

00570



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE QUÍMICA

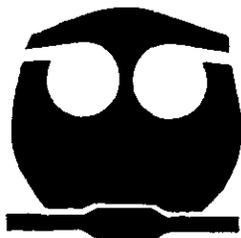
DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
DE 1H-BENZIMIDAZOLES

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA FARMACÉUTICA)

P R E S E N T A :

Q.F.B. JUAN VALDEZ GARAY



MEXICO, D.F.

285302  
2000



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 Bratoeff Tittf

**VOCAL** : Dra. Lilián Yépez Mulia

**SECRETARIO** : Dr. Eduardo Cortés Cortés

**1er. SUPLENTE** : Dr. Roberto Martínez

**2do. SUPLENTE** : M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

### **ASESOR DE TESIS**

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

---

### **SUPERVISOR TECNICO :**

M. en C. María Alicia Hernández Campos

---

### **SUSTENTANTE.**

Q.F.B. Juan Valdez Garay

---

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS, bajo la dirección del Dr. Roberto Cedillo Rivera y de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por enseñarme lo sorprendente que es la química.

A la Dra. Alicia Hernández Campos por siempre estar al pendiente de mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por sus atinados consejos.

Al excelente grupo académico de la UNAM.

A mis compañeros del laboratorio 122 por su ayuda desinteresada.

Al personal de la USAI en especial a Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán y Marisela Gutiérrez por su apoyo en el registro de espectros,

Al Dr. Roberto Cedillo, Dra. Lilián Yépez, Raúl Morales y Amparo Tapia por su ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

Al CONACyT y a la DGEP por las becas otorgadas.

A la DGAPA y CONACyT por financiar los proyectos IN204998 y 25920-M.

## Resumen

En el presente trabajo se elaboró la síntesis y evaluación biológica de los siguientes derivados del 1*H*-bencimidazol: 5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol (**12**); 5,6-Dicloro-2-metil-1*H*-bencimidazol (**13**); 2-Amino-5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol (**14**); 5,6-Dicloro-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (**15**); 5,6-Dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol (**16**); 5,6-Dicloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (**17**); 5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol (**18**). Los compuestos **12-18** se purificaron por recristalización e identificaron por sus constantes físicas, análisis espectroscópicos y espectrométricos.

El compuesto **12** se sintetizó a partir de la 4-Cloro-1,2-fenilendiamina (**20**) preparada en el laboratorio por reducción catalítica de la 4-Cloro-2-nitroanilina (**25**) comercial, mientras que los compuestos **13-18** se sintetizaron a partir de la 4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (**25**), preparada en el laboratorio.

La ciclación de **20** y **25** con ácido fórmico a 100°C y posterior neutralización con hidróxido de sodio formó el 5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol (**12**) y 5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol (**18**) respectivamente. Cuando se trató **25** de igual manera, pero con ácido acético dio el compuesto 5,6-Dicloro-2-metil-1*H*-bencimidazol (**13**).

El tratamiento de la diamina **25** con bromuro de cianógeno y posterior neutralización con hidróxido de sodio llevó al 2-Amino-5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol (**14**).

Para obtener el 5,6-Dicloro-2-metoxicarbonilamino-1*H*-bencimidazol (15), se trató el sulfato de *S*-metiltiopseudourea con cloroformiato de metilo y solución de hidróxido de sodio, al intermediario formado se le agregó la diamina 25.

Por último, el tratamiento de 25 con una mezcla de disulfuro de carbono, etanol y sosa dio el respectivo 2-mercaptobencimidazol 16. La posterior *S*-metilación con yoduro de metilo dio el compuesto 5,6-Dicloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (17).

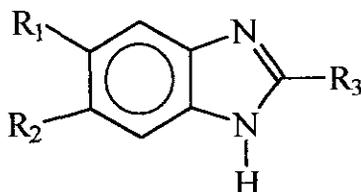
Se realizaron ensayos *in vitro* contra los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, así como de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. Los compuestos mostraron una alta actividad contra los protozoarios y escasa actividad contra *T. spiralis*.

## Abstract

Compounds **12-18** were prepared by treatment of the proper *o*-phenylene diamine with formic acid (**12**, **18**); acetic acid (**13**); cyanogen bromide (**14**); methyl *S*-methylthioisourea carboxylate (**15**); carbon disulfide (**16**) and methyl iodide (**17**).

Compounds **12-18** were identified by spectroscopic and spectrometric data.

Compounds **12-18** were *in vitro* tested against the protozoa *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites; and the helminth *Trichinella spiralis* muscle larvae. All compounds tasted showed potent activity against the protozoa, but low activity over the helminth.



	Compounds						
	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
-R <sub>1</sub>	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl
-R <sub>2</sub>	H	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl
-R <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	SH	SCH <sub>3</sub>	H

# INDICE

Introducción	1
<b>1. Antecedentes</b>	<b>6</b>
1.1 Información epidemiológica en México	6
1.2 Bencimidazoles con actividad antiparasitaria	7
1.3 Relación estructura-actividad de los bencimidazoles como antihelmínticos	9
1.4 Mecanismo de acción de fármacos antihelmínticos	10
1.4.1 Mecanismo de acción de los bencimidazoles	10
1.5 Fármacos antiprotozoarios	13
1.6 Bencimidazoles con actividad antiprotozoaria	15
1.7 Ensayo colorimétrico con sal de tetrazolium (MTT) y metasulfato de fenazina (PMS)	22
1.8 Síntesis de bencimidazoles	23
Objetivos	26
Consideraciones para el diseño.	27
<b>2 Parte experimental</b>	<b>29</b>
2.1 Parte química	29
2.1.1 Instrumentación	29
2.1.2 Cromatografía	31
2.1.3 5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol (12)	32
2.1.4 5(6)-Dicloro-2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol (13)	32
2.1.5 2-Amino-5,6-dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol (14)	33
2.1.6 (5,6-Dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il) carbamato de metilo (15)	34
2.1.7 5,6-Dicloro-2-mercapto-1 <i>H</i> -bencimidazol (16)	35
2.1.8 5,6-Dicloro-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol (17)	36

2.1.9 5,6-Dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol (18)	36
2.1.10 Síntesis de las 1,2-Fenilendiaminas	37
2.1.10.1 4-Cloro-1,2-.fenilendiamina (20)	38
2.1.10.2 3,4-Dicloroacetanilida (22)	38
2.1.10.3 4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (23)	39
2.1.10.4 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (24)	40
2.1.10.5 4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (25)	40
2.1.11 Bromuro de cianógeno	41
2.2 Parte biológica	41
2.2.1 Material biológico	41
2.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biológica de los compuestos contra la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> empleando el método de MTT/PMS	42
2.2.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los compuestos 12-18 contra <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Giardia lamblia</i>	43
<b>3 Resultados y discusión</b>	44
3.1 Parte química	44
3.2 Parte biológica	52
3.2.1 Efecto de los 1 <i>H</i> -Bencimidazoles sobre la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	52
3.2.2 Efecto de los 1 <i>H</i> -Bencimidazoles sobre <i>Entamoeba histolytica</i>	55
3.2.3 Efecto de los 1 <i>H</i> -Bencimidazoles sobre <i>Giardia lamblia</i>	58
3.2.4 Actividad biológica de la serie completa de 1 <i>H</i> -Bencimidazoles contra protozoarios	61
<b>Conclusiones</b>	65
Bibliografía	67
Espectros	71

# INTRODUCCION

Las infecciones causadas por helmintos han sido, y siguen siendo, una preocupación tanto para el sector veterinario como para el humano. Este grupo de infecciones es uno de los más representativos por su distribución universal y por causar daño a muchas especies.

La importancia económica de las infecciones por helmintos se manifiesta en toda la industria ganadera, es por eso que los avances más importantes en la quimioterapia provienen del área veterinaria. Se sabe que el tratamiento de helmintosis mejora el peso de los animales y estudios sobre el crecimiento y capacidad física en los niños han mostrado que éstos se incrementan al ser desparasitados.

Entre las enfermedades más importantes causadas por parásitos helmintos se encuentra la taeniosis causada por la fase adulta de *Tenia solium*. Esta parasitosis puede causar dolor abdominal, debilidad, pérdida de peso, diarrea y anemia. La infección por huevos de dicho parásito causa cisticercosis, la cual origina una reacción inflamatoria principalmente en músculo, ojos y sistema nervioso central. Por otro lado, se calcula que el 30 % de la población mundial está parasitada por *Ascaris lumbricoides*, agente etiológico de la ascariosis, cuya infección masiva causa dolor abdominal, pérdida de apetito, náuseas, diarrea o estreñimiento. Otra parasitosis de importancia es la trichuriasis, la cual causa dolor abdominal, trastornos digestivos, pérdida de apetito y peso; la

infestación intestinal causa diarrea, en ocasiones anemia atribuida a la sangre que chupa el parásito y puede causar reacciones alérgicas. La enterobiosis causada por *Enterobius vermicularis*, causa diarrea y en ocasiones, los parásitos entran a la vagina produciendo vulvitis y vaginitis. La fase intestinal de otro helminto, *Trichinella spiralis* causa en el hombre inflamación intestinal con diarrea y fiebre, en la fase extraintestinal del parásito causa daño a los músculos esqueléticos, causando dolores musculares y en articulaciones.

Los fármacos que más se han empleado para el tratamiento de las helmintosis son los derivados del bencimidazol, como el tiabendazol, mebendazol, albendazol y recientemente el triclabendazol (Figura 1).

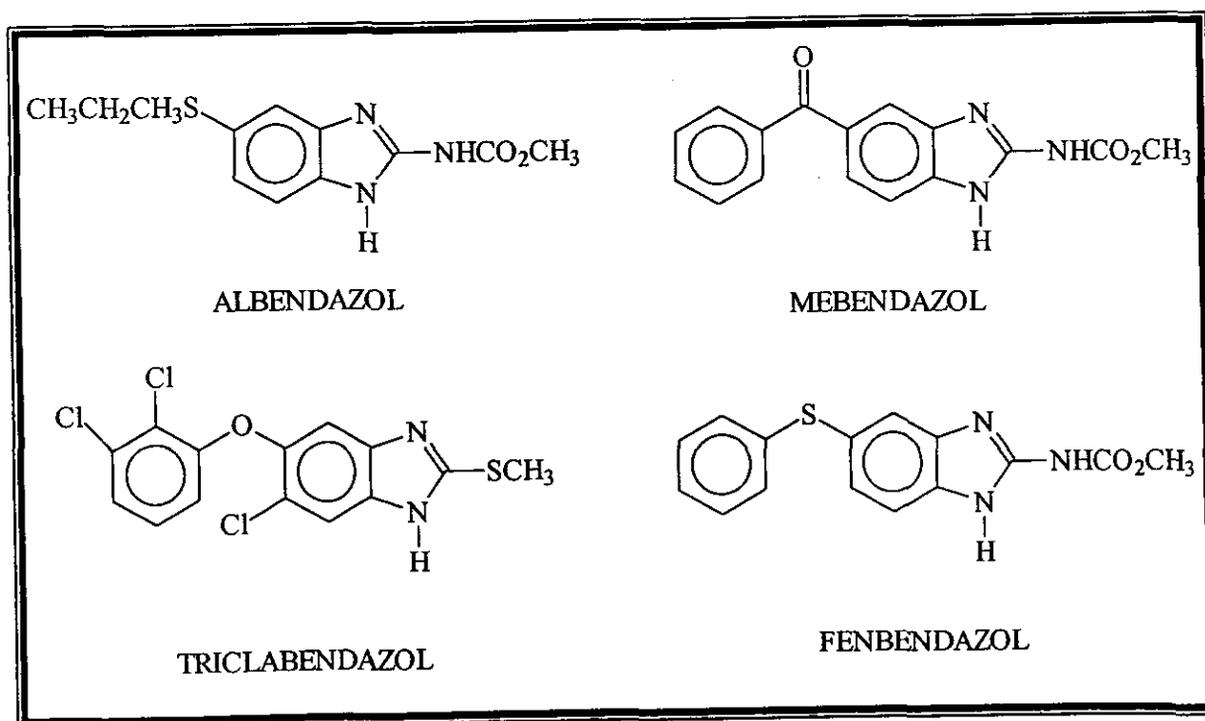


Figura 1. Algunos agentes bencimidazólicos antihelmínticos frecuentemente usados en la terapéutica.

Los bencimidazoles poseen un amplio espectro de actividad biológica como antihelmínticos, antimicrobianos, pesticidas, anticancerígenos, antiprotozoarios y otras actividades farmacológicas. La polifuncionalidad relacionada con el núcleo del bencimidazol, la facilidad para llevar a cabo varias reacciones orgánicas y su asociación con biomoléculas han estimulado, a varios laboratorios de todo el mundo, para explorar su síntesis y efectos biológicos.

Los bencimidazoles antihelmínticos como el albendazol y mebendazol, entre otros, muestran una potente actividad contra las infecciones gastrointestinales, pero su baja solubilidad en agua reduce en gran medida la capacidad de absorberse, por lo que su eficacia en infecciones de tipo sistémicas se ve reducida. Estos compuestos son rápidamente metabolizados, además de haber diversos reportes en todo el mundo de resistencia a dichos fármacos.

En la última década, la resistencia de parásitos helmintos a fármacos de tipo bencimidazólico se ha incrementado dramáticamente en ganado bovino y caprino, causando severos problemas económicos en la industria ganadera. Esto ha amenazado el control de las parasitosis en humanos, tomando en cuenta que los helmintos que infectan a los humanos pueden provenir de los animales de granja.

También hay reportes de resistencia a otros fármacos como el prazicuantel, ivermectinas, levamisol e incluso en combinaciones de bencimidazoles con levamisol. En estudios posteriores se descubrió que la magnitud de esta reducción en la actividad antihelmíntica depende de la estructura del bencimidazol, sugiriendo que el cambio en los sustituyentes del bencimidazol

podría producir un fármaco que mejore la eficacia contra los parásitos aislados resistentes a los bencimidazoles.

Por otro lado, las infecciones con protozoarios causan severas enfermedades en los humanos. Se estima que el 10 % de la población mundial se encuentra infectada por *Entamoeba histolytica*. Cincuenta millones de casos de disentería y accesos hepáticos son reportados cada año, produciendo de 50 mil a 100 mil muertes anuales. La amibiasis ocupa el tercer lugar mundial en infecciones letales, después de la malaria y esquistosomiasis. La *Giardia lamblia*, otro protozoario, causa diarreas que pueden llegar a ser crónicas y están relacionadas con la mala absorción en niños. Infecciones con *Trichomonas vaginalis* resultan en vaginitis y pueden conducir a un parto prematuro. *Toxoplasma gondii* causa encefalitis y ceguera a pacientes inmunocomprometidos, en infecciones congénitas puede causar hidrocefalia, retraso mental y ceguera en infantes. Finalmente, infecciones con *Naegleria fowleri*, aunque poco común, causan rápidamente una fatal e intratable meningoencefalitis.

Frecuentemente, la terapia con fármacos para el tratamiento de estas infecciones es inadecuada. Por ejemplo, muchos de los agentes disponibles son contraindicados en el embarazo o en niños; siendo dos de los grupos severamente afectados por estas infecciones. En resumen, la mayoría de los fármacos disponibles tienen graves efectos colaterales, incluyendo arritmias cardiacas, neuritis óptica, discracia sanguínea, náuseas y vómitos. Los serios efectos colaterales pueden limitar el uso de los medicamentos, particularmente en el caso de individuos inmunocomprometidos, los cuales podrían requerir tomar el medicamento por un largo periodo.

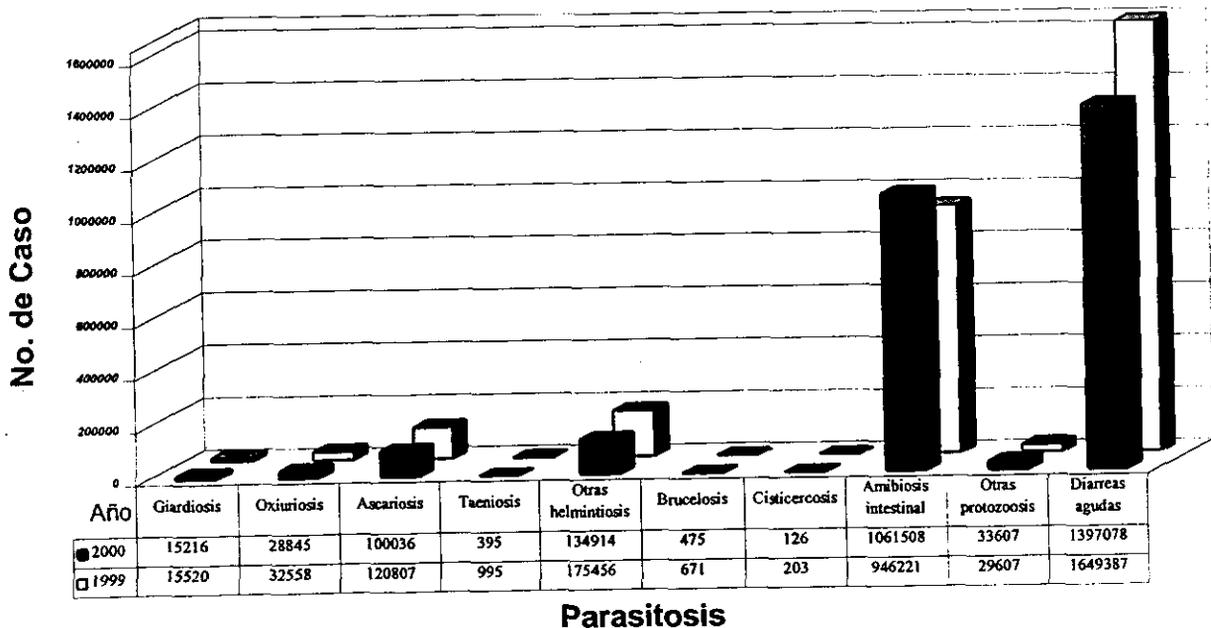
Se ha demostrado que bencimidazoles como el albendazol, mebendazol, flubendazol, fenbendazol, tienen un efecto similar al metronidazol, inhibiendo *in vitro* el crecimiento de *T. vaginalis* y *G. lamblia*. Otros derivados del bencimidazol también han mostrado actividad contra *G. lamblia* y *E. histolytica*, lo cual da una ventana en la posibilidad para el tratamiento de protozoosis.

Considerando la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria de los bencimidazoles, así como los problemas de resistencia y los efectos secundarios de algunos agentes antiprotozoarios, la búsqueda de nuevos agentes alternativos, más selectivos y de amplio espectro, para el tratamiento de estas parasitosis, es de suma importancia.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Información epidemiológica en México

El problema de las parasitosis es muy vasto. Como se observa en los datos de la **Gráfica 1**, la prevalencia de parasitosis en México es muy elevada [1]; especialmente los debidos por la amibiosis y helmintiosis. Estas cifras lejos de disminuir con el transcurso de los años muestran un comportamiento de incremento, o en el mejor de los casos, persistencia con respecto al año anterior. La magnitud de estas infecciones es igual de preocupante en muchas otras partes del mundo; especialmente, en países subdesarrollados.



**Gráfica 1.** Datos epidemiológicos reportados por la Secretaría de Salud correspondiente al número de casos acumulados en 1999 y lo que ha transcurrido del presente año.

## 1.2 Bencimidazoles con actividad antiparasitaria

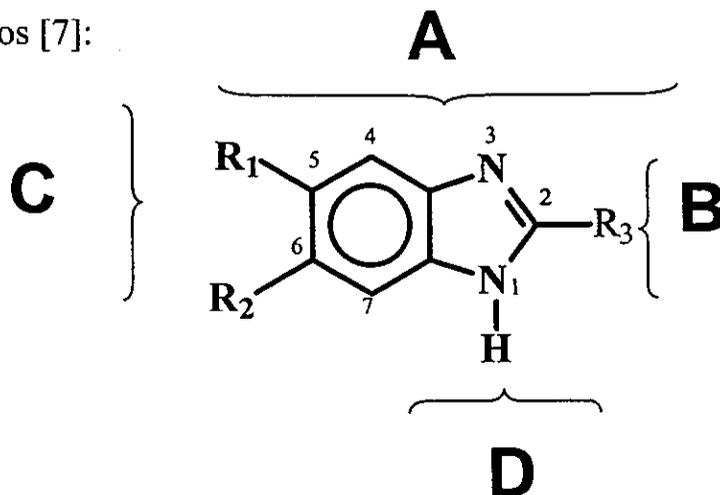
El 2-fenilbencimidazol es quizá el primer bencimidazol que en combinación con fenotiazina fue usado como un antihelmíntico en ovejas a principios de los años 60's; sin embargo, el tiabendazol (2-(4-tiazolil)-1*H*-bencimidazol) es considerado como el primer antihelmíntico de amplio espectro. Descubierta por el grupo Merck en 1961 [2], en humanos y animales tiene la desventaja de ser rápidamente metabolizado para dar el compuesto inactivo 5-hidroxtiabendazol. Este inconveniente llevó a la creación del cambendazol, el cual tiene un sustituyente isopropiloxicarbonilamino en posición 5. Este compuesto posee una mejor actividad antihelmíntica, pero desgraciadamente presenta efectos teratogénicos en varios animales [3].

Después de estos acontecimientos apareció una nueva generación de bencimidazoles sustituidos en la posición 5; además, con un grupo carbamato de metilo en la posición 2 [2,4]. Estos cambios elevaron considerablemente la polaridad y la vida media de los compuestos. Así, surgieron compuestos muy activos como el albendazol, mebendazol y flubendazol, entre otros para uso veterinario (**Figura 1, página 2**). La baja o nula toxicidad de estos compuestos permitió su uso en medicina humana para el tratamiento de helmintosis del tracto gastrointestinal. En la actualidad, el albendazol es utilizado como el antihelmíntico de excelencia, ya que con solo una dosis es efectivo en la mayoría de estas parasitosis. La desventaja de los bencimidazoles carbamatos radica en su baja absorción que no permite su uso en la mayoría de las parasitosis extraintestinales.

En 1978 surgió el triclabendazol, que a diferencia de los anteriores se encuentra sustituido en las posiciones 2, 5 y 6, el cual presenta buena absorción y excelente actividad fasciolicida [5]. En un principio se utilizó exclusivamente en el área veterinaria, pero en la actualidad, también se emplea en humanos [6].

### 1.3 Relación estructura actividad de los bencimidazoles como antihelmínticos.

Los estudios de las relaciones estructura-actividad biológica de un gran número de compuestos bencimidazólicos han permitido establecer los siguientes datos [7]:



**A** El remplazo del bencimidazol por otro sistema aromático congénero como el azaindol o imidazol, genera compuestos que son menos activos.

**B** La sustitución en la posición 2 puede ser por un grupo metilcarbamato, metiltio, un anillo aromático o heteroarómico, sin perder la potencia; sin embargo, los aromáticos suelen ser más tóxicos.

**C** La introducción de varios sutituyentes en la posición 5 no necesariamente aumenta la potencia. R<sub>1</sub> previene la inactivación metabólica, como la hidroxilación. Clorados en R<sub>2</sub> presentan buena actividad.

**D** El hidrógeno en posición 1 se creía necesario para la actividad antiparasitaria [7]; sin embargo, se ha encontrado que la presencia de un metilo no inactiva a la molécula [8].

## 1.4 Mecanismos de acción de fármacos antihelmínticos

Algunos fármacos antihelmínticos actúan rápida y selectivamente en la transmisión neuromuscular de nematodos. Levamisol, pirantel y morantel son agonistas en receptores nicotínicos de la acetilcolona de nematodos causando parálisis espástica. Diclorvos y haloxon son organofosforados que bloquean la acción de la colinesterasa. La piperazina es un agonista del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) por lo que produce parálisis flácida. Las avermectinas incrementan la apertura de canales de glutamato dependientes de cloro y producen parálisis de la bomba. Prazicuantel, tiene un efecto selectivo en el tegumento de los trematodos e incrementa la permeabilidad del calcio. Otros antihelmínticos tienen distinto modo de acción bioquímico. Las salicilanilinas: rafoxamida, oxiclozanida, brotiana y closantel son desacopladores de la fosforilación oxidativa. Clorsulon es un selectivo antagonista de la fosfoglicerato cinasa y mutasa de trematodos. Dietilcarbamazina bloquea a las enzimas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico, aumentando la respuesta inmune no específica [9].

### 1.4.1 Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Los bencimidazoles representan una clase de antihelmínticos de amplio espectro y su modo de acción ha sido investigado extensivamente. Se ha concluido que a pesar de los diversos efectos que producen los bencimidazoles a nivel celular y bioquímico, el principal modo de acción de estos fármacos involucra su interacción con las proteínas del citoesqueleto de los eucariontes, la tubulina [10].

La tubulina forma parte de los microtúbulos, organelos intracelulares que tienen una variedad de funciones, incluyendo el movimiento de los cromosomas durante la división celular, forman la estructura del citoesqueleto en la célula, movilizan partículas intracelulares e intervienen en la exocitosis. Se encuentran tanto en animales, plantas, hongos y algunas bacterias [11].

Los microtúbulos están compuestos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina, aproximadamente de 50 kDa cada una. Estructuralmente ambas subunidades son proteínas heterogéneas. La  $\beta$ -tubulina está compuesta de 3 dominios: el dominio 1 es de 34 kDa, el dominio 2 es de 19 kDa y la cola de 2 kDa en tamaño. Hay sitios de unión I, II, III, IV presentes en la  $\beta$ -tubulina [12].

Los microtúbulos existen en equilibrio dinámico con la tubulina, la porción de tubulina dimérica y los microtubulos poliméricos están controlados por proteínas (MAPs), cofactores endógenos como GTP,  $Mg^{2+}$  y el incremento de la temperatura. Dicho equilibrio puede ser alterado tanto *in vitro* como *in vivo* por sustancias exógenas conocidas como inhibidores de microtúbulos. Algunos de estos inhibidores ejercen su acción por unión a la tubulina evitando la asociación de las subunidades para el crecimiento de los microtúbulos. Esto es resultado de un “taponeo” en el extremo donde se lleva a cabo la asociación de microtúbulos, perdiéndose la capacidad de alargamiento de los mismos [9]. Una implicación de este fenómeno es el de no ser necesario unirse a todos los dímeros de tubulina para inhibir la polimerización, es suficiente, con sólo unirse al extremo de elongación (Figura 2).

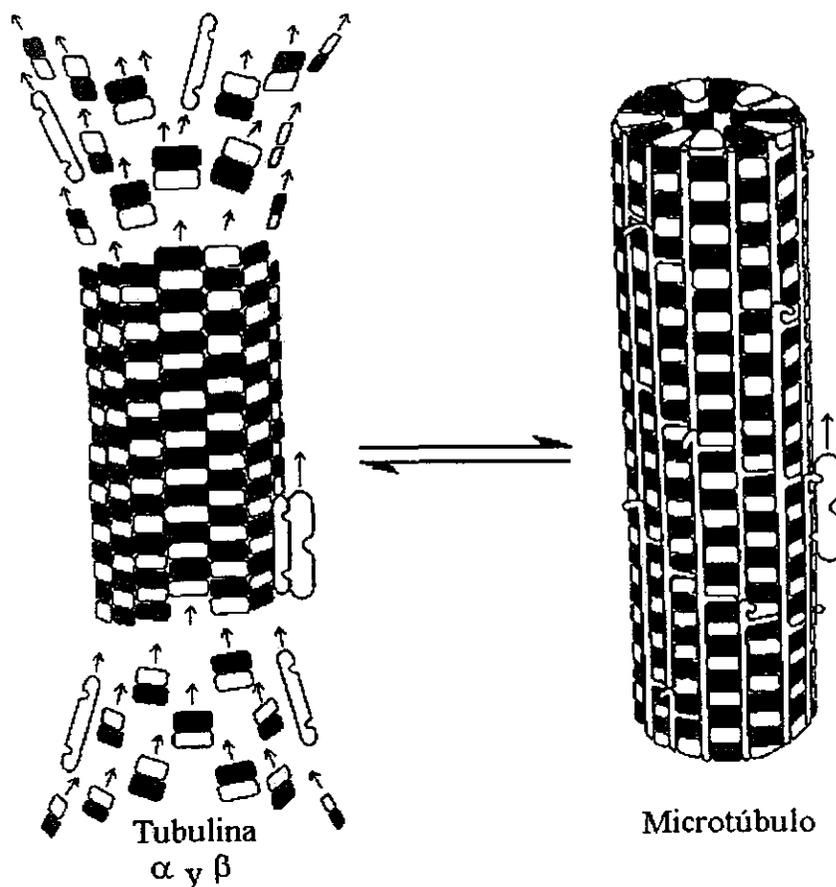


Figura 2. Equilibrio dinámico en la formación de microtúbulos.

Los inhibidores de microtúbulos son un grupo de compuestos con estructuras diversas provenientes de hongos, plantas, organismos marinos y más recientemente de origen sintético, algunos actúan de manera selectiva.

Los bencimidazoles tienen una acción selectiva sobre las células de mamíferos y de nematodos. Estudios *in vivo* demostraron que el fenbendazol y el mebendazol fueron respectivamente 250 y 400 veces más potentes como inhibidores de tubulina de *A. suum* en comparación a la tubulina de mamíferos [13].

Al unirse los benzimidazoles a la tubulina inducen la pérdida de microtúbulos citoplasmáticos del tegumento y células intestinales de cestodos y nematodos, seguido por la pérdida del transporte de vesículas secretoras, disminución de la recaptura de glucosa y el incremento en la utilización de glucógeno almacenado.

La potencia de los benzimidazoles antihelmínticos correlaciona con la constante de disociación de la  $\beta$ -tubulina en los nematodos [10].

## 1.5 Fármacos antiprotozoarios

### Metronidazol.

El Metronidazol (**Figura 3**) tiene acción bactericida, amebicida, giardicida y tricomonicida. El mecanismo de acción exacto del fármaco no se ha elucidado completamente. El metronidazol se encuentra no ionizado al pH fisiológico y es rápidamente incorporado por células u organismos anaerobios. En organismos o células susceptibles, el metronidazol es reducido a causa de un bajo potencial redox en transporte de electrones por proteínas, para dar compuestos polares no identificados que carecen del grupo nitro. Los productos de reducción parecen ser responsables de citotoxicidad y efectos antimicrobianos del fármaco, incluyendo la ruptura del ADN. El metronidazol es tan efectivo en células que se encuentran en división o sin dividirse.

El metronidazol es amebicida por vía oral tanto en infecciones intestinales como en sistémicas (el hígado o pulmones). Sin embargo, dado que es muy bien absorbido por el tracto gastrointestinal, el fármaco tiene una mayor actividad sistémica que local [14].

Las reacciones adversas más frecuentes por administración oral del metronidazol son: náuseas, dolor de cabeza, anorexia, resequedad de boca, sabor metálico. Ocasionalmente causa vómito, diarrea, dolor epigástrico, malestar abdominal y constipación. Pacientes que reciben una prolongada terapia pueden presentar disnea, vértigo, incoordinación, ataxia, confusión, irritabilidad, depresión, debilidad, insomnio, dolor de cabeza y pérdida auditiva [14].

### **Nitazoxanida**

La nitazoxanida (**Figura 3**) es un agente de amplio espectro [15] que se utiliza en la amibiosis intestinal aguda o disentería amibiana, también está indicado en el tratamiento de la giardiosis y de la tricomoniosis sintomática. Además tiene actividad en el tratamiento de helmintosis causadas por: *Enterobios vernicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercolaris*, *Ancylostoma duodenales*, *Taenia solium* y *Fasciola hepatica* entre otros.

En *T. vaginalis*, *G. lamblia* y *E. histolytica*, los estudio bioquímicos han demostrado que la piruvato ferridoxin oxidoreductasa (PFOR), y en menos intensidad la hidrogenasa, reducen la ferridoxina, la que es oxidada por el grupo nitro de la posición 5 sobre los compuestos nitroheterocíclicos tales como la nitazoxanida [16]. En estos organismos la nitazoxanida es reducida a un radical tóxico en el proceso del metabolismo de los carbohidratos, el hidrogenosoma, el cual contiene hidrogenasa PFOR y ferridoxina. El modo de acción contra los helmintos es inhibiendo la polimerización de la tubulina en el parásito. Otros mecanismos no han sido bien dilucidados.

Las reacciones adversas más comunes son náuseas, cefalea, anorexia, vómito, malestar epigástrico inespecífico y dolor abdominal tipo cólico. No existe evidencia de causar teratogenicidad ni mutagenicidad [15].

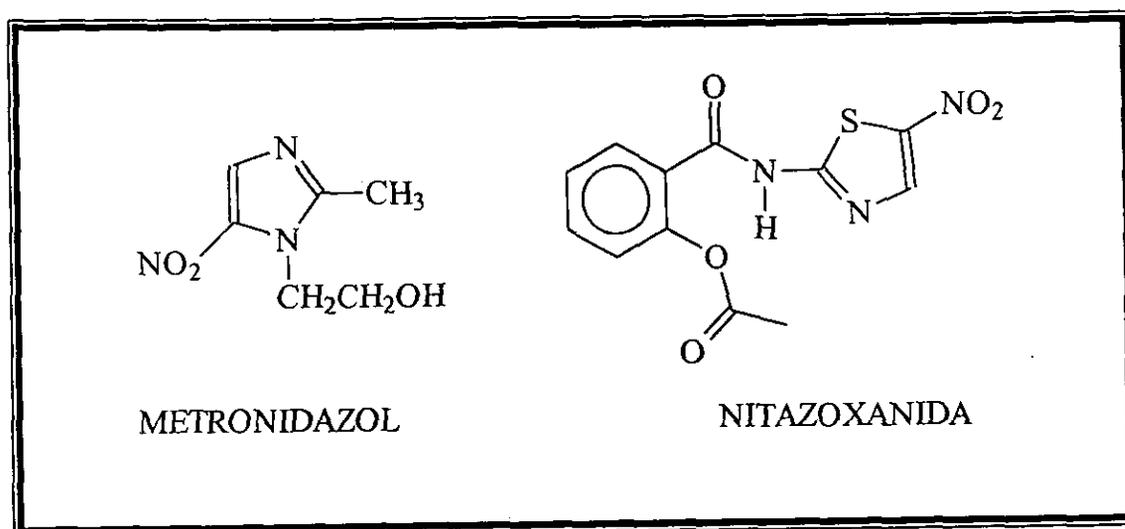


Figura 3. Agentes antiprotozoarios de primera elección.

## 1.6 Bencimidazoles con actividad antiprotozoaria

Los bencimidazoles son efectivos como giardicidas. Se sabe que *Giardia* contiene un prominente citoesqueleto constituido principalmente por microtúbulos. Se ha demostrado con estudios *in vitro* que el mebendazol y albendazol son 30 y 50 veces más activos que el metronidazol, de 10 a 40 veces más activos que la quinacrina [17] y de 2 a 10 veces más efectivos que el ornidazol respectivamente [18]. Estudios clínicos preliminares en humanos no han mostrado evidencias claras de la actividad de los bencimidazoles como giardicidas.

Se ha observado por microscopía electrónica de transmisión (Figura 4) que al incubar trofozoitos de *G. lamblia* a bajas concentraciones de albendazol

producen notables alteraciones en el citoesqueleto, resultando en la distorsión de la célula, desaparición del disco adhesivo y la eventual pérdida de la viabilidad [18]. La desaparición del disco adhesivo (formado principalmente por tubulina) ha sugerido que el albendazol está actuando principalmente en la formación de los microtúbulos del parásito.

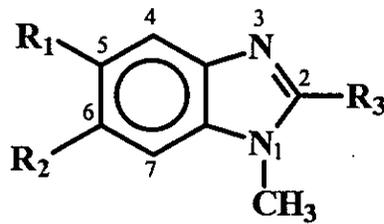


**Figura 4.** Microscopía electrónica de transmisión de trifozoitos de *Giardia lamblia* cultivados en presencia de albendazol (B), 5,6-dicloro-1,2-dimetilbencimidazol (C), 6-cloro-2-mercapto-1-metilbencimidazol (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de los diferentes bencimidazoles a  $1\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Como Controles se incluyeron parásitos cultivados sin fármaco (A). La flecha indica el disco adhesivo.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el Centro Médico Siglo XXI del Seguro Social, llevaron a la síntesis de los 1-metilbencimidazoles enlistados en la **Tabla 1**. Como se puede apreciar todos estos compuestos conservan el núcleo de bencimidazol, sustituido en la posición 1 con un grupo metilo. La posición 2 se sustituyó con grupos isostéricos (-NH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, -SH y -SCH<sub>3</sub>). Pueden no estar sustituidos en las posiciones 5 y 6, monoclorados en 5 ó 6, e incluso diclorados en 5 y 6. La introducción del grupo metilo en posición 1 se consideró por los motivos siguientes: evitar el efecto tautomérico que efectúa la molécula de bencimidazol, lo que permite tener compuestos con estructuras bien definidas; y el disminuir la polaridad, con el fin de incrementar la solubilidad y biodisponibilidad.

La evaluación biológica de dichos compuestos empleando pruebas de susceptibilidad *in vitro*, mostró que los 1-metilbencimidazoles fueron efectivos contra *G. lamblia* [8], destacando el compuesto **XV** que resultó ser 142, 13.4 y 1.5 veces más activo que el metronidazol, albendazol y nitazoxanoda respectivamente. La actividad de estos compuestos contra *E. histolytica*, también fue muy buena, en particular 2 compuestos (**III** y **V**) resultaron ser 9 y 10 veces respectivamente más potentes que la nitazoxanida. En el caso de *T. spiralis*, sólo uno de los compuestos, sin cloro en el anillo bencenoide y con un metilo en posición 2 (**I**); dos compuestos diclorados en posición 5 y 6, con metilo o metiltio en posición 2 (**XV** y **XVI**), mostraron actividad contra el organismo adulto (fase intestinal) y la larva muscular (fase intrainestinal). Con respecto al organismo adulto, sólo los compuestos **VII**, **VIII** y **IX** de la **Tabla 1** redujeron la viabilidad del parásito.

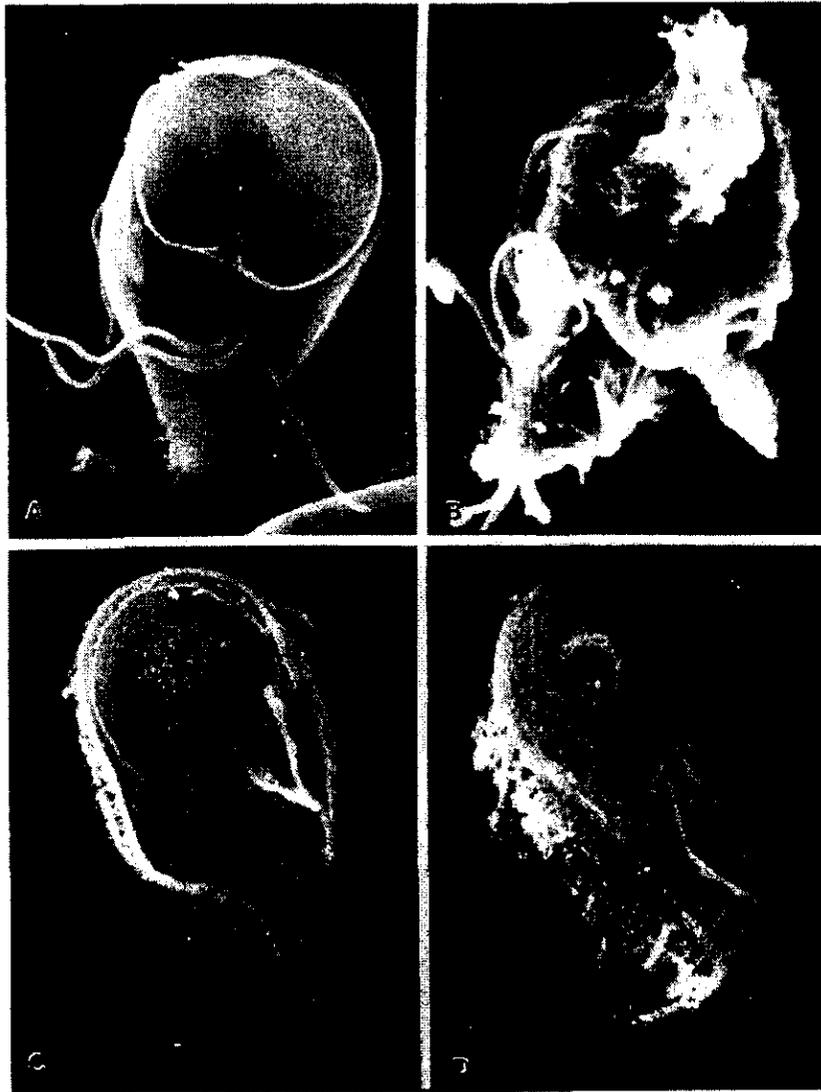
**Tabla 1.** Estructura de los 1-Metilbencimidazoles sintetizados previamente que han mostrado actividad *in vitro* contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.



COMPUESTO	CI <sub>50</sub> (%) <i>G. lamblia</i>	CI <sub>50</sub> (%) <i>G. lamblia</i>	-R <sub>1</sub>	-R <sub>2</sub>	-R <sub>3</sub>
<b>SERIE A</b>					
I	0.062	0.089	H	H	CH <sub>3</sub>
II	0.346	1.365	H	H	NH <sub>2</sub>
III	0.006	0.018	H	H	SH
IV	0.196	0.034	H	H	SCH <sub>3</sub>
<b>SERIE B</b>					
V	0.005	0.144	Cl	H	CH <sub>3</sub>
VI	0.061	0.242	Cl	H	NH <sub>2</sub>
VII	0.010	0.045	Cl	H	SH
VIII	0.038	0.028	Cl	H	SCH <sub>3</sub>
<b>SERIE C</b>					
IX	0.205	0.44	H	Cl	CH <sub>3</sub>
X	0.248	0.132	H	Cl	NH <sub>2</sub>
XI	3.771	0.020	H	Cl	SH
XII	0.569	0.122	H	Cl	SCH <sub>3</sub>
<b>SERIE D</b>					
XIII	0.014	0.056	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>
XIV	0.037	0.074	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>
XV	0.129	0.008	Cl	Cl	SH
XVI	1.049	0.024	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>
Nitazoxanida	0.055	0.013			
Albendazol	56.60	0.0377			
Metronidazol	0.350	1.228			

En estudios de microscopía electrónica y de barrido se observó que los 1-metilbencimidazoles sintetizados causaron daño importante a la membrana

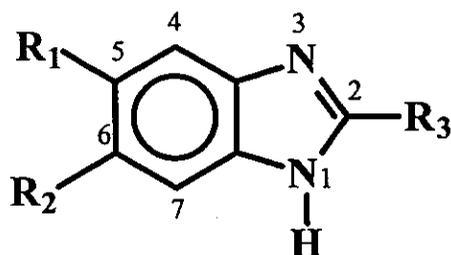
del trofozoíto de *G. lamblia* sin afectar el citoesqueleto, en comparación al daño ocasionado por el albendazol, donde se observó alteración importante del disco adhesivo (**Figura 5**). Esto podría sugerir un mecanismo de acción diferente. Asimismo los nuevos compuestos dañaron la cutícula del parásito adulto de *T. spiralis*.



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido de trofozoítos de *Giardia lamblia* cultivados en presencia de albendazol (B); 5,6-dicloro-1,2-dimetilbencimidazol (C); 5(6)-cloro-1,2-dimetilbencimidazol (D). Los compuestos se emplearon a concentraciones de 1  $\mu\text{g/mL}$ . Como control se incubaron parásitos sin fármaco ni compuestos (A).

Para obtener información acerca de la relevancia del grupo metilo en posición 1, se diseñó la serie de 1*H*-bencimidazoles, formada por compuestos con distintos sustituyentes en posición 2 y monoclorados, diclorados o sin cloro en las posiciones 5 y 6. Parte de este estudio ya ha sido realizado y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**. Los 1*H*-bencimidazoles presentan una muy buena actividad *in vitro* contra los trofozoítos de *G. lamblia* y *E. histolítica*, mientras que su actividad como antihelmínticos contra la larva muscular de *Trichinella spiralis* es limitada [19]. En el estudio mencionado no se evaluó la actividad antiparasitaria de bencimidazoles sustituidos con cloro en las posiciones 5 y 6, dicha parte del estudio se reporta en el presente trabajo

Tabla 2. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de algunos 1H-Bencimidazoles sintetizados



Compuesto	GI <sub>50</sub> (μM) <i>E. histolytica</i>	GI <sub>50</sub> (μM) <i>T. brucei</i>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>SERIE I</b>					
1	0.007	0.317	H	H	CH <sub>3</sub>
2	0.114	1.902	H	H	NH <sub>2</sub>
3	0.204	0.057	H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
4	0.133	0.040	H	H	SH
5	0.393	0.045	H	H	SCH <sub>3</sub>
6	0.042	0.008	H	H	H
<b>SERIE II</b>					
7	0.084	0.156	Cl	H	CH <sub>3</sub>
8	0.125	0.030	Cl	H	NH <sub>2</sub>
9	0.350	0.066	Cl	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
10	0.005	0.081	Cl	H	SH
11	0.192	0.005	Cl	H	SCH <sub>3</sub>
Nitazoxanida	0.055	0.013			
Metronidazol	0.350	1.228			
Albendazol	56.6	0.038			

## 1.7 Ensayo colorimétrico con sal de tetrazolium (MTT) y metosulfato de fenazina (PMS).

Existe un método para determinar la viabilidad celular, el cual está basado en la reducción de la sal de tetrazolium (MTT) a formazan por enzimas (Figura 6); especialmente, deshidrogenasas de células viables [20]. El formazan es un compuesto de color púrpura y la intensidad del color puede medirse por espectrofotometría. Este método ha sido empleado exitosamente para medir la viabilidad de diversas células, presentando una buena correlación entre el número de células viables y la densidad óptica [21]. Con el objetivo de disminuir tiempo de incubación, se usa el acarreador de electrones metosulfato de fenazina (PMS) como catalizador de la reacción.

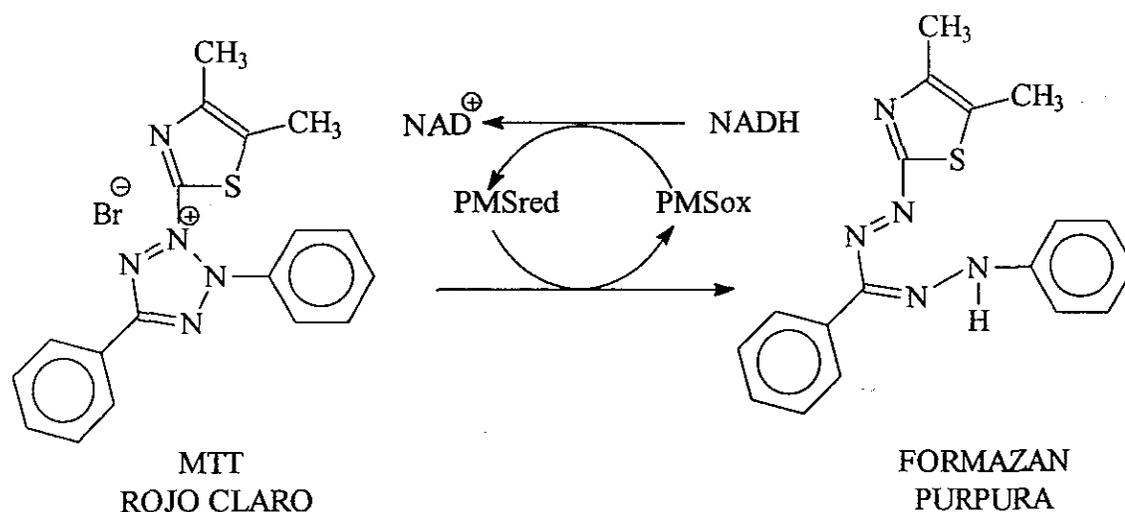
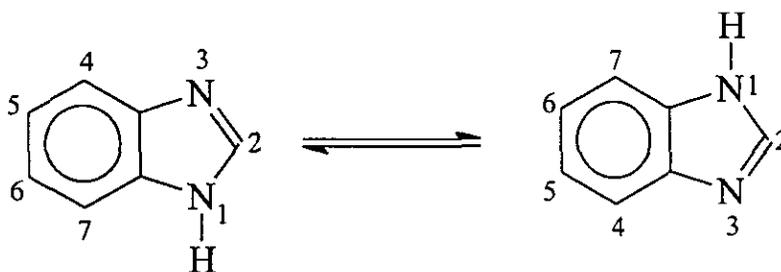


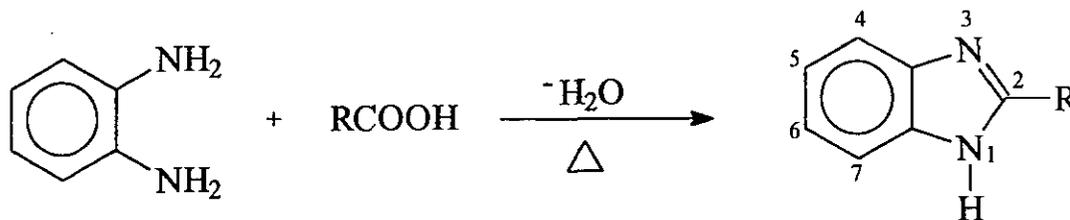
Figura 6. Reacción de reducción celular del MTT catalizada por PMS.

## 1.8 Síntesis de Bencimidazoles

La estructura de la molécula del bencimidazol consiste de un sistema anular bicíclico, en donde un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol. La molécula de bencimidazol se encuentra en equilibrio tautomérico protónico, donde el protón de la posición 1 puede migrar a la posición 3, este hecho causa una equivalencia entre los sustituyentes de las posiciones 4 y 7, así como de 5 y 6.



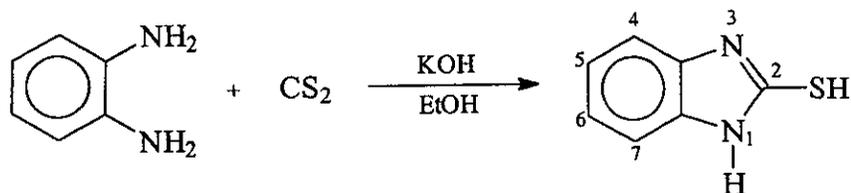
La síntesis de derivados del bencimidazol a partir de la 1,2-fenilendiamina y un ácido carboxílico fue reportada por Phillip [22]. El sustituyente en la posición 2 del bencimidazol dependerá del tipo de ácido carboxílico que se emplee. En general este método tiene buenos rendimientos.



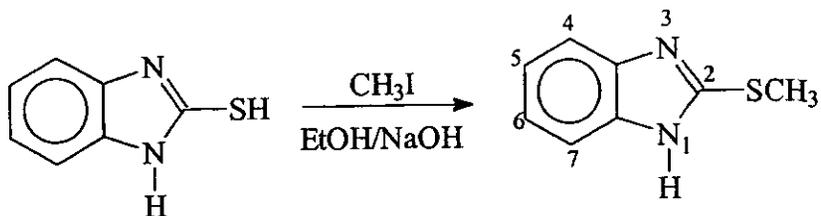
Para la obtención del 2-aminobencimidazol reportado por Leonard *et al* [23], se emplea 1,2-fenilendiamina tratada con bromuro de cianógeno y posterior neutralización.



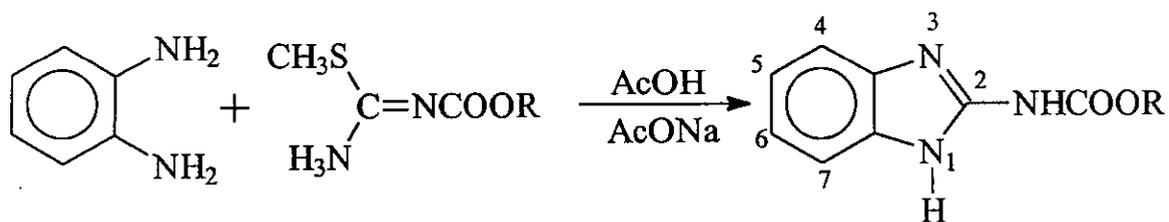
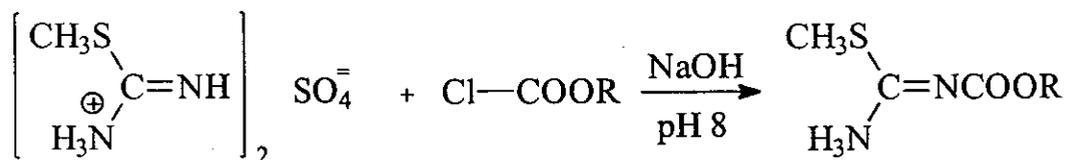
Para la síntesis del 2-mercaptobenzimidazol se ha utilizado la 1,2-fenilendiamina, la cual se trata con disulfuro de carbono y potasa en solución alcohólica, como lo describe Bywater *et al* [24].



Una manera sencilla de obtener derivados del 2-metiltiobenzimidazol es por reacción del yoduro de metilo y el 2-mercaptobenzimidazol correspondiente en medio básico [25].



Uno de los procesos descritos para la obtención del 2-bencimidazolilcarbamato de alquilo [26] involucra el tratamiento de sulfato de *S*-metilisotiurea con un cloroformiato de alquilo apropiado y una base, preferentemente en una solución acuosa del álcali hasta pH 8. De esta manera se obtiene el carboxilato de alquil *S*-metilisotiurea, mismo que no necesita ser aislado previamente para la siguiente reacción con la 1,2-fenilendiamina, lo que da el bencimidazol deseado.



# OBJETIVOS

## Objetivos generales:

- Diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de derivados del 1*H*-bencimidazol, sustituidos en las posiciones 2, 5 y/o 6 con grupos que confieren diferente polaridad, con la finalidad de establecer cuales son los requerimientos estructurales necesarios para la acción biológica, la potencia relativa de los bencimidazoles sintetizados con relación a los antiprotozoarios y antihelmínticos conocidos y contribuir en el desarrollo de nuevos fármacos.

## Objetivos particulares:

- Sintetizar, purificar e identificar los derivados del 1*H*-bencimidazol que se encuentran en la **Tabla 3**, los cuales forman parte de una serie en estudio.
- Evaluar *in vitro* la actividad de los derivados del 1*H*-bencimidazol contra la larva muscular de *T. spiralis* empleando el método de MTT.
- Evaluar *in vitro* la actividad de los derivados del 1*H*-bencimidazol contra trofozoitos de *G. lamblia* y *E. histolytica* empleando el método de subcultivo.
- Analizar los resultados obtenidos para determinar si hay alguna correlación cualitativa de la estructura química y actividad biológica.

# CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO

Los cloros que pueden estar como sustituyentes en las posiciones 5 y 6 se colocan con el propósito de impedir la desactivación metabólica causada por la hidroxilación en dichas posiciones, además de conferir mayor liposolubilidad y modificar factores estéricos y electrónicos de los compuestos.

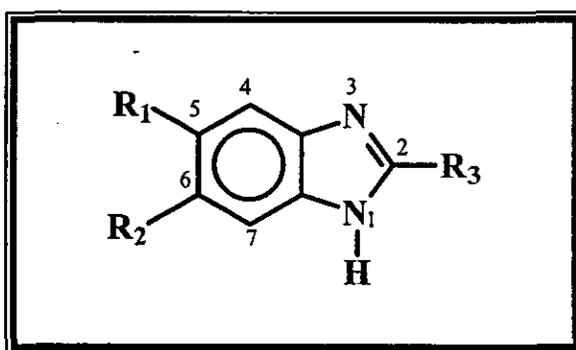
En la posición 2 del anillo se colocan isómeros clásicos  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , además de otros grupos que han mostrado actividad antihelmíntica como  $-\text{SCH}_3$  (presente en el triclabendazol) y  $-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$  (presente en albendazol, mebendazol, etc.). Estos grupos pueden formar puentes de hidrógeno fuertes ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$ ), débiles ( $-\text{SH}$ ) o tener interacciones hidrofóbicas ( $-\text{CH}_3$ ).

Se conserva el hidrógeno de la posición 1 con el fin de evaluar su importancia como responsable en la formación de puentes hidrógeno, así como su efecto tautomérico para poder ser comparado con sus análogos metilados, los cuales ya han sido reportados (**Tabla 1**).

De esta forma, considerando que la mayoría de los fármacos que derivan del bencimidazol poseen poca toxicidad en humanos además de tener un amplio espectro de acción en infestaciones por gusanos y tomando en cuenta la actividad antiprotozoaria, los compuestos a sintetizar en el presente trabajo se muestran en la **Tabla 3**.

Aquí se pretende sumar los resultados obtenidos en esta tesis a otros generados ya por nuestro grupo de investigación. El propósito es construir una base de datos que nos permita realizar estudios cuantitativos de las relaciones de estructura-actividad (QSAR), modelado molecular y diseño de nuevos compuestos con potencial antihelmíntico y/o antiprotozoario.

**Tabla 3.** Compuestos diseñados y sintetizados en el presente trabajo.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
12	Cl	H	H
13	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>
14	Cl	Cl	NH <sub>2</sub>
15	Cl	Cl	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
16	Cl	Cl	SH
17	Cl	Cl	SCH <sub>3</sub>
18	Cl	Cl	H

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

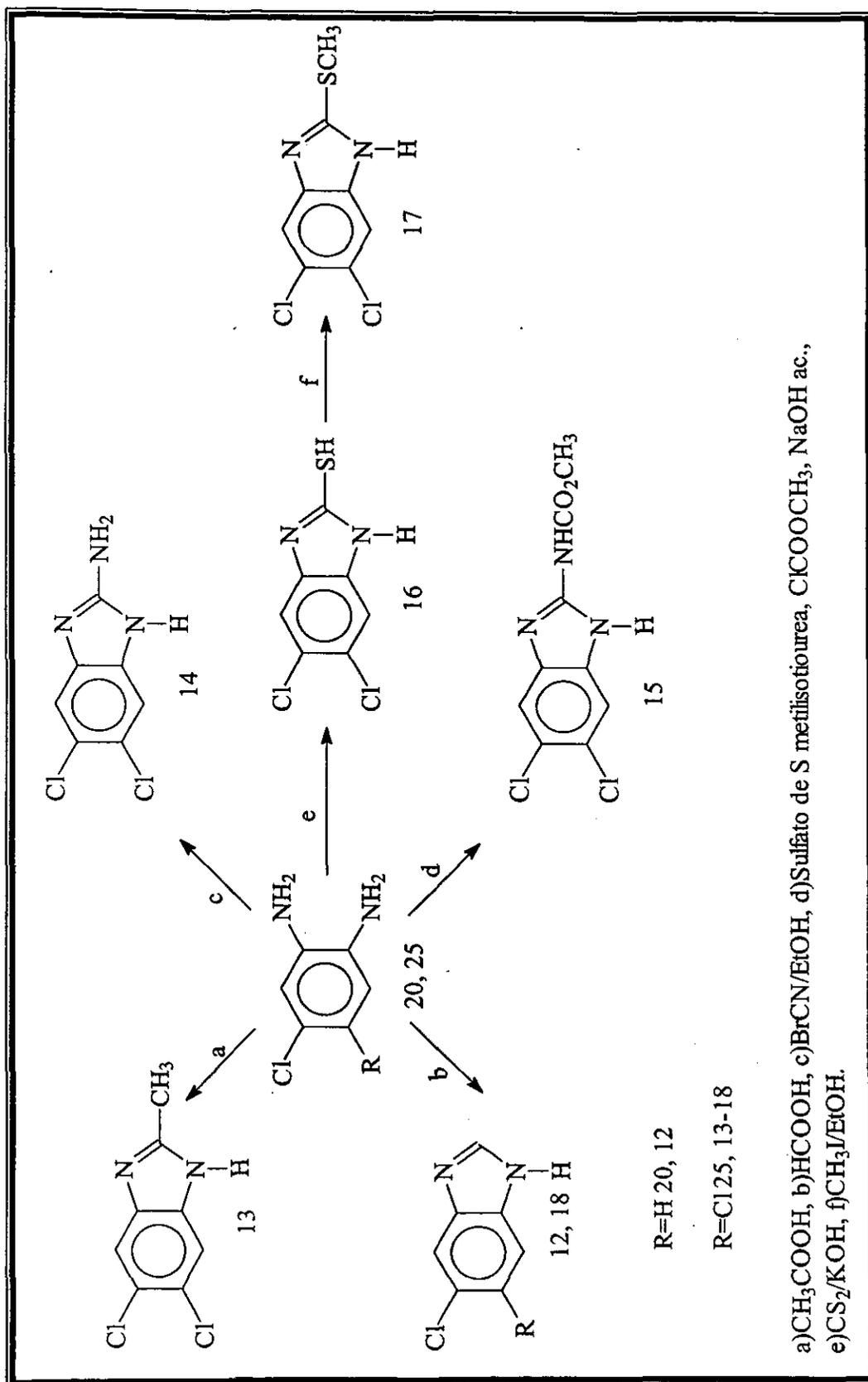
Este trabajo se divide en dos partes. Primero, la parte química comprende los métodos sintéticos seguidos en la preparación de los compuestos del presente estudio de acuerdo al **Esquema 1** de reacción. La segunda, la parte biológica, describe las pruebas de actividad antihelmíntica y antiprotozoaria a que fueron sometidos los compuestos preparados.

### 2.1 Parte Química

#### 2.1.1 Instrumentación

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida utilizando un rotaevaporador marca Büchi RE 111 con condensador de dedo frío. La presión reducida se logró con una bomba FELISA Modelo 1600, a 55 cm de Hg.

Los espectros de infrarojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 337, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales ( $\nu$ ) se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ . Los símbolos de las señales son: w = banda débil, m = banda mediana, s = banda fuerte.



Esquema 1. Ruta sintética de los 1H-Benzimidazoles del presente estudio

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 300 MHz (RMN<sup>1</sup>H) fueron determinados en un espectrómetro Varian modelo VRX-300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, deuterocloroformo y dimetilsulfóxido deuterado como disolventes. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millon (ppm). Los símbolos de las señales son: s = singulete, d = doblete, dd = doble de dobles, m = multiplete complejo, sa = singulete amplio, ma = multiplete amplio.

Los espectros de masas se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra utilizando impacto electrónico a 70 ev como método de ionización en un aparato JEOL-JMS-AX505-HA. La simbología utilizada es:  $m/z$  = relación masa carga,  $M^+$  = ion molecular y 100 % indica el pico base.

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

Para realizar la hidrogenación catalítica se empleo un hidrogenador marca Parr Modelo 3916EG con 70 lb/plg<sup>2</sup> y 80°C como capacidad máxima, utilizando hidrógeno (Infra) y como catalizador Ni-Raney al 50 % (Aldrich).

### 2.1.2 Cromatografía

El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF254 (Merck). Los compuestos orgánicos fueron visualizados con luz ultravioleta y por exposición a vapores de yodo.

Los sistemas de elución empleados fueron los siguientes:

SISTEMA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
I	Cloroformo:Metanol	80:20
II	Cloroformo:Metanol	90:10
III	Cloroformo:Metanol	95:5
IV	Hex:Cloroformo:AcOEt	50:35:15

### 2.1.3 5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol (12)

En un matraz de bola de 250 mL con una boca, provisto con refrigerante de agua en posición de reflujo, agitación magnética y canastilla de calentamiento con reóstato, se colocaron 12.38 g (87 mmol) de 4-cloro-1,2-fenilendiamina junto con 9.7 g (9 mL, 211 mmol, 2.4 eq.) de ácido fórmico y 15 mL de agua. La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas y media. La solución café obscura se tornó color café claro. Comprobado el término de la reacción por ccf, se neutralizó la mezcla de reacción con solución acuosa de NaOH al 10 %. El sólido café claro se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua fría hasta pH neutro. El producto crudo se recrystalizó de agua con carbón activado. Se obtuvo 10.6 g (82 %) de un polvo blanco, el cual mostró una sola mancha en ccf (*R<sub>f</sub>* de 0.67, Sistema III) y pf 128-129°C.

### 2.1.4 5,6-Dicloro-2-metil-1*H*-bencimidazol (13)

En un matraz de bola de 50 mL con una boca, provisto con refrigerante de aire en posición de reflujo, agitación magnética y canastilla de calentamiento con reóstato, se colocaron 4 g (22 mmol) de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina, 8.4 g (8 mL, 140 mmol, 6.2 eq.) de ácido acético glacial, 10 mL de una solución

acuosa de HCl al 18 %. La mezcla de color café oscuro se calentó a reflujo por 1 hora. Se monitoreó el fin de la reacción por ccf. La mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados de 250 mL con un baño de hielo, se neutralizó con una solución acuosa de sosa al 30 %, se formó un sólido café el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo se decoloró con carbón activado en etanol y recristalizó de etanol/agua. Se obtuvieron 13.3 g (76 %) de cristales blancos los cuales en ccf mostraron una sola mancha ( $R_f$  de 0.43, Sistema IV) y un pf de 249-253°C.

### 2.1.5 2-Amino-5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol (14)

En un matraz de bola de 250 mL con 3 bocas, provisto con termómetro, refrigerante de aire en posición de reflujo, tapón de teflón, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 6.8 g (38.4 mmol) de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina, 80 mL de metanol y 50 mL de agua, se formó una solución café, y se agregó, poco a poco, 4.1 g (38 mmol, 1 eq.) de bromuro de cianógeno. La temperatura se incrementó a 35°C, se calentó con un baño de agua hasta 70°C por 2 horas. La solución se tornó de color rojizo. La mezcla de reacción fría se vertió en un vaso de precipitados de 300 mL y neutralizó con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 10 %. Se formó un sólido café rojizo el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua helada. El sólido se disolvió en acetona, se le burbujeo ácido clorhídrico, formándose un sólido blanquecino, se recristalizó de etanol absoluto. El sólido blanco se disolvió en agua caliente y libero la base con hidróxido de amonio al 50 %. Se formó un sólido blanco el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua y recristalizó de etanol. Se obtuvo 6.3 g (75

%) de un sólido blanco, el cual mostró una sola mancha en ccf ( $R_f$  de 0.37, Sistema II) y un pf de 260-263°C.

### 2.1.6 (5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il) carbamato de metilo (15)

En un reactor de 250 mL con cuatro bocas, acondicionado con termómetro, embudo de adición, tapón séptum, agitación magnética y un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro, previamente calibrado con solución reguladora de acetatos pH 4.1 y fosfatos de pH 7.6, se suspendieron 15.1 g (53 mmol) de sulfato de *S*-metilisotiourea en 50 mL de agua, se agitó y enfrió a 5°C. Enseguida, se adicionaron 10.g (8.2 mL, 103 mmol, 2 eq.) de cloroformiato de metilo con ayuda de una jeringa, se agitó vigorosamente y poco a poco se agregó, mediante el embudo de adición, una solución acuosa de hidróxido de sodio al 25 % a una velocidad tal que el pH oscilara entre 7 y 7.5 y la temperatura entre 10 y 15°C. Después de haber adicionado 69 mL de la solución de sosa en un lapso de dos horas, el pH permaneció constante en 7 y se formó un precipitado blanco esponjoso. Este intermediario se empleó sin aislar inmediatamente después de haberse formado.

En un matraz de bola de 1000 mL de una boca, acondicionado con agitación magnética y un refrigerante en posición de reflujo, cuyo extremo superior se conecto a una trampa de hipoclorito de sodio. En el matraz se disolvió en frío 8.5 g (46 mmol) de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (obtenida por reducción catalítica con  $H_2$ /Ni-Raney de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina) en 44 mL de solución amortiguadora de acetatos (12.4 mL de ácido acético, 4.4 g de acetato de sodio y 44 mL de agua) y se adicionó el contenido de la reacción

arriba mencionada. La mezcla se calentó poco a poco con una canastilla con reóstato, observándose el desprendimiento de gas, y se llevó a reflujo, donde se mantuvo por dos horas. Después, se retiró la fuente de calor y se dejó en agitación hasta temperatura ambiente. Se formó un sólido café, el cual separó por filtración al vacío y se lavó una vez con hexano frío, etanol frío y finalmente con agua. El producto crudo se recristalizó de ácido acético glacial. Se obtuvo 10 g (80 %) de cristales color beige, los cuales en ccf mostraron una sola mancha (*R<sub>f</sub>* de 0.61, Sistema III) y un pf de 311-314°C.

### 2.1.7 5,6-Dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol (16)

En un matraz de bola de 1000 mL con tres bocas, provisto con termómetro, tapón de teflón y agitación magnética, se mezclaron 6.7 g (38 mmol) de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina, 2.5 g (45 mmol, 1.2 eq.) de hidróxido de potasio disueltos en 5 mL de agua, 70 mL de etanol y 4.6 g (3.6 mL, 60 mmol, 1.6 eq.) de disulfuro de carbono. En el extremo superior del refrigerante se colocó una llave de paso con un globo lleno de nitrógeno, se purgó el sistema y posteriormente se calentó a reflujo por tres horas. La solución café claro se oscureció, se detectó el fin de la reacción por ccf. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se vertió la mezcla en una vaso de precipitados de 500 mL con 200 g de hielo, se aciduló a pH 6 con una solución acuosa de ácido acético al 15 %. Se formó un sólido café, el cual se decoloró con carbón activado en etanol y se concentró en el rotaevaporador. El residuo se recristalizó de etanol/agua. Se obtuvo 6.2 g (75 %) de cristales blancos, los cuales en ccf mostraron una sola mancha (*R<sub>f</sub>* de 0.57, Sistema II) y un pf de 325-326°C

### 2.1.8 5,6-Dicloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (17)

En un matraz de bola de 50 mL con tres bocas, provisto con termómetro, tapón septum, agitación magnética, condensador de aire en posición de reflujo y un globo con nitrógeno en el extremo superior, se colocaron 2.4 g (11 mmol) de 5,6-dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol, 21 mL de etanol, 1.2 g (11 mmol, 1 eq.) de hidróxido de potasio y 6 mL de agua, se formó una solución de color amarillo, se enfrió en un baño de hielo-acetona-sal hasta  $-17^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura se agregó con una jeringa, gota a gota, 1.5 g (1 mL, 11 mmol, 1 eq.) de yoduro de metilo, la temperatura se elevó a  $-10^{\circ}\text{C}$ , se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación por una hora. La solución se tornó de un color amarillo claro y se aciduló pH 5 con una solución acuosa de ácido acético al 10 %. Se formó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua y se recrystalizó de acetato de etilo. Se obtuvo 2.8 g (89 %) de cristales blancos. Los cuales en ccf mostraron una sola mancha ( $R_f$  de 0.61, Sistema II) y un pf de  $193-194^{\circ}\text{C}$ .

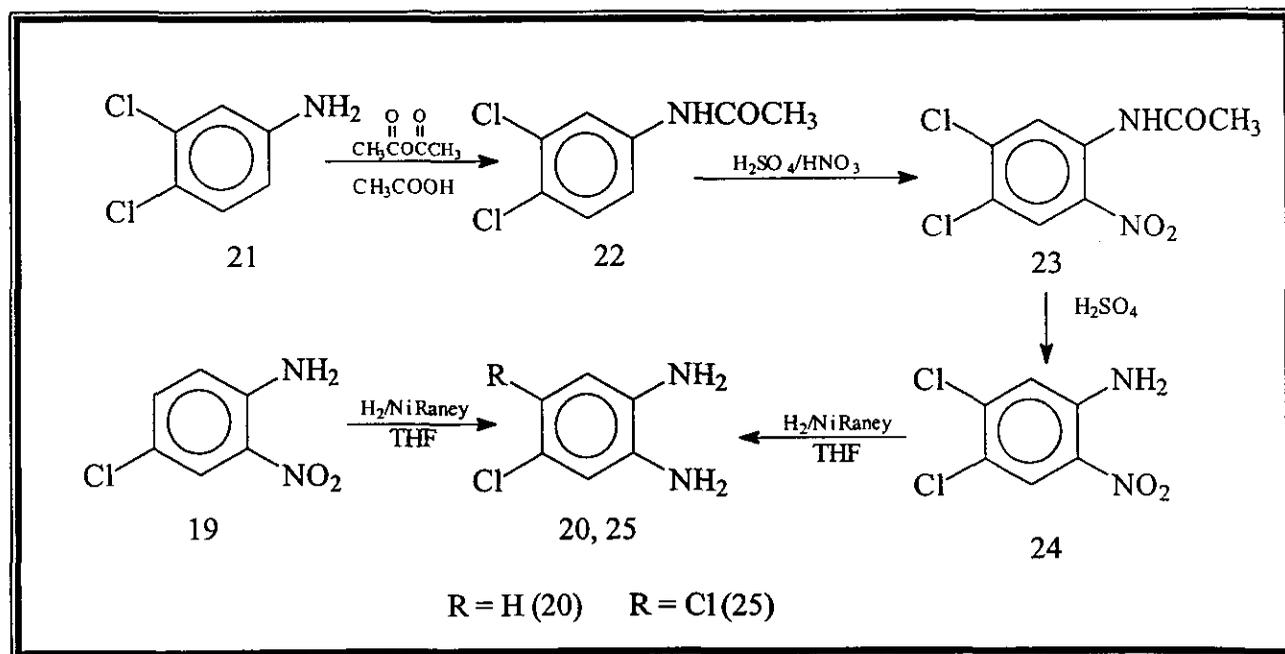
### 2.1.9 5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol (18)

En un matraz de bola de 1000 mL con dos bocas, provisto con refrigerante de agua en posición de reflujo, termómetro, agitación magnética y canastilla de calentamiento con reóstato, se colocaron 16.5 g (93 mmol) de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina y 20.5 g (19 mL, 447 mmol, 4.8 eq.) de ácido fórmico. La mezcla de reacción se calentó a  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 horas. La solución oscura se aclaró y el final de la reacción se monitoreó por ccf. La mezcla de reacción se vertió sobre 200 g de hielo y se formó un sólido de color café claro, el cual se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro. El sólido se recrystalizó de metanol. Se obtuvo 13.2 g (76 %) de cristales blancos,

los cuales en ccf mostraron una sola mancha ( $R_f$  de 0.33, Sistema III) y un pf de 208-209°C.

### 2.1.10 Síntesis de las 1,2-Fenilendiaminas

En el caso de la 4-cloro-1,2-fenilendiamina (20) se partió de la 4-cloro-2-nitroanilina comercial (19) y en el caso de la 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (25) su materia prima fue la 3,4-dicloroanilina (21) como se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Síntesis de las 1,2-Fenilendiaminas precursoras

### 2.1.10.1 4-Cloro-1,2-fenilendiamina (20)

En una botella de hidrogenación de vidrio de 500 mL se colocaron 5g (29 mmol) de 4-cloro-2-nitroanilina (Fluka), 1.2 g de Ni-Raney al 50% (el cual se lavó 3 veces con THF antes de agregar a la botella de hidrogenación) y 20 mL de THF. La botella se conectó al hidrogenador *Parr*, se eliminó el aire mediante la inyección y expulsión de H<sub>2</sub> (tres veces) y enseguida, se inició la reacción cargando la botella con 70 lb/plg<sup>2</sup>. La reacción finalizó después de consumir 61 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno en un tiempo de 4 horas, se filtró al vacío con papel Whatman No. 2 y lavó con THF, el filtrado se concentró en un rotaevaporador. Se obtuvo 4 g (98 %) de un sólido color café, el cual en ccf mostró una sola mancha (*R<sub>f</sub>* de 0.25, Sistema III) y un *pf* de 68-69°C. Este producto se empleó inmediatamente, sin purificación alguna para la síntesis de 12.

### 2.1.10.2 3,4-Dicloroacetanilida (22)

En un vaso de precipitados de 2 L, acondicionado con termómetro, agitador mecánico y baño de hielo, se colocaron 408.3 g (2.52 moles) de 3,4-dicloroanilina (21) y 100 mL de ácido acético. La mezcla anterior se enfrió con un baño de hielo y se agitó mientras se fueron incorporando 321.6 g (297.2 mL, 3.15 mol, 1.25 eq.) de anhídrido acético. La adición se hizo en un tiempo de 8 minutos, de tal manera que la temperatura de reacción no paso de 70°C. Al término de la adición se formó una masa color violácea. Se retiró el baño de hielo, se agitó hasta homogeneización de la mezcla y se dejó en reposo 15 min. Después de comprobar la total conversión de la materia prima por ccf, se adicionó 1 kg de hielo-agua y el sólido café formado se separó por filtración al vacío. El producto crudo se trituró en un mortero, se suspendió en

agua y se volvió a filtrar, lavando repetidas veces con agua hasta pH neutro. El residuo libre de agua se secó en la estufa a 85°C durante 24 h. Se obtuvo 493g (96 %) de un sólido café claro. Este sólido fue un solo compuesto al hacer su determinación de pureza por ccf ( $R_f$  de 0.15, Sistema IV) y un pf de 122-123°C.

### 2.1.10.3 4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (23)

En un vaso de precipitados de 4 L, acondicionado con termómetro, agitación mecánica y un baño de hielo/sal, se disolvieron poco a poco 462.3 g (2.26 mol) de 4,5-dicloroacetanilida (22) en 1L de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo la temperatura entre 10-15°C. Después, se agregó gota a gota, 400 mL de mezcla sulfonítrica (1:1) fría, manteniendo la temperatura de adición entre 17-20°C. Después de 1 hora terminó la adición, se retiró el baño de hielo y agitó por 30 minutos más. Se comprobó el fin de la reacción por ccf. La mezcla se vertió cuidadosamente sobre 12 kg. de hielo. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces hasta pH neutro y dejó secar. Se obtuvo 553 g del producto crudo. Este, se suspendió en 1500 mL de metanol y agitó en frío durante 30 min. Se filtró al vacío y lavó con metanol frío. Esta operación se repitió una vez más. El sólido amarillo claro residual mostró por ccf un compuesto principal y trazas de un producto secundario de mayor polaridad. Se recrystalizó de metanol-agua, se obtuvo 366.8 g (65 %) para obtener un solo producto ( $R_f$  de 0.65, Sistema IV) con un pf de 123-124°C.

#### 2.1.10.4 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (24)

En un vaso de precipitados de 4 L, provisto con termómetro y agitación mecánica, se colocaron 700 mL de ácido sulfúrico concentrado y con agitación suave se incorporaron 348.7 g (1.4 moles) de 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (23) obtenida con anterioridad. La mezcla se calentó a 80-90°C durante 30 minutos, comprobándose el fin de la hidrólisis por ccf. Se dejó enfriar a 50°C y se vertió sobre 5 Kg de hielo. El sólido anaranjado que se formó se separó por filtración al vacío y lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro. Se recrystalizó de ácido acético-agua. Se obtuvo 275.3 g (95 %) de un polvo anaranjado, el cual mostró una sola mancha por ccf (*R<sub>f</sub>* de 0.71, Sistema II) y un *pf* de 176-177°C.

#### 2.1.10.5 4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (25)

En una botella de hidrogenación de vidrio de 500 mL se mezclaron 19.3 g (93 mmol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (12), 4 g de Ni-Raney al 50 % (el cuál se lavó 3 veces con etanol antes de agregar a la botella de hidrogenación), 200 mL de etanol absoluto y 50 mL de acetato de etilo absoluto. La botella se conectó al hidrogenador, se eliminó el aire mediante la inyección y expulsión de hidrógeno (tres veces), y enseguida, se inició la reacción cargando la botella con 60 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno. Se agitó hasta que se consumieron 480 lb/plg<sup>2</sup>, en un lapso de 4 horas. El catalizador se separó de la mezcla por filtración al vacío empleando doble papel filtro Whatman No.2. El filtrado oscuro se concentró en rotaevaporador a sequedad. Se obtuvo 16.5 g (100 %) de un sólido café oscuro el cual mostró una sola mancha por ccf (*R<sub>f</sub>* de 0.32, Sistema II). Este sólido se utilizó inmediatamente para las reacciones

siguientes. Una muestra se recrystalizó de etanol-agua y se obtuvo agujas blancas con un pf de 158-161°C.

### 2.1.11 Bromuro de cianógeno (26)

En un matraz de bola de 3 L con tres bocas, equipado con termómetro, agitador mecánico, embudo de adición y baño de hielo, se colocaron 500.0 g (160 mL, 3.1 mol) de bromo estratificados con 50 mL de agua, y adicionaron 170 g (3.47 mol) de NaCN en 1.2 L de agua a 28°C. La mezcla de bromo en agua, de color rojo, se comenzó a tornar de color naranja y posteriormente se observó un precipitado blanco. El sistema se calentó con un baño de aceite y el producto destiló a 60-62°C [28]. Se obtuvo 197 g (60 %) de un sólido blanco de olor pungente, el cual se guardó en viales ámbar en el refrigerador.

## 2.2 Parte Biológica

### 2.2.1 Material biológico

Se emplearon la cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989:1 y la cepa HMI:IMSS de *Entamoeba histolytica* para el ensayo de actividad biológica de los compuestos 12-18. Los parásitos se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con suero de ternera complementado al 10 % [29]. Los parásitos se subcultivaron dos veces por semana. Aparte, se empleó una cepa de *Trichinella spiralis* [30] que fue aislada del cerdo por el Dr. Martínez Maraón del Instituto Nacional de Diagnósticos y Referencias Epidemiológica (INDRE). Con el objeto de mantener el ciclo de vida de este parásito, ratas de la cepa Sprague-Dawley, de dos a tres meses de edad, fueron infectadas con 3000 larvas musculares resuspendidas en Bacto agar al 0.02 %. La infección se realizó vía intragástrica con cánula y jeringa.

## 2.2.2 Evaluación *in vitro* de la actividad biológica de los compuestos 12-18 contra la larva muscular de *Trichinella spiralis* empleando el método de MTT/PMS

Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo a lo descrito anteriormente [30] y se colocaron 1000 larvas por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunclon) en medio RPMI 1640 conteniendo el compuesto a evaluar a una concentración de 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los parásitos se incubaron tres días a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 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 colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán de acuerdo a lo descrito por Towson y cols [31], con algunas modificaciones [32]. 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 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se añadió 1 mL de una solución de MTT al 0.75 % (Sigma), 50  $\mu\text{L}$  de una solución de metasulfato de fenazina al 5% (PMS, Sigma) como catalizador y 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Los tubos se incubaron a 37°C durante 50 minutos con agitación constante. Después de la incubación se realizó otro lavado con PBS y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de DMSO, los parásitos se resuspendieron y dejaron a temperatura ambiente por 1 hora. 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 eso se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad. Se realizaron 3 experimentos por duplicado de cada uno de ellos.

### **2.2.3 Evaluación *in vitro* de la actividad de los compuestos 12-18 contra *E. histolytica* y *G. lamblia***

Se empleó el método de subcultivo previamente estandarizado [33]. Se incubaron  $5 \times 10^4$  trofozoítos/mL y  $6 \times 10^3$  trofozoítos/mL de *G. lamblia* y *E. histolytica* respectivamente por 48 horas a 37°C, en tubos con concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500 ng/mL de los diferentes 1*H*-bencimidazoles, además del albendazol, nitazoxanida y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia. Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos. En el caso de *G. lamblia*, se tomaron 50 µL de los trofozoítos tratados y se cultivaron en medio fresco, ya sin los compuestos, y se incubaron por otras 48 horas. 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  $CI_{50}$ , que correspondió a la concentración que inhibió al 50 % el crecimiento de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron por triplicado y se repitieron dos ocasiones.

# 3. RESULTADOS Y DISCUSION

## 3.1 Parte química

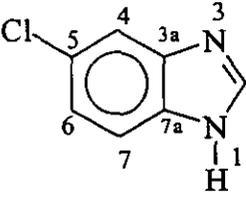
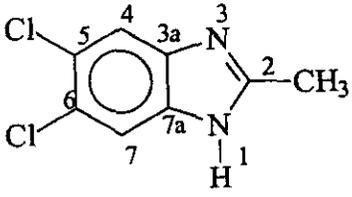
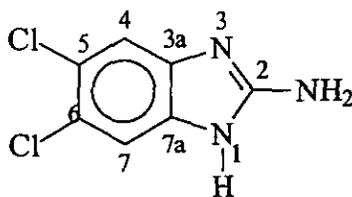
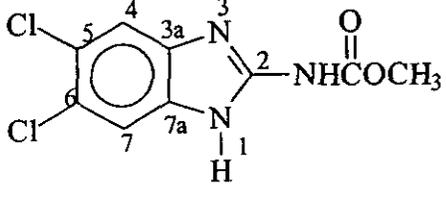
Los datos de constantes físicas, los análisis espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos preparados se muestran en la **Tabla 4** y **5** respectivamente.

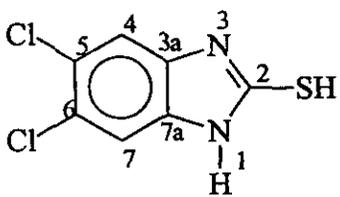
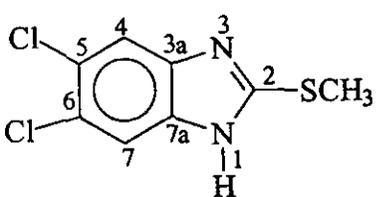
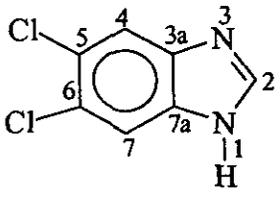
**Tabla 4.** Constantes físicas de los compuestos sintetizados.

Comp. No.	Disolvente (% de rendimiento)	PM	Características	R <sub>f</sub> (sistema)	pf (°C)	Ref.
12	H <sub>2</sub> O (82)	152.5	Polvo blanco	0.67 (III)	228-229	34
13	EtOH/ H <sub>2</sub> O (76)	201.05	Cristales blancos	0.43 (IV)	249-252	35
14	EtOH (86)	202.04	Cristales blancos	0.37 (II)	260-262	36
15	AcOH (80)	260.07	Cristales beige	0.61 (III)	310-314	37
16	EtOH/ H <sub>2</sub> O (75)	219.08	Cristales blancos	0.57 (II)	325-326	38
17	AcEt (89)	233.11	Cristales blancos	0.61 (II)	230-232	39
18	MeOH (76)	187.01	Cristales blancos	0.33 (III)	208-209	34
20	NR (98)	142.58	Sólido café claro	0.25 (III)	68-69	40
22	NR (96)	204.05	Sólido café	0.15 (IV)	122-123	41
23	MeOH/H <sub>2</sub> O (65)	249.06	Polvo amarillo	0.65 (IV)	123-124	42
24	AcOH/ H <sub>2</sub> O (95)	207.01	Polvo naranja	0.71 (II)	176-177	43
25	NR (100)	177.03	Agujas blancas	0.32 (II)	158-161	40
26	NR (60)	105.93	Sólido blanco	-----	-----	28

NR: no recristalizado.

**Tabla 5.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos preparados.

COMPUESTO	SEÑALES
<p>5(6)-Cloro-1H-bencimidazol (12)</p> 	<p><b>Espectro 1, IR (KBr):</b> 3418 m; 3029 w; 1624 m; 906 m; 844 m y 704 w.  <b>Espectro 2, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 12.7 (sa, 1H); 8.2 (s, 1H); 7.6 (d, J = 1.8, 1H); 7.5 (d, J = 8.7, 1H); 7.1 (dd, J = 8.7, J = 1.8, 1H).  <b>Espectro 3, EM (IE) M<sup>+</sup> 152 (100%).</b></p>
<p>5,6-Dicloro-2-metil-1H-bencimidazol (13)</p> 	<p><b>Espectro 4, IR (KBr):</b> 3389 w; 3081 w; 2953 w; 1644 m; 864 m.  <b>Espectro 5, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 12 (sa, 1H); 7.5 (d, 2H); 2.5 (s, 3H).  <b>Espectro 6, EM (IE) M<sup>+</sup> 200 (100%).</b></p>
<p>2-Amino-5,6-dicloro-1H-bencimidazol (14)</p> 	<p><b>Espectro 7, IR (KBr):</b> 3350 m; 3065.10 m; 1686 s; 850 m.  <b>Espectro 8, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 10.9 (sa, 1H); 7.2 (s, 2H); 6.5 (sa, 2H).  <b>Espectro 9, EM (IE) M<sup>+</sup> 201 (100%)</b></p>
<p>(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (15)</p> 	<p><b>Espectro 10, IR (KBr):</b> 3425 m; 3028 s; 2908 s; 2843 s; 1688 m; 1445 s; 1388 s; 1630 w; 863 s.  <b>Espectro 11, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 11.8 (sa, 2H); 7.5 (s, 2H); 3.7 (s, 3H).  <b>Espectro 12, EM (CG, IE) M<sup>+</sup> 259 (70%).</b></p>

COMPUESTO	SEÑALES
<p>5,6-Dicloro-2-mercapto-1<i>H</i>-bencimidazol (16)</p> 	<p><b>Espectro 13, IR (KBr):</b> 3427 w; 3084 s; 2649 w; 1606 m; 1314 s; 745 m; 851 m.  <b>Espectro 14, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> 12.7 (sa, 2H); 7.3 (d, <i>J</i> = 0.6, 2H).  <b>Espectro 15, EM (IE) M<sup>+</sup></b> 218 (100 %).</p>
<p>5,6-Dicloro-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol (17)</p> 	<p><b>Espectro 16, IR (KBr):</b> 3380 w; 3089 m; 2837 m; 846 m.  <b>Espectro 17, RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> 12.8 (sa, N-H); 7.6 (s, 2H); 2.6 (s, 3H).  <b>Espectro 18, EM (IE) M<sup>+</sup></b> 232 (90 %).</p>
<p>5,6-Dicloro-1<i>H</i>-bencimidazol (18)</p> 	<p><b>Espectro 19, IR (KBr):</b> 3412 w; 3126 m; 1622 w; 861 m.  <b>Espectro 20, RMN <sup>1</sup>H (TMS, CDCl<sub>3</sub> y DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> 11.9 (sa, 1H); 8.0 (s, 1H); 7.7 (s, 2H).  <b>Espectro 21, EM (CG, IE) M<sup>+</sup></b> 186 (100%).</p>

La síntesis del compuesto 12 se obtuvo con buen rendimiento (82 %). Mediante los siguientes datos se comprobó la estructura del compuesto: el espectro (No 1) de IR (KBr) muestra la banda característica para enlace N-H a 3418 cm<sup>-1</sup>; para el enlace C-H aromático se observa una banda de intensidad fuerte a 3029 cm<sup>-1</sup>; para el doble enlace entre carbono y nitrógeno se observa una banda de intensidad media a 1624 cm<sup>-1</sup> y las bandas a 906 cm<sup>-1</sup>, 844 cm<sup>-1</sup> y 704 cm<sup>-1</sup> indican una trisustitución asimétrica en el anillo de benceno. En el espectro (No 2) de RMN <sup>1</sup>H, se observa a 12.7 ppm un singulente amplio que integra para un hidrógeno el cual desaparece al intercambiar con D<sub>2</sub>O,

correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno en posición 1; se observa un singulete a 8.2 ppm que integra para un hidrógeno de la posición 2; en 7.6 ppm hay un doblete con una  $J = 1.8$  Hz el cual integra para un hidrógeno de la posición 4; a 7.5 ppm hay un doblete con una  $J = 8.7$  Hz el cual integra para un hidrógeno correspondiente a la posición 7; un doble de dobles a 7.1 ppm con  $J = 8.7$  Hz y  $J = 1.8$  Hz integra para un hidrógeno que corresponde a la posición 6;. El espectro (No 3) de EM muestra un ion molecular con  $m/z$  152 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100 %); se observa la señal de  $[M^{\ddagger}+2]$  con una abundancia relativa del 35 %, indicativo de la presencia de un cloro lo cual se puede comprobar por el pico  $[M^{\ddagger}-35]$  con una abundancia del 10 %.

La síntesis del compuesto 13 se obtuvo con aceptable rendimiento (76 %). Mediante los siguientes datos se comprobó la estructura del compuesto: el espectro (No 4) de IR (KBr) muestra la banda de intensidad media característica para enlace N-H a  $3389\text{ cm}^{-1}$ ; para el enlace C-H aromático se observa una banda de intensidad débil a  $3081\text{ cm}^{-1}$ ; la señal para el C-H alifático del grupo metilo se observa a  $2953\text{ cm}^{-1}$ ; para el doble enlace entre carbono y nitrógeno se observa una banda de intensidad fuerte a  $1644\text{ cm}^{-1}$  y la banda a  $864\text{ cm}^{-1}$  indicadora de una tetrasustitución 1,2,4,5 en el anillo de benceno. El espectro (No 5) de RMN  $^1\text{H}$ , se observa a 12 ppm un singulete amplio que integra para un hidrógeno el cual desaparece al intercambiar con  $\text{D}_2\text{O}$ , correspondiente al hidrógeno unido a nitrógeno en posición 1; en 7.5 ppm hay un doblete que integra para 2 hidrógenos correspondientes a los hidrógenos de la posiciones 4 y 7 los cuales están acoplados en el espacio con el hidrógeno de la posición 1, esto se comprueba al hacer intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$  el doblete se convierte en un singulete; a 2.5 ppm hay un singulete que

integra para 3 hidrógenos pertenecientes al grupo metilo. El espectro (No 6) de EM muestra un ion molecular con  $m/z$  200 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100 %); se observan las señales de  $[M^{\dagger}+2]$  y  $[M^{\dagger}+4]$  con abundancias relativas del 64 % y 10 % respectivamente, indicativo de la presencia de dos cloros; la señal  $m/z$  165 con un  $[M+2]$  del 32 % indica la pérdida de un cloro  $[M^{\dagger}-35]$ .

La síntesis del compuesto 14 se obtuvo con aceptable rendimiento, la formación del clorhidrato del producto crudo resultó ser un método adecuado para la purificación. El espectro (No 7) de IR (KBr) muestra la banda de intensidad media característica para enlace N-H a  $3350\text{ cm}^{-1}$ ; para el enlace C-H aromático se observa una banda de intensidad media a  $3065\text{ cm}^{-1}$ ; la banda de intensidad fuerte a  $1686\text{ cm}^{-1}$  para el doble enlace carbono nitrógeno y la banda de intensidad media a  $850\text{ cm}^{-1}$  indicadora de una tetrasustitución 1,2,4,5 en el anillo de benceno. El espectro (No 8) de RMN  $^1\text{H}$ , se observa un singlete amplio a 10.9 ppm el cual desaparece al intercambiar con  $\text{D}_2\text{O}$ , corresponde al hidrógeno de la posición 1; a 7.2 ppm hay un singlete que integra para 2 hidrógenos correspondientes a las posiciones 4 y 7; el singlete amplio a 6.5 ppm desaparece al intercambiar con  $\text{D}_2\text{O}$ , corresponde a los hidrógenos del grupo  $-\text{NH}_2$ . El espectro (No 9) de EM muestra un ion molecular con  $m/z$  201 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100 %); se observan las señales de  $[M^{\dagger}+2]$  y  $[M^{\dagger}+4]$  con abundancias relativas del 63 % y 11 % respectivamente, indicativo de la presencia de dos cloros; a  $m/z$  166 con un  $[M+2]$  del 31 % indica la pérdida de un cloro  $[M^{\dagger}-35]$ .

La síntesis del compuesto **15** se obtuvo con buen rendimiento (80 %), el cuidado que se debe tener en la preparación de este compuesto es el control del pH y la temperatura, además se deben utilizar trampas consecutivas con hipoclorito de sodio para evitar el desprendimiento de metanotiol a la atmósfera. El espectro (No 10) de IR (KBr) muestra a  $3425\text{ cm}^{-1}$  la banda de intensidad media característica del enlace N-H; para C-H de tipo aromático se observa la señal a  $3028\text{ cm}^{-1}$ ; las señales para el enlace C-H correspondiente al metilo se observan a  $2908\text{ cm}^{-1}$  y  $2843\text{ cm}^{-1}$ ; en  $1688\text{ cm}^{-1}$  hay una banda mediana correspondiente al grupo carbonilo; en  $1445\text{ cm}^{-1}$  hay una banda de intensidad fuerte para la unión N-CO; a  $1388\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda fuerte de enlace C-O y la banda fuerte a  $863\text{ cm}^{-1}$  indica una tetrasustitución 1,2,4,5 en el anillo de benceno. El espectro (No. 11) de RMN  $^1\text{H}$ , se observa un singlete amplio a 11.8 ppm el cual desaparece con  $\text{D}_2\text{O}$  correspondiente a los hidrógenos unidos a nitrógeno; en 7.5 ppm hay un singlete correspondiente a la señal de los hidrógenos en posición 4 y 7; en 3.7 ppm hay un singlete que integra para tres hidrógenos correspondientes al grupo metilo. El espectro (No 12) de EM muestra un ion molecular a una  $m/z$  259 con una abundancia del 70 %; se observa las señales de  $[\text{M}^{\dagger}+2]$  y  $[\text{M}^{\dagger}+4]$  con abundancias relativas del 63 % y 11 % respectivamente, el pico base del espectro se observa a una  $m/z$  de 225  $[\text{M}^{\dagger}-32]$  correspondiente a la pérdida de metanol.

El compuesto **16** se obtiene con un aceptable rendimiento (75 %), en este compuesto se debe tener cuidado de recristalizado en atmósfera inerte para evitar su descomposición. El espectro (No. 13) de IR (KBr) a  $3427\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda débil característica del enlace N-H; la señal para C-H de tipo aromático se observa a  $3084\text{ cm}^{-1}$ ; una banda débil de  $2522\text{ cm}^{-1}$  es correspondiente al enlace S-H y también se observa la banda fuerte de  $1314$

cm<sup>-1</sup> que corresponde al tautómero C=S; la banda de intensidad media a 745 cm<sup>-1</sup> para el enlace C-S y una señal a 851 cm<sup>-1</sup> indicativo de la tetrasustitución en el anillo de benceno 1,2,4,5. El espectro (No. 14) de RMN <sup>1</sup>H se observa un singulete amplio a 12.7 que integra para dos hidrógenos, dicha señal desaparece al intercambiar con D<sub>2</sub>O, correspondiendo a los hidrógenos unido a nitrógenos en posición 1 y 3, lo que indica que el compuesto se encuentra en forma de tiona; a 7.3 ppm se observa un doblete con una  $J = 0.8$  Hz que integra para 2 hidrógenos que se encuentran en posiciones 4 y 7. El espectro (No 15) de EM muestra un ion molecular con  $m/z$  218 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100 %); se observa la señal de [M<sup>+</sup>+2] y [M<sup>+</sup>+4] con abundancias relativas del 65 % y 11 % respectivamente, indicativo de la presencia de dos cloros; a una relación  $m/z$  183 con un [M+2] del 36 % indica la pérdida de un cloro [M<sup>+</sup>-35].

El compuesto 17 se obtuvo de forma cuantitativa, en este caso se debe tener especial cuidado con la temperatura y al agregar la cantidad justa de un equivalente de yoduro de metilo a la mezcla de reacción, para evitar la polialquilación. El espectro (No. 16) de IR (KBr) se observa la banda de intensidad débil característica para el enlace N-H a 3380 cm<sup>-1</sup>; en 3089-3026 cm<sup>-1</sup> se observa la banda de intensidad media para el enlace C-H de tipo aromático; la banda correspondiente al enlace C-H del grupo metilo se observa a 2837 cm<sup>-1</sup>; y la señal de 846 cm<sup>-1</sup> indica la tetrasustitución del anillo de benceno de tipo 1,2,4,5. El espectro (No. 17) de RMN <sup>1</sup>H, muestra a 12.8 ppm un singulete amplio correspondiente al hidrógeno de la posición 1 el cual desaparece al intercambiar con D<sub>2</sub>O; en 7.6 ppm se observa singulete que integra para dos hidrógenos correspondientes a las posiciones 4 y 7; en 2.6 ppm hay un singulete que integra para tres hidrógenos del grupo metilo. El

espectro (No. 18) de EM (IE) muestra un ion molecular a una  $m/z$  232 con una abundancia relativa del 90 % que concuerda con la masa molecular esperada; se observa la señal de  $[M^{\dagger}+2]$  y  $[M^{\dagger}+4]$  con abundancias relativas del 67 % y 12 % respectivamente, indicativo de la presencia de dos cloros; a una relación  $m/z$  199  $[M^{\dagger}-33]$  se observa el pico base del espectro.

El compuesto 18 se obtuvo con rendimiento adecuado (76 %). El espectro (No. 19) de IR (KBr) muestra una banda débil característica para la señal N-H a  $3412\text{ cm}^{-1}$ , la señal para C-H de tipo aromático se observa a  $3126\text{ cm}^{-1}$  y la banda mediana a  $861\text{ cm}^{-1}$  indicativo de la tetrasustitución 1,2,4,5 en el anillo de benceno. El espectro (No. 20) de RMN  $^1\text{H}$  corrido a 300 MHz, se observa un singulete a 11.9 ppm integra para un hidrógeno de la posición 2 el cual desaparece al intercambiar con  $\text{D}_2\text{O}$ ; en 8 ppm hay un singulete que integra para un hidrógeno correspondiente a la posición 2: a 7.7 ppm se observa un singulete que integra para 2 hidrógenos de las posiciones 4 y 7;. El espectro (No 21) de EM (IE) muestra un ion molecular con una relación  $m/z$  186 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100 %); se observa la señal de  $[M^{\dagger}+2]$  y  $[M^{\dagger}+4]$  con abundancias relativas del 64 % y 10 % respectivamente, indicativo de la presencia de dos cloros; a una relación  $m/z$  151 con un  $[M+2]$  del 36 % indica la pérdida de un cloro  $[M^{\dagger}-35]$ .

Las reacciones para la obtención de las 1,2-fenilendiaminas procedieron con buenos rendimientos, solamente en el caso de la reacción de nitración de la 3,4-dicloroacetanilida (22) el rendimiento disminuye a causa del isómero que se forma aunque en menor proporción.

## 3.2 Parte biológica

### 3.2.1 Efecto de los 1H-Bencimidazoles sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Los resultados de la prueba *in vitro* de actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados, y del albendazol como control positivo se muestran en la **Gráfica 2** y en la **Tabla 6**. Todos los compuestos se probaron a concentraciones equivalentes en moles a  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL de albendazol. Debido a que el porcentaje de reducción de la viabilidad de *Trichinella spiralis* causada por los compuestos sintetizados y del albendazol resultaron ser menores al 50%, no fue posible obtener de forma confiable la  $CI_{50}$ . En su lugar se empleó la prueba de 4 puntos (**Tabla 7**), en donde se comparan la actividad a concentraciones de  $3.77 \times 10^{-6}$  M y  $3.77 \times 10^{-8}$  M del compuesto sintetizado con el albendazol. Todos los compuestos sintetizados muestran menor actividad que el albendazol. Se encontró que el compuesto **12** tiene una actividad relativa 100 veces menor respecto al albendazol y el resto son menos activos. El compuesto monoclorado **12** tiene mejor actividad que su análogo diclorado **18**. Entre la serie de compuestos diclorados el derivado con grupo mercapto (**16**) fue el más activo.

Gráfica 2. Actividad de los compuestos 12-18 a diferentes concentraciones contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

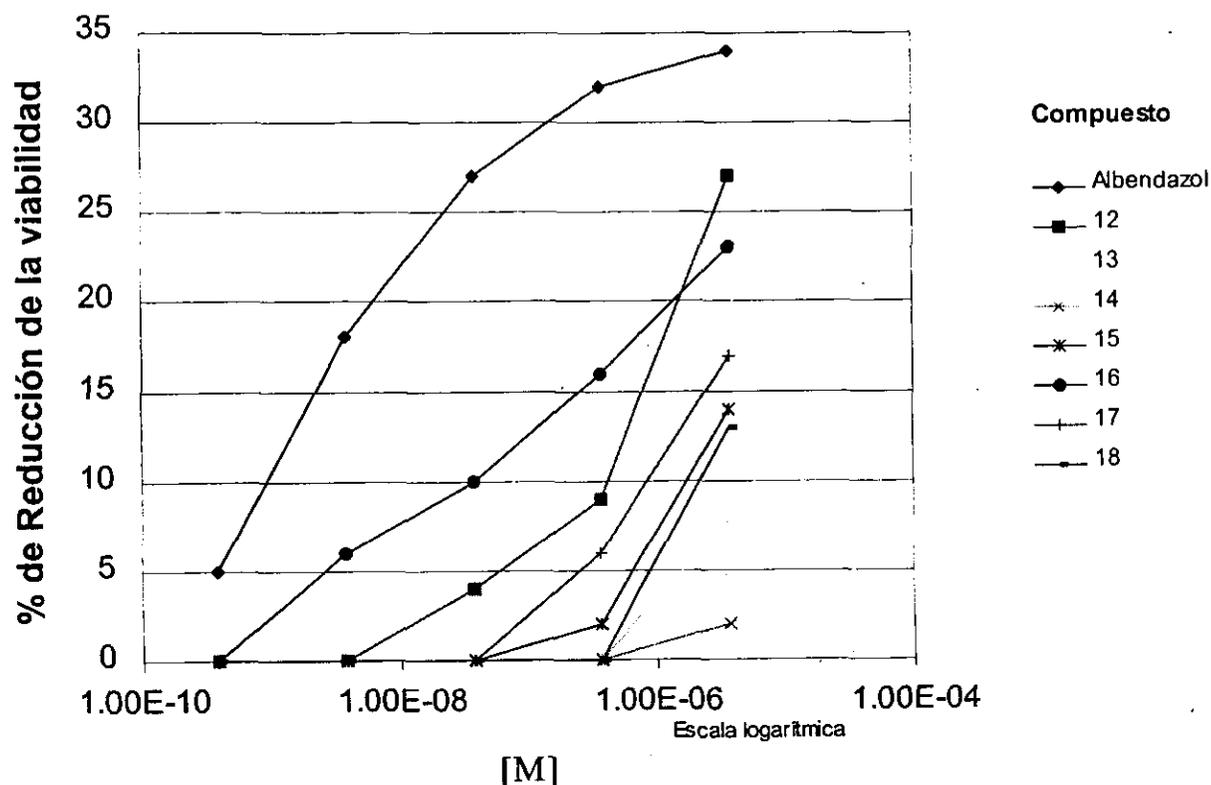


Tabla 6. Porcentaje de reducción de la viabilidad *in vitro*, causada por los 1H-Benzimidazoles contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

[M]	Compuestos							
	12	13	14	15	16	17	18	ABZ
3.77E-06	27	8	2	14	23	17	13	34
3.77E-07	9	NR	NR	2	16	6	NR	32
3.77E-08	4	NR	NR	NR	10	NR	NR	27
3.77E-09	NR	NR	NR	NR	6	NR	NR	18
3.77E-10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	5

NR: no redujo. ABZ: albendazol.

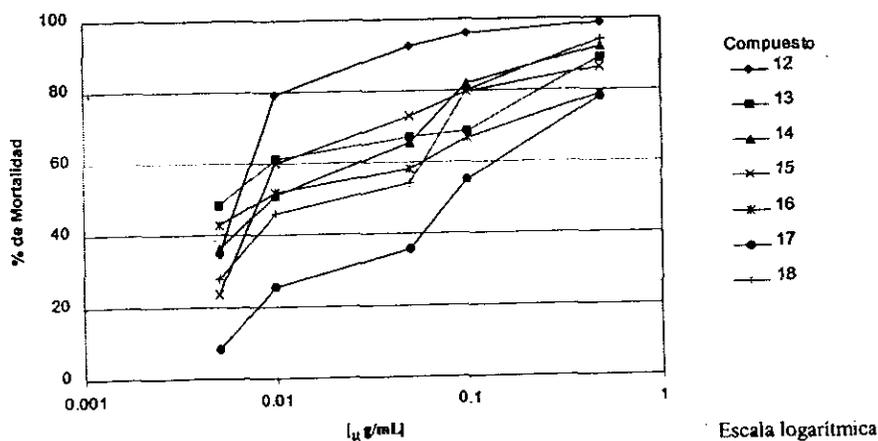
Tbla 7. Ensayo de 4 puntos comparando la actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados con la del albendazol a concentraciones de  $3.77 \times 10^{-6}$  y  $3.77 \times 10^{-8}$  [M].

Compuesto	Actividad relativa
albendazol	1
12	$1 \times 10^{-2}$
13	$8.57 \times 10^{-8}$
14	$7.74 \times 10^{-14}$
15	$3.34 \times 10^{-5}$
16	$1.58 \times 10^{-3}$
17	$2.15 \times 10^{-4}$
18	$1.58 \times 10^{-5}$

### 3.2.2 Efecto de los 1H-Bencimidazoles sobre *Entamoeba histolytica*.

La Gráfica 3 y la Tabla 8 muestran Los resultados de la prueba antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* de los compuestos sintetizados además del albendazol, nitazoxanida y metronidazol como controles positivos. El análisis de varianza que se muestra en la Tabla 9, indica que existe diferencia significativa entre la actividad biológica presentada por cada uno de los compuestos evaluados, por lo tanto, los sustituyentes de las diferentes posiciones del bencimidazol modifican la actividad biológica de los compuestos 12-18 contra *E. histolytica*. Mediante un análisis PROBIT se determino la  $CI_{50}$ , como se muestra en la Tabla 10. Al comparar la  $CI_{50}$  para cada caso se observa que todos los compuestos 12-18 son mucho más activos que el albendanzol, con la excepción el compuesto 6 que tiene una actividad semejante al metronidazol, los demás compuestos resultaron ser más activos que el metronidazol; los compuestos 12 ,13 y 15 fueron más activos que la nitazoxanida, siendo el compuesto 13 el de mayor actividad (Gráfica 4).

**Gráfica 3.** Actividad de los compuestos 12-18 a diferentes concentraciones contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.



**Tabla 8.** Porcentaje de mortalidad de los trofozoítos de *E. histolytica* ocasionada por los compuestos evaluados a diferentes concentraciones.

[µg/mL]	Compuestos						
	12	13	14	15	16	17	18
0.005	34.4	48.1	36	23.6	42.6	8.1	28
0.01	79.2	61.2	51	59.9	51.6	25.3	46
0.05	92.6	66.9	65.3	73	57.9	35.7	54
0.1	96	68.8	82	79.5	66.5	54.8	80
0.5	98.8	88.9	92.2	86.4	78.9	78.1	94

**Tabla 9.** ANDEVA para el diseño de bloques completos aleatorizados de los datos de actividad contra *E. histolytica* que se muestran en la **Tabla 8**.

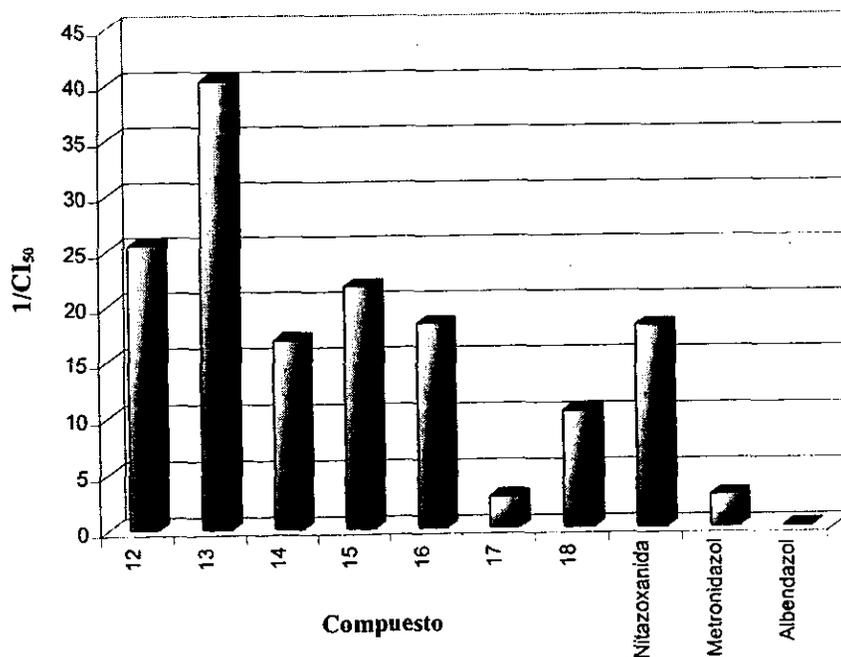
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón de variancias
Tratamientos	4225.806	6	704.301	9.947
Bloques	1313067.611	4	3266.903	
Residuo	1699.345	24	70.806	
Total	18992.762	34		

$F_{\text{tablas}}$  con  $\alpha = 0.05$  es: 2.51 lo que es menor de 9.947; por lo tanto se rechaza la hipótesis de que los datos tengan las mismas medias.

Tabla 10. Concentraciones inhibitorias de los 1*H*-Bencimidazoles contra *Entamoeba histolytica*.

Compuesto	CI <sub>50</sub>	
	[ $\mu$ g/ml]	[ $\mu$ M]
12	0.006	0.039
13	0.005	0.025
14	0.012	0.059
15	0.012	0.046
16	0.012	0.055
17	0.083	0.356
18	0.018	0.096
Nitazoxanida	0.017	0.055
Metronidazol	0.060	0.351
Albendazol	14.999	56.60

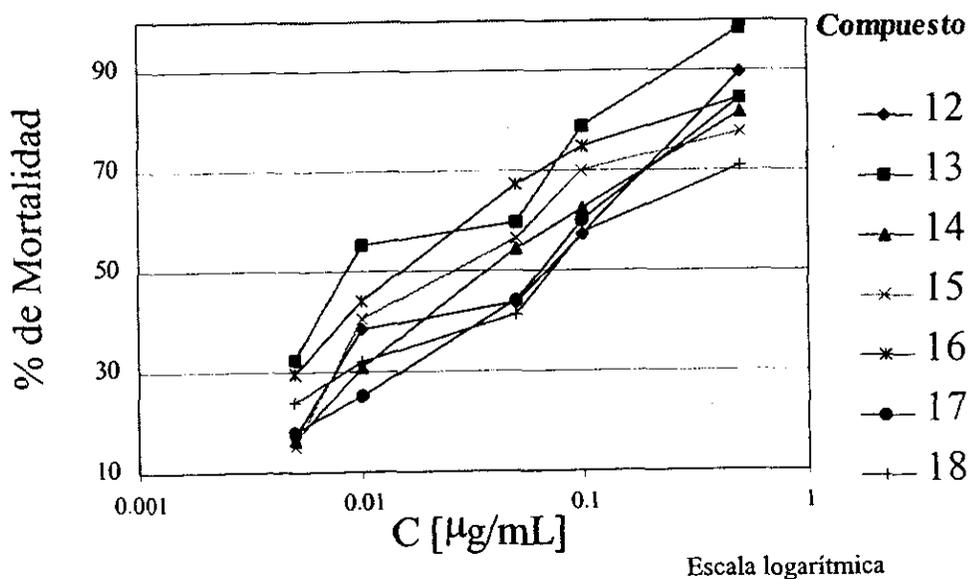
Gráfica 4. Actividad de los compuestos preparados contra *Entamoeba histolytica*



### 3.2.3 Efecto de los 1H-Bencimidazoles sobre *Giardia lamblia*.

En la Gráfica 5 y en la Tabla 11 se muestran los resultados de la prueba antiprotozoaria *in vitro* contra *Giardia lamblia* tanto de los compuestos sintetizados como de los controles positivos: albendazol, nitazoxanida y metronidazol. El análisis de varianza que se muestra en la Tabla 12 indica que existe diferencia significativa entre la actividad biológica presentada por cada uno de los compuestos evaluados indicando que, los sustituyentes de las diferentes posiciones del bencimidazol modifican la actividad biológica de los compuestos 12-18 contra *G. lamblia*. Mediante un análisis PROBIT se determino la  $CI_{50}$ , como se muestra en la Tabla 13. Al comparar la  $CI_{50}$  para cada caso se observa que todos los compuestos 12-18 son mucho más activos que el metronidazol; sin embargo sólo los compuestos 13 y 16 presentaron actividad semejante en magnitud a la nitazoxanida y al albendazol (Gráfica 6).

**Gráfica 5.** Actividad de los compuestos 12-18 contra trofozoítos de *Giardia lamblia* probados a diferentes concentraciones.



**Tabla 11.** Porcentaje de mortalidad de trofozoítos de *Giardia lamblia* ocasionada por los compuestos 12-18 evaluados a diferentes concentraciones.

[µg/mL]	Compuestos						
	12	13	14	15	16	17	18
0.005	17.3	32.3	16.4	15.3	29.8	18	24.1
0.01	38.6	55.4	30.8	40.4	43.9	25.3	31.9
0.05	43.5	59.8	54.3	56.4	67.4	44.2	41.4
0.1	57.3	78.8	62.5	70.1	74.9	60	57.8
0.5	89.7	98.4	81.7	77.5	84.4	84.4	71

**Tabla 12.** ANDEVA para el diseño de bloques completos aleatorizados de los datos de actividad contra *G. lamblia* que se muestran en la **Tabla 11**.

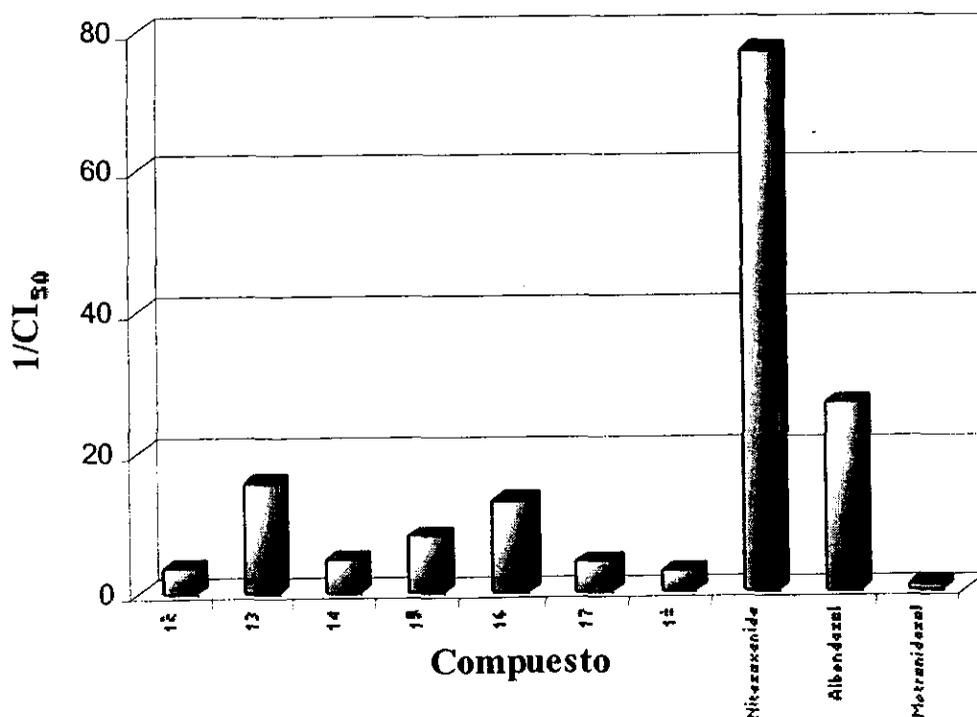
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón de variancias
Tratamientos	1621	6	270.257	8.855
Bloques	16172.329	4	4043.082	
Residuo	732.463	24	30.519	
Total	18526.332	34		

$F_{\text{tablas}}$  con  $\alpha = 0.05$  es: 2.51 lo que es menor de 8.855; por lo tanto se rechaza la hipótesis de que los datos tengan las mismas medias.

Tabla 13. Diferentes concentraciones inhibitorias de los 1H-bencimidazoles contra *Giardia lamblia*.

Compuesto	CI <sub>50</sub>	
	[µg/mL]	[µM]
12	0.043	0.282
13	0.013	0.065
14	0.044	0.218
15	0.033	0.127
16	0.017	0.078
17	0.053	0.227
18	0.067	0.358
Nitazoxanida	0.004	0.013
Albendazol	0.010	0.038
Metronidazol	0.210	1.228

Gráfica 6. Actividad de los compuestos sintetizados contra *Giardia lamblia*.



### 3.2.4 Actividad biológica de la serie completa de los 1*H*-bencimidazoles contra protozoarios.

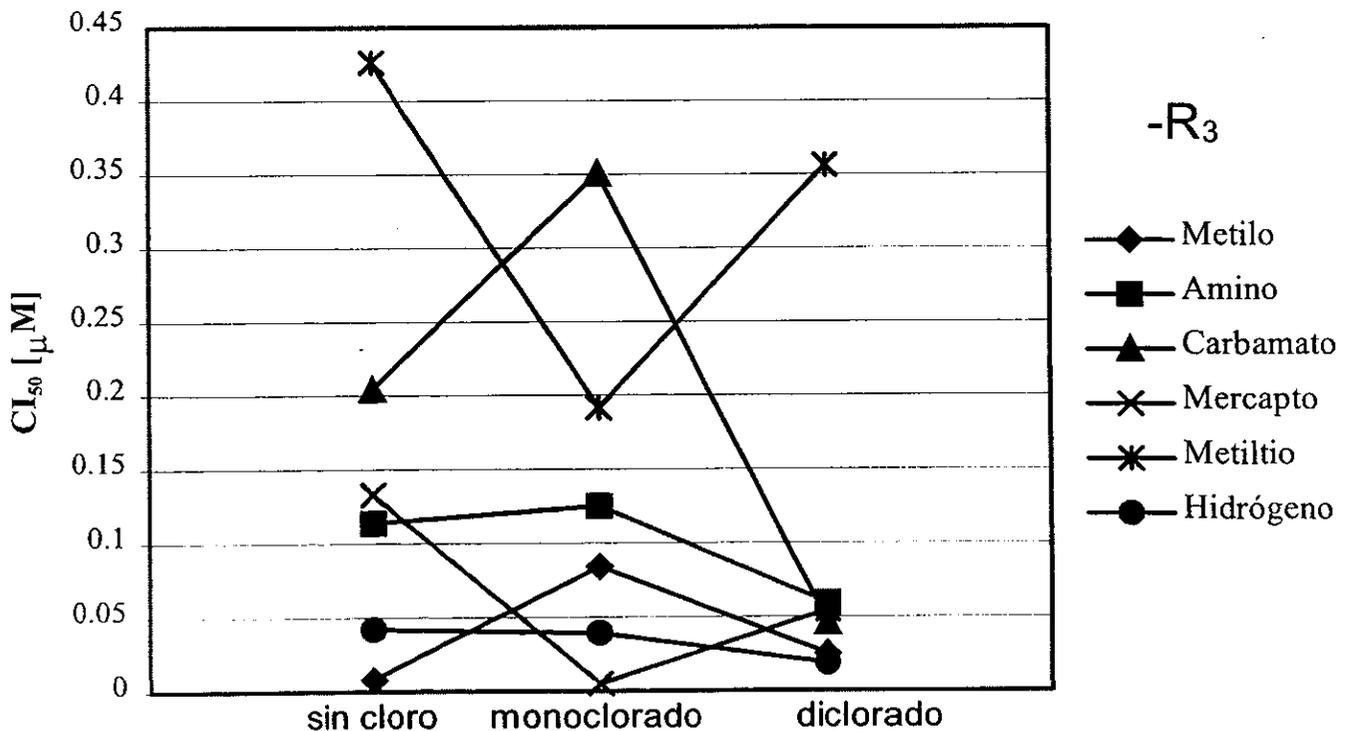
En la **Gráfica 7** se muestra la actividad contra *E. histolytica* de la serie completa de 1*H*-bencimidazoles, cuyas estructuras se muestran en la **Tabla 2** y **3**. Se observa que la actividad para los compuestos con grupos carbamato, amino y metilo disminuye al pasar de derivados sin cloro a monoclorados en posición 5 del núcleo bencimidazólico, mientras que al pasar de derivados monoclorados a diclorados la actividad aumenta para estos mismos compuestos. Los derivados con sustituyentes mercapto y metiltio aumentan su actividad al pasar de compuestos sin cloro a monoclorados; y dicha actividad se decrementa al pasar de monoclorados a diclorados. La actividad de los compuestos con hidrógeno en la posición 2 aumenta de forma discreta en el siguiente orden: desclorado < monoclorado < diclorado, lo que indica que los compuestos al estar sustituidos en posición 2 causan una mayor variación en la actividad. Los cambios más drásticos en la actividad se observan en los compuestos monoclorados con grupo carbamato y metiltio.

En general se puede observar que los compuestos con el mismo sustituyente en la posición 2 tienen una actividad semejante. De esta manera, podemos decir que el orden de los sustituyentes incrementan la actividad biológica en el siguiente orden: -SCH<sub>3</sub>, -NHCOOCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SH, -H y CH<sub>3</sub>.

Entre los compuestos con azufre (**4, 5, 10, 11, 16 y 17**) se observa una mejor actividad cuando hay cloro en la posición 5, y en todos los casos resultan más activos cuando hay un sustituyente mercapto que un metiltio. Esta misma relación se observa en la serie de compuestos 1-metilados (**Tabla 1**).

Comparando la serie de 1*H*-bencimidazoles (1-18) con sus análogos 1-metilbencimidazoles (I-XVI), se observa de forma general que los 1*H*-bencimidazoles monoclorados (7-12) son más activos contra *E. histolytica* que sus análogos 1-metilados con cloro en 6 (IX-XII) pero son menos activos que los análogos 1-metilados con cloro en 5 (V-VIII). Especial mente en esta comparación se puede evaluar el efecto tautomérico de los compuestos y se observa que la posibilidad de tener a un compuesto con 2 estructuras disminuye su actividad con respecto a los compuestos con estructuras bien definidas.

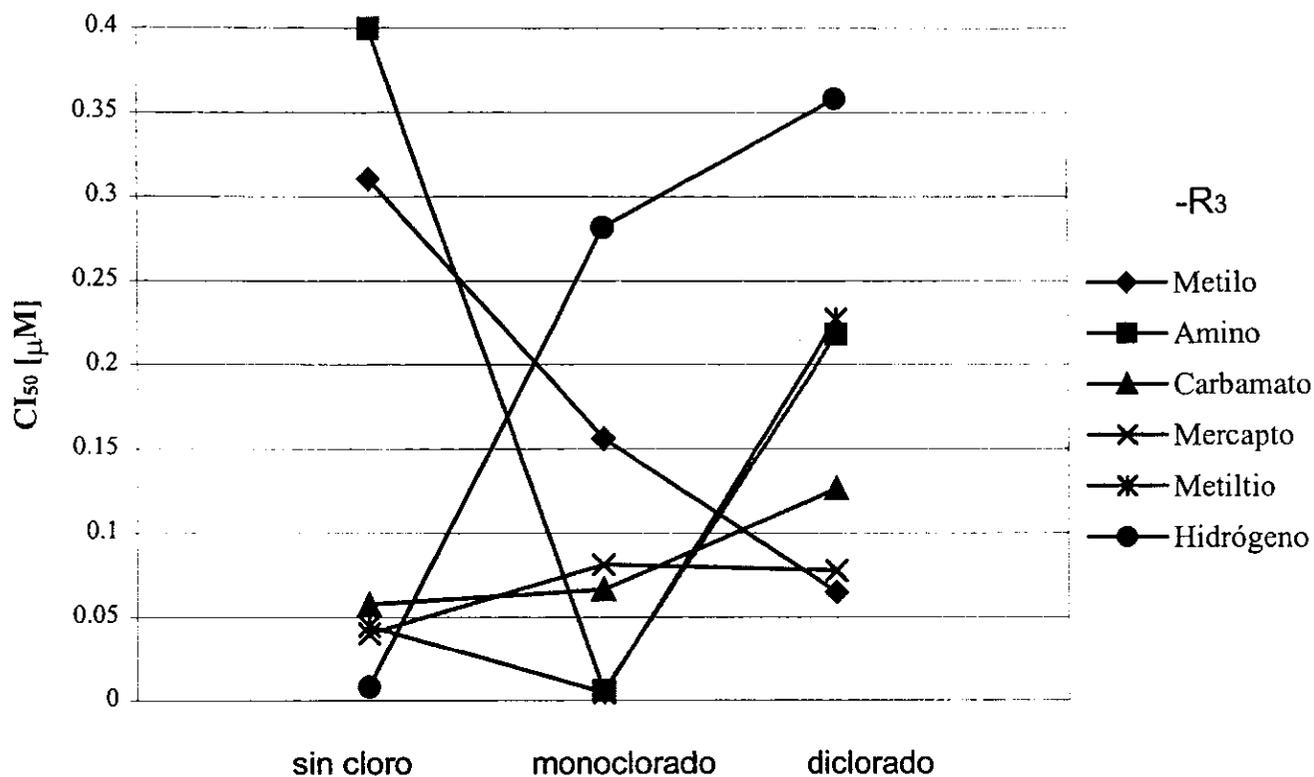
**Gráfica 7.** Comparación de la  $CI_{50}$  para cada compuesto de la serie completa de 1*H*-Bencimidazoles contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.



En la **Gráfica 8** se muestra la actividad contra *G. lamblia* de la serie completa de 1*H*-bencimidazoles, cuyas estructuras están en la **Tabla 2 y 3**. En primera instancia la gráfica muestra un comportamiento complejo en la actividad biológica. El cambio más pronunciado en la actividad se observa cuando se conserva el grupo amino en la posición 2 del bencimidazol, y pasa de un compuesto sin cloro a un compuesto monoclorado la actividad aumenta 253 veces, lo que indica la importancia del cloro en dicha posición. En el caso de haber un grupo metilo en posición 2, el orden de la actividad de los derivados incrementa de la siguiente manera: sin cloro < monoclorado < diclorado. El efecto inverso a los derivados metilados en posición 2 se observa cuando hay grupos carbamato de metilo o hidrógeno en dicha posición. Al parecer, el número de cloros presentes en la molécula no afecta de manera drástica la actividad cuando se tiene un grupo mercapto o carbamato de metilo en posición 2 (**3, 4, 9, 10, 15 y 16**).

Comparando la actividad giardicida de la serie 1*H*-bencimidazol (**Tabla 2 y 3**) con la serie de 1-metilbencimidazoles (**Tabla 1**), en la mayoría de los casos se aprecia una mayor actividad de los 1-metil-bencimidazoles, lo que indica que un grupo metilo en posición 1 del núcleo bencimidazólico incrementa la actividad, pero a diferencia de la actividad amebicida, no se aprecia en forma clara el efecto tautomérico de los 1*H*-bencimidazoles. En ambas series se observa que compuestos con grupo amino en posición 2 mejoran considerablemente la actividad biológica al estar mono clorados (**VI, X y 8**).

**Gráfica 8.** Comparación de la  $CI_{50}$  para cada compuesto de la serie completa de 1H-Bencimidazoles contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.



# CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis, purificación e identificación de todos los compuestos diseñados en este trabajo.
- Los 1*H*-bencimidazoles sintetizados mostraron tener actividad como agentes antiprotozoarios y antihelmínticos.
- La actividad antihelmíntica de todos los compuestos sintetizados es menor a la del albendazol.
- Los 1*H*-bencimidazoles presentaron una buena actividad como antiprotozoarios. Se observaron claras diferencias en actividad biológica de los compuestos evaluados, dependiendo del tipo de protozooario empleado, *Giardia lamblia* o *Entamoeba histolytica*.
- Los compuestos **12-18** mostraron una muy buena actividad *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*, superior en la mayoría de los casos a la actividad de los fármacos de uso rutinario. De los compuestos sintetizados en este trabajo el 5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol (**12**) fue el más activo contra la amiba. De toda la serie de 1*H*-bencimidazoles, el 2-metil-1*H*-bencimidazol (**1**) resultó ser el amebicida más activo.
- El efecto tautomérico presente en los 1*H*-bencimidazoles disminuye la actividad contra *E. histolytica* en comparación con sus análogos 1-metilados.

- Los compuestos sintetizados mostraron en general una buena actividad *in vitro* contra *Giardia lamblia*. En el caso de los compuestos sintetizados en este trabajo, el 5,6-dicloro-2-metilo-1*H*-bencimidazol (13) y del 5,6-dicloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol (16) presentaron una actividad semejante a la del albendazol y nitazoxanida. El 5(6)-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol (10) resultó ser el compuesto más activo de toda la serie de 1*H*-bencimidazoles contra el trofozoíto de *Giardia lamblia*.
- Los compuestos derivados del 1*H*-bencimidazol resultaron ser menos activos *in vitro* contra *G. lamblia* que sus análogos 1-metilbencimidazoles. No hay evidencias que el efecto tautomérico modifique la actividad giardicida.
- Es compleja la relación del tipo de sustituyente en la posición 2, así como el efecto de los cloros en posición 5 y/ó 6 en el anillo de bencimidazol con respecto a la actividad contra *G. lamblia*.
- Con la información obtenida en este trabajo será posible contribuir en estudios cuantitativos de estructura-actividad biológica de derivados bencimidazólicos.

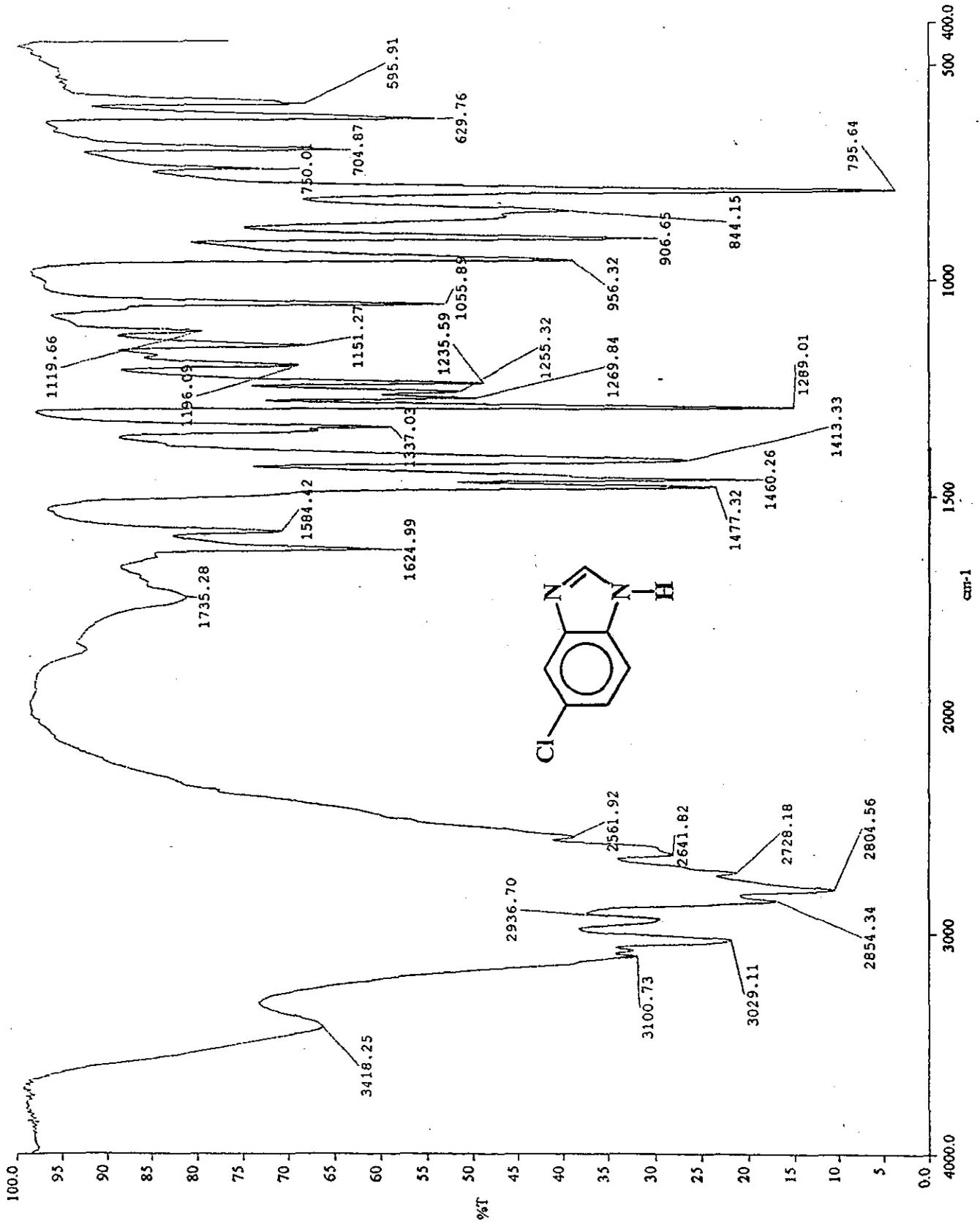
**BIBLIOGRAFIA**

- [1] www.ssa.gob.mx.
- [2] Towson, L. B. & Wise D. S. *Parasitology Today*. **1990**, 6(4), 107-12.
- [3] (a) Taylor, M. *Veterinary Practice*. Feb. **1990**, 7-8.  
(b) Perry, P. & Wolff, S. *Nature*. **1974**, 251, 156.
- [4] Sharman, S. *Advances in Drug Research*. **1994**, 25, 103-72.
- [5] (a) The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12<sup>a</sup> Ed. Merck and Co. Whitehouse Station. **1996**. 1739 p.  
(b) Ciba-Geigy A. G.: Pat. Belg. 865-870. (**1978**); *Chem. Abst.* 90, 137817 z (**1979**).
- [6] Apt, W.; Aguilera, X.; Vega, F.; Miranda, C.; Zulantay, I.; Pérez, C.; Garbor, M. & Apt, P. *American Journal of Tropical Medicinal Hygiene*. **1995**, 52(6), 532-35.
- [7] Korolkovas, A. "Essentials of Medicinal Chemistry". 2<sup>a</sup> ed. Wiley-Intersce Publication. Sao Paulo. **1988**. 874 p.
- [8] Sánchez Díaz, M. R. Tesis de Maestría. FQ-UNAM, México, D. F. **1999**.
- [9] Martin, R. J. *The Veterinary Journal*. **1997**, 154, 11-34.
- [10] (a) Lacey, E. *Parasitology Today*. **1990**, 6, 112-5.  
(b) Sangster, N. C.; Pritchard, R. K. & Lacey, E. *Journal of Parasitology*. **1985**, 71, 645-51.
- [11] Strayer, L. "Biochemistry". W. H. Freeman and Company. N. Y. **1995**.
- [12] (a) Lacey E. *International Journal of Parasitology*. 1983, 18, 885-936.  
(b) Dustin, P. "Microtubules". Springer. **1984**.
- [13] Friedman, P. A. & Platzer, E. G. *Biochemical and Biophysical Acta*. **1980**, 630, 271-78.

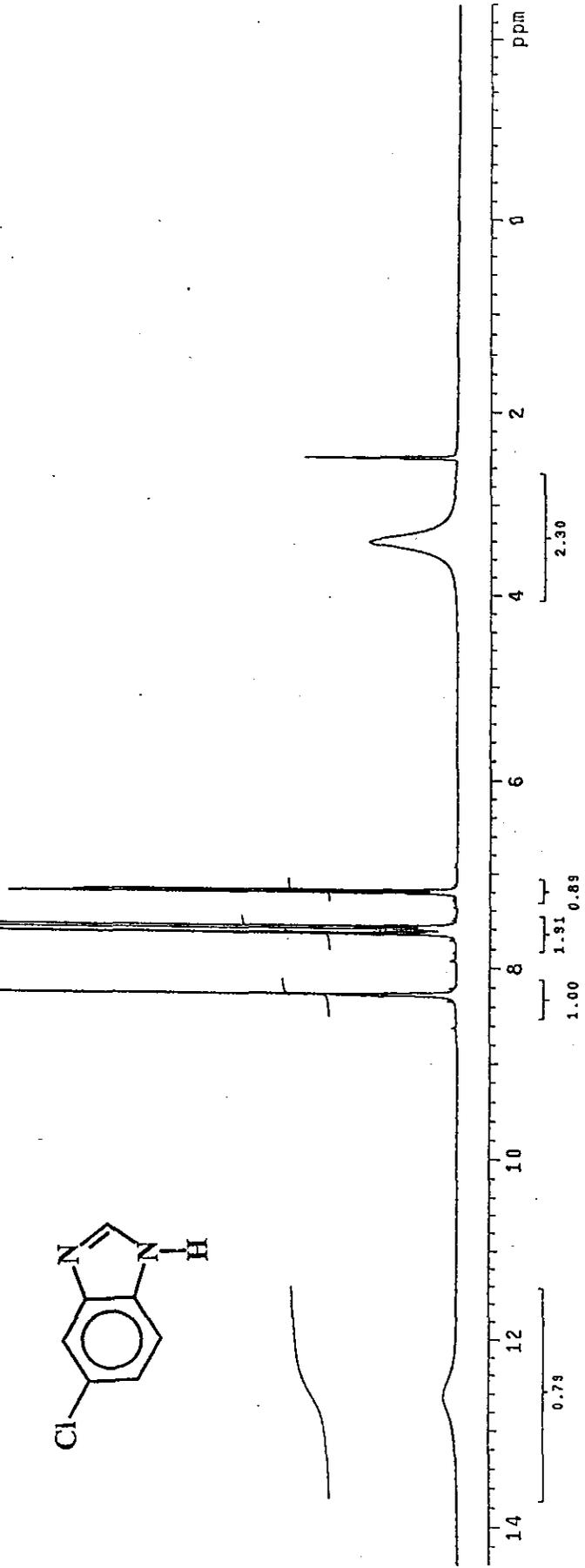
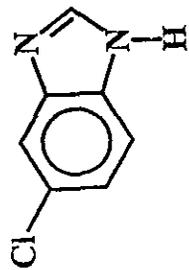
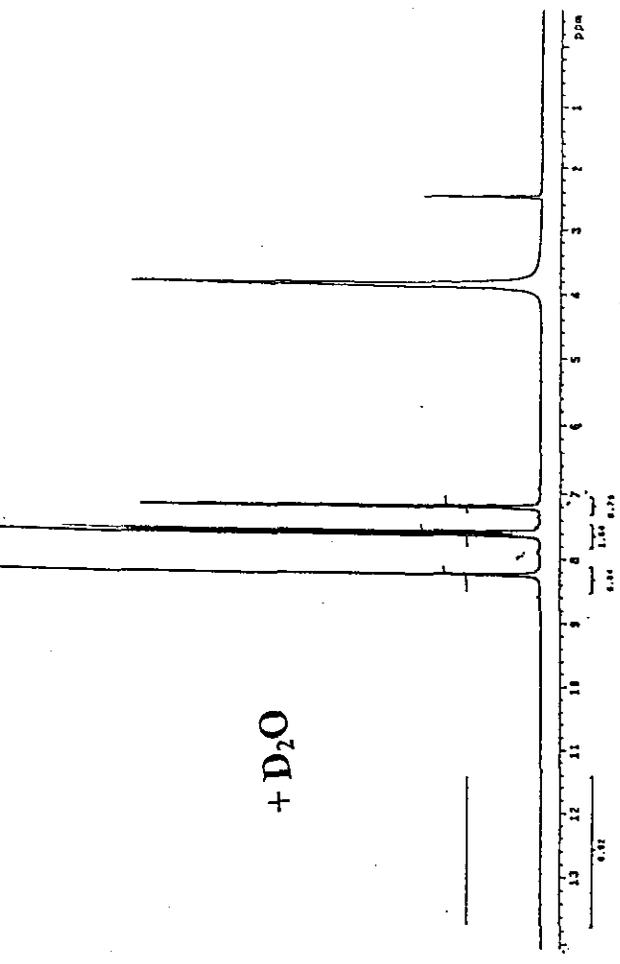
- [14] "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas". Edición 41. Ediciones PLM. Versailles. **1995**. 1848 p.
- [15] "Vademecum Farmacéutico". 9ª Edición. Quintessence Publishing Company. Tautun. **2000**. 1915 p.
- [16] Dupleil, L.; Houckel, I.; Mouton, Y. Antimicrob Agents Chemother. **1996**, 40, 2266-70.
- [17] (a) Freely, D. E.; Holberton, D. V. & Erlandsen, S. L. "The biology of Giardia". Meyer, E. A. (ed), Giardiasis. Elsevier. N.Y. **1990**. 11-49.  
(b) Meloni, B. P.; Thomson, R. C. A.; Reynoldson, J. A. & Seville, P. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, 84, 375-9.
- [18] Chavez, B.; Cedillo-Rivera, R. & Martínez-Palomo, A. *J. Protozool.* **1992**, 34(4), 510-15.
- [19] Valdez, G. J. Tesis de Licenciatura. FQ-UNAM, México, D.F. **1998**.
- [20] Mosmann, T. *Journal of Immunology Methods.* **1983**, 65, 55.
- [21] (a) Green, L.; Reade, J.; Ware, C. *Journal of Immunology Methods.* **1983**, 70, 227.  
(b) Levitz, S. & Diamond, R. *Journal of Infectology Diseases.* **1985**, 152, 938.
- [22] (a) Philips, M. A. *Journal of Chemical Society.* **1928**, 2393.  
(b) Blatt, A. H. Organic Synthesis, Colective vol. II. John Wiley and Sons, Inc., N. Y. **1943**. 65 p.  
(c) Brown, E. L. & Cambell, N. *J. Chem. Soc.* **1937**, 1699.
- [23] Leonard, N. N.; Curtis, D. Y. & Beck, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 2459-61.
- [24] Bywater, W. G.; McGinty, D. A. & Jenesel, N. D. *J. Pharm.* **1995**, 85, 14.

- [25] Hernández, C. M. A. Tesis de maestría. FQ-UNAM, México, D.F. 1990.
- [26] Hubertis, J. L.; Corneel, R. A.; Rijkkevorse, & Margaretha, H. A. Pat. U. S. 3657267 (1972). *Chem. Abst.* 31431-34-7.
- [27] Janssen Pharmaceutica, N. V. Pat. U.S. 3657267 (1972). *Chem. Abst.* 31431-34-7.
- [28] Organic syntheses, Collective. Vol. II, Ed. John Wiley and Sons. 1943, pp 150-151.
- [29] Chavez, B.; Espinosa, M.; Cedillo-Rivera, R.; Ramirez, A. & Martínez, A. *Archives of Medicinal Research*. 1992, 23(2), 63-637.
- [30] Dennis, D. T.; Despommier, D.; Davis, N. *J. Parasitol.* 1970, 56, 974-77
- [31] Towson, D. H. & Morris, D. L. *Trans, R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989, 83, 664-69.
- [32] Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A. & Muñoz, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine metasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medicinal Research*. 1992, 23(2), 59-61.
- [33] Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. *J. Med. Microbiol.* 1992, 37, 221-24.
- [34] Steck, E.; Paulin, B. *OPPI BRIEFS*. 1974.
- [35] Murray, M.; Ryan, A. J.; Little, P. *J. Med.Chem.* 1982, 25, 887-92.
- [36] Ogura, H.; Takayanagi, Y.; Yamazaki, S.; Yonezawa, H.; Tahagi, S.; Kobayashi, T.; Kamoshita, K. *J. Med. Chem.* 1972, 15, 923-29.
- [37] Kurt; Kirsch, Reinhard. Pat. Ger. 2,303,999. Aug 1974. *Chem. Abst.* 2303999.8.

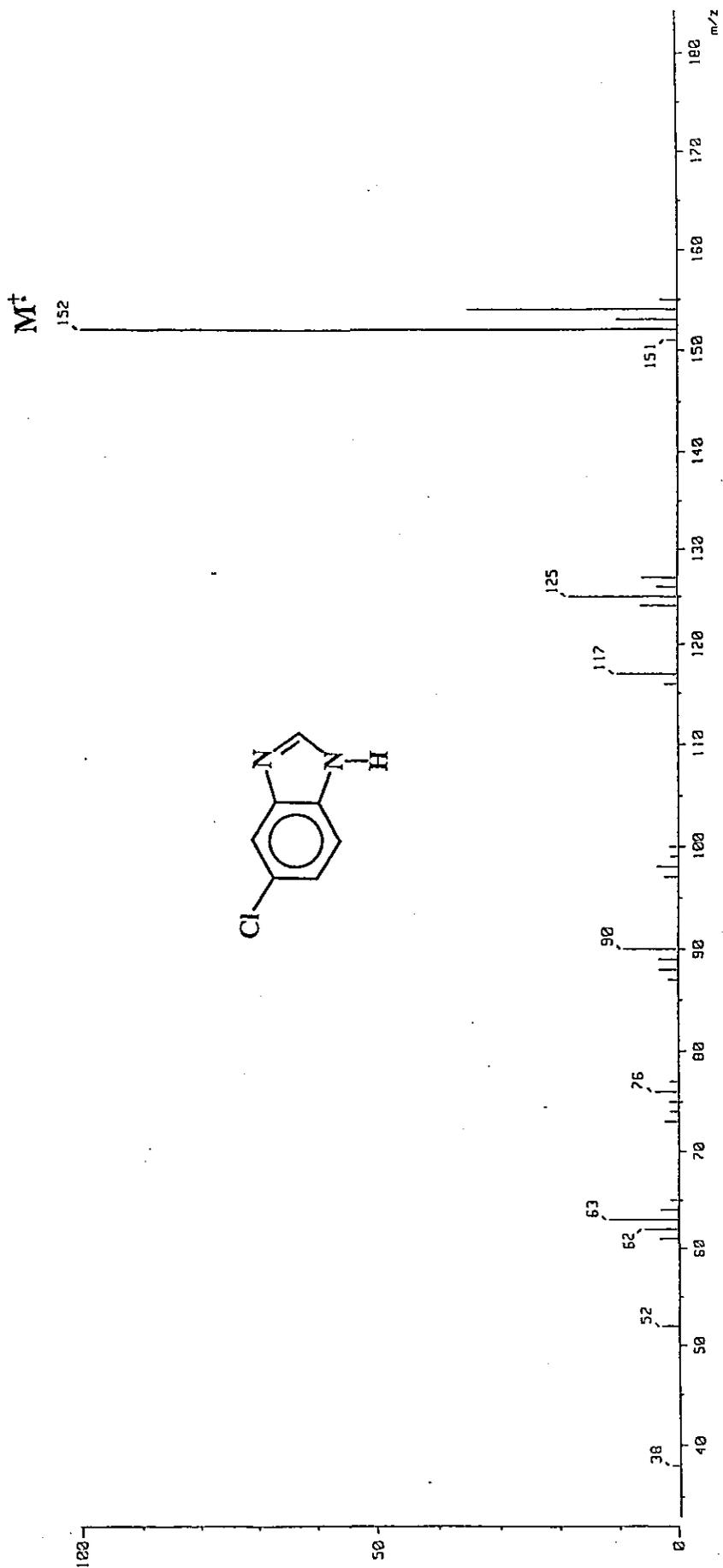
- [38] Devivar, Y. R.; Kawashima, E.; Revankar, G. R.; Breitenbach, J. M.; Kreske, E. D.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2942-49.
- [39] Iddon, B.; Kutschy, P.; Robinson, G.; Suschitzky, H.; Kramer, W.; Neugebauer, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, *1*, 3129-64.
- [40] Catalogo Aldrich. 2000, 2061 p.
- [41] Steck, E. A. *Org. Prep. Proced. Int.* **1975**, *7* (1), 6-11.
- [42] Roberts *et al.* *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 654-659.
- [43] Beilstein Organische Chemie, Band XII, 733-734.



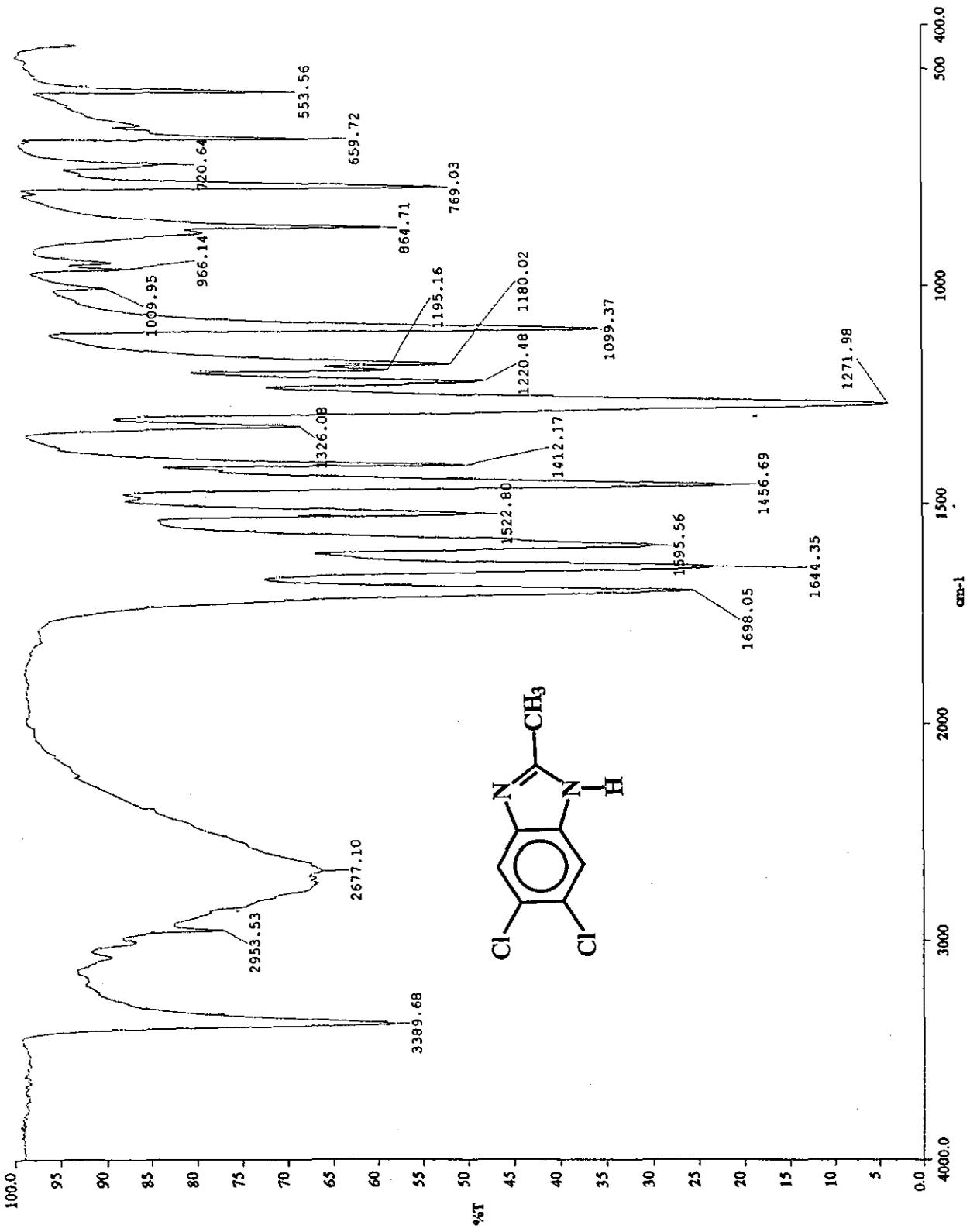
Espectro 1, IR (KBr). 5(6)-Cloro-1H-benzimidazol (12)



Espectro 2, RMN <sup>1</sup>H (TMS). 5(6)-Cloro-1H-benzimidazol (12)

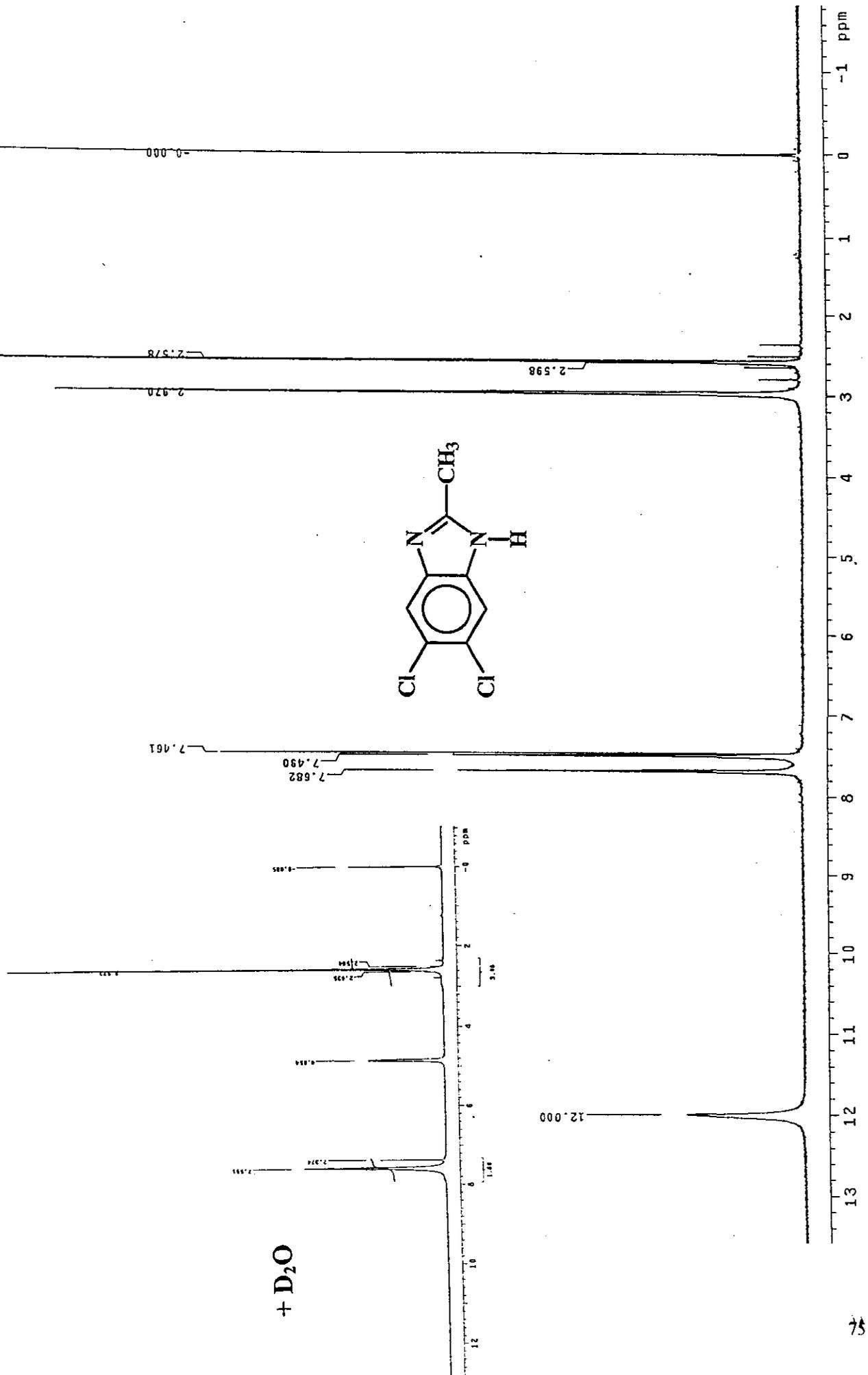


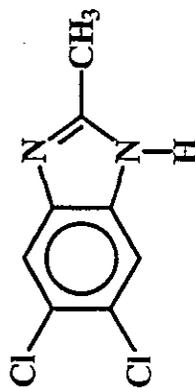
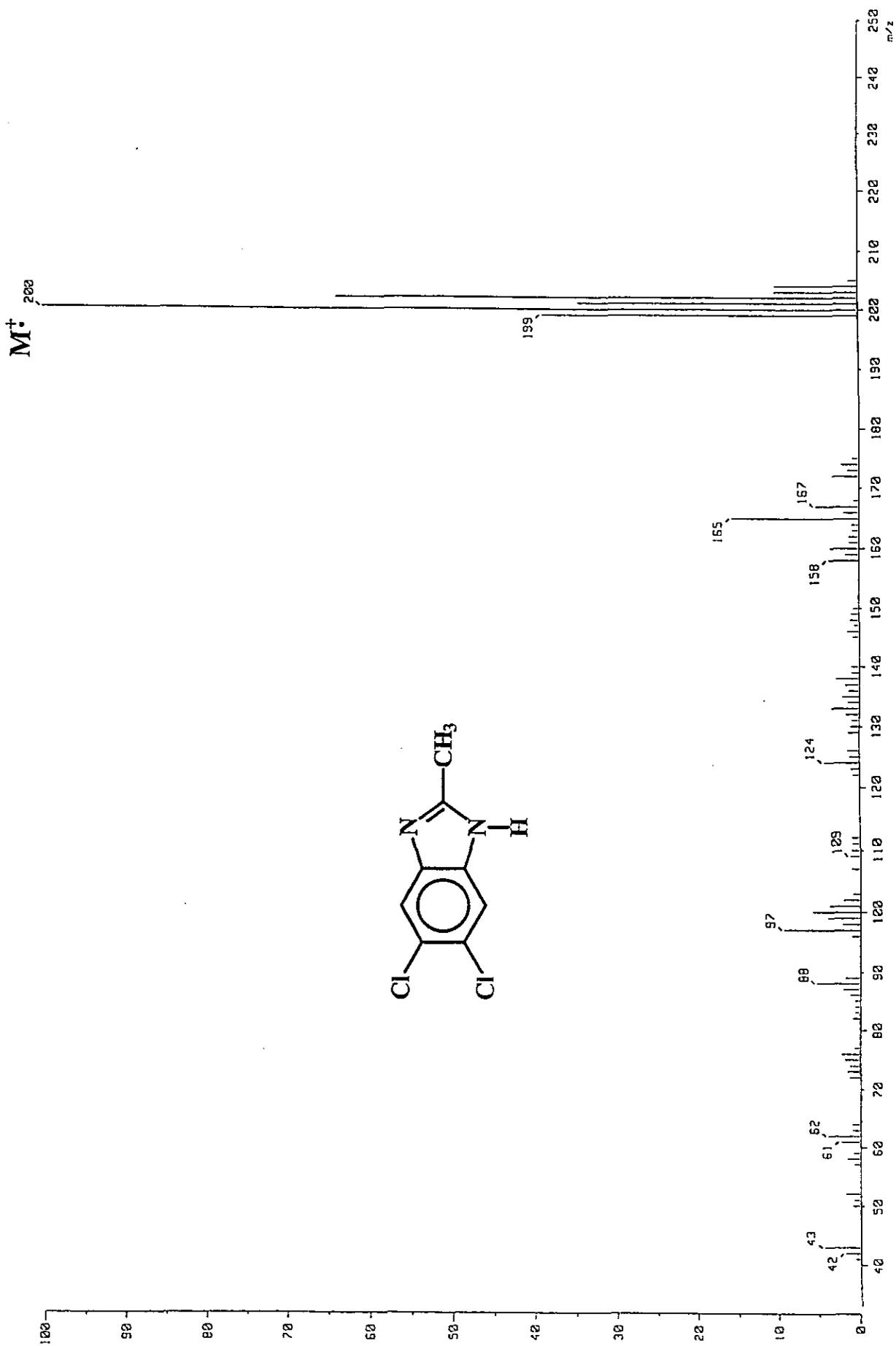
**Espectro 3, EM (IE). 5(6)-Cloro-1H-benzimidazol (12)**



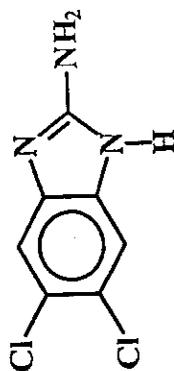
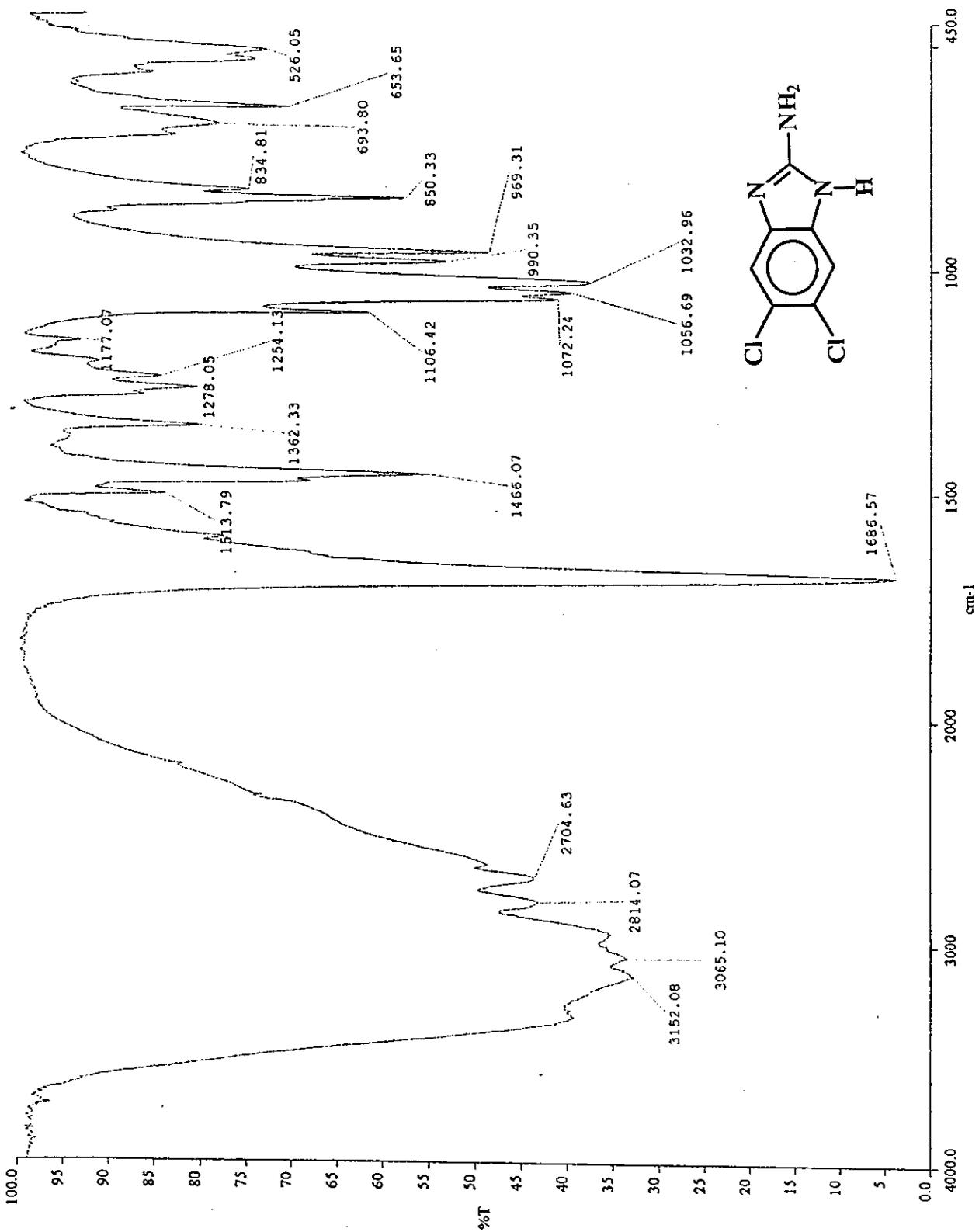
**Espectro 4, IR (KBr). 5,6-Dicloro-2-metil-1H-benzimidazol (13)**

Espectro 5, RMN <sup>1</sup>H (TMS). 5,6-Dicloro-2-metil-1H-bencimidazol (13)

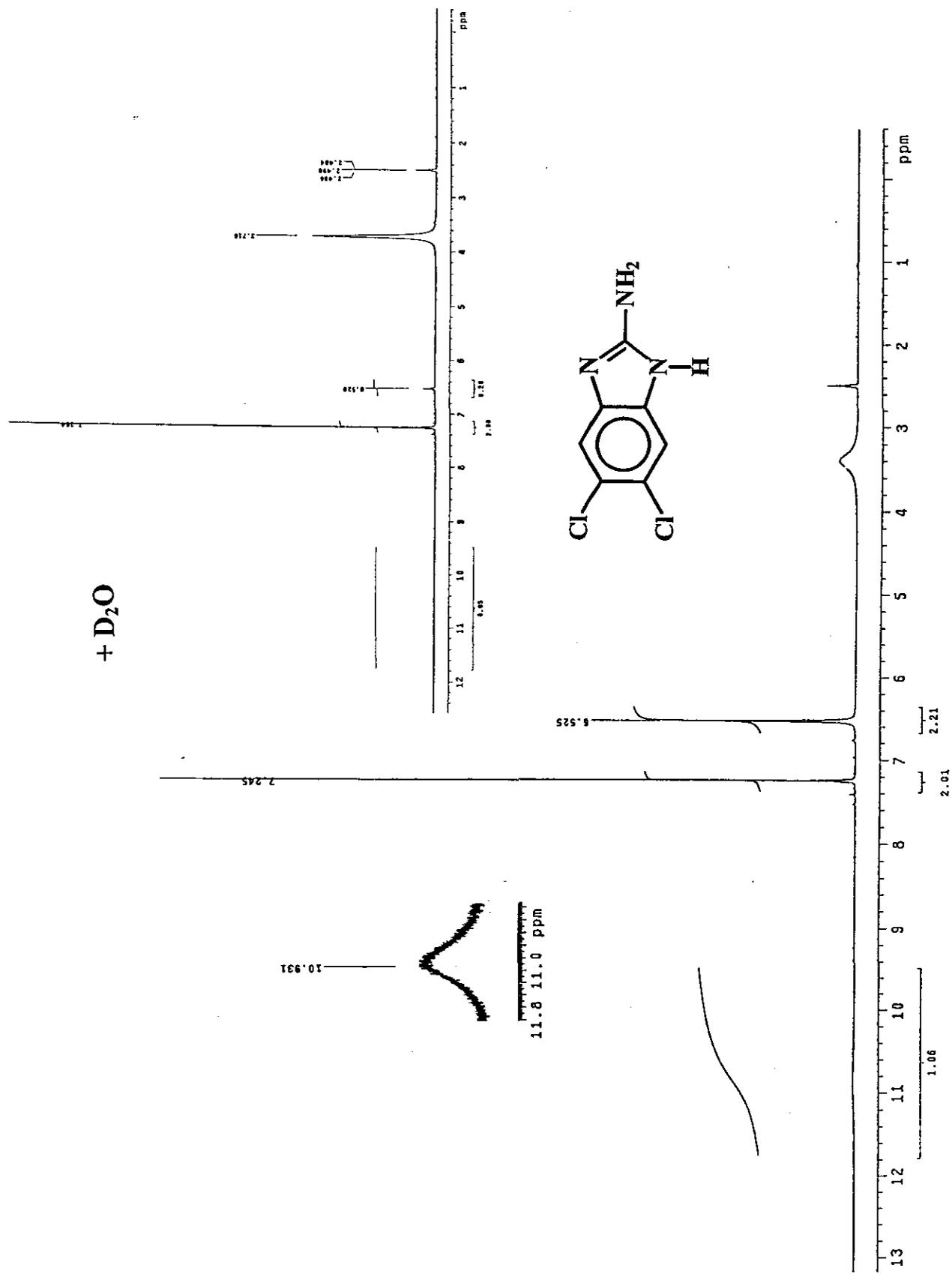




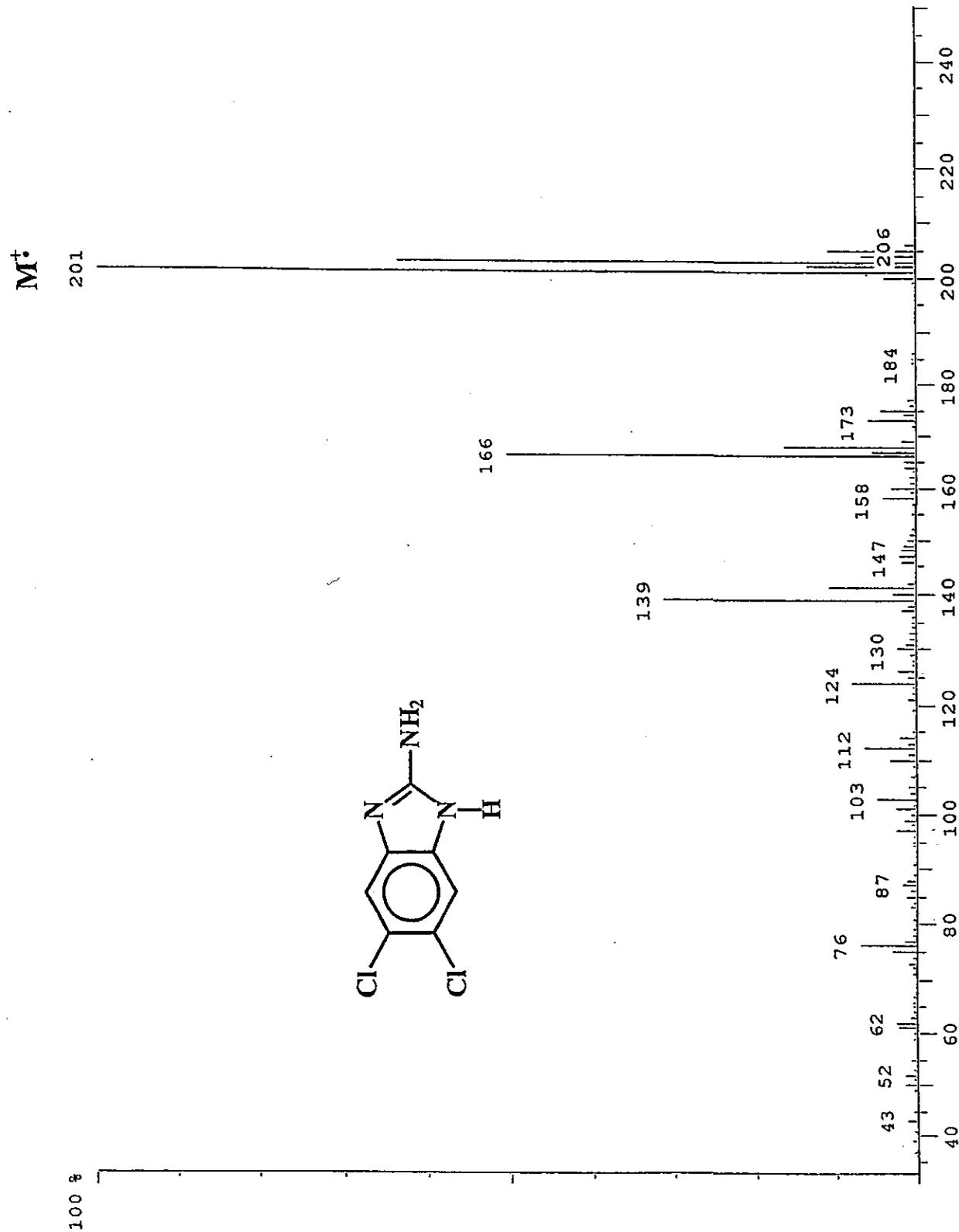
**Espectro 6, EM (IE). 5,6-Dicloro-2-metil-1H-benzimidazol (13)**



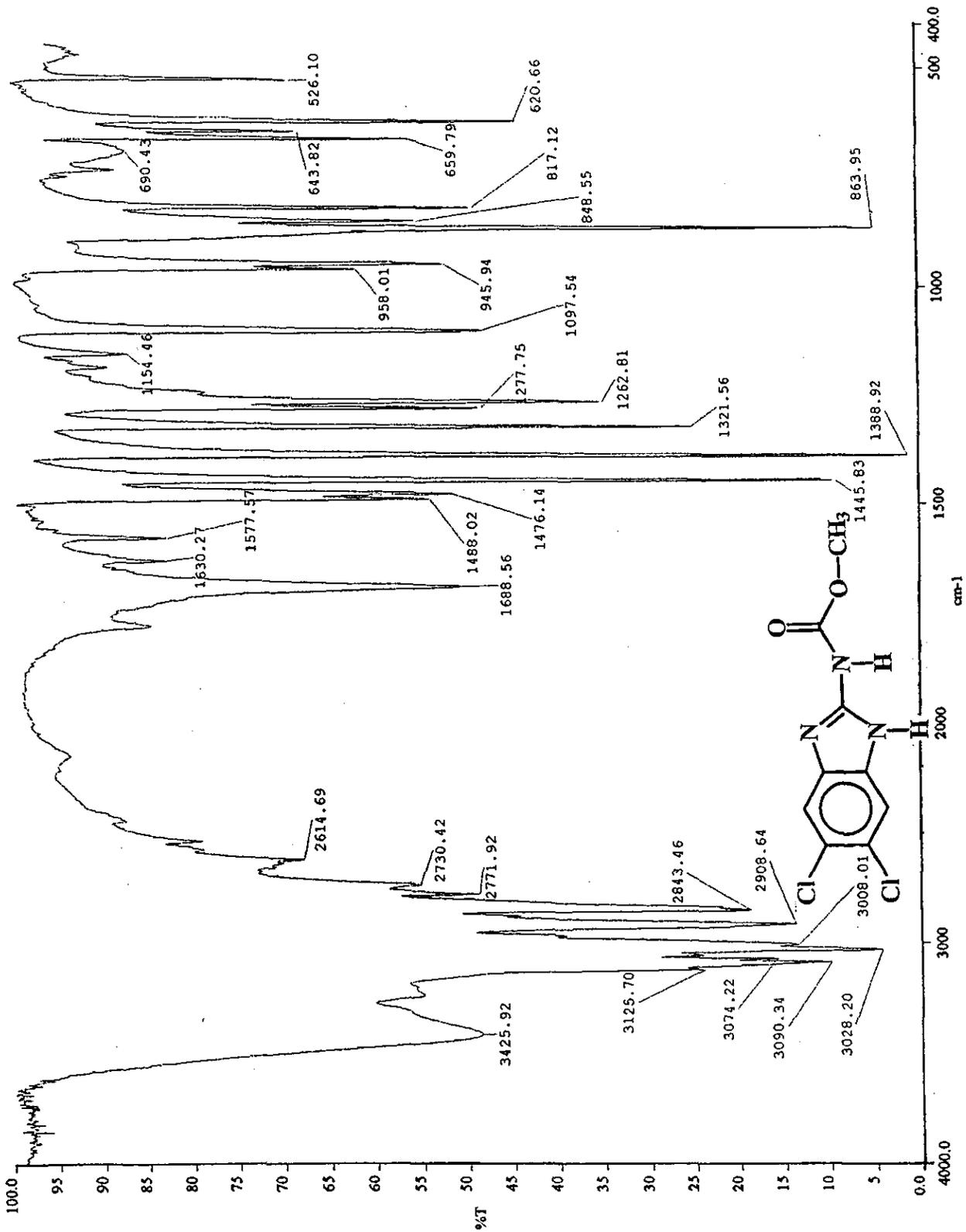
**Espectro 7, IR (KBr). 2-Amino-5,6-dicloro-1H-benzimidazol (14)**



Espectro 8, RMN <sup>1</sup>H (TMS). 2-Amino-5,6-dicloro-1H-benzimidazol (14)

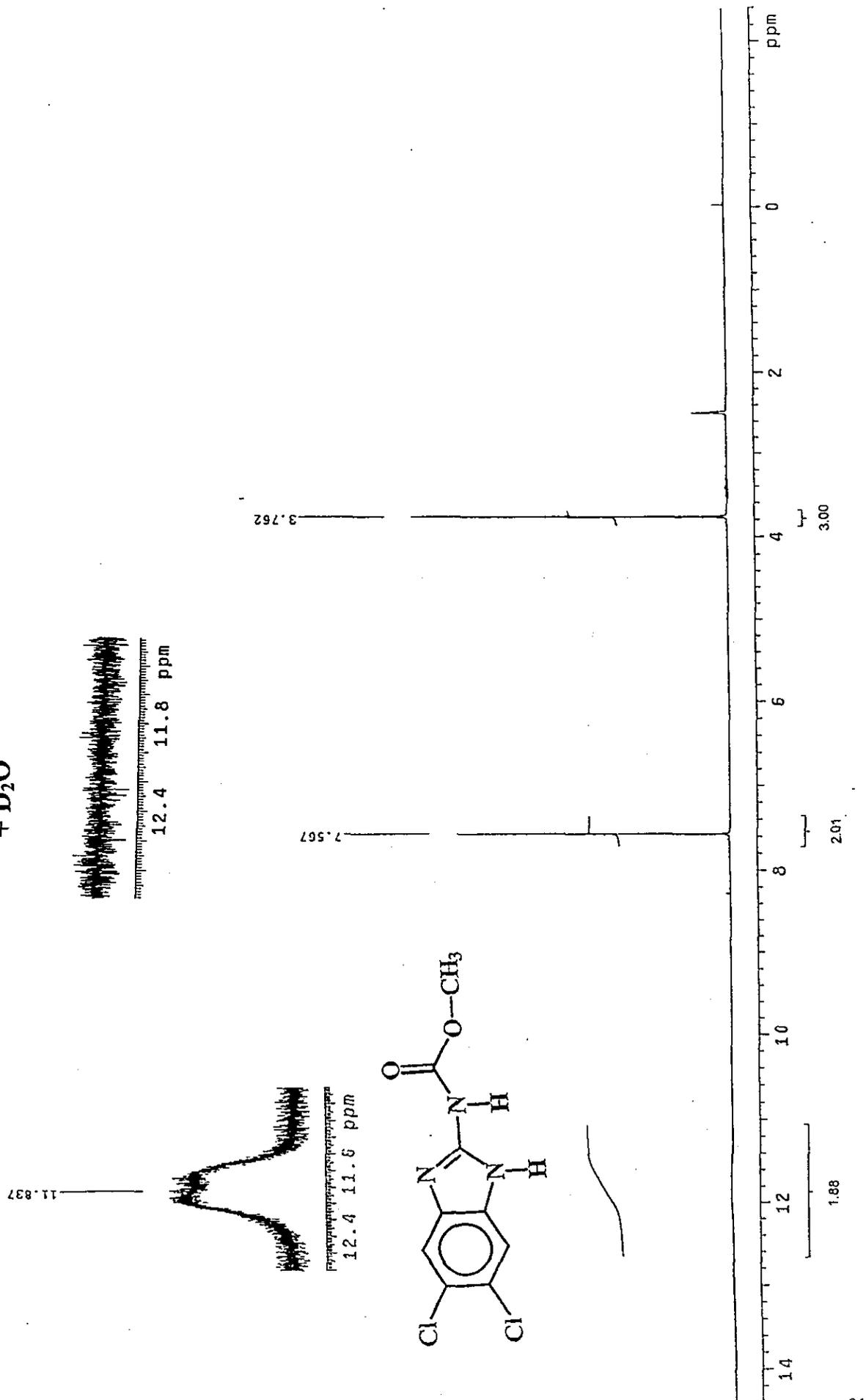


Espectro 9, EM (IE). 2-Amino-5,6-dicloro-1H-benzimidazol (14)

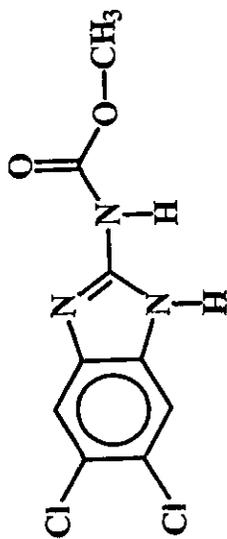
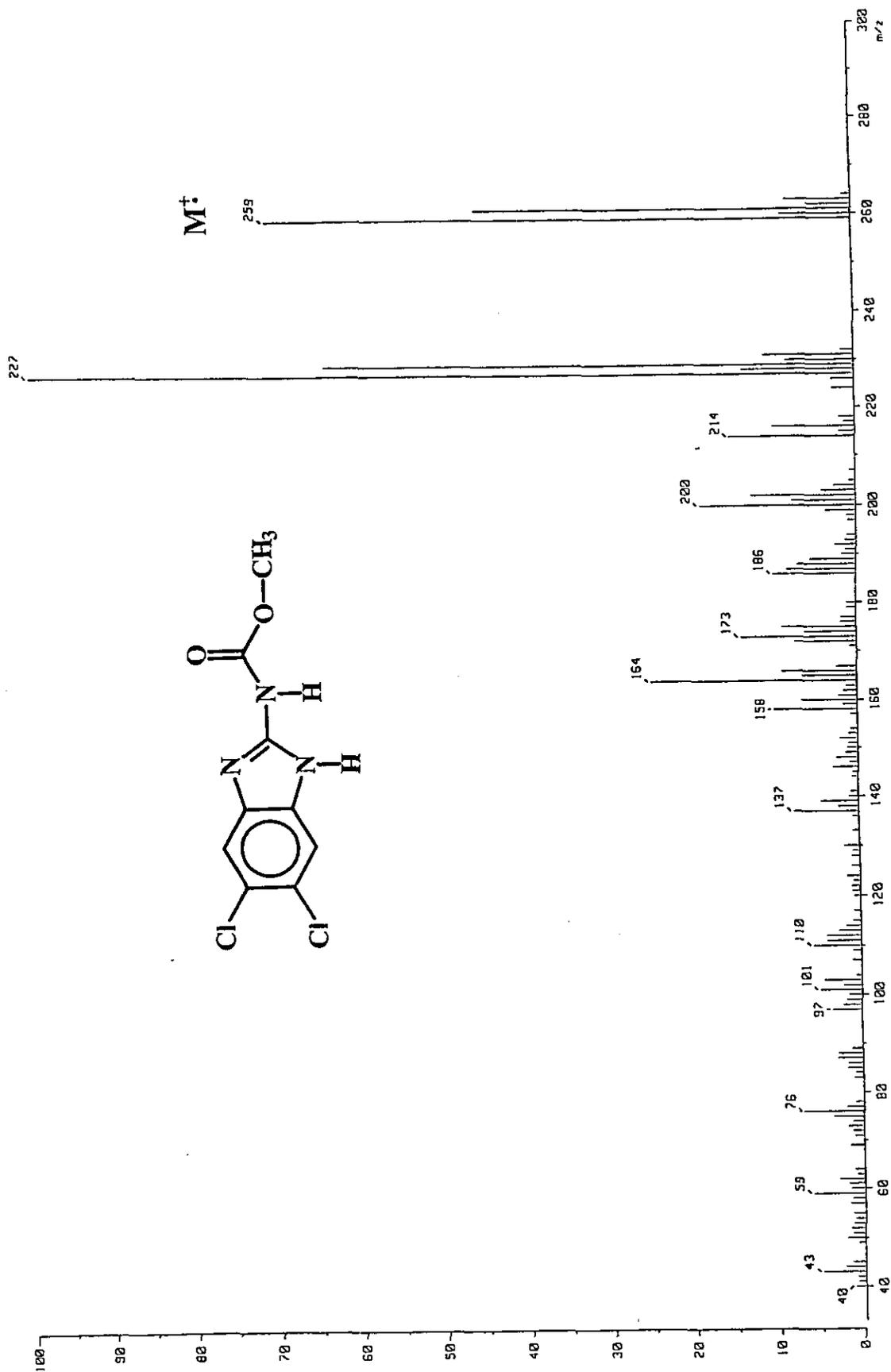


Espectro 10, IR (KBr). (5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il) carbamato de metilo (15)

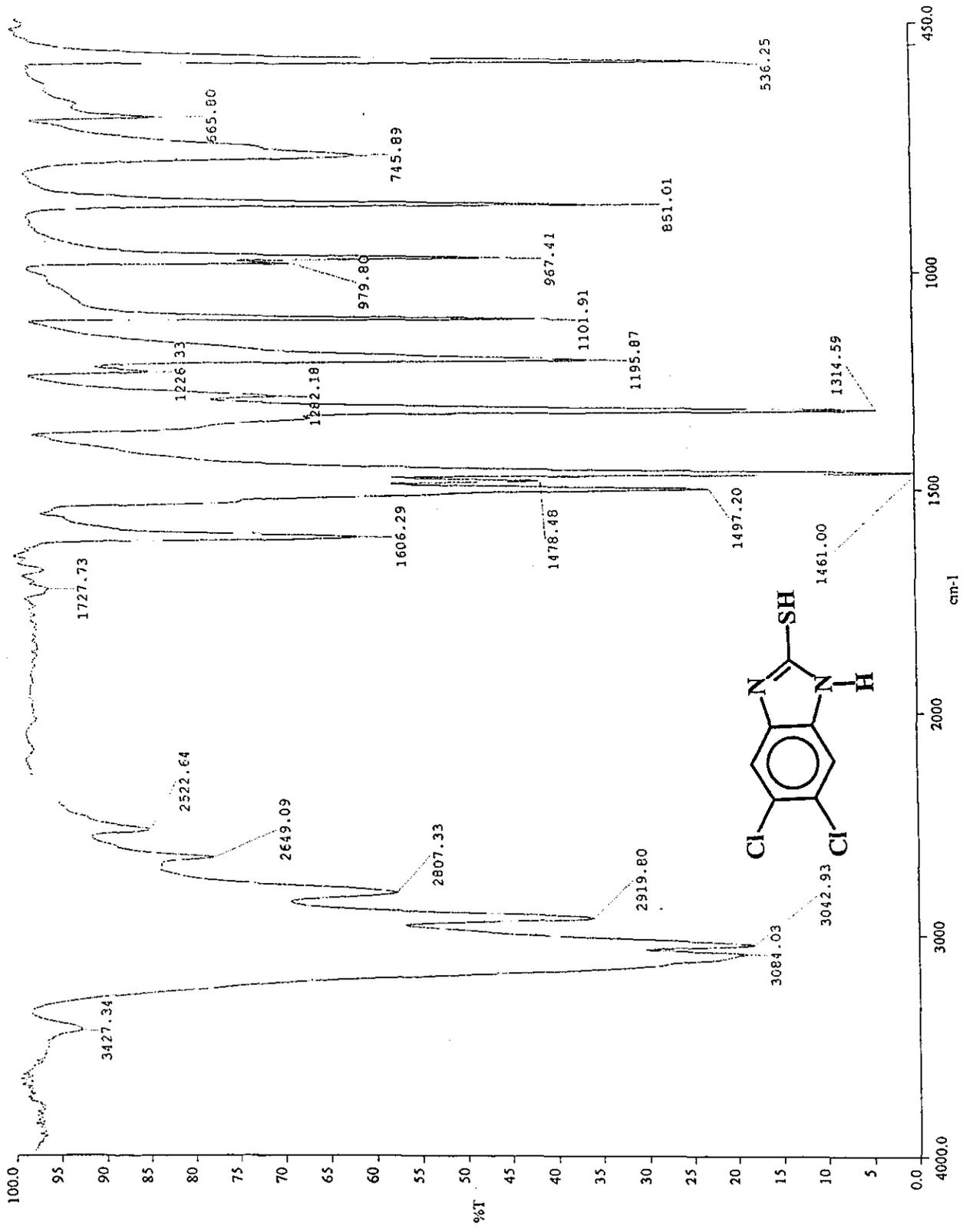
+ D<sub>2</sub>O



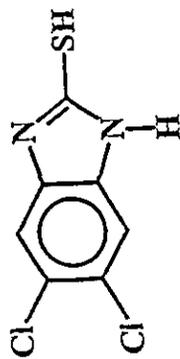
Espectro 11, RMN <sup>1</sup>H (TMS). (5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il) carbamato de metilo (15)



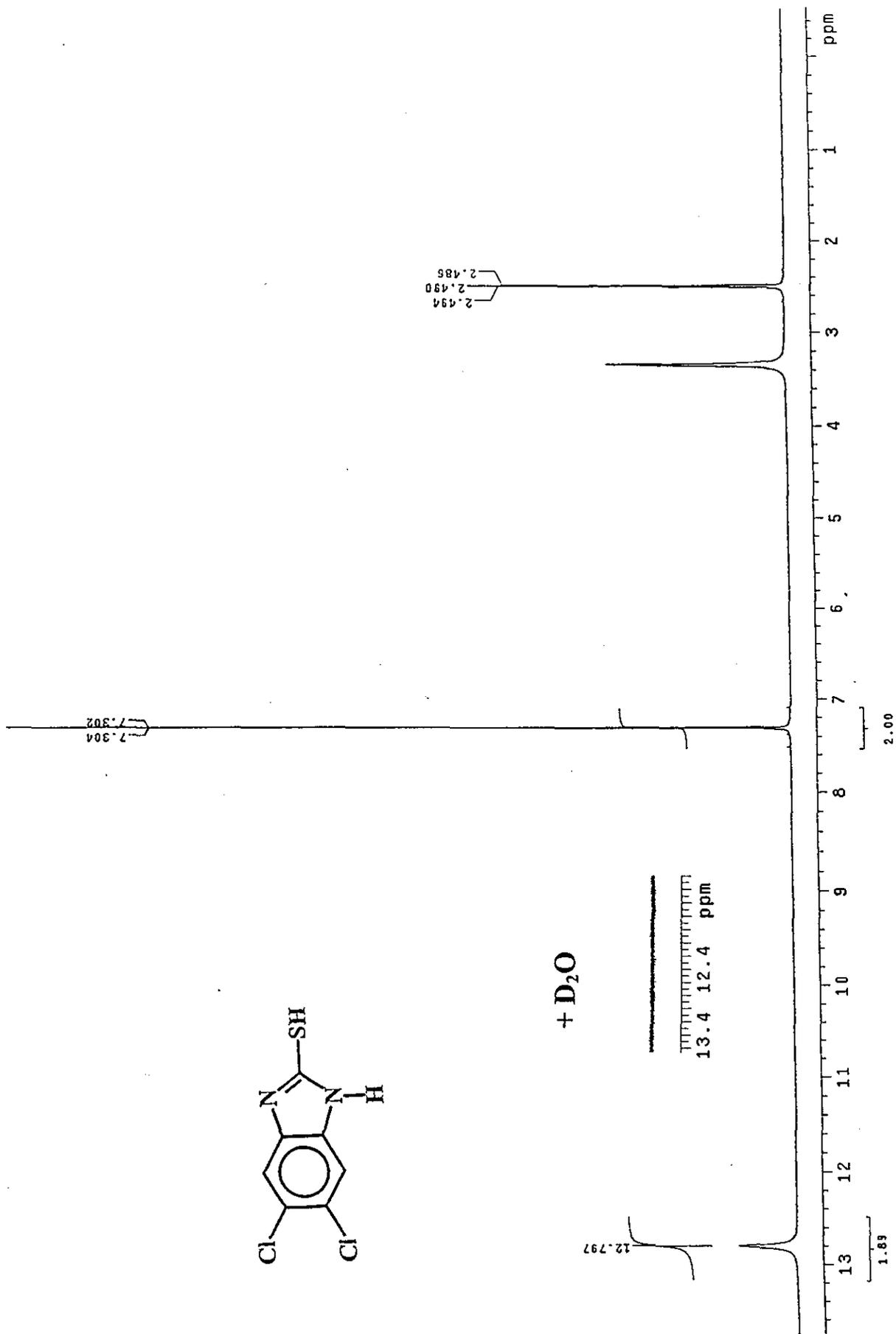
**Espectro 12, EM (IE).** (5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il) carbamato de metilo (15)



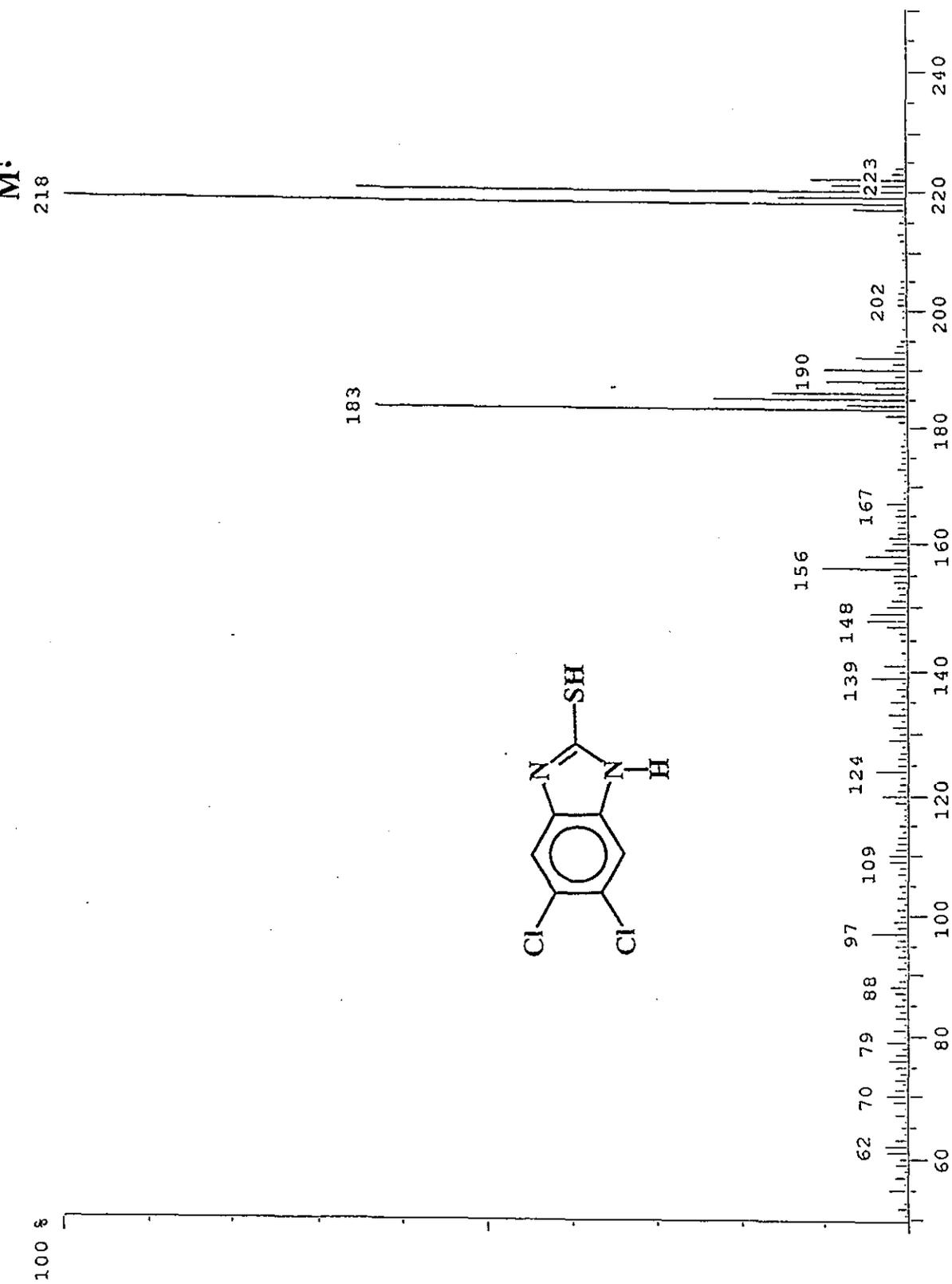
**Espectro 13, IR (KBr). 5,6-Dicloro-2-mercapto-1H-benzimidazol (16)**



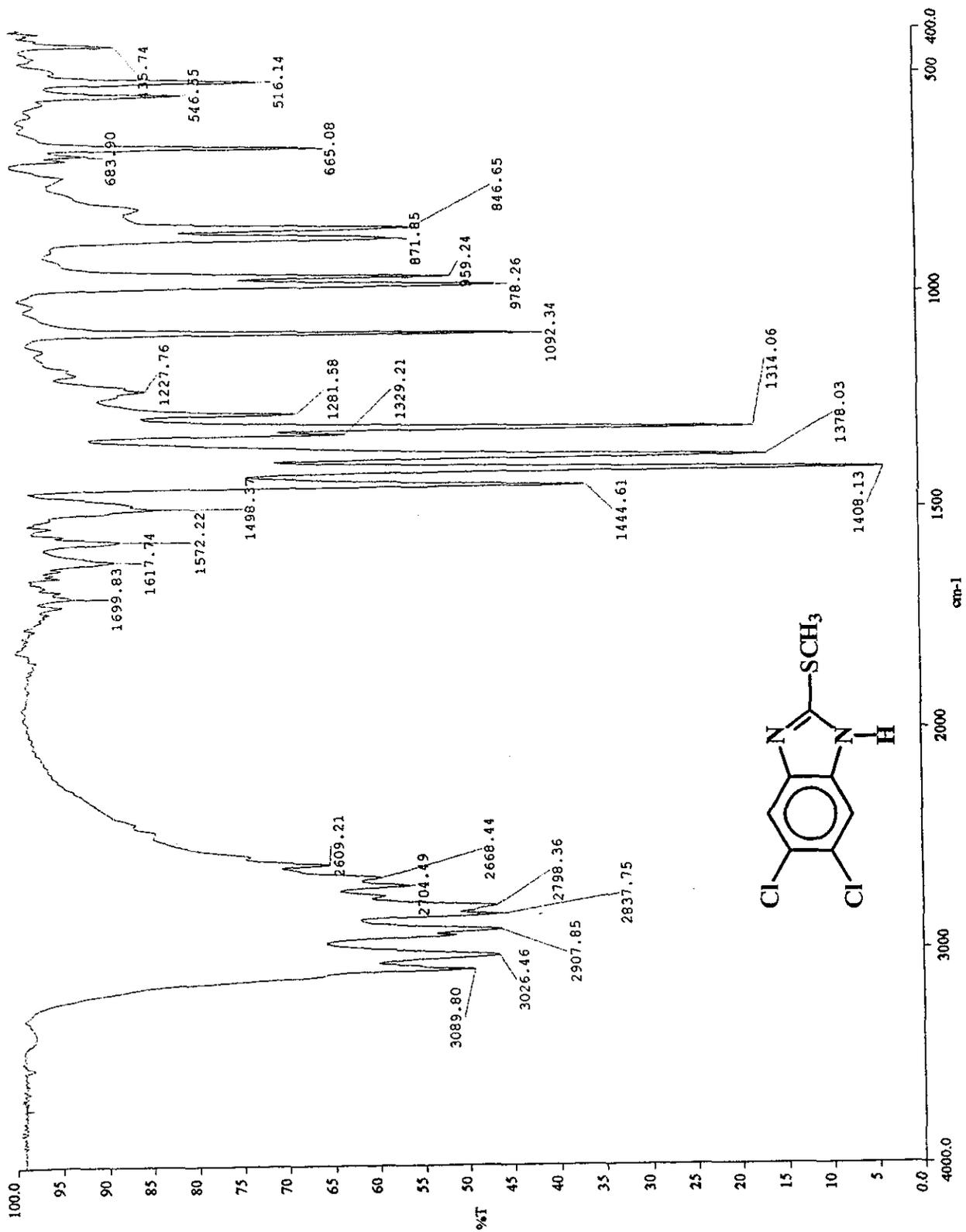
+ D<sub>2</sub>O



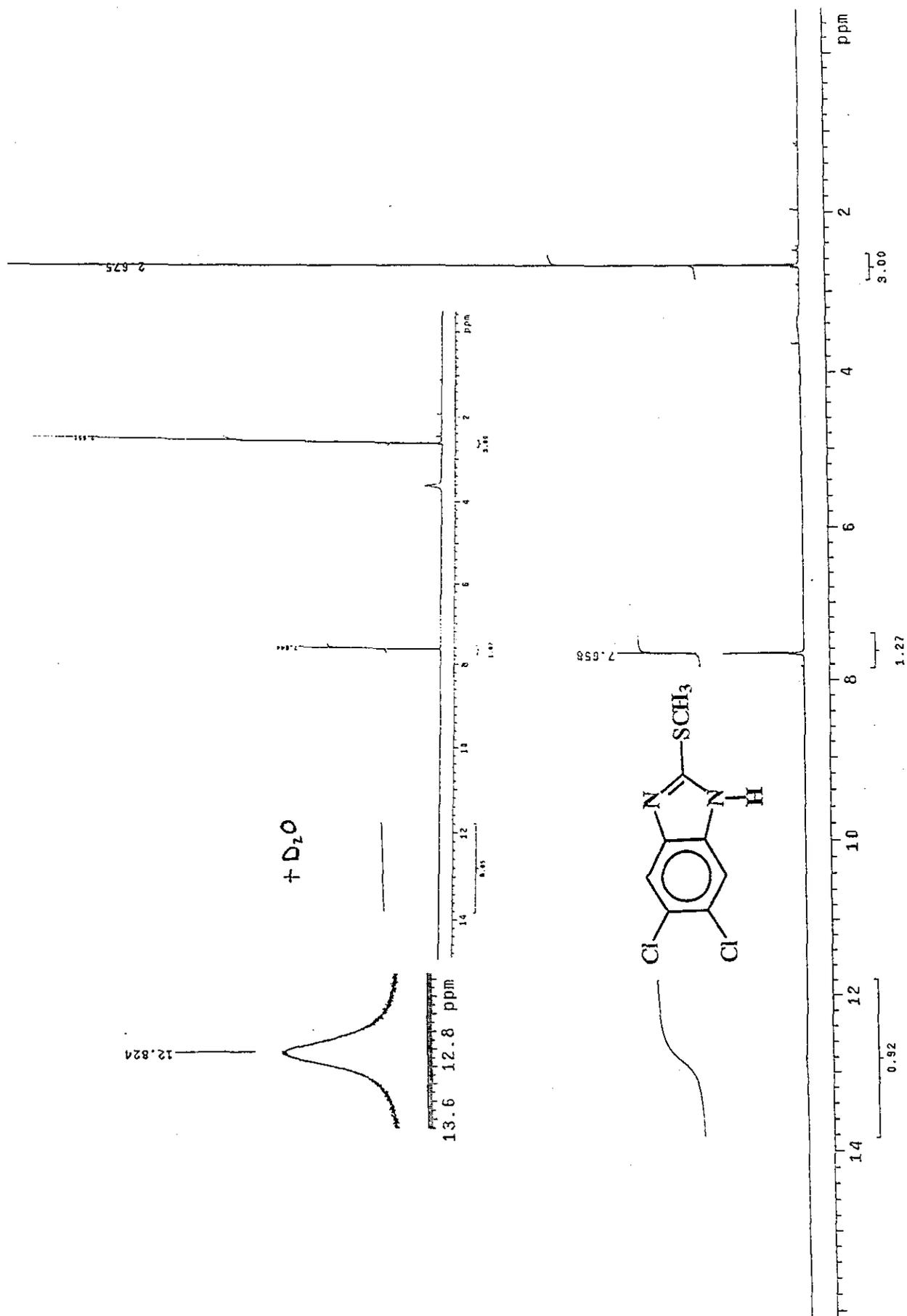
Espectro 14, RMN <sup>1</sup>H (TMS). 5,6-Dicloro-2-mercapto-1H-benzimidazol (16)



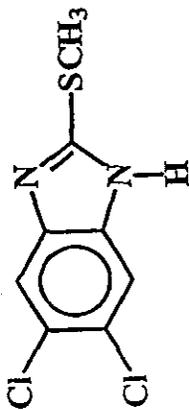
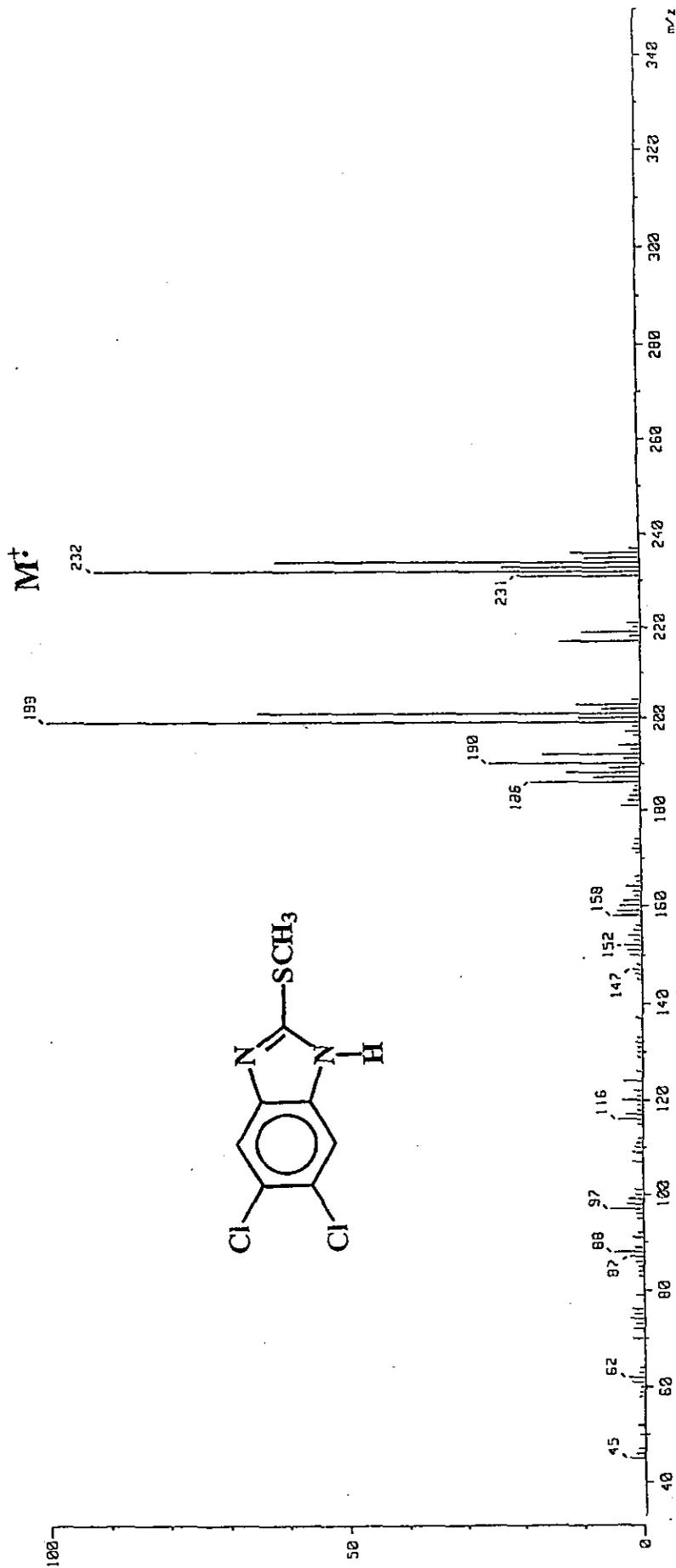
**Espectro 15, EM (IE). 5,6-Dicloro-2-mercapto-1H-benzimidazol (16)**



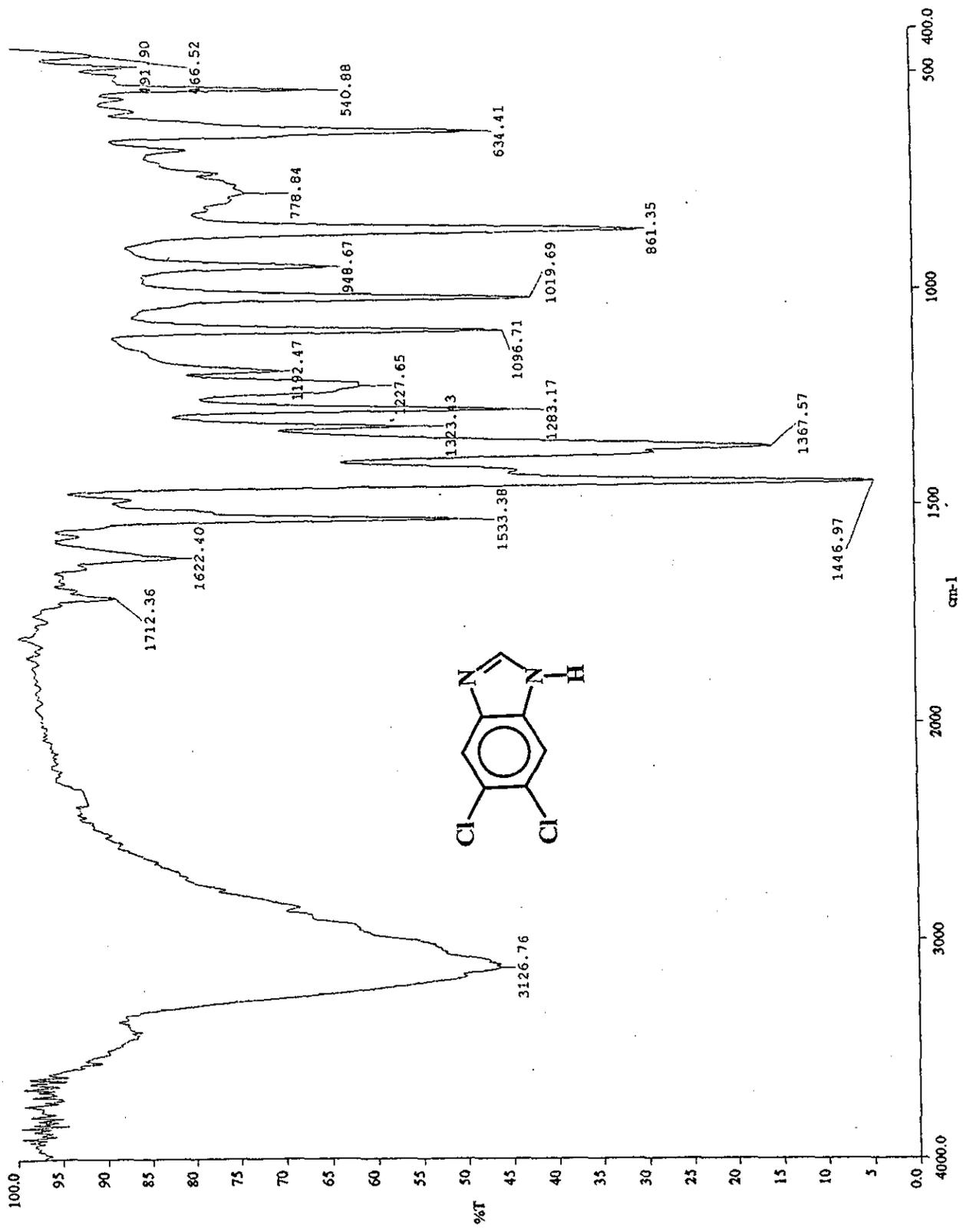
Espectro 16, IR (KBr). 5,6-Dicloro-2-metiltio-1H-bencimidazol (17)



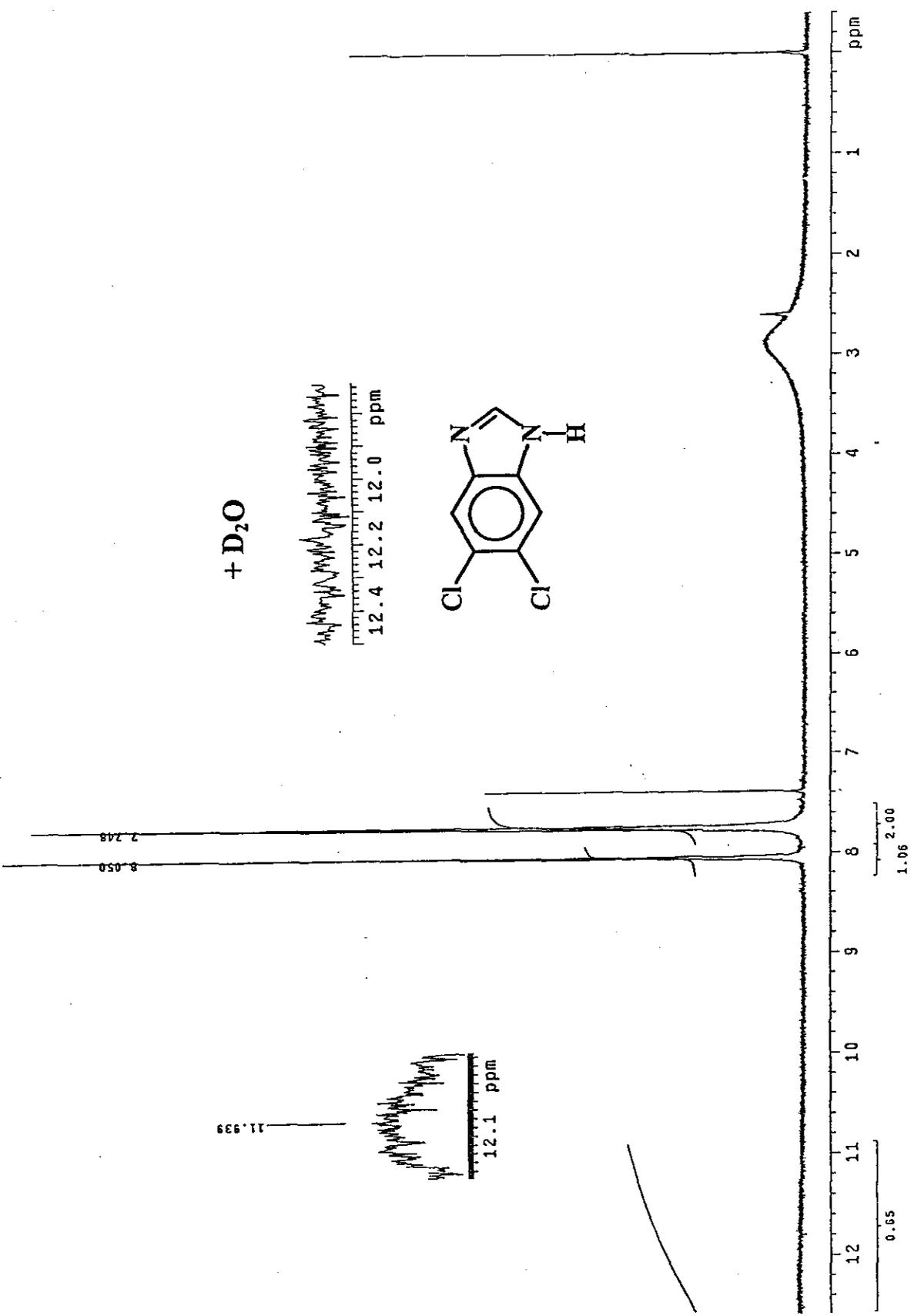
**Espectro 17, RMN <sup>1</sup>H (TMS). 5,6-Dicloro-2-metilio-1H-benzimidazol (17)**



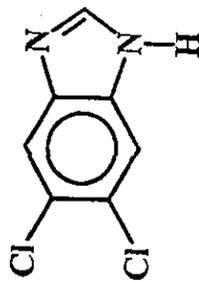
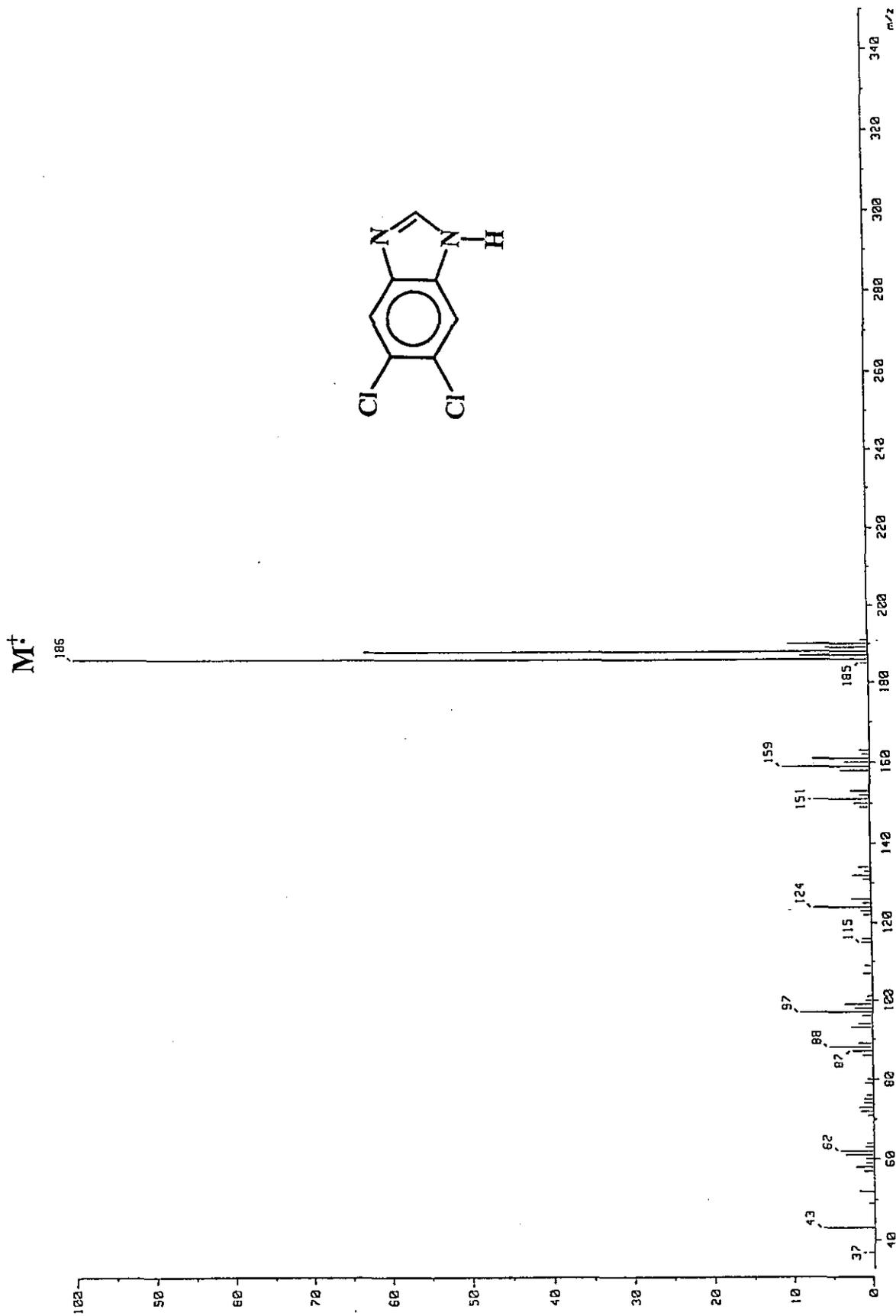
**Espectro 18, EM (IE). 5,6-Dicloro-2-metiltio-1H-bencimidazol (17)**



Espectro 19, IR (KBr). 5,6-Dicloro-1H-benzimidazol (18)



Espectro 20, RMN  $^1H$  (TMS). 5,6-Dicloro-1H-benzimidazol (18)



**Espectro 21, EM (IE). 5,6-Dicloro-1H-benzimidazol (18)**