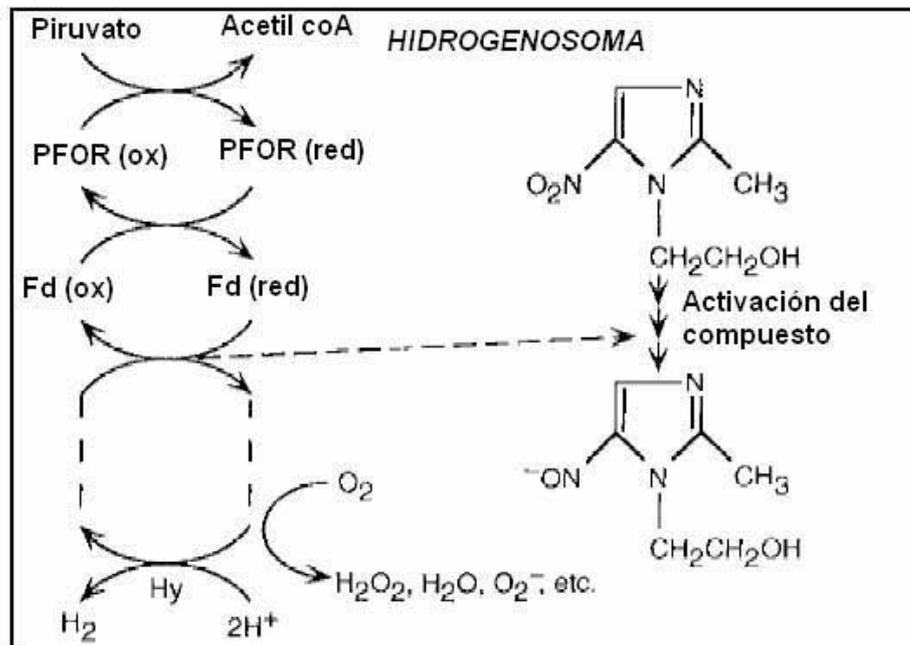


Figura 13. Activación del metronidazol en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*. PFOR: piruvato ferredoxin-oxidorreductasa, Fd: ferredoxina, Hy: hidrogenasa. Tomado de Johnson, 1993.

Al igual que en *G. intestinalis*, se han reportado casos de resistencia hacia el metronidazol en aislados de *T. vaginalis* (Land y Johnson, 1997), incluso cinco años después de su administración como fármaco para el tratamiento de la tricomoniosis, en 1962, ya se reportaban casos de resistencia (Upcroft y Upcroft, 2001). También se han presentado casos de resistencia cruzada con otros derivados nitroimidazólicos como el tinidazol y ornidazol (Voolman y Boreham, 1993; Upcroft y Upcroft, 2001). En Estados Unidos, no cuentan con un sistema estadístico que les permita conocer el número de cepas resistentes provenientes de aislados clínicos, sin embargo el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), estima que de un 2.5 % a 5 % de los aislados de *T. vaginalis*, presentan algún grado de resistencia al metronidazol (Soper, 2004). En un estudio realizado en Finlandia, se determinó la resistencia al metronidazol en tres aislados clínicos provenientes de pacientes con falla terapéutica, éste se realizó considerando los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración letal mínima

(CLM) del fármaco, a diferentes concentraciones de oxígeno. Tomando como referencia los valores de CLM mostrados por la cepa no resistente, CLM = 0.75  $\mu\text{g/mL}$ , bajo condiciones aerobias y 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , bajo condiciones anaerobias, los 3 aislados resistentes, mostraron valores mayores a éstos. Las determinaciones de viabilidad se realizaron a partir de la observación en la movilidad de los trofozoítos del parásito (Meri et al., 2000).

La resistencia en *T. vaginalis* se clasifica fundamentalmente en dos tipos, aerobia y anaerobia. La resistencia aerobia se presenta en cepas provenientes de pacientes que tuvieron falla terapéutica al metronidazol, y se observa únicamente en presencia de oxígeno, la concentración letal mínima de metronidazol requerida es aproximadamente de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Este tipo de resistencia se asocia a una disminución en la cantidad de enzimas de tipo oxidasa que son las encargadas de metabolizar el oxígeno, por lo tanto, el  $\text{O}_2$  presente compite con el metronidazol para ser reducido en el metabolismo hidrogenosomal y consecuentemente el grupo nitro no se reduce (Townson et al., 1994). En la resistencia aerobia, la tasa de transcripción del gene de la enzima ferredoxina esta reducida en un 40 a 65%, esto provoca una disminución de la enzima a nivel intracelular en más del 50% (Johnson, 1993). La resistencia anaerobia se desarrolla de forma *in vitro* en el laboratorio, sometiendo a las cepas a concentraciones subletales del compuesto. Ésta se manifiesta únicamente en condiciones de anaerobiosis, y la concentración letal mínima requerida es mayor a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . En este caso la actividad de las enzimas implicadas en la reducción del grupo nitro está disminuída, en especial la de la enzima PFOR y la hidrogenasa (Land y Jonson, 1997; Kulda, 1999). Las diferencias de actividad enzimática, tienen como consecuencia que no se active el grupo nitro del metronidazol y por lo tanto no se presente el efecto letal.

Otra característica asociada a la resistencia es que se presenta una disminución en el tamaño de los hidrogenosomas (Land et al., 2001).

Las cepas resistentes, compensan la disminución de la actividad de las enzimas hidrogenosomales, aumentando la glicólisis, así como la fermentación de lactato en el citosol. Se demostró también que estas cepas, emplean vías metabólicas alternas en las que participan específicamente dos enzimas con actividad de tipo 2-cetoácido oxidoreductasa nombradas KOR1 y KOR2, las cuales emplean como sustratos al indolpiruvato, fenilpiruvato y  $\alpha$ -cetomalonato, de esta forma obtienen los requerimientos energéticos necesarios, cuando su metabolismo hidrogenosomal no está regulado (Brown et al., 1999).

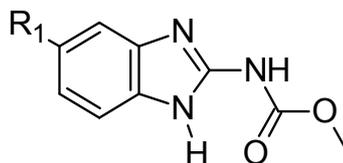
#### 1.6. Generalidades de los compuestos bencimidazólicos

El potencial terapéutico de los compuestos bencimidazólicos fue reconocido a principios de la década de 1960, cuando se empleó una combinación del fenizidol con fenotiazina, como agente antihelmíntico (Sharma, 1997). Posterior a la síntesis del compuesto tiabendazol en 1961, se realizaron modificaciones estructurales a esta molécula, sintetizándose una serie de compuestos con diferentes grupos sustituyentes en la posición 5 del anillo bencimidazólico, uno de los más efectivos fue el 5-aminotiabendazol (Townsend y Wise, 1990).

A partir de estudios de relación estructura-actividad (SAR), se obtuvieron compuestos en los que el anillo tiazólico del tiabendazol fue sustituido por un grupo tiocarbamato, con modificaciones posteriores sobre este grupo, se sintetizaron otro tipo de compuestos como los 2-acilaminobencimidazoles, alquilbencimidazol-2-carbamatos y 2-bencimidazolilureas. De estos tres tipos de compuestos, los derivados del carbendazim (2-acilaminobencimidazol), como el parbendazol,

mebendazol, flubendazol, albendazol, oxibendazol, fenbendazol y ciclo bendazol, mostraron actividad antihelmíntica (Townsend y Wise, 1990; Sharma, 1997). La Tabla 2 muestra el valor de logP y solubilidad acuosa, de este tipo de compuestos.

Tabla 2. Valores de logP y solubilidad de los compuestos derivados del carbendazim.



Compuesto	R <sub>1</sub>	*LogP	*Solubilidad (g/L)
carbendazim	H	1.46 ± 0.60	22.7
mebendazol	COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.42 ± 0.89	2.38
flubendazol	COC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F-4	2.65 ± 0.93	1.36
ciclobendazol	COC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	1.28 ± 0.85	51.8
fenbendazol	SC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3.69 ± 0.89	0.069
albendazol	SC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	3.01 ± 0.86	0.41
oxibendazol	OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	2.44 ± 0.85	1.92

\*Determinado con el programa ACD logP Data Base

Respecto a sus características fisicoquímicas, los derivados del carbendazim presentan baja solubilidad acuosa (Tabla 2). Esto se explica considerando la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares (Navarrete, 2000). Cabe mencionar que su rango de pKa es de 2.0 a 6.0 (ACD logP Data Base), por lo que a pH fisiológico no se presenta un equilibrio entre especies ionizadas y no ionizadas, esto influye en la absorción y biodisponibilidad del compuesto cuando es administrado por vía oral (Voet y Voet, 2004). En especial, el albendazol y mebendazol presentan poca absorción intestinal, esta característica permite que sean empleados en el tratamiento de enfermedades intestinales provocadas por helmintos (Chávez et al., 1992b).

### 1.6.1 Relación estructura-actividad (SAR) en los compuestos bencimidazólicos

Para el diseño y síntesis de nuevos compuestos derivados del bencimidazol con posible actividad antiprotozoaria y antihelmíntica, nuestro grupo de investigación ha realizado modificaciones estructurales en la posición 1 (SITIO A), posición 2 (SITIO B), y posición 5 (SITIO C), del núcleo de bencimidazol (Figura 14). La modificación estructural con un grupo metilo en la posición 1, evita el tautomerismo prodrópico en la molécula (Figura 15), de esta forma se obtienen los compuestos regioisoméricos (Figura 16), que permiten un mejor análisis e interpretación de la relación estructura-actividad de nuevos compuestos por sintetizar (Navarrete, 2004).

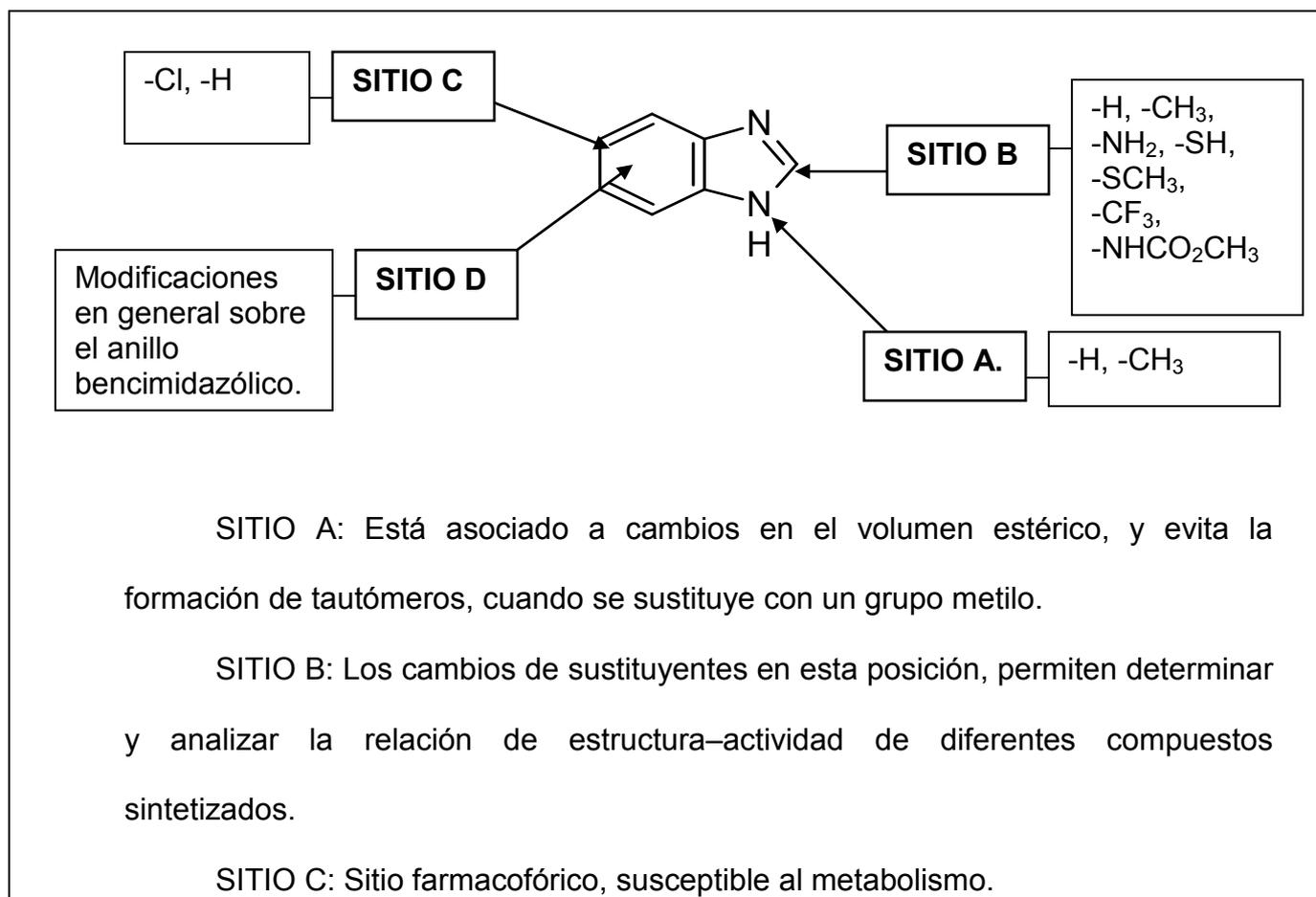


Figura 14. Modificaciones realizadas sobre el anillo bencimidazólico. Tomado de Sharma, 1997; Navarrete, 2004.

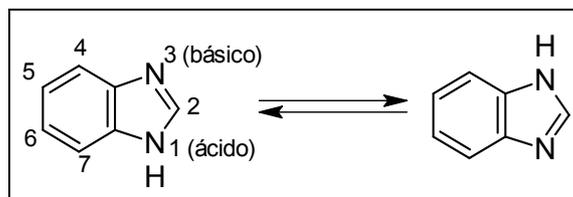


Figura 15. Tautomerismo de la molécula de bencimidazol. Tomado de Townsend y Wise, 1990.

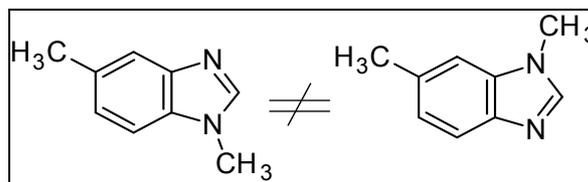
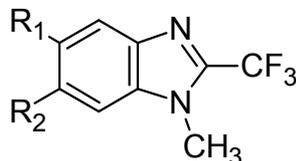


Figura 16. Regioisómeros 1–metilados de la molécula de bencimidazol. Tomado de Townsend y Wise, 1990.

En las tablas 3 y 4, se muestra la actividad biológica *in vitro* ( $CI_{50}$   $\mu$ M) de algunos de los compuestos sintetizados por nuestro grupo de investigación, contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

Tabla 3. Actividad biológica *in vitro* ( $CI_{50}$   $\mu$ M) contra *Giardia intestinalis*, de algunos compuestos derivados del bencimidazol.



Compuesto	R1	R2	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) <i>G. intestinalis</i>
<b>G4</b>	H	H	0.064
<b>G5</b>	Cl	Cl	0.260
<b>G6</b>	Cl	H	0.042
<b>G7</b>	H	Cl	0.127
albendazol			0.037
metronidazol			1.220

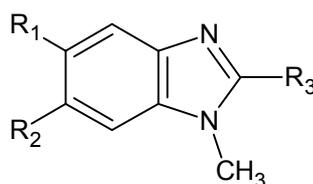
Tomado de: Navarrete et al., 2001.

En la Tabla 3 se observa que ningún compuesto presentó mayor actividad que el albendazol, con excepción del compuesto **G6**, que mostró una actividad

similar. Cabe señalar que todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol. El compuesto **G6**, sustituido con Cl en posición 5, presentó la mejor actividad giardicida de todos los compuestos evaluados. Comparándolos entre si, el **G6** fue 3 veces más activo que el **G7**, 1.5 veces más activo que el **G4**, 6.1 veces más activo que el **G5** y 29 veces más activo que el metronidazol. Estos resultados nos permiten concluir que en presencia de un grupo trifluorometilo en posición 2, un grupo metilo en posición 1, y un sustituyente cloro en posición 5, se favorece la actividad biológica contra *G. intestinalis*.

Navarrete (2004), demostró por microscopia electrónica de transmisión que los compuestos bencimidazólicos, sustituidos con un grupo trifluorometilo (-CF<sub>3</sub>) en posición 2, generan un daño a nivel de membrana, sin tener efecto sobre el disco ventral de *G. intestinalis*, que está constituido principalmente por tubulina. Esto implica que el mecanismo de acción de los compuestos sustituidos con -CF<sub>3</sub> en posición 2, es diferente al de la inhibición de la polimerización de la tubulina de los compuestos 2-carbamato bencimidazólicos.

Tabla 4. Actividad biológica *in vitro* (Cl<sub>50</sub> μM) de compuestos derivados del bencimidazol, contra *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.



Compuesto	Sustituyente	Cl <sub>50</sub> (μM) <i>G. intestinalis</i>	Cl <sub>50</sub> (μM) <i>T. vaginalis</i>
<b>RSD-1</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>	0.089	4.321
<b>RSD-2</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =NH <sub>2</sub>	1.360	0.482
<b>RSD-3</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =SH	0.018	2.786
<b>RSD-4</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =SCH <sub>3</sub>	0.033	0.898
<b>RSD-5</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>	0.144	0.481
<b>RSD-6</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =NH <sub>2</sub>	0.242	0.148
<b>RSD-7</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =SH	0.045	35.540
<b>RSD-8</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =H, R <sub>3</sub> =SCH <sub>3</sub>	0.028	9.924
<b>RSD-9</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>	0.044	3.268
<b>RSD-10</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =NH <sub>2</sub>	0.132	142.300
<b>RSD-11</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =SH	0.020	0.503
<b>RSD-12</b>	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =SCH <sub>3</sub>	0.122	1.091
<b>RSD-13</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>	0.055	17.620
<b>RSD-14</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =NH <sub>2</sub>	0.074	5.115
<b>RSD-15</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =SH	0.008	26.310
<b>RSD-16</b>	R <sub>1</sub> =Cl, R <sub>2</sub> =Cl, R <sub>3</sub> =SCH <sub>3</sub>	0.024	8.421
albendazol		0.037	1.592
metronidazol		1.228	0.216

Tomado de Sánchez, 1999.

Respecto a la actividad giardicida de los compuestos 1-metilbencimidazólicos presentados en la Tabla 4, el compuesto **RSD-15**, mostró la mejor actividad biológica de todos los compuestos, fue 4.6 veces más activo que el albendazol y 154 veces más activo que el metronidazol. Estructuralmente, el compuesto **RSD-15** se caracteriza por estar disustituído con cloro en las posiciones 5 y 6, presenta un grupo mercapto en posición 2, y mantiene el grupo metilo en posición 1. Los compuestos **RSD-3** y **RSD-11**, también fueron activos contra el parásito, ambos presentan un sustituyente –SH en posición 2, pero difieren en la

presencia de un átomo de Cl en la posición 6. De los resultados anteriores, podemos concluir que la disustitución con cloro en las posiciones 5 y 6, favorece la actividad giardicida, así como la presencia de un sustituyente mercapto en posición 2 y un grupo metilo en posición 1.

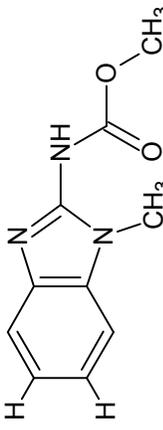
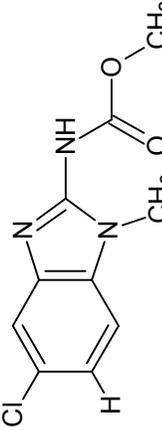
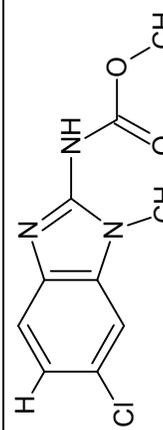
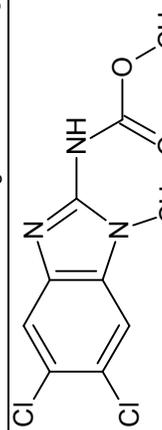
Referente a la actividad contra *T. vaginalis*, ningún compuesto fue más activo que el albendazol y metronidazol, exceptuando al **RSD-6** que fue 11 veces más activo que el albendazol y 1.5 veces más activo que el metronidazol, estructuralmente presenta un átomo de cloro en posición 5 y un grupo amino en posición 2.

La actividad giardicida y tricomonocida de los derivados bencimidazólicos de las Tablas 3 y 4, permiten considerar al núcleo de bencimidazol, como estructura líder para evaluar el efecto de diferentes sustituyentes en las posiciones 2, 5 y 6, manteniendo el grupo metilo en posición 1, sobre la actividad antiparasitaria.

Considerando que los compuestos bencimidazólicos 1-metilados, previamente evaluados por nuestro grupo de investigación, mostraron una buena actividad biológica contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, siendo en algunos casos mejor a la mostrada por el metronidazol y albendazol, resulta de gran interés evaluar la actividad giardicida y tricomonocida de compuestos previamente sintetizados, que presentan carbamato de metilo como sustituyente en la posición 2 y metilo en posición 1 (Tabla 5).

Los resultados que se obtengan, referentes a la actividad giardicida y tricomonocida de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** (Tabla 5), permitirán obtener mayor información acerca de los requerimientos estructurales para que un compuesto presente actividad antiparasitaria.

Tabla 5. Compuestos propuestos para la evaluación de la actividad biológica contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*\*.

Clave	Nombre Químico	Estructura	Peso molecular	°Solubilidad (g/L) <sup>◊</sup>	logP <sup>◊</sup>
<b>AHM-4</b>	metil (1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato		205.213	17.4	1.58 ± 0.61
<b>AHM-11</b>	metil (5-cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato		239.5	3.84	2.18 ± 0.61
<b>AHM-17</b>	metil (6-cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato		239.658	3.84	2.18 ± 0.61
<b>AHM-23</b>	metil (5,6-dicloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato		274.103	1.18	2.65 ± 0.62

\*Los compuestos fueron sintetizados por Antonio Hernández Martínez, en el laboratorio 122 de la Facultad de Química, U.N.A.M.  
<sup>◊</sup>logP y solubilidad: valores teóricos, determinados con el programa ACD logP Data Base.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La giardiosis y la tricomoniosis, son un problema actual de Salud pública en nuestro país. En el tratamiento de estas parasitosis se emplea al metronidazol como fármaco de elección, sin embargo, se presenta falla terapéutica asociada a sus efectos adversos y a la presencia de cepas resistentes a este principio activo.

Con la finalidad de obtener información de la relación estructura-actividad antiparasitaria, se han sintetizado derivados bencimidazólicos con sustituyente metilo en posición 1 y diferentes sustituyentes (-CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub>) en posición 2, los cuales han mostrado actividad giardicida y tricomonocida.

Considerando que el albendazol es un fármaco con actividad antiparasitaria, resulta de interés determinar la actividad giardicida y tricomonocida de los derivados **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, previamente sintetizados, que al igual que el albendazol, presentan al carbamato de metilo como sustituyente en posición 2.

Por lo tanto: ¿Los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, presentarán una buena actividad antiprotozoaria contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*?

## 3. HIPÓTESIS

Los compuestos 1-metil bencimidazólicos, con sustituyentes -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub> en posición 2, presentan actividad antiprotozoaria. En consecuencia los compuestos 1-metil bencimidazólicos: **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, con un grupo -NHCOOCH<sub>3</sub> en posición 2, presentarán una buena actividad giardicida y tricomonocida.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad biológica *in vitro* de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** contra *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

### 4.2. Objetivos particulares

1. Determinar la  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, mediante un análisis PROBIT (unidades de probabilidad) de concentración-respuesta.

2. Analizar la relación estructura-actividad de: **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** para ambos parásitos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Determinación de la curva de crecimiento de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

Se empleó la cepa, IMSS:1090:1 de *Giardia intestinalis* y la cepa GT3 de *Trichomonas vaginalis*. La cepa de *G. intestinalis* se mantuvo en el medio de cultivo TYI-S-33 modificado, suplementado con bilis y suero fetal bovino al 10% (v/v). Para *T. vaginalis* se empleó el medio TYI-S-33 con suero fetal bovino al 10% (v/v) y una mezcla de vitaminas – Tween 80 al 3% (v/v). La preparación de los medios y el mantenimiento del cultivo axénico de ambos parásitos se indican en el ANEXO 1. Para realizar la curva de crecimiento, se inocularon  $50 \times 10^3$  trofozoítos/mL de *G. intestinalis* (tomados del cultivo axénico) y  $6 \times 10^3$  trofozoítos/mL de *T. vaginalis*, en microtubos de 1.5 mL.

Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y se contaron los trofozoítos a las 24, 48, 72, 96 y 120 h después de haber colocado el inóculo inicial. El ensayo se realizó por duplicado.

Se graficó el número de trofozoítos/mL en función del tiempo (h), determinándose la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria de los trofozoítos en el cultivo. La determinación del número de trofozoítos/mL se indica en el ANEXO 1.

## 5.2. Evaluación de la actividad giardicida y tricomonicida de los nuevos derivados bencimidazólicos

Para determinar la actividad de los compuestos, se empleó el método de subcultivo descrito por Cedillo y Muñoz, (1992).

Para la evaluación de los compuestos de interés se preparó, de cada uno de ellos, una solución de 10 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) y a partir de ésta se realizó una serie de diluciones (Diagrama 1 del ANEXO 1). El albendazol y metronidazol se incluyeron como controles positivos y como control negativo se cultivaron los parásitos en medio libre de compuesto.

En tubos Eppendorf, se colocaron  $50 \times 10^3$  y  $6 \times 10^3$  trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, respectivamente, a los que se les añadieron las diferentes concentraciones de los compuestos, en un volumen final de 1 mL. Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Posteriormente, de estos cultivos se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se subcultivaron en medio libre de compuesto, incubándose nuevamente a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 48 h.

Después de este tiempo, los tubos se enfriaron a 4 °C por 1 h y se determinó el número de trofozoítos vivos/mL en cada una de las concentraciones empleadas.

Una vez determinado el número de trofozoítos vivos, se calculó el número de trofozoítos muertos, considerando la diferencia entre el número de trofozoítos presentes en el control negativo y el número de trofozoítos en cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de los compuestos. Los datos obtenidos de trofozoítos vivos y muertos para cada ensayo, se muestran en el ANEXO 2. El ensayo se realizó 3 veces por duplicado.

La  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** se determinó realizando un análisis PROBIT de concentración-respuesta con el programa de cómputo PROBIT (C.U.I.D.A.).

Para realizar el análisis PROBIT, se consideró el número de trofozoítos muertos, obtenidos en cada una de las concentraciones empleadas ( $\mu g/mL$ ).

Una vez obtenido el valor de  $CI_{50}$  en unidades de  $\mu g/mL$ , se convirtió a unidades de micromolaridad ( $\mu M$ ), considerando el peso molecular del compuesto, así como el factor de conversión de mL a L. Se calculó el promedio de las concentraciones obtenidas en  $\mu M$ , el intervalo de confianza, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación asociado a los valores obtenidos.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, empleando la prueba de análisis de varianza de un factor, para determinar la diferencia entre los valores promedio obtenidos de la  $CI_{50}$ , y la prueba del rango múltiple de Duncan, para determinar la diferencia entre pares de valores promedio de  $CI_{50}$  obtenidos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Curva de crecimiento de *Giardia intestinalis*

En la Tabla 6 y Figura 17, se muestran los datos obtenidos para la curva de crecimiento de *G. intestinalis*.

Tabla 6. Número de trofozoítos de *Giardia intestinalis*, obtenidos a diferentes tiempos de cultivo\*

Tiempo (h)	No. de trofozoítos/mL (Experimento 1)	No. de trofozoítos/mL (Experimento 2)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0	50000	50000	50000	0	0
24	55000	57500	56250	1767.767	3.14
48	925000	975000	950000	35355.339	3.72
72	2275000	2325000	2300000	35355.339	1.54
96	2675000	2650000	2662500	17677.67	0.66
120	2700000	2775000	2737500	53033.009	1.94

\*El inóculo inicial fue de  $50 \times 10^3$  trofozoítos/mL.

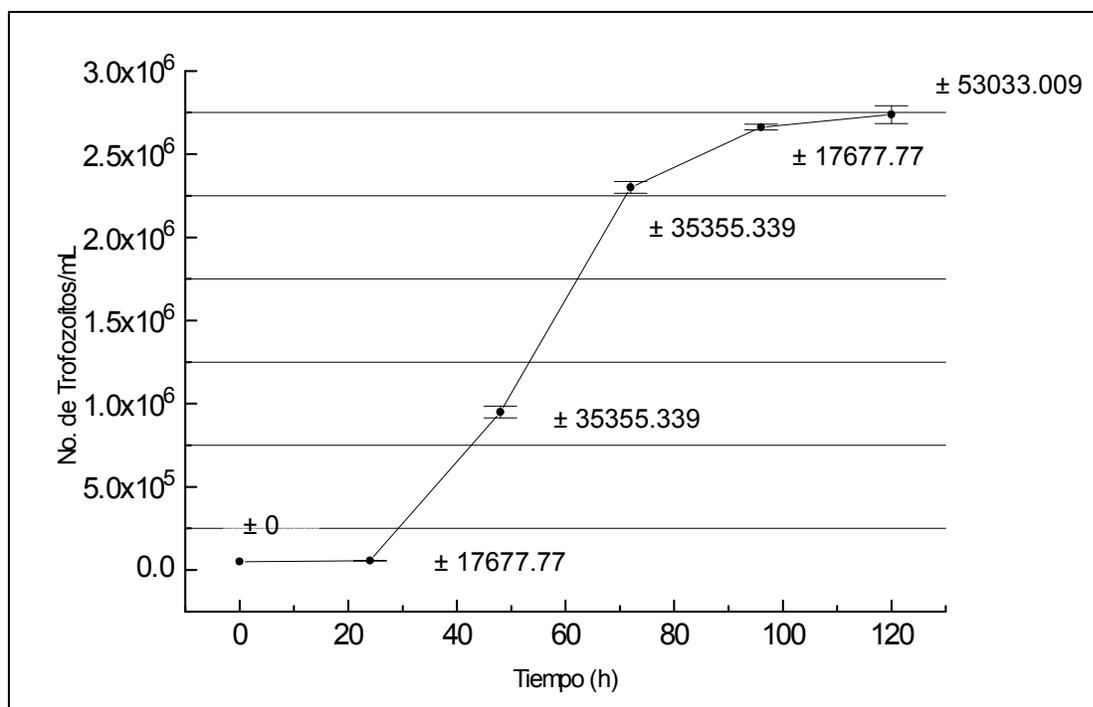


Figura 17. Curva de crecimiento de *Giardia intestinalis*

En la Figura 17 se observa que entre las 30 y 72 h, los trofozoítos se encuentran en una fase de crecimiento exponencial o logarítmica. Durante esta fase de crecimiento del parásito, se puede determinar la actividad biológica de un compuesto, ya que el efecto observado es exclusivo de los compuestos que se evalúan y no debido a un sobre-crecimiento de los trofozoítos, que generaría una deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo y como consecuencia su muerte. Por lo tanto, considerando la curva, se puede establecer un tiempo óptimo de incubación de los trofozoítos en presencia de cada compuesto a evaluar a las 48 h, (tiempo empleado para el método de subcultivo).

## 6.2. Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

En la Tabla 7 y Figura 18, se muestran los datos obtenidos para la curva de crecimiento de *T. vaginalis*.

Tabla 7. Número de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, obtenidos a diferentes tiempos de cultivo.\*

Tiempo (h)	No. de trofozoítos/mL (Experimento 1)	No. De trofozoítos/mL (Experimento 2)	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0	6000	6000	6000	0	0
24	250000	275000	262500	17677.77	6.73
48	1025000	1000000	1012500	17677.77	1.75
72	2350000	2375000	2362500	17677.77	0.75
96	2650000	2600000	2625000	35355.339	1.35
120	2675000	2700000	2687500	17677.77	0.66

\*El inóculo inicial fue de  $6 \times 10^3$  trofozoítos/mL.

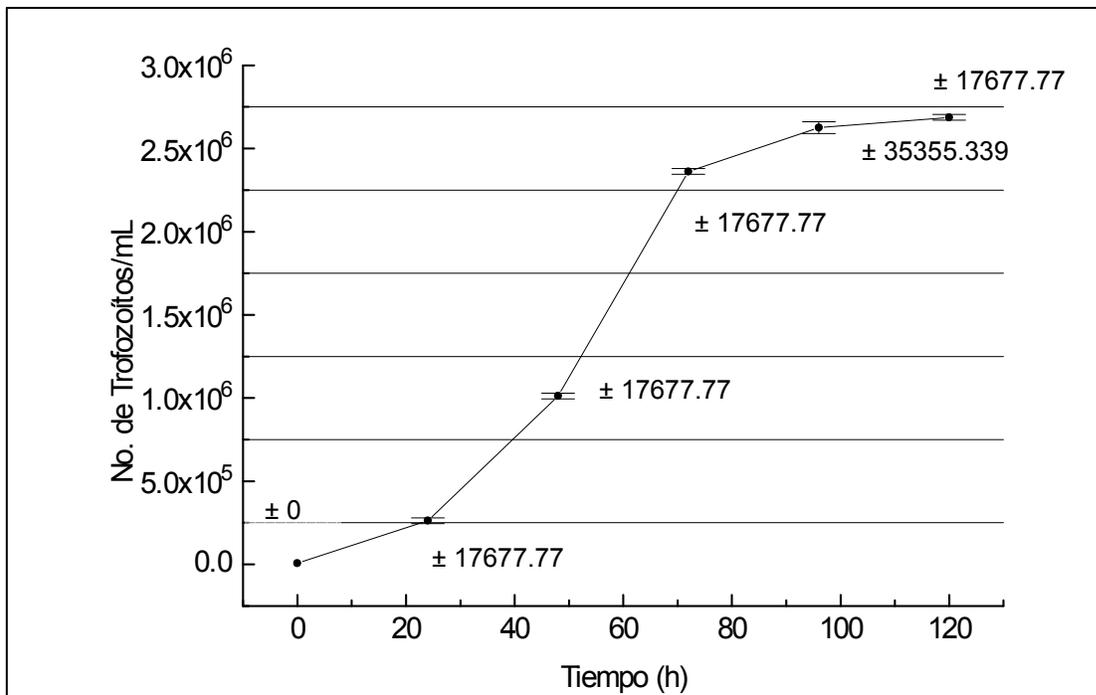


Figura 18. Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

Para *T. vaginalis*, también se estableció que a las 48 h, el parásito se encuentra en una fase de crecimiento exponencial, sin embargo, comparando la cantidad de trofozoítos de ambos parásitos, 24 h después del inóculo inicial, se observa que el tiempo de crecimiento de *G. intestinalis* durante las primeras horas, es más lento que el presentado por *T. vaginalis*, éste último creció 43.8 veces, mientras que *G. intestinalis* sólo creció 1.1 veces, respecto a la cantidad de inóculo inicial. Lo anterior justifica el hecho de colocar un inóculo inicial más pequeño para *T. vaginalis* de  $6 \times 10^3$  trofozoítos/mL, principalmente, debido a que su tasa de crecimiento es mayor. Es importante señalar que, la cantidad inicial de trofozoítos fue determinada con base a lo indicado por Cedillo y Muñoz (1992).

6.3. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* ( $CI_{50}$  ( $\mu M$ )) de los nuevos derivados bencimidazólicos contra *Giardia intestinalis*

En general, de todos los compuestos evaluados, ninguno fue más activo que el albendazol. De los cuatro nuevos derivados bencimidazólicos, el compuesto más activo fue el **AHM-23** con una  $CI_{50} = 0.233 \mu M$ , seguido del **AHM-17** ( $CI_{50} = 0.320 \mu M$ ), el cual a su vez fue más activo que el **AHM-4** ( $CI_{50} = 0.499 \mu M$ ). Por último el compuesto con la menor actividad fue el **AHM-11** ( $CI_{50} = 0.956 \mu M$ ) (Tabla 8) (Figura 19). Los valores promedio de  $CI_{50}$  de cada compuesto fueron estadísticamente diferentes entre sí ( $p = 0.05$ ), en el ANEXO 3, se muestran los resultados de las pruebas estadísticas realizadas.

Tabla 8. Valores de  $CI_{50}$  de los nuevos derivados bencimidazólicos, albendazol y metronidazol obtenidos por el método de subcultivo contra *G. intestinalis*.

Compuesto	Peso Molecular	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	Promedio ( $\mu M$ )	Intervalo de confianza.	D.E.	% C.V.
<b>AHM-4</b>	205.213	0.463 0.492 0.541	0.499	0.402 – 0.596	0.039	7.909
<b>AHM-11</b>	239.5	0.877 0.977 1.015	0.956	0.780 – 1.132	0.071	7.449
<b>AHM-17</b>	239.658	0.342 0.317 0.300	0.320	0.268 – 0.372	0.021	6.565
<b>AHM-23</b>	274.103	0.237 0.219 0.244	0.233	0.201 - 0.265	0.013	5.634
albendazol	265.633	0.049 0.053 0.038	0.046	0.026 - 0.066	0.008	16.878
metronidazol	171.16	0.888 0.666 0.748	0.767	0.489 - 1.045	0.112	14.633

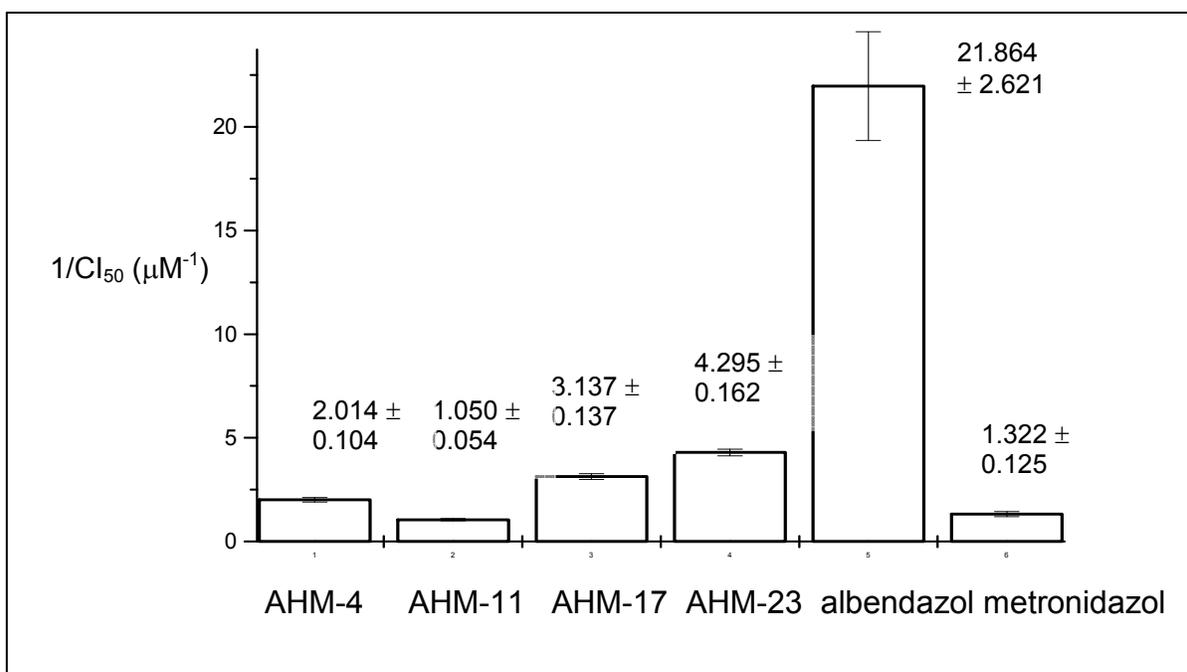


Figura 19. Actividad comparada de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, evaluados contra *Giardia intestinalis*.

La actividad comparada de los compuestos, del albendazol y metronidazol evaluados contra *G. intestinalis*, considera el inverso del valor promedio de la CI<sub>50</sub>.

El coeficiente de potencia, establece la relación de actividad entre los compuestos testigos (albendazol y metronidazol) y los compuestos evaluados. El albendazol fue 20 veces más potente que el compuesto **AHM-11**, así como 10, 7 y 5 veces más potente que los compuestos **AHM-4**, **AHM-17** y **AHM-23** respectivamente (Figura 20). Los valores promedio de CI<sub>50</sub> de los nuevos derivados 1-metil bencimidazólicos fueron estadísticamente diferentes con respecto al albendazol ( $p = 0.05$ ) (ANEXO 3.1).

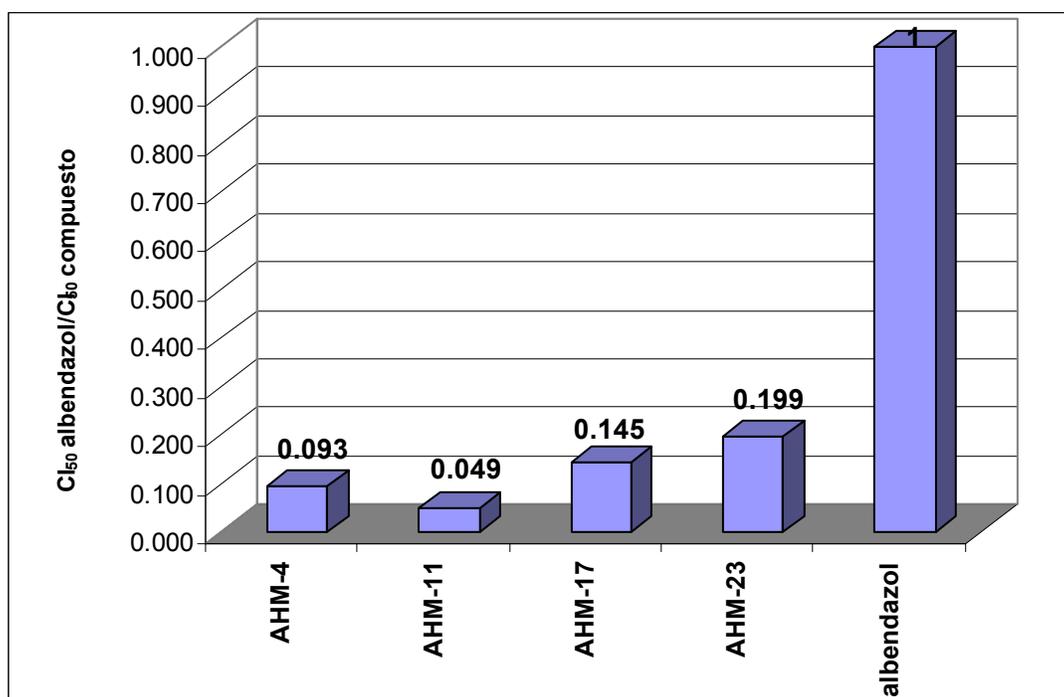


Figura 20. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra *Giardia intestinalis*, con respecto al albendazol.

Todos los compuestos fueron más potentes que el metronidazol, y sólo el compuesto **AHM-11** ( $Cl_{50} = 0.956 \mu\text{M}$ ), presentó una potencia similar a la mostrada por este derivado nitroimidazólico. El compuesto **AHM-23** fue 3.2 veces más potente, seguido del **AHM-17** y **AHM-4** que fueron 2.3 y 1.5 veces más potentes respectivamente, que el metronidazol (Figura 21). Los valores promedio de  $Cl_{50}$  de los compuestos **AHM-4**, **AHM-17** y **AHM-23** fueron estadísticamente diferentes con respecto al metronidazol ( $p = 0.05$ ) y solo el compuesto **AHM-11**, no presentó una diferencia estadística significativa ( $p = 0.05$ ), con respecto al metronidazol, por lo que se establece que la actividad giardicida de ambos compuestos es igual (ANEXO 3.1).

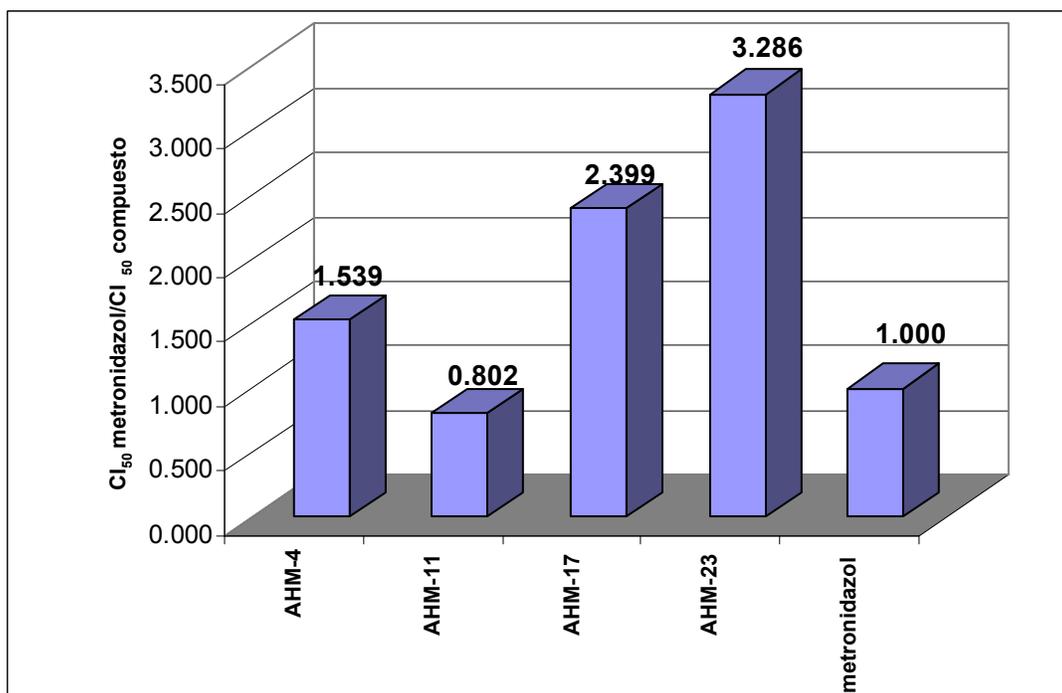


Figura 21. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra *Giardia intestinalis*, con respecto al metronidazol.

Respecto a la relación estructura–actividad, el compuesto derivado del carbendazim más activo de todos, el **AHM-23**, se caracteriza por estar disustituído con un átomo de Cl en las posiciones 5 y 6. El compuesto **AHM-17** es el segundo compuesto más activo; estructuralmente presenta como sustituyente un átomo de cloro en la posición 6. El compuesto **AHM-4** es el siguiente compuesto más activo, a diferencia de los compuestos anteriores, estructuralmente no presenta un átomo de Cl en la posición 5 y/ó 6, el compuesto menos activo, el **AHM-11**, presenta un sustituyente cloro en posición 5. En este caso resulta de interés observar que el compuesto **AHM-4**, que no está sustituido en posición 5 y/ó 6, mostró una mejor actividad, en comparación con el compuesto **AHM-11** (sustituido con Cl en posición 5).

Estos resultados ponen en evidencia que la actividad giardicida se favorece con la presencia de dos sustituyentes cloro en las posiciones 5 y 6 del núcleo de

bencimidazol (compuesto **AHM-23**). Lo anterior concuerda con lo reportado previamente por Sánchez (1999) (Tabla 4), en donde los compuestos disustituídos con cloro en las posiciones 5 y 6 (**RSD-14**  $Cl_{50}=0.074 \mu\text{M}$ , **RSD-15**  $Cl_{50}=0.008 \mu\text{M}$  y **RSD-16**  $Cl_{50}=0.024 \mu\text{M}$ ), sustituídos en posición dos con los grupos:  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  y  $-\text{CH}_3$  respectivamente, presentan la mejor actividad, en comparación con sus compuestos análogos monosustituídos con Cl en posición 5 ó 6 y con los que no presentan sustituyentes en estas mismas posiciones.

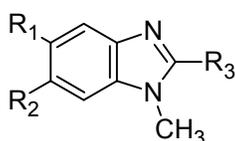
El compuesto **AHM-17** (sustituído con Cl en posición 6), presentó mayor actividad giardicida que **AHM-11** (sustituído con Cl en posición 5). Resultados similares se observaron con los compuestos 1-metilbencimidazólicos de la Tabla 4. En ésta se observa que los compuestos sustituídos con Cl en posición 6, (**RSD-9**, **RSD-10** y **RSD-11**), con un grupo  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ , en posición 2 respectivamente, fueron más activos que sus compuestos análogos sustituídos con Cl en posición 5 (**RSD-5**, **RSD-6** y **RSD-7**), respectivamente.

El compuesto **AHM-4** (sin sustituyentes en 5 ó 6), resultó más activo que el **AHM-11** (Cl en posición 5). Al analizar los resultados de la Tabla 4, es evidente que en el caso de los compuestos sin sustituyentes en 5 ó 6, con  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{SH}$  en posición 2 (**RSD-1** y **RSD-3**, respectivamente), presentaron mayor actividad giardicida que sus análogos con un átomo de Cl en la posición 5 (**RSD-5** y **RSD-7**). De lo anterior, se deduce que en los compuestos 1-metilbencimidazólicos, con sustituyentes  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{SH}$  y  $-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$  en la posición 2 y el átomo de Cl en posición 5, no le confiere mayor actividad a la molécula.

Las comparaciones anteriores, nos permiten establecer que la actividad giardicida de los compuestos 1-metilbencimidazólicos, varía en función del tipo de sustituyente que presenten en posición 2, con los mismos sustituyentes en

posición 5 y/ó 6, que en este caso fue un átomo de cloro. Esta diferencia de actividad, se puede analizar considerando los valores de  $Cl_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos 1-metilbencimidazólicos previamente sintetizados, con los nuevos compuestos 1-metil derivados del carbendazim (**AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**), (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad biológica *in vitro* ( $Cl_{50}$   $\mu\text{M}$ ) de los derivados 1-metilbencimidazólicos contra *Giardia intestinalis*



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$Cl_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <i>G. intestinalis</i>
* <b>RSD-15</b>	Cl	Cl	SH	0.008
* <b>RSD-16</b>	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.024
* <b>RSD-13</b>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	0.055
* <b>RSD-14</b>	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>	0.074
<b>AHM-23</b>	Cl	Cl	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.233
♦ <b>G5</b>	Cl	Cl	CF <sub>3</sub>	0.260
* <b>RSD-3</b>	H	H	SH	0.018
* <b>RSD-4</b>	H	H	SCH <sub>3</sub>	0.033
♦ <b>G4</b>	H	H	CF <sub>3</sub>	0.064
* <b>RSD-1</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	0.089
<b>AHM-4</b>	H	H	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.499
* <b>RSD-2</b>	H	H	NH <sub>2</sub>	1.360
* <b>RSD-11</b>	H	Cl	SH	0.020
* <b>RSD-9</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	0.044
* <b>RSD-12</b>	H	Cl	SCH <sub>3</sub>	0.122
♦ <b>G7</b>	H	Cl	CF <sub>3</sub>	0.127
* <b>RSD-10</b>	H	Cl	NH <sub>2</sub>	0.132
<b>AHM-17</b>	H	Cl	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.320
* <b>RSD-8</b>	Cl	H	SCH <sub>3</sub>	0.028
♦ <b>G6</b>	Cl	H	CF <sub>3</sub>	0.042
* <b>RSD-7</b>	Cl	H	SH	0.045
* <b>RSD-5</b>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	0.144
* <b>RSD-6</b>	Cl	H	NH <sub>2</sub>	0.242
<b>AHM-11</b>	Cl	H	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.956
albendazol				0.037
metronidazol				1.228

\* Tomado de Sánchez, 1999 ♦ Tomado de Navarrete et al., 2001

En la Tabla 9 se observa que los compuestos 1-metilbencimidazólicos más activos, son los que presentan un grupo mercapto o metiltio como sustituyente en la posición 2 y se encuentran diclorados en las posiciones 5 y 6. Otra característica, es que la presencia de un átomo de Nitrógeno como parte de su grupo sustituyente en posición 2 (-NH<sub>2</sub> y -NHCOOCH<sub>3</sub>), promueve que la actividad giardicida disminuya.

Considerando los resultados mostrados en la Tabla 9, es evidente que los nuevos compuestos 1-metilados, derivados del carbendazim, no tienen una mejor actividad giardicida que el albendazol, ni que los compuestos previamente evaluados. Cabe mencionar que el mecanismo de acción de los compuestos 1-metilbencimidazólicos con un sustituyente diferente al carbamato de metilo en posición 2, no es mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina, como lo demostró Sánchez (1999) y Navarrete (2004). Por lo tanto, resultará de interés determinar posteriormente, si el compuesto con el mayor efecto giardicida, actúa sobre la tubulina de *G. intestinalis*, por presentar al carbamato de metilo en posición 2, o bien si su mecanismo de acción es diferente a éste.

#### 6.4. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* (Cl<sub>50</sub> (μM)) de los nuevos derivados bencimidazólicos contra *Trichomonas vaginalis*

Con respecto a la actividad tricomonocida, el derivado 1-metilbencimidazólico **AHM-17**, fue el más activo de los compuestos evaluados, el **AHM-11** y **AHM-23**, presentaron una actividad similar y el menos activo de todos fue el **AHM-4** (Tabla 10) (Figura 22). Los valores promedio de Cl<sub>50</sub> entre el compuesto **AHM-11** y **AHM-23** no fueron estadísticamente diferentes entre si (p = 0.05) (ANEXO 3.2), por lo tanto se establece que presentan la misma actividad

tricomonicida. Sin embargo, el compuesto más activo (**AHM-17**), si muestra una diferencia estadística significativa ( $p = 0.05$ ), respecto al valor promedio de  $CI_{50}$  de los demás compuestos. En general, todos presentaron mayor actividad que el albendazol, con excepción del **AHM-4**, que presentó una actividad similar a la de este derivado bencimidazólico. Estadísticamente, no hay una diferencia significativa entre los valores promedio de  $CI_{50}$  de ambos compuestos ( $p = 0.05$ ) (ANEXO 3.2), por lo tanto, el albendazol y el compuesto **AHM-4**, presentan la misma actividad tricomonicida.

Tabla 10. Valores de  $CI_{50}$  de los nuevos derivados bencimidazólicos, albendazol y metronidazol obtenidos por el método de subcultivo, contra *T. vaginalis*.

Compuesto	Peso molecular	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	Promedio ( $\mu M$ )	Intervalo de confianza	D.E.	% C.V.
<b>AHM-4</b>	205.213	1.145 1.335 1.462	1.314	0.919 - 1.709	0.159	12.132
<b>AHM-11</b>	239.5	0.426 0.397 0.493	0.438	0.386 - 0.490	0.021	4.714
<b>AHM-17</b>	239.658	0.359 0.346 0.342	0.349	0.327 - 0.371	0.009	2.488
<b>AHM-23</b>	274.103	0.401 0.646 0.602	0.550	0.227 - 0.873	0.130	23.712
Albendazol	265.633	1.171 1.152 1.291	1.205	1.016 - 1.394	0.076	6.273
Metronidazol	171.16	0.228 0.275 0.280	0.261	0.189 - 0.333	0.029	11.044

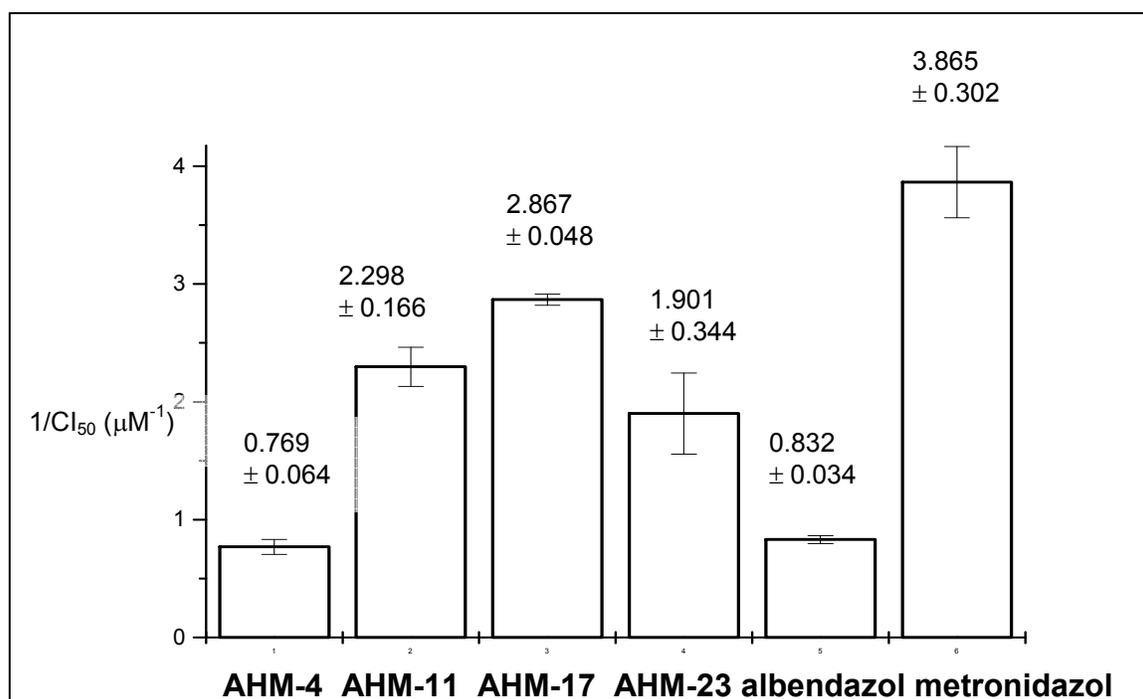


Figura 22. Actividad comparada de los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** evaluados contra *Trichomonas vaginalis*

Referente al coeficiente de potencia de los compuestos con respecto al albendazol, todos fueron más potentes que este derivado bencimidazólico, con excepción del **AHM-4**. En orden creciente de actividad se observó que el compuesto **AHM-23** fue 2.2 veces más potente que el albendazol, seguido del **AHM-11** y **AHM-17** que fueron 2.7 y 3.4 veces más potentes, respectivamente (Figura 23).

Los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, no fueron más potentes que el metronidazol, el compuesto **AHM-17** fue 1.3 veces menos potente, seguido de los compuestos: **AHM-11**, **AHM-23** y **AHM-4** que fueron 1.6, 2.1 y 5 veces menos potentes respectivamente, que el metronidazol (Figura 24). A pesar de que la actividad y potencia mostrada por el compuesto **AHM-17** es cercana a la del metronidazol, se determinó una diferencia significativa ( $p = 0.05$ ), entre los valores promedio de  $CI_{50}$  de ambos compuestos, por lo tanto, su actividad tricomonicida es diferente (ANEXO 3.2).

En términos generales, los compuestos **AHM-17** y **AHM-11**, fueron los que mostraron la mejor actividad tricomonocida.

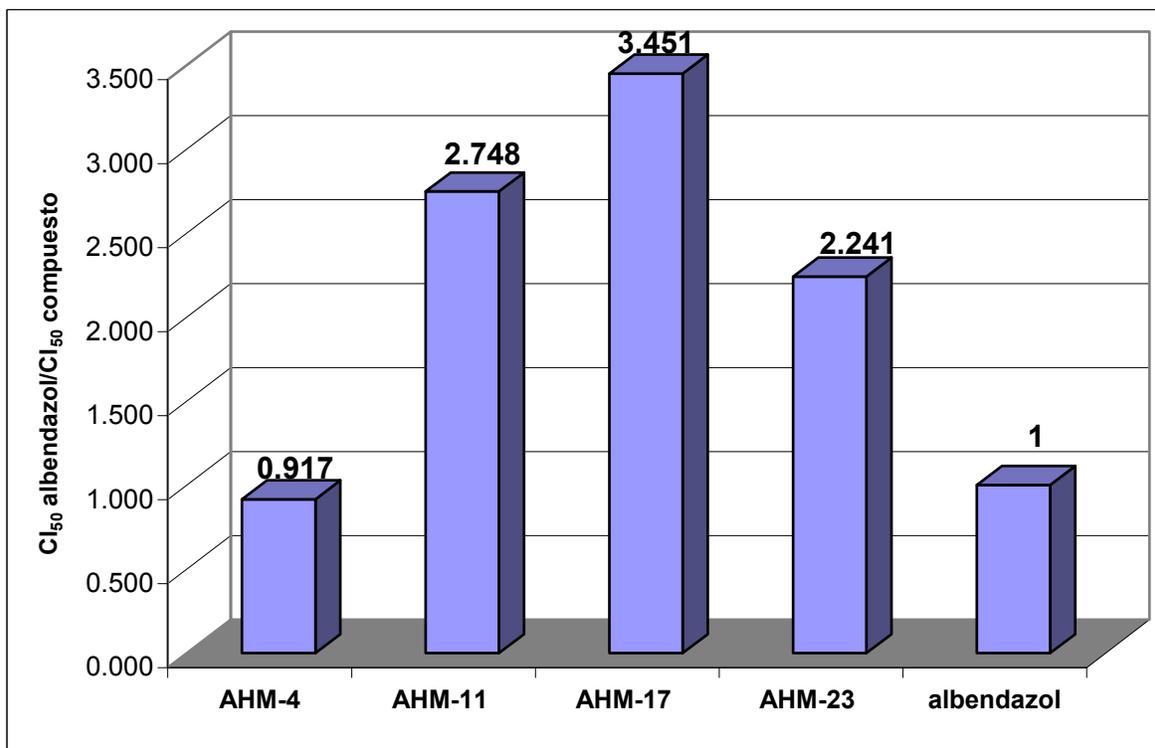


Figura 23. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra *Trichomonas vaginalis*, con respecto al albendazol.

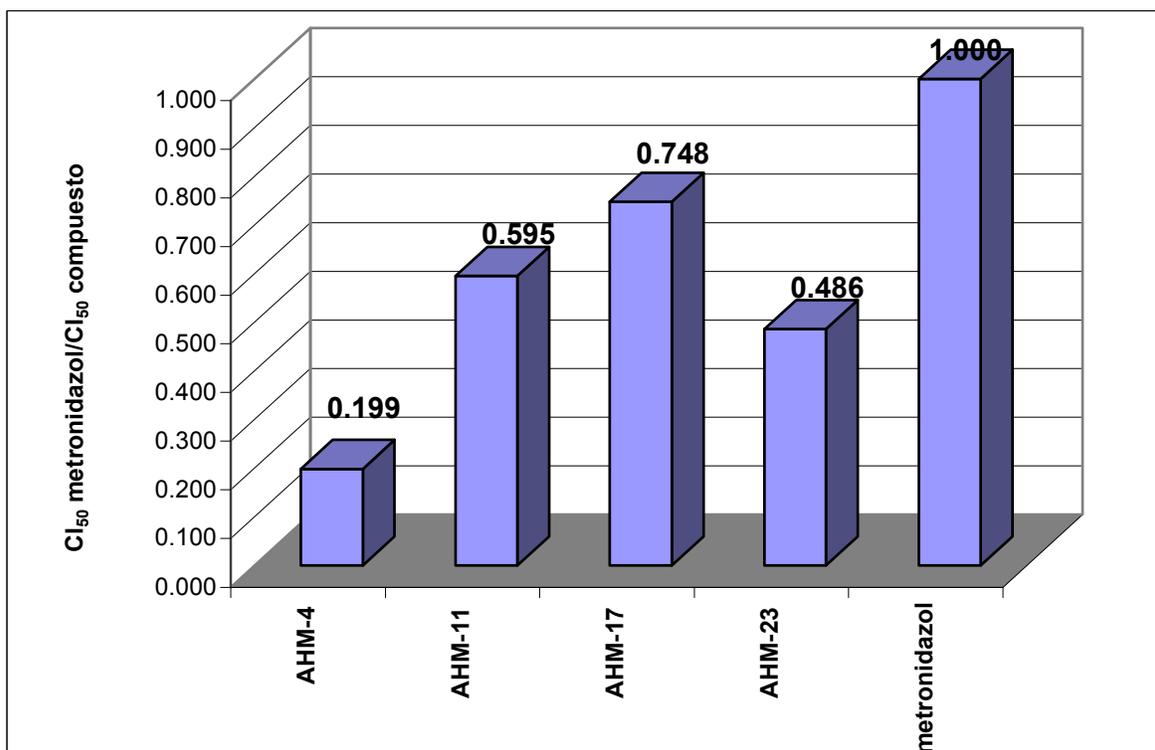


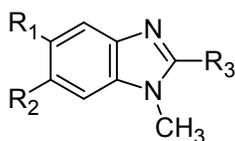
Figura 24. Coeficiente de potencia de los compuestos evaluados contra *Trichomonas vaginalis*, con respecto al metronidazol.

Respecto a la relación estructura–actividad, resulta de interés observar que, los valores obtenidos de la actividad biológica *in vitro* de los nuevos compuestos 1-metilbencimidazólicos (**AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**) contra *T. vaginalis*, fueron mejores que los reportados previamente por Sánchez (1999) (Tabla 4). Estos últimos presentan sustituyentes -CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub> en posición 2. En particular, para *T. vaginalis* se observó, con base a los valores obtenidos de CI<sub>50</sub>, que si se presenta un sustituyente carbamato de metilo en posición 2 en el anillo bencimidazólico, un metilo en posición 1, y un átomo de cloro en posición 6, como en el compuesto **AHM-17**, se favorecerá la actividad tricomonocida.

En la serie de compuestos **RSD**, el más activo fue el **RSD-6** (CI<sub>50</sub>=0.148 μM), presentando una actividad mayor que el albendazol y metronidazol, estructuralmente, presenta un átomo de Cl en posición 5 y un grupo -NH<sub>2</sub> en posición 2.

Considerando el sustituyente en la posición 2, se observa que la actividad tricomonocida varía, cuando se tienen sustituyentes diferentes en esta posición, con los mismos sustituyentes en posición 5 y/o 6. En la Tabla 11 se observan las diferencias de actividad, entre los distintos compuestos 1-metilbencimidazólicos.

Tabla 11. Actividad biológica *in vitro* ( $CI_{50}$   $\mu$ M) de los derivados 1-metilbencimidazólicos contra *Trichomonas vaginalis*.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) <i>T. vaginalis</i>
<b>*RSD-6</b>	Cl	H	NH <sub>2</sub>	0.148
<b>AHM-11</b>	Cl	H	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.438
<b>*RSD-5</b>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	0.481
<b>*RSD-8</b>	Cl	H	SCH <sub>3</sub>	9.924
<b>*RSD-7</b>	Cl	H	SH	35.540
<b>AHM-17</b>	H	Cl	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.349
<b>*RSD-11</b>	H	Cl	SH	0.503
<b>*RSD-12</b>	H	Cl	SCH <sub>3</sub>	1.091
<b>*RSD-9</b>	H	Cl	CH <sub>3</sub>	3.268
<b>*RSD-10</b>	H	Cl	NH <sub>2</sub>	142.300
<b>*RSD-2</b>	H	H	NH <sub>2</sub>	0.482
<b>*RSD-4</b>	H	H	SCH <sub>3</sub>	0.898
<b>AHM-4</b>	H	H	NHCOOCH <sub>3</sub>	1.314
<b>*RSD-3</b>	H	H	SH	2.786
<b>*RSD-1</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	4.321
<b>AHM-4</b>	Cl	Cl	NHCOOCH <sub>3</sub>	0.550
<b>*RSD-14</b>	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>	5.115
<b>*RSD-16</b>	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>	8.421
<b>*RSD-13</b>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	17.620
<b>*RSD-15</b>	Cl	Cl	SH	26.310
albendazol				1.592
metronidazol				0.216

\* Tomado de Sánchez, 1999

En la Tabla 11, se observa que en el compuesto **RSD-10** ( $CI_{50}$ =142.300  $\mu$ M), el sustituyente  $-NH_2$  en posición 2 y el cloro en posición 6, hace que la actividad disminuya 1000 veces en comparación con el compuesto **RSD-6** ( $CI_{50}$ =0.148  $\mu$ M).

Respecto a los compuestos 1-metil-2-carbamato bencimidazólicos, la presencia del cloro en posición 6 favorece la actividad tricomonocida y ésta disminuye 1.2 veces cuando el cloro se encuentra en la posición 5. A diferencia de lo observado para *G. intestinalis*, en los compuestos disustituídos con cloro en

posiciones 5 y 6, la actividad tricomonocida disminuye considerablemente, respecto a los compuestos que están monosustituídos con cloro en posición 5 ó 6 y a los que no presentan sustituyentes en estas posiciones.

De forma general los nuevos compuestos (**AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**), presentaron una mayor y notoria actividad tricomonocida, en comparación con los compuestos evaluados previamente.

Resulta de interés continuar con el estudio de los compuestos con la mejor actividad giardicida y tricomonocida, en especial para determinar cuál es el mecanismo de acción sobre los parásitos, las estructuras celulares que se afectan, o bien como disminuye su viabilidad.

El ensayo biológico realizado es la parte inicial en el estudio de los compuestos, que pueden ser desarrollados como fármacos para el tratamiento de alguna enfermedad en particular. Cabe señalar que la técnica *in vitro* (método de subcultivo) realizada, sólo permite establecer si el compuesto presenta o no actividad contra los parásitos de interés *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, por lo que es conveniente continuar con otro tipo de ensayos *in vitro*, en los que se determine citotoxicidad, utilizando modelos de líneas celulares. De igual forma es conveniente realizar estudios *in vivo* con modelos animales en los que se determinen parámetros farmacocinéticos como: absorción del compuesto, biodisponibilidad, y toxicidad.

## 7. CONCLUSIONES

- Los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, presentaron actividad giardicida y tricomonocida, por lo que la hipótesis propuesta es aceptada.

- Ninguno de los compuestos evaluados tuvo mejor actividad giardicida que el albendazol, sin embargo sí mostraron mayor actividad giardicida que el metronidazol.

- Para los compuestos 1-metilbencimidazólicos, la presencia del grupo carbamato de metilo en posición 2, disminuyó la actividad biológica contra *G. intestinalis*, en comparación con los compuestos que presentan un sustituyente -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH o -SCH<sub>3</sub>, diferente al carbamato en la misma posición.

- El átomo de cloro en la posición 6, confiere a la molécula del 1-metilbencimidazol 2-carbamato, una mejor actividad biológica contra *G. intestinalis*, a diferencia del compuesto 1- metilbencimidazol 2-carbamato, con cloro en posición 5.

- El análogo **AHM-23** (diclorado), fue el más activo de los compuestos contra *G. intestinalis*.

- Los compuestos evaluados, **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, presentaron una buena actividad biológica, contra *T. vaginalis*, siendo más activos que el albendazol.

- La presencia del sustituyente carbamato de metilo en posición 2, favoreció la actividad biológica contra *T. vaginalis*, en comparación con los compuestos que presentan sustituyentes -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub>, en la misma posición.

- El átomo de cloro en la posición 6, confiere mayor actividad tricomonocida a la molécula del 1-metilbencimidazol-2-carbamato.

- El análogo **AHM-17** fue el más activo de los compuestos contra *T. vaginalis*.

- El análisis estadístico de los resultados, permitió comprobar las diferencias estadísticas en los valores de actividad, obtenidos entre los compuestos evaluados y los controles empleados, con un nivel de confianza del 95%.

- Los compuestos **AHM-23** y **AHM-17** presentaron una buena actividad giardicida y tricomocida, respectivamente, por lo tanto, resulta conveniente continuar con su evaluación *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Argüello G. R., Cruz S. M., Romero M. L., Ortega P.G. *Variability and variation in drug susceptibility among Giardia isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vivo*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2004**, 54 (4): 711-721.
- Arroyo R., Engbring J. and Alderete J.F. *Molecular basis of host epithelial cell recognition by Trichomonas vaginalis*. Molecular Biology, **1992**, 6(7): 853-862.
- Boreham P.F.L., Phillips R.E., Sheperd R.W. *Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of Giardia intestinalis with different drug sensitivities*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **1988**, 82: 104–106.
- Brown D. M., Upcroft J. A., Edwards M. R., Upcroft P. *Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote Giardia duodenalis*. International Journal for Parasitology, **1998**, 28: 149–164.
- Brown D. M., Upcroft J. A., Dodd H.N., Chen N., Upcroft P. *Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in Trichomonas vaginalis*. Molecular and Biochemical Parasitology. **1999** 98: 203–214.
- Brustenga G.J. *Infecciones por Giardia*. Farreras Rozman Medicina Interna. 13<sup>a</sup> Edición. Ediciones DOYMA (CD ROM), **1996**.
- Cedillo R., Muñoz O. *In-Vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents*. Journal of Medical Microbiology, **1992**, 37: 221-224.
- Cedillo R. R., Chávez B., González R. A., Tapia A., Yépez M. L. *In Vitro Effect of Nitazoxanide Against Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and*

- Trichomonas vaginalis* Trophozoites. Journal of Eukaryotic Microbiology, **2002**, 49 (3): 201–208.
- Chávez B., Espinoza C. M., Cedillo R. R., Ramírez A., Martínez P. A. *Effects of Albendazole on Entamoeba histolytica and Giardia lamblia Trophozoites*. Archives of Medical Research, **1992a**, 23 (2): 63-67.
  - Chávez B., Cedillo R. R., Martínez P. A. *Giardia lamblia: Ultrastructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles*. Journal of Protozoology, **1992b**, 39 (4): 510-515.
  - Cruz A., Sousa M.I., Azeredo Z., Leite E., Figueiredo de Sousa J.C., Cabral M. *Isolation excystation and axenization of Giardia lamblia isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **2003**, 51: 1017–1020.
  - Cudmore S. L., Delgaty K. L., Hayward-McClelland S. F., Petrin D. P. and Garber G. E. *Treatment of Infections Caused by Metronidazole – Resistant Trichomonas vaginalis*. Clinical Microbiology Reviews, **2004**, 17 (4): 783–793.
  - Diamond L. S., Harlow D.R., Cunnick C.C. *A New Medium for the Axenic Cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, **1978**, 72: 431-432.
  - Dirección General de Epidemiología **2005** Boletín de Epidemiología ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)).
  - Dolezal P., Smíd O., Rada P., Zubáková Z., Bursac D., Suták R., Nebesárova J., Lithgow T., Tachezy J. *Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosome, share a common mode of protein targeting*. The National

- Academy of the Sciences of the USA (PNAS), **2005**, 102 (31): 10924–10929.
- Dunne R. L., Dunn L. A., Upcroft P., O'Donoghue P. J., Upcroft J. A. *Drug resistance in the sexually transmitted protozoan Trichomonas vaginalis*, Cell Research, **2003**, 13 (4): 239–249.
  - Edlind D. T., Hang T. L. and Chakraborty P. R. *Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles against Giardia lamblia In Vitro*. Journal of Infectious Diseases, **1990**, 162: 1409-1411.
  - Ellis J.E., Wingfield J.M., Cole D., Boreham P.F.L., Lloyd D. *Oxygen affinities of metronidazole – resistant and sensitive stocks of Giardia intestinalis*. International Journal for Parasitology **1992**, 23: 35–39.
  - Farthing M.J.G. *Giardiasis*. Gastroenterology **1996**, 25 493–515.
  - Fox L. A. M., Saravolatz L. D. *Nitazoxanide: A new Thiazolide Antiparasitic Agent*. Reviews of Anti – Infective Agents, **2005**, 40: 1173-1179
  - Gardner T. B., Hill D. R. *Treatment of Giardiasis*. Clinical Microbiology Reviews, **2001**, 14 (1): 114-128.
  - Gillin F. D., Reiner D. S. and Boucher S. E. *Small - Intestinal Factors Promote Encystation of Giardia lamblia In Vitro*. Infection and Immunity, **1988**, 56: 705–707.
  - Henze K., Martin W. *Evolutionary biology: Essence of mitochondria*. Nature, **2003**, 426: 127–128.
  - Johnson P.J. *Metronidazole and Drug Resistance*. Parasitology Today **1993**, 9 (5): 183–186.

- Katiyar S.K., Gordon V.R., McLaughlin G.L., Edlind T.D. *Antiprotozoal Activities of Benzimidazoles and Correlations with  $\beta$ -Tubulin Sequence*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **1994**, 38 (9): 2086–2090.
- Keister D. B. *Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile*. Tropical Medicine and Hygiene, **1983**, 77 (4): 487-488.
- Kulda J. *Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance*. International Journal for Parasitology, **1999**, 29: 199–212.
- Lacey E. *The Role of the Cytoskeletal Protein, Tubulin in the Mode of Action and Mechanisms of Drug Resistance to Benzimidazoles*. International Journal for Parasitology, **1985**, 18 (7): 885–936.
- Land K.M., Johnson P. J. *Molecular Mechanisms Underlying Metronidazole Resistance in Trichomonads*. Experimental Parasitology, **1997**, 87: 305–308.
- Land K.M., Clemens D.L., Johnson P. J. *Loss of Multiple Hydrogenosomal Proteins Associated with Organelle Metabolism and High – Level Drug Resistance in Tricomonads*. Experimental Parasitology, **2001**, 97: 102–110.
- Lemée V., Zaharia I., Nevez G., Rabodonirina M., Brasseur P., Ballet J.J. and Favennec L. *Metronidazole and Albendazole Susceptibility of 11 Clinical Isolates of Giardia duodenalis from France*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2000**, 46: 819–821.
- MacDonald L. M., Armson A., Thompson A. R. C., Reynoldson J. A. *Characterisation of benzimidazole binding with recombinat tubulin from*

- Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **2004**, 138: 89–96.
- Marques de Cantú M. J. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico – Biológicas. Pre edición Ed. Mc Graw Hill. México **1998**, 277-384.
  - Meri T., Jokiranta T. S., Suhonen L., Meri S. *Resistance of Trichomonas vaginalis to Metronidazole: Report of the First Three Cases from Finland and Optimization of In Vitro Susceptibility Testing under Various Oxygen Concentrations*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**, 38 (2): 763-767
  - Morgan U. M., Reynoldson J. A. and Thompson R. C. A. *Activities of several Benzimidazoles and Tubulin Inhibitors against Giardia spp. In Vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, 37 (2): 328-331.
  - Navarrete V. J. G. *Síntesis y actividad biológica de 2-(trifluorometil) bencimidazoles*. Tesis de Maestría. U.N.A.M. Facultad de Química. México **2000**.
  - Navarrete V. J. G., Cedillo R., Hernández C. A., Yépez L., Hernández L. F., Valdez J., Morales R., Cortés R., Hernández M., Castillo R. *Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives*. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, 11: 187–190.
  - Navarrete V. J.G. *Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)-bencimidazoles*. Tesis de Doctorado U.N.A.M. Facultad de Química. México **2004**.
  - Petrin D., Delgaty K., Bhatt R. and Garber G. *Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, **1998**, 11(2): 300-317.

- Rasoloson D., Vanacová S., Tomková E., Rázga J., Hdrý I., Tachezy J. and Kulda J. *Mechanisms of in vitro development of resistance to Metronidazole in Trichomonas vaginalis*. Microbiology, **2002**, 148: 2467–2677.
  
- Sánchez D. M. R. *Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial*. Tesis de Maestría (Maestría en ciencias químicas) U.N.A.M Facultad de Química. México **1999**.
  
- Schmidt G., Roberts L. *Foundations of Parasitology* 6ª. Edición. Mc Graw Hill E.U.A, **2000**: 83-99.
  
- Schofield P.J., Edwards M.R. *Giardia: From Molecules to Disease*. Edited by Thompson R.C.A. CAB International. U.K., **1994**: 394.
  
- Schwebke J. R., Burgess D. *Trichomoniasis*. Clinical Microbiology Reviews, **2004**, 17 (4): 794–803.
  
- Sharma S. *Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs*. Vol. 25 Edited by Anand Nitya. Elsevier science **1997**.
  
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Número 52, Volumen 22 Semana 52 (del 25 al 31 de diciembre del 2005), **2006**, 9 (23)
  
- Smyth J. D. *Introduction to animal Parasitology* 3<sup>rd</sup> edition Cambridge University Press. Great Britain, **1994**: 44-51.
  
- Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? American Journal of Obstetrics and Gynecology. **2004**, 190: 281-290.
  
- Tovar J., León – Ávila G., Sánchez L. B., Sutak R., Tachezy J., van der Giezen M., Hernández M., Müller M. and Lucocq J. M. *Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron–sulphur protein maturation*. Nature, **2003**, 426: 172-176.

- Townsend L.B., Wise D.S. *Parasitology Today*, **1990**, 6 (4): 107-112.
- Townson S. M., Boreham P.F.L., Upcroft P., Upcroft J.A. *Resistance to nitroheterocyclic drugs*. *Acta Tropica* **1994**, 56: 176–194.
- Townson S.M., Upcroft J.A., Upcroft P., *Characterisation and Purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **1996**, 79: 183–193.
- Upcroft J.A., Upcroft P. *Metronidazole and drug resistance*. *Parasitology Today*. **1993**, 9: 187-190
- Upcroft J., Mitchell R., Chen N. and Upcroft P. *Albendazole Resistance in Giardia Is Correlated with Cytoeskeletal Changes but Not with a Mutation at Amino Acid 200 in  $\beta$ -Tubulin*. *Microbial Drug resistance*, **1996**, 2(3): 303–308.
- Upcroft P. *Drug resistance in Giardia: clinical versus laboratory isolates*. *Drug Resistance Updates* **1998**, 1: 166–168.
- Upcroft P., Upcroft J. A. *Drug Targets and Mechanisms of resistance in anaerobic protozoa*. *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**, 14: 150–164.
- Voet D., Voet J. G. *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> edition Wiley International U.S.A. **2004**: 531–535.
- Voolman T., Boreham P. *Metronidazole resistant Trichomonas vaginalis in Brisbane* *Medicinal Journal of Australia* **1993**, 159: 490
- Wolfe M. S. *Giardiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, **1992**, 5 (1): 93–100.
- Ximénez G. C. *Las parasitosis intestinales en México*. Cuadernos de la Fundación Mexicana para la salud (FUNSALUD) No. 36. 1<sup>a</sup>. Edición México **2002** ([www.funsalud.org.mx](http://www.funsalud.org.mx)).

Páginas electrónicas consultadas:

- [www.cdfound.to.it/HTML/gia1C.htm](http://www.cdfound.to.it/HTML/gia1C.htm)

- [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)
- [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm)
- [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Trichomoniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Trichomoniasis.htm)
  
- [www.funsalud.org.mx](http://www.funsalud.org.mx)
- [www.sinais.salud.gob.mx](http://www.sinais.salud.gob.mx)
- [www.superior.de/pgr06\\_info\\_s.htm](http://www.superior.de/pgr06_info_s.htm)
- [www.ub.es/biocel/wbc/images/neubauer.jpg](http://www.ub.es/biocel/wbc/images/neubauer.jpg)
- [www.who.int/whr/2004/es/](http://www.who.int/whr/2004/es/)

Programas de cómputo empleados:

- Programa PROBIT, proporcionado por el Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario (C.U.I.D.A.). Laboratorio de Control Biológico de insectos de la Universidad de Colima.
- Programa ACD logP Data Base
- Programa ACD Chem/Sketch Freeware Version 8.1
- Programa Origin Version 3.5

## ANEXO 1. Materiales y procedimiento experimental

### REACTIVOS EMPLEADOS

- \*albendazol grado humano Lote: 9908000239 (Smithekline Beecham)
- \*cloruro de sodio (NaCl) (Merck)
- \*cloruro de potasio (KCl) (Merck)
- \*fosfato de potasio dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (J.T. Baker)
- \*fosfato de potasio monobásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (J.T. Baker)
- \*biosote, peptona (BBL)
- \*D-(+)-glucosa (Sigma)
- \*L-cisteína (ICN Biochemicals)
- \*L-ácido ascórbico (Sigma)
- \*citrato férrico (Sigma)
- \*bilis (Sigma)
- \*metronidazol EC207136-1 Suiza (Sigma)
- \*mezcla de penicilina-estreptomina 10000 U/ $\mu\text{g/ml}$  control: 050713 México (in vitro s.a.)
- \*mezcla de vitaminas Tween 80 Diamond 1978 solución de trabajo control: 050762 México (in vitro s.a.)
- \*dimetilsulfóxido DMSO lote: Y26611 E.U.A. (J.T. Baker)
- \*suero fetal de ternera (Hyclone)
- \*solución amortiguadora de fosfatos pH = 7 lote: L802171 (Beckman)
- \*solución amortiguadora de ftalato pH = 4 lote: L803032 (Beckman)
- \*medio de cultivo Gelosa Sangre

## EQUIPO

\*balanza analítica Scientech SA 210

\*microscopio invertido marca Olympus CK2 ULWCD 0.30

\*vortex Fisher vortex genie 2 Cat. No. 12-812

\*cámara de Neubauer Superior Marienfield (profundidad: 0.100 mm, 0.0025 mm<sup>2</sup>)

\*gabinete de seguridad biológica clase II (UN-425-400 Nuaire)

\*incubadora (Revco)

\*autoclave

\*filtro de nitrocelulosa marca millipore (0.22  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro)

\*medidor de pH marca Beckman  $\Phi$  720

\*electrodo Beckman 3984I lote 5805B

\*microtubos de polipropileno de 1.5 mL de capacidad (marca Axygen)

\*frascos Schott con capacidad de 100 mL y 500 mL

## PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 MODIFICADO PARA

*Giardia intestinalis* (Keister, 1983)

Compuesto	Cantidad
cloruro de sodio (NaCl)	2.0 g
fosfato de potasio dibásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
fosfato de potasio monobásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.6 g
biosote, peptona	30.0 g
D-(+)-glucosa	10.0 g
L-cisteína	2.0 g
L-ácido ascórbico	0.2 g
citrato férrico	0.0228 g
Bilis	0.8 g

Todos los compuestos se disolvieron con agitación constante en 700 mL de agua bidestilada, posteriormente se llevó la solución a un volumen de 900 mL, se ajustó el pH a un valor de 7.2 con una solución de NaOH [1 M], y se aforó a un volumen de 1000 mL.

El medio con el pH ajustado, se esterilizó mediante filtración al vacío, empleando filtros de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$ . Se recolectó en frascos Schott estériles, de 500 mL de capacidad.

Finalmente el medio se sometió a una prueba de esterilidad.

Al momento de utilizar el medio para la realización de los ensayos, se adicionaron: 10 mL de suero fetal bovino y 1.0 mL de mezcla de antibióticos penicilina–estreptomicina [10000 U/ $\mu\text{g}$ /mL].

#### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S- 33 PARA *Trichomonas vaginalis* (Diamond, 1978)

Compuesto	Cantidad
cloruro de sodio (NaCl)	2.0 g
fosfato de potasio dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.0 g
fosfato de potasio monobásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.6 g
biosote, peptona	30.0 g
D-(+)-glucosa	10.0 g
L-cisteína	1.0 g
L-ácido ascórbico	0.2 g
citrato férrico	0.0228 g

Todos los compuestos se disolvieron con agitación constante en 700 mL de agua bidestilada, posteriormente se llevó la solución a un volumen de 900 mL, se ajustó el pH a un valor de 6.8 con una solución de NaOH [1 M], y se aforó a un volumen de 1000 mL.

El medio se colocó en frascos Schott de 500 mL de capacidad, se esterilizó en autoclave bajo las siguientes condiciones: 15 lb de presión, temperatura de

120°C por un tiempo de 15 min. Posteriormente se sometió a una prueba de esterilidad.

El medio TYI-S- 33 (Diamond, 1978) antes de ser empleado en los ensayos, se adicionó con 10 mL de suero fetal bovino, 1.0 mL de mezcla de antibióticos penicilina–estreptomicina [10000 U/ $\mu$ g/mL], y 3.0 ml de una mezcla de vitaminas– agente tensoactivo Tween 80.

#### PRUEBA DE ESTERILIDAD

Ambos medios fueron sometidos a una prueba de esterilidad que consistió en inocular 500  $\mu$ L de cada uno de los medios estériles en cajas con medio de cultivo gelosa sangre. Las cajas y los frascos con el medio, se incubaron a una temperatura de 37 °C  $\pm$  0.5 °C por 48 h, después de este tiempo se verificó que no se presentara crecimiento de bacterias y hongos, tanto en los frascos como en las cajas.

#### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS AL 10 % (v/v) (PBS 10X)

Compuesto	Cantidad
cloruro de sodio (NaCl)	80.0 g
cloruro de potasio KCl	2.0 g
fosfato dibásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.0 g
fosfato monobásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	21.5 g

Se disolvieron todos los compuestos en 500 mL de agua bidestilada, la solución se aforó a 1000 mL, posteriormente se ajustó el pH con NaOH o HCl [0.1 M] hasta obtener un pH de 7.2. Se esterilizó en autoclave bajo las siguientes condiciones: 15 lb de presión, 120°C de temperatura durante un tiempo de 15 min. A partir de esta solución se preparó una solución al 1% (v/v), con ésta última se

realizaron las diluciones de los tubos de los ensayos para la determinación del número de trofozoítos vivos.

#### DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TROFOZOÍTOS/mL PARA EL INÓCULO INICIAL

A partir del cultivo axénico se realizó una dilución 1:10 con medio de cultivo. El número de trofozoítos/mL se determinó empleando un hematocitómetro nombrado también como cámara de Neubauer, en el que se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la dilución realizada. Se contó el número de trofozoítos en los cuatro cuadrantes correspondientes a la cámara, la cantidad total de trofozoítos se dividió entre 4 y se multiplicó por el inverso de la dilución realizada, así como por el factor de corrección (10,000), el cual consideró el volumen y profundidad de la cámara.

Conociendo la cantidad de trofozoítos presentes en 1 mL, se estableció el volumen necesario del cultivo axénico (V) para obtener una cantidad inicial de  $50 \times 10^3$  trofozoítos para *G. intestinalis*, considerando la siguiente expresión:

$$V = \frac{(50 \times 10^3 \text{ trofozoítos} \times 1000 \mu\text{L}) \times \text{F.D.}}{\text{N.T.}}$$

Donde :

V = volumen del cultivo axénico agregado a cada uno de los tubos en el ensayo

N.T. = Número de trofozoítos contados en 10  $\mu\text{L}$

F.D. = Factor de dilución

Para la determinación de la cantidad inicial de trofozoítos de *T. vaginalis*, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, la diferencia fue la cantidad inicial de trofozoítos, en este caso se colocaron  $6 \times 10^3$ , por lo tanto la siguiente expresión permitió determinar el volumen necesario de inóculo para realizar el ensayo.

$$V = \frac{(6 \times 10^3 \text{ trofozoítos} \times 1000 \mu\text{L}) \times \text{F.D.}}{\text{N.T.}}$$

Donde :

V = volumen del cultivo axénico agregado a cada uno de los tubos en el ensayo

N.T. = Número de trofozoítos contados en 10  $\mu\text{L}$

F.D. = Factor de dilución

#### MANTENIMIENTO DEL CULTIVO AXÉNICO DE *Giardia intestinalis*

La cepa IMSS:1090:1 de *G. intestinalis* proveniente de un aislamiento clínico, se mantuvo en el medio TYI-S-33 modificado y suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), en tubos de ensayo de vidrio con capacidad de 8 mL. La resiembra de la cepa se realizó regularmente cada 72 h, al observar una confluencia celular del 100%. Considerando que la viabilidad de los trofozoítos se determina de acuerdo a su capacidad para adherirse a la superficie del tubo, la resiembra se realizó de la siguiente forma:

1. Se decantó el medio contenido en los tubos, para eliminar los trofozoítos sin adherir, se añadió 6 mL de medio nuevo y se enfriaron a una temperatura aproximada de 4 °C, hasta observar (con la ayuda del microscopio invertido), el desprendimiento de los trofozoítos de la superficie del tubo, el tiempo aproximado en el que se observó un desprendimiento total de los trofozoítos fue entre 15 a 20 min.

2. Se inocularon 15  $\mu\text{L}$  del cultivo axénico, de acuerdo a lo indicado por (Cedillo y Muñoz, 1992) en 6 mL de medio TYI-S-33 modificado, cabe mencionar

que el volumen de inóculo se estableció considerando la tasa de crecimiento de *G. intestinalis*.

3. Posteriormente los tubos se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en posición vertical y tapados para promover las condiciones de microaerofilia necesarias, 72 h después se realizó nuevamente la resiembra.

#### MANTENIMIENTO DEL CULTIVO AXÉNICO DE *Trichomonas vaginalis*.

La cepa GT3 de *T. vaginalis*, proveniente de un aislamiento clínico se mantuvo en el medio TYI-S-33 suplementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v) y mezcla de vitaminas–agente tensoactivo Tween 80 al 3% (v/v). La resiembra del cultivo se realizó cada 48 h, considerando que a este tiempo, el parásito se encuentra en una fase de crecimiento exponencial como lo indica la curva de crecimiento. La observación de cúmulos de trofozoítos a lo largo de la superficie del tubo, con un movimiento regular fue una característica particular de que se encontraban viables. La resiembra se realizó como se indica a continuación:

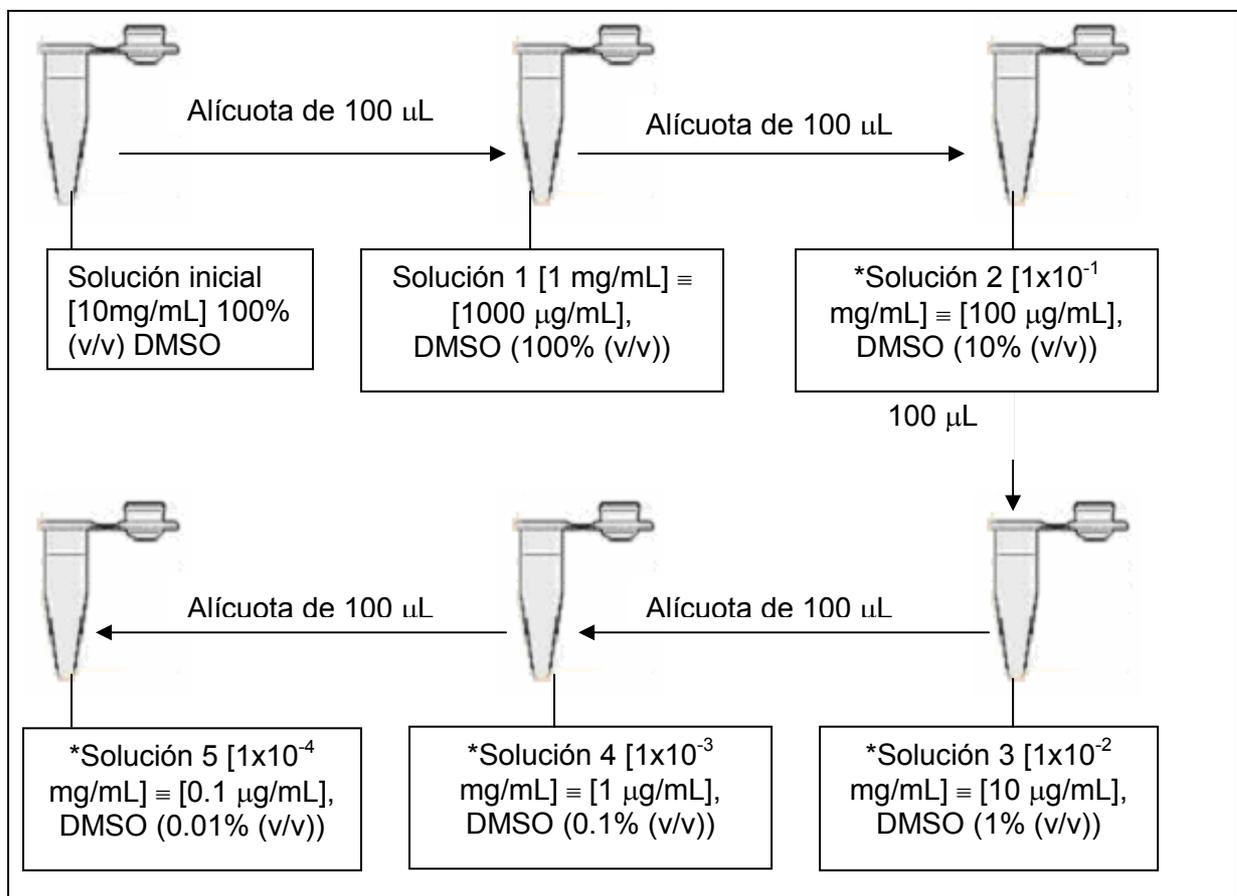
1. El cultivo axénico se mantuvo en tubos de ensayo de vidrio con tapa, a una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Antes de realizar la resiembra, los tubos se mantuvieron por 10 min aproximadamente a temperatura ambiente.

2. Posteriormente se colocó un volumen de inóculo de 10  $\mu\text{L}$ , en 6 mL de medio nuevo. Antes de tomar el inóculo, el tubo se agitó suavemente para homogenizar los trofozoítos presentes en el medio. Finalmente los tubos se sellaron incubándose a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por 48 h de forma inclinada, para favorecer las condiciones de microaerofilia necesarias para su crecimiento. Después de este tiempo se realizó nuevamente la resiembra.

## PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS

Para la solución inicial, se pesaron 10 mg del compuesto por evaluar, disolviéndose en 1000  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta solución de concentración [10 mg/mL], se realizaron diluciones consecutivas 1:10, hasta obtener una solución final de concentración [ $1 \times 10^{-4}$  mg/mL], como se muestra en el Diagrama 1.

Diagrama 1. Diluciones realizadas con cada uno de los compuestos

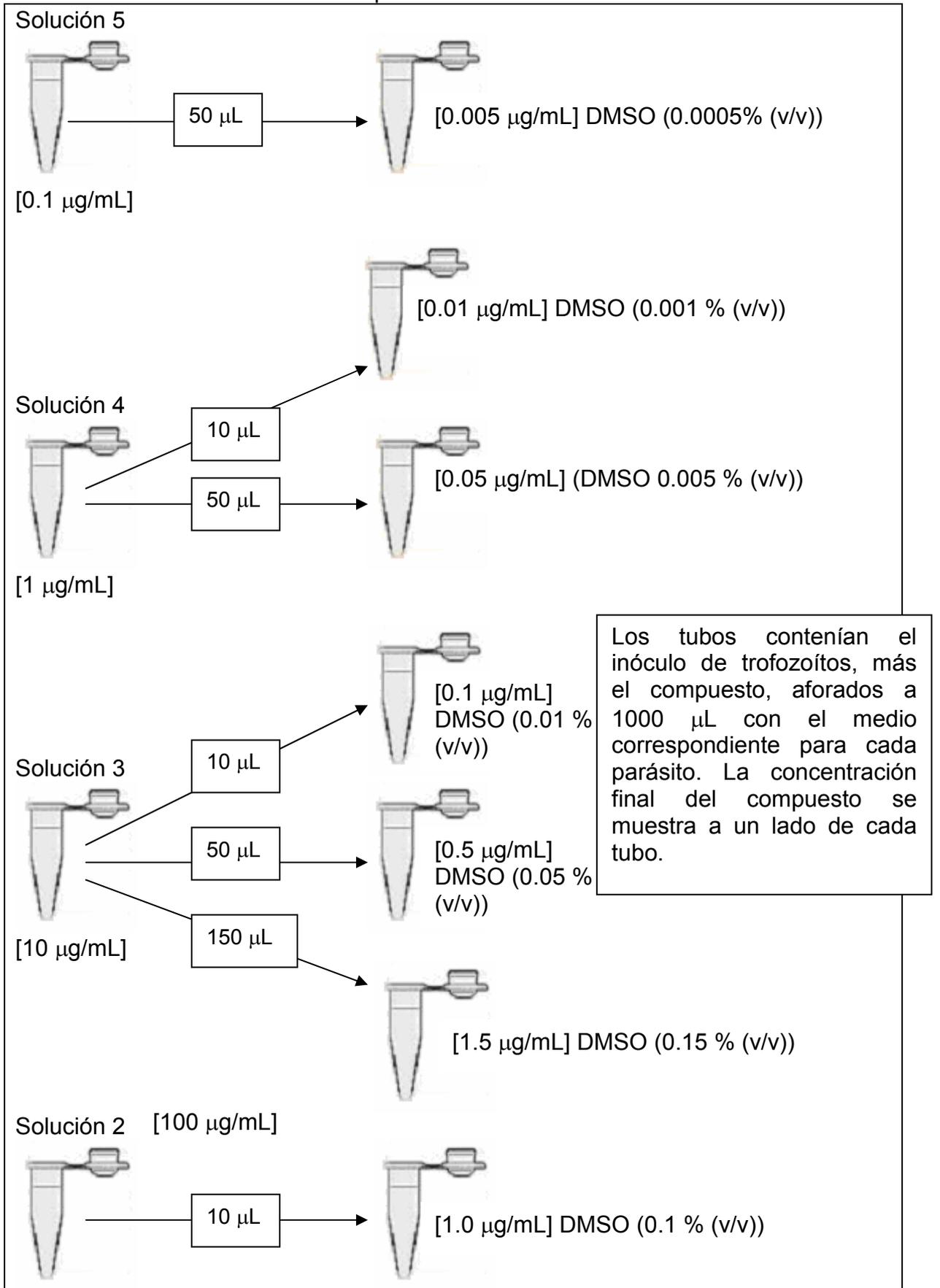


\*Las soluciones 5, 4, 3, y 2 se emplearon para realizar los ensayos.

El rango de concentraciones empleadas para la evaluación de los compuestos así como para el metronidazol contra *G. intestinalis* fue: 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, y 1.0 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para el albendazol: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, y 0.01 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En el caso de *T. vaginalis*, el rango de concentraciones para evaluar los compuestos y el albendazol fue: 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para el metronidazol: 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, y 1.0 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

El Diagrama 2, muestra el volumen de las alícuotas tomadas de las soluciones 5, 4, 3 y 2, para obtener las concentraciones correspondientes de los compuestos evaluados.

Diagrama 2. Diluciones realizadas para las diferentes concentraciones de los compuestos evaluados.



## DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TROFOZOÍTOS VIVOS EN LOS ENSAYOS.

1. Después del periodo de incubación, los tubos se enfriaron a una temperatura de 4°C durante 1 h, posteriormente, se realizó una dilución 1:10 de cada uno de los tubos del ensayo, con solución amortiguadora de fosfatos al 1% (v/v) (pH = 7.2). Para esto se tomaron 100  $\mu$ L de los tubos problema, colocándose en 900  $\mu$ L de solución amortiguadora.

2. Se colocaron 10  $\mu$ L de esta dilución en cada uno de los dos compartimentos del hematocitómetro (cámara de Neubauer) (Figura 25).

3. Se contó el número de trofozoítos en los cuatro cuadrantes correspondientes de la cámara.

4. El número de trofozoítos totales dentro de los cuatro cuadrantes se dividió entre cuatro y se multiplicó por el inverso de la dilución (10) y por el factor de corrección (10,000), éste último consideró el volumen de la cámara así como la profundidad.

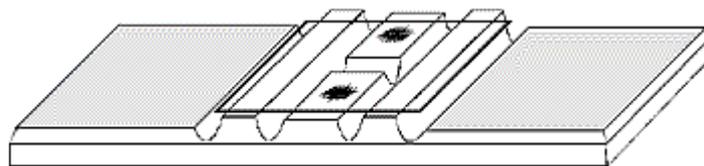


Figura 25. Cámara de Neubauer. Tomado de [www.superior.de](http://www.superior.de)

ANEXO 2. Tablas de resultados del número de trofozoítos vivos y muertos.

2.1. Tablas correspondientes al número de trofozoítos vivos y muertos de *Giardia intestinalis*

Compuesto **AHM-4**

Ensayo 1

concentración (µg/mL)	No. De trofozoítos Vivos	No. de trofozoítos Muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	3516666	370834	9.54	<b>0.095</b>
0.01	3350000	537500	13.83	
0.05	3133333	754167	19.40	
0.1	3050000	837500	21.54	
0.5	25000	3862500	99.36	
1	0	3887500	100.00	

Ensayo 2

concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos Vivos	No. de trofozoítos Muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2451250	198750	7.50	<b>0.101</b>
0.01	2273700	376300	14.20	
0.05	2175650	474350	17.90	
0.1	2024600	625400	23.60	
0.5	74200	2575800	97.20	
1	0	2650000	100.00	

Ensayo 3

concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos Vivos	No. de trofozoítos Muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	3376200	23800	0.7	<b>0.111</b>
0.05	3376200	23800	0.7	
0.1	2900200	499800	14.7	
0.5	499800	2900200	85.3	
1	0	3400000	100	

Compuesto **AHM-11**

Ensayo 1

concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos Muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	3098700	201300	6.10	<b>0.243</b>
0.01	2676300	623700	18.90	
0.05	2475000	825000	25.00	
0.1	2349600	950400	28.80	
0.5	1798500	1501500	45.50	
1	399300	2900700	87.90	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos Muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2475375	399625	13.90	<b>0.234</b>
0.05	2325875	549125	19.10	
0.1	2274125	600875	20.90	
0.5	1750875	1124125	39.10	
1	0	2875000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	3248250	301750	8.5	<b>0.210</b>
0.05	2840000	710000	20.00	
0.1	2474350	1075650	30.30	
0.5	1824700	1725300	48.60	
1	88750	3461250	97.50	

Compuesto **AHM-17**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2849550	175450	5.80	<b>0.082</b>
0.01	2574275	450725	14.90	
0.05	1899700	1125300	37.20	
0.1	1675850	1349150	44.60	
0.5	323675	2701325	89.30	
1	175450	2849550	94.20	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2925000	325000	10.00	<b>0.076</b>
0.01	2850250	399750	12.30	
0.05	2073500	1176500	36.20	
0.1	1800500	1449500	44.60	
0.5	351000	2899000	89.20	
1	74750	3175250	97.70	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2575125	149875	5.50	<b>0.072</b>
0.01	2275375	449625	16.50	
0.05	1675875	1049125	38.50	
0.1	1526000	1199000	44.00	
0.5	0	2725000	100.00	

Compuesto **AHM-23**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2401250	423750	15.00	<b>0.060</b>
0.01	2248700	576300	20.40	
0.05	2149825	675175	23.90	
0.1	1274075	1550925	54.90	
0.5	149725	2675275	94.70	
1	25425	2799575	99.10	

Ensayo2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2350425	424575	15.30	<b>0.067</b>
0.01	2200575	574425	20.70	
0.05	2150625	624375	22.50	
0.1	1223775	1551225	55.90	
0.5	374625	2400375	86.50	
1	24975	2750025	99.10	

Ensayo3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	3434400	615600	15.2	<b>0.065</b>
0.01	3248100	801900	19.8	
0.05	3187350	862650	21.3	
0.1	1749600	2300400	56.8	
0.5	376650	3673350	90.7	
1	48600	4001400	98.80	

albendazol

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.001	2925000	325000	10.00	<b>0.013</b>
0.005	2749500	500500	15.40	
0.01	2398500	851500	26.20	
0.05	0	3250000	100.00	
0.1	0	3250000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.001	3883850	441150	10.20	<b>0.014</b>
0.005	3425400	899600	20.80	
0.01	3109675	1215325	28.10	
0.05	787150	3537850	81.80	
0.1	0	4325000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.001	2982200	717800	19.40	<b>0.010</b>
0.005	2775000	925000	25.00	
0.01	2701000	999000	27.00	
0.05	0	3700000	100.00	
0.1	0	3700000	100.00	

metronidazol

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2850700	49300	1.70	<b>0.152</b>
0.01	2726000	174000	6.00	
0.05	2575200	324800	11.20	
0.1	2250400	649600	22.40	
0.5	324800	2575200	88.80	
1	0	2900000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2524500	175500	6.50	<b>0.114</b>
0.01	2500200	199800	7.40	
0.05	2224800	475200	17.60	
0.1	2100600	599400	22.20	
0.5	99900	2600100	96.30	
1	0	2700000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	2824350	25650	0.90	<b>0.128</b>
0.01	2624850	225150	7.90	
0.05	2499450	350550	12.30	
0.1	2100450	749550	26.30	
0.5	151050	2698950	94.70	
1	25650	2824350	99.10	

2.2. Tablas correspondientes al número de trofozoítos vivos y muertos de *Trichomonas vaginalis*

Compuesto **AHM-4**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	4126750	123250	2.90	<b>0.235</b>
0.01	3523250	726750	17.10	
0.05	2673250	1576750	37.10	
0.5	1551250	2698750	63.50	
1	1551250	2698750	63.50	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	3298250	876750	21.00	<b>0.274</b>
0.05	3248150	926850	22.20	
0.1	2864050	1310950	31.40	
0.5	2801425	1373575	32.90	
1	1386100	2788900	66.80	
1.5	0	4175000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4249800	1150200	21.30	<b>0.300</b>
0.05	4125600	1274400	23.60	
0.1	3898800	1501200	27.80	
0.5	3677400	1722600	31.90	
1	1998000	3402000	63.00	
1.5	0	5400000	100.00	

Compuesto **AHM-11**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4366350	283650	6.10	<b>0.102</b>
0.05	3966450	683550	14.70	
0.1	2715600	1934400	41.60	
0.5	83700	4566300	98.20	
1	13950	4636050	99.70	
1.5	0	4650000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4541750	83250	1.80	<b>0.095</b>
0.05	4338250	286750	6.20	
0.1	3963625	661375	14.30	
0.5	2539125	2085875	45.10	
1	13875	4611125	99.70	
1.5	0	4625000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	5848850	101150	1.70	<b>0.118</b>
0.05	5325250	624750	10.50	
0.1	3427200	2522800	42.40	
0.5	202300	5747700	96.60	
1	0	5950000	100.00	

Compuesto **AHM-17**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	5174400	425600	7.60	<b>0.086</b>
0.05	3847200	1752800	31.30	
0.1	3276000	2324000	41.50	
0.5	100800	5499200	98.20	
1	0	5600000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4452000	848000	16.00	<b>0.083</b>
0.05	4123400	1176600	22.20	
0.1	3127000	2173000	41.00	
0.5	100700	5199300	98.10	
1	47700	5252300	99.10	
1.5	0	5300000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	4173500	76500	1.80	<b>0.082</b>
0.01	3701750	548250	12.90	
0.05	2953750	1296250	30.50	
0.1	2575500	1674500	39.40	
0.5	76500	4173500	98.20	
1	0	4250000	100.00	

Compuesto **AHM-23**

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	5650200	799800	12.40	<b>0.110</b>
0.05	4598850	1851150	28.70	
0.5	2302650	4147350	64.30	
1	148350	6301650	97.70	
1.5	0	6450000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	5527200	72800	1.30	<b>0.177</b>
0.05	5152000	448000	8.00	
0.1	4799200	800800	14.30	
0.5	576800	5023200	89.70	
1	50400	5549600	99.10	
1.5	0	5600000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	5422725	352275	6.10	<b>0.165</b>
0.05	4874100	900900	15.60	
0.1	4377450	1397550	24.20	
0.5	1051050	4723950	81.80	
1	502425	5272575	91.30	
1.5	0	5775000	100.00	

albendazol

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4422600	302400	6.40	<b>0.311</b>
0.05	4049325	675675	14.30	
0.1	3472875	1252125	26.50	
0.5	2674350	2050650	43.40	
1	1422225	3302775	69.90	
1.5	0	4725000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.01	4173625	151375	3.50	<b>0.306</b>
0.05	3680575	644425	14.90	
0.1	3139950	1185050	27.40	
0.5	2283600	2041400	47.20	
1	1301825	3023175	69.90	
1.5	0	4325000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	5149125	25875	0.50	<b>0.343</b>
0.01	5009400	165600	3.20	
0.05	4962825	212175	4.10	
0.1	3824325	1350675	26.10	
0.5	2323575	2851425	55.10	
1	1226475	3948525	76.30	

metronidazol

Ensayo 1

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.001	5272875	102125	1.90	<b>0.039</b>
0.005	4848250	526750	9.80	
0.01	4063500	1311500	24.40	
0.05	3601250	1773750	33.00	
0.1	1037375	4337625	80.70	
0.5	0	5375000	100.00	

Ensayo 2

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.001	4186000	414000	9.00	<b>0.047</b>
0.005	4176800	423200	9.20	
0.01	3348800	1251200	27.20	
0.05	575000	4025000	87.50	
0.1	0	4600000	100.00	
0.5	0	4600000	100.00	

Ensayo 3

Concentración (µg/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% de Mortalidad	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
0.005	3838950	436050	10.20	<b>0.048</b>
0.05	3236175	1038825	24.30	
0.1	662625	3612375	84.50	
0.5	0	4275000	100.00	
1	0	4275000	100.00	

ANEXO 3. Fórmulas empleadas en el análisis estadístico.

Tabla 12. Análisis de varianza (Marques, 1998).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Varianza o cuadrados medios	Fo
Entre tratamientos	K-1	$\sum_{j=1}^K \frac{X_{.j}^2}{n_j} - \frac{X_{..}^2}{N} = SC \text{ TRAT}$	$CM \text{ TRAT} = \frac{SC \text{ TRAT}}{K-1}$	$\frac{CM \text{ TRAT}}{CM \text{ ERROR}}$
Error residual	N-K	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \sum_{J=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} \frac{X_{.j}^2}{n_j} = SC \text{ ERROR}$	$CM \text{ ERROR} = \frac{SC \text{ ERROR}}{N-K}$	
Total	N-1	$\sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}^2 - \frac{X_{..}^2}{N} = SC \text{ TOTAL}$		

Fórmula para calcular los rangos significativos mínimos en la prueba de rangos múltiples de Duncan

$$D_p = d_{\alpha, p, g, l_{\text{error}}} * (s_{\text{error}}^2 / n)^{1/2}$$

Donde:

p: toma valores entre 2 y el número de experimentos (K)

$$s^2_{\text{error}} = CM \text{ ERROR}$$

$\alpha = 0.05$

n = Número de observaciones

g.l error = grados de libertad del error, de acuerdo al análisis de varianza realizado previamente

Fórmula para calcular  $F_{(0.05, n_1-1, n_2-2)}$  en el análisis de homogeneidad de varianzas

$$F_{(0.05, n_1-1, n_2-2)} = (S_1^2/S_2^2)$$

Donde  $S_1$  = Desviación estándar mayor

$S_2$  = Desviación estándar menor

Fórmula para determinar los grados de libertad, considerando el estadígrafo  $t'$  (Marques, 1998)

$$g.l. = \frac{(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2)^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1+1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2+1}}$$

El estadígrafo  $t'$  se calcula con la siguiente expresión:

$$t' = \frac{\text{media}_1 - \text{media}_2 - \Delta_0}{(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2)^{1/2}}$$

$S_1$  = Desviación estándar mayor

$S_2$  = Desviación estándar menor

$n_1$  = número de observaciones o experimentos con la mayor desviación estándar

$n_2$  = número de observaciones o experimentos con la menor desviación estándar

$\Delta_0 = 0$

### 3.1. Análisis estadístico referente a *Giardia intestinalis*.

Tabla 13. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos para *Giardia intestinalis*

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	2.15983	1.14025	2.924	4.219	4.665	1.300	8.550	17.803
	2.03252	1.02354	3.155	4.566	4.131	1.048	9.951	20.850
	1.84843	0.98522	3.333	4.098	3.417	0.971	11.111	16.797
Ni	3	3	3	3	N=12	t= 4		
Σxi	6.04078	3.14901	9.412	12.884	Σx	31.485654		
Media	2.014	1.050	3.137	4.295	MediaTotal	2.624		
(Σxi) <sup>2</sup>	36.491	9.916	88.584	165.997	(Σx) <sup>2</sup> /N	82.612		
(Σxi) <sup>2</sup> /3	12.1637	3.305	29.528	55.332	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	100.329		
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	12.213	3.318	29.612	55.450	(Σx <sup>2</sup> )	100.593		
					Ftablas	4.07		

Tabla 14. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos contra *Giardia intestinalis*.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	3	17.717	5.906	178.802
Error	8	0.264	0.033	
Total	11	17.9813		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho: media<sub>AHM-4</sub> = media<sub>AHM-11</sub> = media<sub>AHM-17</sub> = media<sub>AHM-23</sub>

Hi: media<sub>AHM-4</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-11</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-17</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-23</sub>

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 3, 8)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 3, 8)} = 4.07$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 3, 8)}$ ,  $178.802 > 4.07$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$  se establece que hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos para cada compuesto.

Para determinar si se presentó diferencia estadística significativa entre pares de valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ), se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Considerando los rangos significativos mínimos dados por la fórmula:

$$D_p = d_{\alpha, p, g, l_{error}} * (s^2_{error}/n)^{1/2}$$

Donde:

p: toma valores entre 2 y el número de experimentos (en este caso 4)

$\alpha = 0.05$

g.l. error = 8 (de acuerdo al análisis de varianza realizado previamente)

$s^2_{error} = 0.033$  y  $n = 3$

$$(s^2_{\text{error}}/n)^{1/2} = 0.105$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*0.105)
3.475	D4 =	0.364
3.339	D3 =	0.356
3.261	D2 =	0.342

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias de  $1/Cl_{50}$

AHM-11 $1/Cl_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-4 $1/Cl_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-17 $1/Cl_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-23 $1/Cl_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )
1.050	2.014	3.137	4.295

La diferencia obtenida entre medias:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
AHM-23-AHM-11	3.245 > D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-23-AHM-4	2.281 > D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-AHM-11	2.008 > D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-23-AHM-17	1.157 > D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-AHM-4	1.124 > D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-4-AHM-11	0.964 > D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 15. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y albendazol para *Giardia intestinalis*.

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	ALB	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	ALBX <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	2.160	1.140	2.924	4.219	20.408	4.665	1.300	8.550	17.803	416.493
	2.033	1.024	3.155	4.566	18.868	4.131	1.048	9.951	20.850	355.999
	1.848	0.985	3.333	4.098	26.316	3.417	0.971	11.111	16.797	692.521
Ni	3	3	3	3	3	N=15	t=5			
Σxi	6.041	3.149	9.412	12.884	65.592	Σx	97.077532			
Media	2.014	1.050	3.137	4.295	21.864	MediaTotal	6.472			
(Σxi) <sup>2</sup>	36.491	9.916	88.584	165.997	4302.294	(Σx) <sup>2</sup> /N	628.270			
(Σxi) <sup>2</sup> /3	12.164	3.305	29.528	55.332	1434.098	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	1534.427			
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	12.213	3.318	29.612	55.450	1465.012	(Σx <sup>2</sup> )	1565.606			
						Ftablas	3.48			

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y albendazol contra *Giardia intestinalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	4	906.158	226.54	72.660
Error	10	31.179	3.118	
Total	4	937.336		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho: media<sub>AHM-4</sub> = media<sub>AHM-11</sub> = media<sub>AHM-17</sub> = media<sub>AHM-23</sub> = media<sub>albendazol</sub>

Hi: media<sub>AHM-4</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-11</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-17</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-23</sub>  $\neq$  media<sub>albendazol</sub>

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 4, 10)} = 3.48$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ,  $72.66 > 3.48$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos con los derivados bencimidazólicos y el albendazol, evaluados contra *Giardia intestinalis*.

Para determinar si hay diferencia significativa entre pares de medias (albendazol y compuestos), se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, obteniéndose los siguientes resultados:

$$(s^2\text{error}/n)^{1/2} = 1.02$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*1.02)
3.43	D5 =	3.500
3.376	D4 =	3.441
3.293	D3 =	3.357
3.151	D2 =	3.212

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias [=] ( $\mu M^{-1}$ )

AHM-11 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-4 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-17 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-23 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	albendazol $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )
1.050	2.014	3.137	4.295	21.864

La diferencia obtenida entre medias:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
alb-AHM-11	20.814>D5	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
alb-AHM-4	19.850>D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
alb-AHM-17	18.727>D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
alb-AHM-23	17.569>D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 17. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y metronidazol para *Giardia intestinalis*.

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	METRO	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	METROX <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	2.16	1.14	2.924	4.219	1.1261	4.665	1.300	8.550	17.803	1.268
	2.03	1.02	3.155	4.566	1.5015	4.131	1.048	9.951	20.850	2.255
	1.85	0.99	3.333	4.098	1.3369	3.417	0.971	11.111	16.797	1.787
ni	3	3	3	3	3	N=15	t= 5			
Σxi	6.041	3.149	9.412	12.884	3.965	Σx	35.45018			
media	2.014	1.050	3.137	4.295	1.322	MediaTotal	2.363			
(Σxi) <sup>2</sup>	36.491	9.916	88.584	165.997	15.717	(Σx) <sup>2</sup> /N	83.781			
(Σxi) <sup>2</sup> /3	12.1637	3.305	29.528	55.332	5.239	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	105.568			
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	12.213	3.318	29.612	55.450	5.310	(Σx <sup>2</sup> )	105.903			
						Ftablas	3.48			

Tabla 18. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y metronidazol contra *Giardia intestinalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	4	21.787	5.447	162.572
Error	10	0.335	0.034	
Total	4	22.122		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho:  $media_{AHM-4} = media_{AHM-11} = media_{AHM-17} = media_{AHM-23} = media_{metronidazol}$

Hi:  $media_{AHM-4} \neq media_{AHM-11} \neq media_{AHM-17} \neq media_{AHM-23} \neq media_{metronidazol}$

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 4, 10)} = 3.48$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ,  $162.572 > 3.48$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos para cada compuesto y el metronidazol, evaluados contra *Giardia intestinalis*.

Para determinar si hay diferencia significativa entre pares de medias (metronidazol y compuestos), se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

$$(s^2_{error}/n)^{1/2} = 0.164$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*0.164)
3.43	D5 =	0.365
3.376	D4 =	0.359
3.293	D3 =	0.351
3.151	D2 =	0.335

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias:

AHM-11 1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )	metronidazol 1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )	AHM-4 1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )	AHM-17 1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )	AHM-23 1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )
1.050	1.322	2.014	3.137	4.295

La diferencia obtenida entre medias fue:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
AHM-4-met	0.692 > D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
met-AHM-11	0.272 < D2	NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-met	1.816 > D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-23-met	2.973 > D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Para determinar si se presenta una diferencia significativa entre los valores de media obtenidos para el albendazol y metronidazol, se realizó un análisis de homogeneidad de varianzas, previo a una prueba de t'.

Considerando la hipótesis para la homogeneidad de varianzas:

$$H_0: S^2_{\text{albendazol}} = S^2_{\text{metronidazol}}$$

$$H_1: S^2_{\text{albendazol}} \neq S^2_{\text{metronidazol}}$$

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 2, 2)}$ ; Se rechaza  $H_0$

Compuesto	1/Cl <sub>50</sub> (μM <sup>-1</sup> )	Promedio	S	S <sup>2</sup>	Fo
Albendazol	20.408	21.864	3.932	15.457	436.590
	18.868				
	26.316				
Metronidazol	1.126	1.322	0.188	0.035	
	1.502				
	1.337				

$F_{(0.05, 2, 2)} = 19.00$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 2, 2)}$ ,  $463.590 > 19.00$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de las varianzas de ambos experimentos.

Para determinar si existe diferencia entre las medias de ambos compuestos, se emplea a  $t'$  como estadígrafo con 2 grados de libertad.

Considerando la hipótesis para la diferencia entre medias con varianzas diferentes:

Ho: media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})$  albendazol = media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})$  metronidazol

Hi: media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})$  albendazol  $\neq$  media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})$  metronidazol

Regla de decisión:

Si  $t' > t_{(0.05, 2)}$ ; Se rechaza Ho. Para un valor de  $t_{(0.05, 2)} = 2.920$

$$t' = (20.542) / (2.272) = 9.040$$

$t' > t_{(0.05, 2)}$   $9.040 > 2.920$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, y se establece que con un nivel de confianza del 95%, hay una diferencia significativa entre el valor de medias reportadas para el albendazol y metronidazol.

### 3.2 Análisis estadístico referente a *Trichomonas vaginalis*

Tabla 19. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos para *Trichomonas vaginalis*

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	0.873	2.347	2.786	2.494	0.763	5.510	7.759	6.219
	0.749	2.519	2.890	1.548	0.561	6.345	8.353	2.396
	0.684	2.028	2.924	1.661	0.468	4.114	8.550	2.759
ni	3	3	3	3	N=12	t= 4		
Σxi	2.306	6.895	8.600	5.703	Σx	23.504		
media	0.769	2.298	2.867	1.901	MediaTotal	1.959		
(Σxi) <sup>2</sup>	5.320	47.537	73.954	32.523	(Σx) <sup>2</sup> /N	46.035		
(Σxi) <sup>2</sup> /3	1.773	15.846	24.651	10.841	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	53.111		
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	1.792	15.970	24.662	11.374	(Σx <sup>2</sup> )	53.798	Ftablas	4.07

Tabla 20. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos contra *Trichomonas vaginalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	3	7.076	2.359	27.491
Error	8	0.686	0.086	
Total	11	7.762		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho: media<sub>AHM-4</sub> = media<sub>AHM-11</sub> = media<sub>AHM-17</sub> = media<sub>AHM-23</sub>

Hi: media<sub>AHM-4</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-11</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-17</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-23</sub>

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 3, 8)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 3, 8)} = 4.07$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 3, 8)}$ ,  $27.491 > 4.07$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos para cada compuesto.

Para determinar si se presentó diferencia estadística significativa entre pares de valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidas, se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

$$(s^2_{error}/n)^{1/2} = 0.169$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*0.169)
3.475	D4 =	0.588
3.339	D3 =	0.575
3.261	D2 =	0.551

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias de  $1/CI_{50}$

AHM-4 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-23 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-11 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-17 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )
0.769	1.901	2.298	2.867

Diferencia obtenida entre medias:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
AHM-17-AHM-4	2.098>D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-AHM-23	0.966>D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-11-AHM-4	1.530>D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-AHM-11	0.568>D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-11-AHM-23	0.397<D2	NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-23-AHM-4	1.132>D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 21. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y albendazol para *Trichomonas vaginalis*

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	ALB	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	ALBX <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	0.873	2.347	2.786	2.494	0.854	0.763	5.510	7.759	6.219	0.729
	0.749	2.519	2.890	1.548	0.868	0.561	6.345	8.353	2.396	0.754
	0.684	2.028	2.924	1.661	0.775	0.468	4.114	8.550	2.759	0.600
ni	3	3	3	3	3	N=15	t= 5			
Σxi	2.306	6.895	8.600	5.703	2.497	Σx	26.000296			
media	0.769	2.298	2.867	1.901	0.832	MediaTotal	1.733			
(Σxi) <sup>2</sup>	5.320	47.537	73.954	32.523	6.233	(Σx) <sup>2</sup> /N	45.068			
(Σxi) <sup>2</sup> /3	1.77319	15.846	24.651	10.841	2.078	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	55.189			
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	1.792	15.970	24.662	11.374	2.083	(Σx <sup>2</sup> )	55.880			
						Ftablas	3.48			

Tabla 22. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los derivados bencimidazólicos y albendazol contra *Trichomonas vaginalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	4	10.121	2.530	36.594
Error	10	0.691	0.069	
Total	4	10.813		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho: media<sub>AHM-4</sub> = media<sub>AHM-11</sub> = media<sub>AHM-17</sub> = media<sub>AHM-23</sub> = media<sub>albendazol</sub>

Hi: media<sub>AHM-4</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-11</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-17</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-23</sub>  $\neq$  media<sub>albendazol</sub>

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 4, 10)} = 3.48$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ,  $36.594 > 3.48$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos para cada compuesto y el albendazol, evaluados contra *T. vaginalis*.

Para determinar si hay diferencia significativa entre pares de medias (albendazol y compuestos), se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

$$(s^2_{error}/n)^{1/2} = 0.152$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*0.152)
3.43	D5 =	0.521
3.376	D4 =	0.513
3.293	D3 =	0.450
3.151	D2 =	0.478

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias:

AHM-4 1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	albendazol 1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	AHM-23 1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	AHM-11 1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	AHM-17 1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )
0.769	0.832	1.901	2.298	2.867

La diferencia obtenida entre medias fue:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
Alb-AHM-4	0.063 < D2	NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-11-alb	1.466 > D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-17-alb	2.034 > D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
AHM-23-alb	1.069 > D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 23. Análisis de varianza entre los derivados bencimidazólicos y metronidazol para *Trichomonas vaginalis*

	AHM-4	AHM-11	AHM-17	AHM-23	METRO	AHM-4X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-11X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-17X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	AHM-23X <sup>2</sup> <sub>i</sub>	METROX <sup>2</sup> <sub>i</sub>
	0.873	2.347	2.786	2.494	4.386	0.763	5.510	7.759	6.219	19.237
	0.749	2.519	2.890	1.548	3.6364	0.561	6.345	8.353	2.396	13.223
	0.684	2.028	2.924	1.661	3.5714	0.468	4.114	8.550	2.759	12.755
ni	3	3	3	3	3	N=15	t=5			
Σxi	2.30642	6.89471	8.599665339	5.703	11.594	Σx	35.097433			
media	0.769	2.298	2.867	1.901	3.865	MediaTotal	2.340			
(Σxi) <sup>2</sup>	5.320	47.537	73.954	32.523	134.415	(Σx) <sup>2</sup> /N	82.122			
(Σxi) <sup>2</sup> /3	1.77319	15.846	24.651	10.841	44.805	TOTAL(Σxi) <sup>2</sup> /3	97.916			
Σx <sup>2</sup> <sub>i</sub>	1.792	15.970	24.662	11.374	45.215	(Σx <sup>2</sup> )	99.013	Ftablas	3.48	

Tabla 24. Resultados del análisis de varianza, obtenidos con los compuestos evaluados y metronidazol contra *Trichomonas vaginalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Entre tratamientos	4	15.794	3.949	36.019
Error	10	1.096	0.110	
Total	4	16.890		

Considerando la hipótesis para el valor promedio de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ):

Ho: media<sub>AHM-4</sub> = media<sub>AHM-11</sub> = media<sub>AHM-17</sub> = media<sub>AHM-23</sub> = media<sub>metronidazol</sub>

Hi: media<sub>AHM-4</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-11</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-17</sub>  $\neq$  media<sub>AHM-23</sub>  $\neq$  media<sub>metronidazol</sub>

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ; Se rechaza Ho

$F_{(0.05, 4, 10)} = 3.48$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ,  $36.019 > 3.48$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de  $1/CI_{50}$  ( $\mu M^{-1}$ ) obtenidos para cada compuesto y el metronidazol, evaluados contra *T. vaginalis*.

Para determinar si hay diferencia significativa entre pares de medias (metronidazol y compuestos), se realizó una prueba del rango múltiple de Duncan, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

$$(s^2_{error}/n)^{1/2} = 0.191$$

d ( $\alpha=0.05$ )	Rango	Valor (d*0.191)
3.43	D5 =	0.656
3.376	D4 =	0.645
3.293	D3 =	0.629
3.151	D2 =	0.602

Ordenando en forma ascendente los valores de las medias:

AHM-4 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-23 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-11 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	AHM-17 $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )	metronidazol $1/CI_{50}$ ( $\mu M^{-1}$ )
0.769	1.901	2.298	2.867	3.865

La diferencia obtenida entre medias fue:

Diferencia entre medias		Diferencia significativa
met-AHM-4	3.096>D5	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
met-AHM-11	1.566>D3	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
met-AHM-17	0.998>D2	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
met-AHM-23	1.964>D4	SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

El análisis de varianza y la prueba de rango, corroboran que ningún compuesto evaluado presentó mejor actividad que el metronidazol contra *T. vaginalis*, ya que se observó una diferencia significativa respecto al valor de las medias con un nivel de confianza del 95%.

Al igual que en *G. intestinalis*, para determinar si se presenta una diferencia significativa entre los valores promedios obtenidos para el albendazol y metronidazol, se realizó un análisis de homogeneidad de varianzas, previo a una prueba de  $t'$ .

Considerando la prueba de hipótesis para la homogeneidad de varianzas:

$$H_0: S^2_{\text{albendazol}} = S^2_{\text{metronidazol}}$$

$$H_1: S^2_{\text{albendazol}} \neq S^2_{\text{metronidazol}}$$

Regla de decisión:

Si  $F_o > F_{(0.05, 2, 2)}$ ; Se rechaza  $H_0$

Compuesto	1/CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	Promedio	S	S <sup>2</sup>	Fo
albendazol	0.854	0.832	0.050	0.0025	80.711
	0.868				
	0.775				
metronidazol	4.386	3.865	0.453	0.205	
	3.636				
	3.571				

$F_{(0.05, 2, 2)} = 19.00$ , por lo tanto  $F_o > F_{(0.05, 4, 10)}$ ,  $80.711 > 19.00$  y se rechaza la hipótesis nula estableciendo que: Con un valor de  $p = 0.05$ , hay una diferencia estadística significativa entre los valores de las varianzas de ambos experimentos.

Para determinar si existe diferencia entre las medias de ambos compuestos, se emplea a  $t'$  como estadígrafo, con 2 grados de libertad.

Considerando la prueba de hipótesis:

$H_o$ : media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})_{\text{albendazol}} = \text{media } (1/CI_{50} \mu M^{-1})_{\text{metronidazol}}$

$H_i$ : media  $(1/CI_{50} \mu M^{-1})_{\text{albendazol}} \neq \text{media } (1/CI_{50} \mu M^{-1})_{\text{metronidazol}}$

Regla de decisión:

Si  $t' > t_{(0.05, 2)}$ ; Se rechaza  $H_o$ . Para un valor de  $t_{(0.05, 2)} = 2.920$

$$t' = (3.032) / (0.263) = 11.531$$

$t' > t_{(0.05, 2)}$   $11.531 > 2.920$ , por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, y se establece que con un nivel de confianza del 95%, hay una diferencia significativa entre el valor de medias reportadas para el albendazol y metronidazol en la evaluación biológica de los compuestos contra *T. vaginalis*.