



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis y actividad antiparasitaria de
derivados *N*-metilados del bencimidazol**

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

**PRESENTA
Armando Maldonado Rangel**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	M. en C. Eduardo Guillermo Ramón Marambio Dennett
Secretario	Dr. Abel Gutiérrez Ramos
1er sup.	Dra. Elena Guadalupe Ramírez López
2do sup.	M. en C. Ehecatl Luis David Paleo Gonzales

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

Asesor:

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Supervisor Técnico:

M. en C. Jaime Pérez Villanueva

Sustentante:

Armando Maldonado Rangel

INDICE GENERAL

RESUMEN

INDICE	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Parasitosis en México	3
Gráfico 1. Casos de amebiasis reportados.	4
Gráfico 2. Otras helmintiasis.	4
2.2. Protozoarios	5
2.2.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	5
2.2.1.1. Ciclo de vida	6
Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	7
2.2.2. <i>Giardia intestinalis</i>	7
2.2.2.1. Ciclo de vida	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i> .	9
2.2.3. <i>Trichomonas vaginalis</i>	9
2.2.3.1. Ciclo de vida	10
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .	10
2.3. <i>Trichinella spiralis</i> como modelo de helminto	11
2.3.1. Ciclo de vida	11
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	12
2.4. Tratamientos antiparasitarios	12
Figura 5. Estructura de algunos fármacos bencimidazólicos antihelmínticos.	13
Figura 6. Estructura de algunos fármacos nitroderivados antiprotozoarios.	14
Figura 7. Estructura del Triclabendazol.	15
2.5. Los Bencimidazoles	15
Figura 8. Tautomerismo e Isomerismo de los bencimidazoles.	16
Tabla 1. Evaluación Biológica de los 1-metilbencimidazoles	17
Tabla 1. Evaluación biológica de los 1 <i>H</i> -bencimidazoles	18

2.6. Relación Estructura actividad (SAR) biológica de los bencimidazoles	19
Tabla 3. Actividad biológica de derivados del 5(6)-clorocarbamato de metilo	20
2.7. Mecanismo de acción de los bencimidazol 2-carbamato de metilo	20
Figura 9. Mecanismo de inhibición de la β -tubulina por los BZC.	21
Figura 10. Docking propuesto de la molécula de Albendazol-SO en β -tubulina de <i>Haemonchus contortus</i> .	22
2.8. Métodos de Síntesis de los bencimidazol 2-carbamato de metilo	22
Esquema 1. Métodos de síntesis de los bencimidazol 2-carbamato de metilo	23
2.9. Síntesis de 1-metilbencimidazoles	23
2.9.1 A partir de 2-Nitroanilinas	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
4.1. Hipótesis	26
4.2. Objetivo General	26
4.3. Objetivos Particulares	26
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Parte química	27
Esquema 3. Preparación del 1,3-dimetoxicarbonil-S-metilisotiourea	27
Esquema 4. Síntesis de AMRMX a partir de dos materias primas diferentes	28
5.1.2. Síntesis de [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo(AMRMXII)	28
5.1.1. Síntesis de (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX)	28
Esquema 5. Síntesis de AMRMXII a partir de 4-Cloro-2-nitroanilina	29
5.1.3. Síntesis de (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMXIII)	29
Esquema 6. Síntesis de AMRMXIII a partir de 2,4-dicloronitrobenceno	30
5.2. Parte biológica	30
5.2.1. Evaluación in vitro de la actividad antiprotozoaria	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. Parte química	31

6.1.1. Síntesis de los Intermediarios	31
6.1.2. Síntesis de los compuestos finales	32
Tabla 4. Rendimientos y constantes físicas de los productos finales y sus intermediarios sintetizados.	32
6.1.3. Espectroscopia y espectrometría de los compuestos finales	33
6.1.3.1. Espectroscopia de Infrarrojo	33
6.1.3.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^1H	33
Figura 11. Interacción de H-N 1 del bencimidazol con CH $_3$ -N en AMRMXII	33
6.1.3.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C	34
6.1.3.4. Espectrometría de masas	34
Figura 12. Sitio de ruptura para generar las fragmentaciones más importantes de los compuestos finales	35
Tabla 5. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales	35
6.2. Parte biológica	37
6.2.1. Efecto de AMRMX, AMRMX II y AMRMX sobre <i>E. histolytica</i> , <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i>	37
Tabla 6. Actividad antiprotozoaria de los compuestos finales sintetizados	37
Gráfico 3. Potencia antiprotozoaria de los compuestos sintetizados en comparación con Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ).	38
Gráfico 4. Potencia antiprotozoaria de los compuestos sintetizados anteriormente y ahora en comparación con Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ)	39
Tabla 7. Actividad antiprotozoaria (CI $_{50}$) de los derivados <i>N</i> -metilados del 5(6) clorobencimidazol, Albendazol y Metronidazol	40
6.2.2. Evaluación de actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados contra <i>Trichinella spiralis</i>	40
Tabla 8. Actividad in vivo de los compuestos sintetizados y el albendazol contra la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	41
Gráfico 5. Único compuesto sintetizado con potencia en comparación con Albendazol (ABZ).	41
7. CONCLUSIONES	42
9. PARTE EXPERIMENTAL	44

9.1. Instrumentación	44
9.2. Sistemas cromatográficos	45
9.3. Procedimientos sintéticos	46
9.3.1. 1,3-dimetoxicarbonil- <i>S</i> -metilisotiourea (19)	46
9.3.2. Síntesis de (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX)	46
9.3.2.1. 4-Cloroacetanilida (2)	46
9.3.2.2. 4-Cloro-2-nitroacetanilida (3)	47
9.3.2.3. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilacetamida (4)	47
9.3.2.4. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilamina (5a)	48
9.3.2.5. 4-Cloro- <i>N</i> ¹ -metilbenzeno-1,2-diamina (6)	49
9.3.2.6. (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (7)	49
9.3.2.7. (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX)50	
9.3.2.8. 1,4-Dicloro-2-nitrobenceno (9)	50
9.3.2.9. <i>N</i> -(4-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilamina (5b)	51
9.3.3. Síntesis de [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II)	51
9.3.3.1. 4-Cloro-1,2-fenilendiamina (11)	51
9.3.3.2. [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (12)	52
9.3.3.3. [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMXII)	53
9.3.4. Síntesis de (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMXIII).	53
9.3.4.1. <i>N</i> -(5-Cloro-2-nitrofenil)- <i>N</i> -metilamina (14)	53
9.3.4.2. 4-Cloro- <i>N</i> ² -metilbenzeno-1,2-diamina (15)	54
9.3.4.3. (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (16)	54
9.3.4.4. (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX III)	55
10. BIBLIOGRAFÍA	56
11. ESPECTROS	58
Espectro 1. IR: (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX).	58
Espectro 2. RMN ¹H: (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX).	59

Espectro 3. RMN ¹³C: (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX).	60
Espectro 4. EM (IE) <i>m/z</i>: (5-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMX).	61
Espectro 5. IR: [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II).	62
Espectro 6. RMN ¹H: [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il] metilcarbamato de metilo (AMRMX II).	63
Espectro 7. RMN ¹³C: [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II).	64
Espectro 8. NOESY: [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II).	65
Espectro 9. EM (IE) <i>m/z</i>: [5(6)-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II)	66
Espectro 10. IR: [(6)-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX III).	67
Espectro 11. RMN ¹H: (6-Cloro-1metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il) metilcarbamato de metilo (AMRMXIII).	68
Espectro 12. RMN ¹³C: (6-Cloro-1metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il) metilcarbamato de metilo (AMRMXIII).	69
Espectro 13. EM (IE) <i>m/z</i>: (6-Cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (AMRMXIII).	70

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre por ser nuestro apoyo y el pilar de nuestra familia, Te amo. Gracias por ser mi mujer maravilla.

A mi familia, pues este logro que no es solo mío sino de nosotros, “solo un paso más en esta larga travesía juntos” a mis amigos de la universidad porque demostramos estar siempre juntos en las buenas, las malas y las peores.

A ti Jessi “Niteo” por estar al final conmigo pues en los momentos de flaqueza estuviste siempre a mi lado y cuando me viste tirado me extendiste la mano, por eso eres mi Niteo.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por su apoyo, confianza pues me extendió la mano desde el principio y sin dudarlo.

A la Maestra Alicia Hernández Campos por sus valiosos consejos, regaños y experiencia.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por sus enseñanzas como profesor y el apoyo recibido durante la realización del trabajo.

A la Dra. Lilián Yépez, por la determinación de las pruebas antiparasitarias en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS.

Al M. en C. Antonio Romo Mancillas y al M. en C. Carlos Méndez. Por sus consejos conocimiento y compañerismo durante mi estancia en el laboratorio.

Al M. en C. Jaime Pérez Villanueva que me acompañó durante todo el camino como Maestro, consejero y gran amigo, sin el este trabajo no sería posible.

“Hijo, recuerda que lo más valioso que tiene un hombre es su palabra, no seas uno más y aléjate del mal, trabajen día con día como hasta ahora lo han hecho, porque me siento orgulloso de ti y de tus hermanos”

Armando Maldonado

RESUMEN

En la actualidad, las enfermedades parasitarias son un grave problema de salud pública. Los antiparasitarios de mayor uso para su tratamiento son los nitroderivados, como el metronidazol y la nitazoxanida, para las protozoosis, y los bencimidazol 2-carbamato, como el albendazol, mebendazol y fenbendazol, para las helmintosis. El uso indiscriminado de los nitroderivados y efectos secundarios de éstos puede llevar al abandono del tratamiento, lo que conlleva a la generación de resistencia por los parásitos a este tipo de fármacos. Por otro lado, debido a la pobre solubilidad de los bencimidazol 2-carbamato en los fluidos biológicos, éstos tienen baja absorción y biodisponibilidad, por lo que se requiere de altas dosis y tiempos prolongados para el tratamiento de las infecciones sistémicas.

Considerando que los bencimidazol 2-carbamato también tienen actividad antiprotozoaria y viendo la necesidad de contar con nuevos antiparasitarios con mejores propiedades biofarmacéuticas, en este proyecto de investigación se describe el estudio realizado para sintetizar y evaluar la actividad antiprotozoaria de los siguientes compuestos: (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo **AMRMX**, [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo **AMRMX II** y (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo **AMRMX III**. Este estudio es parte de un proyecto de investigación más amplio cuyo propósito es determinar la importancia que juega el enlace N-H en la actividad antiparasitaria.

Para la síntesis de los compuestos anteriores se partió de 3-cloroanilina o 4-cloroanilina, que se sometieron a reacciones conocidas de acetilación, nitración, *N*-metilación, reducción catalítica y ciclocondensación. Los productos finales purificados se identificaron por los métodos espectroscópicos y espectrométricos, y se evaluaron *in vitro* contra los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* y contra el helminto *Trichinella spiralis*.

Los compuestos en estudio resultaron ser más potentes que el metronidazol contra los tres parásitos. Comparados con el albendazol la actividad fue equiparable, excepto contra de *G. intestinales* en donde resultó más potente el albendazol.

1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos siguen siendo un problema de salud pública universal, en especial, en regiones del mundo con áreas tropicales y subtropicales, y en las que carecen de instalaciones sanitarias adecuadas y buenos hábitos de higiene. La gravedad se puede apreciar al considerar que más de la mitad de la población mundial, estimada en 6500 millones de personas, está infectada con algún tipo de parásito.

La población principalmente afectada es la infantil y la de adultos mayores. En la primera, las parasitosis ocasionan lento desarrollo corporal e intelectual que pueden tener consecuencias negativas tanto físicas como desde el punto de vista cognitivo, mientras que en la segunda una pobre calidad de vida. En adición, el sector veterinario doméstico, y silvestre, también se ve afectado ocasionando baja producción de carne, leche, lana, e índices de reproducción.

El fármaco de primera elección para el tratamiento de las infecciones causadas por protozoarios, como *G. intestinalis*, *E. histolytica* o *T. vaginalis* es el metronidazol (MTZ). También se emplean otros derivados nitroheterocíclicos como la furoxona y recientemente la nitazoxanida (NTZ). Este tipo de fármacos puede emplearse en las infecciones intestinales y sistémicas; sin embargo, tienen como desventaja efectos secundarios indeseables y alta toxicidad.

Para el tratamiento de las helmintiasis se emplean los derivados del bencimidazol, como los bencimidazol 2-carbamatos (BZC) albendazol (ABZ) y mebendazol (MBZ). Aunque este tipo de fármacos es de amplio espectro de acción, que abarca hasta actividad sobre protozoarios como *G. intestinalis*, por su alta polaridad y baja absorción su uso se limita al tratamiento de las infecciones del tracto gastrointestinal. Para el tratamiento de infecciones sistémicas se requieren altas dosis y tratamientos prolongados. El uso indiscriminado de los derivados del bencimidazol ha generado en algunos casos parásitos resistentes, como *Fasciola hepatica* resistente al triclabendazol (TCBZ) en el Reino Unido y Australia.

Considerando la problemática de las enfermedades parasitarias, los tratamientos existentes y sus desventajas, en esta tesis se estudia la síntesis y actividad antiparasitaria de tres nuevos derivados clorados del bencimidazol 2-carbamato de metilo *N*-metilados

2. ANTECEDENTES

2.1. Parasitosis en México

Las zoonosis parasitarias presentan un problema de salud en todo el mundo; sin embargo, es en los países en vías de desarrollo y los subdesarrollados donde se presentan con mayor prevalencia. Las parasitosis del aparato digestivo son comunes en México, especialmente, en las regiones montañosas con dificultad de acceso y carentes de servicios de salud.

En México, las parasitosis han sido la quinta causa de consulta en el Instituto Mexicano del Seguro Social; mientras que la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud reporta dentro de las 20 principales causas de morbilidad general a cuatro diferentes tipos de parásitos intestinales (protozoarios y helmintos) considerados un problema de salud pública a causa de la magnitud con la que se presentan y por su trascendencia, que está ligada sobre todo a enfermedades secundarias como la anemia y las complicaciones quirúrgicas; por lo tanto, están clasificadas como enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo de “notificación semanal”.^{1,2}

Las infecciones causadas por protozoarios son causa significativa de morbilidad y mortalidad. Los pacientes 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 las más comúnmente reportadas.

De acuerdo a los datos reportados por la secretaria de salud, la amebiasis intestinal se encuentra dentro de las primeras 10 causas de morbilidad en México, mientras que las helmintiasis ocupan el lugar número 11, donde la población más afectada por estos parásitos son infantes de 1 a 9 años.³

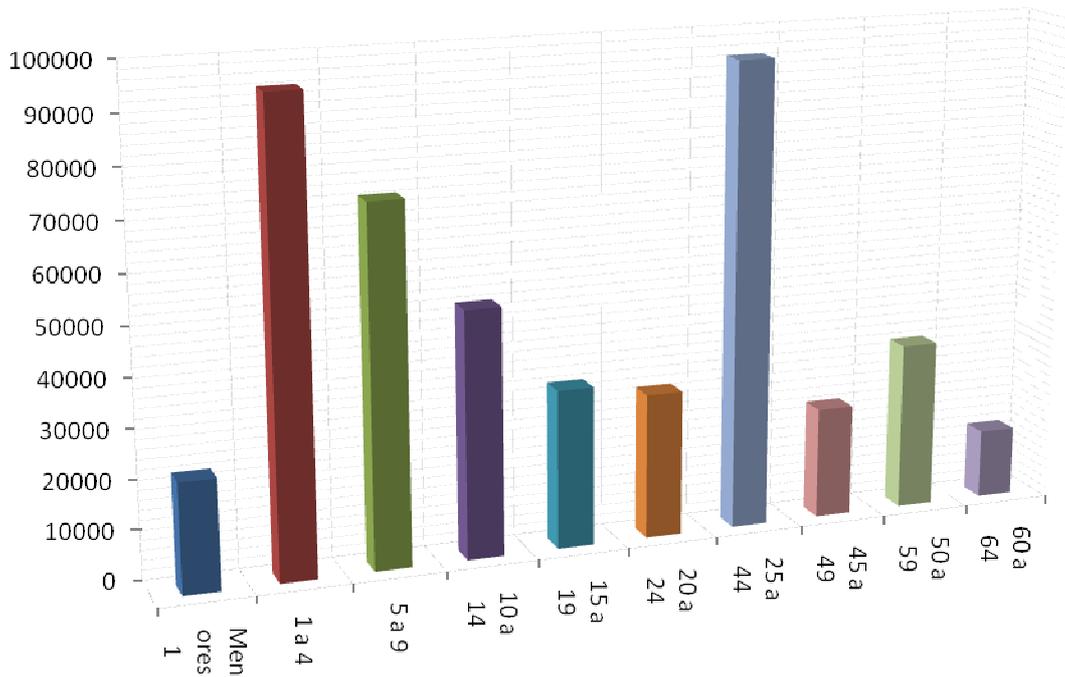


Gráfico 1. Tasa de morbilidad por amebiasis, por cada 100000 habitantes, tomando en cuenta diferentes edades de la población.

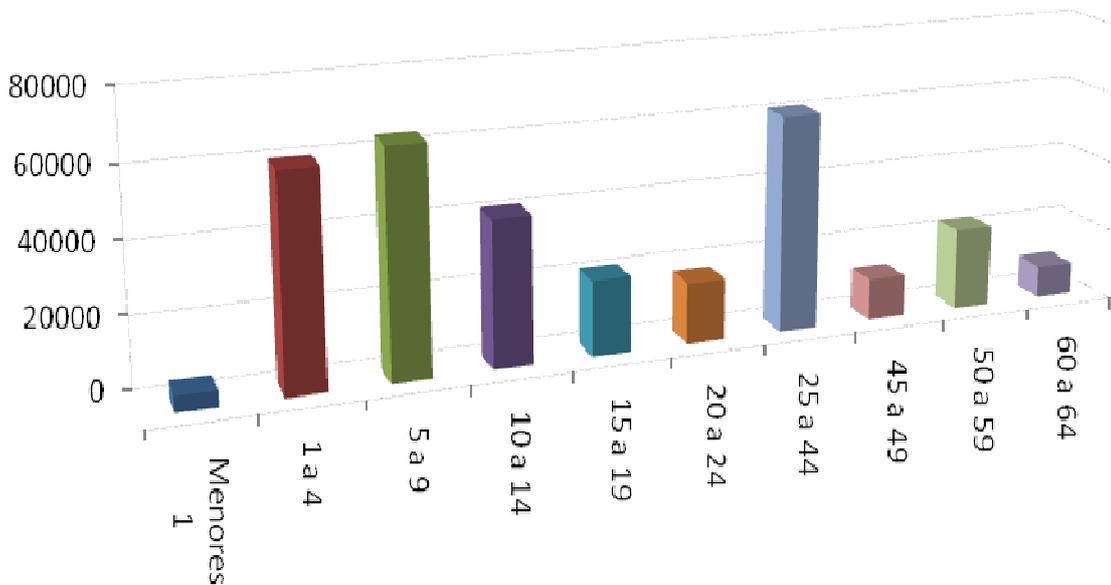


Gráfico 2. Tasa de morbilidad por helmintiasis, por cada 100000 habitantes, tomando en cuenta diferentes edades de la población.

Actualmente existe un incremento en todas las medidas higiénicas, sanitarias, y de los tratamientos antiparasitarios, aun así, en las zonas alejadas existen dificultades para implementar estas medidas, además de que se reportan casos de falla terapéutica.

2.2. Protozoarios

Los protozoarios son organismos unicelulares que desempeñan todas las funciones de un organismo vivo, estos organismos se encuentran incluidos dentro del reino protista, quiere decir que están dotados de un núcleo verdadero. Los protozoarios de interés en este trabajo son: *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Los dos primeros se relacionan con diarreas agudas o crónicas y el tercero con vaginitis. El fármaco de elección para el tratamiento de estas infecciones es el MTZ que es un derivado de imidazol.

2.2.1. *Entamoeba histolytica*

La infección por *E. histolytica* se conoce como “patología de la pobreza”, es responsable de hasta 100000 defunciones anuales, colocándola en el segundo lugar de mortalidad por protozoarios parásitos. La alta frecuencia de amebiasis está dada por varios factores como falta de saneamiento ambiental, escasez de agua potable y drenaje, poca higiene personal e insuficiente educación.

Se sabe que muchas personas infectadas con *Entamoeba* nunca desarrollan síntomas y estas infecciones desaparecen espontáneamente, lo que sugirió la existencia de dos especies: una capaz de causar una enfermedad invasora (*E. histolytica*) intestinal y extraintestinal, y otra que no causa enfermedad, a la que se le denominó *E. dispar*.

La Organización Mundial de Salud propone para el control de la amebiasis dar tratamiento solamente en el caso de identificar a *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas.⁴

2.2.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* se muestra en la **Figura 1**. Este protozooario existe en dos formas evolutivas: trofozoíto y quiste. Los quistes entran por vía bucal y avanzan por el tubo digestivo hasta llegar al estómago. En este sitio, el pH del jugo gástrico y las enzimas hidrolíticas destruyen la pared del quiste del parásito sin afectar su citoplasma, al pasar al duodeno se libera en la fase de trofozoíto con cuatro núcleos. Inmediatamente se divide cada núcleo para dar lugar a un trofozoíto con ocho núcleos llamado amoeba. Este estado del parásito es tan inestable que cada núcleo se separa y origina ocho pequeños trofozoitos uninucleados los cuales se reproducen por fisión binaria, se establecen en el colon, que posee un pH de 8 a 9, donde se alimentan de bacterias y restos celulares. Dado a que en esta porción del intestino los trofozoitos están deshidratados comienza su transformación en quiste. Los quistes tetranucleados abandonan el organismo humano junto con las heces, pueden expulsarse también en la forma de quistes binucleados o uninucleados si el tránsito intestinal de la persona infectada es relativamente rápido

Después de ser eliminados con las heces, los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales, la infección no se transmite por trofozoítos, los cuales son expulsados durante los periodos de colitis aguda, debido a que se desintegran fuera del cuerpo rápidamente con el jugo gástrico.

La infección puede producirse con solo un quiste en el agua o alimentos contaminados, o debido a que las personas manipulan los alimentos sin el aseo adecuado.⁵

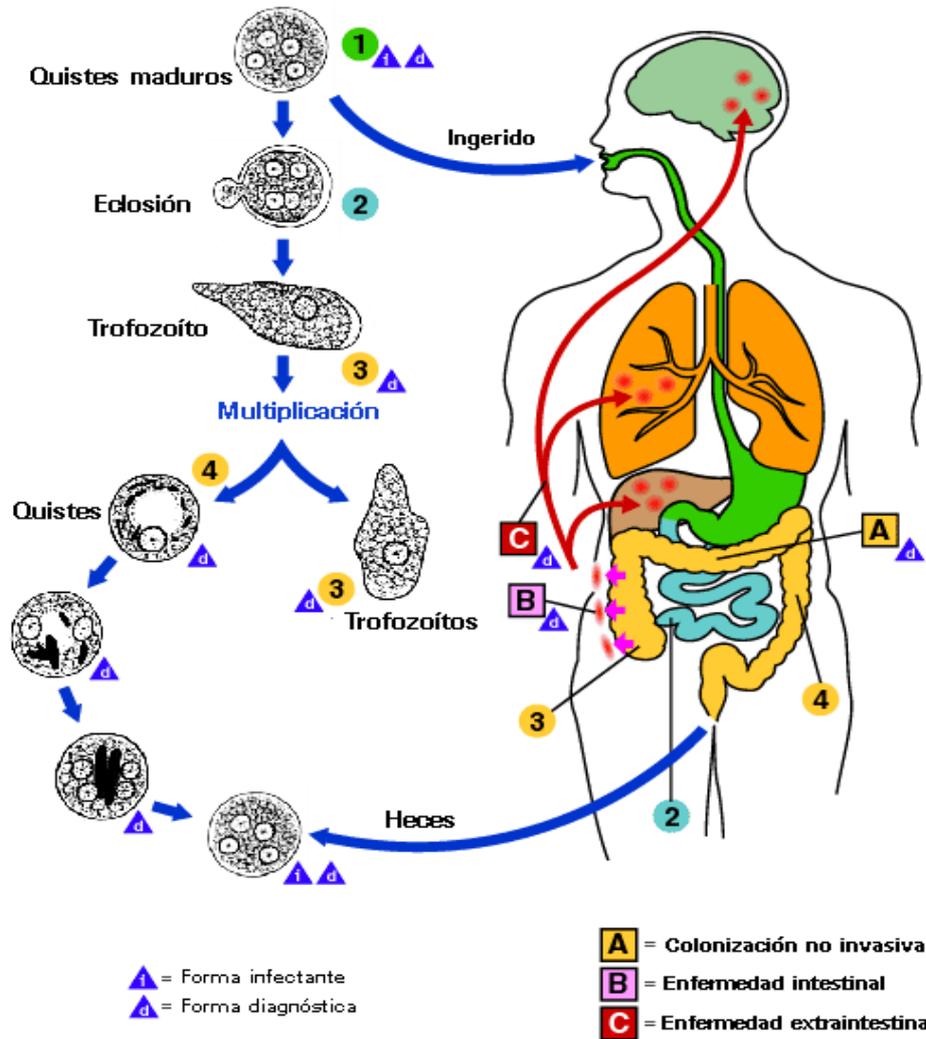


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

2.2.2. *Giardia intestinalis*

También conocida *Giardia duodenalis* y *Giardia lamblia*, es el agente causal de la giardiosis que es una enfermedad diarreica y es posiblemente la infección intestinal más frecuente en zonas urbanas. La OMS calculó desde 1988 que hay más de 250 millones de personas infectadas en el mundo.

Su hábitat en el huésped se encuentra en el yeyuno y duodeno, y por esto se le conoce también como *Giardia duodenalis*. Es un protozoo arcoflagelado, anaerobio tolerante y es causa común de diarrea endémica, y epidémica en todo el mundo, la transmisión ocurre principalmente por consumo de agua contaminada, pues el quiste es relativamente resistente a la cloración y puede sobrevivir varias semanas a

temperaturas bajas, otros factores de riesgo incluyen la exposición con un miembro de la familia infectado, la exposición en instituciones como guarderías u hogares de ancianos.

En cuanto a las estrategias para el control epidemiológico de *Giardia* se incluyen: evitar la irrigación de verduras con aguas negras o no tratadas, abastecimiento doméstico de agua, la detección clínica y el tratamiento de los casos.

2.2.2.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *G. Intestinalis* se muestra en la **Figura 2**. Los quistes que salen con las heces de los humanos y animales contaminan en agua y los alimentos, y la infección se da cuando los quistes atraviesan el estómago y se exponen al pH ácido y desenquistan en el duodeno debido al cambio a pH alcalino. El proceso es rápido y el trofozoíto se divide asexualmente por fisión binaria longitudinal, el pH óptimo de desarrollo oscila entre 6.4 y 7.2.

Las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento, ya que constituyen elementos fundamentales para la biogénesis de sus membranas y los procesos de desenquistación, lo que promueve la colonización de duodeno, yeyuno e incluso íleon, la duración del ciclo celular varía entre seis y veinte horas o más. El enquistamiento se inicia debido a la escasez de colesterol, cuando los quistes se excretan en las heces ya son infectivos.

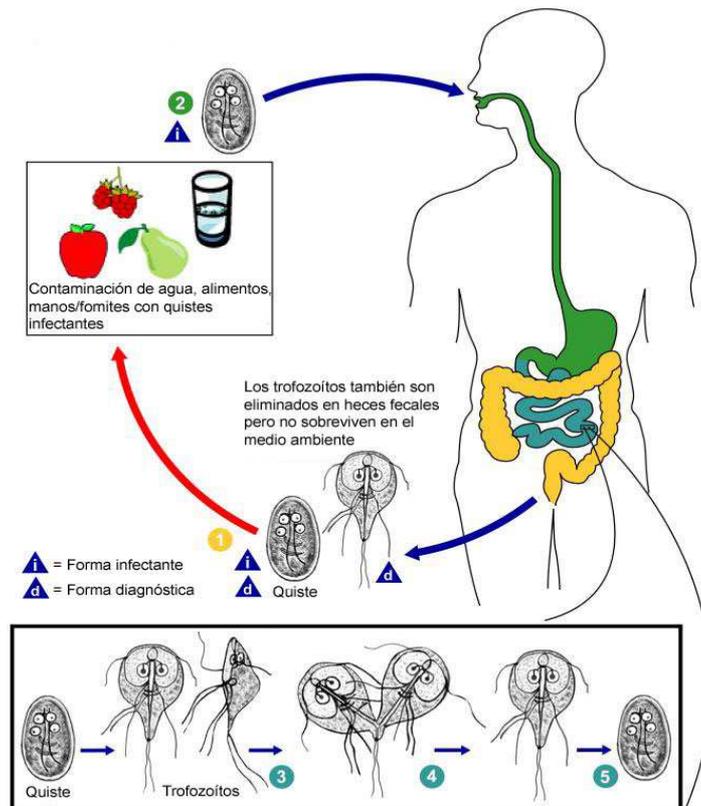


Figura 2. Ciclo de vida de *G. intestinalis*.

2.2.3. *Trichomonas vaginalis*

Causante de la trichomoniosis, protozoo de forma ovoide y periforme, flagelado, el trofozoito mide entre 10-30 micras de longitud y 10-18 de ancho, el hombre es el único huésped natural conocido. El parásito se reproduce en las mucosas de las vías urinarias, y genitales en la forma de trofozoito, esta misma forma es la infectante pues no existe el quiste. Es predominante en mujeres y es la infección más común por contacto sexual.

Aunque puede ser una infección asintomática, los síntomas iniciales consisten en disuria, flujo vaginal claro y espumoso que posteriormente se hace lechoso o purulento y fétido, dolor localizado e inflamación; el cérvix se torna rojizo, granuloso y friable. El hombre es portador, y en ocasiones puede presentar uretritis, prostatitis o epididimitis con escasa secreción uretral.

2.2.3.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis* se muestra en la **Figura 3**. El mecanismo de infección más frecuente es la transmisión del trofozoíto en forma directa de persona a persona por contacto sexual, el hábitat en las mujeres es la vagina y la uretra y en el hombre es la próstata, las vesículas seminales y uretra, sitios en los que se alimenta principalmente de bacterias, leucocitos y células de descamación. Los factores que predisponen el desarrollo de la trichomoniosis en la mujer son: el pH vaginal, 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 establecimiento del parásito provoca un cambio con la tendencia hacia la alcalinidad, también se producen erosiones en la superficie de la mucosa de la vagina y la uretra, con intensa reacción inflamatoria hasta el corion.⁵

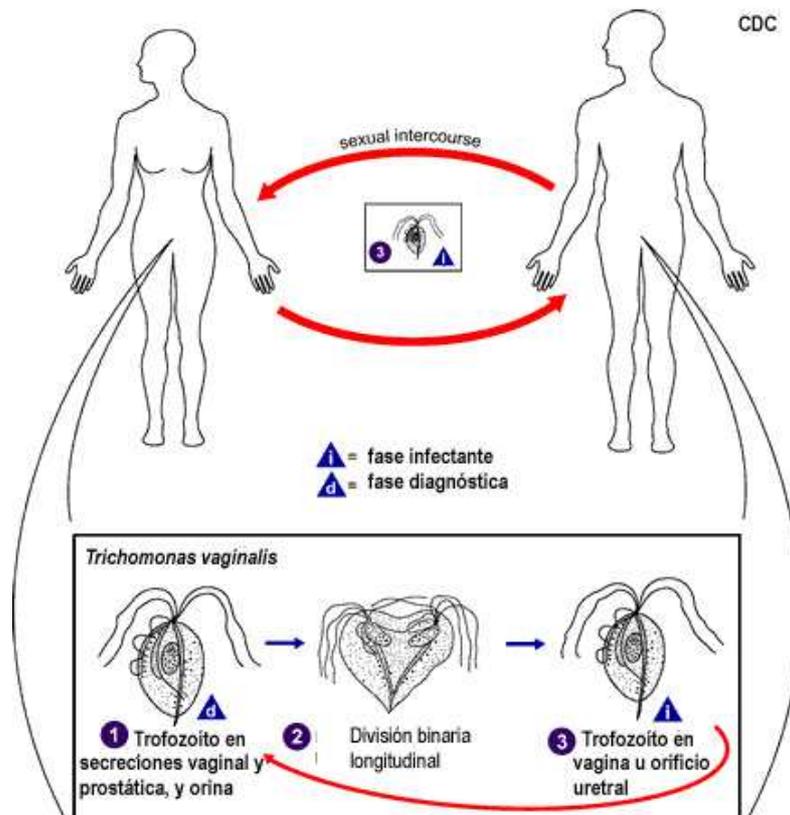


Figura 3. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.

2.3. *Trichinella spiralis* como modelo de helminto

La triquinelosis o trichinellosis es una enfermedad parasitaria producida en el hombre y los animales por larvas y adultos del nematodo *T. spiralis*. Desde el descubrimiento del parásito hasta nuestros días se ha reconocido como una parasitosis que representa gran importancia por el impacto socioeconómico que le causa directamente a la salud humana o a la ganadería.⁶ *Trichinella* es responsable de numerosos brotes en humanos que ocurren en diversas partes del mundo, incluyendo a México. Se estima que 11 millones de personas pueden estar infectadas a nivel mundial.⁷ Estos brotes han sido asociados principalmente al consumo de carne de cerdo y de caballo mal cocidas.

2.3.1. Ciclo de vida

La triquinelosis, como se muestra en la **Figura 4**. Se adquiere por la ingestión de carne que contenga pseudo-quistes (larvas enquistadas) (1) de *Trichinella*. Después de exponerse a los ácidos gástricos y pepsina, las larvas se liberan (2) e invaden la mucosa del intestino delgado donde se desarrollan en gusanos adultos (3) (hembras con 2.2 mm de longitud, machos con 1.2 mm; tiempo de vida en el intestino delgado: 4 semanas). Después de 1 semana, las hembras liberan sus larvas (4) que migran hacia los músculos estriados y se enquistan (5). Cabe mencionar que la especie *Trichinella pseudospiralis* no se enquista. El enquistamiento se completa de 4 a 5 semanas y la larva se mantiene enquistada por varios años. La ingestión de la larva enquistada, perpetúa el ciclo de vida. Las ratas y roedores son los principales responsables de mantener esta infección endémica. Los animales carnívoros y omnívoros, tales como cerdos y osos, se alimentan de los roedores infectados u otra carne de animal. Hay diferentes hospedadores animales involucrados en el ciclo biológico de las diversas especies de *Trichinella*. Los humanos se infectan accidentalmente cuando comen carne de animales carnívoros contaminada que no está apropiadamente procesada.⁸

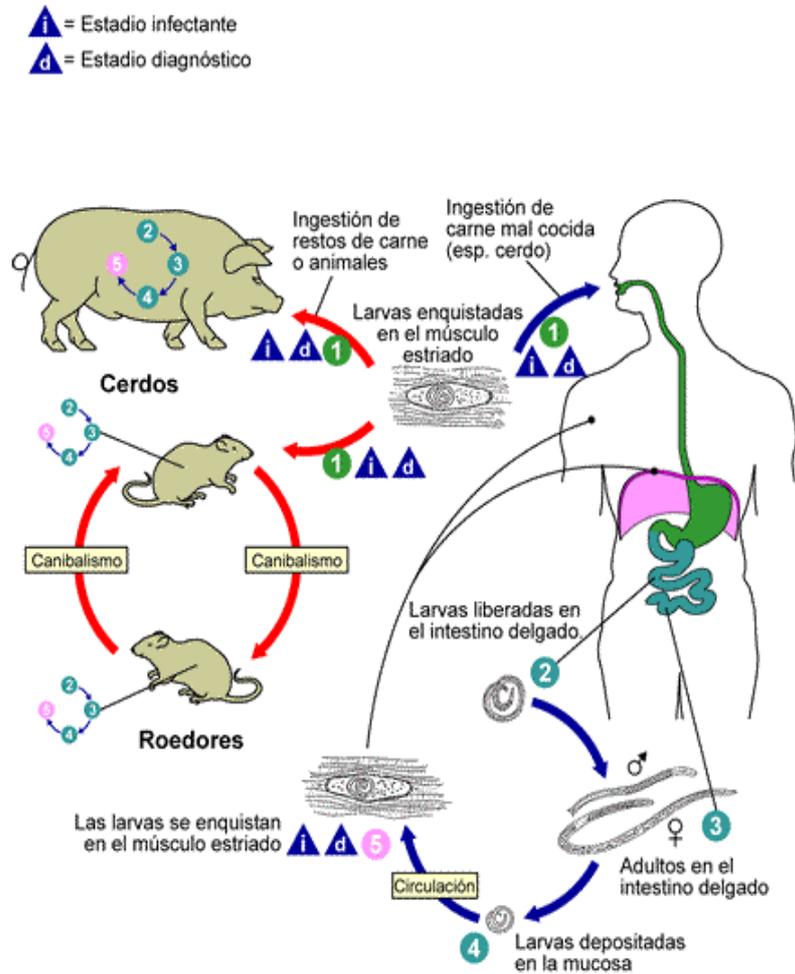


Figura 4. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

2.4. Tratamientos antiparasitarios

El control de las enfermedades parasitarias ha sido alcanzado por medio de la quimioterapia, mejoras de la educación, sanidad e higiene. Sin embargo, el tratamiento de algunas helmintiasis causadas por nematodos, trematodos y cestodos, que han invadido musculatura, circulación sanguínea, hígado, pulmones y cerebro, es un problema más serio que el que se presenta en el tratamiento de los parásitos que habitan la zona gastrointestinal; por ejemplo, la quimioterapia de las parasitosis sistémicas con derivados del bencimidazol requiere de altas dosis y tratamientos prolongados.

Desde hace más de 30 años no se han mejorado de manera sustancial los fármacos antiparasitarios que existen en el mercado. Esto llama la atención pues a la fecha hay mejor entendimiento sobre la patología de las enfermedades parasitarias, relación huésped-parásito, la fisiología y la bioquímica de los parásitos y con ello la aplicación del diseño racional de fármacos, en particular, mediante los principios de la Química Medicinal y los métodos computacionales⁵.

Los fármacos antihelmínticos de uso actual, ABZ y MBZ, **Figura 5**, son derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo). Se sabe que su mecanismo de acción es a través de su interacción directa con la β -tubulina.

Estos dos fármacos están incluidos en la lista de los fármacos esenciales de la OMS para el tratamiento de nematodos intestinales. Dentro del campo de la farmacoterapia con antiparasitarios, recientemente se ha desarrollado un fármaco de amplio espectro y que parece ser eficiente en infecciones por helmintos y protozoarios intestinales, este es la nitazoxanida, **Figura 6**.

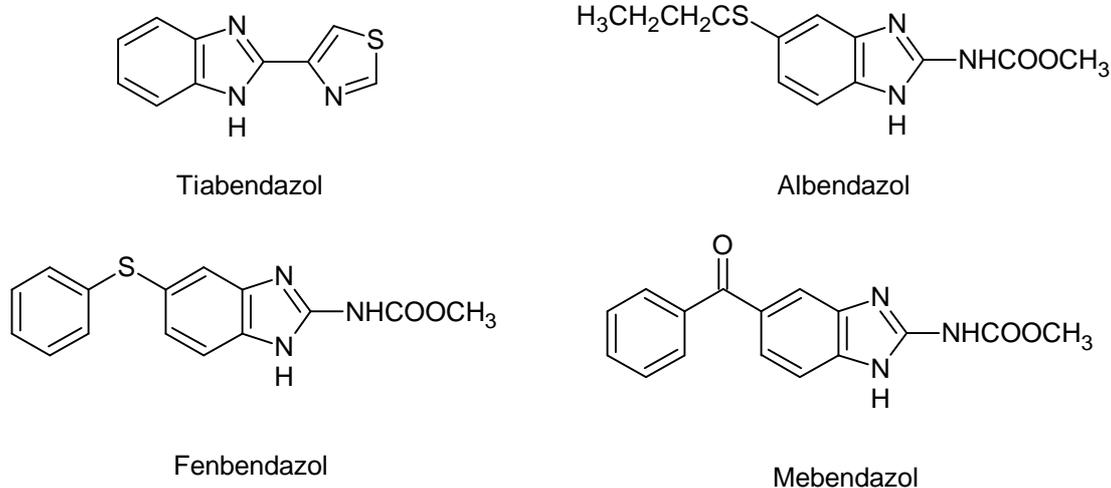


Figura 5. Estructura de algunos fármacos bencimidazólicos antihelmínticos.

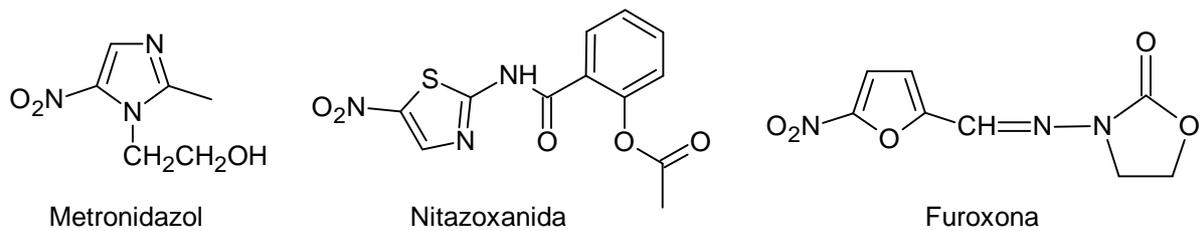


Figura 6. Estructura de algunos fármacos nitroderivados antiprotozoarios.

Si bien son fármacos usados comúnmente en el tratamiento de las parasitosis, presentan algunas desventajas como son:

- Efectos adversos molestos.
- Solo son efectivos sobre ciertas fases del parásito.
- Se han presentado casos de resistencia.

Los fármacos como el MTZ producen; náuseas, mutagenicidad en bacterias y altas dosis pueden causar cáncer en ratones. En el caso del ABZ, éste puede producir malformaciones fetales, es decir, es teratogénico, por lo que se contraindica en animales en periodo de gestación.⁴

Algunos BZC antihelmínticos sólo son efectivos sobre fases adultas, y no sobre las fases juveniles, siendo estos en la mayoría de los casos los que producen el daño mas grave, un ejemplo claro es sobre *F. hepatica* donde el ABZ es efectivo solo en la fase adulta y no en la juvenil.

Uno de los compuestos antihelmínticos de mayor uso es el triclabendazol (TCBZ) **Figura 7.** Usado comúnmente para la fasciolosis, causada por *F. hepática*, que produce graves pérdidas en el ganado bovino, ovino y caprino alrededor del mundo. Este fasciolicida tiene en la posición 2 un grupo metiltilio, en lugar del carbamato de metilo, lo cual le confiere mayor lipofilia, absorción y biodisponibilidad, Aunque es el fármaco de elección en contra de los estadios juveniles y maduros del parásito, su uso indiscriminado ha generado cepas resistentes del parásito en algunos países europeos desde mediados de los 90's.

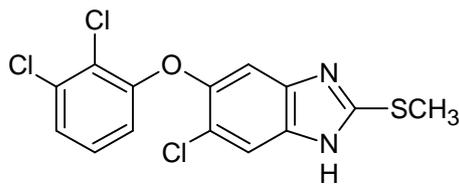


Figura 7. Estructura del Triclabendazol.

Debido a todo lo anterior, es de la mayor importancia realizar investigación conducente a la obtención de nuevos agentes antiparasitarios, más seguros y con menos efectos tóxicos para el huésped, más económicos y efectivos, ya que aun no se cuenta con un fármaco antiparasitario ideal con un amplio espectro.

2.5. Los Bencimidazoles

Una base para el interés de los bencimidazoles es su sistema de anillos usado como núcleo para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, establecido en 1950's. Como resultado de extensos estudios se benefició el tratamiento de las enfermedades parasitarias, aunque también tienen actividad antiviral, antifúngica, antihelmíntica y antibacteriana.

Como su nombre implica, se trata de un sistema bicíclico, un benceno fusionado a la posición 4,5 de un imidazol; aunque la estructura se dibuja con un protón en N1, éste se puede desplazar entre los átomos de nitrógeno, por tautomerismo, generando dos especies o tautómeros. Este fenómeno ocurre a través de interacciones moleculares entre 2 o más moléculas de bencimidazol, o a través de interacciones moleculares con disolventes próticos tales como el agua. Los compuestos que no están sustituidos en los nitrógenos del imidazol poseen propiedades tanto básicas como ácidas. Cuando el bencimidazol se encuentra *N*-sustituido el tautomerismo no es posible, por lo que se generan dos moléculas diferentes o regioisómeros, que pueden ser aisladas y caracterizadas.⁹

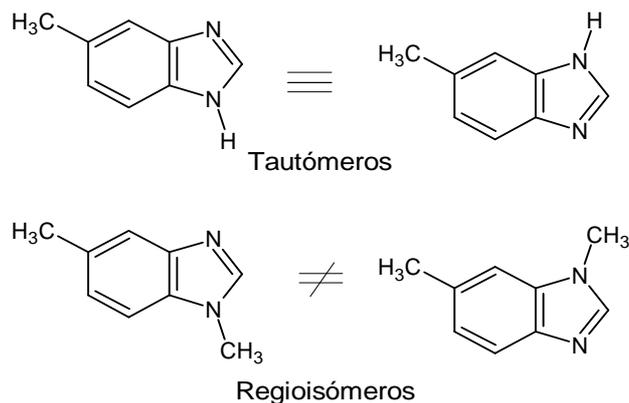


Figura 8. Tautomerismo e Isomerismo de los bencimidazoles.

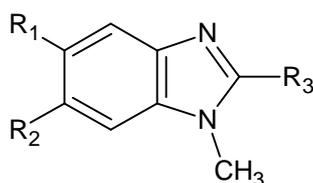
El descubrimiento del tiabendazol como un antihelmíntico de amplio espectro de actividad en 1961 fue muy prometedor; sin embargo, debido a su rápido metabolismo por hidroxilación aromática se genera el 5-hidroxitiabendazol, el cual se elimina rápidamente. Este inconveniente dio pie al diseño y síntesis de cientos de derivados del bencimidazol como agentes antihelmínticos, de los cuales menos de veinte existen en el mercado internacional. Entre ellos aparecieron los bencimidazoles sustituidos en la posición 5, para evitar el metabolismo en dicha posición, y en la posición 2 un grupo carbamato de metilo para incrementar la vida media, con la desventaja de ser pobremente absorbidos, lo que limita su acción a nivel del tracto intestinal.⁹

En adición a la actividad antihelmíntica, estudios recientes establecen que los BZC inhiben *in vitro* el crecimiento de algunos protozoarios como *T. vaginalis* y *G. intestinalis*, algunas evaluaciones biológicas sugieren que el mecanismo de acción antiprotozoaria de los BZC es diferente al mecanismo de acción antihelmíntica.¹⁰

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el Centro Médico Siglo XXI del Seguro Social se evaluó la actividad antiprotozoaria de 1-metilbencimidazoles contra *G. intestinalis* y *E. histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. Los resultados del estudio inicial¹⁰, aunado a los obtenidos a través de los años, se muestran en la **Tabla 1**. Se aprecia que contra *G. intestinalis*, con excepción de **3** y los 2-H **1**, **7**, **13** y **19** todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol,

destacando los derivados 2-SH. Contra *E. histolytica* también se obtuvieron compuestos más activos que el metronidazol. Aunque la actividad de estos compuestos no fue tan grande contra *T. vaginalis*, sí se obtuvieron compuestos más activos que el metronidazol. La actividad contra *T. spiralis* fue modesta. Estos resultados dieron pie a seguir investigando la actividad antiparasitaria de este tipo de compuestos.

Tabla 1. Evaluación Biológica de los 1-metilbencimidazoles



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ μM ^a <i>G. intestinalis</i>	Cl ₅₀ μM ^a <i>E. histolytica</i>	Cl ₅₀ μM ^a <i>T. vaginalis</i>	Viabilidad ^b <i>T. spiralis</i>
1	H	H	H	143.450	71.620	73.870	
2	H	H	CH ₃	0.089	0.062	4.321	25
3	H	H	NH ₂	1.360	0.346	0.482	NR
4	H	H	SH	0.018	0.006	2.786	
5	H	H	SCH ₃	0.033	0.196	0.898	
6	H	H	NHCO ₂ CH ₃	0.499	0.370	1.314	
7	Cl	H	H	53.110	49.910	25.700	
8	Cl	H	CH ₃	0.144	0.005	0.481	13
9	Cl	H	NH ₂	0.242	0.061	0.148	16
10	Cl	H	SH	0.045	0.010	35.540	18
11	Cl	H	SCH ₃	0.028	0.037	9.924	16
12	Cl	H	NHCO ₂ CH ₃	0.956	0.922	0.438	
13	H	Cl	H	85.660	47.250	24.390	
14	H	Cl	CH ₃	0.044	0.204	3.268	19
15	H	Cl	NH ₂	0.132	0.247	142.300	15
16	H	Cl	SH	0.020	3.773	0.503	
17	H	Cl	SCH ₃	0.122	0.569	1.091	12
18	H	Cl	NHCO ₂ CH ₃	0.320	0.287	0.349	
19	Cl	Cl	H	80.070	42.780	32.640	
20	Cl	Cl	CH ₃	0.055	0.013	17.620	27
21	Cl	Cl	NH ₂	0.074	0.037	5.115	34
22	Cl	Cl	SH	0.008	0.128	26.310	37

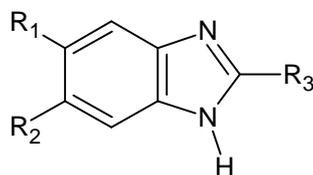
23	Cl	Cl	SCH ₃	0.024	0.128	26.310	46
24	Cl	Cl	NHCO ₂ CH ₃	0.233	0.230	0.538	
MTZ				1.228	0.350	0.216	
ABZ				0.037	56.60	1.592	67
NTZ				0.013	0.055	0.110	

^aLos valores son la media de tres experimentos. % de reducción metabólica en el ensayo de MTT.

NR = no reducción observada

Posteriormente se sintetizaron y evaluaron los análogos 1-H de los compuestos anteriores (**Tabla 2**), los cuales se sometieron a estudios de inhibición de la polimerización de la tubulina de cerebro de rata. También se encontró muy buena actividad antiprotozoaria y que únicamente los derivados bencimidazol 2-carbamatos de metilo inhibieron la polimerización de la tubulina.¹⁰ Con estos estudios se estableció que no se requiere la presencia de un hidrógeno en la posición 1 para tener actividad antiprotozoaria y que el mecanismo de acción de estos derivados es diferente al de los bencimidazol 2-carbamatos de metilo.

Tabla 2. Evaluación biológica de los 1H-bencimidazoles



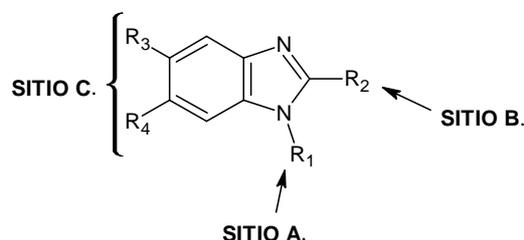
Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ μM ^a <i>G.intestinalis</i>	CI ₅₀ μM ^a <i>E. histolytica</i>	Viabilidad ^b <i>T. spiralis</i>
1	H	H	H	0.008	0.042	NR
2	H	H	CH ₃	0.317	0.007	NR
3	H	H	NH ₂	1.902	0.114	9
4	H	H	SH	0.040	0.133	11
5	H	H	SCH ₃	0.045	0.393	NR
6	H	H	NHCO ₂ CH ₃	0.057	0.204	NR
7	Cl(H)	H(Cl)	H	0.282	0.039	27
8	Cl(H)	H(Cl)	CH ₃	0.156	0.084	14
9	Cl(H)	H(Cl)	NH ₂	0.030	0.125	17
10	Cl(H)	H(Cl)	SH	0.081	0.005	13
11	Cl(H)	H(Cl)	SCH ₃	0.005	0.192	15
12	Cl(H)	H(Cl)	NHCO ₂ CH ₃	0.066	0.350	19
13	Cl	Cl	H	0.358	0.096	18

14	Cl	Cl	CH ₃	0.065	0.025	8
15	Cl	Cl	NH ₂	0.218	0.059	2
16	Cl	Cl	SH	0.078	0.055	23
17	Cl	Cl	SCH ₃	0.227	0.356	17
18	Cl	Cl	NHCO ₂ CH ₃	0.127	0.046	14
MTZ				1.228	0.350	NR
ABZ				0.037	56.60	34

^aLos valores son la media de tres experimentos. % de reducción metabólica en el ensayo de MTT.

NR = no reducción observada

2.6. Relación Estructura actividad (SAR) biológica de los bencimidazoles¹¹



Sitio A:

La sustitución en la posición 1 con grupos que ha llevado a compuestos antihelmínticos cuando son grupos que generan con un grupo carbamato de metilo, aunado a un hidrógeno en la posición 1, ha llevado a los bencimidazol 2-carbamatos, agentes antihelmínticos de amplio espectro de actividad.

Sitio B:

Los cambios en la naturaleza del sustituyente de la posición 2 han coincidido que el mejor grupo es el carbamato de metilo aunado al hidrogeno en la posición 1.

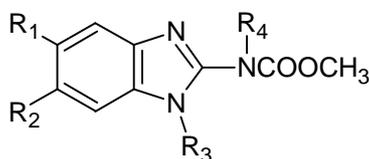
Sitio C:

La sustitución en las posiciones 5(6) de los bencimidazoles 2-sustituídos 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 pero previene la inactivación metabólica. Clorados en R₄ presentan buena actividad.

A partir de estos datos se han sintetizado y evaluado, diversos análogos del 5(6) clorocarbamato de metilo para elucidar los requerimientos estructurales y aumentar

la base de datos del laboratorio, y así, diseñar un modelo computacional capaz de predecir la actividad de nuevas moléculas.

Tabla 3. Actividad biológica de derivados del 5(6)-clorocarbamato de metilo ¹²



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Cl ₅₀ μM <i>G. intestinalis</i>	Cl ₅₀ μM <i>E. histolytica</i>	Cl ₅₀ μM <i>T. vaginalis</i>
1	H	H	CH ₃	H	0.4990	0.3732	1.3140
2	Cl	H	CH ₃	H	0.9560	0.9221	0.4380
3	H	Cl	CH ₃	H	0.3200	0.2879	0.3490
4	Cl	Cl	H	H	0.0308	0.0500	0.0923
5	Cl	Cl	H	CH ₃	0.0876	0.1824	0.1897
6	Cl	Cl	CH ₃	H	0.0625	1.0898	0.1284
7	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	0.0556	0.0416	0.6316
Metronidazol					1.228	0.350	0.216
Albendazol					0.037	56.60	1.592

La Cl₅₀ del Albendazol y Metronidazol contra los distintos protozoarios fue tomada de la referencia 13, Los compuestos del 1–4 fueron obtenidos de la referencia 13, mientras que los compuestos de 5–8 fueron obtenidos de la referencia 14.

2.7. Mecanismo de acción de los bencimidazol 2-carbamato de metilo

El modo de acción antihelmíntico de los bencimidazoles ha sido evaluado extensamente; sin embargo, poco se sabe del mecanismo de acción antiprotozoario. Lo que se sabe de la acción antihelmíntica es que los bencimidazoles pueden ejercer su actividad como inhibidores de la polimerización de la β-tubulina, inhibiendo el metabolismo energético o la recaptura de la glucosa.^{15,16}

La tubulina es una proteína dimérica citoesquelética compuesta por subunidades α y β de aproximadamente 50 Kda.¹⁶ Los microtúbulos existen en equilibrio dinámico con la tubulina, la proporción de tubulina dimérica con los microtubulos poliméricos es controlada por proteínas endógenas regulatorias y cofactores, GTP, Mg⁺², los cuales favorecen la polimerización, mientras que el Ca²⁺ o calmodulina favorecen la despolimerización,¹⁷ Los BZC ejercen su acción mediante la unión a la β-tubulina lo

que impide la asociación de las subunidades para formar el microtúbulo, mientras que por el otro lado éste se despolimeriza ocasionando una pérdida neta de su longitud. La perturbación del equilibrio tubulina-microtúbulo desencadena una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos, como resultado de esto un desequilibrio celular, como pérdida de transporte de vesículas secretoras y disminución de la reabsorción de glucosa.¹⁸

Ya que los BZC tienen una selectividad tóxica sobre la β -tubulina de los parásitos, sobre la de los mamíferos, estas moléculas se consideran antiparasitarios de gran éxito.¹⁸

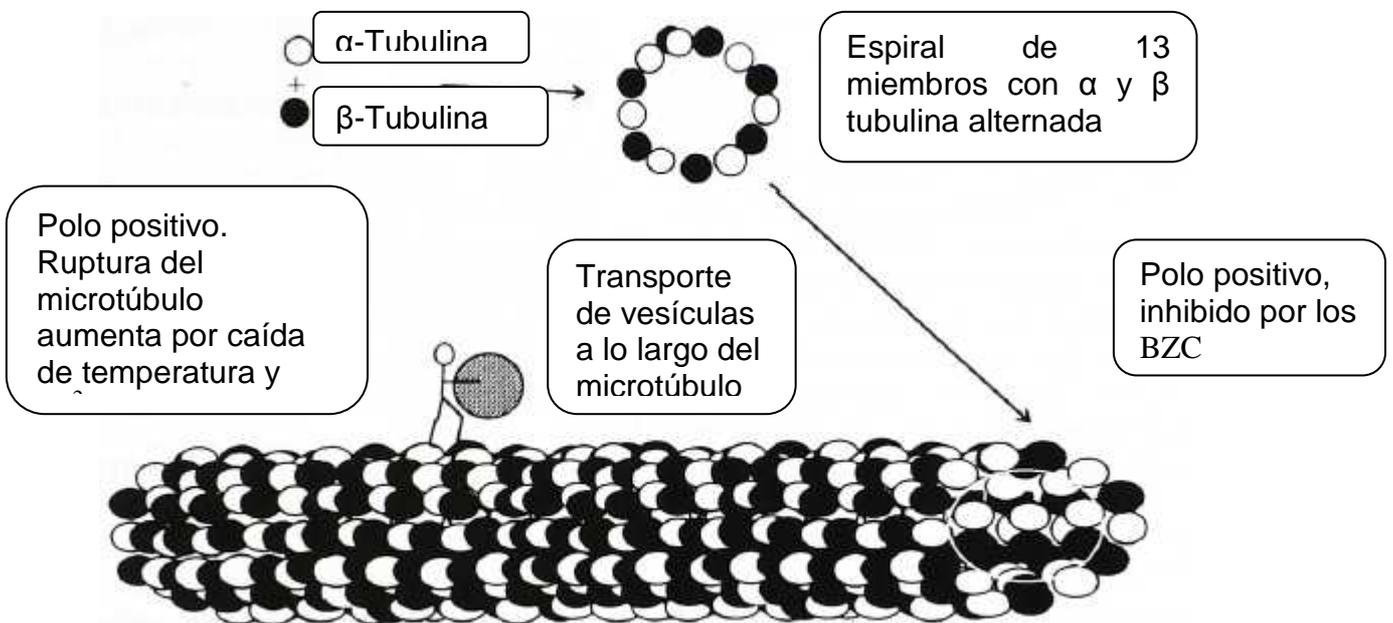


Figura 9. Mecanismo de inhibición de la β -tubulina por los BZC.

Recientes estudios sobre las interacciones de los BZC con la tubulina de algunos parásitos han mostrado que las poblaciones resistentes han reducido la afinidad. Tales cambios estructurales, se presume, son causados por una mutación en la fenilalanina a tirosina (No. 200)¹⁹ principalmente, aunque más de un mecanismo puede estar involucrado en la resistencia a los BZC, como lo pueden ser sus propiedades farmacodinámicas, pues estos son de complicada absorción, distribución, metabolismo, excreción y sitio de acción.^{20,21}

Para explicar cómo se unen los BZC a la β -tubulina, se realizó un estudio computacional que sugiere un modo de unión con la β -tubulina de *Haemonchus contortus* y el sulfóxido de albendazol (ricobendazol), **Figura 10**. En este estudio se muestran las interacciones con los aminoácidos en el posible sitio de unión, donde el grupo carbamato de metilo en posición 2 del anillo de bencimidazol y los grupos N-H en posición 1 resultan de gran importancia debido a sus interacciones con la fenilalanina (No. 200) y la serina (No. 165).¹⁹

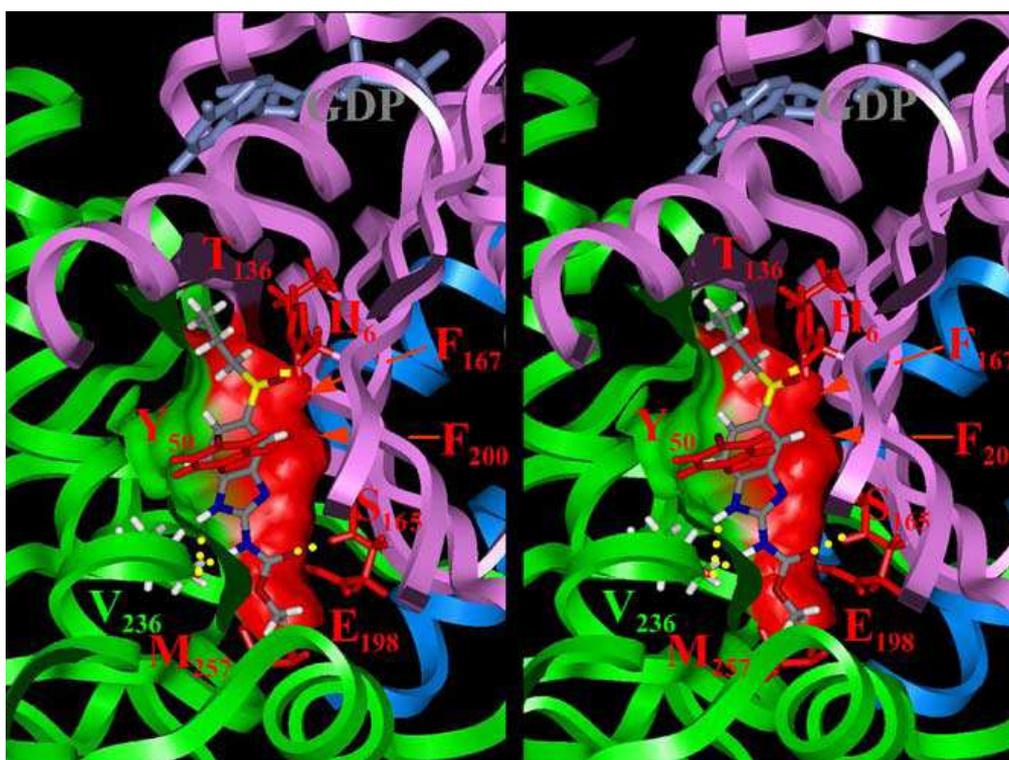


Figura 10. Posible modo de unión propuesto del ricobendazol a la β -tubulina de *Haemonchus contortus*.

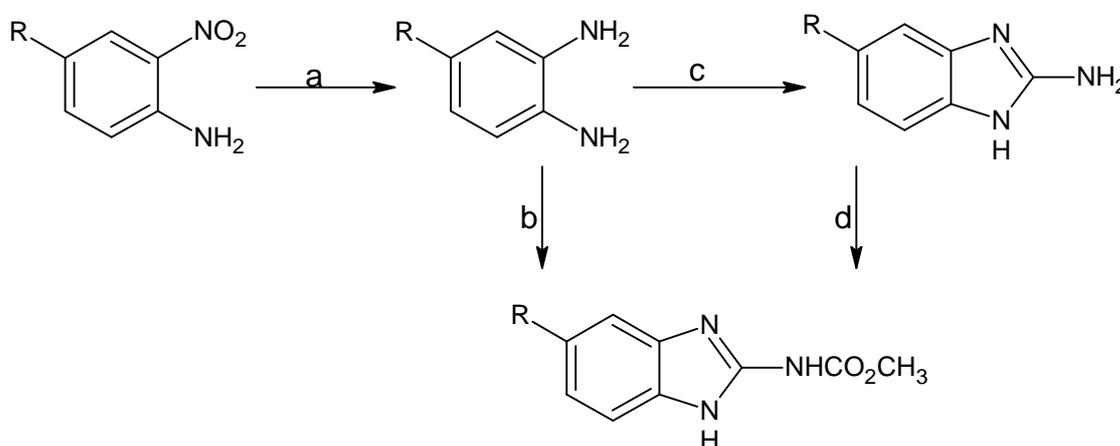
2.8. Métodos de Síntesis de los bencimidazol 2-carbamato de metilo

En la síntesis de los BZC se utiliza como materia prima una *o*-fenilendiamina adecuadamente sustituida, con 1-metoxicarbonil-*S*-metilisotiurea o 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiureas en metanol, etanol o algún otro disolvente apropiado. Como método de síntesis alternativo, las *o*-fenilendiaminas **III** pueden ciclarse con bromuro de cianógeno para formar los 2-aminobencimidazoles **IV** con

sustituyentes en la posición 5(6) que por acilación con cloroformiato de metilo dan el carbamato **V**, (**Esquema 1**).

A partir de compuestos nitrados, se realiza una reducción del grupo $-\text{NO}_2$, por hidrogenación catalítica formando así la 1,2-diamina correspondiente. Mientras que los bencimidazoles con sustituyentes arilo, alquilo o heteroarilo en C-2 se obtiene por ciclación de la 1,2-fenilendiamina con el aldehído o ácido correspondiente en ácido polifosfórico.

Esquema 1. Métodos de síntesis de los bencimidazol 2-carbamato de metilo



(a) H_2 , Ni-Raney; (b) $\text{H}_3\text{CO}_2\text{CNHC}(\text{SCH}_3)=\text{NCO}_2\text{CH}_3$, H^+ , pH 5; (c) BrCN , (d) ClCO_2CH_3

2.9. Métodos de síntesis de 1-metilbencimidazoles

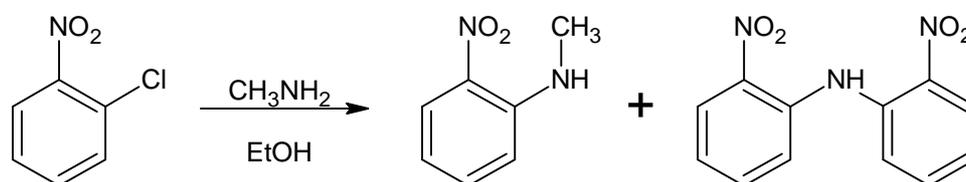
Existen diversos métodos para la síntesis de los 1-metilbencimidazoles, el método a elegir para la síntesis depende de los sustituyentes en el anillo aromático.

La metilación de los bencimidazoles produce la mezcla de los isómeros 1-metilados en una proporción 1:1 aproximadamente. Ya que la separación de estos isómeros resulta muy compleja se han diseñado métodos de síntesis alternos.

2.9.1 A partir de 2-Nitroanilinas

Este método se basa en la sustitución nucleofílica que sufre el nitrobenzeno sustituido por metilamina. Este tipo de reacción tiene el inconveniente del uso de un reactor y de altas temperaturas para poder realizar la sustitución nucleofílica aromática, lo que lleva a obtener productos de doble sustitución como impurezas, los cuales son difíciles de separar. **Esquema 2.**²²

Esquema 2. Sustitución nucleofílica de un nitrobenzeno por metilamina con su producto secundario



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la importancia de las parasitosis en nuestro país, y que los BZC son los compuestos más utilizados en la terapia contra las parasitosis causadas por helmintos, tanto en el sector veterinario como el humano, toma gran importancia el hecho de que los BZC son más usados en parasitosis del tracto gastrointestinal, dejando a un lado el tratamiento de las parasitosis sistémicas que también son de relevancia clínica. Por otro lado, el desarrollo de resistencia a estos fármacos de elección y la insolubilidad acuosa que los caracteriza, indican que es necesario contar con nuevos agentes antiparasitarios que sean más potentes que los ya existentes.

La presente investigación tiene como propósito obtener información básica sobre los requerimientos estructurales que deben tener los derivados del bencimidazol para la actividad antiparasitaria.

Hoy se sabe que la actividad giardicida y trichomonocida no se restringe a los BZC y que el H en posición 1 no es indispensable para la actividad. De acuerdo a pruebas de actividad biológica realizadas in vitro a los compuestos 5(6)-clorados 2-carbamato de metilo, el cloro en posición 5 aumenta la actividad antiprotozoaria en comparación con la del ABZ y el MTZ, del mismo modo aumenta la actividad con el cloro en posición 6 en relación al metilo y por último se observa que los compuestos diclorados resultan ser de los más activos, todos estos con una actividad mayor en relación a los bencimidazoles no clorados. Con base a los datos anteriores se plantea:

- ¿Existirá una diferencia significativa en la actividad antiprotozoaria por la sustitución en el carbamato de metilo del H con un metilo, en comparación con sus análogos (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il) carbamato de metilo?
- Es posible que la posición del sustituyente (5 ó 6) en el núcleo de bencimidazol tenga un papel importante en la actividad biológica de estos compuestos?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

- Los compuestos sintetizados tendrán una actividad mayor a la que presentaron sus análogos (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo y los *N*-metilados del 5,6-diclorobencimidazol.

4.2. Objetivo General

- Sintetizar y evaluar la actividad antiprotozoaria de 3 derivados del (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo, con la finalidad de establecer los requerimientos estructurales, determinando la importancia del enlace *N*-H en la actividad antiprotozoaria.

4.3. Objetivos Particulares

- Realizar la síntesis de (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo **AMRMX**, [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo **AMRMXII** y (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo **AMRMXIII**
- Purificar y determinar las constantes físicas, como punto de fusión y *R_f* de los compuestos finales.
- Caracterizar a los productos finales con técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM)
- Evaluar la actividad antiprotozoaria in vitro de los nuevos compuestos contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Comparar la actividad antiprotozoaria de los nuevos carbamatos con la de sus análogos (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo.

5. METODOLOGÍA

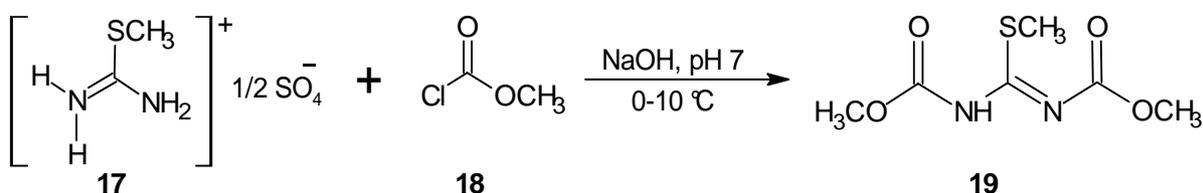
En esta sección primeramente se describe la parte química, la cual incluye las técnicas de preparación de cada uno de los compuestos intermediarios y finales. Después se describe la parte biológica que consiste de las pruebas de actividad antiprotozoaria a las que fueron sometidos los compuestos contra *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *T. spiralis*.

5.1. Parte Química

5.1.1. Síntesis de (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**)

Para la síntesis del compuesto **AMRMX** primeramente se sintetizó la 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea (**19**) a partir del hemisulfato de *S*-metilisotiourea comercial (**17**) y cloroformiato de metilo (**18**), como se muestra en el **Esquema 3**.²³

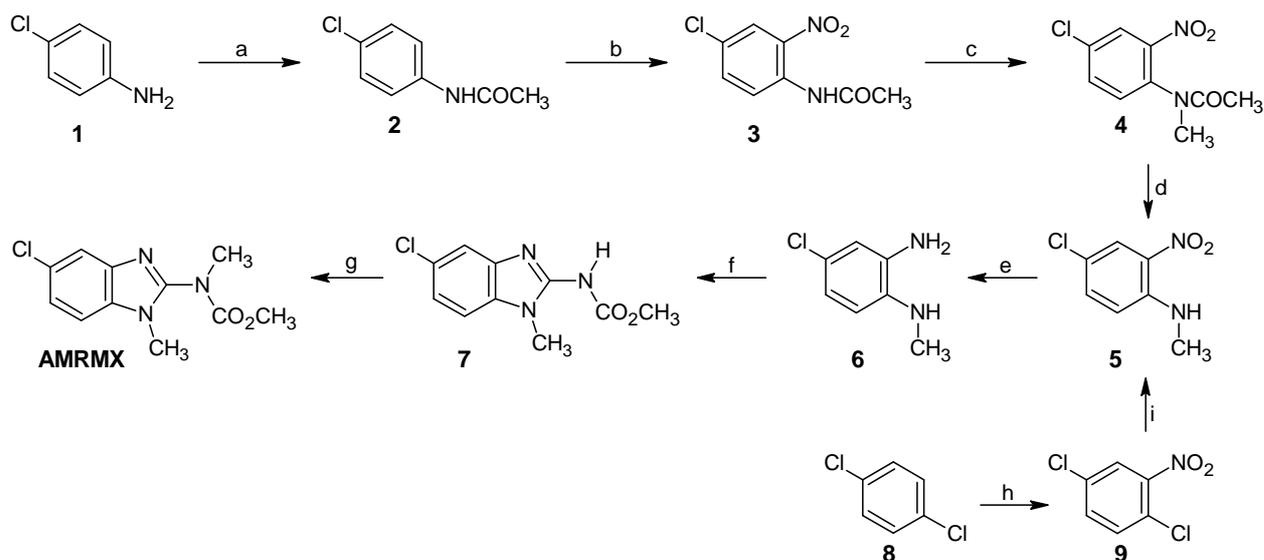
Esquema 3. Preparación del 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea



Posteriormente se siguió la secuencia de reacciones del **Esquema 4**. Se partió de la 4-cloroanilina comercial (**1**) la cual se pulverizó y adicionó sobre exceso de anhídrido acético para dar la *N*-(4-clorofenil)acetamida (**2**); ésta, bien seca, se nitró con mezcla sulfonítrica en frío y dio la *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**) que sometida a tratamiento con sulfato de dimetilo en monoglina y sosa acuosa permitió obtener la *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metil-acetamida (**4**). La hidrólisis ácida de **4** en caliente llevó a la 4-cloro-*N*-metil-2-nitroanilina (**5**) la cual se redujo con hidrógeno en presencia de Níquel Raney y dio la 4-cloro-*N*¹-metilbenceno-1,2-diamina (**6**). El tratamiento de la diamina anterior con 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea en caliente y medio ácido dio el (5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**7**), el cual se sometió a tratamiento con yoduro de metilo en medio básico y

dio el compuesto final (5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**). Adicionalmente, el compuesto **5** también se pudo preparar por nitración con ácido nítrico fumante, en frío, del 1,4-diclorobenceno comercial (**8**). El 1,4-dicloro-2-nitrobenzenceno obtenido (**9**) se sometió a reacción con exceso de metilamina a presión y dio el compuesto **5**.

Esquema 4. Síntesis de **AMRMX** a partir de dos materias primas diferentes

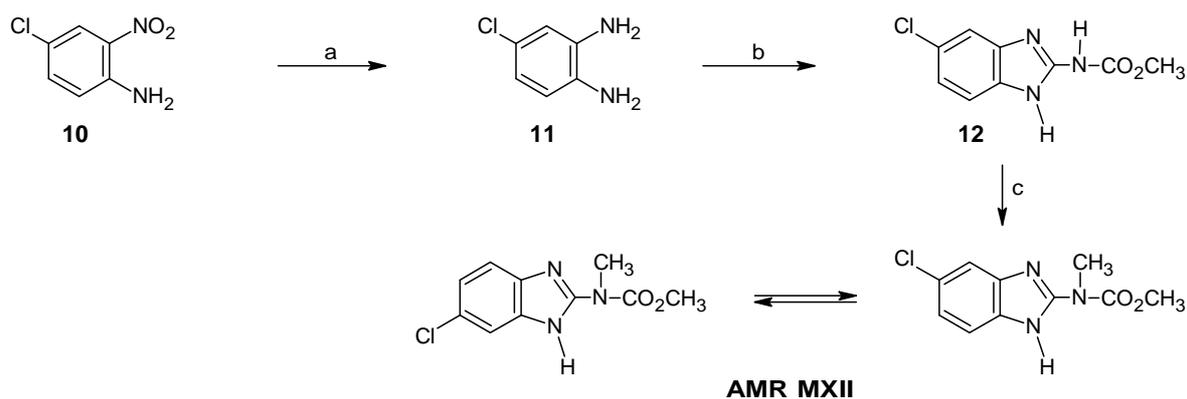


(a) Ac_2O ; (b) HNO_3 , H_2SO_4 , 0-5 °C; (c) 1) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, monoglisma, 2) NaOH , H_2O , 30-35 °C; (d) H_2SO_4 , 80-90 °C; (e) H_2 , Ni-Raney; (f) $\text{H}_3\text{CO}_2\text{CNHC}(\text{SCH}_3)=\text{NCO}_2\text{CH}_3$, H^+ , pH 5; (g) CH_3I , K_2CO_3 , DMF; (h) HNO_3 fum., 0-5 °C; (i) $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl}$, K_2CO_3 , 130 °C, presión

5.1.2. Síntesis de [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMXII**)

Para sintetizar el compuesto **AMRMXII**, el cual no tiene metilo en la posición 1, se siguió la secuencia sintética que se muestra en el **Esquema 5**. Se partió de la 4-cloro-2-nitroanilina comercial (**10**), la cual se sometió a reducción catalítica con hidrógeno y Ni-Raney para dar la 4-cloro-1,2-fenilendiamina (**11**), ésta se ciclocondensó con **19** y llevó al derivado bencimidazólico [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**12**), que se trató con yoduro de metilo en medio básico y dio el compuesto buscado **AMRMXII**.

Esquema 5. Síntesis de **AMRMXII** a partir de 4-Cloro-2-nitroanilina

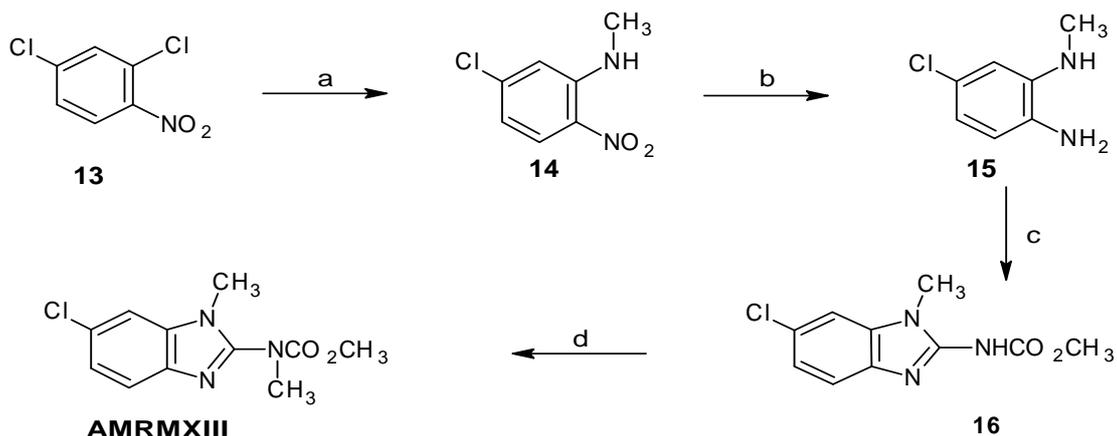


(a) H_2 , Ni-Raney, CH_3OH , AcOEt; (b) $H_3CO_2CNHC(SCH_3)=NCO_2CH_3$, H^+ , pH 5; (c) CH_3I , K_2CO_3 , DMF.

5.1.3. Síntesis de (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMXIII**)

El tercer compuesto buscado, **AMRMXIII**, se sintetizó de acuerdo a las reacciones del **Esquema 6**. Se partió del 2,4-dicloro-2-nitrobenceno comercial (**13**) que se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica con clorhidrato de metilamina y carbonato de potasio a presión; el producto obtenido, la 5-cloro-*N*-metil-2-nitroanilina (**14**) se sometió a reducción catalítica con hidrógeno y Ni-Raney para dar la 4-cloro-*N*-metil-1,2-diaminobenceno (**15**), que se ciclocondensó con (**19**) y llevó al derivado bencimidazólico (6-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**16**). Finalmente, (**16**) se trató con yoduro de metilo y carbonato de potasio y dio el compuesto esperado **AMRMXIII**.

Esquema 6. Síntesis de AMRMXIII a partir de 2,4-dicloronitrobenceno.



(a) $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl}$, K_2CO_3 ; (b) H_2 , Ni-Raney; (c) $\text{H}_3\text{CO}_2\text{CNHC}(\text{SCH}_3)=\text{NCO}_2\text{CH}_3$, H^+ , pH 5; (d) CH_3I , K_2CO_3 , DMF.

5.2. Parte Biológica

5.2.1. Evaluación in vitro de la actividad antiprotozoaria

El ensayo para la determinación de la actividad antiprotozoaria se realizó en la unidad de Investigación Médica de enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS. Centro Médico Siglo XXI, por el grupo de investigación de la Dra. Lilián Yépez Mulia

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se siguió el método descrito por Cedillo Rivera.²⁴ Se incubaron 5×10^4 trofozoítos/mL de *G. intestinalis* y 6×10^3 trofozoítos/mL de *E. histolytica* y *T. vaginalis* con los diferentes compuestos a concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$, usando el DMSO libre de compuestos como control negativo. Los tubos se incubaron a 37 °C por 48 h. Posteriormente, los trofozoítos se sembraron en medio fresco por 48 h. Finalmente se determinó el número de trofozoítos por mililitro en una cámara de Neubauer. Los resultados se analizaron por medio de un análisis probit para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada uno de los compuestos, la cual corresponde a la concentración del compuesto que inhibió en 50 % el crecimiento de los trofozoítos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Parte química

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos de los compuestos finales **AMRMX**, **AMRMX II**, **AMRMX III**, así como de sus intermediarios **2-13**, se muestran en la **Tabla 4**.

A continuación se presenta una breve discusión de los resultados obtenidos durante el proceso de síntesis, desde la preparación de los intermediarios hasta los productos finales.

6.1.1. Síntesis de los Intermediarios

El compuesto **5** se obtuvo por dos rutas sintéticas diferentes, **Esquema 4**. La primera partió de la 4-cloroanilina (**1**) que llevó, por reacciones conocidas, a la *N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**4**), que por hidrólisis dio **5** con un rendimiento global de 24.38% ($0.977 \times 0.6578 \times 0.516 \times 0.7352$). En una segunda ruta, el 2,4-diclorobenceno (**8**) llevó al 1,4-dicloro-2-nitrobenceno (**9**), que sometido a una sustitución nucleofílica aromática dio **5** con un rendimiento global mucho mayor de 84.65% (0.8701×0.9729).

El rendimiento global obtenido por la primera ruta para la obtención del compuesto **5** fue menor, esto era de esperarse por el mayor número de pasos realizados (cuatro) comparado con dos pasos por la otra ruta. Sin embargo, con ambas rutas se obtuvo el compuesto **AMRMX** puro.

La reducción del grupo nitro para la obtención de las *o*-fenilendiaminas **6**, **11** y **15** se realizó empleando H_2 y Ni-Raney como catalizador para evitar la deshalogenación. Los productos obtenidos por hidrogenación catalítica se sometieron inmediatamente a la siguiente reacción de ciclocondensación, para evitar su descomposición, dando el derivado bencimidazólico correspondiente. En la reacción de ciclocondensación se empleó el *N,N'*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea que es soluble en el disolvente orgánico, al igual que la *o*-fenilendiamina, de tal manera que la reacción procedió en un medio homogéneo y dio buenos rendimientos de los intermerdiarios **7**, **12** y **16**. Durante la ciclocondensación se liberó metanotiol (CH_3SH), el cual es sumamente

fétido, por lo que se acondicionaron 3 trampas con solución de hipoclorito de sodio y una de permanganato de potasio.

6.1.2. Síntesis de los compuestos finales

En la reacción de alquilación de **7** ó **16**, por tratamiento prolongado con CH_3I y K_2CO_3 en DMF, se obtuvo predominantemente el compuesto **AMRMX** o **AMRMX III**, ya que solo hay una posibilidad de *N*-metilación sobre el nitrógeno en el grupo carbamato de metilo. En cambio, cuando **12** se sometió a la misma reacción de *N*-metilación de los dos nitrógenos existentes en la molécula, se obtuvo una mezcla compleja de varios productos detectados por ccf, entre ellos **AMRMX** y **AMRMXIII**, por lo que la mezcla se tuvo que separar por cromatografía flash²⁵. En todos los casos la purificación de los productos finales fue difícil, por lo que se obtuvieron bajos rendimientos. Cabe mencionar que los compuestos finales son novedosos y en ese sentido se presentan los datos espectrométricos y espectroscópicos que permitieron su identificación.

Tabla 4. Rendimientos y constantes físicas de los productos finales y sus intermediarios sintetizados

Compuesto	PM	Rendimiento (%)	Pf (°C)	R_f (Sistema)
2	169.61	97.53	178.4-179.3	0.31 (I)
3	214.61	65.78	99.5-100	0.69 (I)
4	228.63	51.6	90.8-91.5	0.42 (I)
5^a	186.59	73.52	106.6-107	0.65 (I)
5^b	186.59	97.29	106.6-107	0.65 (I)
6	156.61	100	N.D.	0.26 (II)
7	239.66	91.70	203.3-204.4	0.70 (VI)
9	192.00	87.01	54-57.4	0.75 (I)
11	142.59	100	N.D.	0.49 (III)
12	225.63	52.93	295.4-296.7	0.55 (VI)
14	186.60	46.17	105.6-106.6	0.78 (V)
15	156.61	86.67	N.D.	0.35 (II)
16	239.65	70.06	191.5-193.0	0.55 (VI)
19	206.22	50.76	100-100.6	0.59 (I)
AMRMX	253.68	15.75	135.8-136.5	0.66 (VI)
AMRMX II	239.65	9.72	167-168.2	0.64 (VI)
AMRMX III	253.68	17.65	166.2-167.1	0.60 (VI)

^aPor hidrólisis de **4**. ^bPor Sustitución Nucleofílica Aromática en **9**. N.D.: No determinado

6.1.3. Espectroscopia y espectrometría de los compuestos finales

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales, así como las asignaciones realizadas para cada compuesto, se muestran en la **Tabla 5**. Estos datos permitieron la identificación inequívoca de los compuestos **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII**.

6.1.3.1. Espectroscopia de Infrarrojo

Los **Espectros 1, 5 y 10** de IR de los productos finales mostraron bandas de estiramiento y deformación características de los grupos metilo (2975-2950, 1470-1435), además, una banda intensa cercana a 1700 característica de los grupos carbonilo. En el caso del compuesto **AMRMX II** mostró adicionalmente una banda intensa y aguda arriba de 3000 cm^{-1} , característica del N-H.

6.1.3.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^1H

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos finales fueron concordantes con las estructuras propuestas. Así, para **AMRMX (Espectro 2)** y **AMRMXIII (Espectro 11)** se tienen tres señales para los protones de los tres CH_3 . Por otro lado, para poder asegurar que la estructura de la molécula **AMRMX II** era la correcta, se realizó el experimento NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), **Espectro 8**, el cual mostró una fuerte correlación entre los hidrógenos del grupo N-CH_3 y el protón del N-H^1 a través del espacio, en caso de que estuviera el metilo en posición 1, no podría verse interacción por el efecto tautomérico del H en el carbamato y el anillo del imidazol. **Figura 11**.

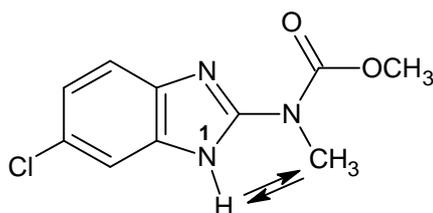


Figura 11. Interacción de H-N^1 del bencimidazol con $\text{CH}_3\text{-N}$ en **AMRMXII**.

Con esta información se puede asegurar que en el compuesto **AMRMXII** el metilo se encuentra unido al nitrógeno del carbamato y no al nitrógeno de la posición 1 del bencimidazol.

6.1.3.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C

Los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **AMRMX** y **AMRMXIII** concordaron con el número de átomos de carbono esperados para las estructuras planteadas. Sin embargo, en el caso del compuesto **AMRMXII** el **Espectro 7** mostró un número de átomos de carbono menor, debido a que hay señales duplicadas para los carbonos que fusionan los anillos, así como los que están unidos directamente a ellos, esto se debe al efecto tautomérico del anillo del bencimidazol. Esto no sucede en los demás espectros debido a la presencia del metilo en el anillo de bencimidazol, por lo que este dato nos sirve como una evidencia más para asegurar que el metilo se encuentra en la posición N del carbamato y no en el nitrógeno de la posición 1 del bencimidazol.

6.1.3.4. Espectrometría de masas

Los compuestos finales **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII** mostraron el ion molecular esperado, así como un pico con dos unidades más de masa, correspondiente a la presencia de un cloro en la molécula. La fragmentación del carbamato por pérdida de 59 unidades de masa dio el correspondiente pico base para los tres compuestos, **Figura 12**. En el caso de los compuestos **AMRMX** y **AMRMXIII**, que son regioisómeros, los espectros mostraron un patrón de fragmentación semejante, con los mismos picos para el M^+ , M^+2 y M^+-59 . Estos **Espectros 4**, **9** y **13** se determinaron por la técnica de impacto electrónico.

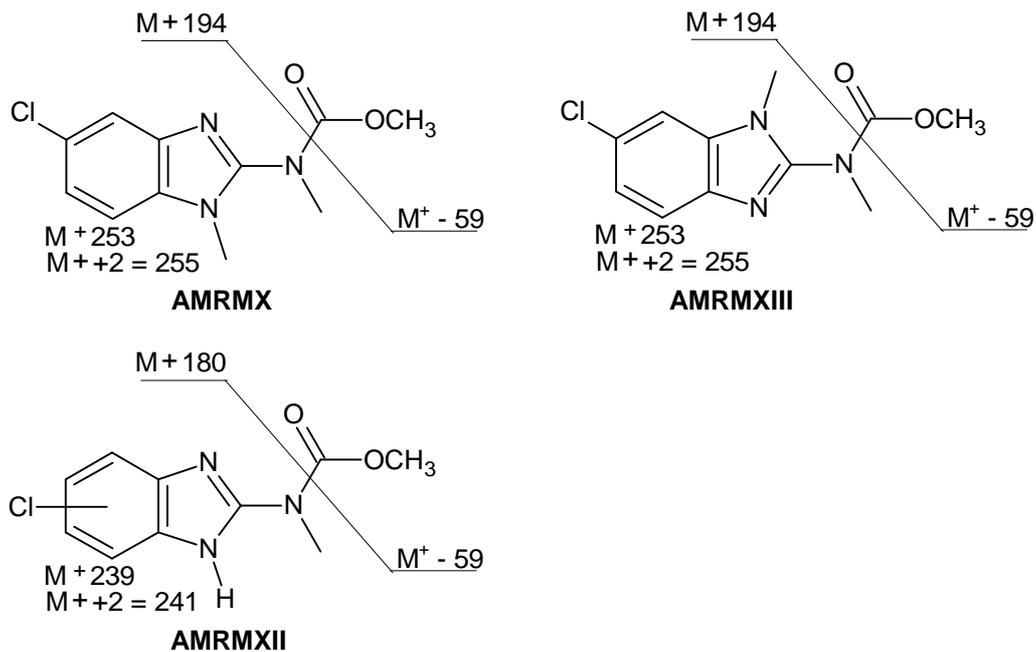
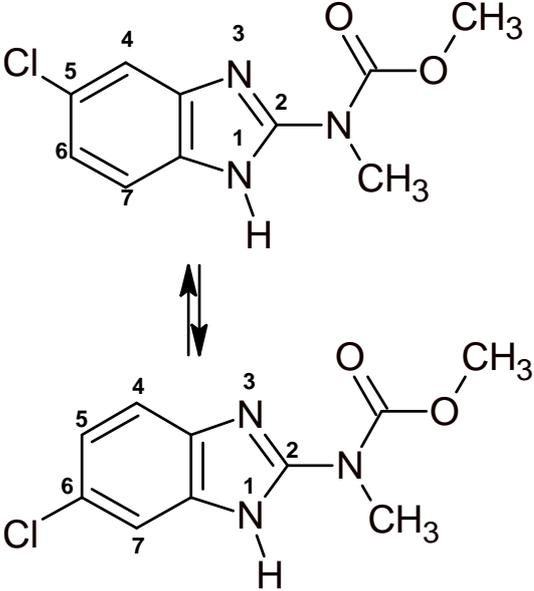
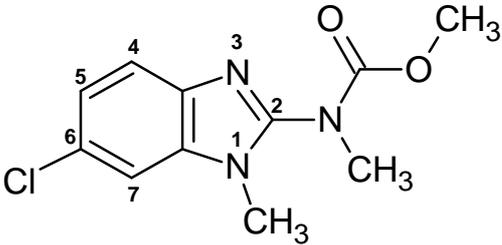


Figura 12. Sitio de ruptura para generar las fragmentaciones más importantes de los compuestos finales.

Tabla 5. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales

Compuesto	Señales
<p>AMRMX</p>	<p>Espectro 1. IR (KBr) en cm^{-1}: 3447.62, 2961.03, 2910.45, 1729.69, 1523.08, 1444.60, 1167.59, 1144.25.</p> <p>Espectro 2. RMN ^1H (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 3.28 (s, 3H, CH_3N^-), 3.61 (s, 3H, CH_3N^{1-}), 3.70 (s, 3H, CH_3O^-), 7.30 (dd, 1H, $J = 8.46$, $J = 1.92$ Hz, CH6), 7.62 (d, 1H, $J = 9$ Hz, CH7), 7.65 (d, 1H, CH4 $J = 2.32$ Hz)</p> <p>Espectro 3. RMN ^{13}C (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 31.15, 37.64, 54.79, 113.15, 119.63, 123.81, 127.58, 134.48, 142.22, 155.82.</p> <p>Espectro 4. EM (IE$^+$) m/z (int.%): 255 ($M^+ + 2$, 12), 253 (M^+, 39), 196 (35), 194 (100), 166 (20).</p>

 <p style="text-align: center;">AMRMXII</p>	<p>Espectro 5. IR (KBr) en cm^{-1}: 3336.72, 2957.01, 1701.96, 1563.72, 1452.69, 1341.20, 1199.18, 1157.50.</p> <p>Espectro 6. RMN ^1H (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 3.48 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3.86 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 7.11 (dd, 1H, $J = 8.88$, $J = 1.92$, CH6), 7.44 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, CH7) 7.50 (d, 1H, $J = 1.56$ Hz, CH4), 12.13 (s, 1H, $\text{N}^1\text{-H}$, intercambiable con D_2O).</p> <p>Espectro 7. RMN ^{13}C (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 34.08, 53.95, 121.56, 125.70, 149.96, 154.96.</p> <p>Espectro 8. Experimento NOESY. Ver espectro</p> <p>Espectro 9. EM (IE^+) m/z (int.%): 241 (M^{+2}, 9), 239 (M^+, 30), 182 (30), 180 (100), 152 (26)</p>
 <p style="text-align: center;">AMRMX III</p>	<p>Espectro 10. IR (KBr) en cm^{-1}: 3431.62, 2950.67, 1720.91, 152.20, 1450.63, 1345.79, 1165.63</p> <p>Espectro 11. RMN ^1H (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 3.28 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{N-}$), 3.60 (s, 3H, $\text{N}^1\text{-CH}_3$), 3.70 (s, 3H, CH_3O), 7.24 (dd, 1H, $J = 8.6$, $J = 1.96$ Hz) 7.58 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz) 7.65 (d, 1H, $J = 1.56$ Hz)</p> <p>Espectro 12. RMN ^{13}C (DMSO-d_6, MHz δ en ppm): 30.36, 36.84, 53.98, 111.05, 120.67, 122.76, 127.36, 135.72, 139.27, 155.16.</p> <p>Espectro 13. EM (IE^+) m/z (int.%): 255 (M^{+2}, 10), 253 (M^+, 34), 196 (40), 194 (100), 166 (22). (17), 149 (22)</p>

6.2. Parte biológica

6.2.1. Efecto de **AMRMX**, **AMRMX II** y **AMRMX** sobre *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Los resultados de la actividad antiprotozoaria in vitro de los tres compuestos sintetizados junto con sus controles positivos se muestran en la **Tabla 6 y Gráfico 3**.

Contra *G. intestinalis*, los compuestos **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII** fueron 19, 23 y 33 veces, respectivamente, más potentes que el metronidazol, el fármaco de elección para estos parásitos. Comparados con el albendazol, la actividad fue del mismo orden, siendo equiparable la del compuesto **AMRMXIII**. Destaca el compuesto **AMRMXIII** como el más activo de los tres en los tres parásitos.

Contra *E. histolytica*, los compuestos **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII** fueron 8, 9, y 13 veces, respectivamente, más potentes que el metronidazol. Sin embargo, comparados con el albendazol fueron 1,316, 1,450 y 2,096 veces más activos, respectivamente.

Contra *T. vaginalis*, los compuestos **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII** fueron 2.5, 2.6 y 3 veces, respectivamente, más potentes que el metronidazol. Comparados con el albendazol los compuestos anteriores fueron aproximadamente 19, 19 y 24 veces más activos. Destaca el compuesto **AMRMXIII** como el más activo de los tres contra los tres parásitos.

Tabla 6. Actividad antiprotozoaria de los compuestos finales sintetizados

Compuesto	CI ₅₀ (µM) <i>G. intestinalis</i>	CI ₅₀ (µM) <i>E. histolytica</i>	CI ₅₀ (µM) <i>T. vaginalis</i>
AMRMX	0.063	0.043	0.086
AMRMXII	0.054	0.039	0.083
AMRMXIII	0.037	0.027	0.067
Metronidazol	1.228	0.350	0.216
Albendazol	0.037	56.60	1.592

Con el propósito de poder visualizar los resultados de actividad obtenidos se calculo el inverso de CI_{50}

Lo que da el valor de $1/CI_{50}$ que se presenta para cada ensayo en el **Gráfico 3**.

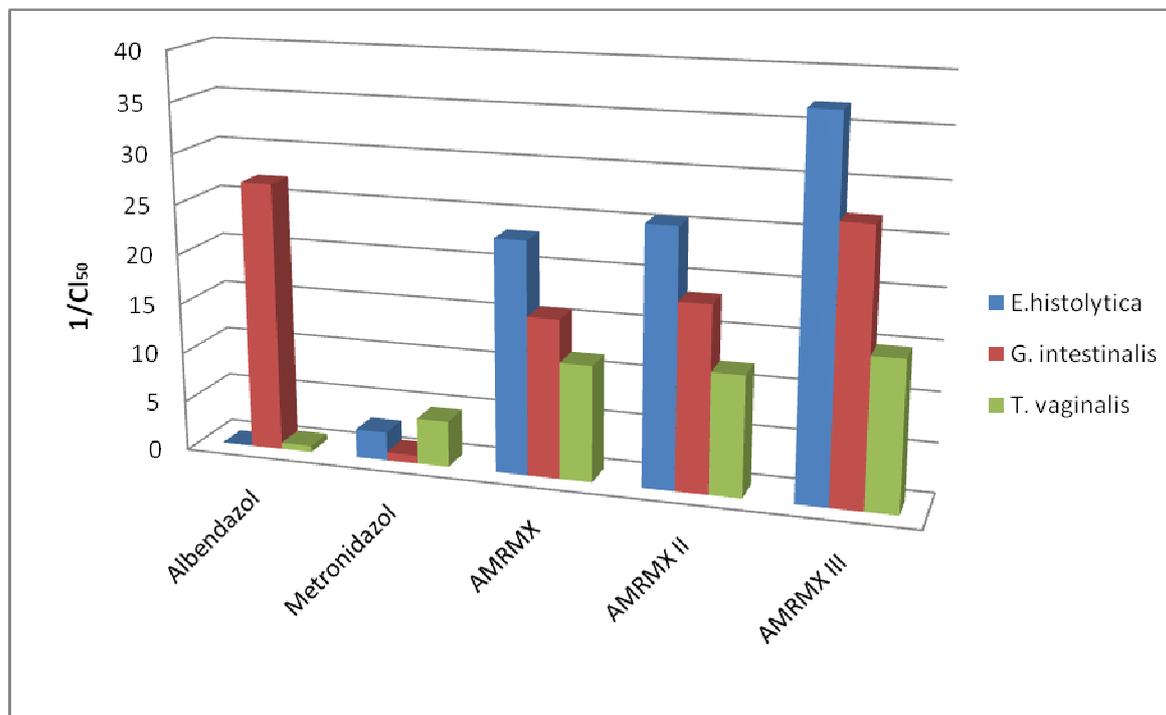


Gráfico 3. Potencia antiprotozoaria de los compuestos sintetizados en comparación con Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ).

La relación 1,6 del metilo en 1H respecto al Cl en el anillo del bencimidazol resultó ser la más activa, estos resultados nos hacen ver el efecto del grupo metilo en la posición 1, aparentemente la presencia del grupo metilo en esta posición no afecta en gran medida la actividad, ya que no hay una diferencia significativa entre los compuestos **AMRMX** y **AMRMXII** de los cuales la diferencia estructural es la presencia del metilo en la posición 1. Pero los tres compuestos cuentan con un Grupo metilo en el N- del carbamato.

Al comparar la actividad antiprotozoaria de los (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il) carbamatos de metilo compuestos **1**, **2**, **3**, **4** de la **Tabla 3**, éstos muestran una menor actividad que los compuestos sintetizados y la diferencia radica en la presencia del metilo en el carbamato. Pese a que tampoco se encuentra el metilo del carbamato en el compuesto **5**, éste cuenta con cloros en la posición 5 y 6, resulta interesante mencionar que éste ultimo resulta ser más activo que los

compuesto sintetizados contra de *G. intestinalis* a diferencia que con *E. histolytica* y *T. vaginalis*, las actividades fueron similares

En cambio los compuesto **AMRMX**, **AMRMX II** y **AMRMXIII** resultaron ser los más activos comparados con los (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo previamente sintetizados por nuestro grupo en contra de *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Lo que indica que los compuestos sintetizados tienen una mejora considerable en la actividad debido a la presencia del metilo tanto en el N- del carbamato como en la posición 1.

El compuesto **AMRMXIII** resultó ser el más activo de los tres en contra de los tres protozoarios, estudios previos en nuestro grupo, ya se había indicado una preferencia por los compuestos con una relación 1,6 metilo-cloro.

Este aumento en la actividad de los compuestos sintetizados posiblemente se deba a un incremento en la lipofilia de la molécula dada por la presencia de los 2 grupos metilo en posición 1 al bencimidazol y N- carbamato, lo que le permite atravesar con mayor facilidad la membrana celular.

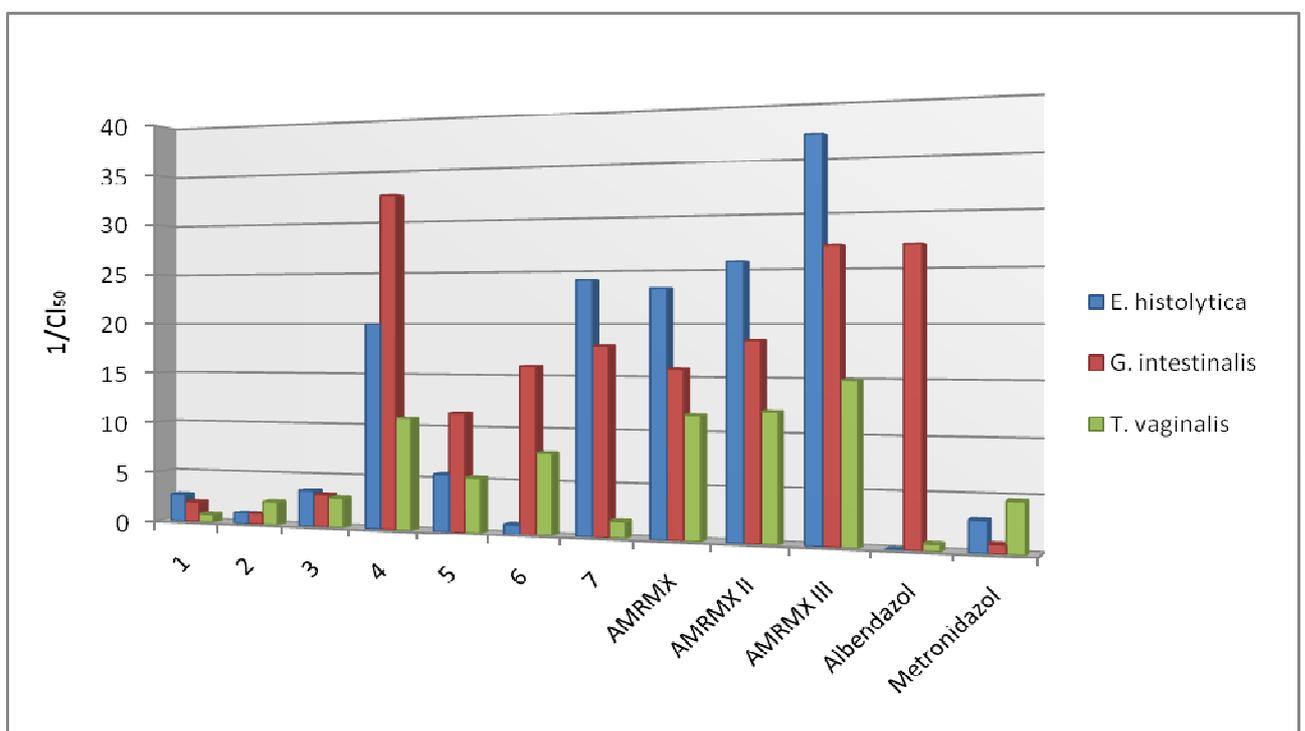
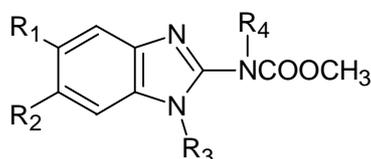


Gráfico 4. Potencia antiprotozoaria de los compuestos sintetizados anteriormente y ahora en comparación con Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ).

Tabla 7. Actividad antiprotozoaria (Cl₅₀) de los derivados *N*-metilados del 5(6) clorobencimidazol, Albendazol y Metronidazol

* En relación al efecto tautomerico del bencimidazol



Compuesto	Cl ₅₀ μM <i>E. histolytica</i>	Cl ₅₀ μM <i>G. intestinalis</i>	Cl ₅₀ μM <i>T. vaginalis.</i>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	0.3732	0.4990	1.3140	H	H	CH ₃	H
2	0.9221	0.9560	0.4380	Cl	H	CH ₃	H
3	0.2879	0.3200	0.3490	H	Cl	CH ₃	H
4	0.0500	0.0308	0.0923	Cl	Cl	H	H
5	0.1824	0.0876	0.1897	Cl	Cl	H	CH ₃
6	1.0898	0.0625	0.1284	Cl	Cl	CH ₃	H
7	0.0416	0.0556	0.6316	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃
AMRMX	0.043	0.063	0.086	Cl	H	CH ₃	CH ₃
AMRMX II	0.039	0.054	0.083	*Cl	*Cl	H	CH ₃
AMRMX III	0.027	0.037	0.067	H	Cl	CH ₃	CH ₃
Metronidazol	0.350	1.228	0.216				
Albendazol	56.60	0.037	1.592				

6.2.1. Evaluación de actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados contra *Trichinella spiralis*

En este estudio se determinó la actividad de los compuestos **AMRMX**, **AMRMX II** y **AMRMX III** sobre la fase entérica (fase adulta) de *T. spiralis* en un modelo murino de triquinellosis. La actividad encontrada se comparó con la del ABZ, fármaco de elección en el tratamiento de diversas helmintosis.

Los resultados de la actividad antihelmíntica muestran en la **Tabla 8** y en el **Gráfico**

5. Los experimentos se realizaron dos veces.

Tabla 8. Actividad in vivo de los compuestos sintetizados y el albendazol contra la larva muscular de *T. spiralis*

Compuesto	No. de Larvas Musculares	Reducción de la carga parasitaria (%)
*Control (-)	306	
AMRMX	NR	0
AMRMX II	240	22
AMRMX III	NR	0
ABZ	126	58.8

Debido a que los compuestos **AMRMX** y **AMRMIII** no presentaron efecto en la carga parasitaria, pues la reducción de la carga parasitaria fue de 0, se realizó un segundo ensayo, donde nuevamente no se mostró cambio en la carga parasitaria excepto con **AMRMX II**, el cual mantuvo su valor, (22%) por lo que la actividad de los compuestos sintetizados no mostró incremento como lo fue en el caso de los protozoarios.

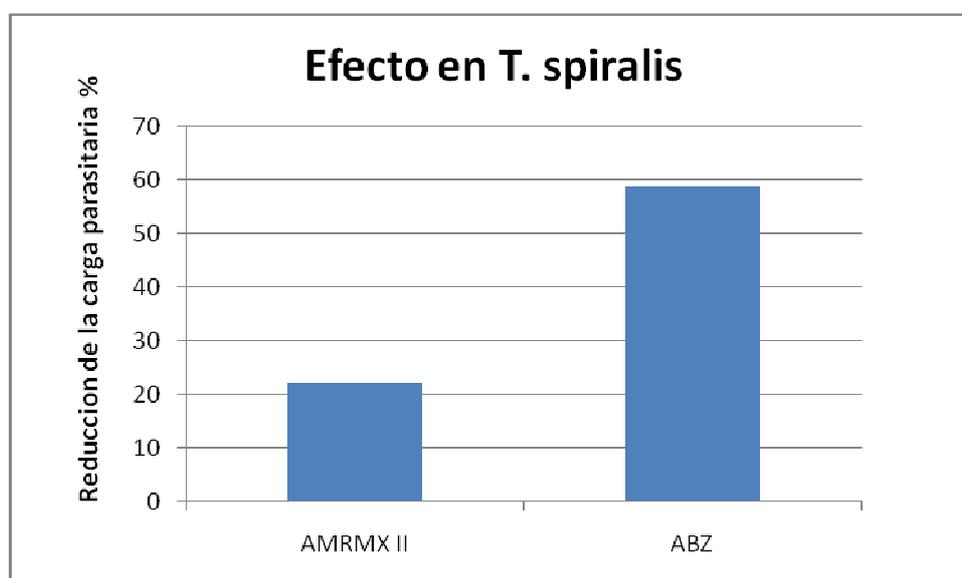


Gráfico 5. Único compuesto sintetizado con potencia en comparación con Albendazol (ABZ)

7. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron los tres compuestos propuestos: **AMRMX**, **AMRMXII** y **AMRMXIII**, las cuales son moléculas novedosas, las estructuras de los compuestos se comprobó por las técnicas espectroscópicas, como IR y RMN ^1H , así como técnicas espectrométricas. Se determinaron sus constantes físicas como *pf* y *Rf*. En el caso de los rendimientos estos fueron buenos con los compuestos ya recristalizados a excepción de la reacción de *N*-metilación la cual da un pobre rendimiento, donde el máximo obtenido fue de 17.51% del compuesto **AMRMXIII**.
- Se prepararon los compuestos intermediarios para la síntesis de los compuestos finales a partir de materias primas simples. Para el caso del compuesto **AMRMX**, se probaron dos métodos diferentes, donde el primero dio un menor rendimiento.
- Se evaluó la actividad antiparasitaria in vitro de los compuestos finales contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Los tres compuestos sintetizados tuvieron una mayor actividad que el Metronidazol contra los tres parásitos. Con respecto al Albendazol, la actividad de los 3 compuestos fue similar contra *G. intestinalis*, mientras que contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*, fue superior la de los tres compuestos. De todos los compuestos sintetizados el **AMRMXIII** fue el más activo.
- La relación 1,6 del anillo bencimidazólico en base al metilo-cloro y la alquilación en el N del carbamato es importante para la actividad biológica de estos compuestos, ya que **AMRMXIII** y **AMRMXII** fueron los que mostraron mayor potencia.
- La sustitución de un -H por un CH₃ en el carbamato incrementa la actividad antiparasitaria de los compuestos, no obstante en el caso de *G. intestinalis*, la actividad de los compuestos no superó la del Albendazol.

- De todos los análogos de (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo, los compuestos sintetizados fueron los de mayor actividad, lo que indica que la presencia del metilo, tanto en el carbamato como en el anillo de bencimidazol y la relación 1,6 con el cloro, son de gran importancia para mejorar la actividad biológica de estos compuestos.

9.1. Instrumentación

- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- La concentración de las soluciones se llevaron a cabo en el rotaevaporador marca Buchi modelo R-205 con vacío generado con bomba marca Buchi V-800.
- Las hidrogenaciones catalíticas se llevaron a cabo en un hidrogenador marca Parr modelo 3916EG con 60 lb/in² y 80 °C y 250 mL como capacidad máxima adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney al 10% marca Aldrich.
- La determinación de los puntos de fusión (pf) se realizó en un aparato Buchi 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 FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio. Las señales se reportan en cm⁻¹.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) se determinaron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 400 MHz, utilizando como disolvente DMSO_{d6}. 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.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C) se determinaron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 400 MHz, utilizando

- como disolvente DMSO_{d6} . Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).
- Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se determinaron por introducción directa de la muestra (ID), en un aparato marca JEOL modelo JMS-SX102A. La simbología utilizada es: M^+ = ión molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.

9.2. Sistemas cromatográficos

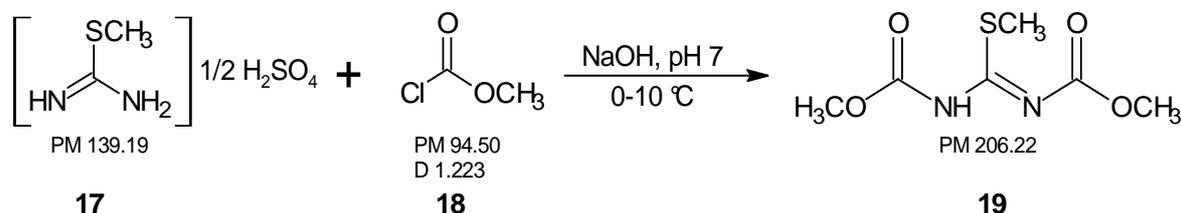
- El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas por gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV). Los sistemas utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Componentes	Proporción
I	Hexano–Cloroformo-Acetato de etilo	50:35:15
II	Cloroformo-Metanol	90:10
III	Cloroformo-Metanol	95:5
IV	Cloroformo-Metanol	98:2
V	Cloroformo-Metanol	99.5:0.5
VI	Acetato de etilo	100

Para la cromatografía en columna Flash se empleó el sistema Hexano:Acetato de etilo (80:20) como fase móvil.

9.3. Procedimientos sintéticos

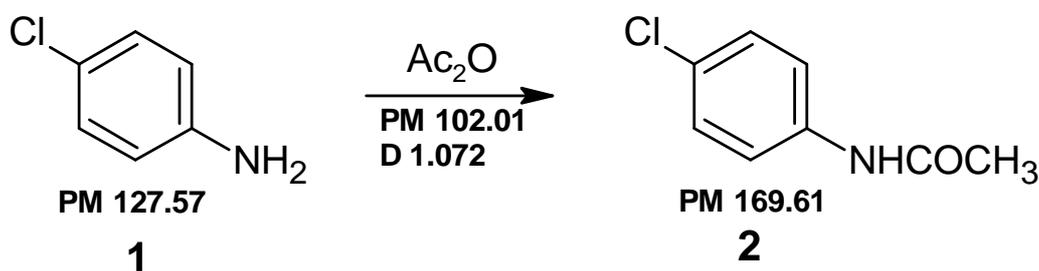
9.3.1. 1,3-dimetoxicarbonil-S-metilisotiourea (**19**)



En un matraz de bola de 500 mL con tres bocas, adaptado con agitación magnética, baño de hielo, termómetro, un potenciómetro y un embudo de adición, se mezclaron 51 g (0.3664 mol) de hemisulfato de S-metilisotiourea, 100 mL de agua y 69.711 g (57 mL, 0.7377 mol, 2.0133 eq) de cloroformato de metilo. La mezcla se enfrió en baño de hielo y después se le añadió, lentamente, una solución de 50 g (1.25 mol) de NaOH en 200 mL de agua, mantenido la temperatura entre 0-15 °C y el pH 7-7.5. El producto se extrajo 3 veces con 200 mL de cloroformo, el extracto se secó con sulfato de sodio anhidrido y se evaporó a presión reducida. El producto se lavó con metanol. Se obtuvieron 38.35 g (50.76%) de cristales blancos que mostraron una sola mancha en ccf (R_f de 0.59 Sistema I) y un pf 100-100.6 °C, [Lit.²⁶ °C].

9.3.2. Síntesis de (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**)

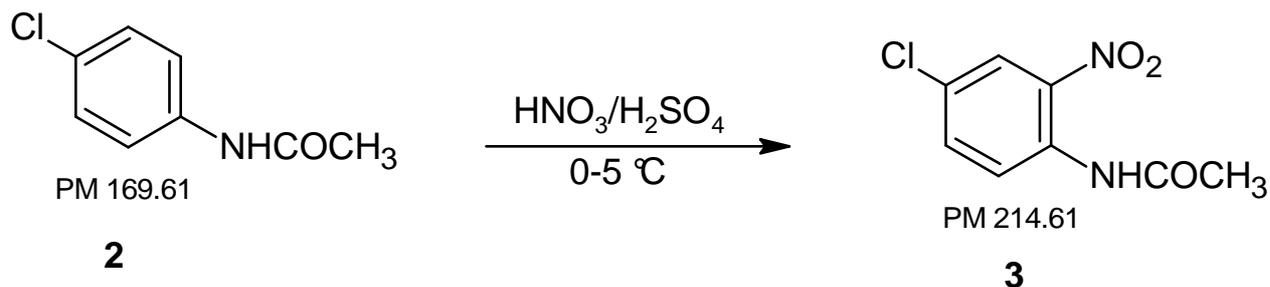
9.3.2.1. 4-Cloroacetanilida (**2**)



En un vaso de precipitados de 100 mL, acondicionado con un termómetro y agitación magnética, se colocaron 32.16 g (30 mL, 0.3200 mol, 1.34 eq) de anhídrido acético y se le fueron agregando 30 g (0.2351 mol) de 4-cloroanilina (**1**) de tal forma que la temperatura no excediera los 80 °C. Después de la adición se mantuvo en agitación 15 minutos. La mezcla de reacción se vertió sobre agua fría y

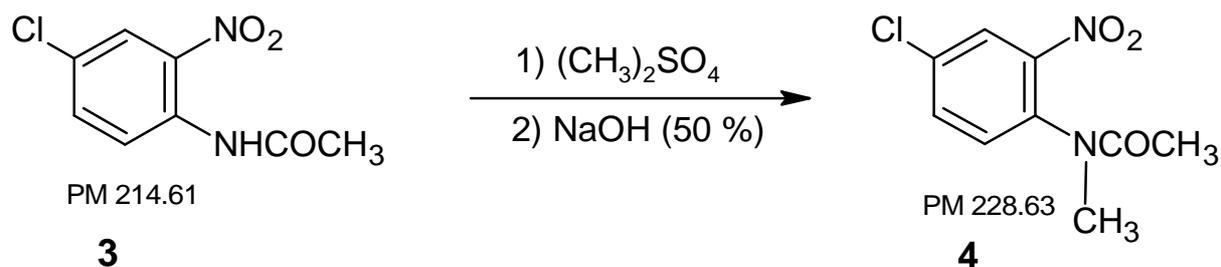
el residuo formado se separó por filtración con succión, se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 38.96 g (97.70%) de un polvo gris, el cual mostró ser un solo compuesto por ccf (R_f 0.31, Sistema V) con punto de fusión de 178.4-179.3 °C [Lit.²⁷ 178-179 °C].

9.3.2.2. 4-Cloro-2-nitroacetanilida (**3**)



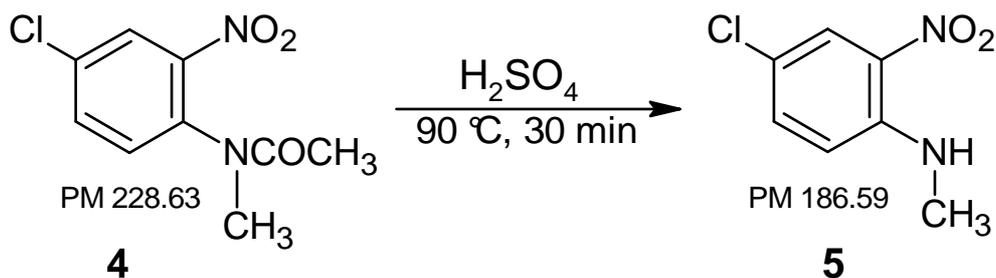
En un vaso de precipitados de 500 mL, acondicionado con termómetro, agitación magnética, embudo de adición y un baño de hielo-agua con sal, se disolvieron 38.46 g (0.2268 mol) de **2** en 100 mL de H_2SO_4 concentrado, de tal forma que la temperatura no excediera los 20 °C. Terminada la adición se enfrió con un baño de hielo-sal y se adicionó gota a gota una mezcla fría de 20 mL de HNO_3 y 20 mL de H_2SO_4 sin que la temperatura excediera los 15 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción se siguió agitando durante 30 minutos y se vertió sobre agua-hielo. El producto formado se separó por filtración con succión, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar al aire. El producto crudo recristalizado de etanol dio 32.01 g (65.78%) de un sólido amarillo que mostró ser un solo compuesto por ccf (R_f 0.69 Sistema I) con punto de fusión 99.5-100 °C, [Lit.¹³ Ref. 100-101 °C].

9.3.2.3. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilacetamida (**4**)



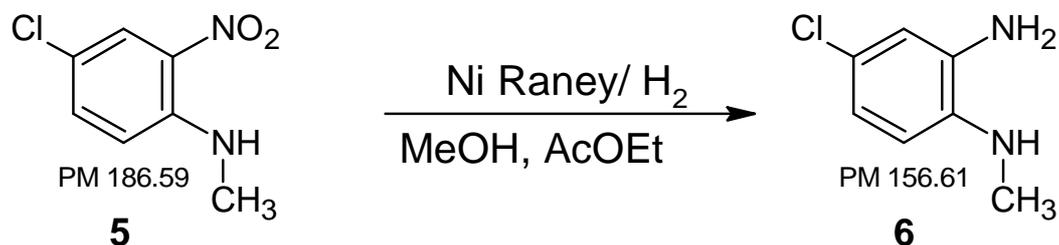
En una matraz bola de dos bocas de 50 mL, acondicionado con termómetro y agitación magnética; se colocaron 5 g (0.0232 mol) de **3** y 7.4 g (0.0786 mol, 2.5 eq.) de sulfato de dimetilo y 15 mL de monoglima. La mezcla anterior se calentó a 30 °C y se goteó, con agitación vigorosa, una solución acuosa al 50% m/v de hidróxido de sodio (2.3 g, 0.05825 mol, 2.5 eq.) manteniendo la temperatura entre los 30-35 °C. Al terminar la adición se comprobó el consumo de materia prima por ccf. La mezcla de reacción se vertió sobre 200 g de hielo-agua, el sólido formado se separó por filtración con succión, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 3.5 g (62.78%) de un sólido amarillo que recristalizados de etanol dieron 2.58 g (51.6%) de cristales amarillos, una sola mancha por ccf (R_f 0.42 Sistema I) con una punto de fusión de 90.8-91.5 °C, [Lit.²⁸ 90.5-91.5 °C].

9.3.2.4. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (**5a**)



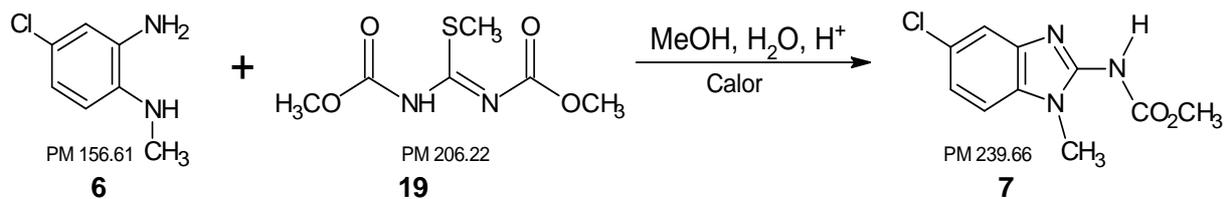
En un vaso de precipitados de 100 mL, acondicionado con un termómetro y agitación magnética, se adicionaron con agitación 5 g (0.219 mol) de **4** sobre 30 mL de H_2SO_4 concentrado y la mezcla se calentó a 90 °C por 30 min. Comprobado el consumo de la materia prima por ccf, se dejó enfriar y después se vertió sobre 100 g de hielo-agua. El sólido formado se separó por filtración con succión, se lavó con agua repetidas veces hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 3 g (73.52%) de un sólido naranja, una sola mancha por ccf, (R_f 0.65 Sistema I). El producto crudo se recristalizó en etanol/agua y se obtuvieron cristales naranjas con un punto de fusión de 106.8-107.7 °C, [Lit. Ref ²² 110 °C].

9.3.2.5. 4-Cloro-*N*¹-metilbenzeno-1,2-diamina (**6**)



En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 9 g (0.0482 mol) de 4-Cloro-*N*-metil-2-nitroanilina, 2.7g de catalizador Ni Raney, 150 mL de Metanol y 20 mL de acetato de etilo. La botella se acopló al hidrogenador, se cargó con hidrógeno hasta 30 lb/in² y se succionó con vacío, esta operación se realizó dos veces mas. Finalmente, la botella se llenó con hidrógeno hasta 60 lb/in² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no se consumió más hidrógeno. El consumo total de hidrógeno fue de 167 lb/in² en 2 h. La mezcla de reacción se filtró con succión usando Celita para eliminar el catalizador, el filtrado se concentró a presión reducida. Se obtuvo un polvo oscuro, una sola mancha por ccf (*R*_f de 0.26 Sistema II). El producto se uso como tal en la reacción siguiente.

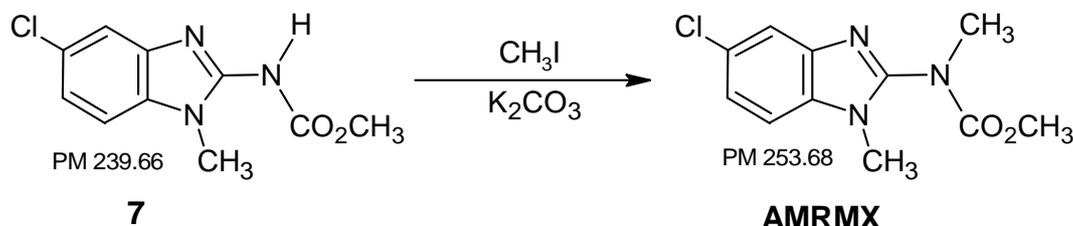
9.3.2.6. (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**7**)



En un matraz de bola de 500 mL con tres bocas, adaptado con agitador magnético, tapón de hule, termómetro y un condensador en posición de reflujo conectado a tres trampas de hipoclorito de sodio y una de permanganato de potasio, se mezclaron el producto crudo (**6**) de la reacción anterior (0.0482 mol), 13 g (0.0630 mol, 1.3 eq) de **19**, 100 mL de metanol, 100 mL de agua y 2 mL de ácido acético. La mezcla se llevó a reflujo con agitación constante durante dos horas. Posteriormente se vertió en agua con hielo en un vaso de precipitado de 1 L y el sólido formado se separó por filtración con succión, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire. Se

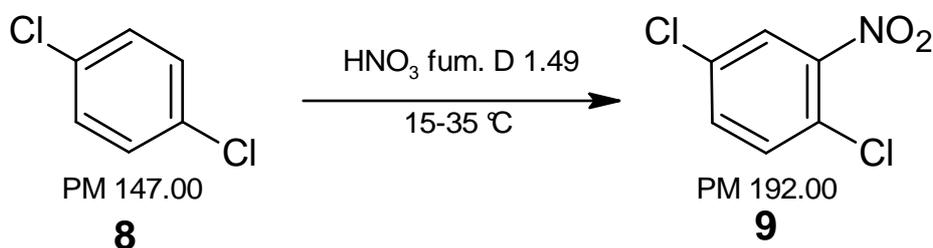
obtuvo un polvo blanco que pesó 10.60 g (91.70%), una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.70 Sistema VI) y un pf 203.3-204.4 °C, [Lit. ¹³ 203.0-203.8 °C].

9.3.2.7. (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**)



En un matraz de bola de 250 mL con una boca, adaptado con agitador magnético y tapón de hule, se colocaron 4 g (0.0167 mol) de **7**, 2.29 g (2 eq.) de K₂CO₃, 1.03 mL de CH₃I y 100 mL de DMF. La mezcla anterior se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 48 h. Una ccf comprobó el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se filtró con succión y el filtrado con la DMF se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en diclorometano y la solución se pasó por una columna de alúmina neutra. La solución filtrada se concentró en el rotaevaporador y el residuo, un polvo amarillo, se recristalizó de metanol. Se obtuvieron 0.667 g (15.75%) de un polvo blanco, una sola mancha por ccf (*R_f* 0.66 Sistema VI) y un pf 135.8-136.5 °C.

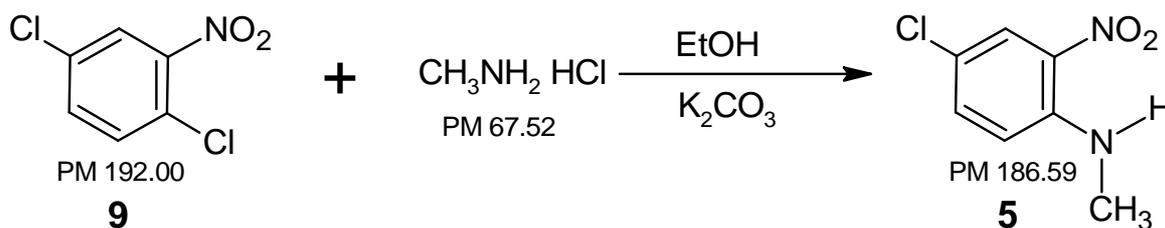
9.3.2.8. 1,4-Dicloro-2-nitrobenceno (**9**)



En un vaso de precipitado de 500 mL se colocaron 150 mL de HNO₃ fum (D 1.49) y se incorporaron, poco a poco y con agitación, 75 g (0.5102 mol) de **8** por abajo de 35 °C. Terminada la adición se agitó 60 min y se comprobó el consumo de **8** por ccf. La mezcla de reacción se vertió sobre 600 mL de agua fría, se agitó y se filtro con succión. El residuo se lavó con agua fría repetidas veces, con solución diluida de

bicarbonato de sodio y agua fría hasta pH neutro. El producto crudo se dejó secar al aire obteniéndose 85.24 g (87.01%) de un sólido amarillo claro puro. Una muestra de 10 g se recrystalizó de éter de petróleo dando 6.86 g (68.60%) de cristales amarillo claro, una sola mancha por ccf (R_f 0.75 Sistema I) y pf 54-55.4 °C, [Lit. 54-57°C].

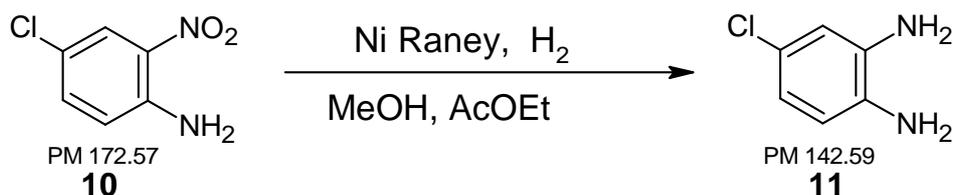
9.3.2.9. *N*-(4-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (**5b**)



En un reactor Parr de un litro se mezclaron 65.25g de 1,4-dicloro-2-nitrobenzene (0.3398 mol), 600 ml de etanol, 70.69 g de clorhidrato de metilamina (3 eq) y 75.18 g de carbonato de potasio. La mezcla de reacción se calentó con agitación a 135 °C durante 5 horas y media. Una ccf comprobó el consumo total de la materia prima. El producto crudo se separó por filtración con succión, se lavó con metanol frío, luego se resuspendió en agua y agitó por 30 min., se filtró con succión, se lavó con agua, y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 61.62g (97.29%) de un sólido anaranjado puro. Una muestra de 5 g se recrystalizó en etanol dando 3.86 g (77.24%) de cristales anaranjados, una sola mancha en ccf (R_f 0.65 Sistema I) y pf 106.6-107 °C, [Lit.²² 110 °C].

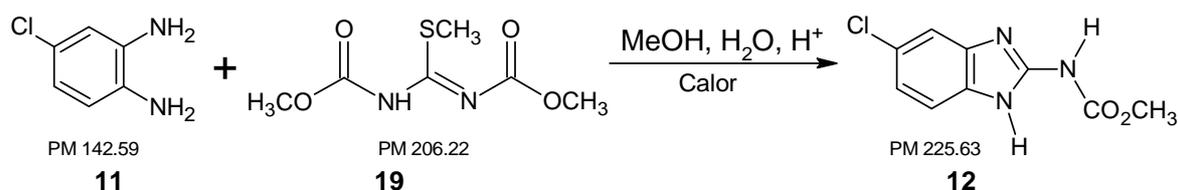
9.3.3. Síntesis de [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (AMRMX II)

9.3.3.1. 4-Cloro-1,2-fenilendiamina (**11**)



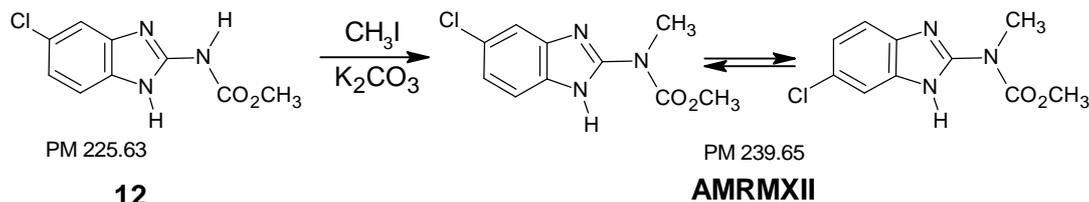
En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 10 g (0.0579 mol) de 4-cloro-2-nitro-anilina, 3 g de catalizador Ni Raney, 180 mL de metanol y 20 mL de acetato de etilo. La botella se acopló al hidrogenador y se cargó con hidrógeno hasta 30 lb/in², y se succionó con vacío, esta operación se realizó dos veces más. Finalmente, la botella se llenó con hidrógeno hasta 60 lb/in² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no se consumió más hidrógeno, alcanzando así hasta 313 lb/in² en 1 hora y media. La mezcla de reacción se filtró con succión usando Celita para eliminar el catalizador, el filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose un polvo negro, Rf 0.49 (Sistema III) el producto se uso como tal en la reacción siguiente.

9.3.3.2. [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**12**)



En un matraz de bola con tres bocas adaptado con agitador magnético, tapón de hule, termómetro y un condensador en posición de reflujo conectado a tres trampas de hipoclorito de sodio y una de permanganato de potasio, se mezclaron el producto crudo (**11**) de la reacción anterior (0.0579 mol) 13 g de 1,3-dimetoxicarbonil-S-metilisotiourea (0.0630 mol, 1.087 eq), 100 mL de metanol, 100 mL de agua y 2 mL de ácido acético como catalizador ácido. La reacción se llevo a cabo a reflujo con agitación constante durante dos horas. Posteriormente la reacción se vertió en agua con hielo en un vaso de precipitado de 1 L y se filtró con succión lavando repetidas veces con agua, obteniéndose un polvo café que se dejó secar al aire. Se obtuvieron 12.3 g (94.07%) de producto crudo, el cual se recristalizó de EtOH/DMF para dar 6.92 g (52.93%) de un polvo blanco nácar, el cual presentó una sola mancha en ccf con un Rf de 0.55 (Sistema VI) con un pf de 295.4-296.7 °C. [Lit. ²⁹ 295-304].

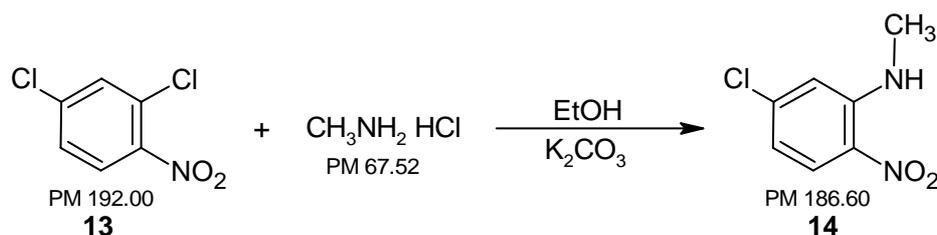
9.3.3.3. [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMXII**)



En un matraz de bola de una boca de 250 mL, adaptado con agitador magnético y tapón de hule, se mezclaron 1.02 g (0.0045 mol) de **12**, 0.623 g (2 eq) de K_2CO_3 y 0.56 mL de CH_3I en 50 mL de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Una ccf comprobó el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se filtro con succión, y se concentró a sequedad. Se obtuvo un polvo amarillo, el cual se purificó por cromatografía flash²⁵ en una columna de 60 x 2.5 cm empacada con 50 g de gel de sílice y eluida con Hexano:AcoEt (80:20). Se obtuvieron 180 mg (15.76%) de producto puro, un solo compuesto en ccf con R_f 0.64 (Sistema VI) y pf de 167-168.2.

9.3.4. Síntesis de (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMXIII**).

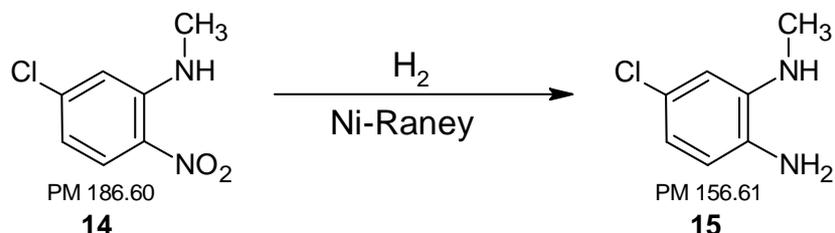
9.3.4.1. *N*-(5-Cloro-2-nitrofenil)-*N*-metilamina (**14**)



En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 15 g de 1,3-dicloro-4-nitrobenzene (0.0781 mol), 150 mL de etanol, 20.7 g de clorhidrato de metilamina (3.92 eq) y 34.54 g (3.2 eq) de carbonato de potasio. La mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 8 h con lo que se alcanzó una presión de 250 psi. Una ccf comprobó el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con succión, lavando el residuo con metanol, el filtrado se recristalizó de metanol. El producto se dejó secar al aire obteniéndose

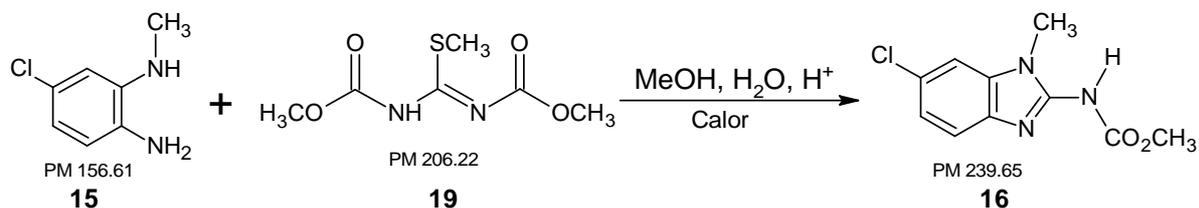
6.73 g (46.17%) de un sólido anaranjado, una sola mancha en ccf con un R_f 0.78 (Sistema V) y pf 105.6-106.6 °C. [Lit. ²⁶ 106-107]

9.3.4.2. 4-Cloro-*N*²-metilbenzeno-1,2-diamina (**15**)



En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se suspendieron 5.54 g (0.0297 mol) de **14** y 1.66 g de catalizador Ni Raney/ H_2 en 100 mL de Metanol y 50 mL de Acetato de etilo. La botella se acopló al hidrogenador y se realizó una purga con hidrógeno hasta 30 lb/in², esta operación se realizó 2 veces más. Luego, la botella se llenó con hidrógeno hasta 60 lb/in² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no se consumió más hidrógeno, alcanzando así 100 lb/in² durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró con succión usando Celita humedecida con etanol para eliminar el catalizador, el filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose 4.03 g (86.67%) de un aceite café oscuro. La ccf mostro 1 sola mancha con R_f de 0.35 (Sistema II). El producto crudo se usó como tal para la siguiente reacción.

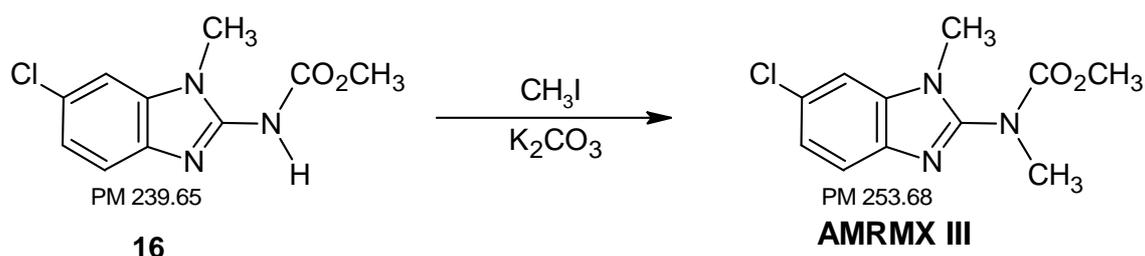
9.3.4.3. (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**16**)



En un matraz de bola con tres bocas, adaptado con agitador magnético, tapón de hule, termómetro y un condensador en posición de reflujo conectado a tres trampas de hipoclorito de sodio y una de permanganato de potasio, se colocaron 5.56 g (0.0355 mol) de **15**, 7.32 g (0.0355 mol) de 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea (1.0 eq), 100 mL de metanol, 100 mL de agua y 2 mL de ácido acético como catalizador ácido. La reacción se llevó a reflujo con agitación constante durante dos

horas. Posteriormente, la reacción se vertió en agua con hielo y se filtró con succión, lavando repetidas veces con agua. Se obtuvo un polvo violeta que se dejó secar con aire y luego se recristalizó de etanol para dar 5.96 g (70.06%) de un polvo blanco algodonoso, el cual presentó una sola mancha en ccf con un R_f de 0.55 (Sistema VI) y un pf de 191.5-193 °C. [Lit. ¹³ 191.3-192.4 °C].

9.3.4.4. (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX III**)



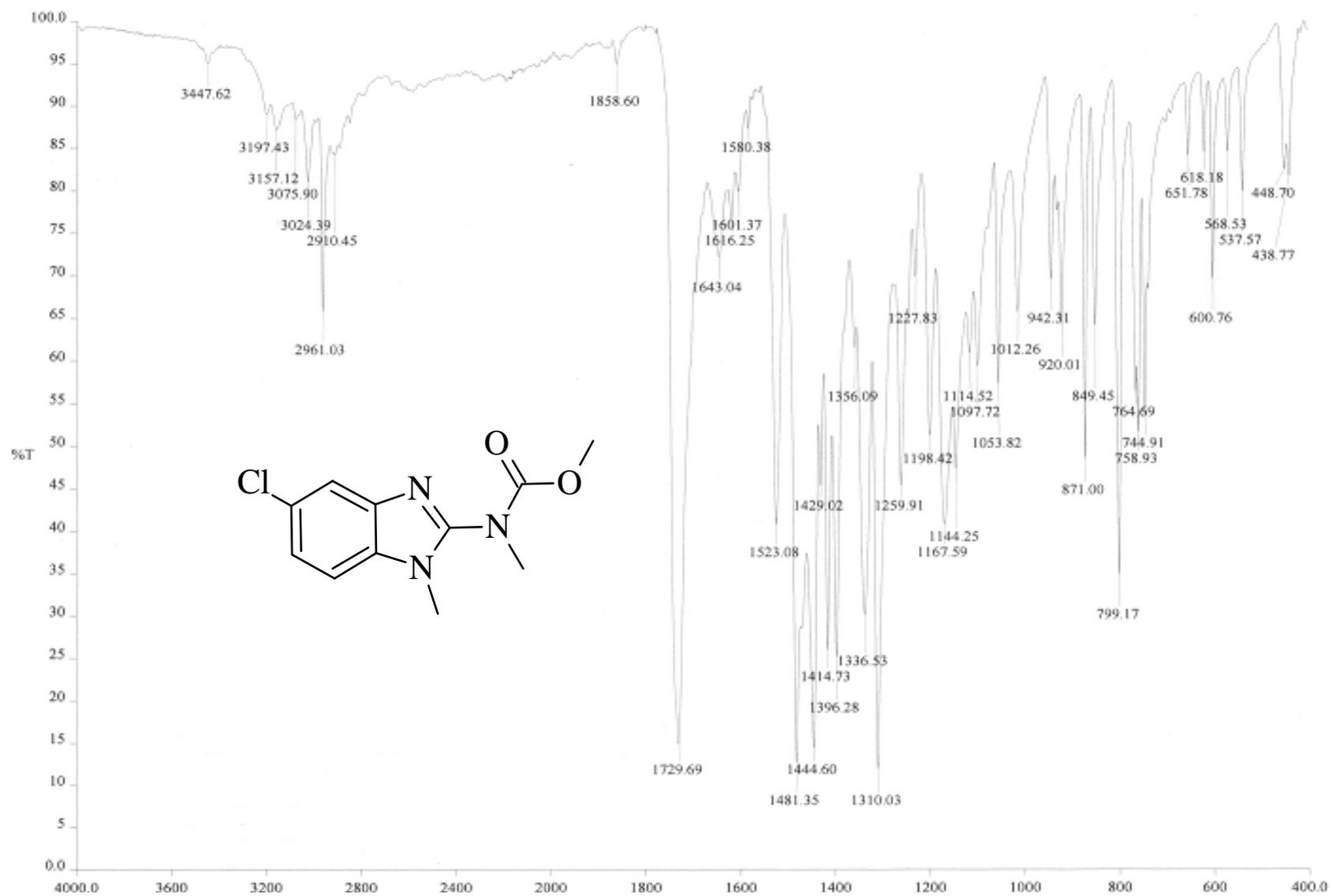
En un matraz de bola de una boca de 250 mL adaptado con agitador magnético y tapón de hule, se colocaron 1.29 g (0.0005 mol) de **16**, 0.7424 g (2 eq) de K_2CO_3 y 0.669 mL de CH_3I , en 80 mL de DMF. Se dejó bajo agitación durante 48 horas, a temperatura ambiente. Una ccf comprobó el consumo total de la materia prima. La mezcla de reacción se filtro con succión y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió nuevamente en diclorometano y la solución se filtró nuevamente con succión por una columna de alúmina neutra. El diclorometano se evaporó a presión reducida, y se obtuvo un polvo amarillo, el cual se recristalizó en isopropanol. Se obtuvieron 241 mg (17.65%) de un polvo blanco, una sola mancha por ccf con un R_f 0.6 (Sistema VI) y un pf 166.2-167.1 °C.

11. BIBLIOGRAFÍA

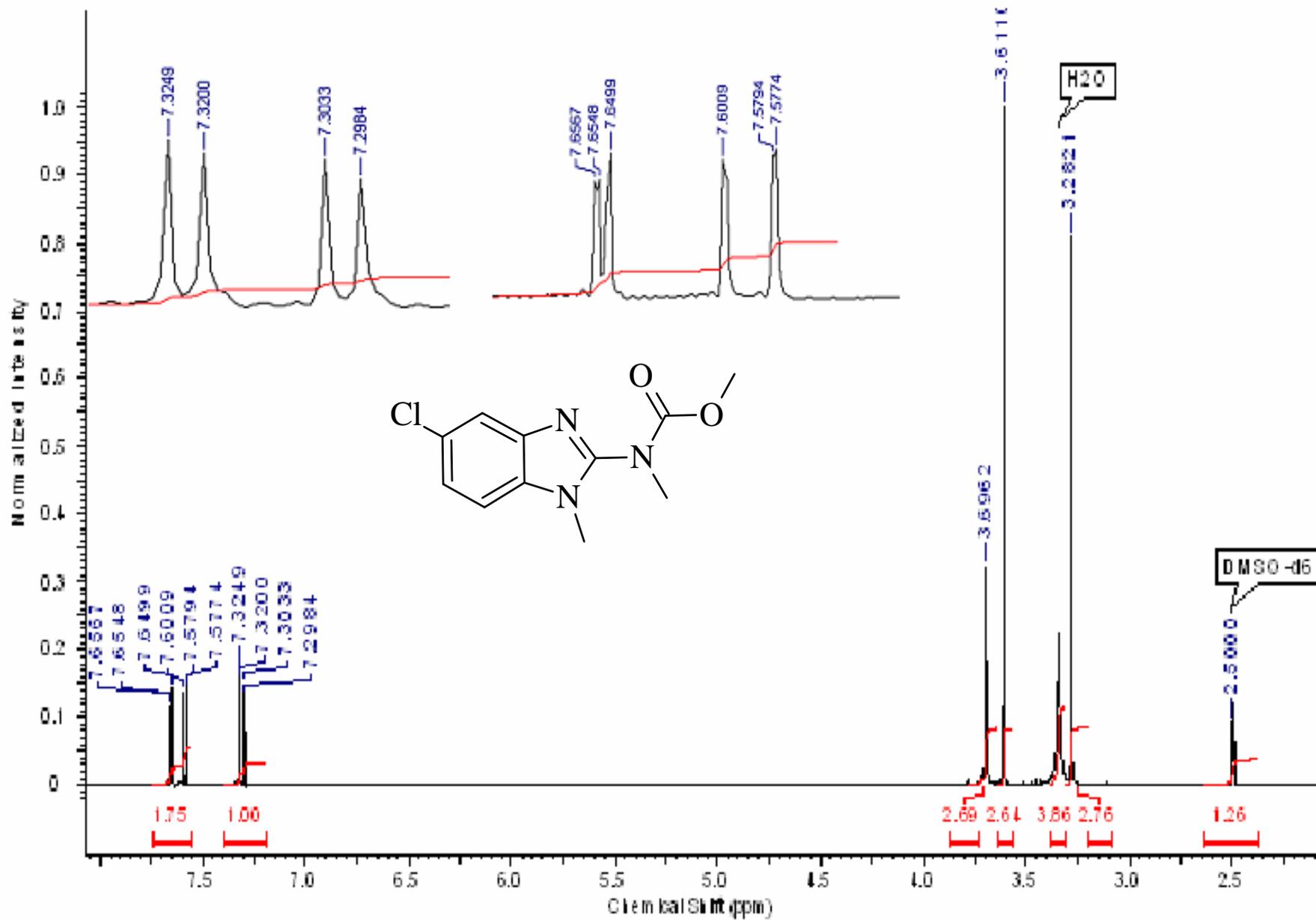
1. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/parasitosis/amibiasis.html>
Consultada el 28- junio- **2010**.
2. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/parasitosis/girdiasis.html>
Consultada el 28- junio- **2010**.
3. http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/morbilidad/princ_causas/08_morb_prin_cau_index.html Consultada el 24-agosto-**2010**.
4. Bustos Salgado Paola. Tesis de Maestria. Síntesis y actividad antiparasitaria de análogos del 1*H*-bencimidazol-2-il-Carbamato de metilo.
5. Marco Antonio Becerril. Parasitología Médica, McGraw-Hill, 2^{da} Edición **2008**.
6. Rafael Cortés Manuel Hernández and Rafael Castillo. Síntesis y Actividad Antiparasitaria de derivados 2-(Trifluorometil)- bencimidazol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11 (**2001**) 187-190.
7. Gabriel Navarrete Vázquez, Roberto Cedillo, Alicia Hernández Campos, Lilián Yépez, Francisco Hernández Luis, Juan Valdez, Raúl Morales, Rafael Cortés Manuel Hernández and Rafael Castillo. Síntesis y Actividad Antiparasitaria de derivados 2-(Trifluorometil)- bencimidazol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11 (**2001**) 187-190.
8. Laboratory identification of parasites of public health concern. www.dpd.cdc.gov/dpdx.
9. L.B Townsend and D.S wise. The synthesis and Chemistry of certain Anthelmintic Benzimidazoles, *Parasitology today*. 6. (**1990**) No 4.
10. Valdez J., Castillo R., Alicia Hernández Campos, Lilián Yépez, Francisco Hernández, Navarrete G., Tapia A., Cortés R., Hernández M., and Rafael Castillo. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1*H*- Benzimidazole Derivates. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 12 (**2002**): 2221-2224.
11. Sharma, S. Design of New Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles, *Ad. Drug. Res.* 25, (**1994**): 105-163.
12. Navarrete, G.; Rojano, M.M.; Yépez, L.; Meléndez, V.; Gerena, L.; Hernández, A.; Castillo, R.; Hernández, F. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 41 (**2006**), 135-141.
13. Hernández Martínez Antonio. Tesis de licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il) carbamato de metilo).
14. Gonzáles Gonzáles María Susana, Tesis de Licenciatura. Síntesis y evaluación de la actividad antiparasitaria de derivados *N*-metilados del 5,6-diclorobencimidazol, facultad de Química. UNAM. México, D.F., **2010**

- 15.-R. O. McCracken and W. H. Stillwell, A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics, *Parasitology* Vol. 21 (1999), No. 1, pp. 99-104.
- 16.-E. Lacey, Mode of Action of Benzimidazoles, *Parasitology today*. 6 (1990), 112-115.
17. R.J. MARTIN Review Modes of Action of Anthelmintic Drugs, *The Veterinary Journal* 154 (1997), 11-34. **Referencia mal redactada.**
18. E. Lacey, Mode of Action of Benzimidazoles, *Parasitology today*. 6 (1990), 112-115.
19. Mark W. Robinson, Neil McFerran, Alan Trudgett, Liz Hoey, Ian Fairweather, A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 23 (2004) 275–284.
20. Townsend, L.B.; Wise, D.S. *Parasitology Today*. 6 (1990), 107-112.
21. Thakuria, H.; Das, G. *Arkivoc*, 2008, 321-328
22. Mendoza Romero, L. Tesis de Licenciatura. Síntesis de *N*-metil-2-nitroanilinas, Materia prima para la preparación de 1-metilbencimidazoles antiparasitarios. Facultad de Química, UNAM, México, D.F, 2000.
23. Kus y Altanlar: Kus C, Altanlar N., Synthesis of some new benzimidazole carbamate derivatives for evaluation of antifungal activity. *Turk Chem.* 27(2003), 35-39.
- 24.- Cedillo, R.; Muños, O. *Med. Microbiol.* 1992, 37, 221-224.
25. W. Clark Still, Michael Kahn, and Abhijit Mitra, Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, Department of Chemistry, Columbia University, New York, 1978.
- 26- Kooping. H.L, U.S Patent 2933504, 1960.
27. Merck Index. CFW, 13 Edición. 2001.
28. Sánchez Díaz, M.R. Tesis de Maestría. Síntesis de Derivados del 1-metilbencimidazol con Actividad Antihelmíntica Potencial. Facultad de Química, UNAM, México, D.F, 1999.
29. Valdez, G.J. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2000.

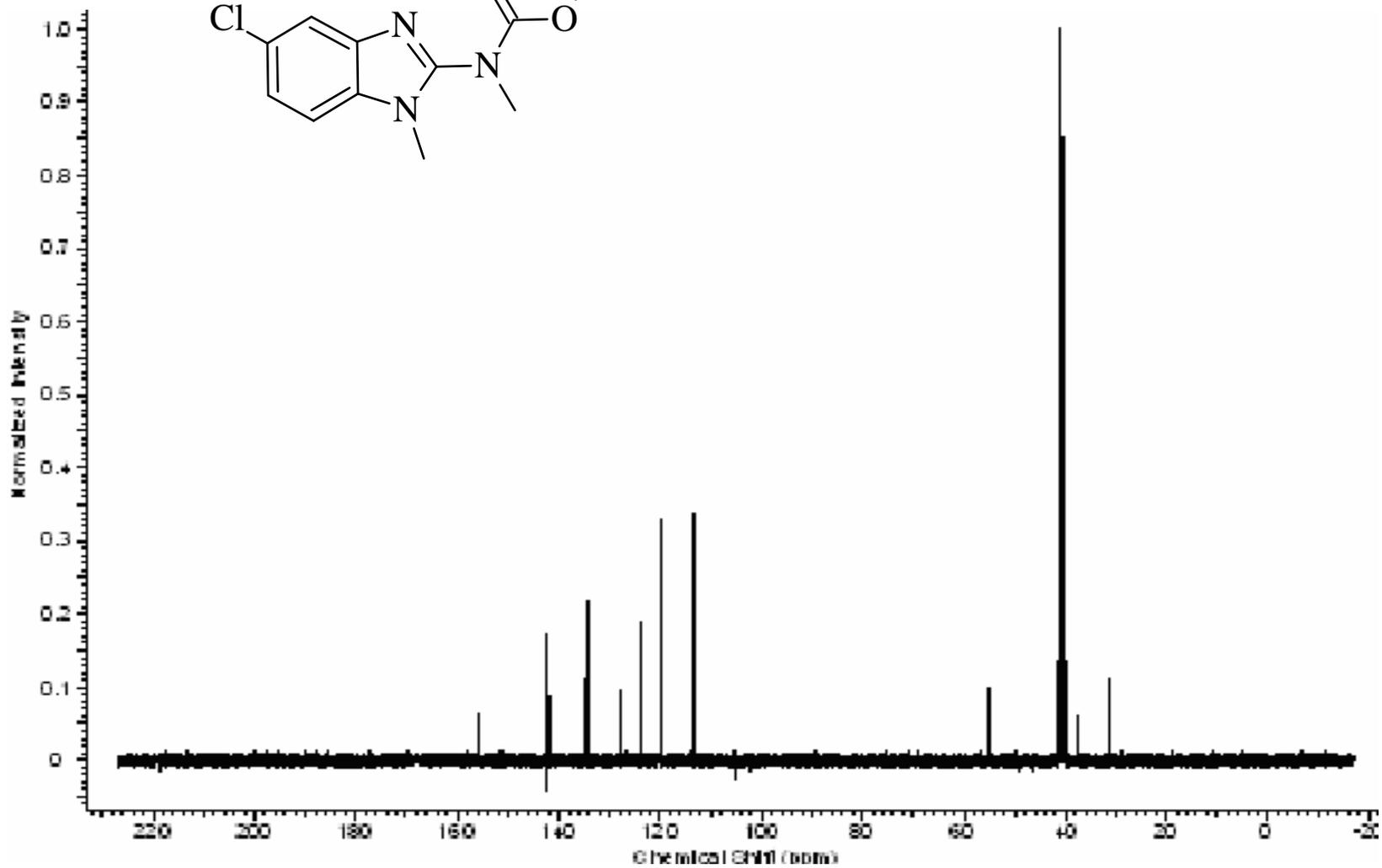
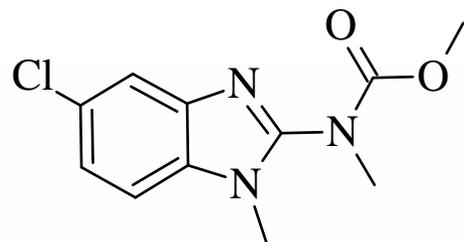
10. ESPECTROS



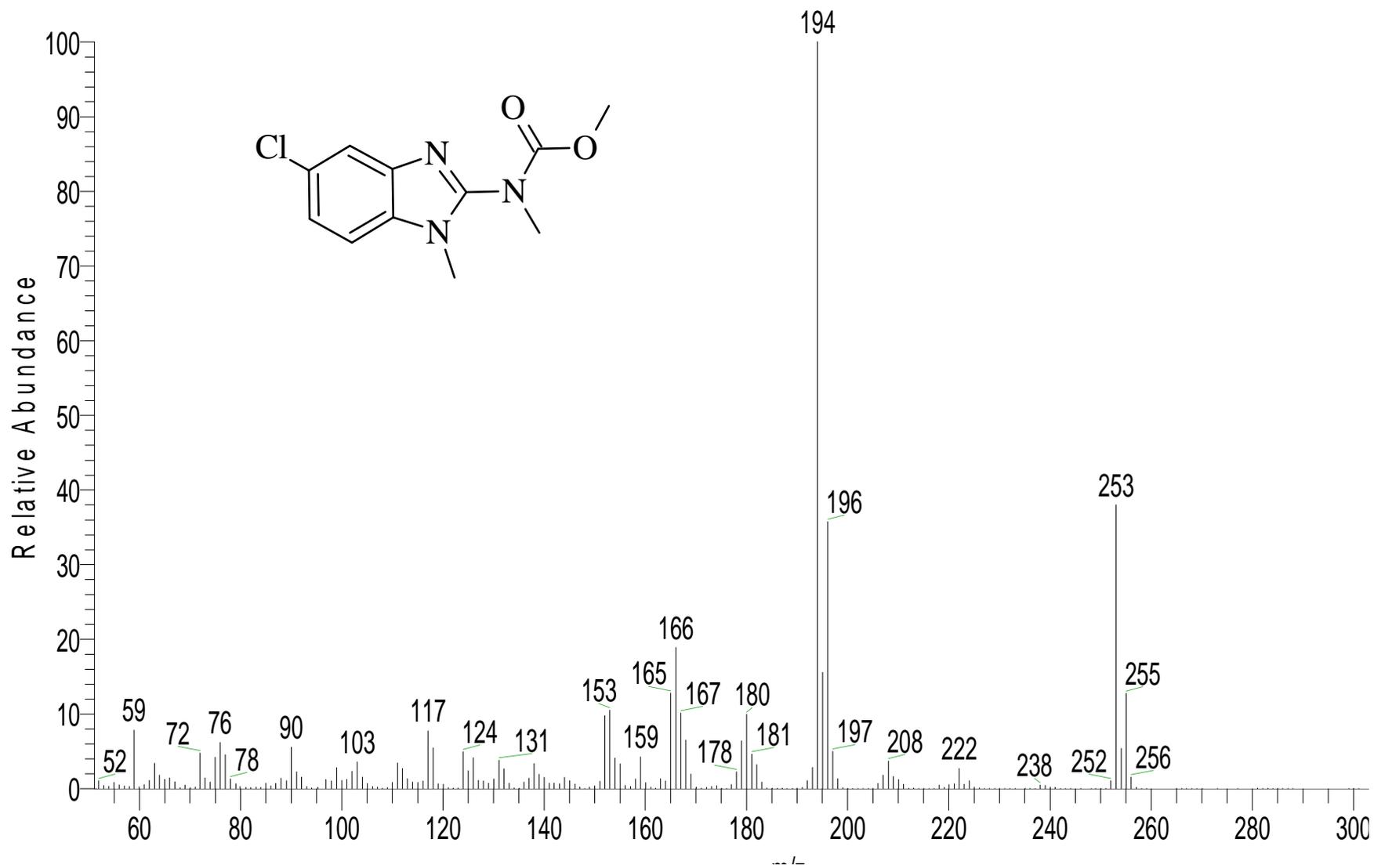
Espectro 1. IR (KBr) cm^{-1} : (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**).



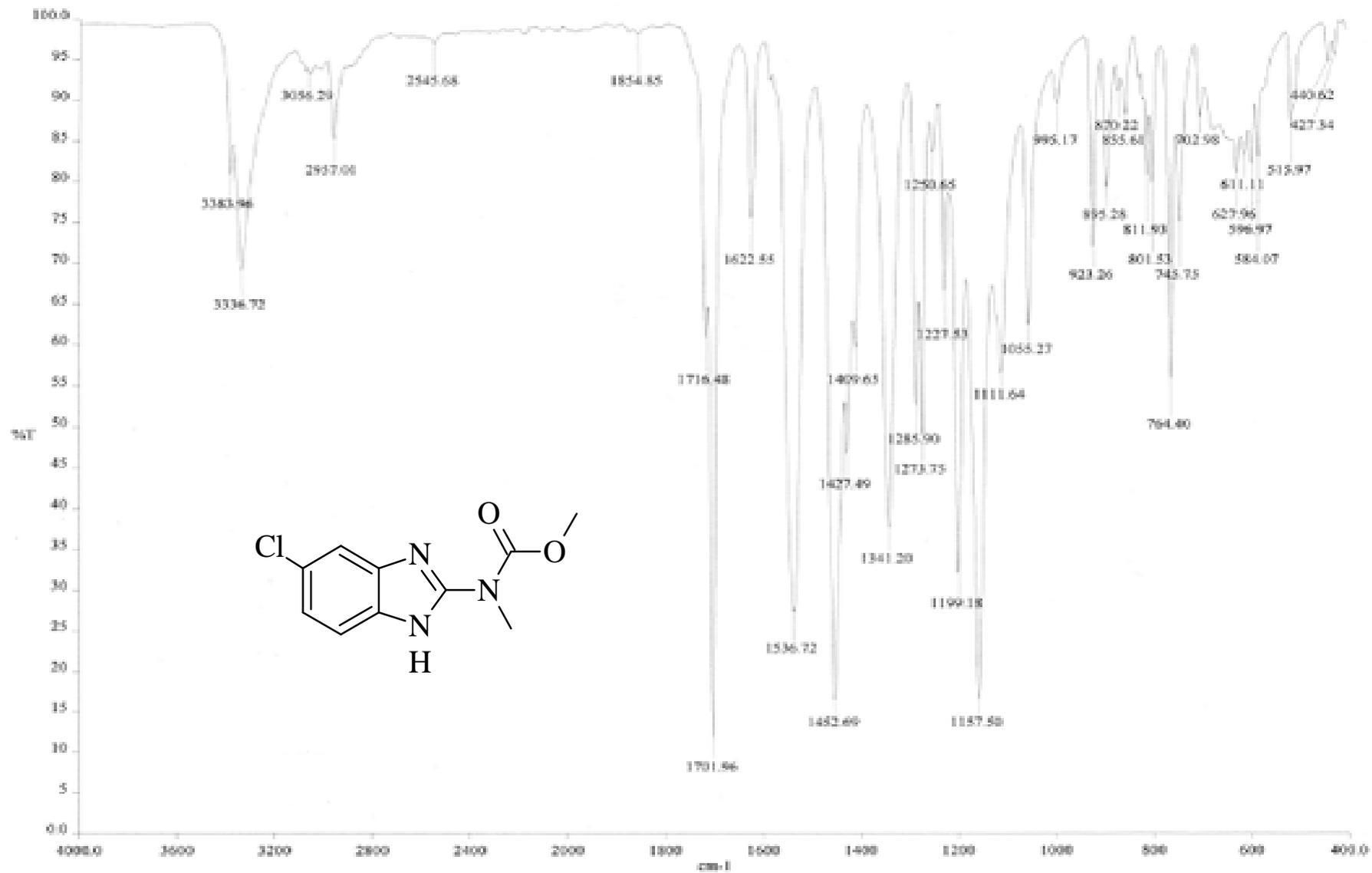
Espectro 2. RMN ^1H (DMSO) ppm: (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**).



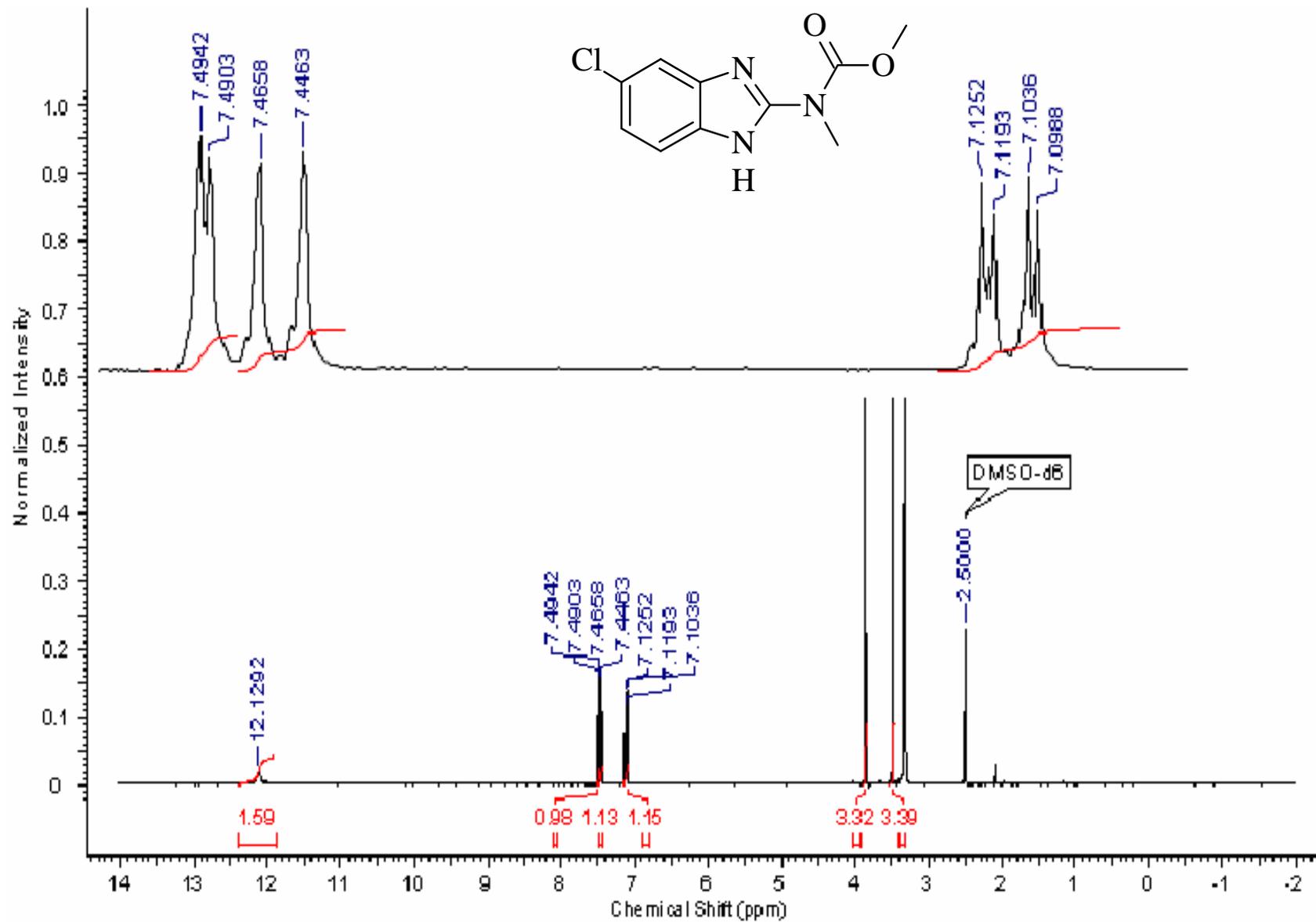
Espectro 3. RMN ^{13}C (DMSO) ppm: (5-Cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**).



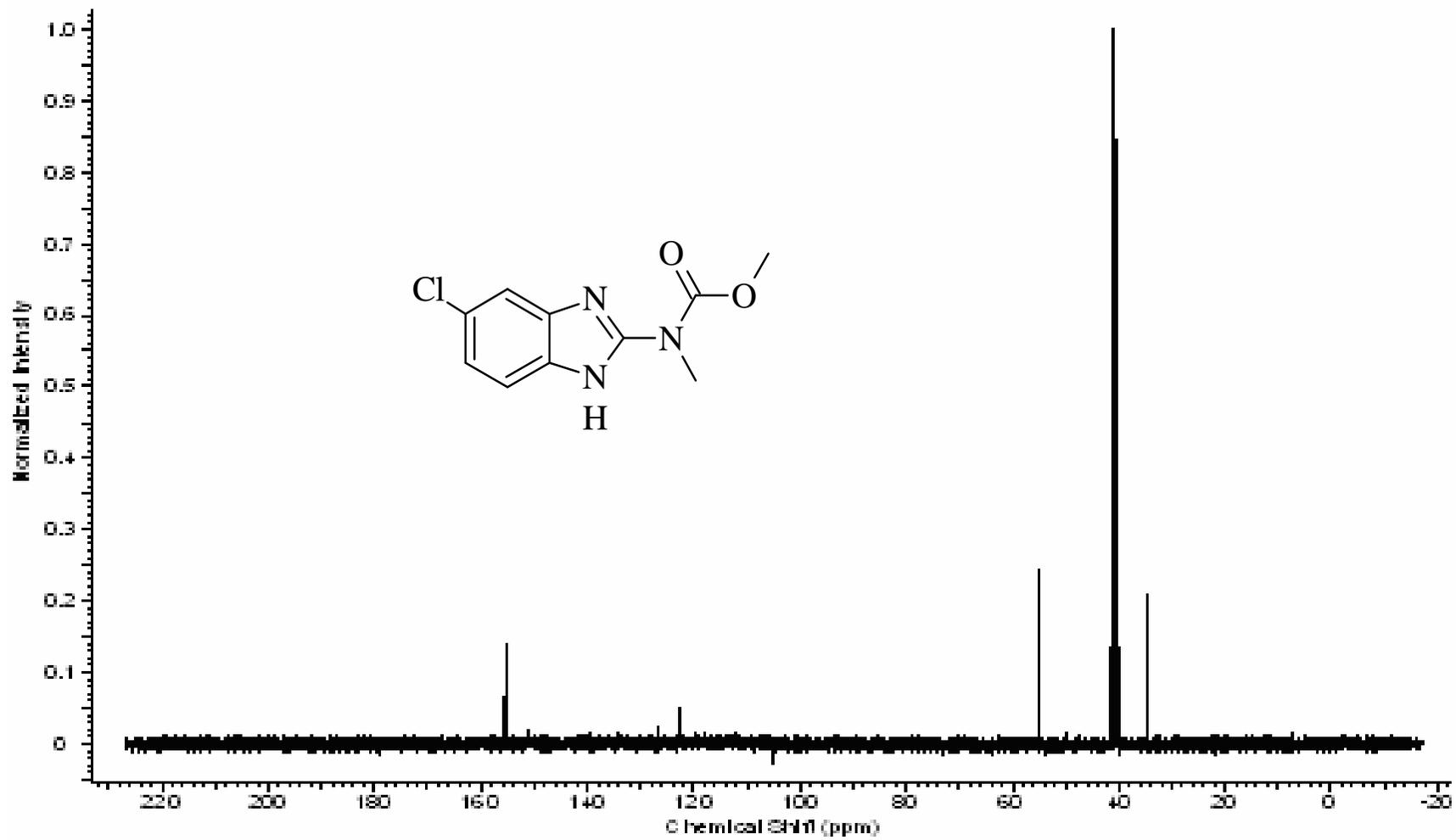
Espectro 4. EM (IE) m/z : (5-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX**).



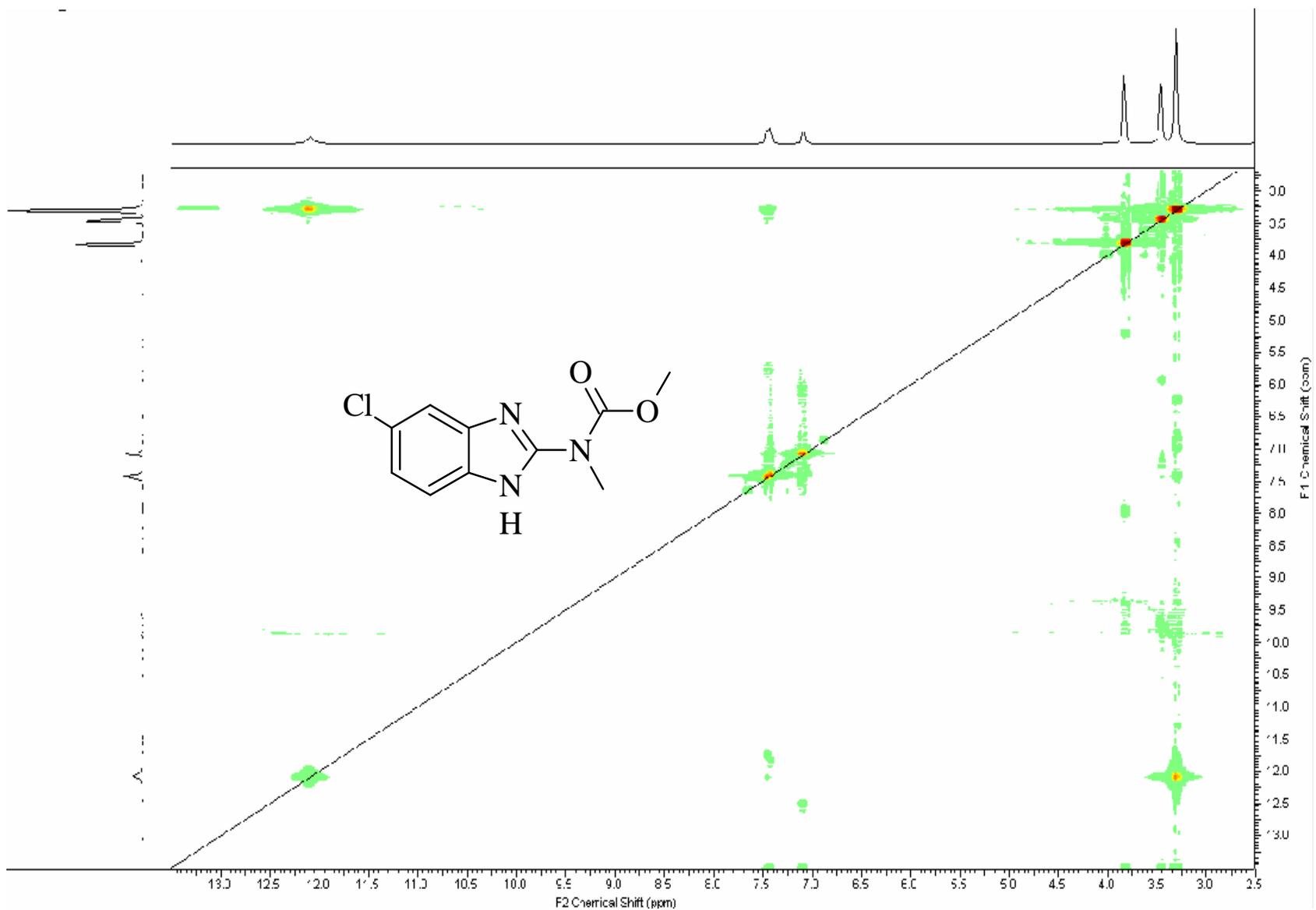
Espectro 5. IR (KBr) cm⁻¹: [5(6)-Cloro-1H-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMX II**).



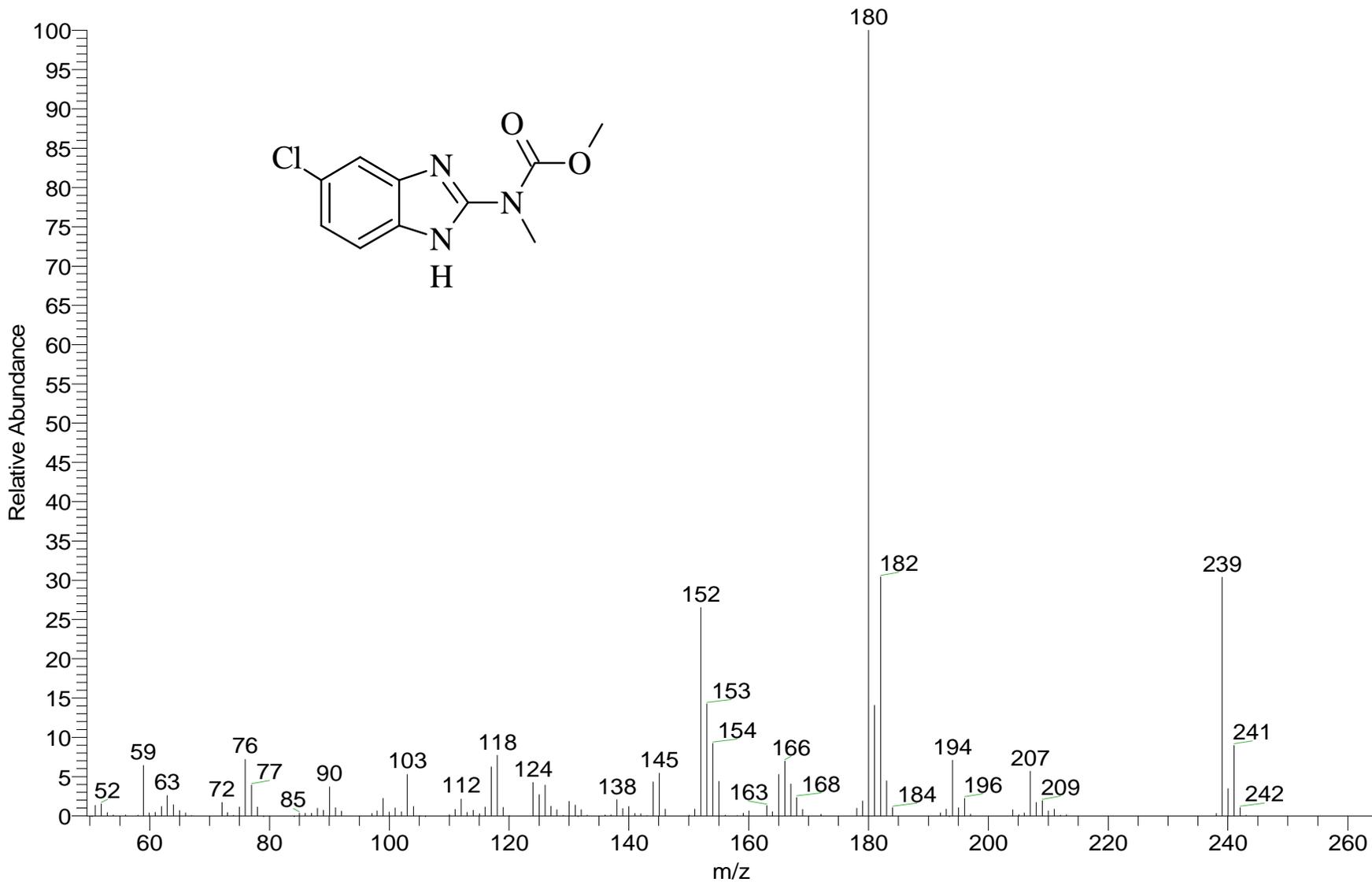
Espectro 6. RMN ¹H (DMSO) ppm: [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il] metilcarbamato de metilo (AMRMX III).



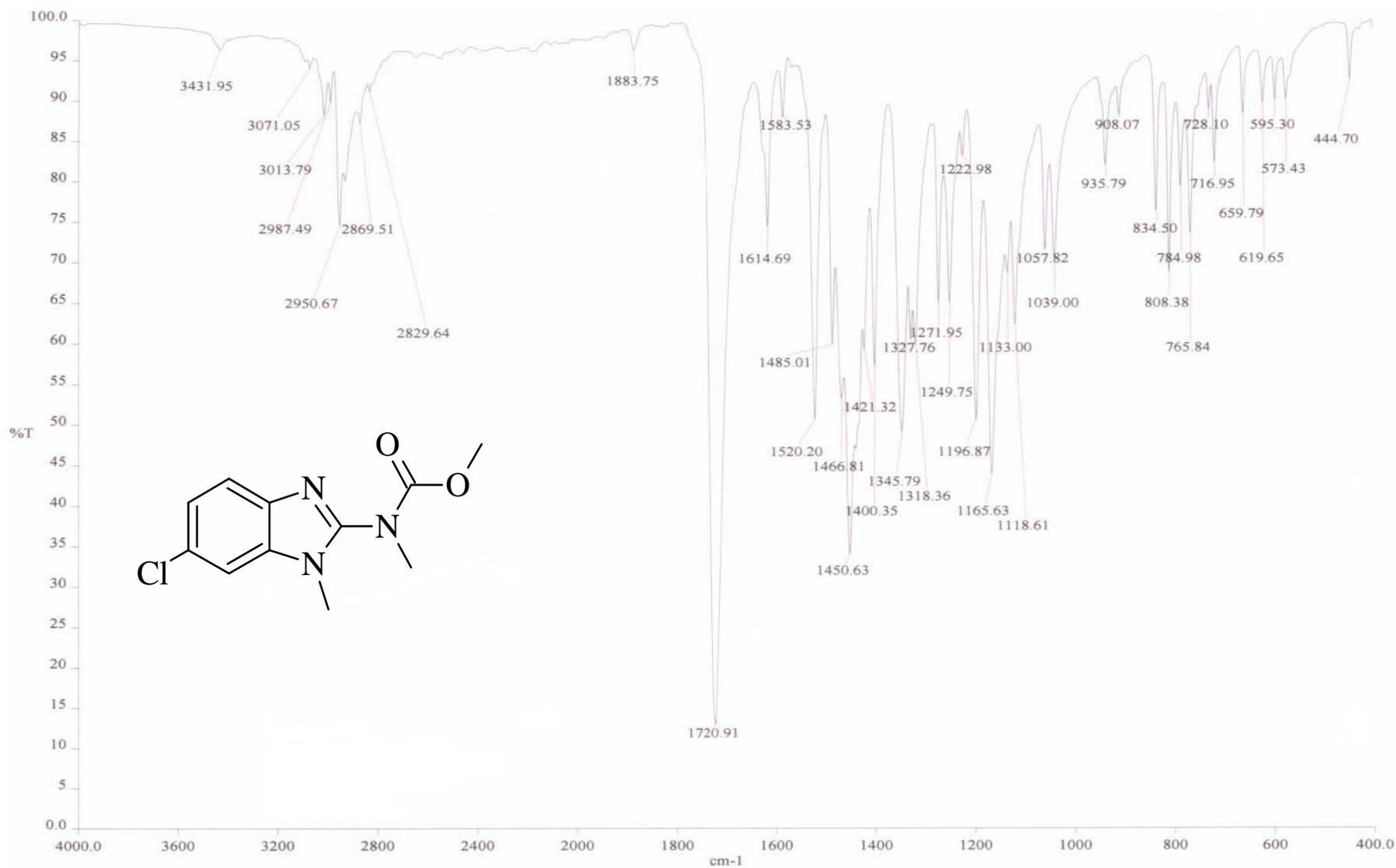
Espectro 7. RMN ¹³C (DMSO) ppm: [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMXII**).



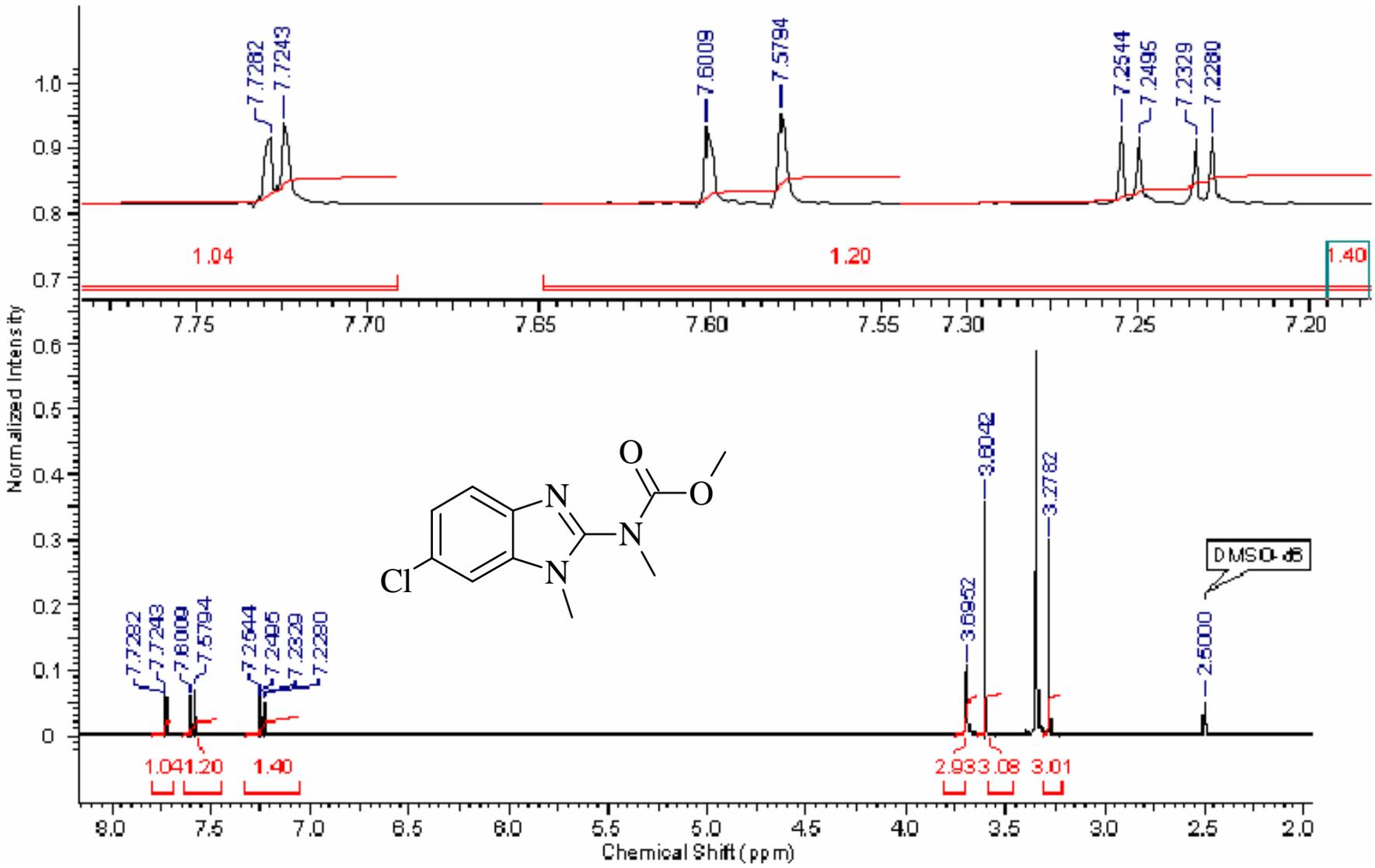
Espectro 8. NOESY (DMSO) ppm: [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMXII**).



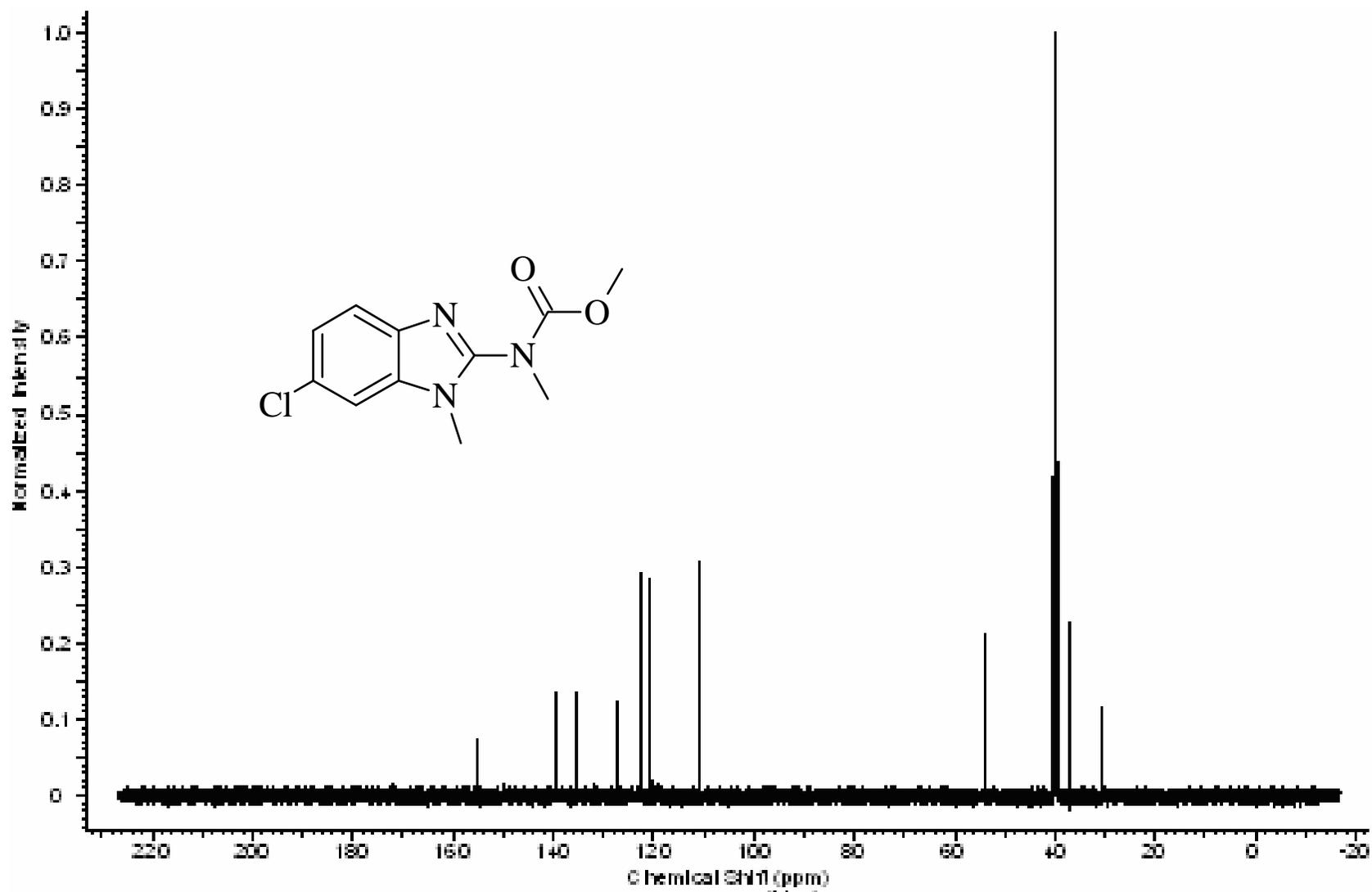
Espectro 9. EM (IE) m/z : [5(6)-Cloro-1*H*-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMXII**)



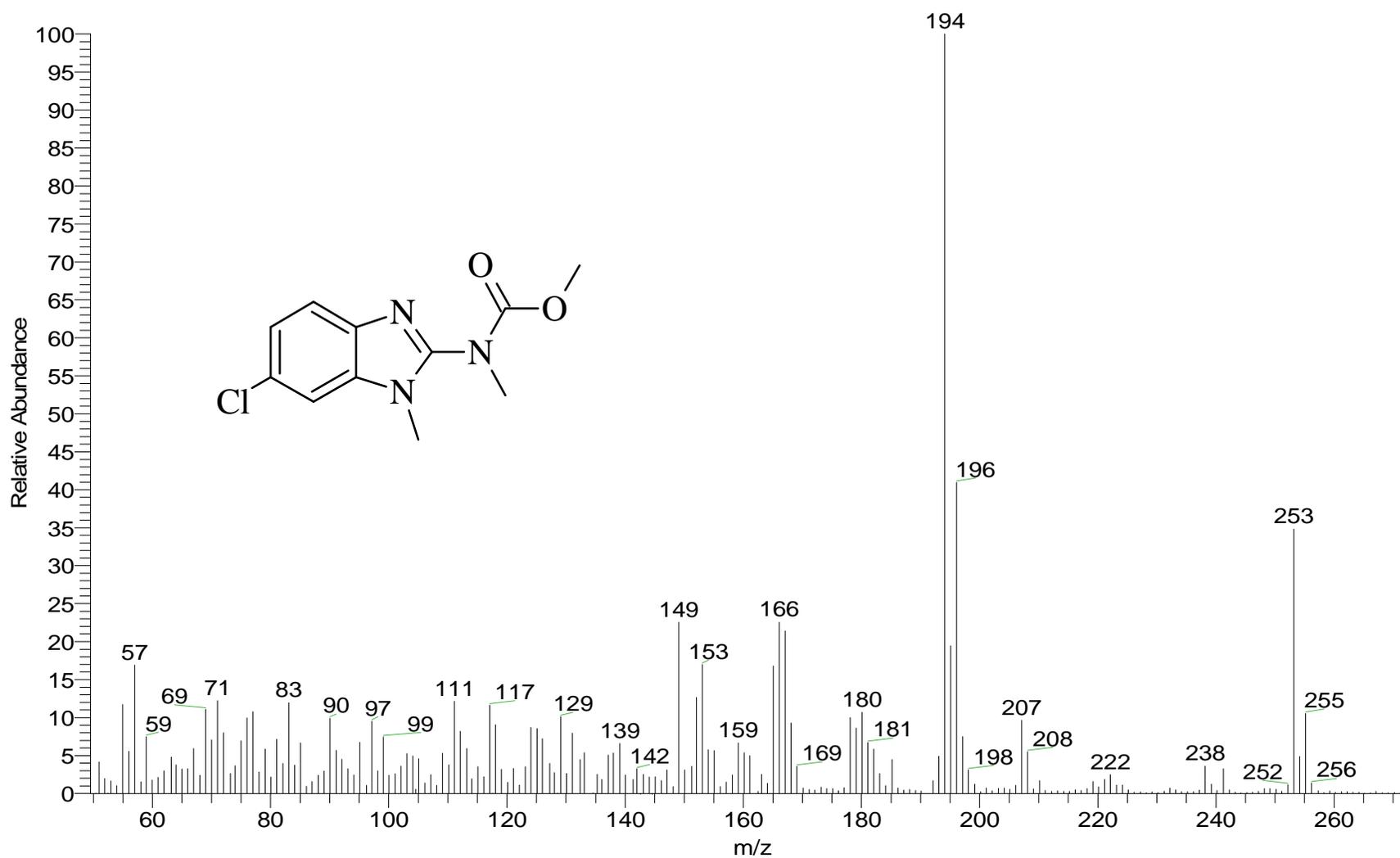
Espectro 10. IR (KBr) cm⁻¹: [(6)-Cloro-1-metil-1H-bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo (**AMRMX III**).



Espectro 11. RMN ¹H (DMSO) ppm: (6-Cloro-1metil-1H-bencimidazol-2-il) metilcarbamato de metilo (AMRMX III).



Espectro 12. RMN ^{13}C (DMSO) ppm: (6-Cloro-1metil-1H-bencimidazol-2-il) metilcarbamato de metilo (AMRMX III).



Espectro 13. EM (IE) m/z : (6-Cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metilcarbamato de metilo (**AMRMX III**).