



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

## **FACULTAD DE QUÍMICA**

### **Preparación de conjugados de Bencimidazoles antiparasitarios con aminoácidos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**GISELA YOLANDA GARCÍA TREJO**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Rocío Pozas Horcasitas  
**VOCAL:** Profesor: Rosa Luz Cornejo Rojas  
**SECRETARIO:** Profesor: Francisco Hernández Luis  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Blas Flores Pérez  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Héctor García Ortega

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR:**

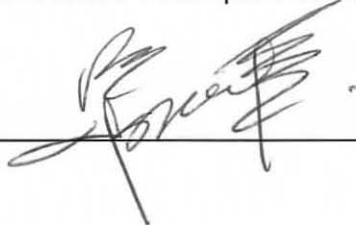
Dr. Francisco Hernández Luis



---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Israel Velázquez Martínez



---

**SUSTENTANTE:**

Gisela Yolanda García Trejo



---

*A mis padres:  
Patricia Trejo e Isaías García*

# *Agradecimientos*

**A Dios:** Por haberme dado la sabiduría para descubrir lo correcto, la voluntad para elegirlo y la fuerza para hacer que perdure.

**A mis padres:** Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Pero sobre todo, por creer en mí.

**A mis abuelos:** Por sus cuidados y consejos cuando más los he necesitado.

**A Oswaldo:** Por apoyarme en mis proyectos. Por ayudar a levantarme en mis tropiezos. Por haber estado siempre conmigo. Pero sobre todo, gracias por ser quien eres.

**A mis hermanos Raquel, Fede, Karla y Moy:** Por los ratos de felicidad que me han dado. Pero sobre todo gracias por estar conmigo.

**A Paola:** Por contagiarme tu felicidad cada vez que te veo. Por la paz que me das. Gracias por haber nacido.

**A mis tíos, primos y sobrinos:** Gracias por su lealtad y por ser parte de mi familia.

**A mis amigos de la FQ:** Dolores, Ara, Alba, Angy, Caro y Amanda.

**Al Dr. Francisco Hernández Luis:** Por permitirme ser parte del grupo de trabajo y haberme dado una segunda oportunidad. Por su paciencia, por sus consejos. Pero sobre todo, gracias por ser una magnífica persona.

**Al M. en C. Israel Velázquez Martínez:** Por sus acertados consejos en la realización de este trabajo. Por escucharme y por compartir sus conocimientos. Pero sobre todo por concederme la dicha de su amistad.

**Al Dr. Castillo y Dra. Alicia Hernández:** Por las atenciones que me han brindado y por haberme abierto las puertas de su grupo de investigación.

**A mi jurado asignado:** Rocío Pozas, Rosa Luz Cornejo, Blas Flores y Héctor García.

**A mis amigos del Lab 122:** Ceci, Eliana, M. Olivia, Toño, Fabián y Sergio.

# *Agradecimientos Institucionales*

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

A la Dirección General del Personal Académico UNAM por el apoyo recibido para la compra de reactivos y materias primas dentro del proyecto **PAPIIT-UNAM IN210809**.

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en el **Proyecto V 43629**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales y Nuria Esturau Escofet); Espectrometría de Masas (Georgina Artemisa Duarte Lisci, Margarita Guzmán Villanueva); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco), Análisis elemental (Nayeli López Balbiaux)..

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser mi segunda casa.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	3
2.1.1. El parásito.....	5
2.1.2. Ciclo de vida.....	6
2.1.3. Características clínicas de la Enfermedad de Chagas.....	8
2.1.4. Mecanismos de transmisión.....	9
2.1.4.1. Transmisión por deyecciones de triatomíneos.....	9
2.1.4.2. Transmisión por transfusión sanguínea.....	10
2.1.4.3. Transmisión a través de la placenta.....	10
2.1.5. Quimioterapia en la Enfermedad de Chagas.....	10
2.1.5.1. Nifurtimox y Benznidazol.....	10
2.1.5.2. Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol.....	11
2.2. Control vectorial.....	13
2.3. Perspectivas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos.....	13
2.4. Los bencimidazoles.....	13
2.4.1. Los bencimidazoles con actividad biológica.....	14
2.4.2. Síntesis de bencimidazoles.....	15
2.5. Los $\alpha$ -aminoácidos.....	17
2.6. Péptidos.....	19
2.6.1. Síntesis de péptidos.....	20
2.6.2. Protección del grupo amino.....	21
2.6.3. Protección del grupo carboxilo.....	22
2.7. Importancia de los aminoácidos en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
2.7.1. Efecto de los ésteres metílicos en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
2.8. Mecanismos de transporte a través de las membranas.....	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
3.1. Consideraciones para el diseño.....	30
3.2. Objetivos.....	33
3.2.1. Objetivo general.....	33

---

3.2.2.	Objetivos específicos. . . . .	33
3.3.	Hipótesis. . . . .	34
4.	PARTE EXPERIMENTAL. . . . .	35
4.1.	Parte Química. . . . .	36
4.1.1.	Instrumentación. . . . .	36
4.1.2.	Métodos de Preparación. . . . .	37
4.1.2.1.	Ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico ( <b>1</b> ). . . . .	38
4.1.3.	Procedimiento general de esterificación. . . . .	39
4.1.3.1.	Síntesis del 2-Aminopropanoato de metilo ( <b>10</b> ). . . . .	39
4.1.3.2.	Síntesis del Aspartato de dimetilo ( <b>11</b> ). . . . .	39
4.1.4.	Síntesis de <i>p</i> -toluensulfonato de L-aspartato de dibencilo ( <b>14</b> ). . . . .	40
4.1.5.	Procedimiento general para la preparación de las amidas ( <b>2-6</b> ). . . . .	40
4.1.5.1.	<i>N</i> -[(2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo ( <b>2</b> ). . . . .	41
4.1.5.2.	<i>N</i> -[(2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo ( <b>3</b> ). . . . .	41
4.1.5.3.	1-[(2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo ( <b>4</b> ). . . . .	42
4.1.5.4.	<i>N</i> -[(2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo ( <b>5</b> ). . . . .	42
4.1.5.5.	Síntesis del <i>N</i> -[(2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo ( <b>6</b> ). . . . .	43
4.2.	Parte biológica. . . . .	43
4.2.1.	Ensayos de susceptibilidad in vitro para <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	43
4.2.2.	Determinación in vitro de la susceptibilidad de los tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i> a los fármacos de prueba. . . . .	44
4.2.3.	Cuenta de parásitos por el método de Pizzi (1957). . . . .	45
4.2.4.	Determinación del porcentaje de lisis de los compuestos sobre <i>T. cruzi</i> en la fase de tripomastigotes sanguíneos. . . . .	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. . . . .	46
5.1.	Parte química. . . . .	46
5.1.1.	Constantes físicas. . . . .	46
5.1.2.	Constantes espectroscópicas y espectrométricas. . . . .	47
5.1.3.	Síntesis de conjugados bencimidazólicos ( <b>2-6</b> ). . . . .	50



5.1.4.	Síntesis del ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico ( <b>1</b> ). . . . .	53
5.1.5.	Síntesis de los compuestos finales ( <b>2-6</b> ). . . . .	53
5.2.	Parte biológica. . . . .	56
5.2.1.	Actividad biológica de los compuestos <b>2-6</b> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	56
6.	CONCLUSIONES. . . . .	58
7.	BIBLIOGRAFÍA. . . . .	60
8.	APÉNDICE. . . . .	63
9.	GLOSARIO. . . . .	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Especies de <i>Triatoma</i> transmisores de la Enfermedad de Chagas en México. . . . .	3
Figura 2.2.	Países endémicos de la Enfermedad de Chagas. . . . .	4
Figura 2.3.	Estados con mayor incidencia de casos de Enfermedad de Chagas en México de 1928 a 2004. . . . .	4
Figura 2.4.	Casos de Enfermedad de Chagas en México 1982-2005 en su fase aguda y fase crónica. . . . .	5
Figura 2.5.	Morfología de los distintos estadios de <i>T. Cruzi</i> . . . . .	6
Figura 2.6.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	7
Figura 2.7.	Signos patognomónicos de la Enfermedad de Chagas. . . . .	8
Figura 2.8.	Manifestaciones clínicas de la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas. . . . .	9
Figura 2.9.	Estructuras químicas de los compuestos utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. . . . .	10
Figura 2.10.	Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol. . . . .	12
Figura 2.11.	Equilibrio tautomérico del bencimidazol. . . . .	14
Figura 2.12.	5,6-dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol. . . . .	14
Figura 2.13.	2-(tiazol-4-il)bencimidazol (Tiabeldazol). . . . .	15
Figura 2.14.	Compuestos antiparasitarios comúnmente empleados. . . . .	15
Figura 2.15.	Estructura general de los L-aminoácidos. . . . .	18
Figura 2.16.	Estereoisomerismo en los $\alpha$ -aminoácidos. . . . .	18
Figura 2.17.	Formación de un enlace peptídico por condensación. . . . .	19
Figura 2.18.	Agentes acoplantes más utilizados en la síntesis de péptidos. . . . .	21
Figura 2.19.	Modos de transporte a través de la membrana celular de diferentes moléculas. . . . .	25
Figura 2.20.	Estructura de subunidades de tres tipos de ATPasas transportadoras de iones. . . . .	26
Figura 2.21.	Mecanismos de transporte mediado. . . . .	28
Figura 3.1.	Compuestos sintetizados por Juan Valdez. . . . .	30
Figura 3.2.	Ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico. . . . .	31
Figura 5.1.	Sistema ABX encontrado en el espectro de RMN $^1\text{H}$ de los conjugados bencimidazólicos. . . . .	52

---

**ÍNDICE DE ESQUEMAS**

Esquema 2.1.	Síntesis de bencimidazoles. . . . .	17
Esquema 2.2.	Protección del grupo amino de la alanina. . . . .	22
Esquema 2.3.	Protección del grupo carboxilo de la alanina. . . . .	23
Esquema 4.1.	Preparación de los nuevos conjugados bencimidazólicos. . .	35
Esquema 4.2.	Síntesis del ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico ( <b>1</b> ). . . . .	38
Esquema 4.3.	Esterificación de los aminoácidos L-alanina ( <b>9</b> ) y L-ácido aspártico ( <b>10</b> ) mediante el método de Fisher. . . . .	39
Esquema 4.4.	Esterificación del L-ácido aspártico ( <b>14</b> ). . . . .	40
Esquema 4.5.	Síntesis del compuesto <b>2</b> . . . . .	41
Esquema 4.6.	Síntesis del compuesto <b>3</b> . . . . .	41
Esquema 4.7.	Síntesis del compuesto <b>4</b> . . . . .	42
Esquema 4.8.	Síntesis del compuesto <b>5</b> . . . . .	42
Esquema 4.9.	Síntesis del compuesto <b>6</b> . . . . .	43

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 3.1.	Estructuras de los conjugados del ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico con aminoácidos. . . . .	32
Tabla 4.1.	Sistemas de elución cromatográfica. . . . .	37
Tabla 5.1.	Propiedades físicas de los compuestos finales. . . . .	46
Tabla 5.2.	Propiedades físicas de los compuestos intermediarios. . . . .	47
Tabla 5.3.	Constantes espectroscópicas (IR, RMN <sup>1</sup> H) y espectrométricas (EM) del ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico ( <b>1</b> ). . . . .	47
Tabla 5.4.	Constantes espectroscópicas (IR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C) y espectrométricas (EM) de los compuestos finales. . . . .	48
Tabla 5.5.	Bandas características del grupo amida de los compuestos sintetizados (cm <sup>-1</sup> ). . . . .	51
Tabla 5.6.	Bandas características del grupo éster de los compuestos sintetizados (cm <sup>-1</sup> ). . . . .	51
Tabla 5.7.	Fragmentos característicos de los compuestos sintetizados. . . . .	52
Tabla 5.8.	Resultados de la actividad antichagásica de los compuestos ( <b>2-6</b> ). . . . .	56

**RESUMEN**

En el presente trabajo se realizó la síntesis y se determinó la actividad biológica de los siguientes derivados del bencimidazol: Ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**1**); *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (**2**); *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (**3**); *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (**4**); *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo (**5**); *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (**6**). Los compuestos **1**, **2** y **6** se purificaron por recristalización; en el caso de los compuestos **3-5** se purificaron por cromatografía en placa preparativa. A los compuestos **1-6** se les determinaron sus constantes físicas (pf y R<sub>f</sub>) y se elucidó su estructura mediante técnicas espectroscópicas (Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear) y Espectrometría de Masas.

El compuesto **1** fue sintetizado a partir del ácido 3-4-diaminobenzoico (**8**) comercial, mientras que las amidas **2** a la **6** se sintetizaron a partir de **1**, preparado en el laboratorio.

Se realizaron ensayos *in vitro* contra amastigotes y tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados mostraron una escasa actividad contra este parásito.

### 1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances en el área científica y tecnológica, las enfermedades parasitarias siguen siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo como el nuestro. La alternativa, a corto y mediano plazo, para el tratamiento de estas enfermedades es la quimioterapia, debido a que el desarrollo de vacunas y las estrategias de educación sanitaria serán factibles a largo plazo. El problema que actualmente se presenta en la quimioterapia de las enfermedades parasitarias es la disposición de sólo unas cuantas sustancias para su tratamiento; como es el caso del Nifurtimox y Benznidazol para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Situación que conlleva a que, en algunos casos, se puedan presentar cepas de parásitos resistentes a los fármacos actuales. Aunado a esto, los efectos adversos que causan estos fármacos, los cuales provocan que en muchos de los casos los pacientes abandonen el tratamiento (por ser muy prolongados). Tanto el Nifurtimox como el Benznidazol, son medicamentos que sólo actúan en la fase aguda de la enfermedad.

Esto resalta la importancia del desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios más potentes y de fácil acceso a la población, que tengan efectos colaterales mínimos, y cuyos períodos de administración sean cortos.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal la síntesis de moléculas que pudiesen presentar actividad antiprotozoaria, tomando como referencia al ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (actividad antiprotozoaria conocida) y algunos aminoácidos. Se ha informado que los ésteres metílicos de algunos aminoácidos poseen actividad antiprotozoaria. En este caso en particular se utilizó la estrategia de la hibridación molecular para intentar que dicha molécula pudiese ampliar su espectro de acción antiparasitaria.

La unión de los aminoácidos y el ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico fue a través de un enlace covalente tipo amida; con la ayuda de agentes activantes, como es el caso del *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) y la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es llamada así en honor a su descubridor el Doctor Carlos Chagas (1909), quien además de describir el ciclo de vida del parásito, identificó los vectores que transmiten la enfermedad, así como los reservorios animales y sugirió algunas medidas importantes para prevenir el contagio. Esta enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, y es transmitida a los mamíferos por medio de los vectores hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae (orden Hemiptera). *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* son los vectores más importantes que transmiten la enfermedad, (Figura 2.1) (Barrett et al., 2003).

**Distribución de tres especies de triatominos en México**



**Figura 2.1.** Especies de *Triatoma* transmisores de la Enfermedad de Chagas en México ([www.paho.org/default\\_spa.htm](http://www.paho.org/default_spa.htm)).

En 1985, la OMS estimó aproximadamente que 100 millones de personas en América Latina estuvieron en riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas. (Barrett et al., 2003). Hoy en día, se calcula que en todo el mundo, principalmente en América Latina, unos 10 millones de personas están infectadas por el protozoo *Trypanosoma cruzi*.

Actualmente, más de 25 millones de personas están a riesgo de adquirir la enfermedad. Se calcula que en 2008 esta enfermedad mató a más de 10 mil personas. (WHO, 2010).

Inicialmente, la enfermedad de Chagas estaba confinada a la Región de las Américas, principalmente en América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo.



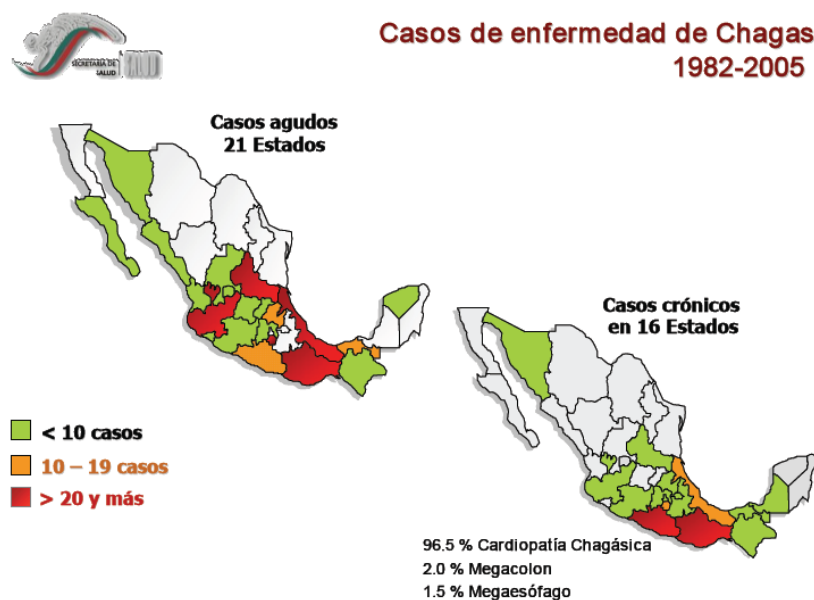
**Figura 2.2.** Países endémicos de la Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas se considera endémica desde México hasta Sudamérica (Figura 2.2) y en el caso particular de México, los reportes estadísticos del 2004 indican que las personas infectadas se concentran principalmente en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sonora, Yucatán y Zacatecas, siendo mayor la prevalencia de la enfermedad mayor en la costa del Pacífico (Figura 2.3) (WHO, 2004).



**Figura 2.3.** Estados con mayor incidencia de casos de Enfermedad de Chagas en México de 1928 a 2004. (CHAG-MEX, Instituto de Biología, UNAM. <http://www.unibio.unam.mx/chagamex>)

Según estimaciones más recientes de la Organización Mundial de la Salud - Organización Panamericana de la Salud, en el año 2005 había en México un total de 1,100,000 de infectados y 7,700 casos nuevos por transmisión vectorial (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Casos de Enfermedad de Chagas en México 1982-2005 distribuidos en fase aguda y fase crónica. (CENAVECE, <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>)

### 2.1.1. El parásito

*T. cruzi* infecta a células de mamíferos y es altamente pleomórfico, por lo cual podemos encontrar distintos estadios en su ciclo de vida. Cada estadio presenta propiedades únicas y los cambios que ocurren entre éstos se desarrollaron en respuesta a variaciones en las condiciones de su entorno. La identificación de estos estadios está basada en características morfológicas, tales como la forma general de la célula, la posición entre el cinetoplasto y núcleo, así como la región donde el flagelo emerge del saco flagelar. De acuerdo a esto, encontramos que *Trypanosoma cruzi* presenta tres estadios de desarrollo: el amastigote, el epimastigote y el tripomastigote (Figura 2.5), (Brener et al, 1973).

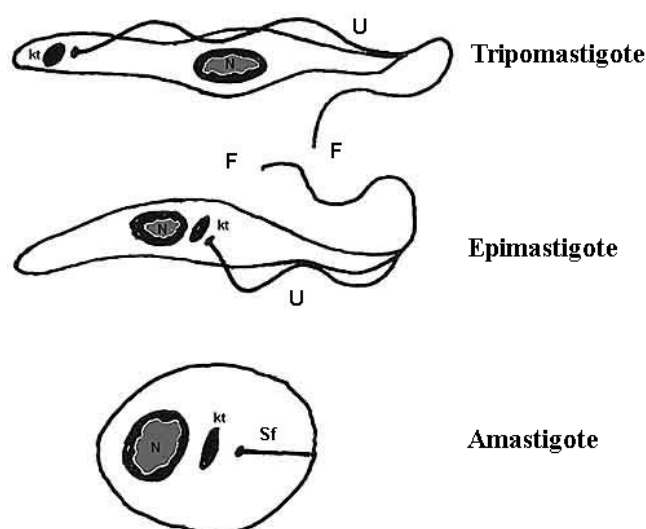
El estadio replicativo intracelular es conocido como amastigote, que es una forma redonda que mide de 3 a 5 micras de diámetro, no presenta flagelo libre, pero éste se va a encontrar dentro de una bolsa denominada saco flagelar, también se puede observar un gran núcleo y el cinetoplasto (formado principalmente por ADN y mitocondrias) (Romero et al., 1999; Tyler et al., 2001).

El estadio conocido como tripomastigote se encuentra en el mamífero hospedero de manera intracelular en los tejidos y extracelularmente en la circulación. En el vector hematófago se encuentra sólo de manera extracelular, localizado en el



intestino posterior llevando el nombre de tripomastigote metacíclico, que es la forma infectante para los mamíferos. Estas formas parasitarias no replicativas son flageladas de cuerpo alargado, que miden aproximadamente de 20 a 25 micras de longitud y presentan el cinetoplasto en posición subterminal posterior al núcleo. Del cinetoplasto surge la membrana ondulante que recorre al parásito a todo lo largo de su cuerpo y sale libre en la porción anterior (Tay et al., 1995).

Los epimastigotes son las formas replicativas extracelulares, y se localizan en el intestino medio de los insectos (vectores) en donde se multiplican. Estas formas parasitarias son de aspecto fusiforme con 20 a 25 micras de longitud, su cinetoplasto se encuentra en posición anterior y cercano al núcleo, y el flagelo forma una pequeña capa ondulante (Tay et al., 1995).



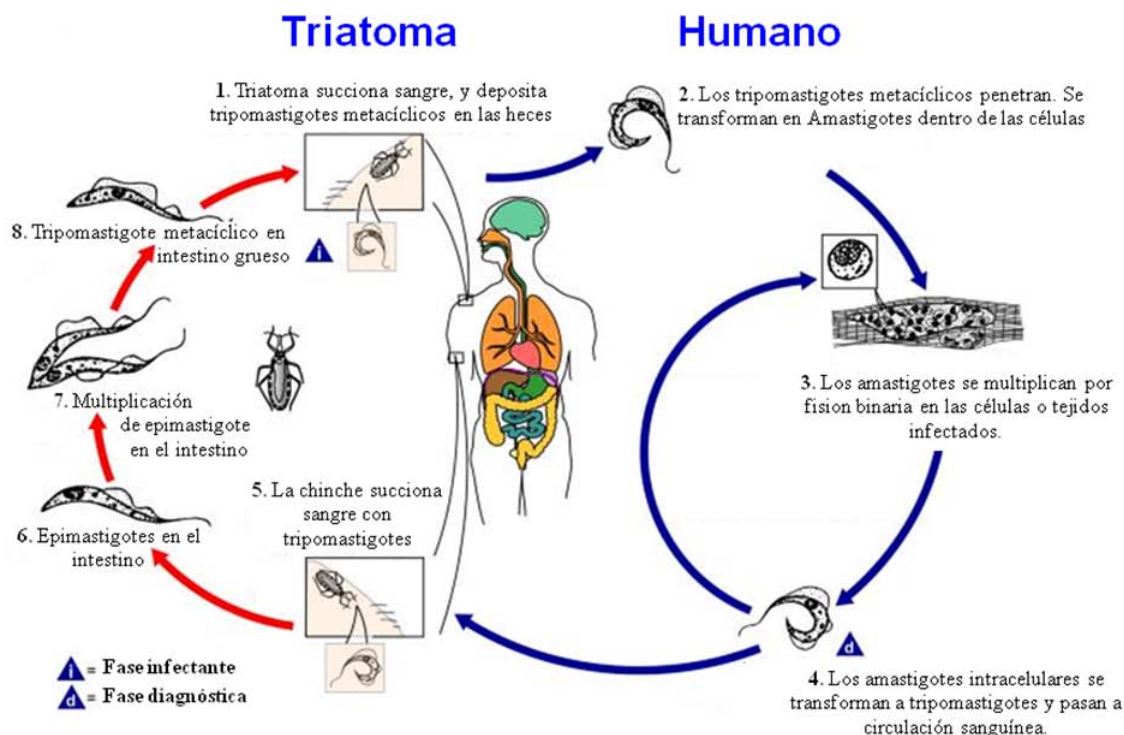
**Figura 2.5.** Morfología de los distintos estadios de *T. Cruzi* (Tripomastigote, epimastigote y amastigote).

U: membrana ondulante,  
kt: cinetoplasto,  
N: núcleo,  
F: flagelo,  
Sf: saco flagelar.

### 2.1.2. Ciclo de vida

Cuando un hematófago se alimenta con sangre contaminada de un mamífero infectado con *T. cruzi*, adquiere las formas de tripomastigotes que se encuentran en la circulación sanguínea del hospedero. Los tripomastigotes, en el intestino medio o estómago del triatomíneo, se transforman en epimastigotes, los cuales se reproducen por fisión binaria longitudinal. Al alimentarse estos triatomíneos, que tienen la capacidad de ayuno de meses, su forma aplanada se torna redonda por la cantidad de sangre que ingieren, entonces a medida que van comiendo, van empujando el contenido intestinal y con esto, en el sitio donde se alimentan, defecan, dejando entonces las heces con parásitos llamados tripomastigotes metacíclicos, ya que los epimastigotes en el intestino posterior se convierten en tripomastigotes. Los tripomastigotes metacíclicos entran en contacto con un sitio donde exista pérdida de continuidad de la piel, pudiendo penetrar al organismo. El mejor sitio es el trauma dejado por la probóscide del triatomíneo, ya que queda contiguo al sitio de la

picadura y la deyección. Lo que ocurre es que el individuo siente comezón y, al rascarse, pone en contacto las heces con el orificio de la picadura que ha dejado el triatomíneo. Mediante éste mecanismo penetran los tripomastigotes metacíclicos al organismo (autoinoculación) (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. En la figura se explican cada uno de los estadios del ciclo de vida del parásito. (Imagen tomada y modificada de [www.med.sc.edu:85/lecture/trypanosomiasis.htm](http://www.med.sc.edu:85/lecture/trypanosomiasis.htm))

La presencia de los parásitos en circulación facilita la propagación de la infección al dirigirse hacia otros tejidos. Ya encontrándose ahí y siendo un parásito que se reproduce en las células del sistema fagocítico mononuclear, puede ocurrir que sea fagocitado o que penetre a las células, y dentro de ésta o de los macrófagos, los tripomastigotes se transforman en amastigotes. Éstos se reproducen dentro de la célula hasta que la rompen, quedando libres en la circulación y transformándose nuevamente en tripomastigotes, los cuales pueden invadir nuevas células, tales como células del sistema fagocítico mononuclear, células de tejido muscular estriado y células nerviosas. Ahí se vuelven a reproducir y lisan las células, repitiéndose el ciclo biológico, quedando la posibilidad de que cuando sea picado este mamífero por un triatomíneo y le succione sangre e ingiera las formas circulantes, se cierre el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Romero et al., 1999).

### 2.1.3. Características clínicas de la Enfermedad de Chagas

Recién infectado el mamífero se produce la fase aguda de la infección, la que está caracterizada por una alta parasitemia en sangre y una extensa parasitosis de tejidos locales. Por lo general, esta fase es asintomática, pero algunas veces pueden presentarse síntomas tales como: fiebre, vómito, diarrea, anorexia, inflamación de tejido linfático, miocarditis y en algunos casos de pacientes infantiles se puede desarrollar meningoencefalitis; estos síntomas desaparecen espontáneamente después de 4 a 8 semanas sin alguna secuela aparente (WHO, 2002). Los síntomas anteriormente descritos no son característicos de la enfermedad, y pueden ser confundidos con otros padecimientos; sin embargo, en algunas ocasiones se pueden observar signos patognomónicos en el lugar de entrada del parásito. Cuando la vía de entrada es en la piel, se observa una lesión que se conoce como Chagoma y cuando se da a través de las membranas mucosas oculares, se desarrolla una conjuntivitis unilateral conocida como Síndrome de Romaña (Figura 2.7), (Barret et al., 2003). La fase aguda de la enfermedad se reconoce sólo en aproximadamente del 1-2% de los individuos que adquieren la infección (WHO, 2002). La mayoría de los casos surge principalmente entre las edades de 1 y 5 años. (Barret et al., 2003).

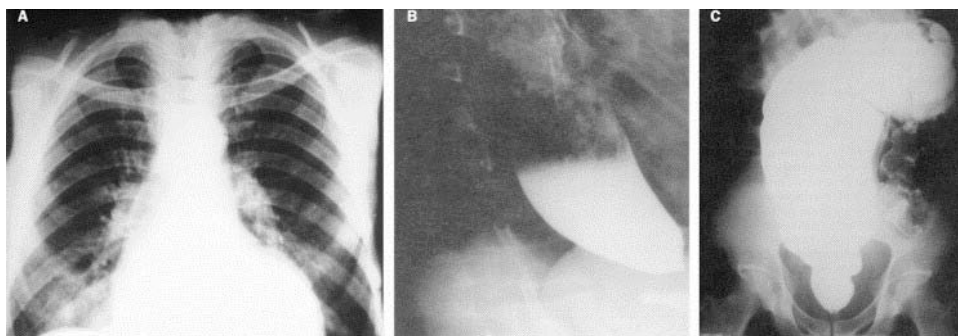


**Figura 2.7.** Signos patognomónicos de la Enfermedad de Chagas.  
(A) Chagoma; (B) Síndrome de Romaña (Barrett et al., 2003).

La alta parasitemia en sangre sigue por cerca de uno a dos meses, después de este tiempo el paciente entra a una fase latente, indeterminada o crónico-sintomática. Esta etapa está caracterizada por una baja parasitemia, ausencia de síntomas, un tiempo inespecífico de duración y detección de anticuerpos IgG anti-*T. Cruzi*. Durante esta fase, puede ocurrir la proliferación del parásito dentro de las

células, por lo que algunos autores la consideran como un periodo de aumento gradual de los síntomas característicos de la etapa crónica sintomática, posiblemente como resultado del lento desarrollo de un proceso de autoinmunidad (Takler y Snary, 1993). Cerca del 70 al 85% de los individuos infectados permanecen bajo esta condición por el resto de sus vidas (Barret et al., 2003).

Posteriormente, el individuo infectado pasa a la etapa crónica sintomática de la enfermedad, en la cual se ven afectados principalmente el corazón y el tracto digestivo. En el caso de la afección cardíaca las manifestaciones clínicas son: falla cardíaca, agrandamiento del corazón (cardiomegalia), anomalías electrocardiográficas, dilatación, arritmias y tromboembolismo, entre otras. El síndrome en conjunto es conocido como megacardio o cardiomiopatía chagásica, (WHO, 2002). La forma digestiva de la enfermedad involucra aperistaltismo y agrandamiento de las regiones del tracto digestivo, originando así las características conocidas como megaesófago y megacolon (Figura 2.8). Las formas cardíacas y digestivas parecen tener una causa común asociada con la destrucción del sistema nervioso autónomo en los órganos afectados, lo cual trae como consecuencia la reducción en el tono y en la eficiencia muscular. (Takle y Snary et al, 1993). Las células ganglionares también son destruidas tanto por la infección con los parásitos como por la acción de anticuerpos generados. Dadas las características anteriormente mencionadas, aproximadamente un 60% - 70% de las personas que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad mueren (WHO, 2002).



**Figura 2.8.** Manifestaciones clínicas de la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas. La forma cardíaca es conocida como megacardio (A). La forma digestiva involucra megaesófago (B) y megacolon (C) (tomado de Barret, 2003).

#### 2.1.4. Mecanismos de transmisión

El hombre puede infectarse con *T. cruzi* de diversas maneras:

##### 2.1.4.1. Transmisión por deyecciones de triatomíneos

Es la forma más importante de transmisión, ya que es el mecanismo natural de la infección y sucede como ya se ha explicado, cuando un triatomíneo defeca sobre el huésped, depositando junto con las materias fecales a los tripomastigotes

metacíclicos, los cuales pueden penetrar la piel indemne, por el sitio de la picadura, en el momento del rascado, al frotarse los ojos con los dedos contaminados con materias fecales de triatomíneos infectados o por la mucosa oral o nasal.

#### 2.1.4.2. Transmisión por transfusión sanguínea

Esta vía de transmisión sucede con relativa frecuencia, ya que en los países donde no se tiene un control adecuado de los donadores de sangre, al usar sangre infectada pasa *T. cruzi* a otras personas, ya que mantiene su viabilidad a la temperatura de refrigerador de 4°C hasta por dos meses.

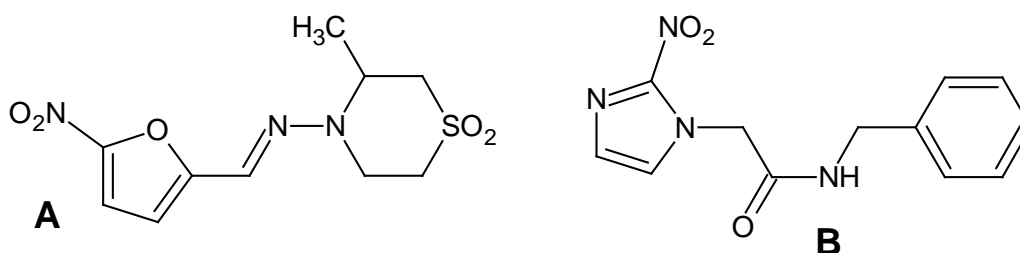
#### 2.1.4.3. Transmisión a través de la placenta

Constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas, ya que durante la segunda mitad de la gestación, los tripomastigotes sanguíneos de la madre pueden atravesar la barrera placentaria e infectar al producto.

### 2.1.5. Quimioterapia en la Enfermedad de Chagas

#### 2.1.5.1. Nifurtimox y Benznidazol

Los fármacos más frecuentemente utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos, un nitrofurano, el nifurtimox (Lampit® Bayer; <http://www.bayer.com/>); y un derivado nitroimidazólico, el benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche; <http://www.roche.com/>) (Figura 2.9) (Urbina et al., 2003). El nifurtimox es administrado en una dosis oral de 8–10mg/Kg por día, y después de 3.5 horas se advierten los valores plasmáticos máximos (10 a 20 µM). El benznidazol es administrado también por vía oral a una dosis de 5 mg/Kg por día, logrando los niveles plasmáticos máximos de 3 a 4 horas después (8.5 a 10.8 µM) (Goodman et al, 2003).



**Figura 2.9.** Estructuras químicas de los compuestos utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Nifurtimox (A) y Benznidazol (B). En ambos compuestos la presencia del anillo nitroderivado en su estructura es determinante para su actividad biológica.

Ambos compuestos presentan una significativa actividad durante la fase aguda, logrando más del 80% de la cura parasitológica en pacientes bajo tratamiento, la cura parasitológica se logra cuando el paciente presenta resultados negativos en las pruebas parasitológicas y serológicas. Sin embargo, su eficacia varía

de acuerdo al área geográfica, probablemente debido a las diferencias en la susceptibilidad que tienen las cepa de *T. cruzi* con el fármaco (Urbina et al., 2003).

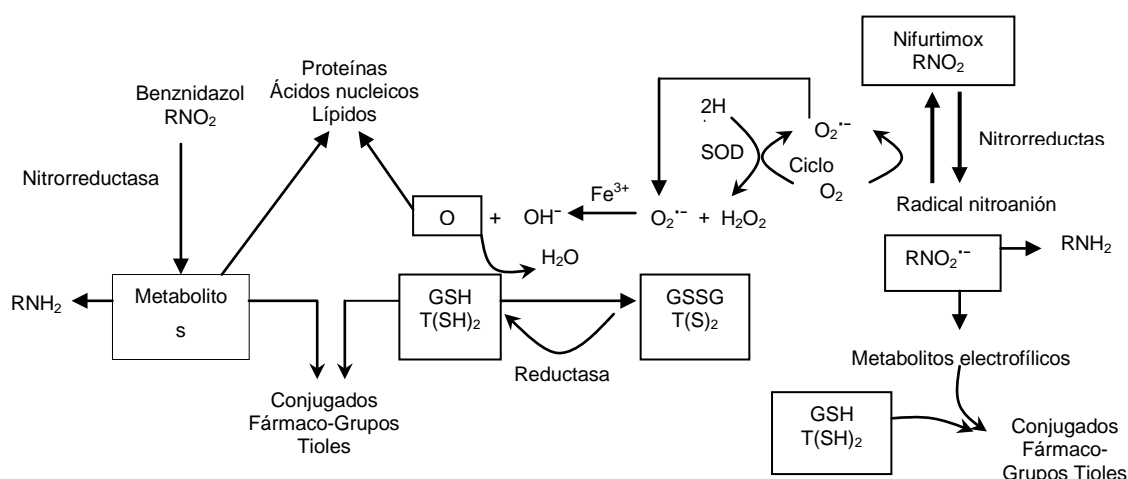
En la última década, el benznidazol ha sido reportado por su significativa actividad curativa durante la fase crónica ya que, en un estudio realizado en Argentina y Brasil, se logró más del 60% de la cura parasitológica en niños infectados tratados con este compuesto (Sosa Esteani et al, 1998). Sin embargo, resultados recientes (utilizando ambos fármacos, benznidazol y nifurtimox) han contradicho esta conclusión (Urbina et al., 2003). Ambos fármacos tienen significativos efectos colaterales, probablemente como una consecuencia del daño oxidativo o reductivo en los tejidos hospederos. Estos efectos colaterales incluyen: anorexia, vomito, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica, y éstos en algunos casos pueden causar la interrupción del tratamiento (Urbina et al., 2003).

La mayor limitación de estos compuestos es su baja actividad antiparasitaria en la fase crónica de la enfermedad porque mas del 80% de los individuos tratados no consiguieron la cura parasitológica (Urbina et al., 2003).

Las razones que marcan la diferencia en la eficacia antiparasitaria que tiene los compuestos nitroheterocíclicos durante la fase aguda y crónica de la enfermedad son desconocidas, pero puede deberse a las desfavorables propiedades farmacocinéticas de los fármacos durante la fase crónica.

#### **2.1.5.2. Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol**

El Nifurtimox y el Benznidazol actúan vía la formación de radicales libres o de metabolitos electrofílicos. El grupo nitro presente en ambas moléculas es reducido a un grupo amino por la acción de nitrorreductasas con la formación de varios radicales libres y metabolitos electrofílicos. Este proceso inicia con la reacción catalizada por la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa, que actúa en el grupo nitro de la molécula ( $R-NO_2$ ) produciendo el radical nitro anión intermedio ( $R-NO_2^{\cdot-}$ ). Este radical entra a un ciclo redox con el oxígeno molecular, el cual se reduce parcialmente al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), mientras que el fármaco se regenera. El anión superóxido dismuta a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en presencia de  $Fe^{3+}$  forma el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) el cual va a unirse a lípidos, proteínas y DNA provocando un daño sobre ellos, o bien se puede unir directamente al glutatión y el tripanotión libre (Figura 2.10), (Maya et al., 2006).



**Figura 2.10.** Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol. El grupo nitro de ambos compuestos es reducido a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de nitrorreductasas. Este radical nitroanión del Nifurtimox puede unirse directamente al glutatión (GSH) y tripanotión (T(SH)<sub>2</sub>) del parásito o bien puede entrar a un ciclo redox con el oxígeno presente y formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden a su vez formar el radical hidroxilo, el cual va a unirse a las macromoléculas del parásito (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, así como la glutatión (GSH) y tripanotión libre (TSH)<sub>2</sub>). Los metabolitos electrofílicos formados a partir del Benznidazol también pueden afectar las macromoléculas anteriormente mencionadas (Maya et al., 2006).

En un estudio realizado por Docampo y Stoppani en 1979, se sugiere que la reducción intracelular del nifurtimox genera un radical a partir del grupo nitro, que a su vez sigue el ciclo redox que trae como consecuencia la formación del anión superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esto indica que la generación de radicales libres de oxígeno es el principal mecanismo de acción del nifurtimox, dado que estos radicales van a ser capaces de unirse a las macromoléculas del parásito provocando peroxidación de lípidos, destrucción de membranas, daño a ADN, unión a proteínas e inactivación de enzimas (Goijman y Stoppani et al., 1983). Dentro de las enzimas que se pueden ver inactivadas por la acción del nifurtimox se encuentra la enzima tripanotión reductasa, la cual es importante en los procesos de detoxificación del parásito (Raether y Hanel et al., 2003). De la misma forma puede unirse a tioles libres como tripanotión y glutatión del parásito, limitando así sus mecanismos de detoxificación a radicales libres (Maya et al., 1997).

El mecanismo de acción del benznidazol no depende de radicales libres de oxígeno como el caso del nifurtimox (Urbina et al., 2003). Al parecer los metabolitos reducidos del benznidazol se van a unir covalentemente con las moléculas sin pasar por un ciclo redox, afectando de esta manera al ADN y a los lípidos (Goijman y Stoppani et al., 1983). Además es capaz de disminuir los niveles de tripanotión, glutatión y de la enzima tripanotión reductasa.

## 2.2. Control vectorial

No hay vacuna contra la enfermedad de Chagas. Por lo que el método más eficaz para prevenir la transmisión de la enfermedad en América Latina, es el control vectorial. La enfermedad de Chagas, es una patología peridomiciliaria, ya que la mayor parte de las personas infectadas fueron picadas por el insecto dentro de su propia vivienda. Los triatomíneos residen en lugares oscuros, grietas en muros y techos de paja de viviendas precarias. Por lo tanto, el método principal de control vectorial de la enfermedad de Chagas comprende el rociamiento de las viviendas con insecticidas de efecto residual y, de manera secundaria, el manejo y ordenamiento del ambiente y el mejoramiento de la vivienda rural. A esto también debe sumarse la implementación de planes de educación para la salud de las personas que residen en lugares endémicos. Los países Latinoamericanos afectados por esta patología han implementado numerosas campañas, con las características antes mencionadas, para el control del vector (Dias et al; 2002).

Hasta el momento, las iniciativas regionales en América Latina han resultado en una reducción notable del número de casos de unos 16-18 millones en 1990 a unos 9 millones en 2006. Se ha interrumpido la transmisión de la enfermedad en Chile, Uruguay, en una gran parte del Brasil y en vastas áreas de Centroamérica, Argentina, Bolivia y Paraguay. Al ampliar la red de Chagas del control nivel regional al nivel mundial, la OMS espera que la eliminación mundial de esta enfermedad se convertirá en una posibilidad viable (OMS, 2007).

## 2.3. Perspectivas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos

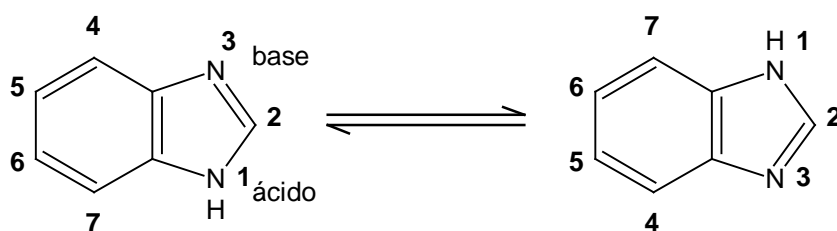
*Trypanosoma cruzi* posee numerosas características estructurales y metabólicas que lo diferencian de sus huéspedes mamíferos. La explotación de dichas divergencias para el desarrollo de nuevas drogas destinadas al tratamiento de la enfermedad es actualmente tema de investigación de numerosos grupos científicos de América Latina y de otras partes del mundo.

## 2.4. Los bencimidazoles

La estructura de la molécula del bencimidazol consiste en un sistema anular bicíclico, donde un anillo de benceno se encuentra fusionado a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol (Townsend et al., 1990).

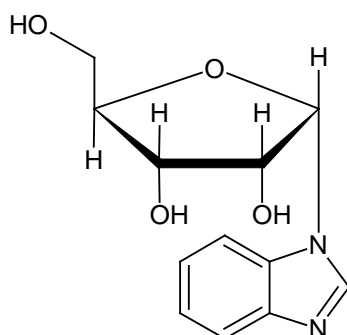
Cuando la molécula de bencimidazol no se encuentra *N*-sustituida se puede comportar como ácido o base y se puede encontrar en equilibrio tautomérico (Figura 2.11); este equilibrio intramolecular afecta a las posiciones 5 y 6 del anillo (Townsend et al., 1990).





**Figura 2.11.** Equilibrio tautomérico del bencimidazol.

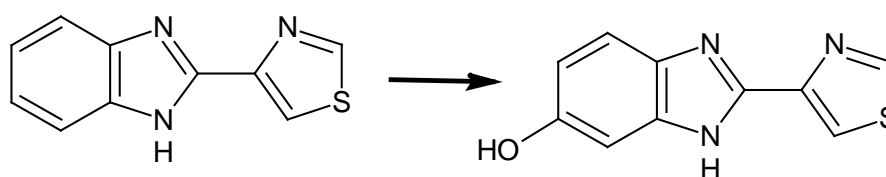
El interés en los bencimidazoles, como un núcleo base para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos potenciales, fue establecida aproximadamente en 1950, cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol (Figura 2.12) formaba parte de la estructura de la vitamina B<sub>12</sub>. Debido a esto se han obtenido cientos de compuestos que tienen un amplio espectro de actividad biológica, como: antihelmínticos, antimicrobianos, pesticidas, anticancerígenos, antiprotozoarios y otras actividades farmacológicas. Como consecuencia de la amplia funcionalidad relacionada con el núcleo del bencimidazol, la facilidad de llevar a cabo varias reacciones orgánicas en dicho núcleo, y su asociación con biomoléculas se ha presentado un amplio campo de investigación por parte de varios laboratorios de todo el mundo para explorar su síntesis y efectos biológicos.



**Figura 2.12.** 5,6-dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol.

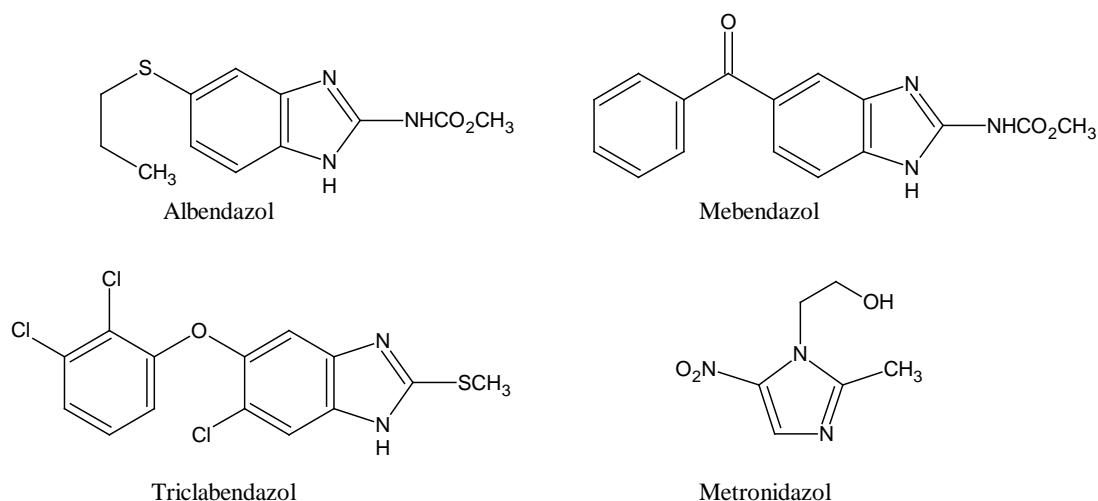
#### 2.4.1. Los bencimidazoles con actividad biológica

La primera molécula de bencimidazol utilizada con fines de tratamiento contra parásitos fue el tiabendazol (Figura 2.13), descubierto por el grupo Merck en 1961. Inicialmente su utilización se enfocó al área veterinaria para después pasar al uso en humanos. Aunque el tiabendazol muestra un amplio espectro contra diferentes helmintos en humanos y animales, tiene la limitante de ser metabolizado para dar el compuesto inactivo 5-hidroxitiabendazol.



**Figura 2.13.** 2-(tiazol-4-il)benzimidazol. Metabolismo del Tiabendazol a 5-hidroxitiabendazol, un compuesto inactivo.

Posteriormente, apareció una nueva generación de benzimidazoles sustituidos; en posición 5, para evitar su metabolismo; y en la posición 2, un grupo carbamato de metilo para aumentar la vida media de los nuevos antihelmínticos, con la desventaja de ser pobremente absorbidos, lo que limita su acción a nivel sistémico. Ejemplos de estos compuestos son el mebendazol, albendazol y fluobendazol (Figura 2.14).



**Figura 2.14.** Compuestos antiparasitarios más comúnmente empleados.

El reemplazo del anillo del benzimidazol por otros anillos heterocíclicos, tales como azaindol o imidazopiridina, son usualmente menos activos. El anillo del benzimidazol ha sido objeto de modificaciones estructurales con el propósito de tener moléculas más activas y potentes.

#### 2.4.2. Síntesis de benzimidazoles

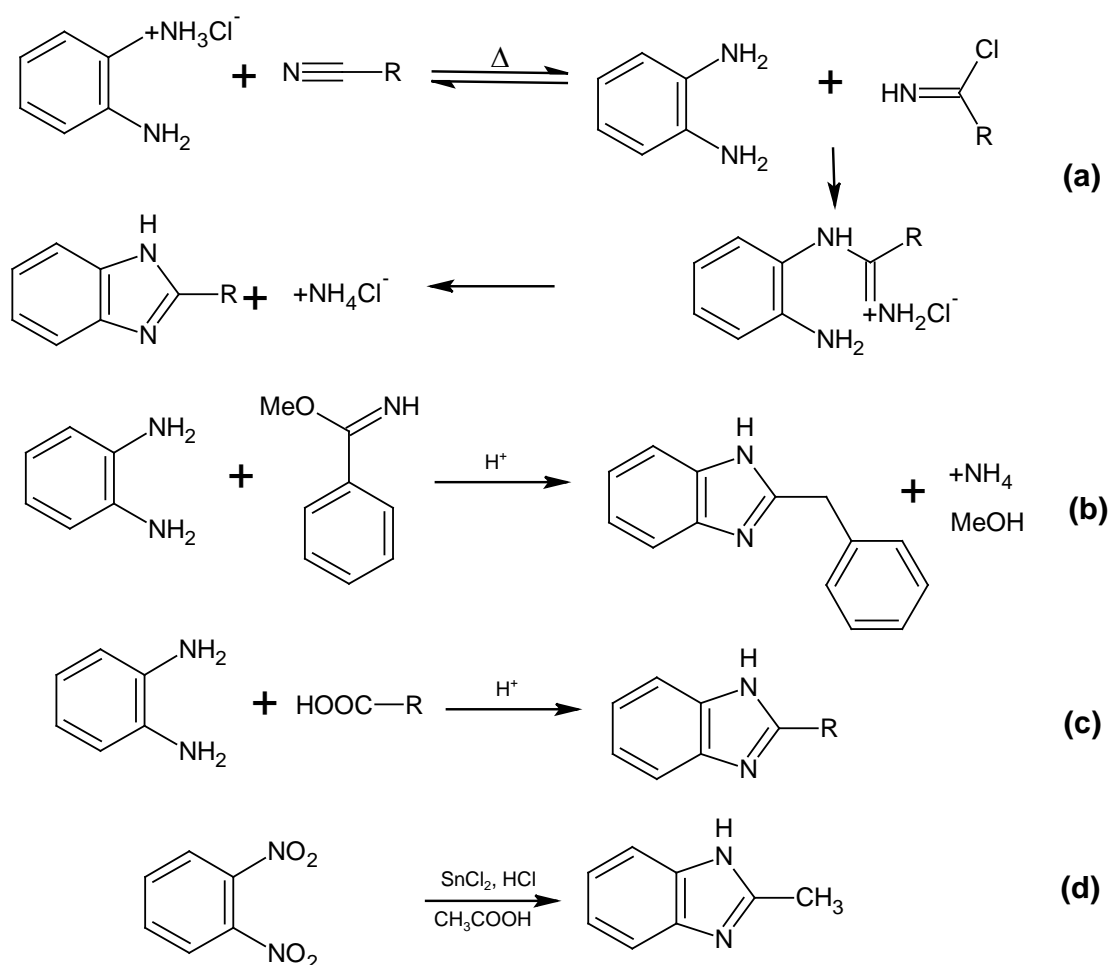
Un método tradicional para la síntesis de benzimidazoles es la reacción del 1,2-diaminobenceno con ácidos carboxílicos bajo rigurosas condiciones de deshidratación, utilizando fuertes ácidos tales como: ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido bórico o ácido *p*-toluensulfónico. Sin embargo, el uso de reactivos suaves, particularmente ácido de Lewis, sales inorgánicas, o ácidos minerales, han mejorado tanto el rendimiento como la pureza de la reacción.

En forma práctica, la síntesis de bencimidazoles consiste en la interacción de una *o*-fenilendiamina y un ácido carboxílico, método descubierto por Ladenburg. Un método ampliamente estudiado para la preparación de bencimidazoles, consiste en poner a reflujo una mezcla de una mol de la *o*-fenilendiamina y una mol ácido carboxílico o anhídrido acético diluido en ácido clorhídrico. Este método fue desarrollado por Phillips y es conocido como Síntesis de bencimidazoles de Phillips. En general, se ha observado que las reacciones con ácidos alifáticos dan un mayor rendimiento del bencimidazol que en comparación con ácidos aromáticos. Mayores rendimientos se dan cuando la reacción se lleva a una temperatura que oscila entre 180 y 190 °C.

Un método alterno es la síntesis de bencimidazoles vía condensación de 1,2-diaminobencenos con aldehídos. Esta reacción requiere un agente oxidativo para generar los núcleos de bencimidazol. Entre algunos agentes oxidativos que se emplean para la generación del núcleo de bencimidazol se encuentran: el nitrobenzono, la benzoquinona, el metabisulfito de sodio, el óxido de mercurio, el tetraacetato de plomo, iodo, acetato cúprico, así como también el aire. Por otra parte, una gran variedad de bencimidazoles pueden también prepararse vía acoplamiento de 1,2-diaminobencenos con derivados de ácidos carboxílicos tales como: nitrilos, imidatos, ortoésteres, anhídridos o lactonas.

Un método recíproco en la síntesis de bencimidazoles se da a partir 2-nitroanilinas, mediante un proceso de 2 pasos. En el primer paso, el grupo nitro se reduce usando uno agente reductor (zinc, hierro, estaño, cloro, hidrógeno, o reactivo de Níquel). El segundo paso consiste en cerrar el anillo de la 2-aminoanilina derivada ya sea con un ácido carboxílico o un aldehído. Sin embargo, este procedimiento algunas veces requiere reacciones adicionales para preparar las anilinas iniciales que comprometen el rendimiento y pureza del producto final. (Mahiuddin, 2007).

En el esquema 2.1 se muestra un resumen de los diferentes métodos de síntesis de bencimidazoles utilizando los métodos mencionados anteriormente.



**Esquema 2.1.** Síntesis de bencimidazoles a partir de: (a) nitrilos alifáticos, (b) iminoeteres, (c) ácidos carboxílicos y (d) nitroarilaminas.

## 2.5. Los $\alpha$ -aminoácidos

Los  $\alpha$ -aminoácidos son moléculas que en su estructura química tienen un átomo de carbono central, llamado carbono alfa ( $\alpha$ ), unido a un grupo amino, un grupo carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo R. El átomo de carbono  $\alpha$  es por tanto un centro quiral (excepto la glicina) (Figura 2.15). Debido a este ordenamiento tetraédrico de los orbitales de enlace alrededor del átomo de carbono, los cuatro grupos diferentes pueden ocupar dos ordenamientos diferentes en el espacio que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Estas dos formas constituyen un tipo de estereoisómeros denominados enantiómeros. Todas las moléculas con un centro quiral son también ópticamente activas, es decir, hacen girar el plano de la luz polarizada.

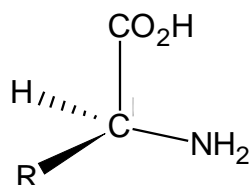


Figura 2.15. Estructura general de los L-aminoácidos

Para especificar la configuración absoluta de una molécula con un átomo de carbono que está unido a cuatro sustituyentes diferentes, el cual se nombra como carbono asimétrico, centro asimétrico, centro quiral, carbono quiral o, últimamente, centro estereogénico; se ha desarrollado una nomenclatura especial. Las configuraciones absolutas de los azúcares sencillos y los aminoácidos se especifican mediante el sistema D, L, basado en la configuración absoluta del azúcar de tres átomos de carbono, el gliceraldehído, según una convención propuesta por Emil Fischer en 1891. Para todos los compuestos quirales, los estereoisómeros que tienen una configuración relacionada con el D-gliceraldehído se designa como D. Los grupos funcionales de la L-alanina están relacionados con los del L-gliceraldehído por conversiones químicas sencillas. Así, el grupo carboxilo de la L-alanina ocupa la misma posición respecto al carbono quiral que el grupo aldehído del L-gliceraldehído puesto que un aldehído puede oxidarse fácilmente en un ácido carboxílico (Figura 2.16). Las denominaciones similares *l* y *d* se utilizan para levógiro (que gira la luz a la izquierda) y dextrógiro (que gira la luz a la derecha).

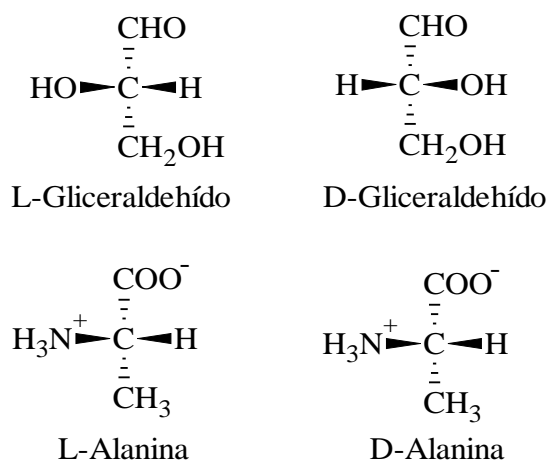


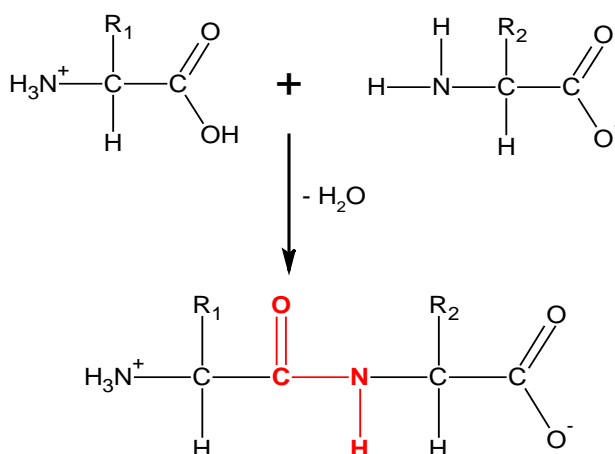
Figura 2.16. Estereoisomerismo en los  $\alpha$ -aminoácidos. La relación estérica de los estereoisómeros de la alanina con la configuración absoluta del L y D-gliceraldehído. En estas formulas de perspectiva los carbonos están alineados verticalmente con el átomo quiral en el centro. Los carbonos de estas moléculas están numerados empezando con los carbonos aldehído o carboxilo en el extremo, 1 a 3 de arriba abajo. Cuando se presenta de esta forma, el grupo R del aminoácido está siempre debajo del carbono  $\alpha$ . Los L-aminoácidos son los que tienen el grupo amino a la izquierda y los D-aminoácidos los que tienen el grupo amino a la derecha.

En estado sólido los aminoácidos existen como iones dipolares o zwitterión, una forma en la cual el grupo carboxilo está presente como ión carboxilato ( $\text{R-COO}^-$ ), y el grupo amino está presente como una amina protonada, ( $\text{R-NH}_3^+$ ). En solución acuosa, existe un equilibrio entre el ion dipolar y las formas aniónicas y catiónicas de un aminoácido (Solomons, 1985).

Debido a que los aminoácidos exhiben el carácter de zwitteriones, poseen propiedades físicas que son características de los compuestos iónicos. Por ejemplo, la mayor parte de los L-aminoácidos tienen puntos de fusión próximos a 300°C, mientras que los derivados no iónicos funden habitualmente alrededor de 100°C. Además, los aminoácidos, al igual que otros compuestos iónicos, son más solubles en disolventes polares que en los disolventes no polares (VOET, 1992).

## 2.6. Péptidos

Dos moléculas de aminoácidos pueden unirse de forma covalente a través de un enlace tipo amida, conocido comúnmente como enlace peptídico, formando así un dipéptido. Este enlace se forma por eliminación de agua (deshidratación) (Figura 2.17). La formación del enlace peptídico es un ejemplo de una reacción de condensación, un tipo de reacción frecuente en las células vivas. En condiciones bioquímicas normales, la reacción de la Figura 2.17 tiene un equilibrio que favorece más a los reactivos que a los productos. Para conseguir que sea termodinámicamente más favorable, es necesario modificar el grupo carboxilo de modo que su grupo hidroxilo sea un mejor grupo saliente; o activar el grupo carbonilo intercambiando el grupo hidroxilo por otro grupo fácil de eliminar.



**Figura 2.17.** Formación de un enlace peptídico por condensación. El grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido (con el grupo  $\text{R}_2$ ) actúa como nucleófilo desplazando el grupo hidroxilo de otro aminoácido (el grupo  $\text{R}_1$ ), para formar un enlace peptídico. Los grupos amino son buenos nucleófilos, pero el grupo hidroxilo es un mal grupo saliente, por lo que no es desplazado fácilmente.

Se pueden unir tres aminoácidos mediante dos enlaces peptídicos para formar un tripéptido; de manera similar se pueden unir aminoácidos para dar tetra y pentapéptidos, etc. Cuando se unen unos pocos aminoácidos así, la estructura resultante es un oligopéptido. Cuando se unen muchos aminoácidos el producto es un polipéptido. Por convención, el residuo aminoácido del extremo de un péptido que tiene un grupo  $\alpha$ -amino libre es el residuo amino-terminal (o *N*-terminal); el residuo del otro extremo, que tiene un grupo carboxilo libre, es el residuo carboxilo-terminal (*C*-terminal).

### 2.6.1. Síntesis de péptidos

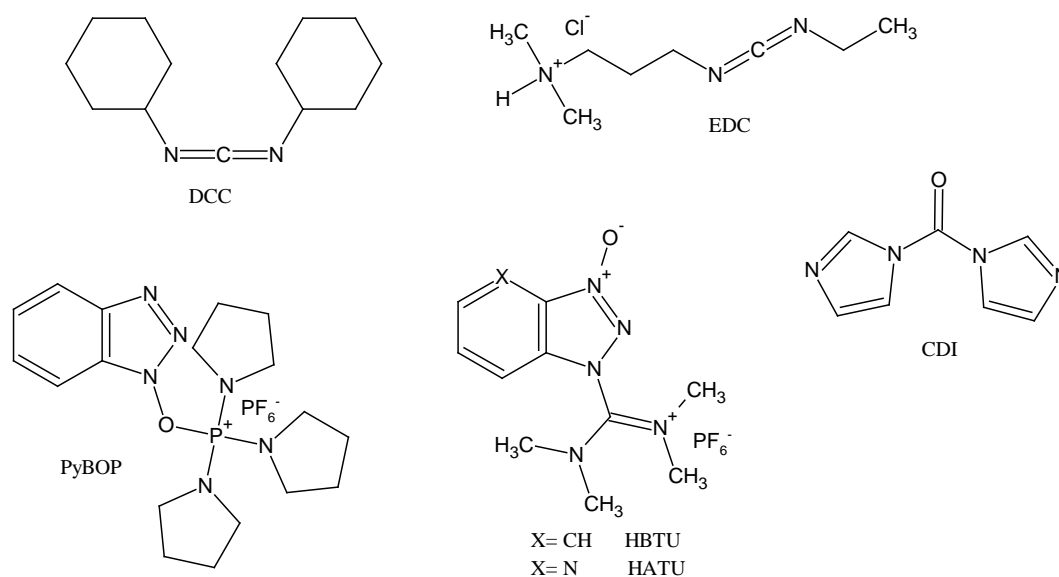
En la formación de un enlace peptídico, el grupo carboxilo del aminoácido con  $R_1$  tiene que ser activado por medio de un agente acoplante (también conocido como activante), para que posteriormente el grupo amino del aminoácido con  $R_2$  pueda unirse al carbono del carboxilo del aminoácido con  $R_1$  (Figura 2.17).

Actualmente existe una gran variedad de agentes acoplantes que son utilizados para la síntesis de péptidos. Estos agentes acoplantes están agrupados en reactivos de fosfonio, uronio, imonio, carbodiimida, imidazolio, organofosforados, etc. (Figura 2.18) (Han et al., 2004).

La era de reactivos de acoplamiento de péptidos comenzó en 1955 con la introducción de la dicitclohexilcarbodiimida (DCC), que en ese momento ya estaba muy bien estudiada, como un reactivo para la formación del enlace amida. Desafortunadamente, las carbodiimidias, debido a su alta reactividad provocan racemización y reacciones indeseables durante la reacción de acoplamiento, han sido sustituidas por otros agentes acoplantes.

Otro desarrollo significativo en las reacciones de acoplamiento de aminoácidos es el descubrimiento de supresores de racemización. La racemización puede ocurrir en el C-término de aminoácido durante el curso de una reacción de acoplamiento debido a la acidez del hidrógeno alfa y a la formación de un intermedio de oxazolona.

Las aminas terciarias como diisopropiletilendiamina (DIPEA) y trietilamina (TEA) son comúnmente utilizadas en la síntesis de péptidos debido que son bases no nucleofílicas; sin embargo pueden inducir racemización, por lo que se prefiere una base con un  $pK_a$  moderado, como lo es la morfolina ( $pK_a = 8.4$ ).



**Figura 2.18.** Agentes acoplantes más utilizados en la síntesis de péptidos. La DCC y el clorhidrato de la 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carbodiimida (EDC), pertenecen al grupo de las carbodiimidas. El hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(pirrolodino)fosfonio (PyBOP), pertenece al grupo fosfonio. El hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HBTU) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), pertenecen al grupo uronio. El 1,1'-barbonildiimidazol (CDI), pertenece al grupo imidazolio.

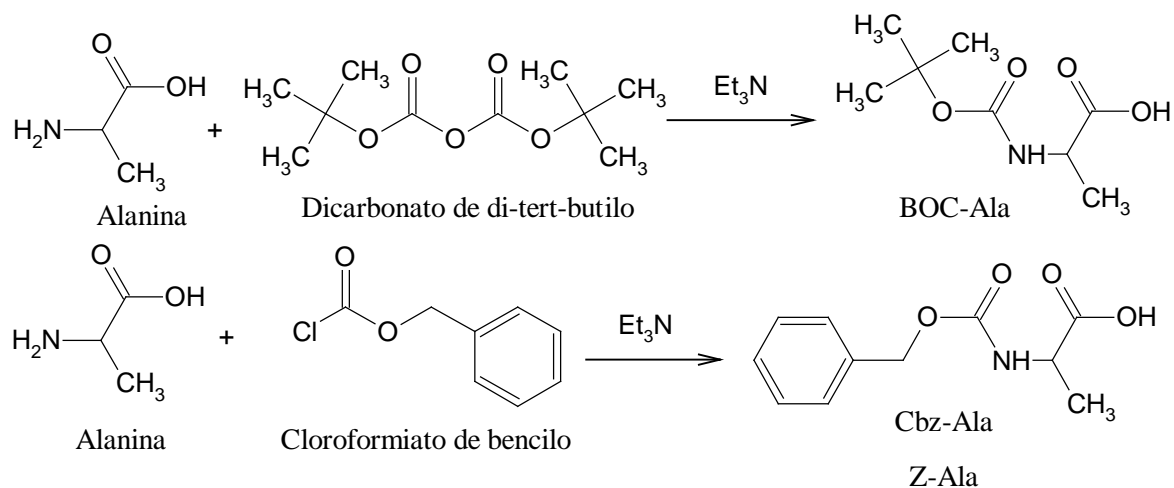
### 2.6.2. Protección del grupo amino

Los métodos más comunes para la protección del grupo amino incluyen la conversión de aminas primarias y secundarias a aminas terciarias (usualmente bencilo), a amidas (carbamatos) y a sulfonamidas.

Los grupos amino son fácilmente convertidos a derivados de uretanos o carbamatos (N-COOR), los cuales son amidas y ésteres. Estos son los más utilizados en la síntesis de péptidos para la protección del grupo amino. Uno de los más populares es el carbamato de *tert*-butilo (*tert*-butoxicarbonil, [NCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], *N*-BOC). El dicarbonato de di-*tert*-butilo ([ (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OCO]<sub>2</sub>O) bajo condiciones básicas da como producto aminas BOC-protégidas (Esquema 2.2). Este grupo es sensible a condiciones ácidas fuertes, pero es estable frente a nucleófilos, organometálicos, hidrogenación y agentes oxidantes. El grupo BOC es usualmente removido por tratamiento con HCl acuoso o en presencia de ácido trifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOH).

Otro carbamato muy popular es el carbamato de bencilo (N-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, *N*-Cbz, *N*-Z, benciloxicarbonil), el cual se ha utilizado desde 1932 (Esquema 2.2). El grupo bencilo es introducido por reacción de una amina con cloroforniato de bencilo (PhCH<sub>2</sub>OCOCI) en presencia de una base (triethylamina). Este grupo es estable a condiciones ácidas y básicas (pH 1-12), nucleófilos, organometálicos y ácidos de Lewis. El grupo es sensible a hidrogenólisis, por lo que la hidrogenación catalítica es el método más utilizado para la removerlo.





**Esquema 2.2.** Protección del grupo amino de la alanina. Se ilustran los 2 grupos más populares utilizados en la síntesis de aminoácidos.

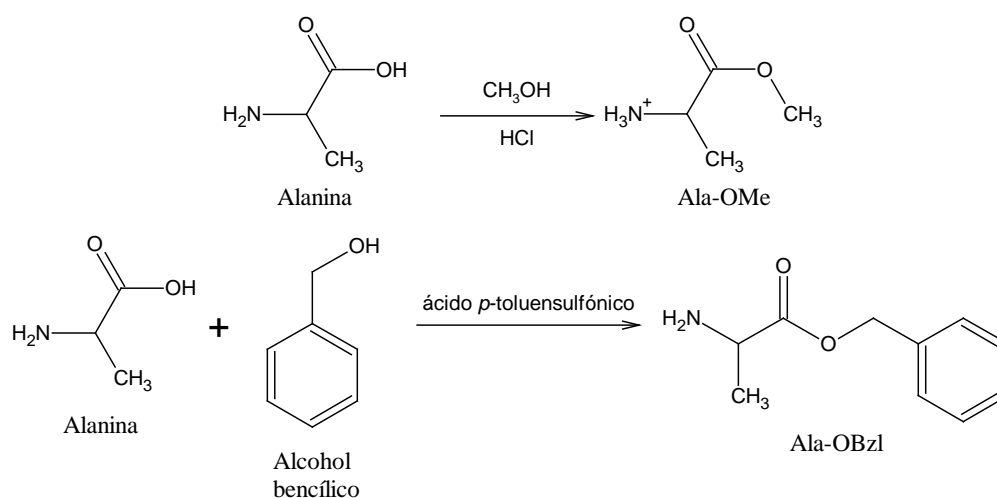
### 2.6.3. Protección del grupo carboxilo

A menudo, los grupos carboxilo se protegen convirtiéndolos en sus ésteres metílico o bencílico. Ambos grupos son fáciles de introducir con los métodos estándares de formación de ésteres y son fáciles de eliminar mediante una hidrogenólisis suave (éster bencílico) o con NaOH acuosa (éster metílico).

Los ésteres metílicos son formados por una reacción entre el metanol y el ácido correspondiente, en presencia de catálisis ácida (esterificación de Fischer).

Los aminoácidos reaccionan fácilmente con cloruro de hidrógeno metanólico, para formar el clorhidrato del éster metílico correspondiente; usualmente son compuestos estables cristalinos (Esquema 2.3). El tratamiento con cloruro de tionilo y metanol es un método alternativo. El clorhidrato puede ser neutralizado para dar su correspondiente base libre.

Los ésteres bencílicos de aminoácidos se preparan por esterificación con alcohol bencílico, utilizando como catalizador el ácido *p*-toluensulfónico, removiendo el agua generada por mezcla azeotrópica con ayuda de la trampa de Dean and Stark.



**Esquema 2.3.** Protección del grupo carboxilo de la alanina. Se ilustran 2 métodos de esterificación, utilizados en la síntesis de péptidos.

## 2.7. Importancia de los aminoácidos en *Trypanosoma cruzi*

Los aminoácidos juegan varios papeles importantes en la biología de los parásitos del género *trypanosoma*. En el caso específico de *Trypanosoma cruzi*, la forma de epimastigote tiene la habilidad de metabolizar la asparagina, glutamina, aspartato, glutamato (Zeledón, 1960), leucina (Mancilla et al, 1967), prolina e isoleucina (Sylverter y Krassner, 1976). La presencia de una arginina cinasa que reversiblemente convierte la arginina a fosfoarginina, involucra a la arginina en un proceso donde la energía celular es crítica; el crecimiento y la supervivencia en condiciones extremas de estrés son un ejemplo de esto. Algunos aminoácidos neutros y ácidos, principalmente la glicina, alanina, prolina y glutamato fueron implicados en la osmoregulación y en el control del volumen celular (El Rohloff et al., 2003) y la prolina, glutamato y aspartato también promueven el metacicloogénesis, el proceso de diferenciación del epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (Contreras et al., 1985). Además, se ha demostrado recientemente que la prolina es esencial para el diferenciación de epimastigotes intracelulares a tripomastigotes (Tonelli et al., 2004). El glutamato es un intermedio metabólico de la prolina, que es reconocido como fuente de energía y carbono en el ciclo del ácido tricarbóxico (Canepa et al., 2005).

El transporte de aminoácidos en los parásitos representa el primer paso en sus vías metabólicas. Las propiedades cinéticas, termodinámicas y mecánicas de los procesos de transporte determinan la disponibilidad del substrato en el medio intracelular. Este hecho hace a la caracterización de transportadores como un propósito de mayor importancia en investigación de rutas metabólicas, así como también en el diseño de nuevos fármacos tripanocidas. Actualmente solo se han descrito tres sistemas de transporte de aminoácidos en *Trypanosoma cruzi*. Para la prolina (Silvestre et al., 1976), arginina (Sydney et al., 2006) y glutamato (Canepa et al., 2005).

### 2.7.1. Efecto de los ésteres metílicos en *Trypanosoma cruzi*

Los éteres metílicos de L-aminoácidos se han identificado como parte importante en el sistema lisosomal en amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Rabinovitch et al., 1986). En un estudio realizado por Rabinovitch en 1986 demostró que el éster metílico de la L-leucina (Leu-OMe) puede matar a las formas de amastigotes intracelulares del género *Leishmania* a una concentración en las que no se ven afectados los macrófagos, al mismo tiempo que se lleva a cabo una eficiente hidrólisis de este compuesto por enzimas endocíticas del parásito. El sitio más probable donde se lleva a cabo la hidrólisis de estos ésteres es en los megasomas (grandes organelos ácidos, ricos en cisteína, proteasas y otras enzimas lisosomales). El tratamiento con Leu-OMe provocó una marcada hipertonicidad de los parásitos, así como la disminución de la densidad electrónica en los megasomas.

En el caso de *Trypanosoma cruzi* se encuentran los reservosomas, que son grandes organelos unidos a las membranas que se localizan en la parte final posterior de las formas de epimastigotes de *T. cruzi*. Estos organelos ácidos contienen grandes cantidades de proteínas, una densa matriz electrónica, así como proteasas de cisteína y por lo cual han sido considerados como compartimentos prelisosomales (Soares, 1999).

Un estudio estereológico demostró que los reservosomas ocupan aproximadamente el 6% del volumen celular total de epimastigotes, y que gradualmente van desapareciendo durante el proceso de diferenciación a la forma de tripomastigote (Soares et al. 1989, Figueredo et al., 1994). Se ha sugerido que los nutrientes acumulados en los reservosomas pueden ser utilizados como fuente principal de energía para esta actividad. Una hipótesis sugiere que un estado de estrés nutricional provoca la acidificación del contenido luminal y la activación de enzimas contenidas en los reservosomas, los cuales evolucionan a un estado lisosomal. La degradación de proteínas acumuladas llevaría entonces a la desaparición de reservosomas, liberando así aminoácidos al citoplasma celular. De acuerdo con datos bioquímicos, se demostró que el consumo de aminoácidos es favorecido en la etapa de diferenciación a epimastigotes (Urbina, 1994).

Los agentes lisosomotrópicos han sido ampliamente usados en la caracterización de compartimentos ácidos en varios tipos de células. Esto ha demostrado que uno de los tipos de agentes son los aminoácidos esterificados, ya que pueden romper lisosomas en los fragmentos subcelulares de hígado de mamíferos (Goldman and Kaplan, 1973).

Se ha propuesto que la lisis del parásito puede ocurrir por un mecanismo similar al observado en lisosomas de mamíferos: las especies no protonadas de los ésteres metílicos de los L-aminoácidos pueden penetrar rápidamente por la membrana

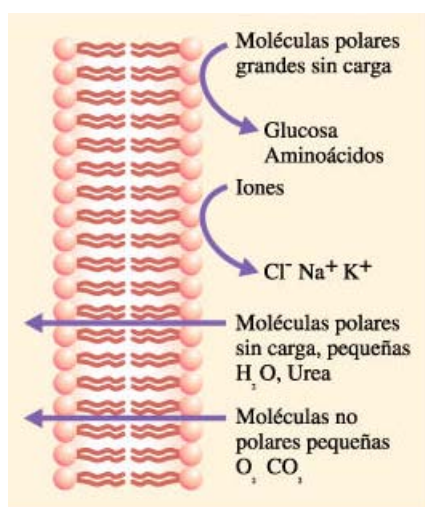
lisosomal, pero una vez dentro del lisosoma, los ésteres son atrapados vía protonación y son rápidamente hidrolizados por las enzimas, resultando en la acumulación de aminoácidos libres que no pueden difundirse fuera del lisosoma, debido a su alta polaridad. Como consecuencia se produce la entrada de agua, hipertonicidad de la célula y finalmente la ruptura del organelo (Revé, 1979).

## 2.8. Mecanismos de transporte a través de las membranas

La membrana celular regula el paso de materiales hacia dentro y fuera de la célula, una función que hace posible que la célula mantenga su integridad estructural y funcional, esta regulación depende de interacciones entre la membrana y los materiales que pasan a través de ella.

La naturaleza lipídica de las membranas biológicas restringe severamente el tipo de moléculas que pueden difundir rápidamente de un lado a otro. Los iones inorgánicos o las moléculas orgánicas cargadas no difunden a velocidad apreciable, debido a la atracción de estas moléculas por las moléculas de agua y a la exclusión de las especies cargadas por el ambiente hidrófobo de la membrana lipídica. Sin embargo, la velocidad de difusión de glúcidos, aminoácidos e iones inorgánicos no es nula, aunque puede ser demasiado lenta para las necesidades de la célula (Figura 2.19). Donde existe una necesidad de trasladar una sustancia a través de una membrana celular, se haya presentes mecanismos específicos para su trasladación.

Se han descrito dos tipos de transporte: transporte no mediado y transporte mediado. El transporte no mediado ocurre mediante una simple difusión. En cambio, el transporte mediado ocurre mediante la acción de proteínas transportadoras específicas que poseen denominaciones diversas: permeasas, portadoras, translocasas, translocadores y transportadores. Además, el transporte mediado se clasifica en dos categorías dependiendo de la termodinámica del sistema.



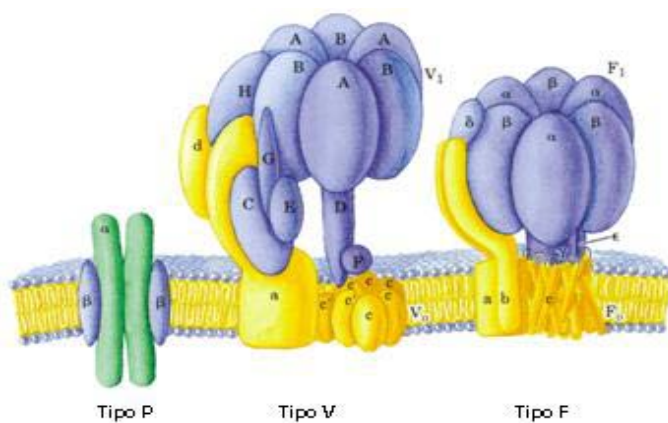
**Figura 2.19.** Modos de transporte a través de la membrana celular de diferentes moléculas.

El transporte mediado pasivo o difusión facilitada, el cual consiste en que moléculas específicas fluyan desde un área de concentración elevada a un área de concentración baja, de modo que se equilibren sus gradientes de concentración. Las diferencias que distinguen las medidas entre simple difusión y transporte pasivo facilitado son la cinética de saturación, especificidad estructural hacia la clase de molécula que se mueve a través de la membrana, y una inhibición específica del movimiento del soluto.

El transporte activo consiste en que moléculas específicas se transportan desde una concentración baja a una concentración elevada, es decir, en contra de su gradiente electroquímico, y por ello se requiere un aporte energético. Un proceso endergónico como éste debe estar acoplado a un proceso suficientemente exergónico para que sea favorable. Siempre ocurre mediante proteínas transportadoras especiales acopladas a una fuente de energía, como la hidrólisis del ATP. En el transporte activo primario, la acumulación de soluto está acoplada directamente a una reacción química exergónica; por ejemplo, la conversión de ATP a ADP + P<sub>i</sub> (fosfato inorgánico).

El transporte activo secundario tiene lugar cuando el transporte endergónico de un soluto está acoplado al flujo exergónico de un soluto diferente que fue bombeado mediante un transporte activo primario.

Los sistemas de transporte facilitado activo poseen las mismas características que los transportadores pasivos, cinética de saturación, especificidad de sustrato y posibilidad de inhibición. Además, requieren de utilización de energía para transportar solutos y, si se elimina la fuente de energía o se le inhibe, el sistema de transporte no funciona. Estos transportadores activos, se pueden clasificar en: primarios, si necesitan utilizar directamente ATP, y secundarios si emplean el gradiente electroquímico transmembranal de Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>. Los transportadores que utilizan ATP se conocen también como ATPasas debido a que durante la translocación, el ATP se hidroliza a ADP y fosfato. Se clasifican como transportadores o ATPasas de tipo P, V o F (Figura 2.20).



**Figura 2.20.** Estructura de subunidades de tres tipos de ATPasas transportadoras de iones.

Las translocasas del tipo P son transportadores de cationes impulsados por ATP que son fosforilados reversiblemente por ATP como parte del ciclo de transporte. Todos los transportadores ATPasas del tipo P tienen similitudes en la secuencia de aminoácidos, especialmente cerca del residuo ácido aspártico (Asp) que experimenta la fosforilación, y todos son sensibles a la inhibición por el análogo del fosfato, vanadato.

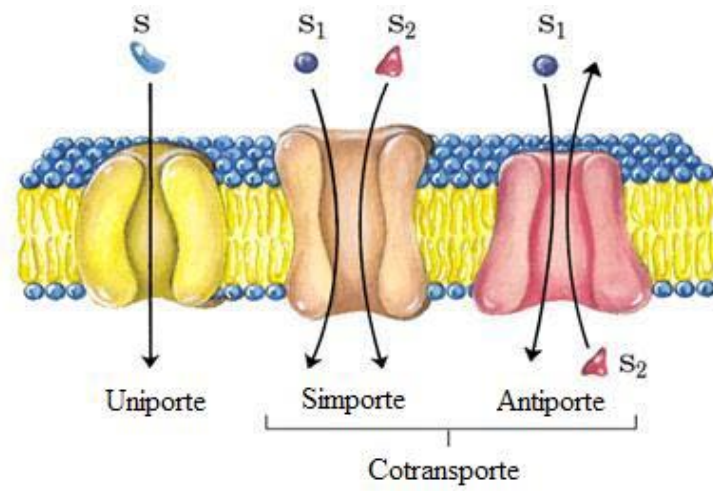
Una clase diferente de ATPasas transportadoras de protones es responsable de la acidificación de los compartimentos intracelulares en muchos organismos. Las vacuolas de hongo y plantas superiores mantienen el pH entre 3 y 6, bastante menos que el del citosol (pH 7.5) circundante, gracias a la acción de ATPasas del tipo V, que bombean protones. Las ATPasas del tipo V (de vacuola) son también responsables de la acidificación de los lisosomas, endosomas, el complejo de Golgi y las vesículas secretoras en células animales. No relacionadas estructuralmente con las ATPasas del tipo P, las ATPasas del tipo V no experimentan fosforilación-desfosforilación cíclica y no se inhiben por vanadato. El mecanismo por el cual las ATPasas del tipo V acoplan hidrólisis del ATP con el transporte cuesta arriba de protones no se conoce con detalle.

La bomba de protones del tipo V se relaciona estructuralmente con una tercera familia de bomba de protones, las ATPasas del tipo F.

Las ATPasas del tipo F (de factores de acoplamiento de energía) juegan un papel central en las reacciones de conservación de energía de bacterias, mitocondrias. Catalizan el paso transmembranal contracorriente de protones impulsado por la hidrólisis de ATP, y la reacción inversa, en la que el flujo de protones cuesta abajo impulsa la síntesis de ATP. En el segundo caso, las ATPasas del tipo F se llaman más apropiadamente ATP sintasas. El gradiente de protones en la fosforilación oxidativa y fotofosforilación se establece por otros tipos de bombas de protones impulsadas por la oxidación de sustratos o por la luz solar (Lehninger, 2002).

El transporte mediado se clasifica de acuerdo con la estequiometría del proceso de transporte. Un transporte uniporte supone el movimiento de una única molécula a la vez. Un transporte simporte transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en la misma dirección. Un transporte antiporte transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en direcciones opuestas (Figura 2.21).

El carácter eléctrico del transporte iónico se especifica además como: electroneutro y electrogénico. Electroneutro (eléctricamente inexistente), cuando hay una neutralización simultánea de cargas, sea por un simporte de iones de carga opuesta o por un antiporte de iones de carga similar. Electrogénico, cuando un proceso de transporte resulta en una separación de cargas a través de la membrana (VOET, 1992).



**Figura 2.21.** Mecanismos de transporte mediado. Uniporte (transporte simple), simporte (cotransporte paralelo) y antiporte (cotransporte antiparalelo) para la translocación de moléculas. S, S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> representan diferentes moléculas.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

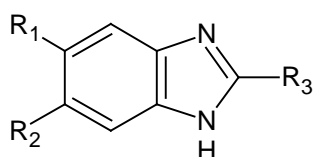
La enfermedad de Chagas, causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, es el mayor problema de salud pública en América Latina. Tratamientos específicos para erradicar esta enfermedad han sido objeto de controversia, dado que la mayoría de los medicamentos disponibles solo actúan en la fase aguda de la enfermedad.

Actualmente en los tratamientos quimioterapéuticos se incluyen moléculas tales como un nitrofurano (nifurtimox) y un nitroimidazol (benznidazol). Sin embargo, estos fármacos sólo son eficaces en la etapa aguda de la enfermedad ya que en la etapa crónica estas moléculas presentan baja eficacia y efectos tóxicos en el paciente. Por lo anterior se considera necesaria la búsqueda de nuevas estructuras que puedan ingresar al parásito mediante diferentes mecanismos de transporte y así puedan ejercer una acción tripanocida.



### 3.1. Consideraciones para el diseño

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el Centro Médico Siglo XXI del Seguro Social y como parte de una búsqueda básica acerca de los requerimientos de la actividad antiprotozoaria y antihelmíntica de las moléculas, algunos compuestos con anillo de bencimidazol (Figura 3.1) fueron preparados utilizando el método de Phillips, en el laboratorio 122 del Conjunto E de la Facultad de Química por Juan Valdez. Aunque los compuestos sintetizados ya eran compuestos descritos en la literatura, muchos de estos no son comercialmente disponibles. Estos compuestos fueron probados *in vitro* contra los protozoarios *G. lamblia* y *E. histolytica*, así como también contra el helminto *Trichinella spiralis* (Valdez, Juan, 2002).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
H	H	H
H	H	CH <sub>3</sub>
Cl	H	H
Cl	H	CH <sub>3</sub>
Cl	Cl	H
Cl	Cl	CH <sub>3</sub>

Figura 3.1. Compuestos sintetizados por Juan Valdez.

En un estudio posterior a esta búsqueda, la alumna Patricia Vargas, en su trabajo de tesis llamado Síntesis de Derivados del 5-aminocarbonil-1*H*-bencimidazol con Potencial Actividad Antiparasitaria, sintetizó algunos compuestos entre los cuales se describió al compuesto llamado Ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (Figura 3.2). Dicho compuesto fue sometido a evaluación biológica mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro* que mostraron que el ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico fue activo contra *G. intestinalis*, teniendo una IC<sub>50</sub> = 0.019 μM (Vargas Benitez, 2002).

En estudios mas recientes, aun no publicados, el compuesto Ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico se probó in vitro contra tripomastigotes sanguíneos de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (NINOA y INC-5), sin embargo no mostró actividad a la concentración de 100 microgramos/mL. La explicación que nuestro grupo de trabajo tiene radica en que el medio de cultivo utilizado tiene un pH = 7.5, situación que propicia que el grupo carboxílico se encuentre como sal (carboxilato), luego entonces por ser iónico no atraviesa la membrana biológica de *Trypanosoma cruzi* ya que este parásito presenta un requerimiento de liposolubilidad más acentuado que otros protozoarios, tal como *Giardia intestinalis*. Una explicación a esto, se debe a que a pesar de que ambos son protozoarios, la ubicación del sitio de infección-sangre para *Trypanosoma cruzi* y el lumen del intestino delgado para *Giardia intestinalis*, les demando desarrollar características estructurales de membrana diferentes. Recientemente se probó un derivado del bencimidazol mencionado, pero con un grupo carboxamida en lugar de carboxilo. Al no poder ionizarse, el nuevo compuesto mostró una actividad in vitro contra *Trypanosoma cruzi* de  $IC_{50} = 95 \mu M$ .

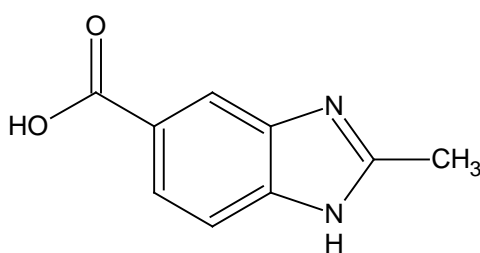
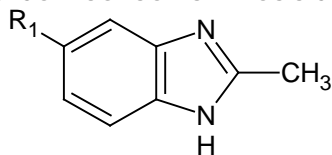


Figura 3.2. Ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico.

Analizando la limitada habilidad que tiene este compuesto para difundir a las células, y mediante el uso de técnicas de optimización de moléculas con aminoácidos, nuestro grupo de trabajo ha diseñado los compuestos del presente estudio; en los cuales se pretende modificar el mecanismo de ingreso al parásito, de difusión pasiva a un mecanismo de transporte activo. Además, considerando también que estudios previos han mostrado que los aminoácidos esterificados tienen actividad tripanocida (Tabla 3.2).

En la posición 5 del núcleo del bencimidazol se realizaron sustituciones con diferentes aminoácidos esterificados, conservando el hidrógeno en la posición 1 y en la posición 2 el grupo metilo.

**Tabla 3.1.** Estructuras de los conjugados del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico con aminoácidos.



COMPUESTO	R <sub>1</sub>
1	-COOH
2	-NHCH(CH <sub>3</sub> )COOCH <sub>3</sub>
3	-NHCH(COOCH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>
4	-NC <sub>4</sub> H <sub>7</sub> COOCH <sub>3</sub>
5	-NHCH(CH <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )COOCH <sub>3</sub>
6	-NHCH(COOCH <sub>2</sub> Ph)CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Ph

**NOMBRE IUPAC**

- 1 Ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico
- 2 *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo
- 3 *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo
- 4 1-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo
- 5 *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo
- 6 *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo

### 3.1. Objetivos

#### 3.1.1. Objetivo general

Realizar la síntesis y caracterización de conjugados del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico con aminoácidos.

#### 3.1.2. Objetivos específicos

- 3.1.2.1. Síntesis del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**1**).
- 3.1.2.2. Síntesis del *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (**2**).
- 3.1.2.3. Síntesis del *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (**3**).
- 3.1.2.4. Síntesis del 1-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (**4**).
- 3.1.2.5. Síntesis del *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo (**5**).
- 3.1.2.6. Síntesis de *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (**6**).
- 3.1.2.7. Caracterizar los compuestos sintetizados, mediante propiedades físicas: punto de fusión y  $R_f$ .
- 3.1.2.8. Elucidar la estructura de los compuestos sintetizados por medio de métodos Espectroscópicos (RMN- $^1\text{H}$ , IR) y espectrométricos (EM).
- 3.1.2.9. Evaluar la actividad biológica de los compuestos sintetizados contra *Trypanosoma cruzi*.

### **3.2. Hipótesis**

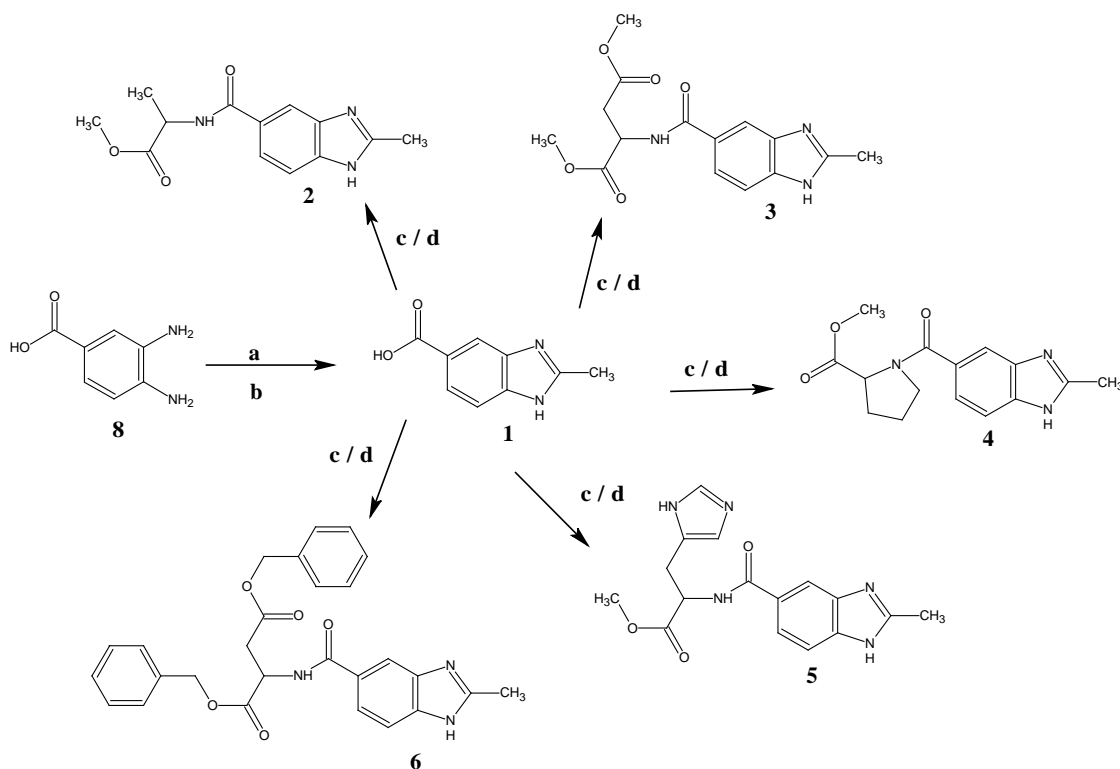
Los compuestos diseñados podrán presentar actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi*.

Los nuevos conjugados de bencimidazol con aminoácidos podrían presentar una mayor actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi* en comparación con el ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (1).

Los compuestos diseñados podrían ingresar al parásito vía transporte activo, mediante una ATPasa de tipo V.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

Para mayor comprensión sobre el trabajo realizado, éste se dividió en dos partes. La primera, la parte química, comprende los métodos sintéticos seguidos de la preparación de los compuestos del presente estudio, de acuerdo al Esquema 4.1. La segunda, la parte biológica, describe la prueba de actividad biológica a la que fueron sometidos los compuestos preparados. Esta segunda parte se realizó en Hospital Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".



a.  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{HCl}$ , reflujo, 8h ; b.  $\text{NaHCO}_3$  ; c. CDI, DMF,  $0^\circ\text{C}$  3h ; d. aa, TEA, DCM, ta, 72h

Esquema 4.1. Preparación de los nuevos conjugados bencimidazólicos

#### 4.1. Parte química

##### 4.1.1. Instrumentación

La concentración de las disoluciones se realizó a presión reducida utilizando un rotaevaporador marca Büchi RE 114. La presión reducida se logró con una bomba Marca GAST Modelo 0523-V4F, baño de agua modelo B-480 y compresora VWR Scientific Modelo 1107.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin-Elmer Modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio. Las señales (bandas de absorción) se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ . Los símbolos de las señales son w = banda débil, m = banda mediana, s = banda fuerte.

Los espectros de resonancia de hidrógeno de 300 MHz (RMN- $^1\text{H}$ ) fueron determinados en un espectrómetro marca Varian modelo Unity Inova 300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ), acetona deuterada (Acetona- $d_6$ ) y agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) para el intercambio de hidrógenos unidos a heteroátomos. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm. Los símbolos de las señales son: s = singulete, sa = singulete amplio, d = doblete, dd = doble de dobles, m = multiplete complejo, t = triplete, c = cuarteto, q = quintuplete, ma = multiplete amplio. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hz.

Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM), por impacto electrónico (70eV) y por medio de la técnica de bombardeo de átomos rápidos (FAB) utilizando Xenón como gas acarreador, en un espectrofotómetro de masas JEOL modelo JMS-SX-102. La simbología utilizado es: m/z= relación masa carga,  $\text{M}^{+\bullet}$ = ion molecular y 100% de abundancia relativa indica al pico base.

En la modalidad  $\text{FAB}^+$ ,  $[\text{M}+1]$  indica el ión cuasimolecular; y la matriz utilizada fue alcohol nitrobenzílico.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

El masa de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.

Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy, o bien, una parrilla con agitación y calentamiento marca Corning modelo PC 220.

Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F254 20X20 cm, y para la separación de muestras se utilizaron placas cromatográficas preparativas de gel de sílice 60 Merck® F254.

Para visualizar las cromatografías se utilizó una lámpara UV UVGL-25 Mineralight® o una cámara de revelado con Yodo resublimado. En otros casos se utilizó una disolución metanólica de ninhidrina para revelar aminoácidos.

Los sistemas de elución empleados se muestran en la Tabla 4.1.

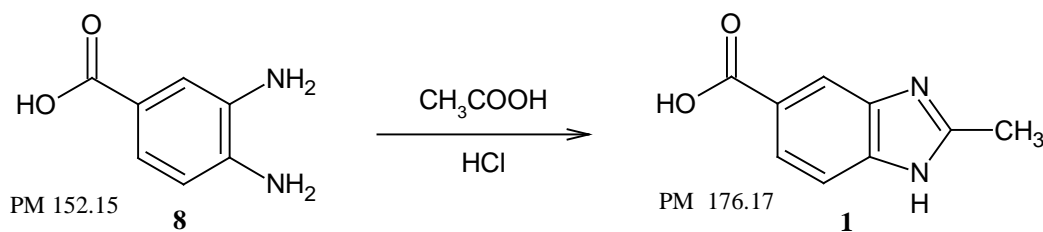
**Tabla 4.1.** Sistemas de elución cromatográfica.

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo:Metanol	85:15
II	n-Butanol:Ac.Acético:Agua	80:20:1
III	Hexano:Acetato de etilo	85:15
IV	Cloroformo:Metanol	99:1

#### 4.1.2. Métodos de preparación

A continuación se detallan los métodos de preparación para el ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**1**) y las amidas **2-6**.

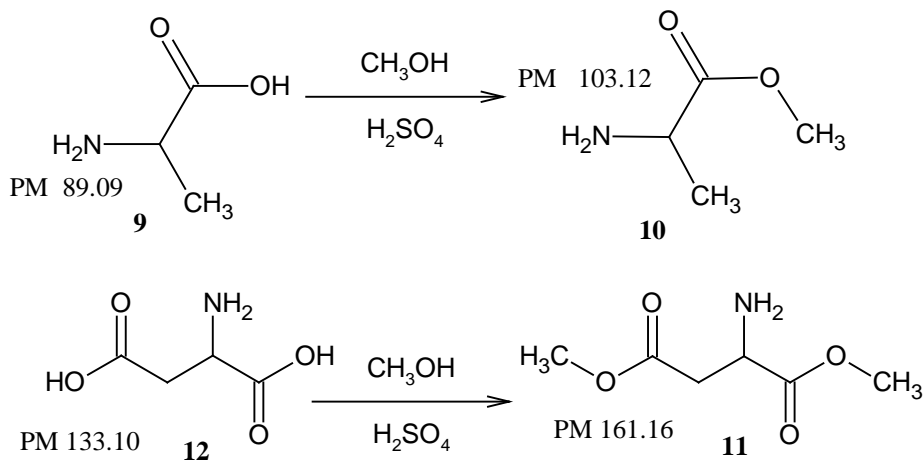


4.1.2.1. Ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**1**)Esquema 4.2. Síntesis del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**1**)

En un matraz bola de 500 mL se pesó 10 g (1eq) del ácido 3,4-diaminobenzoico (**8**), al cual se le adicionó un volumen de ácido acético suficiente para cubrir todo el sólido; y se adicionó 2 gotas de ácido clorhídrico (HCl) para catalizar la reacción. La mezcla se mantuvo a temperatura de reflujo durante 8 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de una mezcla de hielo-agua y el pH se ajustó entre 4-5 con NaHCO<sub>3</sub>. La disolución se separó por filtración al vacío y el sólido obtenido se lavó con agua hasta que el sobrenadante tuviera un pH neutro; para obtener finalmente 11.2 g de un sólido de color café; el cual se purificó por decoloración y recristalización.

El compuesto **1** se colocó en un matraz de bola de 100 mL, al cual se le adicionó lentamente una disolución de NaOH (1.5 eq, 4 g en 25 mL de agua) y 1.1 g (10%) de carbón activado. La disolución se mantuvo a temperatura de reflujo durante 6 h. Transcurrido este tiempo la disolución se filtró al vacío sobre una cama de celita y se lavó con agua. El filtrado se colocó en un vaso de precipitados de 500 mL, sobre un baño de hielo y se ajustó el pH hasta 5 con una disolución de HCl 4 N. La disolución se separó por filtración al vacío para obtener finalmente 10.7 g de un sólido blanco, con un rendimiento del 93%. El sólido fue recristalizado de etanol (85%). El producto **1**, presentó un  $R_f = 0.17$  (sistema I) y un p.f. de 310°C (Lit. 310.4 - 311.2 °C).

#### 4.1.3. Procedimiento general de esterificación



**Esquema 4.3.** Esterificación de los aminoácidos L-alanina (9) y L-ácido aspártico (10) mediante el método de Fisher.

En un matraz bola de 100 mL de 2 bocas (24/40), adaptado con una trampa Dean & Star, utilizando una parrilla con agitación magnética y un baño de aceite a temperatura controlada se colocó 1 eq. del aminoácido a esterificar, al cual se le adicionó 40 mL de metanol, 20 mL de benceno y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura de reflujo durante 24 h. Durante ese tiempo, el agua de la reacción se eliminó formando un azeotropo con benceno. Transcurrido este tiempo, se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se llevó a pH 7 con una disolución de NaHCO<sub>3</sub>, y se realizaron extracciones (2 x 15 mL) con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a sequedad, quedando un residuo aceitoso color ámbar, el cual se utilizó directamente para la siguiente reacción. Al producto crudo se le determinó las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas. Bajo esta metodología se preparó **10** y **11**.

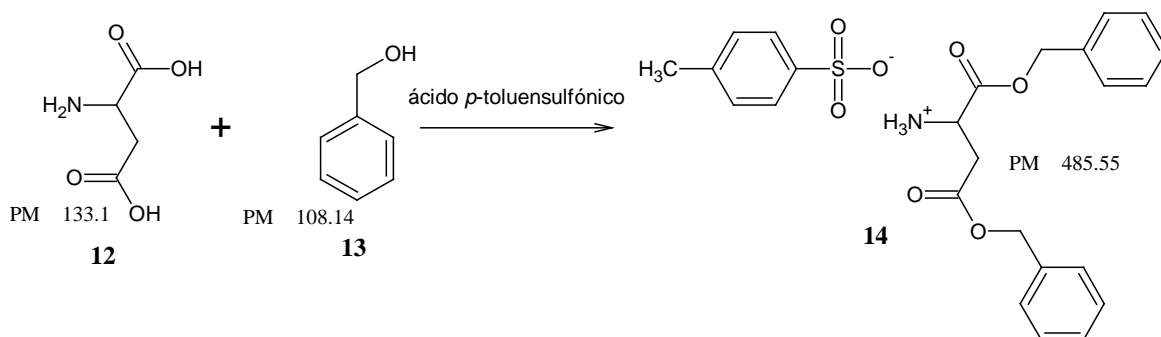
##### 4.1.3.1. 2-Aminopropanoato de metilo (10)

Se obtuvo 1.0 g (86%) de un residuo aceitoso color ámbar, el cual se utilizó directamente para la siguiente reacción.  $R_f = 0.40$  (sistema II) revelando con ninhidrina.

##### 4.1.3.2. Aspartato de dimetilo (11)

Se obtuvo 0.62 g (51%) de un residuo aceitoso color ámbar.  $R_f = 0.35$  (sistema II) revelando con ninhidrina.

4.1.4. *p*-toluensulfonato de L-aspartato de dibencilo (14)



Esquema 4.4. Esterificación del L-ácido aspártico (14).

En un matraz bola de 100 mL de 2 bocas esmeriladas (24/40) acondicionado con una trampa de Dean & Star, utilizando una parrilla con agitación magnética y un baño de aceite a temperatura controlada, se colocó 5 g (1 eq) de L-ácido aspártico (12), 7.8 g (1.1 eq) de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado, 20 mL (5 eq) de alcohol bencílico (13) y 20 mL de benceno. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo durante 15 horas. Durante ese tiempo, el agua de la reacción se eliminó formando un azeotropo con benceno. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar y se concentró a presión reducida; el producto se precipitó con éter dietílico y se filtró al vacío. Se obtuvieron 16.5 g (90%) de un sólido blanco. Se recrystalizó de isopropanol para obtener un sólido blanco (87%), con un p.f. de 149-153°C (Lit. 155-156°C); y un  $R_f = 0.40$  (sistema II).

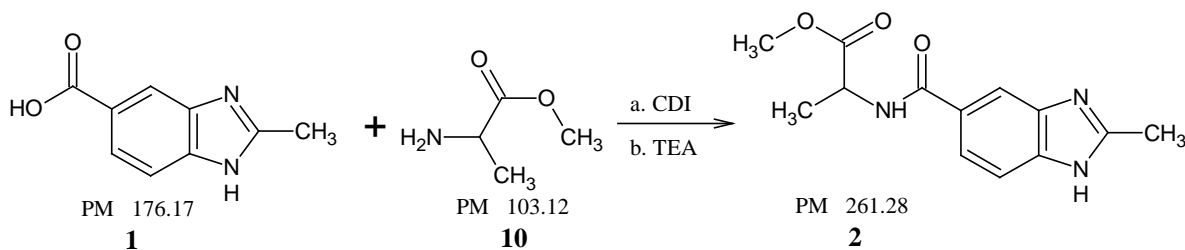
4.1.5. Procedimiento general para la preparación de las amidas 2-6

En un matraz bola de 100 mL de 2 bocas se pesó 1.10 g de 1,1-carbonildiimidazol (CDI) (1.2 eq) y 1 eq del compuesto 1. Se le adicionó 20 mL de DMF y se mantuvo a temperatura ambiente, con agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió con ayuda de un baño de hielo y posteriormente se le adicionó el éster metílico del aminoácido correspondiente, (previamente tratado con 4 mL (3 eq) de TEA anhidra si el aminoácido estaba en forma de clorhidrato o sulfonato), utilizando como disolvente no más de 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla de reacción se mantuvo a 0 °C durante 1 h y posteriormente a temperatura ambiente durante 3 días, bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurridas las 72 horas, la disolución se filtró y la disolución obtenida se concentró a presión reducida. Al aceite obtenido se le adicionó 25 mL de agua y se mantuvo en agitación durante 1 hora para

destruir los restos del CDI y el intermediario imidazólido. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 mL) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró a sequedad, obteniéndose un residuo aceitoso de color ámbar.

El producto crudo se purificó mediante recristalización (2) y en la mayoría de los casos se utilizó la cromatografía en placa preparativa (compuestos 3-6).

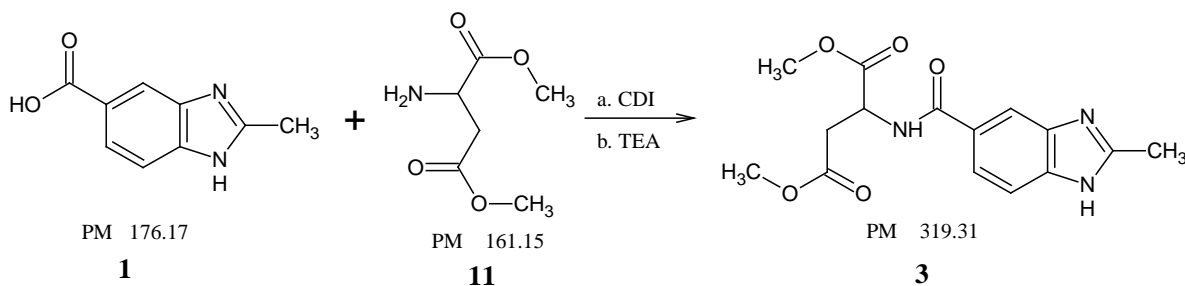
#### 4.1.5.1. N-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (2)



Esquema 4.5. Síntesis del compuesto 2

El residuo aceitoso de color ámbar se recristalizó de acetato de etilo-hexano. Se obtuvo 0.82 g (55%) de un sólido blanco con un R<sub>f</sub> = 0.54 (sistema I) y un p.f. de 186.3-187.7°C.

#### 4.1.5.2. N-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (3)

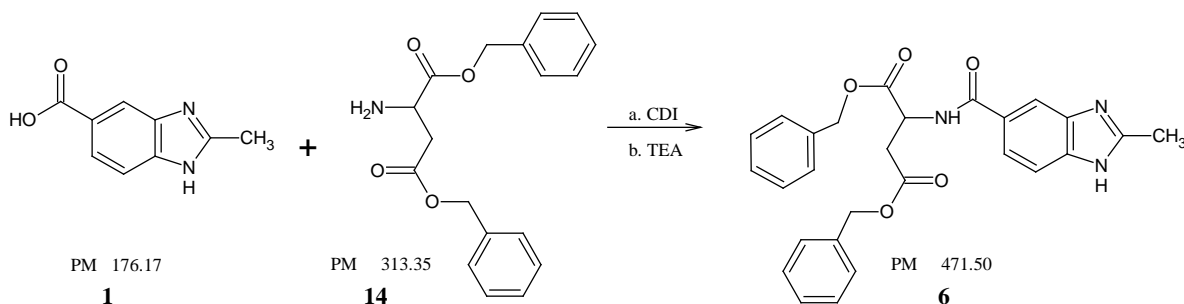


Esquema 4.6. Síntesis del compuesto 3

Se obtuvo 0.53 g (30%) de un residuo aceitoso de color ámbar. La ccf reveló 3 compuestos, que correspondían a la materia prima (1), imidazol y en mayor proporción al compuesto 3. Se procedió a realizar una cromatografía en placa preparativa. Se obtuvo 0.143 g (8.13%) de un sólido color ámbar con un R<sub>f</sub> de 0.44 (sistema II) y un p.f. de 157.6-160.2°C.



4.1.5.5. *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (6)



Esquema 4.9. Síntesis del compuesto 6

Se obtuvo un residuo aceitoso de color ámbar. El aceite se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL y se le adicionó una mezcla de hexano:acetato de etilo 85:15. Se agitó durante 2 horas y se filtró, obteniéndose un sólido de color blanco. El sólido se recrystalizó de acetato de etilo-hexano, y se obtuvo 0.53 g (20%) de un sólido blanco con un  $R_f$  0.65 (sistema I) y un p.f. de 97.2-98.8°C.

4.2. Parte biológica

4.2.1. Ensayos de susceptibilidad *in vitro* para *Trypanosoma cruzi*

Las cepas de *T. cruzi* que se utilizaron en el presente trabajo se seleccionaron de pacientes chagásicos del Hospital Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Fueron donados por el Dr. Víctor Monteón Padilla. Para su caracterización, estas cepas se inocularon en ratones albinos cepa CD1 por vía intraperitoneal. Una vez presente la parasitemia en los ratones, los insectos de la especie *Meccus pallidipennis* se alimentaron con la sangre infectada de los ratones. Cabe resaltar que el vector *Meccus pallidipennis* es el principal transmisor de *Trypanosoma cruzi* en México.

A partir de las heces de *Meccus pallidipennis* se obtuvieron los aislados de *T. cruzi*. A cinco de los aislados se les determinó su susceptibilidad *in vitro* a los fármacos de elección Radanil® (Benznidazol) y Lampit® (Nifurtimox). Posteriormente, se seleccionaron tres aislados (Nayarit, Ninoa y INC-5) por su sensibilidad y/o resistencia a los fármacos de elección.

Los aislados de *T. cruzi* se conservaron por pase triatoma-ratón-triatoma; el pase se realizó una vez cada 6 meses de acuerdo a las condiciones que se han establecido en el laboratorio (Rodríguez-Sánchez et al., 2003). Los aislados se mantuvieron en medio LIT (Infusión Hígado Triptosa) y se realizaron pases cada 15 días. El mantenimiento de cepas se

realizó de acuerdo al procedimiento establecido por el grupo de trabajo (Noguera et al., 2001). La obtención de los amastigotes fue a partir del medio de cultivo bifásico LIT de los aislados seleccionados. Se decantó la fase líquida y centrifugó 15 minutos a 3000 g. El sobrenadante se desechó y las células se suspendieron en amortiguador PSG pH 7.2. Empleando el mismo amortiguador y condiciones de centrifugación, las células se lavaron dos veces. Se formaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  epimastigotes/mL para el ensayo de susceptibilidad a los compuestos.

#### **4.2.2. Determinación *in vitro* de la susceptibilidad de los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* a los fármacos de prueba**

Se inocularon ratones por vía intraperitoneal con aislados de *T. cruzi* y después de 15 días, se revisó diariamente la sangre de los roedores, obtenida por un pequeño corte en la vena caudal, hasta detectar que se logró la parasitemia. Un lote de 10 ratones fue inoculado por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^4$  tripomastigotes sanguíneos provenientes de ratones infectados en los que se mantuvieron a los aislados. Los ratones se revisaron cada tercer día, obteniéndose una gota (0.05 mL) de sangre por medio de un pequeño corte en la vena caudal y se determinó la parasitemia por cuenta por el método de Pizzi. La virulencia se estableció a través de las curvas de parasitemia, observando la parasitemia máxima que alcanzó, mientras que la patogenicidad se registró a través de las posibles muertes de los ratones (Martínez et al., 2001). La sangre obtenida en el pico máximo de parasitemia de ratones infectados con los aislados fue utilizada en los ensayos. Las evaluaciones se realizaron en placas con 96 pozos. A cada uno de los pozos se le agregó 195  $\mu$ L de la sangre infectada ( $2 \times 10^6$  parásitos/mL), e incorporaron 5  $\mu$ L de la disolución de los compuestos a evaluar, disueltos en DMSO, en un rango de concentraciones finales de 1, 10, 100, 500 y 700, 900 mM. Las placas se mantuvieron a 4 °C por 24 h. La concentración de parásitos se evaluó usando un microscopio óptico a 40X por el método de Pizzi. La reducción de la concentración del parásito (lisis del parásito) se determinó en comparación con los parásitos sin tratar. El control positivo a la lisis de los protozoarios es el cristal violeta (7.5  $\mu$ g/mL) con el DMSO (2.5% v/v DMSO), compuesto al cual muy pocos aislados de *T. cruzi* son resistentes. Radanil y Lampit, a las mismas concentraciones, fueron incorporados en todos los experimentos. Se determinó la CL<sub>50</sub> del Radanil, Lampit y de los compuestos bencimidazólicos evaluados. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

#### 4.2.3. Cuenta de parásitos por el método de Pizzi (1957)

Se colectaron 5  $\mu$ L de sangre con una micropipeta, la sangre se depositó en un portaobjetos y por presión mecánica con un cubreobjetos se distribuyó uniformemente la sangre en el área del cubreobjetos. Se contaron 25 campos microscópicos, utilizando el objetivo de 40x, para el conteo se tomó en cuenta el número de campos posibles que se pudieran contar en esta área (Pizzi, 1957).

#### 4.2.4. Determinación del porcentaje de lisis de los compuestos sobre *T. cruzi* en la fase de tripomastigotes sanguíneos.

Tomando en cuenta la cantidad de parásitos (tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*) presentes en el testigo negativo (ausencia de fármaco) al final del experimento se determinó el porcentaje de los parásitos eliminados por acción del fármaco. Se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\# \text{ Parásitos en presencia del fármaco}}{\# \text{ Parásitos en ausencia del fármaco}} \times 100$$

$$\% \text{ de lisis} = 100\% - \% \text{ de sobrevivencia}$$



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

### 5.1. Parte Química

#### 5.1.1 .Constantes físicas

Las constantes físicas, punto de fusión y  $R_f$ , así como los rendimientos obtenidos para los compuestos finales sintetizados se muestran en la Tabla 5.1. Los resultados emanados por los compuestos intermediarios de los productos finales se muestran en la Tabla 5.2

**Tabla 5.1.** Propiedades físicas de los compuestos finales.

Compuesto	Rend. Crudo (%)	Rend. Recristalizado (%)	Sistema de recristalización	p.f. (°C)	$R_f$ (Sistema) <sup>a</sup>
2	Nd	55	AcOEt / Hexano	186.3-187.7	0.54 (I)
3	30	8.3 <sup>b</sup>	-	157.6-160.2	0.44 (II)
4	37	6.4 <sup>b</sup>	-	65.3-67.1	0.56 (I)
5	29	5.1 <sup>b</sup>	-	157.6-160.2	0.44 (II)
6	Nd	20	AcOEt / Hexano	97.2-98.8	0.65 (I)

<sup>a</sup>Los sistemas de elusión se pueden consultar en la Tabla 4.1.

<sup>b</sup>Purificado por Cromatografía en placa preparativa. nd: no determinado.

Tabla 5.2. Propiedades físicas de los compuestos intermediarios.

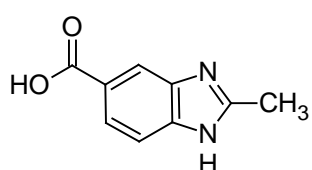
Comp.	Rendimiento Crudo (%)	Rendimiento recristalizado (%)	Sistema de recristalización	p.f. (°C)	R <sub>f</sub> (Sistema) <sup>a</sup>
1	93	85	EtOH	310	0.17 (I)
10	86	-	-	aceite	0.40 (II)
11	51	-	-	aceite	0.35 (II)
14	90	87	iPrOH	149-153	0.40 (II)

<sup>a</sup>Los sistemas de elución se pueden consultar en la Tabla 4.1

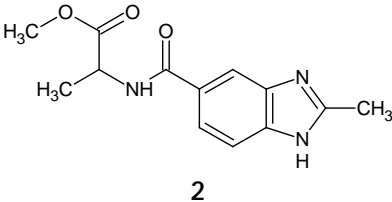
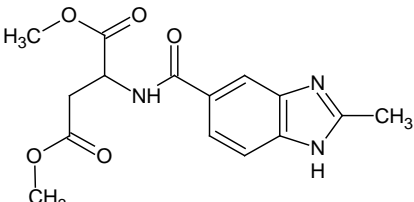
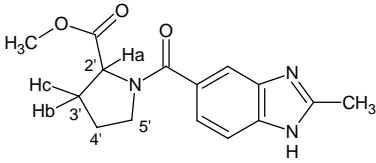
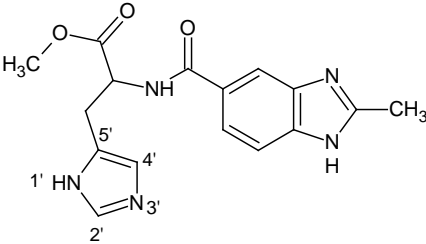
### 5.1.2 . Constantes espectroscópicas y espectrométricas

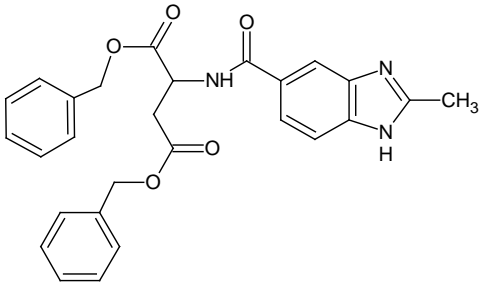
En la Tabla 5.3 se resume las constantes espectroscópicas (IR, RMN <sup>1</sup>H) y espectrométricas (EM) determinadas para los intermediarios. Mientras la elucidación espectroscópica y espectrométrica de los compuestos finales se muestran en la Tabla 5.4. Los espectros citados en el presente capítulo se numeraron y se pueden consultar en el Apéndice.

Tabla 5.3. Constantes espectroscópicas (IR, RMN<sup>1</sup>H) y espectrométricas (EM) del ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (1)

Compuesto	Señales
 <p style="text-align: center;">1</p>	<p><b>Espectro 1 IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):</b> 3330.76 (O-H), 2503.84 (R-COOH), 1632.41 (C=N), 1445.16 (CH<sub>3</sub>)</p>
	<p><b>Espectro 2 (FAB+):</b> [M+1]= 177 (16%)</p>
	<p><b>Espectro 3 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ:</b> 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.49 (d, 1H, J=8.1, H-7), 7.75 (dd, 1H, J=1.5, J=8.4, H-6), 8.05 (d, 1H, J=0.9, H-5), 12.52 (sa, 2H, intercambia con D<sub>2</sub>O, OH y NH)</p>

**Tabla 5.4.** Constantes espectroscópicas (IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ ) y espectrométricas (EM) de los compuestos finales.

Compuesto	Señales
 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	<p><b>Espectro 4 IR (KBr, <math>\text{cm}^{-1}</math>):</b> 3329 (NH), 2987 (<math>\text{CH}_3</math>), 1737 (C=O éster), 1635 (C=O amida), 1209 (C-O-C).</p> <p><b>Espectro 5 EM (FAB<math>^+</math>):</b> <math>[\text{M}+1]= 262</math> (100%), <math>[\text{M}+1+\text{M}]: 523</math> (5% dímero), <math>[\text{M}+1+2\text{M}]: 784</math> (1% trímero)</p> <p><b>Espectro 6 RMN <math>^1\text{H}</math> (400 MHz DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 1.48 (d, <math>J=7.6</math>, 3H, C-<math>\text{CH}_3</math> alanina), 2.55 (s, 3H, C-<math>\text{CH}_3</math> bencimidazol), 3.67 (s, 3H, O-<math>\text{CH}_3</math>), 4.66 (q, <math>J=7.6</math>, 1H, <math>\text{CH}</math> alanina), 7.49 (d, <math>J=8.4</math>, 1H, H-7), 7.75 (dd, <math>J=8.4</math>, <math>J=1.6</math>, 1H, H-6), 7.93 (d, <math>J=6.4</math>, NH amida), 8.1 (d, <math>J=1.6</math>, 1H, H-4).</p> <p><b>Espectro 7 RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz acetona-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 14.92 (C-<math>\text{CH}_3</math> bencimidazol), 17.62 (CH-<math>\text{CH}_3</math> alanina), 49.37 (CH alanina), 52.19 (O-<math>\text{CH}_3</math>), 114.4 (C-7), 115.1 (C-4), 121.8 (C-6), 128.5 (C-5), 154.2 (C-2), 167.8 (C=O amida), 174.1 (C=O éster).</p>
 <p style="text-align: center;"><b>3</b></p>	<p><b>Espectro 8 RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 2.5 (<math>\text{CH}_3</math> bencimidazol, señal sobrepuesta con el DMSO), 2.9 (m, 2H, <math>\text{CH}_2</math> aspártico), 3.59 (s, O-<math>\text{CH}_3</math> señal sobrepuesta con agua del DMSO), 3.62 (s, O-<math>\text{CH}_3</math> señal sobrepuesta con agua del DMSO), 4.7 (m, 1H, <math>\text{CH}</math> aspártico), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.6 (d, <math>J=8.7</math>, 1H, H-6), 7.7 (d, <math>J=8.7</math>, 1H, H-7), 8.6 (d, 1H, NH amida), 8.8 (d, 1H, NH)</p> <p><b>Espectro 9 RMN <math>^{13}\text{C}</math> (75.5 MHz DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 14.71 (<math>\text{CH}_3</math> bencimidazol), 35.6 (<math>\text{CH}_2</math> aspártico), 51.7 (O-<math>\text{CH}_3</math>), 52.9 (O-<math>\text{CH}_3</math>).</p>
 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>	<p><b>Espectro 10 IR (KBr, <math>\text{cm}^{-1}</math>):</b> 3149 (NH), 2953 (<math>\text{CH}_2</math>, <math>\text{CH}_3</math>), 1743 (C=O éster), 1608 (C=O amida), 1443 (<math>\text{CH}_2</math>), 1282 (C-O-C).</p> <p><b>Espectro 11 EM (FAB<math>^+</math>):</b> <math>[\text{M}+1]= 288</math> (100%), <math>[\text{M}+1+\text{M}]: 575</math> (10% dímero), <math>[\text{M}+1+2\text{M}]: 862</math> (1% trímero)</p> <p><b>Espectro 12 RMN <math>^1\text{H}</math> (DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 1.86 (ma, 4H, <math>\text{CH}_2</math> prolina), 2.2 (m, 1H, <math>\text{CH}_2</math> prolina), 4.47 (d, <math>J_{ab}=8.0</math>, d, <math>J_{ac}=7.6</math>, 1H, <math>\text{CH}</math> prolina), 7.3-7.65 (m, 4H, H-4, H-6, H-7, NH)</p> <p><b>Espectro 13 RMN <math>^{13}\text{C}</math> (100 MHz DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 14.67 (<math>\text{CH}_3</math> bencimidazol), 25.1 (C-4'), 30.35 (C-3'), 49.89 (C-5'), 51.82 (O-<math>\text{CH}_3</math>), 59.4 (C-2'), 110.3 (C-7), 117.1 (C-4), 121.1 (C-6), 129.0 (C-5), 133.7 (C-3a), 142.7 (C-2), 153.0 (C-7a), 169.0 (C=O amida), 172.6 (C=O éster).</p>
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	<p><b>Espectro 14 IR (KBr, <math>\text{cm}^{-1}</math>):</b> 3148 (NH), 1738 (C=O éster), 1629 (C=O amida), 1591 (C=N).</p> <p><b>Espectro 15 (FAB<math>^+</math>):</b> <math>[\text{M}+1]= 328</math> (80%), <math>[\text{M}+1+\text{M}]: 655</math> (4% dímero); <math>[\text{M}+1+2\text{M}]: 982</math> (1% trímero).</p> <p><b>Espectro 16 RMN <math>^1\text{H}</math> (299.7 MHz DMSO-<math>d_6</math>) <math>\delta</math>:</b> 2.5 (s, <math>\text{CH}_3</math> bencimidazol, señal sobrepuesta con el DMSO), 3.03 (d, 6H<sup>a</sup>, <math>J= 6.5</math>, <math>\text{CH}_2</math> Histidina), 3.2-3.8 (sa, O-<math>\text{CH}_3</math>, señal sobrepuesta con el agua del DMSO), 4.5 (c, 1H, <math>J= 7.19</math>, <math>\text{CH}</math> histidina), 6.83 (s, 1H, H-4'), 7.0<sup>b</sup> (s, 2H, H4 y H5), 7.48 (d, 1H, <math>J=8.3</math>, H-7), 7.5<sup>c</sup> (d, 1H, <math>J=8.3</math>, H-7), 7.56 (s, 1H, H-2'), 7.61 (d, 1H, <math>J=1.49</math>, H-4), 7.63<sup>c</sup> (s, 1H, H-6), 7.7 (dd, 1H, <math>J=1.49</math>, <math>J=8.09</math>, H-6), 7.9<sup>b</sup> (s, 1H, H-2), 8.0<sup>c</sup> (s, 1H, H-4), 8.54 (d, 1H, <math>J=7.19</math>, NH amida)</p> <p><sup>a</sup>Debido a la humedad del disolvente, la integral en esa zona no corresponde a la esperada. <sup>b</sup>imidazol, producto secundario de la reacción. <sup>c</sup>materia prima 1.</p>

Compuesto	Señales
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	<p><b>Espectro 17 IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):</b> 3257 (NH), 3033, 2949 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), 1737 (C=O éster), 1625 (C=O amida), 1455 (CH<sub>2</sub>), 1212 (C-O-C), 749 (CH aromático), 696 (O-C-O).</p> <p><b>Espectro 18 EM (FAB<sup>+</sup>):</b> [M+1]= 472 (100%), [M+1+M]: 944 (6% dímero)</p> <p><b>Espectro 19 RMN <sup>1</sup>H (299.7 MHz DMSO-d<sub>6</sub>) δ:</b> 2.5 (s, 4H<sup>a</sup>, CH<sub>3</sub> bencimidazol), 3.0 (m, 2H, CH<sub>2</sub> aspártico), 4.93 (c, 1H, J=7.79, CH aspártico), 5.0 (s, 2H, CH<sub>2</sub> bencilico), 5.1 (s, 2H, CH<sub>2</sub> bencilico), 7.3 (m, 10H, bencilo), 7.48<sup>b</sup> (d, 1H, J=8.4, H-7), 7.64<sup>b</sup> (dd, 1H, J=1.6, J=8.4, H-6), 7.9<sup>b</sup> (s, 1H, H-4), 8.90 (d, 1H, J=7.79, NH amida, int. con D<sub>2</sub>O).</p> <p><sup>a</sup>Debido a la sobreposición con la señal del disolvente, la integral en esta zona no corresponde a la esperada. <sup>b</sup>Valores de J calculados a partir del espectro adquirido al hacer el intercambio con D<sub>2</sub>O.</p> <p><b>Espectro 20 RMN <sup>13</sup>C (75.3 MHz DMSO-d<sub>6</sub>) δ:</b> 14.74 (CH<sub>3</sub> bencimidazol), 36.65 (CH<sub>2</sub> aspártico), 49.57 (CH aspártico), 65.87 (CH<sub>2</sub> bencilico), 66.27 (CH<sub>2</sub> bencilico), 110.2 (C-7), 117.4 (C-4), 120.6 (C-6), 121.3 (C-5), 127.6, 127.8, 128.0, 128.4, 135.8 135.9 (C y CH bencilicos), 167.0 (C=O amida), 170.0 (C=O éster bencilico), 170.8 (C=O éster bencilico).</p>

### 5.1.3. Síntesis de conjugados bencimidazólicos 2-6

La síntesis de los conjugados bencimidazólicos **2-6** se logró siguiendo la secuencia del Esquemas 4.1. Para todos los compuestos se lograron obtener puntos de fusión bien definidos, sin embargo en la mayoría de los casos los rendimientos fueron de bajos a moderados.

La técnica consistió en la activación del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**1**) utilizando *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), que formó rápida y de manera evidente (debido al desprendimiento de CO<sub>2</sub>), un buen grupo saliente imidazolío que fue sustituido por alaninato de metilo (**10**), aspartato de dimetilo (**11**), prolinato de metilo (**18**), histidinato de metilo (**19**) y aspartato de dibencilo (**14**) para formar respectivamente los compuestos **2**, **3**, **4**, **5** y **6**. Cuando los aminoácidos se encontraban estabilizados en forma de clorhidratos, estos fueron tratados con una base, como trietilamina, antes de incorporarlos al medio de la reacción.

Para la síntesis del compuesto **2**, el rendimiento (55%) fue significativamente mayor que el resto de los conjugados bencimidazólicos. Debido probablemente a que se trataba de un conjugado con un aminoácido relativamente pequeño, que incluso se pudo recrystalizar por par de disolventes.

La purificación de estos compuestos fue relativamente complicada, y en la mayoría de los casos esto fue lo que provocó los bajos rendimientos. Todos los productos crudos se obtuvieron como aceites de color ámbar. Para los compuestos **2** y **6**, estos pudieron recrystalizarse utilizando una mezcla de acetato de etilo y hexano. Para los compuestos **3-5** se utilizó la cromatografía en placa preparativa, dado que se disponía de pocas cantidades para purificarlos por cromatografía en columna abierta. De esta forma se lograron obtener como sólidos y determinarles su punto de fusión.

El compuesto **5** fue el que presentó mayores problemas, a pesar de haberlo purificado por cromatografía en placa preparativa, cuando se adquirió el espectro de RMN de hidrógeno, se observaron las señales características del subproducto de la reacción (1*H*-imidazol) y restos del ácido **1**.

Los conjugados bencimidazólicos **2-6** presentaron una banda ancha y fuerte entre los 3100 y 3300 cm<sup>-1</sup>, característica del estiramiento N-H correspondiente al enlace amida. En la zona de los 1600 a 1750 cm<sup>-1</sup> se presentaron 2 bandas características del grupo carbonilo del

éster y la amida. El estiramiento antisimétrico C-O-C del grupo éster fue característico entre los 1180 y 1290  $\text{cm}^{-1}$ . Los aminoácidos con cadenas alifáticas, presentaron las bandas de estiramientos simétrico y antisimétrico de C-H entre los 2850 y 2990  $\text{cm}^{-1}$ .

A continuación se presentan las frecuencias a las que aparecieron las bandas del grupo amida y del grupo éster para los diferentes compuestos.

**Tabla 5.5.** Bandas características del grupo amida de los compuestos sintetizados ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Compuesto	Estiramiento N-H	Estiramiento C=O
2	3329	1635
3	nd	Nd
4	3149	1608
5	3148	1629
6	3257	1625

nd: no determinado

**Tabla 5.6.** Bandas características del grupo éster de los compuestos sintetizados ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Compuesto	Estiramiento C=O	Estiramiento O-C-O
2	1737	1209
3	nd	nd
4	1743	1282
5	1738	1214
6	1737	1212

nd: no determinado

Con respecto a la espectrometría de masas, la técnica utilizada fue el bombardeo de átomos rápidos (FAB) en modo positivo, ya que por Impacto Electrónico (IE) no se observaba el ión molecular esperado para los productos. El FAB<sup>+</sup> es una técnica de ionización blanda y no induce mucha fragmentación en la molécula. El espectro de estos compuestos mostró el ión cuasimolecular [M+1] esperado en todos los casos. En algunos se observó el producto dimérico [M+1 + M] y trimérico [M+1 + 2M].

Tabla 5.7. Fragmentos característicos de los compuestos sintetizados.

Compuesto	PM (g/mol)	[M+1]	[M+1 + M]	[M+1 + 2M]
2	261.28	262	523	784
3	319.31	nd	nd	Nd
4	287.31	288	575	862
5	327.34	328	655	982
6	471.50	472	944	-

nd: no determinado

En la espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ , en los compuestos sintetizados se apreció un sistema ABX, asignable a los hidrógenos 4, 6 y 7 del bencimidazol. Los acoplamientos *orto*, *meta* y *para* se ilustran en la Figura 5.1. Como se puede ver, la asignación de los hidrógenos 4, 6 y 7 se hizo en base a los valores de constantes de acoplamiento y la multiplicidad presentada en las señales.

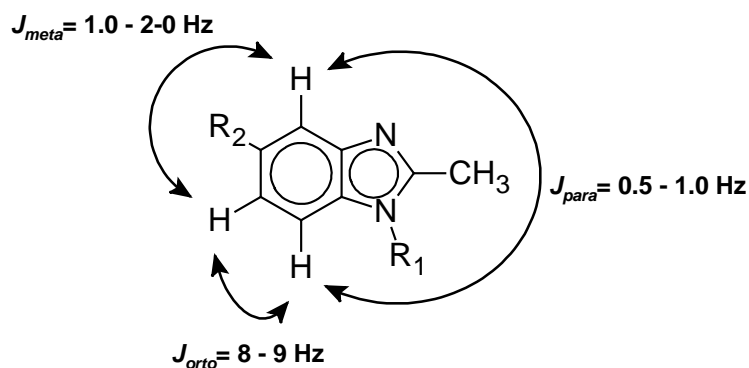


Figura 5.1. Sistema ABX encontrado en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de los conjugados bencimidazólicos

Con respecto a la espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$ , esta fue contundente con respecto a las señales de los grupos metilo y metilenos de los productos finales; ya que en algunos casos, la señal en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se sobreponía con el agua del disolvente, y el valor de las integrales no era el esperado.

#### 5.1.4. Síntesis del ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico (1)

La síntesis del compuesto **1** resultó con un buen rendimiento y el producto obtenido mostró constantes físicas y espectroscópicas bien definidas. Su obtención se llevó a cabo sin ninguna dificultad bajo el principio de la reacción de Phillips. El punto clave para obtener un excelente rendimiento fue no excederse en la cantidad de base que se utiliza para que precipite el compuesto; por lo que se eligió al bicarbonato de sodio. Dado que se sintetiza a partir del ácido 3,4-diaminobenzóico (materia prima comercial); esta diamina tiene un color muy oscuro, por lo que el compuesto **1** tiene un color café oscuro. Sin embargo, su decoloración fue sencilla, formando el carboxilato (usando una solución de NaOH) y utilizando un 10% de carbón activado. El compuesto **1** mostró en IR una banda característica de estiramiento O-H en  $3330\text{ cm}^{-1}$ , una en  $1632.4$  correspondiente al enlace C=N del bencimidazol; y una en  $1445$  correspondiente al grupo  $\text{CH}_3$ . La espectrometría de masas en la modalidad FAB de iones positivos mostró un ión cuasimolécula  $[\text{M}^+]= 177$ , con una abundancia del 16%. La RMN de  $^1\text{H}$  mostró las señales características del compuesto obtenido, las cuales se asignaron con base en sus constantes de acoplamiento *orto*, *meta* y *para*. En 2.51 ppm se observó un singulete, correspondiente al grupo metilo. En 7.49 un doblete, con una constante de acoplamiento *orto* ( $J=8.1$ ), correspondiente a H-7; un doble de dobles en 7.75, con constantes de acoplamiento *orto* ( $J=8.4$ ) y *meta* ( $J=1.5$ ), correspondiente a H-6; y un doblete con una constante de acoplamiento *meta* ( $J=0.9$ ) correspondiente al H-6, En 12.52 se observó una señal amplia, que intercambia con agua deuterada, correspondiente a los H unidos a heteroátomos (OH y NH).

#### 5.1.5. Síntesis de los compuestos finales 2-6

El compuesto **2** se obtuvo como un residuo aceitoso de color ámbar, se recristalizó de Acetato de etilo-Hexano, dando un sólido blanco, con un punto de fusión de  $186.3\text{-}187.7^\circ\text{C}$ . En el espectro de IR mostró una banda característica en  $3329\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento N-H; dos en  $1737$  y  $1635$  asignadas al grupo carbonilo del éster y la amida; y una en  $1209$  correspondiente al estiramiento C-O-C del éster. La espectrometría de masas en la modalidad FAB<sup>+</sup> mostró un ión cuasimolécula de  $[\text{M}^+]= 262$ , correspondiente al peso molecular del compuesto. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró en 1.48 ppm un doblete correspondiente al grupo metilo de la alanina; en 2.25 otro singulete correspondiente al metilo del bencimidazol. En 3.67 un singulete correspondiente al grupo metilo del éster de la alanina. En 4.46 ppm un cuarteto, asignado al CH de la alanina. La zona aromática, presentó las señales características del anillo



bencimidazólico, las cuales fueron asignadas en base a sus constantes de acoplamiento. En 7.49 ppm un doblete con  $J_{orto}=8.4$  correspondiente a H-7; un doble de dobles con  $J_{orto}=8.4$  y  $J_{meta}=1.6$  en 7.75 ppm correspondiente a H-6. Un doblete en 7.93 correspondiente al NH de La amida. Y en 8.1 ppm un doblete con una constante de acoplamiento de 1.4, correspondiente a H-4.

En el espectro de Carbono 13, se observaron las señales en la zona alquímica correspondiente a los grupos metilo del bencimidazol (14.92 ppm) y alanina (17.62 ppm). La señal en 49.37 se asignó al CH de la alanina. En 52.19 ppm se observó el grupo metilo unido a oxígeno (metilo del éster). En 167.8 y 174.1 los carbonos de amida y éster.

El compuesto **3** se obtuvo por purificación en cromatografía en placa preparativa, como un residuo aceitoso de color ámbar, con un rendimiento bajo (8.13%). A este solo se le determinaron sus características espectroscopias de hidrógeno y carbono.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró en 2.5 ppm la señal del grupo metilo del bencimidazol, la cual se sobrepone con el disolvente. En 2.9 ppm una señal múltiple, atribuida al  $\text{CH}_2$  del ácido aspártico. En 3.59 ppm se observó el grupo metilo del éster, el cual también se sobreponía con la señal del agua del disolvente. En 4.7 ppm se observó una señal múltiple, asignada al CH del ácido aspártico. En la zona aromática, en 7.51 ppm se presentó un singulete asignado a H-4; en 7.6 ppm un doblete con una  $J_{orto}=8.7$  correspondiente a H-6; y en 7.7 otro doblete con  $J_{orto}=8.7$ , correspondiente a H-7. En 8.6 y 8.8 se observaron dos señales correspondientes a los hidrógenos unidos a heteroátomos, N-H de la amida y del bencimidazol.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  mostró en 14,71 ppm la señal característica del grupo metilo del bencimidazol; en 35.6 ppm el  $\text{CH}_2$  del ácido aspártico. En 51.7 y 52.9 señales características de carbono unido a oxígeno (metilos de ésteres).

El Compuesto **4**, obtenido también por purificación en placa preparativa, tuvo un rendimiento de 6.4%. Este compuesto mostró una banda en el espectro de IR en  $3149\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramiento N-H; en 1743 y 1608 dos señales de grupo carbonilo (éster y amida). La espectrometría de masas en la modalidad FAB<sup>+</sup> mostró un ión cuasimolecular de  $[\text{M}+1]=288$ , correspondiente al peso molecular Del compuesto. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró en 1.86 ppm una señal múltiple y amplia que integró para 4 hidrógenos, correspondientes a los metilenos de la prolina. En 2.2 ppm, otra señal múltiple, correspondiente a otro grupo metileno de la prolina. La zona aromática mostró las señales e integrales correspondientes a el anillo bencimidazólico.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ , en 14.67 apareció el grupo metilo del bencimidazol. En 25.1, 30.35, 49.89, 59.4 ppm las señales correspondientes a los carbonos del anillo de pirrolidina, de la prolina. En 169 y 172.6 los carbonos de carbonilo de amida y éster.

El compuesto **5** se obtuvo por purificación en cromatografía en placa preparativa, como un sólido de color ámbar, con un rendimiento bajo (5.10%). El espectro de IR mostró la banda característica del estiramiento N-H en  $3148\text{ cm}^{-1}$ . En 1738 y 1629 las correspondientes al grupo carbonilo de éster y amida. Y en 1591 la banda de estiramiento C=N. La espectrometría de masas en la modalidad FAB+ mostró un ión cuasimolecular de  $[M+1]= 328$ , correspondiente al peso molecular Del compuesto. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró en 2.5 ppm una señal simple, correspondiente al metilo del bencimidazol, sin embargo esta señal se sobrepuso con la del disolvente, en este caso DMSO. En 3.6 ppm una señal amplia (sobrepuesta con el agua del DMSO) correspondiente al grupo metilo del éster. En 4.5 ppm se observó un cuarteto correspondiente al CH de la histidina. En 8.54 ppm un doblete correspondiente al NH de la amida.

El compuesto **6**, se obtuvo como un sólido blanco, recristalizado de una mezcla de hexano y acetato de etilo. Con un rendimiento moderado, del 20%. Este compuesto en el espectro de IR, mostró una banda en  $3257\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento N-H de la amida. Una banda en 2949, correspondiente a los metilenos del ácido aspártico. En 1737 y 1625 los grupos carbonilo del éster y la amida. La espectrometría de masas en la modalidad FAB+ mostró un ión cuasimolecular de  $[M+1]= 472$ , correspondiente al peso molecular del compuesto. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostró en 2.5 ppm la señal correspondiente al metilo del bencimidazol, sobrepuesta con el DMSO. En 3.0 ppm una señal múltiple que integró para 2 hidrógenos, correspondientes al metileno del ácido aspártico. En 4.93 ppm, un cuarteto, correspondiente al CH del ácido aspártico. En 5.0 ppm se observó una señal simple, que integró para 2 hidrógenos, correspondientes al  $\text{CH}_2$  bencílico. En 8.9 ppm se observó una señal doble, que intercambia con agua deuterada, correspondiente al NH del enlace amida.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  mostró en 14.74 ppm la señal correspondiente al metilo del bencimidazol. En 49.57 el CH del ácido aspártico; en 36.65, 65.87 y 66.27 los metilenos correspondientes al ácido aspártico y el éster bencílico. En 167, 170 y 170.8 los carbonilos de amida y ésteres bencílicos.

## 5.2. Parte Biológica

### 5.2.1. Actividad biológica de los compuestos 2-6 frente a *Trypanosoma cruzi*.

A continuación se presentan los resultados biológicos obtenidos al evaluar *in vitro* la eficacia como antiparasitarios de los compuestos **1-6** en el parásito *Trypanosoma cruzi* con el modelo anteriormente descrito. Los datos de la Tabla 5.8 están reportados en concentraciones de milimolar (mM).

**Tabla 5.8.** Resultados de la actividad antichagásica de los compuestos **2-6**.

Compuesto	Cepa		
	INC-5	Nayarit	Ninoa
<b>2</b>	NA	NA	NA
<b>3</b>	NA	NA	NA
<b>4</b>	NA	NA	NA
<b>5</b>	562.37	NA	NA
<b>6</b>	179.13	162.15	136.23
Nifurtimox	126.59	48.95	0.49
Benznidazol	844.42	NA	142.28

NA: se consideró no activo cuando fueron concentraciones mayores a 900 mM.

De los compuestos sintetizados, los conjugados de bencimidazol con aminoácidos no fueron activos. A excepción de los compuestos **5** y **6**. Donde el compuesto **5** fue 1.5 veces más activo que el benznidazol en la cepa INC-5, pero menos activo que el nifurtimox; y fue inactivo en las otras 2 cepas.

El compuesto **6** fue 4.7 veces más activo que el benznidazol en la cepa INC-5, y ligeramente más activo en la cepa Ninoa. Con respecto al nifurtimox fue ligeramente menos activo en la cepa INC-5; en las cepas Nayarit y Ninoa fue practicante inactivo. En las tres cepas evaluadas, el compuesto **6** fue menos activo que el Nifurtimox.

Los datos señalan que los conjugados con aminoácidos como histidina y ácido aspártico son más activos que los conjugados de aminoácidos como de tipo alanina y prolina. Probablemente los conjugados con estos aminoácidos son más liposolubles y pueden ingresar más fácilmente al parásito.

En el caso del compuesto **6**, que sería la excepción comparado con **2-5**, ya que es un conjugado de bencimidazol con un aminoácido; este tiene de particular un aminoácido funcionalizado como un éster dibencílico. Probablemente la presencia de los 2 grupos hidrofóbicos (bencilos) ayuden a que ingrese más fácil al trypomastigote y sea activo.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis de los 6 conjugados bencimidazólicos propuestos en los objetivos específicos: *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (**2**), *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (**3**), 1-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (**4**), *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo (**5**) y *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (**6**).
- Se planteó un método de síntesis sencillo donde la reacción de formación del enlace peptídico se llevó a cabo bajo condiciones suaves (temperatura ambiente).
- Los rendimientos obtenidos para los compuestos en general son bajos, debido a que estos son aceites, lo que hizo difícil su manejo y purificación. Los compuestos **3-5** se purificaron por cromatografía en placa preparativa; mientras que los compuestos **2** y **6** fueron purificados fácilmente por recristalización por par de disolventes, y se obtuvieron con rendimientos moderados.
- Los compuestos se caracterizaron a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Los compuestos sintetizados se evaluaron contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*; y los conjugados bencimidazólicos con aminoácidos no fueron activos. A excepción de los compuestos **5** y **6**. Donde **5** fue 1.5 veces más activo que el benznidazol en la cepa INC-5, pero menos activo que el nifurtimox.
- El compuesto **6** fue 4.7 veces más activo que el benznidazol en la cepa INC-5, y ligeramente menos activo que el nifurtimox. En la cepa Ninoa, su actividad fue prácticamente equiparable a la del benznidazol.
- El compuesto **6** como líder del grupo de los compuestos sintetizados, es buen candidato para realizar posteriores evaluaciones sobre otros parásitos, como el género *Leishmania spp*; determinar su toxicidad, etc.

- En el caso del compuesto **6**, que es un conjugado de bencimidazol con un aminoácido, tiene la particularidad de que el aminoácido está funcionalizado como un éster dibencilico. Probablemente la presencia de los grupos hidrofóbicos (2 bencilos) permiten que ingrese más fácil al trypomastigote y sea activo.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrett M.P.; The trypanosomiasis; *The lancet*; November 1, **2003**, 362, 1469-1480.
2. Figueiredo RCBQ; Steindel M.; Soares MJ.; The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. *Parasitol Res.* **1994**, 80, 517-522.
3. Frayha G. J.; Smyth J. D.; Gobert J. G.; Savel J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Revista Gen. Pharmac.* **1997**, 28 (2), 273-299.
4. Goldman R.; Kaplan, A.; Rupture of rat liver lysosomes mediated by L-amino acid esters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, 318, 205-216.
5. Rabinovitch, M.; Zilberfarb, V.; Ramazeilles, C.; Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes within macrophages by lysosomotropic amino acid esters. *J. Exp. Med.* **1986**, 163, 520-535.
6. Romero Cabello Raúl. *Microbiología y parasitología*. Ed. Médica panamericana. México **1999**, 650-657.
7. Soares M.J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **1999**, 94 (1), T39-T41.
8. Soares M.J.; Souto-Padrón T; Bonaldo MC; Goldenberg S; De Souza W.; A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **1989**, 75, 522-527.
9. Sosa Esteani S.; Efficacy of chemotherapy with benznidazol in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **1998**, 59, 526-529.
10. Tay J.; Lara Z. *Parasitología*. Ed. Médica Méndez. México, **1995**, 109-132.
11. Townsend L.B., Wise D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today.* **1990**, 6 (4), 107-112.
12. Tyler K.M. The life of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology.* **2001**, 31, 472-481.

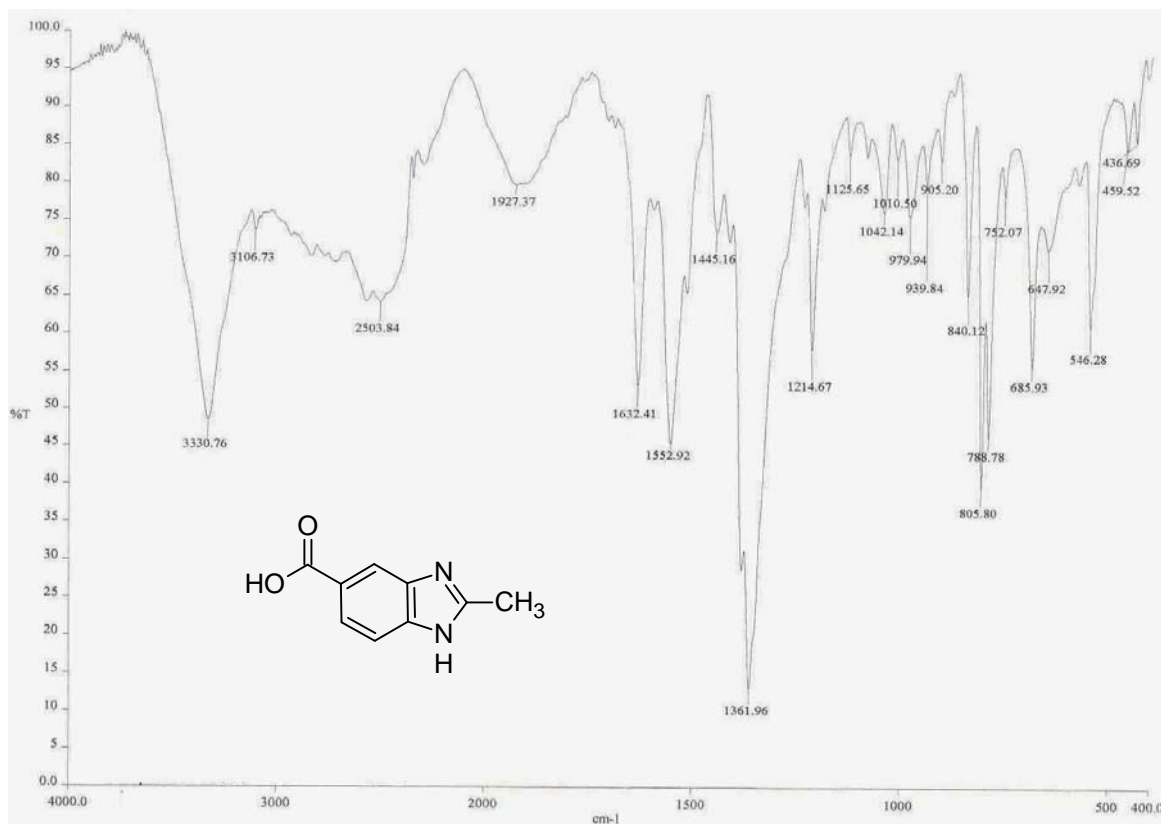
13. Urbina Julio A.; Docampo Roberto. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitology*. **2003**, 19(11), 495-501.
14. Urbina J.A.; Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. **1994**, 10, 107-110.
15. Solomons T. W. G. Química Orgánica. Editorial Limusa. México **1985**, 1003-1028.
16. Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J. Parasitol.* **1960**, 46, 541–551.
17. Mancilla R.; Naquira C; Lanás, C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C<sup>14</sup> in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **1967**, 21, 154–159.
18. Sylvester D.; Krassner S.M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1976**, 55, 443–447.
19. Rohloff P.; Rodríguez C.O.; Docampo R.; Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, 126, 219–230.
20. Contreras V.T.; Salles, J.M.; Thomas N.; Morel C.M.; Goldenberg S.; In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, 16, 315–327.
21. Tonelli R.R.; Silber A.M.; Almeida-de-Faria; M. Hirata I.Y.; Colli W.; Alves M.J.; L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* **2004**, 6, 733–741.
22. Canepa, G.E.; Bouvier, L.A.; Urias, U.; Miranda, M.R.; Colli, W.; Alves, M.J.; Pereira, C.A.; Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, 247, 65–71.
23. Sidney M. M.; Arginine metabolism: Enzymology, nutrition and clinical significance. *The Journal of Nutrition.* **2006**, 134, 2743S-2747S.



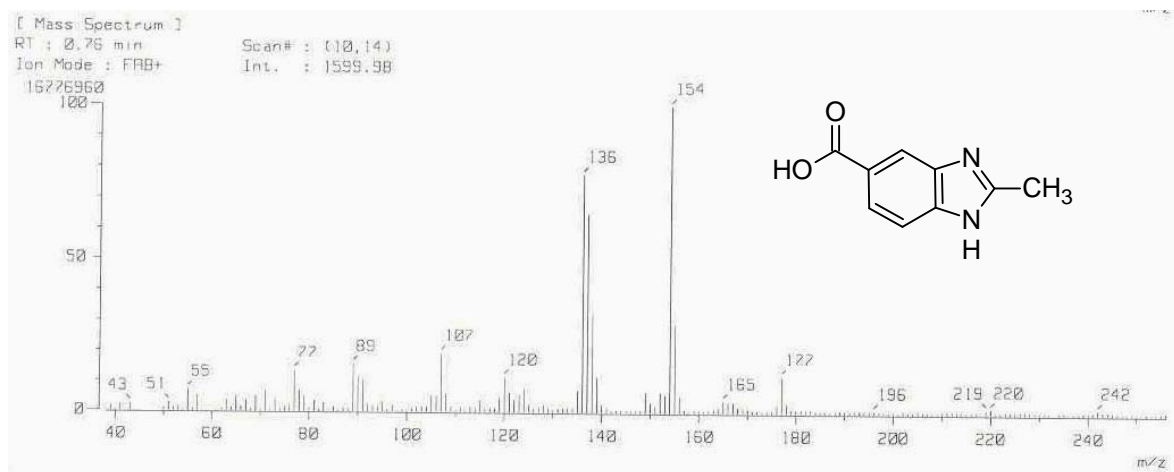
24. Dias J.C.; Silveira A.C.; Schofiel C.J.; The impact of Chagas disease control in Latin America. *Review. Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2002**, 97, 603-612.
25. Han S.Y.; Kim Y.A.; Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron.* **2004**, 60, 2447-2467.
26. Valdez, Juan. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1*H*-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2002**, 12, 2221-2224.
27. Vargas, B.P. Síntesis de Derivados del 5-aminocarbonil-1*H*-bencimidazol con Potencial Actividad Antiparasitaria. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas, UABJO, **2002**.
28. Gilchrist T.L. Química Heterocíclica, 2ª edición. Longman Scientific & Technical. USA, **1992**, 176-177.
29. Hofmann, Klaus. Imidazole and its derivatives Part I. Interscience Publisher LTD. London **1953**, 261-318.
30. Mahiuddin Alamgir. Synthesis, reactivity and biological activity of benzimidazoles. *Journal Heterocyclic Chemistry.* **2007**, 87-118.
31. OMS; Libro: Reporte sobre la enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, **2007**, 31-42.
32. Pizzi T. Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Chile. Santiago, Chile, **1957**.

**8. APÉNDICE: Colección de Espectros**

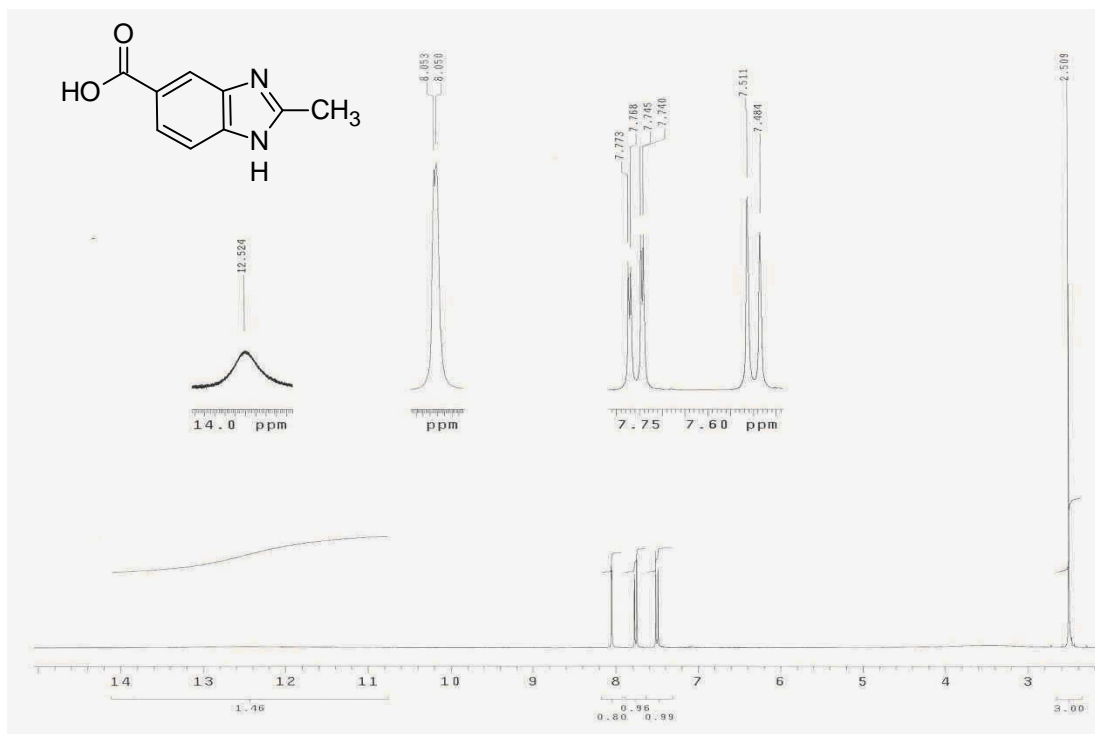
En las siguientes páginas se presentan los espectros de infrarrojo (IR), Espectrometría de Masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) y Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) de las materias primas y los compuestos sintetizados.



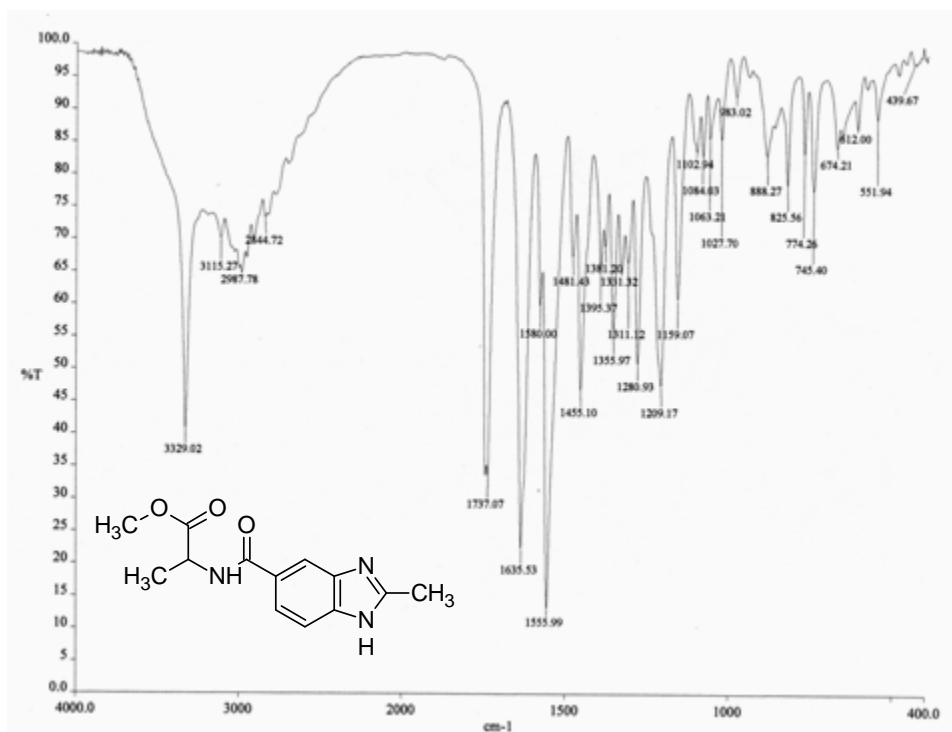
**Espectro 1, IR:** ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (1)



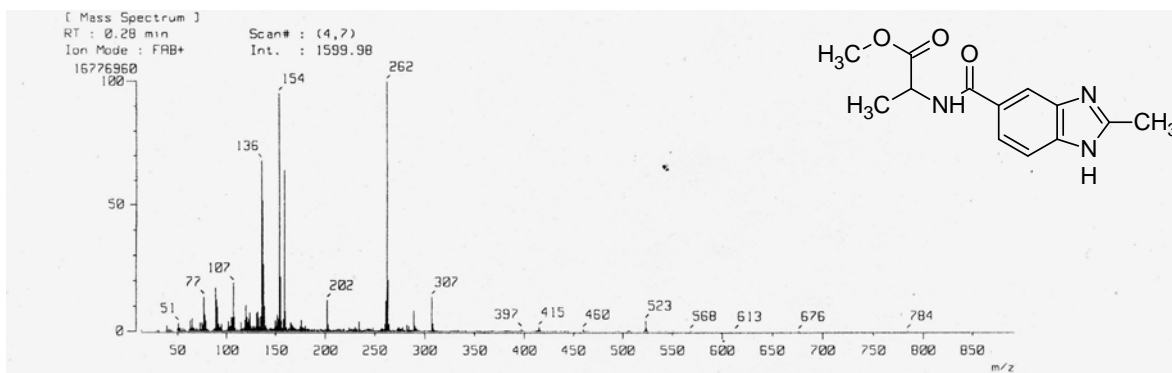
**Espectro 2, EM (FAB+):** ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (1)



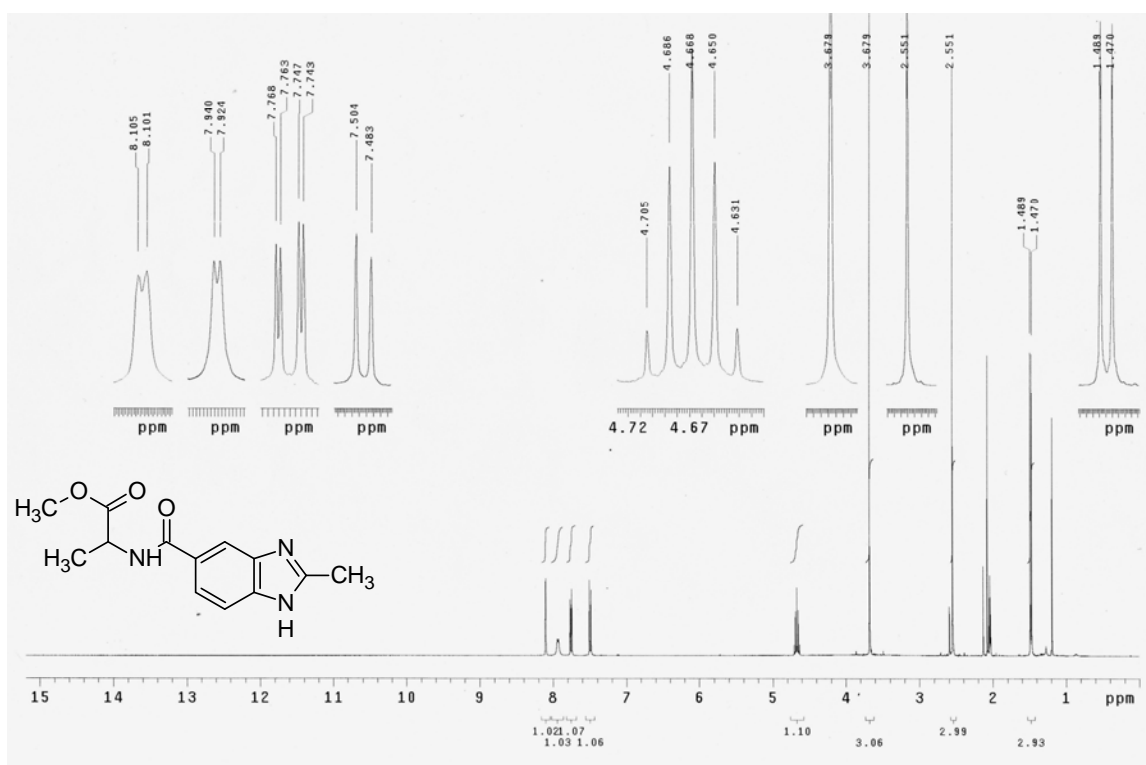
**Espectro 3, RMN <sup>1</sup>H: ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (1)**



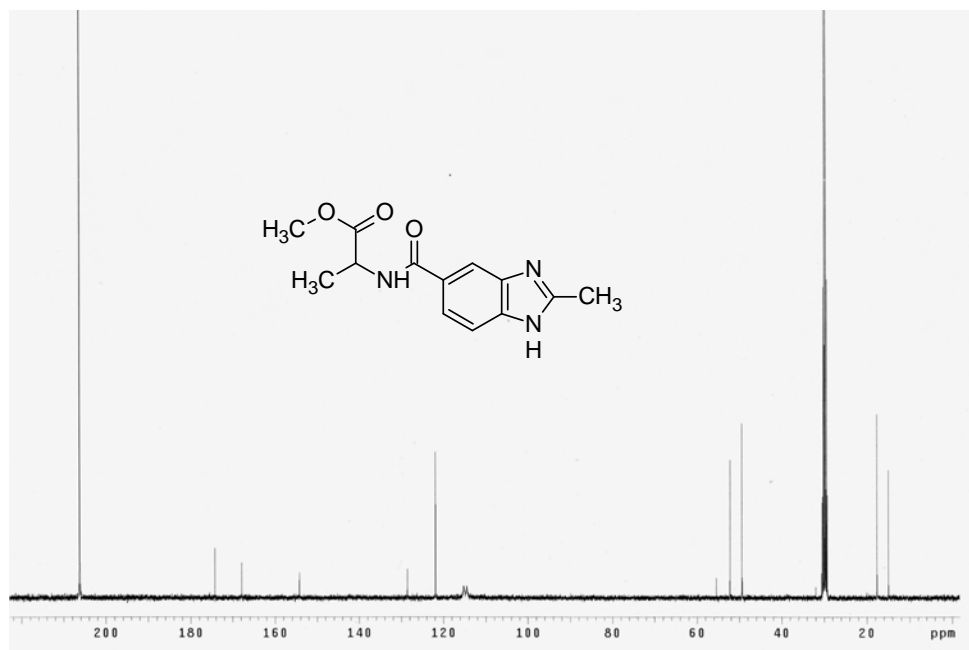
**Espectro 4, IR: N-[(2-metil-1H-benzimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (2)**



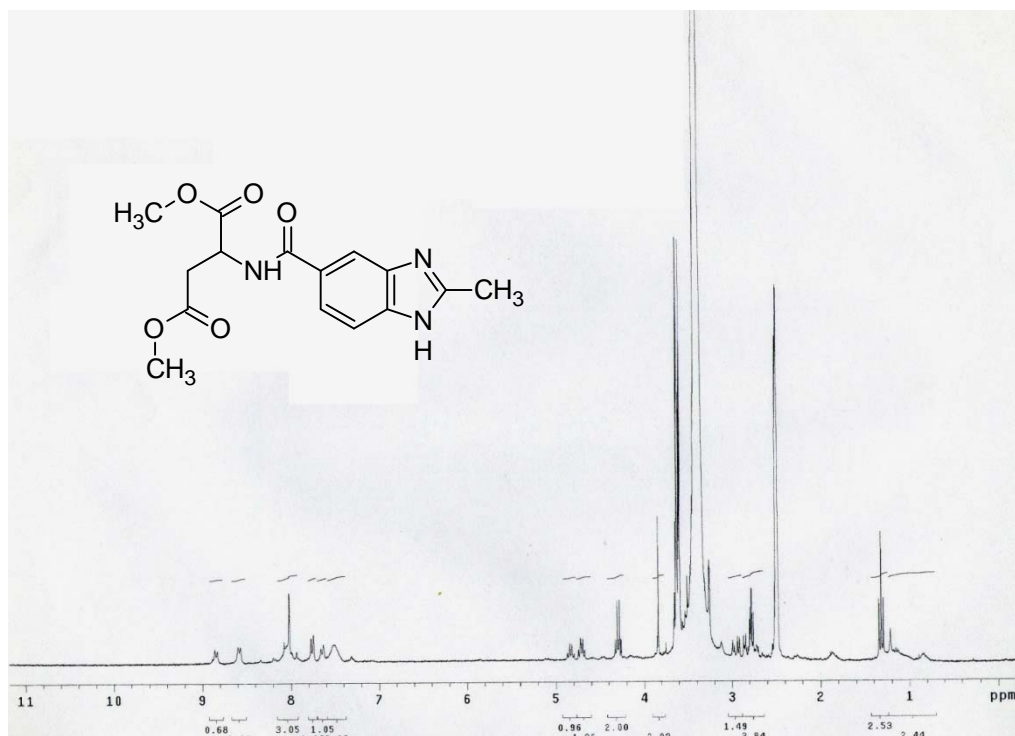
**Espectro 5, EM (FAB<sup>+</sup>):** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (**2**)



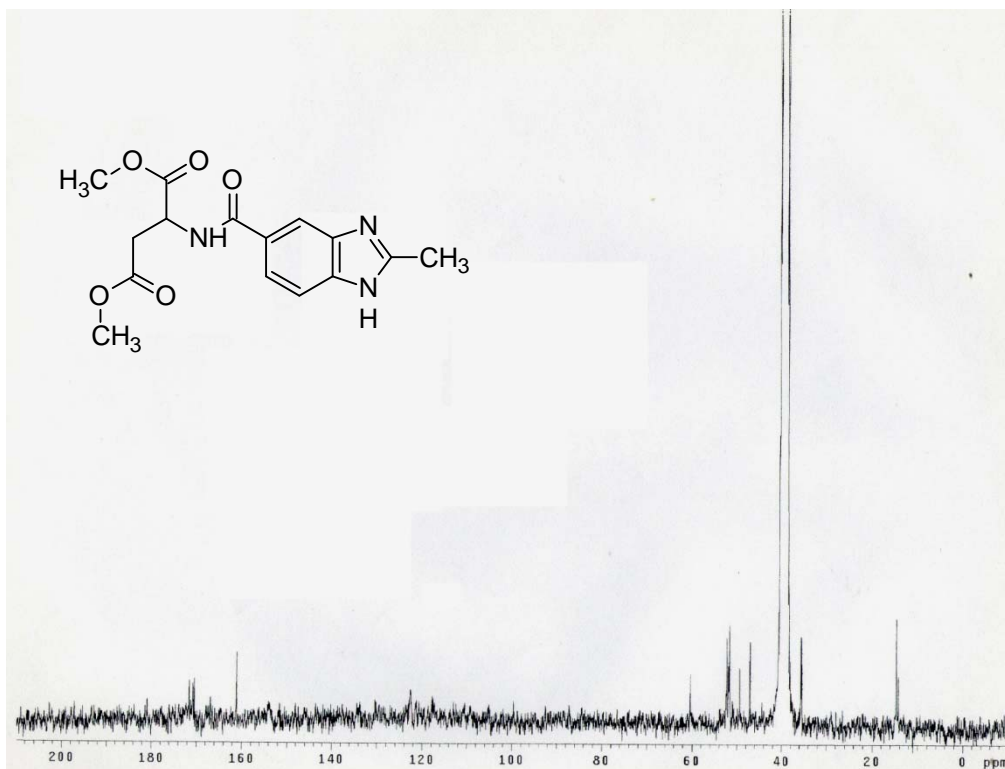
**Espectro 6, RMN <sup>1</sup>H:** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (**2**)



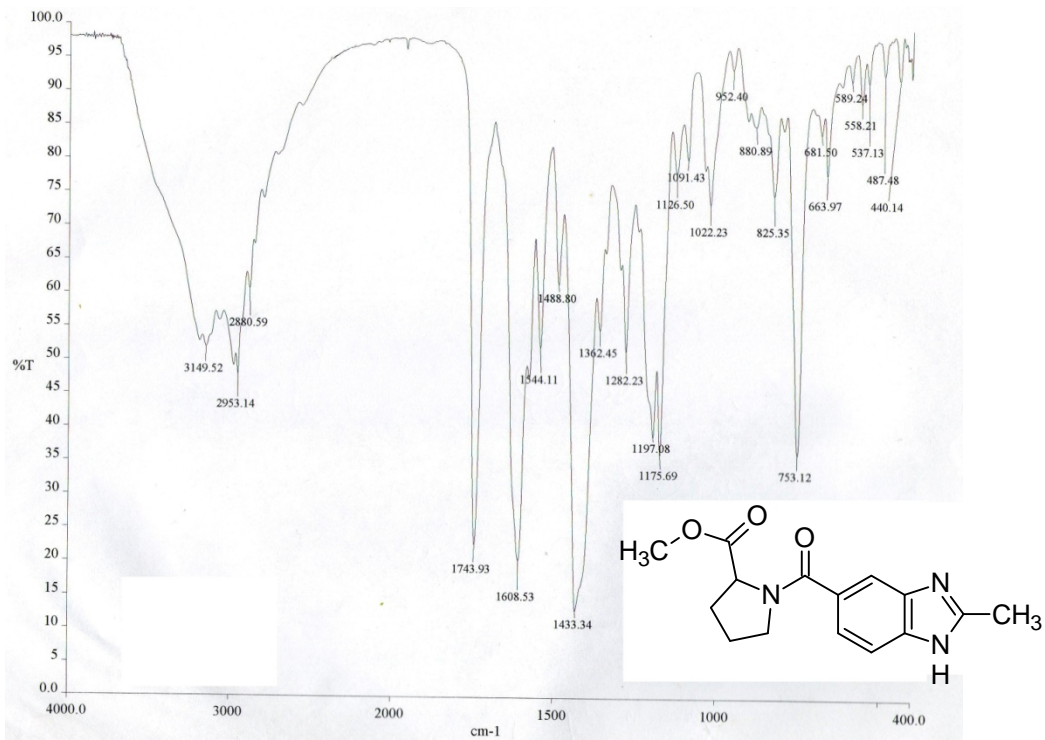
**Espectro 7, RMN <sup>13</sup>C:** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]alaninato de metilo (2)



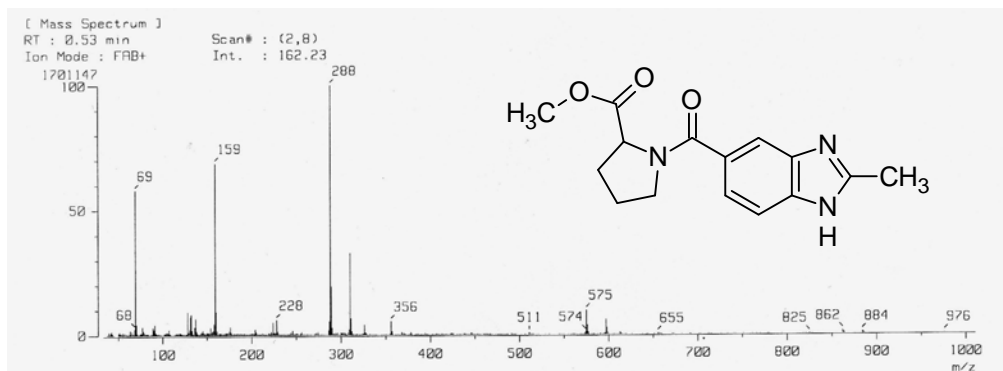
**Espectro 8, RMN <sup>1</sup>H:** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (3)



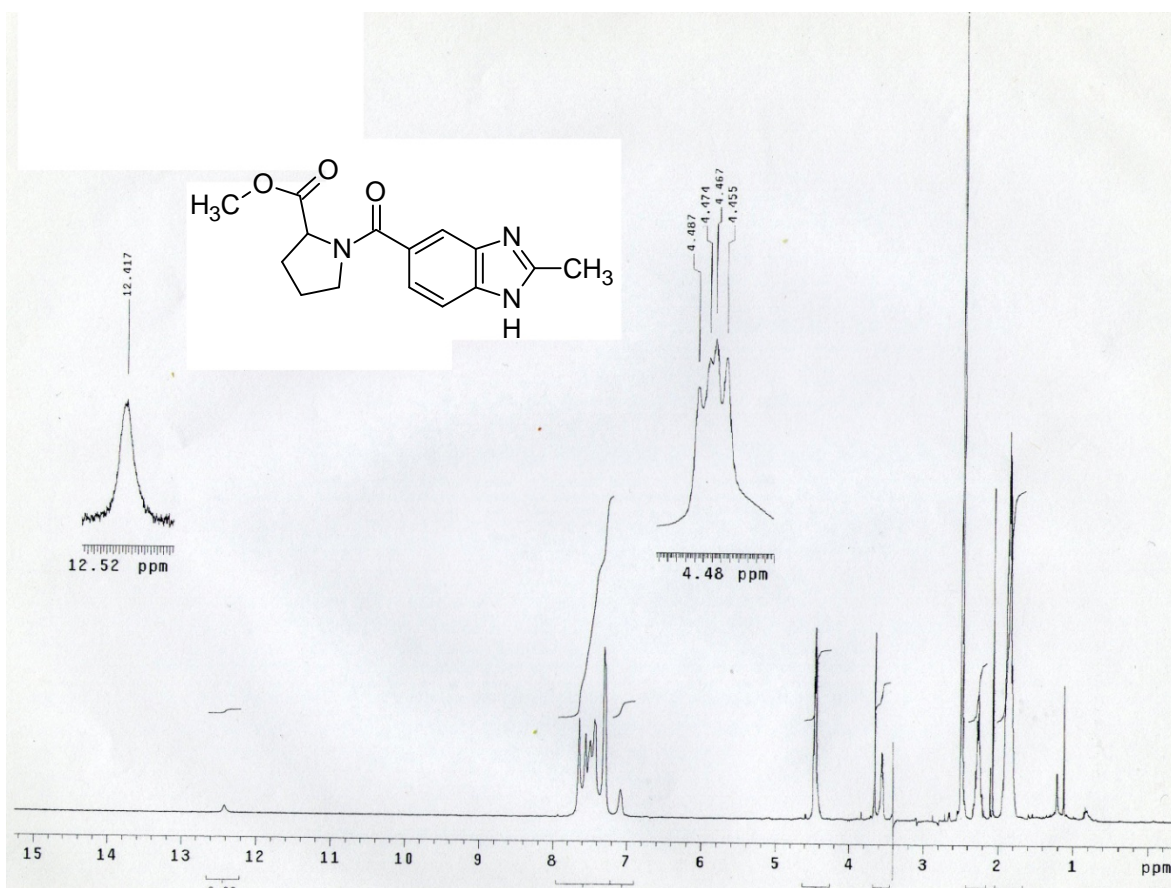
**Espectro 9, RMN <sup>13</sup>C:** -[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dimetilo (3)



**Espectro 10, IR:** 1-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (4)

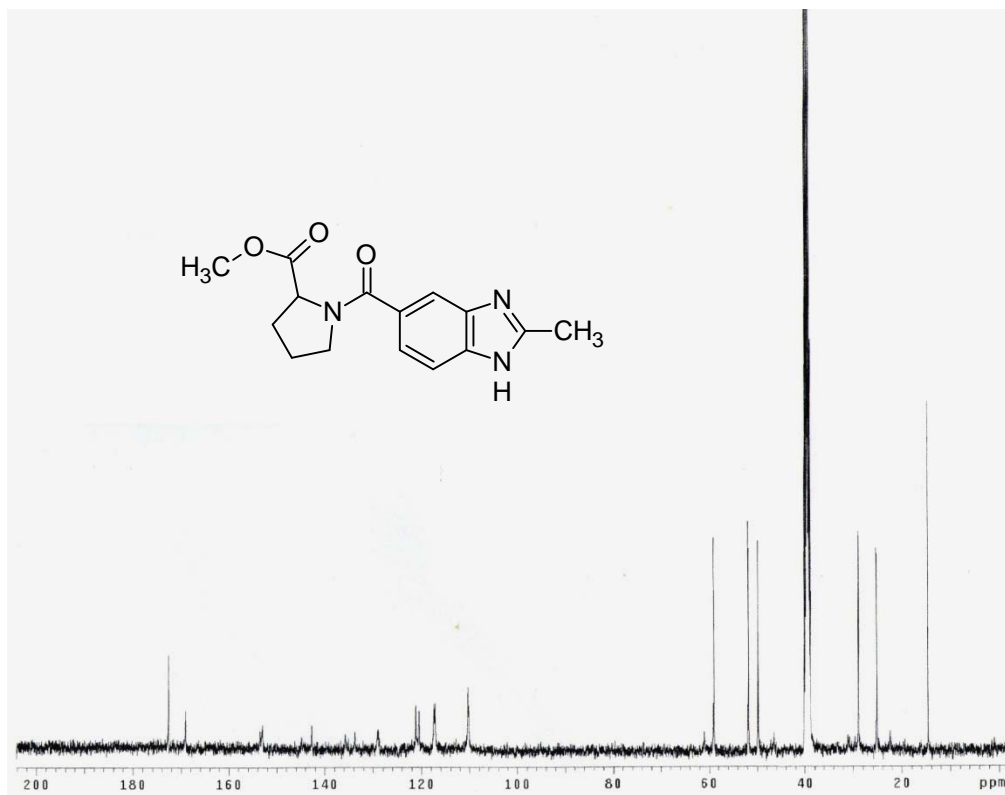


**Espectro 11, EM (FAB<sup>+</sup>): 1-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (4)**

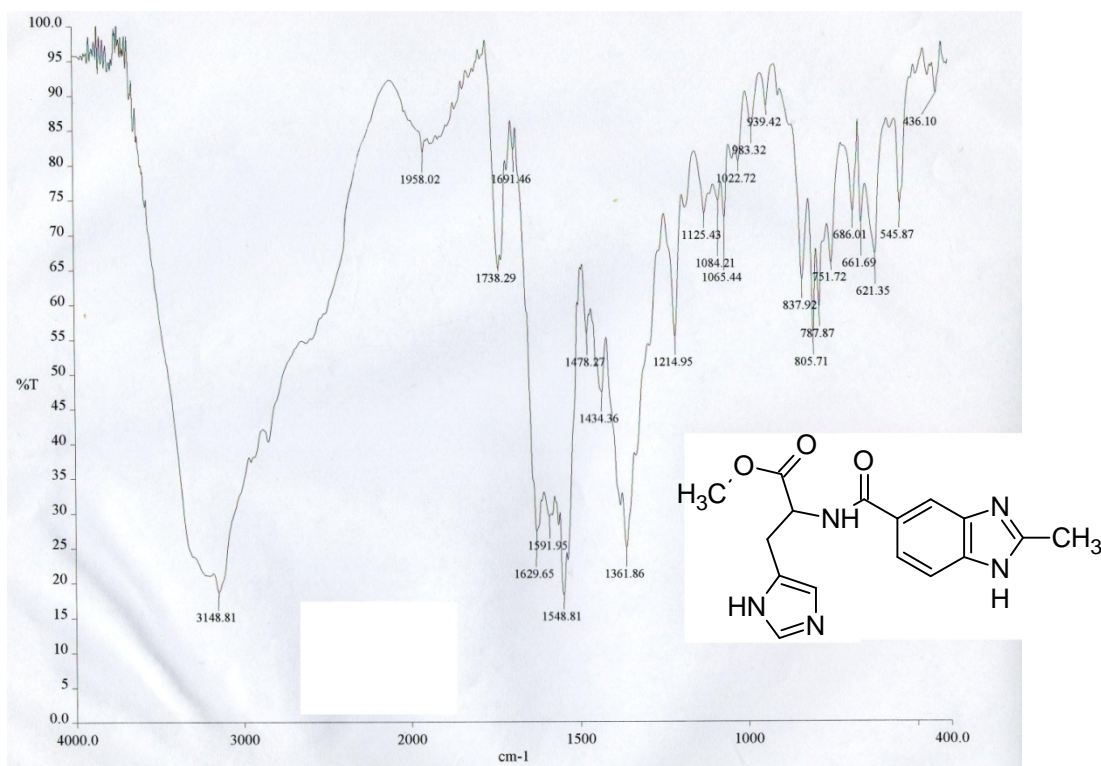


**Espectro 12, RMN <sup>1</sup>H: 1-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonil]prolinato de metilo (4)**

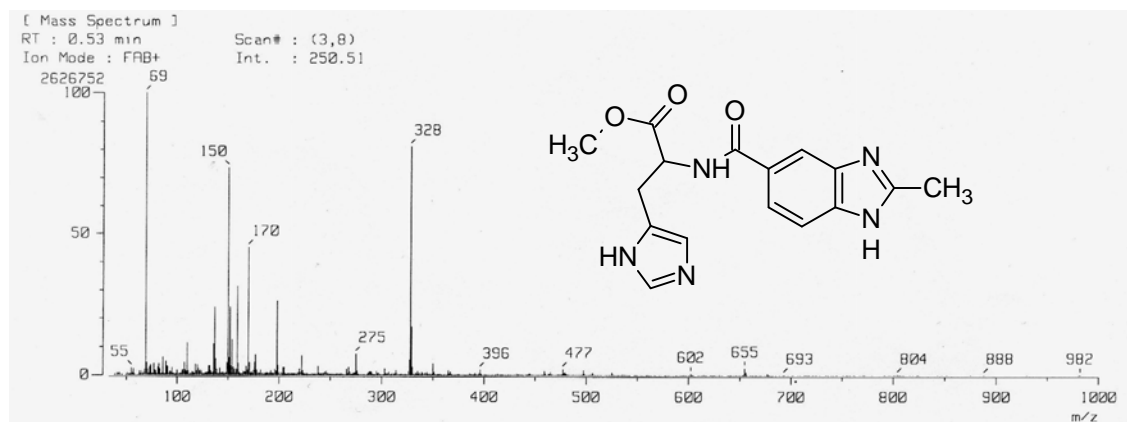




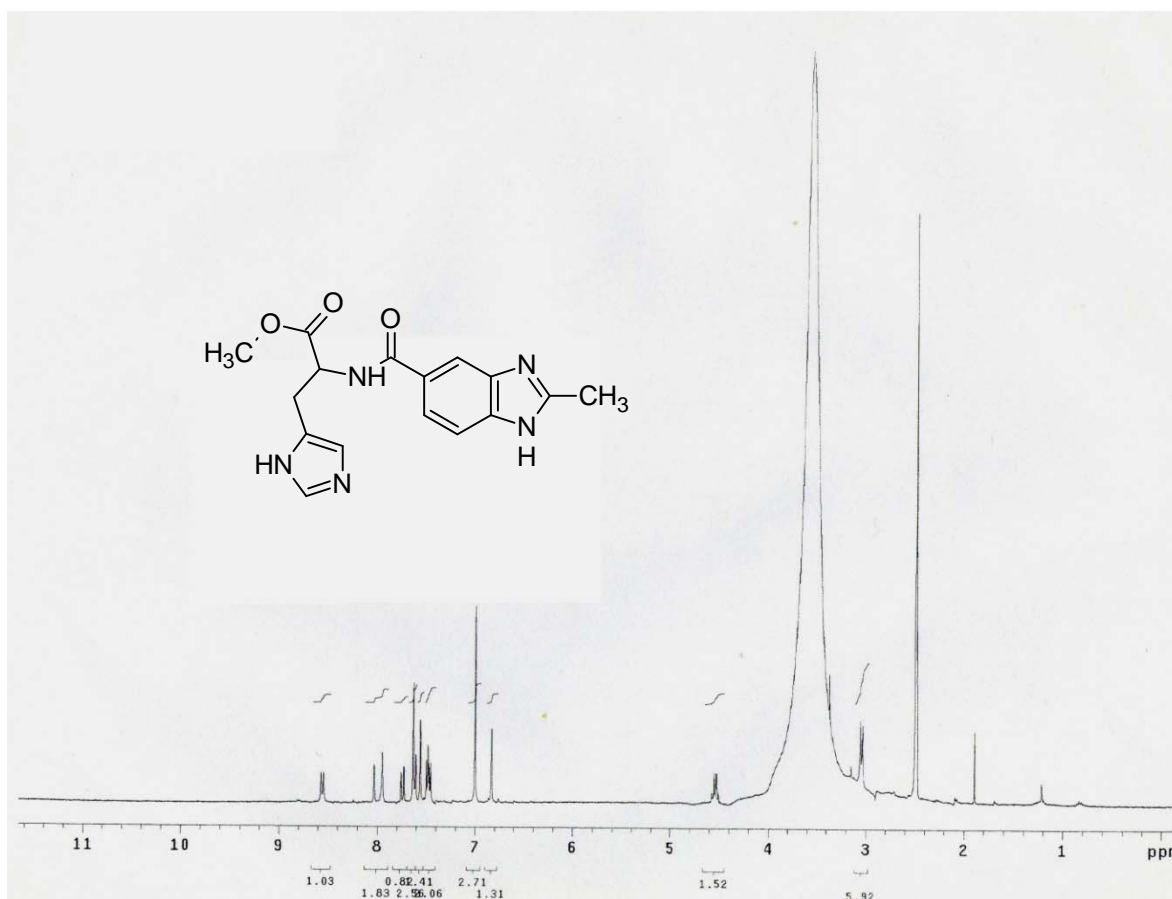
**Espectro 13, RMN <sup>13</sup>C:** 1-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonyl]prolinato de metilo (4)



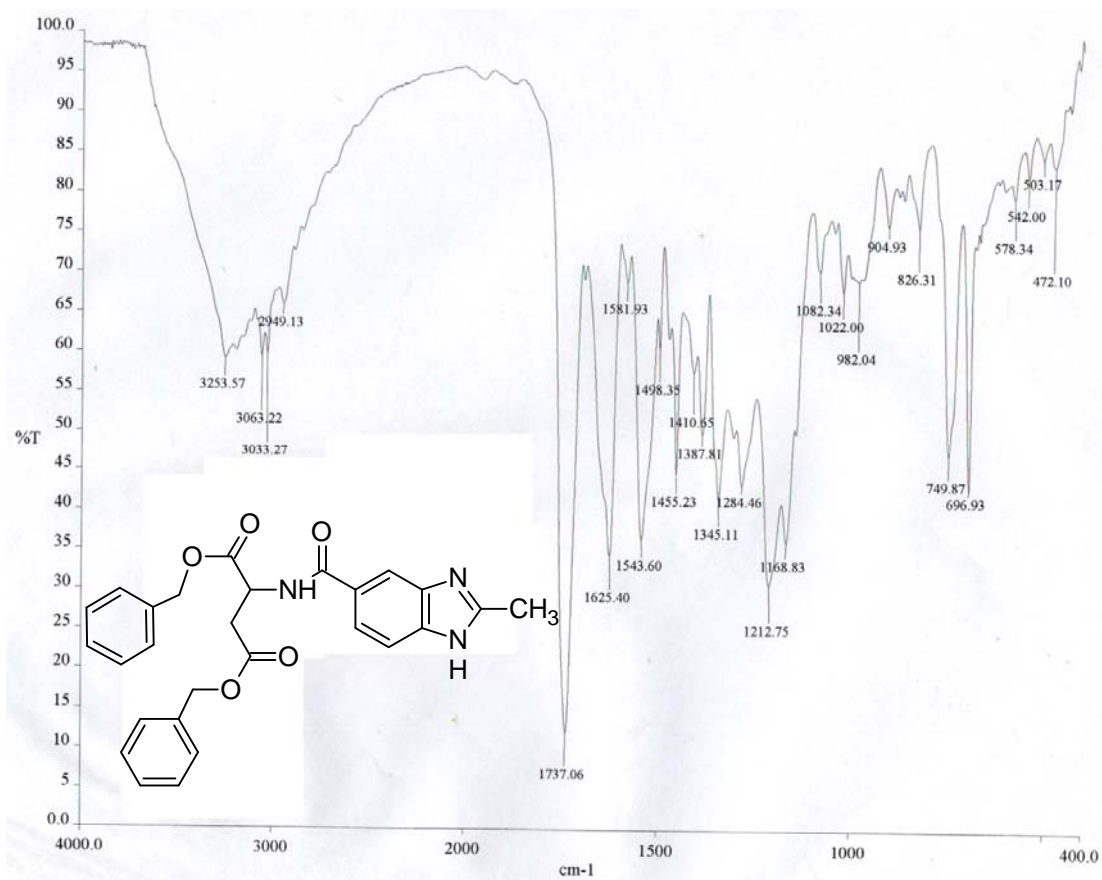
**Espectro 14, IR:** N-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonyl]histinato de metilo (5)



**Espectro 15, (FAB<sup>+</sup>):** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo (**5**)

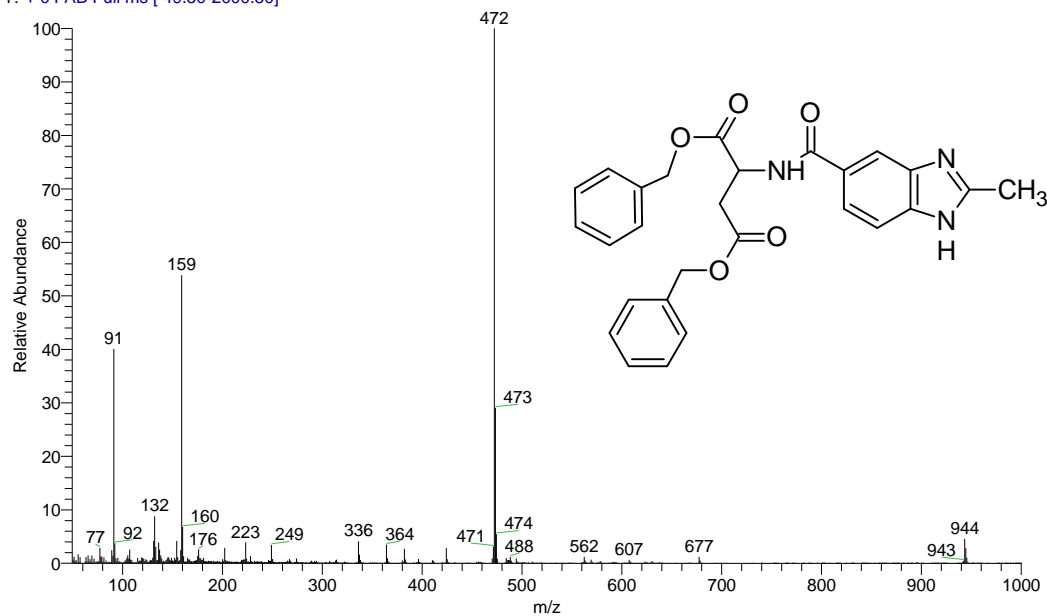


**Espectro 16, RMN <sup>1</sup>H:** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]histidinato de metilo (**5**)

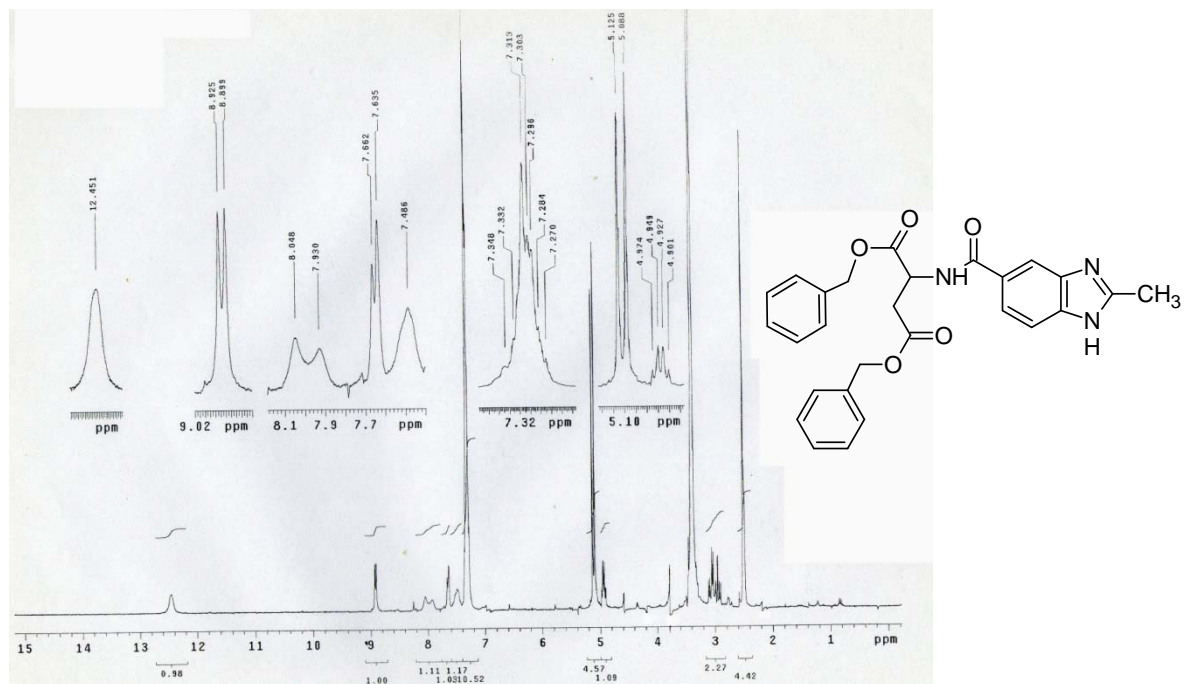


**Espectro 17, IR:** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (**6**)

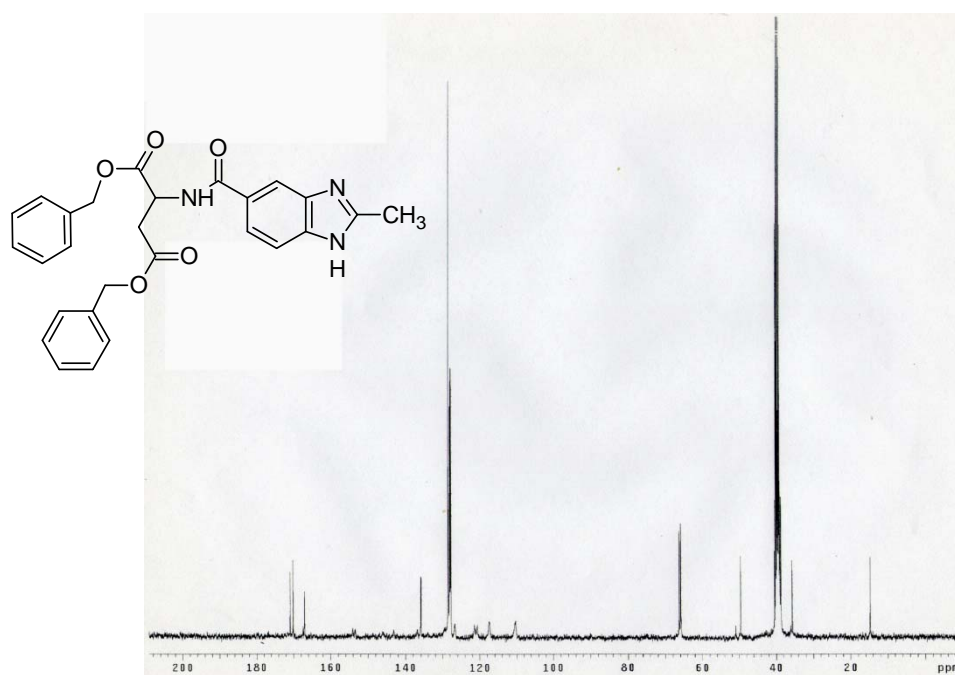
T: + c FAB Full ms [ 49.50-2000.50]



**Espectro 18, EM (FAB<sup>+</sup>):** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonil]aspartato de dibencilo (**6**)



**Espectro 19, RMN  $^1\text{H}$ :** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonyl]aspartato de dibencilo (6)



**Espectro 20, RMN  $^{13}\text{C}$ :** *N*-[(2-metil-1*H*-bencimidazol-5-il)carbonyl]aspartato de dibencilo (6)

## 9. GLOSARIO

**Aislado:** Grupo biológico que comparte características hereditarias de un mismo antecesor.

**Aperistaltismo:** Ausencia del peristaltismo (contracciones musculares organizadas que ocurren a todo lo largo del tubo digestivo) de una parte o de la totalidad del intestino.

**Artrópodo:** Invertebrado con patas articuladas y esqueleto quitinoso

**Cinetoplasto:** Un cinetoplasto es una masa de ADN circular dentro de una gran mitocondria que contiene numerosas copias del genoma mitocondrial. Sólo se encuentran en los organismos de la clase Kinetoplastea. Los cinetoplastos son usualmente adyacentes al cuerpo basal flagelar dando la sensación de que están firmemente vinculados al citoesqueleto.

**CL<sub>50</sub>:** Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL<sub>50</sub> se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/L).

**Cultivo Primario:** Cultivo celular derivado de fragmentos de tejido. Generalmente termina en el primer subcultivo.

**Chagoma:** Es una forma de inoculación de *T. cruzi* cuando la penetración es a través de la piel.

**Endemia:** Es la presencia continua de una enfermedad o de un agente infeccioso dentro de una zona geográfica determinada.

**Especie:** Organismo que tiene las características morfológicas parecidas entre los que es posible un intercambio genético cuyo producto es viable, permitiendo la perpetuación del grupo como un todo.

**Fisión binaria longitudinal:** La fisión binaria o bipartición es una forma de reproducción asexual que se lleva a cabo en arqueobacterias, bacterias, levaduras de fisión, algas unicelulares y protozoos. La célula madre se divide en dos células hijas de igual tamaño. La fisión en dos partes, o binaria, puede ser idéntica a una división celular, o implicar una reorganización del citoplasma y la formación de estructuras celulares nuevas. La fisión es frecuente en los organismos unicelulares, pero rara en los

multicelulares, ya que requiere la regeneración de partes especializadas en cada uno de los descendientes. En los microorganismos la fisión binaria puede ser transversal (se produce a lo ancho del organismo), como en el caso del paramecio, o longitudinal (a lo largo del organismo), como en la euglena, un flagelado colonial.

**Flagelos:** Son finos con forma de látigo que están formados por vaina externa que es continuación de membrana celular y por un axonema. El flagelo está embebido en el citoplasma a la altura de la superficie de la membrana celular existiendo una placa terminal.

**Fusiforme:** En forma de huso, es decir con una forma cilíndrica afilada en sus dos extremos.

**Helmintos:** Conjunto de familias de gusanos planos y cilíndricos, que incluye a los cestodos, trematodos y nematodos.

**Hematófagos:** Dicese del animal que se alimenta de sangre, como muchos insectos chupadores. Un mamífero hematófago: los vampiros.

**Hemípteros:** Orden de insectos que se caracterizan, entre otros, por poseer un aparato bucal chupador que, según las especies, utilizan para alimentarse de savia o sangre.

**Huésped:** Persona o animal que en circunstancias naturales permiten la subsistencia o alojamiento de un agente infeccioso.

**Incidencia:** Es el número de casos nuevos que se registran de una enfermedad, en un momento y lugar determinados. Se calcula dividiendo el número de casos notificados de una enfermedad por la población total en la que ocurren. Tasa de Incidencia:  $N^{\circ}$  de casos nuevos / población total, en un lugar y momento determinado.

**Lisosomas:** Son sáculos membranosos que contienen enzimas hidrolíticas que realizan la digestión intracelular controlada de los materiales extracelulares y de los orgánulos inservibles. Contienen una mezcla de diferentes hidrolasas ácidas que presentan su actividad excelente a pH ácido (sobre 5).

**Macrófagos:** Glóbulos blancos diferenciados para el reconocimiento y fagocitosis de elementos antigénicos.

**Membrana ondulante:** el flagelo puede estar encerrado en la membrana celular en gran parte de su recorrido dando lugar a una estructura en forma de aleta.

**Miocarditis:** Enfermedad del músculo cardíaco.

**Mitocondrias:** Son orgánulos donde se realice el metabolismo. Posee dos membranas (externa e interna). El Tripanosoma tiene mitocondrias poco desarrolladas cuando se encuentra en la sangre y mayor desarrollado en el intestino del vector. En las mitocondrias es donde tiene lugar el ciclo de Krebs y el ácido cítrico.

**Mononuclear:** Que tiene un solo núcleo.

**Parasitemia:** Presencia de parásitos en sangre circulante.

**Parásito:** Ser que vive a expensas de otro de distinta especie llamado huésped y al cual puede producir daño de magnitud variable.

**Parasitosis:** Enfermedad por parásitos.

**Pase de las células:** El pase de las células supone transferir un pequeño número de células a un nuevo continente. Las células pueden cultivarse más tiempo si se pasan regularmente, ya que así se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular. Con cultivos en suspensión el pase se hace fácilmente, tomando una pequeña cantidad de cultivo que contenga unas pocas células y diluyéndola en un volumen mayor de medio fresco.

**Patogenicidad:** Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**Patognomónicos:** Se utiliza para denominar aquellos signos (manifestaciones visibles) o síntomas (manifestaciones no visibles, subjetivas) que, si están presentes, aseguran que el sujeto padece un determinado trastorno.

**Peridomiciliario:** Es el área alrededor de los dormitorios donde se realiza la actividad humana cotidiana y se alojan los animales domésticos en una diversidad de estructuras físicas de variada estabilidad, pudiendo abarcar un radio de hasta 150 m alrededor de los domicilios.

**Periodo de Latencia:** Periodo de incubación que transcurre entre la exposición a un estímulo y la respuesta que se produce.

**Período de incubación:** Período desde la penetración del parásito hasta la aparición de los primeros signos o síntomas de la enfermedad.

**Periodo sintomático:** persisten las manifestaciones clínicas.

**Pleomórfico:** que adopta varias formas en determinadas circunstancias. Ocurre con frecuencia en las bacterias. También se utiliza para describir diferentes tipos de cristalización.

**Prevalencia:** Es la cantidad de casos acumulados de una enfermedad, en un momento y lugar determinados. Se calcula teniendo como numerador el número de personas enfermas – sin importar cuando enfermaron- sobre el total de la población en la que ocurrieron. Tasa de Prevalencia:  $N^{\circ}$  de enfermos / población total en un lugar y momento determinado.

**Protozoarios:** Seres vivos en que las funciones vitales se da en una célula. Son eucariotas (su material genético ADN está contenido en los cromosomas y estos están confinados en el núcleo (diferencia con las bacterias). Hay unas 65.000 especies tanto de vida libre, parásito y patógenos oportunistas.

**Reservorio:** Cualquier ser humano, animal, planta, suelo o materia inanimada donde normalmente vive y se multiplica un agente infeccioso y del cual depende para su supervivencia, reproduciéndose de manera que pueda ser transmitido a un huésped susceptible.

**Reservosomas:** Son compartimentos grandes y esféricos presentes en la región posterior de la forma epimastigote.

**Saco flagelar:** Es el hueco que queda entre la célula y el flagelo. También se denomina bolsa flagelar o reservorio flagelar.

**Senescencia:** Punto final en el ciclo biológico de una línea celular finita, caracterizado por la ausencia de división. La conversión de una línea celular finita a una continua requiere sobrepasar la senescencia.

**Síndrome de Romaña:** Cuando *T. cruzi* penetra a la conjuntiva.

**Subcultivo o Pase:** Término para determinar el cambio de células de un frasco de cultivo a uno nuevo. Recambio de medio de cultivo.

**Susceptibilidad:** Probabilidad de producir una respuesta significativamente superior a la media a una exposición específica a una sustancia.



**Triatomíneos o Triatominos:** Chinchas transmisoras de la enfermedad de Chagas, conocidas como chinchas besuconas u hociconas.

**Tripomastigotes metacíclicos:** Es la forma no replicativa, infectante para los mamíferos, de forma alargada, que mide de 20 a 25 micras, con núcleo vesiculoso, cinetoplasto en la parte posterior y flagelo a lo largo del cuerpo y libre en el extremo posterior.

**Tripomastigotes sanguíneo:** Es la forma no replicativa infectante para el huésped invertebrado.

**Tromboembolismo:** Es una situación clínica que ocurre cuando se genera un coágulo en el interior del sistema vascular y permanece in situ (trombosis) o es desplazado hacia delante en el torrente circulatorio (embolia).

**Vector:** organismo animal, generalmente artrópodo, que puede transportar activamente un agente desde la fuente infectante hasta un susceptible.