

00570
6
2Fj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA.

SINTESIS DE DERIVADOS DEL
1-METILBENCIMIDAZOL CON ACTIVIDAD
ANTHELMINTICA POTENCIAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A

Q.B.MARIA DE LOS REMEDIOS SANCHEZ DIAZ



MEXICO, D. F.

27-07-83 - 1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff.
Primer vocal: Dra. Ofelia Espejo González.
Secretario: Dr. Roberto Cedillo Rivera (IMSS).
Primer suplente: Dra. Rachel Mata Essayag.
Segundo suplente: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet.

Sustentante:



Q.B. María de los Remedios Sánchez Díaz.

Asesor de Tesis:
(Parte química)



Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Asesor de Tesis:
(Parte biológica)



Dr. Roberto Cedillo Rivera.

Asesor técnico:



M. en C. Alicia Hernández Campos.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por sus invaluable enseñanzas durante la dirección de la presente tesis, parte fundamental en mi formación académica.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera, Amparo Tapia Contreras, Noemí Viveros, Raúl Morales Hurtado, Lilian Yepes Mulia de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por la realización de las pruebas de actividad sobre *Giardia lamblia* y sobre *Trichinella Spiralis*.

Al Dr. Ramiro Román Contreras, Investigador del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, por proporcionar los camarones de agua dulce.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus comentarios y observaciones. En especial doy gracias a la Dra. Rachel Mata Essayag por sus sugerencias y oportunas correcciones que hicieron de este trabajo un mejor manuscrito.

Al Dr. Daniel Chávez Velasco, por su valiosa colaboración en el manejo de los paquetes de computo utilizados en la redacción de este trabajo.

Al M. en C. Francisco Hernández Luis y a la M. en C. Alicia Hernández Campos, por sus valiosas sugerencias y asistencia técnica, durante el desarrollo de la tesis.

A las QFB. Graciela Chávez, Marisela Gutiérrez y Margarita Guzmán Villanueva de la USAI; Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

A la QFB. Rosa Isela del Villar Morales y a las Q. Alejandrina Acosta e Irene Audelo de la USAI; Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q. Georgina Duarte Lisci y al M. en C. José Luis Gallegos Pérez de la USAI; Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas.

DEDICATORIAS

A Daniel Héctor y Daniel Chavéz: por dar sentido y dirección a mi vida.

A tí que estes donde estes,
siempre vas conmigo,
me proteges y me acompañas.
A tí que nunca me has abandonado,
que en los momentos de angustia me
consuelas, y los de alegría, conmigo
celebras.

A tí cuyo amor es infinito.

HDR.

Porque después de todo he
comprendido
que lo que el árbol tiene de florido
vive de lo que tiene sepultado.

Francisco Luis Bernádez.

A mis padres y hermanos.

Con cariño a mis sobrinos: Litzania, Alitzel y Felipe de Jesús.

A mis grandes amigos: Francisco Hernández, Alicia Hernández, Moustapha Bah, Sergio Rodríguez y Aida Solís.

Deseo dedicar de manera especial al Dr. Rafael Castillo,

Tanto al académico: por ser mi asesor de tesis ya que sin él no hubiera sido posible lograr la culminación de este trabajo;
como al hombre (padre y amigo) que siempre me alentó en los momentos de desfallecimiento. POR SIEMPRE GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	viii
Lista de Esquemas.	x
Lista de Figuras.	x
Lista de Tablas.	xi
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
2,1 Los bencimidazoles como agentes antihelmínticos.	4
2.2 Los bencimidazoles como agentes antiprotozoarios.	7
2.3 Síntesis de bencimidazoles.	7
2.4 Síntesis de 1-metilbencimidazoles.	9
2.4.1 A partir de bencimidazoles.	9
2.4.2. Apartir de 2-nitroanilinas.	10
2.4.3 Apartir de 2-cloronitrobencenos.	12
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3.1 Consideraciones generales.	14
3.2 Objetivos.	17
3.3 Metas.	18
IV. PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1 Parte química.	19
4.1.1 Síntesis de los 1-Metilbencimidazoles (1-16).	21
4.1.1.1 1,2-Dimetilbencimidazol (1).	21
4.1.1.1.1 A partir de N-metil-1,2-fenilendiamina (21).	21
4.1.1.1.2 A partir de 1,2-fenilendiamina (22).	23
4.1.1.1.2.1 2-Metilbencimidazol (23).	23
4.1.1.1.2.2 1,2.Dimetilbencimidazol (1).	23
4.1.1.2 2-Amino-1-metilbencimidazol (2).	24
4.1.1.2.1 A partir de N-metil-1,2-fenilendiamina (21).	24
4.1.1.2.2 A partir de 1,2-fenilendiamina (22).	24
4.1.1.2.2.1 2-Aminobencimidazol (24).	24

4.1.1.2.2.2	2-Amino-1-metilbencimidazol (2).	25
4.1.1.3	2-Mercapto-1-metilbencimidazol (3).	25
4.1.1.4	1-Metil-2-metiltiobencimidazol (4).	26
4.1.1.4.1	A partir de 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3).	26
4.1.1.4.2	A partir de 1,2-fenilendiamina (22).	27
4.1.1.4.2.1	2-Mercaptobencimidazol (25).	27
4.1.1.4.2.2	1-Metil-2-metiltiobencimidazol (4).	27
4.1.1.5	5-Cloro-1,2-dimetilbencimidazol (5).	28
4.1.1.6	2-Amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).	28
4.1.1.7	5-Cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (7).	29
4.1.1.8	5-Cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (8).	29
4.1.1.9	6-Cloro-1,2-dimetilbencimidazol (9).	30
4.1.1.10	2-Amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).	30
4.1.1.11	6-Cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (11).	31
4.1.1.12	6-Cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (12).	31
4.1.1.13	5,6-Dicloro-1,2-dimetilbencimidazol (13).	32
4.1.1.14	2-Amino-5,6-dicloro-1-metilbencimidazol (14).	33
4.1.1.15	5,6-Dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15).	33
4.1.1.16	5,6-Dicloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (16).	34
4.1.2	Síntesis de las 1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 22, 32, 37, 43).	35
4.1.2.1	Síntesis de N-metil-1,2-fenilendiamina (21).	35
4.1.2.1.1	2-Nitroacetanilida (18).	35
4.1.2.1.2	N-Metil-2-nitroacetanilida (19).	37
4.1.2.1.3	N-Metil-2-nitroanilina (20).	37
4.1.2.1.4	N-Metil-1,2-fenilendiamina (21).	38
4.1.2.2	Síntesis de N-Metil-4-cloro-1,2-fenilendiamina (31). .	38
4.1.2.2.1	4-Cloroacetanilida (27).	38
4.1.2.2.2	4-Cloro-2-nitroacetanilida (28).	39
4.1.2.2.3	N-Metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).	39
4.1.2.2.4	N-Metil-4-cloro-2-nitroanilina (30).	40
4.1.2.2.5	N-Metil-4-cloro-1,2-fenilendiamina (31).	40
4.1.2.3	Síntesis de N-Metil-5-cloro-1,2-fenilendiamina (37). .	41
4.1.2.3.1	5-Cloroacetanilida (33).	41

4.1.2.3.2	5-Cloro-2-nitroacetanilida (34).	41
4.1.2.3.3	N-Metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).	42
4.1.2.3.4	N-Metil-5-cloro-2-nitroanilina (36).	43
4.1.2.3.5	N-Metil-5-cloro-1,2-fenilendiamina (37).	43
4.1.2.4	Síntesis de N-Metil-5,6-dicloro-1,2-fenilendiamina (43).	44
4.1.2.4.1	5,6-Dicloroacetanilida (39).	44
4.1.2.4.2	5,6-Dicloro-2-nitroacetanilida (40).	44
4.1.2.4.3	N-Metil-5,6-dicloro-2-nitroacetanilida (41).	45
4.1.2.4.4	N-Metil-5,6-dicloro-2-nitroanilina (42).	45
4.1.2.4.5	N-Metil-5,6-dicloro-1,2-fenilendiamina (43).	46
4.1.2.5	1,2-Fenilendiamina (22).	46
4.2	Parte biológica.	47
4.2.1	Evaluación del potencial tóxico de los 1-metilbencimidazoles sintetizados (1-16).	47
4.2.1.1	Para el crustáceo <i>Artemia salina</i>	47
4.2.1.2	Para el crustáceo de agua dulce <i>Macrobrachium tenellum</i> (Smith,1871).	47
4.2.1.3	Para la larva J2 de <i>Meloidogyne incognita in vitro</i>	48
4.2.2	Evaluación del potencial antiprotozoario de los derivados del 1-metilbencimidazol.	49
4.2.2.1	Parásitos.	49
4.2.2.2	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> para <i>Giardia lamblia</i>	49
4.2.3	Evaluación del potencial antihelmíntico de los derivados del 1-metilbencimidazol.	50
4.2.3.1	Parásitos.	50
4.2.3.2	Obtención de los organismos adultos de <i>Trichinella spiralis</i>	50
4.2.3.3	Ensayo <i>in vitro</i> (MTT/PMS) para evaluar el efecto de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre el adulto de <i>T. spiralis</i>	51
4.2.3.4	Obtención de las larvas musculares de <i>T. spiralis</i>	52
4.2.3.5	Ensayo <i>in vitro</i> (MTT/PMS) para evaluar el efecto de	

	los derivados del 1-metilbencimidazol sobre la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	52
4.2.4	Estudios de Microscopía electrónica.	53
4.2.4.1	Microscopía electrónica de barrido.	53
4.2.4.2	Microscopía electrónica de transmisión.	53
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	54
5.1	Parte química.	54
5.1.1	Síntesis de los 1-metilbencimidazoles (1-16).	54
5.1.2	Síntesis de las 1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 22, 31, 37, 43).	61
5.1.3	Elucidación estructural de 1-16.	65
5.1.4	Elucidación estructural de 19, 29, 35, 41.	68
5.1.5	Elucidación estructural del producto secundario 40b.	70
5.2	Parte biológica.	70
5.3	Estudios de microscopía electrónica.	79
VI.	CONCLUSIONES	83
VII.	BIBLIOGRAFIA	86
	ANEXO I (Espectros)	92

RESUMEN

Hasta hace poco se consideraba que los bencimidazol carbamatos, Albendazol y Mebendazol, tenían únicamente acción antihelmíntica; sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos compuestos son muy efectivos contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Trichomona vaginalis*. Los ensayos clínicos han mostrado que el Albendazol es tan efectivo como el Metronidazol en el tratamiento de la giardiosis.

La actividad antihelmíntica de los bencimidazol carbamatos, parece estar relacionada a una acción antimitótica selectiva, debido a la unión preferencial de estos agentes a la tubulina de los helmintos sobre la tubulina de los mamíferos. Se ha sugerido: para que la molécula del bencimidazol carbamato ejerza un efecto sobre la tubulina, éste debe tener un hidrógeno en la posición 1.

Aparte del hecho de que los bencimidazol carbamatos se unen a la tubulina, existe poca información precisa sobre el mecanismo de acción de los bencimidazoles por el cual ejercen su actividad antiprotozoaria.

El común denominador de estos compuestos es el núcleo del bencimidazol, un sustituyente en la posición 2 y en la posición 5(6) un sustituyente de diversa naturaleza que de alguna forma impide el rápido metabolismo por hidroxilación en esa posición.

A pesar de su amplio espectro de actividad, estos compuestos tienen poca solubilidad por lo que se absorben pobremente y alcanzan concentraciones bajas en plasma.

Teniendo como base lo anterior, se diseñaron y sintetizaron cuatro series de nuevas moléculas derivadas del 1-metilbencimidazol, con el fin de contar con información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad biológica y el mecanismo de acción de los bencimidazoles sobre helmintos y protozoarios.

Los compuestos sintetizados, con el núcleo base del 1-metilbencimidazol, son: 2-metil(1); 2-amino(2); 2-mercapto(3); 2-metiltio(4); 5-cloro-2-metil(5); 2-amino-5-cloro(6); 5-cloro-2-mercapto(7); 5-cloro-2-metiltio(8); 6-cloro-2-metil(9); 2-amino-6-cloro(10); 6-cloro-2-mercapto(11); 6-cloro-2-metiltio(12); 5,6-dicloro-2-metil(13); 2-amino-5,6-dicloro(14); 5,6-dicloro-2-mercapto(15); 5,6-dicloro-2-metiltio(16).

La elucidación estructural de todos los compuestos preparados, así como la de sus intermediarios, se determinó por los datos espectroscópicos y espectrométricos.

Los compuestos preparados se sometieron a estudios de toxicidad para *Artemia salina* con la finalidad de poder correlacionar la toxicidad con la actividad antiprotozaria y antihelmíntica. Conjuntamente también se emplearon en este ensayo los bencimidazoles comerciales Triclabendazol, Albendazol y Mebendazol.

Los resultados de estos ensayos mostraron que los compuestos 2, 8, 13 y 16 fueron más tóxicos que el Triclabendazol; el compuesto 3 resultó igual de tóxico que el Albendazol, por último, los compuestos 4, 5, 9, 12, 14 y 15 fueron más tóxicos que el Mebendazol.

La evaluación biológica de 13 de estos compuestos empleando pruebas de susceptibilidad *in vitro* mostró que la mayoría de los 1-metilbencimidazoles fueron activos contra *G. lamblia* a concentraciones menores a 1 µg/mL. Dos de ellos (9 y 10) tuvieron concentraciones inhibitorias menores que las del Albendazol. En el caso de *T. spirallis*, sólo 1, 8, 13 y 16 mostraron actividad contra el organismo adulto (fase intestinal) y la larva muscular (fase extraintestinal).

La viabilidad del adulto se vió reducida sólo por los compuestos 7, 8 y 9.

En estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, se observó que los 1-metilbencimidazoles 9 y 10 causaron daño importante a la membrana del trofozoíto de *G. lamblia*, sin afectar el citoesqueleto, en

comparación al daño ocasionado por el Albendazol, en donde se observó alteración importante del disco de adhesión. Así mismo, los nuevos compuestos dañaron la cutícula del adulto de *T. spirallis*.

Se concluye que no existe correlación entre la toxicidad contra *A. salina* y la actividad antiprotozoaria o antihelmíntica y que los 1-metilbencimidazoles son efectivos tanto contra protozoarios como contra helmintos, ejerciendo su acción por un mecanismo diferente al de los bencimidazol carbamatos.

ABSTRACT

Benzimidazole carbamates are well known as anthelmintic drugs; however, recent studies have demonstrated that albendazole and mebendazole are very effective *in vitro* against protozoa such as *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. Clinical trials have shown that albendazole is as effective as metronidazole in the treatment of giardiasis.

The anthelmintic activity of benzimidazole carbamates appears to be related to their selective antimetabolic action, due to the preferential binding of these agents to helminthic tubulin, over mammalian tubulin. It has been suggested that the benzimidazole carbamate molecule must bear a hydrogen at position 1, in order to present this action.

Studies on the mechanism of action of benzimidazole carbamates on protozoa are as yet unknown.

There are some common structural features in these compounds, such as a benzimidazole ring, a substituent at position 2, and at position 5(6) a substituent that somehow prevents early metabolism.

In spite of the wide spectrum of activity shown by these compounds, their solubility is very poor; consequently, the bioavailability and plasma concentrations are low.

In order to have basic information about the structural requirements for the biological activity and the mechanism of action of these agents on helminths and protozoa, we designed and synthesized four series of new compounds, derivatives of 1-methylbenzimidazole.

The synthesized compounds, having the nucleus of 1-methylbenzimidazole, are: 2-methyl(1); 2-amino(2); 2-mercapto(3); 2-methylthio(4); 5-chloro-2-methyl(5); 2-amino-5-chloro(6); 2-chloro-2-mercapto(7); 5-chloro-2-methylthio(8); 6-chloro-2-methyl(9); 2-amino-6-chloro(10); 6-chloro-2-mercapto(11); 6-chloro-2-methylthio(12); 5,6-dichloro-2-methyl(13); 2-amino-5,6-dichloro(14); 5,6-dichloro-2-mercapto(15); 5,6-dichloro-2-methylthio(16).

The structure of all the compounds synthesized was established by spectroscopic and spectrometric data.

Compounds 1-16 were subjected to toxicity evaluations against *Artemia salina*, in order to establish any correlation between toxicity and anthelmintic, and antiprotozoa activity. Together with these compounds were tested the commercial benzimidazoles triclabendazole, albendazole, and mebendazole.

The results of these studies showed that compounds 2, 8, 13 and 16 were more toxic than triclabendazole; compound 3 was as toxic as albendazole; and compounds 4, 5, 9, 12,14, and 15 were as toxic as mebendazole.

The biological evaluation of 13 of these compounds, in a susceptibility test *in vitro*, showed that most of these compounds are active against *G. lamblia* at concentrations lower than 1 µg/mL. Compounds 9 and 10 had lower inhibitory concentration than albendazole.

Biological activity test were also carried out on *Trichinella spiralis*. Compounds 1, 8, 13 and 16 showed activity against the adult organism (intestinal phase), and the muscular larvae (extraintestinal phase). The viability of the adult was decreased only by compounds 7, 8 and 9.

In transmission and scanning electron microscopy studies it was observed that 1-methylbenzimidazoles 9 and 10, damaged severely the membrane of *G. lamblia* trophozoite, and did not alter the adhesive disc; in contrast, albendazole did not alter the membrane but the adhesive disc. The new compounds also damaged the cuticle of the adult *T. spiralis*.

It is concluded that there is not a correlation between toxicity and anthelmintic or antiprotozoa activity, and that the 1-methylbenzimidazoles are effective against helminths and protozoa, as the benzimidazole carbamates, but the mechanism of action is different.

Lista de Esquemas.

Esquema 1.	Métodos sintéticos representativos para los bencimidazoles sustituidos. ^{17, 26}	8
Esquema 2.	Metilación de bencimidazoles 5(6)-sustituidos.	9
Esquema 3.	Ruta sintética para preparar selectivamente 1-Metilbencimidazoles.	11
Esquema 4.	Obtención de 1-Metilbencimidazoles a partir de 2-cloronitrobenzenos.	13
Esquema 5.	Secuencia sintética seguida para preparar los 1-metilbencimidazoles (1-16).	22
Esquema 6.	Secuencia sintética seguida para preparar las N-metil-1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 31, 37, 43) y la 1,2-fenilendiamina (22).	36
Esquema 7.	Metilación de los precursores bencimidazólicos 23-25.	57
Esquema 8.	Método seguido para la obtención de los 1-metilbencimidazoles 5-12.	58
Esquema 9.	Tautomería e isomería de bencimidazoles.	59
Esquema 10.	Reacción de sustitución nucleofílica aromática estudiada.	61
Esquema 11.	Reacción de N-metilación de las 2-nitroacetanilidas.	64

Lista de Figuras.

Figura 1.	Microscopía electrónica de barrido de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> cultivados en presencia de albendazol (B), 13 (C) y 9 (D).	80
Figura 2.	Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> cultivados en presencia de albendazol (B), 13 (C) y 9 (D).	81
Figura 3.	Microscopía electrónica de barrido de organismos adultos de <i>Trichinella spiralis</i> cultivados <i>in vitro</i> con albendazol (B), 8 (C) y 12 (D).	82

Lista de Esquemas.

Esquema 1.	Métodos sintéticos representativos para los bencimidazoles sustituidos. ^{17, 26}	8
Esquema 2.	Metilación de bencimidazoles 5(6)-sustituidos.	9
Esquema 3.	Ruta sintética para preparar selectivamente 1-Metilbencimidazoles.	11
Esquema 4.	Obtención de 1-Metilbencimidazoles a partir de 2-cloronitrobenzenos.	13
Esquema 5.	Secuencia sintética seguida para preparar los 1-metilbencimidazoles (1-16).	22
Esquema 6.	Secuencia sintética seguida para preparar las N-metil-1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 31, 37, 43) y la 1,2-fenilendiamina (22).	36
Esquema 7.	Metilación de los precursores bencimidazólicos 23-25.	57
Esquema 8.	Método seguido para la obtención de los 1-metilbencimidazoles 5-12.	58
Esquema 9.	Tautomería e isomería de bencimidazoles.	59
Esquema 10.	Reacción de sustitución nucleofílica aromática estudiada.	61
Esquema 11.	Reacción de N-metilación de las 2-nitroacetanilidas.	64

Lista de Figuras.

Figura 1.	Microscopía electrónica de barrido de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> cultivados en presencia de albendazol (B), 13 (C) y 9 (D).	80
Figura 2.	Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> cultivados en presencia de albendazol (B), 13 (C) y 9 (D).	81
Figura 3.	Microscopía electrónica de barrido de organismos adultos de <i>Trichinella spiralis</i> cultivados <i>in vitro</i> con albendazol (B), 8 (C) y 12 (D).	82

Lista de Tablas.

Tabla 1.	Incidencia de helmintos y población mundial infectada en millones.	1
Tabla 2.	Estructura de los 1-metilbencimidazoles diseñados.	15
Tabla 3.	Sistema de elución empleados en las cromatografías de capa fina.	20
Tabla 4.	Constantes físicas y rendimientos de los 1-metilbencimidazoles (1-16).	55
Tabla 5.	Constantes físicas y rendimientos de los precursores bencimidazólicos (23-25).	56
Tabla 6.	Constantes físicas y rendimientos de los intermediarios sintetizados.	63
Tabla 7.	Datos espectroscópicos para los compuestos nuevos (1-16).	67
Tabla 8.	Datos espectroscópicos para las N-metil-2-nitroacetanilidas (19, 29, 35, 41) y el producto secundario 40b.	69
Tabla 9.	Toxicidad para <i>Artemia salina</i> de los 1-metilbencimidazoles sintetizados (1-16).	71
Tabla 10.	Toxicidad para el camarón de agua dulce <i>Macrobrachium tenellum</i> (Smith, 1871) de los 1-metilbencimidazoles.	72
Tabla 11.	Efecto de algunos 1-metilbencimidazoles sobre la sobrevivencia de la larva J2 de <i>Meloidogyne incognita en vitro</i>	73
Tabla 12.	Toxicidad para el protozooario <i>Giardia lamblia</i> de 1-metilbencimidazoles.	75
Tabla 13.	Actividad de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre adultos de <i>Trichinella spiralis</i>	78

I. INTRODUCCION

Las infecciones causadas por helmintos (helminthiasis)¹ son conocidas, tanto en los animales domésticos, como en los humanos. La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones sobre el planeta.²

Aunque las helmintosis se encuentran dentro de los padecimientos más antiguos de la humanidad, el impacto sobre la salud en humanos y animales se estableció en 1947,³ y poco ha cambiado en los años subsecuentes (Tabla 1), sólo aumentando en proporción con el crecimiento de la población mundial.^{4,5}

Tabla 1. Incidencia de helmintos intestinales y población mundial infectada en millones.

Helminto	1947 ^a	1984 ^b
Ascaris	650	1100-1300
Gusanos con gancho	450	1,000
Trichuris	350	500-1000
Enterobius	209	300-500
Strongyloides	35	50-100

^a Datos de la referencia 3; población mundial 2100 millones.

^b Datos de la referencia 4 y 5; población mundial 4300 millones.

Adicionalmente, casi 400 millones de personas en el mundo están infectadas con filarias,⁶ mientras que existen 130 millones de casos de infecciones con tenias⁷ y más de 200 millones de personas padecen schistosomiosis en diferentes partes del mundo.⁸ Estos datos claramente

indican que una proporción alta de la población mundial, en especial la que vive en zonas tropicales, sufre los estragos de los helmintos, parásitos que no sólo dan origen a un número alto de casos de morbilidad, sino también a casos de mortalidad.

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de muertes anuales debido a ascariosis es de 20,000, mientras que 55,000 y 75,000 personas mueren cada año de ancilostomiosis y de schistosomiosis.⁹

El impacto económico de las helmintosis a nivel mundial se ha estudiado por varios investigadores. La ascariosis, considerada anteriormente sin importancia médica, está asociada al pobre crecimiento y malnutrición protéica-calórica en niños preescolares, disminuyendo también la absorción de macronutrientes y vitamina A.¹⁰ Las pérdidas económicas debidas a la ascariosis en los Kenianos en 1976 fue de alrededor de 5 mdd, que podrían haberse ahorrado por el uso de un antihelmíntico efectivo con un costo de 1 mdd.

La pérdida económica de la ascariosis se debe a la disminución de carbohidratos en el paciente, causada por el helminto. Se ha estimado que un paciente con 20 lombrices adultas de *Ascaris* puede perder 2.8 g de carbohidratos por día,¹¹ lo que sería para una población mundial de 1100 millones de personas con ascaris, igual a la pérdida de 3,080 toneladas de carbohidratos por día.¹¹

Las infecciones en humanos causadas por los gusanos con gancho (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) también están relacionadas con un alto grado de pérdidas económicas. Las primeras estimaciones en 1982 mostraron que el Japón sufrió pérdidas de 60 mdd por año debido a estas infecciones, las cuales podrían haberse prevenido por el tratamiento de los pacientes con un costo de 7 mdd.¹² Se ha considerado que un *Ancylostoma duodenale* toma de 0.15-0.23 mL de sangre por día; esto es, para una población de un millón de personas que portan 100 gusanos cada una, daría una pérdida

de 15,000 a 23,000 litros de sangre por día.¹³ En el caso de *Necator americanus*, que succiona 0.03 mL de sangre por día, el total de sangre perdida por 1 millón de personas que portan cada una 400 gusanos, sería de 12,000 litros de sangre por día.¹³

Las helmintosis también causan estragos en la salud del ganado vacuno, equinos, borregos, cabras, cerdos, gatos, perros y aves, disminuyendo así la producción de leche, carne, grasa, huevos, lana y cuero. Se ha estimado que la pérdida potencial debido a helmintosis en rumiantes podría llegar a 320 mdd y que con un tratamiento antihelmíntico de 0.040 mdd, la pérdida se reduciría a sólo 60 mdd.¹⁴

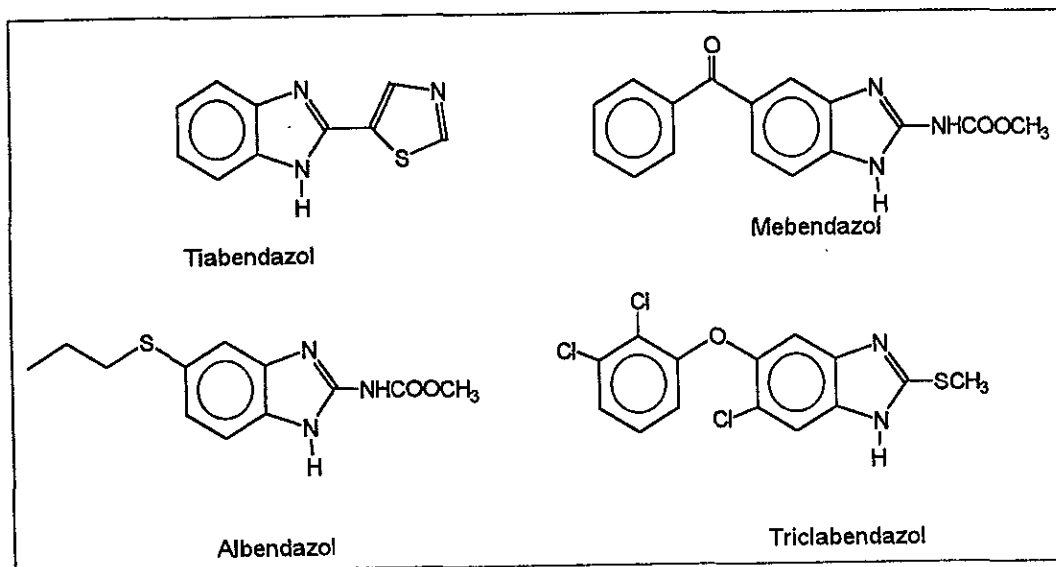
Similarmente, la pérdida económica debida a hígados de ganado contaminados con *Fasciola hepatica* en Florida, EUA, podría exceder 0.5 mdd por año.¹⁵ Siendo la pérdida anual en la ganadería de ese país, más de 3000 mdd por año.¹⁶

Estos son sólo algunos ejemplos que claramente demuestran que el tratamiento de las helmintosis en humanos y animales domésticos, es esencial para alcanzar salud para todos en el año 2000 y también para aumentar el estatus socioeconómico de las masas afectadas.¹⁷ Por consiguiente, las investigaciones conducentes a la obtención de nuevos agentes antihelmínticos, más potentes, menos tóxicos y más económicos que los actuales, son de la mayor importancia.

II. ANTECEDENTES

2.1 Los bencimidazoles como agentes antihelmínticos.

En la actualidad, los fármacos más ampliamente usados en el tratamiento de las helmintosis son los bencimidazoles.¹⁷ El tiabendazol, mebendazol, albendazol y triclabendazol, son ejemplos de algunos bencimidazoles activos, representativos de una gran familia de agentes terapéuticos.



Fue en el año de 1961 cuando investigadores de la casa Merck reportaron al tiabendazol como el más activo de una serie de cientos de compuestos, con amplio espectro de actividad antihelmíntica y alto índice terapéutico.¹⁸ Estudios posteriores mostraron que el tiabendazol se metaboliza rápidamente al 5-hidroxtiabendazol el cual se conjuga como glucurónido o sulfato y se elimina.¹⁹

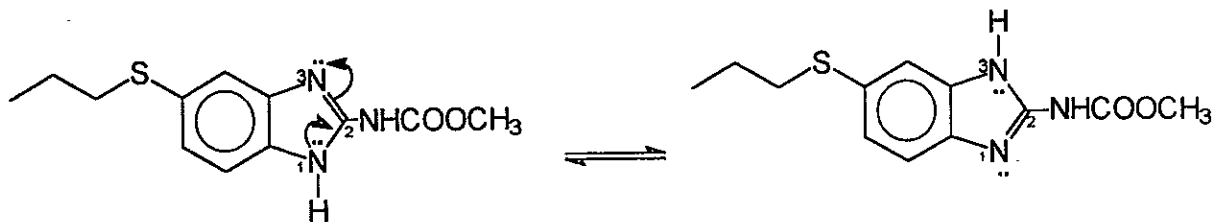
A raíz de esto surgieron nuevos bencimidazoles con la posición 5 sustituida y con un grupo carbamato de metilo en la posición 2. Este patrón de sustitución confiere a la molécula mayor vida media, alta polaridad y baja biodisponibilidad, por lo que el uso de estos compuestos se limita al tratamiento

de helmintosis intrainestinales. Representativos de este grupo son el mebendazol y el albendazol, los cuales son de amplio espectro y los más comunmente empleados en la actualidad.

Con respecto al albendazol, su espectro de acción incluye la mayor parte de las infecciones por helmintos intestinales y además es efectivo contra infecciones sistémicas como la trichinellosis y cisticercosis.^{20,21} El mebendazol ha sido desplazado por el albendazol, ya que aunque su espectro antihelmíntico es similar, requiere de tres días de tratamiento para las helmintosis intestinales en comparación con una sólo dosis del albendazol.²²

El último tipo de bencimidazol antihelmíntico es el triclabendazol.²³⁻²⁶ En este compuesto se aprecian dos sustituyentes en las posiciones 5 y 6, además, un grupo metiltio en la posición 2. Con estos cambios se disminuyó la polaridad e incrementó la biodisponibilidad, de tal forma que el triclabendazol es en la actualidad el fasciolícida de excelencia.

Aunque no se conoce con precisión el mecanismo de acción de todos los bencimidazoles, se ha encontrado que algunos pueden inhibir la fumarato reductasa, la incorporación de la glucosa, la síntesis de ATP y la descarga de protones transmembrana.²⁷ Estudios recientes indican que el mecanismo de los bencimidazol carbamatos se debe principalmente a una acción antimitótica selectiva, debido a la unión preferencial de estos agentes a la tubulina de los helmintos sobre la tubulina de los mamíferos.²⁸⁻²⁹ Se ha sugerido que para que la molécula del bencimidazol carbamato ejerza su efecto sobre la tubulina, éste debe tener un hidrógeno en la posición 1.³⁰ Los bencimidazoles que tienen un hidrógeno en la posición 1 pueden existir como mezcla de dos compuestos debido al efecto tautomérico; esto es, la migración del hidrógeno en 1 a la posición 3, según la siguiente ecuación.



Tautómeros del Albendazol

A pesar de su uso generalizado, la eficacia de los bencimidazoles a nivel sistémico se ve limitada por su pobre absorción intestinal, debido principalmente a que son insolubles en agua y en consecuencia alcanzan bajas concentraciones en plasma y poca biodisponibilidad en tejidos. De los bencimidazol carbamatos, el albendazol tiene una mejor absorción a nivel intestinal (aunque sólo un 5% de la dosis ingerida se absorbe) y su tolerancia ha permitido el empleo de este fármaco en tratamientos prolongados.²¹ Se ha sugerido que la acción antihelmíntica del albendazol se debe principalmente a su metabolito, el sulfóxido del albendazol, el cual tiene mejor penetración tisular que el mismo albendazol.²¹

Por otro lado, se han sintetizado diferentes compuestos derivados del bencimidazol y han sido probados en el tratamiento de diferentes infecciones por helmintos, entre ellas la trichinellosis.³¹⁻³⁵ Sin embargo, la aplicación de algunos de ellos, como el luxabendazol durante la fase muscular de *T. spiralis*, puede ocasionar reacciones adversas graves debido a la muerte masiva de los parásitos.³⁴

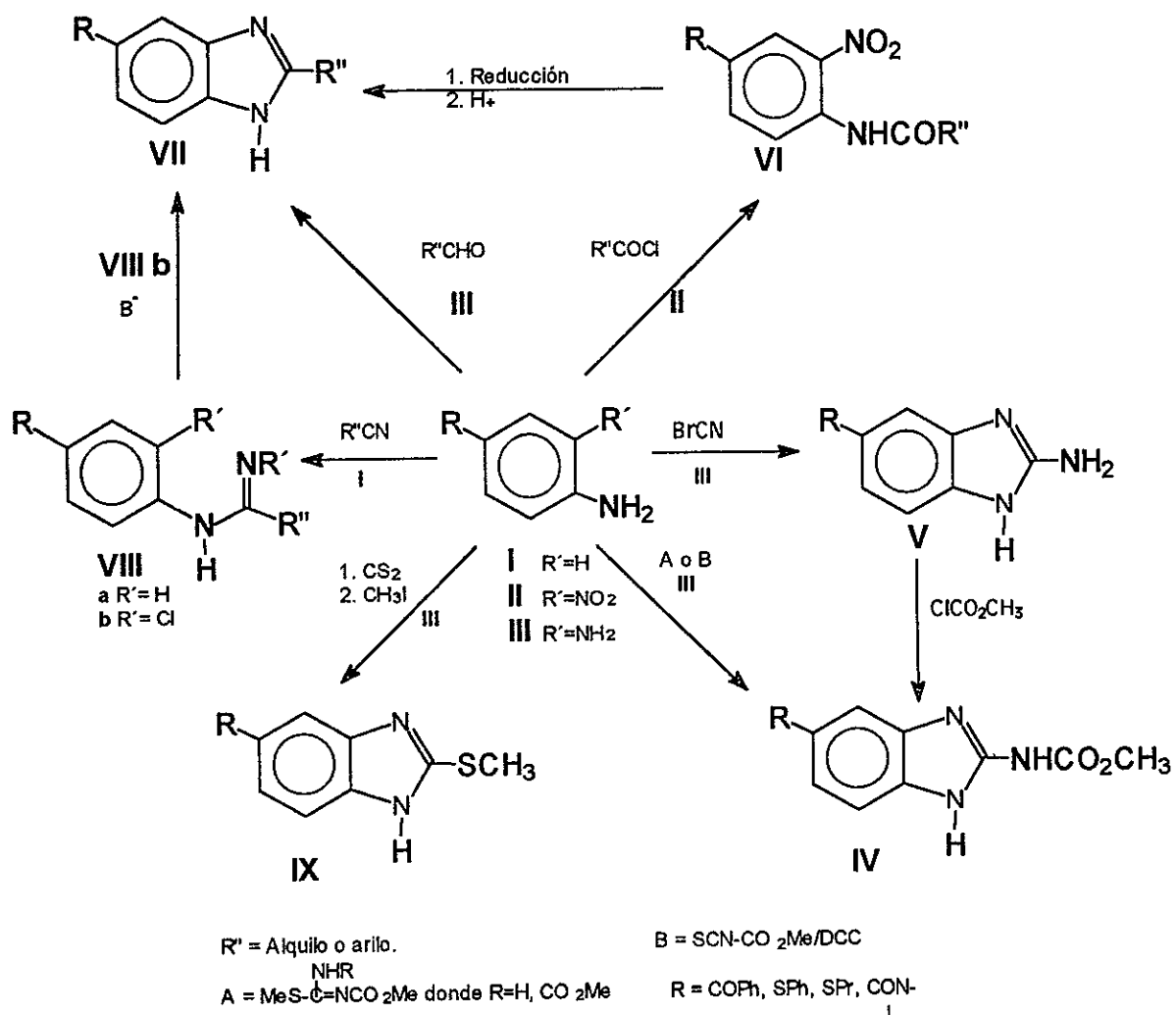
2.2 Los bencimidazoles como agentes antiprotozoarios.

Hasta hace poco se consideraba que los bencimidazol carbamatos tenían únicamente acción antihelmíntica; sin embargo, recientemente se demostró que el albendazol y el mebendazol son muy efectivos *in vitro* contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, entre otros.³⁶⁻³⁸ Los ensayos clínicos han mostrado que el albendazol es tan efectivo como el metronidazol en el tratamiento de la giardiosis.³⁹⁻⁴¹

2.3 Síntesis de bencimidazoles.

La mayoría de los bencimidazol-2-carbamatos antihelmínticos (IV) se prepara por condensación de la 1,2-fenilendiamina adecuadamente sustituida en la posición 4 (III), con 1-metoxicarbonil o 1,3-di(metoxicarbonil)-S-metilisotiureas en metanol, etanol o algún otro disolvente apropiado (Esquema 1).^{17,26} Un método efectivo para preparar IV consiste en la ciclación de III con metoxicarbonilisotiocianato en presencia de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en acetonitrilo. Alternativamente, las 1,2-fenilendiaminas pueden ciclarse con bromuro de cianógeno para formar los 2-aminobencimidazoles (V) con sustituyentes en la posición 5(6), que por acilación con cloroformiato de metilo dan IV. Los bencimidazoles con sustituyentes alquilo, arilo o heteroarilo en C-2 (VII) se obtienen por ciclación de la 1,2-fenilendiamina con el aldehído o ácido correspondiente en ácido polifosfórico. Otra forma parte de la 2-nitroanilina (II) que se aroila con cloruros de ácido para dar la N-(aroil)amino-2-nitroanilinas (VI) las cuales por reducción, seguido de ciclación en medio ácido de la amina obtenida, dan los bencimidazoles (VII) 2-aril sustituidos. También es posible utilizar una anilina (I) como precursor; esto es, si se trata I con un arilnitrilo se obtiene la amidina (VIII a) la cual se halogena con hipoclorito de sodio o N-clorosuccinimida para obtener el derivado N-clorado (VIII b). La ciclación de éste

en medio básico lleva a la formación de VII. El método más simple para preparar los derivados 2-metilto (IX) consiste en tratar las 1,2-fenilendiaminas (III) con CS₂ en potasa etanólica, los 2-mercaptobencimidazoles obtenidos se someten posteriormente a una metilación con CH₃I en medio básico y dan los 2-metiltoibencimidazoles IX.



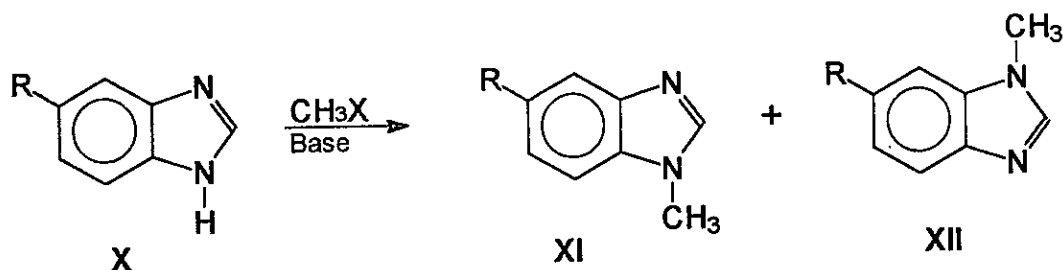
Esquema 1. Métodos sintéticos representativos para los bencimidazoles sustituidos.^{17, 26}

2.4 Síntesis de 1-metilbencimidazoles.

Existen diversos métodos para preparar los 1-metilbencimidazoles, el método seleccionado para la síntesis de un compuesto en particular, depende de los sustituyentes en el anillo bencimidazólico.

2.4.1 A partir de bencimidazoles.

La metilación de los bencimidazoles que tienen un sustituyente en el anillo bencenoide lleva a la obtención de una mezcla de dos isómeros. Así, cuando el bencimidazol 5(6)-sustituido (X) se metila, se obtienen los isómeros XI y XII en proporción de 1:1 (Esquema 2).⁴²



Esquema 2. Metilación de bencimidazoles 5(6)-sustituidos.

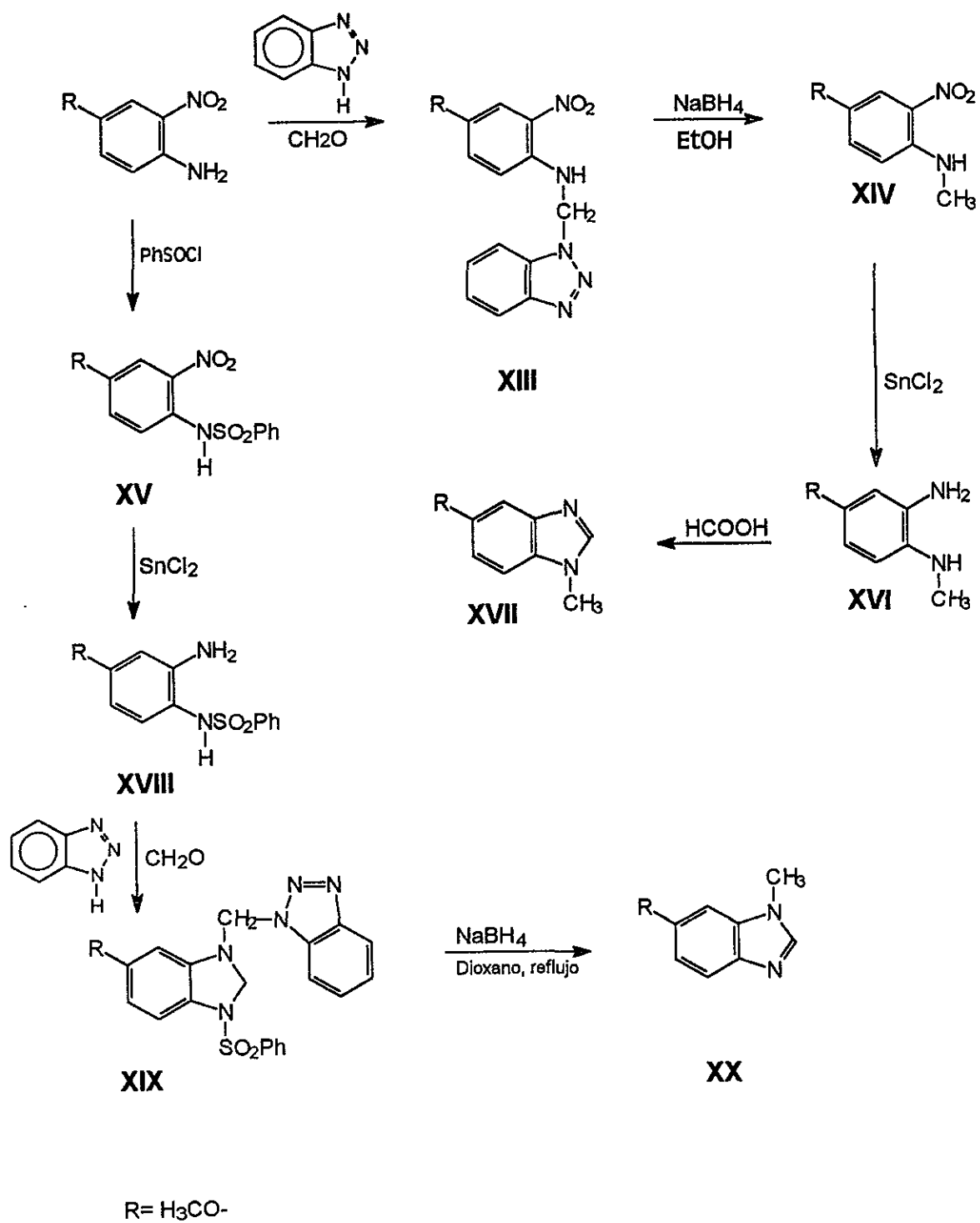
Aún cuando el sustituyente en la posición 5(6) del bencimidazol sea un grupo electrón atrayente fuerte, como el grupo nitro, éste no distingue entre uno u otro de los nitrógenos aromáticos y como resultado se obtiene una mezcla de isómeros, uno con el grupo nitro en 5 y otro con el grupo nitro en 6.⁴³

2.4.2 A partir de 2-nitroanilinas.

Dado que las mezclas XI y XII son difíciles de separar, se han desarrollado métodos alternos complejos, que permiten la obtención de cada isómero. Por ejemplo, el 1,5-dimetilbencimidazol se preparó iniciando con la 2-nitro-4-toluidina sometida a protección del grupo amino con cloruro de tosilo, N-metilación con sulfato de dimetilo en medio básico, hidrólisis del grupo sulfamido con H_2SO_4 concentrado, reducción del grupo nitro y finalmente una ciclocondensación con ácido fórmico.⁴⁴

Estudios recientes realizados por Katritzki y cols. muestran la síntesis selectiva de 1-metilbencimidazoles empleando el benzotriazol y formaldehído como reactivos clave del proceso.⁴⁵ Este ingenioso método se muestra en el Esquema 3.

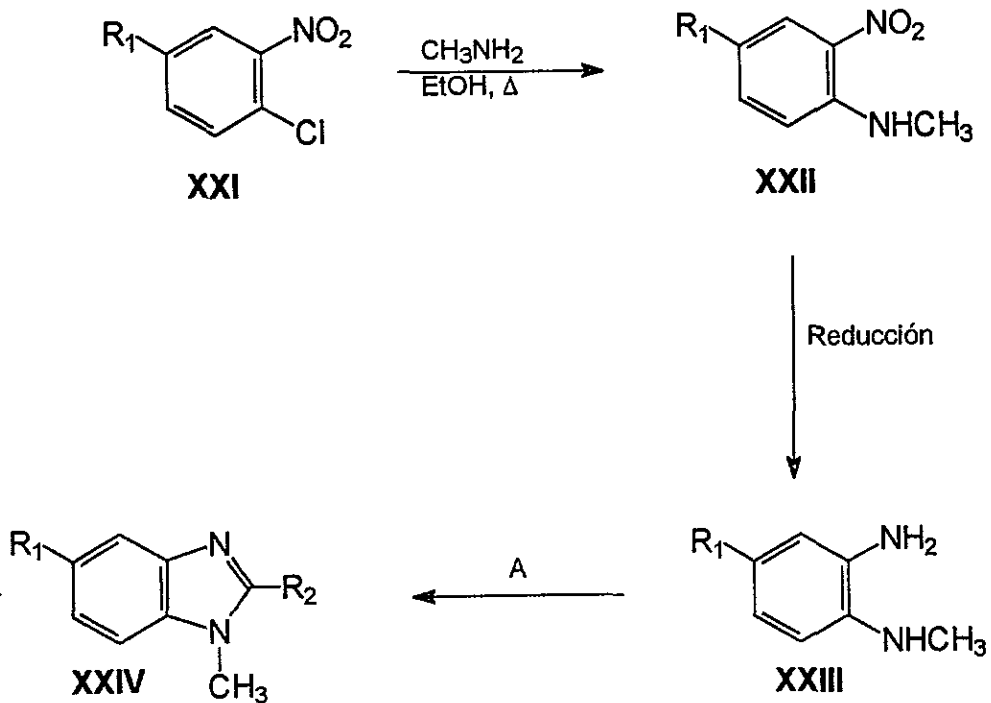
La benzotriazolimetilación⁴⁶ de la 4-metoxi-2-nitroanilina da un derivado estable (XIII) que por reducción de borohidruro de sodio en etanol, lleva a la N-metil-anilina sustituida (XIV). La reducción del grupo nitro en XIV con cloruro estanoico conduce a la diamina (XVI), que inmediatamente se ciclocondensa con ácido fórmico originando así el isómero 5-metoxi-1-metilbencimidazol (XVII) con un rendimiento global del 62 % en 4 pasos. Por otro lado, cuando se protege el grupo amino de la 4-metoxi-2-nitroanilina con cloruro de bencensulfonilo, se obtiene la sulfonamida (XV). La reducción del grupo nitro en XV con cloruro estanoico da la amina (XVIII) que con dos equivalentes de formaldehído y benzotriazol conduce directamente al bencimidazol sustituido (XIX). La posterior reducción de XIX con borohidruro de sodio en dioxano a reflujo lleva al otro isómero (XX), el 6-metoxi-1-metilbencimidazol con un rendimiento global del 50 % en 4 pasos.



Esquema 3. Ruta sintética para preparar selectivamente 1-Metilbenzimidazoles.

2.4.3 A partir de 2-cloronitrobenzenos.

En este procedimiento se parte del 2-cloronitrobenzeno (XXI) adecuadamente sustituido (Esquema 4) y se somete a una reacción de sustitución nucleofílica aromática empleando metilamina en etanol.⁴⁵ El producto principal de reacción, la N-metil-2-nitroanilina (XXII), se somete a reducción para dar N-metil-1,2-fenilendiamina (XXIII), la cual no se aísla por su inestabilidad y se somete inmediatamente a la reacción de ciclocondensación y conducir así a la obtención del 1-metilbencimidazol sustituido (XXIV).



Si A es CS_2/KOH , $\text{R}_2 = \text{SH}$
 Si A es BrCN , $\text{R}_2 = \text{NH}_2$
 Si A es R_2COOH , $\text{R}_2 = \text{Alquilo}$
 Si A es ArCOOH , $\text{R}_2 = \text{Ariilo}$

Esquema 4. Obtención de 1-Metilbencimidazoles a partir de 2-cloronitrobenzenos.

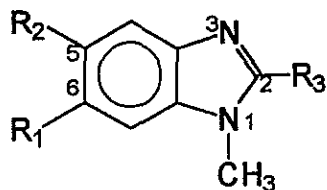
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Consideraciones generales.

Considerando la importancia de las enfermedades causadas por los helmintos y protozoarios mencionados anteriormente, los grupos de Farmacia de la Facultad de Química y la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, IMSS, se han unido y han estructurado un proyecto amplio de investigación denominado "SINTESIS Y EVALUACION BIOLOGICA DE NUEVOS BENCIMIDAZOLES", con el fin de contar con información básica sobre los requerimientos estructurales para la actividad biológica y el mecanismo de acción de los bencimidazoles sobre los helmintos y protozoarios. Se pretende mejorar así, tanto la biodisponibilidad como la eficacia de los bencimidazoles y contribuir de este modo a la obtención de compuestos activos fáciles de preparar en nuestro país y económicos, para su uso en terapia humana y veterinaria.

En esta tesis se contribuye a la realización del proyecto anterior a través de la síntesis y evaluación biológica de los compuestos que se encuentran enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Estructura de los 1-Metilbencimidazoles diseñados.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Serie A			
1	H	H	CH ₃
2	H	H	NH ₂
3	H	H	SH
4	H	H	SCH ₃
Serie B			
5	H	Cl	CH ₃
6	H	Cl	NH ₂
7	H	Cl	SH
8	H	Cl	SCH ₃
Serie C			
9	Cl	H	CH ₃
10	Cl	H	NH ₂
11	Cl	H	SH
12	Cl	H	SCH ₃
Serie D			
13	Cl	Cl	CH ₃
14	Cl	Cl	NH ₂
15	Cl	Cl	SH
16	Cl	Cl	SCH ₃

Como se puede apreciar todos estos compuestos conservan el núcleo de bencimidazol, sustituido en la posición 1 por un grupo metilo (CH_3). La posición 2 se sustituye con grupos isostéricos,⁴⁷ como son el $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SH}$ y $-\text{SCH}_3$; las posiciones 5 y 6 pueden no estar sustituidas (compuestos 1-4, serie A), monoclorada en 5 (compuestos 5-8, serie B), monoclorada en 6 (compuestos 9-12, serie C) o diclorada en 5 y 6 (compuestos 13-16, serie D). La introducción del grupo metilo en la posición 1 se consideró por los motivos siguientes:

- a) para evitar el efecto tautomérico que sufre la molécula del bencimidazol, lo que permitiría tener los compuestos con estructuras bien definidas;
- b) para conocer la importancia que tiene el hidrógeno en la posición 1 en la actividad antiprotozoaria; y
- c) para disminuir la polaridad, incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos.

El sustituyente en la posición 2 se consideró por la posibilidad de formar puentes de hidrógeno fuertes ($-\text{NH}_2$), débiles ($-\text{SH}$, $-\text{SCH}_3$) o hidrofóbicos ($-\text{CH}_3$). El grupo $-\text{SCH}_3$ puede también sufrir oxidación metabólica para dar el sulfóxido ($-\text{SO}-$), especie activa del albendazol y triclabendazol.

La sustitución en las posiciones 5 y 6, con el H o Cl, definiría los requerimientos estereoelectrónicos para la actividad biológica.

3.2 Objetivos.

Considerando que los compuestos bencimidazólicos se han usado exitosamente como agentes antihelmínticos y que recientemente se ha demostrado que tienen actividad antiprotozoaria, los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar el potencial antihelmíntico y antiprotozoario de una serie de derivados del 1-metilbencimidazol sustituidos en las posiciones 2, 5, 6, y 5, 6 con grupos pequeños de diferente polaridad, con la finalidad de establecer cuáles son los requerimientos estructurales necesarios para la acción biológica y la potencia relativa a los bencimidazoles antihelmínticos conocidos; y así, contribuir al desarrollo de nuevos agentes de utilidad terapéutica.
2. Evaluar la toxicidad de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol y de los bencimidazoles antihelmínticos conocidos, con el propósito de establecer si existe alguna correlación entre la toxicidad y la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria, que pudiera ser de utilidad en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica.
3. Comparar, a través de estudios de microscopía electrónica, el efecto a nivel ultraestructural sobre *Giardia lamblia* y *Trichinella spiralis*, causado por el derivado 1-metilbencimidazólico más activo y el albendazol, para establecer los daños causados y contribuir así al conocimiento sobre el mecanismo de acción de estos agentes.

3.3 Metas.

1. Sintetizar la serie de derivados del 1-metilbencimidazol por métodos sencillos, a partir de materias primas accesibles.
2. Aislar, purificar y determinar las constantes físicas más importantes (pf, Rf) y caracterizar los compuestos finales y sus intermediarios a través de sus datos espectroscópicos (IR, RNM ^1H , RMN ^{13}C) y espectrométricos (EM).
3. Evaluar la toxicidad de los compuestos 1-metilbencimidazólicos sintetizados sobre *Artemia salina*.
4. Evaluar la actividad antiprotozoaria y antihelmíntica de los compuestos 1-metilbencimidazólicos sintetizados sobre *Giardia lamblia* y *Trichinella spiralis* respectivamente.
5. Realizar estudios de microscopía electrónica de *Giardia lamblia* y *Trichinella spiralis* tratados con el compuesto 1-metilbencimidazólico más activo y albendazol.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo realizado en esta tesis se llevó a cabo en dos partes. En la primera, la parte química, se hizo la síntesis de los 1-Metilbencimidazoles (1-16), así como la de las 1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 22, 31, 37 y 43).

En la segunda, la parte biológica, se hicieron las pruebas de toxicidad y de actividad biológica, así como los estudios de microscopía electrónica.

A continuación se describe el trabajo realizado en ambas partes.

4.1 Parte química.

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida empleando un evaporador rotatorio marca Büchi RE 111, con condensador enfriado con hielo seco-acetona.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi Mod 539 y no se corrigieron.

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. 337, en pastilla de bromuro de potasio (KBr), las señales se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H), se determinaron en un espectrómetro marca Varian modelo VXR-300 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y CDCl_3 o $\text{C}_2\text{D}_6\text{SO}$ como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm; las señales se representan como s=singulete, sa=singulete amplio, d=doblete, dd=doble de dobles, t=triplete, c=cuarteto y m=multiplete; las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hertz (Hz). La resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) se determinó en un espectrómetro Varian VXR-300S.

Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en un aparato JEOL-JMS-AX505-HA. La simbología empleada es M^+ =ión molecular, $M+2$, $M+4$ =picos de isotopía, PB=pico base (100%).

Los compuestos conocidos se identificaron por sus constantes físicas y no se caracterizaron espectroscópicamente.

Las hidrogenaciones catalíticas se realizaron empleando un hidrogenador marca Parr Modelo 3916EG con 60 lb/pulg² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando hidrógeno de tanque de la casa INFRA y como catalizador Pd/C a 5 o 10% de la casa Aldrich.

El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se determinó por cromatografía en capa fina (ccf) en placas de vidrio de 2.5 x 10 cm recubiertas con gel de sílice GF-254 de la casa Merck. La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta (UVP, Inc. Mod. UVGL-25) y por exposición a vapores de yodo. En la Tabla 3 se muestran los sistemas de elución empleados.

Tabla 3. Sistemas de elución empleados en las cromatografías en capa fina.

<u>Sistema</u>	<u>Disolvente</u>	<u>Proporción</u>
I	C ₆ H ₁₄ /CHCl ₃ /AcOEt	50:35:15
II	CHCl ₃ /MeOH	99:1 (10 mL + 2 gotas de NH ₄ OH conc.)
III	CHCl ₃ /MeOH	80:20 (10mL + 2 gotas de NH ₄ OH conc.)

Para mayor claridad sobre el trabajo realizado en la parte sintética, primeramente se describe la preparación de los 1-metilbencimidazoles 1-16 y después la síntesis de las 1,2-fenilendiaminas precursoras. En ambos casos, la información obtenida de estos estudios, se reporta en la parte de RESULTADOS Y DISCUSION.

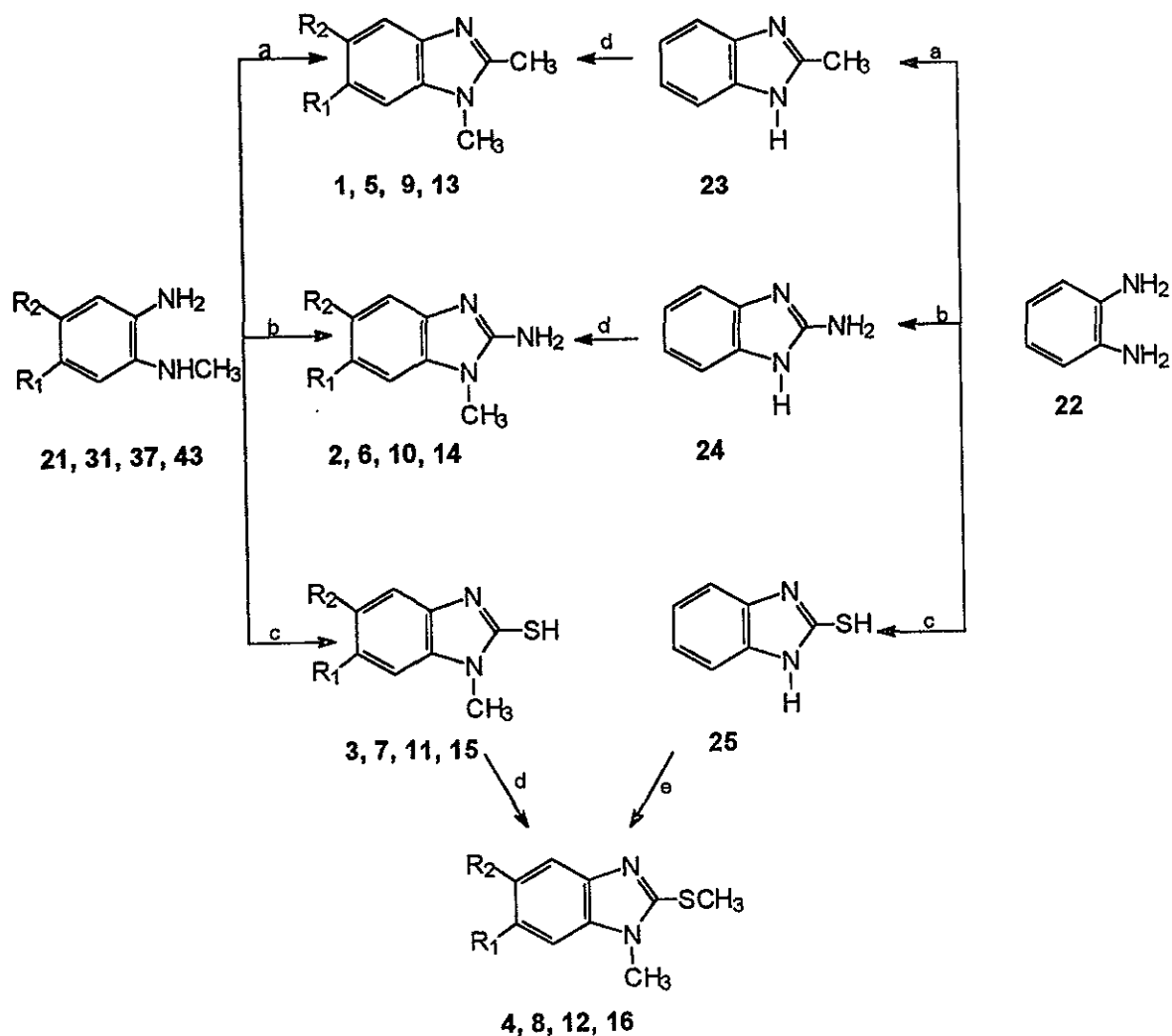
4.1.1 Síntesis de los 1-Metilbencimidazoles (1-16).

La secuencia sintética que se siguió para preparar los 1-metilbencimidazoles (1-16) se muestra en el Esquema 5.

4.1.1.1 1,2-Dimetilbencimidazol (1).

4.1.1.1.1 A partir de N-Metil-1,2-fenilendiamina (21).

En un matraz redondo de 100 mL con tres bocas 14/40, adaptado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno y un embudo de adición, se colocaron 5 g (0.041 mol) de N-metil-1,2-fenilendiamina (21) y con agitación vigorosa se adicionaron 16 mL de anhídrido acético y 16 mL de ácido acético. Terminada la adición, la mezcla se calentó a reflujo entre 70-75°C por 1.5 h. Al cabo de este tiempo, se dejó enfriar a 25°C y la reacción se vertió sobre agua-hielo. Se formó una pasta oscura la cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada hasta pH neutro. El sólido oscuro mostró una mancha principal en la ccf. Se purificó por recristalización de EtOH-H₂O con carbón activado obteniéndose 5 g de cristales blancos.



$R_1=R_2=H$ en 1-4,21

$R_1=Cl, R_2=H$ en 9-12, 37

$R_1=H, R_2=Cl$ en 5-8, 31

$R_1=R_2=Cl$ en 13-16, 43.

a) Ac_2O, CH_3COOH ; b) 1) $BrCN, H_2O, \Delta$; 2) $NaOH, H_2O$; c) $CS_2, EtOH, KOH, H_2O$. Δ ;
 d) $CH_3I, (CH_3)_2CO, KOH, H_2O$; e) $2CH_3I, (CH_3)_2CO, 2KOH, H_2O$.

Esquema 5. Secuencia sintética seguida para preparar los 1-metilbencimidazoles (1-16)

4.1.1.1.2 A partir de 1,2-Fenilendiamina (22).

4.1.1.1.2.1 2-Metilbencimidazol (23).

En un matraz redondo de 500 mL con una sola boca 24/40, adaptado con una trampa de Dean stark y sobre ésta un refrigerante en posición de reflujo, se mezclaron 54.07 g (0.5 mol) de 1,2-fenilendiamina (22), 90 mL de ácido acético, 2 mL de HCl conc. y 50 mL de tolueno, y calentaron a reflujo en un baño de aceite. A las 4 h de reacción se drenaron 50 mL de H₂O y 30 mL de tolueno; se continuó el calentamiento 2 h más. La mezcla de reacción fría se vertió sobre 200 g de agua-hielo y neutralizó con una solución de NaOH al 40%. Se formó un sólido rosa, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro y dejó secar al aire. El sólido obtenido se recrystalizó de H₂O con carbón activado obteniéndose 33.15 g de cristales blancos puros.⁴⁸

4.1.1.1.2.2 1,2-Dimetilbencimidazol (1).

En un matraz redondo de 500 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con N₂, y un embudo de adición, se disolvieron 32 g (0.2421 mol) de 2-metilbencimidazol (23) en 150 mL de acetona. A esta disolución se le goteó, lentamente a temperatura ambiente, una solución de 40.74 g (0.7261 mol, 3 eqs) de KOH en 165 mL de H₂O. La temperatura subió espontáneamente a 28 °C, y sin que sobrepasara esta temperatura, se adicionaron gota a gota, 37.82 g (16.59 mL, 0.26 mol, 1.1 eqs.) de CH₃I. La reacción se dejó en agitación vigorosa por 20 min y luego se concentró en el rotavapor. Se obtuvo un sólido que se recrystalizó de H₂O-EtOH con carbón activado. Se obtuvieron 28.9 g de cristales blancos puros. Este producto resultó ser idéntico en R_f y p_f al obtenido con anterioridad.

4.1.1.2 2-Amino-1-metilbencimidazol (2).

4.1.1.2.1 A partir de N-Metil-1,2-fenilendiamina (21).

En un matraz redondo de 100 mL con 3 bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 5 g (0.0409 mol) de N-metil-1,2-fenilendiamina (21) recién obtenida y 20 mL de agua caliente. La mezcla anterior se calentó a 50 °C y se agregaron lentamente 4.34 g (0.041 mol, 1 eq) de BrCN, luego se calentó a 70 °C por 2.0 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar y vertió sobre 50 g de hielo finamente picado. La solución formada se neutralizó con una solución de 1.64 g (0.041 mol) de NaOH en 4.1 mL de H₂O. Se formó un precipitado oscuro, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro y dejó secar al aire. El producto crudo se recristalizó de H₂O-EtOH con carbón activado, obteniéndose 4.19 g de producto puro.

4.1.1.2.2 A partir de 1,2-Fenilendiamina (22).

4.1.1.2.2.1 2-Aminobencimidazol (24).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con N₂, se colocaron 20 g (0.185 mol) de 1,2-fenilendiamina (22) en 123.0 mL de agua caliente. La mezcla se calentó en baño de agua entre 60-70 °C y a esta temperatura se fue adicionando cuidadosamente 19.6 g (0.185 mol) de BrCN en un lapso de 30 min. Terminada la adición se continuó el calentamiento entre 70-80 °C por 1 hora. Al cabo de este tiempo se dejó enfriar a 50 °C y adicionó una solución de 7.4 g (0.185 mol) de NaOH en 14.8 mL de agua. Se formó una masa amarilla muy espesa, se enfrió hasta 18-20°C, el producto formado se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada hasta pH neutro. El sólido se

recristalizó de H₂O con carbón activado, obteniéndose 13.15 g de escamas blancas.⁴⁹

4.1.1.2.2.2 2-Amino-1-metilbencimidazol (2).

En un matraz redondo de 500 mL con tres bocas 24/40 adaptado con termómetro, embudo de adición y un refrigerante en posición de reflujo, y sobre éste un globo con N₂, se mezclaron 10.5 g (0.0789 mol) del 2-aminobencimidazol (24) en 150 mL de acetona. A esta mezcla se le adicionó, gota a gota y a temperatura ambiente, una solución de 13.28 g (0.2367 mol, 3 eqs) de KOH en 54 mL de H₂O. Al ir adicionando la potasa, se logró una buena disolución de la materia prima; finalmente, a 26-30 °C se adicionaron lentamente 11.35 g (4.98 mL, 0.08 mol) de CH₃I y se agitó por 15 min más. La mezcla de reacción se concentró en el rotavapor y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). La fase orgánica reunida se lavó con agua y secó con Na₂SO₄ anh., luego se concentró a presión reducida obteniéndose un sólido amarillo. La recristalización del producto crudo de H₂O-EtOH dio 10 g de cristales color crema. Este producto resultó ser idéntico en R_f y pf al obtenido con anterioridad.

4.1.1.3 2-Mercapto-1-metilbencimidazol (3).

En un matraz de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con septum, termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se disolvieron 7.6 g (0.0622 mol) de N-metil-1,2-fenilendiamina (21), en 60 mL de etanol. Luego se adicionaron 7.12 g (5.62 mL, 0.0935 mol, 1.5 eqs) de CS₂ y 3.74 g (0.0935 mol, 1.5 eqs,) de NaOH en 4 mL de H₂O. Terminada la adición, la mezcla se calentó a reflujo por 2 h en baño de agua. Después se

enfrió a temperatura ambiente y agregaron 25 mL de AcOH al 20 % para alcanzar un pH de 5-6. El enfriamiento se prolongó hasta la formación de un precipitado, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y dejó secar. De esta manera se obtuvo un sólido oscuro de olor desagradable, el cual se recrystalizó de EtOH-H₂O (1:1) con carbón activado. Se obtuvieron 5 g de agujas blancas muy finas.

4.1.1.4 1-Metil-2-metiltiobencimidazol (4).

4.1.1.4.1 A partir de 2-Mercapto-1-metilbencimidazol (3).

En un matraz de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con un septum, termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se disolvieron 4.5 g (0.0274 mol) de 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3) en 30 mL de acetona. Con agitación magnética, a temperatura ambiente, se adicionaron lentamente 1.85 g (0.0329 mol, 1.2 eqs) de KOH en 2 mL de H₂O; la temperatura subió espontáneamente a 30 °C y manteniéndola entre 25-30 °C se agregaron 4.67 g (2.0 mL, 0.0329 mol, 1.2 eqs) de CH₃I. Terminada la adición la mezcla se agitó por 20 min más y al cabo de este tiempo, la reacción se vertió sobre hielo finamente picado, obteniéndose dos fases. El producto se extrajo con AcOEt (3 x 25 mL), las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua fría hasta pH neutro, el extracto se secó con sulfato de magnesio anhidro y concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 4 g de un líquido amarillo claro, que al recrystalizarlo de ciclohexano-éter de petróleo dio 2.94 g de un sólido blanquesino.

4.1.1.4.2 A partir de 1,2-Fenilendiamina (22).

4.1.1.4.2.1 2-Mercaptobencimidazol (25).

En un matraz redondo de 1000 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 32.4 g (0.2996 mol) de 1,2-fenilendiamina (22), 19 g (0.3386 mol, 1.13 eqs) de KOH en 10 mL de agua, 25 g (19.82 mL, 0.3296 mol, 1.1 eqs) de CS₂ y 300 mL de EtOH al 95 %. La mezcla se calentó a reflujo entre 70-80°C por 3 h. Después se llevó a 25°C y adicionaron 12 g de carbón activado con agitación vigorosa, se calentó por 10 min más. Finalmente se filtró sobre celita y ésta se lavó con agua caliente tres veces. El filtrado se calentó entre 60-70 °C, se adicionaron 250 mL de agua tibia y continuó con el calentamiento 30 min. Luego, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y con agitación vigorosa se adicionaron 25 mL de AcOH en 50 mL de H₂O. Al adicionar el AcOH precipitó un sólido cristalino plateado, que se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada hasta pH neutro. La alta pureza del producto crudo permitió emplearlo como tal en la siguiente reacción.

4.1.1.4.2.2 1-Metil-2-metiltiobencimidazol (4).

En un matraz redondo de 1000 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 28 g (0.1864 mol) del 2-mercaptobencimidazol (25) crudo, 150 mL de acetona y 26.15 g (0.4660 mol, 1.2 eqs) de KOH en 50 mL de agua; la temperatura se elevó espontáneamente hasta 28-30 °C y entre ese rango se adicionaron 66.15 g (29.01 mL, 0.4660 mol, 2.5 eqs) de CH₃I. Terminada la adición se dejó en agitación vigorosa 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la solución se concentró en el rotavapor

obteniéndose un líquido café claro, que se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL). La fase orgánica se lavó con agua helada, secó con sulfato de magnesio anhidro y concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 32.9 g de un líquido con ligero color ámbar. Este aceite se destiló de bulbo a bulbo a 115-120 °C/0.3 mmHg dando 30.1 g de un sólido blanquesino. Este producto se recrystalizó de ciclohexano-éter de petróleo y se obtuvieron 26 g de cristales blancos puros con Rf idéntico al obtenido con anterioridad.

4.1.1.5 5-Cloro-1,2-dimetilbencimidazol (5).

En un matraz de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, septum y refrigerante en posición de reflujo con un globo con nitrógeno, se colocaron 10 g (0.0638 mol) de N-metil-4-cloro-1,2-fenilendiamina (31), 30 mL de ácido acético y 20 mL de anhídrido acético. La mezcla anterior se agitó magnéticamente y calentó a reflujo por 90 min. Después se dejó enfriar y vertió sobre 300 g de hielo finamente picado, se llevó a pH 9 con una solución de NaOH al 50 % en frío. Se formó un precipitado beige, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro y se dejó secar al aire. El producto crudo se purificó por recrystalización de benceno obteniéndose 8.2 g de cristales blancos.⁵¹

4.1.1.6 2-Amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se disolvieron 10 g (0.0638 mol) de 31 en 50 mL de agua caliente. La solución se agitó y calentó en baño de agua hasta 50-70 °C; luego,

se adicionó lentamente 6.77 g (0.064 mol) de BrCN. Al terminar la adición, se calentó entre 70-80 °C durante 1.5 h; posteriormente, se dejó enfriar a 50 °C y filtró al vacío. El filtrado se neutralizó con una solución diluida de NaOH y el producto café-rojizo que se formó, se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y dejó secar al aire. El producto crudo se recristalizó de MeOH-H₂O con carbón activado, y dio 6.78 g de escamas blancas.

4.1.1.7 5-Cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (7).

En un matraz de 125 mL con tres bocas 14/20, provisto de un termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se mezclaron 10 g (0.0638 mol) de 31, 50 mL de etanol absoluto y 9.72 g (7.67 mL, 0.128 mol, 2 eqs) de disulfuro de carbono. Con agitación vigorosa se fue adicionando lentamente una solución de 5.10 g (0.1276 mol, 2 eqs) de NaOH en 5 mL de H₂O y después se calentó a reflujo por 2 h. Terminado este tiempo, se llevó a temperatura ambiente y trató con ácido acético hasta pH 5-6, se dejó enfriar y filtró al vacío. El filtrado se concentró al rotavapor obteniéndose un sólido grisáceo de olor muy desagradable. El producto crudo se recristalizó de EtOH dando 7.83 g de cristales blancos.

4.1.1.8 5-Cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (8).

En un matraz redondo de 125 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se disolvieron 8.0 g (0.0403 mol) de 5-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (7) en 50 mL de acetona y con agitación magnética se adicionaron lentamente 2.26 g (0.0403 mol, 1 eq) de KOH en 2.5 mL de agua, a

una temperatura por debajo de 25-30 °C. Después, con ayuda de una jeringa, se adicionaron gota a gota y a 25 °C, 5.72 g (2.51 mL, 0.0403 mol, 1 eq.) de CH_3I . Terminada la adición se agitó por 20 min más, luego se vertió sobre 50 g de hielo-agua. Se neutralizó con una solución de HCl al 5 %, obteniéndose un líquido aceitoso oscuro, el cual se extrajo tres veces con 15 mL de acetato de etilo cada una. Las fases orgánicas se reunieron, lavaron con agua helada y secaron con sulfato de sodio anhidro. Luego se concentraron en el rotavapor. El residuo, un sólido de color beige, se purificó por recristalización de EtOH para dar 7.53 g de producto puro.

4.1.1.9 6-Cloro-1,2-dimetilbencimidazol (9).

En un matraz de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 10 g (0.0638 mol) de N-metil-5-cloro-1,2-fenilendiamina (37), 15 mL de ácido acético glacial y 13 mL de anhídrido acético. La mezcla se agitó vigorosamente y calentó a reflujo por 90 min, luego se enfrió a temperatura ambiente y vertió sobre 300 g de hielo finamente picado. Después se neutralizó con una solución de NaOH al 40 % y el producto formado se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al vacío. El producto crudo se purificó por recristalización de EtOH dando 8.97 g de cristales blancos.

4.1.1.10 2-Amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).

En un matraz de 250 mL con tres bocas 24 /40, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 10 g (0.0638 mol) de 37, los cuales se disolvieron en 25 mL de

agua tibia. Luego se llevó a 50-55 °C y agitó durante la adición lenta de 7.8 g (0.0736 mol, 1.15 eqs) de BrCN, después se llevó a 70-75 °C y mantuvo así por 2 h. La reacción se dejó enfriar y neutralizó con solución de NaOH al 50 %. Se formó un precipitado oscuro que se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al vacío. Se obtuvieron 8.5 g de un sólido oscuro, el cual se purificó por recristalización de MeOH-H₂O con carbón activado obteniéndose 7.34 g de cristales color rosa pálido.

4.1.1.11 6-Cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (11).

En un matraz de 125 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 6 g (0.0383 mol) de 37, 30 mL de etanol y 5.83 g (4.6 mL, 0.0766 mol, 2eqs) de disulfuro de carbono. Con agitación vigorosa se fue adicionando lentamente, una solución de 3 g (0.0766 mol, 2 eqs) de NaOH en 3 mL de H₂O y la mezcla se calentó al reflujo por 2 h. Se formó una solución café oscura, la cual se dejó llegar a temperatura ambiente y trató con ácido acético hasta pH 5-6, se dejó enfriar y filtró al vacío. El filtrado se concentró en el rotavapor y el residuo, un sólido café, de olor desagradable, se recristalizó de EtOH dando 4.23 g de un sólido beige.

4.1.1.12 6-Cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (12).

En un matraz de 125 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste una trampa anhidra, se disolvieron 4 g (0.0201 mol) de 6-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (11) en 25 mL de acetona. La solución agitada a 25-30 °C, se trató gota a gota con 1.13

g (0.0201 mol, 1 eq) de KOH en 1.5 mL de agua; luego lentamente y con ayuda de una jeringa, se agregaron 2.85 g (1.25 mL, 0.0201 mol, 1 eq) de CH₃I. Terminada la adición se agitó 20 min y finalmente se vertió sobre 50 g de hielo, neutralizó con HCl al 5 % y extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). La fase orgánica se lavó con agua fría, secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró al rotavapor. El producto crudo se recrystalizó de EtOH, obteniéndose 2.97 g de un sólido crema.

4.1.1.13 5,6-Dicloro-1,2-dimetilbencimidazol (13).

En un matraz de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se mezclaron 10 g (0.0523 mol) del N-metil-4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (43), 36 mL de AcOH y 20 mL de Ac₂O. Después se calentó a reflujo en baño de aceite por 2 h, se dejó enfriar y se vertió sobre 200g de hielo finamente picado. Se formó un escaso precipitado color blanco, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro y dejó secar al aire. El filtrado se neutralizó con una solución de NaOH al 50 % formándose un precipitado rojizo, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al vacío. El sólido claro mostro ser una mancha en ccf con R_f de 0.65 y el sólido rojizo mostró dos manchas con R_f de 0.5 y 0.65 (sistema I). El sólido rojizo se recrystalizó de EtOH obteniéndose 1.5 g de un producto con pf 215-217 °C y R_f 0.50 (sistema I). Por concentración de las aguas madres se obtuvo un sólido con R_f 0.65 (sistema I), el cual se recrystalizó de EtOH-H₂O dando 3.78 g de cristales blancos.

4.1.1.14 2-Amino-5,6-dicloro-1-metilbencimidazol (14).

En un matraz redondo de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se suspendieron 12.5 g (0.0654 mol) **43** en 40 mL de agua tibia. La mezcla se calentó en Baño María entre 60-70 °C y adicionaron lentamente, con agitación magnética, 7 g (0.0661 mol) de BrCN. Terminada la adición se continuó el calentamiento entre 70-80 °C por 1.5 h. Al finalizar este tiempo la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y después, en baño de hielo, se neutralizó con una solución de NaOH al 40 %. El enfriamiento se prolongó hasta la formación de un sólido que se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al vacío. El producto crudo se purificó por recrystalización de MeOH con carbón activado, seguido de recrystalización de EtOH-H₂O, y dio 10.8 g de cristales beige.

4.1.1.15 5,6-Dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15).

En un matraz redondo de 500 mL con tres bocas 24/40 acondicionado con termómetro, septum, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, agitación magnética y baño de agua, se mezclaron 17.29 g (0.0905 mol) de **43**, 140 mL de EtOH, 29.86 mL de H₂O, 7.62 g (0.1358 mol) de KOH y 10.33 g (9 mL, 0.1358 mol, 1.5 eqs) de CS₂. La mezcla anterior se calentó a 65 °C durante 2 h y luego se incorporaron 2 mL más de CS₂. Se volvió a calentar por una hora más y dejó en reposo toda la noche (12 h). La masa sólida formada se diluyó con 200 mL de H₂O, agitó mecánicamente durante 10 min y llevó a pH 5-6 con ácido acético al 20 %. El sólido café claro que se formó se separó por filtración al vacío, lavó con H₂O hasta pH neutro y dejó secar al

aire. El producto crudo se recristalizó dos veces de EtOH-H₂O con carbón activado y luego de tolueno para dar 15.3 g de agujas blancas.

4.1.1.16 5,6-Dicloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol (16).

En un matraz redondo de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, septum, agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se disolvieron 6.0 g (0.0257 mol) de 5,6-dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15) en 30 mL de acetona. Con ayuda de una jeringa se adicionaron 1.5 g (0.0267 mol, 1.04 eqs) de KOH en 5 mL de agua a 25 °C y con agitación, gota a gota, 3.8 g (1.67 mL, 0.0267 mol, 1.04eqs) de CH₃I disueltos en 10 mL de acetona. La mezcla de reacción se agitó 30 min más. Al cabo de este tiempo la reacción se vertió sobre 300 g de H₂O, formándose un precipitado blanquesino que se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada repetidas veces. El producto crudo se recristalizó de EtOH con carbón activado, dando 4 g de cristales blancos.

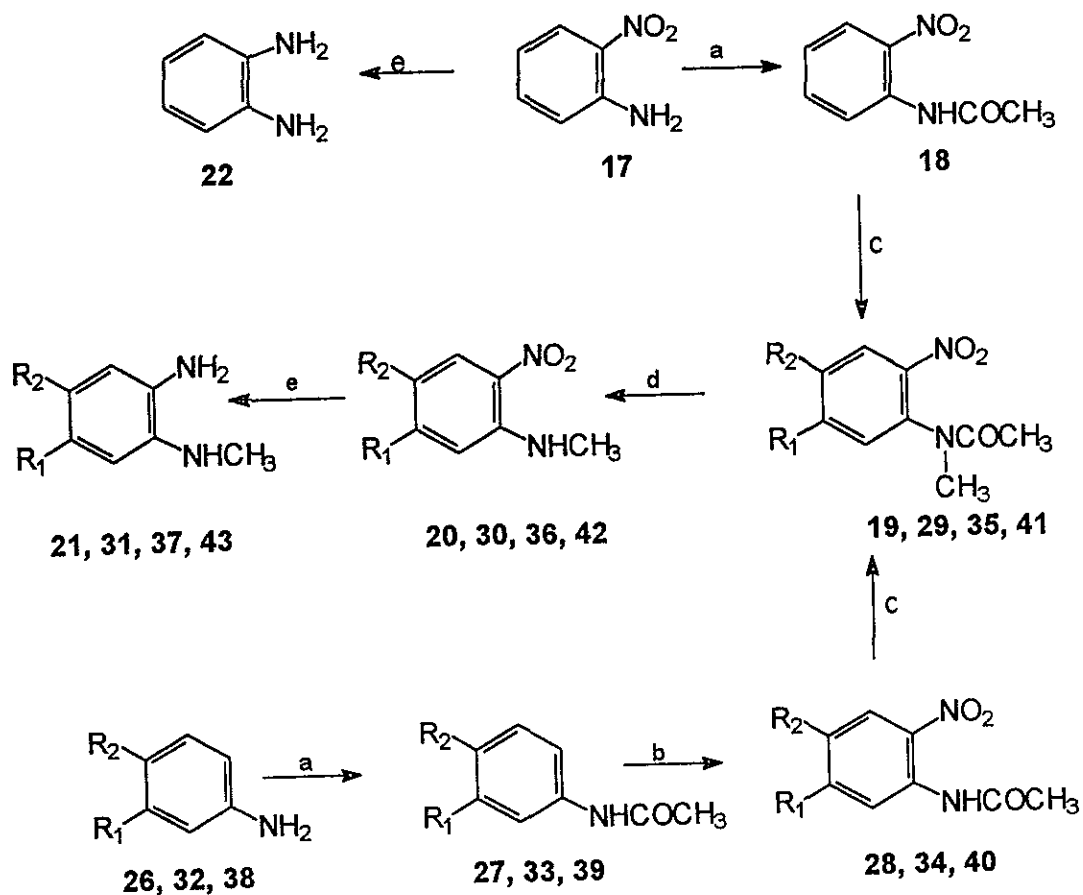
4.1.2 Síntesis de las 1,2-Fenilendiaminas precursoras (21, 22, 31, 37, 43).

La secuencia sintética que se siguió para preparar las N-metil-1,2-fenilendiaminas (21, 31, 37, 43), así como la 1,2-fenilendiamina (22), se muestra en el Esquema 6.

4.1.2.1 Síntesis de N-Metil-1,2-fenilendiamina (21).

4.1.2.1.1 2-Nitroacetanilida (18).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con embudo de adición, termómetro, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste una trampa anhidra, se colocaron 20 g (0.145 mol) de 2-nitroanilina (17) y con agitación magnética vigorosa, se adicionaron lentamente 17.75g. (18 mL, 0.174 mol, 1.2 eqs) de anhídrido acético y 0.5 mL de H₂SO₄ conc. La mezcla se calentó espontáneamente y dejó en agitación 30 min, luego se vertió sobre 200 g de H₂O-hielo. Se formó un sólido café oscuro, el cual se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua helada hasta pH neutro. Se secó al aire obteniéndose 26 g de un sólido café con tonalidades verde-amarillo.⁵²⁻⁵³ Esta reacción se repitió varias veces y se obtuvieron los mismos resultados. Una muestra se recristalizó de EtOH.



$R_1=R_2=H$ en 19-21; $R_1=H, R_2=Cl$ en 26-31
 $R_1=Cl, R_2=H$ en 32-37; $R_1=R_2=Cl$ en 38-43

a) Ac_2O ; b) HNO_3 fum/ Ac_2O o HNO_3/H_2SO_4 ; c) 1) $(CH_3)_2SO_4$, 2) $NaOH/H_2O$; d) H_2SO_4, Δ ;
 e) $H_2, Pd/C$ o $SnCl_2 \cdot 2H_2O, \Delta$.

Esquema 6. Secuencia sintética seguida para preparar las N-Metil-1,2-fenilendiaminas precursoras (21, 31, 37, 43) y la 1,2-fenilendiamina (22).

4.1.2.1.2 N-Metil-2-nitroacetanilida (19).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, embudo de adición, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 90g (0.5 mol) de 2-nitroacetanilida (18) cruda y con agitación magnética vigorosa se adicionaron 189.98 g (142.25 mL, 1.5 mol, 3.0 eqs) de sulfato de dimetilo. La mezcla se calentó hasta la disolución de la materia prima y a 33-35°C se goteó lentamente una solución de NaOH al 40 % (64 g, 1.6 mol, 3.2 eqs). La agitación se continuó por 20 min más a la misma temperatura y finalmente se vertió sobre 200 g de hielo-H₂O. Se obtuvo un líquido café oscuro, el cual se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL). La fase orgánica reunida se lavó con agua fría, secó con sulfato de sodio anhidro, filtró y concentró al rotavapor. El aceite obtenido (90 g) mostró alta pureza por ccf; no se purificó más y enseguida se sometió al proceso de hidrólisis.

4.1.2.1.3 N-Metil-2-nitroanilina (20).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, un refrigerante en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno y septum, se colocaron 82 g (0.422 mol) de la N-metil-2-nitroacetanilida (19) cruda, 40 mL de ácido sulfúrico concentrado y 30 mL de agua. La mezcla de reacción se calentó a reflujo 12 h, se dejó enfriar y se vertió sobre 200 g de hielo finamente picado, se neutralizó con una solución de NaOH al 50%. El sólido formado se separó por filtración al vacío y lavó con agua fría. El producto crudo se purificó por recristalización de EtOH dando 33.4 g de agujas rojizas.⁵⁴⁻

4.1.2.1.4 N-Metil-1,2-fenilendiamina (21).

En una botella para hidrogenación de 500 mL se colocaron 15 g (0.0986 mol) de 20, 1.5 g de Paladio/Carbono al 5% y 250 mL de etanol. La mezcla anterior se adaptó a un hidrogenador y lavó tres veces con hidrógeno, luego se hidrogenó a temperatura ambiente durante 37 min, consumiéndose 115 lb/pulg² de H₂. Al finalizar la reacción, se separó el catalizador por filtración al vacío empleando un embudo de vidrio poroso, y el filtrado se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 10.85 g de un líquido viscoso café oscuro. En ccf mostró dos manchas, una principal con Rf de 0.28 (sistema I). El producto como tal se utilizó inmediatamente para las reacciones siguientes de síntesis de los 1-metilbencimidazoles sin sustituyentes en el anillo bencénico.

4.1.2.2 Síntesis de N-Metil-4-cloro-1,2-fenilendiamina (31).

4.1.2.2.1 4-Cloroacetanilida (27).

En un matraz redondo de 500 mL con tres bocas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro, condensador en posición de reflujo y sobre éste una trampa anhidra, y un embudo de adición, se colocaron 207 g (1.6226 mol) de 4-cloroanilina (26) pulverizada y gotearon 231.91 g (214.34 mL, 2.2717 mol, 1.4 eqs) de anhídrido acético. La adición se hizo de tal forma que la temperatura de la reacción no sobrepasara los 80 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó llegar a 40°C y vertió sobre 500 g de H₂O-hielo. Se formó un precipitado blanco, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua hasta pH neutro y dejó secar al aire. Se obtuvieron 273.34 g de un sólido cristalino blanco, esencialmente puro por ccf, el cual se utilizó crudo para la siguiente reacción de nitración. Una muestra se purificó por recristalización de ácido acético acuoso.^{59b}

4.1.2.2.2 4-Cloro-2-nitroacetanilida (28).

En un vaso de precipitados de 4 L, adaptado con agitación mecánica y baño de hielo-sal, se colocaron 700 mL de HNO₃ conc. y enfriaron a 0 °C. Enseguida se gotearon 700 mL de H₂SO₄ conc. previamente enfriados a 5 °C. La adición se hizo de tal forma que la temperatura no subiera de 20 °C. Después se enfrió a 0 °C y adicionaron, poco a poco, 262.87 g (1.5498 mol) de 4-cloroacetanilida (27) recién preparada y pulverizada, manteniendo la temperatura entre 0 y 5 °C. Se agitó 10 min más y se cambió el baño de hielo por uno de agua a 20 °C, se agitó hasta que la temperatura de reacción llegó a 15-20 °C (1 h). Se vertió sobre 10 Kg de hielo-H₂O, y se formó un precipitado amarillo abundante. Se agitó por 30 min y filtró por succión, el filtrado se neutralizó con NaOH y desechó. El residuo se lavó con agua repetidas veces hasta pH neutro y dejó secar al aire. Se obtuvieron 329.67 g de un sólido amarillo, una sola mancha por ccf. Este producto crudo se empleó como tal para la siguiente reacción de N-metilación. Una muestra se purificó por recristalización de EtOH.⁵⁶

4.1.2.2.3 N-Metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).

En un matraz de 1000 mL, con tres bocas 24/40, equipado con termómetro, agitación mecánica, embudo de adición y baño de agua, se suspendieron 99.6 g (0.4641 mol) de 4-cloro-2-nitroacetanilida (28) en 175.64 mL (234.14 g, 1.8563 mol, 4 eqs) de sulfato de dimetilo, se agitó vigorosamente y calentó a 30 °C. Entonces se goteó, lentamente, una solución de 74.25 g (1.8563 mol, 4 eqs) de NaOH en 75 mL de agua. La adición se hizo de tal forma que la temperatura oscilara entre 32 y 35 °C. Al término de la adición, se agitó 30 min más y comprobó la desaparición de la materia prima por ccf; después, la mezcla de reacción se vertió sobre 500 g de hielo-H₂O con agitación. Se agitó 10 min y el

sólido anaranjado que precipitó se separó por filtración con vacío, lavó con agua varias veces y dejó secar al aire. Se obtuvieron 104 g de un sólido anaranjado, una mancha en ccf. Este sólido se sometió a la reacción de hidrólisis. Una muestra se recrystalizó de EtOH-H₂O

4.1.2.2.4 N-Metil-4-cloro-2-nitroanilina (30).

En un vaso de precipitados de 1000 mL, adaptado con agitación magnética y termómetro, se suspendieron 84 g (0.3674 mol) de 29 en 200 mL de H₂SO₄ conc., con agitación moderada. Una vez que se incorporó todo el sólido se calentó a 80-95 °C durante 30 min y después se dejó enfriar a 50 °C. El contenido del vaso se vertió cuidadosamente sobre 1 Kg de hielo-H₂O y agitó hasta la precipitación total de un sólido anaranjado-rojizo, el cual se separó por filtración con succión. El residuo se lavó con agua hasta pH neutro, después se dejó secar sobre una plancha tibia hasta peso constante. Se obtuvieron 65.48 g de un sólido anaranjado,⁵⁶ el cual se recrystalizó de EtOH-H₂O para dar 47.47 g y 3.93 g de las aguas madres concentradas.

4.1.2.2.5 N-Metil-4-cloro-1,2-fenilendiamina (31).

En un reactor de 500 mL se colocaron 50 g (0.027 mol) de N-metil-4-cloro-2-nitroanilina (30), 2.5 g de Pd/C al 10% y 300 mL de etanol absoluto. El reactor se adaptó al hidrogenador y se llenó con H₂ hasta 60 lb/pulg². La reacción se llevó a cabo en 3 h, consumiéndose 1950 lb/pulg² de H₂. Al terminar la reacción se separó el catalizador por filtración al vacío, y el filtrado se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 37.7 g de un líquido viscoso oscuro; en ccf mostró dos manchas con R_f de 0.425 y 0.55 (Sistema I 10 mL, más dos gotas de

NH₄OH). Este producto se utilizó como tal en las siguientes reacciones de síntesis para obtener los 1-metilbencimidazoles monoclorados en la posición 5.

4.1.2.3 Síntesis de N-Metil-5-cloro-1,2-fenilendiamina (37).

4.1.2.3.1 3-Cloroacetanilida (33).

En un matraz de 100 mL con tres bocas 14/20, adaptado con termómetro, embudo de presiones igualadas, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste una trampa anhidrida, se colocaron 100g (82.92 ml, 0.7838 mol) de 3-cloroanilina (32) y se fueron adicionando, lentamente, con agitación magnética, 79.58 mL (0.8402 mol, 1.1 eq) de anhídrido acético, cuidando de no llegar a la ebullición. La temperatura subió espontáneamente a 80 °C y se continuó la agitación hasta llegar a la temperatura ambiente. Se comprobó la total acetilación de la materia prima por ccf observándose un solo producto y después se incorporó esta mezcla a la reacción de nitración siguiente. Esta reacción se realizó varias veces; en una de ellas se aisló el producto y recristalizó de CH₃COOH-H₂O, obteniéndose agujas blancas.^{59a}

4.1.2.3.2 5-Cloro-2-nitroacetanilida (34).

En un matraz de 3 L con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, embudo de adición y agitación mecánica, se colocaron 481 mL (6.8 mol, 6 eqs) de anhídrido acético y enfriaron a 0°C por medio de un baño de isopropanol-hielo seco. A esta temperatura se adicionaron, lentamente y con agitación, 238 mL (2.35 mol, 3 eqs) de ácido nítrico fumante previamente enfriados a 0 °C. La mezcla nitrante anterior se mantuvo entre -10 a 0 °C y se le goteó, en un lapso de 1 h, la solución de la 3-cloroacetanilida (33) de la reacción anterior.

Terminada la adición se continuó la reacción en las mismas condiciones por 3 h más. Finalmente, se filtró en frío obteniéndose un sólido de color amarillo. El filtrado se vertió sobre hielo formándose un precipitado de color amarillo oscuro, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada. Los sólidos obtenidos mostraron ser un mismo producto por ccf, se reunieron en un vaso de precipitados y extrajeron con benceno (3 x 100 mL), con agitación durante 15 min y filtración. Los extractos se reunieron y concentraron al rotavapor dejando 129.5 g de un sólido amarillo claro.^{56a} El producto crudo se purificó por recristalización de EtOH.

4.1.2.3.3 N-Metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).

En un matraz de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, embudo de adición con tampa anhidra y un septum, se mezclaron 50 g (0.232 mol) de 5-cloro-2-nitroacetanilida (34) con 87.77 mL (117 g, 0.928 mol, 4 eqs) de sulfato de dimetilo. La mezcla se calentó a 35 °C y con agitación vigorosa se agregó, gota a gota, una solución de 37.12 g (0.928 mol, 4 eqs) de hidróxido de sodio en 62 mL de H₂O. Terminada la adición se continuó la reacción 30 min más; después la mezcla se extrajo en tres ocasiones con 50 mL de benceno cada una. Se drenó la fase acuosa y la fase bencénica se lavó con agua fría (3 x 50 mL), luego se secó con sulfato de sodio anhidro y llevó a sequedad en el rotavapor. Se obtuvieron 48.8 g de un sólido amarillo, los cuales se purificaron por recristalización de EtOH.

4.1.2.3.4 N-Metil-5-cloro-2-nitroanilina (36).

En un vaso de precipitados de 500 mL se colocaron 100 mL de H₂SO₄ conc. y enfriaron con un baño de hielo agua hasta 5°C. El ácido frío se agitó magnéticamente y se le incorporaron 45 g (0.186 moles) de 35. Terminada la adición se calentó a 100 °C por 20 min, dejó enfriar y vertió sobre 300 g de hielo picado. Se formó un sólido anaranjado, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro, y dejó secar al aire. Se obtuvieron 34 g de un producto crudo que en ccf mostró ser una sola mancha. El producto se recrystalizó de EtOH dando agujas amarillas.^{56, 58}

4.1.2.3.5 N-Metil-5-cloro-1,2-fenilendiamina (37)

En un reactor de hidrogenación de 500 mL se colocaron 50 g (0.268 mol) de 36, 2.5 g de Pd/C al 10% y 250 mL de etanol absoluto. El reactor se adaptó al hidrogenador y se inyectó el H₂. La reacción se llevó a cabo en 3.25 h consumiéndose 2,522 lb/pulg² de H₂. Al terminar la reacción se separó el catalizador por filtración al vacío, empleando un embudo de vidrio poroso y el filtrado se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 35.6 g de un líquido café oscuro que en ccf mostró dos manchas. Este producto de inmediato se empleó en las reacciones siguientes para obtener los 1-metilbencimidazoles monoclorados en la posición 6.

4.1.2.4 Síntesis de N-Metil-4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (43).

4.1.2.4.1 3,4-Dicloroacetanilida (39).

En un matraz redondo de 500 mL con tres bocas 24/40, adaptado con termómetro, embudo de adición de presiones igualadas, refrigerante en posición de reflujo y sobre éste una trampa anhidra, se colocaron 100 g (0.617 mol) de 3,4-dicloroanilina (38), previamente pulverizados y secos, a los cuales se les goteó, lentamente y con agitación vigorosa, 102 mL (110.36 g, 1.08 mol, 1.75 eq.) de anhídrido acético cuidando de que la temperatura no pasara de 90 °C. Terminada la adición se dejó en agitación a la misma temperatura por 20 min más y finalmente se vertió sobre agua helada con agitación constante. Se formó un precipitado de color blanco, el cual se separó por filtración al vacío, lavó repetidas veces con agua fría hasta pH neutro y secó al aire. Se obtuvo un sólido blanco con rendimientos cuantitativos. Por ccf mostró ser un único producto. Este sólido se recrystalizó de EtOH dando un cristales blancos.⁵⁹

4.1.2.4.2 4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (40).

En un matraz redondo de 1 L con tres bocas 24/40, provisto con agitación mecánica, termómetro y embudo de adición, se colocaron 80 mL de ácido nítrico fumante y enfriaron a 0°C en un baño de isopropanol-hielo seco; enseguida se fueron adicionando, lentamente y con agitación vigorosa, 40 g (0.196 mol) de 39 entre -5 a 0 °C. La adición terminó en 30 min y se dejó en agitación por 3 h a 0 °C. Después se vertió sobre 300 g de agua-hielo formándose un producto amarillo, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro, y dejó secar al aire. Se obtuvieron 39.06 g de un sólido amarillo que en ccf mostró tres manchas, una principal de Rf 0.65 (Sistema I, más dos gotas de NH₄OH). Se recrystalizó de MeOH-H₂O obteniéndose cristales amarillos.⁶⁰

4.1.2.4.3 N-Metil-4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (41).

En un matraz redondo de 250 mL con tres bocas 24/40, adaptado con refrigerante en posición de reflujo, termómetro y un embudo de adición, se colocaron 30 g (0.1204 mol) de 40 y 37.98 g (28.49 mL, 0.3011 mol, 2.5 eqs) de sulfato de dimetilo. La mezcla anterior se calentó a 30 °C por medio de un baño de agua, se formó una solución que se agitó vigorosamente mientras se goteó una solución de 14.45 g (0.3612 mol, 3 eqs) de NaOH en 15 mL de H₂O. La adición fue lenta, de tal forma que la temperatura de reacción oscilara entre 30 y 35 °C. Terminada la adición se agitó 15 min más y vertió sobre hielo-H₂O con agitación vigorosa. Se formó un precipitado amarillo, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada hasta pH neutro. Se obtuvieron 31.39 g de un sólido amarillo, el cual se recristalizó de EtOH obteniéndose cristales amarillos.

4.1.2.4.4 N-Metil-4,5-dicloro-2-nitroanilina (42).

En un matraz redondo de 250 mL con dos bocas 24/40, adaptado con termómetro y refrigerante en posición de reflujo, se enfriaron 80 mL de H₂SO₄ por medio de un baño de hielo-agua. Cuando la temperatura llegó a 0-5 °C se fueron adicionando, con agitación vigorosa, 20 g (0.076 mol) de 41; posteriormente, se calentó, hasta 90-100 °C y se mantuvo así por 20 min. La reacción se dejó enfriar a 50 °C y vertió sobre 200 g de hielo. Se formó un precipitado anaranjado, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada hasta pH neutro, y dejó secar al aire. Se obtuvieron 16.69 g de un sólido amarillo-naranja, que en ccf mostró una mancha con R_f de 0.58 (Sistema I). El producto se recristalizó de EtOH originando agujas anaranjadas.⁶⁰

4.1.2.4.5 N-Metil-4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (43).

En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 10.7 g (0.0484 mol) de N-metil-4,5-dicloro-2-nitroanilina (42) y 0.8 g de Pd/C al 5% en 200 mL de etanol absoluto. La suspensión se sometió a hidrogenación hasta que se consumieron 240 lb/pulg² de hidrógeno en un lapso de 27 min. Se tomó una muestra de la solución tibia, amarillo-verdosa, y analizó por ccf encontrándose la formación de un solo producto y la total desaparición de la materia prima. Enseguida, se separó el catalizador por filtración al vacío empleando un embudo de vidrio poroso, y el filtrado se concentró a presión reducida. Se obtuvieron 9.24 g de un sólido rojo oscuro el cual mostró ser un solo compuesto por ccf (Rf 0.43, Sistema I). Esta reacción con idénticas cantidades se repitió varias veces obteniéndose los mismos resultados. Para la obtención de los 1-metilbencimidazoles diclorados en 5 y 6, se empleó el producto crudo o la solución etanólica recién obtenida.

4.1.2.5 1,2-Fenilendiamina (22).

En un reactor de hidrogenación de 500 mL se colocaron 30 g (0.217 mol) de 2-nitroanilina (17), 3 g de Pd/C al 5% y 250 mL de etanol absoluto. La mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente durante 2 h, consumiéndose 1,500 lbs/pulg² de H₂. Al terminar se separó el catalizador por filtración al vacío, empleando un embudo de vidrio poroso, el filtrado se concentró en el rotavapor, obteniéndose 20.4 g de un sólido café claro que al paso del tiempo se fue obscureciendo. Esta reacción se repitió varias veces y en todas la ccf mostró una mancha intensa con un Rf 0.52 (Sistema II 10 mL, más dos gotas de NH₄OH), idéntico al de una muestra comercial. Este producto se empleó como tal para las reacciones siguientes.

4.2 Parte biológica.

4.2.1 Evaluación del potencial citotóxico de los bencimidazoles sintetizados (1-16), mediante pruebas de toxicidad.

4.2.1.1 Para el crustáceo *Artemia salina*.

Se preparó una solución original de cada uno de los derivados del 1-metilbencimidazol obtenidos, disolviendo 20 mg de la muestra de prueba en 2 mL del disolvente (1.6 mL de EtOH más 0.4 mL de HCOOH). De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 μL a viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se aforó cada vial con 5 mL de solución salina artificial, obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.⁶¹ Después de incubar los huevecillos de *Artemia salina* en solución salina a 25 °C, durante 48 horas, se transfirieron 10 larvas a cada uno de los viales conteniendo las muestras de prueba. Transcurridas 24 horas, se registró el número de organismos sobrevivientes. Los resultados se procesaron mediante un análisis Probit[®] para calcular la concentración letal media (CL₅₀).⁶²

4.2.1.2 Para el crustáceo de agua dulce *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871).^{63, 64}

Los crustáceos se recolectaron en el Estado de Guerrero, Méx. y se transportaron en agua de su medio natural al Instituto del Mar y Limnología donde se realizó el ensayo.

Los camarones se depositaron en una pecera con medio natural y medio salino artificial, se mantuvieron a 25 °C con aereación moderada. De esta

manera los camarones se adaptan y sobreviven. Al momento de ser utilizados los derivados 1-metilbencimidazólicos se pesaron por triplicado en viales pequeños en las siguientes cantidades, 5, 50 y 500 mg.

Se colocaron 10 crustáceos previamente adaptados a cada frasco de 500 mL, uno por cada concentración y por triplicado.

Se aforaron los frascos con medio salino artificial y se mantuvieron con aereación a una temperatura de 25 °C por 24 horas, para su adaptación al medio de prueba.

Después se adicionó la muestra previamente disuelta en 1 mL de EtOH.

Se continuó con la aereación y temperatura a 25 °C.

Transcurridas 24 horas, se registró el número de organismos sobrevivientes.

Al mismo tiempo se trabajó un control de toxicidad negativa (testigo) para observar el 100% de sobrevivencia.

4.2.1.3 Para la larva J2 de *Meloidogyne incognita in vitro*.

Las raíces de los tomates (*Lycopersicon esculentum* L.) fueron infectados por el nematodo *Meloidogyne incognita*. Las larvas del segundo estadio (J2) fueron colectadas de una masa de huevecillos, los cuales estuvieron incrustados en la raíz del tomate. Los huevos se colocaron en cajas de Petri con agua y se incubaron a 25 °C durante 48 hrs.⁶⁵

Se colocaron 3 mL de agua, disolvente (MeOH) o una cantidad conocida del compuesto a probar (50, 100 y 200 ppm) disueltos en MeOH usando cajas de Petri de 35 x 15 mm. Estas cajas se incubaron con 10 larvas J2 *Meloidogyne incognita* y mantuvieron a 25 °C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se determinan las velocidades de inmovilización.

4.2.2 Evaluación del potencial antiprotozoario de los derivados del 1-metilbencimidazol.

4.2.2.1 Parásitos.

Se empleó la cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989:1, la que se mantuvo en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con suero de ternera descomplementado al 10%.⁶⁶ Los parásitos se cultivaron dos veces por semana.

4.2.2.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para *Giardia lamblia*.

Se empleó el método de subcultivos previamente estandarizados.³⁶ Así, se incubaron 5×10^4 trofozoítos/ml por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de los diferentes 1-metilbencimidazoles, además del albendazol y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos. Después de la incubación se inocularon 50 µL de los trofozoítos tratados, en medio fresco, ya sin la adición de los compuestos y se incubaron por otras 48 h. El número final de trofozoítos se determinó en una cámara cuentaglóbulos. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit[®] se calculó la CI₅₀ que correspondió a la concentración que inhibió al 50 % el crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron en tres ocasiones.

4.2.3 Evaluación del potencial antihelmíntico de los derivados del 1-metilbencimidazol.

4.2.3.1 Parásitos.

Se empleó una cepa de *Trichinella spiralis* que fue aislada de cerdo por el Dr. Martínez-Marañón del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). Con el objeto de mantener el ciclo de vida de este parásito, ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad fueron infectadas con 3000 larvas musculares resuspendidas en Bacto agar al 0.02%. La infección se realizó por vía intragástrica con cánula y jeringa.

4.2.3.2 Obtención de los organismos adultos de *Trichinella spiralis*.

Los parásitos adultos se obtuvieron siguiendo lo recomendado por Dennis y cols.⁶⁷ Ratas de la cepa Sprague-Dawley se infectaron con 3000 larvas musculares de *T. spiralis* y fueron sacrificadas a los 3 días. Se obtuvieron los intestinos, se abrieron longitudinalmente y se colocaron en un aparato de Bearman con amortiguador de fosfatos salino pH 7.3 (PBS). Los adultos recuperados se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se incubaron a 37 °C por 12 h en RPMI 1640 adicionado con 500 U/mL de penicilina, 500 µg/mL de estreptomycinina y 1.25 µg/mL de amfotericina B. Los organismos se resuspendieron en Bacto agar al 0.02% para contar el número de parásitos adultos disponibles para los ensayos *in vitro*.

4.2.3.3 Ensayos *in vitro* (MTT/PMS) para evaluar el efecto de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre el adulto de *T. spiralis*.

Los organismos adultos (fase intestinal) se obtuvieron como se indicó previamente y se colocaron 100 parásitos en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunc) en medio RPMI 1640 al cual se adicionaron 1 µg/mL y 10 µg/mL de los diferentes fármacos. Los parásitos se incubaron durante 3 días a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%, con cambio diario de medio más compuesto. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de albendazol a las mismas concentraciones y como control negativo, parásitos incubados sólo con los disolventes utilizados. Después de la incubación se determinó la viabilidad de los parásitos mediante un método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán de acuerdo a lo descrito por Towson y cols.⁶⁸ con algunas modificaciones.⁶⁹ Así, los parásitos cultivados con los diferentes compuestos se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugaron a 2,500 rpm por 2 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se añadió 1 mL de una solución de MTT al 0.75%, 50 µL de una solución de metosulfato de fenazina al 5% (PMS) como catalizador y 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 50 min, con agitación constante. Después de la incubación se realizó otro lavado con PBS y se agregaron 500 µL de DMSO, los parásitos se resuspendieron y se dejaron a temperatura ambiente por 1 h. Al finalizar este tiempo los tubos se centrifugaron y se transfirió el sobrenadante a placas de ELISA, las cuales se leyeron a 492 nm. Se calculó el porcentaje de reducción de la densidad óptica en comparación con el control negativo y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad. Se realizaron tres experimentos por duplicado cada uno de ellos.

4.2.3.4 Obtención de las larvas musculares de *T. spiralis*.

Las larvas musculares se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por Dennis y cols.⁶⁷ Ratas de la cepa Sprague-Dawley se infectaron con 3000 larvas musculares de *T. spiralis*. A los 28 días postinfección, los animales fueron sacrificados y el músculo esquelético fue macerado y digerido artificialmente con una solución de pepsina-HCl al 1% durante 3 h a 37 °C con agitación constante. Posteriormente la solución se pasó por un tamiz, dejando que las larvas se sedimentaran por 15 min. Las larvas así obtenidas se lavaron con PBS hasta que no quedaran restos de carne y se incubaron por 12 h a 37 °C con medio RPMI 1640 al cual se le adicionaron 500 U/mL de penicilina, 500 µg/mL de estreptomicina y 1.25 µg/mL de amfotericina B, Una vez realizado lo anterior, las larvas se lavaron con PBS y se resuspendieron con Bacto agar al 0.02% para contar el número de larvas.

4.2.3.5 Ensayos *in vitro* (MTT/PMS) para evaluar el efecto de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre la larva muscular de *T. spiralis*.

Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se colocaron 1000 larvas por pozo, en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunc), en medio RPMI 1640 conteniendo el compuesto a evaluar a una concentración de 1 mg/mL y 10 mg/mL. Los parásitos se incubaron por tres días a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%, con cambio diario de medio más compuesto. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de albendazol, y como control negativo se incluyeron larvas musculares sin tratamiento. Después de la incubación, se determinó la viabilidad de las larvas musculares mediante el método de MTT/PMS descrito previamente.^{68, 69}

4.2.4 Estudios de microscopía electrónica.

Para evaluar las alteraciones ultraestructurales, los trofozoítos de *G. lamblia* y las larvas de *T. spiralis*, tanto los expuestos a los diferentes compuestos como los controles, se procesaron de acuerdo a lo descrito por Chávez y cols.⁷⁰

4.2.4.1 Microscopía electrónica de barrido.

Los trofozoítos de *G. lamblia* y las larvas de *T. spiralis* se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 durante 1 h. Después de deshidratar las muestras con soluciones de concentraciones crecientes de etanol, se secaron a punto crítico con CO₂ y se matalizaron con oro en un aparato Jeol de bombardeo iónico. La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol 35 C.

4.2.4.2 Microscopía electrónica de transmisión.

Los trofozoítos de *G. lamblia* se fijaron en glutaraldehído al 2.5% y se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio. Las muestras se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de etanol, en óxido de propileno y se infiltraron en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y Epon 812 durante 18 h. Posteriormente, las mezclas se incluyeron en Epon 812. La polimerización de la resina epóxica se realizó a 60 °C durante 24 h y se hicieron cortes a 60 nm de espesor. Los cortes se colectaron en una rejilla de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para la observación de las diferentes muestras se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol 100 SX.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Parte química.

Las constantes físicas y rendimientos obtenidos para los compuestos 1-16 se muestran en la Tabla 4; para los precursores bencimidazólicos 23-25, en la Tabla 5; y para los intermediarios, en la Tabla 6. Los datos espectroscópicos para los compuestos nuevos, y algunos conocidos que son relevantes para la discusión, se muestran en la Tabla 7 y en la Tabla 8.

A continuación se presenta una discusión sobre la parte sintética, seguida de la elucidación estructural.

5.1.1 Síntesis de los 1-metilbencimidazoles (1-16).

La preparación de los compuestos 1-4 se realizó por dos rutas sintéticas diferentes (Esquema 5), ambas conocidas.

En una de ellas se partió de la N-metil-1,2-fenilendiamina (21) cruda, recién obtenida, la cual llevó al compuesto 1, 2 o 3, con ácido acético por reacción de Phillips,⁷¹ con bromuro de cianógeno,⁷² o con disulfuro de carbono⁵⁰ respectivamente. La S-metilación de 3 dio el compuesto 4.²³

Aunque en esta parte se obtuvieron los compuestos 1-3 en un sólo paso, el producto crudo, en cada caso, estuvo impurificado con sustancias coloreadas que al eliminarlas bajaron el rendimiento sustancialmente. Estos resultados podrían deberse a que la materia prima (21) no se purificó antes de la reacción, o bien, a la naturaleza misma de cada reacción de ciclación, misma que se ve reflejada en la obtención de los análogos desmetilados 23-25, reportada con bajos rendimientos^{71, 72, 50}.

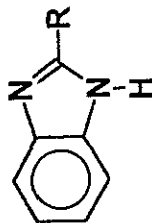
La otra manera de sintetizar 1-4 consistió en preparar el bencimidazol 2 sustituido (23-25), por reacción de la 1,2-fenilendiamina (22) y ácido acético,⁷¹

Tabla 4. Constantes físicas y rendimientos de los 1-metilbencimidazoles (1-16).

No	F.M.	P.M.	Rend.(%)	Crist.	Edo. Fis.	Rf (sist.)	pf (°C)
1	C ₉ H ₁₀ N ₂	146.19	67.00, 81.69 ^a	EtOH-H ₂ O ^b	cristales blancos	0.21 (II)	106-108
2	C ₈ H ₉ N ₃	147.19	69.60, 86.15 ^a	EtOH-H ₂ O ^b	escamas blancas	0.01 (II), 0.38 (III)	203-205
3	C ₈ H ₈ N ₂ S	164.23	49.00	EtOH-H ₂ O ^b	agujas blancas	0.26 (II)	189-191
4	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	178.26	69.19, 78.25 ^a	Ciclohex.-Eter de Pet.	cristales blancos	0.53 (II)	53-54
5	C ₉ H ₉ ClN ₂	180.63	71.15	EtOH-H ₂ O ^b	cristales blancos	0.13 (II)	129-130
6	C ₈ H ₈ ClN ₃	181.63	58.51	EtOH-H ₂ O ^b	escamas blancas	0.00 (II), 0.44 (III)	210-211
7	C ₈ H ₇ ClN ₂ S	198.62	61.79	EtOH-H ₂ O ^b	agujas blancas	0.29 (II)	230-231
8	C ₉ H ₉ ClN ₂ S	212.65	87.87	Ciclohex.-Eter de Pet.	cristales crema	0.69 (III)	92-93
9	C ₉ H ₉ ClN ₂	180.63	77.84	EtOH	cristales blancos	0.09(II)	157-159
10	C ₈ H ₈ ClN ₃	181.63	63.34	MeOH-H ₂ O ^b	cristales rosa pálido	0.00 (II), 0.42 (III)	252-255
11	C ₈ H ₇ ClN ₂ S	198.62	55.61	EtOH	agujas blancas	0.24 (II)	273-275
12	C ₉ H ₉ ClN ₂ S	212.65	69.49	Ciclohex.-Eter de Pet.	cristales blancos	0.69 (II)	80.5-81.5
13	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂	215.09	33.60	EtOH-H ₂ O	cristales blancos	0.24 (II)	197-200
14	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃	216.08	76.42	EtOH-H ₂ O ^b	cristales beige	0.01 (II), 0.34 (III)	241-243
15	C ₈ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	233.06	72.54	EtOH-H ₂ O ^b , Tolueno	agujas blancas	0.30 (II)	229-232
16	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂ S	247.09	63.00	EtOH ^b	cristales blancos	0.66(II)	121-122

^a Rendimiento obtenido por el método alterno de metilación de su correspondiente bencimidazol intermedio; ^b Con carbón activado.

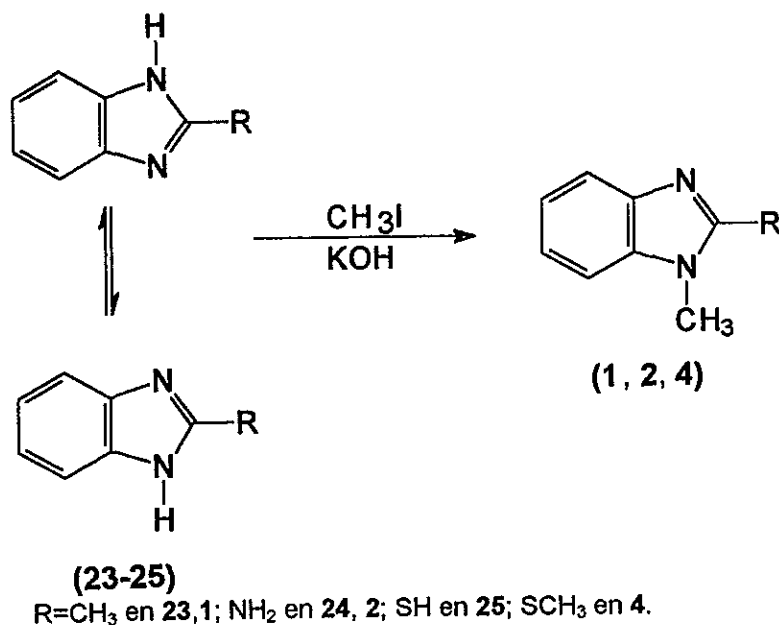
Tabla 5. Constantes físicas y rendimientos de los bencimidazoles intermediarios (23-25).



No	R	Rend (%)	Crist.	Edo. Fis.	Rf(sist (III))	pf °C
23	CH ₃	50.16	H ₂ O ^a	cristales blancos	0.46	171-172 ^a
24	NH ₂	54.82	H ₂ O ^d	escamas blancas	0.22	229-230 ^b
25	SH	46.99	EtOH-H ₂ O	cristales plateados	0.52	299-301 ^c

^a Lit.⁴⁸ 172-174, ^b Lit.⁴⁹ 229-231, ^c Lit.^{49,50} 301-303.

bromuro de cianógeno,⁷² o disulfuro de carbono⁵⁰ respectivamente. La ventaja en esta parte fue contar con una materia prima (22) que se puede adquirir comercialmente y por ende, de alta pureza. Considerando ahora la simetría de los compuestos 23-25, la monometilación en 23, 24 y la metilación doble para 25, llevó a un sólo producto, el esperado 1-4, según se aprecia en el Esquema 7 de reacción.

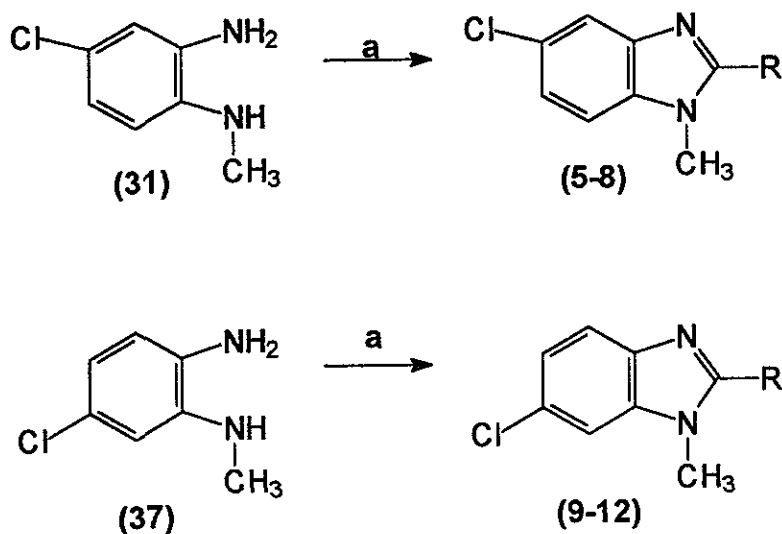


Esquema 7. Metilación de los precursores bencimidazólicos 23-25.

Los productos obtenidos (1-4) por este camino fueron prácticamente puros, cristales blancos, fáciles de recrystalizar y con mejores rendimientos que por el otro camino. Cuando se partió de la 1,2-fenilendiamina (22) cruda, recién obtenida por reducción catalítica de la 2-nitroanilina (17), los rendimientos y pureza de 1-4 también fueron mejores que por el primer método.

Para preparar los compuestos 5-8, serie B; 9-12, serie C y 13-16, serie D, se siguió un sólo procedimiento, el ya descrito en primer término para 1-4, serie A.

En el caso de la serie B o C fue necesario contar con la N-metil-1,2-fenilendiamina adecuadamente sustituida (31 o 37) para tener el sustituyente cloro en la posición 5 o 6 respectivamente. Esto se aprecia en el esquema 8 de reacción.



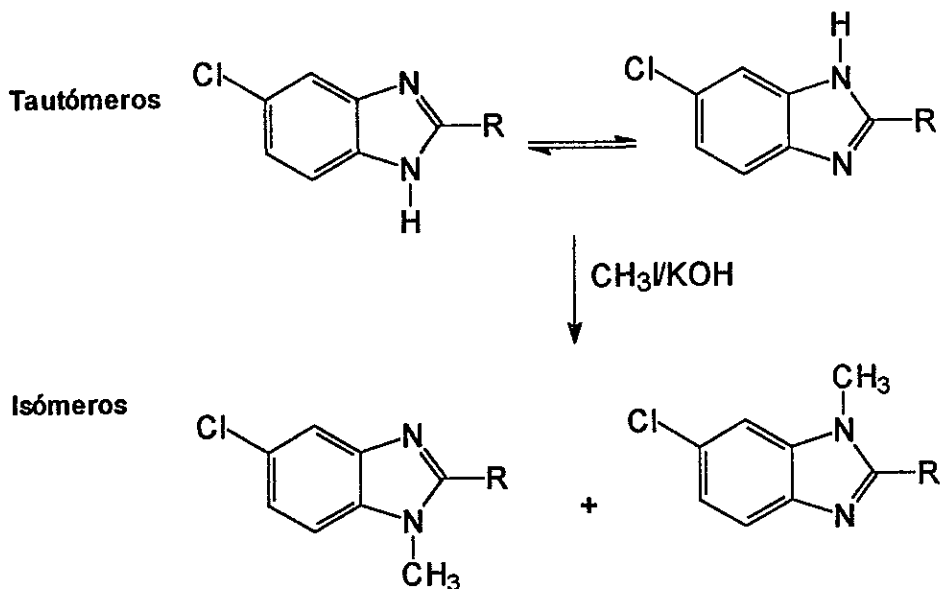
R=CH₃ en 5,9; NH₂ en 6, 10; SH en 7, 11; SCH₃ en 8, 12.

(a) Ac₂O, CH₃COOH para 5 y 9; BrCN para 6 y 10; CS₂ para 7 y 11 seguido de CH₃I para 8 y 12.

Esquema 8. Método seguido para la obtención de los 1-metilbencimidazoles 5-12.

Al igual que en la serie A, los compuestos 8-12 se obtuvieron en un sólo paso, y se logró la purificación de estos por recristalización con carbón activado,

lo que llevó a bajos rendimientos en la mayoría de los casos. Por lo extenso del trabajo sintético, no se hizo un estudio profundo para la optimización de los procesos. Por otro lado, no se estudió el otro procedimiento que emplearía 4-cloro-1,2-fenilendiamina como materia prima, ya que los intermediarios bencimidazólicos sufren el fenómeno de tautomería y al metilarlos dan una mezcla de isómeros,²⁶ como puede apreciarse en el Esquema 9.



Esquema 9. Tautomería e isomería de bencimidazoles.²⁶

La última serie de compuestos, la serie D, también se preparó por ciclación de la N-metil-4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (43) con ácido acético, bromuro de cianógeno o disulfuro de carbono. Se obtuvieron los compuestos 13-16 con las mismas dificultades ya explicadas anteriormente.

Aunque para esta serie también es factible la síntesis de 13-16 por metilación de los correspondientes bencimidazoles intermediarios, el estudio no se realizó por lo extenso del mismo; sin embargo, éste se sigue estudiando por el grupo de trabajo.

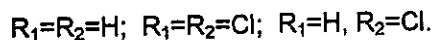
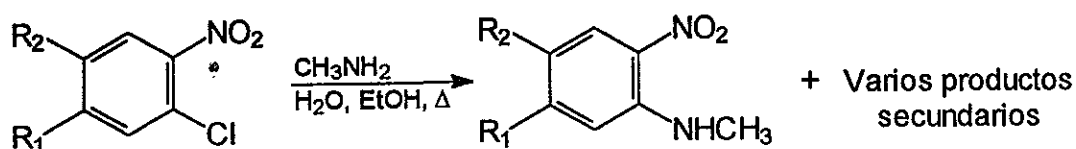
Los compuestos preparados 1-16 son sólidos cristalinos, que se pudieron obtener de color blanco por recristalización de EtOH-H₂O con carbón activado en la mayoría de los casos. La polaridad relativa mostrada en ccf (sistema II) según el tipo de sustituyente en la posición 2 (Tabla 4) fue la siguiente:

2-NH₂ (2, 6, 10, 14) > 2-CH₃ (1, 5, 9, 13) > 2-SH (3, 7, 11, 15) > 2-SCH₃ (4, 8, 12, 16), estos resultados son lógicos, debido a la facilidad del grupo NH₂ de interactuar con la gel de sílice mediante la formación de puentes de hidrógeno, por ser un grupo altamente polar. El grupo metilo disminuye la polaridad de los 2-metiltios, debido a que imposibilita la formación de puentes de hidrógeno.

Con relación a los puntos de fusión relativos, los compuestos sin sustituyente (1-4) y los diclorados (13-16) muestran una relación equiparable, en cuanto al incremento del punto de fusión y éste es el siguiente: 2-NH₂ > 2-SH > 2-CH₃ > 2-SCH₃. Este resultado es razonable, ya que una molécula, entre mayor sea la posibilidad para formar puentes de hidrógeno, mayor será su punto de fusión. Los compuestos monosustituídos, clorado en 5 (5-8) y clorado en 6 (9-12) muestran el siguiente comportamiento: 2-SH > 2-NH₂ > 2-SCH₃ > 2-CH₃. Nuevamente observamos que el grupo metilo disminuye el punto de fusión de los compuestos, debido a la incapacidad de formar puentes de hidrógeno.

5.1.2 Síntesis de las 1.2-Fenilendiaminas precursoras (21, 22, 31, 37 43).

Para preparar las N-metil-1,2-fenilendiaminas precursoras se realizaron dos estudios. En uno de ellos se partió del 2-cloronitrobenzeno adecuadamente sustituido y se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con metilamina al 30% en solución acuosa y etanol como disolvente (Esquema 10). Este proceso es el que se describe en la literatura para la preparación de este tipo de compuestos.^{48, 49, 51, 54, 56}



Esquema 10. Reacción de sustitución nucleofílica aromática estudiada.

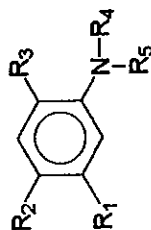
Si bien se obtiene el producto esperado, también se obtienen productos secundarios de reacción que dificultan la purificación y bajan los rendimientos considerablemente.⁷³ Este proceso se consideró impráctico para nuestros fines y no se continuó estudiando.

En otro estudio se introdujo el metilo en la posición adecuada, mediante la metilación con sulfato de dimetilo, de las 2-nitroacetanilidas convenientemente sustituidas (18, 28, 34, 40). Para este estudio se partió de las anilinas comerciales 17, 26, 32 y 38, las que se acetilaron fácilmente con anhídrido

acético y una cantidad catalítica de H_2SO_4 . Los rendimientos y pureza de los productos obtenidos fueron altos, por lo que los productos crudos (27, 33 y 39) se utilizaron para la reacción de nitración. Sin embargo, en cada caso se recristalizó una pequeña cantidad y se le determinó el punto de fusión el cual fue coincidente con el reportado en la literatura (Tabla 6). La nitración de la 4-cloroacetanilida (27) con H_2SO_4/HNO_3 según técnica reportada por Fitton y Smally^{56b} llevó a la 4-cloro-2-nitroacetanilida (28) en un 99 % de rendimiento, con alta pureza y punto de fusión semejante al reportado.^{56a} De igual forma se nitró la 3,4-dicloroacetanilida (39), pero en este caso junto al producto esperado 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (40) se obtuvo un producto secundario en un 17 % que correspondió a la 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (40b) la cual se pudo eliminar por recristalización de la mezcla cruda de reacción de metanol. El producto principal de esta reacción (40), tuvo un punto de fusión concordante con el reportado.⁶⁰ Para la nitración de la 3-cloroacetanilida se empleó una mezcla de anhídrido acético y HNO_3 fumante. De esta manera se favorece la nitración en la posición 2 sobre la 4, obteniéndose resultados semejantes a los reportados.^{56a} La separación de la 5-cloro-2-nitroacetanilida (34), producto principal, de la 3-cloro-4-nitroacetanilida, producto secundario, se logró por extracción con benceno del primero y posterior recristalización de etanol. Su punto de fusión también fue semejante al reportado.^{56a} En el caso de la 2-nitroacetanilida (18), no se realizó la reacción de nitración, ya que se partió de la 2-nitroanilina, la cual se acetiló con anhídrido acético y cantidades catalíticas de H_2SO_4 . Sin dicha catálisis, esta reacción no procedió, aún empleando cloruro de acetilo y calor.

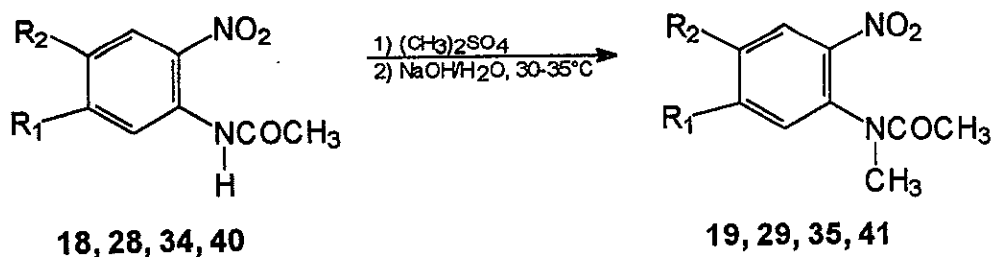
Partiendo de las 2-nitroacetanilidas adecuadamente sustituidas (18, 28, 34, 40), (Esquema 6) se logró la N-metilación de cada una de ellas con altos rendimientos, obteniéndose productos de reacción prácticamente puros. En esta parte se empleó un exceso de sulfato de dimetilo, el cual sirvió de disolvente a la vez. Controlando la temperatura entre 30-35 °C se logró la N-metilación y evitó la hidrólisis de la acetanilida, ambas reacciones facilitadas por el grupo nitro en posición orto, según se aprecia en el Esquema 11.

Tabla 6. Constantes físicas y rendimientos de los intermediarios sintetizados



No	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	F. M	P. M.	Ren d. %	Crist.	Edo. fis.	Rf (sist I)	pf °C Enc. y Rep.	Ref.	
18	H	H	NO ₂	COCH ₃	H	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	180.16	100	EtOH	Crist. amarillo osc.	0.38	93-94	93-94	52,53
19	H	H	NO ₂	COCH ₃	CH ₃	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃	194.21	93	EtOH	Liq. amarillo obsc.	0.07	36-37	35-38	54,55
20	H	H	NO ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	152.15	52	EtOH	Agujas rojizas	0.58	—	—	—
21	H	H	NH ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₁₀ N ₂	122.17	90	H ₂ O	Liq. café osc.	0.28	—	—	—
22	H	H	NH ₂	H	H	C ₆ H ₈ N ₂	108.16	87	H ₂ O	Sólido café claro	0.52 ^a	177-178	178-179	59
27	H	Cl	H	COCH ₃	H	C ₈ H ₈ CINO	169.61	99	AcOH-H ₂ O	Crist. blancos	0.08	99-101	100-101	56
28	H	Cl	NO ₂	COCH ₃	H	C ₈ H ₇ ClN ₂ O ₃	214.62	99	EtOH	Crist. amarillo pálido	0.33	90.5-91.5	—	—
29	H	Cl	NO ₂	COCH ₃	CH ₃	C ₉ H ₉ ClN ₂ O ₃	228.65	98	EtOH-H ₂ O	Crist. anaranjados	0.10	107-108	110	56
30	H	Cl	NO ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₇ ClN ₂ O ₂	186.61	78	EtOH-H ₂ O	Crist. anaranjados	0.54	—	—	—
31	H	Cl	NH ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₉ ClN ₂	156.63	90	EtOH	Liq. osc.	0.43, 0.55 ^a	78-79	77-78	59
33	Cl	H	H	COCH ₃	H	C ₈ H ₈ CINO	169.61	100	AcOH-H ₂ O	Crist. blancos	0.08	116-118	117-118	56
34	Cl	H	NO ₂	COCH ₃	H	C ₈ H ₇ ClN ₂ O ₃	214.62	77	EtOH	Crist. amarillo pálido	0.57	86-87	—	—
35	Cl	H	NO ₂	COCH ₃	CH ₃	C ₉ H ₉ ClN ₂ O ₃	228.65	92	EtOH	Crist. amarillo pálido	0.20	104-106	106-107	56,58
36	Cl	H	NO ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₇ ClN ₂ O ₂	186.61	98	EtOH	Agujas amarillos	0.70	—	—	—
37	Cl	H	NH ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₉ ClN ₂	156.63	85	EtOH	Liq. café osc.	0.72, 0.83 ^a	122-123	120.5	59
39	Cl	Cl	H	COCH ₃	H	C ₈ H ₇ Cl ₂ NO	204.06	100	EtOH	Crist. blancos	0.31	123-124	123-124	60
40	Cl	Cl	NO ₂	COCH ₃	H	C ₈ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₃	249.06	80	MeOH-H ₂ O	Crist. amarillo pálido	0.65	94-95	—	—
41	Cl	Cl	NO ₂	COCH ₃	CH ₃	C ₉ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₃	263.09	99	EtOH	Crist. amarillo pálido	0.68	146-148	148	60
42	Cl	Cl	NO ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	221.05	99	EtOH	Agujas anaranjadas	0.58	—	—	—
43	Cl	Cl	NH ₂	H	CH ₃	C ₇ H ₈ Cl ₂ N ₂	191.07	100	EtOH	Sólido rojo osc.	0.43 ^a	—	—	—

^a Sistema (III)



$\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ en 18, 19; $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{Cl}$ en 28, 29;
 $\text{R}_1=\text{Cl}, \text{R}_2=\text{H}$ en 34, 35; $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{Cl}$ en 40, 41;

Esquema 11. Reacción de N-metilación de las 2-nitroacetanilidas.²⁶

Por un lado el grupo nitro incrementa la acidez, facilitando la formación del N-anión, estabilizado doblemente por resonancia hacia el grupo nitro y hacia el carbonilo; por otro lado, incrementa el carácter electrofílico del carbonilo al deslocalizar el par de electrones del nitrógeno hacia el grupo nitro, lo cual lleva a un ataque de la base al carbonilo con la subsecuente hidrólisis de la acetanilida. El control de la reacción de N-metilación se logró manteniendo la temperatura entre 30-35°C. En algunos casos en que la temperatura paso de 40-45 °C, la reacción se disparó hasta la ebullición y se obtuvieron mezclas de reacción con varios productos. Los productos de N-metilación (19, 29, 35, 41) no han sido descritos con anterioridad en la literatura, en esta tesis se reportan sus propiedades físicas y espectroscópicas por primera vez. Tanto las 2-nitroacetanilidas precursoras (18, 28, 34, 40) como los productos de hidrólisis (20, 30, 36, 42) son compuestos conocidos, algunos de ellos se pueden adquirir comercialmente a precios elevados. Por último se describe la hidrólisis de las N-metil-2-nitroacetanilidas, la cual se llevó a cabo con H₂SO₄ conc. y calor, obteniéndose los compuestos 20, 30, 36 y 46 con excelentes rendimientos. La purificación de la mayoría de estos compuestos, se realizó por recristalización de

EtOH (Tabla 6). Estos productos se redujeron por hidrogenación catalítica con Pd/C y empleando etanol como disolvente y de esta manera se obtuvieron las N-metil-1,2-fenilendiaminas cocorrespondientes (21, 31, 37) como líquidos viscosos color café oscuro que en la en ccf mostraron dos manchas y los compuestos 22 y 43 se obtuvieron como sólidos que con el tiempo se fueron oscureciendo y en ccf mostraron una sólo mancha. Es importante mencionar que las N-metil-1,2-fenilendiaminas (21, 31, 37, 43) son compuestos novedosos. Debido a su alta inestabilidad las 1,2-fenilendiaminas se emplearon como tal en las reacciones siguientes para obtener los 1-metilbencimidazoles correspondientes.

5.1.3 Elucidación estructural de los compuestos 1-16.

De los derivados del 1-metilbencimidazol sintetizados en la presente investigación (1-16), únicamente en 5-cloro-1,2-dimetilbencimidazol (5) es conocido, aunque sintetizado por una ruta diferente⁵¹ y los compuestos restantes son novedosos.

La evaluación estructural de 1-16 se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. El análisis detallado de la información proporcionada por los espectros de RMN, IR, EM (Tabla 7), permitió comprobar que las estructuras de los compuestos 1-16 corresponden a los diseñados y sintetizados en este trabajo (Tabla 2).

Los espectros de IR (Espectros 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57 y 61), mostraron las bandas características para el núcleo del bencimidazol (~ 1550, 1490, 1321 cm^{-1}).⁷⁴ Para el caso de los compuestos 2, 6, 10 y 14 se observaron también dos bandas del alargamiento del enlace N-H, características de las aminas primarias (-NH₂) entre 3460-3374 y 3280-3306 cm^{-1} .

Con relación a los 2-mercapto-1-metilbencimidazoles (3, 7, 11 y 15) se observa un hombro pequeño correspondiente al enlace S-H a 2930-2700 cm^{-1} .

Las señales se observan en los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (Espectros 22-3, 6-7, 10-11, 14-15, 18-19, 22-23, 26-27, 30-31, 34-35, 38-39, 42-43, 46-47, 50-51, 54-55, 58-59 y 62-63), de la siguiente manera:

a) Las absorciones del grupo metilo unido al nitrógeno de la posición 1, aparecen en δH 3.475-3.810 y δC 25.318-30.864.

b) Las señales para los metilos unidos al carbono de la posición 2 de los compuestos 1, 5, 9 y 13 aparecen en δH 2.6-3.406 y δC 9.23-13.757.

c) Las señales amplias intercambiables con D_2O , indican la presencia de dos protones del grupo $-\text{NH}_2$ que aparecen en δH 6.0-6.676 (compuestos 2, 6, 10 y 14).

d) El intercambio de un protón con D_2O correspondiente al S-H (3, 7, 11 y 15), se indica por las señales que aparecen en δH 11.718-12.86.

e) Las absorciones del grupo metilíto ($-\text{SCH}_3$) de los compuestos 4, 8, 12 y 16 aparecen en δH 2.784-2.828 y δC 14.476-14.679.

La fórmula molecular (FM) de los compuestos se estableció por espectrometría de masas (EM) de alta resolución en su modalidad FAB^+ (Tabla 4) concordantes con m/z para $[\text{M}+\text{H}]^+$. La fórmula permite calcular 6 grados de insaturación, 4 de los cuales corresponden al anillo bencénico y los 2 restantes se deben al anillo imidazólico.

En el análisis de espectros de masas (Espectros 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60 y 64), el ión molecular $[\text{M}^+]$ correspondió al peso molecular del compuesto y que en la mayoría de los casos, también es el pico base (PB). La pérdida de los fragmentos $[\text{CH}_3]^+$, $[\text{CH}_3\text{NC}]^+$ y $[\text{HCN}]^+$ correspondientes a $[\text{M}-15]^+$, $[\text{M}-41]^+$ y $[\text{M}-27]^+$ son de abundancia considerable y fragmentaciones típicas de los 1-metilbencimidazoles.⁷⁴

Tabla 7. Datos espectroscópicos para los compuestos nuevos 1-16.

Comp.	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H en ppm	RMN ¹³ C en ppm	EM m/z (int. rel.)
1	3048, 2932, 1616, 1508, 1492, 1476, 1398, 1328, 1236, 1000, 734. Espectro 1.	2.6 (s, 3H, CH ₃ -C ₂); 3.67 (s, 3H, CH ₃ -N); 7.24 (m, 3H, Ar); 7.68 (m, 1H, H ₇). Espectro 2.	9.23(CH ₃ -C ₂); 25.33(CH ₃ -N); 104(C ₇); 115(C ₄); 118(C ₅ y C ₆); 132(C _{7a}); 138(C _{3a}); 148(C ₂). Espectro 3. (122, 54, 1(C _{7a}), 100, 300, 105, 139, 962(C ₆); 152.872(C ₂). Espectro 51.	M ⁺ 746 (100) [M-1] ⁺ 745 (54) [M-15] ⁺ 731 (28.7) Espectro 4. [M-1] ⁺ 215 (100) [M-15] ⁺ 199 (25) Espectro 52.
14	3462.02 y 3309.94, 3057.64, 1657.04, 1543.83, 1461.19, 1088.29, 856.64. Espectro 53.	3.495 (s, 3H, CH ₃ -N); 6.383 (sa, interc. con D ₂ O, 2H, NH ₂); 7.097 (s, 1H, H ₇); 7.308 (s, 1H, H ₄). Espectro 54.	28.038(CH ₃ -N); 107.742 (C ₇); 115.212(C ₄); 120.675(C _{3a}); 122.989 (C _{7a}); 133.607(C ₅); 141.033(C ₆); 155.913(C ₂). Espectro 55.	M ⁺ 215 (100) [M+2] ⁺ 216 (64.5) [M+4] ⁺ 218 (10.52) [M-1] ⁺ 214 (50) Espectro 56.
15	3031.59, 2930.79, 1491.91, 1484, 1321.13, 1296.50, 1093, 534.22. Espectro 57.	3.587 (s, 3H, CH ₃ -N); 7.221 (s, 1H, H ₇); 7.502 (s, 1H, H ₄); 12.842 (sa interc. con D ₂ O, 1H, SH). Espectro 58.	30.864(CH ₃ -N); 110.559 (C _{7a}); 111.455(C _{3a} y 7a); 119.581(C ₅); 132.772(C ₆); 164.500(C ₂). Espectro 59.	M ⁺ 232 (100) [M+2] ⁺ 234 (68.88) [M+4] ⁺ 236 (13.42) [M-33] ⁺ 199 (30) Espectro 60.
16	3011, 2930.61, 1462.3, 1446, 1418.49, 1356, 1298, 867.44, 859.92. Espectro 61.	2.784 (s, 3H, CH ₃ -S); 3.607 (s, 3H, CH ₃ -N); 7.277 (s, 1H, H ₇); 7.700 (s, 1H, H ₄). Espectro 62.	14.506(CH ₃ -S); 30.089(CH ₃ -N); 109.557(C ₇); 119.033(C ₄); 125.515(C _{3a}); 125.635(C _{7a}); 136.06(C ₅); 142.528(C ₆); 155.786(C ₂). Espectro 63.	M ⁺ 246 (100) [M+2] ⁺ 248 (59) [M+4] ⁺ 250 (13.5) [M-33] ⁺ 213 (65) [M-45] ⁺ 200 (60) Espectro 64.

J=Hz.

5.1.4 Elucidación estructural de las N-metil-2-nitroacetanilidas (29, 35 , 41).

El análisis de los espectros de IR (Espectros 65, 69 y 73), correspondientes a los compuestos 29, 35 y 41 respectivamente; nos indican señales en 3036, 3098 y 3093.45, características de enlaces π (C=C); en estos espectros se observa la inexistencia de la señal típica de alargamiento N-H confirmando la metilación de la acetanilida correspondiente: Se aprecia también, la señal de 1660-1676.03 característica del carbonilo de amida terciaria. Para los compuestos 29 y 35 se corrobora la trisustitución respectiva (1, 2, 4) y (1, 2, 5) por las señales a 878-900 cm^{-1} comprobables por los sobretonos en la región entre 1600 a 2000 cm^{-1} . Con relación al compuesto 41, se aprecia la tetrasustitución 1, 2, 4, 5 del anillo aromático por las señales en 840-900 cm^{-1} y los sobretonos en la región 1600 a 2000 cm^{-1} del espectro correspondiente.

Las señales de RMN (Espectros 66-67, 70-71 y 74-75) muestran señales duplicadas para cada uno de los δH y δC (Tabla. 8). Este hecho puede explicarse, a que la molécula pierda libertad de giro a través de los enlaces del N de la acetanilida y se ancle, generando así, señales duplicadas correspondientes a cada uno de los isómeros.

La fórmula molecular (FM) se determinó por espectrometría de masas (EM) de alta resolución en su modalidad FAB^+ con señales de m/z correspondientes a $[\text{M}+1]^+$ y en donde el ión molecular es el pico base (PB). (Tabla 8).

Tabla 8. Datos espectroscópicos para las N-metil-2-nitro acetanilidas (29, 35, 41) y el producto secundario 40b.

Comp.	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H en ppm	RMN ¹³ C en ppm	EM m/z (int. rel.)
29	3036, 2934, 1660, 1535, 1486, 1360, 768, 562, 526. Espectro 65.	1.836 y 2.250(s,3H,CH ₃ -CO); 3.199 y 3.450(s,3H,CH ₃ -N); 7.373(d,J=8.4,1H,H ₆); 7.686(dd,J=2.4 y 8.4,1H,H ₅); 7.984(dd,J=2.4,1H,H ₃). Espectro 66.	21.763 y 21.83(CH ₃ -N); 36.464 y 38.937(CH ₃ -O); 125.02 y 125.555(C ₆); 130.152 y 132.05(C ₃); 133.119 y 133.961(C ₄); 134.496 y 134.977(C ₁); 135.565 y 135.859(C ₅); 146.417 y 146.645(C ₂); 169.432 y 171.022(CO). Espectro 67.	M ⁺ 229. (100); [M+2] ⁺ 237(33) [M-47] ⁺ 182 (95) [M-43] ⁺ 186 (90) Espectro 68.
35	3098, 1660, 1520.77, 1350.85, 1001.77, 921.93, 837.74. Espectro 69.	1.852 y 2.249(s,3H,CH ₃ -CO); 3.212 y 3.439(s,3H,CH ₃ -N); 7.353(d,J=2.4,1H,H ₆); 7.577(dd,J=2.4 y 9.0,1H,H ₅); 7.993(dd,J=9.0,1H,H ₃). Espectro 70.	21.763 y 21.856(CH ₃ -N); 36.478 y 38.937(CH ₃ -O); 126.196 y 126.798(C ₆); 127.894 y 129.324(C ₄); 129.564 y 131.008(C ₃); 138.332 y 138.679(C ₁); 139.735 y 140.216(C ₂); 144.747(C ₅); 169.258 y 171.049(CO). Espectro 71.	M ⁺ 229(16.4); [M-47] ⁺ 182 (100) [M+2] ⁺ 231 (6) Espectro 72.
41	3093.45, 2928.45, 1676, 1654.47, 1527.75, 1471.56, 1391.25, 1349.58, 1158, 896.57, 794. Espectro 73.	1.858 y 2.246(s,3H,CH ₃ -CO); 3.195 y 3.445(s,3H,CH ₃ -N); 7.482 y 7.595(s,1H,H ₆); 8.101 y 8.192(s,1H,H ₃). Espectro 74.	21.683 y 21.843(CH ₃ -N); 36.478 y 38.843(CH ₃ -O); 126.544 y 127.159(C ₆); 130.714 y 132.478(C ₃); 131.689 y 133.627(C ₄); 136.314 y 136.688(C ₂); 138.185 y 138.813(C ₅); 144.578(C ₁); 169.088 y 171.076(CO). Espectro 75.	[M+1] ⁺ 263 (100) [M+2] ⁺ 265 (65.1) [M+4] ⁺ 267 (10.96) [M-46] ⁺ 216 (95) [M-42] ⁺ 220 (94) Espectro 76.
40b	3223.4, 2992.25, 2688.96, 1662.44, 1541.96, 1512.66, 1356.97, 829.33. Espectro 77.	2.208(s,3H, CH ₃ -CO); 7.585(d,J=9.0,1H,H ₆); 7.931(sa,interc.con D ₂ O,1H,NH) 8.115(d,J=9.0,1H,H ₃). Espectro 78.	24.450(CH ₃ -N); 123.077(CH ₃ -O); 125.259(C ₃); 129.909(C ₄); 129.961(C ₁); 132.377(C ₅); 141.0(C ₂); 168.612(CO). Espectro 79.	[M] ⁺ 248 (13) [M+2] ⁺ 250 (8) [M+4] ⁺ 252 (1.6) [M-42] ⁺ 206 (100). Espectro 80.

J=Hz.

5.1.5 Elucidación estructural del producto secundario 40b.

Durante la síntesis de **40** se obtuvo un subproducto de nitración correspondiente al 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (**40b**), el cual se aisló de las aguas madres de recristalización de **40**, obteniéndose un sólido blanquesino con pf coincidente con el reportado⁶⁰ para dicho isómero, además el análisis de su espectro de IR (Espectro 77), mostró señales a 3223.4 cm^{-1} correspondiente al alargamiento del enlace N-H de amina secundaria; la señal 1662.44 cm^{-1} del grupo carbonilo de amida secundaria y a $760\text{-}860\text{ cm}^{-1}$, los sobretonos característicos de una tetrasustitución 1, 2, 3, 4 del anillo bencénico, confirmada por las señales a $1800\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$. La espectroscopía de RMN ^1H (Espectro 78) permitió corroborar su estructura, mostrando señales en δH 2.208 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$); 7.585 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H_6); 7.931 (sa, intercambia con D_2O , 1H, NH) y 8.115 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H_5).

5.2 Parte biológica.

Toxicidad para *Artemia salina* de los 1-metilbencimidazoles. Todos los 1-metilbencimidazoles sintetizados en este trabajo se sometieron a evaluación contra el crustáceo *Artemia salina*. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 9. En este ensayo se utilizaron bencimidazoles comerciales, como compuestos antihelmínticos de referencia, estos fueron el triclabendazol, albendazol y mebendazol; siendo el triclabendazol el más tóxico de los tres. También se aprecia claramente que los compuestos **2**, **13** y **16** presentaron la mayor actividad tóxica en relación al resto de los 1-

metilbencimidazoles, e inclusive fueron más tóxicos que los de referencia. Debido a que el triclabendazol es el único compuesto de referencia que guarda cierta semejanza estructural con cuatro de los compuestos 1-metilbencimidazólicos (4, 8, 12 y 16), pues posee un grupo metilío (-SCH₃) en la posición 2. Se comparó su efectividad entre ellos observándose la relación siguiente: 16 >triclabendazol>8>12>4. Estos resultados nos permiten visualizar que probablemente para este tipo de ensayo la presencia del metilo en la posición 1 no disminuye la toxicidad de los 1-metilbencimidazoles.

Tabla 9. Toxicidad para *Artemia salina* de los 1-metilbencimidazol sintetizados (1-16).

<u>Compuesto</u>	<u>CL₅₀ (ppm).</u>	<u>Compuesto</u>	<u>CL₅₀ (ppm).</u>
1	62.4600	11	>1000
2	0.2590	12	9.2700
3	2.4000	13	0.1909
4	10.3700	14	10.3700
5	7.6540	15	11.4900
6	75.2400	16	0.1308
7	83.2200	Triclabendazol	0.5332
8	0.7470	Albendazol	2.4000
9	32.5100	Mebendazol	34.1900
10	148.9300		

Toxicidad para *Microbrachium tenellum* (Smith, 1871) de los 1-Metilbencimidazoles Los resultados de la toxicidad de los compuestos 8, 12 y 16 sobre el camarón de agua dulce, se registran en la Tabla 10. Donde el compuesto 16 también resultó ser el más activo de los compuestos probados en este ensayo e inclusive resultó ser más tóxico que el triclabendazol y albendazol, bencimidazoles comerciales empleados como referencia para este ensayo. La actividad entre los 1-metilbencimidazoles fue la siguiente: 16>8>12.

Tabla 10. Toxicidad para los camarones de agua dulce *Macrobrachium temellum* (Smith, 1871) de los 1-metilbencimidazoles.

<u>Compuesto</u>	<u>CL₅₀ (ppm)</u>
8	0.2567
12	2.1000
16	0.0169
Albendazol	0.1385
Triclabendazol	0.1000

Toxicidad para la larva J2 *Meloidogyne incognita* (in vitro).

Se evaluó el efecto nematocida de los compuestos 8, 12 y 16 sobre la larva J2 *M. incognita* (nemátodo que infecta al tomate), los resultados se muestran en la Tabla 11. Como se puede apreciar por los datos de % de sobrevivencia, que el grado de toxicidad es 16>8>12 y los % de recuperación a las 24 h demuestran que el grado de toxicidad es en el siguiente orden 8>12~16. Con estos resultados podemos inferir una actividad nematostática a 12 y 16 y una actividad nematocida al compuesto 8.

Tabla 11. Efecto de algunos 1-metilbencimidazoles sobre la sobrevivencia de la larva J-2 de *Meloidogyne incognita* in vitro.

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración</u> (ppm)	<u>% de sobrevivencia</u>	<u>% de recobro</u> (24 horas)
8	Control	95.0±5.77	-
	50	15±5.77	15
	100	7.5±9.57	0
	200	00±00	0
	Control	95.0±5.77	-
12	50	17.5±8.0	80
	100	12.3±9.57	60
	200	7.5±9.57	40
	Control	80±8.16	-
16	50	0.0	80
	100	0.0	50
	200	0.0	50
	Control	80±8.16	-

Efecto antiprotozorico para *Giardia lamblia* de los 1-metilbencimidazoles. Se realizaron pruebas de susceptibilidad *in vitro* del protozooario *G. lamblia* a 13 de los 1-metilbencimidazoles sintetizados en este trabajo. Los resultados se muestran en la Tabla 12, donde se puede apreciar que la mayoría de los compuestos son realmente efectivos contra el trofozoito del parásito, especialmente los compuestos 9 y 10, clorados en la posición 6. Es importante mencionar que la efectividad de dichos compuestos fue superior a la del albendazol y a la mostrada por el metronidazol, fármaco de elección para el tratamiento de la giardiosis. Los compuestos clorados en la posición 5 (5-8), también son efectivos contra el parásito e incluso mejor que el metronidazol, exceptuando al compuesto 7 que no presento efecto marcado sobre el parásito. Los compuestos 13-16 (diclorados en posición 5 y 6) presentaron actividad superior que el metronidazol. Estos resultados parecen indicar que los sustituyentes en posición 2 no influyen de manera relevante sobre el efecto antiprotozoario; preferentemente la presencia del cloro en posición 5 o 6 es de mayor importancia sobre la actividad biológica.

Tabla 12. Toxicidad para el protozoario *Giardia lamblia* de los 1-metilbencimidazoles.

<u>Compuesto</u>	<u>CI₅₀</u>
Metronidazol.	0.21
Mebendazol	0.06
Albendazol	0.01
1	0.56
2	0.15
5	0.18
6	0.09
7	4.13
8	0.14
9	0.001
10	0.002
12	0.1
13	0.15
14	0.19
15	0.09
16	0.15

CI₅₀=Concentración Inhibitoria media en µg/mL.

Evaluación de la actividad antihelmíntica de los 1-metilbencimidazoles sobre *Trichinella spiralis*. En esta evaluación se utilizó únicamente el albendazol como control, mostrando una reducción de la viabilidad del parásito adulto a concentraciones de 1µg/mL en un 28 % pero al aumentar la concentración a 10 µg/mL la actividad aumentó a un 31 %; en

cuanto a la actividad sobre la larva muscular (LM), fue semejante a 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (22 y 23 % respectivamente).

En relación a los 1-metilbencimidazoles evaluados, observamos que sólo el compuesto 1 (sin sustituyente en 5 y 6 y un grupo $-\text{CH}_3$ en la posición 2) presentó actividad contra la fase extraintestinal del parásito a las concentraciones probadas, sin embargo, este compuesto también fue efectivo contra el organismo adulto, y al igual que el albendazol, el compuesto 1 al aumentar la concentración a 10 $\mu\text{g/mL}$, la efectividad aumentó considerablemente de 6 a 51 %.

De la serie de los compuestos clorados en la posición 5 (Serie B), los compuestos 7 ($-\text{SH}$ en posición 2) y 8 ($-\text{SCH}_3$ en posición 2), fueron efectivos contra el adulto a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, a concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$, únicamente 7 mejoró ligeramente su efectividad en un 28%. Aunque la viabilidad de la larva muscular, sólo se vio afectada por 8, esta efectividad disminuyó al aumentar la concentración a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Con relación a los compuestos clorados en la posición 6 (Serie C), el compuesto 9 ($-\text{CH}_3$ en posición 2), resultó efectivo contra el adulto (25%), sin embargo, al aumentar la concentración, éste perdió su actividad a un 14%; una situación contraria, se observó con el compuesto 12 ($-\text{SCH}_3$ en la posición 2) a 10 $\mu\text{g/mL}$ el efecto sobre la viabilidad del parásito aumentó (de 14 a 26%). Ninguno de estos compuestos fue efectivo contra la larva muscular de *T. spiralis*.

Finalmente los compuestos diclorados en 5 y 6 (Serie D), los compuestos 13 ($-\text{CH}_3$ en posición 2) y 16 ($-\text{SCH}_3$ en posición 2), a las dos concentraciones probadas, redujeron la viabilidad del organismo adulto. Sin embargo la actividad contra la larva muscular del parásito, fue mayor con todos los compuestos de esta serie, sin importar el tipo de sustituyente en la posición 2 del núcleo 1-metilbencimidazólico y al aumentar la concentración a 10 $\mu\text{g/mL}$, la actividad aumentó de manera importante. Incluso estos compuestos en esta fase del parásito, en ambas concentraciones probadas, la actividad fue mayor que la del propio albendazol.

Del análisis anterior es evidente que los compuestos 8 y 16 (monoclorado en 5 y diclorado respectivamente), ambos con un grupo $-SCH_3$ en posición 2 y los compuestos 1 y 13 (sin sustituyente y diclorado respectivamente) con un grupo $-CH_3$ en posición 2, son efectivos contra ambas fases del parásito. Los compuestos 7, 9 y 12 (monoclorado en 5, monoclorado en 6 y diclorado) con sustituyentes $-SH$, $-CH_3$ y $-SCH_3$ respectivamente en posición 2, sólo fueron efectivos contra la fase adulta. En todos los compuestos con sustituyente $-NH_2$ en posición 2 (2, 6, 10 y 14), la actividad contra la fase adulta fue nula, mejorando mínimamente contra larvas musculares, destacando en este caso el compuesto 14. La explicación a este hecho podría ser a que los componentes de superficie del adulto y de la larva muscular son estadio-específicos,⁷⁵ lo que posiblemente tenga influencia sobre la permeabilidad a los compuestos. Es importante asentar que los sustituyentes $-CH_3$ y $-SCH_3$, confirieron mayor actividad antihelmíntica a los derivados del 1-metilbencimidazol evaluados, y el hecho que los compuestos 1 y 13 (sin sustituyente y diclorado) sustituidos con un grupo $-CH_3$ en la posición 2, hayan sido efectivos contra la fase intra y extraintestinal del parásito, confirma que el grupo $-CH_3$ confiere una gran actividad a la molécula de los 1-metilbencimidazoles.

Tabla 13. Porcentaje de reducción de la viabilidad del adulto y larva muscular (LM) de *Trichinella spiralis* de los derivados del 1-metilbencimidazol.

Serie	Comp.	Adulto 1µg/mL	Adulto 10µg/mL	LM 1µg/mL	LM 10µg/mL
	Albendazol	28±7	31±10	22±12	23±14
A					
	1	6	51±2	25±6	25±17
	2	NR	NR	9±8	NR
B					
	5	8	NR	14±2	13±5
	6	NR	NR	12±1	16
	7	23±12	28±21	7±4	18±6
	8	34±12	24±4	24±10	16±10
C					
	9	25	16	14±4	19±1
	10	NR	NR	14±4	15
	12	14±7	26	9±5	12
D					
	13	23	23±13	24±6	27±8
	14	NR	NR	26±2	34±4
	15	15	15	30±6	37±3
	16	29±5	27±4	22±11	46±5

El porcentaje de reducción de la viabilidad del parásito se calculó con respecto al control. NR=No Redujo.

5.3 Estudios de microscopía electrónica.

Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (Figura 1), se aprecia el daño producido por los compuestos 9 y 13 a los trofozoítos de *G. lamblia*, en comparación con los daños producidos por el albendazol. Se observa que el albendazol produce alteración importante de la forma celular con daño especial del disco de adhesión (Figura 1 B), en cambio el daño producido por los 1-metilbencimidazoles afecta principalmente a la membrana celular, observándose un gran número de orificios que le dan un aspecto "poroso" a la célula sin afectar el disco de adhesión (Figura 1 C y D). Por microscopía electrónica de transmisión (Figura 2 C y D) se muestran las alteraciones producidas por 9 y 13 a los trofozoítos del parásito. Se observa un aumento de las vesículas submembranales, pero sin alteración del citoesqueleto (el disco de adhesión se encuentra íntegro).

En estudios de microscopía electrónica de barrido, se muestra que los compuestos 8 y 12 dañan al organismo adulto de *T. spiralis*, ocasionándole mayores alteraciones a nivel cuticular que el mismo albendazol (Figura 3).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

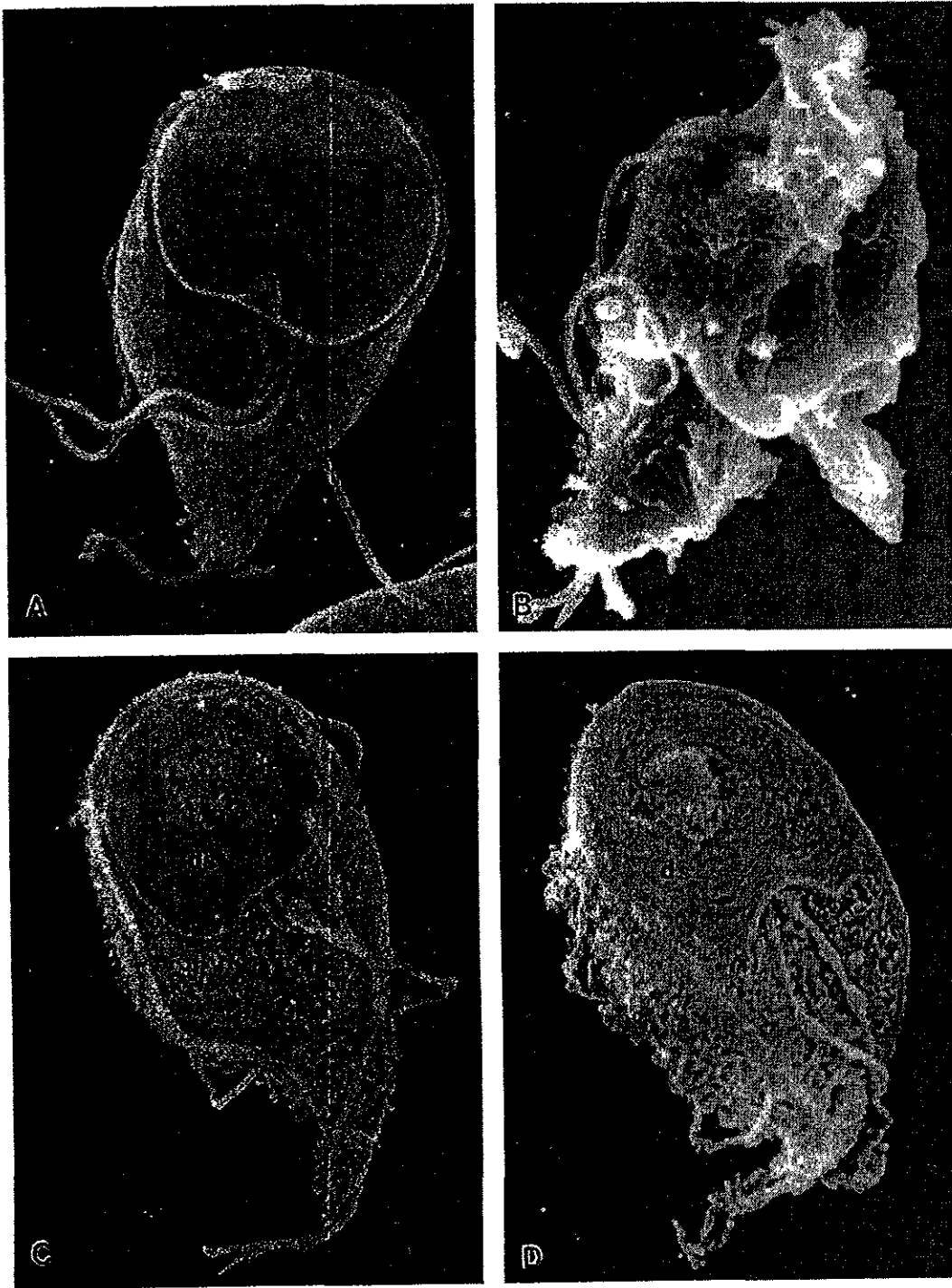


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de los trofozoítos de *G. lamblia* cultivados en presencia de albendazol (B), compuesto 13 (C) y el compuesto 9 (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de los diferentes bencimidazoles a 1 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h a 37°C. El control fueron parásitos cultivados sin fármaco (A). ds=disco de adhesión.

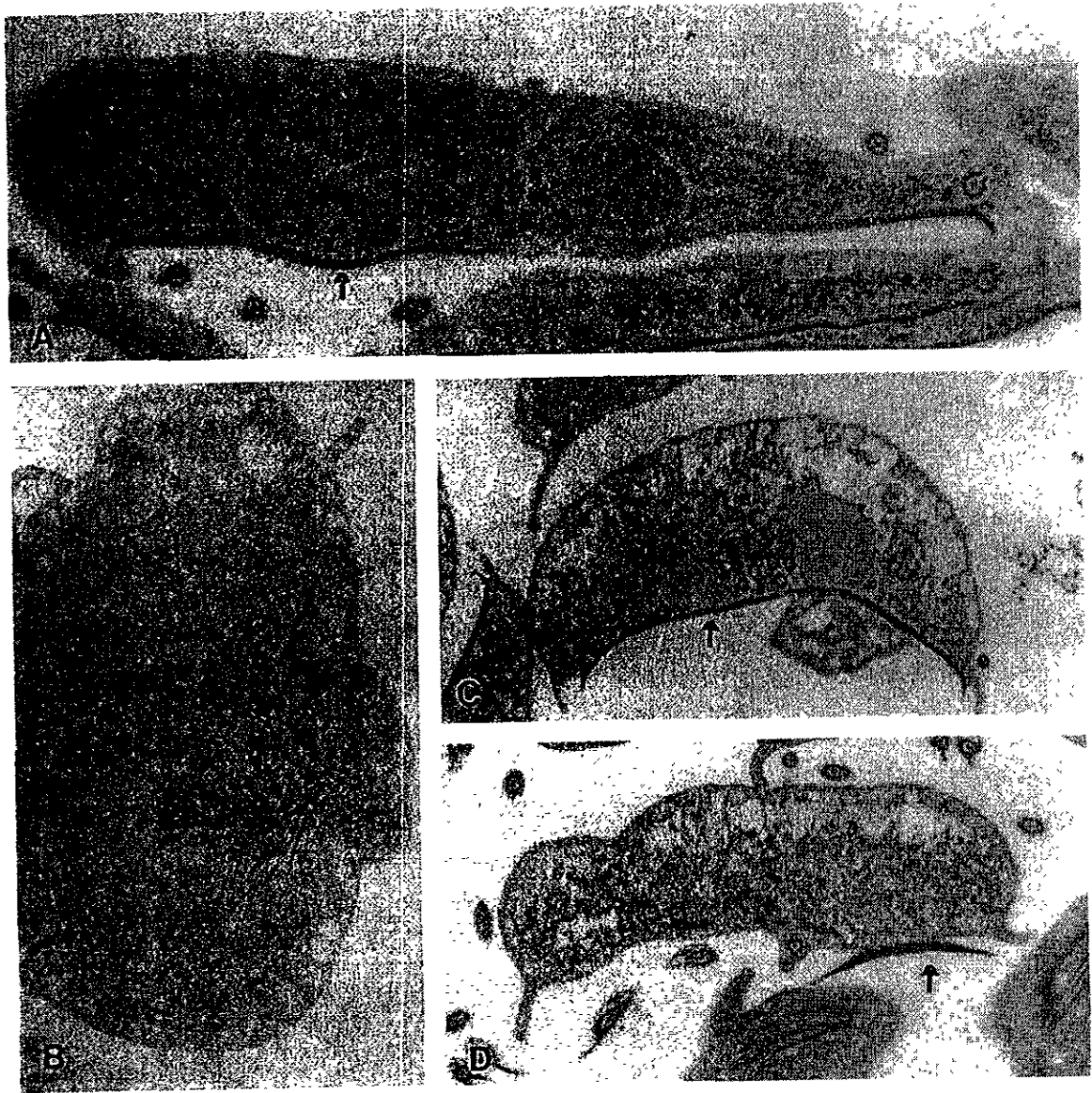


Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de *G. lamblia* cultivados en presencia de albendazol (B), 13 (C) y 9 (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de los diferentes bencimidazoles a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h a 37°C. El control fueron parásitos cultivados sin fármacos (A). La flecha indica el disco de adhesión.

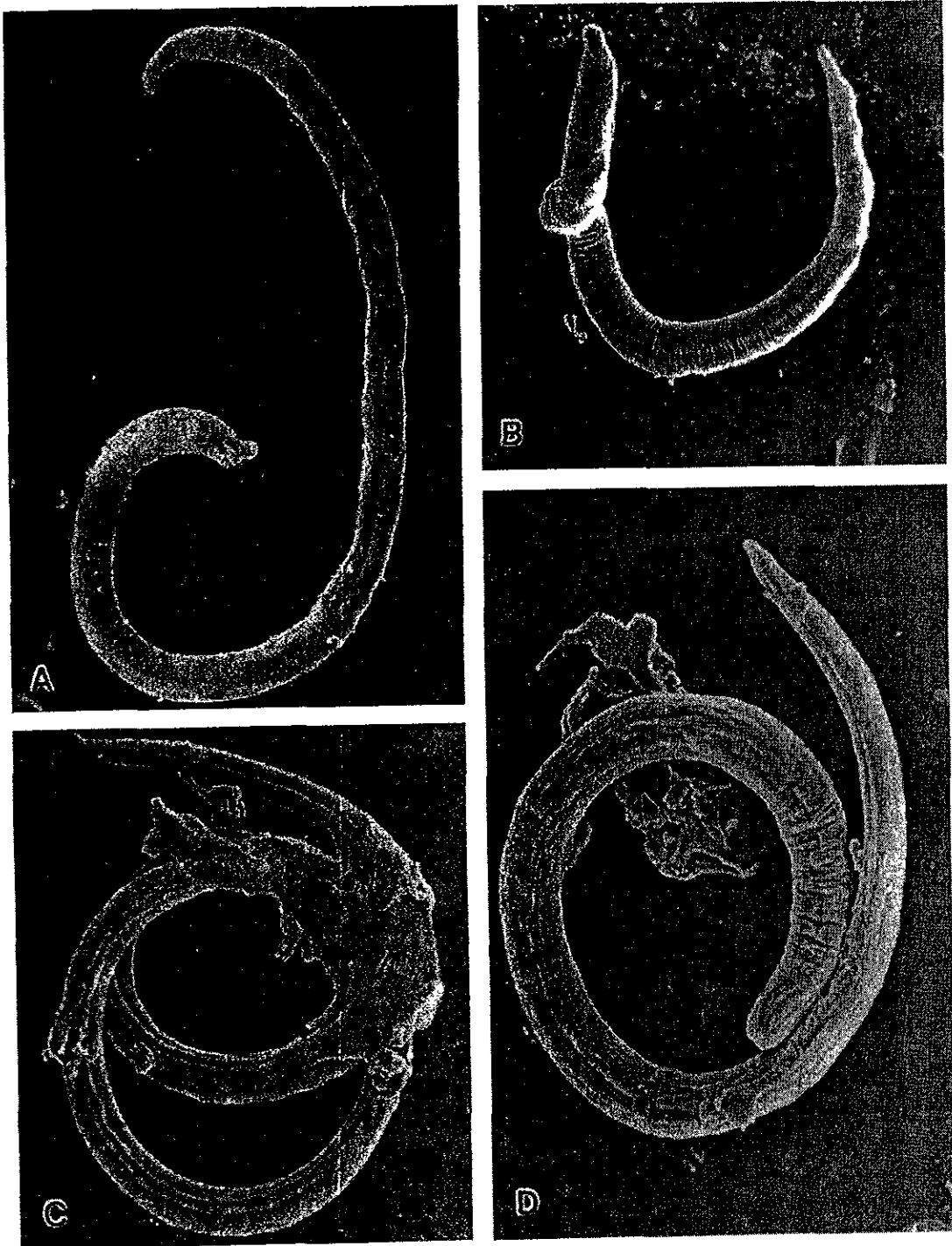


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de los organismos adultos de *T. spiralis* cultivados *in vitro* con albendazol (B), 8 (C) y 12 (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de los diferentes bencimidazoles ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) por 3 días a 37°C bajo atmósfera de CO_2 al 5%. El control fueron parásitos cultivados sin fármacos (A).

VI. CONCLUSIONES

Después de finalizada la parte experimental y una vez cubiertos los objetivos planteados al inicio de este trabajo, se concluye lo siguiente:

Se logró la preparación de 16 derivados del 1-metilbencimidazol; y excepto los compuestos 2 y 5, 14 de ellos fueron químicamente novedosos. Con relación a los 22 compuestos intermediarios, 5 de ellos no se encontraron reportados en la literatura. La estructura de los derivados del 1-metilbencimidazol y la de sus intermediarios de síntesis se logró establecer por análisis de datos espectroscópicos.

En general los 1-metilbencimidazoles se obtuvieron con rendimientos aceptables, puntos de fusión menores y de mayor solubilidad frente a disolventes orgánicos, en comparación a los bencimidazoles antihelmínticos existentes en el mercado (albendazol, triclabendazol y mebendazol).

Se encontró que la toxicidad para *A. salina* de los bencimidazoles arriba mencionados, fue la siguiente: triclabendazol > albendazol > mebendazol. Y de los 1-metilbencimidazoles, el compuesto 16 fue el más tóxico (16 > 13 > 2 > 8 > albendazol). El efecto tóxico observado sobre el % de sobrevivencia de las larvas J2 de *M. incognita* fue: 16 > 8 > 12. Esta misma relación se conserva en el efecto tóxico sobre el camarón de agua dulce *M. tenellum*. Extrapolando estos resultados con los obtenidos para *A. salina* se puede apreciar que guardan relación semejante.

Sin importar el tipo de sustituyente en la posición 2, los 1-metilbencimidazoles, mostraron buena actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia*, incluso fueron más efectivos que el metronidazol. Sin embargo, es importante mencionar que la presencia del cloro en las posiciones 5 y/o 6, le dio

mayor actividad a la molécula, pudiera ser a que de alguna manera aminora el metabolismo temprano que sufren los bencimidazoles sin sustituyente en esta posición.

El compuesto **9**, monoclorado en 6, fue 10, 60 y 200 veces más efectivo que el albendazol, mebendazol y metronidazol respectivamente.

Los compuestos **8**, **13** y **16** fueron efectivos contra *T. spiralis* en ambas fases del parásito. Destaca notablemente que los compuestos **13-16**, diclorados, fueron especialmente activos contra la larva muscular de *T. spiralis*, aumentando su efectividad al incrementar su concentración.

Debido al hecho que el compuesto **1** sin sustituyente en 5 y 6 pero con sustituyente metilo en posición 2 haya sido efectivo contra la fase intra y extraintestinal del parásito, nos hace pensar que el grupo metilo confiere una gran actividad a la molécula de los 1-metilbencimidazoles.

Con relación a los estudios de microscopía electrónica de barrido y de transmisión, en el caso de *G. lamblia* se evidencia que los compuestos **9** y **13** (monoclorado en 5 y diclorado, respectivamente), ambos con sustituyente metilo en la posición 2, producen daño a nivel de membrana únicamente, sin alterar el citoesqueleto, pues el disco de adhesión se observa intacto. Con relación a *T. spiralis* se observó que los compuestos sólo dañan la cutícula del organismo adulto, y en el caso de los compuestos **8** y **12** producen un daño mayor que el propio albendazol. Estos hallazgos son importantes e interesantes, pues debido a que los 1-metilbencimidazoles no alteran el disco de adhesión de *G. lamblia*, estructura con alto contenido de tubulina, indica que su mecanismo de acción es totalmente diferente al del albendazol. Este hecho apoya a la teoría que el H de la posición 1 de los bencimidazoles es imprescindible para la unión a la tubulina. De manera similar, los 1-metilbencimidazoles, dañaron mayormente a la cutícula del parásito que el propio albendazol.

Con todas estas aseveraciones podemos confirmar que el mecanismo de acción de los 1-metilbencimidazoles es diferente al del albendazol.

A pesar de que los compuestos más tóxicos para *A. salina* (16 > 13 > 8) fueron efectivos contra las dos fases de *T. spiralis*, sólo se observa relación semejante en contra de la larva muscular del parásito a 10 µg/. Confrontando la toxicidad para *A. salina* frente a la actividad antiprotozoaria de los 1-metilbencimidazoles, no se encontró correlación alguna.

Cabe señalar que aunque estos análisis son preliminares, son alentadores para continuar con nuevos estudios de la actividad de los 1-metilbencimidazoles.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- En esta tesis se utiliza la nueva nomenclatura para las enfermedades parasitarias. Kassai, T.; Córdero del Campillo, M.; Euzeby, J; Gaafar, S. 1988, *Vet. Parasitology*, **29**. 299-326.
- 2.- Horton, R. J. 1990, Benzimidazoles in a Wormy World, *Parasitol. Today*, **6**. 106.
- 3.- Stoll, N. 1947, *J. Parasitol.* **33**. 1-18.
- 4.- Walsh, J. y Warren, K. 1979, *New Eng. J. Med.* **301**. 967-974.
- 5.- Pawlowsky, Z. 1984, *Fed. Proc.* **43**. 260-265.
- 6.- Janssen, P. A. J. 1974, Recent Advances in the Treatment of Parasitic Infections. *Prog. Drug Res.* **18**. 191-203.
- 7.- D'Arcy, P. F. y Harron, D. W. G. 1983. *Pharm. Int.* **4**, 16-20.
- 8.- Kvalsvig, J. D.; Cooppan, R. M. y Connolly, K. J. 1991. The Effects of Parasite Infections on Cognitive Processes in Children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**, 551-568.
- 9.- Shofield, C. J. 1985. *Parasitol. Today*, **1**, 2.
- 10.- Stephenson, L. S.; Latham, M. C. y Oduori, M. 1980. *J. Trop. Pediatr.* **26**, 246-263.
- 11.- Cabrera, B. D. 1984. *World Health* **38**, 8-9.
- 12.- Janssen, P. A. J. y Van den Bossche, H. 1982. *Scand, J. Infect. Dis.* **36**, (suppl.), 52-57.
- 13.- Hoagland, k. E. y Schad, G. A. 1978. *Exp. Parasitol.* **44**, 36-49.
- 14.- Urquhart, G. M. 1983. *Hellenic Vet. Med.* **26**. 36-49.
- 15.- Simpson, J. R.; Kunkle, W.; Courtney, C. H. y Shearer, J. K. 1985. *Agri. Pract.* **6**, 20-224; 1985. *Helm. Abstr.* **54**, 3933.
- 16.- Cambell, W. C. 1983. "Trichinella and Trichinosis". Plenum Press, New York.
- 17.- Sharma, S. 1994. Design of New Drug for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles. *Adv. Drug. Res.* **25**, 103-172.
- 18.- Brown, H. D.; Matzuk, A.-R.; Ilves, I. R.; Peterson, L.; Harris, S. A., Sarett, L. H.; Egerton, J. R.; Yakstis, J. J.; Cambell, W. C. y Cucker, A. C. 1961.

- Antiparasitic Drugs IV. 2-(4'-Thiazolyl)benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1764-1765.
- 19.- Tocco, D. J. 1964. The Metabolic Fate of Thiabendazole in Sheep. *J. Med. Chem.* **7**, 399-405.
- 20.- McCracken, R. O. 1978. Efficacy of Mebendazole and Albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *J. Parasitol.* **64**, 214-219.
- 21.- Jung, H.; Sánchez, M.; Medina, M. T.; Hurtado, M. y Sotelo, J. 1992. Clinical Pharmacokinetics of Albendazole in Patients with Brain cisticercosis. *J. Clin. Pharmacol.* **32**, 28-31.
- 22.- Ramalingam, S.; Sinniah, B. y Krishnan, U. 1983. Albendazole an Effective Single Dose, Broad Spectrum Anthelmintic Drug. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 984-1989.
- 23.- Ciba-Geigy A. G. Pat. Belg. 865, 870 (1978) Pat. U. S. 4, 197, 308 (1980); C. A. 90, 137817z (1979).
- 24.- The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th Ed. Merck & Co., Inc. N. J. EUA. 1996, compuesto 9784, 1645.
- 25.- Thorpe, P. J. 1984. *Drug of the Future*, **9**, 593-594.
- 26.- Townsend, L. B. y Wise, D. S. 1990. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles, *Parasitol. Today*, **6**, 107-112.
- 27.- Sharma, S. y Abuzar, S. 1983. The Benzimidazole Anthelmintics-Chemistry and Biological Activity. *Prog. Drug Res.* **27**, 85-161.
- 28.- Friedman, P. A. y Platzer, E. G. 1980. Interaction of Anthelmintic Benzimidazoles with *Ascaris suum* Embryonic Tubulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **630**, 271-278.
- 29.- Lacey, E. y Watson, T. R. 1985. Structure-Activity relationships of Benzimidazole Carbamates as Inhibitors of Mammalian Tubulin, *in vitro*. *Biochem, Pharmacol.* **34**, 1073-1077.
- 30.- Lacey, E. 1988. The Role of Cytoskeletal Protein, Tubulin, in the Mode of Action and Mechanism of Drug Resistance to Benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* **18**, 885-936.

- 31.- Karanurakaran, C. S. y Denham, D. A. 1980. A Comparison of the Anthelmintic Effects of Oxfendazole and Oxibendazole on *Trichinella spiralis* in mice. *J. Parasitol.* **66**, 929-932.
- 32.- Delatour, P.; Cure, M. C.; Benoit, E. y Garnier, F. 1986. Netobimin (Tatobin-Sch): Preliminary Investigations on Metabolism and Pharmacology. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **9**, 230-234.
- 33.- Walchshofer, N.; Delabre-Defayolle, I.; Paris, J. y Petavy, A. F. 1990. *In vivo* Morphological Damage Induced by a New Benzimidazole Prodrug in *Echinococcus multilocularis* Metacestodes. 1990. *J. Pharm. Sci.* **79**, 606-608.
- 34.- Grzwiniski, L. y Karmanska, K. Efficacy of Luxabendazole Against Different Stages of *Trichinella spiralis*. 1988. Proceedings of the 7th International Conference in Trichinellosis. Edited by Tanner Ch., Martínez-Fernández, A. y Bolás-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 490-496.
- 35.- Novak, M. y Blackburn, B. J. 1981, Anthelmintic Activity of Several 5-Substituted Benzimidazolyl Carbamates Against *Hymenolepis nana* Cysticercoids. *Experientia*, **37**, 250-251.
- 36.- Cedillo-Rivera, R. y Muñoz, O. 1992. *In Vitro* Susceptibility of *Giardia lamblia* to Albendazole, Mebendazole and Other Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Microbiol.* **37**, 221-224.
- 37.- Chavéz, B.; Cedillo-Rivera, R. y Martínez-Palomo, A. 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the *In Vitro* Effects of Benzimidazoles. *J. Protozool.* **39**, 510-515.
- 38.- Fears, S. D. y O'Hare, J. 1988. *In Vitro* Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to Fifty Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 144-146.
- 39.- Hall, A. y Nahar, Q. 1993. Albendazole as a Treatment for Infections with *Giardia duodenalis* in Children in Bangladesh, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 84-86.
- 40.- Romero-Cabello, R.; Robert, L.; Muñoz-García, R. y Tanaka, J. 1996. Estudio Aleatorio para Comparar Seguridad y Eficacia del Albendazol y

Metronidazol en el Tratamiento de Giardiosis en Niños. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **37**, 315-323.

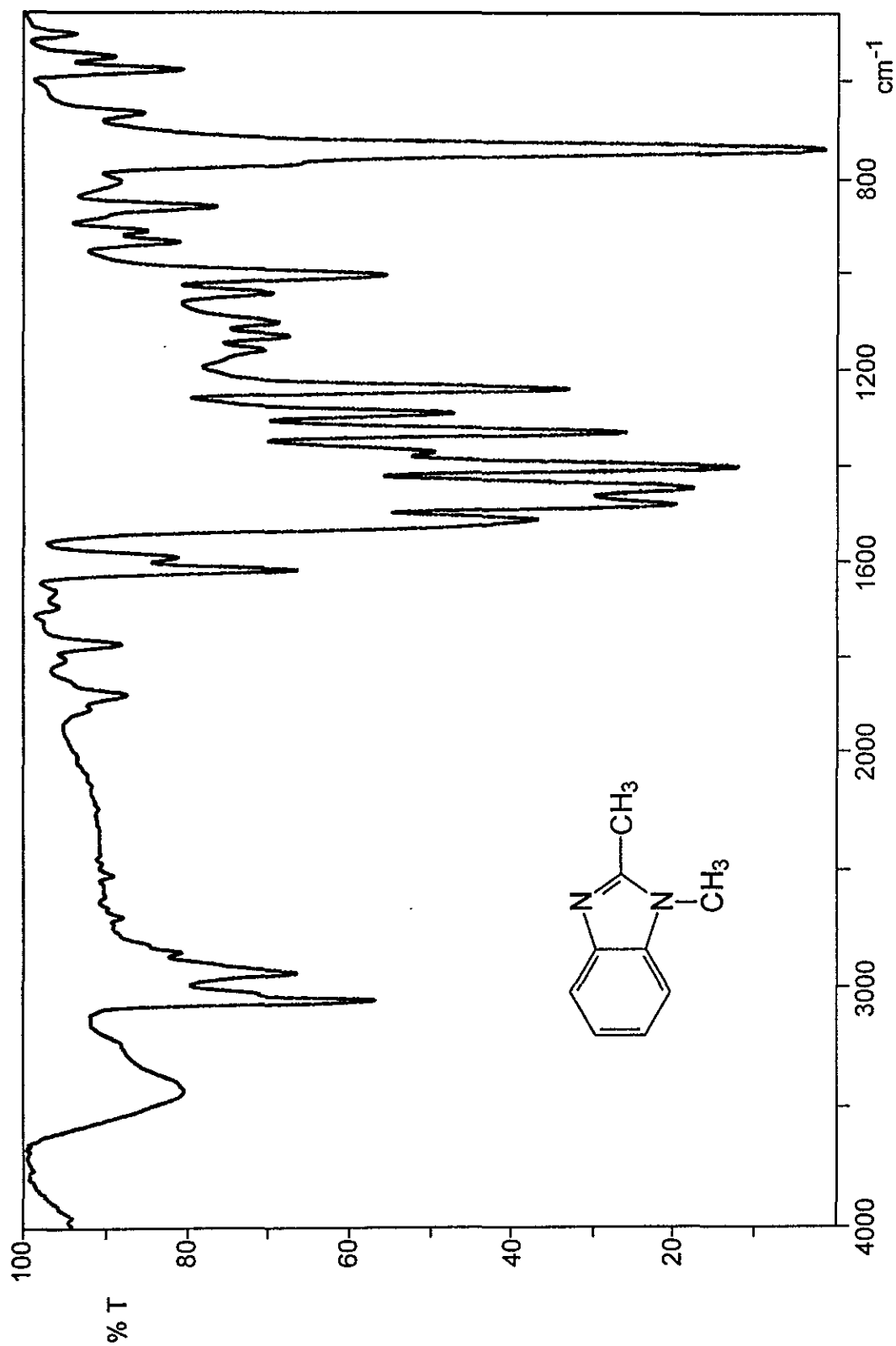
- 41.- Rodríguez-García, R.; Aburto-Bandala, M. y Sánchez-Maldonado, M. 1996. Eficacia del Albendazol en el Tratamiento de Giardiosis en Niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **53**, 173-177.
- 42.- Mathias, L. J. y Burkett, D. 1979. N-Alkylation of Benzimidazoles and Benzotriazole via phase Transfer Catalysis. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4709-4712.
- 43.- Bergman, J. y Sand, P. 1984. A New Simple Procedure for Alkylation of Nitrogen Heterocycles using Dialkyl Oxalatos and Alkoxides. *Tetrahedron Lett.* **25**, 1957-1960.
- 44.- Beaven, G. R.; Holiday, E. R.; Johnson, E. A.; Ellis, B.; Mamalis, P.; Petrow, V. y Sturgeon, B. 1994. *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 957.
- 45.- Katritzky, A. R. y Stanislaw, R. 1994. New Rutes to Selectivity Methylated Benzimidazoles. *J. Heterocyclic Chem.* **31**, 775-779.
- 46.- Katritzky, A. R.; Rachwal, S. y Rachwal, B. 1987. The Chemistry of Benzotriazole. Part 3.¹ The Aminoalkylation of Benzotriazole. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 799.
- 47.- Korolkovas, A. 1970. *Essentials of Molecular Pharmacology*. Wiley Intercience, EUA, 54-55.
- 48.- Beilstein Organische Chemie, Band XXIII, 145.
- 49.- Beilstein Organische Chemie, Band XXIV, 116-119.
- 50.- *Org. Syn. Coll. Vol. IV*, 1963, 569.
- 51.- Beilstein Organische Chemie, Band XII, 146.
- 52.- Köhler, P. y Bachmann, R. 1978. *Molec. Pharmc.* **14**, 155-163.
- 53.- Miller, M. 1976. Protozoan and Helmint Parasites. A Review of Current Treatment. *Prog. Drug. Res.* **20**, 433-446.
- 54.- Beilstein Organische Chemie, Band XII, 689.
- 55.- Van den Bossche, H. 1978. Chemoterapy of Parasitic Infections. *Nature*, **273**, 626-630.

- 56.- a) Beilstein Organische Chemie, Band XII, 729-731. b) Fitton, A. O. y Smalley, R. K. 1968, *Practical Heterocyclic Chemistry*, Academic Press, London, 59.
- 57.- Fusson, R. C., *et al.* 1947. *J. Org. Chem.* **12**, 799.
- 58.- Dictionary of Organic Compounds, Vol. 1, 15th Ed. 11697, 1269.
- 59.- a) Beilstein Organische Chemie, Band XII, 626. b) Roberts *et al.* 1959. *J. Org. Chem.* **24**, 654-659.
- 60.- Beilstein Organische Chemie, Band XII, 733-734.
- 61.- Lewan, L.; Anderson, M. y Morales-Gomez, P. 1992. The Use of *Artemia salina* in Toxicity Testing. *ATLA.* **20**, 297-301.
- 62.- Finney, D. L. Probit Analysis. Cambridge University Press. EUA. 1977:20.
- 63.- Roman-Contreras, R. 1979. Contribución al conocimiento de la Biología y Ecología de *Macrobrachium tenellum* (Smith) (Crustáceos, Decápoda, Palaemonidae). 1979. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol.* UNAM, **6**, 137-160.
- 64.- Román-Contreras, R. 1991, *An. Del Inst. De Cienc. del Mar y Limnol.*, UNAM. **18**, 1.
- 65.- Schmitt, D. P. 1985, North Carolina State University Graphics. 241-248.
- 66.- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G. 1991, Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Med.* **22**, 79-85.
- 67.- Dennis, D. T., Despommier, D. D., Davis, N. 1970, Infectivity of the new born larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* **56**, 974-977.
- 68.- Towson, D. H., Morris, D. L. 1989, *Echinococcus granulosus*: *in vitro* maintenance of whole cyst and the assessment of effects of albendazole sulfoxide and praziquantel on the germinal layer. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**, 664-669.
- 69.- Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A., Muñoz, O. 1992, A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **23**, 59-61 (Special issue).

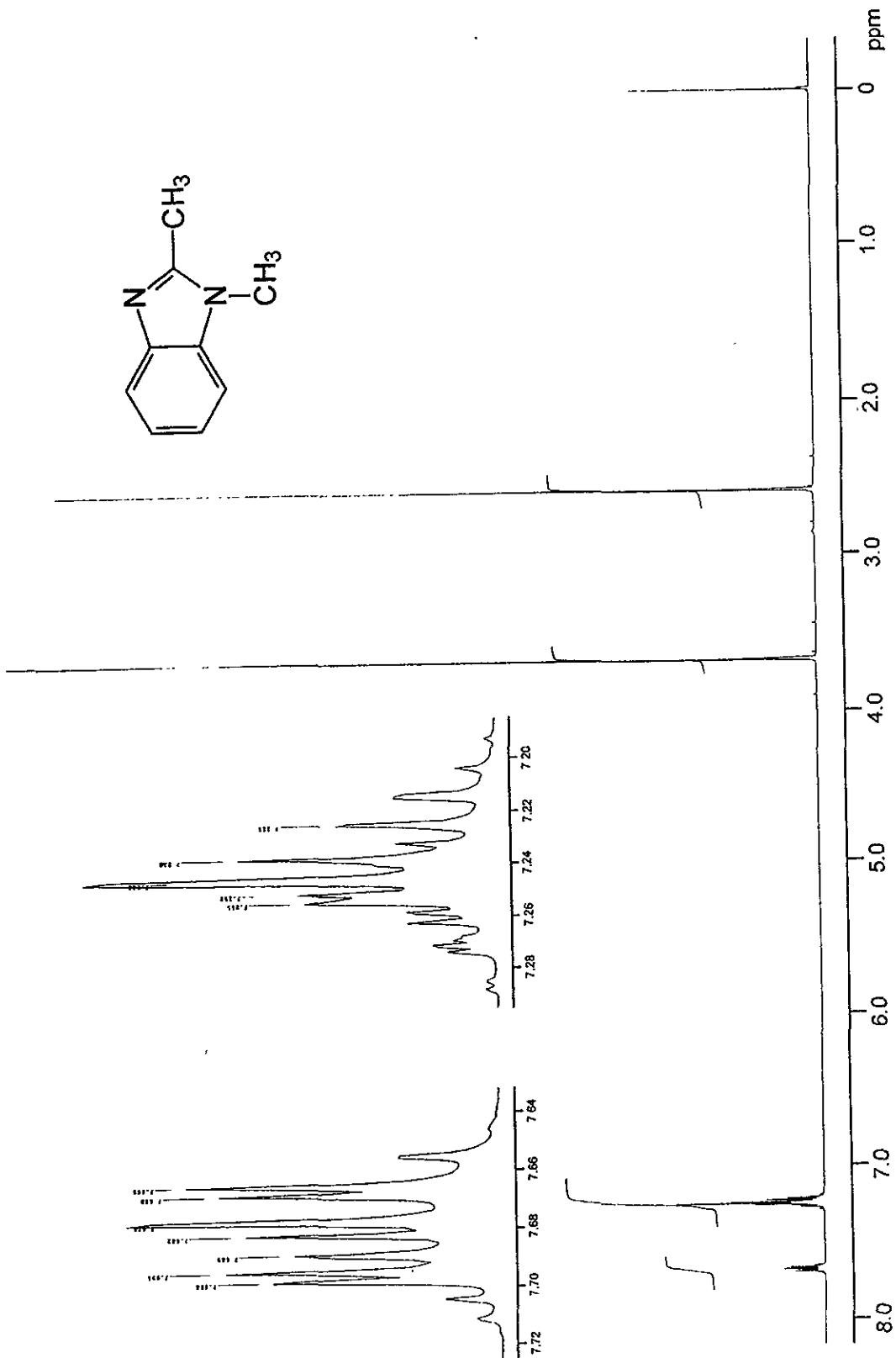
- 70.- Chavéz, B.; Cedillo-Rivera, R.; Martínez-Palomo, A. 1992. *Giardia lamblia*: Ultraestructural Study of the *In Vitro* Effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* **39**, 510-515.
- 71.- a) Phillips, M. A. 1928, *J. Chem. Soc.* 2393-2399. b) Vogel's, A. J. 1978, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4a. Edn. Hongmans, Londres.
- 72.- Leonard, N. J.; Curtin, D. Y. y Beck, K. 1947, Sulfonate Salts of Substituted Benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2459-2461.
- 73.- Casimiro, G. A. 1994, Síntesis de Análogos del Triclabendazol con Actividad Antihelmíntica Potencial. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- 74.- Katritzky, A. R. y Rees, C. W. 1984, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Vol. **5**, Pergamon, Press, Ltd. U. K. 353-359.
- 75.- Parkhouse, R. M. E. y Clark, N. W. T. 1983, Stage Specific Secreted and Somatic Antigens of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **9**, 319-327.

ANEXO I

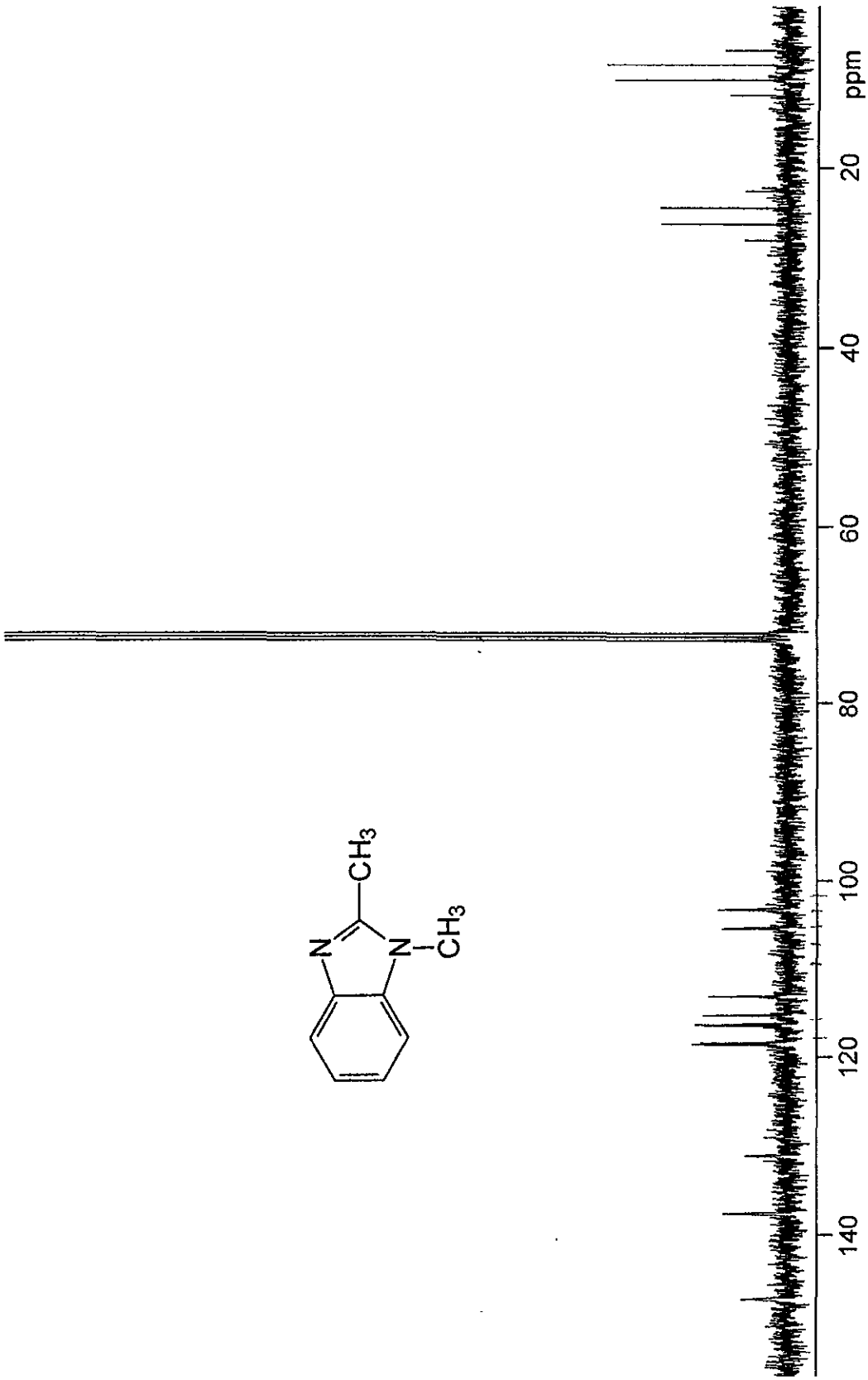
Espectros



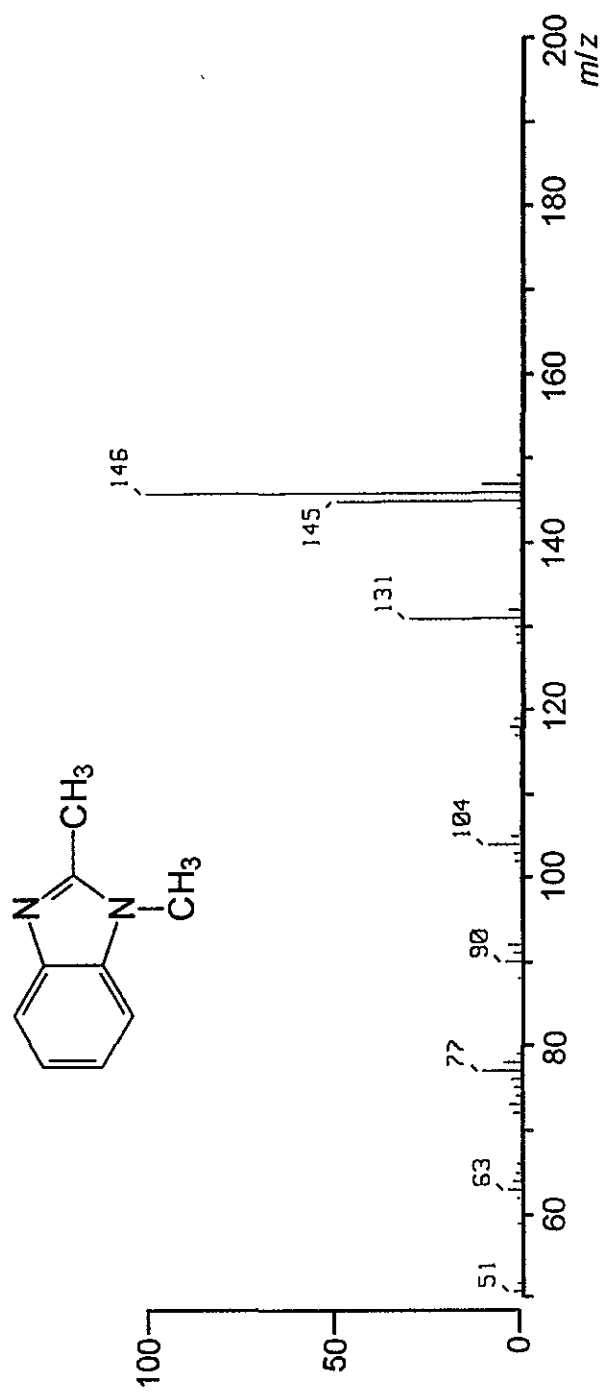
ESPECTRO 1. Espectro en el IR del 1,2-dimetilbenzimidazol (1).



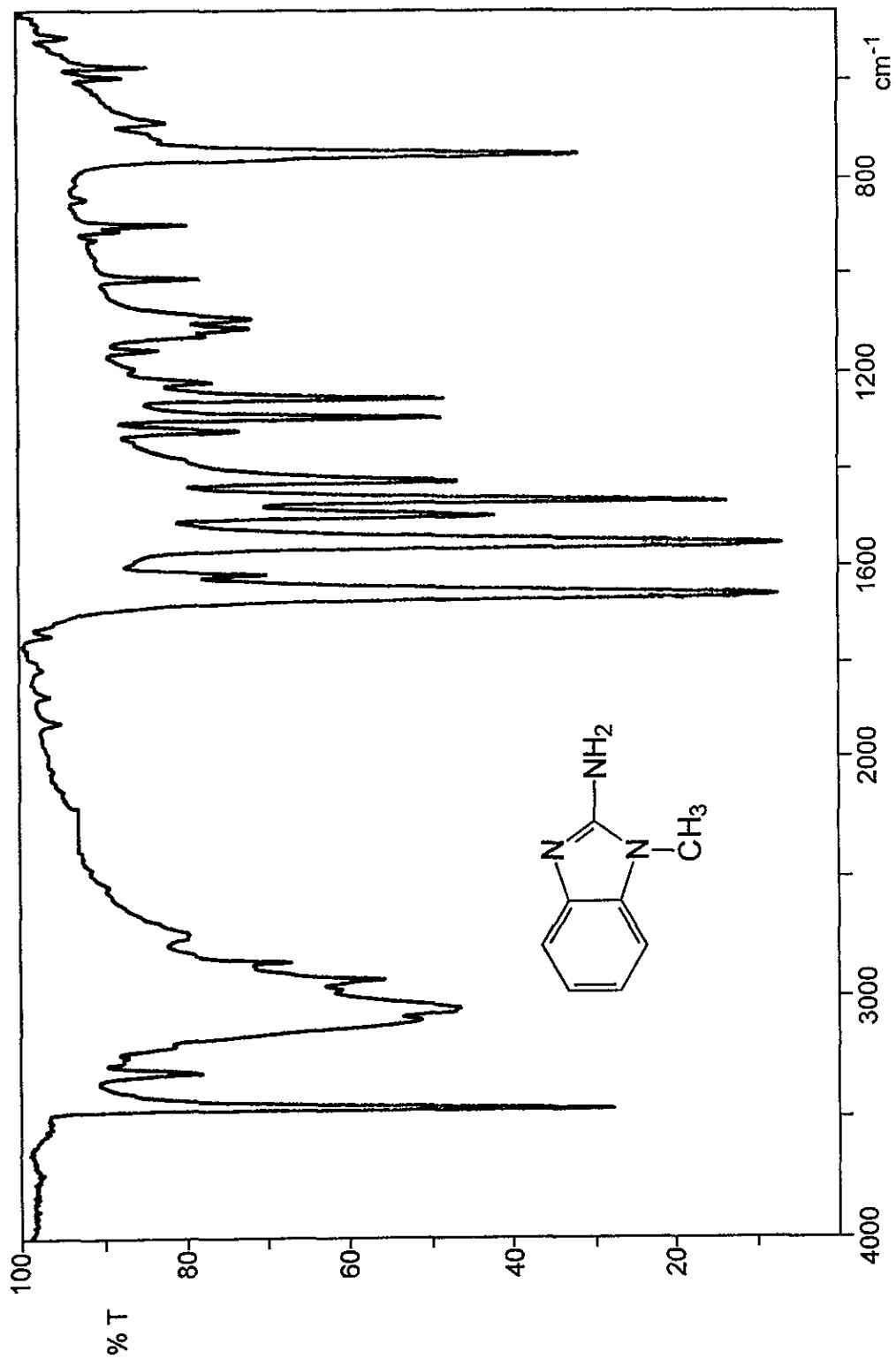
ESPECTRO 2. Espectro de RMN ^1H del 1,2-dimetilbenzimidazol (1).



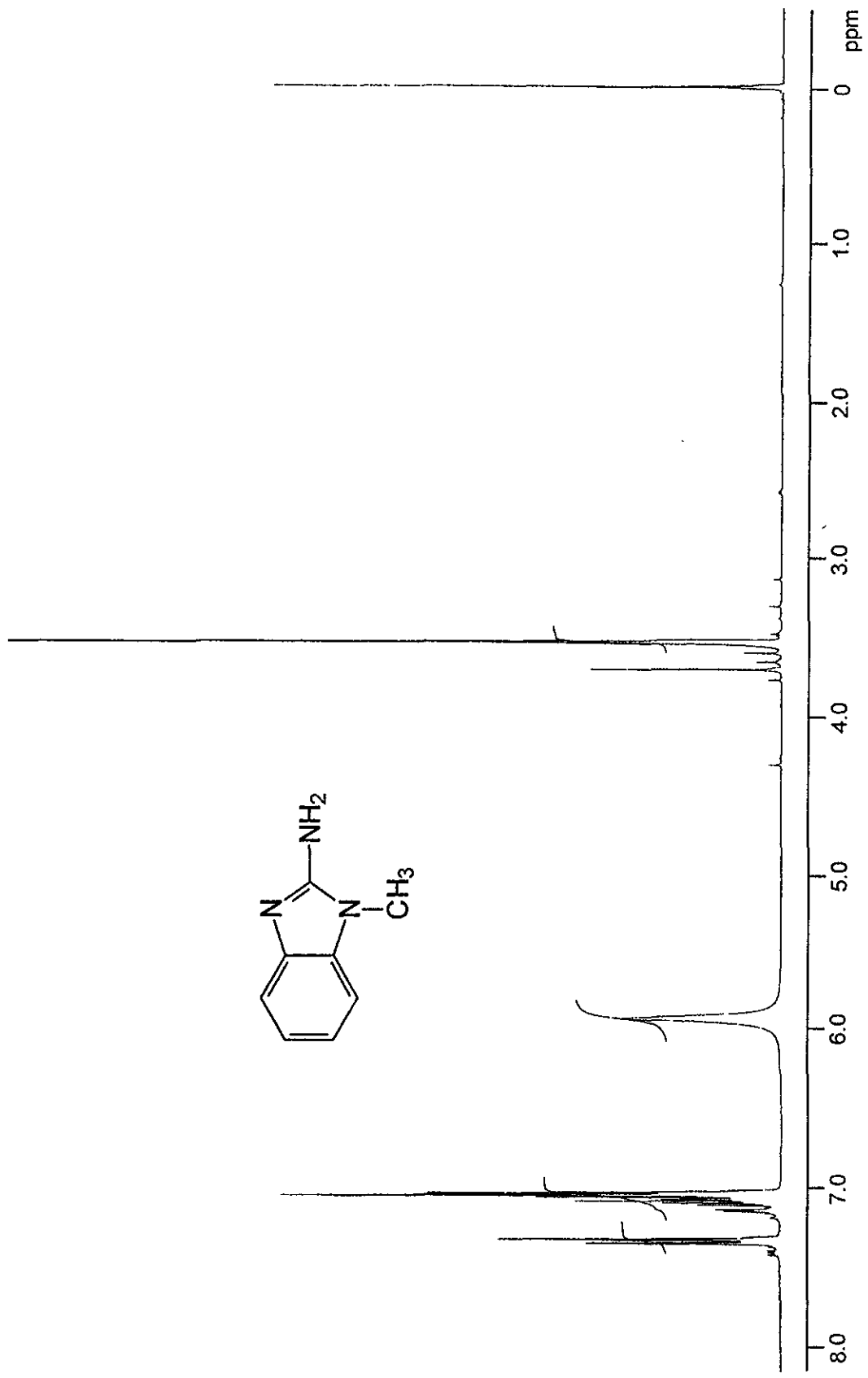
ESPECTRO 3. Espectro de RMN ^{13}C del 1,2-dimetilbenzimidazol (1).



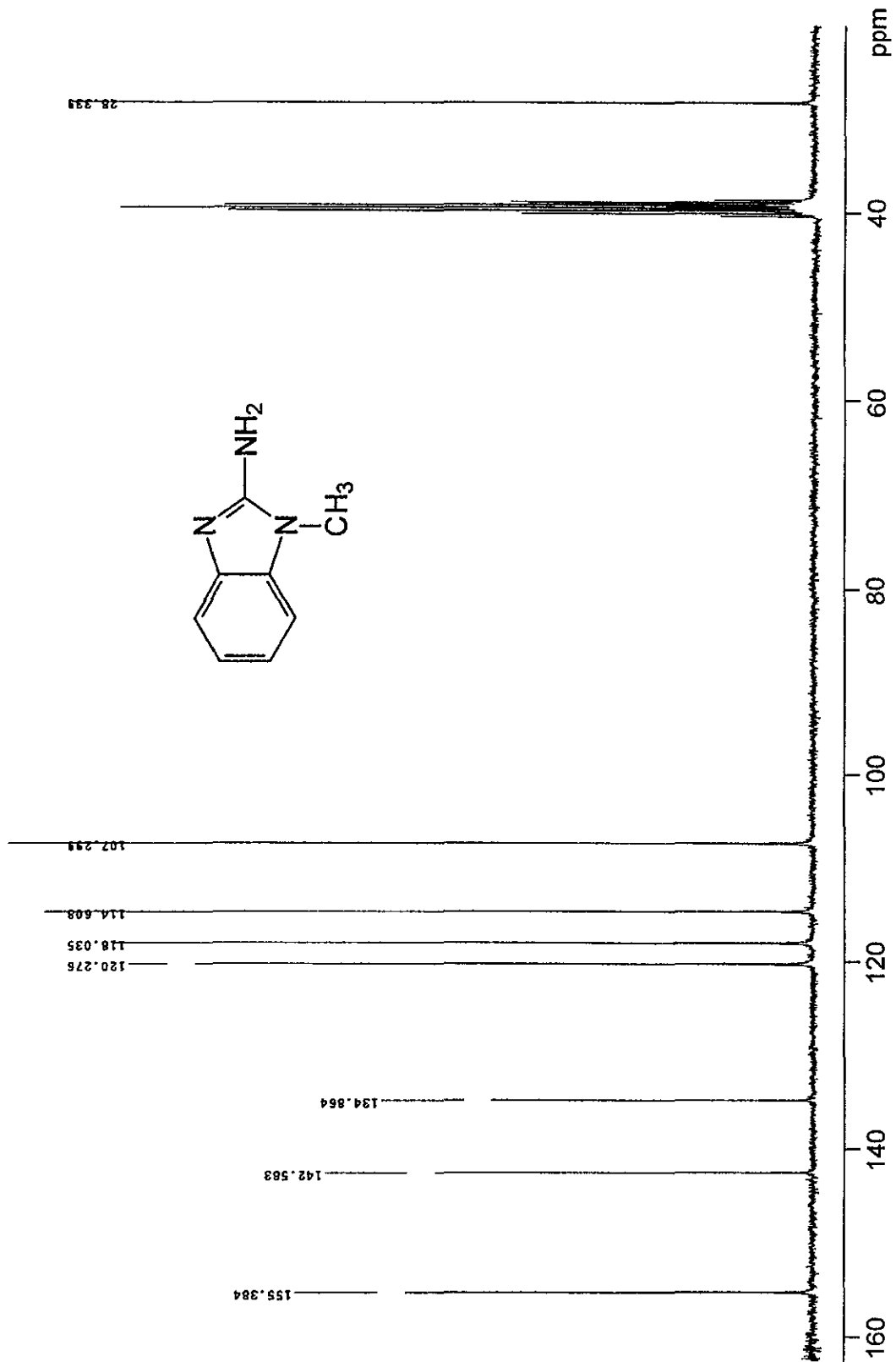
ESPECTRO 4. Espectro de masas por impacto electrónico del 1,2-dimetilbenzimidazol (1).



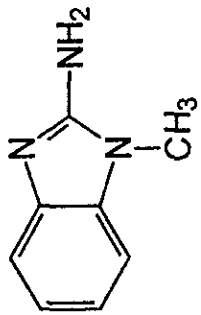
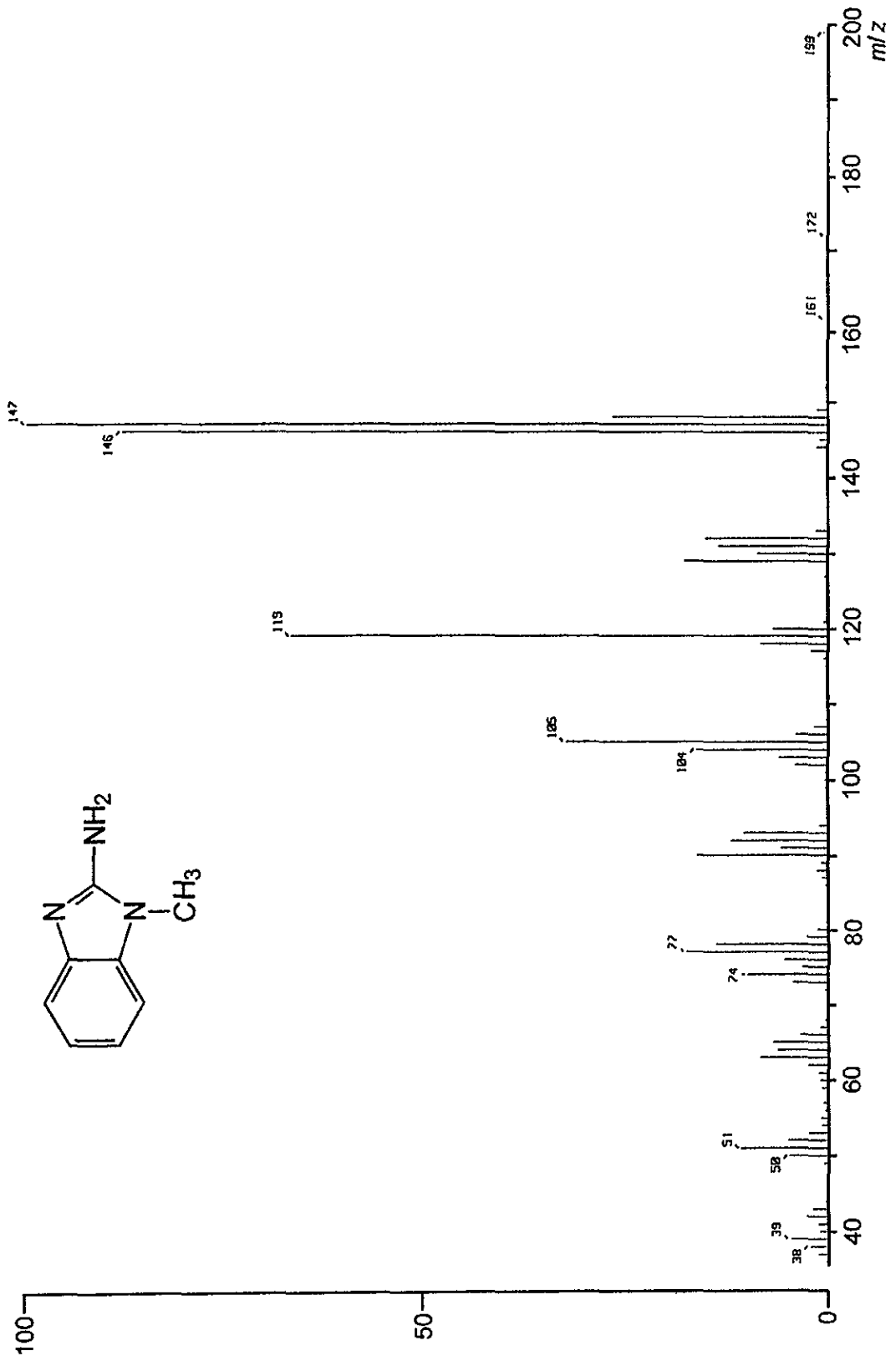
ESPECTRO 5. Espectro en el IR del 2-amino-1-metilbencimidazol (2).



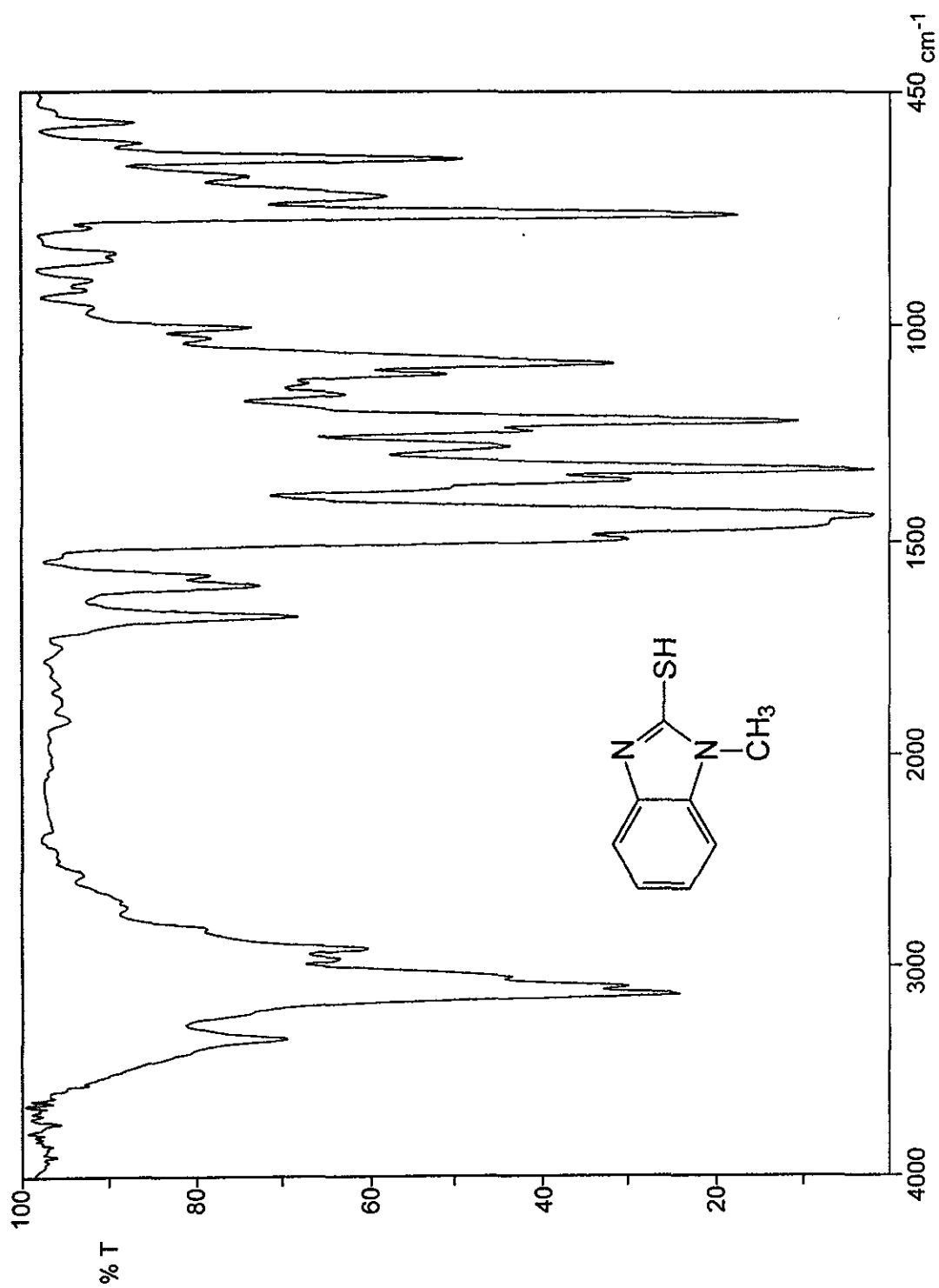
ESPECTRO 6. Espectro de RMN ^1H del 2-amino-1-metilbenzimidazol (2).



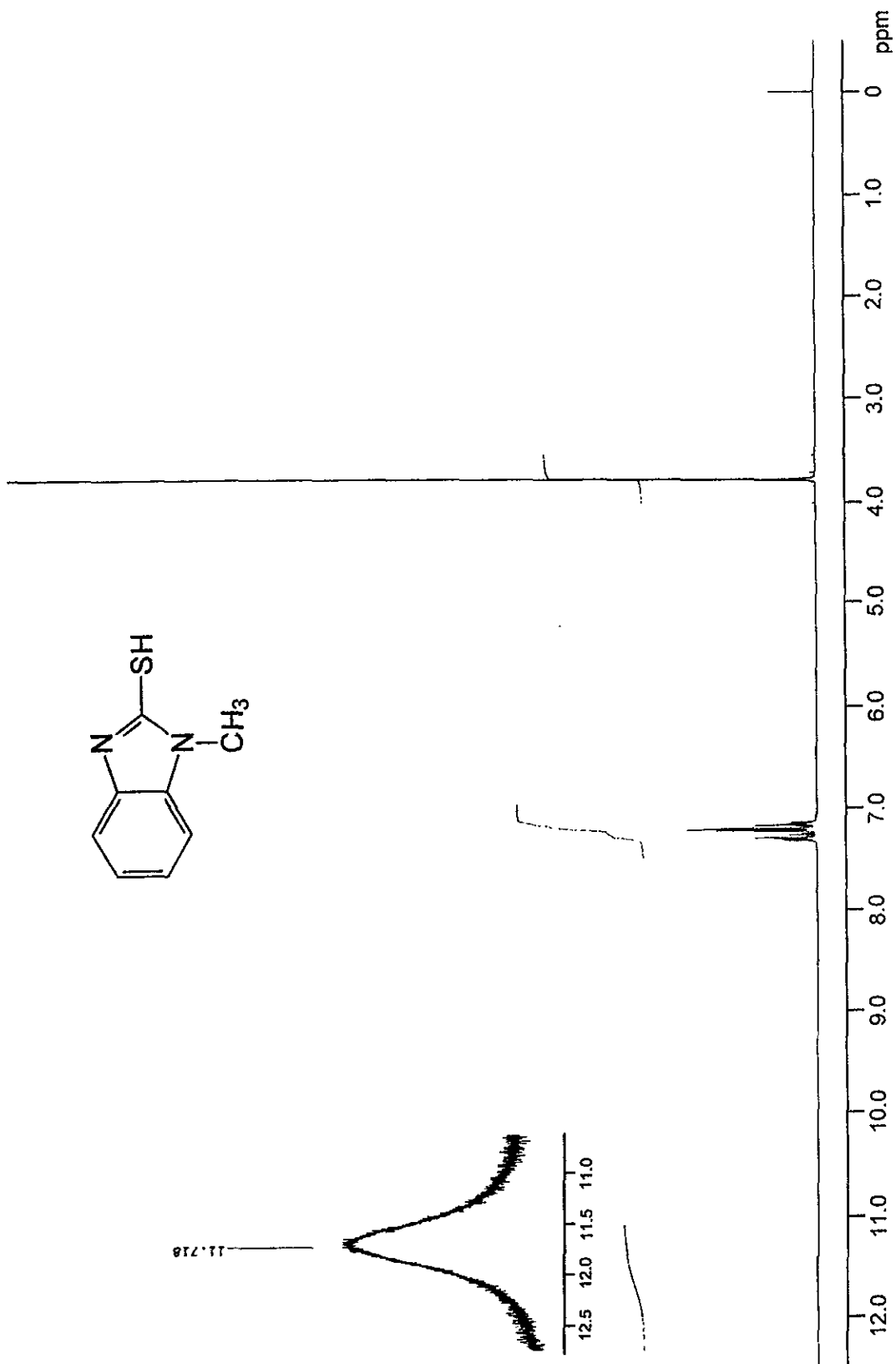
ESPECTRO 7. Espectro de RMN ^{13}C del 2-amino-1-metilbencimidazol (2).



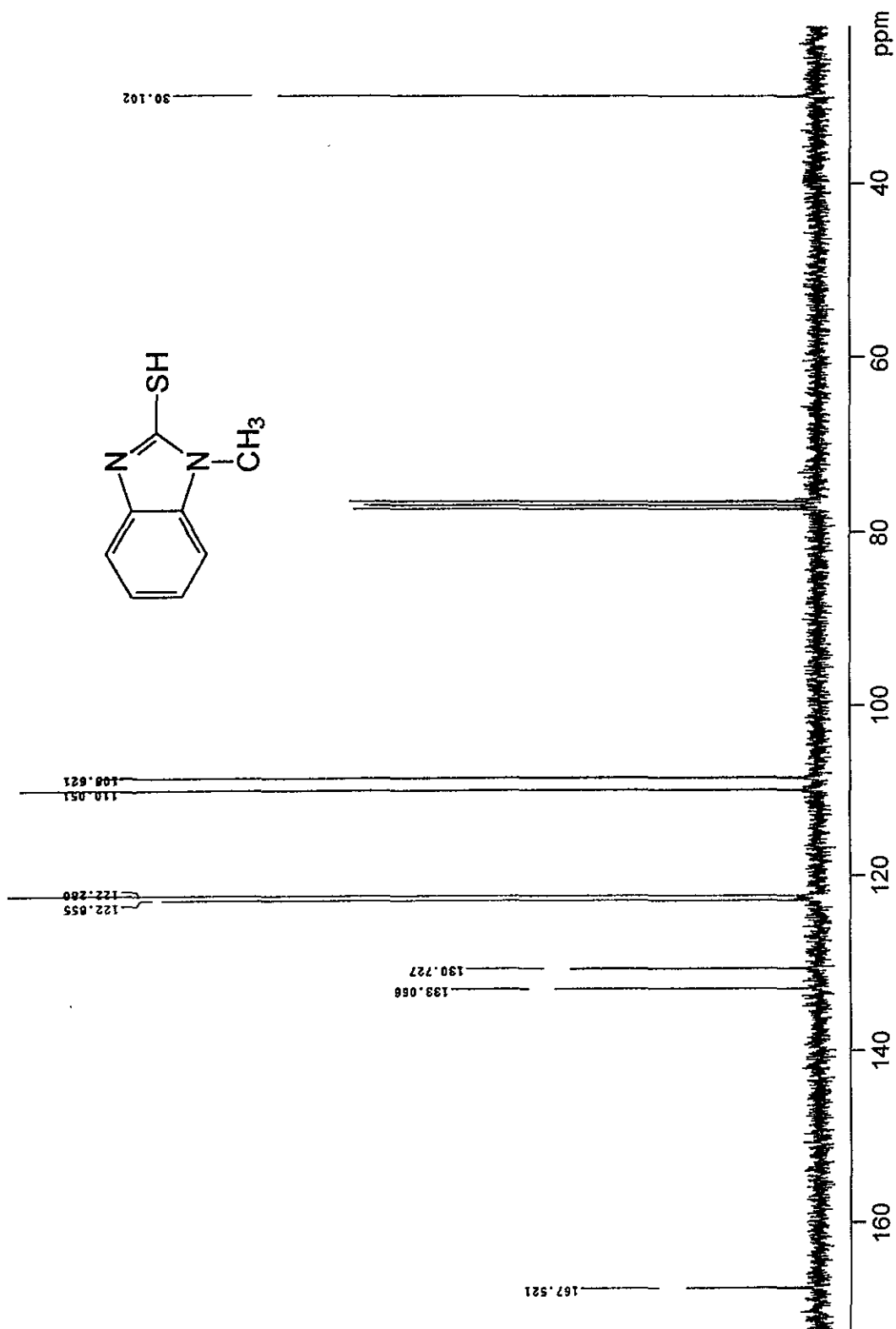
ESPECTRO 8. Espectro de masas por impacto electrónico del 2-amino-1-metilbencimidazol (2).



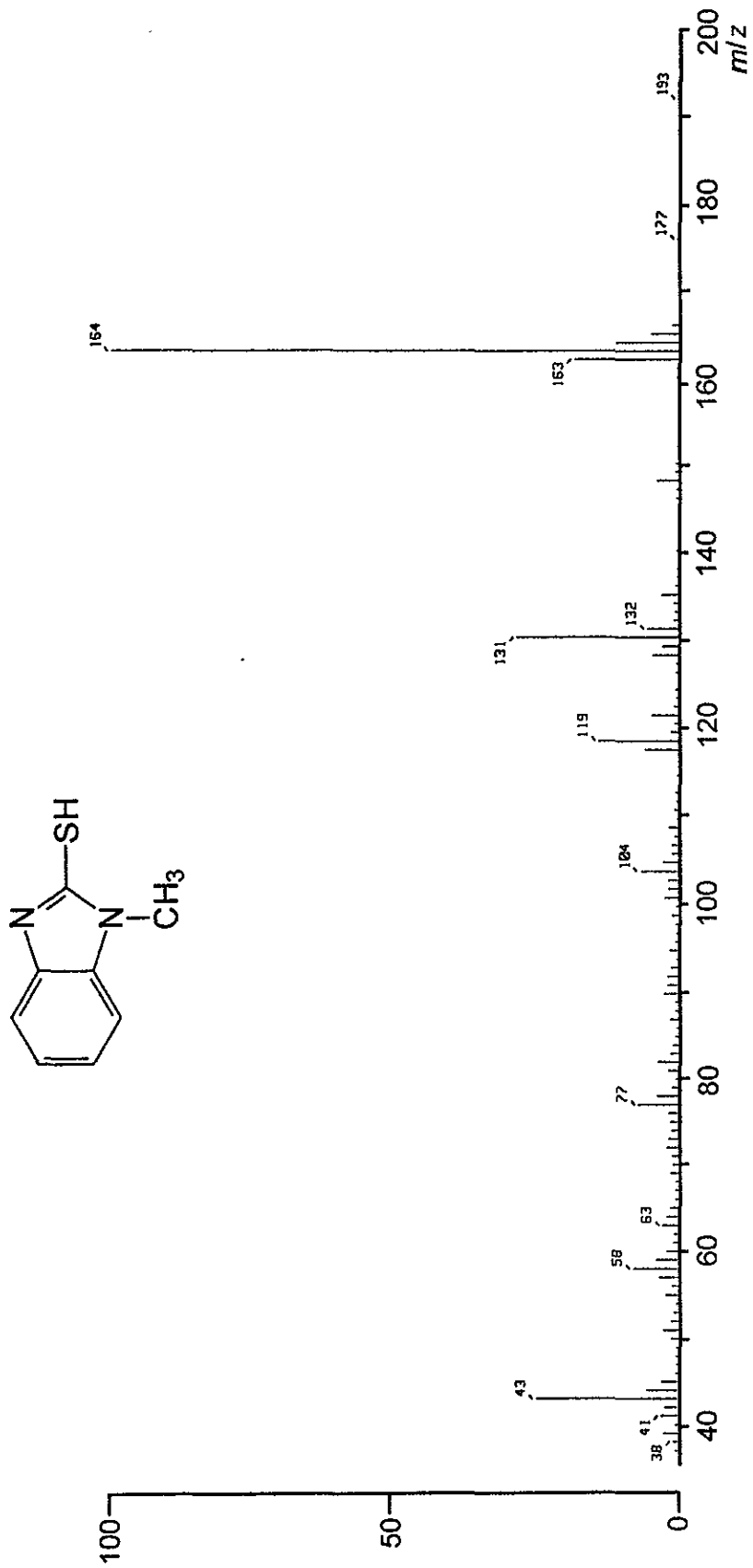
ESPECTRO 9. Espectro en el IR del 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3).



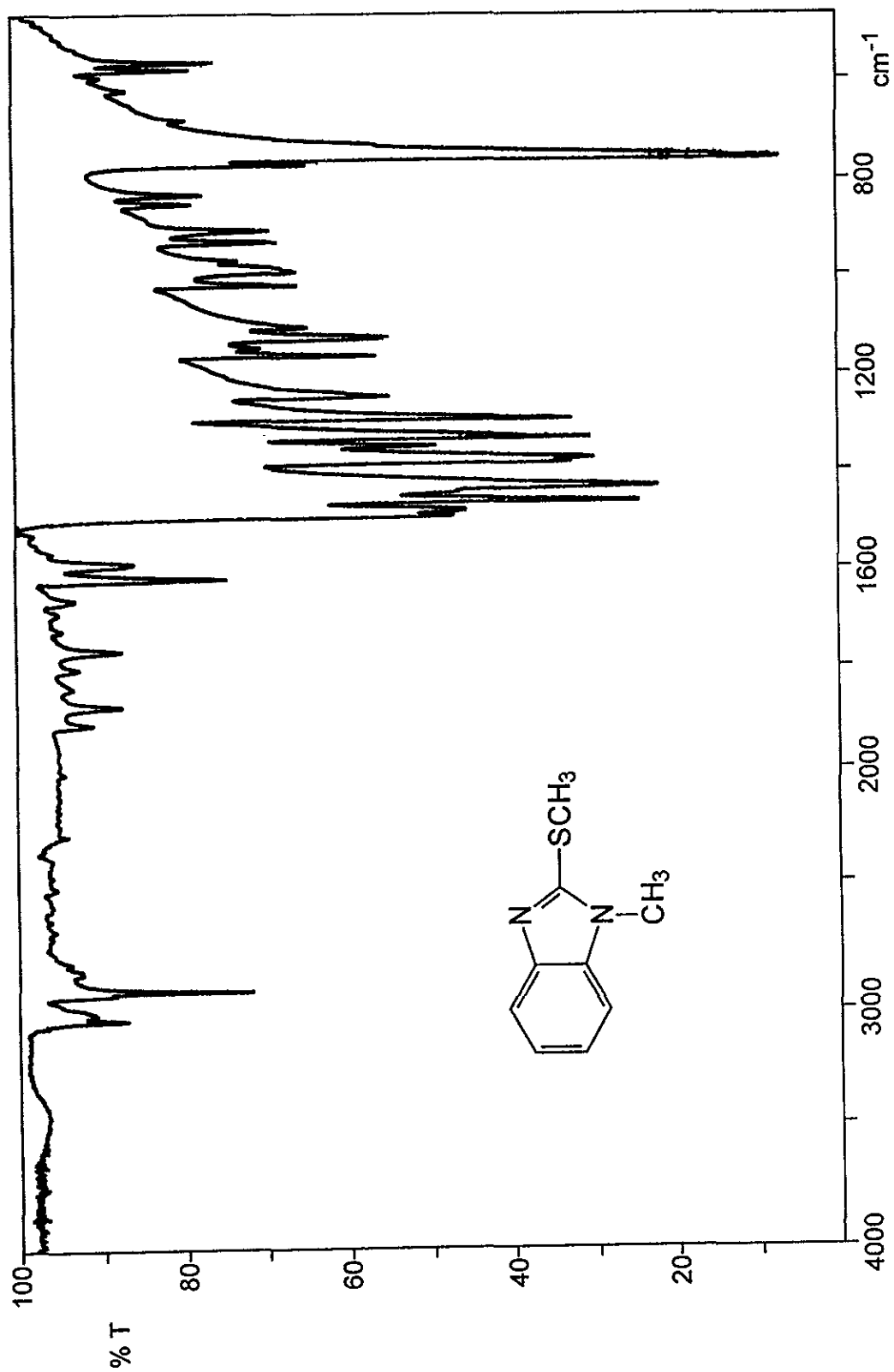
ESPECTRO 10. Espectro de RMN ^1H del 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3).



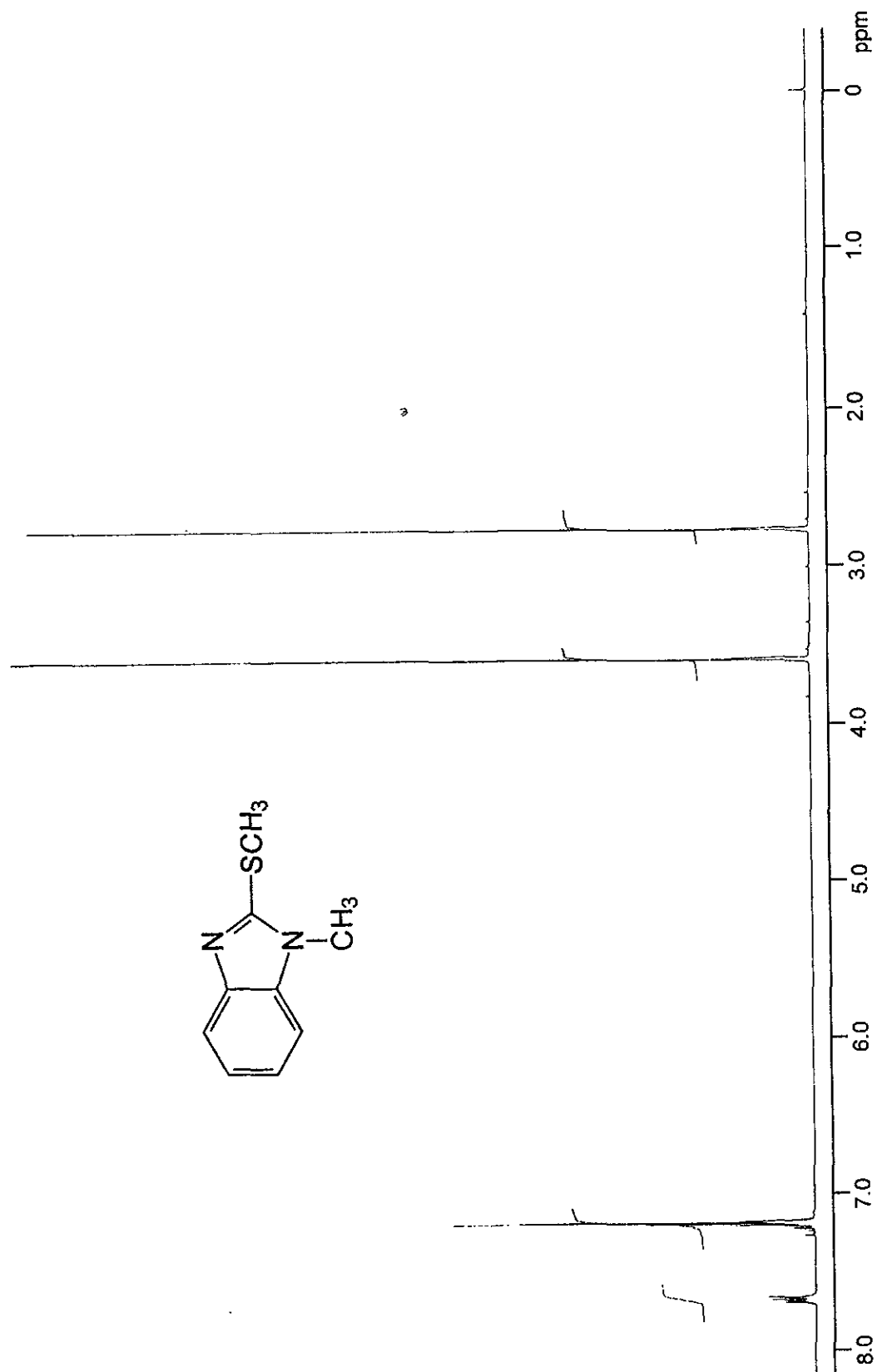
ESPECTRO 11. Espectro de RMN ^{13}C del 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3).



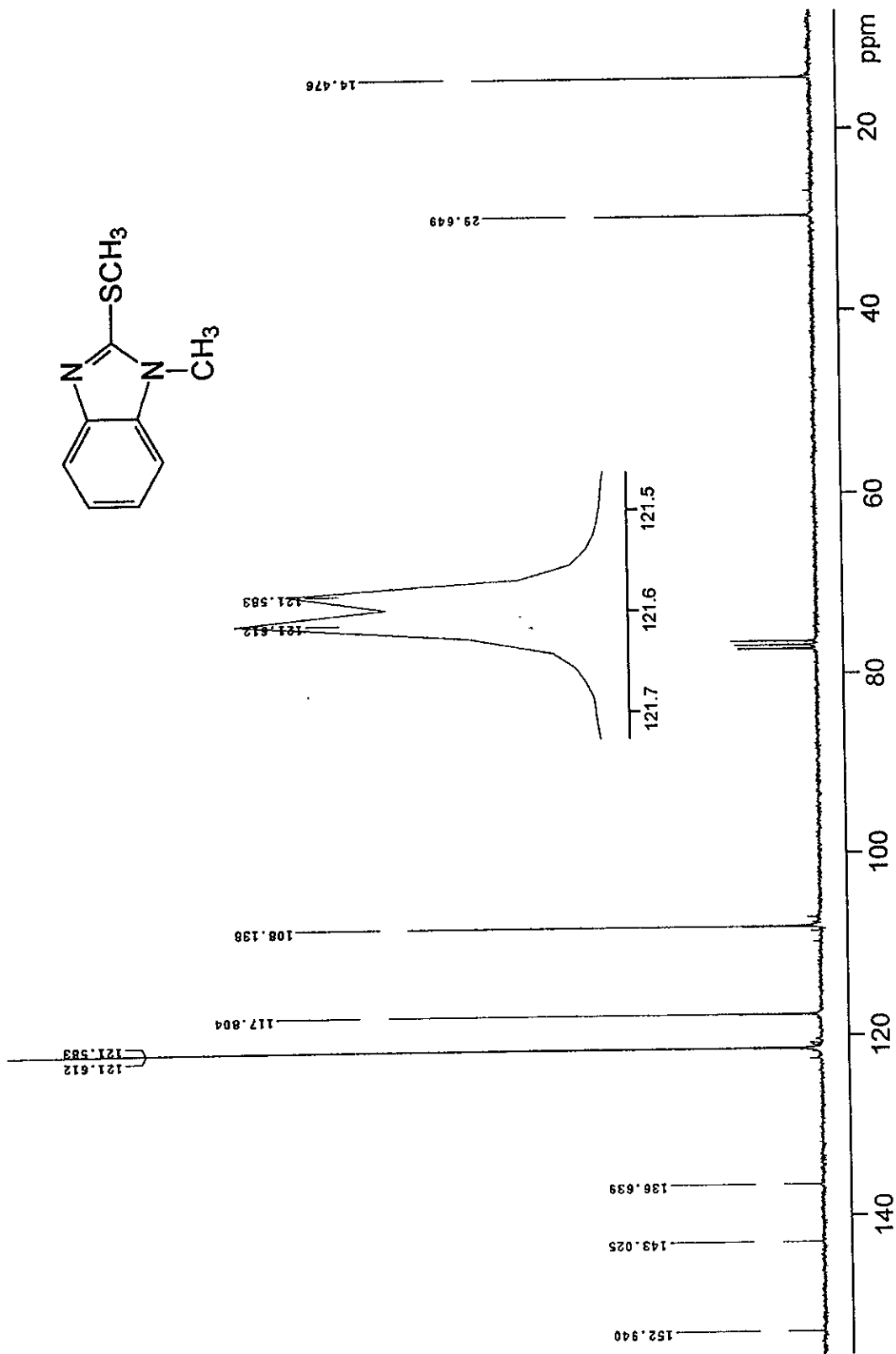
ESPECTRO 12. Espectro de masas por impacto electrónico del 2-mercapto-1-metilbencimidazol (3).



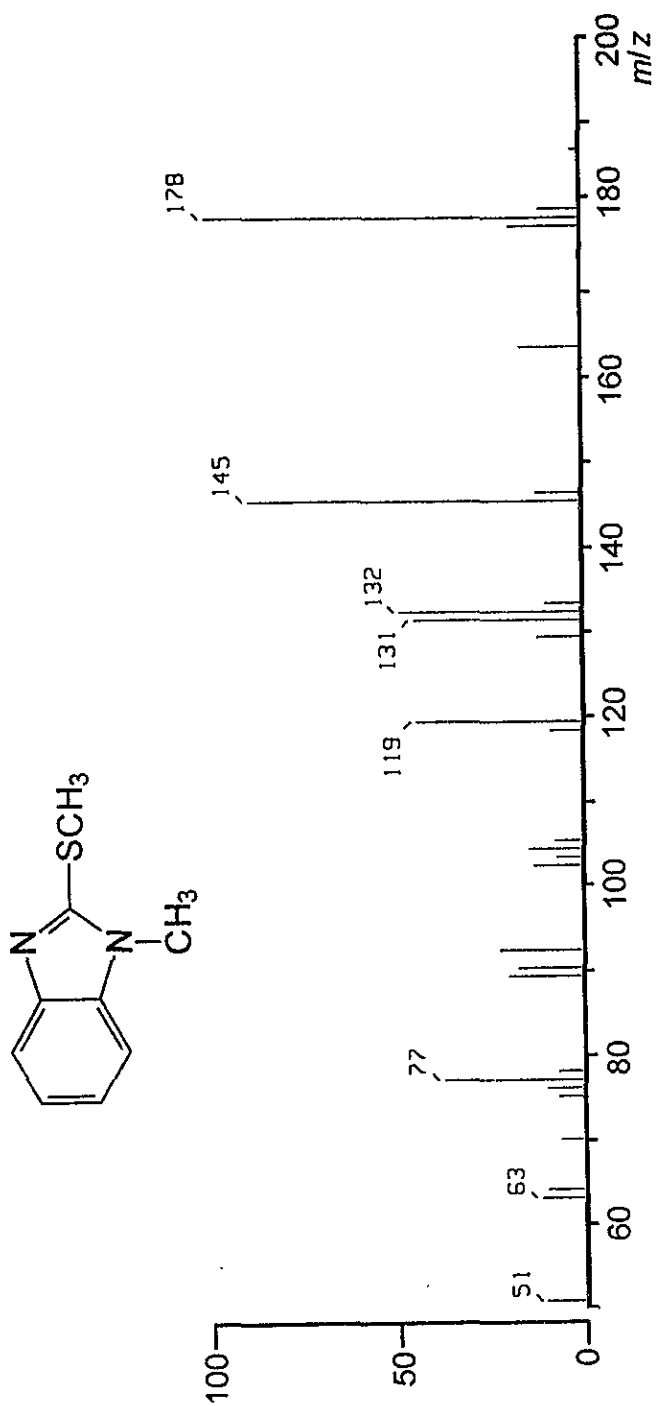
ESPECTRO 13. Espectro en el IR del 1-metil-2-metilthiobenzimidazol (4).



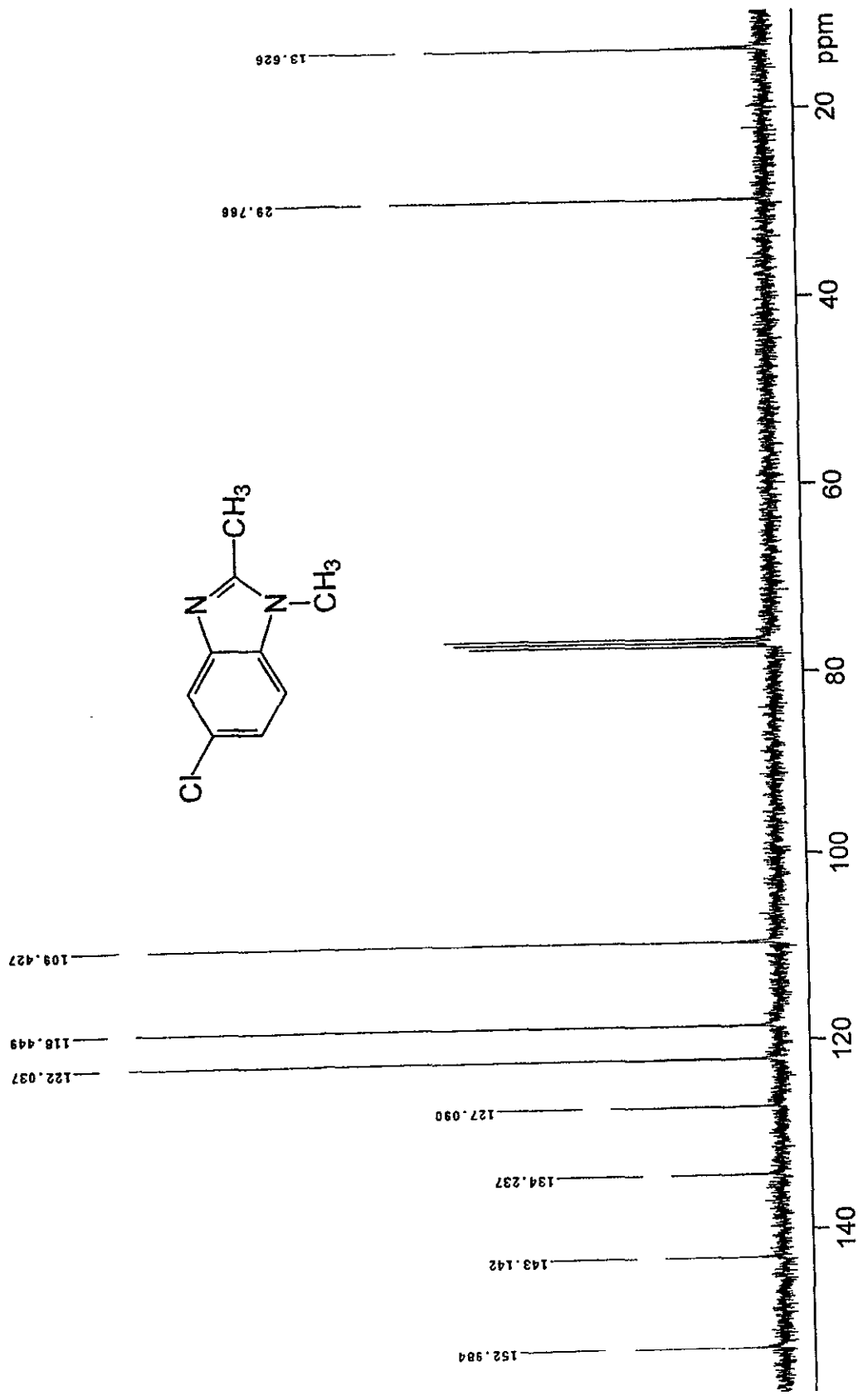
ESPECTRO 14. Espectro de RMN ^1H del 1-metil-2-metilbencimidazol (4).



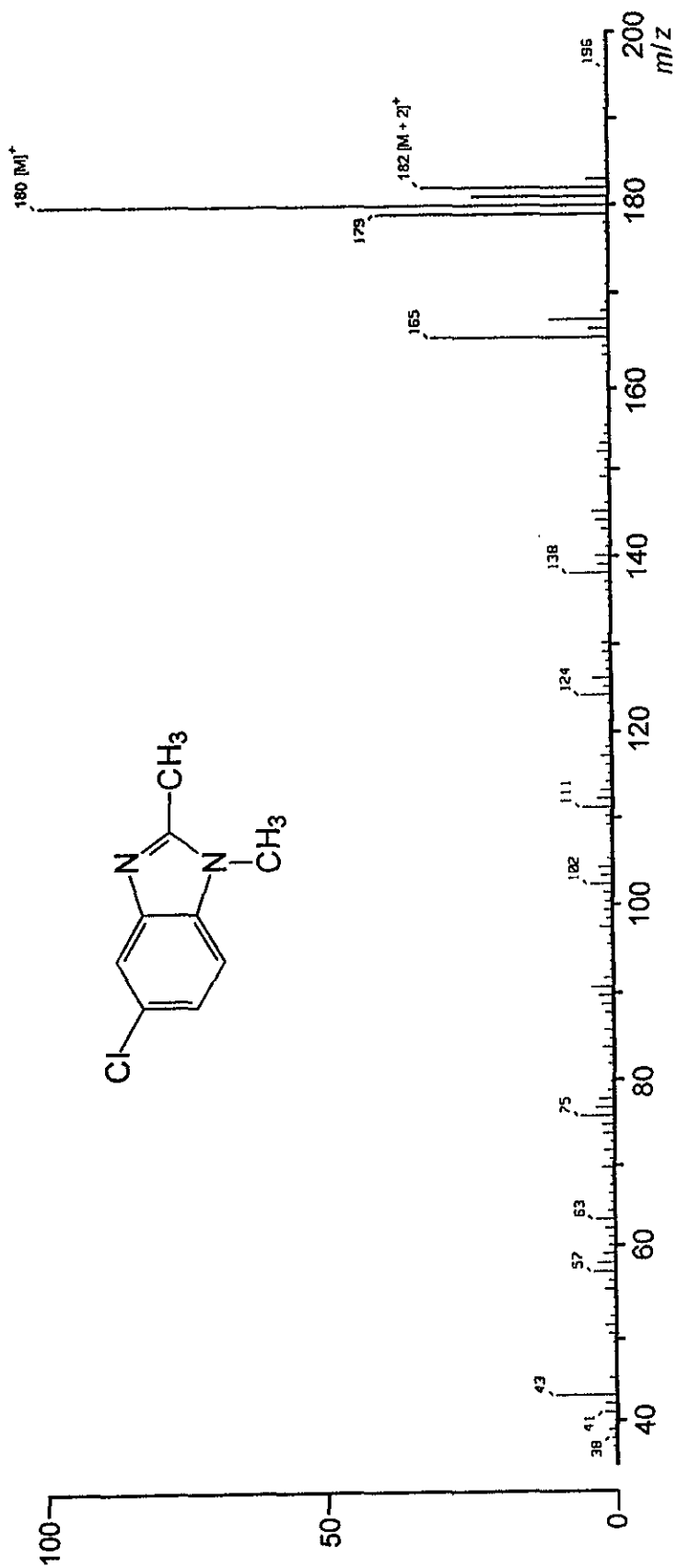
ESPECTRO 15. Espectro de RMN ¹³C del 1-metil-2-metilbencimidazol (4).



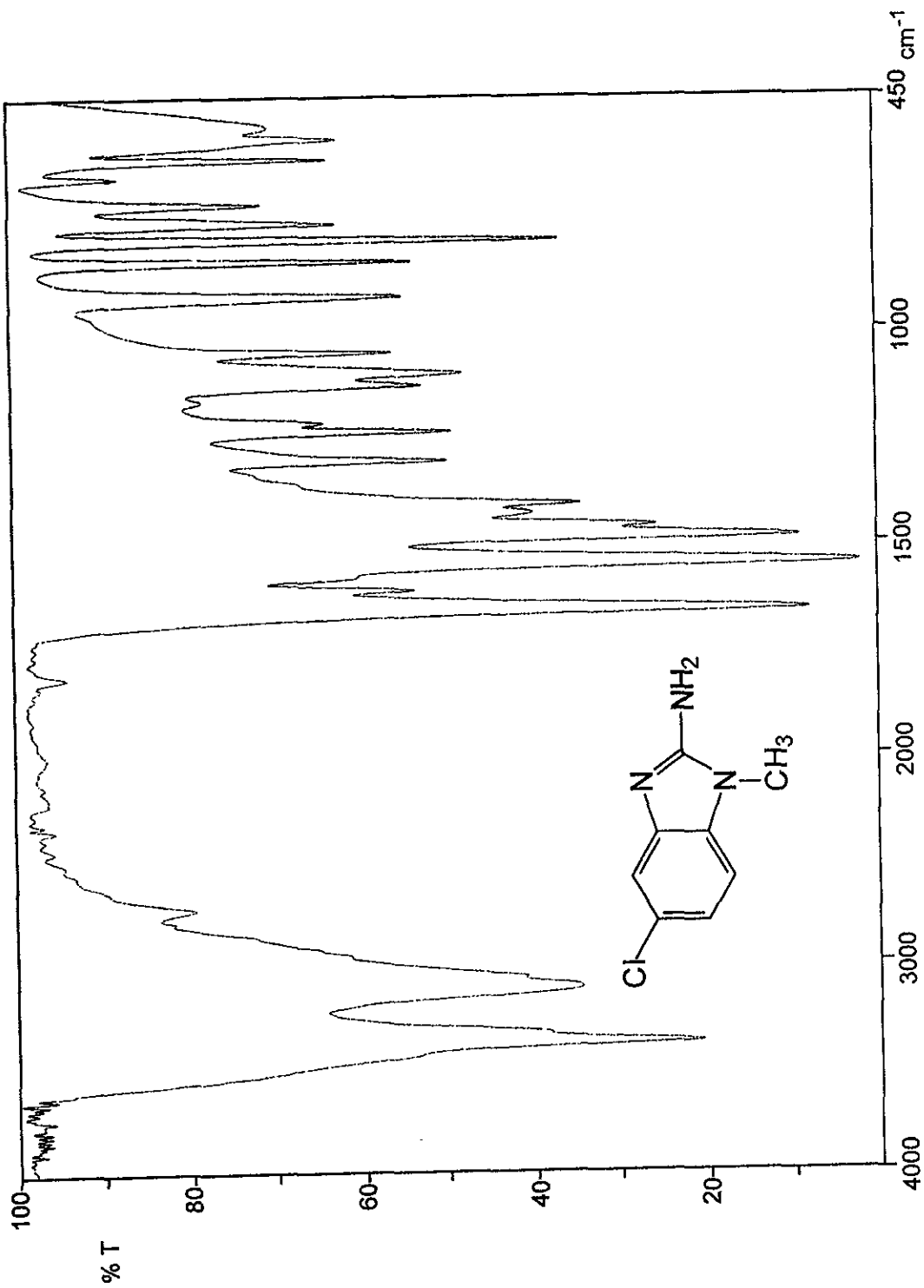
ESPECTRO 16. Espectro de masas por impacto electrónico del 1-metil-2-metilthiobenzimidazol (4).



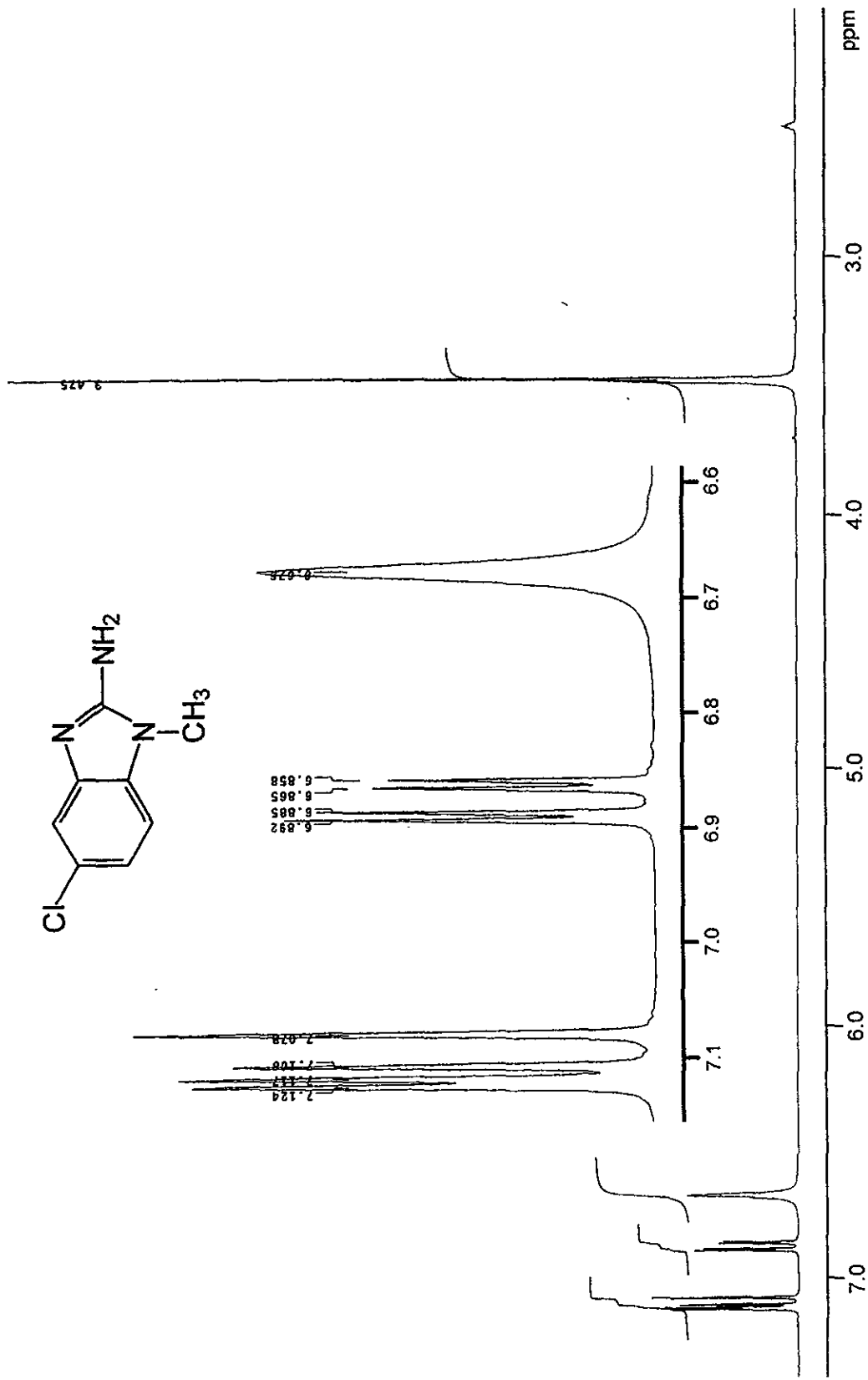
ESPECTRO 19. Espectro de RMN ¹³C del 5-cloro-1,2-dimetilbencimidazol (5).



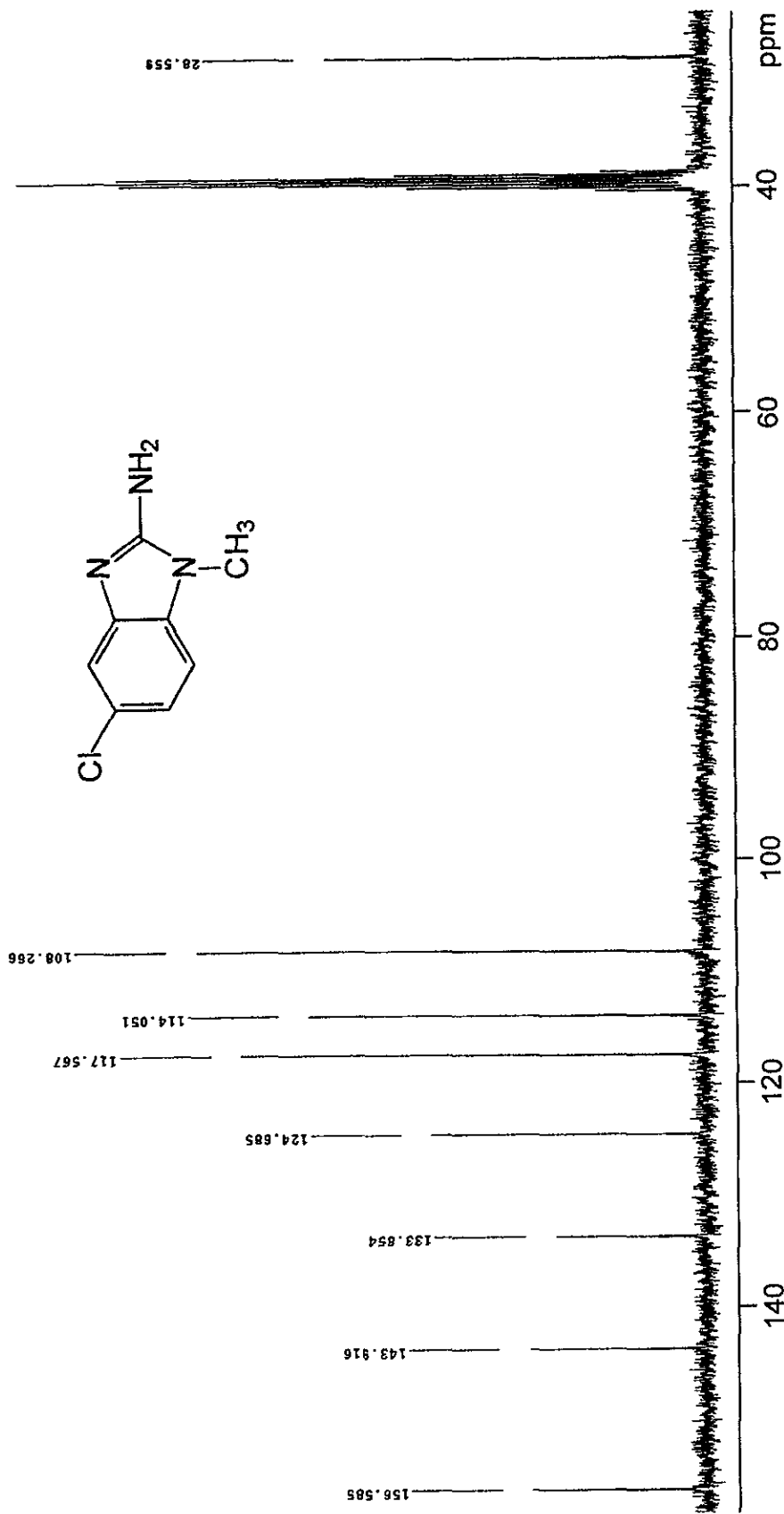
ESPECTRO 20. Espectro de masas por impacto electrónico del 5-cloro-1,2-dimetilbenzimidazol (5).



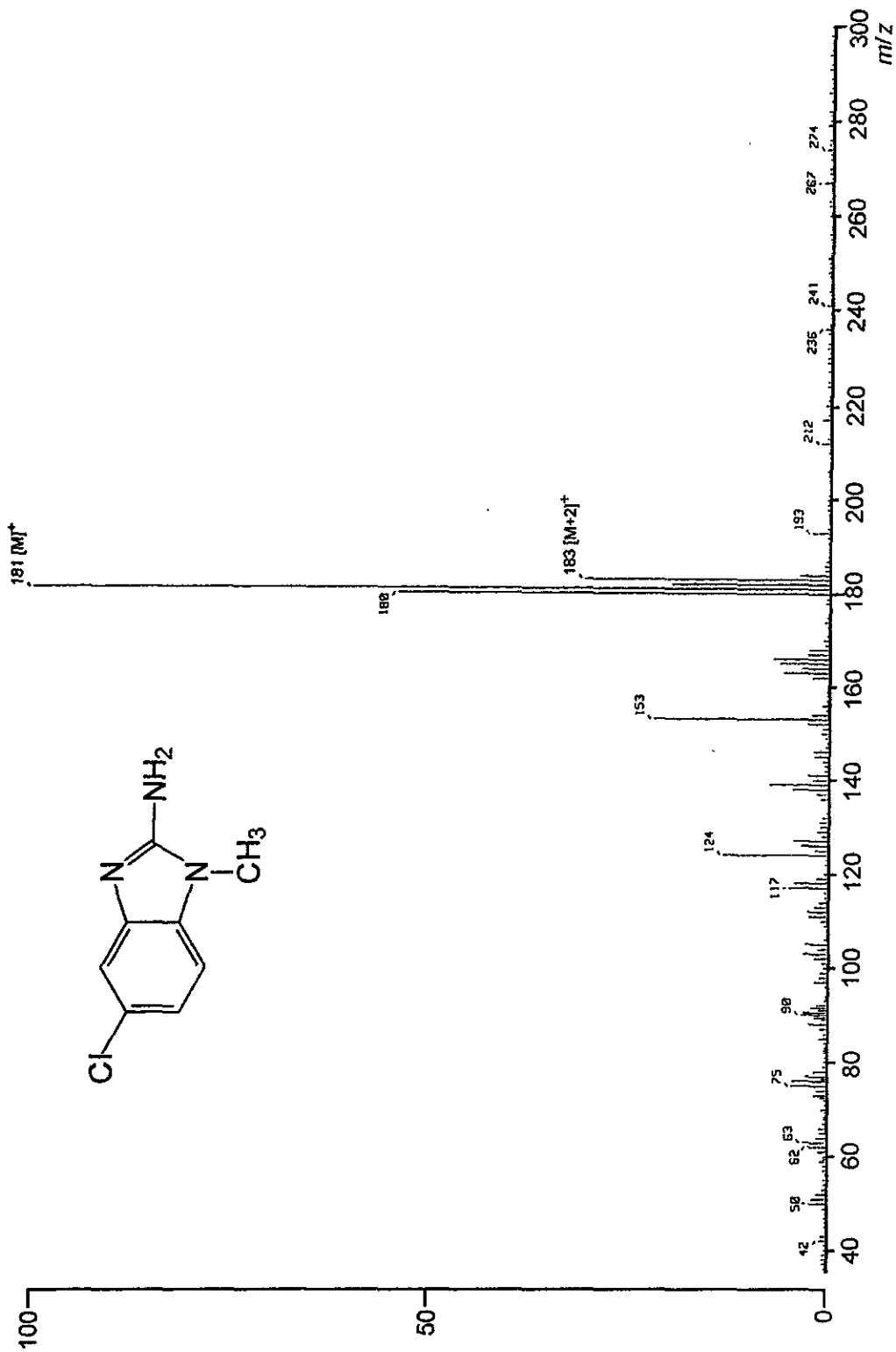
ESPECTRO 21. Espectro en el IR del 2-amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).



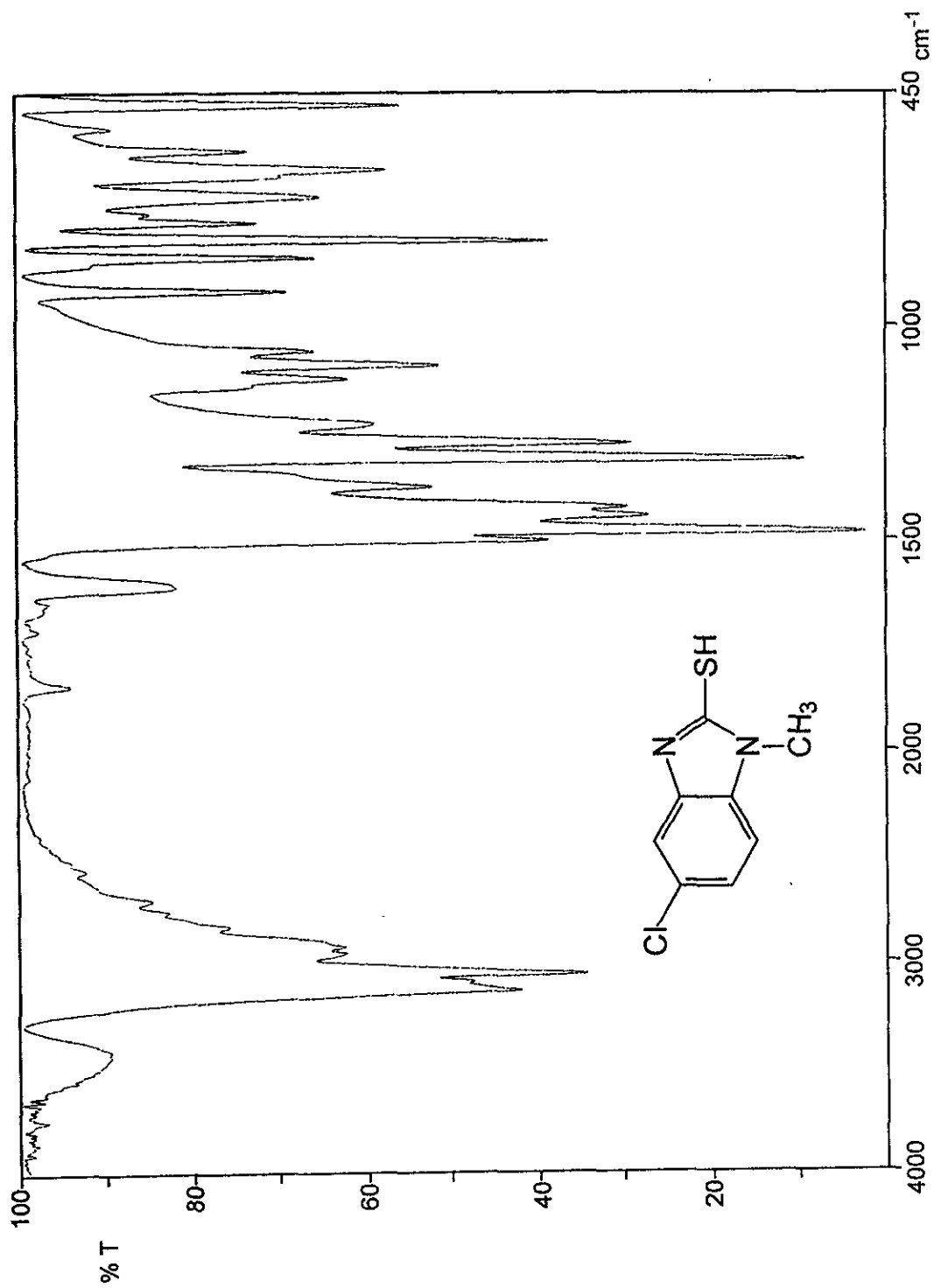
ESPECTRO 22. Espectro de RMN ^1H del 2-amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).



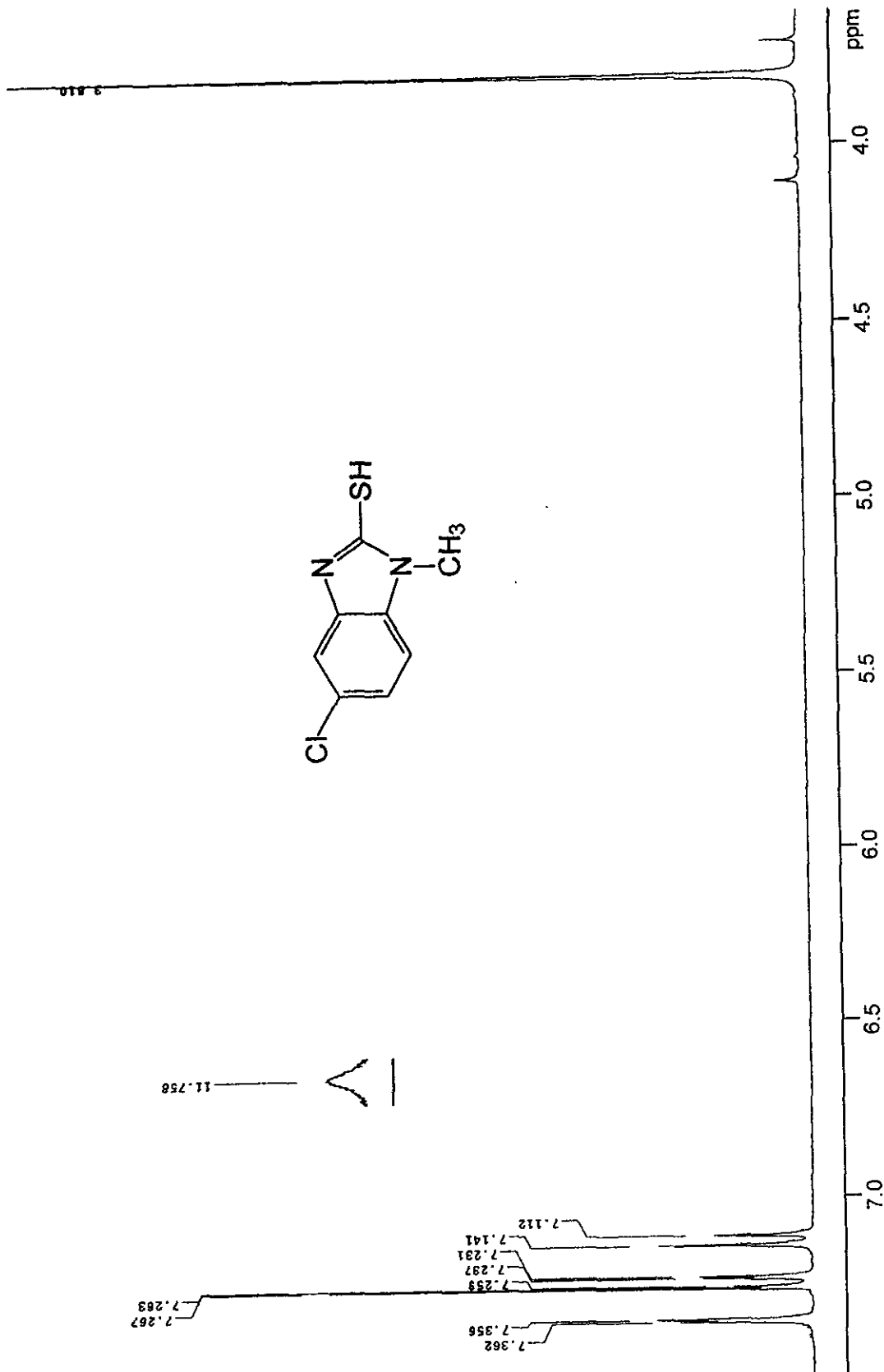
ESPECTRO 23. Espectro de RMN ^{13}C del 2-amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).



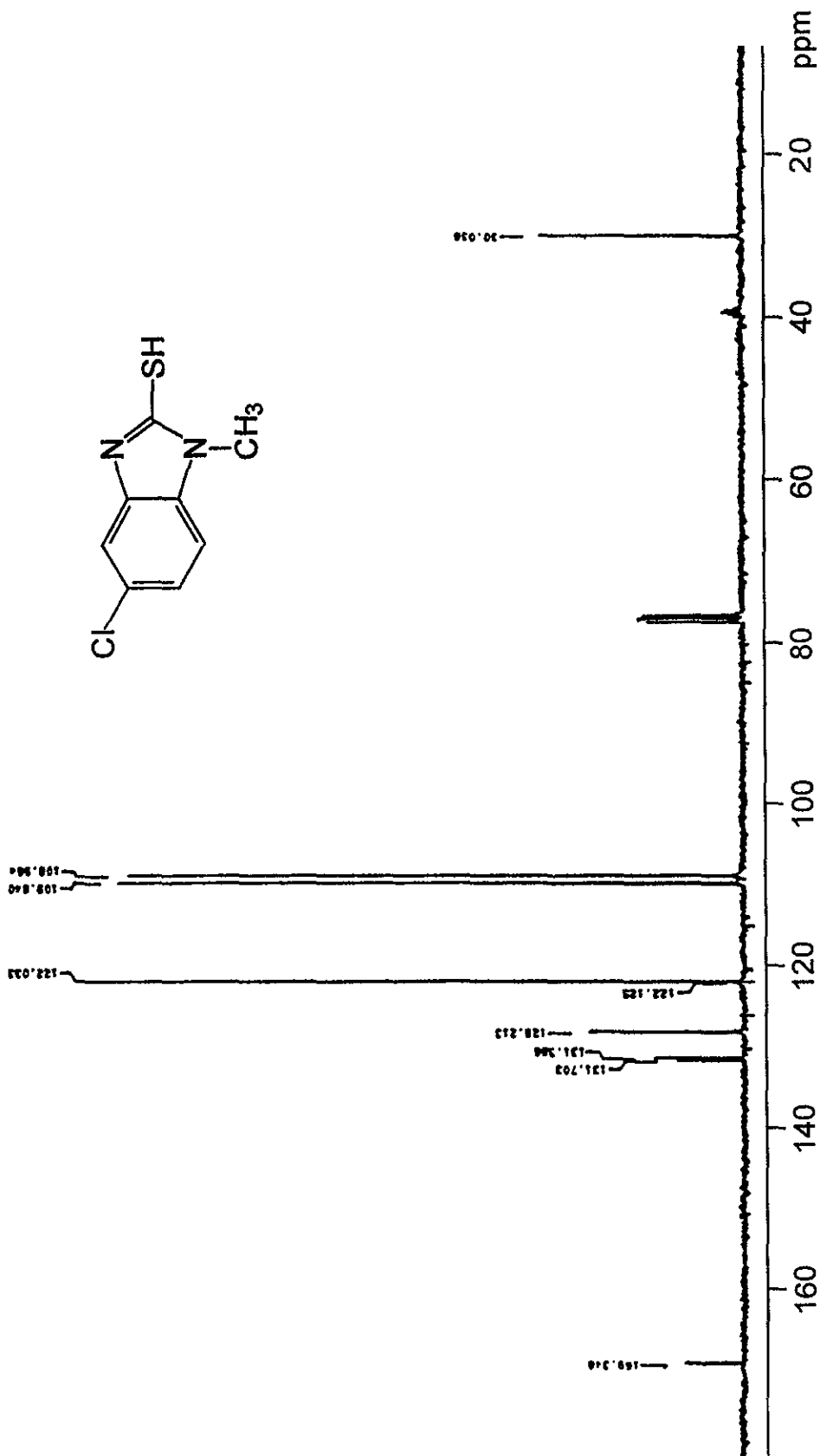
ESPECTRO 24. Espectro de masas por impacto electrónico del 2-amino-5-cloro-1-metilbencimidazol (6).



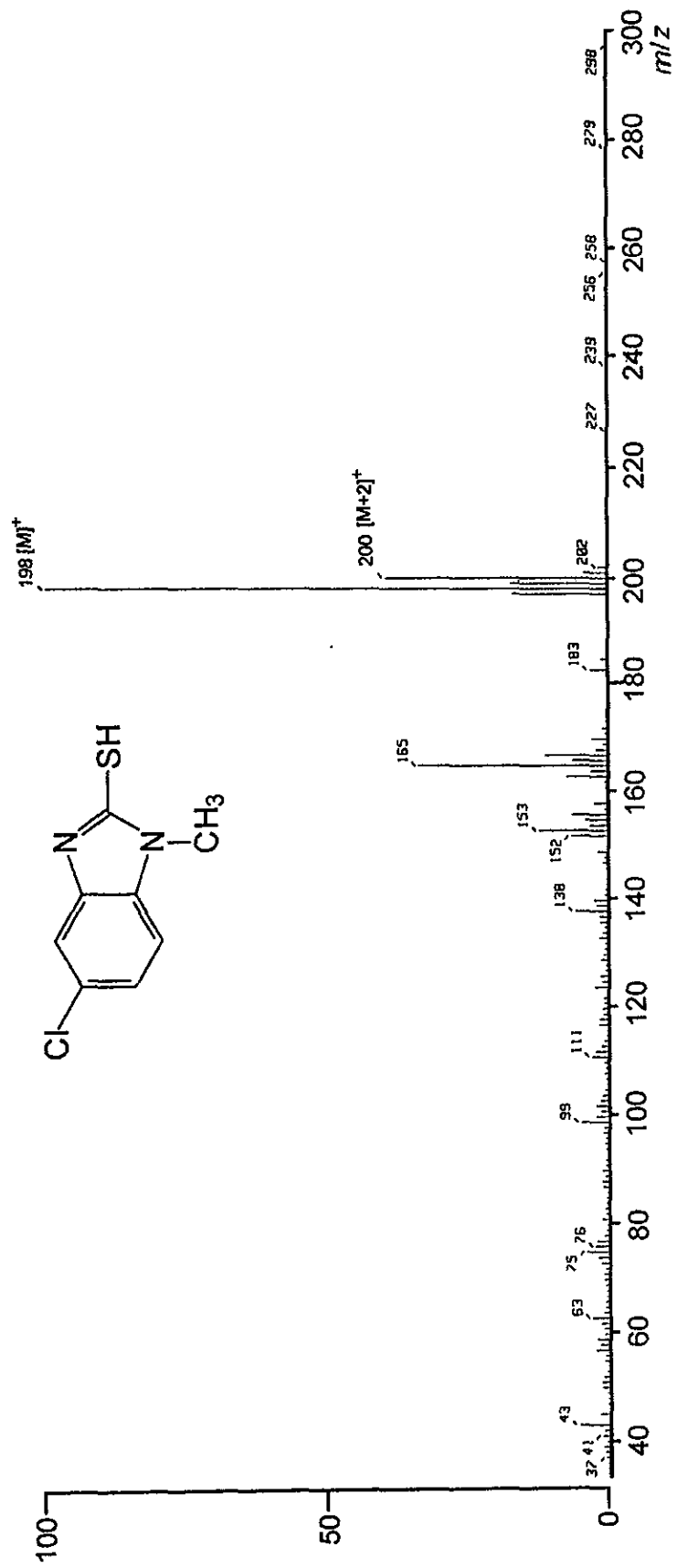
ESPECTRO 25. Espectro en el IR del 5-cloro-2-mercapto-1-metilbenzimidazol (7).



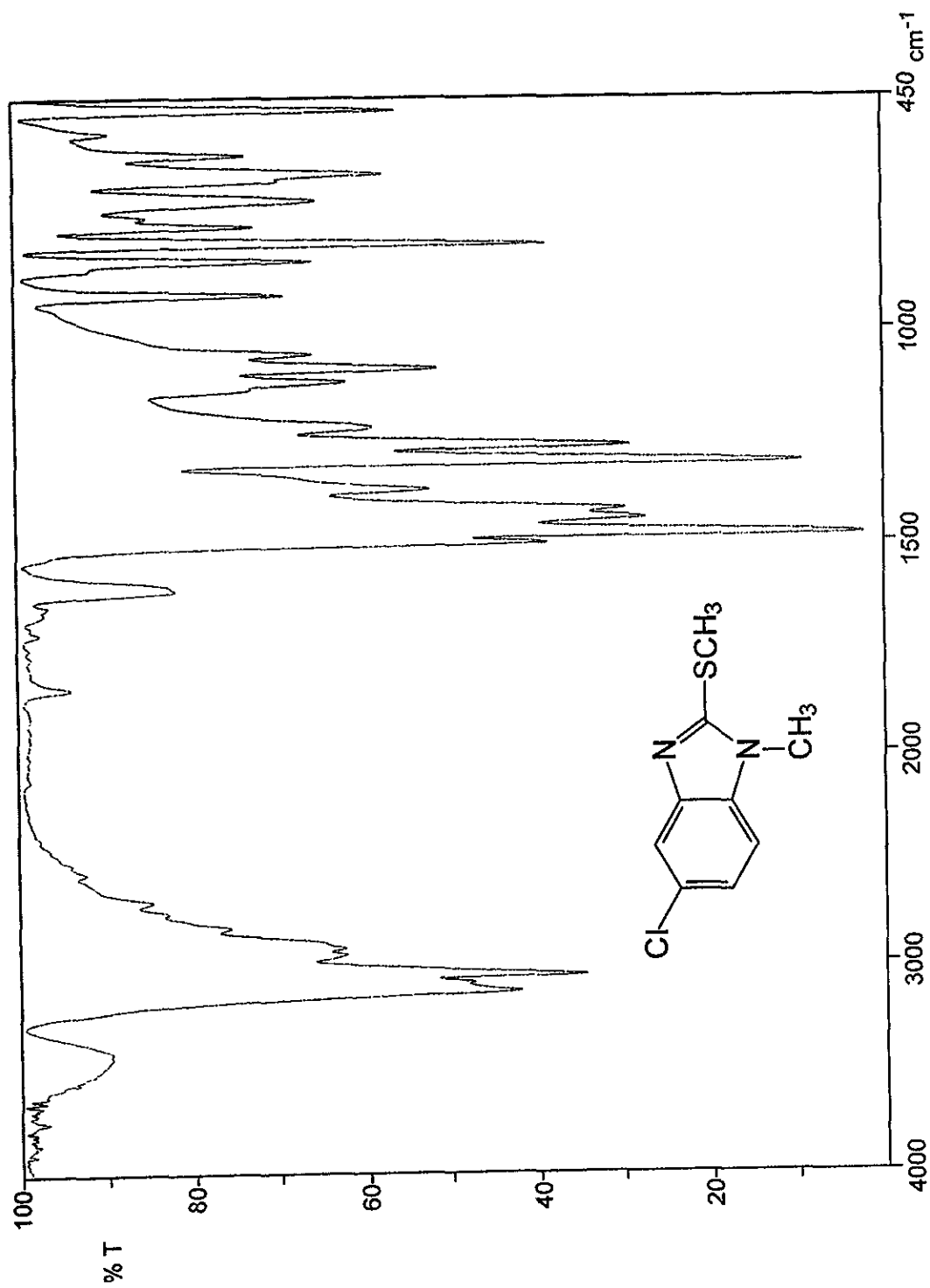
ESPECTRO 26. Espectro de RMN ¹H del 5-cloro-2-mercapto-1-metilbenzimidazol (7).



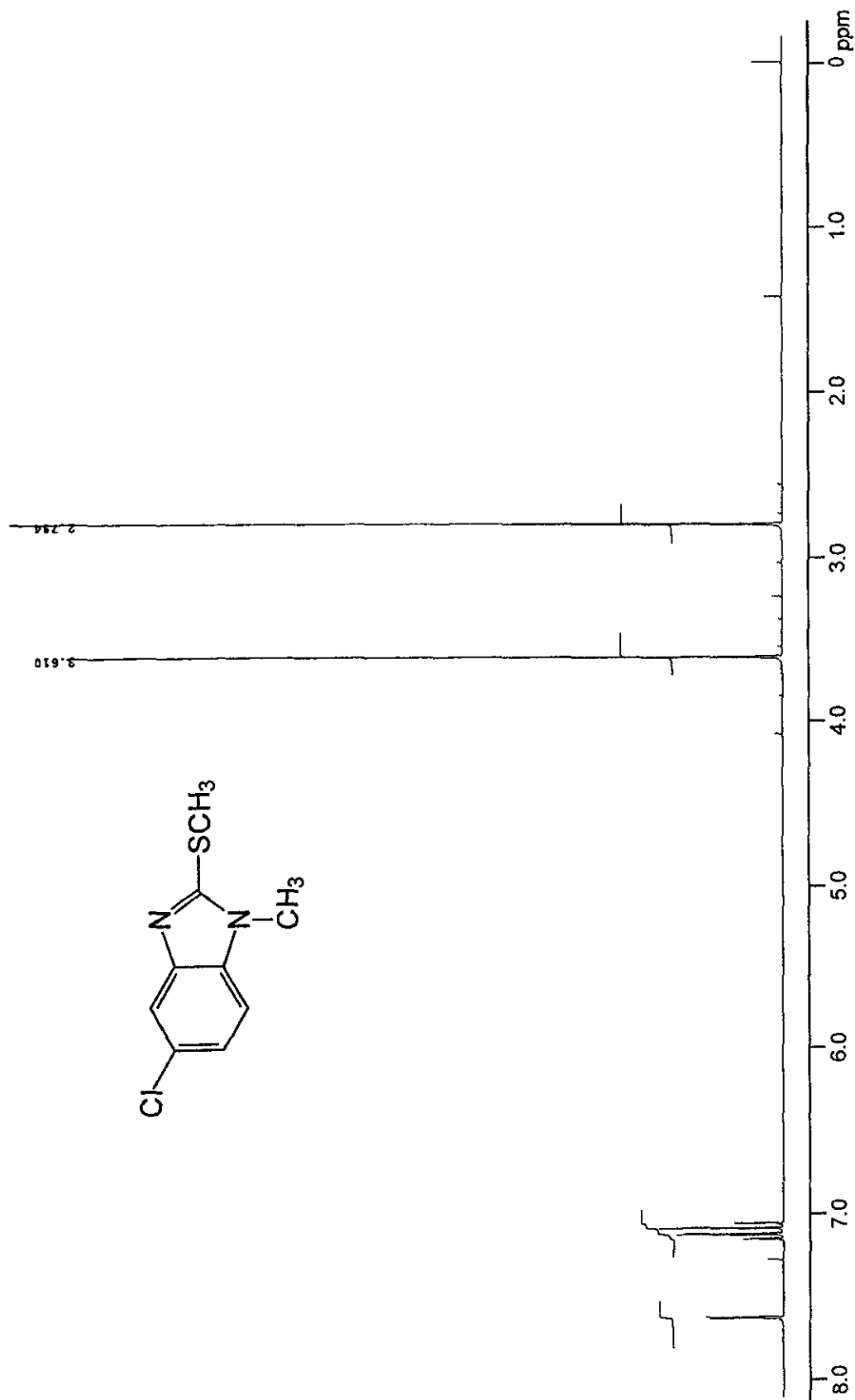
ESPECTRO 27. Espectro de RMN ^{13}C del 5-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (7).



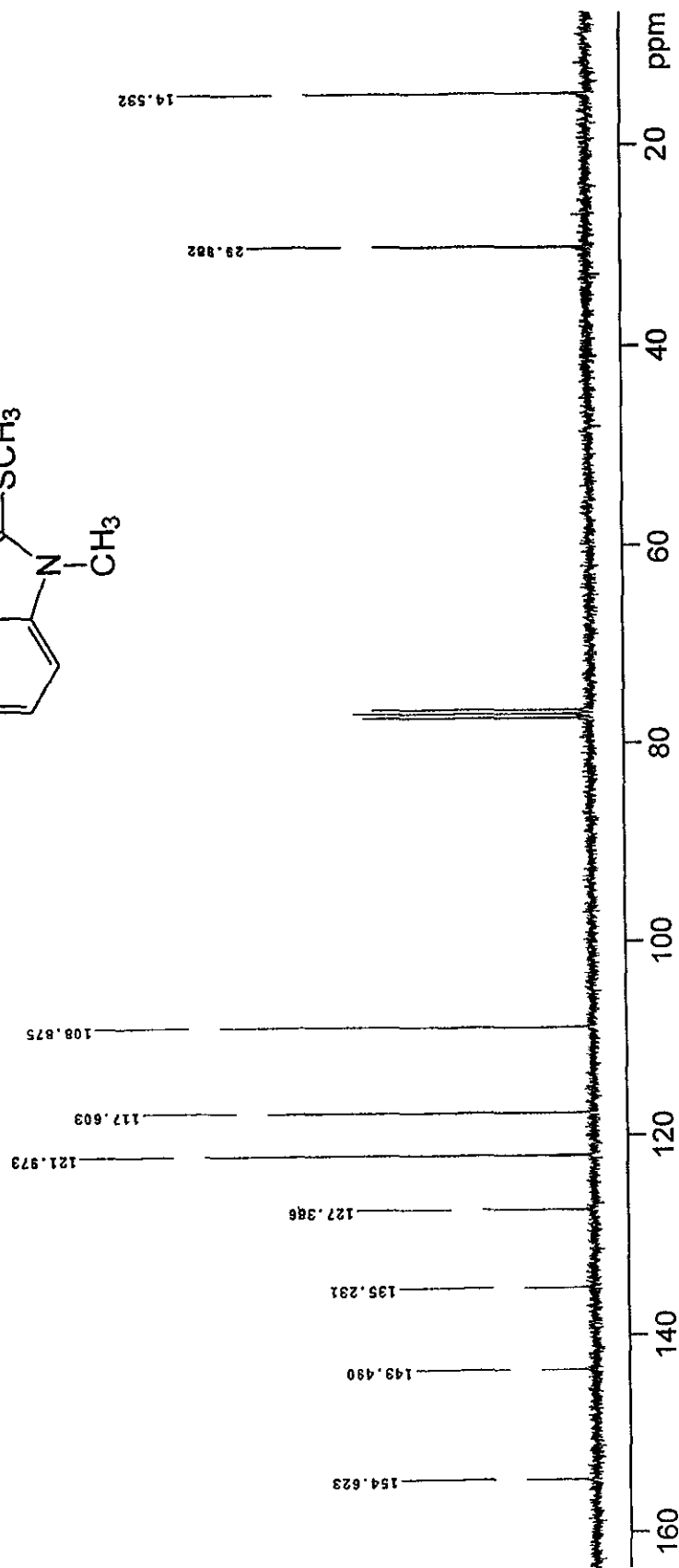
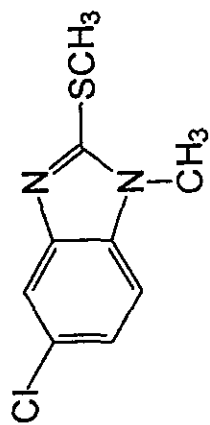
ESPECTRO 28. Espectro de masas por impacto electrónico del 5-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (7).



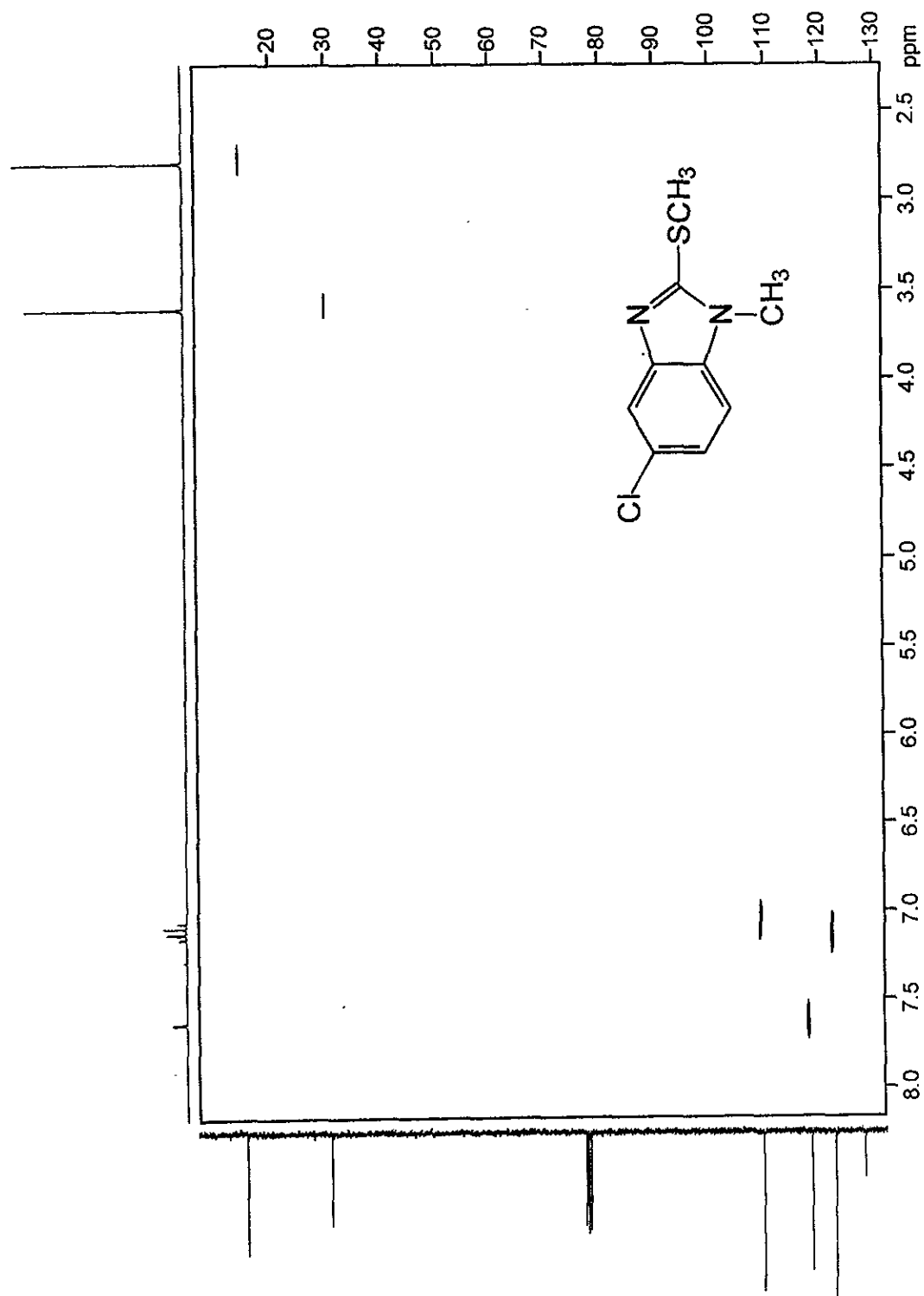
ESPECTRO 29. Espectro en el IR del 5-cloro-1-metil-2-metil-tiobenzimidazol (8).



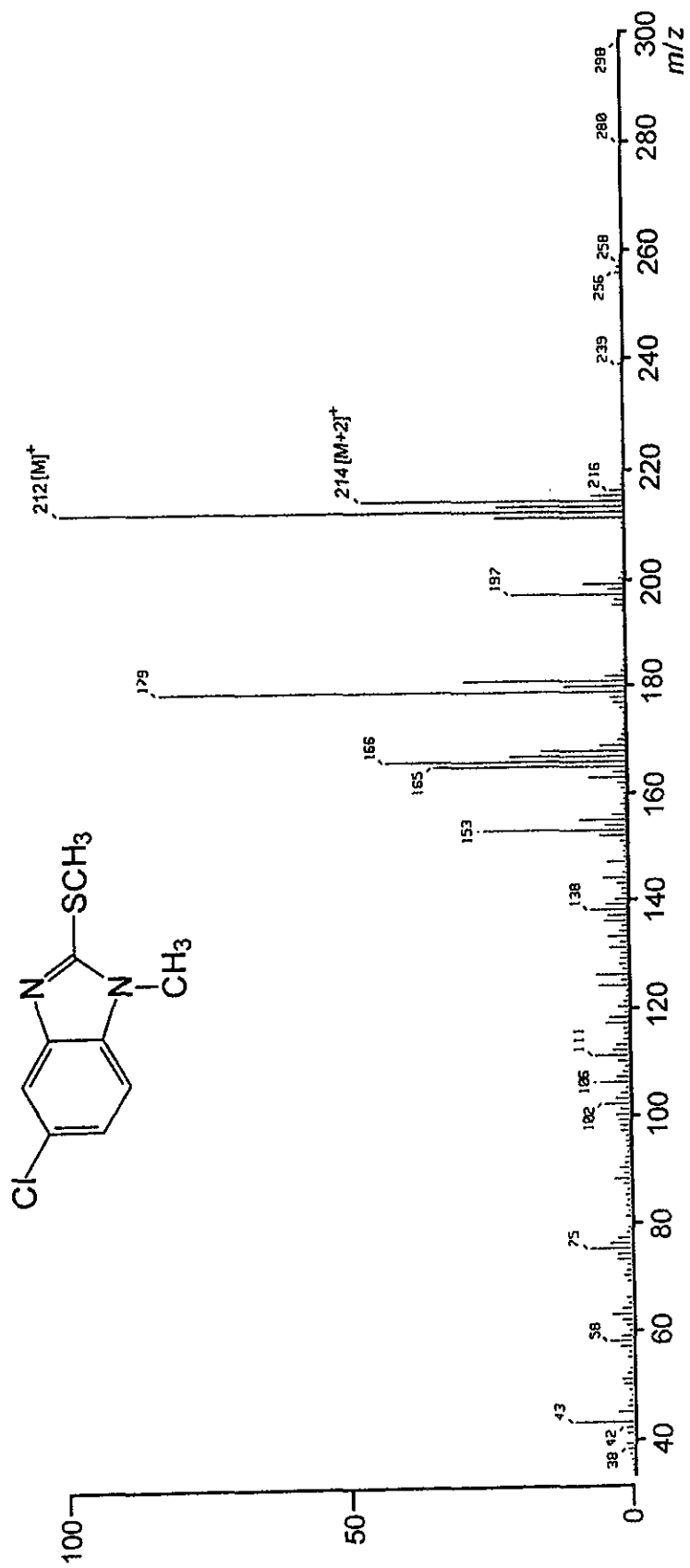
ESPECTRO 30. Espectro de RMN ¹H del 5-cloro-1-metil-2-metilthiobenzimidazol (8).



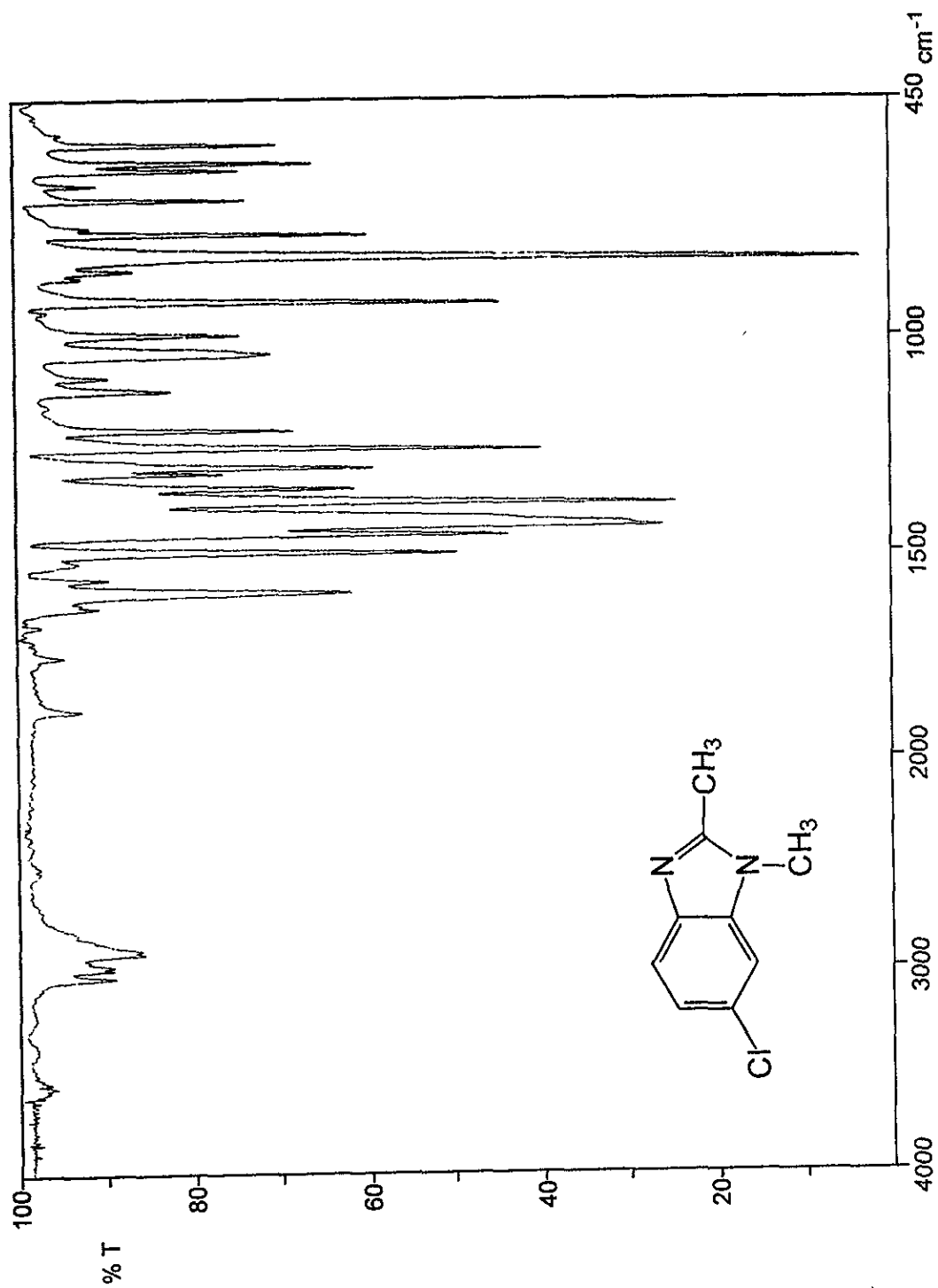
ESPECTRO 31. Espectro de RMN ^{13}C del 5-cloro-1-metil-2-metil-tiobenzimidazol (8).



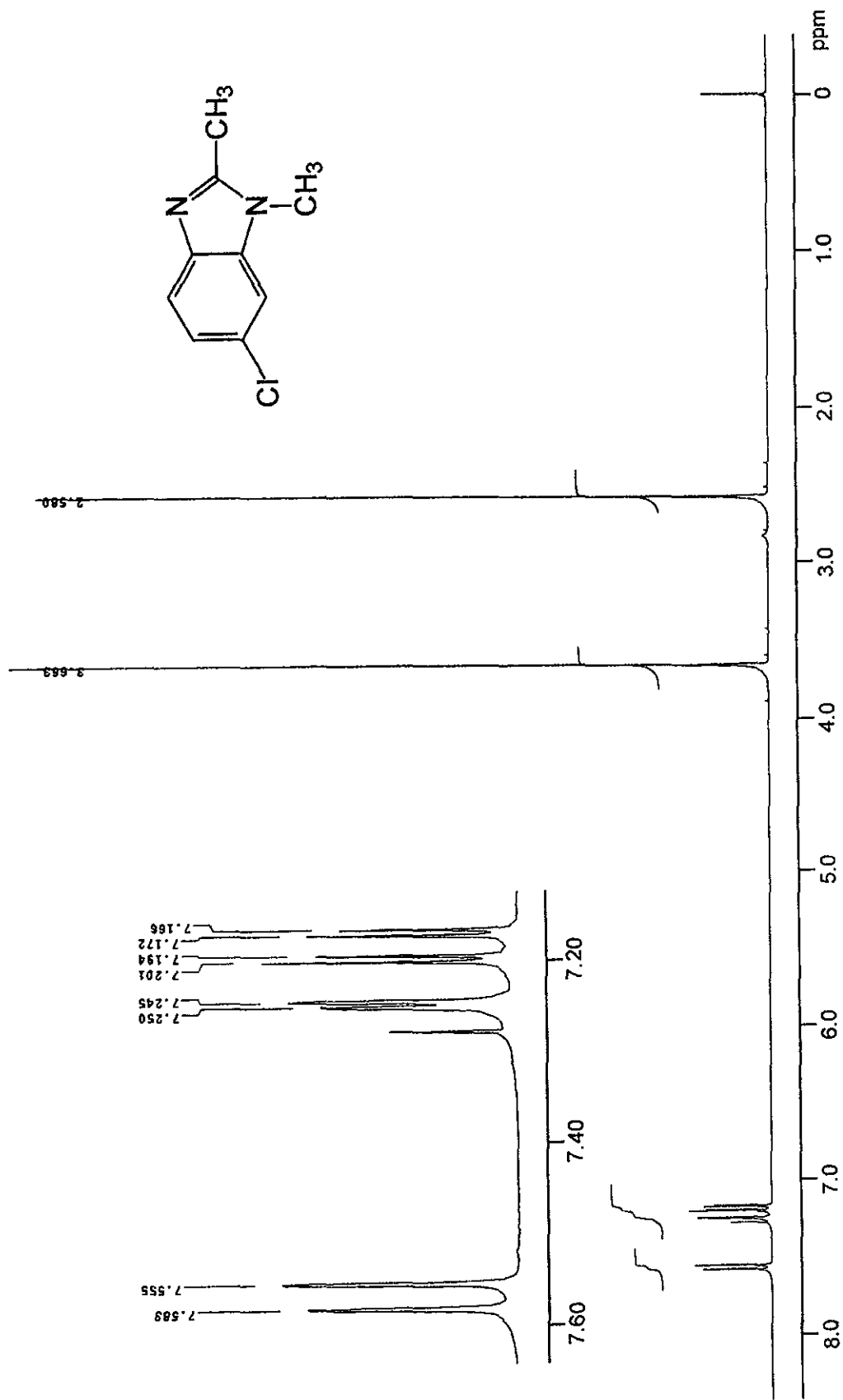
ESPECTRO 31a. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HETCOR del 5-cloro-1-metil-2-metilbencimidazol (8).



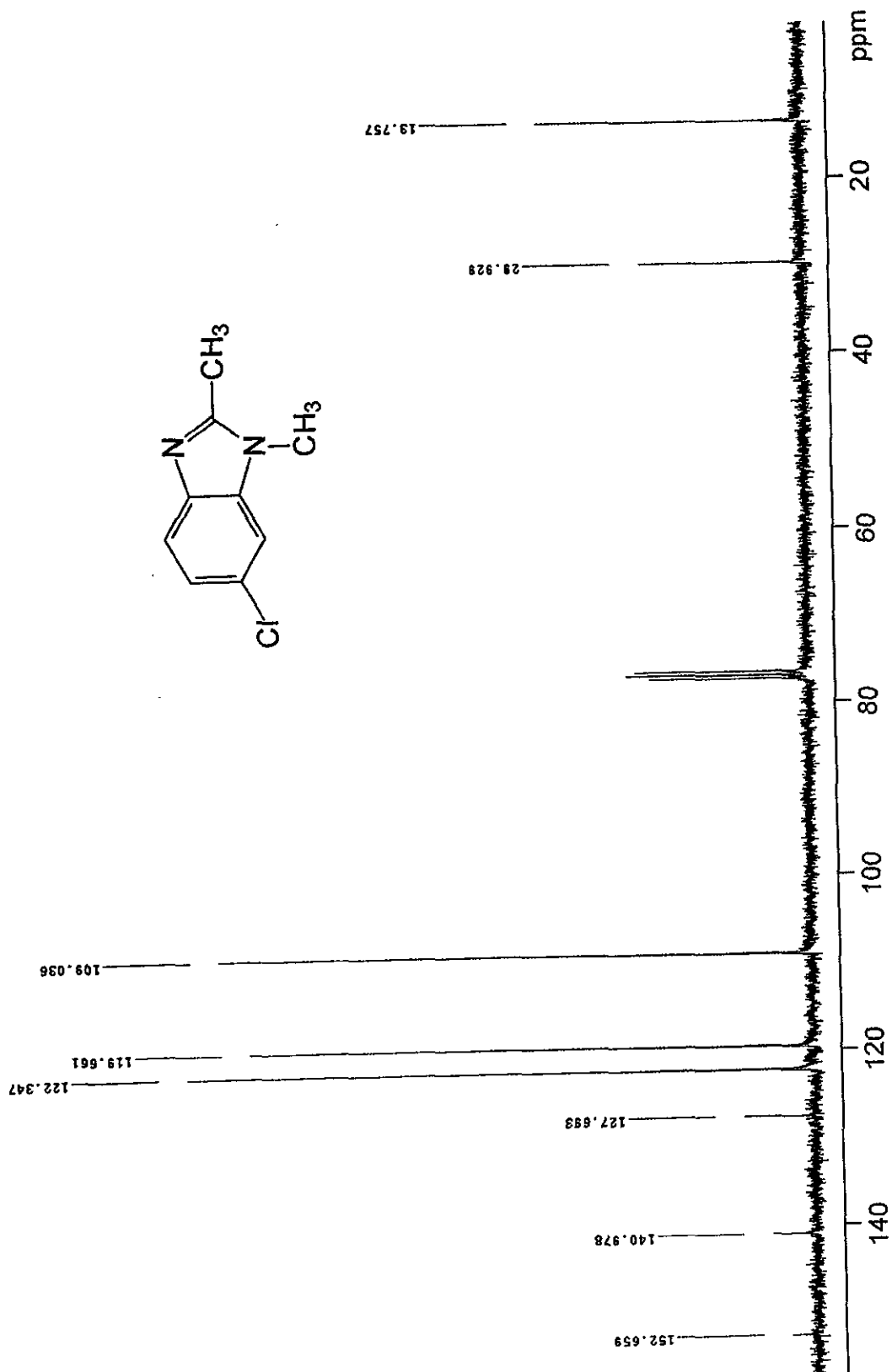
ESPECTRO 32. Espectro de masas por impacto electrónico del 5-cloro-1-metil-2-metilbenzimidazol (8).



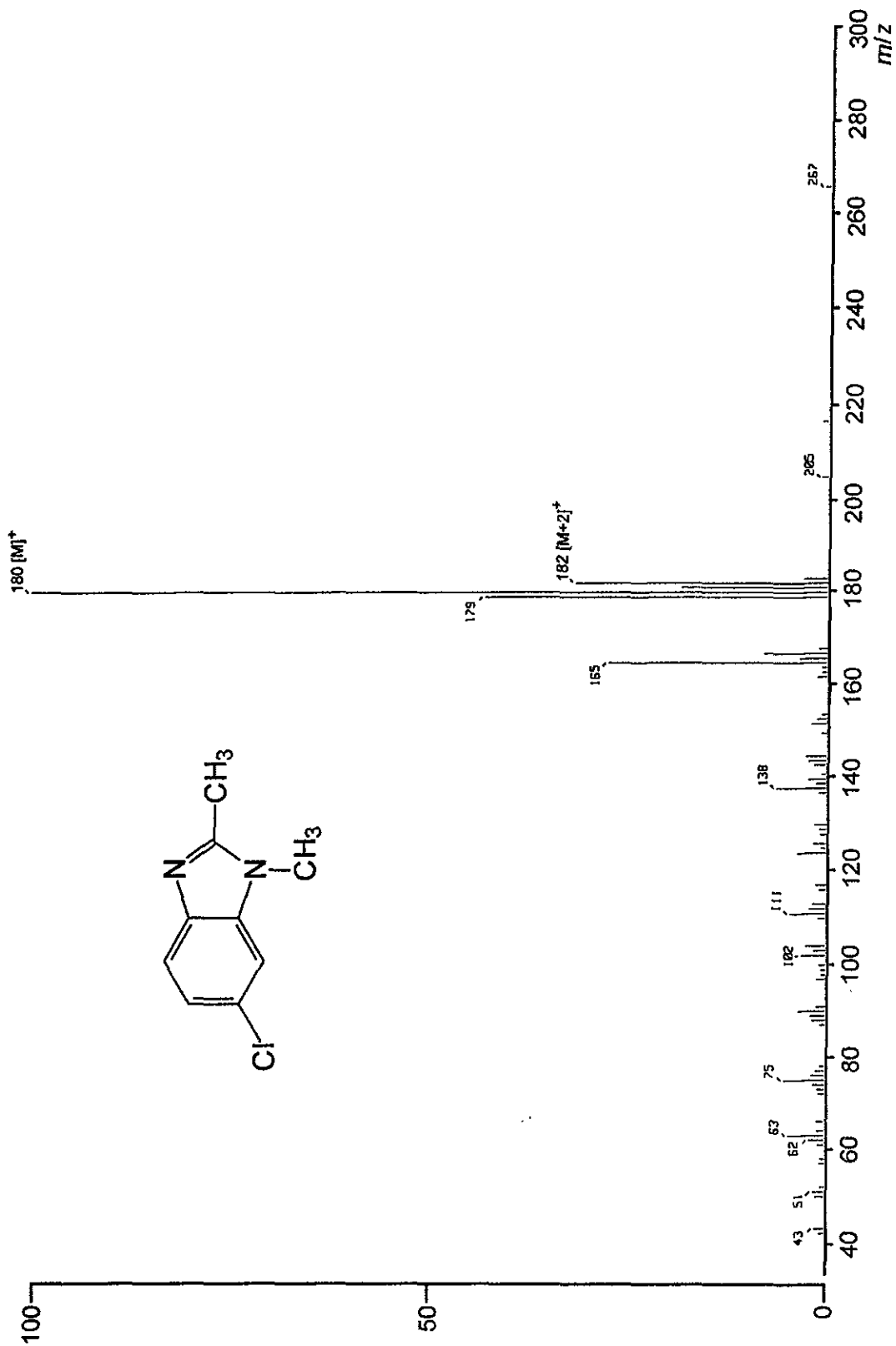
ESPECTRO 33. Espectro en el IR del 6-cloro, 1-2-dimetilbenzimidazol (9).



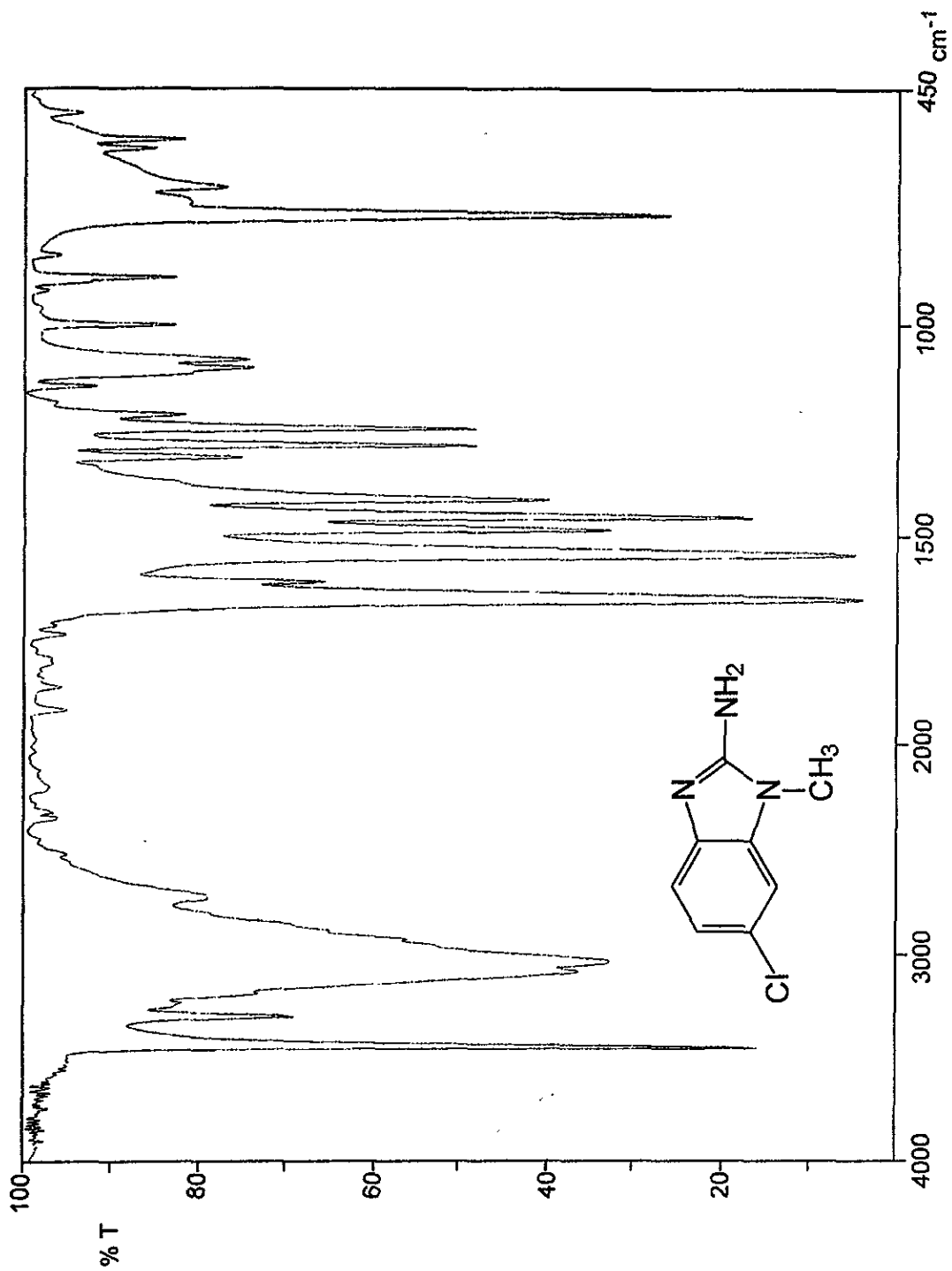
ESPECTRO 34. Espectro de RMN ¹H del 6-cloro-1,2-dimetilbenzimidazol (9).



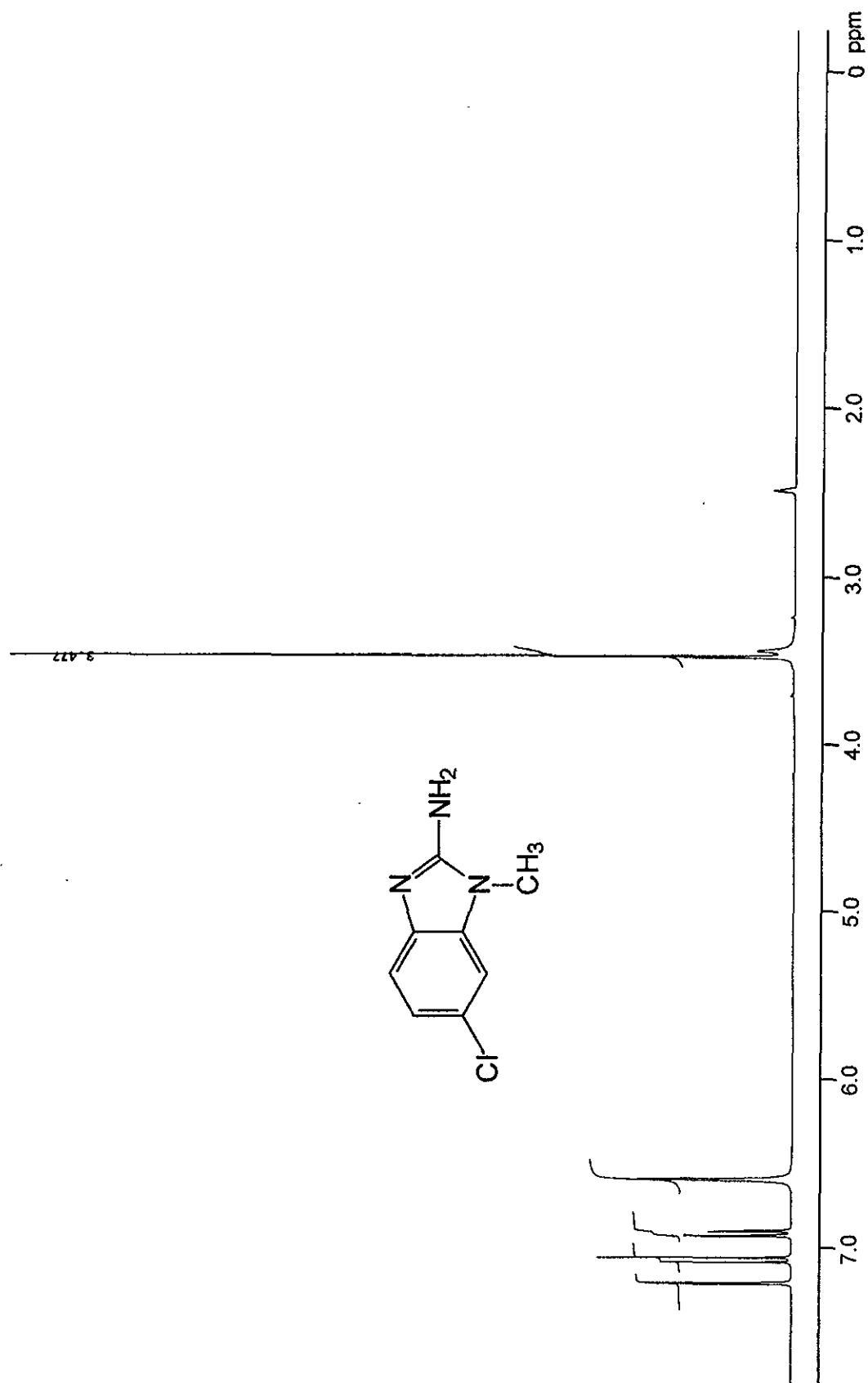
ESPECTRO 35. Espectro de RMN ^{13}C del 6-cloro-1,2-dimetilbenzimidazol (9).



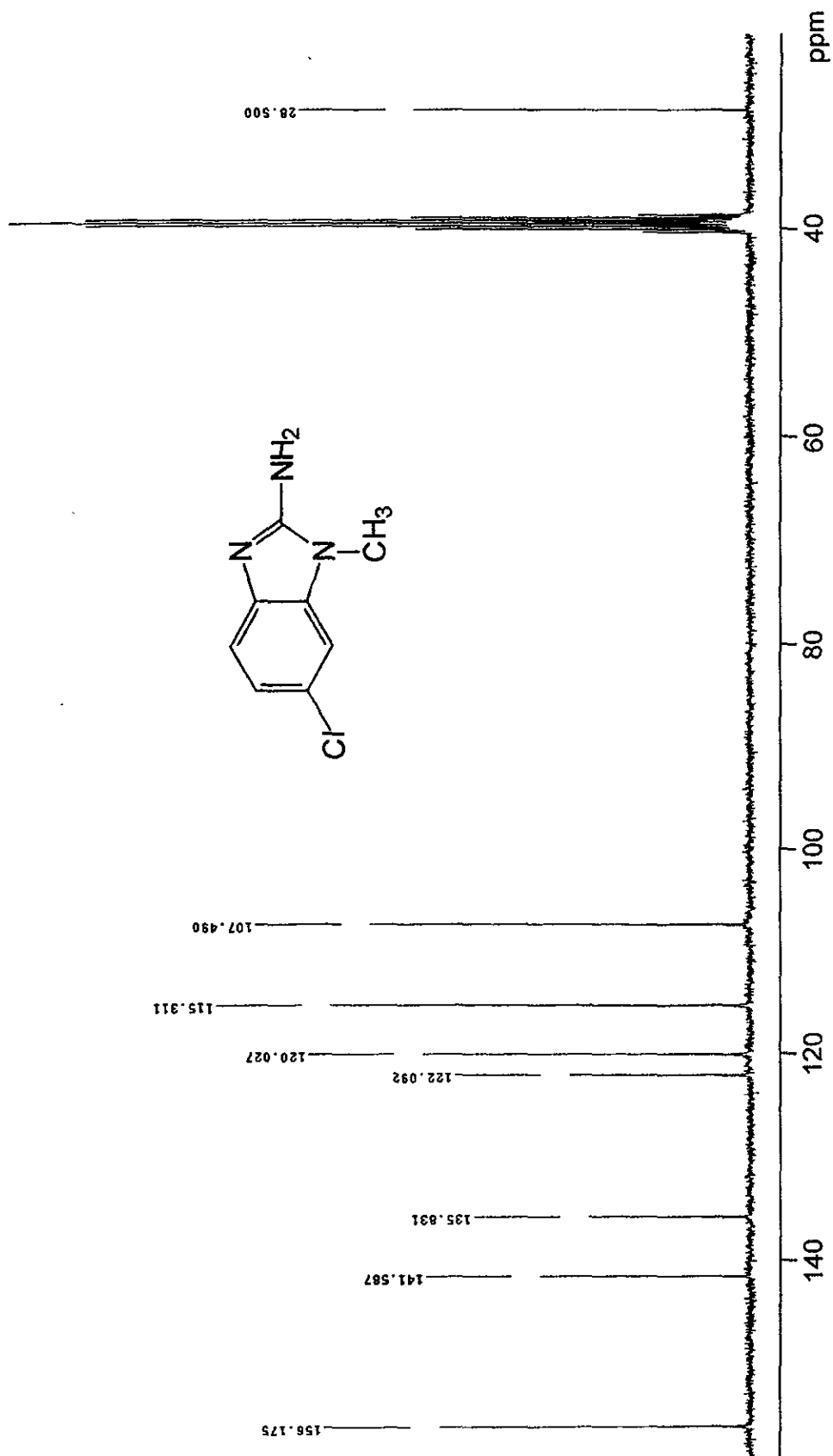
ESPECTRO 36. Espectro de masas por impacto electrónico del 6-cloro-1,2-dimetilbenzimidazol (9).



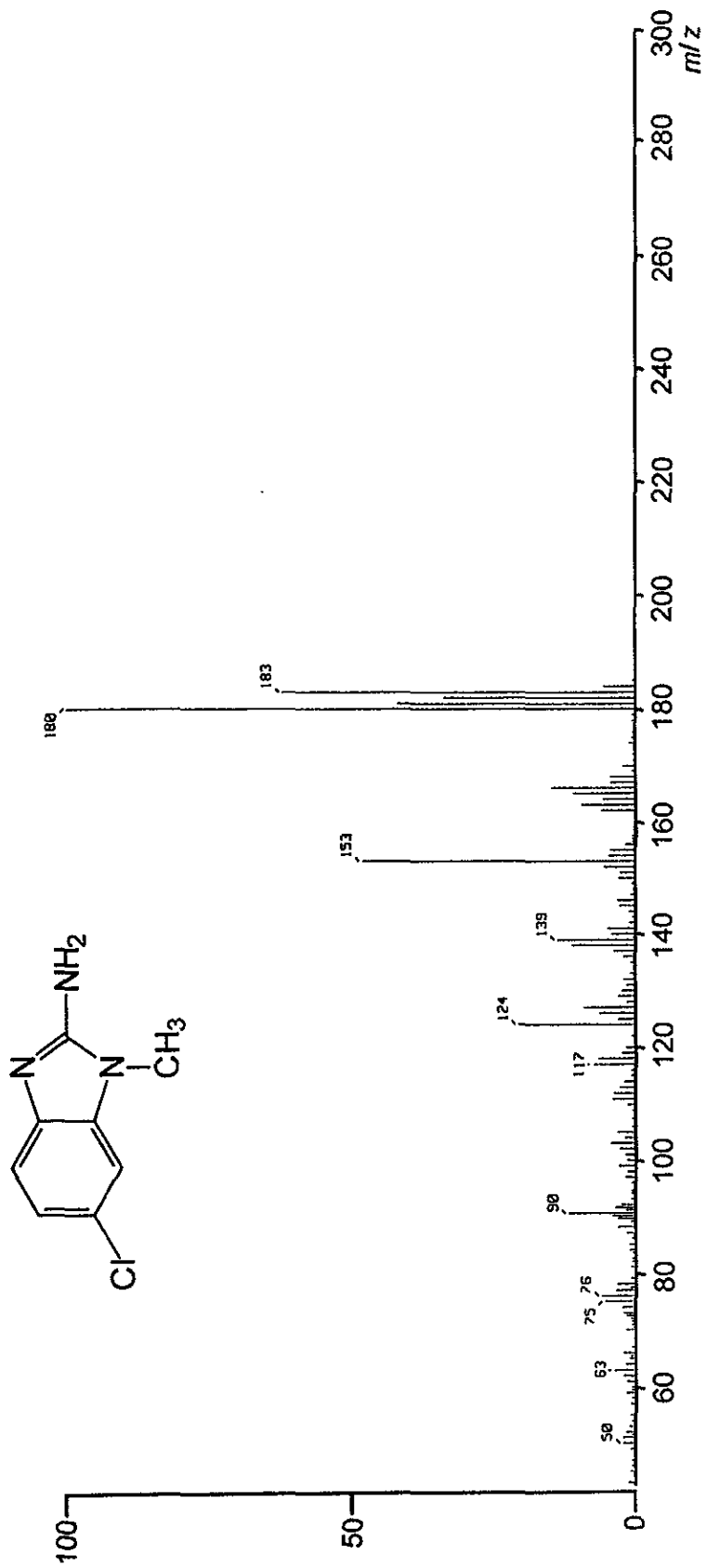
ESPECTRO 37. Espectro en el IR del 2-amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).



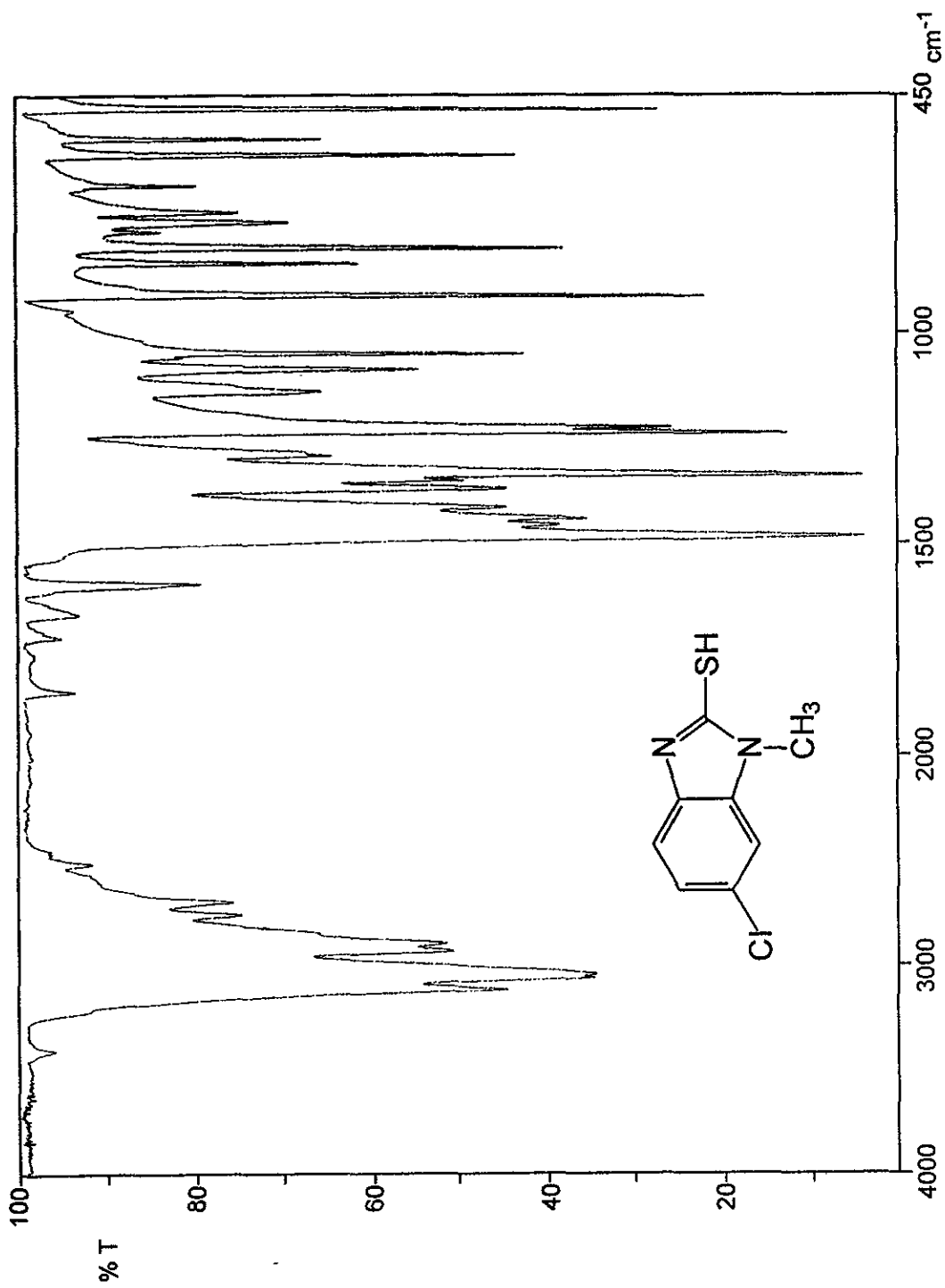
ESPECTRO 38. Espectro de RMN ^1H del 2-amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).



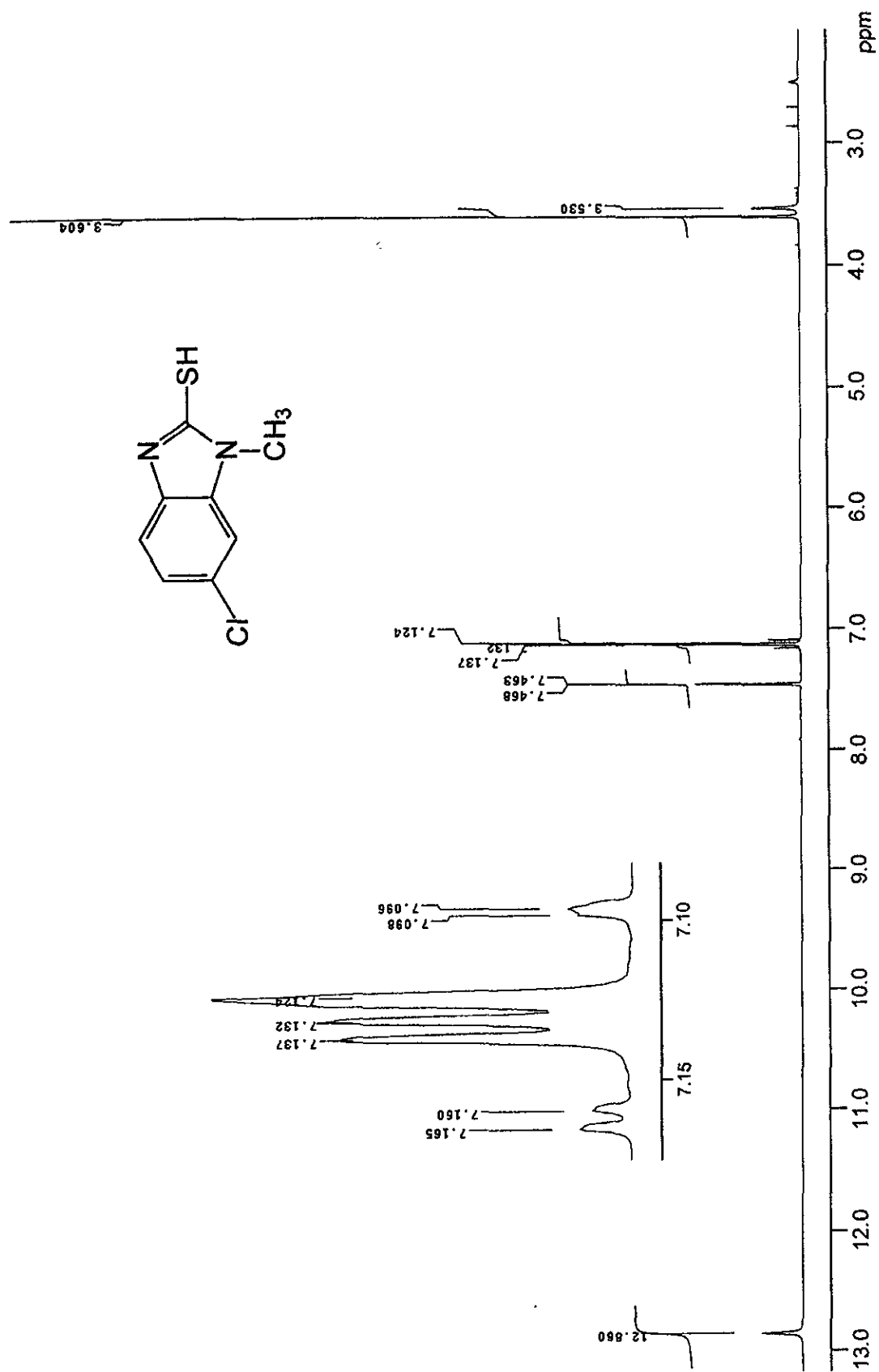
ESPECTRO 39. Espectro de RMN ^{13}C del 2-amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).



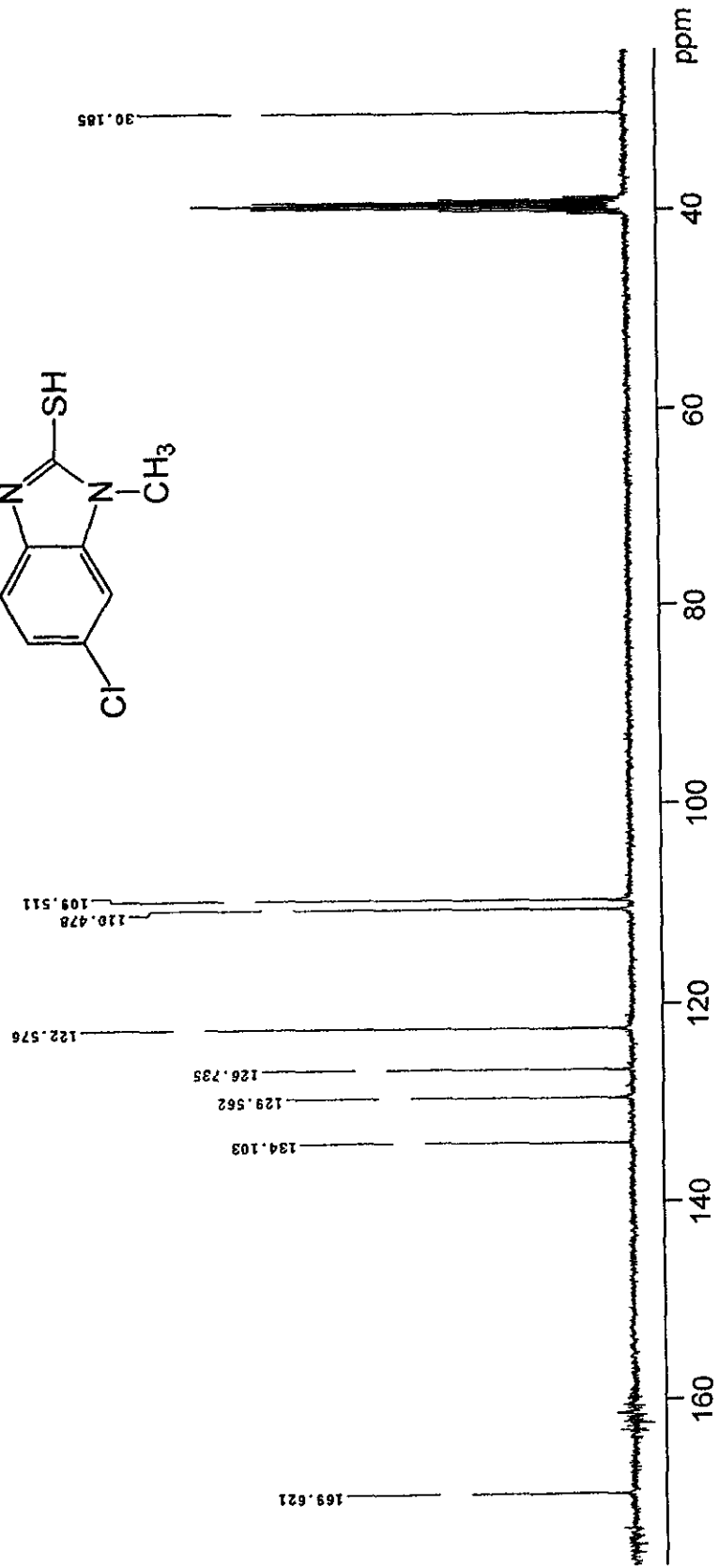
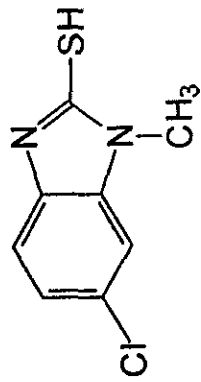
ESPECTRO 40. Espectro de masas por impacto electrónico del 2-amino-6-cloro-1-metilbencimidazol (10).



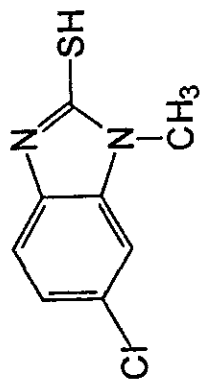
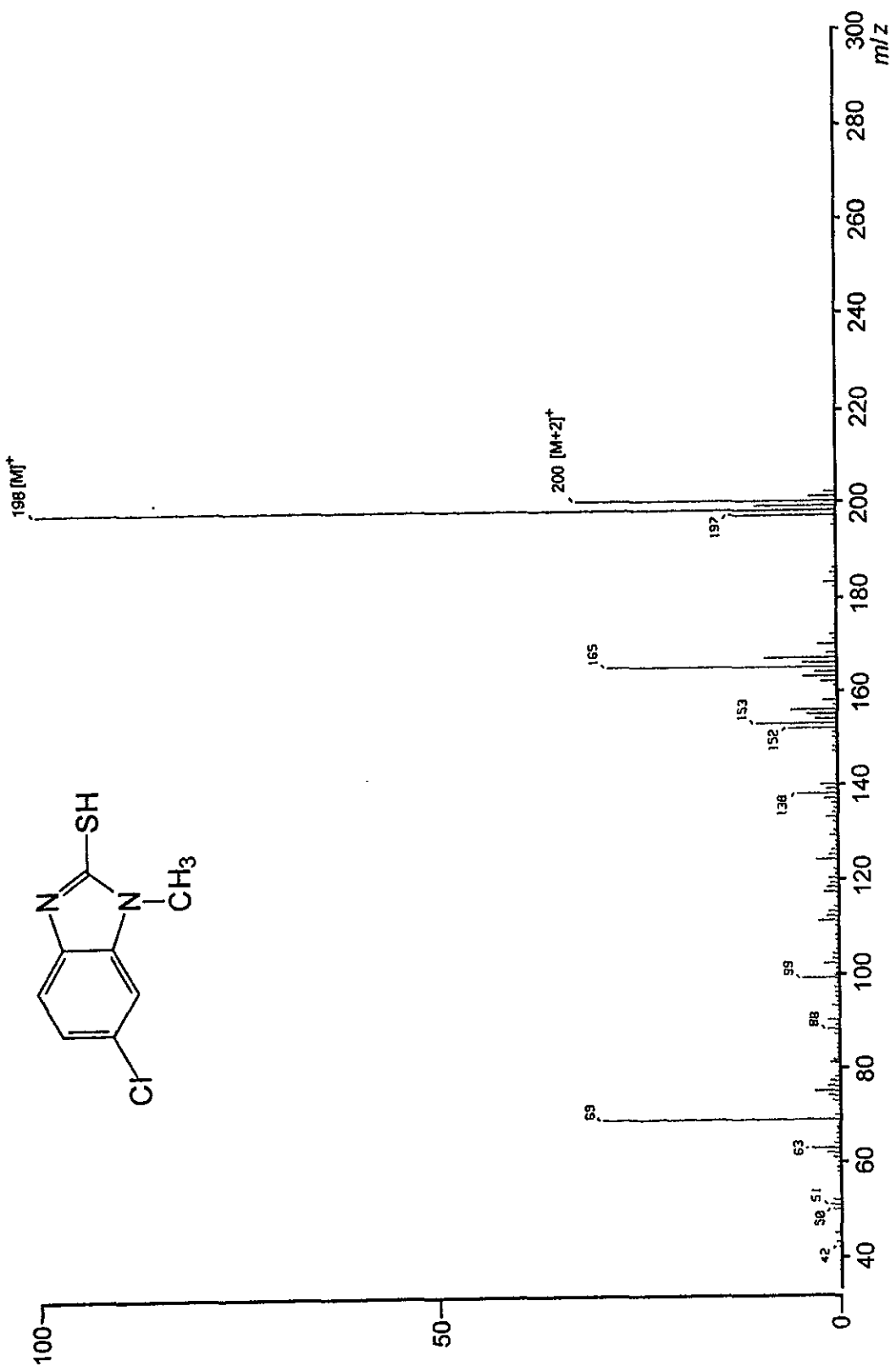
ESPECTRO 41. Espectro en el IR del 6-cloro-2-mercapto-1-1-metilimidazol (11).



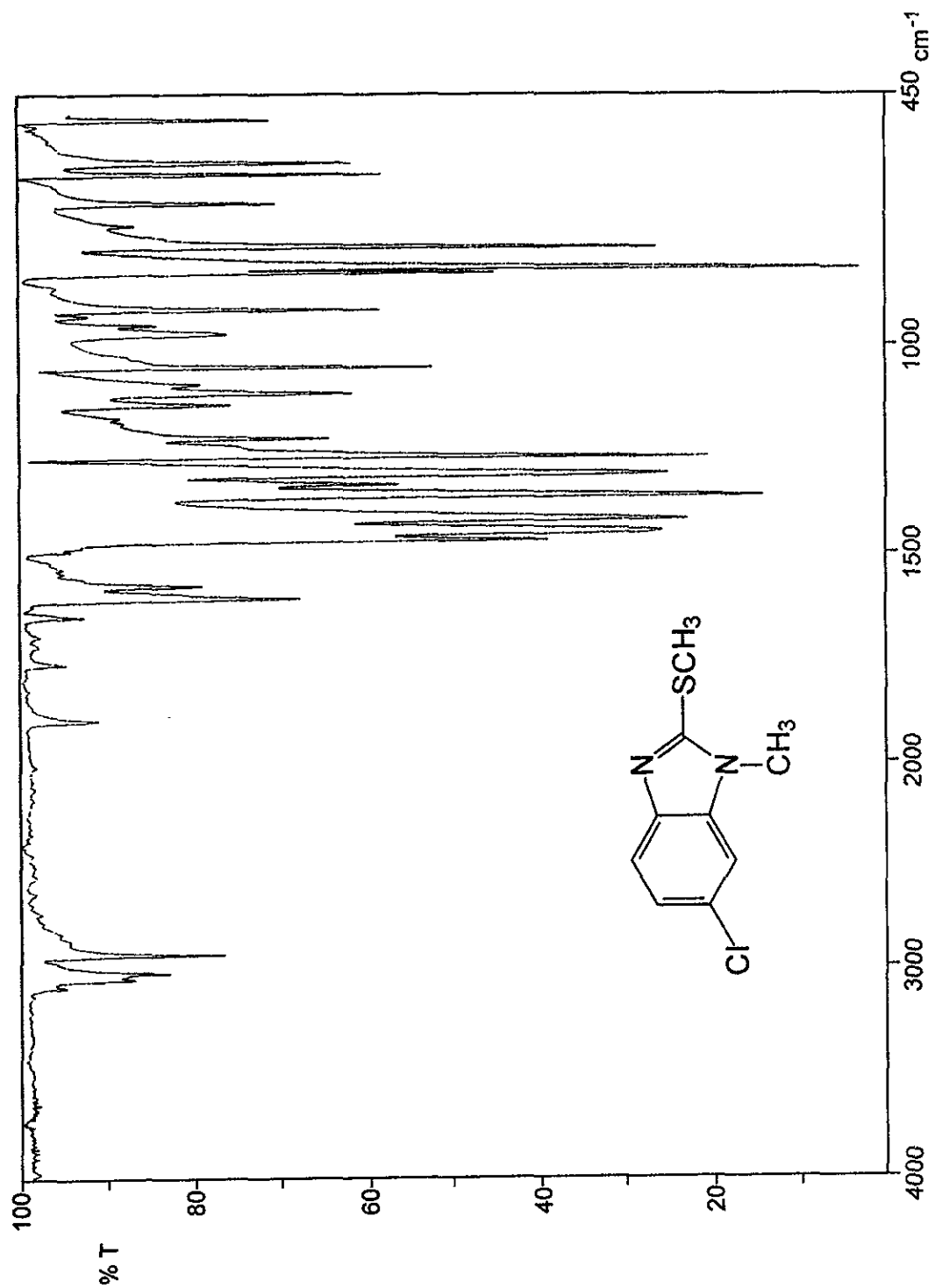
ESPECTRO 42. Espectro de RMN ¹H del 6-cloro-2-mercapto-1-metilimidazol (11).



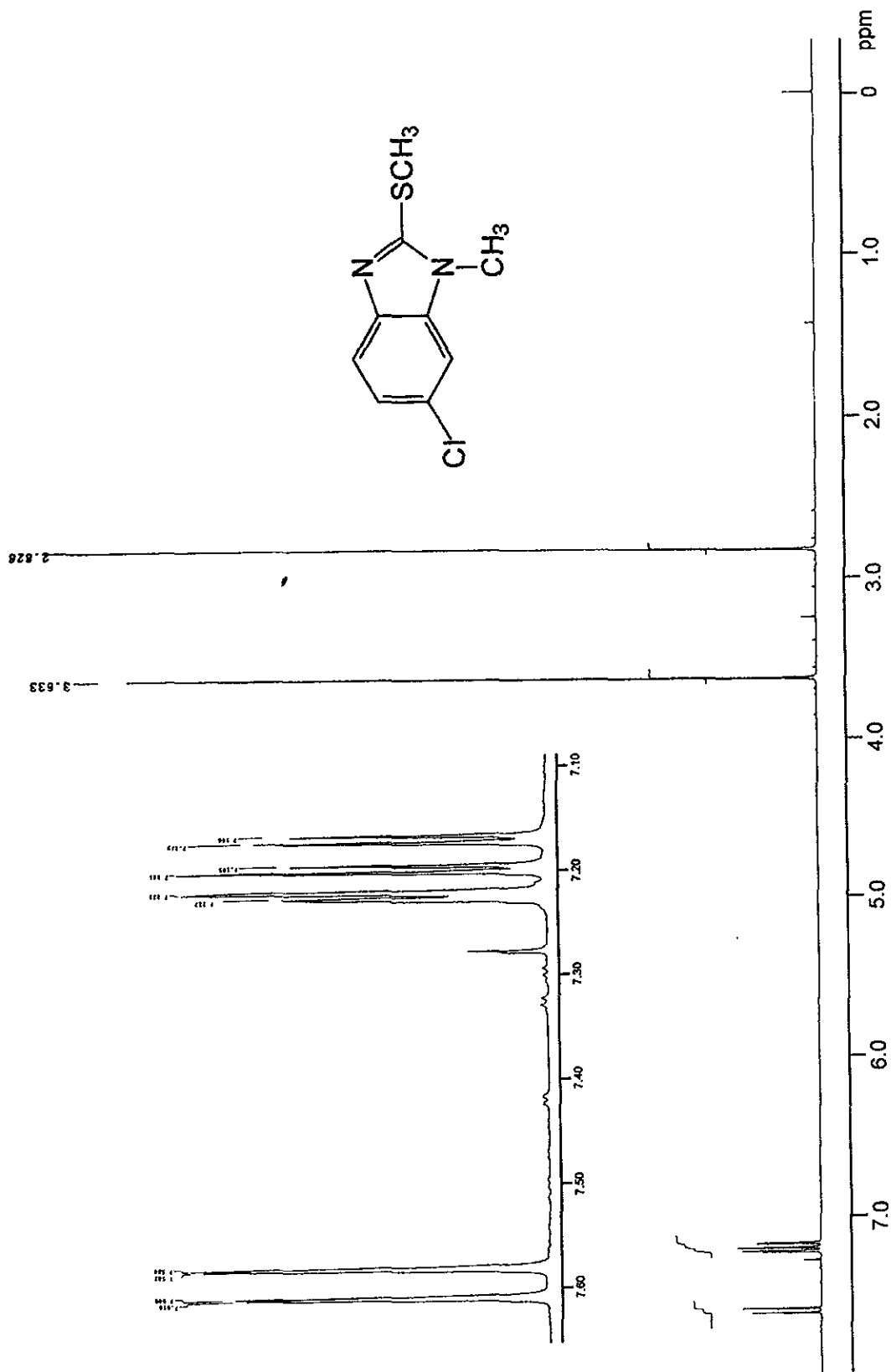
ESPECTRO 43. Espectro de RMN ^{13}C del 6-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (11).



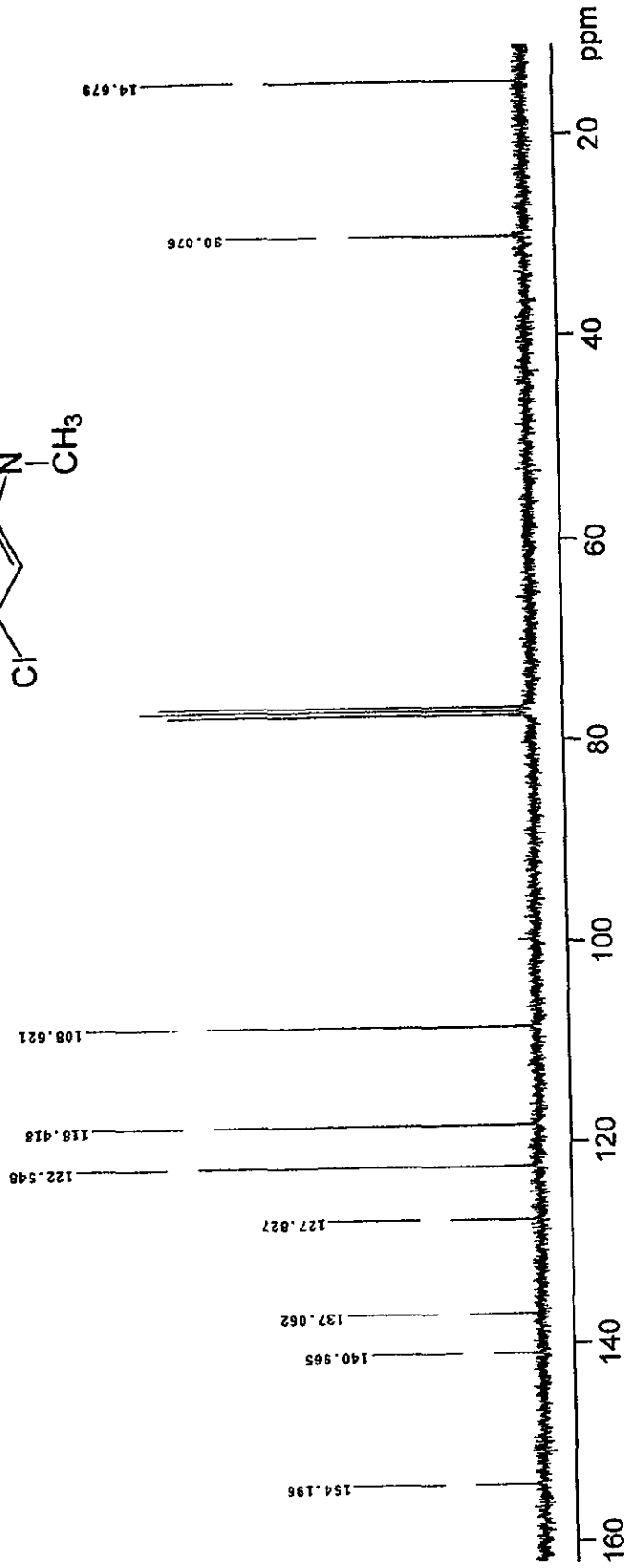
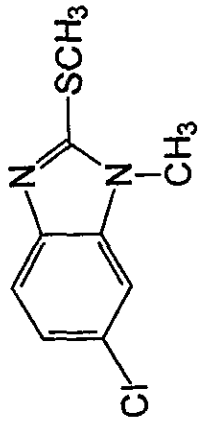
ESPECTRO 44. Espectro de masas por impacto electrónico del 6-cloro-2-mercapto-1-metilimidazol (11).



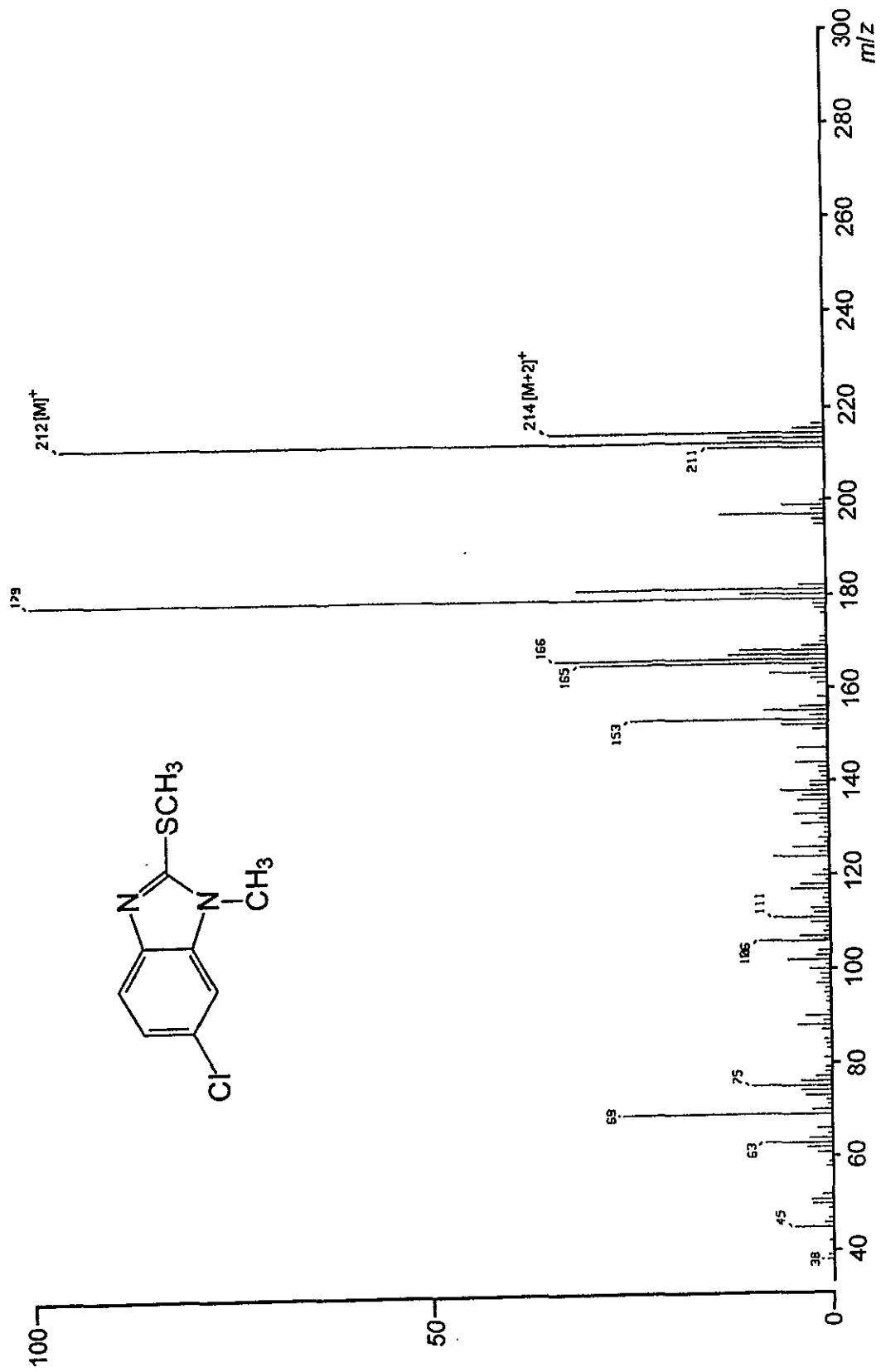
ESPECTRO 45. Espectro en el IR del 6-cloro-1-metil-2-metilbencimidazol (12).



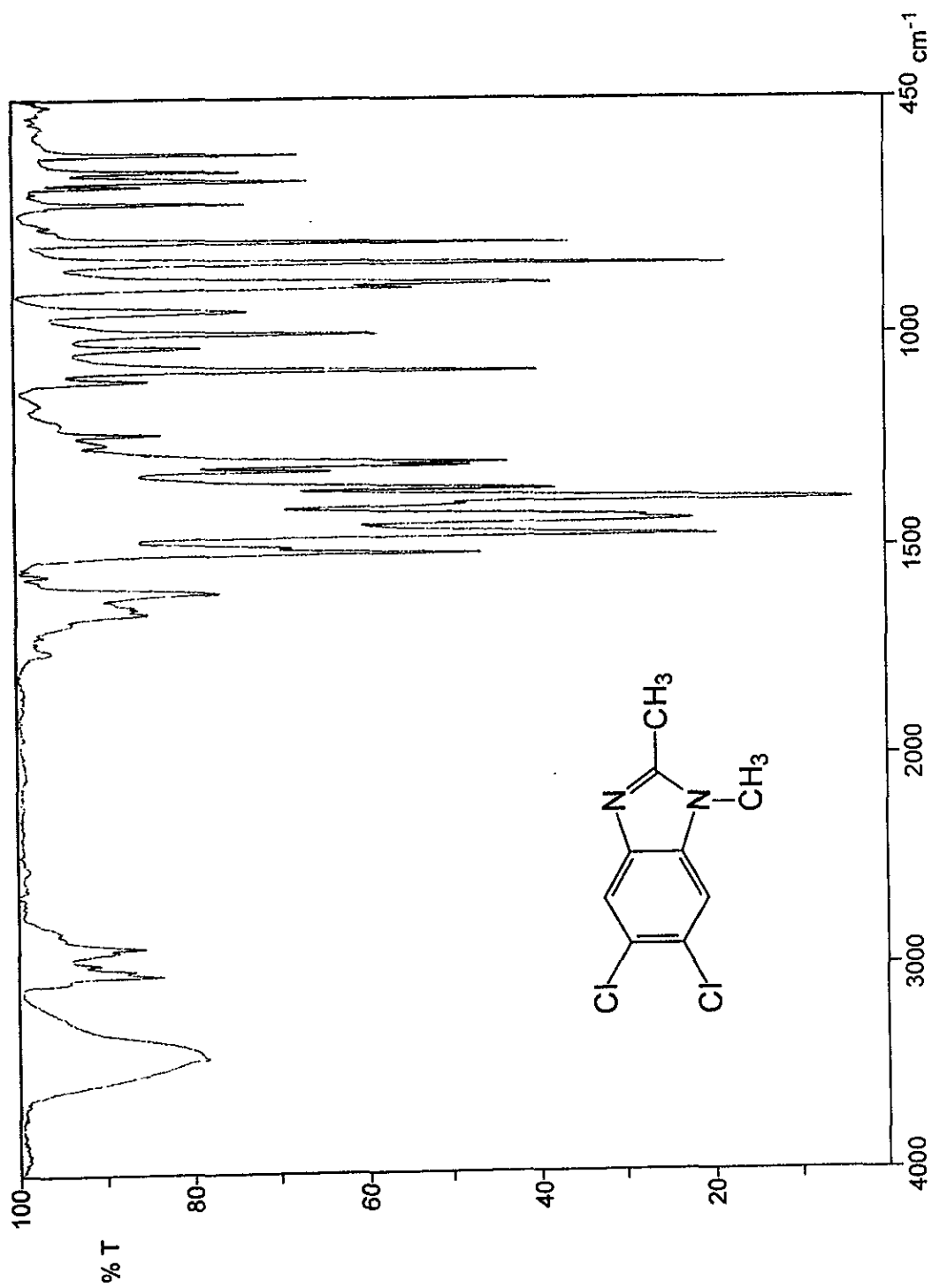
ESPECTRO 46. Espectro de RMN ^1H del 6-cloro-1-metil-2-metilbencimidazol (12).



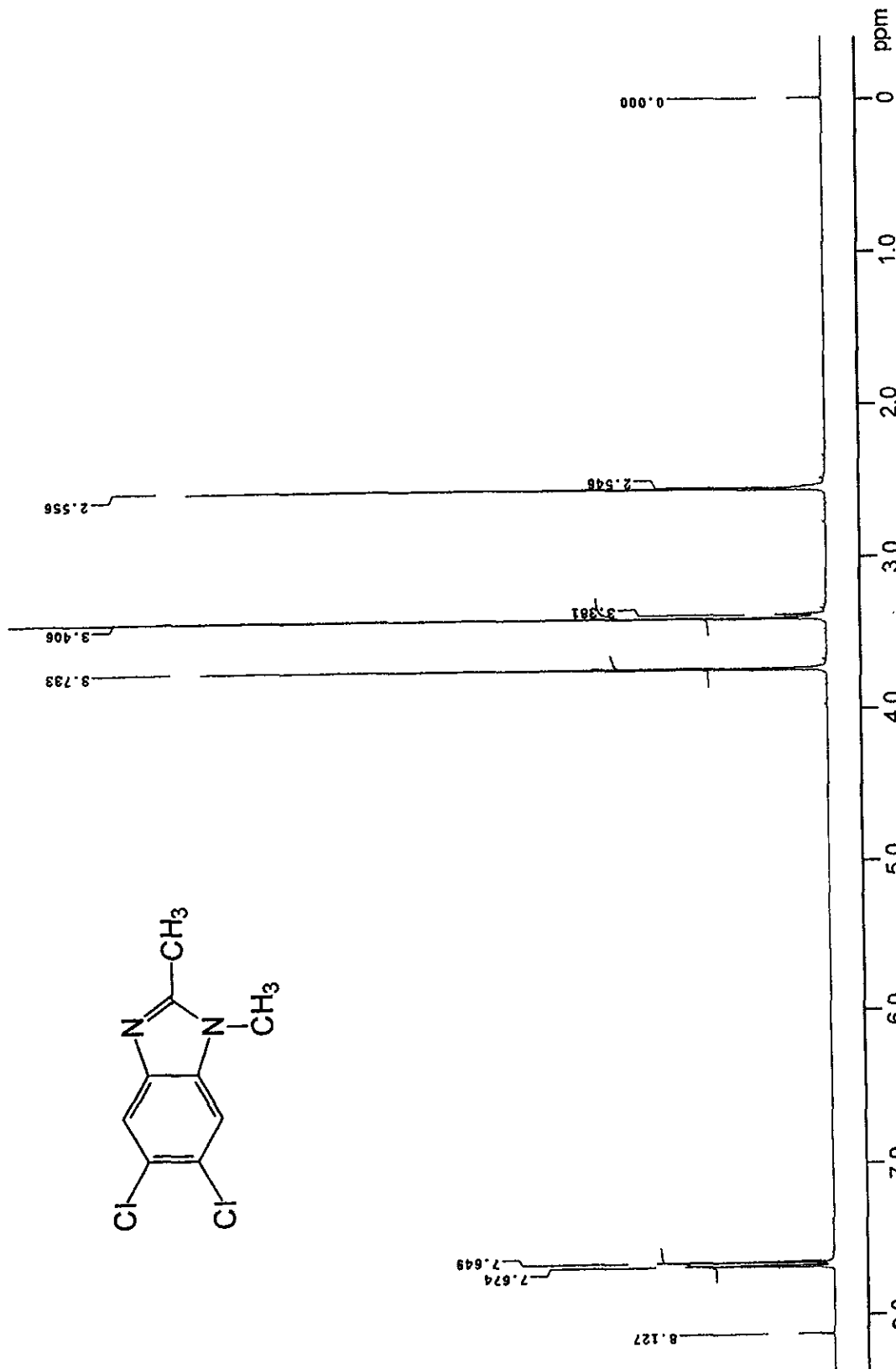
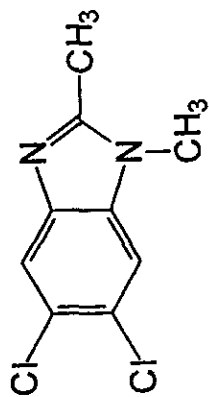
ESPECTRO 47. Espectro de RMN ^{13}C del 6-cloro-1-metil-2-metilbencimidazol (12).

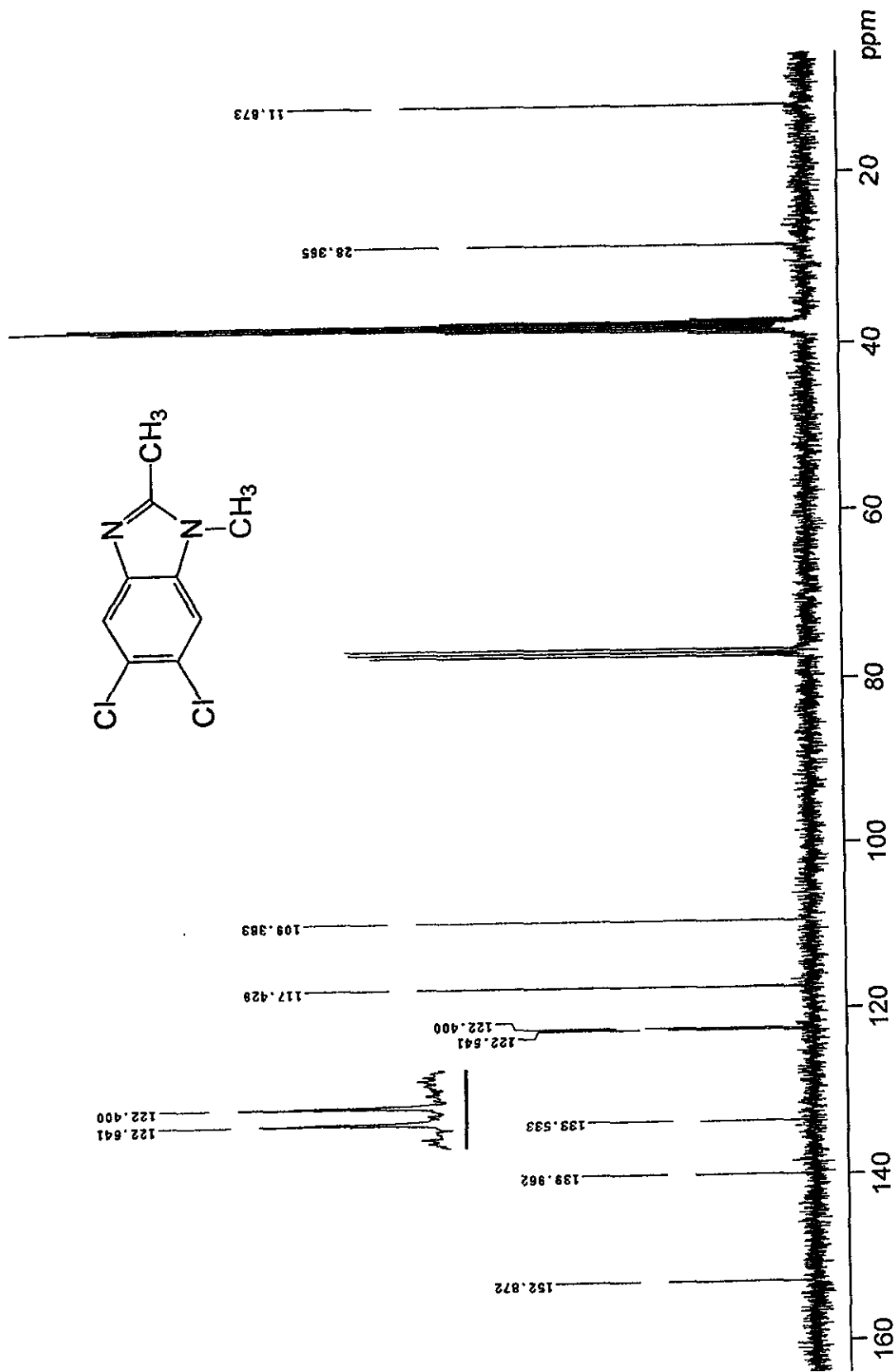


ESPECTRO 48. Espectro de masas por impacto electrónico del 6-cloro-1-metil-2-metilthiobenzimidazol (12).

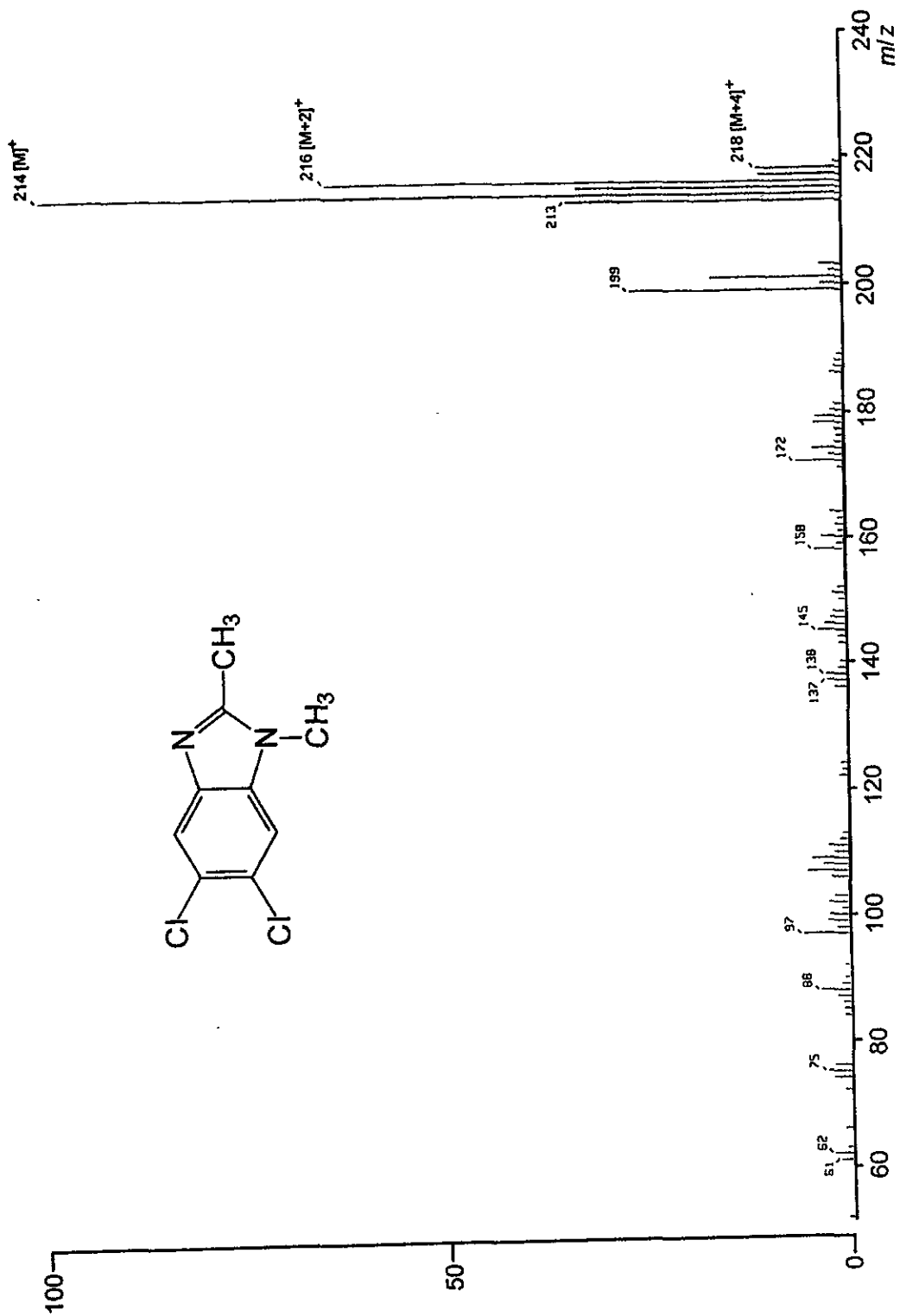


ESPECTRO 49. Espectro en el IR del 5,6-dicloro-1,2-dimetilbenzimidazol (13).

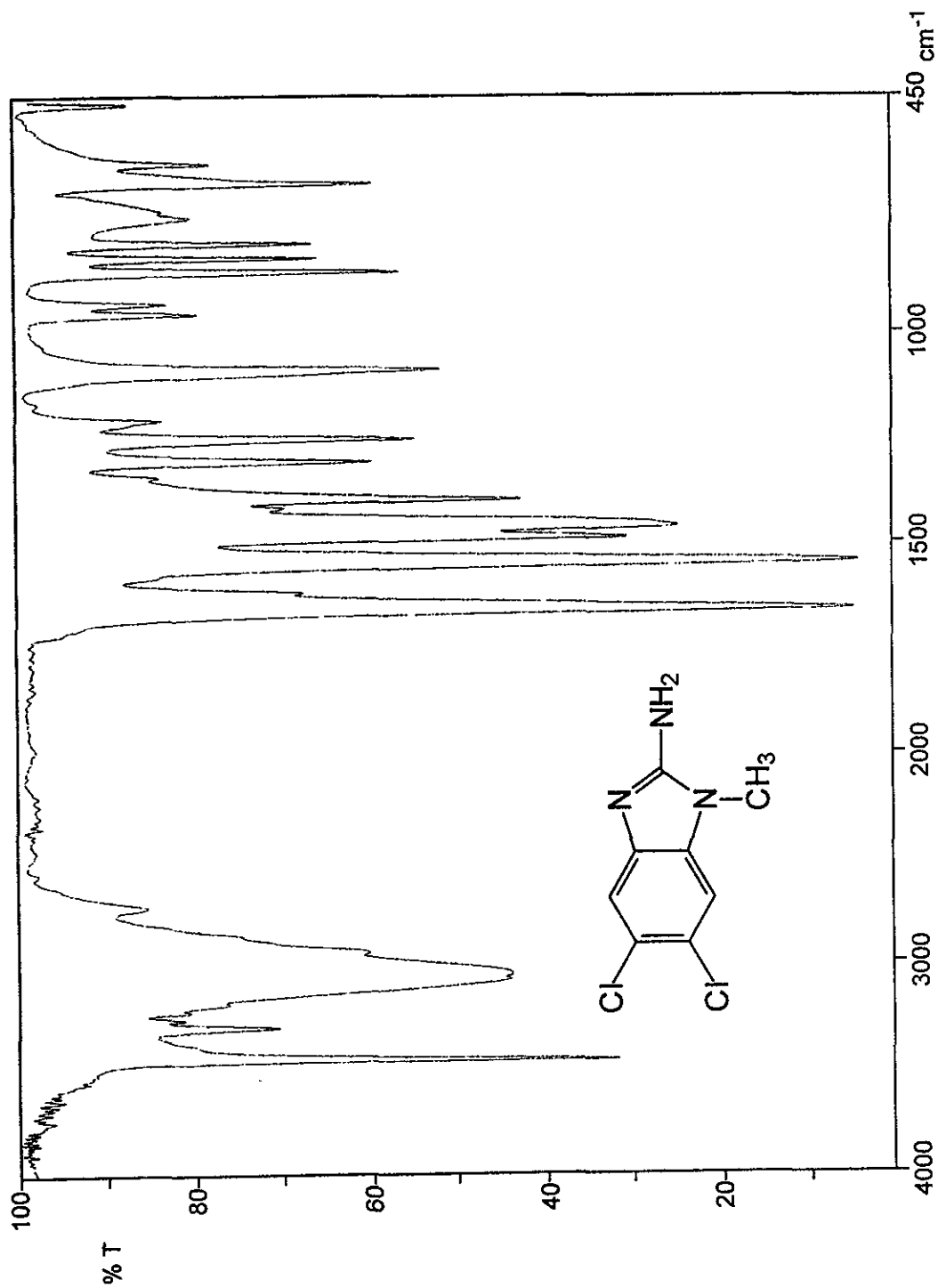




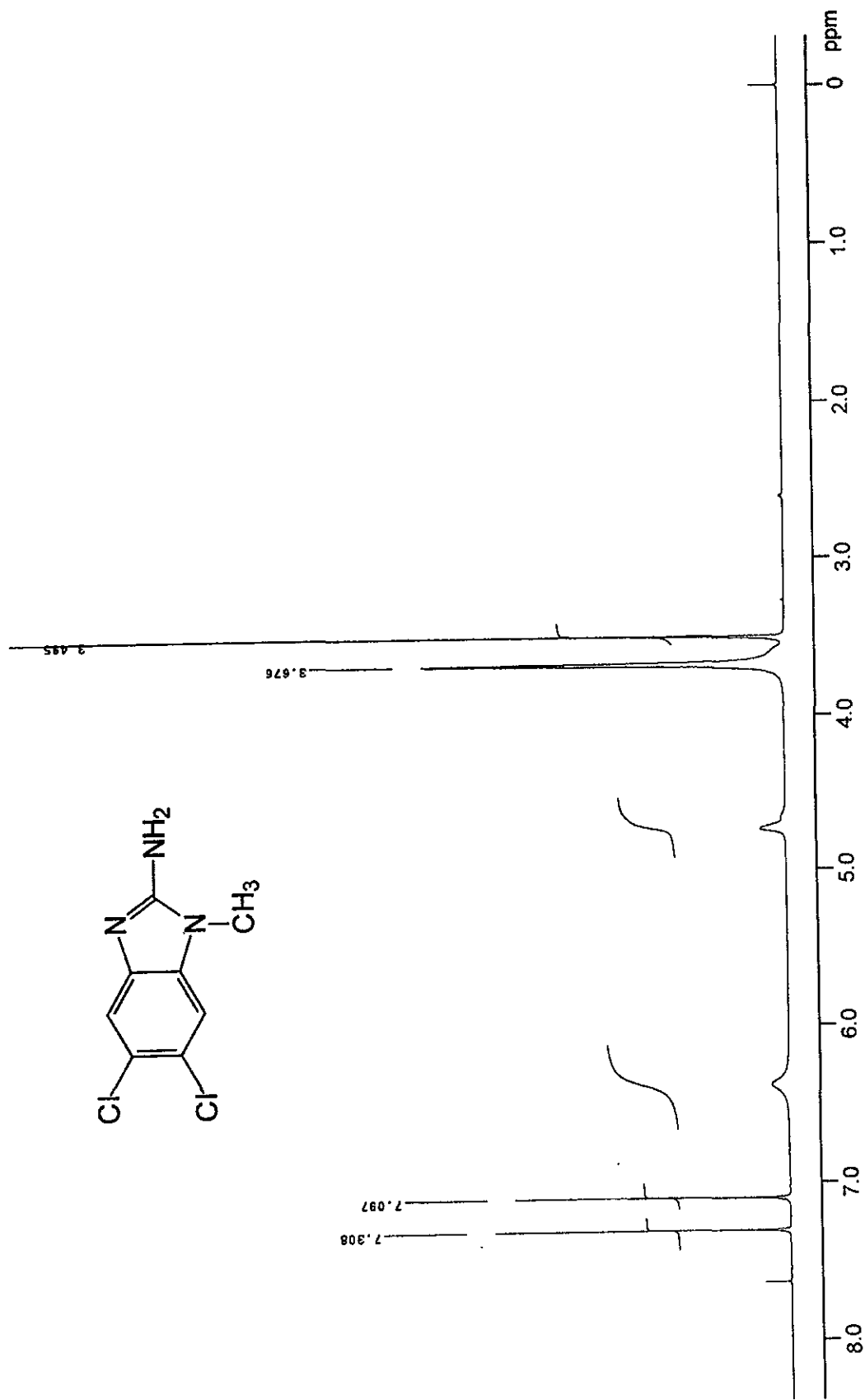
ESPECTRO 51. Espectro de RMN ¹³C del 5,6-dicloro-1,2-dimetilbenzimidazol (13).



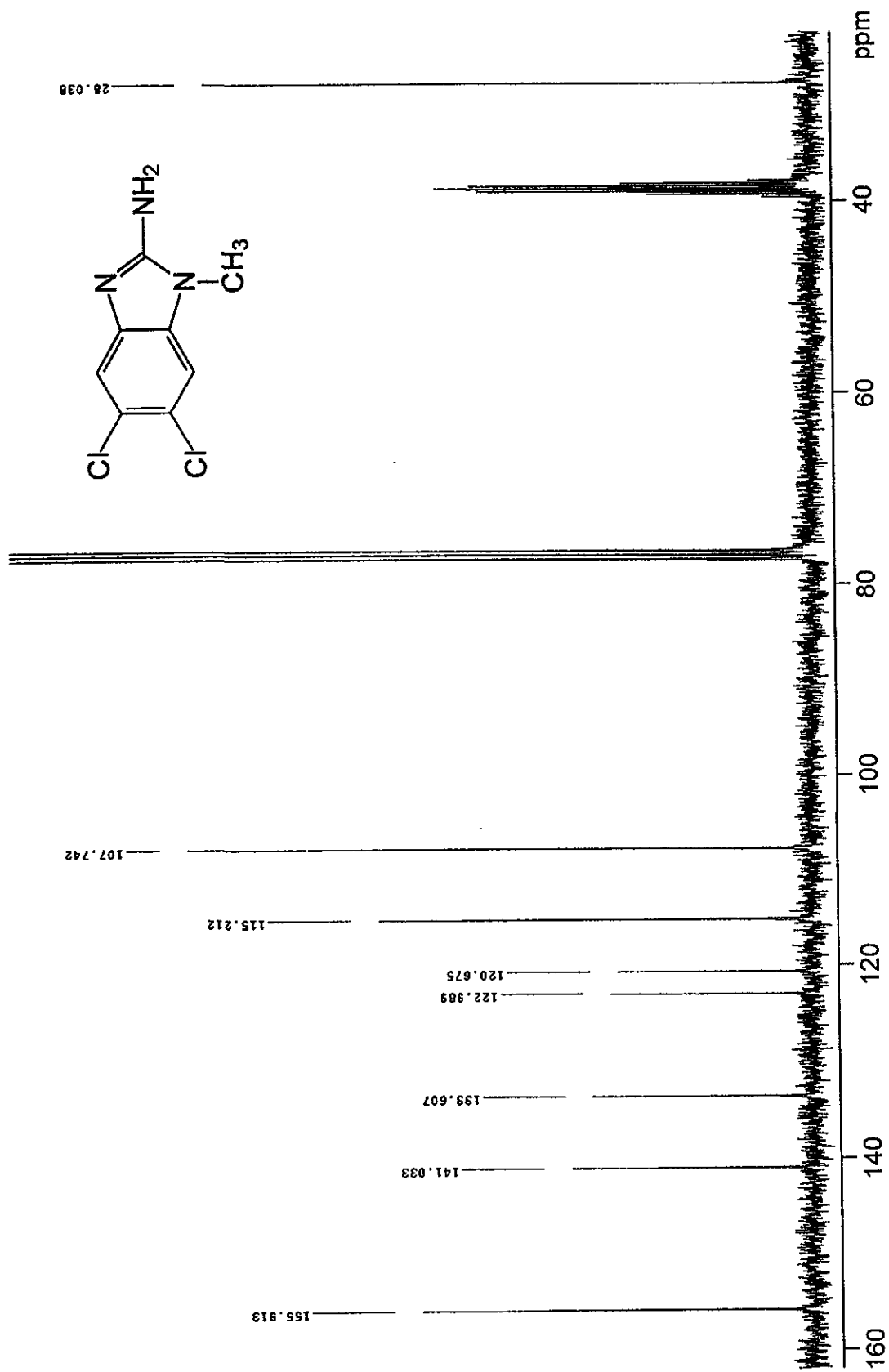
ESPECTRO 52. Espectro de masas por impacto electrónico del 5,6-dicloro-1,2-dimetilbenzimidazol (13).



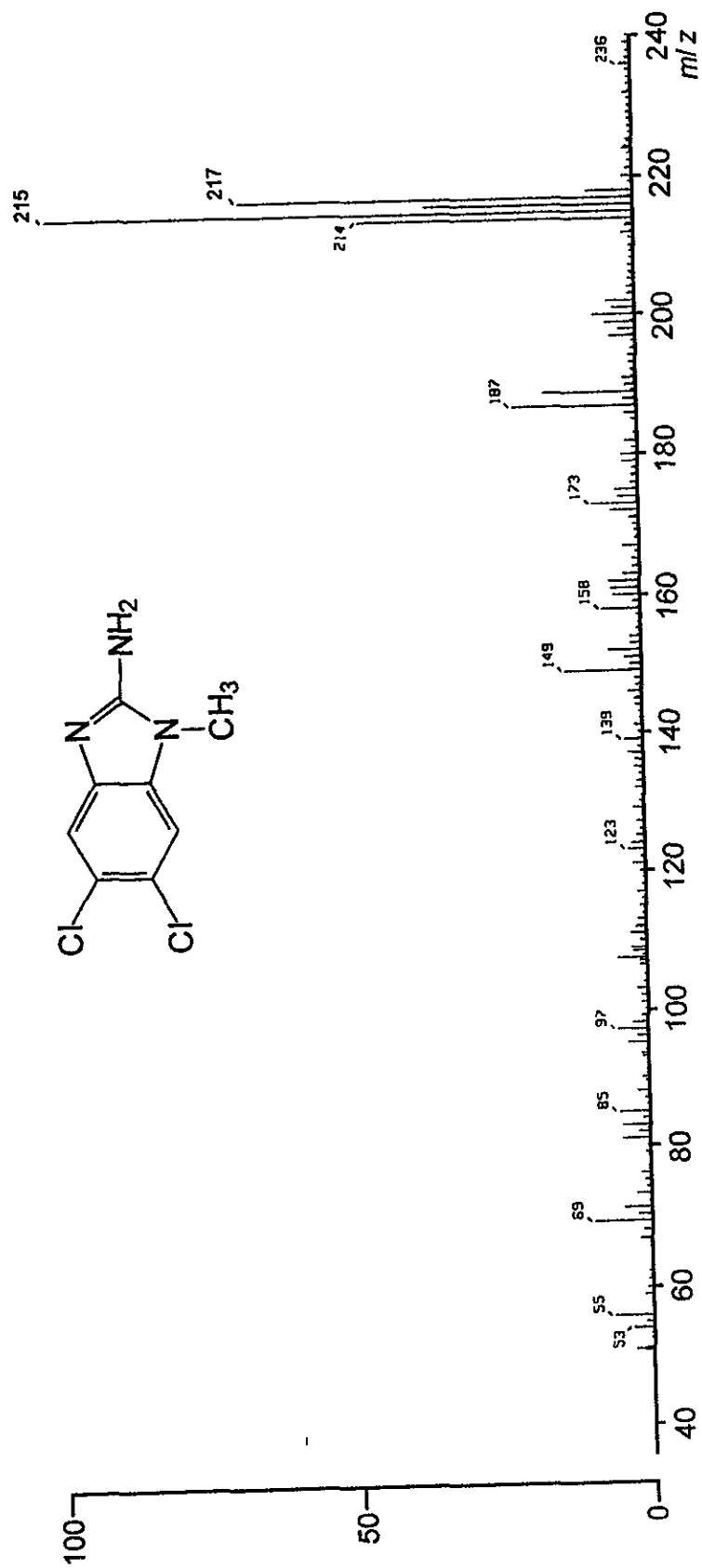
ESPECTRO 53. Espectro en el IR del 2-amino-5,6-dicloro-1-metilbencimidazol (14).



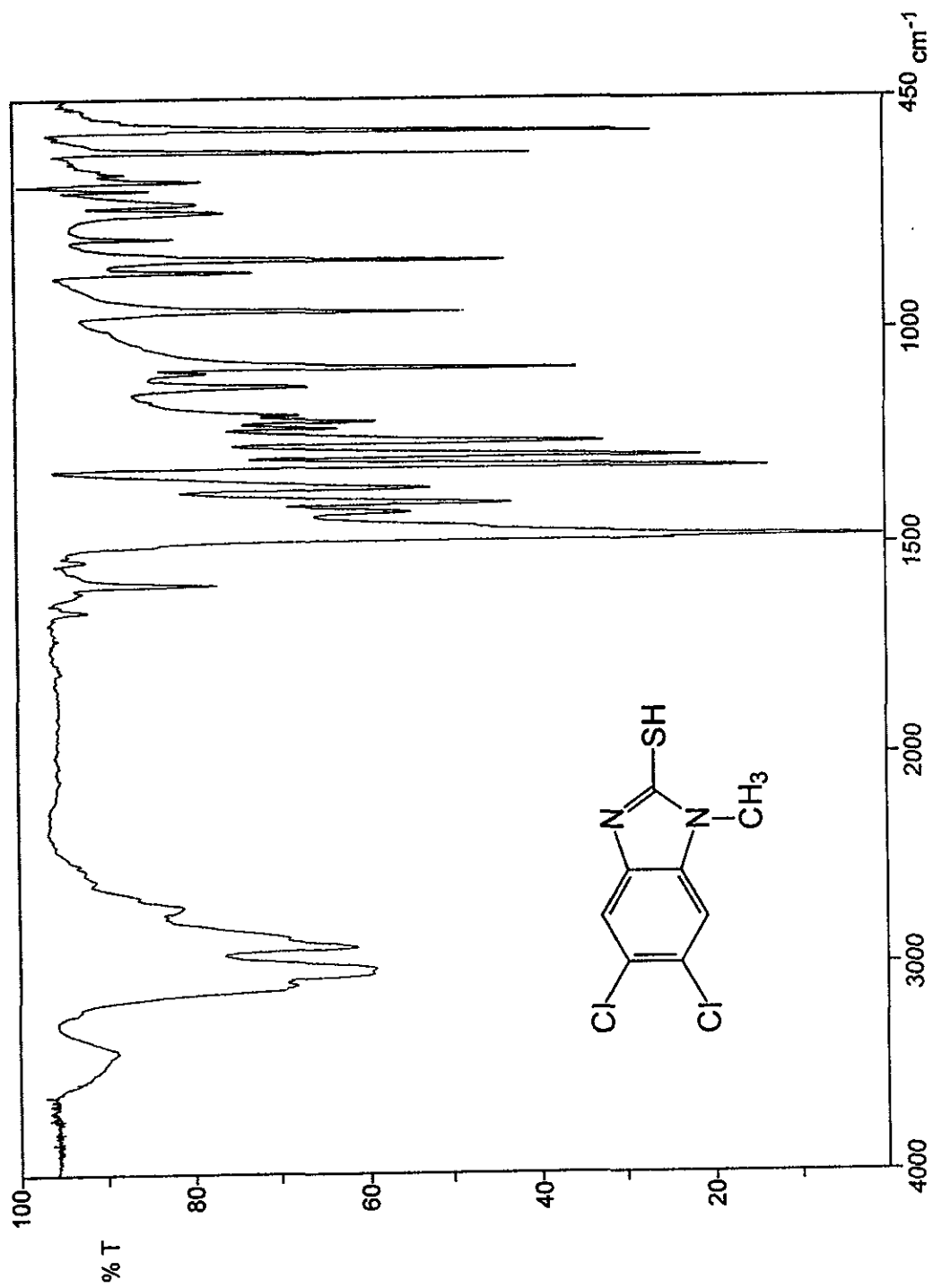
ESPECTRO 54. Espectro de RMN ^1H del 2-amino-5,6-dicloro-1-metilimidazol (14).



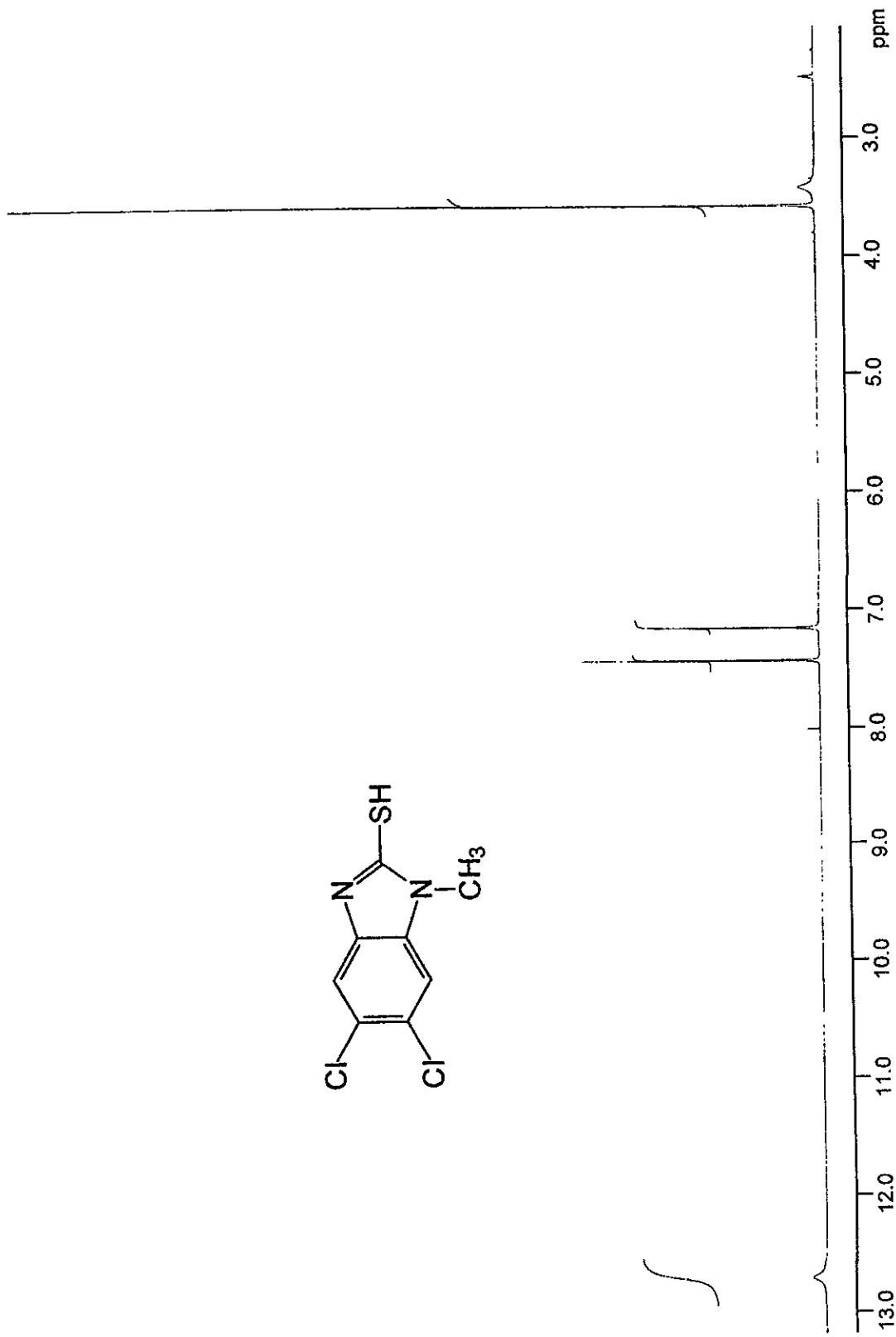
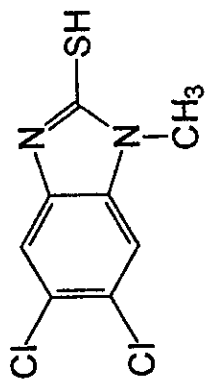
ESPECTRO 55. Espectro de RMN ^{13}C del 2-amino-5,6-dicloro-1-metilimidazol (14).



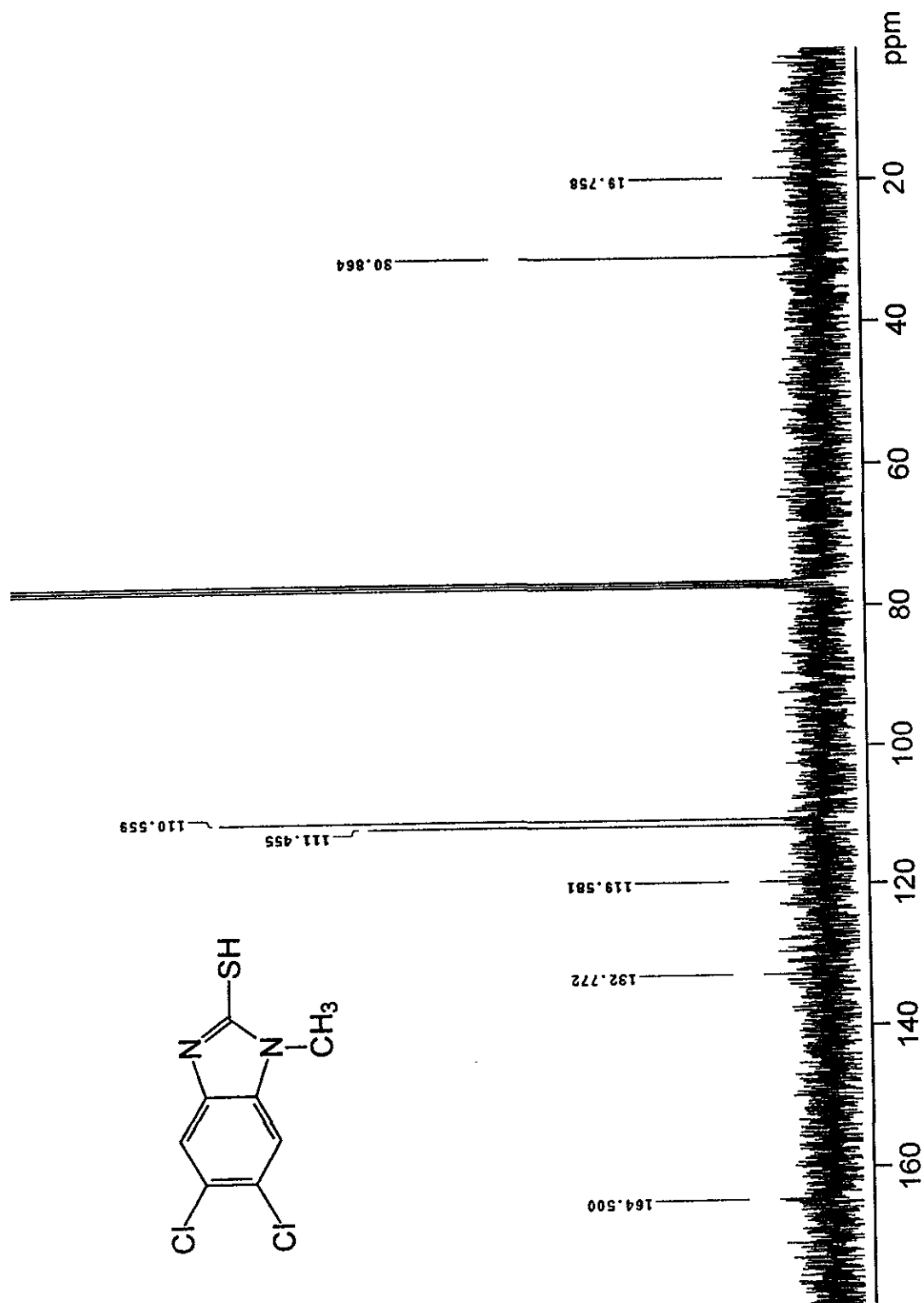
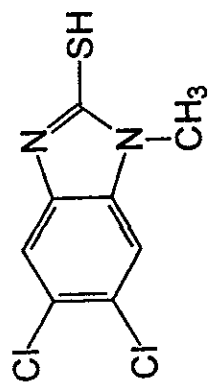
ESPECTRO 56. Espectro de masas por impacto electrónico del 2-amino-5,6-dicloro-1-metilbencimidazol (14).



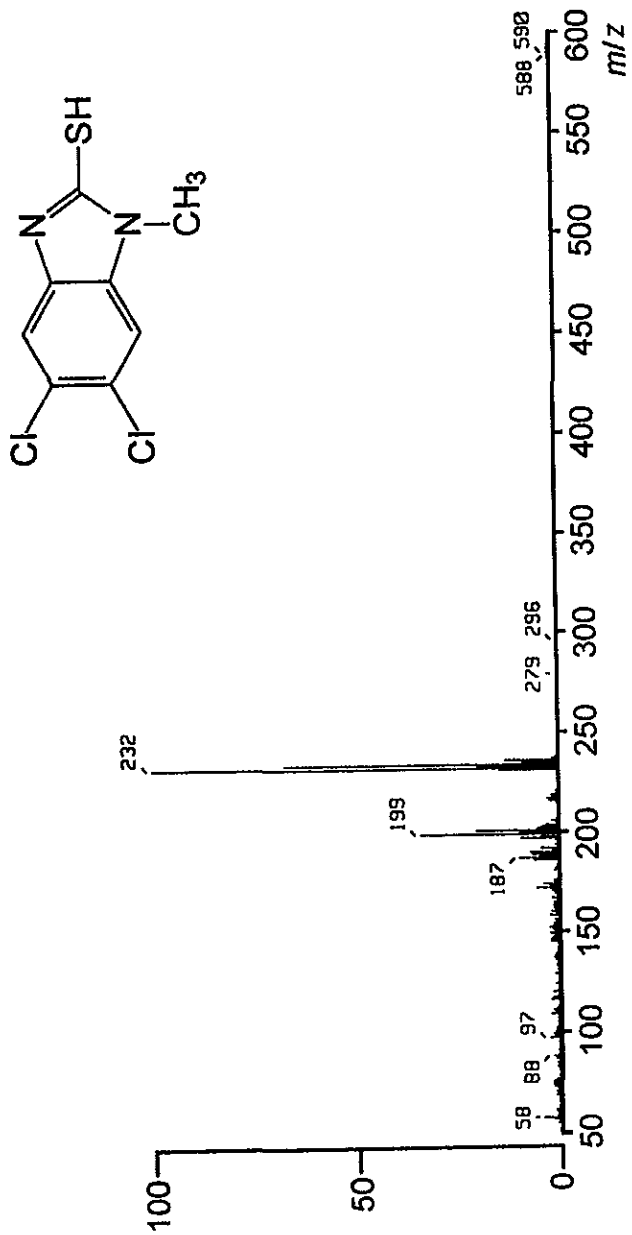
ESPECTRO 57. Espectro en el IR del 5,6-dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15).



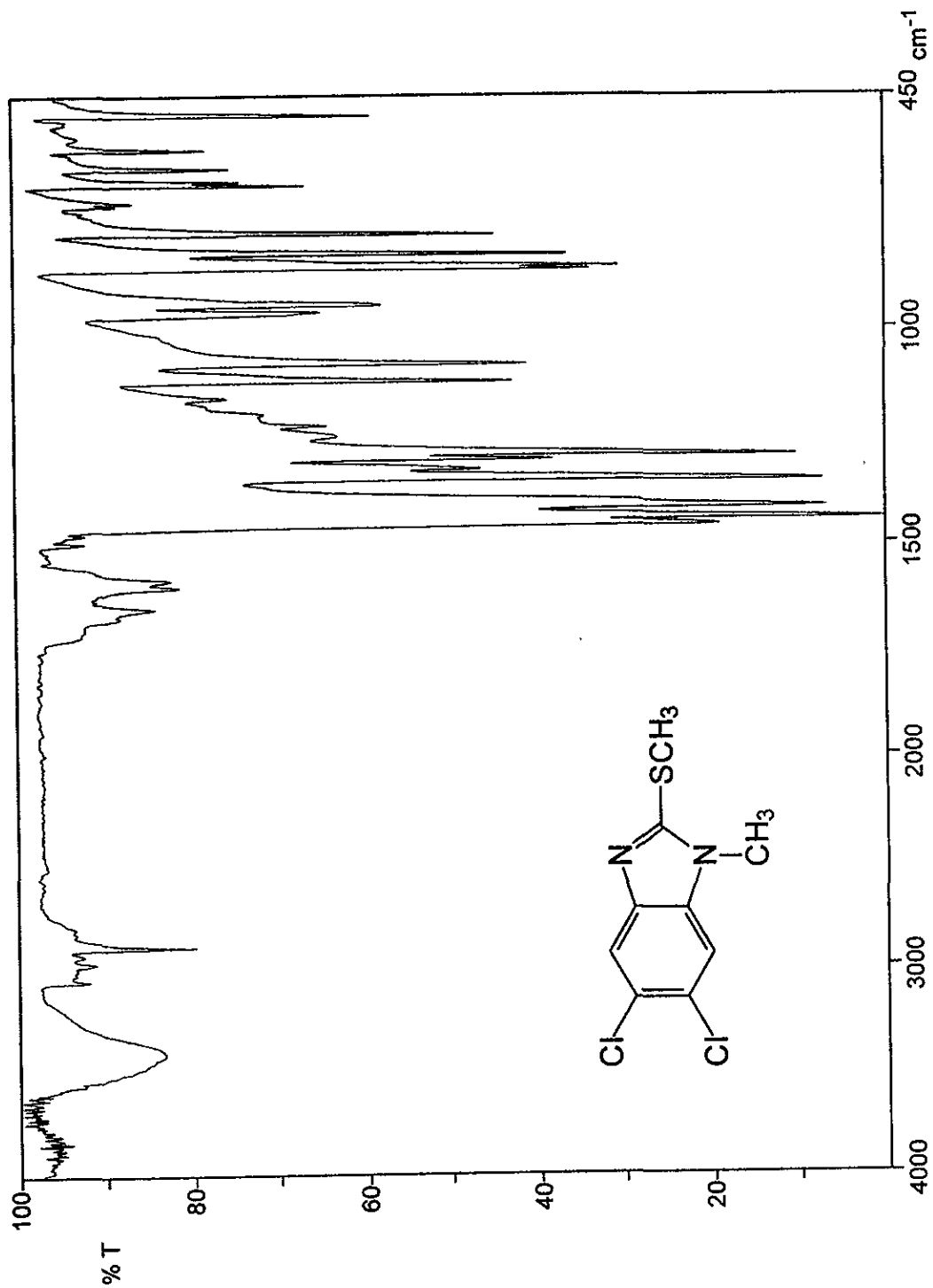
ESPECTRO 58. Espectro de RMN ^1H del 5,6-dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15).



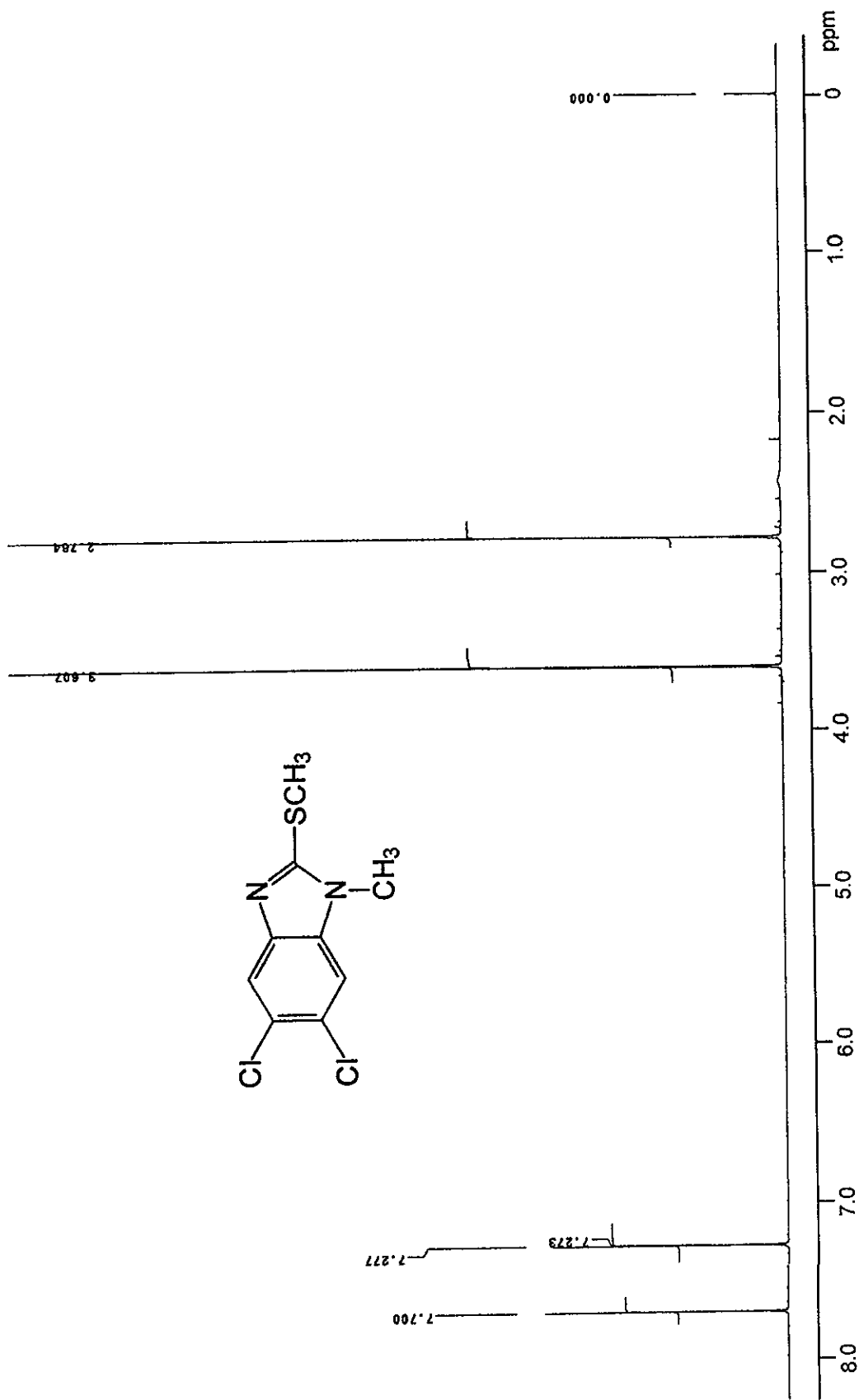
ESPECTRO 59. Espectro de RMN ¹³C del 5,6-dicloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (15).



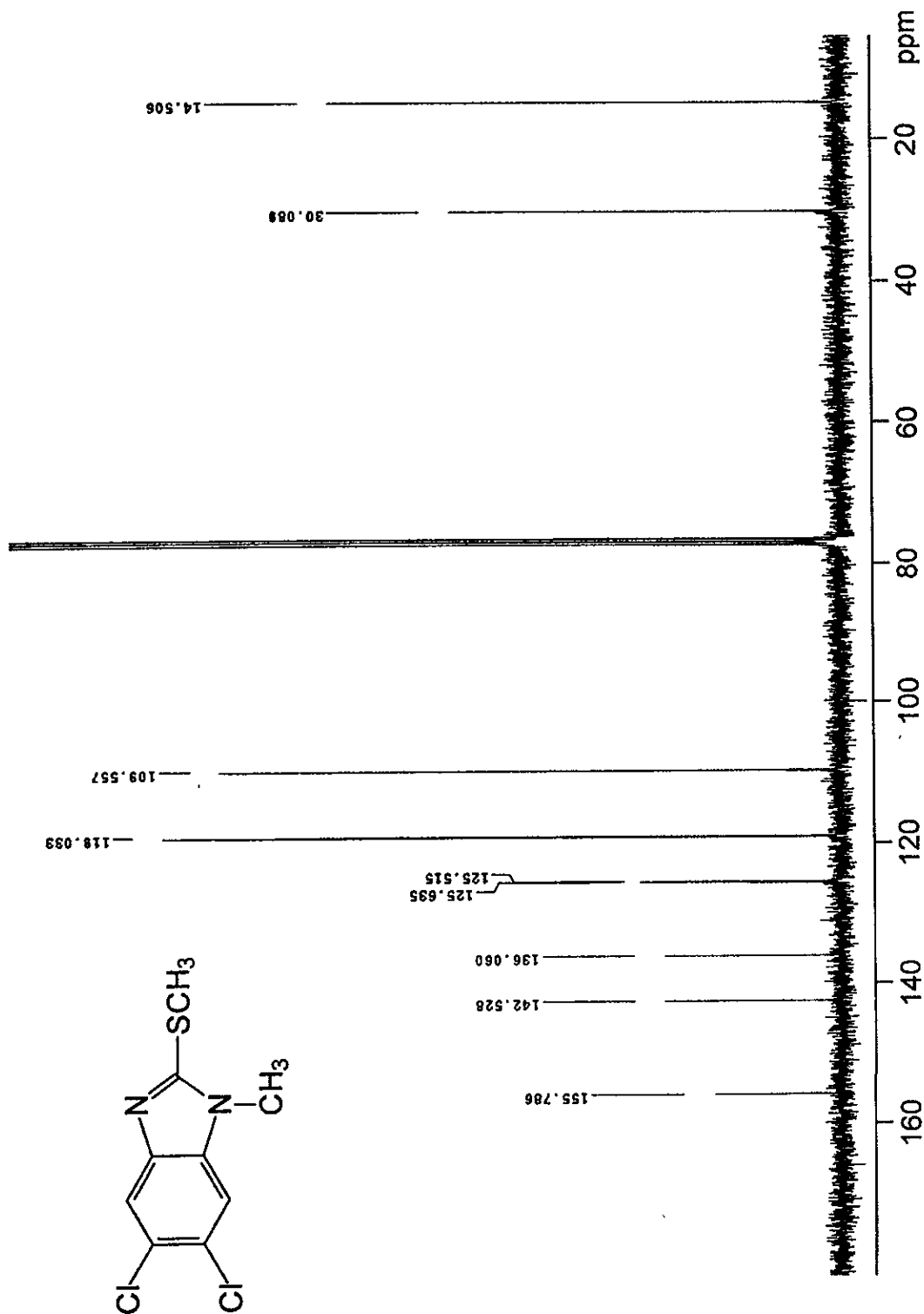
ESPECTRO 60. Espectro de masas por impacto electrónico del 5,6-dicloro-2-mercapto-1-metilbenzimidazol (15).



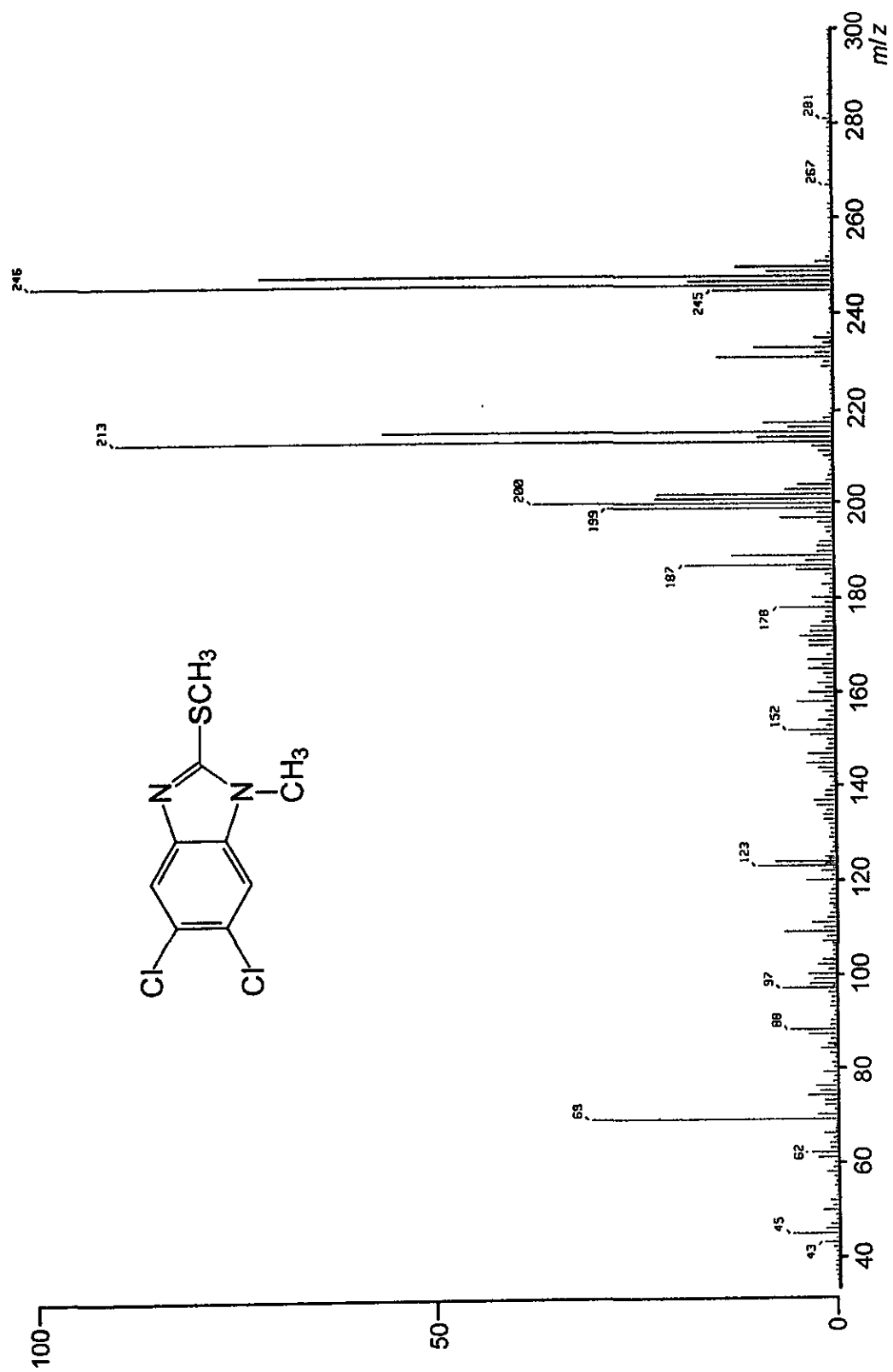
ESPECTRO 61. Espectro en el IR del 5,6-dicloro-1-metil-2-metilbencimidazol (16).



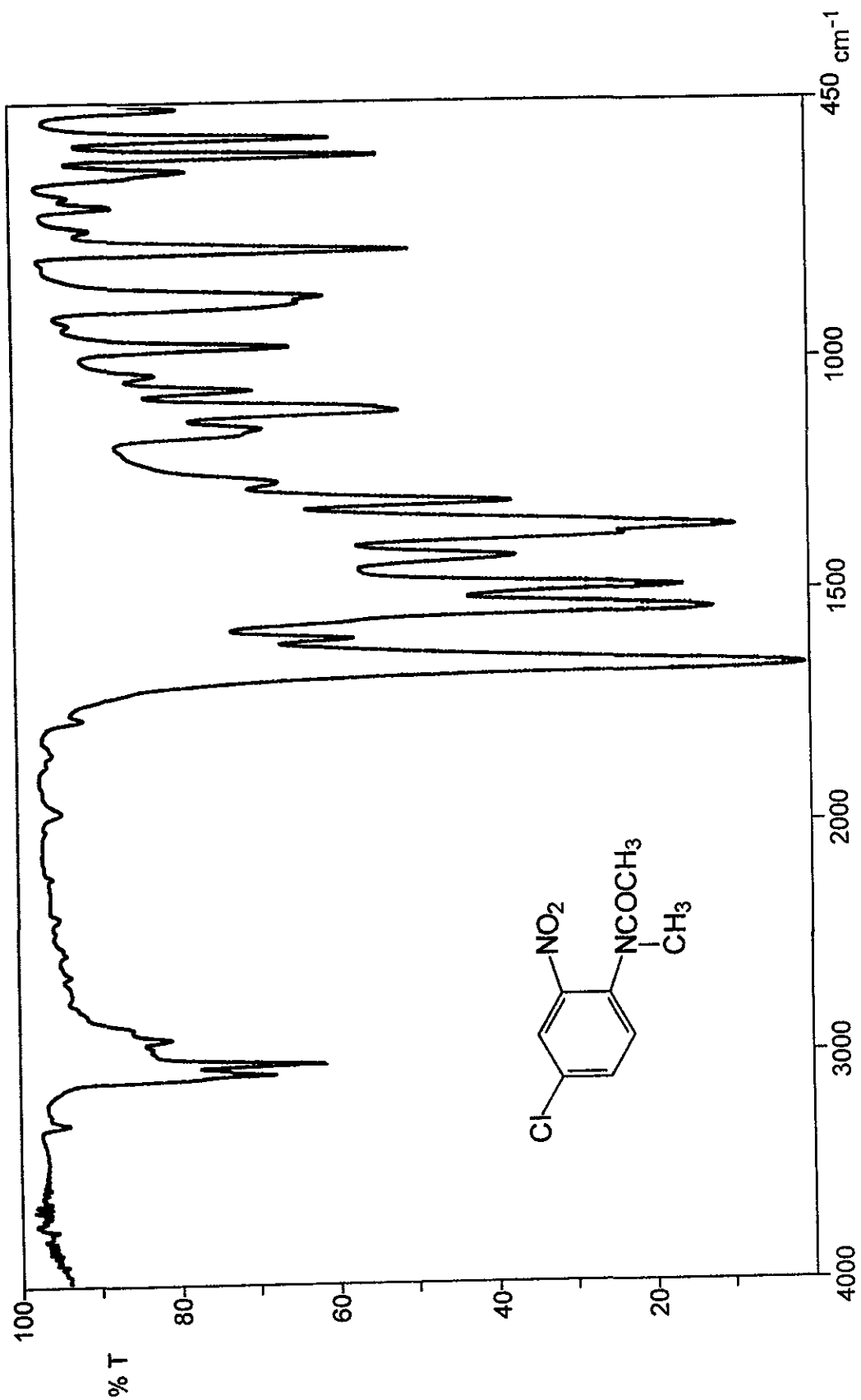
ESPECTRO 62. Espectro de RMN ^1H del 5,6-dicloro-1-metil-2-metilthiobenzimidazol (16).



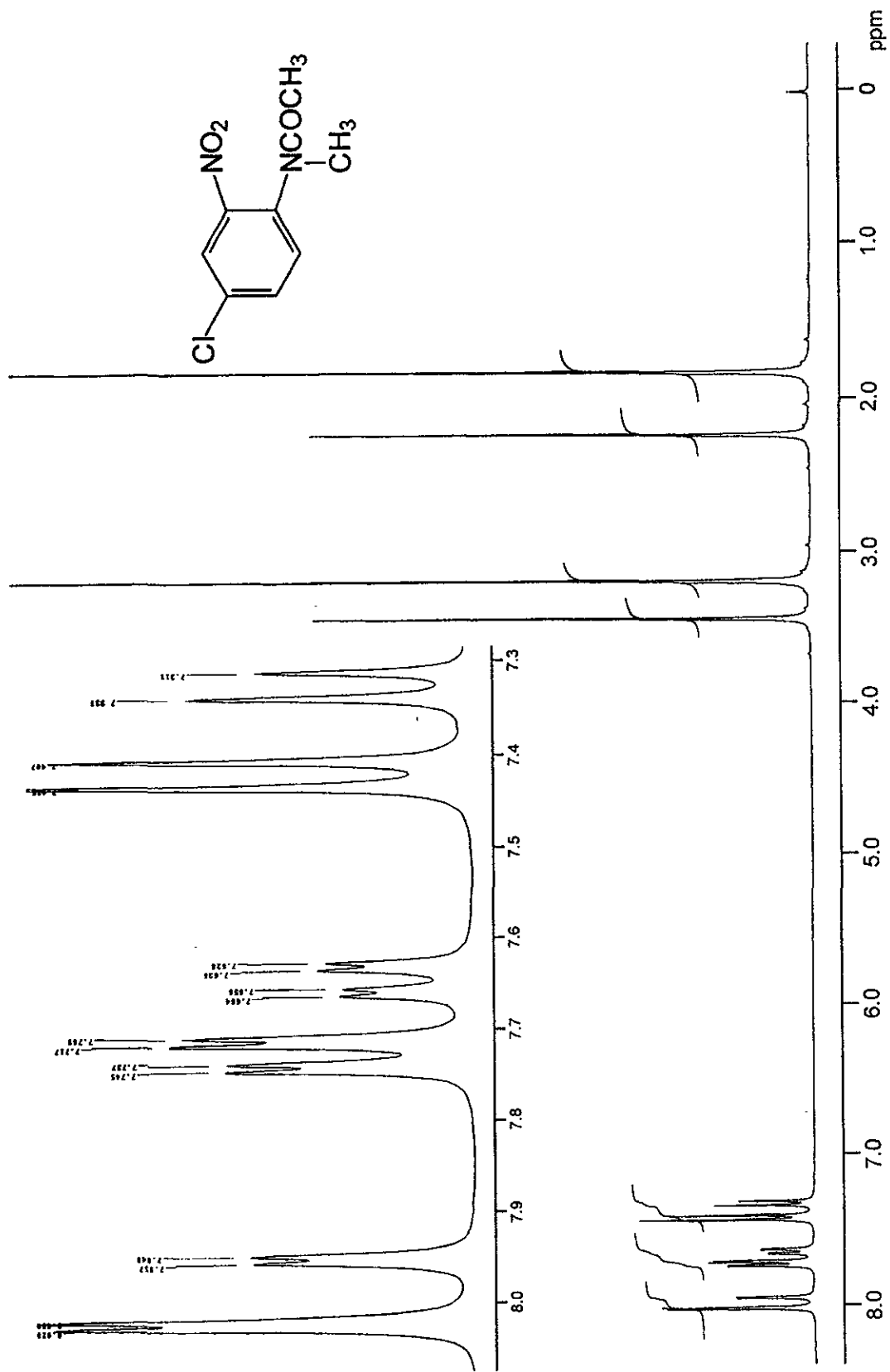
ESPECTRO 63. Espectro de RMN ¹³C del 5,6-dicloro-1-metil-2-metilbencimidazol (16).



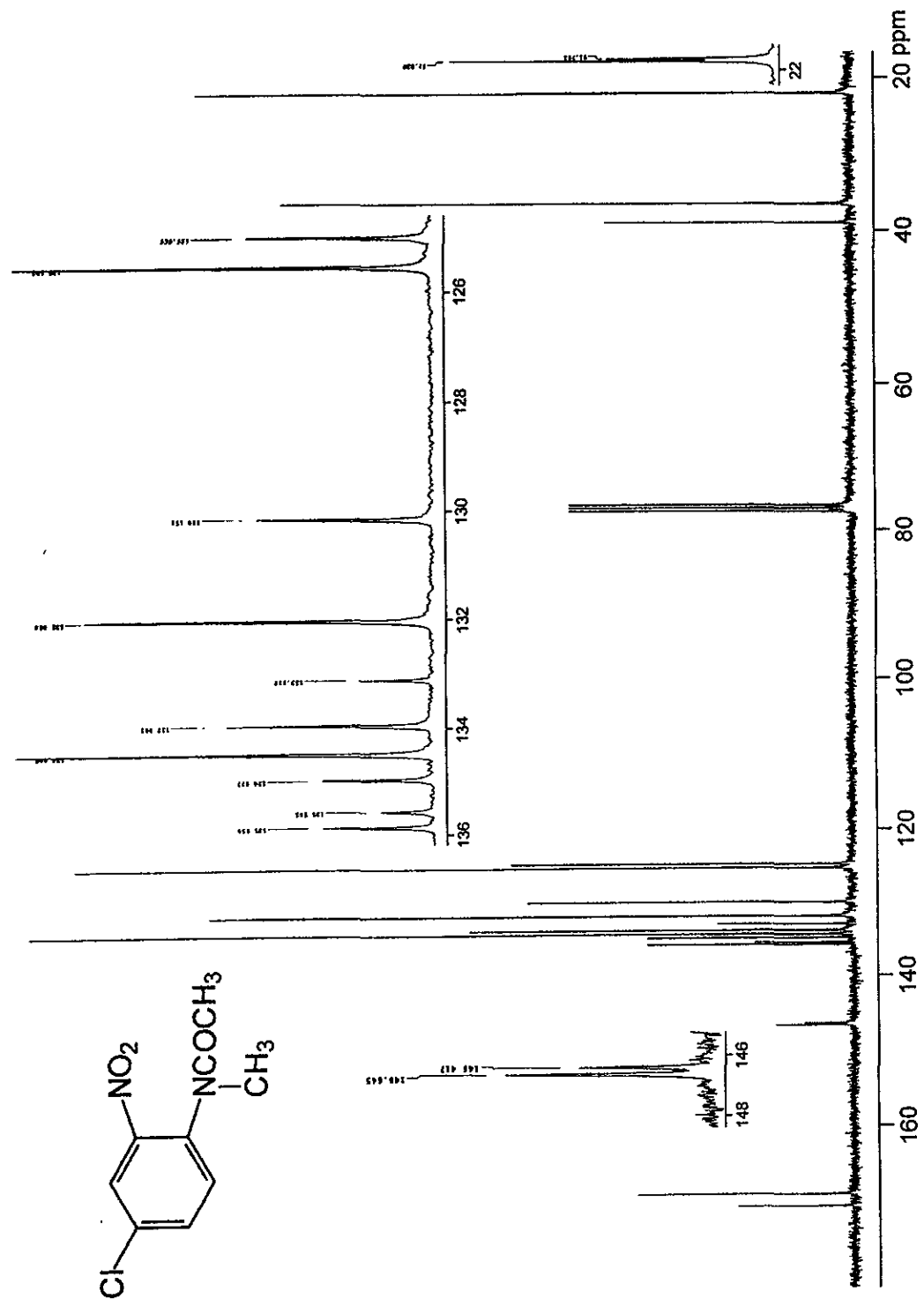
ESPECTRO 64. Espectro de masas por impacto electrónico del 5,6-dicloro-1-metil-2-metilbencimidazol (16).



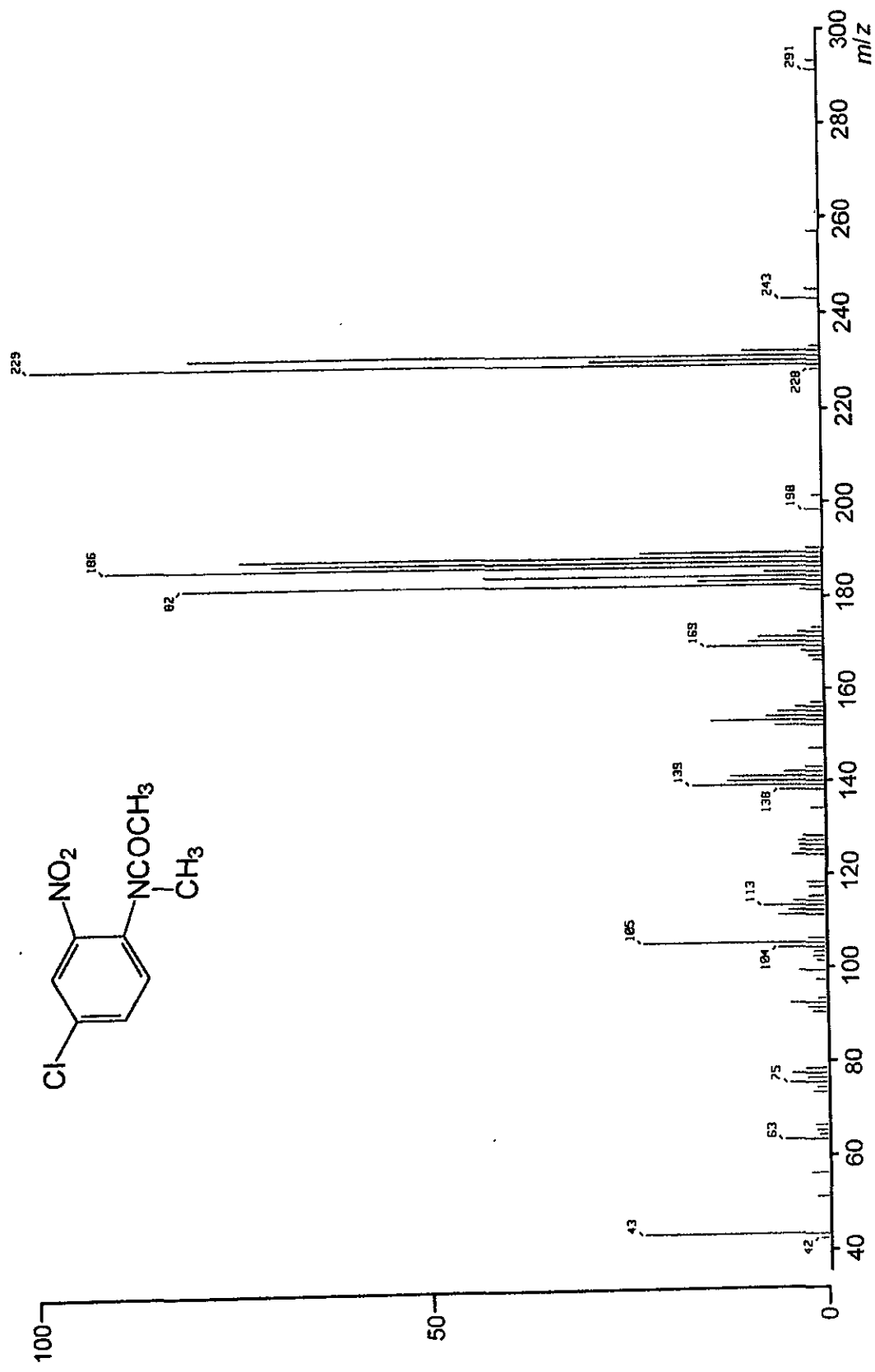
ESPECTRO 65. Espectro en el IR de la N-metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).



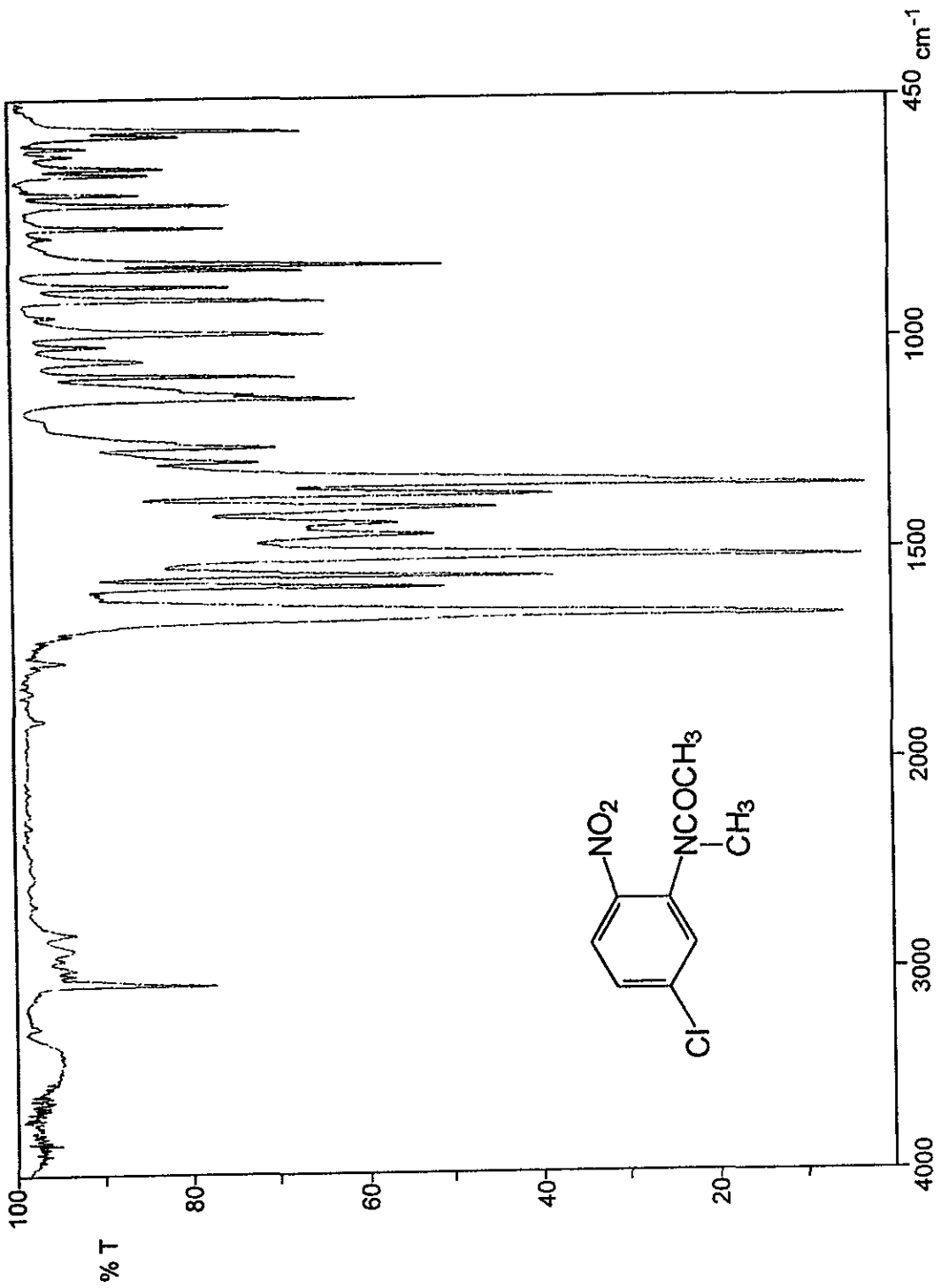
ESPECTRO 66. Espectro de RMN ^1H de la N-metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).



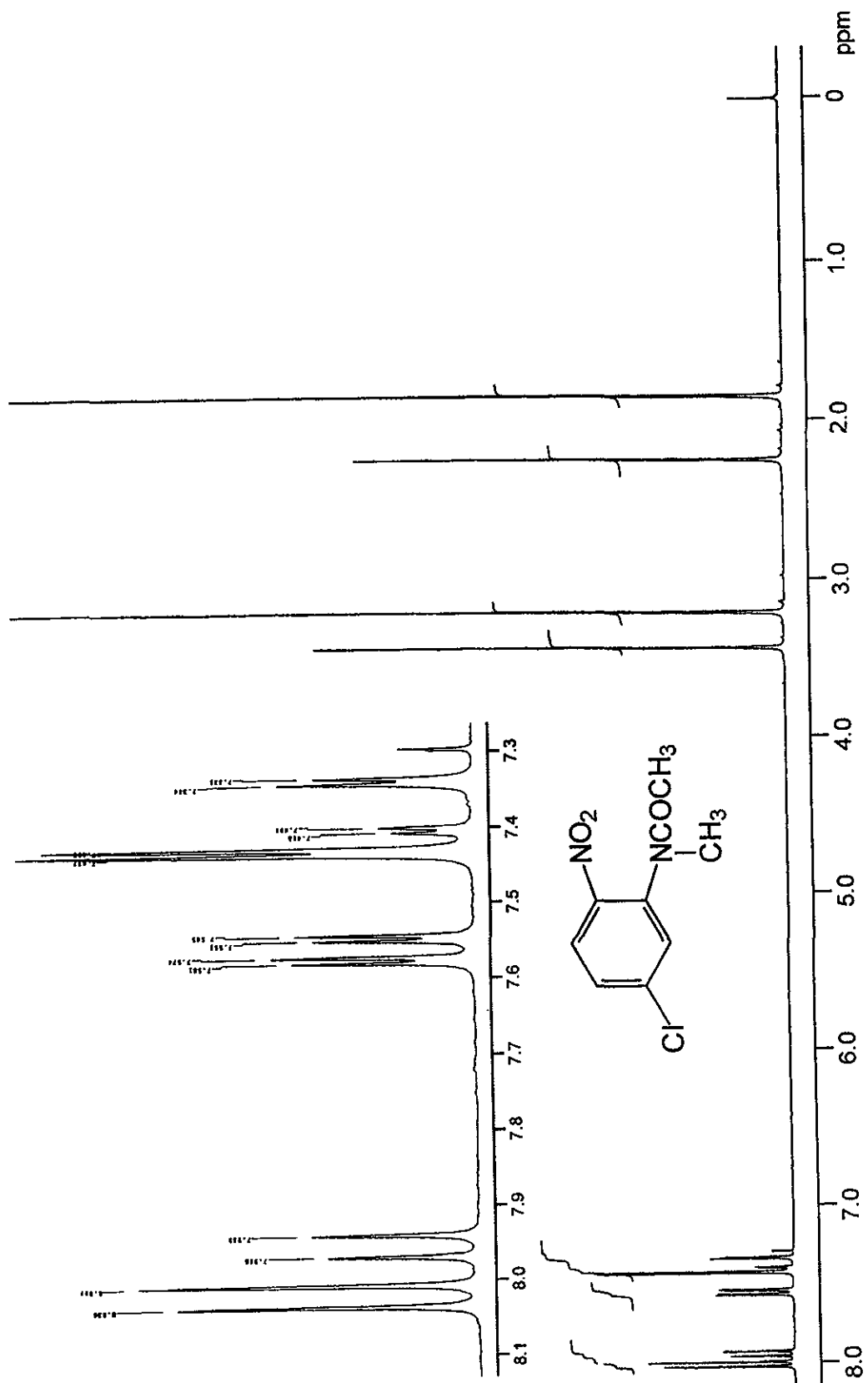
ESPECTRO 67. Espectro de RMN ¹³C de la N-metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).



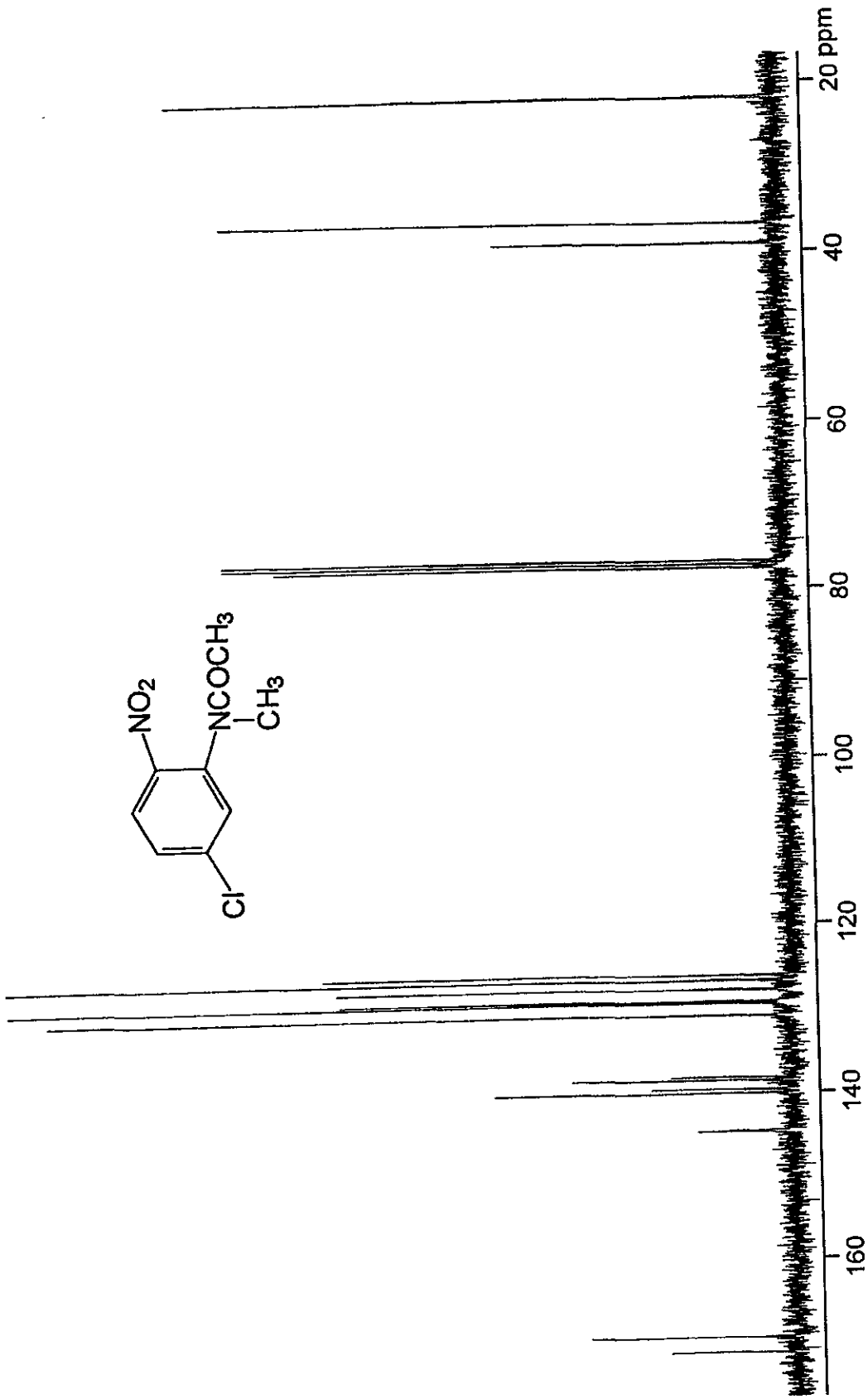
ESPECTRO 68. Espectro de masas por impacto electrónico de la N-metil-4-cloro-2-nitroacetanilida (29).



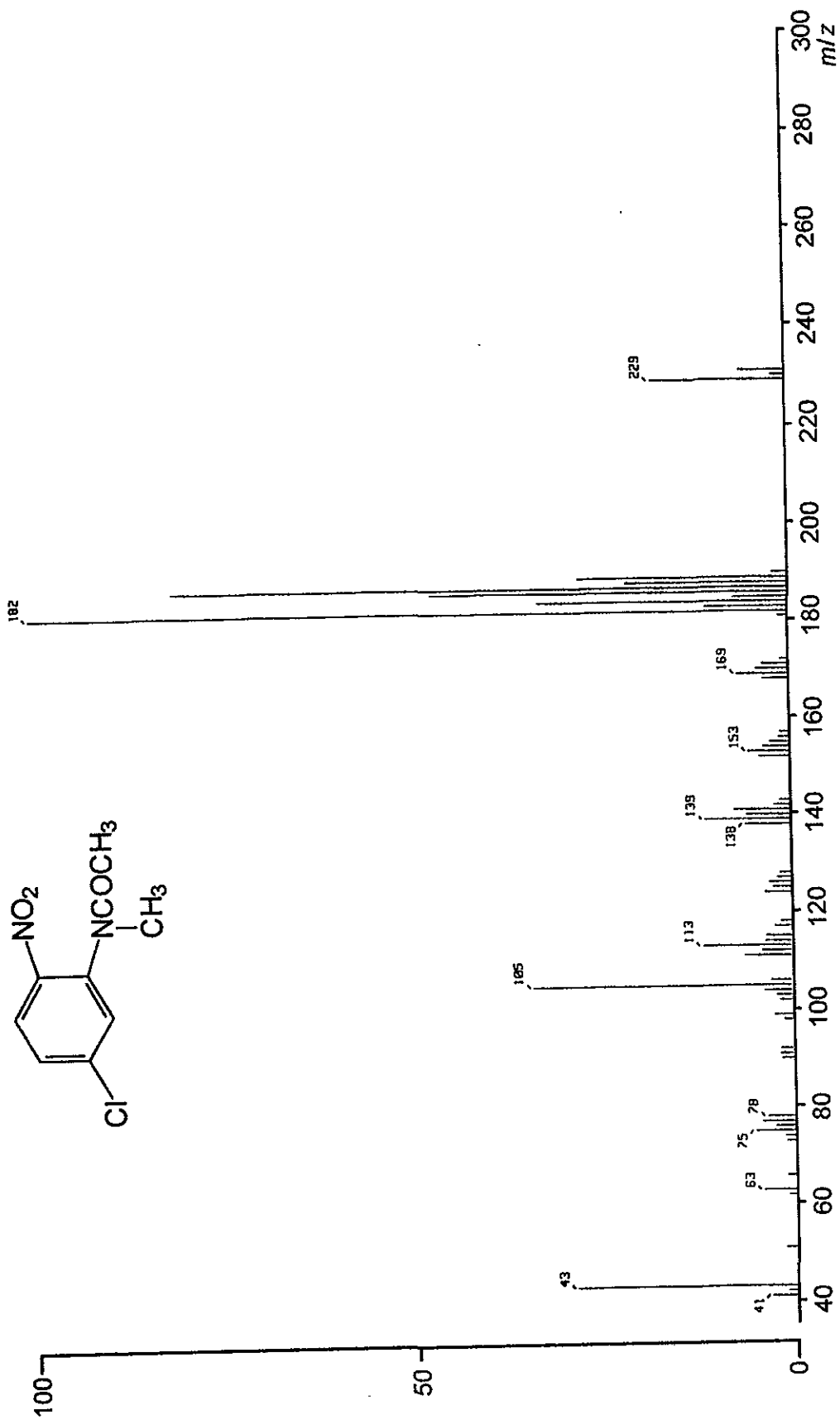
ESPECTRO 69. Espectro en el IR de la N-metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).



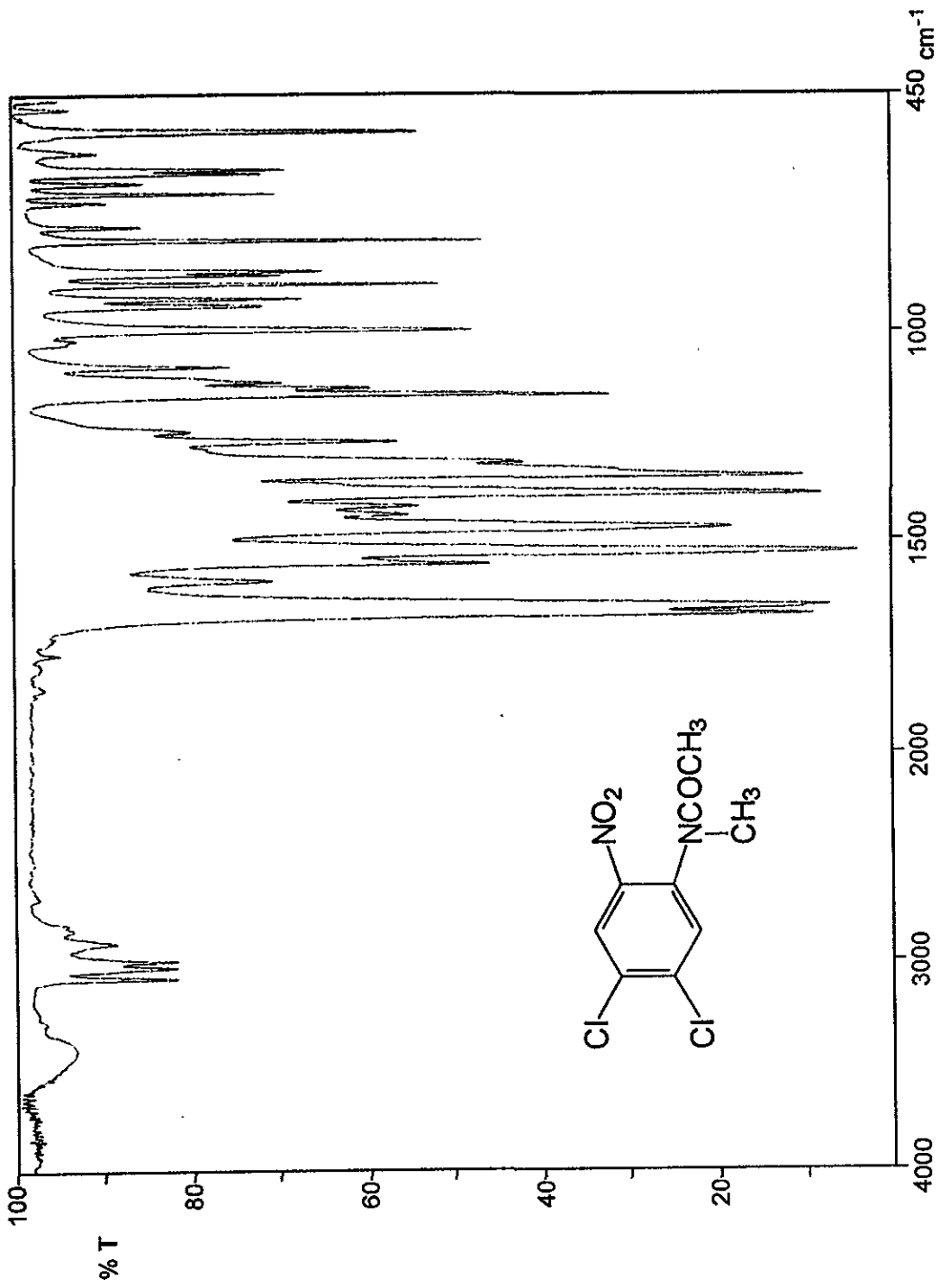
ESPECTRO 70. Espectro de RMN ^1H de la N-metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).



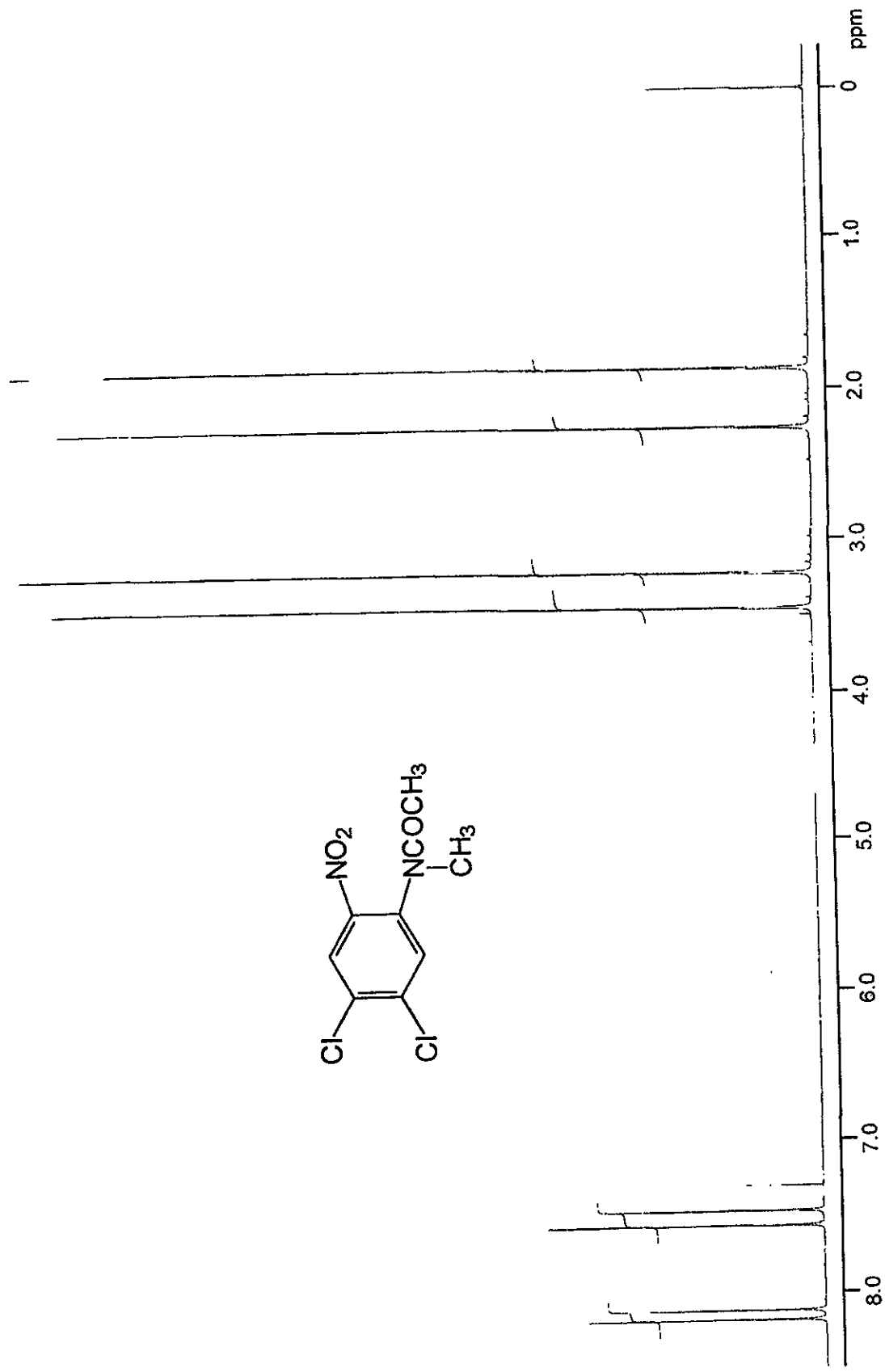
ESPECTRO 71. Espectro de RMN ^{13}C de la N-metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).



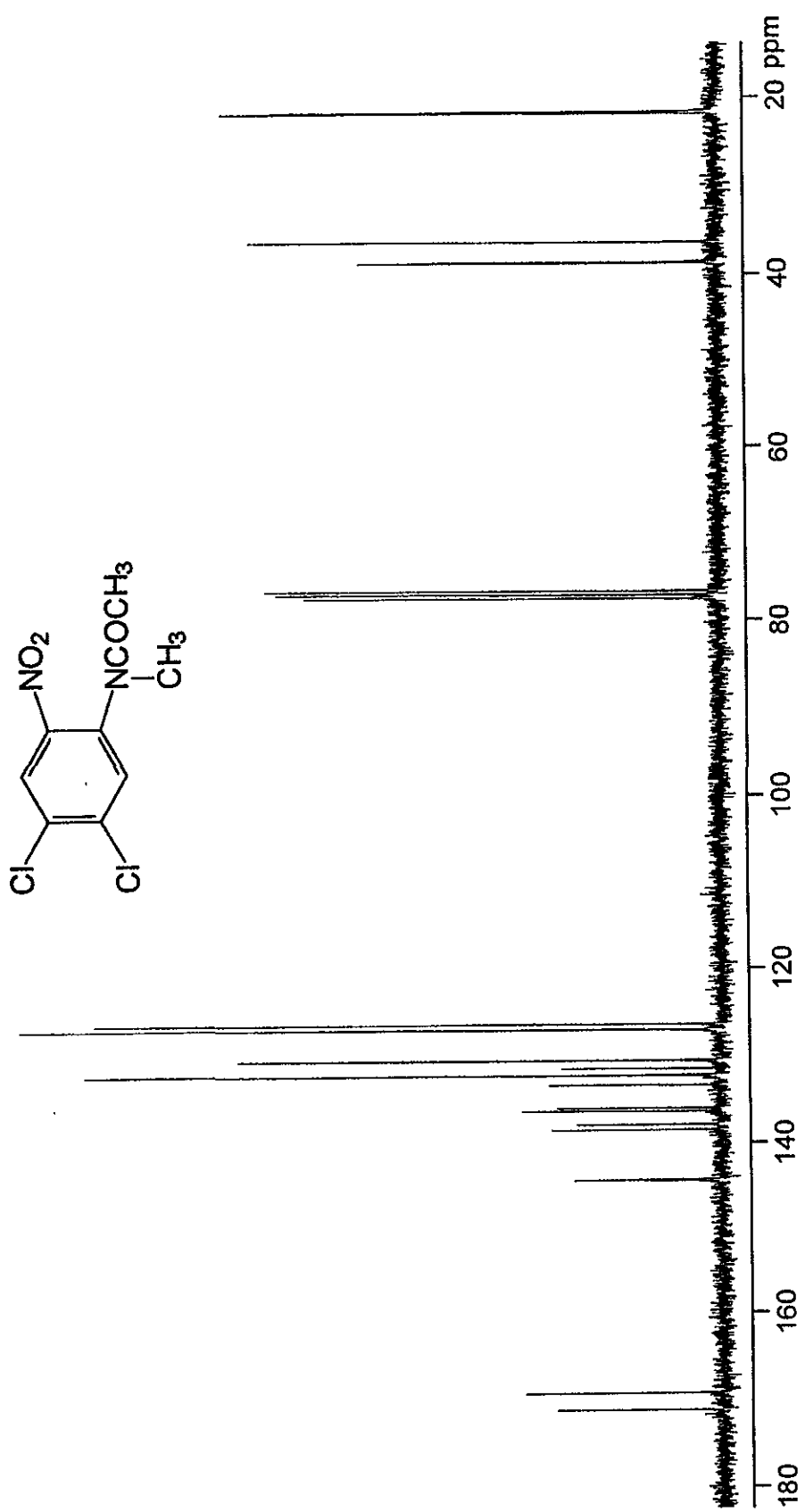
ESPECTRO 72. Espectro de masas por impacto electrónico de la N-metil-5-cloro-2-nitroacetanilida (35).



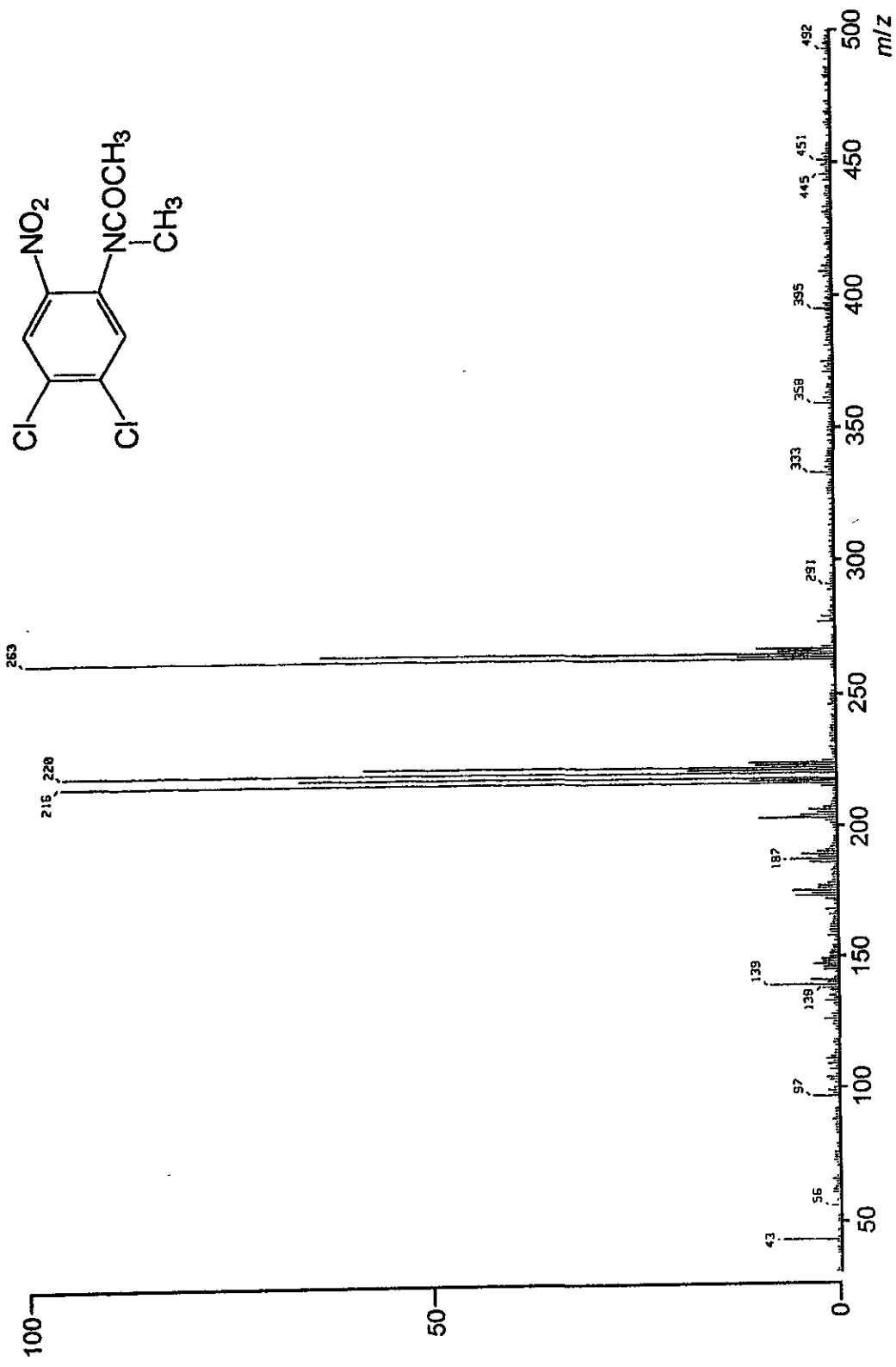
ESPECTRO 73. Espectro en el IR de la N-metil-4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (41).



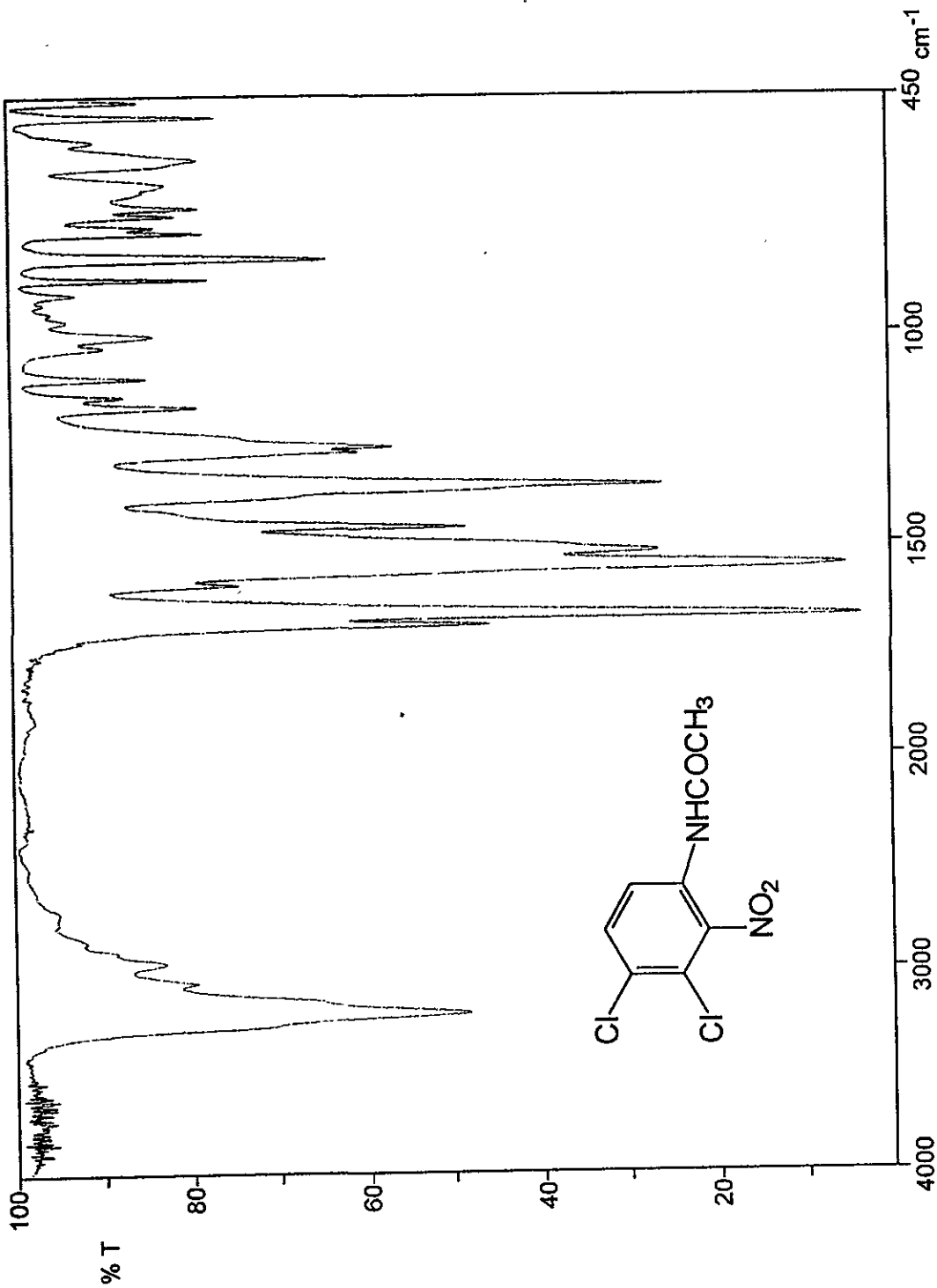
ESPECTRO 74. Espectro de RMN ^1H de la N-metil-4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (41).



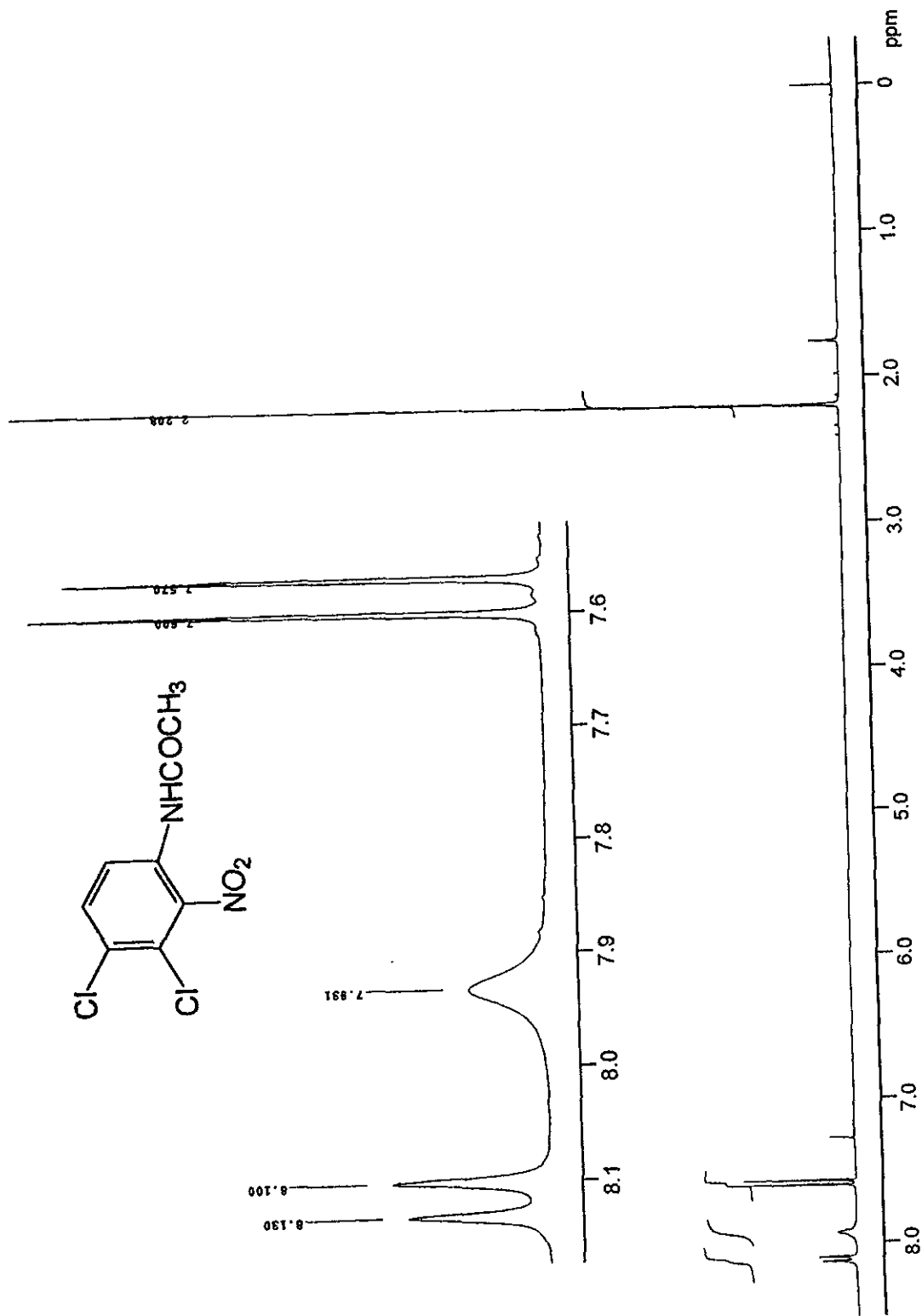
ESPECTRO 75. Espectro de RMN ¹³C de la N-metil-4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (41).



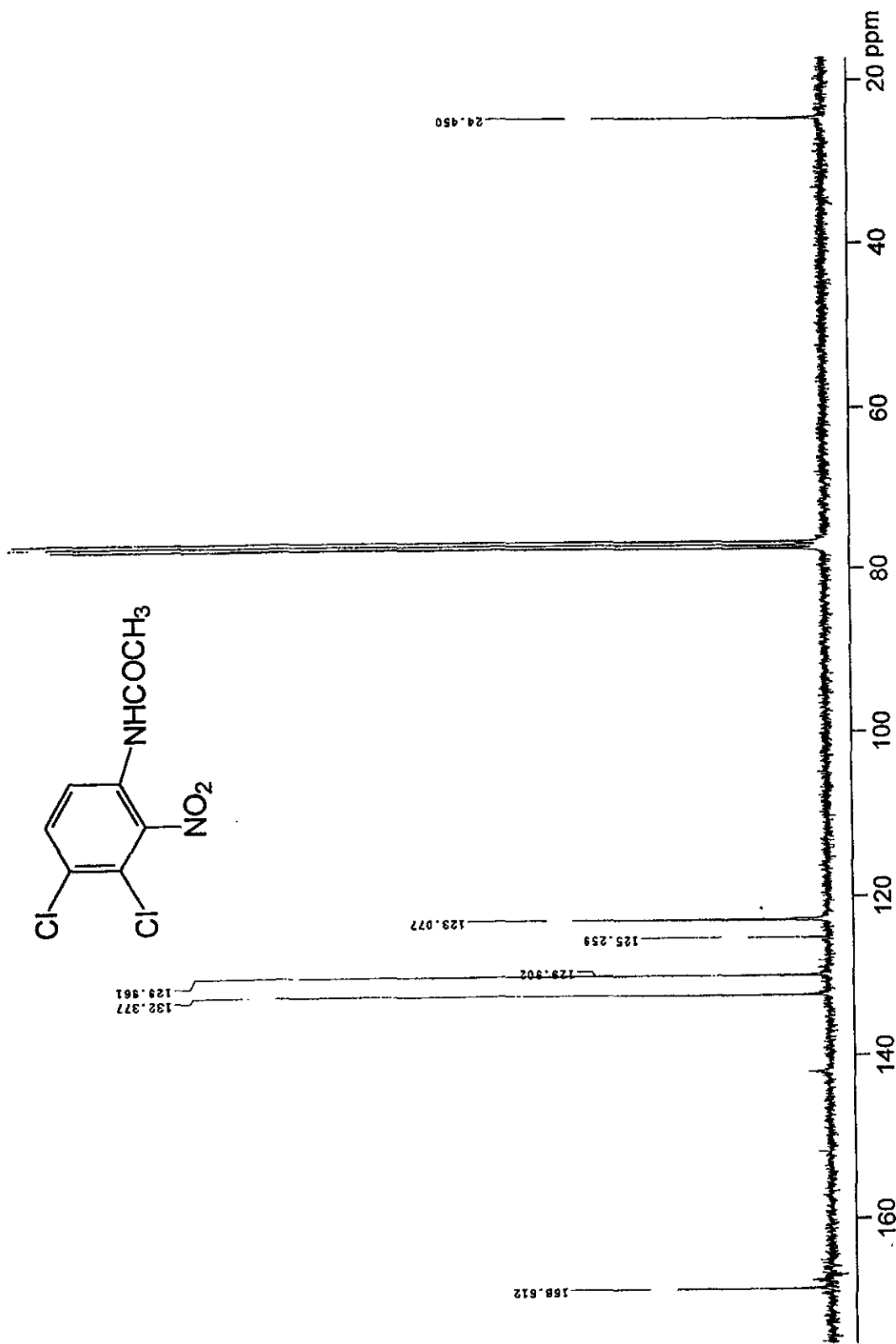
ESPECTRO 76. Espectro de masas por impacto electrónico de la N-metil-4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (41).



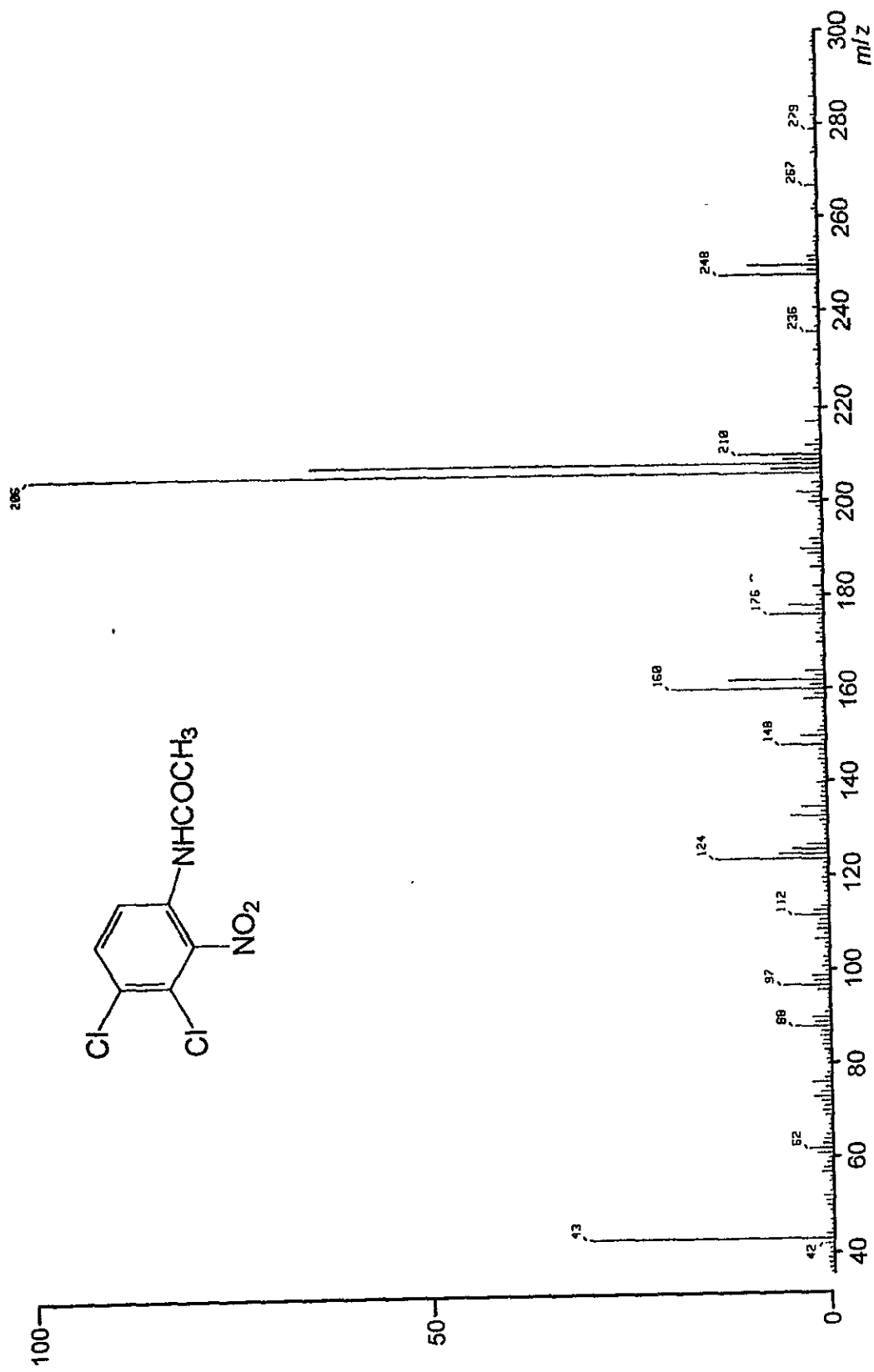
ESPECTRO 77. Espectro en el IR de la 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (40b).



ESPECTRO 78. Espectro de RMN ^1H de la 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (40b).



ESPECTRO 79. Espectro de RMN ^{13}C de la 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (40b).



ESPECTRO 80. Espectro de masas por impacto electrónico de la 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida (40b).