



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE
DERIVADOS DEL (1-METIL-1H-BENCIMIDAZOL-
2-IL)CARBAMATO DE METILO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ANTONIO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2006



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. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal: Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Secretario: M. en C. María Alicia Hernández Campos
Primer suplente: Prof. Marisol Reyes Lezama
Segundo suplente: Prof. José Cordero Hernández

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio
L-122 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM

Asesor:

M.en C. María Alicia Hernández Campos

Sustentante:

Antonio Hernández Martínez

“En realidad, entre la religión y la verdadera ciencia no existe parentesco, ni amistad, ni siquiera enemistad: viven en esferas distintas”

NIETZSCHE, FRIEDRICH

DEDICATORIAS

A mi mamá, por la visión que ha tenido de sus hijos, por todos los esfuerzos y sacrificios realizados para brindarnos la mejor preparación y sacarnos adelante. Por sus consejos y enseñanzas. Por siempre estar a nuestro lado, mil gracias gordita, este es sólo uno de los tantos triunfos que has tenido. Esta tesis es tuya.

A mi papá, por preocuparte por nosotros. Por el apoyo y cariño que siempre me has dado, por todos los sacrificios que has realizado para que estemos bien. Este es sólo el comienzo jefe.

A ti grisitos, por todos los cuidados que siempre me has dado, por seguirte preocupando y por seguirme cuidando como cuando era niño, sabes que te debo mucho de mi formación, te encargaste de formar mi niñez. Gracias por todos los sacrificios que hiciste para cuidarnos.

Mary, no se como pagarte todo el apoyo que me diste y que me das, por preocuparte y seguirme consintiendo, por cuidarme mejor que a un hermano, por cubrirme en mis aventuras y por apoyarme en todo. Gracias también a ti por tus sacrificios, por el apoyo para que yo sólo me dedicara a la escuela. No ha sido en vano. Te quiero mucho pecosita

Myri, gracias por todas las confianzas y las regañadas que me han ayudado a crecer y a ser más humano, por ayudarme a comprender muchas de las cosas que no entendía, por los años que te tuvimos en la casa apoyándonos. Por los prestamos millonarios que me han servido para divertirme y para algo más. Sin ti no lo hubiera logrado pequeña, gracias por apoyarme a dar el último salto.

Burritos, sin duda eres la hermana de la que he aprendido mucho de su forma de ser, gracias por tu paciencia y por el apoyo que nos brindas. Gracias por ser nuestro confidente y entendernos más. Por los sacrificios que haces y por enseñarme que si alguien quiere algo tiene que luchar y no desanimarse.

Carnita, gracias por todas tus enseñanzas, por siempre estar a mi lado apoyándome, por compartir cada momento desde que eramos niños y por enseñarme a madurar. Gracias por todas las regañadas y las carcajadas que nos han unido más. Estoy muy orgulloso de ti carnal, de verdad muchas gracias por ayudarme a salir adelante como siempre lo has hecho.

A mis hijos: Sandra y Eduardo, que sea motivo de superación y orgullo para que logren todos sus sueños. Los quiero mucho gorditos.

A la familia Acosta Trujillo, por el cariño y la confianza que me han brindado. Especialmente a ti Jenny, gracias por todo el amor que me das, por ayudarme a ser paciente y por todos los cuidados y motivaciones para que sea mejor. Gracias por estar siempre en cada momento, sobre todo cuando las cosas no salen bien, por cada momento que me haces olvidar todas las cosas en el mundo. Este logro también es tuyo, y sabes mejor que nadie que sin ti esto estaría inconcluso. Te amo pequeña.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo, por todos los consejos, apoyos recibidos y por siempre estar dispuesto a legarnos su conocimiento.

A la M. en C. Alicia Hernández Campos, por permitirme trabajar a su lado, por guiarme a lo largo de este proyecto, por la confianza y cariño que me ha brindado.

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por enseñarme como profesor y por el apoyo recibido en el tiempo que he estado en el laboratorio.

A la UNAM, por haberme brindado la oportunidad de formarme, por la excelencia en la preparación de sus egresados.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia y a la bióloga Amparo Tapia, por la determinación de la actividad antiprotozoaria que se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI.

Al personal de la USAI, Rosa Isela del Villar, Gerorgina Duarte, Margarita Guzmán, Marisela Gutierrez, Nallely López y Víctor Manuel Arroyo por la determinación de los espectros.

Al proyecto PAPIIT IN214502-3, por el apoyo económico recibido por la participación en la síntesis del compuesto faciolicida Alfa.

Al proyecto CONACYT V43628-M, por el apoyo económico recibido para la realización de esta tesis.

A mis amigos de la perrera, Delaney, Paco, Andrea, Ranferi, Ernesto, Memo, Víctor, Omar, Odín, por todos los partidos jugados en esa cancha.

A mis amigos de la carrera: Delaney, Paco, Oscar, Fernando, Anel, Tona y Noe. Gracias por todas las parrandas y el apoyo en la carrera.

A mis amigos de la maestría, Lupita, Fer y Jorge, por todo el apoyo y la confianza que me brindan.

A mis amigos de la vida: Maricuz y Fabiola, gracias por todo el apoyo que me han brindado, por ayurame en los malos momentos y por saber que siempre voy a contar con ustedes. Especialmente a ti Fabiola, mil gracias niña por todo las atenciones que has tenido conmigo y por brindarme tu amistad incondicional.



ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Panorama actual de las parasitosis en México	3
2.2. Los protozoarios	5
2.2.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	5
2.2.2. <i>Giardia intestinalis</i>	7
2.2.3. <i>Trichomonas vaginalis</i>	10
2.3. Tratamientos antiparasitarios	12
2.4. Los bencimidazoles	19
2.5. Relación estructura-actividad de los bencimidazoles	21
2.6. Mecanismo de acción de los bencimidazoles	22
2.6.1. Inhibición del metabolismo de la glucosa	22
2.6.2. Inhibición en la recaptura de la glucosa	23
2.6.3. Inhibición de la polimerización de Tubulina	23
2.7. Métodos generales de síntesis de bencimidazol-2-carbamatatos	24
2.8. Síntesis de 1-metilbencimidazoles	27
2.8.1. A partir de bencimidazoles	27
2.8.2. A partir de 2-nitroanilinas	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	31



	Pág.
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
5.1. Parte Química	34
5.1.1. Instrumentación	34
5.2. Técnicas para la preparación de los intermediarios y productos finales	38
5.2.1. Método general de síntesis del intermediario:	38
[Imino(metiltio)metil]carbamato de metilo (24) para la formación de los bencimidazol-2-il-carbamatos de metilo	
5.3. Secuencia sintética para la preparación del (1-Metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2- il)carbamato de metilo (AHM-4)	39
5.3.1. <i>N</i> -Metil- <i>N</i> -(2-nitrofenil)amina (2)	39
5.3.2. <i>N</i> -(2-Aminofenil)- <i>N</i> -metilamina (3)	39
5.3.3. (1-Metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-4)	40
5.4. Secuencia sintética para la preparación del (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-11)	41
5.4.1. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)acetamida (7)	41
5.4.2. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilacetamida (8)	41
5.4.3. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilamina (9)	42
5.4.4. <i>N</i> -(2-Amino-4-clorofenil)- <i>N</i> -metilamina (10)	43
5.4.5. (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-11)	43
5.5. Secuencia sintética para la preparación (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2- il)carbamato de metilo (AHM-17)	44



	Pág.
5.5.1. <i>N</i> -(5-Cloro-2-nitrofenil)acetamida (13)	44
5.5.2. <i>N</i> -(5-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilacetamida (14)	45
5.5.4. <i>N</i> -(2-Amino-5-clorofenil)- <i>N</i> -metilamina (16)	46
5.5.5. (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-17)	47
5.6. Secuencia sintética para la preparación del (5,6-Dicloro-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-23)	48
5.6.1. <i>N</i> -(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)	48
5.6.2. <i>N</i> -(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilacetamida (20)	49
5.6.3. <i>N</i> -(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilamina (21)	49
5.6.4. <i>N</i> -(2-Amino-4,5-diclorofenil)- <i>N</i> -metilamina (22)	50
5.6.5. (5,6-Dicloro-1-metil-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-23)	51
5.7. Pruebas de actividad biológica	52
5.7.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiprotozoaria	52
5.7.2. Pruebas de actividad contra <i>E. histolytica</i>	52
5.7.3. Pruebas de actividad contra <i>Giardia intestinalis</i> .	52
5.7.4. Pruebas de actividad contra <i>T. vaginalis</i> .	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1. Resultados de la parte Química	54
6.1.2. Intermediarios de reacción	61
6.1.3. Compuestos finales	65



	Pág.
6.2. Efecto de los compuestos finales sobre los parásitos: <i>E. histolytica</i> , <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i>	66
7. CONCLUSIONES	71
8. LITERATURA CITADA	73
9. APÉNDICE	78

1. INTRODUCCIÒN

Las parasitosis son uno de los grandes problemas de salud pública. La OMS las considera como una de las principales causas de morbilidad; estrechamente ligada a la pobreza y relacionada con inadecuada higiene personal y de los alimentos crudos, falta de servicios sanitarios, falta de provisión de agua potable y contaminación fecal del ambiente. Infectan a personas de todas las edades, pero la sufren principalmente los niños, y se asocian a desnutrición, retraso de crecimiento, anemia, así como disminución en el rendimiento físico y escolar.

Tradicionalmente, las parasitosis están ubicadas dentro de padecimientos del tracto gastrointestinal; sin embargo, existen parasitosis que afectan otros órganos y tejidos, como es el caso de la triquinosis y de la amibiasis invasora, la cual es responsable de unas 100,000 muertes al año. También existen las parasitosis causadas por parásitos externos, como los ácaros, piojos, garrapatas, etc.

Los tratamientos antiparasitarios masivos constituyen una modalidad que en muchos países han logrado controlar el problema de las altas prevalencias de parasitosis. Los fármacos de elección para el tratamiento de las protoósis son nitroderivados, como el metronidazol, la furoxona y recientemente, la nitazoxanida. Sin embargo, la mayoría de estos agentes terapéuticos tienen efectos secundarios severos, como generación de estrés oxidativo, mutaciones y cáncer. En el caso de las helmintiasis, los fármacos de elección son los bencimidazol-2-carbamato de metilo (BC), como el albendazol (ABZ) y mebendazol (MBZ). Aunque estos fármacos no tienen efectos secundarios severos, su uso está limitado al tratamiento de las parasitosis del tracto gastrointestinal, debido a su alta polaridad, pobre absorción y baja biodisponibilidad. Sin embargo, a pesar de su amplio espectro de actividad, el uso de dosis inapropiadas resulta en la generación de resistencia por los parásitos a este tipo de fármacos.

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

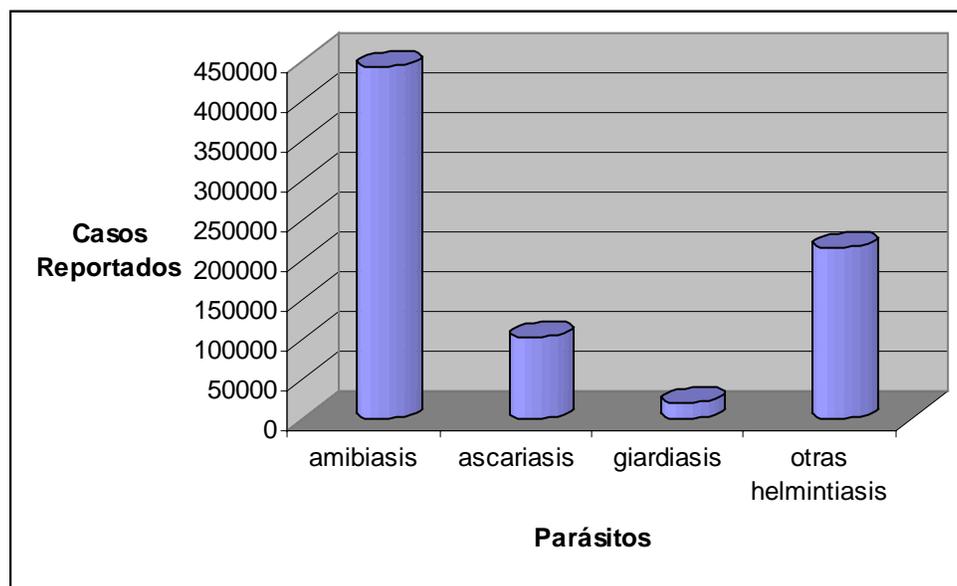
Considerando la alta prevalencia de las enfermedades causadas por los parásitos, las cualidades antiparasitarias de los nitroderivados y BC, así como sus desventajas, es necesaria la creación de nuevas moléculas para su uso en la terapia de las enfermedades parasitarias en humanos y animales; es por tal motivo que el presente trabajo presenta la síntesis de cuatro nuevos derivados bencimidazol-2-carbamato de metilo, así como su evaluación *in vitro* sobre los protozoarios: *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *T. vaginalis*. Con ello se pretende contribuir al enriquecimiento de una base de datos generada en el laboratorio E-122 de la Facultad de Química sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria

2. ANTECEDENTES

2.1. Panorama actual de las parasitosis en México

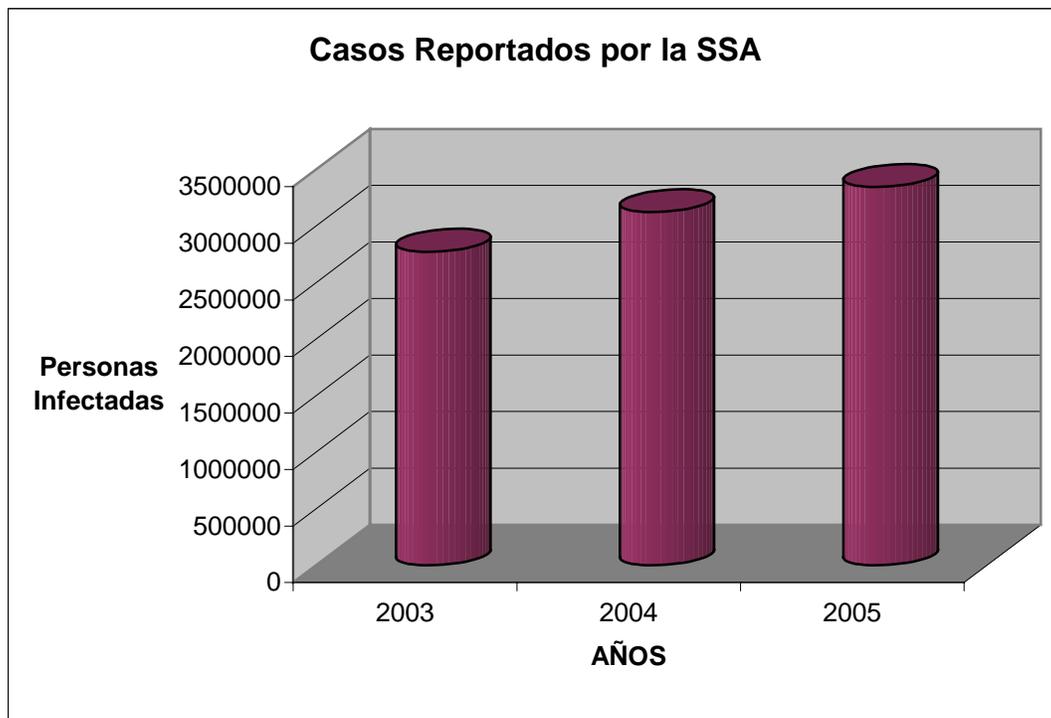
Las zoonosis parasitarias representan un problema de salud en todo el mundo; sin embargo, es en los países en vías de desarrollo y los subdesarrollados donde se presentan con mayor prevalencia.^{1,2} En México, las parasitosis intestinales causadas por protozoarios y nematodos transmitidos por el suelo continúan estando en nuestro país dentro de las primeras 20 causas de enfermedad. La amibiasis, las helmintiasis, la ascariasis, giardiasis y oxiuriasis son las enfermedades intestinales más frecuentes, con tasas/100,000 habitantes tan altas como >1,500 en el caso de la amibiasis en sus diferentes formas clínicas.³ Las infecciones causadas por protozoarios son causa significativa de morbilidad y mortalidad. Los pacientes típicamente presentan dolor abdominal y diarrea, incluyendo contracción del músculo abdominal y dolor. Aunque muchos protozoarios pueden causar estos síntomas, las infecciones por *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* son los más comúnmente reportados.⁴⁻⁶ (Gráfica 1).

Datos reportados del 2005 hasta la semana 31



Gráfica 1. Frecuencia de parásitos en México.⁶

En la **Gráfica 2** se muestra la prevalencia de las enfermedades infecciosas intestinales reportadas por la Dirección General de Epidemiología de la SSA en la semana 31 del 2003-2005.⁶ En dicha gráfica podemos apreciar un mayor número de personas infectadas, a pesar del incremento de las medidas higiénicas, sanitarias y tratamiento masivo con fármacos antiparasitarios. En un principio, esta última medida fue de gran utilidad en el control de las infecciones parasitarias; sin embargo, a últimas fechas su uso ha favorecido la existencia de parásitos resistentes.⁷



Gráfica 2. Prevalencia de las parasitosis en México.⁶

2.2. Los protozoarios

Los protozoarios son organismos unicelulares que desempeñan todas las funciones de un organismo vivo. Estos organismos se encuentran incluidos dentro del reino protista, es decir que son organismos que están dotados de un núcleo verdadero. Las protozoosis de mayor prevalencia son las entamobosis (*Entamoeba histolytica*), giardiasis (*Giardia intestinalis*) y cryptosporidiasis (*Cryptosporidium sp*) que se relacionan con diarreas agudas y crónicas. El fármaco de elección es el metronidazol, cuya molécula tiene un núcleo de imidazol. Este fármaco puede ser utilizado también como amebicida y tricomonicida.⁸

2.2.1. Amibiasis

La amibiasis es la infección causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Las amibas, normalmente presentes en el intestino grueso, ocasionalmente penetran la mucosa intestinal y pueden diseminarse a otros órganos. *E. histolytica* es responsable de unas 100.000 muertes por año, lo que coloca a la amibiasis en segundo lugar, después de la malaria, en mortalidad por parásitos protozoarios. Se sabe que muchas personas infectadas con *E. histolytica* nunca desarrollan síntomas y estas infecciones desaparecen espontáneamente, lo que sugirió la explicación de que había dos especies: una capaz de causar enfermedad invasora y otra que nunca causa enfermedad, a la que se le llamó *Entamoeba dispar*. La *E. histolytica* puede causar enfermedad invasora intestinal y extraintestinal, contrario a *E. dispar*.³

Ciclo vital

El protozoario existe en dos formas evolutivas: trofozoíto y quiste. La infección se adquiere por la ingestión del quiste maduro (tetranucleado), que es resistente a los jugos gástricos. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. Del quiste sale una amiba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una ameba de 8 núcleos. Posteriormente, ésta se fragmenta en 8 pequeñas amibas, llamadas amébulas metaquísticas.

Éstas se transforman en los trofozoítos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y restos celulares. Seguidamente los trofozoítos pueden enquistarse, proceso aparente estimulado por condiciones lumbinales no ideales para los trofozoítos. Después de ser eliminados con las heces, los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales. La infección no se transmite por trofozoítos, los que pueden ser excretados durante los períodos de colitis aguda, debido a que se desintegran rápidamente fuera del cuerpo ya que se destruyen con el jugo gástrico. La infección puede producirse con tan sólo un quiste en el agua o alimentos contaminados. Con inóculos más grandes, el período de incubación puede acortarse en unos pocos días en vez de 1-2 semanas.⁵

La infección por *Entamoeba histolytica* (**Fig. 1**), ocurre por ingestión de quistes maduros (1) en alimentos, agua o manos contaminadas con heces. El desenquistamiento (2) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos (3) son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes (4) que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de la transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente; en muchos casos, éstos permanecen confinados en la luz intestinal (A, infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal) o, a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones cerebro etc. (C: enfermedad extraintestinal). La transmisión también puede ocurrir por exposición fecal durante el contacto sexual (en tal caso no solo los quistes sino también los trofozoítos son infectantes).³

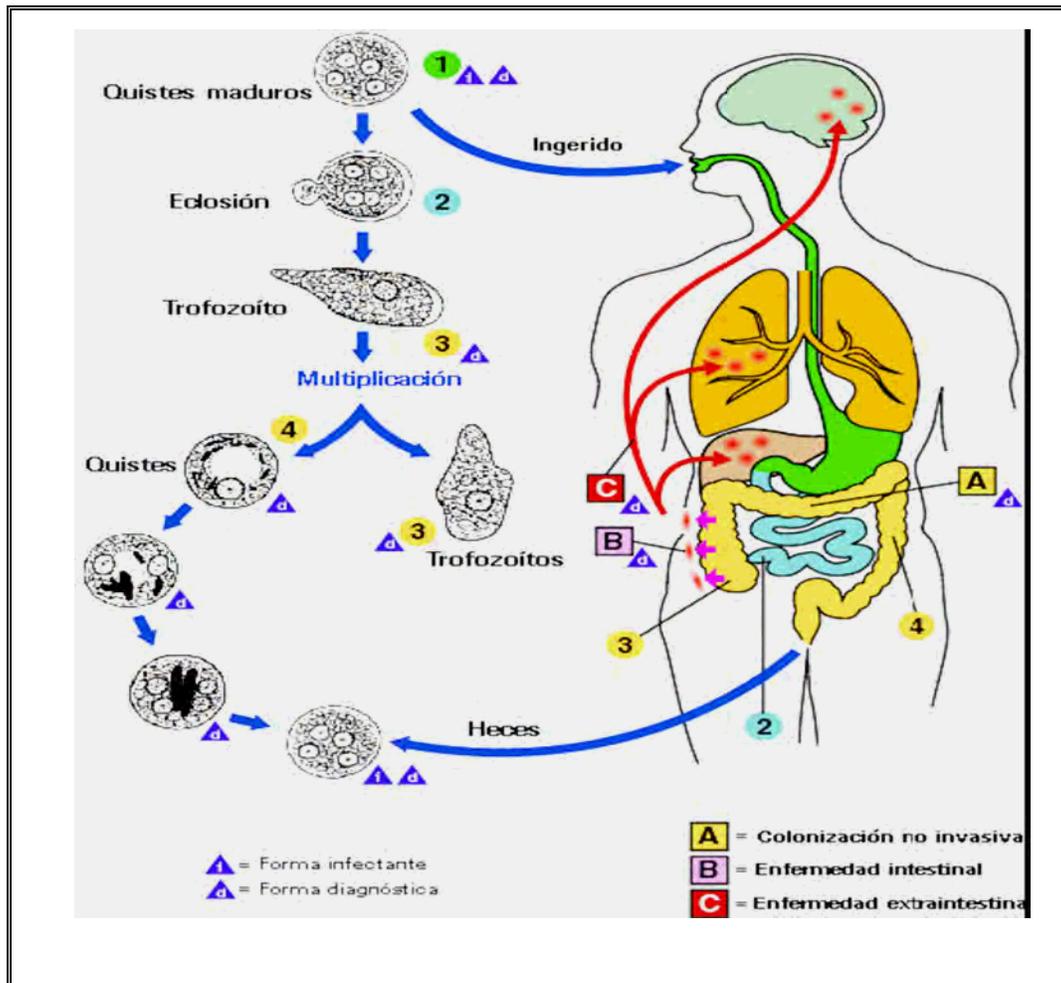


Figura 1. Ciclo vital de *Entamoeba histolytica*.

2.2.2. Giardiasis

Giardia intestinalis, también conocida como *Giardia duodenalis* y *Giardia lamblia*, es el agente causal de la *Giardiasis*.⁹ El habitat de *Giardia intestinalis* se encuentra en el duodeno, y por esto en el pasado se le conocía como *G. duodenalis*. Es un protozoo arcoflagelado, anaerobio tolerante y es causa común de diarrea endémica y epidémica en todo el mundo. Se ve particularmente en episodios de diarrea transmitida por el agua, en niños en guarderías. También contribuye a la diarrea crónica en el mundo desarrollado y en desarrollo.^{9,10} Aunque no es una causa importante de mortalidad, su fisiopatología tiene graves implicaciones en las tasas de crecimiento de la población infantil.¹¹⁻¹²

Ciclo vital

El ciclo vital de *G. intestinalis* (**Fig. 2**) tiene dos estadios: el estadio de vida libre o trofozoíto y el quiste.¹⁰ El trofozoíto es el responsable de las manifestaciones clínicas y el quiste el de la transmisión del parásito. Los trofozoítos colonizan primariamente el yeyuno, aunque algunos organismos pueden encontrarse en el duodeno y, rara vez, en el íleon, vías biliares o vesícula biliar. El pH óptimo de desarrollo oscila entre 6.4 y 7.2. Esta predilección de los trofozoítos por el yeyuno sugiere que requieren una alta concentración de nutrientes para su supervivencia y proliferación, especialmente los que el parásito no es capaz de sintetizar *ex novo*, como el colesterol, elemento fundamental para la biogénesis de sus membranas y en el proceso de enquistación de los trofozoítos a lo largo del intestino.¹²

Algunos de los síntomas producidos por la giardiasis¹²

Síntomas	%
Diarrea	63
Déficit de absorción de lactosa	60
Estreñimiento	55
Déficit de absorción de B 12/ Fólico	45
Flatulencia	46
Esteatorrea	44
Dolor/distensión abdominal	32
Fatiga	28
Anorexia/ náuseas	20
Pérdida de peso	18
Vómitos	5
Moco en heces	4
Fiebre	2

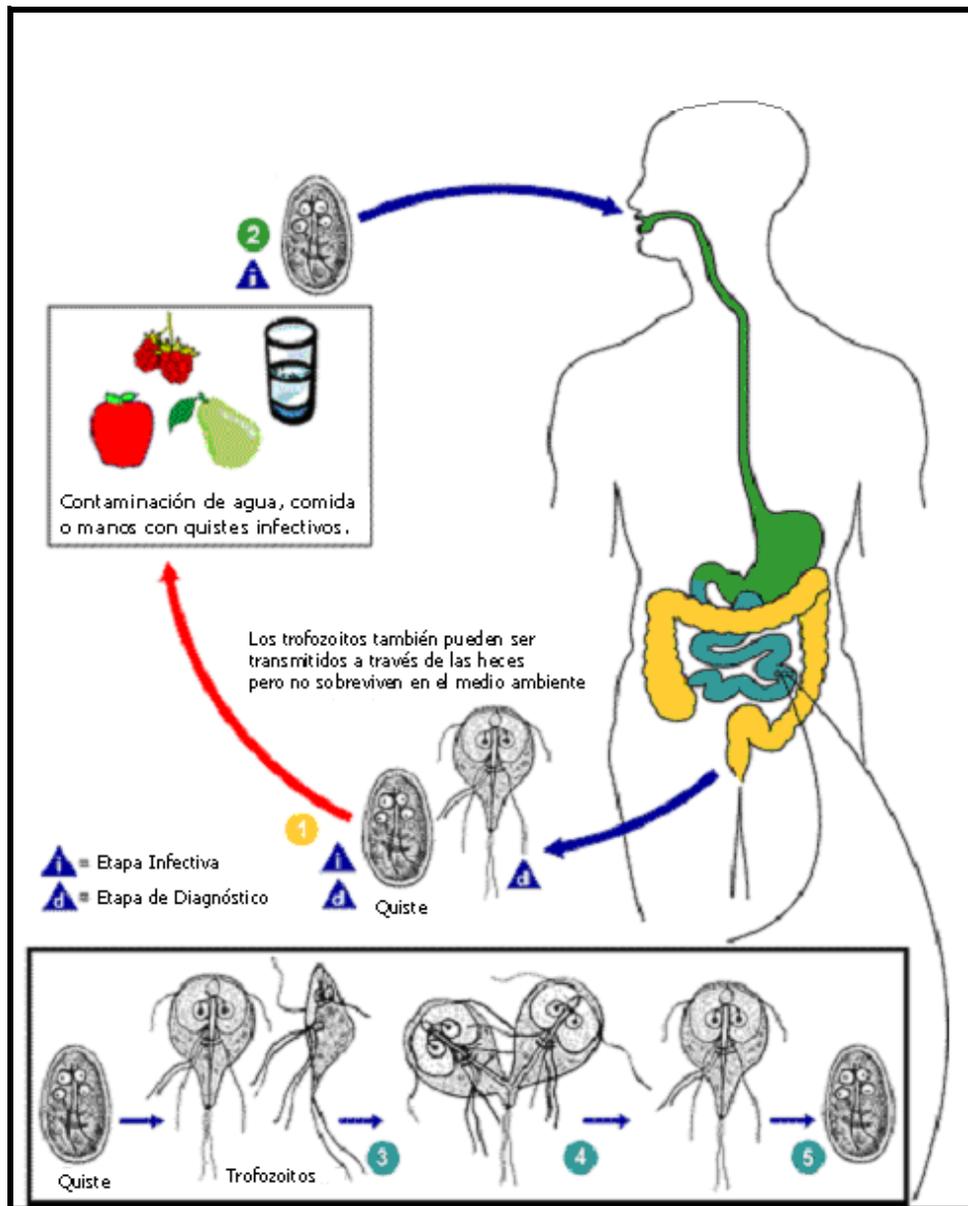
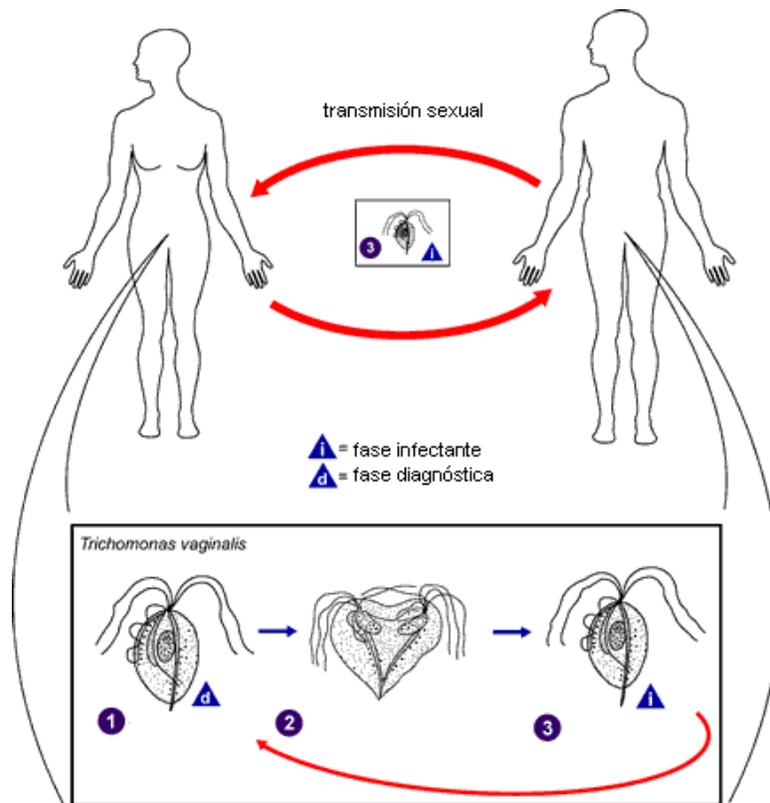


Figura 2. Ciclo vital de *Giardia intestinalis*.^{13, 14}

2.2.3. Tricomonirosis

La tricomonirosis es causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, un protozoo de forma ovoide o periforme, flagelado. El trofozoito mide de 10-30 μ de longitud y 10-18 μ de ancho. El hombre es el único huésped natural conocido. El parásito se reproduce en las mucosas de las vías urinarias y genitales en la forma de trofozoito. Esta misma forma es la infectante por contacto directo, pues no existe el quiste. Es predominante en mujeres y es la infección más común que se transmite sexualmente. La Organización Mundial de la Salud estima que 180 millones de infecciones se producen anualmente.¹⁵

En la **Figura 3** se muestra el ciclo vital de *Trichomonas vaginalis*.



1. Trofozoito en vagina y en orificio de la uretra.
2. Trofozoito en secreciones vaginales, prostáticas y en orina.
3. Multiplicación por fisión binaria longitudinal.

Figura 3. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.¹⁶

El trofozoíto se pega a las membranas mucosas por medio de cuatro proteínas de superficie que regulan esta adherencia. Los factores que predisponen el desarrollo de la trichomonosis en la mujer son: pH de la vagina menos ácido de lo normal, entre 5 y 6; ausencia o disminución de la flora bacteriana normal, principalmente bacilo de Doderlein y deficiencia de estrógenos que disminuyen el glicógeno de las células vaginales. El parásito produce erosiones en la superficie de las mucosas de vagina y uretra, con intensa reacción inflamatoria hasta el corion. Las manifestaciones clínicas en la mujer están asociadas en la producción de flujo vaginal y disuria.¹⁵

2.3. Tratamientos Antiparasitarios

El control de las helmintiasis en países desarrollados se ha alcanzado a través de una gran variedad de métodos, los cuales incluyen quimioterapia, mejoras a la educación, sanidad e higiene.¹⁷ Sin embargo, un número de helmintos que pertenecen a la clase nematoda, cestoda y trematoda son capaces de invadir musculatura, circulación sanguínea, hígado, pulmones y cerebro produciendo un problema más serio que aquellos que habitan la zona gastrointestinal. La quimioterapia de esta clase de parásitos es algo difícil debido al índice terapéutico. Sin embargo, el tratamiento de algunas helmintosis que se diseminan en tejido es satisfactorio, mientras que otros necesitan mejores fármacos.¹⁸

Se cuenta con antiparasitarios luminales y tisulares, los cuales tienen actividad contra las diferentes especies de protozoarios intestinales patógenos y no patógenos para el hombre. Dentro de los antiparasitarios luminales eficientes en el tratamiento de la amibiasis se encuentra la diyodohidroxiquinoleína, el furoato de diloxanida y la paramomicina. Dentro de los amebicidas tisulares más efectivos están la emetina y la dehidroemetina que actúan en las formas invasoras intestinales y extraintestinales de amibiasis. Otros antiamebianos, que actúan tanto en el lumen intestinal como en los tejidos, son el metronidazol y los derivados de los nitroimidazoles, tales como el tinidazol y el ornidazol.⁸

Dos bencimidazoles derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo), el albendazol y el mebendazol (**Figura 4**) se han usado, y se siguen usando, como antihelmínticos; se sabe que su mecanismo de acción es a través de su enlace directo a la tubulina, por lo que el albendazol y mebendazol resultaron atractivos para su evaluación giardicida.¹⁹

En estudios *in vitro*, el albendazol mostró mayor potencia giardicida que el metronidazol.^{19,20} Sin embargo, en estudios *in vivo* la actividad del albendazol fue similar a la del metronidazol; esto al parecer se debe a dos factores importantes: la baja solubilidad acuosa del albendazol (0.0001 mg/mL) y el corto tiempo de exposición del parásito al fármaco, como ya se mencionó, *G. intestinalis* coloniza el duodeno y el yeyuno donde el tiempo de permanencia del contenido intestinal es de 2 a 2.5 horas.⁸

El albendazol, levamisol, mebendazol y pirantel son los fármacos antihelmínticos incluidos en la lista de los fármacos esenciales de la OMS para el tratamiento de nematodos intestinales.³ Dentro del campo de la farmacoterapia con antiparasitarios, recientemente se ha desarrollado un fármaco con amplio espectro y que parece ser eficiente en infecciones por helmintos y protozoarios intestinales; este es la nitazoxanida, utilizada en el tratamiento de infecciones por *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*.³ En las **Figuras 4 y 5** se muestra la estructura del tiabendazol y los fármacos utilizados en la quimioterapia parasitaria.

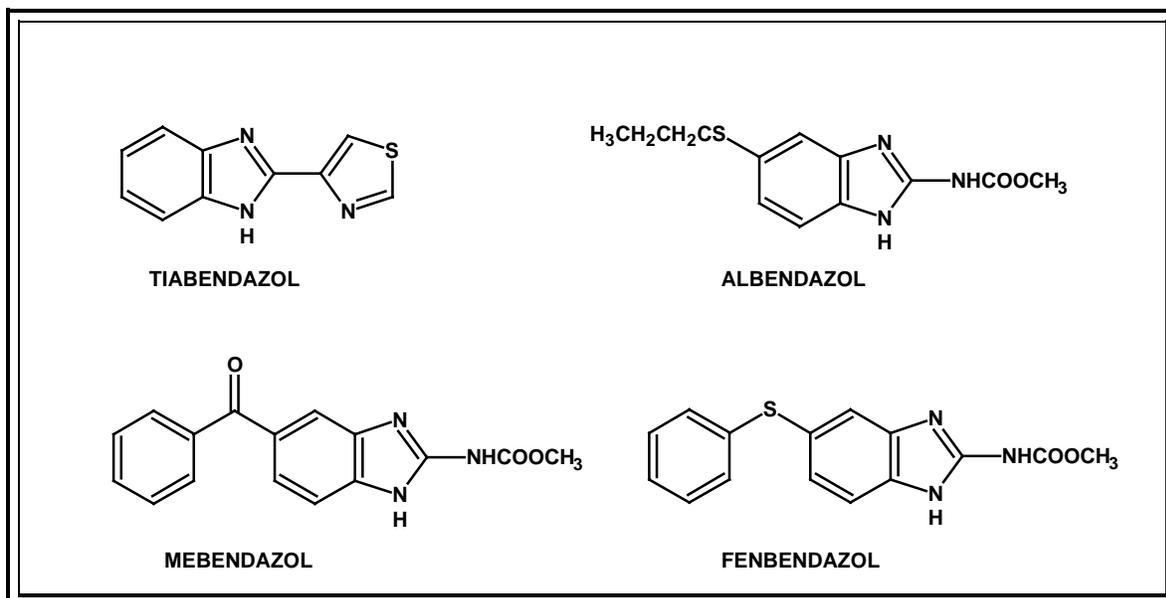


Figura 4. Estructura del Tiabendazol y los fármacos bencimidazólicos utilizados en el tratamiento de las infecciones parasitarias.

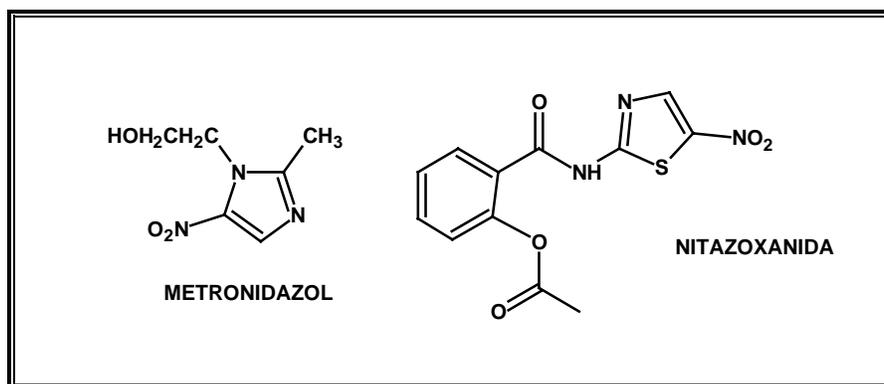
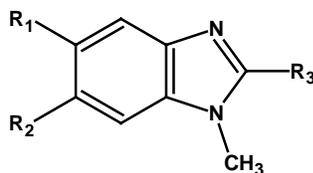


Figura 5. Agentes antiprotozoarios utilizados en la terapéutica.

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. En la posición 2 se sustituyeron los grupos: $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SH}$ y $-\text{SCH}_3$.²¹ Están sustituidos en las posiciones 5 y/ó 6 o no hay sustitución en estas posiciones. La introducción de un grupo metilo en posición 1 se consideró con el propósito para saber la importancia del H en la posición 1 del bencimidazol en la actividad antiprotozoaria, empleando pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *G. intestinales* y *E. histolytica*. Los resultados de este estudio demostraron que los 1-metilbencimidazoles fueron activos, destacando el compuesto **3**, que resultó ser más efectivo que el metronidazol y albendazol. La actividad contra *E. histolytica* también fue considerable, ya que los compuestos **3** y **5** fueron más activos que la nitazoxanida, que a su vez, es más activa que el metronidazol y el albendazol.²¹

Tabla 1. Evaluación biológica de los 1-metilbencimidazoles²¹



COMPUESTO	Cl ₅₀ μM <i>E. histolytica</i>	Cl ₅₀ μM <i>G. intestinalis</i>	-R ₁	-R ₂	-R ₃
SERIE A					
1	0.062	0.089	H	H	CH ₃
2	0.346	1.365	H	H	NH ₂
3	0.006	0.018	H	H	SH
4	0.192	0.034	H	H	SCH ₃
SERIE B					
5	0.005	0.144	Cl	H	CH ₃
6	0.061	0.242	Cl	H	NH ₂
7	0.010	0.045	Cl	H	SH
8	0.038	0.028	Cl	H	SCH ₃
SERIE C					
9	0.205	0.440	H	Cl	CH ₃
10	0.248	0.132	H	Cl	NH ₂
11	3.771	0.020	H	Cl	SH
12	0.569	0.122	H	Cl	SCH ₃
SERIE D					
13	0.014	0.056	Cl	Cl	CH ₃
14	0.037	0.074	Cl	Cl	NH ₂
15	0.129	0.008	Cl	Cl	SH
16	1.049	0.024	Cl	Cl	SCH ₃
Nitazoxanida	0.055	0.013			
Albendazol	56.60	0.0377			
Metronidazol	0.350	1.228			

En las **Figuras 6 y 7**, se muestra el daño producido por algunos de los compuestos de la **Tabla 1**. Claramente observamos la diferencia del modo de acción de los compuestos 1-metilbencimidazoles-2-sustituidos, así como del albendazol, el cual destruye el disco de adhesión debido a la gran cantidad de tubulina presente en dicho disco, por lo que se supone que el mecanismo de acción de los 1-metilbencimidazoles es diferente al del albendazol.

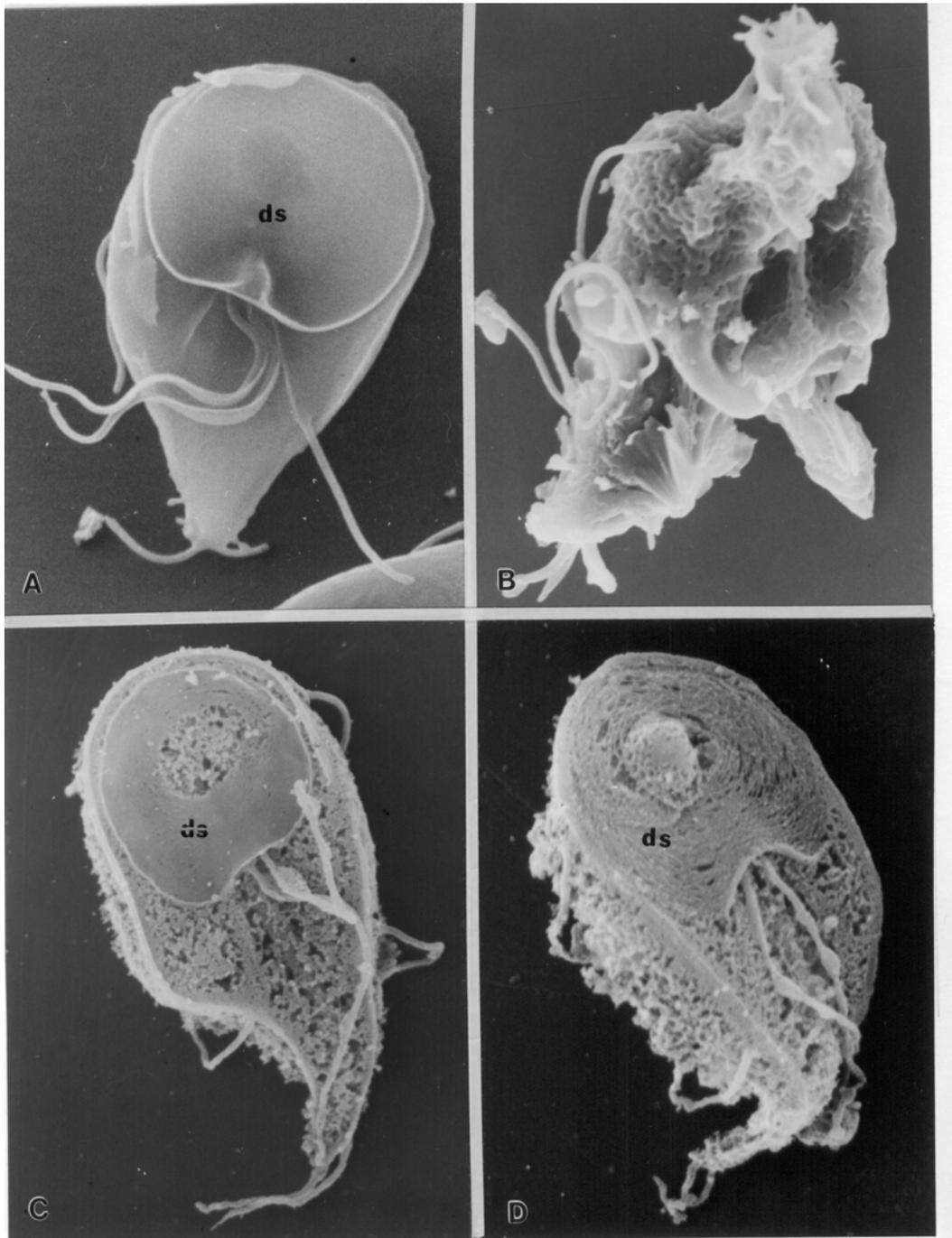


Figura 6. Microscopia electrónica de barrido de los trofozoítos de *G. intestinalis* cultivados en presencia de albendazol (B), compuesto **12** (C) y el compuesto **9** (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de diferentes bencimidazoles a 1µg/ml por 24 h a 37°C. El control fueron los parásitos cultivados sin fármaco (A). ds: disco de adhesión.²¹

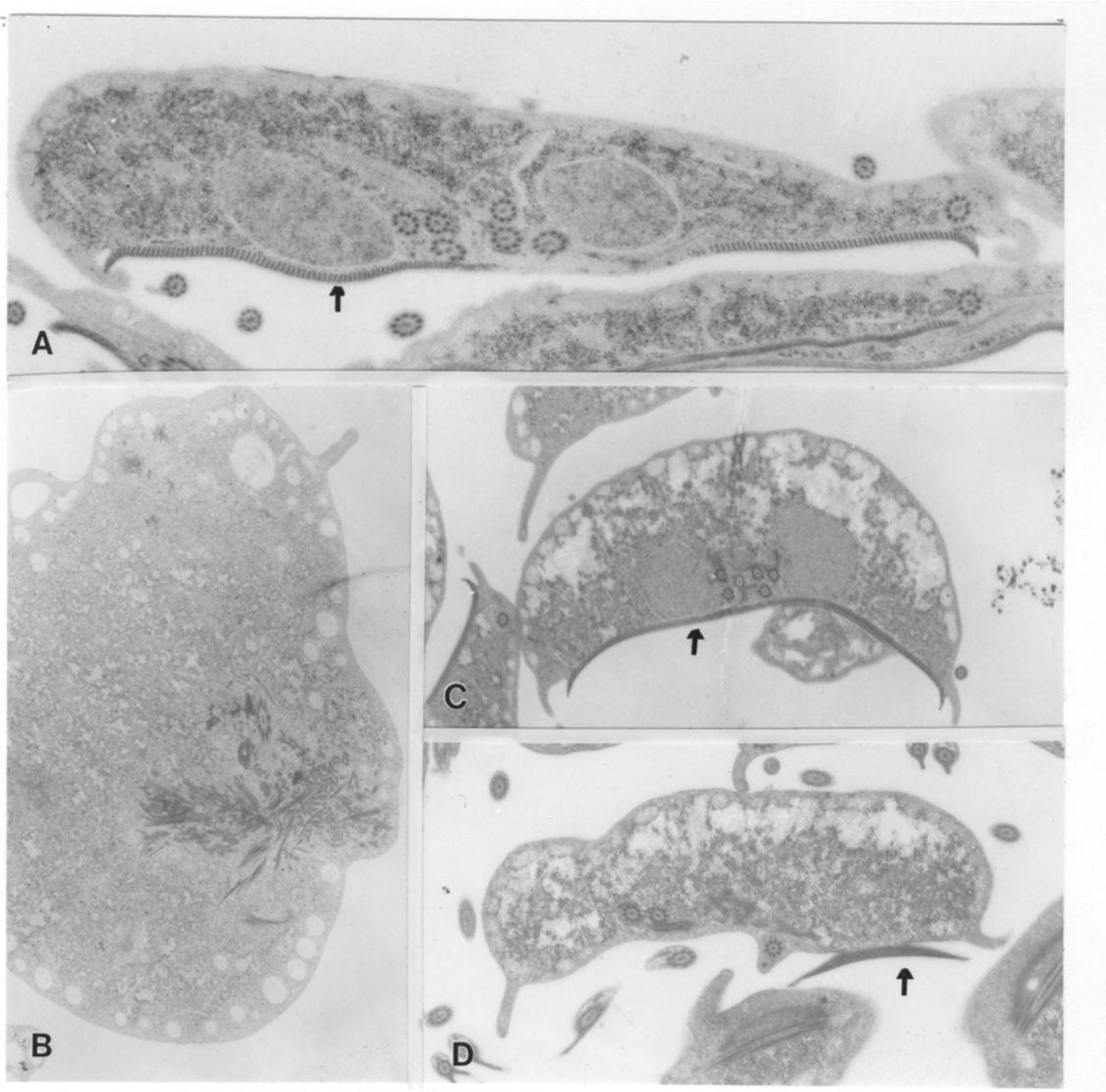
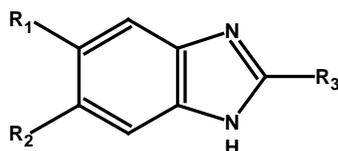


Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de *G. intestinalis* cultivados en presencia de albendazol (B), **13** (C) y **9** (D). Los parásitos se cultivaron en presencia de los diferentes bencimidazoles a 1µg/ml por 24 h a 37°C. El control fue los parásitos cultivados sin fármaco (A). La flecha indica el disco de adhesión.²¹

Además, también se determinó la actividad antiprotozoaria de los 1*H*-bencimidazoles 2-sustituídos, análogos a los compuestos de la **Tabla 1**, pero se anexó a esta serie a los 1*H*-2-carbamatos de metilo correspondientes.²² De estos trabajos se encontró que no es necesario el H en la posición 1 para la actividad antiprotozoaria.

Así mismo, también se realizaron estudios de inhibición de la polimerización de tubulina de cerebro de rata y se encontró que únicamente los (1*H*-bencimidazol-2-il) carbamatos de metilo inhibieron este proceso.²²⁻²³ Por lo que se presupone que estos compuestos actúan de forma distinta a los 1-metilbencimidazoles. Sin embargo, no se puede decir nada con respecto a los (1*H*-bencimidazol-2-il) carbamatos de metilo y sus análogos 1-metilados ya que éstos no se habían sintetizado, hasta este trabajo.

Tabla 2. Actividad de los 1*H*-Bencimidazoles^{22, 24}



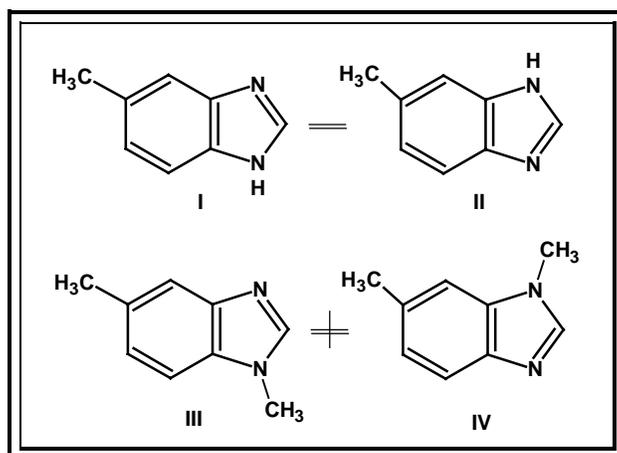
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)	
				<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>
1	H	H	CH ₃	0.317	0.007
2	H	H	NH ₂	1.902	0.114
3	H	H	NHCO₂CH₃	0.057	0.204
4	H	H	SH	0.04	0.133
5	H	H	SCH ₃	0.045	0.393
6	H	H	H	0.008	0.042
7	Cl	H	CH ₃	0.156	0.084
8	Cl	H	NH ₂	0.03	0.125
9	Cl	H	NHCO₂CH₃	0.066	0.35
10	Cl	H	SH	0.081	0.005
11	Cl	H	SCH ₃	0.005	0.192
12	Cl	H	H	0.282	0.039
13	Cl	Cl	CH ₃	0.065	0.025
14	Cl	Cl	NH ₂	0.218	0.059
15	Cl	Cl	NHCO₂CH₃	0.127	0.046
16	Cl	Cl	SH	0.078	0.055
17	Cl	Cl	SCH ₃	0.227	0.356
18	Cl	Cl	H	0.358	0.096
Albendazol				0.037	56.33
Mebendazol				1.22	0.35

2.4. Los bencimidazoles

El descubrimiento del bencimidazol como fármaco de amplio espectro y como molécula potencialmente activa con propiedades antiparasitarias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antihelmínticas, entre otras, lo sitúa como un heterociclo versátil.²⁵⁻²⁷

El núcleo del bencimidazol, como su nombre lo implica, es un biciclo, en el cual, el benceno está fusionado a las posiciones 4 y 5 de un heterociclo, el imidazol.

Aunque en la estructura del bencimidazol se dibuja con protón en N1, éste sufre un rápido cambio entre los átomos de nitrógeno, generando los tautómeros I y II, cuando la sustitución en el anillo es asimétrica. Los compuestos que no están sustituidos en algún átomo de nitrógeno del anillo del imidazol poseen características tanto básicas como ácidas.²⁸ Cuando el bencimidazol está *N*-sustituido el tautomerismo no es posible, ya que se generan dos moléculas que no son equivalentes (III y IV) que pueden ser aislados y caracterizadas.²⁸

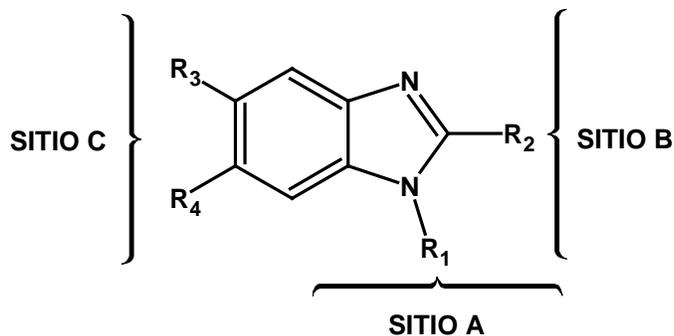


Esquema 1. Tautomerismo e isomerismo.²⁸

El descubrimiento en 1961 del 2-(1,3-tiazol-4-il)-1*H*-benzimidazol (tiabendazol), el cual posee un amplio espectro de actividad contra parásitos gastrointestinales, abrió una nueva era en el tratamiento de las enfermedades parasitarias. Sin embargo, el tiabendazol se metaboliza fácilmente por hidroxilación aromática, generando el 5-hidroxitiabendazol, el cual se elimina rápidamente, reduciendo así la efectividad del fármaco.²⁸

Posteriormente, apareció una nueva generación de benzimidazoles sustituidos en la posición 5 para evitar el metabolismo en dicha posición, y en la posición 2 un grupo carbamato de metilo, para aumentar la vida media de los nuevos antihelmínticos, con la desventaja de ser pobremente absorbidos, lo que impide su acción a nivel sistémico.²⁸ En adición, el reciente desarrollo de resistencia que ocurre con los fármacos disponibles por ciertos parásitos ha permitido el desarrollo de nuevos tipos de benzimidazoles carbamatos.²⁹ Ejemplos de estos fármacos son el mebendazol, albendazol y flubendazol.

2.5. Relación Estructura-Actividad (SAR) biológica de los bencimidazoles



Los estudios SAR de un gran número de compuestos bencimidazólicos han permitido establecer los siguientes datos:

Sitio A:

La nucleofilia del nitrógeno en la posición 3 ha sido utilizada para sintetizar una gran cantidad de 1-alkil, 1-aryl, 1-arylalquil y 1-acilbencimidazoles para comprender la importancia que juega al átomo de hidrogeno en la actividad antihelmíntica de los bencimidazoles, además de evitar el efecto tautomérico que presenta la molécula.¹⁸ El resultado de estos estudios indican que el hidrógeno en 1 es importante para la actividad.

Sitio B:

Los cambios en la naturaleza del sustituyente en la posición 2 del bencimidazol juegan un papel muy importante en el perfil antiparasitario de la molécula resultante, se ha realizado una gran variedad de modificaciones estructurales en esta posición.^{18, 30} Para una buena actividad antihelmíntica el mejor grupo es el carbamato de metilo, aunado al hidrógeno en posición 1

Sitio C:

La presencia de un grupo farmacofórico en las posiciones 5(6) de los bencimidazoles 2-sustituidos es un factor importante para determinar el perfil biológico de estos compuestos.

La introducción de varios sustituyentes en la posición 5 no necesariamente aumenta la potencia. R₃ previene de la inactivación metabólica, como la hidroxilación. Clorados en R₄ presentan buena actividad.^{18, 24, 30, 31}

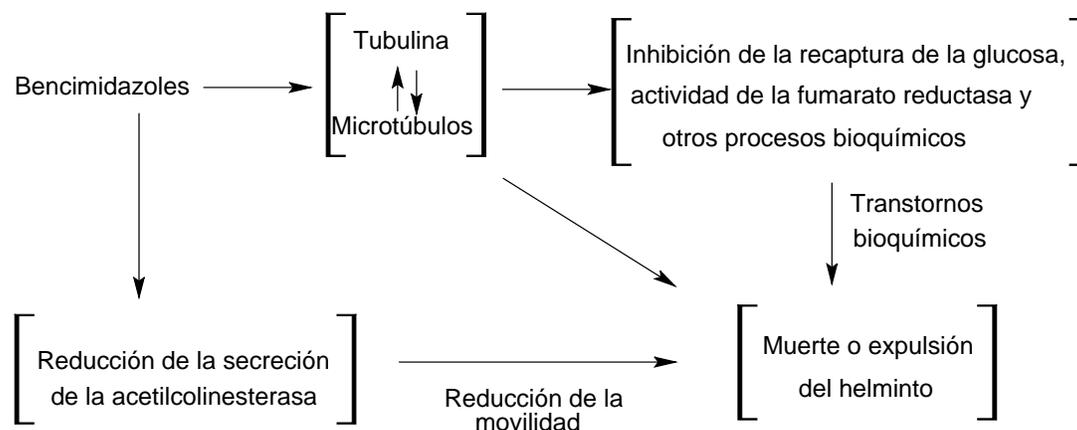
Sin embargo poco se sabe sobre los estudios SAR para los antiprotozoarios.

2.6. Mecanismos de acción de los bencimidazoles

El modo de acción de los bencimidazoles antihelmínticos ha sido extensamente estudiado, no así como antiprotozoarios. El trabajo realizado en esta área indica que los bencimidazoles antihelmínticos pueden ejercer su acción inhibiendo la polimerización de la tubulina para formar los microtúbulos, inhibiendo el metabolismo energético o la recaptura de la glucosa en los parásitos, principalmente.¹⁸

2.6.1. Inhibición del metabolismo de la glucosa

La enzima fumarato reductasa, responsable de convertir el fumarato en succinato en la mitocondria, juega un papel importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa y la producción energética eventual en muchos helmintos. Así, la inhibición de esta enzima se ha considerado como el alto en la fuente energética del helminto, lo que conduce a su parálisis. Esta enzima es única de los parásitos y, por lo tanto, proporciona un blanco excelente para el ataque quimioterapéutico (**Esquema 2**).^{18, 31}



Esquema 2. Mecanismos de acción de los bencimidazoles.¹⁸

El tiabendazol, cambendazol, fenbendazol y el oxfendazol causan inhibición de la enzima fumarato reductasa en cultivos aislados de *A. suum* y *H. contortus*. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado la inhibición en la actividad de esta enzima en larvas de *Trichinella spiralis* tratadas con tiabendazol.¹⁸

2.6.2. Inhibición en la recaptura de la glucosa

El mebendazol interfiere tanto *in vitro* como *in vivo* con la recaptura de la glucosa en nematodos y cestodos. El bloqueo de la recaptura de glucosa o de su transporte hace que disminuya la síntesis de ATP produciendo una depleción de energía en el parásito que lo conduce a la muerte.^{18,31}

2.6.3. Inhibición de la polimerización de Tubulina

La teoría más reciente se basa en su capacidad de unión *in vitro* e *in vivo* a la tubulina, un componente importante del citoesqueleto de todas las células vivas.³¹

La tubulina forma parte de los microtúbulos, organelos intracelulares que tienen una gran 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 interviene en la exocitosis.³²⁻³³

Los microtúbulos están compuestos de subunidades α y β de tubulina, aproximadamente de 50 KDa cada una. Estructuralmente, ambas unidades son proteínas heterogéneas. Los microtúbulos están en equilibrio dinámico con la tubulina, la relación de tubulina dimérica y los microtúbulos 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 vivo* como *in vitro* por sustancias exógenas conocidas como inhibidores de microtúbulos.³³ El resultado de algunos de estos inhibidores es a través de su unión a la tubulina evitando la asociación de las subunidades para el crecimiento de los microtúbulos.

Esto es el resultado de un tapón en el extremo donde se lleva a cabo la asociación de microtúbulos, perdiéndose la capacidad de alargamiento de los mismos.³⁴ 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 solo unirse al extremo de elongación. Al unirse los bencimidazoles, en particular los (1*H*-bencimidazol-2-il) carbamatos de metilo, 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.³²

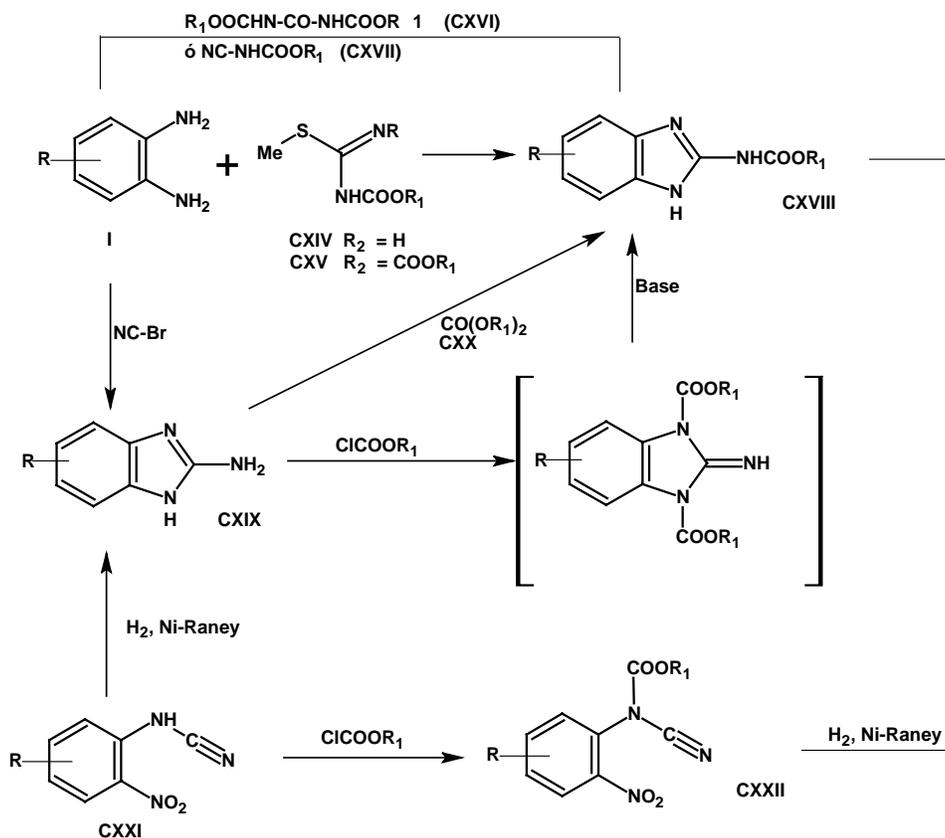
Los bencimidazoles tienen una acción selectiva sobre las células de mamíferos y de nematodos. Estudios *in vivo* demostraron que el febendazol y el mebendazol fueron respectivamente 250 y 400 veces más potentes como inhibidores de tubulina de *A. suum*, en comparación con la tubulina de mamíferos. La diferencia de la afinidad de unión a tubulina de nematodos y mamíferos explica la acción selectiva de los bencimidazoles contra helmintos.³²

2.7. Métodos generales de síntesis de bencimidazol-2-carbamatos de metilo

Prácticamente todas las síntesis de los bencimidazoles empiezan con derivados del benceno sustituidos con grupos nitrogenados, generalmente se llega a la 1,2-fenilendiamina adecuadamente sustituida, para después condensarla y formar el bencimidazol.³⁴

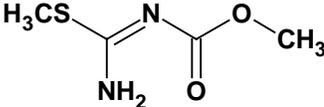
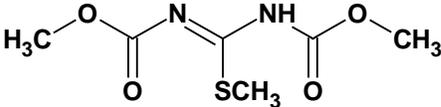
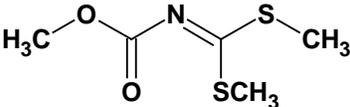
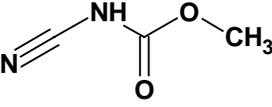
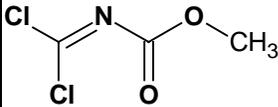
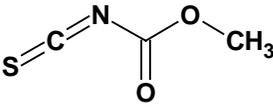
Los bencimidazol 2-carbamatos generalmente se sintetizan por condensación de *o*-fenilendiaminas (I) con 1-carbalcoxi-*S*-metilisotiourea (CXIV), 1,3-dicarbalcoxi-*S*-metilisotiourea (CXV), 1,3-dicarbalcoxiurea (CXVI) o *N*-carbalcoxicianamida (CXVII). Alternativamente, I puede convertirse a 2-aminobencimidazol (CXIX) por reacción con bromuro de cianógeno y tratarse con cloroformatos de alquilo o acetales (CXX) para formar CXVIII. Sin embargo, se puede obtener CXVIII con buenos rendimientos por reacción de CXIX, generado *in situ*, con cloroformatos de alquilo.

El precursor CXXI del 2-aminobencimidazol (CXIX) también puede ser usado para preparar CXVIII por reacción de cloroformatos de alquilo seguido de la reducción por ciclación reductiva que resulta en el intermediario CXXII, que con una hidrogenación y con catalizador Ni-Raney da CXVIII **Esquema 3**.³¹



Esquema 3. Métodos reportados para la síntesis de benzimidazol-2-carbamatos de metilo.

Las estructuras químicas de los compuestos usados para la formación final de los benzimidazol-2-carbamatos de metilo se muestran en el **Esquema 4**.²⁸

Estructura	Nombre
	[(1 <i>E</i>)-Amino(metiltio)metilen]carbamato de metilo
	[(<i>Z</i>)-(Metiltio)metiliden]biscarbamato de metilo
	(Metoxicarbonil)ditioimidocarbonato de dimetilo
	Cianocarbamato de metilo
	(Diclorometilen)carbamato de metilo
	Isotiocianatidocarbonato de metilo

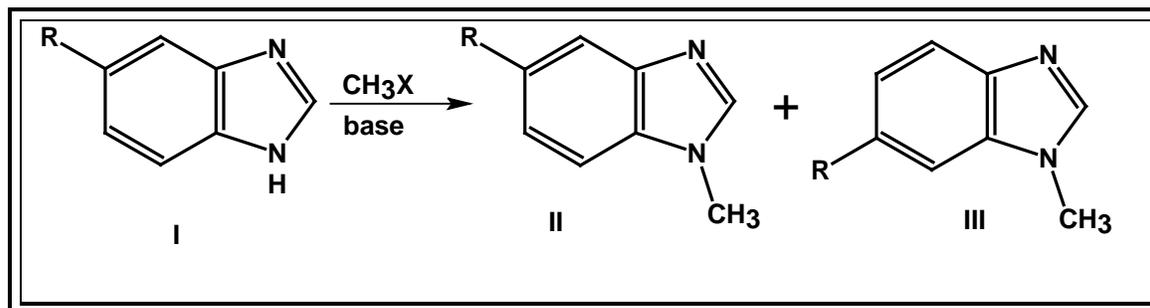
Esquema 4. Compuestos utilizados para formar (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo.

2.8. Síntesis de 1-metilbencimidazoles

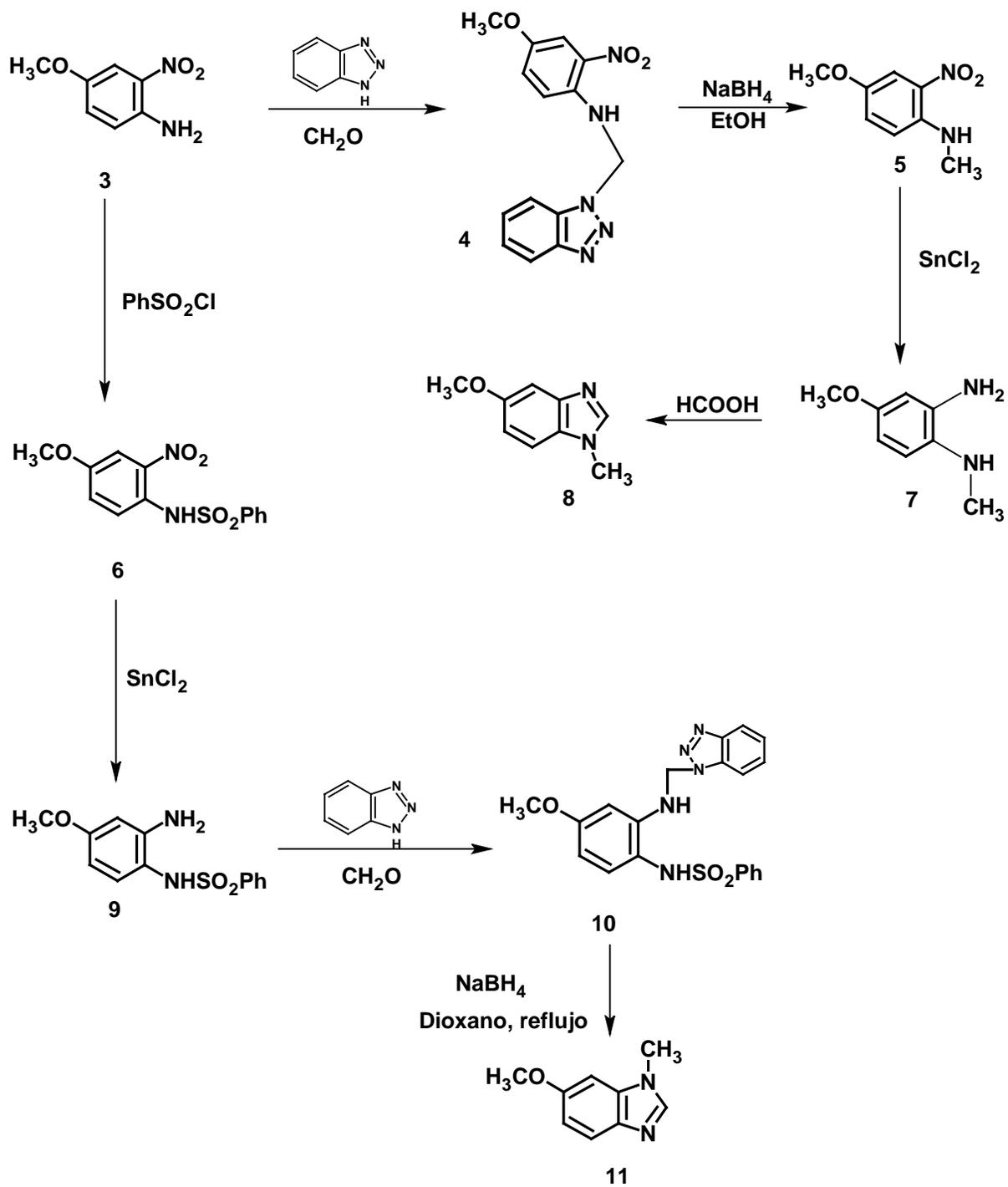
Existen diversos métodos para la síntesis de los 1-metilbencimidazoles, el método a elegir para la síntesis depende de los sustituyentes en el anillo aromático.

2.8.1. A partir de bencimidazoles

La metilación de los bencimidazoles, produce la mezcla de los isómeros 1-metilados en una proporción 1:1, aproximadamente (**Esquema 5**).³⁵ Dado la compleja separación de los isómeros, se han diseñado métodos para la preparación individual de los isómeros.³⁶⁻³⁷ Por ejemplo en el **Esquema 6** se muestra la metodología propuesta por Katrinski.³⁵ La benzotriazolimetilación de la 4-metoxi-2-nitroanilina da un derivado estable (**4**), que por reducción con borohidruro de sodio en etanol da la *N*-metilanilina sustituida (**5**). La reducción del grupo nitro de **5** con cloruro estanoso conduce a la endiamina correspondiente (**7**) que fue condensada directamente debido a la susceptibilidad de oxidación con ácido fórmico para originar el 5-metoxi-1-metilbencimidazol (**8**) con un rendimiento global del 62%. Alternativamente, cuando se protege el grupo amino de **3** con cloruro de bencensulfonilo da la sulfonamida (**6**). La reducción del grupo amino con cloruro estanoso forma la amina (**9**), que con dos equivalentes de formaldehído por una de amina y de benzotriazol obtenemos el bencimidazol sustituido (**10**). La reducción de **10** con borohidruro de sodio en etanol con dioxano en reflujo directamente lleva al otro isómero (**11**), el cual da un rendimiento global del 50% en cuatro pasos.³⁵ **Esquema 6.**



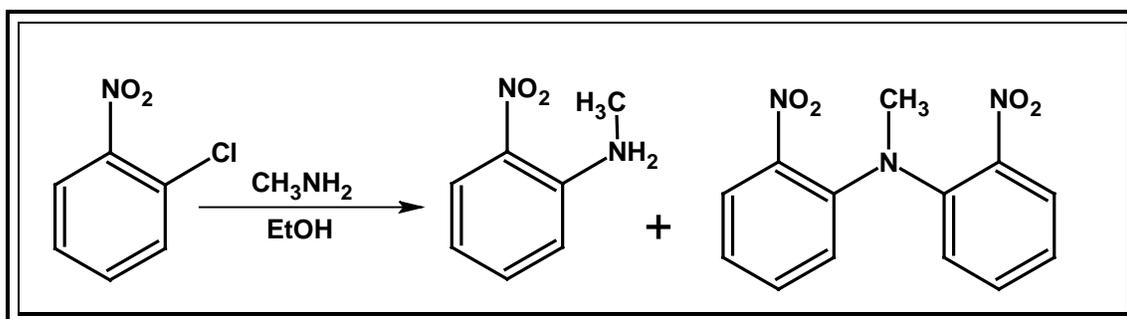
Esquema 5. Metilación de bencimidazoles 5(6)-sustituidos.



Esquema 6. Método de preparación de 1-metilbencimidazoles.

2.8.2. A partir de 2-nitroanilinas

Este método se basa en la sustitución nucleofílica que sufre el nitrobenzeno sustituido por la metilamina, esta reacción se muestra en el **Esquema 7**. Este tipo de reacción tiene el inconveniente, como se menciona más adelante en la descripción de la parte experimental, del uso de un reactor y altas temperaturas que llevan a obtener productos de doble sustitución como impurezas, las cuales son difíciles de separar.³⁸



Esquema 7. Preparación de la *N*-metil-2-nitroanilina por S_{NA} .

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la importancia de las parasitosis en nuestro país; tanto en el sector veterinario como en el humano, el desarrollo de resistencia de los parásitos frente a los fármacos de elección, la toxicidad de los nitroderivados y la insolubilidad acuosa que caracteriza a los derivados del bencimidazol 2-carbamato de metilo; es necesario contar con nuevos agentes antiparasitarios que presenten menores o nulos efectos secundarios que sean más potentes que los ya existentes. Así mismo, la investigación que se realice en este campo contribuye de este modo a la obtención de información básica sobre los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antiparasitaria.

Hoy se sabe que la actividad antiprotozoaria giardicida y tricomonicida de los bencimidazoles no se restringe a compuestos 2-carbamatos de metilo, y que el H en la posición 1 del bencimidazol no es indispensable para la actividad giardicida y/o tricomonicida. Con base en los establecimientos anteriores se pueden plantear las siguientes preguntas:

- ◆ ¿La introducción de un grupo carbamato de metilo en la posición 2 modificará la actividad en relación a sus análogos 1-metilbencimidazoles sintetizados?
- ◆ ¿Existe la posibilidad de que se presente una diferencia importante en la actividad antiprotozoaria por la sustitución en la posición 1 de un H por un grupo metilo (CH₃) en relación a sus análogos (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo?
- ◆ ¿Es posible que la posición del sustituyente (5 ó 6) en el núcleo de bencimidazol sea importante en la actividad biológica de estos compuestos?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

- ◆ Los compuestos sintetizados tendrán una menor actividad antiprotozoaria que la que presentaron sus análogos 1-metilbencimidazoles. Así mismo, se presentará una disminución en la actividad biológica en relación a sus análogos (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo, sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación.

4.2. Objetivo General

Sintetizar y evaluar la actividad antiprotozoaria de cuatro derivados del (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo, con la finalidad de delinear los requerimientos estructurales para la actividad antiprotozoaria y contribuir al desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios.

4.3. Objetivos Particulares

- ◆ Realizar la síntesis de los siguientes compuestos: (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**AHM-4**), (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**AHM-11**), (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**AHM-17**) y (5,6-Dicloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**AHM-23**) **Esquema 8**.
- ◆ Purificar y determinar las constantes físicas, como punto de fusión y *R_f* de los compuestos finales, así como de sus intermediarios.
- ◆ Caracterizar a los intermediarios y productos finales con técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- ◆ Evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los nuevos compuestos contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.
- ◆ Comparar la actividad antiprotozoaria de los nuevos carbamatos con las de sus análogos con diferentes grupos en la posición 2 (-CH₃, -NH₂, SH, SCH₃, CF₃).
- ◆ Comparar la actividad antiprotozoaria de los nuevos carbamatos con las de sus análogos con H en la posición 1.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Esta sección comprende la descripción de la parte química, la cual incluye la instrumentación utilizada, así como las técnicas de preparación de cada uno de los compuestos intermediarios y finales (**Esquemas 8a y 8b**), seguido de la parte biológica, la cual describe las pruebas de actividad antiprotozoaria a que fueron sometidos los compuestos.

5.1. Parte química

5.1.1. Instrumentación

- ◆ La concentración de las soluciones se llevaron a cabo en un rotaevaporador marca Büchi modelo R-114 con vacío generado con bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F y compresora VWR Scientific modelo 1107.
- ◆ Las hidrogenaciones catalíticas se llevaron a cabo en un hidrogenador marca Parr modelo 3916EG con 60 lb/in² y 80°C como capacidad máxima, adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizadores Ni-Raney y Pd/C al 5% marca Aldrich y Pd/C.
- ◆ La determinación de los puntos de fusión (pf) se realizó en un aparato Büchi modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- ◆ Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer modelo 1605, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales se reportan en cm⁻¹.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

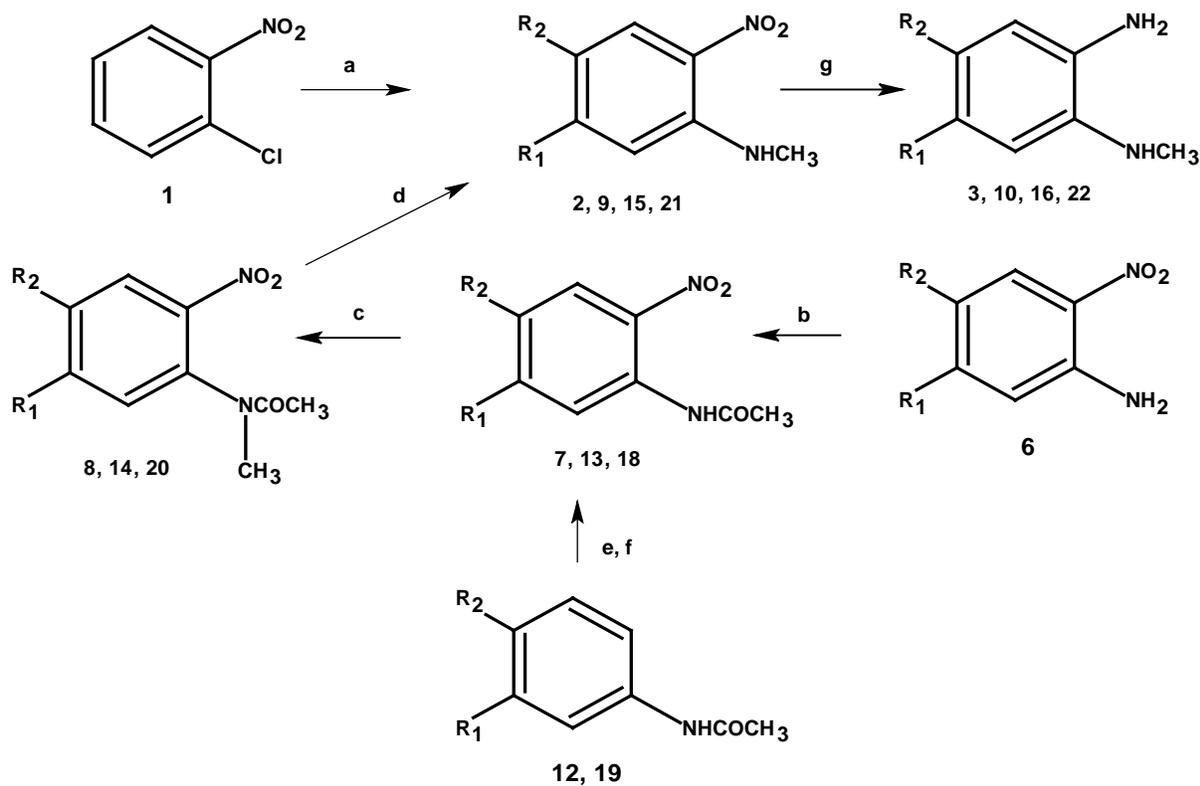
- ◆ Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se determinaron por introducción directa de la muestra (ID) o por la técnica de bombardeo rápido de átomos (FAB), en un aparato marca Jeol modelo JMS-SX102A. La simbología utilizada es: M^+ = ión molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.
- ◆ Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H) se determinaron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 300 MHz, utilizando como disolventes dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆). Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm). La simbología empleada es la siguiente: s = singulete, sa = señal amplia, d = doblete, dd = doble de dobles, m = multiplete.
- ◆ El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando las placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se revelaron con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a los vapores de yodo. Los sistemas utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Hexano:Cloroformo:AcOEt	50:35:15
II ^a	Cloroformo:Metanol	90:10
III	Hexano:AcOEt	50:50

^{a)} Más una gota de NH₄OH

El **Esquema 8a** describe la ruta de síntesis que se siguió para la preparación de las *orto*-feniléndiaminas necesarias para la obtención de los carbamatos de metilo. La reacción de ciclación se muestra en el **Esquema 8b**.

Esquema 8a. Síntesis para la formación de las *orto*-feniléndiaminas sustituidas correspondientes 3, 10, 16 y 22



$R_1 = R_2 = H$: 2 y 3

$R_1 = H$; $R_2 = Cl$: 6, 8, 9, 10 y 13

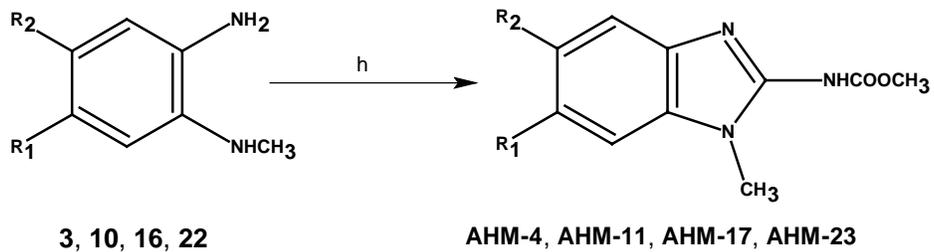
$R_1 = Cl$; $R_2 = H$: 7, 12, 14, 15 y 16

$R_1 = R_2 = Cl$: 18, 19, 20, 21 y 22

(a) MeOH/CH₃NH₂HCl/K₂CO₃, (b) (CH₃CO)₂O, (c) (CH₃)₂SO₄/NaOH (ac), (d) H₂SO₄

(e) (CH₃CO)₂/HNO₃ fum, (f) H₂SO₄/HNO₃, (g) H₂/Ni-Raney

Esquema 8b. Secuencia sintética para la formación de los compuestos finales



R ₁ = H y R ₂ = H	AHM-4	R ₁ = Cl y R ₂ = H	AHM-17
R ₁ = H y R ₂ = Cl	AHM-11	R ₁ = Cl y R ₂ = Cl	AHM-23

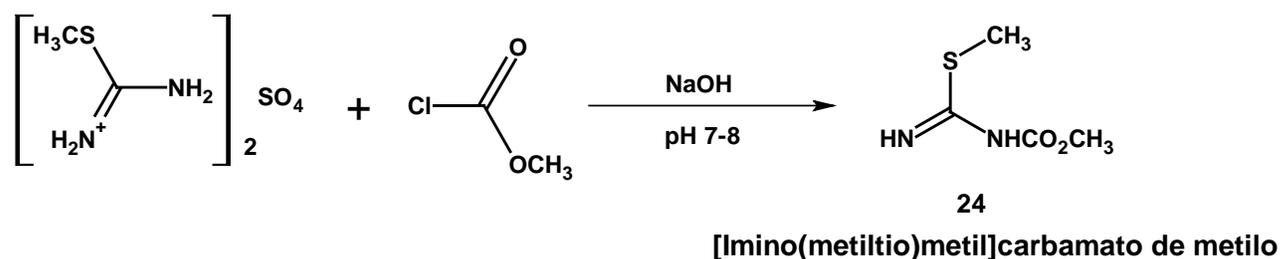
(h) Hemisulfato de S-metilisotiurea, $\text{CH}_3\text{NCOOCH}_3$, NaOH (ac)

5.2. Técnicas para la preparación de los intermediarios y productos finales

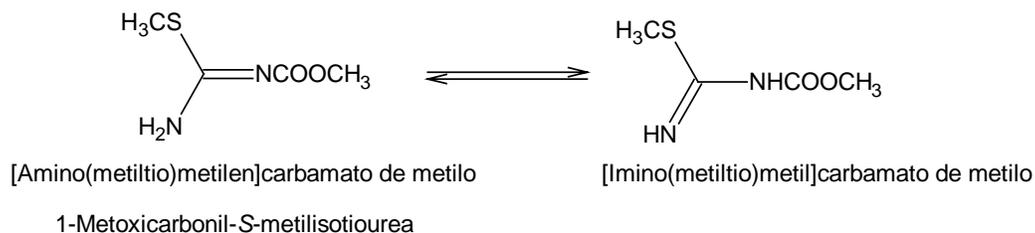
5.2.1. Método general de síntesis del intermediario para la formación de los (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo finales

Preparación del intermediario: [Imino(metiltio)metil]carbamato de metilo (24)

En un matraz bola de tres bocas de 250 mL, equipado con agitación magnética, termómetro, tapón de hule (séptum) y un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro previamente calibrado,^a se disolvieron 5 g (0.0360 mol) de sulfato de *S*-metilisotiurea en 25 mL de agua. A la mezcla agitada y fría se añadieron 6.81 g de cloroformiato de metilo con ayuda de una jeringa, la mezcla se agitó vigorosamente; después se le agregó, poco a poco, una solución acuosa de hidróxido de sodio al 25% a una velocidad tal que el pH oscilara entre 7-7.5 y la temperatura entre 10-15°C. Después de haber adicionado 32 mL de la solución de sosa (42min), el pH permaneció constante a 7.3 y precipitó un sólido blanco esponjoso. Este intermediario recién preparado se utilizó sin aislar en el siguiente paso.



Así mismo se muestran las formas tautoméricas que presenta dicho intermediario.

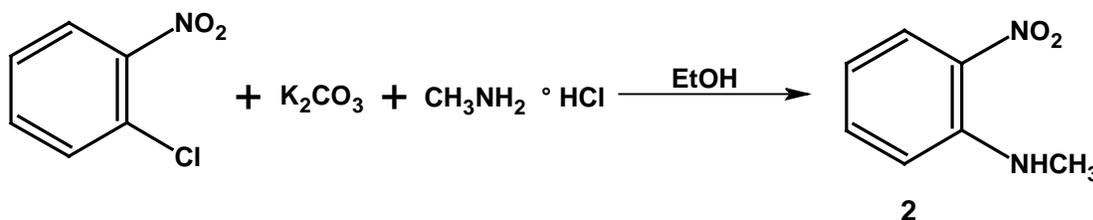


- La calibración se llevó a cabo con solución reguladora de acetatos pH 4.1 y fosfatos pH 7.6.
- 12.4mL de ácido acético, 4.4 g de acetato de sodio y 44 mL de agua.

5.3. Secuencia sintética para la preparación del (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il) carbamato de metilo (AHM-4)

5.3.1. *N*-metil-*N*-(2-nitrofenil)amina (2)

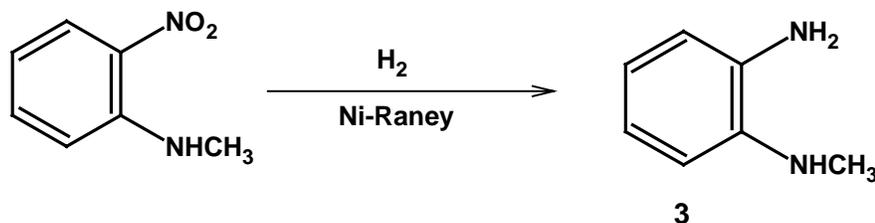
En un vaso reactor PARR de 500 mL se mezclaron 10 g (0.06346 mol) de 2-cloronitrobencono, 26.4 g (0.1934 mol) de carbonato de potasio, 100 mL de glima y 17.15 g (0.254 mol) de clorhidrato de metilamina. El reactor se cerró rápidamente, se ensambló el sistema y se calentó a 142 °C con agitación constante. La reacción se llevo a cabo en 24 h, consumiéndose completamente la materia prima. Al terminar la reacción, la mezcla se separó por filtración al vacío y el residuo sólido se lavó en 12 mL de metanol. Las aguas madres, que contenían el producto, se llevaron a sequedad en el rotavapor. El residuo oleoso de color naranja se redisolvió en 200 mL de acetato de etilo se lavó en 50 mL (2 x 25 mL) de agua salada. La fase orgánica se secó en sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 8.2g (85%) de un aceite café oscuro que en ccf mostró una mancha con $R_f = 0.68$ (Sistema I). El producto se recrystalizó de etanol dando agujas rojas con $pf = 34.5-34.7$ °C [Lit.³⁹ 37°C].



5.3.2. *N*-(2-Aminofenil)-*N*-metilamina (3)

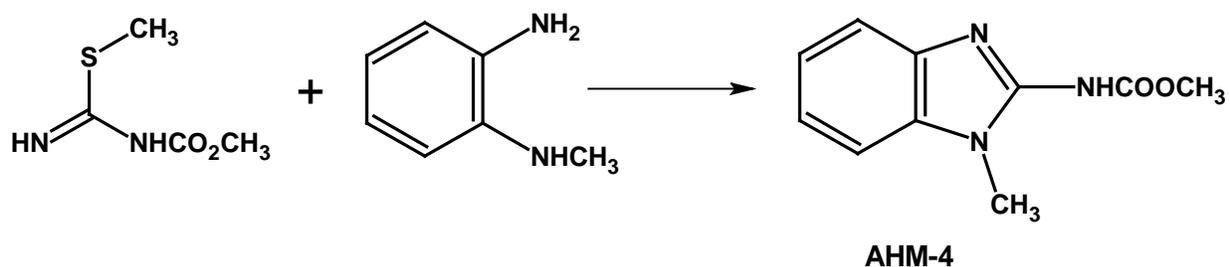
En un reactor de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N_2 , 4 g (0.0262 mol) de *N*-metil-*N*-(2-nitrofenil) amina, 0.4 g de Pd/C (al 5%) y 250 mL de etanol. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavados de 30 lb/in² de H_2 , se cargó el reactor con 60 lb/in² de H_2 y se inició la agitación. La reacción terminó en 32 min, consumiéndose un total de 65 lb/in² de H_2 .

Al terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío empleando una capa de celita humedecida en etanol; el filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 2.67 g (89%) de un líquido café oscuro. La ccf mostró dos manchas con R_f de 0.28 y 0.48 (Sistema I). Este producto se empleó como tal para la siguiente reacción.



5.3.3. Síntesis del (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-4)

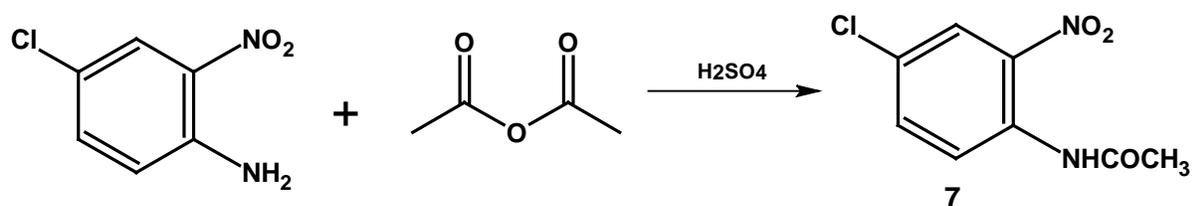
En un matraz bola de 250 mL de tres bocas, acondicionado con agitación magnética, tapón de hule (séptum) y un refrigerante en posición de reflujo, conectado por su extremo superior a una trampa de hipoclorito de sodio, se disolvieron 3.6 g (0.02934 mol) de *N*-(2-aminofenil)-*N*-metilamina (3) en 44 mL de solución amortiguadora de acetatos^b. A la solución se le agregó el carbamato intermediario recién preparado (24). La mezcla se calentó poco a poco, observándose la evolución de gas. La reacción se mantuvo a reflujo por 3 h, tiempo en el que la materia prima (3) se consumió totalmente. Después se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se formó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire dando 5.46 g (90%). El producto crudo se recrystalizó de metanol; se obtuvieron 5.66 g (87%) de unos cristales blancos con $R_f = 0.4$ (sistema III) y $\text{pf} = 183.3\text{-}183.7^\circ\text{C}$.



5.4. Secuencia sintética para la preparación del (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-11)

5.4.1. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil) acetamida (7)

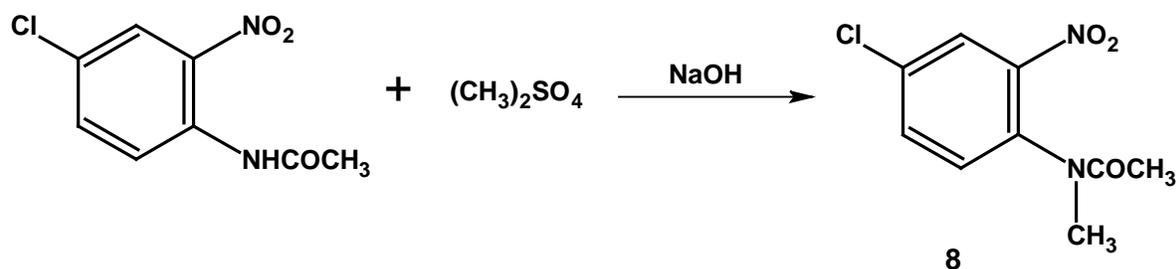
En un vaso de precipitados, acondicionado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 20 g (0.11589 mol) de 4-cloro-2-nitroanilina y 16.9 g (12.2 mL, 0.1623 mol) de anhídrido acético con dos gotas de H₂SO₄. La mezcla se calentó a 70 °C con agitación constante. Después de 10 min se comprobó por ccf el consumo total de la materia prima dando una sola mancha con un *R_f* de 0.64 (Sistema I). Se obtuvieron 24.9 g (100%) de un sólido amarillo. Una muestra se recrystalizó de etanol dando pf = 99.6-100.0 °C [Lit.⁴⁰ 100-101°C].



5.4.2. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8)

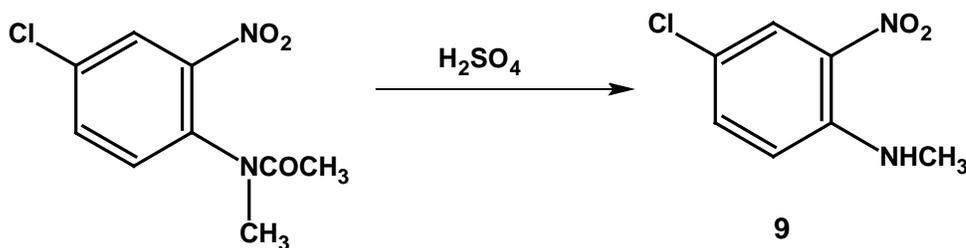
En un matraz bola de 25 mL de dos bocas, equipado con agitación magnética y termómetro, se adicionó 5 g (0.023298 mol) de *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida, 8.9 g (6.7 mL, 0.06989 mol, 3 Eq) de sulfato de dimetilo y 3 mL de glima. La mezcla anterior se calentó a 30 °C por medio de un baño de agua, se formó una solución que se agitó vigorosamente mientras se le goteó una solución de 2.3 g (0.05825 mol, 2.5 Eq) de NaOH (al 50% m/v) a una velocidad tal que la temperatura oscilara entre 30-35°C. Al término de la adición se comprobó por ccf el consumo total de la materia prima y la formación del producto. La mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de agua-hielo.

Se formó un precipitado amarillo, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 4.6 g (87%) de un sólido amarillo, el cual presentó un R_f de 0.4 (Sistema I). El producto crudo se recrystalizó de etanol. Se obtuvieron unos cristales amarillos con $pf = 90.6-91.6^\circ\text{C}$ [Lit.²¹ $90.5-91.5^\circ\text{C}$].



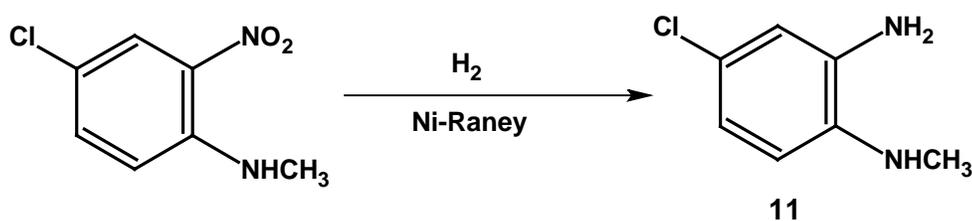
5.4.3. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)

En un vaso de precipitados, de 100 mL equipado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 5 g de *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8) y 50 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se calentó a 80-90°C durante 30 min, comprobándose por ccf la hidrólisis total de la materia prima. Se dejó enfriar hasta 45°C y se vertió sobre 100 g de hielo, se filtró por succión y se lavó repetidas veces con agua. El sólido color naranja formado se separó por filtración al vacío y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 3.5 g (86%) de un polvo anaranjado el cual mostró una mancha por ccf con R_f de 0.54 (sistema I). Una muestra se recrystalizó de etanol/agua, obteniéndose cristales anaranjados con un $pf = 105.0-105.7^\circ\text{C}$ [Lit.³⁹ 110°C].



5.4.4. *N*-(2-Amino-4-clorofenil)-*N*-metilamina (10)

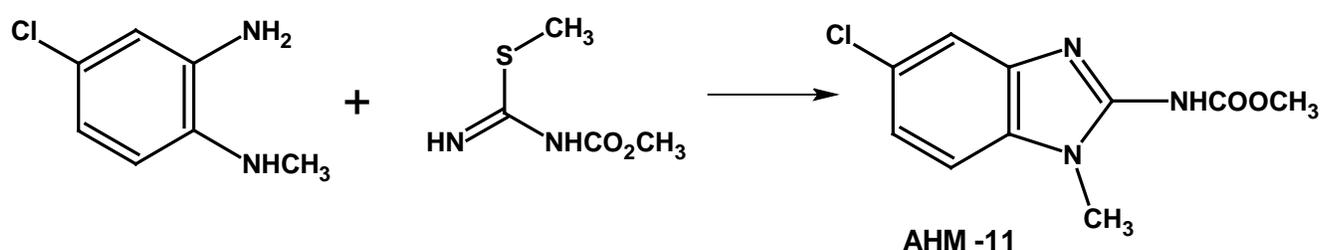
En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N₂, 3 g (0.0161 mol) de *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina, 0.9 g de Ni-Raney (al 30%), 150 mL de etanol y 100 mL de acetato de etilo. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavadas de 30 lb/in² de H₂ cada una; después se cargó el reactor con 60 lb/in² de H₂ y se inició la agitación. La reacción terminó en 5 h, consumiéndose un total de 103 lb/in² de H₂. Al terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío empleando una capa de celita humedecida en etanol; el filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 2.016 g (80%) de un aceite café oscuro. La ccf mostró dos manchas con *R_f* de 0.28 y 0.48 respectivamente (Sistema I). Este producto se empleó como tal para la siguiente reacción.



5.4.5. Síntesis del (5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-11)

En un matraz bola de 250 mL de tres bocas, acondicionado con agitación magnética, tapón de hule (séptum) y un refrigerante en posición de reflujo, conectado por su extremo superior a una trampa de hipoclorito de sodio; se disolvieron, 2.016 g (0.012872 mol) de *N*-(2-amino-4-clorofenil)-*N*-metilamina en 44 mL de solución amortiguadora de acetatos^b. A la solución se le agregó el carbamato intermediario recién preparado (24). La mezcla se calentó poco a poco, observándose la evolución de gas. La reacción se calentó a reflujo por 3 h, tiempo en el que la materia prima se consumió totalmente.

Después se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se formó un sólido negro, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 2.7 g (87.7%). El producto crudo se disolvió en etanol y se trató con carbón activado a reflujo por 3h. Después de separar el carbón, el filtrado se concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un sólido blanco el cual se recrystalizó de etanol dando 2.16 g (85%) de un sólido blanco esponjoso que en ccf mostró una sola mancha con R_f de 0.63 (sistema II) con $pf = 203.0-203.8^\circ\text{C}$.

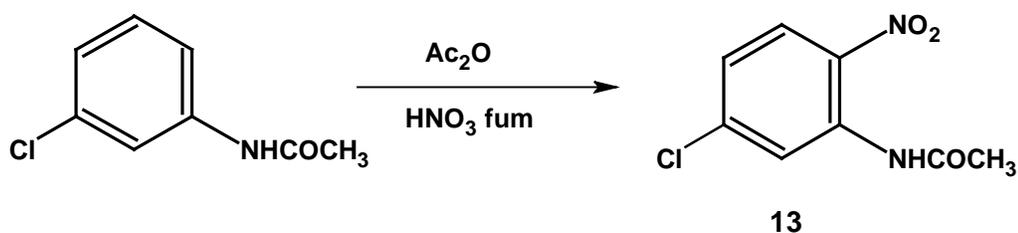


5.5. Secuencia sintética para la preparación del (6-Cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2 il)carbamato de metilo (AHM-17)

5.5.1. N-(5-Cloro-2-nitrofenil) acetamida (13)

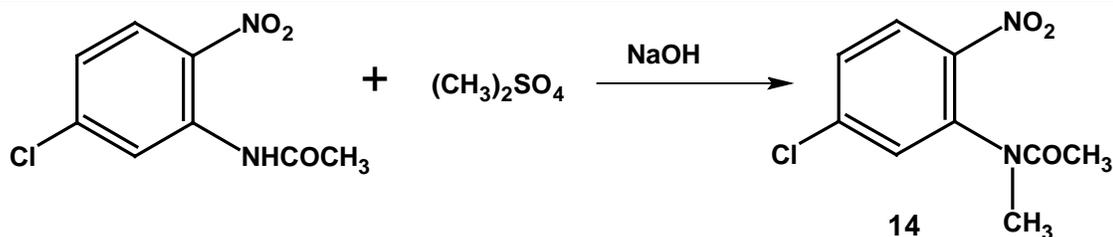
En un vaso de precipitados de 4 L, equipado con agitación mecánica y termómetro, se mezclaron 535.5 g (3.1573 mol) de N-(3-clorofenil)acetamida y 1,468.5 g (1056.2 mL, 14.3973 mol, 4.56 Eq) de anhídrido acético. La mezcla anterior se enfrió por medio de un baño hielo-sal y se agitó mientras se incorporaron 397.8198g (284 mL, 6.3146 mol, 2 Eq) de HNO_3 fumante. La adición se realizó lentamente, de tal manera que la temperatura de la reacción oscilara entre $0-10^\circ\text{C}$. Al término de la adición (2 h), se dejó agitando por 7 h más manteniendo la misma temperatura. Después de comprobar el consumo total de la materia prima por ccf, la mezcla se vertió sobre 1600 mL de agua-hielo.

El sólido amarillo que precipitó se separó por succión, se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se secó al aire, obteniéndose 365.5 g de **13**. Este sólido mostró ser un solo compuesto por ccf, con R_f 0.83 (Sistema 1). A las aguas madres, que aún contenían el compuesto de interés, se les agregó agua. El sólido que precipitó se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. La ccf mostró dos manchas con R_f 0.4 y 0.60, respectivamente el sólido se lavó repetidas veces (7 X 20 mL) con benceno con lo que se extrajo el compuesto de mayor R_f (compuesto **13**) los extractos bencénicos reunidos mostraron una sola mancha con R_f 0.60 (Sistema 1). Se extrajeron 100.1 g de **13**, de los cuales 29.1g se recrystalizaron de etanol dando 27g (92.78%) de cristales amarillos con $pf = 117.2-118.0\text{ }^\circ\text{C}$ [Lit.⁴⁰ 117-118 $^\circ\text{C}$]. Se obtuvieron 80 g de compuesto secundario y 50g de otros productos de la reacción. El rendimiento total de la reacción fue de 87.9%.



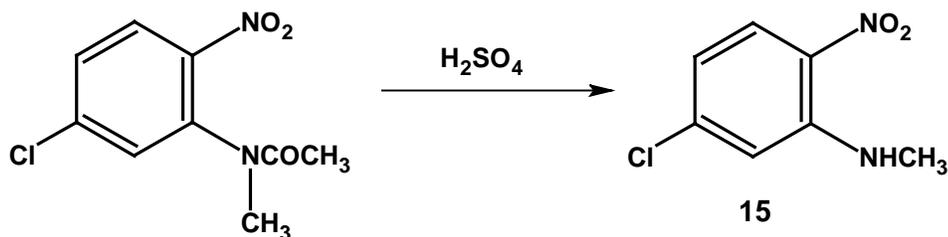
5.5.2. *N*-(5-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**14**)

En un matraz bola de 250 mL con dos bocas, equipado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 23 g (0.107173 mol) de *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)acetamida, 20.27 g (15.3 mL, 0.16076 mol, 1.5 Eq) de sulfato de dimetilo y 40 mL de glima. La mezcla anterior se calentó hasta 30 $^\circ\text{C}$ por medio de un baño de agua, se formó una solución que se agitó vigorosamente mientras se gotearon 8.8 g (0.21435 mol, 2 Eq) de NaOH (al 50% m/v) a una velocidad tal que la temperatura oscilara entre 30-35 $^\circ\text{C}$. Al término de la adición se comprobó por ccf el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se vertió sobre 100 g de agua-hielo. Se formó un precipitado amarillo, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con agua repetidas veces. Se obtuvieron 24 g (97.11%) de un sólido amarillo, el cual presentó un R_f de 0.34 (Sistema I). El producto crudo se recrystalizó de etanol (80%); se obtuvieron unos cristales amarillos con $pf = 90.5-90.8\text{ }^\circ\text{C}$ [Lit.²¹ 86-87 $^\circ\text{C}$].



5.5.3. *N*-(5-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (15)

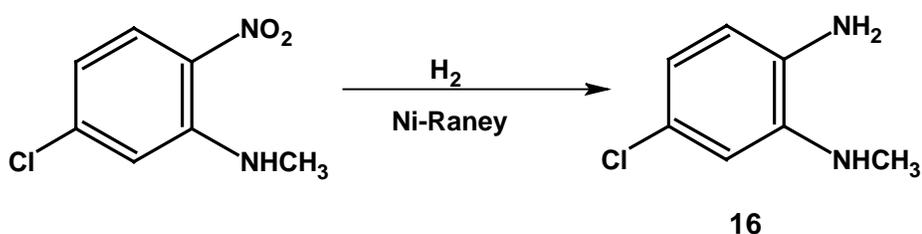
En un vaso de precipitados de 100 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se adicionaron 5 g (0.021678 mol) de *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**14**) y 50 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se calentó a 80-90 °C durante 30 min. La ccf mostró la hidrólisis total de la materia prima. La mezcla se dejó enfriar hasta 45 °C; luego, se vertió sobre 100 g de hielo-agua, se filtró por succión y se lavó repetidas veces con agua. El sólido anaranjado formado se separó por filtración al vacío y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 3.236 g (80%) de un sólido amarillo que en ccf mostró una sola mancha con *R_f* de 0.45 (Sistema I). Una muestra se recrystalizó de etanol, obteniéndose cristales anaranjados con un *pf* = 104.2-105.2°C [Lit.⁴⁰⁻⁴¹ 106-107°C].



5.5.4. *N*-(2-Amino-5-clorofenil)-*N*-metilamina (16)

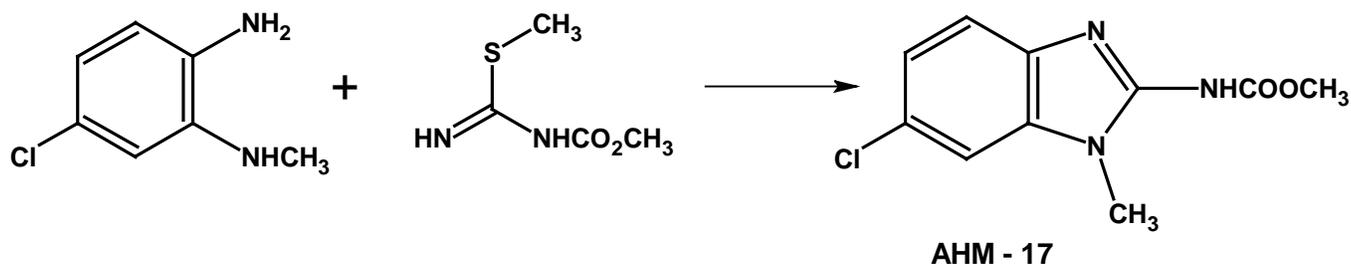
En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N₂, 4.3 g (0.02304 mol) de *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina, 1.3 g de Ni-Raney (al 30%), y 200 mL de acetato de etilo. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavados de 30 lb/in² de H₂; después se cargó el reactor con 40 lb/in² de H₂; se adaptó un reostato y se calentó la solución a 30°C y se inició la agitación. La reacción terminó en 2 h, consumiéndose un total de 129 lb/in² de H₂.

Al terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío empleando una capa de celita humedecida en etanol. El filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 2.9963 g (83%) de un aceite café oscuro. La ccf mostró dos manchas con R_f de 0.20 y la principal de 0.45 respectivamente (Sistema I). Este producto se empleó como tal para la siguiente reacción.



5.6.5. Síntesis del (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-17)

En un matraz bola de 250 mL de tres bocas, acondicionado con agitación magnética, tapón de hule (séptum) y un refrigerante en posición de reflujo, conectado por su extremo superior a una trampa con hipoclorito de sodio; se disolvieron 2.9963 g (0.019132 mol) de *N*-(2-amino-5-clorofenil)-*N*-metilamina en 44 mL de solución amortiguadora de acetatos.^b A la solución se le agregó el carbamato intermediario recién preparado (**24**). La mezcla se calentó poco a poco, observándose la evolución de gas. La reacción se mantuvo a reflujo por 4 h, tiempo en el que la materia prima se consumió totalmente. Después se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se formó un sólido muy oscuro, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 3.927 g (85.65%). El producto crudo se disolvió en etanol y trató con carbón activado a reflujo por 3 h. Después de separar el carbón, el filtrado se concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un sólido blanco el cual se recrystalizó de etanol dando 3.59 g (80%) de un sólido blanco esponjoso con $R_f=0.5$ (Sistema II) y con $pf = 191.3-192.4$ °C.

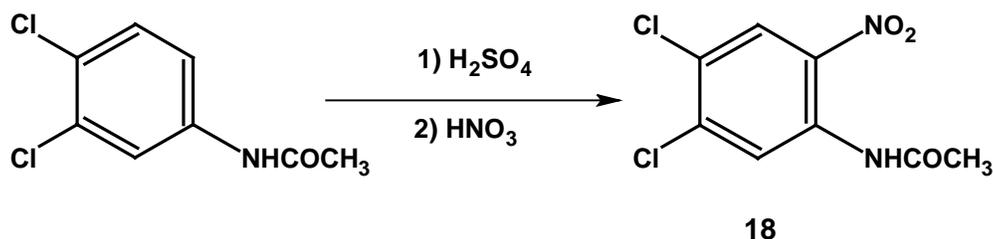


5.6. Secuencia sintética para la preparación del (5,6-Dicloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-23)

5.6.1. *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil) acetamida (**18**)

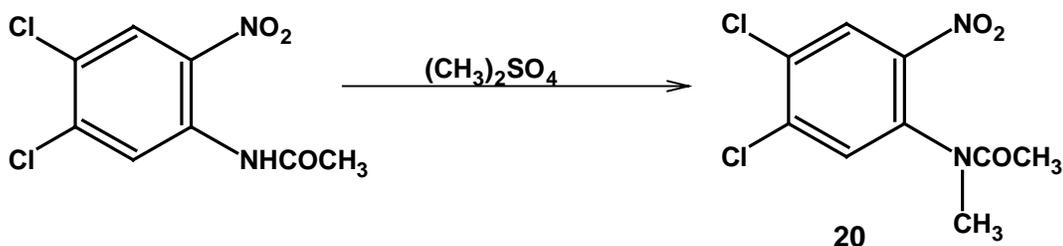
A partir de *N*-(3,4-Diclorofenil) acetamida (**19**)

En un vaso de precipitados de 500 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se colocaron 250 mL de H₂SO₄ a los cuales se les agregó, poco a poco, 50 g (0.2450 mol) de *N*-(3,4-diclorofenil) acetamida (**19**). La adición se hizo de tal forma que la temperatura no subiera de 25 °C. Terminada la adición (1h), se enfrió la solución con ayuda un baño de hielo-sal a 0 °C y se adicionaron, gota a gota 25 mL de HNO₃, cuidando que la temperatura se mantuviera entre 0-5°C (2.5 h). Terminada la adición, se dejó reaccionar por 15 minutos más, se comprobó por ccf el completo consumo de la materia prima y la mezcla se vertió sobre 1 Kg de hielo-agua. El sólido formado se separó por filtración, se lavó con agua repetidas veces hasta pH neutro y dejó secar al aire. El sólido amarillo residual, 59.98 g (98.3%) mostró por ccf un compuesto principal con *R*_f = 0.65 (Sistema I). Una muestra se recrystalizó de metanol-agua y dio cristales amarillo-pálido del compuesto **18** con pf 123-124°C [Lit.⁴² 123-124 °C].



5.6.2. *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**20**)

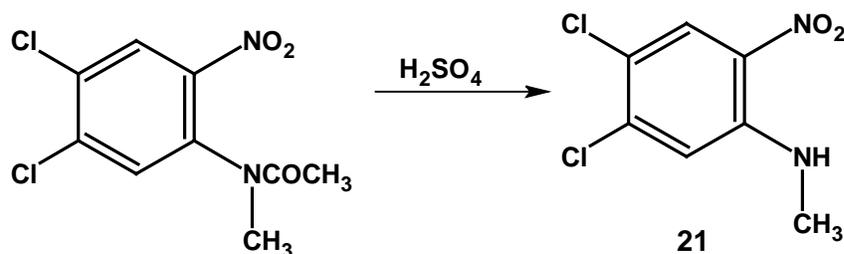
En un matraz bola de 100 mL con dos bocas 20/40, adaptado con agitación magnética y termómetro, se adicionaron 3 g (0.012046 mol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**18**), 4.558 g (0.018069 mol, 1.5 eq, 2.3 mL) de sulfato de dimetilo y 10 mL de glima. La mezcla anterior se calentó a 30°C por medio de un baño de agua, se formó una solución que se agito vigorosamente mientras se le goteó una solución de 0.7 g (0.018069 mol, 1.5 Eq) de NaOH al 50 % m/v de H₂O, de tal manera de que la temperatura de reacción oscilara entre 30-35 °C. Al terminar la adición se comprobó el consumo de la materia prima por ccf y se vertió sobre 200 g de hielo-agua. Se formó un precipitado amarillo el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 2.8341 g (88.76 %) de un sólido amarillo que en ccf mostró una mancha con *R_f* = 0.20 (Sistema I). Una muestra se recrystalizó de etanol y dio cristales amarillos con *pf* = 96.0-96.5°C [Lit.²¹ 94-95 °C].



5.6.3. *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (**21**)

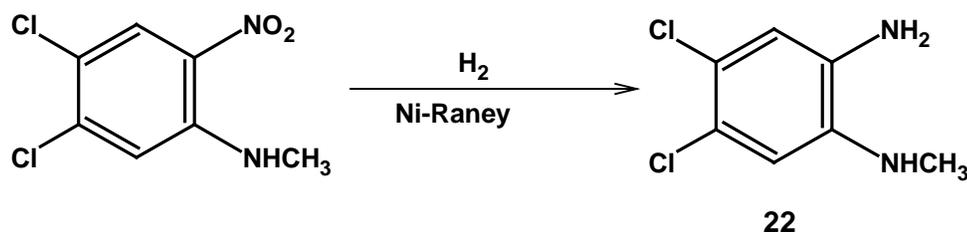
En un vaso de precipitados de 150 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 5 g (0.01886 mol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**20**) y 50 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se calentó a 80-90 °C durante 30 min, comprobándose por ccf la hidrólisis total de la materia prima. Se dejó enfriar hasta 45 °C y se vertió sobre 100 g de hielo-agua. El sólido anaranjado formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire.

Se obtuvieron 4.1 g (97.6%) de un sólido anaranjado, que en ccf mostró una sola mancha con *Rf* de 0.6 (Sistema I). Una muestra se recristalizó de etanol, obteniéndose agujas anaranjadas con un *pf* = 146.3-146.5 °C [Lit.⁴² 148 °C].



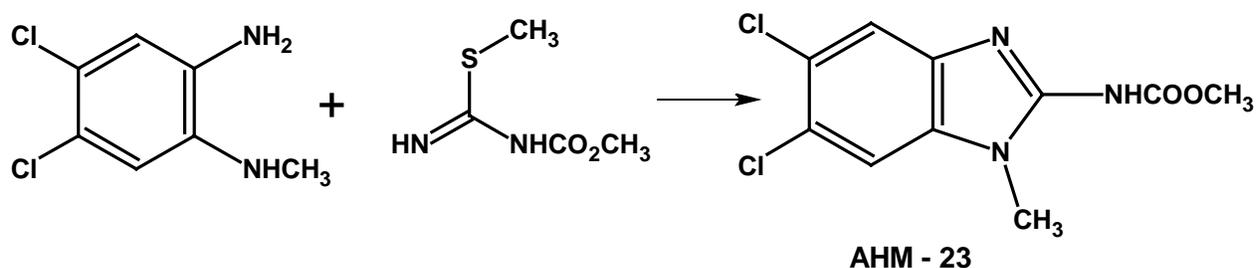
5.6.4. *N*-(2-Amino-4,5-diclorofenil)-*N*-metilamina (22)

En una botella de hidrogenación de 500 mL, se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N_2 , 4.1 g (0.01855 mol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (21), 1.23 g de Ni-Raney, 150 mL de etanol y 100 mL de acetato de etilo. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavados de 30 lb/in² de H_2 ; después, se cargó el reactor con 60 lb/in² de H_2 y se inició la agitación. La reacción terminó en 2 h, consumiéndose un total de 91 lb/in² de H_2 . Al terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío empleando una capa de celita humedecida en etanol. El filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 2.94 g (83%) de un aceite café oscuro. La ccf mostró dos manchas con *Rf* de 0.3 y 0.45 respectivamente (Sistema I). Este producto se empleó como tal para la siguiente reacción.



5.6.5. Síntesis de (5,6-Dicloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (AHM-23)

En un matraz bola de 250 mL con tres bocas 24/40, acondicionado con agitación magnética, tapón de hule (séptum) y un refrigerante en posición de reflujo, conectado por su extremo superior a una trampa con hipoclorito de sodio; se disolvieron a temperatura ambiente 4.1 g (0.02145 mol) de *N*-(2-amino-4,5-diclorofenil)-*N*-metilamina (**22**) en 44 mL de solución amortiguadora de acetatos.^b A la solución se le agregó el carbamato intermediario recién preparado (**24**). La mezcla se calentó poco a poco, observándose la evolución de gas. La reacción se mantuvo a reflujo por 3 h, tiempo en el que la materia prima se consumió totalmente. Después se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Se formó un sólido oscuro, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 5.5 g (93.5%). El producto crudo se disolvió en etanol y se trató con carbón activado a reflujo por 3 h. Después de separar el carbón, el filtrado se concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un sólido blanco el cual se recrystalizó de etanol dando 4.84 g (88%) de un sólido blanco con *pf* = 229.0-229.5 °C.



5.7. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.7.1. Evaluación *in vitro* de la actividad antiprotozoaria

El ensayo para la determinación de la actividad antiprotozoaria se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia y la supervisión de la bióloga Amparo Tapia.

5.7.2. Pruebas de actividad contra *E. histolytica*

Para la determinación de este ensayo se siguió el método descrito por Cedillo Rivera⁴³ con algunas modificaciones, quedando de la siguiente manera: Se incubaron en tubos de ensayo 2×10^4 trofozoítos/mL en medio fresco a las siguientes concentraciones 0.005, 0.01, 0.05 0.1, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de los diferentes compuestos de prueba, paralelamente se realizó este ensayo con los compuestos de referencia Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ) como controles positivos. El control negativo consistió en trofozoítos en medio libre de fármacos en DMSO. Los tubos se encubaron a 37 °C por 48 h. Terminado este tiempo los trofozoítos se lavaron y resembraron en medio fresco por 24 h más. Al final de este tiempo, se determinó el número de trofozoítos por mililitro en una cámara de Neubauer. Posteriormente, mediante un análisis Probit, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de los compuestos que correspondió a la concentración que inhibió el 50% el crecimiento de los trofozoítos en $\mu\text{g/mL}$.

5.7.3. Pruebas de actividad contra *Giardia intestinalis*

Para estos ensayos se siguió el método descrito por Cedillo-Rivera y Muñoz.⁴⁴⁻⁴⁵ Se basó en la incubación de 5×10^4 trofozoítos/ml de *G. intestinalis* a las concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de los diferentes compuestos de prueba.

Los controles positivos fueron Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ). El control negativo consistió en trofozoítos en medio libre de fármacos en DMSO. Los tubos se incubaron a 37 °C por 48 h. Terminado este tiempo, los trofozoítos se lavaron y resembraron en medio fresco por 48 h más. Al final de este tiempo se determinó el número de trofozoítos por mililitro en una cámara de Neubauer. Posteriormente, mediante un análisis Probit, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de los compuestos que correspondió a la concentración que inhibió el 50% el crecimiento de los trofozoítos en µg/mL.

5.7.4. Pruebas de actividad contra *T. vaginalis*

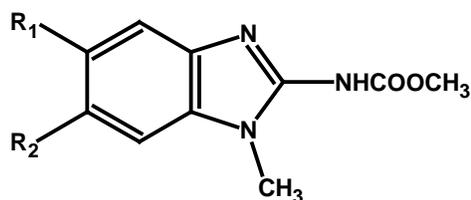
Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para *E. histolytica*, la diferencia fue la cantidad inicial de trofozoítos, en este caso se colocaron en tubos de ensaye 6000 trofozoítos/mL en medio fresco a las siguientes concentraciones 0.005, 0.01, 0.05 0.1, 0.5 y 1.0 µg/mL de los diferentes compuestos de prueba, así como de los compuestos de referencia Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ) en tubos de ensaye. El control negativo consistió en trofozoítos en medio libre de fármacos en DMSO. Los tubos se incubaron a 37°C por 48 h. Terminado este tiempo, los trofozoítos se lavaron y resembraron en medio fresco por 24 h más. Al final de este tiempo se determinó el número de trofozoítos por mililitro en una cámara de Neubauer. Posteriormente, mediante un análisis Probit, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de los compuestos que correspondió a la concentración que inhibió el 50% el crecimiento de los trofozoítos en µg/mL.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resultados de la parte Química

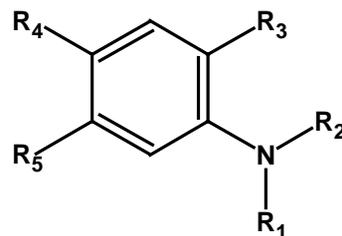
Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos finales **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17**, **AHM-23**, así como de sus intermediarios **2**, **7-9**, **13-15**, **18**, **20-21**, se muestran en las **Tablas 3** y **4**. Los datos espectroscópicos y espectrométricos de todos los compuestos de este estudio se muestran en las **Tablas 5**, **6**, **7**, **8** y **9**.

Tabla 3. Rendimientos y constantes físicas de los compuestos finales



Compuesto	Rendimiento Crudo (%)	Disolvente de Recristalización	Rendimiento Recristalizado	pf (°C)	R _f (sistema)
AHM-4	90	Metanol	87	183.3-183.7	0.40 (III)
AHM-11	88	Etanol	85	203.0-230.5	0.63 (II)
AHM-17	86	Etanol/H ₂ O	80	191.3-192.4	0.50 (II)
AHM-23	94	Etanol	88	229.0-229.5	0.60 (II)

Tabla 4. Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios sintetizados



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Rendimiento (%)	Disolvente de Cristalización	Estado Físico	R _f (Sis. I)	pf (°C) encontrado	pf (°C) rep.	Ref
2	CH ₃	H	NO ₂	H	H	85	EtOH	agujas anaranjadas	0.68	34.5-34.7	35-38	40
3	CH ₃	H	NH ₂	H	H	89	-----	Líqu. café oscuro	0.28, 0.48	-----	-----	-----
7	H	COCH ₃	NO ₂	Cl	H	100	EtOH	Crist. amarillos	0.64	99.6-100	100-101	41
8	CH ₃	COCH ₃	NO ₂	Cl	H	87	EtOH/H ₂ O	Crist. amarillos	0.40	90.6-91.6	90.5-91.5	23
9	CH ₃	H	NO ₂	Cl	H	86	EtOH/ H ₂ O	Crist. naranjas	0.54	105.0-105.7	110	41
10	CH ₃	H	NH ₂	Cl	H	80	-----	Líqu. café oscuro	0.28,0.48	-----	-----	-----
13	H	COCH ₃	NO ₂	H	Cl	93	EtOH	Crist. amarillos	0.60	117.2-118.2	117-118	41
14	CH ₃	COCH ₃	NO ₂	H	Cl	97	EtOH	Crist. amarillos	0.34	90.5-90.8	86-87	23
15	CH ₃	H	NO ₂	H	Cl	80	EtOH	Crist. naranjas	0.45	104.2-105.2	106-107	41,42
16	CH ₃	H	NH ₂	H	Cl	83	-----	Líqu. café oscuro	0.2, 0.45	-----	-----	-----
18	H	COCH ₃	NO ₂	Cl	Cl	98	EtOH	Crist. amarillos	0.45	122.7-123.1	123-124	43
20	CH ₃	COCH ₃	NO ₂	Cl	Cl	89	EtOH	Crist. amarillos	0.20	96.0-96.5	94-95	23
21	CH ₃	H	NO ₂	Cl	Cl	98	EtOH	Crist. naranjas	0.60	146.3-146.5	148	43
22	CH ₃	H	NH ₂	Cl	Cl	83	-----	Líqu. café oscuro	0.30, 0.45	-----	-----	-----

Tabla 5. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

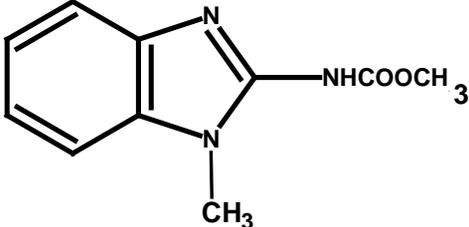
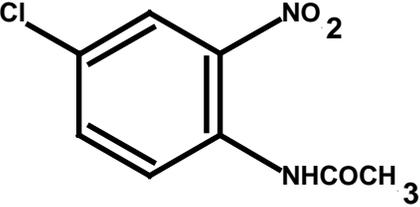
COMPUESTO, NÚMERO	SEÑALES
(2) 	<p>Espectro 1, IR cm^{-1}: 3387 (-NH), 3107 (C-H, aromático), 2988 y 2817 (C-H, alifático), 1885-1781 (sobretonos aromático orto-disustituído), 1575 y 1355 (NO_2), 1265 (-C-N), 1230, 1179, 1030, 1050, 739.</p> <p>Espectro 2, EM (ID) m/z: 152 (M^+; 81%), 105 ($\text{M}^+ - 47$, 65%), 77 ($\text{M}^+ - 75$, 100%)</p> <p>Espectro 3, RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 3,029 (s, 3H, -NCH_3), 6,655 (ddd, $J_1=7.2$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, $J_3=1.3$ Hz, 1H, H-4), 6,744 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=1.2$ Hz, 1H, H-6), 7,467 (ddd, $J_1=7.2$ Hz, $J_2=6.6$ Hz, $J_3=1.8$ Hz, 1H, H-5), 7,8 (sa, 1H, int. con D_2O, N-H), 8,174 (dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 1H, H-3).</p>
(AHM-4) 	<p>Espectro 4, IR cm^{-1}: 3308 (-NH- de carbamato), 2952 (C-H alifático), 1635 (C=O), 1287 (-C-N-).</p> <p>Espectro 5, EM (ID) m/z: 205 (M^+, 10%), 173 ($\text{M}^+ - 32$, 100%), 144 ($\text{M}^+ - 61$, 15%), 118 ($\text{M}^+ - 87$, 25%).</p> <p>Espectro 6, RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 3,485 (s, 3H, -NCH_3), 3,602 (s, 3H, -O-CH_3), 7,20 (ddd, $J_1=7.8$ Hz, $J_2=7.2$ Hz, $J_3=1.5$ Hz, 2H, H-5,6), 7,363 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-4), 7,407 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, H-7), 12,020 (sa, 1H, int. con D_2O, NH).</p>
(7) 	<p>Espectro 7, IR cm^{-1}: 3364 (-NH-), 3124 (C-H, aromático), 3095 (-CH_3), 1713 (-CO), 1516 y 1338 (-NO_2), 1220 (-C-N-), 1143, 845, 533.</p> <p>Espectro 8, EM (FAB) m/z: 214 (M^+, 20%), 172 ($\text{M}^+ - 42$, 100%), 126 ($\text{M}^+ - 88$, 40%), 43 ($\text{M}^+ - 171$, 20%).</p> <p>Espectro 9, RMN ^1H (acetona) δ (ppm): 2,238 (s, 3H, -CH_3), 7,752 (dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, 1H, H-5), 7,753 (dd, $J_1=9.6$ Hz, $J_2=2.8$ Hz, 1H, H-5), 8,134 (d, $J_1=2.8$ Hz, 1H, H-3), 8,137 (d, $J_1=2.0$ Hz, 1H, H-3), 8,459 (d, $J_1=9.2$ Hz, 1H, H-6), 8,473 (d, $J_1=9.2$ Hz, 1H, H-6), 9,965 (sa, 1H, int. con D_2O, NH).</p>

Tabla 6. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

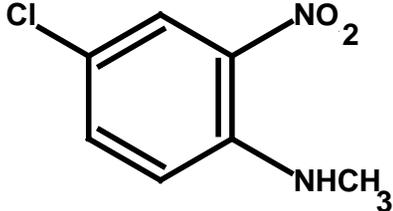
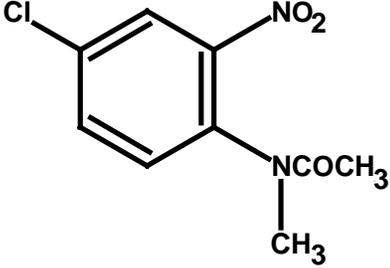
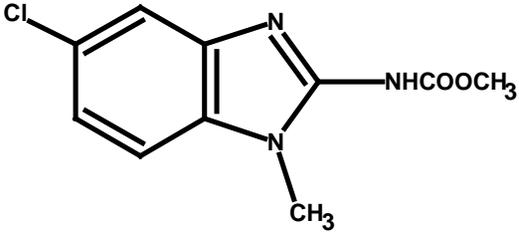
COMPUESTO, NÚMERO	SEÑALES
<p>(8)</p>  <p>Chemical structure of 1-(2-chloro-4-nitrophenyl)ethan-1-amine: A benzene ring with a chlorine atom at the 2-position, a nitro group (NO₂) at the 4-position, and a methylamino group (NHCH₃) at the 1-position.</p>	<p>Espectro 10, IR cm⁻¹: 3036 (C-H, aromático), 1658 (-CO), 1536 y 1359 (-NO₂), 112, 768.</p> <p>Espectro 11, EM (FAB) m/z: 229 (M⁺ +1, 100%), 187 (M⁺ -42, 50%), 136 (M⁺-93).</p> <p>Espectro 12, 400 MHz RMN ¹H (CDCl₃): 1.831 (s, 1H, -COCH₃), 2.244 (s, 1H, -COCH₃), 3.196 (s, 1H, -NCH₃), 3.420 (s, 1H, -NCH₃), 7.276 (d, J₁= 8.4, 1H, H-6), 7.38 (d, J₁= 8.4, 1H, H-6), 7.624 (dd, J₁= 8.4 Hz, J₂= 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.684 (dd, J₁= 8.4 Hz, J₂= 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.96 (d, J₁= 2.4 Hz, 1H, H-3), 8.009 (d, J₁= 2.4 Hz, 1H, H-3).</p>
<p>(9)</p>  <p>Chemical structure of 1-(2-chloro-4-nitrophenyl)ethan-1-one: A benzene ring with a chlorine atom at the 2-position, a nitro group (NO₂) at the 4-position, and an acetyl group (NCOCH₃) at the 1-position.</p>	<p>Espectro 13, IR cm⁻¹: 3376 (-NH), 3089 (C-H, aromático), 2910 y 1395 (-CH₃), 1550 y 1353 (-NO₂), 1173, 887, 803.</p> <p>Espectro 14, EM (ID) m/z: 186 (M⁺, 100%), 188 (M⁺², 33%), 139 (M⁺ - 47, 30%), 105 (M⁺ - 81, 97%), 77 (M⁺ - 109, 37%).</p> <p>Espectro 15, RMN ¹H δ (ppm): 3.032 (s, 3H, -CH₃), 6.85 (d, J₁= 9.6 Hz, 1H, H-6), 7.43 (dd, J₁= 9.2 Hz, J₂= 2.4 Hz, 1H, H-5), 8.026 (sa, int. con D₂O, NH), 8.200 (d, J₁= 2 Hz, 1H, H-3).</p>
<p>(AHM-11)</p>  <p>Chemical structure of 1-(2-chloro-5-methyl-1H-benzotriazol-4-yl)ethan-1-one: A benzotriazole ring system with a chlorine atom at the 2-position, a methyl group (CH₃) at the 5-position, and an acetyl group (NHCOOCH₃) at the 4-position.</p>	<p>Espectro 16, IR cm⁻¹: 3304 (-NH), 3036 (C-H, aromático), 2949 (C-H, alifático), 1592 (-CO), 1301 y 1077 (-CO-O-R), 1205, 794.</p> <p>Espectro 17, EM (ID) m/z: 239 (M⁺, 18%), 207 (M⁺ -32, 100%), 178 (M⁺ - 61, 15%), 124 (M⁺ - 115, 12%).</p> <p>Espectro 18, RMN ¹H δ (ppm): 3.040 (s, 3H, -NCH₃), 3.117 (s, 3H, -OCH₃), 6.90 (ddd, J₁= 8.4 Hz, J₂= 8.4 Hz, J₃= 1.8 Hz, 3H, H-4, 6, 7).</p>

Tabla 7. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

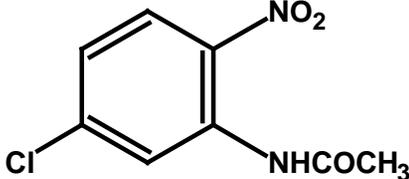
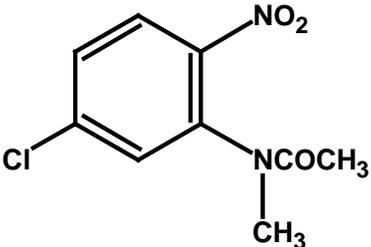
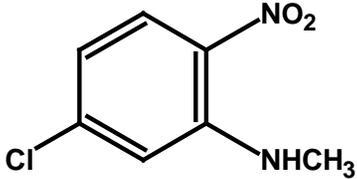
COMPUESTO, NÚMERO	SEÑALES
<p>(13)</p>  <p>Chemical structure of compound 13: 1-(4-chloro-3-nitrophenyl)ethan-1-one. It consists of a benzene ring with a chlorine atom at the para position, a nitro group at the meta position, and an acetyl group (-NHCOCH₃) at the other meta position.</p>	<p>Espectro 19, IR cm⁻¹: 3381 (-CO-NR), 3103 (C-H, aromático), 2917 y 1408 (C-H, alifático), 1617 (-CO), 1565 y 1315 (-NO₂), 1051, 902, 749.</p> <p>Espectro 20, EM (ID) m/z: 214 (M⁺, 17%), 216 (M⁺, 6%), 172 (M⁺ - 42, 100%), 142 (M⁺ - 72, 15%), 126 (M⁺ - 88, 20%).</p> <p>Espectro 21, RMN ¹H δ (ppm): 2.274 (s, 1H, -COCH₃), 7.35 (dd <i>J</i>₁= 9 Hz, <i>J</i>₂= 2.1 Hz, 1H, H-4), 8.203 (d, <i>J</i>₁= 9 Hz, 1H, H-3), 8.673 (d, <i>J</i>₁= 2.4 Hz, 1H, H-6), 10.154 (sa, int. con D₂O, NH).</p>
<p>(14)</p>  <p>Chemical structure of compound 14: 1-(4-chloro-3-nitrophenyl)ethan-1-one N-methylacetamide. It is similar to compound 13 but the acetyl group is an N-methylacetamide group (-NCOCH₃CH₃).</p>	<p>Espectro 22, IR cm⁻¹: 3426, (-NR₂), 3097 (C-H, aromático), 1660 (-CO), 1520 y 1350 (-NO₂), 1376, 1153, 837.</p> <p>Espectro 23, EM (FAB) m/z: 229 (M⁺ + 1, 100%), 187 (M⁺ -42, 98%), 137 (M⁺ - 92).</p> <p>Espectro 24, RMN ¹H δ (ppm): 1.845 (s, 3H, -COCH₃), 2.241 (s, 3H, -COCH₃), 3.206 (s, 3H, -NCH₃), 3.421 (s, 3H, -NCH₃), 7.317 (d, <i>J</i>₁= 2.1 Hz, 1H, H-6), 7.404 (d, <i>J</i>₁= 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.408 (dd <i>J</i>₁= 8.7 Hz, <i>J</i>₂= 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.539 (dd <i>J</i>₁= 8.4 Hz, <i>J</i>₂= 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.952 (d, <i>J</i>₁= 8.7 Hz, 1H, H-3), 8.002 (d, <i>J</i>₁= 9.0 Hz, 1H, H-3).</p>
<p>(15)</p>  <p>Chemical structure of compound 15: 1-(4-chloro-3-nitrophenyl)ethan-1-one N-methylacetamide. It is similar to compound 14 but the acetyl group is an N-methylacetamide group (-NHCH₃).</p>	<p>Espectro 25, IR cm⁻¹: 3329 (-NH), 3138 (C-H, aromático), 1579 y 1531 (-NO₂), 1409 (-CH₃), 1256 (-C-N), 867, 751, 610.</p> <p>Espectro 26, EM (ID) m/z: 186 (M⁺, 80%), 188 (M⁺, 28%), 139 (M⁺ - 47, 25%), 105 (M⁺ - 81, 100%), 77 (M⁺ - 109, 35%).</p> <p>Espectro 27, RMN ¹H δ (ppm): 3.098 (d, <i>J</i> = 4.5Hz, 3H, -CH₃, simplifica con D₂O), 6.693 (dd, <i>J</i>₁= 9.0 Hz, <i>J</i>₂= 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.035 (d, <i>J</i>₁= 2.4 Hz, 1H, H-6), 8.122 (d, <i>J</i>₁= 9.3 Hz, 1H, H-3), 8.204 (sa, 1H, int. con D₂O, NH).</p>

Tabla 8. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

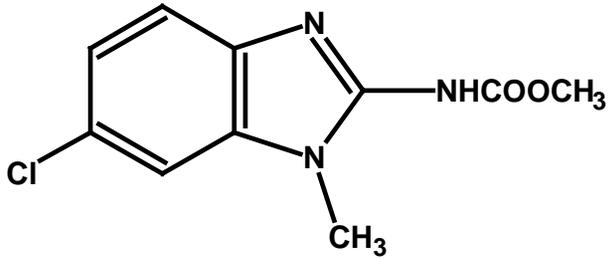
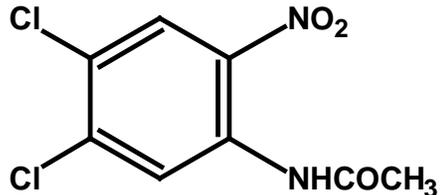
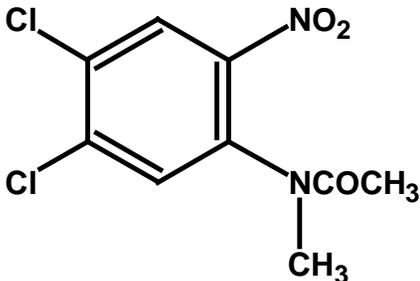
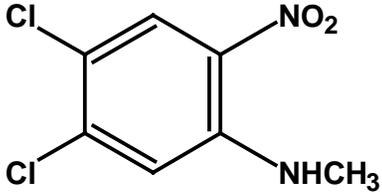
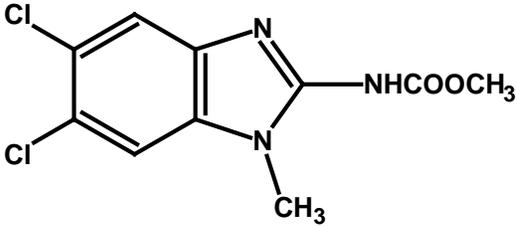
COMPUESTO, NÚMERO	SEÑALES
<p>(AHM-17)</p> 	<p>Espectro 28, IR cm^{-1}: 3291 (-NH de amida), 2947 (C-H, alifático), 1703 (OCH₃), 1626 (-CO-), 1556, 1284, 1079.</p> <p>Espectro 29, EM (ID) m/z: 239 (M⁺, 10%), 241 (M⁺², 3%), 207 (M⁺- 32, 100%), 182 (M⁺- 57, 50%), 153 (M⁺- 86, 20%).</p> <p>Espectro 30, RMN ¹H δ (ppm): 3.728 (s, 3H, -NCH₃), 3.821 (s, 3H, -OCH₃), 7.258-7.349 (m, 3H, H-4, H-5 y H-7), 9.915 (da, 1H, int. con D₂O, NH).</p>
<p>(18)</p> 	<p>Espectro 31, IR cm^{-1}: 3214 (-NH-CO), 3143 (C-H, aromático), 1678 (-CO), 1575 y 1374 (-NO₂), 1272 (-C-N), 1272, 1140, 886, 867, 646.</p> <p>Espectro 32, EM (FAB) m/z: 248 (M⁺¹, 15%), 250 (M⁺², 10%), 252 (M⁺⁴, 3%), 206 (M⁺- 42, 100%), 176 (M⁺- 72, 20%), 160 (M⁺- 88, 30%), 97 (M⁺- 151, 30%).</p> <p>Espectro 33, RMN ¹H δ (ppm): 2.312 (s, 3H, -COCH₃), 8.339 (s, 1H, H-6), 9.067 (s, 1H, H-3), 10.321 (sa, 1H, int. con D₂O, NH).</p>
<p>(20)</p> 	<p>Espectro 34, IR cm^{-1}: 3092 (C-H, aromático), 2928 (C-H, alifático), 1656 (-CO), 1527 y 1390 (-NO₂), 896, 866</p> <p>Espectro 35, EM (FAB) m/z: 263 (M⁺¹, 70%), 265 (M⁺⁴, 70%), 221 (M⁺-42, 30%), 154 (M⁺- 109, 100%), 136 (M⁺- 127, 75%), 89 (M⁺- 174, 20%).</p> <p>Espectro 36, RMN ¹H δ (ppm): 1.805 (s, 3H, -COCH₃), 2.177 (s, 3H, -COCH₃), 3.138 (s, 3H, -NCH₃), 3.528 (s, 3H, -NCH₃), 7.810 (s, 1H, H-6), 8.040 (s, 1H, H-3), 8.179 (s, 1H, H-6), 8.377 (s, 1H, H-3).</p>

Tabla 9. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

COMPUESTO, NÚMERO	SEÑALES
<p>(21)</p>  <p>The structure shows a benzene ring with two chlorine atoms at the 2 and 4 positions, a nitro group at the 6 position, and an N-methylamino group at the 1 position.</p>	<p>Espectro 37, IR cm^{-1}: 3389 (-NH), 3075 (C-H, aromático), 2909 (C-H, alifático), 1510 y 1336 (-NO₂), 1252, 1217, 939.</p> <p>Espectro 38, EM (ID) m/z: 220 (M⁺, 80%), 222 (M⁺², 50%), 224 (M⁺⁴, 8%), 147 (M⁺-73, 55%), 139 (M⁺-81, 100%).</p> <p>Espectro 39, RMN ¹H δ (ppm): 3.114 (d, $J= 4.8\text{Hz}$, simplifica con D₂O, 3H, -CH₃), 7.242 (s, 1H, H-6), 8.182 (sa, int. con D₂O, NH), 8.235 (s, 1H, H-3).</p>
<p>(AHM-23)</p>  <p>The structure shows a benzene ring fused to a 1,2,4-triazole ring. The benzene ring has chlorine atoms at the 2 and 4 positions. The triazole ring has a methyl group on the nitrogen at position 1 and a methyl ester group (-NHCOOCH₃) at position 3.</p>	<p>Espectro 40, IR cm^{-1}: 3274 (-CO-NH), 2950 (C-H, alifático), 1606 (-CO), 1588, 1281, 1086.</p> <p>Espectro 41, EM (ID) m/z: 273 (M⁺, 10%), 275 (M⁺², 6%), 241 (M⁺-32, 100%), 186 (M⁺-87, 15%).</p> <p>Espectro 42, RMN ¹H δ (ppm): 3.342 (s, 1H, -N-CH₃), 3.648 (s, 1H, -O-CH₃), 7.587 (s, 1H, H-4), 7.789 (s, 1H, H-7) 12.101 (sa. int. con D₂O, NH).</p>

Resultados de la parte Química

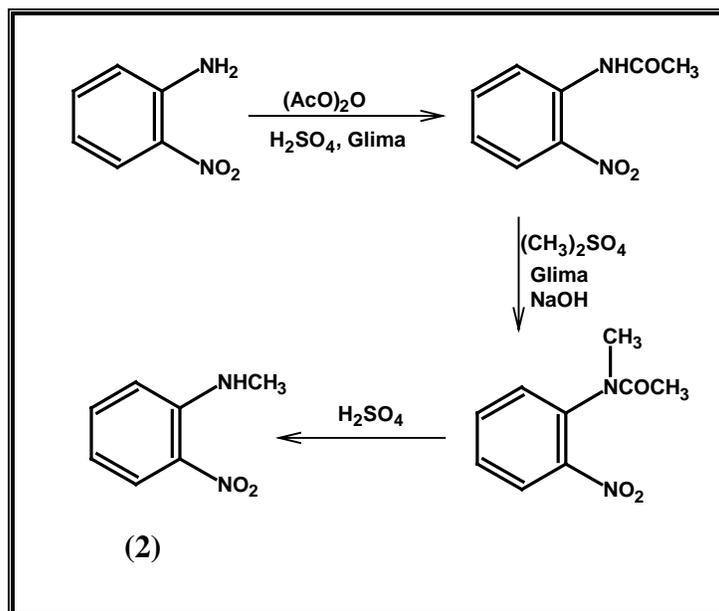
Para la síntesis de los carbamatos de metilo **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** fue necesario partir de las *N*-metil-*o*-feniléndiaminas adecuadamente sustituidas (**3**, **10**, **16** y **22**), las cuales se prepararon según como se describió en el **Esquema 8a**. A continuación se presenta una breve discusión de los resultados obtenidos, tanto en la preparación de los intermediarios, así como para la obtención de los productos finales.

6.1.2. Intermediarios de reacción

El compuesto **2** se preparó por dos rutas. La primera fue una síntesis de un solo paso, mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática entre el 2-cloronitrobenzono y clorhidrato de metilamina en presencia de carbonato de potasio y etanol. La reacción se llevo acabó en condiciones drásticas, ya que se utilizó un reactor cerrado de acero inoxidable y calentamiento a 130°C.

El producto de reacción se identificó fácilmente a través de espectroscopia de RMN ¹H, donde se demostró la presencia del metilo de la amina por el singulete en 3.029 ppm que se asignó al -NCH₃. La espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto con *m/z* de 152 (81%). La segunda ruta partió de la 2-nitroanilina, la cual primeramente se sometió a una reacción de acetilación, después su posterior *N*-metilación y por último, la hidrólisis del grupo acetamido llevó al compuesto **2**, **Esquema 9**.

El rendimiento global de esta secuencia de tres pasos fue de 25 %, inferior al obtenido por la síntesis directa, como era de esperarse. La espectroscopia del producto obtenido por esta ruta se comparó con la del obtenido por la ruta directa y coincidió en todos los casos, además, el *pf* y el *Rf* fueron los mismos. El principal problema en la obtención de **2** fue la purificación por recristalización, debido a su bajo punto de fusión.



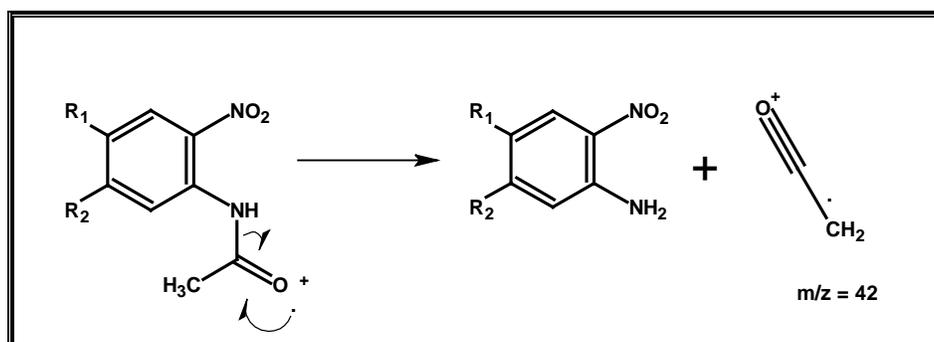
Esquema 9. Ruta alterna para la preparación de 2.

La reacción de hidrogenación catalítica de **2**, empleando Pd/C como catalizador a temperatura ambiente, dio formación a la amina correspondiente con altos rendimientos del producto crudo (**3**). En el caso de las aminas cloradas (**9,15,21**) se empleó como catalizador Ni-Raney, debido a la agresividad del Pd/C, el cual promueve la hidrogenólisis. En todas las reacciones de hidrogenación catalítica se obtuvieron buenos rendimientos del producto crudo **Tabla 4**. Las diaminas como tal, se emplearon en la siguiente reacción debido a su rápida oxidación.

El compuesto **7** se obtuvo por acetilación directa de la 4-cloro-2-nitroanilina. No así los compuestos **13** y **18** que se obtuvieron por nitración de las correspondientes acetanilidas, **13** con nitrato de acetilo y **18** con mezcla sulfonítrica.

Los compuestos **7**, **13** y **18** presentaron las bandas características en el espectro de IR del grupo carbonilo a 1713, 1617 y 1678, respectivamente. Los espectros de masas realizados por las técnicas de FAB y por ID mostraron los iones moleculares con m/z de 214, 214 y 248 que concuerdan con la masa molecular esperada para cada compuesto.

Además, en todos los casos se observó que el pico base del espectro correspondió a la 2-nitroanilina sustituida, ($m/z = 172$ para los compuestos monoclorados y $m/z = 206$ para el diclorado), que fue generada por la pérdida del ion acilo menos un protón ($m/z = 42$) (**Esquema 10**). En los espectros de RMN ^1H de los compuestos **7**, **13** y **18** se observó el fenómeno de atropoisomerismo ya que todas las señales se presentaron por duplicado.



Esquema 10. Mecanismo de fragmentación de los intermediarios 7, 13 y 18.

Con lo que respecta a los compuestos **8**, **14** y **20** los espectros de masas por FAB mostraron una relación m/z ($M^+ + 1$) de 229 para los compuestos **8**, **14** y de 263 para **20**. La pérdida principal fue generada al perder 42 unidades de masa, lo que correspondió a la fragmentación del grupo acetilo tal y como sucedió para sus antecesores no metilados. Los datos proporcionados por RMN ^1H mostraron la unión del metilo al nitrógeno por las señales a 3.196, 3.206 y 2.177 respectivamente, lo que confirmó la *N*-metilación de la materia prima correspondiente. También en este caso el fenómeno de atropoisomerismo se observó claramente. En la **Figura 8** se muestra el espectro de RMN ^1H para el compuesto *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**8**), en el que la duplicidad de las señales es evidente; también se puede ver que la mezcla de isómeros está en relación 70:30. Los espectros de masas concordaron con los iones esperados.

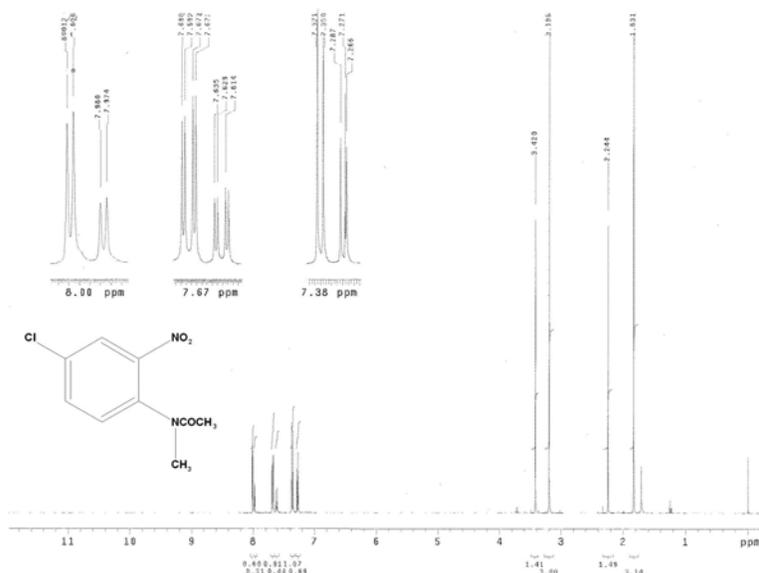


Figura 8. Duplicación de las señales para el compuesto 8 debidas al atropisomerismo.

El análisis espectroscópico de IR para los compuestos **2**, **9**, **15** y **21** mostraron la señal característica de la amina secundaria a 3387, 3376, 3329 y 3389, respectivamente. Además, en estos compuestos se observaron las bandas características del grupo nitro, entre 1575 y 1355 para **3**, de 1550 y 1353 para **9**, 1579 y 1331 para **15**; y de 1510 y 1336 para **21**.

Los espectros de masas realizados por introducción directa de los compuestos **2**, **9**, **15** y **21**, mostraron los iones moleculares con m/z de 152, 186, 186 y 220 que concuerdan con la masa molecular esperada para cada uno de los compuestos obtenidos, y el pico base del espectro para cada compuesto correspondió a la pérdida de 75 unidades de masa, correspondiente a la pérdida del grupo nitro y del metilamino, para el compuesto **2**, para el compuesto **9** el pico base correspondió al ión molecular, aunque la pérdida de 81 unidades de masa presentó una abundancia del 97%. Finalmente, para el compuesto **15**, así como para el compuesto **21**, el ión molecular correspondió a la pérdida de 81 unidades de masa, lo que correspondió a la pérdida del grupo nitro y de un cloro. Así mismo, la espectroscopia de RNM ¹H mostró el H de amina secundaria a campos bajos dando las señales a 8.100, 8.026, 8.204 y de 8.235 que intercambiaron con D₂O, para los compuestos **2**, **9**, **15** y **21** respectivamente.

6.1.3. Compuestos finales. (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo

La síntesis de los (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo, **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, consistió en la ciclocondensación de la *o*-fenilendiamina correspondiente con el intermediario [imino(metiltio)metil]carbamato de metilo preparado en el momento en condiciones ácidas (buffer de acetatos). La síntesis de este intermediario fue clave, ya que requirió de mucho cuidado en mantener el pH de la reacción entre 7-8; de otra manera, por debajo de este pH la reacción no procedió y por arriba el producto se descompone. Los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** se obtuvieron con buenos rendimientos (**Tabla 3**). Esto se debió en gran medida a que se trabajó inmediatamente la *o*-feniléndiamina correspondiente después de la reacción de reducción, así como a de la preparación previa del reactivo intermediario.

Para los compuestos **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23** el espectro de IR mostró las señales características del -NH del carbamato a 3308, 3304, 3312 y 3274 respectivamente. También fue importante la señal del C=O que se observó entre 1703 y 1626. Así mismo, la espectrometría de masas mostró los iones de m/z de 205, 239, 239 y 273 respectivamente, concordantes con la masa molecular esperada para cada compuesto. El pico base de cada compuesto correspondió a la pérdida de 32 unidades de masa, correspondiendo a la pérdida de una molécula de HO-CH₃.

Los datos proporcionados por RMN ¹H mostraron los cambios estructurales, donde se observó la señal del metilo del éster carbámico como un singulete a 3.602, 3.177, 3.821 y 3.648, para los compuestos finales **AHM-4**, **AHM-11**, **AHM-17** y **AHM-23**, respectivamente, y también mostró el singulete a 3.485, 3.040, 3.728 y a 3.342 respectivamente, correspondiente al metilo en posición 1 del bencimidazol; además de la señal a campos bajos característica del N-H, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D₂O.

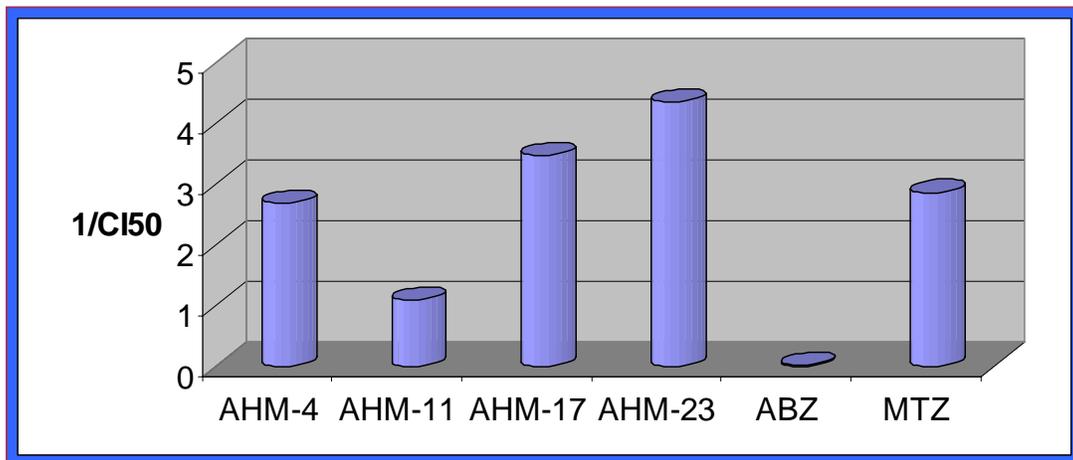
6.2. Efecto de los (1-Metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo (AHM-4, AHM-11, AHM-17 y AHM-23) sobre: *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

El resultado de la evaluación de la actividad antiprotozoaria, contra *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis in vitro*, de los cuatro compuestos sintetizados en este trabajo y de los controles positivos se muestran en la **Tabla 10**. En ésta podemos apreciar que fueron activos contra los parásitos de estudio con CI_{50} menores a 1 μ M, excepto en uno de los casos. La efectividad de dichos compuestos, cuando se realizó el estudio con *E. histolytica*, fue superior a la que muestra el albendazol en todos los casos, con lo que respecta al metronidazol los compuestos **AHM-17** y **AHM-23** fueron ligeramente más activos mientras que el compuesto **AHM-4** presentó una actividad cercana a la del metronidazol.

Tabla 10. Evaluación antiprotozoaria de los carbamatos AHM-4, AHM-11, AHM-17 y AHM-23

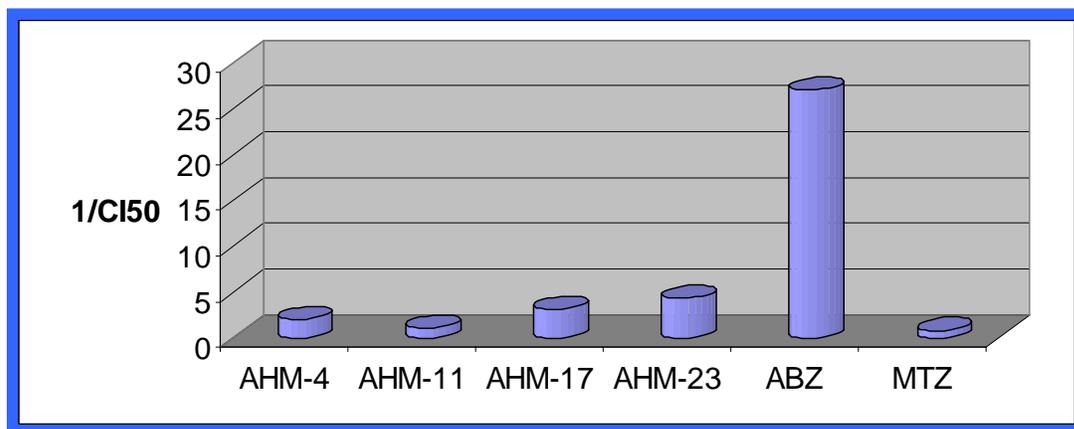
COMPUESTO	CI_{50} μ M <i>E. histolytica</i>	CI_{50} μ M <i>G. intestinalis</i>	CI_{50} μ M <i>T. vaginalis</i>	-R ₁	-R ₂
AHM-4	0.3732	0.4990	1.3140	H	H
AHM-11	0.9221	0.9560	0.4380	Cl	H
AHM-17	0.2879	0.3200	0.3490	H	Cl
AHM-23	0.2298	0.2330	0.5380	Cl	Cl
Albendazol	56.600	0.0370	1.592		
Metronidazol	0.3500	1.2280	0.2160		

Aunque todos los compuestos presentaron actividad contra *E. histolytica*, los compuestos **AHM-17** y el **AHM-23** fueron los más activos, siendo 1.22 y 1.52 veces más activos respectivamente que el metronidazol (**Gráfica 3**), y muy superiores al albendazol, 196.5 y 246.3 veces respectivamente.

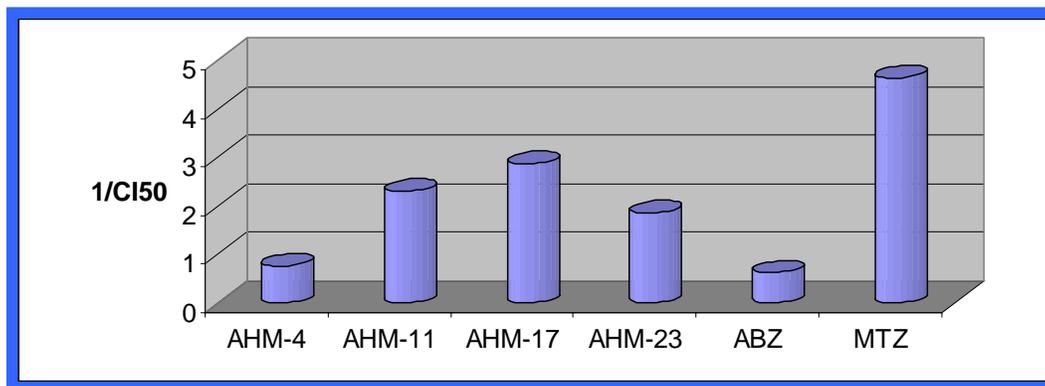


Gráfica 3. Actividad de los compuestos sintetizados sobre *E. histolytica*.

En el caso de *G. intestinalis* todos los compuestos presentaron mayor actividad que el metronidazol, entre 1.3 y 5.3 veces más activos. Nuevamente, **AHM-17** y **AHM-23** fueron los más activos de la serie, pero ninguno superó al albendazol (**Grafica 4**). Con respecto a *T. vaginalis* tres compuestos resultaron con una actividad importante, mejor que la presentada por el albendazol pero no así a la del metronidazol. El compuesto **AHM-17** fue aproximadamente 0.5 veces menos activo que el metronidazol lo que lo hace el más activo del grupo de compuestos sintetizados contra este parásito. (**Grafica 5**).



Grafica 4. Actividad de los compuestos sintetizados sobre *G. intestinales*.

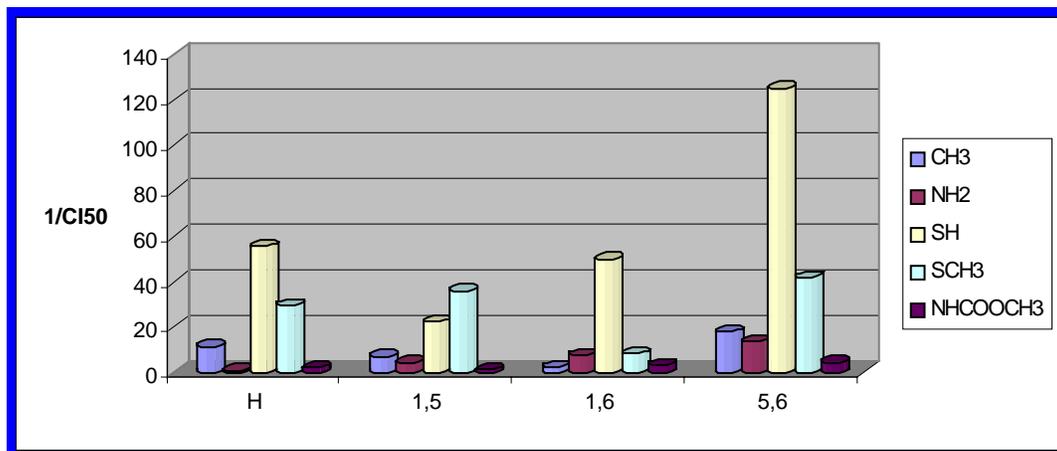


Grafica 5. Actividad de los compuestos sintetizados sobre *T. vaginalis*.

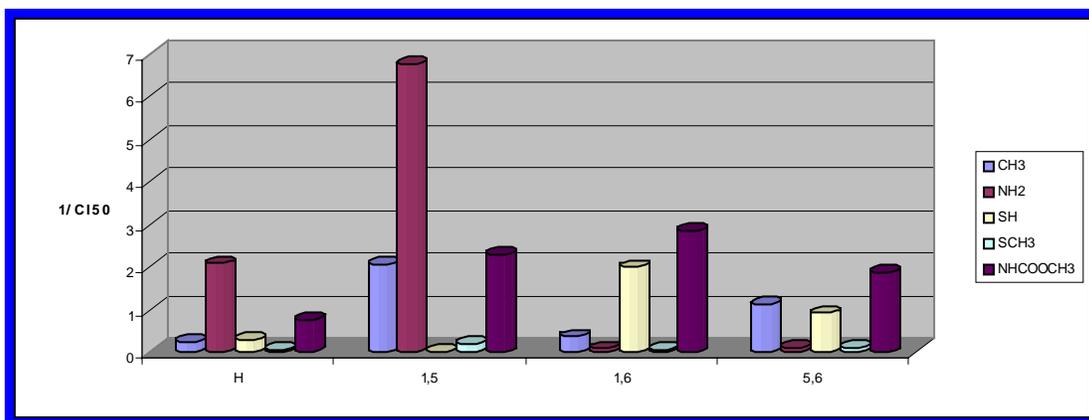
Al comparar la actividad de los (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo con sus análogos 1-metilbencimidazólicos, mostrados en la **Tabla 1**, observamos que los carbamatos fueron menos activos que los 1-metilbencimidazoles ya reportados en los ensayos *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. intestinalis*, por lo que podemos apreciar que la actividad se incrementa notablemente cuando se trata al parásito con los compuestos que tienen en posición 2 del bencimidazol los grupos: $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SH}$, $-\text{SCH}_3$. Con lo que respecta a *T. vaginalis* observamos que, en general, los compuestos del presente estudio son más activos que los compuestos 1-metilados previamente sintetizados por nuestro grupo de investigación. (**Graficas 6 y 7**). Por otro lado, al comparar la actividad antiprotozoaria de los (1*H*-bencimidazoles-2-il)carbamatos de metilo (**Tabla 2**) previamente reportados por nuestro grupo con los nuevos derivados 1-metilados (**Gráficas 8 y 9**) observamos que los nuevos carbamatos de este estudio presentaron un aumento en la actividad contra *E. histolytica*, y una disminución en la actividad contra *G. intestinalis*.

Esto nos hace ver que el efecto del grupo metilo en posición 1, si bien ejerce una actividad antiprotozoaria, no supera a la de sus análogos 1-metilados, por un lado; y por otro, disminuyeron la actividad de los (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo. Esto datos sugieren efectivamente que los 1-metilbencimidazoles actúan por un mecanismo diferente a de los (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo y que el grupo en la posición 1 del bencimidazol es de vital importancia para uno u otro mecanismo.

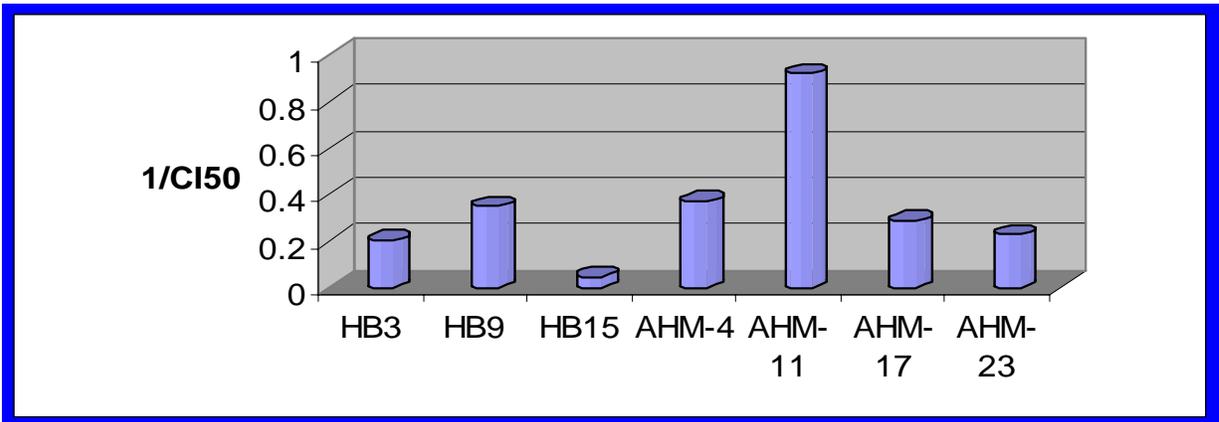
Con base en los resultados obtenidos de los ensayos de actividad biológica podemos apreciar que dicha actividad está en función de ciertos requerimientos estructurales. En la **Tabla 10** observamos que los compuestos más activos fueron el **AHM-17** y el **AHM-23**. Esto nos indica que es indispensable el sustituyente cloro en la posición 6, ya que es más activo que su isómero en 5 (**AHM-11**). También en las gráficas observamos que en general, el compuesto más activo de la serie es el **AHM-23**, esto se debe a la contribución de las dos posiciones ocupadas.



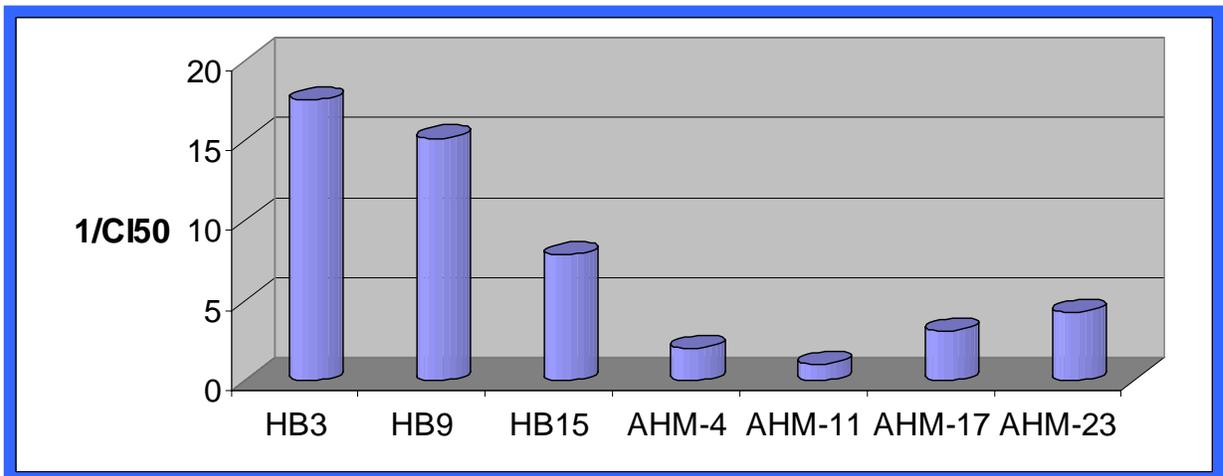
Gráfica 6. Comparación de la CI_{50} de los compuestos 1-metilados-2-sustituidos con los del presente trabajo sobre *G. intestinalis*.



Gráfica 7. Comparación de la CI_{50} de los compuestos 1-metilados-2-sustituidos con los del presente trabajo sobre *T. vaginalis*.



Gráfica 8. Comparación de las CI_{50} de los 1*H*-bencimidazol-2-carbamatos de metilo contra los 1-metil-bencimidazol-2-carbamatos de metilo sobre *E. histolytica*.



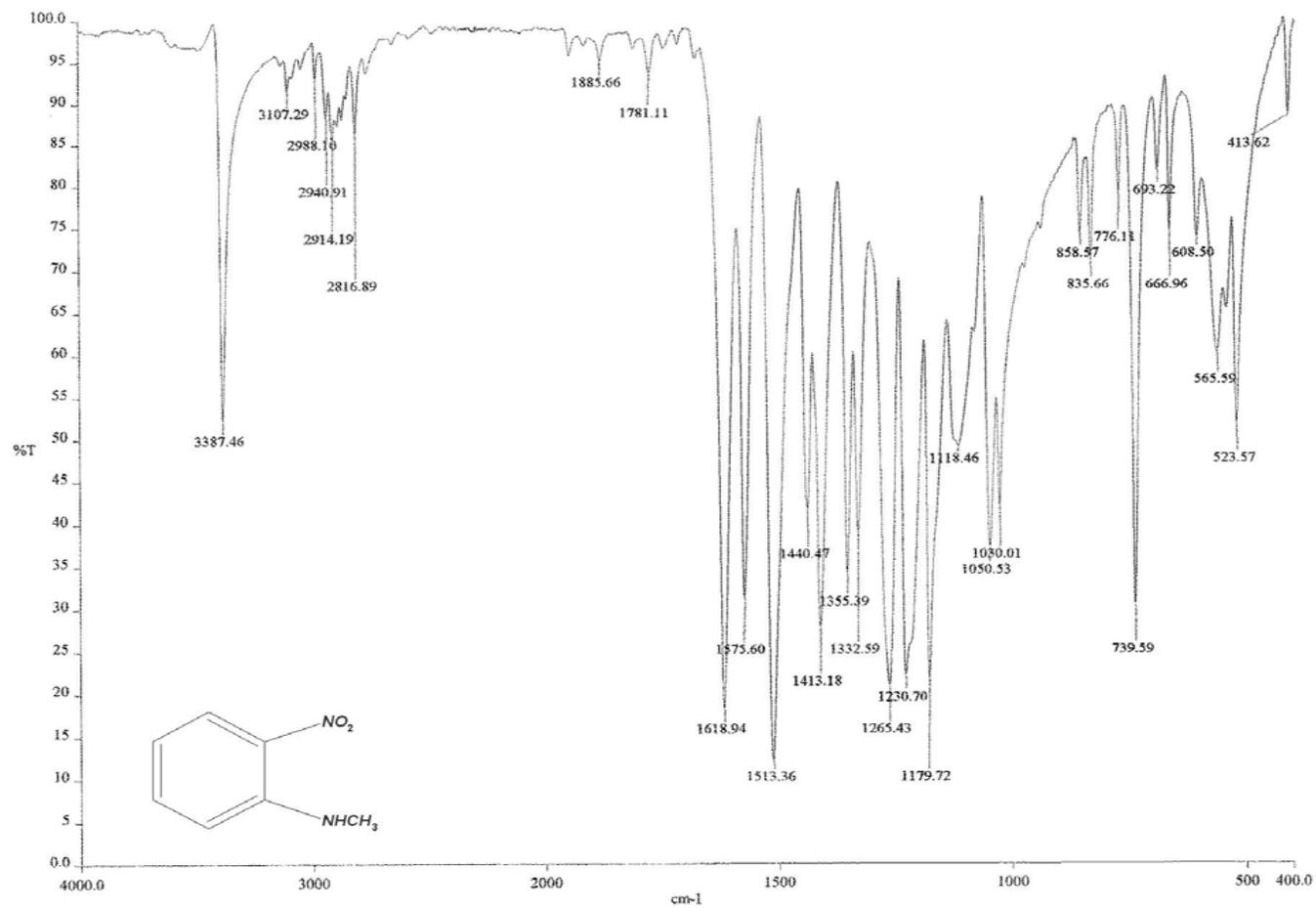
Gráfica 9. Comparación de las CI_{50} de los 1*H*-bencimidazol-2-carbamatos de metilo contra los 1-metil-bencimidazol-2-carbamatos de metilo sobre *G. intestinalis*.

7. CONCLUSIONES

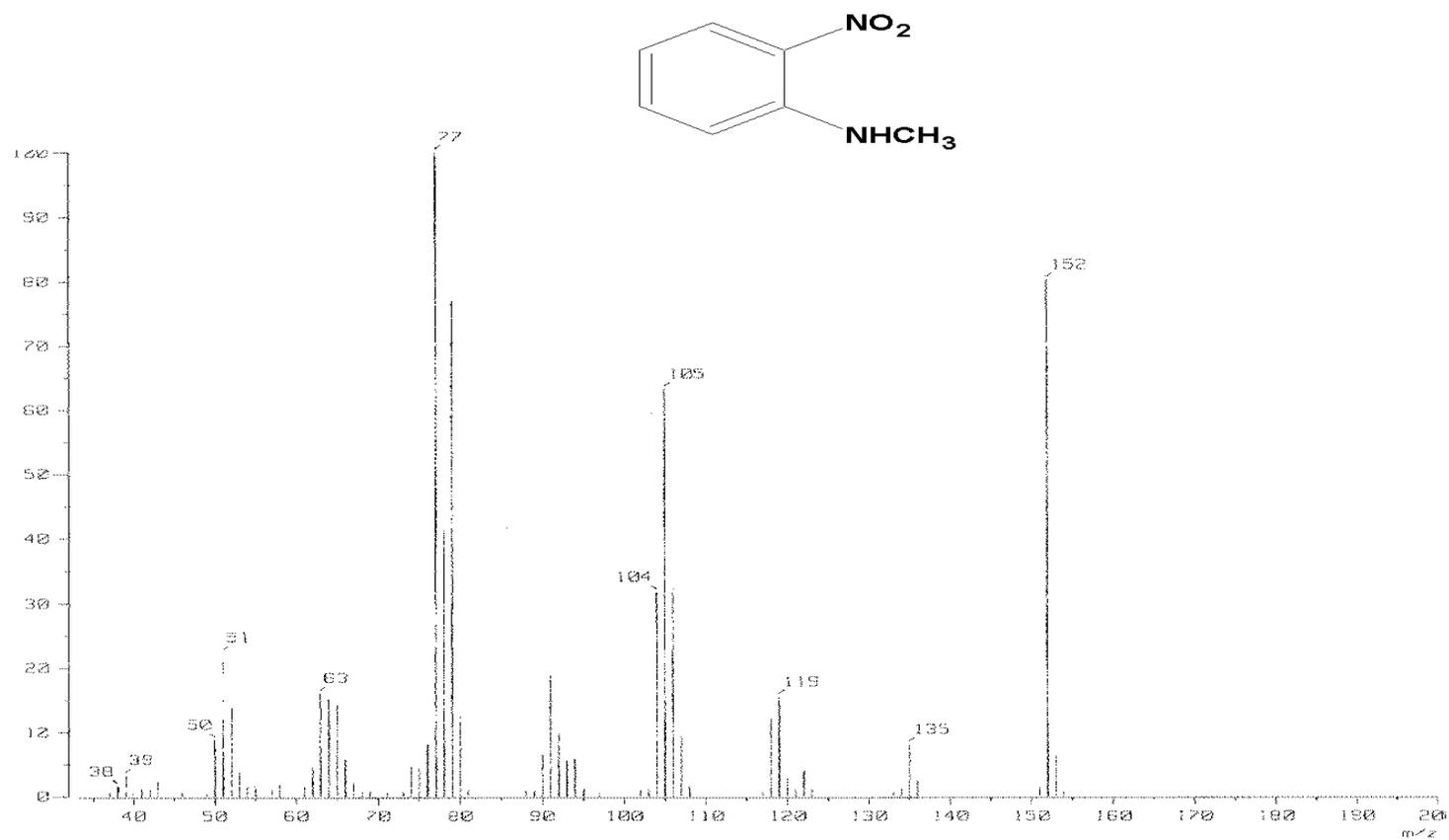
- Se sintetizaron los cuatro compuestos propuestos con clave **AHM-4**, **AMM-11** , **AHM-17** y **AHM-23**, a partir de las o-feniléndiaminas recién preparadas. La estructura de los compuestos se comprobó por las técnicas espectroscópicas y espectrométricas. También se les determinó sus constantes físicas como p_f y R_f Los rendimientos fueron entre 80-88% ya recristalizados.
- Se prepararon los compuestos intermediarios para la síntesis de los compuestos finales a partir de materias primas simples. Las constantes físicas y espectroscópicas de los intermediarios de síntesis fueron concordantes con las reportadas previamente. En algunos casos se mejoraron los rendimientos y la pureza, así como también algunas técnicas de preparación. Todos los rendimientos fueron mayores al 80%.
- Se evaluó la actividad antiparasitaria de los compuestos finales *in vitro* contra los protozoarios *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T vaginalis*. En general podemos mencionar que los compuestos **AHM-17** y **AHM-23** fueron los más activos de la serie.
- Es importante destacar que los todos los compuestos **AMH-4**, **AMH-11**, **AMH-17** y **AMH-23** fueron mucho más activos que el ABZ contra *E. histolytica* y *T vaginalis* pero no contra *G. intestinales*.
- Se observa que la posición 6 en el núcleo bencimidazólico es importante para la actividad biológica de estos compuestos, ya que el compuesto **AHM-17**, el cual presenta la relación 1,6 en base al metilo y el cloro, fue en general el más activo de la serie. Por consiguiente, el compuesto **AHM-23** (clorado en 5 y 6) tuvo buena actividad antiprotozoaria.

- La sustitución en la posición 2 por un carbamato de metilo disminuye la actividad antiprotozoaria con relación a los 1-metilbencimidazole análogos con grupos más pequeños en la posición 2 del bencimidazol (CH₃, NH₂, SH, SCH₃).
- La actividad biológica de estos compuestos al sustituir un -H por un -CH₃ en la posición 1 del bencimidazol, en relación a los (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo, fue significativamente menor en relación a *G. intestinalis*, pero no así con *E. histolytica*.

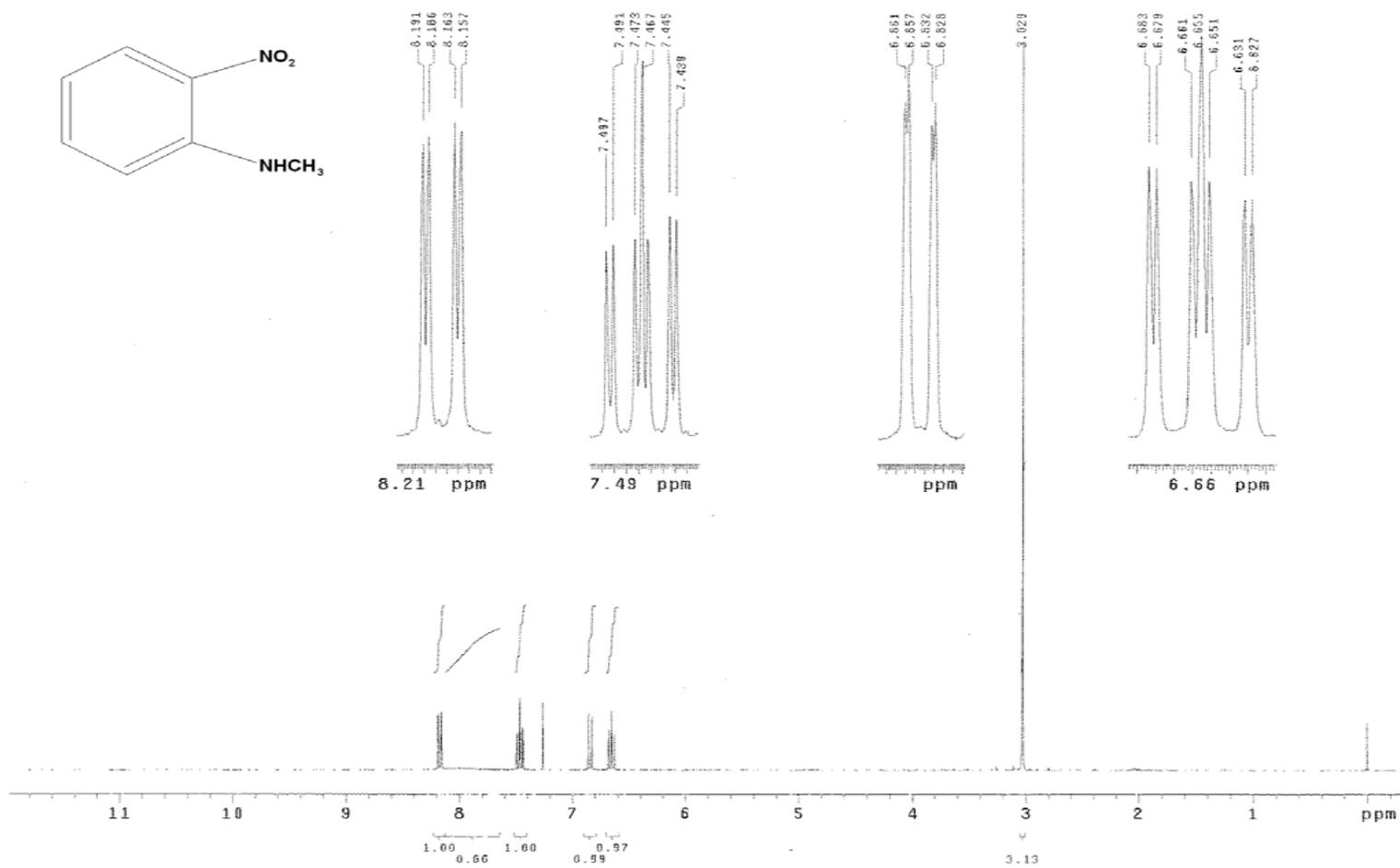
APÉNDICE



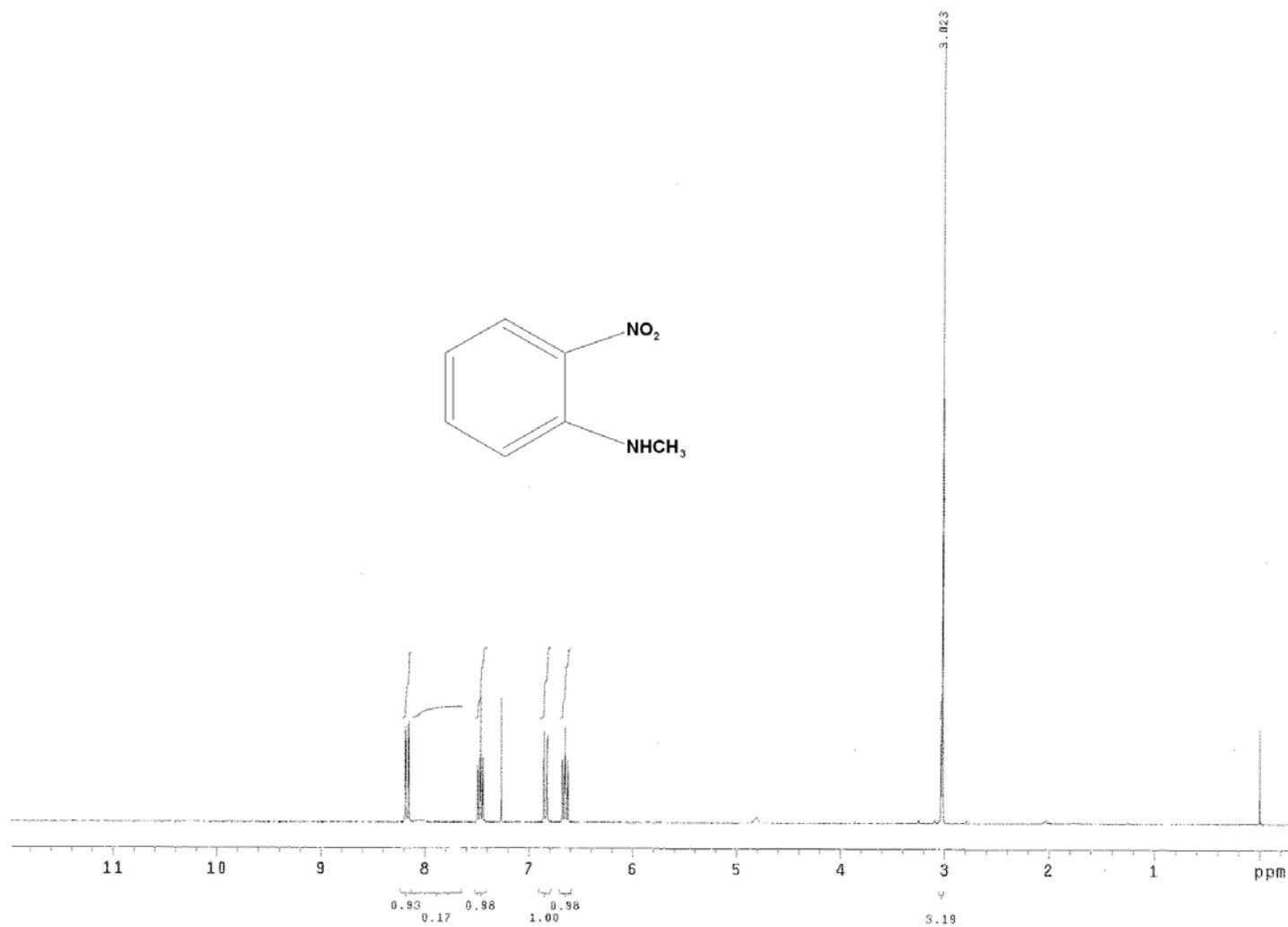
Espectro No. 1. IR (KBr) cm⁻¹: N-metil-N-(2-nitrofenil)amina (2)



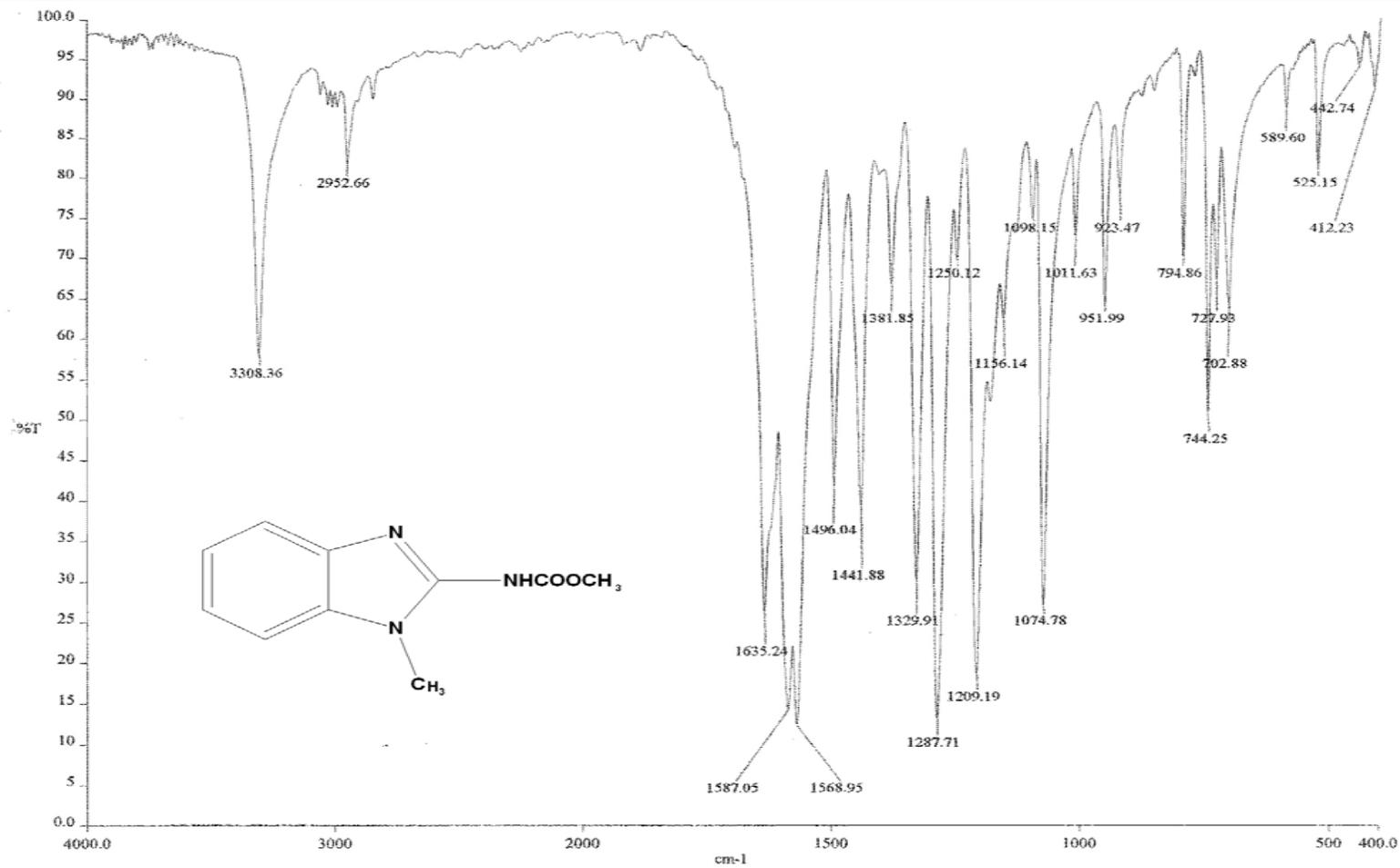
Espectro No. 2. EM (IE/ID) m/z : *N*-metil-*N*-(2-nitrofenil)amina (2)



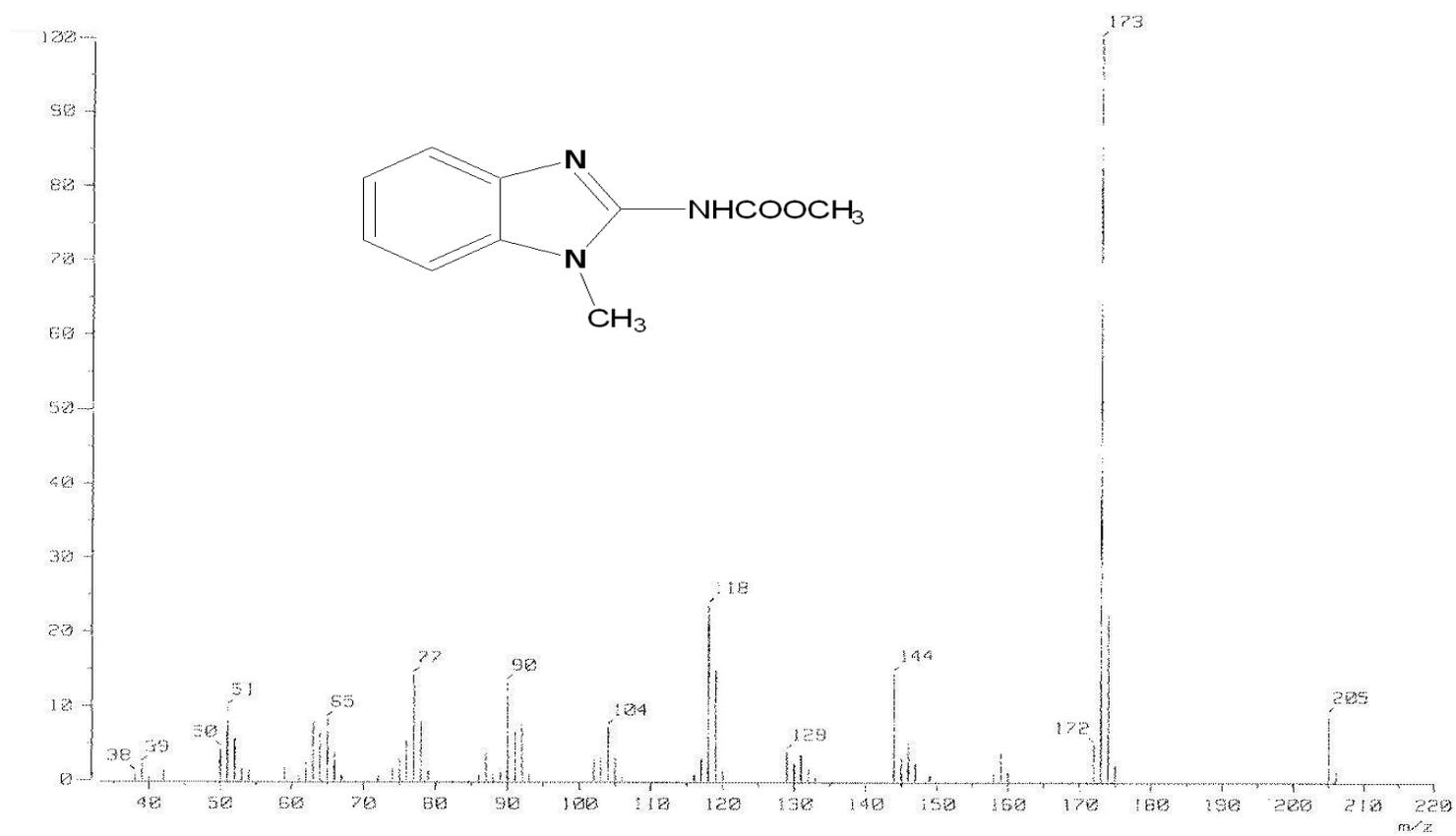
Espectro No. 3^a. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: *N*-metil-*N*-(2-nitrofenil)amina (2)



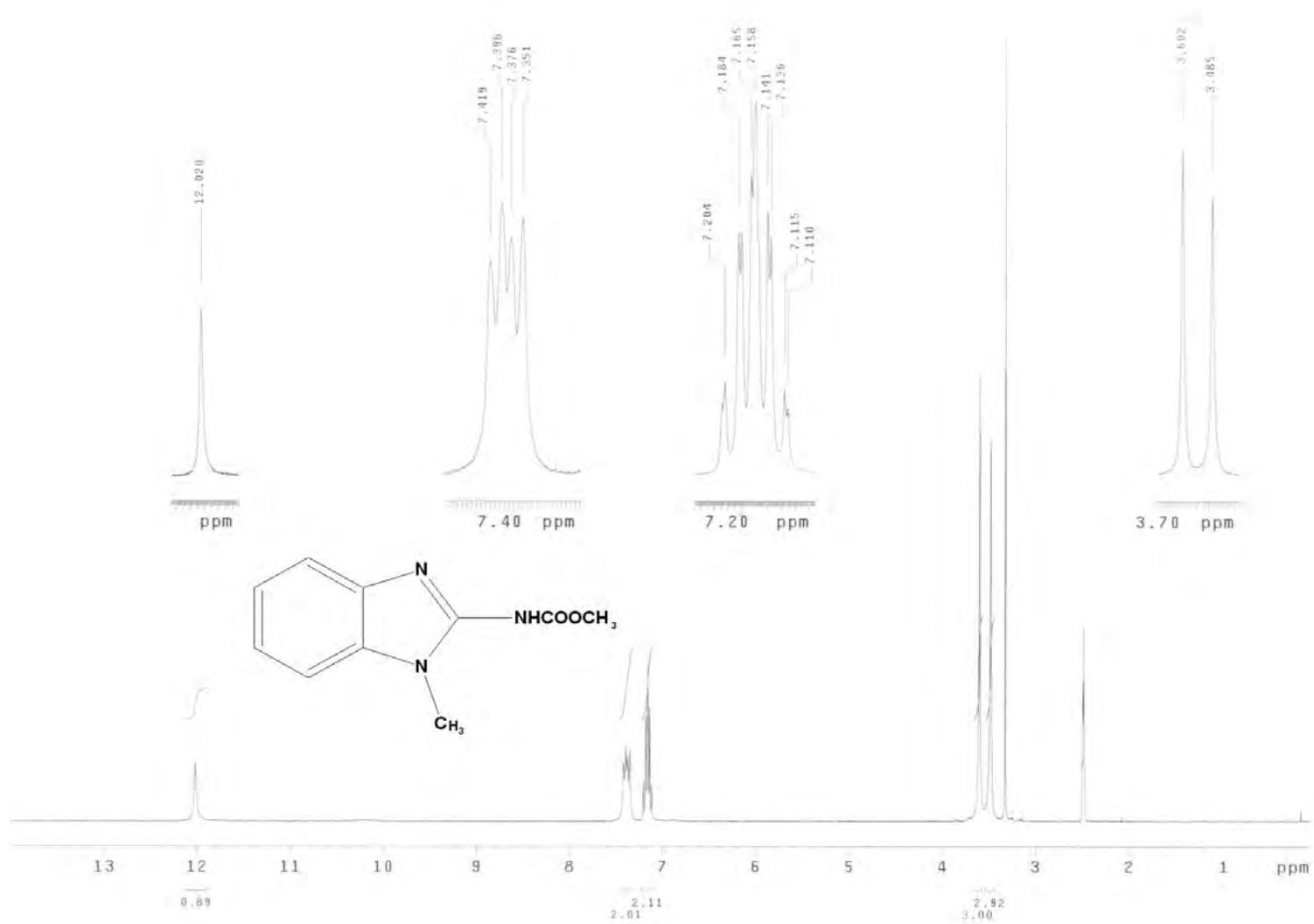
Espectro No. 3^b. (TMS, CDCl₃), Intercambio con D₂O, ppm: *N*-metil-*N*-(2-nitrofenil)amina (2)



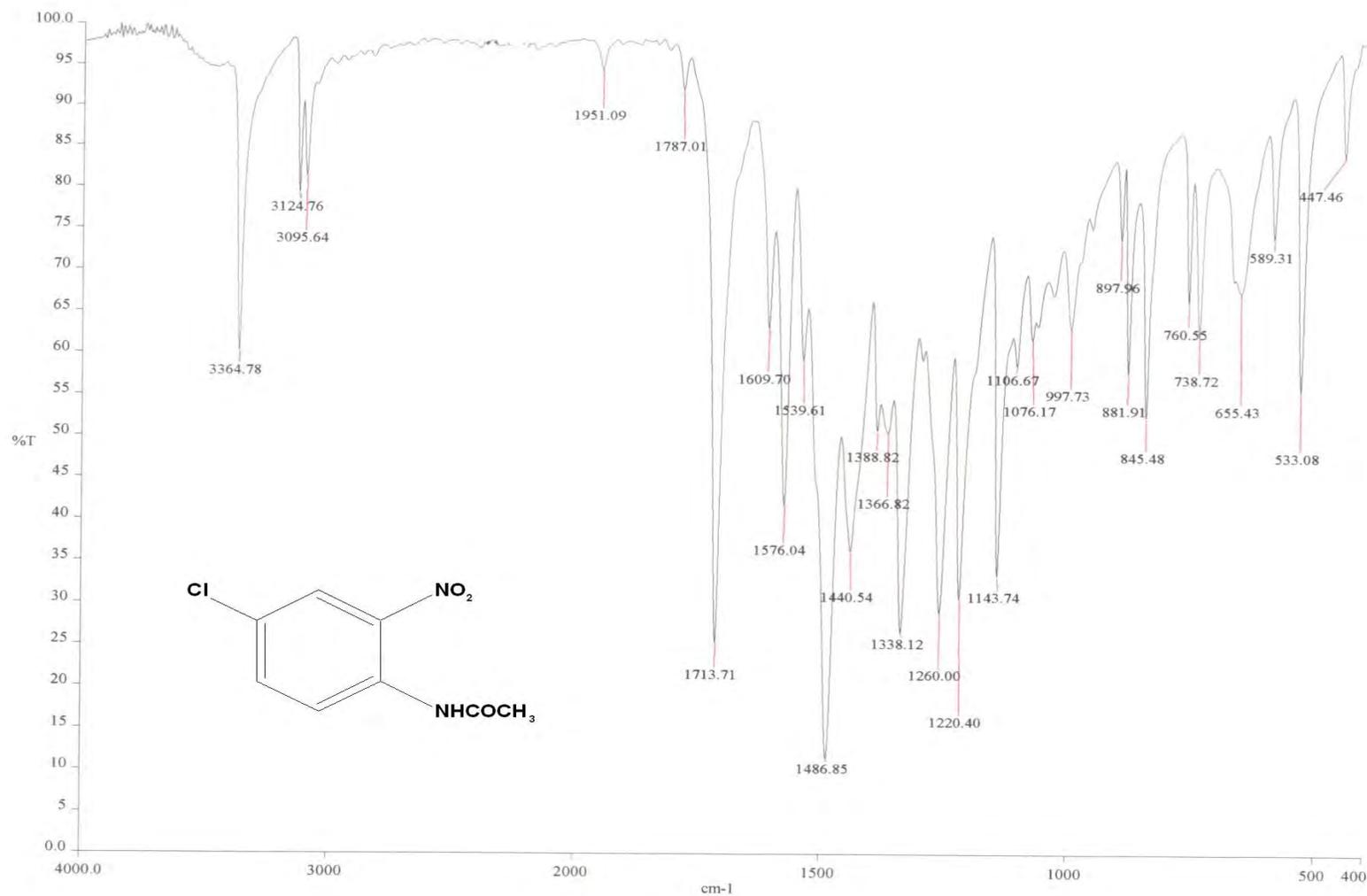
Espectro No. 4. IR (KBr) cm⁻¹: 1-metil-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-4)



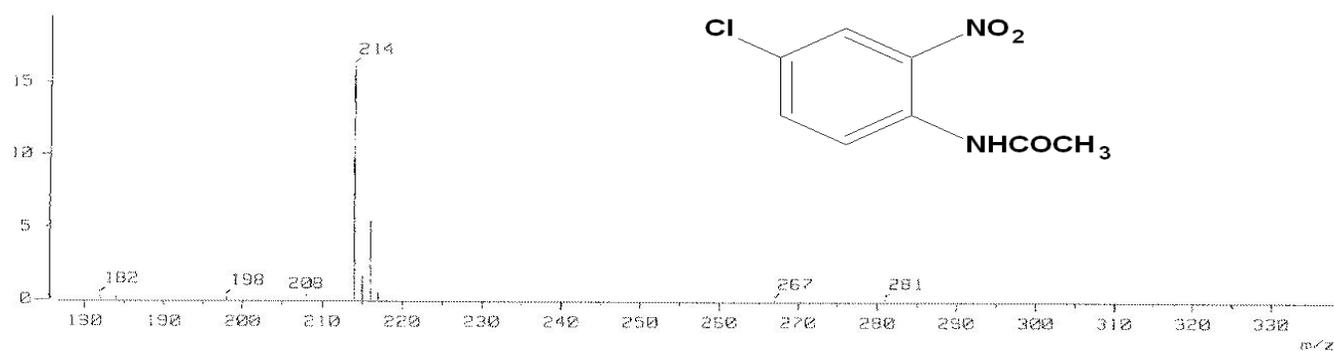
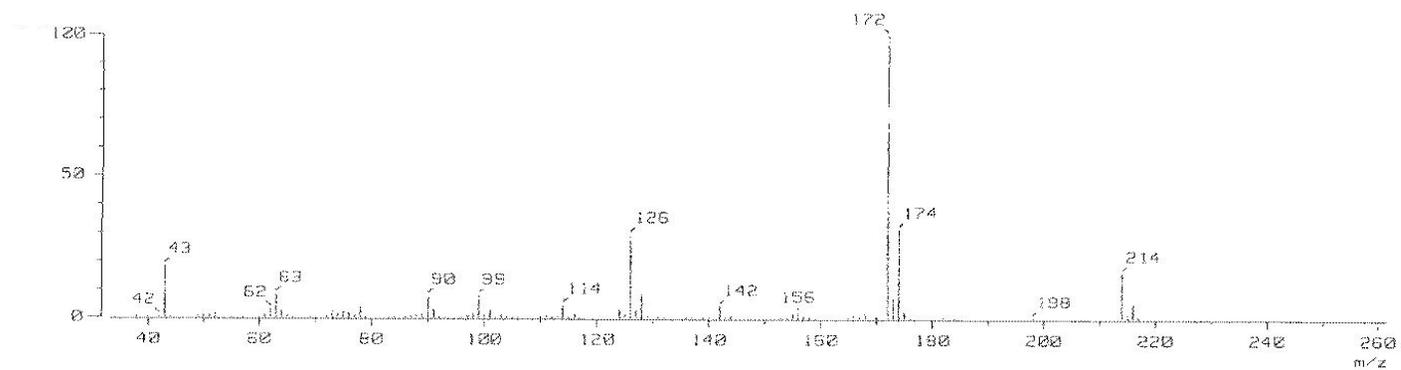
Espectro No. 5. EM (IE/ID) m/z : 1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-4)



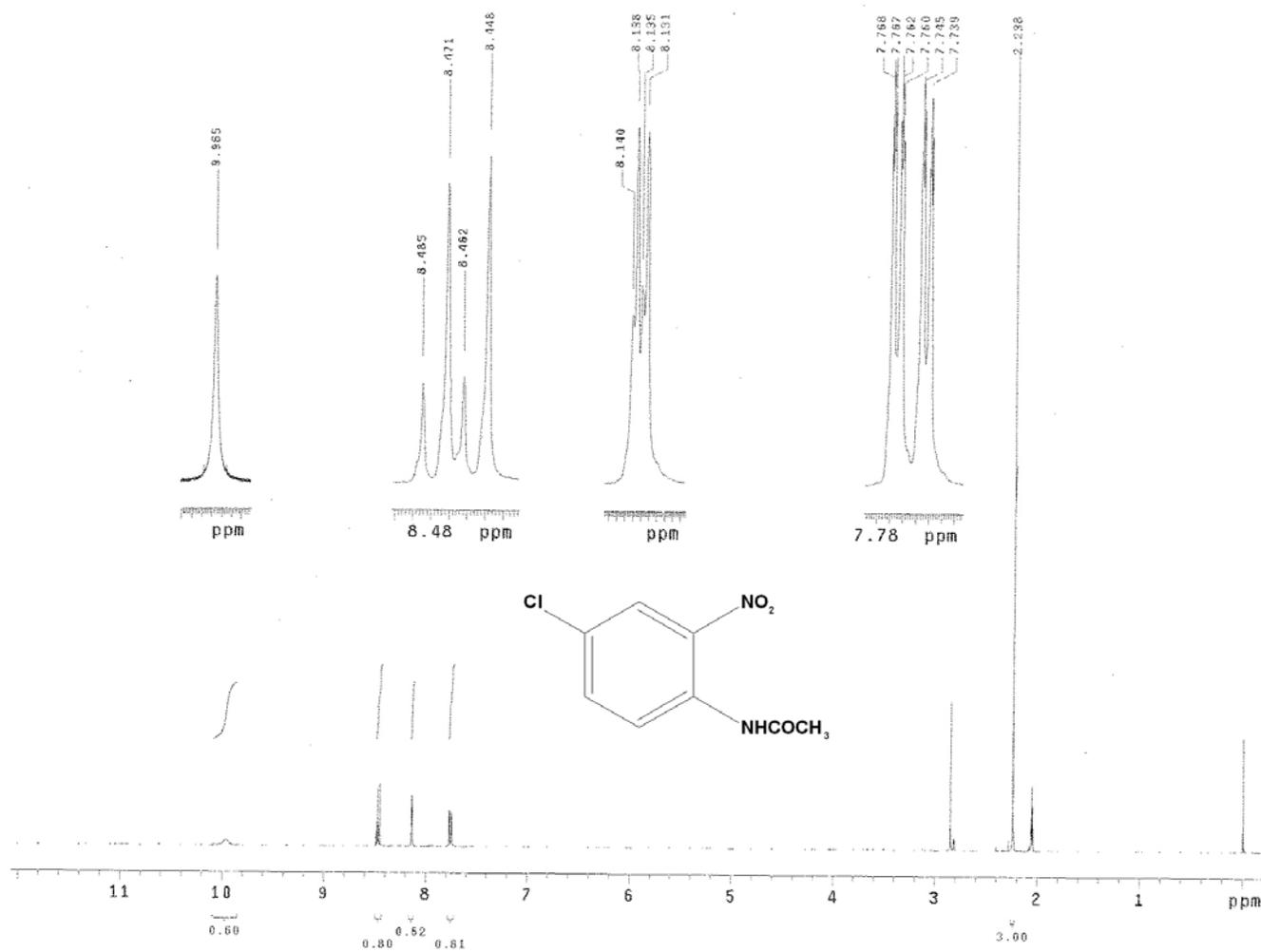
Espectro No. 6. RMN ¹H (DMSO) ppm: 1-metil-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-4)



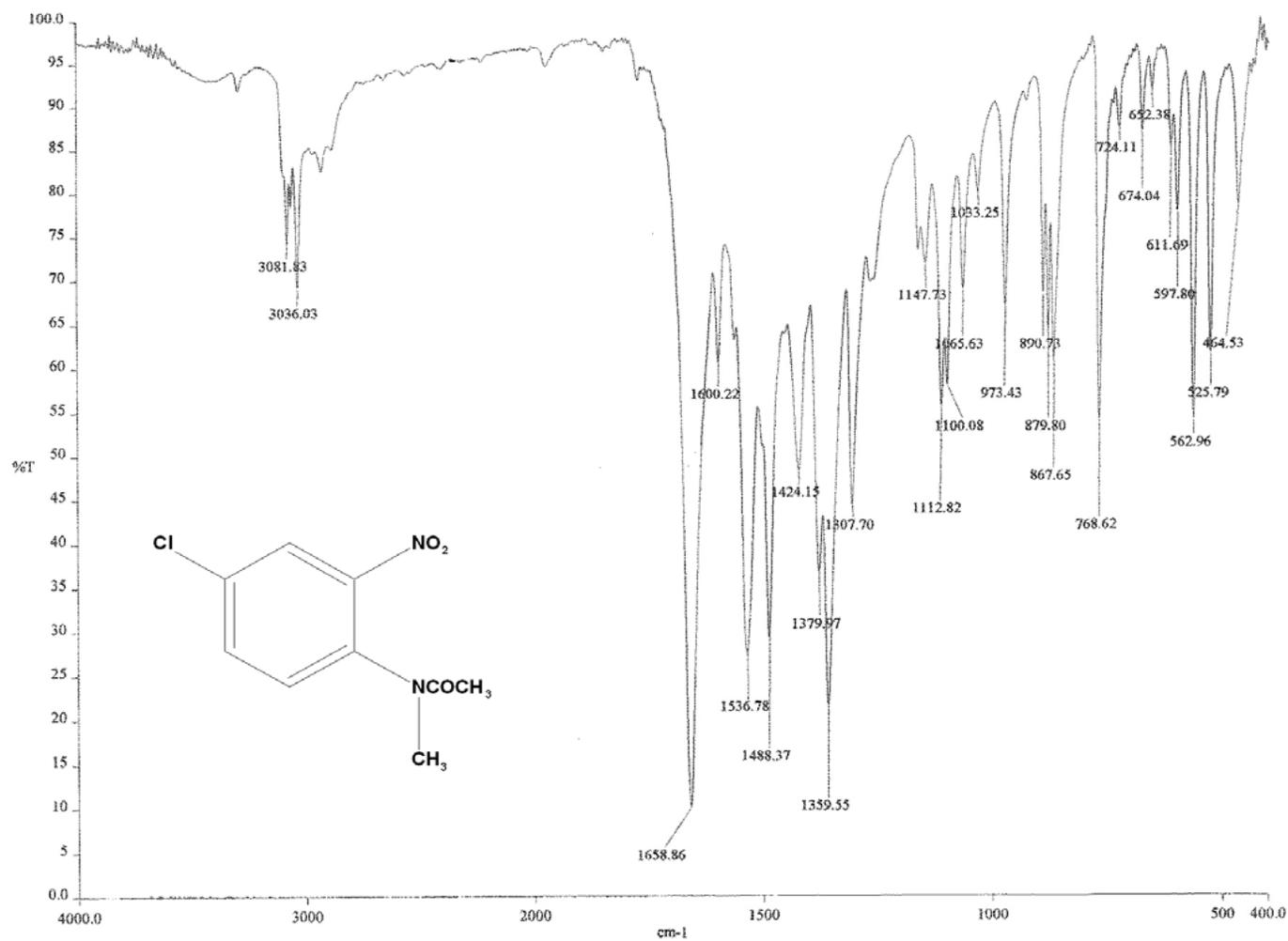
Espectro No. 7. IR (KBr) cm⁻¹: N-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (7)



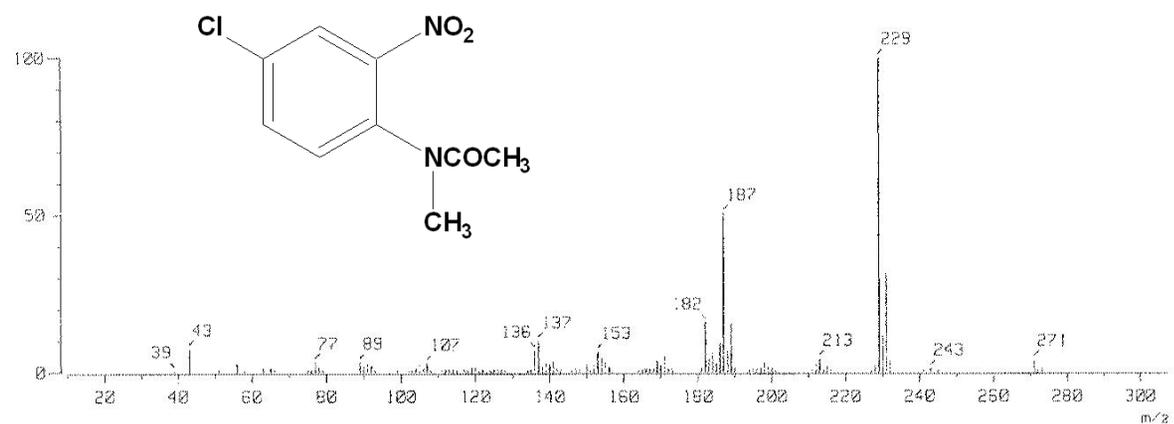
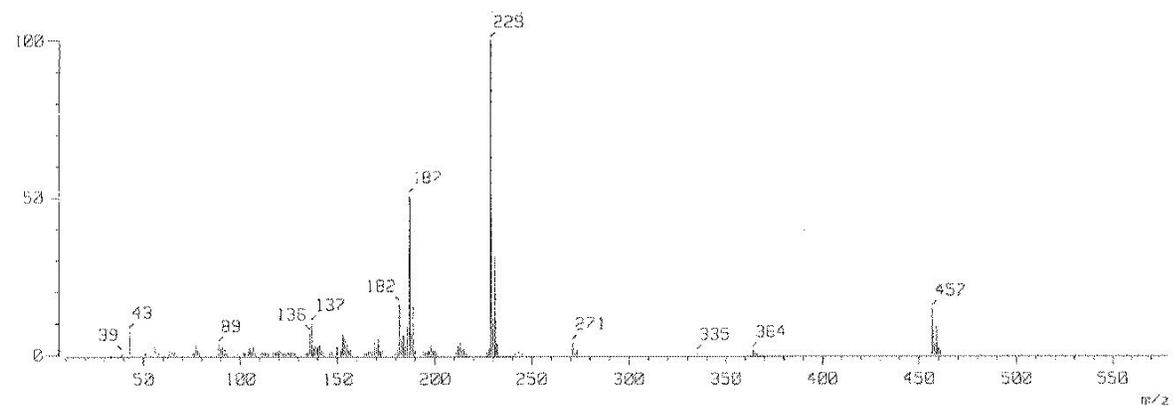
Espectro No. 8. EM (FAB +1): N-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (7)



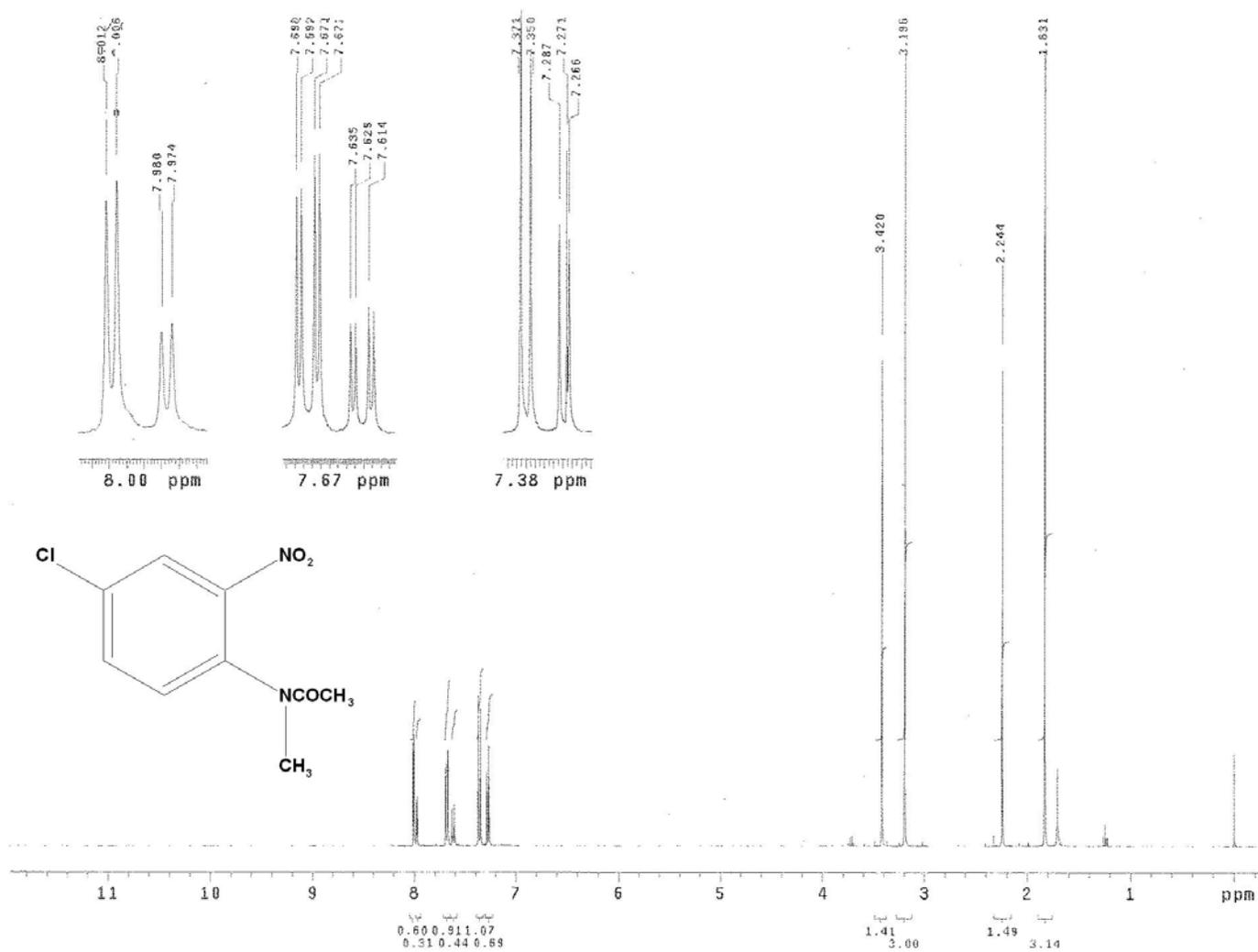
Espectro No. 9. RMN ^1H (ACETONA- d_6) ppm: *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (7)



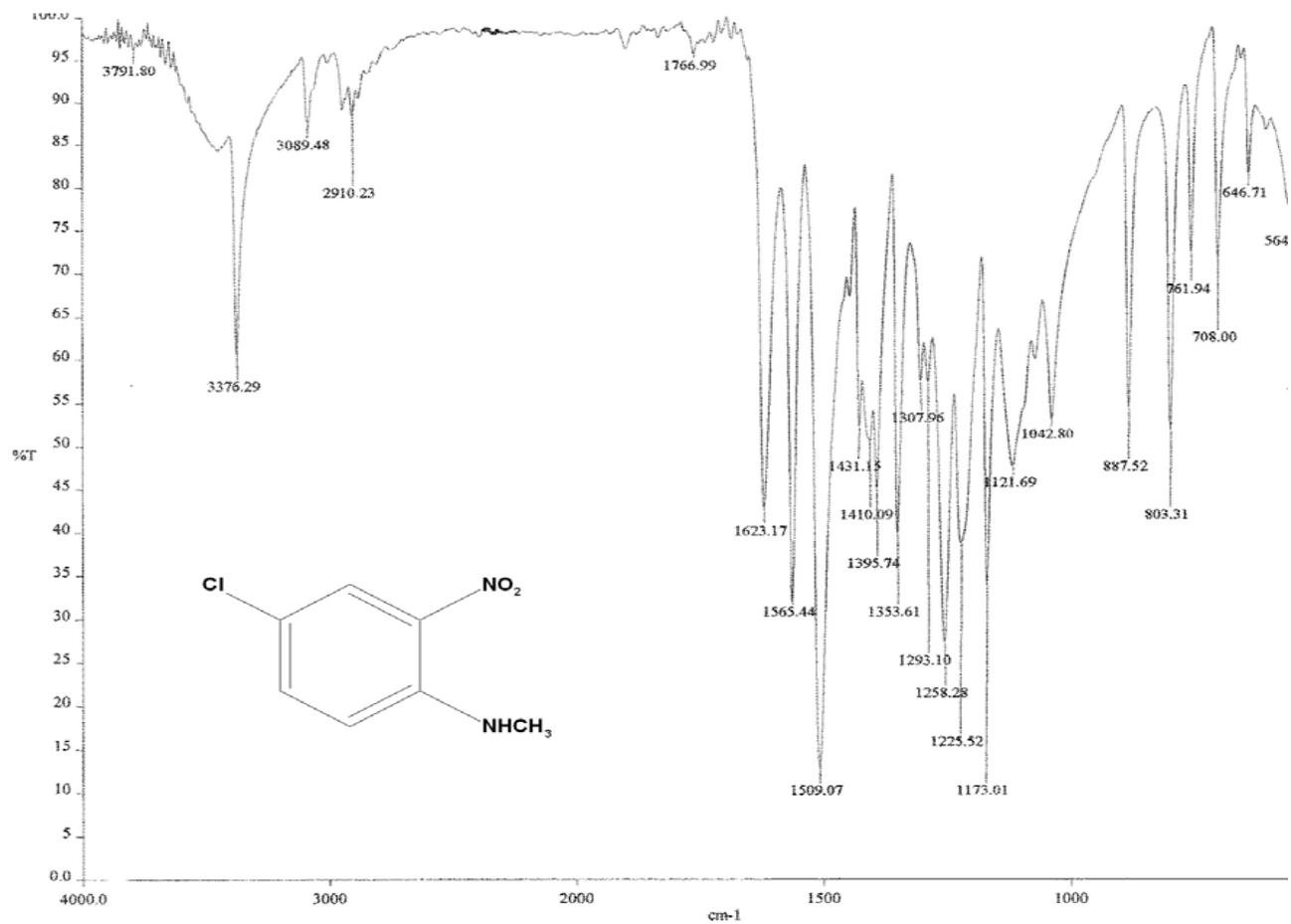
Espectro No. 10. IR (kBr) cm⁻¹: N-(4-cloro-2-nitrofenil)-N-metilacetamida (8)



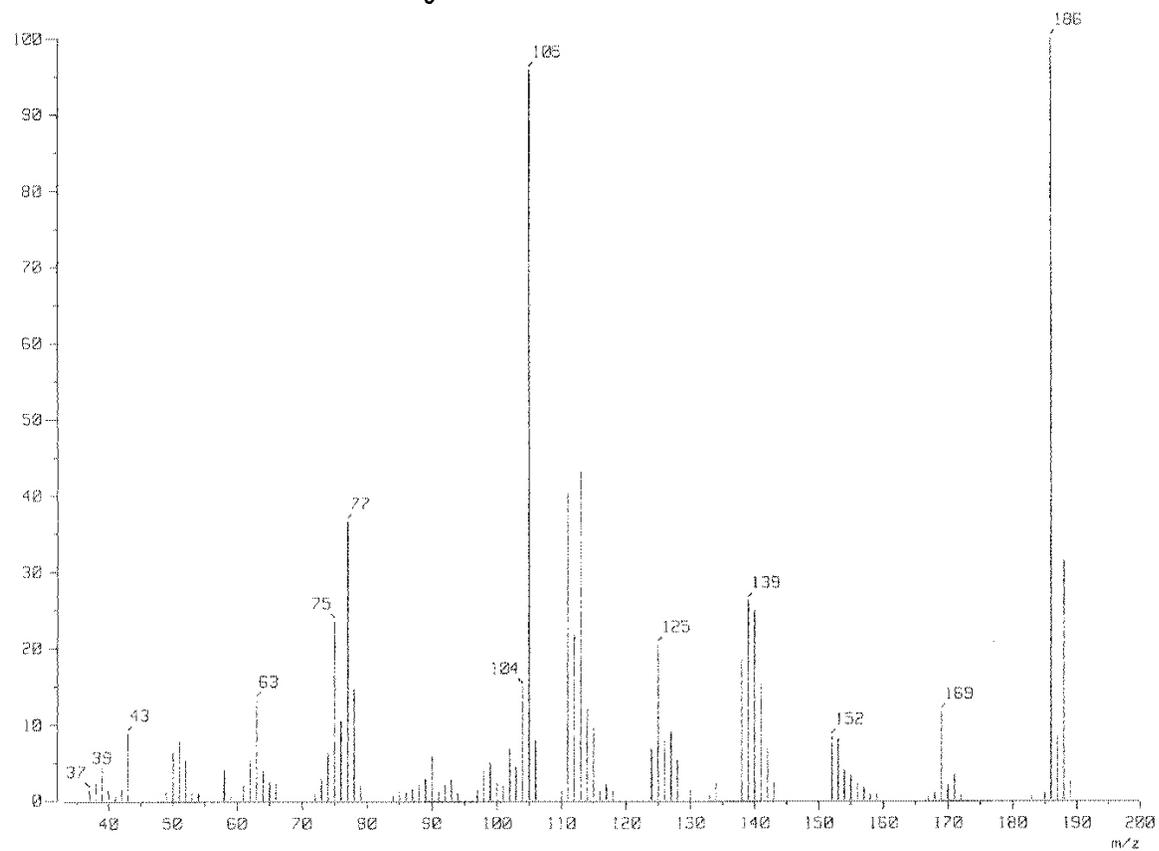
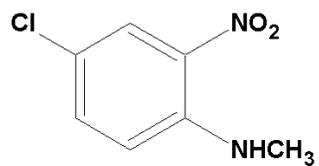
Espectro No. 11. EM (FAB +1) m/z: *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8)



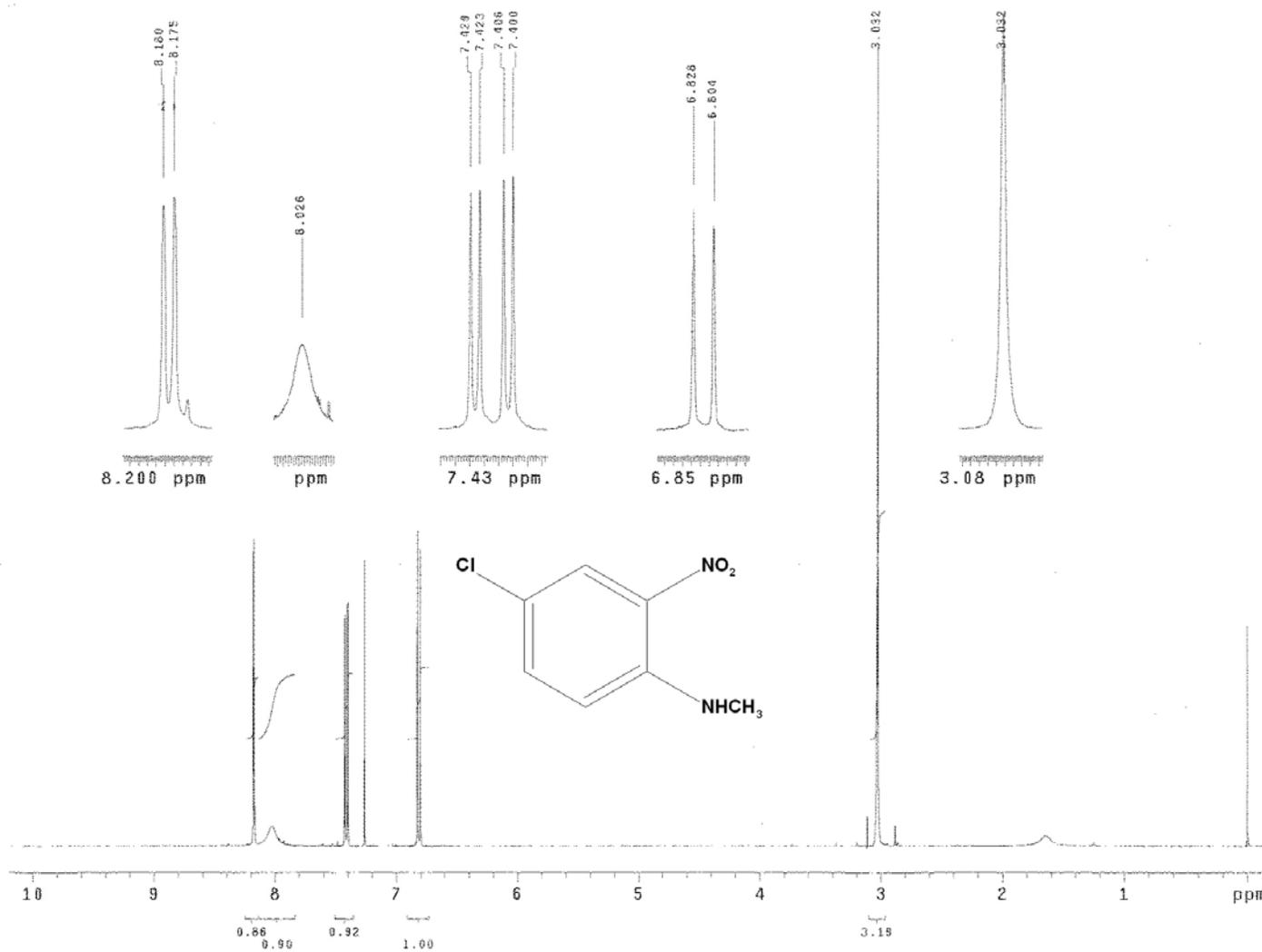
Espectro No. 12. RMN ^1H (CDCl_3) ppm: *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8)



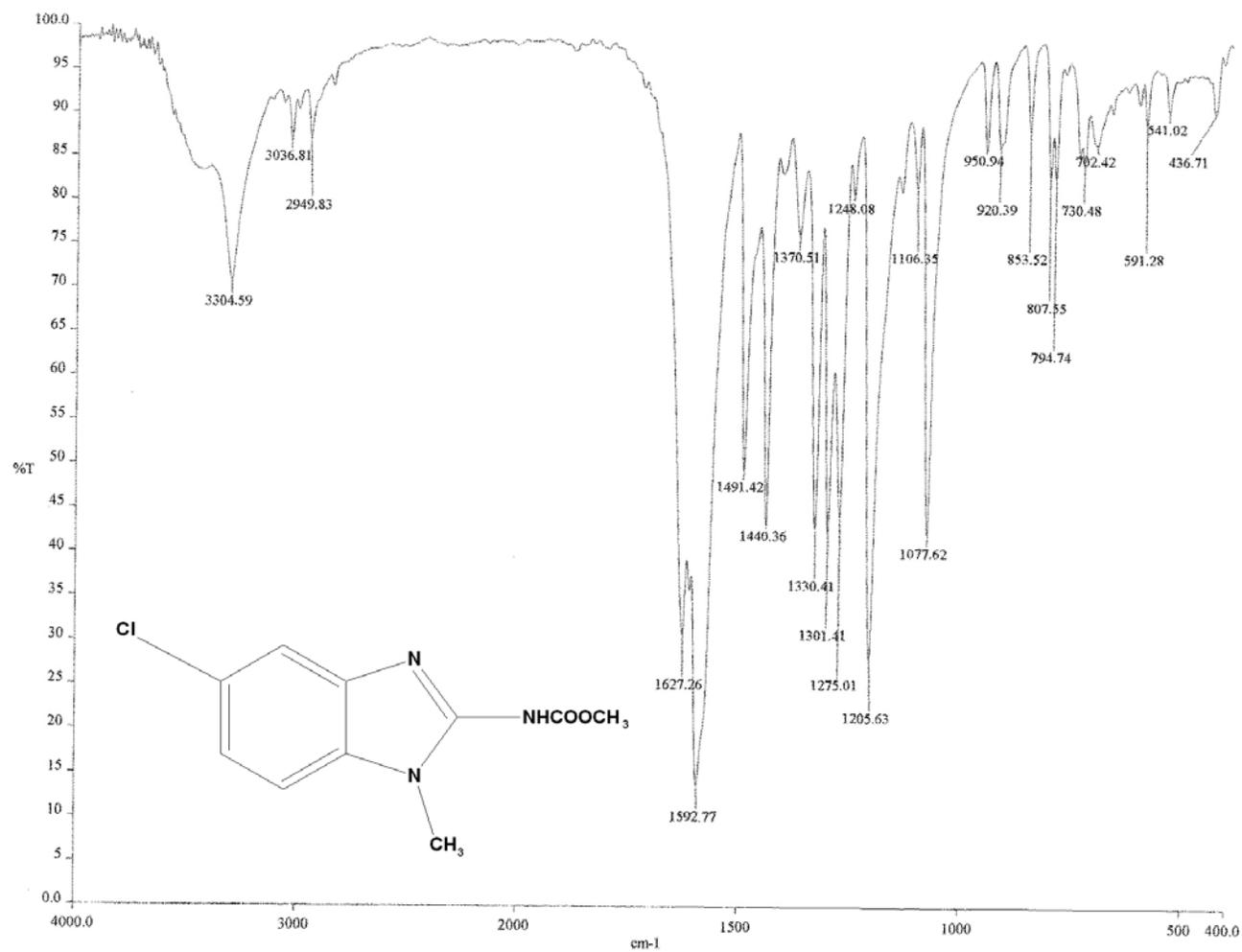
Espectro No. 13. IR (KBr) cm⁻¹: N-(4-cloro-2-nitrofenil)-N-metilamina (9)



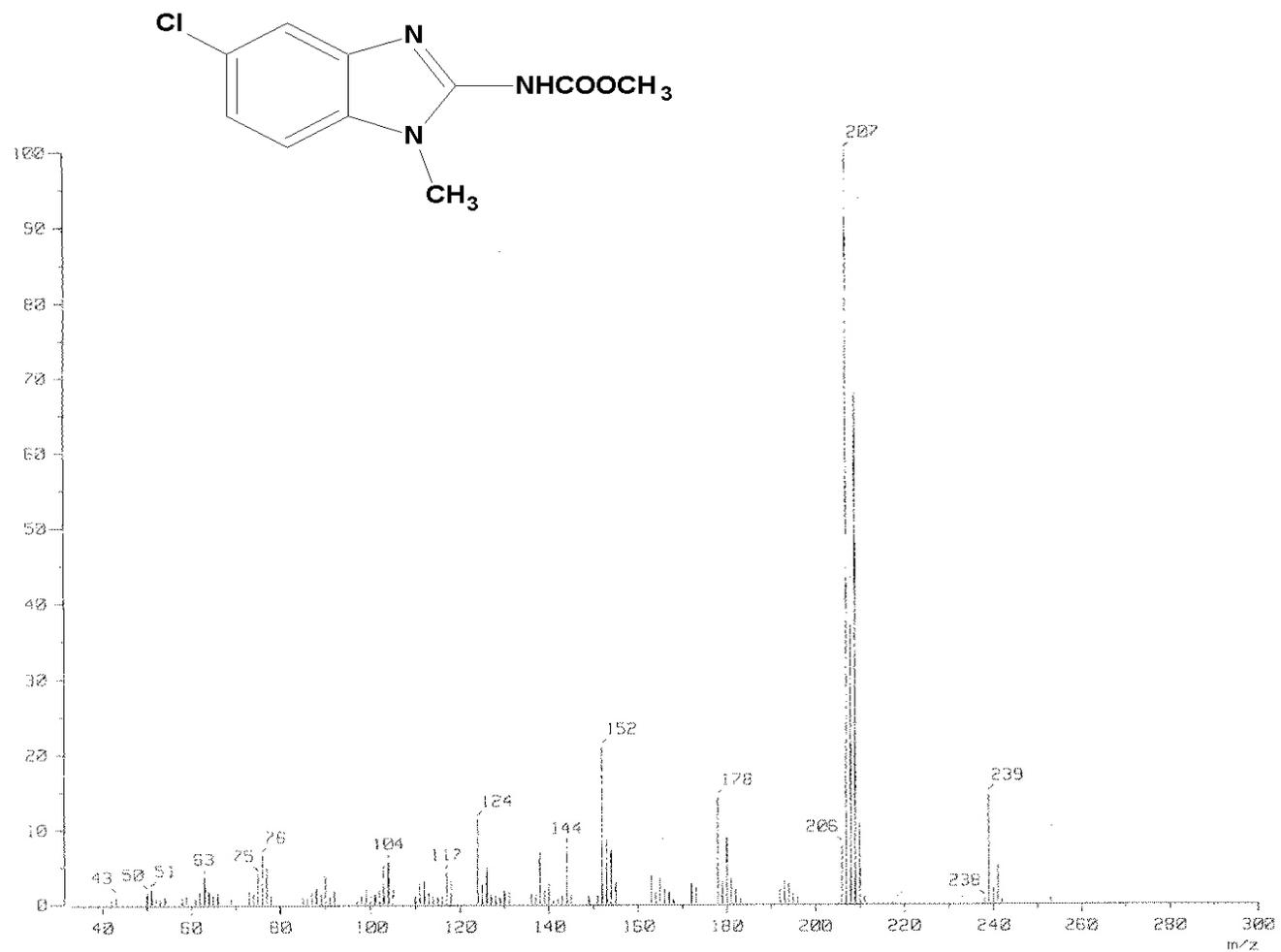
Espectro No. 14. EM (IE/ID) cm^{-1} : *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)



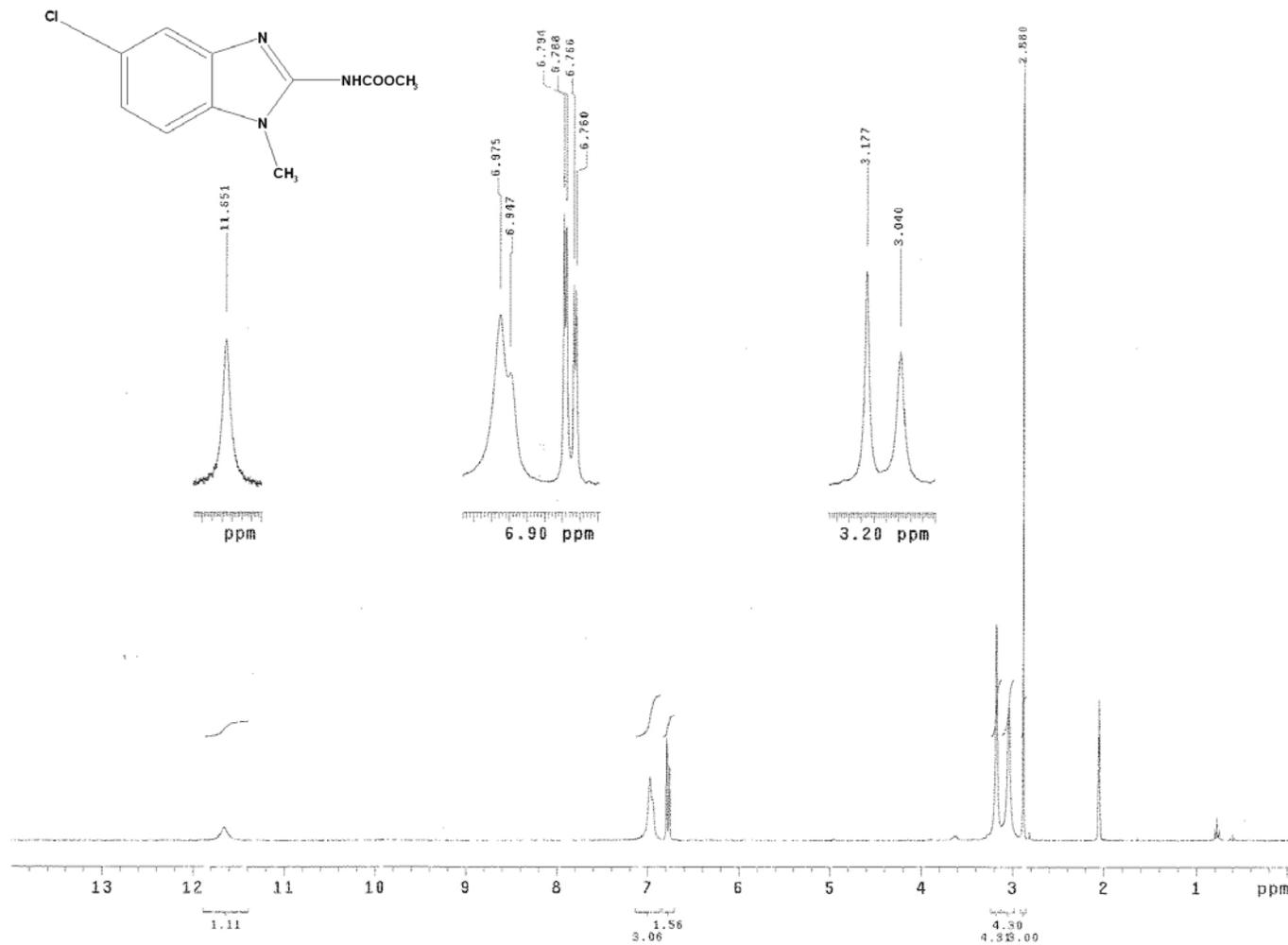
Espectro No. 15. (TMS, CDCl_3) ppm: *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)



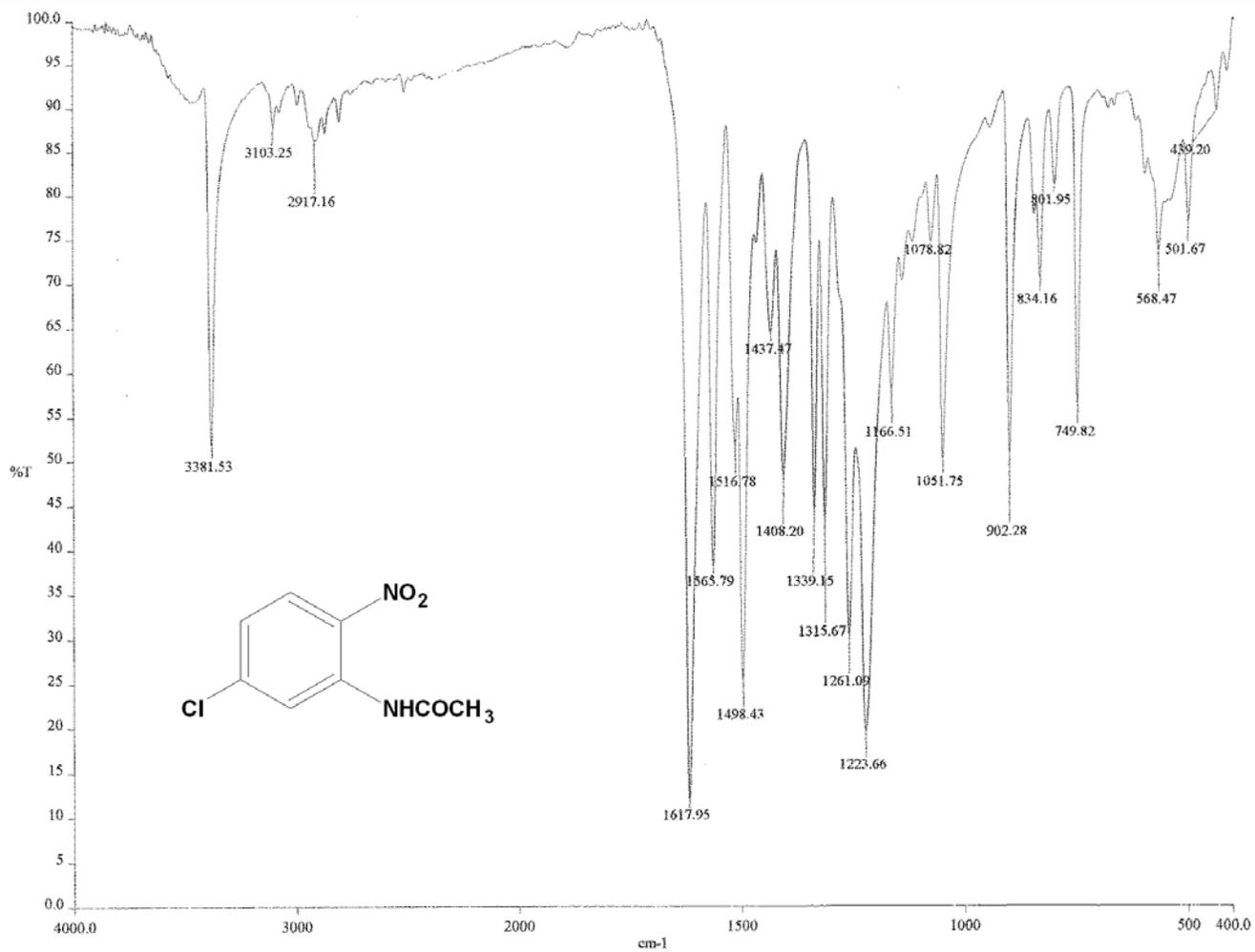
Espectro No. 16. IR (KBr) cm⁻¹: 5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHMM-11)



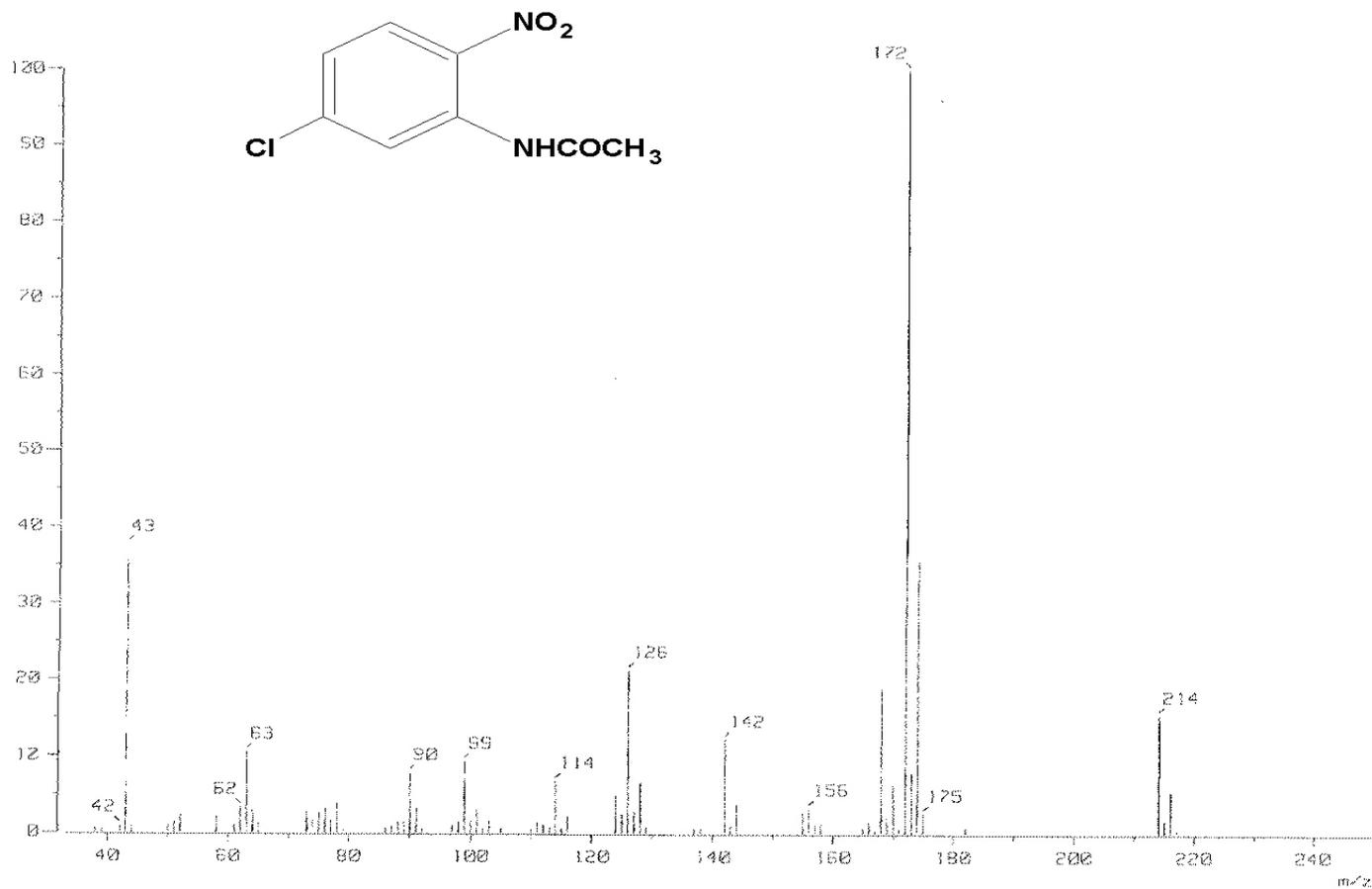
Espectro No. 17. IR (IE/ID) m/z : 5-cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-11)



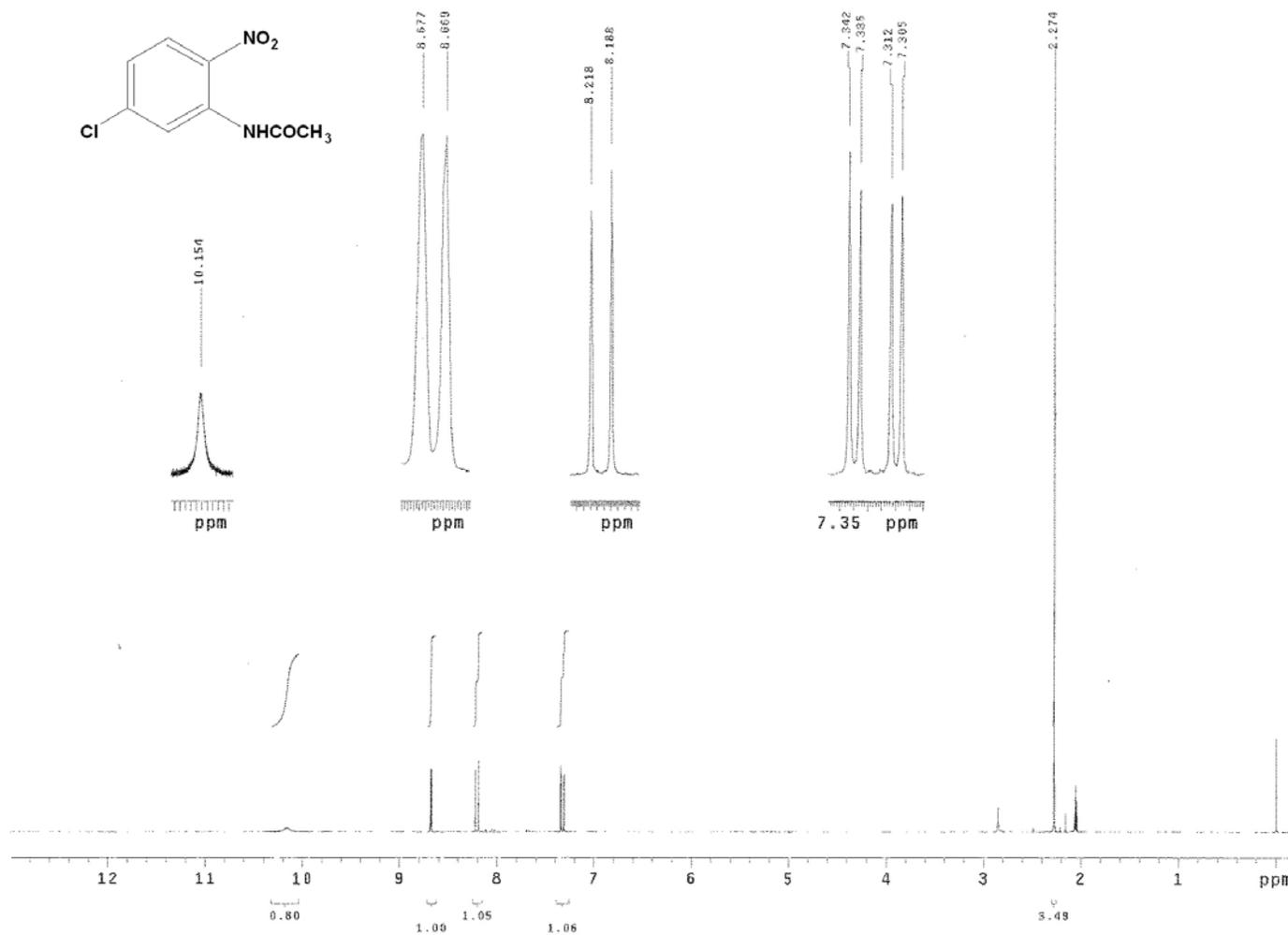
Espectro No. 18. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: 5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-11)



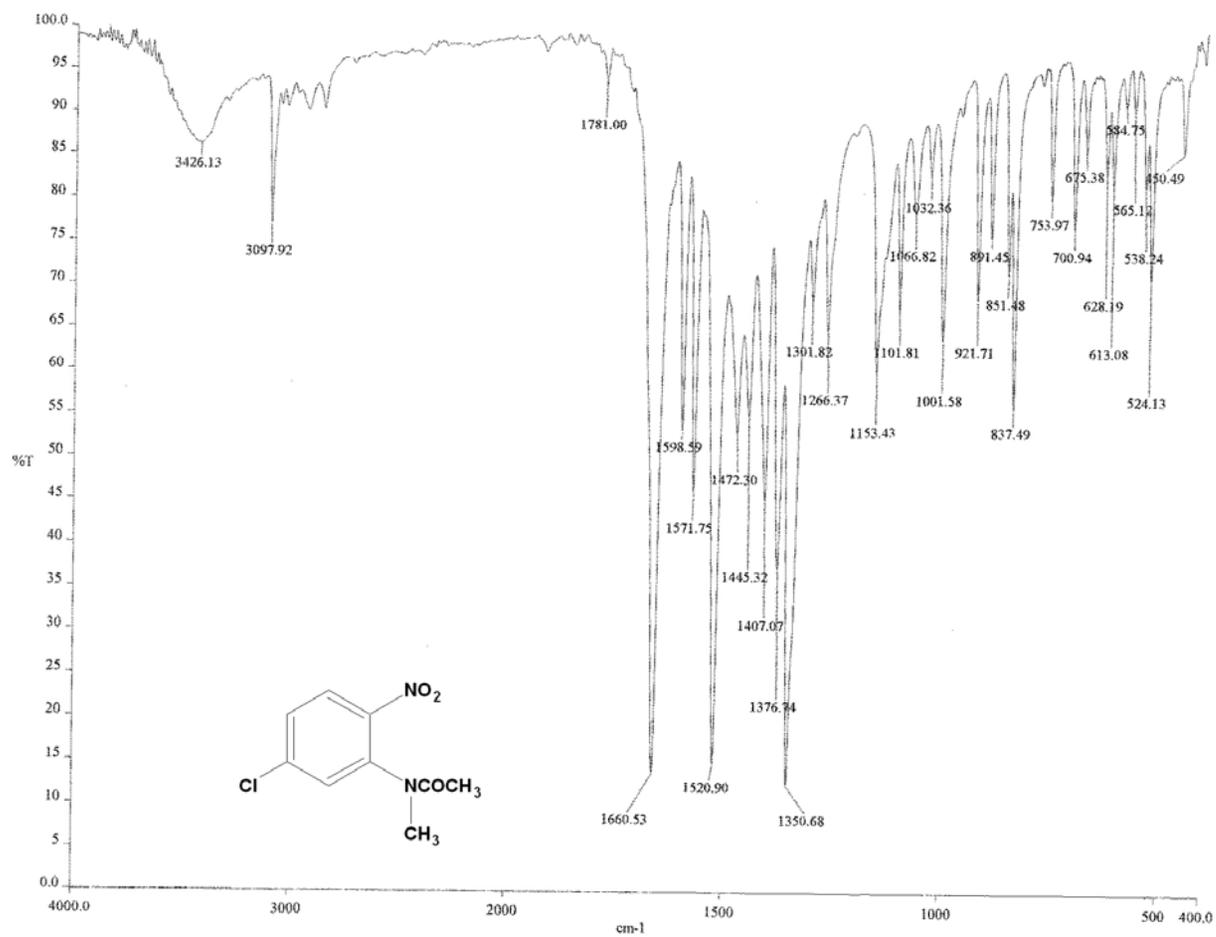
Espectro No. 19. IR (KBr) cm⁻¹: N-(5-cloro-2-nitrofenil)acetamida (13)



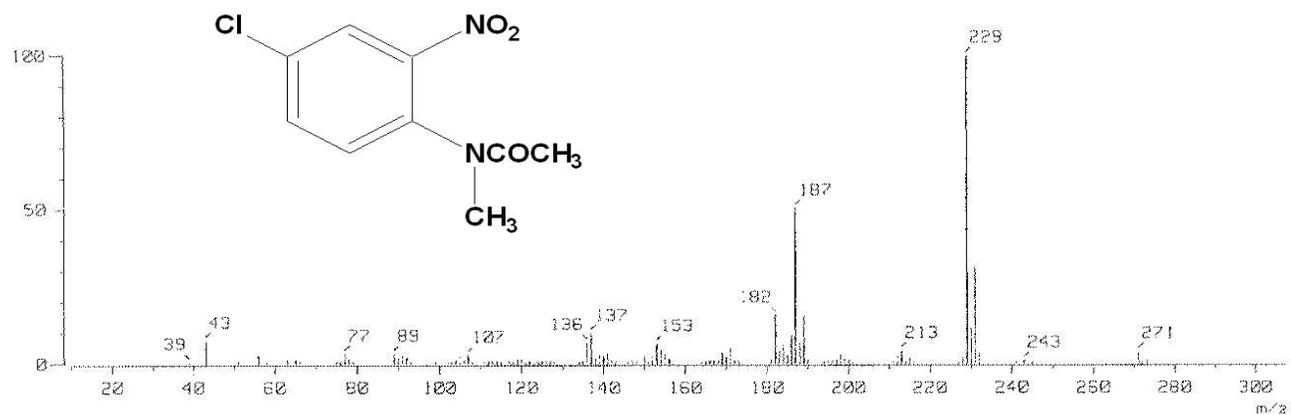
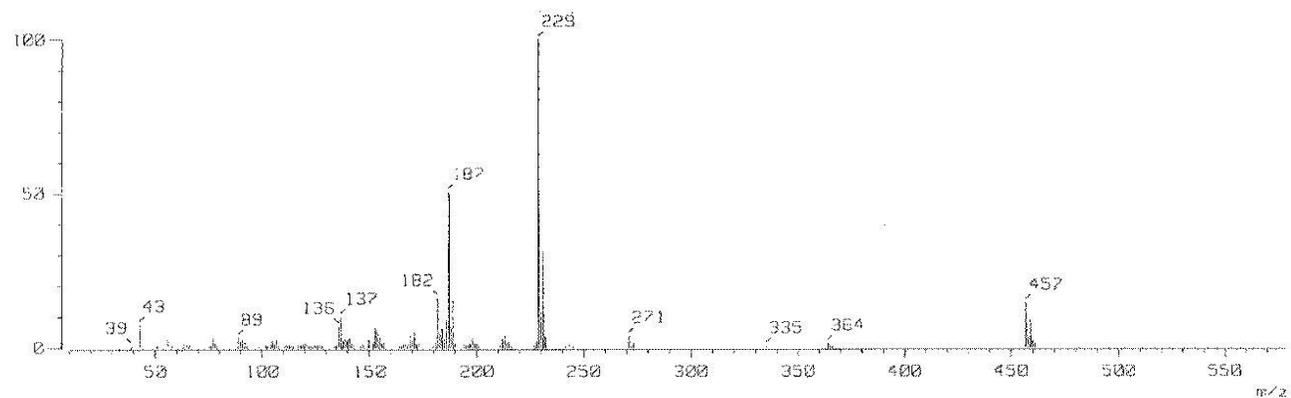
Espectro No. 20. IR (KBr) cm^{-1} : N-(5-cloro-2-nitrofenil)acetamida (13)



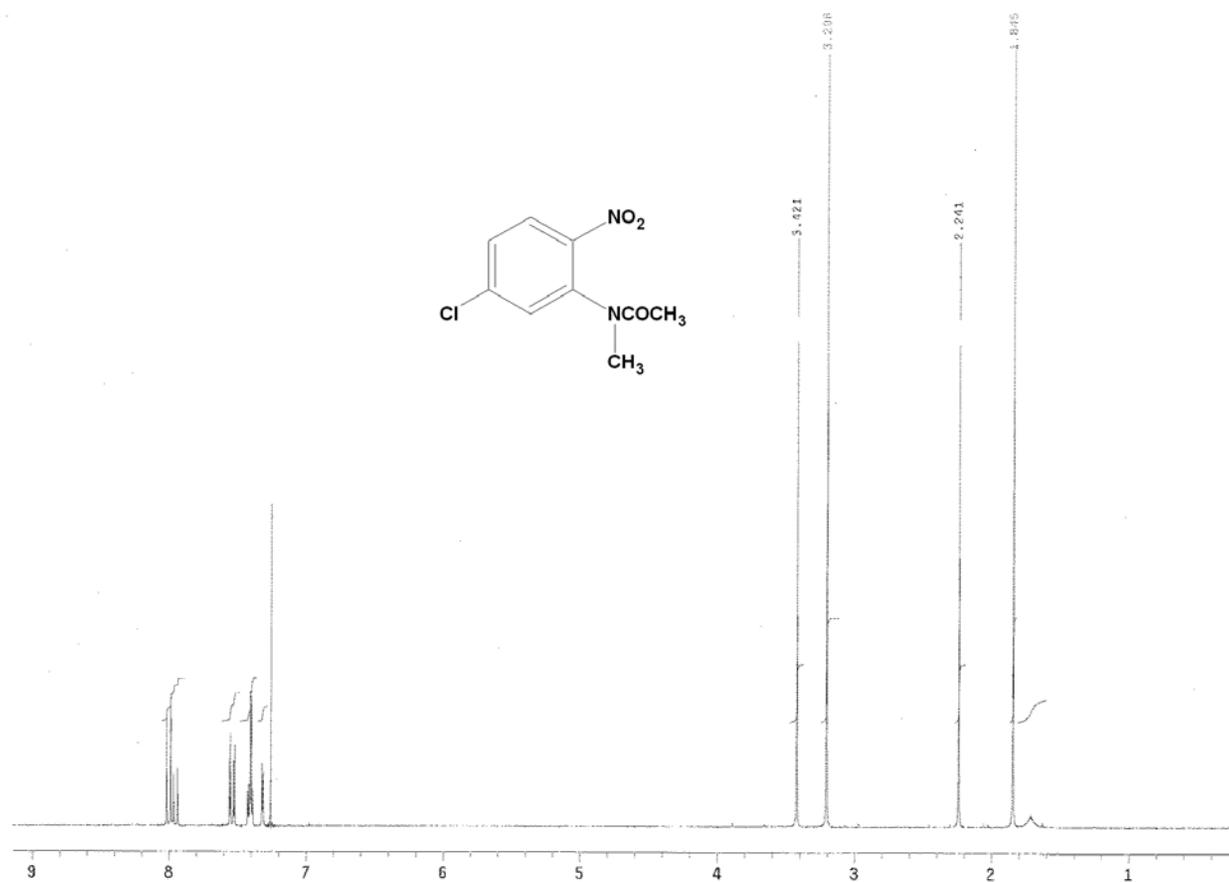
Espectro No. 21. RMN ^1H (CDCl_3) ppm: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)acetamida (13)



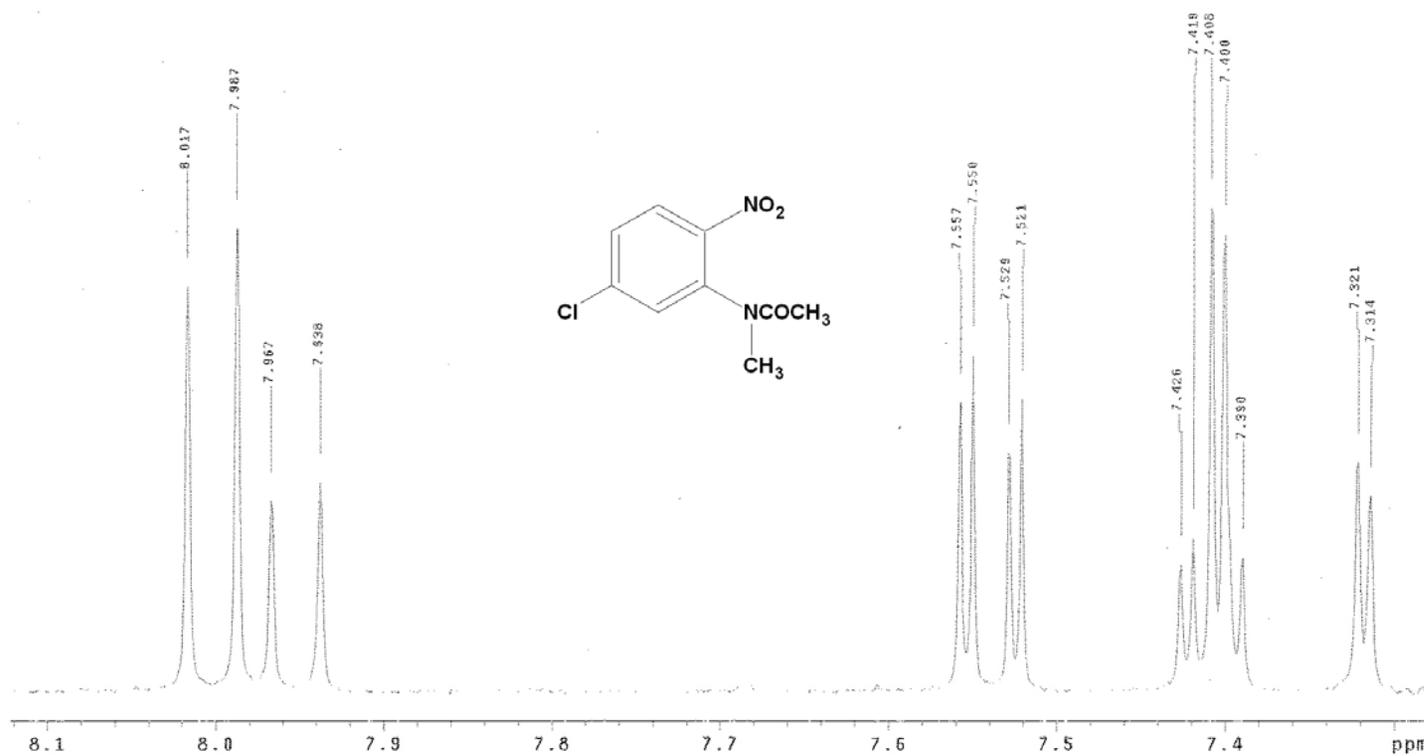
Espectro No. 22. IR (KBr) cm^{-1} : *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (14)



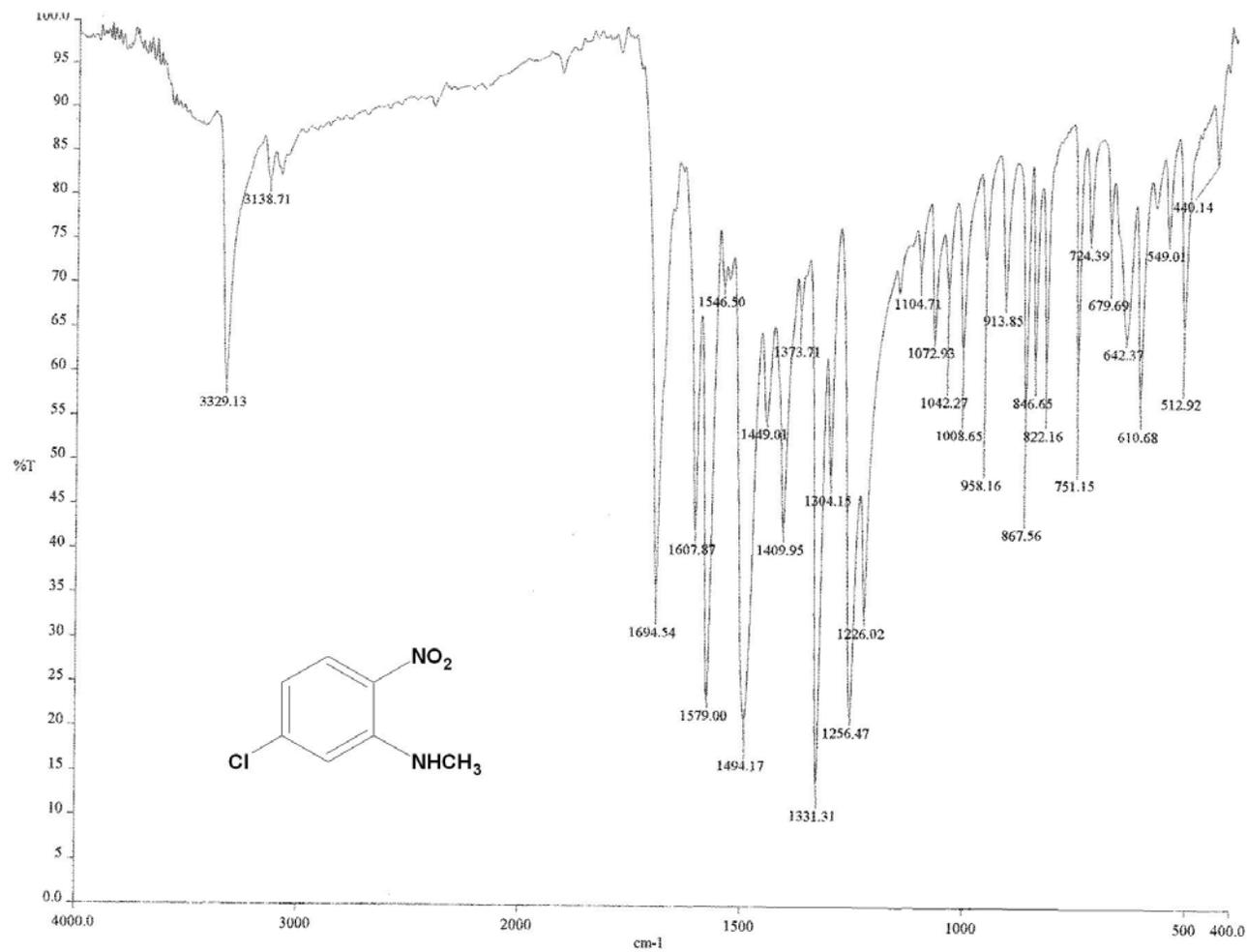
Espectro No. 23. EM (IE/ID) cm^{-1} : *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (14)



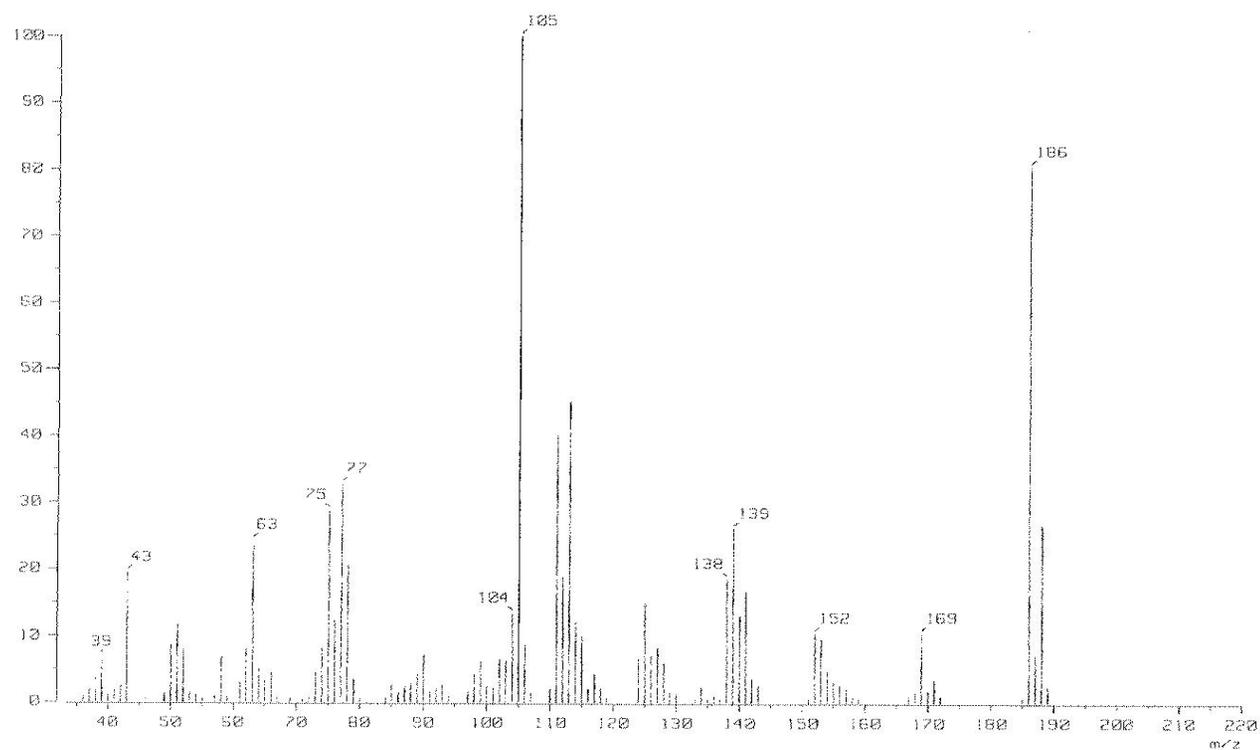
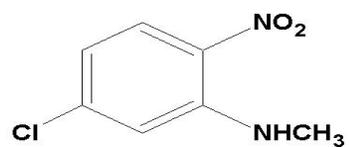
Espectro No. 24^a . RMN ^1H (CDCl_3) ppm: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (14)



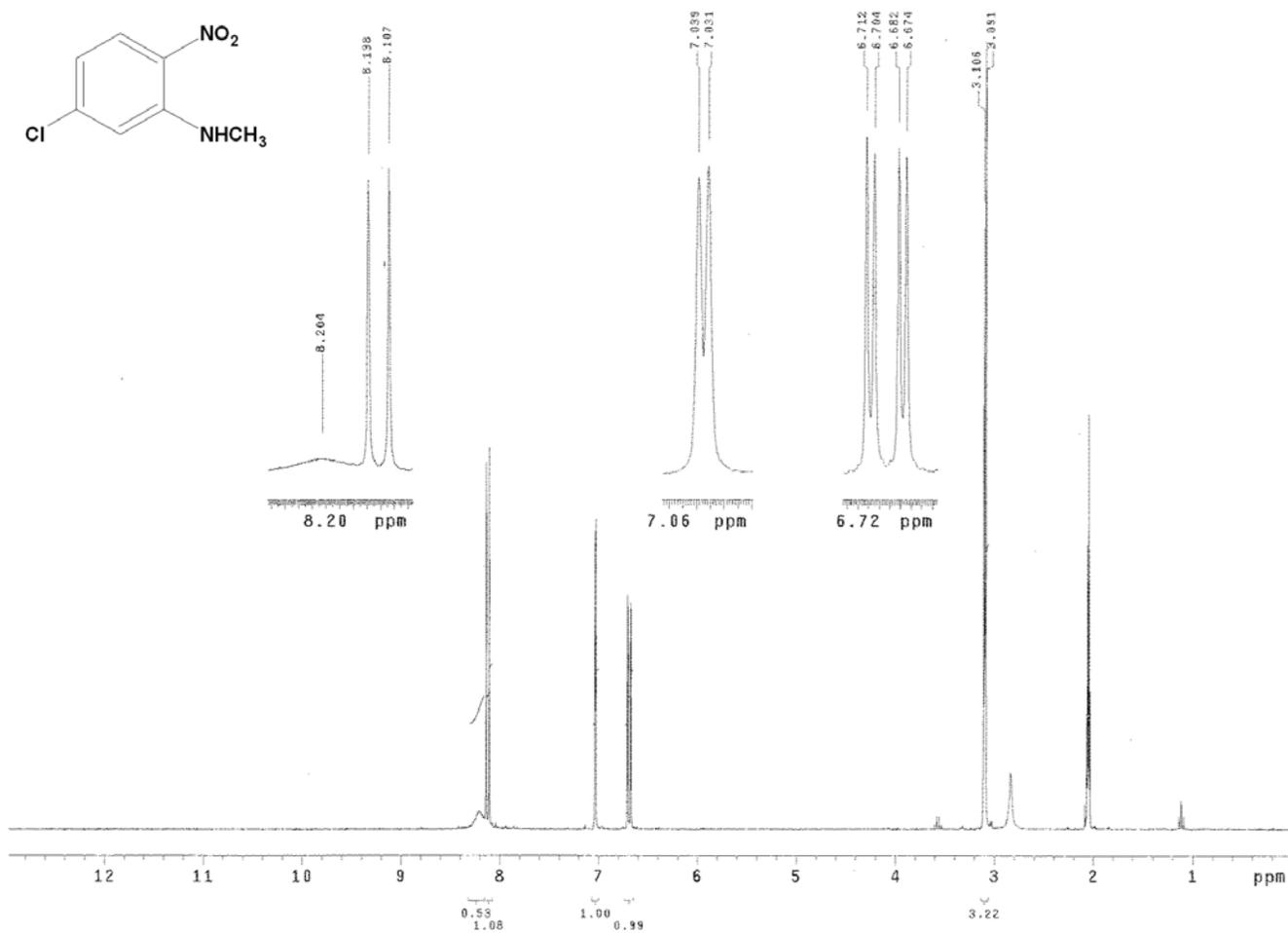
Espectro No. 24^b. RMN ¹H (CDCl₃) ppm: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (14)



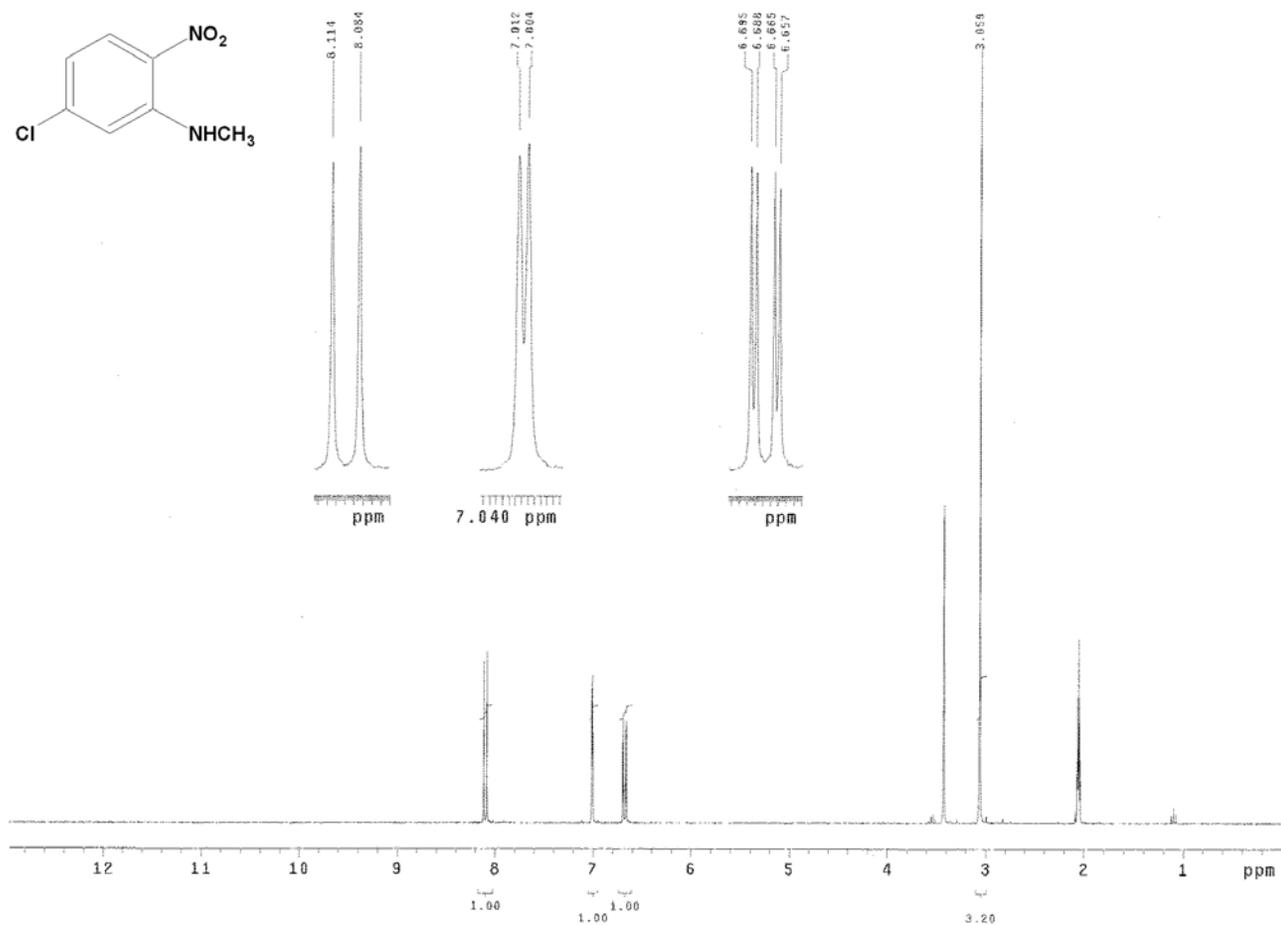
Espectro No. 25. IR (KBr) cm⁻¹: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (15)



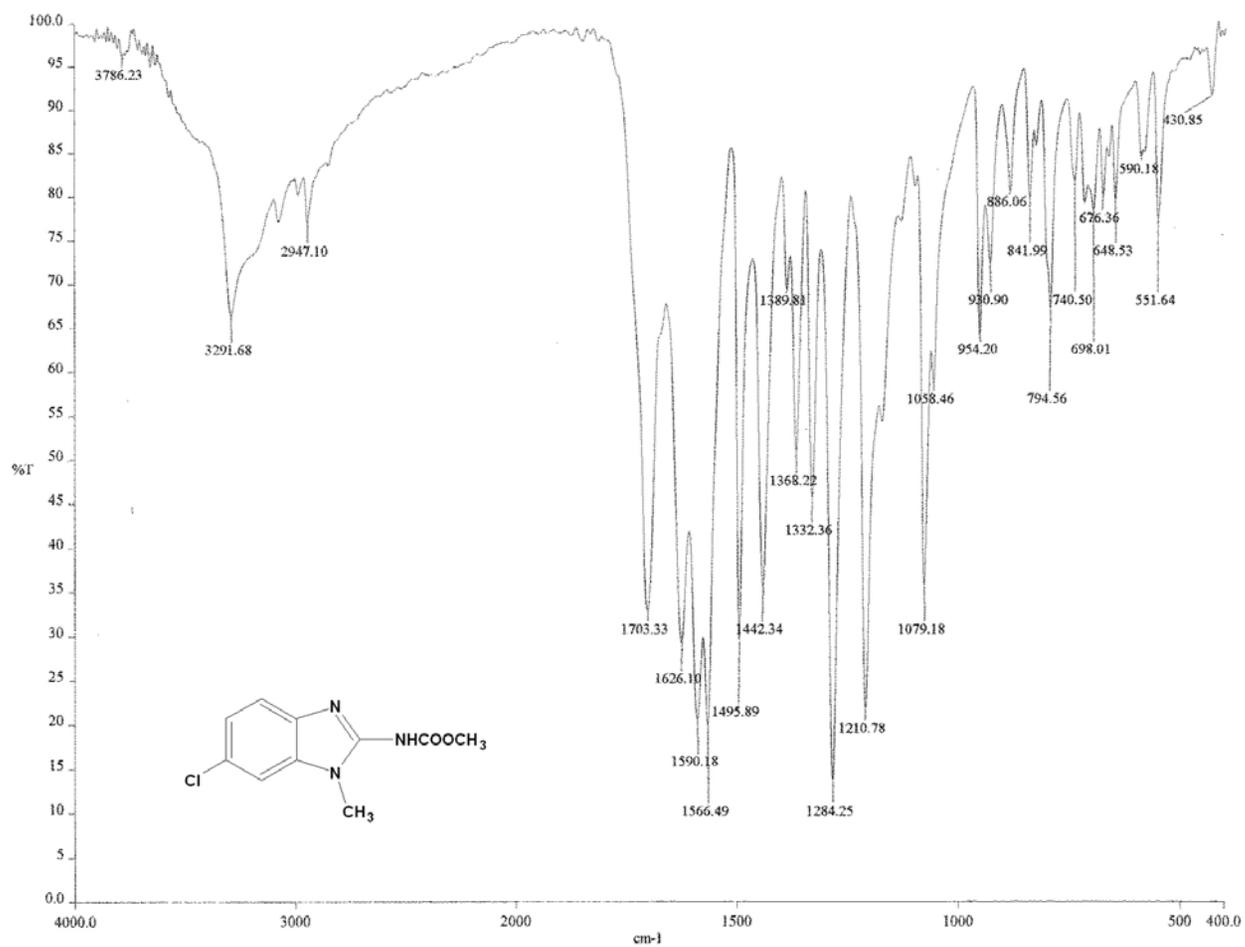
Espectro No. 25. IR (KBr) cm^{-1} : *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (15)



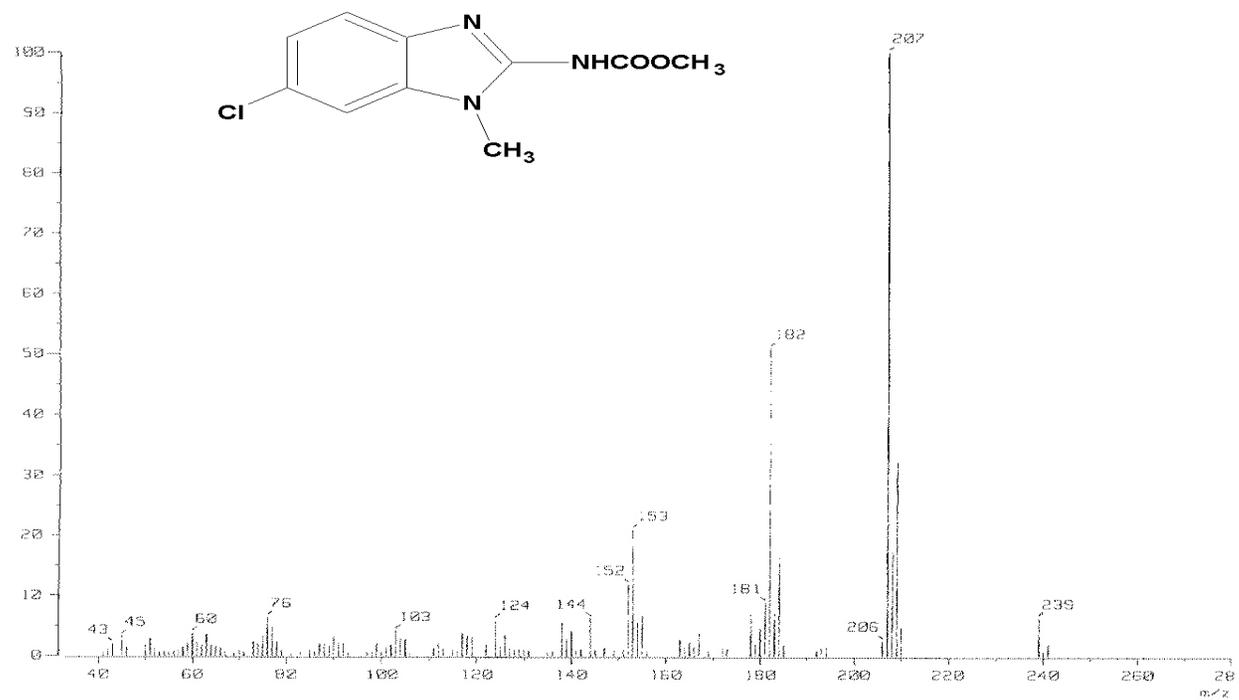
Espectro No. 27^a . RMN¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (15)



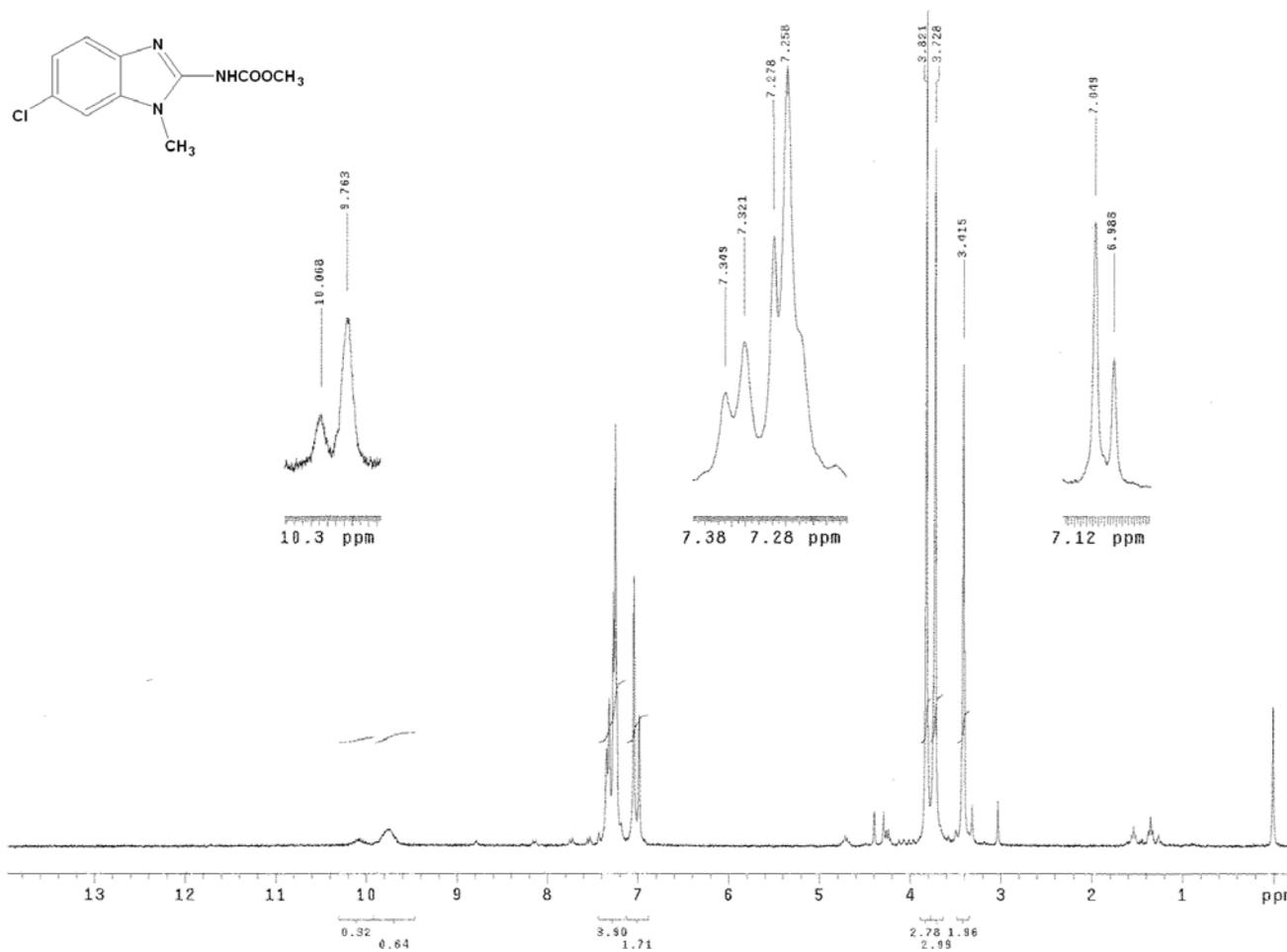
Espectro No. 27^b. RMN¹H (ACETONA-*d*-6), Intercambio con D₂O, ppm: *N*-(5-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (15)



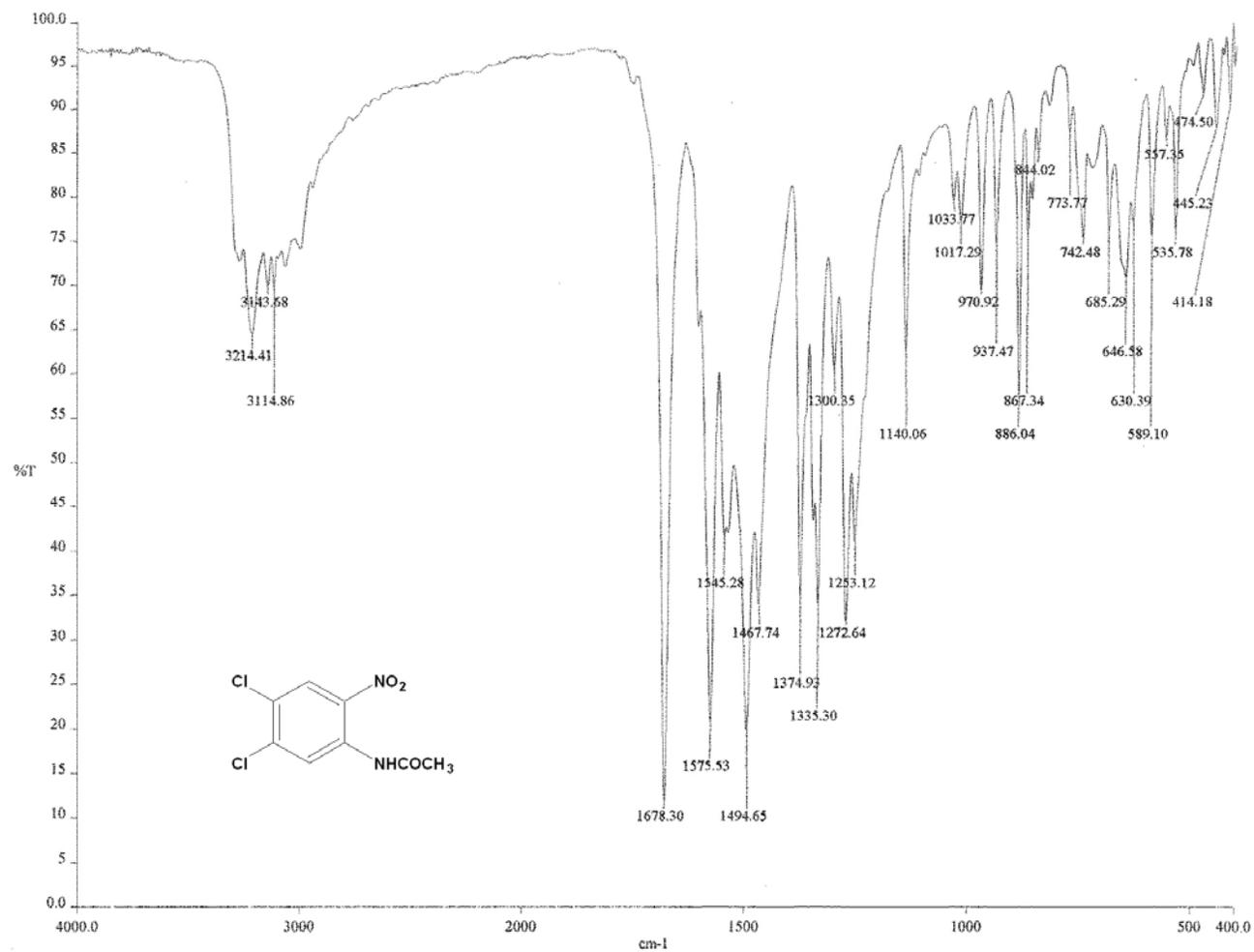
Espectro No. 28. IR (KBr) cm⁻¹: 6-cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-17)



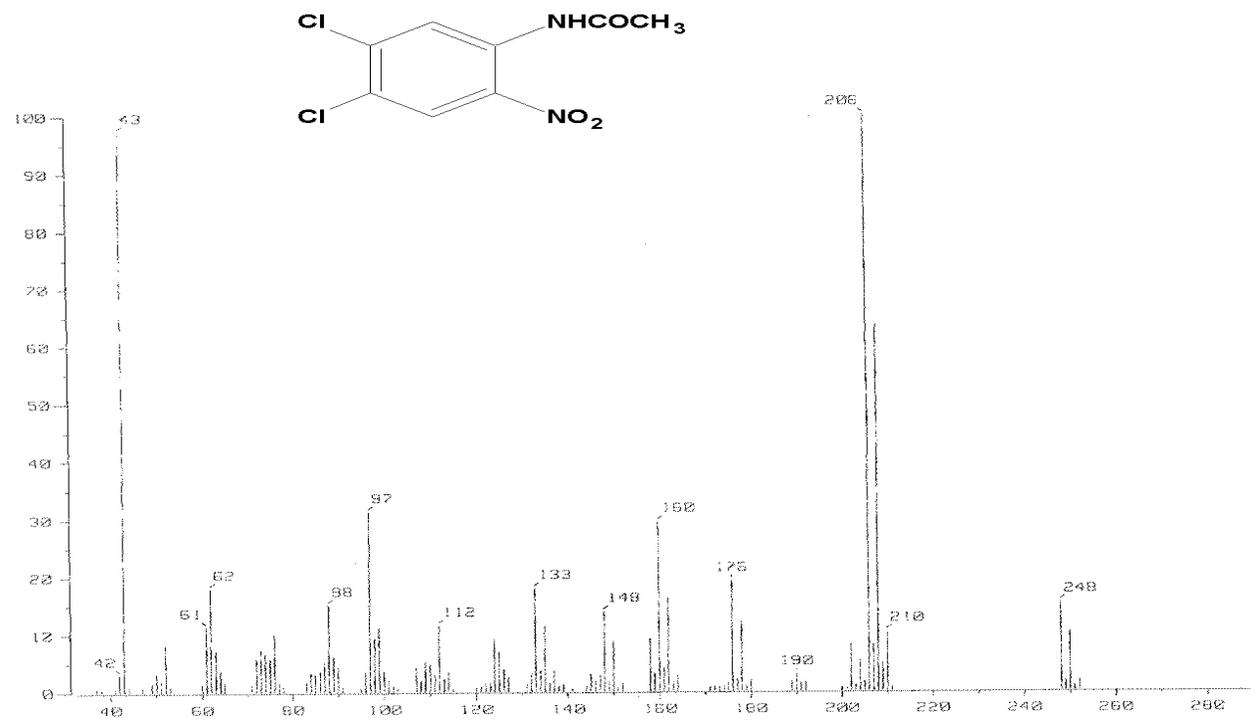
Espectro No. 29. EM (IE/ID) m/z : 6-cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-17)



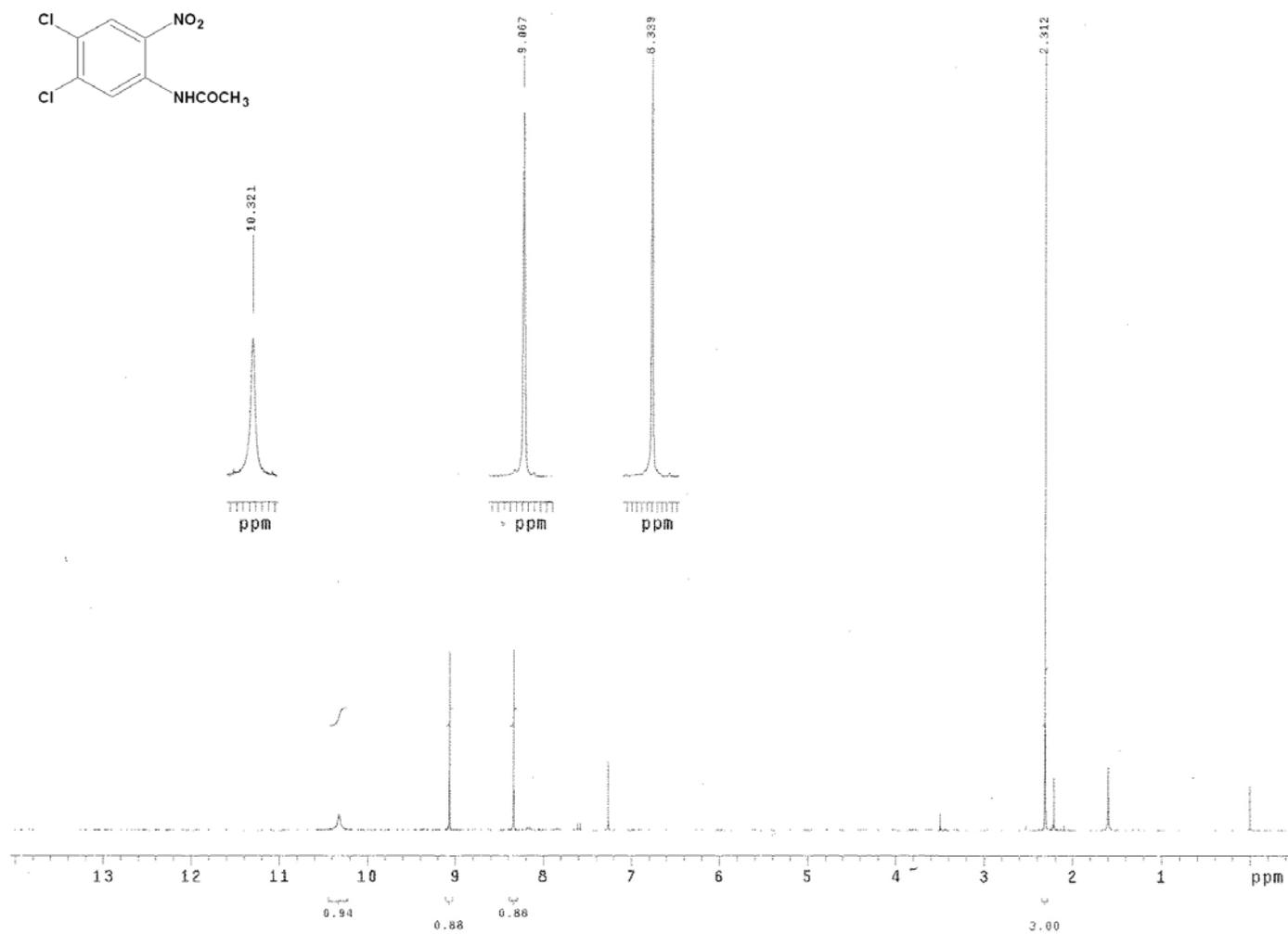
Espectro No. 30. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: 6-cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-17)



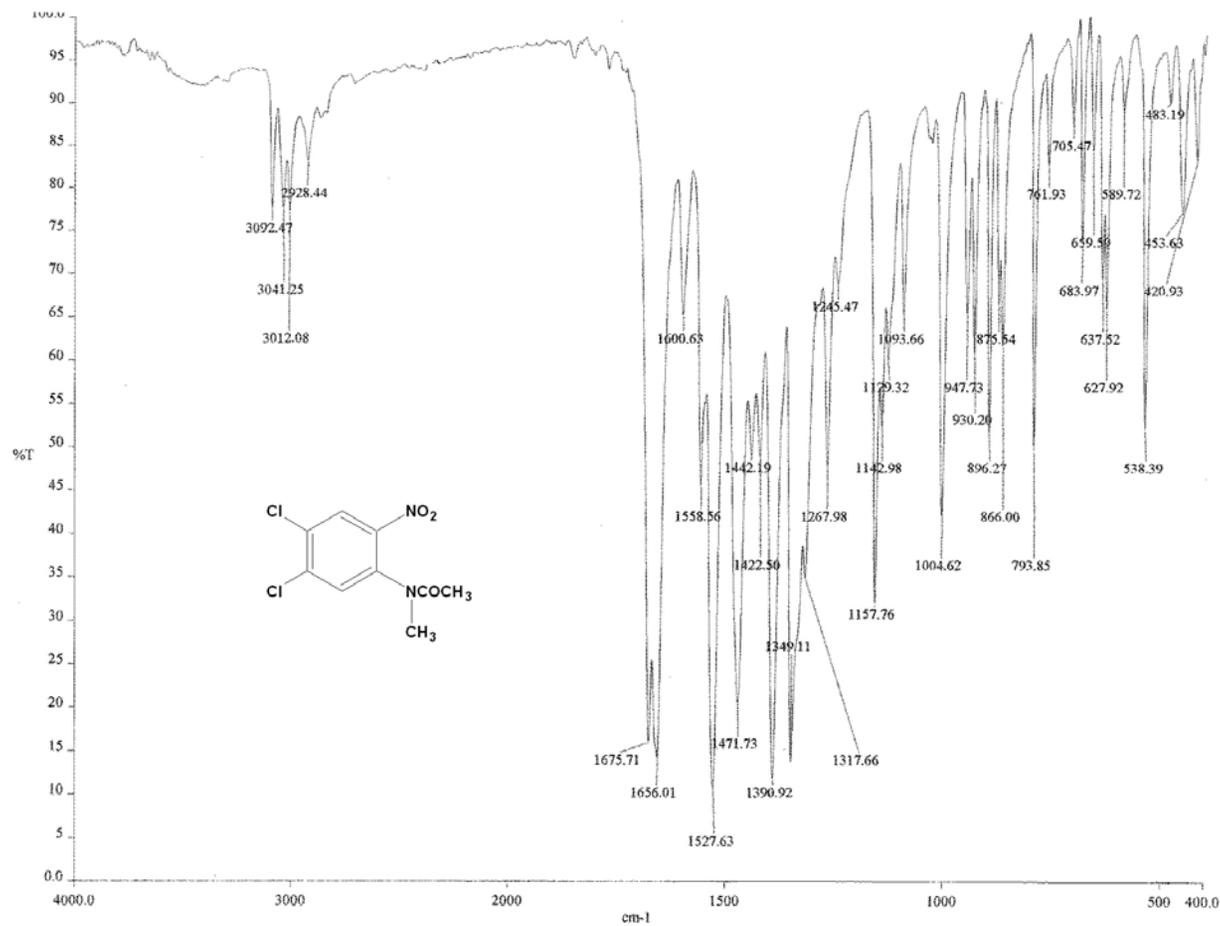
Espectro No. 31. IR (KBr) cm⁻¹: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)



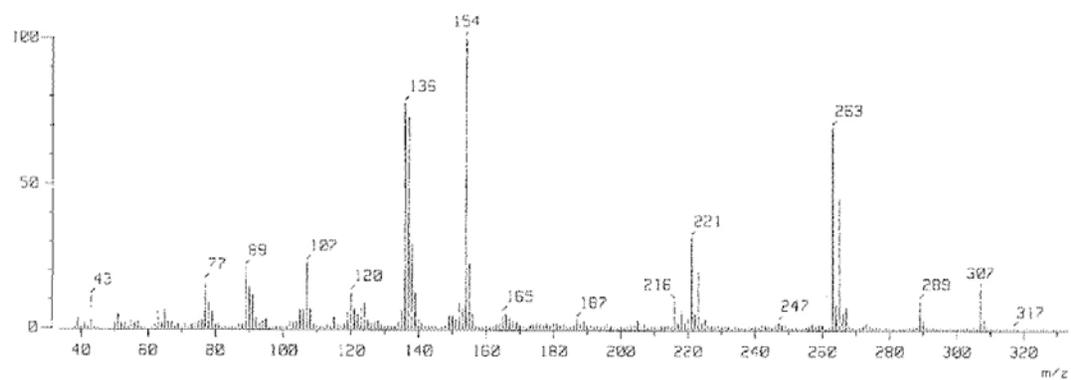
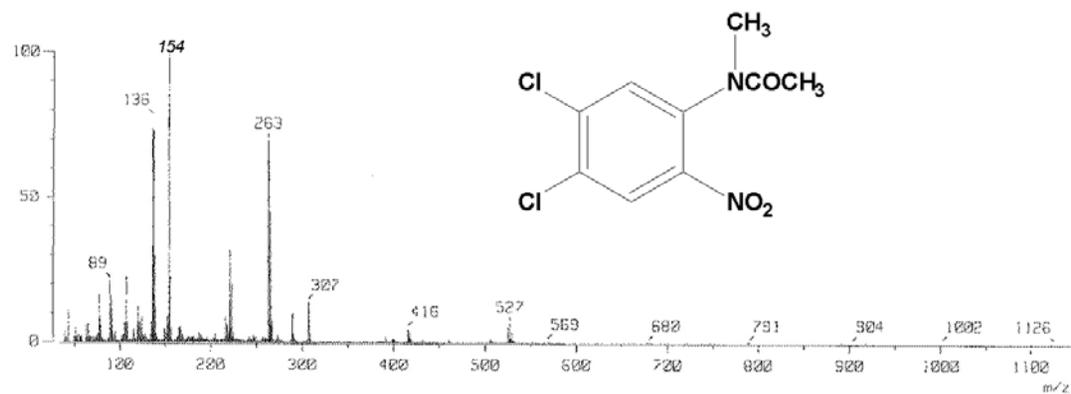
Espectro No. 32. EM (IE/ID) m/z : *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)



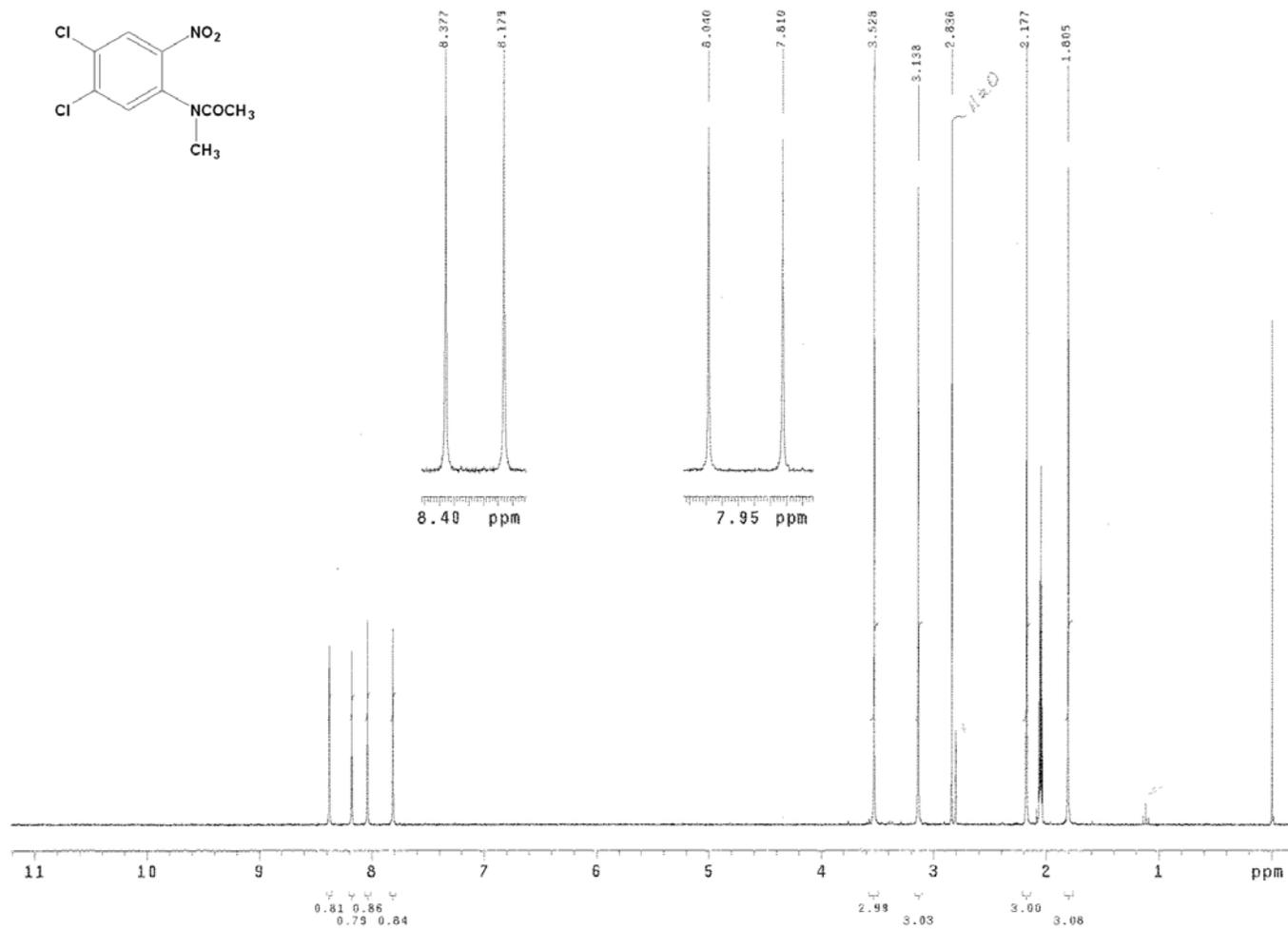
Espectro No. 33. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)



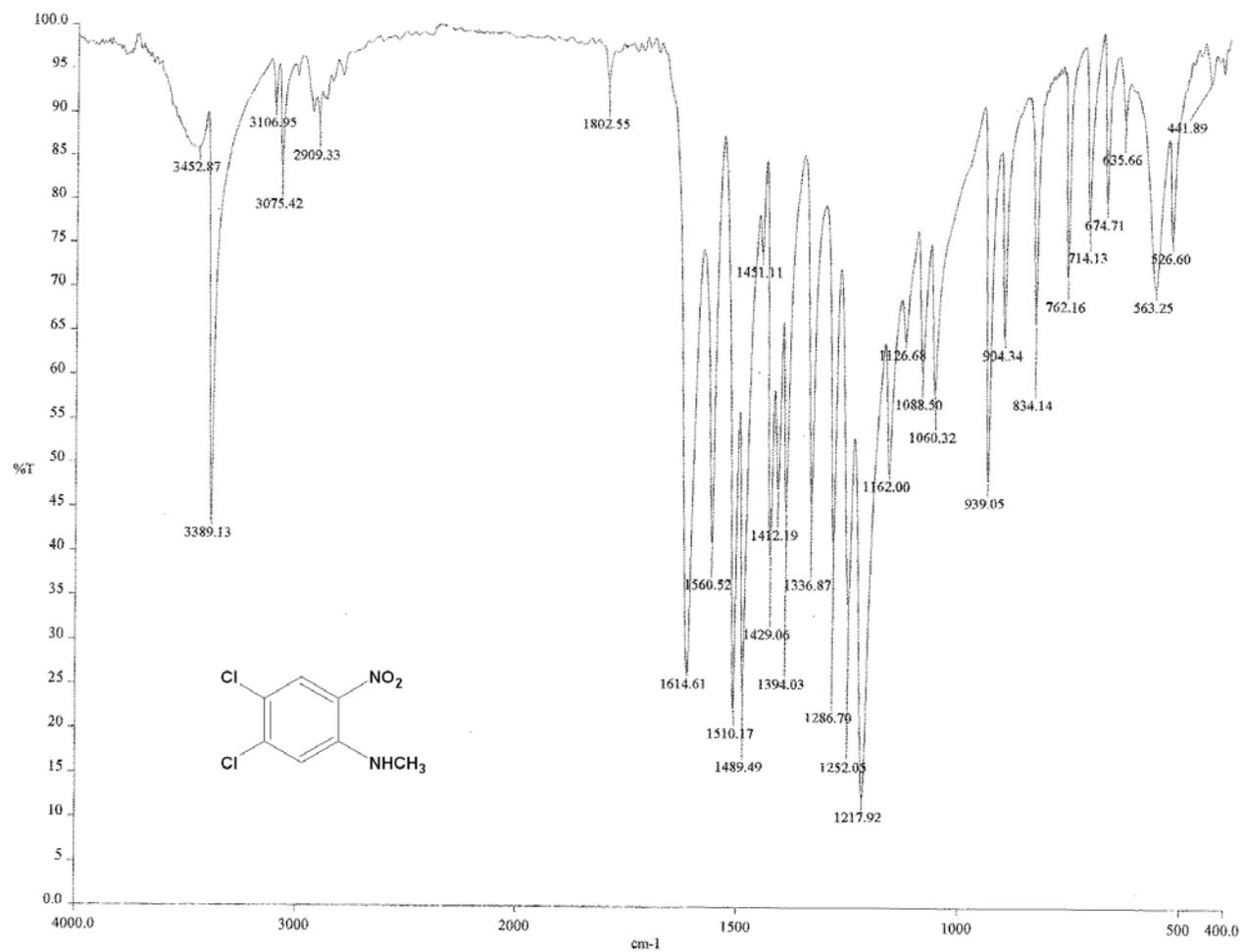
Espectro No. 34. IR (KBr) cm⁻¹: N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-N-metilacetamida (20)



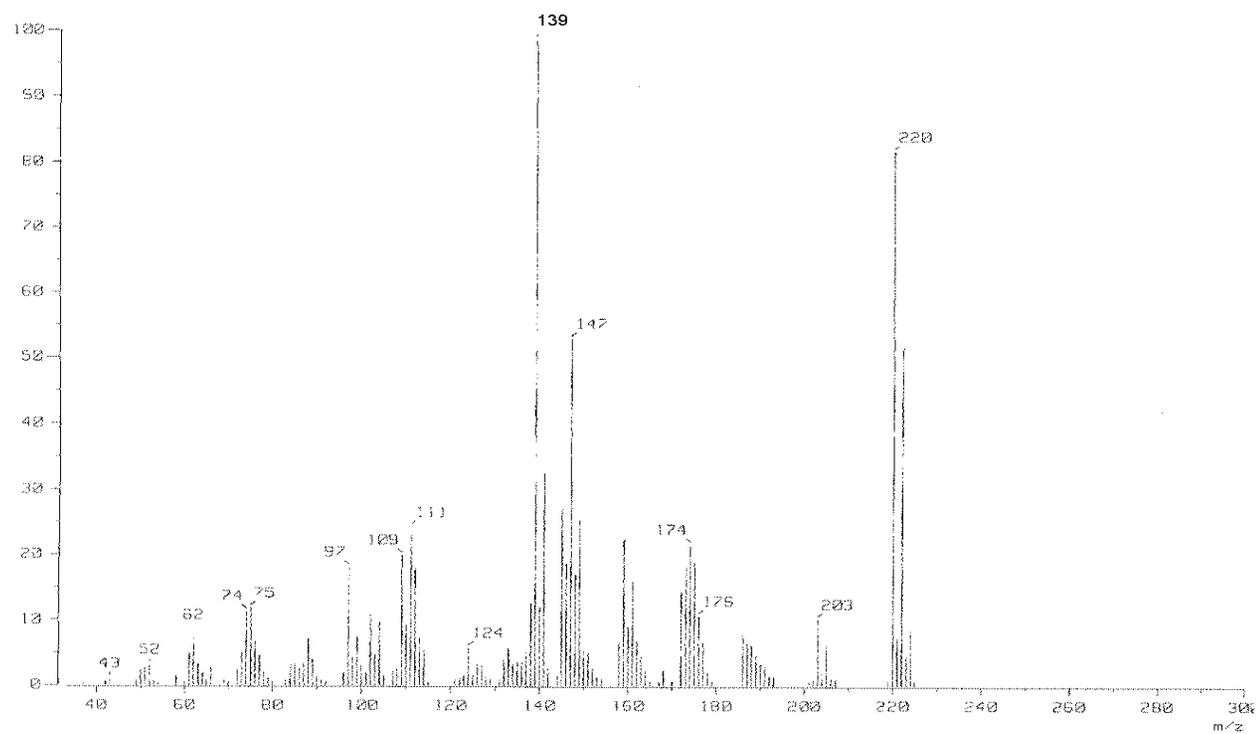
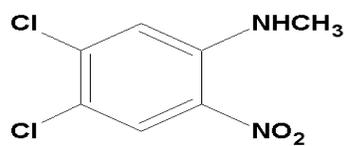
Espectro No. 35. EM (IE/ID) *m/z*: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (20)



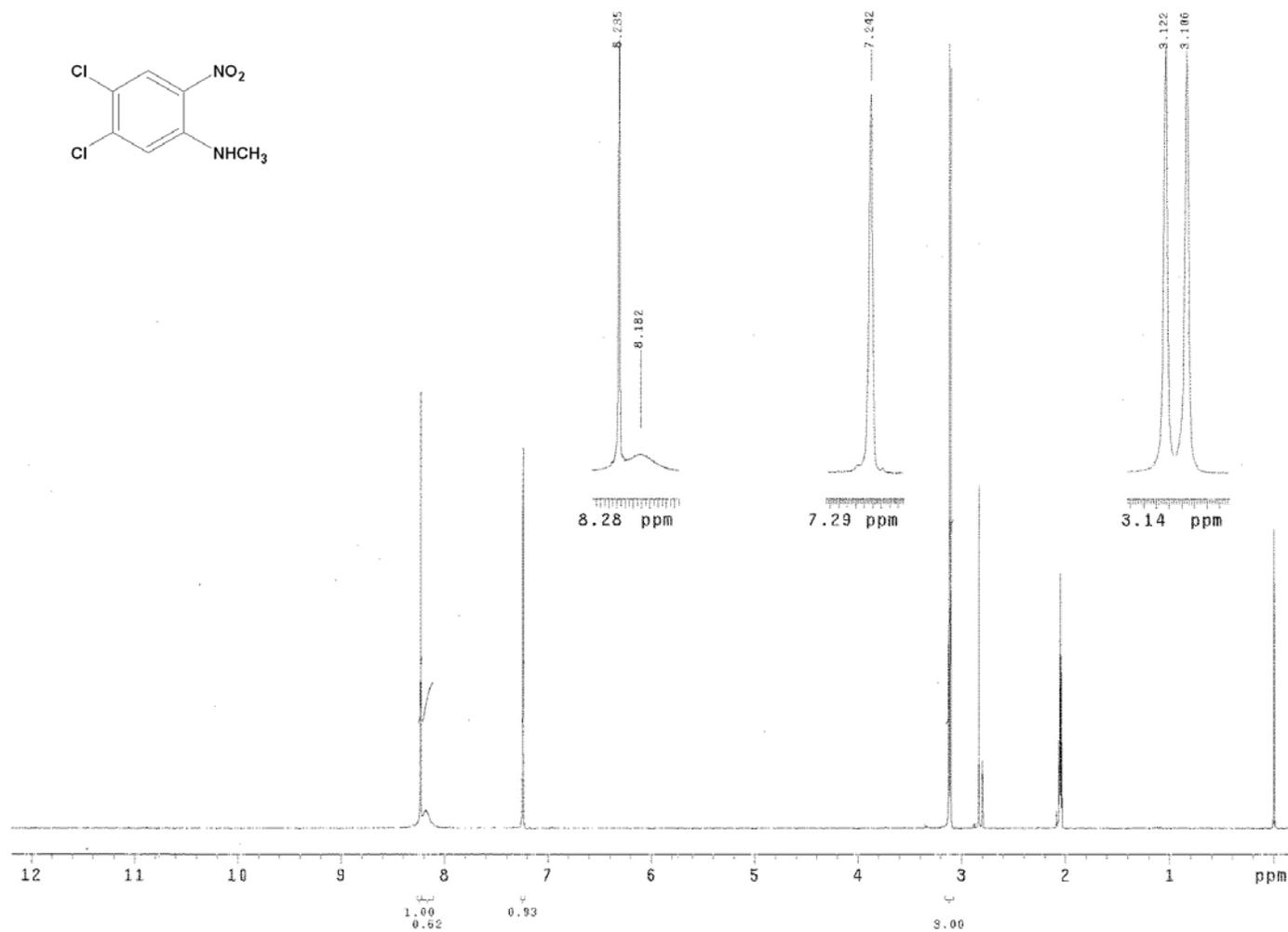
Espectro No. 36. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (20)



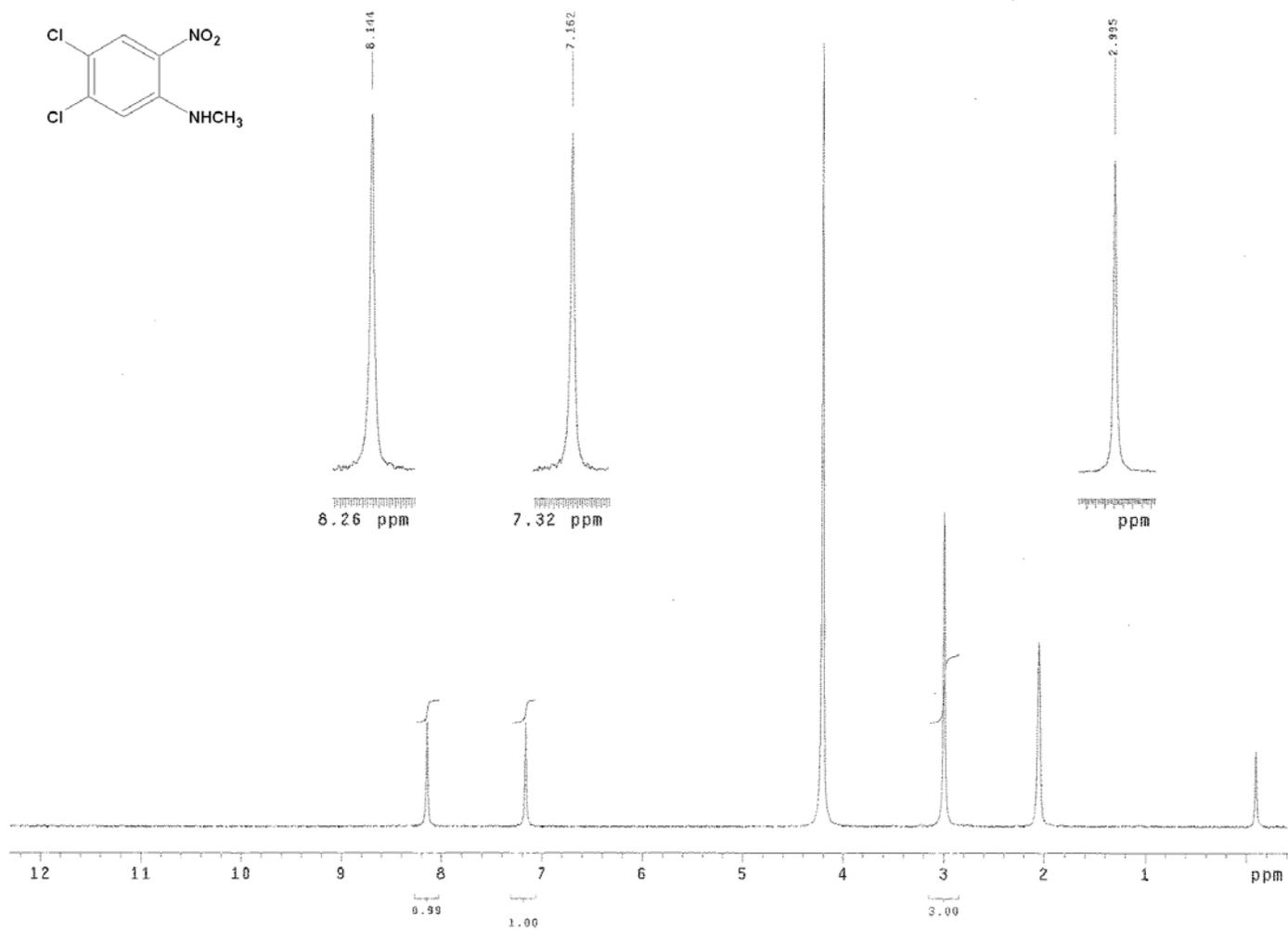
Espectro No. 37. IR (KBr) cm⁻¹: N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-N-metilamina (21)



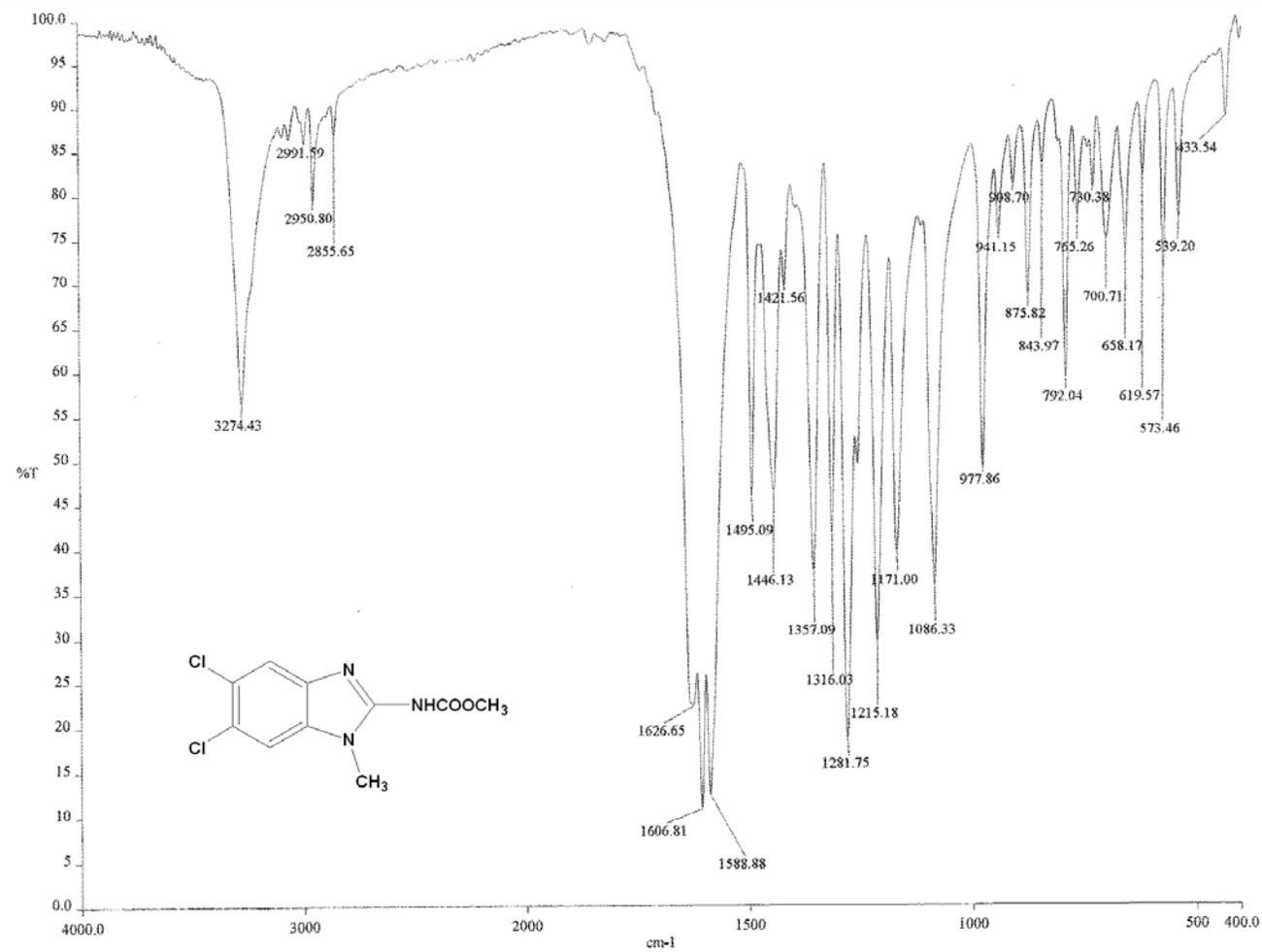
Espectro No. 38. EM (IE/ID) m/z : *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (21)



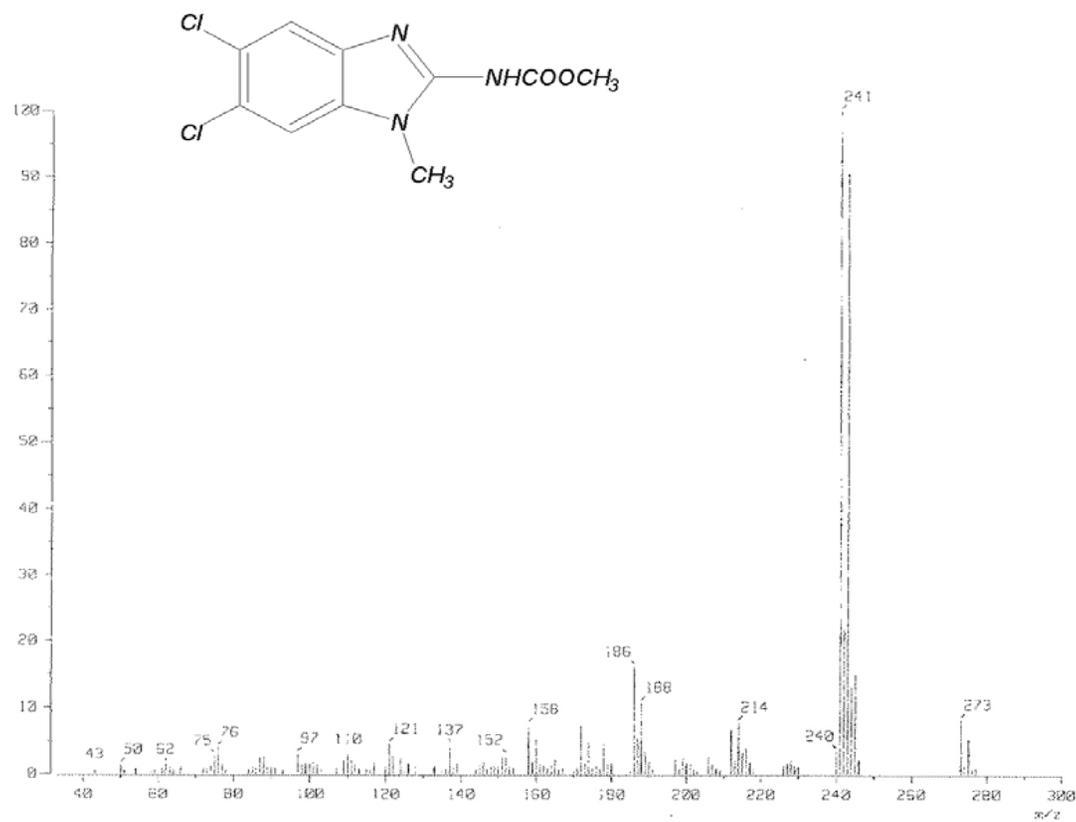
Espectro No. 39^a . RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (21)



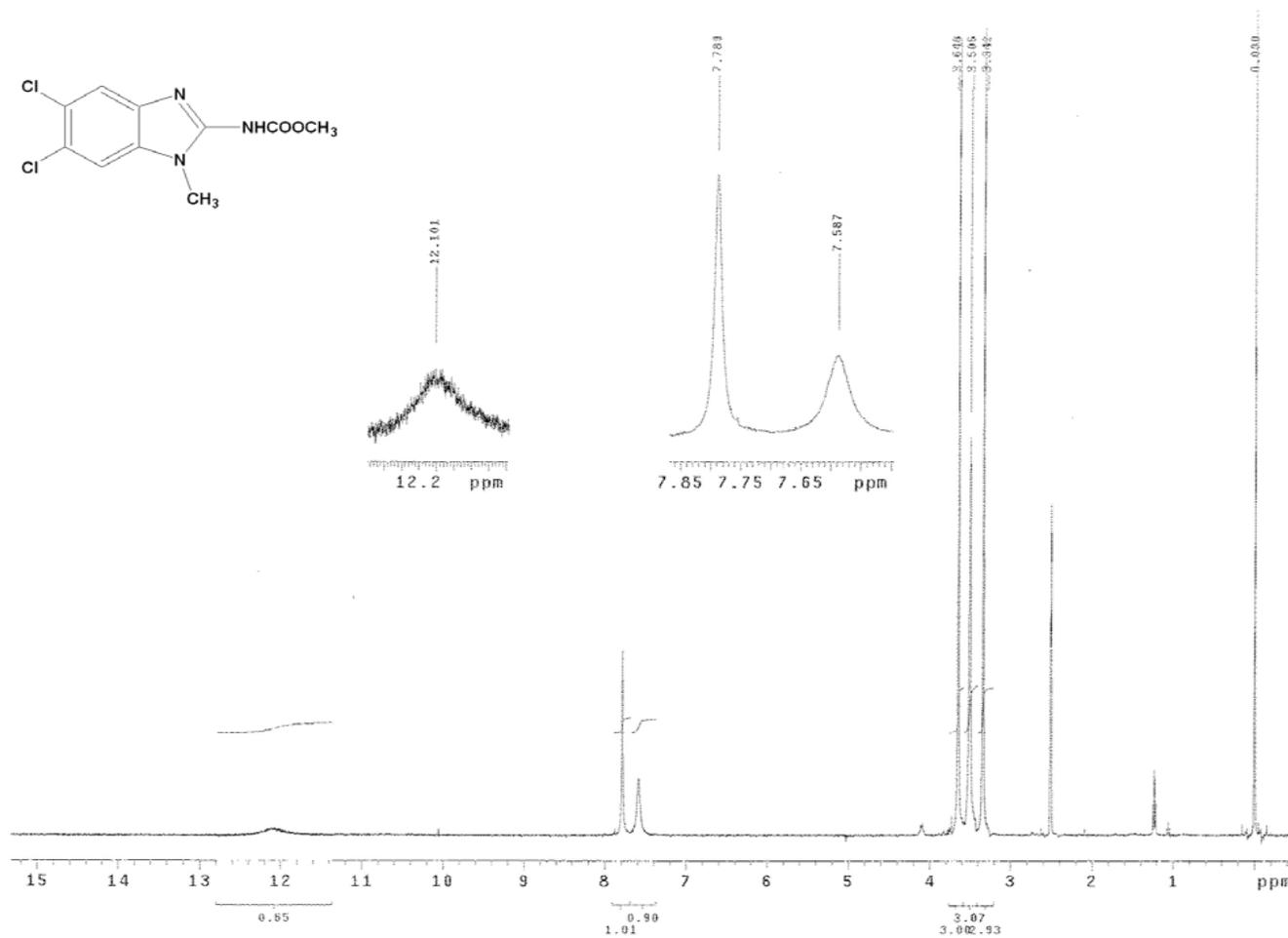
Espectro No. 39^b . RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (21)



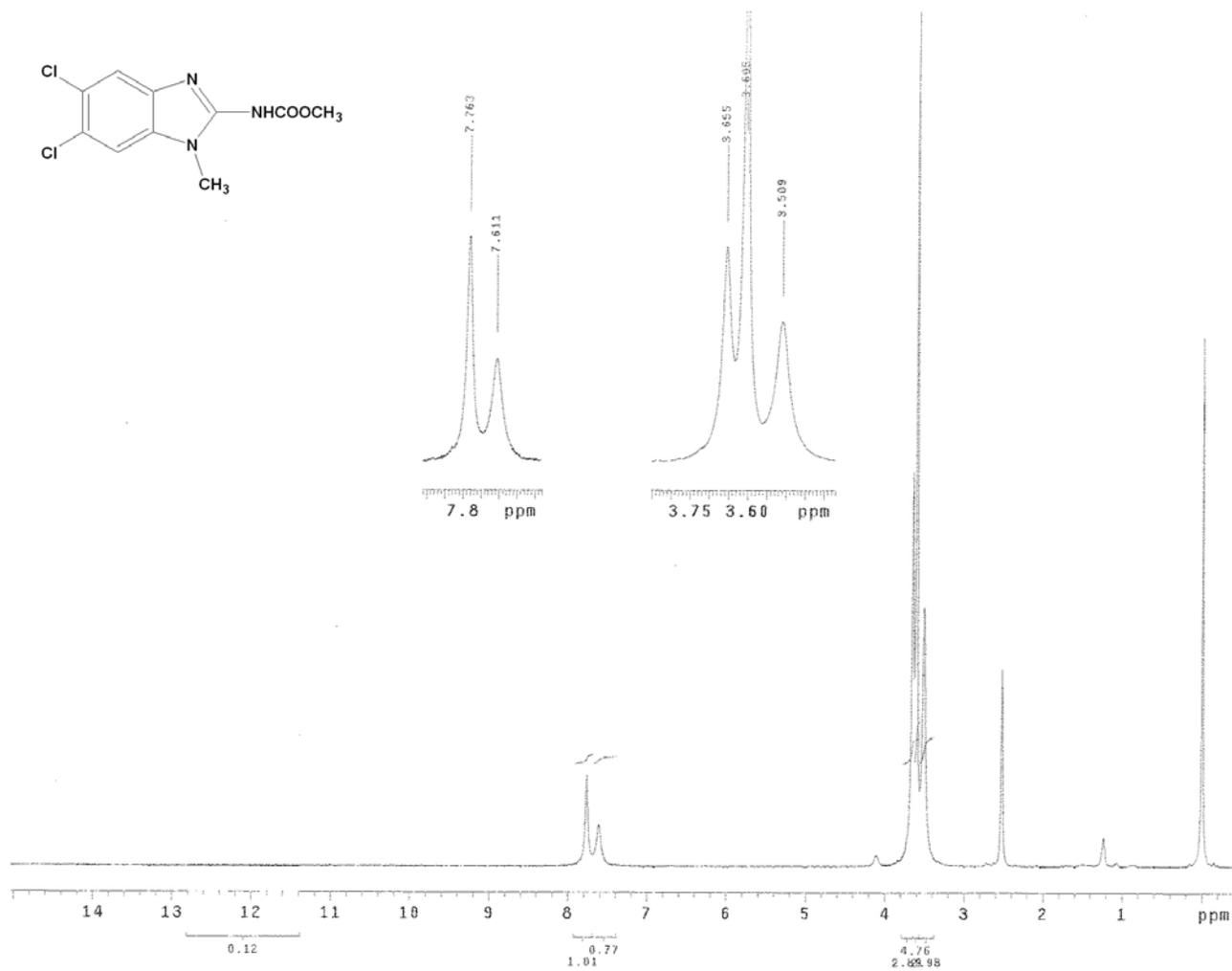
Espectro No. 40. IR (KBr) cm⁻¹: 5,6-dicloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-23)



Espectro No. 41. EM (IE/ID) m/z : 5,6-dicloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-23)



Espectro No. 42^a . RMN ¹H (TMS, DMSO) ppm: 5,6-dicloro-1-metil-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-23)



Espectro 42^b. RMN ¹H (TMS, DMSO), Intercambio con D₂O, ppm: 5,6-dicloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (AHM-23)

**LITERATURA
CITADA**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Atención primaria de la Salud. Boletín PROAPS-REMEDIAR.; Volumen 2. No 14. Octubre **2004**.
2. 2° Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de medicina Tropical, 28-31 Mayo. **2002**. Nuevo León Monterrey. Radisson plaza gran hotel ancira
3. Ximénez, G.C.; Las parasitosis intestinales en México. Cuadernos funsalud No. 36. Fundación Mexicana para la Salud, **2002**. <http://www.funsalud.org.mx>
4. Jean-Francois R.; Ayman Ayoub; Treatment of Diarrhea Caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba Histolytica* or *E. Dispar*: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Nitazoxanide. The Journal of Infectious Diseases, **2001**; 184:381-4.
5. Jawetz, Melnick and Adelberg.; Medical Microbiology.21 edition, Ed. Appleton nd Lange. **1998**.
6. Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, **2005**. <http://www.ssa.gob.mx>
7. Peter K.; The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. International Journal Parasitology, **2001**, 31:336-345
8. Dr Luis Felipe Bojalil J., et al. Microbiología Médica, México. **1981**
9. Adam RD.; Biology of *Giardia intestinalis*. Clinical Microbiol Rev, July **2001**, p. 447-445
10. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas, Principios y Práctica. 4ª edición. Ed. México Panamericana. Tomo II. Argentina **1977**: 2789-2794.
11. Rodríguez, G.R.; Rodríguez, G.L.; Cruz, C.A.; Eficacia y seguridad de Mebendazol contra Nitazoxanida en el tratamiento de Giardia en niños. Revista Gastroenterológica, México **1999**; 64(3):122-126
12. Murria, R.P; Kobayashi, S.G.; Pfaller, A.M.; Rosenthal, S.K.; Microbiología Médica, **2001**; 2da. Edición, Ediciones Harcourt, España.
13. Barr C.S. y Bowman D.D.; Colegio de Medicina de Nueva York, Universidad Cornell, Ithaca, Nueva York. Compendium Continuing Education; 16(5), **1994**
14. <http://www.mbl.edu/Giardia/index2.html>
15. David Botero, Marcos Restrepo. Parasitosis Humanas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. 3ª Edición. Medellín; Colombia. **1998**: 286-288

16. <http://www.monografias.com/trabajos16/trichomonas-vaginalis/trichomonas-vaginalis.shtml>
17. Ocampo, G.; Salgado, D.; La Omnipresencia de las Helmintosis. Salud Pública de México, **1992**; 34(3)
18. Sharma, S. Design of new Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles, Avd. Drug. Res.25, **1994**:105-163
19. Chévez, B., Cedillo-Rivera., Martínez Palomo, A. *Giardia lamblia*: Ultraestructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles. Journal of Protozool., 39(4), **1992**, 510-515.
20. Meloni, B., Thompson, R., Horton, R. Albendzoles as a future anti giardial agent. Parasitology Today. **1992**, 8, 412-414.
21. Sánchez Díaz, M.R. Tesis de Maestría. Síntesis de Derivados del 1-metilbencimidazol con Actividad Antihelmíntica Potencial. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **1999**
22. Valdez J., Castillo R., Alicia Hernández-Campos, Lilián Yépez, Francisco Hernández, Navarrete G., Tapia A., Cortés R., Hernández M., and Rafael Castillo. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1*H*-Benzimidazole Derivatives. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters. 12 (**2002**): 2221-2224
23. Gabriel Navarrete-Vázquez, Roberto Cedillo, Alicia Hernández-Campos, Lilián Yépez, Francisco Hernández-Luis, Juan Valdez, Raul Morales, Rafael Cortés, Manuel Hernández and Rafael Castillo. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters. 11 (**2001**), 187-190
24. Valdez Garay, Juan. Tesis de Maestría. Diseño, síntesis y actividad biológica de 1*H*-bencimidazoles. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **2000**
25. Ozden S., Atabey D., Yildiz S and goker H.; Synthesis and potent antimicrobial activity of some novel methyl or ethyl 1*H*-benzimidazole-5-carboxilates derivatives carrying or amidine groups. Bioorganic and Medicinal Chemistry; 13(2005): 1587-1597

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

26. Pawar, Dalal, Shimpi and Muhulikar.; Studies of antimicrobial activity of *N*-alkyl and *N*-acyl 2(4-thiazolyl)-1H-benzimidazoles. European Journal of Pharmaceutical Sciences; 21(2004): 115-118
27. Cheng J., Xie J and Luo X.; Synthesis and antiviral activity against Coxsackie virus B3 of some novel benzimidazole derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters; 15 (2005): 267-269
28. Townsend, L.B., Wise, D.S.; The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. Parasitology Today, 1990; 6(4): 107-112
29. Peter Upcroft and Jacqueline A. Upcroft. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the anaerobic Protozoa. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 2001:150-164
30. Navarrete Vazquez G. Tesis Doctoral. Diseño, Síntesis y Actividad Antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)benzimidazol. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2004
31. Sharma S., Abuzar S. The benzimidazole anthelmintics chemistry and biological activity. Prog Drug Res. 1983; 27:85-161.
32. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Interamericana MacGraw Hill. 9ª Ed. 1997: 17
33. Lacey E. Mode of Action of Benzimidazoles. Parasitology Today. 6(4), 1990: 112-115
34. Wright B.J. The Chemistry of the Benzimidazoles. Research Laboratories. Jan 29, 1951
35. Katritzky, A.R.; Rachawl, S.; New Routes to Selectively Methylated Benzimidazoles. Heterocyclic Chem., 1994; 31: 775
36. Prashad M.; Har D.; Hu B., Kim Y.; Repic O., Blacklock T.; An efficient and Practical *N*-Methylation of Amino Acid Derivatives. Organic Letters. 5(2), 2003:125-128
37. Beilstein Organische Chemie. Band XII, pp. 730., (Blanskma, R 21, 276)
38. Mendoza Romero, L. Tesis de Licenciatura. Síntesis de *N*-metil-2-nitroanilinas. Materia prima para la preparación de 1-metilbenzimidazoles antiparasitarios. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2001
39. Beilstein Organische Chemie, Band XII, p. 689
40. Beilstein Organische Chemie, Band XII, p. 729-731
41. Dictionary of Organic Compounds, Vol 1, 15th Ed. p. 11697, 1269

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

42. Beilstein Organische Chemie, Band XII, p. 733-734
43. Cedillo Rivera, B. Chávez, M. Espinosa-Castellano, A. Ramírez and Martínez Palomo. Effects of Albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Trophozoites. Arcives of Medical Research, **1992**, 23, p. 63-67
44. Cedillo Rivera, R Muños O.J. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemoterapeutic agents. Med Microbiol., **1992**, 37, 221
45. Cedillo Rivera, Enciso Moreno J. Antonio. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in México. Arch. Invest. Med. (Méx), **1991**; 22-79