



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DEL 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-
BENCIMIDAZOL CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JORGE ENRIQUE GRES MOLINA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Vocal: Dr. Armando Cabrera Ortiz

Secretario: Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos

1er sup.: M. en C. Irene Sara Audelo Méndez


2do sup.: M. en C. Martha Ivonne Berros Espino

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 122, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR

Dr. Rafael Castillo Bocanegra



Rafael Castillo B.

SUP. TÉCNICO

M. en C. Ma. Alicia Hernández Campos



Alicia Hernández Campos

SUSTENTANTE

Jorge Enrique Gres Molina



Jorge Enrique Gres Molina

DEDICATORIA:

"A la Vida, por dejarme seguir adelante"

"A mis Padres, por lo que soy"

"A Vanessa y Johann, por lo que llegare a ser"

"A mis Maestros, por lo que se"

"A mi alma mater U.N.A.M., por lo que me brindó"

Gracias por creer en mí, no os defraudaré



AGRADECIMIENTOS:

Gracias a mis padres por brindarme la oportunidad de desarrollarme como persona y dejarme seguir adelante, les agradezco por haber brindado todo lo que podían, parte de este trabajo le pertenece a mi familia.

A Vanessa le agradezco el estar siempre a mi lado, a Johann por que su sonrisa me recuerda que siempre hay que luchar para seguir adelante.

Gracias a la U.N.A.M por permitirme formar parte de su comunidad y darme la oportunidad de desarrollarme académicamente dentro de su seno en la honorable Facultad de Química.

Al Dr. Rafael Castillo y a la M. en C. Alicia Hernández por su guía, por todos los consejos y el apoyo que me brindaron en la realización de este trabajo experimental, una parte también les pertenece a ustedes, Gracias.

Una parte importante de este trabajo se debe al excelente trabajo de todo el personal de la U.S.A.I. de la Facultad de Química. Gracias, Rosa J. del Villar, Víctor M. Arroyo, Nayeli López, Margarita Guzmán, Georgina Duarte y Marisela Gutiérrez.

A la Dra. Lilián Yépez M. y a la Biol. Amparo Tapia por las determinaciones de las pruebas biológicas en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

A todos mis compañeros tanto de carrera como del laboratorio 122, todos ustedes forman parte de mi historia, gracias por su apoyo, por su amistad y por todo el tiempo que pasamos. Quisiera nombrarlos a todos y a cada uno de ustedes en estas paginas, me disculparan que no lo haga, pero créanme les agradezco a todos ustedes.

Al proyecto CONACYT G-34851-M por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | VI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. PARASITOSIS A NIVEL MUNDIAL..... | 3 |
| 2.2. EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO..... | 4 |
| 2.3. ENFERMEDADES PARASITARIAS CAUSADAS POR PROTOZOARIOS..... | 6 |
| 2.3.1. <i>GIARDIOSIS</i> | 6 |
| 2.3.1.1. <i>Epidemiología</i> | 6 |
| 2.3.1.2. <i>Agente etiológico</i> | 6 |
| 2.3.1.3. <i>Aspectos clínicos</i> | 7 |
| 2.3.2. <i>ENTAMOEBOSIS</i> | 8 |
| 2.3.2.1. <i>Epidemiología</i> | 8 |
| 2.3.2.2. <i>Agente etiológico</i> | 9 |
| 2.3.2.3. <i>Aspectos clínicos</i> | 9 |
| 2.3.3. <i>TRICOMONOSIS</i> | 10 |
| 2.3.3.1. <i>Epidemiología</i> | 10 |
| 2.3.3.2. <i>Agente etiológico</i> | 10 |
| 2.3.3.3. <i>Aspectos clínicos</i> | 11 |
| 2.3.4. <i>PROTOZOARIOS COMO MODELO BIOLÓGICO</i> | 12 |
| 2.4. TRATAMIENTO: FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS..... | 13 |
| 2.4.1. <i>LOS FÁRMACOS NITROHETEROCÍCLICOS</i> | 14 |

| | Página |
|---|--------|
| 2.4.1.1. <i>Los nitroimidazoles</i> | 14 |
| 2.4.1.2. <i>Los nitrotiazoles</i> | 15 |
| 2.4.1.3. <i>Mecanismo de acción de los nitroheterociclos</i> | 17 |
| 2.4.2. LOS FÁRMACOS BENCIMIDAZÓLICOS | 18 |
| 2.4.2.1. <i>Mecanismo de acción de los bencimidazoles</i> | 19 |
| 2.5. MODIFICACIÓN MOLECULAR | 21 |
| 2.5.1. TIPOS DE MODIFICACIÓN MOLECULAR | 22 |
| 2.5.1.1. <i>Simplificación del prototipo</i> | 22 |
| 2.5.1.2. <i>Replicación moduladora</i> | 22 |
| 2.5.1.3. <i>Asociación de dos moléculas</i> | 22 |
| 2.5.2. MODIFICACIONES MOLECULARES AL ANILLO DE BENCIMIDAZOL | 24 |
| 2.5.2.1. <i>Modificaciones en el Sitio A (Posición 1)</i> | 24 |
| 2.5.2.2. <i>Modificaciones en el Sitio B (Posición 2)</i> | 25 |
| 2.5.2.3. <i>Modificaciones en el Sitio C (Posición 5(6))</i> | 25 |
| 2.5.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOLES | 26 |
| 2.5.3.1. <i>Actividad antihelmíntica</i> | 26 |
| 2.5.3.2. <i>Actividad antiprotozoaria</i> | 26 |
| 2.6. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE LOS 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOLES | 27 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 31 |
| 3.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL | 31 |
| 4. HIPÓTESIS | 32 |
| 4.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO | 32 |
| 5. OBJETIVOS | 33 |
| 5.1. OBJETIVO GENERAL | 33 |
| 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES | 33 |

| | Página |
|--|--------|
| 6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO | 34 |
| 6.1. COMPUESTOS DISEÑADOS..... | 34 |
| 6.1.1. <i>DISEÑO DE LA SERIE 1: HÍBRIDOS</i> | 35 |
| 6.1.2. <i>DISEÑO DE LA SERIE 2: HÍBRIDOS MODIFICADOS</i> | 36 |
| 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 37 |
| 7.1. PARTE QUÍMICA..... | 37 |
| 7.1.1. <i>ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DE LOS COMPUESTOS DISEÑADOS</i> | 37 |
| 7.1.2. <i>SÍNTESIS DE 5(6)-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-6(5)-CARBOXILATO DE METILO, COMPUESTO INTERMEDIARIO 14</i> | 39 |
| 7.1.3. <i>SÍNTESIS DEL 6(5)-CLORO-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (1) Y SU ANÁLOGO NO NITRADO (4)</i> | 40 |
| 7.1.4. <i>SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES 6-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5-CARBOXAMIDA (2), 5-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXAMIDA (3) Y SUS ANÁLOGOS NO NITRADOS (5 Y 6)</i> ... | 40 |
| 7.2. PARTE BIOLÓGICA..... | 42 |
| 7.2.1. <i>PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO CONTRA G. intestinalis, E. histolytica Y T. vaginalis</i> | 42 |
| 8. RESULTADOS | 43 |
| 8.1. RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA..... | 43 |
| 8.1.1. <i>CONSTANTES FÍSICAS</i> | 43 |
| 8.1.2. <i>CONSTANTES ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS</i> | 44 |
| 8.2. RESULTADOS DE LA PARTE BIOLÓGICA..... | 49 |
| 8.2.1. <i>RESULTADOS DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FINALES</i> | 49 |
| 8.2.2. <i>RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS INTERMEDIARIOS</i> | 50 |

| | Página |
|---|-----------|
| 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 51 |
| 9.1. DISCUSIÓN DE LA PARTE QUÍMICA..... | 51 |
| 9.1.1. <i>OBTENCIÓN DEL INTERMEDIARIO: 6(5)-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXILATO DE METILO (14).....</i> | 51 |
| 9.1.2. <i>OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS FINALES: 6(5)-CLORO-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (1) Y SU ANÁLOGO NO NITRADO (4).....</i> | 55 |
| 9.1.3. <i>OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTO FINALES: 6(5)-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (2 Y 3) Y SUS ANÁLOGOS NO NITRADOS (5 Y 6).....</i> | 58 |
| 9.2. DISCUSIÓN DE LA PARTE BIOLÓGICA..... | 65 |
| 9.2.1. <i>ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LOS COMPUESTOS FINALES FRENTE A LOS PARÁSITOS: G. intestinalis, T. vaginalis Y E. histolytica.....</i> | 65 |
| 9.2.1.1. <i>Acerca de la actividad biológica de los compuestos de la serie 1.....</i> | 65 |
| 9.2.1.2. <i>Acerca de la actividad biológica de los compuestos de la serie 2.....</i> | 67 |
| 9.2.2. <i>ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS FRENTE A LOS PARÁSITOS: G. intestinalis, T. vaginalis Y E. histolytica.....</i> | 68 |
| 9.3. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS..... | 69 |
| 9.3.1. <i>RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA E. histolytica.....</i> | 69 |
| 9.3.2. <i>RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA T. vaginalis.....</i> | 71 |
| 9.3.3. <i>RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA G. intestinalis.....</i> | 72 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 74 |
| 10.1. CONCLUSIONES DE LA PARTE QUÍMICA..... | 74 |
| 10.2. CONCLUSIONES DE LA PARTE BIOLÓGICA..... | 75 |
| 10.3. CONCLUSIONES SOBRE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD..... | 76 |

| | Página |
|--|--------|
| 11. PERSPECTIVAS | 77 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 78 |
| 13. ANEXOS | 85 |
| 13.1. ANEXO A: PARTE EXPERIMENTAL..... | 86 |
| 13.1.1. <i>INSTRUMENTACIÓN</i> | 86 |
| 13.1.2. <i>CROMATOGRAFÍA</i> | 87 |
| 13.1.3. <i>PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES E INTERMEDIARIOS</i> | 88 |
| 13.1.3.1. <i>Procedimientos experimentales para la preparación de intermediarios</i> | 88 |
| 13.1.3.2. <i>Procedimientos experimentales para la síntesis de los compuestos finales</i> | 96 |
| 13.2. ANEXO B: ESPECTROS (IR, RMN Y EM)..... | 99 |
| 13.2.1. <i>ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS FINALES</i> | 99 |
| 13.2.2. <i>ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS</i> | 121 |

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se describe el diseño, síntesis y evaluación biológica de una serie de nuevas moléculas híbridas las cuales reúnan las características de los fármacos activos: nitroderivados y de los bencimidazoles del tipo 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol. Los compuestos propuestos son los siguientes:

SERIE 1:

- 6(5)-Cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5(6)-carboxamida (**1**)
- 6-Cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**2**)
- 5-Cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**3**)

SERIE 2:

- 6(5)-Cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5(6)-carboxamida (**4**)
- 6-Cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**5**)
- 5-Cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**)

La estructura de dichos compuestos se determinó por datos espectroscópicos (IR y RMN ¹H) y espectrométricos (EM).

Los compuestos sintetizados, incluyendo compuestos intermediarios y finales, en el presente estudio fueron sometidos a pruebas de evaluación biológica *in vitro* contra los protozoarios intestinales *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* y contra el protozoario de transmisión sexual *Trichomonas vaginalis*.

Los compuestos de las Series 1 y 2 mostraron una mejor actividad que el metronidazol contra los tres protozoarios evaluados. Los compuestos **2**, **3**, **5** y **6** mostraron una actividad biológica mejor o equiparable a la nitazoxanida contra los protozoarios *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

Los compuestos bencimidazólicos intermediarios mostraron una actividad mejor o equiparable al metronidazol contra los tres protozoarios evaluados.

Los resultados anteriores nos permitieron establecer una relación estructura-actividad la cual revela una clara influencia del patrón de sustitución en el anillo bencimidazólico para generar una buena actividad biológica.

“ora, lege, relegere, labora et invenis...”



Sólo para vosotros, hijos de la doctrina y de la sabiduría, hemos escrito esta obra. Escrutad el libro, concentraos en la intención que hemos diseminado y emplazado en diferentes lugares; lo que en un lugar hemos ocultado, en otro lo hemos manifestado, para que vuestra sabiduría pueda comprenderlo.
(Heinrich Cornelius Agrippa von Nettesheim, De occulta philosophia, 3, 65)

1. INTRODUCCIÓN

“El microbio que ayer derribó a un niño en un continente distante puede alcanzar a su hijo hoy y provocar una pandemia global mañana.”

Joshua Lederberg, premio Nobel.

Las asociaciones entre seres vivos son tan antiguas, como la misma aparición de la vida sobre la tierra. Una de estas agrupaciones es el parasitismo, donde un organismo vive a expensas de otro. La forma de vida parasitaria ha tenido tanto éxito que ha evolucionado en casi todos los grupos de organismos, debido a esto sabemos que hay más organismos parásitos que no parásitos. Por lo cual, el hombre no está libre de ser parasitado por otros organismos¹.

Las enfermedades parasitarias, tanto las protozoosis como las helmintosis, siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y principalmente en países en vías de desarrollo, como lo es el nuestro; por lo que continúan teniendo un impacto significativo sobre la salud, calidad de vida y desarrollo económico. Los datos epidemiológicos de este tipo de enfermedades revelan un alto índice de morbilidad y mortalidad. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002), se calcula que de los 6,000 millones de habitantes en el mundo, alrededor de 3,500 millones están parasitados y aproximadamente 450 millones padecen de alguna enfermedad parasitaria, entre éstos la población más afectada es la infantil.

Este tipo de enfermedades son frecuentes en las zonas de África, Asia y Sudamérica, ya que se encuentran favorecidas por factores ecológicos, socioeconómicos y culturales. Sin embargo, la importancia de las parasitosis a nivel mundial está aumentando, ya que al haber un mayor número de vías de comunicación se han incrementado los viajes internacionales (turismo), migraciones, etc.; con lo cual, las enfermedades endémicas también se desplazan junto con la población, diseminando los agentes infecciosos a nuevas áreas geográficas. Otro factor de riesgo es la globalización, ya que el contacto con otras culturas trae consigo modas alimentarias cosmopolitas y hábitos de vida que contribuyen a la introducción de nuevos parásitos en la población mundial.

Es indudable que hay varios factores del mundo moderno que contribuyen a la aparición y propagación de nuevas enfermedades. Una forma de controlar estas enfermedades es mediante la implementación de estrategias de educación para la salud, mediante el desarrollo de vacunas

¹ Por convenio se emplea el término parásito cuando se habla de un protozoario, un helminto o un ectoparásito.

(Profilaxis), y sobre todo mediante el desarrollo socioeconómico, lo cual será factible a largo plazo. Sin embargo, la estrategia a corto plazo es mediante el tratamiento quimioterapéutico, siendo el método más eficaz y barato para el control de la mayoría de estas enfermedades.

En el caso de las enfermedades causadas por protozoarios, los fármacos de elección son nitroderivados como el metronidazol, el tinidazol y la nitazoxanida, este último de reciente aparición. Estos compuestos presentan la ventaja de ser de amplio espectro de actividad, además, actúan sobre parásitos del tracto gastrointestinal y sistémicos; desafortunadamente, estos fármacos presentan algunas desventajas como son efectos secundarios adversos por generación de estrés oxidativo y una posible acción mutagénica. Por otro lado, los fármacos de excelencia empleados para el tratamiento las helmintosis son derivados del bencimidazol-2-carbamato de metilo, como el albendazol y el mebendazol. Aunque estos poseen una gran actividad y no tienen efectos secundarios severos, tienen la gran desventaja de su alta polaridad que lleva a una pobre absorción y baja biodisponibilidad. Sumado a la problemática que presentan los principales fármacos empleados, se ha observado la aparición de resistencia tanto en helmintos como en protozoarios hacia éstos. Por estas razones es de suma importancia emprender el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios más potentes, de amplio espectro de acción, con menos efectos tóxicos y que puedan ser de fácil acceso a la población. Obviamente, para enfrentar el problema no sólo basta con tener medicamentos y vacunas; hay que utilizarlos con sabiduría.

El presente trabajo pretende contribuir a la solución de esta problemática, mediante la obtención de información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiparasitaria; por medio del diseño y síntesis de una serie de nuevas moléculas híbridas las cuales reúnan las características de los fármacos activos: nitroderivados y de los bencimidazoles del tipo 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.

2. ANTECEDENTES

“La ciencia no conoce fronteras, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina al mundo”

Louis Pasteur, químico y biólogo francés

“El señor creó las medicinas de la tierra, y el juicioso no las despreciará”

Eclesiastés 38:4

2.1. PARASITOSIS A NIVEL MUNDIAL

Desde tiempos inmemorables los parásitos han sido reconocidos por varias culturas (egipcios, griegos y persas) como los causantes de varias enfermedades causadas por gusanos dañinos. En la actualidad, los conocimientos científicos acerca de las parasitosis están bien establecidos (Botero, 1999). A pesar de que conocemos la mayoría de las características de estos organismos, los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los seres humanos. Éstos se encuentran ampliamente diseminados alrededor del mundo; sin embargo, los países tropicales reúnen las características geográficas, climatológicas y socioeconómicas que favorecen a la mayoría de estos organismos (Ximénez, 2002).

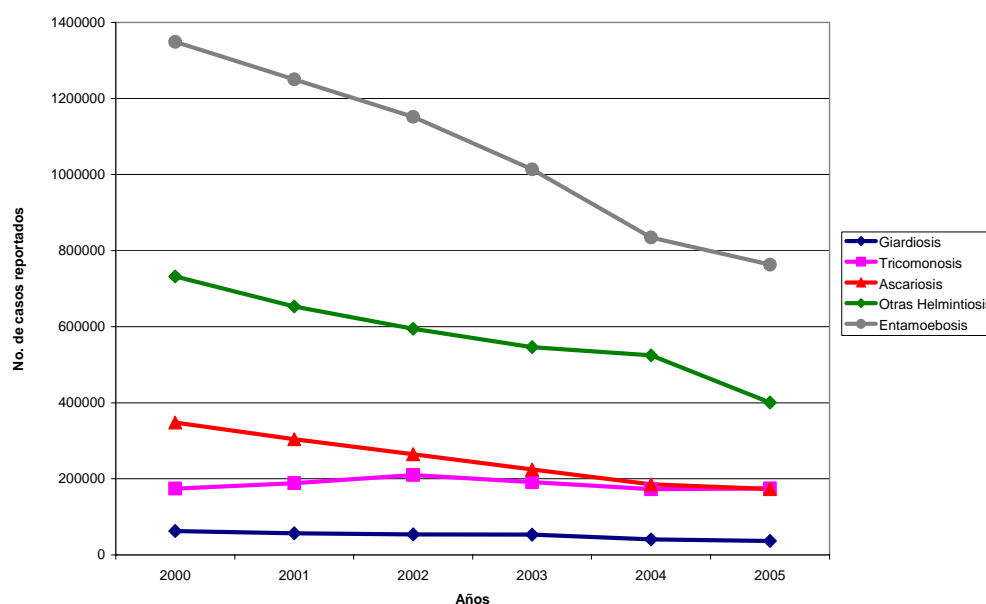
La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que más de la mitad de la población mundial se encuentra parasitada, de los cuales aproximadamente 450 millones padecen de alguna enfermedad parasitaria, siendo la población infantil la más afectada.

Los datos proporcionados por la OMS revelan que alrededor de 65,000 muertes anuales pueden ser atribuidas a infecciones por nematodos y 60,000 muertes debidas a infección por *Ascaris lumbricoides*. Por otro lado, el protozooario *Entamoeba histolytica* es el agente causante de la entamoebosis intestinal y extraintestinal en 48 millones de personas, de las cuales mueren alrededor de 70,000 enfermos anualmente (Ximénez, 2002; Watkins, 2003).

Las parasitosis no solo se limitan al tracto gastrointestinal, también se pueden diseminar sistémicamente y son de suma importancia. Entre ellas se encuentra la malaria o paludismo, causada por parásitos del genero *Plasmodium*, el cual provoca alrededor de 1 millón de muertes anualmente; la enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el *Tripanosoma cruzi*, que causa 13,000 muertes anualmente, por último, la leishmaniosis y la tripanosomosis africana son, respectivamente, las causantes de 57,000 y 49,000 muertes anualmente (Watkins, 2003).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

Las protozoosis y helmintiosis están dentro de las 20 principales causas de enfermedad en nuestro país. Las parasitosis más frecuentes son la entamoebosis, las helmintiosis, la ascariosis y la tricomonosis (**Gráfica 1**). La morbilidad de estas enfermedades sigue siendo muy alta, con alrededor de 2 millones de personas infectadas en el 2005 (SINAVE 2005, SSA).

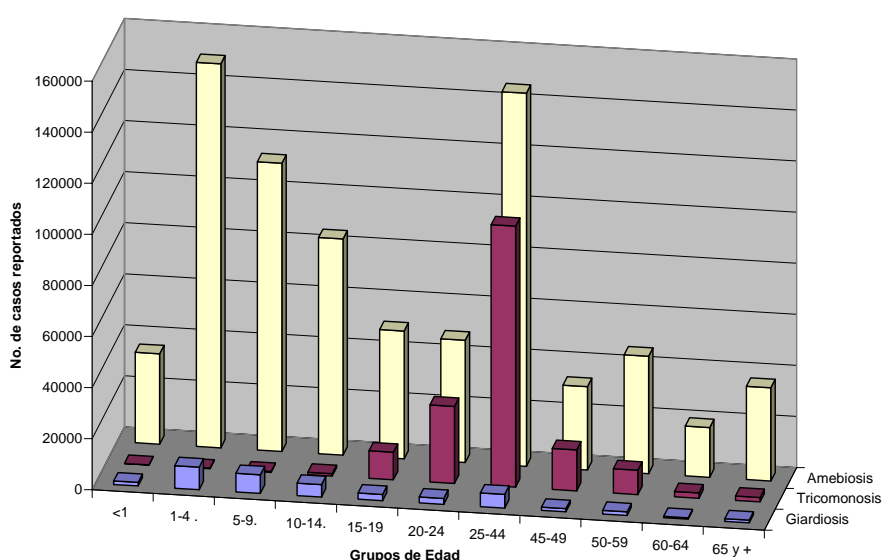


Gráfica 1. Principales parasitosis en México del año 2000 al 2005.

Como se muestra en la **Gráfica 1**, podemos ver la evolución de las principales enfermedades parasitarias del 2000 al 2005, lo cual nos da una idea de cómo han progresado este tipo de enfermedades, podemos observar la disminución significativa de los casos reportados de entamoebosis, mientras que las helmintiosis y la ascariosis han experimentado una ligera disminución. Sin embargo, las protozoosis causadas por *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* representan un problema de salud pública preocupante, ya que éstas no muestran una disminución significativa; lo que vemos en su lugar, es un problema de persistencia de estas enfermedades.

Por otro lado, llama la atención que las helmintiosis y la ascariosis siguen siendo una causa importante de enfermedad, a pesar de los programas de desparasitación periódica implementada a partir de 1995 para la población infantil (Ximénez, 2002).

Los datos epidemiológicos aportados por la secretaría de salud (SSA) muestran, en la **Gráfica 2**, que la población afectada por los protozoarios intestinales *G. intestinalis* y *E. histolytica* es principalmente la población infantil. También podemos observar en esta gráfica que las personas en edad laboral también son un grupo susceptible, debido en gran medida a los malos hábitos alimenticios. En contraste, la tricomonosis es una parasitosis que afecta a las personas en edad reproductiva, ya que esta enfermedad es de transmisión sexual; esto se puede atribuir principalmente a que muchos casos de esta enfermedad son asintomáticos, y por lo tanto, las personas actúan como portadores y transmisores de la enfermedad generando nuevos brotes (SINAVE 2005, SSA).



Gráfica 2. Principales parasitosis causadas por protozoarios por grupos de edad.

Un problema adicional a las parasitosis intestinales es la presencia de infecciones múltiples, las cuales se diagnostican con mayor frecuencia en zonas marginadas. Los estudios realizados por Díaz *et al* (**Tabla 1**) muestran la frecuencia de poliparasitismo en un estudio realizado en niños en Coacalco de Berriozabal, México. De los 272 niños estudiados, 121 mostraron la presencia de uno o varios parásitos; destaca en este estudio el hecho de que un niño se encontraba infectado con ocho organismos diferentes (Díaz *et al.* 2003).

Tabla 1. Parasitismo asociado a 121 niños (Díaz *et al.* 2003)

| | Número de niños (%) |
|---------------------------|---------------------|
| Simple | 84 (69) |
| Múltiple | 37 (31) |
| Protozoario + Protozoario | 13 (11) |
| Helminto + Helminto | 5 (4) |
| Protozoario + Helminto | 19 (16) |

2.3. ENFERMEDADES PARASITARIAS CAUSADAS POR PROTOZOARIOS

2.3.1. GIARDIOSIS

2.3.1.1. Epidemiología

La giardiosis es una enfermedad intestinal causada por el protozooario *Giardia intestinalis* (sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*). Este protozooario tiene una distribución global y es el parásito intestinal más común en los países en desarrollo. En Asia, África y América Latina, cerca de 200 millones de personas padecen la enfermedad, y se reportan alrededor de 500 000 casos nuevos cada año (Thompson, 2000). En los Estados Unidos el centro de control y prevención de enfermedades (CDC) reportó alrededor de 2.5 millones de enfermedades parasitarias asociadas a alimentos, de las cuales alrededor de 2 millones son atribuibles a *G. intestinalis* (Slifko *et al.* 2000).

En nuestro país, la SSA reportó 36,918 casos nuevos de giardiosis durante el 2005 (SINAVE 2005, SSA). Como podemos ver en la **Gráfica 1**, la giardiosis es la enfermedad con el menor número de casos reportados; esto no refleja la realidad de esta enfermedad intestinal, como lo demuestran los estudios realizados que la colocan como el parásito más frecuente en niños; con porcentajes que van desde el 18% hasta el 54%, ya que la mayoría de los casos cursan de forma asintomática (Díaz *et al.* 2003; Rodríguez-Guzmán *et al.* 2000). Desde el punto de vista económico, la SSA estima que el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad tiene un costo aproximado de \$179.06 pesos por persona infectada (Ningenda *et al.* 2002).

2.3.1.2. Agente etiológico

Giardia intestinalis (**Fig. 1a y 1b**) se presenta en dos formas o estadios: la primera de trofozoíto (forma vegetativa y reproductiva) y la segunda de quiste (forma de resistencia e infecciosa). La forma de trofozoíto es móvil y presenta una simetría bilateral con dos núcleos, con una forma piriforme o elipsoidal. Puede medir de 12-15 μm de longitud por 6-8 μm de ancho, con una superficie dorsal convexa y con una concavidad ventral (disco suctorio). Posee cuatro pares de flagelos, lo que le confiere la movilidad y en el centro un par de estructuras distintivas conocidas como cuerpos parabasales. El quiste tiene forma ovalada con doble membrana y con 2 a 4 núcleos, tiene un tamaño aproximado de 10 μm de longitud (Botero, 1999; Thompson, 2004).

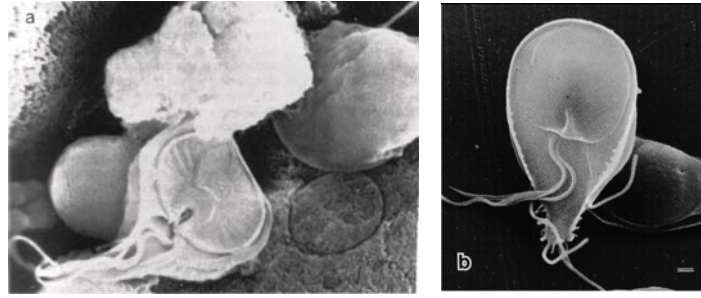


Fig. 1 (a) Trofozoítos en la mucosa intestinal; (b) Trofozoítos en cultivo (Tomado de Botero, 1999; Cedillo-Rivera *et al.* 2002).

2.3.1.3. Aspectos clínicos

El ciclo de vida de *G. intestinalis* (**Fig. 2**) es simple, la infección se puede dar directamente persona a persona por vía fecal-oral o más comúnmente mediante la ingestión de agua y/o por comida contaminada con quistes. Los quistes son muy infectivos, la ingestión de 10 quistes viables da como resultado giardiasis sintomática en voluntarios (Wolfe, 1992).

Tras ser ingeridos los quistes y llegar al intestino delgado (duodeno), el quiste se rompe y da origen a 4 trofozoítos, los cuales se fijan a la pared del intestino (**Fig. 1a**) mediante el disco succionador. Allí se multiplican por división binaria, los trofozoítos que caen a la luz intestinal dan origen a los quistes, los cuales son eliminados con las materias fecales y pueden permanecer viables durante varios meses en las condiciones adecuadas (Botero, 1999).

En los pacientes con giardiasis, la sintomatología clínica muestra una gran variabilidad. En la mayoría de los pacientes infectados con *G. intestinalis* la parasitación es asintomática; se estima que alrededor de un 60% de estas parasitosis cursan de esta manera. La sintomatología más frecuente es: dolor epigástrico, diarrea, flatulencia, esteatorrea, anorexia y pérdida de peso (Wolfe, 1992).

En casos crónicos, especialmente en niños, se presenta el denominado síndrome de malabsorción, lo cual tiene implicaciones nutricionales. Esto es debido a anomalías en la absorción de grasas, glucosa, D-xilosa, vitaminas A y B₁₂; además de interferir en la absorción de hierro, lo que origina una anemia en las personas con este parásito (Wolfe, 1992; Olivares *et al.* 2004).

El diagnóstico de *Giardia* se realiza mediante métodos microscópicos tradicionales, en el cual se busca los quistes en una muestra de materia fecal (examen coproparasitológico). Otro método complementario es mediante el examen de contenido duodenal, en donde se busca la presencia de trofozoítos. Por último tenemos los ensayos inmunológicos (Inmunofluorescencia, ELISA), los cuales tienen una mayor sensibilidad y especificidad, pero son de mayor costo (Botero, 1999).

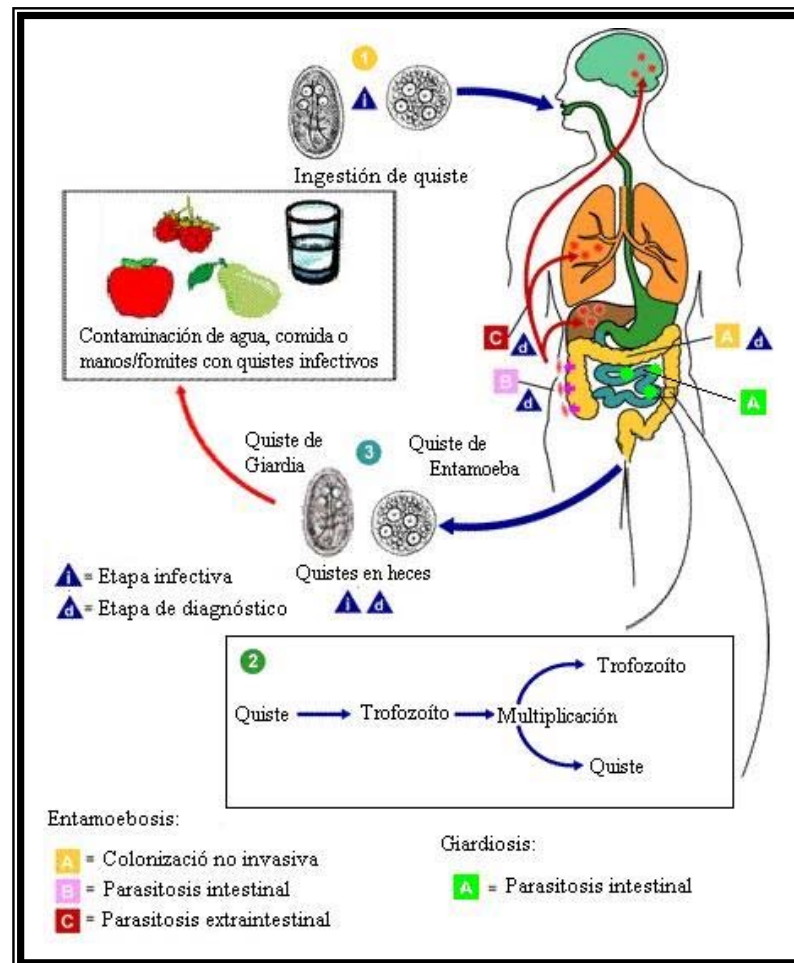


Fig. 2. Ciclo de vida de los parásitos intestinales *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*.

2.3.2. ENTAMOEBOISIS

2.3.2.1. Epidemiología

Como se mencionó anteriormente, *Entamoeba histolytica* es la causa de la amibiasis intestinal y extraintestinal en 48 millones de personas, de las cuales mueren alrededor de 70,000 enfermos anualmente (Ximénez, 2002; Watkins, 2003). Debido a que las muertes por *Entamoeba histolytica* oscilan entre las 40,000 y las 100,000 defunciones anuales, esta enfermedad es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias, solo por debajo de la malaria (Stanley, 2003). Esta enfermedad tiene efectos más severos en los niños y en los ancianos, y también en pacientes con desnutrición o inmunosuprimidos (Petri, 2003).

En México, la entamoebosis es la enfermedad con el mayor número de casos registrados en el 2005 con un total de 762,937 (SINAVE 2005, SSA). Las infecciones por *E. histolytica* son consideradas

como un serio problema de salud pública en nuestro país, el cual es considerado como una zona endémica de dicha enfermedad. Los estudios serológicos realizados por Ramos *et al.* (2005) indican que el 8.4% de la población mexicana se encuentra infectada, con un predominio de *E. histolytica* (11.4 %) sobre *E. dispar* (7.2%).

2.3.2.2. Agente etiológico

El trofozoíto de *E. histolytica* mide de 20-40 μm de diámetro (**Fig. 3**). Este parásito se mueve mediante la proyección de un pseudópodo unidireccional. En el citoplasma se encuentran vacuolas digestivas y eritrocitos fagocitados. Los quistes de entamoeba son redondos, miden de 10-18 μm de diámetro y poseen una cubierta gruesa en su interior donde se pueden observar de 1 a 4 núcleos. Los datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos indican la existencia de dos especies que poseen las características descritas: *E. histolytica* y *E. dispar* (Botero, 1999; Stanley, 2003).

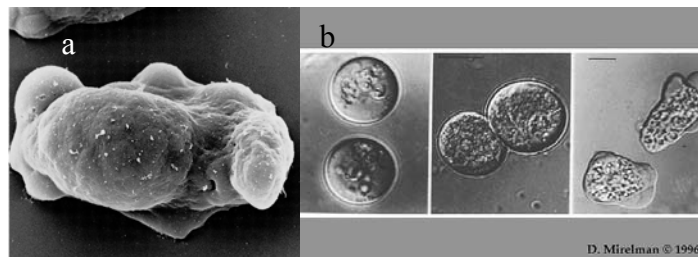


Fig. 3: (a) Trofozoíto en cultivo; (b) Trofozoítos y quistes en muestra clínica (Tomado de Cedillo-Rivera *et al.* 2002; www.medlib.med.utah.edu/parasitology/).

2.3.2.3. Aspectos clínicos

Al igual que *G. intestinalis*, el ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* es simple (**Fig. 2**), la infección puede ser directa (vía fecal-oral) o mediante la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados. Tras ser ingeridos los quistes, la pared de éstos se debilita por la acción de los jugos gástricos y posteriormente se rompe en el intestino para dar origen a los trofozoítos, los cuales se multiplican por fisión binaria. Posteriormente, por acción mecánica en la luz del colon se forman los quistes, los cuales salen en las heces y en las condiciones adecuadas permaneces viables durante semanas (Botero, 1999).

Alrededor del 10% de las personas infectadas presenta los síntomas clínicos de la entamoebosis, de los cuales del 80 al 90% son relacionados a la mucosa gastrointestinal (dolor abdominal, diarrea o disentería). Solo en el 2 al 20% presenta síntomas de una invasión extraintestinal (absceso

hepático, invasión al tracto respiratorio y/o cerebro), en estos casos el pronóstico es muy grave, con una mortalidad superior al 40% (Bruckner, 1992; Stanley, 2003).

El diagnóstico se realiza mediante el examen microscópico de muestras biológicas (heces o biopsias) o mediante pruebas inmunológicas, las cuales sirven de valor epidemiológico y para poder resaltar si la infección es debida a *E. histolytica* o por *E. dispar* (Bruckner, 1992).

2.3.3. TRICOMONOSIS

2.3.3.1. Epidemiología

Trichomonas vaginalis es el agente no viral con mayor predominio en infecciones de transmisión sexual en el mundo, siendo el 92% de los casos reportados en mujeres. Se estima que anualmente 167 millones de personas se infectan con *T. vaginalis*, de los cuales el 50% podría cursar de forma asintomática. En Estados Unidos, recientemente se ha estimado la aparición anual de 5 millones de casos nuevos (Lehker *et al.* 2000; Soper, 2004).

En México, la tricomonosis se encuentra dentro de las 20 principales causas de enfermedad, con un total de 174,826 casos reportados en el 2005, de los cuales 166,066 casos corresponden a mujeres (96%) y 6,706 reportes corresponde a la población masculina (4%). Como vemos el porcentaje es concordante con la situación mundial. Los datos también revelan que el grupo de edad más afectado es entre los 25 a los 44 años de edad (**Gráfica 2**) con alrededor del 49-58 % de los casos reportados (SINAVE 2005, SSA).

2.3.3.2. Agente etiológico

T. vaginalis es un protozoario flagelado de forma ovoide o piriforme (**Fig. 4a**), el trofozoíto mide de 10-30 μm de longitud y 10-18 μm de ancho. Posee cuatro flagelos localizados en la porción anterior y un quinto flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante, la cual se extiende hasta dos tercios del parásito. Se encuentra también una estructura que comienza en el núcleo y bisecta longitudinalmente al protozoario, la cual se conoce como axostilo. Este protozoario no presenta forma de resistencia: quiste (Petrin *et al.* 1998; Botero, 1999).

Cuando este parásito coloniza el epitelio vaginal sufre una transformación de su forma ovoide a una morfología ameboide (**Fig. 4b**), tras el contacto con el tejido. Este cambio de forma le puede conferir una mayor estabilidad y eficiencia durante el parasitismo, ya que aumenta la superficie de contacto y se ha observado que hay una fusión de las membranas plasmáticas entre *T. vaginalis* y las células del epitelio (Arroyo *et al.* 1993; Lehker *et al.* 2000).

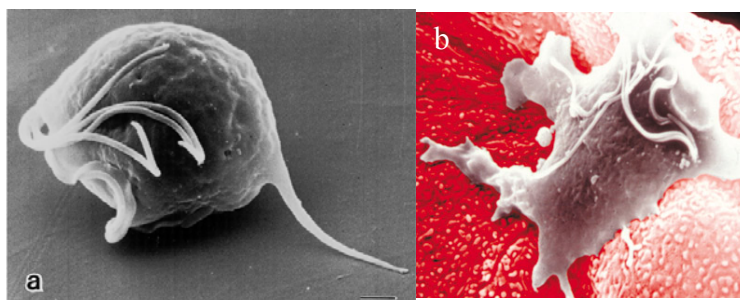


Fig. 4: (a) Trofozoíto en cultivo; (b) Transformación morfológica (ameboide) (Tomado de Cedillo-Rivera *et al.* 2002; Arroyo *et al.* 1993).

2.3.3.3. Aspectos clínicos

El ciclo de vida de este parásito es muy simple (**Fig. 5**), ya que al no contar con una forma de resistencia (quiste), la forma de transmisión es mediante el contacto sexual directo, persona a persona, donde se desarrolla en la mucosa de las vías urinarias y genitales en forma de trofozoíto. Además de que el hombre es el único hospedero natural conocido (Botero, 1999).

Se ha estimado que alrededor del 25-50% de las mujeres infectadas cursan de forma asintomática, desde el punto de vista epidemiológico se les considera como portadoras de la enfermedad. Dentro de la sintomatología que se desarrolla tenemos las siguientes: emisiones vaginales amarillo-verdosas, irritación vulvovaginal, disuria, prurito y solo en el 2-5% de las mujeres presentan el denominado “cérvix de fresa”, que es cuando la vagina y el cérvix se encuentran edematosos y eritromatosos, con una erosión del epitelio cervical y puntos hemorrágicos. Las complicaciones de esta enfermedad incluyen: incremento de la transmisión del VIH, infertilidad, incremento en el riesgo de cáncer cervical y se encuentra asociado con nacimientos prematuros (Meysick, 1995; Lehker *et al.* 2000; Soper, 2004).

En los hombres, la tricomonosis cursa generalmente de forma asintomática, por eso el bajo número de reportes epidemiológicos, por lo que se considera como el vector transmisor de la enfermedad. Los hombres que presentan sintomatología, manifiestan comúnmente una escasa

emisión mucopurulenta, disuria, prurito y la sensación de quemazón. En la mayoría de los hombres la infección se auto limita, teniendo una duración de alrededor de 10 días. Las complicaciones en hombres incluyen: incremento de la transmisión del VIH, uretritis e infertilidad (Meysick, 1995; Petrin *et al.* 1998; Soper, 2004).

El diagnóstico se realiza mediante la observación directa del trofozoíto en las secreciones, o mediante métodos inmunológicos (Soper, 2004).

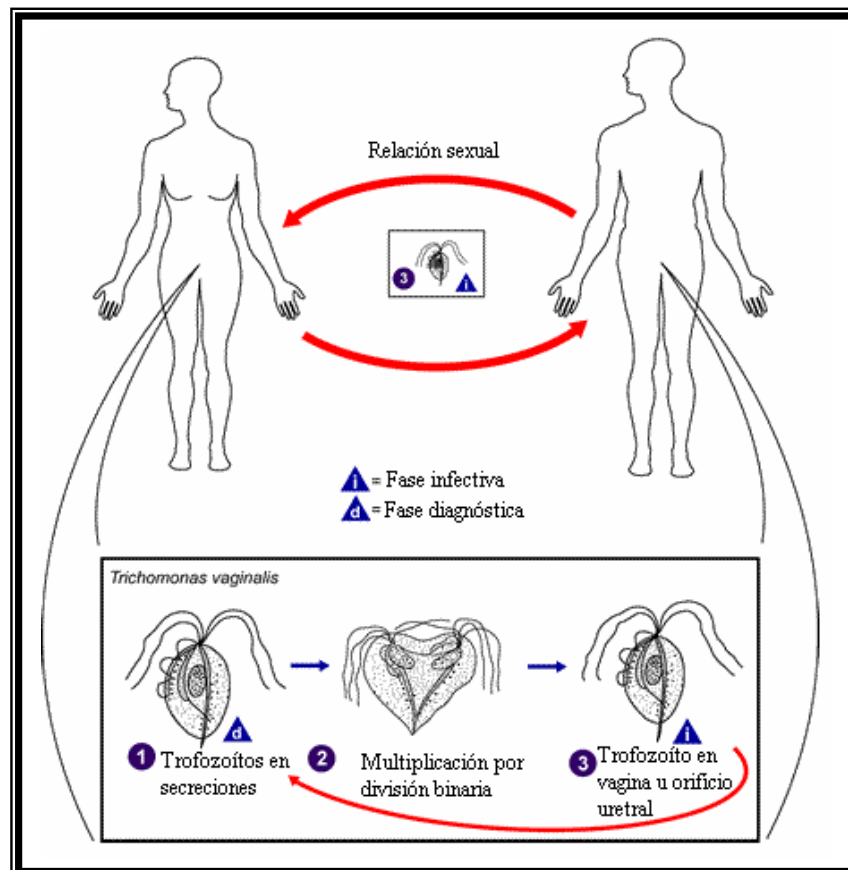


Fig. 5: Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*
(Tomado de CDC, www.cdc.gov)

2.3.4. PROTOZOARIOS COMO MODELO BIOLÓGICO

Debido a que se conoce de forma amplia la biología y ciclos de vida de estos parásitos, es posible que se puedan cultivar *in vitro* de forma relativamente fácil, emulando los requerimientos nutricionales y condiciones fisiológicas necesarias para su desarrollo, obteniéndose por estos medios, una tasa alta de crecimiento del organismo cultivado. Lo anterior permite realizar la

evaluación de diversos compuestos y así poder ver las alteraciones estructurales y la viabilidad de los organismos que se están estudiando. La importancia de usar estos parásitos como modelo biológico radica en que se tiene un método que es fácil de aplicar como una prueba rutinaria en el laboratorio, lo cual permite evaluar la actividad y eficacia de nuevas moléculas y por ende realizar el discernimiento de posibles agentes antiparasitarios.

Uno de los métodos empleados para realizar la evaluación de nuevos compuestos, es mediante la detección de la viabilidad de los trofozoítos de *G. intestinalis*, midiendo la inhibición de la adherencia de estos hacia una superficie. Otro método ampliamente utilizado es la evaluación de la inhibición del crecimiento de los trofozoítos, provocado por el compuesto a evaluar, este método se emplea para realizar la evaluación contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Cedillo-Rivera *et al.* 2002; Cruz *et al.* 2003).

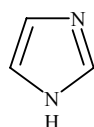
2.4. TRATAMIENTO: FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

En teoría, las enfermedades parasitarias deben ser relativamente fáciles de tratar debido a que conocemos a los agentes etiológicos causantes y sus ciclos de vida. Sin embargo, el control de las enfermedades parasitarias requiere una compleja interrelación de actividades en salud pública, educación, voluntad política y ciencias médicas. Por lo que las enfermedades parasitarias siguen estando consideradas como las enfermedades de mayor predominio en el mundo; siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, principalmente en la población infantil. La quimioterapia sigue teniendo un rol importante en el tratamiento de estas enfermedades, no solo en el tratamiento individual de los pacientes, sino también en la reducción en la propagación de las enfermedades parasitarias, mediante campañas de desparasitación masivas. La OMS ha establecido como meta lograr que la quimioprevención con fármacos antiparasitarios logre una cobertura superior al 75% en niños con edad escolar (Liu *et al.* 1996; Frayha *et al.* 1997; Watkins, 2003; Petri, 2003).

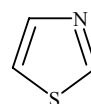
Dentro de los fármacos más empleados en el tratamiento de las enfermedades parasitarias se encuentran los nitroheterociclos, comúnmente empleados como antiprotozoarios y a los bencimidazoles, empleados como antihelmínticos de predilección.

2.4.1. LOS FÁRMACOS NITROHETEROCÍCLICOS

Los fármacos clasificados como nitroheterociclos, son compuestos que poseen un anillo nitroaromático de cinco miembros con dos heteroátomos, los heterociclos más comúnmente empleados son el imidazol y el tiazol (**Fig. 6**).



Imidazol



Tiazol

Fig. 6. Heterociclos empleados en los fármacos antiparasitarios.

2.4.1.1. Los nitroimidazoles

Los nitroimidazoles consisten en dos grupos (**Fig. 7**) el primero es el de los derivados 5-nitroimidazoles, dentro de los cuales se encuentran el metronidazol, el tinidazol y otros derivados; y el segundo grupo es el de los 2-nitroimidazoles por ejemplo el benznidazol, empleado contra la enfermedad de Chagas (Frayha *et al.* 1997). En este rubro nos enfocaremos en el metronidazol ya que es el fármaco representativo de los 5-nitroimidazoles, además de ser el único aprobado por la FDA para su uso en enfermedades parasitarias.

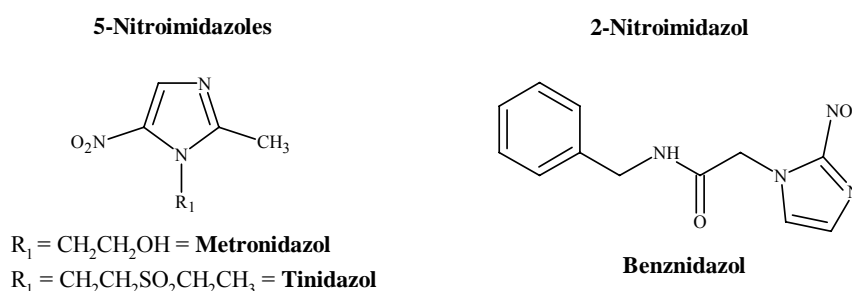


Fig. 7. Nitroimidazoles empleados como antiprotozoarios
(Modificado de Frayha *et al.*, 1997).

El metronidazol (MTZ) fue uno de los primeros 5-nitroimidazoles empleados en la terapéutica; fue introducido en 1959 como tricomonocida por Cosar y Julou, con lo cual ya lleva en el mercado más de 45 años. En la actualidad, sus aplicaciones clínicas se han ampliado y es el fármaco de elección contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*: además de ser eficaz contra bacterias anaerobias,

como *Helicobacter pilory* y tener otras aplicaciones terapéuticas, lo que lo ha llevado a ser uno de los fármacos más empleados en el mundo, además de estar dentro de los 100 fármacos más prescritos en los Estados Unidos. El MTZ aparece como un fármaco esencial en la lista de la OMS y en el cuadro básico de medicamentos de la SSA (Bendesky *et al.* 2001; Bendesky *et al.* 2002; SSA, 2004).

Es un fármaco excelente para las infecciones intestinales y extraintestinales, causadas por protozoarios. El MTZ puede ser administrado por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal y rectal, aunque la más empleada es la oral (Frayha *et al.* 1997; Bendesky *et al.* 2001). La dosificación es de 500 a 750 mg por 5-10 días, para los adultos; mientras que la dosificación pediátrica es de 35 a 50 mg/Kg por alrededor 5-10 días (Abramowicz, 1995).

Los efectos adversos más frecuentes son cefalea, náusea, sequedad de la boca y sabor metálico; ocasionalmente se presenta vomito, diarrea, dolor abdominal, insomnio y vértigo; y en casos muy raros encefalopatía, ataxia, incoordinación y convulsiones. Sumado a esto, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica al MTZ como un agente con evidencia insuficiente para ser considerado carcinógeno humano, pero con suficiente evidencia de carcinogenicidad animal (Abramowicz, 1995; Bendesky *et al.* 2002).

Debido a varios factores, entre los cuales está el abandono del tratamiento y dosis subterapéuticas, se han reportado casos de resistencia al fármaco en los parásitos *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Bendesky *et al.* 2001).

2.4.1.2. Los nitrotiazoles

El núcleo de nitrotiazol fue seleccionado para reemplazar el anillo de nitroimidazol clásico, ya que en los estudios Ames no se encontró efecto mutagénico con el reemplazo; además, el átomo de azufre que reemplaza al nitrógeno en el anillo, es responsable de la destoxificación en estos compuestos. De esta manera se aumenta su espectro, su eficacia y se disminuye su toxicidad (Daxón).

Uno de los miembros de este grupo es el Niridazol (**Fig. 8**), el cual presenta actividad contra *Schistosoma mansoni* y contra *Dracunlus medinensis*. Su mecanismo de acción es mediante alteraciones bioquímicas y fisiológicas, en la obtención de energía y en los órganos reproductivos. Este fármaco presenta efectos adversos sobre el sistema nervioso central (Frayha *et al.* 1997).

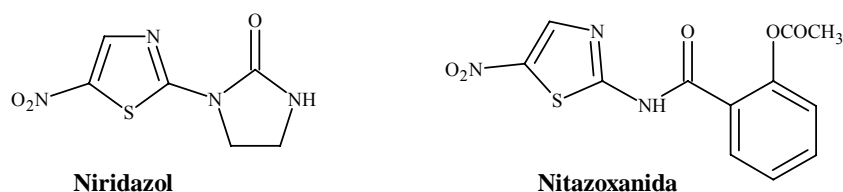


Fig. 8. Derivados del nitrotiazol empleados como antiprotozoarios.

El miembro más sobresaliente de esta familia de fármacos es la nitazoxanida (NTZ), la cual fue sintetizada en 1974 por Rossignol-Cavier. Diez años después se describió como un fármaco activo contra cestodos, efectivo en una sola dosis contra *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*. El desarrollo de la NTZ se reinició en 1994, después que se demostró su actividad como un antiprotozoario, desde entonces ha habido muchos reportes clínicos y preclínicos que avalan su amplio espectro de actividad contra protozoarios y helmintos. La NTZ ha demostrado actividad contra los helmintos: *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichuria*, *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides*, *Uncinaria stenocephala*, *Enterobius vermicularis*, *Loa loa*, *Ancylostoma duodenale* y *Fasciola hepatica*; para el caso de los protozoarios a demostrado ser eficaz contra: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Isoospora belli* y *Cryptosporidium parvum*; además de presentar actividad contra bacterias anaerobias como *Clostridium perfringens* y *Helicobacter pylori* (Adagu *et al.* 2002; Guilles *et al.* 2002; White, 2003; White, 2004).

En nuestro país, la nitazoxanida fue autorizada para su salida al mercado nacional por la Dirección General de Insumos para la Salud (dependiente de la Secretaría de Salud), en 1996. Debido a su amplio espectro y poca toxicidad observado en los estudios clínicos, se aprobó su empleo en niños mayores de 2 años y adultos (Eguiza Salomón, 2000).

Los estudios realizados en nuestro país demuestran su alta efectividad tanto en parasitosis simples como múltiples. En los estudios realizados se administró una dosificación de 200 mg a los niños y 500 mg a los adultos, por tres días consecutivos en ambos casos. Resultando tener una eficacia global que oscila entre el 56 y el 100 por ciento, tanto en helmintosis como en protozoosis y aun en las formas múltiples o mixtas. Estos estudios también revelaron la baja toxicidad, ya que solo se presentaron efectos adversos en el 3 al 6% de los pacientes, los cuales mostraron dolor abdominal (Romero Cabello, 1997; Dávila-Gutiérrez, 2002; Díaz, 2003).

2.4.1.3. Mecanismo de acción de los nitroheterociclos

La actividad de los nitroheterociclos se debe a la facilidad con que el grupo nitro (NO_2) puede actuar como aceptor de un solo electrón, la reducción también genera un gradiente de concentración lo cual facilita la penetración de los compuestos en los protozoarios (**Fig. 9**) (Frayha *et al.* 1997; Avendaño, 2001).

La reducción del grupo nitro resulta en la formación de intermediarios citotóxicos de vida corta, los cuales, al formar aductos con las proteínas y los ácidos nucleicos ocasionan daños celulares múltiples que conllevan a la muerte del protozoario. La enzima responsable de esta reducción es la Piruvato:ferrodoxina oxidoreductasa (PFOR), enzima que se encuentra en los protozoarios anaerobios como *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, y su función es la de generar Acetil-CoA para la generación de ATP (Frayha *et al.* 1997; Kulda, 1999; Katzung, 2001).

Los protozoarios que presentan resistencia contra los nitroimidazoles se ha atribuido a la disminución de la activación del grupo nitro, lo que se refleja en la disminución o supresión de la actividad de una o más proteínas, dentro de esta la PFOR, la Hidrógenasa, Oxidasas, entre otras. Se ha observado que estos cambios se pueden deber a la supresión de un gen de uno de los cromosomas lo que probablemente cause las alteraciones en las proteínas (Frayha *et al.* 1997; Kulda, 1999).

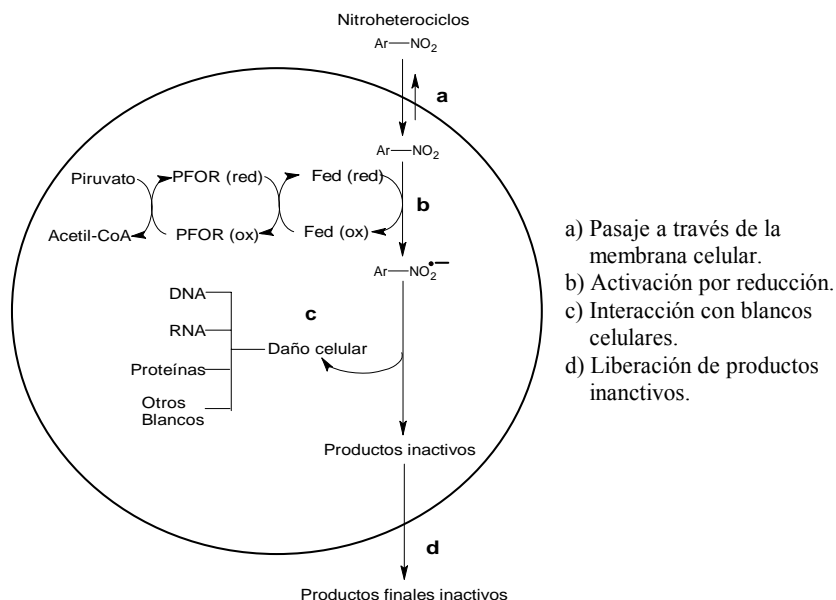


Fig. 9. Mecanismo de acción de los nitroheterociclos en parásitos anaerobios (Modificado de Frayha *et al.* 1997).

La nitazoxanida se ajusta al mecanismo de acción anteriormente visto para los protozoarios, pero el mecanismo de acción sobre helmintos difiere, ya que se ha estudiado que interfiere con el metabolismo de la glucosa, debido a la alteración de las sustancias secretoras (acetilcolinesterasa) del aparato de Golgi y al consumo de glucosa del parásito. Estas alteraciones conllevan al agotamiento del glucógeno y una acidosis láctica, que ocasiona la muerte del parásito (Daxón).

2.4.2. LOS FÁRMACOS BENCIMIDAZÓLICOS

Los derivados del bencimidazol surgieron como antihelmínticos en el año de 1961 con el descubrimiento del tiabendazol (**Fig. 10**), un antihelmíntico de amplio espectro de actividad. Este hecho abrió las puertas hacia el desarrollo de una amplia gama de nuevos bencimidazoles (Horton, 1990).

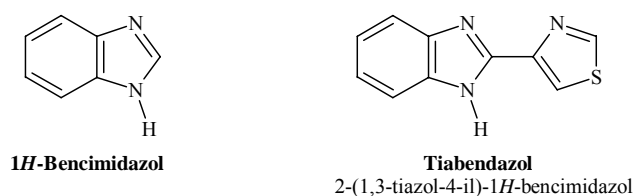


Fig. 10. Estructura del Bencimidazol y Tiabendazol.

El grupo de los bencimidazoles está reconocido como el de los fármacos antihelmínticos de elección, tanto para parasitosis intestinales como tisulares. Debido a su amplio espectro de acción y su baja toxicidad se han empleado en la terapéutica humana como en la veterinaria (Horton, 1990; Frayha *et al.* 1997).

En la práctica clínica en los humanos, la SSA solo tiene dos fármacos en su lista básica: el albendazol y el mebendazol (**Fig. 11**), los cuales han mostrado una alta actividad y seguridad para el tratamiento de la mayoría de las infecciones intestinales por helmintos y se usan en el tratamiento individual o en masa contra estas enfermedades. Su absorción limitada y su rápido metabolismo solo los hace efectivos contra parásitos sistémicos en altas dosis durante un tiempo prolongado (Horton, 1990; SSA, 2004).

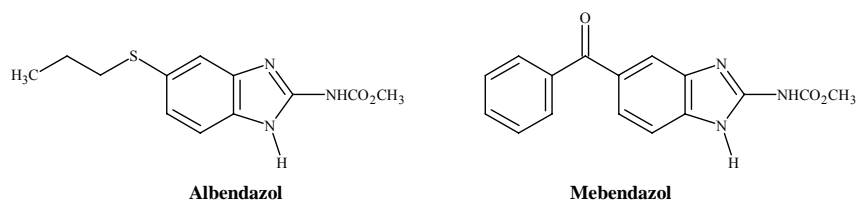


Fig. 11. Fármacos bencimidazólicos más usados en la terapéutica en humanos.

El mebendazol fue introducido en 1975 y el albendazol en 1980, su forma de dosificación para las helmintiasis es en dosis única de 400 mg o en varias dosis (por tres días) de 100 ó 200 mg. Debido a su baja toxicidad, estos fármacos se han empleado para el tratamiento de helmintiasis en niños menores de los 2 años. Algunos de los efectos adversos que se presentan son: diarrea y dolor abdominal, los cuales no justifican el abandono del tratamiento (Abramowicz, 1995; Frayha *et al.* 1997; Montresor *et al.* 2003). El albendazol es bien tolerado y de fácil administración, debido a esto se ha usado en campañas de desparasitación masivas, en dosis única de 400 mg. La SSA distribuyó 28 mil dosis de este fármaco a la población menor de cinco años durante la primera semana nacional de salud 2005 (Belkind-Valdovinos *et al.* 2004; SSA, 2005).

La quimioresistencia en *G. intestinalis* es más y más frecuente, por lo que hay que contar con alternativas para el tratamiento, una de estas opciones es la de emplear algunos de los fármacos antiparasitarios ya existentes, como por ejemplo, los que poseen el anillo de bencimidazol. El albendazol y el mebendazol podrían ser usados como agentes giardicidas. Los estudios clínicos e *in vitro* han producido diferentes resultados en cuanto a su eficacia. Los reportes *in vitro* muestran que el albendazol y el mebendazol son 30 a 50 veces más activos que el metronidazol. Los estudios clínicos han reportado que el albendazol es equiparable al metronidazol en niños cuando se administra por 5 días. Mientras que la combinación albendazol-metronidazol tiene una eficacia del 100% en pacientes con giardiosis resistente al metronidazol. La dosificación en adultos es de 400 mg por día durante 5 días para el albendazol, con un 95-97% de eficacia; y de 200 a 400 mg por día durante 5 a 10 días para el mebendazol. La dosificación en niños es de 15 mg/Kg por día durante 5 a 7 días (Liu *et al.* 1996; Reynoldson *et al.* 1998; Gardner *et al.* 2001).

2.4.2.1. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Los trabajos realizados indican que el mecanismo de acción de los bencimidazoles antihelmínticos (**Fig. 12**) puede deberse a la inhibición del metabolismo y transporte de la glucosa en los helmintos, o bien, por la inhibición de la polimerización de la tubulina en los microtúbulos (Sharma, 1994).

La inhibición del metabolismo de la glucosa es mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa; enzima responsable de convertir el fumarato en succinato, el cual tiene un importante rol en el metabolismo anaerobio de la glucosa y la eventual producción de energía en los helmintos. Esta enzima solo está presente en los parásitos y por tanto un blanco ideal para la quimioterapia. En

cuanto al transporte de glucosa, los bencimidazoles inhiben directa y selectivamente la absorción de glucosa en nematodos y cestodos, lo que conduce al consumo del glicógeno del parásito. Consecuentemente el parásito pierde sus recursos de obtención de energía (glucosa exógena y reservas endógenas de glicógeno), y con ello la disminución de la formación de ATP, esencial para la supervivencia y reproducción del parásito (Sharma, 1994; Frayha *et al.* 1997).

Los microtúbulos son estructuras compuestas por dos proteínas, la α -tubulina y la β -tubulina. La formación de los microtúbulos involucra la polimerización de la tubulina en uno de los extremos (polo positivo) y la despolimerización del otro extremo (polo negativo). Los microtúbulos tienen un rol muy importante en el movimiento de los cromosomas durante la división celular, provee de estructura a la célula, el movimiento intracelular de partículas, incluyendo metabolitos esenciales y participa en la exocitosis. Los bencimidazoles inducen la inhibición de la polimerización de tubulina mediante la unión de los bencimidazoles a la β -tubulina, la unión es suficiente para inhibir el ensamble del microtúbulo, lo cual lo inestabiliza y subsecuentemente resulta en la desintegración de estos vía despolimerización. La pérdida de los microtúbulos repercute en la pérdida del transporte de vesículas secretorias, disminuye la captación de la glucosa e incrementa la utilización de las reservas de glicógeno, con la consecuente muerte del parásito (Martin, 1997; MacDonald *et al.* 2004).

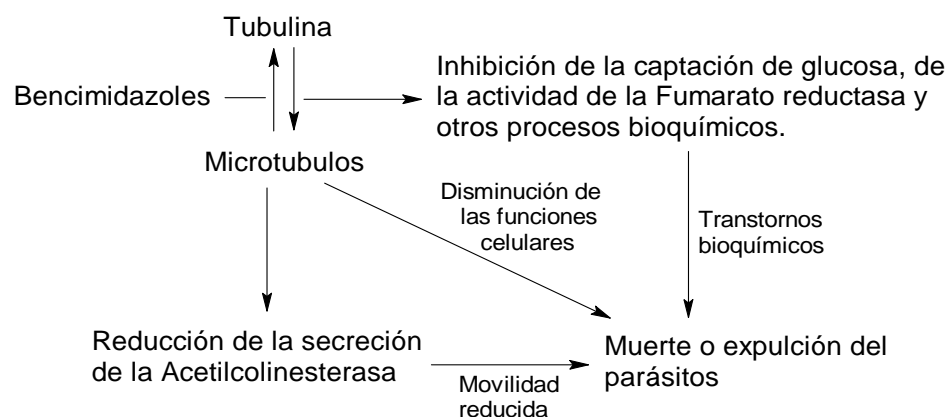


Fig. 12. Mecanismo de acción de los bencimidazoles (Tomado de Sharma, 1994).

2.5. MODIFICACIÓN MOLECULAR

Una de las herramientas que se emplea para la búsqueda de nuevos fármacos es la modificación estructural o molecular de sustancias químicas de actividad biológica conocida (prototipo). La modificación estructural de un prototipo tiene por objeto optimizar su actividad farmacológica principal, a fin de disponer de fármacos más selectivos y menos tóxicos, con una mejor farmacocinética y/o sin problemas de formulación farmacéutica. Este proceso de diseño es más racional y productivo, ya que hay una gran probabilidad de que una molécula obtenida por modificación de un prototipo activo presente propiedades útiles, por esta razón este proceso de búsqueda suele ser más productivo que el ensayo de compuestos naturales o de síntesis seleccionados al azar (Korolkovas, 1988; Avendaño, 2001).

Este método presenta varias ventajas dentro de las cuales cabe mencionar las siguientes (Korolkovas, 1988; Avendaño, 2001):

1. La gran probabilidad de obtener compuestos con propiedades farmacológicas similares a la del prototipo empleado.
2. Ofrece ventajas económicas, ya que tanto los métodos de síntesis como los ensayos farmacológicos de los análogos serán semejantes a los utilizados para el compuesto de referencia.
3. Los datos obtenidos de la actividad biológica de los productos pueden ayudar a elucidar relaciones estructura actividad.

Incluso, si no se obtienen análogos de gran actividad, las correlaciones cuantitativas y cualitativas que se pueden establecer entre las modificaciones realizadas y los datos de la actividad biológica son de gran utilidad para avanzar en el conocimiento del grupo farmacóforo¹, la definición del grupo farmacóforo es esencial para el diseño de fármacos (Avendaño, 2001).

¹ **Grupo Farmacóforo:** se define como la porción de la estructura de un fármaco que interactúa con su receptor farmacológico y por tanto explica la acción biológica a nivel molecular (Avendaño, 2002).

2.5.1. TIPOS DE MODIFICACIÓN MOLECULAR

Las modalidades que se pueden usar en el procedimiento de modificación molecular son las siguientes:

- a) Simplificación del prototipo
- b) Replicación moduladora
- c) Asociación molecular

Los cuales veremos de una forma más detallada a continuación.

2.5.1.1. *Simplificación del prototipo*

Este método se aplica fundamentalmente a productos naturales o compuestos de estructura compleja. En algunos casos la simplificación de la estructura supone la pérdida de la actividad biológica, aunque es frecuente que una porción estructural del prototipo posea su misma actividad. Los productos sintetizados son réplicas parciales o virtuales del fármaco prototipo, un ejemplo es la simplificación de la morfina, que da una serie de hipnoanalgésicos. En casos esporádicos, el proceso es el inverso y la estructura del prototipo, en vez de simplificarse, se hace más compleja (Korolkovas, 1988; Avendaño, 2001).

2.5.1.2. *Replicación moduladora*

Consiste en la modificación sistemática de determinados grupos o porciones estructurales de la estructura modelo. Normalmente la actividad farmacológica del producto se mantiene, pero en algunos casos se descubre en un análogo un nuevo perfil farmacológico. Esta metodología es la que se utiliza con mayor frecuencia para la optimización de un prototipo, este proceso produce fármacos denominados homólogos (Avendaño, 2001).

2.5.1.3. *Asociación de dos moléculas*

Esta modalidad consiste en la asociación de dos o más fármacos, a través de enlaces covalentes para formar una nueva estructura que potencie la acción de ambos, estos fármacos son llamados fármacos gemelos o híbridos. La combinación de dos grupos farmacóforos idénticos da origen a un

nuevo compuesto denominado fármaco gemelo, mientras que la asociación de dos grupos farmacóforos distintos genera una nueva estructura llamada fármaco gemelo no idéntico o **híbrido** (**Fig. 13a**). La primera estrategia consiste de una variación molecular basada en la duplicación, mientras que la segunda resulta de la síntesis asociativa (Avendaño, 2001; Wermuth, 2004).

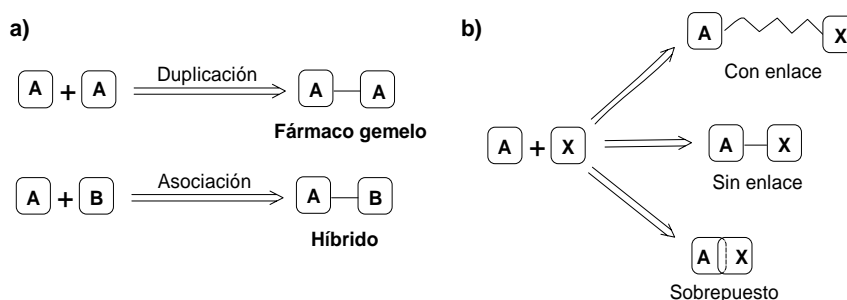


Fig. 13. (a) Tipos de asociación de dos moléculas; (b) Formas de unión de dos fármacos. (Tomado de Wermuth, 2004).

Los fármacos gemelos e híbridos pueden ser combinados por medio de un enlace, sin un enlace o mediante superposición (**Fig. 13b**). Un ejemplo de este método se muestra en la **Fig. 14**, la duplicación de la aspirina nos origina un fármaco gemelo llamado diaspirina el cual está unido sin un enlace de por medio. La asociación del ácido salicílico y el paracetamol por medio de una superposición nos da un fármaco híbrido denominado acetaminosalol (Wermuth, 2004).

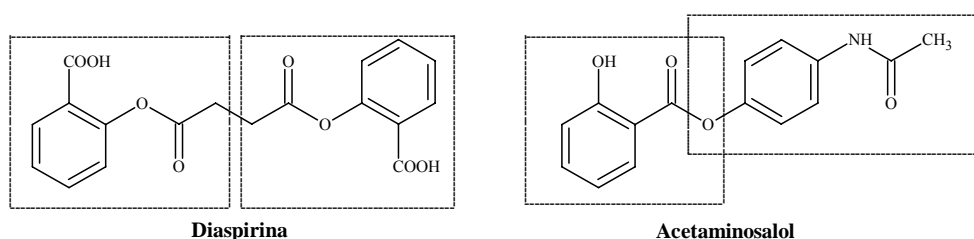


Fig. 14. Ejemplos de fármacos gemelos e híbridos (Modificado de Wermuth, 2004).

Los fármacos híbridos también son denominados fármacos de acción dual, debido a que poseen dos blancos farmacológicos ya que poseen dos grupos farmacóforos diferentes. El objetivo de tener dos efectos farmacológicos es con el propósito de obtener una respuesta sinérgica (Wermuth, 2004).

2.5.2. MODIFICACIONES MOLECULARES AL ANILLO DE BENCIMIDAZOL

El bencimidazol hoy en día es reconocido como un heterociclo muy versátil en la investigación químico-farmacéutica, y consecuentemente ha sido sujeto de una gran variedad de cambios estructurales, lo que ha generado moléculas activas no solo contra parásitos, sino como: antivirales, antimicrobianos, antifúngicos, pesticidas y anticancerígenos, debido a que este heterociclo presenta una amplia funcionalidad ha despertado el interés de muchos grupos de investigación, los cuales se concentran en el estudio de este prototipo (Sharma *et al.* 1983; Sharma, 1994; Boiani *et al.* 2005).

La versatilidad de las manipulaciones químicas en los bencimidazoles ha llevado a establecer varios sitios donde se han realizado las principales modificaciones moleculares en el núcleo del bencimidazol, que altera su actividad como antiparasitario, estableciendo su perfil ya sea como antiprotozoarios o como antihelmínticos (**Fig. 15**), los cuales veremos más detalladamente.

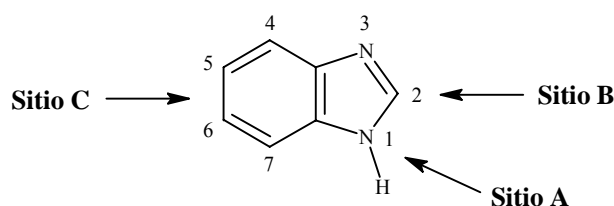


Fig. 15. Sitios de modificación molecular en los bencimidazoles antiparasitarios.

2.5.2.1. Modificaciones en el **Sitio A** (Posición 1)

Para comprender la relevancia del hidrógeno de esta posición, se han sintetizado un gran número de 1-alkil, 1-aryl, 1-acil y 1-arylalkil bencimidazoles. Se ha demostrado que la presencia del átomo de hidrógeno de la posición 1 es esencial para la actividad antihelmíntica cuando en la posición 2 se encuentra un grupo carbamato de metilo, como en el caso del Albendazol y Mebendazol. Pero se ha demostrado que no es esencial para la actividad antiprotozoaria, la introducción de un grupo metilo mejora la actividad contra protozoarios con respecto a sus análogos 1-*H* bencimidazoles, tomando como referencia al metronidazol (Sharma, 1994; Sánchez Díaz, 1999).

La introducción del grupo metilo u otros grupos en esta posición tiene la finalidad de evitar el equilibrio tautomérico que sufre la molécula del 1*H*-bencimidazol, donde el protón de la posición 1 migra a la posición 3 (**Fig. 16a**), obteniendo una mezcla de dos tautómeros (Townsend *et al.* 1990).

En los compuestos *N*-sustituídos el efecto tautomérico no es posible y cuando el anillo bencenoide se encuentra sustituido se obtiene dos compuestos regioisómeros con una relación estructural 1,5 y 1,6 (**Fig. 16b**), lo cual nos brinda una mejor y detallada información sobre los requerimientos estructurales para la acción biológica (Townsend *et al.* 1990).

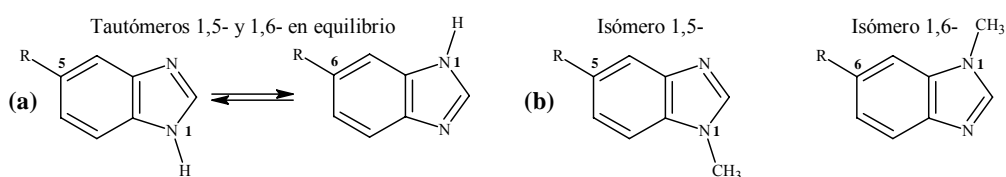


Fig. 16. Efecto tautomérico y regioisómeros del anillo de bencimidazol

2.5.2.2. Modificaciones en el **Sitio B** (Posición 2)

La naturaleza de los sustituyentes presentes en la posición 2 de los bencimidazoles desempeña un papel importante en el perfil de la respuesta biológica de la molécula resultante, se ha llevado a cabo una gran variedad de modificaciones estructurales en esta posición (Sharma, 1994).

Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química en colaboración con el Centro Médico Nacional del IMSS y estuvo encaminado a determinar la actividad antiparasitaria de bencimidazoles sustituidos en la posición 2 con los grupos siguientes: H, CH₃, CF₃, NH₂, SH, SCH₃ y NHCO₂CH₃. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos, en general, son más activos que el metronidazol como agentes antiprotozoarios y poco activos como agentes antihelmínticos. Los resultados de la evaluación biológica permitieron concluir que los compuestos sintetizados presentan una buena actividad con los grupos -SH, -SCH₃ y -CF₃ en la posición 2.

2.5.2.3. Modificaciones en el **Sitio C** (Posición 5(6))

La presencia de un grupo farmacofórico en las posiciones 5(6) de los bencimidazoles 2-sustituidos es un factor importante para determinar el perfil biológico de estos compuestos. Los sustituyentes en ambas posiciones previene que la molécula sufra de metabolismo oxidativo y pérdida actividad (Sharma, 1994).

2.5.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOLES

Como hemos visto la modificación molecular del fármaco prototipo ha llevado a sintetizar una serie de nuevas moléculas, dentro de las cuales están los derivados del 2-(trifluorometil) bencimidazol, los cuales han mostrado un amplio espectro de actividad biológica (fungicidas, insecticidas, herbicidas y antiparasitarios), veremos a continuación su actividad como antiparasitarios.

2.5.3.1. Actividad antihelmíntica

El compuesto 4,5,6,7-tetracloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (**Fig. 17a**) mostró una buena actividad contra los nematodos *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus contortus* y *Ascaris suum*, y contra el trematodo *Fasciola hepatica*; cuando se evaluaron en borregos, perros y ratas con dosis orales de 0.1-5 mg/Kg. Mientras que una solución al 5% del segundo compuesto, el 7-(dietilsulfamoyl)-4,5,6-tricloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (**Fig. 17b**), causó el 99-100% de reducción de *Fasciola hepatica* en el hígado de borregos tratados, a dosis de 100-200 mg/Kg (Sharma *et al.* 1983; Sharma, 1994). Otra modificación a los derivados del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol es la de realizar el intercambio del hidrógeno de la posición 1 por un metilo (modificación en el sitio A). El compuesto 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (**Fig. 17c**) mostró una actividad *in vitro* equiparable al albendazol, cuando se evaluó contra *Trichinella spiralis* a una concentración de 3×10^{-3} μM (Navarrete-Vázquez *et al.* 2001).

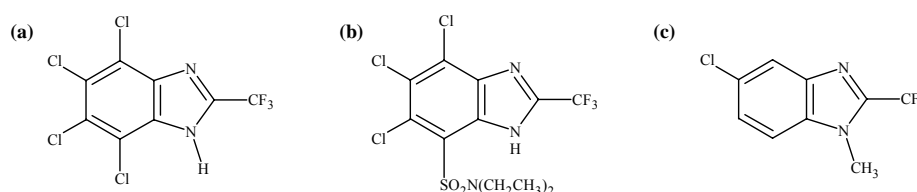
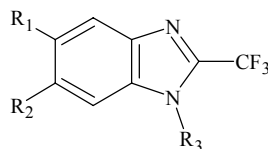


Fig. 17. 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazoles con actividad antihelmíntica *in vivo* e *in vitro* (Sharma *et al.*, 1994; Navarrete-Vázquez *et al.*, 2001).

2.5.3.2. Actividad antiprotozoaria

El estudio de la actividad antiprotozoaria de los derivados del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol ha empezado recientemente, debido al posible empleo del albendazol como un fármaco giardicida. Por lo cual se sintetizaron una serie de nuevas moléculas derivadas de este núcleo, las cuales se presentan en la **Tabla 2** (Navarrete-Vázquez *et al.* 2001).

Tabla 2. 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles con actividad antiprotozoaria *in vitro* (Tomado de Navarrete-Vázquez *et al.* 2001)



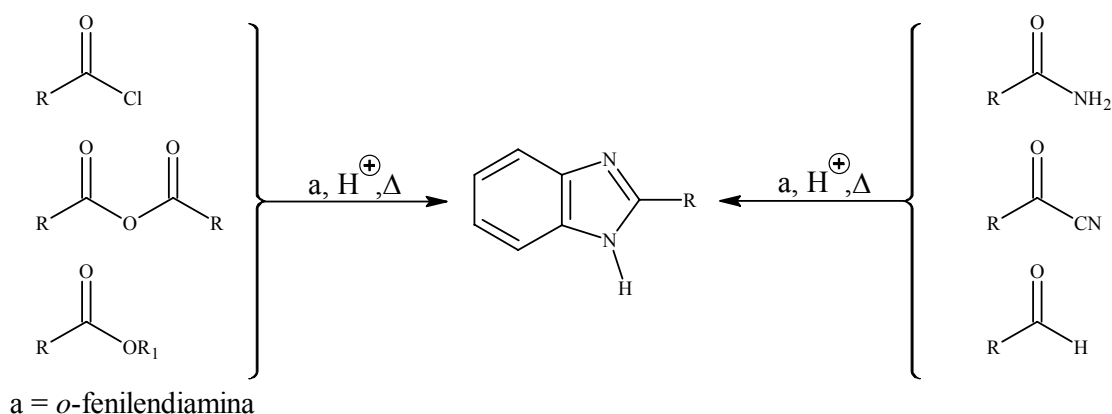
| COMPUESTO | R ₁ | R ₂ | R ₃ | <i>G. lamblia</i> CI ₅₀ (μM) | <i>E. histolytica</i> CI ₅₀ (μM) |
|--------------|----------------|----------------|-----------------|--|--|
| XVI | H | H | H | 0.107 | 0.069 |
| XVII | Cl | H | H | 1.282 | 0.022 |
| XVIII | Cl | Cl | H | 0.078 | 0.011 |
| XIX | H | H | CH ₃ | 0.064 | 0.040 |
| XX | Cl | H | CH ₃ | 0.042 | 0.046 |
| XXI | H | Cl | CH ₃ | 0.127 | 0.008 |
| XXII | Cl | Cl | CH ₃ | 0.260 | 0.033 |
| Metronidazol | | | | 1.220 | 0.350 |
| Albendazol | | | | 0.037 | 56.330 |

Como se puede apreciar, los compuestos sintetizados son mejores *in vitro* contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*, que el metronidazol (fármaco de elección para el tratamiento de la giardiosis y la entamoebosis). En este estudio se volvió a comprobar la gran actividad del albendazol contra los trofozoitos de *G. intestinalis*, pero no mostró ser muy eficaz contra *E. histolytica*. Los compuestos nuevos evaluados son equiparables al albendazol al ser comparados contra *G. intestinalis* y son mejores al ser comparados contra *E. histolytica*. Otro punto que hay que resaltar es que en la posición 1 hay un intercambio del hidrógeno por el grupo metilo, lo cual no afecta la actividad biológica de los compuestos, lo que sugiere que el hidrógeno en la posición 1 no es necesario para la actividad antiprotozoaria (Navarrete-Vázquez *et al.* 2001).

2.6. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE LOS 2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOLES

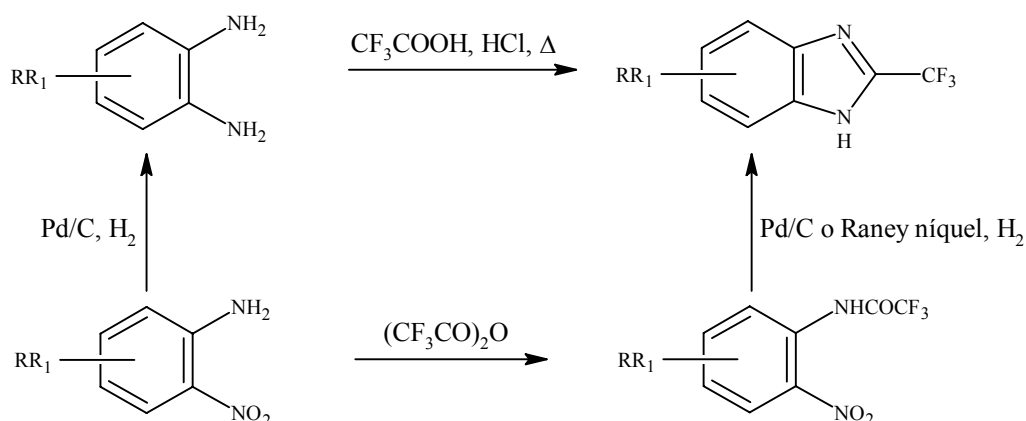
Uno de los métodos más importantes de síntesis para la preparación de un amplio rango de bencimidazoles consiste en condensar *o*-fenilendiaminas con ácidos carboxílicos. Uno de estos métodos es la reacción de Phillips, la cual se emplea para preparar varios bencimidazoles 2-

sustituídos. Esta reacción se basa en el tratamiento de las 1,2-fenilendiaminas con el ácido carboxílico correspondiente, en presencia ácido clorhídrico diluido caliente (Phillips, 1928). Se ha estudiado la reacción y se ha visto que también procede cuando las *o*-fenilendiaminas se trataron con ésteres, amidas, cloruro de ácido, anhídridos, nitrilos y aldehídos, ver el **Esquema 1** (Sharma *et al.* 1983).



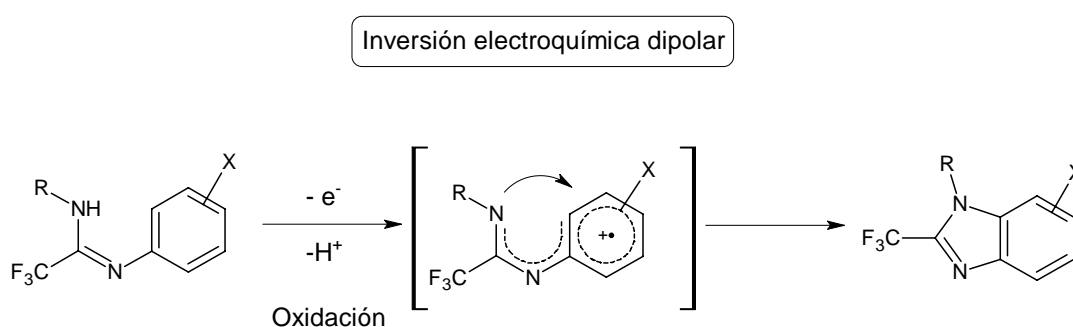
Esquema 1. Rutas de síntesis de bencimidazoles 2-sustituídos. (Modificado de Sharma *et al.*, 1983).

Los 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles se obtienen con buenos rendimientos por medio de la reacción de Phillips, al realizar la ciclocondensación de las *o*-fenilendiaminas con ácido trifluoroacético, en presencia de catálisis ácida. De manera alternativa, se pueden preparar con *o*-nitroanilinas tratadas con anhídrido trifluoroacético para dar la trifluoroacetanilida correspondiente, la cual posteriormente se somete a una hidrogenación catalítica, utilizando Pd/C o Níquel-Raney como catalizador (**Esquema 2**), generando los 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles (Bishop *et al.* 1964; Holan *et al.* 1967; Sharma *et al.* 1983).



Esquema 2. Rutas de síntesis de 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles (Modificad de Sharma *et al.*, 1983).

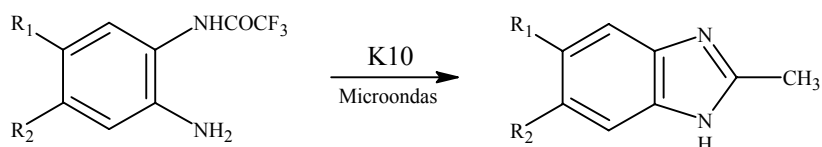
Otra técnica de preparar los 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles es mediante la inversión electroquímica bipolar. Esta técnica se caracteriza por la transformación electroquímica de un electrófilo a un nucleófilo mediante una reducción, mientras un nucleófilo es transformado a un electrófilo mediante una oxidación. La formación del anillo del bencimidazol a partir de la amidina correspondiente, se da mediante la electro-oxidación de la amidina, lo que genera un radical catión, por lo cual se lleva acabo el ataque al anillo aromático que actúa como electrófilo, formando el enlace carbono-nitrógeno (**Esquema 3**). Este proceso se realiza en la superficie del ánodo con buenos rendimientos (Uneyama *et al.* 1994; Uneyama, 1999; Uneyama, 2000).



Esquema 3. Ruta de síntesis de 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles empleando inversión electroquímica dipolar (Tomado de Uneyama, 2000).

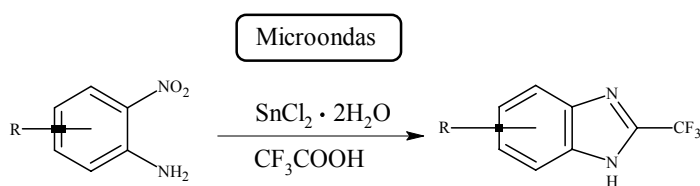
Otro método para preparar estos compuestos es mediante la utilización de microondas, esta técnica presenta las ventajas de ser simple, tener buenos rendimientos y de ser rápida, ya que las microondas aceleran la cinética de la reacción.

En el **Esquema 4** se presenta la ciclocondensación intramolecular de una *o*-fenilendiamina monotrifluoroacetilada en presencia de montmorillonita bajo irradiación de microondas (900w) por un periodo de 2 a 10 minutos; reportándose muy buenos rendimientos (Bougrin *et al.* 2001).



Esquema 4. Ruta de síntesis de 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles empleando microondas (Tomado de Bougrin *et al.*, 2001).

Otro método que emplea microondas se reporta por Van Vliet y consiste en la ciclación de 2-nitroanilinas, la cual ocurre en dos pasos: primero la reacción con el ácido trifluoroacético para dar la trifluoroacetanilida correspondiente y el segundo paso es la reducción con cloruro de estaño (II), lo cual genera la *o*-fenilendiamina monotrifluoroacetilada, la cual bajo las condiciones de microondas resulta en la conversión a 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles (**Esquema5**). Esta reacción se lleva a cabo bajo irradiación de microondas a 130° C durante 5-10 minutos, reportándose una conversión buena (VanVliet *et al.* 2005).



Esquema 5. Ruta de síntesis de 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazoles empleando microondas (Tomado de VanVliet, *et al.* 2005).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

"La formulación de un problema es más importante que su solución."

Albert Einstein, premio Nobel.

3.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En el control de las enfermedades parasitarias se considera que el desarrollo de vacunas y la implementación de estrategias de educación para la salud serán factibles a largo plazo. Por lo cual, a corto y mediano plazo, la alternativa más factible para el control de dichas enfermedades es el tratamiento quimioterapéutico. Aun cuando disponemos de fármacos para combatir la mayoría de las enfermedades parasitarias, éstos empiezan a presentar ciertas desventajas dentro de las cuales destacan: el uso por más de 30 años de los fármacos de elección ha generado cepas resistentes, por lo que éstos ya empiezan a sufrir de una eficacia sub-óptima, además, se empieza a comprender su toxicidad, la cual es cada vez más seria; por estos motivos es importante la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.

Para tomar esta búsqueda de forma racional, tendremos que aprovechar las herramientas propuestas acerca de la modificación estructural, anteriormente vistas, lo cual nos conduce a los siguientes planteamientos:

- ¿Realizando la asociación de tipo *Non-identical twin drug* (híbrido) entre los grupos farmacóforos de los nitrotiazoles y de los bencimidazoles, se podrá generar una molécula que tenga un efecto antiparasitario superior o igual a sus grupos predecesores?
- El grupo nitro es el responsable de la actividad biológica y se le ha asociado con la toxicidad que presentan los fármacos que lo poseen, lo que nos lleva a plantear: ¿se vera afectada la actividad biológica de los compuestos híbridos al suprimir el grupo nitro de su estructura?

4. HIPÓTESIS

El método mejor y más seguro de filosofar parece ser primero, investigar en forma diligente las propiedades de los objetos y verificar dichas propiedades experimentales, y entonces postular hipótesis que las expliquen. No obstante, las hipótesis deben limitarse a explicar las propiedades de los objetos y no tratar de predeterminarlas, a menos que puedan ser una ayuda en los experimentos.

Sir Isaac Newton, físico Inglés

4.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Al llevar a cabo la asociación de dos grupos farmacóforos antiprotozoarios, nitrotiazol y bencimidazol mediante un enlace carboxamida, se tendrá una nueva molécula híbrida, la cual tendrá un mejor perfil de actividad que sus predecesores contra: *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.
- Al suprimir el grupo nitro de las moléculas experimentales la actividad biológica se vera modificada, siendo menor que la de los compuestos híbridos pero mejor o equiparable a la de sus precursores.

5. OBJETIVOS

“Un camino de mil millas comienza con un paso.”

Benjamin Franklin, físico estadounidense

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar nuevos derivados híbridos del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol con el grupo farmacóforo del nitrotiazol, así como evaluar su actividad antiparasitaria *in vitro* contra protozoarios de interés clínico, con la finalidad de brindar información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la síntesis del 6(5)-Cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5(6)-carboxamida (**1**) y sus derivados 1-metilados (**2** y **3**).
- Realizar la síntesis del 6(5)-Cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5(6)-carboxamida (**4**) y sus derivados 1-metilados (**5** y **6**).
- Caracterizar los productos finales, así como sus intermediarios, mediante técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrometría de masas.
- Evaluar su potencial antiparasitario *in vitro* usando como modelo biológico *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *E. histolytica*.
- Adquirir experiencia en el campo la síntesis, la elucidación estructural y el diseño de moléculas de interés farmacéutico.

6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO.

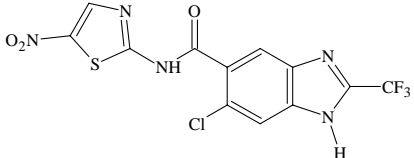
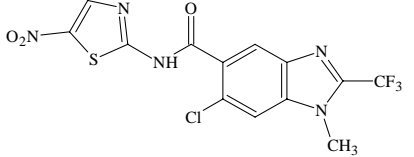
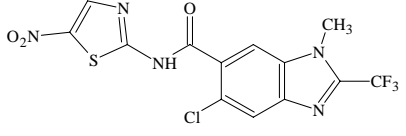
“(...) la naturaleza se deleita tanto con los cambios (...) que ni siquiera bajo los árboles de la misma especie es posible encontrar una planta que se asemeje mínimamente a otra (...) Así pues, presta atención y varía todo cuanto puedas.”

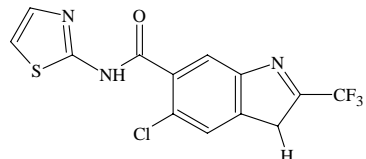
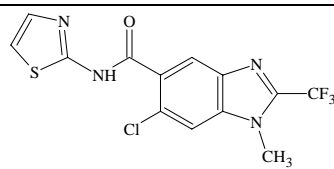
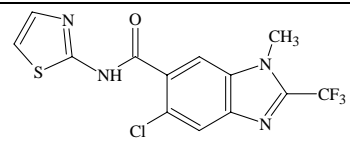
Leonardo da Vinci; artista e inventor renacentista

6.1. COMPUESTOS DISEÑADOS

Los compuestos híbridos diseñados en este proyecto se muestran en la **Tabla 3**. Son dos series de tres compuestos; una de ellas con el grupo nitro en el tiazol (**1,2,3**), y la otra, no nitrada (**4,5,6**).

Tabla 3. Derivados híbridos del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol diseñados

| SERIE | COMPUESTO | ESTRUCTURA |
|---|-----------|--|
| Serie 1 “Híbridos” (con grupo NO ₂) | 1 |  <p>5(6)-Cloro-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6(5)-carboxamida</p> |
| | 2 |  <p>6-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida</p> |
| | 3 |  <p>5-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxamida</p> |

| | |
|--|--|
| <p>Serie 2 “Híbridos modificados” (sin grupo NO₂)</p> | <p>4</p>  <p>5(6)-Cloro-<i>N</i>-1,3-tiazol-2-il-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6(5)-carboxamida</p> |
| | <p>5</p>  <p>6-Cloro-1-metil-<i>N</i>-1,3-tiazol-2-il-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida</p> |
| | <p>6</p>  <p>5-Cloro-1-metil-<i>N</i>-1,3-tiazol-2-il-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxamida</p> |

6.1.1. DISEÑO DE LA SERIE 1: HÍBRIDOS

La primera serie de compuestos se diseñó tomando en cuenta dos moléculas con actividad antiparasitaria probada, tanto *in vitro* como *in vivo*; empleando como estrategia la asociación de dos moléculas, con el fin de obtener un fármaco híbrido. En esta serie se tomaron como base a la nitazoxanida y a los 2-(trifluorometil) bencimidazoles (**Fig. 18**). Donde el grupo farmacofórico de la nitazoxanida se unió mediante un enlace de tipo carboxamida al núcleo del bencimidazol y así obtener la serie de compuestos híbridos (Serie 1).

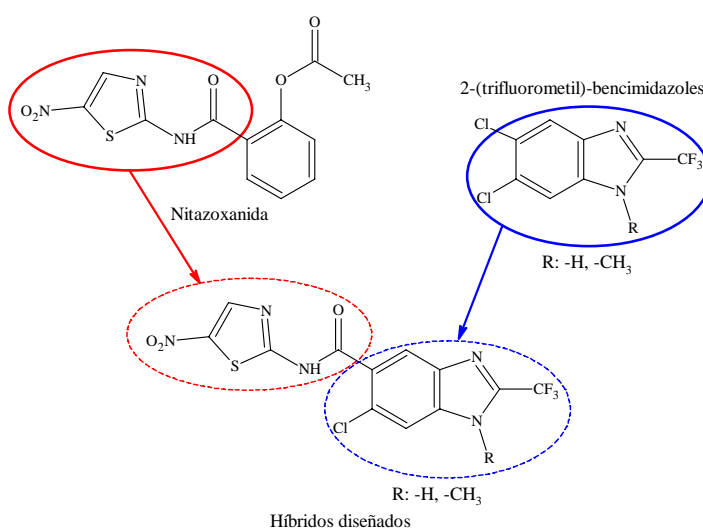


Fig. 18. Diseño de los compuestos híbridos de la serie 1.

6.1.2. DISEÑO DE LA SERIE 2: HÍBRIDOS MODIFICADOS

Los compuestos de la serie 2 se diseñaron en base a la serie 1, ya que estos compuestos no poseen el grupo nitro en la posición 5 del anillo de tiazol (**Fig. 19**), con la finalidad de ver cómo se ve afectada la actividad antiparasitaria al ser removido dicho grupo funcional. Ya que en la literatura se plantea que el grupo nitro es el responsable de la acción biológica en los compuestos antiparasitarios que lo poseen; además de ser el responsable de los efectos adversos que presentan dichos fármacos.

Es por eso que se planteó la eliminación del grupo nitro de las moléculas diseñadas, con el propósito de ver si se puede suprimir dicho grupo para así disminuir los efectos adversos provocados por éste; y de ser posible, sin sacrificar la actividad biológica que presenten los compuestos diseñados en la serie 1.

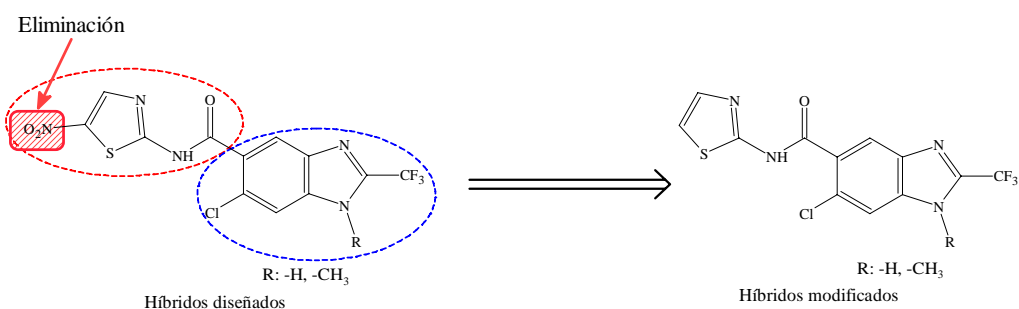


Fig. 19. Diseño de los compuestos híbridos modificados de la serie 2.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

“La sabiduría no nos viene dada, sino que debemos descubrirla por nosotros mismos, después de un viaje que nadie puede ahorrarnos o hacer por nosotros.”

Marcel Proust, escritor francés.

Para una mejor comprensión del desarrollo experimental que se siguió en esta tesis, lo dividiremos en dos partes. En la primera, la parte química, se describe la secuencia de síntesis empleada para la preparación de los compuestos diseñados; y la segunda, la parte biológica, describe la metodología empleada para la evaluación antiparasitaria de los compuestos sintetizados. La parte química se realizó en el laboratorio L-122 del edificio E, Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Rafael Castillo Bocanegra y la supervisión de la M. en C. Alicia Hernández Campos. La evaluación biológica de los compuestos sintetizados frente a los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI del IMSS, bajo la asesoría de la Dra. Lilián Yépez Mulia y la supervisión de la Bióloga Amparo Tapia.

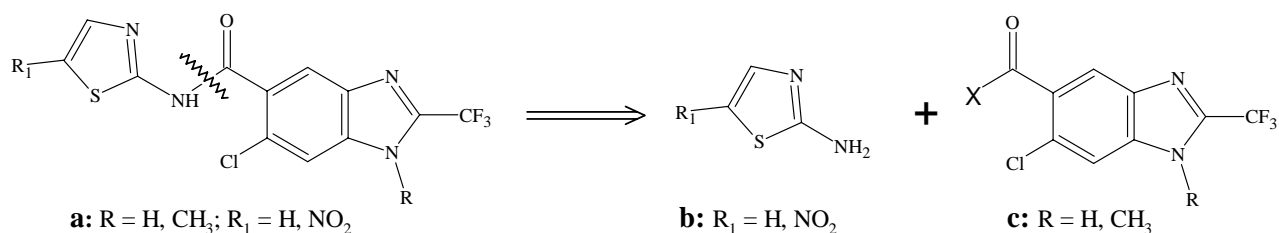
A continuación se describe en detalle la secuencia de la parte química, seguida de la parte biológica. Cabe mencionar que las metodologías empleadas para la síntesis de cada uno de los intermediarios y productos finales se presentan en el anexo A.

7.1. PARTE QUÍMICA

7.1.1. ANÁLISIS RETROSINTÉTICO DE LOS COMPUESTOS DISEÑADOS

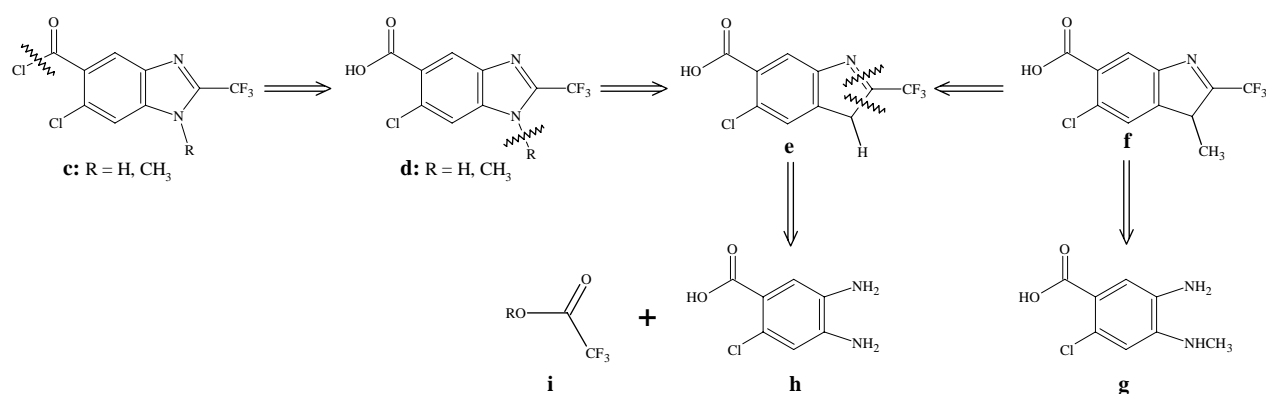
Una forma de saber los compuestos de partida para la síntesis de una molécula compleja es mediante la retrosíntesis. Esta es una herramienta muy útil, ya que por medio de desconexiones en la molécula deseada se generan compuestos de estructura más simple y, por consiguiente, de síntesis más fácil. Aplicando esta técnica a la estructura general (**a**) de los compuestos finales; se

hizo la primera desconexión en el enlace carboxamida (**Esquema 6**) para generar los sintones (**b**) y (**c**). Para la primera serie de los compuestos finales, (**1, 2 y 3**), **b** es el 2-amino-5-nitrotiazol; y para la segunda, (**4, 5 y 6**), **b** es el 2-aminotiazol, los cuales se pueden adquirir comercialmente. El segundo sintón (**c**) es un derivado activado (halogenuro de acilo), ya que este tipo de compuestos se emplea comúnmente para la síntesis de amidas (Solomons, 2000).



Esquema 6. Primera desconexión en la retrosíntesis de los compuestos finales.

El proceso de retrosíntesis se continuó con el compuesto **c** (**Esquema 7**), en el cual, se efectuó un intercambio de grupo funcional, un halogenuro de acilo por un ácido carboxílico (**d**). Cuando los productos finales tengan un grupo metilo (CH₃) en la posición 1 del bencimidazol, la desconexión se hizo en el enlace del grupo metilo, con lo cual el 1-metilbencimidazol (**f**) procede del 1*H*-bencimidazol (**e**), o bien, puede estar previamente incorporado como un -NHCH₃ en la materia prima (**g**). La última desconexión se realizó en el anillo de imidazol, lo cual da dos intermediarios, el **i**, el cual puede ser un ácido o un anhídrido; y el segundo, es una *o*-fenilendiamina (**h** o **g**) debidamente sustituida en las posiciones 5(6).



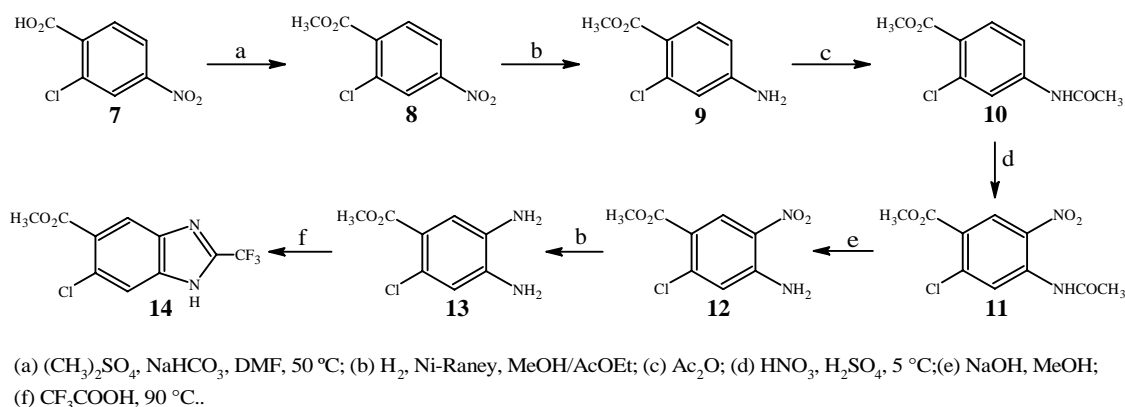
Esquema 7. Segunda y tercera desconexión de retrosíntesis de los bencimidazoles precursores **c** y **d**.

En el siguiente apartado veremos los pasos de síntesis para la obtención de los compuestos finales, y las metodologías se pueden consultar en los anexos.

7.1.2. SÍNTESIS DE 5(6)-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-6(5)-CARBOXILATO DE METILO, COMPUESTO INTERMEDIARIO 14

Como primer paso para la síntesis de los compuestos finales se obtuvo primero el intermediario 6-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**14**), el cual se utilizó como precursor común, y cuyo método de síntesis veremos a continuación.

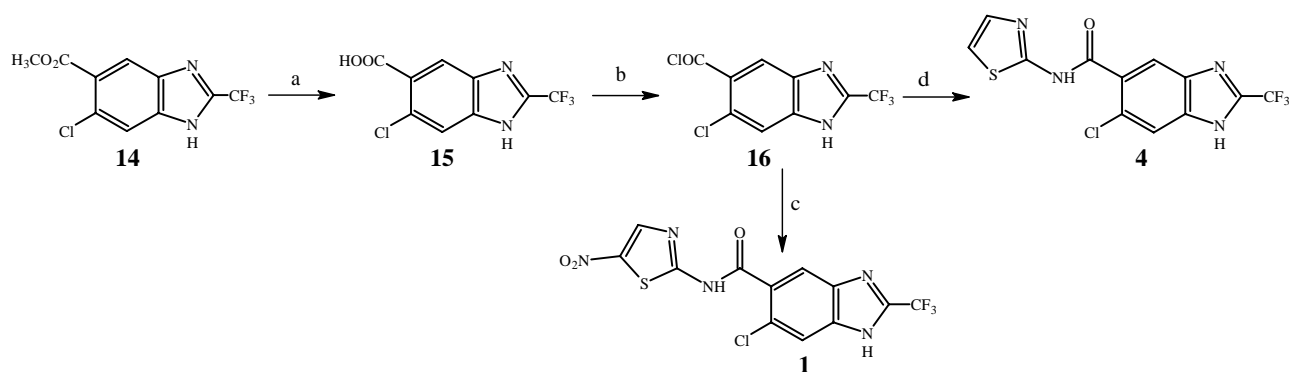
Para obtener el intermediario **14** (**Esquema 8**) se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**7**), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio ligeramente básico para obtener el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**8**), éste se sometió a una reducción catalítica del grupo nitro, empleando H_2 y Níquel Raney como catalizador. El producto obtenido, el 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**9**), se acetiló inmediatamente con anhídrido acético para obtener el 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**10**). La nitración de **10** se realizó mediante la disolución de este compuesto en ácido sulfúrico concentrado, seguido de la adición cuidadosa de ácido nítrico concentrado a bajas temperaturas, lo que dio como resultado el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**11**); este compuesto se sometió a una hidrólisis selectiva del grupo acetamido empleando una disolución de sosa metanólica a 20 °C. Se obtuvo el 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**12**). La reducción catalítica de **12**, llevó al 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**13**). Una vez obtenida la *o*-fenilendiamina **7**, ésta se sometió inmediatamente a una ciclocondensación de Phillips empleando ácido trifluoroacético en caliente, con lo que se obtuvo el compuesto buscado 6-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**14**). El cual fue el precursor inmediato para las siguientes reacciones.



Esquema 8. Secuencia de síntesis para la preparación del compuesto intermediario **14**.

7.1.3. SÍNTESIS DE LA 6(5)-CLORO-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (1) Y SU ANÁLOGO NO NITRADO(4)

Para la obtención del primer conjunto de compuestos finales (**Esquema 9**) se partió del intermediario **14**, el cual se sometió a una hidrólisis básica con NaOH en metanol a 60°C, para dar el ácido 6(5)-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5(6)-carboxílico (**15**). Este ácido se activó con cloruro de tionilo en caliente y el intermediario, cloruro de 6(5)-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5(6)-carbonilo (**16**), se trató con 2-aminotiazol y NaHCO₃ en acetona para dar el compuesto final **4**, la 6(5)-cloro-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5(6)-carboxamida. Para la síntesis del compuesto **1** se empleó la misma técnica hasta la formación del cloruro de ácido **16**, el cual ahora se trató con el 2-amino-5-nitrotiazol y NaHCO₃ en acetona para dar el compuesto final, la 6(5)-cloro-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5(6)-carboxamida (**1**).



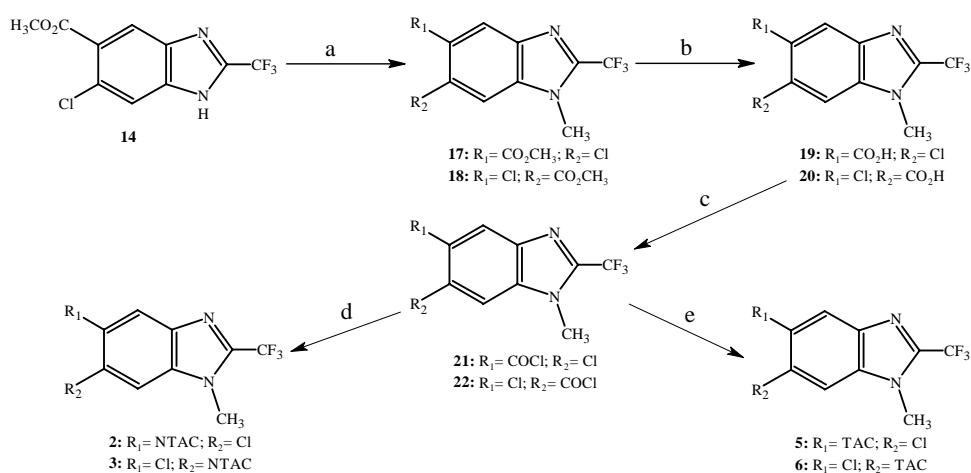
(a) NaOH, MeOH, 60 °C; (b) SOCl₂, Tolueno, 60 °C; (c) 2-Amino-5-nitrotiazol, NaHCO₃, acetona; (d) 2-Aminotiazol, NaHCO₃, acetona.

Esquema 9. Secuencia de síntesis para la preparación de los compuestos **1** y **4**.

7.1.4. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES 6-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5-CARBOXAMIDA (2), 5-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXAMIDA (3) Y SUS ANÁLOGOS NO NITRADOS (5 Y 6)

Para la síntesis de los compuestos de esta etapa experimental (**Esquema 10**); el intermediario **14** se trató con 1.5 equivalentes de CH₃I en medio alcalino con KOH, a un temperatura de 10 °C, lo que dio como resultado una mezcla de dos isómeros: el 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-

bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**17**) y el 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**18**). Estos isómeros se separaron por medio de una cromatografía *flash* en columna, obteniendo los isómeros por separado. Posteriormente, **17** y **18** se sometieron por separado a la hidrólisis básica del éster, con KOH en metanol a 60 °C, para dar el ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**19**) y el 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**20**), respectivamente. A continuación, cada uno de los ácidos obtenidos anteriormente se activó con cloruro de tionilo en caliente, lo que llevó al cloruro de 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo (**21**) y el cloruro de 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carbonilo (**22**), respectivamente. Debido a que estos productos son muy reactivos se trataron inmediatamente con 2-aminotiazol y NaHCO₃ en acetona para dar las carboxamidas finales: 6-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**5**) y 5-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**), respectivamente. Para la síntesis de los dos últimos compuestos faltantes (**2** y **3**), los nitrados, se trató el cloruro de ácido **21** ó **22** con el 2-amino-5-nitrotiazol y NaHCO₃ en acetona para dar los compuestos finales: 6-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**2**) y el 5-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**3**), respectivamente.



NOTA: TAC = (1,3-tiazol-2-il)aminocarbonilo; NTAC = (5-nitro-1,3-tiazol-2-il-aminocarbonilo)

(a) CH₃I, KOH, Acetona; (b) KOH, MeOH, 60°C; (c) SOCl₂, Tolueno, 60 °C; (d) 2-Amino-5-nitrotiazol, NaHCO₃, acetona; (e) 2-Aminotiazol, NaHCO₃, acetona.

Esquema 10. Secuencia de síntesis para la preparación de los compuestos finales **2**, **3**, **5** y **6**.

7.2. PARTE BIOLÓGICA

7.2.1. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* CONTRA *G. lamblia*, *E. histolytica* Y *T. vaginalis*

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos previamente estandarizado. Se incubaron 4×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* o *T. vaginalis* por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de los diferentes 2-(trifluorometil) bencimidazoles (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL), además del albendazol, nitazoxanida y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia (control positivo). Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos empleando DMSO. Después de la incubación se inocularon 50 µL de los trofozoítos tratados, en medio fresco, ya sin la adición de los compuestos y se incubaron por otras 48 h. El número final de trofozoítos se determinó en un hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente, mediante análisis Probit, se calculó la CI_{50} que correspondió a la concentración que inhibió al 50% el crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron por duplicado y se repitieron en tres ocasiones.

8. RESULTADOS

"El avance en la ciencia se produce poniendo ladrillo sobre ladrillo, no por la súbita erección de palacios de fábula."

J. S. Huxley, biólogo británico

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en este trabajo experimental, el presente capítulo se ha dividido en dos partes. La primera aborda los resultados químicos donde se exponen los datos arrojados por el trabajo de síntesis, así como la información proporcionada por los espectros de IR, RMN ^1H y EM; los cuales son una herramienta importante para la elucidación estructural de los compuestos sintetizados. La segunda parte consiste en la evaluación biológica, la cual contiene los resultados que se obtuvieron de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. intestinalis*.

8.1. RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA

8.1.1. CONSTANTES FÍSICAS

Las constantes físicas, punto de fusión y R_f , así como los rendimientos obtenidos para los compuestos finales sintetizados se muestran en la **Tabla 4**. Los resultados emanados por los compuestos intermediarios de los productos finales se muestran en la **Tabla 5**.

^aLos sistemas de elusión se pueden consultar en el **Anexo A**.

Tabla 4. Propiedades físicas de los compuestos finales

| COMPUESTO | RENDIMIENTO CRUDO (%) | RENDIMIENTO CRISTALIZADO (%) | SISTEMA DE CRISTALIZACIÓN | PUNTO DE FUSIÓN (°C) | R_f (Sistema) ^a |
|-----------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| 1 | 93 | 45 | EtOH / Agua | 233.5-234.5 | 0.41 (VI) |
| 2 | 83 | 30 | EtOH / AcOEt | 268.0-268.8 | 0.55 (VI) |
| 3 | 93 | 42 | DMF / Agua | 303.3-303.6 | 0.54 (VI) |
| 4 | 85 | 45 | EtOH | 271.2-272.2 | 0.42 (VI) |
| 5 | 83 | 50 | EtOH / AcOEt | 277.0-278.1 | 0.37 (I) |
| 6 | 93 | 50 | MeOH / AcOEt | 287.0-287.6 | 0.56 (VI) |

^aLos sistemas de elusión se pueden consultar en el **Anexo A**.

Tabla 5. Propiedades físicas de los compuesto intermediarios.

| COMPUESTO | RENDIMIENTO CRUDO (%) | RENDIMIENTO CRISTALIZADO (%) | SISTEMA DE CRISTALIZACIÓN | PUNTO DE FUSIÓN (°C) | <i>R_f</i> (Sistema) ^a |
|-----------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------|---|
| 8 | 98 | 90 | EtOH | 76.0-76.7 | 0.68 (I) |
| 9 | 99 | 95 | MeOH-Agua | 108.6-109.5 | 0.52 (I) |
| 10 | 94-97 | 80 | Tolueno | 114.4-114.8 | 0.38 (II) |
| 11 | 91 | 60 | MeOH | 141.6-142.2 | 0.68 (I) |
| 12 | 82 | 84 | EtOH-AcOEt | 222.7-223.6 | 0.49 (I) |
| 13 | 99 | <i>Nd</i> | <i>Nd</i> | <i>Nd</i> | <i>Nd</i> |
| 14 | 91 | 74 | EtOH-Agua | 151.8-153.3 | 0.48 (II) |
| 15 | 96 | 48 | AcOEt-EtOH | 319-320 | 0.13 (II) |
| 17 | 86 | 42 (columna) | Hex-AcOEt | 124.7-125.5 | 0.52 (III) |
| 18 | 86 | 22 (columna) | Hex-AcOEt | 102.2-103.1 | 0.43 (III) |
| 19 | 95 | 80 | EtOH-AcOEt | 307.0-308.1 | 0.23 (II) |
| 20 | 100 | 80 | EtOH | 241.2-242.3 | 0.16 (II) |

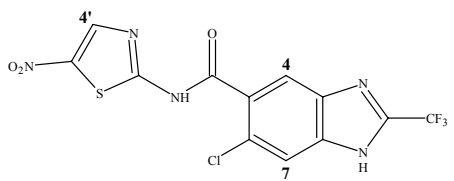
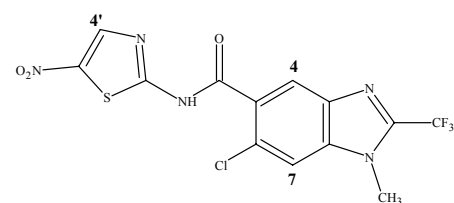
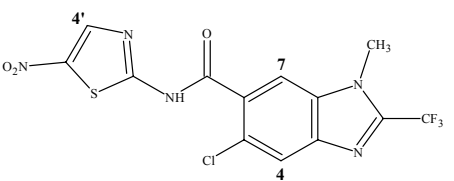
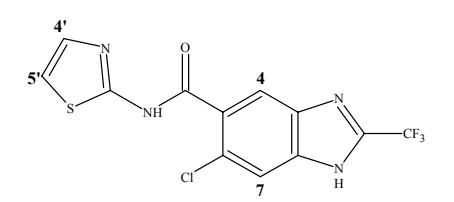
^aLos sistemas de elusión se pueden consultar en el **Anexo A**.

8.1.2. CONSTANTES ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

En la **Tabla 6** se resume las constantes espectroscópicas (IR, RMN ¹H) y espectrométricas (EM) determinadas para los compuestos finales. Mientras la elucidación espectroscópica y espectrométrica de los intermediarios se muestran en la **Tabla 7**. Los espectros citados en el presente capítulo se numeraron y se pueden consultar en el Anexo B.

Los símbolos empleados en RMN ¹H son los siguientes: *J*, constantes de acoplamiento; para las señales observadas, s = simple, d = doble, dd = doble de doble, t = triple, c = cuádruple, m = múltiple compleja, sa = simple amplia. La simbología empleada en EM es: m/z (masa/carga), IE (Impacto Electrónico), ID (Introducción Directa), CG (Cromatografía de Gases), M⁺ (ión molecular), M+1, M+2, M+4 (picos isotópicos) y pb (pico base).

Tabla 6. Constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H) y espectrométricas (EM) de los compuestos finales

| COMPUESTO | SEÑALES |
|--|---|
|  <p>6(5)-Cloro-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5(6)-carboxamida (1)</p> | <p>IR. Espectro 1, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3378 (-NH-), 3149 (C-H aromático), 1660 (N-C=O), 1542 y 1307 (-NO₂), 1261 a 1100 (-CF₃), 1009 (C-Cl), 739 (C-S).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 2, (TMS, DMSO-d_6) δ (ppm): 7.987 (s, 1H, H-7), 8.174 (s, 1H, H-4), 8.703 (s, 1H, H-4'), 13.979 (sa, 2H, Int. D₂O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 3, FAB+/ID, m/z: 392 (M+1, 31%), (M+2, 40%); 247 (M-144, 74%); 73 (M-319, 100%).</p> |
|  <p>6-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (2)</p> | <p>IR. Espectro 4, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3134 (-NH-), 2930 (-CH₃), 1691 (N-C=O), 1541 y 1353 (-NO₂), 1183 a 1103 (-CF₃), 1088 (C-Cl), 631 (C-S).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 5, (TMS, DMSO-d_6) δ (ppm): 4.010 (s, 3H, $J=1.2$ Hz, -CH₃), 8.210 (d, 1H, $J_p=0.6$ Hz, H-7), 8.260 (d, 1H, $J_p=0.3$ Hz, H-4), 8.710 (s, 1H, H-4'), 13.803 (sa, 2H, Int. D₂O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 6, FAB+/CG, m/z: (M+2, 40%); 406 (M+1, 68%); 261 (M-145, 89%); 154 (M-252, 100%).</p> |
|  <p>5-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxamida (3)</p> | <p>IR. Espectro 7, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3431 (-NH-), 3110 (C-H aromático), 2927 (-CH₃), 1640 (N-C=O), 1544 y 1351 (-NO₂), 1247 a 1174 (-CF₃), 1096 (C-Cl), 666 (C-S).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 8, (TMS, DMSO-d_6) δ (ppm): 4.016 (s, 1H, -CH₃), 8.130 (s, 1H, H-4), 8.364 (s, 1H, H-7), 8.727 (s, 1H, H-4'), 13.844 (sa, 2H, Int. D₂O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 9, FAB+/CG, m/z: (M+2, 38%); 406 (M+1, 81%); 261 (M-145, 100%).</p> |
|  <p>6(5)-Cloro-<i>N</i>-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5(6)-carboxamida (4)</p> | <p>IR. Espectro 10, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3377 (-NH-), 3116 (C-H aromático), 1672 (N-C=O), 1235 a 1154 (-CF₃), 1049 (C-Cl), 702 (C-S).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 11, (TMS, Acetona-d_6) δ (ppm): 7.212 (d, $^3J=3.6$ Hz, 1H, H-5'); 7.303 (d, $^3J=3.6$ Hz, 1H, H-4'), 7.935 (s, 1H, H-7), 8.151 (s, 1H, H-4), 11.810 (sa, 1H, Int. D₂O, -NHCO-), 13.030 (sa, 1H, Int. D₂O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 12, IE/ID, m/z: 348 (M+2, 37%); 346 (M+, 4%); 311 (M-35, 45%); 247 (M-99, 100%); 219 (M-127, 15%); 150 (M-196, 14%).</p> |

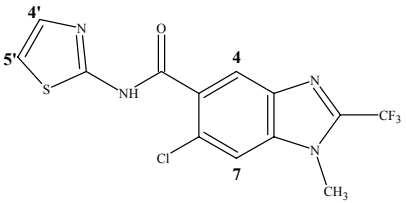
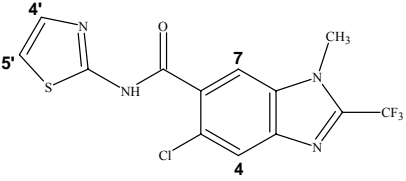
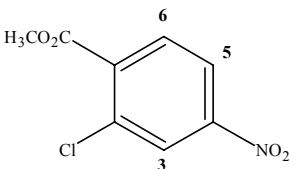
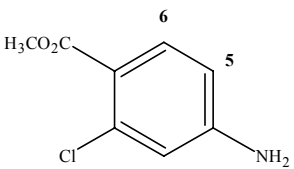
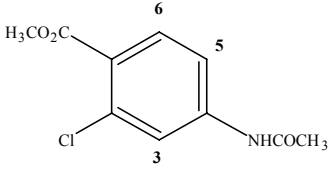
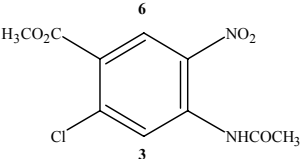
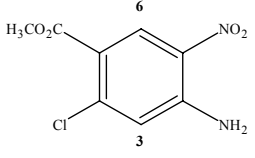
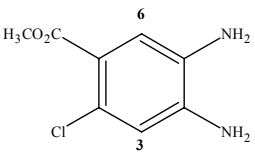
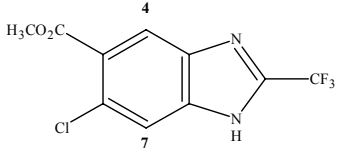
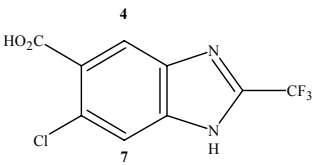
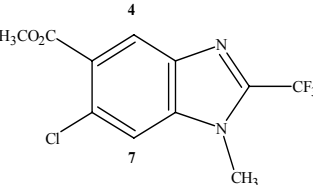
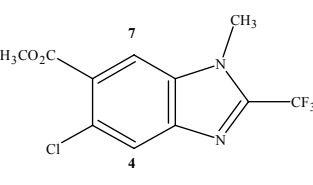
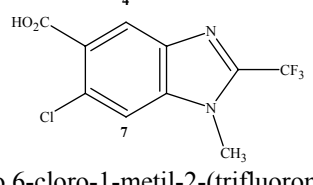
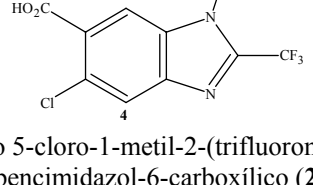
| | |
|--|--|
|  <p>6-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (5)</p> | <p>IR. Espectro 13, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3439 (-NH-), 3148 (C-H aromático), 1679 (N-C=O), 1213 a 1111 (-CF₃), 1087 (C-Cl), 713 (C-S).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 14, (TMS, DMSO-d₆) δ (ppm): 4.000 (s, 1H, -CH₃); 7.322 (d, ³<i>J</i>=3.6 Hz, 1H, H-5'); 7.548 (d, ³<i>J</i>=3.6 Hz, 1H, H-4'), 8.140 (s, 1H, H-7), 8.154 (s, 1H, H-4), 12.783 (sa, 1H, Int. D₂O, -NHCO-).</p> <p>EM. Espectro 15, IE/CG, <i>m/z</i>: 362 (M+2, 33%); 360 (M+, 3%); 325 (M-35, 27%); 261 (M-99, 100%); 233 (M-127, 6%); 164 (M-196, 11%).</p> |
|  <p>5-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxamida (6)</p> | <p>IR. Espectro 16, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3164 (-NH-), 3112 (C-H aromático), 2781 (-CH₃), 1671 (N-C=O), 1237 a 1101 (-CF₃), 1085 (C-Cl), 719 (C-S).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 17, (TMS, DMSO-d₆) δ (ppm): 4.015 (s, 1H, -CH₃); 7.339 (d, ³<i>J</i>=2.7 Hz, 1H, H-5'); 7.556 (d, ³<i>J</i>=2.7 Hz, 1H, H-4'), 8.076 (d, <i>J_p</i>=0.3 Hz, 1H, H-4), 8.260 (d, <i>J_p</i>=0.3 Hz, 1H, H-7), 12.793 (sa, 1H, Int. D₂O, -NHCO-).</p> <p>EM. Espectro 18, IE/ID, <i>m/z</i>: 360 (M+, 1%); 325 (M-35, 52%); 261 (M-99, 100%); 233 (M-127, 14%); 164 (M-196, 21%).</p> |

Tabla 7. Constantes espectroscópicas (IR, RMN¹H) y espectrométricas (EM) de los compuestos intermedios

| COMPUESTO | SEÑALES |
|---|--|
|  <p>2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (8)</p> | <p>IR. Espectro 19; pastilla (KBr) cm^{-1}: 3099 (C-H aromático), 2965 (-CH₃), 1720 (C=O), 1528 y 1356 (Ar-NO₂), 1297 (C-O), 1046 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 20, (TMS, Acetona-d₆) δ (ppm): 3.967 (s, 3H, -CO₂CH₃); 8.089 (dd, <i>J_o</i>=8.4 Hz, <i>J_p</i>=0.3 Hz, 1H, H-6); 8.302 (dd, <i>J_o</i>=8.4 Hz, <i>J_m</i>=2.1 Hz, 1H, H-5); 8.362 (dd, <i>J_m</i>=2.1 Hz, <i>J_p</i>=0.3 Hz, 1H, H-3).</p> <p>EM. Espectro 21, IE/ID, <i>m/z</i>: 217(M+2, 35%); 215 (M+, 40%); 184 (M-31, 100%).</p> |
|  <p>4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (9)</p> | <p>IR. Espectro 22, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3427, 3337 y 3223 (Ar-NH₂), 3003 (C-H aromático), 2952 (-CH₃), 1702 (C=O), 1264 (C-O), 1043 (C-Cl)</p> <p>RMN ¹H. Espectro 23, (TMS, CDCl₃) δ (ppm): 3.862 (s, 3H, -CO₂CH₃); 4.104 (s, 2H, int. D₂O, NH₂); 6.523 (dd, <i>J_o</i>=8.4 Hz, <i>J_m</i>=2.1 Hz, 1H, H-5); 6.696 (d, <i>J_m</i>=2.4 Hz, 1H, H-3); 7.775 (d, <i>J_o</i>=8.7 Hz, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 24, IE/ID, <i>m/z</i>: 187(M+2, 32%); 185 (M+, 60%); 154 (M-31, 100%); 126 (M-59, 11%).</p> |

| | |
|--|---|
|  <p>4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (10)</p> | <p>IR. Espectro 25, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3263 y 1592 (NH), 3107 (C-H aromático), 2947 (-CH₃), 1725 (C=O de éster), 1677 (N-C=O), 1251 (C-O de éster), 1045 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 26, (TMS, CDCl₃) δ (ppm): 2.208 (s, 3H, -COCH₃); 3.910 (s, 3H, -CO₂CH₃); 7.490 (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_m=2.1$ Hz, 1H, H-5); 7.714 (d, $J_m=1.8$ Hz, 1H, H-3); 7.820 (sa, 1H, int. D₂O, -NH-); 7.846 (d, $J_o=8.7$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 27, IE/ID, m/z: 229 (M+2, 33%); 227 (M+, 56%); 185 (M-42, 88%); 154 (M-73, 100%).</p> |
|  <p>4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)</p> | <p>IR. Espectro 28, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3343 y 1612 (NH), 3091 (C-H aromático), 2953 (-CH₃), 1732 (C=O de éster), 1715 (N-C=O), 1567 y 1336 (Ar-NO₂), 1293 (C-O de éster), 1122 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 29, (TMS, CDCl₃) δ (ppm): 2.334 (s, 3H, -COCH₃); 3.960 (s, 3H, -CO₂CH₃); 8.827 (s, 1H, H-3); 9.058 (s, 1H, H-6); 10.523 (s, 1H, int. D₂O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 30, IE/ID, m/z: 274 (M+2, 35%); 272 (M+, 17%); 230 (M-42, 100%); 226 (M-46, 20%); 199 (M-73, 76%).</p> |
|  <p>4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (12)</p> | <p>IR. Espectro 31, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3453 y 3348 (Ar-NH₂), 3245 (C-H aromático), 2950 (-CH₃), 1707 (C=O de éster), 1627 (C=C), 1549 (Ar-NO₂), 1286 (C-O-C de éster).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 32, (TMS, CDCl₃) δ (ppm): 3.912 (s, 3H, -CO₂CH₃); 6.372 (sa, 2H, int. D₂O, -NH₂); 6.915 (s, 1H, H-3); 8.832 (s, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 33, IE/ID, m/z: 232 (M+2, 34%); 230 (M+, 71%); 199 (M-31, 100%); 153 (M-77, 31%).</p> |
|  <p>4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (13)</p> | <p>IR. Espectro 34, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3440, 3400 (Ar-NH₂), 3355 (C-H aromático), 2952 (-CH₃), 1708 (C=O de éster), 1215 (C-O de éster), 1117 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 35, (TMS, DMSO-d₆) δ (ppm): 3.702 (s, 3H, -CO₂CH₃); 4.812 (sa, 1H, int. D₂O, -NH₂); 5.492 (sa, 1H, int. D₂O, -NH₂); 6.536 (s, 1H, H-3); 7.105 (s, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 36, IE/CG, m/z: 202(M+2, 33%); 200 (M+, 100%); 169 (M-31, 90%); 141 (M-59, 30%).</p> |
|  <p>6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (14)</p> | <p>IR. Espectro 37, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3246 (-NH-), 2964 (-CH₃), 1707 (C=O de éster), 1303 (C-O de éster), 1242 a 1101 (-CF₃), 1013 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 38, (TMS, Acetona-d₆) δ (ppm): 3.929 (s, 3H, -CO₂CH₃); 7.883 (s, 1H, H-7); 8.232 (s, 1H, H-4); 13.058 (sa, 1H, int. D₂O, -NH₂).</p> <p>EM. Espectro 39, IE/CG, m/z: 280 (M+2, 33%); 278 (M+, 43%); 259 (M-19, 5%); 247 (M-31, 100%); 219 (M-59, 13%); 150 (M-128, 10%).</p> |

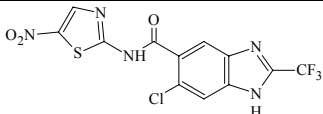
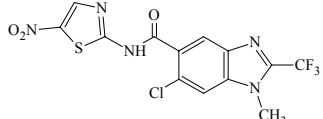
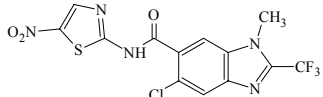
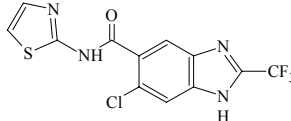
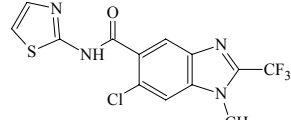
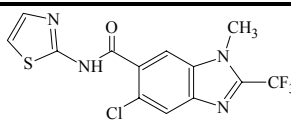
| | |
|--|--|
|  <p>Ácido 6(5)-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5(6)-carboxílico (15)</p> | <p>IR. Espectro 40, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3246 ($-\text{COOH}$), 1548 ($-\text{COOH}$), 1219 a 1138 ($-\text{CF}_3$), 1002 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 41, (TMS, DMSO-d_6) δ (ppm): 3.5 (sa, COOH y NH); 7.484 (s, 1H, H-7); 7.959 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM. Espectro 42, FAB+/ID m/z: 265 (M+1, 6%); 176 (M-89, 100%); 153 (M-111, 72%).</p> |
|  <p>6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)</p> | <p>IR. Espectro 43, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3085 (C-H aromático), 2961 ($-\text{CH}_3$), 1715 (C=O de éster), 1278 (C-O de éster), 1222 a 1085 ($-\text{CF}_3$), 1009 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 44, (TMS, Acetona-d_6) δ (ppm): 3.929 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4.107 (c, $J=1.2$ Hz, 3H, $-\text{NCH}_3$); 7.952 (d, $J_p=0.3$ Hz, 1H, H-7); 8.264 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM. Espectro 45, IE/ID, m/z: 294 (M+2, 33%); 292 (M+, 42%); 273 (M-19, 4%); 261 (M-31, 100%); 233 (M-59, 9%), 164 (M-128, 14%).</p> |
|  <p>5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (18)</p> | <p>IR. Espectro 46, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3101 (C-H aromático), 2954 ($-\text{CH}_3$), 1728 (C=O de éster), 1267 (C-O de éster), 1228 a 1117 ($-\text{CF}_3$), 1096 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 47, (TMS, Acetona-d_6) δ (ppm): 3.937 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4.130 (c, $J=1.2$ Hz, 3H, $-\text{NCH}_3$); 7.931 (d, $J_p=0.6$ Hz, 1H, H-4); 8.210 (d, $J_p=0.6$ Hz, 1H, H-7).</p> <p>EM. Espectro 48, IE/CG, m/z: 294(M+2, 32%); 292 (M+, 75%); 273 (M-19, 7%); 261 (M-31, 100%); 233 (M-59, 15%), 164 (M-128, 18%).</p> |
|  <p>Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)</p> | <p>IR. Espectro 49, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 2890 ($-\text{COOH}$), 2779 ($-\text{CH}_3$), 1717 ($-\text{COOH}$), 1230 a 1104 ($-\text{CF}_3$), 1089 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 50, (TMS, Acetona-d_6) δ (ppm): 3.978 (d, $J=1.2$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$); 8.105 (s, 1H, H-7); 8.233 (s, 1H, H-4); 13.363 (sa, 1H, Int.D_2O, -OH).</p> <p>EM. Espectro 51, IE/CG, m/z: 280 (M+2, 32%); 278 (M+, 100%); 261 (M-17, 89%); 233 (M-45, 10%); 164 (M-114, 17%).</p> |
|  <p>Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (20)</p> | <p>IR. Espectro 52, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 2898 ($-\text{COOH}$), 2609 ($-\text{CH}_3$), 1716 ($-\text{COOH}$), 1230 a 1161 ($-\text{CF}_3$), 1087 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 53, (TMS, DMSO-d_6) δ (ppm): 4.006 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 8.016 (s, 1H, H-4); 8.278 (s, 1H, H-7); 13.543 (sa, 1H, Int.D_2O, -OH).</p> <p>EM. Espectro 54, IE/ID, m/z: 280 (M+2, 36%); 278 (M+, 100%); 261 (M-17, 63%); 233 (M-45, 13%); 164 (M-114, 22%).</p> |

8.2. RESULTADOS DE LA PARTE BIOLÓGICA

8.2.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FINALES

Los resultados obtenidos mediante la realización de pruebas de susceptibilidad biológica *in vitro* de los compuestos **1-6** contra los protozoarios *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. intestinalis*, se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultados de la evaluación *in vitro* de los compuestos finales (**1-6**)

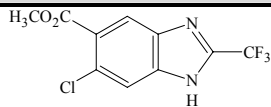
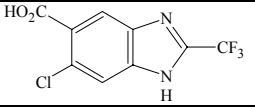
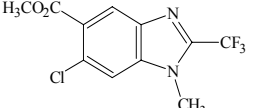
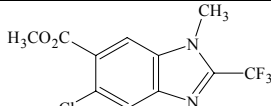
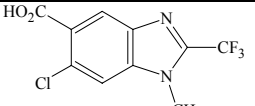
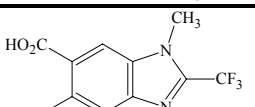
| COMPUESTO | FORMULA MOLECULAR | CI ₅₀ (μM) | | |
|------------|---|------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | <i>G. intestinalis</i> | <i>E. histolytica</i> | <i>T. vaginalis</i> |
| 1 |  | 0.203 | 0.06 | 0.107 |
| 2 |  | 0.021 | 0.006 | 0.041 |
| 3 |  | 0.021 | 0.011 | 0.023 |
| 4 |  | 0.143 | 0.151 | 0.195 |
| 5 |  | 0.026 | 0.018 | 0.069 |
| 6 |  | 0.028 | 0.055 | 0.086 |
| ABZ | | 0.037 | 56.6 | 1.592 |
| NTZ | | 0.013 | 0.055 | 0.11 |
| MTZ | | 1.228 | 0.35 | 0.216 |

8.2.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS INTERMEDIARIOS

Debido a que los compuestos precursores de los productos finales son bencimidazoles, los cuales no tienen antecedentes de evaluación biológica, se decidió realizar la evaluación de los compuestos con el fin de obtener más datos para posteriormente poder realizar, en un futuro, una correlación estructura-actividad *in silico*.

Los resultados obtenidos mediante la realización de pruebas de susceptibilidad biológica *in vitro* de los compuestos intermediarios contra los protozoarios *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. intestinalis*, se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de la evaluación *in vitro* de los compuestos intermediarios

| COMPUESTO | FORMULA MOLECULAR | CI ₅₀ (μM) | | |
|-----------|---|------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | <i>G. intestinalis</i> | <i>E. histolytica</i> | <i>T. vaginalis</i> |
| 14 |  | 0.287 | 0.305 | 0.273 |
| 15 |  | 0.13 | 0.161 | 0.435 |
| 17 |  | 0.08 | 0.101 | 0.135 |
| 18 |  | 0.029 | 0.041 | 0.07 |
| 19 |  | 0.124 | 0.099 | 0.174 |
| 20 |  | 0.048 | 0.034 | 0.089 |
| ABZ | | 0.037 | 56.6 | 1.592 |
| NTZ | | 0.013 | 0.055 | 0.11 |
| MTZ | | 1.228 | 0.35 | 0.216 |

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

“Aunque la verdad de los hechos resplandezca, siempre se batirán los hombres en la trinchera sutil de las interpretaciones.”

Gregorio Marañón, médico y escritor español.

En el presente capítulo, al igual que en el capítulo de resultados, en una parte se abordará una discusión de los resultados químicos y, en otra, se discutirán los resultados obtenidos en las pruebas biológicas, y por último, en una tercera parte se tratará de establecer una aproximación a la relación estructura-actividad.

9.1 DISCUSIÓN DE LA PARTE QUÍMICA

9.1.1. ACERCA DE LA OBTENCIÓN DEL COMPUESTO INTERMEDIARIO: 6(5)-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXILATO DE METILO (**14**)

Para la obtención de los compuestos finales se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**7**), materia prima comercial (Aldrich), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico, con el fin de evitar problemas de solubilidad y/o reacciones secundarias en las reacciones subsecuentes. La sustitución nucleofílica procedió sin ninguna dificultad y de manera rápida; se obtuvo el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**8**) con altos rendimientos (98%). El cambio estructural se comprobó a través de la espectroscopia de RMN ^1H . El espectro mostró una señal simple a 3.967 ppm, que integró para tres hidrógenos que corresponden al metilo del éster; así mismo, el EM confirmó el peso molecular del compuesto con un pico de m/z de 215 y una abundancia relativa del 40%, así como el fragmento de m/z 184 (M-31), el cual correspondió a la pérdida del OCH_3 que originó el pico base del espectro. Así mismo, el espectro de IR dio señales características para éster a 2965 cm^{-1} (CH_3), 1720 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1297 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$).

El éster **8** se sometió a una hidrogenación catalítica empleando Ni-Raney como catalizador a temperatura ambiente, lo cual dio origen al 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**9**) con un buen

rendimiento del producto crudo. La elección del catalizador fue un aspecto importante para la preparación de este compuesto, ya que se ha visto que al usar Pd/Carbono se promueve la hidrogenólisis del cloro de la posición 2. El espectro IR mostró dos bandas amplias a 3427 y 3337 cm^{-1} característico de las aminas primarias, además de una banda adicional en los 3223 cm^{-1} , la cual corresponde a aminas primarias aromáticas, denominada resonancia de Fermi (Pretsch, et al. 2000), además de una banda delgada y de poca intensidad que fue asignada al enlace C-Cl. La espectroscopia de RMN ^1H mostró una señal amplia a 4.104 ppm que integró para 2H y desapareció cuando se intercambió con D_2O ; esta señal fue asignada a la amina. El EM mostró el ión molecular (M^+) con m/z 185 (60%) concordante con la masa molecular esperada y un pico base de m/z 154 ($\text{M}-31$) generado por la pérdida del OCH_3 ; otro dato importante que proporcionó el EM fue la presencia del átomo de cloro en $\text{M}+2$, ya que el isótopo ^{37}Cl se presenta con una abundancia relativa del 32.399%, así, si $\text{M}+2$ tiene una proporción de alrededor del 30% con respecto al ión molecular (M^+) es indicativo de la presencia de cloro en la molécula (Seibl, 1973), lo cual se comprobó en el espectro al presentar el pico 217 m/z ($\text{M}+2$, 35%), este dato confirmó que el catalizador no eliminó el Cl del compuesto **9**.

La protección del grupo amino con un acetilo generó la acetamida **10**, la cual se obtuvo a partir del compuesto **9** mediante la adición de anhídrido acético a temperatura ambiente. Esta reacción procedió rápidamente dando muy buenos rendimientos del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**10**). El espectro de IR mostró señales en 3263 y 1592 cm^{-1} que fueron asignadas al -NH- de la amida, además se observaron las bandas del carbonilo del éster en 1725 cm^{-1} y una banda característica del carbonilo de la acetamida a 1677 cm^{-1} . El espectro de RMN ^1H mostró un singulete a 2.208 ppm que integró para 3H, correspondiente al metilo de la acetanilida, así como una señal amplia a 7.820 ppm característica del N-H de la acetamida, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D_2O . En el espectro de masas se observó el ión molecular (M^+) con una relación m/z de 227 (56%) que correspondió al peso molecular esperado. El espectro también mostró señales en 185 m/z ($\text{M}-42$, 88%), el cual se generó partir de la pérdida del acetilo de la amida; el pico base del espectro apareció en una relación m/z de 154 generado a partir de la pérdida del acetilo anterior y del OCH_3 del éster.

El compuesto **10** se nitró por adición directa del ácido nítrico sobre la acetamida disuelta en H_2SO_4 entre 0° y 5°C, de esta manera se formó el ión nitronio *in situ*. En estas condiciones, la reacción procedió de forma eficiente y sin dificultades, consiguiendo obtener el 4-acetamido-2-cloro-5-

nitrobenzoato de metilo (**11**) en mayor proporción y buen rendimiento y muy poco del isómero nitrado en la posición 3, el cual se eliminó mediante cristalización fraccionada con AcOEt. El IR mostró las bandas anteriormente descritas para el compuesto **10**; a estas bandas se sumaron las bandas características del grupo nitro en 1567 y 1336 cm^{-1} . En el análisis espectroscópico de RMN ^1H se comprobó el cambio estructural ya que se perdió la complejidad de las señales del anillo aromático visto en los compuestos anteriores (sistema ABX, **Fig. 20**), apareciendo dos señales simples a 8.827 y 9.058 ppm correspondientes a los hidrógenos H-3 y H-6 del anillo aromático. El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z 272 (17%), comprobando el peso molecular esperado. El espectro también nos muestra las señales: 230 m/z (M-42, 100%) el cual se generó a partir de la pérdida del acetilo del grupo amida dando como resultado el pico base; la señal en 226 m/z (M-46, 20%) nos confirmó la presencia del grupo nitro ya que se generó por la pérdida del mismo en la molécula y el pico 199 m/z se generó a partir de la pérdida del acetilo y del OCH_3 del éster.

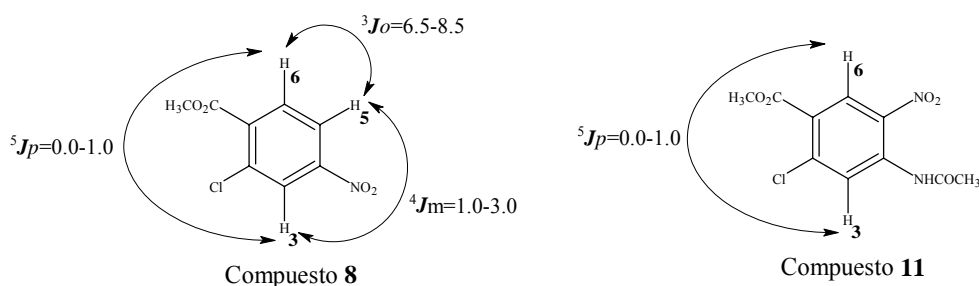


Fig. 20: Pérdida de la complejidad de señales en el espectro de RMN ^1H .

La hidrólisis básica de la acetamida **11**, empleando NaOH en MeOH a temperatura ambiente, produjo el compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**12**) con un buen rendimiento, la fácil hidrólisis de la acetamida demostró la influencia del grupo NO_2 , en posición orto, aumentando la electrofilia del $\text{C}=\text{O}$ de la acetamida. El espectro de IR mostró dos bandas en 3453 y 3348 cm^{-1} , correspondientes a la amina primaria y la desaparición de las bandas de $\text{C}=\text{O}$ de amida a 1678 cm^{-1} . En el espectro de RMN ^1H se corroboró la presencia de la amina por la aparición de un singulete amplio a 6.372 ppm, que integró para dos hidrógenos, el cual desapareció cuando se realizó el intercambio con D_2O , también, por la presencia de un singulete a 3.912 ppm que integró para 3H, confirmó la presencia del grupo éster no hidrolizado. El EM señaló la presencia del ión molecular con m/z de 230 (71%), el pico base apareció en una relación m/z de 199 (M-31) característico de la pérdida del OCH_3 ; la pérdida del grupo nitro a la relación anterior nos genera el pico con una relación m/z de 153 (M-77, 31%).

El compuesto 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**13**) se obtuvo a partir de la reducción del grupo nitro del compuesto anterior a temperatura ambiente empleando Ni-Raney como catalizador. La diamina se procesó rápidamente para evitar su oxidación, por lo que inmediatamente se sometió a la siguiente reacción. Una muestra se separó para su posterior análisis espectroscópico. En el IR se observó la desaparición de las bandas del grupo nitro a 1567 y 1336 cm^{-1} , así como la presencia de las bandas características para el grupo amino 3440, 3400 y 3335 cm^{-1} . El espectro de RMN ^1H demostró la presencia de los dos grupos aminos debido a la aparición de dos señales aisladas a 4.812 y 5.492 ppm que integraron para 2H cada una, y que desaparecieron al realizar el intercambio con D_2O . En espectrometría de masas el ion molecular (M^+) con m/z de 200 correspondió al pico base del espectro, confirmando la masa molecular del compuesto de interés, el pico isotópico $\text{M}+2$ con una abundancia relativa del 33% con respecto al M^+ nos confirmó la presencia del Cl en la molécula; el pico m/z de 169 ($\text{M}-31$, 94%) es característico de la pérdida del OCH_3 del grupo éster.

La diamina anteriormente obtenida se empleó para preparar el bencimidazol (**14**) intermediario clave para la síntesis de los compuestos finales. El 6-cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**14**) se preparó a través de la ciclocondensación de la diamina anterior con ácido trifluoacético (**Fig. 21**), empleando un método alternativo de la reacción de Phillips para la síntesis de bencimidazoles. Ya que en esta reacción no se utilizó un ácido mineral como catalizador para la ciclondensación, sino en su lugar se emplearon dos equivalentes de ácido trifluoacético, como reactivo y medio de reacción, obteniéndose buenos rendimientos.

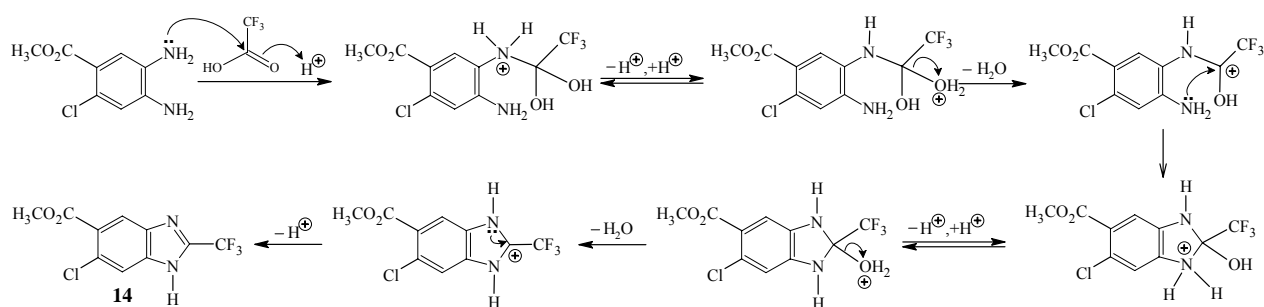


Fig. 21. Probable mecanismo de reacción para la formación del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol a partir de la *o*-fenilendiamina y el ácido trifluoroacético

La elucidación estructural de este nuevo compuesto se determinó por medio de IR, RMN ^1H y EM. El espectro de IR mostró una banda en 3246 cm^{-1} correspondiente al enlace N-H del anillo de imidazol; el grupo funcional éster dio bandas en los 2964, 1707 y 1303 cm^{-1} para los enlaces $-\text{CH}_3$,

C=O y C-O, respectivamente; también, apareció una banda múltiple a 1249 a 1101 cm^{-1} , atribuible al enlace $-\text{CF}_3$. El espectro de RMN ^1H mostró las siguientes señales: a 3.929 ppm un singlete que integró para tres hidrógenos, correspondiente al metilo del grupo éster; a 7.883 y 8.232 ppm dos singletes, los cuales integraron para un H cada uno, que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, y, por último, un singlete amplio en 13.058 ppm, el cual integró para un H y desapareció en el intercambio con D_2O , asignado al hidrógeno unido al nitrógeno del anillo de imidazol. El EM mostró el ión molecular (M^+) en una relación m/z de 278 con una abundancia relativa del 43%, concordante con el peso molecular esperado; el pico isotópico $\text{M}+2$ mostró una abundancia del 33%, indicativo de la presencia de un cloro en la molécula. La fragmentación se observó en los siguientes picos: en 259 m/z ($\text{M}-19$, 5%), correspondiente a la pérdida de un átomo de fluor del grupo trifluorometilo; el pico base 247 m/z ($\text{M}-31$, 100%), originado tras la pérdida característica del OCH_3 del grupo éster. En la posterior fragmentación se perdió el C=O del éster, dando un pico con una relación de 219 m/z ($\text{M}-59$, 13%); el siguiente paso de la fragmentación anterior fue la pérdida del grupo trifluorometilo, dado en una relación m/z de 150 ($\text{M}-128$, 10%).

9.1.2. *OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS FINALES: 6(5)-CLORO-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (1) Y SU ANÁLOGO NO NITRADO (4)*

Para la obtención de los compuestos finales **1** y **4** se partió del intermediario **14** previamente sintetizado. El primer paso consistió en la obtención del ácido 6-cloro -2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**15**) mediante la hidrólisis alcalina del compuesto **14** con NaOH en MeOH y reflujo a 60 °C durante cuatro horas, lo que es indicativo de la estabilidad de grupo éster. Cabe mencionar que el compuesto tiene un intervalo de precipitación estrecho ya que dependiendo del pH va a presentar dos formas con carga, por un lado tiene el nitrógeno del anillo de imidazol el cual puede aceptar un protón (H^+) a un pH ácido y por el otro extremo se encuentra el ácido carboxílico que puede ceder un H^+ a un pH básico, teniendo cierta similitud con los aminoácidos. El ácido esperado (**15**) se logró precipitar a un pH cercano a 4 y se pudo purificar por recristalización con EtOH/AcOEt, dando un sólido de color blanco.

El espectro de IR mostró una banda ancha en 3246 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H del ácido carboxílico además de una banda en 1548 cm^{-1} del carbonilo del ácido; también se observó una banda ancha múltiple de 1219 a 1138 cm^{-1} atribuible al enlace $-\text{CF}_3$. El espectro de RMN ^1H mostró

las siguientes señales: a 7.484 y 7.959 ppm dos singuletes, los cuales integran para un H cada uno, y corresponden a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, cabe mencionar que no se observaron las señales para los hidrógenos del ácido y del -NH- del anillo de imidazol. El EM mostró el ión molecular (M^+) en una relación m/z de 264 con una abundancia relativa del 6%, concordante con el peso molecular esperado.

Para la síntesis de los compuestos finales **1** y **4**, el ácido carboxílico **15** se activó con cloruro de tionilo en condiciones anhidras, empleando como disolvente tolueno. La reacción procedió de manera rápida y el producto obtenido, el cloruro de ácido (**16**), se empleó de forma inmediata en la siguiente reacción; esto debido a su naturaleza altamente reactiva, por lo cual el disolvente y el cloruro de tionilo restante se codestilaron juntos dejando el producto en el matraz el cual se empleo de forma inmediata.

El producto anterior se hizo reaccionar inmediatamente con el 2-amino-5-nitrotiazol o con el 2-aminotiazol, dependiendo del producto final que a obtener. En esta reacción también fue importante mantener las condiciones anhidras debido a que las trazas de agua que pudieran llevar el disolvente o los reactivos podrían reaccionar con el cloruro de ácido regenerando el ácido carboxílico, y por lo tanto bajando el rendimiento de la reacción.

La sustitución nucleofílica con el 2-amino-5-nitrotiazol llevó a la formación del compuesto final **1**, el 6-cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida, un producto sólido de color amarillo, con un buen rendimiento en crudo (95%). La elucidación estructural mediante el espectro de IR mostró una banda en 3378 cm^{-1} correspondiente a los enlaces N-H de la molécula; una banda débil a 3149 cm^{-1} asociada al enlace C-H aromático, una banda en 1660 cm^{-1} fue asignada al grupo carbonilo de la amida (N-C=O); el grupo funcional NO_2 mostró señales a los 1542 y 1307 cm^{-1} ; además, aparece una banda ancha múltiple de 1261 a 1100 cm^{-1} atribuible al enlace $-\text{CF}_3$; así como las señales a 1009 y 739 cm^{-1} , las cuales corresponden a los enlaces C-Cl y C-S respectivamente. El espectro de RMN ^1H mostró las siguientes señales: en 7.987 y 8.174 ppm dos singuletes, los cuales integraron para un H cada uno, que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, un singulte en 8.703 ppm el cual integró para un H y corresponde al hidrógeno del anillo de tiazol, por ultimo, un singulete amplio en 13.979 ppm, el cual integró para dos H y desapareció cuando se realizó el intercambio con D_2O , este par de hidrógenos se asignó al nitrógeno del anillo de imidazol y al grupo carboxamida. El EM mostró el ión molecular (M^+) en una relación m/z de 391 con una abundancia relativa del 31%, el cual fue

concordante con el peso molecular esperado; el pico isotópico M+2 mostró una abundancia del 40%, lo cual es indicativo de la presencia de isótopos de cloro y de azufre. La fragmentación de la molécula se observó en el pico de m/z 247 (M-144, 74%), correspondiente a la pérdida del 2-amino-5-nitrotiazol mediante la ruptura del enlace carboxamida.

El producto final **4** se obtuvo por la reacción entre el cloruro de acilo **16** y el 2 aminotiazol, lo que llevó a la formación del 6-cloro-*N*-(1,3-tiazol-2il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**4**); dando un producto sólido de color blanco crema que posteriormente se recristalizó en etanol dando un sólido cristalino de color blanco.

El Espectro de IR mostró una banda en 3378 cm^{-1} correspondiente a los enlaces N-H de la molécula; una banda débil a 3149 cm^{-1} asociada el enlace C-H aromático, una banda en 1660 cm^{-1} fue asignada al grupo carbonilo de la amida (N-C=O); el grupo funcional NO₂ mostró señales a los 1542 y 1307 cm^{-1} ; además apareció una banda ancha múltiple de 1261 a 1100 cm^{-1} atribuible al enlace -CF₃; así como las señales a 1009 y 739 cm^{-1} , las cuales correspondieron a los enlaces C-Cl y C-S respectivamente. El espectro de RMN ¹H mostró las siguientes señales: en 7.987 y 8.174 ppm dos singuletes, los cuales integraron para un H cada uno, que correspondieron a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, un singulte en 8.703 ppm el cual integró para un hidrógeno, el del anillo de tiazol; por último, un singulete amplio en 13.979 ppm, el cual integró para dos H y desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O, este par de hidrógenos se asignó al nitrógeno del anillo de imidazol y al grupo carboxamida. El EM mostró el ión molecular (M+) en una relación m/z de 346 con una abundancia relativa del 4%, el cual fue concordante con el peso molecular esperado; el pico isotópico M+2 mostró una abundancia del 37%, el cual fue indicativo de la presencia de isótopos de cloro y de azufre. La fragmentación de la molécula se observó en el pico de m/z 247 (M-99, 100%) correspondiente a la pérdida del 2-amino-tiazol mediante la ruptura del enlace carboxamida, generando el pico base del espectro.

Cabe observar que las dos reacciones de sustitución, que dieron origen a los compuestos finales **1** y **4**, se llevaron a cabo en diferentes tiempos de reacción, debido a la influencia del sustituyen en el anillo de tiazol. En la reacción de formación de la carboxamida **4** con el 2-aminotiazol el tiempo requerido fue de dos horas, ya que el par de electrones del nitrógeno se encuentra, hasta cierto punto, más disponible para llevar acabo el ataque al grupo carbonilo y dar la sustitución nucleofílica (**Fig. 22A**); en cambio, al llevar acabo la sustitución nucleofílica entre el cloruro de acilo y el 2-amino-5-nitrotiazol, para dar la carboxamida **1**, el tiempo de reacción fue de alrededor de 12 horas

(una noche) de reacción, esto se debió en gran medida a que el grupo nitro en la posición 5 del anillo de tiazol es un grupo electrotractor (ya que el nitrógeno que está directamente unido al carbono en la posición 5 posee una carga positiva formal y atrae electrones), lo que compromete al par de electrones libres del átomo de nitrógeno del grupo amino en 2 que entra en resonancia, como se observa en la **fig. 22B**.

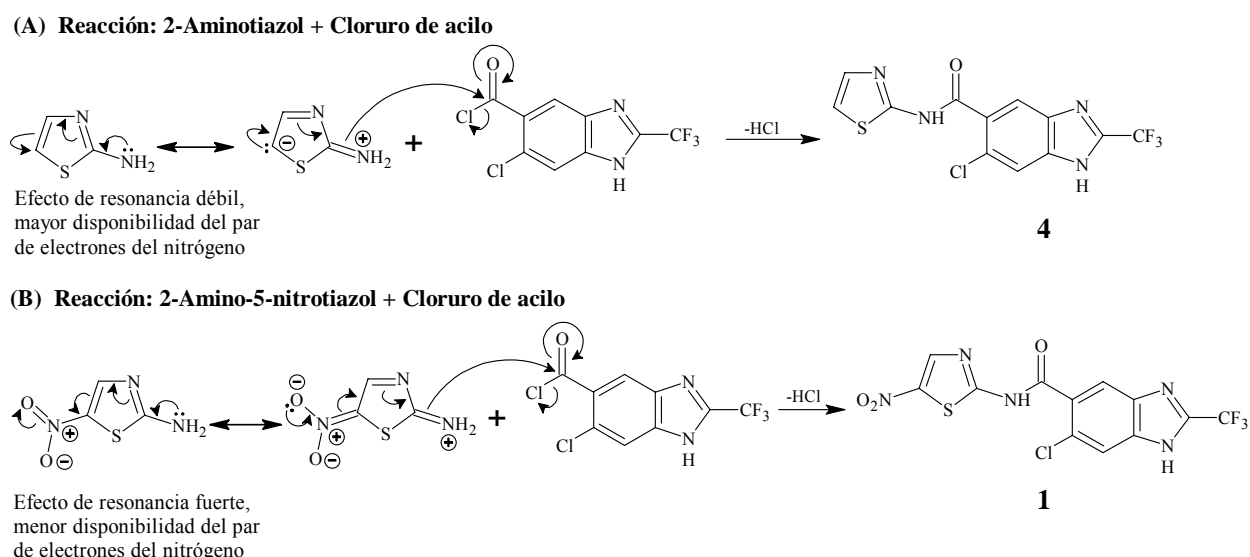


Fig. 22. Efecto de resonancia del grupo nitro que afectan la velocidad de reacción.

9.1.3. OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTO FINALES: 6(5)-CLORO-1-METIL-N-(5-NITRO-1,3-TIAZOL-2-IL)-2-(TRIFLUOROMETIL)-1H-BENCIMIDAZOL-5(6)-CARBOXAMIDA (2 y 3) Y SUS ANÁLOGOS NO NITRADOS (5 y 6)

Para la síntesis de los compuestos finales **5** y **6** se partió del intermediario bencimidazólico **14**, previamente sintetizado. El primer paso consistió en la metilación de **14** con yoduro de metilo en medio alcalino, con lo que se obtuvo una mezcla de regioisómeros: el 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**17**) y el 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**18**), esto debido al efecto tautomérico intrínseco que posee el anillo de bencimidazol cuando esta sustituido en las posiciones 5 y/ó 6 (**Fig. 22**). La mezcla de isómeros obtenida se separó mediante la técnica de cromatografía en columna modalidad “Flash”; mediante el empleo de esta técnica se logro separar el 42 % del compuesto puro con el $R_f = 0.52$ y el 22% del compuesto con el $R_f = 0.43$.

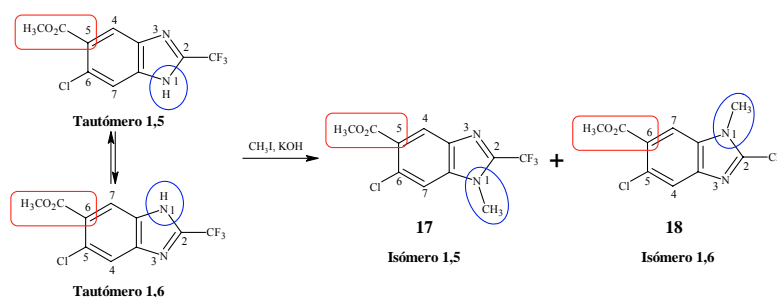


Fig. 23. Efecto tautomérico de la molécula de bencimidazol que origina los dos isómeros

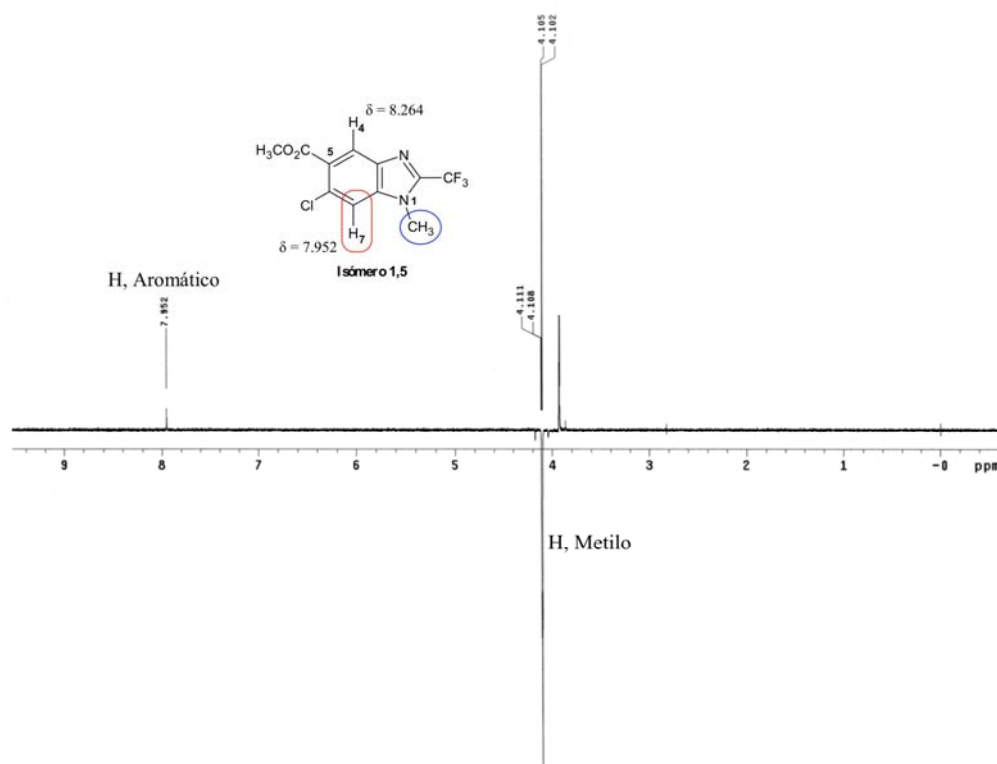
Las técnicas convencionales de elucidación estructural no permitieron diferenciar los compuestos separados ya que ambos isómeros presentaron espectros similares. El espectro de IR mostró la banda del enlace N-H del anillo de bencimidazol en 3085 (3101)¹ cm⁻¹; en 2961 (2954) cm⁻¹ apareció la banda asignada al grupo metilo, tanto del éster como el *N*-metilo del anillo de imidazol; el grupo funcional éster dio bandas 1715 (1728) y 1278 (1228) cm⁻¹ para los enlaces C=O y C-O respectivamente y la presencia de una banda ancha múltiple de 1222-1085 (1267-1096) comprobó la presencia del grupo 2-trifluorometilo.

El espectro de RMN ¹H mostró las siguientes señales: a 3.929 (3.937) ppm un singlete que integró para tres hidrógenos, correspondiente al metilo del grupo éster; en 4.107 (4.130) ppm se presentó un cuadruplete que integró para tres hidrógenos, correspondiente al *N*-metilo del anillo de imidazol, acoplado a 5 enlaces de distancia con los Fluor del CF₃. Para el compuesto con R_f = 0.52, asignado arbitrariamente como **17**, el espectro mostró dos señales: a 7.952 y 8.264 ppm, ambos singletes que integraron para un H cada uno, correspondientes a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente. Para el compuesto con R_f = 0.43, asignado arbitrariamente como **18** el espectro mostró las dos señales a 7.931 y 8.210 ppm, los cuales correspondieron a los hidrógenos aromáticos H-4 y H-7 respectivamente.

El EM mostró el ión molecular (M⁺) en una relación *m/z* de 292 con una abundancia relativa del 42 (75) %, concordante con el peso molecular esperado. En la fragmentación de ambas moléculas se observaron los siguientes picos: en 273 *m/z* (M-19), que corresponde a la pérdida de un átomo de flúor del grupo trifluorometilo; el pico base 261 *m/z* (M-31, 100%) se originó tras la pérdida característica del OCH₃ del grupo éster. La molécula posteriormente se fragmentó perdiendo el C=O del éster y dio un pico con una relación de 233 *m/z* (M-59); el siguiente paso de la fragmentación anterior fue la pérdida del grupo trifluorometilo dado en una relación *m/z* de 164 (M-128).

¹ El número fuera del paréntesis corresponde a la señal en el espectro del compuesto **17**, mientras el que esta encerrado entre paréntesis corresponde a la señal del espectro del compuesto **18**.

Debido a que los espectros no ofrecieron una certidumbre sobre la estructura de los isómeros **17** y **18**, se recurrió al experimento NOE diferencial para poder observar los acoplamientos a través del espacio a una distancia menor de 3Å. El efecto NOE o efecto nuclear Overhauser, se define como el cambio en la intensidad de la línea de resonancia de un núcleo cuando se perturba con una irradiación las transiciones de otro núcleo próximo en el espacio, pero no acoplado; con lo cual nos proporciona una interacción directa a través del espacio entre núcleos, lo que nos aporta una idea precisa de las posiciones de dichos núcleos en el espacio tridimensional de la molécula (Giménez *et al.* 1998). Con lo cual se pudo demostrar la correlación de un H del anillo bencenoide con los hidrógenos del *N*-metilo. Para el isómero con el $R_f = 0.52$, la correlación se dio entre el hidrógeno en la posición 7 del anillo de bencimidazol (H-7, 7.952 ppm) y el grupo *N*-metilo (3H, 4.107 ppm), mientras que para el isómero con el $R_f = 0.43$, esta correlación se dio entre el hidrógeno en la posición 7 del anillo de bencimidazol (H-7, 8.210 ppm) y los hidrógenos del *N*-metilo (3H, 4.130 ppm). Estos datos permitieron establecer inequívocamente la estructura del compuesto **17**, el isómero 1,5-, como aquel en donde la correlación del *N*-CH₃ es con el hidrógeno en C-7 con menor desplazamiento en el espectro y que correspondió al compuesto con $R_f = 0.52$ (**Fig. 24**); mientras que para el compuesto **18**, el isómero 1,6-, la correlación del *N*-CH₃ fue con el hidrógeno en C-7 con mayor desplazamiento en el espectro, indicativo de que este hidrógeno está vecino al grupo carboxilo, y que correspondió al compuesto con $R_f = 0.43$ (**Fig. 25**).



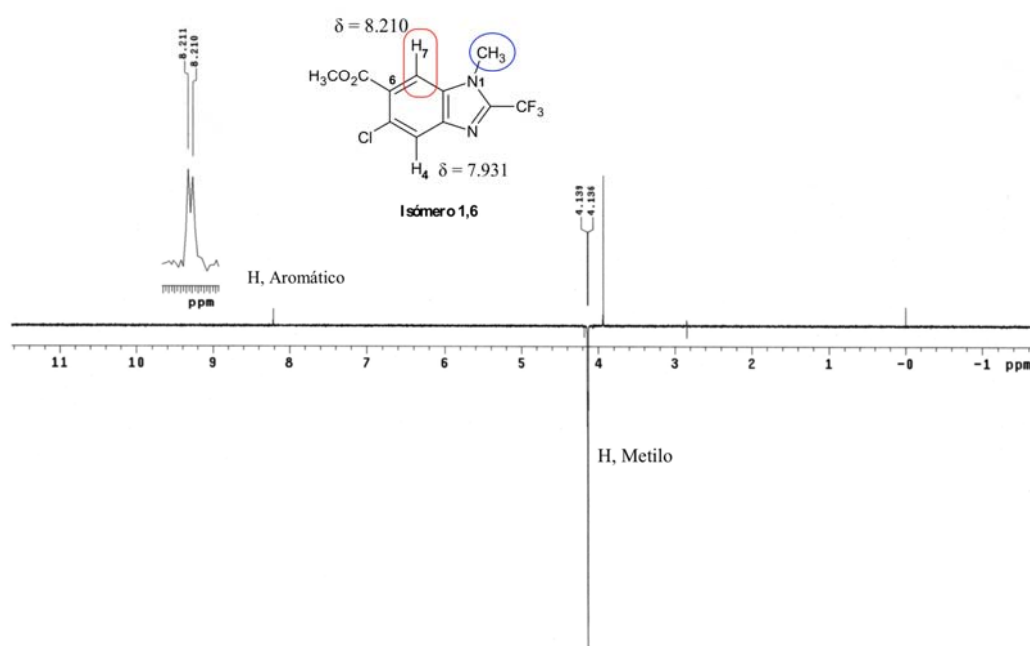


Fig 25. Espectro NOE del compuesto **18**, que corresponde al isómero 1,6.

Los siguientes pasos en la secuencia sintética para la preparación de los compuestos finales son similares a los descritos anteriormente para los compuestos finales **1** y **4**; por lo cual los procedimientos son similares y se realizaron a cada compuesto por separado. Así, la obtención de los ácidos 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**19**) y 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**20**), fue mediante la hidrólisis alcalina de los compuestos **17** y **18** respectivamente, con un rendimiento superior al 90% en ambos casos. Al igual que los compuestos anteriores, la elucidación estructural no mostró una gran diferencia entre ambos compuestos presentando espectros similares.

El espectro de IR mostró una banda ancha en 2890 (2898)² cm⁻¹ correspondiente al enlace O-H del ácido carboxílico, además de una banda en 1717 (1716) cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del ácido; además, se observó una banda ancha múltiple de 1230 a 1104 (1230 a 1161) cm⁻¹ atribuible al enlace -CF₃.

El espectro de RMN ¹H mostró las siguientes señales: en 3.978 ppm un singulete el cual integró para tres hidrógenos y correspondió al *N*-metilo; para el compuesto **19** se observaron dos singuletes en 8.105 y 8.233 ppm asignados a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente; para el compuesto **20** las señales a 8.016 y 8.278 ppm correspondieron a los hidrógenos aromáticos H-4 y

² El número fuera del paréntesis corresponde a la señal en el espectro del compuesto **19**, mientras el que está encerrado entre paréntesis corresponde a la señal del espectro del compuesto **20**.

H-7 respectivamente; por último, la señal que confirmó la presencia del hidrógeno del ácido carboxílico apareció en 13.363 (13.543) ppm, integró para un hidrógeno y desapareció por el intercambio con agua deuterada. Para la determinación de los isómeros nuevamente se recurrió a la técnica NOE diferencial, confirmando que el compuesto **19** es el isómero 1,5, mientras que el compuesto **20** es el isómero 1,6 (los espectros de NOE se pueden consultar en el Anexo B).

El EM mostró el ión molecular (M^+) en una relación m/z de 278 con una abundancia relativa del 100%; en ambos casos, el pico base resultó ser el ión molecular, el cual fue concordante con el peso molecular esperado. La fragmentación de ambas moléculas resultó similar, observaron los siguientes picos: la señal en 261 m/z ($M-17$) se originó tras la pérdida del-OH del ácido carboxílico; la molécula posteriormente se fragmentó perdiendo el grupo carbonilo ($C=O$) dando un pico con una relación de 233 m/z ($M-45$), el siguiente paso de la fragmentación anterior fue la pérdida del grupo trifluorometilo dado en una relación m/z de 164 ($M-114$).

Para la síntesis de los compuestos finales 6-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**2**) y el 5-cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**3**) se partió de los ácidos carboxílicos **19** y **20** respectivamente, los cuales se pusieron a reaccionar por separado con cloruro de tionilo en condiciones anhidras obteniéndose los cloruros de acilo **21** y **22**. La reacción procedió de manera rápida, el producto obtenido se procesó en condiciones anhidras y se empleó de forma inmediata en la siguiente reacción.

Los productos anteriores se hicieron reaccionar inmediatamente con 2-amino-5-nitrotiazol en condiciones anhidras. La sustitución nucleofílica del cloruro de acilo **21** con el 2-amino-5-nitrotiazol llevó a la formación del compuesto final **2**, mientras que el cloruro **22** dio el producto final **3** por tratamiento con el mismo reactivo.

El compuesto **2** se obtuvo como un sólido blanco, el cual se recrystalizó en EtOH/AcOEt para dar un producto cristalino. El compuesto puro (**2**) mostró en el espectro de IR una banda en 3134 cm^{-1} correspondiente al enlace N-H de la carboxamida; una banda débil a 2930 cm^{-1} del enlace del metilo ($-CH_3$), una banda en 1691 cm^{-1} asignada al grupo carbonilo de la amida ($N-C=O$); el grupo funcional NO_2 mostró señales en 1541 y 1353 cm^{-1} ; además, apareció una banda ancha múltiple de 1183 a 1103 cm^{-1} , atribuible al enlace $-CF_3$; así como dos señales en 1088 y 631 cm^{-1} , las cuales correspondieron a los enlaces C-Cl y C-S, respectivamente. El espectro de RMN 1H mostró las siguientes señales: los hidrógenos del grupo metilo aparecieron como un doblete con un

desplazamiento de 4.010 ppm; en 8.210 y 8.260 ppm se observaron dos singuletes, los cuales integraron para un H cada uno, asignables a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente; un singulete en 8.710 ppm, el cual integró para un hidrógeno, y correspondió al hidrógeno del anillo de tiazol; por último, un singulete amplio en 13.803 ppm, el cual integró para un H, desapareció en el intercambio con D₂O, dicha señal es característica del hidrógeno en el grupo carboxamida. Cabe señalar que el experimento NOE diferencial (**Anexo B**) mostró una interacción entre los hidrógenos del grupo metilo y el hidrógeno aromático H-7, con lo cual se confirmó que es el isómero 1,5 (metilo, carboxamida). El EM en la modalidad FAB mostró el ión molecular (M⁺) en una relación *m/z* de 406 una abundancia relativa del 68%, concordante con el peso molecular esperado; el pico isotópico M+2 mostró una abundancia del 40%, el cual es indicativo de la presencia isótopos de cloro y de azufre. La fragmentación de la molécula se observó en el siguiente pico: en 261 *m/z* (M-145, 89%) que corresponde a la pérdida del 2-amino-5-nitrotiazol mediante la ruptura del enlace carboxamida.

El compuesto **3**, obtenido a partir de los compuestos que mostraban una relación estructural 1,6- se obtuvo como un sólido amarillo, el cual se recristalizó en DMF/agua para dar un producto amarillo claro.

El compuesto mostró en el espectro de IR una banda en 3431 cm⁻¹ correspondiente al enlace N-H de la carboxamida; se observó una señal en 3110 cm⁻¹ correspondiente al enlace C-H aromático, una banda débil en 2927 cm⁻¹ correspondió al enlace del metilo (-CH₃), una banda en 1640 cm⁻¹ fue asignada al grupo carbonilo de la amida (N-C=O); el grupo funcional NO₂ mostró señales en 1544 y 1351 cm⁻¹; además, se observó una banda ancha múltiple de 1247 a 1174 cm⁻¹ atribuible al enlace -CF₃; así como las señales a 1096 y 666 cm⁻¹, las cuales correspondieron a los enlaces C-Cl y C-S respectivamente. El espectro de RMN ¹H mostró los hidrógenos del grupo metilo con un desplazamiento de 4.016 ppm; en 8.130 y 8.364 ppm aparecieron dos singuletes, los cuales integraron para un H cada uno, los hidrógenos aromáticos H-4 y H-7, respectivamente; un singulete en 8.727 ppm integró para un hidrógeno, el del anillo de tiazol; por último, un singulete amplio en 13.844 ppm integró para un H y desapareció en el intercambio con, D₂O, dicha señal es característica del hidrógeno en el grupo carboxamida. Cabe señalar que el experimento NOE diferencial (**Anexo B**) mostró una interacción entre los hidrógenos del grupo metilo y el hidrógeno aromático H-7, con lo cual se confirmó que es el isómero 1,6- (metilo, carboxamida). El EM mostró el ión molecular (M⁺) con una relación *m/z* de 405 y una abundancia relativa del 81%. La

fragmentación de la molécula se observó en el pico 261 m/z (M-145, 100%) el cual correspondió a la pérdida del 2-amino-5-nitrotiazol mediante la ruptura del enlace carboxamida.

Los productos finales **5** y **6** se obtuvieron al llevar a cabo la reacción entre los cloruros de acilo correspondientes y el 2 aminotiazol, lo que llevo a la formación del 6-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**5**) y el 5-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**); dando en ambos casos un producto cristalino de color blanco.

Para estos compuestos las señales espectroscópicas y espectrométricas son similares a las vistas para los compuestos anteriores, en el espectro de IR se observaron las mismas bandas que sus compuestos predecesores, con la excepción de las señales del grupo nitro, las cuales no aparecen en los espectros de estos compuestos (**Tabla 6**).

El espectro de RMN ^1H de ambos compuestos mostró las siguientes señales: los hidrógenos del grupo metilo aparecieron como dobletes con un desplazamiento de 4.000 ppm para el compuesto **5**, mientras que para el compuesto **6** apareció en 4.015 ppm; los hidrógenos del anillo de tiazol se observaron en 7.322 y 7.548 para el compuesto **5**, y en 7.339 y 7.556 para el compuesto **6**; los hidrógenos del sistema aromático del bencimidazol aparecieron para el compuesto **5** en 8.140 y 8.154 ppm que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, en el compuesto **6** estas señales aparecieron en 8.076 y 8.260 para los hidrógenos H-4 y H-7 respectivamente; la ultima señal apareció en 12.783 ppm para **5** y en 12.793 para **6**, dicha señal desapareció cuando se realizó el intercambio con D_2O , por lo cual corresponde al hidrógeno del grupo carboxamida. El EM en ambos casos fue similar ya que mostró las mismas señales de fragmentación solo variando los porcentajes de abundancia relativa. El ión molecular apareció con una relación m/z de 360, el cual es concordante con el peso molecular esperado para ambos compuestos; la fragmentación de la molécula se observó en los siguientes picos: el pico base se observó en ambos casos con una relación m/z de 261 (M-99) el cual corresponde a la pérdida del 2-amino-5-nitrotiazol mediante la ruptura del enlace carboxamida, esta molécula sufre una nueva fragmentación perdiendo una molécula de $\text{C}=\text{O}$ ($m/z = 233$; M-127), posteriormente vuelve a sufrir una nueva fragmentación ($m/z = 164$; M-196) originado por la pérdida del grupo trifluorometilo.

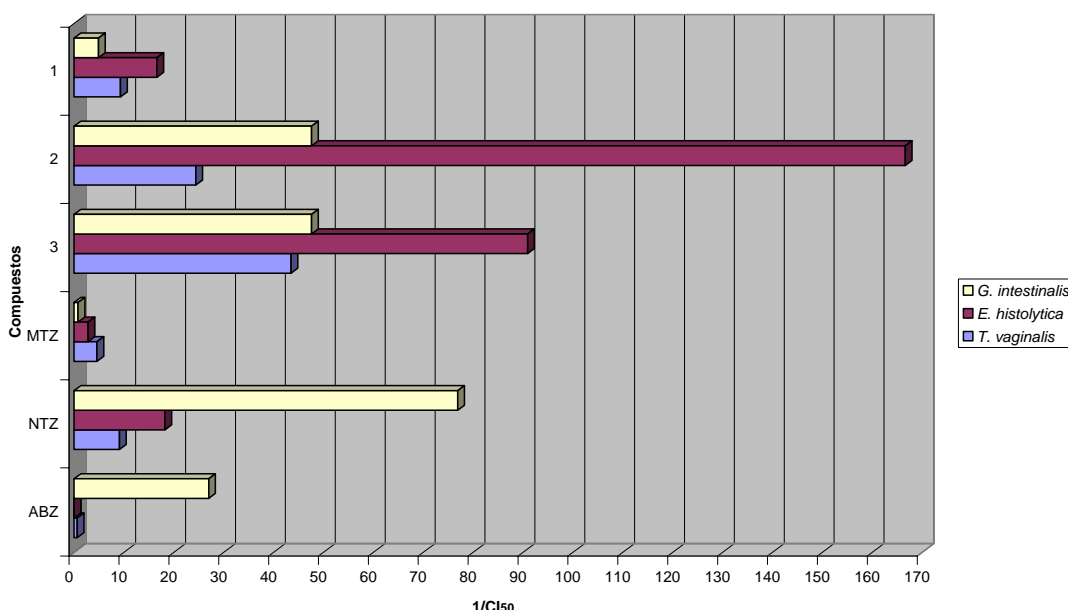
9.2. DISCUSIÓN DE LA PARTE BIOLÓGICA

9.2.1. ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LOS COMPUESTOS FINALES FRENTE A LOS PARASITOS: *G. intestinalis*, *T. vaginalis* Y *E. histolytica*

Los resultados de las pruebas *in vitro* para poder determinar el potencial antiprotozoario de la serie de compuestos diseñados, empleando como modelo biológico a los parásitos *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *E. histolytica*, se muestran en la **Tabla 8** del capítulo anterior. Con los datos mostrados podemos construir gráficas de la serie de compuestos finales sintetizados contra el inverso de la CI_{50} (Concentración inhibitoria al 50%), esto con la finalidad de poder visualizar de forma más clara la actividad de los compuestos diseñados y poder compararlos contra los compuestos de referencia, los cuales son fármacos empleados en el tratamiento contra dichos parásitos y cuya efectividad se ha demostrado por varios estudios clínicos.

9.2.1.1. Acerca de la actividad biológica de los compuestos de la serie 1

Los primeros resultados que analizaremos serán los de los compuestos de la serie 1, con los datos presentados en el capítulo de resultados podemos construir la siguiente gráfica (**Gráfica 3**)



Gráfica 3. Actividad biológica de los compuestos finales (Serie 1).

De la gráfica anterior podemos obtener información de la actividad de nuestros compuestos diseñados de forma más rápida que solo observando los datos en las tablas. La primera información que nos permite visualizar es que los tres compuestos sintetizados de la serie 1 presentan una gran actividad contra *E. histolytica*, aun mejor que los fármacos empleados como referencia, de los cuales la NTZ y el MTZ son empleados como fármacos contra dicho parásito.

De una forma mas detallada podemos observar que los tres compuestos sintetizados presentan una mejor actividad contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* que el fármaco de elección empleado para combatir dichas parasitosis, el metronidazol (MTZ). Los compuestos **1**, **2** y **3**, fueron respectivamente 6, 59 y 32 veces más potentes³ que el MTZ contra *E. histolytica*; para *G. intestinalis* fueron 6, 58 y 58 veces más potentes; mientras que para *T. vaginalis* fueron 2, 5 y 9 veces más potentes que el MTZ, respectivamente.

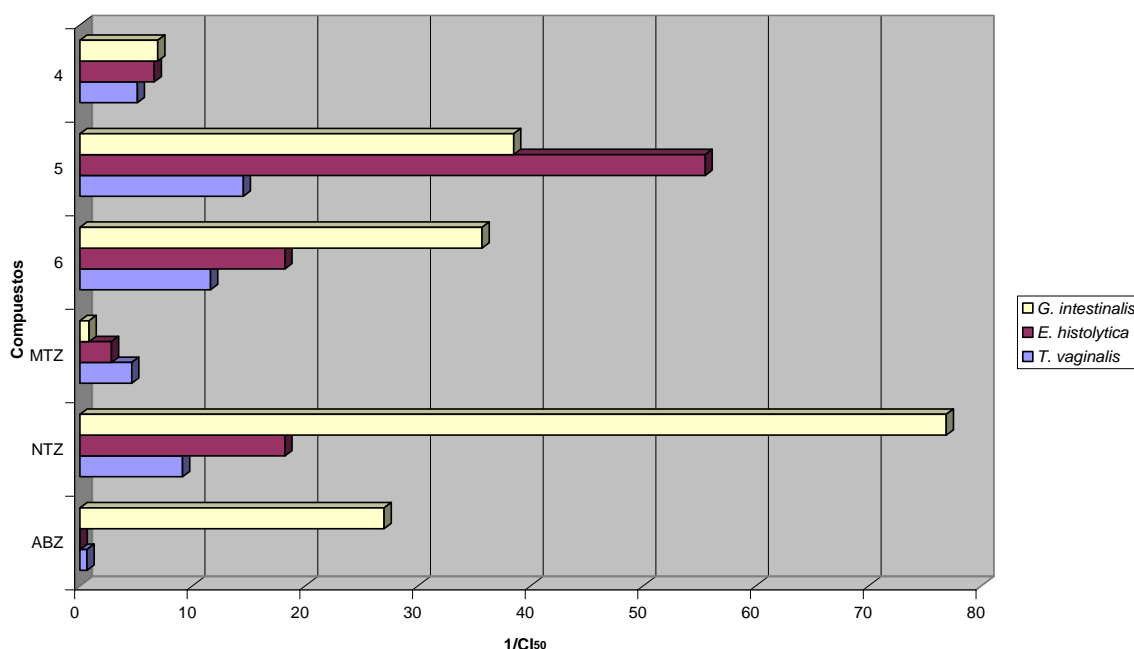
Al comparar la actividad de los compuestos preparados en esta tesis con la nitazoxanida (NTZ), fármaco empleado desde 1996 por la SSA contra varias parasitosis, los primeros fueron menos activos contra *G. intestinalis*. Al ser evaluados contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*, los compuestos mostraron una buena actividad; el compuesto **1** resultó equiparable a la actividad mostrada por dicho fármaco contra ambos parásitos, los compuestos **2** y **3** resultaron ser más potentes contra ambos parásitos que la nitazoxanida, el compuesto **2** resultó ser 9 veces más potente contra *E. histolytica* y 3 veces más contra *T. vaginalis*; mientras que el **3** fue 5 veces más potente que la nitazoxanida contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

Con lo que respecta al uso de albendazol (ABZ) como un compuestos de referencia, se debe a que este fármaco de tipo bencimidazólico se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento de la giardiosis; como se aprecia en la gráfica de actividades se puede confirmar su probable uso como una alternativa terapéutica, ya que dicho fármaco resulto más activo que el metronidazol en contra de *G. intestinalis*, aunque no resulta tener actividad alguna contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Así mismo los compuestos sintetizados **2** y **3** fueron más potentes que el albendazol contra *G. intestinalis*.

³ La potencia relativa entre dos fármacos se obtiene mediante la siguiente relación $PR = CI_{50} A / CI_{50} B$; donde A es la CI_{50} mayor con el fin de obtener un número entero de fácil interpretación.

9.2.1.2. Acerca de la actividad biológica de los compuestos de la serie 2

Como podemos ver en la **Gráfica 4**, los compuestos de la serie 2 no presentaron una tendencia marcada contra algún parásito en especial, como sucedió con los compuestos de la serie 1. El compuesto 6-cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**4**) no mostró una especificidad significativa contra alguno de los organismos de prueba. El 6-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**5**) mostró una mejor actividad contra *E. histolytica*; mientras que su isómero el 5-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**) presentó una mejor actividad contra *G. intestinalis*.



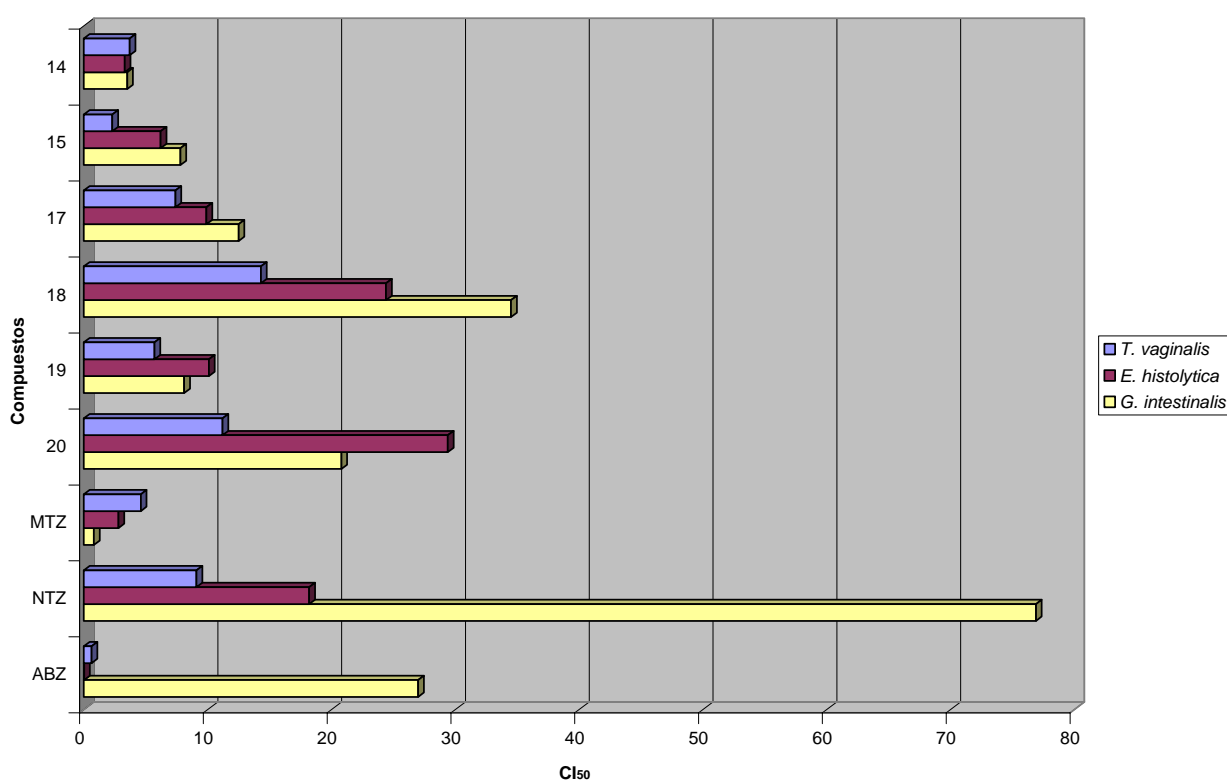
Gráfica 4. Actividad biológica de los compuestos finales (Serie 2).

Al comparar los tres compuestos de la serie 2 contra el metronidazol se observó que los compuestos mostraron una buena actividad. El compuesto **4** mostró ser 9 y 2 veces más activo que el MTZ contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*, y resultó equiparable en contra de *T. vaginalis*. El compuesto **5** reveló ser más activo que el metronidazol resultando ser 47 veces más activo contra *G. intestinalis*, 19 veces más activo contra *E. histolytica* y aproximadamente 3 veces mejor que el MTZ contra *T. vaginalis*. El compuesto **6** al igual que el compuesto anterior resultó tener una mejor actividad que el MTZ; contra *G. intestinalis* fue 44 veces más activo, contra *E. histolytica* y contra *T. vaginalis* fue respectivamente 6 y 2 veces más potente que el MTZ.

Al comparar los compuestos sintetizados contra la nitazoxanida se observa que estos tuvieron una actividad biológica muy variable. Contra *G. intestinalis* los tres compuestos no fueron mejores que la NTZ. Al ser evaluados contra *E. histolytica* se encontró que el compuesto **5** fue alrededor de 3 veces más potente que la NTZ y el compuesto **6** resultó ser equiparable, mientras que el compuesto **4** tuvo una actividad menor que la NTZ. Contra *T. vaginalis* el compuesto **4** tuvo una menor actividad que la NTZ y los compuestos **5** y **6** resultaron ser alrededor de dos veces más potentes que la NTZ en contra de *T. vaginalis*.

Con lo que respecta al albendazol los compuestos **5** y **6** resultaron ser equiparables contra *G. intestinalis*.

9.2.2. ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS FRENTE A LOS PARASITOS: *G. intestinalis*, *T. vaginalis* Y *E. histolytica*



Gráfica 5. Actividad biológica de los compuestos intermediarios.

Como podemos observar en la **Gráfica 5** vemos que la actividad los compuestos intermediarios que tiene un hidrógeno en la posición 1 (**14** y **15**), resultaron tener una actividad biológica menor a sus análogos 1-metilados, siendo estos compuestos en general equiparables a la actividad mostrada

por el metronidazol contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, con excepción del compuesto **15** que tuvo una actividad menor contra *T. vaginalis*. El ácido carboxílico **15** mostró una buena actividad contra *G. intestinalis* al compararlo contra el MTZ siendo 9 veces más potente.

Los compuestos precursores con un metilo en la posición 1 y un grupo éster en la posición 5 ó 6 (**17** y **18**, respectivamente) mostraron una mejor actividad que el metronidazol contra los tres parásitos probados. Siendo el isómero 1,6 (**18**) el que presentó la mejor actividad contra los tres parásitos probados, es mejor que el metronidazol y equiparable a la nitazoxanida contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*; dicho compuesto mostró la mejor actividad frente a *G. intestinalis* siendo 42 veces mejor que el MTZ y equiparable al ABZ.

Los siguientes compuestos en la cadena de reacción son los compuestos de hidrólisis de los ésteres anteriores. Los ácidos carboxílicos **19** y **20** mostraron una buena actividad contra los tres parásitos evaluados, siendo ambos compuestos mejores o equiparables al MTZ. El compuesto **19** fue 10 y 3 veces más potentes que el MTZ en contra de *G. intestinalis* y *E. histolytica* respectivamente, mientras que fue equiparable contra *T. vaginalis*. El compuesto **20** presentó una mejor actividad siendo 26, 10 y 2 veces más potente que el MTZ contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

En comparación con la NTZ, sólo el compuesto **20** resultó ser alrededor de 2 veces mejor contra *E. histolytica*, y equiparable contra *T. vaginalis*.

9.3. RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

9.3.1. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA *E. histolytica*

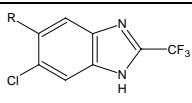
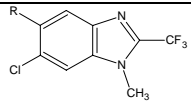
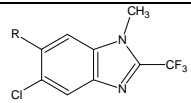
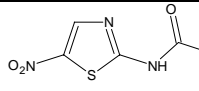
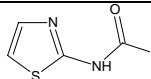
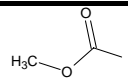

Con los datos obtenidos en las pruebas biológicas sobre el protozooario *E. histolytica* se estableció la relación estructura-actividad antiprotozoaria que se muestra en la **Tabla 10**.

Como podemos observar en la **Tabla 10** se puede inferir una probable influencia de los grupos tanto por su tamaño (propiedades estéricas) como por su patrón de sustitución en el anillo de bencimidazol, así como por la presencia de ciertos grupos funcionales.

Sustituyentes voluminosos: lo primero que podemos observar es que estos sustituyentes tienen una mejor actividad, que los sustituyentes medianos. La actividad se ve favorecida cuando en la posición 1 del anillo de bencimidazol se encuentra un grupo metilo, siendo preferentemente cuando el patrón de sustitución es 1,5, con respecto al metilo y al grupo voluminoso, teniendo su regioisómero 1,6 una actividad menor. Otro factor importante en este grupo de compuestos fue la presencia del grupo nitro el cual potenció de forma notable la actividad de las moléculas contra *E. histolytica*.

Sustituyentes medianos: estos sustituyentes (éster, ácido carboxílico) presentan una menor actividad contra *E. histolytica*. De igual forma que los compuestos anteriores la actividad se ve favorecida cuando presentan un grupo metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol, aunque la actividad aumenta de manera inversa a los sustituyentes voluminosos, siendo el regioisómero 1,6 el que presenta la mejor actividad, seguido de los compuestos 1,5 mientras que los compuestos 1H presentaron una menor actividad. Teniendo una mayor actividad los compuestos que contienen el ácido carboxílico.

Tabla 10. Relación estructura-actividad antiprotozoaria de los compuestos finales e intermediarios frente a *E. histolytica*

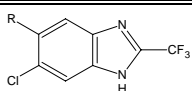
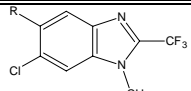
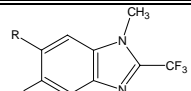
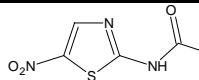
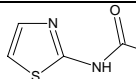
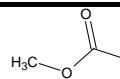

| IC ₅₀ (µM) contra <i>E. histolytica</i> | | | | |
|---|---|---|---|-------------------------|
| Núcleo R |  |  |  | Relación de actividades |
| Sustituyentes voluminosos | | | | |
|  | 0.06 | 0.006 | 0.011 | 1,5>1,6>1H |
|  | 0.151 | 0.018 | 0.055 | 1,5>1,6>1H |
| Sustituyentes medianos | | | | |
|  | 0.305 | 0.101 | 0.041 | 1,6>1,5>1H |
|  | 0.161 | 0.099 | 0.034 | 1,6>1,5>1H |

9.3.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA *T. vaginalis*

Contra este parásito se puede observar nuevamente que existe una cierta relación entre los grupos que se encuentran en la posición 5(6) del anillo de bencimidazol (**Tabla 11**).

Sustituyentes voluminosos: como podemos observar la actividad es similar a la vista anteriormente contra *E. histolytica*, siendo mejor que la de los grupos medianos, también se observa que la actividad biológica se ve favorecida cuando en la posición 1 del anillo de bencimidazol se encuentra un grupo metilo y en la molécula se tiene la presencia del grupo nitro. En este grupo de moléculas el patrón de sustitución no presentó una tendencia clara, ya que cuando se tenía el grupo (5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-aminocarbonilo, el isómero con mejor actividad fue el 1,6 seguido del isómero 1,5; caso inverso cuando tenemos el (1,3-tiazol-2-il)-aminocarbonilo, ya que el isómero con mejor actividad es el 1,5 seguido del isómero 1,6.

Tabla 11. Relación estructura-actividad antiprotozoaria de los compuestos finales e intermediarios frente a *T. vaginalis*

| IC ₅₀ (μM) contra <i>T. vaginalis</i> | | | | |
|---|---|---|---|-------------------------|
| Núcleo R |  |  |  | Relación de actividades |
| Sustituyentes voluminosos | | | | |
|  | 0.107 | 0.041 | 0.023 | 1,6>1,5>1H |
|  | 0.195 | 0.069 | 0.086 | 1,5>1,6>1H |
| Sustituyentes medianos | | | | |
|  | 0.273 | 0.135 | 0.07 | 1,6>1,5>1H |
|  | 0.435 | 0.174 | 0.089 | 1,6>1,5>1H |

Sustituyentes medianos: estos sustituyentes (éster, ácido carboxílico) presentan una actividad similar a la vista anteriormente contra *E. histolytica*. La actividad se ve favorecida cuando presentan un grupo metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol, siendo el regioisómero 1,6 el que presenta la mejor actividad, seguido de los compuestos 1,5 mientras que los compuestos 1H presentaron una menor actividad. De esta serie de moléculas las que presentaban el grupo éster presentaron una mejor actividad en contra de *T. vaginalis*.

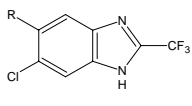
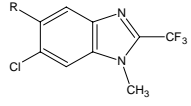
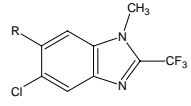
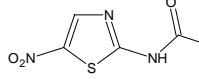
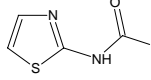
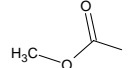

9.3.3. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CONTRA *G. intestinalis*

Como se aprecia en la **Tabla 12** los compuestos muestran nuevamente una variación entre los grupos tanto por sus propiedades estéricas, así como por su patrón de sustitución y por la presencia de ciertos grupos en las moléculas.

Sustituyentes voluminosos: se observa que la actividad biológica se ve favorecida por la presencia de un grupo voluminoso, también por un grupo metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol y por la presencia del grupo nitro en la molécula. En este grupo de moléculas el patrón de sustitución no presentó una tendencia, ya que ambos isómeros presentaron actividades biológicas similares, la actividad contra *G. intestinalis* en el caso de los compuestos 1 metilados no depende del patrón de sustitución ya que los isómeros 1,5 y los 1,6 mostraron una actividad similar entre si.

Sustituyentes medianos: estos grupos presentan una actividad similar a la vista anteriormente. La actividad de estas moléculas se ve favorecida cuando presentan un grupo metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol, siendo el regioisómero 1,6 el que presenta la mejor actividad, seguido de los compuestos 1,5 mientras que los compuestos 1H presentaron una menor actividad. En cuanto a la naturaleza del grupo en la posición 5(6) se observó que el ácido carboxílico era más activo cuando en la posición 1 del anillo de bencimidazol había un hidrógeno, mientras que el grupo éster resultó más activo cuando la posición 1 estaba presente el grupo metilo.

Tabla 12. Relación estructura-actividad antiprotozoaria de los compuestos finales e intermediarios frente a *G. intestinalis*.

| IC ₅₀ (μM) contra <i>G. intestinalis</i> | | | | |
|--|---|---|---|-------------------------|
| Núcleo R |  |  |  | Relación de actividades |
| Sustituyentes voluminosos | | | | |
|  | 0.203 | 0.021 | 0.021 | 1,5=1,6>1H |
|  | 0.143 | 0.026 | 0.028 | 1,5≈1,6>1H |
| Sustituyentes medianos | | | | |
|  | 0.287 | 0.08 | 0.029 | 1,6>1,5>1H |
|  | 0.13 | 0.124 | 0.048 | 1,6>1,5>1H |

10. CONCLUSIONES

La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos.

Albert Einstein, premio Nobel.

- Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permitió corroborar nuestra hipótesis de trabajo ya que los compuestos híbridos mostraron un perfil antiparasitario equiparable y en algunos casos superiores a sus moléculas predecesoras, al suprimir el grupo nitro la actividad se redujo notablemente; lo cual nos proporciona información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiparasitaria.

10.1. CONCLUSIONES DE LA PARTE QUÍMICA

- Se logró la síntesis de los compuestos de la serie 1: 6-cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**1**); 6-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**2**) y 5-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**3**).
- Se logró sintetizar los compuestos de la serie 2: 6-cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**4**), 6-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**5**) y 5-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**).
- Los compuestos sintetizados, tanto compuestos finales como intermediarios, se identificaron mediante la utilización de técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM). También nos fue posible determinar para cada uno de ellos algunas de sus constantes físicas más importantes (pf y R_f).
- Se logró adquirir conocimiento y experiencia en el campo de la síntesis orgánica, elucidación estructural y diseño de moléculas de interés farmacéutico.

10.2. CONCLUSIONES DE LA PARTE BIOLÓGICA

- Los compuestos de la serie 1 mostraron la mejor actividad de todos los compuestos sintetizados, fueron mejores que el MTZ, fármaco de elección contra las parasitosis causadas por protozoarios, contra los tres parásitos probados. Destacando la actividad de los compuestos **2** y **3** contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*, la cual fue considerablemente mejor que la mostrada por el MTZ y la NTZ, resultando estos compuestos prometedores como buenos agentes antiparasitarios.
- Los compuestos sintetizados de la serie 2 mostraron una menor actividad que los compuestos de la serie 1. Estos compuestos mostraron una actividad mejor y en algunos casos equiparables al MTZ. Nuevamente hay que destacar la actividad biológica en contra de *E. histolytica* y *T. vaginalis* de los compuestos **5** y **6** los cuales fueron mejores que el MTZ y la NTZ, con excepción del compuesto **6** que resultó equiparable a la NTZ. Estos resultados son interesantes desde el punto de vista terapéutico ya que al no poseer un grupo nitro en su estructura se pueden evitar los efectos adversos que se asocian a dicho grupo, por lo cual se perfilan al igual que los compuestos anteriores como agentes antiparasitarios.
- Los compuestos intermediarios (ésteres y ácidos bencimidazólicos) aunque no figuraban dentro de los objetivos primarios también se evaluaron para determinar su actividad biológica ya que son compuestos novedosos y que no se tiene su CI_{50} contra los tres parásitos probados y por tanto nos aportan datos interesantes en cuanto a la relación estructura-actividad. Estos compuestos presentaron una actividad menor a los compuestos diseñados (serie 1 y 2). Los compuestos que presentan una relación estructural 1,6 (**18** y **20**) fueron mejores que el MTZ contra los tres parásitos evaluados, mientras que al comparar contra la NTZ estos compuestos mostraban una actividad equiparable contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

10.3. CONCLUSIONES SOBRE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

- Los compuestos que poseen un grupo nitro dentro de su estructura (serie 1) mostraron la mayor actividad contra los parásitos evaluados, dicho grupo potencia el efecto antiparasitario de las moléculas, sin llegar a ser imprescindible para la actividad; ya que los compuestos que no poseen el grupo nitro dentro de su estructura también mostraron una buena actividad antiprotozoaria. Por lo tanto se puede deducir que el grupo nitro actúa por medio de otro mecanismo de acción diferente al grupo bencimidazólico, ya con una cierta actividad antiprotozoaria. Al unir estos dos grupos en una sola molécula se corrobora nuestra hipótesis ya que ambos núcleos presentaron un sinergismo siendo mucho más activos que los compuestos predecesores.
- También se observó que la presencia de un grupo voluminoso en las posiciones 5 ó 6 (compuestos de la serie 1 y 2) favorecen la actividad de los compuestos con una relación estructural 1,5 en contra de *E. histolytica*; no teniendo un impacto significativo en cuanto a la relación estructural contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.
- Los grupos medianos favorecen la actividad de los compuestos con una relación estructural 1,6 contra los tres parásitos evaluados, siguiendo en actividad los compuestos con una relación 1,5 y al último los compuestos 1-H.
- En relación a los puntos anteriores la presencia de un grupo metilo en la posición uno del anillo de bencimidazol es favorable para aumentar el efecto antiprotozoario, ya que en todos los compuestos evaluados se observó que los compuestos metilados presentaban una mejor actividad frente a los compuestos que poseen un hidrógeno en dicha posición.
- Los compuestos diseñados (serie 1 y 2) nos aportan una guía acerca de la estructura que debe poseer una molécula para que presente una buena actividad antiparasitaria y en un futuro contar con fármacos selectivos y más potentes contra la entamoebosis, la giardiosis y la tricomosis, ya que son enfermedades parasitarias con un impacto mundial.

11. PERSPECTIVAS

- Los compuestos sintetizados en el presente trabajo representan un nuevo prototipo estructural de sustancias con propiedades antiprotozoarias que podrían ser de utilidad para el desarrollo de agentes con posible uso en la terapéutica, tanto en medicina humana como veterinaria.
- Cabe señalar que los resultados hasta ahora obtenidos son alentadores para continuar con nuevos estudios dirigidos a determinar el espectro antiparasitario, evaluando nuestros compuestos contra otros protozoarios y contra helmintos de interés clínico.
- Determinar la actividad antiparasitaria *in vivo* de los compuestos que poseen una mejor actividad.
- Realizar estudios dirigidos a determinar características farmacológicas importantes como absorción, biodisponibilidad, metabolismo, toxicidad, entre otras.
- Incursionar en el diseño de fármacos asistido por computadora, estableciendo relaciones estructura-actividad *in silico* y así poder generar otras moléculas activas mediante el estudio cuantitativo de las relaciones estructura-actividad (QSAR).

12. BIBLIOGRAFÍA.

12.1. REFERENCIAS CITADAS

- Abramowicz, M. Editor. Drugs for parasitic infections. *Med. Lett. Drugs Ther.* **1995**; **37**(961): 99-108.
- Adagu, I. S.; Nolder, D.; Warhurst, D. C.; Rossignol, J. F. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compound against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**; **49**: 103-111.
- Arroyo, R.; González-Robles, A.; Martínez-Palomo, A.; Alderete, J. F. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* **1993**; **7**(2): 299-309.
- Avendaño López, C. Introducción a la química farmacéutica. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. 2ª Edición; España, 2001. pp 63-67, 606-607.
- Belkind-Valdovinos, U.; Belkind-Gerson; J.; Sánchez-Francia, D.; Espinoza-Ruiz, M. M.; Lazcano-Ponce, E. Evaluación de la nitazoxanida en dosis única y por tres días en parasitosis intestinal. *Salud Pública Mex.* **2004**; **46**(3): 333-340.
- Bendesky, A.; Menéndez, D. Metronidazol: una visión integral. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **2001**; **44**(6): 255-259.
- Bendesky, A.; Menéndez, D.; Ostrosky-Wegman, P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat. Res.* **2002**; **511**: 133-144.

- Bishop, B. C.; Jones, A. S.; Tatlow J. C. The synthesis of some perfluoroalkylbenzimidazoles. *J. Chem. Soc.* **1964**: 3076-3080.
- Boiani, M; González M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**; **5**: 409-424.
- Botero, D.; Restrepo, M. Parasitosis humanas. Ed. Corporación para investigaciones biológicas. 3ª Edición; Colombia, 1999. pp. 11-69, 286-289.
- Bougrin, K.; Loupy, A.; Petit, A.; Daou B.; Soufiaoui M. Nouvelle voie de synthèse des 2-trifluorométhylarylimidazoles sur montmorillonite K10 en 'milieu sec' sous micro-onde. *Tetrahedron* **2001**; **57**: 163-168.
- Bruckner, D. A. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**; **5**(4): 356-369.
- Cedillo-Rivera, R.; Chávez, B.; González-Robles, A.; Tapia, A.; Yépez-Mulia, L. In Vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2002**; **49**(2): 201-208.
- Cruz, A.; Sousa, M. I.; Azeredo, Z.; Silva, M. C.; Figueiredo de Sousa, J. C.; Manso, O.; Cabral, M. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. *Acta Trop.* **2003**; **88**: 131-135.
- Davila-Gutierrez, C. E.; Vasquez, C.; Trujillo-Hernandez, B.; Huerta, M. Nitazoxanide compared with quinfanide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**; **66**(3): 251-254.
- Daxón. Monografía: Nitazoxanida. Laboratorios Columbia-División Lanac.
- Díaz, E.; Mondragón, J.; Ramírez, E.; Bernal, R. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**; **68**(4): 384-385.

- Eguiza Salomón, L. La nitazoxanida y los niños. *Rev. Mex. Pediatr.* **2000**; **67**(2): 89-90.
- Frayha, G. J.; Smyth, J. D.; Gobert, J. G.; Savel, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen. Pharmac.* **1997**; **28**(2): 273-299.
- Gardner, T. B.; Hill, D. R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**; **14**(1): 114-128.
- Gilles, H. M.; Hoffman, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends Parasitol.* **2002**; **18**(3): 95-97.
- Giménez Martínez, J. J.; Expósito López, J. M. RMN para químicos orgánicos. Ed. Almería. Almería, 1998. pp. 249-265.
- Holan G.; Samuel E. L.; Ennis B. C.; Hinde R. W. 2-Trihalogenomethylbenzazoles. Part I. Formation. *J. Chem. Soc. (C)*, **1967**: 20-25.
- Horton, R. J. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol. Today.* **1990**; **6**(4): 106.
- Katzung, B. G. Basic & clinical pharmacology. Ed. McGraw-Hill. 8a Edición; EUA, 2001. pp. 869-871.
- Korolkovas, A. Essentials of medicinal chemistry. Ed. Elsevier-Interscience publication. 2a Edición; EUA, 1988. pp. 67-76.
- Kulda, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol.* **1999**; **29**: 199-212
- Lehker, M. W.; Alderete, J. F. Biology of trichomonosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2000**; **13**: 37-45.
- Liu, L. X.; Weller, P. F. Drug therapy: Antiparasitic drugs. *N. Engl. J. Med.* **1996**; **334**(18): 1178-1184.

- MacDonald, L. M.; Armson, A.; Thompson, R. C. A.; Reynoldson, J. A. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**; **138**: 89-96.
- Martin, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* **1997**; **154**: 11-34.
- Meysick, K.; Garber, G. E. *Trichomonas vaginalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **1995**; **8**: 22-25.
- Montresor, A.; Awasthi, S.; Crompton, D. W. T. Use of benzimidazoles in children younger than 24 months for the treatment of soil-transmitted helminthiasis. *Acta Trop.* **2003**; **86**: 223-232.
- Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**; **11**: 187-190.
- Nigenda G.; Cifuentes E.; Duperval P. A. Estimación del Valor Económico de Reducciones en el Riesgo de Morbilidad y Mortalidad por Exposiciones Ambientales. *Instituto Nacional de Ecología*. 2002. <http://www.ine.gob.mx/>
- Olivares, J. L.; Fernández, R.; Fleeta, J.; Ruiz, M. Y.; Clavel, A.; Moreno, L. A. Iron deficiency in children with *Giardia lamblia* and *Enterobius vermicularis*. *Nut. Res.* **2004**; **24**: 1-5.
- Petri Jr, W. A. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol.* **2003**; **19**(11): 523-526.
- Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**; **11**(2): 300-317.
- Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. Structure determination of organic compounds: tables of spectra data. Ed. Springer. Alemania, 2000.
- Phillips, M. A. The formation of 2-substituted benzimidazoles. *J. Chem. Soc.* **1928**: 2393-2399.

- Ramos, F.; Morán, P.; González, E.; García G.; Ramiro, M.; Gómez, A.; García de León, M. C.; Melendro, E. I.; Valadaz, A.; Ximénez, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural mexican community. *Exp. Parasitol.* **2005**; **110**: 327-330.
- Reynoldson, J. A.; Behnke, J. M.; Gracey, M.; Horton, R. J.; Spargo, R.; Hopkins, R. M.; Constantine, C. C.; Gilbert, F.; Stead, C.; Hobbs, R. P.; Thompson, R. C. A.; Efficacy of albendazol against *Giardia* and hookworm in remote aboriginal community in the north of western Australia. *Acta Trop.* **1998**; **71**: 27-44.
- Rodríguez-Guzmán, L. M.; Hernández-Jerónimo E. J.; Rodríguez-García, R. Parasitosis intestinal en niños seleccionados en una consulta ambulatoria de un hospital. *Rev. Mex. Pediatr.* **2000**; **67**(3): 117-122.
- Romero Cabello, R. Robert Guerrero, L; Muñoz García, M. R.; Geyne Cruz, A. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1997**; **91**: 701-703.
- Sánchez Díaz, R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmintica potencial. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México DF, 1999.
- Seibl, J. Espectrometría de masas. Ed. Alhambra. España, 1973. pp 20, 100-102.
- Sharma, S.; Abuzar, S. The bezimidazole anthelmintics –chemistry and biological activity. *Prog. Drug Res.* **1983**; **27**: 85-150.
- Sharma, S. Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Adv. Drug Res.* **1994**; **25**: 105-163.
- SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica); SSA, 2005. <http://www.salud.gob.mx/>
- Slifko, T. R.; Smith, H. V.; Rose, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* **2000**; **30**: 1379-1393.

- Solomons, T. W. G. Química Orgánica. Ed. Limusa-Wiley. 2ª Edición; México, 2000.
- Soper, D. Trichomoniasis: under control or undercontrolled. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2004**; **190**: 281-290.
- SSA (Secretaria de Salud). Cuadro básico y catálogo de medicamentos. 3ª Edición; 2004.
<http://www.salud.gob.mx/>
- SSA (Secretaria de Salud). Comunicado de prensa No. 081. 2005. <http://www.salud.gob.mx/>
- Stanley Jr, S.L. Amoebiasis. *Lancet.* **2003**; **361**: 1025-1034.
- Thompson, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **2000**; **30**: 1259-1267.
- Thompson, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* **2004**; **126**: 15-35.
- Townsend, L. B.; Wise, D. S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol. Today.* **1990**; **6**(4): 107-112.
- Uneyama. K.; Kobayashi, M. Electrochemical oxidation of *N,N'*-disubstituted trifluoroethanimidamides. An approach to *N*-substituted 2-(trifluoromethyl) benzimidazoles. *J. Org. Chem.* **1994**; **59**: 3003-3014.
- Uneyama, K. Chemistries of trifluoroacetimidoyl halides: preparation, reactions, and applications for the synthesis of fluorinated heterocycles. *J. Fluorine Chem.* **1999**; **97**: 11-25.
- Uneyama, K. Challenge to fluorination as an electro-organic chemist. *J. Fluorine Chem.* **2000**; **105**: 209-210.

- VanVliet, D. S.; Gillespie, P.; Scicinski, J. J. Rapid one-pot preparation of 2-substituted benzimidazoles from 2-nitroanilines using microwave conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**; **46**: 6741-6743.
- Watkins B. M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. *Trends Parasitol.* **2003**; **19**(11): 477-478.
- Wermuth, C. G. The practice of medicinal Chemistry. Ed. Elsevier Academic Press. 2a Edición; Great Britain, 2004. pp. 251-273.
- White Jr, A. C. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**; **68**(4): 382-383.
- White Jr, A. C. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert. Rev. Anti-infect. Ther.* **2004**; **2**(1): 43-50.
- Wolfe, M. S. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**; **5**(1): 93-100.
- Ximénez, G. C. Las parasitosis intestinales en México. *Cuadernos Funsalud No. 36*. Fundación Mexicana para la salud 2002. <http://www.funsalud.org.mx>

13. ANEXOS

13.1. ANEXO A: PARTE EXPERIMENTAL

13.1.1. INSTRUMENTACIÓN

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy, o bien, una parrilla con agitación y calentamiento marca Corning modelo PC 220.
- La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi R-114 con baño B-480 acoplado a una bomba de vacío marca Gast 0523-V47-6528DX ajustada a 50 mmHg y un condensador de alta eficiencia conectado a un enfriador VWR Scientific modelo 1107, o bien, acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30. Para disminuir la presión del sistema se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2.
- La hidrogenación catalítica se realizó empleando un hidrogenador marca Parr Modelo 3916 EG con 60 lb/pulg² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Níquel-Raney (al 30% en agua) de la casa Aldrich.
- El punto de fusión (pf) de los productos se determinó en un aparato Büchi B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600, en pastilla de bromuro de potasio, la frecuencia de las señales se reportan en cm⁻¹.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H) se realizaron en un espectrómetro Varian modelo Unity Inova de 300 MHz usando tetrametilsilano como referencia interna.

Los disolventes empleados fueron cloroformo, acetona o dimetilsulfóxido deuterados y agua deuterada para el intercambio de hidrógeno. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. Las constantes de acoplamiento J se dan en Hertz. Los símbolos correspondientes a la multiplicidad de las señales son: s = señal simple, d = señal doble, dd = señal doble de doble, t = señal triple, m = señal múltiple compleja, sa = señal simple amplia.

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

13.1.2. CROMATOGRAFÍA

El seguimiento de las reacciones y el análisis de la pureza de los productos obtenidos se realizaron mediante la técnica de cromatografía en capa fina (ccf) empleando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 GF-254 de la casa Merck. La visualización de los productos se hizo mediante luz ultravioleta y/o por exposición a vapores de yodo. La composición y proporción de los sistemas utilizados fueron las siguientes:

| Sistema | Composición | Proporción |
|---------|---|--------------|
| I | Cloroformo-metanol | 95:5 |
| II | CHCl ₃ -Acetona-Éter-Ác. acético | 10:6:1.5:0.6 |
| III | Hexano-Acetato de etilo | 65:35 |
| IV | Cloroformo-metanol | 90:10 |

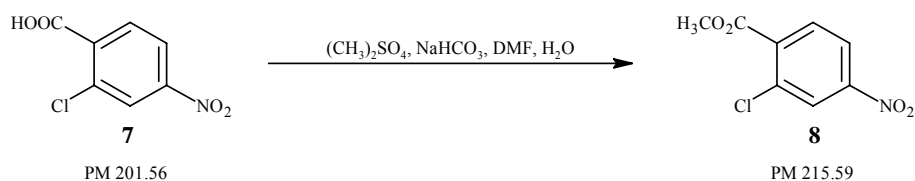
Para la separación cromatográfica por la técnica de cromatografía en columna flash se utilizó una columna de vidrio empacada con gel de sílice 60, con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm y malla 230-400, de la casa Merck. La velocidad de flujo se ajustó a 0.07 in²/min mediante una bomba calibrada a 4.0 lb/in² de presión.

13.1.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES E INTERMEDIARIOS

Los procedimientos experimentales para la síntesis de cada uno de los compuestos de este trabajo de tesis fueron los siguientes:

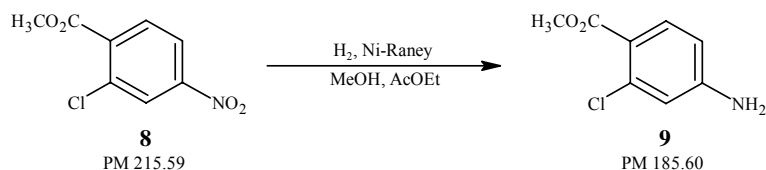
13.1.3.1. Procedimientos experimentales para la preparación de intermediarios

2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (8)



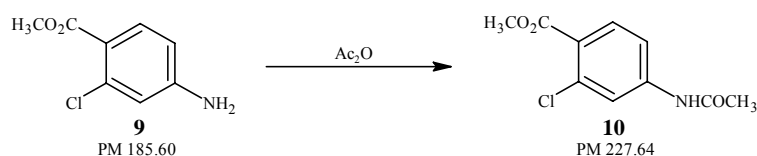
En un matraz de 1 L con tres bocas, acondicionado con termómetro, columna Vigreux, embudo de adición, agitación mecánica y baño de agua, se disolvieron 50 g (0.2481 mol) del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (7) en 150 mL de dimetilformamida (DMF) por debajo de 50 °C. A la disolución anterior se le adicionaron, cuidadosamente y con agitación, 41.7 g (0.4962 mol, 2 eq) de NaHCO₃ en suspensión acuosa, cuidando que el pH estuviera en 7 y se gotearon 35.2 mL (0.3722 mol, 1.5 eq) de sulfato de dimetilo a una temperatura entre 60-65 °C. Terminada la adición se dejó reaccionar por 10 min. Una ccf indicó el consumo total de la materia prima. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua, se agitó y precipitó un sólido, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 52.2 g (97.61%) de un sólido amarillo claro (*R_f* 0.68, sistema I). Una muestra se recrystalizó de etanol dando un sólido cristalino de color amarillo (60%) con pf de 76.0-76.7 °C.

4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (9)



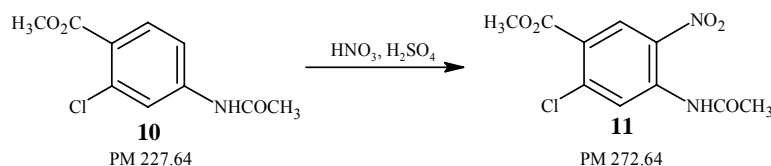
En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 30 g (0.1392 mol) del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**8**) y 9 g de Níquel Raney previamente lavado con agua y MeOH, en 186 mL de una mezcla de MeOH/AcOEt 6:1. El frasco se acopló al hidrogenador y se purgó con tres lavados de 35 lb/in² de hidrógeno. Posteriormente, la botella se cargó con 60 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por tres horas, durante las cuales se consumieron 660 lb/in² de hidrógeno. Una cromatoplaque de la reacción mostró el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se filtró al vacío en un embudo Büchner empacado con celita y se lavó con AcOEt. El filtrado se concentró en el rotaevaporador. Se obtuvieron 25.8 g (99.86%) de un sólido color crema con R_f 0.55 (sistema I). Una muestra del producto se recrystalizó de metanol-agua, dando un sólido cristalino blanco (95%), con un pf de 108.6-109.5 °C.

4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (10)



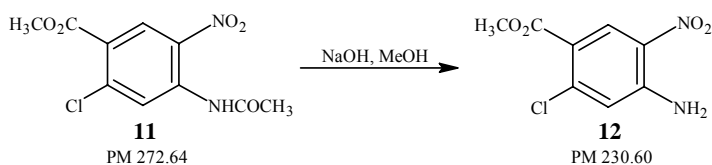
En un vaso de precipitados de 250 mL, acondicionado con termómetro, baño de agua con hielo y una varilla de agitación de teflón, se colocaron 90 mL de anhídrido acético al cual se le adicionaron 25.8 g (0.1390 mol) del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**9**). La adición se hizo lentamente y con agitación vigorosa, de tal manera que la temperatura no pasara de 70 °C. Terminada la adición se retiró el baño de agua y se dejó en reposo. Una ccf indicó el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se vertió sobre agua (1 L) y el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar. Se obtuvieron 30.7 g (97.02 %) de un sólido de color blanco con un R_f 0.12 (sistema I). Una muestra se recrystalizó de tolueno (80.2%), dando su sólido blanco cristalino con un pf de 114.4-114.8 °C.

4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**11**)



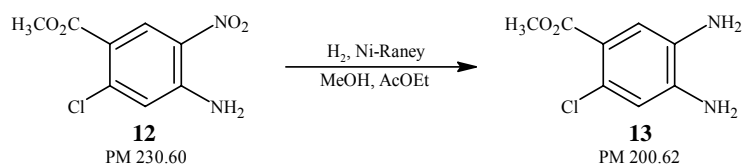
En un vaso de precipitados de 250 mL, acondicionado con termómetro, agitación magnética, embudo de adición y sumergido en un baño con hielo-sal-MeOH, se disolvieron 30.7 g (0.1349 mol) del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**10**) en 60 mL de H_2SO_4 concentrado a una temperatura no mayor a $15\text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se goteó, lentamente y con agitación vigorosa, 20 mL de HNO_3 a $5 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. El seguimiento del progreso de la reacción se hizo por ccf, de tal manera que después de una hora se comprobó el consumo total de la materia prima y la formación de dos productos con una relación aproximada de 8:2. La mezcla de reacción se vertió sobre 300 g de hielo picado, se agitó y el sólido amarillo formado se separó por filtración con vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 33.6 g (91.36 %) de un sólido color amarillo claro. El producto crudo se recrystalizó de MeOH/AcOEt dando 20.2 g (60%) de cristales amarillos con un R_f 0.68 (sistema 1) y un pf de $141.6\text{-}142.2\text{ }^\circ\text{C}$.

4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**12**)



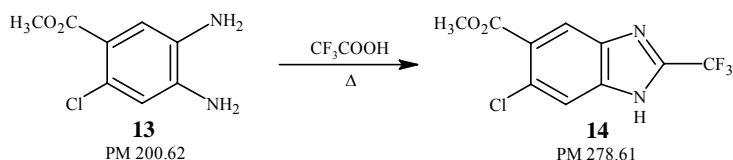
En un vaso de precipitados de 500 mL, acondicionado con termómetro y agitación magnética, se suspendieron 29.2 g (0.1071 mol) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**11**), sin purificar, en 250 mL de MeOH a $20\text{ }^\circ\text{C}$. A esta suspensión se le goteó una solución de 4.3 g (0.1075 mol) de NaOH disueltos en 5 mL de MeOH. Tras el consumo de la materia prima (ccf, sistema 1), la mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético al 20 % y el sólido formado se separó por filtración con vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 24 g (82.2 %) de un sólido color amarillo brillante. Una muestra se recrystalizó de EtOH/AcOEt se obtuvieron cristales amarillos (85%) con R_f 0.49 (sistema I) y un pf de $222.7\text{-}223.6\text{ }^\circ\text{C}$.

4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (13)



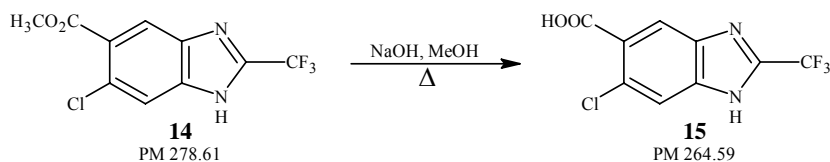
En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 15 g (0.0651 mol) del 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**12**) y 4.5 g de Níquel Raney previamente lavado con agua y MeOH, en 250 mL de una mezcla de MeOH/AcOEt 3:2. El frasco se acopló al hidrogenador y se purgó con tres lavados de 35 lb/in² de hidrógeno. Posteriormente se cargó a 60 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por dos horas durante las cuales se consumieron 284 lb/in² de hidrógeno. Una cromatoplaaca de la reacción mostró el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se filtró al vacío en un embudo Büchner empacado con celita y se lavó con AcOEt. El filtrado se concentró en el rotaevaporador. Se obtuvieron 12.9 g (99.2%) de un sólido color morado con R_f0.23 (sistema I).

6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (14)



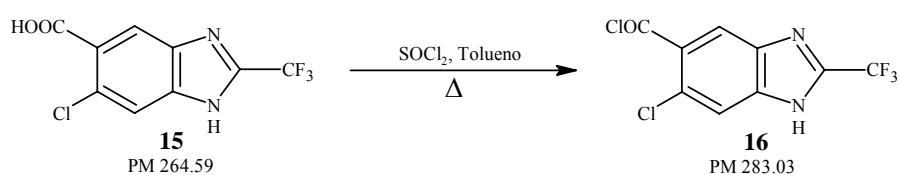
En un matraz pera de tres bocas de 25 mL, provisto con termómetro, refrigerante en posición de reflujo, tapón de hule, atmósfera de nitrógeno y agitación magnética; se colocaron 13 g del 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**); posteriormente, se inyectaron 10 mL (0.1296 mol, 2 eq.) de ácido trifluoroacético y la mezcla de reacción se llevó a reflujo (95°C) durante tres horas. La ccf (sistema I) mostró el consumo del compuesto **7**, por lo cual, la mezcla se neutralizó con una solución concentrada de NaHCO₃, posteriormente, se extrajo con AcOEt por triplicado. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró a sequedad. El producto obtenido se decoloró con carbón activado, Dando 16.0 g (89%) de un producto blanco con R_f 0.48 (Sistema I) y un pf de 152-153 °C.

Ácido 6-cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (15)

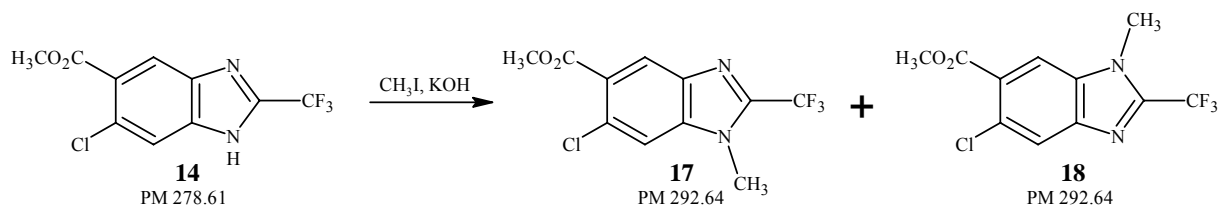


En un matraz Kontes taper de tres bocas de 125 mL, provisto con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y embudo de adición, se colocaron 5g del 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**) en 30 mL de MeOH, se adicionaron 2g (2.5 eq., 0.05 mol) de NaOH disueltos en 4 mL de MeOH. La mezcla de reacción se sometió a un reflujo ligero a 60 °C durante 4 horas. La ccf (sistema II) mostró el consumo total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua y se llevó a pH 4 con ácido acético al 20%, el producto formado se separó por filtración y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 4.5 g (96%) de un sólido color crema. Una muestra se recrystalizó de EtOH/AcOEt para dar un sólido blanco (48%) con R_f 0.13 (sistema II) y un pf de 319-320 °C.

Cloruro de 6-cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo (16)

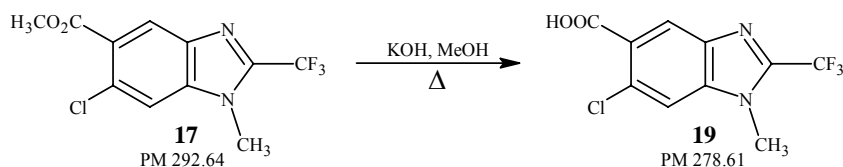


En un matraz Kontes Taper de 50 mL con tres bocas, provisto de refrigerante en posición de reflujo, agitación magnética y trampas con NaOH, se colocó 1g del ácido 6-cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**9**) y 20 mL de tolueno; posteriormente, se agregó 1.1 mL (4 eq, 0.015 mol) de SOCl_2 , se calentó hasta alcanzar un reflujo ligero (50-60 °C), donde se mantuvo en agitación por una hora. La ccf (sistema II) mostró el consumo total del compuesto **9**. El exceso de SOCl_2 se eliminó por codestilación con 20 mL de tolueno (por triplicado). Debido a que este producto es lábil, se sometió directamente a la siguiente reacción.

6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)**5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (18)**

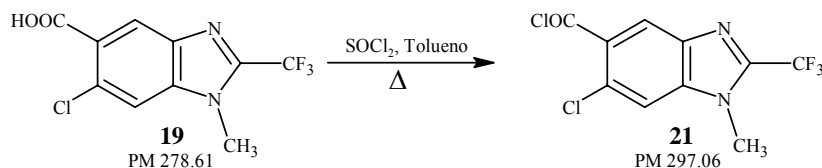
En un matraz Kontes Taper de 125 mL con tres bocas, provisto de refrigerante en posición de reflujo, termómetro, embudo de adición, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 12 g del compuesto **8** en 50 mL de acetona. Posteriormente se agregaron 3.6 g (0.064 mol, 1.5 eq) de KOH en solución acuosa, a la mezcla de reacción se le adicionaron, gota a gota, 4 mL (1.5 eq, 0.064 mol) de CH₃I a una temperatura de 10-12°C. Terminada la adición, se dejó reaccionar por 5 horas. La ccf (sistema III) mostró el consumo de la materia prima y la presencia de dos productos. La mezcla de reacción se vertió en 50 mL de agua y se acidificó con HCl al 10%, el sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro. El producto crudo, un sólido de color café claro, pesó 10.8 g (86%). Una ccf (sistema III) de este producto mostró 2 manchas, una con un R_f 0.52 y la otra con un R_f 0.43. La mezcla, 5 g, se sometió a una separación por cromatografía “flash” empleando Hexano-AcOEt (65:35) como fase móvil y gel de sílice como fase estacionaria, con una velocidad de flujo de 0.7 in/min. Se obtuvieron 2.1 g (42%) del compuesto con el R_f 0.52 y 1.1 g (22%) del compuesto con el R_f 0.43. Los dos productos se recrystalizaron de Hexano-AcOEt para dar cristales blancos en ambos casos. Las constantes físicas para el isómero **13** fueron: R_f 0.52 (sistema III) y un pf de 124.7-125.5 °C; mientras que para el isómero **14** fueron: R_f 0.43 (sistema III) y un pf de 102.2-103.1 °C.

Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**19**)



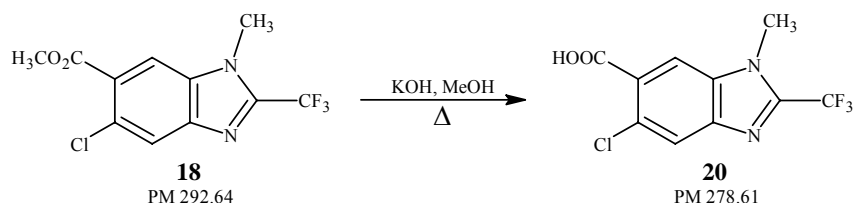
En un matraz Kontes taper de tres bocas de 50 mL, provisto con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y embudo de adición, se colocaron 2 g del 6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**17**) en 15 mL de MeOH, posteriormente se adicionó 0.7 g (2 eq, 0.013 mol) de KOH disueltos en MeOH. La mezcla de reacción se sometió a un reflujo ligero a 60 °C durante 1.5 horas. La ccf (sistema II) mostró el consumo total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua y se llevó a pH 4 con HCl al 5%, el producto formado se separó por filtración y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 1.8 g (95 %) de un sólido color blanco. Una muestra se recrystalizó de EtOH/AcOEt para dar un producto cristalino de color blanco (80 %) con R_f 0.23 (sistema II) y un pf de 307.0-308.1 °C.

Cloruro de 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo (**21**)



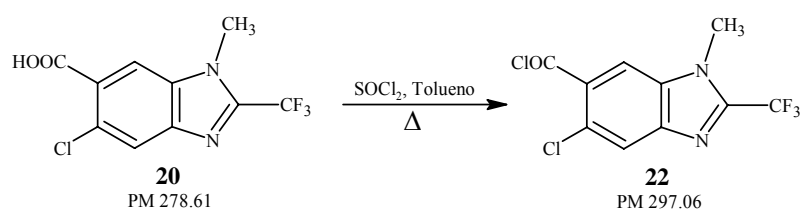
En un matraz Kontes Taper de 50 mL con tres bocas, provisto de refrigerante en posición de reflujo, agitación magnética y trampas con NaOH, se colocó 1 g del Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**19**) y 20 mL de tolueno; posteriormente, se agregó 1.0 mL (4 eq, 0.014 mol) de SOCl_2 , se calentó hasta alcanzar un reflujo ligero (50-60 °C), donde se mantuvo en agitación por una hora y media. La ccf (sistema II) mostró el consumo total del compuesto **19**. El exceso de SOCl_2 se eliminó por codestilación con 20 mL de tolueno (por triplicado). Debido a que este producto es lábil, se sometió directamente a la siguiente reacción.

Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (20)



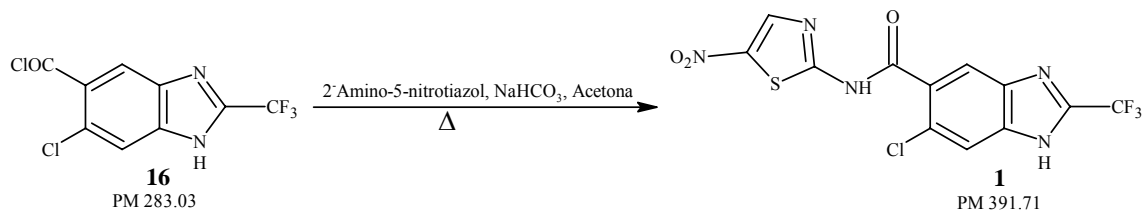
En un matraz Kontes taper de tres bocas de 50 mL, provisto con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y embudo de adición, se colocaron 2 g del producto 5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**18**) en 15 mL de MeOH, posteriormente se adicionó 0.7 g (2 eq, 0.013 mol) de KOH disueltos en MeOH. La mezcla de reacción se sometió a un reflujo ligero a 60 °C durante 1 hora. La ccf (sistema II) mostró el consumo total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en 50 mL de agua y se llevó a pH 4 con HCl al 5%, el producto formado se separó por filtración y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 1.9 g (100 %) de un sólido color blanco. Una muestra se recrystalizó de EtOH para dar un producto cristalino de color blanco (80 %) con R_f 0.16 (sistema II) y un p_f de 241.2-242.3 °C.

Cloruro de 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carbonilo (22)

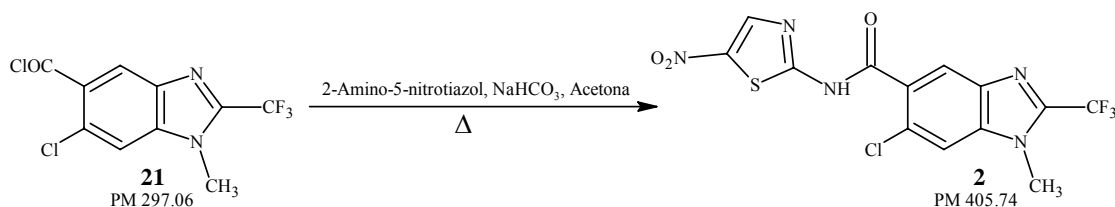


En un matraz Kontes Taper de 50 mL con tres bocas, provisto de refrigerante en posición de reflujo, agitación magnética y trampas con NaOH, se colocó 1 g del Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**20**) y se adicionó 20 mL de tolueno; posteriormente, se agregó 1.0 mL (4 eq, 0.014 mol) de SOCl_2 , se calentó hasta alcanzar un reflujo ligero (50-60 °C), donde se mantuvo en agitación por una hora. La ccf (sistema II) mostró el consumo total del compuesto **20**. El exceso de SOCl_2 se eliminó por codestilación con 20 mL de tolueno (por triplicado). Debido a que este producto es lábil, se sometió directamente a la siguiente reacción.

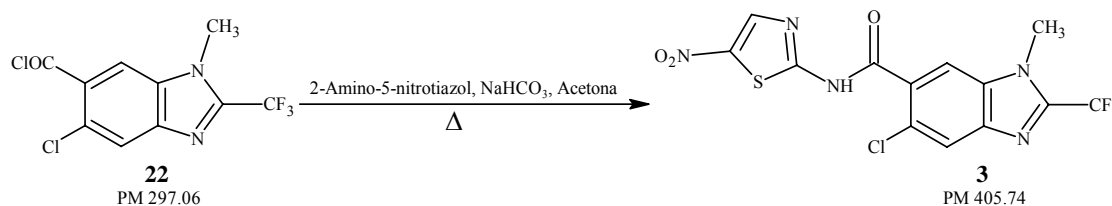
13.1.3.2. Procedimientos experimentales para la síntesis de los compuestos finales

6-cloro-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (1)

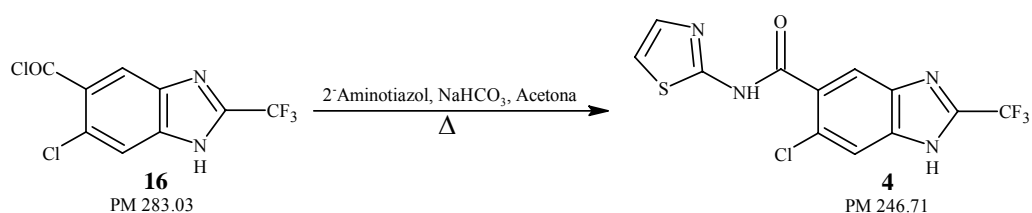
Se empleó el cloruro de ácido **16**. Al matraz de reacción se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Posteriormente se adicionó al matraz 0.44 g (0.8 eq, 3.02×10^{-3} mol) de 2-amino-5-nitrotiazol, 0.63g (2eq, 7.56×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 20 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (60-70 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante una noche. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**16**). La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el NaHCO_3 , posteriormente, el filtrado se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el producto seco se decoloró con carbón activado (30%), dando 1.4 g (93%) de un producto sólido de color amarillo. El producto se recristalizó de EtOH-agua obteniendo un producto amarillo (45 %) con R_f 0.41 (sistema VI) y un pf de 233.5-234.5 °C.

6-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (2)

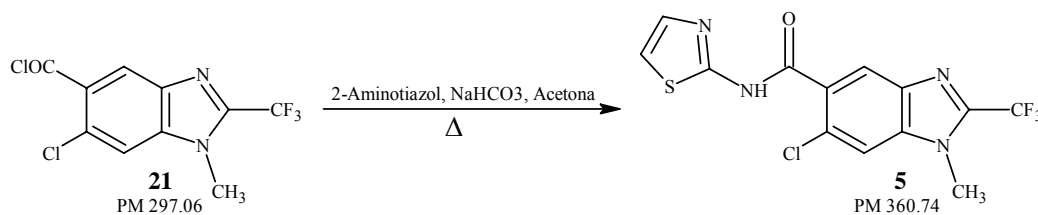
Al matraz de reacción que contiene el compuesto **21** se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Posteriormente, se adicionó al matraz 0.42 g (0.8 eq, 2.87×10^{-3} mol) del 2-amino-5-nitrotiazol, 0.63g (2eq, 7.18×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 20 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (60-70 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante una noche. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**21**). La mezcla de reacción se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el sólido se resuspendió en 50 mL de agua para eliminar el NaHCO_3 , se filtró al vacío y posteriormente el filtrado se decoloró con carbón activado (30%), dando 1.1 g (83%) de un producto sólido de color blanco. El producto se recristalizó de EtOH/AcOEt para dar un sólido cristalino de color blanco (30%) con R_f 0.55 (sistema IV) y un pf de 268.0-268.8 °C.

5-Cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (3)

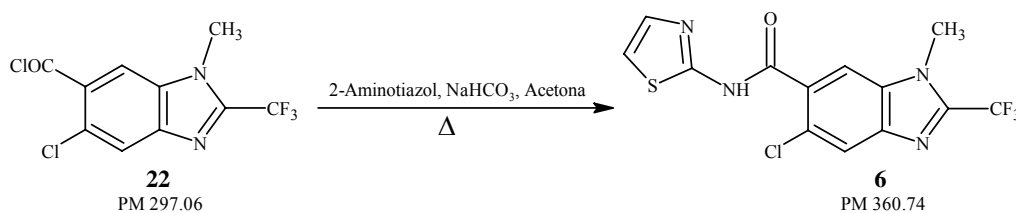
Al matraz de reacción que contiene al compuesto **22** se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Posteriormente se adicionó al matraz 0.42 g (0.8 eq, 2.87×10^{-3} mol) del 2-amino-5-nitrotiazol, 0.6 g (2eq, 7.18×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 20 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (50 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante una noche. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**22**). La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el NaHCO_3 , posteriormente, el filtrado se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el producto seco se decoloró con carbón activado (30%) en etanol, dando 1.3 g (93%) de un producto solidó de color amarillo. El producto se recrystalizó de DMF/agua para dar un sólido cristalino de color amarillo claro (42%) con R_f 0.54 (sistema IV) y un pf de 303.0-303.8°C.

6-cloro-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (4)

Al matraz de reacción conteniendo el cloruro de acido **16**, crudo y seco, se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Se agregó al matraz 0.4 g (1eq, 3.78×10^{-3} mol) de 2-aminotiazol, 0.63g (2eq, 7.56×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 25 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (60-70 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante dos horas. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**16**). La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el NaHCO_3 , posteriormente el filtrado se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el producto seco se decoloró con carbón activado (30%) en etanol, dando 1.1 g de un producto solidó de color blanco crema. El producto se recrystalizó de EtOH para dar un producto cristalino blanco (45 %) con R_f 0.42 (sistema IV) y un pf de 271.2-272.2 °C.

6-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (5)

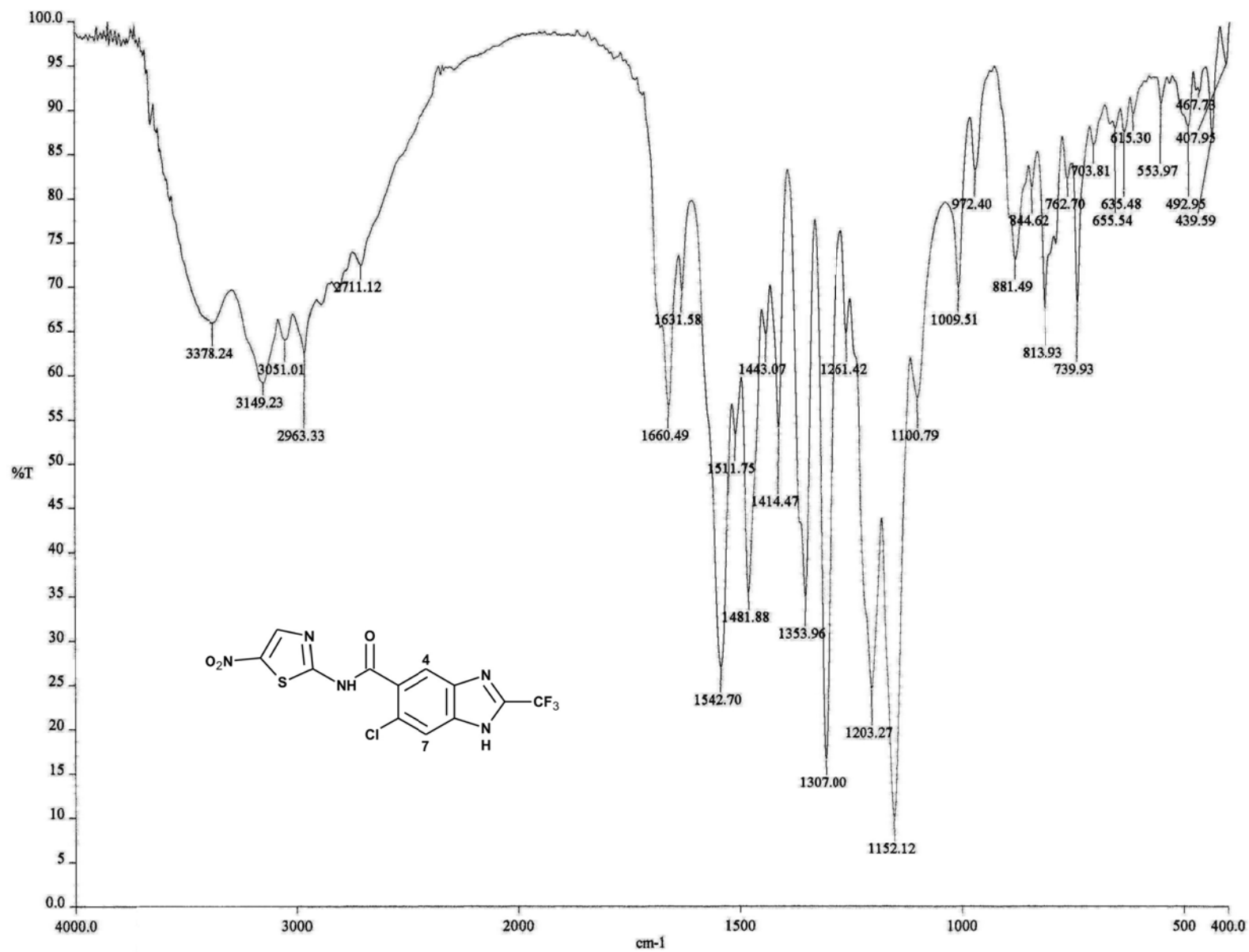
Al matraz de reacción conteniendo el cloruro de ácido **21**, crudo y seco, se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Se agregó al matraz 0.32 g (0.9 eq, 3.23×10^{-3} mol) de 2-aminotiazol, 0.6g (2eq, 7.18×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 20 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (60-70 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante una noche. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**21**). La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el NaHCO_3 , posteriormente, el filtrado se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el producto seco se decoloró con carbón activado (30%) en etanol, dando 1.0 g (83%) de un producto sólido de color blanco crema. El producto se recrystalizó de EtOH/AcOEt obteniendo un producto cristalino blanco (50 %) con R_f 0.37 (sistema I) y un pf de 277.0-278.1 °C.

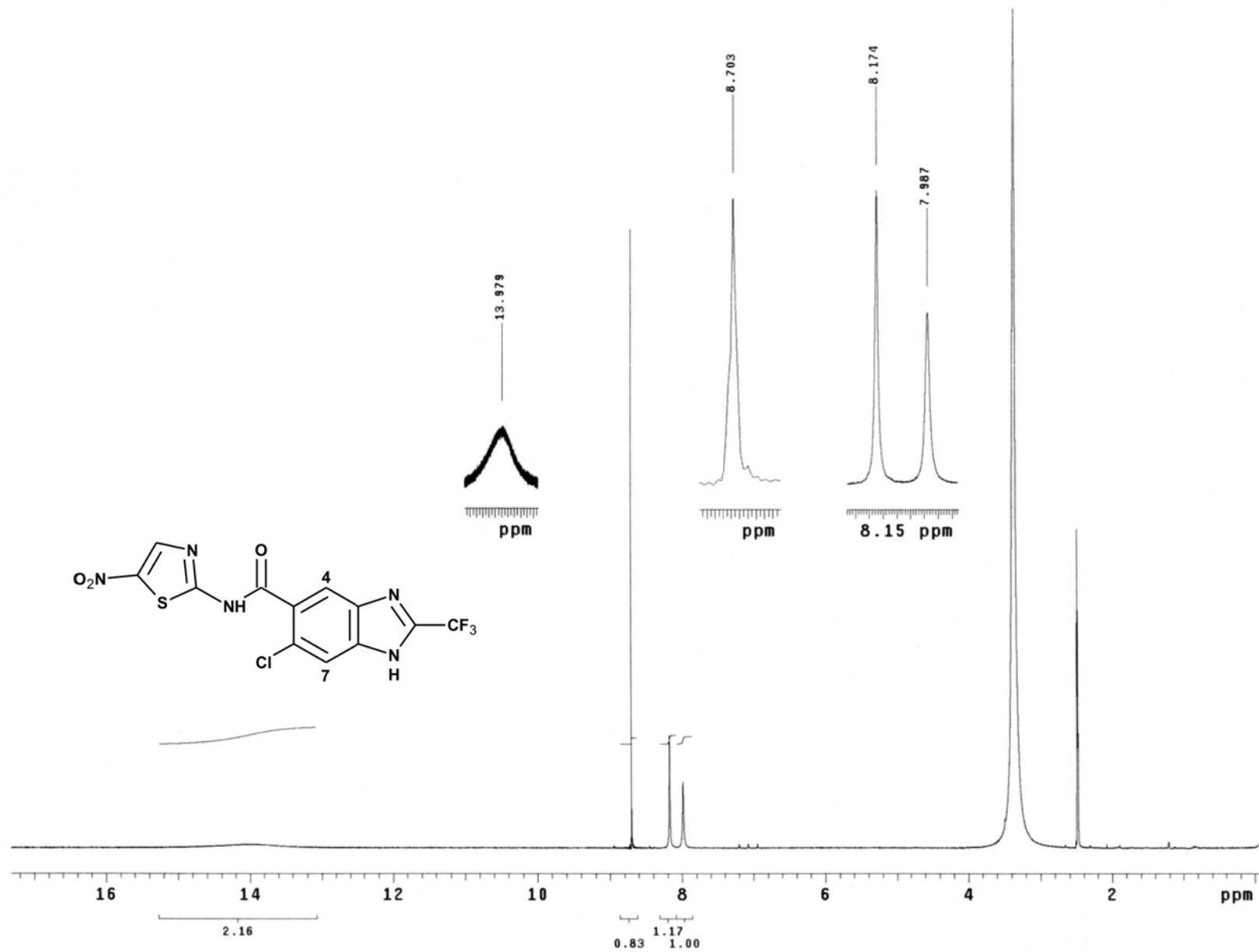
5-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (6)

Al matraz de reacción anterior, conteniendo el cloruro de ácido **22**, se le adaptó un termómetro, un refrigerante en posición de reflujo y una trampa de humedad. Se agregó al matraz 0.32 g (0.9 eq, 3.23×10^{-3} mol) de 2-aminotiazol, 0.6g (2eq, 7.18×10^{-3} mol) de NaHCO_3 y 20 mL de acetona. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (60 °C) y se mantuvo con agitación magnética durante una hora. La ccf (sistema IV) mostró el consumo de la materia prima (**22**). La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el NaHCO_3 , posteriormente, el filtrado se llevó a sequedad en el rotaevaporador, el producto seco se decoloró con carbón activado (30%) en etanol, dando 1.2 g (93%) de un producto sólido de color blanco. El producto se recrystalizó de MeOH/AcOEt para dar un sólido cristalino blanco (50 %) con R_f 0.56 (sistema IV) y un pf de 287.0-287.9 °C.

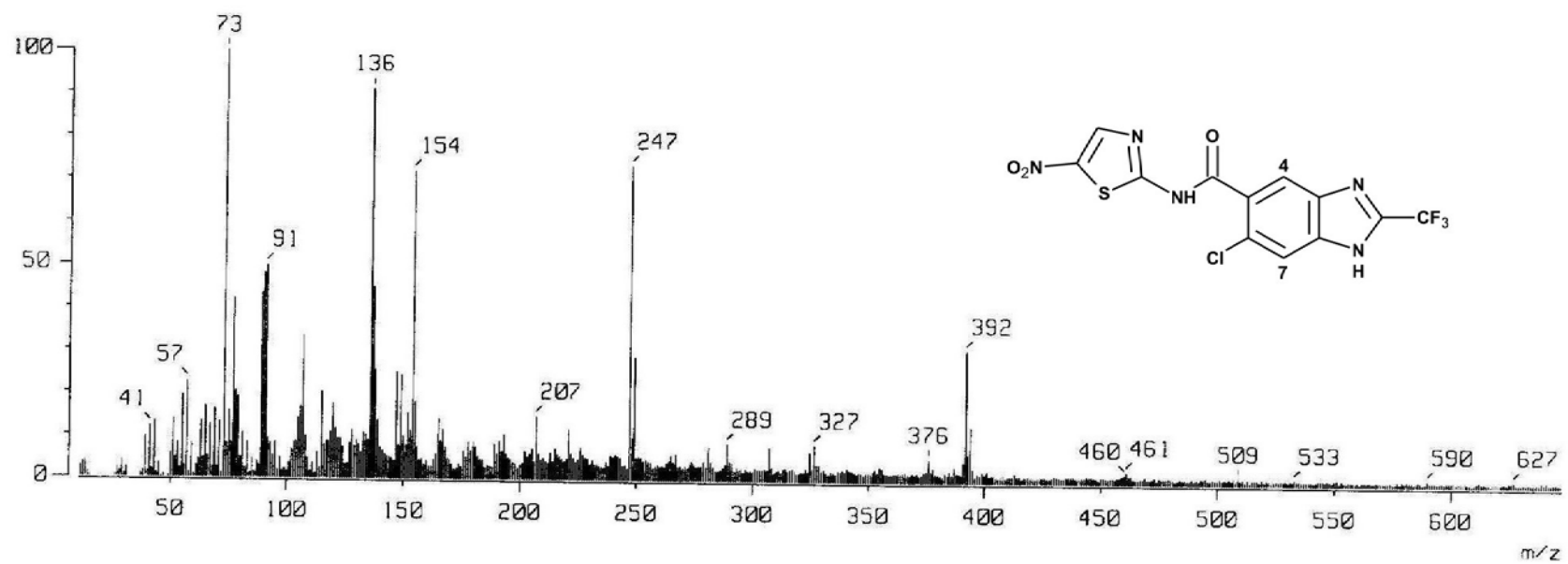
13.2. ANEXO B: ESPECTROS

13.2.1. ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS FINALES

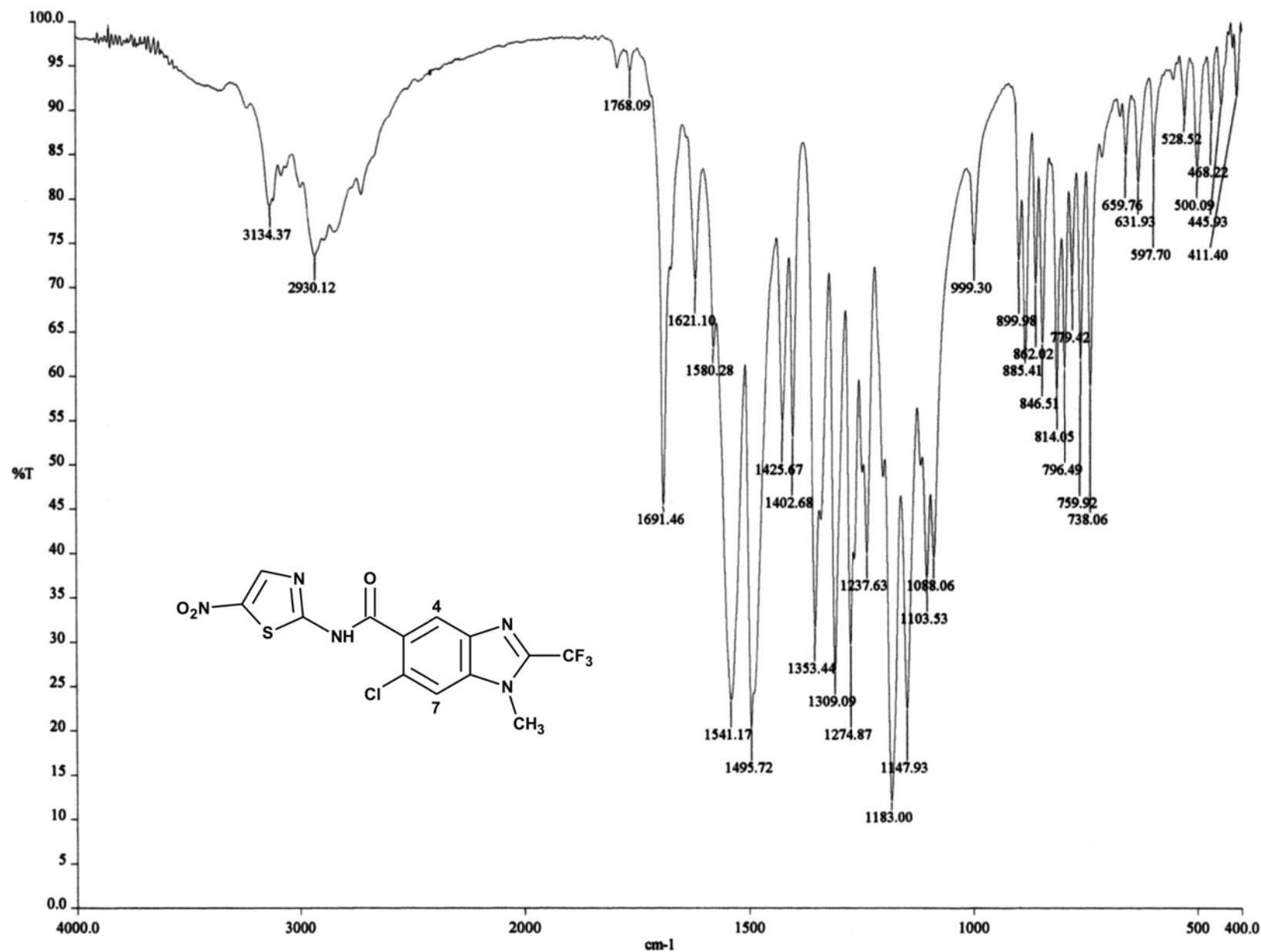
ESPECTRO 1. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (1)



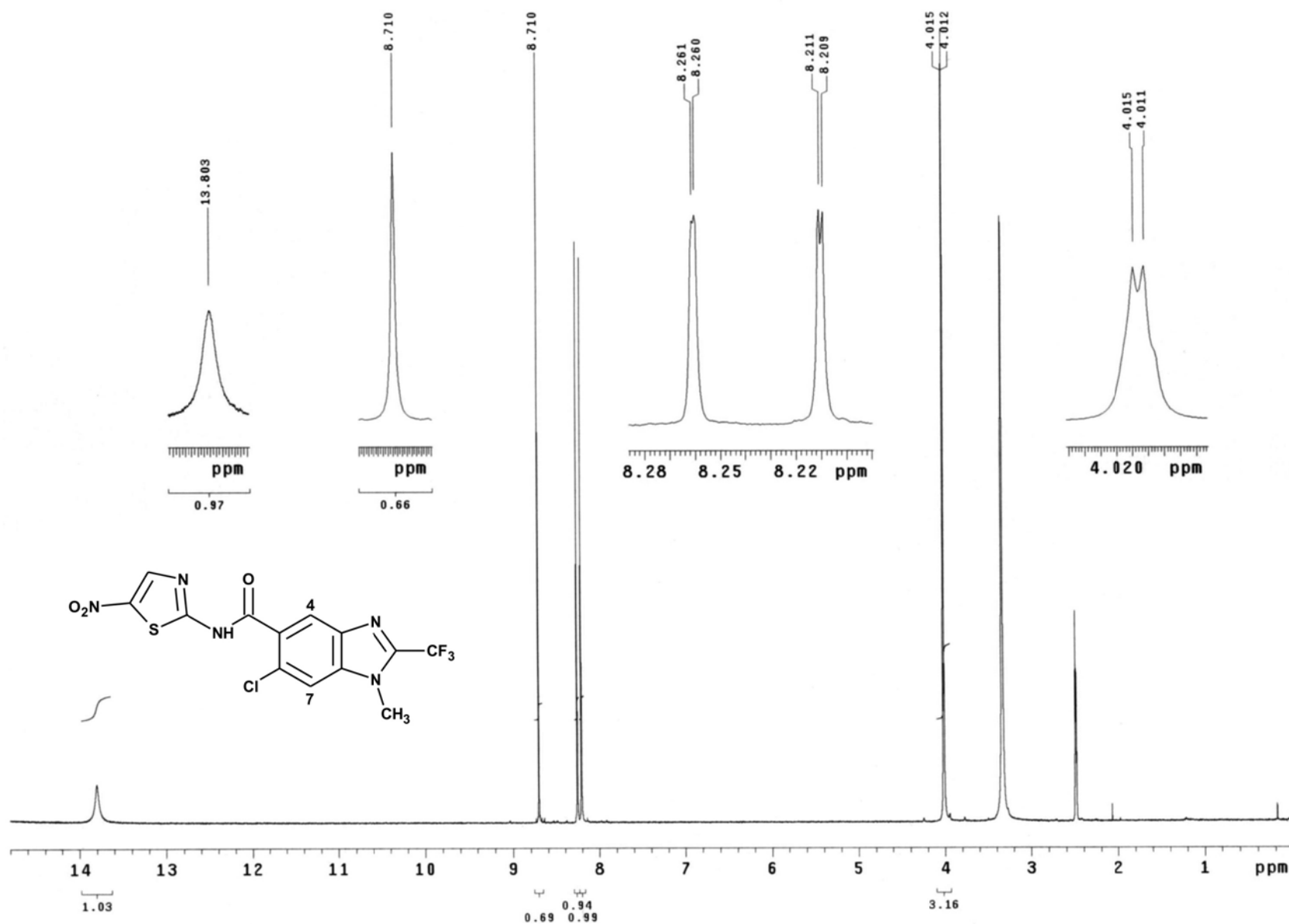
ESPECTRO 2. RMN ^1H , (TMS, DMSO) ppm: 6-cloro-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (1)



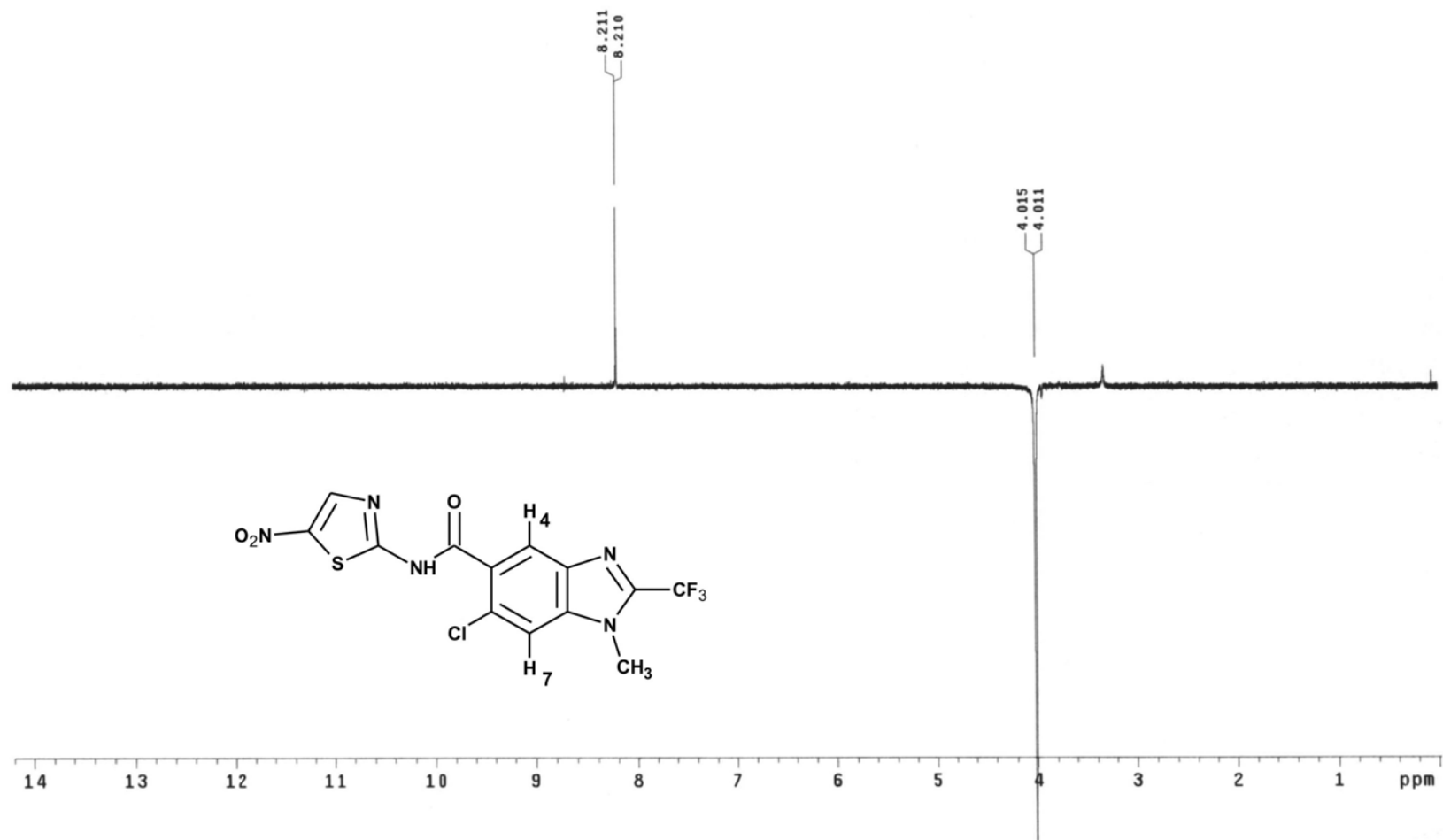
ESPECTRO 3. EM, (FAB+/ID) m/z: 6-cloro-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (1)



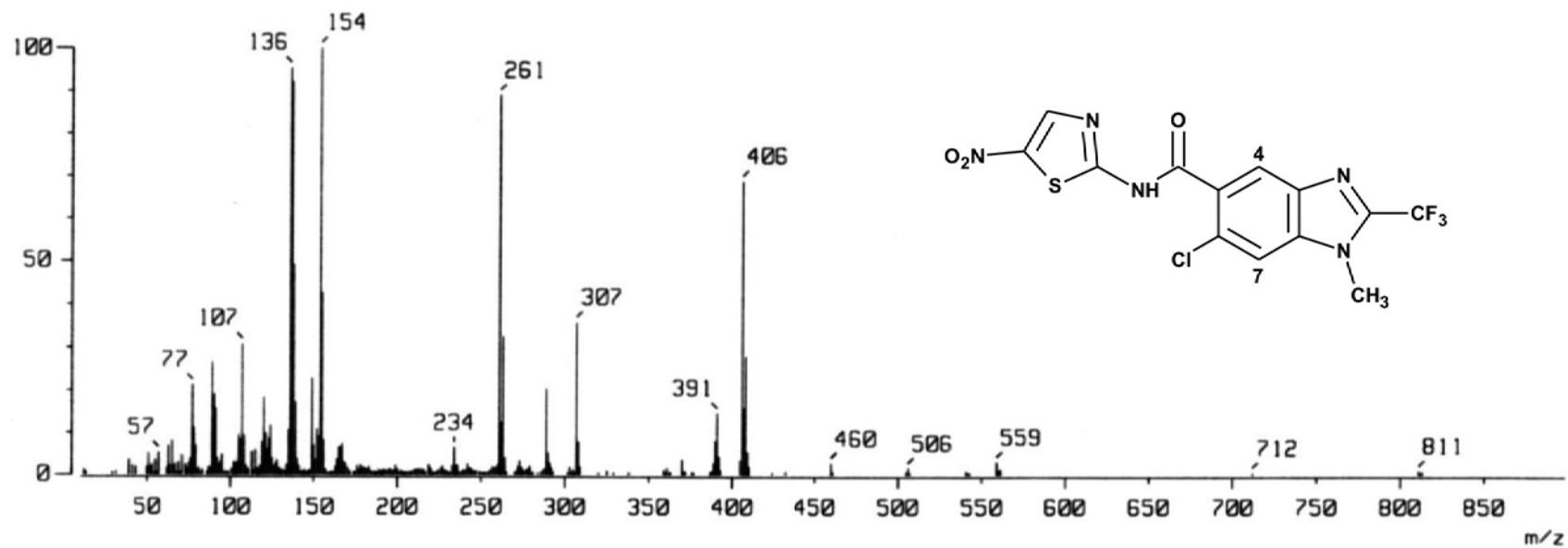
ESPECTRO 4. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (2)



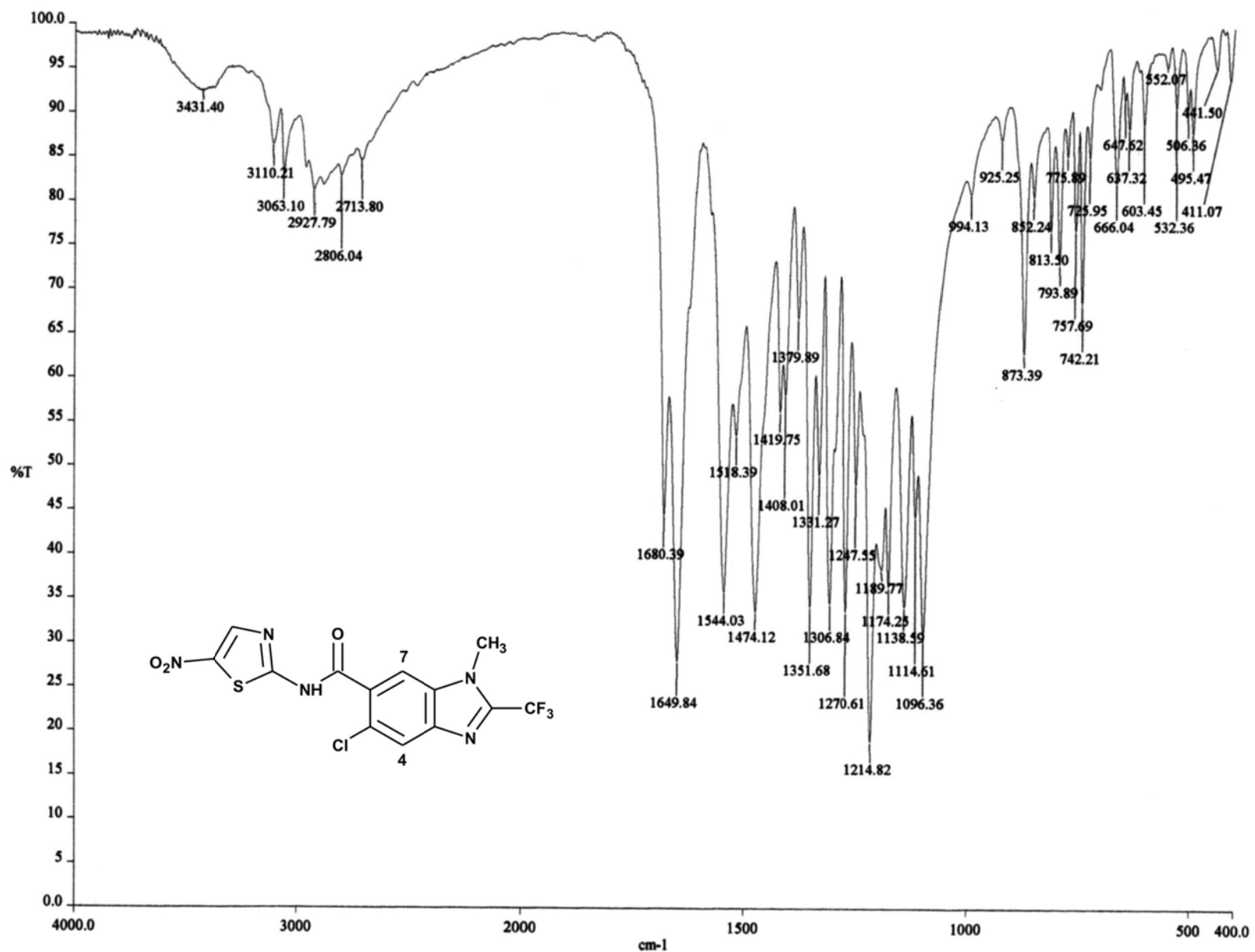
ESPECTRO 5. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (2)



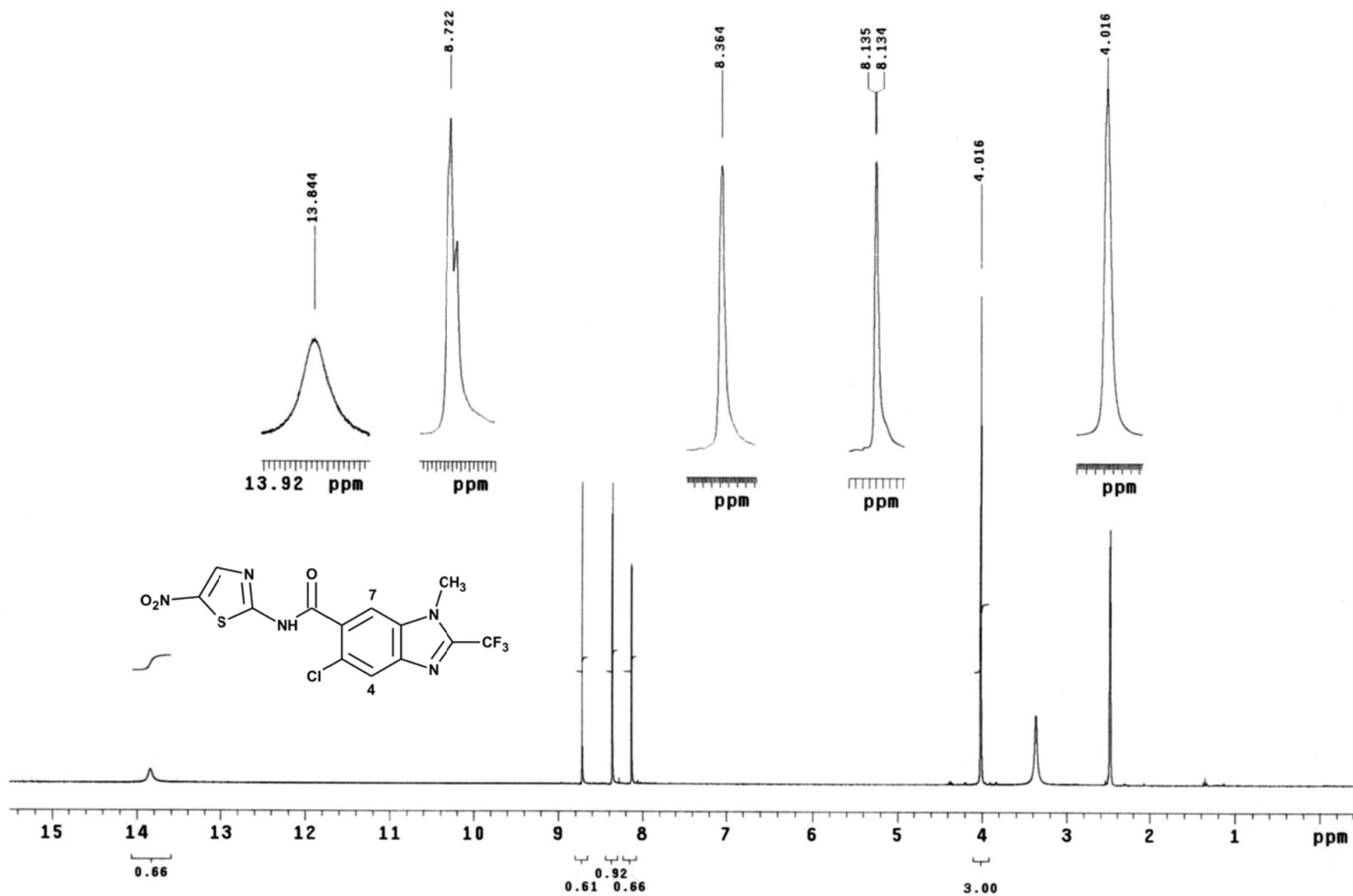
ESPECTRO NOE. RMN ^1H , (DMSO) ppm: 6-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (2)



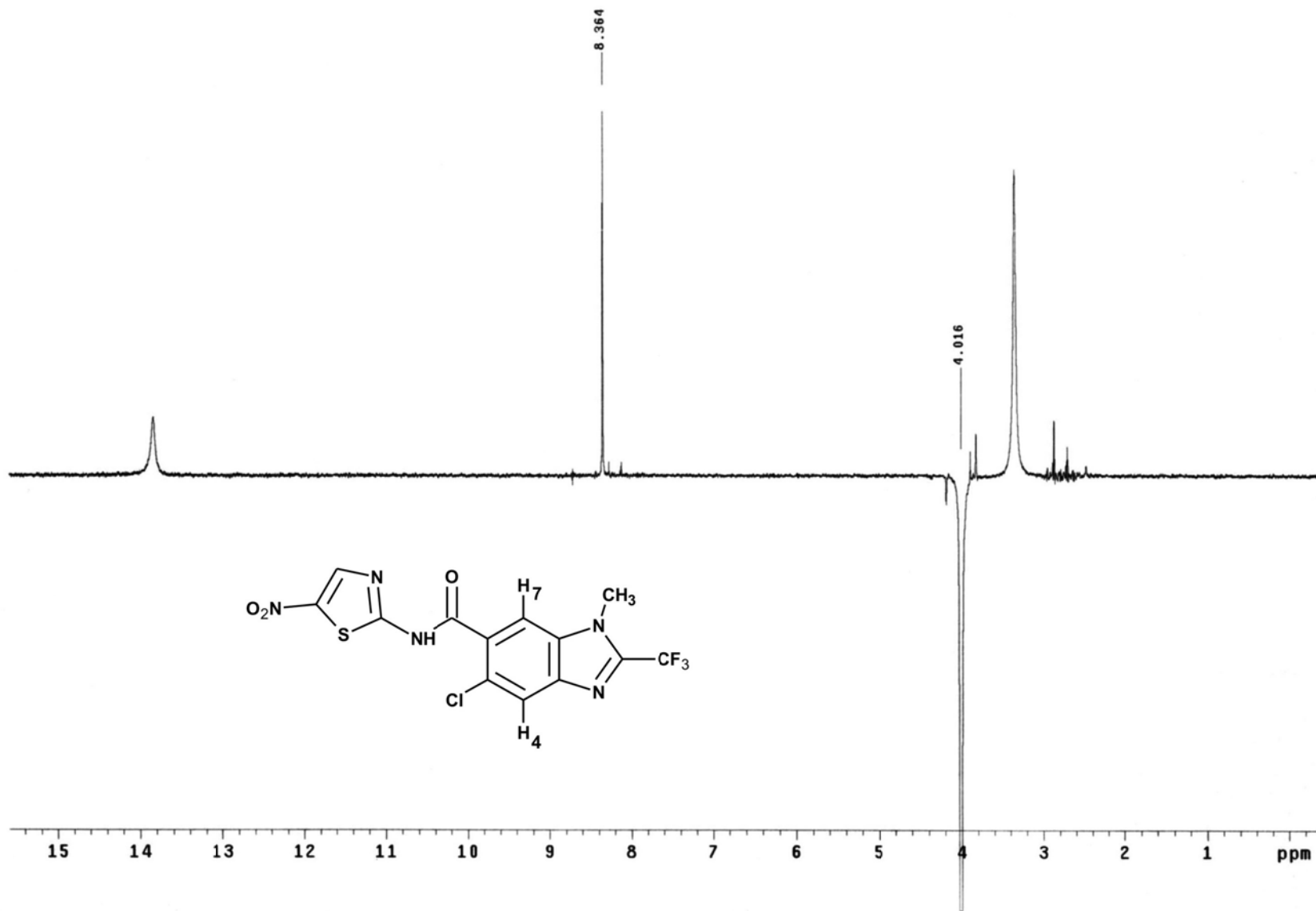
ESPECTRO 6. EM, (FAB+/ID) m/z: 6-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (2)



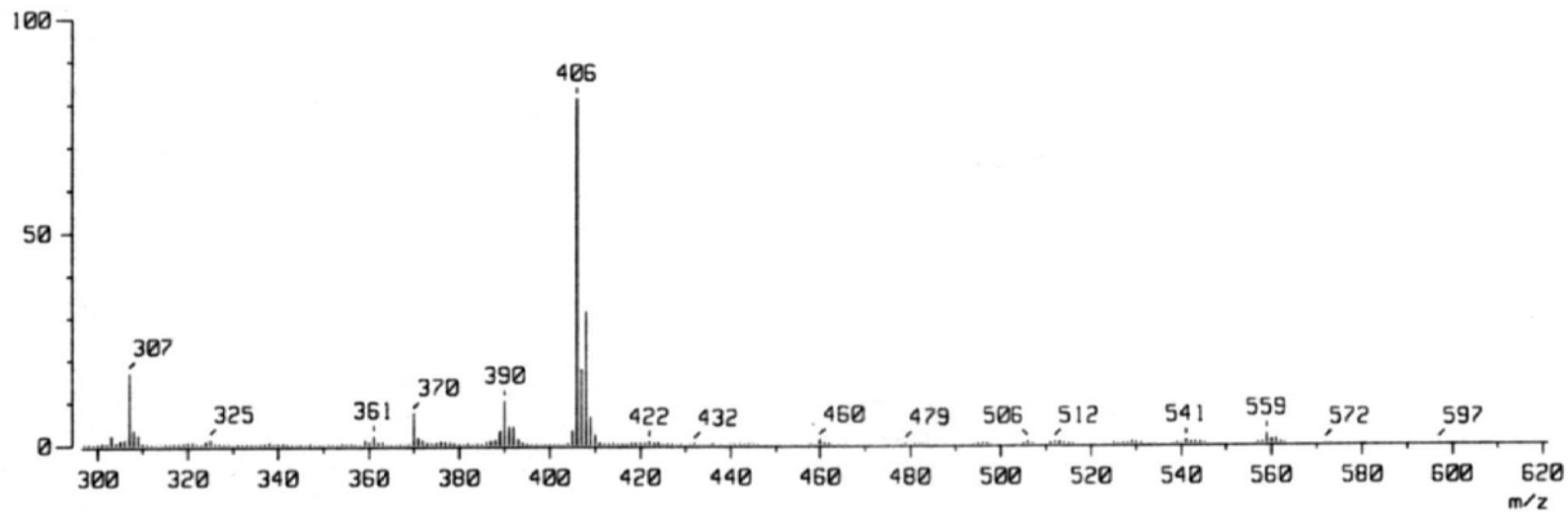
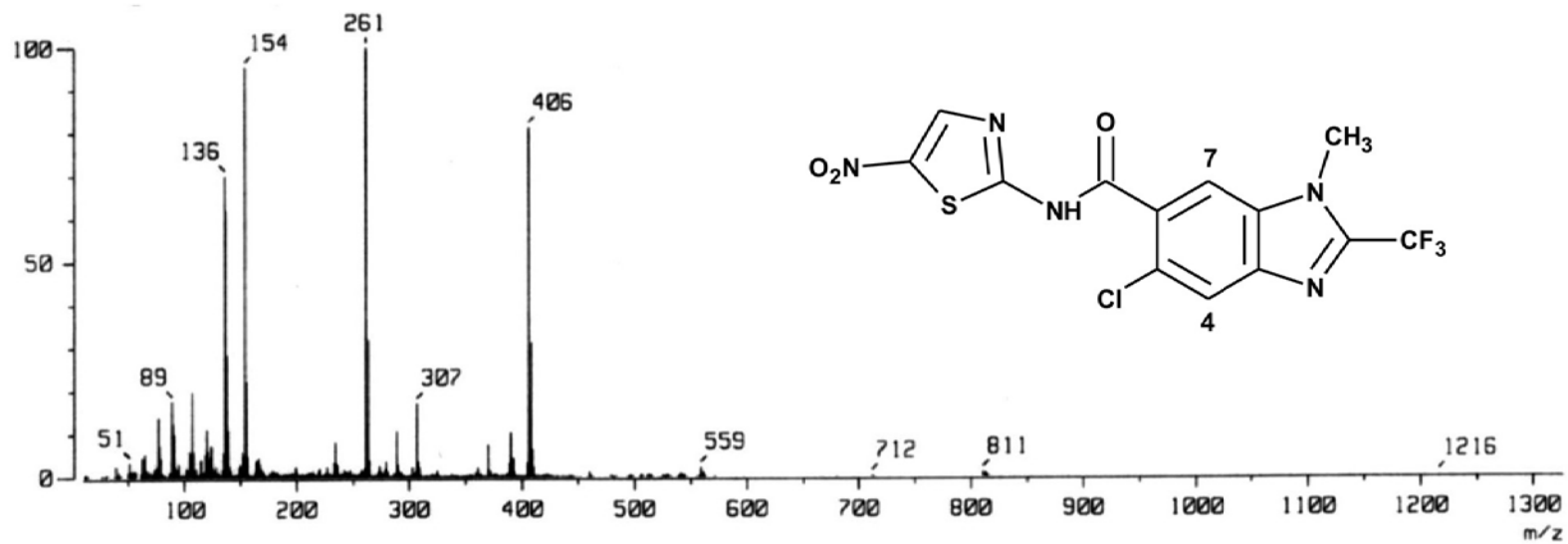
ESPECTRO 7. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 5-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (3)



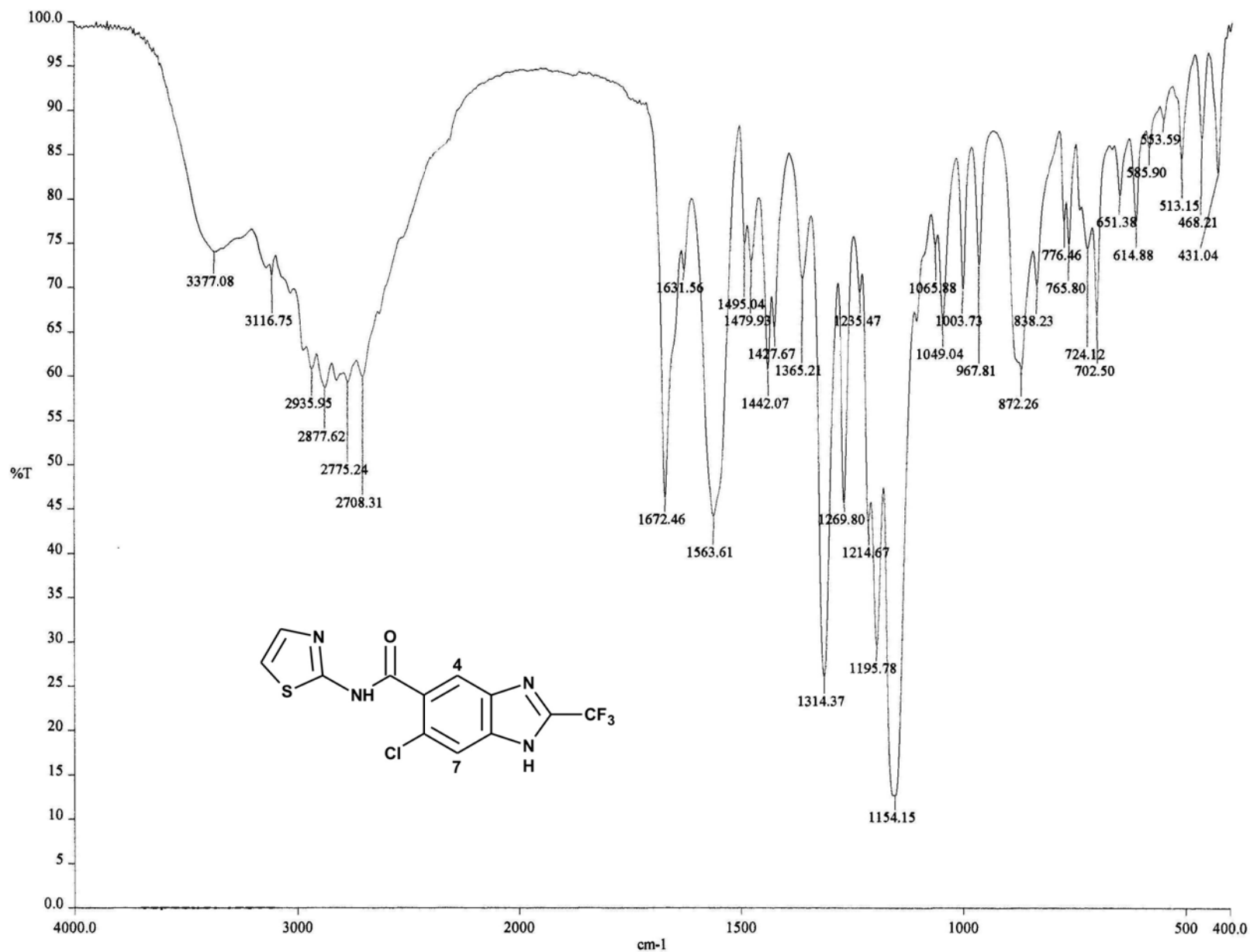
ESPECTRO 8. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: 5-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (3)



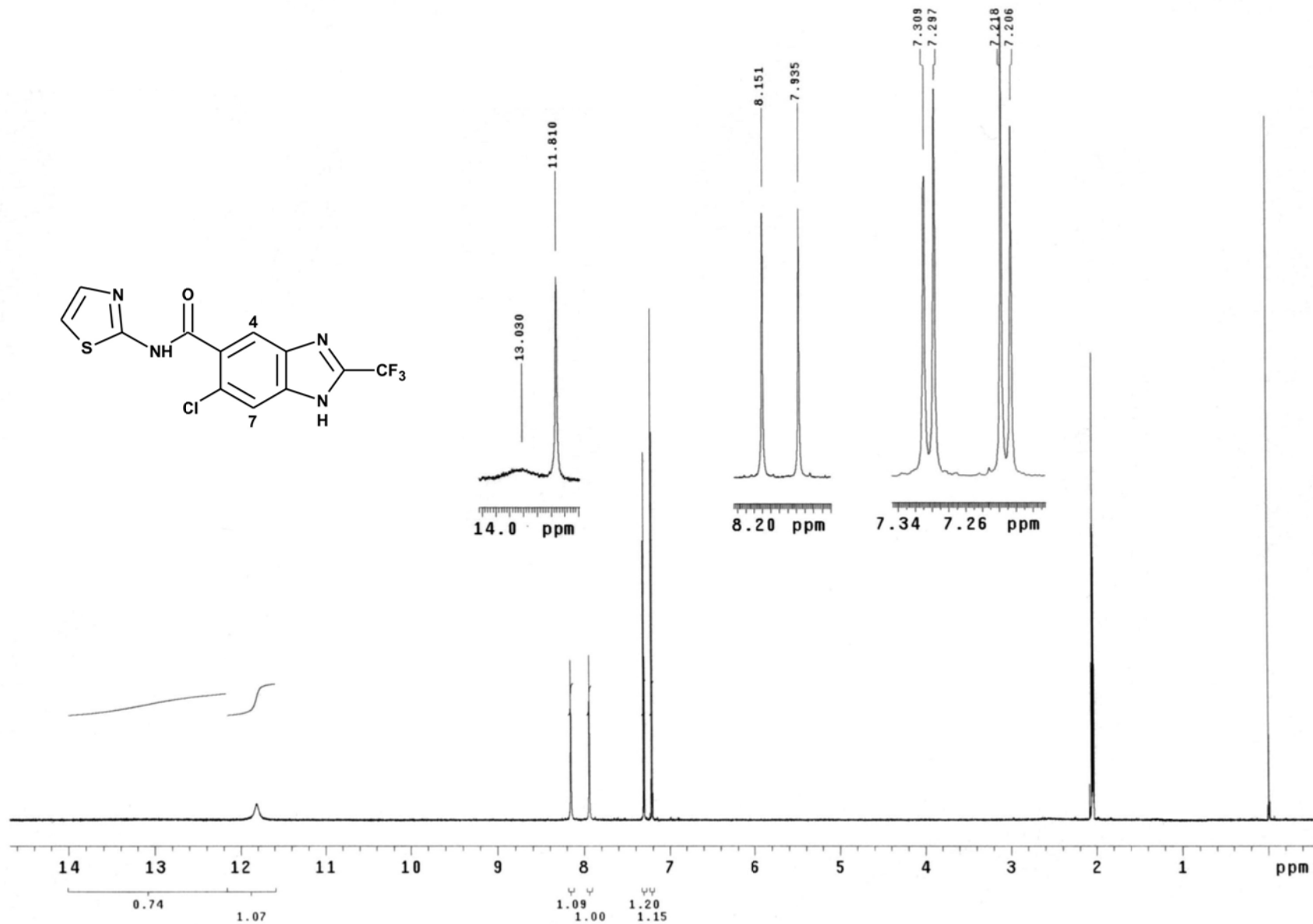
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (DMSO) ppm: 5-cloro-1-metil-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (3)



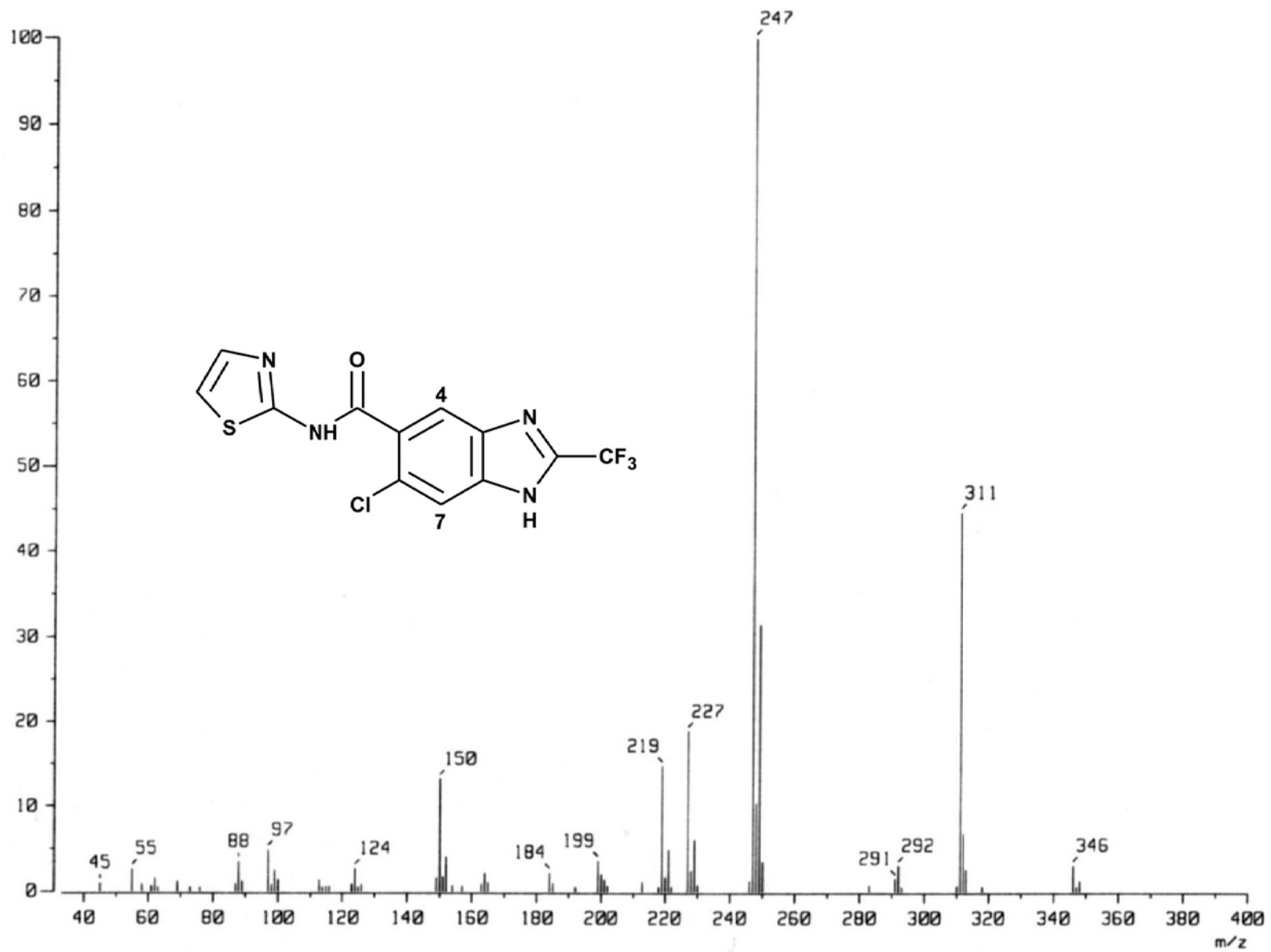
ESPECTRO 9. EM, (FAB+/ID) m/z: 5-cloro-1-metil-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (3)



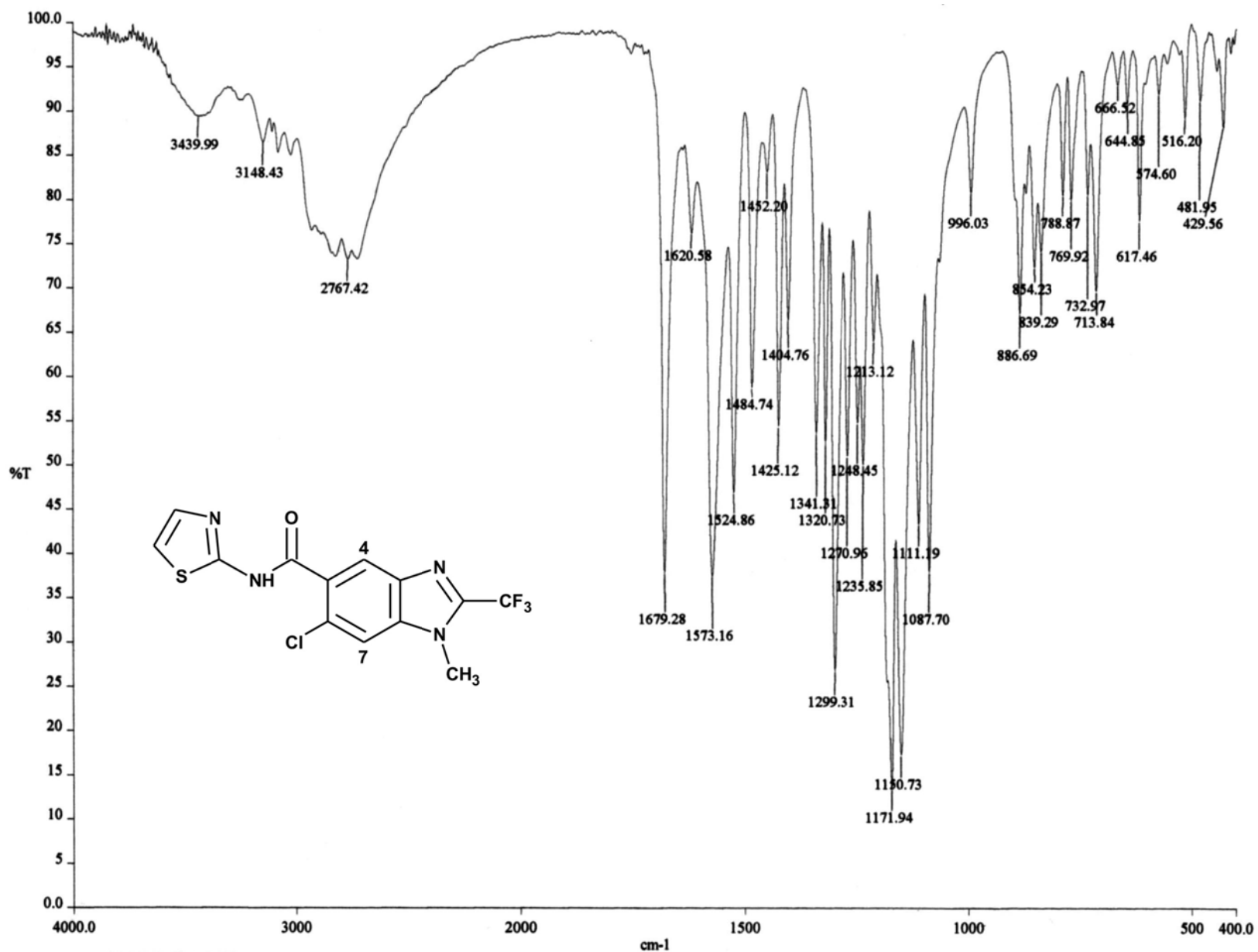
ESPECTRO 10. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-cloro-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (4)



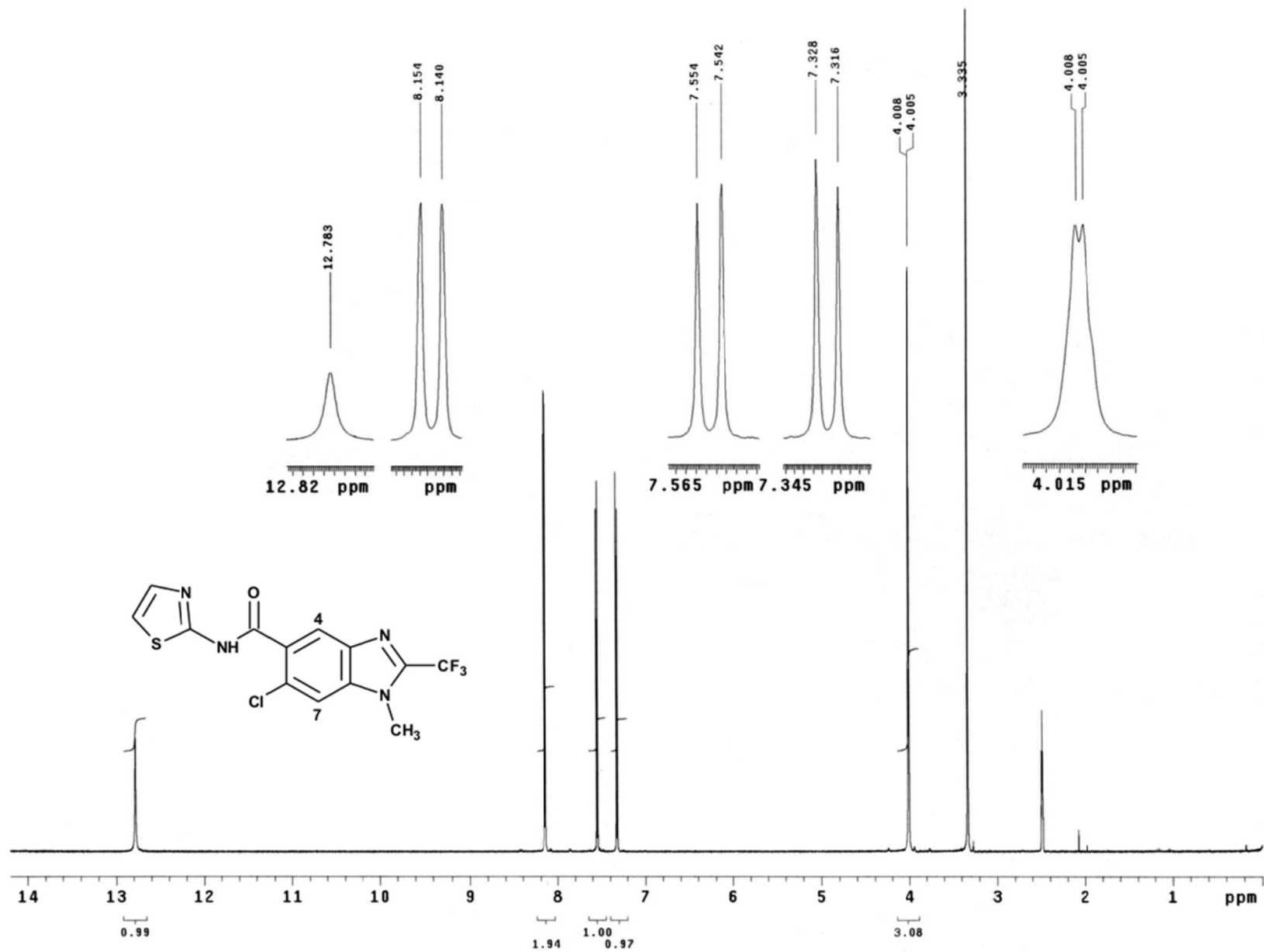
ESPECTRO 11. RMN ¹H, (TMS, Acetona) ppm: 6-cloro-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (4)



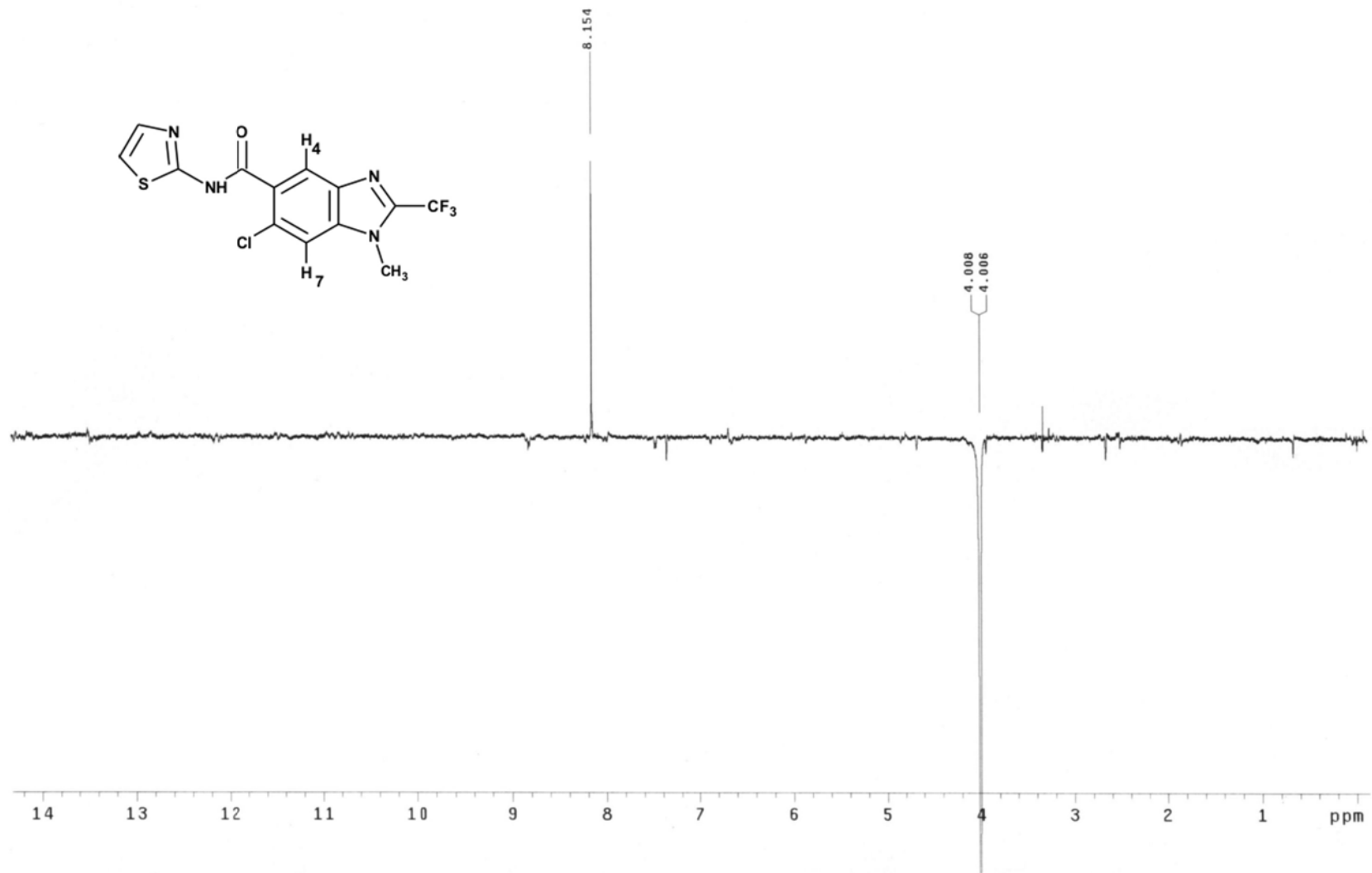
ESPECTRO 12. EM, (IE/ID) m/z: 6-cloro-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (4)



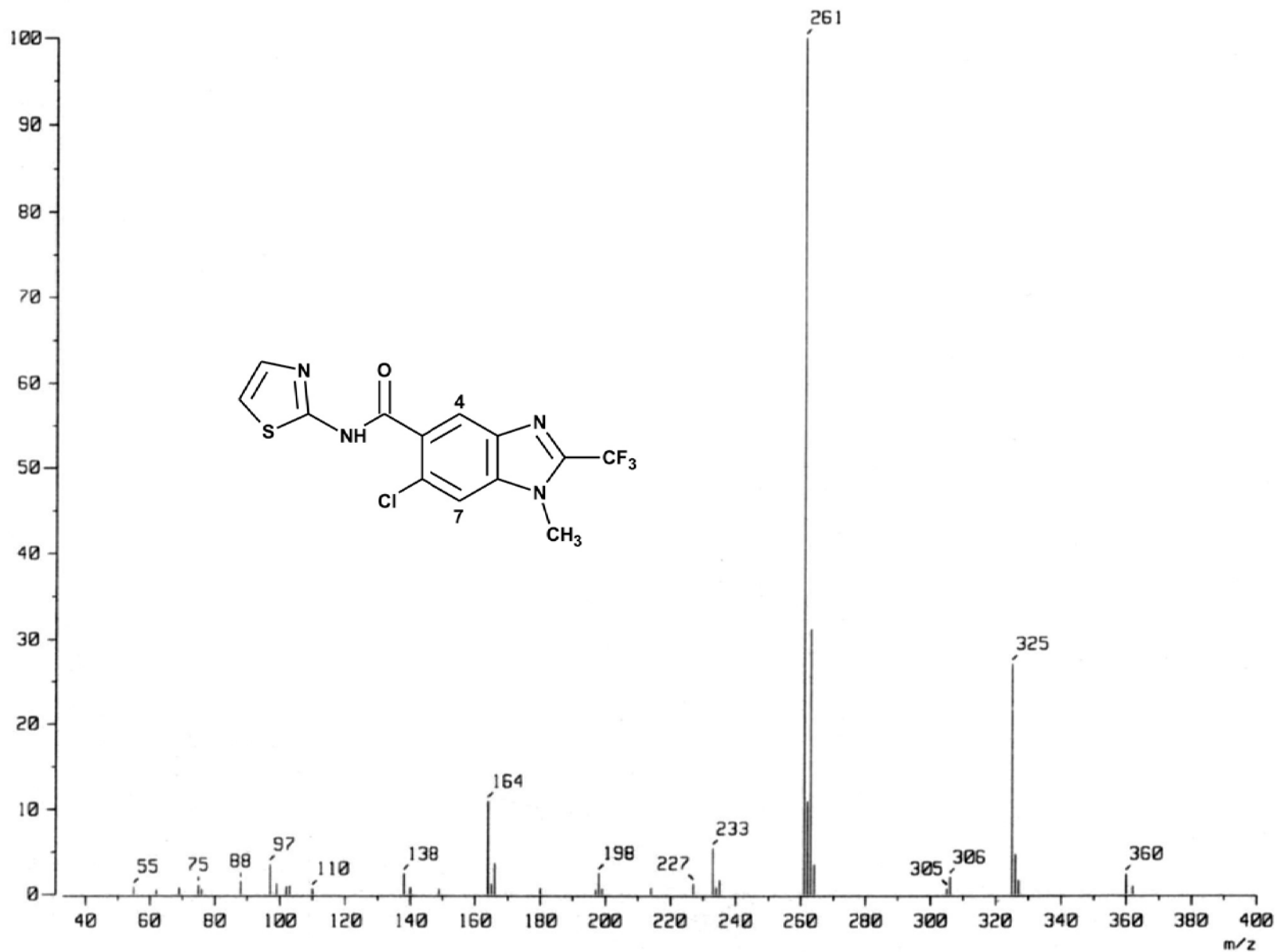
ESPECTRO 13. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (5)



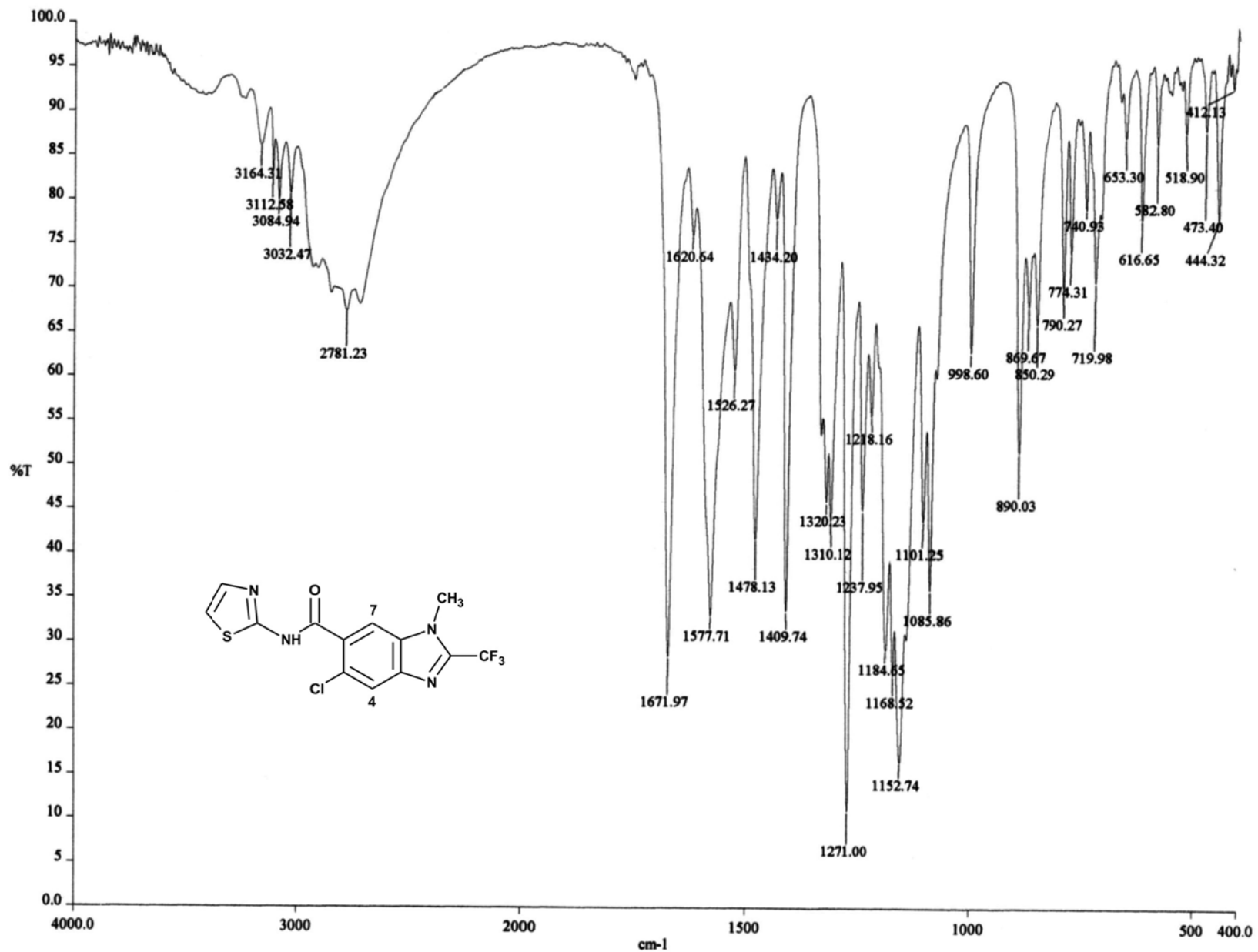
ESPECTRO 14. RMN ^1H , (TMS, CDCl_3) ppm: 6-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (5)



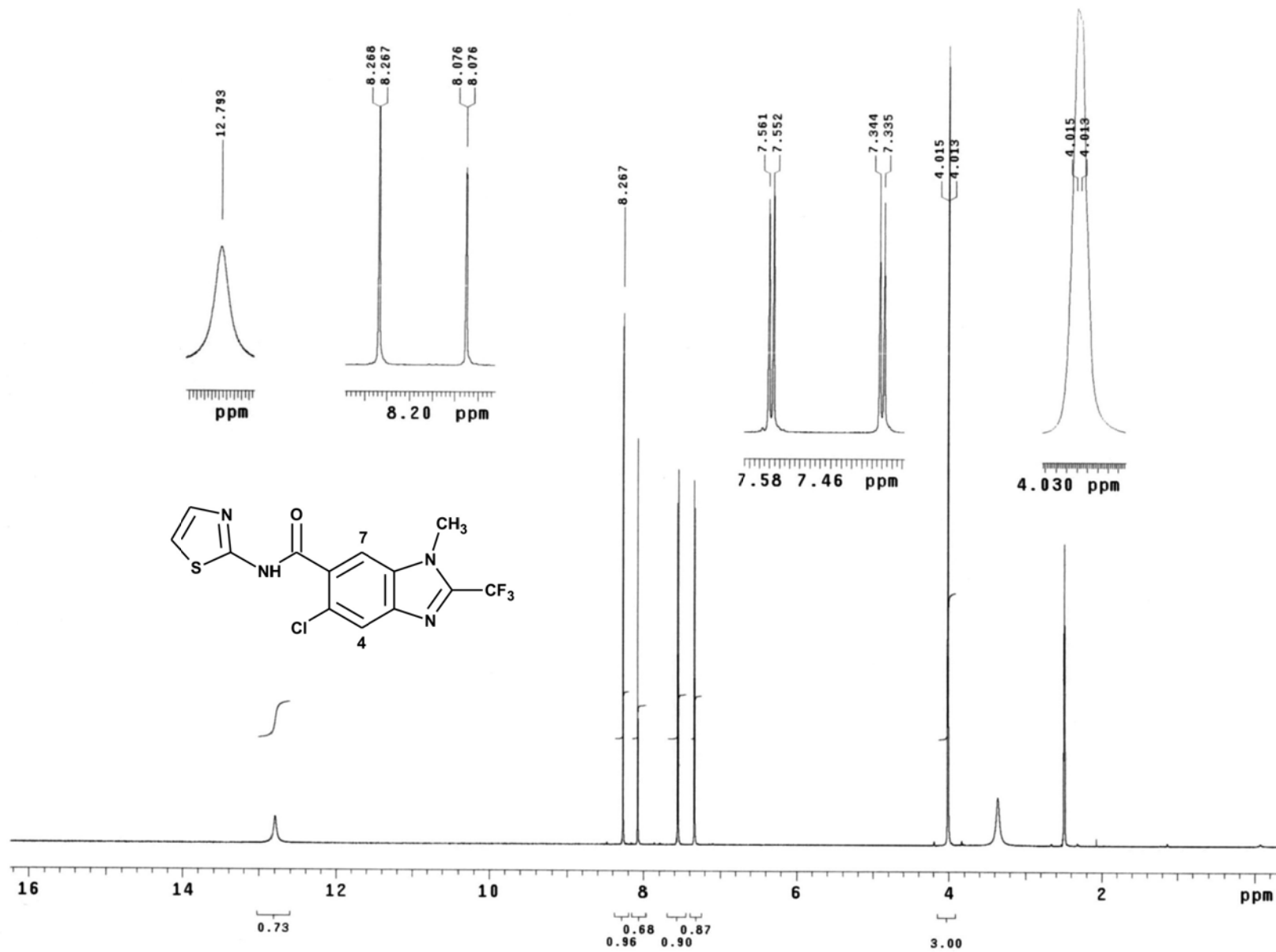
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (CDCl₃) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (5)



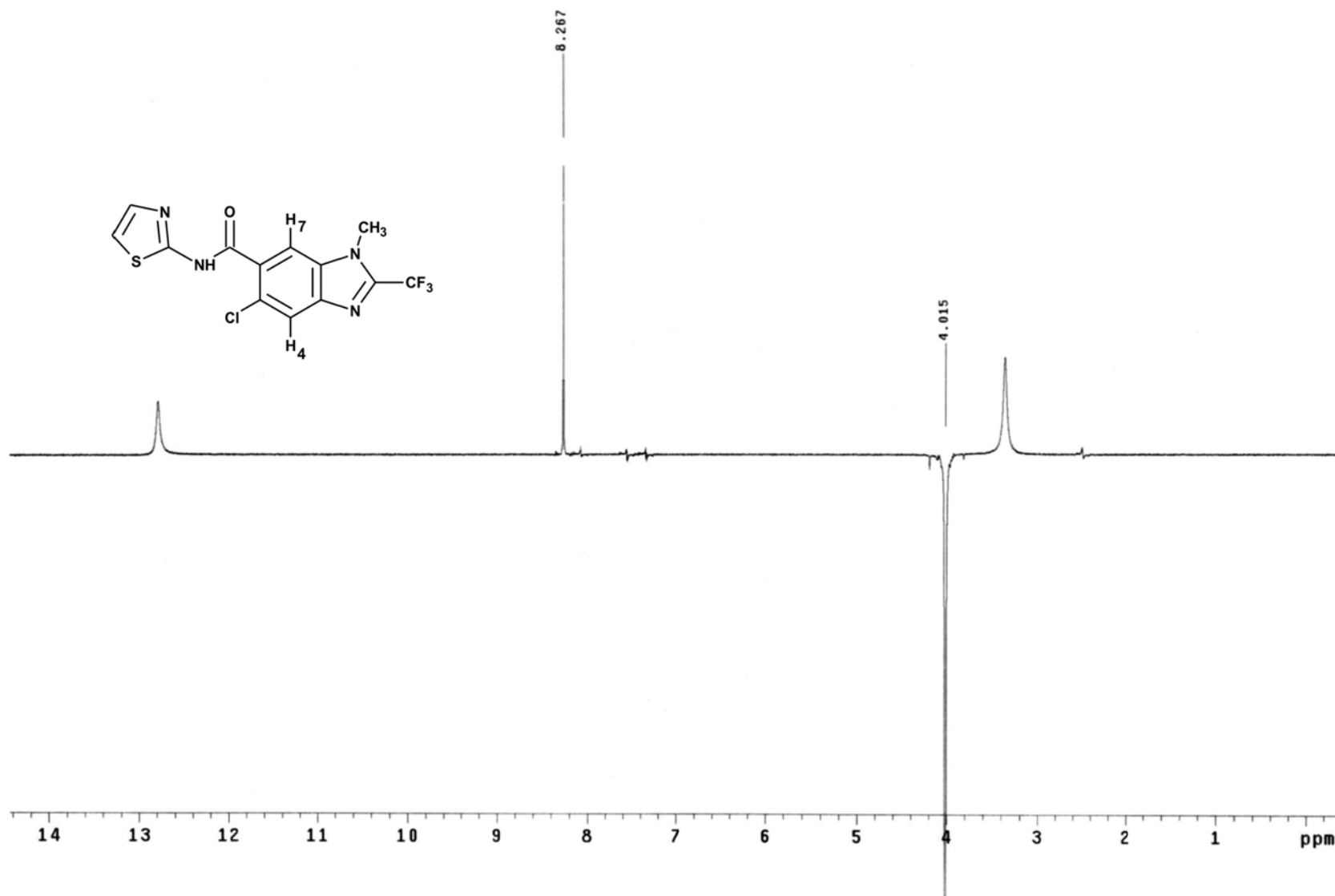
ESPECTRO 15. EM, (IE/CG) m/z: 6-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (5)



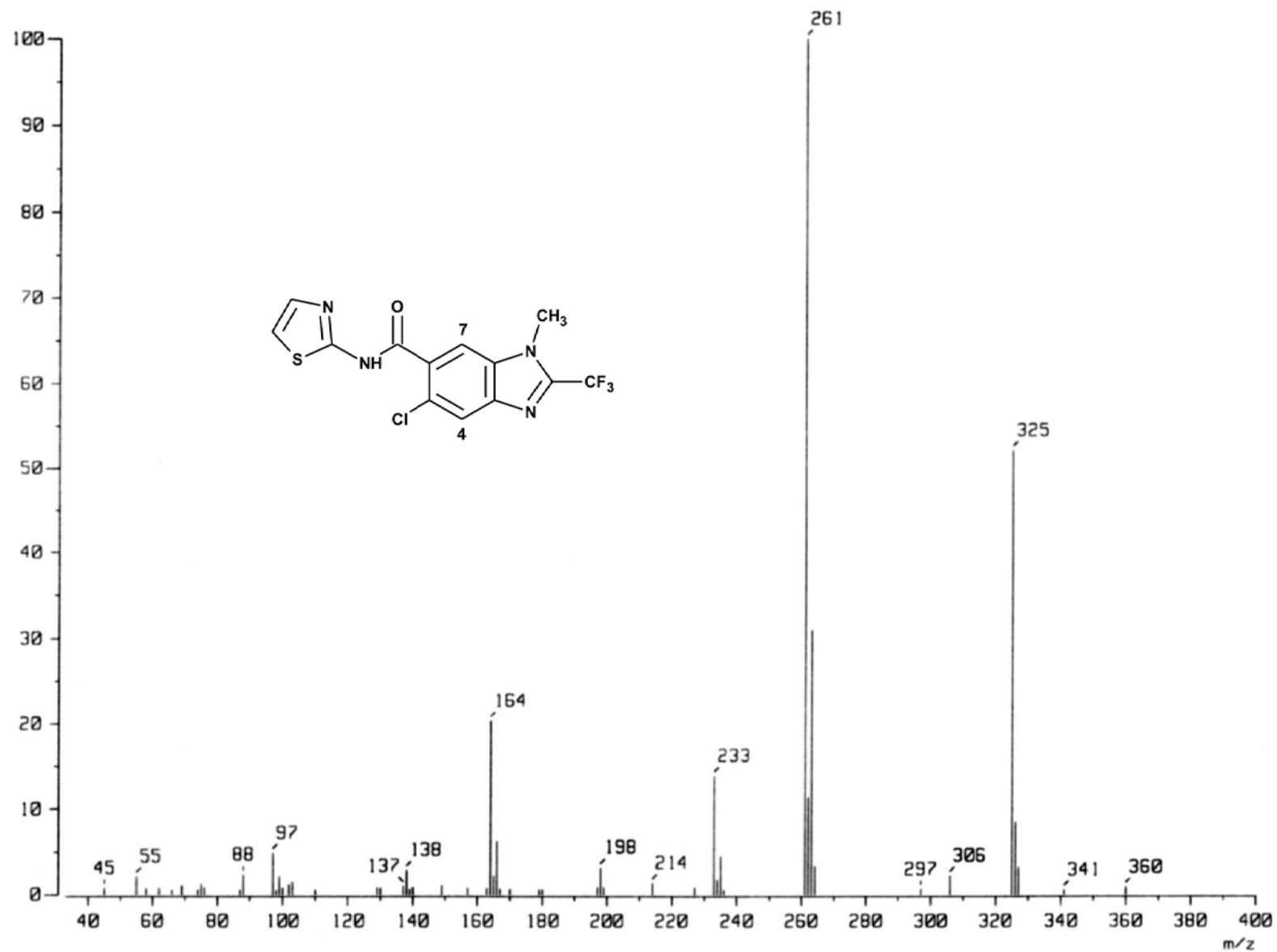
ESPECTRO 16. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 5-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (6)



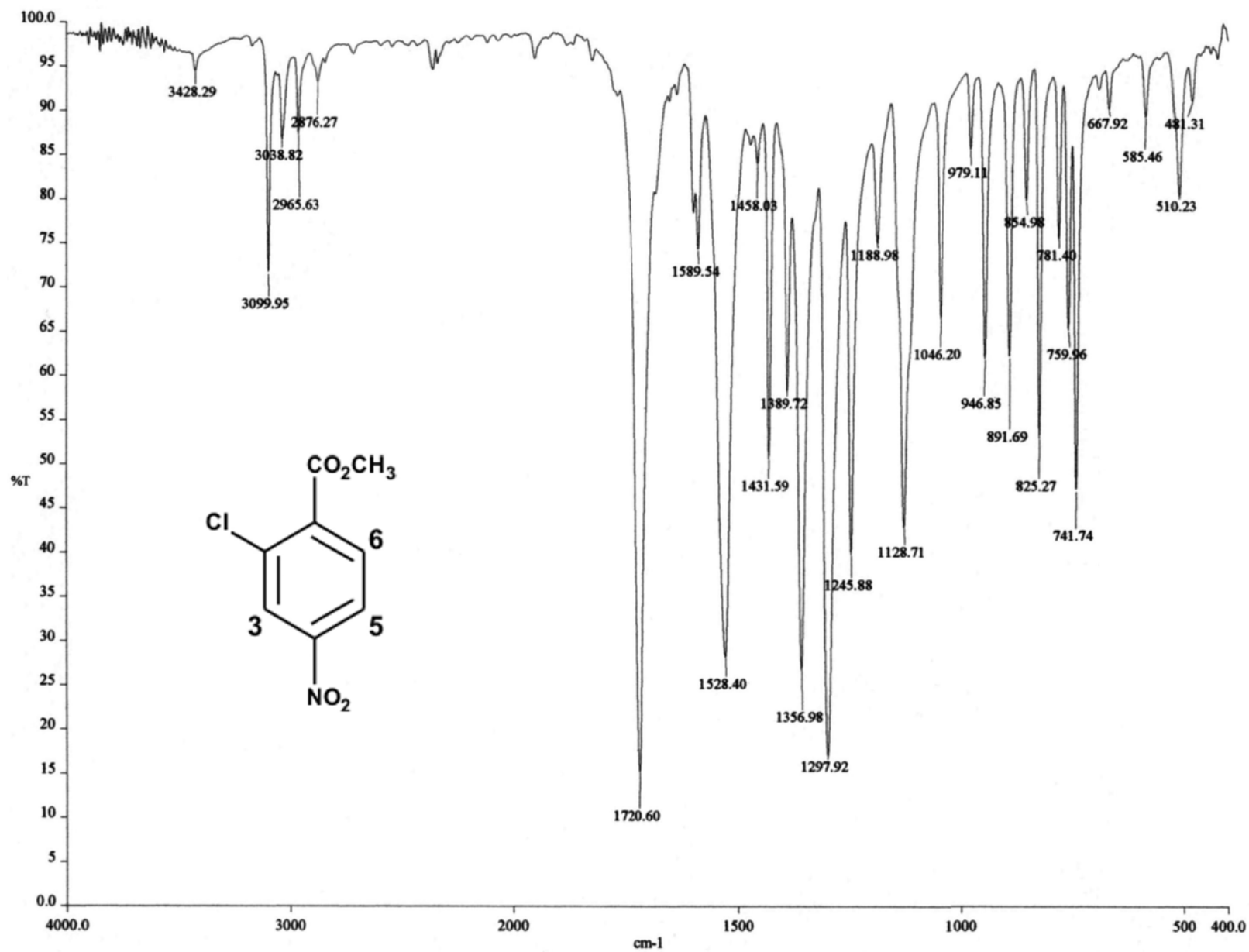
ESPECTRO 17. RMN ^1H , (TMS, CDCl_3) ppm: 5-cloro-1-metil-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**6**)



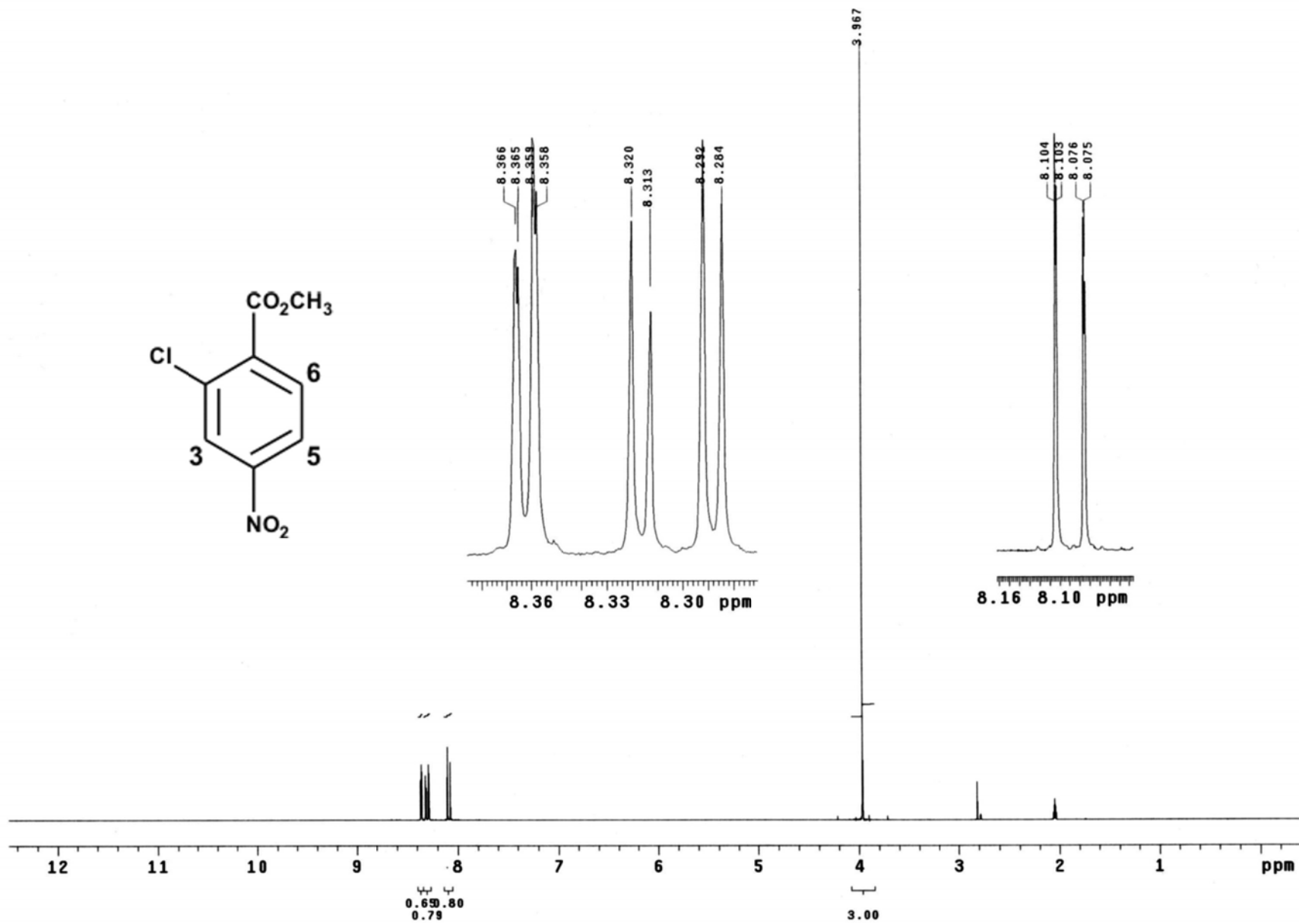
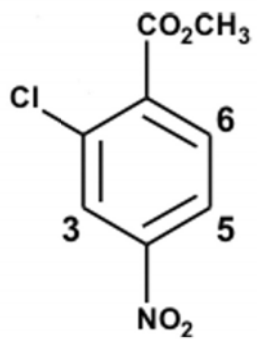
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (TMS, CDCl₃) ppm: 5-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (6)



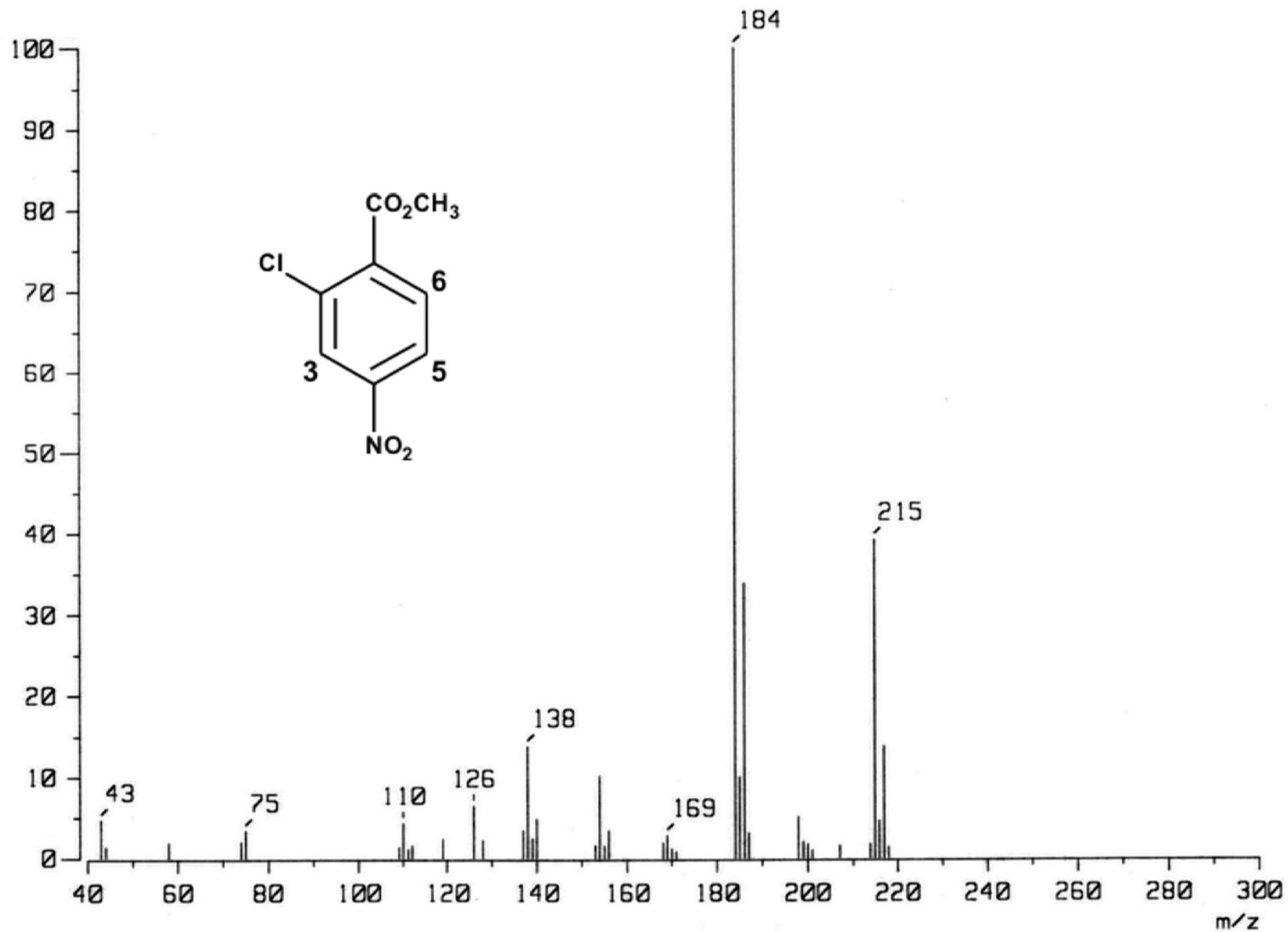
ESPECTRO 18. EM, (IE/ID) m/z: 5-cloro-1-metil-N-(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (6)



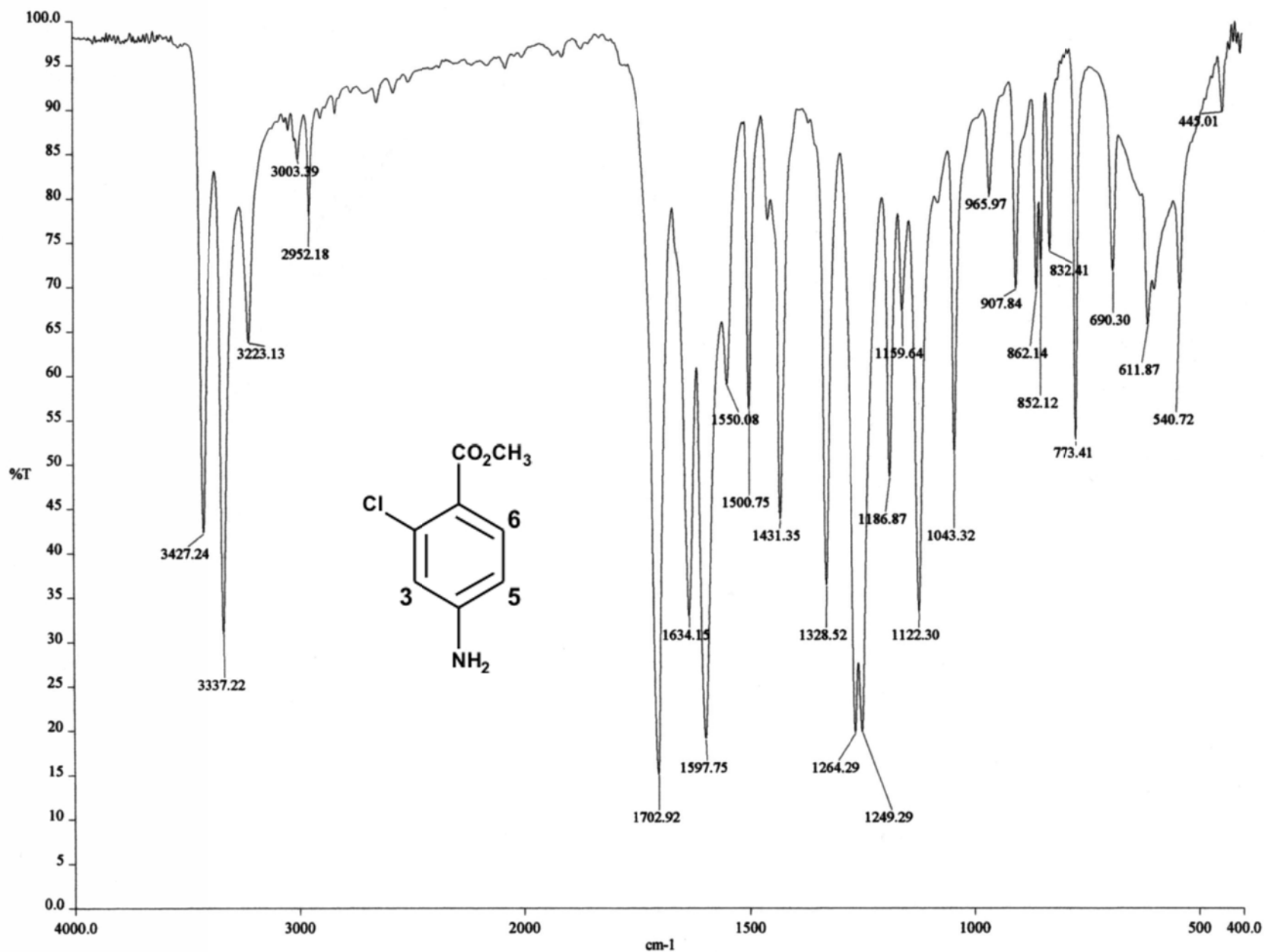
ESPECTRO 19. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (8)



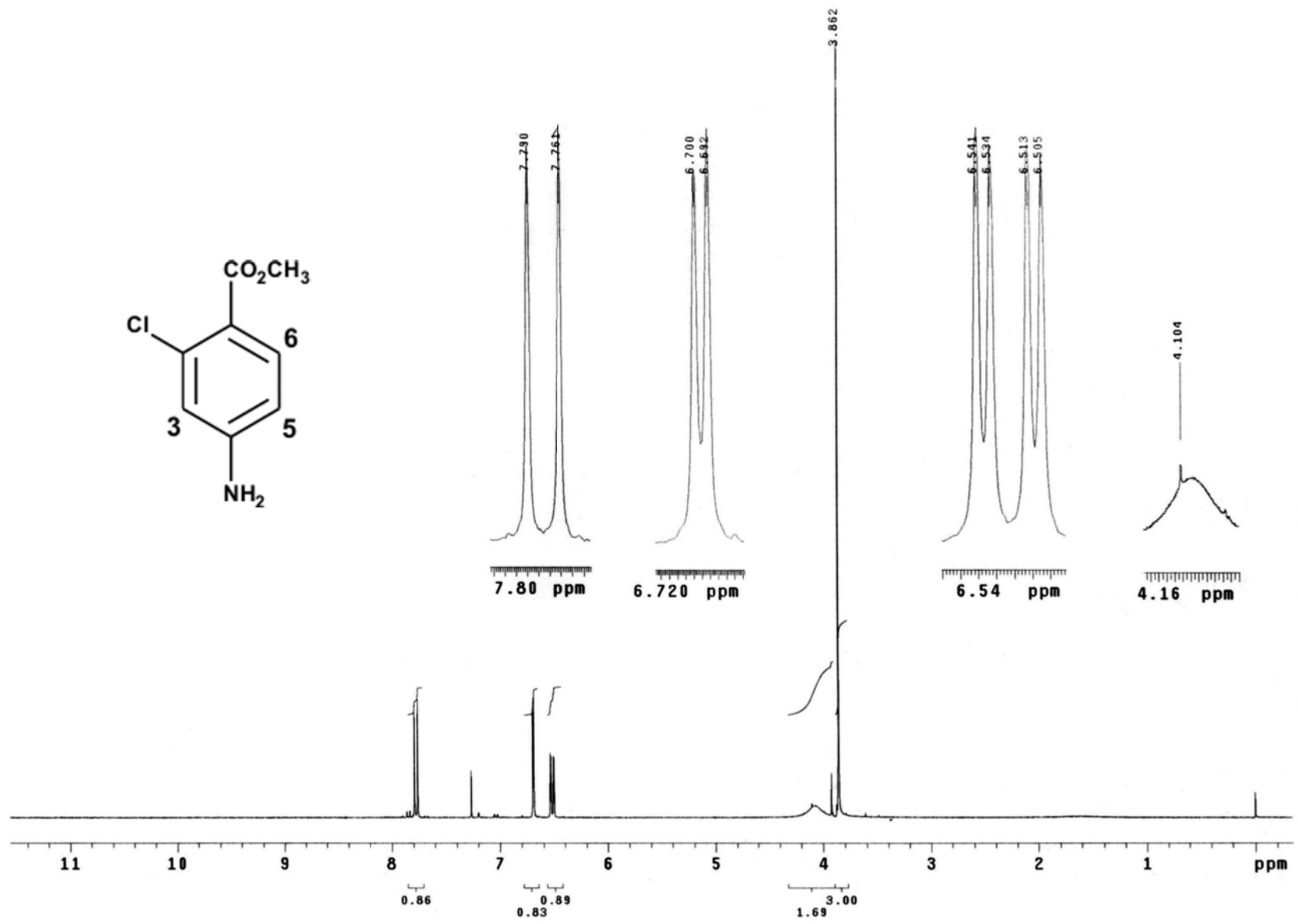
ESPECTRO 20. RMN ¹H, (TMS, CDCl₃) ppm: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (8)



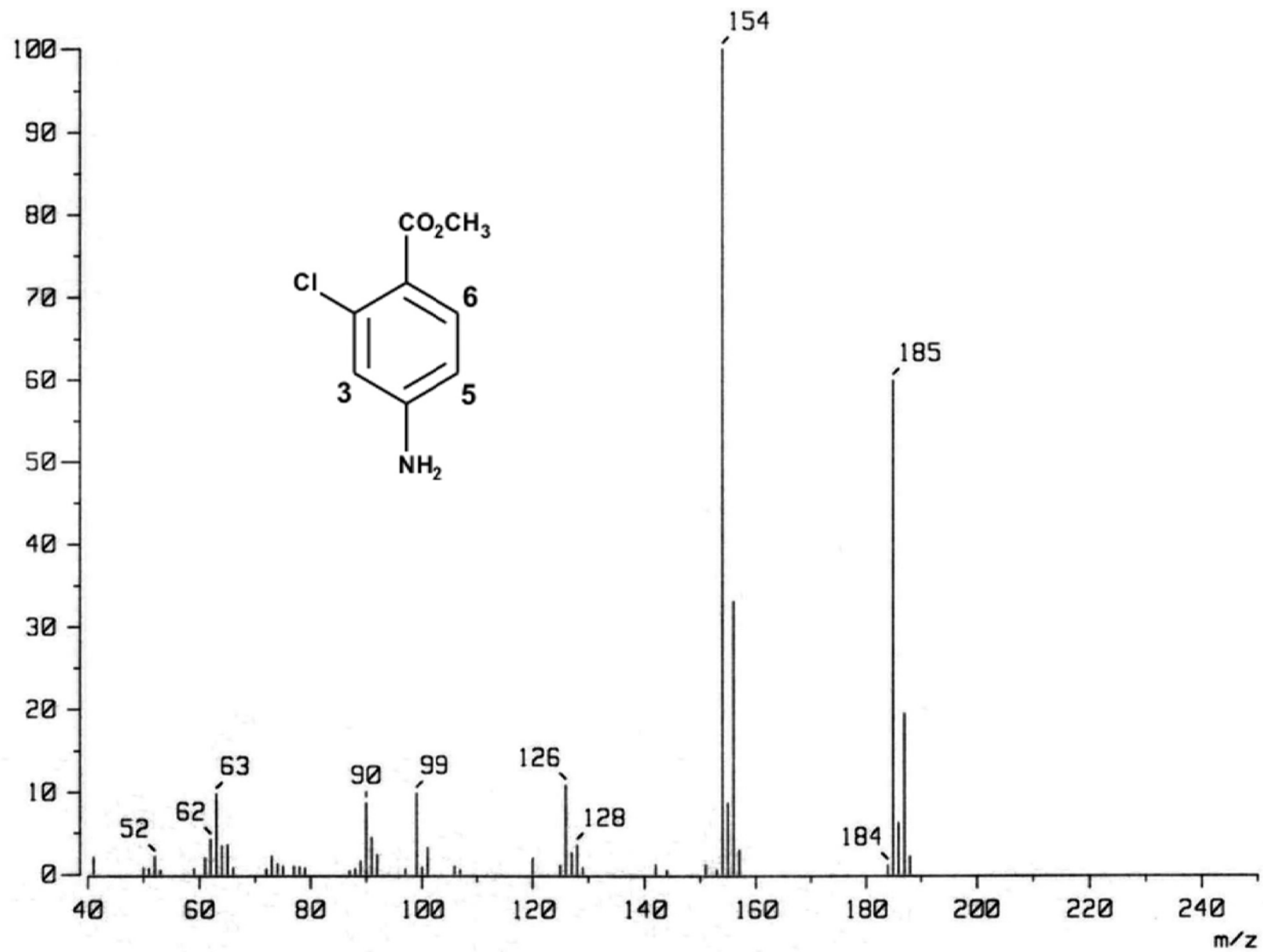
ESPECTRO 21. EM, (IE/ID) m/z: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (8)



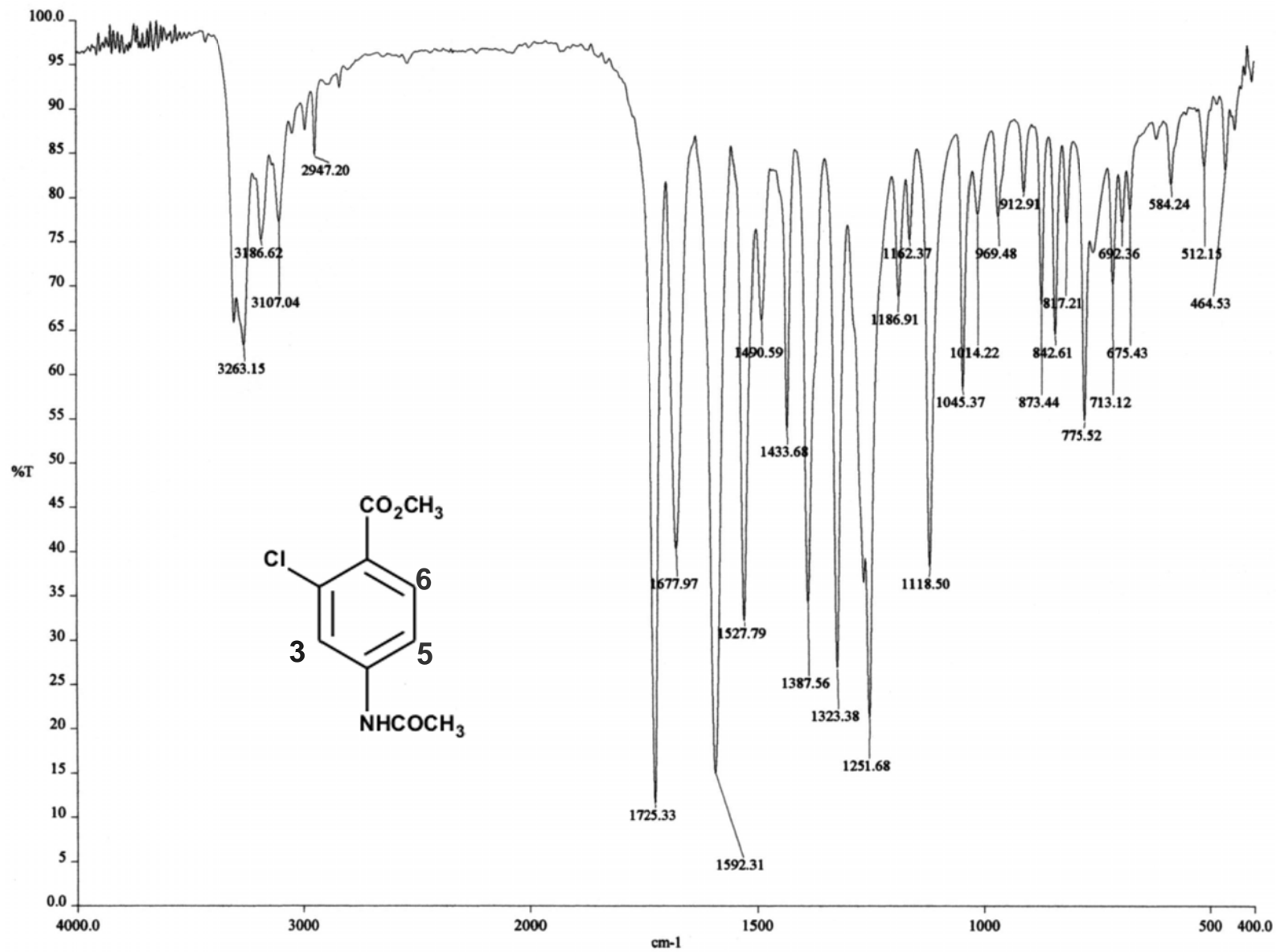
ESPECTRO 22. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (9)



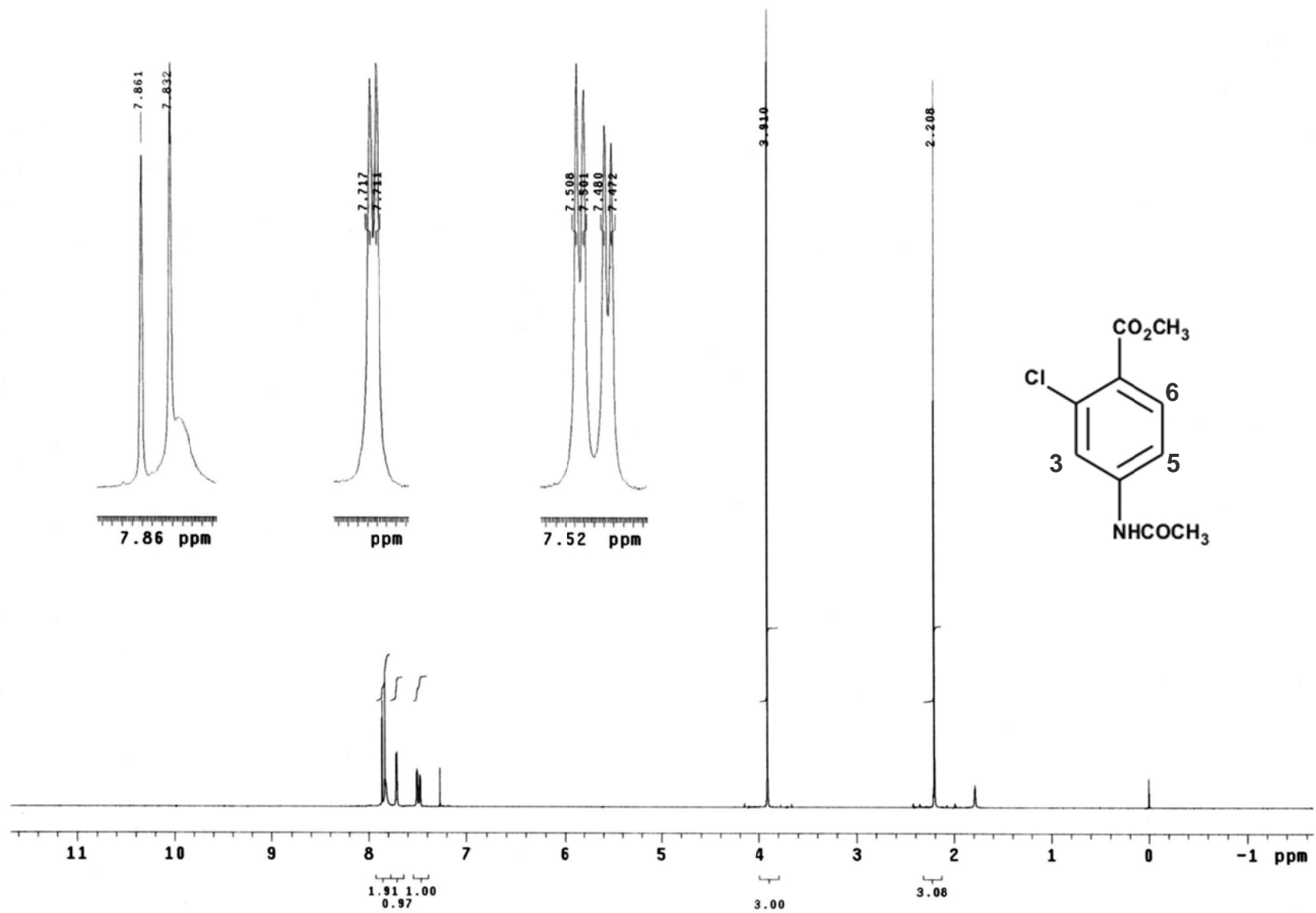
ESPECTRO 23. RMN¹H, (TMS, CDCl₃) ppm: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (9)



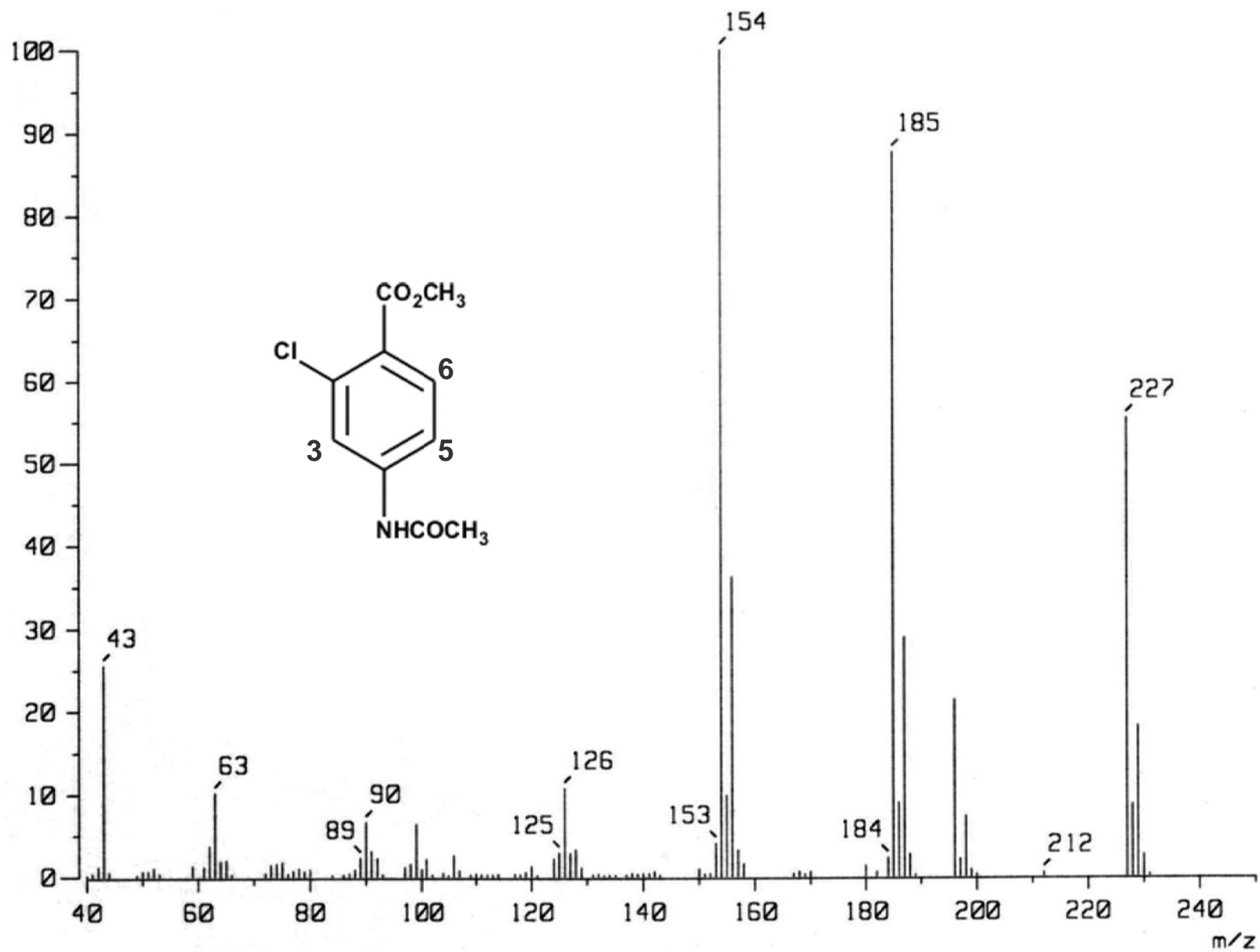
ESPECTRO 24. EM, (IE/ID) m/z: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (9)



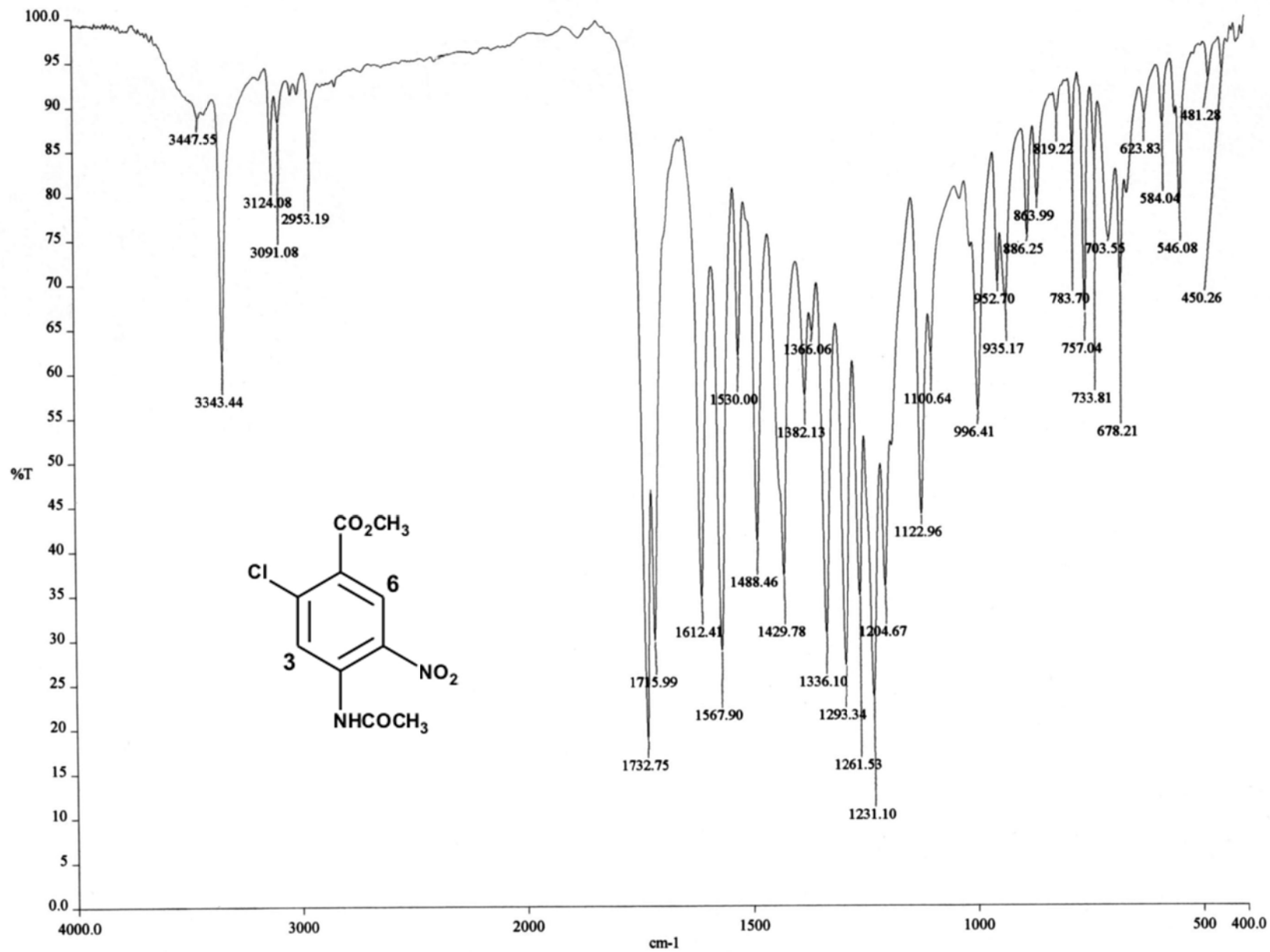
ESPECTRO 25. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (10)



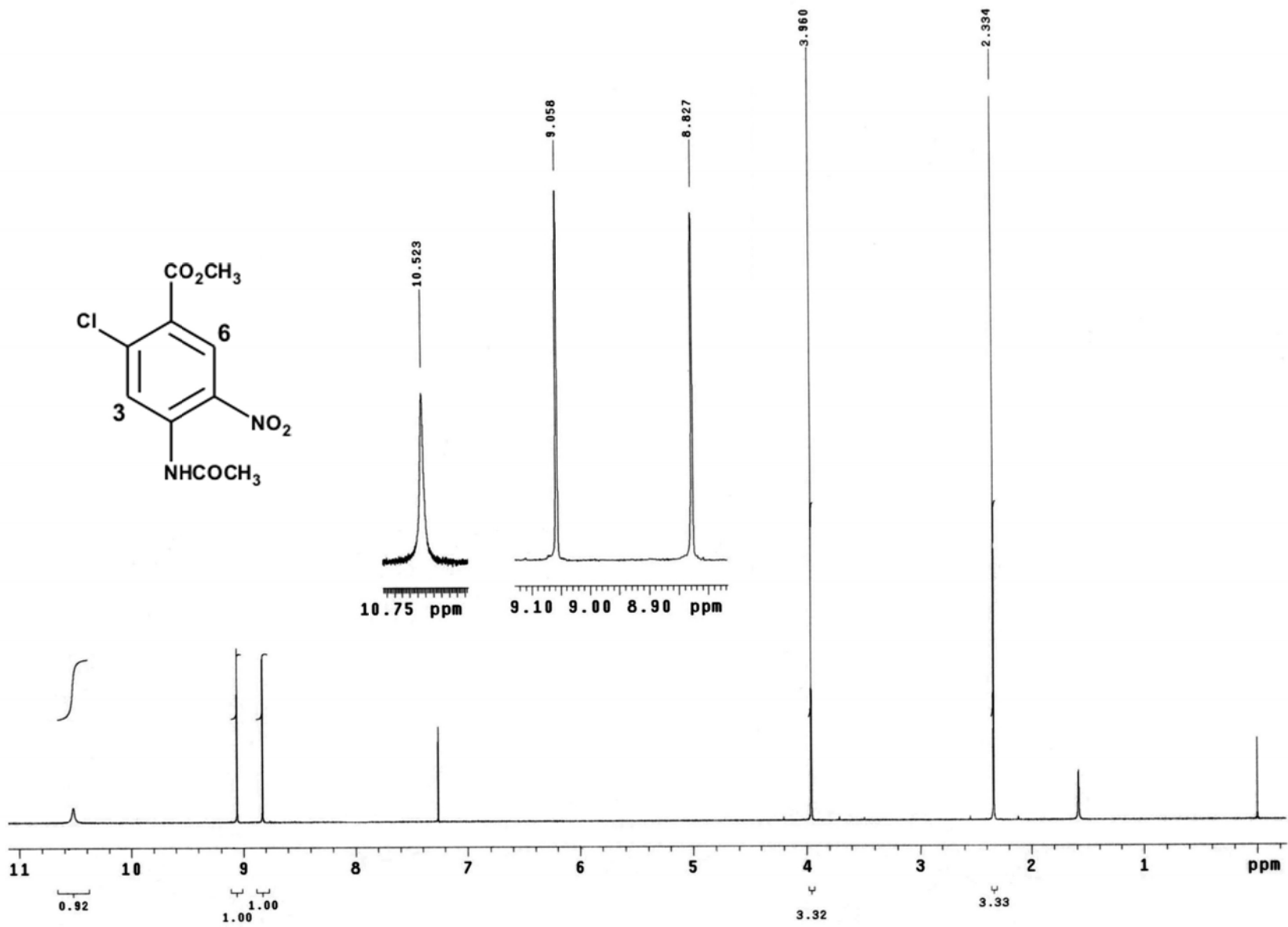
ESPECTRO 26. RMN ^1H , (TMS, CDCl_3) ppm: 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (10)



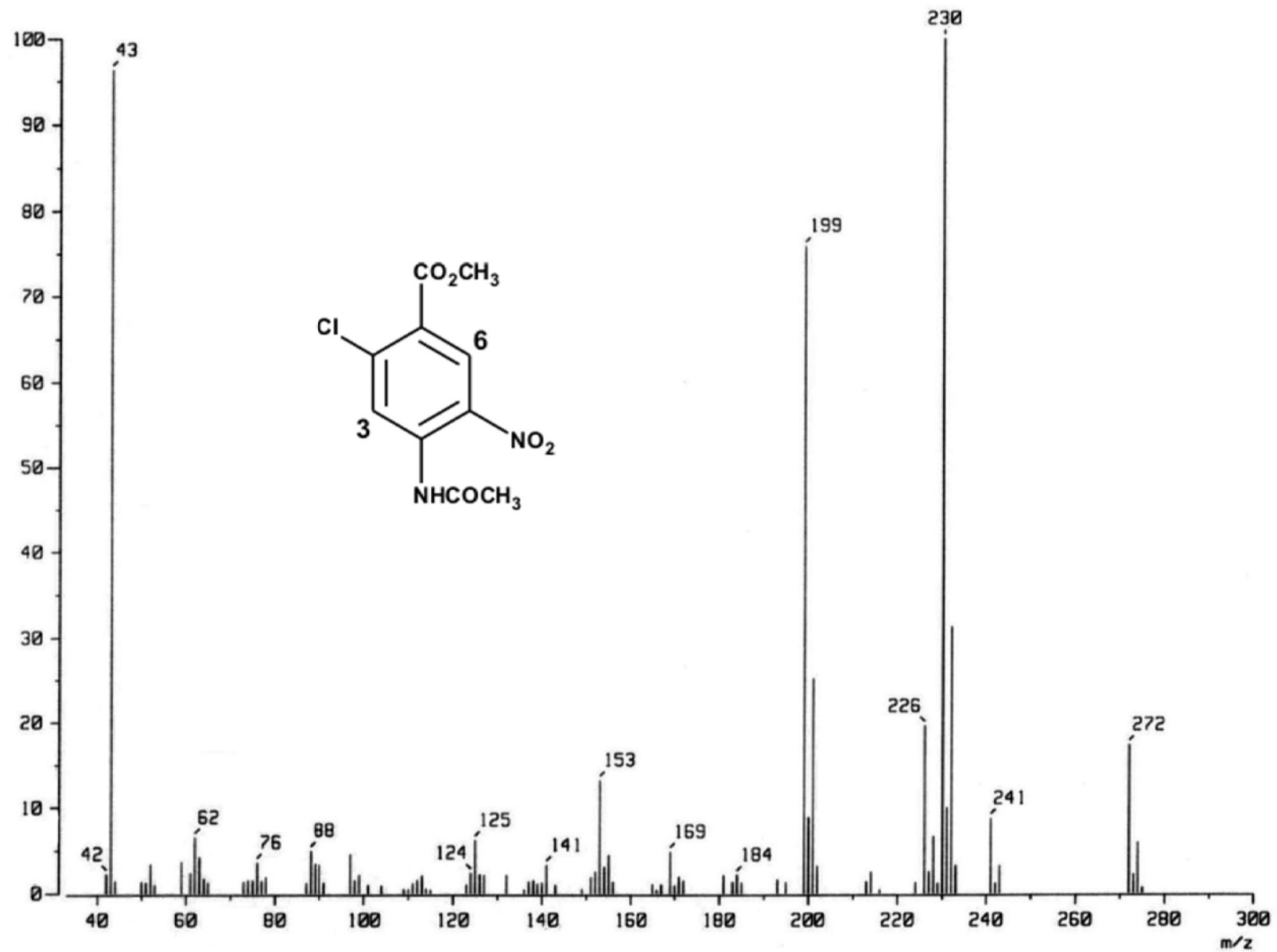
ESPECTRO 27. EM, (IE/ID) m/z: 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (10)



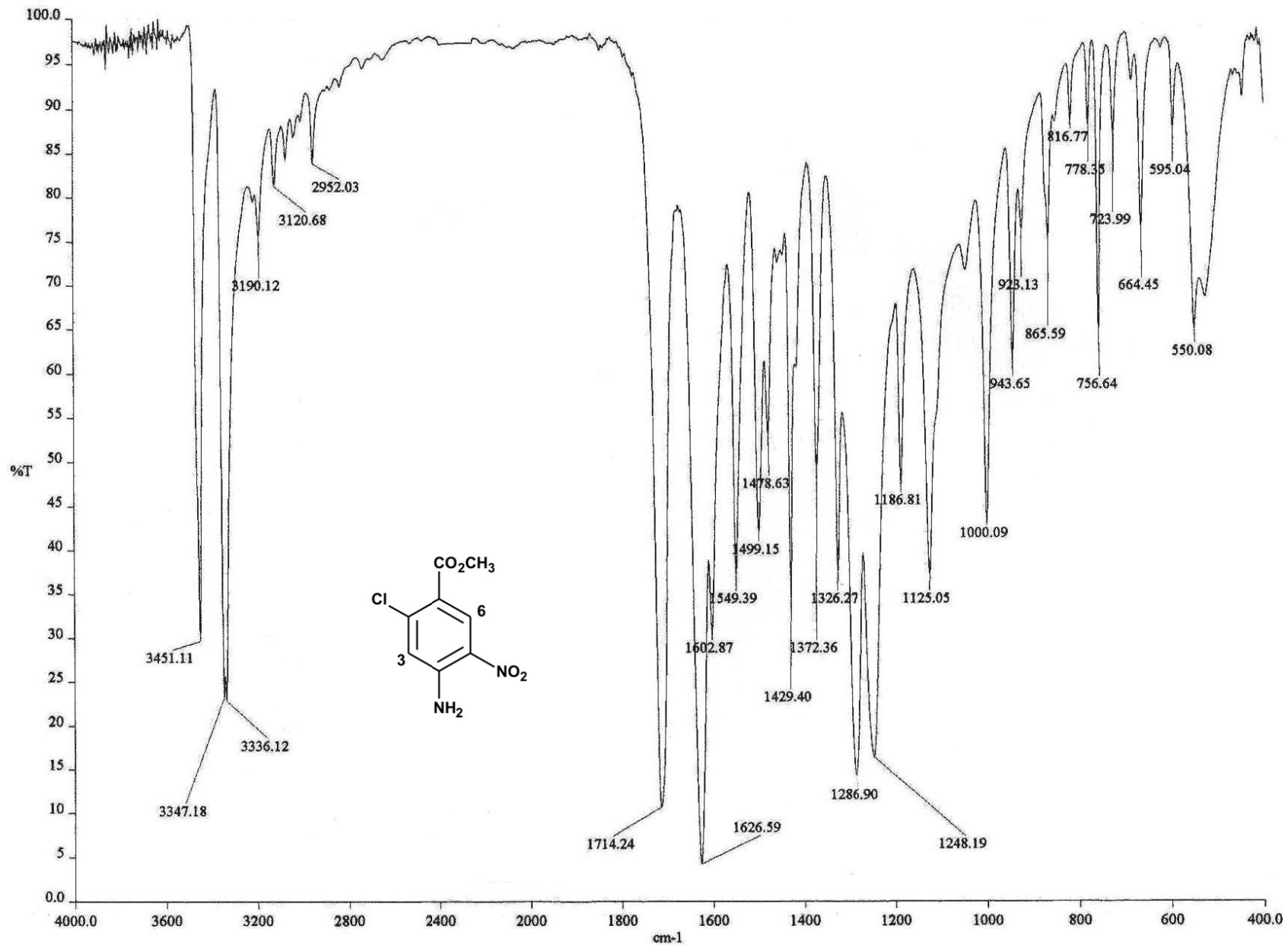
ESPECTRO 28. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)



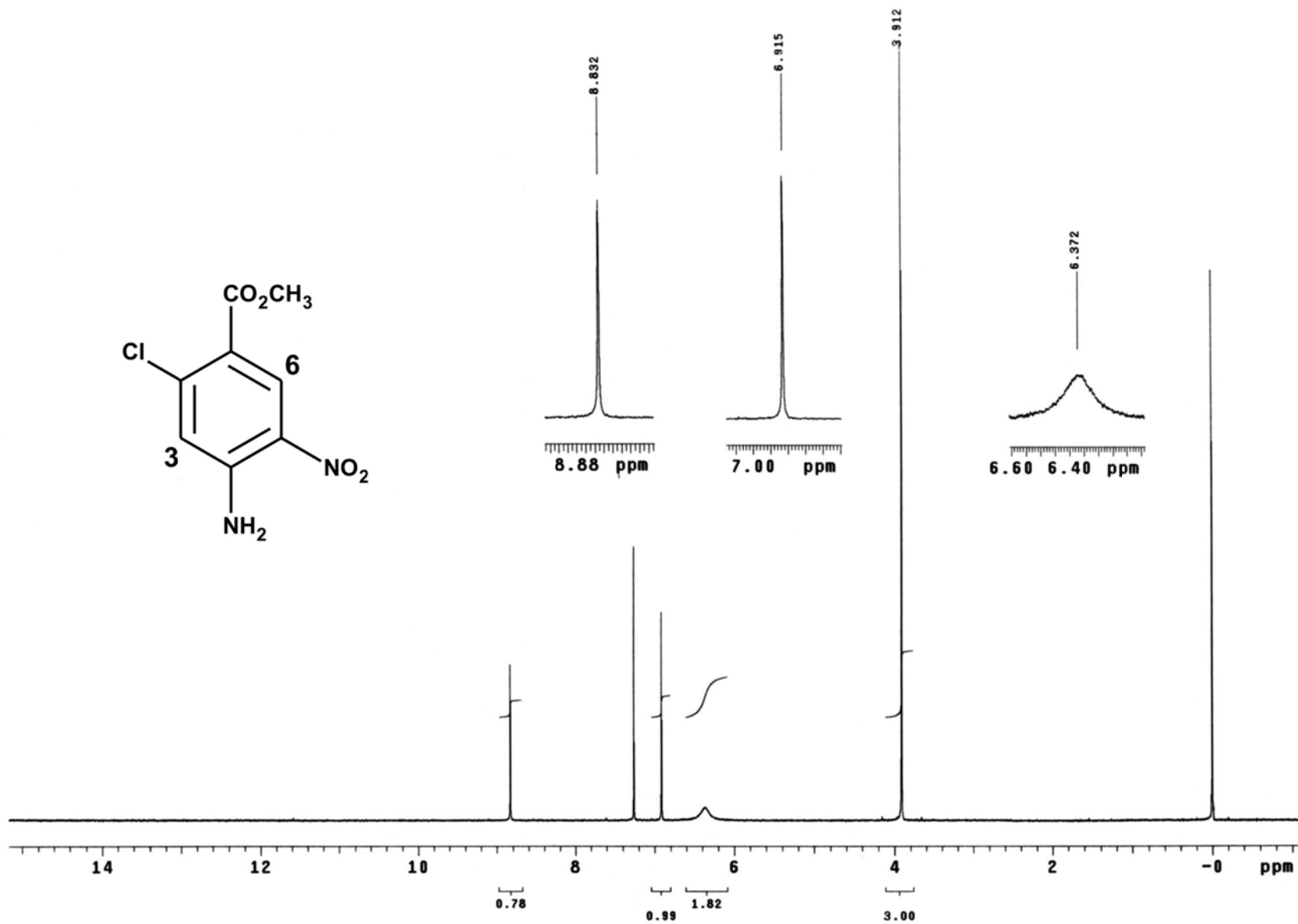
ESPECTRO 29. RMN ^1H , (TMS, CDCl_3) ppm: 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)



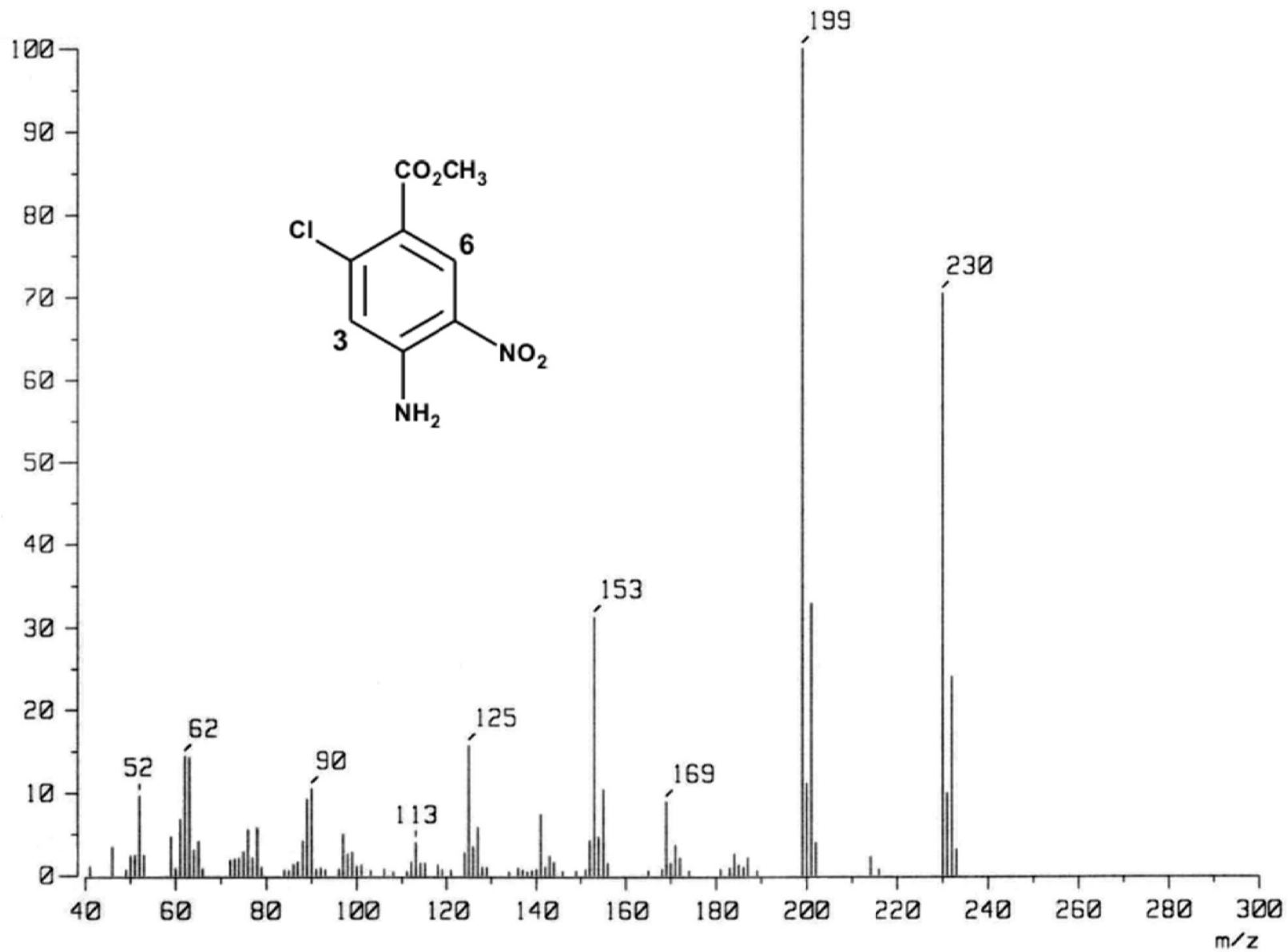
ESPECTRO 30. EM, (IE/ID) m/z: 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)



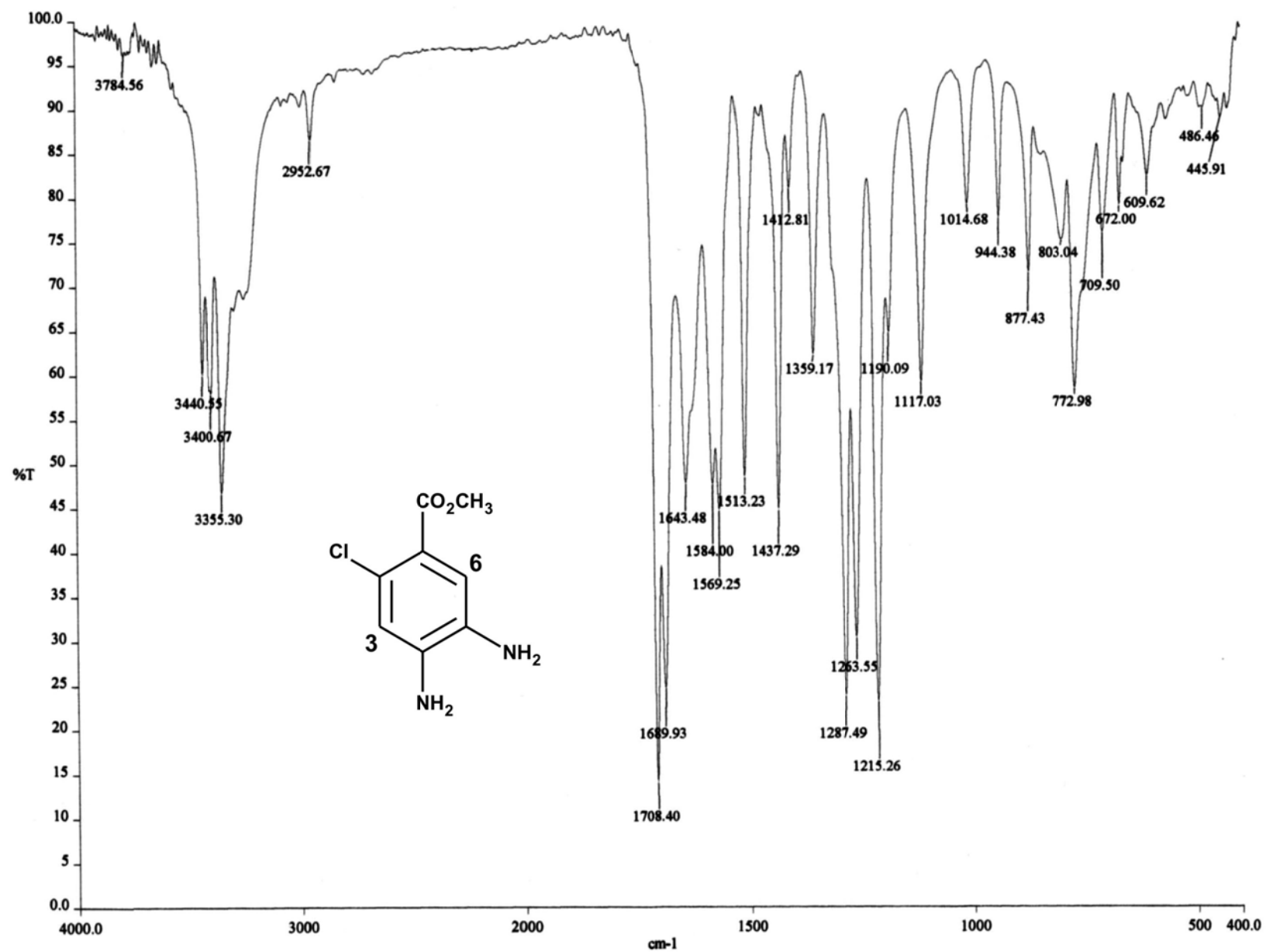
ESPECTRO 31. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (12)



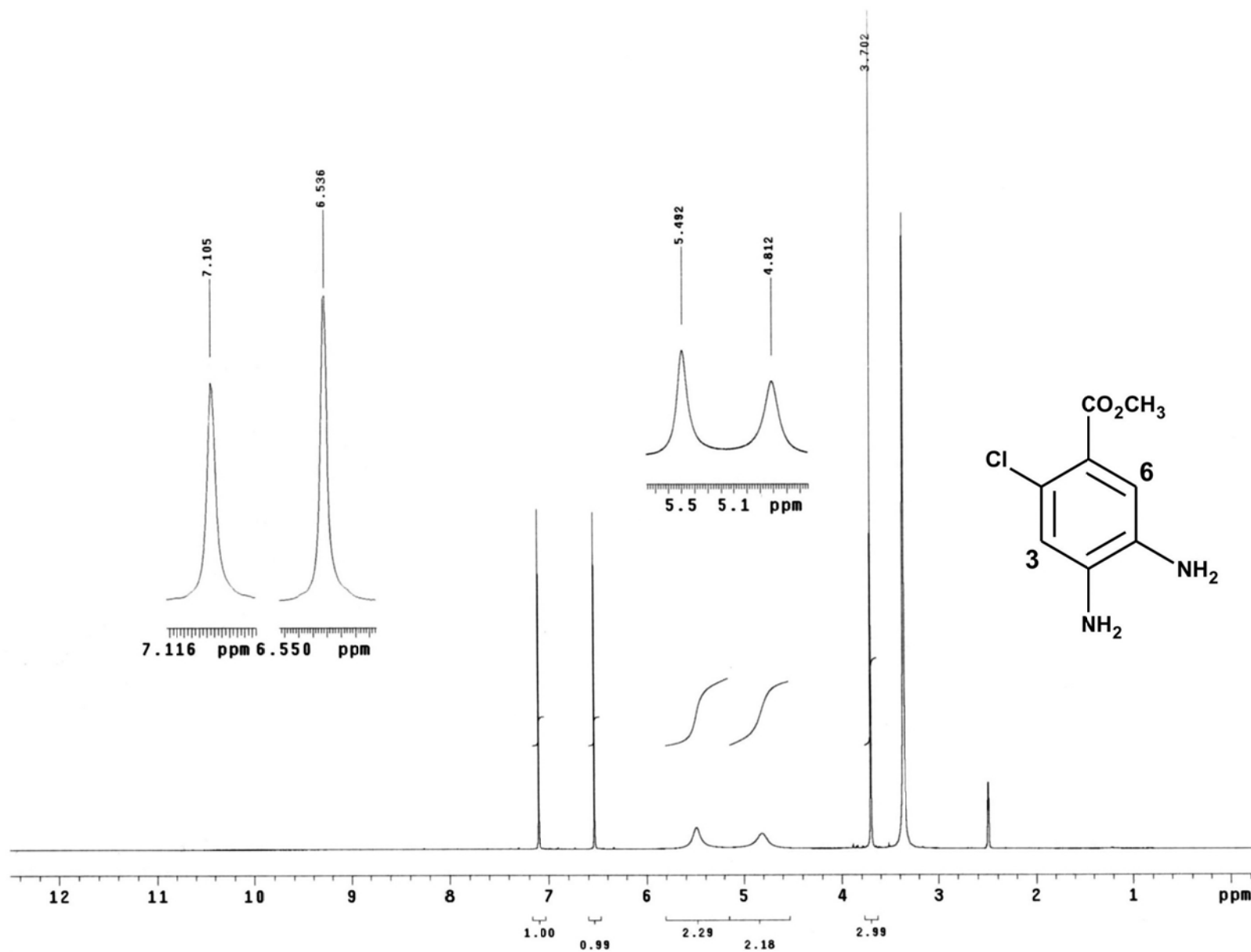
ESPECTRO 32. RMN ¹H, (TMS, CDCl₃) ppm: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (12)



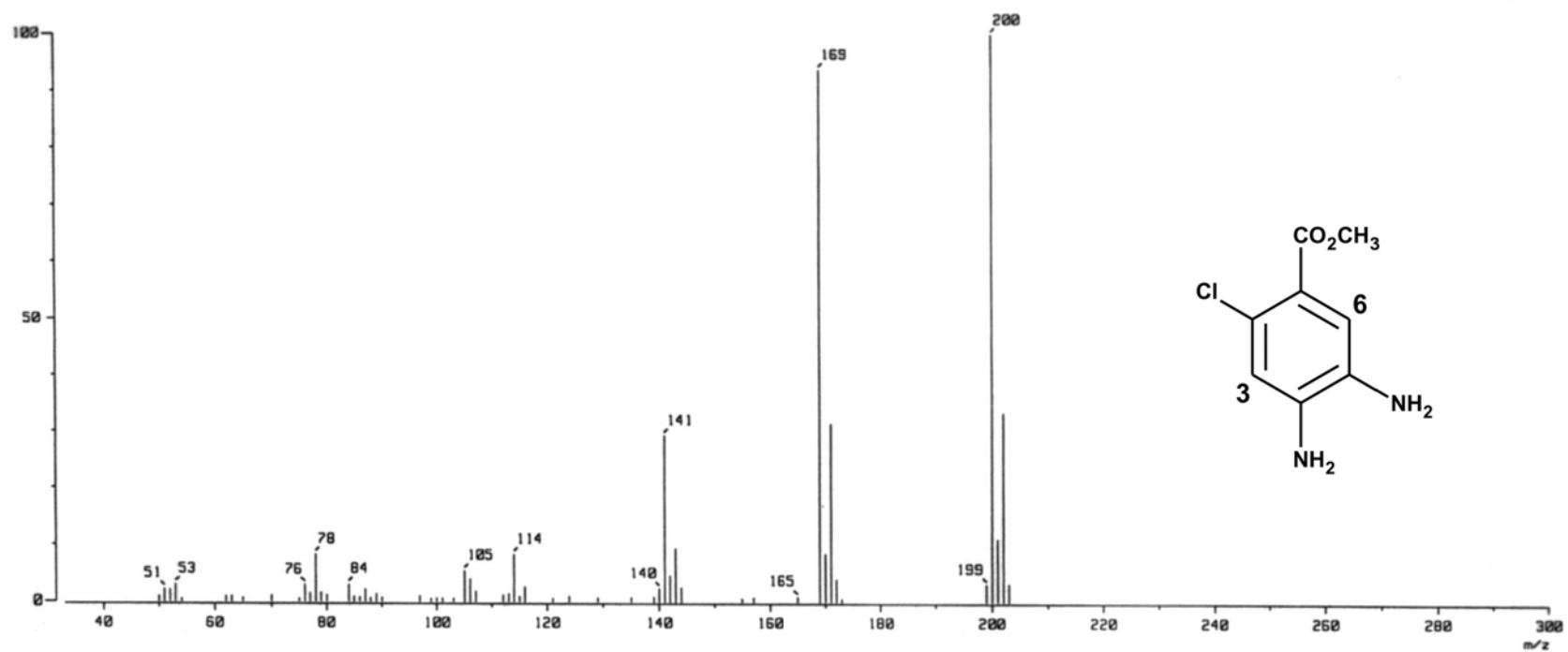
ESPECTRO 33. EM, (IE/ID) m/z: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (12)



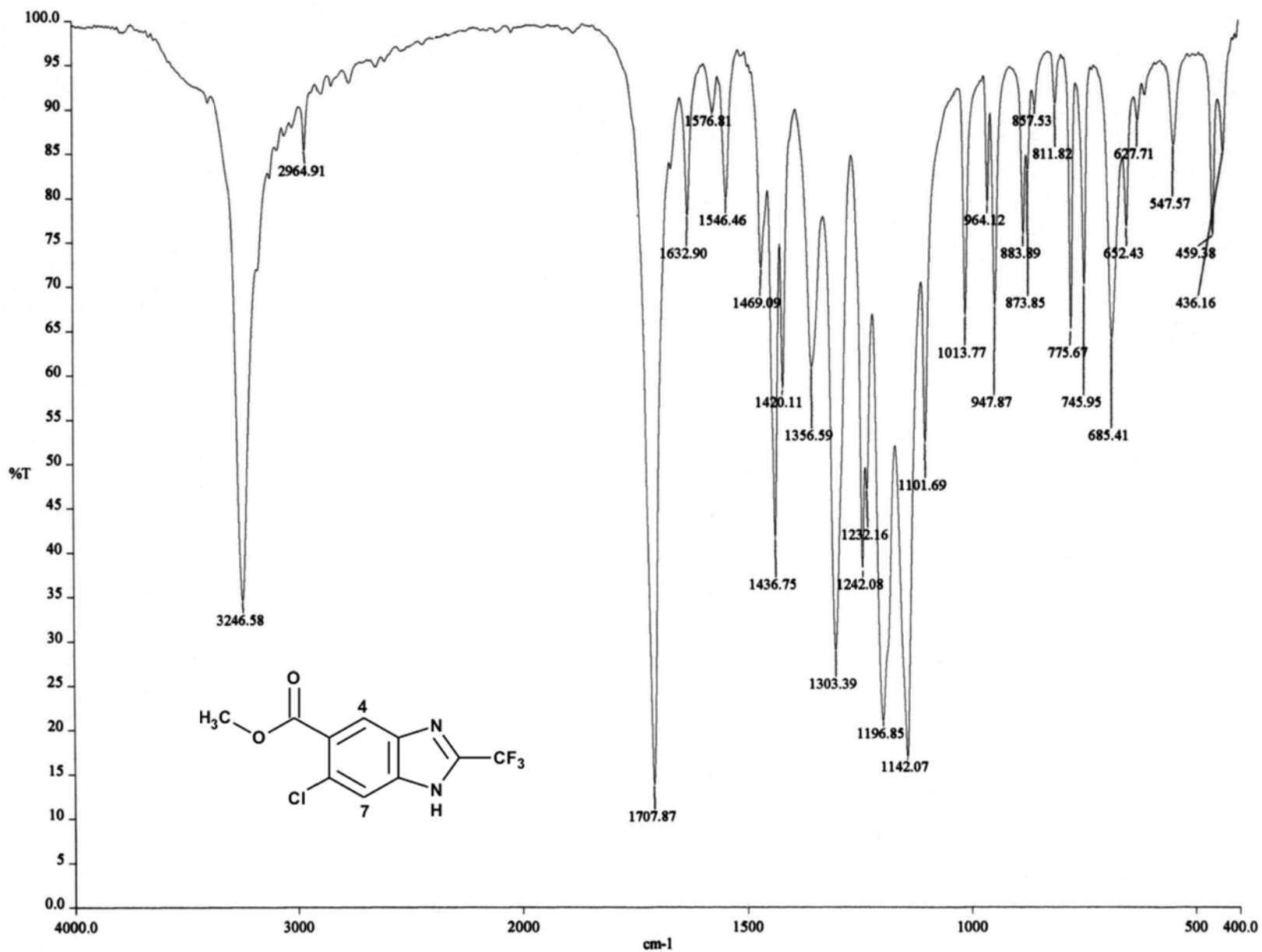
ESPECTRO 34. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (13)



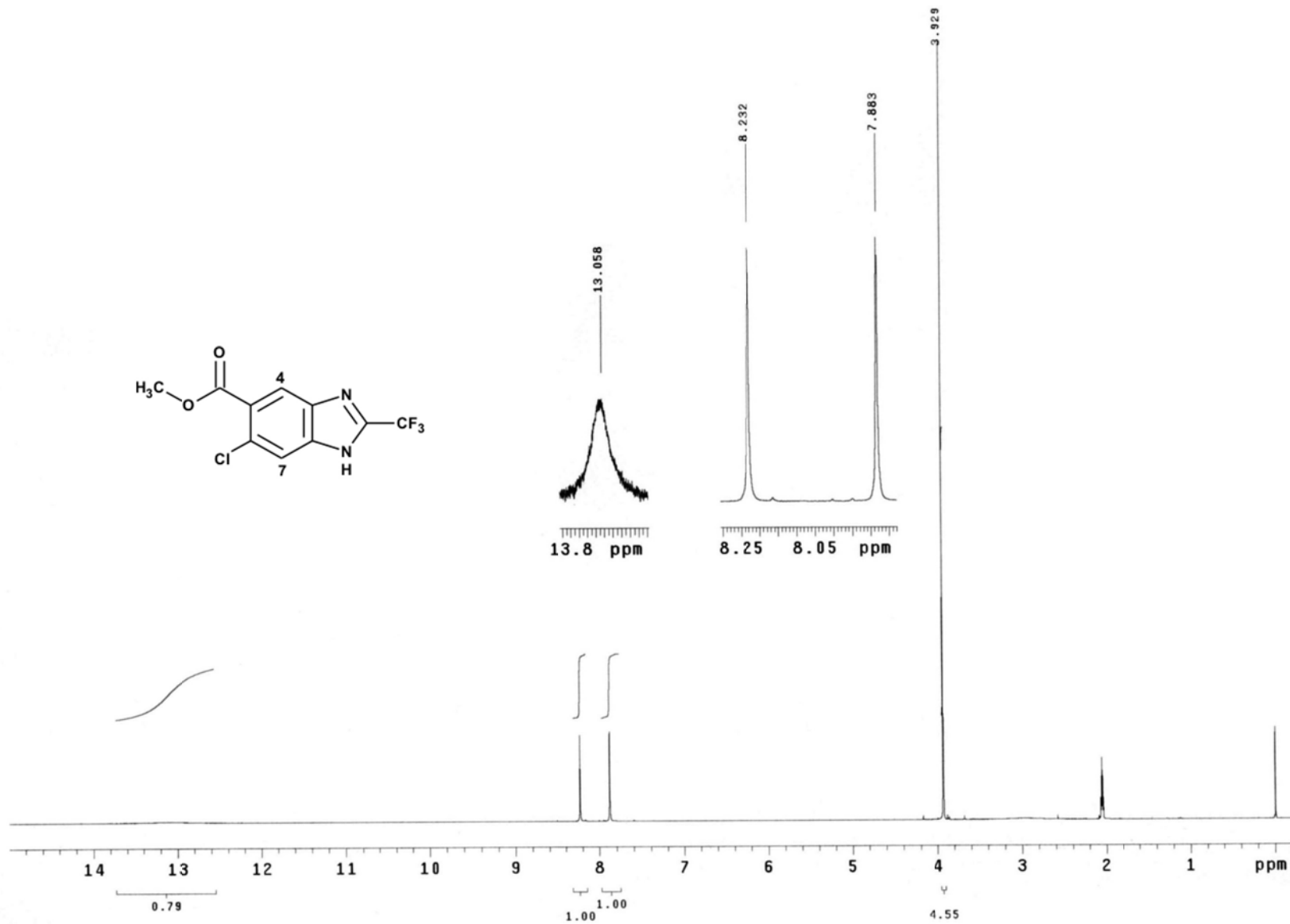
ESPECTRO 35. RMN ^1H , (TMS, DMSO) ppm: 4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (13)



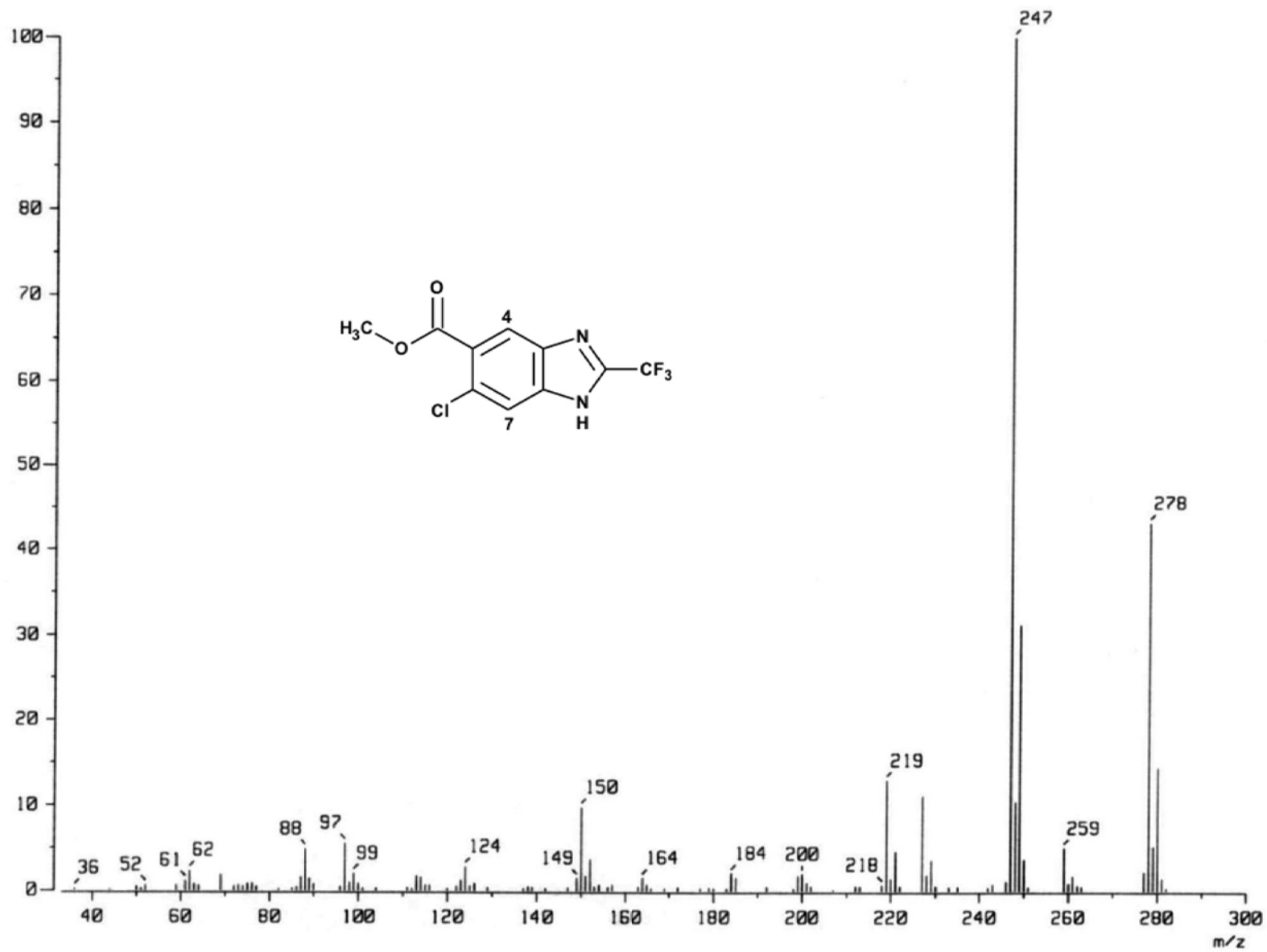
ESPECTRO 36. EM, (IE/CG) m/z: 4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (13)



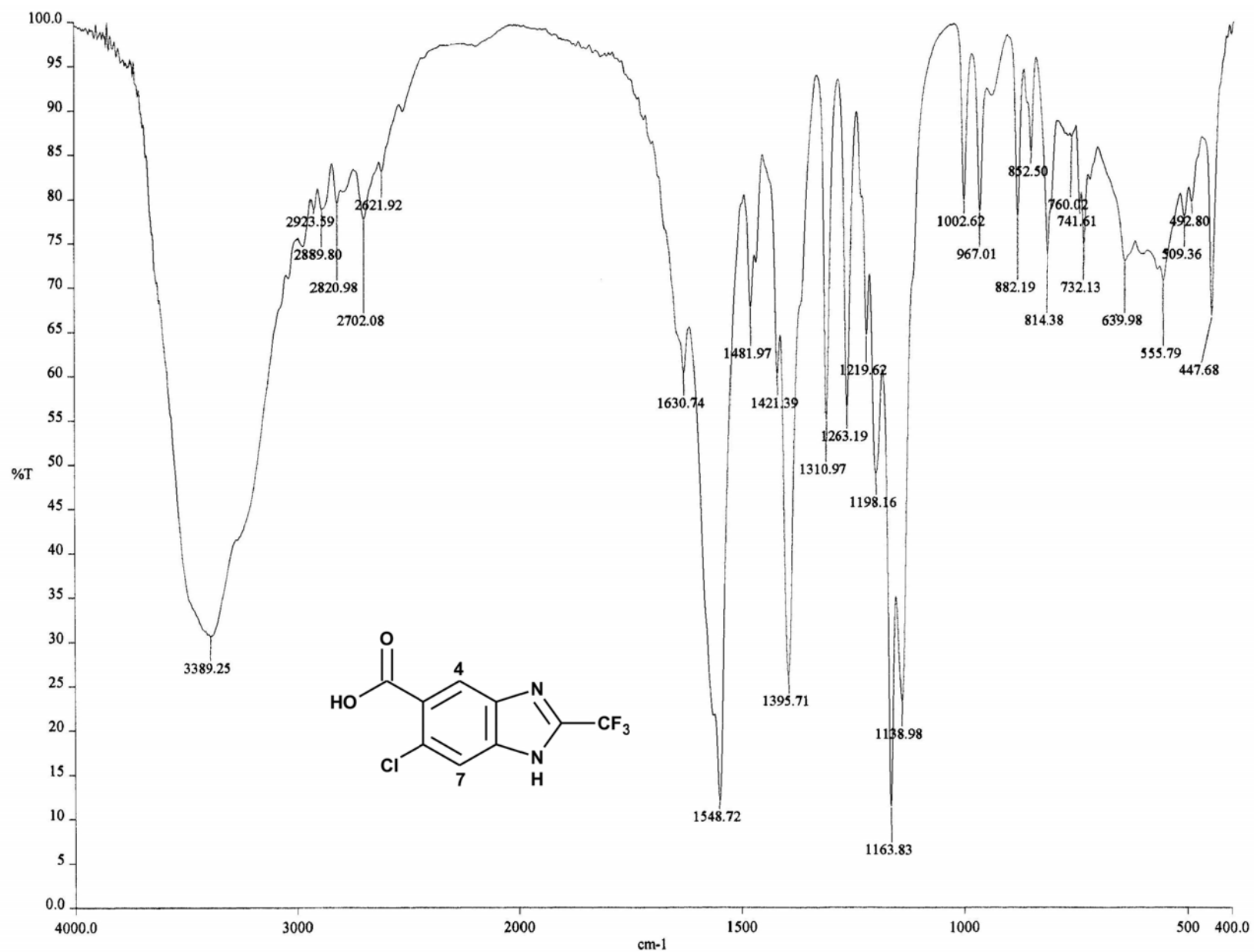
ESPECTRO 37. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (14)



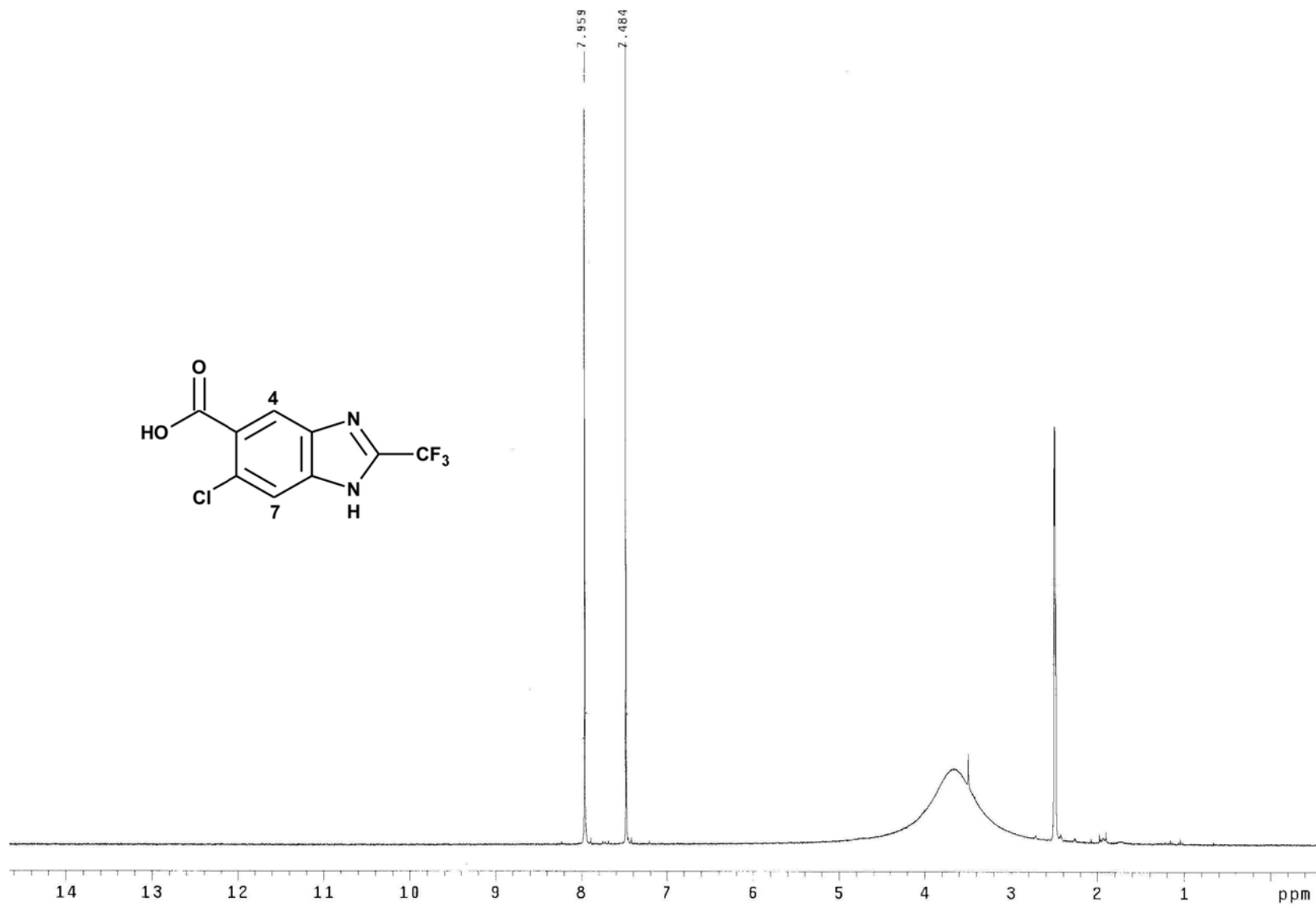
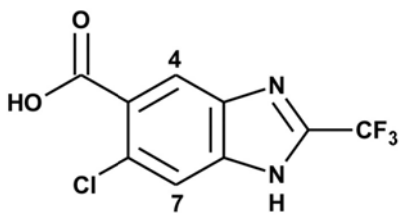
ESPECTRO 38. RMN ¹H, (TMS, Acetona) ppm: 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (14)



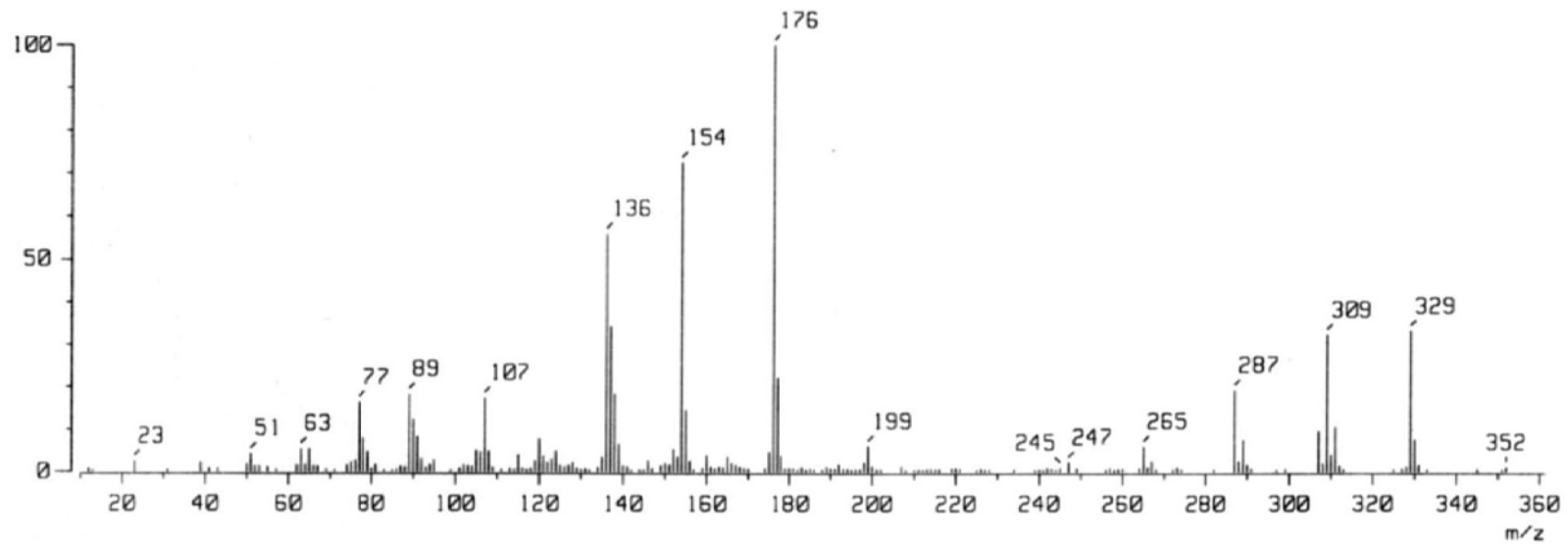
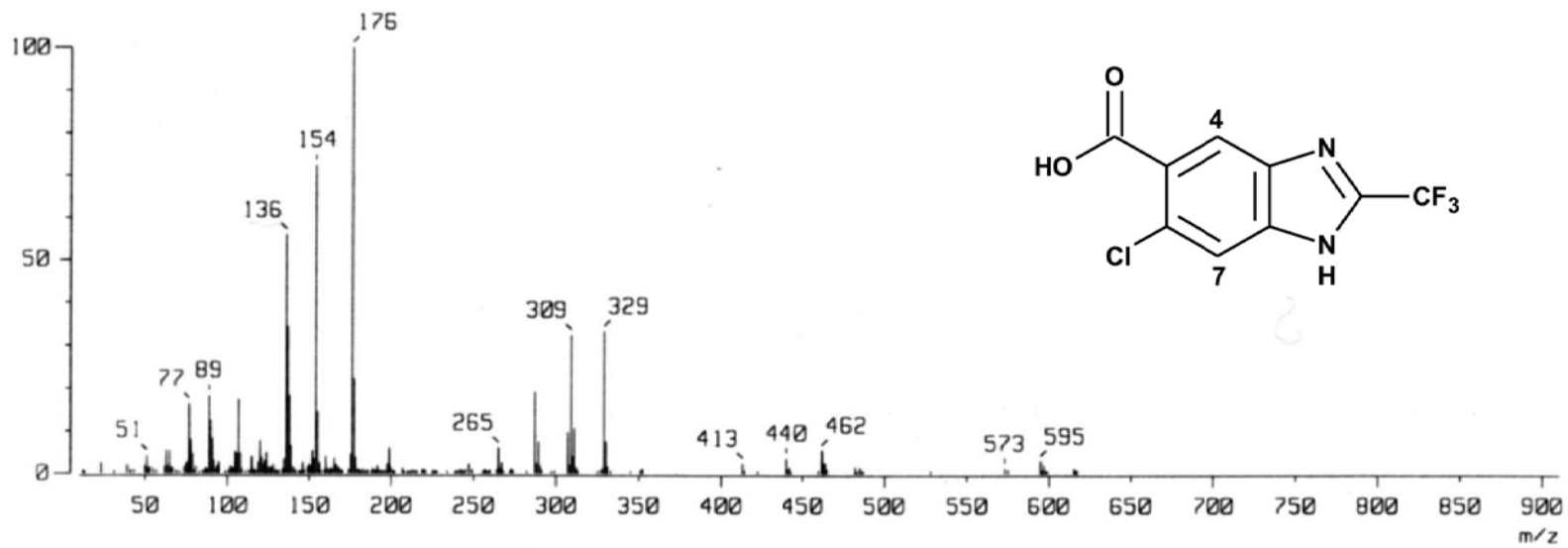
ESPECTRO 39. EM, (IE/CG) m/z: 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (14)



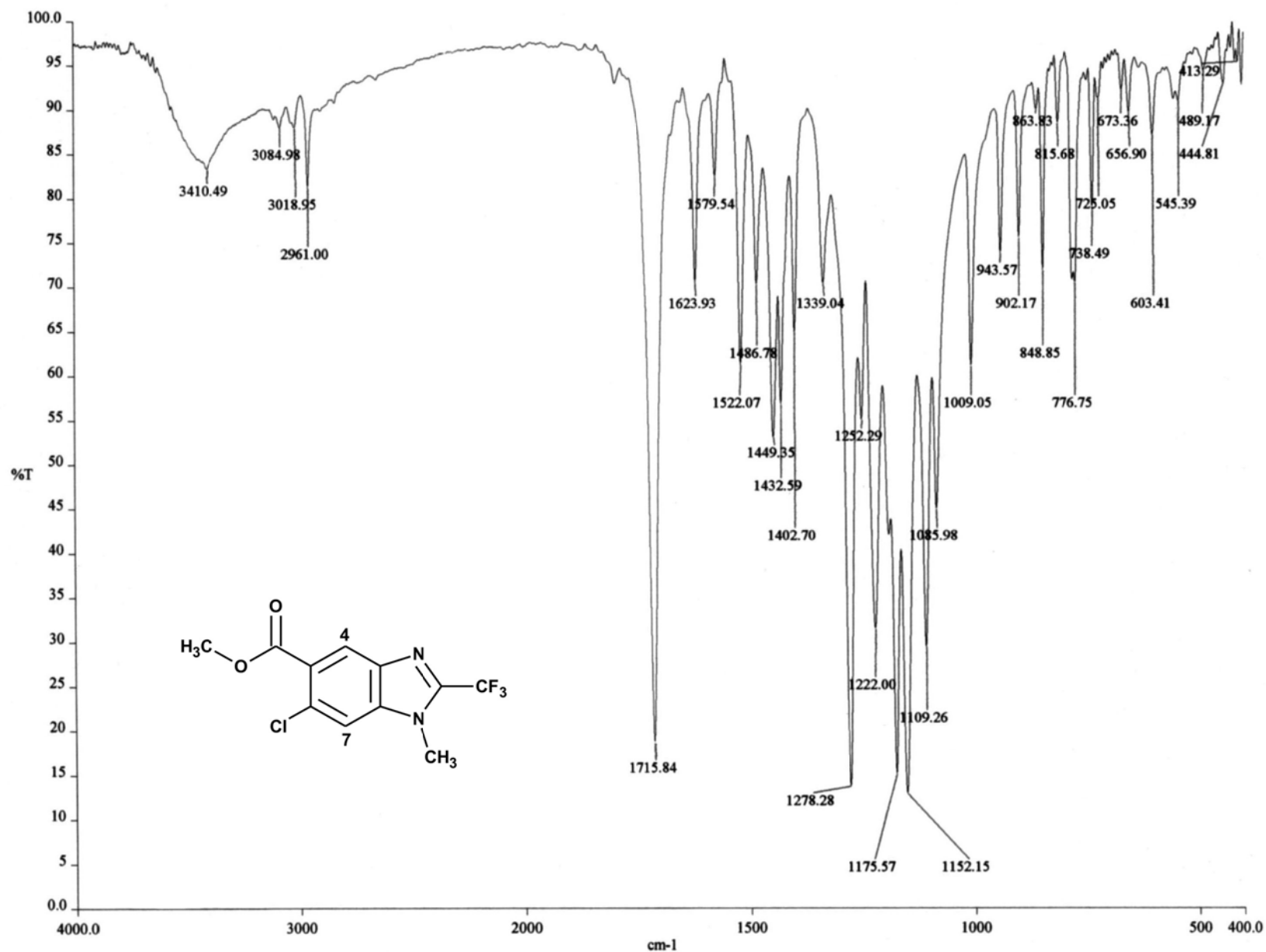
ESPECTRO 40. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: Ácido 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (15)



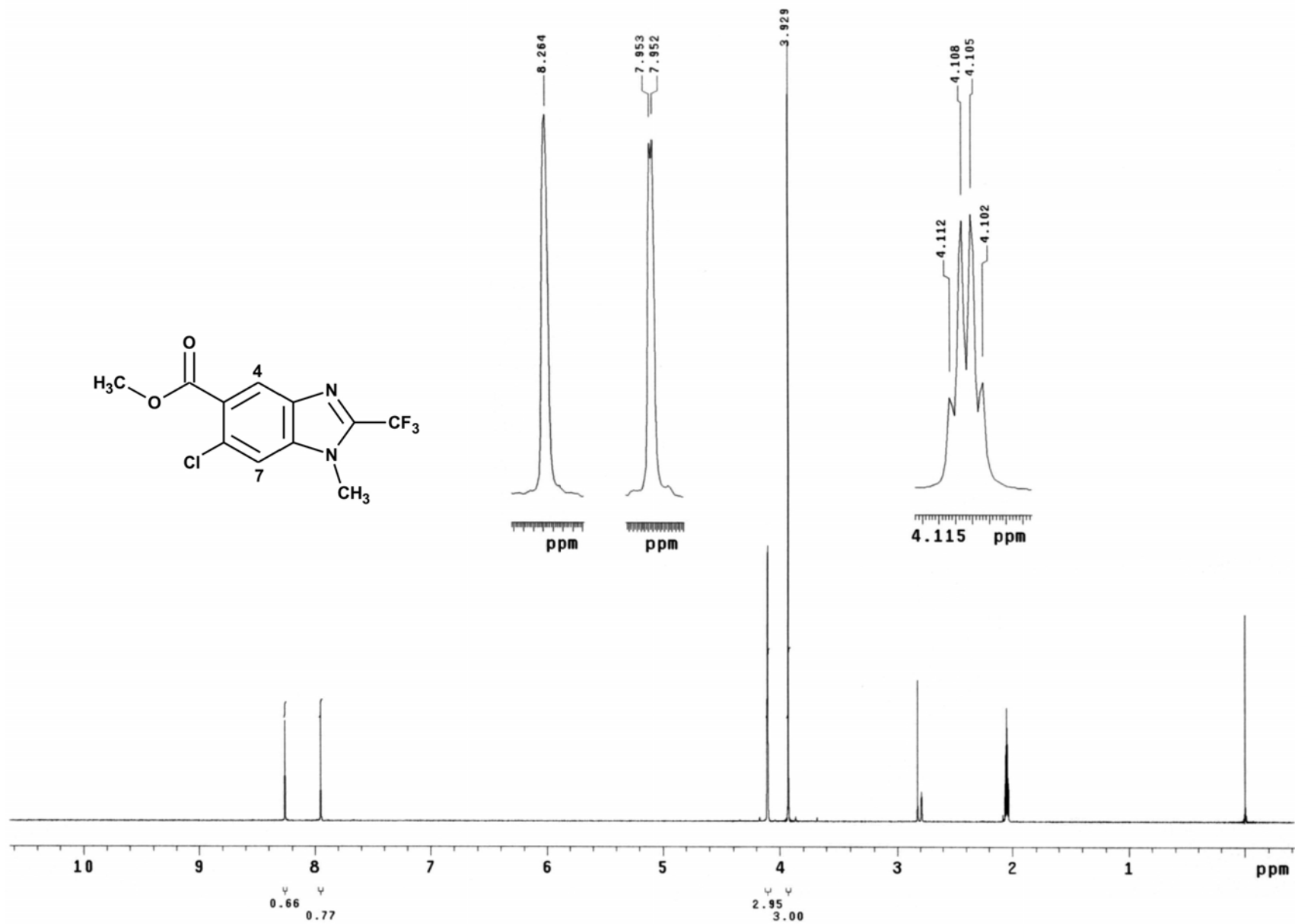
ESPECTRO 41. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: Ácido 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (15)



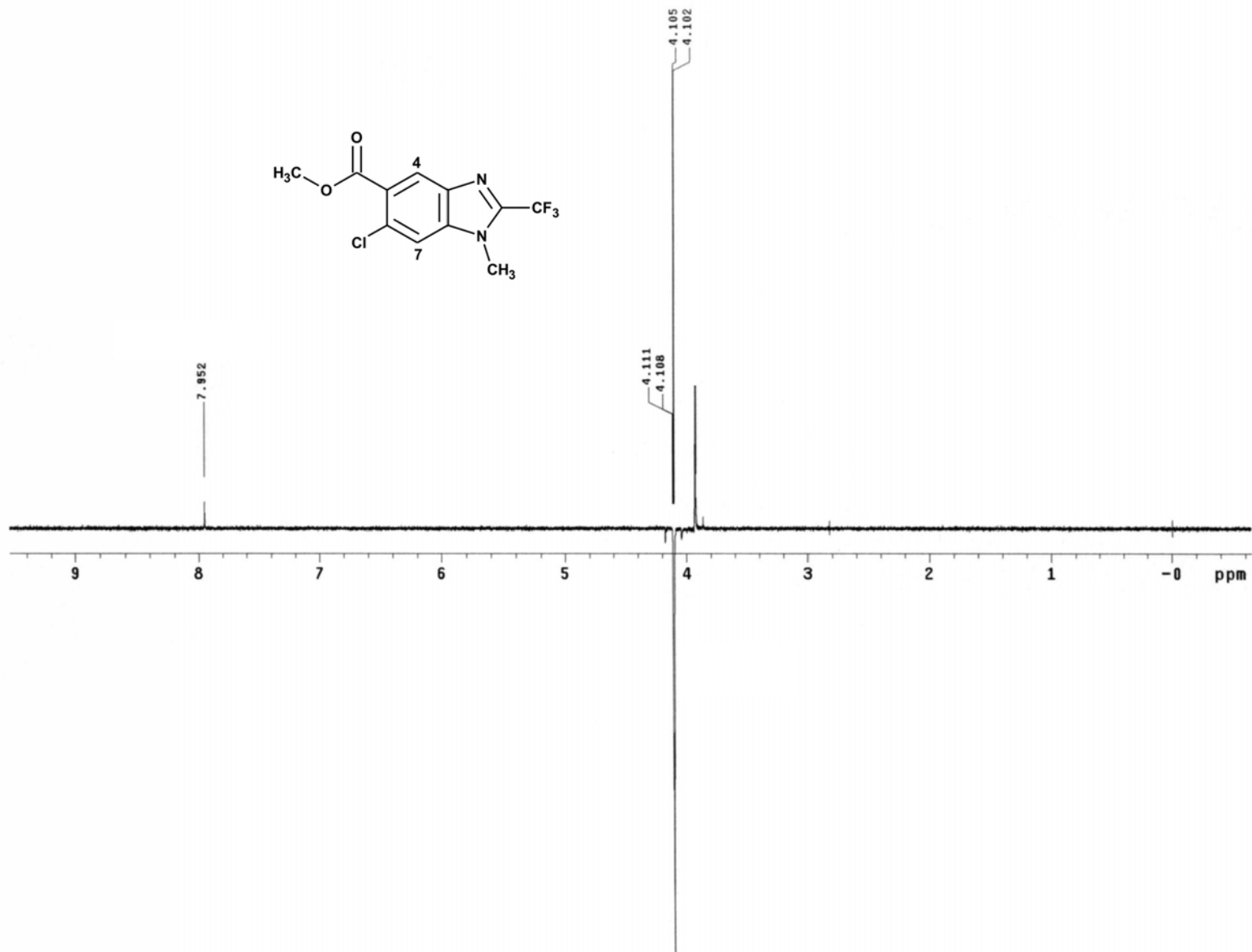
ESPECTRO 42. EM, (FAB+/ID) m/z: Ácido 6-Cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (15)



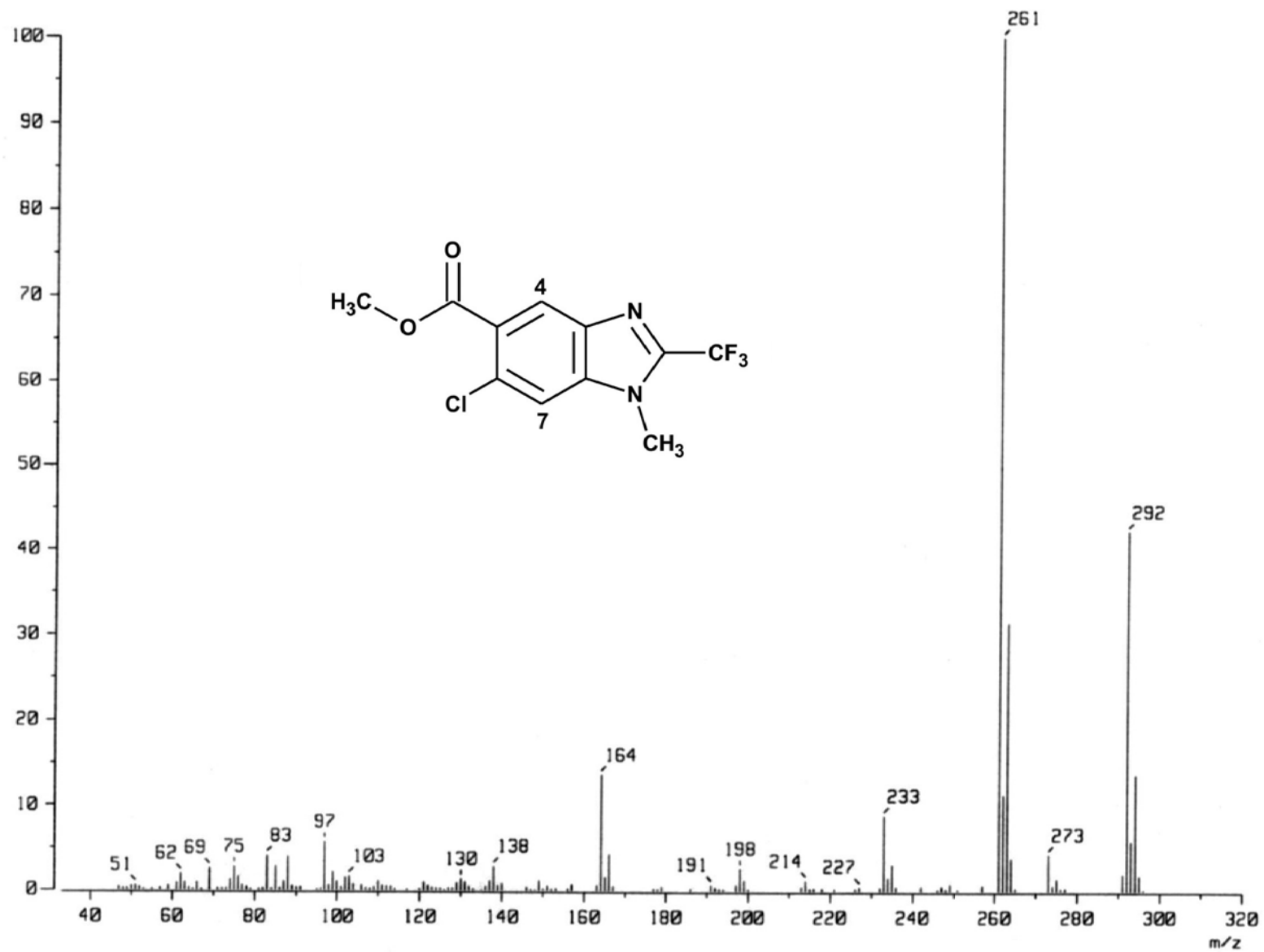
ESPECTRO 43. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)



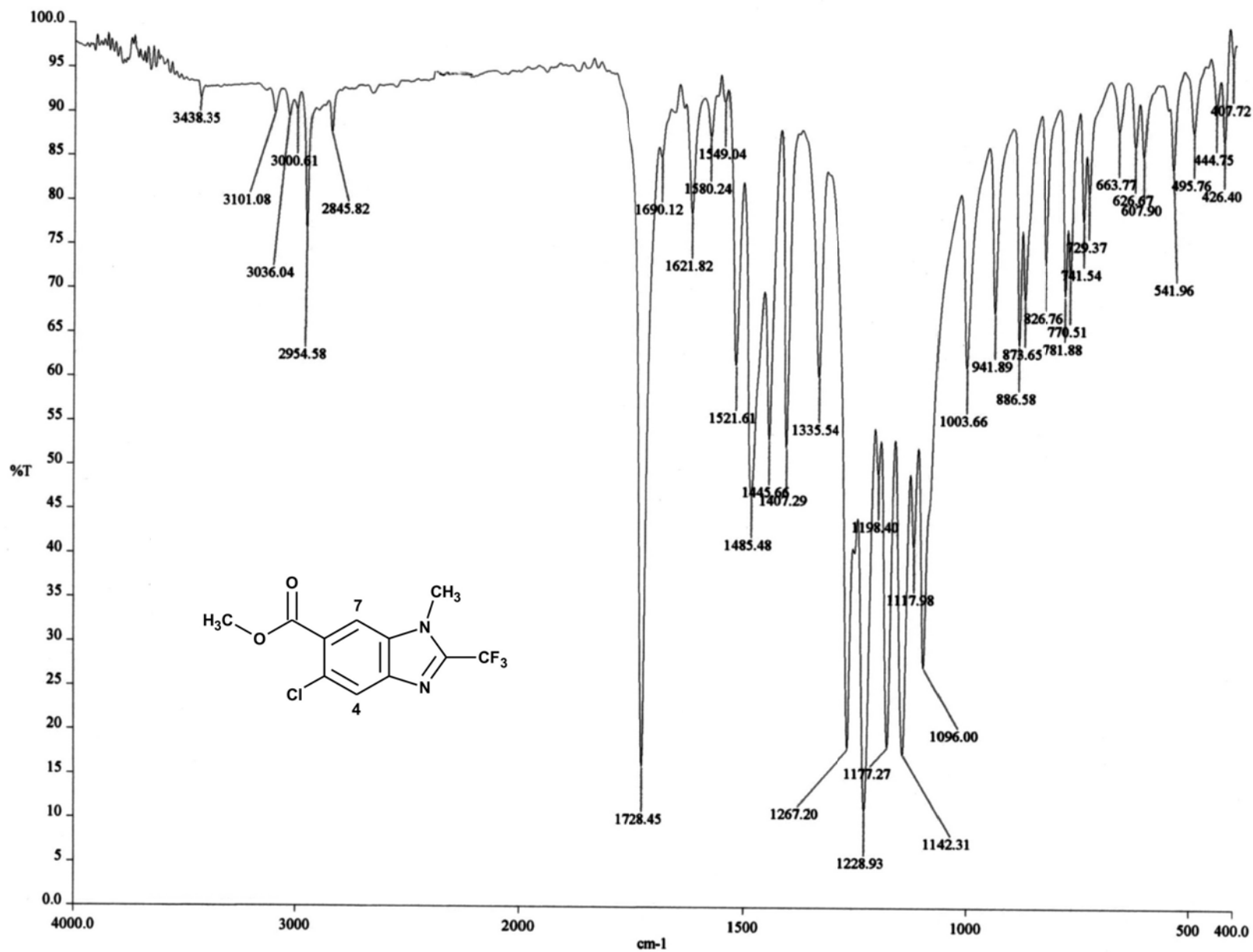
ESPECTRO 44. RMN ^1H , (TMS, Acetona) ppm: 6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)



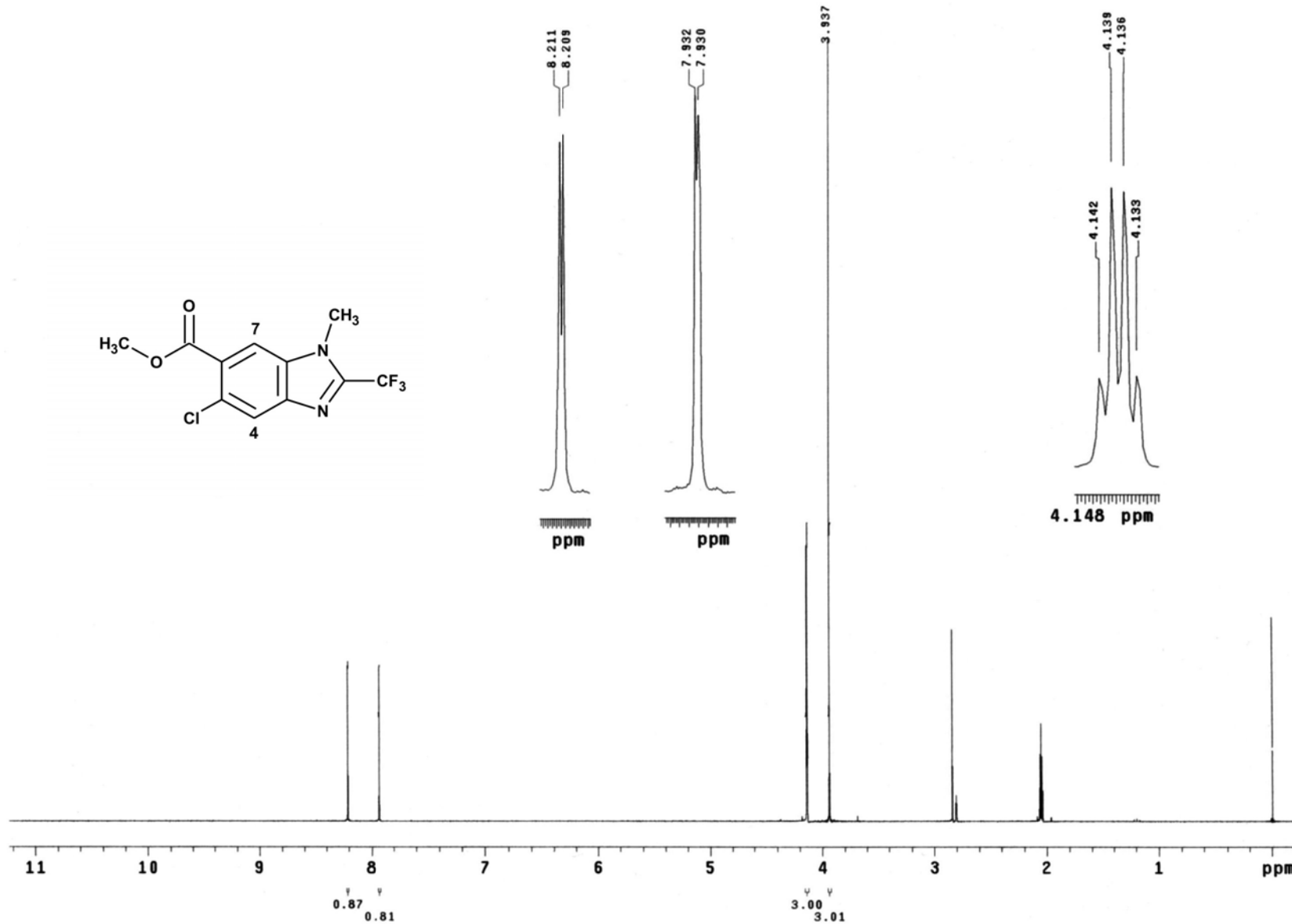
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (TMS, Acetona) ppm: 6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)



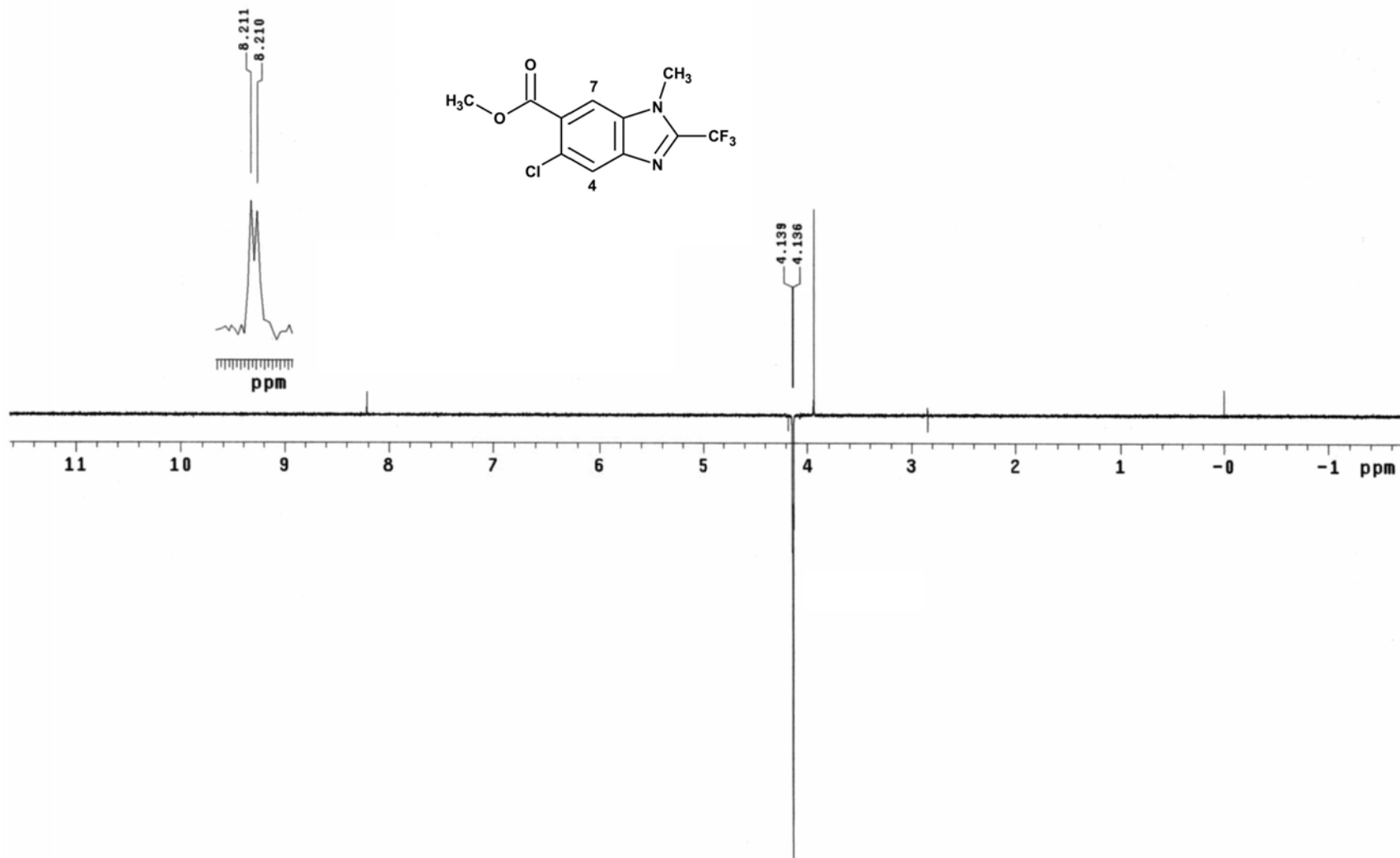
ESPECTRO 45. EM, (IE/ID) m/z: 6-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)



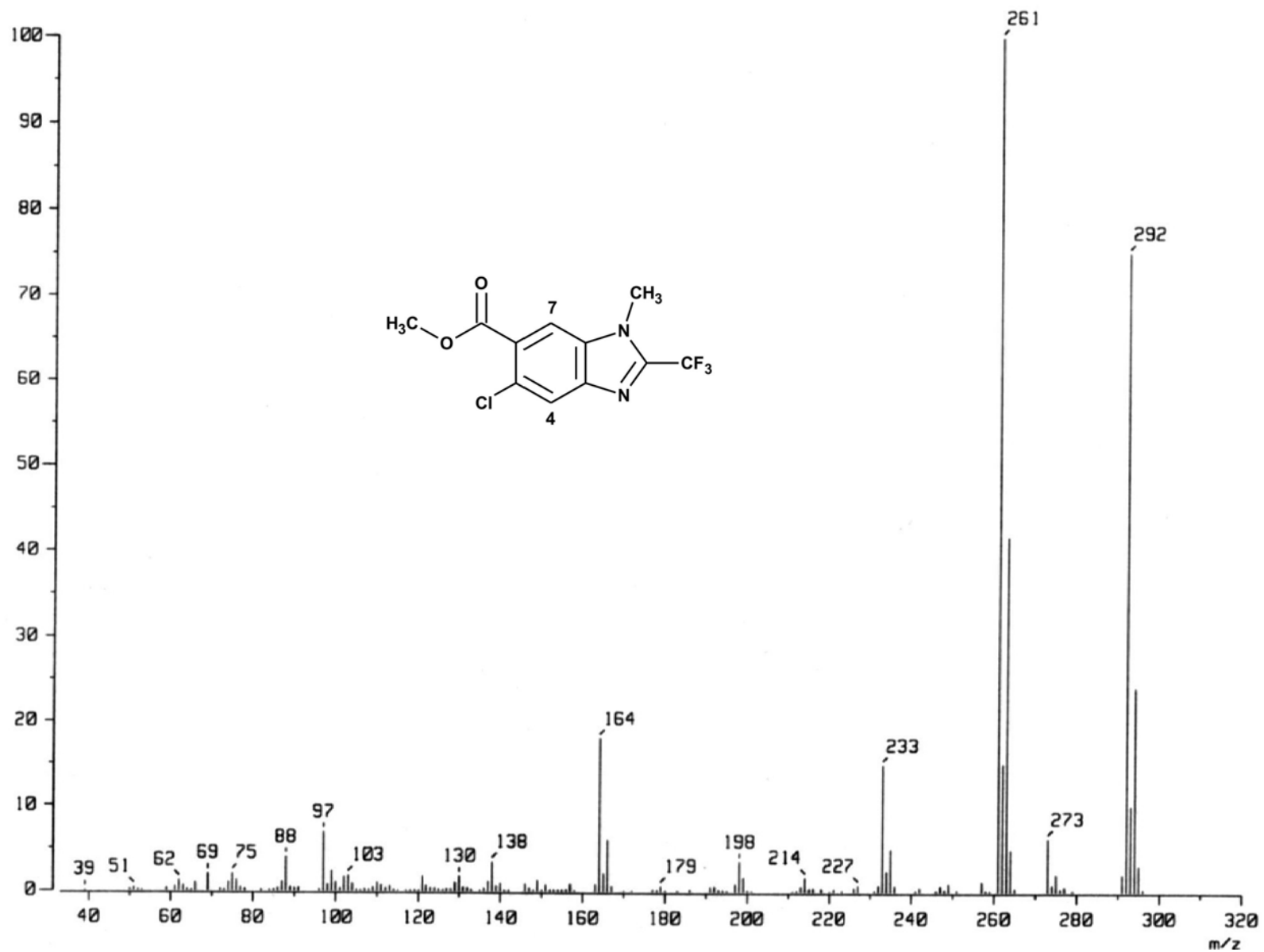
ESPECTRO 46. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (18)



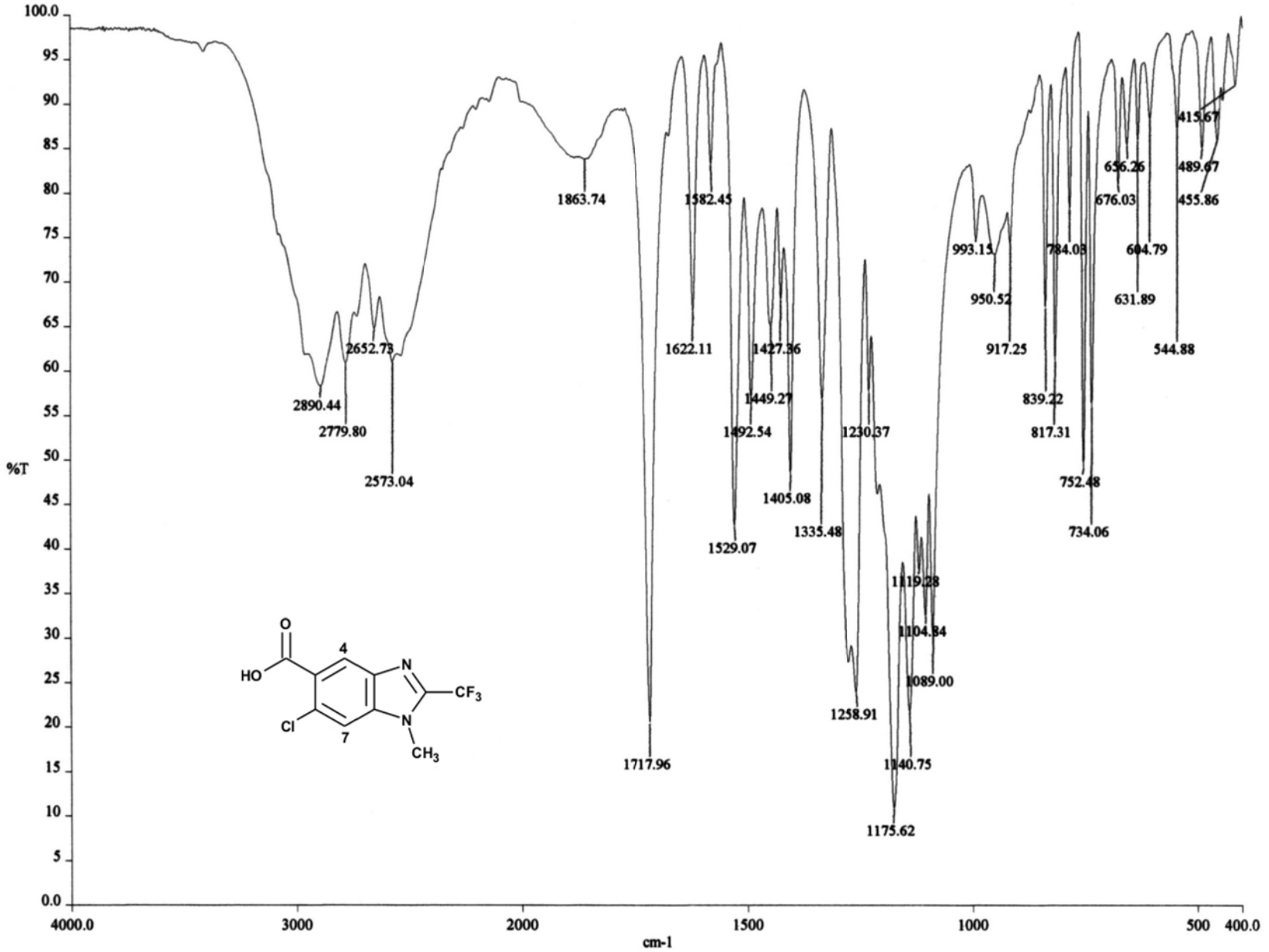
ESPECTRO 47. RMN ¹H, (TMS, Acetona) ppm: 5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (18)



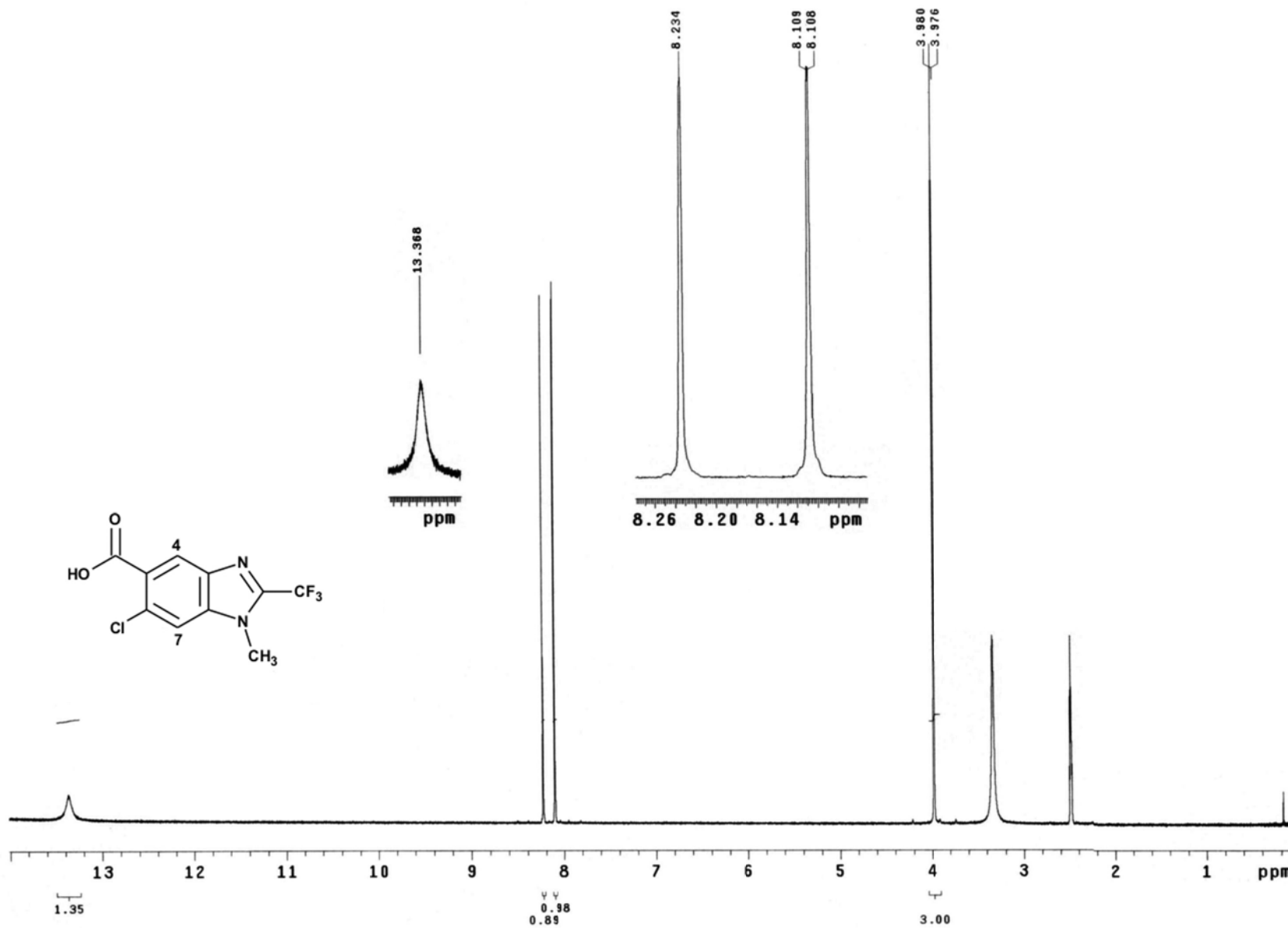
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (TMS, Acetona) ppm: 5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**18**)



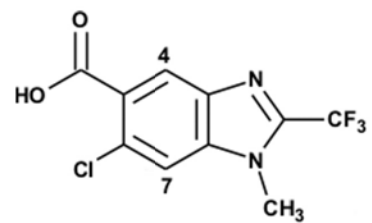
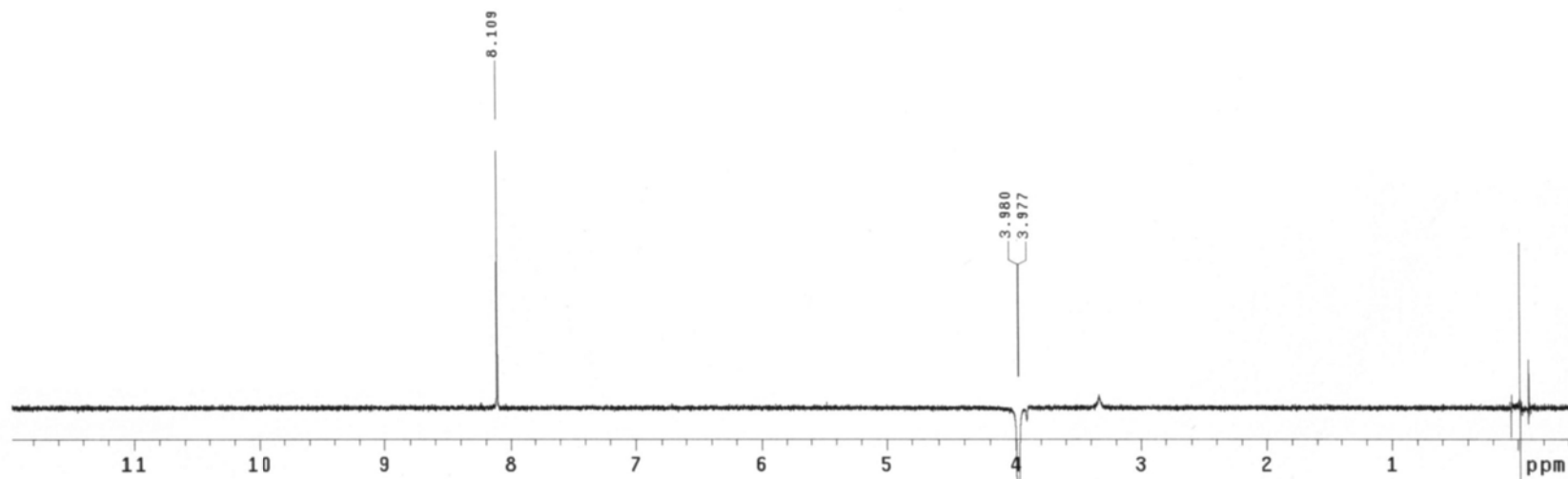
ESPECTRO 48. EM, (IE/CG) m/z: 5-Cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (18)



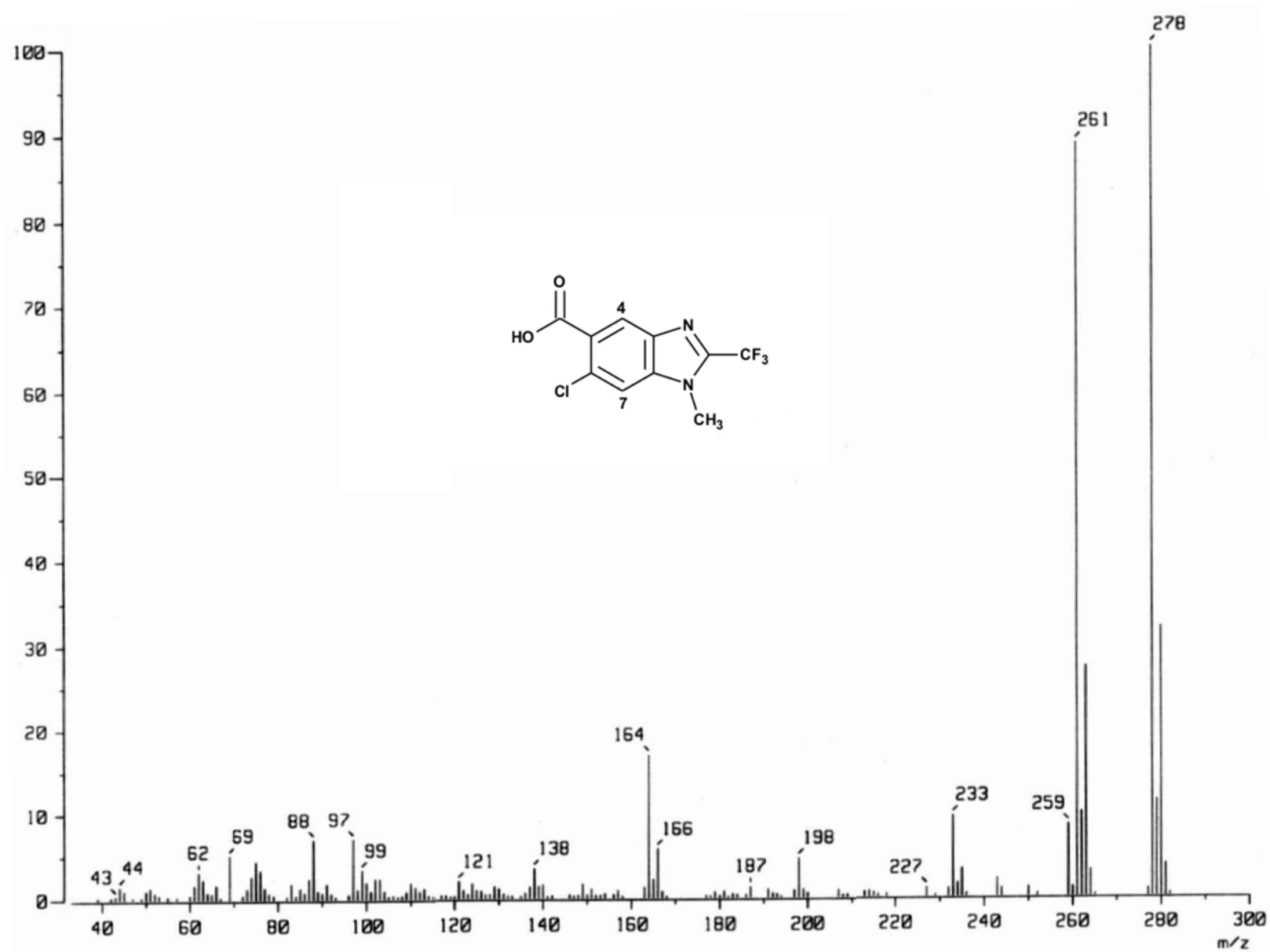
ESPECTRO 49. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)



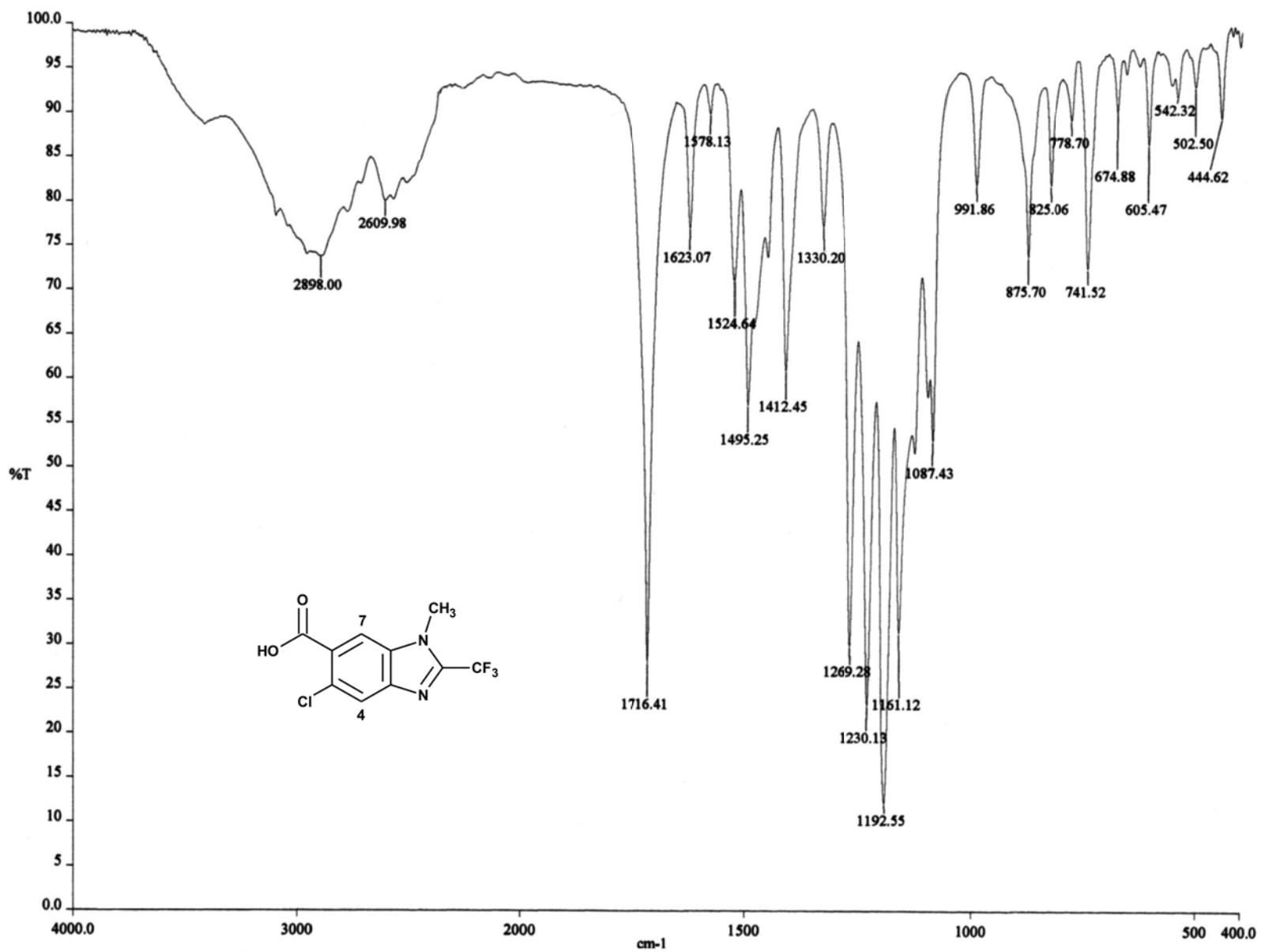
ESPECTRO 50. RMN ^1H , (TMS, DMSO) ppm: Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)



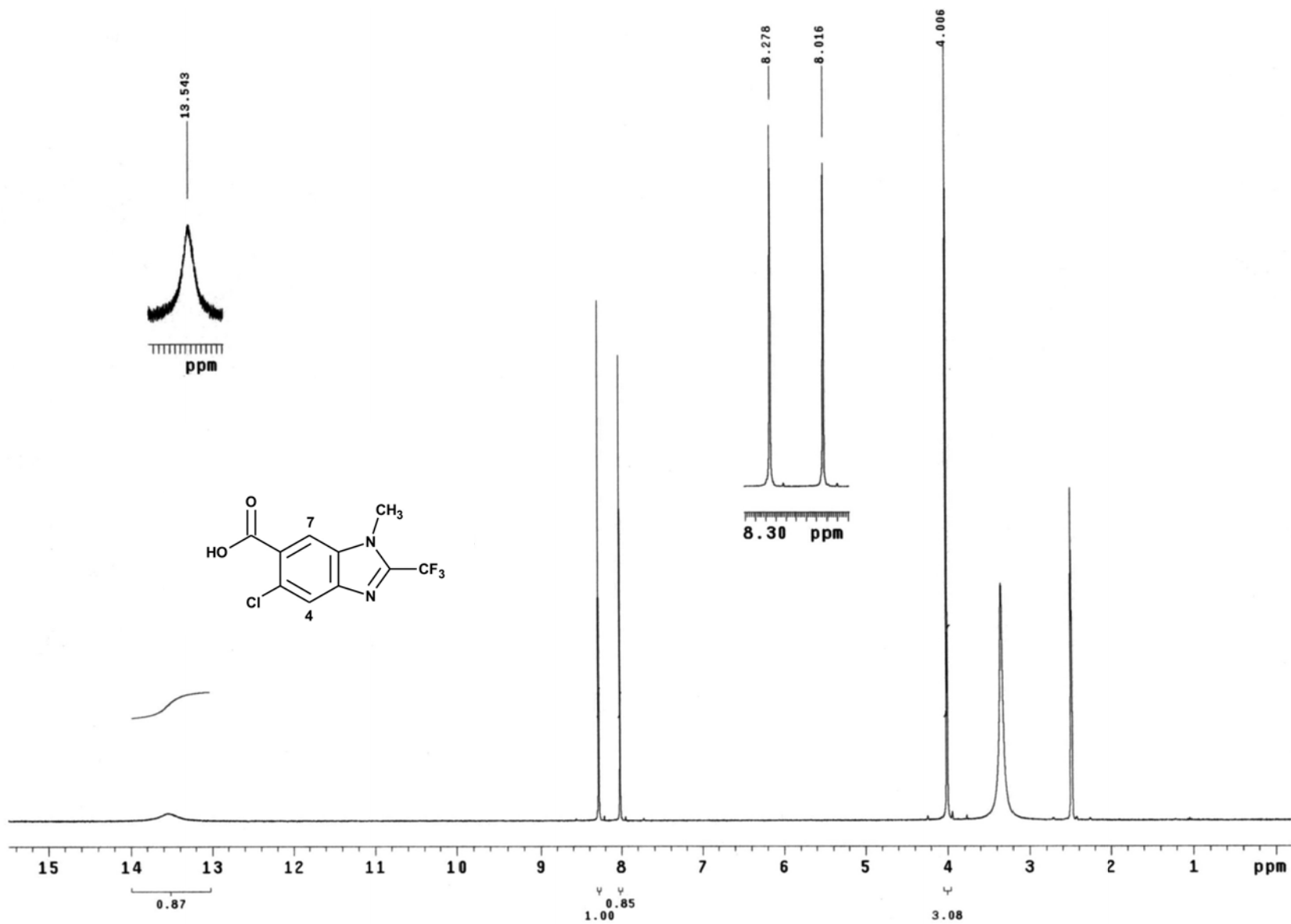
ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)



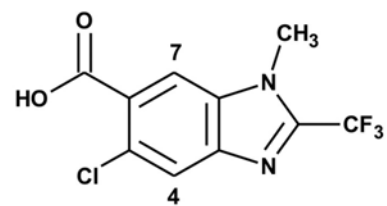
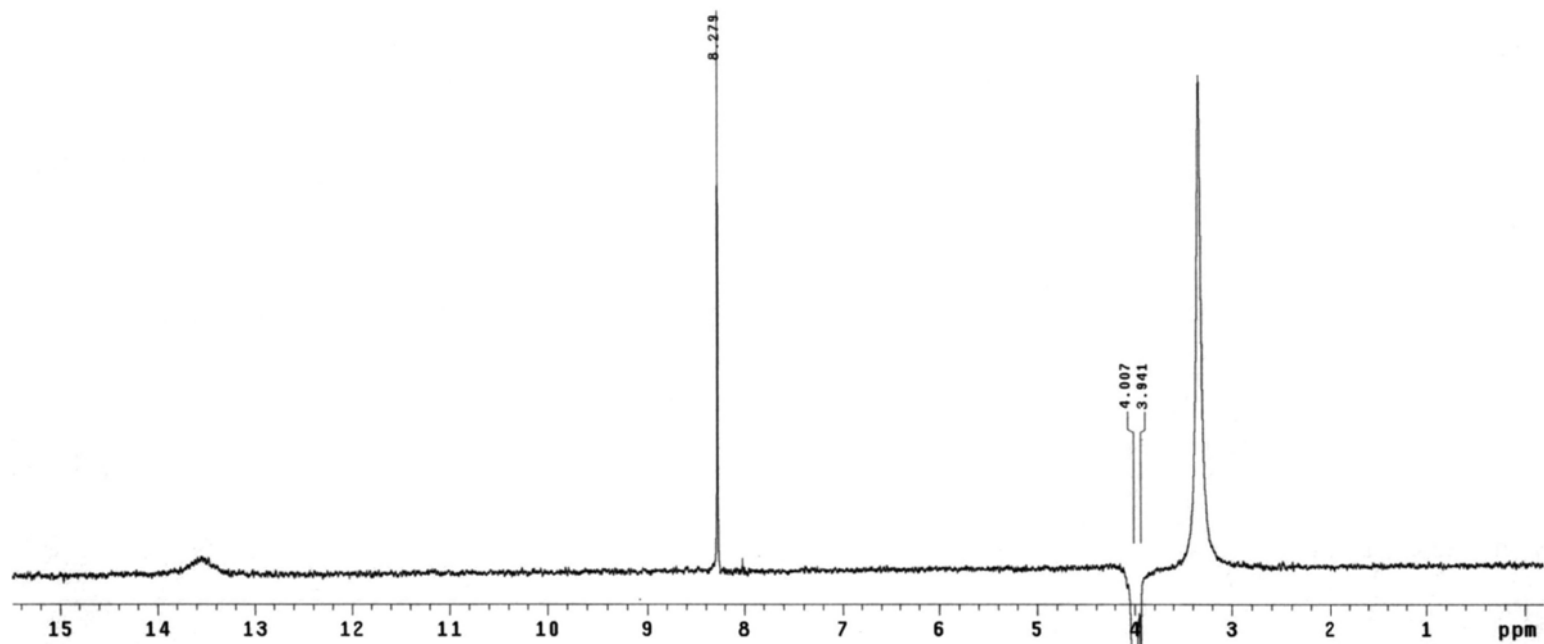
ESPECTRO 51. EM, (IE/ID) m/z: Ácido 6-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)



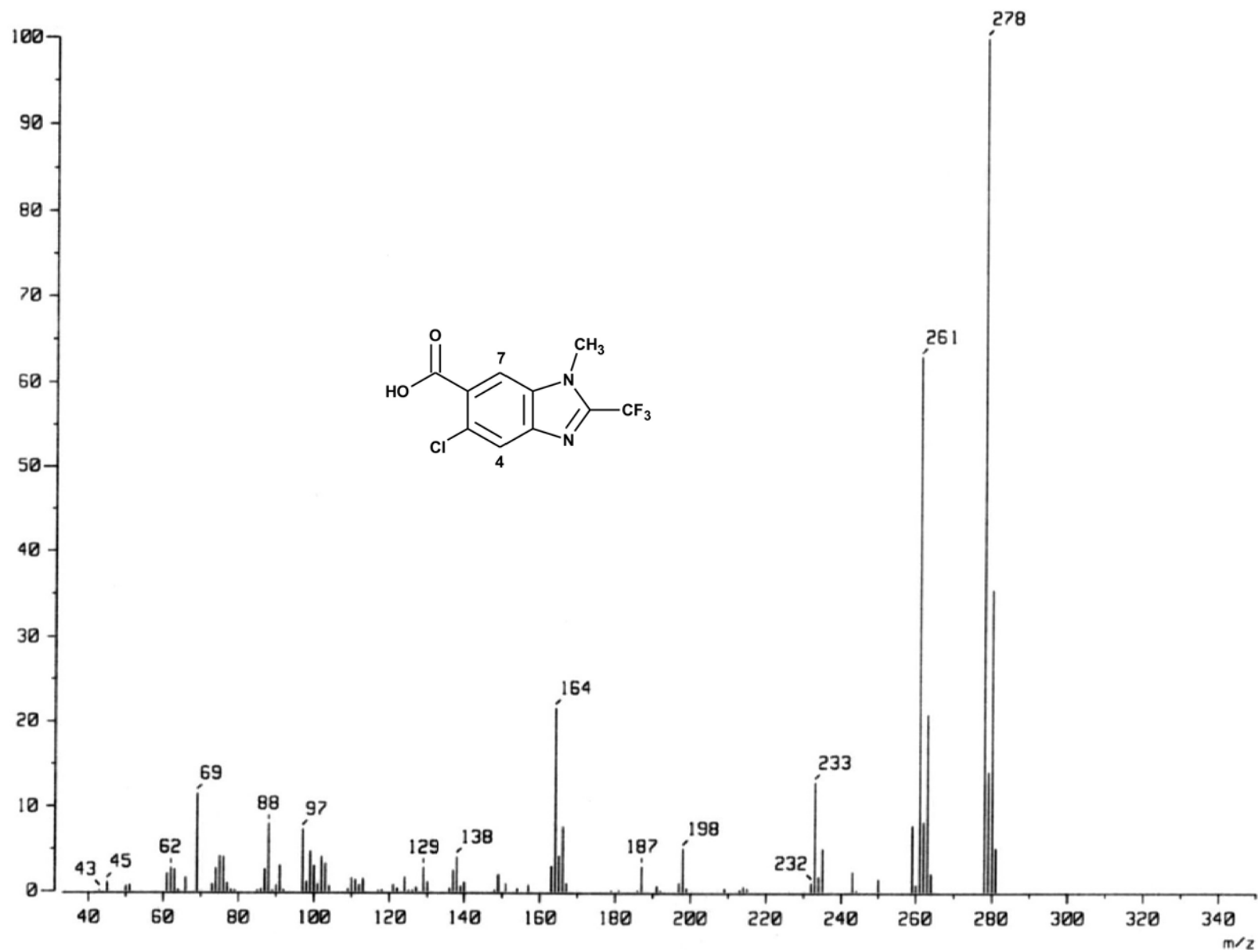
ESPECTRO 52. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (20)



ESPECTRO 53. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (20)



ESPECTRO NOE. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (20)



ESPECTRO 54. EM, (IE/ID) m/z: Ácido 5-cloro-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (20)