



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis y evaluación de la actividad
antiprotozoaria y citotóxica en linfocitos
totales de compuestos derivados del
2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

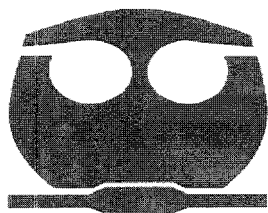
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

MARÍA DE MONSERRAT ROJANO VILCHIS



MÉXICO, D.F.

2008



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.

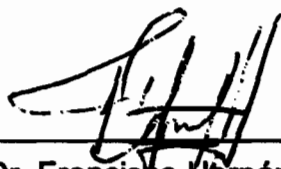
Jurado asignado

Presidente Prof. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal Prof. Abel Gutierrez Ramos
Secretario Prof. Francisco Hernández Luis
1 er Suplente Prof. Mario Alberto Maldonado Tapia
2do Suplente Prof. José Cordero Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema:



Dr. Francisco Hernández Luis

Supervisor técnico:



Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Sustentante:



María de Monserrat Rojano Vilchis

La parte química de la presente tesis se realizó en el Laboratorio 122 del Área de investigación en el Diseño y Síntesis de Compuestos Químicos con Actividad Antiparasitaria, en el Departamento de Farmacia del Conjunto "E" Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis profesor Titular "A" de Tiempo Completo de la Facultad de Química. UNAM.

La parte de pruebas biológicas antiparasitarias 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.

La parte de pruebas citotóxicas se desarrollo en el Laboratorio 4 de Histocompatibilidad del Hospital Juárez de México bajo la dirección de la M. en C. Dolores Delgado Ochoa.

AGRADECIMIENTOS

El proceso de transformar una idea en un escrito es largo y complicado, por eso agradezco sinceramente a las personas que me brindaron su tiempo, paciencia, conocimientos y cariño para la elaboración y término de este trabajo.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química: M. en C. Rosa Isela del Villar; Q. Marisela Gutierrez; Q. Georgina Duarte por la determinación de los espectros de este trabajo.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN 210805 por el apoyo proporcionado para la compra de materias primas y materiales cromatográficos.

Introducción

Las parasitosis intestinales se encuentran ampliamente diseminadas alrededor del mundo. Los países tropicales y subtropicales reúnen las características geográficas y climatológicas que favorecen su prevalencia. Dentro de estas parasitosis se encuentra la giardiosis, causada por *Giardia intestinalis*. Afecta en mayor proporción a los niños que a la población adulta y es considerada como la causa de la diarrea del viajero. En México, a pesar de los programas de desparasitación masiva, la giardiosis tiene una alta prevalencia en niños de 1 a 9 años de edad y se asocia con malnutrición, anemia y alteraciones en el desarrollo.⁴⁻¹⁴

Otra parasitosis de importancia es la trichomoniosis, una infección de transmisión sexual (ITS) causada por *Trichomonas vaginalis*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) representa un problema de salud sexual y reproductiva, no solo en el interior de los grupos de población con prácticas de riesgo, sino también en personas de la población en general. Predispone el riesgo de padecer infertilidad y complicaciones durante el embarazo. Sin embargo el impacto de esta infección, es mayor por su potencial para facilitar la propagación de la infección por el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). En México, tiene una alta prevalencia en el grupo de 15 a 49 años de edad.^{12,20,23,70}

En México el cuadro básico de medicamentos para ambas parasitosis, incluye al Metronidazol (MTZ) como fármaco de elección. No obstante, el fracaso terapéutico se atribuye principalmente a los efectos adversos que provoca como: náusea, vómito, sabor metálico, dolor abdominal y anorexia, además de los casos de resistencia reportados. Por otra parte durante el embarazo y la lactancia no existe ningún tratamiento seguro.^{16,22}

Los derivados del Bencimidazol, Albendazol (ABZ) y Mebendazol (MBZ), se han utilizado como alternativas para el tratamiento de estas parasitosis. Sin embargo su absorción, metabolismo y resistencia han sido limitantes de la respuesta terapéutica y eficacia clínica. Como agentes giardicidas, su escasa solubilidad acuosa restringe la cantidad de fármaco necesario que penetra por difusión pasiva al interior de *G. intestinalis*. Como agentes tricomonicidas, además es necesario resistir la inactivación por efecto de la micro flora habitual y mantener una concentración suficiente y constante en el área vaginal, que permita la difusión del fármaco al interior de *T. vaginalis*.^{18,22}

Por lo anterior se sigue explorando la estructura del Bencimidazol. Como resultado de este esfuerzo, se encontró que el compuesto 5(6)-Cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol mostró actividad giardicida significativa.⁴⁰ Sin embargo su potencial tóxico derivado de su metabolismo en el huésped limitaría su utilidad terapéutica. Por lo tanto en este trabajo se propone modificar esta estructura a través del remplazo bioisostérico⁴⁰⁻⁴⁹ del átomo de Cloro de la posición 5(6), con la finalidad de obtener una mejor actividad antiprotozoaria y disminuir el posible riesgo toxicológico.

Índice general

Introducción

1. Antecedentes	1
1.1. Características de los parásitos <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>	1
1.1.1. <i>Giardia intestinalis</i>	1
1.1.1.1. Clasificación taxonómica	1
1.1.1.2. Morfología	2
1.1.1.3. Ciclo biológico	3
1.1.1.4. Giardiosis en México	4
1.1.1.5. Fisiopatología y Síntomas	4
1.1.1.6. Tratamiento	4
1.1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	6
1.1.2.1. Clasificación taxonómica	6
1.1.2.2. Morfología	6
1.1.2.3. Ciclo biológico	7
1.1.2.4. Trichomonosis en México	8
1.1.2.5. Fisiopatología y Síntomas	8
1.1.2.6. Tratamiento	9
1.2. Derivados del Bencimidazol como agentes giardicidas y tricomonocidas	10
1.2.1. Derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol como antiprotozoarios	12
1.2.2. Generalidades de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol	15
1.3. Isosterismo y bioisosterismo	18
1.4. Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol en linfocitos humanos	19
2. Planteamiento del problema	20

3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
4.1. Objetivo General	21
4.2. Objetivos Específicos	21
5. Metodología	23
5.1. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol	23
5.1.1. Síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1)	23
5.1.2. Síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2)	24
5.2. Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de los 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ frente a <i>Giardia intestinales</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
5.3. Determinación de la actividad citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ sobre la proliferación celular de linfocitos humanos mediante la incorporación de Metiltimidina tritiada	26
6. Resultados y discusión	27
6.1. Diseño de los derivados 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol	27
6.1.1. Propuesta del mecanismo de biotransformación de los compuestos 1-5	28
6.1.2. Aplicación del bioisosterismo en el diseño de los compuestos 1-3 y 5	31
6.1.3. Aplicación de la regla de Lipinski en el diseño de los compuestos 1-5	34
6.2. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol	36
6.2.1. Síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1)	36
6.2.1.1. Obtención del compuesto 1 utilizando como agente reductor la Ditionita de sodio (Na ₂ S ₂ O ₄)	36
6.2.1.2. Obtención del compuesto 1 utilizando como agente reductor el Formiato de amonio (HCO ₂ NH ₄)	39

6.2.1.3. Obtención del compuesto 1 siguiendo la reacción de Phillips	39
6.2.1.4. Caracterización del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1)	44
6.2.2. Síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2)	46
6.2.2.1. Caracterización del compuesto 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2)	48
6.3. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ	50
6.3.1. Evaluación de la actividad giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ	50
6.3.2. Evaluación de la actividad tricomonocida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ	53
6.4. Evaluación del efecto citotóxico <i>in vitro</i> de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol, ABZ y MTZ sobre la proliferación de linfocitos humanos	56
6.5. Relación estructura- actividad	59
7. Conclusiones	61
Bibliografía	63
Anexo 1. Síntesis	69
Anexo 2. Actividad antiprotozoaria	77
Anexo 3. Actividad citotóxica	102
Anexo 4. Espectros	111

Índice de Esquemas

Esquema 1. Trofozoito, quiste y ciclo biológico de <i>Giardia intestinalis</i> .	3
Esquema 2. Agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la giardiosis.	5
Esquema 3. Trofozoito y ciclo biológico de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	7
Esquema 4. Agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la trichomonosis.	9
Esquema 5. Derivados del Bencimidazol utilizados en el tratamiento de las enfermedades parasitarias.	10
Esquema 6. Importancia de los sustituyentes y las posiciones de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol como antiprotozoarios.	14
Esquema 7. Tautomería y estructura de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	15
Esquema 8. Asociación intermolecular de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	16
Esquema 9. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	17
Esquema 10. Síntesis del 5(6)- Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1).	23
Esquema 11. Síntesis del 5(6)- Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2).	24
Esquema 12. Mecanismo de hidroxilación aromática propuesto para los compuestos 1-5.	29
Esquema 13. Epóxido formado.	30
Esquema 14. Influencia sobre la actividad biológica de los sustituyentes presentes en los derivados 1-5.	32
Esquema 15. Obtención del compuesto 1 a partir del compuesto	37

4-Ciano-2-nitrotrifluoroacetamida 10 .	
Esquema 16. Hidrólisis de la trifluoroacetamida 10 .	38
Esquema 17. Mecanismo propuesto para la formación de los compuestos 1 y 2 mediante la reacción de Phillips.	41
Esquema 18. Reacciones ácido-base que se llevan a cabo entre la diamina y el medio ácido.	43
Esquema 19. Obtención del compuesto 2 a partir del compuesto 3-Nitro-4-aminofluorobenceno 8 .	46
Esquema 20. Diagrama del mantenimiento de los protozoarios <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> .	82
Esquema 21. Determinación de la susceptibilidad <i>in vitro</i> mediante el método de subcultivo.	91
Esquema 22. Obtención y aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica.	105
Esquema 23. Determinación de la proliferación celular de linfocitos humanos por incorporación de Metiltimidina tritiada.	107

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores de $CI_{50}(\mu M)$ reportados para la actividad giardicida <i>in vitro</i> de los derivados 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	13
Tabla 2. Ejemplos de sustituyentes bioisostéricos clásicos y no clásicos.	18
Tabla 3. Valores de los parámetros para los sustituyentes bioisostéricos.	31
Tabla 4. Aplicación de la regla de Lipinski a los compuestos 1- 5 .	
Tabla 5. Resultados obtenidos de la reacción de reducción del compuesto 3-Amino-2-nitrobenzonitrilo 6 para la obtención de la diamina 7 .	35 40
Tabla 6. Resultados de los experimentos de la reacción de ciclocondensación del compuesto 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1).	42
Tabla 7. Resultados de la síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (1).	44
Tabla 8. Resultados de la reacción de reducción del compuesto 8 .	
Tabla 9. Resultados obtenidos de la formación del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2).	47 48
Tabla 10. Resultados de la síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (2).	48
Tabla 11. Resultados de la evaluación giardicida de los compuestos 1, 2, 3, 5, ABZ y MTZ .	50
Tabla 12. Potencia giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	51
Tabla 13. Resultados de la evaluación tricomonocida de los compuestos 1, 2, 3, 5, ABZ y MTZ .	53
Tabla 14. Potencia tricomonocida relativa de los derivados del	

2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	54
Tabla 15. Resultados de la evaluación citotóxica (CI ₅₀ μM) de los compuestos 1-5 , ABZ y MTZ.	56
Tabla 16. Resultados de la evaluación citotóxica (CI ₉₀ μM) de los compuestos 1-5 , ABZ y MTZ.	57
Tabla 17. Correlación de la estructura-actividad antiprotozoaria y citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol.	59
Tabla 18. Datos utilizados para la elaboración de la curva de crecimiento de <i>Giardia Intestinalis</i> .	84
Tabla 19. Datos utilizados para la elaboración de la curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	85
Tabla 20. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .	86
Tabla 21. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .	87
Tabla 22. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	88
Tabla 23. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	88
Tabla 24. Arreglo de datos para k muestras con igual número de tamaño.	96
Tabla 25. Análisis de varianza.	
Tabla 26. Arreglo de datos.	96
Tabla 27. Análisis de varianza para los compuestos 1-3 y 5 con respecto a su actividad giardicida.	97 97
Tabla 28. Arreglo de datos.	
Tabla 29. Análisis de varianza para los compuestos 1-3 , 5 y ABZ con respecto a su actividad giardicida.	98 98

Tabla 30. Arreglo de datos utilizados para determinar la <i>t</i> Student.	
Tabla 31. Prueba <i>t</i> Student.	99
Tabla 32. Arreglo de datos.	100
Tabla 33. ANOVA para los compuestos 1-3, 5 y ABZ con respecto a su actividad tricomonicida.	101 101
Tabla 34. Arreglo de datos para k muestras con igual número de tamaño.	108
Tabla 35. Análisis de varianza.	
Tabla 36. Arreglo de datos.	108
Tabla 37. Análisis de varianza para los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.	109 109
Tabla 38. Arreglo de datos.	
Tabla 39. Análisis de varianza para los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.	110 110

Índice de gráficas

Gráfica 1. Curva Concentración–Respuesta de la actividad giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol y ABZ.	52
Gráfica 2. Curva Concentración-respuesta de la actividad tricomonicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1 <i>H</i> -becimidazol y ABZ.	55
Gráfica 3. Actividad citotóxica de los derivados del 2- (Trifluorometil)-1 <i>H</i> -becimidazol ABZ y MTZ.	58
Gráfica 4. Curva de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .	84
Gráfica 5. Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	85
Gráfica 6. Curva estándar de crecimiento de <i>Giardia intestinalis</i> .	87
Gráfica 7. Curva estándar de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	89

1. Antecedentes

Los antecedentes se dividieron en tres partes. En la primera se presentan algunas características de los parásitos *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. La segunda muestra algunas generalidades de los compuestos derivados del Bencimidazol y su empleo como antiprotozoarios. En la tercera se menciona el concepto de bioisosterismo y su utilidad para determinar la relación entre la estructura y la actividad biológica.

1.1. Características de los parásitos *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

1.1.1. *Giardia intestinalis*

Anthony Van Leeuwenhoek en 1681 observó y describió por primera vez a los protozoarios clasificados dentro del género *Giardia*, presentes en el lumen intestinal de mamíferos, reptiles, aves y anfibios.¹ La infección que provoca en el hombre, frecuentemente es asintomática y no invasiva.^{2,3} La giardiosis afecta principalmente a niños y es considerada como la mayor causa de diarrea en los viajeros.⁴⁻⁶

1.1.1.1. Clasificación taxonómica

Para nombrar al parásito se han utilizado los nombres de *Giardia duodenalis*, *G. lamblia* y *G. intestinalis*, nombres actualmente aceptados por la Organización Mundial de la Salud.⁷ La clasificación taxonómica del parásito es la siguiente:^{5,7,8}

Reino:	<i>Protista</i>
Subreino:	<i>Protozoa</i>
Phylum:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum:	<i>Mastigophora</i>
Clase:	<i>Zoomastigophorea</i>
Orden:	<i>Diplomonadida</i>
Suborden:	<i>Diplomonadina</i>
Familia:	<i>Hexamitidae</i>
Género y especie:	<i>Giardia intestinalis</i>

1.1.1.2. Morfología

Giardia intestinalis presenta dos formas: trofozoito y quiste (**Esquema 1**). El trofozoito se adhiere a la mucosa epitelial intestinal del duodeno y yeyuno en el huésped y es responsable de la sintomatología. El quiste es la forma de diseminación del parásito, le confiere resistencia al medio ambiente y a la acidez gástrica.

El trofozoito mide de 10 a 12 μm de longitud por 5 μm de ancho, y de 1 a 2 μm de espesor, presenta simetría bilateral.⁵ Su forma se parece a una gota o pera, el extremo superior contiene dos núcleos y es ancho, el inferior termina en punta. Tiene una cara dorsal convexa y una cara ventral plana ocupada por el disco suctor o disco ventral único en *Giardia sp.*^{3,8} El disco suctor está integrado por tubulina, giardina, actina y miosina,^{3,5} con el cual puede adherirse a las microvellosidades intestinales del huésped. La motilidad está relacionada con los cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, ventral y caudal) que emergen de los blefaroplastos localizados al lado y ligeramente anterior a los dos núcleos; estos marcan el origen de los axonemas, organelos en forma de varilla recta que se disponen paralelamente y terminan en el extremo posterior.⁸

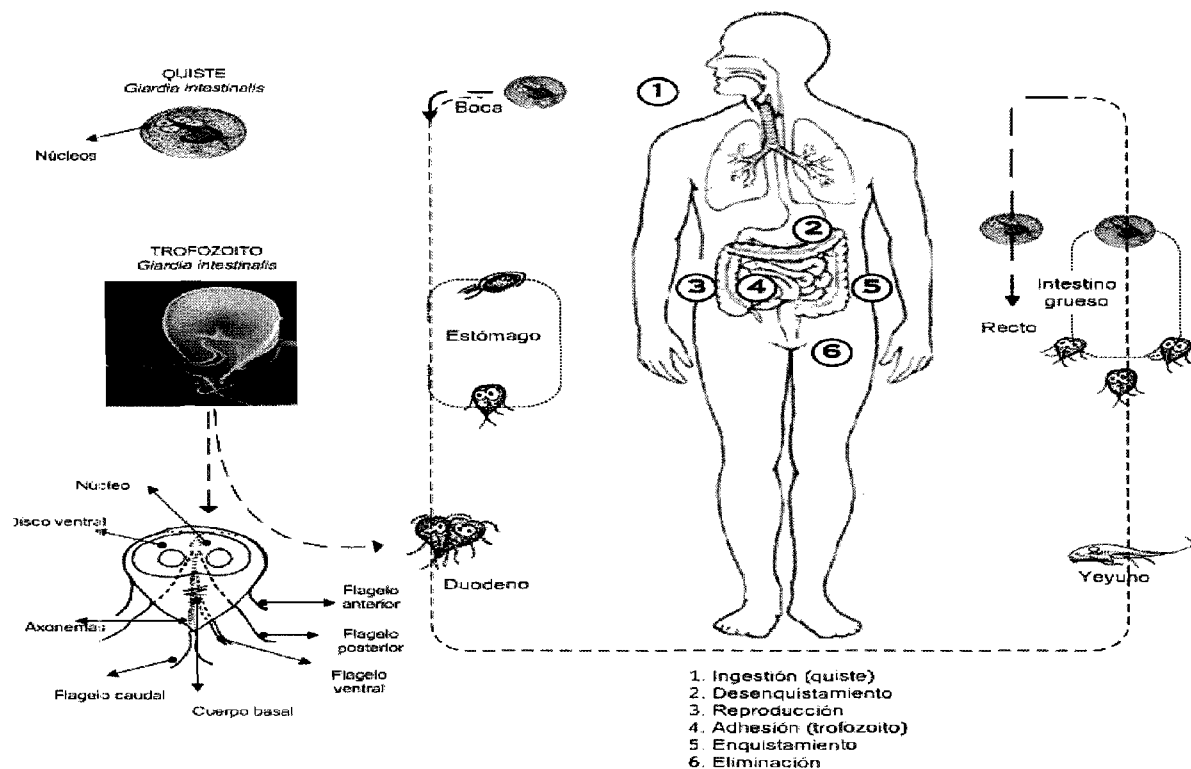
En su citoplasma están presentes vacuolas, importantes en la patogenicidad ya que contienen ADN'asas, RNA'asas y proteasas, de las que se ha demostrado su capacidad para cortar hemoglobina e inmunoglobulina. Presenta además retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, carece de mitocondrias, peroxisomas y nucleolo.⁵ En la superficie del trofozoito se localizan las proteínas de superficie variables, útiles para evadir la respuesta inmunológica del huésped.⁹

El quiste es de forma ovoide, mide de 8 μm de largo por 7 a 10 μm de ancho, posee una pared quística constituida principalmente de *N*-acetil-galactosamina de 0.3 μm de espesor. Contiene cuatro o dos núcleos si el enquistamiento es reciente y no

se ha dado la división nuclear. También presenta fragmentos del disco ventral, ribosomas, elementos estructurales del flagelo y los axonemas enrollados.^{5,10}

1.1.1.3. Ciclo biológico

El ciclo biológico comienza con la ingestión de quistes presentes en la materia fecal de personas y animales infectados.⁷ Al llegar al estómago (pH=1.3-2.7) y bajo las condiciones de humedad y temperatura, inician el proceso de desenquistamiento para originar un trofozoito tetranucleado (exquistozoito); el cual se divide por fisión binaria para dar lugar a dos trofozoitos binucleados, los cuales se adhieren a las microvellosidades intestinales del duodeno y a la primera porción del yeyuno a pH de 6.8-7.2. Así continua su reproducción por varias semanas o meses, hasta que algunos trofozoitos son conducidos al intestino grueso en donde se enquistan y eliminan (**Esquema 1**).^{2,5}



Esquema 1. Trofozoito, quiste y ciclo biológico de *Giardia intestinalis*.^{3,11}

1.1.1.4. Giardiosis en México

En México durante el año 2005, la giardiosis tuvo una alta prevalencia en niños de 1 a 9 años de edad, asociada a malnutrición, anemia y alteraciones en el desarrollo. Se registró durante todo el año con el mayor número de casos en mayo y agosto. Actualmente la giardiosis, es un problema de salud pública en nuestro país.^{4,12,13}

1.1.1.5. Fisiopatología y Síntomas

La adhesión de los trofozoitos al epitelio del intestino delgado provoca anormalidades en la absorción o digestión de electrolitos, nutrimentos y agua, debido a la disminución del área superficial de las microvellosidades intestinales, modificación del transporte de glucosa y la alteración de las enzimas digestivas: tripsina, quimiotripsina, lipasa y amilasa.^{2,14,15} Además la mucosa intestinal pierde la capacidad de protección frente a estímulos antigénicos externos favoreciendo la colonización de *G.intestinalis* hacia el epitelio intestinal.¹⁴

El proceso de la infección puede durar semanas o meses sin que el sistema inmunitario del huésped sea estimulado por el parásito, en estos casos se dice que es asintomático; de lo contrario el periodo de incubación es de 12 a 20 días.² La diarrea provocada es generalmente de tipo crónico, acuosa y sin sangre, además se acompaña de cólicos, meteorismo, náuseas y vómito. La intensidad de los síntomas y la severidad de la infección está relacionada a factores como la edad, el estado inmunológico, nutricional, el tamaño del inóculo ingerido, el tipo de cepa así como a las diferencias genotípicas del huésped.^{10,15}

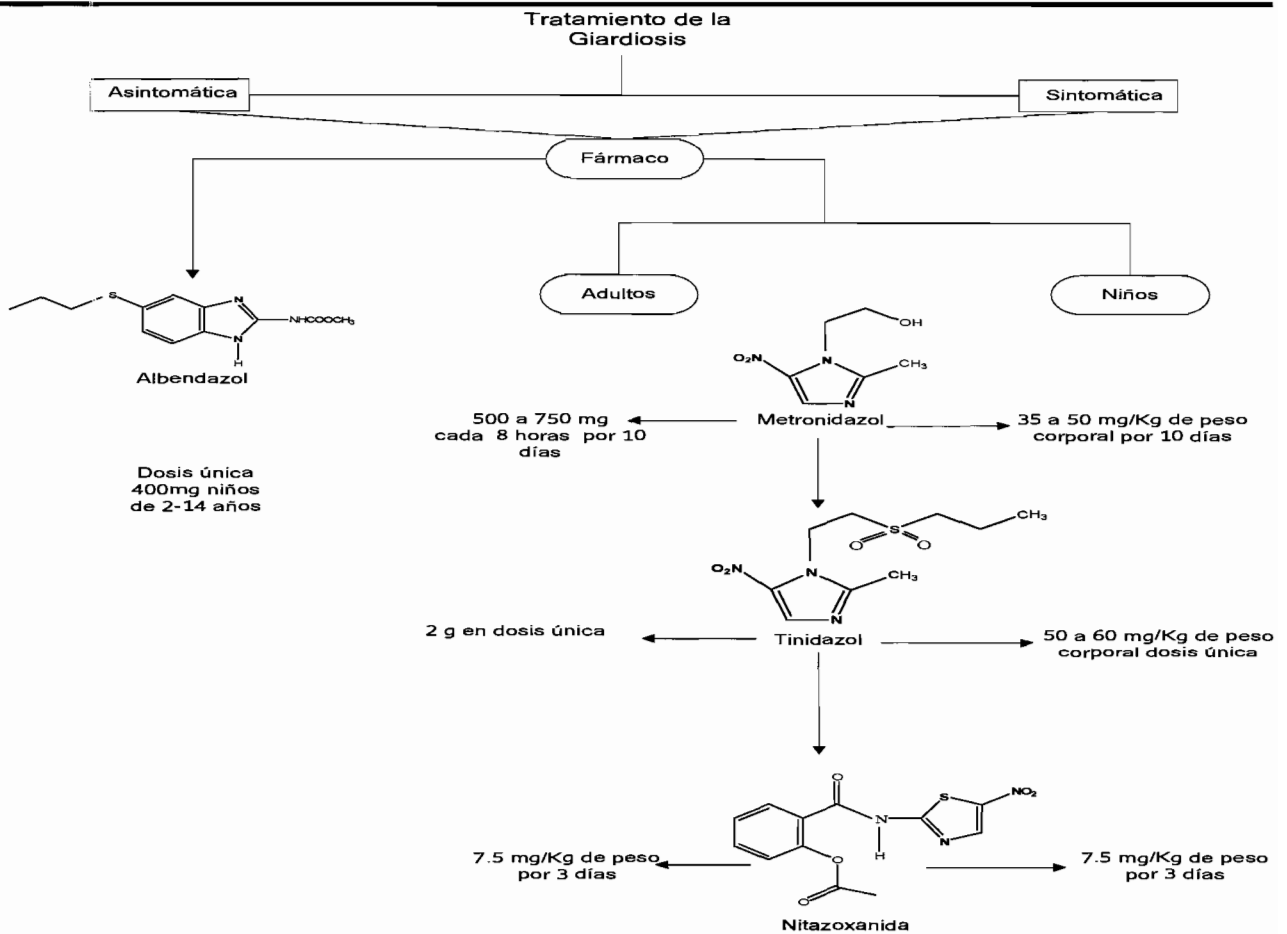
1.1.1.6. Tratamiento

En México la terapia actual descrita en el cuadro básico de medicamentos, considera a dos derivados del 5-Nitroimidazol: el Tinidazol y Metronidazol (MTZ). Este último se considera el fármaco de elección. Además se encuentra un derivado del

Antecedentes

5-Nitrotiazol, la Nitazoxanida.^{16,17} A partir del año de 1993, se distribuye durante la semana nacional de salud un derivado del Bencimidazol, el Albendazol (ABZ), para prevenir la giardiosis (**Esquema 2**).¹⁸

En general el fracaso terapéutico en esta parasitosis se atribuye a la farmacocinética, farmacodinamia y resistencia a los principios activos. Durante el embarazo y la lactancia no existe ningún tratamiento seguro que evite los efectos teratogénicos y carcinogénicos.⁶



Esquema 2. Agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la giardiosis.

1.1.2. *Trichomonas vaginalis*

Es un protozoo flagelado descrito inicialmente por Alfred Donné en 1836. La enfermedad que provoca está clasificada dentro del grupo de infecciones de transmisión sexual (ITS). A nivel mundial afecta a más de 250 millones de personas. Predispone el riesgo de padecer: infertilidad, complicaciones durante el embarazo, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida VIH/(SIDA), cáncer cervicouterino y de próstata.^{19,20}

1.1.2.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Trichomonas vaginalis* es la siguiente:^{8,20}

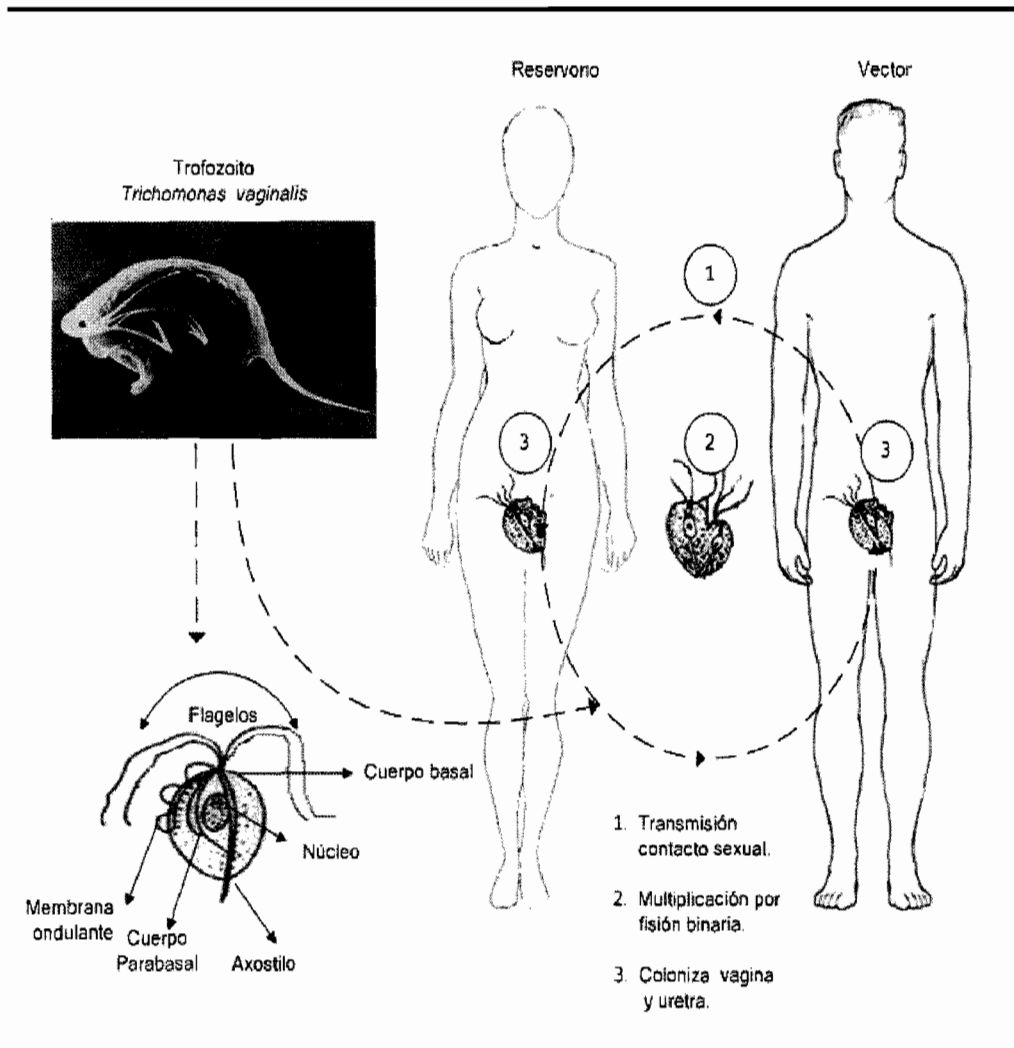
Reino:	<i>Protista</i>
Subreino:	<i>Protozoa</i>
Phylum:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum:	<i>Mastigophora</i>
Clase:	<i>Zoomastigophorea</i>
Orden:	<i>Trichomonadida</i>
Familia:	<i>Trichomonadidae</i>
Género y especie:	<i>Trichomonas vaginalis</i>

1.1.2.2. Morfología

A la *Trichomonas vaginalis* solo se le conoce en la fase de trofozoito (**Esquema 3**). Su forma puede ser ovalada o piriforme con un tamaño promedio de 7 a 23 μm de largo por 5 a 12 μm de ancho.²¹ Se desplaza a través de cinco flagelos que emergen del blefaroplasto, uno bordea a la membrana ondulante, lo que le confiere el movimiento en sacudida característico. El axostilo es una estructura de tubulina y actina que le permite fijarse a las células epiteliales de la vagina.²² El citoplasma de la célula contiene un núcleo con 6 cromosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas e hidrogenosomas.^{8,21,22}

1.1.2.3. Ciclo biológico

Trichomonas vaginalis se transmite por contacto sexual, fomites contaminados y en el momento del alumbramiento. En la transmisión sexual, el hombre sirve como vector y la mujer como reservorio. Se reproduce mediante fisión binaria longitudinal y se establece en la mucosa vaginal, próstata y uretra femenina y masculina (**Esquema 3**).^{8,20}



Esquema 3. Trofozoito y ciclo biológico de *Trichomonas vaginalis*.²¹

1.1.2.4. Trichomonosis en México

La trichomoniosis durante el año 2005, fue una de las principales causas de enfermedad nacional por mes. Tuvo una alta prevalencia en adolescentes y adultos de 15 a 49 años de edad. Se registró durante todo el año. El mayor número de casos se presentaron en marzo, mayo y agosto.^{12,23}

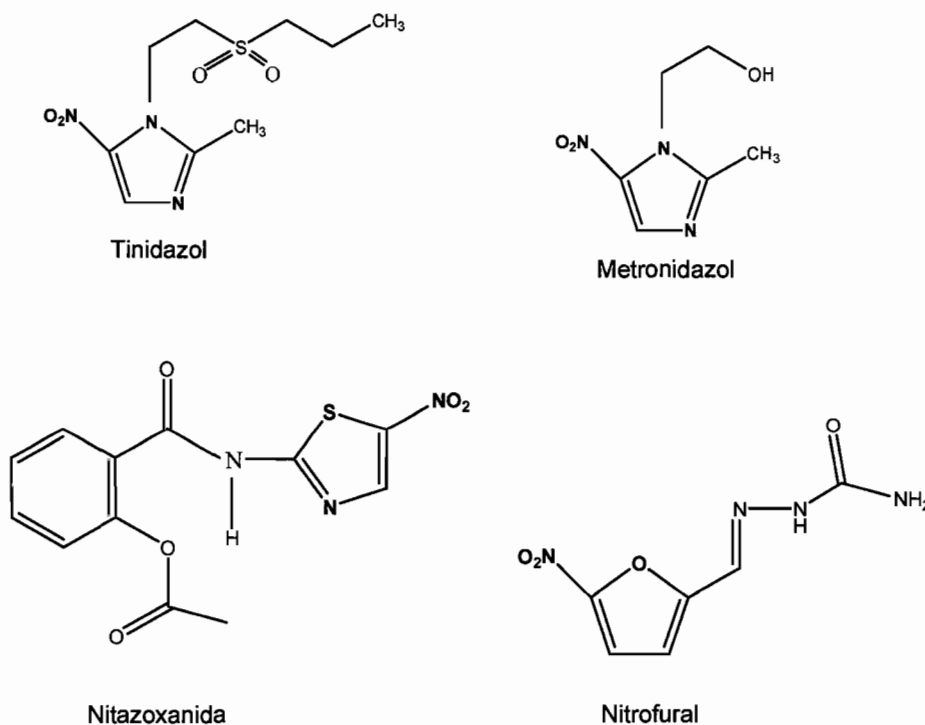
1.1.2.5. Fisiopatología y Síntomas

El establecimiento de *Trichomonas vaginalis* en la mucosa vaginal se explica a través de cuatro mecanismos. El primero propone la disminución de la acidez vaginal, por el incremento de las bacterias anaerobias, debido a la interacción entre el parásito y los *Lactobacillus acidophilus*. El segundo se refiere a la adquisición de ácidos grasos y hierro mediante lisis de los eritrocitos. El tercero, describe la adhesión a las células del epitelio vaginal mediante proteínas,^{21, 24} localizadas en la superficie del parásito. Su expresión depende de los niveles de hierro disponibles. El cuarto menciona la evasión de la respuesta inmunológica a través de la variación fenotípica y la secreción de gran cantidad de antígenos solubles, altamente inmunogénicos, que neutralizan la respuesta y favorecen la destrucción de los linfocitos y las células epiteliales, acompañada de una reacción inflamatoria.²⁴

El periodo de incubación es de 4 a 30 días, la presencia de síntomas es más frecuente en mujeres que en hombres.²⁰ En el 45% de las mujeres sintomáticas, la infiltración de *Trichomonas vaginalis* inicia una respuesta vascular, que se percibe clínicamente, como placas eritematosas con apariencia de una fresa, signo patognomónico en esta parasitosis.^{8,20,21} Además se produce una secreción de aspecto purulento que produce prurito y dolor abdominal. En el hombre la presencia del parásito generalmente pasa inadvertida, no obstante la exposición crónica produce prostatitis, uretritis, epididimitis, prurito e infertilidad.^{8,19}

1.1.2.6. Tratamiento

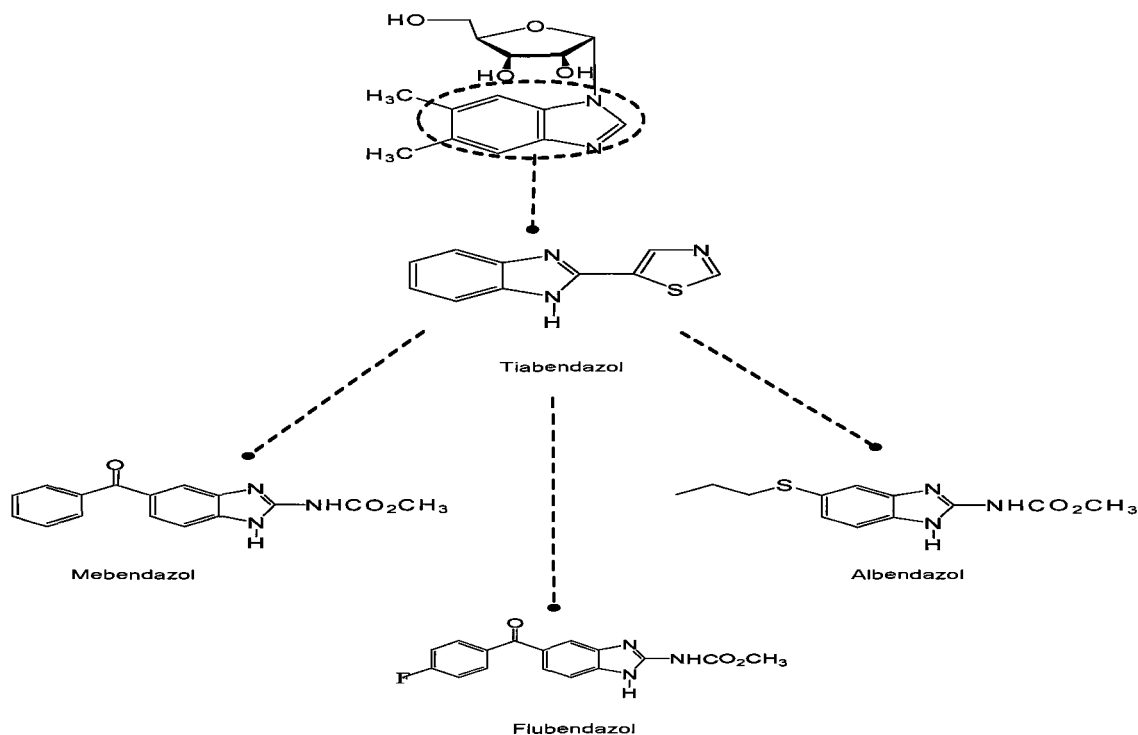
En México el cuadro básico de medicamentos incluye a dos derivados del 5-Nitroimidazol: el Tinidazol y MTZ, el cual se considera el fármaco de elección. Además se encuentra un derivado del 5-Nitrotiazol, la Nitazoxanida¹⁶ y un derivado del 5-Nitrofurano, el Nitrofuril (**Esquema 4**). Los efectos adversos más frecuentes son náuseas, vómito, vértigo, irritación, ardor y en la mujer reseca vaginal y leucorrea. Las fallas en el tratamiento obedecen a las constantes reinfecciones por la pareja sexual, la inactivación por las bacterias presentes en la mucosa vaginal y la escasa distribución de los fármacos en el área vaginal. Durante el embarazo el tratamiento dependerá del riesgo para provocar anomalías fetales.^{19,25}



Esquema 4. Agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la trichomonosis.

1.2. Derivados del Bencimidazol como agentes giardicidas y tricomonocidas

El Bencimidazol es un heterociclo constituido por un anillo bencénico fusionado en la posición 4 y 5 del Imidazol. Durante los años cincuenta, se descubrió que formaba parte integral de la vitamina B₁₂.^{26,27} En 1961, se obtuvo el Tiabendazol, primer derivado del Bencimidazol, que planteó una nueva alternativa para el tratamiento de las parasitosis gastrointestinales, causadas por helmintos. Sin embargo su rápido metabolismo limitó su eficacia. Posteriormente se obtuvieron otros derivados del Bencimidazol, que tenían en común al grupo carbamato de metilo en la posición 2, a este grupo pertenecen el Mebendazol (MBZ), ABZ y Flubendazol (Esquema 5).



Esquema 5. Derivados del Bencimidazol utilizados en el tratamiento de las enfermedades parasitarias.

Antecedentes

En 1985 se reportó que el MBZ y Flubendazol inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*.^{28,29} El MBZ como tricomonocida, fue activo frente a cepas de *T. vaginalis* resistentes al Metronidazol. Se observó que su mecanismo de acción está relacionado a la interacción con la tubulina, lo que altera la morfología y provoca la pérdida de la adhesión a las células del epitelio vaginal. En el tratamiento de la trichomoniosis, el MBZ se considera una alternativa en casos reincidentes.^{21,29,30}

Por otra parte, se reportó que el ABZ y MBZ inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Giardia intestinalis* con resultados semejantes al MTZ. Posteriormente en estudios clínicos realizados en humanos, probaron su eficacia como agentes giardicidas, mostrando resultados semejantes al MTZ.³¹ Su mecanismo de acción se atribuye a la inhibición de la polimerización de la subunidad β de la tubulina, proteína estructural dimérica, integral del citoesqueleto de *G. intestinalis*, afectando la morfología y bloqueando la captación de glucosa.³ Además se observa la dislocación del disco ventral, lo que sugiere la interacción del fármaco con la giardina, proteína presente en esta estructura.^{2,11} Actualmente, el ABZ se utiliza como quimiopreventivo masivo, para el control de la giardiosis en áreas endémicas, debido a su menor frecuencia de efectos secundarios y a su fácil administración en niños.³²

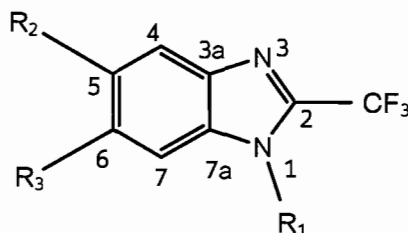
La absorción, metabolismo y resistencia del ABZ y MBZ han sido limitantes de la respuesta terapéutica y eficacia clínica. Como agentes giardicidas, su escasa solubilidad acuosa restringe la cantidad de fármaco necesario que penetra por difusión pasiva al interior de *G. intestinalis*. Como agentes tricomonocidas, además es necesario resistir la inactivación por efecto de la flora habitual y mantener una concentración suficiente y constante en el área vaginal, que permita la difusión del fármaco al interior de *T. vaginalis*.^{18,22}

1.2.1. Derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol como antiprotozoarios

Los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol muestran actividad insecticida, herbicida, antimicrobiana, fúngica y antiparasitaria.³³⁻³⁵ Como antiprotozoarios se han evaluado diferentes estructuras, que soportan sus modificaciones en los hallazgos encontrados en la estructura de los derivados del Bencimidazol, cuando son empleados como antihelmínticos. Se observó, que la posición 5(6) está relacionada con la interacción fármaco-receptor y que los sustituyentes en esta posición, previenen la inactivación y la generación de metabolitos reactivos, tóxicos para el huésped.^{36,37}

En relación a la actividad antiprotozoaria se han preparado y evaluado diferentes moléculas que han permitido explorar las posiciones 1, 5 y 6 dentro del anillo del Bencimidazol, trifluorometilado en la posición 2.^{38,39} Dentro de estas moléculas se encontró una serie de compuestos análogos, los cuales fueron más activos que el MTZ frente a *Giardia intestinalis* (**Tabla 1**). Al mismo tiempo, se evaluó el porcentaje de polimerización de cada compuesto a diferentes concentraciones de tubulina, que al compararse con el ABZ, sugiere que el mecanismo de acción, es diferente al mostrado por los derivados del Bencimidazol con un grupo carbamato de metilo en la posición 2.⁴⁰

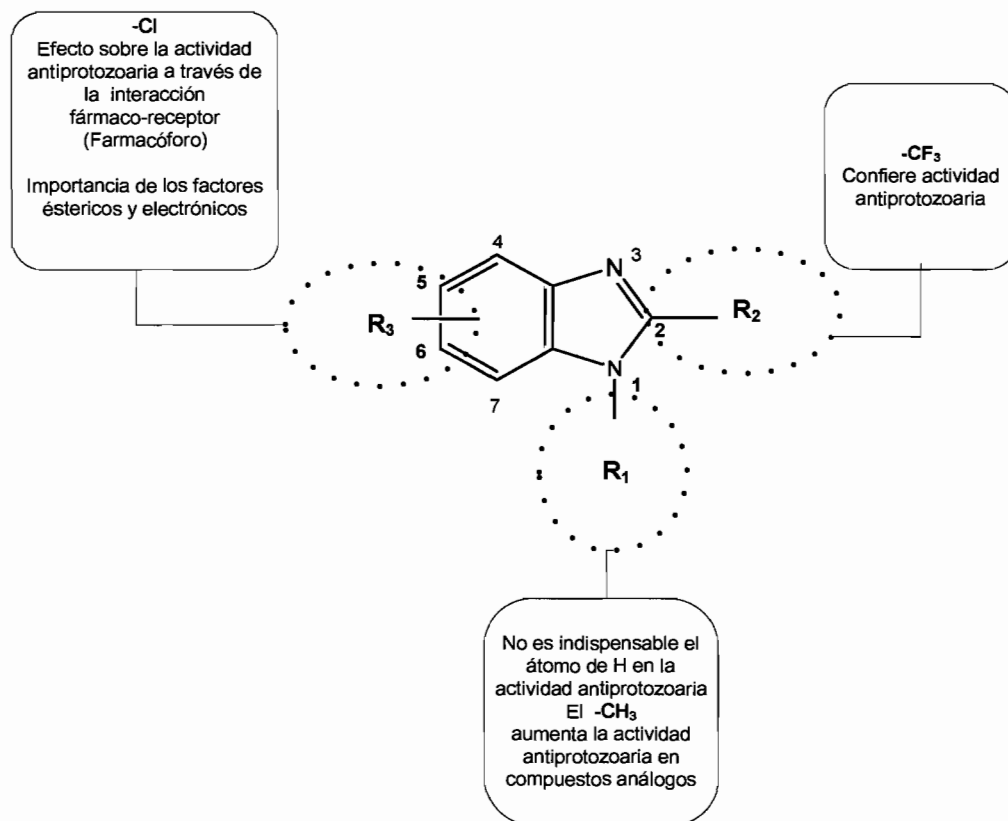
Tabla 1. Valores de CI_{50} (μM) reportados para la actividad giardicida *in vitro* de los derivados 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.⁴⁰



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	<i>G. intestinalis</i> CI ₅₀ (μM)
Metronidazol				1.220
Albendazol				0.037
1	H	H	H	0.107
2	H	Cl	H	1.282
3	H	Cl	Cl	0.078
4	CH ₃	H	H	0.064
5	CH ₃	Cl	H	0.042
6	CH ₃	H	Cl	0.127
7	CH ₃	Cl	Cl	0.260

CI₅₀: Concentración de fármaco que inhibe el 50% de crecimiento.

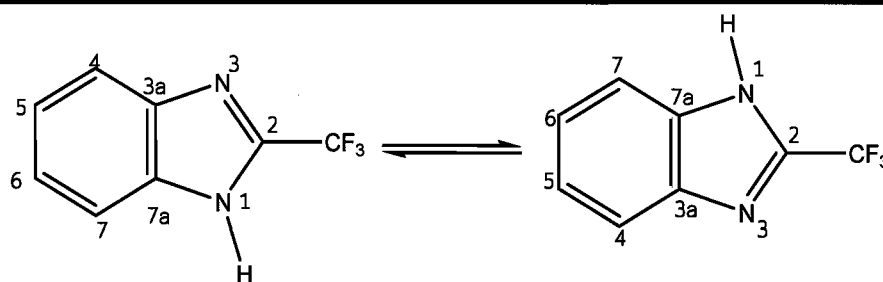
Los resultados obtenidos muestran que la posición 5(6) análogamente, a lo que sucede con el ABZ y MBZ como antihelmínticos, determina la actividad giardicida (**Tabla 1**). Además, la potencia giardicida aumenta, si esta posición, tiene un átomo de Cloro y un grupo Metilo en la posición 1, obteniendo un valor de CI₅₀ menor al fármaco de elección y semejante al ABZ. También se demostró que la presencia de un átomo de Hidrógeno en la posición 1, no es esencial para el desarrollo de la actividad antiprotozoaria (**Esquema 6**).^{37,38,40}



Esquema 6. Importancia de los sustituyentes y las posiciones de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol como antiprotozoarios.

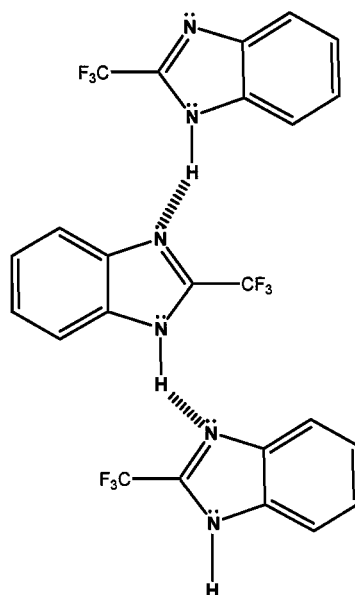
1.2.2. Generalidades de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

Cuando en el anillo del Bencimidazol se sustituye la posición 2 por un grupo trifluorometilo se denominan derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, cuando en la posición 1 esta un átomo de Hidrógeno, se origina un efecto tautomérico, por el intercambio intramolecular del átomo de Hidrógeno entre los nitrógenos de las posiciones 1 y 3, lo que sucede tan rápido que no es posible el aislamiento de las estructuras individuales, por lo tanto las posiciones 5 y 6 son equivalentes (**Esquema 7**).³³



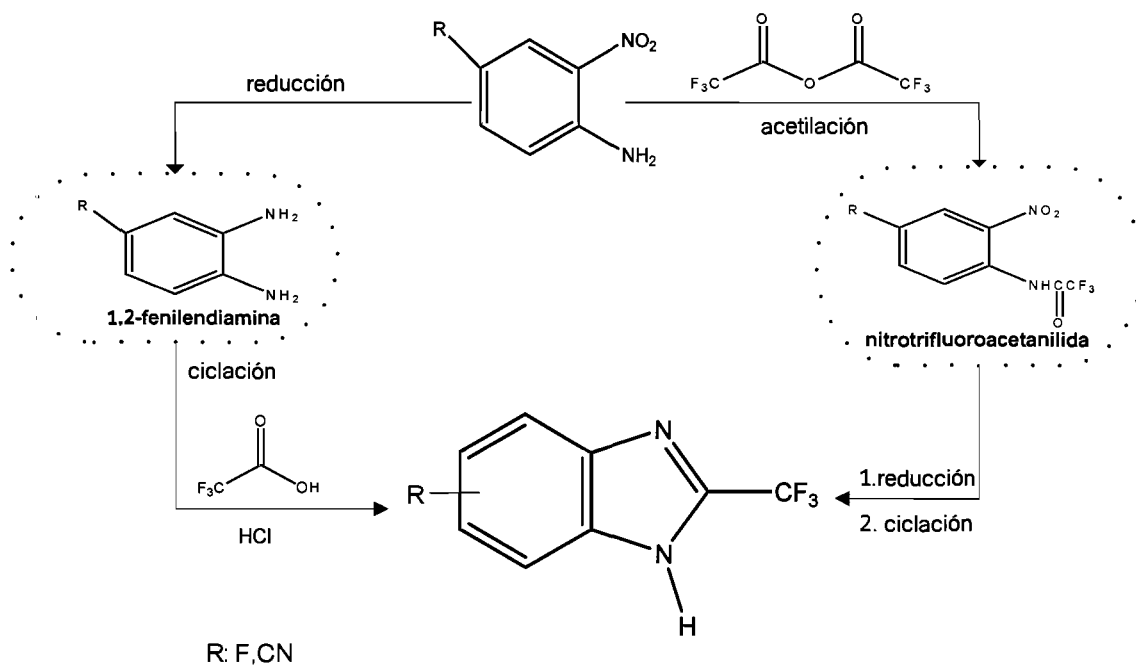
Esquema 7. Tautomería y estructura de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.

Los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol se asocian por puentes de hidrógeno a través de los enlaces –N-H-N- (**Esquema 8**). La manifestación de esta propiedad influye en la solubilidad, disminuyendo la absorción y eficacia terapéutica.⁴¹



Esquema 8. Asociación intermolecular de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.⁴¹

La síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol en este proyecto, se basa en la reacción de A. Phillips.²⁶ Consiste en la formación del anillo Imidazol mediante el tratamiento de la 1,2-fenilendiamina en presencia del Ácido trifluoroacético y bajo la acción catalítica del Ácido clorhídrico. También es posible sintetizar estos compuestos, mediante la trifluoroacetilación del grupo amino de la *o*-Nitroanilina sustituida, en presencia de Anhídrido trifluoroacético para obtener la Nitrotrifluoroacetanilida. Posteriormente esta se reduce para formar el correspondiente derivado del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**Esquema 9**).^{33-35,38}



Esquema 9. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol.

1.3. Isosterismo y Bioisosterismo

A principios del siglo XX, Allen Langmuir dio, el nombre de isóster (ἰσός: parecido, στρεπός: forma) a los compuestos que tienen características físicas semejantes como: el tamaño, la forma, peso molecular, volumen, punto de ebullición y fusión. Este comportamiento se atribuyó, a la similitud en el número y arreglo de electrones en su capa de valencia.⁴²⁻⁴⁴ La semejanza entre las propiedades fisicoquímicas no eran tan evidentes, como entre su actividad biológica, es por esto que Friedman, Thornber y finalmente Burger contribuyeron con el concepto de bioisosterismo. “Los bioisósteros pueden ser moléculas o átomos que producen semejante actividad biológica ya sea como agonista o antagonista, pero que pueden o no compartir semejanzas en sus propiedades fisicoquímicas”.^{42,43}

Los bioisósteros se clasifican en clásicos y no clásicos. Los clásicos comparten propiedades fisicoquímicas y efecto biológico. Los no clásicos, producen un efecto biológico semejante, pero son diferentes sus propiedades fisicoquímicas. En ambos casos el efecto biológico, puede ser agonista o antagonista (**Tabla 2**).^{42,43}

Tabla 2. Ejemplos de sustituyentes bioisostéricos clásicos y no clásicos.⁴⁵

Bioisósteros clásicos	-CH ₃ , -NH ₂ , -OH, -F, -Cl
Bioisósteros no clásicos	Halógenos por: -CF ₃ , -C≡N
	Hidrógeno por: -F

Antecedentes

La sustitución bioisostérica, permite la modificación de una estructura para explorar y diseñar sistemáticamente, nuevas moléculas de interés farmacológico, logrando: incrementar la potencia, biodisponibilidad y disminuyendo la toxicidad.

1.4. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol en linfocitos humanos

El sistema inmunológico contiene una serie de células que contribuyen con la homeostasis, a través de mecanismos que permiten a un individuo, distinguir lo propio de lo ajeno y eliminar cualquier sustancia extraña a sí mismo. Durante la colonización de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se han observado alteraciones en el tejido linfoide que existe en la mucosa intestinal y tracto genitourinario.⁴⁶⁻⁴⁸

El cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, es un sistema apropiado para establecer a corto plazo la actividad citotóxica intrínseca de un compuesto ya que permite utilizar un amplio intervalo de concentraciones que no podrían ser evaluadas *in vivo*.⁴⁹

La citotoxicidad es la capacidad de un compuesto para inducir la muerte celular. Se puede determinar, durante la proliferación de los leucocitos en presencia de un compuesto, directamente mediante la exclusión de azul tripano (viabilidad celular) e indirectamente por la inhibición del crecimiento celular (síntesis de ADN) al incorporar Metiltimidina tritiada. Con respecto a la citotoxicidad del ABZ, se ha evaluado el efecto *in vitro* sobre la proliferación celular de los linfocitos humanos frente al ABZ y a su metabolito, el sulfóxido de ABZ, responsable de la actividad terapéutica, encontrando que ambos detienen la proliferación celular, lo que supone que su administración puede estar relacionada con un daño genotóxico en humanos.^{47,49}

Planteamiento del Problema/ Hipótesis

2. Planteamiento del problema

En México la trichomonosis y giardiosis representan un problema de salud pública. La terapia actual descrita en el cuadro básico de medicamentos considera al Metronidazol como fármaco de elección y el Albendazol o Mebendazol como alternativas. Sin embargo, la pérdida de susceptibilidad al fármaco, los efectos adversos y el inconveniente de su administración en mujeres lactantes y en gestación, han originado la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas.^{16,27,36,50} En este sentido, el derivado del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol monoclorado en la posición 5(6), mostró actividad significativa *in vitro* frente a los trofozoitos de *Giardia intestinalis*.⁴¹ No obstante, se sabe que la biotransformación metabólica de los compuestos clorados, generan productos potencialmente tóxicos para el huésped.^{42,44} Por lo tanto, ¿Existirá una alternativa para modificar la estructura del derivado del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol para poder obtener compuestos análogos, que presenten actividad antiprotozoaria como los fármacos de elección, sin el riesgo de ser tóxicos para el huésped?

3. Hipótesis

Los sustituyentes bioisostéricos presentes en compuestos derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, mostrarán actividad tricomonocida y giardicida, además serán menos tóxicos en comparación con el Albendazol y Metronidazol.

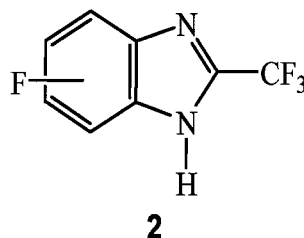
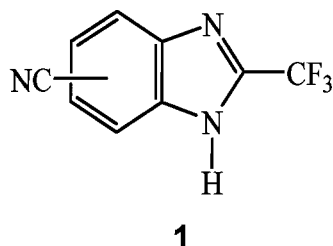
4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Sintetizar dos derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol para evaluar su actividad antiprotozoaria *in vitro* frente a los trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* y determinar el efecto citotóxico *in vitro* en linfocitos humanos.

4.2. Objetivos Específicos

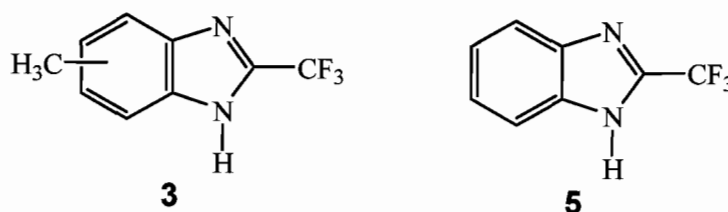
- Diseñar y sintetizar los compuestos: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**1**) y 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**2**).



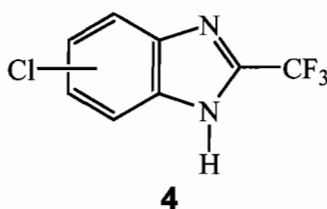
- Caracterizar los compuestos **1** y **2** mediante la determinación de las propiedades físicas (punto de fusión y R_f), técnica espectrométrica (EM) y técnicas espectroscópicas (RMN e IR).

Objetivos

- Determinar y comparar la sensibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* frente a los compuestos Albendazol, Metronidazol, **1**, **2**, 5(6)-Metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**3**) y 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**5**). Evaluando la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la población (CI_{50}).



- Determinar el efecto citotóxico sobre la proliferación *in vitro* de los linfocitos humanos frente a los compuestos: Albendazol, Metronidazol, **1**, **2**, **3**, 5(6)-Cloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**4**) y **5**. Evaluando la concentración de fármaco que inhibe el 50% del crecimiento de la población. (CI_{50}).



- Evaluar la liposolubilidad de los compuestos **1-5** mediante el cálculo del coeficiente de partición Log P, empleando un modelo computacional.
- Relacionar la estructura con la actividad antiprotozoaria y citotóxica de los compuestos **1-5**, Metronidazol y Albendazol.

5. Metodología

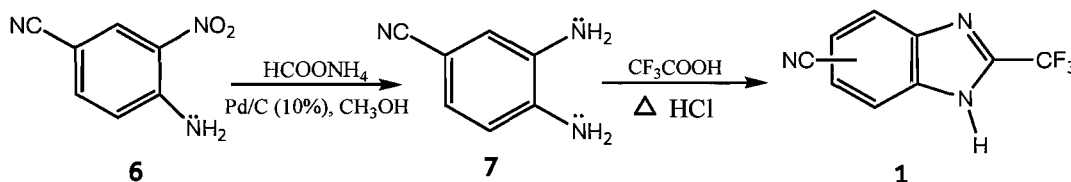
Enseguida se describirán los procedimientos utilizados para alcanzar los objetivos planteados.

5.1. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

Para obtener los compuestos **1** y **2** se siguió el método reportado para la síntesis de los compuestos 2-alkilbencimidazoles que emplea la reacción de Phillips.^{36,40,41} En el Anexo 1 se encuentran descritos los procedimientos empleados en la obtención de cada compuesto y en el Anexo 4 se muestran los espectros correspondientes utilizados para su elucidación.

5.1.1. Síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**1**)

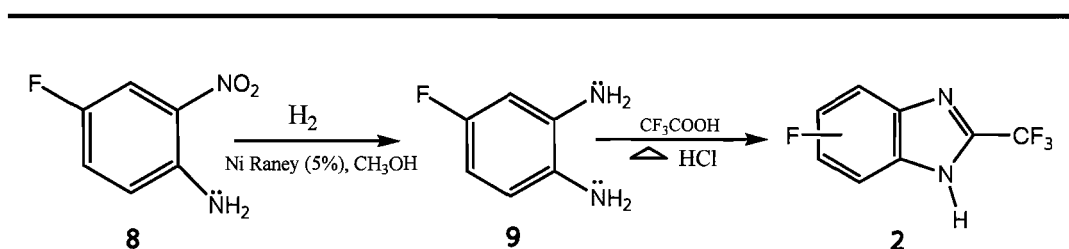
Para obtener el compuesto **1** se redujo el 4-Amino-3-nitrobenzonitrilo (**6**), utilizando el Formiato de amonio y como catalizador Pd/C al 10%. La 3-Ciano-1,2-fenilendiamina (**7**) formada, se calentó a reflujo para generar el intermediario monoacilado en presencia del Ácido Trifluoroacético. El intermediario monoacilado se ciclocondensó por la acción catalítica del Ácido Clorhídrico y calor generado por una resistencia eléctrica (**Esquema 10**).



Esquema 10. Síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**1**).

5.1.2. Síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (2)

Para obtener el compuesto **2** se redujo al 4-Amino-3-nitrofluorobenceno (**8**) en presencia de H₂ y como catalizador Ni/Raney al 5% para formar 3-Fluor-1,2-fenilendiamina (**9**). Este último se calentó a reflujo en presencia del Ácido Trifluoroacético, para generar el intermediario monoacilado, el cual se ciclocondensó por la acción catalítica del Ácido Clorhídrico y calor generado por una resistencia eléctrica (**Esquema 11**).



Esquema 11. Síntesis del 5(6)- Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**2**).

Los compuestos **3**, **4** y **5** han sido previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación.⁴¹

5.2. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol, ABZ y MTZ frente a *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

La actividad antiprotozoaria de los compuestos 1-3, 5 se evaluó sobre aislados axénicos de *Giardia intestinalis* IMSS:0989-1 y *Trichomonas vaginalis* GT3 empleando como controles positivos al ABZ y MTZ. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración menor de 6.4053 μM . Con la finalidad de comparar la potencia de cada compuesto, se cultivaron inóculos de 5×10^4 trofozoitos/mL de *G. intestinalis* y 6×10^3 trofozoitos/mL de *T. vaginalis* respectivamente, a diferentes concentraciones de cada compuesto. Esto permitió realizar las curvas concentración-respuesta apropiadas, para determinar la concentración que inhibe el crecimiento del 50% de la población (CI_{50}).

La evaluación de la viabilidad para ambos protozoarios se realizó mediante el método de subcultivo en medio líquido descrito por Cedillo y cols.⁵¹ Adicionalmente se correlacionó la viabilidad con la morfología.⁵²

Para realizar las resiembras de mantenimiento y para cada ensayo se trabajó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. Los recipientes de cultivo se enfriaron por 30 min en un baño de hielo-agua con el propósito de separar los trofozoitos de las paredes del tubo.

Mediante el análisis Probit se calculó la concentración que inhibe el crecimiento de la población al 50%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces con resultados similares. En el Anexo 2 se encuentran descritos los procedimientos en detalle empleados para cada protozoario.

5.3. Determinación de la actividad citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-benzimidazol, ABZ y MTZ sobre la proliferación celular de linfocitos humanos mediante la incorporación de Metilimidina tritiada

La técnica empleada en esta determinación fue la utilizada en el laboratorio 4 de histocompatibilidad de la Unidad de Investigación Médica del Hospital Juárez de México. Se basa en el método bioquímico de incorporación de Metilimidina tritiada, utilizado como un parámetro cuantitativo. Para determinar de manera indirecta la proliferación de la población de linfocitos expuestos a concentraciones crecientes de los compuestos **1-5**, disueltos en DMSO a una concentración menor de 6.40 μM . Los linfocitos fueron aislados previamente de sangre periférica humana.

Mediante un contador de centelleo líquido se registró la radioactividad en desintegraciones por minuto (DPM) de cada ensayo. Se utilizó un inóculo de 5×10^5 linfocitos/mL y como control positivo el ABZ.⁵³ El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado, considerando como 100% de replicación, el número de células que se contó en el cultivo control para cada ensayo. Mediante el análisis Probit se calculó la concentración que inhibe el crecimiento del 50% y 90% de la población (CI_{50} y CI_{90}).

Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces con resultados similares. En el Anexo 3 se encuentran descritos los procedimientos en detalle empleados en esta determinación.

6. Resultados y Discusión

El siguiente apartado está dividido en tres partes. La primera hace referencia al diseño, la segunda a la obtención, purificación y caracterización de los compuestos **1** y **2**. En la tercera se presenta, la actividad antiprotozoaria de los compuestos frente a *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* y el efecto sobre la proliferación celular de linfocitos humanos de los compuestos derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.

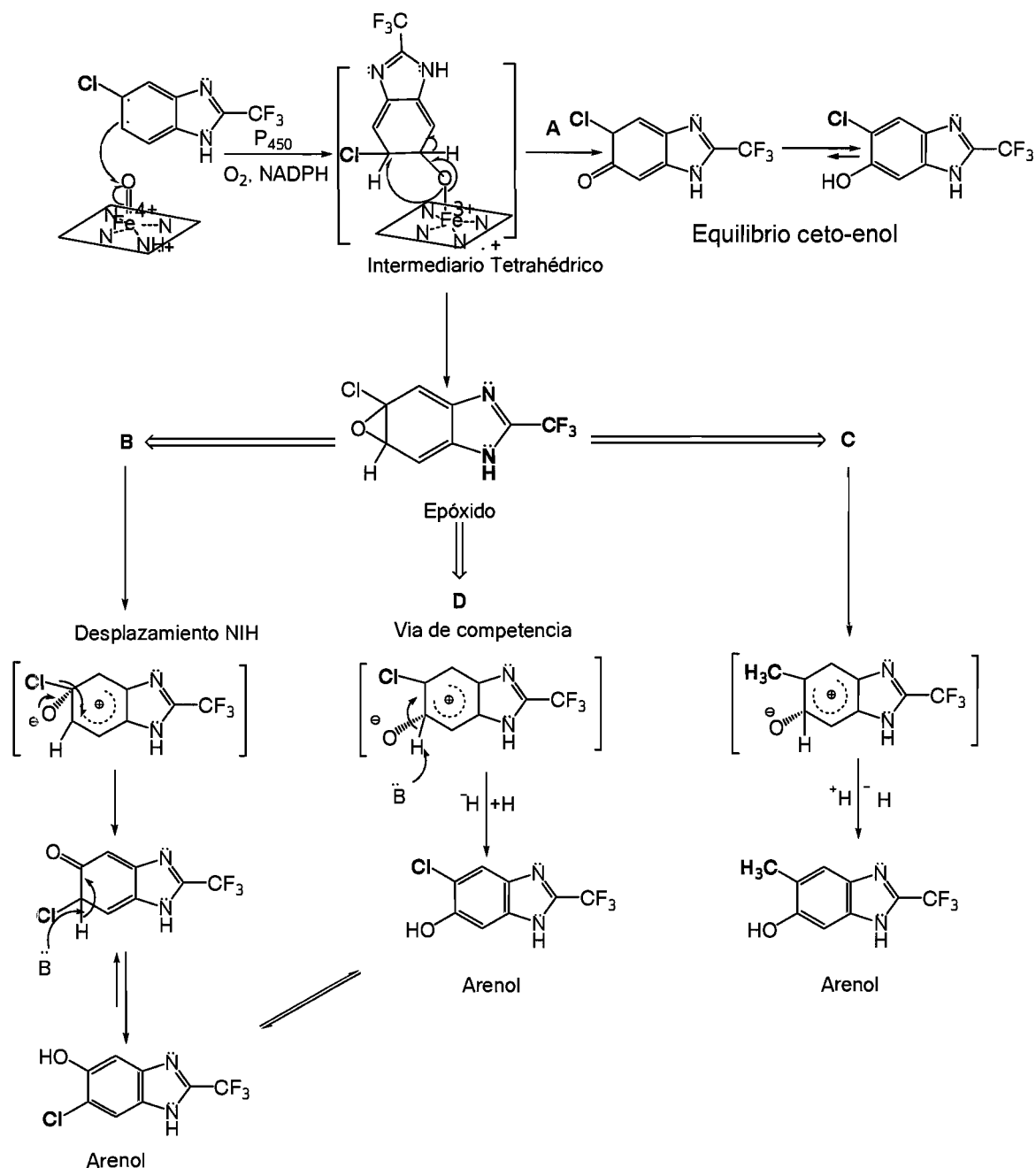
6.1. Diseño de los derivados 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

Para el diseño de los compuestos **1** y **2** se consideró como prototipo la estructura del compuesto **4** debido a que mostró actividad antiprotozoaria significativa *in vitro* frente a los trofozoitos de *Giardia intestinalis* con el valor de CI_{50} (1.282 μ M) semejante al Metronidazol (1.220 μ M).⁴⁰ Se considera que la posición 5(6), determinará la actividad antiprotozoaria *in vivo*, análogamente a lo que ocurre con los derivados del Bencimidazol con actividad antihelmíntica. Además será una posición importante, durante la detoxificación del compuesto en el huésped, ya que puede inactivar su acción terapéutica o generar metabolitos potencialmente tóxicos.^{36,54} En este sentido, se propuso el mecanismo de biotransformación del compuesto **4**, para considerar los posibles metabolitos tóxicos resultantes (**Esquema 12**). Lo anterior dio origen, al remplazamiento bioisostérico del átomo de Cloro en la posición 5(6) del compuesto **4** por los bioisómeros -C≡N, -CH₃, -F e -H.⁴²⁻⁴⁵ Además esta sustitución, nos permite elucidar la relación estructura-actividad al asignar, la equivalencia entre los compuestos conforme a su actividad biológica.^{44,45}

Resultados y discusión

6.1.1. Propuesta del mecanismo de biotransformación de los compuestos 1-5

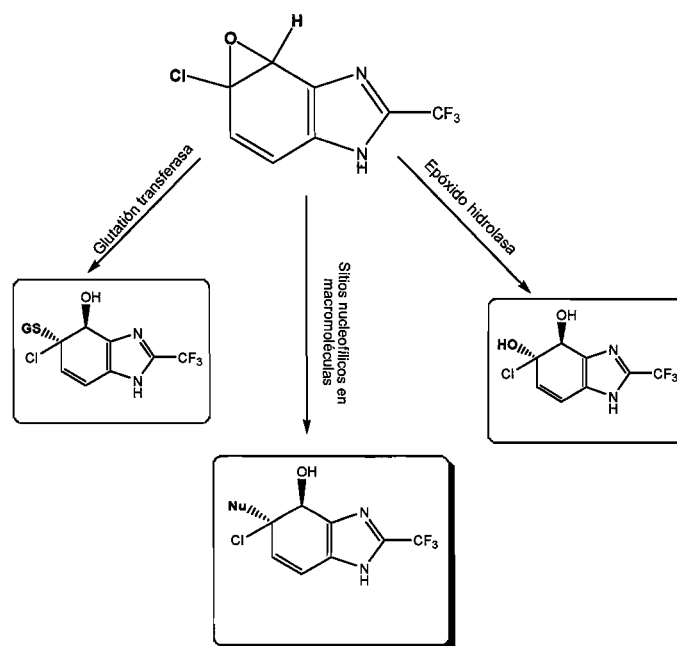
En el huésped la biotransformación de los compuestos **1-5** comenzará al incorporar un grupo hidroxilo en el anillo bencénico. Esta reacción, de hidroxilación aromática o epoxidación, será catalizada por el sistema enzimático citocromo P₄₅₀, el cual forma un intermediario tetraédrico, que se rearregla para formar un arenol, a partir de una cetona (vía A) o de un epóxido (vía B y C). La reacción tiene lugar mayoritariamente en la posición con menor impedimento estérico, respecto al sustituyente, presente en el anillo bencénico. Además el sustituyente, influye sobre la estabilidad del carbocatión, formado por la apertura del epóxido, lo que determina la vía a seguir B o C. Cuando el sustituyente es -Cl, -C≡N, -F o -H el mecanismo está descrito en la vía B, en donde ocurre la migración intramolecular entre el sustituyente del sitio de oxidación y el carbono adyacente, conocida como desplazamiento NIH, previa a la formación del arenol. No obstante puede suceder una vía de competencia (vía D) en la cual, se obtiene el arenol por pérdida directa del hidrógeno.^{44,45} Cuando el sustituyente estabiliza el carbocatión, como sucede con el -CH₃, el mecanismo para la formación del arenol está indicado en la vía C (**Esquema 12**).



Esquema 12. Mecanismo de hidroxilación aromática propuesto para los compuestos 1-5. El sistema enzimático P_{450} cataliza la formación del arenol a partir de una cetona vía A, o de un epóxido vía B y C. Existe además una vía de competencia D que origina un arenol, por la pérdida directa del átomo de Hidrógeno en presencia de una base.

Resultados y discusión

El epóxido (vías B-C) es desactivado mediante las enzimas Epóxido hidrolasa y Glutación transferasa. Sin embargo, este electrófilo puede evadir a la destrucción enzimática y reaccionar covalentemente con grupos nucleofílicos, presentes en proteínas, ADN o ARN, para desencadenar procesos de carcinogénesis, apoptosis, necrosis e hipersensibilidad.^{42,43,44} Es importante destacar que los derivados conjugados con Glutación, son más eficientes para los compuestos aromáticos fluorados que para los clorados.⁵⁵ Además durante el rearrreglo NIH se puede liberar el radical Cloro de la molécula, generando un electrófilo altamente reactivo, aunado a esto se ha documentado que, el carácter lipofílico de los compuestos clorados incide significativamente en su toxicidad (**Esquema 13**).^{56,57}



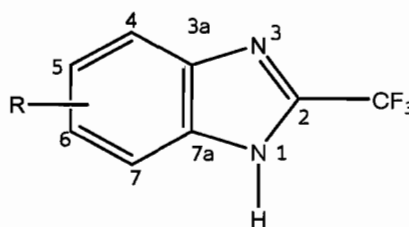
Esquema 13. Epóxido formado. El epóxido formado (vía B-D) es un electrófilo potencialmente tóxico, es desactivado a través de las enzimas Glutación transferasa y Epóxido hidrolasa. Sin embargo, también puede reaccionar con sitios nucleofílicos de macromoléculas presentes en el huésped.

Resultados y discusión

6.1.2. Aplicación del bioisosterismo en el diseño de los compuestos 1-3 y 5

El bioisosterismo representa una estrategia para la modificación racional de moléculas prototipo. En general, implica un cambio en la lipofilia, el efecto estérico y electrónico de la molécula inicial. Estos cambios afectan: el transporte del fármaco hasta el lugar de acción, la interacción fármaco-receptor y bloquea o favorece el metabolismo. Mediante el uso de algunos parámetros como: la refractividad molecular (MR), constante de Hansch(π), constante de Hammet (σ), y efecto inductivo (I) es posible, describir la influencia del sustituyente en la posición 5(6) de los derivados 1-5 en la molécula (**Tabla 3**)⁴⁴ (**Esquema 14**).

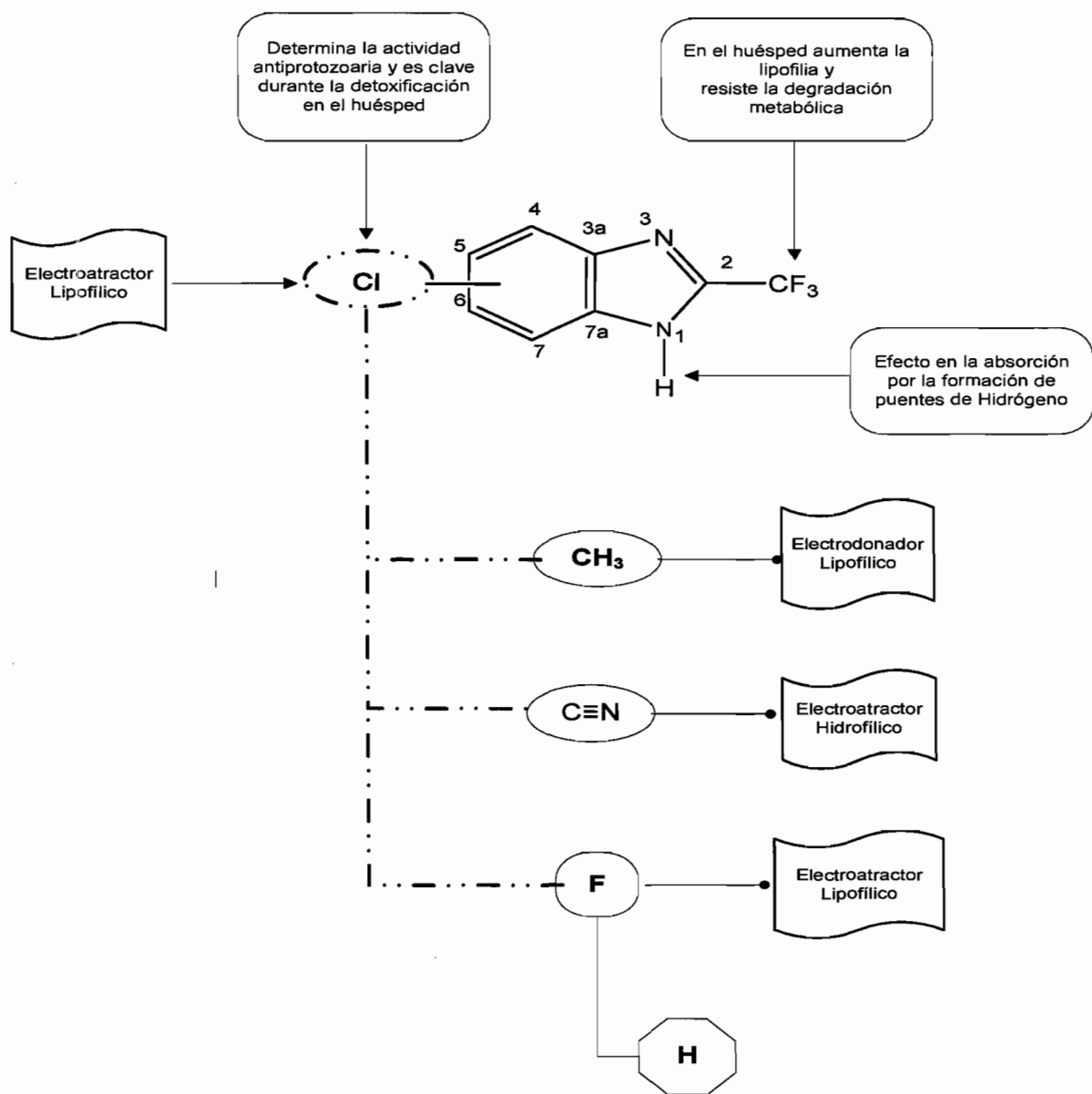
Tabla 3. Valores de los parámetros para los sustituyentes bioisostéricos.



Compuesto	Sustituyente (R)	Parámetros					
		Estéricos		Lipofilia	Electrónicos		
		Refractividad Molecular. (MR) ^a	Radio de Van der Waals. A ^{o a}	Constante de Hansch. π^a	Constante de Hammet. σ^a	Efecto inductivo. I ^a	Electronegatividad de Pauling. ψ^b
1	CN	6.33	----	-0.57	0.66	-	3.3
2	F	0.92	1.47	0.14	0.06	-	3.98
3	CH ₃	5.65	1.8	0.56	-0.17	+	2.3
4	Cl	6.03	1.73	0.71	0.23	-	3.0
5	H	1.03	1.20	0	0		2.2

^a Wermuth, C. The practice of Medicinal Chemistry. Academia Press. Segunda Edición. E.U.A. 2003, 521-526.

^b Huheey, E.J.; Química Inorgánica principios y reactividad. Harla. Segunda Edición México. 1981, 176-185.



Esquema 14. Influencia sobre la actividad biológica de los sustituyentes presentes en los derivados 1-5.

Resultados y discusión

A continuación se mencionan algunas de las características del sustituyente bioisostérico:

- ✦ El grupo $-\text{CH}_3$ se utiliza con frecuencia para reemplazar $-\text{Cl}$ porque contribuye en menor proporción a la lipofilia ($-\text{CH}_3 \pi$: 0.56 vs $-\text{Cl} \pi$: 0.71), por lo que no favorece la acumulación en tejido adiposo. Se asemeja en tamaño al $-\text{Cl}$, por el valor del radio de Van der Waals ($-\text{CH}_3$: 1.8 \AA vs $-\text{Cl}$: 1.73 \AA). Por el valor de MR ($-\text{CH}_3$: 5.65 vs $-\text{Cl}$: 6.03) se espera, que la molécula no cambie su geometría inicial. Los parámetros electrónicos como la electronegatividad y π indican que el CH_3 es menos electronegativo que el Cl ($-\text{Cl} \Psi_P$: 3.0 vs $-\text{CH}_3 \Psi_P$: 2.3) y tiene un efecto inductivo negativo ($-\text{Cl} \sigma$: 0.23 vs $-\text{CH}_3 \sigma$: -0.17). Esto puede explicar, que durante su biotransformación establezca al carbocatión formado en la vía C (**Esquema 12**), mediante el incremento de la densidad electrónica facilitando la formación del arenol.^{43,44}
- ✦ El radical $-\text{C}\equiv\text{N}$ es un pseudohalógeno del $-\text{Cl}$. En los compuestos en donde está presente sus propiedades biológicas son semejantes.⁴⁰⁻⁴³ Contribuye en menor proporción al carácter lipofílico que $-\text{Cl}$ ($-\text{C}\equiv\text{N} \pi$: -0.57 vs $-\text{Cl} \pi$: 0.71), por lo tanto disminuye su acumulación en tejido adiposo. Sin embargo se ha empleado como sustituyente por su carácter electroattractor ($-\text{C}\equiv\text{N} \Psi_P$: 3.3 vs $-\text{Cl} \Psi_P$: 3.0). Existe diferencia en el efecto electrónico ($-\text{Cl} \sigma$: 0.23 vs $-\text{C}\equiv\text{N} \sigma$: 0.66) debido al incremento en la densidad electrónica por influencia del par de electrones no enlazantes presentes en el Nitrógeno.⁵¹
- ✦ El átomo de Cloro al ser liposoluble en comparación con el H ($-\text{Cl} \pi$: 0.71 vs $-\text{H} \pi$: 0) se ha utilizado junto con el F ($-\text{F} \pi$: 0.14 vs $-\text{H} \pi$: 0) para reemplazar al $-\text{H}$, logrando incrementar la actividad biológica del compuesto, ya que bloquea la posición que es susceptible de ser fácilmente metabolizada en la molécula. El efecto de ambos radicales contribuyen al cambio estérico y electrónico en la molécula con el valor de MR ($-\text{F}$: 0.92, $-\text{Cl}$: 6.03 vs $-\text{H}$ 1.03) y el valor de electronegatividad ($-\text{F} \Psi_P$: 3.98, $-\text{Cl} \Psi_P$: 3.0 vs $-\text{H} \Psi_P$: 2.2).⁴²

Resultados y discusión

✦ La sustitución del átomo de Hidrógeno por -F se utiliza, considerando la similitud en su volumen y el valor de MR (-F: 0.92 vs -H: 1.03). Algunos estudios demuestran, que esta semejanza permite que el -F imite el efecto estérico del -H en el sitio de unión con el receptor. La presencia del -F también influye en la lipofilia de la molécula (-F π : 0.14 vs -H π : 0). Sin embargo, el remplazamiento de un solo -H aromático por un Flúor, incrementa levemente la lipofilia de la molécula. La reactividad química y la estabilidad de los grupos funcionales vecinos al -F en la molécula se atribuye a su electronegatividad (-F, Ψ_P :3.98 vs -H Ψ_P : 2.2), a la fuerza del enlace (-C-F 116 kcal/mol vs -C-H 99 kcal/mol) y al efecto inductivo. Estas características reducen el potencial de oxidación y con esto el posible ataque del sistema enzimático citocromo P₄₅₀.^{56,58}

6.1.3. Aplicación de la Regla de Lipinski en el diseño de los compuestos 1-5

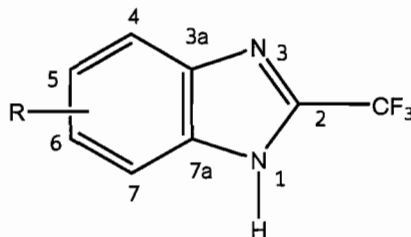
Se considera que la formación de puentes de hidrógeno en los derivados del Bencimidazol **1-5** es una propiedad que limita su solubilidad, necesaria para su absorción, eficacia y potencia. Lipinski ha contribuido al desarrollo y descubrimiento de fármacos que contengan características aceptables para su absorción oral; a través de "La regla de los 5". Esta regla indica que cuando un compuesto viole más de dos de los siguientes parámetros presentará problemas de biodisponibilidad.⁵⁹

1. Peso molecular menor de **500**.
2. Número de donadores de enlace de Hidrógeno (puentes de hidrógeno) igual o menor a **5** (suma de grupos OH y NH en la molécula).
3. Número de aceptores de enlace de Hidrógeno (puentes de hidrógeno) igual o menor a **10** (suma de grupos N y O en la molécula.).
4. Log P calculado (C log P) menor a **5**.

Resultados y discusión

La aplicación de esta regla a los compuestos **1-5** se presenta en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Aplicación de la regla de Lipinski a los compuestos **1-5**.



Compuesto	R	Parámetros				Alertas
		C log P < 5	Peso Molecular g/mol < 500	Número de donadores de enlace de H < 5	Número de aceptores de enlace de H < 10	
1	CN	2	211	1	3	0
2	F	3	204	1	2	0
3	CH ₃	3	200	1	2	0
4	Cl	3	221	1	2	0
5	H	2	186	1	2	0

Datos obtenidos a través de la página <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

Resultados y discusión

6.2. Síntesis de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

6.2.1. Síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (1)

Para obtener el compuesto **1** se plantearon dos rutas de síntesis. La primera propuso la reducción de la *o*-Nitroanilina trifluoroacetilada **10** con dos agentes reductores: Ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) y Formiato de amonio (HCO_2NH_4). Posteriormente, la diamina obtenida se ciclaría inmediatamente para obtener el Bencimidazol trifluorometilado (**Esquema 15**). En la segunda ruta de síntesis se empleó la modificación propuesta por Phillips, que consiste en añadir HCl diluido a la reacción de la *o*-fenilendiamina **7** con el Ácido trifluoroacético (**Esquema 17**).

6.2.1.1. Obtención del compuesto **1** utilizando como agente reductor la Ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

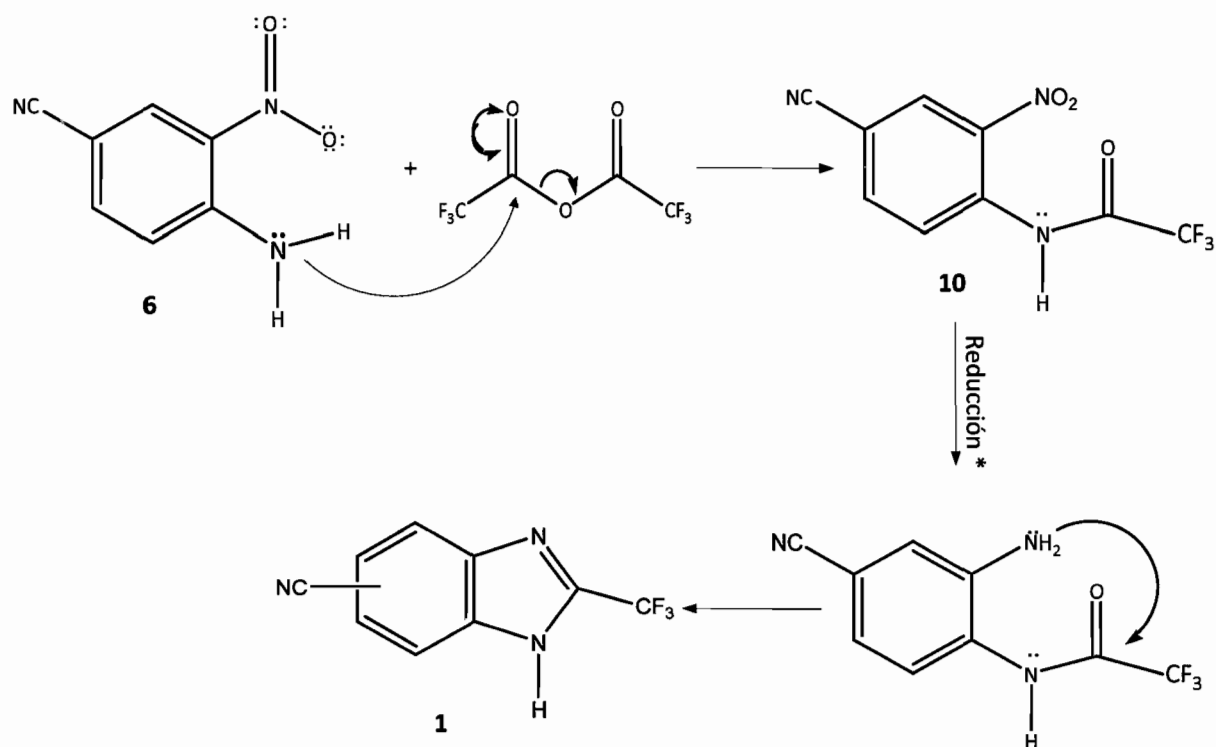
Para obtener la 4-Ciano-2-nitrotrifluoroacetamida **10**, el compuesto **6** se trató con Anhídrido trifluoroacético en Acetato de etilo, aplicando calentamiento durante 1h. El producto se obtuvo con un rendimiento de 76.65%. Se caracterizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos descritos a continuación.

El compuesto **10** es un sólido fino amarillo claro, con punto de fusión 118-120.5°C, en cromatografía de capa fina (CCF) presentó un R_f 0.38 con el sistema Hexano/Cloroformo/Acetato de etilo (50:35:15). El espectro de infrarrojo en KBr (**Espectro 9**) mostró tres señales 926.99, 901.93 y 851.54 cm^{-1} que identifican al anillo del Benceno trisustituido en las posiciones 1, 3 y 5. Una señal intensa en 3316.52 cm^{-1} que corresponde a la amida secundaria que forma el enlace trifluoroacetamida ($-\text{NHCOCF}_3$). A 2238.52 cm^{-1} una señal débil que identifica al grupo nitrilo ($-\text{C}\equiv\text{N}$). A 1527.07 y 1355.51 cm^{-1} , dos señales que corresponden al grupo nitro (NO_2). Una señal intensa 1746.89 cm^{-1} que corresponde al carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y una señal intensa a 1313.52 cm^{-1} que corresponde al CF_3 . El **Espectro 10** muestra la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. El cromatograma mostró una sola banda, lo que indicó la pureza del compuesto

Resultados y discusión

sintetizado. En el espectro de masas el ión molecular [M^+ , 66%] con una señal en m/z 259 correspondió al peso molecular. Es común la pérdida de los fragmentos $[F]^+$ y $[HF]^+$ que indican las señales en m/z 127 [$M-19$, 18%] y m/z en 69 [$M-20$, 31%] para evidenciar la presencia del Flúor en la molécula.

La reducción del grupo nitro presente en el compuesto **10**, conduciría a la obtención del anillo del imidazol mediante el ataque nucleofílico del grupo amino formado hacia el carbonilo de la Trifluoroacetamida (**Esquema 15**).

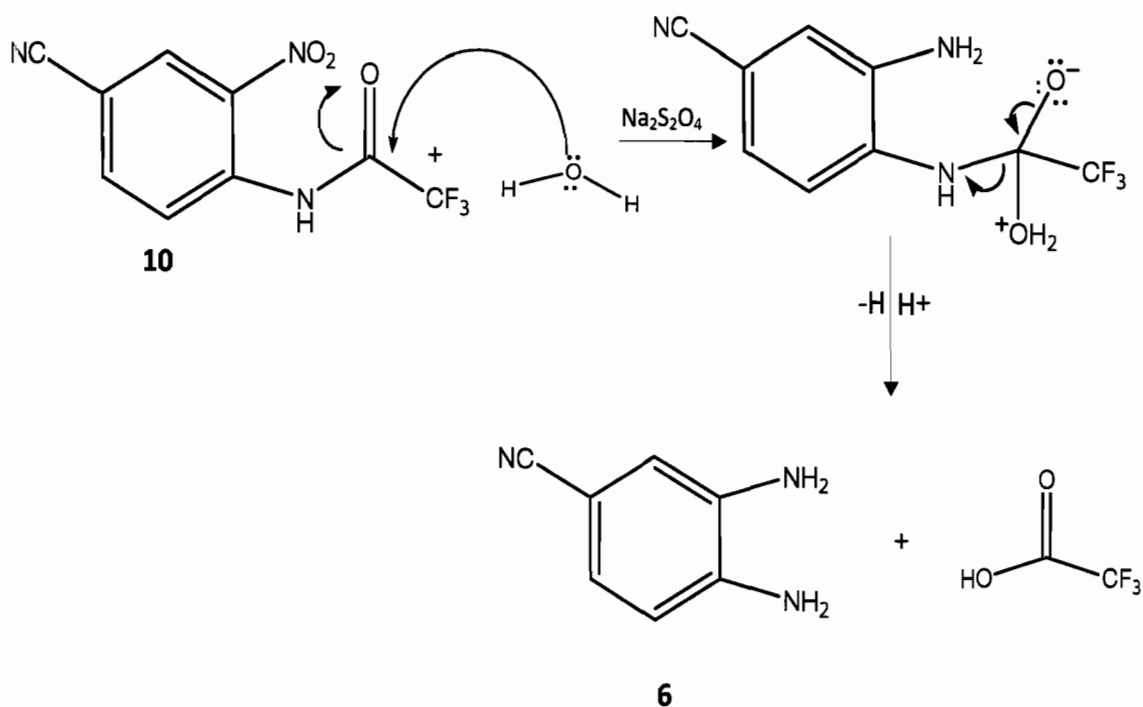


Esquema 15. Obtención del compuesto **1** a partir del compuesto 4-Ciano-2-nitrotrifluoroacetamida **10**.

*($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) o (HCO_2NH_4)

Resultados y discusión

Para reducir el grupo nitro del compuesto **10** se optó por establecer un método suave, sencillo y económico. Con este propósito se utilizó como agente reductor la Ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), debido a que reduce en forma selectiva al grupo nitro, es económica, no tóxica, estable y ofrece la ventaja de emplear condiciones suaves de reacción, al no requerir temperaturas y presiones elevadas, necesarias en métodos de reducción convencionales.⁶⁰ Después de 6 h se obtuvo un sólido café rojizo que mostró diferentes manchas en CCF, una de ellas correspondió a la 3-Ciano-1,2-fenilendiamina. De esta manera se comprobó que el radical trifluoroacetilo de la molécula se había hidrolizado por efecto del medio de reacción (**Esquema 16**).^{60,61} Por lo tanto no fue posible la formación del compuesto **1** utilizando este agente reductor.



Esquema 16. Hidrólisis de la trifluoroacetamida **10**.

Resultados y discusión

6.2.1.2. Obtención del compuesto 1 utilizando como agente reductor el Formiato de amonio (HCO_2NH_4)

Como la reducción del compuesto 1 con Ditionita de sodio no resultó, se planteó la segunda opción que involucraba un nuevo agente reductor que ofreciera las mismas ventajas que el anterior, fuera soluble en solventes orgánicos como el Metanol, disminuyera el tiempo de reacción e incrementará el rendimiento. Con este fin se utilizó el Formiato de amonio (HCO_2NH_4), un agente reductor, selectivo, rápido y suave que se ha empleado exitosamente en la reducción de compuestos aromáticos nitrados con buenos resultados. La reacción es ligeramente exotérmica y efervescente, sucede a temperatura ambiente en un tiempo de 3 a 40 minutos y además se puede utilizar en conjunto con catalizadores como Paladio y Nickel.^{62,63}

Al termino de 2 horas con 30 minutos, se obtuvo un sólido café que se extrajo con Acetato de etilo. Se realizó una CCF la cual presentó una sola mancha que correspondió a la 3-Ciano-1,2-fenilendiamina. En este caso el tiempo de reacción disminuyó significativamente pero el radical trifluoroacetilo tampoco se conservó en la molécula. Por lo tanto no fue posible la formación del Bencimidazol 1 utilizando este agente reductor.

6.2.1.3. Obtención del compuesto 1 siguiendo la reacción de Phillips

Finalmente se obtuvo el compuesto 1, a través de la modificación propuesta por Phillips al adicionar un ácido mineral diluido a la reacción de las *o*-fenilendiaminas con ácidos orgánicos, para obtener bencimidazoles con un mejor rendimiento.²⁶ El primer paso en esta reacción fue reducir el compuesto comercial 3-Amino-2-nitrobenzonitrilo 6 con Formiato de amonio (20.0160 mmol, 1.3 g) utilizando dos porcentajes de paladio sobre carbono 5% y 10% en metanol, con la intención de obtener la 3-Ciano-1,2-fenilendiamina 7 con un mejor rendimiento, como resultado de una reacción más limpia. Los resultados de la síntesis de la diamina se muestran en la **Tabla 5**.

Resultados y discusión

Tabla 5. Resultados obtenidos de la reacción de reducción del compuesto 3-Amino-2-nitrobenzonitrilo **6** para la obtención de la diamina **7**.

Catalizador Pd/C (%)	Compuesto 6 mmol	Formiato de Amonio mmol	Rendimiento % reducción*	Tiempo de reacción h
5	4.3513	20.0160	87	4
10	4.3513	20.0160	98.5	2.30

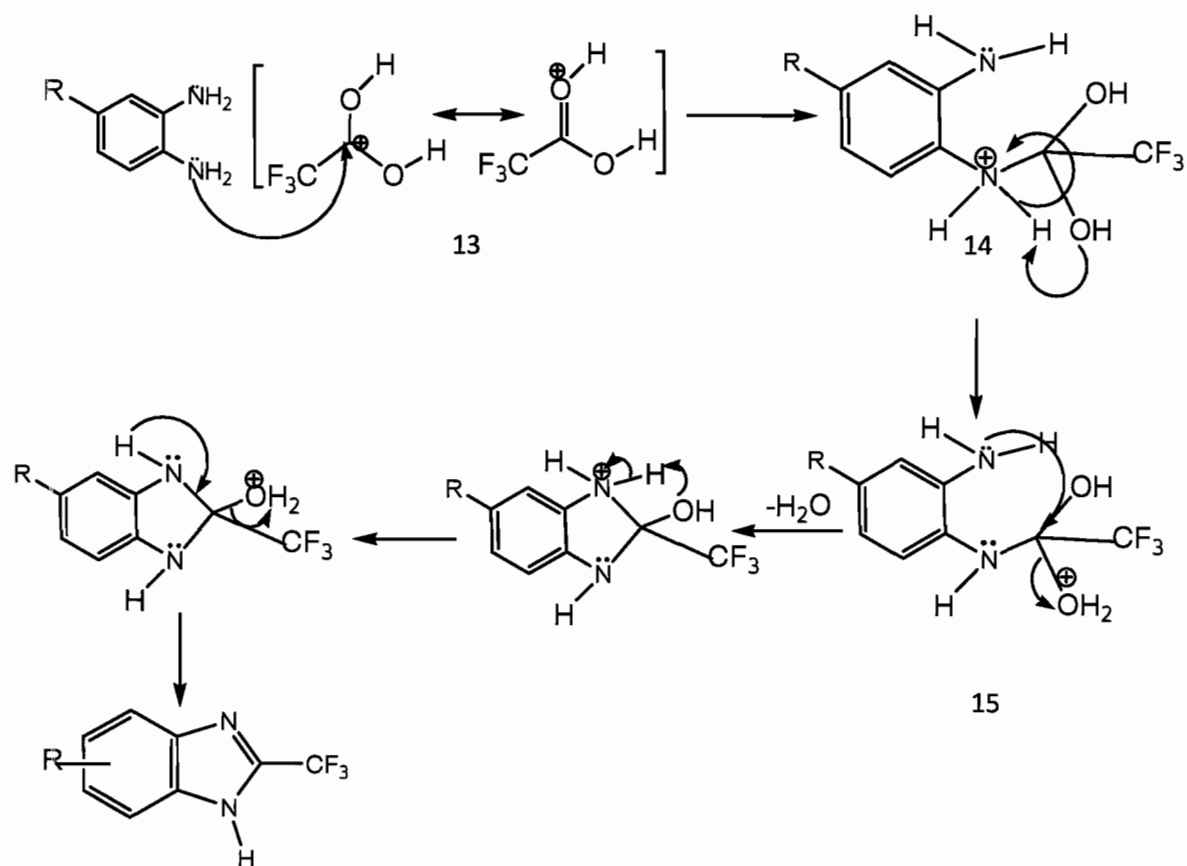
*El compuesto fácilmente se oxida en contacto con el aire por lo tanto solo se seco.

En la **Tabla 5** se puede observar que al utilizar Formiato de amonio con paladio sobre carbono al 10%, el rendimiento aumento un 11.5% y el tiempo de reacción disminuyó a la mitad.

El rendimiento obtenido se explica por la disminución en la cantidad de impurezas generadas durante la reacción de reducción, lo que facilitó la extracción de la diamina e impidió su oxidación al estar tiempo prolongado en contacto con el aire del medio ambiente.

Después de obtener la 3-Ciano-1,2-fenilendiamina se procedió a formar el Bencimidazol, utilizando Ácido trifluoroacético, como catalizador HCl y calentamiento.

El mecanismo propuesto para la obtención de los compuestos **1** y **2** que sigue la reacción de Phillips, se basa en la formación del intermediario monoacilo. Para obtenerlo fue necesario que se protonara el carbonilo del Ácido trifluoroacético en presencia del medio ácido, dando lugar al intermediario reactivo, un carbocatión que se estabilizó por resonancia **13**, el cual fue atacado por el par de electrones del Nitrógeno de la amina libre, formando el diacil derivado que al hidrolizarse formó el monoacilo derivado **14**.⁶⁴ Por último la formación del Bencimidazol 2-trifluorometilado se inició a través de la adición nucleofílica intramolecular de la Amina libre hacia el Carbono del trifluorometilo **15**, bajo la acción catalítica del Ácido clorhídrico y calor (**Esquema 17**).



Esquema 17. Mecanismo propuesto para la formación de los compuestos 1 y 2 mediante la reacción de Phillips.

Resultados y discusión

Para poder establecer la influencia de la concentración de HCl, la temperatura y el tiempo de calentamiento en la reacción de ciclocondensación, se plantearon cuatro experimentos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resultados de los experimentos de la reacción de ciclocondensación del compuesto 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**1**)

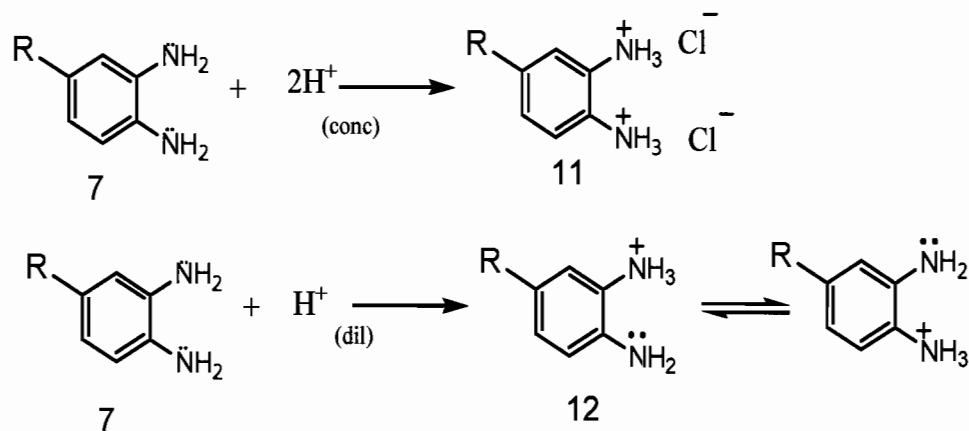
No. Experimento	Catalizador HCO ₂ NH ₄ , Pd/C ^a %	HCl mL(N)	Volt y	Rendimiento	Rendimiento	Tiempo de
			Tiempo de calentamiento ^b %/h	ciclocondensación %	Total Reducción - ciclocondensación %	obtención Compuesto 1 h
1	10	6.5 (3N)	60 / 3.45	68	67	4.30
2	5	2.5 (6N)	40 / 2.30	28	25	20
3	10	3 (11.3N)	60 / 2.30	17	16	12
4	10	7.5 (6N)	40 / 8.20	13	8	10

^a Porcentaje de catalizador en relación a la cantidad de materia prima.

^b Porcentaje de salida de voltaje.

La acción catalítica del Ácido clorhídrico se relacionó directamente con su concentración. La **Tabla 6** muestra que cuando se utiliza Ácido clorhídrico 3N (experimento 1) se encontró el mejor rendimiento, debido a que se estableció el equilibrio ácido-base con la diamina **7** lo que favoreció que existiera la base libre **12** para formar el enlace Carbono-Nitrógeno. No obstante, en el experimento 3 la diamina **7** se encontró principalmente como clorhidrato **11** (**Esquema 18**).

Cuando se utilizó HCl 6N se observa que al aumentar la proporción de agua, el rendimiento disminuyó, porque un exceso en el medio de reacción no favorece que el equilibrio de la reacción se desplace hacia la formación de productos (**Tabla 6**).



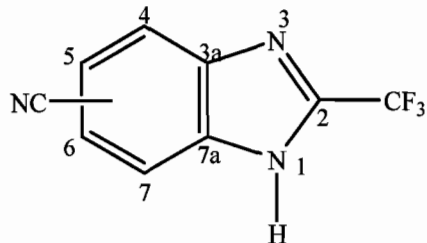
Esquema 18. Reacciones ácido-base que se llevan a cabo entre la diamina y el medio ácido.

Con respecto a la influencia de la temperatura y el calentamiento se observó en la **Tabla 6** que la cantidad de producto se incrementó al aumentar ambos, debido a que favorecieron la producción de choques intermoleculares por unidad de tiempo (experimento 1). Sin embargo, en los experimentos 2, 3 y 4 en los que se sometieron a periodos prolongados de calentamiento se favoreció la degradación del producto y se dificultó la purificación del compuesto formado, disminuyendo así el rendimiento.

Resultados y discusión

6.2.1.4. Caracterización del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)

Tabla 7. Resultados de la síntesis del 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1).

	Rendimiento: 67 %
	Características físicas: Sólido de color blanco. Punto de Fusión: 182.5 -182.9 °C ^a R _f *: 0.6

^a: Punto de fusión reportado 192° C ⁶⁵

* Fase móvil: Heptano, Cloroformo, Acetato de etilo (50:35:15).

El espectro de infrarrojo en KBr (**Espectro 1**) mostró dos bandas (1550.65 y 1422.44 cm^{-1}) características del anillo del bencimidazol. A 1625.15 y 1550.65 cm^{-1} dos bandas que indican que esta sustituido en la posición 2. Las bandas anchas y fuertes a 3075.88, 3037.41, 2994.78, 2915.38 cm^{-1} correspondieron al enlace N-H indicando la asociación intermolecular por los puentes de hidrógeno a través de los enlaces -N-H-N-. Una banda intensa a 2231.95 cm^{-1} que correspondió al enlace -C≡N. En 1317.93, 1143.82, 1177.81 cm^{-1} bandas que correspondieron al enlace CF_3 y 1396.74 cm^{-1} una banda que correspondió al enlace CF.

El espectro 2 mostró la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. El cromatograma mostró una sola banda ancha que indica la pureza del compuesto formado. En el espectro de masas el ion molecular y el pico base [M^+ , 100%] coinciden en la señal en m/z 211 que correspondió al peso molecular del compuesto. La pérdida del fragmento [HF]⁺ que indica la señal en m/z 191, [$\text{M}-20$, 69%] es característica de los compuestos fluorados. ⁶⁶

Resultados y discusión

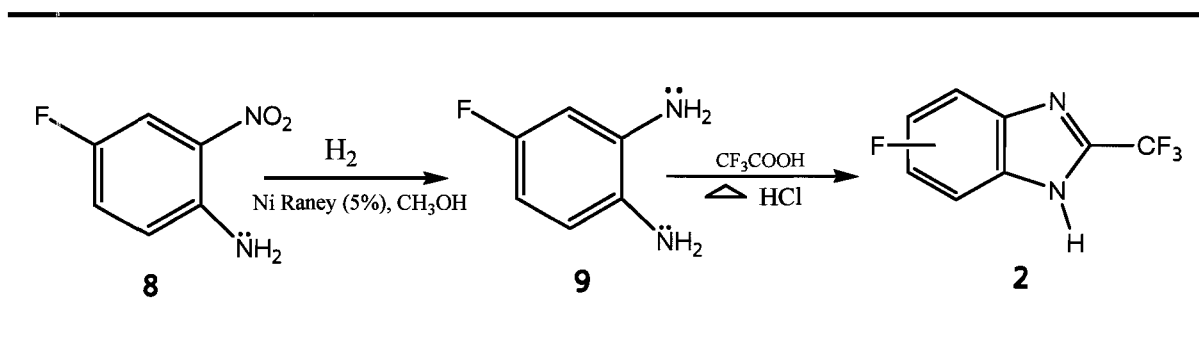
El espectro de RMN de ^1H (TMS) (**Espectro 3**) mostró en la región de protones aromáticos, un sistema ABX que integra para tres hidrógenos. En 8.341 ppm se observó una señal simple, que integró para el Hidrógeno el *H*-4. En 7.86 ppm un doblete, con $J_{\text{orto}} = 8.4$ Hz que integró para un Hidrógeno y que corresponde al *H*-7. En 7.74 ppm un doblete dobleteado con $J_{\text{orto}} = 8.4$ y $J_{\text{meta}} = 1.2$ Hz que integró para un Hidrógeno y se asigna al *H*-6. En 14.4 ppm se observó una señal ancha que intercambió con D_2O y correspondió al Hidrógeno ácido del N-H.

El espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 4**) mostró que el desdoblamiento de los núcleos de ^{13}C se originó por el núcleo de Flúor que está enlazado directamente con el ^{13}C . Se observó en 143 ppm cuatro señales ($^1J_{\text{C-F}} = 39.5$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 79.73$ Hz) que corresponden a C-2, en 118.5 ppm cuatro señales ($^1J_{\text{C-F}} = 271.8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 542.2$ Hz) que se asignaron al Carbono del trifluorometilo. Basadas en desplazamientos teóricos las señales en 138.580, 128.317, 127.365 y 106.223 ppm se asignaron a C-7a, C-3a, C-4, C-6, y C-7. En 119.269 ppm se presentó la señal que permitió confirmar la introducción del radical ciano en la molécula.

Resultados y discusión

6.2.2. Síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (2)

La obtención del compuesto **2** inició partiendo del compuesto comercial 3-Nitro-4-aminofluorobenceno **8** para formar la 3-Fluor-1,2-fenilendiamina **9** y finalmente ciclarlo en presencia de Ácido trifluoroacético y HCl (Reacción de Phillips).^{26,27,67} Se propuso variar las condiciones de reducción con el propósito de obtener un procedimiento de reducción eficiente, suave y seguro. Para esto se utilizó el Formiato de amonio (HCO₂NH₄)⁶² con el catalizador Paladio/ Carbono o H₂ con el catalizador Niquel/Raney (**Esquema 19**).



Esquema 19. Obtención del compuesto **2** a partir del compuesto 3-Nitro-4-aminofluorobenceno (**8**).

La **Tabla 8** muestra los resultados obtenidos de la reducción del compuesto **8** empleando los dos procedimientos de reducción mencionados. El catalizador Pd/C se empleó al 5% y 10% en función de la cantidad de materia prima, su elección se basó en las ventajas conseguidas durante la preparación del compuesto **1**. Esta tabla muestra también que el rendimiento más alto se obtuvo cuando se utilizó H₂/Ni-Raney al 5%. Sin embargo, con Formiato de amonio (HCO₂NH₄) y el catalizador Pd/C al 10% se obtuvo un rendimiento aceptable en un tiempo de reacción más corto.

Resultados y discusión

Tabla 8. Resultados de la reacción de reducción del compuesto **8**.

Procedimiento	% de catalizador ^a	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (h)
HCO ₂ NH ₄ /Pd/C 10%	10	93	1.30
HCO ₂ NH ₄ /Pd/C 5%	10	46	3
H ₂ /Ni-Raney 5%	30	----- ^b	2.4

^a Porcentaje de catalizador utilizado en relación a la cantidad de materia prima.

^b El producto crudo se ciclo inmediatamente.

En ambos casos después de haber obtenido el compuesto **9** se realizó la ciclación empleando Ácido trifluoroacético, Ácido clorhídrico como catalizador y calor generado por dos fuentes diferentes de energía. El mecanismo de reacción que explica la formación de este Bencimidazol se ha descrito en el Esquema 17.

Los resultados obtenidos en la **Tabla 9** señalan que la reacción que permitió obtener al compuesto **2** estuvo influenciada principalmente por la concentración de Ácido clorhídrico 11.3 N. Contrario a lo que se esperaba, el mejor rendimiento se obtuvo cuando se utilizó HCl 11.3 N, esto se explica porque la diamina formada **9** no se secó antes de la ciclación, por lo tanto, es probable que la porción de agua presente contribuyera a establecer el equilibrio ácido-base necesario para que existiera base libre **12** además de las moléculas de agua que se genera durante la reacción (**Esquema 19**). Lo anterior favoreció que la posición del equilibrio químico se desplazara hacia la formación de productos. El calor generado por la resistencia eléctrica o el baño de silicón no influyeron en el tiempo de reacción.

Resultados y discusión

Tabla 9. Resultados obtenidos de la formación del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**2**).

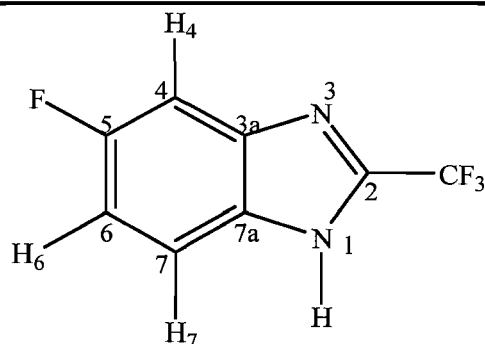
Procedimiento	HCl mL/concentración	Calor	Rendimiento Ciclación (%)	Rendimiento Total (%)	Tiempo de obtención Compuesto (h)
HCO ₂ NH ₄ Pd/C 10%	1.5 (6N)	60 volt ^a	45	36	10
HCO ₂ NH ₄ Pd/C 5%	3.3 (3N)	60 volt ^a	84	84	6
H ₂ Ni Raney 5%	0.5 (11.3N)	Baño de silicón	92	92	5

^a Porcentaje de salida de voltaje.

Cabe destacar que la técnica de purificación más eficiente para obtener al compuesto **2** fue la cromatografía de absorción que utiliza como fase estacionaria hidróxido de aluminio, ya que se obtuvo 78% del producto en comparación con el 23% conseguido de la recrystalización de benceno.⁶⁷

6.2.2.1. Caracterización del compuesto 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**2**)

Tabla 10. Resultados de la síntesis del 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol **2**.



Rendimiento:

84%

Características físicas:
sólido de color blanco.

Punto de Fusión: 219.8-220.4 °C ^a

R_f *:1.8

^a Punto de fusión reportado: 219-220 °C ⁶⁶

* Fase móvil: Heptano, Cloroformo, Acetato de etilo (50:35:15)

Resultados y discusión

El espectro de infrarrojo en KBr (**Espectro 5**) mostró dos bandas en 1604.15 y 1462.05 cm^{-1} características del anillo del Bencimidazol. A 1550 cm^{-1} mostró dos bandas que indican que esta sustituido en la posición 2. Las bandas anchas y fuertes a 2979.34, 2860.46 cm^{-1} correspondieron al enlace N-H indicando la asociación intermolecular por los puentes de hidrógeno a través de los enlaces -N-H-N-. Las bandas que correspondieron al enlace CF_3 se encontraron a 1226.65, 1194.87, 1169.49, 1144.83, 1121.57 cm^{-1} .

El Espectro 6 mostró la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. El cromatograma mostró una sola banda ancha que indica la pureza del compuesto formado. En el espectro de masas el ion molecular y el pico base [M^+ , 100%] coincidieron en la señal en m/z 203 que correspondió al peso molecular del compuesto. La pérdida de los fragmentos [HF] $^+$ y [F] $^+$ en m/z 184 [M-20, 73%] y en m/z 165 [M-19, 2.85%] es característica de los compuestos fluorados.⁶⁶

En el espectro de RMN de ^1H (TMS) (**Espectro 7**) se observó que los hidrógenos cercanos al enlace C-F se acoplaron en la forma usual con él. En la región de protones aromáticos mostró un sistema ABX que integró para tres hidrógenos. En 7.77 ppm un cuarteto con $J_{\text{orto}} = 9$ Hz y $J_{\text{para}} = 5$ Hz que integró para el hidrógeno el H-7; en 7.52 ppm un doble de dobles con $J_{\text{orto}} = 9$ Hz y $J_{\text{meta}} = 3$ Hz que integró para el hidrógeno H-4. En 7.24 ppm un triplete dobleteado con $J_{\text{meta}} = 2.4$ Hz y $J_{\text{orto}} = 9.5$ Hz que integró para un hidrógeno que corresponde al H-6.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 8**), mostró que el desdoblamiento de los núcleos de ^{13}C se originó por el núcleo de Hidrógeno y Flúor que están enlazados directamente con él. Se observó en 160 ppm una señal doble ($J_{\text{C-F}} = 238.8$ Hz) que se asignó C-5 confirmando la presencia del Flúor en esta posición de la molécula, en 141 ppm cuatro señales ($^1J_{\text{C-F}} = 79.50$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 39.93$ Hz) que corresponden a C-2, en 118 ppm cuatro señales ($^1J_{\text{C-F}} = 542.014$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 271.196$ Hz) que se asignaron al Carbono del trifluorometilo. Basadas en desplazamientos teóricos se asignaron los siguientes carbonos, en 113.0 ppm un doblete ($J_{\text{C-F}} = 26.1985$ Hz) que correspondió al C-4, en 109.2 ppm un doblete ($J_{\text{C-F}} = 27.029$ Hz) que se asignó al carbono C-6, en 118.7

Resultados y discusión

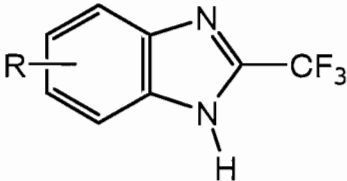
ppm se asignó al C-7. Las señales anchas y de baja intensidad en 137.929 ppm y 134.855 ppm se asignaron a los carbonos cuaternarios C-3a y C-7a.

6.3. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol, ABZ y MTZ

6.3.1. Evaluación de la actividad giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol, ABZ y MTZ

La curva de crecimiento de la cepa IMSS:0989:1 de *Giardia intestinalis* muestra que los trofozoitos utilizados en la evaluación, se encontraron en la fase de duplicación exponencial (28-56 h), es por esto que el efecto observado, se debe directamente a la acción de los compuestos (**Anexo 2**).

Tabla 11. Resultados de la evaluación giardicida de los compuestos **1, 2, 3, 5**, ABZ y MTZ.



The chemical structure shows a benzimidazole ring system. The benzene ring is substituted with an R group at the 6-position. The imidazole ring has a trifluoromethyl group (-CF₃) at the 2-position and a hydrogen atom on the nitrogen at the 1-position.

Compuesto	Radical	Cl ₅₀ (μM)	Intervalo de confianza	D.E. ^a	% C.V. ^b
1	-C≡N	1.791	2.098-1.541	0	0
2	-F	0.498	0.559-0.447	0.0002	0.035
3	-CH ₃	0.416	0.445-0.366	0.0024	5.816
5	-H	0.499	0.555-0.451	0	0
MTZ		3.011	3.017-3.003	0.003	0.0009
ABZ		0.034	0.034-0.034	0	0

^a Desviación estándar ⁶⁸

^b Coeficiente de variación ⁶⁸

Resultados y discusión

Los compuestos **1-3**, y **5** son más activos que el MTZ. Sin embargo son menos activos que el ABZ (**Tabla 11**). Para comparar la potencia relativa de cada compuesto, se obtuvo el cociente entre los controles positivos (ABZ y MTZ) y cada uno de los derivados (**Tabla 12**). Las medias correspondientes a los valores de Cl_{50} (μM) de los compuestos **1**, **2**, **3**, **5** y ABZ fueron evaluadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existen diferencias significativas entre ellas. Además se realizó la prueba *t student* con las medias de Cl_{50} de los compuestos **2** y **5** demostrando que existen diferencias estadísticas entre ellas (**Anexo 2**).⁶⁹

Tabla 12. Potencia giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.

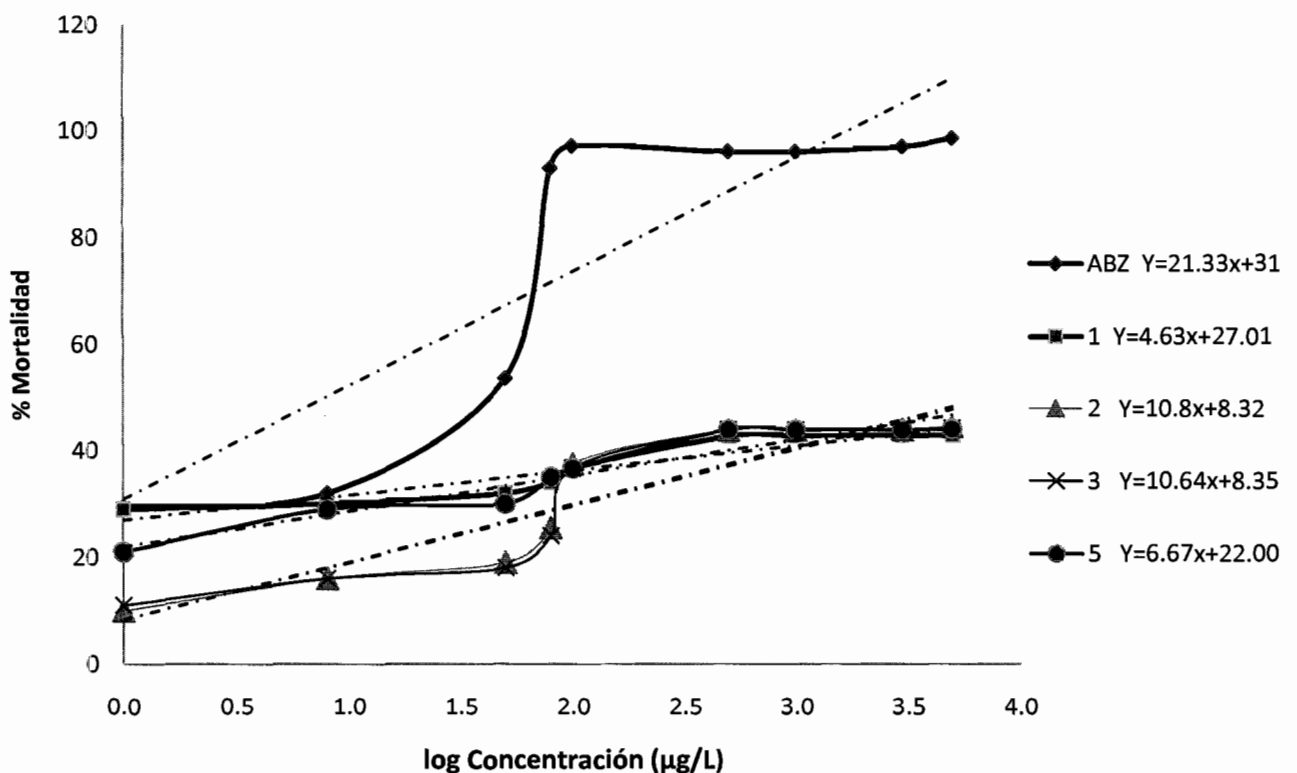
Compuesto	Radical	$Cl_{50}(\mu\text{M})^a$	
		MTZ/ R	ABZ/R
1	-C≡N	1.68	0.02
2	-F	6.05	0.07
3	-CH ₃	7.23	0.08
5	-H	6.03	0.07

^a Cociente del valor de Cl_{50} del control positivo (MTZ o ABZ) /compuesto evaluado (R)

Los resultados obtenidos (**Tabla 12**) muestran que con respecto al MTZ el compuesto **3** fue el más activo, seguido de los compuestos **2** y **5**. El compuesto menos activo fue el **1**.

Resultados y discusión

Con respecto al ABZ el compuesto más activo fue el 3, seguido del 2 y 5. El compuesto menos activo fue el 1. Además la **Grafica 1** muestra la curva concentración–respuesta para los derivados y el ABZ, las pendientes de las rectas para los compuestos 1, 2, 3 y 5, son menores que la del ABZ, indicando que es necesario aumentar la concentración de los fármacos para observar un cambio semejante en la mortalidad al ABZ.⁴⁶



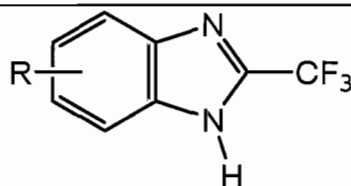
Gráfica 1. Curva concentración–respuesta de la actividad giardicida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol y ABZ.

Resultados y discusión

6.3.2. Evaluación de la actividad tricomonocida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol, ABZ y MTZ

La curva de crecimiento de la cepa GT3 de *Trichomonas vaginalis* muestra que los trofozoitos utilizados en la evaluación, se encontraron en la fase de duplicación exponencial (48 h), es por esto que el efecto observado, se debe directamente a la acción de los compuestos (**Anexo 2**).

Tabla 13. Resultados de la evaluación tricomonocida de los compuestos **1, 2, 3, 5**, ABZ y MTZ.



Compuesto	Radical	Cl ₅₀ (μM)	Intervalo de confianza	D.E. ^a	% C.V. ^b
1	-C≡N	2.231	2.631-1.908	0	0
2	-F	3.136	3.754-2.643	0	0
3	-CH ₃	2.822	4.208-1.977	0.004	0.159
5	-H	3.647	3.770-3.530	0	0
MTZ		0.216	0.216-0.216	0	0
ABZ		3.308	3.308-3.304	0.002	0.066

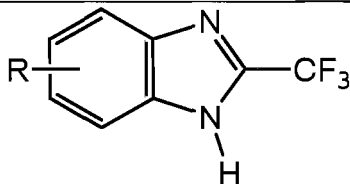
^a Desviación estándar⁶⁸

^b Coeficiente de variación⁶⁸

Ningún compuesto superó la actividad del MTZ. Los compuestos **1** y **3** son más activos que el ABZ (**Tabla 13**). Para comparar la potencia relativa de cada compuesto, se obtuvo el cociente entre los controles positivos (ABZ y MTZ) y cada uno de los derivados (**Tabla 14**). Las medias correspondientes a los valores de Cl₅₀ (μM) de los compuestos **1, 2, 3, 5** y ABZ fueron evaluadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existen diferencias significativas estadísticas entre ellas (**Anexo 2**).⁶⁹

Resultados y discusión

Tabla 14. Potencia tricomonocida relativa de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-bencimidazol.



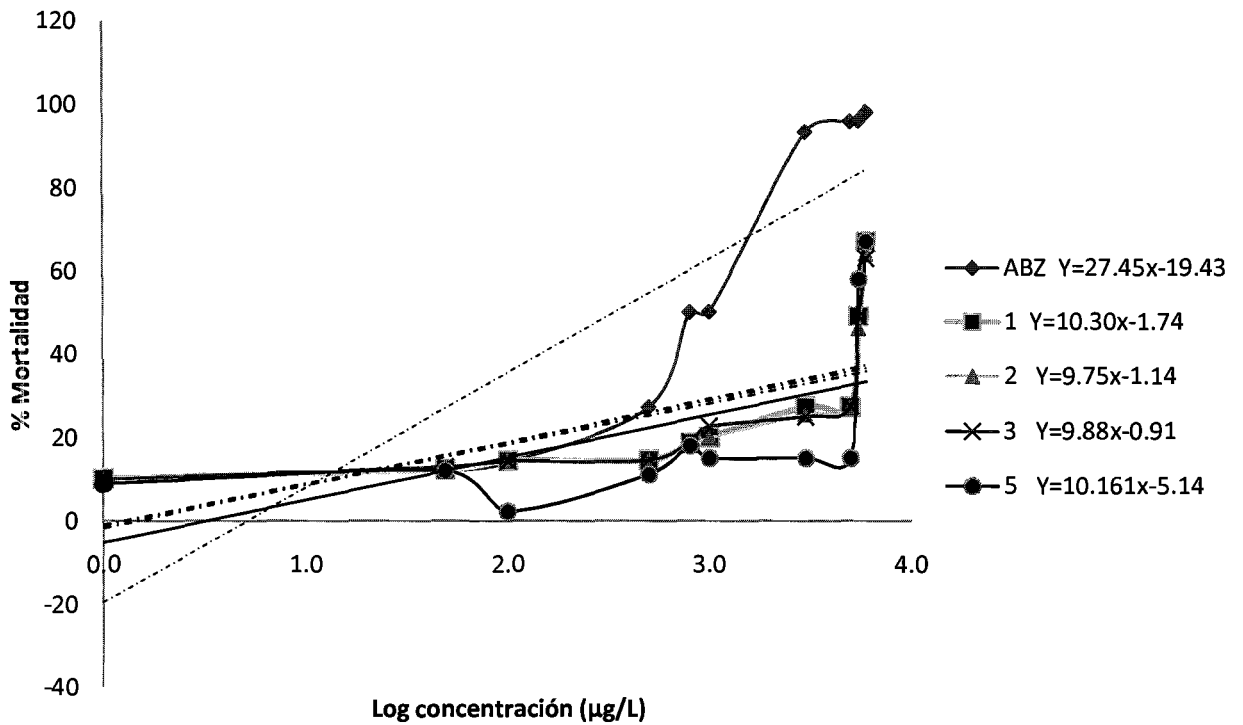
Compuesto	Radical	CI ₅₀ (μ M) ^a	
		MTZ/ R	ABZ/R
1	-C \equiv N	0.09	1.48
2	-F	0.06	1.05
3	-CH ₃	0.7	1.17
5	-H	0.5	0.90

^a Cociente del valor de CI₅₀ del control positivo (MTZ o ABZ) /compuesto evaluado (R)

Los resultados obtenidos (**Tabla 14**) muestran la escasa actividad de los derivados frente al MTZ. Con respecto al ABZ, los compuestos **1**, **2** y **3** fueron más activos.

Además la **Grafica 2** muestra la curva concentración-respuesta para los derivados y el ABZ, las pendientes de las rectas para los compuestos **1**, **2**, **3** y **5**, son menores que la del ABZ indicando, que es necesario aumentar la concentración de los fármacos para observar un cambio semejante en la mortalidad al ABZ.⁴⁶

Resultados y discusión



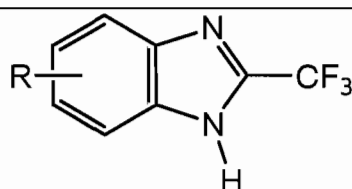
Gráfica 2. Curva concentración-respuesta de la actividad tricomonocida de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-becimidazol y ABZ.

Resultados y discusión

6.4. Evaluación del efecto citotóxico *in vitro* de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, ABZ y MTZ sobre la proliferación de linfocitos humanos

A continuación se muestran los valores de Cl_{50} μM y Cl_{90} μM obtenidos de la evaluación citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, ABZ y MTZ.

Tabla 15. Resultados de la evaluación citotóxica (Cl_{50} μM) de los compuestos 1-5, ABZ y MTZ.



Compuesto	Radical	Cl_{50} (μM)	Intervalo de confianza	D.E. ^a	% C.V. ^b
1	-C≡N	21.056	21.283-20.833	0	0
2	-F	21.780	22.015-21.550	0	0
3	-CH ₃	22.211	22.451-21.977	0	0
4	-Cl	20.094	20.310-19.879	0.1077	0.536
5	-H	23.885	24.143-23.633	0	0
MTZ		18.206	18.372-18.039	0.094	0.519
ABZ		16.713	16.892-16.535	0.096	0.577

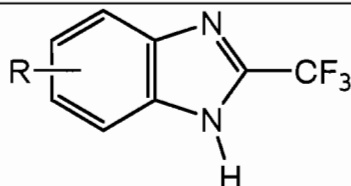
^a Desviación estándar ⁶⁸

^b Coeficiente de variación ⁶⁸

Las medias correspondientes a los valores de Cl_{50} (μM) de los compuestos 1-5 y ABZ fueron evaluadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró existen diferencias significativas entre ellas. Además Las Tablas 15 y 16 muestran que los compuestos 1-5, son menos activos que el ABZ y MTZ (Anexo 3).

Resultados y discusión

Tabla 16. Resultados de la evaluación citotóxica (CI_{90} μM) de los compuestos **1-5**, ABZ y MTZ.



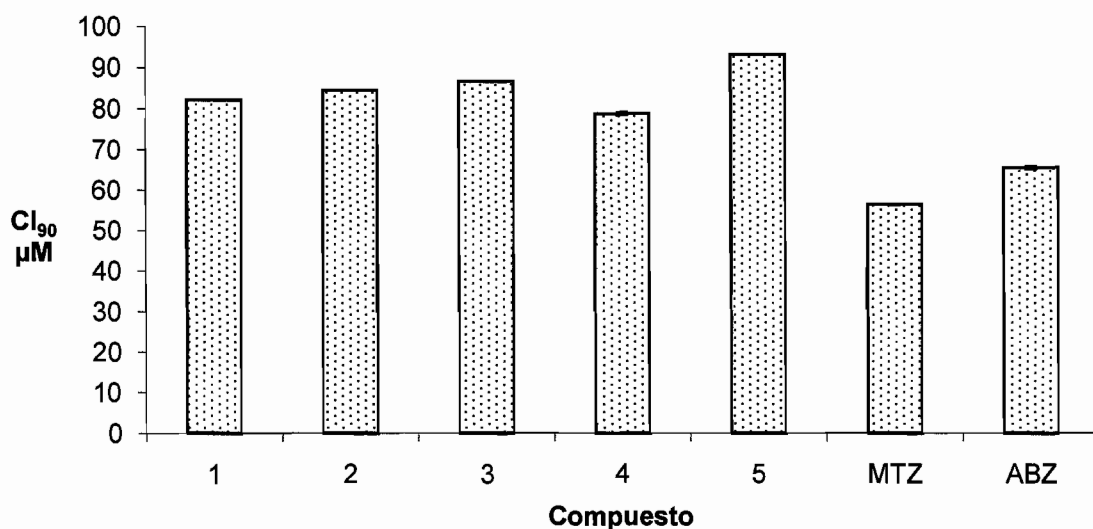
Compuesto	Radical	CI_{90} (μM)	Intervalo de confianza	D.E. ^a	% C.V. ^b
1	-C \equiv N	82.130	84.089-80.261	0	0
2	-F	84.555	86.985-83.025	0	0
3	-CH ₃	86.631	88.708-84.665	0.011	0.013
4	-Cl	78.764	80.662-76.974	0.267	0.339
5	-H	93.159	95.392-91.044	0.012	0.013
MTZ		56.435	57.533-55.381	0.037	0.066
ABZ		65.450	67.026-63.958	0.254	0.388

^aDesviación estándar⁶⁸

^bCoefficiente de variación⁶⁸

Las medias correspondientes a los valores de CI_{90} (μM) de los compuestos **1-5** y ABZ fueron evaluadas a través de un análisis de varianza (ANOVA), el cual mostró que existen diferencias significativas entre ellas (**Anexo 3**).

Resultados y discusión



Gráfica 3. Actividad citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-becimidazol, ABZ y MTZ.

La **Tabla 16** y la **Gráfica 3** muestran que el MTZ es el compuesto más tóxico, ya que se requiere menor concentración de compuesto para eliminar al 90% de la población de leucocitos. De los derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol el compuesto **4** fue el más tóxico y el compuesto **5** el menos tóxico.

6.5. Relación estructura actividad

El reemplazo de los sustituyentes bioisotéricos de la posición 5,6 de la estructura del 2-(Trifluorometil)-1H-benzimidazol presentó efecto sobre los protozoarios *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Además de interferir sobre la proliferación de linfocitos humanos (Tabla 17).

Tabla 17. Correlación de la estructura-actividad antiprotozoaria y citotóxica de los derivados del 2-(Trifluorometil)-1H-benzimidazol.

Compuesto	Radical	Actividad Antiprotozoaria		Actividad Citotóxica Cl ₅₀ (μM)
		Cl ₅₀ (μM)		
		<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>	
1	-C≡N	1.791	2.231	21.056
2	-F	0.498	3.136	21.780
3	-CH ₃	0.416	2.822	22.211
4	-Cl	1.282	ND	20.094
5	-H	0.499	3.647	23.885

Con respecto al remplazo bioisotérico y la relación con la actividad giardicida y citotóxica podemos decir según los resultados mostrados en la **Tabla 17**, lo siguiente:

*La sustitución del bioisómero -Cl por -CH₃ originó un compuesto más activo y menos tóxico.

Resultados y discusión

*La sustitución del bioisótero $-F$ por $-H$ generó un compuesto semejante en actividad giardicida, pero menos tóxico.

*La sustitución del bioisótero $-Cl$ por $-C\equiv N$ originó un compuesto menos activo y menos tóxico.

Con respecto al reemplazo bioisotérico y la relación con la actividad tricomonocida y citotóxica podemos decir según los resultados mostrados en la **Tabla 17**, lo siguiente:

*La sustitución del bioisótero $-F$ por $-CH_3$ originó un compuesto más activo y menos tóxico.

*La sustitución del bioisótero $-F$ por $-H$ generó un compuesto menos tóxico y con actividad semejante.

*La sustitución del bioisótero $-C\equiv N$ por $-F$ originó un compuesto menos activo, pero con actividad citotóxica semejante.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten comprobar que los sustituyentes bioisostéricos, presentes en compuestos derivados del 2-(Trifluorometil)-1*H*-bencimidazol mostraron actividad frente a *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Además fueron menos tóxicos que los compuestos ABZ y MTZ.

- Se sintetizaron los compuestos 5(6)-Ciano-2(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**1**) y 5(6)-Fluor-2(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**2**)
- Se caracterizaron los compuestos sintetizados por técnica espectrométrica (EM) y técnicas espectroscópicas (IR, RMN) además se determinó sus constantes físicas (punto de fusión y R_f).
- Los valores de CI_{50} permiten concluir que con respecto a la actividad giardicida, los compuestos **1-3** y **5** fueron más activos que el MTZ, no obstante fueron menos activos que el ABZ.
- Los valores de CI_{50} permiten concluir que con respecto a la actividad tricomonocida, los compuestos **1** y **3** fueron más activos que el ABZ. Sin embargo los compuestos **1-3** y **5** fueron más activos que el MTZ.
- Los valores de CI_{50} y CI_{90} obtenidos del efecto sobre la proliferación celular de linfocitos humanos, permiten concluir que ninguno de los compuestos fueron más tóxicos que el ABZ y MTZ.
- Los sustituyentes bioisostéricos presentes en la posición 5,6 de los compuestos **1-5** afectaron la actividad giardicida y tricomonocida, además influyeron sobre la actividad citotóxica *in vitro*.

Conclusiones

- Con respecto al compuesto considerado prototipo (4,5(6)-Cl) de la serie de sustituyentes presentes en la posición 5,6 de los compuestos **1-5**, los valores Cl_{50} permiten concluir que, el sustituyente $-CH_3$ fue el más activo frente a *G. Intestinalis* y menos tóxico que el sustituyente $-Cl$. Por otra parte el sustituyente $-C\equiv N$ fue más activo frente a *Trichomonas vaginalis* pero no menos tóxico que el $-Cl$.

1. Dobell, C. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **1920**,13,1-15.
2. Olson, B.; Olson, M. *Giardia The Cosmopolitan Parasite*. Academic Press. Primera Edición. E.U.A. **2002**,pp 4-199.
3. Elmendorf. G.H.; Dawson, C.S. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology* **2003**, 33-28.
4. Andrew, T.R.;Thompson, A.R.C. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology* **2000**, 30 1259-1267.
5. Rodney, D.A. The biology of *Giardia* spp. *Microbiology Reviews* **1991**, 4,(55), 706-732.
6. Upcroft, P.;Upcroft, J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**,1 (14), 150-164.
7. Boreham, P. F.L.; Upcroft, J.A.; Upcroft, P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1687-2000. *International Journal for Parasitology* **1990**, 20 (4), 479-487.
8. Tay, J.; Lara, R.;Velasco O. *Parasitología Médica*. Méndez Cervantes. Séptima Edición. México. 2002,pp 15-117.
9. Singer, S.M.; Elmendorf, G.H.;Conrad, J.T.;Nash, T.E. Biological Selkection of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia lamblia*. *The Journal of Infectious Diseases* **2001**, 183, 119-124.
10. Wolfe, S.M. Giardiasis. *Microbiology Reviews* **1992**,1 (5), 93-100.
11. Cedillo-Rivera, R.;Chavez, B.;González-Robles, A.;Tapia,A.;Yépez-Mulia, L. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2002**, 49 (3), 201-208.
12. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad **2005**. Versión Ejecutiva. pp 34,40,45,117. (Información digital)
13. Wrigth, S. Giardiasis and malabsortion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1980**, 4 (74), 436-437.
14. García,C.; Las parasitosis intestinales en México. Fundación Mexicana para la Salud, AC. Primera edición. México. **2003**,pp 24-26, 43

Bibliografía

15. Wiegerr, L.;Mank, T. Human Giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Journal for Parasitology* **2001**, 31 (4), 822-826.
16. Cuadro básico y Catálogo de medicamentos actualizado **2007**. Grupo terapéutico Número 6 y Número 9 http://www.salud.gob.mx/csg/cuadrs_bas_cat2002
17. Gardner, B.T.;Hill, R.D. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 1 (14), 114-126.
18. Comunicado de Prensa Comunicado No 081. Distribuye el Sector Salud albendazol, para prevenir Parasitosis Feb 2005.
19. WHO 2001-Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexuality Transmitted Infections.Over view and Estimates 27-29.
20. Schwebke, R.J.;Burgess, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* **2004**, 4 (17), 794-803.
21. Petrin, D.;Delgaty, K.;Garber, G.;Bhatt, R. Clinical Microbiology Aspects of *Trichomonas vaginalis* *Clinical Microbiology Reviews* **1998**,2(11), 300-317.
22. Mehlhom.H.; Walldorf, V. Life Cycles in Parasitology in Focus Springer-Verlag. Primera Edición. E.U.A. 1988,pp 4-7.
23. Distribución de los casos nuevos de enfermedades por grupo de edad **2006**. Población en general. Sistema único de Información Epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/index.htm>
24. Alderete, J.F.;Lenker, M.W.;Arroyo, R. The mechanism and molecules involved in Cytoadherence and Pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* **1995**, 2 (11), 70-73.
25. Cudmore, L.S.;Delgaty, L.K. McClelland, H.F.;Petrin, P.D.;Garber, E.G.;Shannon, F. Treatment of Infections Caused by Metronidazoles-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* **2004**, 4 (17), 783-790.
26. Wright, J. The Chemistry of Bencimidazoles. *Chemical Reviews* **1951**, 48 397-525.
27. Townsend, B. L.;Wise, S.D. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today* **1990**, 4 (6),107-112.
28. Sears, S.D.;O`Hare, J. In vitro Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to 50 Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 1 (32), 144-146.

29. Martinotti, J.;Cappuccinelli, P. In vitro effect of microtubule inhibitors on *Trichomonas vaginalis*. *Microbiologica* **1985**, 8 31-42.
30. Juliano, C.;Monaco, G.;Bandiera, P.;Tedde, G.;Cappuccinelli, P. Action of anticytoskeletal compounds on *in vitro* cytophatic effect: Phagocytosis and adhesiveness of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Medical Genitourinan* **1987**,63 256-263.
31. Gutierrez-Davila,C.;Vasquez, C.;Hernandez, T.B.;Huerta, M. Nitazoxanide compared with quinfamide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2002**, 66 (3), 251-254.
32. Belkind-Valdovinos, U.;Belkind-Gerson, J.;Sánchez-Francia, D.;Espinoza-Ruiz, M.;Lazcano-Ponce, E. Evaluación de la nitazoxanida en dosis única y por tres días en parasitosis intestinal. *Salud Pública de México* **2004**, 46 333-340.
33. Andrzejewska, M.;Yépez-Mulia, M.L;Tapia, A.;Cedillo-Rivera, R.;Laudy, A.E.;Starosciak, B.J.;Kazimierczuk, Z. Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo-and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *Europen Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 21 323-329.
34. Jones, O.T.;Watson, A. Properties of Substituted 2-Trifluoromethylbenzimidazoles as uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biochemical* **1967**, 102, 564-573.
35. Wolinowska, R.;Zajdel-Dabrowska, J.;Starosciak, B.J.;Kazimierczuk, Z. Antimicrobial Activity of Substituted 2-Trifluoromethyl-and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *Acta Microbiologica Polonica* **2002**, 3 (51), 265-273.
36. Sharma, S. Desing of New Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles. *Advances in Drug Research* **1994**, (25), 104-169.
37. Sánchez-Díaz R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmintica potencial. Tesis de Maestría, México, Facultad de Química, UNAM, **1999**.
38. Alvarado-Enriquez.Evaluación *in vitro*, de la actividad biológica de los derivados del 2-trifluorometilbencimidazol en los parásitos protozoarios *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Licenciatura. México, Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad del Valle de México, 2005.

39. Navarrete-Vázquez, G.;Yépez-Mulia L.;Hernández-Campos, A.;Tapia, A.;Hernández-Luis, F.;Cedillo-Rivera, R.;González J.;Martinez-Fernández, A.;Martínez-Grueiro, M.;Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of Albendazole and Mebendazole Analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**, (11), 4615-4622.
40. Navarrete-Vázquez, G.;Cedillo, R.; Hernández-Campos, A;Yepéz, L.; Hernández-Luis, F.;Valdez J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2001**, (11), 187-190.
41. Navarrete V. J. G. Síntesis y actividad biológica de 2-(Trifluorometil)bencimidazoles. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas México, Facultad de Química, UNAM, **2000**.
42. Patani, A.G.;La Voie, J.E. Bioisoterism :A Rational Approach in Drug Desing. *Chemical Reviews* **1996**, 96,3147-3176
43. Burger,A. Isosterism and Bioisosterism in drug desing. *Prodrug Research* **1991**, 37 287-371.
44. Wermuth,C.The practice of Medicinal Chemistry. Academic Press. Segunda Edición. E.U.A. 2003,pp 521-526.
45. Silverman, B. The Organic Chemistry of Drug Desing and Drug Action. Academic Press.Tercera Edición. E.U.A. 1992, pp 289-299.
46. Klaassen,C.; Watkins, J.Casarett y Doull. Fundamentos de Toxicología. Mc Graw Hill-Interamericana. Primera Edición en Español. Madrid. 2005,pp 184-196.
47. Ramirez, T.;Benítez-Bribiesca, L.B.;Ostrosky-Wegman, P.; Herrera, L.A. In vitro effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Archives of Medical Research* **2001**, 32, 119-122.
48. Zhurkov, V.S.;Yakovenko, K.N. The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutation research* **1976**, 41, 107-112.
49. Eisenbrand, G.;Pool, Z.B.;Baker, V.;Balls, M.;Blaauboer, B.J.;Boobis, A.;Carere, A.;Kevekordes, S.;Lhuguenot, J.C.;Pieeters, R.;Kleiner, J. Methods of in vitro toxicology. *Food and chemical toxicology* **2002**, 40, 193-236.
50. Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* **1990**,4 (6),112-115.

51. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology* **1992**, (37), 221-224.
52. Hill, R.D.; Pohl, R.; Pearson, R. *Giardia Lamblia*: A culture method for determining parasite viability. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1986**, 35 (6), 1129-1133.
53. Doyle, A.; Griffirhs, B.J. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley & Sons. Primera Edición. E.U.A. 2000, pp 130-137.
54. Gottschall, W. D.; Theodorides, V.J.; Wang, R. The Metabolism of Benzimidazoles Anthelmintic. *Parasitology Today* **1990**, 4(6), 115-120
55. Koerts, J.; Soffers, E.A.; Vervoort, J.; Jager De, A.; Rietjens, M.C. Occurrence of the NIH Shift upon the Cytochrome P450-Catalyzed in Vivo and in Vitro Aromatic Ring Hydroxylation of Fluorobenzenes. *Chemical Research Toxicology* **1997**, 11 503-512.
56. Park, K.; Kitteringham, R.; O' Neill Metabolism of Fluorine-Containing Drugs. *Annual Reviews of Pharmacology and toxicology* **2001** 41, 443-470.
57. Guengerich, P. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions related to metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical research in Toxicology*. **2001** 14 (6), 612-622.
58. Smart, E.B. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *Journal of Fluorine Chemistry* **2001**, 109 3-11.
59. Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 23 3-25.
60. Randall, A.S.; Jumelt, D. The reduction of aromatic nitro groups on solid supports using hydrosulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). *Tetrahedron Letters* **2000**, 41 6531-6535.
61. Fieser, F. *Reagents for organic synthesis*. John Wiley and sons Inc. E.U.A. 1967, pp 1031.
62. Siya, R.; Ehrenkafer, R.E. A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent. *Tetrahedron Letters* **1984**, 32 (25), 3415-3418.

Bibliografía

63. Siya, R.;Ehrenkauf, R.E. Ammonium Formate in Organic Synthesis: A Versatile Agent in Catalytic Hydrogen Transfer Reductions.*Synthesis* **1987**, 91-97.
64. Montague, A.P.The hydrolysis of diacetyl-o-diamines. *Journal of Chemical Society* **1930**, (4),1409-1419.
65. Lyle, F. R. U.S. patent 6,973,257, 1995.
66. Marill, C.;Bassier,C.;Silverstein, M. Spectrometric identification of organic compounds. Academic Press. Quinta Edición. E.U.A. 1978, pp193,211,222,241.
67. Walter.T.;Smith, J.; Steinle, J. Some Substituted 1 Benzimidazoles. *Journal of Chemical Society* **1952** (75), 1292-1294.
68. Johnson,R. Estadística elemental. Trillas. Sexta reimpresión. México D.F. 1999,pp 36,47,347.
69. Tallarida,R.; Murray, R.Manual of Pharmacologic Calculations. Springer-Verlag.Segunda Edición. E.U.A. 1986,pp14,17,49,140,144.
70. Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002 para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.

Anexo 1.

Síntesis

Consideraciones generales

a. Métodos generales

El avance de las reacciones y la pureza de los productos se verificaron por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice e impregnadas con un indicador de fluorescencia 60 GF₂₅₄ Merck. Los compuestos fueron revelados con una lámpara de luz ultravioleta marca UVP Inc modelo UV GL-25., y mediante la introducción de la placa en vapores de yodo.

Los puntos de fusión reportados se determinaron en un equipo marca Büchi modelo B-540 empleando capilares y no fueron corregidos, se reportan en ° C.

La hidrogenación catalítica se realizó en un hidrogenador marca Parr, modelo 3916EG con 60 lb/pulg² en capacidad máxima a una temperatura de 80 ° C, utilizando hidrógeno Marca INFRA y como catalizador Niquel-Raney.

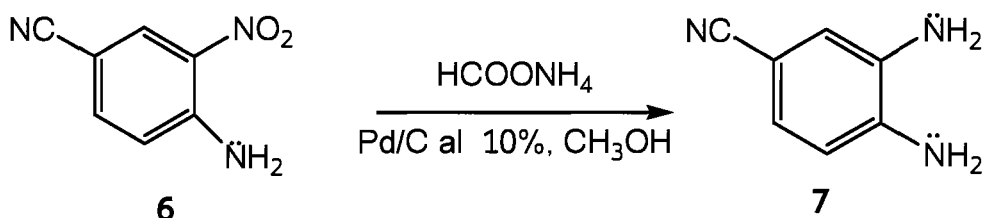
El término “se secó” significa que las soluciones orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro y el termino “se evaporó” significa que las evaporaciones del disolvente se efectuaron a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio marca Büchi modelo RE 114, con vacío generado por una bomba marca GAST modelo 0523-V4F y compresora VWR Scientific modelo 1107 y un condensador.

b. Reactivos y disolventes.

Los disolventes utilizados fueron de la marca Sigma y Becker, se usaron sin destilación posterior.

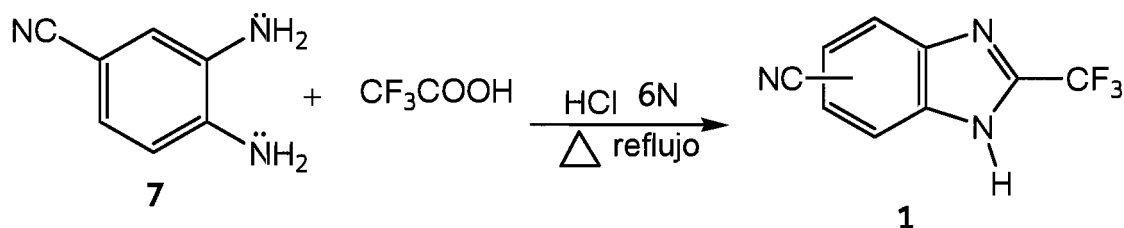
Los catalizadores paladio-carbono y niquel-raney son de la marca Sigma y Aldrich respectivamente.

Síntesis del 3-Ciano-1,2-fenilendiamina (7)



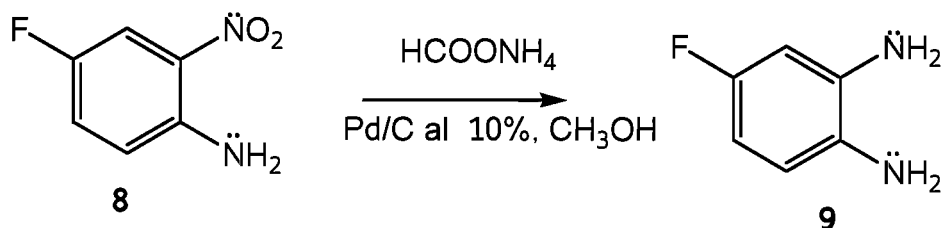
En un matraz bola de dos bocas 14/20 con capacidad de 50 mL acondicionado de un baño de hielo, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 0.7099 g (4.3513 mmol) de 3-Amino-2-nitrobenzonitrilo **6** y 0.710 g del catalizador paladio-carbono (10%) y 4 mL de metanol absoluto, se mezclaron homogéneamente bajo agitación magnética. Aparte se disolvieron los 1.3 g (20.0160 mmol) de Formiato de amonio en 10 mL de Metanol, esta solución se adicionó lentamente a la mezcla de reacción manteniéndola en baño de hielo y agitación continua durante 15 minutos, en seguida se retiró el baño de hielo y se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación continua durante 2.5 h. Una vez que terminó el tiempo de reacción se filtró el catalizador y el disolvente se evaporó. El sólido obtenido se disolvió en 20 mL de Acetato de etilo y se lavó tres veces con 10 mL de solución saturada de Cloruro de sodio, la fase orgánica se secó y se evaporó. De esta manera se obtuvo un sólido café rojizo que correspondió a la 3-Ciano-1,2-fenilendiamina **7**, que mostró una sola mancha en CCF. Este producto crudo se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción.

Síntesis del 5(6)-Ciano-2(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (1)



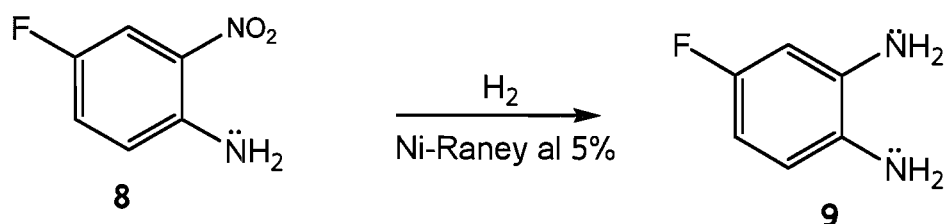
En un matraz bola de una boca 14/20 con capacidad de 50 mL acondicionado con un refrigerante, un aparato de agitación magnética, una canasta de calentamiento y atmósfera de Nitrógeno se colocaron 0.5707 g (4.2860 mmol) de 3-Ciano-1,2-fenilendiamina **7** y 0.5 mL (6.6000 mmol, 1.5 eq) de Ácido trifluoroacético, adicionando lentamente 6.5 mL de Ácido clorhídrico 6N, esta mezcla se mantuvo a reflujo durante 8 horas a 60 volt de operación del reostato. Durante la reacción y al término de la misma se tomó una CCF para observar la transformación de materia prima a producto, al término de este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, en seguida se agrego 15 mL de Acetato de etilo y se lavó con una solución de Bicarbonato de sodio al 1% hasta neutralizarla; la fase orgánica se secó y evaporó, el sólido obtenido se trato con carbón activado y recristalizó con una mezcla de Benceno-Acetonitrilo, correspondió al compuesto **1**.

Síntesis del 3-Fluor-1,2-fenilendiamina (9)



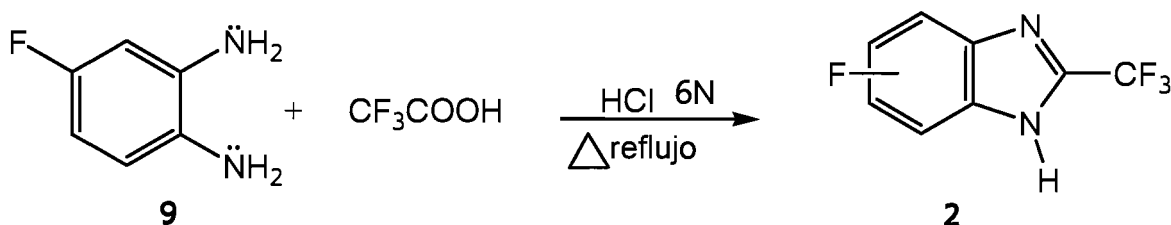
En un matraz bola de dos bocas 14/20 con capacidad de 50 mL acondicionado de un baño de hielo, agitación magnética y atmósfera de Nitrógeno, se colocaron 1 g (6.4053 mmol) de 3-Amino-2-nitrofluorobenceno **8**, 0.100 g del catalizador paladio-carbono (10%) y 4 mL de Metanol absoluto, se mezclaron homogéneamente bajo agitación magnética. A parte se disolvieron los 1.9130 g (29.46 mmol) de Formiato de amonio en 10 mL de Metanol, esta solución se adicionó lentamente a la mezcla de reacción, agitándola durante 15 minutos, en seguida se retiró el baño de hielo y se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación continua durante 1.3 h. Una vez que terminó el tiempo de reacción se filtró el catalizador y el disolvente se evaporó. El sólido obtenido se disolvió en 20 mL de Acetato de etilo, se lavó tres veces con 10 mL de solución saturada de Cloruro de sodio, la fase orgánica se secó y evaporó. De esta manera se obtuvo un sólido café rojizo que correspondió a la 3-Fluor-1,2-fenilendiamina **9** que mostró una sola mancha en CCF. Este producto crudo se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción.

Síntesis del 3-Fluor-1,2-fenilendiamina (9)



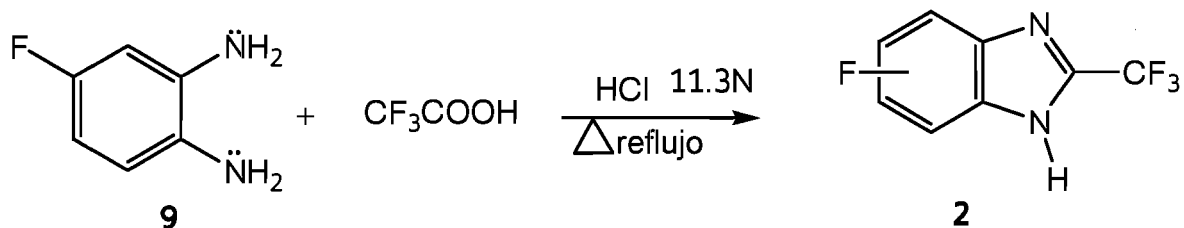
En un dispositivo especial para hidrogenación, se colocó 1 g (6.4053 mmol) de 3-Amino-2-nitrofluorobenceno **8** y 0.3 g de Niquel-Raney 5% disueltos en 100 mL de Metanol, se prehidrogenaron durante 15 minutos a 30-40 lb/plg² de presión, después se mantuvo siempre a 60 lb/plg² y agitación continua hasta que se consumieron 17 lb/plg² durante 2.4 h. Después, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó, de esta manera se obtuvo un sólido de color oscuro que correspondió a la 3-Fluor-1,2-fenilendiamina **9** que mostró una sola mancha en CCF. Este producto crudo se utilizó inmediatamente para la siguiente reacción.

Síntesis del 5(6)-Fluor-2(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)



En un matraz bola de una boca 14/20 con capacidad de 50 mL acondicionado con un refrigerante, un aparato de agitación magnética, un canasta de calentamiento y atmósfera de nitrógeno se colocaron 0.7472 g (5.9238 mmol) de 3-Fluor-1,2-fenilendiamina **9** y 0.7 mL (8.8856 mmol, 1.5 eq) de Ácido trifluoroacético, adicionando lentamente 3.3 mL de Ácido clorhídrico 6N, esta mezcla se mantuvo a reflujo durante 6 horas a 60 volt de operación del reostato. Durante la reacción y al término de la misma se tomó una CCF para observar la transformación de materia prima a producto. Trascurrido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, en seguida se agregó 15 mL de Acetato de etilo y se lavó con una solución de Bicarbonato de sodio al 1% hasta neutralizarla, la fase orgánica se secó y evaporó, el sólido obtenido se trató con Hidróxido de aluminio y se recristalizó de Benceno, correspondió al compuesto **2**.

Síntesis del 5(6)-Fluor-2(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)



En un matraz bola de una boca 14/20 con capacidad de 50 mL acondicionado con un refrigerante, un aparato de agitación magnética, un baño de silicón y atmósfera de nitrógeno se colocó la 3-Fluor-1,2-fenilendiamina **9** y 0.6 mL (7686 mmol, 1.2 eq) de Ácido trifluoroacético, adicionando lentamente 0.5 mL de Ácido clorhídrico 11.3 N, esta mezcla se mantuvo a reflujo durante 4 horas en un baño de silicon. Durante la reacción y al término de la misma se tomó una CCF para observar la trasformación de materia prima a producto. Trascurrido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, en seguida se agregó 15 mL de Acetato de etilo y se lavó con una solución de Bicarbonato de sodio al 1% hasta neutralizarla, la fase orgánica se secó y evaporó, el sólido obtenido se trato con Hidróxido de aluminio y se recristalizó de Benceno, correspondió al compuesto **2**.

Anexo 2.

Actividad antiprotozoaria

Consideraciones generales:

Preparación de los medios de cultivo.

Componentes

L-Cisteína marca Aldrich.

Fosfato de potasio dibásico marca J. T. Baker.

Fosfato de potasio monobásico marca J. T. Baker.

Citrato férrico de amonio marca Sigma.

Bilis bovina deshidratada marca Sigma.

Glucosa marca Sigma.

Mezcla vitamínica NTC marca Microlab.

Suero Hyclone de ternera inactivado a 36 °C durante 30 min.

Equipos

Potenciometro

Präzisions-pH-Meter-E510

Autoclave

Interamericana de equipos, S.A. de C.V. Hecho en México Printwell 1130

Filtros

Filtros de membrana Millipore MF poro 0.45 µm Lot No. R2KN70641 Hecho en Irlanda del Norte Rev 05100.

Refrigeración

Congelador Farma Scientific. Rango de operación -86 °C a -60 °C . Se mantuvo a 72 °C

Balanza Analítica

Santorius 2003 MP1 Capacidad max.166 g, d= 0.1 mg

Cultivo y conteo de protozoarios

Incubadora

Theico. Diseñada y manufacturada por Precisión Científica Inc., Modelo 5DG 115-150 volts. Temperatura ambiente +5 °C -7°C

Cámaras

Fria marca Kulnes 3 °C - 8 °C

Caliente marca Kulnes 37 °C - 40 °C

Campana de flujo laminar

HBB 2448 Holten

Granizadora

Scotsman

Microscopio

Invertido Zeiss Objetivo 10X/0.25 Ph1 440931 Acromat

Hemocitómetro

Neubauer elaborado por Marinfeld; Alemania. Profundidad 0.100mm.
Área 0.0025mm²

Frascos

Schott Duran; Alemania. Capacidad de 100 mL y 1000 mL

Tubos de vidrio

Con tapón rosca 16mm x 150 mm y 13mm x 120mm. Pyrex

Pipetas

Capacidad de 10, 5, 15 mL. Pyrex

Micropipetas

Pipetman Gilson. Francia. M 23923 N con capacidad de 10 μ L, 100 μ L, 500 μ L, 1000 μ L.

Programas Computacionales

Para elaborar las curvas de crecimiento de cada protozooario se utilizó el programa Microsoft Excel versión 2007.

Para obtener las concentraciones que inhiben el 50 y 90 % de crecimiento de cada protozooario se utilizó el programa estadístico PROBIT proporcionado por el Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario (CUIDA) Laboratorio de Control Biológico de Insectos. Universidad de Colima.

Compuestos de referencia

Albendazol marca Sigma

Metronidazol marca Sigma

Disolventes

Dimetilsulfóxido marca J.T. Baker

Mantenimiento de los aislados de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

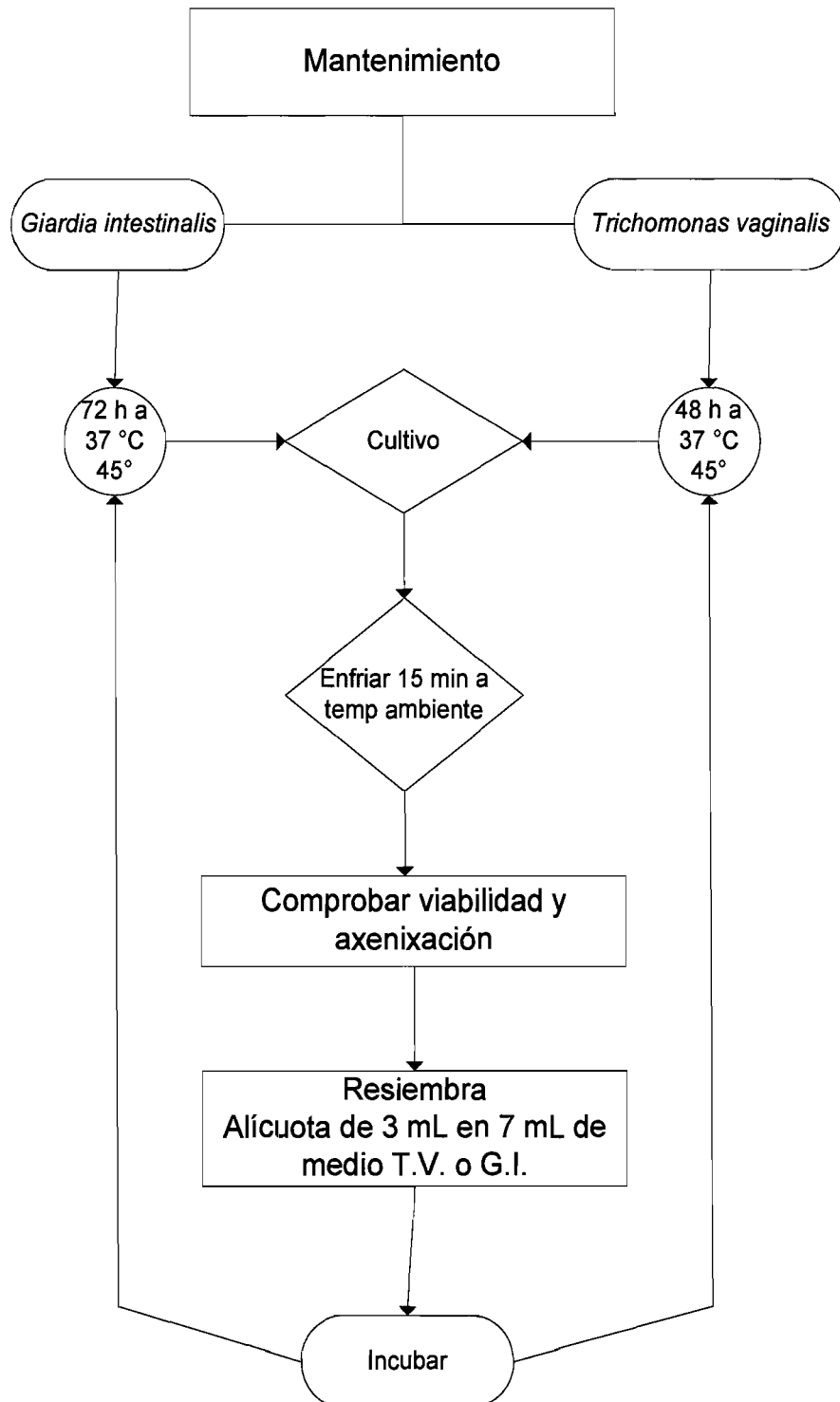
El **Esquema 20** muestra el procedimiento para el mantenimiento de los protozoarios. Cada aislado, se mantuvo en medio líquido TYI-S-33. Para los trofozoitos de *Giardia intestinalis* el medio líquido fue suplementado con 10 % de suero de ternera inactivado (GI). Para *Trichomonas vaginalis* el medio líquido se suplemento con una mezcla de suero de ternera inactivado al 10 % y una mezcla de vitaminas al 3% (TV).

Antes de realizar cada ensayo se analizó la viabilidad del cultivo de inicio mediante un microscopio invertido evaluando la adherencia de las células a las paredes del tubo, la morfología, la cantidad de células en división, la presencia o ausencia de células muertas (evidenciado por un botón en el fondo del tubo), la confluencia y la opacidad del medio.

La axenización se comprobó mediante la ausencia de crecimiento bacteriano al sembrar 10 µl de cada tubo en medio sólido de gelosa sangre, a 37 ° C durante 48 h.

Para realizar las resiembras de *Giardia intestinalis* se partió de un cultivo axénico y viable de 72 h a 37 ° C, se agitó y mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente, se tomó un inóculo de 3 mL y se colocó con 7 mL de medio fresco (GI), a 37 ° C durante 48 h a 45 ° de inclinación.

Para realizar las resiembras de *Trichomonas vaginalis* se partió de un cultivo axénico y viable de 48 h a 37 ° C, se agitó y mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente, se tomó un inóculo de 3 mL y se colocó con 7 mL de medio fresco (TV), a 37 ° C durante 48 h a 45 ° de inclinación.



Esquema 20. Diagrama del mantenimiento de los protozoarios *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

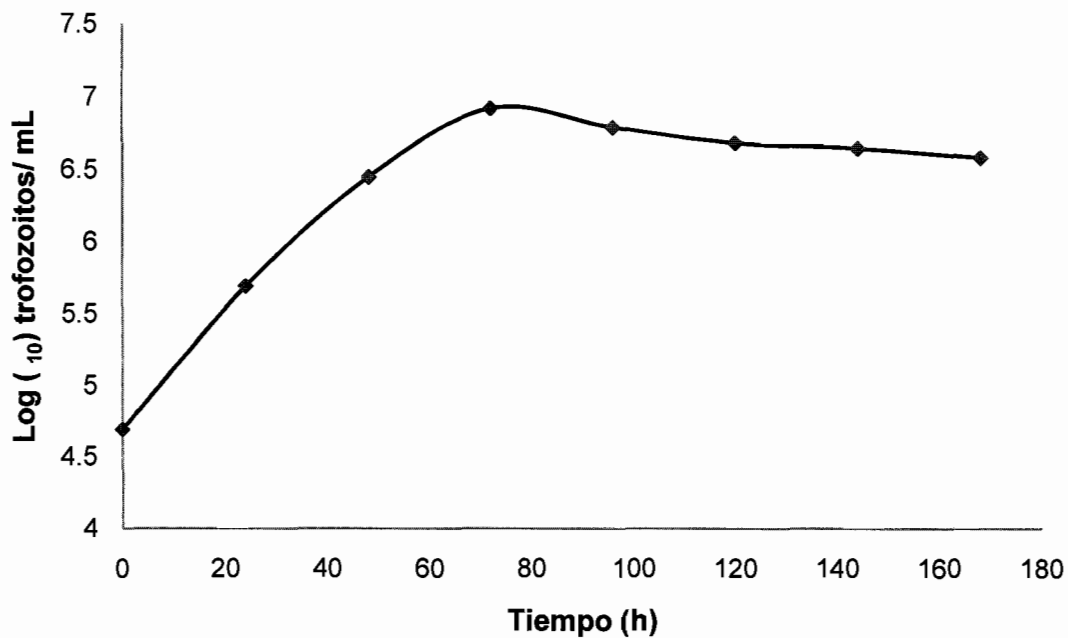
Elaboración de las cinéticas de crecimiento para *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

La cinética de crecimiento se determinó mediante el cultivo de un inóculo de 5×10^4 trofozoitos/mL de la cepa de *Giardia intestinalis* (IMSS:0989:1) y de 6×10^2 trofozoitos/mL para la cepa de *Trichomonas vaginalis* (GT3) en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL de medio (GI y TV), incubándolos a 37 °C. Posteriormente se realizó el conteo de trofozoitos mediante un hemocitómetro, cada 24 horas durante 7 días, se consideró que un trofozoito viable es aquel que conserva la forma, el tamaño y la motilidad característicos. Previo a cada conteo los tubos se enfriaron por 25 min en un baño de hielo-agua para separar a los trofozoitos de la pared del tubo. Cada cinética de crecimiento se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

Tabla 18. Datos utilizados para la elaboración de la curva de crecimiento de *Giardia intestinalis*.

Promedio Trofozoitos/mL	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b	Tiempo de incubación (h)	Promedio trofozoitos/mL (Log ₁₀)
50000	0	0	0	4.69
500000	10000	2	24	5.69
2800000	100000	3.571	48	6.447
8300000	0	0	72	6.919
6133333	208167	3.394	96	6.787
4800000	100000	2.083	120	6.681
4400000	100000	2.273	144	6.643
3800000	100000	2.632	168	6.579

^aDesviación estándar ^bCoefficiente de variación

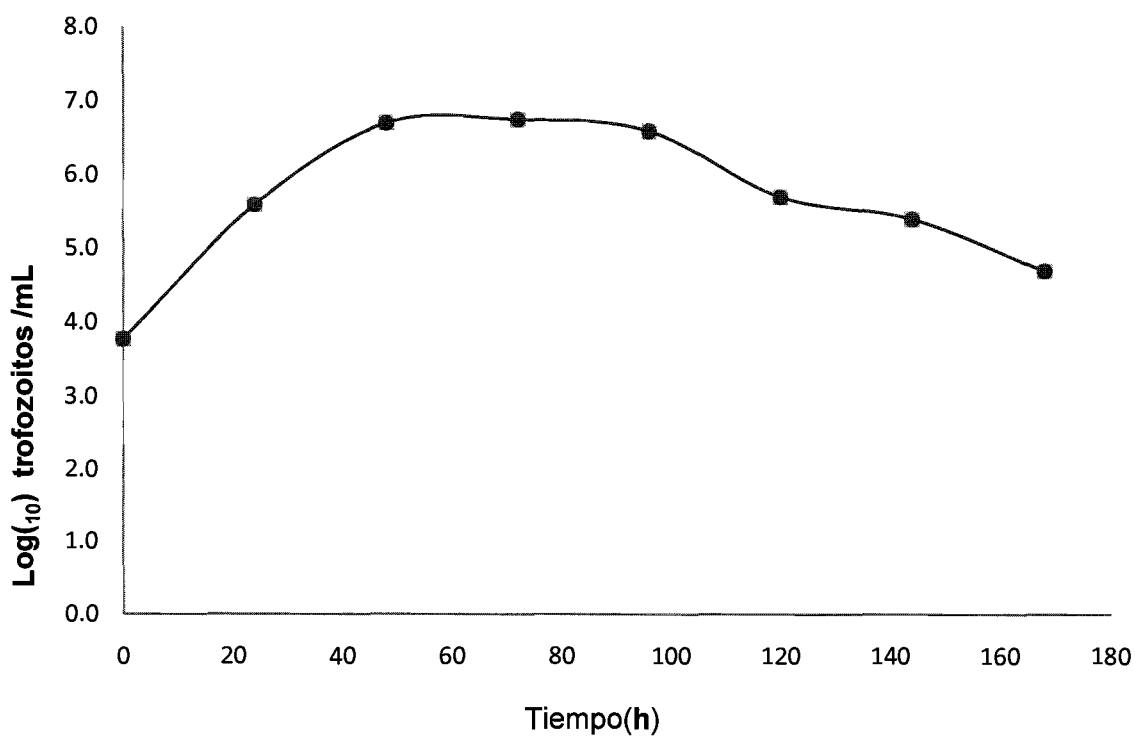


Gráfica 4. Curva de crecimiento de *Giardia intestinalis*.

Tabla 19. Datos utilizados para la elaboración de la curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*.

Promedio trofozoitos/mL	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b	Tiempo de incubación (h)	Promedio trofozoitos/mL (Log ₁₀)
6000	0	0	0	3.778
390000	0	0	24	5.591
5000000	200000	4	48	6.699
5600000	0	0	72	6.748
3900000	100000	2.56	96	6.591
500000	10000	2	120	5.699
250000	0	0	144	5.397
50000	0	0	168	4.699

^aDesviación estándar ^bCoefficiente de variación



Grafica 5. Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

Elaboración de las curvas estándar para *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Las curvas estándar de crecimiento se construyeron utilizando trofozoitos viables que se encontraban en fase exponencial de crecimiento. Se determinó el número de trofozoitos utilizando un hemocitómetro para establecer inóculos de 5×10^3 , 10×10^3 , 50×10^3 , 100×10^3 , 1000×10^3 trofozoitos/mL para *G. intestinalis* y 6 , 6×10^1 , 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 trofozoitos/mL para *T. vaginalis*. Se cultivaron en tubos de microcentrífuga con capacidad de 3 mL con medio TYI-S33 suplementado de acuerdo al protozooario, se incubaron a 37°C durante 48 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se enfriaron los tubos utilizando un baño de hielo-agua durante 25 min, se determinó el número de trofozoitos viables descartando los muertos, considerando que un trofozoito viable mantiene su motilidad, su tamaño, forma, volúmen, movimiento y refringencia característicos para cada uno de los dos protozoarios. Con estos datos se generó una gráfica del promedio de trofozoitos inoculados contra el número promedio de trofozoitos viables, obtenidos después de 48 h para cada protozooario. Se realizaron tres replicas y se repitió tres veces.

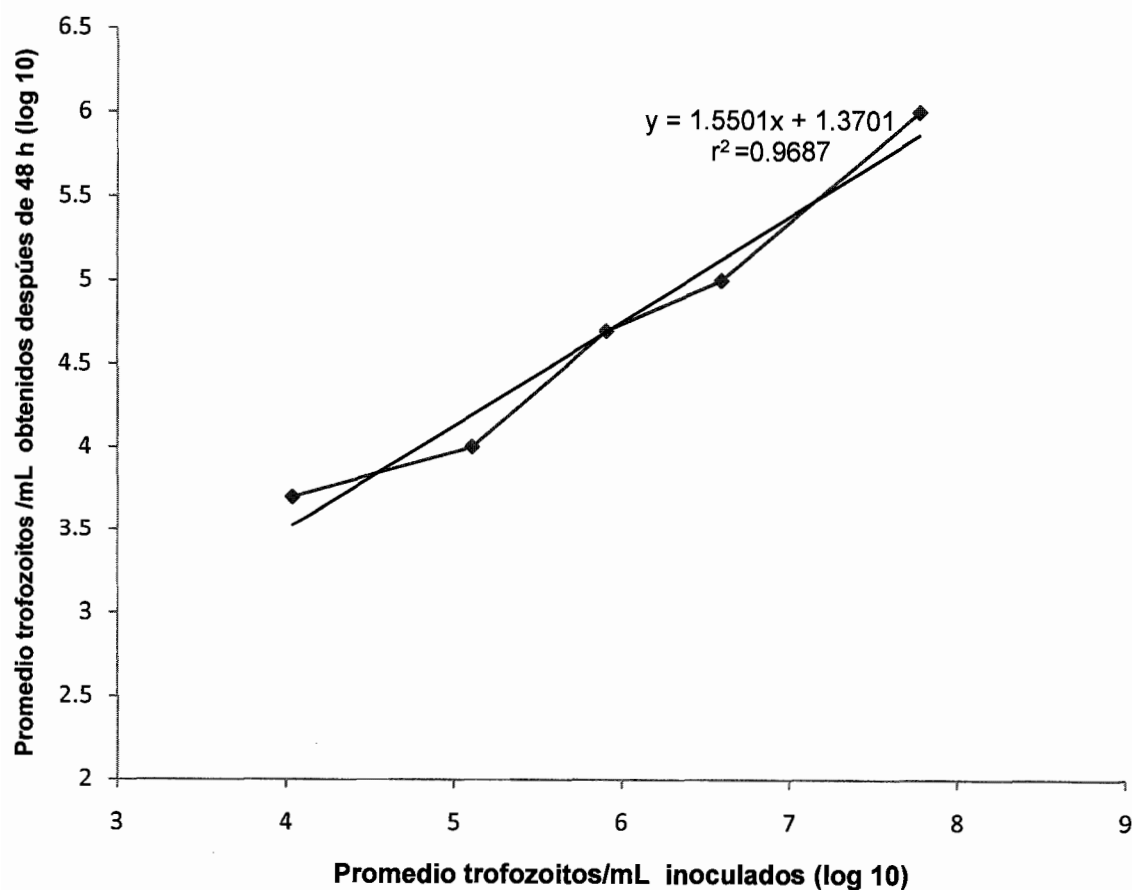
Tabla 20. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de *Giardia intestinalis*.

Promedio de trofozoitos inoculados	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b	Promedio de trofozoitos/mL obtenidos después de 48h	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b
5000	0	0	10831.000	0.000	0.000
10033	57.7350	0.5754	128320.667	0.577	0.004
50033	57.7350	0.1154	804822.297	0.006	0.000
100033	57.7350	0.0577	3907509.116	0.001	0.000
1000033	57.7350	0.0058	59992919.920	0.000	0.000

^aDesviación estándar ^bCoeficiente de variación ⁶⁸

Tabla 21. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de *Giardia intestinalis*.

Promedio trofozoitos inoculados (Log ₁₀)	Promedio trofozoitos/mL obtenidos después de 48h (Log ₁₀)
3.699	4.0347
4.000	5.1083
4.699	5.9057
5.000	6.5919
6.000	7.7781



Gráfica 6. Curva estándar de crecimiento de *Giardia intestinalis*.

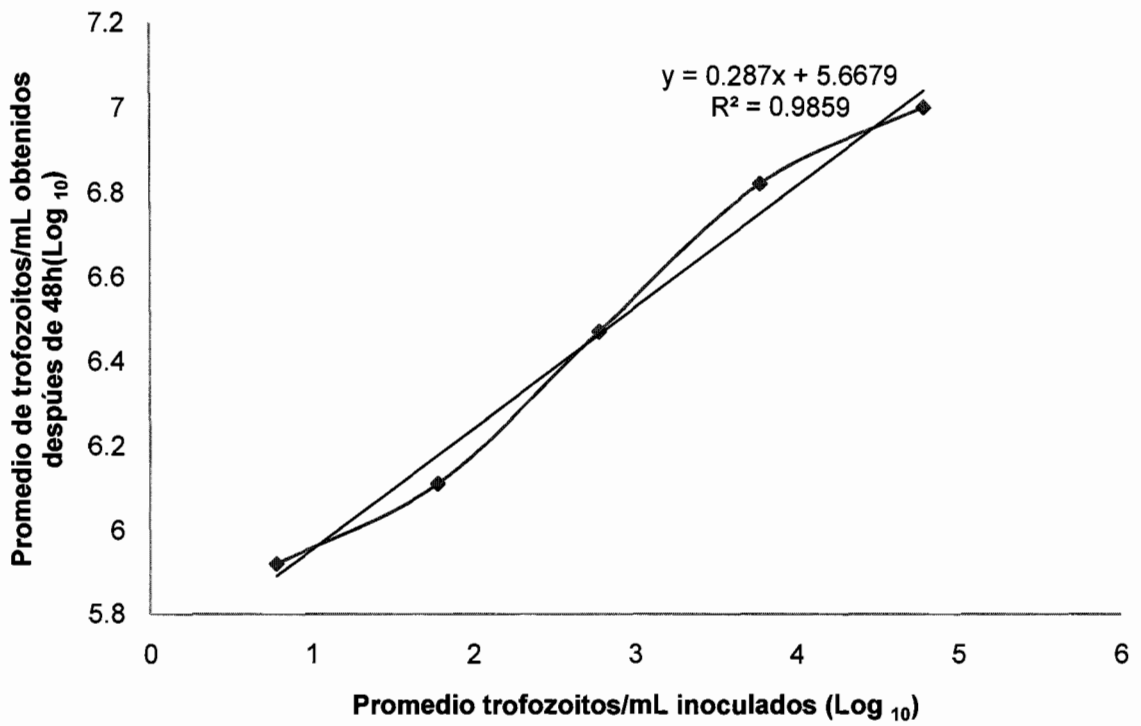
Tabla 22. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*.

Promedio de trofozoitos inoculados	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b	Promedio de trofozoitos/mL obtenidos después de 48h	Desviación estándar (σ) ^a	C.V. % ^b
61404.481	0.0162	2.6E-5	1000000	0	7
5997.910	0.0001	0	6606850	0.0004	6.820
599.791	0	0	2951350	0.0010	6.470
59.979	0	0	1288250	0	6.110
5.997	0	0	831764	0.0001	5.920

^aDesviación estándar ^bCoefficiente de variación ⁶⁸

Tabla 23. Datos utilizados para la elaboración de la curva estándar de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*

Promedio de trofozoitos/mL inoculados (Log ₁₀)	Promedio de trofozoitos/mL obtenidos después de 48h (Log ₁₀)
4.788	7.000
3.78	6.820
2.778	6.470
1.778	6.110
0.778	5.920



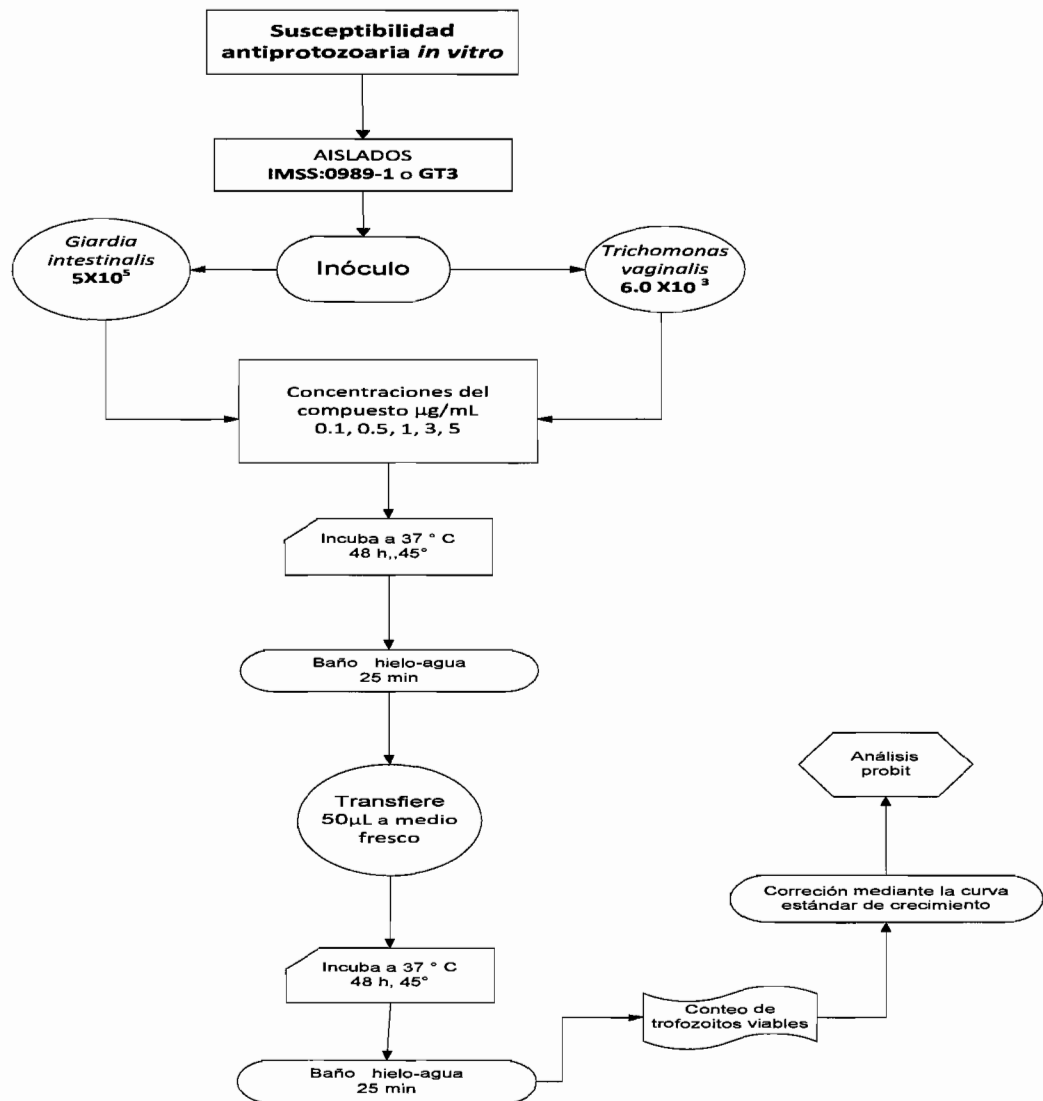
Gráfica 7. Curva estándar de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*.

Determinación de la susceptibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *Giardia intestinalis*.

Para este ensayo se utilizó el aislado axénico IMSS:0989-1 que se obtuvo a partir de individuos mexicanos que cursaban con Giardiosis de tipo crónico-asintomático obtenido por Cedillo y cols.⁵¹ Empleando concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 3, 5 µg/mL para cada compuesto, se cultivó un inóculo de 5×10^5 trofozoitos/mL de *Giardia intestinalis* que se encontraban en fase exponencial de crecimiento en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL, incubándolos durante 48 h a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación, se enfriaron los tubos mediante un baño de hielo-agua durante 25 min, posteriormente se colocaron 50 µL de esta suspensión en tubos con medio nuevo libre de compuesto para incubarlos durante 48h a 37 °C, al finalizar el tiempo de incubación, se enfriaron en un baño de hielo-agua durante 25 min. En seguida se determinó la cantidad de trofozoitos mediante un hemocitómetro, se estimó que un trofozoito viable es aquel que conserva la forma, el tamaño y la motilidad que caracteriza a este parásito. Se utilizó como control negativo a los trofozoitos de *G. intestinalis* en medio libre de compuesto, y control positivo a los trofozoitos con Albendazol y Metronidazol. El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado considerando como 100% de replicación el número de trofozoitos que se contó en el cultivo control que fue corregido con la curva estándar. Mediante el análisis Probit se calculó la concentración que inhibe al 50% de la población (CI_{50}). Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

Determinación de la susceptibilidad *in vitro* de los protozoarios mediante el método de subcultivo.

Para la determinación de la susceptibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* se muestra el siguiente esquema general (Esquema 21).



Esquema 21. Determinación de la susceptibilidad in vitro mediante el método de subcultivo.

Determinación de la susceptibilidad *in vitro* de los trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*.

En este experimento se utilizó el aislado axénico GT3 obtenido a partir de fluidos vaginales de pacientes con Trichomoniosis vaginal sintomática. Empleando concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 3, 5 $\mu\text{g/mL}$ para cada compuesto, se cultivó un inóculo de 6.0×10^3 trofozoitos/mL de *T. vaginalis* que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL, incubándolos durante 48 h a 37 ° C. Terminado el tiempo de incubación se enfriaron los tubos mediante un baño de hielo-agua durante 30 min, posteriormente se colocaron 50 μL de esta suspensión en tubos con medio nuevo libre de compuesto para incubarlos durante 48 h a 37 ° C. Al finalizar el tiempo de incubación, se enfriaron en un baño de hielo-agua durante 30 min. En seguida se determinó la cantidad de trofozoitos mediante un hemocitómetro, se estimó que un trofozoito viable es aquel que conserva la forma, el tamaño y la motilidad que caracteriza a este parásito. Se utilizó como control negativo a los trofozoitos en medio libre de compuesto, y control positivo a los trofozoitos con Albendazol, Metronidazol. El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado considerando como 100 % de replicación el número de trofozoitos que se contó en el cultivo control que fue corregido con la curva estándar. Mediante el análisis Probit se calculó la concentración que inhibe al 50 % de la población (CI_{50}). Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

Medios de Cultivo

Medio de cultivo TYI-S33 para *Giardia intestinalis* suplementado con bilis bovina.

Compuesto	g/L
Cloruro de Sodio	2
Fosfato de potasio dibásico.	1.0
Fosfato de potasio monobásico.	0.6
Tripticasa.	20
Extracto de Levadura.	10
Glucosa.	10
L-Cisteina.	2
Ácido ascórbico.	0.2
Citrato férrico de amonio.	22.8
Bilis bovina deshidratada.	0.8
Agua bidestilada	900 mL
Suero de ternera inactivado	100 mL
Solución stock de penicilina	1 mL
Estreptomina	0.5

Para preparar este medio de cultivo se disolvieron todos sus componentes en 800 mL de agua bidestilada estéril. Posteriormente se ajustó el pH a 7-7.2 con Hidróxido de Sodio 1.0 N y se aforo a 900 mL. Se filtro en membrana de 0.45 μ m de diámetro de poro. Se esterilizó en autoclave y se realizó la prueba de esterilidad por incubación del volumen total a 37 °C por 8-14 h. Se completó con 100 mL de suero de ternera inactivado, 1mL de solución stock de penicilina (50,000 U.I.) y 50 mg de estreptomina. Para realizar los ensayos se evitó el uso de cualquier antibiótico. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.^{51,52}

Medio de cultivo TYI-S33 para *Trichomonas vaginalis*.

Compuesto	g/L
Cloruro de Sodio	2.0
Fosfato de potasio dibásico.	1.0
Fosfato de potasio monobásico.	0.6
Tripticasa.	20.0
Extracto de Levadura.	10.0
Glucosa.	10.0
L-Cisteina.	1.0
Ácido ascórbico.	0.2
Citrato férrico de amonio.	22.8
Agua bidestilada.	900 mL
Suero de ternera inactivado	100 mL
Stock de penicilina.	1mL
Estreptomina.	0.5

Para preparar este medio de cultivo se disolvieron todos sus componentes en 800 mL de agua bidestilada estéril. Posteriormente se ajustó el pH a 6.8 con Hidróxido de Sodio 1.0 N y se aforo a 900 mL. Se filtro en membrana de 0.45 μ m de diámetro de poro. Se esterilizó en autoclave y se realizó la prueba de esterilidad por incubación del volumen total a 37 ° C por 8-14 h. Se completó con 100 mL de suero de ternera inactivado, 1 mL de solución stock de penicilina (50,000 U.I.) y 50 mg de estreptomina. Además se suplementó con 3% de vitaminas. Para realizar los ensayos se evitó el uso de cualquier antibiótico. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.^{51,52}

Solución amortiguadora de Fosfatos-salina (PBS), stock 10X

Compuesto	g/L
Cloruro de sodio	80.0
Cloruro de potasio.	2.0
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado.	21.7
Fosfato de potasio monobásico	2.0

Para preparar 1 L de la solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS), se disolvieron todos los componentes en 800 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1 litro. Se esterilizó en autoclave antes de su uso.

Aplicación del Análisis de Varianza (ANOVA) sobre el estudio de la actividad biológica antiprotozoaria y citotóxica de los compuestos 1- 5.

Tabla 24. Arreglo de datos para k muestras con igual número de tamaño

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra k
	A_{11}	A_{12}	A_{1k}
	A_{21}	A_{22}	A_{2k}
	A_{n11}	A_{n22}	A_{nk}
Totales	T_1	T_2	T_k
Promedios	\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_k
Gran Total= T			
Gran Promedio= \bar{A}			

Tabla 25. Análisis de Varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados o varianza	$F_{0.95}(k-1, N-k)$
Total	$S.S = \sum_{i=1}^k A_i^2 - T^2/(n_1+n_2+n_k)$	$n_1+n_2+\dots+n_k-1$	$MSTr = S.S.T/(k-1)$	
Entre tratamientos	$S.S.T = T_1^2/n_1 + T_2^2/n_2 + T_k^2/n_k - T^2/(n_1+n_2+n_k)$	$(k-1)$		$MSTr / MSE =$
Dentro de las muestras	$S.S.E = S.S - S.S.T$	$(n_1+n_2+\dots+n_k-k)$	$MSE = S.S.E/(n_1+n_2+n_k-k)$	

S.S: Suma total de cuadrados, S.S.T: Suma de cuadrados de los tratamientos, S.S.E: Suma de cuadrados residual o del error, MSTr: Cuadrado medio tratamiento, MSE: Cuadrado medio residual

Análisis estadístico de la actividad giardicida.

Tabla 26. Arreglo de datos.

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 5
	1.7914	0.4984	0.4030	0.4993
	1.7914	0.4981	0.4449	0.4993
	1.7914	0.4981	0.4028	0.4993
Totales	5.3743	1.4946	1.2508	1.4979
Promedios	1.7914	0.4982	0.4169	0.4993
Gran Total=9.6176				
Gran Promedio=0.8015				

Con respecto al valor promedio de Cl_{50} μ M de los derivados **1, 2, 3, y 5** se plantea lo siguiente:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_5$

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_5$

Tabla 27. Análisis de varianza para los compuestos **1- 3, 5** con respecto a su actividad giardicida

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados o varianza	F0
Total	3.9342	11		
Tratamientos	3.9335	3	MSTr=1.3111	MSTr/MSE= 14984
Error o residual	0.0007	8	MSE=8.75E-5	

Criterio de decisión: Si $F_0 > F_{(0.05,3,8)}$; Se rechaza H_0

Conclusión: $F_0: 14984 > F_{(0.05,3,8)} 4.07$

Por lo tanto se rechaza H_0 , existe diferencia estadística significativa entre los valores Cl_{50} μ M de los compuestos **1, 2, 3, 5** con respecto a su actividad giardicida.

Tabla 28. Arreglo de datos.

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 5	ABZ
	1.7914	0.4984	0.4030	0.4993	0.034
	1.7914	0.4981	0.4449	0.4993	0.034
	1.7914	0.4981	0.4028	0.4993	0.034
Totales	5.3743	1.4946	1.2508	1.4979	0.102
Promedios	1.7914	0.4982	0.4169	0.4993	0.034
Gran Total=9.7196					
Gran Promedio=0.6562					

Con respecto al valor promedio de CI_{50} μ M de los derivados **1, 2, 3, 5** y **ABZ** se plantea lo siguiente:

Ho: $\mu_1=\mu_2=\mu_3=\mu_5=\mu_{ABZ}$

Ha: $\mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq\mu_5\neq\mu_{ABZ}$

Tabla 29. Análisis de varianza para los compuestos **1-3, 5** y **ABZ** con respecto a su actividad giardicida

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados o varianza	F0
Total	5.3447	14		
Tratamientos	5.3471	4	MSTr=1.336	MSTr/MSE= 5569.8
Error o residual	0.0024	10	MSE=2.4E-4	

Criterio de decisión: Si $F_0 > F_{(0.05,3,8)}$; Se rechaza Ho

Conclusión: $F_0: 5569.8 > F_{(0.05,4,10)} 3.48$

Por lo tanto se rechaza Ho, existe diferencia estadística significativa entre los valores CI_{50} μ M de los compuestos **1, 2, 3, 5** y **ABZ** con respecto a su actividad giardicida.

Aplicación de la prueba t *Student***Tabla 30.** Arreglo de datos utilizados para determinar la t *Student*

Muestra k	Número de observaciones	Media	Desviación estándar σ	Grados de libertad	Nivel de significación
Compuesto 2	n_1	\bar{A}_1	σ_1	n_1+n_2-2	0.05 (95%)
Compuesto 5	n_2	\bar{A}_2	σ_2		

Cálculo T experimental

$$T_{\text{exp}} = (\bar{A}_1 - \bar{A}_2) / s[(1/n_1) + (1/n_2)]^{-1/2}$$

Donde:

Cálculo de σ :

$$\sigma^2 = (n_1 - 1) \sigma_1^2 + (n_2 - 1) \sigma_2^2 / gL \quad ; \quad \sigma = (\sigma^2)^{-1/2}$$

donde:

gL: grados de libertad σ^2 =varianza

T teorica (gl, 0.05)

Cálculo de la prueba *t student* sobre el estudio de la actividad giardicida de los compuestos **2 y 5**

Con respecto al valor promedio de CI_{50} μ M de los derivados **2 y 5** se plantea lo siguiente:

Ho: $\mu_2 = \mu_5$

Ha: $\mu_2 \neq \mu_5$

Tabla 31. Prueba *t student*

Muestra k	Número de observaciones	Media	Desviación estándar	Grados de libertad	Nivel de significación
Compuesto 2	3	0.4982	1.7320E-4	4	0.05 (95%)
Compuesto 5	3	0.4993	0		

$t_{exp} = -10.997$

Criterio de decisión

Si $t_{experimental} > t_{teorica}$; Se rechaza Ho

Conclusión:

$t_{experimental}: 10.997 > t_{teorica}: 2.776$

Por lo tanto se rechaza Ho, existe diferencia estadística significativa entre los valores CI_{50} μ M de los compuestos **2 y 5** con respecto a su actividad giardicida.

Análisis estadístico de la Actividad tricomonocida

Tabla 32. Arreglo de datos .

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 5	ABZ
	3.3090	2.8242	3.6472	3.1709	2.2315
	3.3090	2.8242	3.6472	3.1360	2.2315
	3.3090	2.8242	3.6472	3.1360	2.2315
Totales	9.927	8.4648	10.9416	9.4429	6.6945
Promedios	3.3090	2.8216	3.6472	3.1476	2.2315
Gran Total=45.4708					
Gran Promedio=9.0941					

Con respecto al valor promedio de CI_{50} μM de los derivados **1, 2, 3, 5** y **ABZ** se plantea lo siguiente:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_5 = \mu_{ABZ}$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_5 \neq \mu_{ABZ}$

Tabla 33. ANOVA para los compuestos **1-3, 5** y **ABZ** con respecto a su actividad tricomonocida

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados o varianza	F0
Total	3.5058	14		
Tratamientos	3.4609	4	MSTr=0.8652	MSTr/MSE= 192.7
Error o residual	0.0449	10	MSE=0.00449	

Criterio de decisión: Si $F_0 > F_{(0.05,4,10)}$; Se rechaza Ho

Conclusión: $F_0: 192.7 > F_{(0.05,4,10)} 3.48$

Por lo tanto se rechaza Ho, existe diferencia estadística significativa entre los valores CI_{50} μM de los compuestos **1, 2, 3, 5** y **ABZ** con respecto a su actividad tricomonocida.

Anexo 3.

Actividad citotóxica

Consideraciones generales

Medio de Cultivo

RPML-1640 sin L-glutamina ni Bicarbonato de Sodio Marca SIGMA

Bilis bovina deshidratada marca Sigma

Equipos

Contador de centelleo Líquido

Liquid scintillation Counter Marca LKB Wallac 1209 Rackbeta

Microscopio

Invertido Zeiss Objetivo 10X/0.25 Ph1 440 Acromat

Hemocitómetro

Neubauer elaborado por Marinfeld; Alemania. Profundidad 0.100mm. Área
0.0025mm²

Balanza Analítica

Sartorius 2003 MP1 Capacidad max.166 g, d= 0.1 mg

Incubadora de CO₂

Marca JP Selecta 5-50 ° C

Reactivos

Omnifluor 100 g marca PerkinElmer

Tritón X 100 marca Aldrich

Ácido tricloroacético (CCl₃COOH) Marca Sigma

Ficoil Hypaque d=1.077g/mL marca Beckman Coulter

Frascos y Tubos

Tubos de poliestireno para cultivo con tapa 12 X 75 mm marca Elkay E.U.A.

Micropipetas

Pipetman Gilson .Francia. M 23923 N con capacidad de 10 µL, 100 µL, 500 µL,
1000 µL

Schott Duran; Alemania. Capacidad de 100 mL y 1000 mL

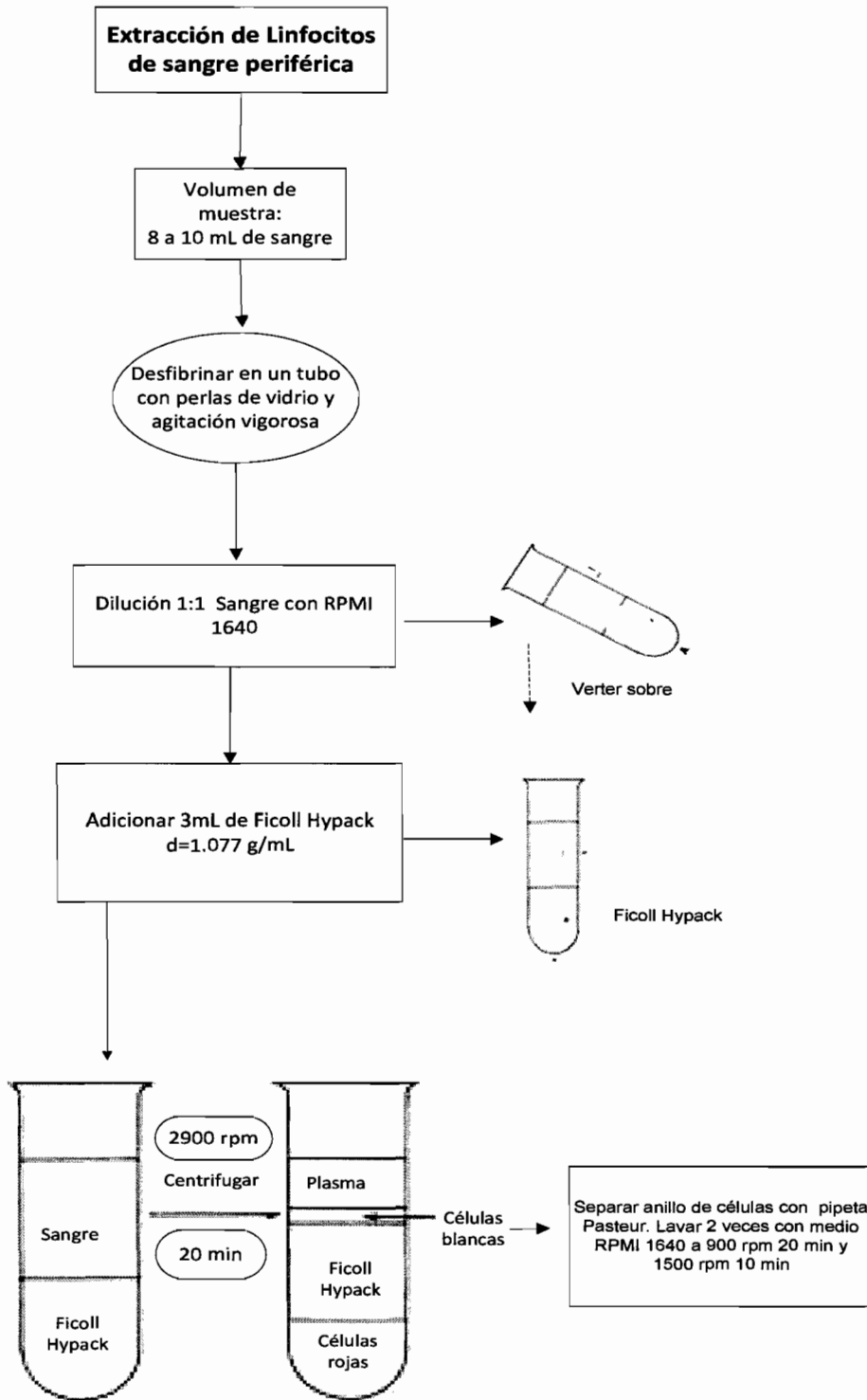
Viales de borosilicato 20 mL para contador de centelleo

Pipeta Pasteur de vidrio

Obtención y aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Las muestras de sangre utilizadas para cada ensayo se extrajeron por punción venosa sin anticoagulante, de donador sano que no habían ingerido medicamentos por lo menos 15 días antes de la toma de la muestra. En condiciones de esterilidad, la sangre se desfibrinó, se diluyó 1:1 con medio RPMI-1640 y se centrifugó sobre 3 mL de Ficoll-Hypaque ($d=1.077$ g/mL) en tubos de poliestireno estériles a 2900 rpm durante 20 min. El anillo formado por los linfocitos se extrajo con pipeta Pasteur, se lavó dos veces con medio RPMI-1640 a 900 y 1500 rpm durante 20 y 10 min respectivamente. Se resuspendieron con medio RPMI-1640 (**Esquema 22**).

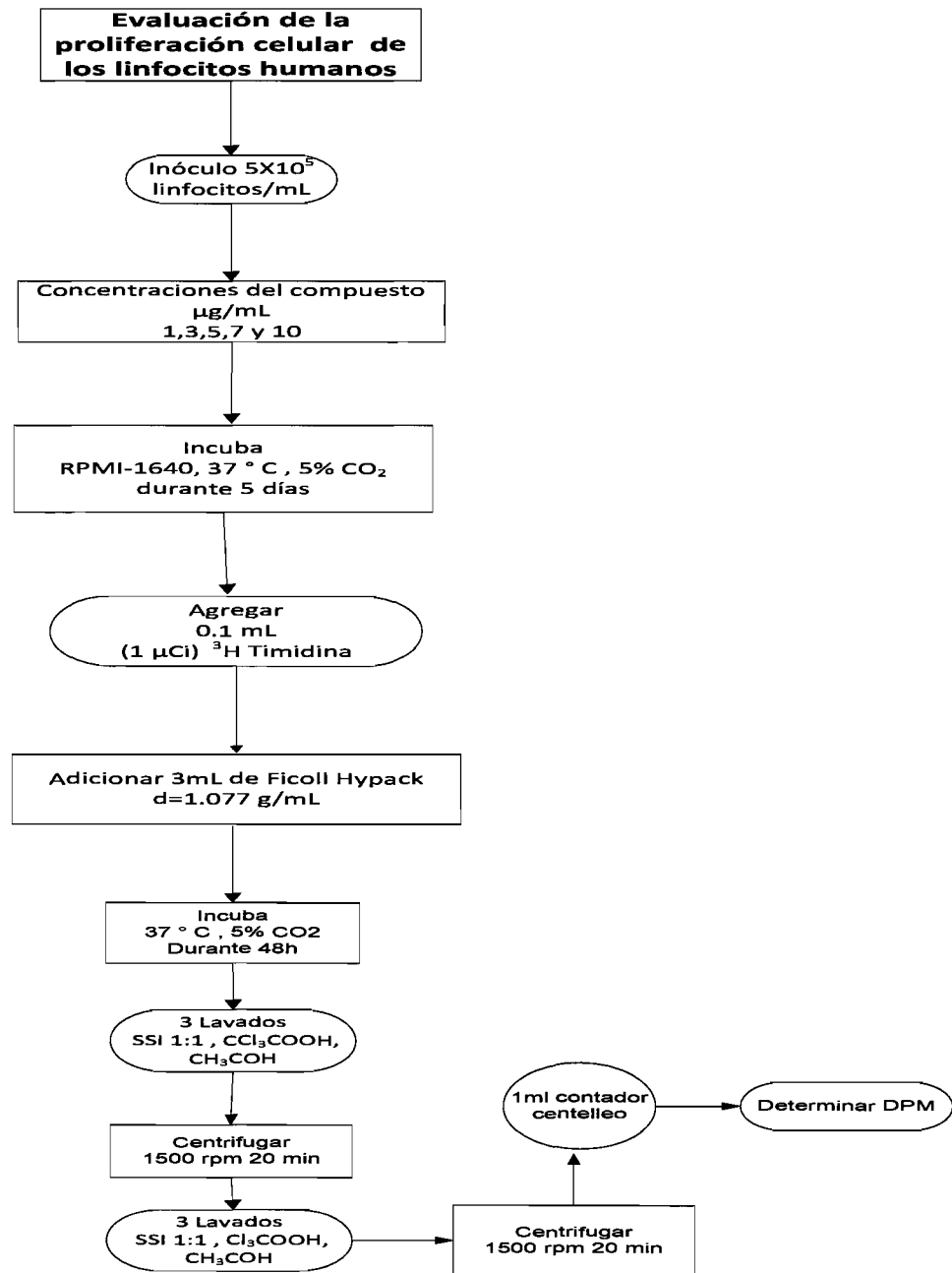
Para determinar su viabilidad se tomaron 0.9 mL de esta suspensión y se agregó 0.1 mL de azul tripano al 0.5% en NaCl al 0.85% se determinó el número de células totales utilizando un hemocitómetro.



Esquema 22. Obtención y aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Evaluación de la proliferación celular de linfocitos humanos por incorporación de Metiltimidina tritiada

En condiciones de esterilidad se incubó una alícuota de 5×10^5 linfocitos/mL a concentraciones de 1, 3, 5, 7 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para cada compuesto. En tubos de poliestireno estériles en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de bovino, se incubaron en presencia de 5% de CO_2 a 37°C durante 5 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación se agregó a cada tubo 0.1mL equivalentes a 1 μCi de [^3H timidina], incubándolos durante 48 h a 37°C y 5% CO_2 . Al concluir el tiempo de incubación, se cosecharon las células; realizando tres lavados con 2 mL de solución salina isotónica, una mezcla 1:1 de agua/Ácido tricloroacético y metanol. Cada lavado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min, fue desechado el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en la mezcla correspondiente. Al final del último lavado se colocó en un vial de contador con 1ml de líquido de centelleo y se determinó la incorporación de timidina [^3H] en un contador de centelleo líquido. Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió tres veces (**Esquema 23**).



Esquema 23. Determinación de la proliferación celular de linfocitos humanos por incorporación de Metiltimidina tritiada.

Aplicación del Análisis de varianza (ANOVA) sobre el estudio de la actividad citotóxica de los compuestos 1- 5

Tabla 34. Arreglo de datos para k muestras con igual número de tamaño

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra k
	A_{11}	A_{12}	A_{1k}
	A_{21}	A_{22}	A_{2k}
	A_{n11}	A_{n22}	A_{nk}
Totales	T_1	T_2	T_k
Promedios	\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_k
	Gran Total= T		
	Gran Promedio= \bar{A}		

Tabla 35. Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados o varianza	$F_{0.95}(k-1, N-k)$
Total	$S.S = \sum A^2_{i1} + \sum A^2_{i2} + \dots + \sum A^2_{ik} - \frac{T^2}{(n_1+n_2+n_k)}$	$n_1+n_2+\dots+n_k-1$	$MSTr = S.S.T / (k-1)$	$MSTr / MSE =$
Entre tratamientos	$S.S.T = T_1^2/n_1 + T_2^2/n_2 + T_k^2/n_k - T^2/(n_1+n_2+n_k)$	$(k-1)$		
Dentro de las muestras	$S.S.E = S.S - S.S.T$	$(n_1+n_2+\dots+n_k-k)$	$MSE = S.S.E / (n_1+n_2+n_k-k)$	

S.S: Suma total de cuadrados, S.S.T: Suma de cuadrados de los tratamientos, S.S.E: Suma de cuadrados residual o del error, MSTr: Cuadrado medio tratamiento, MSE: Cuadrado medio residual

Análisis estadístico de la actividad citotóxica de los valores de CI_{50} μM

Tabla 36. Arreglo de datos.

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5	ABZ
	21.056	21.78	22.211	4.405	23.885	16.602
	21.056	21.78	22.211	4.446	23.885	16.756
	21.056	21.78	22.211	4.446	23.885	16.779
Totales	63.168	65.34	66.633	12.942	71.655	50.137
Promedios	21.056	21.78	22.211	4.314	23.855	16.712
Gran Total= 329.875						
Gran Promedio= 18.321						

Con respecto al valor promedio de CI_{50} μM de los derivados 1- 5 y ABZ se plantea lo siguiente:

Ho: $\mu_1=\mu_2=\mu_3=\mu_4=\mu_5=ABZ$

Ha: $\mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq\mu_4\neq\mu_5\neq ABZ$

Tabla 37. Análisis de varianza para los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados o varianza	F0
Total	796.055	16		
Tratamientos	792.937	5	MSTr=158.587	
Error o residual	3.118	12	MSE=0.259	MSTr/MSE=610.421

Criterio de decisión: Si $F_0 > F_{(0.05,5,12)}$; Se rechaza Ho

Conclusión: $F_0: 610 > F_{(0.05,5,12)} 3.11$

Por lo tanto se rechaza Ho, existe diferencia estadística significativa entre los valores CI_{50} μM de los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.

Análisis estadístico de la actividad citotóxica de los valores de CI_{90} μM

Tabla 38. Arreglo de datos .

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5	ABZ
	82.130	84.955	86.638	79.073	93.166	65.737
	82.130	84.955	86.618	78.601	93.166	65.360
	82.130	84.955	86.638	78.620	93.144	65.254
Totales	246.391	254.864	259.894	236.292	279.477	196.351
Promedios	82.130	84.955	86.631	78.764	93.159	65.450
Gran Total= 1,473.270						
Gran Promedio= 81.848						

Con respecto al valor promedio de CI_{50} μM de los derivados 1- 5 y ABZ se plantea lo siguiente:

Ho: $\mu_1=\mu_2=\mu_3=\mu_4=\mu_5=ABZ$

Ha: $\mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq\mu_4\neq\mu_5\neq ABZ$

Tabla 39. Análisis de varianza para los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados o varianza	F0
Total	1317.264	17		
Tratamientos	1316.888	5	MSTr=263.377	MSTr/MSE= 263.377/0.03129=8417.28
Error o residual	0.375	12	MSE=0.0312	

Criterio de decisión: Si $F_0 > F_{(0.05,5,12)}$; Se rechaza Ho

Conclusión: $F_0: 610 > F_{(0.05,5,12)} 3.11$

Por lo tanto se rechaza Ho, existe diferencia estadística significativa entre los valores CI_{90} μM de los compuestos 1-5 y ABZ con respecto a su actividad citotóxica.

Anexo 4.

Espectros

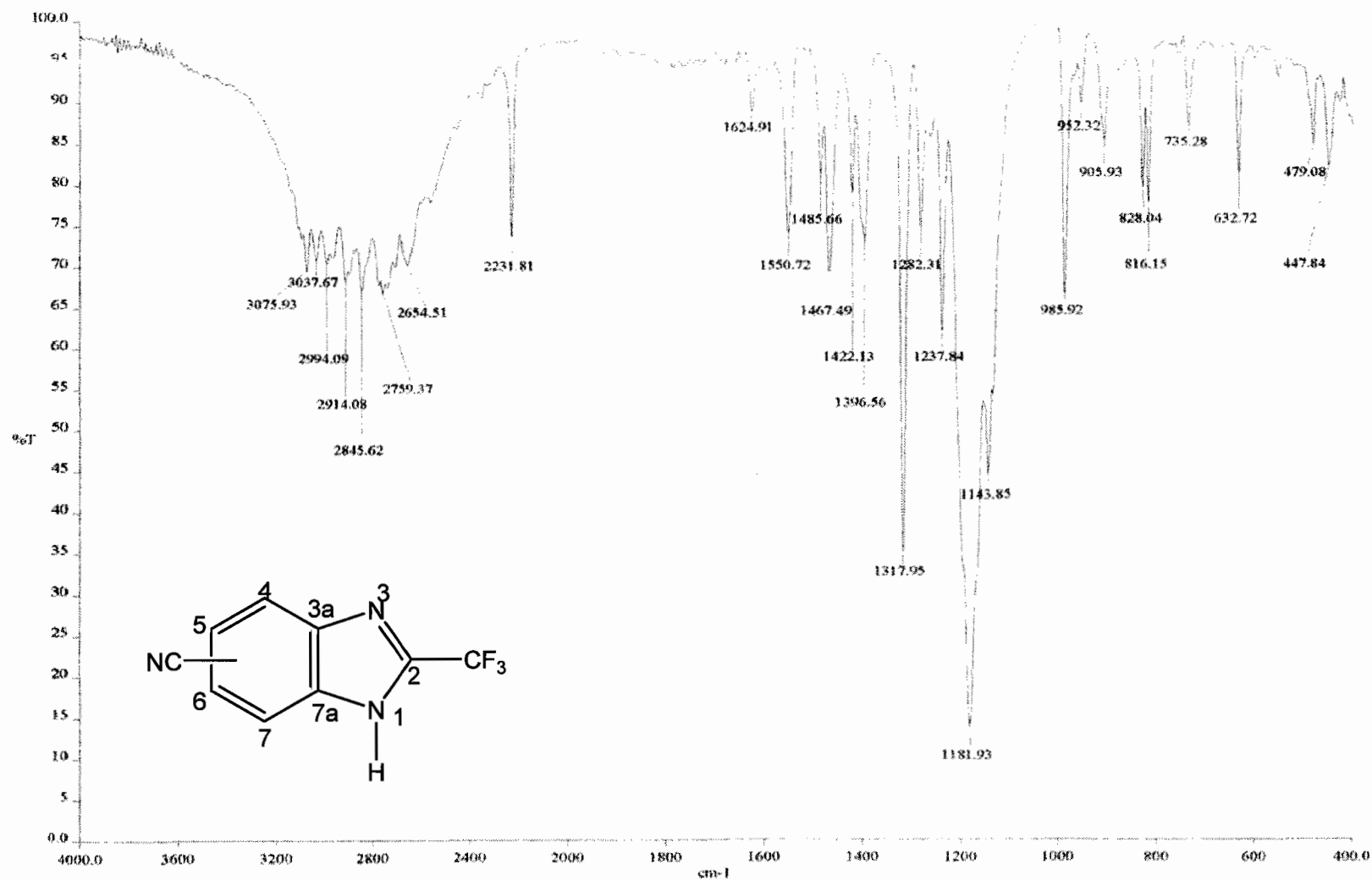
Consideraciones Generales

Instrumentación.

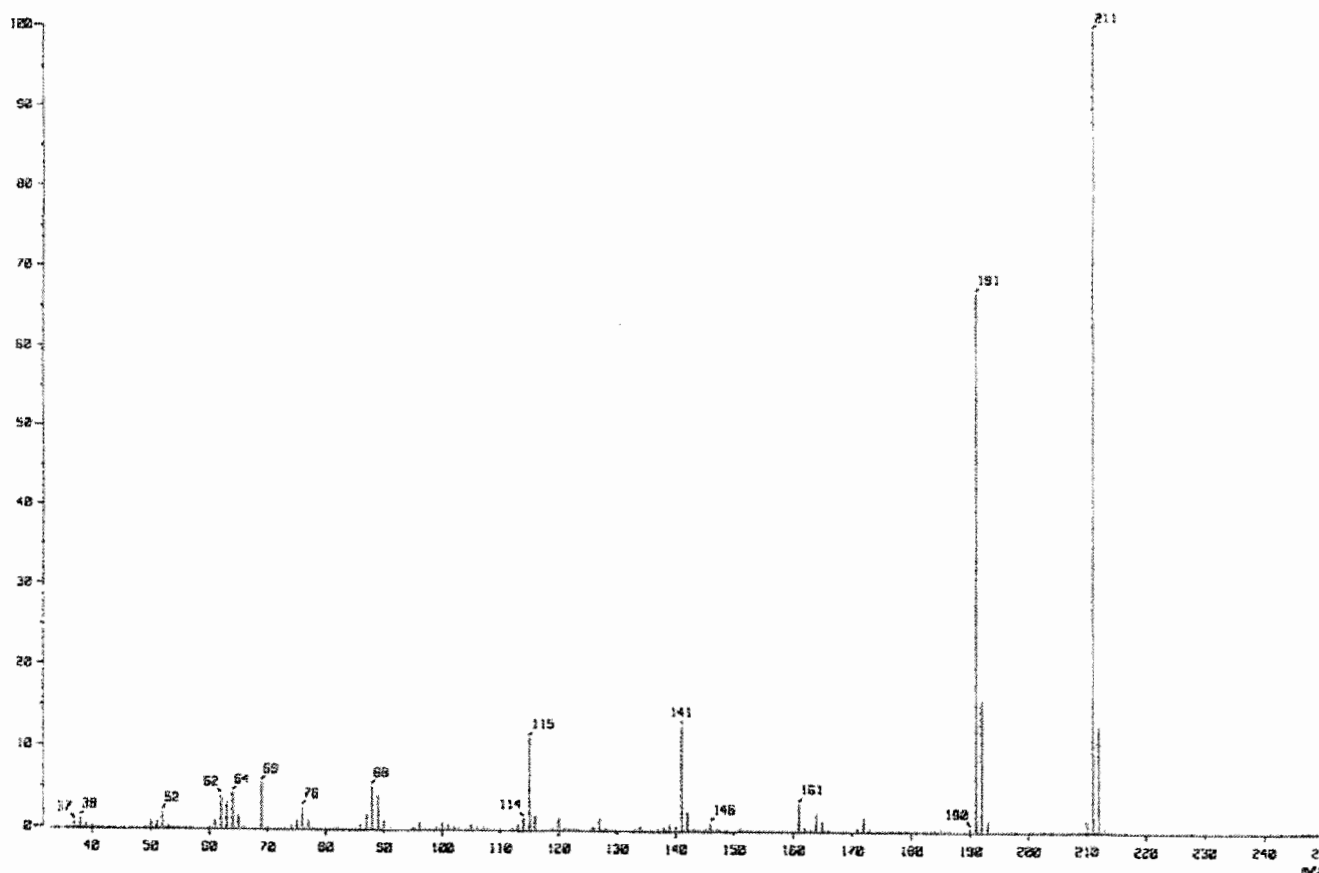
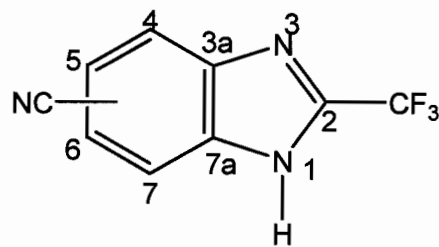
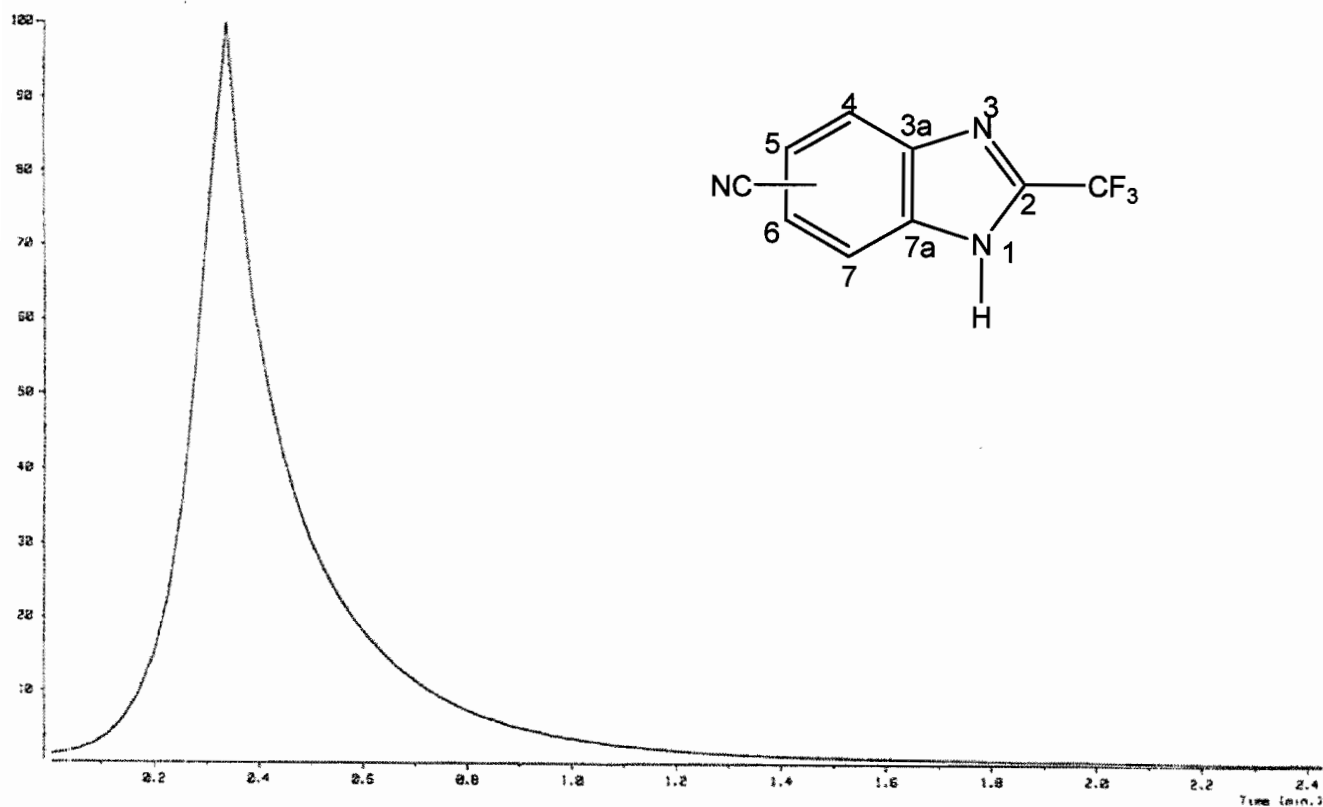
Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en pastilla de bromuro de potasio (KBr) con un espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo FT-IR-1605, las señales se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo acoplado cromatografía de Gases-Espectroscopia de Masas con las siguientes características: Cromatógrafo de Gases marca JEOL Modelo SX-102-A. Se utilizó la técnica de ionización por Impacto Electrónico (IE) a 70 eV. Se reporta la relación masa/carga (m/z), el ion molecular, $[M^+]$, y Pb pico base.

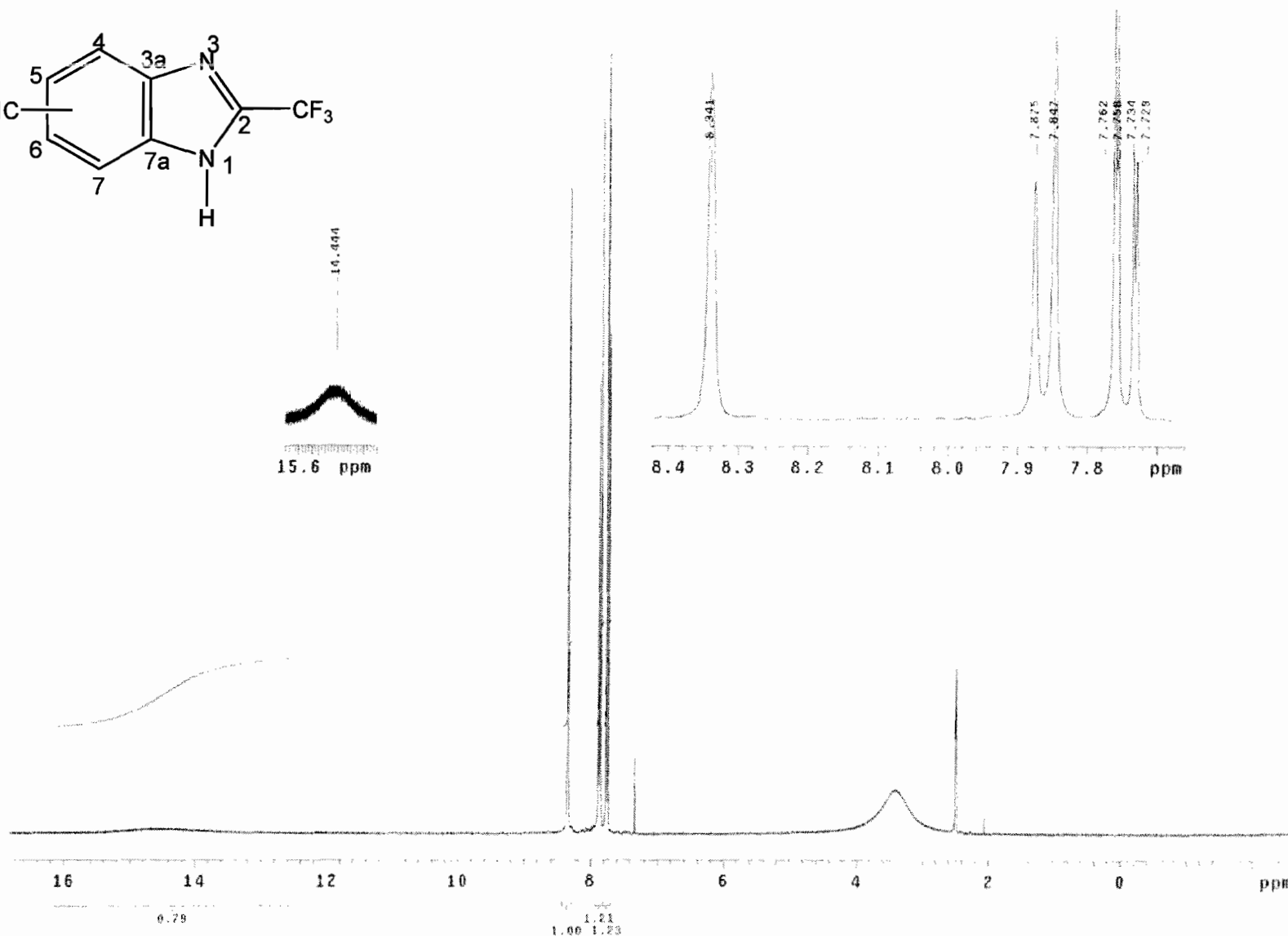
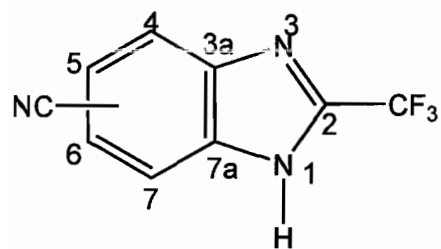
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno que opera a 300 MHz se realizaron en un equipo Varian Modelo Unity Inova. Para ambos casos se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO)- d_6 como disolvente y como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS), el desplazamiento químico (δ) esta expresado en partes por millón, las constantes de acoplamiento (J) se dan Hz. Las abreviaciones empleadas para denotar la multiplicidad de las señales son: s, señal simple; d, señal doble; dd, señal doble de doble; t, señal triple; c, señal cuádruple; m, señal múltiple; sa, señal ancha.



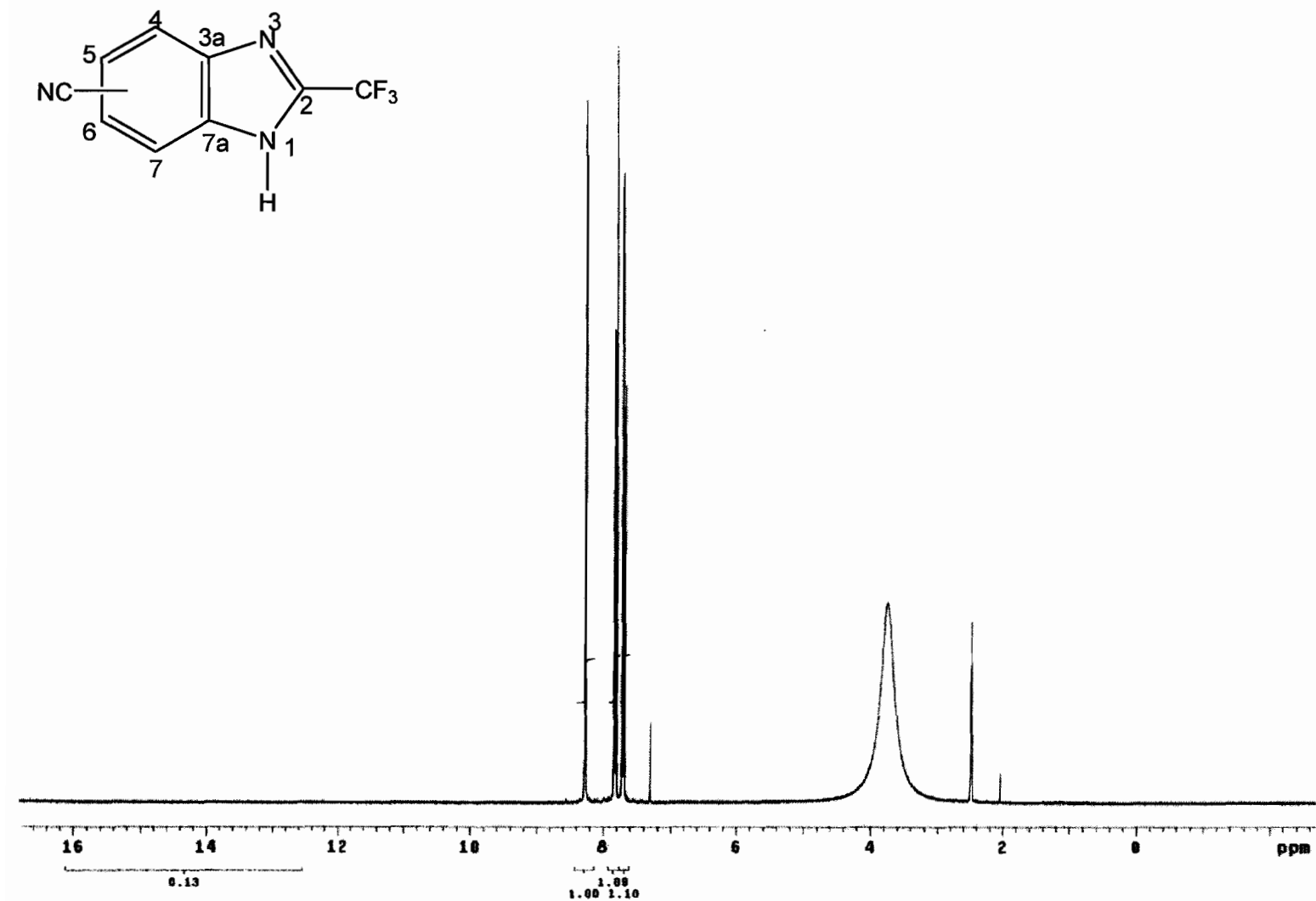
ESPECTRO 1 IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)



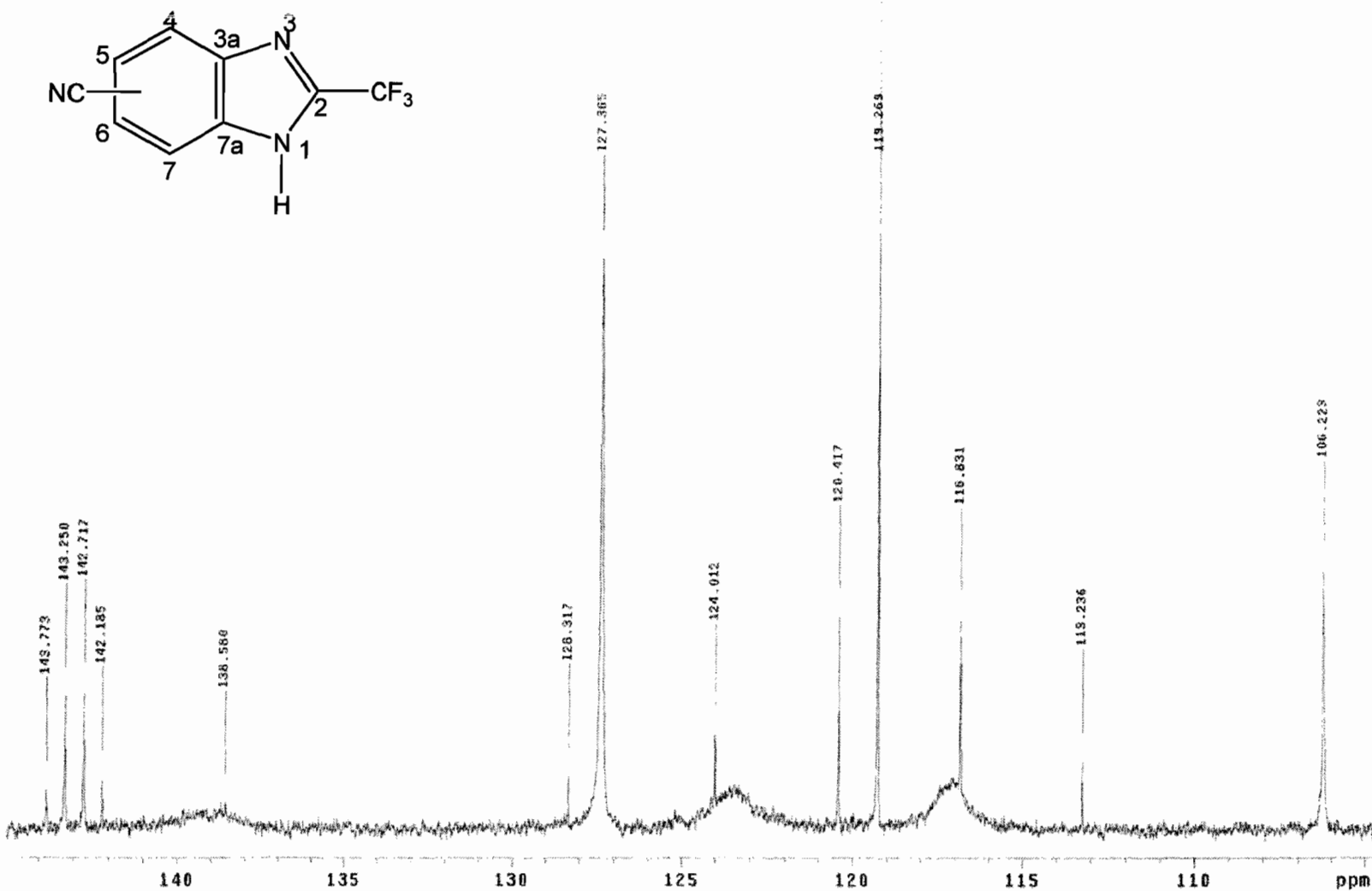
ESPECTRO 2. EM, (IE) m/z: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1) 114



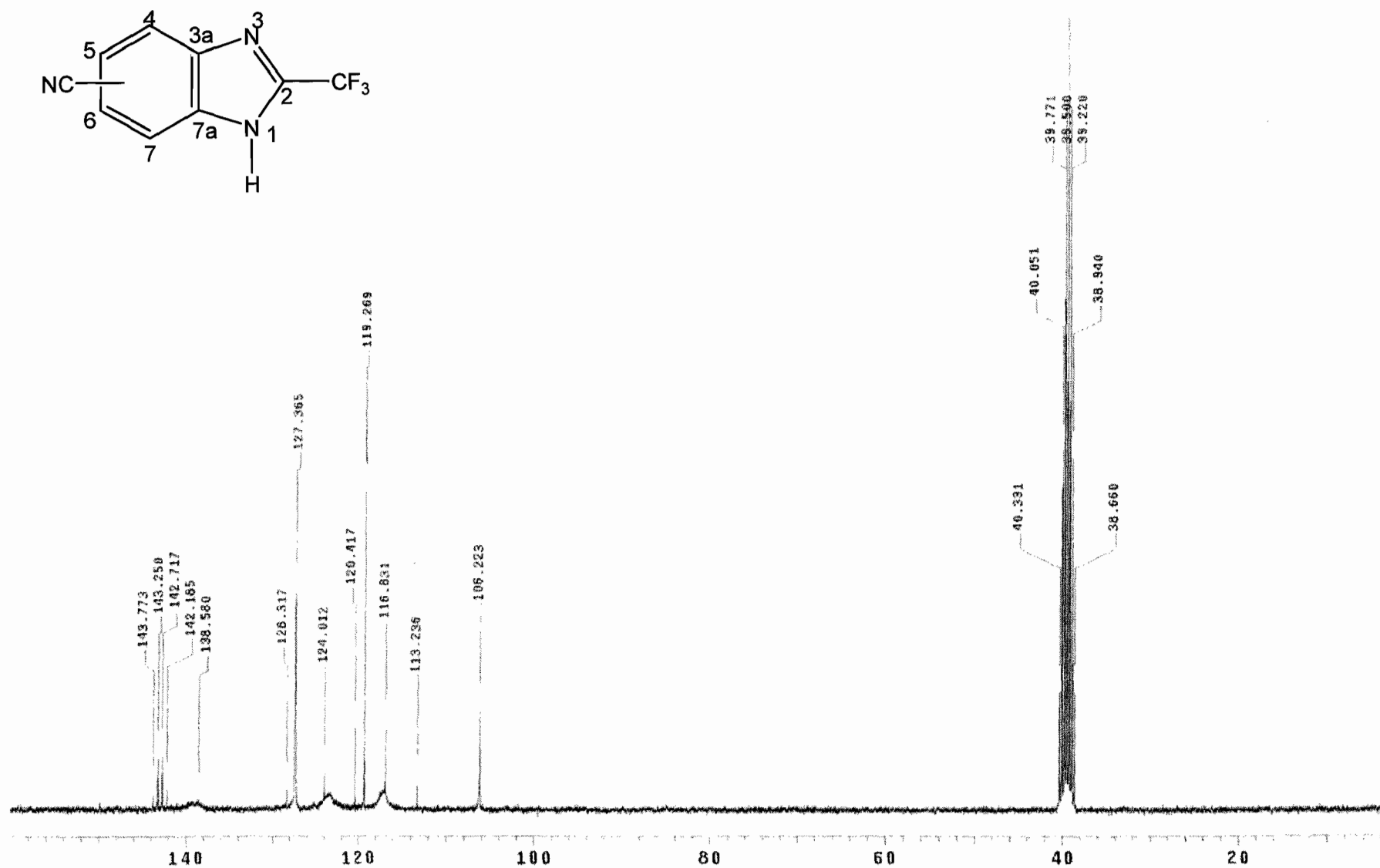
ESPECTRO 3. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)

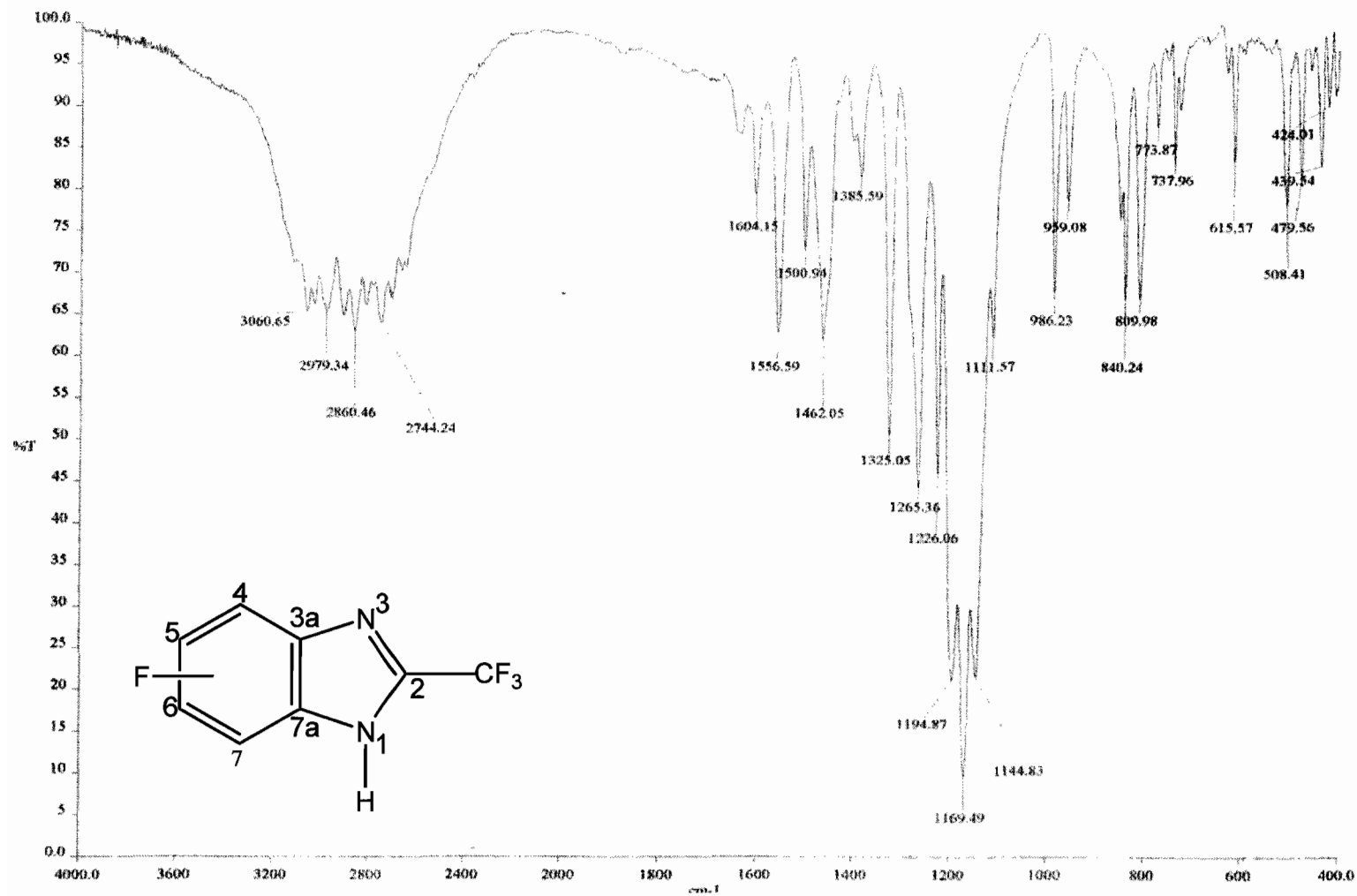


ESPECTRO 3. RMN ¹H, (TMS, DMSO) ppm: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)

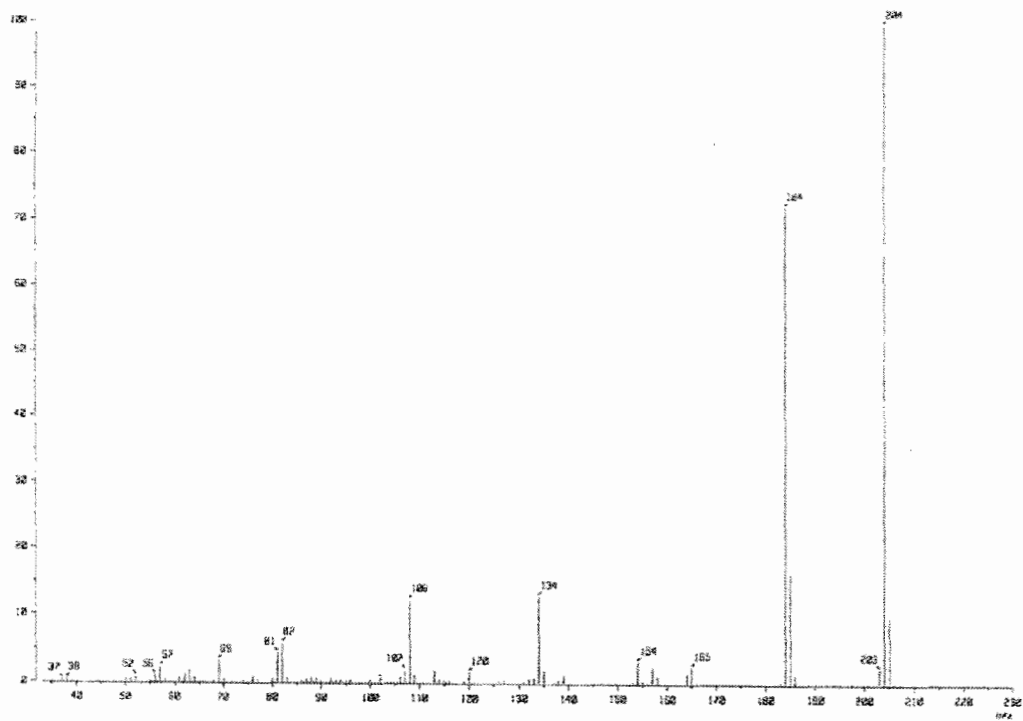
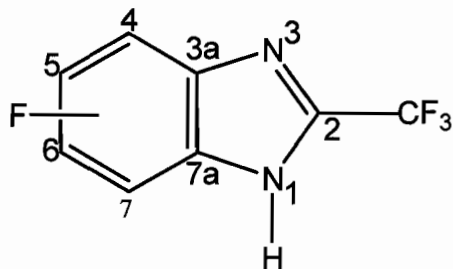
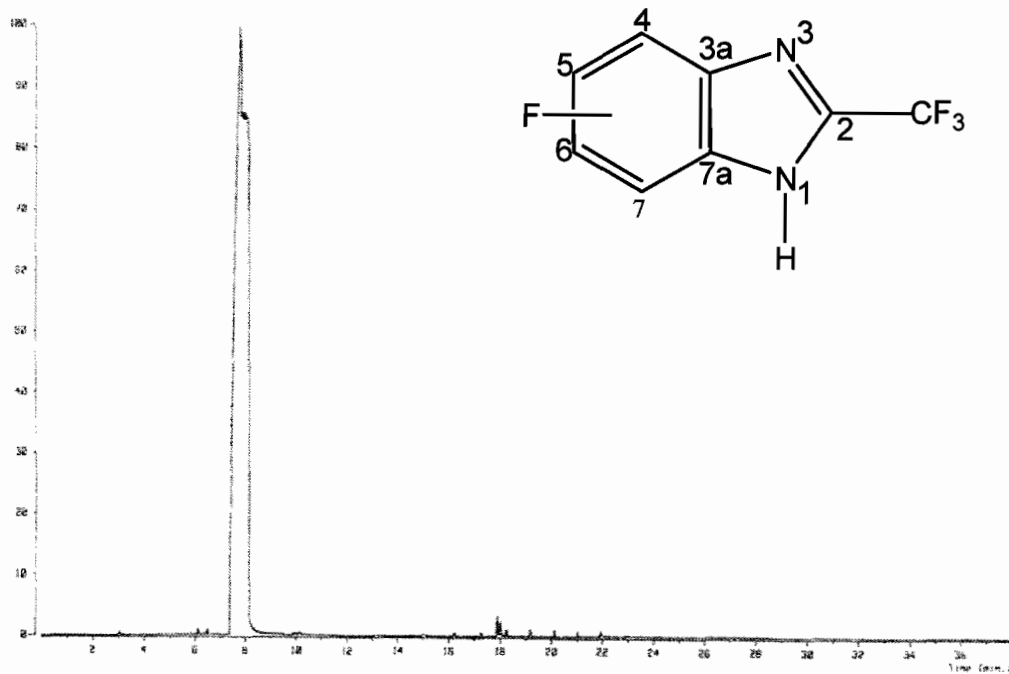


ESPECTRO 4. RMN ^{13}C , (DMSO d_6) ppm: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)

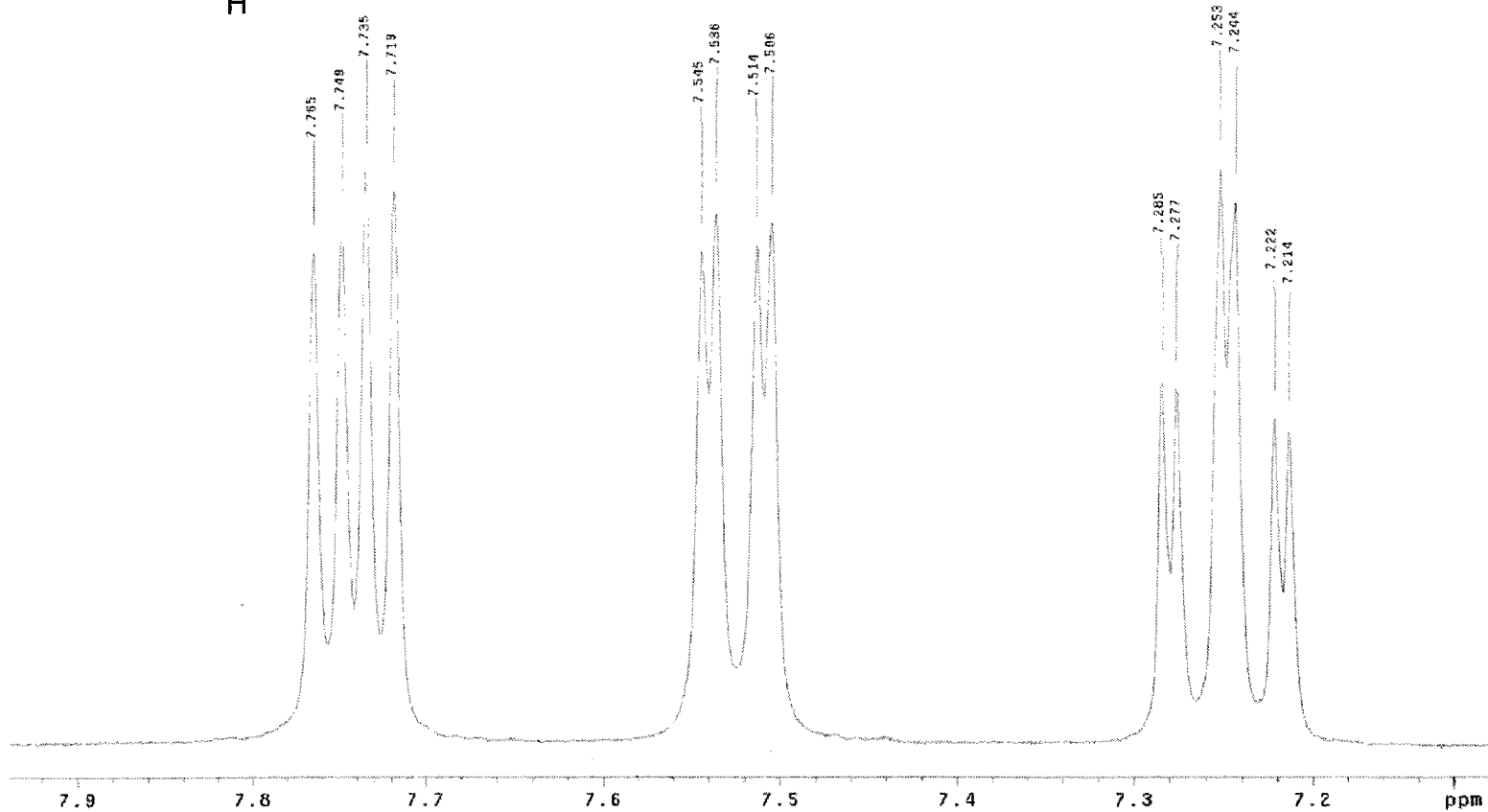
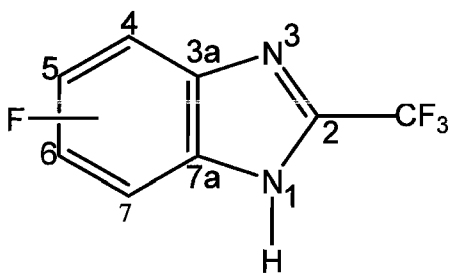
ESPECTRO 4. RMN ¹³C, (DMSO d₆) ppm: 5(6)-Ciano-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (1)



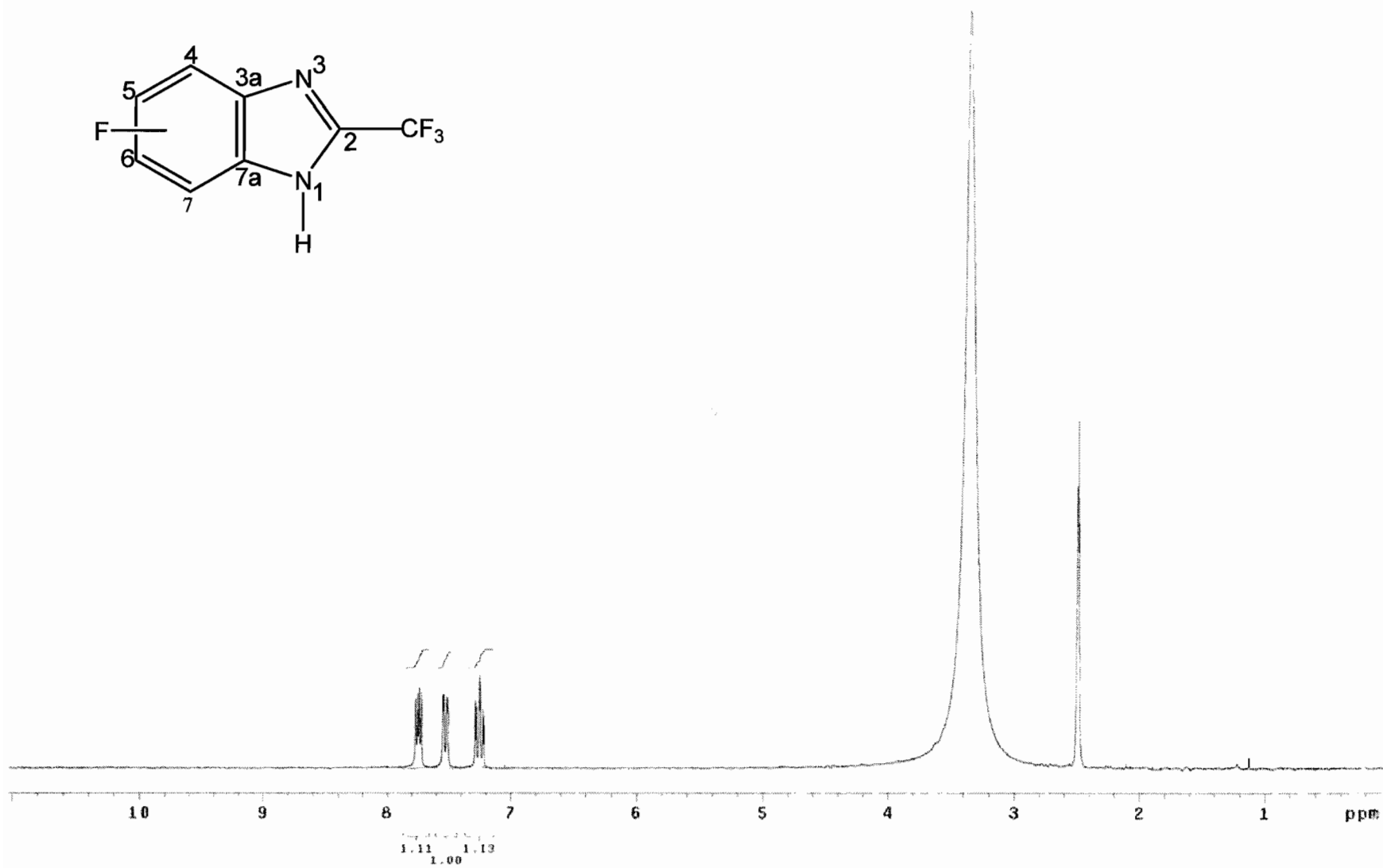
ESPECTRO 5. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)



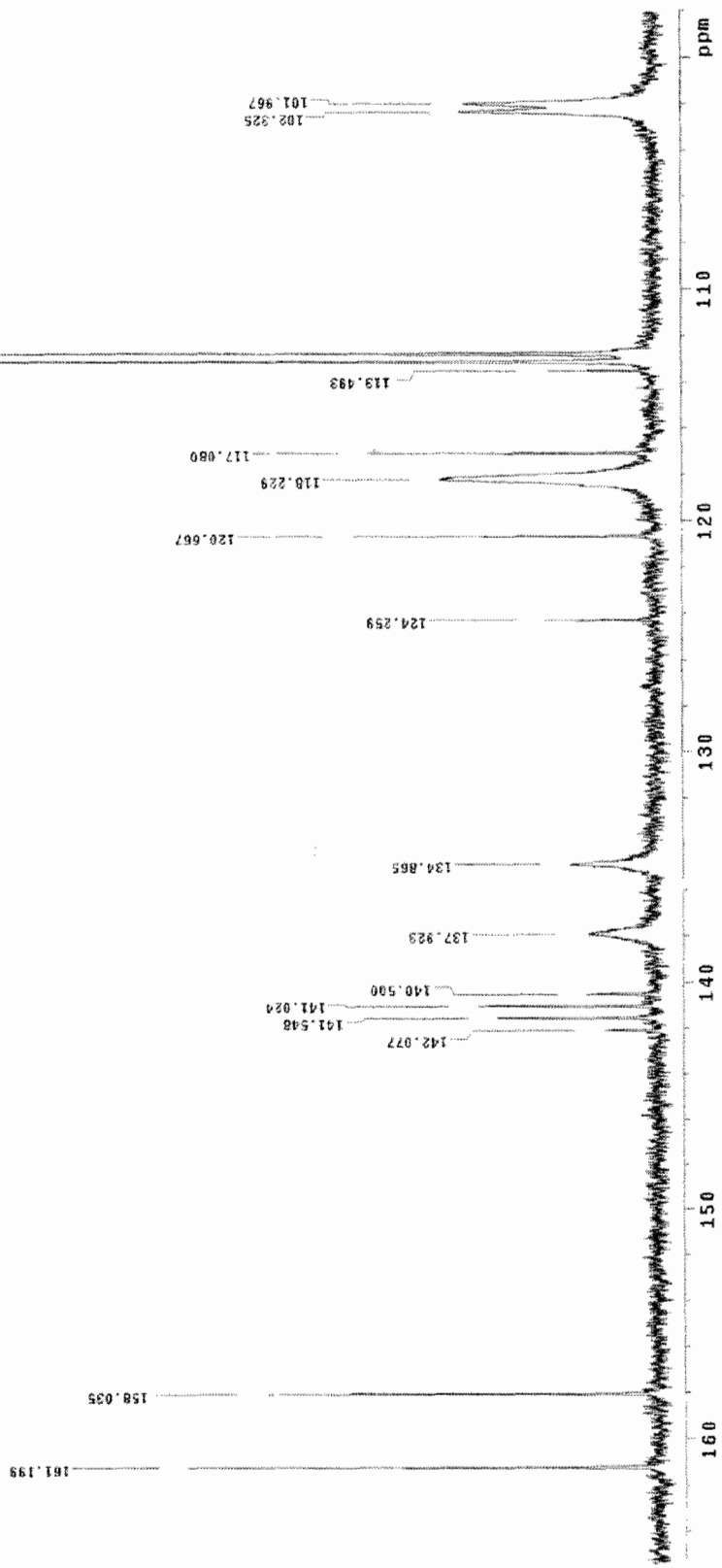
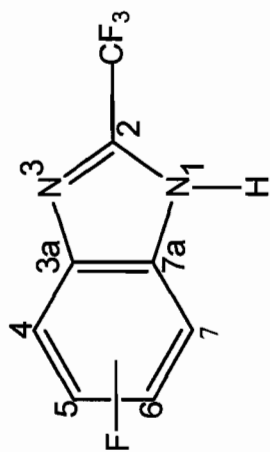
ESPECTRO 6. EM, (IE) m/z: 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)

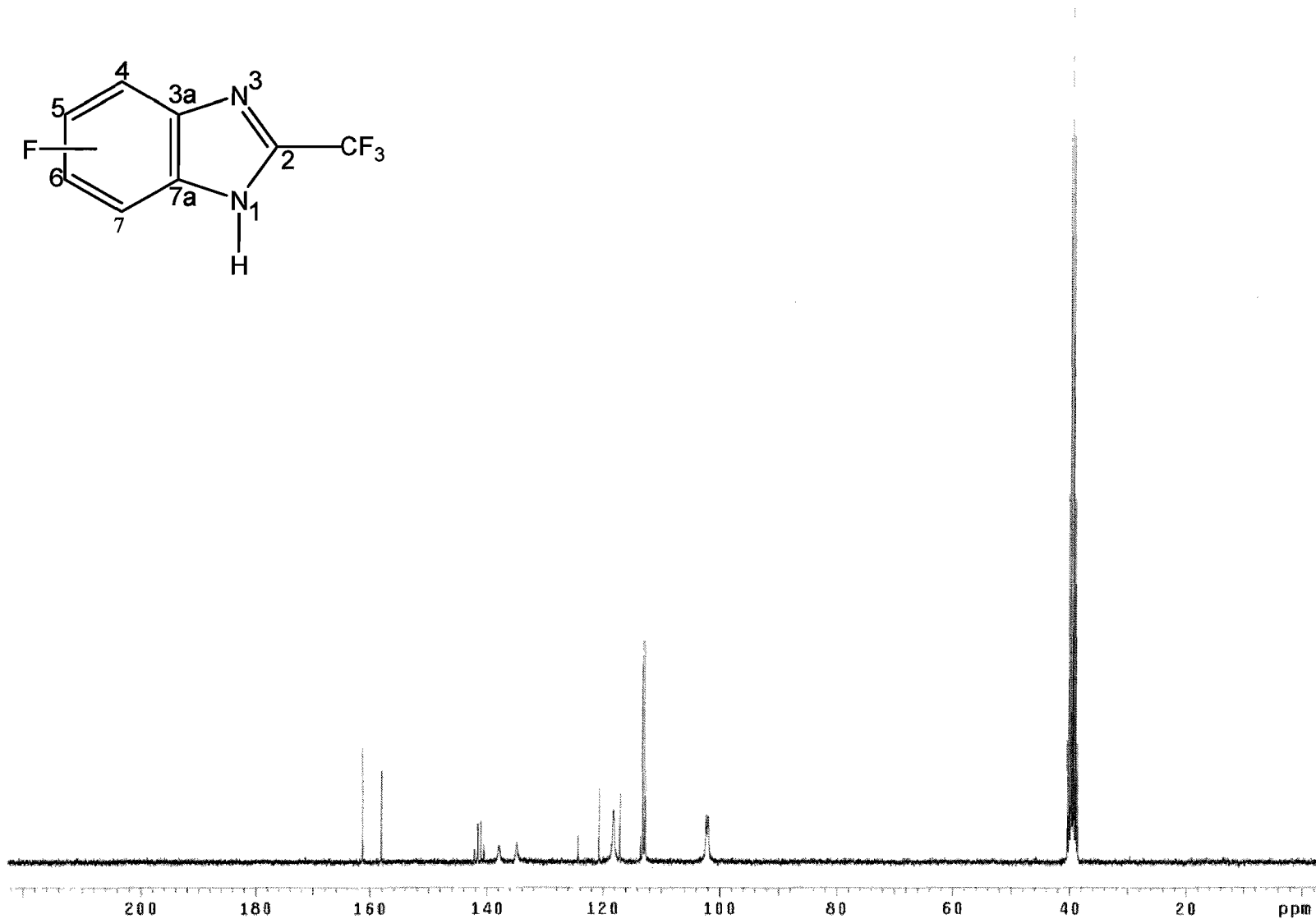
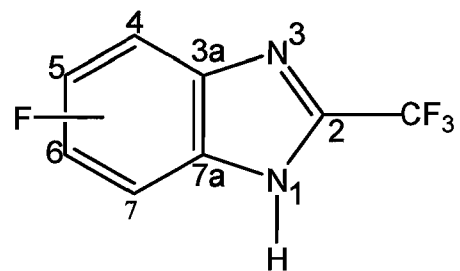


ESPECTRO 7. RMN ^1H , (TMS, DMSO) ppm: 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)

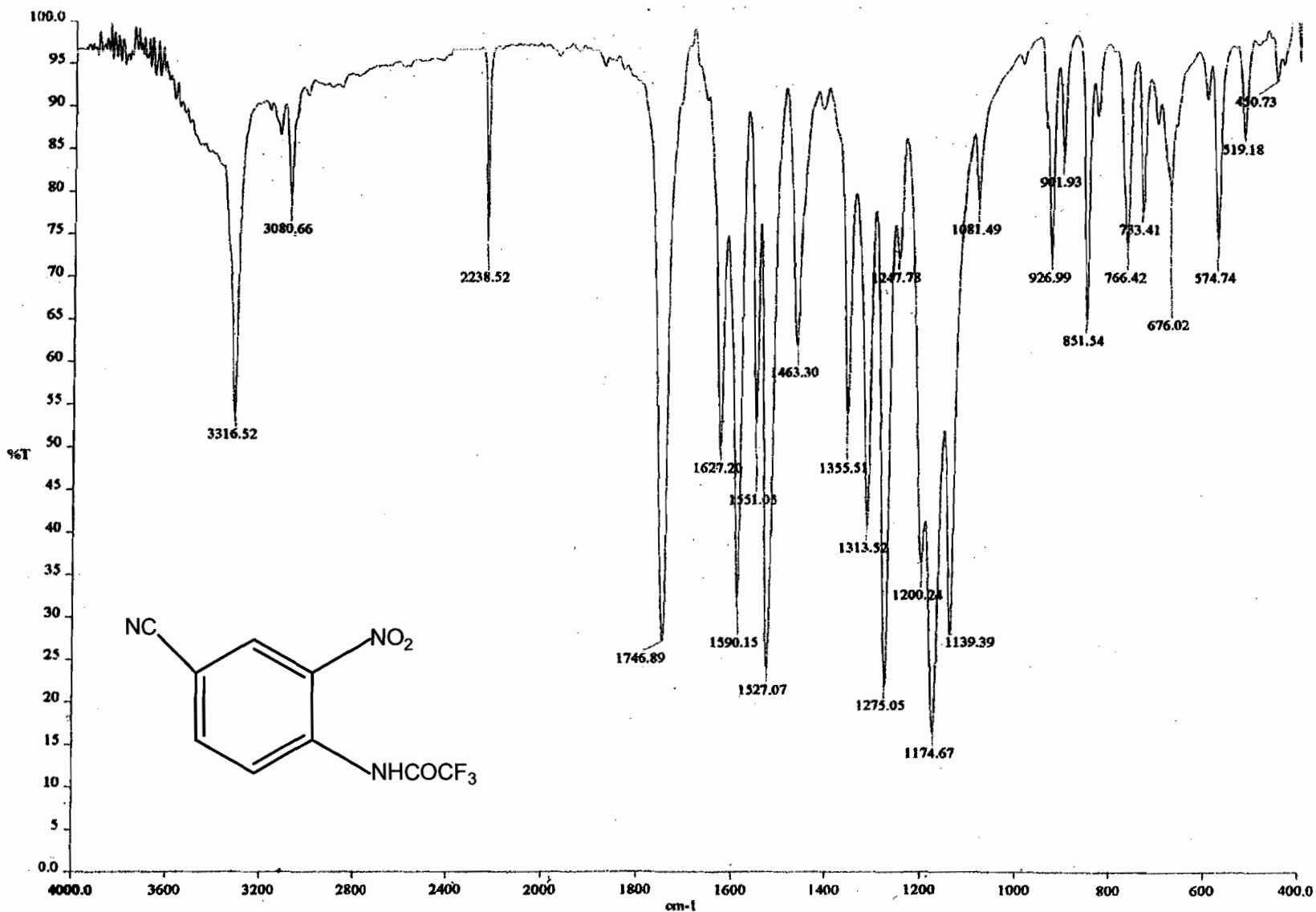


ESPECTRO 7. RMN ^1H , (TMS, DMSO) ppm: 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (2)

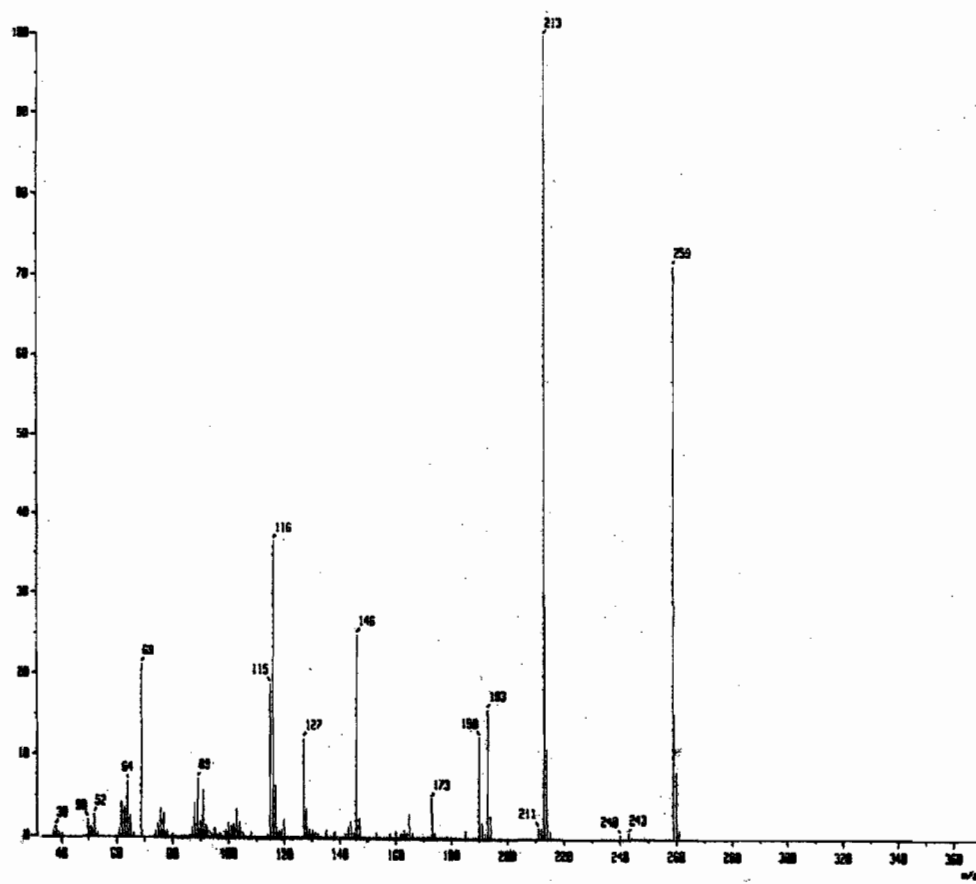
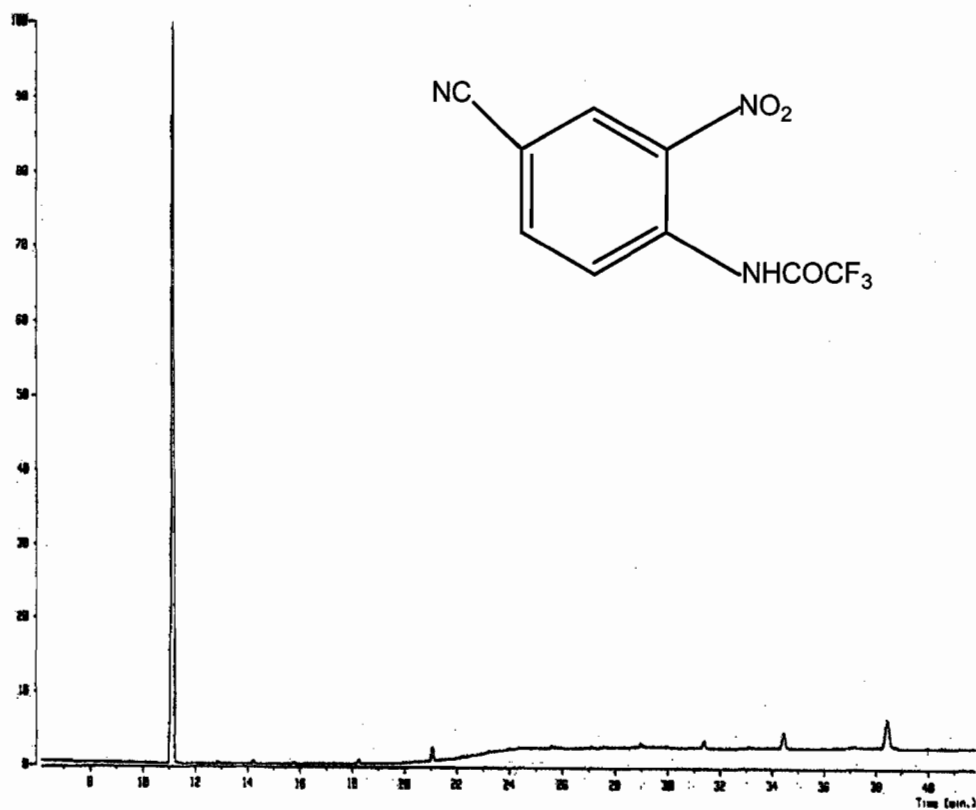




ESPECTRO 8. RMN ^{13}C , (DMSO d_6) ppm: 5(6)-Fluor-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol (2)



ESPECTRO 9. IR, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Ciano-2-nitrotrifluoroacetamida (10)



ESPECTRO 10. EM, (IE) m/z: 4-Ciano-2-nitrotrifluoroacetamida (10)

Short communication

Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole bioisosteres

Gabriel Navarrete-Vázquez^{a,*}, María de Monserrat Rojano-Vilchis^b, Lilián Yépez-Mulia^c,
Víctor Meléndez^d, Lucía Gerena^e, Alicia Hernández-Campos^b, Rafael Castillo^b,
Francisco Hernández-Luis^b

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos 62210, México

^b Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CU, México DF 04510, México

^c Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS, México DF 06720, México

^d Division of Experimental Therapeutics, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD 20910, USA

^e Department of Immunology and Medicine, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok 10400, Thailand

Received 30 May 2005; revised and accepted 8 September 2005

Available online 02 November 2005

Abstract

A series of 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole derivatives with various 5- and 6-position bioisosteric substituents (–Cl, –F, –CF₃, –CN), namely **1–7**, were prepared using a short synthetic route. Each analogue was tested in vitro against the protozoa *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* in comparison with albendazole and metronidazole. Several analogues had IC₅₀ values < 1 μM against both species, which make them significantly more potent than either standard. Compound **4** [2,5(6)-bis(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole], was 14 times more active than albendazole against *T. vaginalis*. This compound (**4**) also showed moderate antimalarial activity against W2 and D6 strains of *Plasmodium falciparum* (5.98 and 6.12 μM, respectively). Studying further structure activity relationships through the use of bioisosteric substitution in these benzimidazolic derivatives should provide new leads against protozoal and possibly malarial diseases.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Benzimidazoles; *Trichomonas vaginalis*; Bioisosteric replacement

1. Introduction

2-(Trifluoromethyl)benzimidazoles are known as an important class of compounds due to their wide range of biological activity acting as antiviral, antifungal, antibacterial and anticancer drugs [1–4]. More recently, antiparasitic activities of this class of compounds have been reported [5,6], which is consistent with earlier observations concerning the giardicidal activity of albendazole and mebendazole [7,8].

Our studies about the antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)benzimidazole derivatives have shown high potential as antiprotozoal agents. When compared to metronidazole, the drug of choice [5], 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole (**1**) and 5(6)-Chloro-2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole

(**2**), showed higher and equal activity, respectively. As part of our search for basic information about the structural requirements for antiparasitic activity, we now report the synthesis and antiprotozoal activity of 2-(trifluoromethyl)benzimidazole derivatives shown in Table 1. Three of them (**3**, **4** and **5**) were obtained by isosteric replacement [9] at position 5(6) of Compound **1**. The replacement included fluorine, trifluoromethyl and cyanide groups (Fig. 1). The two 1-methyl regioisomers of **4** gave rise to compounds **6** and **7**. The in vitro antiparasitic activity of these compounds on an intestinal protozoan (*Giardia intestinalis*), a urogenital tract parasite (*Trichomonas vaginalis*) and red blood cell parasite (*Plasmodium falciparum*) is also reported in this paper.

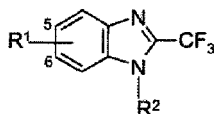
2. Chemistry

Compounds **1** and **2** were prepared as described before in [5]. For the synthesis of compounds **3**, **4** and **5**, the sequence

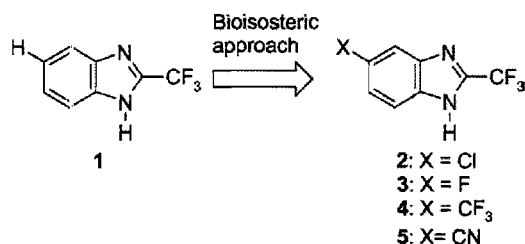
* Corresponding author. Tel./fax: +52 777 329 7089.

E-mail address: gabriel_navarrete@uaem.mx (G. Navarrete-Vázquez).

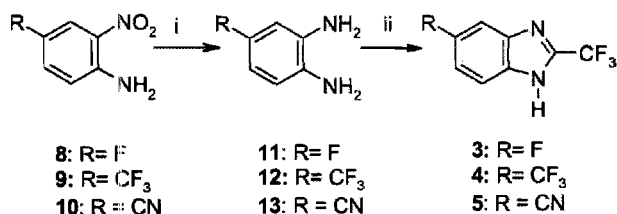
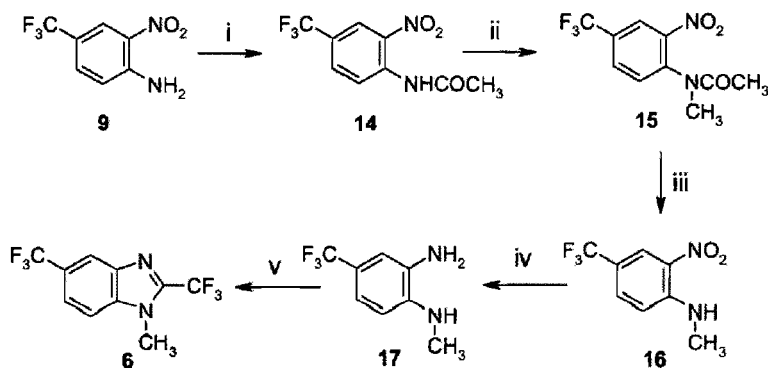
Table 1

Structure of synthesized 2-(trifluoromethyl)-1-*H*-benzimidazoles (1–7)

Compound	R ¹	R ²
1	5(6)-H	H
2	5(6)-Cl	H
3	5(6)-F	H
4	5(6)-CF ₃	H
5	5(6)-CN	H
6	5-CF ₃	CH ₃
7	6-CF ₃	CH ₃

Fig. 1. 2-(Trifluoromethyl)-1-*H*-benzimidazole (1) and their bioisosteres prepared in this work.

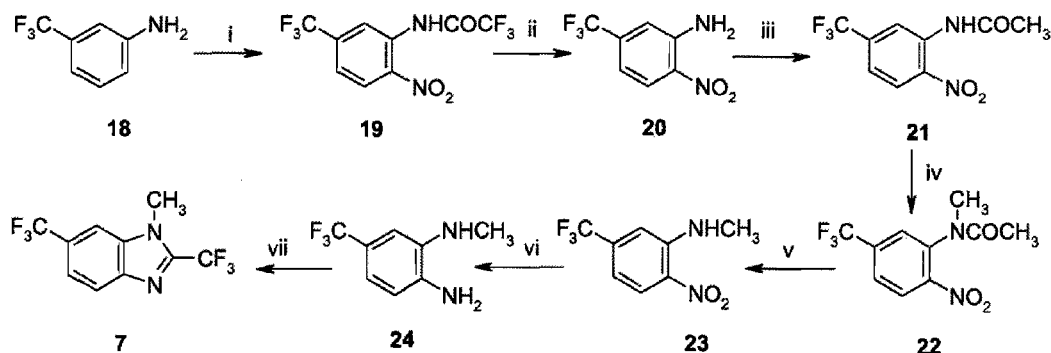
shown in Scheme 1 was followed. Starting from the corresponding 2-nitroanilines **8**, **9** or **10**, through reduction with H₂ and Ni-Raney in ethanol, 1,2-phenylenediamines **11**–**13** were obtained. Reaction of these with CF₃COOH using HCl as catalyst yielded compounds **3**–**5**. Since the 5(6)-(trifluoro-

Scheme 1. Reagents: i) H₂, Ni-Raney; ii) CF₃COOH, HCl, reflux.Scheme 2. Reagents: i) Ac₂O, H₂SO₄ (catalyst); ii) monoglyme, KOH, (CH₃)₂SO₄; iii) H₂SO₄, H₂O; iv) H₂, Ni-Raney, MeOH; v) CF₃COOH, HCl, reflux.

methyl)-substituted compound **4** exhibited the best antiprotozoal activity against *T. vaginalis* and was more active than metronidazole, we decided to synthesize its 1-methyl regioisomers **6** and **7**. Compound **6** was prepared following the reactions showed in Scheme 2. Starting from **9**, the acetylation with Ac₂O using H₂SO₄ as catalyst afforded the acetanilide **14**. This was treated with dimethyl sulfate and KOH to give the *N*-methylated acetamide **15**. Hydrolysis of **15** with H₂SO₄ led to the *N*-methyl-2-nitroaniline **16**, which upon catalytic reduction with H₂ and Ni-Raney generated the *o*-phenylenediamine **17**. Finally, boiling **17** with CF₃COOH afforded the benzimidazole derivative **7**. For the synthesis of the regioisomeric derivative **7**, *o*-phenylenediamine **24** was first prepared through the series of reactions shown in Scheme 3. Thus, 3-(trifluoromethyl)aniline **18**, through nitration with KNO₃ in trifluoroacetic anhydride and hydrolysis of the nitration product **19** with H₂SO₄, preferentially yielded the 2-Nitro-5-(trifluoromethyl)aniline **20**. The acetylation of **20** with Ac₂O, and *N*-methylation of acetanilide **21** led to *N*-Methyl-2-nitroacetanilide **22**, which upon acid hydrolysis followed by reduction of **23** with Ni-Raney, afforded the required *o*-phenylenediamine **24**. Cyclocondensation of **24** with CF₃COOH, as shown before, gave **7**. We also prepared compounds **6** and **7** by direct methylation of **4** using methyl iodide, but the separation of the regioisomers was unsuccessful. The structures of the purified products were established by ¹H NMR, ¹³C NMR, mass spectrometry, and HRMS data.

3. Biological results and discussion

In this study three new 2-(trifluoromethyl)benzimidazole derivatives (Compounds **3**–**5**) were synthesized and tested in vitro as antiprotozoal agents against *G. intestinalis*, *T. vaginalis* and *P. falciparum*. The main features of these compounds are the isosteric substitution of the hydrogen atom at position 5(6) by trifluoromethyl, fluorine and cyanide groups in order to determine bioisosteric equivalence, enhancement of solubility and absorption, and potential antiprotozoal activity. The 1-methyl regioisomers of Compound **4** were prepared in order to determine the importance of hydrogen at position 1 on the antiprotozoal activity.



Scheme 3. Reagents: i) TFAA, KNO_3 ; ii) K_2CO_3 , EtOH; iii) Ac_2O , H_2SO_4 (catalyst); iv) monoglyme, KOH, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$; v) H_2SO_4 , H_2O ; vi) H_2 , Ni-Raney, MeOH; vii) CF_3COOH , HCl, reflux.

Biological assay results shown in Table 2, against *G. intestinalis*, indicate that none of the compounds synthesized were more active than albendazole. However, compounds 3, 4 and 6 showed better activity than metronidazole. Compound 2 was as active as metronidazole. Little or no activity was found for the 1-methyl regioisomer 7. In contrast, the activity of 1,5 regioisomer 6 was similar to that of metronidazole. Compound 3, with a fluorine atom at position 5(6) was 2.5 times more active than metronidazole. Fluorine presents the advantage of having a van der Waals radius comparable to that of hydrogen and therefore, can be used to protect the metabolically sensitive 5(6) position of a benzimidazole molecule. When substituting hydrogen with a cyanide group at position 5 of the benzimidazole ring, the activity decreased.

In the assay against *T. vaginalis*, compounds 2–5 were more active than albendazole. The same assay showed compound 4, with CF_3 at position 5(6), to be as active as metronidazole. Interestingly, compound 4 was 14 times more active than albendazole against *T. vaginalis*. Regioisomeric compounds 6 and 7 showed less potency than albendazole and had similar activity against *T. vaginalis*.

The in vitro antimalarial activity exhibited by these compounds was poor when compared to Mefloquine, which IC_{50} values against W2 and D6 strains of *P. falciparum* are approximately 0.048 and 0.028 μM , respectively. Only compounds 2 and 4 (with Cl and CF_3 at position 5(6), respectively) were

moderately active against W2 and D6 strains of *P. falciparum*. Compound 4 was the most active, with IC_{50} values of approximately 6 μM against either isolate. This spectrum can be explained because the CF_3 group is comparable in size to chlorine and could advantageously replace it to give a potent bioisoster. A chlorine substituent simultaneously produces an increase in lipophilicity, an electron attracting effect and metabolic obstruction. Thus, bioisosterism represents one approach used by the medicinal chemist for the rationale modification of lead compounds into safer and more clinically relevant agents.

These compounds are fully compatible with Lipinski's rule [10] (Table 3), which should allow for the development of additional antiprotozoal analogues. Their advantages include:

- physical properties known to be compatible with desirable pharmacokinetic (low molecular weight, favorable $C \log P$, favorable hydrogen bond donating and accepting capabilities);
- potency and efficacy, with IC_{50} values at the low micromolar level;
- simple synthetic access and thus low production costs;
- bioisosteric groups improving the likelihood of reasonable solubility. Further optimization and pharmacokinetics characterization of this series are ongoing.

Table 2

In vitro susceptibility of *G. intestinalis*, *T. vaginalis* and *P. falciparum* to synthesized compounds, metronidazole and albendazole

Compound	<i>G. intestinalis</i> IC_{50} (μM) ^a	<i>T. vaginalis</i> IC_{50} (μM)	<i>P. falciparum</i>	
			D6 IC_{50} (μM)	W2 IC_{50} (μM)
Metronidazole	1.226 ± 0.125	0.236 ± 0.016	NT	NT
Albendazole	0.038 ± 0.003	3.390 ± 0.125	> 20	> 20
1	0.107 ± 0.017	3.134 ± 0.130	> 20	> 20
2	1.282 ± 0.120	0.451 ± 0.025	11.70 ± 0.33	12.52 ± 0.43
3	0.489 ± 0.018	3.147 ± 0.120	> 20	> 20
4	0.672 ± 0.020	0.232 ± 0.021	5.98 ± 0.25	6.12 ± 0.32
5	1.791 ± 0.130	2.286 ± 0.095	> 20	> 20
6	1.144 ± 0.135	4.098 ± 0.125	> 20	> 20
7	8.850 ± 0.128	5.320 ± 0.095	> 20	> 20

NT: not tested.

^a Data are presented as mean ± S.E.M.

Table 3

The antiprotozoal benzimidazoles have physical properties compatible with reasonable pharmacokinetics and drug availability

Compound	mol wt	C log P	Number of H bond donors	Number of H bond acceptors	Number of criteria met
rule	< 500	< 5	< 5	< 10	at least 3
1	186	2.40	1	1	all
2	220	3.14	1	1	all
3	204	2.60	1	1	all
4	254	2.97	1	1	all
5	211	1.83	1	2	all
6	268	3.28	0	1	all
7	268	3.28	0	1	all

4. Conclusion

Substitution at position 5(6) of compound **1** with fluorine or a trifluoromethyl group led to bioisosters more potent than metronidazole against *G. intestinalis*. However, against *T. vaginalis*, compound **4** was the only one as active as metronidazole. This compound also showed moderate antimalarial activity against W2 and D6 strains of *P. falciparum*. The results obtained with the synthesized analogues as antiprotozoal agents are very promising indeed since they broaden the knowledge of the activity of these versatile benzimidazole derivatives.

5. Experimental

5.1. Instruments

Melting points were determined on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on 0.2 mm precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (E. Merck). ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were measured with a Varian EM-390 (300 and 75.5 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given in ppm relative to tetramethylsilane (Me₄Si, δ = 0) in CDCl₃; *J* values are given in Hz. The following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; q, quartet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet; bs, broad signal. MS were recorded on a JEOL JMS-SX102A spectrometer by electron impact (EI). Catalytic hydrogenations were carried out in a Parr shaker hydrogenation apparatus. Starting materials **8–10** and **18** were commercially available (Aldrich). The C log *P* values were obtained using ACD/labs software v.4.5.

5.2. General method of synthesis of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazoles (**1–7**)

The appropriate 1,2-phenylenediamine (0.0313 mol), 1.6 equivalents of CF₃COOH and one drop of concentrated HCl were heated under reflux in a N₂ atmosphere for 3–4 h. TLC was used to monitor the reaction. The cooled mixture was neutralized with saturated NaHCO₃ solution, and the crude benzimidazole was extracted with AcOEt. The solvent was removed under vacuum, and the resulting solid was isolated by filtration through a fritted 60 ml glass funnel packed with Al₂O₃, neutral type. Applying this technique the following compounds were prepared:

5.2.1. 2-(Trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (**1**)

Eluted with hexane and recrystallized from ethanol–water. Yield 4.7 g (81%) of white solid. M.p. 208–210 °C (Lit. 209–211 °C [5]). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.41 (m, 2H, H-5, H-6), 7.75 (m, 2H, H-4, H-7), 8.21 (bs, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 116.8 (C-4, C-7), 119.1 (q, CF₃, *J* = 285.6 Hz), 124.8 (C-5, C-6), 138.3 (C-7a), 138.5 (C-3a), 141.1 (q, C-2, *J* = 39.1 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 186 (M⁺, 100), 166 (80); HRMS: calc. for C₈H₅F₃N₂: 186.0404, found: 186.0410.

5.2.2. 5(6)-Chloro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (**2**)

Eluted with hexane and recrystallized from ethanol. Yield 5.5 g (68%) of white solid. M.p. 196–198 °C (Lit. 197–199 °C [5]). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.63 (dd, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 8.7, *J*_{6,4} = 2.2 Hz), 7.68 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 8.7 Hz), 7.99 (d, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 2.2 Hz) 13.4 (bs, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 116.6 (C-7), 119.2 (q, CF₃, *J* = 285.6 Hz), 118.33 (C-4), 125.78 (C-6), 128.3 (C-5), 136.9 (C-7a), 137.4 (C-3a), 143.3 (q, C-2, *J* = 39.2 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 222 (M⁺, 30), 220 (M⁺, 100), 200 (50); HRMS: calc. for C₈H₄ClF₃N₂: 220.0015, found: 220.0028.

5.2.3. 5(6)-Fluoro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (**3**)

Eluted with hexane and recrystallized from cyclohexane-CH₂Cl₂. Yield 7.98 g (93%) of white solid. M.p. 220–221 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.19 (dd, 1H, H-6, *J*_{6,7} = 10.0, *J*_{6,4} = 1.0 Hz), 8.03 (d, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 1.0 Hz), 7.87 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 10.0 Hz), 12.9 (bs NH) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 119.0 (q, CF₃, *J* = 271.6 Hz), 111.5 (d, C-4, *J* = 21.1 Hz), 115.1 (d, C-6, *J* = 21.1 Hz), 115.5 (d, C-7, *J* = 7.8 Hz), 143.3 (q, C-2, *J* = 39.1 Hz), 155.8 (d, C-5, *J* = 245.1 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 204 (M⁺, 100), 184 (74); HRMS: calc. for C₈H₄F₄N₂: 204.1241, found: 204.1239.

5.2.4. 2,5(6)-Bis(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (**4**)

Eluted with CHCl₃ and recrystallized from ethanol. Yield 1.7 g (68%) of white solid. M.p. 201–202 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (dd, 1H, H-6, *J*_{6,4} = 1.3, *J*_{6,7} = 8.7 Hz), 7.89 (d, 1H, H-7, *J*_{7,6} = 8.7 Hz), 8.11 (d, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 1.3 Hz), 13.98 (bs, 1H, N-H) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 115.43 (C-4), 116.92 (C-7), 118.72 (q,

CF₃-C2, $J = 271.8$ Hz), 120.85 (C-6), 124.61 (q, CF₃-C5, $J = 271.8$ Hz), 124.62 (q, C-5, $J = 32.2$ Hz), 138.32 (C-3a), 139.06 (C-7a), 142.61 (q, C-2, $J = 40.3$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 254 (M⁺, 100), 234 (60), 215 (22), 204 (5), 184 (15); HRMS: calc. for C₉H₄F₆N₂: 254.0278, found: 254.0278.

5.2.5. 5(6)-Cyano-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (5)

Eluted with hexane and recrystallized from cyclohexane-CH₂Cl₂. Yield 7.98 g (93%) of white solid. M.p. 183–184 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48 (dd, 1H, H-6, $J_{6,7} = 9.0$, $J_{6,4} = 0.9$ Hz), 7.86 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 9.0$ Hz), 8.34 (d, 1H, H-4, $J_{4,6} = 0.9$ Hz), 14.4 (bs, 1H, N-H) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 106.3 (C-5), 118.6 (q, CF₃, $J = 271.8$ Hz), 117 (C-7), 119.2 (CN), 126.7 (C-4), 127.3 (C-6), 142.9 (q, C-2, $J = 39.1$ Hz); MS: m/z (% relative intensity) 211 (M⁺, 100), 191 (68); HRMS: calc. for C₉H₄F₃N₃: 211.1436, found: 211.1438.

5.2.6. 1-Methyl-2,5-bis(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (6)

Eluted with hexane and recrystallized from ethanol. Yield 10 g (71%) of white solid. M.p. 56–58 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (s, 3H, CH₃), 7.55 (d, 1H, H-7, $J_{7,6} = 8.7$ Hz), 7.69 (dd, 1H, H-6, $J_{6,4} = 1.5$, $J_{6,7} = 8.7$ Hz), 8.16 (d, 1H, H-4, $J_{4,6} = 1.5$ Hz) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 31.12 (d, N-CH₃, $J = 2.0$ Hz), 110.83 (C-7), 118.74 (q, CF₃-C2, $J = 271.9$ Hz), 119.50 (q, C-4, $J = 4.0$ Hz), 122.14 (q, C-6, $J = 4.1$ Hz), 124.34 (q, CF₃-C5, $J = 275.9$ Hz), 126.39 (q, C-5, $J = 33.2$ Hz), 137.83 (C-3a), 140.38 (C-7a), 142.77 (q, C-2, $J = 38.3$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 268 (M⁺, 100), 249 (30), 218 (10), 197 (5); HRMS: calc. for C₁₀H₆F₆N₂ (M⁺) m/z : 268.0435, found 268.0440.

5.2.7. 1-Methyl-2,6-bis(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (7)

Eluted with hexane and recrystallized from ethanol. Yield 2.4 g (64%) of white solid. M.p. 122–124 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (s, 3H, CH₃), 7.66 (dd, 1H, H-5, $J_{5,7} = 1.7$, $J_{5,4} = 8.7$ Hz), 8.01 (d, 1H, H-4, $J_{4,5} = 8.7$ Hz), 8.31 (d, 1H, H-7, $J_{7,5} = 1.7$ Hz) ppm; ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 31.44 (d, N-CH₃, $J = 2.1$ Hz), 110.36 (q, C-7, $J = 4.9$ Hz), 118.71 (q, CF₃-C2, $J = 272.2$ Hz), 119.89 (q, C-5, $J = 3.5$ Hz), 122.82 (C-4), 124.57 (q, CF₃-C6, $J = 272.9$ Hz), 125.61 (q, C-6, $J = 31.7$ Hz), 126.38 (C-7a), 135.68 (C-3a), 142.65 (q, C-2, $J = 25.4$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 268 (M⁺, 100), 249 (30), 218 (20), 197 (20), 145 (10); HRMS: calc. for C₁₀H₆F₆N₂ (M⁺) m/z : 268.0435, found 268.0431.

5.3. General method of synthesis of 1,2-phenylenediamines 11–13, 17 and 24

A mixture of adequate substituted 2-nitroaniline (6.37 g, 0.0282 mol), EtOH (100 ml) and 10% Ni-Raney (300 mg) was hydrogenated at 25 °C until cessation of H₂ uptake. The catalyst was filtered off on a Whatman paper number 2, washed with EtOH, and the filtrate concentrated to provide a

dark purple-colored liquid, which was used immediately in a subsequent step without purification.

5.4. Synthesis of precursors 14–16, 19–23

5.4.1. N-[2-Nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide (14)

A stirred mixture of 4-(trifluoromethyl)-2-nitroaniline (12.2 g, 0.0591 mol), acetic anhydride (9.78 g, 9.06 ml, 0.0882 mol, 1.5 eq) and three drops of H₂SO₄ was heated at 80 °C for 1 h. The mixture was cooled, worked up by addition of cold water and filtered by suction. The crude product was recrystallized from hexane. Yield 14.2 g (97%) of white crystals. M.p. 112–113 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.38 (s, 3H, CO-CH₃), 7.87 (dd, 1H, H-5, $J_{5,3} = 3.1$, $J_{5,6} = 9.0$ Hz), 8.51 (d, 1H, H-3, $J_{3,5} = 3.1$ Hz), 9.06 (d, 1H, H-6, $J_{6,5} = 9.0$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 248 (M⁺, 10), 206 (100), 176 (20).

5.4.2. N-methyl-N-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide (15)

Into a stirred mixture of **9** (14.1 g, 0.0572 mol) in dimethyl sulfate (10.82 g, 8.11 ml, 0.0858 mol, 1.5 eq) and monoglyme (14 ml) was added a solution of KOH 50% m/v (4.81 g, 0.0858 mol, 1.5 eq) at 32–35 °C. The mixture was cooled, worked up by addition of cold water and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with brine, dried with anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give an orange liquid (14.78 g, 98.6%), which was immediately hydrolyzed in the next step.

5.4.3. N-methyl-2-nitro-4-(trifluoromethyl)aniline (16)

A solution of **15** (14 g, 0.0533 mol) in concentrated sulfuric acid (15 ml) and water (1 ml) was heated at 80–90 °C for 15 min, and then cooled to room temperature. Ice (250 g) was added and the precipitated solid was removed by filtration and washed several times with water until neutral pH. It was recrystallized from ethanol to give yellow pale needles (11.72 g, 98%). M.p. 73–75 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.05 (s, 3H, N-CH₃), 6.94 (d, 1H, H-6, $J_{6,5} = 8.8$ Hz), 7.65 (dd, 1H, H-5, $J_{5,6} = 8.8$, $J_{5,3} = 1.8$ Hz), 8.48 (d, 1H, H-3, $J_{3,5} = 1.8$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 220 (M⁺, 60), 201 (10), 145 (30), 127 (30), 105 (100).

5.4.4. 2,2,2-Trifluoro-N-[2-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide (19)

Into a cooled solution of compound **18** (6 g, 0.0372 mol) in trifluoroacetic anhydride (10 ml) was added potassium nitrate (3.75 g, 0.0372 mol, 1 eq) and the resulting solution was stirred at 0 °C for 3 h at 25 °C, then, all volatiles were removed in vacuo, and the solid residue was purified by flash chromatography eluted with petroleum ether to give a single yellow product (3.7 g, 33%). M.p. 87–89 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.47 (sa, 1H, N-H), 7.78 (dd, 1H, H-4, $J_{4,6} = 1.9$, $J_{4,3} = 9.2$ Hz), 8.31 (d, 1H, H-3, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 9.00 (d, 1H, H-6, $J_{6,4} = 1.9$ Hz) ppm; MS: m/z (% relative intensity) 302 (M⁺, 10), 283 (10), 233 (100), 205 (80).

5.4.5. 2-Nitro-5-(trifluoromethyl)aniline (20)

Aqueous potassium carbonate solution (1 M, 15 ml) was added to the trifluoroacetamide **19** (3.7 g, 0.0124 mol) in ethanol (15 ml). The solution was heated at 50 °C for 3 h. The mixture was cooled, worked up by addition of cold water, filtered by suction and recrystallized from ethanol to give orange crystals (2.45 g, 96%). M.p. 105–106 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.04 (sa, 2H, N-H₂), 7.57 (d, 1H, H-6, *J*_{6,4} = 1.9 Hz), 7.61 (dd, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 1.9, *J*_{4,3} = 9.0 Hz), 7.91 (d, 1H, H-3, *J*_{3,4} = 9.0 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 206 (M⁺, 100), 190, (15), 187 (20), 168 (5), 160 (30), 137 (23).

5.4.6. N-[2-Nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide (21)

A stirred mixture of 2-nitro-5-(trifluoromethyl)aniline (2.45 g, 0.0118 mol), acetic anhydride (1.81 g, 1.67 ml, 0.0178 mol, 1.5 eq) and three drops of H₂SO₄ was heated at 80 °C for 1 h. The mixture was cooled, worked up by addition of cold water, filtered by suction and the crude product recrystallized from hexane. Yield 2.84 g (97%) of white crystals. M.p. 125–127 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.00 (s, 3H, CO-CH₃), 7.86 (d, 1H, H-6, *J*_{6,4} = 1.9 Hz), 8.14 (dd, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 1.9, *J*_{4,3} = 9.0 Hz), 9.36 (d, 1H, H-3, *J*_{3,4} = 9.0 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 248 (M⁺, 10), 206 (100), 176 (30).

5.4.7. N-methyl-N-[2-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl]acetamide (22)

Into a stirred mixture of **21** (2.48 g, 0.0100 mol), in dimethyl sulfate (1.89 g, 1.42 ml, 0.0150 mol, 1.5 eq) and monoglyme (10 ml), was added a solution of KOH 50% m/v (0.841 g, 0.0150 mol, 1.5 eq) at 32–35 °C. The mixture was cooled, worked up by addition of cold water and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with brine, dried with anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to give an orange liquid (2.58 g, 98%), which was immediately hydrolyzed in the next step.

5.4.8. N-methyl-2-nitro-5-(trifluoromethyl)aniline (23)

Water (1 ml) was added to a solution of **22** (2.58 g, 0.098 mol) in concentrated sulfuric acid (5 ml). The solution was heated at 80–90 °C for 15 min, and then cooled to room temperature. Ice (250 g) was added and the orange–yellow precipitated solid was removed by filtration and washed several times with water until neutral pH. It was recrystallized from ethanol to give orange crystals (2.2 g, 99%). M.p. 86–88 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.07 (s, 3H, N-CH₃), 7.40 (d, 1H, H-6, *J*_{6,4} = 2.0 Hz), 7.62 (dd, 1H, H-4, *J*_{4,6} = 2.0, *J*_{4,3} = 9.0 Hz), 7.93 (d, 1H, H-3, *J*_{3,4} = 9.0 Hz) ppm; MS: *m/z* (% relative intensity) 220 (M⁺, 70), 201 (15), 145 (30), 127 (50), 105 (100).

5.5. Biological assays

5.5.1. In vitro antiprotozoal assay

G. intestinalis strain IMSS:0989:1 and *T. vaginalis* strain GT3 were cultured in TYI-S-33 modified medium, supplemented with 10% calf serum and bovine bile. In vitro susceptibility

assays were performed using a method previously described in [7]. Briefly: 4 × 10⁴ trophozoites of *G. intestinalis* or *T. vaginalis* were incubated for 48 h at 37 °C with increasing concentrations of synthesized compounds, albendazole, and metronidazole. As the negative control, trophozoites were incubated with dimethylsulphoxide (DMSO) used in the experiments. After the incubation, an aliquot (5.0 μl) of the treated trophozoites were subcultured for another 48 h in fresh medium alone. At the end of this period, trophozoites were counted and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by Probit analysis. Experiments were carried out in triplicate and repeated at least twice.

5.5.2. In vitro antimalarial assay

The in vitro potency of each of the analogues was tested using the tritiated hypoxanthine method as described by Milhous et al. [11] with minor modifications. The parent analogues were dissolved in DMSO as 50.0 mg/ml stock solutions. The stock solutions were diluted 1000-fold in folate-free media (RPMI-1640) to get the 50.0 or 1.0 μg/ml starting concentrations, respectively. Twofold dilutions of the starting concentration were made in folate-free media and 20 μl per well was added to a 96-well culture plate. A 0.5% parasite concentration was diluted fourfold in folate-free media and 180 μl per well was added to each culture plate. Five 10-fold serial dilutions were made to evaluate a range from 5000 ng/ml to 5 pg/ml for the compounds. The plates were maintained at 37 °C for 48 h, then, 25 μl of [³H]-hypoxanthine (15 μCi/ml) were added, and the parasite plates were incubated for an additional 24 h. At 72 h, parasites were harvested onto Unifilter-96 microplates. The filter plates were air-dried and 50 μl per well scintillation fluid were added. Radioactive emissions were counted in a TopCount NXT (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Each analogue was assayed against each parasite strain in triplicate on three separate occasions. Parasite growth inhibition was measured by the decreased accumulation of [³H]-hypoxanthine used in the purine nucleotide salvage pathway. The IC₅₀ value was determined by sigmoid dose-response non-linear regression analysis. Two well characterized *P. falciparum* clones W2 (Indochina III/CDC) and D6 (Sierra Leone I/CDC), representing antifolate-resistant and -sensitive strains, respectively, were assayed [12,13].

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACyT G34851-M and DGAPA-PAPIIT 203101. We are grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán, and Marisela Gutiérrez from the School of Chemistry, UNAM, for the determination of all spectra. We also thank Norma Roncal from the Walter Reed Army Institute of Research for assisting with the antimalarial assay.

References

- [1] J.Z. Stefanska, R. Gralewska, B.J. Starosciak, Z. Kazimierzczuk, *Pharmazie* 54 (1999) 879–884.

- [2] M. Andrzejewska, M.A. Pagano, F. Meggio, A.M. Brunati, Z. Kazimierzczuk, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 3997–4002.
- [3] M. Andrzejewska, L. Yépez-Mulia, R. Cedillo-Rivera, A. Tapia, L. Vilpo, J. Vilpo, Z. Kazimierzczuk, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 973–978.
- [4] Z. Kazimierzczuk, J.A. Upcroft, P. Upcroft, A. Gorska, B. Starosciak, A. Laudy, *Acta Biochim. Pol.* 49 (2002) 185–195.
- [5] G. Navarrete-Vázquez, R. Cedillo, A. Hernández-Campos, L. Yépez-Mulia, F. Hernández-Luis, J. Valdez, R. Morales, R. Cortes, M. Hernández, R. Castillo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 187–190.
- [6] G. Navarrete-Vázquez, L. Yépez, A. Hernández-Campos, A. Tapia, F. Hernández-Luis, R. Cedillo, J. González, A. Martínez-Fernández, M. Martínez-Grueiro, R. Castillo, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 4615–4622.
- [7] R. Cedillo-Rivera, B. Chávez, A. González-Robles, A. Tapia, L. Yépez-Mulia, *J. Euk. Microbiol.* 49 (2002) 201–208.
- [8] T. Mineno, M.A. Avery, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 841–855.
- [9] G.A. Patani, E.J. LaVoie, *Chem. Rev.* 96 (1996) 3147–3176.
- [10] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25.
- [11] W.K. Milhous, N.F. Weatherly, J.H. Bowdre, R.E. Desjardins, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) 525–530.
- [12] A.M. Oduola, W.K. Milhous, N.F. Weatherly, J.H. Bowdre, R.E. Desjardins, *Exp. Parasitol.* 67 (1988) 354–360.
- [13] D.S. Peterson, W.K. Milhous, T.E. Wellems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 3018–3022.