



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

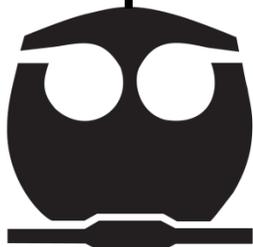
***SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE 5-CLORO-
2-(METILTIO)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXAMIDAS-N-
SUSTITUIDAS***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LAURA GISELA GONZÁLEZ IGLESIAS



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** ESPEJO GONZÁLEZ OFELIA

VOCAL: **Profesor:** CASTILLO BOCANEGRA RAFAEL

SECRETARIO: **Profesor:** CORNEJO ROJAS ROSA LUZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** LÓPEZ CORTÉS JOSÉ GUADALUPE

2° SUPLENTE: **Profesor:** CASTILLO RANGEL NORMA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA,
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, LABORATORIO 122, CONJUNTO E, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. CARLOS MENDEZ CUESTA

SUSTENTANTE:

LAURA GISELA GONZÁLEZ IGLESIAS

DEDICATORIAS

A Dios por brindarme la vida, por dotarme de las capacidades necesarias para salir adelante en ella, disfrutándola, compartiendo y amando a todos aquellos que la han marcado.

**“Ni siquiera el más perfecto de los hombres
será algo sin la sabiduría que viene de ti”**

Sabiduría (9,6)

A mis padres por darme la vida, brindarme todo su amor, comprensión y apoyo, son los mejores que pude haber escogido.

A mi terapeuta Georgina que desde muy pequeña me enseñó que un poco de frustración es esencial, que él no luchar por lo que quieres es imperdonable y que la vida es para disfrutarse (Mamá).

A mi primer ideal masculino por mostrarme: que cada día hay que sonreír ya que los problemas son una oportunidad, por contagiarme su inagotable alegría y apoyar mis decisiones (Papá).

A mi hermano Carlos por cuidarme, apoyarme, enseñarme y confiar en mí más de lo que pensé.

A mi pequeño hermano Alan por su cariño, confianza y por ser mi camarada durante todo nuestro desarrollo escolar.

A mi hermana Marlensita por hacer de mi infancia una etapa maravillosa e inolvidable, por las inagotables horas de juego y travesuras de calcetines.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme en sus aulas y ser mi segunda casa.

A la Facultad de Química por forjarme en el campo de la Química brindándome todos los conocimientos necesarios para mi desarrollo personal y profesional.

Al Doctor Rafael Castillo por ser mi asesor, brindándome su apoyo, consejo y diligencia en la realización y revisión de esta tesis.

Al M. en C. Carlos Méndez Cuesta por ser mi supervisor técnico, por su apoyo, enseñanza y amistad para la realización y revisión de esta tesis.

Al Doctor Francisco Hernández Luis y a la M. en C. Alicia Hernández Campos por su apoyo y consejo durante la realización de esta tesis.

Al personal de la USAI por la asistencia técnica en la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas e infrarrojo.

En agradecimientos al CONACYT proyecto 80093 por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, Amparo Tapia y Josué Daniel Bravo Martínez, por la determinación de la actividad antiprotozoaria, en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

A todas aquellas personas que me brindaron su amistad desinteresadamente y marcaron mi vida.

A mis amigos de la preparatoria, Gaby y Martin. A mis amigos y compañeros de toda la carrera, Jazzita (mi hermana postiza), Ismael, Roberto y René por su apoyo, risas y a veces tranquilizarme en los momentos de desesperación, porque sin ustedes este viaje no hubiera sido tan fabuloso.

A mi querida amiga Norma por su amistad, cariño, apoyo y consejo en los momentos difíciles.

A Daniel por su apoyo, cariño y comprensión en aquellos momentos de sobrecarga de trabajo, por su ayuda con mis tareas y revisión de acentos, por su amor.

A Eduardo, Silvia y Miguel por su amistad e incontables risas, por su apoyo en la obtención de mis espectros y por sus excelentes ideas.

A mis amigos del laboratorio 122 Carlos, Toño, Pedro, Armando, Oscar, Normas, Rodrigos, Jeshua, Paulina, Irene y Bere por hacer de mis decepciones de síntesis una oportunidad para conocerlos más y apreciarlos.

Síntesis y actividad antiparasitaria de 5-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-6-carboxamidas-N-sustituidas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Parasitosis en México.....	3
2.2 Protozoosis.....	4
2.2.1 Amebiasis.....	4
2.2.2 Giardiosis.....	6
2.2.3 Tricomoniasis	8
2.3 Fármacos antiparasitarios.....	10
2.3.1 Bencimidazoles como agentes antiprotozoarios.....	11
2.3.2 Mecanismo de acción de los Bencimidazoles.....	13
2.3.3 Modificaciones estructurales de Bencimidazoles.....	15

2.4	Métodos de síntesis de Bencimidazoles.....	18
2.4.1	Síntesis de Bencimidazoles a partir de <i>o</i> -Feniléndiaminas.....	19
2.4.2	Síntesis de Bencimidazoles a partir de <i>N</i> -acil y <i>N,N</i> -diacil- <i>o</i> - feniléndiaminas.....	19
2.4.3	Síntesis de bencimidazoles a partir de bases de Schiff.....	20
2.5	Métodos de síntesis de Amidas.....	20
2.5.1	Vía cloruros de acilo.....	21
2.5.2	Vía Anhídridos.....	22
2.5.3	Vía agentes acoplantes.....	23
2.5.4	Vía Ésteres	23
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4.	HIPÓTESIS.....	26
5.	OBJETIVOS.....	26

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
6.1 Parte Química.....	28
6.1.1 Síntesis del Ácido 5-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxílico (10).....	28
6.1.2 Síntesis de las Carboxamidas bencimidazólicas LGI 1-5	29
6.2 Parte Biológica.....	31
6.2.1 Pruebas de susceptibilidad biológica.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1 Resultados de la parte química.....	32
7.2 Resultados de la parte Biológica.....	44
7.2.1 Actividad contra <i>G. intestinalis</i>	46
7.2.2 Actividad contra <i>E. histolytica</i>	48
7.2.3 Actividad contra <i>T. vaginalis</i>	49

8. CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÉNDICE A. PARTE EXPERIMENTAL	61
A.1 Instrumentación.....	61
A.2 Cromatografía.....	63
A.3 Reactivos y disolventes.....	63
A.4 Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales.....	64
APÉNDICE B. ESPECTROS.....	73

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias en seres humanos y animales, tanto domésticos como silvestres, constituyen uno de los problemas más serios de salud a nivel mundial, principalmente en países en vía de desarrollo. La frecuencia mundial de las distintas parasitosis intestinales es alta, especialmente en zonas geográficas donde las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos. Entre los parásitos que se han aislado con más frecuencia se encuentran: *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichomonas vaginalis*, *Taenia* en sus especies *saginata* y *solium*.

Las características socioeconómicas poblacionales como la pobreza, la ignorancia y la deficiente infraestructura son factores que comparten los países en vías de desarrollo, y que en América Latina no han presentado modificaciones importantes en los últimos 50 años. Esto incide de manera drástica sobre la salud, disminuye la esperanza de vida al nacimiento y la productividad de millones de personas.

En la República Mexicana, las parasitosis intestinales son una de las principales causas de morbilidad, ya que el país presenta las características geográficas anteriormente descritas y zonas de poco desarrollo socioeconómico, lo cual facilita la presencia de enfermedades parasitarias en diversas regiones. Se calcula que las parasitosis intestinales producen la pérdida de aproximadamente 1.6 millones de años de vida potencial.

Cabe destacar que las parasitosis tienen como principal factor común, decisivo para su existencia y difusión, un alto grado de “fecalismo ambiental”, el cual sumado a las carencias en el saneamiento y deficiente abastecimiento de agua potable, propician que tanto agua como alimentos tengan un alto índice de contaminación.

Para controlar casi todas las parasitosis causadas por helmintos y protozoarios, la quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y barato. En el caso particular de las helmintiasis, los fármacos más empleados son los derivados bencimidazol 2-carbamato de metilo (BC), como el Mebendazol y el Albendazol, los cuales han demostrado tener alta eficacia y un amplio espectro de acción; sin embargo, su baja solubilidad en agua reduce su capacidad de absorberse, y por tanto compromete su eficacia en infecciones de tipo sistémicas. Lo anterior aunado a la generación de cepas resistentes a los derivados del bencimidazol, como el caso de *Fasciola hepática* resistente al triclabendazol, han sido motivos para que en esta tesis se aborde la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios que cuenten con un mayor espectro terapéutico, mejores propiedades farmacodinámicas intrínsecas, menor toxicidad y bajos costos de producción.

2. MARCO TEÓRICO

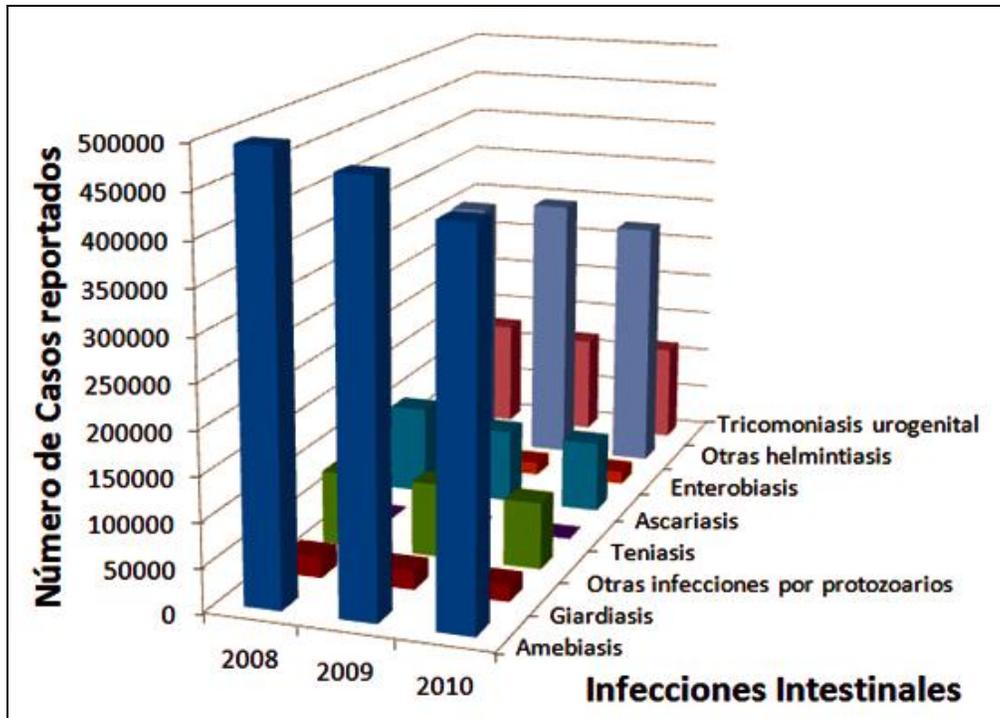
2.1 Parasitosis en México

Se sabe que a través de los tiempos las enfermedades parasitarias han producido más muertes y daño económico a la humanidad que todas las guerras juntas.¹ Este tipo de padecimientos se presenta en su mayoría como multiparasitosis, las cuales se ven favorecidas en los climas tropicales, pobres condiciones socioeconómicas, deficientes instalaciones sanitarias, malos hábitos de higiene y alimentación inadecuada. La amebiasis, helmintiasis, ascariasis, giardiasis y oxiuriasis son las enfermedades más frecuentes, con tasas/100,000 habitantes tan altas como >1,500 para el caso de la amebiasis en sus diferentes formas clínicas.² En el 2008 la OMS informó que la mayoría de los niños en países en vía de desarrollo están infectados con gusanos intestinales, afectando a 2.000 millones de personas en todo el mundo.³

En los países en vías de desarrollo y con climas tropicales, como México, alrededor de cinco millones de mexicanos son portadores asintomáticos de parásitos, lo que lo ubica como una de las naciones con más alto índice de parasitosis en el mundo (SSA).^{4,5} En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) las helmintiasis constituyen la sexta causa de demanda de consulta.⁶

La Dirección General de Epidemiología (DGEPI) permite conocer los datos de incidencia de este tipo de enfermedades. En la **Gráfica 1** se muestra la incidencia de distintas parasitosis en los últimos 3 años.⁷ Se puede observar una ligera disminución en la tasa de morbilidad, lo cual está relacionado con la mejora de las condiciones básicas de la vivienda, disponibilidad de drenaje, excretas y agua potable, así como en educación.⁸ Sin embargo, a pesar de los programas de desparasitación periódica y las mejoras anteriores, aun se reporta un gran número de casos de parasitosis que ocupa uno de los primeros lugares como causa de morbilidad y mortalidad en la población infantil. Esto podría deberse al mal uso de

los antiparasitarios o la falta de seguimiento del tratamiento por parte del paciente, lo cual se ve reflejado en un aumento de resistencia por parte del parásito frente a los fármacos antiprotozoarios y antihelmínticos.⁹



Gráfica 1. Incidencia de infecciones intestinales reportadas en México hasta el año 2010.

2.2 Protozoosis

2.2.1 Amebiasis

La amebiasis es causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Se encuentra prácticamente en todos los países del mundo, constituyendo la tercera parasitosis causante de muerte.^{10,11} *E. histolytica* ocasiona una enfermedad invasiva intestinal y extraintestinal en 48 millones de personas. Los grupos que presentan mayor susceptibilidad son los lactantes, preescolares y escolares.¹² La parasitosis se adquiere al ingerir los quistes, que corresponden a la fase infectante para el humano.^{1,10-11} La infección se adquiere principalmente por la vía oral al ingerir agua

o alimentos contaminados con los quistes. Cuando se ingiere el quiste, éste viaja por el aparato digestivo hasta el íleon, donde desenquista, originando un protoplasto desnudo tretranucleado que da lugar a ocho trofozoítos metaquísticos,¹⁰ los cuales migran al intestino grueso donde se alimentan, crecen y se reproducen. Los trofozoítos invaden la mucosa intestinal y producen desde síntomas leves hasta disentería grave. Cuando el parásito ha invadido el epitelio intestinal puede diseminarse a través de la sangre, originando lesiones extra intestinales, principalmente en hígado y con menor frecuencia en pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón.^{1,12} Los trofozoítos pueden enquistarse, salir al ambiente con las heces y contaminar agua y alimentos para infectar nuevamente a otros individuos, completando así su ciclo de vida (**Figura 1**).

El diagnóstico de la amebiasis intestinal sigue siendo a través de la identificación del parásito en las heces fecales mediante la realización de un examen coproparasitoscópico o por histopatología en tejidos;¹¹ así como ensayos de PCR o ELISA que permiten diferenciar a *E. histolytica* de otras especies.

El tratamiento de la amebiasis intestinal es fundamentalmente quimioterapéutico, a base de medicamentos de variada estructura química, como las quinoleínas, la diloxanida, el sulfato de paromicina, las quinifamidas, la emetina, la dehidroemetina, la cloroquina, el metronidazol y sus derivados.¹¹

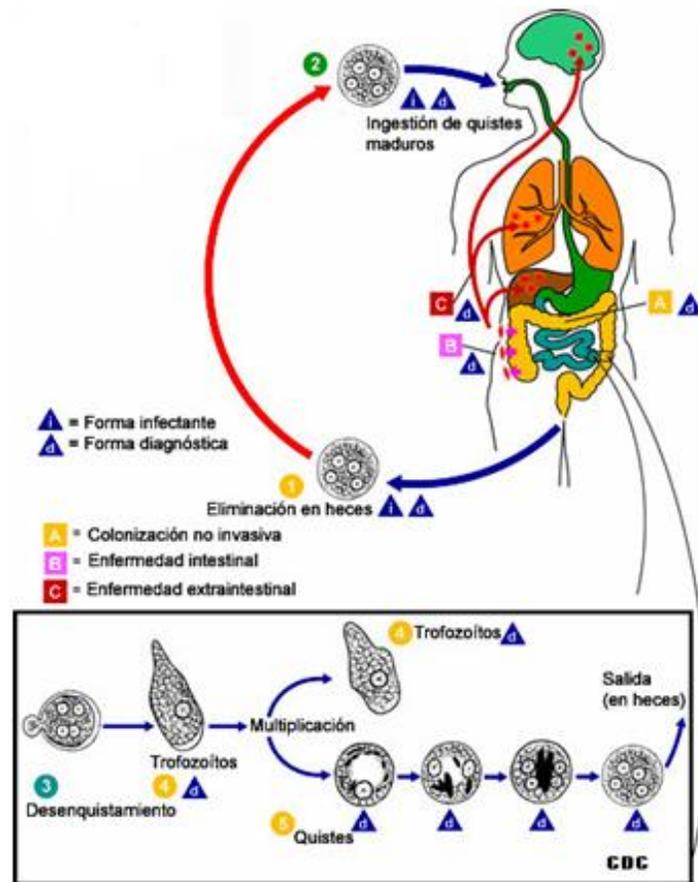


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.¹³

2.2.2 Giardiosis

La giardiosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Giardia intestinalis*. Constituye la enfermedad parasitaria más común en el mundo y de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad, fundamentalmente entre la población infantil.^{10,14} La frecuencia de esta parasitosis en México es variable debido a que alrededor de un 60% de los pacientes adultos infectados son asintomáticos.^{14,15} Sin embargo, la infección puede causar graves trastornos intestinales, como diarrea crónica, náusea, esteatorrea, distensión abdominal, flatulencia y mala absorción (incapacidad para absorber sustancias esenciales como caroteno, glucosa, xilosa, lactosa, ácido fólico, vitaminas A y B12); generando síndrome de talla y peso.^{10,12} La transmisión es fundamentalmente fecal-oral, por contacto con personas infectadas, por el

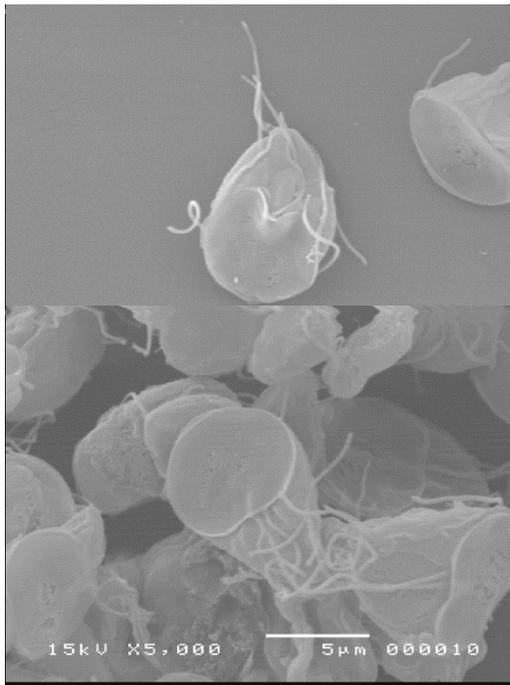
consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes, por vía sexual, sobre todo entre la población homosexual.¹⁰

G. intestinalis presenta dos formas morfológicas: el trofozoíto o forma móvil y el quiste. El primero presenta una morfología piriforme, tiene una cara dorsal convexa y una ventral plana, esta última constituye el disco ventral o de adhesión. Posee 2 núcleos dispuestos a los lados de la línea media y cuatro pares de flagelos que salen de los blefaroplastos (**Figura 2a**). El quiste es una estructura ovalada más pequeña.¹² Éste constituye la fase infectante, ya que al ser ingerido por un huésped se desenquista en el duodeno y libera 2 trofozoítos, los cuales se adhieren a la superficie del epitelio intestinal del duodeno y el yeyuno mediante el disco ventral.¹⁶ En esta región el trofozoíto toma los nutrientes para su supervivencia y proliferación, especialmente aquellos que no es capaz de sintetizar, como el colesterol. Los trofozoítos se dividen en el intestino delgado mediante un proceso de fisión binaria.¹⁴ Algunos trofozoítos que no se adhieren son arrastrados a las porciones bajas del intestino donde comienza el proceso de enquistamiento para posteriormente ser excretados con las heces, pudiendo ser ingeridos de nuevo por otro huésped para reiniciar su ciclo biológico,¹⁵ (**Figura 2b**).

El diagnóstico se realiza mediante la Identificación de quistes característicos en heces, por medio de un análisis coproparasitoscópico. También puede realizarse un estudio de detección de antígenos de *G. intestinalis* por métodos inmunológicos.^{14,15}

Los nitroimidazoles utilizados en el tratamiento de la infección por *G. intestinalis* incluyen al metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol. Siendo los 2 primeros los que han demostrado una mayor actividad *in vitro*. También pueden ser utilizados fármacos como la furazolidona o la quinacrina.¹⁰

(a)



(b)

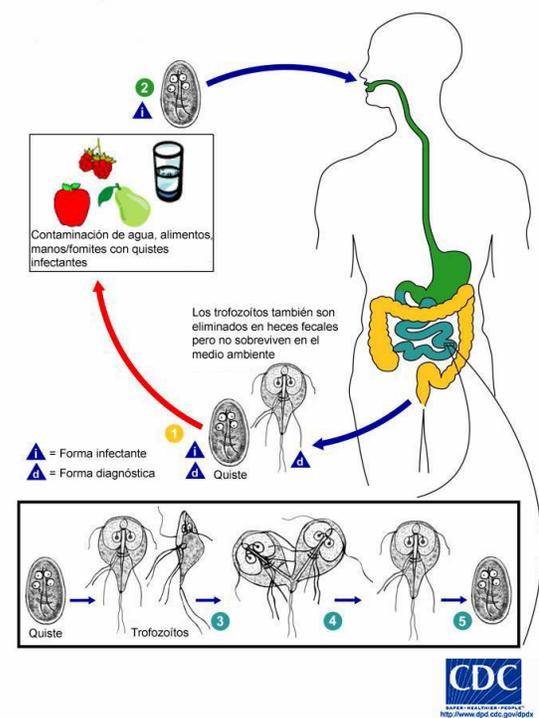


FIGURA 2.(a) Morfología de *Giardia intestinalis*.¹⁷ (b)Ciclo biológico de *Giardia intestinalis*.¹⁸

2.2.3 Tricomoniosis

Trichomonas vaginalis es el protozoo causante de la tricomoniosis urogenital, la cual es frecuente en grupos de mujeres donde la higiene es deficiente. Es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) no viral más importante en el mundo, con una incidencia anual de más de 170 millones de casos.^{19,20} También se ha relacionado este padecimiento con cáncer cervical, enfermedad inflamatoria pélvica atípica e infertilidad. Así como con el aumento en la predisposición a la infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).¹⁹

Este protozoo posee un cuerpo piriforme o redondeado, mide de 7 a 30 micras de largo por 4 a 15 de ancho. El cuerpo del parásito tiene una membrana ondulante, más pequeña que la de otras especies, y presenta 5 flagelos (**Figura 3a**).²⁰

T. vaginalis solo existe como trofozoíto, ya que carece de un estadio de quiste. Generalmente se transmite de persona a persona por contacto sexual y se establece en la mucosa vaginal, uretra femenina o masculina y próstata (**Figura 3b**). Se reproduce por fisión binaria.¹⁹ Una alta proporción de mujeres con *Trichomonas* en la vagina son asintomáticas, puede haber molestias, pero llegan a desaparecer espontáneamente aun cuando persista el parásito. Los síntomas son vaginitis y vulvitis, con secreción que al principio es clara y espumosa, posteriormente adquiere aspecto verde o gris, lechoso o purulento y que puede o no ser fétido.²⁰ Estas molestias son incómodas, la leucorrea suele acompañarse de prurito y dolor dando lugar a infecciones bacterianas secundarias, insomnio, dispareunia y a veces anafrodisia. En algunos casos puede haber sintomatología del aparato urinario como disuria.¹⁹

El diagnóstico se realiza mediante la exploración y medición del pH del exudado vaginal y por métodos inmunoenzimáticos.^{20,21} Aunque existen preparaciones vaginales disponibles en el mercado, éstas solo eliminan los síntomas pero no al parásito. Los nitroimidazoles son los fármacos de elección para el tratamiento de la tricomoniosis, entre ellos el metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol.^{1,19}

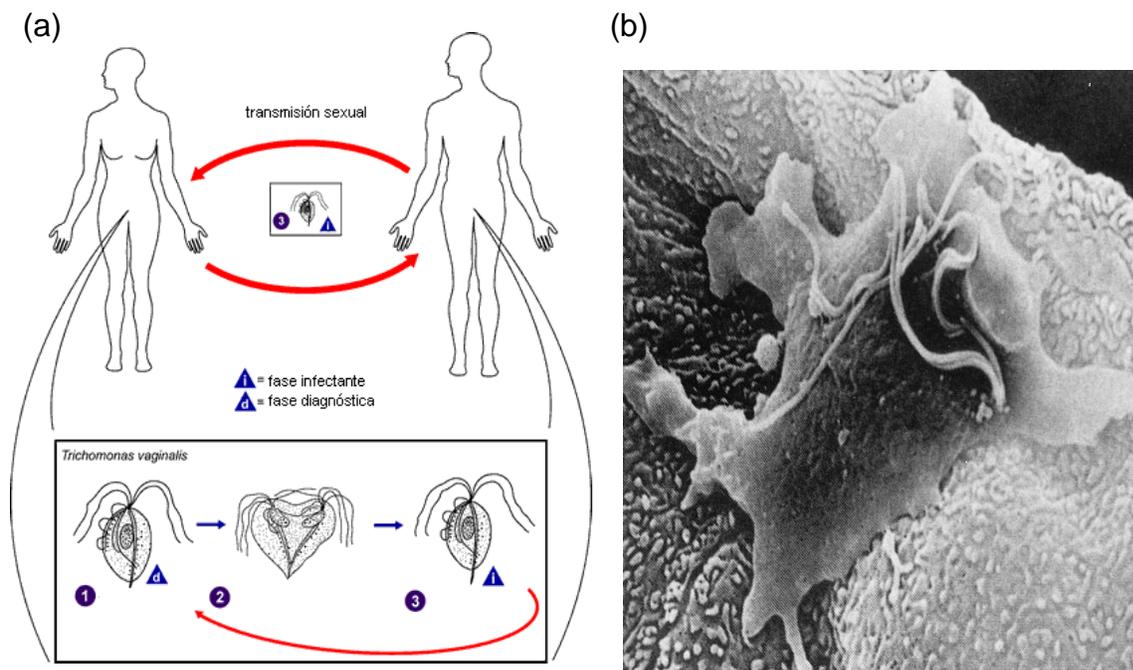


Figura 3. (a) Ciclo biológico de *T. vaginalis*²² (b) Morfología del parásito.¹⁹

2.3 Fármacos antiparasitarios

Actualmente se dispone de un amplio número de fármacos para el tratamiento de las infecciones por protozoarios y helmintos. Sin embargo, algunos de ellos, como los nitroheterociclos, han estado en el mercado por más de 40 años; lo anterior, aunado al uso indiscriminado y severos efectos secundarios que originan el abandono del tratamiento, ha llevado a la generación de cepas resistentes. De ahí la necesidad de obtener nuevos o mejores fármacos antiparasitarios para combatir infecciones tales como la cisticercosis, filariasis, leishmaniasis, triquinelosis y tripanosomiasis.²³ Esto hace que el tratamiento de muchas de estas enfermedades constituya hoy en día un grave problema de salud en el mundo.²⁴

Los fármacos antiparasitarios se dividen en lumbinales, tisulares y mixtos; los cuales tienen actividad contra las diferentes especies de protozoarios intestinales patógenos y no patógenos para el hombre.²

- Dentro de los antiparasitarios lumbinales se encuentran aquellos que actúan sobre los parásitos del lumen intestinal, tales como la paramomicina, el yodoquinol, furoato de diloxanida, quinacrina y dicloroacetamida, entre otros.^{2,25}

- Dentro de los antiparasitarios tisulares están la emetina, dehidroemetina, cloroquina, quinina, quinidina, mefloquina, primaquina, atovacuona, inhibidores de la síntesis de folatos, pentamidina, estibogluconato sódico, nitazoxanida.^{2,25}

- Dentro de los antiparasitarios mixtos que actúan tanto en el lumen intestinal como en los tejidos están el metronidazol y los derivados de los nitroheterociclos.²⁶

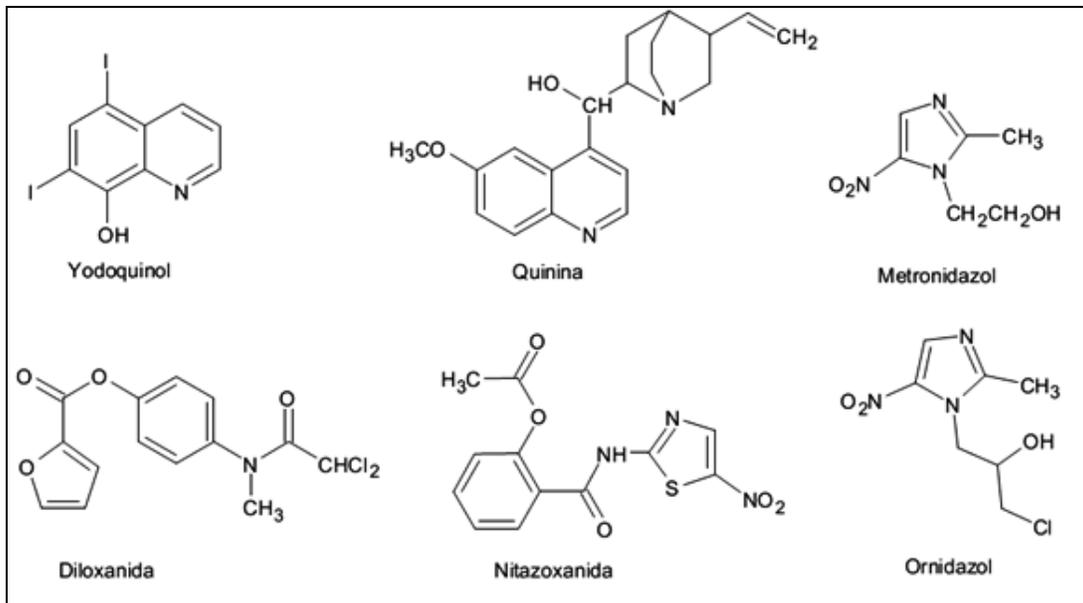


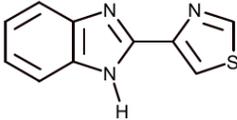
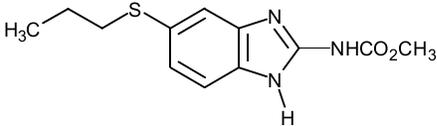
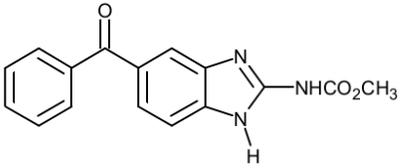
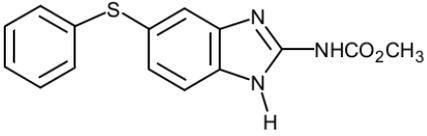
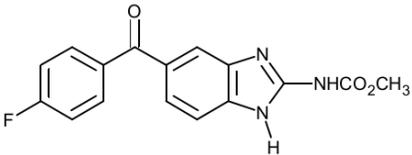
Figura 4. Algunos fármacos antiparasitarios.

2.3.1 Bencimidazoles como agentes antiprotozoarios

Los bencimidazol 2-carbamatos (BZC) son los principales agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de las infecciones causadas por los helmintos. Entre los más empleados se encuentran el Albendazol, Mebendazol y Tiabendazol (**Tabla 1**).²³ Todos presentan un amplio espectro de acción antiparasitaria, baja toxicidad, y debido a su baja solubilidad y absorción han sido usados exitosamente para tratar infecciones a nivel gastrointestinal. Sin embargo, las infecciones sistémicas requieren de altas dosis por largos periodos de tiempo.²⁷

El uso de estos agentes estuvo limitado al tratamiento por excelencia de las infecciones causadas por los helmintos y hongos; sin embargo, estudios recientes han demostrado que los BZC tales como el Albendazol, Mebendazol, Flubendazol y Fenbendazol inhiben el crecimiento *in vitro* de *Trichomonas vaginalis* y *G. intestinalis*. Incluso se ha demostrado que contra *G. intestinalis* el Albendazol es tan efectivo como Metronidazol, el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis, pero no es efectivo contra *E. histolytica* ni *Leishmania donovani*.²⁸⁻³⁰

Tabla 1. Bencimidazoles utilizados en el tratamiento de las helmintiasis

FÁRMACO	NOMBRE REGISTRADO	EMPRESA FARMACÉUTICA	USO
 <p>Tiabendazol</p>	Mintezol®	Merck Sharpe and Dohme	Antihelmíntico en humanos
	Tibenzol®	Merck Sharpe and Dohme	Antihelmíntico veterinario
 <p>Albendazol*</p>	Albenza®	GlaxoSmithKline	Antihelmíntico en humanos
	Valbazen®	SmithKline	Antihelmíntico veterinario
 <p>Mebendazol*</p>	Telmin®	Crown Chemicals	Antihelmíntico veterinario
	Equiverm Plus®	Crown Chemicals	Antihelmíntico veterinario
	Vermox®	Janssen	Antihelmíntico en humanos
 <p>Fenbendazol</p>	Panacur®	Hoechst	Antihelmíntico veterinario
 <p>Flubendazol</p>	Flutelmium®	<u>Janssen</u>	Antihelmíntico veterinario
	Flumoxal®	Janssen	Antihelmíntico en humanos

Aunque los fármacos actuales para el tratamiento de la amebiasis y la giardiosis son efectivos, la mayoría de éstos presentan efectos secundarios importantes que limitan su uso. Teniendo en cuenta los efectos secundarios y la falta de actividad de los BZC contra *E. histolytica*, hay una necesidad urgente de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de estas parasitosis.²⁸

2.3.2 Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Los microtúbulos son estructuras tubulares que se encuentran en casi todas las células eucariotas. Consisten de proteínas globulares conocidas como protofilamentos. Cada microtúbulo se forma de 13 protofilamentos ensamblados a partir de bloques diméricos consistentes de una tubulina α y una β .^{32,33} Los microtúbulos son esenciales para la célula ya que ayudan a mantener la forma celular y su organización interna; permiten el transporte de vesículas, mitocondrias, lisosomas, cromosomas y otros filamentos; forman parte del huso mitótico y constituyen el centro de cilios y flagelos. Estas estructuras existen en un estado dinámico en el que el ensamble y desensamble de las subunidades solubles está en balance.³⁴

Es en el monómero de la β -tubulina en donde los bencimidazoles parecen interaccionar; sin embargo, la naturaleza del sitio de unión sigue sin ser caracterizado. La unión se presenta con gran afinidad de manera pseudo-irreversible, siendo mucho mayor en el caso de los helmintos en comparación con la tubulina de los mamíferos.³⁵

En tales sistemas, la interacción del bencimidazol con la tubulina resulta en la pérdida neta de los microtúbulos y la acumulación de tubulina libre.³⁵ Esto produce dos efectos principales que sugieren una acción en el sistema microtubular de estos gusanos: 1) El bloqueo del movimiento de vesículas en las células secretoras, y 2) La pérdida de los microtúbulos citoplasmáticos estructurales.³⁶

La presencia de un número de mutaciones naturales en la β -tubulina se ha asociado con la resistencia a los BZC en parásitos. Algunos ejemplos son el cambio en la fenilalanina 200 por tirosina, la fenilalanina 167 por tirosina o histidina y la alanina 165 a Valina.³⁵

Otros mecanismos de acción de los antihelmínticos bencimidazólicos son la inhibición del metabolismo de la glucosa y la producción de energía, a través de la inhibición de la enzima fumarato reductasa, lo cual detiene el suministro energético conduciendo a la parálisis. Esta enzima es única en los parásitos, lo

que proporciona un buen blanco de acción para el diseño de nuevos antiparasitarios. También interfieren con la vía energética inhibiendo la malato deshidrogenasa (MDH) citoplásmica y mitocondrial. Los antihelmínticos bencimidazólicos pueden perturbar gravemente el gradiente de protones transmembranal, lo que conduce a una disminución considerable en los niveles celulares de ATP.³⁷

Se cree que la inhibición de la absorción de glucosa, la actividad de la fumarato reductasa y la actividad neuromuscular dependen de los microtúbulos (**Figura 5**).

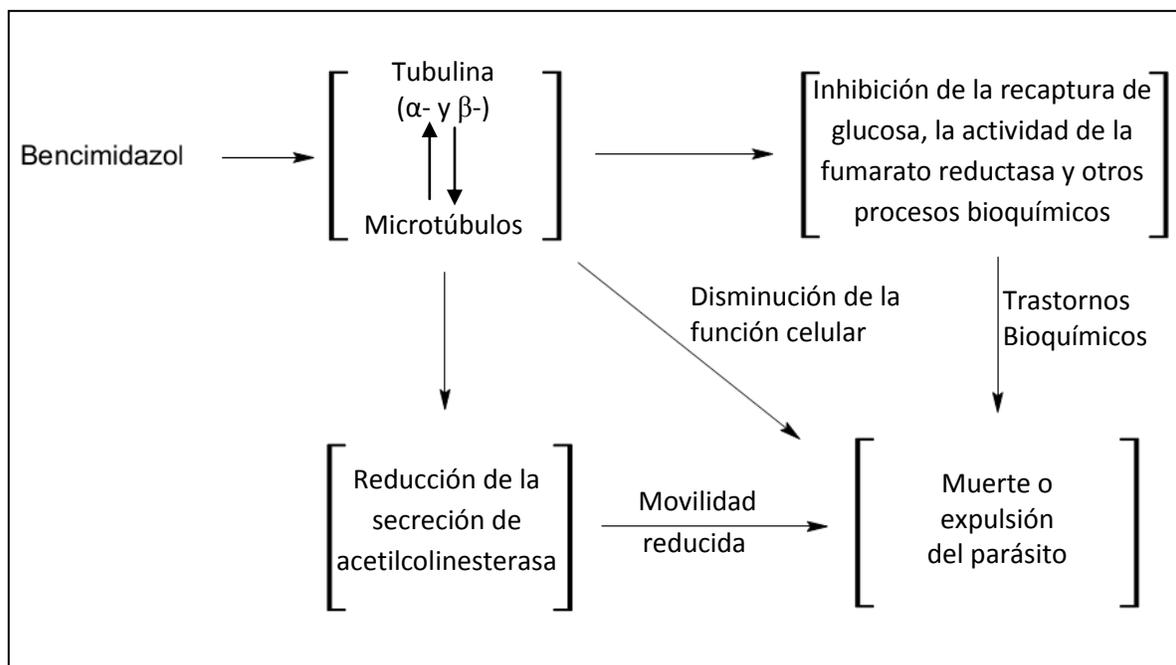


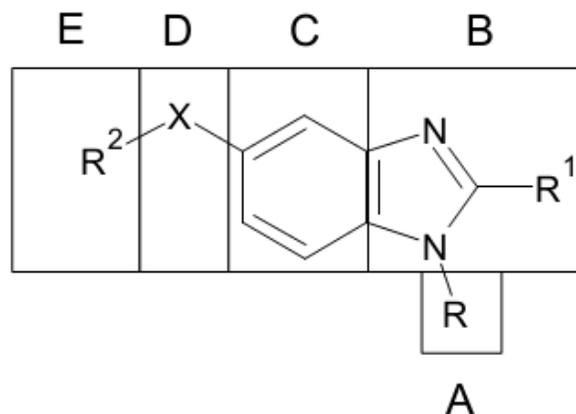
Figura 5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.³⁷

2.3.3 Modificaciones estructurales de Bencimidazoles

El núcleo del bencimidazol es un importante farmacóforo y una estructura privilegiada en la química farmacéutica. Reconocido en investigación médica como un heterociclo versátil, presenta una combinación única de excelentes características químicas y biológicas. Químicamente es una molécula estable que puede sufrir reacciones electrofílicas, nucleofílicas y ciclocondensaciones. La versatilidad de las manipulaciones químicas en los bencimidazoles, en conjunto

con su potencialidad para producir compuestos, con un amplio espectro de actividad antihelmíntica, ha permitido llevar a cabo una serie de estudios a profundidad, en cuanto a la relación estructura-actividad (SAR) en este heterociclo.³⁸

El BZ también presenta actividades biológicas tales como; antibacterianos, antiparasitarios, antivirales, antidiabéticos y anticancerígenos. Sin embargo, siempre habrá una necesidad de nuevos agentes quimioterapéuticos para superar problemas de resistencia, respuesta al tratamiento por los pacientes y efectividad entre otros.³⁸ Por lo que el núcleo del bencimidazol ha sido sometido a una gran variedad de modificaciones estructurales,³⁷ las cuales se pueden resumir en la **Tabla 2.**



Sitio de Modificación	Cambios estructurales	Comentarios
A	R=H, Me, COR, Ar, CH ₂ OAr, (CH ₂) _n -R, etc.	La presencia de H es esencial para la actividad antihelmíntica. Sin embargo no es necesario para la actividad antiprotozoaria.
B	R ¹ = OMe, OEt, OPr, Me, Et, NRR', NHCO ₂ CH ₃ . Reemplazo de uno de los	Se obtiene actividad de moderada a buena con los derivados acilo y ureas; sin embargo, la actividad óptima se obtiene solo en los compuestos sustituidos con carbamatos. Los compuestos con sustitución metilto muestran muy buena actividad fasciolicida. La presencia de los átomos de N es esencial para la actividad antihelmíntica. Por lo que la

	átomos de N por O, S o CH	sustitución de éstos por lo general conduce a compuestos con un espectro de acción más débil y estrecho.
C	Inserción de nitrógeno en el anillo de benceno Sustitución en la posición 5(6) R=H, Cl	Disminución de la actividad antiparasitaria. Define requerimientos estereoelectrónicos e impide la desactivación metabólica.
D	X= O, S, SO, SO ₂ , OSO, CO, CONH, NHCO, CH ₂ , etc.	Estos espaciadores que separan a los dos farmacóforos desempeñan un papel importante en la actividad y selectividad contra helmintos intestinales y tisulares. En general, los bencimidazoles en donde X=OCO, S, SO, o CONH muestran una buena actividad; sin embargo, la actividad óptima se obtiene con compuestos que tienen X= O o CO.
E	R ² =alquilo, cicloalquilo, alquenos, arilos y heteroarilos.	Los cambios estructurales en este sitio son esenciales para la presencia de la actividad de los bencimidazoles. En la mayoría de los casos los compuestos que tienen R ² =alquilo, cicloalquilo, alquenos, fenilos y heteroarilos exhiben un amplio espectro de acción; sin embargo, la actividad óptima se obtiene cuando R ² es un propilo, ciclopropilo, fenilo, tienilo, 2-piridilpiperazino y 2-metoxicarbonilamino bencimidazol-5-ilo

Tabla 2. Modificaciones moleculares en el núcleo del bencimidazol.

Como parte de un proyecto amplio de investigación consistente en la búsqueda de información básica acerca de los requerimientos estructurales de los derivados del bencimidazol como antiparasitarios, en el laboratorio 122 se han sintetizado diversos compuestos en los que se realizó la sustitución del grupo 2-metilcarbamato por grupos como el trifluorometilo y metiltio, con la finalidad de aumentar su solubilidad, propiedades de absorción y su actividad antiparasitaria. La adición de Cl en la posición 5(6) permite prolongar el tiempo de vida del compuesto al impedir la desactivación metabólica.³⁹ Lo anterior ha llevado a compuestos con muy buena actividad antihelmíntica, como es el caso del fasciolicida conocido como compuesto ALFA.⁴⁰

Al observar que el patrón de sustitución y las propiedades electrónicas de los sustituyentes en la posición 5(6) juegan un papel importante en la actividad antiparasitaria, en dos estudios se realizó la sustitución en esta posición con un grupo carboxamido, lo cual condujo a compuestos con buena actividad, los compuestos CDRI-87-144⁴¹ y CMC-20.⁴² También se ha realizado la síntesis de los isómeros derivados 1-metilbencimidazol para determinar la importancia del hidrógeno en la posición 1 sobre la actividad antiparasitaria.^{39,42} Los resultados sugieren que el H en la posición 1 y el grupo metilcarbamato en la posición 2 del bencimidazol no son necesarios para la actividad antiprotozoaria; pero sí son necesarios para obtener una buena actividad antihelmíntica.^{30,39,42}

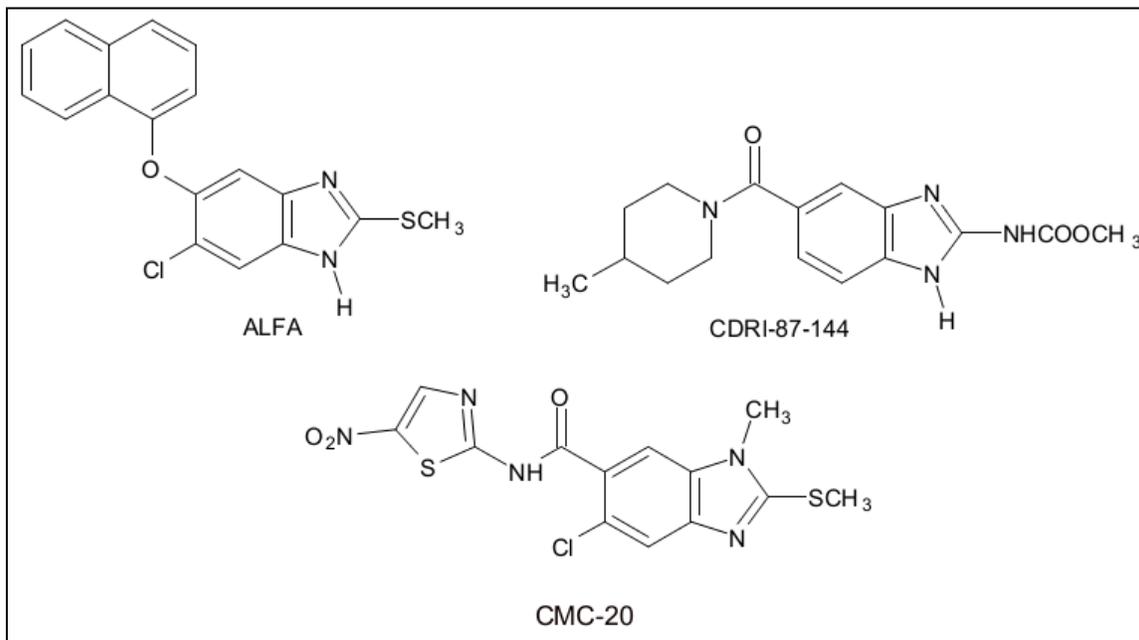


Figura 6. Derivados del bencimidazol con actividad antiparasitaria.

2.4 Métodos de síntesis de Bencimidazoles

El bencimidazol contiene un anillo de benceno fusionado a un anillo de imidazol. Los derivados 1H presentan un equilibrio tautomérico protónico en donde existe un rápido intercambio del protón de la posición 1 a la 3, dando como resultado 2 estructuras tautoméricas (**Figura 7**).

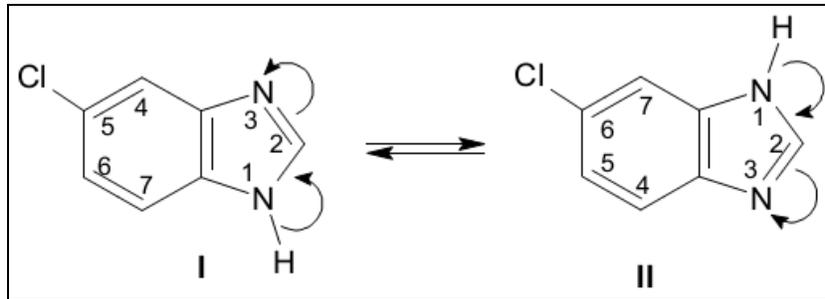


Figura 7. Tautómeros del 5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol

Sin embargo, en los bencimidazoles *N*-sustituidos la tautomería ya no es posible, por lo que los dos isómeros pueden ser aislados y caracterizados (**Figura 8**).⁴³

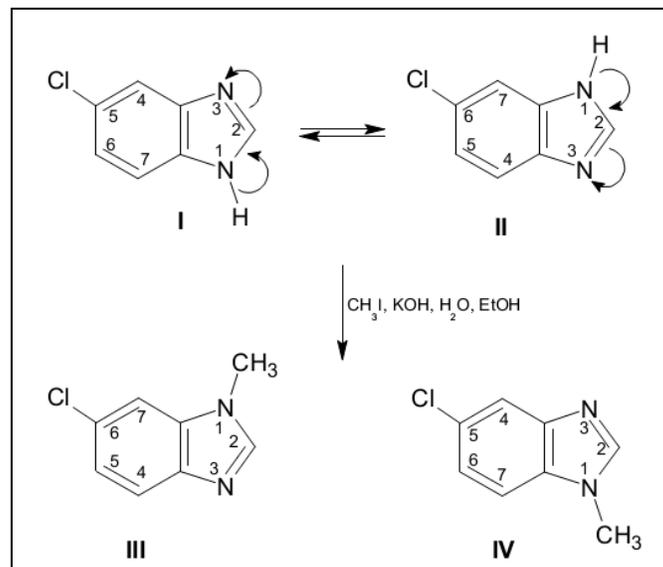


Figura 8. Generación de los isómeros 5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol y 6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol.

2.4.1 Síntesis de Bencimidazoles a partir de *o*-feniléndiaminas

Phillips introdujo una importante modificación en la reacción de condensación de *o*-feniléndiaminas con ácidos carboxílicos o sus derivados para dar bencimidazoles 2-sustituidos, adicionando ácido diluido (usualmente ácido clorhídrico 4*N*) en la mezcla de reacción. En algunos casos esto permitía que las reacciones se llevaran a cabo a bajas temperaturas y con buenos rendimientos, en

comparación con reacciones que se realizaban a mayores temperaturas y en ausencia de ácido (**Figura 9**).^{44,45}

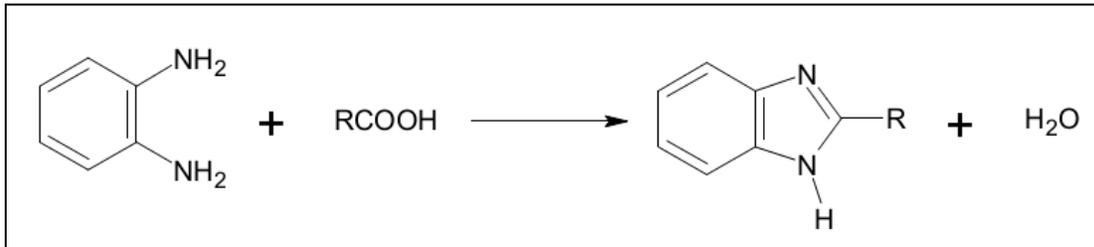


Figura 9. Síntesis de bencimidazoles a partir de *o*-feniléndiaminas

2.4.2 Síntesis de Bencimidazoles a partir de *N*-acil y *N,N'*-diacil-*o*-feniléndiaminas

Los bencimidazoles pueden prepararse directamente a partir de monoacil-*o*-feniléndiaminas. La reacción se lleva a cabo por calentamiento de la materia prima en presencia de ácido mineral, ácido acético o por calentamiento en solución alcohólica a reflujo (**Figura 10**).^{44,45}

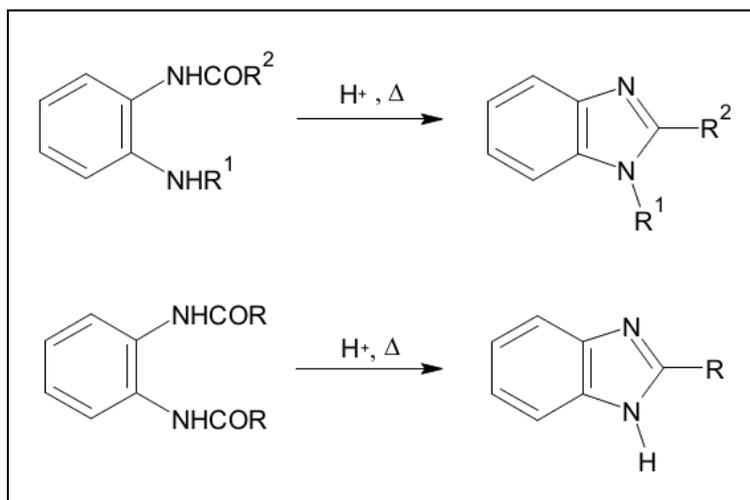


Figura 10. Síntesis de bencimidazoles a partir de *N*-acil- y *N,N'*-diacil-*o*-feniléndiaminas

Este método también puede ser aplicado cuando se reducen acil-*o*-nitroanilinas con estaño o algún otro agente reductor y ácido clorhídrico, se obtiene la monoacil-*o*-feniléndiamina. Bajo las condiciones de reducción inmediatamente se

realiza la ciclación. Este método se utiliza extensamente en la síntesis de 2-arilbencimidazoles, en conjunto con el método de Phillips constituyen los métodos más usados en la síntesis de bencimidazoles (**Figura 11**).⁴⁴

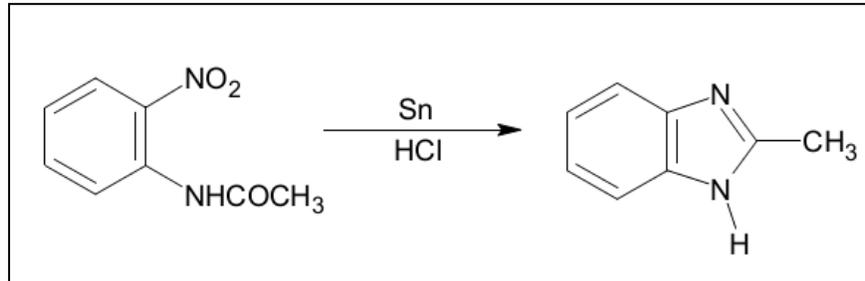


Figura 11. Síntesis de bencimidazoles a partir de *N*-acil-*o*-nitroanilinas.

2.4.3 Síntesis de bencimidazoles a partir de bases de Schiff

La preparación de los bencimidazoles y aldehídos puede ser a partir de bases de Schiff de la *o*-feniléndiamina. La conversión de bases de Schiff mono alquilidén-*o*-feniléndiaminas a bencimidazoles implica oxidación y la reacción puede llevarse a cabo, por ejemplo, por la exposición prolongada de una solución en el aire, o por calentamiento a reflujo en una solución alcohólica o etérea de la base de Schiff. La conversión de monoalquilidén-*o*-feniléndiaminas a bencimidazoles puede ser realizada también con agentes oxidantes, tales como óxido de mercurio, acetato cúprico y tetraacetato de plomo (**Figura 12**).⁴⁴

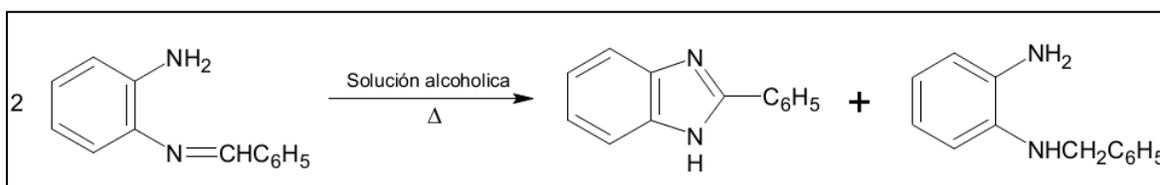


Figura 12. Síntesis de Bencimidazoles a partir de bases de Schiff.

2.5 Métodos de síntesis de Amidas

La reacción entre un ácido y una amina para la formación del enlace amida es una condensación que ocurre por adición de la amina al carbonilo, seguido de la eliminación de agua. Al mezclar una amina con un ácido carboxílico ocurre

primero una reacción ácido-base para formar una sal estable. En otras palabras, la formación del enlace amida tiene que luchar contra factores termodinámicos adversos como el equilibrio mostrado en la **Figura 13**.

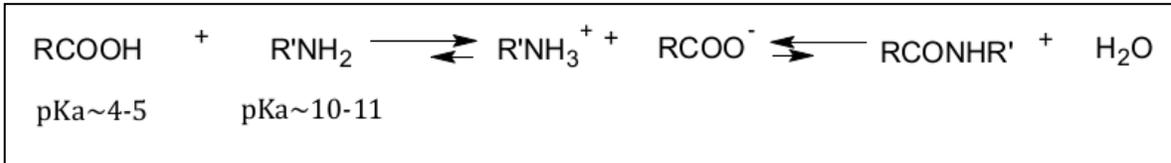


Figura 13. Equilibrio ácido-base en la formación de amidas.

Por lo tanto, la activación del ácido, mediante la unión de un grupo saliente al carbonilo del ácido, es necesaria para permitir un ataque por el grupo amino.⁴⁶

2.5.1 Vía cloruros de acilo

La formación de los cloruros de acilo (también llamados cloruros de ácido) es uno de los métodos más convenientes para activar un ácido carboxílico. Aunque hay numerosos cloruros de acilo comercialmente disponibles. Cuando un cloruro en particular no se puede comprar se prepara en el laboratorio calentando el ácido carboxílico con diversos agentes clorados en exceso para evitar la formación del anhídrido del ácido. Los agentes clorados más empleados son: cloruro de tionilo (SOCl_2), cloruro de oxalilo (COCl_2), tricloruro de fósforo (PCl_3), oxiclورو de fósforo (POCl_3) o pentacloruro de fósforo (PCl_5).⁴⁶ El cloruro de acilo generado se libera del exceso del agente clorado y en un segundo paso se trata con la amina.⁴⁷ Usualmente se requiere una base adicional para neutralizar el HCl formado y evitar la conversión de la amina en su sal no reactiva.⁴⁸ El acoplamiento se realiza generalmente en disolventes inertes secos, en presencia de una amina terciaria no-nucleofílica (NEt_3 , DIEA también llamada base de Hünig o *N*-metilmorfolina) (**Figura 14**).⁴⁷

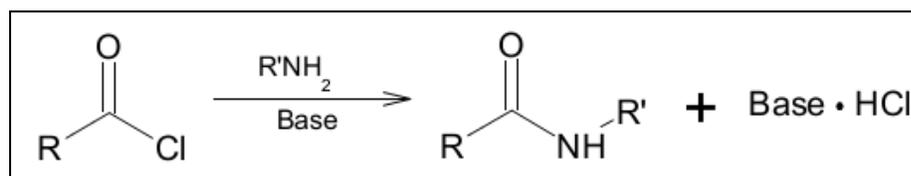


Figura 14. Acoplamiento del cloruro de acilo con la amina

2.5.2 Vía Anhídridos

La diversidad de los anhídridos disponibles en el mercado es bastante limitada. A menudo el anhídrido deseado tiene que estar preparado de antemano. Los anhídridos simétricos se forman ya sea por calentamiento del ácido correspondiente,⁴⁸ o en condiciones más suaves, al reaccionar dos moléculas de ácido en presencia de un equivalente de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).⁴⁹ El anhídrido se hace reaccionar en un segundo paso con la amina seleccionada. La principal limitación es que sólo la mitad del ácido está efectivamente unido y la otra mitad se desperdicia. Esto podría ser un problema si el ácido es muy valioso **(Figura 15)**.⁵⁰

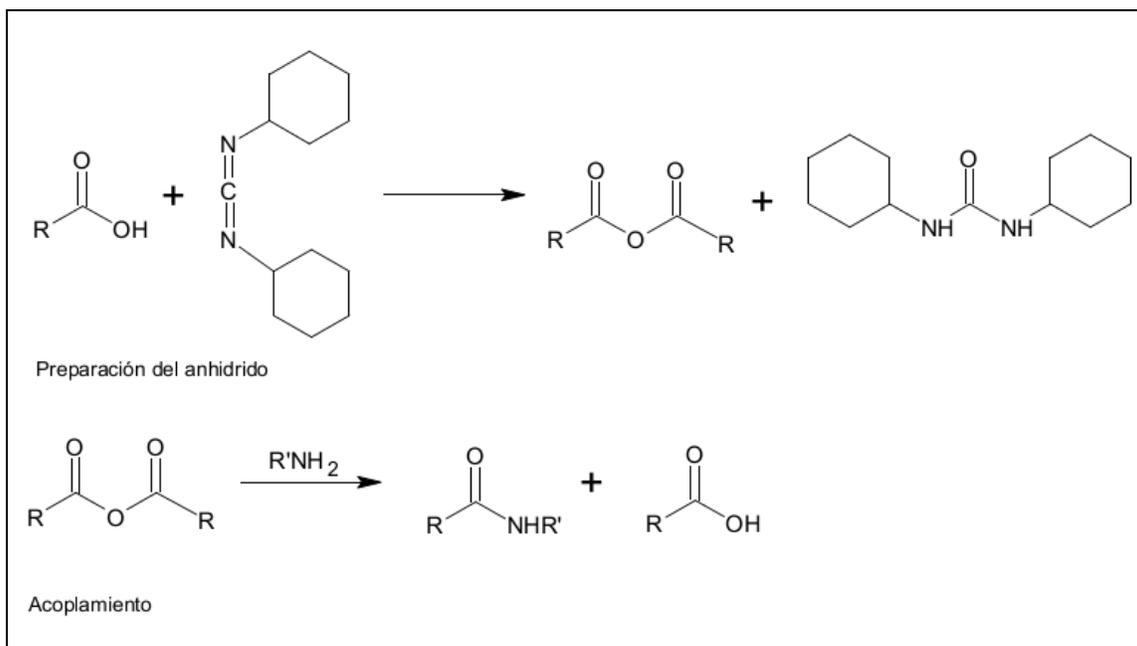


Figura 15. Formación de anhídridos.

2.5.3 Vía agentes acoplantes

El *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) es un agente acoplante útil que permite la formación de la amida. Prácticamente el acilimidazol (imidazólido) es preformado durante 1 hora y luego se adiciona la amina.⁴⁷ Esta reacción, que genera imidazol *in situ*, no requiere una base adicional y generalmente se obtienen rendimientos

elevados. Este agente es comúnmente usado en gran escala en la química de los péptidos y su uso puede ser extendido a la formación de ésteres y tioésteres (**Figura 16**).⁴⁹

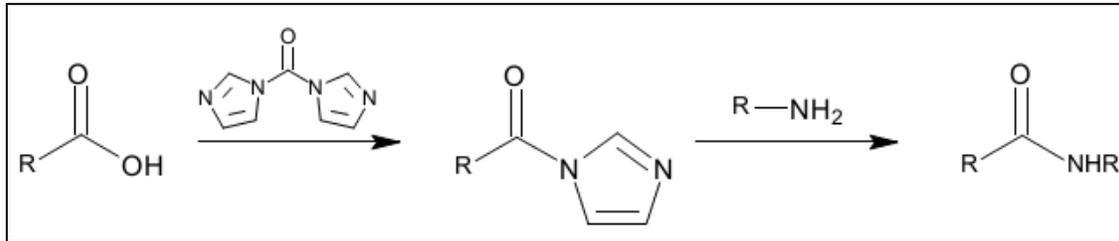


Figura 16. Acoplamiento mediante CDI.

2.5.4 Vía Ésteres

Los ésteres de ácidos carboxílicos no pueden ser considerados como especies activas y son comúnmente utilizados como protección de los ácidos en la síntesis de péptidos. Sin embargo, pueden ser utilizados de vez en cuando para desplazar el alcóxido por las aminas en condiciones extremas de temperatura o la adición de un ácido de Lewis (por ejemplo TiCl_4). Los ésteres activos tales como ésteres aromáticos son generalmente más fáciles de hidrolizar que los ésteres de alquilo y son propensos a reaccionar con una gran variedad de nucleófilos (**Figura 17**).⁴⁷

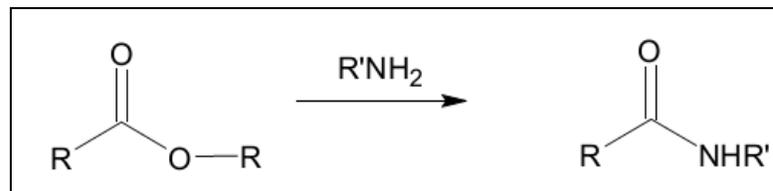


Figura 17. Formación de amida a partir de ésteres.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se dispone de un amplio número de fármacos para el tratamiento de las infecciones por helmintos y protozoarios; sin embargo, éstos se introdujeron hace más de 30 ó 40 años, por lo que ya existen serios problemas de resistencia, toxicidad, baja solubilidad y absorción, largos periodos de tratamiento y en muchos casos falta de acceso por disponibilidad o por el precio de algunos de estos fármacos. Es por eso que se tiene la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas moléculas, con la meta de obtener nuevos y mejores fármacos para combatir estas infecciones, más eficientes y con menos efectos secundarios.

Los derivados 2-(metiltio) del bencimidazol tienen importante actividad antiprotozoaria y mejoran la propiedades farmacocinéticas de la molécula, la actividad también se ve influenciada por la sustitución en la posición 5(6); en donde se ha encontrado que la adición de carboxamidas y de un halógeno, como el cloro, da lugar a compuestos con buena actividad antiprotozoaria.

Establecido lo anterior surgen las siguientes interrogantes:

- ¿La incorporación de las cloroanilinas mediante un enlace carboxamida en la posición 6 del bencimidazol aumentara su actividad antiprotozoaria respecto a otros compuestos bencimidazolicos?
- ¿La variación en la sustitución de las anilinas con cloro permitirá conocer datos relevantes en cuanto a los requerimientos estructurales para el diseño de fármacos más eficientes?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- ¿La presencia del grupo 2-(metiltio) en el bencimidazol permitirá obtener un fármaco que presente mejores características de solubilidad y absorción *in vivo*?

- ¿Los compuestos sintetizados presentaran buena actividad antiprotozoaria al ser evaluados contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*?

4. HIPÓTESIS

Si se sustituye el 1-*H*bencimidazol en la posición 6 con distintas anilinas cloradas mediante un enlace carboxamida, entonces se obtendrán compuestos con mejor actividad, permitiéndonos observar las variaciones debidas a la sustitución del cloro en el fenilo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Sintetizar 5 derivados de la 5-Cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida-*N*-sustituída, con la finalidad de delinear los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria y contribuir al desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios.

5.2 Objetivos particulares

- Realizar la síntesis de las siguientes carboxamidas:
 - 5-Cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-1**)
 - 5-Cloro-*N*-(3-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-2**)
 - 5-Cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-3**)

- 5-Cloro-*N*-(2-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-4**)
- 5-Cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-5**)

- Purificar y determinar las constantes físicas, como punto de fusión y R_f de los compuestos finales.

- Caracterizar a los productos finales con técnica espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM).

- Enviar los compuestos **LGI 1-5** al Centro Médico Nacional para evaluar la actividad in vitro contra los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

- Analizar las variaciones en la actividad debidas a los distintos patrones de sustitución del cloro en el fenilo.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para una mejor comprensión, el trabajo realizado para esta tesis se presenta en 2 partes: en la primera, la parte química, se describe la secuencia sintética que se llevó a cabo para la obtención de los compuestos de interés, el ácido precursor **10** y las carboxamidas finales **LGI 1-5**; en la segunda, la parte biológica, se describen los ensayos de la actividad biológica realizados a la que se sometieron los compuestos sintetizados. La parte química se llevó a cabo en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. La parte de evaluación biológica de los compuestos sintetizados se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia. Las metodologías involucradas en la preparación de cada uno de los intermediarios y productos finales, así como su comprobación por métodos espectroscópicos y espectrométricos, se presentan en el Anexo A.

6.1 Parte Química

Para la síntesis de las carboxamidas **LGI 1-5** primero se sintetizó el intermediario ácido 5-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**10**), como se muestra en el **Esquema 1**. Este intermediario se utilizó como precursor en una segunda etapa para preparar las carboxamidas bencimidazólicas **LGI 1-5**, según el procedimiento que se muestra en el **Esquema 2**.

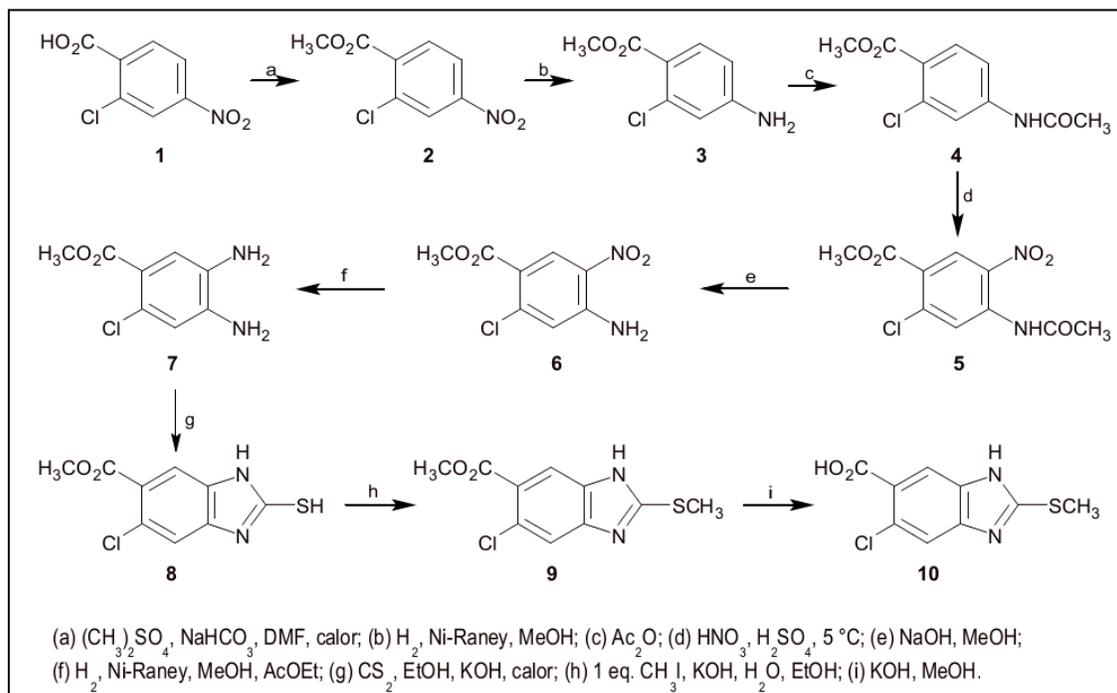
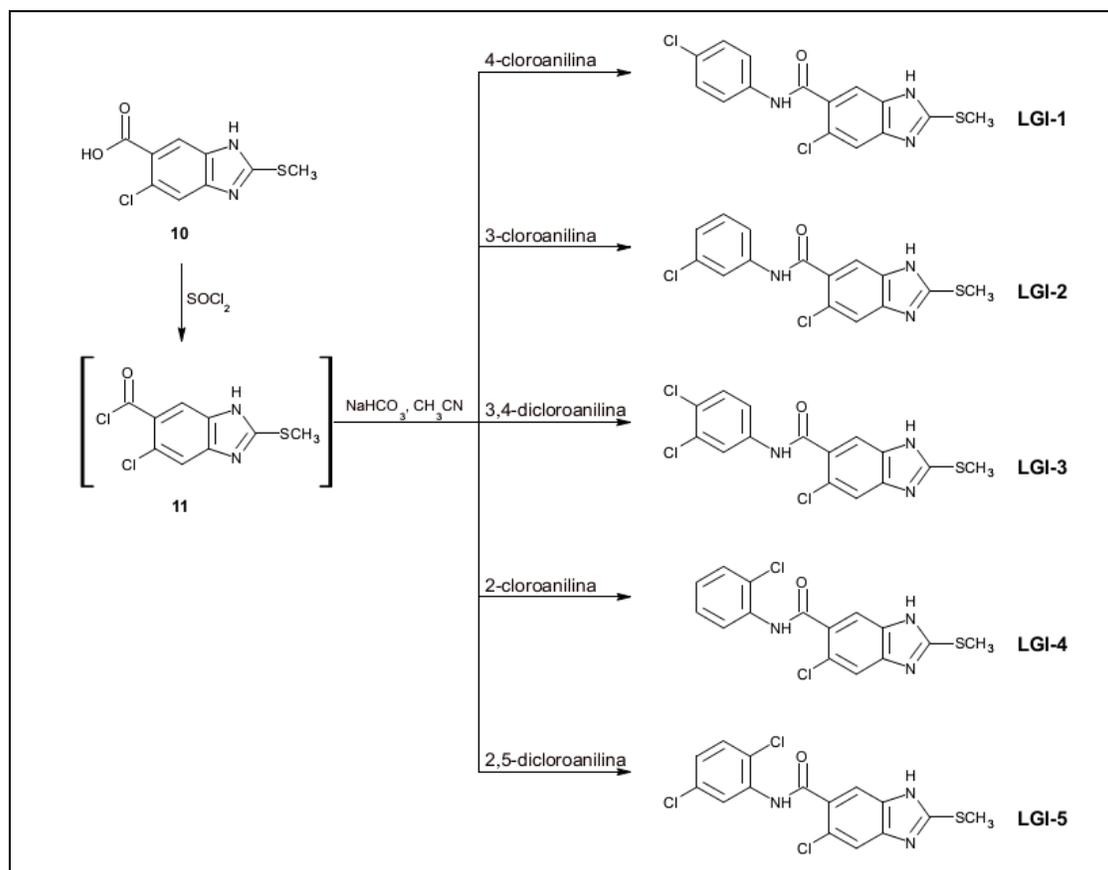
6.1.1 Síntesis del Ácido 5-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**10**)

Se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**). La reducción catalítica de **2** llevó al 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**), el cual se acetiló inmediatamente para dar el 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**). La nitración de éste con mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas llevó al 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). La posterior hidrólisis selectiva del grupo acetamida en medio básico dio el 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**), que por reducción del grupo nitro por medio de una hidrogenación

catalítica a temperatura ambiente, generó el 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**), el cual inmediatamente se ciclocondensó con disulfuro de carbono en medio básico para dar el par de tautómeros del 2-mercapto-6-clorobencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**). Posteriormente, **8** se trató con un equivalente de CH₃I en medio básico, procedimiento por el cual la metilación selectiva del azufre llevó al 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**9**), que sometido a una hidrólisis alcalina dio el ácido correspondiente esperado (**10**).

6.1.2 Síntesis de las Carboxamidas bencimidazólicas **LGI 1-5**

En la segunda etapa, el ácido **10** se trató con cloruro de tionilo en exceso para dar el cloruro de 5-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carbonilo (**11**), el cual in situ se trató con 4-cloroanilina para obtener 5-cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-1**); con 3-cloroanilina dio la 5-cloro-*N*-(3-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-2**); con 3,4-dicloroanilina llevó a la obtención de la 5-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-3**); con 2-cloroanilina se obtuvo la 5-cloro-*N*-(2-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-4**); y por último, con 2,5-dicloroanilina se pudo obtener la 5-cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-5**).

Esquema 1. Secuencia de síntesis del ácido carboxílico precursor **10****Esquema 2.** Secuencia de síntesis de las carboxamidas finales **LGI 1-5**.

6.2 Parte Biológica

6.2.1 Pruebas de susceptibilidad biológica

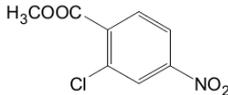
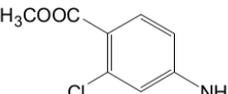
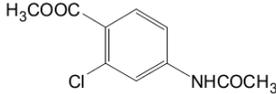
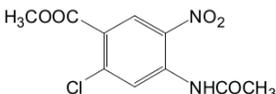
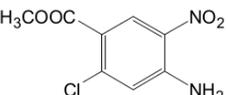
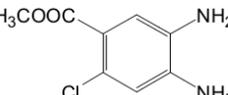
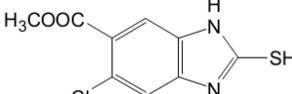
El ensayo biológico para la determinación de la actividad antiprotozoaria se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Cedillo-Rivera y Muñoz (1992)^{51,52}, con algunas modificaciones. En el ensayo se evaluó la actividad sobre *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, de acuerdo con el siguiente procedimiento: se incubaron 5×10^4 trofozoítos/mL a 37 °C por 48 horas con diferentes concentraciones del compuesto prueba (0.5, 0.1, 0.050, 0.010, 0.005 µg/mL); paralelamente, también se incubaron Albendazol, Metronidazol y Nitazoxanida a las mismas concentraciones como controles positivos, así como un control negativo donde sólo se incorporó el inóculo correspondiente a 5×10^4 trofozoítos/mL con el disolvente utilizado (DMSO). Después de este periodo de tiempo, los trofozoítos se sembraron en medio de cultivo fresco y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Al final de este periodo se contaron los trofozoítos y finalmente se analizaron los datos por el método estadístico Probit.

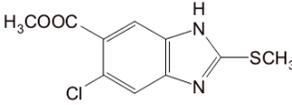
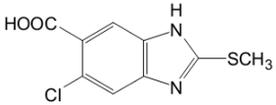
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados de la parte química

A continuación se presentan las características fisicoquímicas y rendimientos obtenidos de los compuestos intermediarios sintetizados **2-10 (Tabla 3)** y finales **LGI 1-5 (Tabla 4)**. En todos los casos los datos obtenidos de los intermediarios son coincidentes con los encontrados con anterioridad en nuestro laboratorio.⁴² Por otro lado, en la **Tabla 5** se recopilan los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales.

Tabla 3. Características fisicoquímicas y rendimientos de los compuestos intermediarios

CLAVE	ESTRUCTURA	Pf (°C) APARIENCIA	R _f	RENDIMIENTO (%)
2		76.1-76.6 ^a Cristales amarillo claro	0.64 (I)	93.87
3		109.2-109.8 ^b Cristales blancos	0.55 (I)	99.8
4		115.2-115.8 ^c Cristales Blancos	0.38 (I)	94.85
5		139.1-139.8 ^d Cristales amarillo claro	0.72 (I)	91.12
6		221.3-222.2 ^a Cristales amarillo limón	0.64 (I)	90.68
7		ND Sólido café violáceo	0.23 (I)	99.69
8		250.5-251.7 ^e Sólido Blanco	0.58 (II)	93.85

9		91.7-92.8 ^a Sólido Café	0.65 (II)	90.67
10		221-221.9 ^a Sólido Blanco	0.08 (II)	90.87

Disolvente de recristalización: ^aEtanol, ^bH₂O, ^cTolueno, ^dAcOEt, ^eEtOH-10%DMF. Sistema cromatográfico I o II (ver apéndice A).

Tabla 4. Características fisicoquímicas y rendimientos de los compuestos finales (**LGI 1-5**)

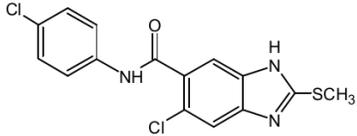
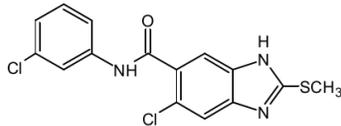
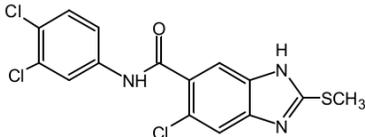
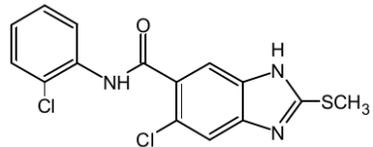
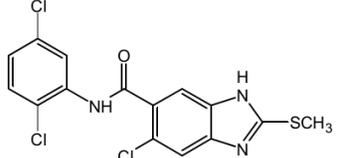
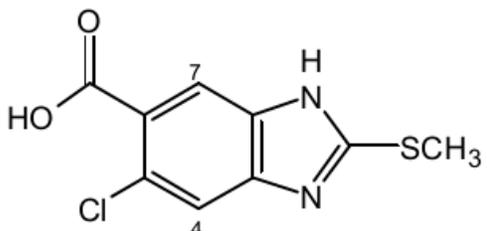
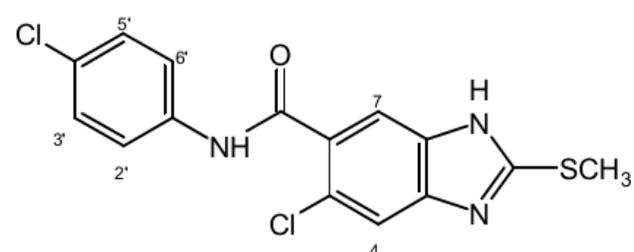
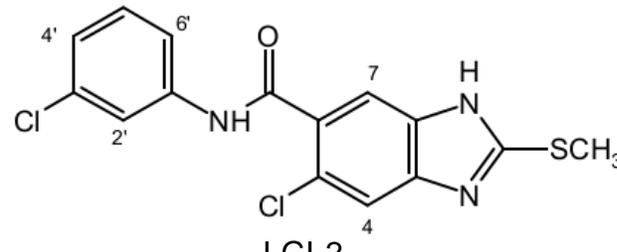
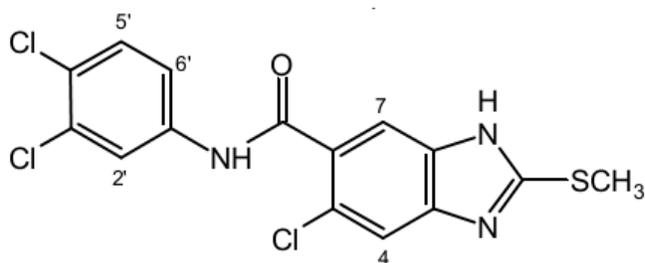
CLAVE	ESTRUCTURA	Pf (°C) APARIENCIA	R _f (I)	RENDIMIENTO (%)
LGI-1		260-261 Polvo blanco	0.14	76.13
LGI-2		229-230 Polvo blanco	0.12	79.57
LGI-3		249-250 Polvo blanco	0.12	73.74
LGI-4		217-218 Polvo blanco	0.12	67.17
LGI-5		217-218 Polvo blanco	0.16	69.03

Tabla 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados (LGI 1-5)

COMPUESTO	SEÑALES
 <p style="text-align: center;">(10)</p>	<p>Espectro 1, EM, m/z: 243 (M^+, 100%), 245 ($M^+ + 2$, 38%), 242 ($M^+ - 1$, 32%), 225 ($M - 18$, 8%), 227 ($M - 16$, 2%), 209 ($M - 33$, 8%).</p> <p>Espectro 2, IR: 3495 (Ar-NH-R), 3385 (C-H Aromático), 2932 (-CH₃), 2467.96 (-COOH), 1701.67 (C=O), 1618.35 (C=N).</p> <p>Espectro 3, RMN ¹H: 2.74 (s, 3H, -SCH₃), 7.60 (s, 1H, H-4), 7.91 (s, 1H, H-7), 12.99 (sa, 2H, int. con D₂O, O-H de ácido y NH).</p>
 <p style="text-align: center;">LGI-1</p>	<p>Espectro 4, EM, m/z: 352 (M^+, 9.6%), 354 ($M^+ + 2$, 7%), 356 ($M^+ + 4$, 2%), 225 ($M^+ - 127$, 4.8%), 227 ($M^+ - 125$, 2%).</p> <p>Espectro 5, IR: 3098 (Ar-NH-R, de amida), >3000 (C-H Aromático), 2958 (-CH₃), 1643 (C=O de amida).</p> <p>Espectro 6, RMN ¹H: 2.69 (s, 3H, -SCH₃), 7.38 (d, J=8.85 Hz, 2H, H-3',5'), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.62 (s, 1H, H-7), 7.72 (d, J= 8.89 Hz, 2H, H-2',6'), 10.53 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p>
 <p style="text-align: center;">LGI-2</p>	<p>Espectro 7, EM, m/z: 352 (M^+, 96%), 354 ($M^+ + 2$, 66%), 356 ($M^+ + 4$, 14%), 225 ($M^+ - 127$, 52%), 227 ($M^+ - 125$, 20%).</p> <p>Espectro 8, IR: 3167 (Ar-NH-R, de amida), >3000 (C-H Aromático), 3063 (-CH₃), 1647 (C=O de amida).</p> <p>Espectro 9, RMN ¹H: 2.70 (s, 3H, -SCH₃), 7.13 (dt, J₁=8.08 Hz, J₂=1.21 Hz, 1H, H-4'), 7.36 (t, J=8.10 Hz, 1H, H-5'), 7.56 (d, J=8.30 Hz, 1H, H-6'), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.61 (s, 1H, H-7); 7.88 (s, 1H, H-2'), 10.59 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p>

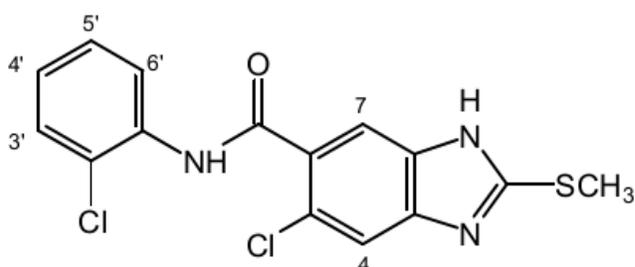


LGI-3

Espectro 10, EM, m/z : 386 (M^+ , 34%), 388 (M^++2 , 36%), 390 (M^++4 , 14%), 392 (M^++6 , 4%), 225 (M^+-161 , 18%), 227 (M^+-159 , 14%).

Espectro 11, IR: 3088 (Ar-NH-R, de amida), >3000 (C-H Aromático), 2967 (-CH₃), 1655(C=O de amida).

Espectro 12, RMN 1H : 2.69 (s, 3H, -SCH₃), 7.58 (sc, 2H, H-4, H-5'), 7.64 (sc, 2H, H-6', H-7), 8.10 (sd, J=2.15 Hz, 1H, H-2'), 10.70 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).

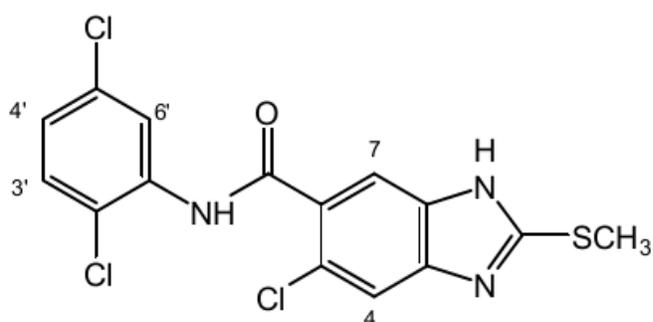


LGI-4

Espectro 13, EM, m/z : 352 (M^+ , 98%), 354 (M^++2 , 70%), 356 (M^++4 , 15%), 225 (M^+-127 , 44%), 227 (M^+-125 , 18%).

Espectro 14, IR: 3177 (Ar-NH-R, de amida), >3000 (C-H Aromático), 2968 (-CH₃), 1656 (C=O de amida).

Espectro 15, RMN 1H : 2.75 (s, 3H, -SCH₃), 7.31 (td, J₁= 7.64 Hz, J₂=1.53, 1H, H-4'), 7.43 (t, J=7.76 Hz, 1H, H-5'), 7.58 (dd, J₁=8.06 Hz, J₂=1.29 Hz, 1H, H-3'), 7.64 (s, 1H, H-4), 7.71 (s, 1H, H-7), 7.74 (d, J=8.06 Hz, 1H, H-6'), 10.13 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).



LGI-5

Espectro 16, EM, m/z : 386 (M^+ , 22%), 388 (M^++2 , 22%), 390 (M^++4 , 8%), 392 (M^++6 , 2%), 225 (M^+-161 , 20%), 227 (M^+-159 , 14%).

Espectro 17, IR: 3170 (Ar-NH-R, de amida), >3000 (C-H Aromático), 2966 (-CH₃), 1658 (C=O de amida).

Espectro 18, RMN 1H : 2.70 (s, 3H, -SCH₃), 7.33 (dd, J₁=8.65 Hz, J₂=2.58 Hz, 1H, H-4'), 7.56 (d, J=8.65, 1H, H-3'), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.68 (s, 1H, H-7), 7.86 (s, 1H, H-6'), 10.18 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).

Para la obtención del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo a 60 °C, una reacción rápida y con buenos rendimientos. En este paso se mezclaron los ingredientes en DMF y se adicionaron dos equivalentes de bicarbonato de sodio humedecido con agua para mantener el medio a pH neutro.

La hidrogenación catalítica del éster **2**, empleando Ni-Raney como catalizador a temperatura ambiente, dio origen a la amina correspondiente **3** con un buen rendimiento del producto crudo. La selección del catalizador fue un aspecto importante ya que se ha visto que al usar Pd/C se promueve la eliminación del cloro en la posición 2.

La acetamida **4** se obtuvo a partir de la adición de anhídrido acético a la amina a temperatura ambiente. Esta reacción procedió rápidamente dando muy buenos rendimientos. También se observó que el producto crudo y seco de la reducción catalítica da buenos rendimientos cuando se humedece con 1.3 equivalentes de anhídrido acético y agita el matraz de reacción manualmente.

El siguiente paso fue la nitración de la acetamida **4**, la cual se realizó por adición de mezcla sulfonítrica sobre la acetanilida disuelta en H₂SO₄ entre 0 y 5 °C. Sin embargo se encontraron problemas ya que la reacción no procedió completamente, obteniéndose una mezcla de acetamida y compuesto nitrado, por lo que se realizó un secado de **4** en la estufa a 80 °C por 3 días, lo cual no produjo ninguna descomposición del producto. Posteriormente se procedió a la nitración, con lo cual se obtuvo solamente el producto crudo nitrado con un rendimiento del 81.74 %, el cual disminuyó al realizar la maceración en metanol para eliminar las impurezas de la reacción.

La hidrólisis básica de la acetamida **5**, en metanol a temperatura ambiente, produjo rápidamente el compuesto 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) con un buen rendimiento. En esta reacción se observó que las impurezas se disuelven en metanol, no así **6**, dando un producto prácticamente puro.

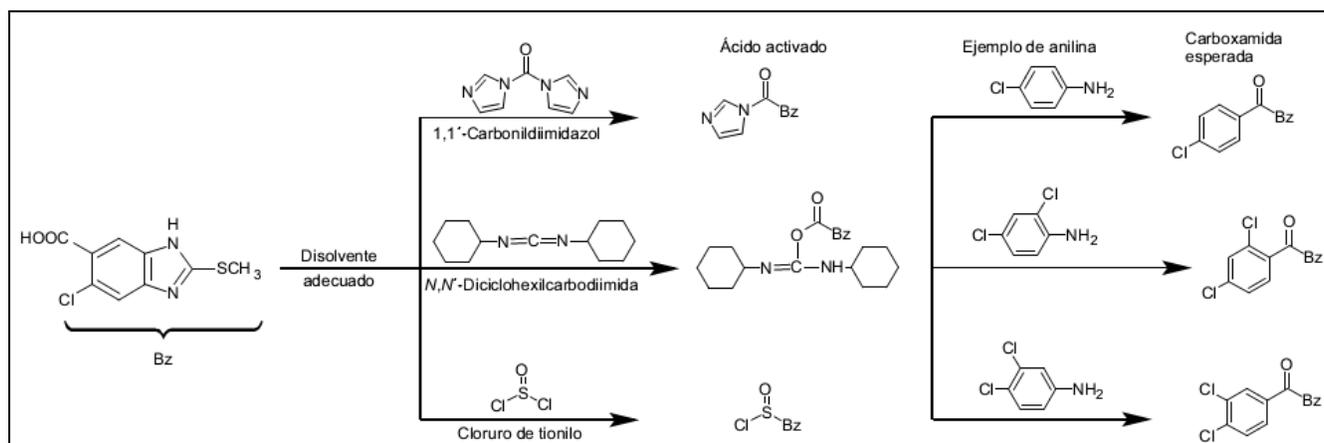
La diamina se obtuvo por reducción catalítica del grupo nitro en **6** a temperatura ambiente; el disolvente se destiló en el rotaevaporador y para evitar la descomposición, inmediatamente se sometió a la siguiente reacción.

El 2-mercaptobencimidazol **8** se obtuvo a través de la ciclocondensación de la *o*-feniléndiamina **7** con disulfuro de carbono en medio básico. La temperatura por debajo de 65 °C y el pH de 9 fueron importantes para evitar la hidrólisis del éster. Fue importante el tratamiento con ácido acético diluido hasta pH de 5-6 para obtener buen rendimiento.

La metilación del tiol **8** con un equivalente de yoduro de metilo en medio básico, a bajas temperaturas para evitar la formación del producto dimetilado, dio origen al compuesto **9**.

El ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**) se obtuvo mediante la hidrólisis básica a 60-65 °C del compuesto **9**. La reacción procedió de manera rápida y con un rendimiento de 90.9 %, el sólido obtenido resultó ser idéntico a una muestra pura obtenida con anterioridad. De cualquier forma, por ser la materia prima para la preparación de las nuevas carboxamidas **LGI 1-5** se realizaron los correspondientes espectros para asegurar su pureza e identidad. El espectro de IR mostró una señal amplia en 2467.96 que comprobó el grupo hidroxilo del ácido, una señal en 3495 correspondiente al estiramiento N-H, una señal en 3385 por el estiramiento C-H, una señal en 1701.67 característica del carbonilo del ácido y una señal en 1618.35 debida al estiramiento C=N. El espectro de RMN ¹H mostró un singulete a 2.74, el cual integra para un hidrógeno correspondiente al metiltio, dos singuletes en 7.60 y 7.91 que integran para un hidrógeno correspondiente a H-4,7 y un singulete amplio a 12.99 que integra para 2 hidrógenos y corresponde a los hidrógenos del ácido y la amida, la cual desaparece al realizar intercambio con D₂O. El espectro de masas realizado por FAB⁺ mostró el ion molecular muy estable con *m/z* 243 y abundancia del 100%, así como el ion M+2 debido a la presencia del cloro con *m/z* 245, la pérdida del hidrógeno del ácido con *m/z* 242 y la pérdida del OH con *m/z* 225, también se comprobó la presencia del sulfuro por el fragmento *m/z* 209.

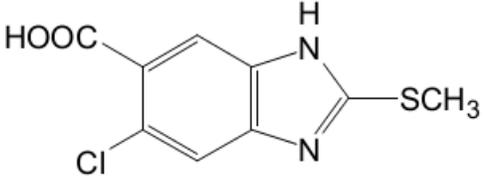
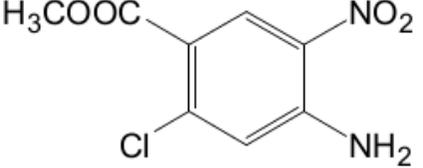
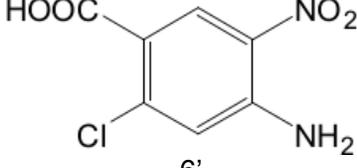
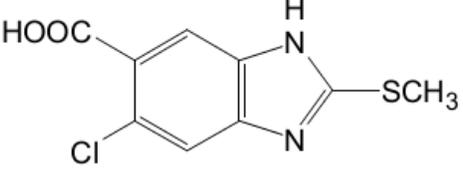
Para obtener las carboxamidas **1-5** a partir del ácido **10** se planeó activar el ácido con algún agente que posteriormente permitiera la formación de la amida, por tratamiento con la anilina adecuada, según la siguiente reacción:



Se hicieron varios experimentos, en los cuales se establecieron distintas condiciones de reacción e incluso se realizó un experimento a partir de otra materia prima, lo cual se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Ensayos de Síntesis de las Carboxamidas LGI 1-5

MATERIA PRIMA	FORMACIÓN DE INTERMEDIARIO	FORMACIÓN DE CARBOXAMIDA	RENDIMIENTO
<p>10</p>	CDI (1.2 eq), THF anhidro, 30 min a 30 °C	THF anhidro, Et ₃ N (1 eq), anilina (0.8 eq). A ebullición (66 °C) por 7 días.	No se obtuvieron
		THF/acetonitrilo, Reacción en MW a 180 °C, 600 w, 13 bar, Hold: 10-20 min.	
		THF anhidro, ácido <i>p</i> -toluensulfónico (1-1.3 eq), anilina (0.8 eq). Se calentó a 90 °C por 7 días.	
	CDI (1.2 eq), THF anhidro, 30 min a 30 °C	DMF, Et ₃ N (1 eq), anilina (0.8 eq). A 150 °C por 7 días.	No se obtuvo

 <p style="text-align: center;">10</p>	<p>DCC (1.1 eq), THF anhidro, 30 min a 5 °C</p>	<p>No se obtuvo</p>	<p>No se obtuvieron</p>
 <p style="text-align: center;">6</p>	<p>Sin formación de intermediario</p>	<p>DMSO, anilina (1 eq) Reacción en MW a 150 °C, 300 w, 10 bar, Hold: 20 min.</p> <p>DMSO, anilina (1 eq), DBU ó ácido p-toluensulfónico (1 eq) Reacción en MW a 150 °C, 300 w, 10 bar, Hold: 20 min.</p>	<p>No se obtuvieron</p>
 <p style="text-align: center;">6'</p>	<p>CDI (1.5 eq), THF anhidro, 30 min a 30 °C.</p>	<p>THF, anilina (1 eq), Et₃N (1 eq), a ebullición (66 °C) por 2 días.</p> <p>DMF, anilina (1 eq), Et₃N (1 eq), se calentó a 150 °C durante 2 días.</p>	<p>No se obtuvieron</p>
 <p style="text-align: center;">10</p>	<p>SOCl₂ (3 eq), THF anhidro, 60-65 °C por 6. h</p> <p>SOCl₂ (10 eq), 3 h a 60-65 °C.</p>	<p>Acetonitrilo, NaHCO₃, anilina, t. ambiente.</p> <p>Acetonitrilo, NaHCO₃, anilina, t. ambiente.</p>	<p>40 %</p> <p>>60 %</p>

El ácido **10** presenta una baja solubilidad en la mayoría de los disolventes, por lo que se decidió trabajar las reacciones en THF, DMF y DMSO; sin embargo, el intermediario imidazólico formado al agregar CDI, presentó una menor solubilidad que su correspondiente

ácido, por lo que a pesar de los largos tiempos de reacción solo se obtuvo el intermediario e impurezas.

Se intentó realizar la reacción mediante la formación del anhídrido a partir del ácido **10** adicionando DCC; sin embargo, se obtuvo mayoritariamente el producto secundario, dicitclohexilurea, lo cual reduce de manera importante el rendimiento de las reacciones.

Para disminuir los tiempos de reacción y mejorar la eficiencia se decidió realizar algunos ensayos asistidos por microondas (SOAM) con y sin catálisis. Sin embargo, a pesar de que se alargó el tiempo de reacción de 10 a 20 minutos (Hold), no se obtuvo ningún compuesto final, debido a que la baja solubilidad impidió que se llevara a cabo la reacción de sustitución.

Con el fin de mejorar la solubilidad de la materia prima y el producto intermediario, se partió de **6** realizando una reacción por microondas durante 20 min en DMSO. Se realizaron varios experimentos, uno sin catálisis y 2 catalizados con DBU y ácido *p*-toluensulfónico; sin embargo, no se obtuvieron los compuestos finales ya que el producto intermediario tiene una reducida solubilidad.

El compuesto **6** se sometió a una hidrólisis en medio básico para obtener el ácido 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoico (**6'**), el cual se sometió a una activación con CDI para posteriormente realizar la reacción de sustitución en THF y DMF con catálisis básica. A pesar de que al usar DMF como disolvente se aumentó la temperatura de reacción, se obtuvo una gran cantidad de impurezas debido a la descomposición del disolvente por los largos periodos de reacción y no se obtuvieron los compuestos finales.

La síntesis de las carboxamidas **LGI 1-5** se logró mediante la formación del cloruro de ácido correspondiente con cloruro de tionilo, el cual se usó como disolvente para evitar el problema de la baja solubilidad. Posteriormente, el cloruro de ácido (**11**) se hizo reaccionar con las anilinas correspondientes para formar las carboxamidas. Un bajo porcentaje de ácido quedó sin reaccionar, por lo que fue necesario purificar el sólido obtenido mediante filtración en alúmina básica y un lavado final con CHCl_3 . Finalmente se obtuvieron compuestos puros con rendimientos superiores a 60 %.

La carboxamida **LGI-1** se obtuvo a partir del ácido **10** que tratado con cloruro de tionilo a 60-65 °C dio el cloruro de ácido, el cual no se aisló sino que se hizo reaccionar a temperatura ambiente con la 4-cloroanilina en medio básico, obteniéndose la carboxamida deseada con un rendimiento del 76.1 %. En el espectro de IR se observó una banda en 3098 debida al estiramiento N-H y otra en 1643 la cual se asignó al grupo carbonilo de la amida. En el espectro de RMN ^1H se observó un singulete en 2.69 que integró para 3 hidrógenos del metilo en el metiltio. También se observaron 2 singuletes en 7.58 y 7.62 los cuales corresponden a los hidrógenos H-4 y H-7 del bencimidazol; en 7.38 con $J=8.85$ se encontró un doblete con integración para 2 hidrógenos que corresponde a H-3' y H-5', de igual manera, en 7.72 con $J=8.89$ se encontró otro doblete el cual corresponde a H-2' y H-6'. En 10.53 apareció el singulete correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, señal que desapareció al hacer el intercambio con D_2O . El espectro de masas mostró el ion molecular $\text{M}^+ + 1$ poco estable con relación m/z de 352 y abundancia de 9.6%, así como los iones $\text{M}^+ + 2$ y $\text{M}^+ + 4$ con m/z 354 y 356 respectivamente, debidos a la disustitución con cloro. Finalmente, el ion con m/z 225 correspondiente al pico base formado por la ruptura del enlace carboxamida.

La carboxamida **LGI-2** se obtuvo a partir del ácido **10** con cloruro de tionilo a 60-65 °C, para obtener el cloruro de ácido, el cual se hizo reaccionar a temperatura ambiente con la 3-cloroanilina en medio básico, obteniéndose la carboxamida deseada con un rendimiento del 79.6%. En el espectro de IR se observó una banda en 3167 debida al estiramiento N-H y otra en 1647 correspondiente al grupo carbonilo de la amida. En el espectro de RMN ^1H se obtuvo un distinto patrón de sustitución en comparación con la carboxamida antes descrita, por lo que se observó un doblete tripleteado en 7.13 con $J_1=8.08$ y $J_2=1.2$, el cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-4'; un triplete en 7.36 con $J=8.10$ y que integró para un hidrógeno, el cual corresponde a H-5'; un doblete a 7.56 con $J=8.30$ que integra para un hidrógeno y corresponde con H-6', y por último, un singulete a 7.88 que integra para un hidrógeno y corresponde a H-2'. Encontrándose en similitud con la carboxamida anterior un singulete en 2.70 que integra para 3 hidrógenos y corresponde al metiltio, 2 singuletes en 7.58 y 7.61 correspondientes a H-4,7, así como un singulete en 10.59 correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, señal que desaparece al hacer el intercambio con D_2O . El espectro de masas mostró el ion molecular bastante estable con relación m/z de 352 y abundancia del 96%, así como los iones $\text{M}^+ + 2$ y $\text{M}^+ + 4$ con m/z 354, 356 debidos a la di-

sustitución con cloro y finalmente el ion con m/z 225 correspondiente al pico base formado por la ruptura del enlace carboxamida.

La carboxamida **LGI-3** se obtuvo a partir del ácido **10** tratado con cloruro de tionilo a 60-65 °C, para obtener el cloruro de ácido el cual se hizo reaccionar a temperatura ambiente con la 3,4-dicloroanilina en medio básico, obteniéndose un rendimiento del 73.7% del producto. En el espectro de IR se observó una banda en 3088 debida al estiramiento N-H y otra en 1655 correspondiente al grupo carbonilo de la amida. En el espectro de RMN ^1H se obtuvo un distinto patrón de sustitución en comparación con las carboxamidas antes descritas, por lo que se observó un singulete dobleteado a 8.10 con $J=2.15$ que integra para un hidrógeno correspondiente a H-2', una señal compleja a 7.58 que integra para 2 hidrógenos, la cual corresponde a un sigulete de H-4 y un doblete de H-5'; sin embargo, éstos no pueden definirse por completo ya que las señales se sobreponen, otra señal compleja se observa a 7.64 la cual integra para 2 hidrógenos y corresponde a la superposición de un singulete de H-7 y un doblete de H-6'. En similitud con las anteriores carboxamidas se observa un singulete en 2.69 que integra para 3 hidrógenos, correspondiente al metiltio; un singulete a 10.70 que integra para un hidrógeno y corresponde al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, señal que desaparece al hacer el intercambio con D_2O . El espectro de masas mostró el ion molecular poco estable con relación m/z de 386 y abundancia del 34%, así como los iones $\text{M}^+ +2$, $\text{M}^+ +4$ y $\text{M}^+ +6$ con m/z 388, 390, 392 debidos a la trisustitución con cloro y finalmente el ion con m/z 225 correspondiente al pico base formado por la ruptura del enlace carboxamida.

La carboxamida **LGI-4** se obtuvo a partir del ácido **10** con cloruro de tionilo a 60-65 °C, para obtener el cloruro de ácido el cual se hizo reaccionar a temperatura ambiente con la 2-cloroanilina en medio básico, obteniéndose con un rendimiento del 67.2%. En el espectro de IR se observó una banda en 3177 debida al estiramiento N-H y otra en 1656 correspondiente al grupo carbonilo de la amida. En el espectro de RMN ^1H se tiene un distinto patrón de sustitución en comparación con las carboxamidas antes descritas, por lo que se observaron 2 tripletes, uno en 7.31, el cual se observó dobleteado con $J_1=7.64$, $J_2=1.53$, correspondiente a H-4' y otro en 7.43 con $J=7.76$, correspondiente a H-5', ambos integraron para un hidrógeno. En 7.58 se observa un doble de dobles con $J_1=8.06$ y $J_2=1.29$, que integró para un hidrógeno, el cual corresponde a H-3' y un doblete en 7.74 con $J=8.06$, que integra para un hidrógeno y

corresponde al H-6'. En similitud con las anteriores carboxamidas en 2.75 se observa un singulete que integra para 3 hidrógenos correspondiente al metilto, un singulete en 7.64 y otro en 7.71 ambos con integración para un hidrógeno y correspondientes a H-4,7 y un singulete en 10.13 correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, señal que desaparece al hacer el intercambio con D₂O. El espectro de masas mostró el ion molecular bastante estable con relación m/z de 352 y abundancia del 98%, así como los iones $M^{+}+2$ y $M^{+}+4$ con m/z 354, 356 debidos a la di-sustitución con cloro y finalmente el ion con m/z 225 correspondiente al pico base formado por la ruptura del enlace carboxamida.

La carboxamida **LGI-5** se obtuvo a partir del ácido **10** con cloruro de tionilo a 60-65 °C, para obtener el cloruro de ácido, el cual se hizo reaccionar a temperatura ambiente con la 2,5-dicloroanilina en medio básico, obteniéndose con un rendimiento del 69%. En el espectro de IR se observó una banda en 3170 debida al estiramiento N-H y otra en 1658 correspondiente al grupo carbonilo de la amida. En el espectro de RMN ¹H se tiene un distinto patrón de sustitución en comparación con las carboxamidas anteriores, ya que aquí se observa un doblete en 7.56 con $J=8.65$ que integra para un hidrógeno correspondiente a H-3', un doble de dobles a 7.33 con $J_1=8.65$ y $J_2=2.58$, que integra para un hidrógeno correspondiente a H-4' y un singulete a 7.86 el cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-6'. En similitud con las anteriores carboxamidas se tiene un singulete a 2.70 el cual integra para 3 hidrógenos correspondiente al metilto, dos singuletes a 7.58 y 7.68, los cuales integran para un hidrógeno cada uno correspondientes a H-4,7 y un singulete en 10.18 que integra para un hidrógeno, correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, señal que desaparece al realizar el intercambio con D₂O. El espectro de masas mostró el ion molecular poco estable con relación m/z de 386 y abundancia del 22%, así como los iones $M^{+}+2$, $M^{+}+4$ y $M^{+}+6$ con m/z 388, 390, 392 debidos a la trisustitución con cloro y finalmente el ion con m/z 225 correspondiente al pico base formado por la ruptura del enlace carboxamida.

7.2 Resultados de la parte biológica

Las carboxamidas sintetizadas **LGI 1-5** se sometieron a pruebas de actividad *in vitro* contra *G. intestinalis* sensible a Metronidazol, *G. intestinalis* resistente a Metronidazol, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Se determinó la susceptibilidad de estos protozoarios a los compuestos mediante el

método de subcultivos,^{51,52} obteniendo la CI_{50} mediante un análisis Probit. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en la Gráfica 2.

Tabla 7. Resultados de susceptibilidad biológica de las carboxamidas **LGI 1-5**

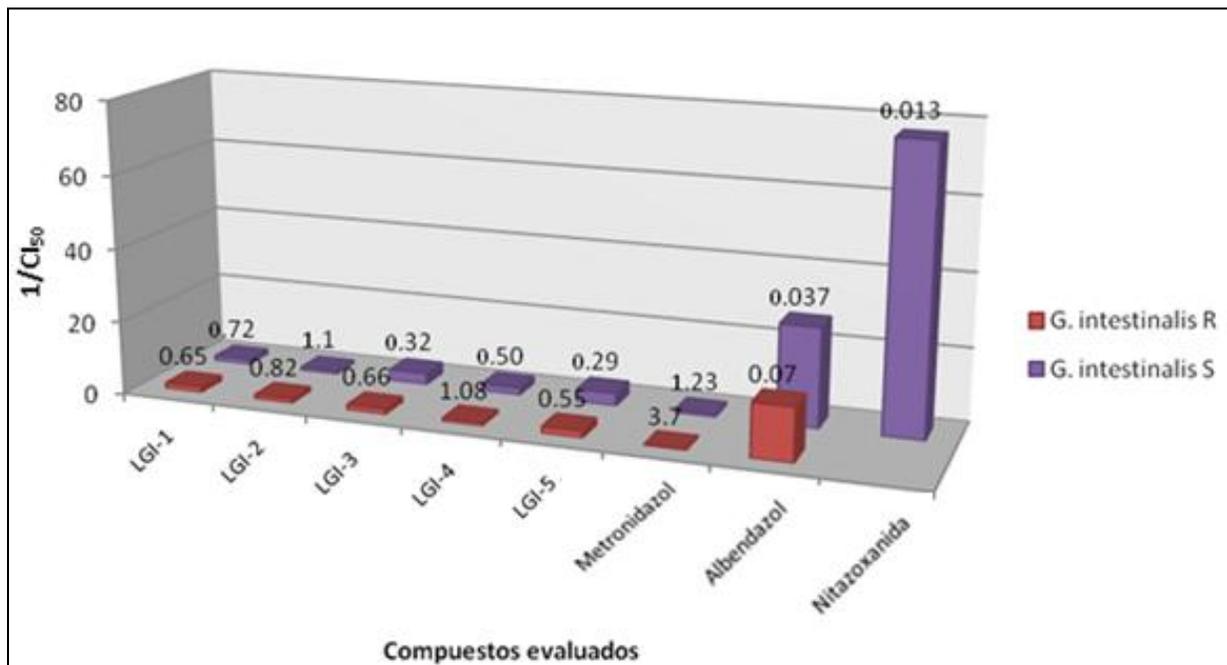
COMPUESTOS	<i>G. intestinalis</i> Resistente a MTZ		<i>G. intestinalis</i> Sensible a MTZ		<i>E. histolytica</i>		<i>T. vaginalis</i>	
	CI_{50} (μ M)	1/ CI_{50}	CI_{50} (μ M)	1/ CI_{50}	CI_{50} (μ M)	1/ CI_{50}	CI_{50} (μ M)	1/ CI_{50}
LGI-1	0.654	1.53	0.716	1.40	0.031	32.26	0.151	6.62
LGI-2	0.816	1.23	1.11	0.90	0.051	19.61	0.162	6.17
LGI-3	0.663	1.51	0.319	3.13	0.027	37.04	0.114	8.77
LGI-4	1.080	0.93	0.497	2.01	0.043	23.26	0.131	7.63
LGI-5	0.547	1.83	0.285	3.51	0.027	37.04	0.111	9.01
Metronidazol	3.70	0.27	1.228	0.81	0.350	2.86	0.216	4.63
Albendazol	0.069	14.49	0.037	27.03	56.60	0.02	1.592	0.63
Nitazoxanida			0.013	76.92	0.055	18.18	0.110	9.01

De manera general se puede observar que contra *G. intestinalis* resistente y *G. intestinalis* sensible los compuestos sintetizados (**LGI 1-5**) presentaron mejor actividad que el Metronidazol, el fármaco de elección contra este parásito; sin embargo, no fueron mejores que el Albendazol o la Nitazoxanida.

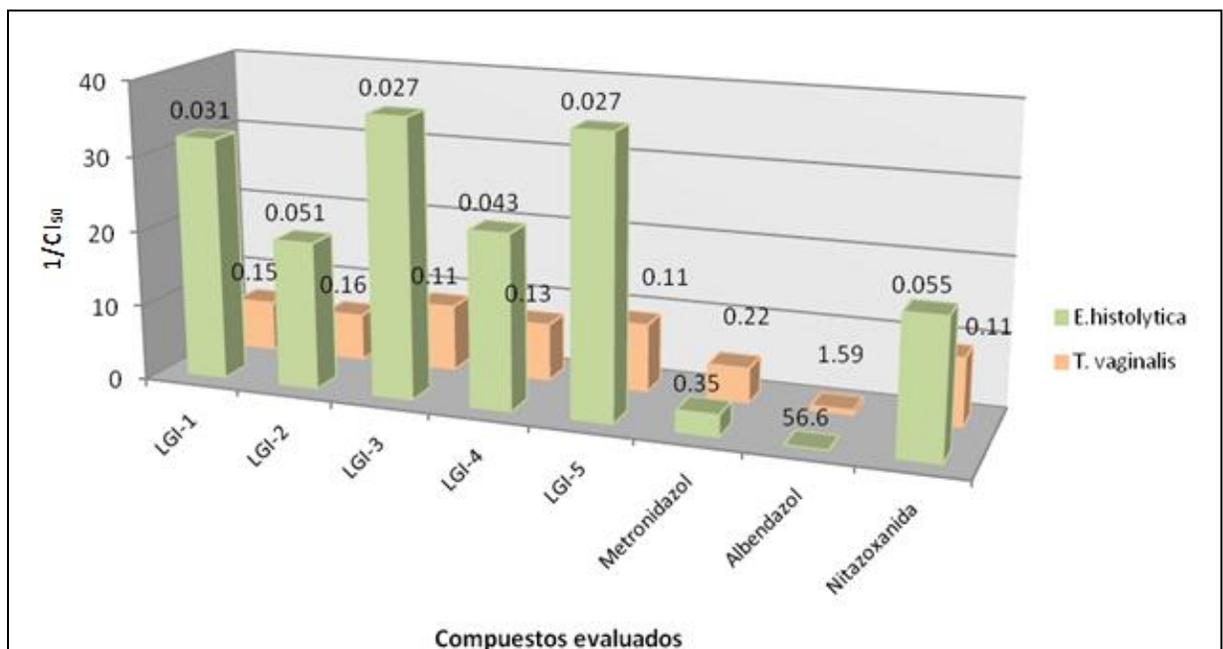
Para el caso de la actividad contra *E. histolytica* se aprecia que los compuestos **LGI-3** y **5** presentan la mejor actividad, siendo 13 veces más potente que Metronidazol, 2096 veces más potentes que el Albendazol y 2 veces más potente que la Nitazoxanida.

Para *T. vaginalis* los compuestos **LGI-3** y **5** presentaron las mejores actividades. Estos compuestos resultaron ser 2 veces más potente que el Metronidazol, 14 veces más potentes que el Albendazol y equiparables en actividad a la Nitazoxanida.

Graficas 2. Comparación entre la actividad contra *G.intestinalis*, de los compuestos **LGI-1-5** y los fármacos de referencia.



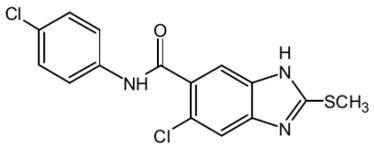
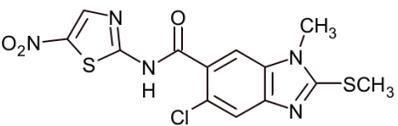
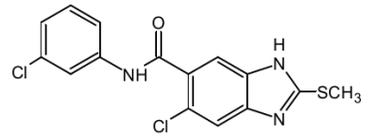
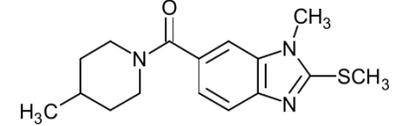
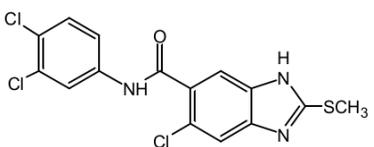
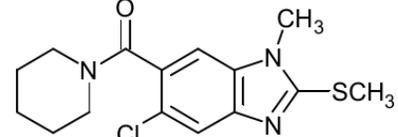
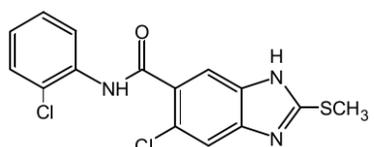
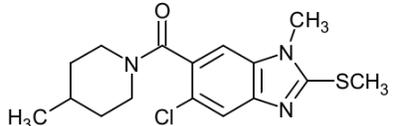
Graficas 3. Comparación entre la actividad contra *E.histolytica* y *T. vaginalis*, de los compuestos **LGI-1-5** y los fármacos de referencia.

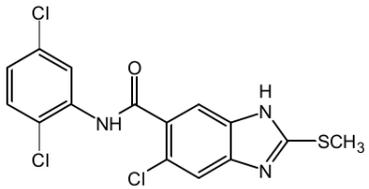
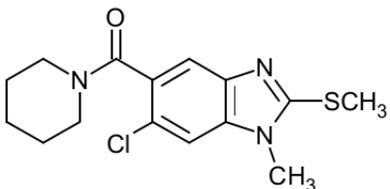
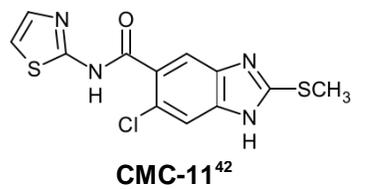
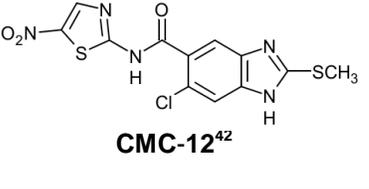
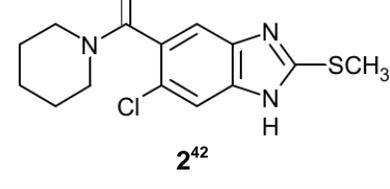
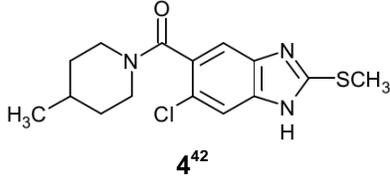


Con el fin de conocer los requerimientos estructurales para la actividad antiparasitaria evaluada en este estudio, se realizó una comparación de las actividades presentadas por los compuestos sintetizados en este trabajo y algunas carboxamidas bencimidazolicas sintetizadas previamente en el laboratorio 122. Los datos obtenidos hasta ahora se comparan en las Tablas 8, 9 y 10.

7.2.1 Resultados de actividad contra *G. intestinalis*

Tabla 8. Resultados de actividad de carboxamidas sintetizadas en el Lab-122

COMPUESTOS	Actividad biológica	COMPUESTOS	Actividad biológica
	Cl ₅₀ (μM)		Cl ₅₀ (μM)
 <p>LGI-1</p>	0.716	 <p>CMC-20⁴²</p>	0.005
 <p>LGI-2</p>	1.11	 <p>IFY-2⁵³</p>	0.053
 <p>LGI-3</p>	0.319	 <p>LBN-13⁵⁴</p>	0.122
 <p>LGI-4</p>	0.497	 <p>LBN-15⁵⁴</p>	0.099

 <p>LGI-5</p>	0.285	 <p>SRE-37⁵⁵</p>	7.013
 <p>CMC-11⁴²</p>	0.022	 <p>SRE-38⁵⁵</p>	4.226
 <p>CMC-12⁴²</p>	0.005	 <p>2⁴²</p>	0.359
 <p>CMC-19⁴²</p>	0.010	 <p>4⁴²</p>	2.095

En la **Tabla 8** se observa que el compuesto **CMC-11** es similar a las carboxamidas sintetizadas, la diferencia radica en la sustitución en la posición 5(6), la cual presenta un tiazol en lugar de un clorofenil, lo que resultó en una mayor actividad que los compuestos de la serie **LGI 1-5**. Ambas estructuras presentan aromaticidad y pueden establecer interacciones π - π con aminoácidos en el sitio receptor. Sin embargo, al sustituir el anillo de benceno con cloro, que es un grupo electroatrayente y con cierto volumen, podría producir un efecto electrónico y de impedimento estérico evitando la correcta interacción con el sitio receptor. Al comparar la actividad biológica de **CMC-11** y **12**, se aprecia que la adición del grupo Nitro incrementa la potencia, probablemente debido a la producción de radicales libres, característicos de este grupo. También observamos que la actividad de **CMC-12** y **20** son iguales, demostrando que el isómero [1,6] es el que determina la actividad.

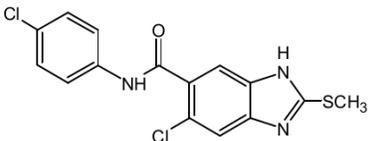
En el compuesto **2** observamos que el sustituyente en la posición 5(6) es una piperidina o metilpiperidina en el caso del compuesto **4**, un ciclo alifático que no tendría interacciones π - π como en el caso de los **LGI**. La presencia de un sustituyente metilo en la piperidina disminuye considerablemente la actividad, mientras que sustituyentes como el Cl que es más voluminoso y polar dieron lugar a compuestos con mayor actividad; sin embargo, esto solo aplica a los compuestos **LGI-3** y **5** los cuales están disustituidos con Cl.

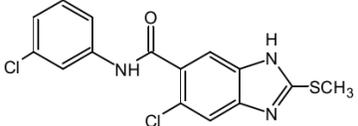
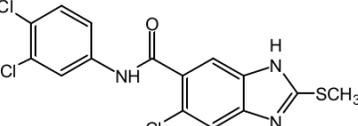
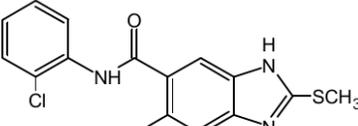
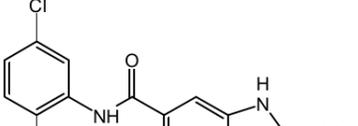
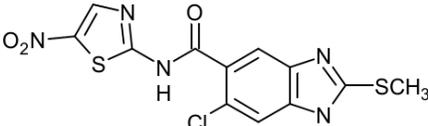
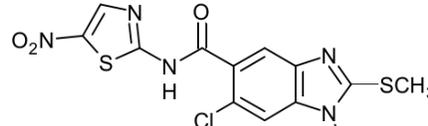
Al comparar el compuesto **IFY-2** con **LBN-15** podemos observar que la actividad del primero es ligeramente mayor; sin embargo, la única diferencia estructural es la presencia del cloro en posición 5. Este sustituyente fue colocado debido a que, como se mencionó anteriormente, ayuda a impedir la desactivación metabólica *in vivo*, lo cual no puede ser comprobado con estos estudios y su utilidad no se refleja en estos resultados.

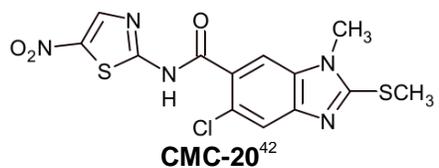
Por último observamos que **LBN-13** y **15** son los isómeros [1,6] mientras que **SER-37** y **38** son los isómeros [1,5]. En base a estos resultados es claro que los isómeros que presentan las mayor potencia son los [1,6] al igual que ocurre en el compuesto **CMC-20**. En cuanto a la sustitución de estos compuestos, observamos que la presencia de metilpiperidina en estos compuestos metilados en posición 1, da una mayor potencia, por lo que la sustitución no produce un efecto de impedimento estérico, tal y como se observa en las carboxamidas **LGI-3** y **5** que, a pesar de ser disustituidas, presentaron la mejor actividad.

7.2.2 Resultados de actividad contra *E. histolytica*

Tabla 9. Actividad biológica de distintas carboxamidas sintetizadas en el Lab-122

COMPUESTOS	Actividad biológica	
	Cl ₅₀ (μM)	1/Cl ₅₀
 <p>LGI-1</p>	0.031	32.26

 <p>LGI-2</p>	0.051	19.61
 <p>LGI-3</p>	0.027	37.04
 <p>LGI-4</p>	0.043	23.26
 <p>LGI-5</p>	0.027	37.04
 <p>CMC-12⁴²</p>	0.070	14.29
 <p>CMC-19⁴²</p>	0.026	38.46

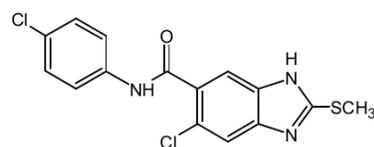
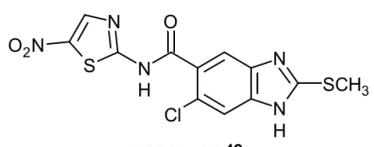
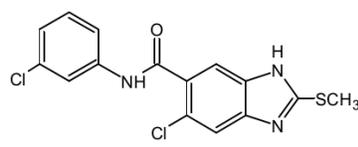
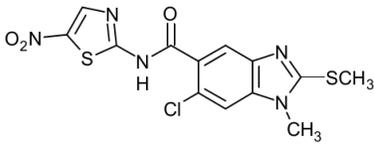
 <p>CMC-20⁴²</p>	0.022	45.45
---	-------	-------

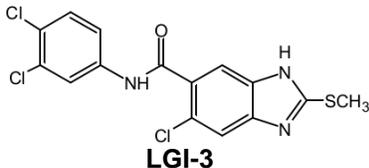
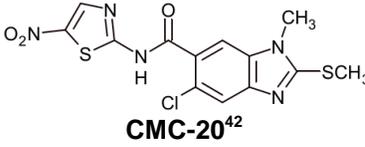
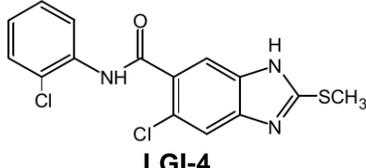
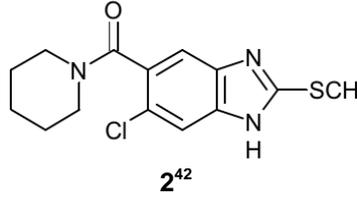
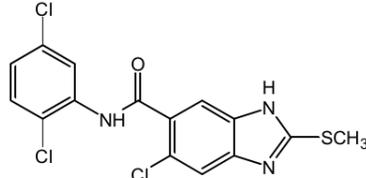
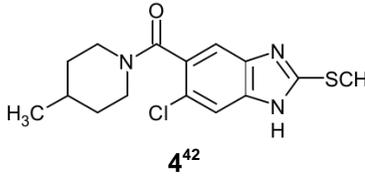
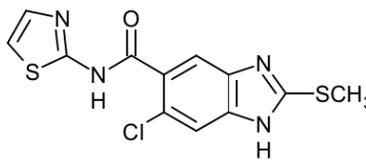
En la **Tabla 9** podemos observar que las carboxamidas **LGI-3** y **5** presentaron la mejor actividad de la serie **LGI**, la cual fue similar a la presentada por **CMC-19** y **20**, siendo el isómero [1,6] el más activo. También se puede observar que al incluir sustituyentes voluminosos como el Cl y el nitro en anillos aromáticos, esto mejora la actividad biológica de los compuestos. El enlace carboxamida de todos los compuestos no presentan movilidad, lo que repercute en la facilidad de acomodo de los compuestos en el sitio activo.

Es importante resaltar que la presencia del metilo en posición 1 no reduce la actividad de los compuestos, como ocurre con la actividad antihelmíntica. Al contrario de esto, la actividad es mejor, por lo que es importante poder aislar el isómero responsable de la actividad.

7.2.3 Resultados de actividad contra *T. vaginalis*

Tabla 10. Resultados de actividad de distintas carboxamidas sintetizadas en el Lab-122

COMPUESTOS	Actividad biológica		COMPUESTOS	Actividad biológica	
	Cl ₅₀ (μM)	Cl ₅₀ (μM)		Cl ₅₀ (μM)	Cl ₅₀ (μM)
 <p>LGI-1</p>	0.151	6.62	 <p>CMC-12⁴²</p>	0.019	52.63
 <p>LGI-2</p>	0.162	6.17	 <p>CMC-19⁴²</p>	0.016	62.50

 <p>LGI-3</p>	0.114	8.77	 <p>CMC-20⁴²</p>	0.010	100.00
 <p>LGI-4</p>	0.131	7.63	 <p>2⁴²</p>	1.281	0.78
 <p>LGI-5</p>	0.111	9.01	 <p>4⁴²</p>	5.955	0.17
 <p>CMC-11⁴²</p>	0.012	83.33			

En la **Tabla 10** se puede observar que los compuestos de la serie LGI que presentan la mayor actividad sobre *T. vaginalis* son **LGI 3** y **5**. Sin embargo, esta actividad es mucho menor que la mostrada por **CMC-11**, **12**, **19** y **20**. En este caso observamos que la sustitución con grupos voluminosos como el cloro no generan compuestos con alta actividad biológica. Cabe resaltar que una vez más el compuesto con mayor potencia es el isómero [1,6].

Al comparar los compuestos sintetizados en este trabajo con **2** y **4**, podemos determinar que la incorporación de ciclos aromáticos genera compuestos con mejor actividad.

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron las 5 Carboxamidas propuestas: 5-Cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-1**), 5-Cloro-*N*-(3-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-2**), 5-Cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-3**), 5-Cloro-*N*-(2-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-4**) y 5-Cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-5**), haciendo reaccionar el cloruro del ácido 5-Cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6 carboxílico con la anilina correspondiente.

- Los compuestos finales se obtuvieron como polvos blancos purificados por lavados con cloroformo a los que se les pudieron determinar sus constantes físicas. En general se obtuvieron rendimientos mayores al 60%.
- La estructura de las 5 carboxamidas propuestas fue identificada mediante técnicas espectroscópicas (IR, RMN¹H) y espectrométricas (EM FAB⁺).
- Se evaluó la actividad biológica de las carboxamidas obtenidas **LGI 1-5** contra parásitos de importancia clínica; *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.
 - Para *E. histolytica* **LGI-3** y **5** presentan mejor actividad que los fármacos de referencia y una CI₅₀ similar a la obtenida con los compuestos **CMC** anteriormente sintetizados en el Lab 122.

- A grandes rasgos para *G. intestinalis* resistente y *G. intestinalis* sensible los compuestos sintetizados presentaron mejor actividad que Metronidazol, pero menor a Albendazol y Nitazoxanida.
 - Para *T. vaginalis* se obtuvo que los compuestos **LGI-3** y **5** presentan las mejores actividades, siendo más potentes que Albendazol y Metronidazol, y similares a la Nitazoxanida.
- De la serie **LGI** los compuestos disustituidos con cloro (**LGI-3** y **5**) fueron los que presentaron la mejor actividad biológica en *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.
- Los compuestos sintetizados en este trabajo servirán para establecer los requerimientos estructurales de los derivados bencimidazólicos y servirán para sentar las bases de futuras modificaciones para obtener mejores principios activos.
- Se obtuvo experiencia en química orgánica para obtener nuevos compuestos de interés farmacéutico, cuya relación estructura-actividad fue analizada poniendo en práctica el conocimiento y las herramientas adquiridas en química farmacéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tay, J.; Aguilera, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M. Parasitología Médica; 5a. ed. Méndez E: México1995. 1-15, 20-25, 32-40.
2. Ximénez-García, C. Parasitosis Intestinales en México. Cuadernos Funsalud. 2002; (36): [13-7, 54-9 pp.]. <http://www.ssa.gob.mx>
3. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf.
4. Boletín Epidemiológico 2009; 26: <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.
5. Boletín Epidemiológico 2003; 20: <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.
6. Guerrero-Hernández, M. T.; Hernández-Molinar, Y.; Rada-Espinosa, M. E.; Aranda-Gámez, A.; Hernández, M. I. Intestinal parasitosis and feces excretion alternatives in municipalities characterized by high marginality. Revista Cubana de Salud Pública. 2008: <http://www.scielosp.org>.
7. http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html
8. Boletín Epidemiológico 2011; 28: <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.
9. Kouznetsov, V.; Meléndez-Gómez, C. M. Búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios selectivos. MedUNAB. 2009; 12: 33-34.
10. Bogitsh, B. J; Carter, C. E.; Oeltmann, T. N. Human parasitology; Elsevier Academic Press: Boston, 2005, 61-9, 84-8, 93-5.

11. Conde-Bonfil M. C; Mora-Zerpa, C. *Entamoeba histolytica*: Un desafío vigente. Salud Pública de México, 1992; 34(3):335-41.
12. Gilles, H.M. Protozoal diseases; Arnold: United States of America, 1999. 548-570, 667-678.
13. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Amebiasis_il.htm.
14. Lujan, H. D. Giardia and Giardiasis. Medicina. 2006; 66(1): 70-4.
15. Vázquez-Tsuji, O.; Campos-Rivera T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. REDALYC. 2009; 8(31):75-90.
16. Alcaraz-Soriano, M.J. Giardia y Giardiosis. Control Calidad SEIMC, 1-9. <http://www.seimc.org/control/revisiones/parasitologia/Giardia.pdf>.
17. Méndez-Cuesta, C. A. Tesis de Maestría. Síntesis alterna de Nitazoxanida y evaluación proteómica de algunos antiprotozoarios contra *G. intestinalis*. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.; 2007.
18. <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>.
19. Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clinical microbiology reviews. 1998; 11(2):300-17.
20. Lewis D. Trichomoniasis. Medicine. 2010; 38(6): 291-3.
21. Granato, P. Vaginitis: Clinical and Laboratory Aspects for Diagnosis. Clinical Microbiology Newsletter 2010; 32(15):111-6.
22. <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Trichomoniasis.htm>.

23. Goodman, L.S.; Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics; 10th ed. McGraw-Hill: New York, 2001. 1017-23.
24. Aparicio, P.; Rodríguez, E.; Garate, T.; Molina, R.; Soto, A.; Alvar, J.; Terapéutica antiparasitaria. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003; 21(10):579-94.
25. Katzung, B. Farmacología básica y clínica; 10a. ed Manual Moderno: País, 2007. 877-99.
26. Harvey, R.; Champe, P. Pharmacology; Lippincott Williams &Wilkins: Philadelphia, 2009, 417-20.
27. Cook, G.C. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: Indications and efficacy. Parasitology Today. 1990; 6(4):133-6.
28. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; et al. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2002; 12(16):2221-4.
29. Katiyar, S.K.; Gordon, V. R.; McLaughlin, G.L.; Edlind, T. D.; Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994; 38(9):2086-90.
30. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; et al. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl) benzimidazole derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2001; 11(2):187-90.

31. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/default.htm>.
32. Karp, G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*; Mc Graw-Hill/Interamericana. 4ª: México, 2005, 363-8.
33. Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for parasitology*. 1988; 18(7):885-936.
34. Peter, K. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 2001; 31(4):336-45.
35. Robinson, M.W.; McFerran, N.; Trudgett, A.; Hoey, L.; Fairweather, I. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2004; 23(3):275-84.
36. Laclette, J.P.; Guerra, G.; Zetina, C. Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 1980; 92(2):417-23.
37. Sharma, S. Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research*. 1994; 25:103-72.
38. Ramanpreet, W.; Hedaitullah, M.; Syeda-Farha, N.; Khalid, I.; Lamba, H. Benzimidazole derivatives – an overview. *international journal of research in pharmacy and chemistry*. 2011; 1(3):565-74.
39. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; et al. Synthesis and antiparasitic activity of

- albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2003; 11(21):4615-22.
40. Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Hernández-Campos, A.; Castillo-Bocanegra, R. Eficacia fasciolicida del compuesto " alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Veterinaria México*. 1997; 28(4):297.
 41. Rivera, J.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Campos, A.; Moreno-Esparza, R.; Castillo-Bocanegra, R.; Navarrete-Vásquez, G.; et al. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 343(1–2):159-65.
 42. Méndez-Cuesta, Carlos Alberto. Tesis de Licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-Cloro-2-(metiltio)-N-(5-Nitro-1,3- Tiazolil-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Facultad de Química: UNAM; 2005.
 43. Townsend, L.B.; Wise, D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*. 1990; 6(4):107-12.
 44. Wright, J.B. The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chemical reviews*. 1951; 48(3):397-541.
 45. Preston, P.N. Synthesis, Reactions, and Spectroscopic properties of Benzimidazoles. *Chemical reviews*. 1974; 74(3):279-314.
 46. Boyd, R.N.; Morrison, R.T. *Química orgánica*; Addison-Wesley Iberoamericana: México 1976. 1167-76

47. Montalbetti, C.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005; 61(46):10827-52.
48. McMurry, J. *Química Orgánica*; 5ª. International Thomson Editores: México. 2001. 1090-1110
49. Beyer, H.; Mur, J.B.; Walter, W. *Manual de química orgánica*; Reverté: país1986. 899-902.
50. Bruice, P.Y.; Farfán, N. *Química orgánica*; Pearson Educación: México, 2008. 1040-2.
51. Cedillo, R.; Chávez, B.; González, A.; Tapia, A.; Yépez, L.; In vitro effect of Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* trophozoites; *Journal Eukaryot Microbiology*; 2002, 49(3): 201-208.
52. Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A.; Muñoz.; A rapid colorimetric assay with the tetrazolium SALT MTT and phenazine methasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*; *Archives of Medical Research*; 1992, 23: 59-61.
53. Islas-Fonseca, Yeni. Tesis de Licenciatura. Síntesis alterna de dos 1-metil-6 carboxamidas bencimidazolicas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química: UNAM; 2003.

54. López-Balbiaux, Nayeli. Tesis de Licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazolicos 1-metilados. Facultad de Química: UNAM, México; 2003.

55. Sandoval-Rivera, Eduardo. Tesis de Licenciatura. Síntesis de carboxamidas 1-metilbencimidazolicas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química: UNAM; 2003.

APÉNDICE A

En esta parte se describen la instrumentación, cromatografía, reactivos y disolventes, así como los procedimientos generales de síntesis del intermediario **10** y las carboxamidas bencimidazólicas finales **LGI 1-5**. Todas las reacciones se llevaron a cabo dentro de una campana bien ventilada.

A.1 Instrumentación

- ✓ El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria SCIENTECH SL600, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.

- ✓ Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo RCT básica con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy.

- ✓ La hidrogenación catalítica se realizó en un aparato de hidrogenación Parr Modelo 3916 EG a 60 lb/in² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Ni-Raney (al 10 %) de la casa Aldrich; para esto, la botella de hidrogenación conteniendo la sustancia por reducir, el catalizador y el disolvente se purgó tres veces con 30 lb/in² de hidrógeno y succión y después se sometió a la hidrogenación a 60 lb/in² hasta que no se consumió más hidrógeno.

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

- ✓ La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi Modelo R-215 con condensador vertical de dedo frío y baño B-491. El condensador se llenó con líquido refrigerante de automóvil y se enfrió con un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30. Para disminuir la presión del sistema (hasta 1 mmHg) se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo CVC2.PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2.

- ✓ Los espectros de masas por bombardeo rápido de átomos (FAB) se determinaron por introducción directa en un espectrómetro de Masas marca LECO modelo Pegasus 4D, con analizador másico TOF (Tiempo de Vuelo). La simbología utilizada es M^+ = ion molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.

- ✓ Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400. La frecuencia de las señales se reportan en cm^{-1} .

- ✓ Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($\text{RMN } ^1\text{H}$) se obtuvieron en un espectrómetro Varian 400 S4 ASC (400 MHz), espectrómetro Oxford NMR (300 MHz) y en un espectrómetro Oxford NMR (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me_4Si , $\delta=0$) en DMSO-d_6 y los valores de J en Hz. La simbología empleada es: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, c = señal cuádruple, m = señal múltiple, sd = señal simple dobleteada, sa = señal amplia, dd = señal doble de dobles.

A2 Cromatografía

- ✓ El progreso de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se determinó por cromatografía en placa fina (ccf) empleando cromatoplasmas de la casa Merck recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a vapores de yodo.

Los sistemas cromatográficos empleados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo-Metanol	95:5
II	Cloroformo-Metanol	80:20

A3 Reactivos y disolventes

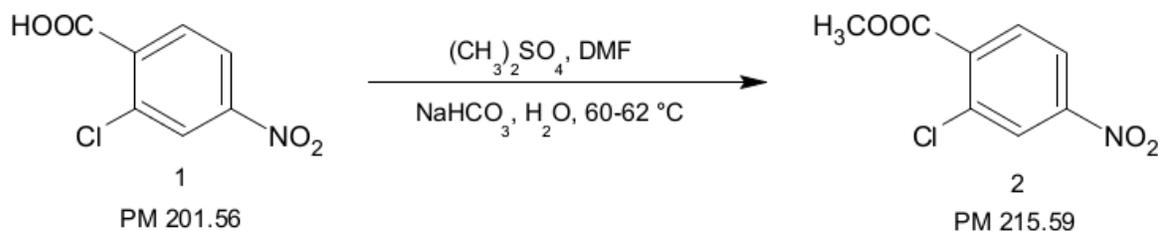
El ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**), materia prima inicial, se adquirió de la casa Sigma-Aldrich y se utilizó como tal sin ninguna purificación. De la misma casa se adquirió el catalizador Ni-Raney suspendido en agua alcalina.

Los disolventes empleados en las reacciones fueron del grado RA y QP.

A4 Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

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

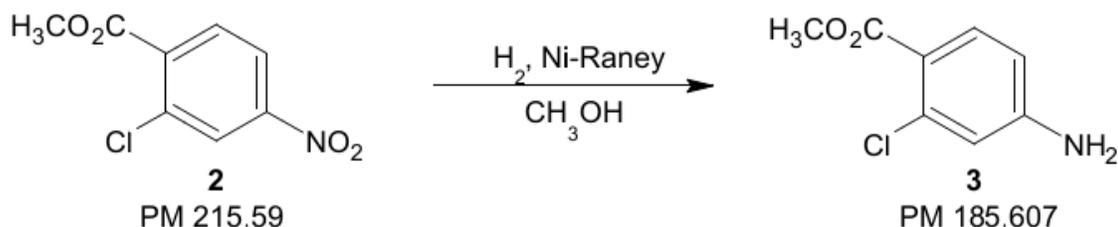
Esterificación



En un matraz de 1 L con 2 bocas, provisto de termómetro y columna Vigreux, se disolvieron 100 g (0.4961 mol) del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (1) en 250 mL de DMF a 50 °C. Posteriormente se adicionaron 83.4 g (2 equivalentes, 0.9924 mol) de NaHCO₃ en suspensión acuosa; se verificó que el pH estuviera en 7 y se agregaron, gota a gota, 70.2 mL (1.5 equivalentes, 0.7441 mol) de sulfato de dimetilo, a una temperatura de 60–62 °C. Terminada la adición, se dejó reaccionando por 20 minutos. Después de este tiempo, la ccf indicó el consumo total de **1**. La mezcla de reacción, a temperatura ambiente, se vertió en agua, se filtró al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire. El producto crudo pesó 100.4 g (93.87%). Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de etanol y dio cristales amarillo claro con *R_f* (0.64, Sistema I) y pf 76.1-76.6. °C, semejantes a los reportados.⁴²

4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)

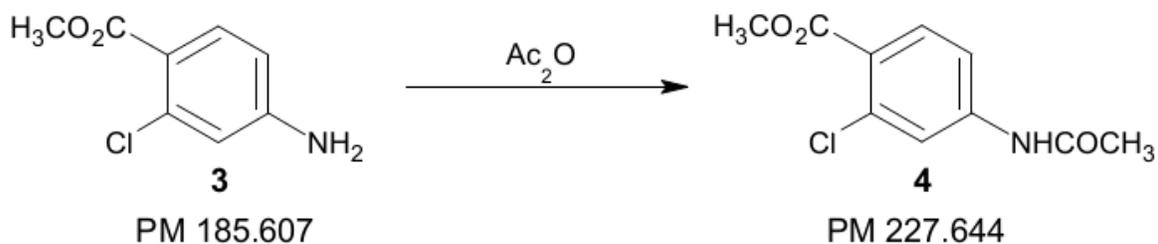
Hidrogenación catalítica



En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 30 g (0.1392 mol) de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**) y 9 g (30%) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH, en 230 mL de MeOH. El frasco se colocó en el hidrogenador y se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de hidrógeno; después, el frasco se cargó con hidrógeno hasta una presión de 60 lb/in². La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 4 horas, consumiéndose 647 lb/in² de hidrógeno. La suspensión translúcida, incolora, se filtró con vacío a través de un embudo Büchner con celita, la cual se lavó varias veces con metanol. En todo el proceso de filtrado y lavado no se dejó secar el catalizador para evitar que se inflamara. El filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador dando 25.10 g (99.8%) de un sólido blanco con R_f 0.55 (Sistema I), el cual se empleó como tal en la siguiente reacción. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de agua y dio cristales blancos con pf de 109.2-109.8, semejante al reportado.⁴²

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

Acetilación

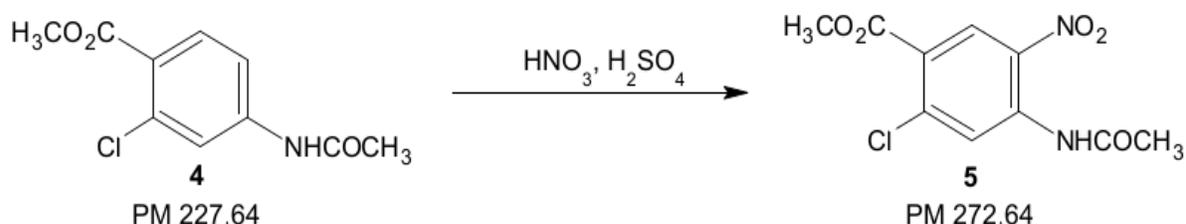


En un vaso de precipitados de 250 mL, provisto de termómetro, varilla de agitación de teflón y baño de agua con hielo, se colocaron 25.089 g (0.1352 mol) de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**) y se le adicionaron 90 mL de anhídrido acético con agitación vigorosa, sin que la temperatura rebasara los 40 °C; luego, se dejó reaccionar por 20 minutos. Después de este tiempo, la ccf reveló el consumo total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en 300 mL de agua helada. El sólido blanco que precipitó se separó por filtración con

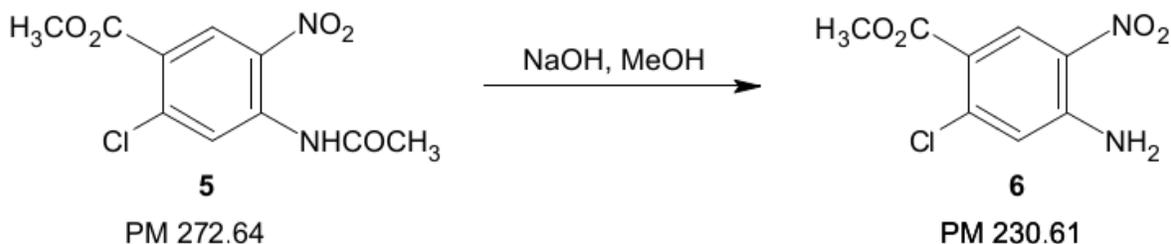
vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 30.12 g (97.89%) de un sólido blanco. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de tolueno y dio un sólido con R_f (0.38, Sistema I) y pf 115.2-115.8 °C, semejantes a los reportados.⁴²

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

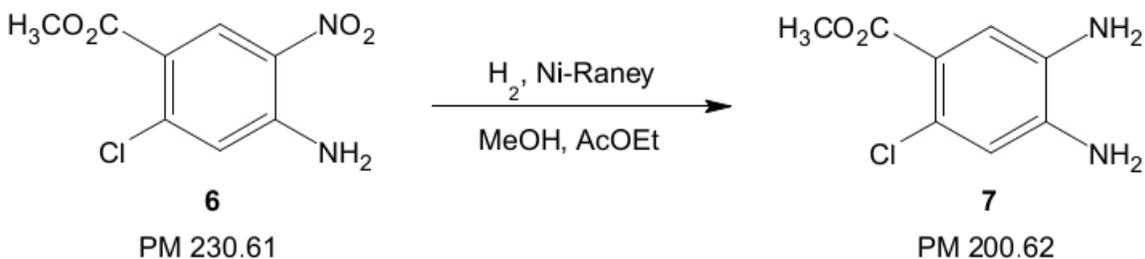
Nitración con ácido nítrico/ácido sulfúrico



En un vaso de precipitados de 250 mL, acondicionado con termómetro, embudo de adición y sumergido en un baño de hielo con sal, se disolvieron 30 g (0.1318 mol) del 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**) en 60 mL de H_2SO_4 concentrado, a una temperatura entre 0 y 3 °C. Una vez disuelto el sustrato, se le adicionaron poco a poco 20 mL de ácido nítrico concentrado. La adición del HNO_3 se hizo de tal manera que la temperatura no rebasara los 3-5 °C (aproximadamente 2 h). Después de este tiempo, la ccf indicó el consumo total de **4** y la formación de dos productos en la relación 8:2, por lo que la mezcla se vertió sobre 200 g de hielo. El sólido que precipitó se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 32.7 g (91.12%) de un sólido amarillo claro, el producto secundario se eliminó mediante maceración con MeOH. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de AcOEt y dio cristales amarillo brillantes con R_f (0.72, Sistema I) y pf 139.1-139.8 °C, semejantes a los reportados.⁴²

4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)*Hidrólisis*

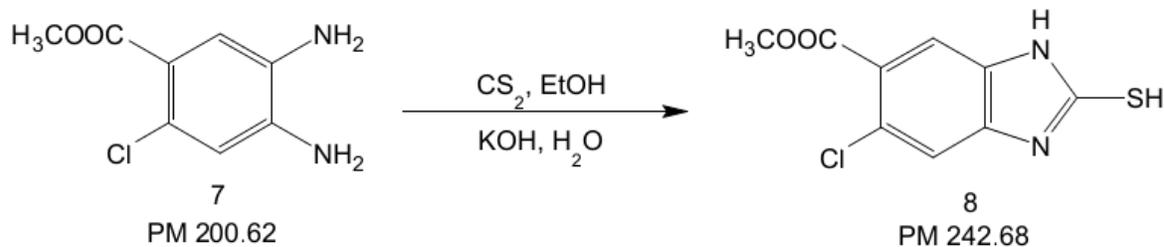
En un vaso de precipitados de 1 L, adaptado con termómetro y agitación magnética, se suspendieron 20.77 g (0.0762 mol) de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**) en 200 mL de MeOH. Después, la mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente y con agitación constante se le incorporaron 3.05 g (1 equivalente) de NaOH en agua (1:1). La temperatura no cambió durante la adición, pero sí el color que se oscureció. Después de 20 minutos se comprobó por ccf el consumo total de la materia prima, por lo que la suspensión enfriada en baño de hielo se filtró con succión y se lavó con metanol frío repetidas veces y se dejó secar al aire. De esta forma se obtuvieron 15.93 g (90.68 %) de un sólido color amarillo limón. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de grandes volúmenes de etanol y dio un sólido con R_f (0.64, Sistema I) y pf 221.3-222.2°C, semejantes a los reportados.⁴²

4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (7)*Reducción catalítica*

En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 15 g (0.0650 mol) de 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) en una mezcla de MeOH/AcOEt (150 mL/100 mL) y 4.5 g (30%) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado 4 veces con agua y una vez con MeOH. Una vez instalada la botella en el sistema de hidrogenación, se le colocó una camisa de calentamiento, la cual solo se usó para conservar el calor de la reacción. El aire del matraz se eliminó con 3 purgas de aproximadamente 30 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 2 ½ horas, consumiéndose 273 lb/in² de hidrógeno. La ccf reveló el consumo total de la materia prima. La suspensión translúcida, incolora, se filtró con vacío a través de un embudo Büchner con celita, la cual se lavó varias veces con metanol. En todo el proceso de filtrado y lavado no se dejó secar el catalizador para evitar que se inflamara. El filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador dando 13 g (99.69%) de un sólido café (morado) con R_f 0.23 (Sistema I), el cual se empleó como tal en la siguiente reacción.

5-Cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**8**)

Ciclocondensación

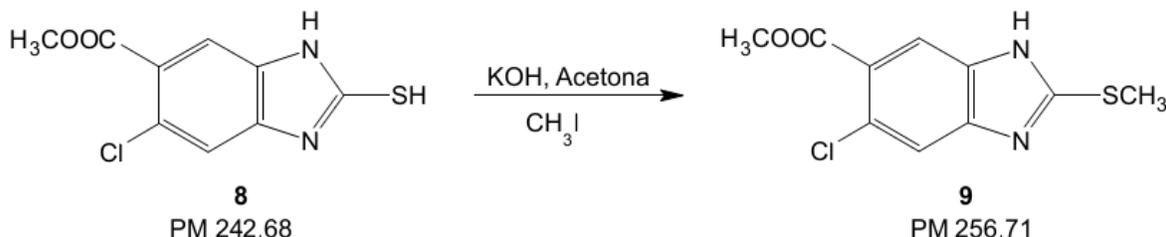


En un matraz de 500 mL con tres bocas, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 38.95 g (0.1941 mol) de 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**) en 400 mL de etanol a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 21.74 g (2 eq, 0.3883 mol) de KOH disueltos en 73 mL de agua y 23.3 mL (2 eq, 0.3883 mol) de disulfuro de carbono. Terminada la adición, la mezcla se calentó a 60-65 °C por tres horas, después de las cuales la ccf indicó el consumo total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción fría se vertió en 1300 mL de agua,

se agitó y llevó a pH 5 por adición de ácido acético al 20%. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces y se dejó secar al aire. El producto crudo, un sólido color crema, pesó 44.21 g (93.85%). Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de etanol con 10% de DMF. El producto purificado color blanco presentó una mancha con R_f 0.58 (Sistema II) y pf 250.5-251.7 °C, semejante al reportado.⁴²

6-Cloro-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (9)

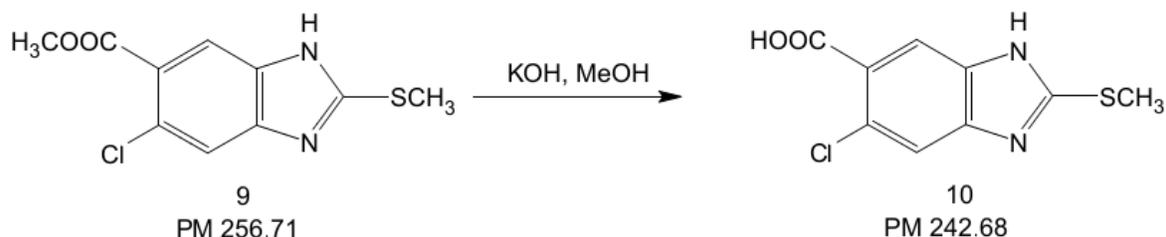
S-Metilación



En un matraz bola de 250 mL, provisto de termómetro, embudo de adición atmósfera de nitrógeno y sumergido en un baño de agua helada, se disolvieron 8.57 g (0.0353 mol) del compuesto 8 en 86 mL de acetona. Después se adicionó una solución de 2.376 g (1.2 Eq, 0.0424 mol) de KOH en agua (1:1). Posteriormente se gotearon 2.42 mL (1.1 Eq, 0.0388 mol) de CH₃I a 0-5 °C. La mezcla se agitó durante 3 h. Una ccf indicó entonces el consumo total de la materia prima. Después, la mezcla se vertió sobre en 300 mL de agua fría y se neutralizó con HCl 20%. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire. El producto crudo obtenido fue un sólido café claro que pesó 8.22 g (90.67%). Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de etanol obteniéndose cristales blancos con R_f 0.65 (Sistema II) y pf 91.7-92.8 °C, semejante al reportado.⁴²

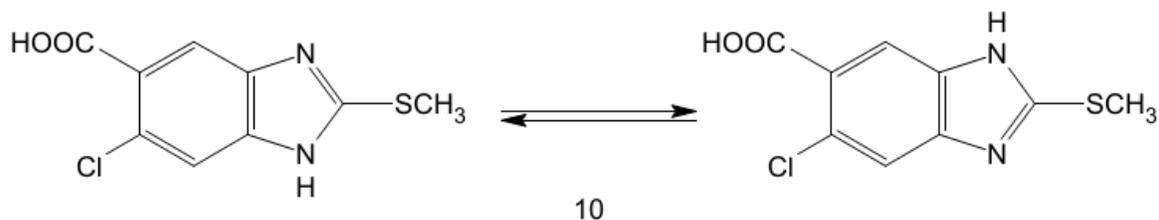
Ácido 6-cloro-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (10)

Hidrólisis



En un matraz bola de 100 mL con 2 bocas, acondicionado con termómetro y condensador en posición de reflujo, se suspendieron 14.4 g (0.056 mol) de **9** en 59 mL de MeOH. A temperatura ambiente se adicionaron 7.22 g (0.1121 mol, 2 eqs) de KOH en solución acuosa (1:1) y se formó una solución, la cual se calentó a 60-65 °C durante 3.5 h. Después de consumida toda la materia prima, la reacción se vertió en 400 mL de agua y se aciduló con H₂SO₄ al 20 % a pH de 4. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire, dando 12.37 g (90.87 %) de un sólido color crema que analizado por ccf presentó una mancha (*R_f* 0.08, Sistema II). Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de etanol dando un sólido blanco con pf 221-221.9 °C, semejante al reportado.⁴²

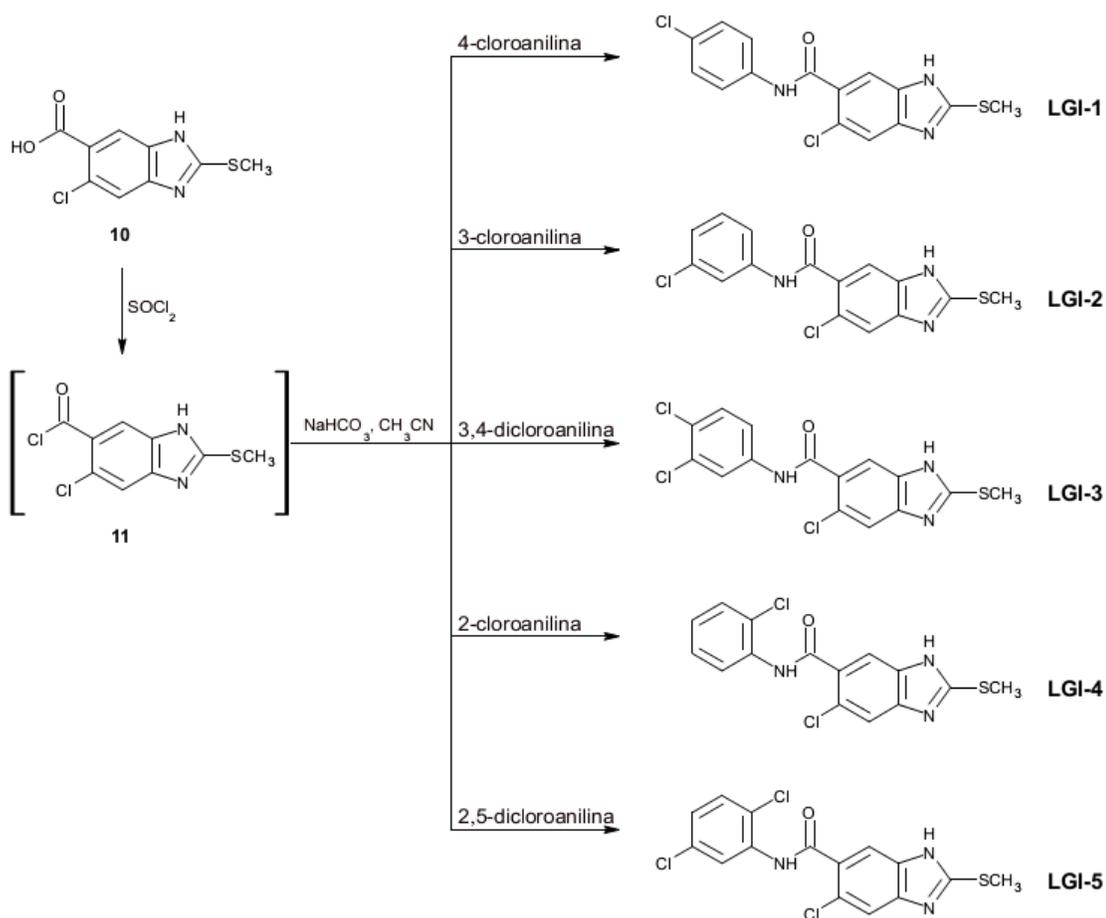
En esta última parte de la secuencia sintética, los compuestos **8**, **9** y **10** son en realidad un par de tautómeros cada uno. Así, para el compuesto **10** se tendría el par:



Para los fines prácticos en esta tesis se hace referencia al tautómero **1H-5Cl**.

Procedimiento general para la preparación de las 5-Cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-6-carboxamidas *N*-sustituidas (LGI-1-LGI-5)

(a) Formación del cloruro de ácido (11)

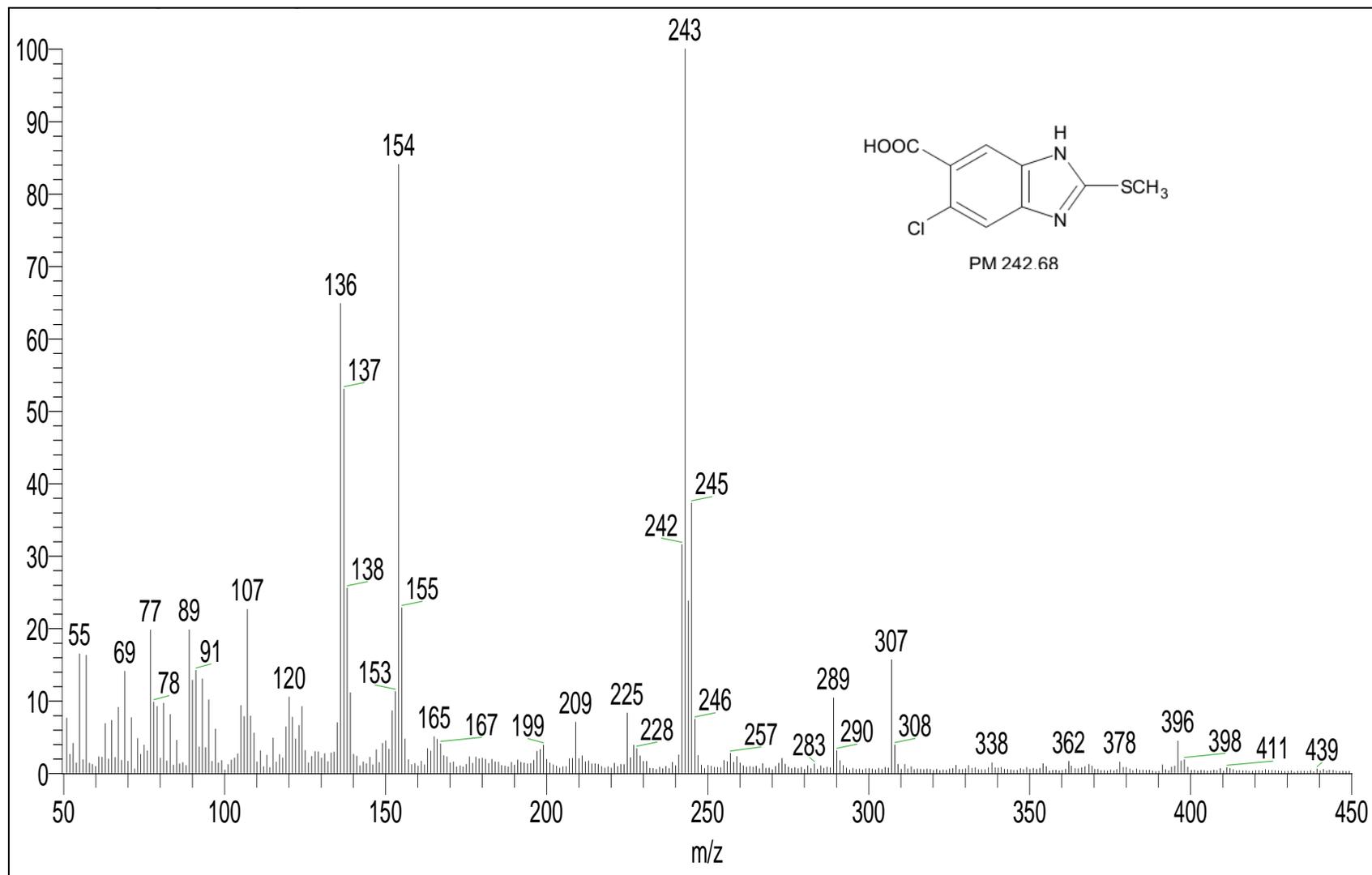


En un matraz bola de 100 mL con 2 bocas, provisto de termómetro, un condensador en posición de reflujo adicionado con trampas de NaOH y sumergido en un baño de aceite, se mezclaron 2 g (0.008 mol) del compuesto **10** seco y 6 mL de SOCl_2 (10 equivalentes, 0.082 mol). Posteriormente se calentó a 50-60 °C y se mantuvo en agitación por 3 horas. Una ccf reveló la ausencia de materia prima, lo que indicó que se había formado el cloruro de ácido. El exceso de SOCl_2 se eliminó por arraste con benceno (3 x 30 mL). Después, la mezcla seca se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

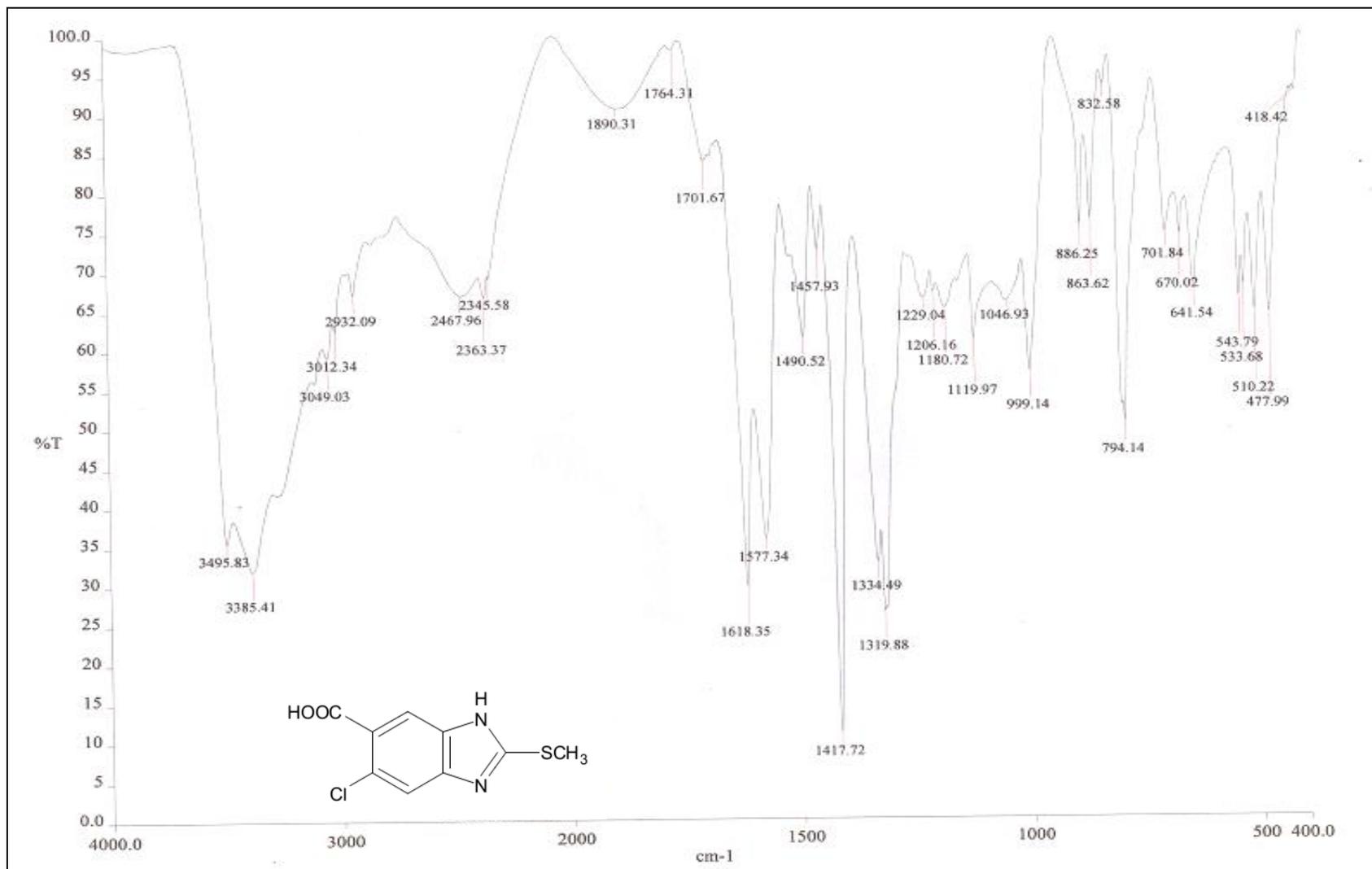
(b) Sustitución (formación de las amidas)

El matraz con el cloruro de ácido, acondicionado con un refrigerante en posición de reflujo y trampa de humedad, se le agregaron 30 mL de acetonitrilo, 0.7 g (1.3 eq, 0.011 mol) de NaHCO_3 y 0.8 equivalentes de la anilina correspondiente. La mezcla se dejó en agitación 12 h a temperatura ambiente, después, la ccf confirmó la ausencia de materia prima, por lo que se destiló el disolvente en el rotaevaporador. El residuo, un sólido amarillo, se suspendió en agua, se separó por filtración con vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire. El sólido crudo obtenido se disolvió en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80:20 y se pasó a través de una columna empacada con 15 g de alúmina básica en CHCl_3 , la cual se lavó con el mismo disolvente. El producto purificado, un sólido blanco, se obtuvo por evaporación del disolvente en el rotaevaporador. En la siguiente tabla se muestran las anilinas utilizadas, rendimiento y constantes físicas de las carboxamidas sintetizadas.

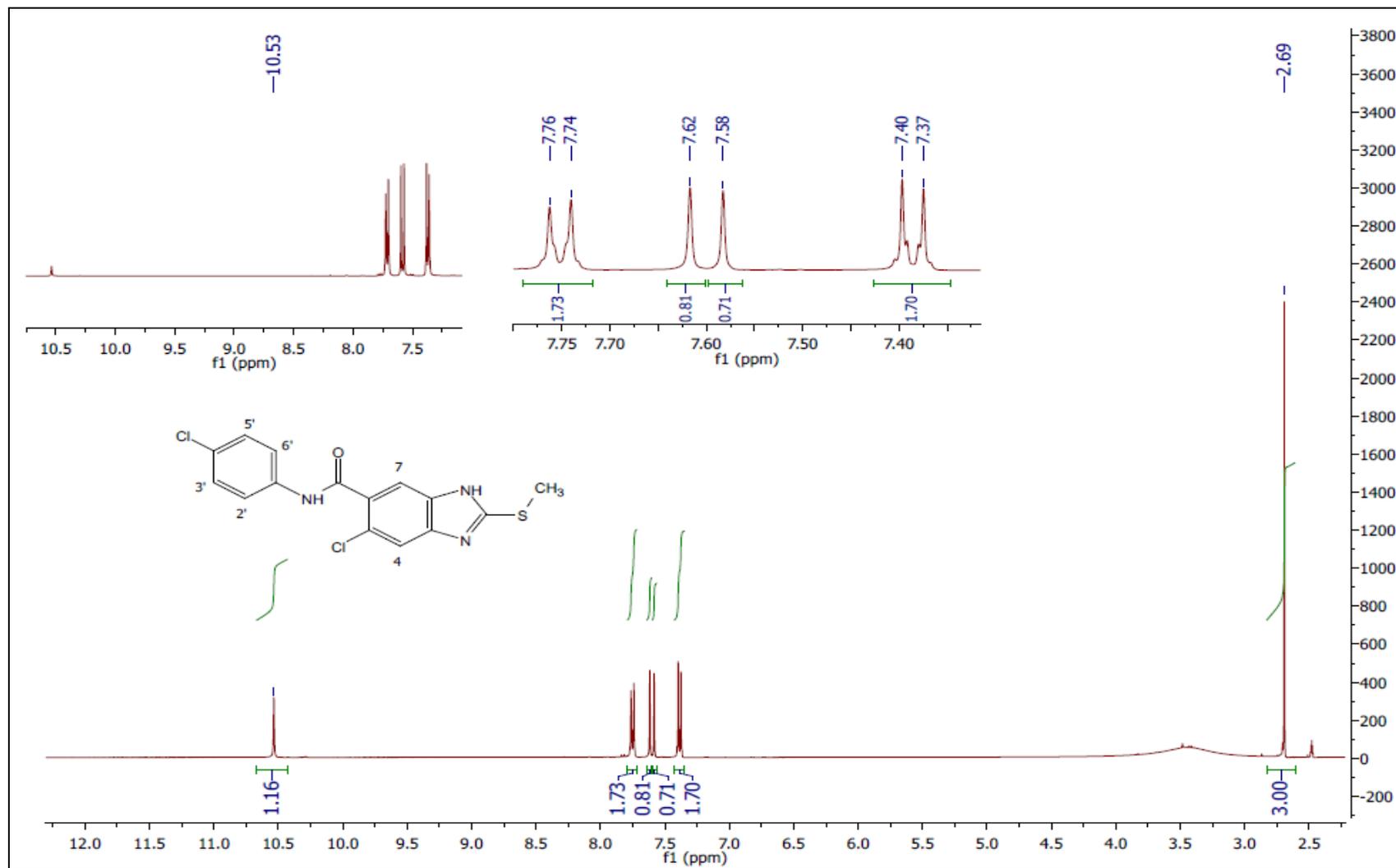
Anilina	Producto	R_f (Sistema I)	Pf (°C)	Rendimiento (%)
4-Cloroanilina	LGI-1	0.14	260-261	76.13
3-Cloroanilina	LGI-2	0.12	229-230	79.57
3,4-Dicloroanilina	LGI-3	0.12	249-250	73.74
2-Cloroanilina	LGI-4	0.12	217-218	67.17
2,5-Dicloroanilina	LGI-5	0.16	217-218	69.03



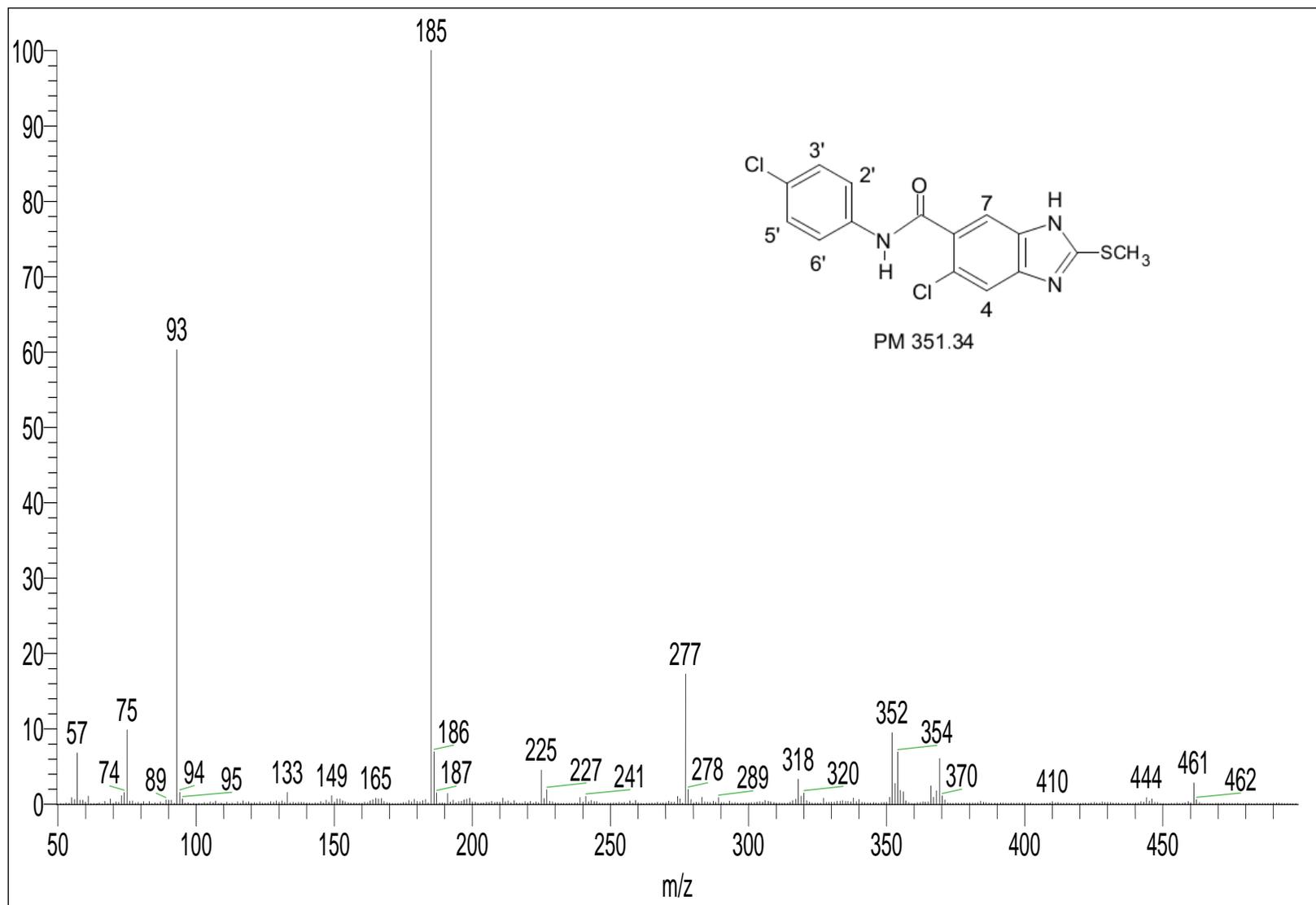
Espectro 1. EMFAB de Ácido 5-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**10**).



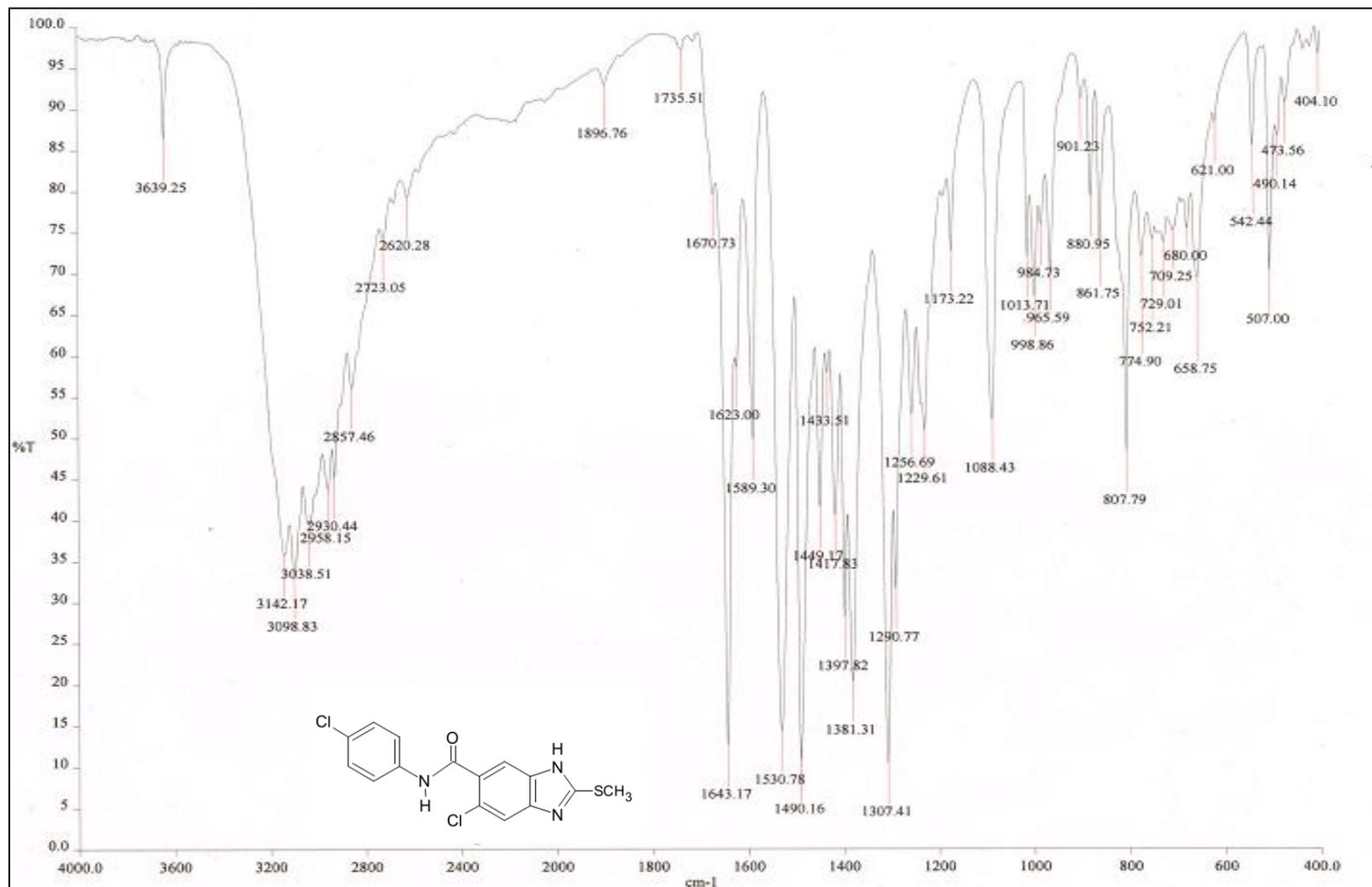
Espectro 2. IR de Ácido 5-cloro-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (10).



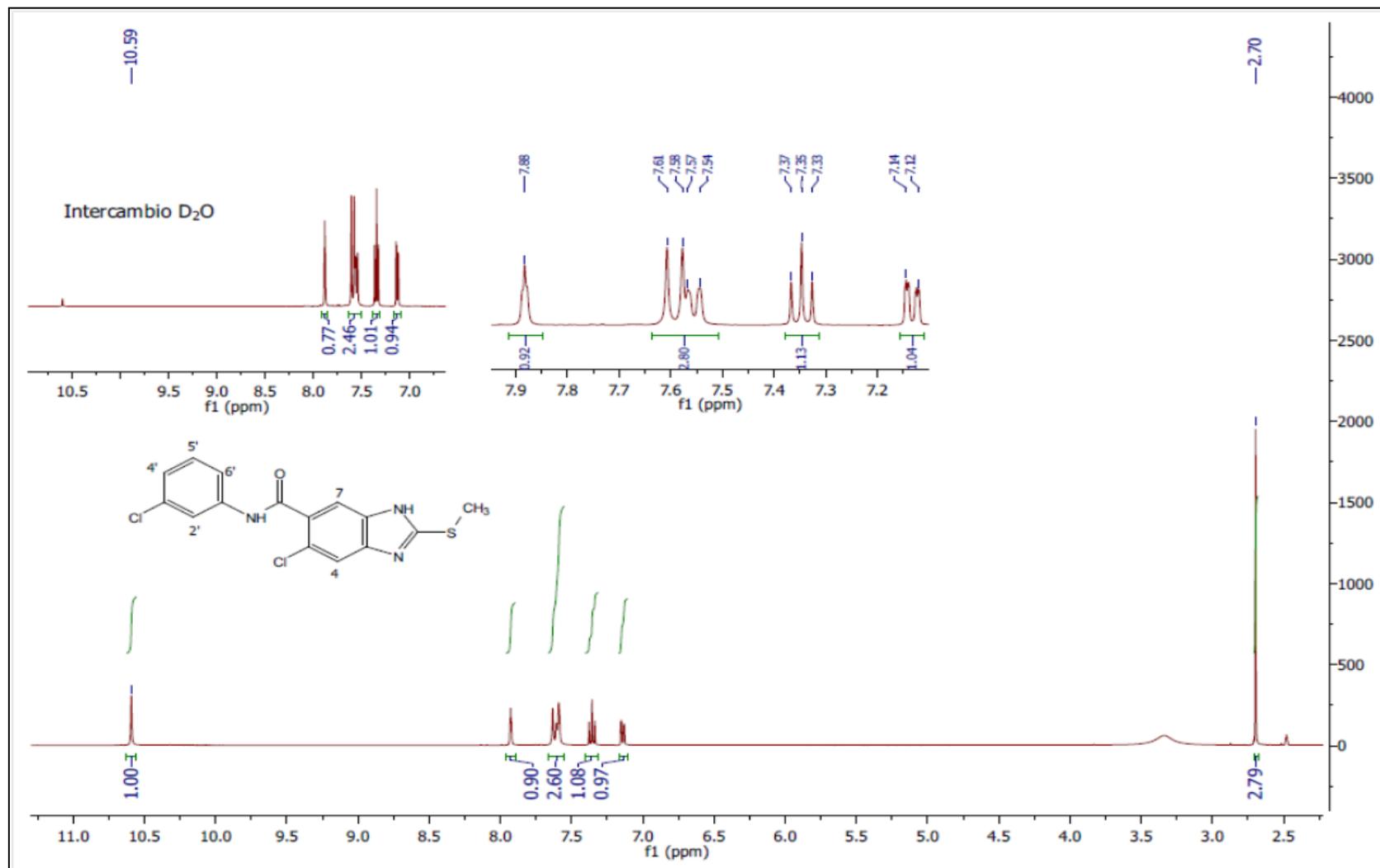
Espectro 3. RMN- ^1H de Ácido 5-cloro-2-(metilto)-1H-bencimidazol-6-carboxílico (10)



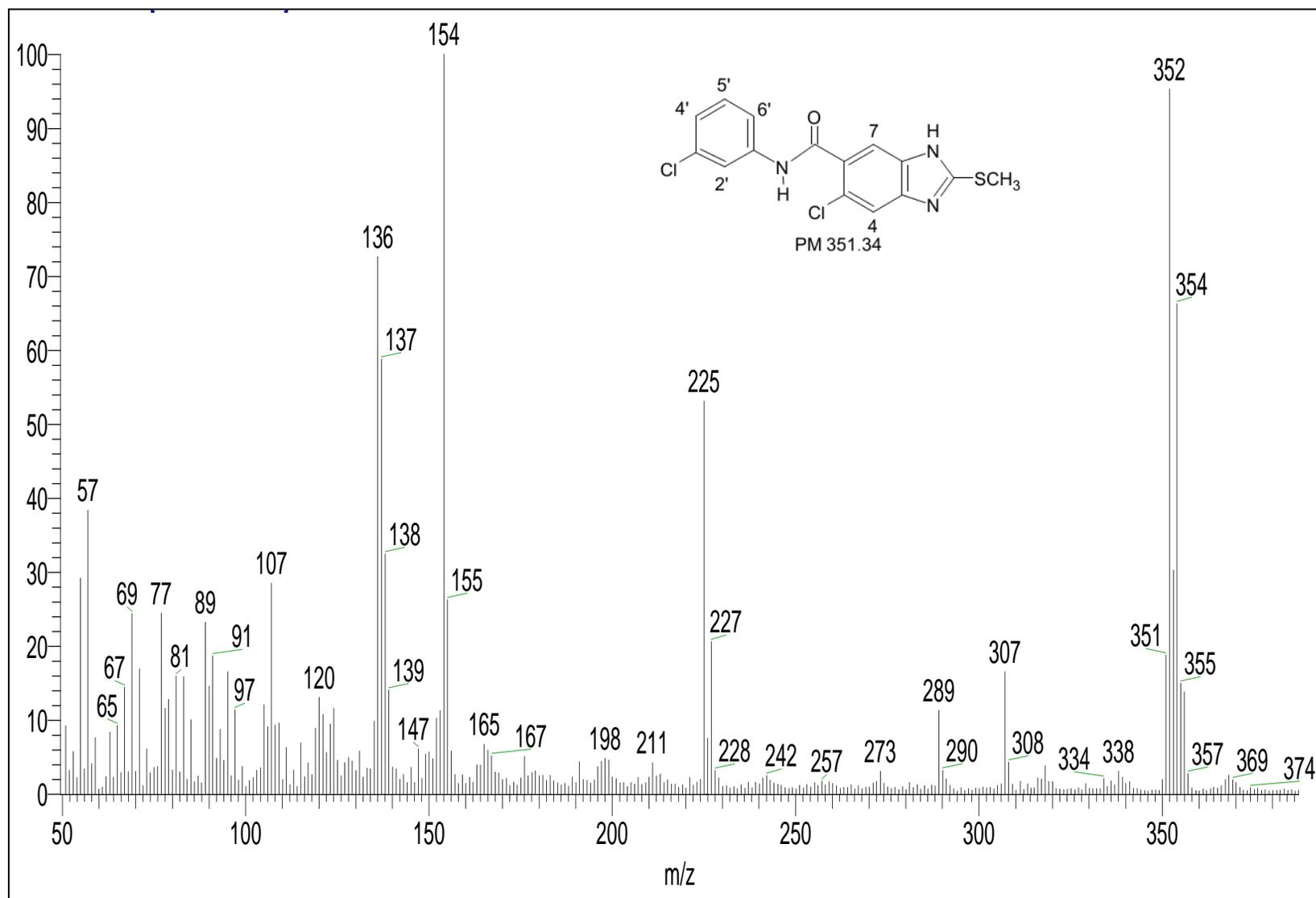
Espectro 4. EMFAB de 5-Cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-1**).



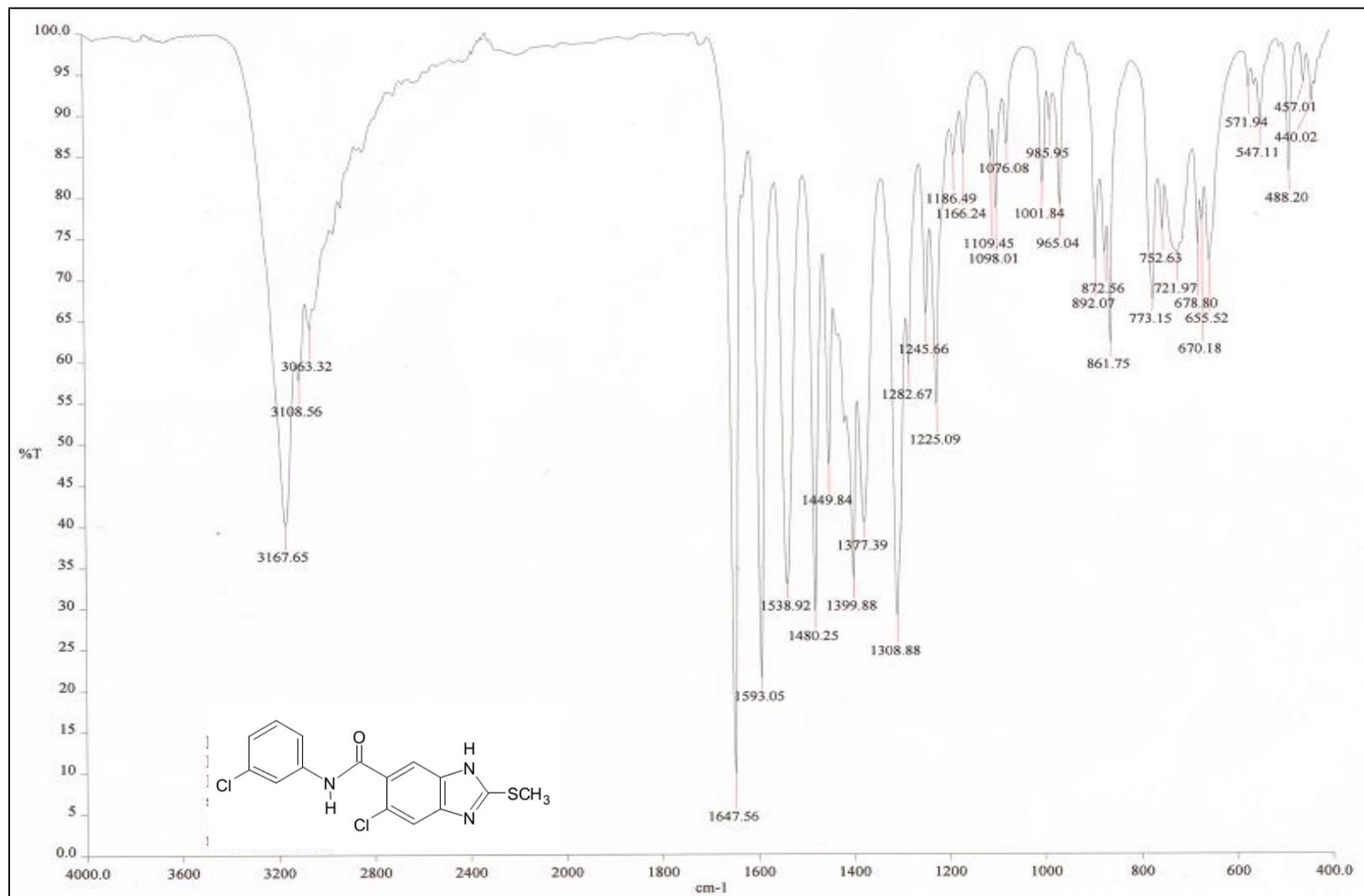
Espectro 5. FTIR 6-Cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltilio)-1*H*-bencimidazol-5carboxamida (LGI-1).



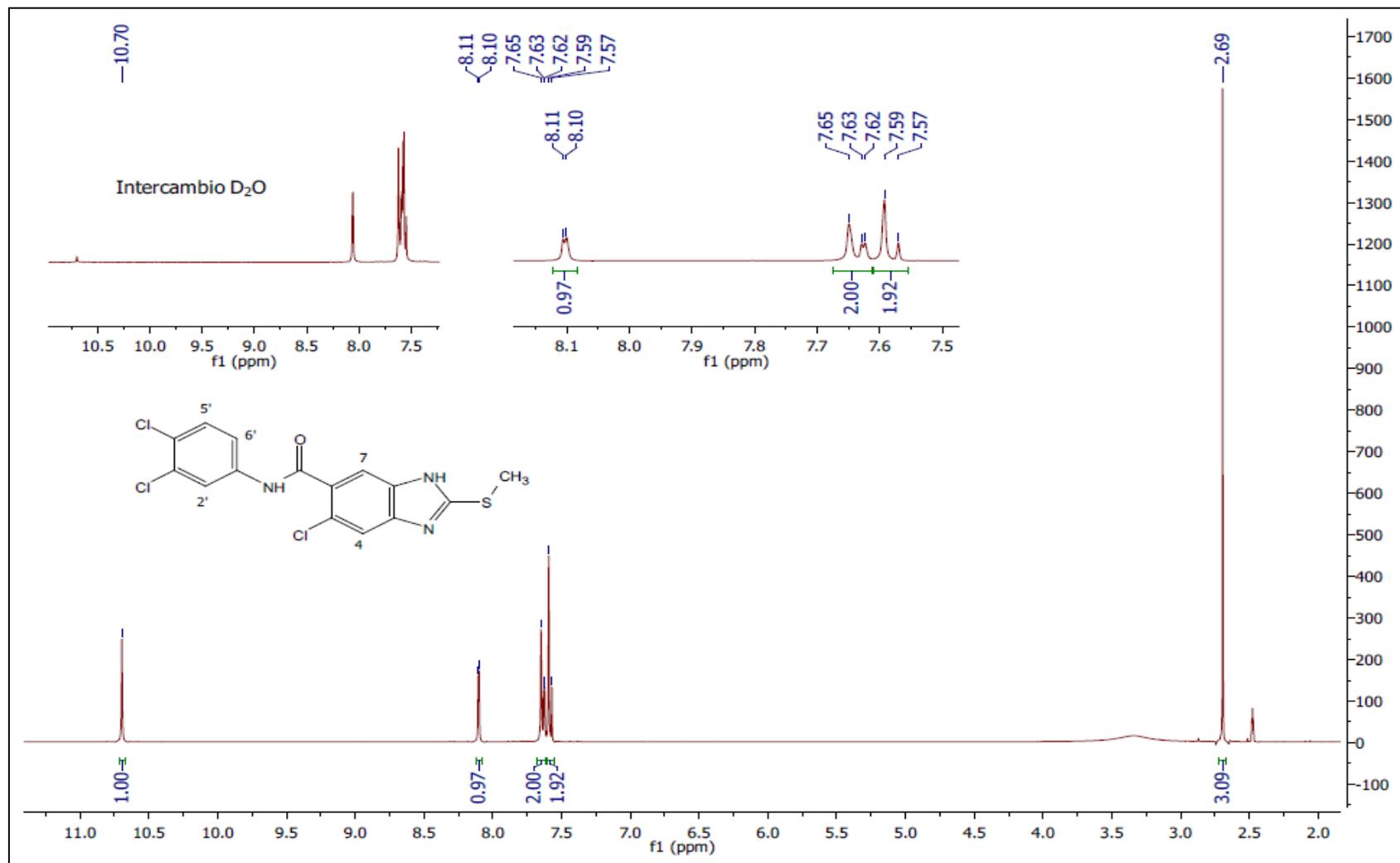
Espectro 6. RMN-¹H de 5-Cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-1**).



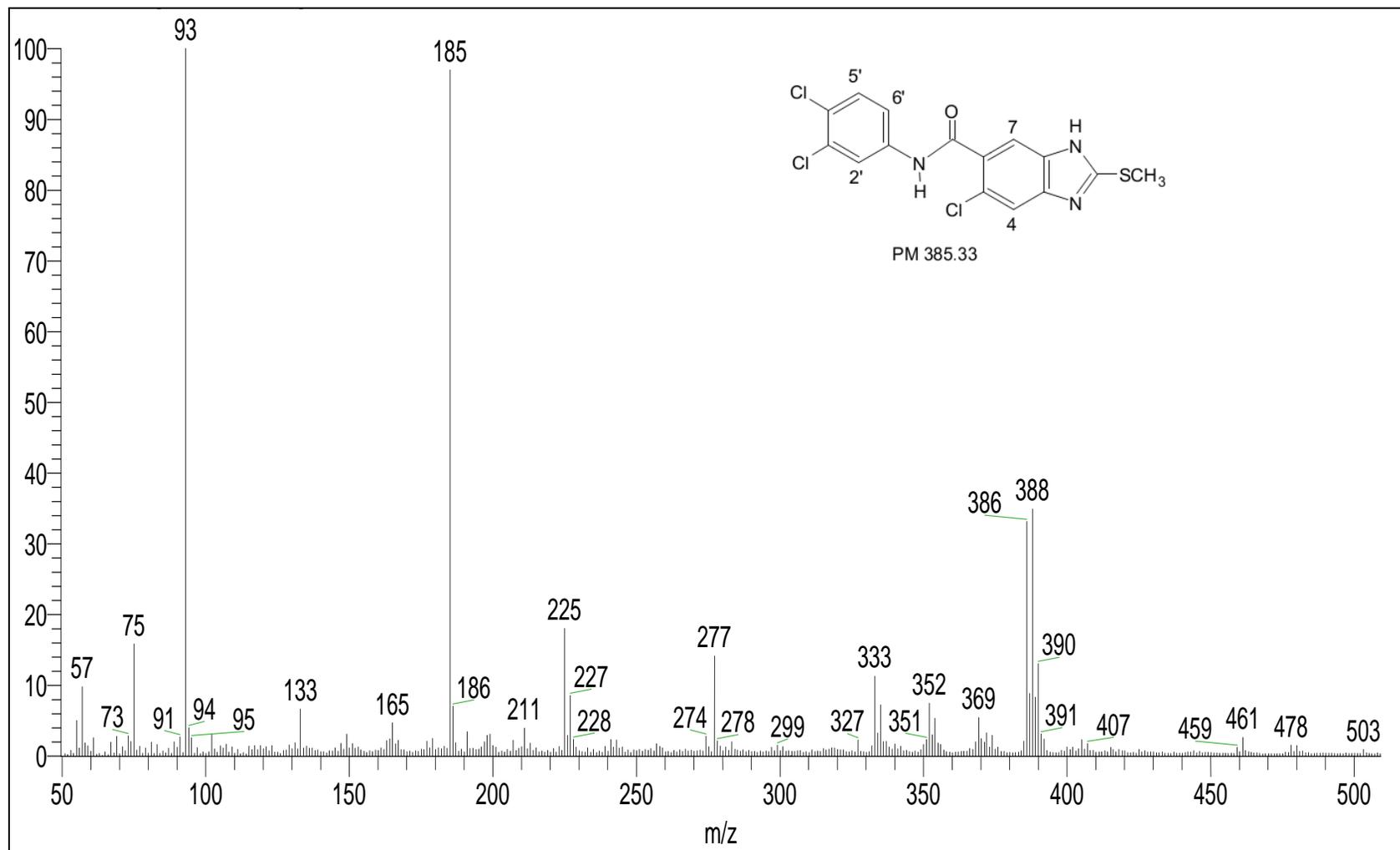
Espectro 7. EMFAB de 5-Cloro-N-(3-clorofenil)-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-6-carboxamida (**LGI-2**).



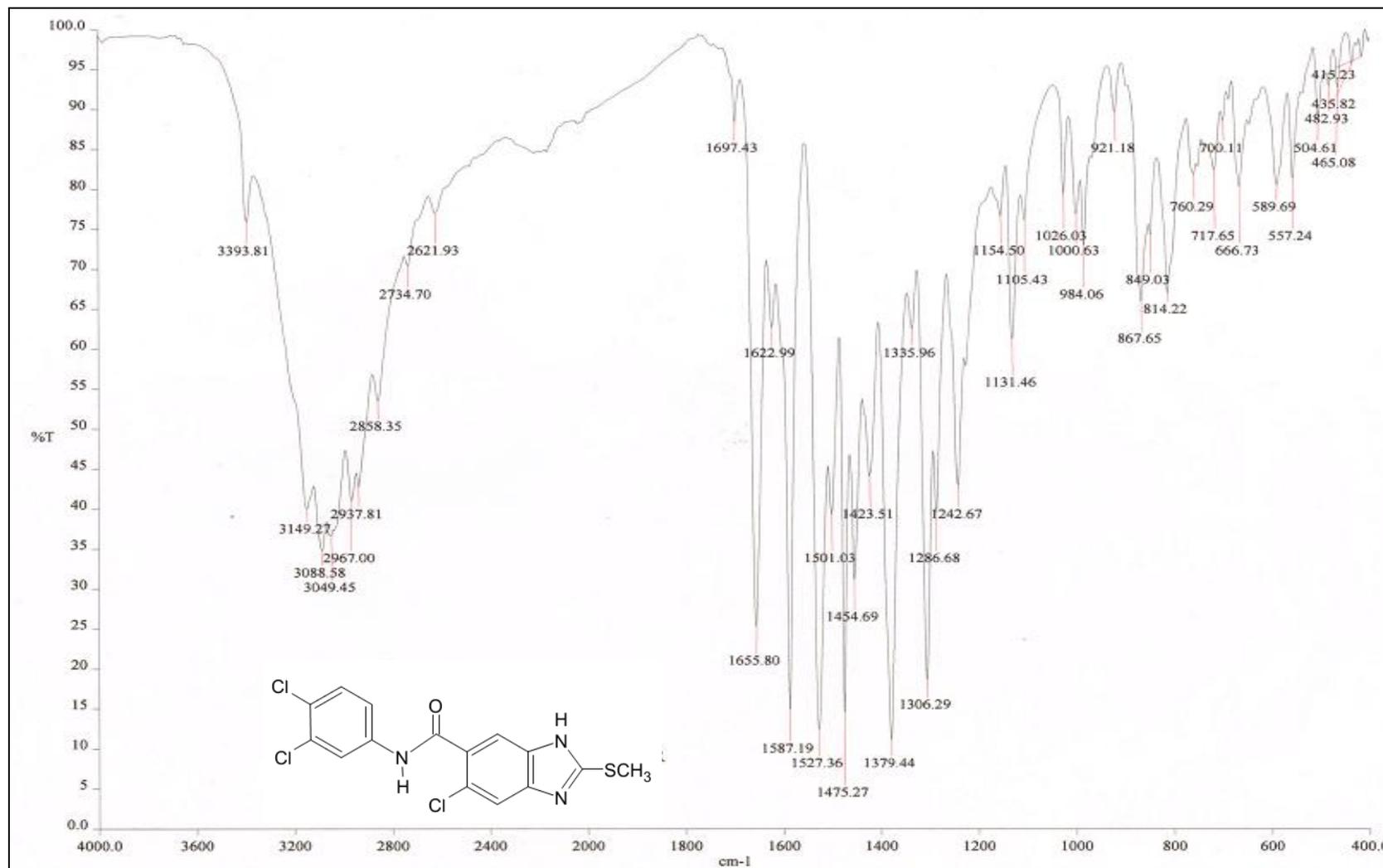
Espectro 8. FTIR de 5-Cloro-*N*-(3-clorofenil)-2-(metilto)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-2**).



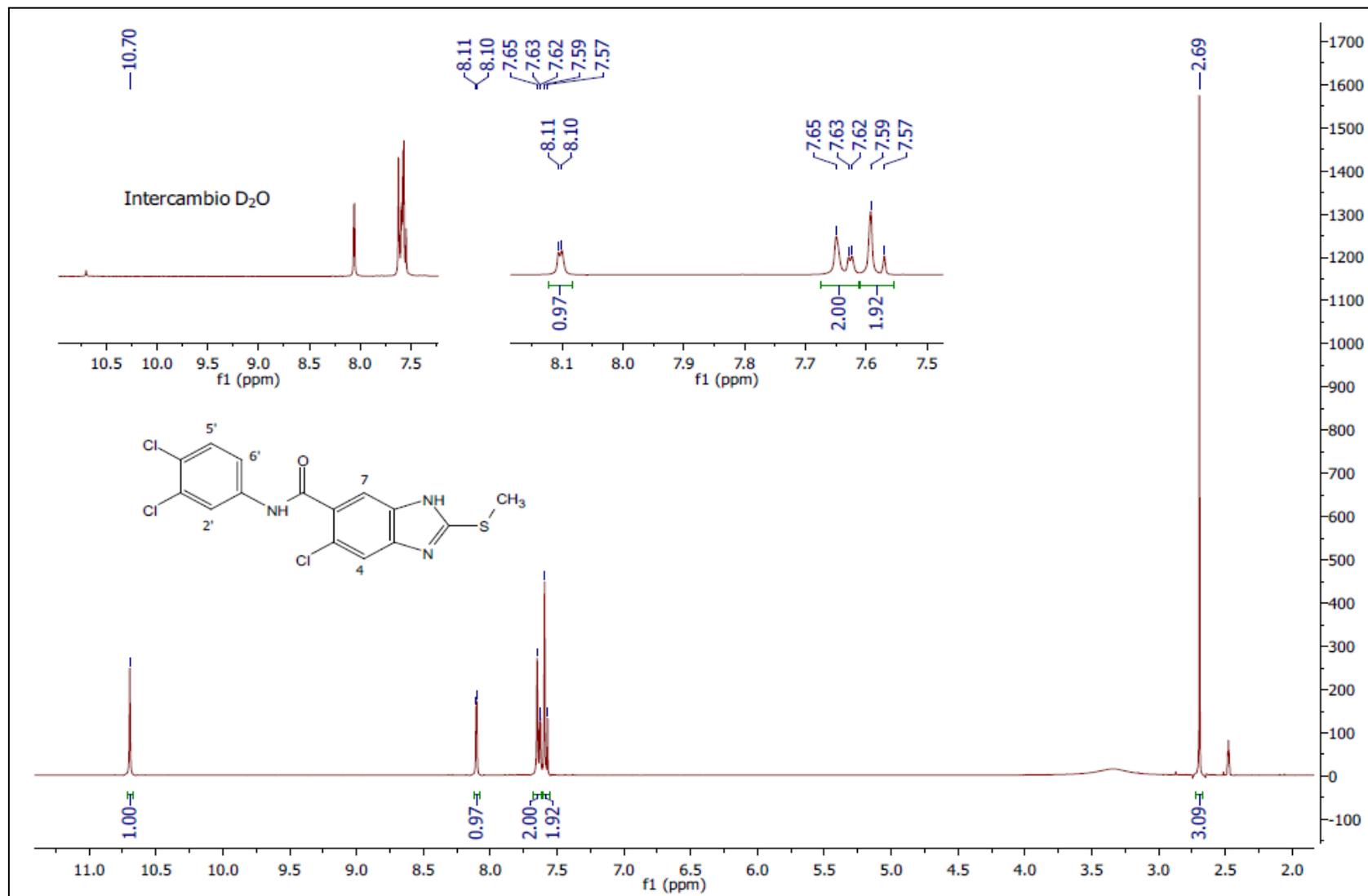
Espectro 9. RMN- ^1H de 5-Cloro-*N*-(3-clorofenil)-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LGI-2).



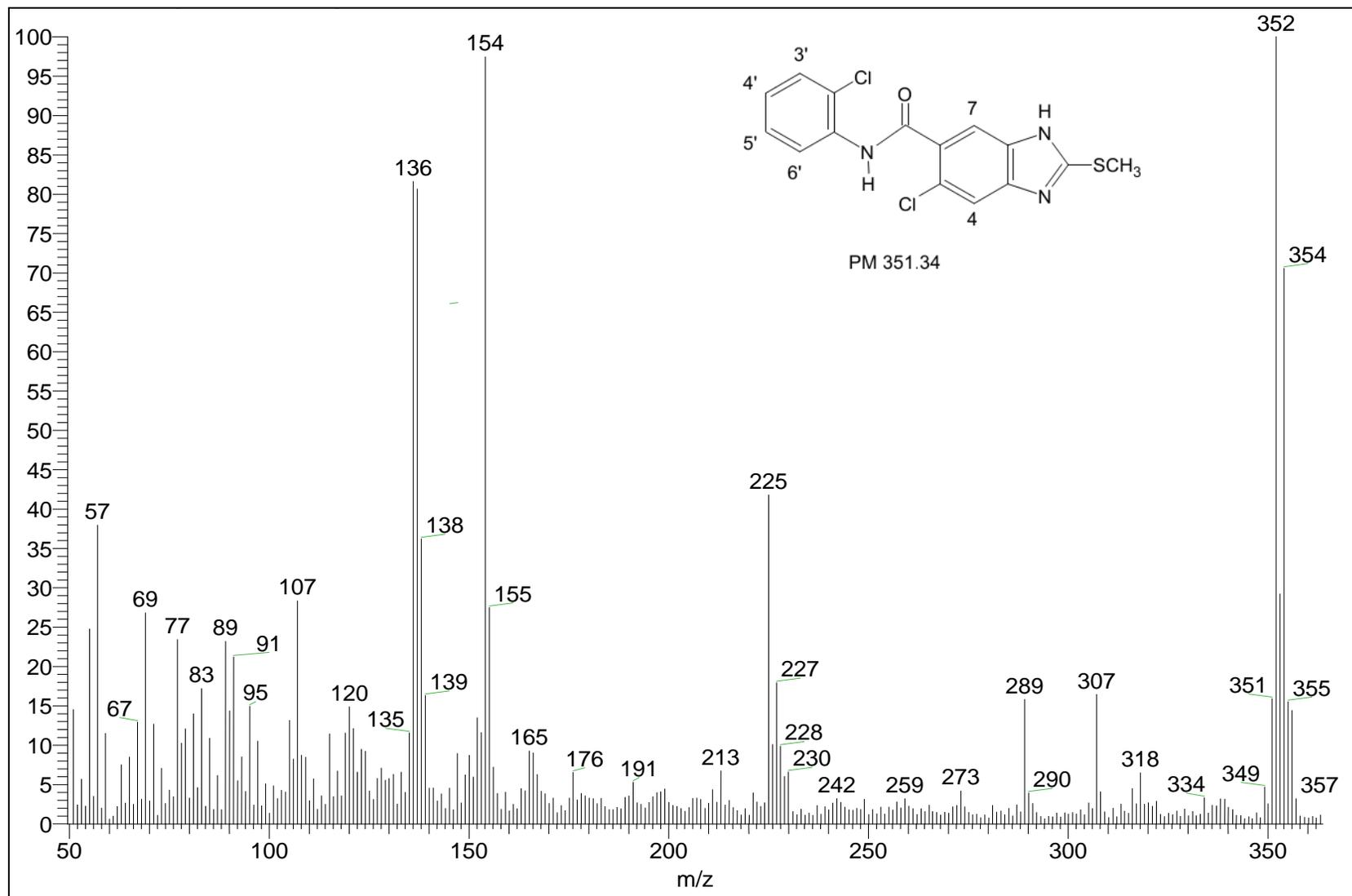
Espectro 10. EMFAB de 5-Cloro-N-(3,4-diclorofenil)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-3**).



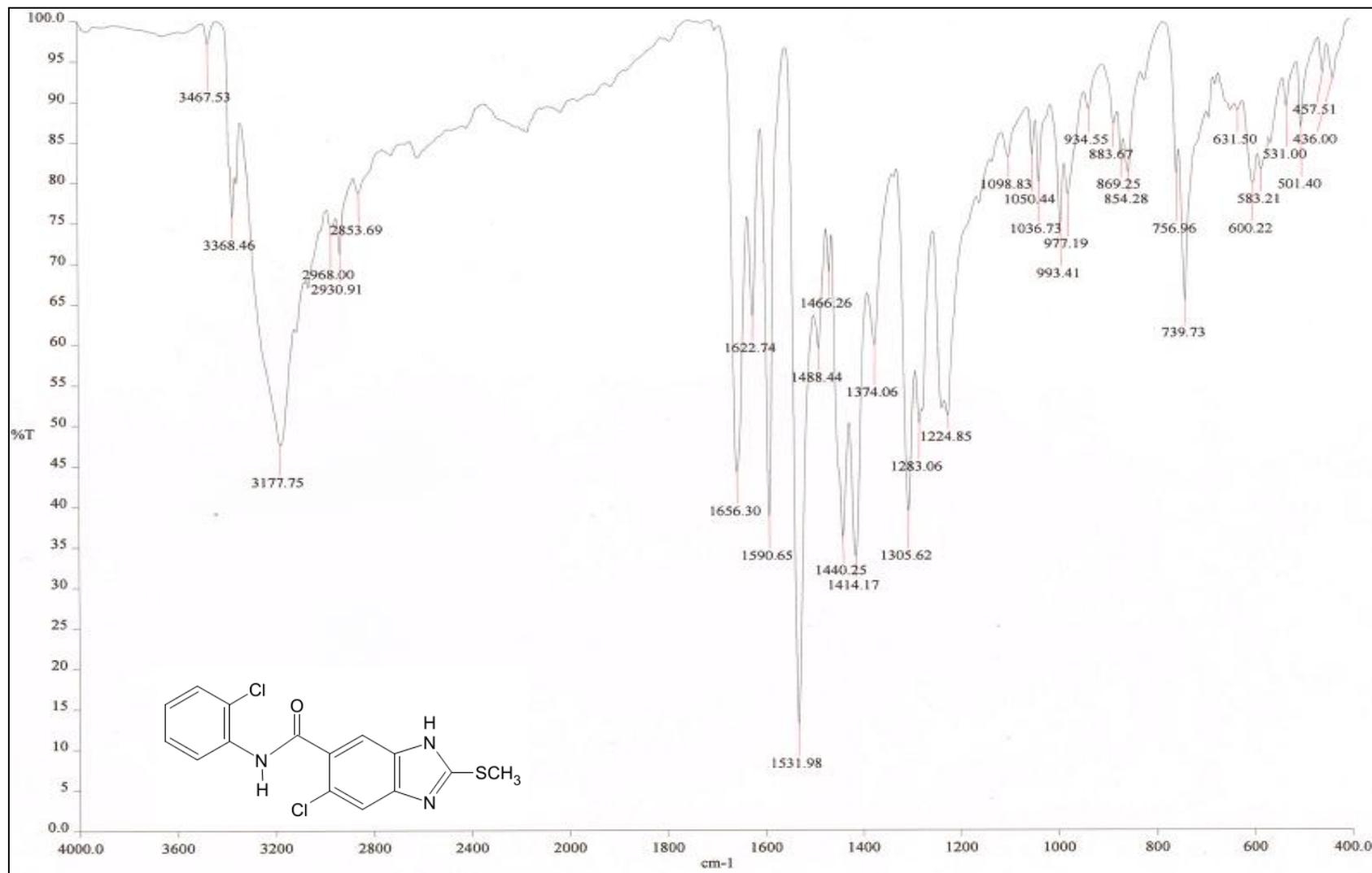
Espectro 11. FTIR de 5-Cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-(metiltilio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-3**).



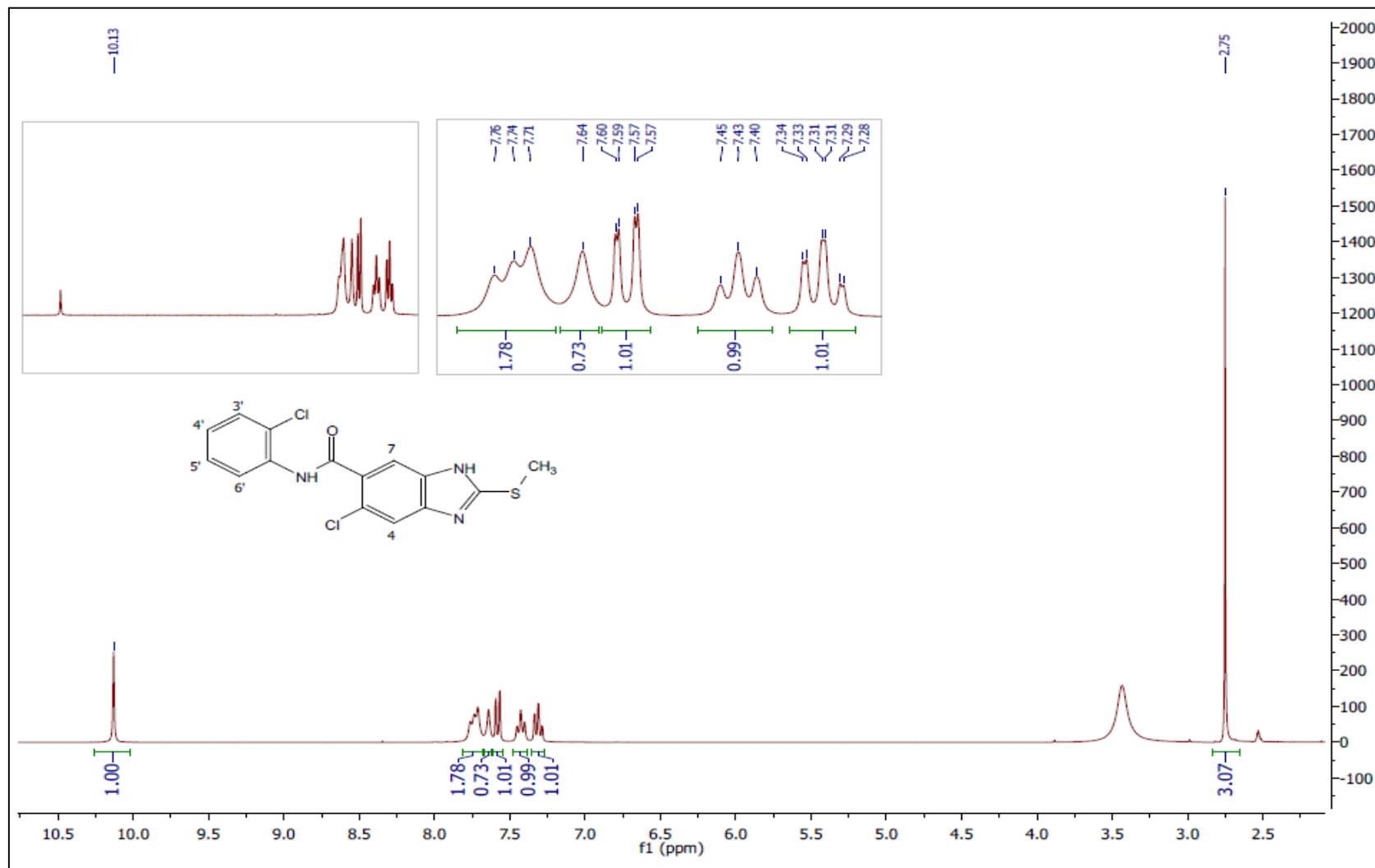
Espectro 12. RMN- ^1H 5-Cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (LGI-3).



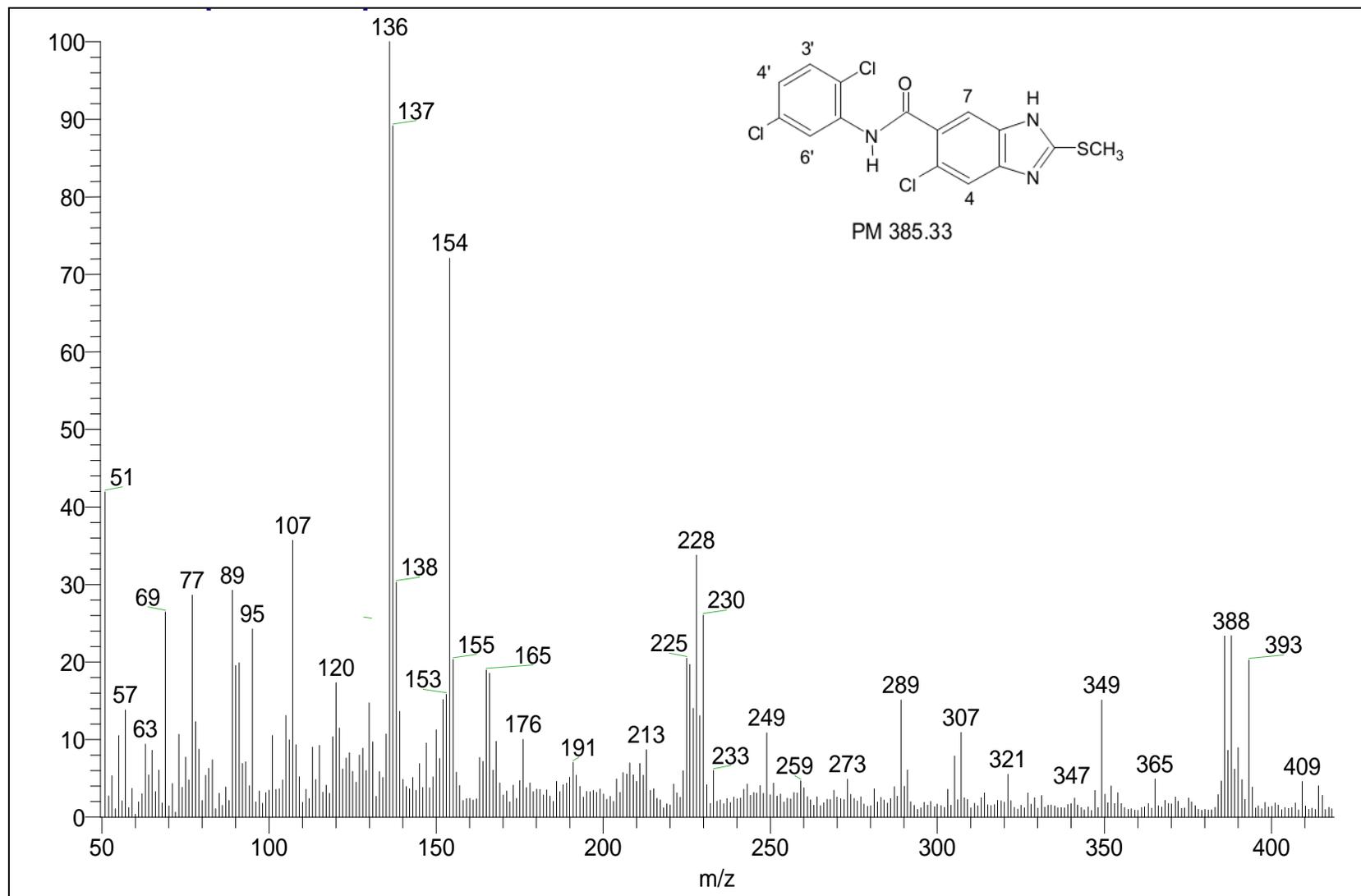
Espectro 13. EMFAB de 5-Cloro-N-(2-clorofenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (LGI-4).



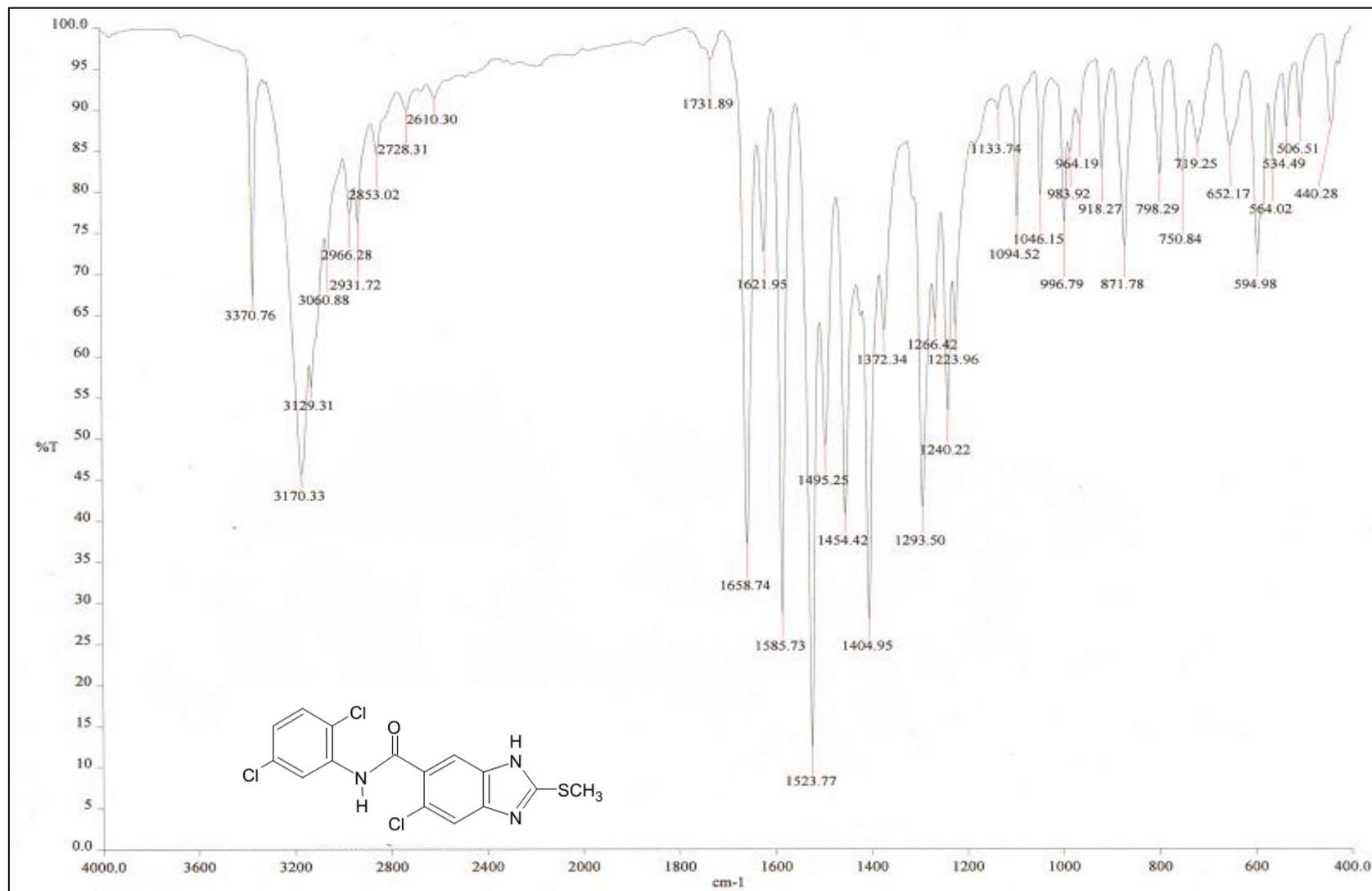
Espectro 14. FTIR de 5-Cloro-*N*-(2-clorofenil)-2-(metiltilio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-4**).



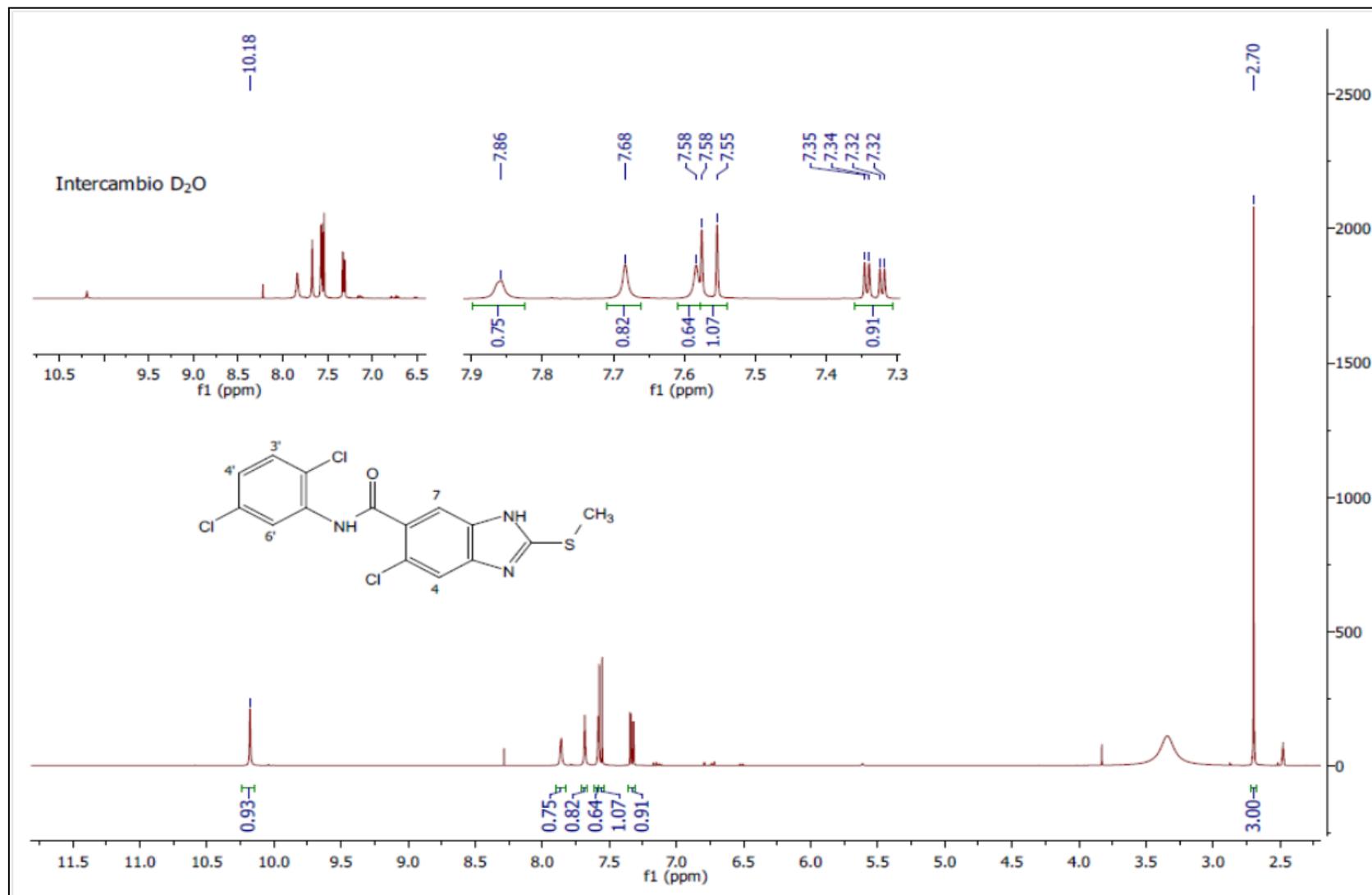
Espectro 15. RMN-¹H de 5-Cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-4**)



Espectro 16. EMFAB de 5-Cloro-N-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-6-carboxamida (LGI-5).



Espectro 17. FTIR 5-Cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-5**).



Espectro 18. RMN-¹H de 5-Cloro-*N*-(2,5-diclorofenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**LGI-5**).