

00570

8
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DISEÑO Y SINTESIS DE N - FENILCARBAMATOS
DE METILO 3 - SUSTITUIDOS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA”

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-QUIMICA FARMACEUTICA)

p r e s e n t a

Q.F.B. CARLOS ALBERTO VELAZQUEZ MARTINEZ

Director: Dr. Rafael Castillo Bocanegra



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

262234



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

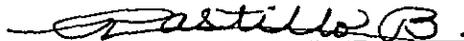
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

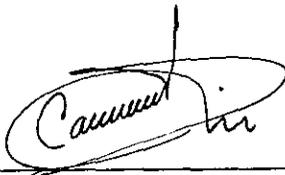
División de Estudios de Posgrado

**Diséño y Síntesis de N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituidos
con potencial actividad antiinflamatoria**



Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Director de Tesis



Q.F.B. Carlos Alberto Velázquez Martínez

Sustentante

***D**edico este trabajo a la persona
que más quiero y respeto en mi vida,
a ella...*

*Que durante mis veintiseis años
de existencia siempre ha estado a mi lado,
a pesar de la distancia que hay entre
nosotros...*

*Que nunca mostró flaqueza alguna
en los tiempos difíciles, y ha sabido salir
siempre adelante...*

*Que con su sacrificio diario y esmerado, me mostró
que su amor hacia mí y hacia mis hermanos,
estará siempre por encima de todo...*

Mi eterno agradecimiento, cariño y respeto.

A tí Mamá

- **A** *tí Papá, que a pesar de mostrar siempre tu carácter fuerte y reservado, reflejaste un sincero y enorme cariño hacia nosotros; gracias por darme la oportunidad de vivir; por apoyarme incondicionalmente en mis decisiones, y por haberme dado una familia a la quiero y querré siempre.*

- **A** *mis hermanos Juan, César y Claudia, que son mi familia, mi apoyo y estímulo constante.*

- **A** *mis tíos Juan, Josefina y Felipe, José Luis y María, María de Jesús y Clemente, Roberto y Guadalupe, Rogelio y Rosario, ya que esto también es suyo; lo que hoy consigo y todo cuanto logre en la vida, se los debo a todos.*

- **A** *mis Primos : Josefina, Felipe, Elsa, Braulio, Mayra, Rocio, Marisol, Andrea, Miriam, Pepe, Xochitl, Angela, Karina y Rogelio; a todos los he visto crecer junto conmigo, y constituyen una parte integral en mis gratos recuerdos de infancia y juventud.*

AGRADECIMIENTOS...

- ◆ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación.
- ◆ Al laboratorio de espectroscopía de la Facultad de Química de la UNAM, por su apoyo y trabajo técnico invaluable, que me brindaron al momento de requerir de su servicio en el desarrollo de los espectros presentados en este trabajo.
- ◆ Al Laboratorio de espectroscopía del Instituto de Química de la UNAM.
- ◆ A mis compañeros y grandes amigos del Laboratorio 122 : Sergio, Rosita, Lalo, Ceci ¹ y Ceci ², por crear siempre un ambiente de trabajo tan placentero y agradable; con ustedes, nunca me sentí solo.
- ◆ Al maestro Francisco Hernández, por compartir conmigo su tiempo y sus amplios conocimientos.
- ◆ Al maestro Alfonso Lira y a Pilar, ya que en ellos encontré a otros grandes amigos.
- ◆ Al profesor Armando García Neri, que gracias a su apoyo, me fue posible salir de todos los problemas que surgieron al principio de mis estudios.
- ◆ A mis grandes amigos de generación : Ana, Maribel, Rocio, Tere, Samuel y Fausto, por hacer de mi estancia en la maestría algo muy grato y placentero.
- ◆ Al Dr. Daniel Chávez y su esposa Remedios, a quienes les brindo mi eterno agradecimiento y amistad, por ayudarme de manera siempre incondicional.

Pero sobre todo...

- ◆ A los amigos, compañeros y maestros, a los que debo la excelente formación profesional y personal que me guiará siempre en todo lo que haga :

***Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra
y
M. en C. Alicia Hernández Campos***

Que en todo momento me brindaron incondicionalmente su apoyo...

Compartieron conmigo su tiempo, y sus conocimientos...

Supieron guiarme y aconsejarme en los momentos más difíciles...

Gracias por hacerme entender que un fuerte regaño, no es otra cosa que una muestra de cariño, afecto e interés...

Gracias por darme dos años de gratos e inolvidables recuerdos...

A ustedes, mi eterno agradecimiento.

INDICE

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introducción.....	1
1.1. Helmintiosis.....	2
1.2. Terapéutica actual de las helmintiosis.....	3
1.3. Helmintiosis extraintestinales.....	4
1.4. Bencimidazol como molécula prototipo.....	5
2. Antecedentes.....	7
3. Objetivos.....	15
4. Hipótesis y diseño.....	17
4.1. Hipótesis. Análisis de las estructuras.....	17
4.2. Hipótesis. Diseño de nuevas estructuras.....	17
4.3. Diseño de los N-fenilcarbamatos de metilo.....	20
5. Resultados y Discusión.....	22
5.1.- Síntesis.....	23
5.1.1.- Síntesis del compuesto 1.....	25
5.1.2.- Síntesis del compuesto 2.....	28
5.1.3.- Síntesis del compuesto 3.....	32
5.1.4.- Síntesis del compuesto 4.....	36
5.1.5.- Síntesis del compuesto 5.....	39
5.1.6.- Síntesis del compuesto 6.....	41
5.1.7.- Síntesis del compuesto 7.....	44
5.1.8.- Síntesis del compuesto 8.....	46
5.1.9.- Síntesis del compuesto 9.....	48
5.2.- Ensayos de actividad biológica.....	50
6. Conclusiones.....	53
7. Parte experimental.....	56
7.1. Instrumentación.....	57
7.2. Cromatografía.....	58

7.3. N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).....	59
4-tiociano-2-nitroanilina (10).....	59
2-nitro-4-(propiltio)anilina (11).....	59
3-(propiltio)nitrobenzeno (13).....	60
3-(propiltio)anilina (14).....	60
N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).....	61
7.4. N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1)	
Síntesis alterna.....	61
7.5. N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2)	
m-dinitrobenzeno (15).....	63
3-(feniltio)nitrobenzeno (16).....	63
3-(feniltio)anilina (17).....	64
N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2).....	64
7.6. N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3)	
benzoato de metilo (18).....	65
3-nitrobenzoato de metilo (19).....	65
ácido 3-nitrobenzoico (20).....	66
cloruro de 3-nitrobenzoilo (21).....	66
3-nitrobenzofenona (22).....	67
3-aminobenzofenona (23).....	67
N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3).....	68
7.7. N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo (4).....	68
7.8. N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo (5).....	68
7.9. N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo (6).....	69
7.10. N-(3-clorofenil)carbamato de metilo (7).....	69
7.11. N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo (8).....	70
7.12. N-fenilcarbamato de metilo (9).....	70
8.- Espectros.....	72
Apéndice.....	113
Bibliografía.....	114

RESUMEN

Recientemente, se ha reportado la actividad antihelmíntica de algunos N-fenilcarbamatos de etilo contra *Hymenolepis nana* en ratones. Analizando la estructura de estos compuestos y la de los bencimidazol carbamatos antihelmínticos, se encontró cierta similitud estructural, que puede estar relacionada con la actividad biológica observada. En este trabajo se describe la síntesis del N-fenilcarbamato de metilo (9) y ocho derivados de éste, con los siguientes sustituyentes: 3-propiltio (1), 3-feniltio (2), 3-benzoil (3), 3-hidroxi (4), 3-metoxi (5), 3-nitro (6), 3-cloro (7), y 3,4-dicloro (8). La síntesis de los nueve compuestos se llevó a cabo haciendo reaccionar la anilina 3-sustituida correspondiente, con cloroformiato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona. La pureza e identidad de los compuestos obtenidos, fue corroborada por CCF, espectros de IR, RMN H^1 , RMN C^{13} y espectrometría de masas.

Los compuestos 1-9, conjuntamente con el albendazol, mebendazol y fenbendazol, se probaron contra *Trichinella spiralis* in vitro. Se encontró que a dosis de 1 µg/mL ninguno de los compuestos probados fue activo; sin embargo, a dosis de 10 µg/mL los bencimidazoles comerciales redujeron la viabilidad de las larvas de *T. spiralis* en un 47 % (mebendazol), 30 % (albendazol), 26 % (fenbendazol); mientras que los carbamatos sintetizados tuvieron el siguiente orden de reducción: 34 % (1), 27 % (2), 18 % (4), 16 % (3), 17 % (7), 4 % (6), y 0% (5,8,9).

Se concluye que el anillo bencimidazólico no es esencial para la actividad biológica probada; sin embargo, el sustituyente en la posición 3, que es común en los bencimidazoles y los carbamatos (1,2 y 3), juega un papel importante. Los compuestos 5-9, que tienen otros sustituyentes más simples, mostraron poca actividad o ninguna.

ABSTRACT

Recently, the anthelmintic activity of some ethyl N-phenylcarbamates against *Hymenolepis nana* on mice has been reported. There are some similarities between these structures and the benzimidazole carbamate drugs that could be related with the biological activity. In this work, the synthesis of methyl N-phenylcarbamate (9) and eight derivatives with the following substituents : 3-propylthio (1), 3-phenylthio (2), 3-benzoyl (3), 3-hydroxy (4), 3-methoxy (5), 3-nitro (6), 3-chloro (7), and 3,4-dichloro (8), is described. The synthesis of the nine compounds was achieved by reacting the corresponding 3-substituted aniline with methyl chloroformate and sodium bicarbonate in acetone. The purity and identity of the synthesized compounds was corroborated by TLC, infrared and NMR spectroscopy, and mass spectrometry.

Compounds 1-9, together with albendazole, mebendazole, and fenbendazole were tested against *Trichinella spiralis* in vitro. It was found that at a 1 µg/mL dose, neither of the tested compounds was active; however, at a 10 µg/mL dose, the commercial benzimidazole carbamate drugs reduced the viability of larvae of *T. spiralis* 47 % (mebendazole), 30 % (albendazole), 26 % (fenbendazole); while the methyl carbamates showed the following reductions : 34 % (1), 27 % (2), 18 % (4), 16 % (3), 17 % (7), 4 % (6), 0 % (5,8,9).

These results suggest, that the benzimidazole ring is not essential for the tested biological activity; however, the substituent at position 3, present in both, benzimidazole carbamate drugs and methyl carbamates (1, 2 and 3), hold an important role in the anthelmintic activity.

Compounds 4-9 with more simpler substituents showed poor activity or none.

1.- INTRODUCCION

1.1. Helmintosis.

El término helmintosis define de manera genérica, a un grupo de enfermedades parasitarias causadas por helmintos.^{1,2,3} Los helmintos (palabra de origen griego : *helmis*, que significa gusano) también llamados vermes, son organismos multicelulares e invertebrados, que parasitan al hombre y a una gran variedad de animales. La mayoría de ellos son visibles a simple vista, ya que miden desde milímetros hasta algunos metros de longitud. Requieren de uno o de varios huéspedes intermediarios para completar su ciclo de vida, hasta que infectan al hombre. Durante su estancia en estos “intermediarios”, presentan varios estadios o formas inmaduras, que al finalizar su crecimiento, pueden permanecer totalmente inadvertidos, o producir serios problemas de salud para el huésped. La sintomatología y desarrollo de la enfermedad varía con el tipo, número y localización de los parásitos. De acuerdo a su morfología, se clasifican en dos grandes grupos :

- a) *Platelmintos*
- b) *Nematelmintos*

a) Platelmintos. Son gusanos intestinales de cuerpo aplanado, metazoarios, es decir, organismos formados por muchas células, no poseen cutícula (cubierta que aísla el interior del organismo del medio ambiente), simplemente tienen una membrana que permite el intercambio de sustancias con el exterior, carecen de aparato digestivo y son hermafroditas. Este grupo de helmintos se subdividen en dos categorías :

- *Cestodos* : además de ser planos, tienen su cuerpo segmentado o dividido de la siguiente manera : la estructura anterior se llama escólex, en la que se encuentran las estructuras de fijación ; la parte intermedia contiene fragmentos que reciben el nombre de proglótidos, los posteriores son proglótidos grávidos, los cuales contienen huevos que al ser eliminados al medio ambiente permiten continuar con el ciclo biológico del parásito.

- *Trematodos* : del griego *trema* (“agujero”) y *trao* (“atravesar”), también son aplanados, pero no son segmentados. Poseen aparato digestivo y tienen dos ventosas que funcionan como soporte y boca.

b) *Nematelmintos*. Son organismos cilíndricos o redondos, más desarrollados que los platelmintos, dado que sus estructuras morfológicas les permiten desarrollar más funciones. Tienen un aparato digestivo más complejo, son bisexuados y poseen sistema nervioso. Una cutícula los aísla del medio externo, de manera que no se alimentan a través de su superficie. Tienen una sola subdivisión, que agrupa a todos sus miembros: los *Nematodos*.

Las helmintosis están ampliamente distribuidas en todo México, ya que en nuestro país se reúnen las condiciones ecológicas, socioeconómicas y culturales para su desarrollo y propagación. Aunque este tipo de infecciones se presenta con mayor frecuencia en países subdesarrollados, también se llegan a encontrar casos en los llamados países de primer mundo. Hasta 1993, el número total de casos de helmintosis (en general) reportados en México era de 879,319;⁴ sin embargo, se calcula que cifras como ésta, representen solo una pequeña fracción del número real de infecciones, debido a que no siempre se logra un diagnóstico apropiado de ellas, ni toda la población acude a recibir tratamiento a un centro de salud especializado.

1.2. Terapéutica actual de las helmintosis.

En los últimos 30 años, la quimioterapia de las helmintosis ha experimentado un notable progreso, como resultado de un mejor entendimiento de la enfermedad, las relaciones huésped-parásito y la bioquímica de los helmintos. Gracias a ello, ha sido posible diseñar nuevos fármacos para la mayoría de las helmintosis entéricas de humanos y de animales domésticos. La Tabla No. 1 muestra los medicamentos utilizados en el tratamiento de las diferentes helmintosis.⁵

1.3. Helmintiosis extraintestinales.

Un número significativo de helmintos, pertenecientes a las clases de Nematodos, Cestodos y Trematodos, tienen la capacidad de invadir tejido muscular, circulación sanguínea, hígado, pulmones y cerebro entre otros, produciendo enfermedades mucho más serias que aquellas relacionadas al tracto intestinal. La quimioterapia de estas clases de parasitosis es aún muy difícil, a causa de los severos requerimientos estructurales que debe reunir un fármaco antihelmíntico para que pueda absorberse y llegar hasta los órganos afectados. Como la mayoría de ellos se absorbe en una proporción muy baja, se presentan algunos problemas inherentes a su prescripción, tal como una baja biodisponibilidad oral, poca especificidad y un índice terapéutico estrecho. Pese a estos inconvenientes, la investigación en el tratamiento de algunas helmintiosis extraintestinales ha comenzado a dar resultados, por ejemplo, se ha utilizado el prazicuantel⁶ y el albendazol⁷ a dosis elevadas para el tratamiento de la cisticercosis y neurocisticercosis en el hombre, ya que son bien tolerados y la mayor parte del prazicuantel es absorbido. Sin embargo, la mayoría de las infecciones producidas por estos parásitos, aun necesitan mejores fármacos antihelmínticos que proporcionen una alternativa de tratamiento.

1.4. Bencimidazol como molécula prototipo.

Los esfuerzos llevados a cabo a nivel mundial para encontrar estructuras guía, biológicamente activas, para el diseño de mejores fármacos antihelmínticos, han culminado en el descubrimiento de algunas clases de moléculas orgánicas, de las cuales, la del bencimidazol ha sido la más exitosa en esta quimioterapia. El descubrimiento de fármacos antihelmínticos de amplio espectro de actividad, asociados con los bencimidazoles 2,5-disustituídos, significó una nueva etapa en el tratamiento de las enfermedades parasitarias que afectan al ser humano, animales domésticos y de ganadería. Actualmente, el anillo de bencimidazol es reconocido como un heterociclo muy versátil en investigación de química medicinal, y consecuentemente, ha sido objeto de una gran cantidad de modificaciones estructurales, para generar fármacos activos contra helmintos intestinales y extraintestinales.

Principalmente, se ha incursionado en la modificación molecular del bencimidazol, en las posiciones 1, 2 y 5(6), con sustituyentes de muy variada naturaleza funcional. Además, se han introducido varios cambios sobre el esqueleto hidrocarbonado del anillo, manteniendo la planaridad de las moléculas, la disposición espacial de los grupos y las distancias interatómicas entre los heteroátomos; sin embargo, ninguna estructura mostró una actividad superior a la de los fármacos de elección, como son el tiabendazol, mebendazol y otros antihelmínticos relacionados.

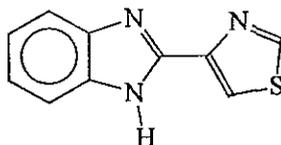
Por consiguiente, todavía falta por investigar con mayor profundidad, cuales son los factores que determinan la actividad antihelmíntica, la generación de nuevos compuestos antihelmínticos de acción extraintestinal y los efectos que la modificación del núcleo de bencimidazol tiene sobre la actividad. Esta tesis aborda la preparación de nuevas estructuras con potencial antihelmíntico, las cuales guardan analogía con la de los bencimidazol carbamatos. Se espera que los compuestos preparados puedan brindar información sobre la importancia que tiene el núcleo de bencimidazol en la actividad antihelmíntica y sirvan de base para el diseño de nuevos compuestos.

Fármaco	Prescripción
Albendazol	Infecciones por gusanos con gancho, ascariosis, enterobiosis, trichuriasis y strongiloidosis.
Amoscánato	Schistosomosis
Bitionol	Paragonimosis y fasciolosis
Cambendazol	Strongiloidosis
Diclorofeno	Teniosis (<i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i>)
Dietilcarbamazina	Filariosis linfática y loasis
Flubendazol	Trichuriasis
Ivermectina	Filariosis linfática
Levamisol	Ascariosis
Mebendazol	Infecciones por gusanos con gancho, ascariosis, trichuriasis, enterobiosis, capillariosis y strongiloidosis
Mepronidazol	Infección por el gusano de Guinea
Metrifonato	Cisticercosis
Niridazol	Schistosomosis
Niclosamida	Infecciones por gusanos planos
Oxamniquina	Infección por <i>S. mansoni</i>
Oxantel	Trichuriasis
Piperazina	Ascariosis y enterobiosis
Prazicuantel	Cisticercosis, schistosomosis
Pirantel	Ascariosis y enterobiosis
Tetracloroetileno	Infección por gusanos con gancho
Tiabendazol	Strongiloidosis, enterobiosis, capillariosis, infección por el gusano de Guinea, trichinellosis, toxocarosis y larva cutánea migrante

Tabla 1. Fármacos antihelmínticos utilizados clínicamente y su prescripción.⁵
 La nomenclatura de los helmintos se describe según las reglas de la SNOAPAD.⁸

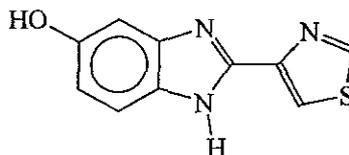
2.- ANTECEDENTES

Un gran número de trabajos de investigación, encaminados a la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica, culminaron en 1961, con el hallazgo del Tiabendazol, de nombre químico 2-(4-tiazolil)bencimidazol, el cual, mostró la mayor actividad luego de ensayar con toda una serie de compuestos.⁹



Tiabendazol

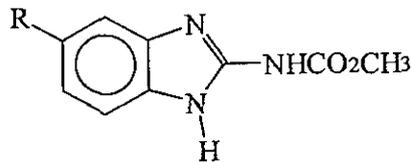
Luego de que el Tiabendazol se absorbe, sufre metabolismo oxidativo, hidroxilándose en la posición 5 del anillo bencimidazólico, produciendo un metabolito, el 5-hidroxitiabendazol, que se elimina rápidamente.¹⁰



5-Hidroxitiabendazol

En diversos laboratorios de todo el mundo, se dieron a la tarea de modificar estructuralmente al Tiabendazol, a fin de impedir su metabolismo rápido e incrementar su vida media plasmática; esto llevó a la introducción de múltiples sustituyentes de muy variada naturaleza, en la posición 5 del anillo aromático. Además, se observó que cuando el bencimidazol soporta un carbamato de metilo en posición 2, la actividad antihelmíntica era considerablemente mayor, por lo que, su utilización fue trascendental en el diseño de los nuevos antihelmínticos.

La Tabla 2 muestra los diversos bencimidazoles de amplio espectro y sus fórmulas condensadas, que se han utilizado en el tratamiento de las helmintosis, tanto en medicina humana como en veterinaria. Su estructura en general, les confiere características físicas y químicas muy particulares, de las cuales, resultan de gran importancia las siguientes : tienen altos puntos de fusión, son compuestos altamente polares y tienen una solubilidad en agua prácticamente nula, en general son muy poco solubles en casi cualquier disolvente. Estas características, hacen de los carbamatos bencimidazólicos de amplio espectro, fármacos poco biodisponibles, ya que ejercen su acción biológica sólo en el tracto gastrointestinal. Además, se ha observado que estos compuestos no presentan acción antihelmíntica en todos los estadios de algunos parásitos.



Compuestos	R
Albendazol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ S
Mebendazol	C ₆ H ₅ CO
Fenbendazol	C ₆ H ₅ S
Oxfendazol	C ₆ H ₅ SO
Flubendazol	p-F-C ₆ H ₄ CO
Oxibendazol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ O
Parbendazol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂

Tabla 2. Fórmulas condensadas de algunos fármacos bencimidazólicos utilizados clínicamente.

Resulta evidente, que si bien los bencimidazoles son fármacos de elección en el tratamiento de infecciones intestinales ocasionadas por helmintos, son incapaces de actuar de manera eficaz contra éstos, cuando se localizan en órganos como el hígado, el músculo, sistema nervioso, cerebro, etc.

Estudios recientes realizados en México, dan luz a una nueva posibilidad hacia el tratamiento de las helmintosis extraintestinales, ya que, a nivel clínico, el albendazol resultó ser efectivo en el tratamiento de la neurocisticercosis.⁷ Sin embargo, en otros estudios relacionados con la biodisponibilidad del albendazol, se encontró que este fármaco se absorbe en una proporción muy baja, y que sólo su metabolito, el sulfóxido de albendazol, se encuentra en plasma.¹¹

Por otra parte, en investigaciones actuales, realizadas en la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, se describe la preparación y ensayo de N-fenilcarbamatos de etilo (Figura 1), con actividad biológica en contra de *Hymenolepis nana* en ratones,¹² equiparable a la del prazicuantel. La similitud estructural que se observa al comparar los compuestos de origen bencimidazólico, y los N-fenilcarbamatos de alquilo, hace suponer que comparten ciertas características moleculares, que producen la actividad biológica, al interaccionar sobre un receptor específico en el parásito, o bien, que debieran su actividad a un mecanismo de acción diferente.

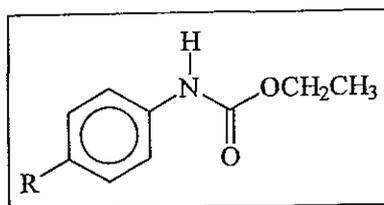
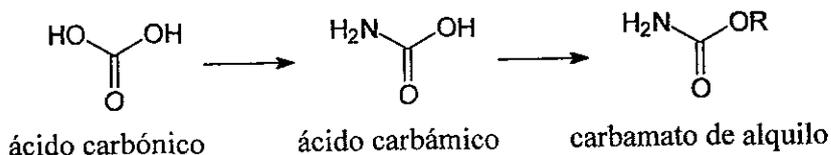


Figura 1. Estructura general de los N-fenilcarbamatos de etilo probados contra *H. nana* en ratones.

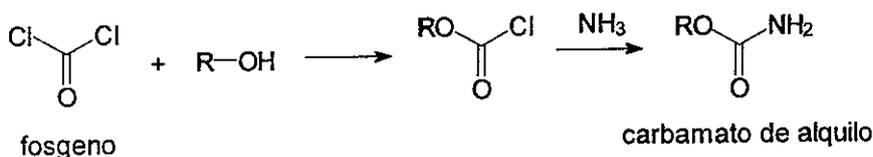
Por otro lado, los carbamatos de alquilo, también conocidos como *uretanos*, son compuestos orgánicos considerados derivados del ácido carbámico, el cual a su vez, es reconocido como derivado del ácido carbónico :



El átomo de nitrógeno puede o no estar sustituido, dando origen a los N-alquil o N-aril carbamatos de alquilo. En estos compuestos se observa una doble funcionalidad por parte del grupo carbonilo, ya que el carbono se encuentra unido por un lado, al oxígeno de un alcóxido, y por el otro, al nitrógeno de una amina (si es que el carbamato es N-sustituido).

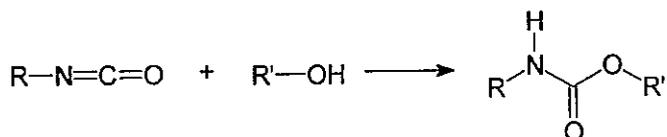
Los principales métodos de síntesis para la obtención de carbamatos de alquilo, son los siguientes :

a) A partir de fosgeno, un alcohol y amoniaco.¹³



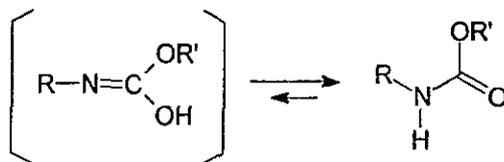
La sustitución nucleofílica sobre carbono sp^2 , llevada a cabo sobre el fosgeno por parte del alcohol, produce un cloroformiato de alquilo intermediario en la reacción, que posteriormente sufre una sustitución nucleofílica similar a la primera, para rendir el carbamato de alquilo correspondiente. Esta reacción se efectúa en dos pasos, con dos nucleófilos diferentes : en el primero, se requiere de la utilización de un equivalente de fosgeno por un equivalente del alcohol ; en el segundo paso, se hace reaccionar el cloruro de ácido con amoniaco, para obtener el carbamato de alquilo deseado.

b) A partir de un isocianato de alquilo o arilo y un alcohol.^{14, 15, 16}

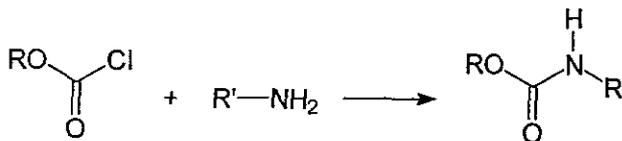


El uretano obtenido por medio de esta ruta sintética, se produce por la adición nucleofílica de un alcohol (1°, 2° o 3°) sobre el isocianato de alquilo o arilo utilizado.

El intermediario formado se transpone por tautomería de hidrógeno, y produce el carbamato de alquilo. La reacción es espontánea, procede sin la utilización de un catalizador y generalmente se obtienen buenos rendimientos del carbamato de alquilo.



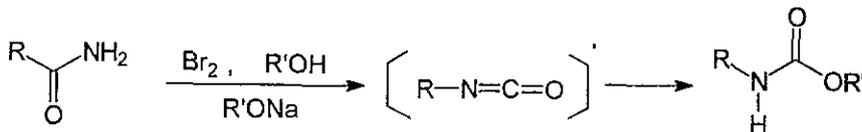
c) A partir de una aril o alquilamina y cloroformiato de alquilo.¹⁴



Esta reacción de acilación se utiliza, además de la preparación de carbamatos de alquilo, para la caracterización de aminas, ya que el uretano obtenido generalmente es un sólido estable de punto de fusión característico. Procede a temperaturas bajas (de 0 a 5° C), en un disolvente aprótico y polar.

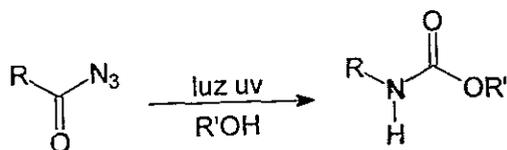
En el seno de la reacción, se adiciona bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido clorhídrico desprendido, y evitar que se protone la amina que no ha reaccionado.

d) Haciendo reaccionar una amida, no sustituida, con bromo en presencia de un alcohol (transposición de Hofmann).^{16, 17}

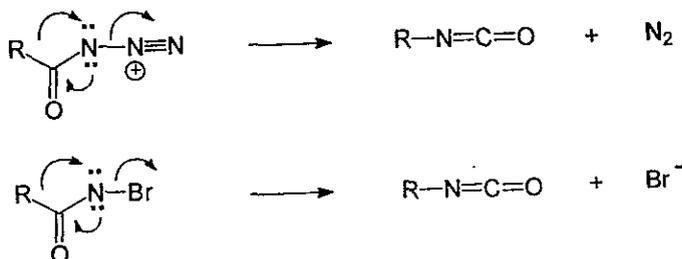


La reacción de amidas primarias con bromo en medio básico, produce la correspondiente amina y anhídrido carbónico; sin embargo, si se utiliza un alcohol como disolvente, la transposición de Hofmann procede hasta la formación del carbamato de alquilo. El nucleófilo que se adiciona sobre el isocianato intermediario, es la base conjugada del alcohol. El primer paso de la reacción lo constituye la abstracción de un protón de la amida, para formar su base conjugada, misma que desplaza un bromuro de una molécula de bromo. El compuesto obtenido de la sustitución nucleofílica constituye un estado de transición inestable, que por transposición da el isocianato intermediario, mismo que reacciona con el alcohol para formar el carbamato.

- e) Utilizando fuentes alternas de isocianato, como es la irradiación con luz ultravioleta de las azidas de ácido, tomando un alcohol como disolvente.¹⁶



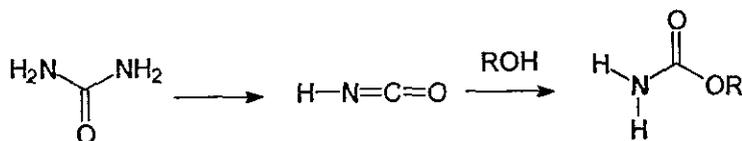
La reacción de irradiación con luz ultravioleta de una azida de ácido, para la obtención de isocianatos, es denominada transposición de Curtis. Está muy relacionada con la reacción de transposición de Hofmann, ya que, en la primera, el grupo saliente es una molécula de nitrógeno, en la segunda, un bromuro:



Algunas diferencias prácticas significativas hacen que se prefiera la utilización de una o de otra, dependiendo de cual sea el producto deseado. La

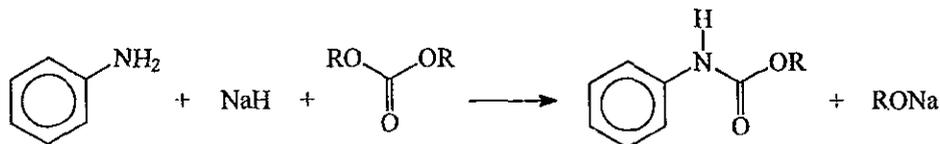
transposición de Hofmann requiere disolventes próticos, el isocianato intermediario reacciona con la base conjugada del disolvente, y por lo tanto, no es posible aislarlo. La reacción de Curtius en cambio procede bien en disolventes apróticos tal como benceno o tolueno, por lo que, se pueden aislar los isocianatos obtenidos. Aunque la reacción de Curtius también puede llevarse a cabo en disolventes próticos, el isocianato formado puede hacerse reaccionar con otros nucleófilos para producir el correspondiente derivado requerido.

f) Por tratamiento térmico de la urea en presencia de un alcohol (vía ácido isocianico).¹⁶



La reacción procede a reflujo, hasta que termina el desprendimiento de amoníaco. Como en las reacciones anteriores con isocianatos de alquilo o arilo, el ácido isocianico sufre una adición nucleofílica por el alcohol, produciendo el carbamato de alquilo no sustituido.

g) Por tratamiento de la anilina correspondiente, con hidruro de sodio en presencia de un carbonato de alquilo.¹⁸



3.- OBJETIVOS

Objetivos

3.1.- Diseñar estructuras de fórmula general N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituidos, con potencial actividad antihelmíntica, que puedan brindar información sobre los requerimientos estructurales necesarios, para que un fármaco presente actividad antihelmíntica.

3.2.- Síntesis total de las moléculas diseñadas, a partir de materias primas relativamente más sencillas, que las utilizadas para la obtención de los carbamatos bencimidazólicos de uso comercial.

3.3.- Realizar el ensayo de actividad biológica correspondiente, a fin de establecer la correlación estructura-actividad entre los fármacos bencimidazólicos de uso comercial (albendazol, mebendazol y fenbendazol), y las estructuras sintetizadas.

4.- HIPOTESIS Y DISEÑO

4.1. Hipótesis. Análisis de las estructuras.

Los N-fenilcarbamatos de etilo probados contra *Hymminolepis nana*, tienen cierta similitud molecular con la estructura general de los fármacos bencimidazólicos que se han utilizado clínicamente para el tratamiento de las helmintiosis; al comparar ambos grupos de compuestos, se observan ciertas semejanzas estructurales (Figura 2).

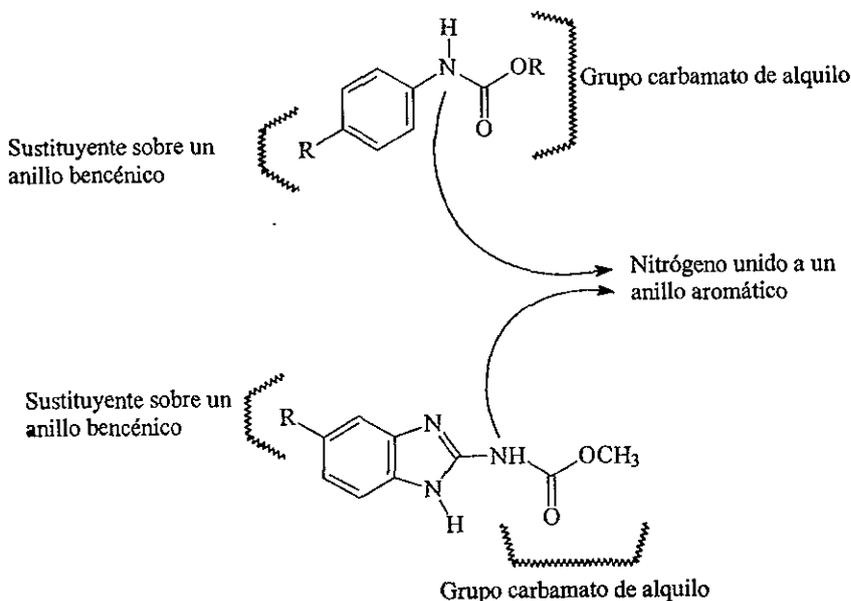


Fig. 2. Comparación estructural entre los N-fenilcarbamatos de alquilo y los carbamatos bencimidazólicos.

4.2. Hipótesis. Diseño de nuevas estructuras.

Los fármacos bencimidazólicos poseen un grupo carbamato de metilo en posición 2 del anillo, y un sustituyente de variada composición, ya sea en 5 o en 6, dependiendo del equilibrio tautomérico que muestra el heterociclo (Figura 3).

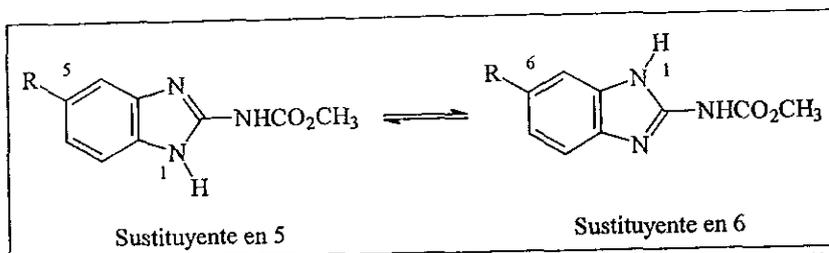


Fig. 3. Equilibrio tautomérico mostrado por el anillo bencimidazólico.

Este equilibrio tautomérico sobre los nitrógenos heteroaromáticos, produce una variación en la posición relativa del sustituyente sobre el fenilo, por lo que, en un momento determinado, puede encontrarse en 5 o en 6. Si la estructura de los N-fenilcarbamatos de alquilo, presenta actividad antihelmíntica semejante a los fármacos bencimidazólicos, tendrá que tomarse en cuenta entonces, la variación en la posición relativa de los sustituyentes sobre el benceno (Figura 4) y relacionarla con la observada en el anillo de bencimidazol.

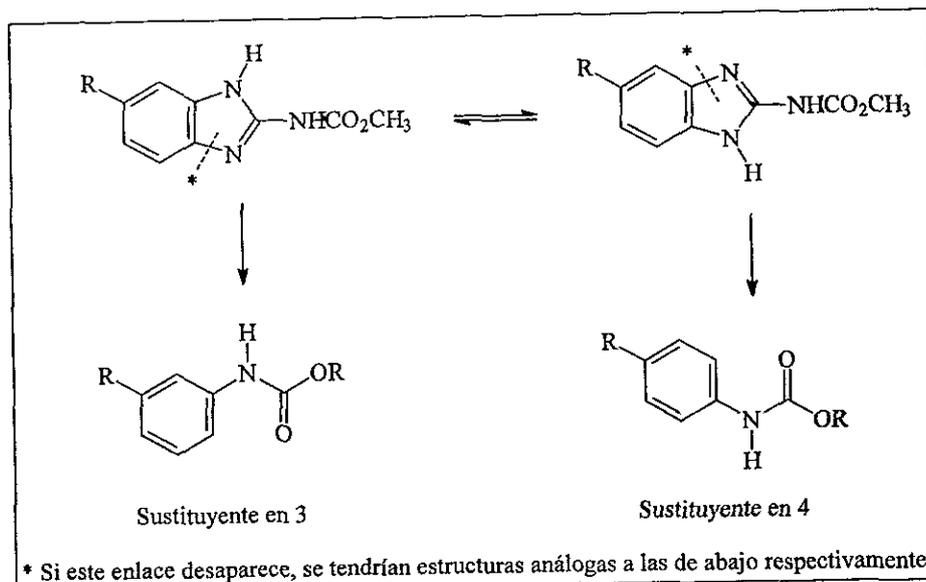


Fig. 4. Comparación de la posición relativa de los sustituyentes, en los bencimidazoles y en los N-fenilcarbamatos de alquilo.

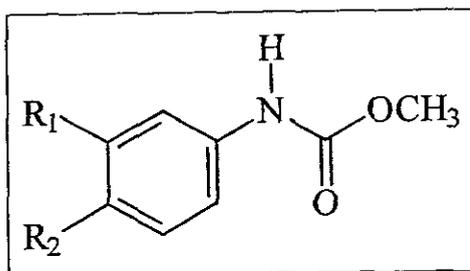
Por lo tanto, las características generales que se pueden resaltar para el diseño de nuevas moléculas con potencial actividad antihelmíntica, análogas a los carbamatos bencimidazólicos, son las siguientes :

- a) Nitrógeno directamente unido a un anillo aromático.
- b) La presencia de un grupo carbamato de metilo como sustituyente en el anillo.
- c) Un sustituyente en posición 3, 4, o ambas, que corresponda a las posiciones 5 y 6 de los bencimidazoles, y que teóricamente, impida el metabolismo sobre el carbono aromático.
- d) Si los sustituyentes que se han utilizado en los fármacos bencimidazólicos, presentan influencia importante en la actividad antihelmíntica, resulta interesante incorporarlos también a la estructura de los N-fenilcarbamatos de metilo.

4.3. Diseño de los N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituídos.

Tomando en cuenta el análisis comparativo entre las estructuras de los fármacos de origen bencimidazólico, y las de los N-fenilcarbamatos de alquilo, se consideró importante contar con compuestos de fórmula general N-fenilcarbamatos de metilo. Las estructuras diseñadas y sintetizadas en esta tesis se muestran en la Tabla 3, como agentes con potencial actividad antihelmíntica. Las estructuras **1**, **2** y **3**, presentan los sustituyentes contenidos en los fármacos Albendazol, Fenbendazol y Mebendazol, que corresponden a un grupo propiltio, feniltio y benzoilo respectivamente. Los compuestos **4-9** tienen sustituyentes de variada capacidad electrodonadora o electroatrayente.

La posición 4 en la estructura de los N-fenilcarbamatos de metilo también es motivo de estudio ; sólo que, esto da origen a otra serie de compuestos descritos en un trabajo posterior.¹⁹



Número	R ₁	R ₂
1	CH ₃ CH ₂ CH ₂ S	H
2	C ₆ H ₅ S	H
3	C ₆ H ₅ CO	H
4	OH	H
5	CH ₃ O	H
6	NO ₂	H
7	Cl	H
8	Cl	Cl
9	H	H

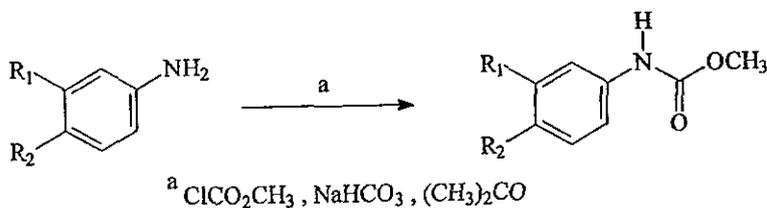
Tabla 3. Estructuras de los N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituidos propuestas y sintetizadas, con potencial actividad antihelmíntica.

5.- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1.- Síntesis.

Uno de los objetivos de este trabajo, es el de sintetizar los compuestos diseñados con actividad antihelmíntica potencial, a partir de materias primas y rutas de síntesis relativamente más sencillas, que las utilizadas para la síntesis de los fármacos antihelmínticos de uso comercial, que involucran la formación de compuestos heterocíclicos como el núcleo de bencimidazol con diversos sustituyentes ; por lo tanto, las materias prima base, propuestas para obtener los N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituídos, fueron las correspondientes anilinas 3-sustituídas, haciéndolas reaccionar con cloroformiato de metilo, según la reacción general que se muestra en el Esquema 1. Se utilizó acetona como disolvente y bicarbonato de sodio en el seno de la reacción para neutralizar el cloruro de hidrógeno desprendido. Generalmente, la temperatura se mantuvo entre 0 y 5 grados centígrados, excepto en los casos en donde la nucleofilia del nitrógeno anilínico se vio disminuida, por contar con un grupo electrón-atrayente en posición 3 ; en estos casos, se incrementó la temperatura de reacción hasta alrededor de 50 grados.

Esquema 1. Reacción general de síntesis para los N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituídos.



En la Tabla 4 se presentan los rendimientos y puntos de fusión obtenidos, tanto para los N-fenilcarbamatos de metilo 1-9, como para sus intermediarios.

Tabla 4

Compuesto	% Rendimiento	pf (obtenido) °C	pf (reportado) °C
4-tiociano-2-nitroanilina (10)	78	114-115	116-117
4-(propiltio)-2-nitroanilina (11)	~ 100	*	*
3-(propiltio)nitrobenzoceno (13)	60	*	*
3-(propiltio)anilina (14)	95.5	*	*
1	55.3	30-32	^b
1	24.7 (global)	30-32	^b
3-(propiltio)nitrobenzoceno (13) ^a	83	*	*
3-(propiltio)anilina ^a (14)	~ 100	*	*
1 ^a	61.9	30-32	^b
1 ^a	51.4 (global)	30-32	^b
m-dinitrobenzoceno (15)	81.7	88-89	89-90
3-(feniltio)nitrobenzoceno (16)	45	41-42	42.5
3-(feniltio)anilina (17)	~ 100	*	*
2	62.5	89-91	^b
2	22.9 (global)	89-91	^b
benzoato de metilo (18)	91	*	*
3-nitrobenzoato de metilo (19)	89.1	75-76	78
ácido 3-nitrobenzoico (20)	92	138-139	140
cloruro de 3-nitrobenzoilo (21)	~ 100	nd	35
3-nitrobenzofenona (22)	94.8	93-94	95
3-aminobenzofenona (23)	93	84-86	87
3	92.7	110-112	^b
3	61 (global)	110-112	^b
4	93.5	90-92	91-93
5	51.1	44-46	45-46
6	94.3	147-149	148-149
7	94.8	81-83	82-83
8	97.9	110-112	114
9	90.1	42-44	44-45

* líquido, ^a síntesis alterna, ^b no reportado, nd no determinado.

La caracterización de cada intermediario y de los compuestos 1-9, se basó en la comparación de su punto de fusión con el reportado, para los compuestos conocidos; en la asignación de señales en los espectros de infrarrojo, RMN-H¹, RMN-C¹³, y en el caso de los compuestos 1, 2 y 3 espectrometría de masas y análisis elemental.

Aunque este trabajo no tiene por objeto establecer una correlación espectroscópica exacta y detallada de las estructuras sintetizadas, se reportan los valores de desplazamiento químico para la caracterización de los N-fenil carbamatos de metilo. Por medio de sus espectros de RMN- C^{13} , se calcularon los diferentes desplazamientos químicos (relativos al TMS) de los diferentes carbonos (utilizando tablas reportadas en la literatura),^{30,31,32} y se compararon con los diferentes desplazamientos observados en los espectros.

A continuación se discute la metodología sintética realizada y la espectroscopía más relevante, obtenida en los compuestos **1-9**.

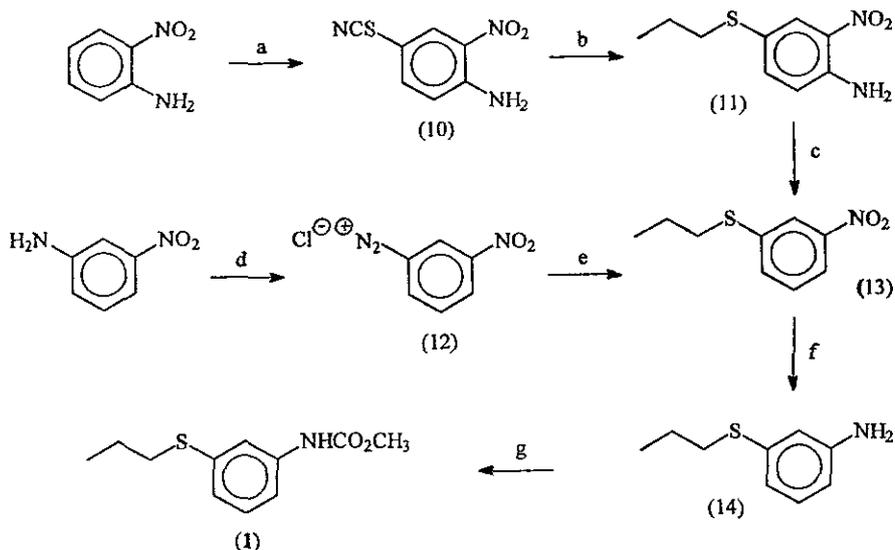
5.1.1.- Síntesis de N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).

Para la síntesis del compuesto N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (**1**), se evaluaron las dos diferentes rutas sintéticas que se muestran en el Esquema 2.

En la primera de ellas (procedimiento de patente para la síntesis del albendazol²⁰), la 2-nitroanilina comercial se trató con tiocianato de amonio y bromo, para dar la 4-tiociano-2-nitroanilina (**10**); posteriormente, ésta se hizo reaccionar con 1-bromopropano y cianuro de sodio en propanol, obteniendo la 4-(propiltio)-2-nitroanilina (**11**).²⁰ Se formó la sal de diazonio (**11**) con nitrito de sodio en medio ácido y luego se adicionó ácido hipofosforoso hasta evolución total de nitrógeno. El producto obtenido, 3-(propiltio)nitrobenzoceno (**13**), se sintetizó con un 46.8 % de rendimiento global hasta esta reacción y se presentó como un líquido amarillo claro, mismo que se redujo con cloruro estanosos dihidratado y ácido clorhídrico en caliente,²¹ obteniéndose así la 3-(propiltio)anilina (**14**), que por tratamiento con cloroformiato de metilo en acetona, produjo el carbamato de metilo 3-sustituido correspondiente (**1**).

En la segunda secuencia sintética de preparación del compuesto **14**, se inició con la 3-nitroanilina comercial y se preparó la sal de diazonio correspondiente (**12**); ésta se trató con 1-propanotiol para dar el 3-(propiltio)nitrobenzoceno (**13**), el cual se redujo de manera semejante a la descrita anteriormente, para obtener la 3-(propiltio)anilina (**14**). El rendimiento ahora fue de 83 %, obteniéndose un líquido amarillo claro, idéntico en R_f al anterior.

Esquema 2. Secuencia sintética seguida para la preparación del N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).



(a) $2 \text{ NH}_4\text{SCN}$, Br_2 , CH_3OH ; (b) n-Pr Br , n-Pr OH , CH_2Cl_2 , CH_3 (n-Bu) $_3\text{N Cl}$ / H_2O , NaCN / H_2O ; (c) NaNO_2 , HCl , H_2PO_2 , $0-5^\circ\text{C}$; (d) NaNO_2 , H_2O , HCl , $0-5^\circ\text{C}$; (e) n-Pr SH ; (f) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / HCl (g) $\text{Cl CO}_2\text{CH}_3$, NaHCO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

Cabe señalar que la reducción del compuesto 13 con H_2 y Pd/C , llevó a una mezcla compleja de hidrogenación difícil de purificar; se optó entonces por usar otro método de reducción que emplea cloruro estanoico dihidratado y ácido clorhídrico concentrado en caliente.²¹ El producto obtenido a partir del 3-(propiltio)nitrobenzénico, la 3-(propiltio)anilina (14), se logró con rendimientos superiores al 95 %, un solo compuesto, el cual no requirió de purificación para la reacción siguiente.

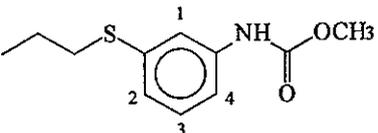
El último paso de la secuencia sintética (obtención del carbamato de metilo), también se basó en un procedimiento de patente para la síntesis del tolnaftato.³³ En este procedimiento, se diluye la anilina en acetona comercial (hidratada) y se adiciona en frío, el cloroformiato de metilo en presencia de bicarbonato de sodio, para neutralizar el ácido liberado; luego, se lleva a reflujo.

En este caso, la reacción se realizó en frío y los rendimientos del compuesto **1** fueron del 55 y 61 %. De acuerdo a estos resultados, se mejoró notablemente el rendimiento global del primer proceso de síntesis (24.72 %) hasta más del doble (58.86 %).

El compuesto **1** fue un sólido amarillo claro, cristalino, con punto de fusión de 30-32° C, de olor característico. El espectro de Infrarrojo (No. 3) muestra las bandas características para los grupos presentes en la molécula, los cuales se resumen a continuación :

Infrarrojo (espectro No. 3)							
enlace	C-S	CH ₂	CO-N	C=O	O-CH ₃	C-H	N-H
cm ⁻¹	686	772	1228	1712	2872	2960	3318

Las señales obtenidas en el espectro de RMN-H¹, muestran un total de 7 ambientes protónicos diferentes, que integran para un total de 15 protones presentes en la molécula. El intercambio con agua deuterada fue importante para asignar la señal correspondiente al protón sobre el nitrógeno del carbamato.

RMN H ¹ (espectro No. 15, señales en ppm)

0.96 (t, 3H, CH ₃ -CH ₂), 1.55 (sex, 2H, CH ₃ -CH ₂ -CH ₂), 2.85 (t, 2H, CH ₂ S), 3.68 (s, 3H, CH ₃ O-), 6.82-7.0 (dd, 1H, H-2), 7.1-7.3 (t, 1H, H-3), 7.2 (dd, 1H, H-4), 7.5 (t, 1H, H-1), 9.7 (s, 1H, -NH-).

La asignación de las señales en el espectro de RMN-C¹³, tomó como base el cálculo de las mismas de acuerdo al medio ambiente magnético presente en cada carbono, y posterior comparación con las señales observadas en el espectro.

RMN C ¹³ (espectros No. 26 y 26a, señales en ppm)											
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
δ	145.77	122.74	143.09	127.34	134.76	120.75	159.75	56.93	39.68	27.76	18.26

La numeración de cada carbono es independiente de la numeración de los hidrógenos descrita en la tabla anterior. Se observaron un total de 11 carbonos en el espectro. La señal del carbono No. 9 se encontró sobrepuesta a la señal del disolvente utilizado (DMF-d⁷), por lo que se tuvo que correr una ampliación de esa parte del espectro para poder observarla (espectro 26a).

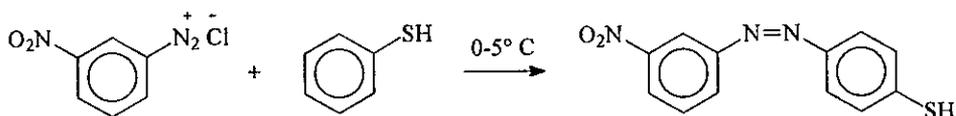
Se determinó una masa molecular de 225 para este compuesto, al someterlo a espectrometría de masas (espectro 35), la cual concuerda de manera satisfactoria con la masa molecular calculada (225.304 unidades); el pico base correspondió al ión molecular. Cuando se determinó su composición elemental en espectrometría de masas de alta resolución, se encontró una fórmula mínima de C₁₁H₁₅NO₂S (apéndice 1, 1.1).

5.1.2.- Síntesis de N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2).

Para preparar el N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2) se llevaron a cabo las reacciones descritas en el Esquema 3. El nitrobenceno se nitró con mezcla sulfonítrica en caliente;²² el 3-dinitrobenceno obtenido (15) se hizo reaccionar con tiofenol en presencia de carbonato de potasio, usando como disolvente hexametilfosforamida (HMPA).²³ El tioéter obtenido (16) se redujo con cloruro estanoico dihidratado y ácido clorhídrico en caliente. Se obtuvo de esta manera la 3-(feniltio)anilina (17), que por tratamiento con cloroformiato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona, llevó al producto buscado (2).

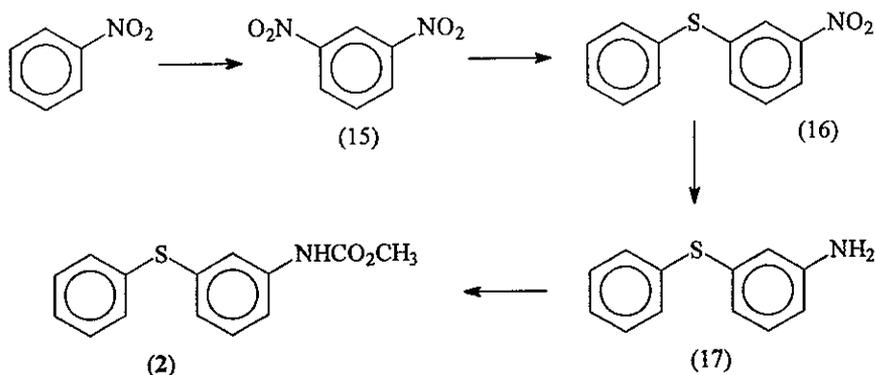
El método de síntesis utilizado para introducir un grupo propiltio, via sales de diazonio, funcionó en la obtención del 3-(propiltio)nitrobenceno (13). Cuando se hizo la misma reacción con tiofenol sobre la sal de diazonio de la 3-nitroanilina, se obtuvo un solo compuesto con rendimiento

cuantitativo; sin embargo, el punto de fusión de este compuesto (120°C) no coincidió con el punto de fusión esperado (42.5°C) reportado para el 3-(feniltio)nitrobenzono (16).²³ El espectro de RMN- ^1H del compuesto obtenido, mostró un total de ocho hidrógenos aromáticos en vez de nueve, como se esperaba para 16. Estos datos son concordantes con la estructura de un producto de sustitución electrofílica aromática, generado por la sal de diazonio como electrófilo y el tiofenol, rico en electrones, según se muestra en la siguiente reacción :



No se hicieron más estudios sobre esta reacción y el producto obtenido.

Esquema 3. Secuencia sintética seguida para la preparación del N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2).



- (a) $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$; (b) $\text{C}_6\text{H}_5\text{SH}$, K_2CO_3 , HMPA; (c) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{HCl}$; (d) ClCO_2CH_3 , NaHCO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$.

Para la preparación del compuesto 16, se partió de un procedimiento especial reportado para la preparación de este compuesto, el cual consiste en formar el

tiofenolato de sodio, con sodio y metanol, aislarlo, purificarlo, y después someterlo a una reacción de sustitución nucleofílica, con el 1,3-dinitrobenceno. El proceso anterior resultó ser complicado, largo y de bajo rendimiento (menor al 10 %) para 16. Considerando la naturaleza de la reacción, la fácil hidratación y oxidación del tiofenolato, se decidió efectuar la reacción en un solo paso en atmósfera inerte. Para ello, a una suspensión formada por la solución de 1,3-dinitrobenceno y hexametilfosforamida (HMPA), se adicionó carbonato de potasio; posteriormente, se lavó con una corriente de nitrógeno y se goteó el tiofenol. El rendimiento del producto obtenido, después de purificarlo, fue de 45 %; su punto de fusión fue de 42-43° C, idéntico al reportado (42.5° C).²³

La reducción del compuesto 16 también se realizó con cloruro estanoso dihidratado y ácido clorhídrico en caliente, obteniendo un excelente rendimiento (~ 100 %) de la 3-(feniltio)anilina (17); esta amina, después de obtenerla se hizo reaccionar con cloroformiato de metilo en acetona. El carbamato 2 se obtuvo con un 62.5 % de rendimiento, como un sólido de color café claro, opaco, amorfo, con punto de fusión de 89-91° C.

La asignación de las señales al infrarrojo para los distintos enlaces presentes en la molécula, se describen en la siguiente tabla, donde se aprecian los grupos carbamato de metilo, aromáticos y el enlace tioéter.

Infrarrojo (espectro No. 5)							
enlace	C-S	N-H	CO-N	C=O	C-H	C-H	N-H
cm ⁻¹	688	1550	1232	1712	2950	3020	3344

En RMN-H¹ se aprecian tres diferentes ambientes magnéticos, correspondientes a los distintos tipos de núcleos de hidrógeno en la molécula. Únicamente la señal que aparece a campos más bajos (9.8ppm) mostró intercambiar con agua deuterada, por lo que se identifica como la correspondiente señal del hidrógeno sobre nitrógeno; cabe señalar que este intercambio con deuterio requirió de un tiempo considerable para observarse.

RMN H¹ (espectro No. 17, señales en ppm)

3.62 (s, 3H, CH₃O-), 6.88-7.55 (m, 9H), 9.8 (s, 1H, -NH-).

Al igual que para el compuesto **1**, se asignaron las 12 señales observadas en RMN- C^{13} a los carbonos del uretano. Debido a que existe equivalencia magnética en algunos de los átomos que se observan en el análisis, 4 carbonos del anillo aromático en el sustituyente feniltio (8, 9, 11 y 12) se observan sobrepuestos en dos de las señales del espectro, ya que absorben en el mismo campo.

RMN C^{13} (espectro No. 27, señales en ppm)							
C	1	2	3	4	5	6	7
δ	146.21	125.46	141.42	129.96	135.26	122.51	140.51
C	8	9	10	11	12	13	14
δ	134.99	136.52	132.93	136.52	134.99	159.70	56.96

La masa molecular determinada para este compuesto fue de 259 unidades (espectro No. 36), la cual, coincide con su masa molecular calculada (259.321 unidades); como pico base se observó a la señal correspondiente al ión molecular de la estructura. Al correr la determinación de espectrometría de masas de alta resolución, se determinó que la fórmula mínima para este carbamato es de $C_{14}H_{13}NO_2S$ (apéndice 1, 1.2).

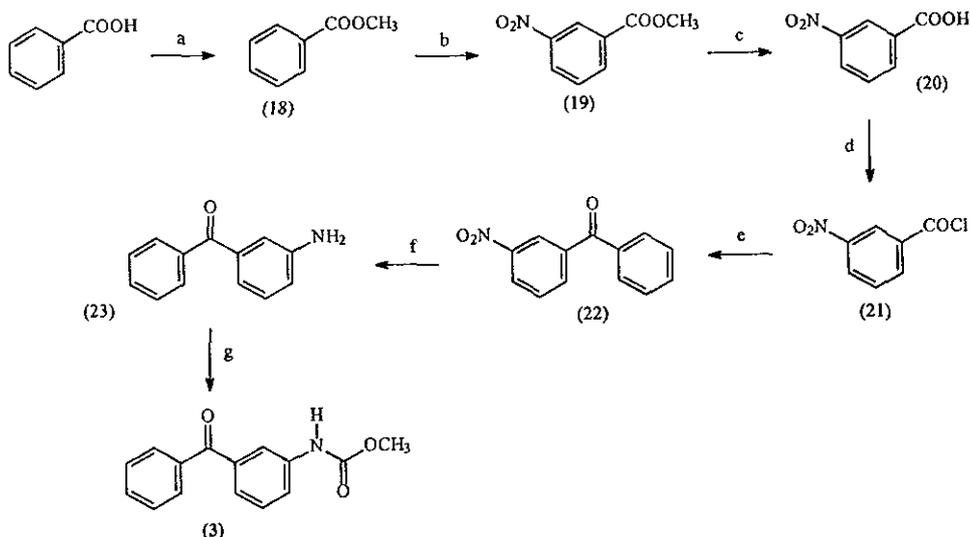
5.1.3.- Síntesis de N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3).

Para la síntesis del compuesto **3** se llevaron a cabo una serie de siete reacciones que van desde el ácido benzoico, hasta la obtención de la amina precursora (**23**) y finalmente el carbamato de metilo. La ruta de síntesis global para su obtención se muestra en el Esquema 4.

Se inició con ácido benzoico comercial, mismo que se sometió a esterificación con metanol en presencia de ácido sulfúrico, para obtener benzoato de metilo (**18**).²⁴ El producto anterior se nitró con mezcla sulfonítrica, dando como producto principal, el 3-nitrobenzoato de metilo (**19**);²⁵ posteriormente, el éster se hidrolizó con hidróxido de sodio acuoso en caliente y el ácido 3-nitrobenzoico (**20**),²⁶ se obtuvo al llevar el medio de reacción a pH 3 en frío. El rendimiento global fue de 74.59 % hasta este compuesto. El ácido seco se trató con pentacloruro de fósforo en caliente y dió el cloruro de 3-nitrobenzoilo (**21**),²⁷ que por tratamiento con benceno y cloruro de aluminio, primero en frío y luego en caliente, llevó a la 3-nitrobenzofenona (**22**). La reducción de ésta con cloruro estanoso dihidratado y ácido clorhídrico en caliente, dió la 3-aminobenzofenona (**23**) que al tratarla con cloroformiato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona, llevó al carbamato (**3**).

La reacción de acilación de Friedel-Crafts con cloruro de aluminio en benceno, para obtener el intermediario 3-nitrobenzofenona (**22**) con un 94.8 % de rendimiento global, se encuentra descrita en la literatura³⁴ y fue relativamente fácil de reproducir.

Esquema 4. Secuencia sintética seguida para la preparación del N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3).



a) $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{SO}_4$, b) $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4$; c) 1 $\text{NaOH} / \text{H}_2\text{O}$, 2. HCl ; d) PCl_5 ; e) $\text{AlCl}_3 / \text{C}_6\text{H}_6$; f) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{HCl}$
g) ClCO_2CH_3 , $\text{NaHCO}_3 / \text{CH}_3\text{COCH}_3$

La reducción catalítica del compuesto 22 con H_2 y Pd/C al 5 %, dió una mezcla de productos, entre los que destacan dos de mayor polaridad que la materia prima. Es factible que en este proceso también se reduzca el grupo carbonilo. Se optó entonces por la reducción química con cloruro estannoso dihidratado y ácido clorhídrico conc.; la cual llevó a un 93 % de rendimiento de un solo producto, identificado por su punto de fusión de $84\text{-}86^\circ \text{C}$, coincidente con el reportado para la 3-aminobenzofenona (23).³⁵

Una vez obtenida la amina precursora, se sometió a la reacción de sustitución nucleofílica general con cloroformato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona, a 5°C . Se obtuvo un 92.7 % de rendimiento de un polvo café claro, fino, con un punto de fusión de $109\text{-}111^\circ \text{C}$. Su caracterización espectroscópica consistió, al igual que para los carbamatos 1 y 2, de espectros de infrarrojo, resonancia magnética protónica y de carbono-13, así como espectrometría de masas.

Los diferentes enlaces presentes en el grupo carbamato de metilo, anillo aromático y grupos carbonilo, se detectan en el espectro infrarrojo (espectro No. 7) de forma clara.

Infrarrojo (espectro No. 7)					
enlace	CO-N	C=O	C=O	C-H	N-H
cm ⁻¹	1232	1652	1730	2948	3306

El grupo carbonilo cetónico presente entre los dos anillos aromáticos, aparece a un número de onda menor que el grupo carbonilo del carbamato de metilo, debido a que este último presenta doble efecto de resonancia (uno por parte del nitrógeno y otro por parte del oxígeno) que aumenta la energía necesaria para producir absorción en el sistema π .

La resonancia de hidrógeno revela un total de tres ambientes magnéticos diferentes en la molécula, al identificarse los siguientes tipos de señales :

RMN H ¹ (espectro No. 19, señales en ppm)
3.72 (s, 3H, CH ₃ O-), 7.12 (s, 1H, -NH-), 7.23-7.90 (m, 9H)

El protón que se encuentra sobre el átomo de nitrógeno se intercambia por deuterio al dejar reposar la muestra del carbamato en presencia de agua deuterada. Fue difícil observar este intercambio, ya que se requirió de un tiempo relativamente grande para adicionar deuterio al uretano y desplazar el correspondiente hidrógeno.

Los núcleos de los átomos de carbono fueron identificados por resonancia magnética de C¹³, calculando sus diferentes desplazamientos y relacionandolos con las señales observadas en el espectro.

RMN C^{13} (espectro No. 28 y 28a, señales en ppm)								
C	1	2	3	4	5	6	7	8
δ	145.45	124.77	143.53	129.25	134.48	127.55	201.27	143.0
C	9	10	11	12	13	14	15	
δ	135.22	133.98	138.08	133.98	135.22	159.86	57.03	

Dos pares de carbonos (9, 10, 12 y 13) presentan desplazamientos químicos registrados en dos señales, lo cual implica que tanto los carbonos 9-13 y 10-12 se encuentren en ambientes magnéticos equivalentes. El grupo carbonilo del carbamato se encuentra localizado a campos más altos que el carbonilo cetónico, debido a que existe en él, un ambiente diamagnético ligeramente mayor, por el efecto resonante de los pares de electrones no compartidos de los dos heteroátomos unidos al mismo. Es prácticamente constante el desplazamiento que presenta este carbono en todos los uretanos analizados.

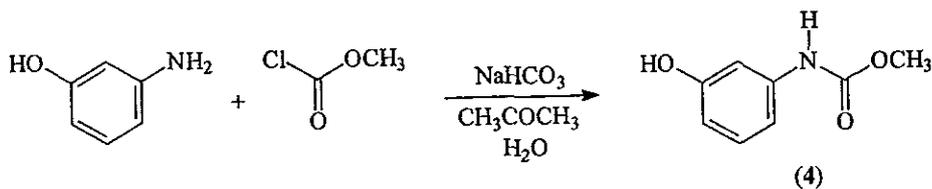
La masa molecular determinada por espectrometría (255 unidades, espectro No. 37) correspondió fielmente con la calculada para su estructura (255.271 unidades).

Los compuestos **1**, **2** y **3** no se encuentran reportados en la literatura, por lo que constituyen tres nuevas estructuras sintéticas.

5.1.4.- Síntesis de N-(3-hidróxifenil)carbamato de metilo (4).

Cuando se hizo reaccionar el 3-aminofenol y cloroformiato de metilo, utilizando acetona seca como disolvente, el bicarbonato de sodio quedó suspendido en el medio de reacción debido a su pobre solubilidad. La temperatura se mantuvo entre 0-5° C. Se obtuvo una mezcla de dos productos en proporción similar. Uno de ellos se formaba más rápido que el otro al inicio de la reacción, y conforme transcurría el tiempo, el segundo aumentaba su concentración. Para explicar esta observación, se propuso que al reaccionar el grupo amino (nucleófilo más fuerte que el hidroxilo), se adiciona sobre el carbonilo del cloroformiato y desprende HCl; éste, lleva a cabo una reacción ácido-base con el grupo amino libre que no ha reaccionado en el 3-aminofenol. Al protonarse, el nitrógeno anilínico no puede funcionar como nucleófilo y da oportunidad al hidroxilo de reaccionar con el cloroformiato, produciendo el compuesto de adición sobre el oxígeno. De esta manera, se consume la totalidad de materia prima (3-aminofenol) y se detectan dos diferentes productos de adición.

Ahora bien, cuando se efectuó la reacción anterior bajo las mismas condiciones, pero con una mezcla de disolventes que se constituyó de 5 partes de acetona por dos partes de agua, el bicarbonato de sodio utilizado se solubilizó casi en su totalidad, por lo que al adicionar el cloroformiato de metilo sobre el 3-aminofenol disuelto, el ácido clorhídrico desprendido se neutralizó inmediatamente con el bicarbonato disuelto en el agua, y no protonó el grupo amino libre del reactivo aromático, obteniendo casi exclusivamente el uretano 4.

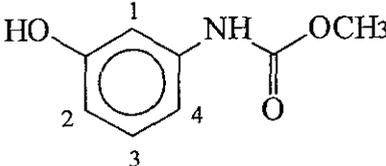


El producto así obtenido con un rendimiento de 93.5 %, correspondió a un sólido de color café oscuro en forma de cristales pequeños, finos, con punto de fusión de 90-92° C. Sus características al infrarrojo definen bien al grupo carbamato a través de sus señales ; se hace

notoria la señal del grupo -OH, alrededor de 3302 cm^{-1} . Los enlaces N-H del uretano también demuestran absorción cercana en esa región espectral, pero a números de onda mayores.

Infrarrojo (espectro No. 8)							
enlace	CO-N	C-OH	N-H	C=O	C-H	O-H	N-H
cm^{-1}	1236	1292	1594	1696	2954	3302	3406

Los espectros de resonancia magnética protónica y de carbono-13 para este compuesto se describen a continuación :

RMN H^1 (espectros No. 20 y 20a, señales en ppm)	
	
3.8 (s, 3H, CH_3O -)	6.74 (s, 1H, -NH-)
6.598-6.636 (ddd, 1H, H-2)	7.152-7.206 (t, 2H, H-1,3)
6.667-6.703 (ddd, 1H, H-4)	7.38 (s, 1H, -OH)

Se observaron dos señales con multiplicidad doble de doble de dobles (hidrógenos 2 y 4), correspondientes a un acoplamiento orto y dos meta (espectro No. 20a). El protón identificado con el número 3, se observó como un triplete con dos constantes de acoplamiento orto (espectro No. 20a) ; sin embargo, el hidrógeno No. 1 no logró definirse. Su multiplicidad esperada es la de un triplete con dos constantes de acoplamiento meta, pero se supone sobrepuesto a la señal central del triplete del hidrógeno 3, tomando como evidencia las integraciones respectivas (tres hidrógenos para las señales de esa región).

El intercambio con agua deuterada se llevó a cabo luego de un tiempo relativamente grande y de manera incompleta, es decir, las señales correspondientes al -OH y -NH- no desaparecen del todo.

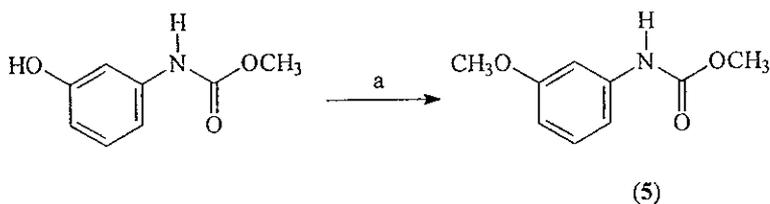
Ocho núcleos de carbono se detectaron en resonancia magnética, asignándole uno a cada señal registrada, de acuerdo al cálculo previo de los desplazamientos químicos teóricos de cada uno de ellos.

RMN C^{13} (espectro No. 29, señales en ppm)								
C	1	2	3	4	5	6	7	8
δ	146.27	110.93	163.83	114.51	134.83	114.98	159.68	56.72

La numeración de los carbonos es totalmente independiente de la numeración de hidrógenos descrita anteriormente. El carbono que aparece a campos más bajos es el aromático identificado con el número 3, mientras que el grupo metilo demuestra tener el mayor efecto diamagnético, al registrarse en 56.72 ppm.

5.1.5.- N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo (5).

El carbamato de metilo obtenido en la reacción anterior se purificó por cristalización, y se utilizó para la síntesis del siguiente uretano, el N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo (5). Se disolvió el compuesto 4 en etanol y se enfrió hasta una temperatura entre 0-5° C. Sobre esta solución, se adicionó una mezcla de hidróxido de sodio y etanol, con el objeto de formar el fenolato (nucleófilo más fuerte que el correspondiente fenol). Una vez formado, se hizo reaccionar con sulfato de dimetilo, para metilar el oxígeno fenólico y producir el correspondiente carbamato de metilo, con un grupo metoxi en posición 3.



a. 1. NaOH , CH₃CH₂OII , 2 (CH₃)₂SO₄

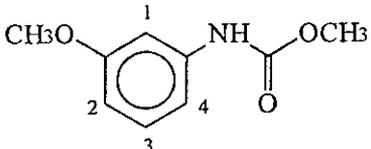
El compuesto 5 se obtuvo con un rendimiento del 51.1 % como un compuesto sólido de color café claro, con punto de fusión de 44 a 46° C. Al observar su espectro infrarrojo se pudo determinar la desaparición de la señal correspondiente al enlace -OH, y la presencia del enlace C-O-C del éter formado.

Infrarrojo (espectro No. 9)					
enlace	C-O-C	CO-N	C=O	C-H	N-H
cm ⁻¹	1048	1232	1706	2954	3338

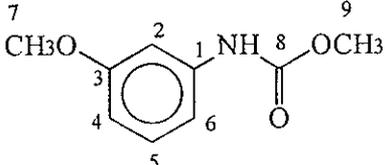
Las señales de resonancia magnética protónica hacen evidente la desaparición del hidrógeno fenólico, permaneciendo prácticamente el mismo patrón de multiplicidad entre los hidrógenos aromáticos, con relación a su materia prima, es decir, los hidrógenos 2 y 4 presentan multiplicidad doble de doble de dobles, mientras que el hidrógeno 3 se observa como un triplete con

dos constantes de acoplamiento orto. De nuevo, el protón 1 no logró resolverse al quedar sobrepuesto en el pico central del triplete anterior.

Debido a que los dos grupos metilo tienen ambientes magnéticamente muy similares, absorben prácticamente en el mismo campo (3.8 ppm); por lo que, únicamente con el espectro protónico es muy difícil asignar a cual de ellos corresponde cada señal en esta región (3.809-3.834 ppm).

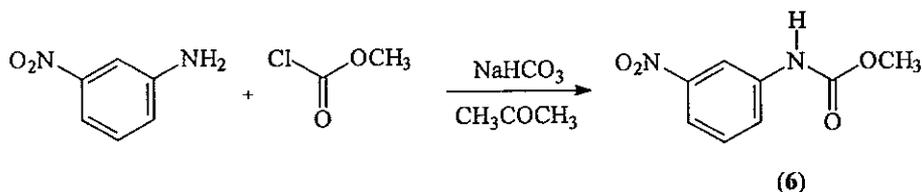
RMN H^1 (espectro No. 21, señales en ppm)	
	
3.809 (aromático, s, 3H, CH_3O -)	6.76 (s, 1H, -NH-)
3.834 (carbamato, s, 3H, CH_3O -)	6.887-6.923 (ddd, 1H, H-4)
6.637-6.676 (ddd, 1H, H-2)	7.203-7.256 (t, 2H, H-1,3)

Un total de nueve átomos de carbono fueron identificados en resonancia magnética, los cuales, corresponden con el número y tipo de carbonos presentes en la estructura del uretano.

RMN C^{13} (espectro No. 30, señales en ppm)				
				
C	1	2	3	4
δ	143.37	109.66	165.66	113.05
C	6	7	8	9
δ	115.99	60.17	159.72	56.83

5.1.6.- Síntesis de N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo (6).

La síntesis de este carbamato de metilo tomó como base la reacción general de obtención de los carbamatos de metilo. Se disolvió la 3-nitroanilina obtenida comercialmente (previamente purificada) en acetona, y se hizo reaccionar con cloroformiato de metilo en acetona a 50° C en presencia de bicarbonato de sodio. Se incrementó la temperatura para esta reacción, debido a que la fuerza nucleofílica del nitrógeno anilínico se vió disminuida considerablemente, por la acción electrón-atrayente del grupo nitro en posición 3, por lo que la reacción se tornó muy lenta a bajas temperaturas.



El uretano 6, obtenido con un 94.6 % de rendimiento, fue un sólido color café claro, fino, con punto de fusión de 147-149° C. El espectro infrarrojo de este carbamato de metilo mostró además de las señales características descritas anteriormente, las correspondientes bandas de absorción de los enlaces nitrógeno-oxígeno del grupo nitro.

Infrarrojo (espectro No. 10)							
enlace	CO-N	C-NO2	C-NO2	C=O	C-H	C-H	N-H
cm⁻¹	1230	1352	1526	1714	2958	3092	3044

El espectro de resonancia magnética protónica de este compuesto, presenta 5 diferentes ambientes protónicos.

RMN H^1 (espectro No. 22, señales en ppm)	
3.7 (s, 3H, CH ₃ O-)	8.5 (t, 1H, H-1)
7.6 (t, 1H, H-3)	10.25 (s, 1H, -NH-)
7.8-8.0 (m, 2H, H-2,4)	

Se observaron variaciones considerables en relación con los espectros de resonancia de hidrógeno de los compuestos anteriores ; el protón No. 1 que no era observado en los uretanos 4 y 5, se desplazó hasta 8.5 ppm debido al efecto electrón-atrayente del grupo nitro, y con ello, se separó de la señal triple del hidrógeno 3 que aparece a campos más altos (7.6 ppm).

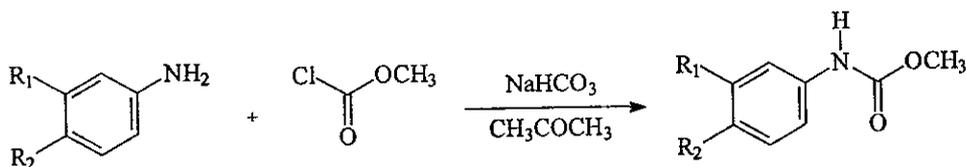
Los protones 2 y 4 muestran el comportamiento característico de un acoplamiento en orto y dos en meta, produciendo dos señales doble de doble de dobles, que no se resuelve igual que en los espectros de 300 Mhz (espectros 20 y 21), sin embargo, se aprecia la integración para estos dos hidrógenos.

Una observación importante fue el desplazamiento de la señal del protón sobre nitrógeno, que se detectó hasta 10.25 ppm. El efecto electrón-atrayente del grupo nitro afectó considerablemente el ambiente magnético de este hidrógeno, aumentando la desprotección magnética en los alrededores del mismo, y con ello, ejerciendo un gran efecto paramagnético en él.

Los ocho átomos de carbono presentes en la estructura de este carbamato, se detectaron en resonancia magnética nuclear, asignándole a cada uno, su señal correspondiente.

RMN C^{13} (espectro No. 31, señales en ppm)				
C	1	2	3	4
δ	146.55	117.70	154.05	122.39
C	5	6	7	8
δ	135.60	129.57	159.79	57.30

Los tres carbamatos de metilo restantes fueron sintetizados por medio de la reacción general, utilizando la correspondiente anilina sustituida, con cloroformiato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona, a una temperatura de 50-55° C para los tres.



No.	R ₁	R ₂	Nombre
7	Cl	H	N-(3-clorofenil)carbamato de metilo
8	Cl	Cl	N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo
9	H	H	N-fenilcarbamato de metilo

Los átomos de cloro fuertemente electronegativos, ejercen su acción electrón-atrayente sobre el anillo aromático y a su vez, sobre el nitrógeno anilínico, por lo que fue necesario aumentar la temperatura y así obtener los correspondientes productos de adición.

5.1.7.- Síntesis de N-(3-clorofenil)carbamato de metilo (7).

Este compuesto se obtuvo con un rendimiento de 94.8 %, como un sólido de color blanco con punto de fusión de 81 a 83° C.

Se identificó como el carbamato de metilo 7 por sus datos espectroscópicos. En su espectro de infrarrojo se observaron las bandas características del grupo carbamato de metilo y grupo bencénico. El enlace carbono-cloro se asignó a la banda presente a 1074 cm^{-1} , siendo el nuevo enlace presente en la posición 3 del uretano.

Infrarrojo (espectro No. 11)						
enlace	C-Cl	CO-N	C=O	C-H	C-H	N-H
cm^{-1}	1074	1248	1708	2954	3070	3350

Las señales de RMN- H^1 que se obtuvieron al correr el espectro correspondiente, mostraron el patrón de desplazamiento y multiplicidad siguientes :

RMN H^1 (espectro No. 23, señales en ppm)	
3.7 (s, 3H, CH_3O -)	7.2 (m, 2H, H-2,3)
6.8 (s, 1H, -NH-)	7.5 (t, 1H, H-1)
6.9-7.1 (ddd, 1H, H-4)	

Aunque los protones 2 y 3 presentan multiplicidades diferentes, los dos absorben en campos similares, por lo que el triplete del hidrógeno 3 se sobrepone a la señal doble de doble de dobles del hidrógeno 2 (la integral para esa región espectral corresponde al área de dos protones). El hidrógeno 1 se desplaza a campos más bajos, y con ello, se observa su señal en forma de un triplete no muy definido, pero con la constante de acoplamiento meta.

El protón sobre nitrógeno (6.8 ppm) no se vió influenciado de manera significativa como sucedió con el compuesto **6**, donde su señal se desplazó a campos muy bajos (10.25 ppm).

De nuevo, un total de 8 núcleos de carbono fueron identificados en resonancia magnética. A cada uno de ellos le fue asignada una señal del espectro obtenido.

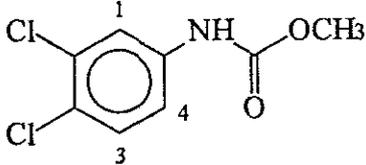
RMN C ¹³ (espectro No. 32)				
C	1	2	3	4
δ	146.77	123.16	139.16	127.61
C	5	6	7	8
δ	135.85	122.05	159.72	57.08

5.1.8.- Síntesis de N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo (8).

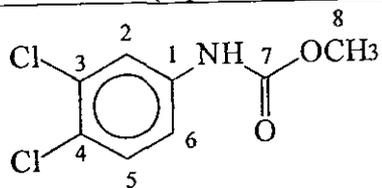
Siguiendo la ruta de síntesis general propuesta para la obtención de los carbamatos de metilo, al reaccionar la 3,4-dicloroanilina con cloroformiato de metilo en acetona, se obtuvo un sólido de color blanco, fino, de punto de fusión de 110 a 112° C, con un rendimiento de 97.9 %. La asignación de bandas al infrarrojo para este uretano se describe en la siguiente tabla.

Infrarrojo (espectro No. 12)							
enlace	C-Cl	CO-N	N-H	C=O	C-H	N-H	N-H
cm ⁻¹	1078	1250	1540	1712	2956	3334	3364

Este derivado en particular, únicamente presenta tres hidrógenos aromáticos, por lo que la multiplicidad es diferente en ellos. El protón 1 se mostró como un doblete a campos bajos, con una constante de acoplamiento meta; el protón 3 también se presentó como un triplete pero con una J correspondiente a un acoplamiento orto; solamente el hidrógeno 4 se acopla con más de un núcleo, por lo que se identificó como un doble de dobles, con dos constantes de acoplamiento diferentes.

RMN H ¹ (espectro No. 24, señales en ppm)	
	
3.8 (s, 3H, CH ₃ O-)	7.35 (d, 1H, H-3)
6.75 (s, 1H, -NH-)	7.6 (d, 1H, H-1)
7.15-7.25 (dd, 1H, H-4)	

La caracterización de los núcleos de carbono en el espectro obtenido, observó un total de ocho señales. El carbono carbonílico fue el núcleo más desprotegido magnéticamente, al desplazarse hasta 159.6 ppm. Prácticamente en todos los carbamatos de metilo sintetizados, este fue el núcleo de carbono que presenta el ambiente paramagnético mayor.

RMN C^{13} (espectro No. 33)

C	1	2	3	4
δ	145.44	124.88	137.01	129.75
C	5	6	7	8
δ	136.20	123.72	159.66	57.23

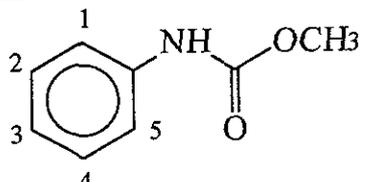
5.1.9.- Síntesis de N-fenilcarbamato de metilo (9).

El carbamato de metilo con un hidrógeno en posición 3, corresponde al derivado más sencillo de toda la serie. Tomando como material de partida la anilina y cloroformiato de metilo en acetona y bicarbonato de sodio, el producto obtenido correspondió a un sólido de forma cristalina, de color azul claro, con punto de fusión de 42 a 44° C, con un rendimiento de 90.1%, luego de una recrystalización necesaria para purificarlo.

De igual manera que sus compañeros de serie, este compuesto se caracterizó por las siguientes técnicas espectroscópicas :

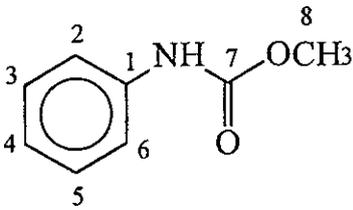
Infrarrojo (espectro No. 13)						
enlace	CO-N	C=O	C-H	C-H	N-H	N-H
cm ⁻¹	1242	1708	2950	3054	3302	3354

Donde se aprecia de forma clara el número y tipo de enlaces presentes en la estructura de este uretano. Aunque se presenta el uretano 9 hasta el final de toda la serie, en realidad fue el primer compuesto que se obtuvo en el laboratorio. Sirvió como base para la determinación de las condiciones de reacción de los otros derivados, así como para la caracterización de cada uno de los enlaces del grupo carbamato de metilo y anillo aromático, ya que no hay sobreposición de estas con otro tipo de bandas que cada compuesto presentó, de forma adicional, por llevar diferentes sustituyentes en la posición 3.

RMN H ¹ (espectro No. 25, señales en ppm)	
	
3.82 (s, 3H, CH ₃ O-)	7.317-7.370 (td, 2H, H-2,4)
6.87 (s, 1H, -NH-)	7.42-7.44 (d, 2H, H-1,5)
7.078-7.135 (tt, 1H, H-3)	

Un total de cuatro ambientes magnéticos diferentes se identificaron en el espectro, correspondientes a siete protones presentes en la estructura molecular. El hidrógeno 3 se encuentra acoplado con cuatro protones, con dos diferentes constantes de acoplamiento, dos orto y dos meta, por lo que se presentó como un triple de triples. Los ambientes magnéticos alrededor de las posiciones 2 y 4 hacen que estos protones absorban en el mismo campo y muestren dos señales sobrepuestas, con una multiplicidad triple de doble.

Los hidrógenos 1 y 5 mostraron únicamente su acoplamiento orto, por lo que se presentan como un doblete sencillo, que integra para dos núcleos de hidrógeno.

RMN C^{13} (espectro No. 34, señales en ppm)				
				
C	1	2	3	4
δ	145.20	127.85	134.22	123.67
C	5	6	7	8
δ	134.22	127.85	159.82	56.83

Los ocho átomos de carbono que contiene este carbamato, se identificaron, presentándose en la tabla anterior.

5.2.- Ensayos de actividad biológica.

5.2.1.- Obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.

Para la obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*, se siguió el procedimiento descrito por Dennis.²⁸ Ratas de la cepa Sprague-Dawley se infectaron con 3,000 larvas musculares de *T. spiralis*. Después de 28 días post-infección, los animales fueron sacrificados y el músculo esquelético fue macerado y digerido artificialmente con una solución de pepsina y ácido clorhídrico al 1 %, durante tres horas a 37° C con agitación constante.

Posteriormente, la suspensión se pasó por un tamiz y dejó que las larvas se sedimentaran por 15 min. El sedimento obtenido fue transferido a tubos Falcon de 15 ml y centrifugado por 15 min. a 2,500 r.p.m.

Se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete larvario con una solución amortiguadora de fosfato salino pH 7.3 (PBS 1X). Se procedió a resuspender en bactoagar al 0.02 % para cuantificar el número de larvas obtenidas.

5.2.2.- Ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de los compuestos 1-9 sobre *Trichinella spiralis*.

Para determinar la viabilidad de las larvas musculares de este helminto, se utilizó el método descrito y publicado por Towson,²⁹ con algunas modificaciones. Los parásitos fueron cultivados en presencia de los nueve N-fenilcarbamatos de metilo 3-sustituidos, obtenidos previamente en el laboratorio, a dos concentraciones diferentes (1 y 10 µg/mL).

El ensayo particular para cada compuesto, consistió en poner en contacto las larvas musculares obtenidas, con cada carbamato de metilo, bajo las siguientes condiciones :

- a) Se prepararon soluciones de los fármacos por ensayar, a una concentración de 1 mg/mL en DMF.
- b) Las larvas obtenidas de *T. spiralis* fueron incubadas previamente por 24 hr en bacto agar al 0.2%, en presencia de antibióticos para inhibir el crecimiento de cualquier especie bacteriana.

- c) Después de esta incubación, se realizó un conteo de las mismas, para transferir un total de 1,000 de ellas a un tubo de incubación de 4 mL.
- d) Se adicionó un volumen de 2 o 20 μL de la solución del fármaco al tubo de cultivo con las larvas.
- e) Se adicionó la cantidad suficiente de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), hasta llegar a un volumen final de 2 mL. Las concentraciones finales de fármaco en estos ensayos fue de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.
- f) Se incubó este sistema por 72 hr a 37° C.
- g) Luego de este periodo, los parásitos fueron transferidos a tubos eppendorf de 2 mL, los cuales, fueron centrifugados a 2,500 rpm durante 2 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS, desechando el sobrenadante. Se adicionó un ml de reactivo MTT, una gota de metasulfonato de fenacina (MSF) como catalizador, y 100 μL de DMSO. Se agitó el contenido del tubo y se incubó a 37 ° C por 50 min.
- h) Al término de la incubación se realizó nuevamente un lavado con PBS, desechando el sobrenadante ; se adicionó un volumen de 500 μL de DMSO, se agitó y se dejó reposar por un tiempo de 1 hora a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo de reposo, se centrifugó a 2,500 rpm durante 2 min. y se transfirió la solución resultante a una placa para lector de ELISA, la cual fue leída a una longitud de onda de 492 nm, para su cuantificación.

Tomando como base la actividad enzimática que presentan las larvas de *Trichinella spiralis*, bajo la presencia de un sustrato artificial como el MTT, se midió la diferencia en actividad enzimática en cultivos celulares *in vitro*, entre un sistema donde se puso en contacto al parásito con cada uno de los nueve carbamatos de metilo 3-sustituidos, y un control sin fármaco. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Se utilizaron también como controles de comparación, el albendazol, mebendazol y fenbendazol, que son los tres fármacos antihelmínticos utilizados clínicamente, que fueron objeto de modificaciones moleculares, hasta llegar a los N-fenilcarbamatos de metilo diseñados y sintetizados.

Tabla 5. Resultados de actividad biológica para los nueve carbamatos de metilo sintetizados, así como la correspondiente actividad biológica para los bencimidazoles antihelmínticos utilizados clínicamente.

Compuesto	% de reducción de la actividad enzimática (1 µg/mL) ^a	% de reducción de la actividad enzimática (10 µg/mL) ^b
Albendazol	0	30 ± 6
Mebendazol	0	47 ± 3
Fenbendazol	0	26 ± 10
1	0	34 ± 2
2	0	27 ± 3
3	0	16 ± 6
4	0	18 ± 6
5	0	0
6	0	4 ± 3
7	0	13 ± 4
8	0	0
9	0	0

^a Resultado obtenido luego de realizar dos experimentos por duplicado ; ^b resultados de actividad luego de realizar cuatro experimentos por duplicado.

Ninguno de los compuestos ensayados (incluyendo a los bencimidazoles de uso clínico) mostró actividad inhibitoria en contra de las larvas, a una concentración de 1µg/mL; sin embargo, aumentando diez veces esta concentración, se logró reducir la actividad enzimática del parásito de forma significativa.

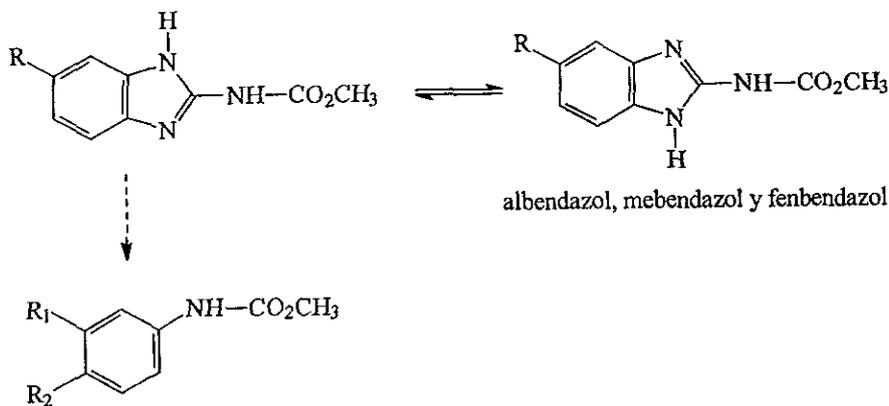
Para los compuestos bencimidazólicos, la reducción de la viabilidad de *Trichinella spiralis* representa el mayor porcentaje. Los carbamatos de metilo 1, 2 y 3 mostraron un porcentaje de reducción equiparable a sus análogos heterocíclicos. El carbamato de metilo No. 4, que presenta un grupo hidroxilo en posición 3, también fue capaz de inducir de manera significativa esta actividad inhibitoria, mientras que los otros miembros de la serie no presentaron reducción apreciable.

6.- CONCLUSIONES

1.- Las nueve estructuras diseñadas en esta tesis fueron sintetizadas satisfactoriamente. El método general de síntesis a partir de la anilina, adecuadamente sustituida, cloroformiato de metilo y bicarbonato de sodio en acetona, llevó a los productos **1-9**, con buenos rendimientos en la mayoría de los casos.

2.- Los procedimientos sintéticos seguidos, tanto para la obtención de los productos finales **1, 2 y 3**, como para sus intermediarios, son más simples que los seguidos para la síntesis de los bencimidazol carbamatos análogos.

3.- Los ensayos de actividad biológica *in vitro* contra *Trichinella spiralis*, indican que no es imprescindible el núcleo heterocíclico de bencimidazol, para la actividad antihelmíntica. Sin embargo, la naturaleza del sustituyente en posición 3 del carbamato de metilo, es importante, ya que cuando éste fue propiltio, feniltio o benzoilo, la actividad biológica fue equiparable a la de los bencimidazoles con cadenas similares en posición 5(6).



N-fenilcarbamatos de metilo **1, 2 y 3**

El compuesto **4** que presenta un grupo -OH en posición 3, también mostró ser biológicamente activo, pero los compuestos restantes (**5-9**) no fueron activos significativamente.

4.- Los sustituyentes relativamente voluminosos en la posición 3, permiten una mayor interacción con algún sitio receptor del parásito, ya que cuando el volumen disminuye en los sustituyentes presentes en los compuestos 6-9, la actividad es baja o nula. Es muy probable que el grupo OH en 3, participe en la interacción a través de enlaces de hidrógeno, ya que cuando se éste se metila, la actividad se pierde.

5.- En el caso particular del compuesto 1, análogo al albendazol, se determinó un porciento de reducción en la actividad enzimática, equiparable al de su homólogo heterocíclico. Por lo que se puede inferir que estas estructuras se adaptan a un sitio receptor en común, debido a su gran similitud estructural, aunque el fenilcarbamato de metilo sea relativamente más pequeño. La distribución electrónica, hibridación, planaridad y distancia entre sus átomos, es biológicamente equivalente.

6.- La actividad inhibitoria mostrada por el carbamato de metilo 2, resultó ser aproximadamente la mitad de la observada para su homólogo, el mebendazol. Al disminuir el número de átomos del anillo heterocíclico del mebendazol, se producen cambios conformacionales que limitan su interacción con su sitio receptor. Si las estructuras del mebendazol y del N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo, presentan más de un conformero bajo las condiciones del ensayo, se favorece un aumento en la concentración del conformero activo en un sistema donde el número total de átomos aromáticos, es mayor (mebendazol). De tal forma, aunque el derivado 2 no presenta una actividad biológica equiparable al bencimidazol, mantiene una interacción con el sitio receptor, lo que hace mantener la teoría de que el número de átomos del anillo aromático no es un requisito indispensable para la actividad antihelmíntica.

7.- Cuando el sustituyente en posición 3 es un benzoilo, la analogía estructural y conformacional entre el anillo bencimidazólico (fenbendazol) y el anillo del uretano (3), es de nuevo evidente, aunque no sea exactamente la misma. Al igual que para el derivado feniltio- sustituido, la reducción en el número total de átomos del anillo aromático, resulta importante pero no indispensable.

7.- PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Instrumentación.

Los espectros para la caracterización al infrarrojo de los compuestos sintetizados, se obtuvieron corriendo las muestras en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 337, en pastilla de bromuro de potasio ; las señales se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno a 90 MHz, se realizaron en un espectrómetro Varian EM-390 ; la resonancia de hidrógeno y de carbono-13 a 300 y 400 MHz se llevó a cabo en un aparato Varian Unity-Inova, utilizando cloroformo, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo deuterados, como disolventes (según corresponda a cada compuesto). La referencia empleada para todos ellos fue el tetrametil silano (TMS), y las señales de desplazamiento químico se reportan en ppm (δ) relativas a este último.

Un espectrómetro de masas modelo JMS-AX505 HA, marca Jeol, se utilizó para la obtención de los espectros de masas reportados.

La determinación de los puntos de fusión para todos los compuestos sintetizados, se efectuó en un aparato Buchi modelo 530. La evaporación de disolventes se basó en la utilización de un rotavapor Buchi modelo 461 conectado a una bomba de vacío y condensador de hielo seco.

Los ensayos de actividad biológica en contra de las larvas musculares de *Trichinella spiralis*, fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas Tropicales y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Estas, estuvieron a cargo de la Dra. Lilán Yopez Mulia, Dr. Roberto Cedillo y del Q.F.B. Raúl Morales.

7.2. Cromatografía.

Las reacciones efectuadas y la pureza de los productos obtenidos, se verificaron por cromatografía en placa fina, utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice GF₂₅₄ de marca Merck. Se utilizó como revelador luz ultravioleta (lámpara modelo UVGL-25), vapores de yodo y una solución etanólica saturada de ácido fosfomolibdico. La tabla 6 muestra los sistemas de elución utilizados para resolver las placas cromatográficas.

Tabla 6. Sistemas de elución cromatográficos.

Sistema	Disolvente	Proporción
1	Hexano	50
	Cloroformo	35
	Acetato de etilo	15
2	Hexano	90
	Acetato de etilo	10
3	Cloroformo	90
	Metanol	10
4	Hexano	95
	Acetato de etilo	5
5	Hexano	95
	Ciclohexano	5
6	Tolueno	180
	Tetrahidrofurano	18
	Solución 16 M de ácido acético	6

7.3. N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).

7.3.1. 4-tiociano-2-nitroanilina (10).²⁰ En un matraz de 500 ml de tres bocas, se disolvieron 10 g (0.072 mol) de 2-nitroanilina en 150 ml de metanol, y adicionaron 13.23 g (0.17 mol) de tiocianato de amonio, hasta formar una solución homogénea, misma que se llevó a una temperatura de 0 a 5 °C con baño de hielo. Gota a gota, y con agitación constante, se adicionó una solución de 4.1 ml (12.71 g, 0.07 mol) de bromo, en 15 ml de metanol saturado con bromuro de sodio, y se mantuvo la agitación a dicha temperatura por un periodo de 6 h. La mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de hielo, y agitó hasta precipitación total. El producto crudo de reacción se separó por filtración al vacío y dejó secar al aire hasta peso constante. Se obtuvieron 10.9 g (78 %) de un sólido amarillo con punto de fusión de 114-115 °C, correspondiente al 4-tiociano-2-nitroanilina (lit. 116-117 °C).

Por cromatografía en placa fina se observó una sola mancha con Rf de 0.27 (sistema 1). IR : (espectro No. 1) 1260 (C-NH₂), 1342 (C-NO₂), 1506 (C-NO₂), 1624 (N-H), 2152 (CN), 3078 y 3182 (C-H), 3356 y 3472 (N-H).

7.3.2. 2-nitro-4-(propiltio)anilina (11).²⁰ En un matraz de 250 ml de 3 bocas, adaptado con termómetro, un refrigerante de aire y un embudo de adición de presiones igualadas, se mezclaron 10 g (0.051 mol) de 4-tiociano-2-nitroanilina, 20 ml de cloroformo, 18 g (22.5 ml, 0.3 mol) de 1-propanol, 36.9 g (27.3 ml, 0.30 mol) de 1-bromopropano y 0.8 g de solución acuosa al 70 % de cloruro de tetrabutilamonio. Con agitación constante, se incrementó gradualmente la temperatura hasta 50 °C; posteriormente, se adicionaron 60 g (0.25 mol) de una solución acuosa al 25 % de cianuro de sodio, y la mezcla se agitó por un periodo de 3 h. Se dejó llegar a temperatura ambiente, y entonces, se pasó a un embudo de separación y extrajo el producto con tres fracciones de acetato de etilo. Se evaporó el disolvente y resuspendió el producto (aceite rojizo) en cloroformo para filtrarlo en una columna de 2 x 66 cm, conteniendo 50 g de sílica gel suspendidos en hexano. Se eluyó con cloroformo, las fracciones que contenían al producto se juntaron y concentraron a presión reducida, dejando un líquido color rojizo correspondiente a la 2-nitro-4-(propiltio)anilina, que presentó una sola mancha en cromatografía de capa fina, con un Rf de 0.53 (sistema 1).

7.3.3.- 3-(propiltio)nitrobenzono (13). 82.5 ml (0.87 mol) de solución acuosa de ácido hipofosforoso al 50 % y 100 ml de agua, se utilizaron para formar una suspensión con el producto crudo de reacción anterior (aproximadamente 10.8 g, 0.051 mol considerando un rendimiento del 100 % en la reacción de alquilación). Este sistema se llevó a una temperatura de 0 a 5 °C en baño de hielo-sal, y agitó vigorosamente, luego se agregaron 3.9 g (0.056 mol) de nitrito de sodio disueltos en 17 ml de agua, de forma que el desprendimiento de nitrógeno fuera controlado. Se mantuvo la agitación por un tiempo de 3 h a esta temperatura. Luego de observar que se consumió la totalidad de materia prima, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y el producto se extrajo con acetato de etilo. Las partes orgánicas reunidas se lavaron con agua, secaron y concentraron a presión reducida. Se obtuvo un aceite de color oscuro que se sometió a destilación fraccionada a presión reducida, para eliminar los productos secundarios de alta polaridad.

Se consiguió destilar 7 g de un aceite amarillo que se purificaron en una columna de 2 x 66 cm, con 50 g de sílica gel suspendidos en hexano. La columna se eluyó con hexano; las fracciones que contenían al producto se juntaron y concentraron a presión reducida, dejando 6 g (60 %) de un aceite amarillo claro, que en cromatografía en capa fina mostró una sola mancha con un R_f de 0.53 (sistema 2). IR (espectro No. 2) : 670 (C-S aromático), 1348 (C-NO₂), 1526 (C-NO₂), 2964 (C-H saturado). RMN H¹ (espectro No. 14, CDCl₃): δ 1.1 (t, 3H, CH₃CH₂-), 1.67 (sex., 2H, CH₃CH₂CH₂-), 2.97 (t, 2H, -CH₂CH₂S-), 7.3-7.5 (t, 1H, H-3), 7.52-7.65 (dt, 1H, H-2), 7.92-8.05 (dt, 1H, H-4), 8.15 (t, 1H, H-1).

7.3.4. 3-(propiltio)anilina (14). Se adicionaron 5.4 g (0.027 mol) de 3-(propiltio)nitrobenzono, a una solución de una mezcla de 42.7 ml (1.4 mol) de ácido clorhídrico concentrado, y 18.9 g (0.08 mol) de cloruro estanoico dihidratado,²⁷ a temperatura ambiente. Con fuerte agitación, se incrementó gradualmente la temperatura hasta 90 °C, y se mantuvo la reacción por 2 h. Se enfrió a temperatura ambiente y agregaron 50 ml de agua, la suspensión formada se neutralizó y basificó con hidróxido de sodio, en baño de hielo, hasta un pH de 13. Posteriormente se hicieron tres extracciones con 80 ml de acetato de etilo cada una. El extracto se lavó con tres porciones de 60 ml de agua para eliminar las sales de estaño, secó con sulfato de sodio anhidro y eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo 4.3 g (95.5 %) de un

aceite café obscuro. En cromatografía en capa fina se observó una sola mancha con un Rf de 0.31 (sistema 2).

7.3.5.- N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1). En un matraz de 100 ml de tres bocas, adaptado con termómetro y embudo de adición de presiones igualadas, se disolvieron 4.2 g (0.025 mol) de 3-(propiltio)anilina en 20 ml de acetona; después, se adicionaron 2.1 g (0.025 mol) de bicarbonato de sodio. Esta suspensión se enfrió en baño de hielo hasta 5 °C y agregó, gota a gota, una solución de 2.3 ml (2.8 g, 0.03 mol) de cloroformiato de metilo en 5 ml de acetona. Después de 2 h de reacción, se adicionó 50 g de hielo y agitó hasta fusión del mismo. Se extrajo el producto con tres fracciones de 30 ml de acetato de etilo, se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y destiló el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 5.2 g (92 % rendimiento crudo) de un líquido amarillo claro. El producto se purificó en una columna de 2 x 66 cm, con 25 g de sílica gel suspendidos en hexano; esta separación se realizó utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo 90:10 como eluyente. Luego de recolectar las fracciones orgánicas que contenían al carbamato, se eliminó el disolvente a presión reducida y obtuvo 3.1 g (55.3 %) de un sólido amarillo claro con punto de fusión de 30-32 °C, que en cromatografía de placa fina mostró una sola mancha con un Rf de 0.46 (sistema 1).

7.4. N-[3-(propiltio)fenil] carbamato de metilo (1). Síntesis alterna.

7.4.1. 3-(propiltio)nitrobenzono (13). Se mezclaron 6 g (0.043 mol) de 3-nitroanilina, 9 g de hielo y 9 ml (0.3 mol) de ácido clorhídrico concentrado hasta formar una pasta uniforme. Posteriormente, se enfrió en baño de hielo-sal hasta llegar a 0-5 °C, temperatura a la cual, se goteó una solución previamente enfriada de 3 g (0.043 mol) de nitrito de sodio y 9 ml de agua. Durante toda la adición, y por un tiempo de 1 h, se mantuvo la temperatura entre 0 y 5 °C; posteriormente, se agregaron 4 ml (3.29 g, 0.043 mol) de 1-propanotiol. La mezcla de reacción se agitó por 30 minutos y posteriormente se adicionaron 50 g de hielo. Se extrajo el producto con 3 porciones de 30 ml de acetato de etilo, la fase orgánica se lavó, secó y eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo un aceite café-rojizo, mismo que se sometió a purificación por cromatografía en columna (2 x 66 cm) con 40 g de sílica gel suspendidos en hexano, y se utilizó este disolvente para eluir al producto.

Se obtuvieron 5 g (83 % de rendimiento), de un aceite amarillo claro que en cromatografía de placa fina, mostró una sola mancha con un Rf de 0.45 (sistema 1). El 3-propiltionitrobenceno así obtenido, mostró constantes físicas y espectroscópicas iguales, al obtenido por la ruta sintética descrita anteriormente.

7.4.2. 3-(propiltio)anilina (14). Un total de 5 g de 3-(propiltio) nitrobenceno (0.025 mol) se agregaron a una solución de 20.6 ml (0.677 mol) de ácido clorhídrico concentrado, y 20.5 g (0.09 mol) de cloruro estanoso dihidratado.²⁷ Posteriormente, se incrementó gradualmente la temperatura hasta 90 °C y agitó de manera constante hasta formar una solución homogénea. Luego de 40 minutos se observó la desaparición de materia prima. Se vertió la mezcla de reacción sobre 100 g de hielo y agitó hasta fusión del mismo. Se neutralizó y alcalinizó esta suspensión hasta un pH de 13 con hidróxido de sodio; se extrajo el producto con tres fracciones de 40 ml de acetato de etilo, y luego se lavó la fase orgánica con tres porciones de 30 ml de agua para eliminar las sales de estaño, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y destiló el disolvente a presión reducida, obteniendo un líquido café claro, que en cromatografía en placa fina mostró un Rf de 0.30 (sistema 2).

7.4.3. N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1). El producto de reacción anterior, correspondiente a la 3-(propiltio)anilina (aproximadamente 4.2 g, 0.025 mol), se disolvió en 25 ml de acetona y se agregó 2.5 g (0.03 mol) de bicarbonato de sodio. Este sistema se enfrió en baño de hielo hasta una temperatura de 5°C, y entonces, se gotearon 2.3 ml (0.03 mol) de cloroformiato de metilo disueltos en 5 ml de acetona. Bajo agitación mecánica, y por un periodo de 30 minutos, se dejó reaccionar la amina con el compuesto carbonílico. Posteriormente, se vertió la mezcla de reacción sobre 50 g de hielo y se agitó hasta fundirlo. Se extrajo el producto con tres fracciones de acetato de etilo, lavó con agua, secó y destiló el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 3.5 g (61.9 %) de un sólido amarillo claro, con punto de fusión de 30-32° C, y un Rf de 0.46 (sistema 1).

7.5. N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2).

7.5.1. m-dinitrobenceno (15).²² En un matraz de 500 ml de fondo redondo de una boca, contenido en baño de hielo-sal, se adicionaron 48.8 ml (3.08 g, 1.16 mol) de ácido nítrico fumante a 68.8 ml (123.4 g, 1.26 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Una vez formada la mezcla sulfonítrica, se agregó en un periodo de 20 minutos y con fuerte agitación, 41.6 ml (50 g, 0.4 mol) de nitrobenceno. Cuando la última fracción del nitrobenceno se agregó, se observó la formación de un precipitado de color amarillo, se retiró el baño de hielo y se colocaron una canasta de calentamiento y un refrigerante de agua. Posteriormente, se incrementó la temperatura hasta mantener un reflujo constante por 1.25 h. Se vertió la mezcla de reacción sobre 300 g de hielo, y se agitó hasta precipitación total del dinitrobenceno. Todo el producto se separó por filtración al vacío y lavó en dos ocasiones con agua fría; después, se secó hasta peso constante (aproximadamente 1 h). El m-dinitrobenceno obtenido, se recristalizó desde etanol para eliminar productos secundarios. 55.8 g (81.7 % de rendimiento) del producto recristalizado fueron obtenidos, con un punto de fusión : 88-89 °C (lit. 89-90) y un Rf de 0.40 (sistema 1).

7.5.2. 3-(feniltio)nitrobenceno (16).²³ En un matraz de 250 ml de 4 bocas, se suspendieron 5 g (0.036 mol) de carbonato de potasio y 5 g (0.03 mol) de m-dinitrobenceno, en 50 ml de hexametilfosforamida (HMPA). Se agitó hasta disolver la totalidad del m-dinitrobenceno a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron un septum, un refrigerante de aire con adaptador para nitrógeno, un termómetro y un embudo de adición de presiones igualadas, en donde previamente se adicionaron 3.7 ml (0.036 mol) de tiofenol. Inmediatamente después, se burbujeó nitrógeno sobre la solución en agitación, para eliminar todo el oxígeno disuelto en la HMPA y en la atmósfera del sistema, dejando escapar el gas con una aguja sobre el septum. Se pasó un volumen de nitrógeno equivalente a tres veces el volumen total del sistema, se llenó de nuevo con nitrógeno, y gradualmente se incrementó la temperatura con una canasta de calentamiento hasta 60 °C, temperatura a la cual, se agregó el tiofenol. Se mantuvo la reacción a dicha temperatura por un periodo de 2 h, a 80° C por 4.5 h y a temperatura ambiente por 12 h. Se vertió la mezcla de reacción sobre 100 g de hielo y agitó hasta fusión del mismo.

Se extrajo el producto con tres fracciones de acetato de etilo, se lavó la fase orgánica y destiló el disolvente, obteniendo un aceite café oscuro muy viscoso, mismo que se purificó por cromatografía en columna (2 x 66 cm) con 40 g de silica gel suspendidos en hexano; el producto se purificó utilizando como eluyente al mismo hexano. Las fracciones que contenían al producto se juntaron y concentraron por destilación al vacío, obteniendo 3.0 g (45 % de rendimiento) de un sólido amarillo claro con punto de fusión de 41-42° C (lit. 42.5° C) y un Rf de 0.40 (sistema 2). IR (espectro No. 4) : 688 (C-S), 1344 (C-NO₂), 1526 (C-NO₂), 3058 (C-H). RMN H¹ (espectro No. 16, CDCl₃) : δ 7.25-7.60 (m, 7H), 7.90-8.10 (m, 2H).

7.5.3. 3-(feniltio)anilina (17). En un vaso de precipitados de 100 ml, se mezclaron 7.8 ml (0.25 mol) de ácido clorhídrico concentrado y 4.2 g (0.018 mol) de cloruro estanoso dihidratado, hasta formar una solución homogénea.²⁷ Después, se adicionaron 1.6 g (0.007 mol) de 3-(feniltio)nitrobenzoceno y gradualmente se incrementó la temperatura hasta 90° C, se agitó fuertemente por un periodo de 30 minutos, y posteriormente, se agregaron 50 g de hielo a la mezcla de reacción. Se neutralizó y alcalinizó esta suspensión hasta pH 13 con hidróxido de sodio, se extrajo la amina con tres fracciones de acetato de etilo, se lavó con agua, secó y destiló el disolvente, obteniendo 1.3 g (~ 100 %) de un aceite café claro, que en cromatografía en placa fina, presentó una sola mancha con un Rf de 0.34 (sistema 1).

7.5.4. N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2). El total del producto de reducción anterior (aproximadamente 1.3 g, 0.0064 mol de 3-(feniltio)anilina), se disolvieron en 20 ml de acetona, y se agregaron 0.6 g (0.0071 mol) de bicarbonato de sodio, inmediatamente después, se enfrió este sistema hasta 5° C en un baño de hielo, temperatura a la cual, se adicionaron 0.6 ml (0.0077 mol) de cloroformiato de metilo disueltos en 3 ml de acetona. Se agitó esta solución por 40 minutos, y posteriormente, se adicionaron 50 g de hielo.

Se extrajo el producto con tres fracciones de 30 ml de acetato de etilo, se lavó en tres ocasiones con agua la fase orgánica, secó y destiló el disolvente. Se obtuvo un aceite café oscuro que solidificó al enfriarlo en baño de hielo.

Este sólido se purificó por cristalización en par de disolventes (hexano-cloroformo), obteniendo 1.0 g (62.5 %) de un sólido café claro con punto de fusión de 89-91° C, y un Rf de 0.51 (sistema 1).

7.6. N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3).

7.6.1. Benzoato de metilo (18).²⁴ En un matraz de 1 lt de una boca, se mezclaron 120 g (0.98 mol) de ácido benzoico, 404 ml (9.9 mol) de metanol absoluto y 10.8 ml (0.19 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Se colocó un refrigerante de agua sobre el matraz, y con agitación mecánica se calentó gradualmente hasta reflujo por un tiempo de 4.5 h. El exceso de metanol se destiló a presión reducida sobre un baño de agua, y se permitió a la mezcla de reacción llegar a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió el contenido del matraz a un embudo de separación, y se adicionaron 250 ml de agua, se agitó vigorosamente y se recuperó el benzoato de metilo. Se lavó la fase orgánica con una solución saturada de bicarbonato de sodio (hasta que no se produjo desprendimiento de dióxido de carbono), para eliminar el residuo de ácido sulfúrico, y luego, se lavó una vez más con agua. Un total de 122.4 g (91 %) de un líquido incoloro, correspondientes al benzoato de metilo, fueron obtenidos. Por cromatografía de placa fina, mostró una sola mancha con un Rf de 0.55 (sistema 5).

7.6.2. 3-nitrobenzoato de metilo (19).²⁵ 400 ml (719.3 g, 7.34 mol) de ácido sulfúrico concentrado, se colocaron en un matraz de 1 lt de una boca y se enfriaron a 5° C en baño de hielo, después, se adicionaron 204 g (1.5 mol) de benzoato de metilo; posteriormente, con la ayuda de un embudo de adición de presiones igualadas, se agregó una mezcla de 125 ml (177 g, 2.81 mol) de ácido nítrico fumante, y 125 ml (225 g, 2.3 mol) de ácido sulfúrico concentrado, en un periodo de 1 hr.

Durante toda la adición, se mantuvo la temperatura entre 5 y 15° C. Luego de adicionar la solución nitrante, se mantuvo la agitación por 20 minutos más, y posteriormente, se vertió la mezcla de reacción en 1300 g de hielo. El producto crudo precipitó y fue separado por filtración al vacío. Se transfirió a un vaso de precipitados de 500 ml, y agregaron 200 g de una mezcla hielo-metanol, se agitó por 5 minutos, enfrió en baño de hielo y separó el sólido por filtración, mismo que se lavó con 100 ml mas de metanol

frío. Después de secar al vacío hasta peso constante, se obtuvieron 222 g (89.1 % de rendimiento) de un sólido ligeramente amarillo con punto de fusión de 75-76° C (lit. 78° C) y un Rf de 0.27 (sistema 4).

7.6.3. Ácido 3-nitrobenzoico (20).²⁶ En un matraz de 500 ml de una boca, se colocaron 44.2 g (1.1 mol) de hidróxido de sodio, 176.8 ml de agua y 100 g (0.55 mol) de m-nitrobenzoato de metilo; posteriormente, se incrementó gradualmente la temperatura hasta producir reflujo, mismo que se mantuvo por 15 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con un volumen equivalente de agua e inmediatamente después, se agitó con 138 ml de ácido clorhídrico concentrado. Una vez que esta solución llegó a temperatura ambiente, se enfrió en baño de hielo y el ácido 3-nitrobenzoico precipitado, se separó por filtración al vacío. Se obtuvieron 153.7 g (92 % de rendimiento) de un sólido café claro con punto de fusión de 138-139° C (lit. 140° C), que en cromatografía de placa fina mostró una sola mancha con Rf de 0.21 (sistema 6).

7.6.4. Cloruro de 3-nitrobenzoilo (21).²⁷ Se mezclaron 65.7 g (0.39 mol) de ácido 3-nitrobenzoico, y 82 g (0.39 mol) de pentacloruro de fósforo, en un matraz de 500 ml de una boca, sumergido en un baño de agua. Este matraz fue adaptado con una trampa de cloruro de calcio anhidro, y ésta a su vez, conectada a un matraz que contiene una solución acuosa de hidróxido de sodio, con el propósito de neutralizar el ácido clorhídrico desprendido en la reacción. El sistema se calentó progresivamente con agitación constante, hasta observar desprendimiento de ácido clorhídrico. La reacción continuó por 30 minutos adicionales, produciéndose una solución homogénea de color amarillo. Posteriormente, el matraz de reacción fue adaptado con un sistema de destilación, y se transfirió a un baño de aceite, en el cual, se incrementó gradualmente la temperatura hasta destilar todo el oxicluro de fósforo producido (200° C a presión atmosférica). El producto crudo de reacción (72.9 g, 0.3934 mol, muy cerca del 100 % de rendimiento), se empleó para la formación de 3-nitrobenzofenona. El Rf del cloruro de 3-nitrobenzoilo sintetizado fue de 0.34 (sistema 1), donde se observó prácticamente una sola mancha.

7.6.7. N-[3-(benzoil)fenil]carbamato de metilo (3). 5.0 g (0.025 mol) de 3-aminobenzofenona se disolvieron en 25 ml de acetona, y se agregaron 2.5 g (0.03 mol) de bicarbonato de sodio. Esta suspensión se enfrió hasta 5° C en baño de hielo, y entonces, se adicionaron 2.3 ml (2.8 g, 0.03 mol) de cloroformiato de metilo disueltos en 5 ml de acetona. Se agitó por un periodo de 45 minutos, y posteriormente se vertió la mezcla de reacción sobre 50 g de hielo. El carbamato de metilo formado precipitó de la mezcla de reacción y se separó por filtración al vacío, lavó con agua y secó hasta peso constante. Se obtuvieron 6 g (92.7 % de rendimiento) de un sólido café claro, con un punto de fusión de 109-111° C y un Rf de 0.32 (sistema 1).

7.7. N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo (4).

En un matraz de tres bocas de 125 ml se disolvieron 5.0 g (0.045 mol) de 3-aminofenol comercial en una mezcla de 50 ml de acetona y 20 ml de agua; posteriormente, se agregaron 3.9 g (0.046 mol) de bicarbonato de sodio y esta suspensión se enfrió hasta 5° C en baño de hielo. Con agitación constante se goteó sobre el sistema una solución de 3.5 ml (4.25 g, 0.045 mol) de cloroformiato de metilo y 10 ml de acetona. Esta adición se llevó a cabo en un tiempo de 20 minutos, y de forma adicional, se dejó reaccionar por 2 h más. Luego de este periodo, se vertió el contenido de la mezcla de reacción sobre 50 g de hielo y se agitó hasta formar una solución homogénea. Se extrajo la amina con tres fracciones de acetato de etilo, se lavó, secó y destiló el disolvente, para obtener un líquido muy viscoso de color café, que por enfriamiento produjo cristales de un sólido oscuro, 7.1 g (93.5 %) con punto de fusión de 90-92° C. En cromatografía en capa fina mostró una sola mancha con un Rf de 0.48 (sistema de elución 3).

7.8. N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo (5).

20 g (0.11 mol) de N-(3-hidroxi)fenilcarbamato de metilo se disolvieron en 115 ml de etanol y la solución se enfrió en baño de hielo hasta llegar a una temperatura de 5° C. Posteriormente se agregó en un periodo de 30 minutos una solución previamente formada por 5.5 g (0.13 mol) de hidróxido de sodio y 115 ml de etanol. Este sistema se mantuvo en agitación por 15 minutos y luego, en frío, se agregaron lentamente 13 ml (16.4 g, 0.13

mol) de sulfato de dimetilo; se agitó el sistema por 7.5 hr a dicha temperatura; posteriormente se vertió la mezcla de reacción sobre 500 g de hielo; se agitó hasta formar una solución uniforme; se extrajo el producto metilado con tres fracciones de acetato de etilo; lavó éste con agua en tres ocasiones; secó y destiló el disolvente. Se obtuvo un aceite color café oscuro. Este producto crudo de reacción se purificó por cromatografía en una columna de 2 x 66 cm; se usaron 50 g de sílica gel suspendidos en hexano; y se eluyó con una solución de 95 partes de hexano por 5 de acetato de etilo. El producto de reacción se recrystalizó de 1-propanol para obtener 13.8 g (51.1 %) de un sólido café claro, con un punto de fusión de 44-46° C y un Rf de 0.74 (sistema 3).

7.9. N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo (6).

En un matraz de tres bocas de 125 ml, adaptado con termómetro y un embudo de adición de presiones igualadas, se disolvieron 20 g (0.14 mol) de m-nitroanilina previamente purificada por recrystalización de benceno, en 60 ml de acetona; posteriormente, se agregaron 12.1 g (0.14 mol) de bicarbonato de sodio. Este sistema se colocó en un baño de agua, y entonces, se adicionaron 13.5 ml (16.5 g, 0.17 mol) de cloroformiato de metilo con agitación fuerte. Una vez que se añadió el compuesto carbonílico, se incrementó gradualmente la temperatura hasta 50° C, y se mantuvo en agitación este sistema por 20 minutos. Se vertió la mezcla de reacción sobre 100 g de hielo y se agitó hasta precipitación total del carbamato, el cual, se separó por filtración al vacío, lavó con agua, y secó hasta peso constante. Se obtuvieron 26.8 g (94.3 % de rendimiento teórico) de un sólido café claro con punto de fusión de 147-149° C (lit. 148-149° C)³⁷ y un Rf de 0.37 (sistema de elución 1).

7.10. N-(3-clorofenil)carbamato de metilo (7).

En un baño de agua, se colocó un matraz de tres bocas de 125 ml, al que previamente se adicionaron 16.5 ml (20g, 0.15 mol) de 3-cloroanilina y 13.1 g (0.15 mol) de bicarbonato de sodio, suspendidos en 20 ml de acetona; posteriormente, se adicionaron 14.5 ml (17 g, 0.18 mol) de cloroformiato de metilo, disueltos en 15 ml de acetona. Bajo agitación fuerte, la mezcla de

reacción se calentó gradualmente hasta 50° C y se mantuvo así por 15 minutos. Una vez que se consumió la materia prima, se vertió la mezcla de reacción sobre 75 g de hielo y se agitó hasta precipitación total del producto de condensación. El sólido obtenido se separó por filtración al vacío, lavó con agua, y secó después hasta peso constante. Se obtuvieron 27.5 g (94.8 % de rendimiento) de un sólido blanco con punto de fusión de 81-83° C (lit. 82-83° C)³⁷ y un Rf de 0.5 (sistema de elución 1).

7.11. N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo (8).

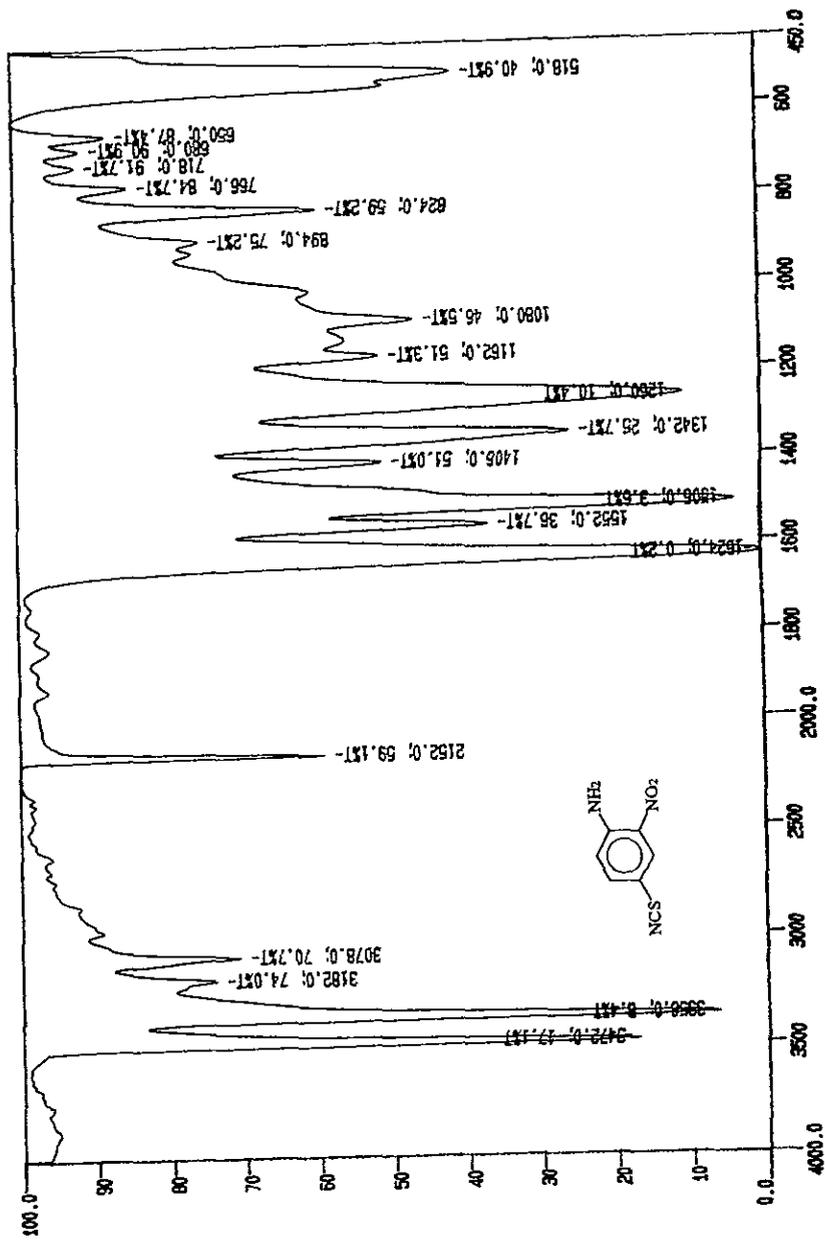
En un matraz de tres bocas de 125 ml, adaptado con termómetro y un embudo de adición de presiones igualadas, se mezclaron 8.4 g (0.12 mol) de bicarbonato de sodio y 20 g (0.12 mol) de 3,4-dicloroanilina y 30 ml de acetona. Este sistema se hizo reaccionar con una solución de 11.4 ml (13.9 g, 0.14 mol) de cloroformiato de metilo, y 10 ml de acetona. Sobre un baño de agua, se incrementó paulatinamente la temperatura hasta 50° C, y se mantuvo en agitación por 20 minutos. Posteriormente, se vertió la mezcla de reacción sobre 50 g de hielo y se agitó hasta precipitación total del producto. Se observó un sólido de color café claro, se filtró y lavó con agua fría y secó hasta peso constante. Se obtuvieron 26.6 g (97.9 % de rendimiento) del correspondiente carbamato de metilo, como un sólido blanco con punto de fusión de 110-112° C (lit. 114° C)³⁷ y un Rf de 0.46 (sistema 1).

7.12. N-fenilcarbamato de metilo (9)

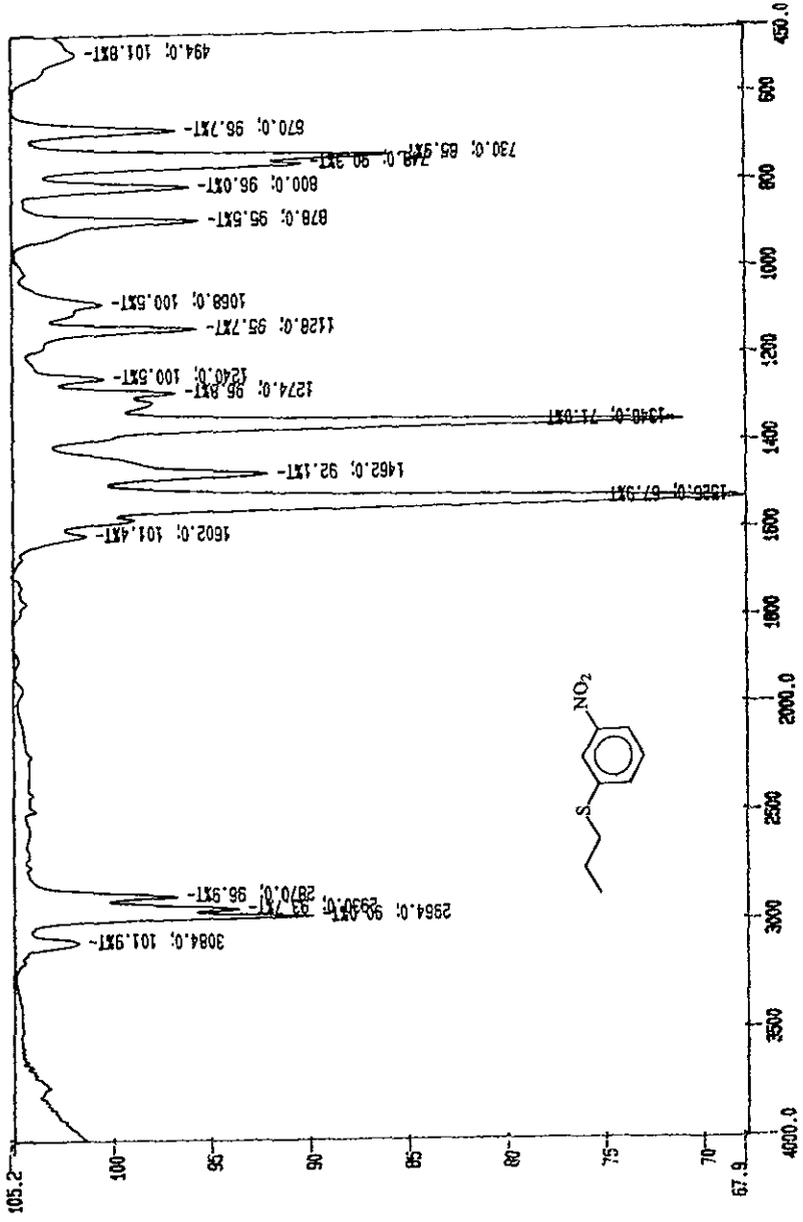
En un matraz de tres bocas de 125 ml adaptado con termómetro y embudo de adición de presiones igualadas, se disolvieron 19.5 ml (20 g, 0.21 mol) de anilina en 30 ml de acetona. Posteriormente, se agregaron 18 g (0.21 mol) de bicarbonato de sodio, y luego se colocó este matraz sobre un baño de agua. Con agitación constante, se goteó desde el embudo de adición, una solución de 18.2 ml (21.7 g, 0.23 mol) de cloroformiato de metilo y 10 ml de acetona. Luego de la adición, gradualmente se incrementó la temperatura hasta 55° C y se mantuvo en agitación por 20 minutos. Cuando se observó el consumo de la materia prima, la mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de hielo, formándose dos fases inmiscibles entre sí, se decantó la fase orgánica y se le agregaron 50 g mas de hielo. Después de agitar por cinco minutos se

formó un sólido amarillo claro, mismo que se separó por filtración al vacío, se lavó con agua fría y secó hasta peso constante. Fue necesario recrystalizar el producto crudo de reacción en hexano, obteniendo 29.1 g (90.1 % de rendimiento) de un cristal de color azul claro con punto de fusión de 42-44° C (lit. 44-45° C)³⁷ y un Rf de 0.5 (sistema de elución 1).

8.- ESPECTROS

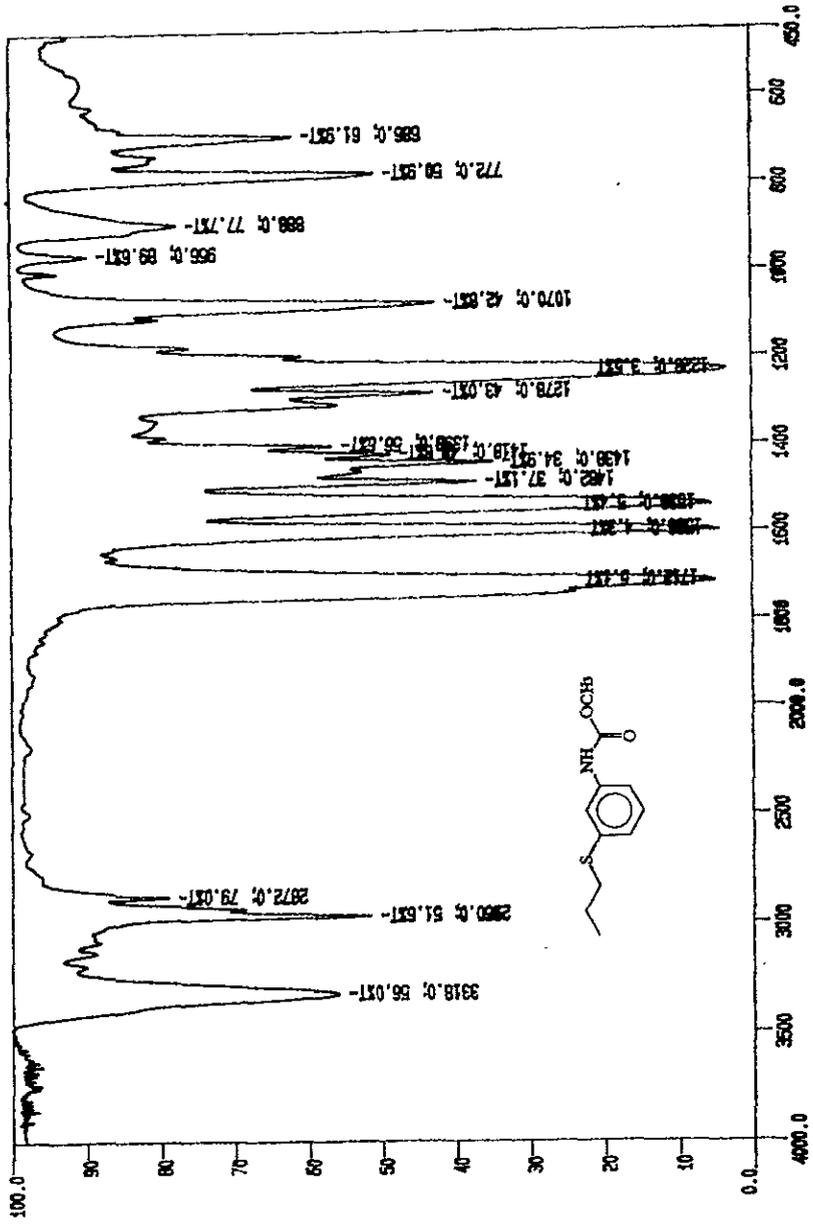


Espectro No.1.- Infrarrojo de la 2-nitro-4-tiocianoanilina.



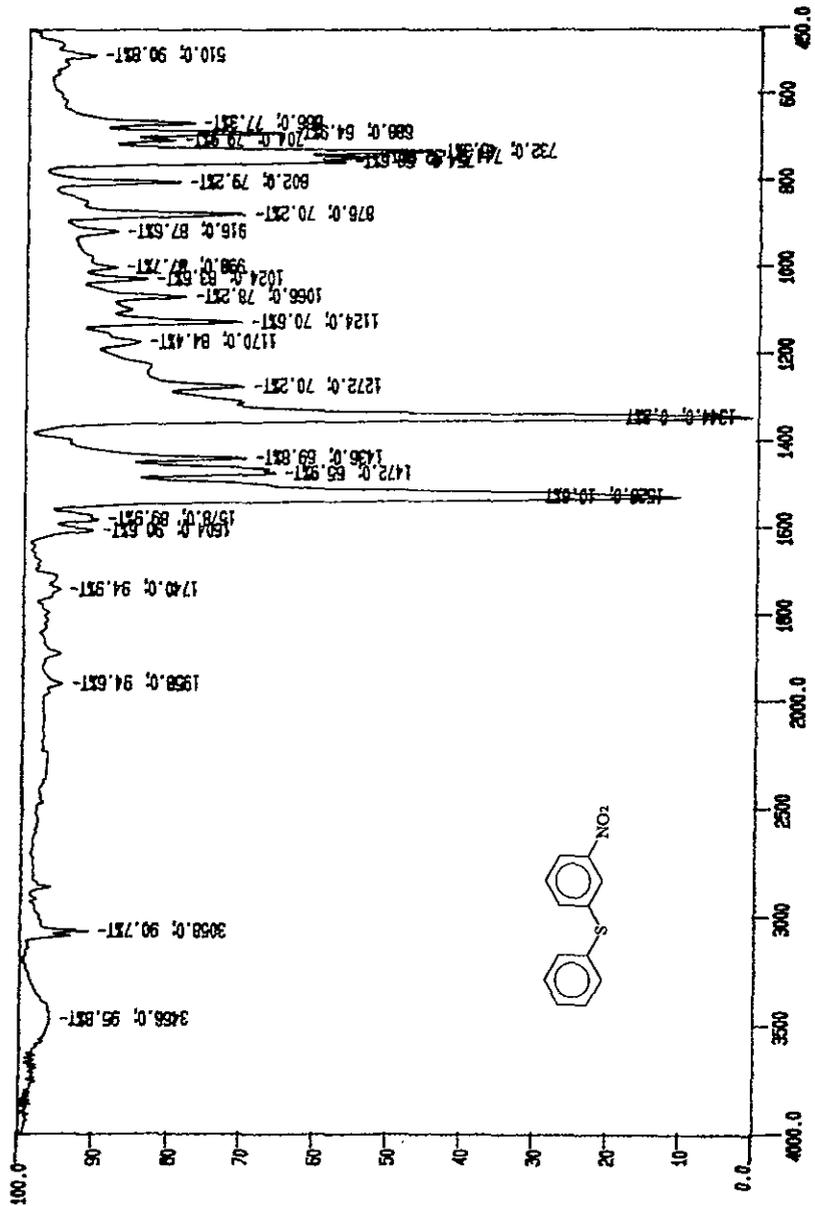
12

Espectro No. 2.- Infrarrojo del 3-(propiltio)nitrobenzeno.

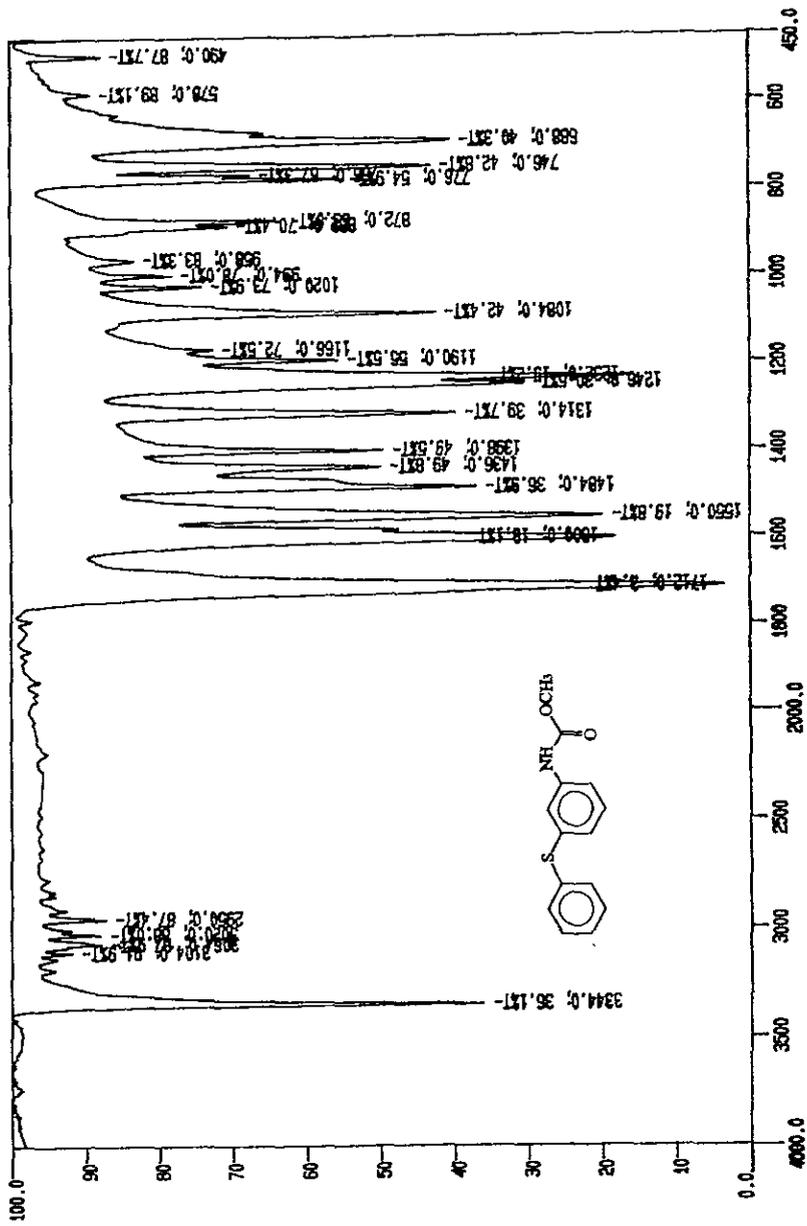


1x

Espectro No. 3.- Infrarrojo del N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1).

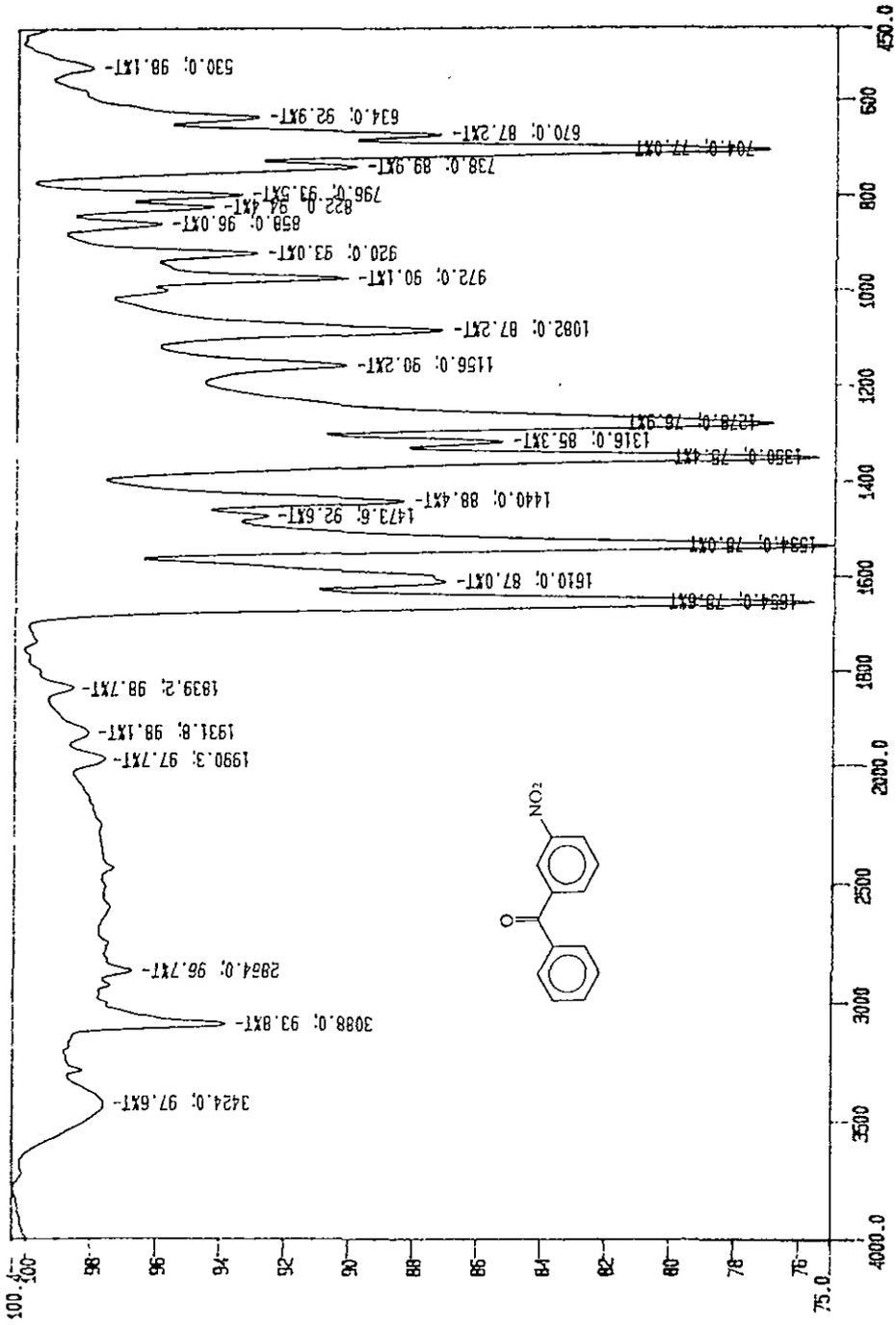


Espectro No. 4.- Infrarrojo del 3-(feniltio)nitrobenzeno.



Espectro No. 5.- Infrarrojo del N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2).

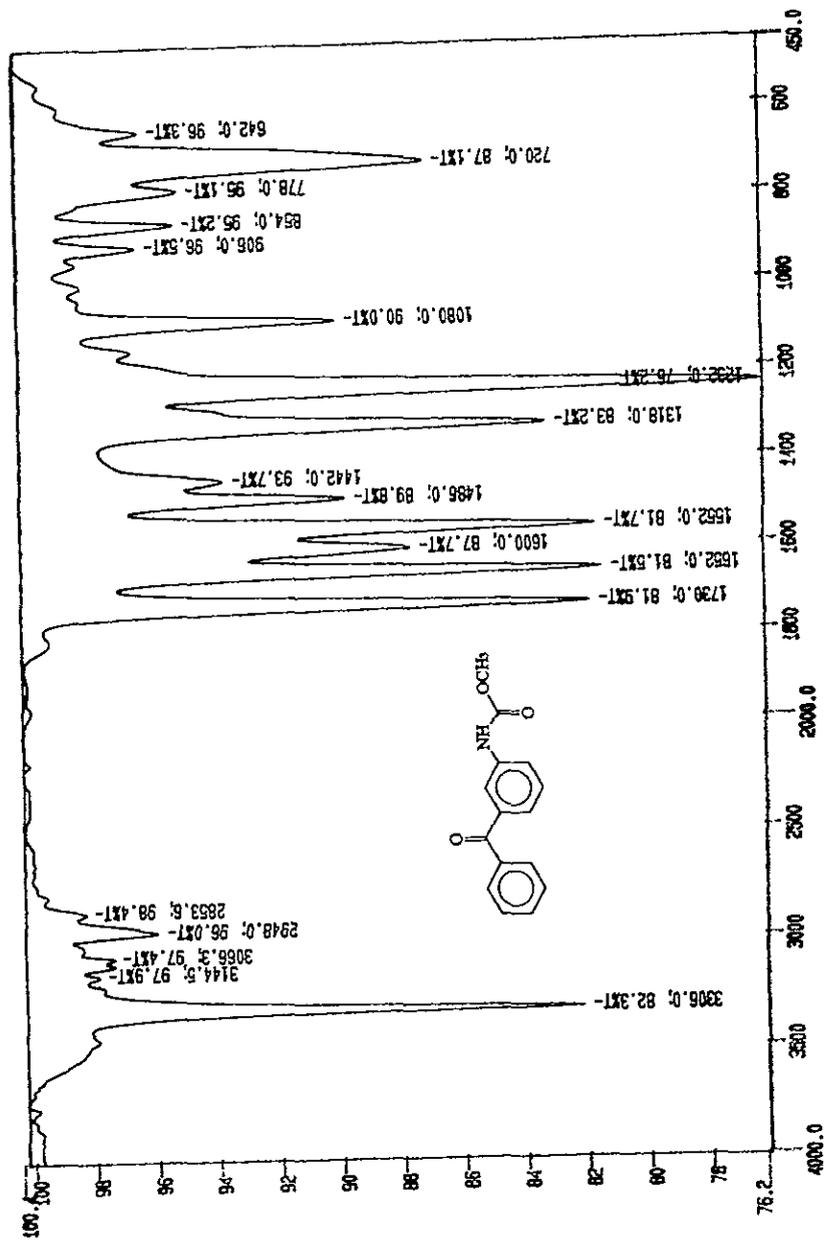
f. spectra



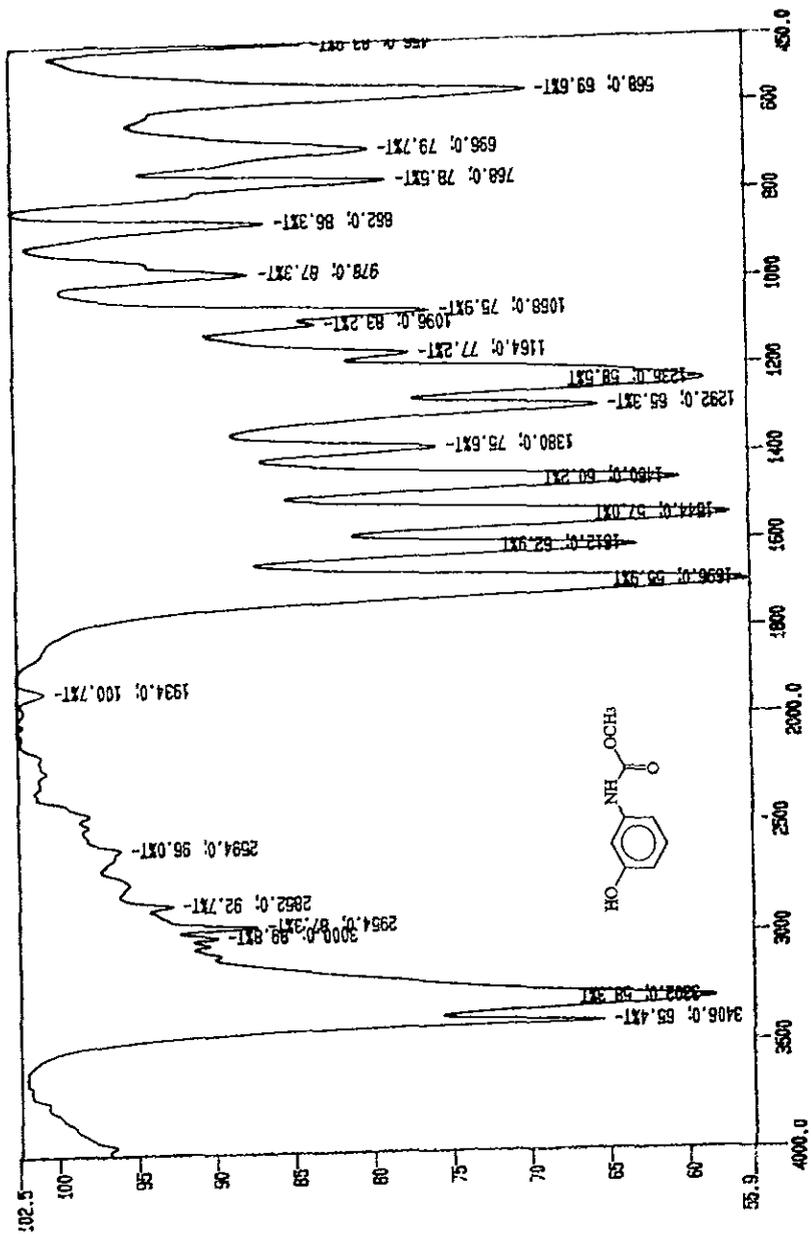
15

Espectro No. 6.- Infrarrojo de la 3-nitroacetofenona.

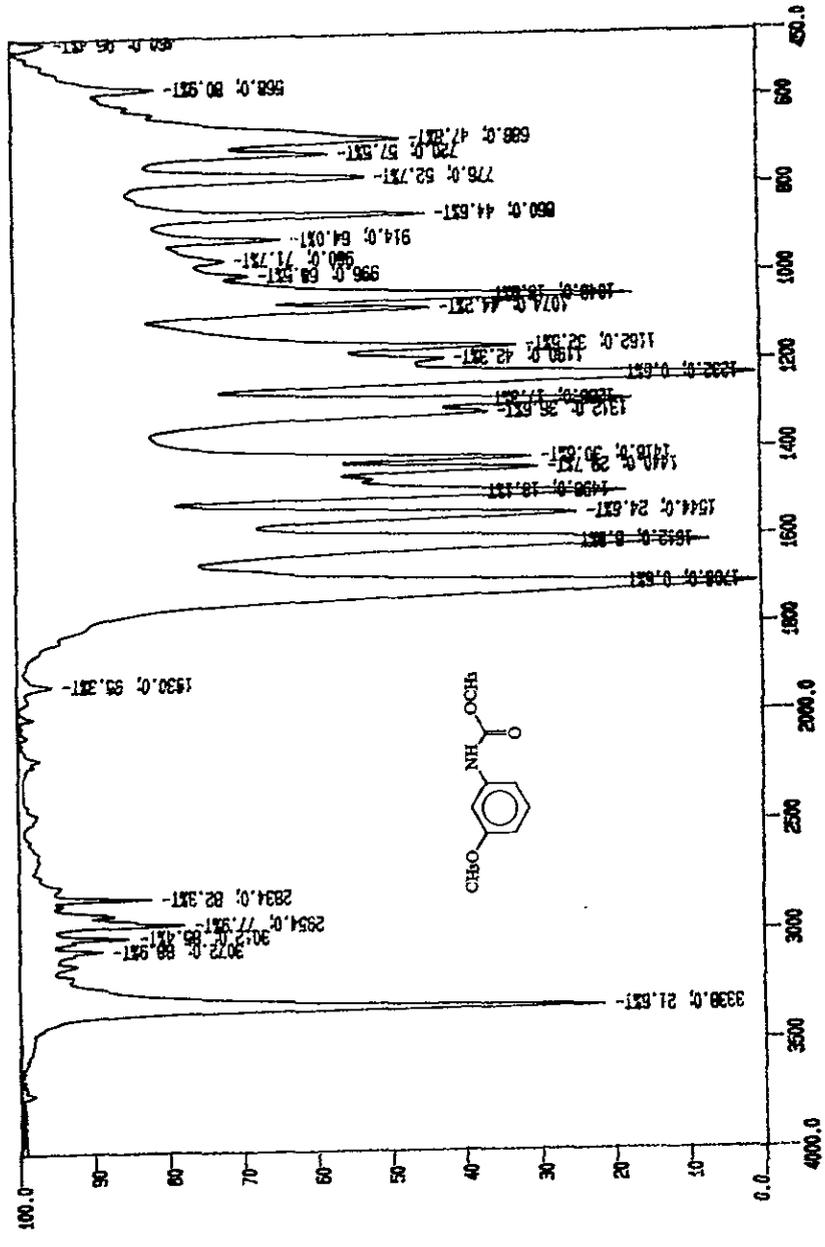
Espectros



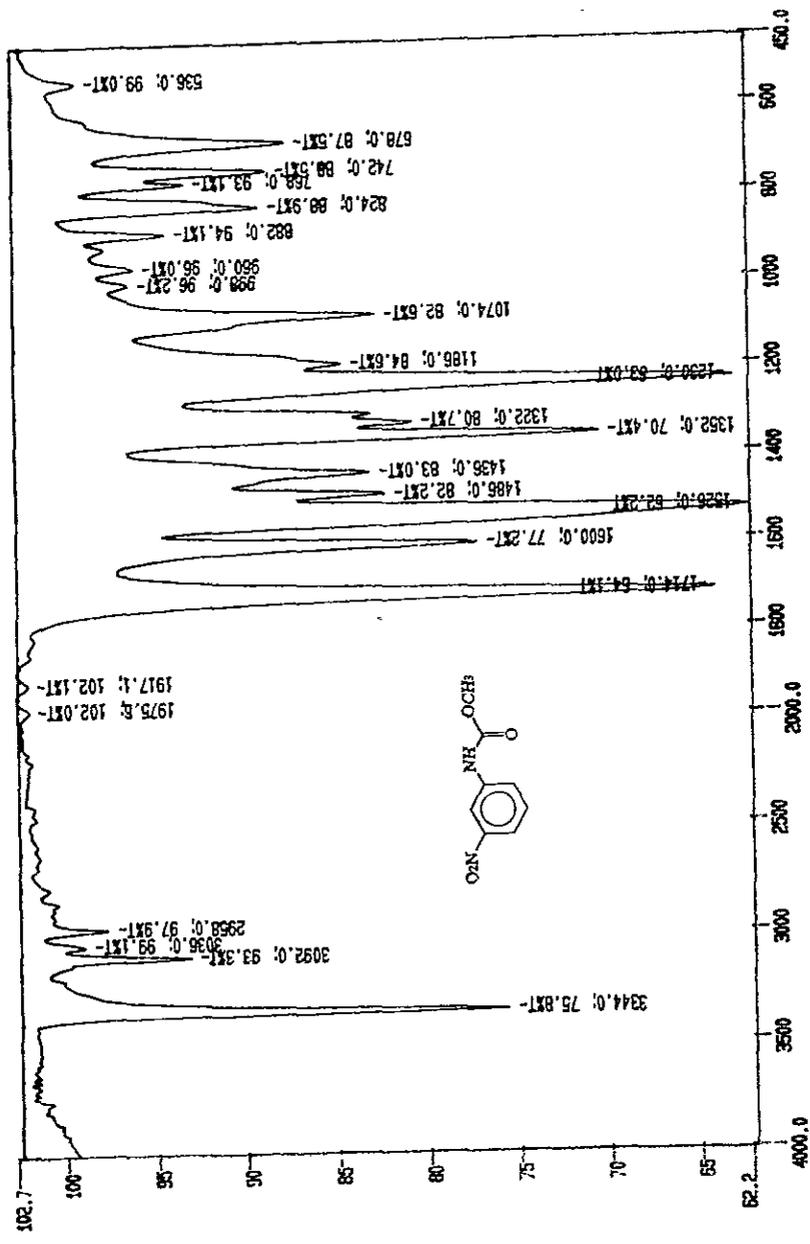
Espectro No. 7.- Infrarrojo del N-[3-(benzoyl)fenil]carbamato de metilo (3).



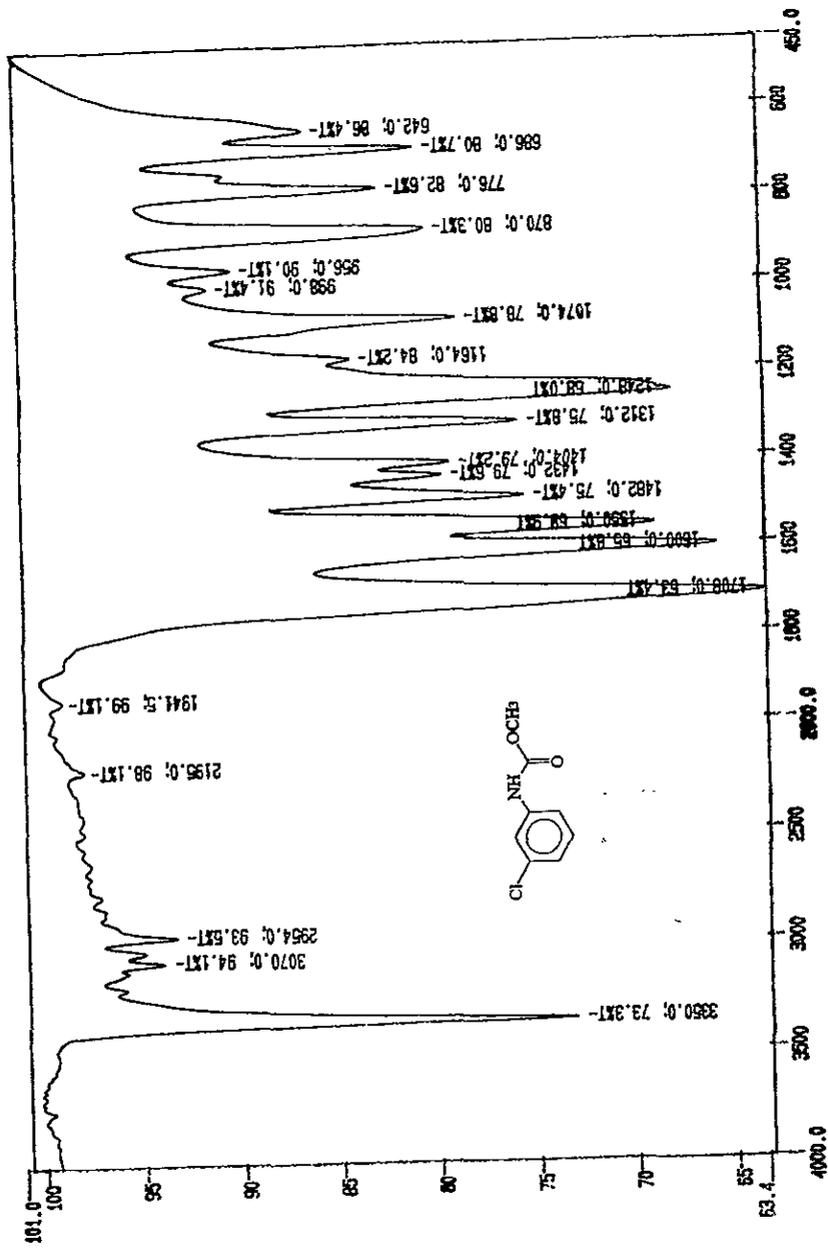
Espectro No. 8. - Infrarrojo del N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo (4).



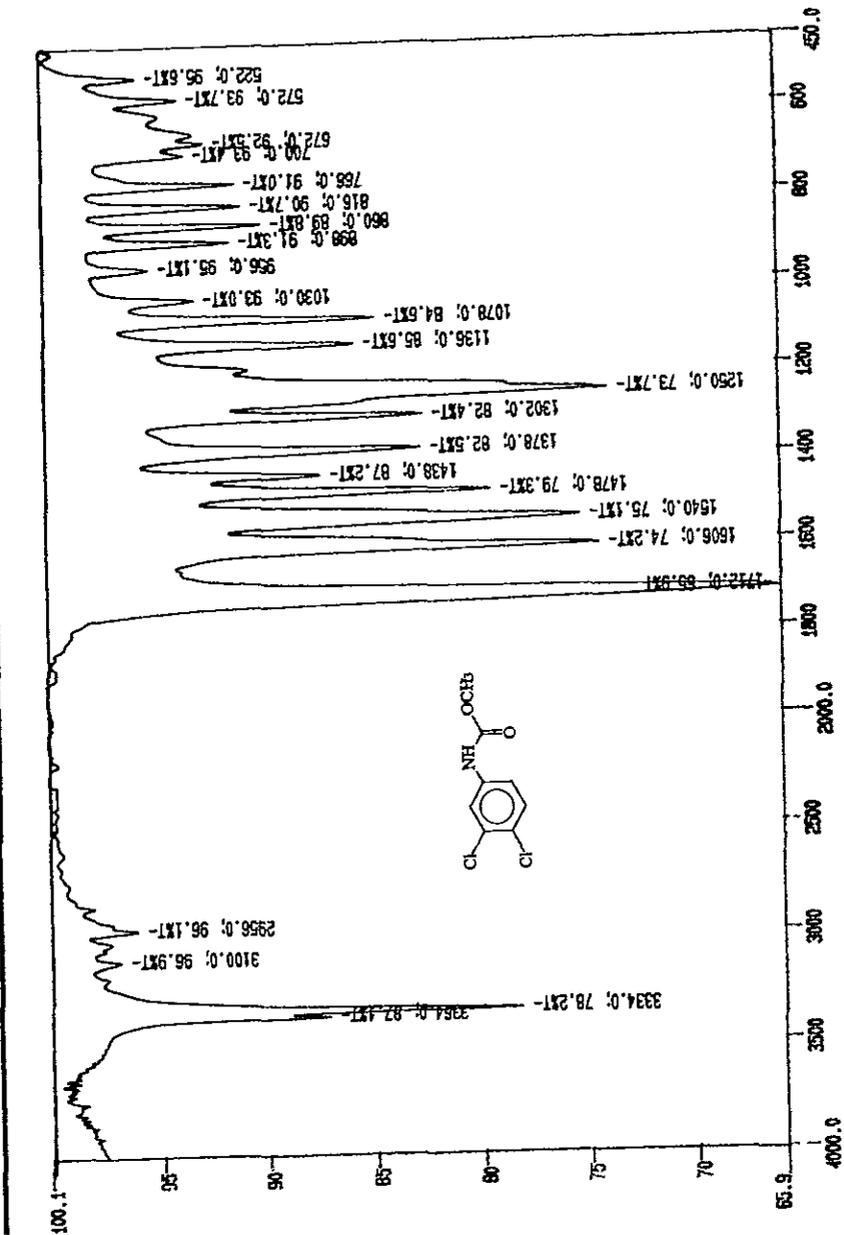
Espectro No. 9.- Infrarrojo del N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo (5).



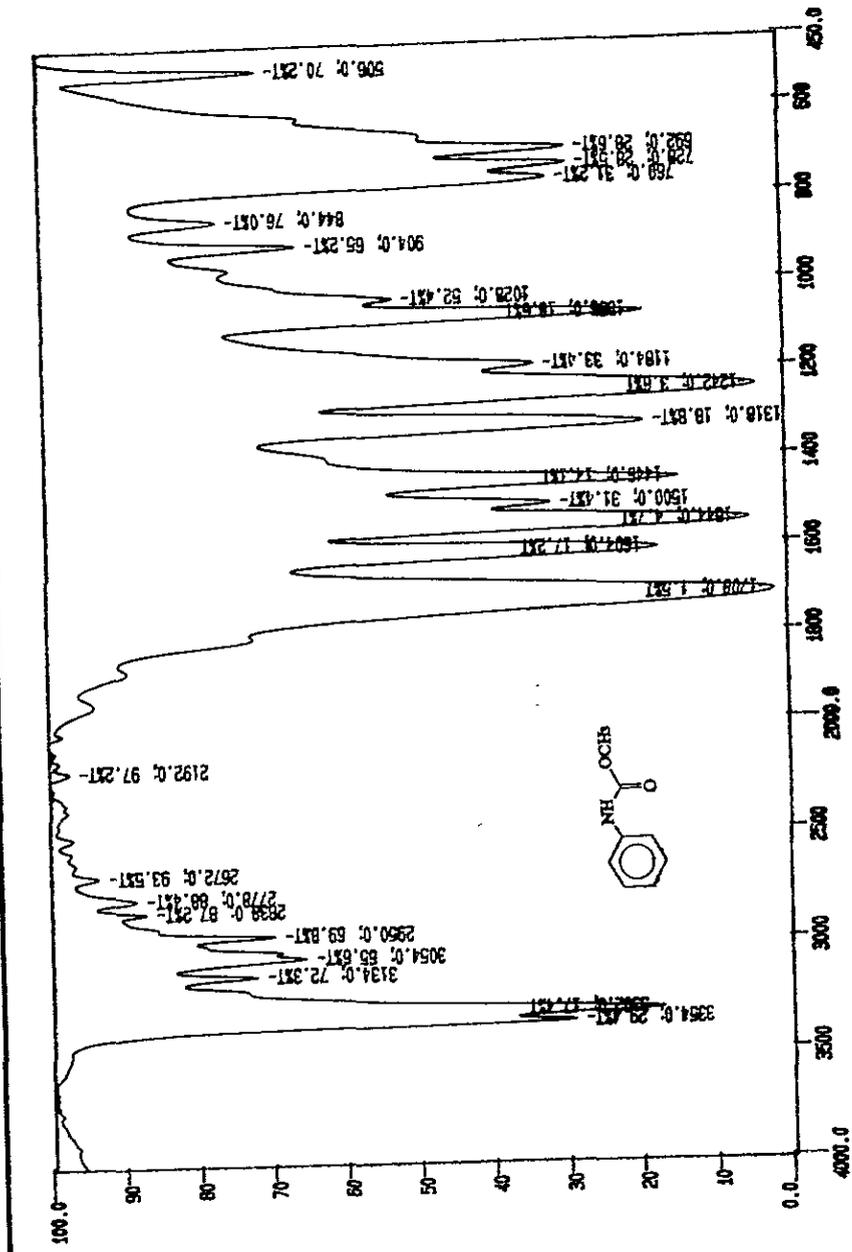
Espectro No. 10.- Infrarrojo del N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo (9).



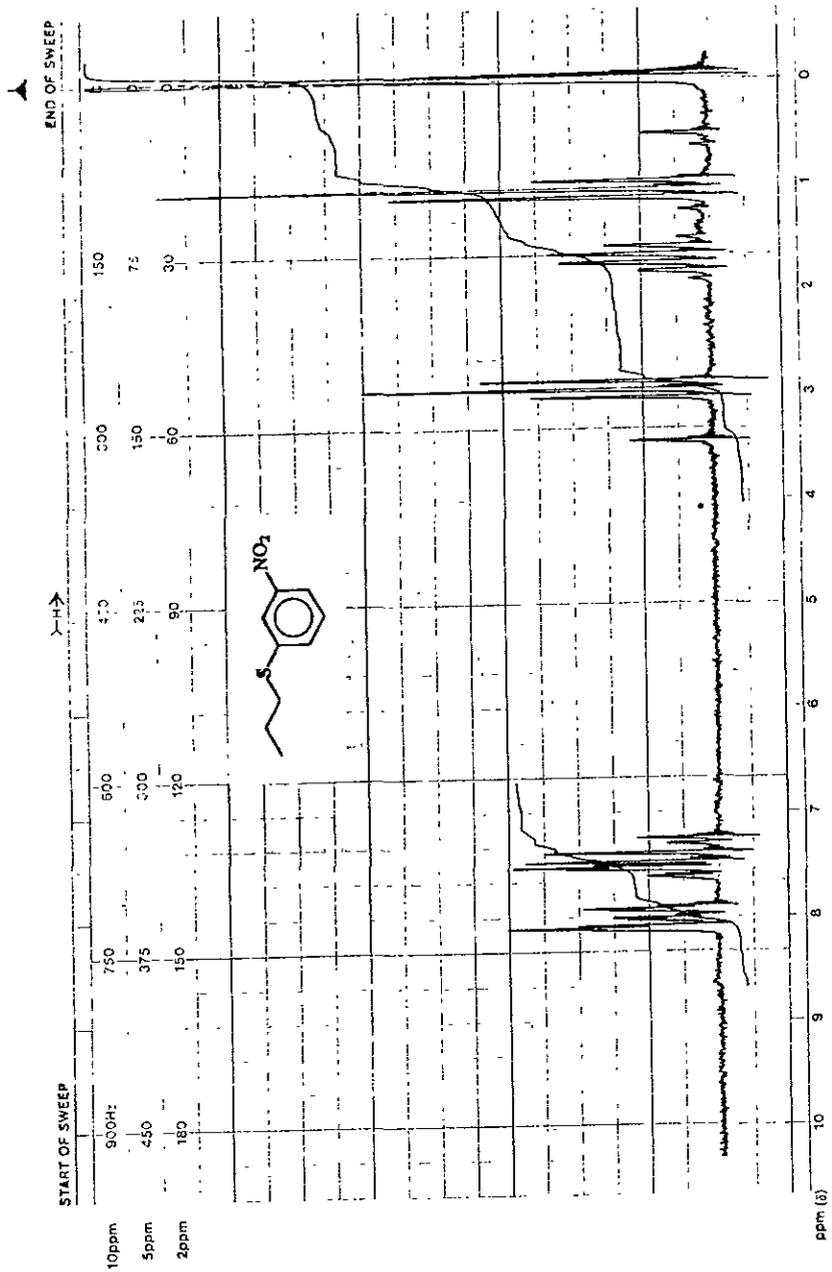
Espectro No. 11.- Infrarrojo del N-(3-clorofenil)carbamato de metilo (7).



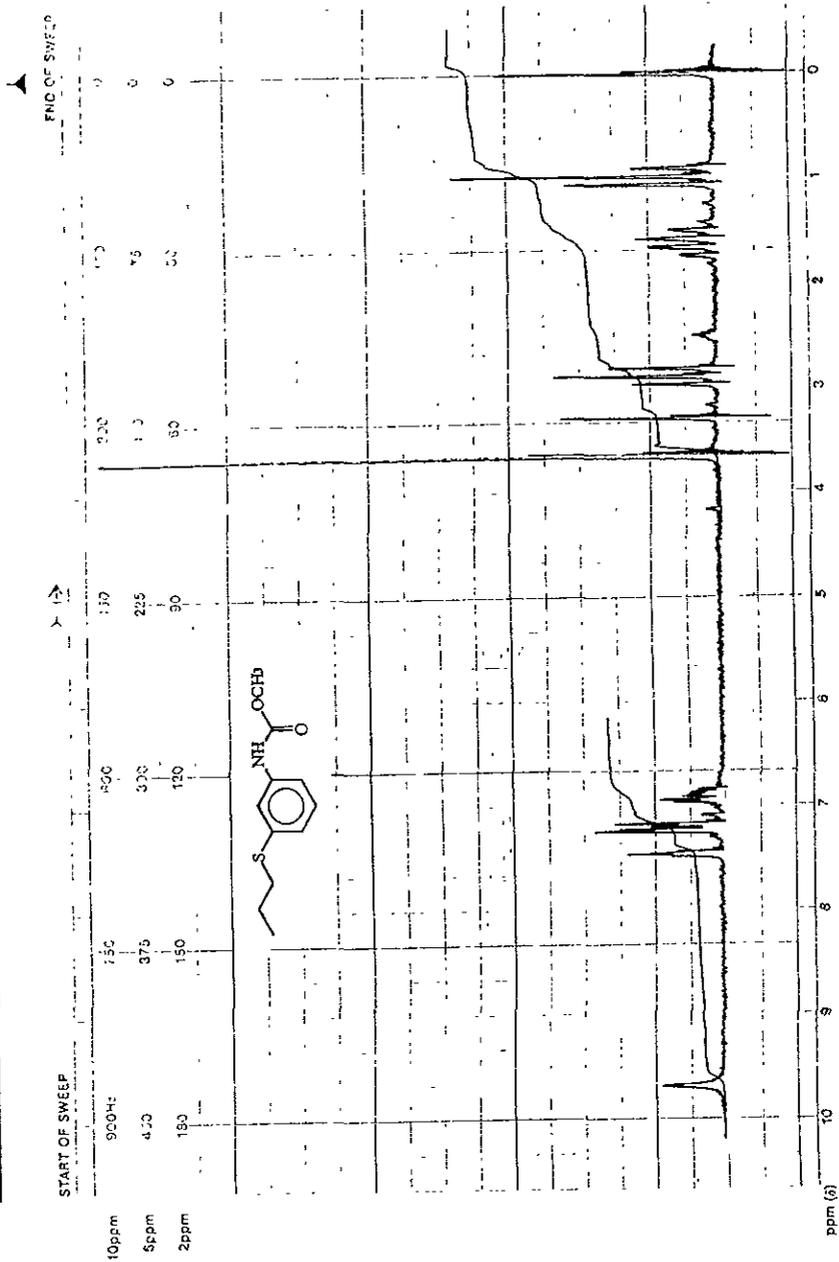
Espectro No. 12.- Infrarrojo del N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo (8).



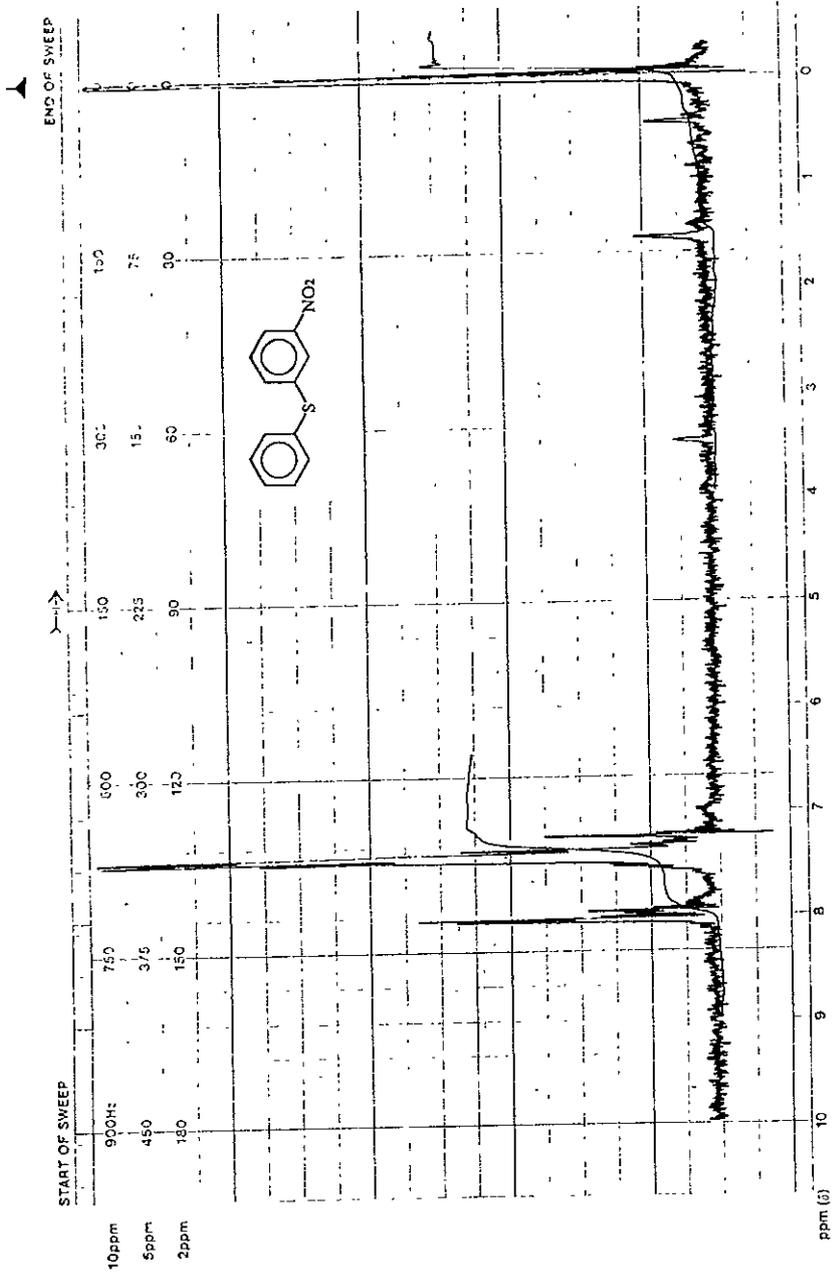
Espectro No. 13.- Infrarrojo del N-fenilcarbamato de metilo (9).



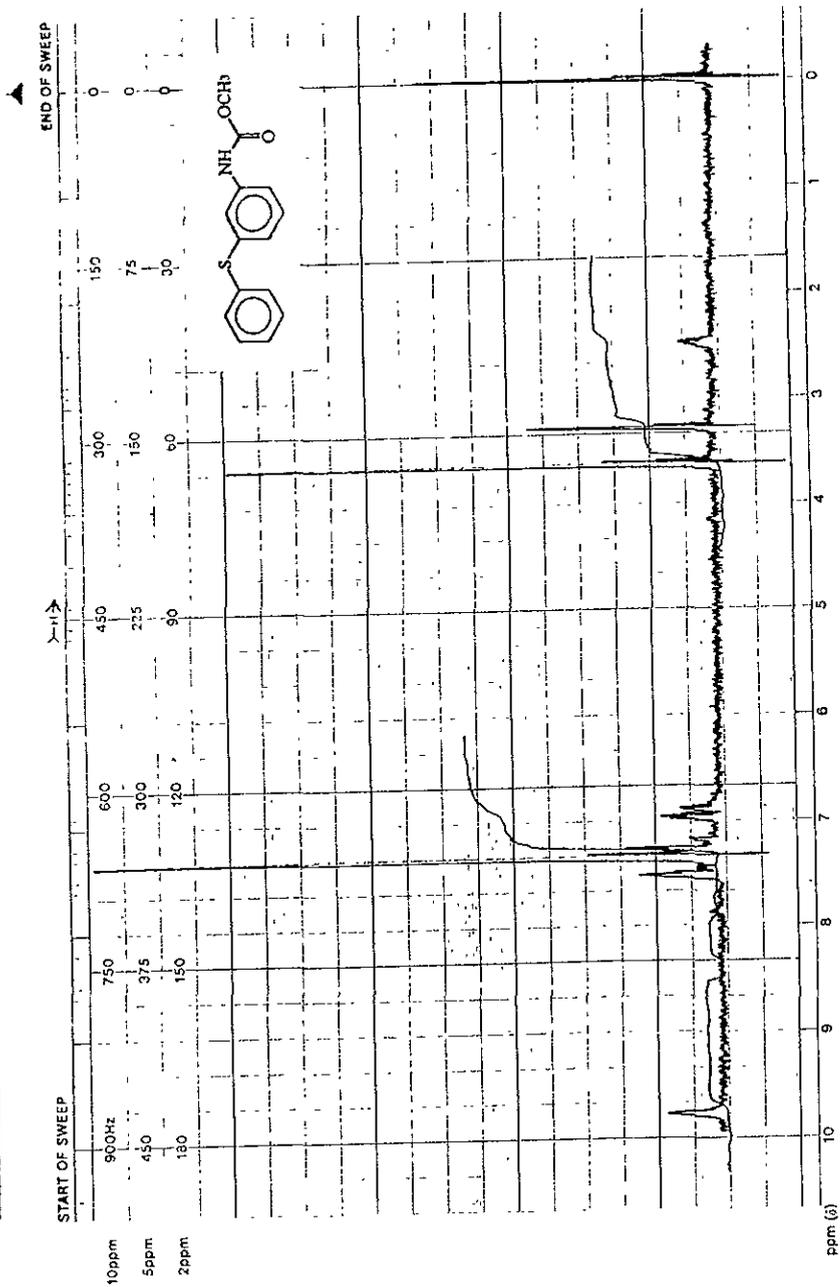
Espectro No. 14.- RMN H¹ del 3-(propiltio)nitrobenzeno.



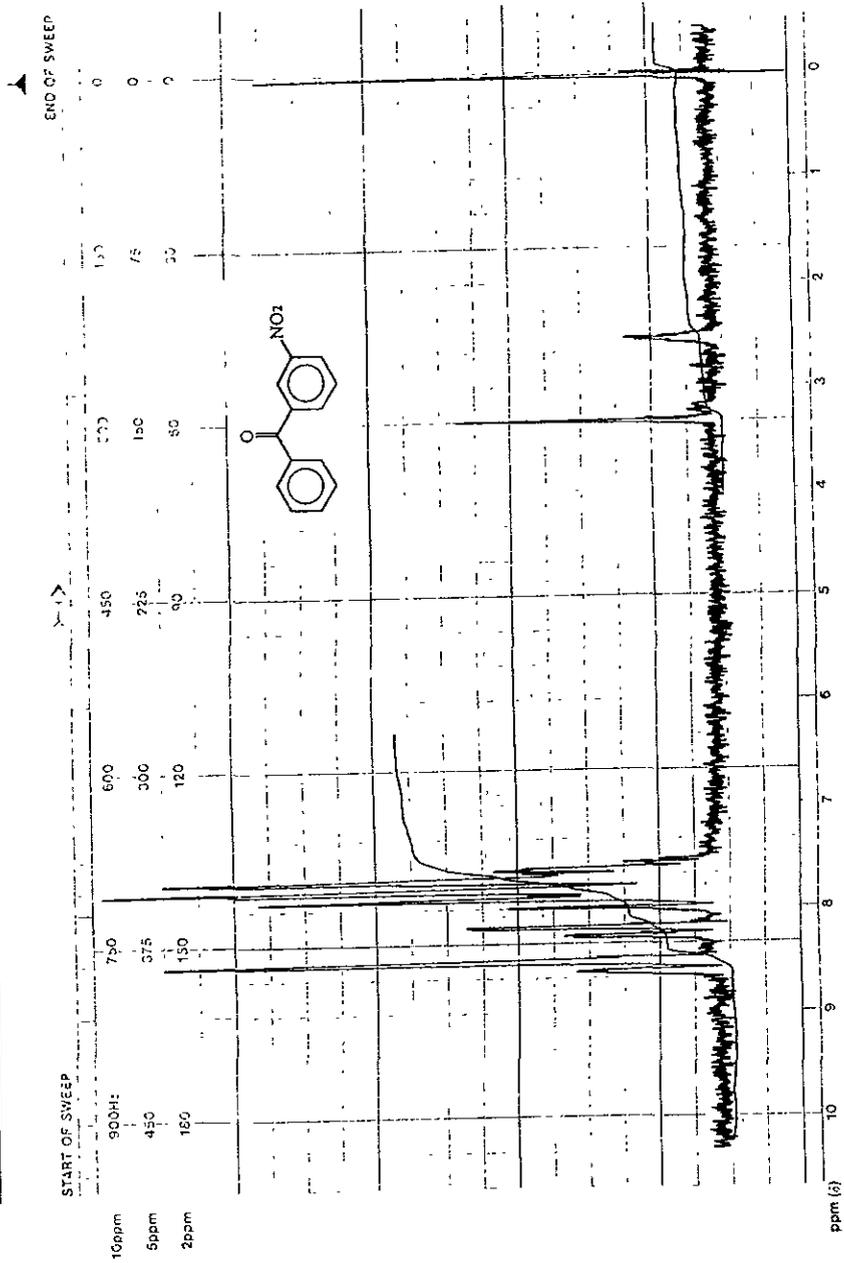
Espectro No. 15.- RMN H¹ del N-[3-(propilthio)fenil]carbamato de metilo 1



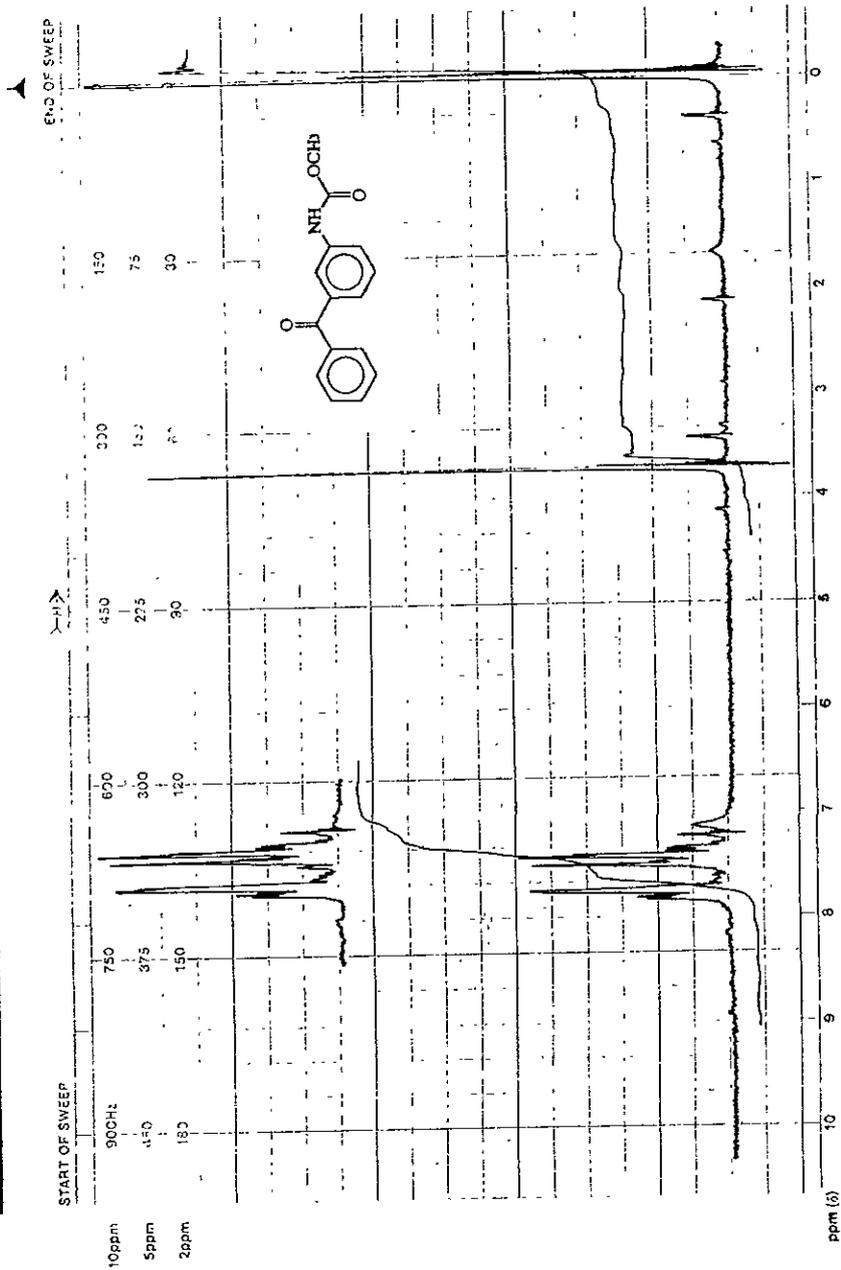
Espectro No. 16.- RMN H¹ del 3-(feniltio)nitrobenzeno.



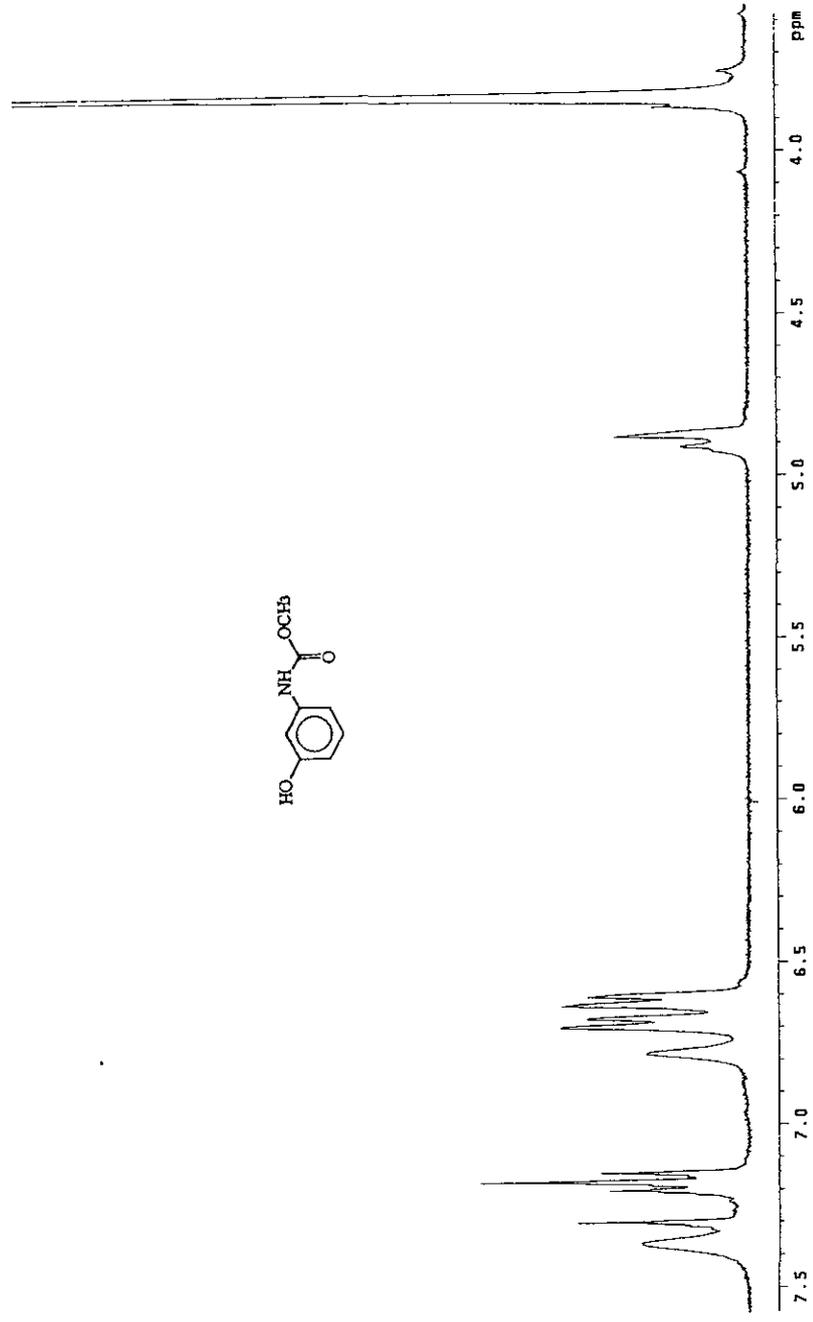
Espectro No. 17.- RMN H¹ del N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo 2



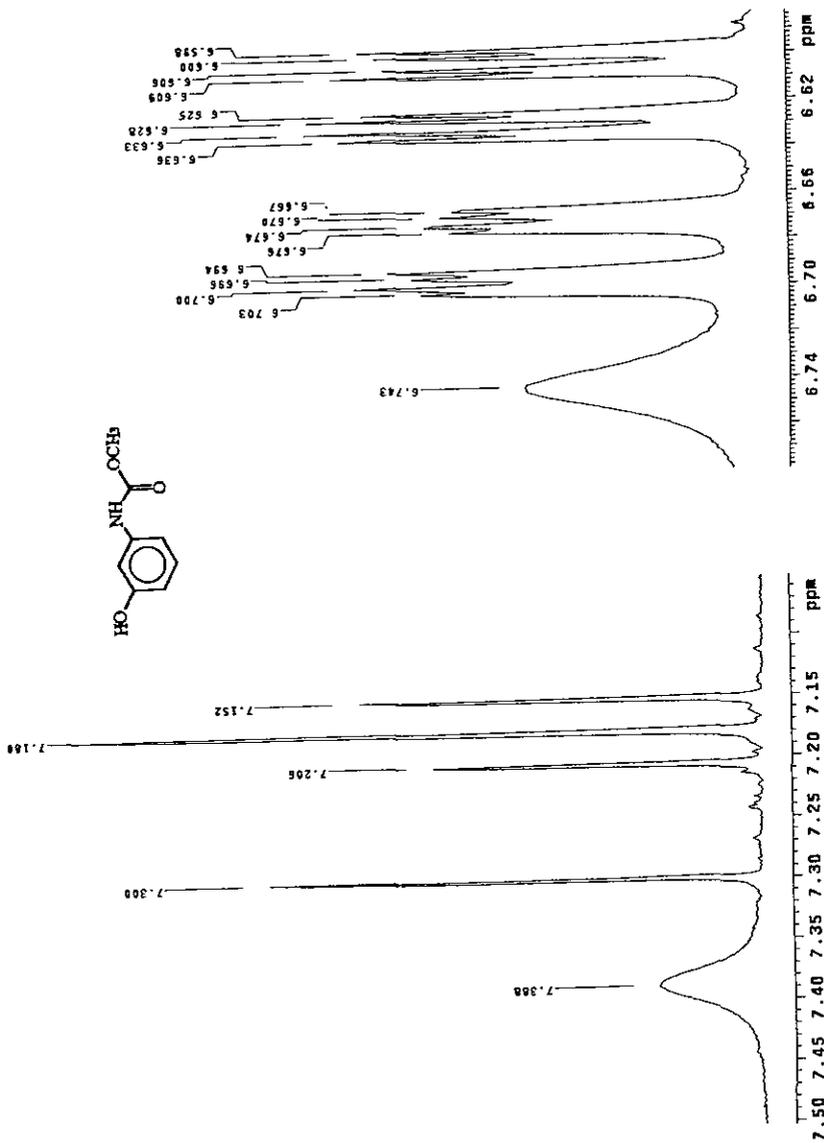
Espectro No. 18.- RMN H¹ de la 3-nitrobenzofenona.



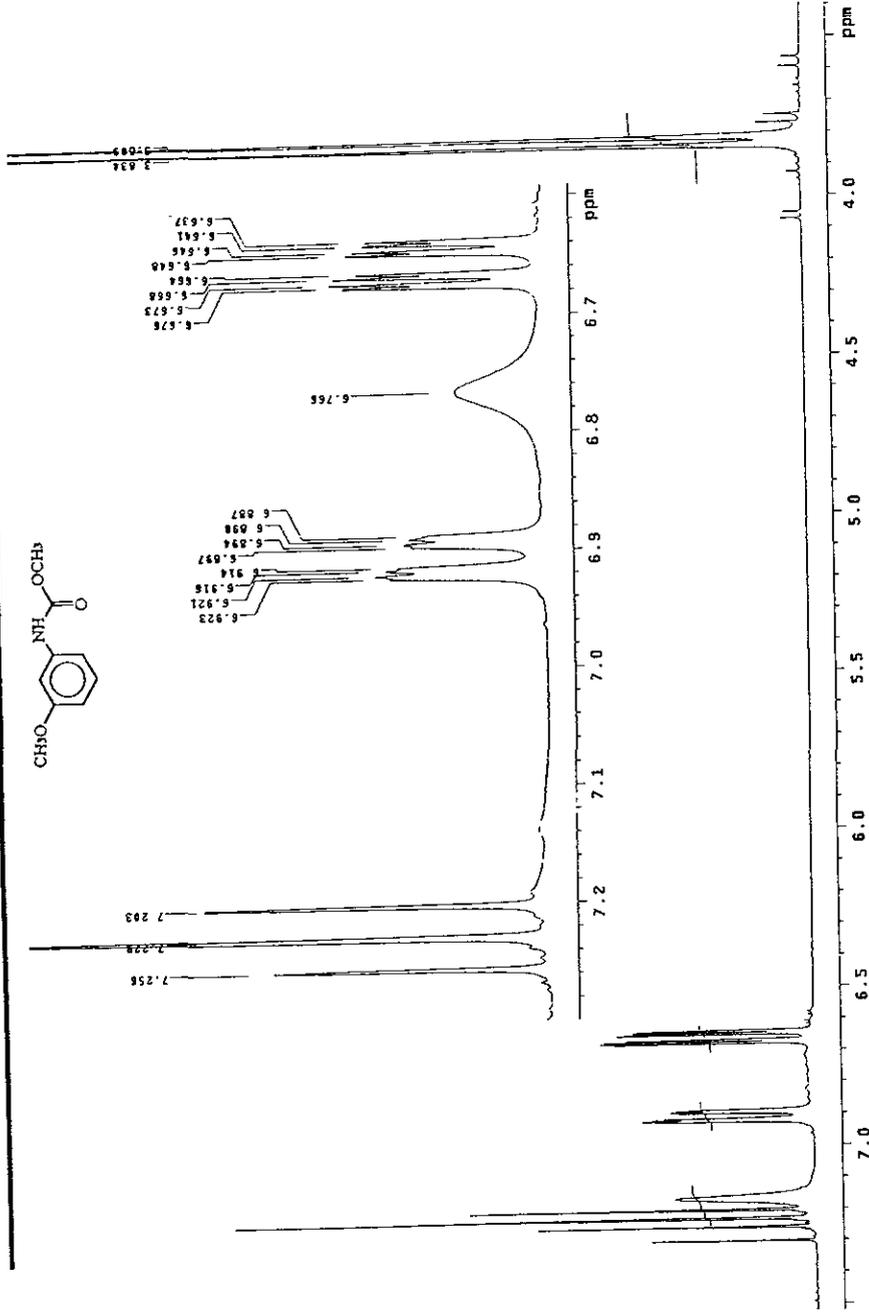
Espectro No. 19.- RMN H¹ del N-[β -(benzoi)]fenil]carbamato de metilo 3



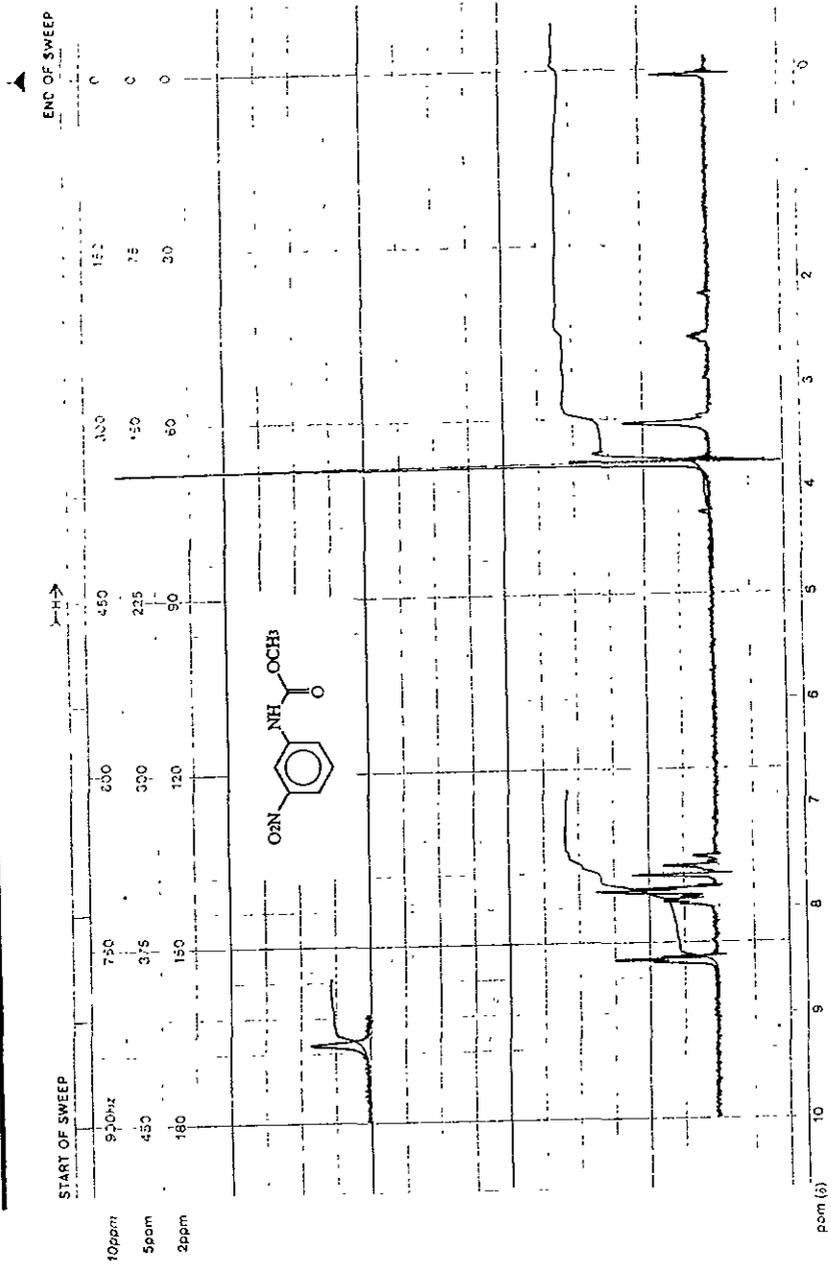
Espectro No. 20.- RMN H¹ del N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo 4



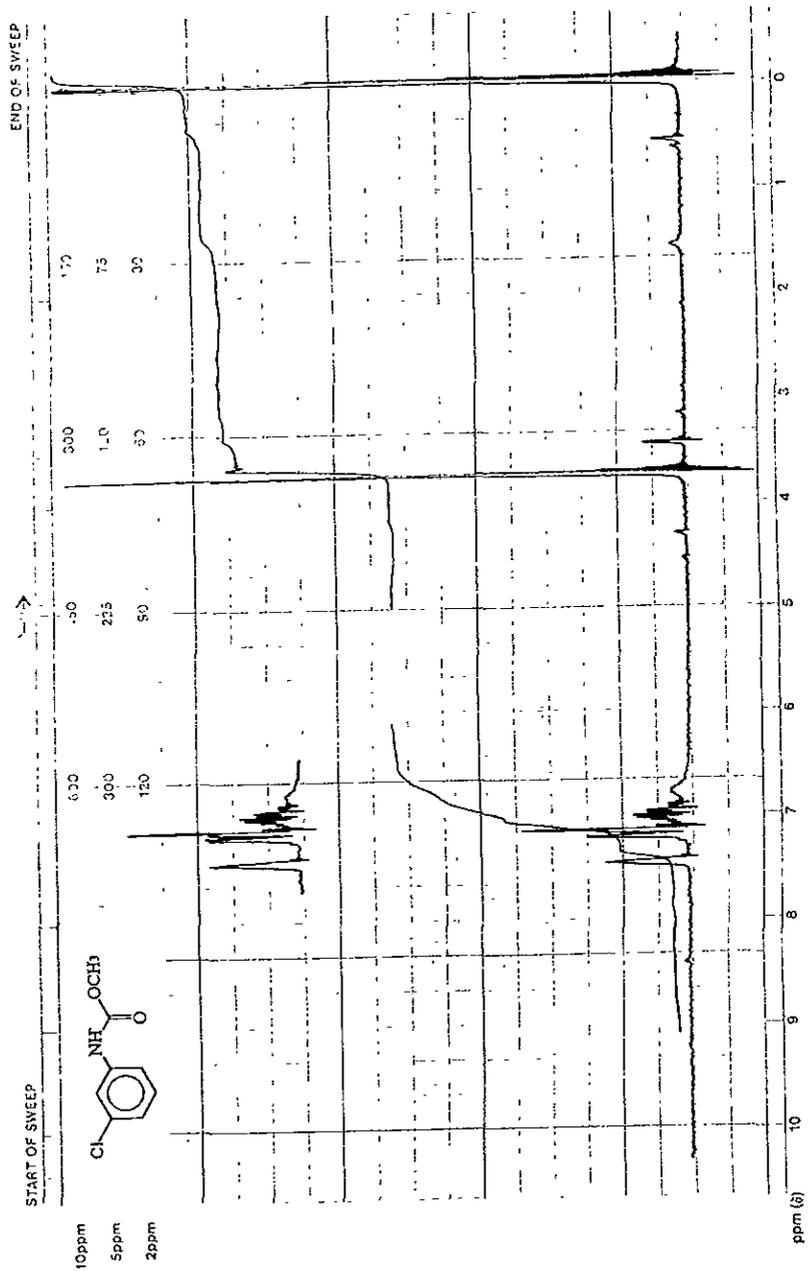
Espectro No. 20a.- RMN H¹ del N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo 4



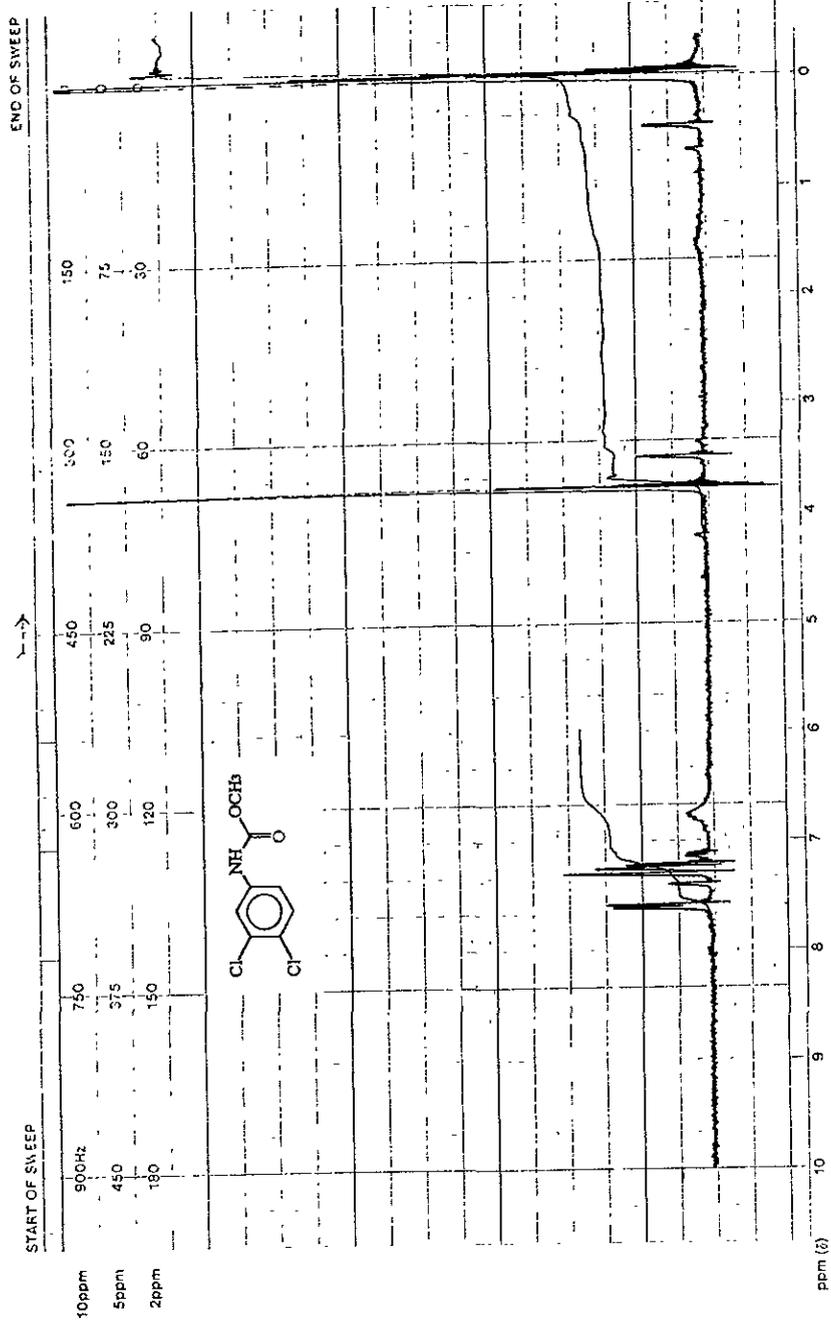
Espectro No. 21.- RMN H¹ del N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo 5



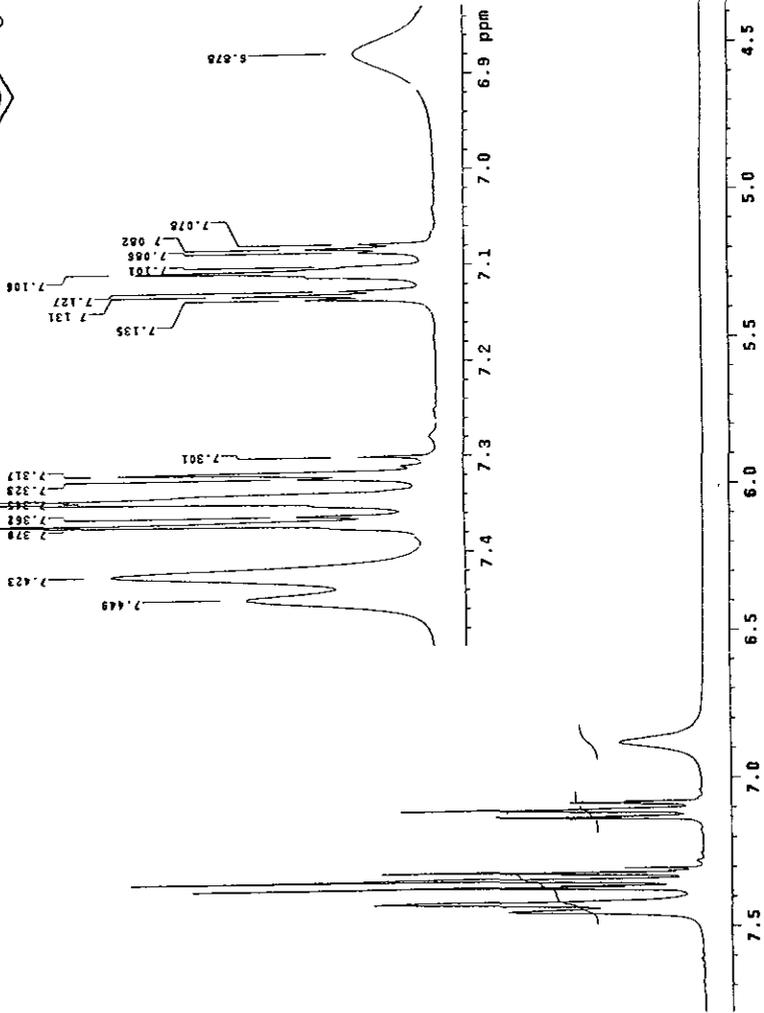
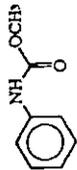
Espectro No. 22.- RMN H¹ del N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo 6



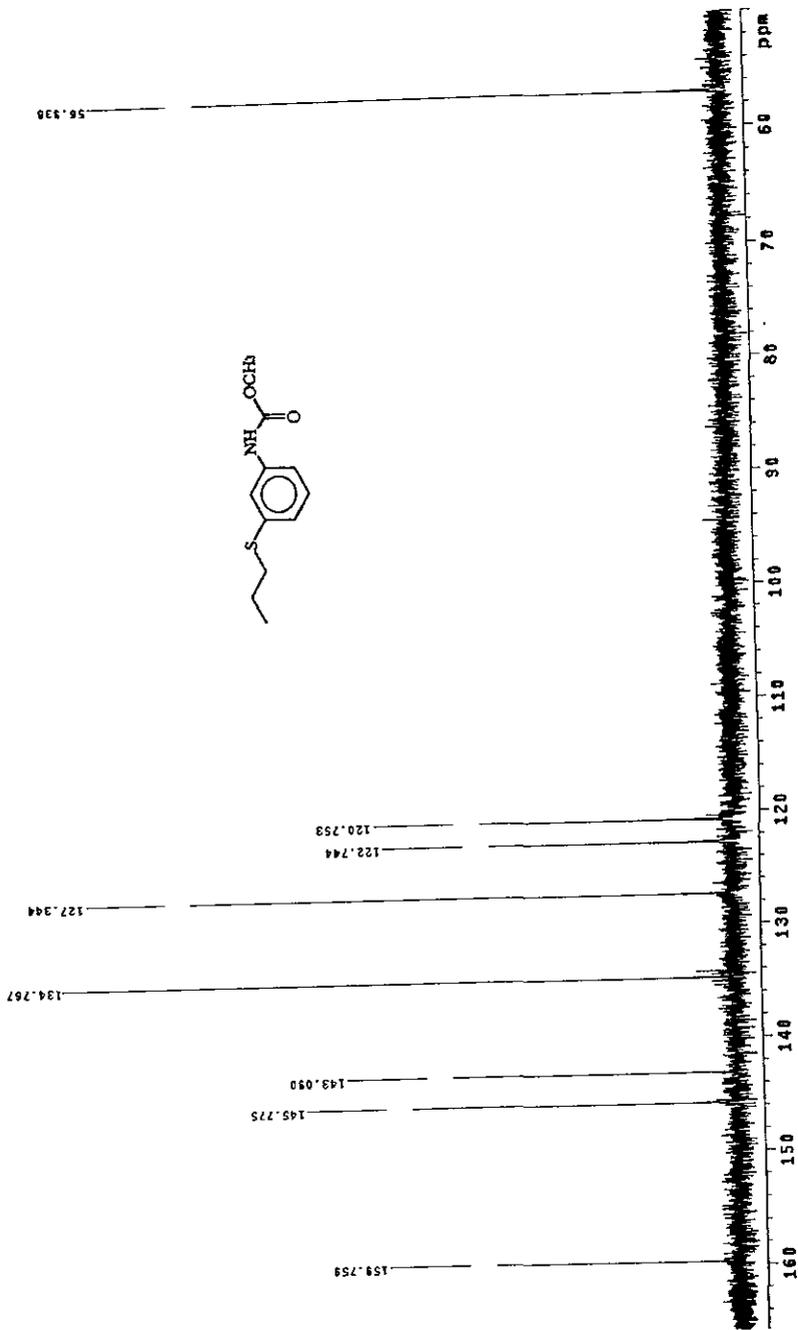
Espectro No. 23.- RMN H¹ del N-(3-clorofenil)carbamato de metilo 7



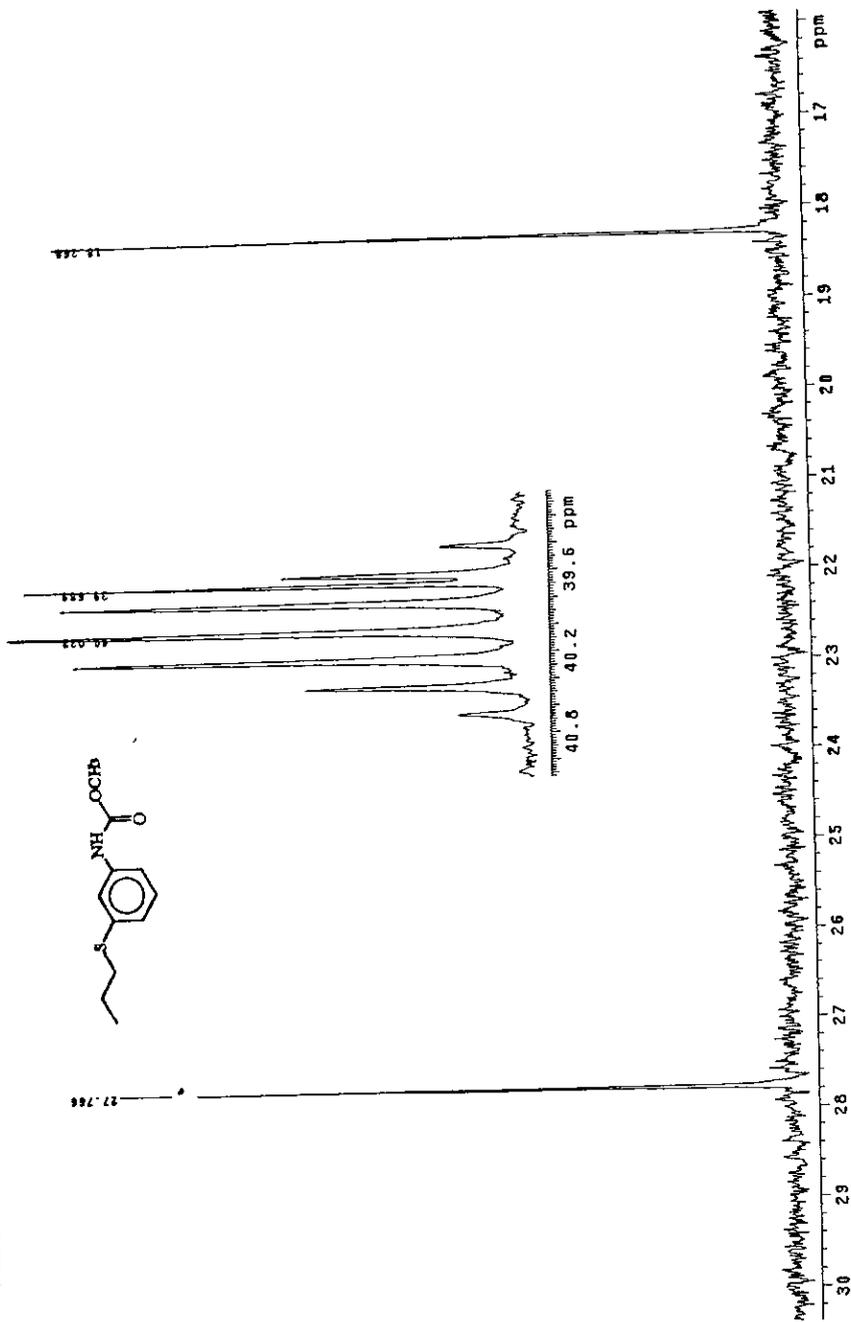
Espectro No. 24.- RMN H¹ del N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo 8



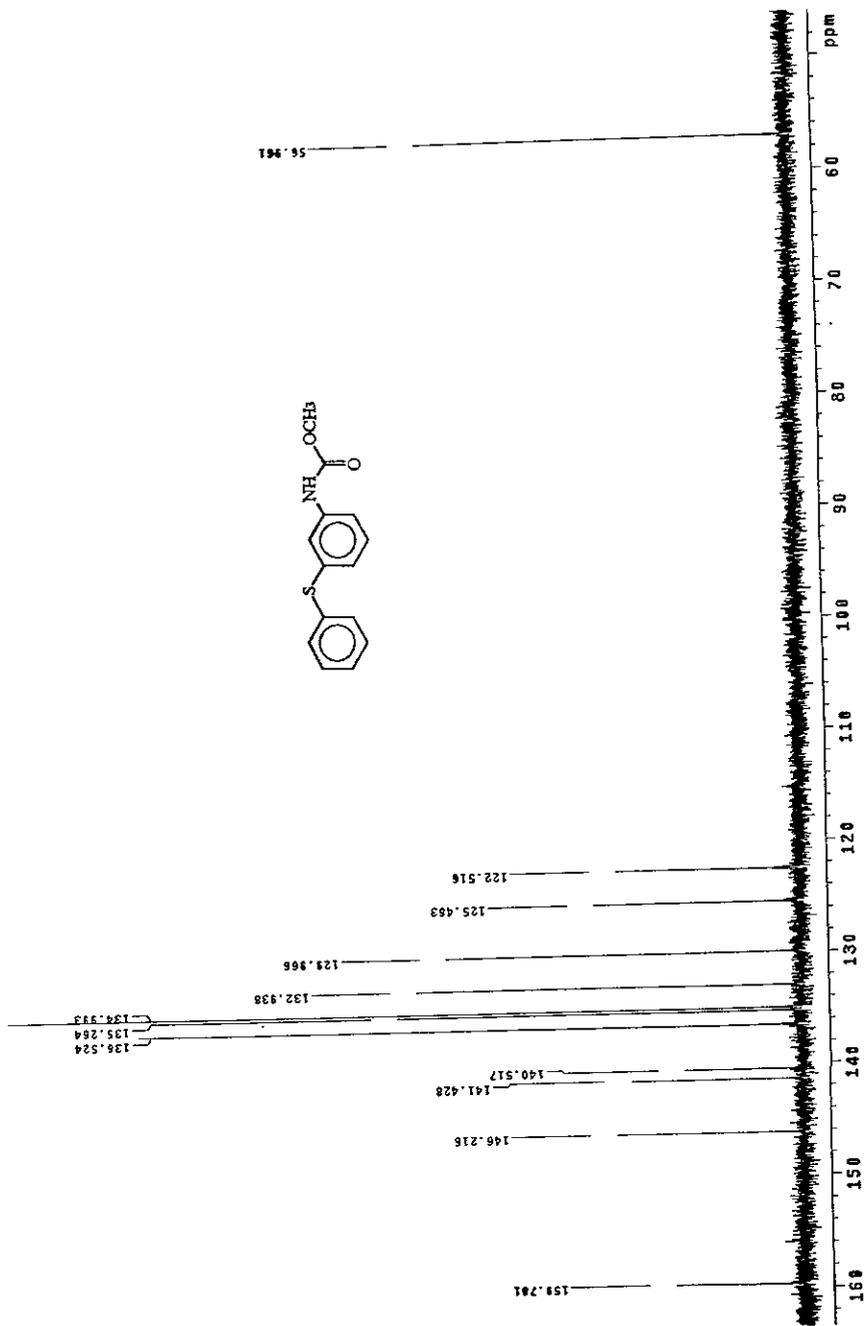
Espectro No. 25.- RMN H¹ del N-fenilcarbamato de metilo 9



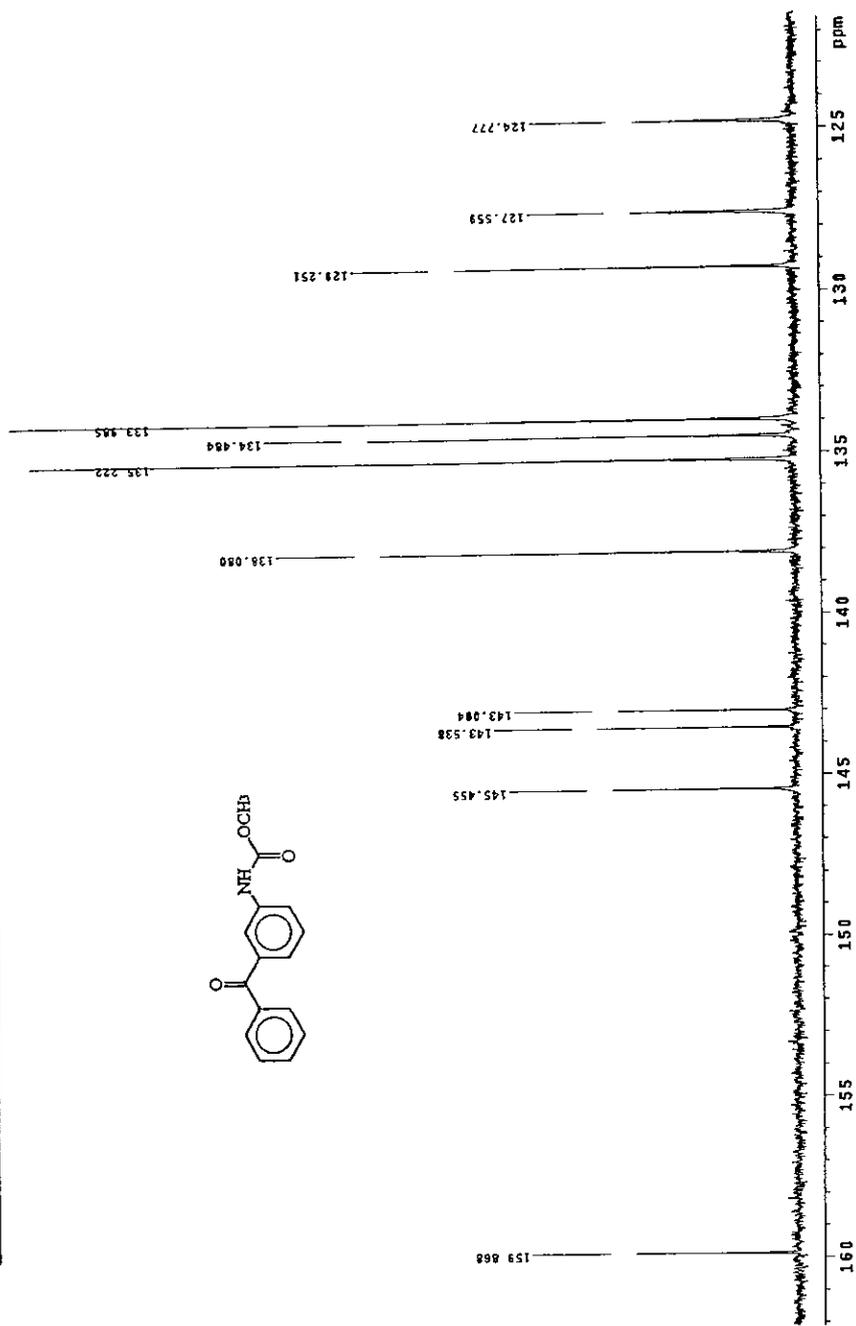
Espectro No. 26.- RMN C¹³ del N-[3-(propilto)fenil]carbamato de metilo I



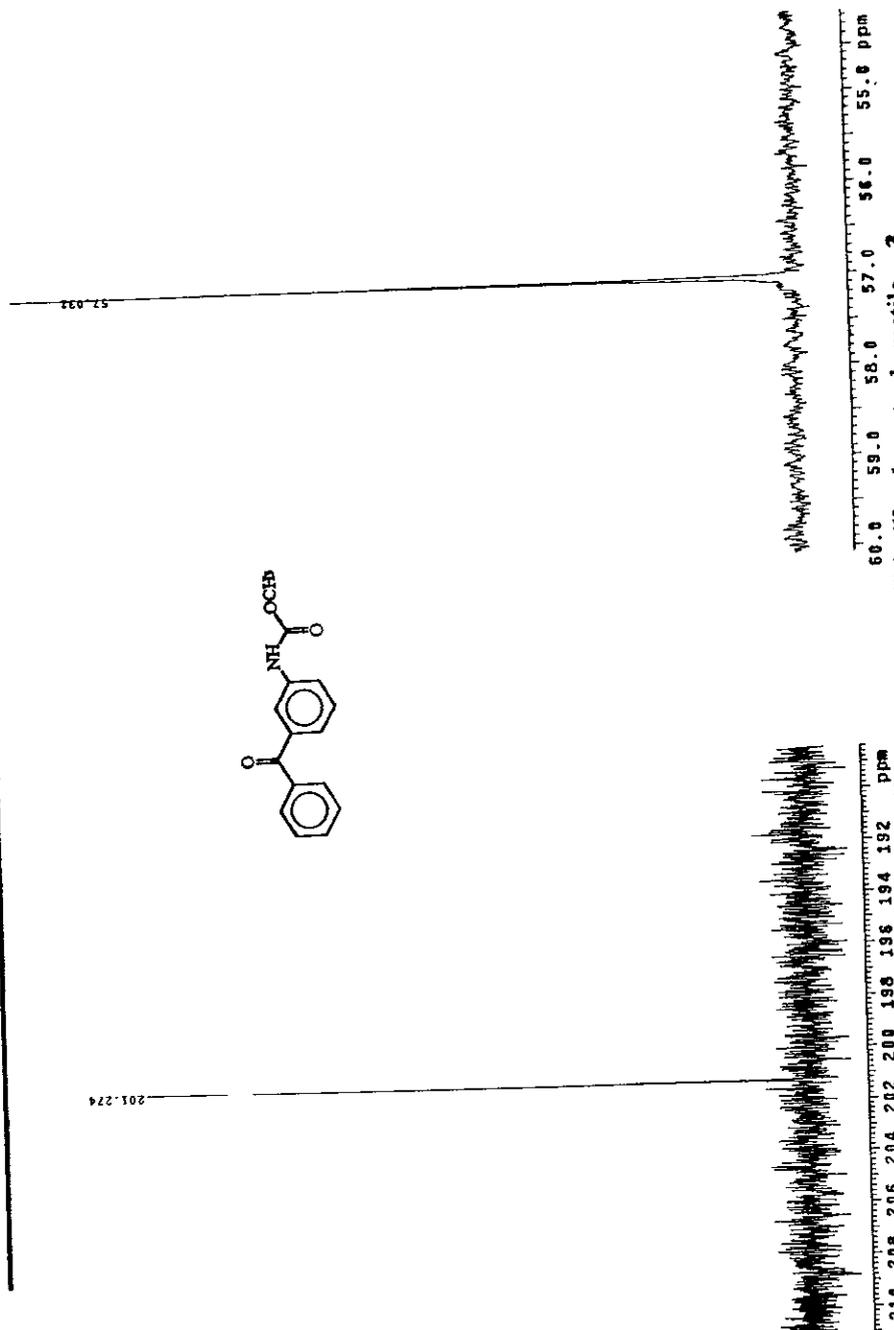
Espectro No. 26a.- RMN C^{13} del N-[3-(propilthio)fenil]carbamato de metilo 1



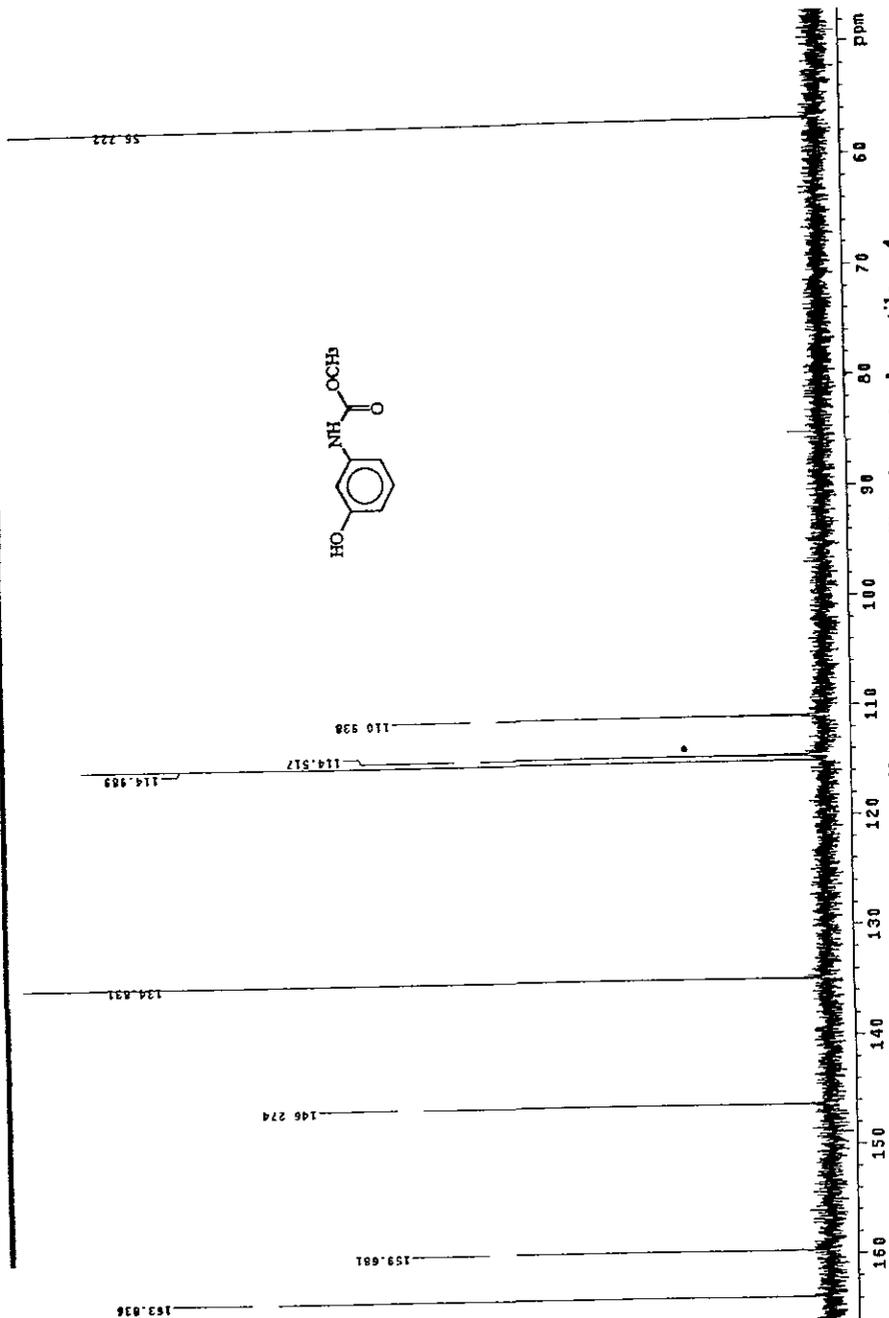
Espectro No. 27.- RMN C¹³ del N-[3-(fenilthio)fenil]carbamato de metilo 2



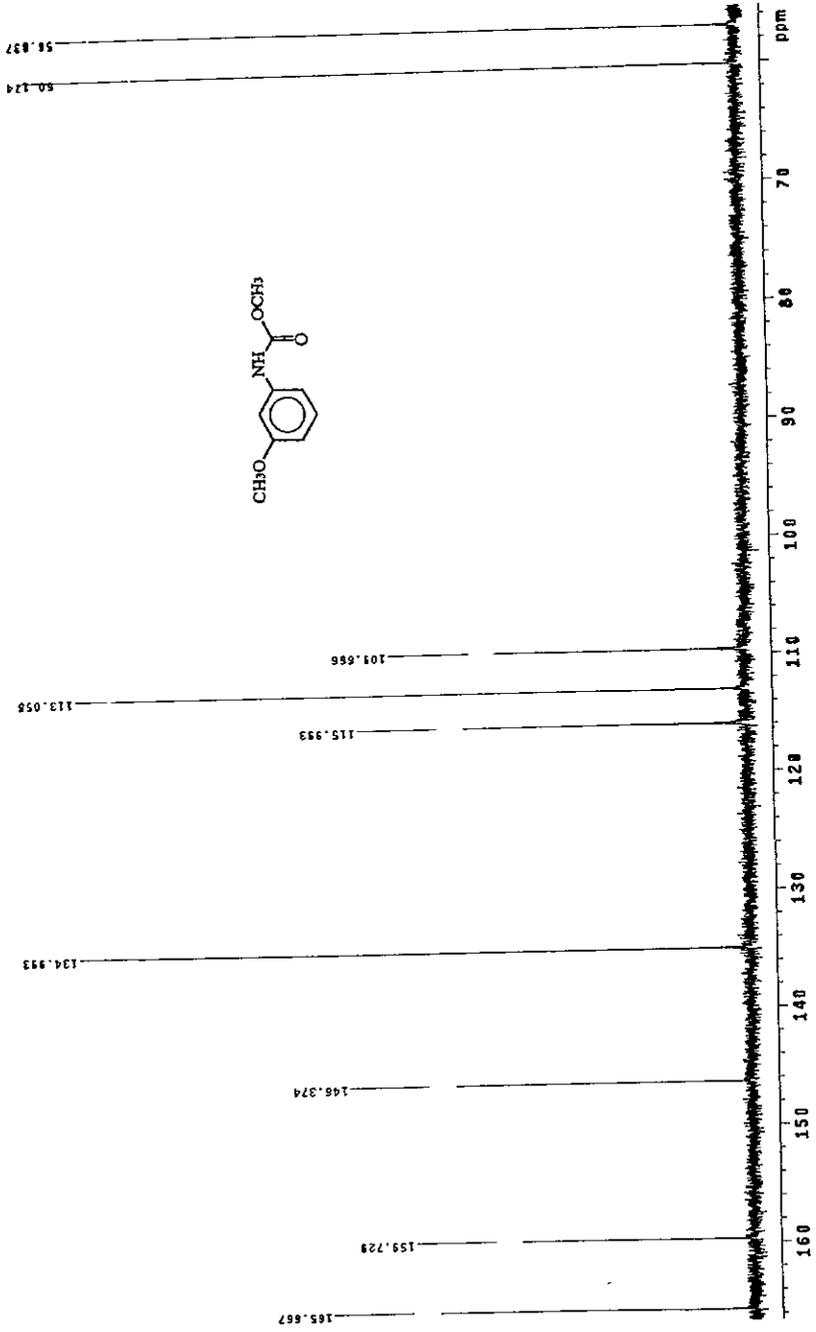
Espectro No. 28.- RMN C¹³ del N-[3-(benzoi)fenil]carbamato de metilo 3



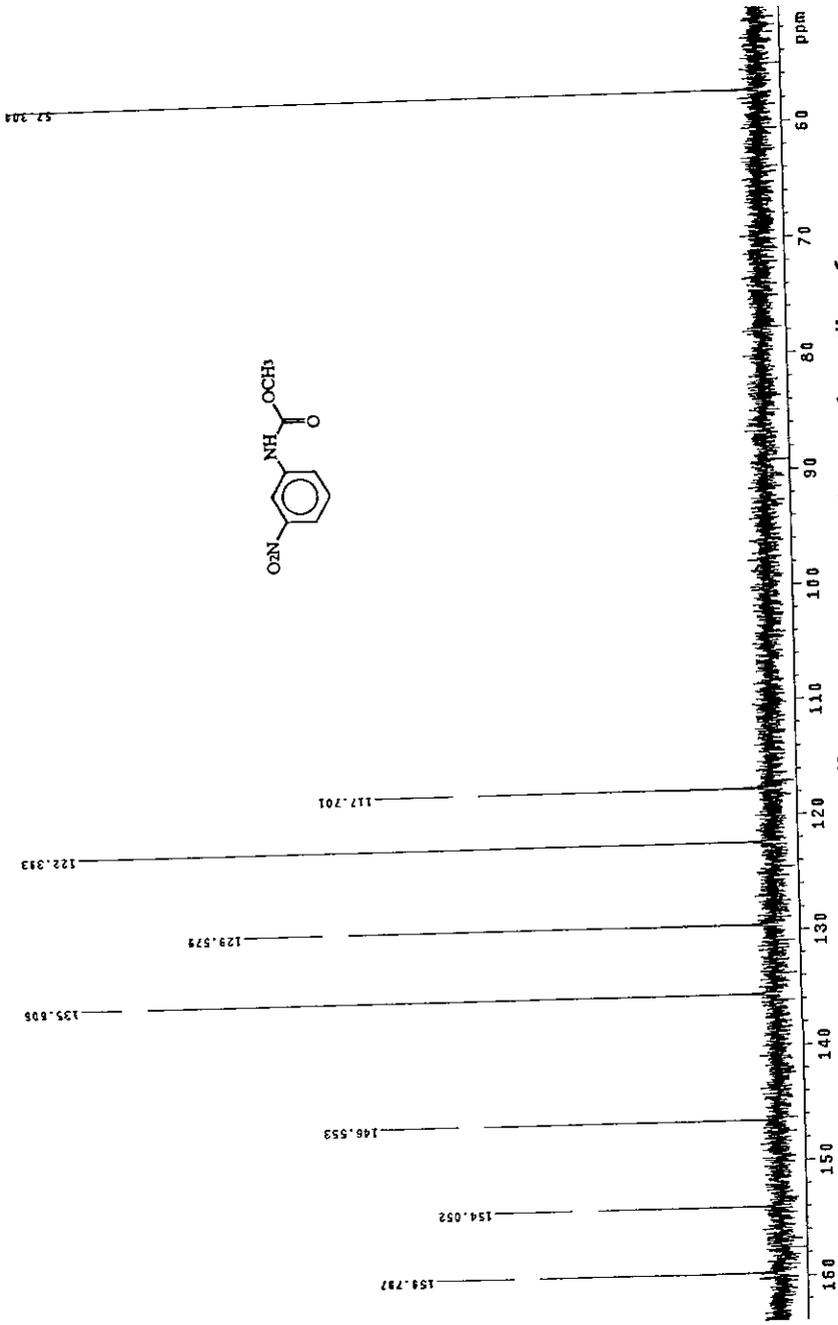
Espectro No. 28a.- RMN C¹³ del N-[3-(benzoi)fenil]carbamato de metilo 3



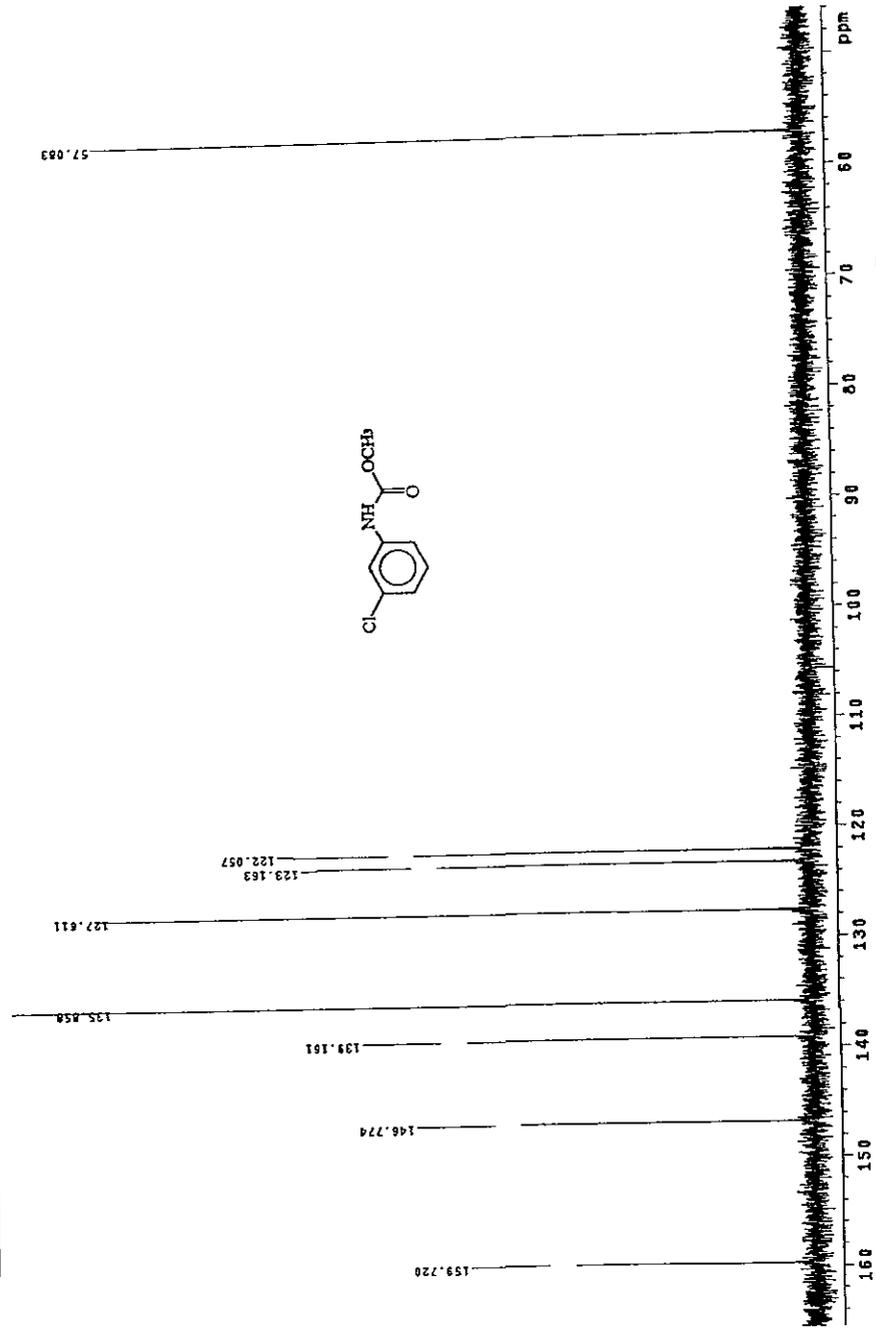
Espectro No. 29. - RMN C¹³ del N-(3-hidroxifenil)carbamato de metilo 4



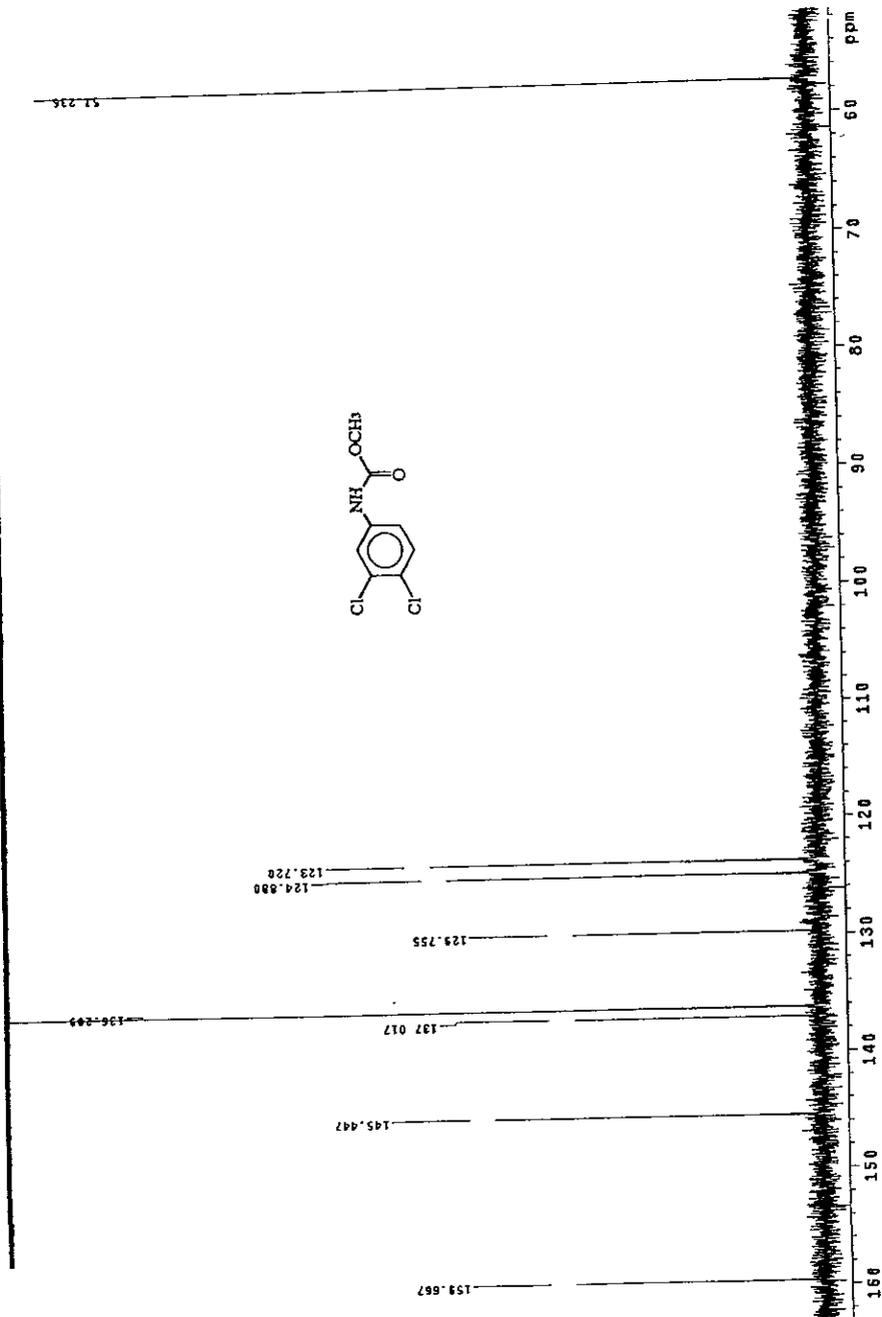
Espectro No. 30.- RMN C¹³ del N-(3-metoxifenil)carbamato de metilo 5



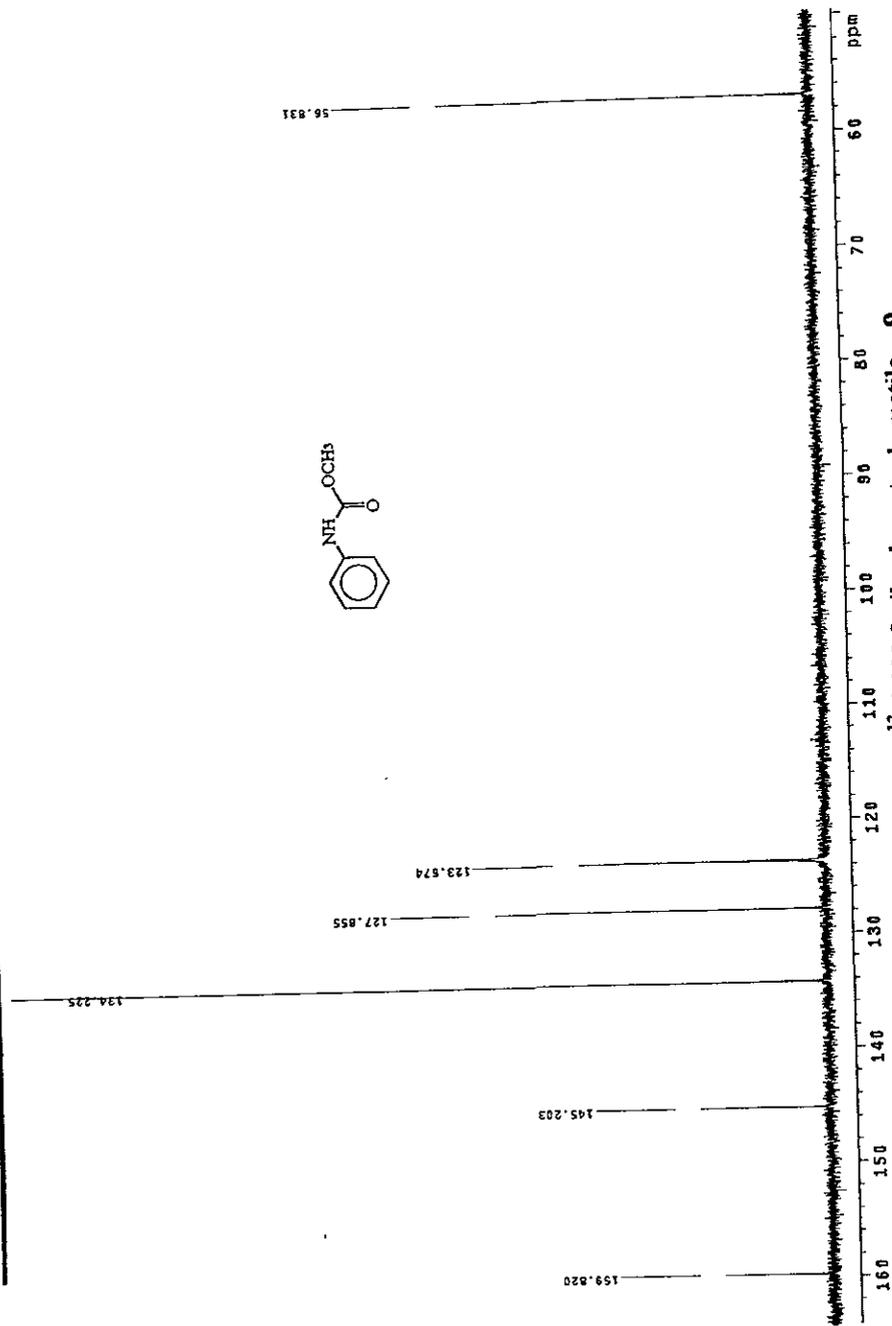
Espectro No. 31.- RMN C¹³ del N-(3-nitrofenil)carbamato de metilo 6



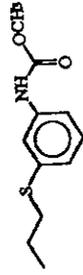
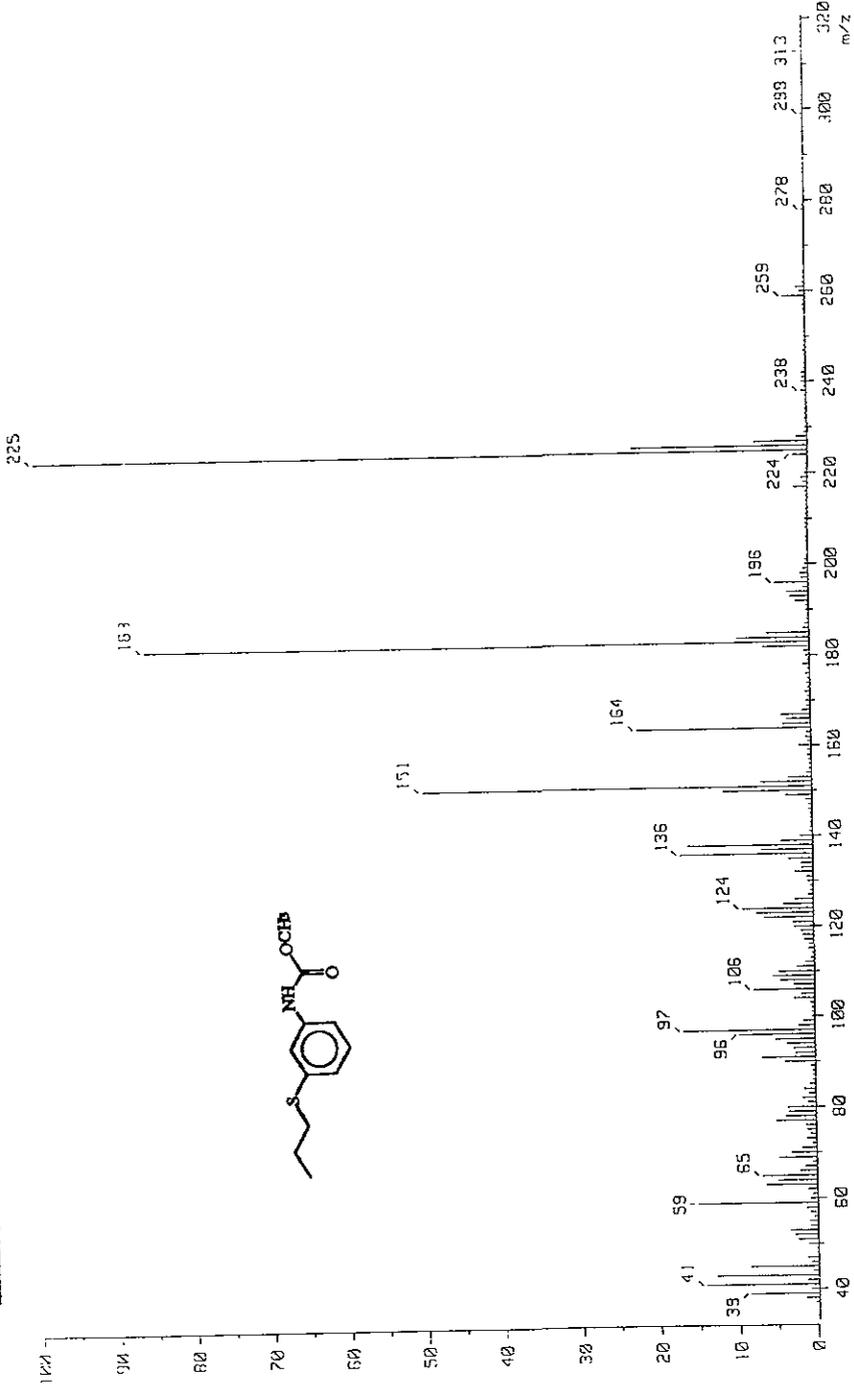
Espectro No. 32.- RMN C¹³ del N-(3-clorofeni)carbarnato de metilo 7



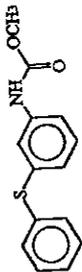
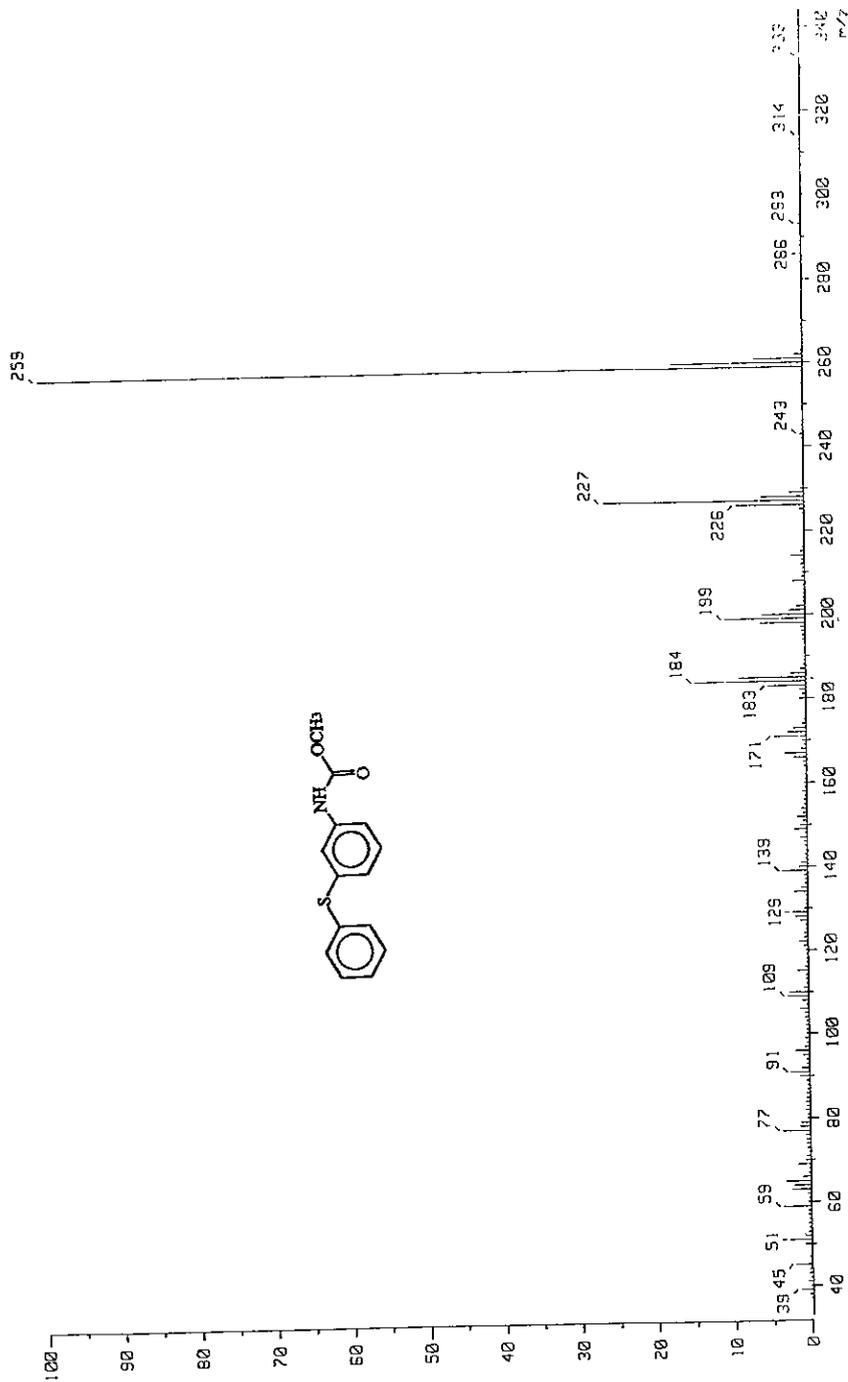
Espectro No. 33.- RMN C¹³ del N-(3,4-diclorofenil)carbamato de metilo 8



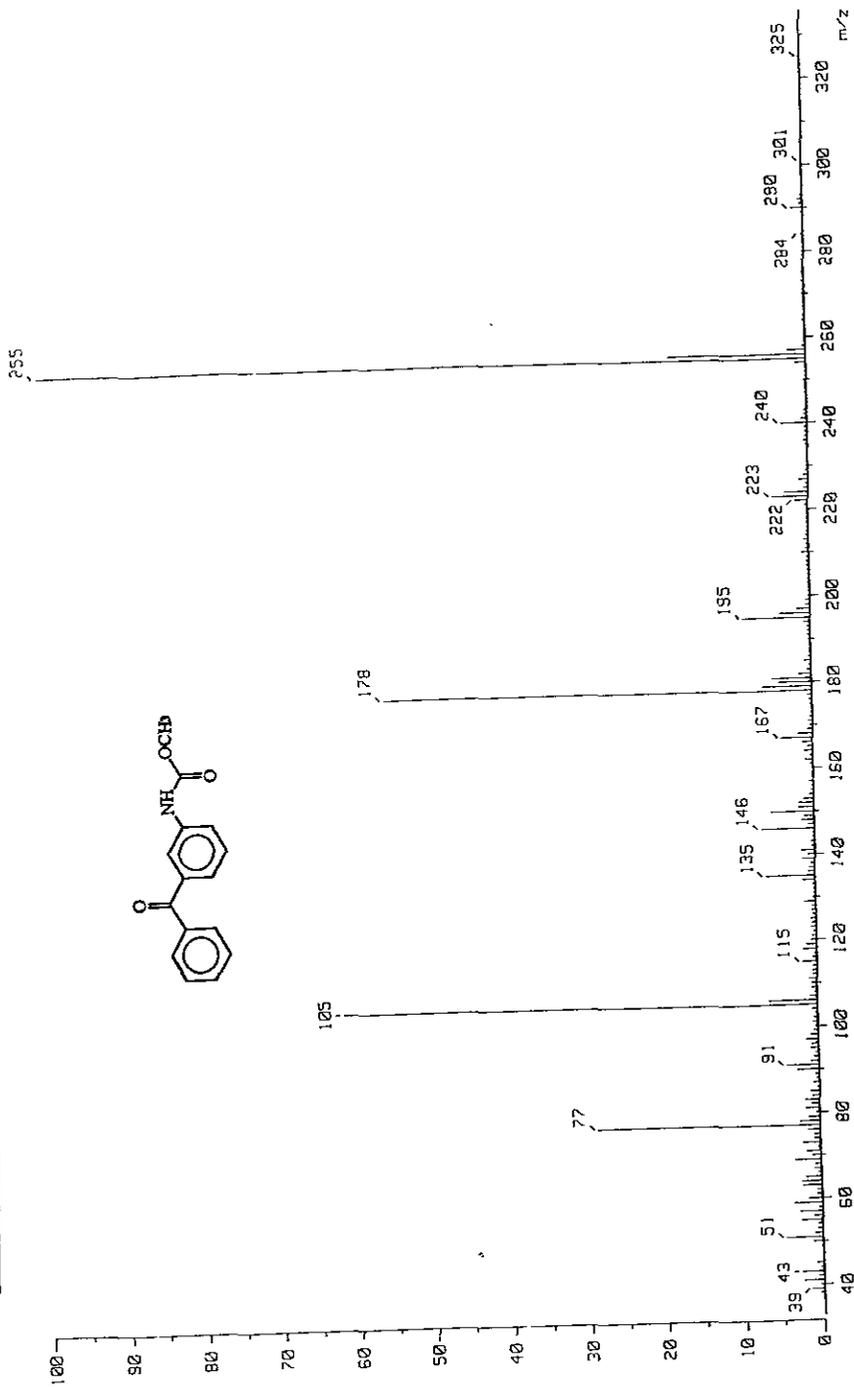
Espectro No. 34.- RMN C¹³ del N-fenilcarbarnato de metilo 9



Espectro No. 35.- Masas del N-[3-(propilitio)fenil]carbamato de metilo (1).



Espectro No. 36.- Masas del N-[3-(fenitio)fenil]carbamato de metilo (2).



Espectro No. 37.- Masas del N-[3-(benzoi)fenil]carbamato de metilo (3).

Apéndice 1

[Elemental Composition]

Data : VEMC-22

Date : 22-Feb-97 22:53

Sample: *

Note : Dr-Rafael-Castillo

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 1.89 min

Scan#: (2,27)

Elements : C 15/0, H 20/0, O 3/0, N 1/0, S 1/0

Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 9.0

Observed m/z	Int%						
225.0835	100.0						
Estimated m/z	Error[ppm]	U.S.	C	H	O	N	S
225.0824	+4.9	6.0	11	15	2	1	1

1.1. Análisis elemental del N-[3-(propiltio)fenil]carbamato de metilo (1)

[Elemental Composition]

Data : VEMC-31

Date : 22-Feb-97 23:13

Sample: *

Note : Dr-Rafael-Castillo

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 1.88 min

Scan#: (2,31)

Elements : C 20/0, H 20/0, O 3/0, N 1/0, S 1/0

Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 12.0

Observed m/z	Int%						
259.0646	100.0						
Estimated m/z	Error[ppm]	U.S.	C	H	O	N	S
259.0667	-8.1	10.0	14	13	2	1	1

1.2. Análisis elemental del N-[3-(feniltio)fenil]carbamato de metilo (2)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Zapater, R. C. Parasitosis Intestinales ; El Ateneo : Argentina, 1977.
- 2.- Romero-Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana ; Médica Panamericana : México, 1993 ; 1ª edic.
- 3.- Lamothe, R. Helmintiasis del hombre en México ; AGT : México, 1988.
- 4.- Centro Nacional de Información y documentación en Salud (CENIDS), Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo, Secretaria de Salud, México, 1993.
- 5.- Sharma, S. ; Design of new drugs for helminth diseases : lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research*. 1994, 25, 103-172.
- 6.- Organización Mundial de la Salud (OMS). Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias ; OMS : Ginebra, 1996 ; 2a edic.
- 7.- Escobedo, F. ; Penagos, P. ; Rodríguez, J. ; Sotelo, J. ; Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch. Int. Med.* 1987, 738-741.
- 8.- Kassai, T. ; Cordero-Del campillo, M. ; Euzeby, J. ; Gaafar, S. ; Hiepe, T. ; and Himonas, C. A. Standarized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*. 1988, 29, 299-326.
- 9.- Brown, H. ; Matzuk, A. R. ; Ilves, I. R. ; Peterson, L. H. ; Harris, S. A. ; Sarret, L. H. ; Egerton, J. R. ; Yaktstis, J. J. ; Campbell, W. C. ; and Cuckler ; Antiparasitic drugs, IV. 2-(4-tiazolil)benzimidazole. A new antihelmintic. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 1764.
- 10.- Tocco, D. J. ; Buhs, R. P. ; Brown, H. D. ; Matzuk, A. R. ; Mertell, H. E. ; Harman, R. E. ; and Trenner, N. R. ; The metabolic fate of thiabendazole in sheep. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1964, 7, 399.
- 11.- Jung, H. ; Hurtado, M. ; Sánchez, M. ; Medina, M. T. ; and Sotelo, J. ; Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin. Neuropharm.*, 1990, 13, 559.

- 12.- Angeles, E. ; et.al. ; A simple method for the synthesis of carbamates. *Synthetic communications*, 1994, 24, 244.
- 13.- Morrison, T. N.; Boyd, R. N. *Química Orgánica*; Addison-Wesley Iberoamericana : México, 1987; nueva edición, p. 837-840.
- 14.- Louis F. Fieser and Mary Fieser, *Organic chemistry*; Reinhold Publishing Co. : New York, USA , 1956 ; Third edition, p. 608-609.
- 15.- John Mc. Murry, *Química Orgánica* ; Grupo editorial Iberoamericano : México, 1994 ; p. 1181.
- 16.- Calvin A. Buehler, Donald E. Pearson, *Survey of Organic Synthesis* ; Willey-Interscience : USA, 1970 ; p. 497, 812, 819.
- 17.- G. Marc Loudon, *Organic Chemistry* ; The Benjamin Cummings Publishing Company : USA, 1988 ; p. 1023-1026.
- 18.- Angeles, E.; Santillan, A.; Martínez, I.; Ramírez, A.; Salmón, M.; Martínez, R.; Moreno, E.; *Synthetic Communications*, 1994, 24, (17), 2441-2447.
- 19.- Rodríguez-Morales, Sergio ; *Síntesis y actividad biológica de N-fenilcarbamatos de metilo 4-sustituídos como antihelmínticos y herbicidas*, Tesis de maestría, Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
- 20.- Thomas, J. United States Patent 4 152 522, 1979 ; *Chem. Abstr.* 1979, 91, 710.
- 21.- Johannes, S. B. ; Walter, S. I. *Organic Synthesis* ; John Wiley & sons : USA, 1955 ; collective volume 1, p 130-132.
- 22.- Vogel, A. I. *A Text Book of Practical Organic Chemistry* ; Longman : USA, 1972 ; 3a. edic., p 526.
- 23.- Kornblum, N. ; Cheng, L. ; Kerber, R. C. ; Kestner, M. ; Newton, B. ; Pinnick, H. W. ; Smith, R. G. ; and Wade, P. A. ; Displacement of the nitro group of substituted nitrobenzenes : a synthetically useful process. *Journal of Organic Chemistry*, 1976, 41, 9, 1560-1564.

- 24.- Vogel, A. I. A Text Book of Practical Organic Chemistry ; Longman : USA, 1972 ; 3a. edic., p. 781.
- 25.- Kamm, O. ; Segur, J. B. Organic Synthesis ; John Wiley & sons : USA, 1955 ; collective volume 1, p 372-374.
- 26.- Kamm, O. ; Segur, J. B. Organic Synthesis ; John Wiley & sons : USA, 1955 ; collective volume 1, p 391-392.
- 27.- Adams, R. ; Jenkins, R. L. Organic Synthesis ; John Wiley & sons : USA, 1955 ; collective volume 1, p 394-396.
- 28.- Dennis, D. T. ; Despommier D. ; Davis, N. ; Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* ; *The Journal of Parasitology*, **1970**, 6(5), 929-932.
- 29.- Towson, S. ; Shay, E. K. ; *Onchocerca guturosa* and *Onchocerca volvulus* studies on the viability and drug responses of cryopreserved adult worms in vitro ; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1989**, 83, 664-669.
- 30.- Silverstein, R. M. Spectrometric Identification of Organic Compounds ; John Wiley & sons : USA, 1991 ; 5a edic.
- 31.- Pretsch, E. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds ; Fresenius, W. ; Huber, J. F. K. ; Pungor, E., Ed. ; Springer-Verlag : USA, 1989 ; 2a edic.
- 32.- Kemp, W. Organic Spectroscopy ; Mc Millan : USA, 1993 ; 3a edic.
- 33.- Nippon, S. ; Kabushiki, K. London Patent 967 897, 1964.
- 34.- Survey of Organic Synthesis; Wiley-Interscience: USA, 1970; p. 651-667.
- 35.- Handbook of Chemistry and Physics; CRC : USA, 1973-1974; p. C-195.
- 36.- Handbook of Chemistry and Physics; CRC : USA, 1973-1974; p. C-196.

37.- Bergon, M. ; Ben-Hamida, N. ; Calmon, J. P. Isocyanate formation in the decomposition of phenmedipham in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 577-583 (1985).