



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE [5-CLORO-6-(1-NAFTILOXI)-
1*H*-BENCIMIDAZOL-2-IL]CARBAMATO DE METILO Y DE UN DERIVADO 1-
METILADO COMO PROFÁRMACO POTENCIAL

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. ANTONIO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ



TUTOR: Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff
Vocal	Dr. Manuel de Jesús Salmón Salazar
Secretario	Dra. Lilián Yépez Mulia
Primer suplente	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
Segundo suplente	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

La parte sintética del presente trabajo se realizó en el laboratorio 122 de la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. La parte de las pruebas de actividad biológica se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico del IMSS, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia y la supervisión técnica de la Bióloga Amparo Tapia. La actividad del compuesto **Alfa-carbamato (7)** en *Paramphystomon sp* se llevó a cabo en la FMVZ de la UNAM bajo la dirección del Dr. Fróylan Ibarra Verlarde.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo, por seguir alentándome en mis sueños.

A la familia Acosta Trujillo por el apoyo incondicional, por aceptarme como un integrante más de esta maravillosa familia. Especialmente a la mujer que ha transformado mi vida, por ser tan especial y estar siempre a mi lado en cualquier situación. Te amo PWMLT

Con muy especial cariño quiero agradecerle a mi M. en C. Alicia Hernández Campos, de verdad maestra son pocas las palabras para expresarle mi gratitud por todo este tiempo ya que no solo me ha orientado en la parte académica sino también en la personal. Quiero agradecerle por permitirme trabajar a su lado, por guiarme a lo largo de este proyecto, por sus valiosos consejos. La quiero mucho maestra. Mil gracias.

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por aceptarme prácticamente como un alumno más y por formar parte importante del diseño de este proyecto así como de toda la parte metodología de este, por todos sus consejos y observaciones durante toda mi estancia.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por permitirme seguir adelante con esta preparación interminable en mi vida profesional, por alentarme y estar siempre dispuesto a compartir su conocimiento.

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

A la Dra. Lilian 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.

A todo el jurado por sus valiosas aportaciones en el diseño final de esta tesis.

Al personal de la USAI, Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez, y Nallely López por la determinación de los espectros.

Al proyecto CONACYT 49629 por la beca recibida durante la realización de este proyecto.

Al proyecto PAPIIT DEGAPA IN 211806, por el apoyo económico recibido por la realización de esta tesis.

A fundación Telmex por el apoyo recibido al formar parte de su grupo de becarios.

*GRACIAS A TODOS AQUELLOS QUE NO SÓLO ME ENSEÑARON
A SOÑAR, SINO QUE POR ENCIMA DE ESO ME AYUDARON A
CONQUISTAR ESTE SUEÑO.*

AHM



ÍNDICE	Pág.
ÍNDICE	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Panorama actual de las parasitosis en México	3
2.2. Los protozoarios	4
2.2.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	4
2.2.2. <i>Giardia intestinalis</i>	6
2.2.3. <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
2.3. Los helmintos	10
2.3.1. <i>Trichinella spiralis</i>	10
2.3.2. <i>Paramphistomonas sp</i>	12
2.4. Tratamientos antiparasitarios	14
2.5. Los bencimidazoles	16
2.6. Relación estructura-actividad biológica de los bencimidazoles	17
2.7. Mecanismo de acción de los bencimidazoles	18
2.7.1. Inhibición del metabolismo de la glucosa	18
2.7.2. Inhibición en la recaptura de la glucosa	19
2.7.3. Inhibición de la polimerización de tubulina	19
2.8. El compuesto Alfa como agente faciolicida	21
2.9. Los profármacos como método de optimización de fármacos	23
2.9.1. Tipos de profármacos	24



	Pág.
2.9.2. Profármacos de bencimidazoles	25
2.10. Importancia del citocromo P-450 en el metabolismo de xenobióticos	26
2.10.1. Reacciones y Regulación enzimática del CYP	27
2.10.2. Regulación enzimática por bencimidazoles anthelmínticos	29
2.11. Metabolismo de la cafeína	31
2.12. Métodos de evaluación del citocromo P450	33
2.12.1. Estudios in vivo	34
2.13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	34
2.13.1 Cromatografía de fase reversa	34
2.13.2 Extracción en fase sólida	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
5. MATERIAL Y METODO	42
5.1. Parte Química	43
5.2. Parte Biológica	45
5.3. Parte analítica	45
6. RESULTADOS Y DISCUSION	47
6.1. Resultados de la Parte Química	48
6.1.1. Intermediarios de reacción	52
6.1.2. Compuestos Finales	56
6.2. Resultados de la Parte Biológica	57



	Pág.
6.2.1. Efecto de los compuestos Alfa-carbamato y HSK sobre <i>E. histolytica</i> , <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i>	57
6.2.2. Resultados de la actividad de los compuestos Alfa-carbamato y HSK sobre <i>T. spiralis</i> in vivo e in vitro	59
6.3. Resultados de la parte analítica	62
6.3.1. Resultados de los estudios de biotransformación	62
7. CONCLUSIONES	72
8. PARTE EXPERIMENTAL	73
8.1. Parte química	73
8.1.1. Instrumentación	73
8.1.2. Síntesis de Alfa-carbamato	74
8.1.3. Dicloroacetanilida (1)	74
8.1.4. Dicloro-2-nitroacetanilida (3)	75
8.1.5. 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (4)	76
8.1.6. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)	76
8.1.7. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-feniöldiamnina (6)	77
8.1.8. [5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (7). Alfa-carbamato	78
8.1.9. Síntesis de HSK	79
8.1.10. 4,5-Dicloro- <i>N</i> -metilacetanilida (8)	79
8.1.11. 4,5-Dicloro- <i>N</i> -metil-2-nitroanilina (9)	80
8.1.12. 4-Cloro- <i>N</i> -metil-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (10)	80
8.1.13. 4-Cloro- <i>N</i> -metil-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (11)	81
8.1.14. [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)	82



	Pág.
8.1.15. 1,3-(Dimetoxicarbonil)- <i>S</i> -metilisotiourea (14)	82
8.2. Par te Biologica	83
8.2.1. Ensayos de actividad en protozoarios in vitro	83
8.2.2. Ensayos de actividad in vitro en <i>T. spiralis</i> (MTT/PMS)	84
8.2.3. Ensayos de actividad in vivo en <i>T. spiralis</i>	85
8.2.3.1. Fase muscular	85
8.2.3.2. Fase enteral	85
8.3. Parte analitica	86
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
10. APENDICES	98
ARTICULO PUBLICADO	

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias provocadas por helmintos y protozoarios son uno de los grandes problemas de salud pública, tanto en el sector humano como en el veterinario, lo que lleva a una pobre calidad de vida y pérdidas económicas importantes. Actualmente, los fármacos más utilizados en el tratamiento quimioterapéutico de las helmintosis son derivados del bencimidazol 2-carbamato de metilo (BZC), como el albendazol y mebendazol, los cuales también han demostrado potente actividad antiprotozoaria contra *G. intestinalis*; sin embargo, estos compuestos presentan poca biodisponibilidad por lo que actúan a nivel gastrointestinal, y en parasitosis sistémicas se utilizan dosis más elevadas de dichos compuestos por un tiempo más prolongado. Para compensar su baja solubilidad se han sintetizado profármacos de los bencimidazoles como el tiofanato, febantel, netobimin, que presentan mayor solubilidad en agua, y que su actividad depende de su conversión en el organismo en un BZC.

Por otro lado, para el tratamiento de las parasitosis causadas por protozoarios se han empleado los nitroheterociclos, los cuales han estado en el mercado por varias décadas, tienen efectos secundarios indeseables y su uso ha generado cepas resistentes a estos agentes quimioterapéuticos.

En México, las parasitosis continúan siendo una de las principales causas de morbilidad, presentándose en el sector humano entre las que se encuentran las causadas por: *G. intestinalis*, que afecta principalmente al sector infantil, *T. vaginalis*, que afecta a la población sexualmente activa y *E. histolytica*, que causa severas diarreas, entre otras. Por otro lado, en el sector veterinario en México, una de las parasitosis menos estudiadas es la paramfistomosis, causada por el trematodo *Paramphistomum spp*, presentándose en nuestro país en los estados de Tabasco, Sinaloa y Campeche, provocando pérdidas importantes en la producción de carne, leche y lana. Actualmente, el único fármaco disponible para el tratamiento de la paramfistomosis, pero no el más efectivo, es el Triclabendazol.

Con el propósito de contar con nuevos agentes antiparasitarios, en esta tesis se describe la síntesis de dos compuestos: el [5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo, denominado **Alfa-carbamato (7)**, y de un derivado monometilado de éste, el **HSK (12)**. El compuesto **HSK** se diseñó como un posible profármaco del compuesto **Alfa-Carbamato**, que podría generarse mediante una reacción de *N*-desmetilación oxidativa por el huésped mediante el citocromo P-450.

A la fecha, la actividad del compuesto **Alfa-carbamato (7)** ha sido evaluada contra el parásito *Paramphistomon spp*, obteniéndose en borregos una reducción de la carga parasitaria del 86.7 %.

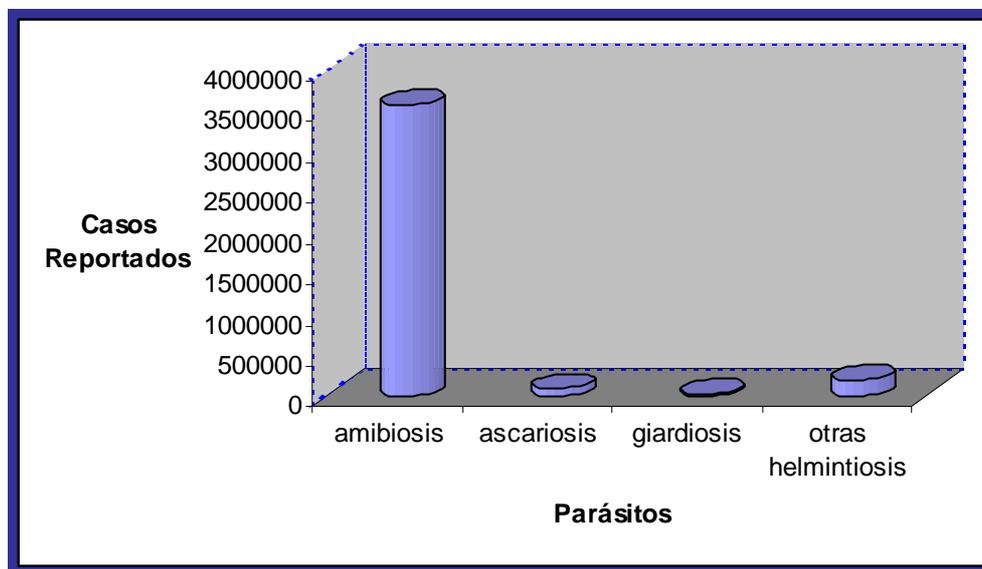
Los compuestos **Alfa-carbamato** y **HSK** se evaluaron in vitro contra los parásitos *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *E. histolytica*. Así mismo, se evaluaron in vivo contra la fase muscular y adulta de *T. spiralis*

Adicionalmente en este trabajo de síntesis, se determinó la biotransformación en ratones del compuesto **HSK**.

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, con clima subtropicales y tropicales, malas condiciones sanitarias y pobres hábitos de higiene, donde se presentan con mayor prevalencia.^{1,2} En México, las parasitosis intestinales causadas por protozoarios y nematodos transmitidos por el suelo continúan estando dentro de las primeras 20 causas de enfermedad. La amibiosis, giardiosis, ascariosis y oxiuriasis, son las enfermedades intestinales más frecuentes, con tasas/100,000 habitantes tan altas como >1,500 en el caso de la amibiosis 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 *G. intestinalis* y *E. histolytica* son los más comúnmente reportados.⁴⁻⁶ (Datos reportados por la Secretaría de Salud hasta la semana 27 del 2007 se muestran en la **Grafica 1**).



Gráfica 1. Frecuencia de parasitosis en México reportado por el boletín de vigilancia epidemiológica.⁶

Actualmente existe un incremento en las medidas higiénicas, sanitarias y tratamiento masivo con fármacos antihelmínticos. Sin embargo, la quimioterapia en zonas alejadas se dificulta además de que se tiene información de falla terapéutica.⁷

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. Los protozoarios de interés en esta tesis son: *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Los dos primeros se relacionan con diarreas agudas y crónicas y el tercero con la vaginitis. El fármaco de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos es el metronidazol (**Figura 7**), cuya molécula tiene un núcleo de imidazol.

2.2.1. *Entamoeba histolytica*

La infección causada por *Entamoeba histolytica* se conoce como amebiasis. Las amibas, normalmente presentes en el intestino grueso, ocasionalmente penetran la mucosa intestinal y pueden diseminarse a otros órganos. La amebiasis es responsable de unas 100,000 muertes por año, lo que la coloca 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 existencia de dos especies: una capaz de causar enfermedad invasora (*E. histolytica*) y otra que nunca causa enfermedad, a la que se le llamó *Entamoeba dispar*. La *E. histolytica* puede causar enfermedad invasora intestinal y extraintestinal, a diferencia de *E. dispar*.³

Ciclo de vida

La infección por *E. histolytica* (**Figura 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 individuos infectados, quienes en ocasiones son 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, 5}

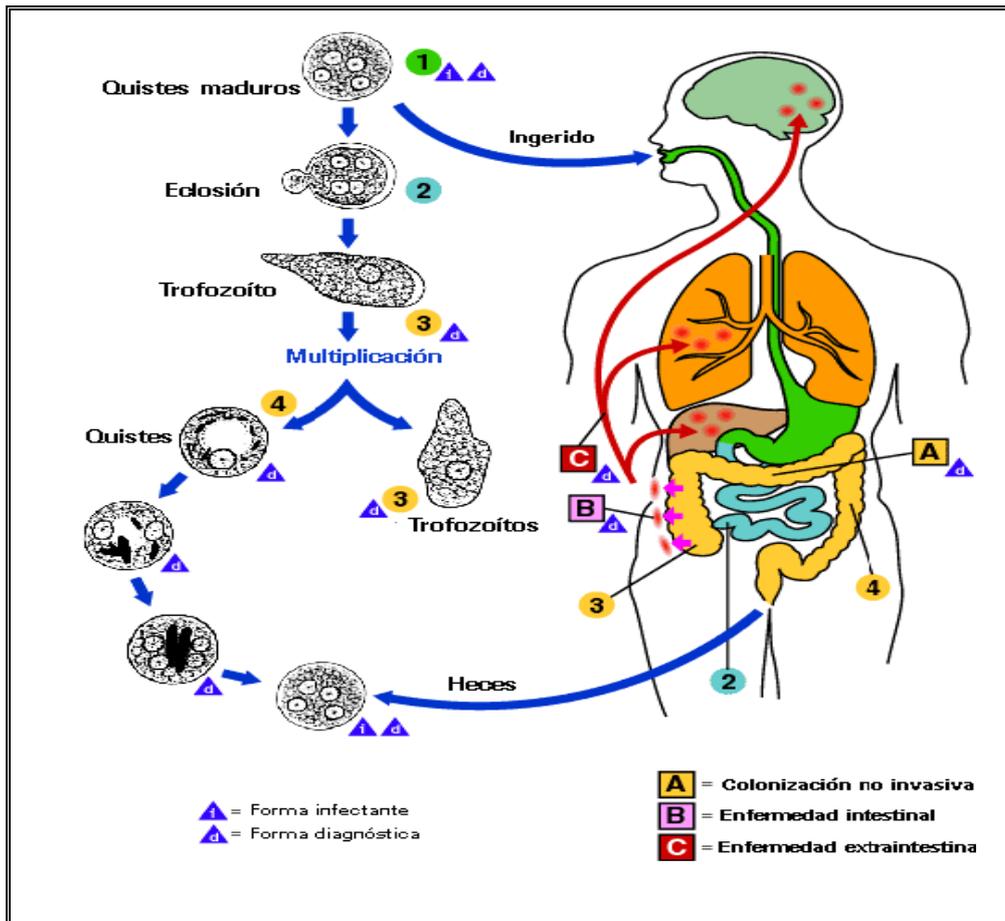


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

2.2.2. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis, también conocida como *Giardia duodenalis* y *Giardia lamblia*, es el agente causal de la *Giardiasis*.⁹ El habitat de *G. intestinalis* se encuentra en el yeyuno y 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 de vida

El ciclo de vida de *G. intestinalis* (**Figura 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 *G. intestinalis*¹²

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

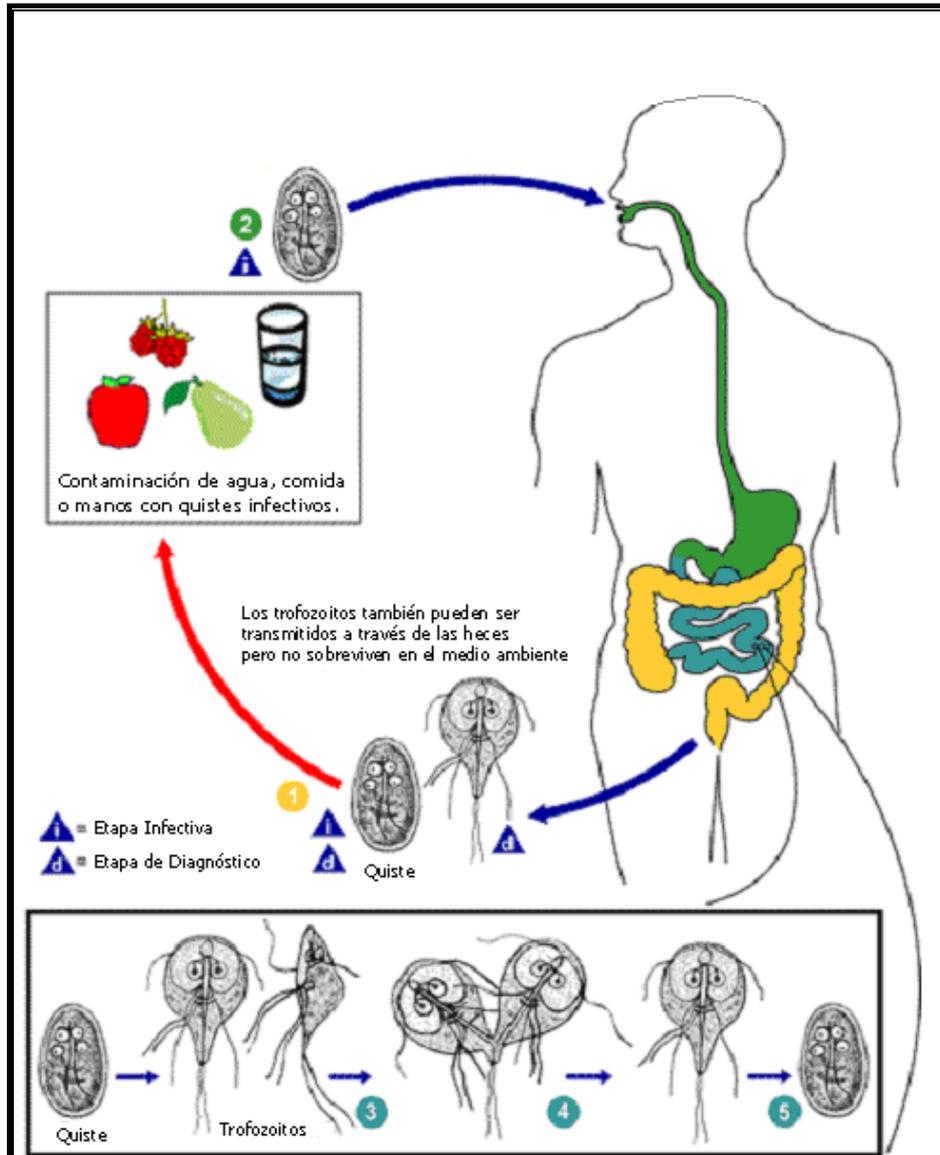


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*.^{13,14}

2.2.3. *Trichomonas vaginalis*

La trichomonosis es causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, un protozoo de forma ovoide o periforme, flagelado (**Figura 3**). El trofozoíto 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 trofozoíto. 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

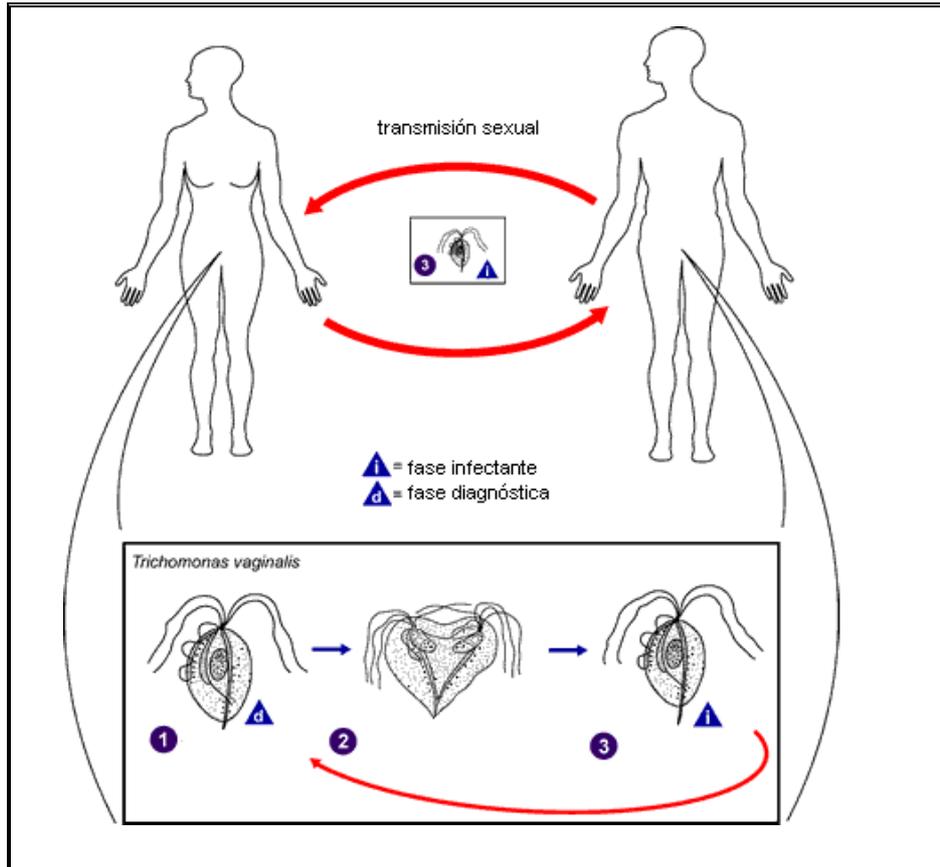


Figura 3. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.¹⁶ 1. Trofozoito en vagina y en orificio de la uretra. 2. Trofozoito en secreciones vaginales, prostáticas y en orina. 3. Multiplicación por fisión binaria longitudinal.

El trofozoito se pega a las membranas de la mucosa 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. LOS HELMINTOS

Los helmintos (nematodos, cestodos y trematodos), a diferencia de los protozoarios, son organismos pluricelulares, se reproducen sexualmente, y su morfología es muy variada dependiendo al grupo que pertenecen. Entre las helmintosis que causan mayores estragos en la salud pública se encuentran la fasciolosis (*Faciola hepatica*), la cisticercosis (*Tenia solium*) y la triquinelosis (*Trichinella spiralis*), las cuales provocan enfermedades graves e incluso fatales.¹⁷ Para el tratamiento de las helmintosis se han utilizado muchos compuestos con una gran variedad de estructuras moleculares, denominados antihelmínticos.^{18,19}

Dentro de los diversos grupos que se han utilizado para combatir estas parasitosis, se encuentran los bencimidazoles, especialmente los bencimidazol 2-carbamatos de metilo, como el albendazol y el mebendazol, los cuales presentan actividad de amplio espectro.

2.3.1. *Trichinella spiralis*

La trichinellosis es causada por el nematodo *Trichinella spiralis* y pertenece al género *Trichinella*. Los parásitos del género *Trichinella* son organismos intracelulares obligados, sexuados, con ciclo de vida directo, pues todos los estadios ocurren en un solo hospedero.¹⁷

El género *Trichinella* afecta a casi cualquier especie de mamífero, incluido el ser humano (**Figura 4**). El ser humano se infecta al comer carne de cerdo cruda o mal cocida que tenga larvas musculares (LM) de *T. spiralis* contenidas en una estructura conocida como célula nodriza, aunque la infección se debe también a la ingestión de carne infectada de otros animales, como jabalí, oso, foca o morsa. Las larvas musculares son liberadas de la célula nodriza por acción de los jugos gástricos y después de 4 mudas maduran al organismo adulto el cual infecta a las células epiteliales del intestino delgado. Posteriormente al quinto día postinfección el adulto libera las larvas recién nacidas y, por circulación sanguínea invade a las células musculares y generando LM transformando a la célula muscular en célula nodriza.

Todas las especies de *Trichinella* infectan al hombre, la trichinellosis se considera como una enfermedad endémica cosmopolita de origen alimentario.^{20,21}

El tratamiento de la trichinellosis no es efectivo y los fármacos de elección para el tratamiento son el mebendazol y el albendazol, el primero es ineficaz cuando el parásito ya esta encapsulado y el segundo induce efectos colaterales en el 30% de los pacientes.²⁰

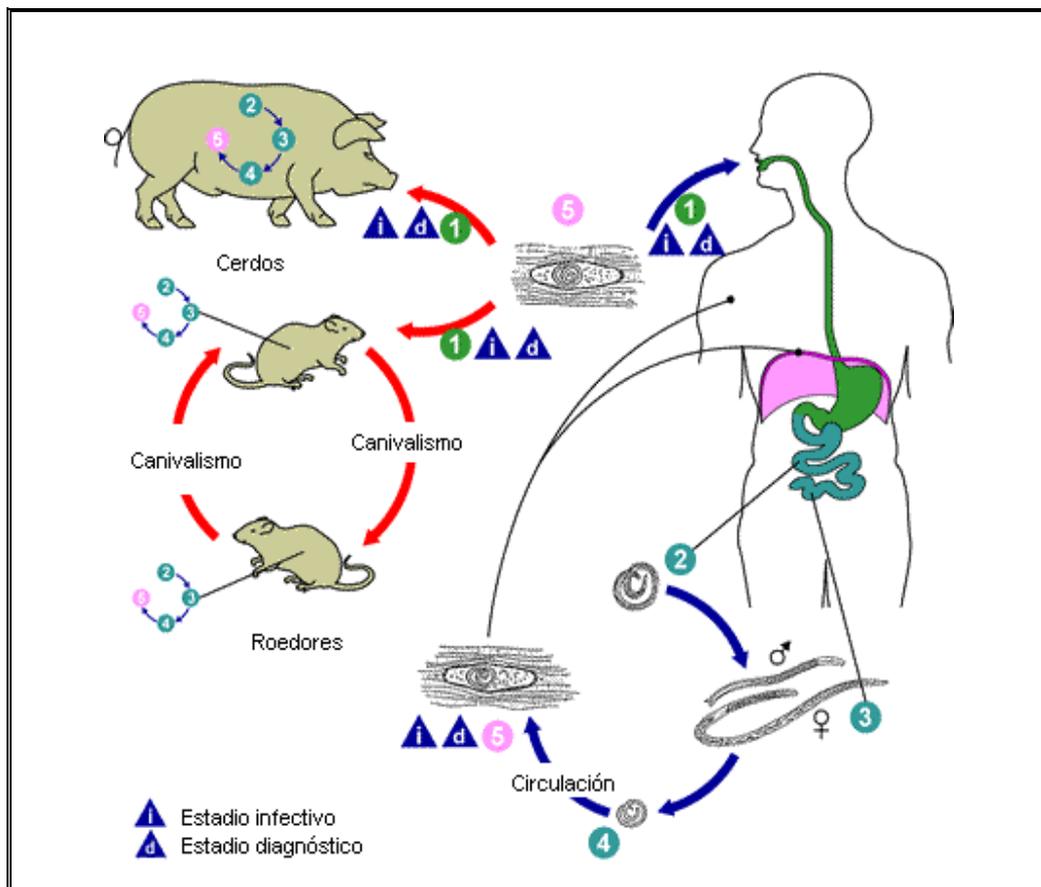


Figura 4. Ciclo vital del parásito *T. spiralis*.²² (1) ingestión de carne infectada, (2) larva liberada en el intestino delgado, (3) adultos en el intestino delgado, (4) larva recién nacida liberada, (5) larva muscular dentro de la célula nodriza.

2.3.2. *Paramphistomun spp*

La paramfistomosis es una parasitosis gastrointestinal de los rumiantes causada por *Paramphistomun spp* que parasita el rumen, retículo, abomaso e intestino delgado. Esta parasitosis es debida a la acción y presencia de parasitos de diferentes generos. Entre las generos registrados con más frecuencia en bovinos se pueden señalar *P. cervi*, *P. microbothrioides*, *P. liarchis*, *P. ichikawai*, *P. microbothrium*, *Calicophoron calicophorum*, *Colylophoron streptocoelium*, *Calicophorum ijimai* y *Colylophoron colyphorum*

La paramfistomosis es una enfermedad que provoca serios problemas económicos en el sector veterinario, como pérdidas en carne, lana y en la industria de la leche.^{23,24}

Aunque la distribución de esta enfermedad es cosmopolita, presentándose en algunos lugares de África, Asia y Europa. En México, la epidemiología no ha sido estudiada exhaustivamente. Sin embargo, se han determinado algunas zonas enzoóticas para el ganado bovino, principalmente la zona sureste se ha identificado su presencia en primavera, identificándose como agente causal especies del género *Paramphistomum cervi*.²⁴

Ciclo de vida

Los trematodos como es el caso del *Paramphistomum spp.*, poseen como huéspedes intermediarios a caracoles planórbidos acuáticos que son mucho más adaptables y ocupan un hábitat más diversificado que los caracoles limneidos, por lo que tienen una distribución geográfica distinta a la del hígado (*Fasciola hepatica*). En las regiones costeras de México se ha identificado al caracol de la especie *Lymnaea*.²³ Las formas tempranas del trematodo penetran a la cavidad respiratoria de los caracoles y al cabo de dos meses se desarrollan completamente y salen de éstos durante las horas de mayor intensidad solar, nadan cerca de la superficie del agua (gracias a que poseen una gran cola propulsora más larga que su cuerpo) de un lado para otro y se fijan en el agua a las plantas, formando quistes que son ingeridos por los animales (**Figura 5**). Los quistes, de unas 250 micras, están rodeados de dos membranas resistentes, una externa de estructura fibrosa y una interna. Las duelas inmaduras se depositan en el duodeno y a medida que maduran emigran por el abomaso al rumen y retículo. El periodo necesario para madurar varía de seis semanas a cuatro meses.

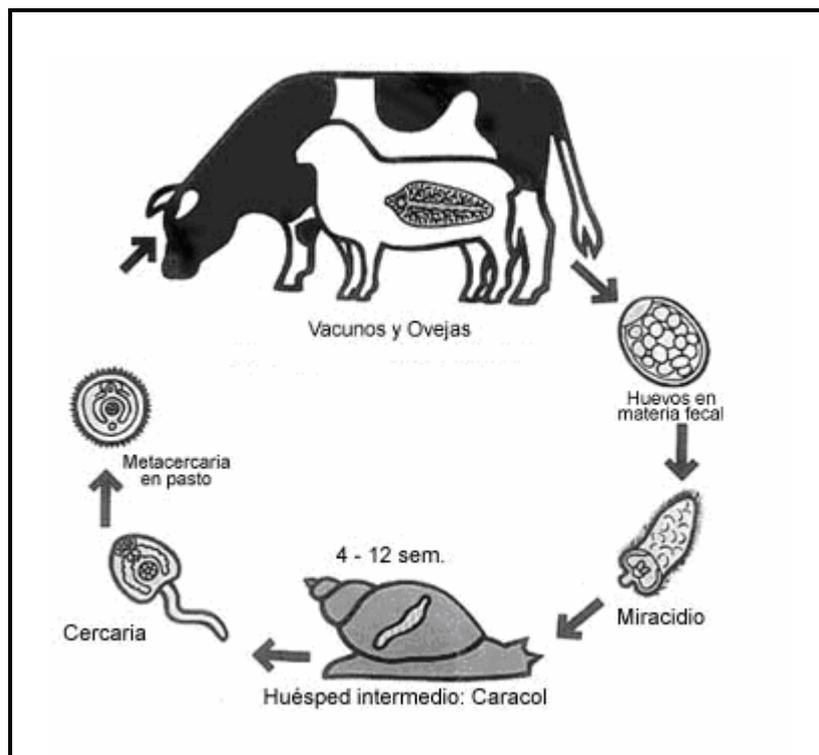


Figura 5. Ciclo de vida de *Paramphistomum ssp.*

Actualmente sólo hay un fármaco para el tratamiento de esta parasitosis, el triclabendazol, que elimina las fases inmaduras tanto de *Paramphistomum*, así como de *Fasciola hepatica*. Además de éste, los dos fármacos más frecuentemente utilizados son rafoxanida y nitroxinil y algunos otros como closantel y niclosamida también están comercializados en algunos países; el albendazol también es eficaz a dosis elevadas.²⁴

Con el interés de contar con un nuevo agente parafistomicida se sintetizó como parte de este trabajo al compuesto **Alfa-carbamato (7)**. La evaluación de la actividad del compuesto en ovinos demostró una eficacia del 86.7% a una dosis de 12 mg/Kg.²⁴ Este compuesto guarda relación con el compuesto fasciolicida denominado Alfa (ver pagina 22) y conserva la alta polaridad del albendazol (**Figura 6**). Los resultados de este estudio se muestran en la **Tabla 1**. Para más detalle de este estudio revisar artículo en el apéndice III.

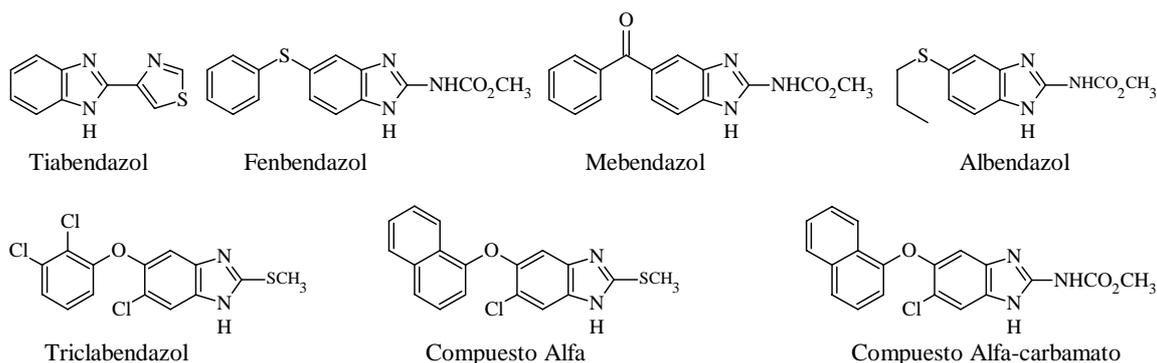


Figura 6. Estructura de algunos agentes antihelmínticos

Tabla 1: Eficacia del compuesto Alfa-Carbamato contra *P. spp* en ovinos.

Grupo	Ovino No.	Peso (kg)	Dosis mg/Kg	No de paramfistomidos recuperados	Promedio (+/- DE)	% Eficacia
1	2067	41	12	4	4 (+/-2.9)	86.7
	s/n	41		8		
	2415	44		1		
	s/n	42		3		
2	1906	39	18	0	0.75 (+/-0.95)	97.5
	1860	43		2		
	879	38		1		
	1118	42		0		
3	2296	44	24	0	0 (+/- 0)	100
	2096	42		0		
	1058	42		0		
	1921	39		0		
4	2412	41	Testigo	21	30.2 (+/-6.65)	-----
	2346	42		36		
	1893	43		34		
	1821	43		30		

2.4. Tratamientos Antiparasitarios

El control de las helmintosis en países desarrollados se ha alcanzado a través de una gran variedad de métodos, los cuales incluyen quimioterapia, mejoras en educación, sanidad e higiene.²⁵ 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.²⁶

Se cuenta con antiparasitarios lumbales y tisulares, los cuales tienen actividad contra las diferentes especies de protozoarios intestinales patógenos y no patógenos para el hombre. Dentro de los antiparasitarios lumbales eficientes en el tratamiento de la amibiosis 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 amibiosis. Otros antiamibianos, 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 6**), 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.²⁷

En estudios *in vitro*, el albendazol mostró mayor potencia giardicida que el metronidazol.^{27,28} 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*, *Hymenolepis nana*, *G. intestinalis*, *E. histolytica*, entre otros. (**Figura 7**).³

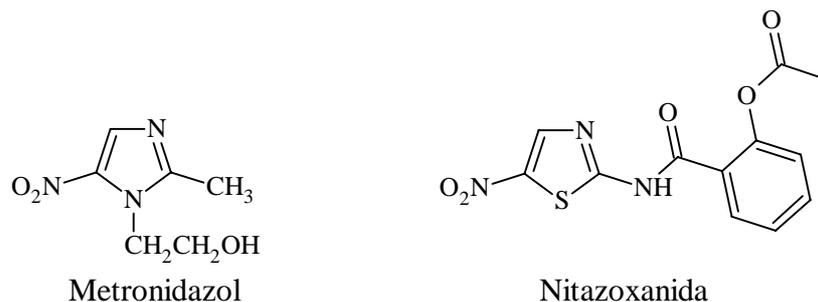


Figura 7. Fármacos antiprotozoarios

2.5. Los bencimidazoles

El descubrimiento de los derivados del bencimidazol como fármacos de amplio espectro y como moléculas potencialmente activas con propiedades antiparasitarias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antihelmínticas, entre otras, los sitúan como derivados de un heterociclo versátil.²⁹⁻³¹ 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 se puede desplazar 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.³² 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 aisladas y caracterizadas (**Figura 8**).³²

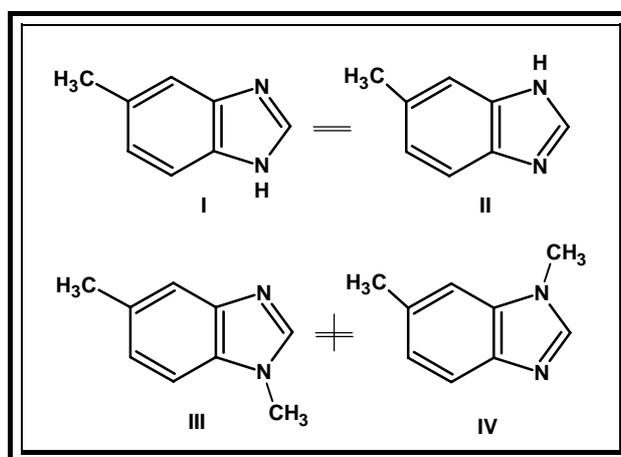
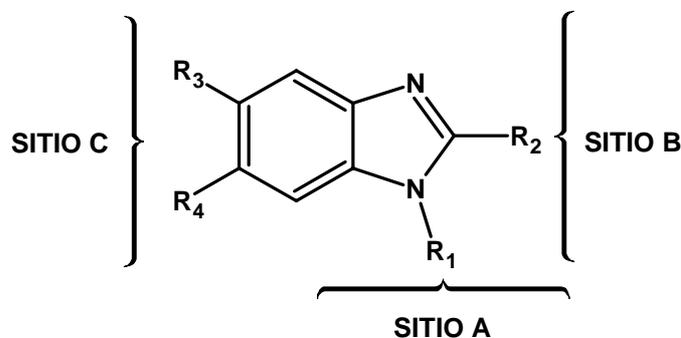


Figura 8. Tautomerismo e isomerismo en los bencimidazoles.²⁸

El descubrimiento en 1961 del 2-(1,3-tiazol-4-il)-1*H*-benzimidazol (tiabendazol, **Figura 6**), 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-hidroxtiabendazol, el cual se elimina rápidamente, reduciendo así la efectividad del fármaco.³² Posteriormente, apareció una nueva generación de bencimidazoles 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 limita su acción a nivel sistémico.³² Sin embargo, el reciente desarrollo de resistencia de nematodos que ocurre con los fármacos disponibles por ciertos parásitos ha permitido el desarrollo de nuevos tipos de bencimidazoles carbamatos.³³

2.6. Relación Estructura-Actividad (SAR, por sus iniciales in inglés) biológica de los bencimidazoles



Los estudios SAR de un gran número de compuestos bencimidazólicos han permitido establecer los siguientes datos en base a la estructura anterior:

Sitio A

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, se han sintetizado 1-alkil, 1-aril, 1-arilalkil y 1-acilbencimidazoles y se ha evaluado la actividad antihelmíntica.²⁶ Los resultados 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 juega un papel muy importante en el perfil antiparasitario de la molécula resultante, se ha realizado una gran variedad de modificaciones estructurales en esta posición.^{26,34} Para una buena actividad antihelmíntica el mejor grupo es el carbamato de metilo, aunado al hidrógeno en posición 1

Sitio C

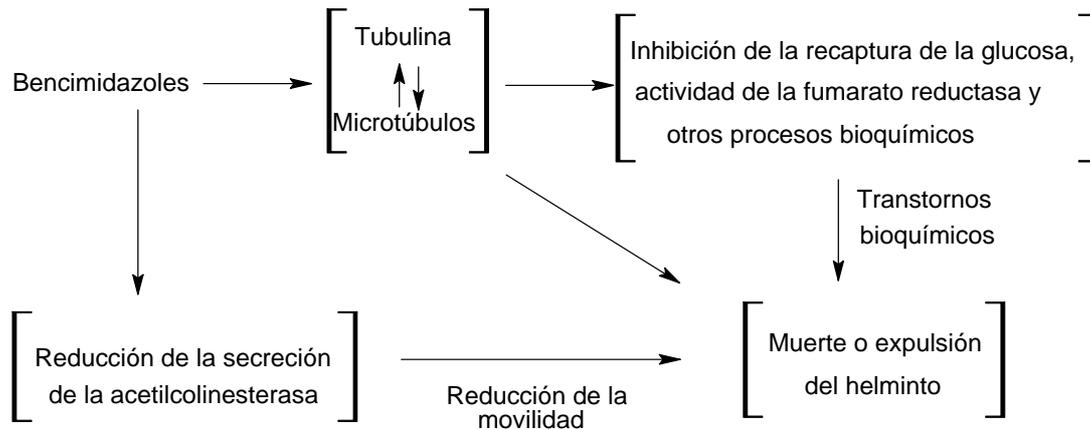
La presencia de un grupo farmacofórico en las posiciones 5(6) de los bencimidazoles 2-sustituidos es un factor importante para determinar el perfil biológico de estos compuestos. La introducción de varios sustituyentes en la posición 5 no necesariamente aumenta la potencia. R₃ previene la inactivación metabólica, como la hidroxilación. Clorados en R₄ presentan buena actividad.^{26,34-36} Sin embargo, poco se sabe sobre los estudios SAR para los derivados del bencimidazol como agentes antiprotozoarios.

2.7. 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.²⁶

2.7.1. 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 1**).^{26,36}



Esquema 1. Mecanismos de acción de los bencimidazoles.²⁶

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.²⁶

2.7.2. 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.^{26,36}

2.7.3. 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.³⁶ 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.^{37,38}

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.³⁸ El mecanismo 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 da como resultado un tapón en el extremo donde se lleva a cabo la asociación de microtúbulos, perdiéndose la capacidad de alargamiento de los mismos.³⁹ 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.³⁷ (**Figura 9**)

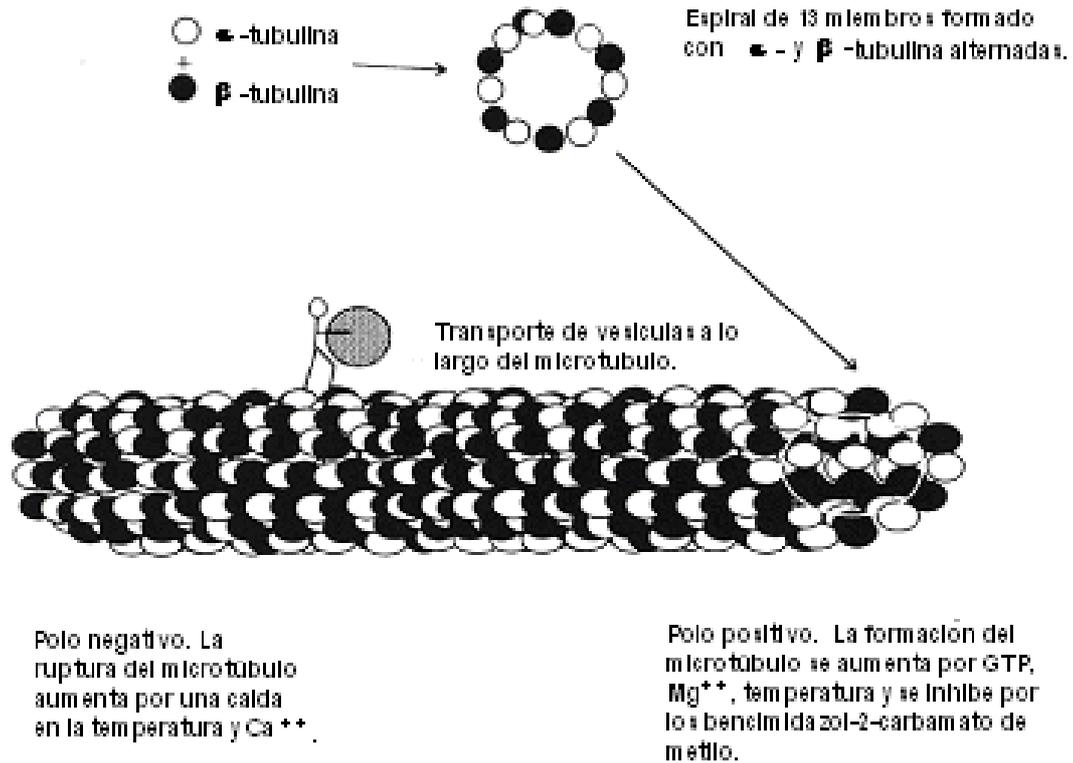


Figura 9: Formación del microtúbulo y su inhibición por los bencimidazol 2-carbamato de metilo.⁴⁰

Los bencimidazoles tienen una acción selectiva sobre las células 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.³⁷

2.8. El compuesto alfa como agente faciolicida

El triclabendazol se ha venido usando desde 1978 para combatir la faciiosis,⁴¹ parasitosis causada por el trematodo *Faciola hepatica*,⁴² la cual genera pérdidas económicas importantes en el sector veterinario, estas pérdidas se manifiestan como disminuciones en la producción de carne, leche y lana.⁴³

El uso desmedido del triclabendazol en el tratamiento de la faciiosis ha tenido como consecuencia inevitable la aparición de cepas resistentes en varias partes del mundo.⁴⁴

Aunque en algunos países no se ha convertido en un gran problema, la preocupación es grande, ya que no se cuenta con otro fasciolicida con la eficacia del triclabendazol para uso veterinario.

Considerando la necesidad de contar con nuevas estructuras fasciolicidas, estudios realizados por nuestro grupo de investigación, en conjunto con el departamento parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, dio como resultado el diseño, la síntesis y evaluación fasciolicida del compuesto llamado Alfa, cuyo nombre químico es 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol.²⁴ Sobre las relaciones estructura-actividad de los compuestos antiparasitarios, determinados por nuestro laboratorio, se ha determinado la importancia de un sustituyente metiltio en posición 2 del anillo bencimidazólico para que la molécula tenga actividad fasciolicida, los sustituyentes en las posiciones 5 y 6 son importantes pero no esenciales, por lo que se puede modificar estas posiciones por grupos con un comportamiento electrónico similar.^{43,45}

El diseño del compuesto Alfa se basó en el enfoque de isosterismo observado en la creación del pronetalol a partir del dicloroisoproterenol (**Figura 10**). La sustitución del diclorofenilo por un 2-naftilo en el dicloroisoproterenol, un bloqueador adrenérgico parcial, llevó al pronetalol, un mejor bloqueador adrenergico, lo cual puso de manifiesto que estos grupos son isostéricos y el cambio generó un bioisótero.⁴⁶

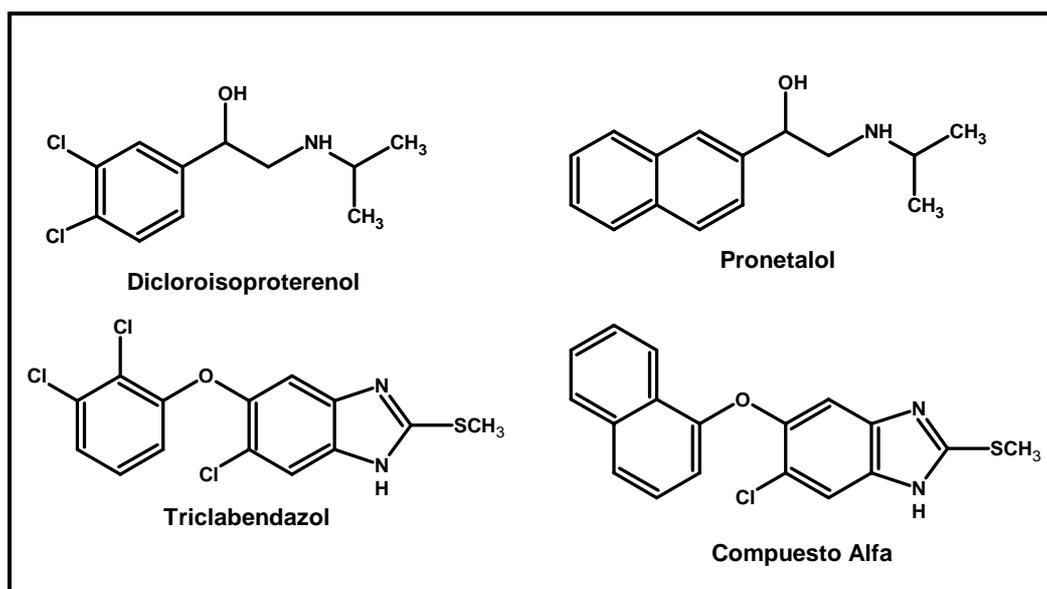


Figura 10. Reemplazo isostérico que llevó al compuesto Alfa.

La actividad fasciolicida obtenida de los ensayos in vitro sobre metacercarias de *F. hepatica* mostraron que el compuesto Alfa es activo a concentraciones de 10 µg/mL y en las pruebas in vivo en ovinos y bovinos los resultados mostraron que el compuesto tiene una eficacia del 86.90 % a una dosis de 15 mg/Kg contra parásitos de 10 semanas, y presenta una eficacia del 100 % a la misma dosis en suspensión oral.^{46,47} Estudios posteriores de microscopia electrónica mostraron el daño en la estructura de *F. hepatica* causado por el compuesto Alfa.⁴⁸

2.9. Los profármacos como método de optimización de fármacos

El término profármaco se refiere a un compuesto que es farmacológicamente inactivo, pero que es convertido al fármaco mediante una biotransformación.⁴⁹ Un profármaco también puede ser activado por un proceso no enzimático como es el caso de la hidrólisis; sin embargo, en estos casos los compuestos generalmente presentan problemas de estabilidad.⁵⁰ Algunas de las razones por las cuales se aborda la estrategia de los profármacos en el diseño de fármacos son las siguientes:⁵⁰

- ◆ Solubilidad
- ◆ Absorción y distribución
- ◆ Especificidad en el blanco
- ◆ Inestabilidad
- ◆ Liberación prolongada
- ◆ Toxicidad
- ◆ Poca aceptación por el paciente
- ◆ Problemas de formulación

2.9.1. Tipos de profármacos

Existen muchas clasificaciones para los profármacos,⁵¹ pero en general suelen clasificarse en: Profármacos con un grupo transportador y Bioprecursores.^{49,50} Profármacos unidos a un acarreador: Son compuestos que contienen el fármaco activo unido a un grupo acarreador el cual puede ser removido enzimáticamente, ejemplo de este tipo es un éster que es convertido al fármaco que contiene un ácido carboxílico mediante hidrólisis.⁵⁰ Dentro de esta clasificación encontramos:

- Profármacos bipartitas: obtenidos de la unión entre un fármaco y un acarreador.
- Profármacos tripartitas: obtenidos de la unión de un fármaco, el acarreador y de un acoplador que los mantenga unidos. “Fármaco-Acoplador-Acarreador”
- Profármacos mutuos: consiste en la unión de dos fármacos, generalmente sinérgicos entre sí.

Bioprecursores: son profármacos que al ser metabolizados generan al principio activo, o puede seguirse metabolizando para generar el fármaco activo. Por ejemplo, un fármaco que contiene un ácido carboxílico puede tener como bioprecursor una amina primaria, que al ser metabolizada por oxidación genere al aldehído, el cual posteriormente vuelve a ser metabolizado para formar el fármaco con el grupo ácido.⁵⁰ En el diseño de bioprecursores se debe de tomar en cuenta las reacciones de Fase I del metabolismo.⁵² En la **Tabla 2** se muestran las diferencias entre profármaco con un grupo acarreador y bioprecursores.⁵²

Tabla 2: Diferencias entre profármaco con un grupo acarreador y bioprecusores

Profármacos		
Característica	Profármacos unidos a un acarreador	Bioprecusores
Constitución	principio activo + grupo acarreador	sin grupo acarreador
Lipofilia	Fuertemente modificada	Ligeramente modificada
Bioactivación	Hidrolítica	Oxidativa o reductiva
Catálisis	Química o enzimática	Solo enzimática

2.9.2. Profármacos de bencimidazoles

Debido a los problemas de solubilidad que caracterizan a los derivados del bencimidazol, se han sintetizado profármacos para solucionar este inconveniente y dichos profármacos son llamados pro-bencimidazoles ^{26,53} En la **Figura 11** se muestran algunos ejemplos de pro-bencimidazoles. ^{32,45,54}

Un ejemplo de pro-bencimidazoles es el netobimin, el cual sufre una serie de reacciones complejas incluyendo la reducción del grupo nitro y posterior ciclación para formar el albendazol. Cinco metabolitos del netobimin fueron identificados en orina, plasma y en muestras de hígado de animales de laboratorio en ovejas y ratas. Todos fueron identificados como productos del metabolismo del albendazol; tales como: el sulfóxido, la sulfona, el 2-aminosulfóxido y la 2-aminosulfona. Otro ejemplo es el benomil, el cual se diseñó como profármaco del carbendazim. El principal metabolito fue el 5-hidroxibencimidazol-2-il carbamato de metilo y los metabolitos de las reacciones de conjugación.⁵⁴ Otros bioprecusores bencimidazol 2-carbamato de metilo son el promebendazol, el tiofanato y el febantel, en donde la posición 2 del anillo bencimidazólico se genera mediante una ciclación intramolecular.

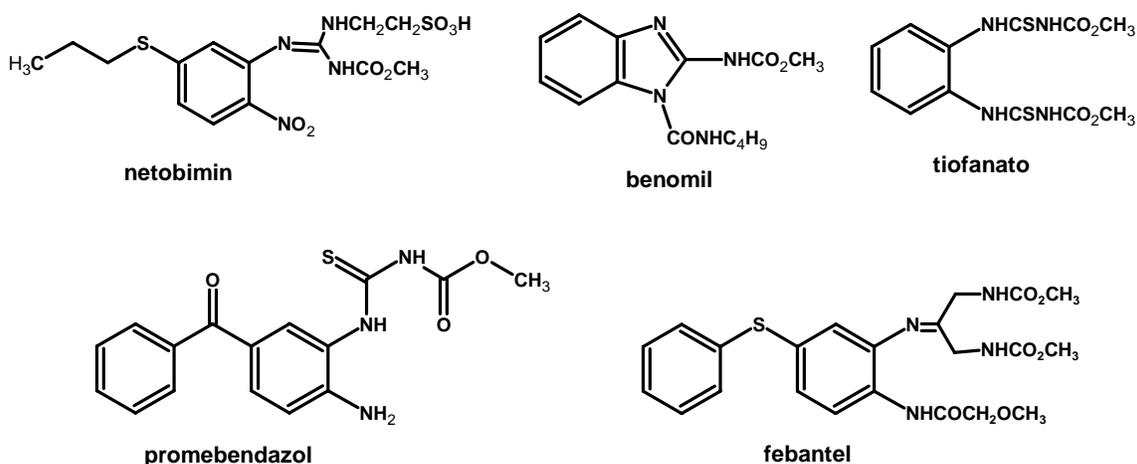


Figura 11: Ejemplos de pro-benzimidazoles

2.10. Importancia del Citocromo P-450 en el metabolismo de xenobióticos

Un gran número de sustancias extrañas a nuestro organismo (xenobióticos) penetran por vía oral, piel, sangre o pulmones y pueden ocasionar trastornos a corto o largo plazo, lo que se evita gracias a que poseemos sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación.⁵⁵ La biotransformación de los xenobióticos se realiza principalmente en dos fases⁵⁶: Las de Fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P-450 encontradas principalmente en el hígado, y las de Fase II.⁵⁶ encontradas en los microsomas, la mitocondria y el citosol.

La expresión del citocromo P-450 esta regulada por factores genéticos (polimorfismo), fisiopatológicos (enfermedades, regulación hormonal) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición) que condicionan que los niveles hepáticos de las enzimas P-450 varíen extraordinariamente entre diferentes individuos.⁵⁷

El sistema P-450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar. Salvo contadas excepciones, el P-450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. Se trata de reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua.⁵⁸ ver **Figura 12**.

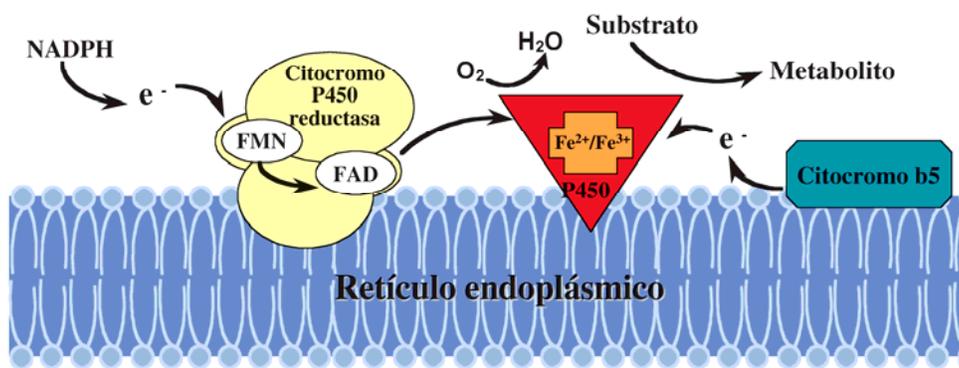


Figura 12: Reacción catalizada por el CYP

2.10.1. Reacciones y Regulación enzimática del CYP

Entre las oxidaciones catalizadas por el P-450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, *N*- y *S*-oxidaciones, epoxidaciones, *O*-, *N*- y *S*-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones.⁵⁸ Otra de las características más significativas del P-450 es su inducibilidad por los propios xenobióticos. Las primeras alusiones en este sentido se remontan a los años 50-60, al observarse que pacientes que eran tratados con ciertos fármacos desarrollaban una tolerancia al mismo de manera que eran necesarias dosis crecientes para producir el mismo efecto. Este hecho fue constatado en estudios con animales de experimentación y se comprobó la existencia de tipos o grupos de inductores que actuaban de forma selectiva sobre diferentes enzimas P-450.⁵⁹

Frecuentes administraciones de una sustancia farmacológicamente activa puede tener serias consecuencias en la inducción o inhibición de las enzimas de biotransformación.⁶⁰ La inducción provoca un incremento en la actividad de las enzimas de biotransformación debido a los xenobióticos; este incremento en la actividad es consecuencia de un incremento en la expresión del respectivo gen y/o una disminución en la degradación de la proteína. La inhibición disminuye la actividad de las enzimas de biotransformación debido a los xenobióticos, puede ser causado por interacción con el xenobiótico. La mayor parte de los inhibidores son poco específicos al ser capaces de actuar sobre enzimas. Los más útiles son los que se utilizan para inhibir un único enzima,⁶⁰ por unión al centro catalítico (inhibición competitiva), o bien por una unión irreversible del xenobiótico a la enzima bloqueando su actividad (sustratos suicidas). Ver **Tabla 3**^{56,61-63}

Tabla 3: Ejemplos de algunos sustratos inhibidores e inductores del CYP

Enzima	Sustrato	Inductor	Inhibidor
1A2	Cafeína, Acetanilida Fenacetina, Warfarina, Imipramina, Lanzoprazol, etc.	3-Metilcolantreno, Omeprazol, Humo de cigarro, hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fenobarbital.	Fluvoxamina, 7,8- Benzoflavona.
2B6	7-Benciloxi-resorufina, Benzfetamina, ciclofosfamida, etc.	Fenitoína, Rifampicina, Fenobarbital.	Metoxiclor, 9- Etinilfenatreno.
2E1	Alcanos halogenados, Alcoholes, Anilina, Benceno, Cafeína, Teofilina, Paracetamol, etc.	Etanol, Isoniacida.	DMSO, Disulfiram.
3A4	Ácido retinoico, Aminopirina, Carbamazepina, Lanzoprazol, Lidocaína, Losartran, Omeprazol.	Carbamacepina, Rifabutina, Fenobarbital.	Clotrimazol, Kertokonazol, Ritanovir.

2.10.2. Regulación enzimática por bencimidazoles antihelmínticos

Los compuestos bencimidazólicos antihelmínticos se utilizan en el sector veterinario alrededor del mundo. Para uso en humanos se emplean el mebendazol y el albendazol.⁶⁰ El albendazol es el más representativo de este grupo, su biotransformación ha sido ampliamente estudiada en diferentes especies, incluyendo rata, ratón, conejo, gallinas, ovejas, perro y en el humano. Es conocido que los compuestos antihelmínticos que presentan un azufre sufren dos pasos de oxidación; en el albendazol primero se forma el sulfóxido de albendazol, seguido por la sulfona de albendazol. El sistema flavin monooxigenasas y el CYP3A participan predominantemente en el primer paso del metabolismo, sin embargo la formación de la sulfona es principalmente catalizado por la subfamilia CYP1A.⁶⁰

Las primeras evidencias de la inducción del albendazol fue publicado en los 80's, cuando algunos estudios mostraron el incremento de la actividad catalítica así como del contenido proteico del CYP1A en ratas,⁶⁴ en microsomas humanos y en el cultivo celular HepG2.⁶⁵ Los estudios de inducción del albendazol y de sus dos metabolitos en rata mostraron que el albendazol y el sulfóxido, pero no la sulfona, pueden causar inducción del CYP1A1.⁶⁶ Una comparación en la intensidad de la biotransformación del albendazol en varias especies de animales, incluido el hombre, mostraron una diferencia sustancial en la cantidad formada del sulfóxido de albendazol.^{67, 68}

La proporción enantiomérica en plasma de (+)-sulfóxido de albendazol y (-)-sulfóxido de albendazol es especie-específico y varía después de las dosis repetidas.⁶⁰ Se reportó que las FMO y el CYPs muestran diferente estereoespecificidad; el CYP, pero no las FMO, podría inducirse por el albendazol y podría ser responsable de los cambios en la proporción quiral. De estas observaciones también puede esperarse las diferencias en los efectos de la inducción de albendazol en las enzimas CYP1A. Además de esta subfamilia, el albendazol induce ligeramente el citocromo de la rata CYP2A6, CYP2E1, CYP2B1 y CYP2B2, y en una magnitud menor el CYP3A4.^{64,66}

El fenbendazol es otro fármaco con un átomo de azufre, y guarda analogía con el albendazol respecto al metabolismo, ya que primero se metaboliza al sulfóxido (oxfendazol) y subsecuentemente a la sulfona en ratas, conejos, ratones,...etc, y se ha demostrado un metabolismo similar en microsomas intestinales de rata. Cuando se inhibió la actividad del CYP se redujo el metabolismo oxidativo del fenbendazol en microsomas hepáticos de ovinos y se potenció la actividad antihelmíntica.⁶⁹ El efecto inductor del fenbendazol y de su principal metabolito, oxfendazol, en el CYP1A1/2 fue reportado en conejos.⁶⁰

El tiabendazol y mebendazol también se han descrito como inductores del CYP1A en estudios con diferentes especies de animales y el flubendazol se ha reportado como un inhibidor de las enzimas de oxidación en estudios in vivo en ratas. (**Tabla 4**) A cerca del triclabendazol muy pocos estudios se han realizado en este sentido.⁶⁰

Tabla 4: Inducción del CYP1A por algunos bencimidazoles^a

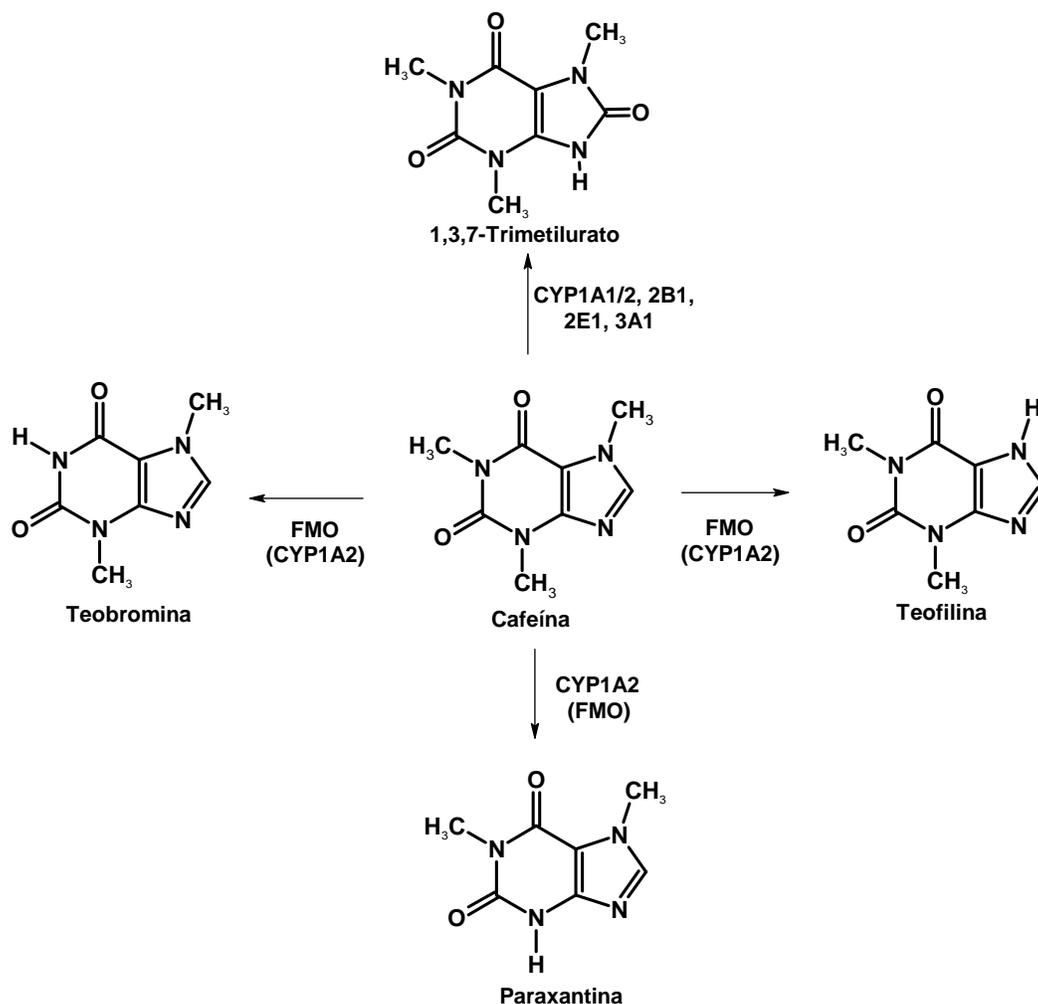
Derivado	Inducción del CYP1A						
	in vivo			in vitro			
	Rata	Humano	Conejo	Hepatocitos			
				Rata	Conejo	Humano	Perro
Carbendazim					+		
Albendazol	+			+			
Oxfendazol			+	0	+		
Mebendazol				+			
Tiabendazol			+	+	+		
Cambendazol				+	+		
Omeprezol	+	+	+	+/-	+	+	+

^aTomado y modificado de ⁶⁰

2.11. Metabolismo de la cafeína

El citocromo P-450 1A contiene dos enzimas, el CYP1A1 y CYP1A2, las cuales catalizan la activación de procarcinógenos. Sin embargo, el CYP1A2 cataliza el metabolismo de ciertos fármacos, como por ejemplo *N*-desmetilación de antidepresivos tricíclicos y de derivados de xantina.⁷⁰

La cafeína, 1,3,7-trimetilxantina, es uno de los xenobióticos más consumidos alrededor del mundo. El metabolismo hepático es predominante en la eliminación de la cafeína y menos del 5% del xenobiótico es eliminado sin modificación en la orina.⁷¹ La cafeína es oxidada por las enzimas microsomales hepáticas en las posiciones 1, 3 y 7 mediante una *N*-desmetilación para generar teobromina, paraxantina y teofilina, respectivamente. Se ha demostrado que la desmetilación oxidación de cafeína a teobromina y teofilina es catalizada en un inicio por el sistema flavin monooxigenasas (FMO).^{72, 73} Las isoenzimas P450 que participan en el metabolismo completo de la cafeína en humanos y animales de laboratorio es el CYP1A2 y, cuando hay concentraciones altas de cafeína, también participa el CYP2E1 y posiblemente otras isoformas. Cabe resaltar que las tres rutas de *N*-desmetilación de la cafeína para generar los metabolitos teofilina, teobromina y paraxantina es la misma en ratón, conejo y rata.^{70, 71, 74} **Esquema 2.**



Esquema 2: Rutas metabólicas de la cafeína catalizada por microsomas de hígado de rata indicando las enzimas responsables de cada metabolito.

Existen otros ejemplos de *N*-desmetilación sobre diferentes sustratos con estructuras diferentes que cataliza el organismo por diferentes enzimas. La meperidina, un opioide analgésico es metabolizado por el hígado a normeperidina, un potente estimulante del sistema nerviosos central. Los estudios in vitro muestran que los CYP's que participan en esta biotransformación son los CYP's 2B6, 3A4 y el 2C19,⁷⁵ otro ejemplo es la metanfetamina, la cual genera anfetamina mediante una reacción catalizada por el CYP y las FOM.⁷⁶ Como ejemplos adicionales, podemos mencionar el propranolol, la nicotina y

el antidepresivo tricíclico, imipramina, la cual genera desipramina, la cual también presenta las mismas propiedades farmacológicas que su predecesor.⁵⁰

2.12. Métodos de evaluación del citocromo P-450

Existen diversas formas de estudiar el metabolismo de xenobióticos, entre los que podemos mencionar:

- Ensayos clínicos
- Estudios in vivo
- Estudios in vitro⁷⁷
- Simulación por computadora.⁷⁸⁻⁷⁹

Sin embargo, han surgido evidencias de la existencia de notables diferencias cuantitativas y cualitativas en el metabolismo de fármaco en el hombre y en otras especies. Estas diferencias son debidas a que cada especie presenta su propio patrón de enzimas de biotransformación.⁸⁰ En el caso del P-450, no sólo la distribución de isoenzimas es diferente, sino que, además, existen P-450s que son propios de una especie en particular, e incluso formas homólogas pertenecientes a diferentes especies que presentan distinta actividad catalítica.⁸¹ De hecho, las diferencias metabólicas entre el ser humano y la especie animal escogida para realizar los ensayos preclínicos son algunas de las causas más frecuentes del fracaso de nuevos fármacos.⁸² Habida cuenta de estas diferencias interespecies, y dado que el objetivo básico es el diseño de agentes terapéuticos seguros para su aplicación clínica, los estudios de metabolismo de fármacos deberían realizarse en la especie humana. Por razones obvias no es posible realizarlos con seres humanos, por lo que la disponibilidad de un modelo experimental alternativo resulta esencial. A continuación mencionaremos brevemente las características del modelo in vivo.

2.12.1 Estudios in vivo

Para la evaluación de un compuesto in vivo se han utilizado animales de diferentes especies: el ratón, la rata, el cobayo, el conejo, el perro y el mono, entre otros.⁸³ Aunque ha sido cuestionada las pruebas en animales para predecir la eficacia y la seguridad de los fármacos, el uso de los estudios en animales pueden ser extrapolada a los humanos con la aplicación de los apropiados principios farmacocinéticos.⁸⁴ Actualmente la forma más común de analizar muestras es mediante el uso del acoplamiento HPLC-MS.

2.13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución, comúnmente llamada HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography), es el tipo de cromatografía de elusión más versátil y ampliamente utilizado, ya que es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla, basándose en diferentes tipos de interacciones entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica, así mismo ayuda a la identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes.⁸⁵

2.13.1. Cromatografía de fase reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas con base en su polaridad.⁸⁵ La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ó C_8H_{17} .⁸⁵ Las columnas C-18 se pueden utilizar para las aplicaciones donde se requiere un máximo de retención.

2.13.2. Extracción en fase sólida

La Extracción en Fase Sólida (SEP) es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. Una columna SPE consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. Se utilizan las mismas interacciones muestra-fase que en HPLC, en las que el componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen.⁸⁶

Un método típico de SEP tanto para columnas **HyperSEP** o **MultiSEP** se organiza en cinco pasos. **Figura 13.**



Figura 13: Pasos para la activación del cartucho de EFS o SEP

1. Activación. El primer paso es la activación (A) en la que se utiliza un disolvente orgánico para "humidificar" la fase. Con fases hidrofóbicas (p. ej. C18) se usa un disolvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares (p. ej. Sílice) se usa un disolvente no polar, como el cloruro de metileno.

2. Acondicionamiento. La fase estacionaria SEP se acondiciona (K) con el mismo disolvente de la matriz, por ejemplo, con matrices acuosas el disolvente es agua. El acondicionamiento permite "alinear" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier disolvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

3. Retención. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SEP. Para maximizar las interacciones la muestra (A=analitos + M=matriz) deben cargarse en el adsorbente de SPE a aproximadamente 3 mL/min. Este flujo puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de SEP mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.

Durante las etapas 1-3, el adsorbente SEP ha de mantenerse húmedo siempre, puesto que el secado del mismo puede acarrear una pérdida de muestra.

4. Eliminar interferencias. Usando un disolvente o una serie de disolventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de SEP hasta que solo los analitos de interés queden atrapados.

Por ejemplo, al retener compuestos hidrofóbicos en C18 la contaminación puede eliminarse con un lavado de agua:metanol 50:50, puesto que los compuestos de interés no se eluyen del adsorbente de SEP hasta que no se use un mayor porcentaje de disolvente orgánico. Con un lavado adecuado (M) las impurezas se eliminan con un adecuado eluyente de lavado (W). El adsorbente de SEP se deja secar generalmente con nitrógeno. El secado es esencial si el eluyente de lavado no es miscible con el disolvente de elución final.

5. Elución. La elución de los analitos (A) se efectúa mediante un eluyente adecuado (E) y a un flujo de 1 mL/min. El adsorbente de SEP y la interacción analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, los derivados bencimidazólicos 2-carbamato de metilo son los compuestos más utilizados en la terapia contra las parasitosis causadas por helmintos; sin embargo, por la pobre biodisponibilidad que presentan, solo son usados en parasitosis del tracto gastrointestinal tanto en el sector humano como en el veterinario, dejando a un lado el tratamiento de las parasitosis sistémicas que también son de relevancia clínica.

Con el interés de contar con nuevos antiparasitarios se sintetizó el compuesto **Alfa-carbamato**, determinado su actividad paramfitomicida en ovinos. Sin embargo como era de esperarse, este compuesto presentó baja solubilidad acuosa. El compuesto **Alfa-carbamato** tiene potencial como agente antiparasitario por lo que resulta de interés mejorar su solubilidad mediante el diseño y síntesis de un profarmaco que libere al compuesto activo y con esto incrementar su absorción y biodisponibilidad.

Considerando lo anterior en este trabajo se propone el diseño y síntesis de un profarmaco del compuesto **Alfa-carbamato** que mediante una reacción de *N*-desmetilación oxidativa, catalizada por el citocromo P450, genere al compuesto activo y que pueda ser utilizado en infecciones sistémicas.

Con base en los establecimientos anteriores, se pueden plantear las siguientes preguntas:

- ◆ ¿Existe la posibilidad de que se presente una reacción de *N*-desmetilación en el huésped para generar al compuesto activo **Alfa-Carbamato**?
- ◆ ¿La introducción de un grupo metilo en posición 1 modificará la actividad en relación al compuesto original?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta de que las parasitosis también incluyen las protozoosis y debido a que no se cuenta con la información de la actividad de estos dos compuestos propuestos se realizarán los ensayos de actividad sobre tres protozoarios in vitro para determinar la actividad intrínseca de cada compuesto sintetizado de tal forma que la investigación que se realice en este campo contribuya a la obtención de información básica sobre los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antiprotozoaria.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

- ◆ El compuesto 1-metilado, sintetizado en el presente estudio se biotransformará al compuesto activo **Alfa-carbamato**, mediante una reacción de *N*-desmetilación catalizada por el citocromo P450.
- ◆ El profarmaco del compuesto **Alfa-carbamato** presentara mayor actividad en el modelo de triquinelosis murino.

4.2. Objetivo General

- ◆ Síntesis y evaluación antiparasitaria del compuesto **Alfa-carbamato** y de un profarmaco monometilado y analisis de la biotransformación in vivo del profarmaco.

4.3. Objetivos Particulares

- ◆ Realizar la síntesis de los siguientes compuestos: [5(6)-Cloro-5(6)-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo, (**Alfa-Carbamato**), [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo, (**HSK**).
- ◆ 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).
- ◆ Evaluación dela actividad antiprotozoaria in vitro de los compuestos **Alfa-carbamato** y de su profarmaco monometilado **HSK** en *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

- ◆ Debido a que el ciclo de vida de *T. spiralis* comprende la fase intestinal y la fase sistémica, en este estudio se evaluará en un modelo de triquinosis murina la actividad de los compuestos **Alfa-carbamato** y **HSK**.
- ◆ Determinar las proporciones de la fase móvil para una mejor resolución de nuestros compuestos, así como el tiempo de retención de cada uno de ellos mediante el uso del HPLC.
- ◆ Realizar los ensayos de biotransformación in vivo, para su posterior análisis mediante el HPLC.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo realizado en esta tesis se presenta en tres partes. La primera, la parte química, comprende la descripción de los métodos de síntesis que se emplearon para preparar el compuesto **Alfa carbamato (7)** y su derivado metilado **HSK (12)**. La segunda, la parte biológica, incluye las pruebas de actividad antiprotozoaria y antihelmíntica a que fueron sometidos los compuestos finales. Finalmente, en la tercera parte, la parte analítica, incluye los estudios de biotransformación realizados así como la preparación de los estándares.

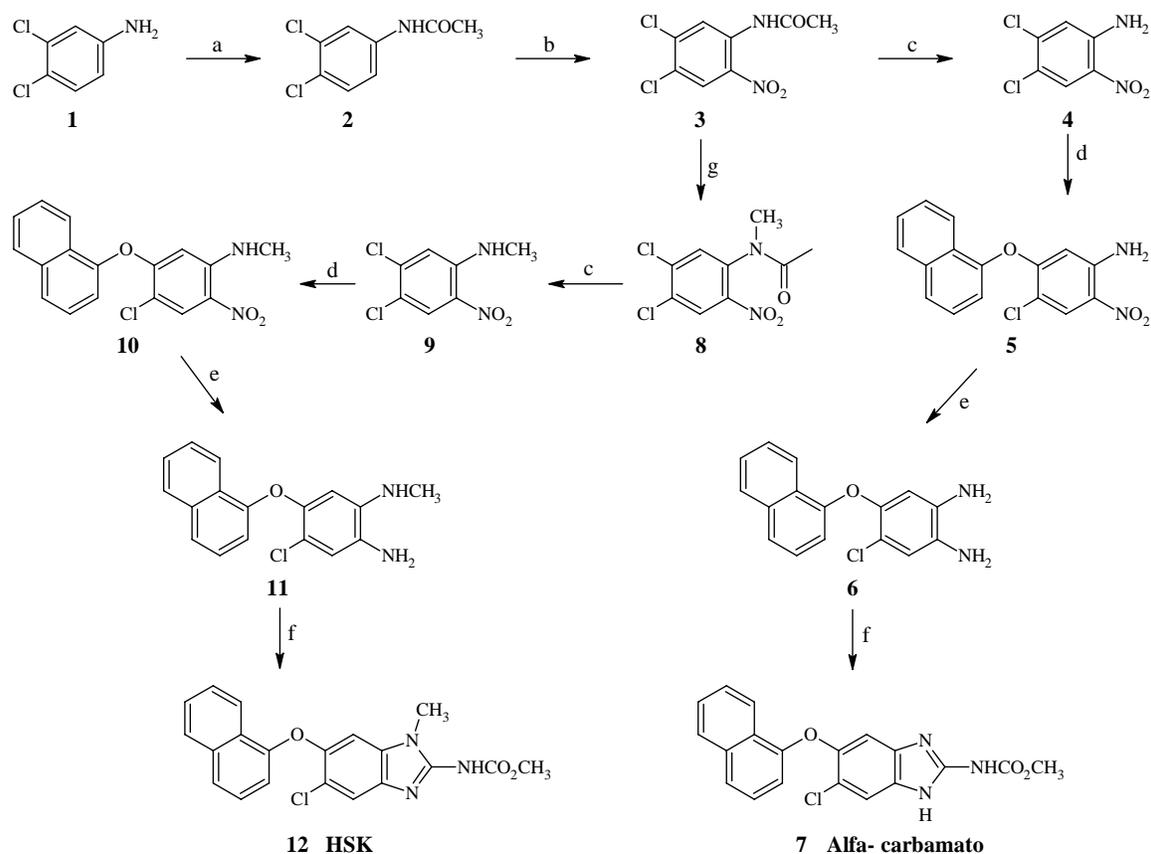
5.1. Parte Química

Para la síntesis de los compuestos **7** y su derivado metilado **12** se hicieron las reacciones que se muestran en el Esquema 1. Se partió de la 3,4-dicloroanilina comercial (**1**), la cual se trató con anhídrido acético y dio la 3,4-dicloroacetanilida (**2**). La nitración en frío de **2** con mezcla sulfonítrica llevó al intermediario 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**), el cual, por hidrólisis con H₂SO₄ conc., proporcionó la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**), que se trató con 1-naftóxido de potasio en DMF con calentamiento y dio el éter funcionalizado 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**5**). Éste se redujo en presencia de H₂ y Ni-Raney para dar la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (**6**). Por último, la ciclocondensación de **6** con dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea (**14**) en metanol a reflujo llevó al compuesto deseado **Alfa-carbamato (7)**.

Por otro lado, para la síntesis del derivado metilado **12** se utilizó el intermediario común 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**), que se *N*-metiló con sulfato de dimetilo en medio básico; el producto obtenido, la 4,5-dicloro-*N*-metil-2-nitroacetanilida (**8**) se sometió a las mismas reacciones descritas anteriormente, esto es, hidrólisis con H₂SO₄ en caliente para dar la 4,5-dicloro-*N*-metil-2-nitroanilina (**9**); tratamiento de **9** con 1-naftóxido de potasio

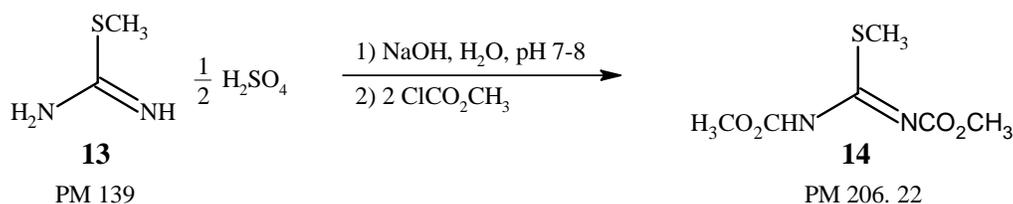
en DMF con calentamiento para dar el éter funcionalizado 4-cloro-*N*-metil-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**10**); hidrogenación catalítica con H₂ y Ni-Raney que llevó a la 4-cloro-*N*-metil-5-(1-naftiloxi)-1,2-feniléndiamina (**11**) y ciclación con dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea (**14**) en metanol a reflujo para dar el compuesto esperado **HSK** (**12**).

Para la preparación de la dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea (**14**) se trató el hemisulfato de *S*-metilisotiurea comercial (**13**) con dos equivalentes de cloroformiato de metilo, según las reacciones del **Esquema 2**.



(a) Ac₂O; (b) HNO₃, H₂SO₄; (c) H₂SO₄, 80-90 °C; (d) 1) 1-naftol, KOH, MeOH, 2) DMF, 100 °C, 2.5 h; (e) H₂, Ni Raney; (f) CH₃OCONHC(CSCH₃)NCO₂CH₃, MeOH, reflujo; (g) 1) (CH₃)₂SO₄, 2) NaOH, H₂O, 30-35 °C.

Esquema 1. Secuencia de reacciones empleadas para preparar el compuesto **Alfa-carbamato** (**7**) y su derivado *N*-metilado **HSK** (**12**).



Esquema 2 Reacción empleada para preparar el compuesto **14**.

5.2. Parte Biológica

La evaluación de la actividad antiparasitaria in vitro e in vivo de los compuestos **Alfa-carbamato** y de su derivado monometilado **HSK** se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

La determinación de la actividad antiprotozoaria in vitro del compuesto **Alfa-carbamato** (**7**) y de su derivado metilado **HSK** (**12**) contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se realizó mediante el método de subcultivo de acuerdo a los procedimientos reportados con anterioridad.⁸⁸⁻⁹⁰

Para evaluar la actividad in vivo de los compuestos contra la fase enteral y muscular de *T. spiralis*, se usaron ratones BALB/c de 4-6 semanas de edad y de 20-25 g de peso. Seis grupos de diez ratones se infectaron con 300 larvas musculares de *T. spiralis* por vía oral. Los compuestos **7** y **12** se administraron a una dosis equimolar de 75 mg/Kg de peso. Como control positivo se incluyó un grupo tratado con albendazol a la misma dosis equimolar. La reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto a un control de infección.

5.3. Parte analítica

(a) Primeramente se determinó el tiempo de retención de los compuestos **7** y **12** usando como fase móvil una mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40), un flujo de 0.6 mL/min y un tiempo de corrida de 15 min.

(b) Para los estudios de biotransformación se emplearon ratones BALB/c de cuatro a seis semanas de edad de 20 a 25 g y se les administró una dosis equimolar de ABZ a una dosis de 75 mg/Kg de peso. Estos estudios se realizaron a las 3 horas con una sola dosis y a los 7 días con dosis diarias.

(c) Pasado este tiempo se les extrajo el hígado y se realizó el estudio de biotransformación del compuesto **HSK** como se describe en la parte experimental.

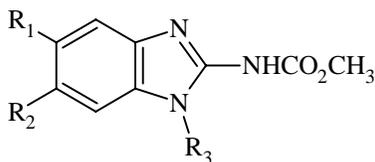
RESULTADOS Y DISCUSION

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resultados de la Parte Química

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos finales, así como de sus intermediarios **2-6** y **8-11** se muestran en las **Tablas 5** y **6**. Los datos espectroscópicos y espectrométricos de todos los compuestos de este estudio se muestran en la **Tabla 7**

Tabla 5. Rendimientos y constantes físicas de los compuestos finales

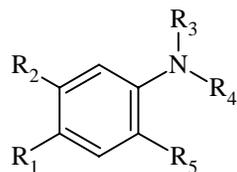


Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	Rend (%)	Pf (°C)/Disolv.	Rf Sistema
7	Cl	1-naftiloxi	H	80	183.3- 183.7/MeOH/DMF	0.73 (II)*
12	Cl	1-naftiloxi	CH ₃	60	156-158/MeOH	0.51 (II)*

*Ver pagina 71 para saber la composición y la proporción de los sistemas de elución

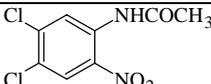
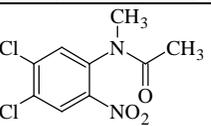
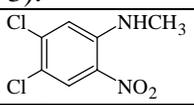
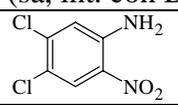
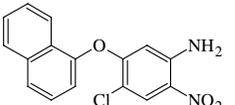
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

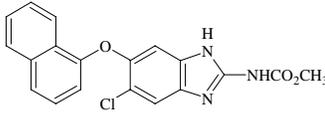
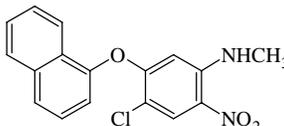
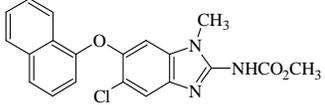
Tabla 6. Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios sintetizados



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Ren. (%)	Disol. de Crist.	Estado Físico	R _f (Sist)	pf (°C) exp	pf (°C) rep.	Ref
2	Cl	Cl	H	COCH ₃	H	100	EtOH	Crist. blancos.	0.31	122-123	120.5	95, 96
3	Cl	Cl	H	COCH ₃	NO ₂	98.3	MeOH/H ₂ O	Crist. amarillos	0.65 (I)	123-124	123-124	87
4	Cl	Cl	H	H	NO ₂	98	EtOH	Ajugas njas	0.61 (I)	176-177	176-177	43
5	Cl	1-naftiloxi	H	H	NO ₂	95	EtOH/Tol	Crist. ocre	0.75 (III)	136-138	136-138	43
6	Cl	1-naftiloxi	H	H	NH ₂	90	-----	Líqu. café oscuro	0.60 (II)	-----	-----	-----
8	Cl	Cl	CH ₃	COCH ₃	NO ₂	88.76	EtOH	Crist. amarillos	0.20 (I)	96.0-96.5	94-95	87
9	Cl	Cl	CH ₃	H	NO ₂	97.6	EtOH	Crist. naranjas	0.60 (I)	146.3-146.5	148	87
10	Cl	1-naftiloxi	CH ₃	H	NO ₂	83.5	MeOH	Crist. amarillos	0.38 (III)	171.1-171.7	-----	-----
11	Cl	1-naftiloxi	CH ₃	H	NH ₂	90	-----	Líqu. café oscuro	0.72 (II)	-----	-----	-----

Tabla 7. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

	4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida 3
<p>Espectro 1, IR cm^{-1}: 3214 (-CONH-), 3143 (C-H, aromático), 1678 (-CO), 1575 y 1374 (-NO₂), 1272 (-C-N), 1272, 1140, 886, 867, 646.</p> <p>Espectro 2, EM (FAB) m/z: 248 (M⁺, 15%), 250 (M⁺, 10%), 252 (M⁺, 3%), 206 (M⁺ - 42, 100%), 176 (M⁺ - 72, 20%), 160 (M⁺ - 88, 30%), 97 (M⁺ - 151, 30%).</p> <p>Espectro 3, RMN ¹H δ (ppm): 2.31 (s, 3H, -COCH₃), 8.34 (s, 1H, H-6), 9.10 (s, 1H, H-3), 10.32 (sa, 1H, int. con D₂O, NH).</p>	
	4,5-Dicloro-N-metil-2-nitroacetanilida 8
<p>Espectro 4, IR cm^{-1}: 3092 (C-H, aromático), 2928 (C-H, alifático), 1656 (-CO), 1527 y 1390 (-NO₂), 896, 866</p> <p>Espectro 5, EM (FAB) m/z: 263 (M⁺, 70%), 265 (M⁺, 70%), 221 (M⁺-42, 30%), 154 (M⁺- 109, 100%), 136 (M⁺- 127, 75%), 89 (M⁺- 174, 20%).</p> <p>Espectro 6, RMN ¹H δ (ppm): 1.81 (s, 3H, -COCH₃), 2.18 (s, 3H, -COCH₃), 3.14 (s, 3H, -NCH₃), 3.53 (s, 3H, -NCH₃), 7.81 (s, 1H, H-6), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.18 (s, 1H, H-6), 8.38 (s, 1H, H-3).</p>	
	4,5-Dicloro-N-metil-2-nitroanilina 9
<p>Espectro 7, IR cm^{-1}: 3389 (-NH), 3075 (C-H, aromático), 2909 (C-H, alifático), 1510 y 1336 (-NO₂), 1252, 1217, 939.</p> <p>Espectro 8, EM (ID) m/z: 220 (M⁺, 80%), 222 (M⁺, 50%), 224 (M⁺, 8%), 147 (M⁺- 73, 55%), 139 (M⁺- 81, 100%).</p> <p>Espectro 9, RMN ¹H δ (ppm): 3.11 (d, $J = 4.8\text{Hz}$, simplifica con D₂O, 3H, -CH₃), 7.24 (s, 1H, H-6), 8.18 (sa, int. con D₂O, NH), 8.24 (s, 1H, H-3).</p>	
	4,5-Dicloro-2-nitroanilina 4
<p>Espectro 10, IR cm^{-1}: 3481 (-NH), 3172 (C-H, aromático), 1551 y 1367 (-NO₂).</p> <p>Espectro 11, EM (ID) m/z: 206 (M⁺, 100%), 208 (M⁺, 64%), 160 (M⁺- 46, 81%), 133 (M⁺- 73, 87%).</p> <p>Espectro 12, RMN ¹H δ (ppm): 6.10 (sa, int. Con D₂O, NH₂), 6.98 (s, 1H, H-6), 8.24 (s, 1H, H-3)</p>	
	4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina 5
<p>Espectro 13, IR cm^{-1}: 3461 y 1635 (-NH), 3048 (C-H, aromático), 1561 y 1388 (-NO₂), 1229 (-Ar-O-R), 772.</p> <p>Espectro 14, EM (ID) m/z: 314 (M⁺, 83%), 316 (M⁺, 50%), 279 (M⁺- 35, 82%), 233 (M⁺- 81, 100%).</p>	

<p>Espectro 15, RMN ¹H δ (ppm): 6.23 (s, 1H, H-6), 7.24 (s, 1H, H-6), 8.18 (sa, int. con D₂O, -NH), 8.24 (s, 1H, H-3).</p>	
 <p>Alfa-carbamato</p>	<p>[5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo 7</p>
<p>Espectro 16, IR (cm⁻¹): 3342 (N-H), 3125-3050 (C-H, insaturado), 1719 (HN-CO-O), 1267 (HN-CO-), 1210 (-O-CH₃).</p> <p>Espectro 17, EM (ID) m/z: 367 (M⁺, 100%), M⁺² (45%) 335 (M⁺-32, 30%), 332 (M⁺-35, 43%), 300 (M⁺-67, 83%), 272 (M⁺-95, 25%).</p> <p>Espectro 18, RMN ¹H δ (ppm): 3.75 (3H, s, -O-CH₃), 6.63 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-2`), 7.22 (1H, s, H-7), 7.37 (1H, t, J = 16 Hz, H-3`), 7.56-7.64 (3H, m, H-4`, H-6`, H-7`), 7.94-7.97 (1H- m, H-5`), 8.24-8.27 (1H, m, H-8`), 11.78 (2H, s, Intercambia com D₂O, 2NH).</p>	
	<p>4-Cloro-N-metil-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina 10</p>
<p>Espectro 19, IR (cm⁻¹): 3364 (-NH), 3054 (C-H, aromático), 2921 (-CH₃), 1504, 1389 (Ar-NHCH₃), 1504 y 1344 (Ar-NO₂), 1153, 1040.</p> <p>Espectro 20, EM (ID) m/z: 328 (M⁺, 47%), 330 (M⁺², 17%), 294 (M⁺-34, 25%), 259 (M⁺-69, 100%), 247 (M⁺-81).</p> <p>Espectro 21, RMN ¹H δ (ppm): 3.17 (3H, s, -CH₃), 6.75 (1H, H-3), 7.72 (1H, d, J = 7.6, H-2`), 7.99-8.09 (3H, m, H-4`, H-5`, H-6`), 8.32 (1H, d, J = 8.4, H-8`), 8.47 (2H, t, J = 7.6, H-3`, H-7`), 8.66 (1H, s, Intercambia con D₂O, -NH), 8.76 (1H, s, H-6)</p>	
 <p>HSK</p>	<p>[5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo 12</p>
<p>Espectro 22, IR (cm⁻¹): 3322 (-NH-CO-R), 3098-3023 (-CH, aromático), 2929 (-CH, alifático), 1678 (-C=O), 1237 (-O-CH₃).</p> <p>Espectro 23, EM (ID) m/z: 381 (M⁺, 10%), 349 (M⁺-32, 100%), 314 (M⁺-67, 95%), 157 (M⁺-224, 17%)</p> <p>Espectro 24, RMN ¹H δ (ppm): 3.47 (3H, s, -OCH₃), 3.80 (3H, s, -NCH₃), 6.71 (1H, dd, H-), 6.87 (1H, s, H-7),</p>	

Resultados de la parte Química

Para la síntesis de los carbamatos de metilo, compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK**, fue necesario partir de las *o*-fenilendiaminas adecuadamente sustituidas (**6** y **11**), las cuales se prepararon según en el **Esquema 1**. A continuación se presenta una breve discusión de los resultados obtenidos, tanto en la preparación de los intermediarios, así como en la obtención de los compuestos finales.

6.1.1. Intermediarios de reacción

El compuesto **2** se obtuvo por acetilación de la 3,4-dicloroanilina comercial (**1**) con anhídrido acético en exceso, sin disolvente alguno. La reacción exotérmica se enfrió con un baño de agua mientras se incorporaba **1** y agitaba con una varilla de teflón. La reacción fue instantánea con rendimiento del 100%. El compuesto crudo, seco y pulverizado se disolvió en H₂SO₄ en frío y después se le goteó el HNO₃ concentrado. La reacción se pudo controlar a bajas temperaturas sin dificultad y al final de la adición del HNO₃ se dejó llegar a la temperatura ambiente. De esta forma se consumió toda la materia prima **2** y se obtuvo el compuesto **3** en mayor proporción. Este compuesto se pudo purificar por maceración en poco metanol en frío y luego filtración con succión.

Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de metanol-agua. El compuesto **3** presentó bandas características en el espectro de IR del grupo carbonilo a 1678 cm⁻¹. El espectro de masas realizado por la técnica de FAB mostró el ion molecular con *m/z* de 248 que concuerda con la masa molecular esperada para el compuesto. Además, se observó que el pico base del espectro correspondió a la 2-nitroanilina sustituida, (*m/z* = 206), que fue generada por la pérdida del ion acilo menos un protón (*m/z* = 42). Una vez confirmada la estructura del compuesto **3**, éste se sometió a hidrólisis en H₂SO₄ en caliente. El producto se pudo purificar por recristalización de etanol.

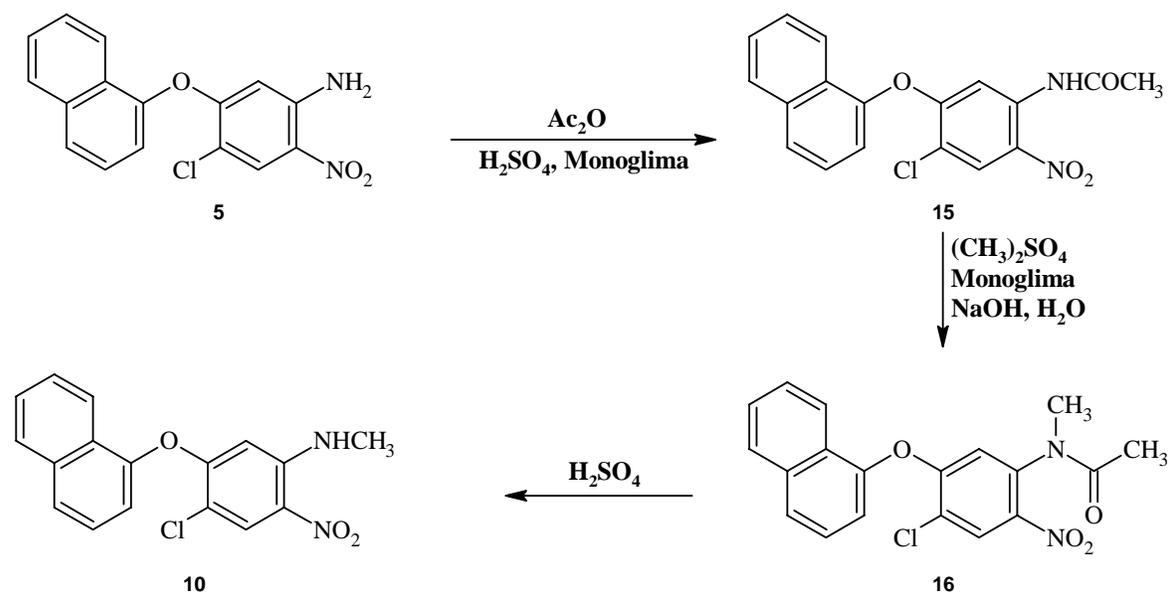
La estructura de **4** se confirmó por su punto de fusión semejante al reportado⁴³ y los datos de sus espectros. En el IR las señales características esperadas para la molécula fueron: en 3481 se observó la señal correspondiente al -NH_2 , en 1551 y 1367 cm^{-1} las señales correspondientes al grupo nitro. El espectro de masas por introducción directa mostró el pico de la masa molecular esperada con una relación m/z de 206, el cual también correspondió al pico base. Algunos picos importantes como el M+2 generado por la contribución isotópica de los cloros, la pérdida del grupo nitro generó el fragmento M^+-46 y la pérdida de 73 unidades de masa, el cual generó el pico con una relación m/z de 133. El espectro de RMN ^1H confirmó la estructura de **4**, obteniéndose tres singuletes correspondientes a los dos hidrógenos aromáticos y a los dos hidrógenos del grupo amino.

La síntesis de los compuestos **5** y **10** consistió en la sustitución nucleofílica de **4** y **9**, respectivamente, con α -naftol. Los dos compuestos sintetizados se obtuvieron con buenos rendimientos (**Tabla 5**). Esto se debió en gran medida a las condiciones de reacción utilizadas. Para la sustitución nucleofílica en un inicio se utilizó un reactor cerrado de acero inoxidable y calentamiento entre 100-130 °C, los equivalentes de α -naftol y K_2CO_3 se variaron de 1.05-1.5 eq con respecto a la materia prima y una cantidad de H_2O tal que no excediera el 10 % del volumen total. Se determinó que las mejores condiciones de reacción fueron 1.5 eq de α -naftol y K_2CO_3 y una temperatura de 115 °C, ya que aumentando la temperatura los subproductos también aumentaban y a menor cantidad de equivalentes de dichos reactivos la reacción no procedía. Con respecto al disolvente que se utilizó, se comprobó que en DMF se llevaba a cabo mejor la reacción ya que con MeOH y con monoglima los subproductos aumentaban. Aunque los rendimientos crudos de la reacción con las condiciones finales, 1.5 eq de α -naftol y K_2CO_3 en DMF y un volumen de H_2O menor al 10%, eran del 60%, aún había subproductos, aunque en menor cantidad, y la reacción duraba un día. Para el tratamiento de la mezcla de reacción se inició como anteriormente se había reportado,⁴⁵ esto es, verterlo en agua; sin embargo, se formaba un producto resinoso difícil de trabajar y al final solo se obtenía un único producto (el de interés) con un rendimiento del 50%.

Para poder obtener el compuesto **5** con mayor rendimiento y pureza, la mezcla de reacción se empezó a verter en diferentes proporciones de H₂O:MeOH. Se encontró que una proporción 1:1 y agitación vigorosa liberaba al compuesto **5** en forma de un precipitado fácil de manejar y filtrar. Otra manera de preparar los compuestos **5** y **10** consistió en preparar primero la sal del naftol, como se describe en la parte sintética, y después realizar la sustitución nucleofílica en DMF. Este procedimiento dio alto rendimiento, comparado con cualquier otra ruta sintética.

Los datos espectroscópicos de **5** y **10** permitieron determinar su estructura, encontrándose en IR las señales del grupo amino de éstos a 3364 y 3461 cm⁻¹ respectivamente, así como la señal del grupo nitro a 1561 y 1504 respectivamente. Los espectros de masas por introducción directa (IE) mostraron el ion molecular de cada uno de ellos, el cual corresponde a la masa molecular para los productos esperados siendo de 314 para el **5** y de 328 para el **10**. El pico base de cada espectro correspondió a la pérdida de cloro y del grupo nitro para el compuesto **5** y de cloro y del grupo metilamino para el compuesto **10**. El espectro de RMN ¹H mostró un singulete a 8.18 ppm que corresponde a la amina, así como los protones aromáticos en campos bajos para el compuesto **5** y el singulete a 3.17 ppm que corresponde al metilo y un singulete a campos bajos 8.66 que intercambia con D₂O, que se asignó a la amina para el compuesto **10**.

El compuesto **10** también se sintetizó por una ruta alterna, la cual partió del compuesto **5** que primeramente se sometió a una reacción de *N*-acetilación seguido de *N*-alquilación y finalmente la hidrólisis del grupo acetamido llevó al compuesto **10** **Esquema 5**. El rendimiento global de esta secuencia fue inferior al obtenido por la primera ruta de síntesis, ya que el compuesto **10** presenta problemas de solubilidad al ser muy hidrofóbico. La espectroscopia del producto obtenido por esta ruta se comparó con la del obtenido por la primera ruta y coincidió en todos los casos, además el pf y el R_f fueron los mismos.



Esquema 5. Ruta alterna para la preparación del compuesto **10**.

Para la obtención de los compuestos **6** y **11** se empleó la hidrogenación catalítica con Ni Raney como catalizador, ya que este método no elimina al cloro. Debido a la fácil oxidación o descomposición de los productos obtenidos, éstos se emplearon inmediatamente en la reacción siguiente de ciclocondensación.

Con respecto al compuesto **8** (**Esquema 1**), el espectro de masas por FAB mostró una relación m/z de 263. Nuevamente, al perderse 42 unidades de masa del grupo acilo dio el pico principal, tal y como sucedió con su antecesor no metilado. Los datos proporcionados por RMN ^1H mostraron la unión del metilo al nitrógeno en la señal 3.14, lo que confirmó la *N*-metilación de la materia prima correspondiente. En este caso también se observó claramente el fenómeno de atropisomerismo.

El espectro de IR para el compuesto **9** mostró la señal característica de la amina secundaria a 3389. Además, en este compuesto se observó las bandas características del grupo nitro entre 1510 y 1336.

El espectro de masas realizado por introducción directa del compuesto **9** mostró el ion molecular con m/z de 220, que concuerda con la masa molecular esperada; el pico base correspondió a la pérdida de 81 unidades de masa del grupo nitro y cloro. Así mismo, la espectroscopia de RMN ^1H mostró el H de amina secundaria a campos bajos dando la señal a 8.24 que intercambió con D_2O .

6.1.2. Compuestos Finales

La síntesis de los compuestos finales **Alfa-Carbamato** y **HSK** consistió en la ciclocondensación de la *o*-fenilendiamina correspondiente con el intermediario 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea (**14**). 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 procede y por arriba el producto se descompone. Los compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK** se obtuvieron con buenos rendimientos, esto se debió en gran medida a que se trabajó inmediatamente la *o*-fenilendiamina correspondiente después de la reacción de reducción, así como a de la preparación previa del reactivo **14**.

Para los compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK** el espectro de IR mostró las señales características del $-\text{NH}$ del carbamato a 3342 y 3322 respectivamente. También fue importante la señal del $\text{C}=\text{O}$ que se observó entre 1719 y 1678.

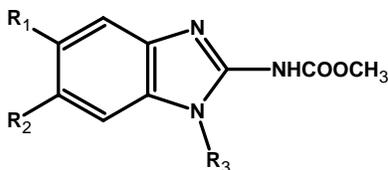
Así mismo, la espectrometría de masas mostró los iones de m/z de 367 y 381 respectivamente, concordantes con la masa molecular esperada para cada compuesto. Los datos proporcionados por RMN ^1H mostraron los cambios estructurales, donde se observó la señal del metilo del éster carbámico como un singulete a 3.75 y 3.47, para los compuestos finales **Alfa-Carbamato** y **HSK** respectivamente, y también mostró el singulete a 3.80, correspondiente al metilo en posición 1 del bencimidazol del compuesto **HSK**; además de la señal a campos bajos característica del N-H, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D_2O para ambos productos.

6.2. RESULTADOS DE LA PARTE BIÓLOGICA

6.2.1. Efecto de los compuestos Alfa-Carbamato y HSK sobre: *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

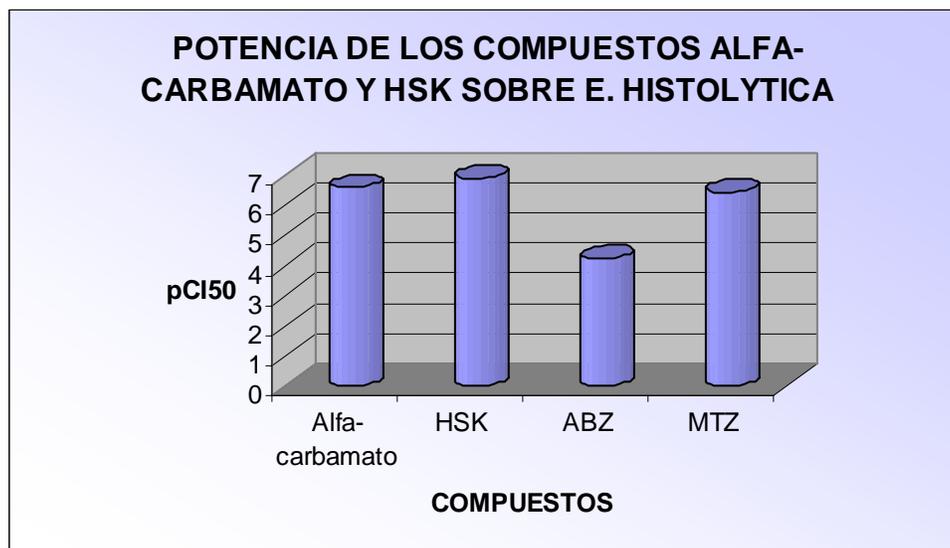
El resultado de la evaluación de la actividad antiprotozoaria in vitro de los dos compuestos sintetizados en este trabajo y de los controles positivos contra *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis* se muestran en la **Tabla 10**. En ésta podemos apreciar que fueron activos contra los parásitos de estudio con CI_{50} menores a $0.3 \mu M$. La efectividad de **7** y **12** contra *E. histolytica*, fue superior a la que muestra el albendazol y el metronidazol en los dos casos.

Tabla 10: Evaluación antiprotozoaria de los carbamatos de este proyecto



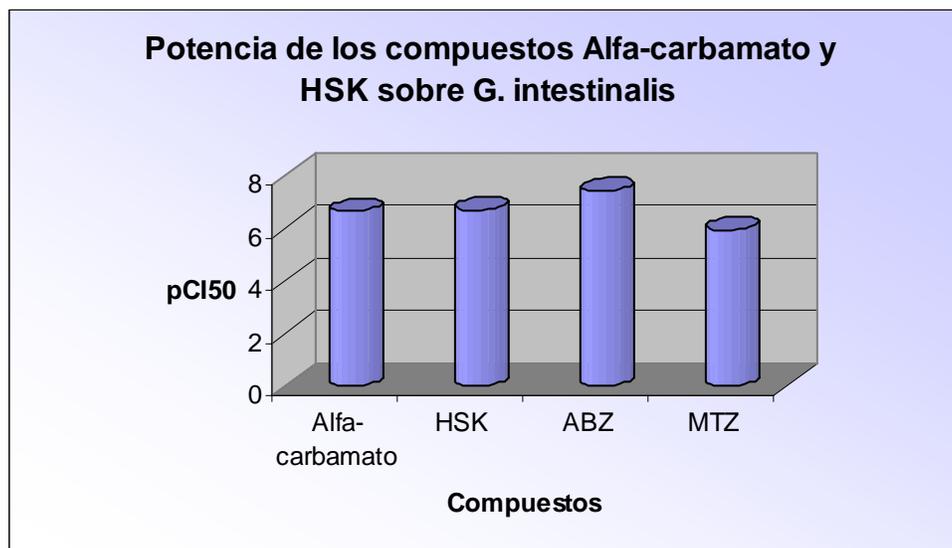
COMPUESTO	<i>E. histolytica</i> $CI_{50} \mu M$	<i>G. intestinalis</i> $CI_{50} \mu M$	<i>T. vaginalis</i> $CI_{50} \mu M$	-R ₁	-R ₂	-R ₃
Alfa-Carbamato	0.2474	0.2311	0.2500	Cl	1-naftiloxi	H
HSK	0.1205	0.19905	0.2016	1-naftiloxi	Cl	CH ₃
Albendazol	56.600	0.03700	1.592			
Metronidazol	0.3500	1.2280	0.2160			

Los compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK** fueron 1.415 y 2.9 veces más activos respectivamente que el metronidazol (**Gráfica 2**), y muy superiores al albendazol, siendo 228.8 y 469.7 veces respectivamente.

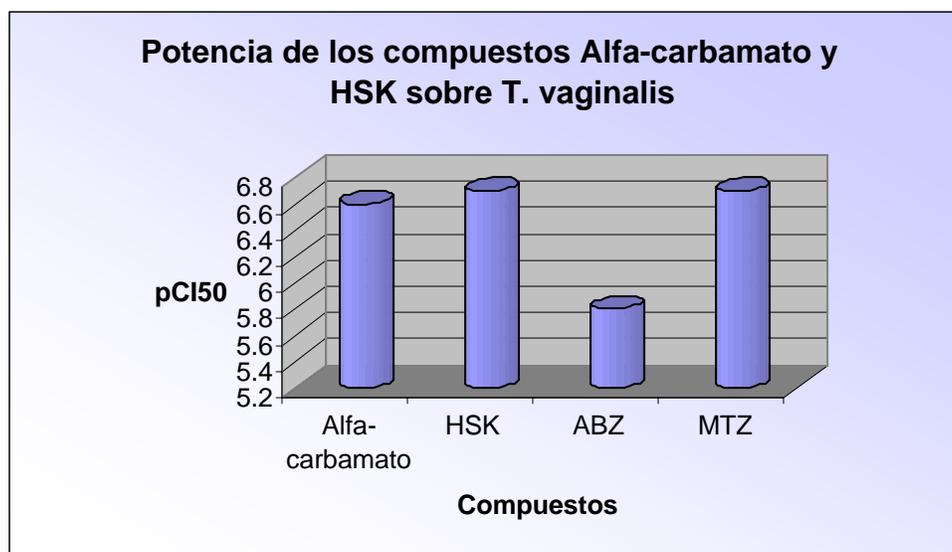


Gráfica 2: Potencia de los compuestos contra *Entamoeba histolytica*.

En el en el caso de *G. intestinales*, los dos compuestos presentaron mayor actividad que el metronidazol, entre 5.31 y 6.17 veces más activos, pero ninguno superó al albendazol (**Gráfica 3**). Con respecto a *T. vaginalis* los dos compuestos resultaron con una actividad importante, mejor que la presentada por el albendazol y muy cercana a la del metronidazol. El compuesto **HSK** fue 7.9 veces más activo que el albendazol lo que lo hace el más activo de los dos compuestos sintetizados contra este parásito. (**Gráfica 4**). El compuesto **12** fue el más activo contra los tres parásitos evaluados en este trabajo, por lo que podemos concluir que no es importante el protón para la actividad antiparasitaria ya que al sustituirlo por el grupo $-CH_3$ se incrementa la actividad en la molécula. El compuesto **12** puede ser más activo que su predecesor ya que puede tener actividad per se.



Gráfica 3: Potencia de los compuestos contra *Giardia intestinalis*.



Gráfica 4: Potencia de los compuestos contra *Trichomonas vaginalis*.

6.2.2. Resultados de la actividad de los compuestos Alfa-carbamato y HSK sobre *T. spiralis* in vivo e in vitro

Los resultados de la actividad contra la fase enteral del helminto *T. spiralis* de los compuestos de este proyecto, así como del albendazol a una dosis equimolar de 75 mg/kg/peso se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Actividad del albendazol y de los compuestos **Alfa-carbamato** y **HSK** a una dosis equimolar de 75 mg/kg/peso contra el adulto de *Trichinella spiralis*

	No. de adultos/ratón	%Reducción de la carga parasitaria
Control (-)	151	0
ABZ	115	24
Alfa-Carbamato	139	8
HSK	40	73

Podemos observar que el compuesto **HSK** tiene mayor actividad contra la fase intestinal de *T. spiralis* con un 73% de reducción de la carga parasitaria. El compuesto **Alfa-Carbamato** no presentó actividad contra el parásito. Estos resultados pueden deberse a la mayor solubilidad presentada por el compuesto **HSK** que a diferencia del **Alfa-carbamato** tiene un sustituyente metilo en posición 1.

Con lo que respecta a la actividad de los compuestos sobre la larva muscular de *T. spiralis*, los resultados se muestran en la **Tabla 12**. Los compuestos presentaron baja actividad contra la fase sistémica del helminto *T. spiralis*, 20.7% de reducción de la carga parasitaria. Resulta interesante la actividad presentada por este compuesto, ya que es muy cercana a la actividad de su profarmaco, sugiriendo que el compuesto **HSK** es biotransformado para general el compuesto **Alfa-Carbamato**.

Tabla 12. Actividad in vivo sobre la larva muscular de *T. spiralis*

	Numero de Larvas	%Reducción
Control (-)	290000	-----
ABZ	85000	70%
Alfa-Carbamato	230000	20.7 %
HSK	243000	16.2 %

El resultado de la evaluación de la actividad antihelmíntica in vitro, sobre la larva muscular de *T. spiralis*, de los dos compuestos de este proyecto se muestra en la **Tabla 13**. En donde apreciamos que el compuesto **HSK** fu el único que presentó una actividad ligeramente similar al del ABZ. Cabe mencionar que estos estudios in vitro se realizaron por cuadruplicado cada uno.

Tabla 13: Reducción de la actividad metabólica de la LM de *T. spiralis* in vitro **Alfa-Carbamato y HSK**

Concentración (µg/mL)	% Reducción del Alfa-Carbamato	% Reducción del HSK	% Reducción del ABZ
1	19.12	68.73	74.15
0.5	0.00	62.56	68.62
0.1	0.00	11.46	63.31
0.05	5.89	10.58	52.14
0.01	1.11	0.23	3.72

Estos resultados pueden deberse a la actividad intrínseca del HSK, sin embargo, es posible que el compuesto **HSK** genere al compuesto **Alfa-carbamato** en el parasito a través del sistema enzimático P450, ya que se ha reportado este sistema enzimático en helmintos como en el nematodo *Haemonchus contortus*⁹² y en *C. elegans*.⁹²⁻⁹⁴

Sin embargo, un experimento contundente de la posible presencia del citocromo P-450 en helmintos fueron los experimentos realizados por Dominique Kerboeuf y colaboradores quienes determinaron la posible existencia del citocromo P-450 en el helminto *Heligmosomoides polygyrus* mediante una reacción de *N*-desalquilación oxidativa de la aminopirine in vivo.⁹⁴ Esta reacción es similar a la que se requiere para que el **HSK** genere al compuesto **Alfa-Carbamato**, por lo que es posible que en *T. spiralis* se este llevando a cabo y la este realizando el parásito y por tal motivo se obtengan estos resultados.

6.3. Resultados de la parte analítica

6.3.1. Resultados de los estudios de biotransformación

En el siguiente apartado se muestran los resultados de la parte analítica, la interpretación de cada espectro, así como los estudios de biotransformación. Se probaron varias proporciones de fase móvil para determinar cuál era la proporción adecuada para obtener una mejor resolución en el HPLC de los compuestos, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Proporción de fase móvil utilizada y tiempo de retención de los compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK**

Proporción de fase móvil (CH ₃ CN:H ₂ O)	Tiempo de retención del compuesto Alfa-Carbamato (min)	Tiempo de retención del compuesto HSK (min)
95:5	nd	1.220
90:10	nd	1.631
85:15	nd	2.377
60:40	3.57	6.00

nd= no determinado

Con los resultados mostrados en la tabla anterior, podemos determinar que la mejor proporción de fase móvil para el análisis es de 60:40 CH₃CN:H₂O. Las condiciones cromatográficas para el estudio de las muestras fueron las siguientes:

- Columna: C18
- Fase móvil: CH₃CN:H₂O (60:40)
- Flujo: 0.6 mL/min, isocrático.
- Tiempo de corrida: 15 min.

El análisis del compuesto **Alfa-Carbamato** se realizó por duplicado ya que el compuesto estaba impuro, aunque en ccf presentaba una sola mancha, al analizarlo en el HPLC mostraba una impureza. El tratamiento que se realizó para tratar de eliminar la impureza fue lavar repetidas veces con metanol en caliente y filtrar. A continuación se muestran los cromatogramas del compuesto **Alfa-Carbamato** impuro, del que se lavó y del compuesto **HSK**. Figuras 14-17.

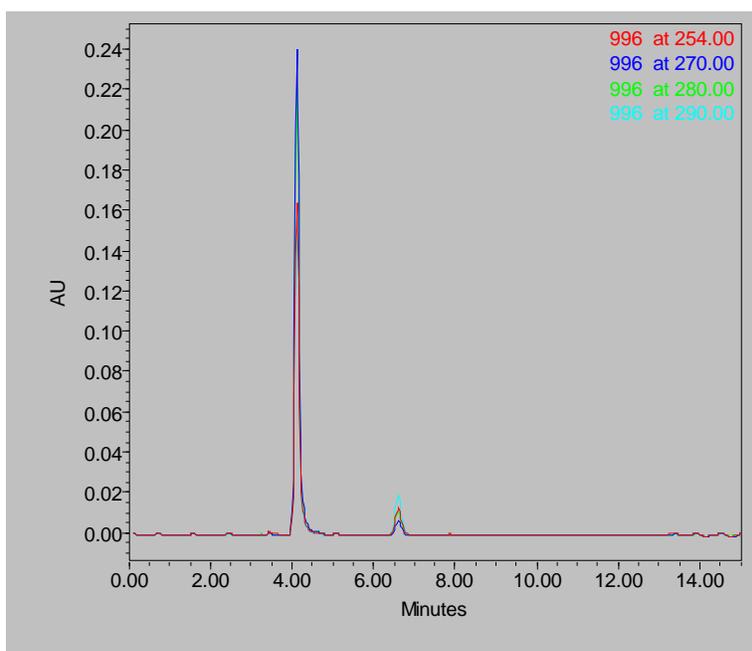


Figura 14: Espectro del compuesto **Alfa-Carbamato** sucio

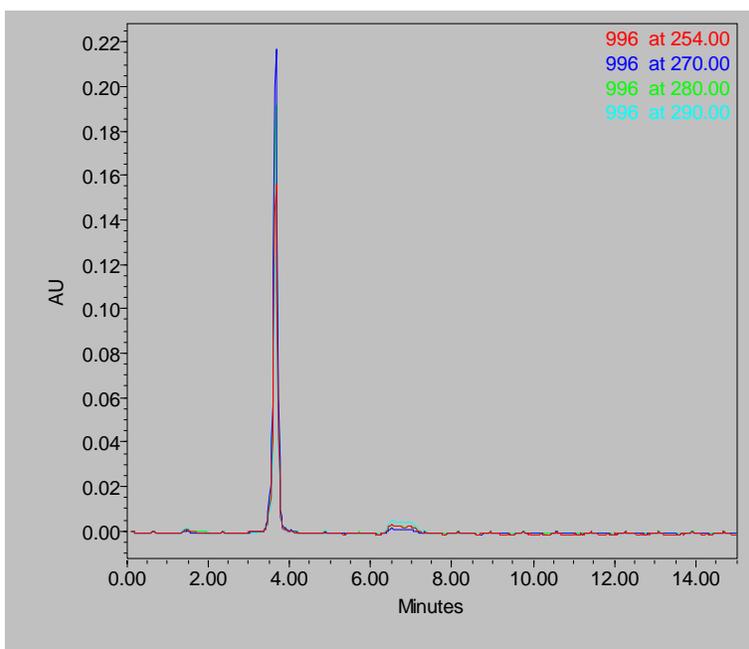


Figura 15: Espectro del compuesto Alfa-Carbamate

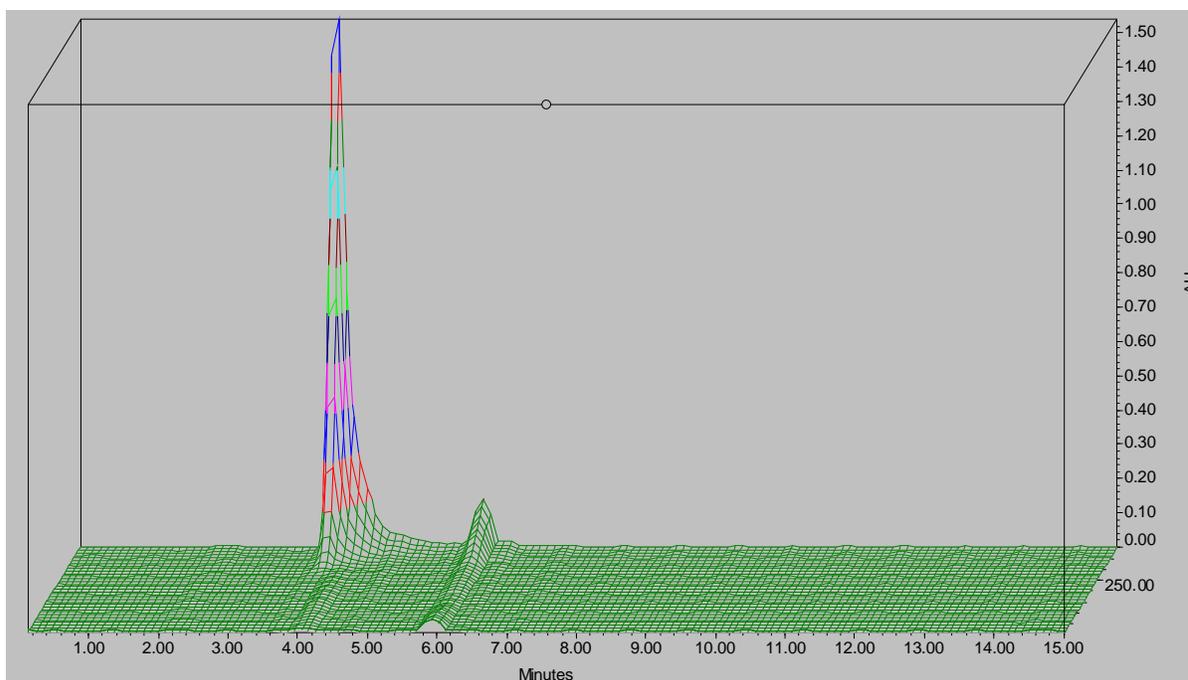


Figura 16: Espectro de absorción del compuesto Alfa-Carbamate

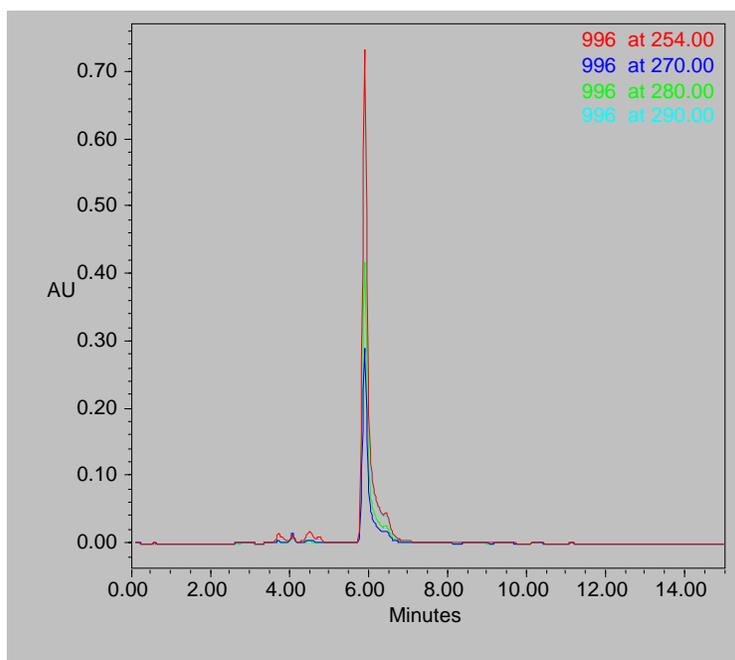


Figura 17: Espectro del compuesto **HSK**

Una vez que se obtuvo el tiempo de retención de los compuestos de interés, así como las condiciones adecuadas, se realizaron los estudios de biotransformación como se menciona en el **Diagrama de flujo 1 (pag 86)**. Los espectros que se muestran a continuación son el blanco y algunas de las muestras obtenidas, ya que se realizó el experimento por duplicado a tres y siete días. De cada muestra se analizaron los resultados de las siguientes fracciones obtenidas mediante una extracción líquido-líquido.

- a) Tejido (fracción nuclear, 800g, 10 min)
- b) Fracción Mitocondrial (20000g, 15 min)
- c) Fracción microsomal (50000rpm, 60 min)
- d) Último sobrenadante que constituye la fracción citosólica

Solo se muestra un ejemplo en general el ejemplo que nos dio indicios de la biotransformación del compuesto **HSK** al compuesto **Alfa-carbamato**. El resto de las muestras obtenidas en promedio son iguales a los 7 días y también se muestra un ejemplo. Con respecto al análisis en el tiempo de tres horas no se observó ningún cambio con respecto al blanco. **Figuras 18 y 19.**

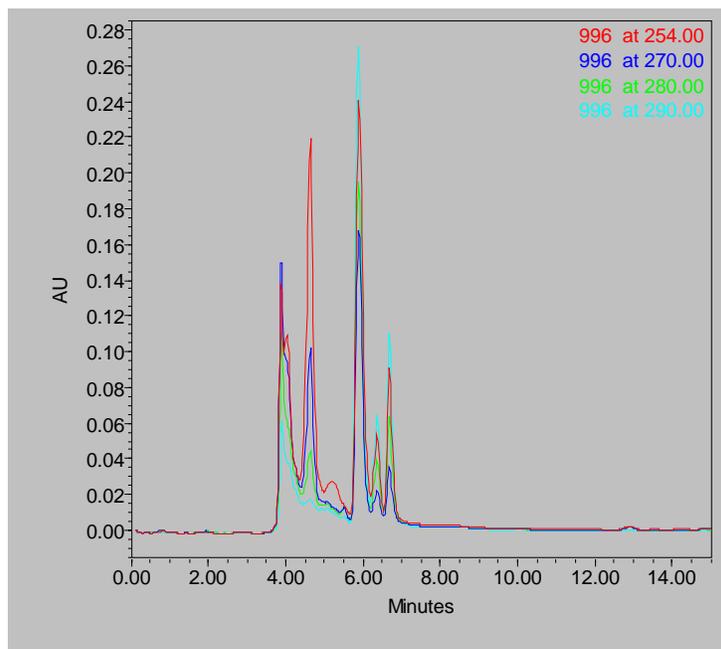


Figura 18: Análisis del blanco de la fracción citosólica a los 7 días

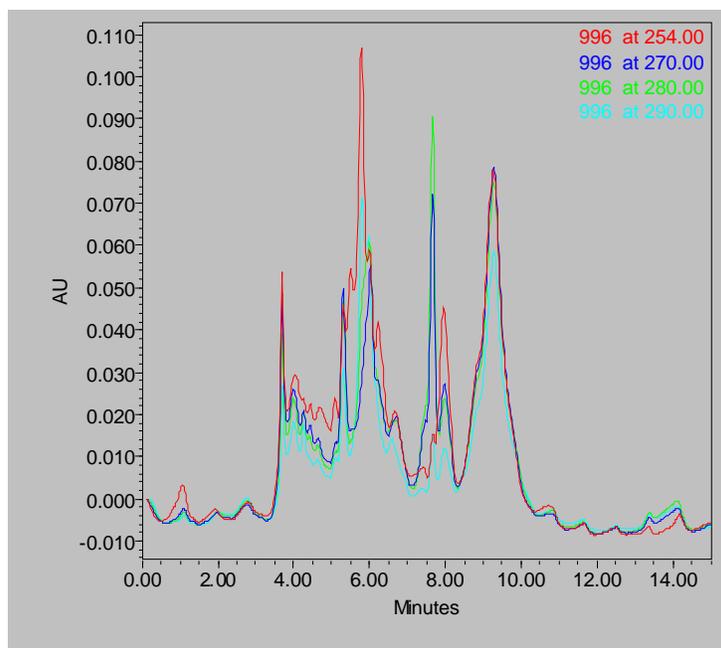


Figura 19: Análisis de la fracción citosólica de la muestra 1 a 7 días

Como podemos apreciar en las **Figuras 18 y 19** no se observa nada en la región del tiempo de retención del compuesto (**Alfa-Carbamato**), y por el contrario se observa mucho ruido, producido posiblemente por la extracción de proteínas. Sin embargo, sucedió lo contrario con muestra 2, la cual se muestra en el **Figura 20**.

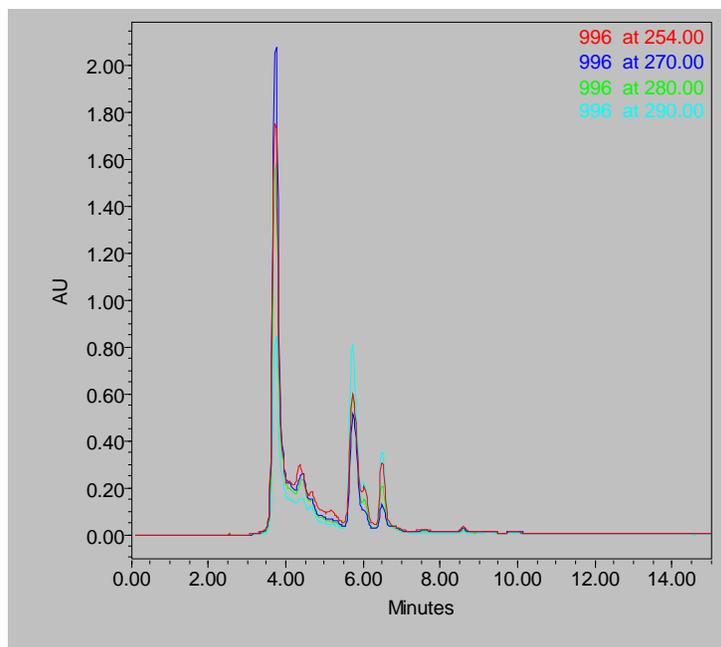


Figura 20. Análisis de la fracción citosólica de la muestra 2 a los 7 días

Como se observa claramente en la **Figura 20** se obtiene un pico en el tiempo de retención del compuesto esperado (**Alfa-Carbamato**) y como se muestra en el **Figura 21**, con los mismos patrones de absorción que el compuesto de interés.

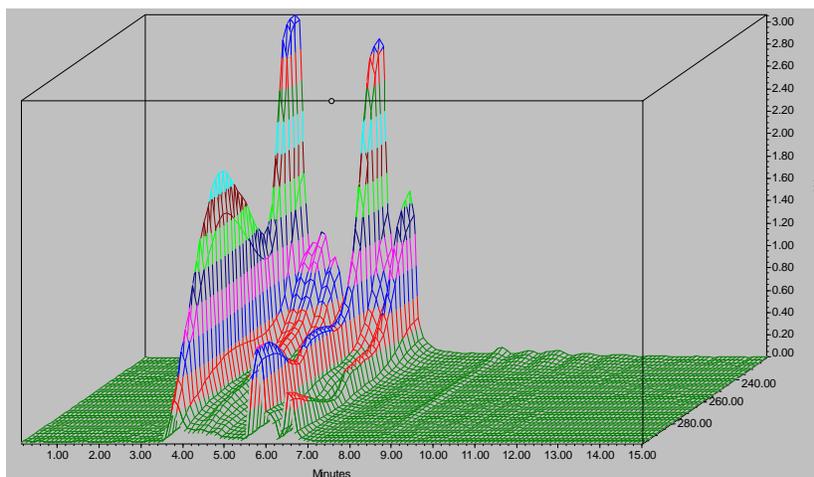


Figura 21: Espectro de absorción de la fracción citosólica de la muestra 2 analizada los 7 días.

Con los resultados obtenidos anteriormente no podemos determinar si efectivamente el compuesto **HSK** está sufriendo una reacción oxidativa para generar al compuesto **Alfa-Carbamto**, ya que solo son dos ensayos de biotransformación y la variabilidad biológica puede estar modificando los resultados aunque las posibilidades fueron 50:50. Lo que sí se logró observar fue que el análisis de los espectros indicaba que la extracción líquido-líquido no era la metodología correcta para la extracción de la muestra ya que se arrastraban también otros componentes celulares. Por estos motivos se cambió la metodología planteada y se incrementó el número de animales, cuatro en total y un blanco, y se realizó una extracción en fase sólida. Los cambios principales consistieron en que una vez tomada la muestra se utilizó un cartucho de EFS y se realizó la metodología descrita previamente descrita en los antecedentes.

Los resultados obtenidos por esta metodología se muestran en los **Figuras 22-24**, en donde se aprecia la alta variabilidad obtenida con los resultados anteriores. Cabe mencionar que en esta segunda parte solo se analizaron las muestras de la fracción citosólica y se muestran dos de ellas.

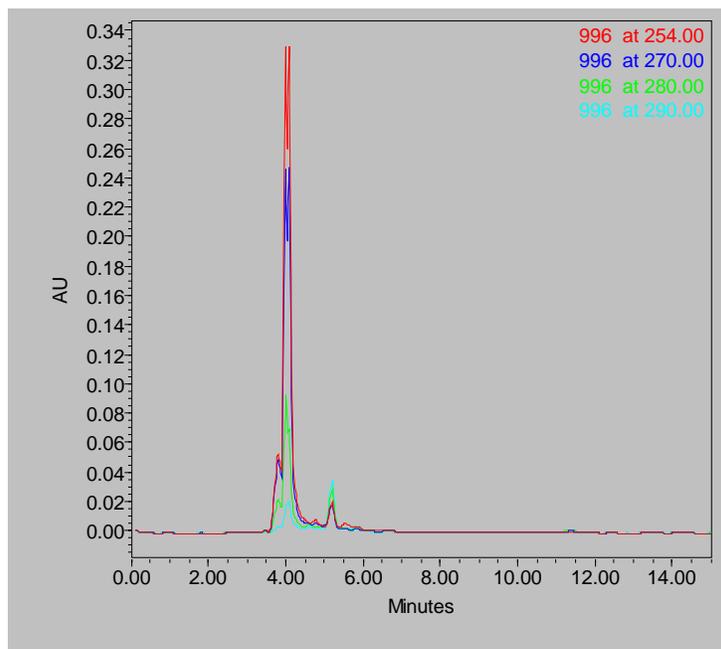


Figura 22: Espectro de absorción del blanco de la fracción citosólica.

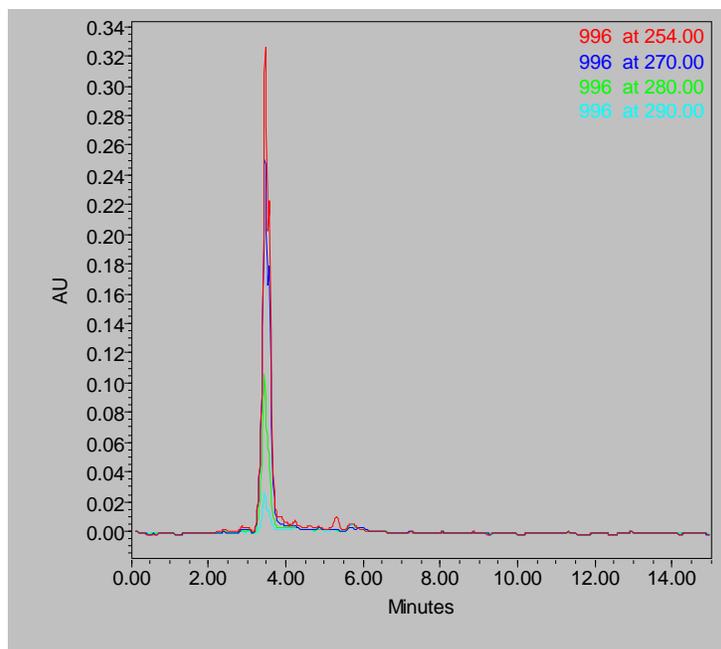


Figura 23: Espectro de absorción de la muestra 1.

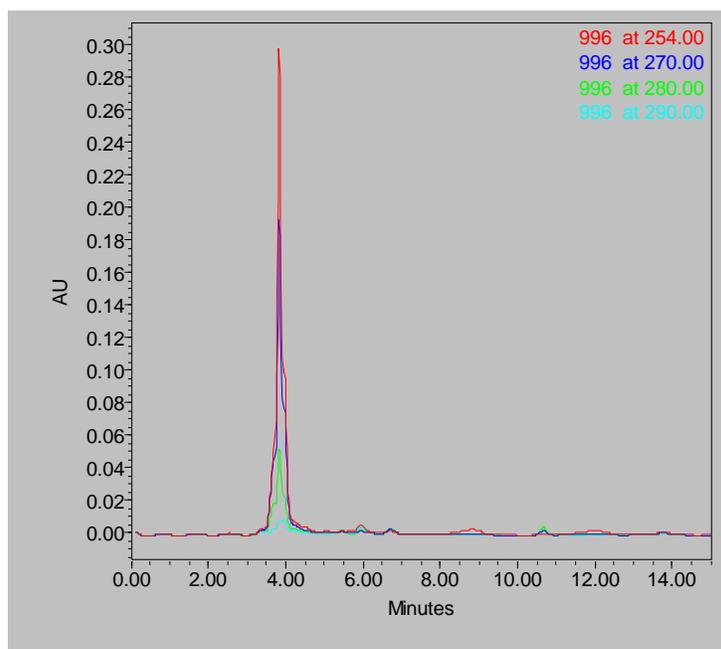


Figura 24: Espectro de absorción de la muestra 2.

Con esta segunda metodología se logró eliminar completamente el arrastre de otras proteínas; sin embargo, aún se presentaban impurezas en la zona de tiempo de retención de interés. Estos resultados no fueron tampoco concluyentes por lo que a la muestra 1 se le adicionó el compuesto **Alfa-Carbamato** impuro para que la impureza sirviera como marcador con el fin de determinar la presencia del compuesto de interés. **Figura 25.**

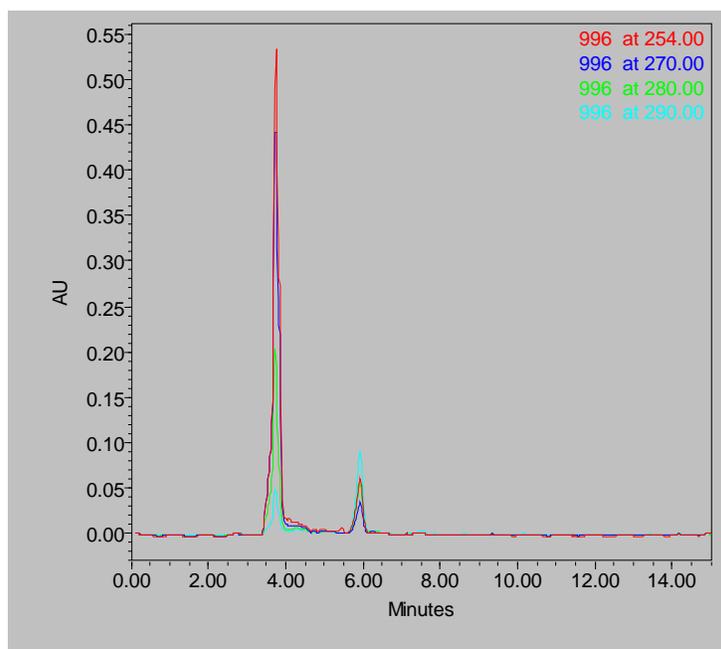


Figura 25: Muestra 1 adicionada con el compuesto **Alfa-Carbamato**.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de la impureza y por lo tanto también la existencia del compuesto **Alfa-Carbamato** ya que, aunque no se observa su presencia, se determinó de una forma indirecta. Por otro lado, también se logra apreciar una mayor intensidad de la señal, ya que la absorción con y sin el compuesto **Alfa-Carbamato** es completamente diferente.

7. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar e identificar dos compuestos nuevos **Alfa-carbamato** y **HSK (7 y 12)** que se evaluaron in vivo e in vitro sobre diferentes modelos. En la síntesis de algunos intermediarios se logró optimizar la reacción y elevar el rendimiento respecto a las referencias reportadas en la literatura. Lo más relevante de la síntesis fue lograr la ciclocondensación para obtener **7** y **12** empleando el dimetoxicarbonil-*S*-metilisoteurea **14** en un medio orgánico y fase homogénea.

En base a los resultados de la evaluación biológica sobre los tres protozoarios el compuesto **HSK** fue el más activo, lo que nos indica que no se requiere del hidrógeno en posición 1 para la actividad antiprotozoaria.

Con lo que respecta a los ensayos de actividad in vitro sobre *T. spiralis*, el compuesto **HSK** fue el más activo. Los dos compuestos presentan actividades muy cercanas contra la fase muscular de *T. spiralis*, indicando posiblemente la *N*-desalquilación oxidativa sufrida en el compuesto **HSK**. y en relación a los estudios en la fase adulta del parásito, el compuesto **HSK** fue más activo.

En relación a los estudios de biotransformación, el procedimiento planteado y la metodología usada fueron satisfactorias para determinar el cambio estructural y se observó mejor la biotransformación de **HSK** a **Alfa-carbamato** a los 7 días respecto a las 3 horas.

En base a los pruebas biológicas y a los estudios de biotransformación se acepta la hipótesis planteada en este trabajo, ya que efectivamente el compuesto **HSK** sufre una reacción de *N*-desmetilación oxidativa para generar al compuesto **Alfa-carbamato**.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Parte química

8.1.1. Instrumentación

- La concentración de las soluciones se llevó a cabo en un rotaevaporador marca Büchi modelo R-114 CR con baño B-480 acoplado a una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2.
- 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.
- 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 placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a los vapores de yodo. Los sistemas eluyentes utilizados fueron los siguientes:

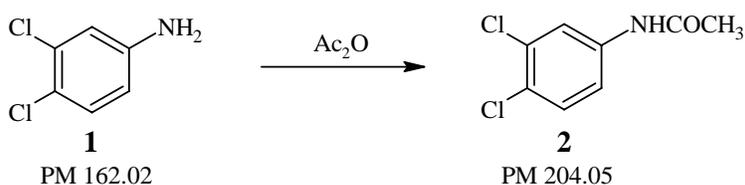
Sistema	Composición	Proporción
Ia	Hexano-Cloroformo-AcOEt	50:35:15
II ^a	Cloroformo-Metanol	90:10
III ^a	Hexano-AcOEt	85:15
IV	Cloroformo-Metanol	99:1

^aMás una gota de NH₄OH

A continuación se describe el trabajo realizado

8.1.2. SÍNTESIS DE ALFA-CARBAMATO

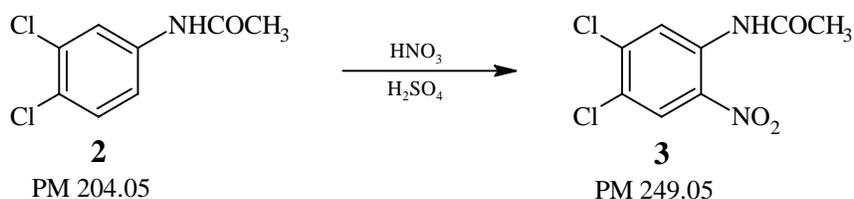
8.1.3. 3,4-Dicloroacetanilida (1)



En un vaso de precipitados de 500 mL, adaptado con termómetro, agitación magnética y baño de agua, se colocaron 110.36 g (102 mL, 1.08 mol) de anhídrido acético y se les adicionaron 100 g (0.6172 mol) de 3,4-dicloroanilina (**1**) pulverizada y seca. La adición se hizo lentamente, procurando que la temperatura no rebasara los 60 °C. Luego, la mezcla de reacción se agitó por 30 min más y se vertió sobre 300 mL de agua, con agitación, donde precipitó un sólido blanco, el cual se separó por filtración con vacío, se

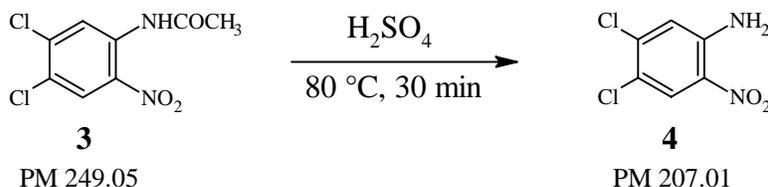
lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 125.94 g (100%) de un polvo blanco, una sola mancha por ccf con R_f 0.31. Una muestra analítica se recristalizó de EtOH y tuvo un pf de 122-123 °C [Lit.^{95, 96} 120.5 °C], coincidente con la 3,4-dicloroacetanilida (**2**). Este producto crudo se empleó como tal para la siguiente reacción.

8.1.4. 4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (**3**)



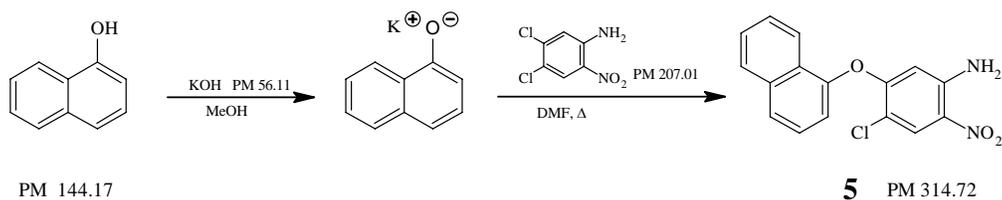
En un vaso de precipitados de 500 mL, provisto de agitación magnética y termómetro, se colocaron 250 mL de H₂SO₄ y se enfriaron a 5 °C, luego, se adicionaron 50 g (0.2450 mol) de 3,4-dicloroacetanilida pulverizada y seca. La adición se hizo lentamente, de tal forma que la temperatura no rebasara los 10 °C. Terminada la adición (1h), la solución se llevó a 4 °C con ayuda un baño de hielo-sal y se adicionaron, gota a gota, 25 mL de HNO₃ conc., 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 recristalizó de metanol-agua y dio cristales amarillo-pálido con pf 123-124°C [Lit.^{87, 97} 123-124 °C], coincidente con la 4,5-dicloroacetanilida (**3**).

8.1.5. 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (4)



En un matraz bola de 250 mL con dos bocas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro y baño de agua, se colocaron 40.5 g (0.1760 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**), y 165 mL de H₂SO₄ conc. La mezcla se calentó a 80 °C durante 30 min; después, se vertió sobre 400 mL de agua-hielo y precipitó un sólido amarillo-naranja, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 32.7 g (98%) de un sólido anaranjado. Una muestra analítica se recristalizó de etanol y dio agujas color anaranjado con un *R_f* de 0.61 (Sistema I) y un pf de 176-177 °C, coincidente con la 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (**4**).^{Ref. 43}

8.1.6. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)

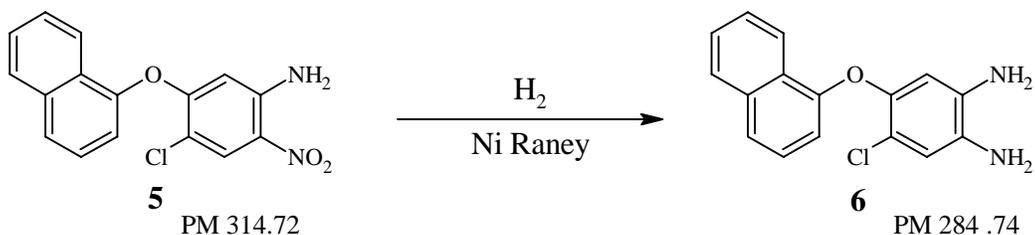


En un matraz bola de 250 mL con una boca 24/40, equipado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 13.93 g (0.0966 mol) de 1-naftol en una disolución recién formada de 5.42g (0.0966 mol) de KOH en 100 mL de metanol; posteriormente, se llevó a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida. Al sólido oscuro residual se le adicionaron 20 g (0.0966 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4**) y

150 mL de DMF. La mezcla bien agitada se calentó a 100 °C durante 2.5 h en las que se consumió completamente la materia prima (ccf). Se dejó enfriar a 50 °C y se filtró con succión, el residuo se lavó con poca DMF. Los filtrados reunidos se concentraron en el rotaevaporador hasta 100 mL a 1 mmHg y 40 °C.

El residuo oleoso oscuro se vertió sobre 400 g de hielo, formándose un sólido resinoso, luego, la mezcla se calentó a ebullición, solidificando un producto al enfriarse, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua fría y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 28.88 g (95%) de producto crudo, como un sólido oscuro. Una muestra analítica se recrystalizó de etanol-tolueno (60-40) dando un sólido amarillo ocre, una sola mancha en ccf con *R_f* de 0.75 (Sistema III) y un punto de fusión de 136-138 °C.⁴³

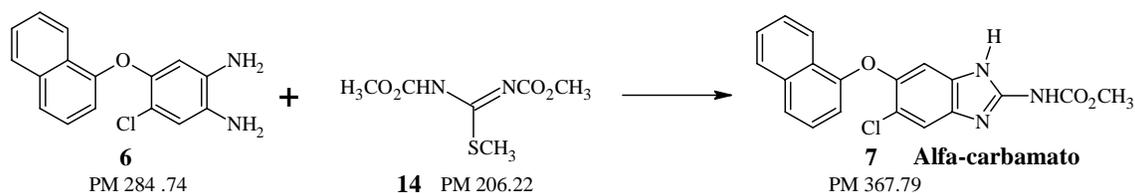
8.1.7. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6)



En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N₂, 27.15 g (0.0865 mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina, 8.2 g de Ni-Raney al 5 % 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 y se inició la agitación. La reacción terminó en 4 h, consumiéndose un total de 337 lb/in² de H₂. Al terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío empleando una capa de celita humedecida en etanol.

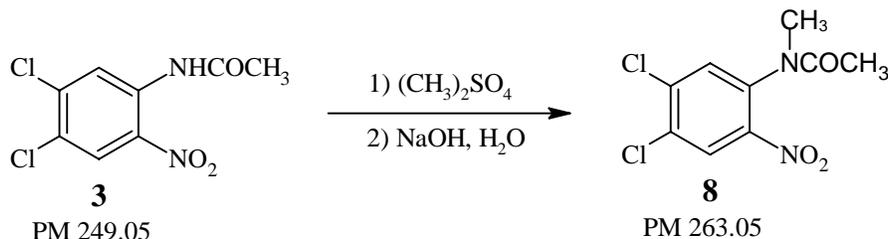
El filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 22.10 g (89.73 %) de un aceite café oscuro. La ccf mostró una sola mancha con R_f de 0.60 (Sistema II). Este producto crudo se empleó como tal para la siguiente reacción.

8.1.8. [5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (7). Alfa-carbamato



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 22.10 g (0.0776 mol) de **6** en una mezcla de metanol-agua (80:20). A la solución se le agregó 19.21 g (1.2 Eq, 0.093 mol) de 1,3-(dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiourea (**14**). 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 a temperatura ambiente. Se formó un sólido negro, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire dando 28.5 g (99.8%). El producto crudo se lavó repetidas veces con MeOH y se recristalizó de DMF. Se obtuvieron 20 g (80%) de unos cristales blancos con R_f 0.73 (Sistema 90:10 CHCl₃:MeOH) y pf 250.9-252.3 °C.

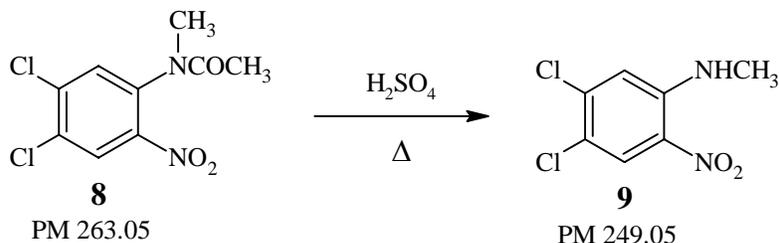
8.1.9. SÍNTESIS DE HSK

8.1.10. 4,5-Dicloro-*N*-metilacetanilida (**8**)

En un matraz bola de 100 mL con dos bocas 20/40, adaptado con agitación magnética y termómetro, se adicionaron 3 g (0.0120 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (**3**), 4.56 g (2.3 mL, 0.0181 mol, 1.5 eq) de sulfato de dimetilo y 10 mL de monoglisma. 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 0.7 g (0.0181 mol, 1.5 Eq) de NaOH al 50 % m/v de H_2O , de tal manera de que la temperatura de reacción oscilara entre 30-35 °C.

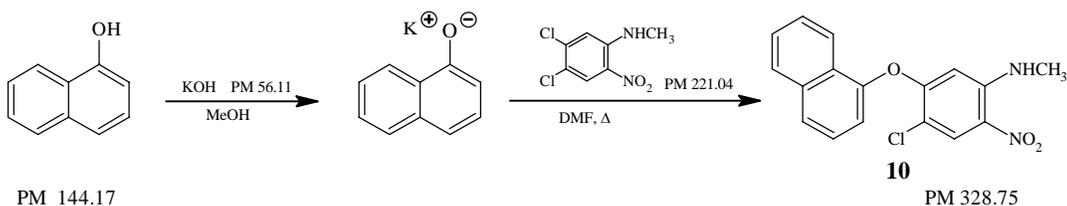
Al terminar la adición se comprobó el consumo de la materia prima por ccf y se vertió sobre 200 g de hielo-agua. Se formó un precipitado amarillo el cual se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 2.83 g (88.76 %) de un sólido amarillo que en ccf mostró una mancha 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.⁸⁷ 94-95 °C]

8.1.11. 4,5-Dicloro-*N*-metil-2-nitroanilina (9)



En un vaso de precipitados de 150 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 5 g (0.0189 mol) de 4,5-dicloro-*N*-metil-2-nitroacetanilida (**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-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 *R_f* de 0.6 (Sistema I). Una muestra se recrystalizó de etanol, obteniéndose agujas anaranjadas con un pf 146.3-146.5 °C [Lit. 148 °C]⁸⁷

8.1.12. 4-Cloro-*N*-metil-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (10)

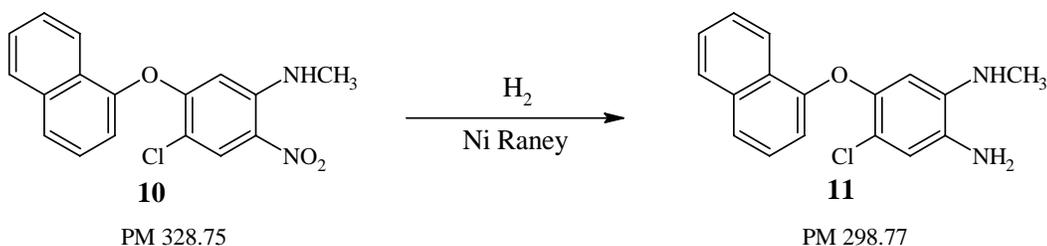


En un matraz bola de 250 mL con una boca 24/40, equipado con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 30 g (0.2081 mol) de 1-naftol en una disolución recién formada de 11.68 g (0.2081 mol) de KOH en 150 mL de metanol; posteriormente, se llevó a sequedad en el rotaevaporador a presión reducida.

Al sólido oscuro residual se le adicionaron 46 g (0.2081 mol) de 4,5-dicloro-*N*-metil-2-nitroanilina (**9**) y 150 mL de DMF. La mezcla bien agitada se calentó a 100 °C durante 2.5 h en las que se consumió completamente la materia prima (ccf). Se dejó enfriar a 50 °C y se filtró con succión, el residuo se lavó con poca DMF. Los filtrados reunidos se concentraron en el rotaevaporador hasta 100 mL a 1 mmHg y 40 °C. El residuo oleoso oscuro se redisolvió en 100 mL de metanol en caliente con agitación vigorosa y precipitó un sólido color naranja que se secó al aire dando 55 g (80.4 %) de **10**.

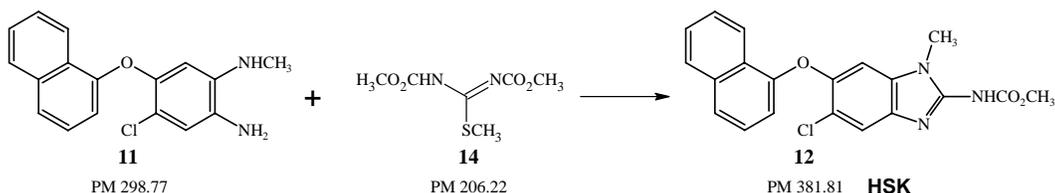
Una muestra de 2 g se se recristalizó de metanol dando 1.67 g (83.5%) de cristales amarillos que en ccf presentaron una sola mancha con un *R_f* de 0.38 (Sistema III) (85:15, Hex: AcOEt) y punto de fusión de 171.1-171.7 °C.

8.1.13. 4-Cloro-*N*-metil-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (**11**)



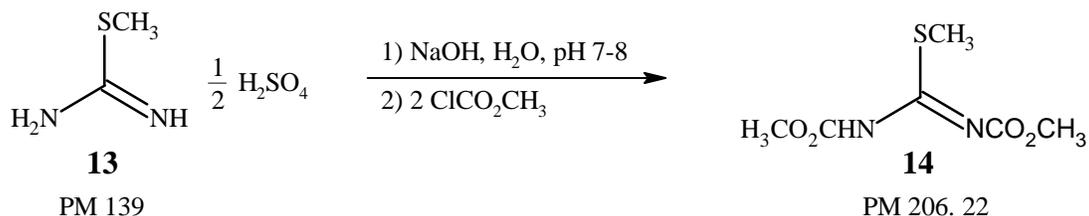
En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N₂, 10 g (0.03042 mol) de 4-cloro-*N*-metil-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**10**), 3.6 g de Ni-Raney y 150 mL de metanol. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavados de 30 lb/in² de H₂; después, se cargó el reactor con 60 lb/in² de H₂ y se inició la agitación. La reacción terminó en 3 h, consumiéndose un total de 98 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 8.2 g (90%) de un aceite café oscuro. La ccf mostró una mancha con *R_f* de 0.72 (Sistema II). Este producto se empleó como tal para la siguiente reacción.

8.1.14. [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)



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 8.2 g (0.0274 mol) de **11** en metanol. A la solución se le agregaron 5.65 g (0.0274 mol) del carbamato (**14**) preparado anteriormente. 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 a temperatura ambiente. Se formó un sólido rosado, el cual se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire dando 9 g (86 %) de un sólido color grisáceo. El producto crudo se recrystalizó de metanol; se obtuvieron 4 g (45 %) de unos cristales blancos algodonosos con *Rf* 0.67 (Sistema II) y *pf* 164.3-165.8 °C.

8.1.15. 1,3-(Dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea (14)



En un matraz bola de tres bocas de 500 mL, equipado con agitación magnética, termómetro, tapón de hule (séptum) y un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro previamente calibrado, se disolvieron 70 g (0.5036 mol) de hemisulfato de S-metilisotiourea en 250 mL de agua. A la mezcla agitada y enfriada a 0-5 °C se añadieron 100.3 g (82 mL, 1.058 mol) de cloroformiato de metilo. La mezcla se agitó vigorosamente; después se le agregó, poco a poco, 200 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 35% a una velocidad tal que el pH oscilara entre 7-7.5 y la temperatura entre 0-10°C. Después de la adición se formó un sólido esponjoso, el cual se extrajo con cloroformo (200 mL x 3). Los extractos reunidos se lavaron con agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron en el rotavapor. El producto crudo se recristalizó de metanol dando 70 g (67.4 %) de un sólido blanco con ligero olor fétido, una sola mancha por ccf con Rf =.52 (Sistema I) y pf de 99.1-100.8 °C.

8.2 Parte biológica

8.2.1. Ensayos de actividad en protozoarios in vitro

Para la determinación de los ensayos se siguió el método descrito por Cedillo Rivera⁸⁸⁻⁹⁰ con algunas modificaciones, quedando de la siguiente manera: Se incubaron en tubos de ensayo la cantidad de 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, 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 incubaron a 37 °C por 48 h. Terminado este tiempo los trofozoítos se lavaron y sembraron 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.

8.2.2. Ensayos de actividad in vitro en *T. spiralis* (MTT/PMS)

La evaluación del efecto de derivados bencimidazol 2-carbamatos de metilo sobre la actividad metabólica de la larva muscular de *T. spiralis* se realizó como se describe a continuación.

El ciclo de vida de *T. spiralis* se realizó en ratas de la cepa Sprague-Dawley a partir de las cuales se aislaron las larvas musculares que se emplearon en los ensayos de evaluación biológica de los compuestos sintetizados.

Se infectaron ratas con 500 larvas musculares/mL y 28 días post infección se sacrificaron y se les extrajo el músculo esquelético, el cual se trató con pepsina y ácido clorhídrico al 1% durante tres horas. El contenido de la digestión se filtró para obtener las larvas, las cuales se lavaron con buffer de fosfatos pH =7.0 cuatro veces y se adicionó una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina.

Se cuantificaron las larvas obtenidas y se puso el ensayo con los fármacos de prueba y los controles negativo y positivo. En caja de cultivos de 24 pozos se ponen 1000 larvas musculares por pozo, a las concentraciones: 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 microgramos/mL y cbp 1.0 ml de medio RPMI estéril. Se incuba durante 48 hrs. a 37 °C. (se cambia el medio y se revisa a las 24 horas).

Para el revelado de la prueba se transfiere el contenido de cada uno de los pozos a tubos eppendorf los cuales se centrifugan y se lavan las larvas con buffer de fosfatos y se adicionan 800 microlitros de MTT, 50 microlitros de MPS y 100 microlitros de DMSO. Los tubos se incuban por 1 hora, posteriormente se centrifugan y se lavan con buffer de fosfatos, se vuelve a centrifugar y se adiciona 500 microlitros de DMSO y se homogeniza. Se centrifuga y se transfieren 200 microlitros del sobrenadante a una placa de ELISA. La prueba se lee a 492 nm y se realizan los cálculos para obtener la actividad metabólica y el porcentaje de reducción.

8.2.3. Ensayos de actividad in vivo en *T. spiralis*

Para el estudio de la actividad de los compuestos sobre la fase sistémica y enteral de *T. spiralis*, los ratones se infectaron experimentalmente por inoculación intragástrica con 800 larvas musculares suspendidas en 0.1 mL de bactoagar al 0.2%. Los compuestos a evaluar se administraron oralmente a una dosis de 75 mg/kg de peso, resuspendidos en una formulación de cromofor/etanol/agua (1:1:8). Como control positivo se utilizó albendazol a una dosis equimolar con respecto a los compuestos.⁹¹

8.2.3.1. Fase muscular

En los ensayos sobre fase muscular de *T. spiralis* se infectaron grupos de 10 ratones con *T. spiralis* y después de 28 días de infección se trataron durante siete días con los compuestos **Alfa-Carbamato**, **HSK** y albendazol. Siete días después de la última administración, los animales se sacrificaron, las larvas se extrajeron del músculo esquelético de los animales y se contaron. La reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto al control de infección.

8.2.3.2. Fase enteral

Para los ensayos sobre la fase intestinal de *T. spiralis* se infectaron seis grupos de 10 ratones y después de tres días de infección se trataron con una sola dosis de los compuestos **Alfa-Carbamato**, **HSK** y albendazol. Posteriormente, los ratones se sacrificaron al día seis postinfección, se obtuvieron los intestinos y se contaron los parásitos adultos obtenidos.

8.3 Parte analítica

El Cromatógrafo de Líquidos de Alto Rendimiento utilizado para la determinación de la pureza y el análisis de los estudios de biotransformación, tiene las siguientes características:

- ◆ Sistema de administración de disolventes, Modelo: Binary HPLC Pump, Waters 1525. Marca: Waters.
- ◆ Válvula de inyección: Loop de 20 μ L. Marca: Rheodyne.
- ◆ Detector; Modelo: Photodiode Array Detector, Waters 996. Marca: Waters.
- ◆ Software; Millennium32, Versión 3.20 Copyright © 1999 Waters Corporation.
- ◆ Columna: Atlantis TM dC18 5 μ m S/N, 3.9 x 150 mm W41171K 02.

Para la determinación del tiempo de retención de los compuestos **Alfa-Carbamato** y **HSK**, los cuales servirían como estándares, se prepararon soluciones a una concentración 5 μ M.

- a) Preparación de las soluciones 5 μ M de analitos problema.

Material:

- 1 navecilla de vidrio
- 1 espátula
- 2 matraces aforados de 100 mL
- 1 matraz aforado de 50 mL
- 1 micropipeta de 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L

Sustancias:

- Analito
- Acetonitrilo (CH₃CN)
- Agua desionizada
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

Procedimiento:

1. Se pesaron 50.0 mg de analito problema y se disolvieron en un volumen final de 100 mL (50 mL de DMSO y 50 de CH₃CN). Se obtuvo una solución con una concentración de 1.36 mmol/L
2. Se hizo 1 dilución 1:10 utilizando como disolvente CH₃CN. Se obtuvo una solución con una concentración de 0.0136 mmol/L (13.6 μM).
3. Finalmente se realizó una última dilución 1:5.6 utilizando como disolvente CH₃CN. Se tomaron 18.4 mL del compuesto **Alfa-Carbamato** y 19 mL del **HSK** y se aforaron a 50 mL. Se obtuvo una solución con una concentración 5 μM.

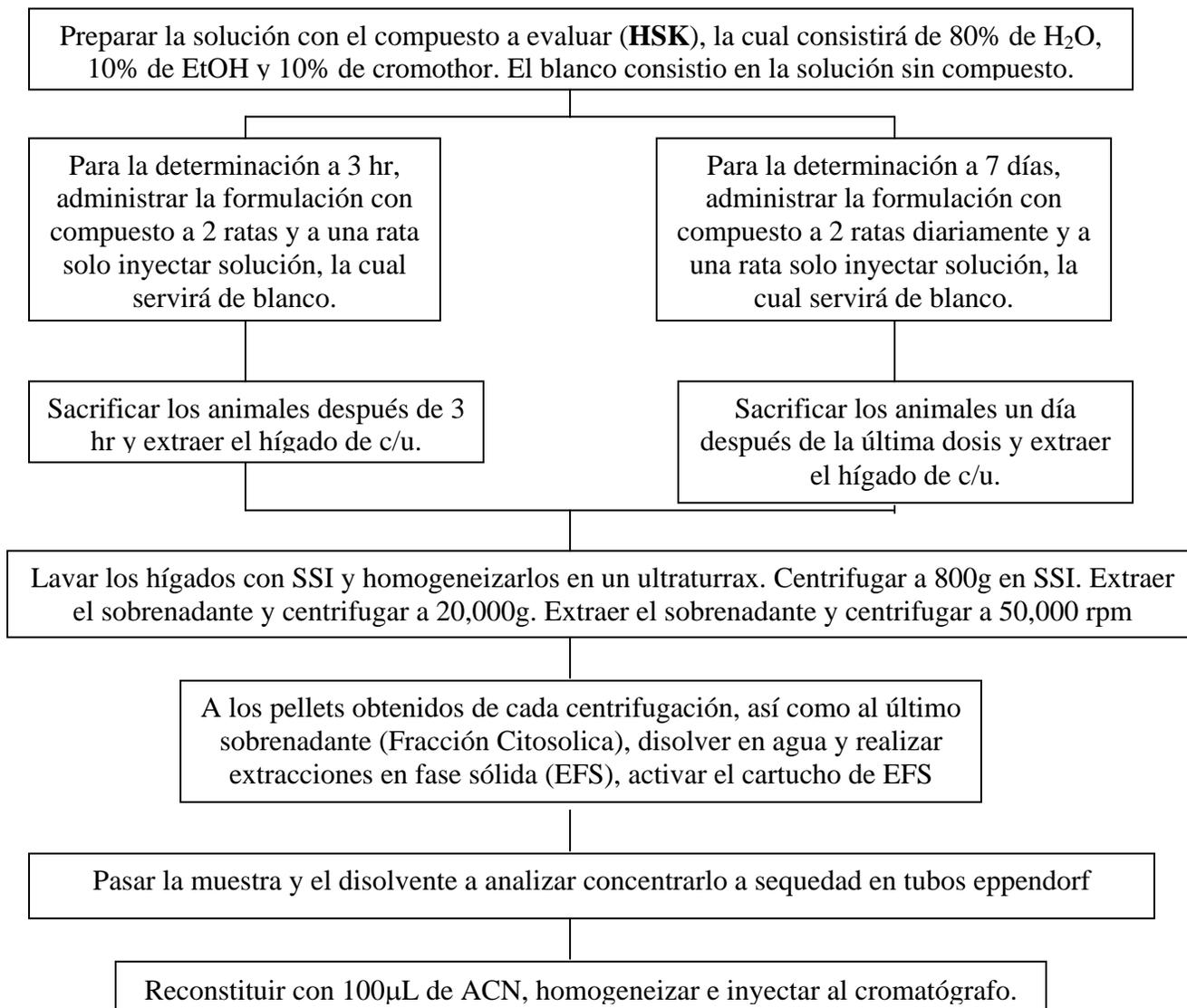
b) Cuantificación de las soluciones 5 μM de analitos problema y determinación de la proporción de disolventes a usar.

1. Se inyectaron 5 muestras por cada analito.
2. Se obtuvo el espectro correspondiente para cada inyección.
3. Se compararon los resultados obtenidos para obtener los mejores resultados de tiempo de retención.

Implementación de un método para la determinación de la biotransformación del compuesto HSK

En el procedimiento utilizado para el estudio de la biotransformación del compuesto **HSK** utilizaron BALB/c, de 4-6 semanas de edad con un peso entre 20-25 g, desparasitados, la metodología utilizada se muestra en el diagrama de flujo 1.

Diagrama de flujo 1: Análisis de la biotransformación de compuestos en hígado de rata in vivo



Forma de activar el cartucho

a) Activar el Cartucho

- 1.0 Lavar con MeOH
- 1.1 Lavar con MeOH/H₂O
- 1.2 Lavar solo con H₂O
- 1.3

b) Tratamiento de la Muestra

- 1.0 Pasar la muestra por el cartucho
- 1.1 Lavar con H₂O/MeOH (90:10)
- 1.2 Lavar con MeOH
- 1.3 Lavar con H₂O/MeOH (90:10)
- 1.4 Lavar con H₂O
- 1.5 Lavar con MeOH

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. Kumate, J; Gutierrez, G; Muñoz, O. Santos. JI. Manual de Infectología Clínica, 14ª Ed, Mendez Editores. México. **1994**
18. Burger, A., Medicinal Chemistry. 3ª Ed. Wiley and Sons. V 1, pp. 583-600. New York. **1970**
19. Goodman, A.G., The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8ª Ed. Pergamon Press Inc. Cap. 40, New York. **1990**. pp. 959-977
20. Flisser A., Ruy Pérez Tamayo., Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. 1ª Ed. Editores de Textos Mexicanos. **2006**. pp. 559-570
21. Ortega Pierres, M. G.; Arriaga, C.; Yépez-Mulia, L. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. **2000**, 93, 201-225.
22. Laboratory identification of parasites of public health concern. www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Para_Health.htm (03. Julio. **2007**)
23. L. Castro-Trejo, Z. Garcja-Vasquez and J. Casildo-Nieto. The Susceptibility of Lymnaeid Snails to *Paramphistomum cervi* Infections in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 35 (**1990**) 157-161
24. Juan Manuel Reyes Perez. Determinación de la Eficacia Paramfistomicida del Compuesto Alfa-Carbamato en Ovinos. Tesis de Maestría. U. N. A. M. 2005.
25. Ocampo, G.; Salgado, D.; La Omnipresencia de las Helmintosis. Salud Pública de México, **1992**; 34(3)
26. Sharma, S. Desing of new Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles, *Avd. Drug. Res.*25, **1994**:105-163
27. 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.
28. Meloni, B., Thompson, R., Horton, R. Albendzoles as a future anti giardial agent. *Parasitology Today*. **1992**, 8, 412-414

29. 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 derivates carrying or amidine groups. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 13(2005): 1587-1597
30. Pawar, Dalal, Shimpi and Muhulikar.; Studies of antimicrobial activity of *N*-alkyl and *N*-acyl 2(4-thiazolyl)-1*H*-benzimidazoles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 21(2004): 115-118
31. 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
32. Townsend, L.B., Wise, D.S.; The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today*, 1990; 6(4): 107-112
33. Upcroft P. and Jacqueline A. Upcroft. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2001:150-164
34. Navarrete Vazquez G. Tesis Doctoral. Diseño, Síntesis y Actividad Antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)benzimidazol. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2004
35. Valdez Garay, Juan. Tesis de Maestría. Diseño, síntesis y actividad biológica de 1*H*-benzimidazoles. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2000
36. Sharma S., Abuzar S. The benzimidazole anthelmintics chemistry and biological activity. *Prog Drug Res*. 1983; 27:85-161
37. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Interamericana MacGraw Hill. 9^a Ed. 1997: 17
38. Lacey E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*. 6(4),1990:112-115
39. Wright B.J. The Chemistry of the Benzimidazoles. *Research Laboratories*. Jan 29, 1951
40. Martin, J.R. Modes of Action of Anthelmintic Drugs. *The Veterinary Journal*, 1997, 154, 11-34
41. Mas-Coma, M.S., Esteban J.C., Bargues M.D.; Bulletin of the World Health Organization, 77, (1999), 340-346

42. Faieweather I., Boray J.C.; *The Veterinary Journal*, 158, (1999), 81-112
43. Rodriguez Morales Sergio. Síntesis de Derivados Naftalenicos 1-Metilados del Triclabendazol con Actividad Antihelmintica Potencial. Tesis para obtener el titulo de Q.F.B. U. N. A. M. **1995**
44. Robinson M.W., Trudgett A., Hoey E.M., Faieweather I.; Triclabendazole-resistant *Faciola hepatica*: β -tubulin and response to in Vitro treatment with triclabendazole; *Parasitology*, 124, (2002), 325-338
45. Ruben Antonio Romo Mancillas. Sintesis de profármacos del faciolicida experimental 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol y su estudio de solubilidad en medio acuoso. Tesis para obtener el titulo de Q.F.B., Facultad de Química, U.N.A.M., **2005**
46. Alicia Hernández-Campos, Froylan Ibarra-Velarde, Yolanda Vera-Montenegro, Norma Rivera-Fernández y Rafael Castillo. Síntesis and Faciolicidal Activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*-bencimidazole. *Chem. Pharm. Bull.* 50(5)649-652 (2002)
47. D.R. Hennessy. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*. 72,1997 367-390
48. Norma Rivera., Froylán Ibarra., Armando Zepeda., Teresea Fortoul., Germinal Cantó., Alicia Hernández., Rafael Castillo. The effect to the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naptyloxy)-1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Faciola hepatica* in their natural host. *Parasitology Res* (2005) 95: 379-382.
49. Avendaño C., Introducción a la Química Farmacéutica. 2ºEd., McGraw Hill Interamericana. España.: 2001
50. Silverman, R.; The organic chemistry of drug design and drug action; Academia Press; E.U.: **1992**
51. Bernard Testa. Prodrug research: futile or fertile?. *Biochemical Pharmacology* 68 (2004) 2097-2106
52. Korolkovas, A.; Essentials of Medicinal Chemistry; 2º Ed., Jonh Wiley and Sons; E.U.: **1988**; pp. 26-28, 97-118

53. Singh, S. K., Sharma, S. *Curren Status of Medicinal Research Reviews* **1991**; 11(6): 581-615
54. D.W. Gottschall., V. J. Theodorides and R. Wang. The Metabolismo of Benzimidazole Anthelmintics. *Parasitology Today*, Vol 6, No. 4, **1990**. pp. 115-124
55. Myriam O.B., Viviana G.T., Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Med. Chile*. **2004**; 132, pp 85-94
56. Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic science of poison; 6° Ed.; McGrall-Hill: E.U., **2001**
57. Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japaneses and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. **1994**. 270, 414-423
58. Omura, T. Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* (**1999**) **266**, 690-698.
59. Conney, A.H. Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci* (**1986**) 39, 2493-2518
60. J. Velík., V. Baliharová., J. Fink-Gremmels., S. Bull., J. Lamka., L. Skálova. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in Veterinary Science* 76 (**2004**) 95-108
61. Pelkonen, O., Maenpaa, J., Taavitsainen, P., Rautio, A. & Raunio, H. Inhibition and induction of human cytochrome P-450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*. **1998**. 28, 1203-1253
62. Pelkonen, O. Human CYPs: in vivo and clinical aspects. *Drug Metab Rev*, 2002, 34, 37-46) (Lin, J. H. & Lu, Y. H. Inhibition and induction of cytochrome P-450 and clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **1998**, 35, 361-390
63. Robert J. Herman, MD. Drug interactions and the statins. *CMAJ* **1999**;161(10):1281-6
64. Souhaili-El Amri, H., Fargetton, X., Benoit, E., Totis, M., Batt, A.M. **1988a**. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92, 141-149.

65. Rolin, S., Souhaili-El Amri, H., Batt, A.M., Levy, M., Bagrel, D., Siest, G., **1989**. Study on the vitro bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines. *Cell Biology and Toxicology* 5, 1-14.
66. Asteinza, J., Camacho-Carranza, R., Reyes-Reyes, R.E., Dorado-Gonzalez, V., Espinosa-Aguirre, J.J., **2000**. Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9, 31-37
67. Delatour, P., Benoit, E., Besse S., Boukraa, A., **1991a**. Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in man, dogs, and rats. *Xenobiotica* 21, 217-221
68. Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Caude, I., **1991b**. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats, and cattle. *Research in Veterinary Science* 50, 134-138.
69. McKellar, Q. A., Gokbulut, C., Muzandu, K., Benchaoui, H., **2002**. Fenbendazole pharmacokinetics, metabolism, and potentiation in horses. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 1230-1239.
70. Wladyslawa A. Daniel, Maciej Syrek, Zbigniew Rylko, Jacek Wójcikowski. Effects of Antidepressant Drug on the Activity of Cytochrome P-450 Measured by caffeine Oxidation in Rat Liver Microsomes. *Pol. J. Pharmacol.*, **2001**, 53, 351-357
71. John O. Miners and Donald J Birkett. The Use of Caffeine As a Metabolic Probe for Human Drug Metabolizing Enzymes. *Gen. Pharmac.* **1996** Vol 27, No. 2, pp. 245-249,
72. Woon-Gye Cheng and Young-Nam Cha. Oxidation of Caffeine to Theobromine and Theophylline Is Catalyzed Primarily by Flavin-Containing Monooxygenase in Liver Microsomes. *Biochem and Biophys Res Comm.* (**1997**) 235, 685-688
73. Wladyslawa A. Daniel, Marta Kot, Jacek Wójcikowski. Effects of Classic and New Antidepressants on the Oxidation Pathways of Caffeine in Rat Liver In Vitro Study. *Pol. J. Pharmacol.*, **2003**, 55, 1045-1053
74. Woon-Gye Cheng, Hyung-Keun Roh, Hwan-Mook Kim, Young-Nam Cha. *Chemico-Biological Interactions* 113 (**1998**) 1-14

75. Jacqueline Ramírez, Federico Innocenti, Erin G. Schuetz, David A. Flockhart., Mary V. Relling, Raymond Santucci., Mark J. Ratain. CYP2B6, CYP3A4, AND CYP2C19 are Responsible for the in vitro N-demethylation of Meperidine in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 32, **2004**, 930-936
76. Éva Szökó., Tamás Tábi., Tímea Borbás., Balázs Dalmadi., Károly Tihanyi., Kálman Magyar. Assessment of the N-oxidation of deprenyl, methamphetamine, and amphetamine enantiomers by chiral capillary electrophoresis: An in vitro metabolism study. *Electrophoresis* **2004**, 25, 2866-2875.
77. Donato, M.T. & Castell, J.V. (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P-450 in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* **42**, 153-178.
78. Gabriele Cruciani., Emanuele Carosati, Benoit De Boeck, Kantharaj Ethirajulu, Claire Mackie, Trevor Howe, and Riccardo Vianello. MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6970-6979.
79. S. A. Kulkarni, J. Zhu, & S. Blechinger. In silico techniques for the study and prediction of xenobiotic metabolism: A review. *Xenobiotica*, October/November **2005**; 35(10/11): 955–973.
80. Nedelcheva, V. & Gut, I. (1994) P-450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**, 1151-1175.
81. Pearce, R., Gateway, D. & Parkinson, A. (1992) Species differences and inter-individual variation in liver microsomal cytochrome P-450A enzymes: effects on coumarin, dicoumarol and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys* **298**, 211-225.
82. Lin, J.H. (1998) Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* **26**, 1202-1212.
83. R. Zuber, Eva Anzenbacherová, P. Anzenbacher, Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J.Cell.Mol.Med.* Vol 6, No 2, **2002** pp. 189-198.
84. Jiunh H Lin. Species Similarities and Differences in Pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol 23 No 10. **1995**. pp. 1008-1020.

85. R. Meyer, Veronika. University of Berne. Practical High-performance Liquid Chromatography. John Wiley and Sons. **1998**. pp 1, 85-87, 132-141.
86. Verónica R. Meyer. Practical High-performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons. University of Berne. **1988**.
87. Antonio Hernández Martínez. Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo. Tesis para obtener el título de Q.F.B. U. N. A. M. **2006**.
88. Cedillo Rivera, B. Chávez, M. Espinosa-Castellano, A. Ramírez and Martínez Palomo. Effects of Albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Trophozoites. Archives of Medical Research, **1992**, 23, p. 63-67
89. Cedillo Rivera, R Muños O.J. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemoterapeutic agents. Med Microbiol., **1992**, 37, 221
90. 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
91. Yépez, L.; Morales, R.; Viveros, R.; Cedillo, R.; Hernández, F.; Hernandez, A.; Muñoz, O.; Castillo, R. Evaluation of Albendazole Prodrugs in Experimental Trichinellosis. *Archives of Medical Research*, **1999**, 30, 368-374.
92. A. C. Kotze., Cytochrome P450 Monooxygenase Activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). International Jorunal for Parasitology, Vol 27, No. 1. **1997**. 33-40
93. Ralph Menzel, Matthias Rödel, Jana Kulas, Christian E.W. Steinberg. CYP35: Xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Archives of Biochemistry and Biophysics 438 (**2005**) 93–102
94. Dominique Kerboeuf et al., In vivo metabolism of aminopyrine by the larvae of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. Parasitol Res (**1995**) 81: 302-304
95. BeilsteinOrganische Chemie, Band XII, 626.
96. Roberts et al., *J. Org. Chem.* 24, 654-659, **1959**
97. BeilsteinOrganische Chemie, Band XII, 733-734.

10. APÉNDICES

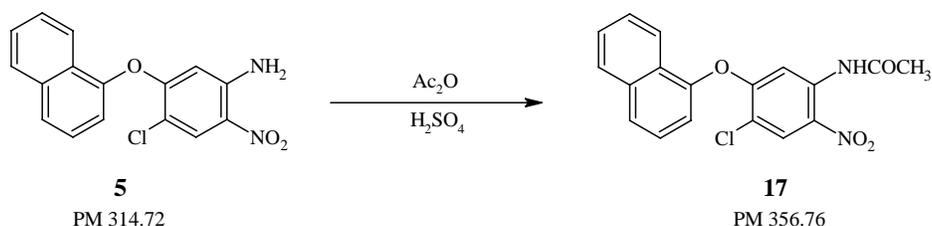
En este apartado esta dividido en dos partes, la primera parte corresponde a los intentos para la síntesis de un compuesto alterno, el isomero del compuesto **HSK**. En la parte dos de presentan los espectros que ayudaron a la identificación de los compuestos sintetizados.

Apéndice I. Síntesis del compuesto 6-Cloro-1-metil-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo

En este proyecto de investigación también se pretendió obtener el compuesto 6-Cloro-1-metil-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo, el cual es un isómero estructural del **HSK** y a lo largo del trabajo realizado se utilizaron diferentes técnicas para su obtención, sin embargo, la obtención de dicho compuesto no fue satisfactoria. A continuación se presentan los estudios realizados.

Secuencia sintética para la preparación de [6-Cloro-1-metil-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo

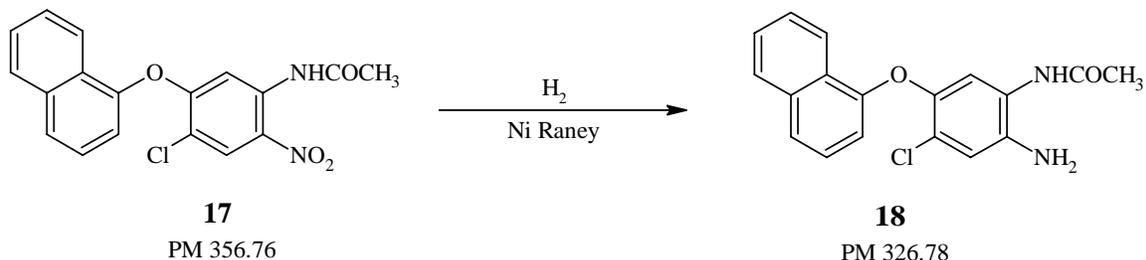
4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroacetanilida (**17**)



En un vaso de precipitados, acondicionado con agitación magnética y termómetro, se mezclaron 20 g (0.0636 mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina y 25.95 g (18.664 mL, 0.2542 mol) de anhídrido acético con dos gotas de H₂SO₄. La mezcla se calentó a 70 °C con agitación constante. Después de 45 min se comprobó por ccf el consumo total

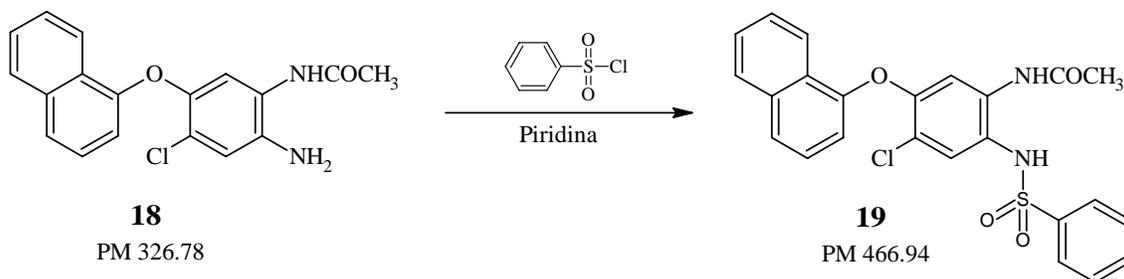
de la materia prima, dando una sola mancha con un R_f de 0.904 (Sistema II). Se obtuvieron 19 g (83.8 %) de un sólido amarillo. Una muestra se recrystalizó de tolueno dando cristales amarillos con $pf = 177.6-178.5^\circ\text{C}$.

2-Amino-4-cloro-5-(1-naftiloxi)acetanilida (18)



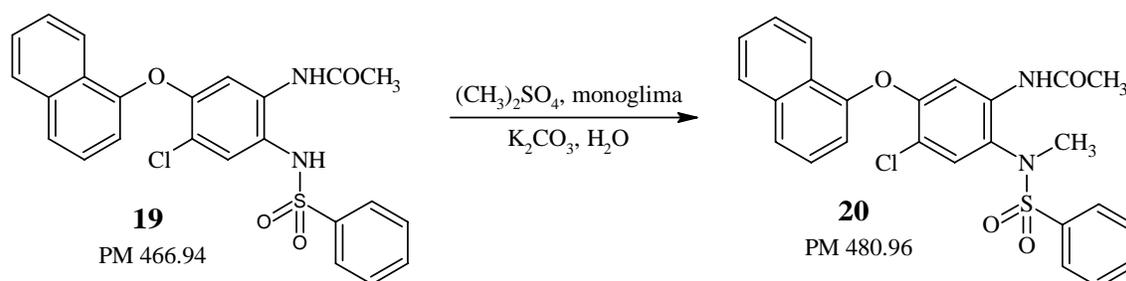
En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron cuidadosamente, bajo atmósfera de N_2 , 10 g (0.0280 mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroacetanilida, 3 g de Ni-Raney (al 30%), y 200 mL de acetato de etilo y 50 mL de MeOH. Posteriormente, la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó el sistema mediante 3 lavados de 30 lb/in² de H_2 ; después, se cargó el reactor con 40 lb/in² de H_2 y se inició la agitación. La reacción terminó en 3.16 h, consumiéndose un total de 148 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 9.1 g (91%) de un sólido rojizo ladrillo. Una muestra se recrystalizó de EtOH/ H_2O dando unos cristales color ocre. La ccf mostró una mancha con R_f de 0.49 (Sistema II) y p.f. de 178.8-180 °C.

4-Cloro-2-[(fenilsulfonil)amino]-5-(1-naftiloxi)acetanilida (19)



En un matraz bola de 250 mL de una boca, acondicionado con agitación magnética y un termómetro, se disolvieron 9.3 g (0.0282 mol) de **18** en piridina (3.0 mL, 0.037 mol, 1.3 Eq). A la mezcla anterior se le agregó, gota a gota, mediante un embudo de adición y cuidando que la temperatura se mantuviera entre 30-35 °C, el cloruro de bencensulfonilo. Al terminar la adición se dejó reaccionar por 20 min más comprobándose el consumo de la materia prima. Se vertió sobre 100 g de hielo-agua y precipitó un sólido color crema, el cual se lavó repetidas veces con ácido acético al 20 % para eliminar el exceso de piridina, se lavó con agua y se dejó secar al vacío dando 12 g (91.3 %). Una muestra se recrystalizó de EtOH/H₂O dando 7.1 g (54%) de unos cristales color mamey con $R_f = 0.35$ (sistema II) y $pf = 207.8-208.8$ °C.

4-cloro-2-[metil(fenilsulfonil)amino]-5-(1-naftiloxi)acetanilida (**20**)



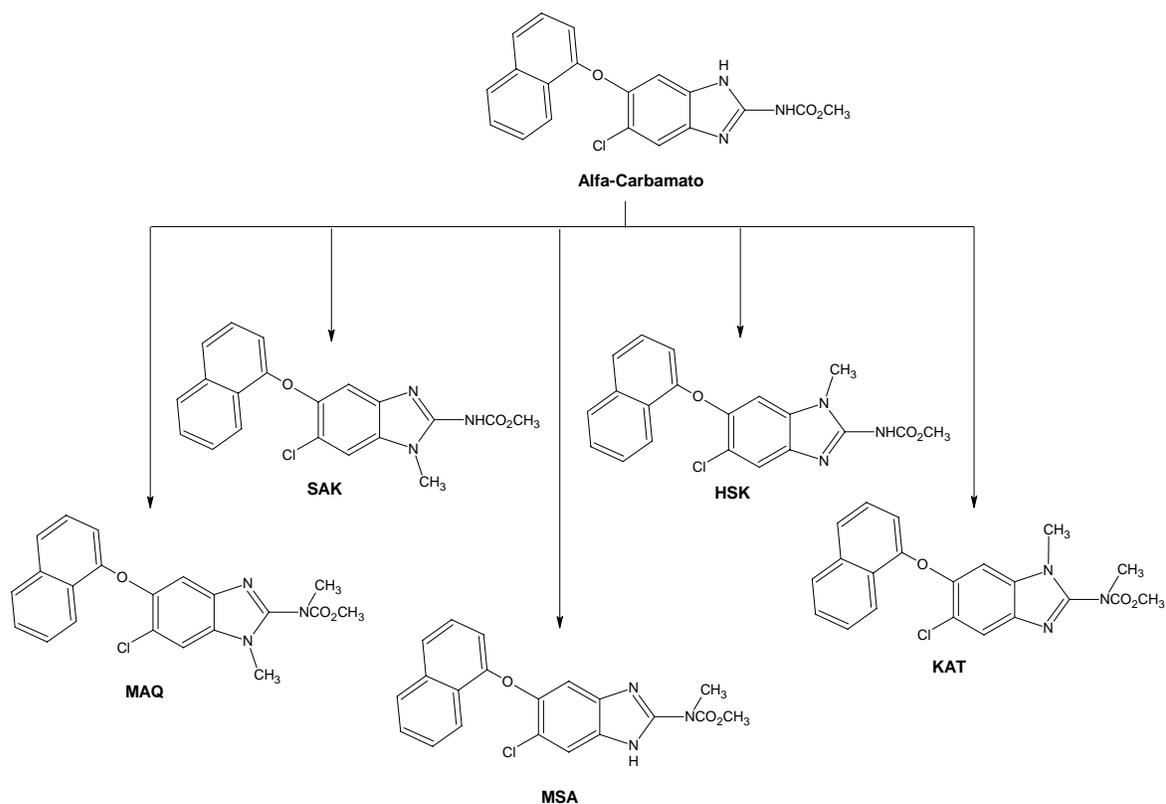
En un matraz bola de 100 mL con dos bocas 20/40, adaptado con agitación magnética y termómetro, se adicionaron 3 g (0.0064 mol) de **19**, 1.216 g (9.64×10^{-3} mol, 1.5 eq, 0.92 mL) de sulfato de dimetilo y 10 mL de monoglima. La mezcla anterior se calentó a 30°C por medio de un baño de agua, se formó una solución que se agitó vigorosamente mientras se le goteó una solución saturada de K₂CO₃, 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 50 g de hielo-agua. Se formó un aceite viscoso que se lavó repetidas veces con agua salada. Posteriormente se congeló y trituró en un mortero. Se obtuvieron 2.8 g (90.6 %) de un sólido oscuro que en ccf mostró una mancha con $R_f = 0.76$ (Sistema IV). Una muestra se recrystalizó de metanol y dio cristales color crema con $pf = 154.7-155.8$ °C.

Una vez obtenido el compuesto **20**, se realizaron las pruebas de hidrólisis del grupo sulfonamido por diferentes técnicas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 15**. En la cual se utilizaron técnicas descritas con anterioridad, sin embargo, en ninguno de los casos se logró obtener el compuesto deseado.

Tabla 15: Condiciones de reacción para la hidrólisis del grupo sulfonamida

CONDICIONES	TIEMPO DE REACCION	RESULTADOS
H ₂ SO ₄	1 SEMANA	MEZCLA
H ₂ SO ₄ /H ₂ O	1 SEMANA	MEZCLA
HBr	1 SEMANA	MEZCLA

Ya que la reacción de hidrólisis no se logró completar se cambió de técnica para obtener el isómero correspondiente. En esta ocasión se partió del compuesto **Alfa-Carbamato** y se realizó una *N*-metilación para generar al compuesto de interés. Sin embargo como se muestra en el **Esquema 6**, son 5 posibles compuestos los que se podrían obtener de esta reacción.



Esquema 6: Productos posibles de la reacción de *N*-metilación del Alfa-Carbamato.

Una vez realizada la reacción a 10-15°C, con agitación constante y con dimetilsulfóxido y carbonato de potasio, se obtuvieron 4 productos. Se realizó una placa preparativa para la identificación individual de cada uno de los productos y una vez que se logró aislar el compuesto principal (y que presentó un mayor *R_f*) se analizó por RMN. La identificación mediante el espectro de RMN no era concluyente, ya que los desplazamientos químicos concordaban con el compuesto **SAK**. **Figura 26**.

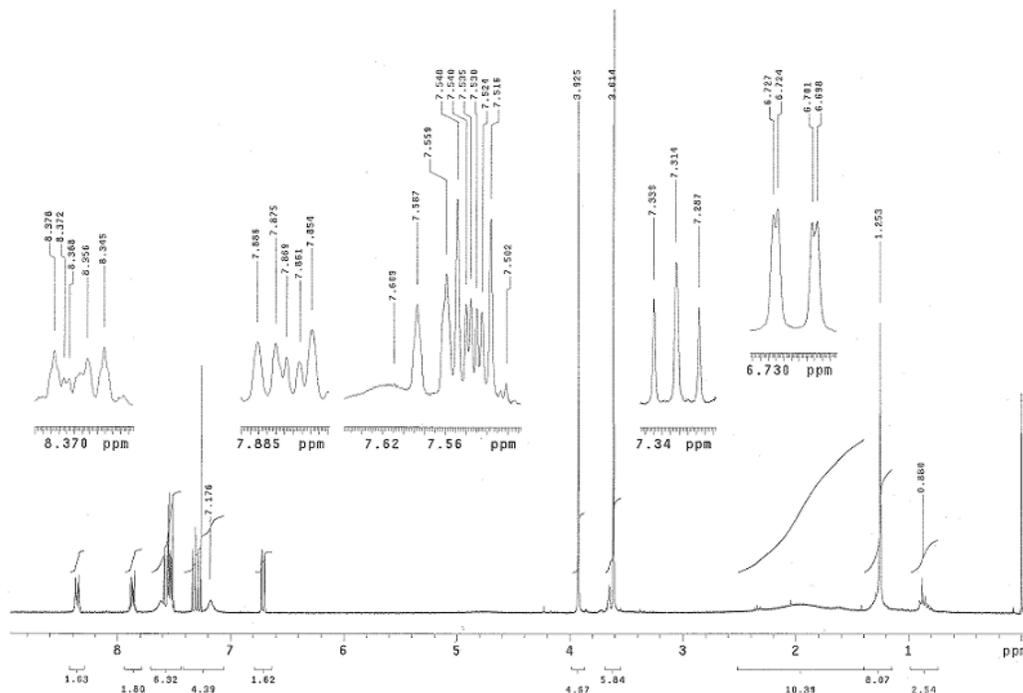


Figura 26: Espectro deRMN del compuesto **MSA**

Sin embargo el espectro de EM fue determinante para la identificación del producto mayoritario. Se obtuvo que el compuesto principal estaba monometilado. En base al patrón de fragmentación la conclusión a la que llegamos fue que el producto mayoritario es el compuesto **MSA**. Como podemos observar en la **Figura 27**, los picos más importantes de fragmentación del compuesto de interés tienen una relación m/z de 381, 346, 322, 286 y 259.

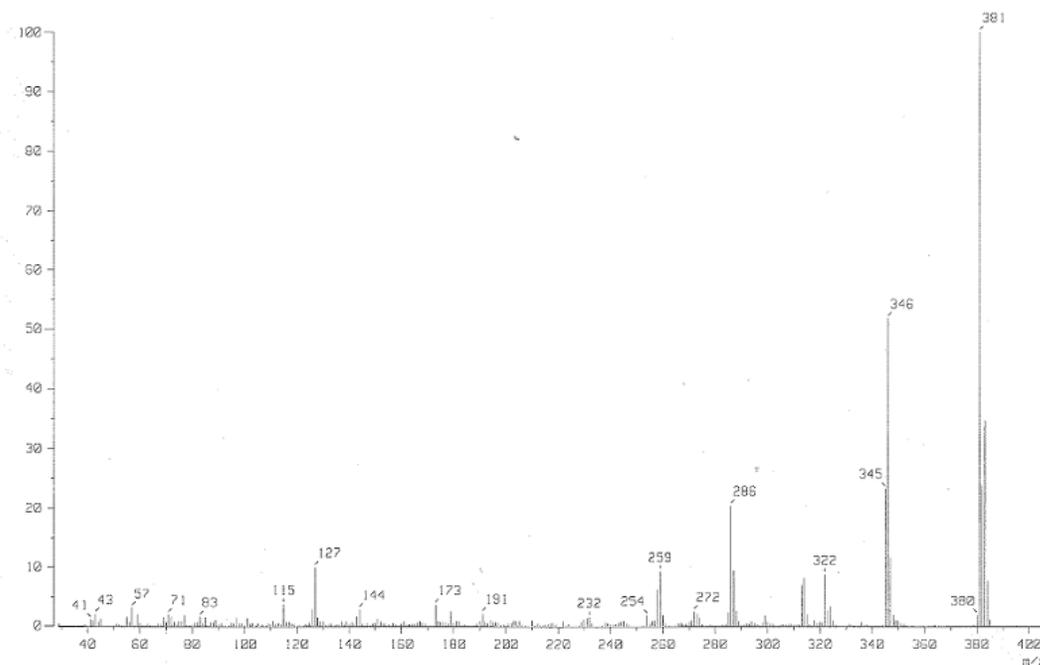
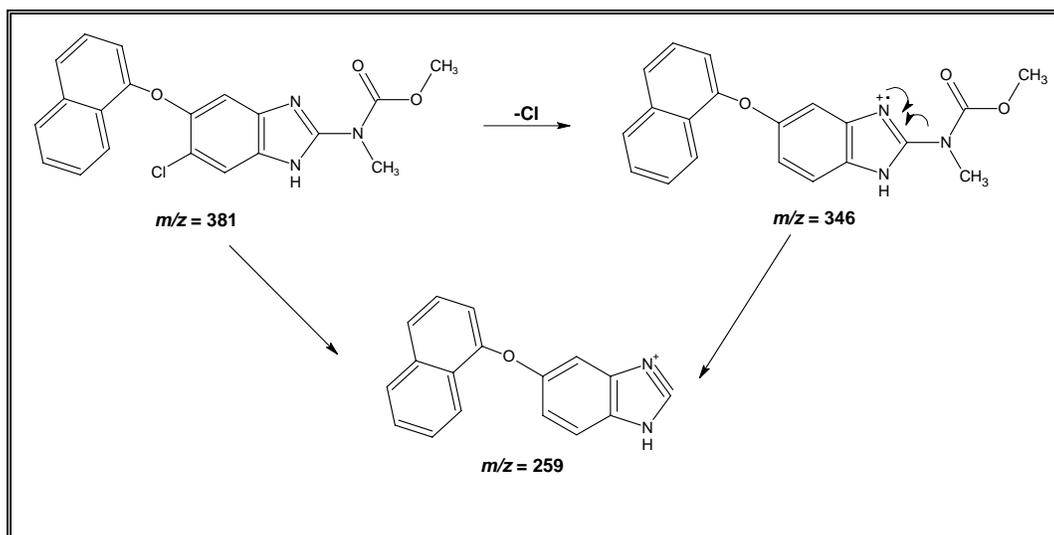


Figura 27: Espectro de masas del compuesto MSA

El pico de 381 es el ion molecular y la información que nos proporciona es que el compuesto es monometilado. La pérdida de 35 unidades de masa, correspondiente a la pérdida del cloro de la molécula, genera el pico de 346 unidades de masa. El pico de 322 unidades de masa se genera a partir de la pérdida de 59 unidades de masa, lo que genera el compuesto 2-amino. El pico con m/z 286 es generada a partir del fragmento m/z 322 el cual pierde cloro. Finalmente el fragmento con relación m/z de 259 es generado por la pérdida de 109 unidades de masa, correspondientes a la pérdida de cloro y del carbamato de metilo como se muestra en el **Esquema 7**.



Esquema 7: Mecanismo que explica la fragmentación del compuesto **MSA** para generar el fragmento con relación $m/z = 259$

Aunado a esto, el NOESY mostró las interacciones que se presentan entre ambos metilos.

Figura 28.

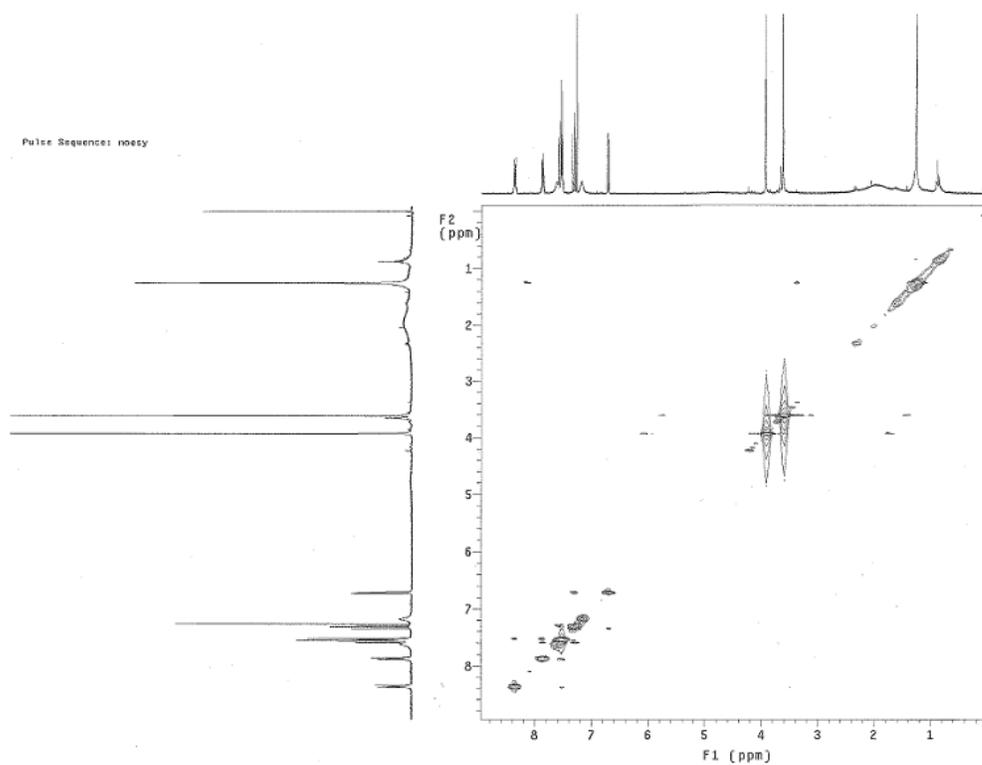
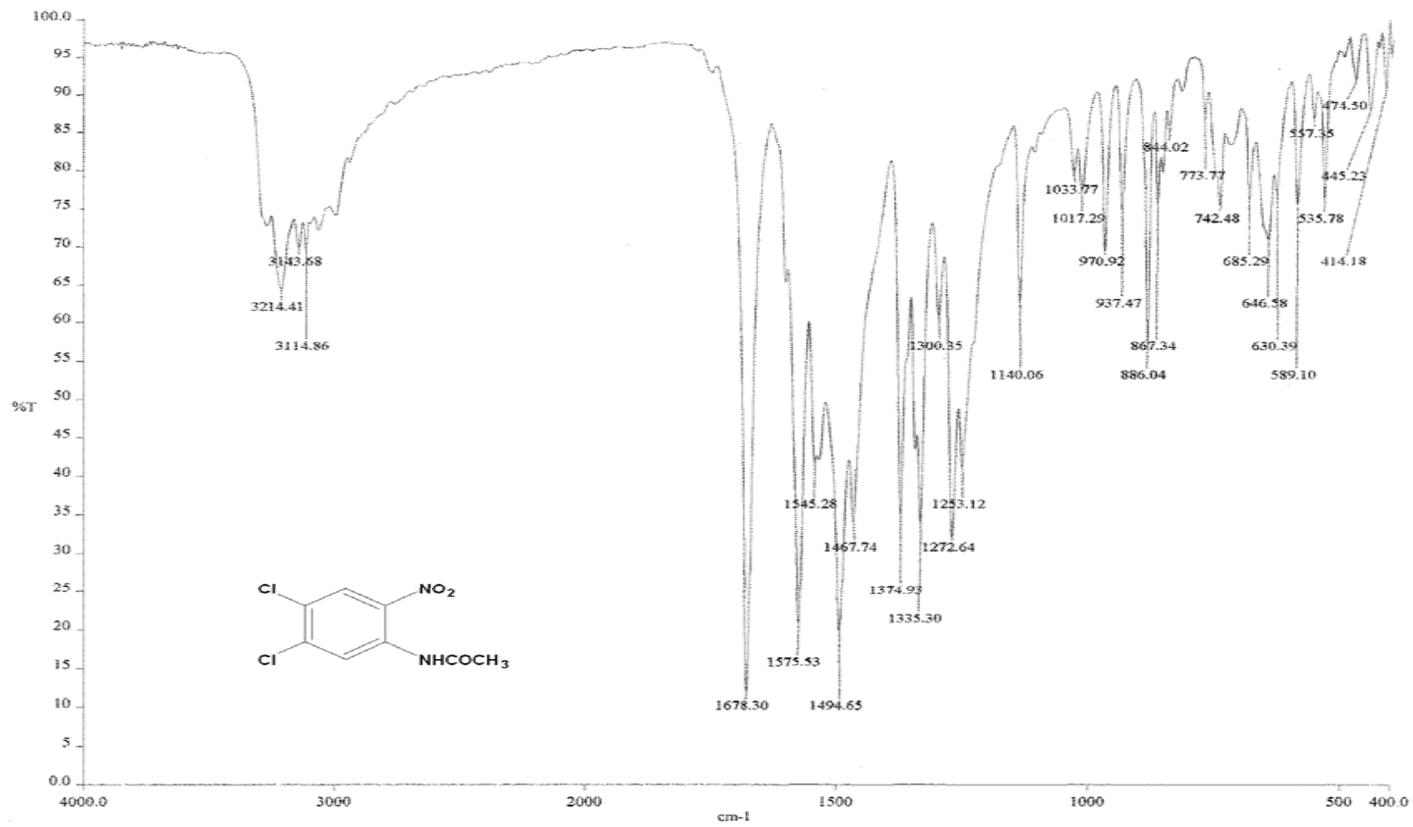
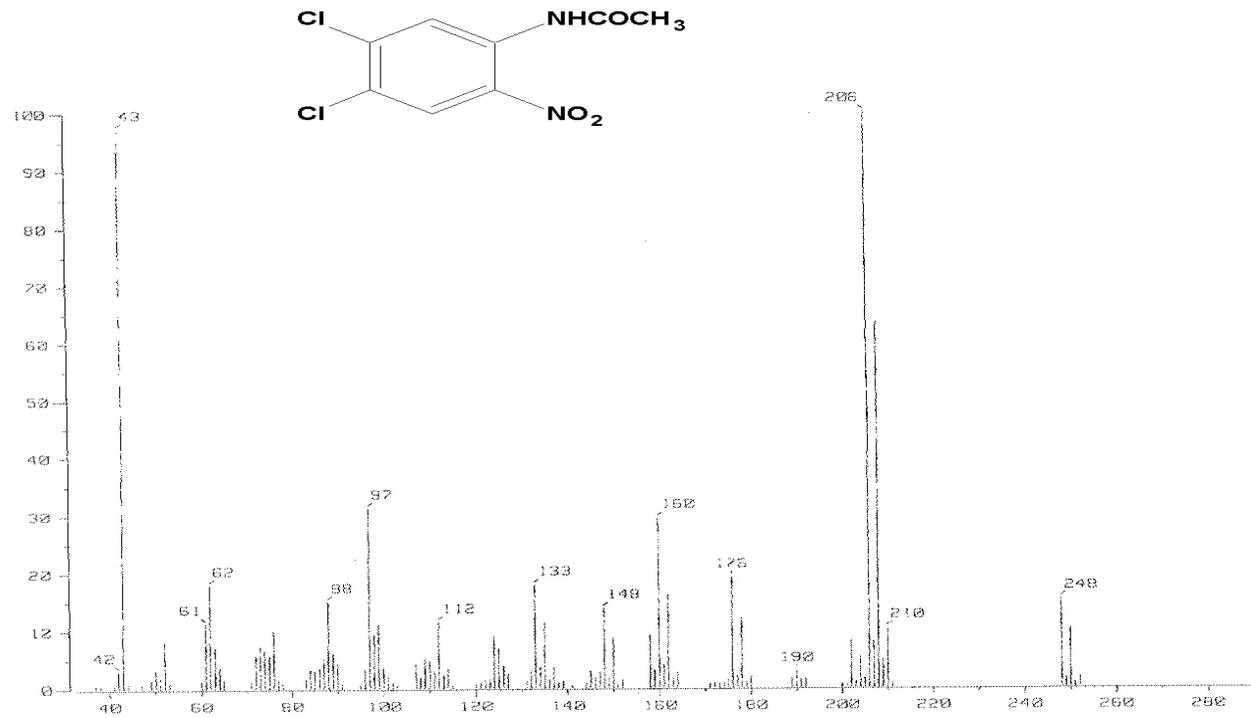


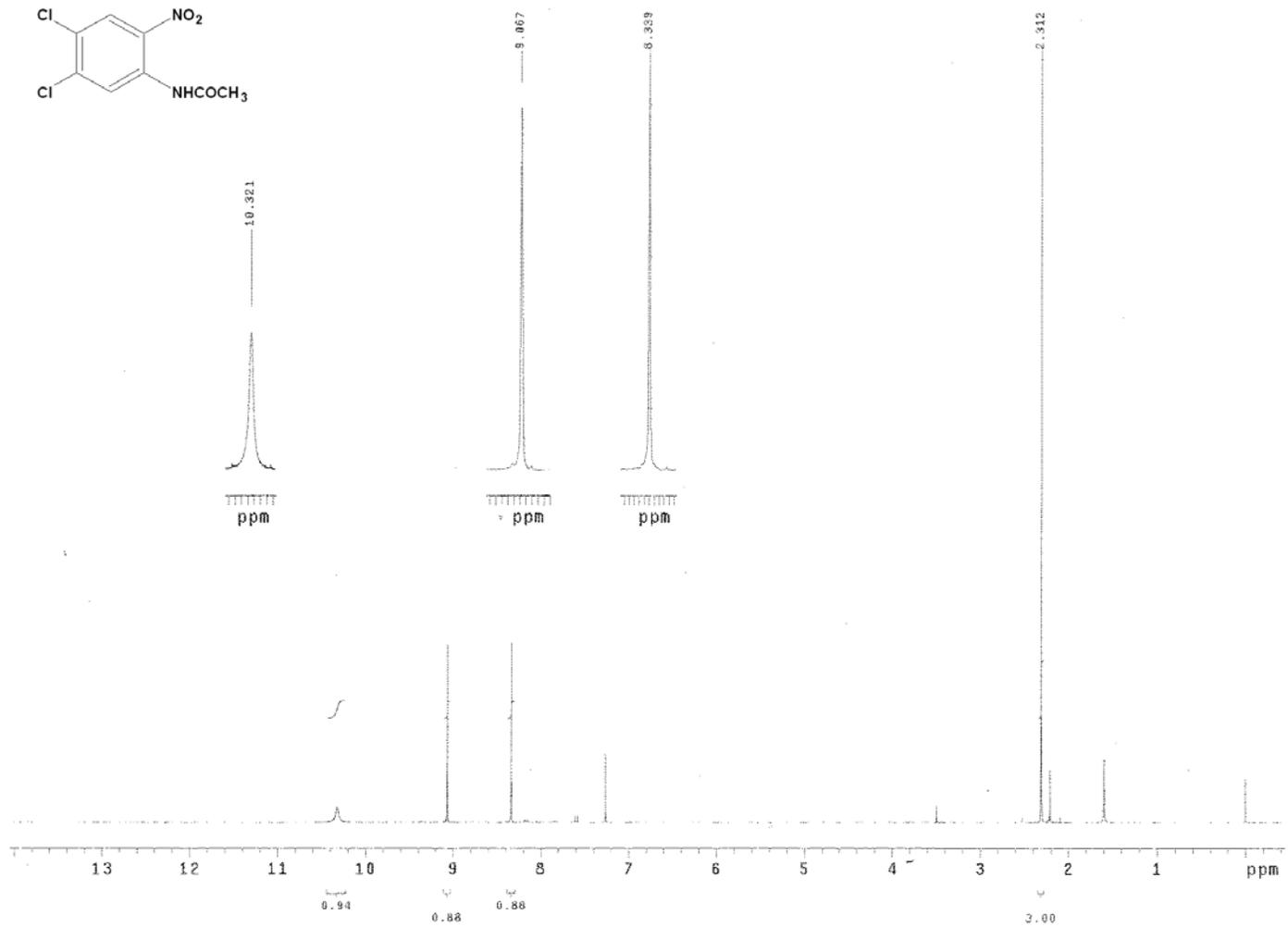
Figura 28: Espectro de NOESY del compuesto **MSA**



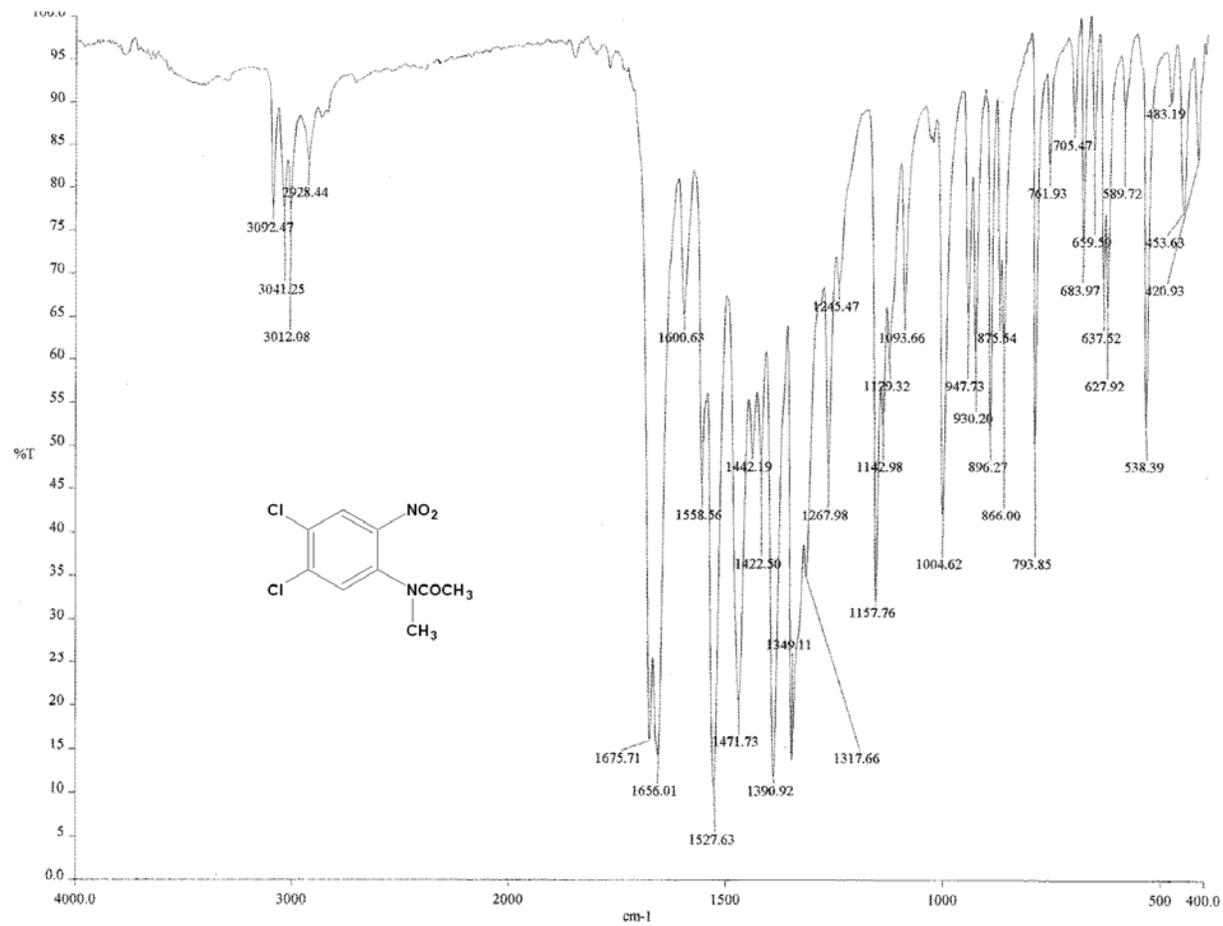
Espectro No. 1. IR (KBr) cm⁻¹: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)



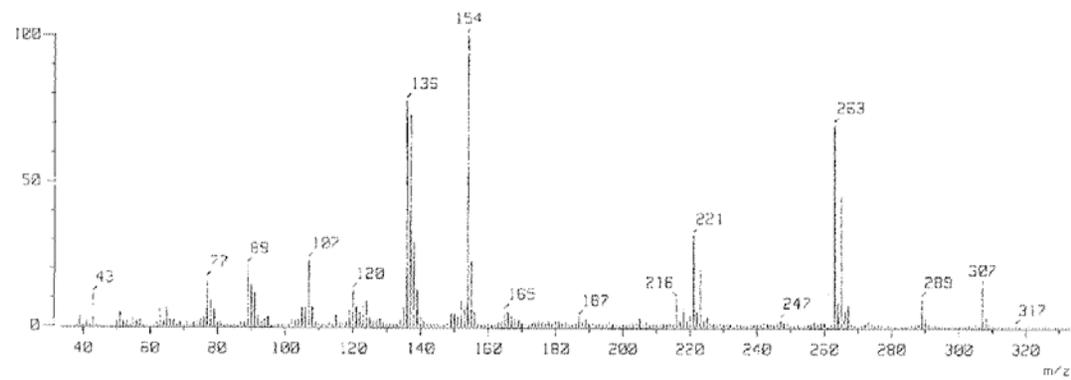
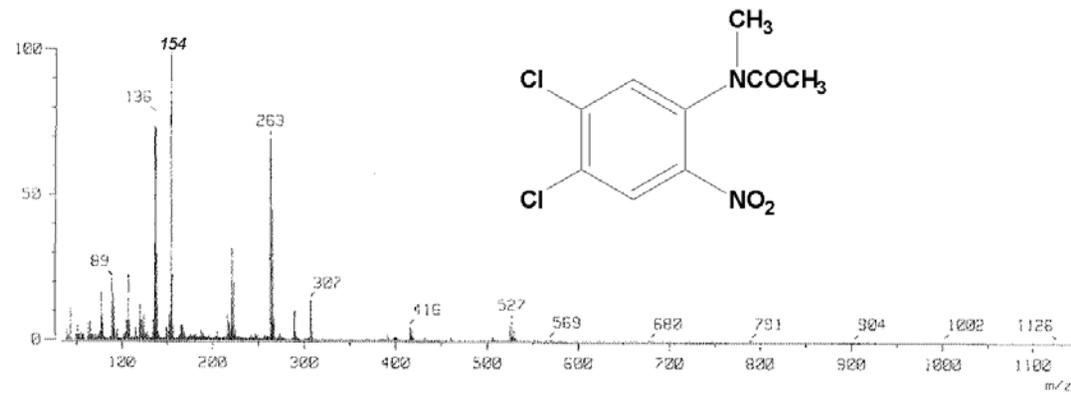
Espectro No. 2. EM (IE/ID) *m/z*: N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)



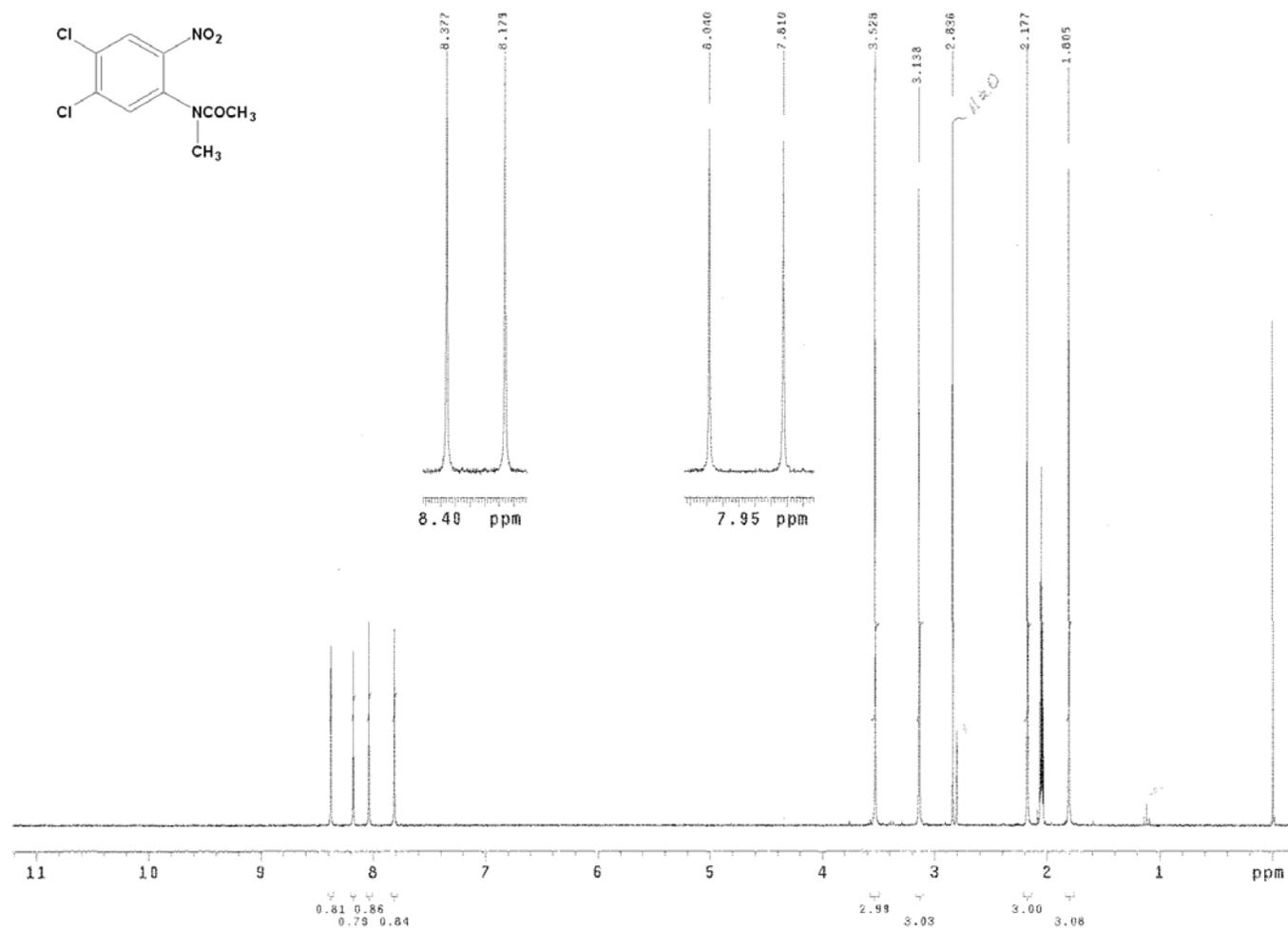
Espectro No. 3. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)



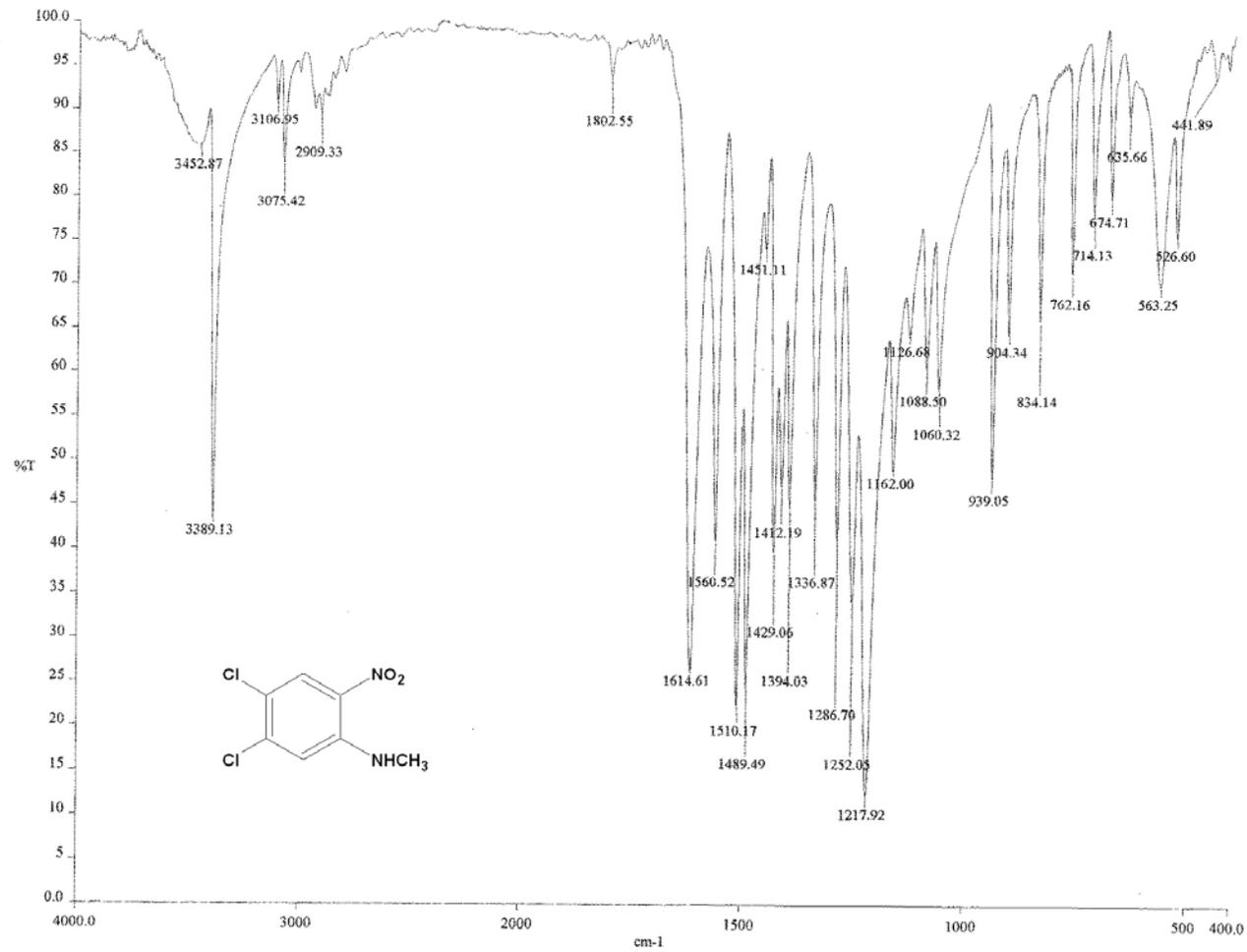
Espectro No. 4. IR (KBr) cm⁻¹: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8)



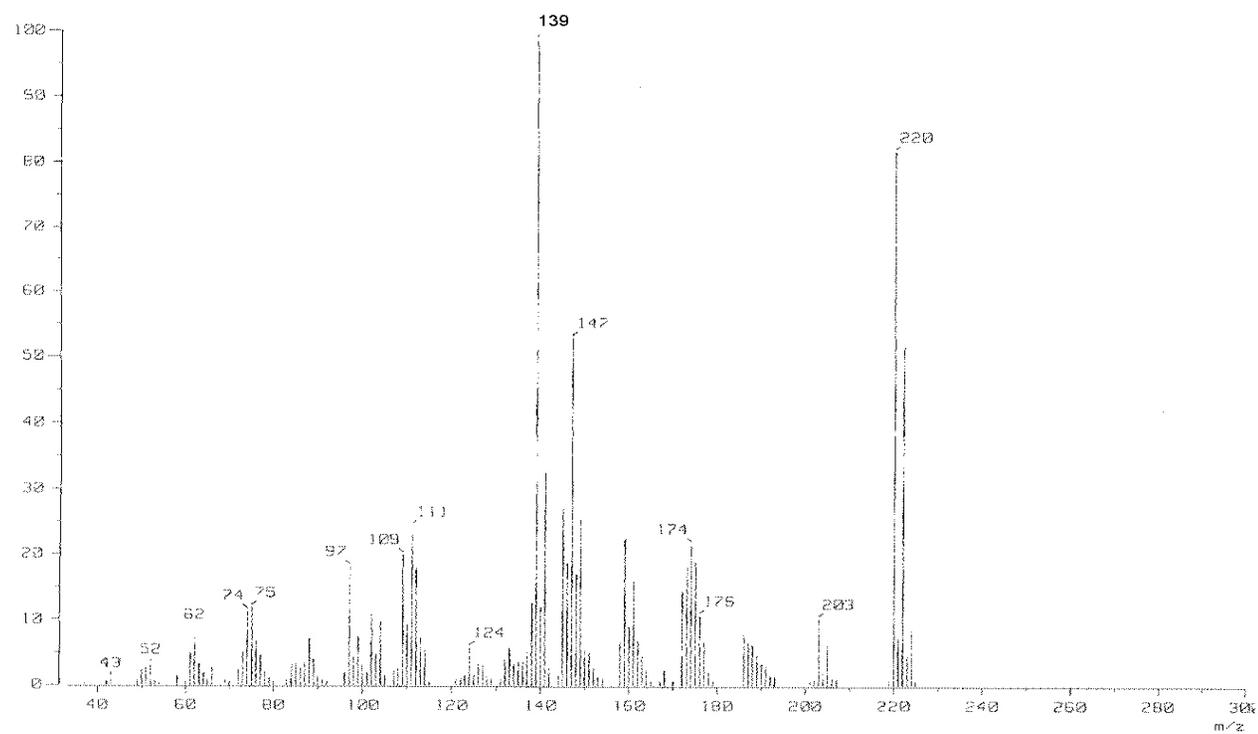
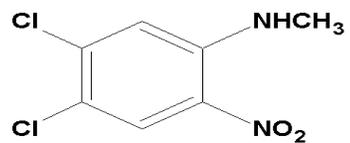
Espectro No. 5. EM (IE/ID) *m/z*: N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-N-metilacetamida (8)



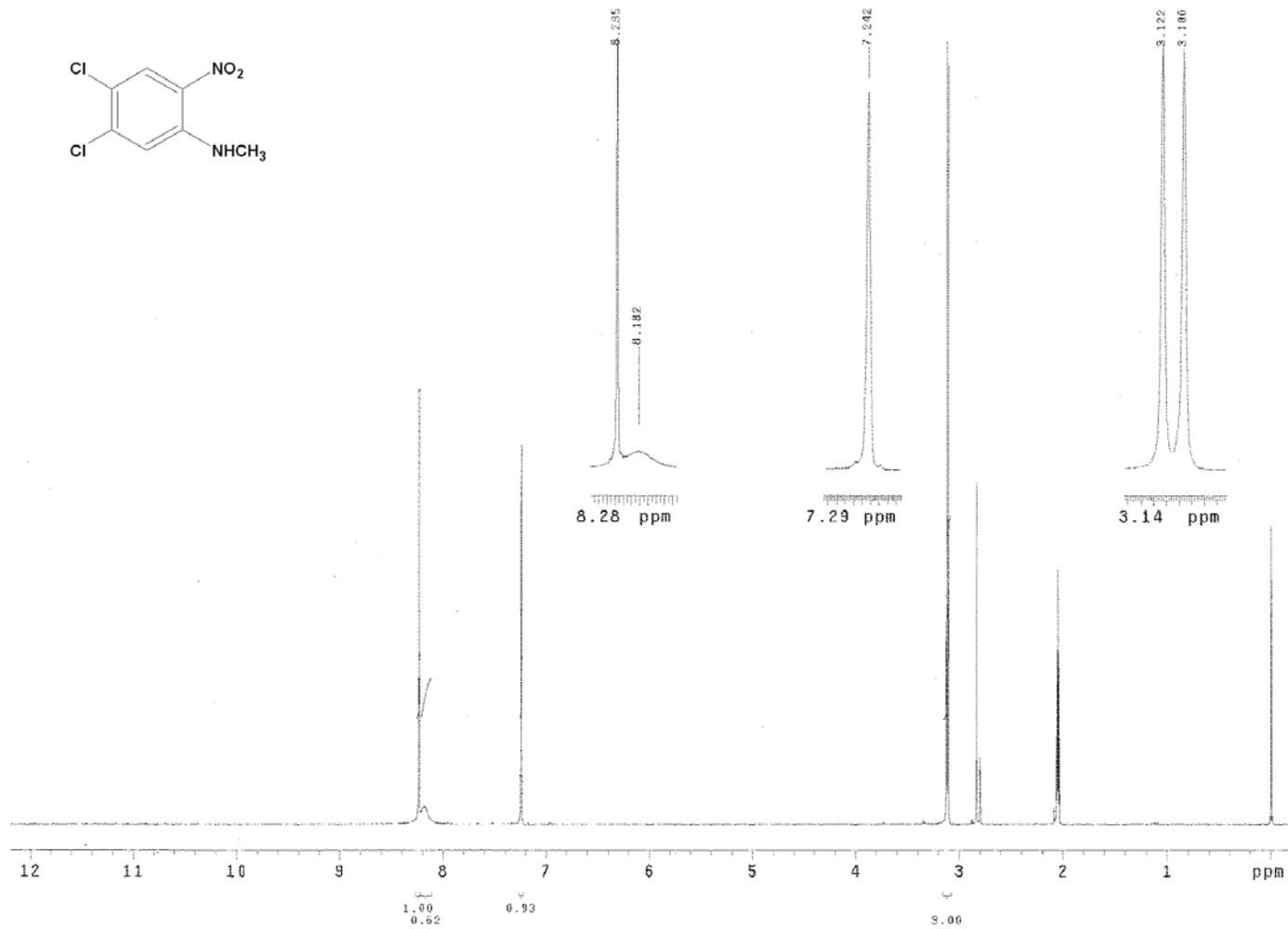
Espectro No. 6. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (8)



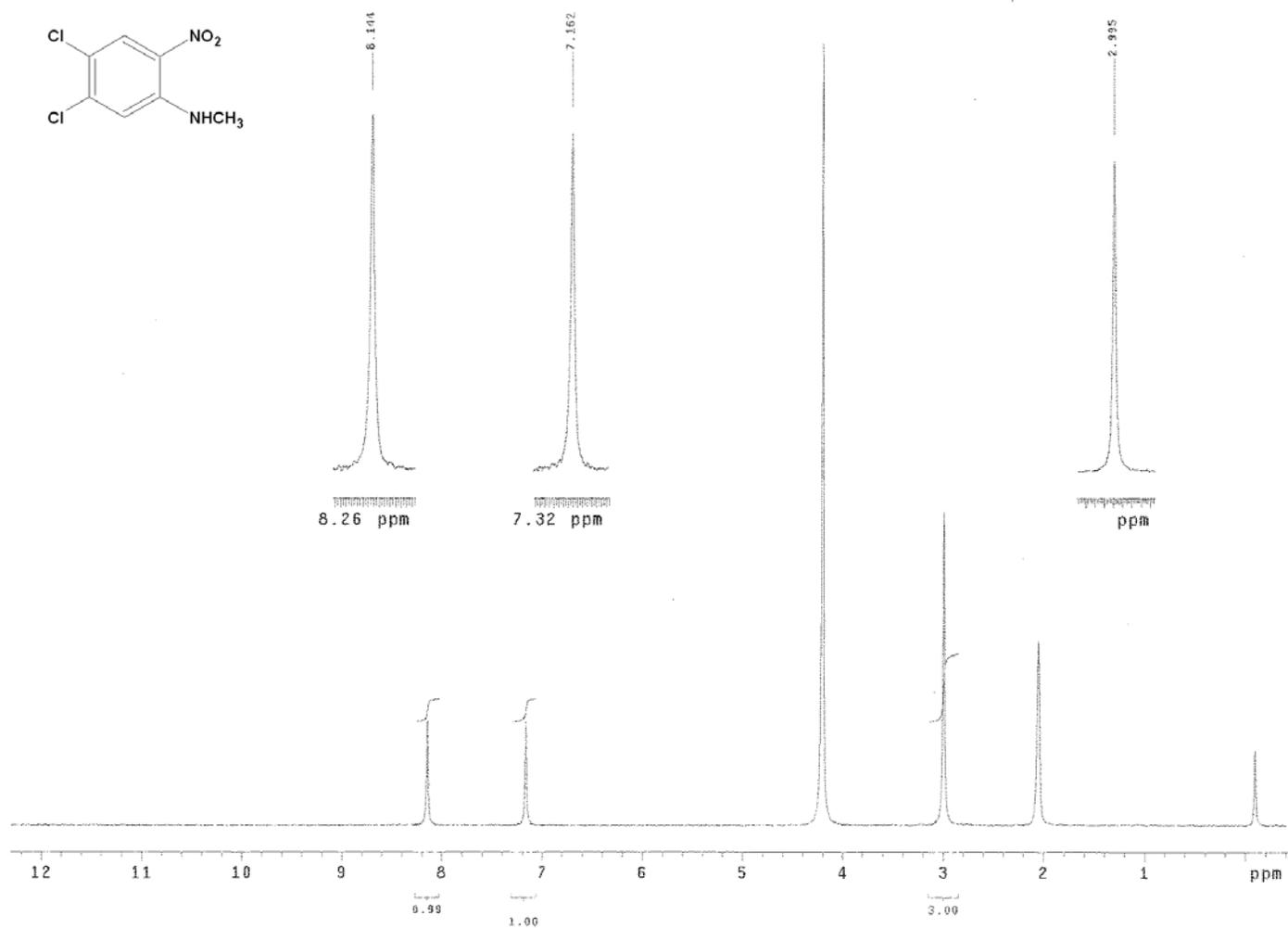
Espectro No. 7. IR (KBr) cm⁻¹: N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-N-metilamina (9)



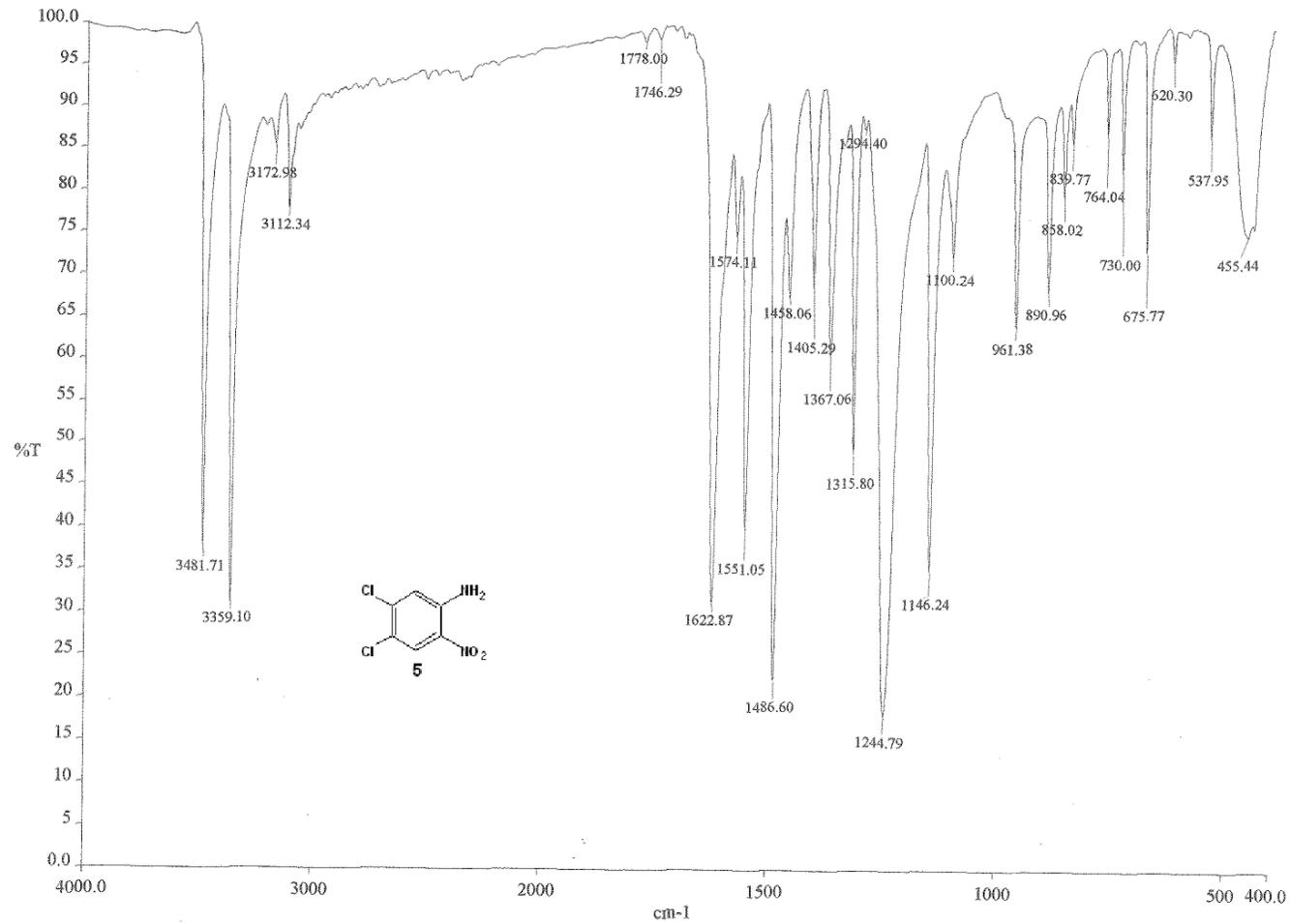
Espectro No. 8. EM (IE/ID) m/z : *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)



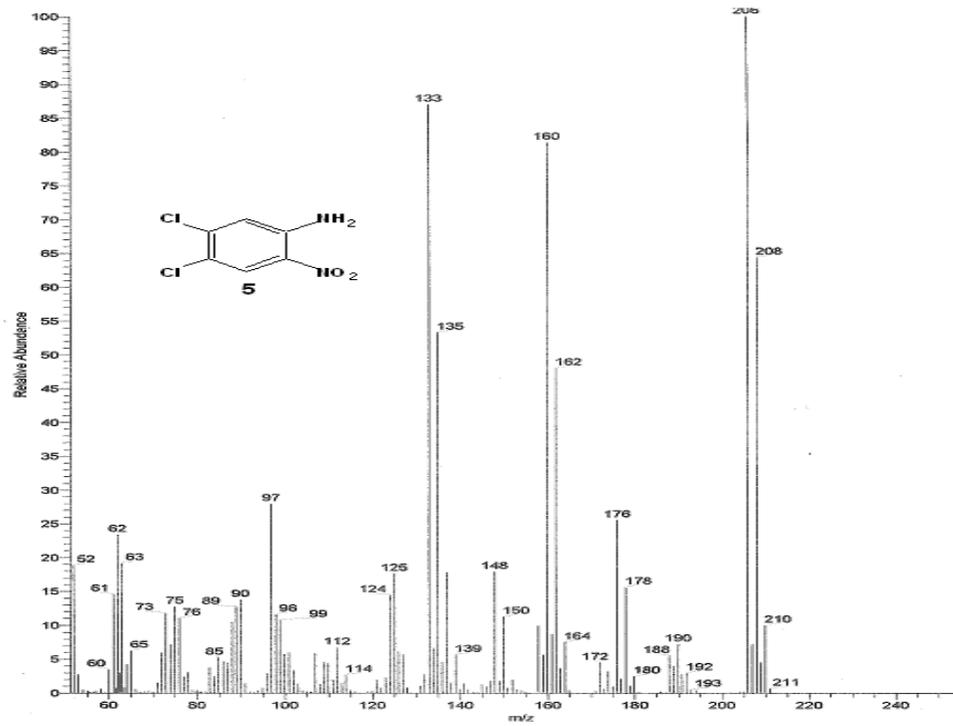
Espectro No. 9^a. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)



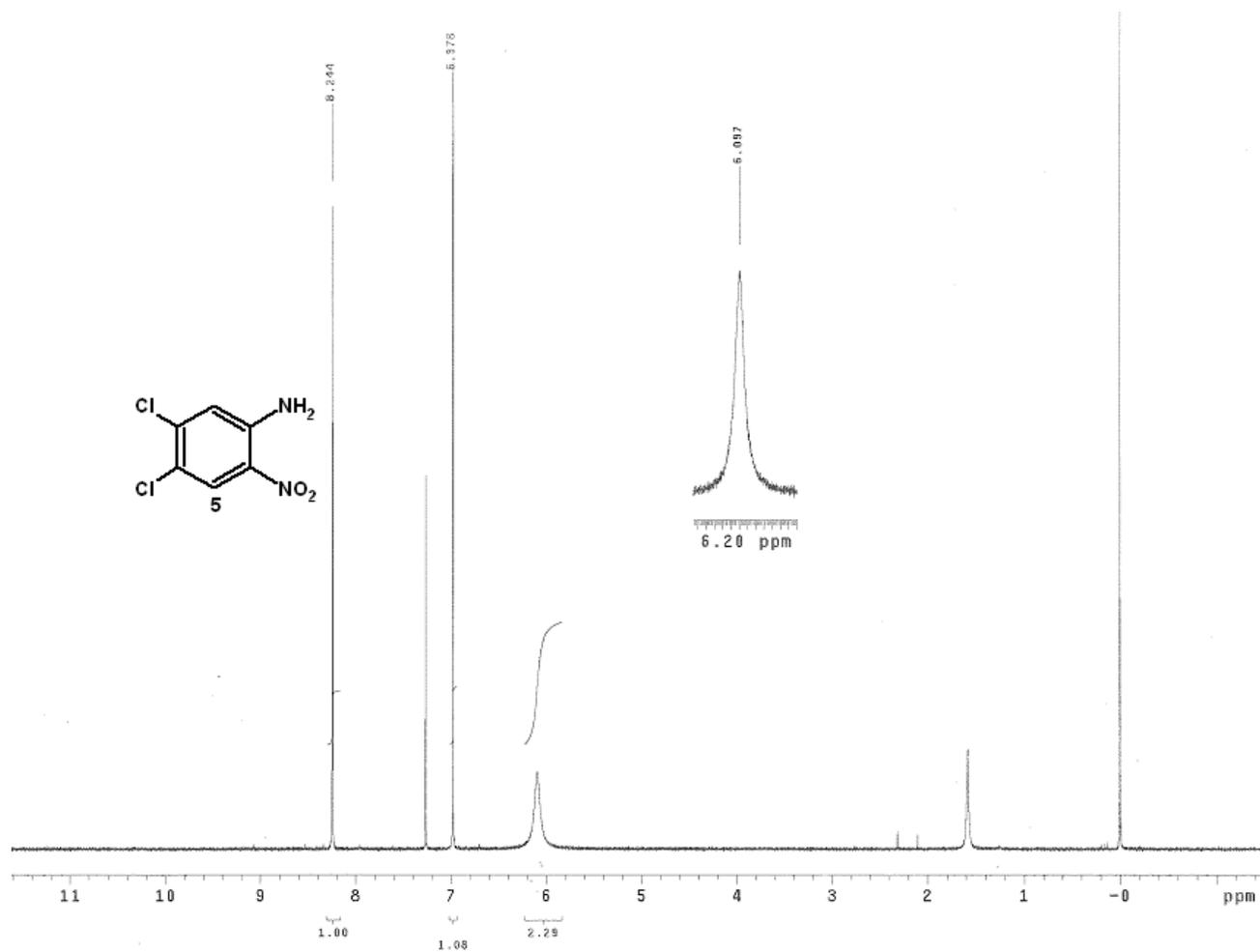
Espectro No. 9^b. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (9)



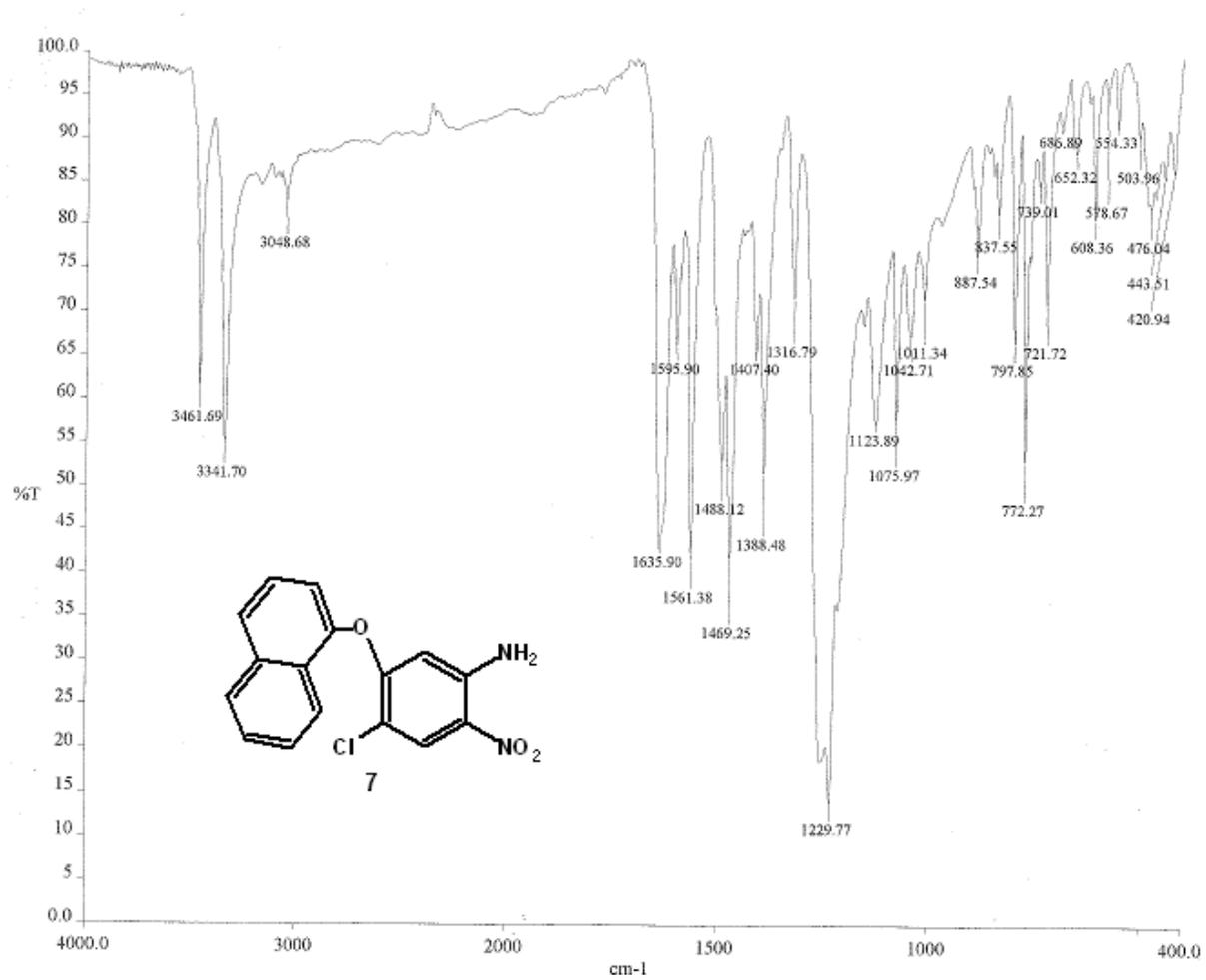
Espectro No. 10. IR (KBr) cm⁻¹: 4,5-dicloro-2-nitro-anilina (4)



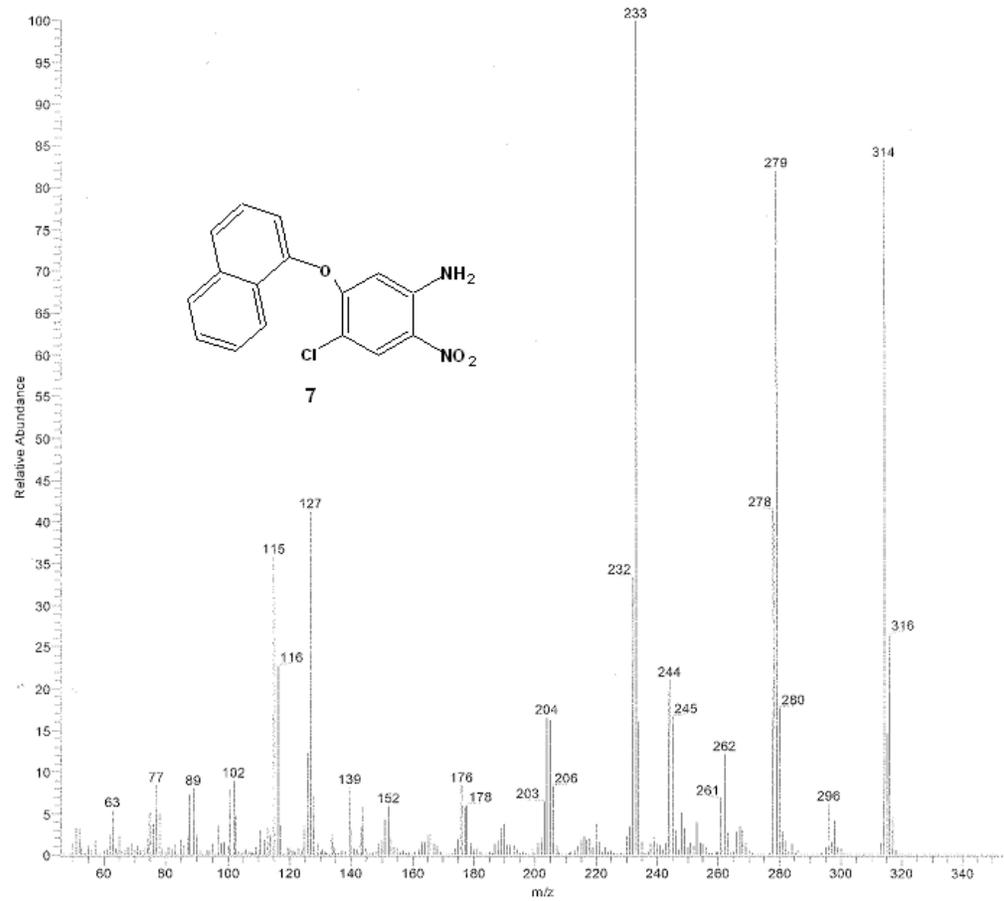
Espectro No. 11. EM (IE/ID) m/z : 4,5-dicloro-2-nitro-anilina (4)



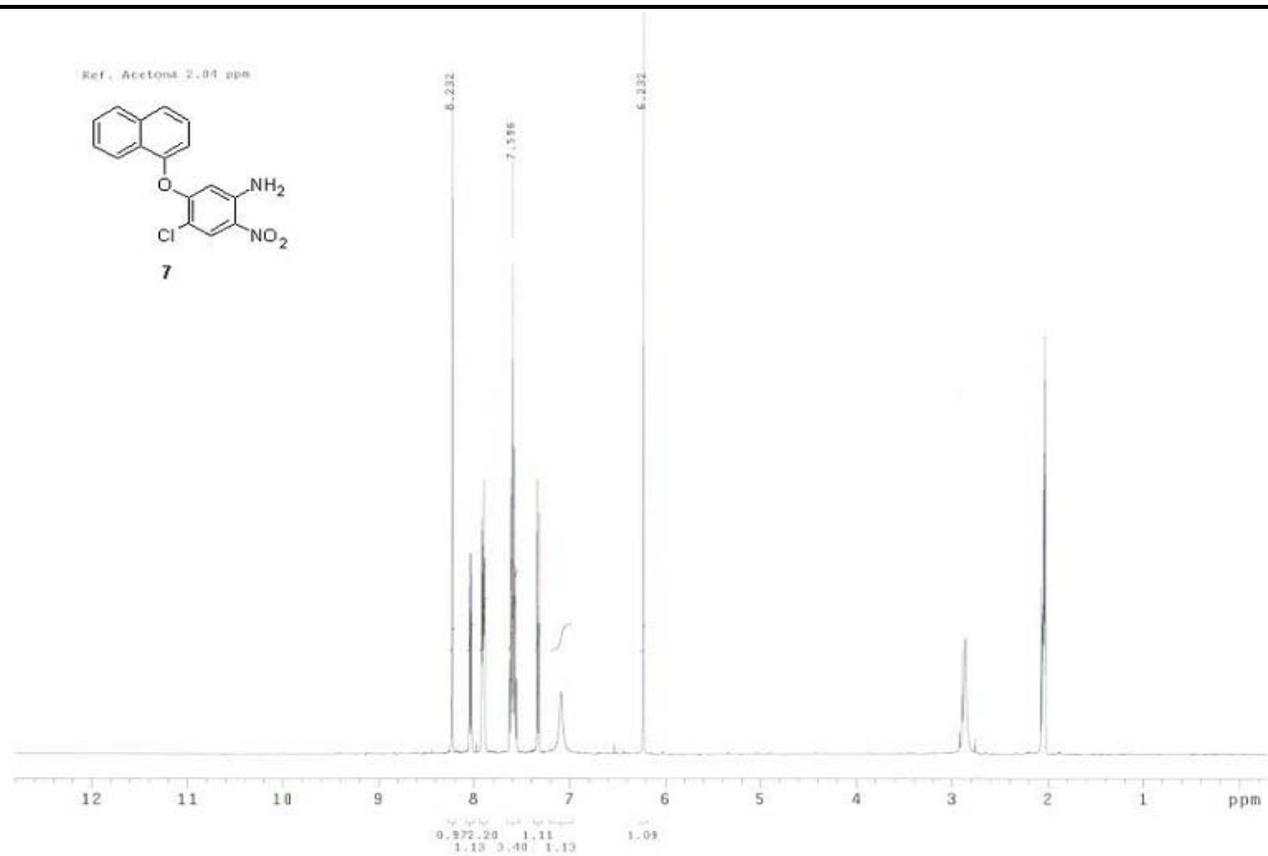
Espectro No. 12. RMN ¹H (CDCl₃, TMS) ppm: 4,5-dicloro-2-nitro-anilina (4)



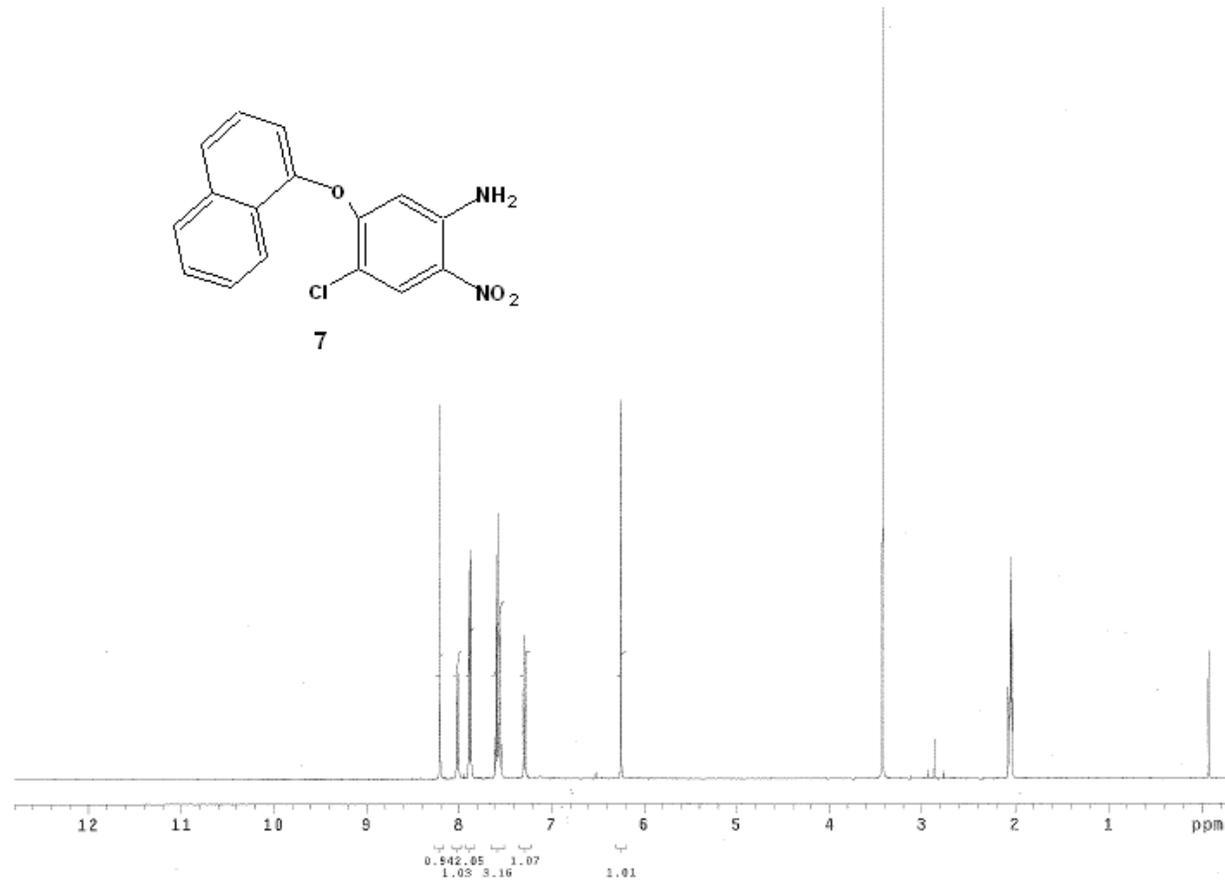
Espectro No. 13. IR (KBr) cm⁻¹: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)



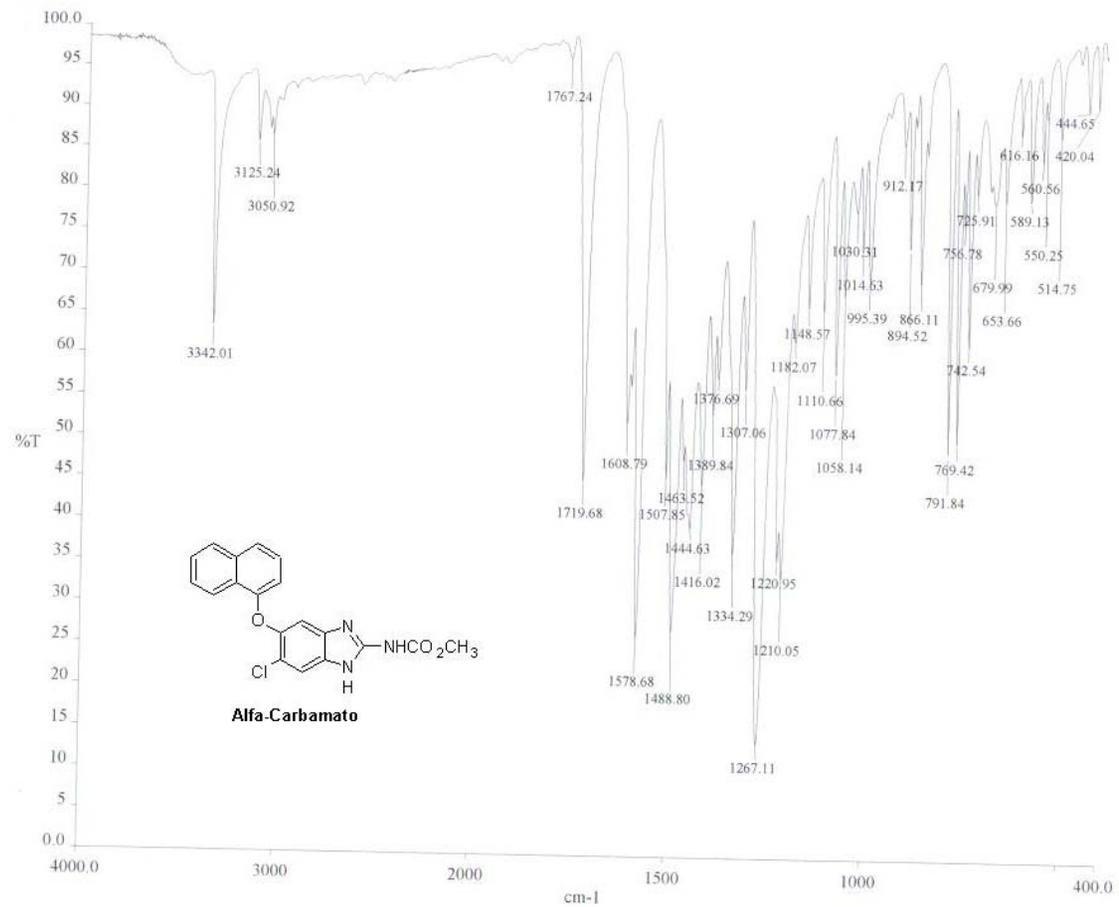
Espectro No. 14. EM (IE/ID) m/z : 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)



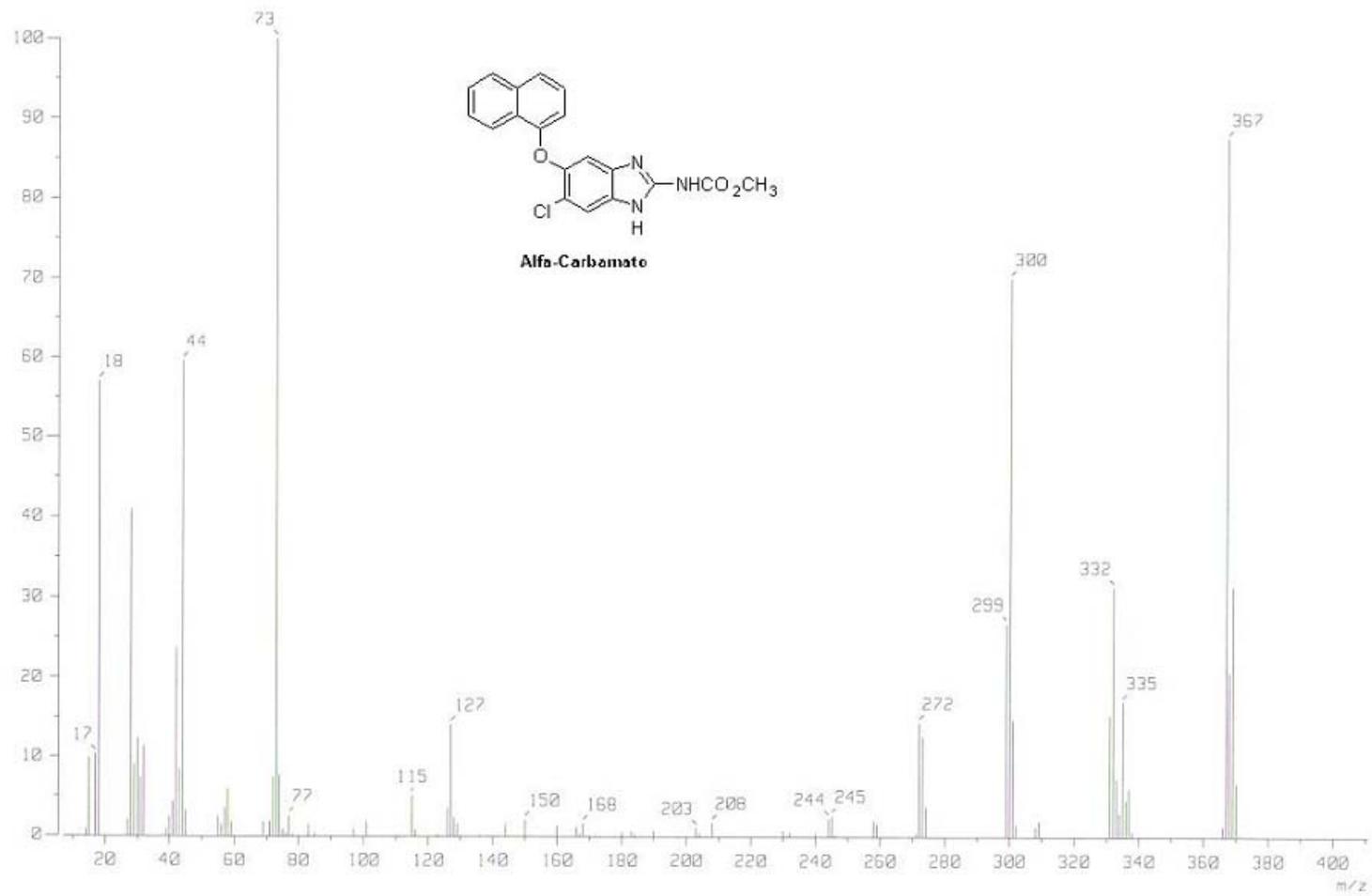
Espectro No. 15^a. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)



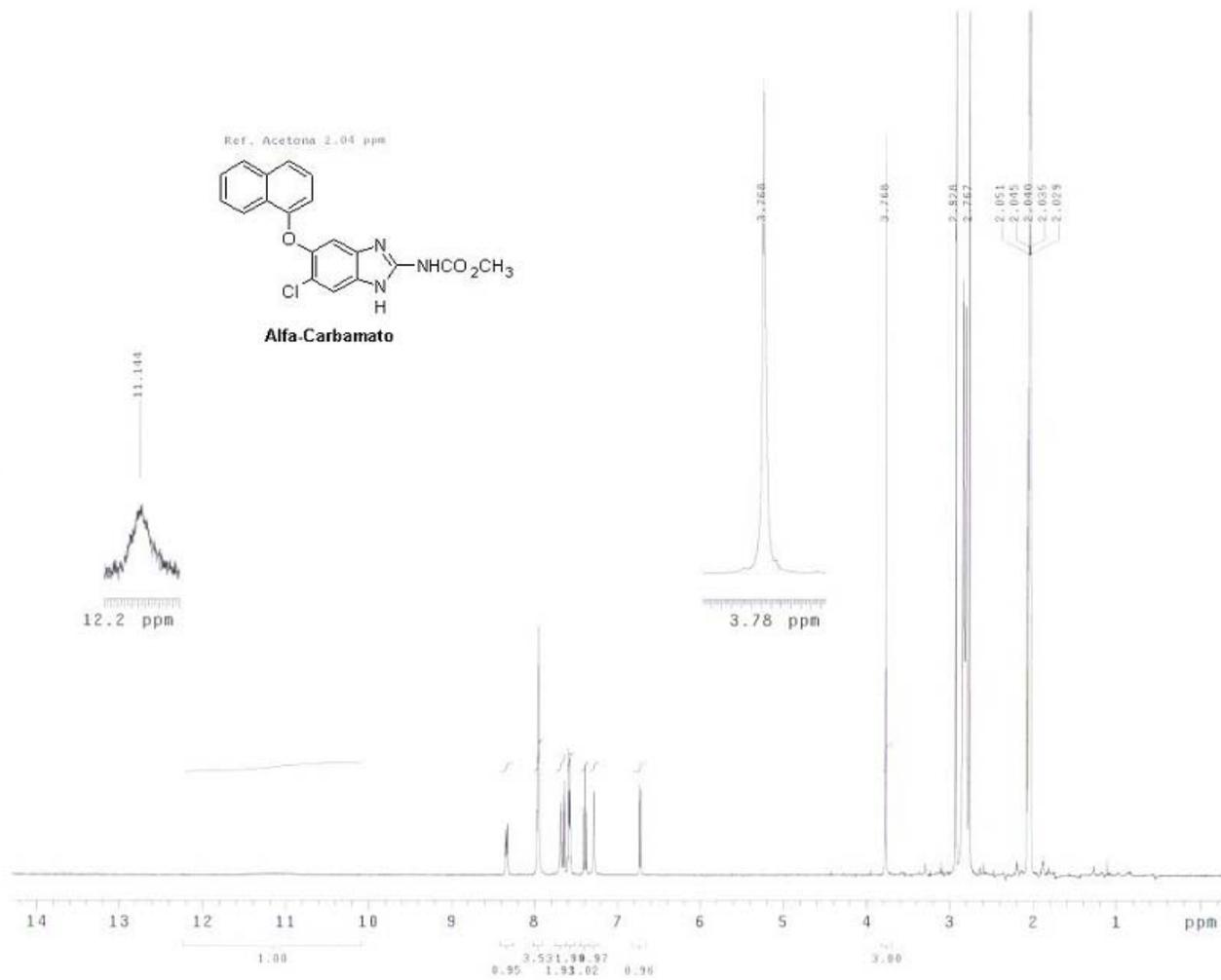
Espectro No. 15^b. RMN ^1H (ACETONA-*d*-6) ppm: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5), Intercambio com D₂O



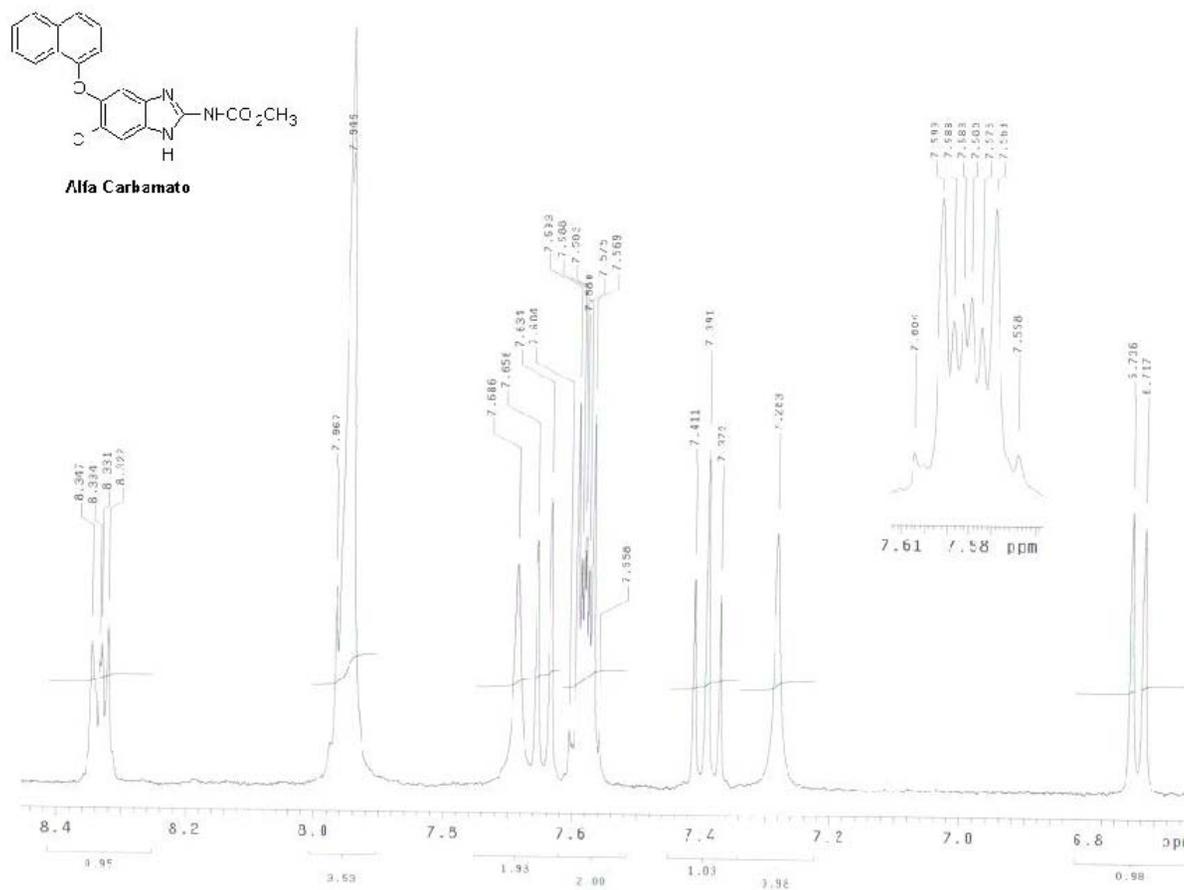
Espectro No. 16. IR (KBr) cm⁻¹: [(4)5-Cloro-(5)6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (Alfa-Carbamato)



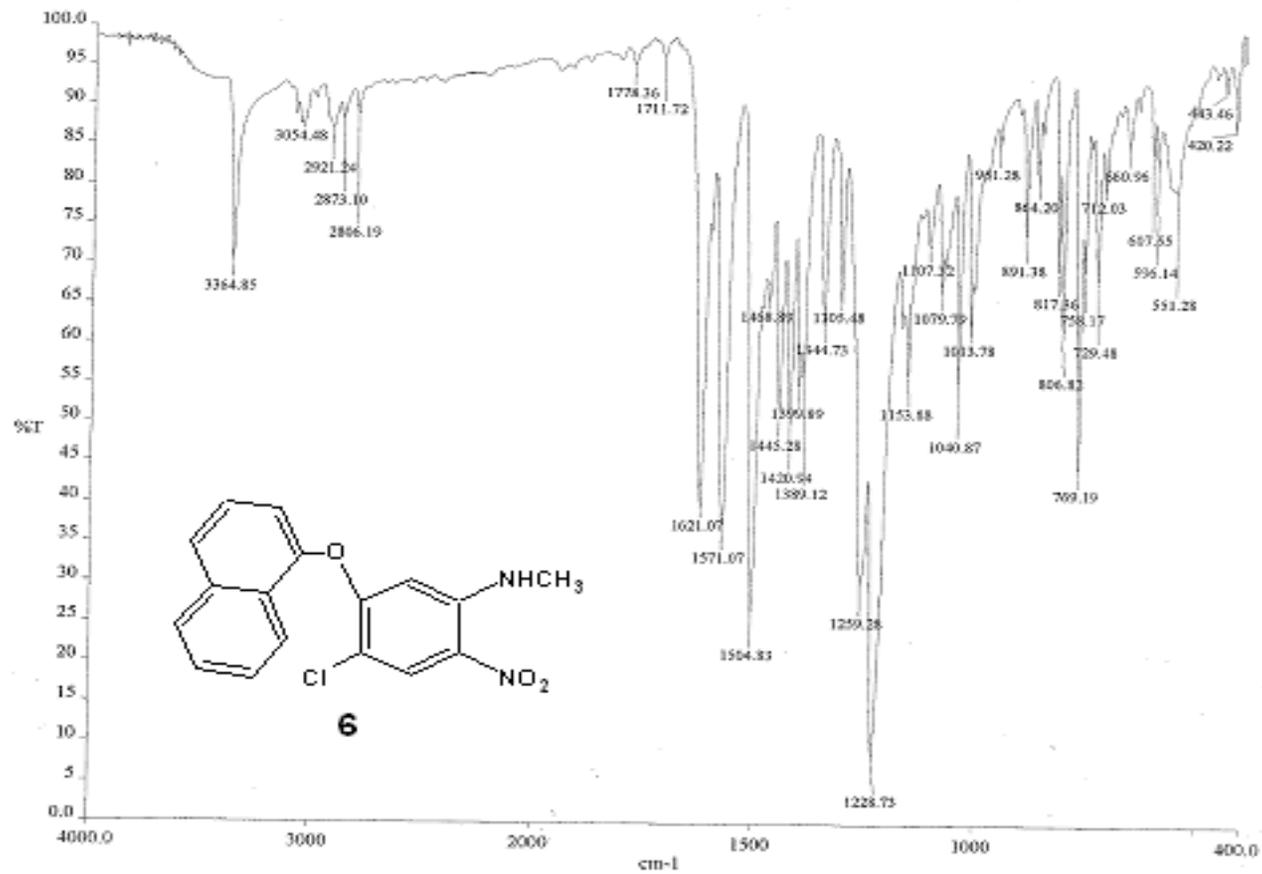
Espectro No. 17. EM (IE/ID) m/z: [(4)5-Cloro-(5)6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (Alfa-Carbamato)



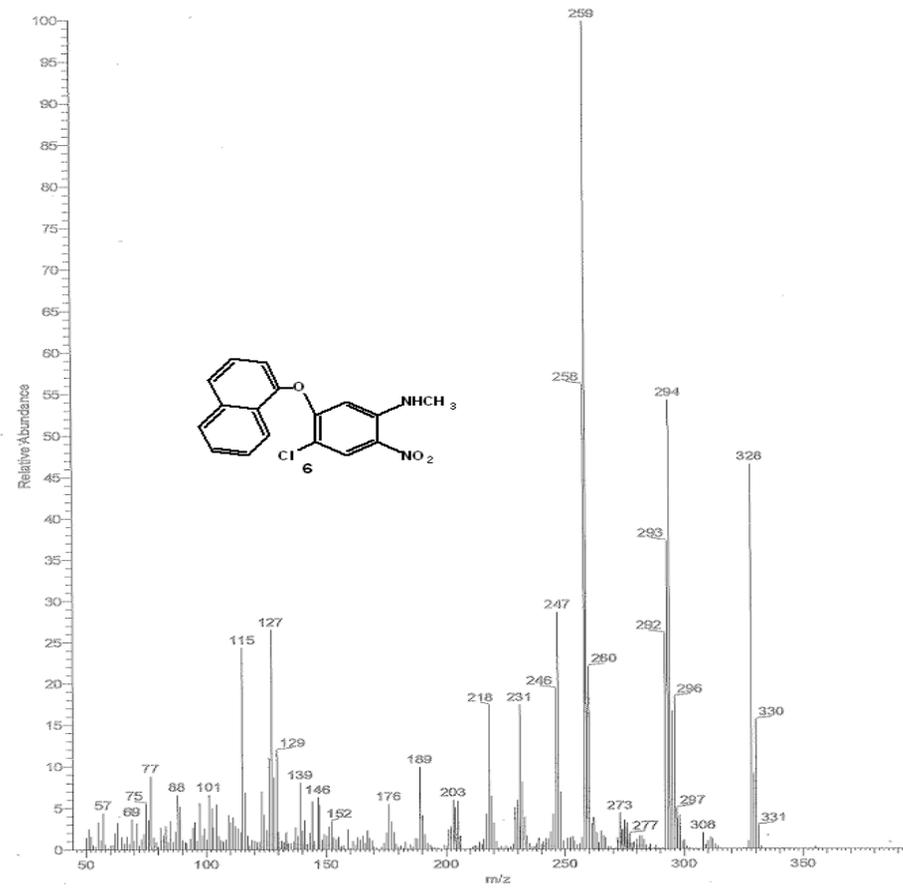
Espectro No. 18^a. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: [(4)5-Cloro-(5)6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (Alfa-Carbamato)



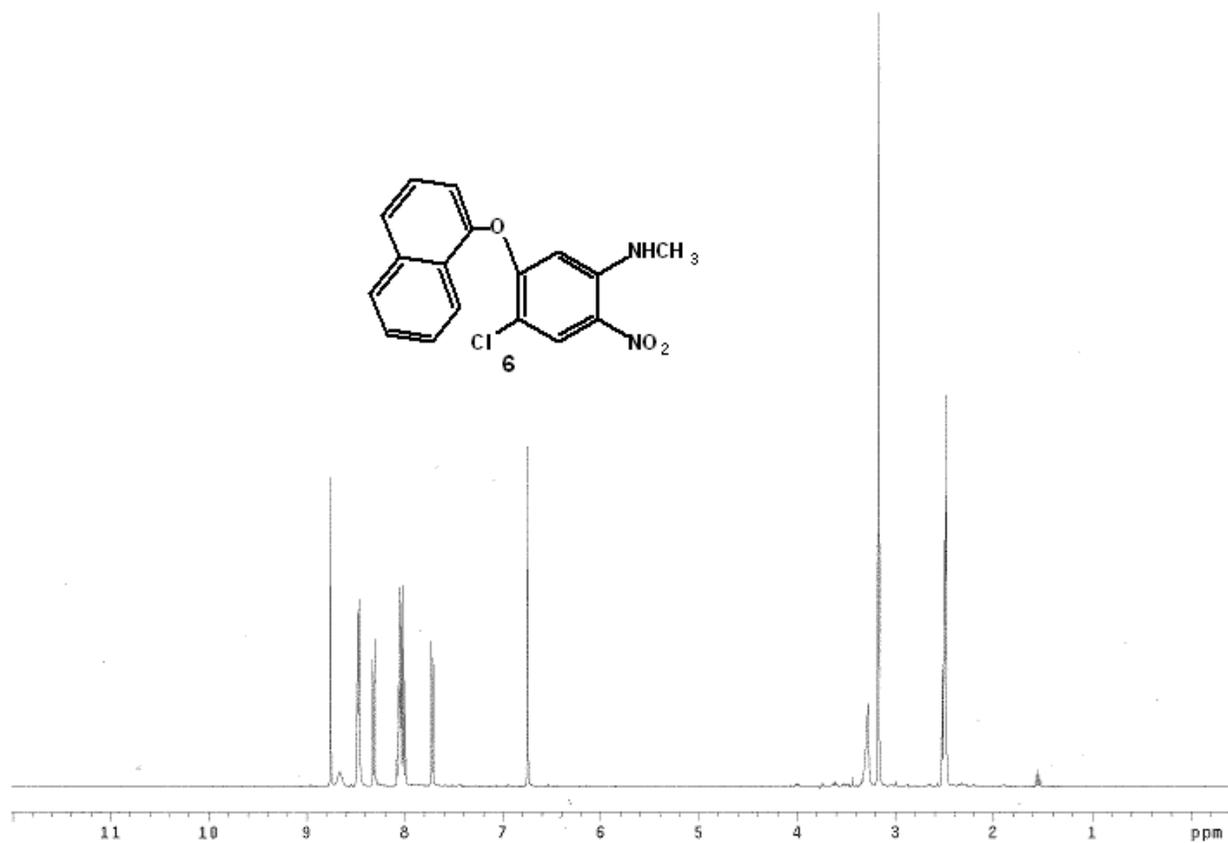
Espectro No. 18^b. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: [(4)5-Cloro-(5)6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (Alfa-Carbamto)



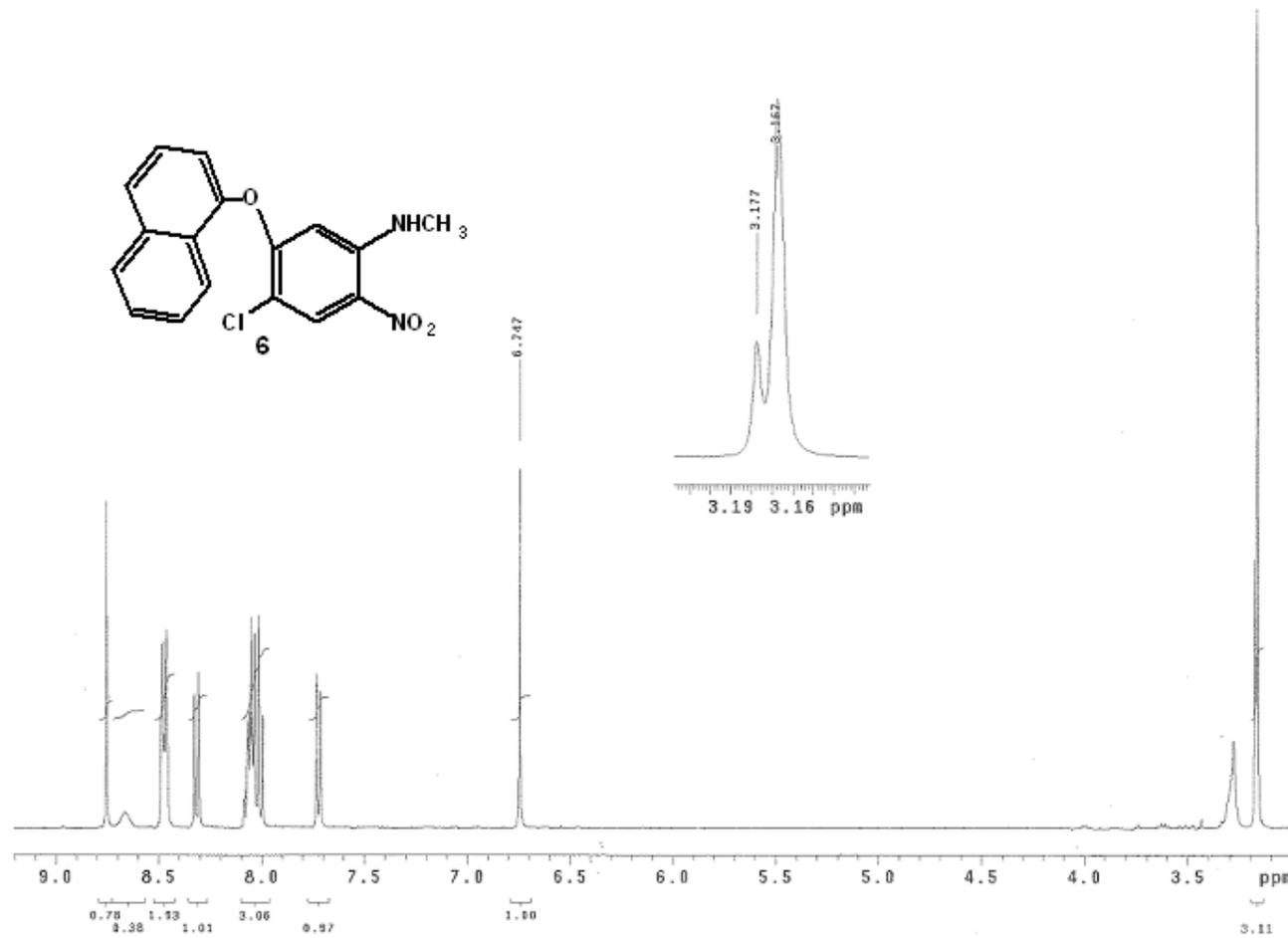
Espectro No. 19. IR (KBr) cm⁻¹: N-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]-N-metilamina (10)



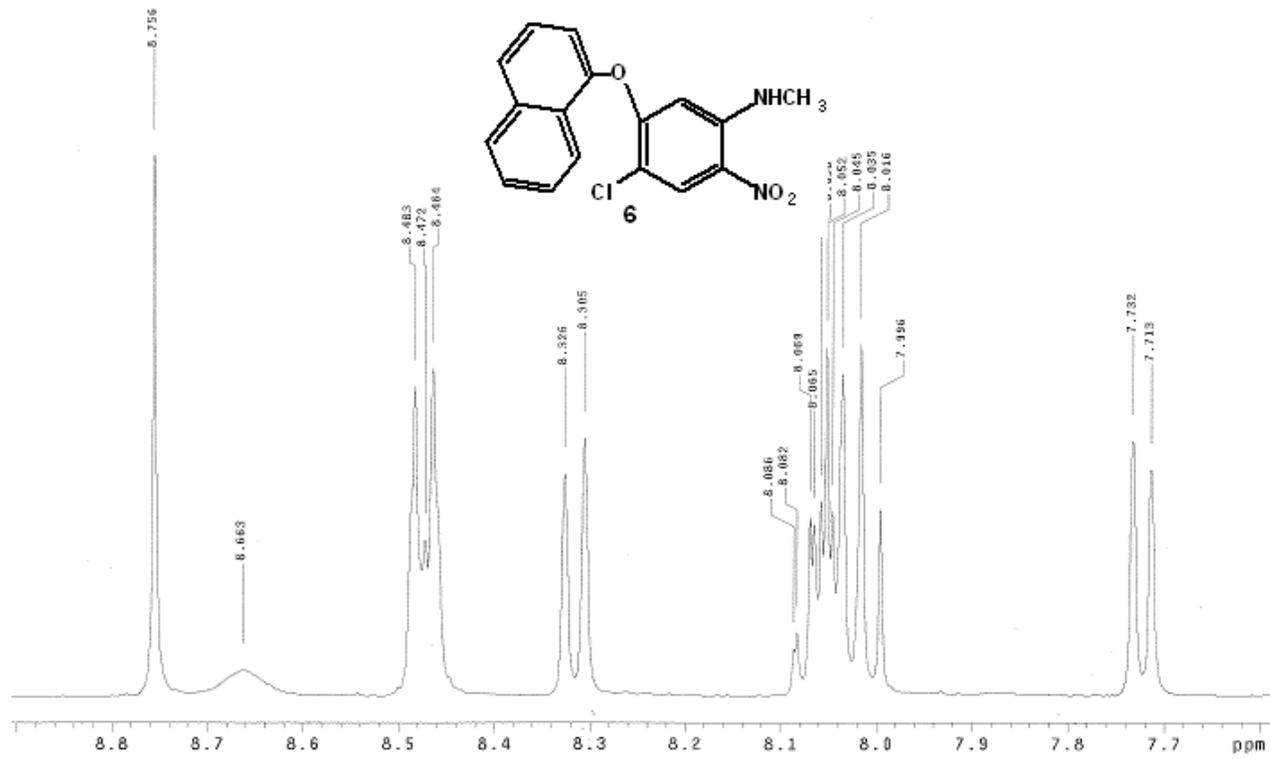
Espectro No. 20. EM (IE/ID) *m/z*: *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilamina (10)



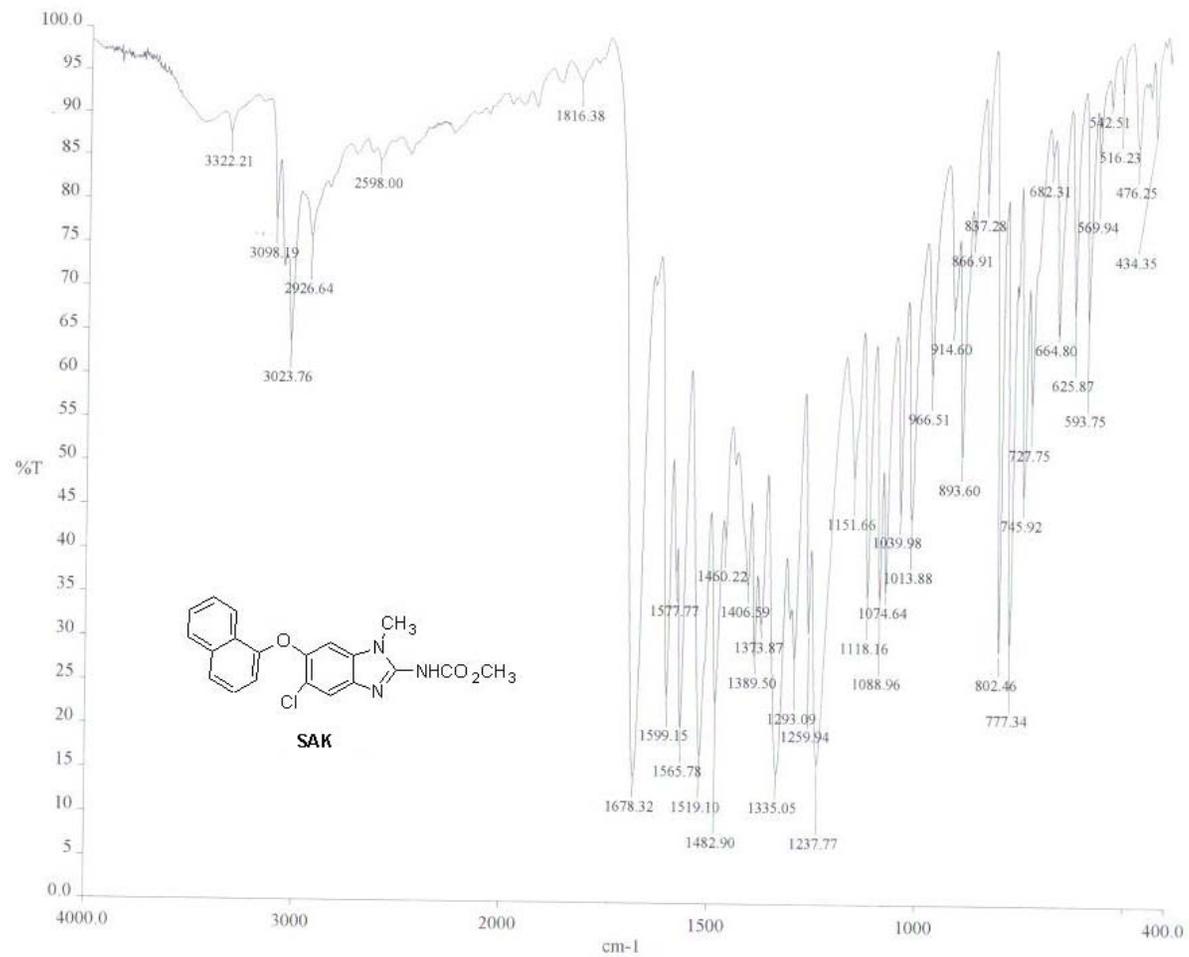
Espectro No. 21^a. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilamina (10)



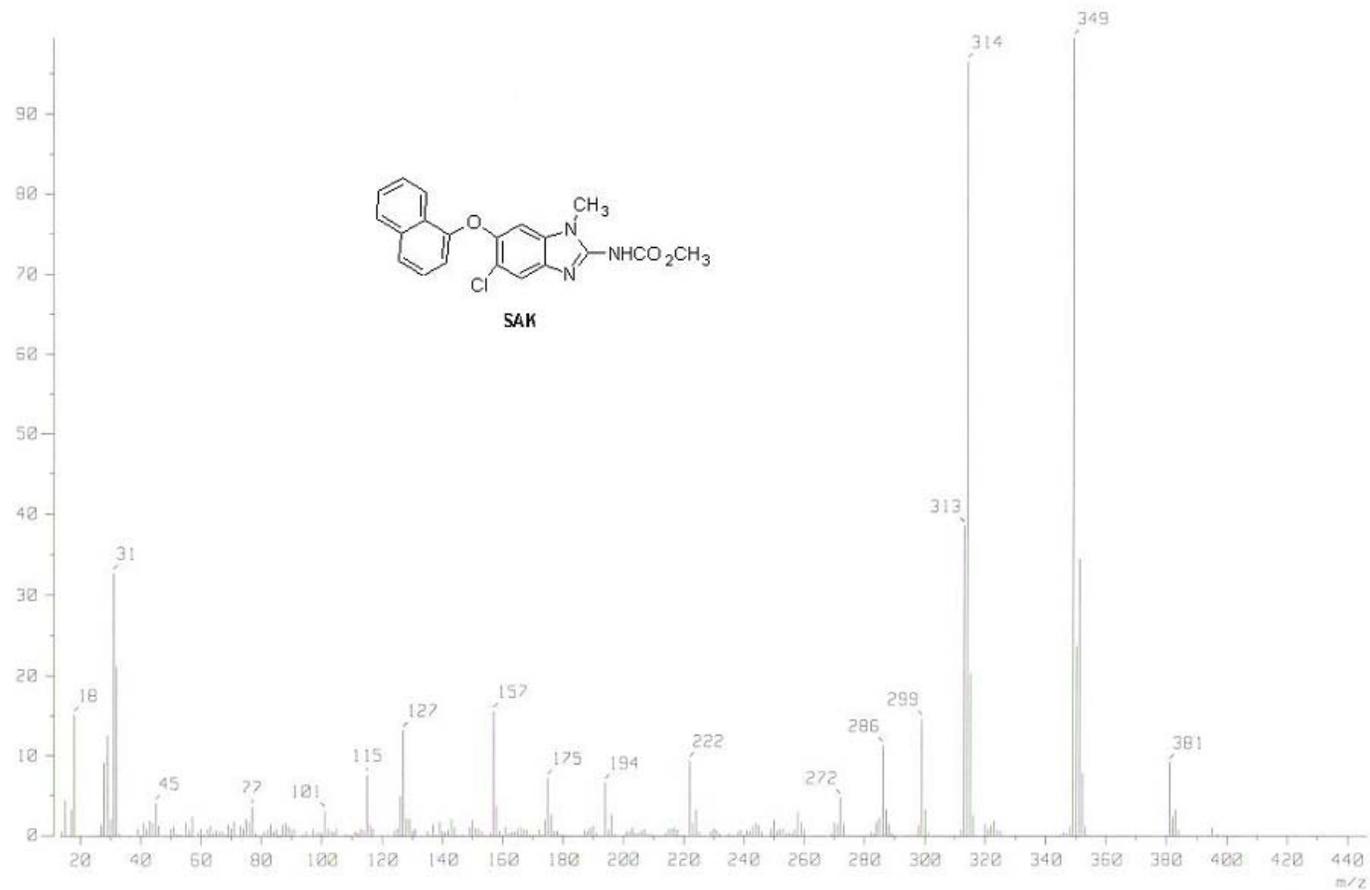
Espectro No. 21^b. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilamina (10)



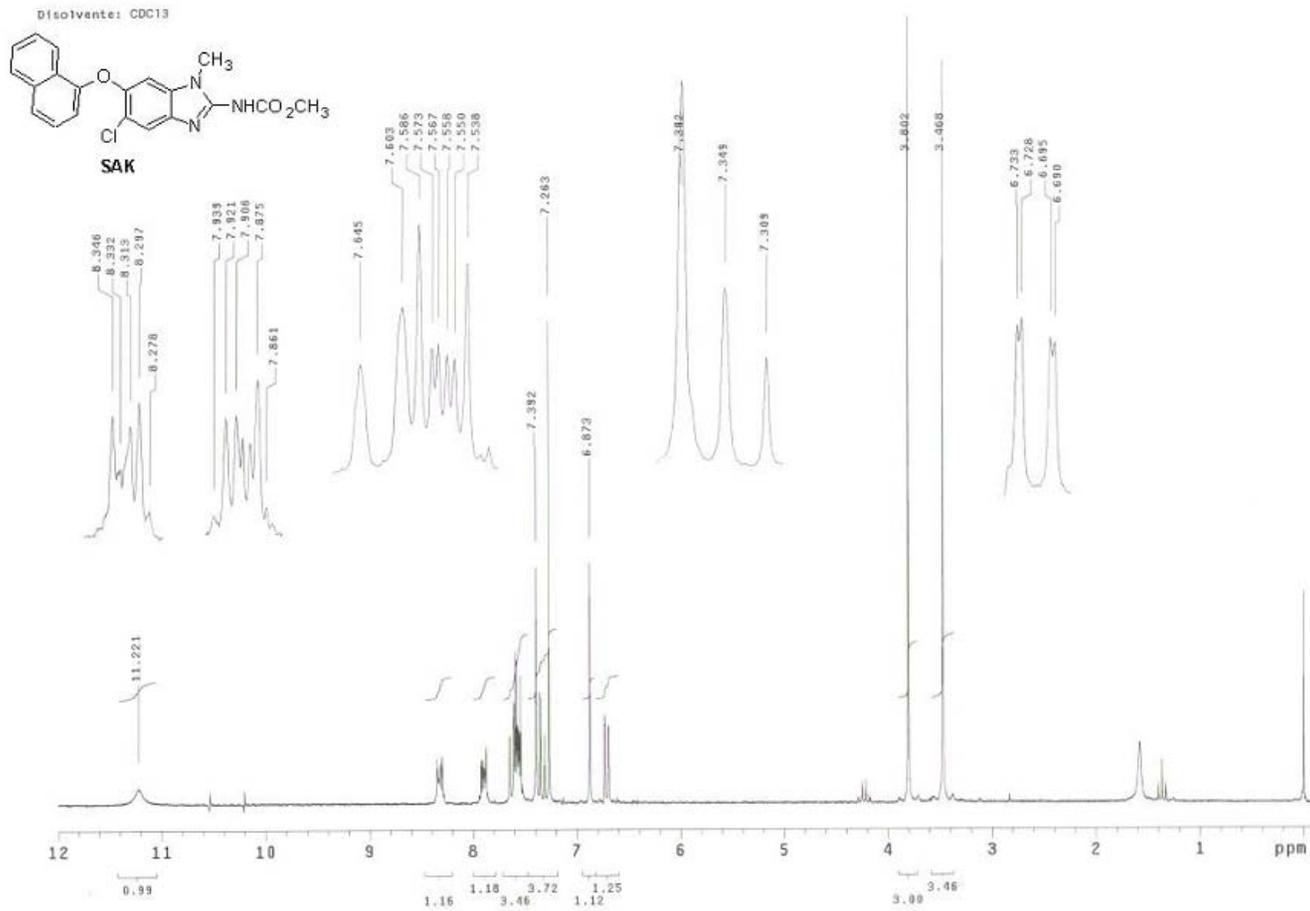
Espectro No. 21^c. RMN ¹H (ACETONA-*d*-6) ppm: *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilamina (10)



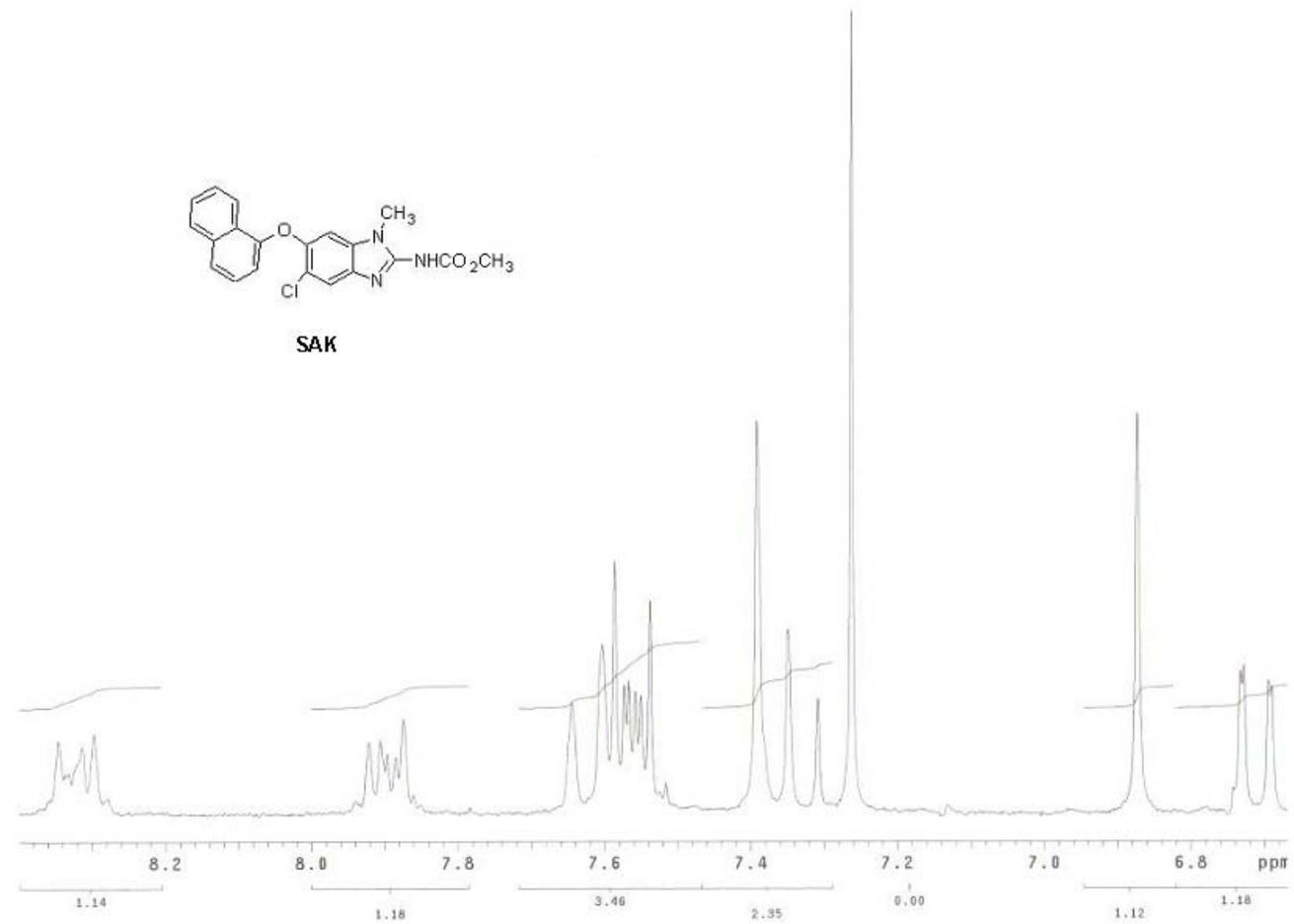
Espectro No. 22. IR (KBr) cm⁻¹: [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)



Espectro No. 23. EM (IE/ID) m/z : [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)



Espectro No. 24^a. RMN ¹H (CDCl₃) ppm: [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)



Espectro No. 24^b. RMN ¹H (CDCl₃) ppm: [5-Cloro-1-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (HSK)

Paramphistomicidal efficacy of an experimental compound in sheep

P. M. Reyes · V. F. Ibarra · M. Y. Vera · A. G. Cantó ·
A. Hernández · C. A. Hernández · R. Castillo ·
M. A. Villa

Received: 14 November 2007 / Accepted: 16 November 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The aim of the present study was to determine the paramphistomicidal efficacy of methyl [5-chloro-6-(1-naphthylthio)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (alpha-carbamate) in experimentally infected sheep. Sixteen crossbred rams were infected each with 600 metacercariae of *Calicophoron calicophorum*. Forty five days after infection, they were divided into four groups of four animals each. Groups 1 to 3 received compound alpha-carbamate at a dose of 12, 18, and 24 mg/kg b/w, respectively; group 4 serving as the nontreated control. Ten days after treatment, all animals were killed to obtain the rumen and collect, measure, and quantify the trematodes present. Efficacy was assessed as the percentage of trematode reduction of the treated groups relative to the nontreated control. The obtained efficacy indicated

a percentage reduction of 86.7%, 97.5%, and 100% for groups 1, 2, and 3, respectively. This experimental compound showed high efficacy against 45-day-old *C. calicophorum* in experimentally infected sheep.

Introduction

Paramphistomosis is a gastrointestinal parasitic disease of ruminants caused by *Paramphistomum* spp, which inhabits the rumen, reticle, abomasum, and small intestine (Eduardo 1982). It is characterized by hemorrhagic and catarrhal enteritis producing nonquantifiable economical losses (Rolfe et al. 1991).

In Mexico, this disease is more frequently seen in cattle (Horak 1971; Quiroz et al. 1973) with higher prevalence in Cebu livestock, particularly from the south-east region of the country (Arizmendi 1981; De la O 1983; Quiroz 1990; Rangel-Ruiz et al. 2003). Treatment of this disease has been carried out with different fasciolicidal compounds, all showing weak efficacy against immature stages of the trematode.

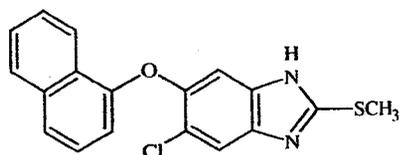
Considering the fasciolicidal efficacy previously shown by the compound 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthylthio)-1H-benzimidazole, known as compound alpha (Hernández et al. 2002), in sheep and cattle, (Ibarra et al. 1997, 2000, 2004; Vera et al. 2001, 2003, 2004; Rivera et al. 2002, 2004, 2005), it was deemed relevant to modify its chemical structure and synthesize alpha-carbamate aimed at testing

P. M. Reyes · V. F. Ibarra (✉) · M. Y. Vera · M. A. Villa
Departamento de Parasitología,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM,
DF 04510 México, México
e-mail: ibarraf@servidor.unam.mx

A. G. Cantó
Facultad de Ciencias Naturales,
Universidad Autónoma de Querétaro,
Querétaro, México

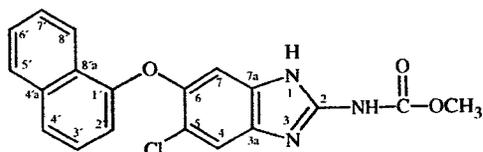
A. Hernández · C. A. Hernández · R. Castillo
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM,
México, México

this new compound at the intestinal level against paramphistomids in sheep.



Compound Alpha

5-Chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole



Compound Alpha-carbamate

Methyl [5-chloro-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamate

The aim of the present study was to determine the paramphistomicidal efficacy of methyl [6-chloro-5-(naphthalen-1-yloxy)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamate in experimentally infected sheep.

Materials and methods

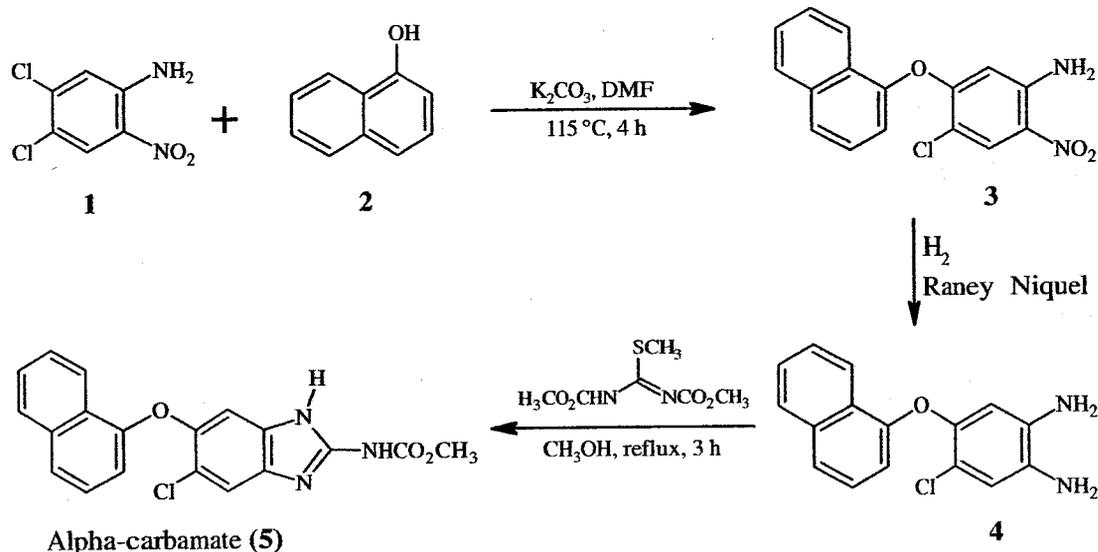
Compound alpha-carbamate (5) was prepared according to the reactions shown in Scheme 1. Treatment of 4,5-dichloro-2-nitroaniline (1) with alpha naphthol (2) and heating in dimethylformamide (DMF) afforded 4-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-nitroaniline (3), which upon catalytic

hydrogenation led to the previously described 4-chloro-5-(1-naphthoxy)-1,2-phenylenediamine (4) (Hernández et al. 2002). In the last step, cyclocondensation of (4) with 1,3-dicarbomethoxy-*S*-methylisothiourea (Kus and Altanlar 2003) in methanol at the reflux point for 3 h, gave a solid mass that after work up and recrystallization in DMF-methanol afforded 5 as a white powder with a mp 236.5–237.6°C.

Animals Sixteen crossbred rams 8 to 12 months of age were used. They were born at the Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal (CENIFA) located in Ajuchitlán in the state of Querétaro (central part of Mexico), which is recognized as a *Paramphistomum*-free area. The animals were fed on green alfalfa and some commercial pelleted food for ovines with water being supplied ad libitum.

Experimental compound Freshly synthesized compound alpha was weighed out as a powder in an analytical balance (Sartorius-BP1215) according to the body weight of each ovine chosen for treatment. Afterwards, the weighed compound was packed in gelatin capsules to administer them with the aid of metallic thin forceps (40 cm in length).

Experimental procedure Before the experiment, fecal samples were analyzed by the sedimentation test (MAFF 1988) to ensure that they were really free of flukes. On day 0, all animals were ear-tagged and infected each with 600 metacercariae of *Calicophoron calicophorum*, given orally in a gelatin capsule, having been harvested from *Lymnaea humilis* snails infected with miracidia at our laboratory.



Scheme 1 Synthesis of compound alpha-carbamate (5)

Briefly, eggs were collected from naturally infected cattle and miracidia were obtained after incubating eggs for 18 days at 27°C. When the flukes reached 45 days of age, four groups of four animals each were randomly formed to be given treatment.

Treatment Compound alpha-carbamate was administered in gelatin capsules with the aid of a forceps as follows:

- Group 1 (G1) received a single oral dose of 12 mg/kg p.o.
- G2 was similarly treated with 18 mg/kg p.o.

- G3 was treated with a single oral dose of 24 mg/kg p.o.
- G4 served as the nontreated control.

Slaughter of animals Fifteen days after treatment, all sheep were killed; the rumen being isolated so that the number and the length of the present paramphistomids could be measured by means of a caliper.

Efficacy The percentage of efficacy was calculated by means of the formula reported by Wood et al. (1995):

$$\%E = \frac{\text{No. of flukes in the nontreated group} - \text{No. of flukes in the treated group}}{\text{No. of flukes in the nontreated group}} \times 100.$$

Statistical analyses The data obtained were submitted to the Kruskal–Wallis nonparametric test to determine a possible statistical difference among the treated groups relative to the nontreated control.

7 mm with a higher predominance of paramphistomids being in the range of 5 mm.

Results

Results for the experimental groups were as follows:

- Group 1 (treated with 12 mg/kg): Sixteen paramphistomids were recovered (8, 4, 3, and 1, respectively). The minimum and maximum number of trematodes was 1 and 8, (<0.01).
- Group 2 (treated with 18 mg/kg): Only three paramphistomids were recovered (0, 2, 1, and 0, respectively). The minimum and maximum number of trematodes was 0 and 2 respectively (<0.01).
- Group 3 (treated with 24 mg/kg): No paramphistomids were recovered, corresponding to a 100% efficacy ($P < 0.01$).
- Group 4 (untreated control): The total number of paramphistomids recovered was 121, (21, 36, 34, and 30, respectively). The minimum and maximum number of trematodes collected was 21 and 36, respectively, and the average number of parasites obtained per animal was 30.2. A highly significant difference was observed when comparisons were made among all treated groups ($P < 0.01$).

Discussion

In the present work, a novel benzimidazole derivative (5), analog of fasciolicide compound alpha, was synthesized. The structure of 5 was elucidated by its spectral data. Characteristic bands at 3,342 (N–H), 3,125–3,050 (unsaturated C–H), 1,719 (HN–CO–O), 1,267 (HN–CO–O), 1,210 (HN–CO–OC) cm^{-1} were seen in the IR spectrum (KBr). The ^1H NMR spectrum (400 MHz, DMSO- d_6) integrated for 14H at 3.75 (s, 3H CH_3O), 6.62 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H-2'), 7.22 (s, 1H, H-4), 7.37 (t, 1H, $J=8.0$ Hz, H-3'), 7.56–7.65 (m, 3H, H-4', H-6', H-7'), 7.62 (s, 1H, H-7), 7.94–7.97 (m, 1H, H-5'), 8.24–8.27 (m, 1H, H-8'), and 11.78 ppm (broad s, 2H, interchangeable with D_2O , N–H). The ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, DMSO- d_6) showed signals for the number and type of carbons at 52.50 (CH_3O), 109.80 (C-2'+C-4), 117.94 (C-5+C-7), 121.30 (C-8'), 122.25 (C-4'+C-6'), 124.90 (C-8'a), 125.92 (C-4'a), 125.99 (C-7'), 126.71 (C-5'), 127.66 (C-3'), 134.40 (C-7a+3a), 145.52 (C-2), 148.47 (C-1'), 153.44 (C-6), and 154.23 ppm (C=O). The mass spectrum (EI) showed peaks at 367 M^+ , 100%, 369 (M^++2), 335, 332, 300, 272, and 127, which were consistent with the fragmentation of these type of compounds.

It is a fact that paramphistomids adapt daily to conditions in the tropical regions of Mexico; they being more prevalent than *Fasciola hepatica* in certain regions of the country. This situation is frequently detected by cattle owners who truly need a paramphistomicidal drug capable of removing the immature and adult stages of the parasite

Fluke length measurement Shows the data obtained with regard to the size of the trematodes collected. The recorded information denoted a fluke-length distribution from 4 to

(Ibarra et al. 1997). Because this parasitic disease is not considered as pathogenic as fasciolosis, private industry has not allotted sufficient financial resources to place a proper drug on the market, perhaps because apparently there is not enough economic justification to spend money on projects of this sort.

In response to this situation, a possible alternative is the chemical modification of compound alpha (log *P* calculated with ACDLabs software=6.41±0.80) to its 2-carbamate analog (log *P*=5.24±0.90) that, given in suspension, should remain longer at the gastrointestinal level as is observed with other benzimidazole 2-carbamates, such as albendazole. Absorption studies with this anthelmintic showed that only 1–5% of the given dose is detected in humans and up to 50% in cattle (Jung et al. 1998; Dayan 2003).

At present, these preliminary results can be considered relevant because several factors, such as the absorption degree of the drug and the lack of a suitable formulation can influence the percentage of drug concentration and permanence at the gastrointestinal level.

Furthermore, because other factors such as sex, breed, age, host nutrition, viability, and handling of the metacercariae dosed, among others, can produce variable results, further studies are in the process at improving the efficacy of this experimental compound.

It is concluded that compound alpha-carbamate is a novel compound with high efficacy against 45-day-old paramphistomids in experimentally infected sheep.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support of project PAPIIT-UNAM-IN207106-3. This experiment complies with the current laws of Mexico.

References

- Arizmendi VRI (1981) Evaluación e identificación de la Paramphistomiasis bovina en el sur del estado de Veracruz. Bachelor thesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México
- Dayan AD (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of no-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 86:141–159
- De la O CJR (1983) Frecuencia y determinación del género de trematodos de la Familia Paramphistomidae (Fischöeder 1901) de bovinos sacrificados en el Frigorífico y Empacadora de Tabasco, S. A., Villahermosa, Tabasco. Bachelor thesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México
- Eduardo SL (1982) The taxonomy of the family Paramphistomidae (Fischöeder, 1901) with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. I. General considerations. *Syst Parasitol* 4:7–57
- Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo R (2002) Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1*H*-benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 50 (5):649–652
- Horak IG (1971) Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Adv Parasitol* 9:33–72
- Ibarra VF, García SE, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR (1997) Eficacia fasciolicida del compuesto ALFA contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Veterinaria (Méx)* 28:4–8
- Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR (2000) Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Veterinaria (Méx)* 31:47–51
- Ibarra VF, Vera MY, Quiroz H, Cantó J, Castillo R, Hernández A, Ochoa P (2004) Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 120:65–74
- Jung H, Medina L, García L, Fuentes I, Moreno-Esparza R (1998) Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *J Pharm Pharmacol* 50:43–48
- Kus C, Altanlar N (2003) Synthesis of some new benzimidazole carbamate derivatives for evaluation of antifungal activity. *Turk J Chem* 27:35–39
- MAFF (Ministry of Agricultura, Fisheries and Food) (1988) Manual of veterinary parasitological laboratory techniques (referente book 418), 3rd edn. Ministry of Agricultura Fisheries and Food, London
- Quiroz RH (1990) Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Limusa, D.F, México
- Quiroz RH, García R, Dávalos E (1973) Identificación de *Cotylophoron cotylophorum* (Fischöeder 1901) en un ovino en México. *Téc Pecu Méx* 21:61–63
- Rangel-Ruiz LJ, Albores-Brahms ST, Gamboa-Aguilar J (2003) Seasonal trends of *Paramphistomum cervi* in Tabasco, México. *Vet Parasitol* 116:217–222
- Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA (2002) Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. *Veterinaria (Méx)* 33(1):55–61
- Rivera FN, Ibarra VF, Zepeda A, Fortoul T, Hernández A, Castillo R, Cantó G (2004) Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with and experimental fasciolicide. *Parasitol Res* 93:283–286
- Rivera FN, Ibarra VF, Zepeda A, Fortoul T, Cantó G, Hernández A, Castillo R (2005) The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1*H*-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. *Parasitol Res* 95:379–382
- Rolfé PF, Boray JC, Nichols P, Collins GH (1991) Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *Int J Parasitol* 21(7):813–839
- Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Rios UA, Castillo BR, Hernández CA (2001) Eficacia del 6-cloro-2-metilthio-5-(1-naftiloxi) benzimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. *Veterinaria (Méx)* 32(1):77–80
- Vera-Montenegro Y, Ibarra-Velarde F, Quiroz-Romero H, Hernández-Campos A, Castillo R (2003) Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitol Res* 91(1):1–4
- Vera-Montenegro Y, Ibarra-Velarde F, Liéban HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP (2004) Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitol Res* 92:211–214
- Wood IB, Amaral NK, Barden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.), second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 58:181–213