



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis de una carboxamida bencimidazólica diseñada por *docking* como posible agente inactivante de la triosa fosfato isomerasa (TIM) de *Entamoeba histolytica*

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA
ZULEMA VARGAS OSORIO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

	JURADO ASIGNADO
PRESIDENTE	M. en C. Jose Manuel Mendez Stivalet
VOCAL	M. en C. Rosa Isela Del Villar Morales
SECRETARIO	M. en C. Ma. Alicia Hernández Campos
1er. SUPLENTE	M. en C. Blas Flores Pérez
2do. SUPLENTE	Dr. Daniel Méndez Iturbide.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:
Laboratorio 122 del Departamento de farmacia, edificio E.
Facultad de Química. UNAM.

ASESOR

M. en C. María Alicia Hernández Campos

SUSTENTANTE

Zulema Vargas Osorio

DEDICATORIA

A la mujer más especial de mi vida, simplemente mis palabras no bastarían para expresar la gratitud, el amor, el respeto y el orgullo que siento de poder formar parte de su vida, ya que es el pilar de nuestra familia, y porque nunca ha dudado ni un solo segundo en sacrificarse por nosotros, no me queda más que decirte que TE AMO mucho mamita.

Gracias a ti papi; por ser el hombre más bueno, trabajador, honrado y valioso que he conocido, por darme la oportunidad de crecer a tu lado y aprender de tí, por ser nuestro apoyo incondicional y por muchas otras cosas TE AMO.

A mis hermanitos; a pesar de que me peleo contigo Andreita, jamás por ningún motivo podría dejar de amarte, tú eres parte de mi y si no te tengo estoy incompleta, nunca dudes de lo que soy capaz de hacer y dar por tí, estoy orgullosa de quién eres. ¡Échale muchas ganas a todo OKi. Dani que te puedo decir, estoy feliz y me siento tan honrada de tener un hermano como tú, tan buena gente y talentoso, solo puedo decir que te amo. No dejes pasar las buenas oportunidades, ¡arriésgate!, porque yo quiero lo mejor para tí. Por mi parte; siempre seguiré adelante, orgullosa y agradecida con Dios por permitirme estar a su lado y tener el privilegio de tener una familia tan maravillosa.

A ti *amor* (Yos); porque siempre has estado conmigo, has sido mi compañía, me has apoyado y me has soportado te amo. Yo se, que como todo ser humano tenemos errores, solo deseo seguir creciendo juntos como pareja para que podamos ser muy felices; también, agradezco mucho a tu familia por abrirme las puertas de su hogar y permitirme ser parte de sus vidas.

Por supuesto a toda la familia completa, a mis abues que las adoro, a mis tiitas, a mis primos, etc. Porque me han hecho reir y llorar, me han enseñado bastante, me han acompañado y me han visto crecer durante todos estos años, a todos ustedes los quiero, muchísimas gracias.

A todos mis amigos que son tantos que no acabaría; a los del lab. disfrute mucho de su compañía, a todos los del fut. como me divierto con ustedes, a los del voli gracias por todo. En especial a los de mi calle, los de los departamentos y a los del club por años enteros de risas y felicidad. A todos los de mi carrera y a los de la fac. que sin ustedes la escuela no hubiese sido lo mismo. A todos, no me queda más que agradecerles enormemente por compartir su tiempo conmigo, su apoyo, comprensión y tolerancia, de tener que aguantar a una loca como yo, cualquier cosa cuentan conmigo, los quiero.

AGRADECIMIENTOS

A la maestra Alicia por toda su comprensión, su apoyo y su tiempo; además por todos los chistes y simplezas que sin ellas no me hubiera sentido como en casa. La estimo mucho gracias por todo.

A CONACYT por la beca otorgada durante la realización de la tesis en el proyecto V43629M. A la UNAM y a DGAPA por el apoyo económico brindado para la elaboración de esta tesis, en el proyecto PAPIIT (IN104008)

Al Dr. Rafael Castillo y al Dr. Francisco Hernández; por todo el apoyo y los conocimientos que nos brindan para ser de este laboratorio uno de los mejores que hay.

A la Dra. Lilián Yépez y a todo su equipo; por la determinación de las pruebas *in vitro* del compuesto sintetizado, que aunque no forman parte de esta tesis es esencial para su éxito.

Al personal de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación): M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Víctor Manuel Arroyo, Q. Maricela Gutiérrez, Q.F.B. Margarita Guzmán, M. en C. Nayeli López y Q. Georgina Duarte, por la determinación de los espectros de trabajo.

Al jurado por la revisión de esta tesis, sus buenas críticas y sugerencias.

A todos los maestros de la Fac. porque sin ellos yo no sería lo que soy ahora.

Y a mi amada UNAM que desde la secundaria me regocijó entre sus brazos y me permitió crecer física e intelectualmente a su lado.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1.	Problemática actual	3
2.2.	<i>Entamoeba histolytica</i>	4
2.2.1.	Aspectos Morfológicos	5
2.2.2.	Epidemiología	6
2.2.3.	Ciclo de vida	7
2.2.4.	Patogenia	8
2.2.5.	Tratamiento	11
2.3.	Diseño de fármacos	12
2.3.1.	Acoplamiento molecular (<i>docking</i>)	12
2.4.	Glucólisis	13
2.5.	Triosa Fosfato Isomerasa	15
2.5.1.	La TIM como blanco para el diseño de fármacos	17
2.6.	Bencimidazoles	18
2.6.1.	Mecanismo de acción de los bencimidazoles	19
2.6.2.	Asociación de moléculas para la formación de fármacos eficientes	20
2.6.3.	Modificaciones moleculares de los bencimidazoles	22
2.6.4.	Métodos de obtención de bencimidazoles	24
2.6.5.	Métodos de obtención de carboxamidas	25
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4.	HIPÓTESIS	27
5.	OBJETIVOS	27
5.1.	Objetivo general	27
5.2.	Objetivos específicos	27
6.	METODOLOGÍA	29
6.1.	Parte química	29
6.2.	Parte biológica	35
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1.	Parte química	36
7.1.1.	Constantes físicas	36
7.1.2.	Síntesis química	37
7.2.	Parte biológica	48
8.	CONCLUSIONES	52
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
10.	ANEXO A. PARTE EXPERIMENTAL	57
10.1.	Instrumentación	57
10.2.	Cromatografía	58
10.3.	Procedimientos experimentales para la obtención de los precursores y compuestos finales.	59
10.3.1.	2,4-Diclorobenzoato de metilo (14)	59
10.3.2.	2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)	60

10.3.3.	2-Cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoato de metilo (7)	60
10.3.4.	5-Amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (8)	61
10.3.5.	6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)	62
10.3.6.	6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)	63
10.3.7.	Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1- <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (11)	64
10.3.8.	2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)	64
10.3.9.	4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)	65
10.3.10.	4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)	66
10.3.11.	4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)	67
10.3.12.	<i>N</i> -(3,4-Diclorofenil)acetamida (17)	67
10.3.13.	<i>N</i> -(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)	68
10.3.14.	4,5-Dicloro-2-nitroanilina (19)	69
10.3.15.	4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)	69
10.3.16.	4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (21)	70
10.3.17.	[5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]amina (22)	71
10.3.18.	6-Cloro- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (23).	73
10.3.19.	2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo	74
10.3.20.	5-Amino-2-clorobenzoato de metilo y 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo	75
10.3.21.	Ácido 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoico	76
10.3.22.	Ácido 2-cloro-4-metilamino-5-aminobenzoico	76
10.3.23.	Ácido 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico	77
11 .	ANEXO B	79
11.1.	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los intermediarios y de la carboxamida final	79
11.2	Espectros	84
	Espectro 1. IR de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)	84
	Espectro 2. RMN ¹ H de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15). CDCl ₃	84
	Espectro 3. EM(IE) de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)	85
	Espectro 4. IR de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)	85
	Espectro 5. RMN ¹ H de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9). DMSO-d ₆	86
	Espectro 6. EM(IE) de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)	86
	Espectro 7. IR de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)	87
	Espectro 8. RMN ¹ H de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10). DMSO-d ₆	87
	Espectro 9. EM(IE) de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)	88

Espectro 10. IR de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (11)	88
Espectro 11. RMN ¹ H de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (11). DMSO-d ₆	89
Espectro 12. EM(IE) de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (11)	89
Espectro 13. IR de 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)	90
Espectro 14. RMN ¹ H de 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2). Acetona-d ₆	90
Espectro 15. EM(IE) de 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)	91
Espectro 16. IR de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)	91
Espectro 17. RMN ¹ H de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3). CDCl ₃	92
Espectro 18. EM(IE) de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)	92
Espectro 19. IR de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)	93
Espectro 20. RMN ¹ H de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4). CDCl ₃	93
Espectro 21. EM(IE) de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)	94
Espectro 22. IR de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)	94
Espectro 23. RMN ¹ H de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5). CDCl ₃	95
Espectro 24. EM(IE) de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)	95
Espectro 25. IR de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)	96
Espectro 26. RMN ¹ H de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20). CDCl ₃	96
Espectro 27. EM(IE) de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)	97
Espectro 28. IR de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il] amina (22)	97
Espectro 29. RMN ¹ H de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il] amina (22). DMSO	98
Espectro 30. EM(IE) de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il] amina (22)	98
Espectro 31. IR de 6-Cloro- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (23).	99
Espectro 32. RMN ¹ H de 6-Cloro- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (23). DMSO	99
Espectro 33. RMN ¹³ C de 6-Cloro- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (23). DMSO	100
Espectro 34. EM(FAB) de 6-Cloro- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (23).	100
Espectro 35. IR de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo	101
Espectro 36. RMN ¹ H de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo. DMSO	101
Espectro 37. EM(IE) de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo	102
Espectro 38. IR de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo	102
Espectro 39. RMN ¹ H de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo. DMSO	103
Espectro 40. EM(IE) de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo	103

1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales constituyen en la época actual un problema médico y social, que afecta a los países llamados del 3^{er} mundo y también a los de más alto desarrollo. En términos generales se considera que existen hoy en día en la población mundial 1110 millones de personas infectadas por cestodos, 240 millones por trematodos y 3200 millones por nematodos. De igual manera se acepta que del 20-50 % de la población mundial se encuentran afectada por giardia y ameba, incluidos los países desarrollados, por tal razón debemos comprender con exactitud la magnitud del problema por sus altas tasas de prevalencia y su amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. Aunque la mortalidad por parasitismo intestinal es baja, a escala mundial ocurren hasta 100 000 muertes debidas a amebiosis y cientos de miles por helmintiosis. La población infantil no es ajena a todo lo anterior, se valora que aporta el mayor número de infectados entre los más de 1 000 000 000 de personas que cada año se infectan por helmintos, según los cálculos de la Organización Mundial de la Salud. Para parásitos como *E. histolytica*, *A. lumbricoides* y *T. trichiura*, la carga parasitaria o intensidad de la infección alcanza su máximo entre los 5 y 15 años de edad, por lo que los escolares tienden a sufrir las infecciones más severas. Algunos reportes han demostrado que estas infecciones persisten más tiempo y son más intensas en los niños, con efectos deletéreos tanto sobre el crecimiento y desarrollo como sobre el aprendizaje.

Estudios conducentes a la búsqueda de terapias alternativas para el tratamiento de las enfermedades causadas por protozoarios anaeróbicos como el *Trypanosoma cruzi* y la *Entamoeba histolytica* han llevado a la conclusión de que la inhibición de la enzima triosa fosfato isomerasa (TIM), la cual cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído 3-fosfato en el ciclo de la glucólisis, es un excelente blanco para el diseño de moléculas bioactivas ya que dichos parásitos dependen de la generación de energía.

Cuando la información acerca de la estructura tridimensional de los blancos se encuentra disponible es posible usar métodos computacionales para el diseño de nuevas moléculas potencialmente activas en base a la estructura del receptor. Uno de los métodos más usados es el acoplamiento molecular (*docking*). Este método permite predecir el modo de unión entre el ligando y el receptor, así como calcular el cambio de energía libre asociado con la formación del complejo ligando-receptor. En pruebas de inactivación enzimática, algunos derivados de bencimidazol mostraron experimentalmente que inactivan parcialmente a la TIM de la *E. histolytica* (EhTIM). Usando esta información experimental fue posible usar el método de acoplamiento molecular para diseñar moléculas y predecir el modo de unión con la enzima EhTIM. La relación estructural de las moléculas diseñadas es que poseen por lo menos un anillo bencimidazólico. La síntesis de y evaluación antiprotozoaria de una de estas moléculas es el propósito del presente trabajo de tesis.

2. ANTECEDENTES

2.1 PROBLEMÁTICA ACTUAL

Al problema mundial de las infecciones parasitarias contribuyen las condiciones socioeconómicas de muchas áreas del planeta; la falta de medidas sanitarias, el nivel de pobreza, el abandono en que se encuentran grandes masas de la población. Por otro lado, los países desarrollados han visto aparecer el parasitismo en forma creciente en su población a pesar de contar con medidas higiénicas y sanitarias adecuadas debido a la gran movilización de las poblaciones. Además, la reinfección frecuente en los pacientes tratados agrava todavía más la situación mundial, en relación con el parasitismo, no se cuenta aún con vacunas establecidas contra ellos, aunque ya se cuentan con algunas experimentales, razón por la cual la quimioterapia ha sido el único tratamiento práctico para tratar individuos afectados o para disminuir la transmisión en poblaciones.

Dentro del gran número de protozoosis, la amibiasis es la segunda enfermedad parasitaria más importante del mundo causada por *Entamoeba histolytica*, su distribución mundial varía de un lugar a otro, observándose con mayor frecuencia en los países pobres y con bajas condiciones socioeconómicas. Se han reportado actualmente alrededor de 500 millones de personas infectadas en todo el mundo de los cuales, el 10% presentan síntomas clínicos; intestinales en un 80% a 98% de los casos y del 2 al 20% extraintestinales, ocasionando una mortalidad que oscila entre 40.000 y 110.000 casos por año.^{2,3,4,5}

A continuación se muestra un mapa donde se puede observar la cantidad de países más afectados por infecciones parasitarias causadas por *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*)

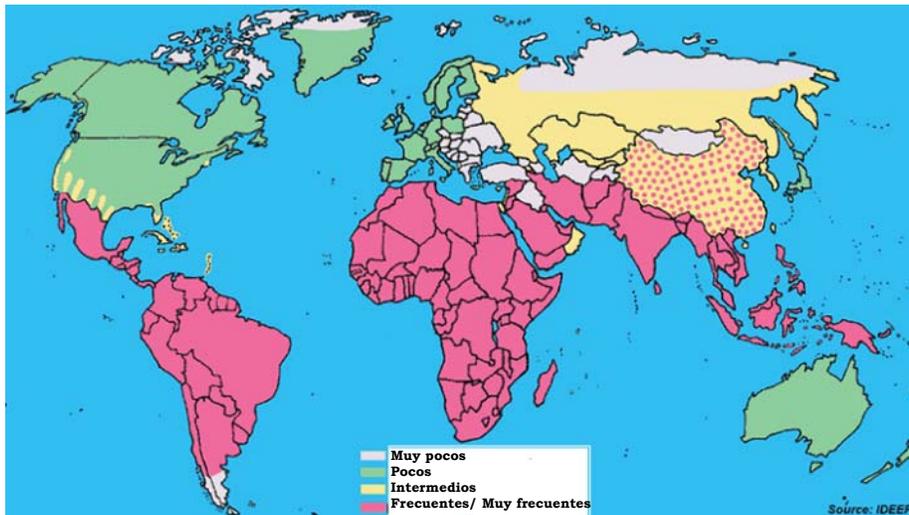


Fig. 2.1.1. Mapa de los países infectados por *E. histolytica*.

A principios del siglo XX, se conocía que algunas personas aparentemente infectadas por *E. histolytica* nunca desarrollaban síntomas y la infección desaparecía espontáneamente. Esto fue interpretado por muchos investigadores como una indicación de que el parásito tenía una virulencia variable. Sin embargo, Brumpt (1925) sugirió la explicación alternativa de la existencia de dos especies, una capaz de producir la enfermedad invasora a la que propuso *Entamoeba dysintariae*, y una no-patógena a la que llamó *Entamoeba dispar*. Medio siglo después, Sargeant y Cols. en estudios de caracterización isoenzimática soporta la hipótesis de Brumpt, pero son los estudios genéticos aportados por Tannich y Cols., así como también los de Diamond y Clark, que demostraron la existencia de divergencias genéticas entre las dos amibas, lo que permitió la redescripción formal de *E. histolytica* causante de amibiasis y *Entamoeba dispar* como comensal en el intestino grueso.^{2,3,4,5}

2.2. ENTAMOEBA HISTOLYTICA

La *E. histolytica* es uno de los eucariotes más primitivos, pertenece a la familia Entamoebidae del orden Amoebida, subfilo Sarcodina, superclase Rhizopoda de protozoos formadores de pseudópodos, de la clase Lobosea. La *E. histolytica* es cosmopolita, se encuentra en todas las regiones del planeta, pero las cepas más patógenas son las de Centroamérica.³²

2.2.1. Aspectos Morfológicos

Presenta dos formas o fases de desarrollo bien establecidas: el trofozoito y el quiste, que constituyen respectivamente la forma invasiva y la infectante.

El trofozoito o forma móvil es extremadamente pleomórfico, ya que su aspecto y movilidad están influenciados por los cambios de pH, potencial redox y osmolaridad. Se multiplica por fisión binaria, es muy sensible a los jugos gástricos y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz, la pared del colon y especialmente el ciego y recto.^{1, 38}

Su tamaño es muy variable y oscila entre 10 a 60 μm (formas no invasivas) y más frecuentemente entre 15 y 30 μm . (formas invasivas).

El trofozoito se nutre por fagocitosis a expensas de los tejidos disueltos y hematíes ayudándose de los pseudópodos.

Si las condiciones del medio ambiente no son propicias, el trofozoito empieza a cambiar de forma, deja de emitir pseudópodos y se transforma en quiste.^{1, 38}

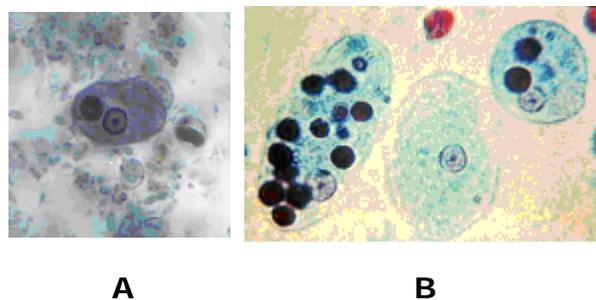


Fig. 2.2.1.1 A, B. trofozoitos de *E. histolytica* con eritrocitos ingeridos teñidos con ácido tricrómico. Los eritrocitos ingeridos aparecen como inclusiones oscuras. Los parásitos muestran los núcleos que tienen el típico cariosoma pequeño situado en una zona céntrica y la delgada, uniforme cromatina periférica.

El quiste o elemento infectante es redondo u oval mide de 10 a 25 μ m de tamaño, posee una pared lisa de 0.6 μ m y es resistente al jugo gástrico, factores externos y cifras habituales del cloro en el agua.^{1, 38}



Fig. 2.2.1.2. Fotomicrografía electrónica de barrido de quistes de *Entamoeba histolytica*

2.2.2. Epidemiología

Según la OMS, hay 50 millones de nuevas infecciones por año y de 110,000 a 70.000 muertes³⁷ La disentería amébrica se presenta frecuentemente en países tropicales aunque también se presentan casos en las zonas templadas y frías. En África, Asia tropical y América latina, más de dos tercios de la población presenta estos parásitos intestinales, a pesar de que la mayoría de las infecciones pueden ser prácticamente asintomáticas. En Europa y Estados Unidos menos del 5% de la población es portadora. La Entamoeba afecta a los primates; los casos en perros y gatos son relativamente raros.

- ❁ Modo de transmisión: ruta fecal-oral o por contacto sexual/anal
- ❁ Fuente de infección: el hombre infectado, esté enfermo o asintomático (portador sano)
- ❁ Hospedero susceptible: cualquier individuo sano, en especial los niños menores de dos años y preescolares en condiciones socio-económicas desfavorables.

Condiciones de baja higiene aumentan la incidencia y prevalencia de disentería amebiana.^{7, 37}



Fig. 2.2.2.1. Condiciones de extrema pobreza favorecen el desarrollo de parásitos

2.2.3 Ciclo de vida

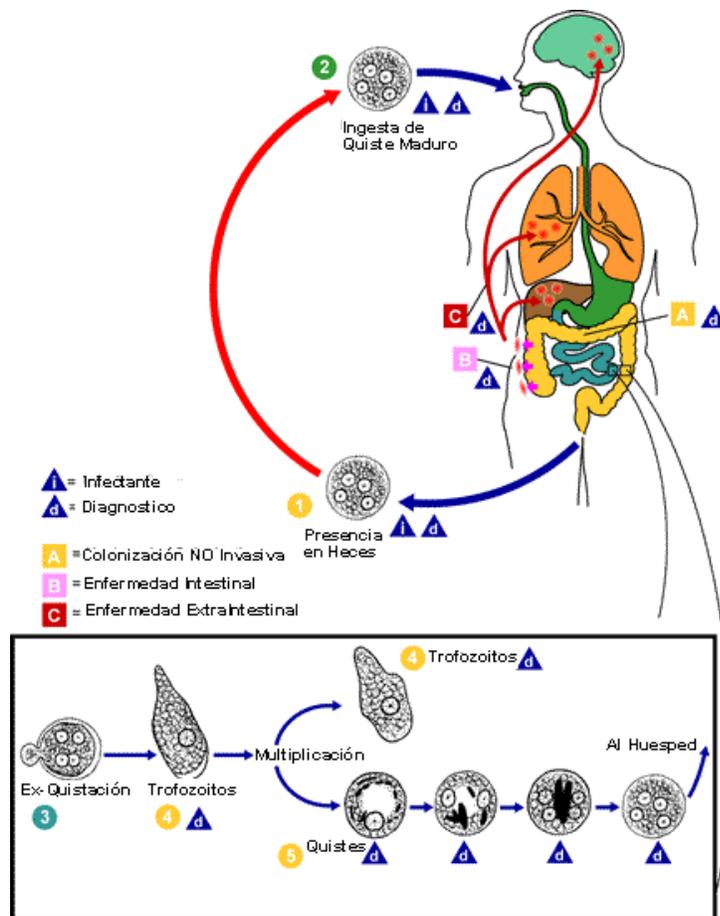


Fig. 2.2.3.1. Ciclo de vida de *E. histolytica*

Los quistes y los trofozoitos son transmitidos a través de las heces ①. Los quistes se encuentran típicamente en las heces normales, mientras que los trofozoitos se encuentran típicamente en las heces diarreicas. La infección por *E. histolytica* se produce por la ingestión de quistes maduros ② que se encuentran en agua, alimentos o las manos infectadas con materia fecal. El quiste maduro desciende del tubo digestivo hasta llegar al intestino, donde previo al contacto con los jugos digestivos, se inicia la fase de desenquistamiento ③ en el cual la pared de resistencia se reblandece, los núcleos se duplican a 8 y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las que crecen a trofozoitos maduros ④ que migran hacia el intestino grueso. Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria formando quistes ⑤, los cuales son expulsados por las heces ①. Gracias a la protección que le confieren sus paredes los quistes pueden resistir días o semanas en el ambiente exterior y son los responsables de la transmisión. Los trofozoitos pueden ser también expulsados a través de la diarrea pero son destruidos inmediatamente una vez fuera del cuerpo y si son ingeridos no sobreviven a la exposición de los jugos gástricos, en muchos casos los trofozoitos se mantienen en el lumen intestinal. (A: infección no invasiva) de los individuos que son portadores asintomáticos, pasando quistes en sus heces. En algunos pacientes los trofozoitos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal), o, a través del torrente sanguíneo, sitios extraintestinales como el hígado, el cerebro y los pulmones (C: enfermedad extraintestinal), resultado de manifestaciones patológicas.³⁶

2.2.4. Patogenia

Gran parte del armamento enzimático que se estima que emplea *E. histolytica* y que probablemente le confiere su modo de acción patogénica lo coloca entre los organismos llamados Zimodemo II. Se piensa que la presencia en el organismo o la capacidad de uso mayor o menor de dicho armamento enzimático confieren a las diferentes cepas sus características virulentas, siendo más dañinas las que combinen el mayor número de estos componentes. En efecto, el uso de ese

repertorio enzimático del grupo Zimodemo II es el método más común para diferenciar entre un organismo patógeno o no patógeno de *E. histolytica*.³⁷

Las amebas se multiplican como trofozoitos no invasivos en la luz intestinal, colonizando el colon y transformándose posteriormente en quistes. En los cuadros sintomáticos el proceso evoluciona en tres fases:

2.2.4.1. Adherencia

La adherencia intestinal se realiza fundamentalmente con las células del epitelio de descamación.

2.2.4.2. Penetración

Para que se lleve a cabo la penetración es necesario que se altere la mucosa, debido a que esta circunstancia ocasiona una disminución de su resistencia.

Como consecuencia de la adherencia se lisan las células del epitelio, destrucción que es potenciada por la fagocitosis que realiza la propia ameba. La penetración se realiza con la intervención de las enzimas líticas (proteasas, mucopolisacaridasas, etc.) y con ayuda del propio movimiento amebiano.

Una vez que los trofozoitos penetran en la mucosa, se forman en ella pequeños nódulos a consecuencia de la reacción inflamatoria tisular, que se ulceran en el centro. Los trofozoitos se extienden lateralmente por la submucosa. Se produce así un trastorno de riego sanguíneo de la mucosa, que la necrosa y ulcera.^{1, 9, 32, 33, 38}

2.2.4.3. Propagación

Los parásitos pueden emigrar a zonas adyacentes del intestino y provocar una intensa reacción inflamatoria y dar así lugar a un ameboma.

En ocasiones, los trofozoitos entran en el torrente circulatorio y a través del sistema portal llegan a cualquier parte del organismo, especialmente al hígado, y dan origen a la llamada amebiasis extraintestinal. Al alcanzar el hígado, las amebas producen

inicialmente una reacción inflamatoria con posterior necrosis tisular y formación de uno o varios abscesos.

Otras formas de amebiasis extraintestinal suelen tener su origen en los abscesos hepáticos que se abren directamente al pulmón, pleura o pericardio, o por vía hemática al pulmón, cerebro, etc. La amebiasis cutánea se presenta normalmente en las proximidades del ano debido a la propagación de los parásitos a partir de úlceras rectales.

El daño que produce *E. histolytica* se debe principalmente a la acción de sus enzimas, entre las que destacan mucinasa, hialuronidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, etc., las que lisan los tejidos y permiten la invasión de órganos, aparatos y sistemas del hospedero.^{1, 9, 32, 33, 38}

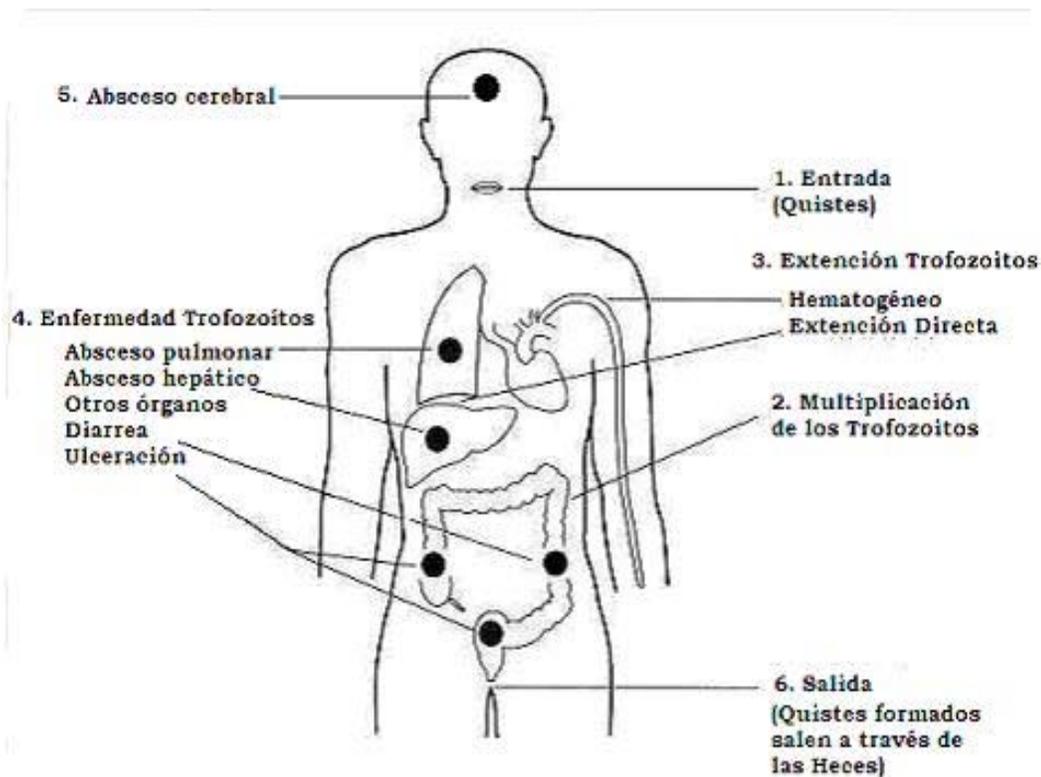


Fig. 2.2.4.1. Localización de *E. histolytica*

2.2.5. Tratamiento

El metronidazol (MTZ) es el *fármaco de elección* para tratar la amebiasis. Se administra 30 mg/Kg/día, tomándose 3 ó 4 diarias, durante 7 a 10 días. La suspensión trae 125 mg cada 5 ml. La dosis máxima diaria es de 2.25 g. Sus efectos secundarios son: sabor metálico, náuseas, dolor abdominal, cefalea y neutropenia reversible.

La nitazoxanida (NTZ) es un antiparasitario de uso "*casi universal*" que cubre la mayoría de las parasitosis intestinales prevalentes en Sudamérica. La nitazoxanida, un nuevo grupo de nitroazoles de amplio espectro. Este fármaco es activo frente a la mayoría de los helmintos (Ascaris, Oxiuros y Giardia), diversos protozoos y amebas. La dosis diaria para adultos es de 1 g; y para niños es de 15 mg/kg peso tomándose 2 diarias, durante 3 días.

El tinidazol es otro derivado imidazólico efectivo, la dosis es de 50 mg / Kg / día durante 3 días (máximo 2 g /día). La suspensión es desagradable y los niños se resisten a tomarla. Los nitroimidazólicos no son efectivos para tratar quistes.

El yodoquinol, el furoato de diloxanida y la paramomicina son drogas con acción intraluminal y se emplean en algunos esquemas de tratamiento como complemento del metronidazol. Con el microscopio sólo puede afirmarse que una disentería es amebiana cuando se encuentran trofozoitos que han ingerido hematíes.^{3, 6, 34}

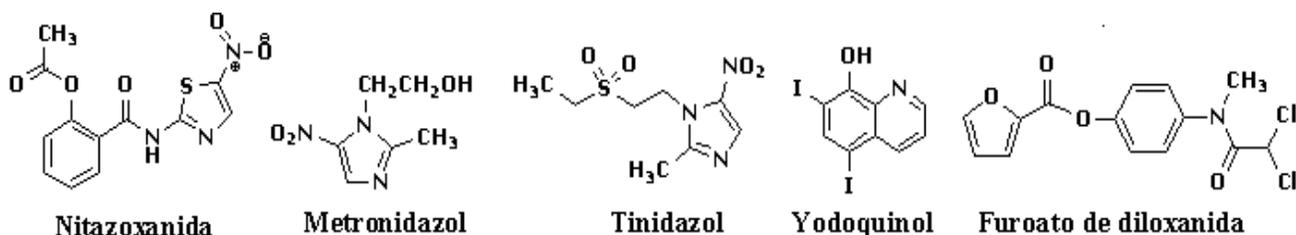


Fig. 2.2.5.1. Moléculas de los fármacos de elección contra *E. histolytica*

2.3. DISEÑO DE FÁRMACOS

El diseño racional de un fármaco, en la fase de descubrimiento, puede llevarse a cabo usando diferentes estrategias. Una de las estrategias más recientes, y en creciente desarrollo, es el uso de diversos métodos computacionales; lo que se conoce como el diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC).¹³

El DiFAC es una disciplina del diseño racional de fármacos que se enfoca en la búsqueda y la optimización de nuevos compuestos líderes con una actividad biológica específica, cuenta con el uso de diversos métodos computacionales para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura. Los métodos computacionales se basan en el postulado de que las moléculas biológicamente activas actúan por interacción con una biomacromolécula-receptor (blanco), las cuales son principalmente proteínas o ácidos nucleicos, involucrados en algún proceso patológico. El DiFAC no es un método directo para obtener nuevos fármacos; por lo tanto debe partir de algún tipo de información experimental.¹³

2.3.1 Acoplamiento molecular (*docking*)

El acoplamiento molecular o *docking* es un procedimiento que permite identificar el modo aproximado de unión (modelo de unión) de un ligando en el sitio de unión del receptor. A partir del modelo es posible diseñar nuevas moléculas. También puede ser usado para la evaluación *in silico* de bases de datos virtuales en la búsqueda de moléculas activas. Actualmente, el acoplamiento molecular es un método muy usado en el descubrimiento y optimización de compuestos líderes. Para hacer *docking* es necesario contar con la estructura tridimensional del receptor, y con la estructura del ligando o una librería virtual. La forma de representar a la proteína y al ligando, así como la forma de evaluar el espacio de búsqueda conformacional del ligando en el sitio de unión dependen del programa que se use.¹³

Un estudio de acoplamiento molecular requiere de dos etapas: La primera consiste en la búsqueda del espacio conformacional accesible al ligando. En la segunda etapa

se usan funciones de evaluación, las cuales utilizan como registro de entrada la posición y conformación del ligando interactuando con los átomos en el sitio de unión y retorna como registro de salida un número. Este número representa la probabilidad que tiene el ligando, en la posición y conformación del registro de entrada, de unirse al sitio de unión.¹³ La mayoría de las funciones de evaluación, las cuales usan diversos programas de acoplamiento molecular, utilizan campos de fuerza. Éstos calculan la energía libre de unión del complejo ligando-receptor. Entre más negativa sea la energía, más afinidad tendrá el ligando por el receptor.¹³

2.4. GLUCÓLISIS

La ausencia de mitocondrias funcionales y de las actividades del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa tienen implicaciones importantes en la forma en que *E. histolytica* genera energía en forma de ATP para el trabajo celular, ya que la obtiene principalmente a través de la glucólisis, por lo que las enzimas de esta vía podrían ser un buen blanco terapéutico para afectar una vía metabólica esencial para el parásito.³⁵

Glucólisis o glicólisis es la ruta metabólica mediante la que se degrada la glucosa hasta dos moléculas de piruvato, a la vez que se produce energía en forma de ATP y de NADH. Es una ruta metabólica universalmente distribuida en todos los organismos y células. Su principal función es la degradación de glucosa y otros monosacáridos para la obtención de energía. La ruta está formada por diez reacciones enzimáticas divididas en dos etapas según sus productos.^{10, 12}

Fases o etapas:

a) Preparatoria: Cuatro reacciones: dos son de fosforilación y consumen 2 ATP por molécula de glucosa. La ruptura de la hexosa produce 2 triosas, que acaban en 2 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato.

b) De beneficios: Oxidación del *gliceraldehido-3-fosfato* (x 2) hasta *piruvato* (x 2) y formación acoplada de ATP en 2 de las reacciones, en total se forman 4 ATP y 2 NADH.⁴⁰

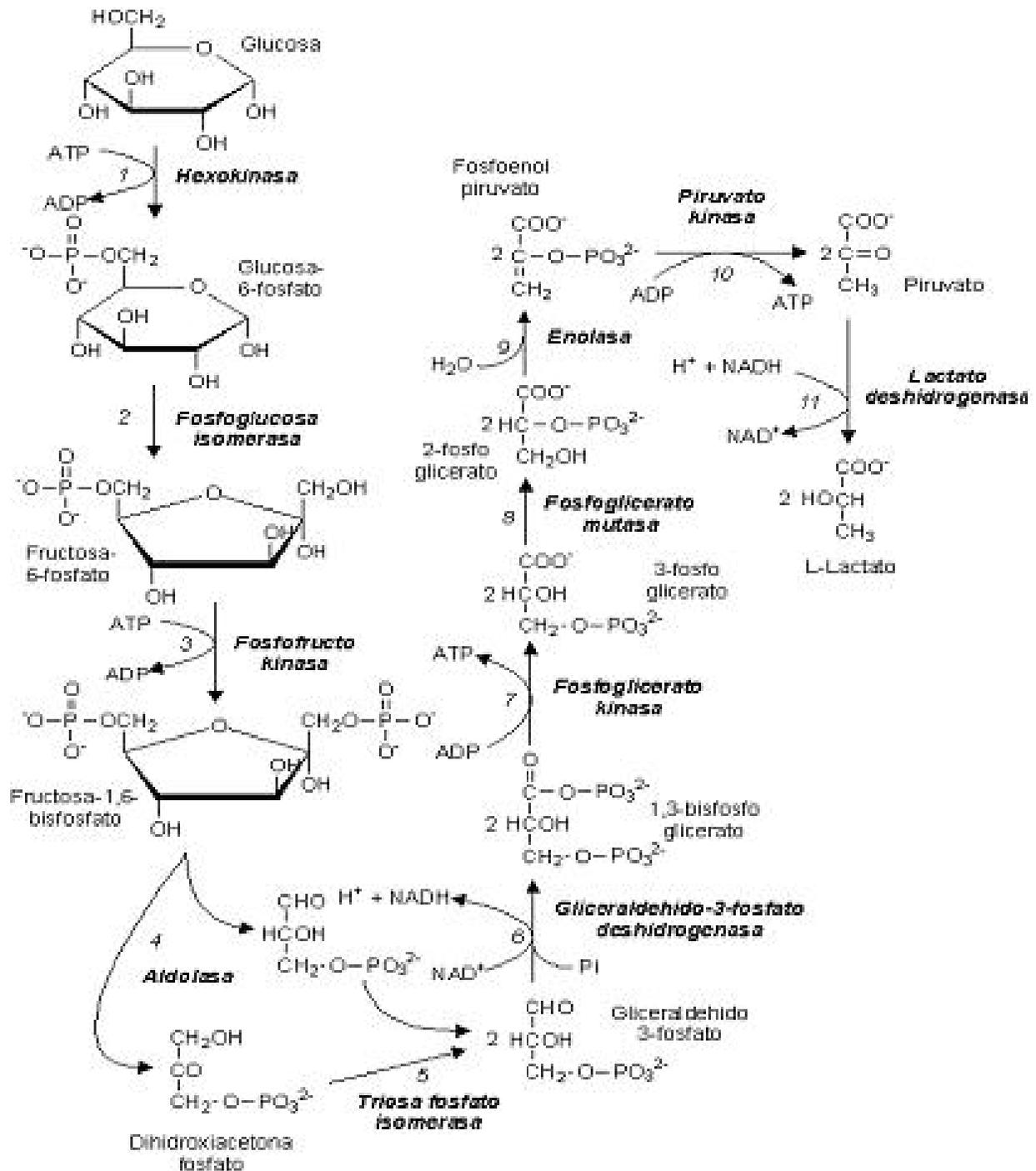


Fig. 2.4.1. Metabolismo de la glucólisis.

2.5. TRIOSA FOSFATO ISOMERASA



Fig. 2.5.1. Estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa de *Bacillus stearothermophilus*.

La Triosa fosfato Isomerasa (TIM) cataliza la interconversión del Gliceraldehído-3-fosfato y Dihidroxiacetonafosfato, esta reacción es la quinta de la glucólisis y la última de primera etapa de este proceso. La TIM, se ha encontrado en todas las especies analizadas hasta la fecha, y actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de ≈ 50 especies y la estructura tridimensional de 8 de ellas (pollo, levadura *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *E. coli*, *Bacillus stearothermophilus*, *Plasmodium falciparum*, *E. histolytica* y humano).³⁹

Sólo uno de los productos de la catálisis de la Aldolasa, el Gliceraldehído-3-fosfato, continúa a lo largo de la vía glucolítica. La Dihidroxiacetonafosfato y el Gliceraldehído-3-fosfato son isómeros cetosa-aldosa. Las concentraciones de Gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y Dihidroxiacetonafosfato (DHAP) se mantienen en la célula en una relación de Gliceraldehído-3-fosfato/Dihidroxiacetonafosfato de 0.473, existe más Dihidroxiacetonafosfato que Gliceraldehído-3-fosfato; sin embargo, debido a que el Gliceraldehído-3-fosfato se consume en la siguiente reacción, la mayor parte de la Dihidroxiacetonafosfato se transforma en Gliceraldehído-3-fosfato. La interconversión de Gliceraldehído-3-fosfato y Dihidroxiacetonafosfato probablemente ocurra vía un intermediario enediol o enediolato:

propuesto que tres residuos están implicados directamente sobre la interconversión del G3P y DHAP. Los residuos del sitio catalítico son: histidina, ácido glutámico y una lisina. En el caso particular de la EhTIM, los residuos involucrados son: lisina 13, histidina 102 y ácido glutámico 174.¹³

2.5.1. La TIM como blanco para el diseño de fármacos

López Vallejo evaluó el efecto sobre la actividad de la EhTIM con 97 compuestos, a una concentración de 250 μ M. La mayoría de los compuestos son derivados del bencimidazol y algunos intermediarios de sus síntesis. Adicional a esto, evaluó la actividad biológica *in vitro* de 5 compuestos los cuales presentaron una alta actividad biológica. Lo que permitió estudiar, de manera computacional, la forma en que éstos interactúan con la enzima.¹³

Después de usar técnicas como *docking*, logró observar que la interfaz del dímero de la EhTIM tiene una cavidad de una longitud de casi el doble que la longitud de los compuestos probados, lo que le permitió diseñar un gran número de moléculas. Los nuevos ligandos se diseñaron de varias formas: por visualización directa de su ambiente en la interfaz de la proteína, por superposición de diferentes modos de unión de un mismo ligando y de diferentes ligandos, por sustitución de las moléculas de agua cristalográficas y usando los conceptos de reemplazamiento isostérico e hibridación molecular.¹³

El estudio de acoplamiento molecular con la HsTIM (TIM de humano) de los compuestos diseñados muestra que *in silico* una parte de ellos tienen selectividad por la EhTIM; por lo que estas moléculas se convierten en agentes inactivantes potenciales de la EhTIM y como posibles candidatos a ser sintetizados y probados contra la enzima. Una de las moléculas diseñadas fue la que se sintetizó como proyecto de esta tesis; sin embargo también resultó ser afín por la HsTIM, hecho que no la descarta como una molécula potencialmente antiprotozoaria.¹³ En la **Tabla 2.5.1.1.** se observa el valor de afinidad y de ΔG del compuesto **23**.

Compuesto	EhTIM (kcal/mol)	HsTIM (Kcal/mol)	ΔG
23	-8.9	-9.5	0.6

Tabla 2.5.1.1. Energías de afinidad del compuesto 23.

2.6. BENCIMIDAZOLES

Los derivados del bencimidazol surgieron como antihelmínticos en el año de 1961 con el descubrimiento del tiabendazol, un antihelmíntico de amplio espectro de actividad. Este hecho abrió las puertas hacia el desarrollo de una amplia gama de nuevos bencimidazoles.

Los bencimidazoles actúan frente a nematodos, cestodos y trematodos, presentan un espectro de actividad muy amplio; son principalmente efectivos en los nematodos. No implica que en algunos casos sean eficaces frente a otros parásitos. Su estructura química es una fusión entre el anillo de benceno y uno de imidazol. Actualmente los compuestos bencimidazólicos de uso común en la práctica clínica para el tratamiento de las enfermedades parasitarias son el albendazol, el flubendazol y el mebendazol los cuales son efectivos y poco tóxicos.¹⁴

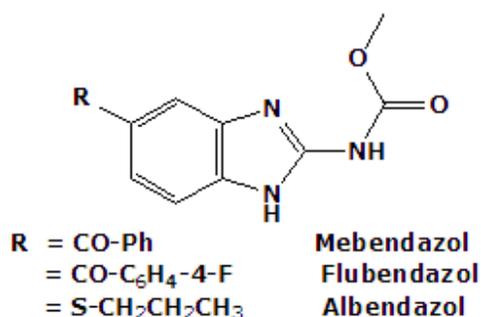


Fig. 2.6.1. Algunos compuestos bencimidazólicos de interés terapéutico.

El grupo de los carbamatos bencimidazólicos está reconocido como el de los fármacos antihelmínticos de elección, tanto para parasitosis intestinales como titulares; debido a su amplio espectro de acción y su baja toxicidad se emplean tanto en la terapéutica humana como en la veterinaria.^{14, 16}

En la práctica clínica en humanos el albendazol y el mebendazol han mostrado una alta actividad y seguridad para el tratamiento de la mayoría de las infecciones intestinales por helmintos y se usan en el tratamiento individual o en masa contra estas enfermedades. Su absorción limitada y su rápido metabolismo solo los hace efectivos contra parásitos sistémicos en altas dosis durante un tiempo prolongado.¹⁴

¹⁶ Actualmente se ha demostrado su eficacia en parasitosis causadas por protozoarios.

2.6.1. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Los trabajos realizados indican que el mecanismo de acción de los bencimidazoles antihelmínticos puede deberse a la inhibición del metabolismo y transporte de la glucosa en los helmintos, o bien, por la inhibición de la polimerización de la tubulina en los microtúbulos.¹⁶

La inhibición del metabolismo de la glucosa es mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa; enzima responsable de convertir el fumarato en succinato, el cual tiene un importante rol en el metabolismo anaerobio de la glucosa y la eventual producción de energía en los helmintos. Esta enzima solo está presente en los parásitos y por tanto es un blanco ideal para la quimioterapia. En cuanto al transporte de glucosa, los bencimidazoles inhiben directa y selectivamente la absorción de glucosa en nematodos y cestodos, lo que conduce al consumo del glicógeno del parásito. Consecuentemente el parásito pierde sus recursos de obtención de energía (glucosa exógena y reservas endógenas de glicógeno), y con ello la disminución de la formación de ATP, esencial para la supervivencia y reproducción del parásito.^{15, 16}

Los microtúbulos son estructuras compuestas por dos proteínas, la α -tubulina y la β -tubulina. La formación de los microtúbulos involucra la polimerización de la tubulina en uno de los extremos (polo positivo) y la despolimerización del otro extremo (polo negativo). Los microtúbulos tienen una función muy importante en el movimiento de los cromosomas durante la división celular, provee de estructura a la célula, el

movimiento intracelular de partículas, incluyendo metabolitos esenciales y participa en la exocitosis. Los bencimidazoles inducen la inhibición de la polimerización de tubulina mediante la unión de éstos a la β -tubulina, la unión es suficiente para inhibir el ensamble del microtúbulo, lo cual lo inestabiliza y subsecuentemente resulta en la desintegración de estos vía despolimerización. La pérdida de los microtúbulos repercute en la pérdida del transporte de vesículas secretorias, disminuye la captación de la glucosa e incrementa la utilización de las reservas de glicógeno, con la consecuente muerte del parásito.^{17, 18}

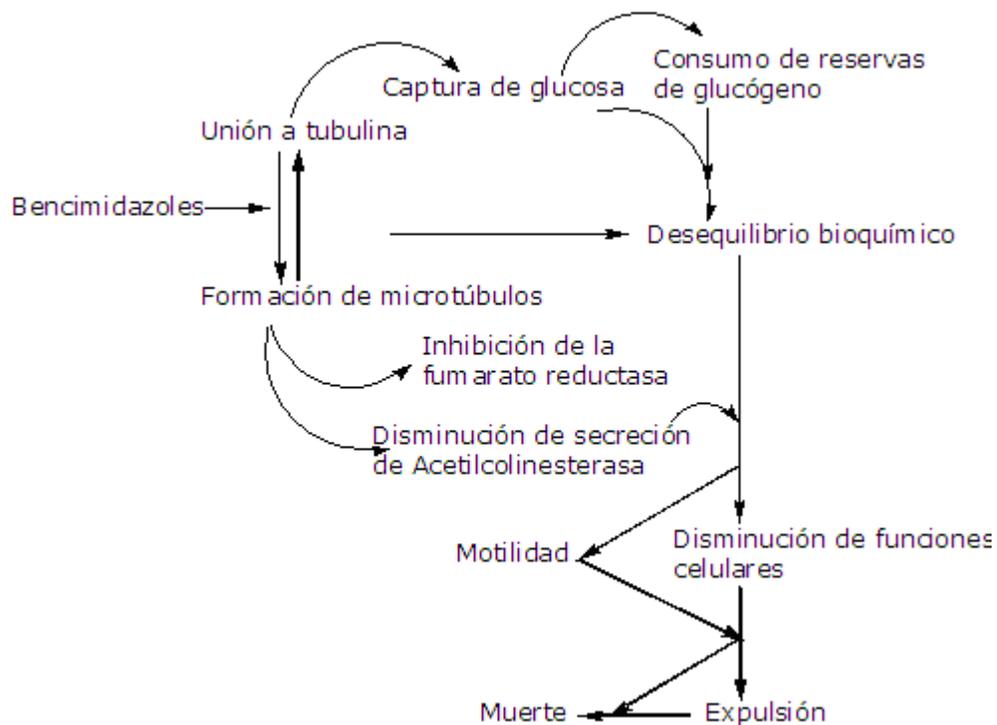


Fig. 2.6.1.1. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.

2.6.2. Asociación de moléculas para la formación de fármacos eficientes

Esta modalidad consiste en la asociación de dos o más fármacos, a través de enlaces covalentes para formar una nueva estructura que potencie la acción de ambos, estos fármacos son llamados fármacos gemelos o híbridos. La combinación de dos grupos farmacóforos idénticos da origen a un nuevo compuesto denominado fármaco gemelo, mientras que la asociación de dos grupos farmacóforos distintos

genera una nueva estructura llamada fármaco gemelo no idéntico o **híbrido**. La primera estrategia consiste de una variación molecular basada en la duplicación, mientras que la segunda resulta de la síntesis asociativa.^{19, 20}

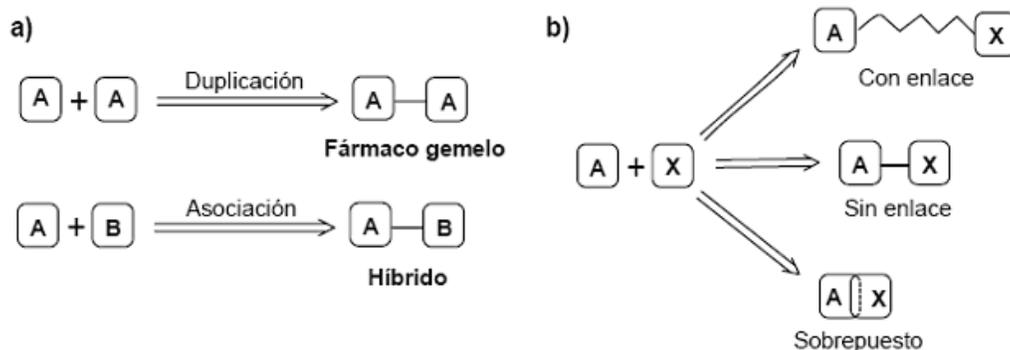


Fig. 2.6.2.1. (a) Tipos de asociación de dos moléculas; (b) Formas de unión de dos fármacos.²⁰

Los fármacos gemelos e híbridos pueden ser combinados por medio de un enlace, sin un enlace o mediante superposición. La duplicación de la aspirina nos origina un fármaco gemelo llamado diaspirina el cual está unido sin un enlace de por medio. La asociación del ácido salicílico y el paracetamol por medio de una superposición nos da un fármaco híbrido denominado acetaminosalol.²⁰

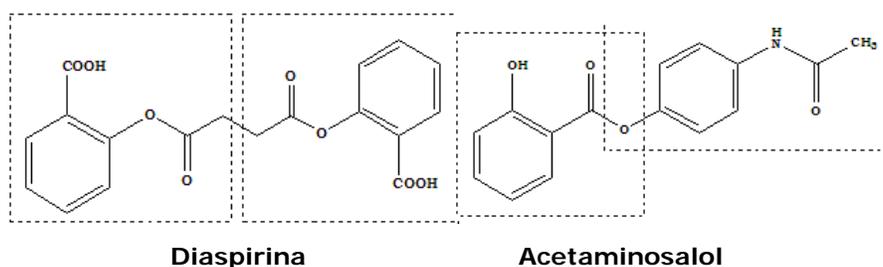


Fig. 2.6.2.1.1 Ejemplos de fármacos gemelos e híbridos

2.6.2.1. Compuestos "híbridos" para la innovación de fármacos

Los fármacos híbridos también son denominados fármacos de acción dual, debido a que poseen dos blancos farmacológicos ó dos grupos farmacóforos diferentes. El objetivo de tener dos efectos farmacológicos es con el propósito de obtener una respuesta sinérgica.²¹

Por otro lado, investigaciones realizadas en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, en colaboración con la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS y otras realizadas por el grupo de trabajo del Doctor Turan-Zitouni,^{22, 23} han aportado datos relevantes que muestran que compuestos híbridos derivados del bencimidazol y la nitazoxanida, presentan buena actividad biológica como antiparasitarios^{24, 25} o bien como antibacterianos y fungicidas.^{22, 23}

Aún cuando en ambos casos los núcleos precursores son los mismos, la diferencia entre ellos radica en que los compuestos sintetizados en la Facultad de Química de la UNAM están unidos vía un enlace carboxamida en la posición 5 del anillo bencimidazólico.^{24, 25}

2.6.3. Modificaciones moleculares de los bencimidazoles

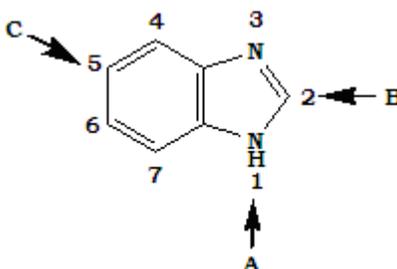


Fig. 2.6.3.1. Posiciones donde se han realizado modificaciones estructurales al anillo bencimidazólico.

2.6.3.1. Modificaciones en el Sitio A (Posición 1)

Para comprender la relevancia del hidrógeno de esta posición, se han sintetizado un gran número de 1-alquil, 1-aril, 1-acil y 1-arilalquil bencimidazoles. Se ha demostrado que la presencia del átomo de hidrógeno de la posición 1 es esencial para la actividad antihelmíntica cuando en la posición 2 se encuentra un grupo carbamato de metilo, como en el caso del Albendazol y Mebendazol¹⁶. Pero se ha demostrado que no es esencial para la actividad antiprotozoaria, la introducción de un grupo metilo mejora la actividad contra protozoarios con respecto a sus análogos 1-*H* bencimidazoles, tomando como referencia al metronidazol¹⁶.

La introducción del grupo metilo u otros grupos en esta posición tiene la finalidad de evitar el equilibrio tautomérico que sufre la molécula del 1*H*-bencimidazol, donde el protón de la posición 1 migra a la posición 3 (**Fig. 2.6.3.2. a**), obteniendo una mezcla de dos tautómeros²⁶. En los compuestos *N*-sustituidos el efecto tautomérico no es posible y cuando el anillo bencenoide se encuentra sustituido se obtiene dos compuestos regioisómeros con una relación estructural 1,5 y 1,6 (**Fig. 2.6.3.2. b**), lo cual nos brinda una mejor y detallada información sobre los requerimientos estructurales para la acción biológica²⁶.

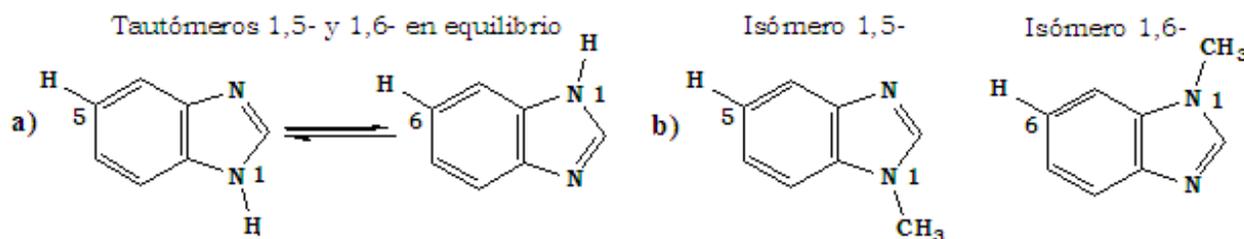


Fig. 2.6.3.2. Efecto tautomérico y regioisómeros del anillo de bencimidazol

2.6.3.2. Modificaciones en el Sitio B (Posición 2)

La naturaleza de los sustituyentes presentes en la posición 2 de los bencimidazoles desempeña un papel importante en el perfil de la respuesta biológica de la molécula resultante, se ha llevado a cabo una gran variedad de modificaciones estructurales en esta posición.¹⁶ Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación logró determinar la actividad antiparasitaria de bencimidazoles sustituidos en la posición 2 con los grupos siguientes: H, CH₃, CF₃, NH₂, SH, SCH₃ y NHCO₂CH₃. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos, en general, son más activos que el metronidazol como agentes antiprotozoarios y poco activos como agentes antihelmínticos. Los resultados de la evaluación biológica permitieron concluir que los compuestos sintetizados presentan una buena actividad con los grupos -SH, -SCH₃ y -CF₃ en la posición 2.^{22, 23, 24, 25}

2.6.3.3. Modificaciones en el Sitio C (Posición 5(6))

La presencia de un grupo farmacofórico en las posiciones 5(6) de los bencimidazoles 2- sustituidos es un factor importante para determinar el perfil biológico de estos compuestos. Los sustituyentes en ambas posiciones previene que la molécula sufra de metabolismo oxidativo y pierda actividad.¹⁶

2.6.4. Métodos de obtención de bencimidazoles

Uno de los principales métodos de síntesis de derivados bencimidazólicos es el método de Phillips²⁷ que consiste en la reacción de ciclocondensación entre una 1,2-fenilendiamina y un ácido carboxílico cuya naturaleza determina el sustituyente en posición 2, obteniéndose generalmente buenos rendimientos.

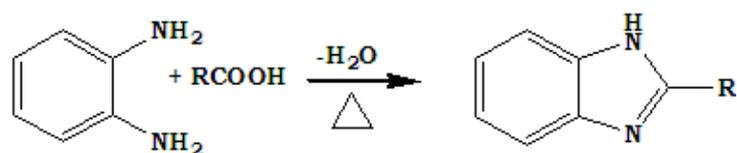


Fig. 2.6.4.1. Síntesis de bencimidazoles a partir de 1,2-fenilendiaminas y ácidos.

Si se requiere funcionalizar la posición 2 del bencimidazol con grupos como NH_2 ó SH , se emplean reactivos electrofílicos como BrCN para obtener el 2-aminobencimidazol, o bien el CS_2 para sintetizar el 2-mercaptobencimidazol.^{28,29}

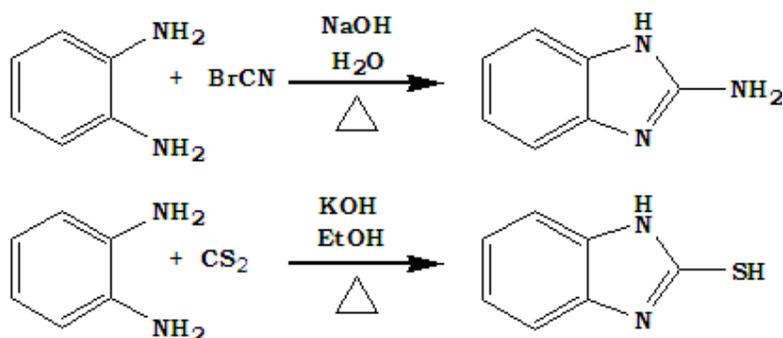


Fig. 2.6.4.2. Métodos de obtención de 2-mercapto-1*H*-bencimidazoles y 2-amino-1*H*bencimidazoles.

2.6.5. Métodos de obtención de carboxamidas

La elaboración de estos compuestos resulta un tanto difícil si se quieren hacer reaccionar directamente los ácidos carboxílicos con aminas, ya que se obtienen las sales correspondientes debido a la reacción ácido-base que ocurre entre ellos, además el grupo hidroxilo del ácido es un mal grupo saliente.³⁰ Por tal motivo, la preparación de este tipo de compuestos se lleva a cabo utilizando una forma más activa del ácido carboxílico (como es el caso de los anhídridos y halogenuros de ácido), o mediante el uso de agentes que forman aductos inestables con el ácido, para después hacerlos reaccionar con las aminas deseadas. Algunos ejemplos de métodos de síntesis de carboxamidas se ilustran a continuación.³¹

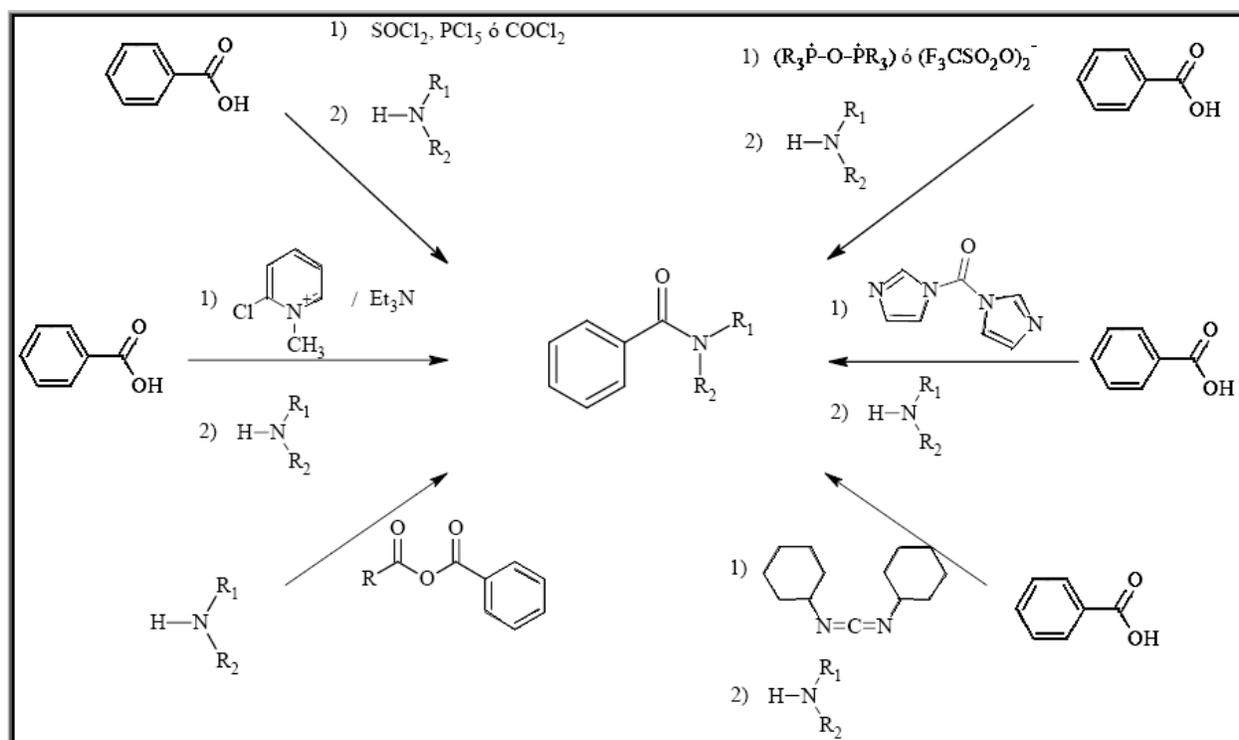


Fig. 2.6.5.1. Métodos de síntesis de carboxamidas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al problema mundial que enfrentamos actualmente respecto a la entamoebosis es que surge la necesidad de crear nuevos fármacos. Aun cuando en la actualidad existen fármacos disponibles para combatir enfermedades causadas por protozoarios, algunos estudios relacionados con su toxicidad, baja absorción y la generación de resistencia a los fármacos de elección, hacen indispensable continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria. Estos fármacos actualmente pueden ser diseñados mediante técnicas avanzadas como el DiFac haciendo uso especial del acoplamiento molecular (*docking*), así al determinar un blanco biológico, como lo sería una enzima de alguna vía metabólica que sea vital para el parásito; se pueden proponer moléculas que actúen en la enzima específicamente inhibiendo su función.

Es conocido que en diseño de antiparasitarios los bencimidazoles son de gran importancia debido a su amplio espectro de acción; por lo que se pueden tomar como base para el diseño de nuevas moléculas con las características estructurales necesarias para una actividad biológica determinada.

Sabemos que en nuestro grupo de investigación se han sintetizado tanto derivados 1-metilbencimidazoles, entre ellos 2-metiltio-5(6)-carboxamidas así como 2-aminobencimidazoles, como el 2-amino-5,6-diclorobencimidazol, y han mostrando importante actividad antiprotozoaria del orden μM . Si nos basamos en el hecho de que la molécula ha sintetizar es un híbrido diseñado por *docking* unido a través de un enlace carboxamida entre un 2-metiltiobencimidazol y un 2-aminobencimidazol con un $(-)\Delta G_{\text{unión}}$ calculado de -8.9 Kcal/mol , dato que representa gran afinidad por EhTIM. Entonces surgen las siguientes preguntas:

- ¿El híbrido diseñado por *docking* como inhibidor de la Triosa Fosfato Isomerasa (TIM) tendrá actividad contra *E. histolytica in vitro*?
- ¿El híbrido diseñado tendrá actividad contra otros protozoarios como *Giardia intestinales* y *Tricomonas vaginallis*?

4. HIPÓTESIS

El compuesto híbrido, diseñado por *docking*, entre el 2-aminobencimidazol 5 y 6 sustituido y el ácido 6-cloro-1-metil-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico unido por un enlace carboxamida, será muy activo contra *E. histolytica*, *in vitro* y más potente que los fármacos actualmente usados (MTZ y NTZ).

Dado que la molécula se conforma de dos núcleos bencimidazólicos se espera que presente una buena actividad *in vitro* contra los otros protozoarios *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar la carboxamida bencimidazólica **23**, así como evaluar su actividad antiparasitaria *in vitro* contra *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis* con la finalidad de brindar validez al uso de herramientas como el *docking* para el diseño de fármacos.

5.2. Objetivos específicos

Sintetizar y purificar el siguiente compuesto híbrido derivado de 2 bencimidazoles unidos por un enlace carboxamida

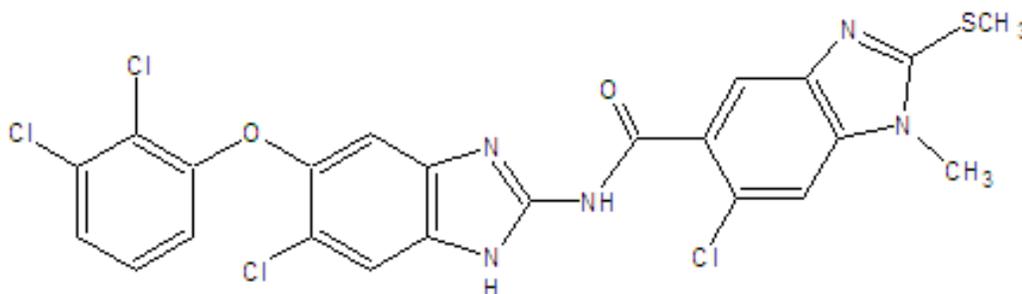


Fig. 5.1.1. 6-Cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**23**).

- ✿ Sintetizar y purificar los compuestos precursores necesarios para la obtención del bencimidazol carboxamida final.
- ✿ Determinar las constantes físicas y caracterizar estructuralmente los compuestos sintetizados, mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas como son IR, RMN ^1H , EM, y en algunos casos con RMN ^{13}C y 2D.
- ✿ Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* del compuesto híbrido, frente a los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinales* y *Tricomonas vaginallis*.
- ✿ Enriquecer la base de datos de compuestos antiparasitarios derivados del bencimidazol, con el fin de aportar información para establecer una relación estructura-actividad.

6. METODOLOGÍA

Para una mejor comprensión del desarrollo experimental que se siguió en esta tesis, lo dividiremos en dos partes. En la primera, la parte química, se describe la secuencia de síntesis empleada para la preparación del compuesto diseñado; y la segunda, la parte biológica, describe la metodología empleada para la evaluación antiparasitaria del compuesto sintetizado. La parte química se realizó en el laboratorio L-122 del edificio E, Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. Alicia Hernández Campos. La evaluación biológica del compuesto sintetizado frente al protozoario *E. histolytica*, *G. Intestinalis* y *T. vaginalis* se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI del IMSS, por la Bióloga Amparo Tapia bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

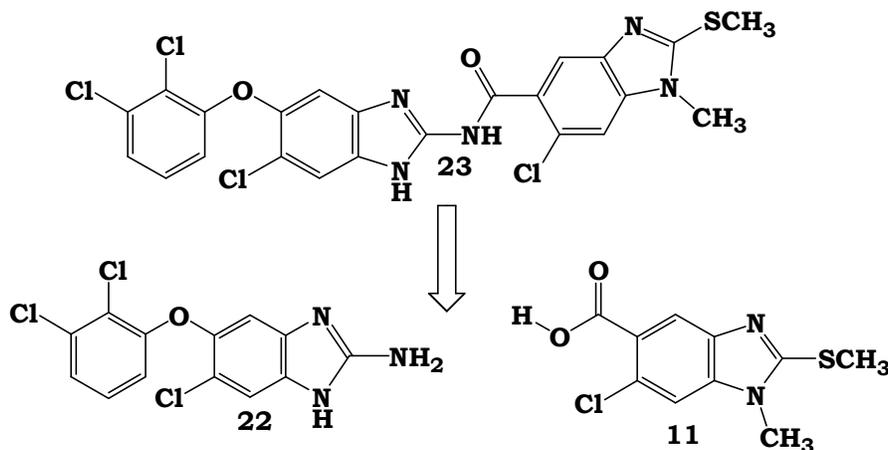
A continuación se describe en detalle la secuencia de la parte química, seguida de la parte biológica. Cabe mencionar que las metodologías empleadas para la síntesis de cada uno de los intermediarios y del producto final se presentan en el anexo A.

6.1. PARTE QUÍMICA

El desarrollo experimental para la síntesis del compuesto híbrido final (carboxamida) se dividió en tres partes:

- a) Síntesis del precursor ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**).
- b) Síntesis del precursor [5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**22**).
- c) Acoplamiento de los dos precursores para la obtención de la carboxamida **23**.

En el **Esquema 6.1** observamos la retrosíntesis; en la cual la molécula **23** da lugar a sus 2 precursores.



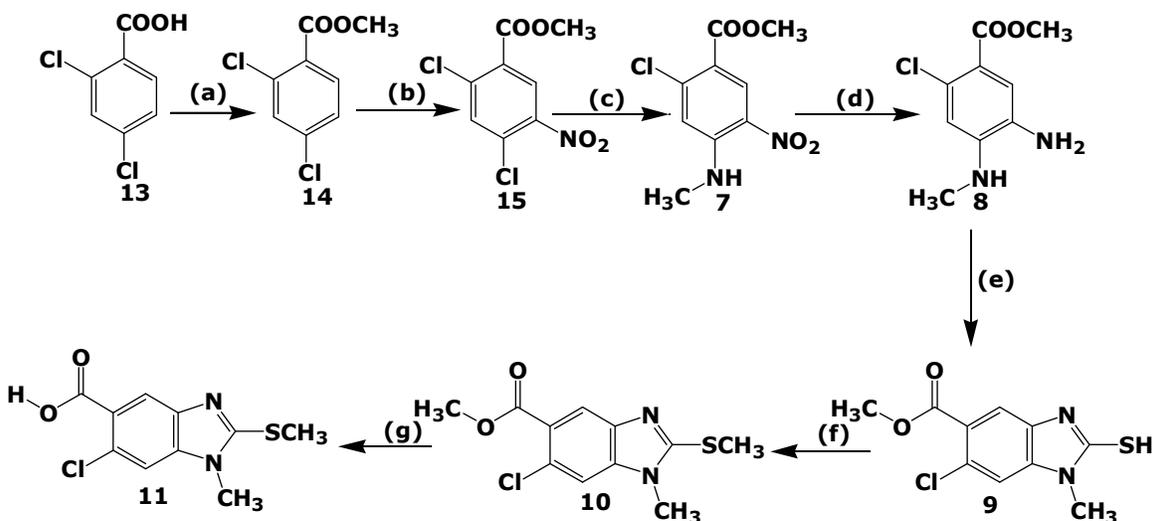
Esquema 6.1. Retrosíntesis de **23**.

a) Síntesis del precursor ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (11).

La secuencia seguida para la preparación del ácido **11** se muestra en el **Esquema 6.2**. Se partió del el ácido 2,4-diclorobenzoico (**13**) el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2,4-diclorobenzoato de metilo (**14**). Posteriormente se trató con mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas (0-5 °C) para dar el 2,4-dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (**15**). Una vez obtenido el producto anterior se realizó una reacción de sustitución nucleofílica con clorhidrato de metilamina en medio básico para obtener el 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoato de metilo (**7**).

Una vez obtenido el intermediario **7**, éste se sometió a una hidrogenación catalítica a temperatura ambiente generando el 5-amino-2-cloro-4-metilaminobenzoato de metilo (**8**). Para preparar **12**, **8** se trato inmediatamente con disulfuro de carbono en medio básico, para que se llevase a cabo la reacción de ciclocondensación dando como resultado la formación de 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxilato de

metilo (**9**). Este último se hizo reaccionar con 1.3 equivalentes de CH_3I en potasa etanólica, para dar como único producto el 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**10**). Por último el éster se hidrolizó con potasa acuosa dando la sal del ácido, el tratamiento con HCl finalmente dio el ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**).

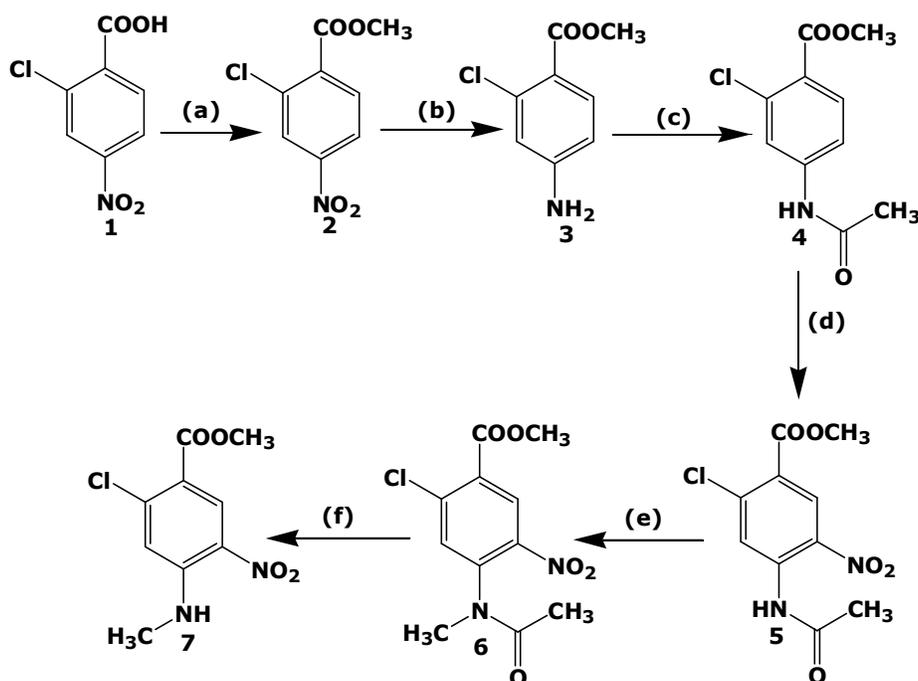


(a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, DMF, H_2O , NaHCO_3 , calor; (b) HNO_3 , H_2SO_4 ; (c) $\text{HCl}\cdot\text{NH}_2\text{CH}_3$, K_2CO_3 , glima.
 (d) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (e) CS_2 , EtOH, KOH, calor; (f) CH_3I , EtOH, KOH, H_2O ; (g) (1) KOH, H_2O , calor; (2) HCl.

Esquema 6.2. Secuencia sintética nueva para obtener el intermediario **11**.

A continuación se muestra un método alterno para la obtención del intermediario 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoato de metilo (**7**). Durante la realización de ésta ruta sintética se tuvieron algunos problemas, por lo que no se continuó la ruta hasta la obtención del bencimidazol **11** y éste se obtuvo como se mostró en el esquema 6.2. Abajo se muestra la ruta sintética original **Esquema 6.3**. Para obtener el intermediario (**7**) se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**). La reducción catalítica de 2 llevo al 4-amino-2- clorobenzoato de metilo (**3**). Este compuesto se acetilo con anhídrido acético para dar 4-

acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**) y posteriormente se trató con ácido nítrico / ácido sulfúrico a bajas temperaturas (0-5 °C) para dar el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). Si hubiéramos continuado con esta ruta para metilar el compuesto (**5**) y obtener el compuesto 4-metilacetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**), se necesitaba llevar a cabo una reacción con sulfato de dimetilo en medio básico, y posteriormente realizar la hidrólisis del grupo acetamido para llegar al compuesto (**7**).



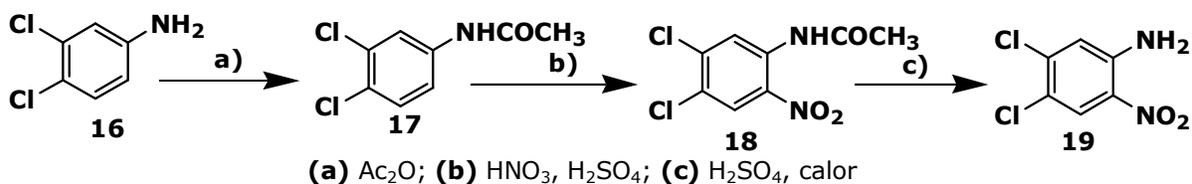
(a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, DMF, H_2O , NaHCO_3 , calor; (b) H_2 Ni-Raney, MeOH; (c) Ac_2O , H_2SO_4 ; (d) HNO_3 , H_2SO_4 ; (e) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaOH, H_2O ; (f) H_2SO_4 , calor.

Esquema 6.3. Secuencia sintética original para obtener el intermediario **7**

b) Síntesis del precursor [5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]amina (22**).**

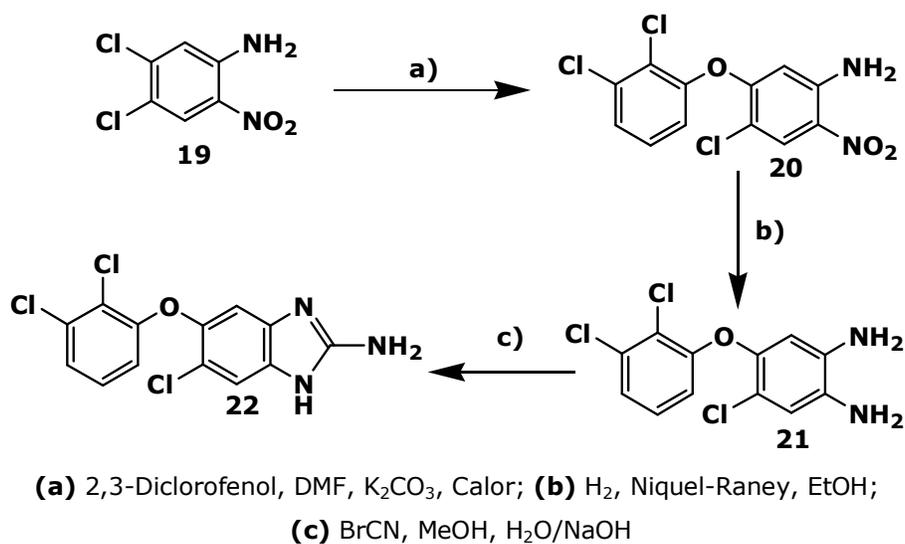
Para la preparación de la amina bencimidazólica **22** se partió de la 3,4-dicloroanilina comercial (**16**), la cual se acetiló con Ac_2O para dar la *N*-(3,4-Diclorofenil)acetamida (**17**) que se sometió a nitración con mezcla sulfonítrica en frío y dio la *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**18**). La

posterior hidrólisis de **18** con H_2SO_4 en caliente llevó al primer intermediario, la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**19**), según se aprecia en el **Esquema 6.4**.



Esquema 6.4. Secuencia sintética para obtener el intermediario **19**.

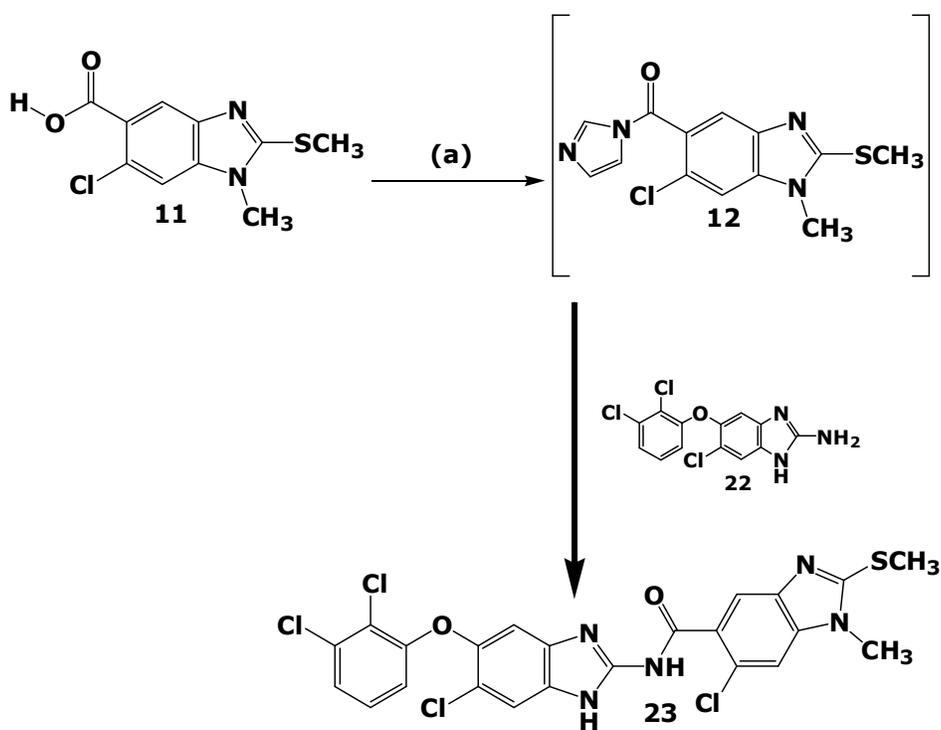
Posteriormente, **19** se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con 2,3-diclorofenol y K_2CO_3 en DMF en caliente para dar la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**20**), que sometida a una reducción catalítica con H_2 y Ni-Raney permitió la obtención de la 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (**21**). La ciclocondensación de **21** con BrCN en MeOH y sosa generó el [5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**22**). Como se muestra en el **Esquema 6.5**.



Esquema 6.5. Secuencia sintética para obtener el intermediario **22**.

c) Acoplamiento de los dos precursores para la obtención de la carboxamida 23.

El **Esquema 6.6** muestra la última etapa de síntesis en la cual el ácido **11** se hizo reaccionar con 1,1-carbonildiimidazol bajo atmósfera de nitrógeno en DMF a 88 °C, para dar lugar a la formación del intermediario reactivo **12**; una vez obtenido éste, se hizo reaccionar, sin aislar el intermediario, con 1.05 eq de la amina **22**, por tiempo prolongado y a temperatura suave (48 h, 60 °C) dando finalmente a la carboxamida **23**.



(a) 1,1-carbonildiimidazol, DMF

Esquema 6.6. Secuencia sintética para obtener el **Producto final (23)**

6.2. PARTE BIOLÓGICA

Evaluación *in vitro* de la actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica*

El ensayo biológico para la determinación de la actividad antiprotozoaria se llevo a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS, Centro Medico Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia. Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos previamente estandarizado. Se incubaron 4×10^6 trofozoitos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de la carboxamida **23** (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL), además del albendazol, nitazoxanida y del metronidazol que sirvieron como compuestos de referencia (control positivo). Como control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos empleando DMSO. Después de la incubación se inocularon 50 µL de los trofozoitos tratados, en medio fresco, ya sin la adición de los compuestos y se incubaron por otras 48 h. El número final de trofozoítos se determinó en un hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente, mediante análisis Probit, se calculó la CI_{50} que correspondió a la concentración que inhibió al 50% el crecimiento de los trofozoitos. Los experimentos se efectuaron por duplicado y se repitieron en tres ocasiones.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**7.1. PARTE QUÍMICA****7.1.1. Constantes físicas**

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos finales sintetizados, se muestran en la **Tabla 7.1.1**

Tabla 7.1.1. Constantes física de los compuestos sintetizados

Compuesto	Rendimiento Crudo (%)	Rendimiento Recristalizado (%)	Punto de Fusión (°C)	Disolvente utilizado en la Recristalización	R_f (Sistema)
2	98.53	97.40	75.8-76.3	EtOH	0.70 (I)
3	50.42	98.86	105-107	MeOH/H ₂ O	0.50 (I)
4	94.33	93.60	109.0-112.0	Tolueno	0.39 (I)
5	95.41	80.60	139-139.5	AcOEt	0.72 (I)
14	99.30	97.42	74.9-76.0	EtOH	0.6 (V)
15	98.63	98.90	61.2-62	MeOH	0.5 (V)
7	76.60	-----	-----	-----	0.45 (V)
8	95.11	-----	-----	-----	0.5 (II)
9	90.43	88.00	256.8-257.2	EtOH/DMF	0.44 (I)
10	94.40	83.20	133.5-134	EtOH	0.5 (I)
11	95.92	90.20	290.5-291	EtOH	0.48 (III)
17	-----	95.08	121-122.8	EtOH	0.16 (VI)
18	-----	87.00	125.1-126	MeOH/H ₂ O	0.48 (VI)
19	-----	80.00	178.7-179.1	CH ₃ COOH	0.47 (VII)
20	96.15	52	151.3-152.1	Tolueno	0.52 (VII)
21	-----	-----	-----	-----	0.5 (IV)
22	96.02	50.60	206-208	MeOH	0.49 (III)
23	96.06	59.70	> 300 °C	-----	0.5 (VIII)

7.1.2. Síntesis química

En esta parte primero se abordará la preparación de **7** por las dos rutas propuestas, después se analizará la formación del compuesto **11**, luego se analizará la ruta sintética en la que se obtuvo el intermediario final amina **22**, y por último la preparación de la amida propósito de este trabajo.

7.1.2.1. Obtención de los precursores **7**, **11**, y **22**

Para la obtención del ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**) fue necesario preparar su precursor **7**. Para ello se comenzó preparando el compuesto 2,4-diclorobenzoato de metilo (**14**) mediante la reacción de esterificación con sulfato de dimetilo en medio básico a partir del ácido 2,4 diclorobenzoico (**13**), el producto crudo fue un sólido de aspecto seroso amarillo claro de muy bajo punto de fusión ya que a temperatura ambiente se mostró como un líquido. El líquido viscoso pesó 106.6 g con un rendimiento del 99.3%. En la ccf se obtuvo una sola mancha. El éster **14**, sin posterior tratamiento, se nitró con mezcla sulfonítrica a baja temperatura preparando el ion nitronio en el seno de la reacción. El producto de nitración en la posición 5 fue el mayoritario y afortunadamente el isómero no deseado, el nitrado en la posición 3, se eliminó con la recristalización. La estructura del éster nitrado **15** se comprobó por el análisis de sus espectros. El espectro de IR mostró bandas en 3096 cm^{-1} que fueron asignadas al C-H aromático, además se observaron las bandas del carbonilo del éster en 1708 cm^{-1} y dos bandas características del grupo nitro en 1599 y 1339 cm^{-1} . El espectro de RMN ^1H mostró un singulete a 3.96 ppm que integró para 3H, correspondiente al metilo del éster, así como dos señales en 7.69 y 8.46 ppm que integran para 1H que corresponden a H-3 y H-6 respectivamente. En el espectro de masas se observó el ión molecular (M^+) con una relación m/z de 249 (30 %) que correspondió al peso molecular esperado, en 251 (M^{+2} 18%) y 253 (M^{+4} 3%) indicativo de los efectos sumados de los isótopos de los 2 cloros de la molécula. El espectro también mostró un pico en 218 m/z ($M-31$, 100 %), el cual se generó a partir de la pérdida del metoxilo del

éster y otro a 172 m/z generado a partir de la pérdida del metoxilo y del grupo NO_2 .

El siguiente paso fue la sustitución del cloro por la metilamina por medio de una reacción de sustitución nucleofílica aromática en un reactor cerrado en medio básico y como disolvente, DMF. Se obtuvo un producto contaminado con la amida correspondiente, resultado de la reacción aminación del éster. La ccf mostró dos manchas una con R_f de 0.27 (éster) y otra con R_f de 0.18 (amida) en un sistema Hex/AcOEt en proporción 85:15); sin embargo después de hacer un pequeño estudio se logró determinar el tiempo de reacción óptimo en el que mayoritariamente se obtiene el producto de sustitución nucleofílica, 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoato de metilo (**7**), prácticamente sin contaminación con la amida. Se determinó que la proporción éster/amida a los 45 minutos de reacción a 130°C a una dilución de 15-20 volúmenes y utilizando 3 equivalentes del clorhidrato de metilamina es de 99/1.

Esta reacción se llevó a cabo 4 veces siguiendo la misma técnica que se muestra en el anexo A con las siguientes condiciones variantes:

No.	Cantidad de materia prima	Condiciones experimentales	Aspecto y cantidad del producto crudo	Rendimiento crudo
1	25 g	18 h de reacción 2 eq. de K_2CO_3 y de metilamina + 150 mL de MeOH se vertió en 600 mL de agua helada y se filtró a vacío	16.91 g de un sólido amarillo-naranja 2 manchas (- éster y +++ amida) pf $201\text{-}207^\circ\text{C}$	65.92 %
2	7.10 g	4 h, 2 eq. de K_2CO_3 y 3 eq. de metilamina + 200 mL de Glima	5 g de un sólido amarillo canario. 2 manchas (éster = amida)	71.42 %

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3	15 g	45 min., 2 eq. de K_2CO_3 y 3 eq. de metilamina + 150 mL de MeOH se vertió en 600 mL de agua helada y se filtró a vacío	11.50 g de un sólido amarillo ocre 1 mancha (éster) no se tomó punto de fusión	76.60 %
---	------	--	--	---------

Enseguida el grupo nitro de **7** se redujo con hidrógeno y Ni Raney como catalizador. La reacción se llevó muy lentamente debido a que la solubilidad de **7** en MeOH es mala, por lo que fue necesario hacer la reacción en mezcla de MeOH/AcOEt. También es posible que se lleve a cabo más rápido si se calienta la reacción a 45° C aproximadamente. El compuesto 5-Amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (**8**) se obtuvo en un tiempo corto tomando como indicador el cambio de coloración de la mezcla y el cese en el consumo de H_2 . La diamina **8** sin tratamiento posterior se sometió a la ciclación.

El 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**) se obtuvo exitosamente a través de la ciclocondensación de la *o*-feniléndiamina **8**, recién preparada, con disulfuro de carbono en medio básico, tomándose en cuenta que el proceso de formación del xantato de etilo se realizó en el mismo medio de reacción. La temperatura por debajo de 65 °C y el pH de 9 fueron importantes para evitar la hidrólisis del éster. En el espectro de IR se observaron unas bandas en 2948 cm^{-1} correspondiente al S-H, 1702 cm^{-1} debida al carbonilo, y una banda de mediana intensidad a 1245 cm^{-1} que se le asignó al grupo C=S de la forma de la tiona. En el espectro de RMN 1H los singuletes en 7.53 ppm y 7.61 ppm correspondieron a los protones aromáticos H-7 y H-4 respectivamente, los singuletes en 3.83 ppm y 3.62 ppm correspondieron a los CH_3 del éster y del N respectivamente. El espectro de masas mostró un ion molecular m/z de 256 perteneciente al pico base del espectro, además de la señal M^{+2} con una abundancia del 35%, indicativo de los efectos sumados de los isótopos de

cloro y azufre para el compuesto. Por otra parte los iones en 225 y 197 de m/z indicaron la pérdida del grupo éster.

La metilación del tiol **9** con 1.3 equivalentes de yoduro de metilo en medio básico, a bajas temperaturas, dio origen al compuesto **10**. El espectro de IR reveló la presencia de una banda correspondiente al carbonilo en 1717 cm^{-1} ; además dos bandas muy intensas a 1270 y 1200 cm^{-1} asignadas a las vibraciones $\text{CH}_3\text{-S}$ y $\text{CH}_3\text{-N}$. En el espectro de RMN ^1H se observaron las señales simples que integraron para 3H cada uno a 2.72, 3.66 y 3.84 ppm correspondientes a los CH_3 unidos a S, N y O respectivamente. La espectrometría de masas comprobó la masa molecular del compuesto por el ion molecular a 270 que también fue el pico base; además se observaron los iones m/z 239 (M-31) indicativo del éster metílico y m/z 237 (M-33) indicativo de la presencia de azufre.

Finalmente, el ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**) se obtuvo mediante la hidrólisis básica metanólica a 65-70 °C de **10** con muy buen rendimiento. El espectro de IR mostró bandas muy anchas $< 3000\text{ cm}^{-1}$ características del grupo O-H del ácido carboxílico, así como en 1698 cm^{-1} correspondientes al grupo C=O del ácido. En el espectro de RMN ^1H se observaron 2 singuletes a 2.72 y 3.66 ppm, integrando para 3H cada uno, correspondientes a los CH_3 unidos a S y N respectivamente, además de dos señales en 7.71 y 7.93 ppm que integran para 1H correspondientes a H-7 y H-4 respectivamente. En la espectroscopia de masas, la presencia del ion molecular m/z de 256, perteneció al pico base, así como a la masa molecular del compuesto; los iones de m/z 223 y 210 fueron indicativos de la presencia de azufre y del ácido carboxílico.

Con la metodología originalmente propuesta para obtener **7** se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**), materia prima comercial (Aldrich), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico, con el fin de evitar problemas de solubilidad y/o reacciones secundarias en las reacciones subsecuentes. La sustitución nucleofílica procedió sin ninguna dificultad y de

manera rápida; se obtuvo el 2 cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**), el producto crudo fue un sólido amarillo, se recristalizó de EtOH dando 78.2 g de cristales amarillos brillantes (97.40 %) con un punto de fusión de 75.8-76.5 °C. En la ccf se obtuvo un *Rf* de 0.70 en un sistema CHCl₃/MeOH en proporción 95:5. El cambio estructural se comprobó a través de la espectroscopia de RMN ¹H. El espectro de IR dio señales características para éster a 2965 cm⁻¹ (CH₃), 1720 cm⁻¹ (C=O), 1297 cm⁻¹ (C-O). El espectro de RMN ¹H mostró una señal simple a 3.967 ppm que integró para tres hidrógenos que corresponden al metilo del éster; así mismo, el EM confirmó el peso molecular del compuesto con un pico de *m/z* de 215 y una abundancia relativa del 40 %, así como el fragmento de *m/z* 184 (M-31), el cual correspondió a la pérdida del OCH₃ que originó el pico base del espectro.

El éster **2** se sometió a una hidrogenación catalítica empleando Ni-Raney como catalizador a temperatura ambiente, lo cual dio origen al 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**). La amina se obtuvo con un rendimiento moderado de 50.40 %; dio un sólido blanco lo suficientemente estable para ser recristalizado. La elección del catalizador fue un aspecto importante para la preparación de este compuesto, ya que se ha visto que al usar Pd/Carbono se promueve la hidrogenólisis del cloro de la posición 2. El espectro IR mostró dos bandas amplias a 3427 y 3337 cm⁻¹ característico de las aminas primarias, además de una banda adicional en los 3223 cm⁻¹, la cual corresponde a aminas primarias aromáticas, denominada resonancia de Fermi además de una banda delgada y de poca intensidad que fue asignada al enlace C-Cl. La espectroscopia de RMN ¹H mostró una señal amplia a 4.104 ppm que integró para 2H y desapareció cuando se intercambió con D₂O; esta señal fue asignada a la amina. El EM mostró el ión molecular (M⁺) con *m/z* 185 (60%) concordante con la masa molecular esperada y un pico base de *m/z* 154 (M-31) generado por la pérdida del OCH₃; otro dato importante que proporcionó el EM fue la presencia del átomo de cloro en M⁺², ya que el isótopo ³⁷Cl se presenta con una abundancia relativa del 33% así, si M⁺² tiene una proporción de alrededor del 30% con respecto al ión

molecular (M^+) es indicativo de la presencia de cloro en la molécula, lo cual se comprobó en el espectro al presentar el pico 217 m/z (M^{+2} , 35 %), con este dato se confirmó que el catalizador no eliminó el Cl del compuesto **3**.

Con el propósito de aumentar el rendimiento de la reducción se probó hacer la hidrogenación variando el disolvente utilizando AcOEt en lugar de MeOH, la reacción no procedió en estas condiciones quedando incompleta como en las otras ocasiones.

También se llevó a cabo la reducción química con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ obteniendo mejores resultados. El rendimiento de la reacción aumentó hasta 10 %. La reducción con SnCl_2 es una reacción casi cuantitativa, siempre y cuando el manejo de las sales de estaño se realice de forma adecuada, de lo contrario se corre el riesgo de perder el producto.

La protección del grupo amino con un acetilo generó la acetamida **4**, la cual se obtuvo a partir del compuesto **3** mediante la adición de anhídrido acético a temperatura ambiente. Esta reacción procedió rápidamente dando un buen rendimiento del 94.33 %. El espectro de IR mostró señales en 3263 y 1592 cm^{-1} que fueron asignadas al -NH- de la amida, además se observaron las bandas del carbonilo del éster en 1725 cm^{-1} y una banda característica del carbonilo de la acetamida a 1677 cm^{-1} . El espectro de RMN 1H mostró un singulete a 2.208 ppm que integró para 3H, correspondiente al metilo de la acetanilida, así como una señal amplia a 7.820 ppm característica del N-H de la acetamida, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D_2O . En el espectro de masas se observó el ión molecular (M^+) con una relación m/z de 227 (56 %) que correspondió al peso molecular esperado. El espectro también mostró señales en 185 m/z ($M-42$, 88 %), el cual se generó partir de la pérdida del acetilo de la amida; el pico base del espectro apareció en una relación m/z de 154 generado a partir de la pérdida del acetilo anterior y del OCH_3 del éster.

El siguiente paso consistió en la nitración del compuesto **4**, la cual se realizó por adición directa del ácido nítrico sobre la acetamida disuelta en H_2SO_4

entre 0° y 5 °C, de esta manera se formó el ión nitronio *in situ*. En estas condiciones, la reacción procedió de forma eficiente y sin dificultades, consiguiendo obtener el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**) en mayor proporción, buen rendimiento y muy poco del isómero nitrado en la posición 3, el cual se eliminó mediante cristalización fraccionada con AcOEt. El IR mostró las bandas anteriormente descritas para el compuesto **4**; a estas bandas se sumaron las bandas características del grupo nitro en 1567 y 1336 cm^{-1} . En el análisis espectroscópico de RMN ^1H se comprobó el cambio estructural, ya que el espectro se simplificó notablemente con respecto a los anteriores (sistema ABX, **Fig. 7.1.2.1.1**); apareciendo dos señales simples a 8.827 y 9.058 ppm correspondientes a los hidrógenos H-3 y H-6 del anillo aromático. El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z 272 (17 %), comprobando el peso molecular esperado, además de los iones 230 m/z (M-42, 100 %) el cual se generó a partir de la pérdida del acetilo del grupo amida dando como resultado el pico base; 226 m/z (M-46, 20 %) lo que nos confirmó la presencia del grupo nitro ya que se generó por la pérdida del mismo en la molécula y el pico 199 m/z se generó a partir de la pérdida del acetilo y del OCH_3 del éster.

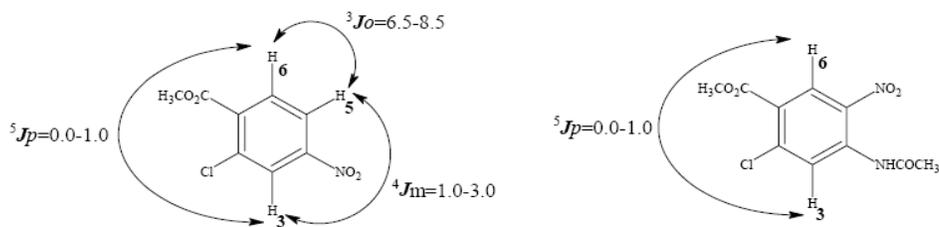


Fig. 7.1.2.1.1. Pérdida de la complejidad de señales en el espectro de RMN ^1H .

Durante la realización de esta ruta sintética se tuvieron algunos problemas, lo que dio origen a que el intermediario 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoato de metilo (**7**) se sintetizara, con buenos resultados, por la metodología antes discutida.

7.1.2.2. Obtención del precursor 22

Para la síntesis del compuesto **22**, el 2-aminobencimidazol, fue necesario contar con suficiente cantidad de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**19**) la cual se preparó a partir de la 3,4-dicloroanilina por acetilación, nitración y posterior hidrólisis⁴¹, esta secuencia no ofreció ningún problema, excepto en el paso de nitración que como la reactividad de la molécula lo indica, se obtuvieron dos isómeros siendo el compuesto **18** el de mayor proporción en la mezcla, por lo que la purificación del crudo de la reacción por recristalización dio la materia prima deseada con buen rendimiento (87%) y pureza. El compuesto **19** se comparó con una muestra pura en ccf y también por el pf.

Una vez obtenido el material de partida **19** se prosiguió con la reacción de sustitución nucleofílica aromática con 2,3-diclorofenol, en medio alcalino y con DMF como disolvente. Esta reacción permitiría colocar el grupo 2,3-diclorofenoxi en la posición 5(6) del producto final. La reacción presentó algunos inconvenientes, ya que la temperatura y el tiempo de reacción fueron relativamente altos (115 °C y 7h) dando origen a productos de sustitución impuros y muy coloridos que después de un tratamiento de recristalización y de resuspenderlo en el disolvente adecuado pudieron obtenerse sólidos cristalinos con un alto grado de pureza. Es así como se obtuvo la nitroanilina sustituida **20**. El compuesto **20** mostró las siguientes bandas en IR correspondientes a la unión Ar-NH₂ en 3468 y 3348, Ar-NO₂ en 1560, C-NO₂ en 1377 y 1321 cm⁻¹ entre otras. En el espectro de RMN ¹H se observaron las señales para los 5 H aromáticos a 8.284, 5.197, 7.431, 7.294, 7.082 ppm, correspondientes a H-3, H-6, H-10, H-11 y H-12 respectivamente. En el espectro de masas se observó el ion molecular con una m/z de 332 M⁺ y una abundancia del 10%; también, en su proporción debida, M⁺² y M⁺⁴. El pico base fue el ion de m/z 262 (M-70) correspondiente a la pérdida de 2 cloros.

La *orto*-feniléndiamina **21** se obtuvo cuando **20** se sometió a la reducción catalítica del grupo nitro con H₂ y Ni-Raney, esta reacción fue bastante sencilla y rápida llevándose a cabo en 1 h y consumiéndose poco hidrógeno (307 lb/in²), el producto **21** se concentró hasta ¼ de su volumen para trabajar inmediatamente en la siguiente reacción.

La amina **22** es el compuesto final de la segunda ruta sintética, se utilizó como intermediario para la formación de la molécula híbrida, y se formó al hacer reaccionar a la diamina **21**, recién preparada, con 1.5 equivalentes de BrCN en MeOH a reflujo a 50 °C, tomando en cuenta que el manejo del BrCN requiere de equipo especial y de la manipulación correcta bajo la campana de extracción todo el tiempo debido a la toxicidad del reactivo. **22** se obtuvo con excelente rendimiento (96 %) superior a los reportados con otras *o*-feniléndiaminas (50 %). El problema que hubo con éste producto, fue en la purificación, intentándose recrystalizar en distintos disolventes y con distintas condiciones, lo que dio mejor resultado fue primeramente hacer lavados sucesivos en en metanol y después se recrystalizó por cristalización fraccionada en MeOH. Las bandas en IR muestran la correspondiente unión Ar-NH₂ en 3077 cm⁻¹, la unión C=N del anillo en 1694 cm⁻¹, el éter C-O-C en 1102, C-Cl en 1022 cm⁻¹, entre otras. En el espectro de RMN ¹H se observaron las señales que integraron para 1H cada una en 7.10, 7.44, 7.36, 7.25, 6.68 ppm, correspondientes a H-4, H-7, H-11, H-12 y H-13 respectivamente: En el espectro de masas se observó el ion con una *m/z* de 327 M⁺¹ y una abundancia del 60% correspondiente a la masa del compuesto; además los iones M⁺² y M⁺⁴ correspondieron a las abundancias relativas reportadas cuando se tienen 3 átomos de cloro. También el ion de *m/z* 257 (M-70) correspondiente a la pérdida de 2 cloros.

7.1.2.3. Obtención del compuesto híbrido 23

La formación de la amida para la obtención del compuesto final, 6-cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida, se logró mediante la activación del ácido **11**

con 1,1-carbonildiimidazol. La reacción, que se hace en dos pasos, se realizó casi en 3 días; la formación del intermediario imidazólido **12** se realizó en 24 h y la formación de la amida requirió un calentamiento prolongado por 48 h. El híbrido **23** se obtuvo con un alto grado de pureza y un buen rendimiento a partir del trabajo simple de la reacción. Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con la estructura propuesta. El espectro IR mostró dos bandas amplias a 3357 y 3142 cm^{-1} característico del NH, además de dos bandas intensas en 2981 y 2847 cm^{-1} correspondientes a los dos CH_3 de la molécula, además se observó una banda muy intensa en 1127 que le fue asignada al enlace C-Cl debido a que la molécula cuenta con 4 de éstos. El espectro de RMN ^1H mostró dos señales amplias en 3.024 y 3.934 ppm que integraron para 3H correspondiente a los CH_3 unidos a S y N respectivamente; 4 singuletes en 7.105, 7.838, 7.904 y 8.186 ppm pertenecientes a los carbonos terciarios de los dos bencimidazoles H-11, H-7, H-14 y H-4 respectivamente, observamos el triplete de H-20 en 7.227 ppm y dos doble de dobles en 6.954 y 7.357 ppm que corresponden a H-21 y H-19 respectivamente; además observamos dos singuletes pequeños en 7.463 y 8.624 ppm que corresponden a NH-C-15 y NH-C=O respectivamente. La espectroscopia de RMN ^{13}C en conjunto con el experimento de RMN en 2D (HMBC) mostró dos carbonos alifáticos en 15.317 ppm para el SCH_3 y 33.191 ppm para el NCH_3 ; también se observó claramente el carbono del carbonilo en 168.609 ppm, C-1 en 160.050 ppm, C-2 en 138.609 ppm, C-9 en 121.164 ppm, C-16 en 154.320 ppm, C-17 en 127.427 ppm, C-18 en 137.179 ppm y en cuanto a los demás fue difícil la asignación debido a la cantidad de carbonos aromáticos que tiene la molécula; sin embargo se encontraron algunas otras correlaciones que dieron origen a asignar a C-13 en 131.255 ppm, C-3 en 133.101 ppm, C-12 en 117.621 ppm, C-21 en 120.831 ppm, C-6 en 128.929 ppm y C-19 en 129.294 ppm. Lo que se observa claramente es la presencia de los 23 carbonos. El espectro de EM(FAB) mostró el ión molecular (M^{+1}) con m/z 566 (3.9 %), (M^{+2}) con m/z 568 (5.3 %), (M^{+4}) con m/z 570 (2.8 %).y (M^{+6}) con m/z 572 (0.7 %), coincidiendo perfectamente la isotopía con el comportamiento esperado cuando se tiene en la molécula Cl_4 .

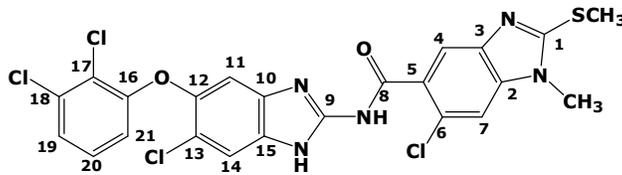


Fig. 7.1.2.3.1. Numeración de los carbonos del compuesto 6-cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1*H*-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (**23**) asignada arbitrariamente

Para determinar la posición en la que se llevó a cabo el enlace carboxamida entre los dos precursores benzimidazólicos fue necesario obtener el espectro de RMN en 2D **HMBC**. El HMBC es un experimento de correlación heteronuclear a dos y tres enlaces de distancia entre ^1H y otro átomo generalmente ^{13}C , cuando se compara con este último esta técnica ofrece una alta sensibilidad y se lleva a cabo mediante detección indirecta.

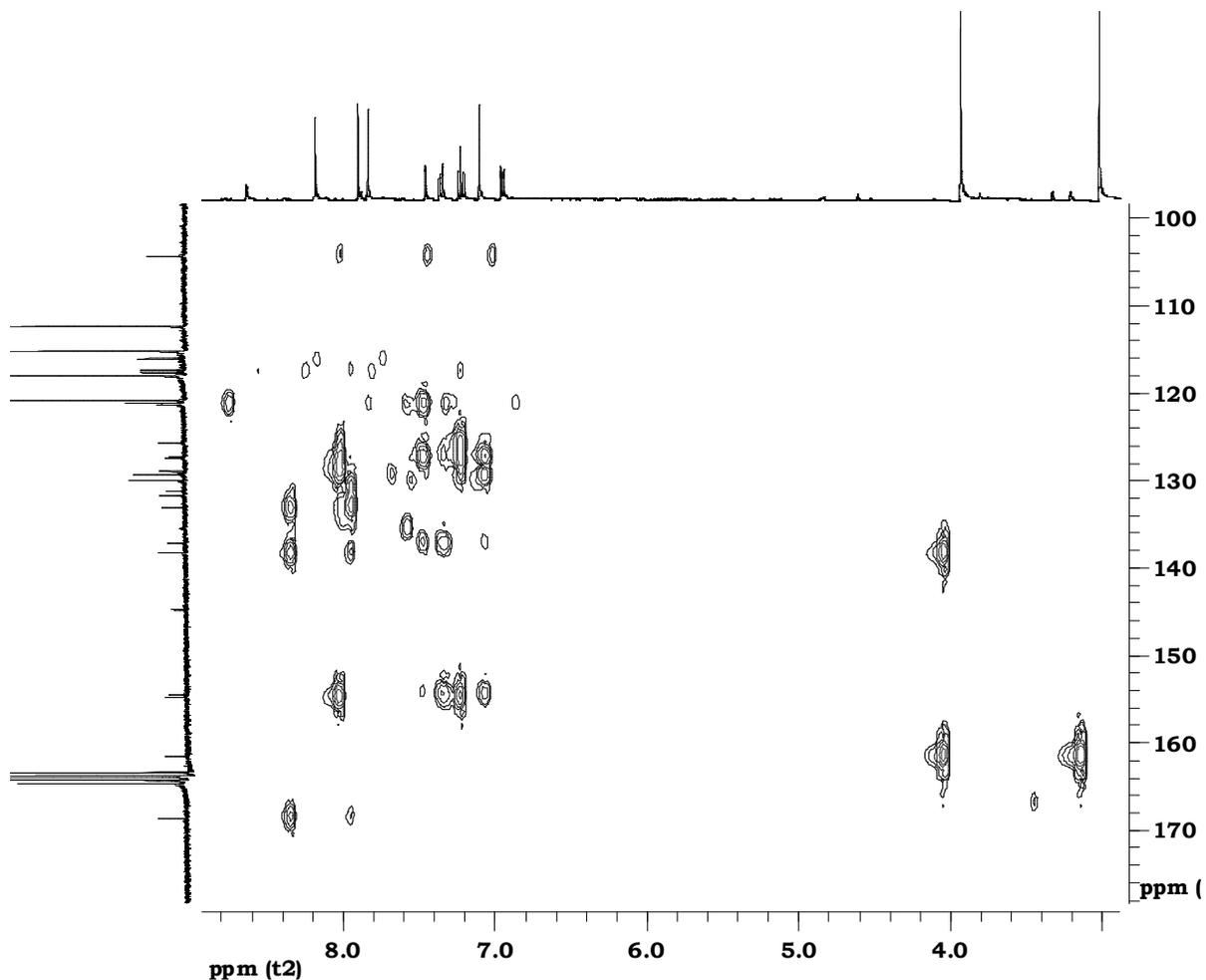


Fig. 7.1.2.3.2. Espectro HMBC de RMN en 2D de la molécula híbrida **23**

Analizando los espectros de RMN, HMBC, ^1H y ^{13}C , se ve claramente que el enlace carboxamida se llevó exitosamente en la posición esperada, esto se sustenta con base en las correlaciones mostradas entre los ^1H y los ^{13}C de la molécula que se muestran en el **Espectro 7.1.2.3.2**. Si además analizamos el espectro de RMN ^1H podemos observar la presencia de dos señales que integran para 1H correspondientes a los NH. Si la molécula se hubiera enlazado por la parte del N heterocíclico del anillo bencimidazólico de **22**, la amina en la posición 2 hubiera quedado libre, por lo que se tendría que ver una sola señal para un NH que integra para 2H. Por otra parte en el espectro de RMN 2D (HMBC) se observa que el C=O correlaciona fuertemente con los protones H-4 y H-7, y no con los protones pertenecientes al otro bencimidazol, debido a la estructura de la molécula, éstos se encuentran muy lejos del C=O. Además el protón de cada NH correlaciona únicamente con C-9 encajando perfectamente con la estructura, ya que cada uno de estos se encuentra a 3 enlaces de distancia con C-9; sin embargo se esperaría que NH-C-15 interaccionara de igual manera con el C-15 y con C-10 pero esta correlación no se observa, quizá por la fuerte interacción que tiene con C-9 debido a la presencia del otro NH-C=O, puede que apantalle la correlación con los otros carbonos y que no se observe. En este espectro se pueden encontrar muchas otras correlaciones importantes, las cuales no son útiles para determinar el modo en que se enlazó la molécula; sin embargo sirvieron de ayuda para asignar las señales a sus respectivos carbonos.

7.2. PARTE BIOLÓGICA

Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos contra *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*

En la **Tabla 7.2.1** se resume la actividad antiprotozoaria mostrada por los compuestos sintetizados en este trabajo de tesis.

Compuesto	CI₅₀ (μM) <i>G. intestinalis</i>	CI₅₀ (μM) <i>E. histolytica</i>	CI₅₀ (μM) <i>T. vaginalis</i>
Albendazol (ABZ)	0.038	56.33	3.39
Metronidazol (MTZ)	1.226	0.350	0.236
Nitazoxanida (NTZ)	0.013	0.055	0.110
23 (clave ZV-01-CF)	0.025	0.020	0.039

Tabla 7.2.1. Actividad antiprotozoaria in vitro de los compuestos sintetizados, MTZ, ABZ y NTZ.

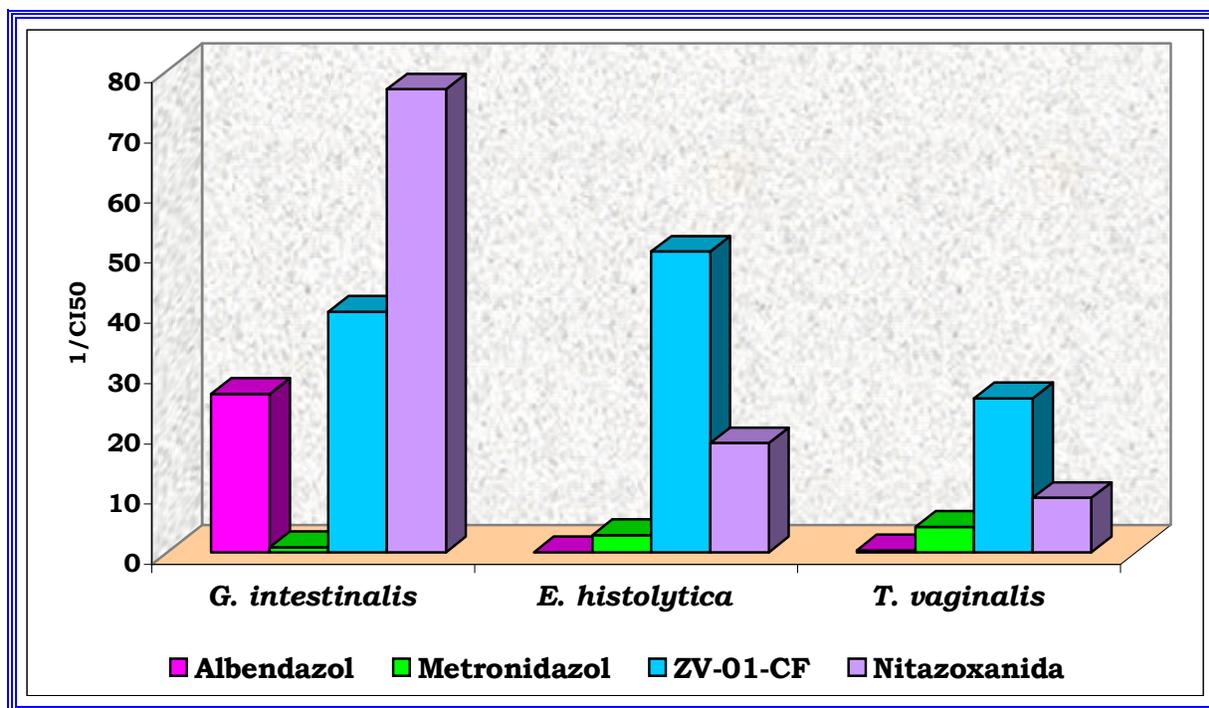
En esta tabla se compara la actividad antiprotozoaria del compuesto sintetizado **23** con respecto a los fármacos de elección más comunes para el tratamiento de las enfermedades parasitarias causadas por estos protozoarios.

A continuación en la **Tabla 7.2.2.** se muestra cuantas veces más potente fue el compuesto **23**, en comparación con el **ABZ, MTZ y NTZ.**

Compuesto	<i>G. intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>
Albendazol	1.52	2816.50	86.92
Metronidazol	49.04	17.50	6.05
Nitazoxanida	0.52	2.75	2.82

Tabla 7.2.2. Veces más activo **23 (ZV-01-CF)** en comparación con ABZ, MTZ y NTZ.

Los resultados se graficaron con los valores de $1/CI_{50}$ (**Gráfica 7.2.1**).



Gráfica 7.2.1. Potencia contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* del compuesto sintetizado en comparación con ABZ, MTZ y NTZ.

Se observa claramente que el compuesto sintetizado resultó ser mucho más activo que el albendazol y el metronidazol contra los protozoarios estudiados; sin embargo, al mismo tiempo resultó ser menos activo contra *G. intestinalis*, que la nitazoxanida pero más activo contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Es importante resaltar que la molécula **23** se diseñó como un potencial amebicida. El resultado de la actividad *in vitro* demostró que fue contra *E. histolytica* que tuvo mayor potencia, quizás sea debido al mecanismo que efectúa. López Vallejo reportó que la interfaz de la EhtIM tiene una cavidad de una longitud de casi el doble que la longitud de los compuestos que probó, algunos de ellos fueron derivados bencimidazólicos parecidos a las estructuras que presentan el ABZ y el MTZ. Si analizamos el compuesto **23** dicha molécula se formó a partir de dos bencimidazoles unidos mediante un enlace carboxamida; entonces **23** tendría el tamaño adecuado para adaptarse a la interfaz de la TIM e inhibirla, ya que aproximadamente tiene el doble de longitud que los compuestos probados lo cual encaja con los

resultados obtenidos por López Vallejo. Dado que también **23** fue activo contra de *G. Intestinalis* y *T. vaginallis* podría suponerse que también actúa inhibiendo a la TIM de dichos parásitos con una afinidad distinta a EhTIM. Los resultados obtenidos demuestran que los métodos de diseño de fármacos asistidos por computadora realmente funcionan como herramienta poderosa para el desarrollo de los mismos.

Es importante resaltar que la estructura del compuesto **23** tiene 4 átomos de cloro y un SCH₃ grupos que han demostrado ser importantes para la actividad antiprotozoaria.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permitieron corroborar nuestra hipótesis de trabajo ya que el compuesto híbrido **23** mostró un alta actividad contra *E. histolytica* la cual fue considerablemente superior a la mostrada por el albendazol, 17 veces mayor que el metronidazol y casi el triple de la nitazoxanida, lo que demuestra que la TIM podría ser el blanco en el mecanismo de acción de éste compuesto.
- Se comprobó la utilidad de los métodos computacionales, en particular el *docking*, en el diseño de fármacos.
- El compuesto **23** también mostró una buena actividad *in vitro* contra *G. intestinalis*, y *T. vaginalis* equiparable y en algunos casos superiores a los fármacos comerciales de referencia, resultando este compuesto prometedor como buen agente antiparasitario,
- Se requiere de la prueba de inhibición enzimática con la TIM de *E. histolytica* para comprobar el modo de acción del compuesto **23**.
- Hace falta determinar la actividad de los compuestos precursores **22** y **11** contra los mismos parásitos y comparar su potencia con respecto al compuesto híbrido **23**.
- Se logró la síntesis de los intermediarios finales y de la molécula híbrida esta última utilizando 1,1 carbonildiimidazol para dar un intermediario muy reactivo que permitió la formación del enlace carboxamida.
- Los compuestos sintetizados, tanto el compuesto final como los intermediarios, se identificaron mediante la utilización de técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM). También nos fue

posible determinar para cada uno de ellos algunas de sus constantes físicas más importantes (p_f y R_f). En el caso del compuesto final también se identificó con RMN en 2D mediante el experimento HMBC, con lo que se comprobó la unión amídica entre el amino en la posición 2 del bencimidazol y el ácido carboxílico en la posición 5 del otro precursor bencimidazólico.

- Se logró adquirir conocimiento y experiencia en el campo de la síntesis orgánica, elucidación estructural y diseño de moléculas de interés farmacéutico.
- Los resultados obtenidos en este trabajo ya forman parte de la base de datos de derivados bencimidazólicos evaluados como antiparasitarios, por lo que contribuyen a que en un futuro se conozcan los parámetros que establecen la relación estructura-actividad de estos compuestos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pumarola, Agustín; Rodríguez Torres, Antonio; García-Rodríguez, José Angel; Piedrola-Angulo, Gonzalo. Microbiología y Parasitología Médica. Barcelona. 1991. 2a ed.. 916 p.
2. Savioli L, Bundy DAP, Tomkins A. Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:353-4.
3. WHO/PHO. Informal consultation on intestinal protozoal infections. Mexico DF: OPS; 1992. (WHO/CDI/IPI/92.2).
4. WHO. Informal Consultation on Intestinal helminth Infections. Geneva: World Health Organization;1990. (WHO/CDS/IPI/90.1).
5. Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections. Fifty years on. *Parasitol Today* 1997;113(11):438-43.
6. García LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. 2.ed. Washington, DC.: American Society for Microbiology; 1993:p.31-9.
7. Pérez-Armengol C, Ariza-Astolfi C, Ubeda-Ontiveros JM, Guevara-Benítez DC, Rojas Álvarez M de, Lozano Serrano C. Epidemiología del parasitismo intestinal en niños del Valle de Guadalquivir, España. *Rev Esp Salud Pub* 1997; 71(6):547-52.
8. Crompton DWT, Savioli L. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull World Health Organ* 1993;71(1):1-7.
9. Espinosa-Cantellano, M., and Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical Microbiology reviews*.13 (2): 318-331.
10. Lehninger, A., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York P.
11. Dixon, M., Webb, E.-C. (1979) *Enzymes*. Academic Press, NY.
12. Saavedra, E., Encalada, R., Pineda E., Jasso-Chávez, R. and Moreno-Sánchez, R. (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica* revisited: biochemical characterization of glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal* 272, 1763-1783

13. López Vallejo Fabián. *Estudios de modelado molecular de bencimidazoles activos contra Entamoeba histolytica y diseño de analogos antiamebianos*. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM 2007.
14. Horton, R. J. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol. Today*. 1990; 6(4): 106.
15. Frayha, G. J.; Smyth, J. D.; Gobert, J. G.; Savel, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen. Pharmac.* 1997; 28(2): 273-299.
16. Sharma, S.; Abuzar, S. The benzimidazole anthelmintics –chemistry and biological activity. *Prog. Drug Res.* 1983; 27: 85-150.
17. MacDonald, L. M.; Armson, A.; Thompson, R. C. A.; Reynoldson, J. A. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004; 138: 89-96.
18. Martin, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 1997; 154: 11-34.
19. Avendaño López, C. Introducción a la química farmacéutica. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. 2ª Edición; España, 2001. pp 63-67, 606-607.
20. Wermuth, C. G. The practice of medicinal Chemistry. Ed. Elsevier Academic Press. 2ª Edición; Great Britain, 2004. pp. 251-273.
21. Wermuth C. Identical and Non Identical Twin Drugs, en *The Practice of Medicinal Chemistry, Academic Press*, 1996, 661-693
22. Kaplancikli, Z.; Turan-Zitouni, G.; Revial, G.; Guven, K. Synthesis and Study of Antibacterial and Antifungal Activities of Novel 2-[[[(Benzoxazole/benzimidazole-2-yl)sulfanyl]acetylamino]thiazoles, *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 11, 1081- 1085
23. Turan-Zitouni, G.; Demirayak, S.; Özdemir, A. ; Kaplancikli, Z. ; Yildiz, M. Synthesis of some 2-[(benzazole-2-yl)thioacetylamino]thiazole derivatives and their antimicrobial activity and toxicity, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003, 39, 267-272
24. Arroyo, S. V. Síntesis de nitrocarboxamidas aromáticas, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. 2003

25. Vargas, B. P. Síntesis y Actividad Giardicida de Carboxamidas Bencimidazólicas. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2006
26. Townsend, L. B.; Wise, D. S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol. Today*. 1990; 6(4): 107-112.
27. Phillips, M. A. *Journal of Medical Society*, 1928, 2393
28. Bywater, W. G.; McGinty, D.; Jenesel, N. *Journal of Pharmacology*, 1995, 85, 14
29. Van Allan, J. A.; Deagon, B. D. *Organic Syntheses Collect; Wiley: New York*, 1963, 4, 569
30. Mc Murry. *Química Orgánica*, 1999, *Editorial Iberoamericana*, 781-793
31. Cativiela, C.; Mayoral, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J.; Lahoz, F.; Gimeno, S. Asymmetric Diels-Alder Reactions of Charal [-2-Cyanocinnamates with Cyclopentates, *American Chemical Society*, 1992, 57, 4664-4669
32. www.scribd.com/doc/5338048/manual-de-parasitologia - 435k
33. <http://www.monografias.com/trabajos60/parasitismo-intestinal/parasitismo-intestinal.shtml>
34. www.pediatriasantafe.com.ar/pdf_graficos/cientif/entamoeba_histolytica.doc
35. www.smb.org.mx/Memorias_Bioener2005/Posters/C05.pdf
36. www.dpd.cdc.gov/
37. http://es.wikipedia.org/wiki/Entamoeba_histolytica
38. catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/hinojosa_s_le/capitulo7
39. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/triosafosfato%20isomerasa.html>
40. <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/metabolismo/indexg.htm>
41. Bustos Salgado Paola. *Síntesis y actividad antiparasitaria de análogos del 1H-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo*. Tesis Maestría (Maestría Doctorado en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM 2008.

10. ANEXO A. PARTE EXPERIMENTAL

10.1. Instrumentación

- * Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi modelo B-540 mediante capilar y no están corregidos.
- * La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador marca Büchi modelo RE-114, con vacío generado con una bomba marca GAST modelo 0523-V4F, baño de agua modelo B-480 y compresora VWR Scientific modelo 1107.
- * La hidrogenación catalítica se realizó empleando un hidrogenador marca Parr modelo 3916 EG con 60 lb/plg² y 500 cc como capacidad, utilizando hidrógeno de tanque marca INFRA y como catalizador Ni/Raney al 30% de marca Aldrich.
- * Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio (KBr), las señales se reportan en cm⁻¹.
- * Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ¹H) se determinaron en un espectrómetro marca VARIAN modelo Unity Inova 300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes DMSO-d₆, CDCl₃, y D₂O para el intercambio de protones unidos a heteroátomos. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).

- * Los espectros de masas (EM) se determinaron por las técnicas introducción directa (ID), de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), por impacto electrónico (70 e.V.) y/o bombardeo rápido de átomos (FAB⁺, por sus siglas en inglés) en un espectrofotómetro de masas marca JEOL, modelo JMS-SX-102, acoplado a un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard, modelo 5890 Serie II.

10.2. Cromatografía

El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se determinaron por cromatografía en capa fina (ccf) en placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de marca Merck. La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta y por exposición a vapores de yodo.

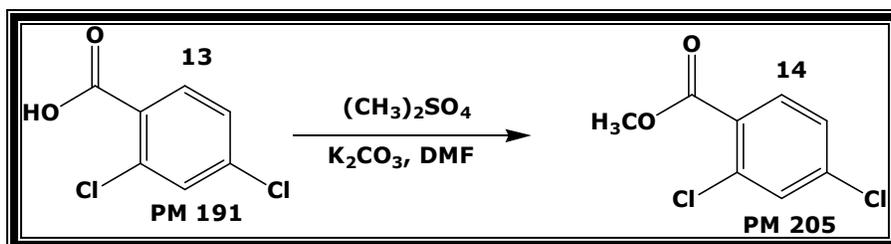
Los sistemas de elución utilizados para la cromatografía en capa fina se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla Sistemas de elución utilizados para la ccf

Sistema	Composición	Proporción
I	CHCl ₃ /MeOH	95:5
II	CHCl ₃ /MeOH	90:10
III	CHCl ₃ /MeOH	80:20
IV	AcOEt/ Hexano	80:20
V	Hexano/ AcOEt	85:15
VI	Hex/CHCl ₃ /AcOEt	50:35:15
VII	CHCl ₃ /MeOH	99.5: 0.5
VIII	AcOEt /Acetona	90:10
IX	CHCl ₃ /MeOH	98:2

10.3. Procedimientos experimentales para la obtención de los precursores y compuestos finales.

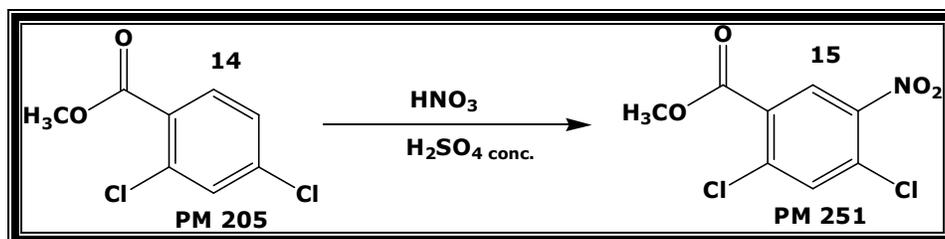
**10.3.1. 2,4-Diclorobenzoato de metilo (14)
(Esterificación)**



En un matraz bola de 1 L con tres bocas, provisto con termómetro, columna Vigreux y embudo de adición se disolvieron 100 g (0.5235 mol) del **ácido 2,4-diclorobenzoico (13)**, en 300 mL de DMF a 50 °C, posteriormente se adicionaron 88 g (0.6367mol, 1.2 eq.) de K_2CO_3 en suspensión acuosa, se verificó que el pH fuera alcalino (7) y se agregaron, gota a gota mediante agitación constante, 72 mL (0.7852 mol, 1.5 eq.) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, la mezcla se dejó reaccionar a 60-65 °C hasta que la ccf mostró el consumo total de la materia prima (1 hora y 30 minutos). Después, la mezcla se vertió en agua; el sólido se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 106.6 g (99.30 % de rendimiento crudo) de un sólido amarillo claro que en ccf mostró una sola mancha. Se recristalizó 1 g de EtOH dando 0.97 g de cristales amarillos brillantes (97.42 %) con un punto de fusión de 74.9-76.0 °C. En la ccf se obtuvo un *Rf* de 0.6 (Sistema V).

10.3.2. 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)

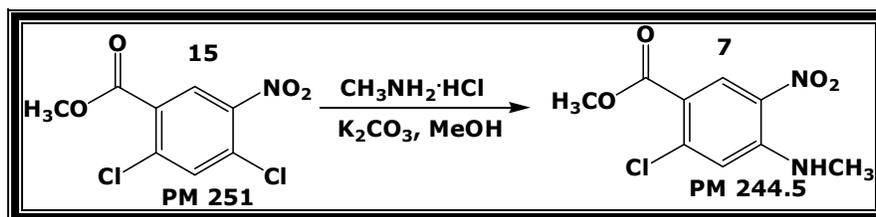
(Nitración)



En un vaso de precipitado de 600 mL, acondicionado con termómetro, embudo de adición y sumergido en un baño de hielo-sal, se disolvieron 106 g (0.5170 mol) de **2,4-diclorobenzoato de metilo (14)** en 200 mL de ácido sulfúrico concentrado. La adición de HNO₃ se realizó lentamente gota a gota entre 5-10 °C aproximadamente durante 4 h; una vez agregado todo el ácido la reacción se dejó 30 minutos más en agitación vigorosa. Una vez consumida la materia prima, la mezcla se vertió sobre 600 mL de agua con hielo picado; el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar con el aire. Se obtuvieron 128 g (98.63 % de rendimiento crudo) de un sólido amarillo claro que en ccf mostró dos manchas. Se recrystalizó todo de MeOH dando 76 g (59.37 %) de cristales amarillos brillantes con un punto de fusión de 61.2-62.0 °C. En la ccf se obtuvo un *R_f* de 0.5 (Sistema V).

10.3.3. 2-Cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7)

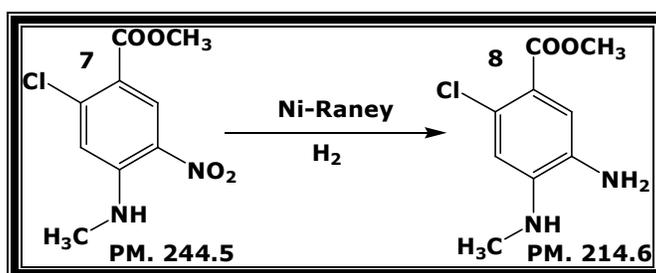
(Sustitución Nucleofílica)



En un reactor Parr se mezclaron 15 g (0.0614 mol) de **2,4-dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)**, 12.43 g (0.1842 mol, 3 eq.) del clorhidrato

de metilamina, 16.97 g (0.1227 mol, 2 eq.) de K_2CO_3 y 250 mL de monoglima. El reactor se cerró inmediatamente, la mezcla se calentó a 130 °C por una hora, después se dejó enfriar; la solución se filtró al vacío para separarlo de las sales, lavando éstas repetidas veces con monoglima. El disolvente se concentró en el rotavapor hasta llegar a $\frac{1}{4}$ del volumen inicial. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con monoglima fría y se dejó secar al aire. El producto crudo fue un sólido amarillo ocre, se obtuvieron 11.50 g del compuesto puro lo que dio un rendimiento del 76.60 %. En la ccf de la reacción se obtuvo un *Rf* de 0.45 (Sistema V). El producto no se recrystalizó. El punto de fusión no se pudo determinar.

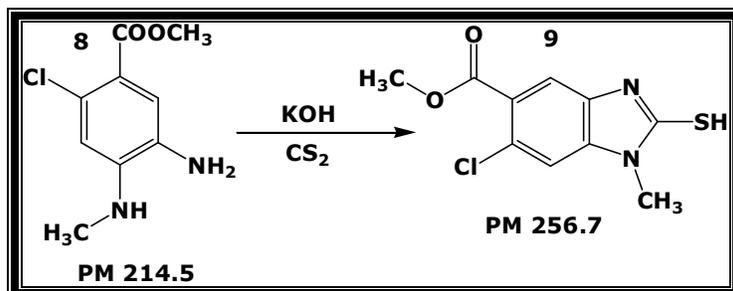
**10.3.4. 5-Amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (8)
(Hidrogenación catalítica)**



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 11.50 g (0.0454 mol) de **2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7)** y 5 g (30 %) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con H₂O/MeOH, en 250 mL de una mezcla de MeOH/AcOEt 150 mL/100 mL, el frasco se colocó en el hidrogenador y se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in². La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas, consumiéndose 320 lb/in², la solución translúcida que se obtuvo se filtró en un Büchner con celita para separar el catalizador; el filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 9.60 g de un aceite café transparente dando un rendimiento de 95.11 % y un *Rf* de 0.5 (Sistema II). El producto sin posterior tratamiento se sometió a la siguiente reacción.

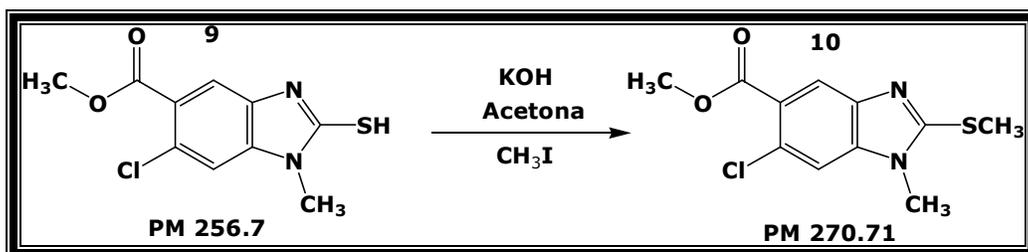
10.3.5. 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)

(Ciclocondensación)



En un matraz bola de 3 bocas de 500 mL se disuolvieron 9.60 g (0.0450 mol) de **5-amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (8)** en 200 mL de etanol a temperatura ambiente. Una vez en solución se le adicionan 5.10 g (0.09 mol, 2 eq.) de KOH disueltos en 12 mL de agua, posteriormente se adicionaron 5.5 mL (0.090 mol, 2 eq.) de CS₂. Terminada la adición la mezcla se calentó a 60-65 °C a reflujo moderado por 3 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez consumida la materia prima, la mezcla de reacción se vertió en 500 mL de agua; después con agitación magnética continua se adicionó ácido acético glacial al 20 % para ajustar el pH a 5. El sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido de color crema, pesó 10.4 g (90.43 %) y su análisis por ccfd dio una sola mancha con un *R_f* de 0.44 (Sistema I). Todo el compuesto se recrystalizó de EtOH + 10 % de DMF obteniéndose 9.15 g de cristales blancos muy finos con un rendimiento del 88 % cuyo punto de fusión fue de 256.8-257.2 °C.

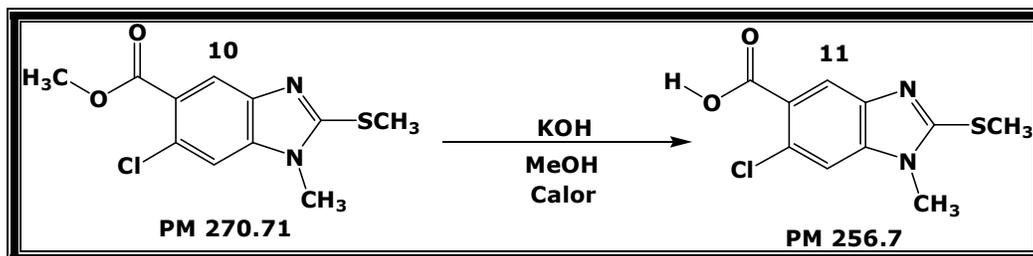
10.3.6. 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)
(Metilación)



En un matraz bola de 250 mL, provisto de termómetro, embudo de adición, atmósfera de nitrógeno y sumergido en un baño de agua helada, se disolvieron 8 g (0.0310 mol) del compuesto **6-cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)** en 100 mL de acetona. Después, se adicionaron 2.10 g (0.037 mol, 1.2 eq) de KOH acuoso (1:1), posteriormente a temperatura entre 3-10 °C, se adicionaron gota a gota 2.5 mL (0.0405 mol, 1.3 eq) de CH₃I. Terminada la adición, se dejó en agitación durante 3 horas. Una ccf mostró la presencia de materia prima por lo que se adicionó 0.3 mL (0.0048 moles) de CH₃I a la misma temperatura, se dejó reaccionar media hora más, transcurrido este tiempo la ccf mostró la ausencia de materia prima, por lo que la reacción se vertió en 250 mL de agua fría y se neutralizó con HCl al 20 %. El sólido formado se separó por filtración a vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido de color beige que pesó 7.97 g (94.40 %), con un *R_f* de 0.5 (Sistema I). Se recristalizó todo de EtOH dando 6.59 g de cristales blancos brillosos con un rendimiento del 83.20 %, con un *pf* de 133.5-134 °C.

10.3.7. Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1-*H*-bencimidazol-5-carboxílico (11)

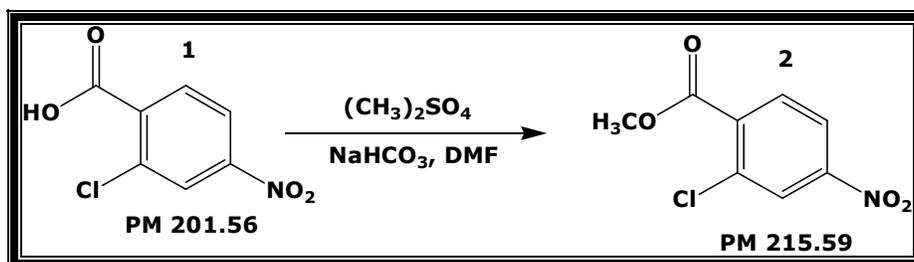
(Hidrólisis)



En un matraz bola de 3 bocas, acondicionado con termómetro, embudo de adición y condensador en posición a reflujo, se pusieron 7 g (0.0260 mol) del compuesto **10** en 30 mL de MeOH. A temperatura ambiente se adicionaron 3 g (0.0520 mol, 2 eq.) de KOH en solución acuosa (1:1), se observó disolución total del sustrato en el medio de reacción. Posteriormente, la mezcla se calentó a 65-70 °C por 3 horas. Después de consumida toda la materia prima, la reacción se vertió en 120 mL de agua y se aciduló con H₂SO₄ al 20 % a pH de 4. El sólido formado se separó por filtración a vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 6.36 g (95.92 %) de un sólido blanco que analizado por ccf presentó una mancha con *R_f* = 0.48 (Sistema III). Todo el producto se recrystalizó de EtOH dando 5.74 g de cristales blancos brillantes con un rendimiento del 90.20 %. el pf determinado fue de 290.5-291 °C.

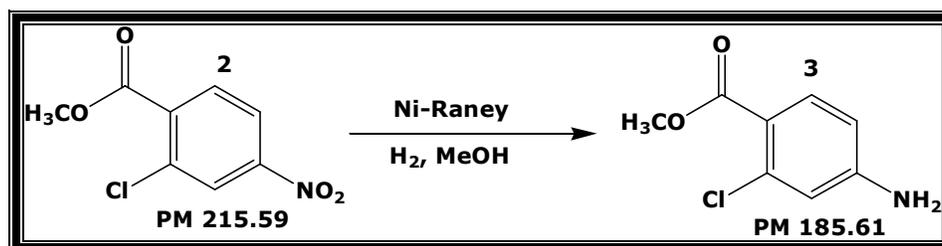
10.3.8. 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)

(Esterificación)



En un matraz bola de 1 L con tres bocas, provisto con termómetro, columna Vigreux y embudo de adición se disolvieron 75 g (0.3721 mol) del **ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (1)**, en 225 mL de DMF a 50 °C, posteriormente se adicionaron 62.55 g (0.7442 mol, 2 eq.) de NaHCO₃ en suspensión acuosa, después de verificar que el pH fuera alcalino (7) se agregaron gota a gota, mediante agitación constante, 52.8 mL (0.5581 mol, 1.5 eq.) de (CH₃)₂SO₄; la mezcla se dejó reaccionar a 60-65 °C hasta que la ccf mostró el consumo total de la materia prima (1 hora y 30 minutos). Después, la mezcla se vertió en agua; el sólido se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se recrystalizó en EtOH. El producto crudo fue un sólido amarillo claro, pesó 79.02 g obteniéndose un rendimiento del 98.53 %, en este caso todo el compuesto se recrystalizó de EtOH dando 78.20 g de cristales amarillos brillantes 97.40 % con un punto de fusión de 75.8-76.3 °C. En la ccf se obtuvo un *R_f* de 0.70 (Sistema I).

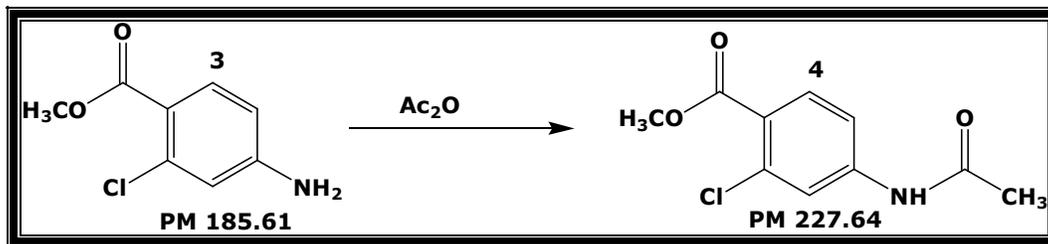
10.3.9. 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3) (Hidrogenación catalítica)



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 30 g (0.1392 mol) de **2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)** y 9 g (30 %) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con H₂O/MeOH, en 230 mL de MeOH el frasco se colocó en el hidrogenador y se purgó mediante tres lavados con 30 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas consumiéndose 718 lb/in²; la solución translúcida que se obtuvo se filtró en un Büchner con celita para eliminar el catalizador, el filtrado se concentró en el rotavapor obteniéndose 13 g (50.42 %) de un sólido blanco, se

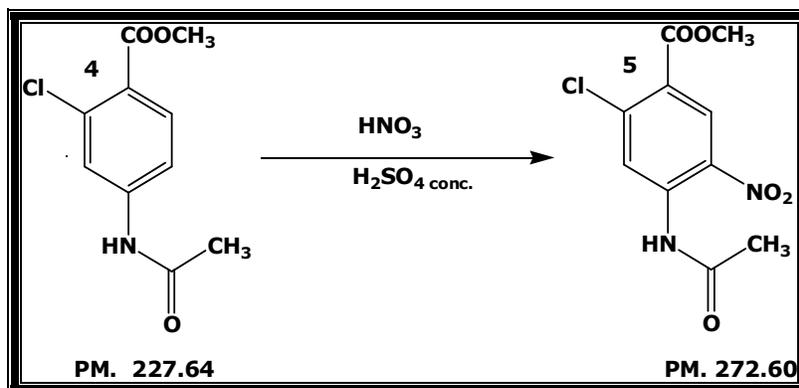
recristalizaron 2 g en MeOH/H₂O 50:50 con bisulfito de sodio dando 1.97 g de cristales blancos perlados, con un rendimiento de recristalización de 98.86 % y un pf de 105-107 °C, el *R_f* = 0.50 (Sistema I).

**10.3.10. 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)
(Acetilación)**



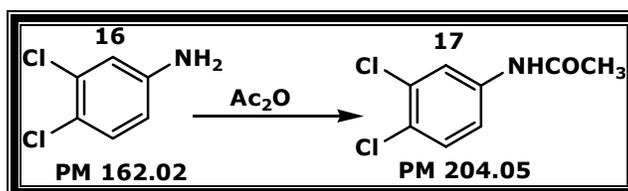
En un vaso de precipitado de 250 mL, provisto de termómetro, varilla de agitación y baño de agua con hielo, se colocaron 13 g (0.0701 mol) de **4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3)** y 50 mL de anhídrido acético; a la mezcla, agitada vigorosamente, se agregaron unas gotas de H₂SO₄ conc., La temperatura subió espontáneamente, sin rebasar los 40 °C, Después de 20 minutos de reacción, la mezcla se vertió en 300 mL de agua helada, el sólido se separó por filtración al vacío, se lavó a repetidas veces con agua, el producto crudo fue un sólido blanco, una sola mancha en ccf, con un *R_f* = 0.39 (Sistema I), el compuesto pesó 15 g con un rendimiento de 94.33 %. se recristalizaron 2 g en tolueno dando 1.87 g cristales blancos con rendimiento de 93.60 % y un pf de 109.0-112.0 °C.

10.3.11. 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)
(Nitración con ácido nítrico/ácido sulfúrico)



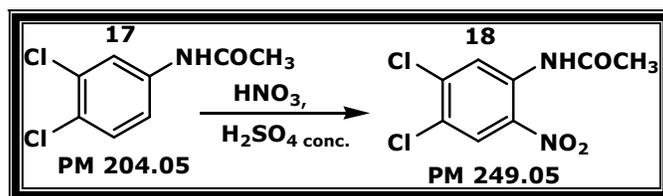
En un vaso de precipitado de 250 mL, acondicionado con termómetro, embudo de adición y sumergido en baño de hielo con sal, se disolvieron 14 g (0.06150 mol) del **4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)** en 30 mL de H₂SO₄ concentrado, a temperatura entre 0-3 °C. Una vez disuelto el sustrato, se le adicionaron poco a poco 10 mL de ácido nítrico concentrado. La adición de HNO₃ se hizo entre 3-5 °C (aproximadamente en 2 h). Después de este tiempo, la ccf indicó el consumo total de la materia prima **4** y la formación de dos productos en relación 8:2 aproximadamente, por lo que la mezcla se vertió en 100 mL de agua con hielo picado. El sólido que precipito se separo por filtración al vacío, se lavo con agua y se dejo secar al aire, se obtuvieron 16 g de la mezcla (95.41 %) de un sólido amarillo claro. Se recristalizó todo el producto crudo con AcOEt dando 12.92 g de cristales amarillos brillantes con un rendimiento de 80.60 %, un *R_f* = 0.72 (Sistema I) y un pf fue de 139-139.5 °C.

10.3.12. N-(3,4-Diclorofenil)acetamida (17)
(Acetilación)



En un vaso de precipitados de 50 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se colocaron 7 mL de Ac_2O . Dicho vaso de reacción se enfrió por medio de un baño de hielo. Al anhídrido se adicionaron lentamente y con agitación constante 7.60 g (0.046 mol, 1.0 eq) de **3,4-dicloroanilina (16)**, de tal forma que la temperatura no excediera los 70 °C. Una vez terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por 10 minutos y después se adicionaron 15 mL de H_2O . El sólido que se formó se pulverizó, se filtró y se lavó con agua fría hasta pH neutro. Finalmente se secó al vacío. El producto crudo se recristalizó con EtOH y se obtuvieron 9.10 g de cristales blancos de **17** con un punto de fusión de 121-122.8 °C y un rendimiento del 95.08%. El sólido mostró ser un solo compuesto con un *Rf* de 0.16 en el Sistema VI.

10.3.13. N-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)
(Nitración)

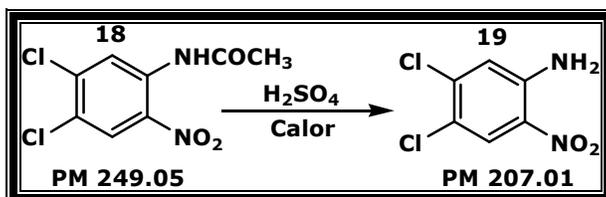


En un vaso de precipitados de 4L, equipado con agitación mecánica, termómetro y un baño de hielo-sal, se colocaron 1000 mL de H_2SO_4 conc. a los cuales se les adicionaron poco a poco 290 g (1.421 mol, 1.0 eq) de **N-(3,4-diclorofenil)acetamida (17)**. La adición se realizó de tal forma que la temperatura de reacción no excediera 10 °C. Terminada la adición se gotearon 117.8 mL de HNO_3 conc. a una temperatura entre 5-10 °C. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 15 minutos aproximadamente; luego que se comprobó, por ccf, el completo consumo de la materia prima, la mezcla se vertió sobre una cubeta de hielo-agua. El sólido formado se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces hasta pH neutro y se dejó secar al aire. El sólido amarillo formado se recristalizó de MeOH/ H_2O dando 307.94 g de cristales amarillos que mostraron ser un solo compuesto por ccf

con *R_f* de 0.48 (Sistema VI) con un punto de fusión de 125.1-126 °C y un rendimiento del 87%.

10.3.14. 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (19)

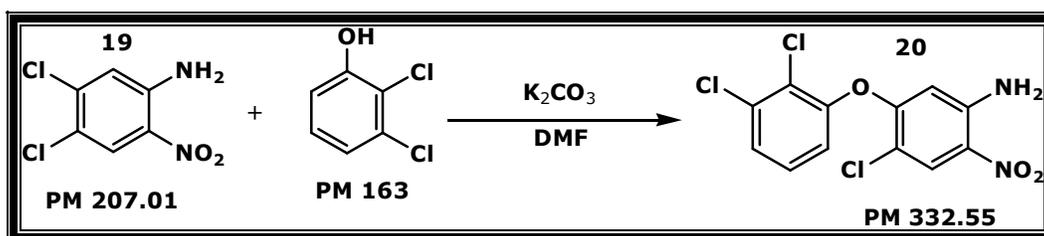
(Hidrólisis)



En un vaso de precipitados de 250 mL, equipado con agitación magnética y termómetro, se colocaron 10 mL de H₂SO₄ conc. y se adicionaron 10 g (0.040 mol) de **N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (18)**. La mezcla se calentó a 70-80 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar hasta 45 °C y se vertió sobre hielo-agua. El sólido amarillo-naranja formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro. El producto se recristalizó de AcOH y se obtuvieron 6.64 g de cristales amarillo-naranja con un *R_f* de 0.47 (Sistema VII) y punto de fusión de 178.7-179.1 °C (rendimiento del 80%).

10.3.15. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)

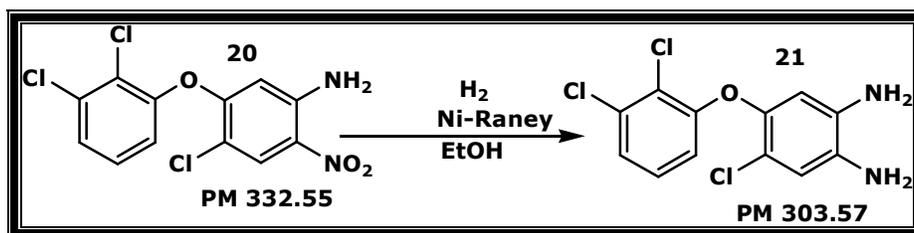
(Sustitución)



En un matraz redondo de 3 bocas de 125 mL, provisto de una barra magnética de agitación, refrigerante en posición de reflujo y termómetro, se colocaron 3 g

(0.0145 mol) de **4,5-dicloro-2-nitroanilina (19)**, 3.3 g (0.0159 mol, 1.1 eq) de 2,3-diclorofenol, 3.6 g (0.0217 mol, 1.5 eq) de K_2CO_3 y 50 mL de dimetilformamida (DMF). Dicha mezcla de reacción se calentó a 115 °C con un baño de aceite a 125 °C (durante 7 h) bajo atmósfera de nitrógeno. Mediante ccf se verificó el fin de la reacción. El matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente, La mezcla se se filtró al vacío para eliminar las sales formadas y se evaporó la DMF en el rotaevaporador. El líquido viscoso color café intenso obtenido se suspendió en MeOH, se agitó y enfrió en un baño de hielo-sal. A la solución metanólica se adicionaron aprox. 50 mL de H_2O , la mezcla se agitó en frío por 1 hora y se filtró, se obtuvieron 4.64 g de un sólido color amarillo (Rendimiento 96.15 %) que presentaba algunas impurezas según lo que mostró la ccf, por lo que se prosiguió con la recristalización de tolueno y carbón activado. Se obtuvieron 2.5 g de cristales amarillos con un rendimiento de 52 %, el pf fue de 150.3-151.7 °C y R_f de 0.52 (Sistema VII).

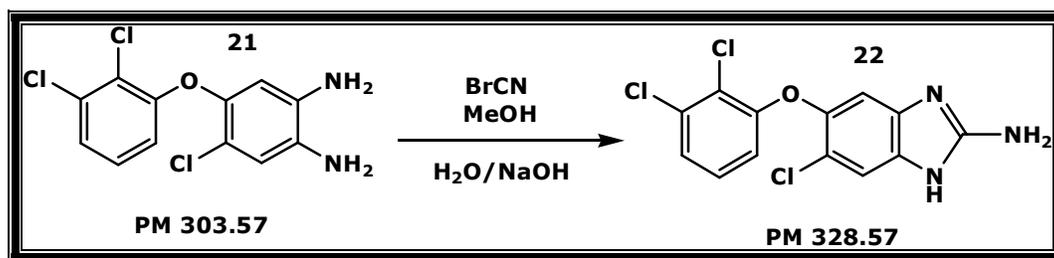
10.3.16. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (21) (Hidrogenación catalítica)



En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 20 g (0.0601 mol) de **4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)**, 300 mL de metanol y 6 g de catalizador Ni-Raney. El Ni-Raney se lavó previamente con H_2O y MeOH (2 veces con cada uno) y decantó. La botella se purgó tres veces mediante la adición-expulsión de 30 lb/pulg² de hidrógeno. Finalmente, la botella se llenó con hidrógeno hasta 60 lb/pulg² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no se consumió más hidrógeno (307 lb/pulg² en 1 hora). La mezcla de reacción resultante con un aspecto rosa fosforescente se filtró sobre celita al vacío para eliminar el catalizador y se lavó con MeOH. El filtrado

se evaporó hasta un volumen de aproximadamente 50 mL para usarse inmediatamente, sin posterior tratamiento, en la siguiente reacción. El producto mostró un R_f de 0.5 con el Sistema IV.

**10.3.17. [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]amina
(22)
(Ciclocondensación)**



En un matraz bola de 1 L, adaptado con un condensador a reflujo se mezclaron 18.2 g (0.0601 mol) de **4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (21)** recién preparada y 240 mL de MeOH, la mezcla se agitó bajo atmósfera de N₂ hasta disolución total. A la solución fría a temperatura ambiente se le agregaron 8.3 g (0.0780 mol, 1.3 eq.) de BrCN (con toda la protección pertinente para el uso de este último); luego se dejó reaccionar durante 1 h a 50 °C a reflujo, una vez transcurrido este tiempo se tomó una ccf y se observó la presencia de materia prima, por lo que se adicionaron 2 g (0.0188 mol) más de BrCN y se dejó reaccionar 20 h más con agitación constante y bajo atmósfera de nitrógeno. Al siguiente día la ccf mostró el consumo total de la materia prima; por lo que una vez acabada la reacción, ésta se trató con 3.6 g (0.0902 mol, 1.5 eq.) de NaOH_(ac) y 2.8 g (15 %) de carbón activado. La reacción se calentó a reflujo por 1½ h más. Al terminar el reflujo, la mezcla se filtró por al vacío a través de celita y se lavó con un poco de MeOH caliente. El MeOH que se colectó se concentró en el rotavapor hasta un ¼ del volumen, el compuesto en MeOH se paso a un vaso de precipitado de 1 L y se calentó a 50 °C; posteriormente, se le adicionaron poco a poco 100 mL de agua caliente precipitando un sólido rosa claro; pero al mismo tiempo se formó una resina de

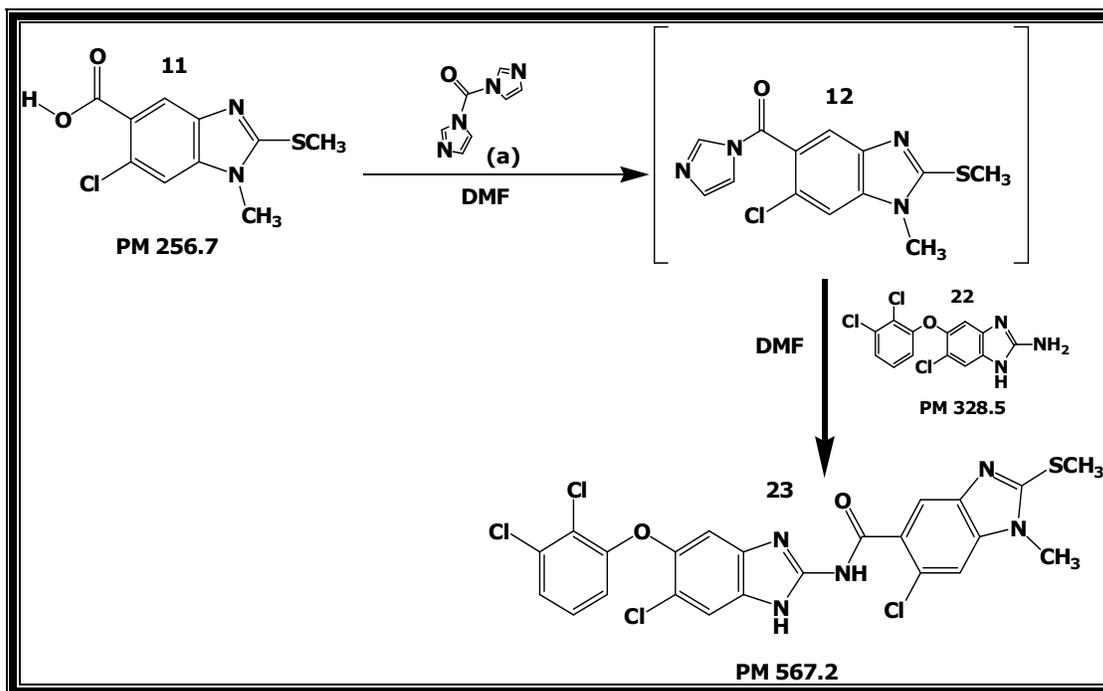
ANEXO A. PARTE EXPERIMENTAL

color naranja, por lo que se dejó asentar esta resina en el fondo y se decantó con mucho cuidado el precipitado, éste se separó por filtración al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar; mientras que la resina se redisolvió en una mezcla de AcOEt/MeOH caliente (50 °C), precipitando un sólido rosa-blanco que se separó por filtración al vacío y se lavó con mezcla 50:50 de MeOH/H₂O, Tratamientos semejantes se le realizaron a las aguas madres obteniéndose un sólido color mamey. Finalmente se juntaron todas las aguas madres y se concentraron en el rotavapor lográndose obtener 2 g más de producto.

Sólidos	Cantidad
Rosa-lila	5.8205 g
Rosa-blanco	4.6044 g
Mamey	6.4037 g

El análisis por ccf de los sólidos obtenidos mostró que todos eran el mismo producto por lo que en total se obtuvieron 18.83 g dando un rendimiento de 96.02 %. El producto se recrystalizó primero de H₂O/DMF y luego de MeOH lo que dio como resultado un polvo fino de color rosa-blanco de buena pureza. Se obtuvieron 9.84 g de polvo fino (50.60 % de rendimiento) y el resto quedó como un sólido de color rosa-café. El punto de fusión del compuesto puro fue de 206-208 °C, y su *R_f* de 0.49 en el Sistema III.

**10.3.18. 6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (23).
(Molécula Híbrida, enlace carboxamida)**

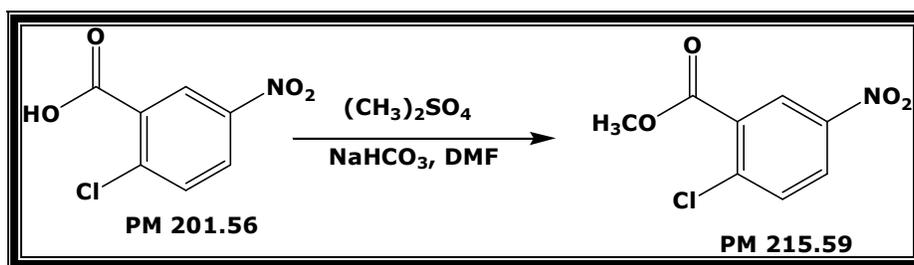


En un matraz de bola de 50 mL, acondicionado con un septum y un globo con N_2 se colocaron, rápidamente y bajo condiciones anhidras, 0.5 g (0.0019 mol) del ácido **6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1-H-bencimidazol-5-carboxílico (11)**, 0.6 g (0.0037 mol, 1.9 eq.) de 1,1'- carbonildiimidazol. Después el matraz se adaptó a un condensador de reflujo con una trampa de humedad; a la mezcla de sólidos se adicionaron rápidamente 5 mL de DMF anhidra y se dejó reaccionar bajo agitación magnética constante a 88 °C durante 2 h, después a 60 °C durante toda la noche. Al día siguiente la ccf reveló el consumo total de materia prima, por lo que se adicionaron 0.8150 g (0.0024 mol, 1.25 eq.) de **[5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]amina (22)**. La reacción se calentó 3 h a 88 °C, luego a 60 °C por 48 h. Pasado este tiempo se formó un precipitado de color blanco que en ccf mostró una mancha principal. El sólido se separó por filtración al vacío y lavó repetidas

veces con DMF fría hasta que el compuesto quedó puro. Se obtuvieron 0.657 g (59.70 %) de un sólido blanco, de las aguas madres se recuperaron 0.4 g (36.36 %), de un sólido color beige-hueso. El punto de fusión del compuesto final **23** fue > 300 °C y el *Rf* fue de 0.5 en el Sistema VIII.

A continuación se anexan los desarrollos experimentales de algunos intermediarios de los cuales su ruta sintética no se llevó a cabo ó bien se sintetizaron como alternativa a la propuesta para sintetizar **23**.

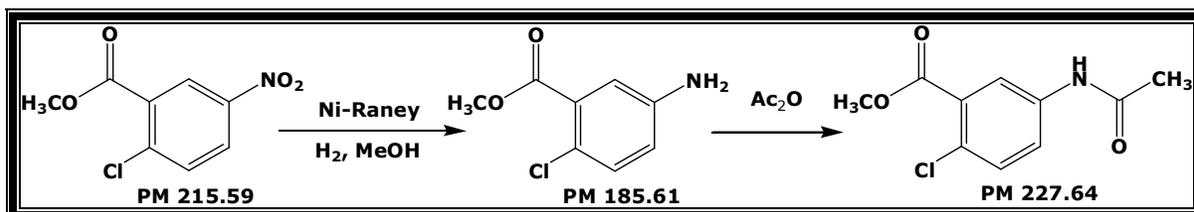
10.3.19. 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (Esterificación)



En un matraz bola de 1 L con tres bocas, provisto con termómetro, columna Vigreux y embudo de adición se disolvieron 100 g (0.4961 mol) del **ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico**, en 300 mL de DMF a 50 °C, posteriormente se adicionan 83.40 g (0.9927 mol, 2 eq.) de NaHCO₃ en suspensión acuosa; se verificó que el pH fuera 7 y se agregaron gota a gota mediante agitación constante 70.40 mL (0.7441 mol, 1.5 eq.) de (CH₃)₂SO₄. La mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora y 30 minutos, tiempo en el que la materia prima se consumió totalmente; después, se vertió en agua, se filtró al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se recristalizó en EtOH.

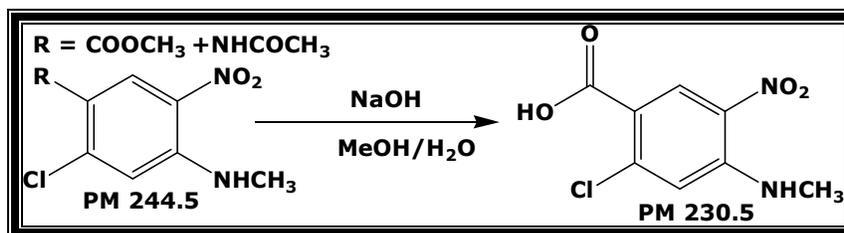
El producto crudo fue un sólido amarillo claro, pesó 105.80 g obteniéndose un rendimiento del 98.97 %, en este caso todo el compuesto se recristalizó de EtOH dando 104.60 g de cristales amarillos brillantes 97.80 % con un punto de fusión de 70.5-71.6 °C. En la ccf se obtuvo un *Rf* de 0.46 (Sistema VII).

**10.3.20. 5-Amino-2-clorobenzoato de metilo y 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo
(Hidrogenación catalítica y acetilación)**



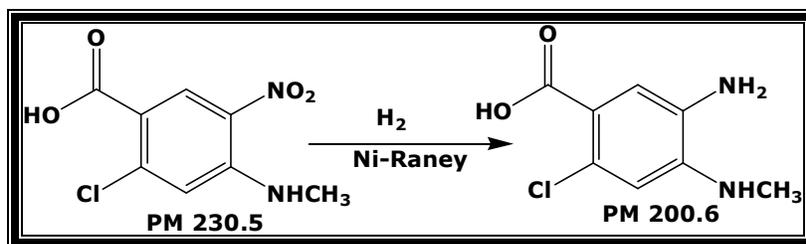
En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.1160 mol) del **2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo** y 7.5 g (30 %) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con H₂O/MeOH, en 240 mL de MeOH; el frasco se colocó en el hidrogenador y se purgó mediante la adición-expulsión de 30 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3¹/₄ horas consumiéndose 617 lb/in² de hidrógeno. La ccf mostró el consumo total de la materia prima y un sólo producto con *Rf* de 0.5 (Sistema IX). La solución translúcida que se obtiene se filtra en un Büchner con celita, el filtrado se recolecta en el rotavapor obteniéndose 19.80 g (92 %) de un sólido blanco y un poco de aceite. Al mismo matraz se adicionaron 45 mL de anhídrido acético con agitación magnética vigorosa, sin que la temperatura rebasara los 40 °C, por 20 min. Después de este tiempo, la ccf reveló la formación del producto acetilado, por lo que la mezcla de reacción se vertió en 250 mL de agua con hielo y se agitó durante 10 min. El sólido blanco que precipitó se separó por filtración a vacío, se lavó con agua y se dejó secar al aire, el producto crudo con un *Rf* de 0.3 (Sistema IX) pesó 22.50 g (92.65 %). 1 g se recristalizó de tolueno obteniéndose 0.93 g (93 % de rendimiento) de cristales blancos. El pf determinado fue de 108.2-108.9 °C.

10.3.21. Ácido 2-cloro-4-metilamino-5-nitrobenzoico (Hidrólisis)



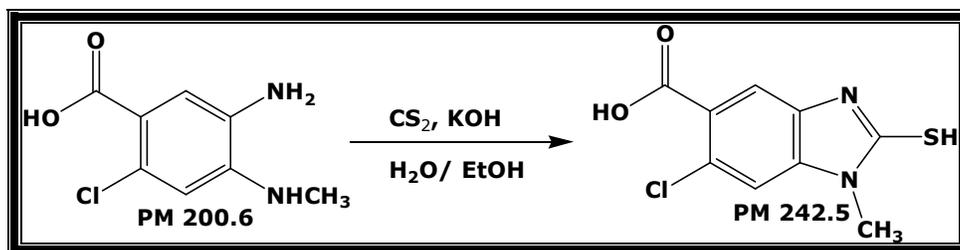
En un matraz bola de 3 bocas, acondicionado con termómetro, embudo de adición y condensador en posición a reflujo, se pusieron 11.30 g (0.0462 mol) de la mezcla (1:1) de **2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo y 2-cloro-N-metil-4-(metilamino)-5-(nitrometil)benzamida** en 30 mL de MeOH y 30 mL de H₂O. A temperatura ambiente, se adicionaron 3.70 g (0.0925 mol, 2 eq.) de NaOH en solución acuosa (1:1), se observó disolución total del sustrato en el medio de reacción. Posteriormente, la mezcla se calentó a 65-70 °C por 3 horas. Después de consumida toda la materia prima, la reacción se vertió en 120mL de agua y se aciduló con H₂SO₄ al 20 % a pH de 4, el sólido formado se separó por filtración a vacío y se lavó con agua, se secó al aire. Dando 10.42 g (97.87 %) de un sólido amarillo canario que analizado por ccf presentó dos manchas en proporción 90:10 la más grande con *R_f* = 0.15 y la otra con una *R_f* = 0.09 (Sistema I). El producto se lavó con y luego se recrystalizó de EtOH y un poco de DMF dando 8.91 g (85.6 %) de un sólido cristalino amarillo canario con un punto de fusión de 268.9-270 °C.

10.3.22. Ácido 2-cloro-4-metilamino-5-aminobenzoico (Hidrogenación catalítica)



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 5 g (0.1392 mol) del **ácido 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoico** y 1.5 g (30 %) de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con H₂O/MeOH, en 200 mL de MeOH el frasco se colocó en el hidrogenador y se purgó mediante tres lavados con 30 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 horas consumiéndose 228 lb/in²; la solución oscura obtenida filtró en un Büchner con celita, el filtrado se recolectó en el rotavapor obteniéndose 4.17 g (95.86 %) de un sólido violáceo, analizado por ccf presentó dos manchas en proporción 80:20 la más grande con *R_f* = 0.28 y la otra con una *R_f* = 0.045 (Sistema I).

10.3.23. Ácido 6-cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico
(Ciclocondensación)

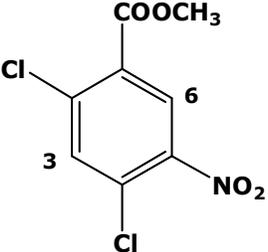
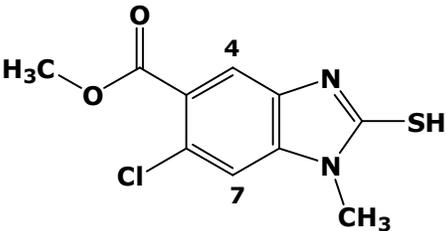
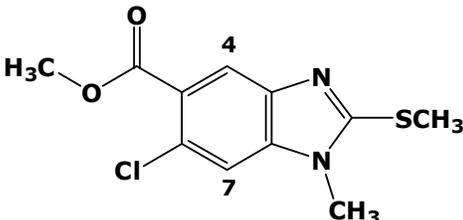


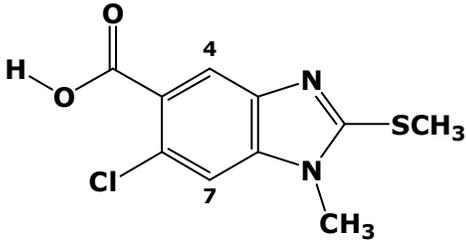
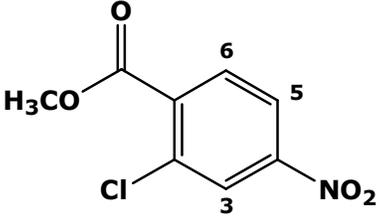
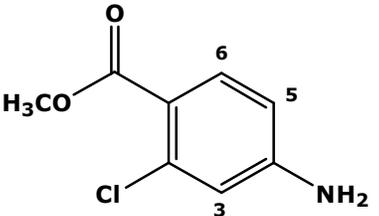
En un matraz bola de 3 bocas de 250 mL se disolvieron 4.17 g (0.0208 mol) de **ácido 2-cloro-4-metilamino-5-aminobenzoico** en 45 mL de EtOH, a temperatura ambiente. A la solución se le adicionaron 2.34 g (0.0416 mol, 2 eq.) de KOH disueltos en 7.5 mL de agua, posteriormente 2.54 mL (0.0416 mol, 2 eq.) de CS₂. Terminada la adición la mezcla se calentó a 60-65 °C a reflujo por 3 horas bajo atmósfera de nitrógeno; después se agregaron 0.8 mL

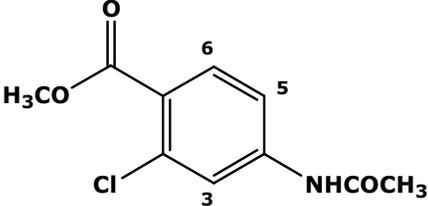
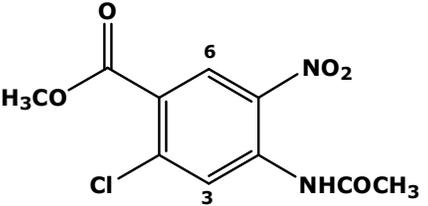
(0.0142 mol) de CS₂ y 50 mL de EtOH y se dejó durante 2 horas más. Después de este tiempo se agregaron 20 mL de una mezcla 1:1 de MeOH/H₂O más 1.2 g (30 %) de carbón activado, y se calentó a reflujo moderado durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo se filtró a vacío con celita y el disolvente se concentró en el rotavapor hasta un volumen de 20 mL aproximadamente. Se formó un sólido de color rosa, se aciduló con AcOH glacial para ajustar el pH a 5 y se separó por filtración al vacío. En el fondo del matraz se formó también una resina de color violeta la cual al secarse endureció y se pudo moler. Se obtuvo un sólido de color violeta que pesó 4.1 g (81 %), el cual se recristalizó de EtOH con 20 % de carbón activado dando 3.87 g (76.45 %) de un sólido rosa. El sólido rosa, el primer sólido que se obtuvo, pesó 0.83 g, se recristalizó en MeOH con 20% de carbón activado. Obteniéndose 0.44 g de cristales blancos-rosados (8.7 %) del compuesto puro con un $R_f = 0.46$ (Sistema III), con un punto de fusión de 308.6-309.7 °C.

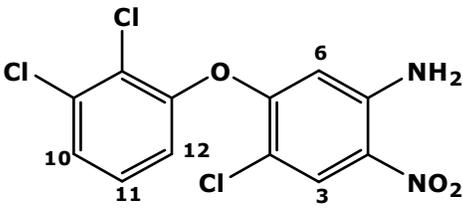
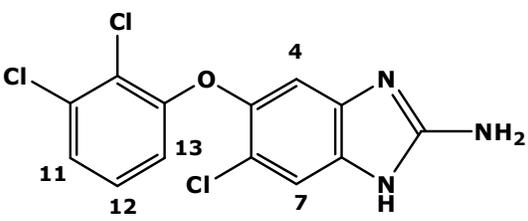
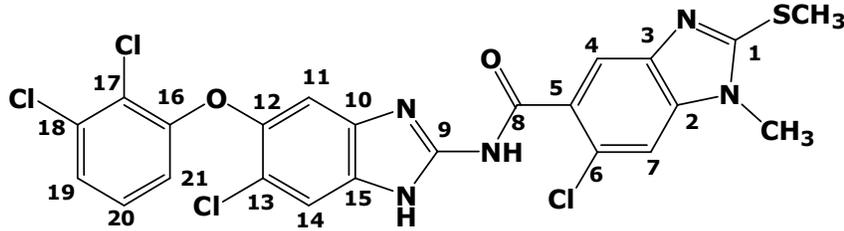
11. ANEXO B

11.1. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los intermediarios y de la carboxamida final

<p>2,4-dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)</p> 	<p>IR. Espectro 13, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3096 (C-H aromático), 2958 (-CH₃), 1708 (C=O de éster), 1599 y 1339 (Ar-NO₂), 1272 (C-O de éster), 1087 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 14, (TMS, CDCl₃, ppm): 3.96 (s, 3H, -CO₂CH₃); 7.69 (s, 1H, H-3); 8.46 (s, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 15, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 249 (30) [M]⁺; 251 (18) [M]⁺²; 218 (100) [M-31]⁺; 172 (39) [M-77]⁺.</p>
<p>6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)</p> 	<p>IR. Espectro 16, pastilla (KBr) cm^{-1}: 3241 (S-H), 2948 (-CH₃), 1702 (C=O de éster), 1628 (C=N), 1245 (C=S), 1100 (C-O-CH₃).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 17, (DMSO-d₆, ppm): 3.83 (s, 3H, -CO₂CH₃); 3.62 (s, 3H, NCH₃); 7.53 (s, 1H, H-7); 7.61 (s, 1H, H-4); 13.08 (s, 1H, int. con D₂O, de la tiona)</p> <p>EM. Espectro 18, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 256 (100) [M]⁺; 258 (35) [M]⁺²; 225 (70) [M-31]⁺.</p>
<p>6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)</p> 	<p>IR. Espectro 19, pastilla (KBr) cm^{-1}: 3007 (C-H aromático), 2949 (-CH₃), 1717 (C=O de éster), 1616 (C=N), 1270 (SCH₃ y NH₃), 1200 (C-O-C de éster).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 20, (DMSO-d₆, ppm): 2.72 (s, 3H, SCH₃); 3.84 (s, 3H, -CO₂CH₃); 3.66 (s, 3H, NCH₃); 7.74 (s, 1H, H-7); 7.93 (s, 1H, H-4).</p> <p>EM. Espectro 21, EMIE m/z (% ar)</p>

	[asignación]: 270 (100) $[M]^+$; 272 (46) $[M]^{+2}$; 239 (69) $[M-31]^+$.
<p>Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (11)</p> 	<p>IR. Espectro 22, pastilla (KBr) cm^{-1}: >3000 (HO-), (C-H aromático), 1698 (C=O de éster), 1615 (C=N), 1266 (SCH₃).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 23, (DMSO-d₆, ppm): 2.72 (s, 3H, SCH₃); 3.66 (s, 3H, NCH₃); 7.71 (s, 1H, H-7); 7.93 (s, 1H, H-4);</p> <p>EM. Espectro 24, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 256 (100) $[M]^+$; 258 (36) $[M]^{+2}$; 223 (77) $[M-33]^+$.</p>
<p>2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)</p> 	<p>IR. Espectro 1, pastilla (KBr) cm^{-1}: 3099 (C-H aromático), 2965 (-CH₃), 1720 (C=O), 1528 y 1356 (Ar-NO₂), 1297 (C-O), 1046 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 2, (TMS, Acetona-d₆, ppm): 3.967 (s, 3H, -CO₂CH₃); 8.089 (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_p=0.3$ Hz, 1H, H-6); 8.302 (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_m=2.1$ Hz, 1H, H-5); 8.362 (dd, $J_m=2.1$ Hz, $J_p=0.3$ Hz, 1H, H-3).</p> <p>EM. Espectro 3, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 217 (35) $[M]^{+2}$; 215 (40) $[M]^+$; 184 (100) $[M-31]^+$.</p>
<p>4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)</p> 	<p>IR. Espectro 4, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3427, 3337 y 3223 (Ar-NH₂), 3003 (C-H aromático), 2952 (-CH₃), 1702 (C=O), 1264 (C-O), 1043 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 5, (TMS, CDCl₃, ppm): 3.862 (s, 3H, -CO₂CH₃); 4.104 (s, 2H, int. D₂O, NH₂); 6.523 (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_m=2.1$ Hz, 1H, H-5); 6.696 (d, $J_m=2.4$ Hz, 1H, H-3); 7.775 (d, $J_o=8.7$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 6, EMIE m/z (% ar)</p>

	[asignación]: 187 (32) $[M]^{+2}$; 185 (60) $[M]^+$; 154 (100) $[M-31]^+$; 126 (11) $[M-59]^+$.
<p>4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)</p> 	<p>IR. Espectro 7, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3263 y 1592 (NH), 3107 (C-H aromático), 2947 ($-\text{CH}_3$), 1725 (C=O de éster), 1677 (N-C=O), 1251 (CO de éster), 1045 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 8, (TMS, CDCl_3, ppm): 2.208 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$); 3.910 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 7.490 (dd, $J_o=8.4$ Hz, $J_m=2.1$ Hz, 1H, H-5); 7.714 (d, $J_m=1.8$ Hz, 1H, H-3); 7.820 (sa, 1H, int. D_2O, -NH-); 7.846 (d, $J_o=8.7$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>EM. Espectro 9, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 229 (33) $[M]^{+2}$; 227 (56) $[M]^+$; 185 (88) $[M-42]^+$; 154 (100) $[M-73]^+$.</p>
<p>4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)</p> 	<p>IR. Espectro 10, Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3343 y 1612 (NH), 3091 (C-H aromático), 2953 ($-\text{CH}_3$), 1732 (C=O de éster), 1715 (N-C=O), 1567 y 1336 (Ar-NO_2), 1293 (C-O de éster), 1122 (C-Cl).</p> <p>RMN ^1H. Espectro 11, (TMS, CDCl_3, ppm): 2.334 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$); 3.960 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 8.827 (s, 1H, H-3); 9.058 (s, 1H, H-6); 10.523 (s, 1H, int. D_2O, -NH-).</p> <p>EM. Espectro 12, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 274 (35) $[M]^{+2}$; 272 (17) $[M]^+$; 230 (100) $[M-42]^+$; 226 (20) $[M-46]^+$; 199 (76) $[M-73]^+$.</p>
<p>4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)</p>	<p>IR. Espectro 31, (KBr) en cm^{-1}: 3468, 3348 (Ar-NH_2), 3172 (Ar-H), 1623, 1560 (Ar-NO_2), 1496 (Ar-H), 1377, 1321 (C-NO_2), 1242 (C-O-C), 1030 (C-Cl), 798 (NO_2), 460 (C-Cl).</p>

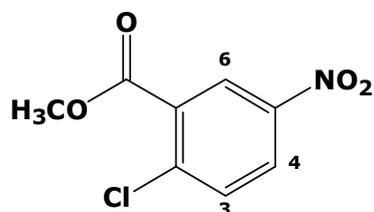
	<p>RMN ¹H. Espectro 32, (CDCl₃, ppm): 5.197 (s, 1H, H-6); 6.091 (s, 2H, Ar-NH₂); 7.082 (dd, 1H, H-12, <i>J</i> = 8.2 Hz); 7.294(t, 1H, H-11, <i>J</i> = 8.2 Hz); 7.431 (dd, 1H, H-10, <i>J</i> = 8.4 Hz); 8.284 (s, 1H, H-3).</p> <p>EM. Espectro 33, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 332 (10) [M]⁺; 262 (100) [M-70]⁺; 251 (33) [M-81]⁺; 216 (10) [M-116]⁺; 131 (11) [M-201]⁺; 125 (13) [M-207]⁺; 109 (10) [M-223]⁺.</p>
<p>[5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il] amina (22)</p> 	<p>IR. Espectro 34, (KBr) en cm⁻¹: 3077 (Ar-NH₂), 2735 (Ar-H), 1694 (C=N), 1448 (Ar-H), 1102 (C-O-C), 1022 (C-Cl).</p> <p>RMN ¹H. Espectro 35, (DMSO, ppm): 7.10 (s, 1H, H-4); 7.44 (s, 1H, H-7); 6.68 (dd, 1H, <i>J</i> = 8 Hz, H-13); 7.25 (t, 1H, <i>J</i> = 8 Hz, H-12); 7.36 (dd, 1H, <i>J</i> = 8 Hz, H-11); 7.91 (s, 2H, Ar-NH₂);</p> <p>EM. Espectro 36, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 327 (60) [M]⁺; 329 (56) [M]⁺²; 257 (100) [M-70]⁺; 182 (36) [M-145]⁺.</p>
<p>6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (23)</p> 	
<p>IR. Espectro 37, (KBr) en cm⁻¹: 3357, 3142 (NH), 2981, 2847 (CH₃-H), 1670 (C=O), 1586 (C=C), 1127 (C-Cl).</p>	

RMN ¹H. Espectro 38, (DMSO, 400 MHz, δ ppm): 3.024 (s, 3H, -SCH₃); 3.934 (s, 3H, -NCH₃); 7.105 (s, 1H, H-11); 7.838 (s, 1H, H-7); 7.904 (s, 1H, H-14); 8.186 (s, 1H, H-4); 6.954 (dd, 1H, H-21, $J = 8$ Hz); 7.227 (t, 1H, H-20, $J = 8$); 7.357 (dd, 1H, H-19, $J = 8$ Hz); 7.463 (s, 1H, NHC₁₅); 8.624 (s, 1H, NHCO)

RMN ¹³C. Espectro 39, (DMSO, 100 MHz, δ ppm): 15.317 (SCH₃); 33.191 (NCH₃); 168.609 (C=O); 160.050 (C-1); 138.609 (C-2); 121.164 (C-9); 154.320 (C-16); 127.427 (C-17); 137.179 (C-18); 131.255 (C-13); 133.101 (C-3); 117.621 (C-12); 120.831 (C-21); 128.929 (C-6), 129.294 (C-19).

EMFAB⁺. Espectro 40, m/z (% ar) [asignación]: 566 (3.9) [M]⁺²; 568 (5.3) [M]⁺²; 570 (2.8) [M]⁺⁴; 572 (0.7) [M]⁺⁶.

2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo

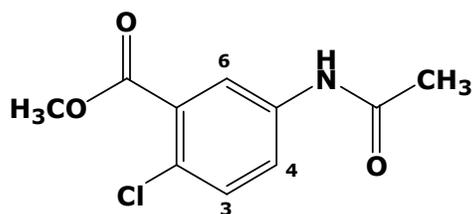


IR. Espectro, pastilla (KBr) cm⁻¹: 3109 (C-H aromático), 2958 (-CH₃), 1731 (C=O), 1525 y 1349 (Ar-NO₂), 1311 y 1252 (C-O), 1047 (C-Cl).

RMN ¹H. Espectro, (DMSO, ppm): 3.90 (s, 3H, -CO₂CH₃); 7.865 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-3); 8.36 (dd, $J_o = 9$ Hz, $J_p = 3$ Hz, 1H, H-4); 8.555 (d, $J_m = 3$ Hz, 1H, H-6).

EM. Espectro, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 217 (6) [M]⁺²; 215 (20) [M]⁺; 184 (100) [M-31]⁺.

5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo

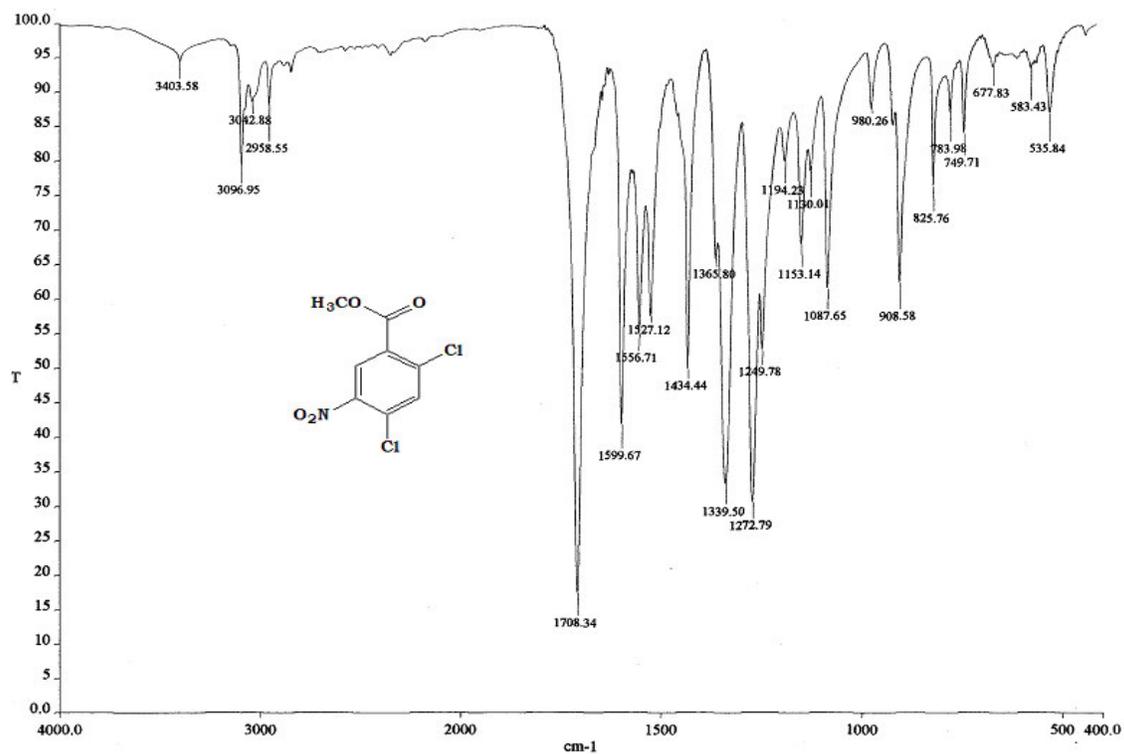


IR. Espectro, Pastilla (KBr) cm⁻¹: 3347 y 1536 (NH), 3116 (C-H aromático), 2956 (-CH₃), 1713 (C=O de éster), 1604 (N-C=O), 1301 (CO de éster), 1050 (C-Cl).

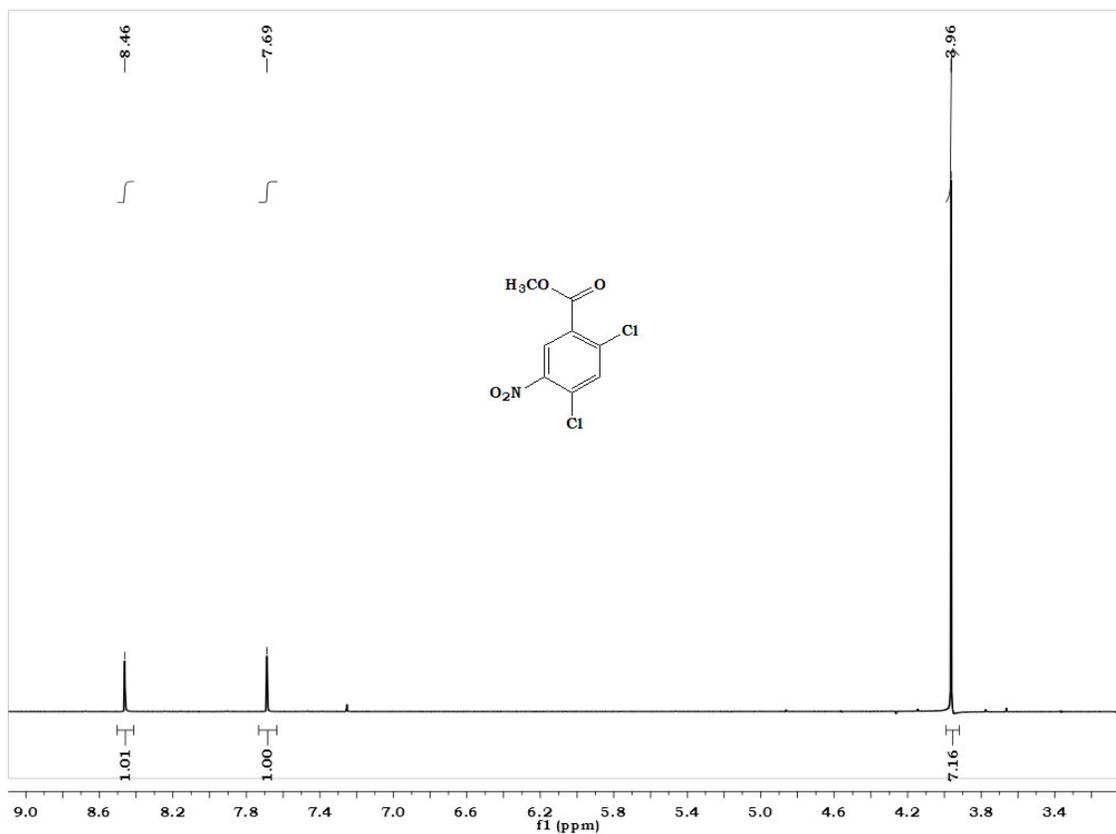
RMN ¹H. Espectro, (DMSO, ppm): 2.04 (s, 3H, -COCH₃); 3.84 (s, 3H, -CO₂CH₃); 7.475 (d, $J_m = 9$ Hz, 1H, H-3); 7.72 (dd, $J_o = 12$ Hz, $J_p = 3$ Hz, 1H, H-4); 8.085 (d, $J_m = 3$ Hz, 1H, H-6); 10.25 (sa, 1H, int. D₂O, -NH-).

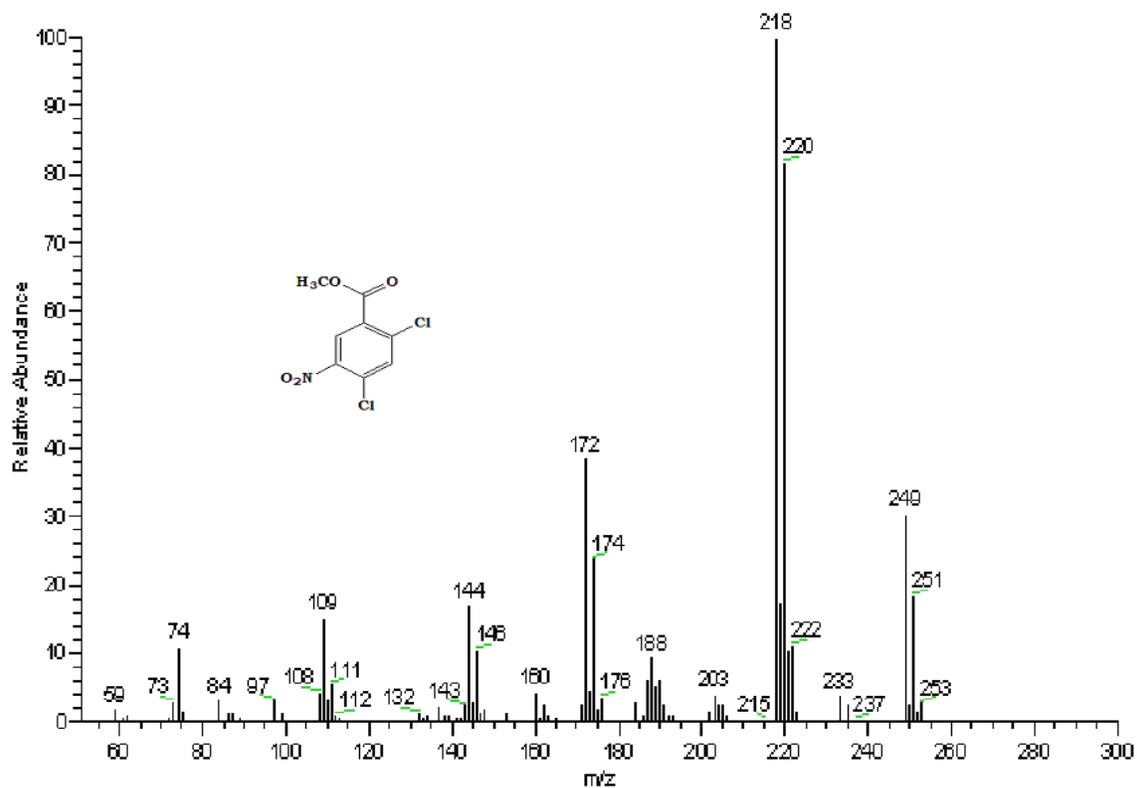
EM. Espectro 27, EMIE m/z (% ar) [asignación]: 229 (8) [M]⁺²; 227 (25) [M]⁺; 185 (100) [M-42]⁺; 154 (69) [M-73]⁺.

11.2. Espectros

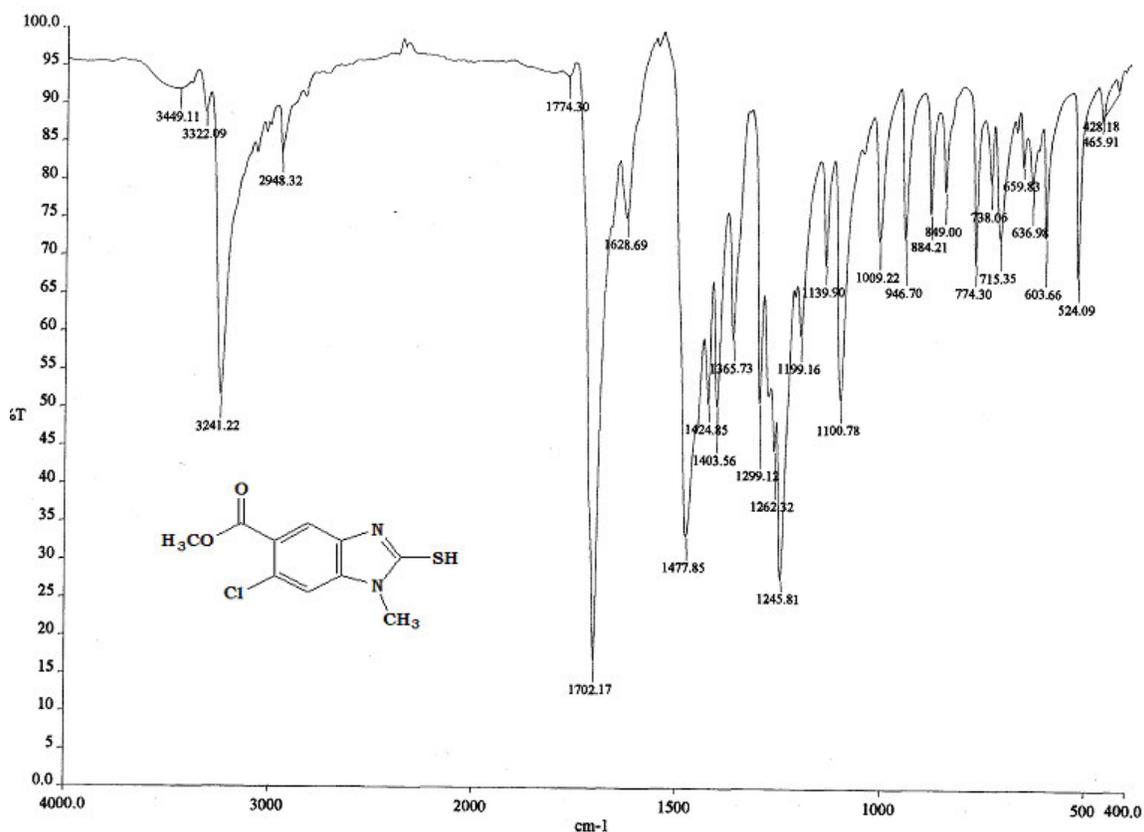


Espectro 1. IR de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)

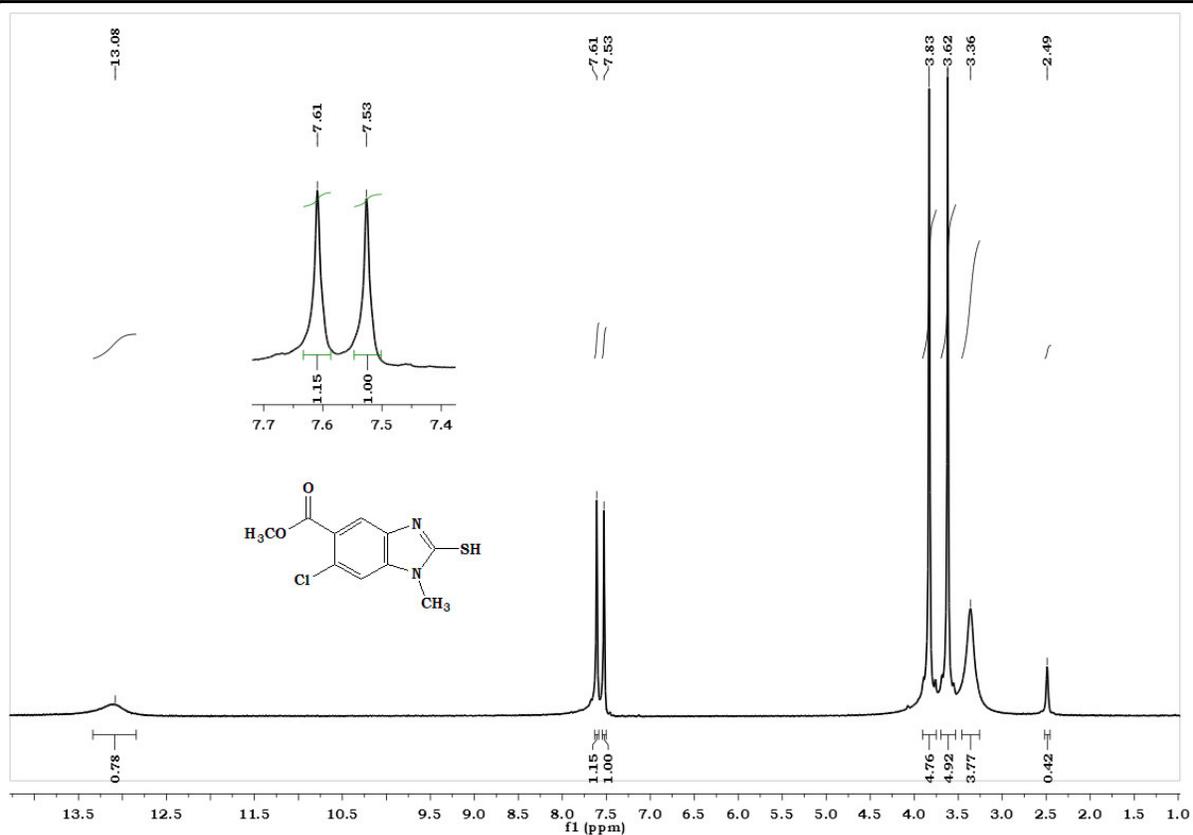
Espectro 2. RMN ¹H de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15). CDCl₃



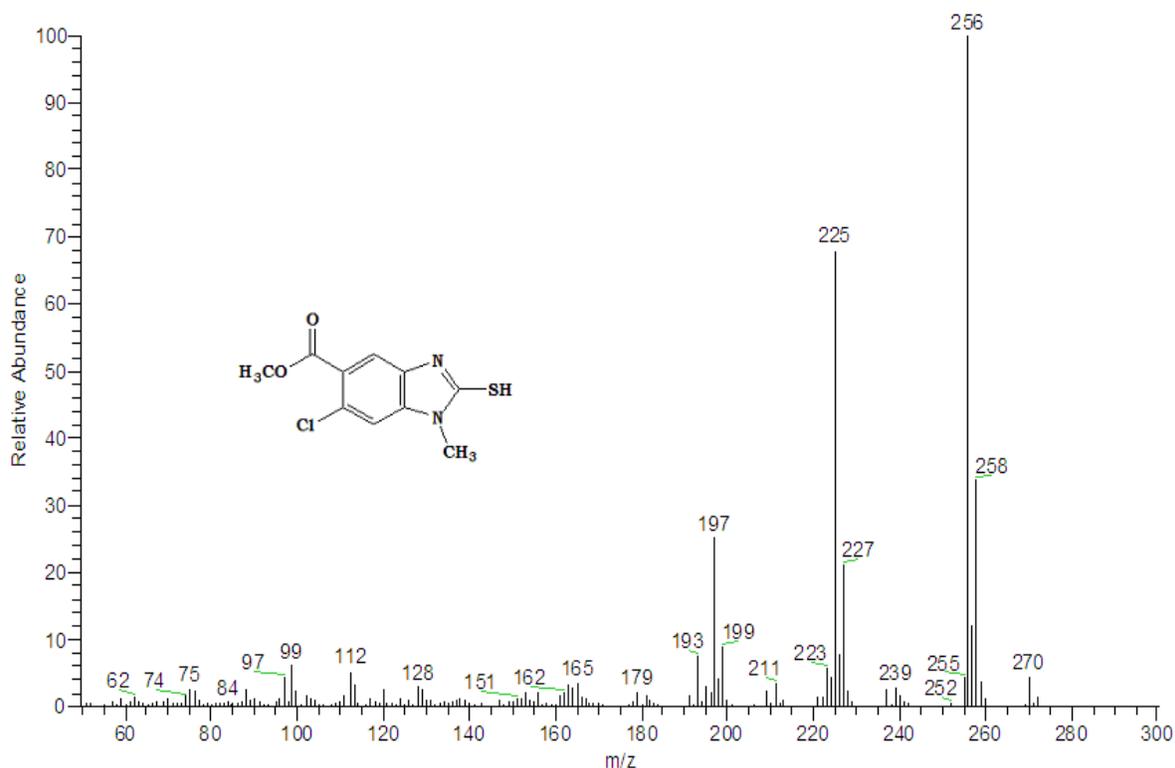
Espectro 3. EM(IE) de 2,4-Dicloro-5-nitrobenzoato de metilo (15)



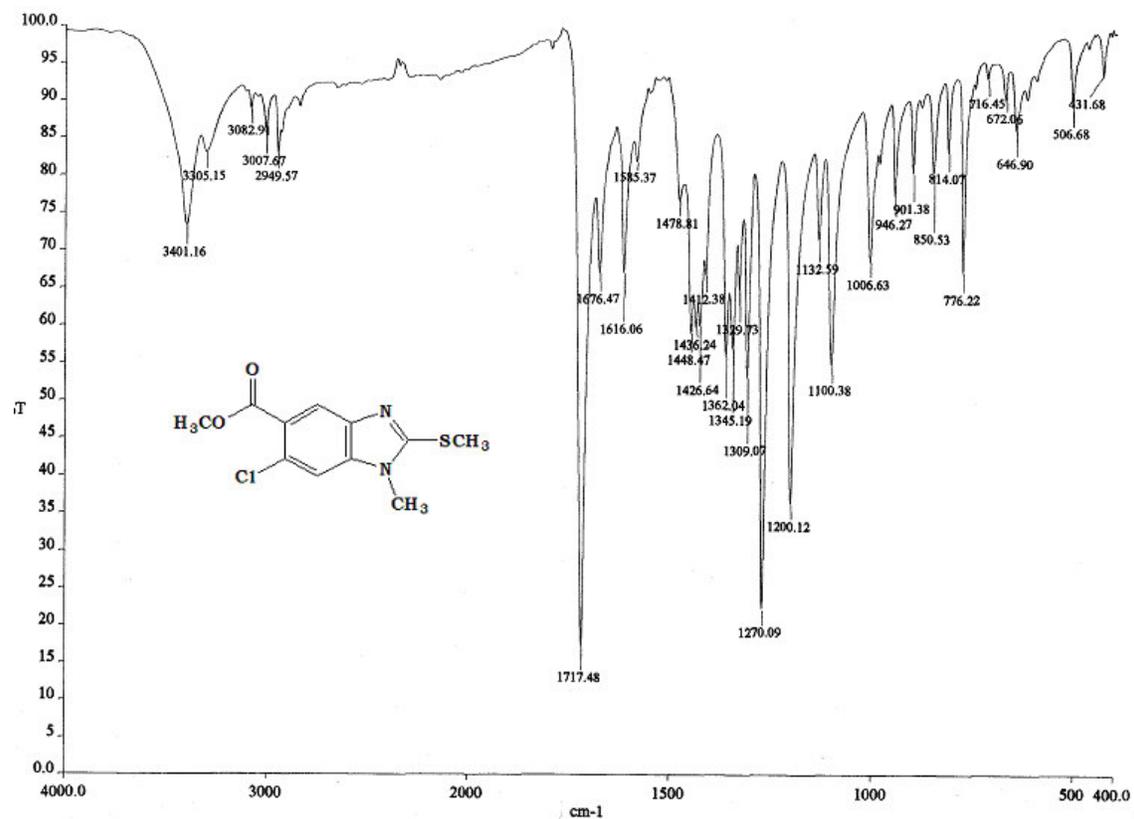
Espectro 4. IR de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)



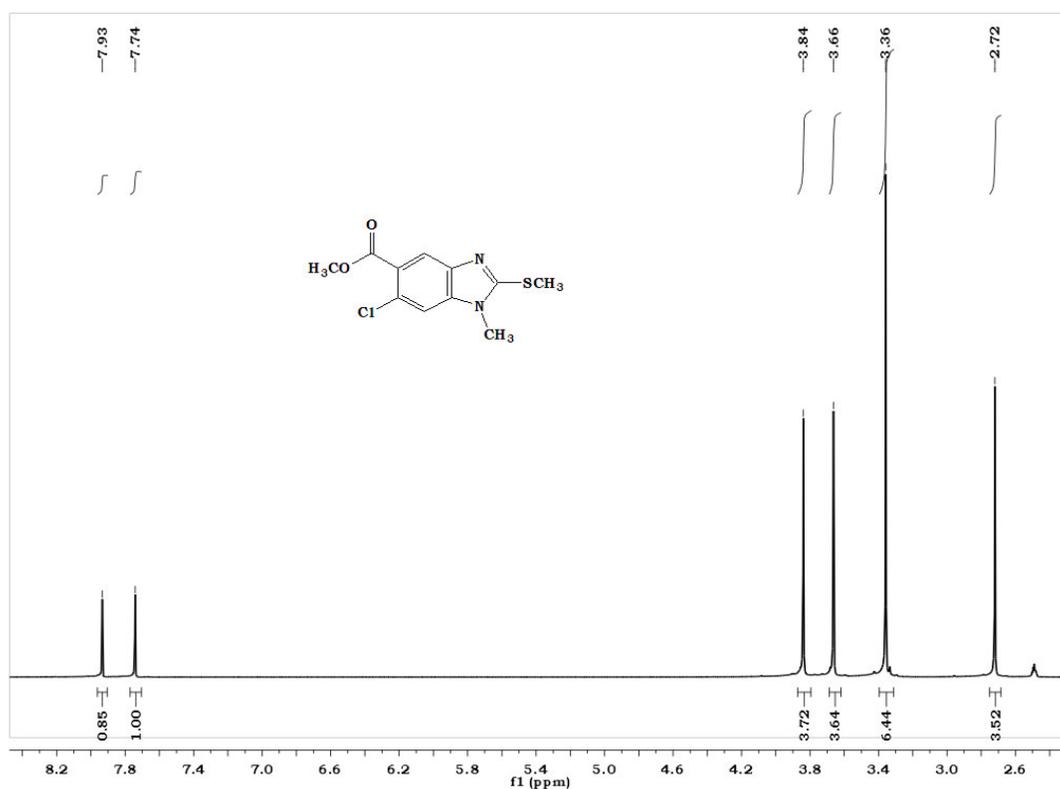
Espectro 5. RMN ^1H de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9). DMSO- d_6



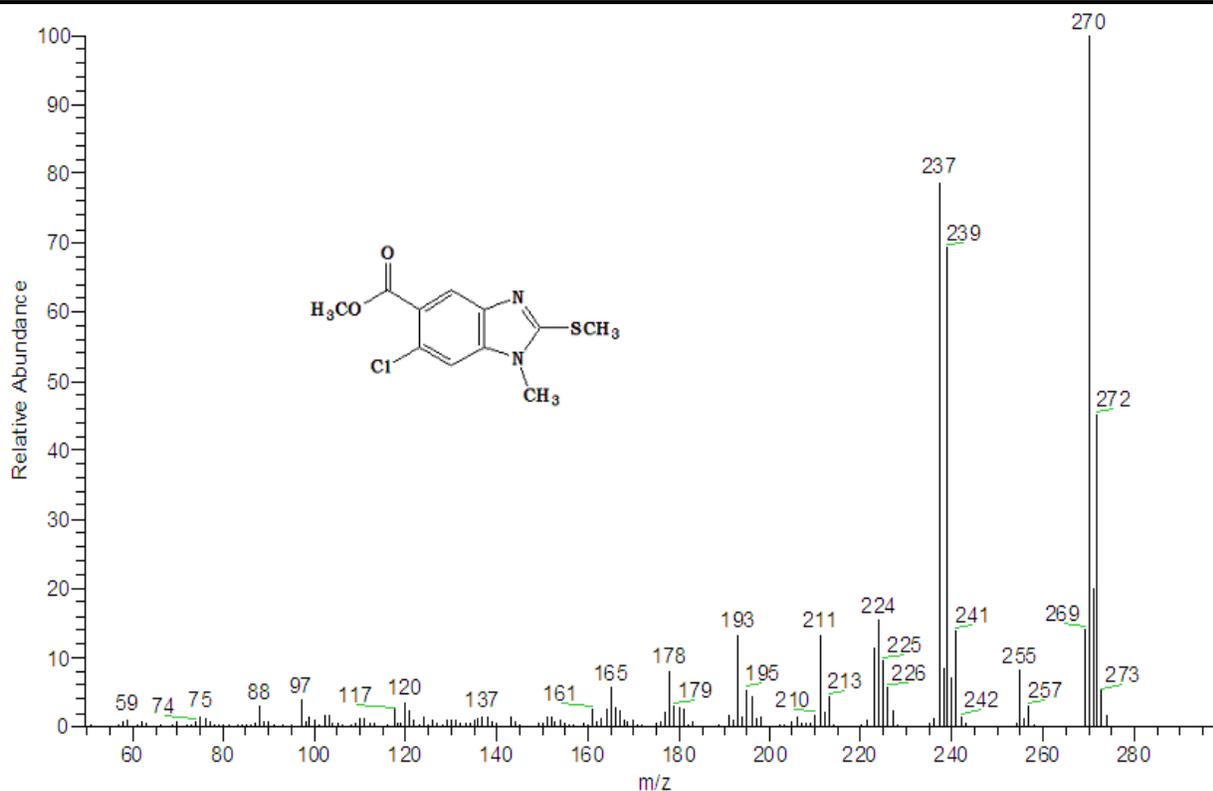
Espectro 6. EM(IE) de 6-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)



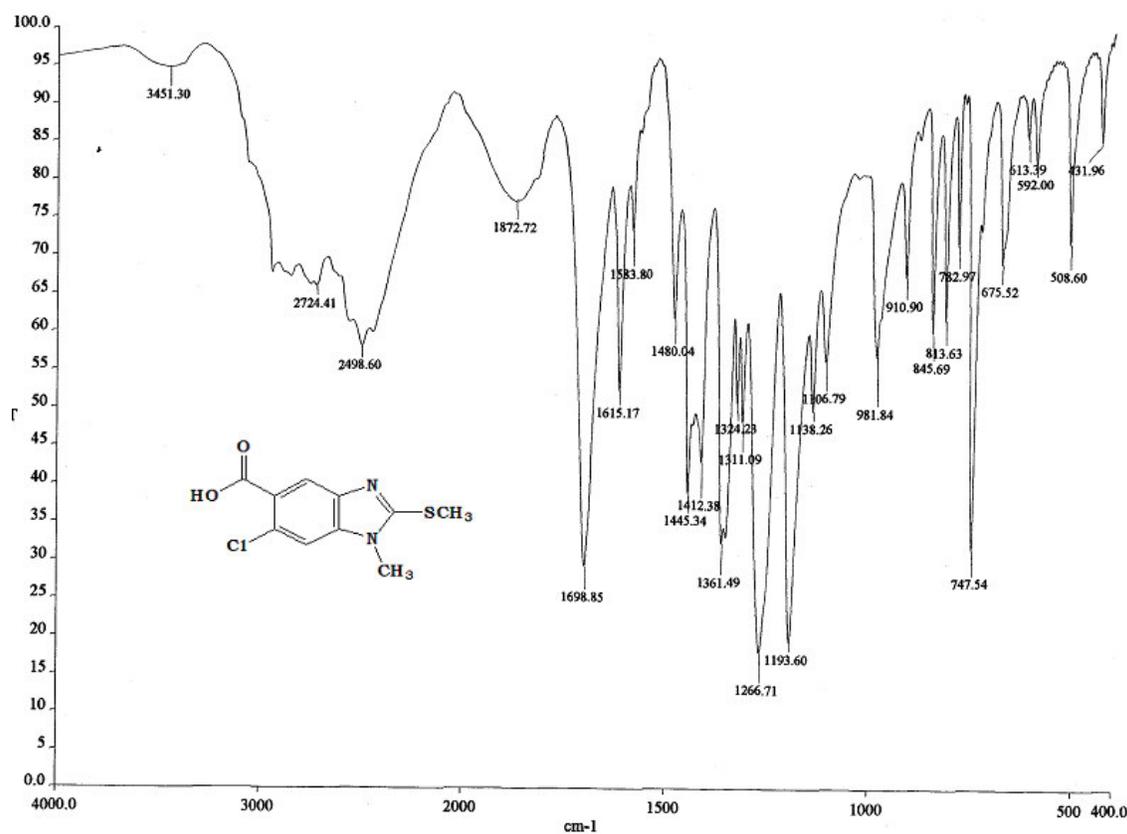
Espectro 7. IR de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)



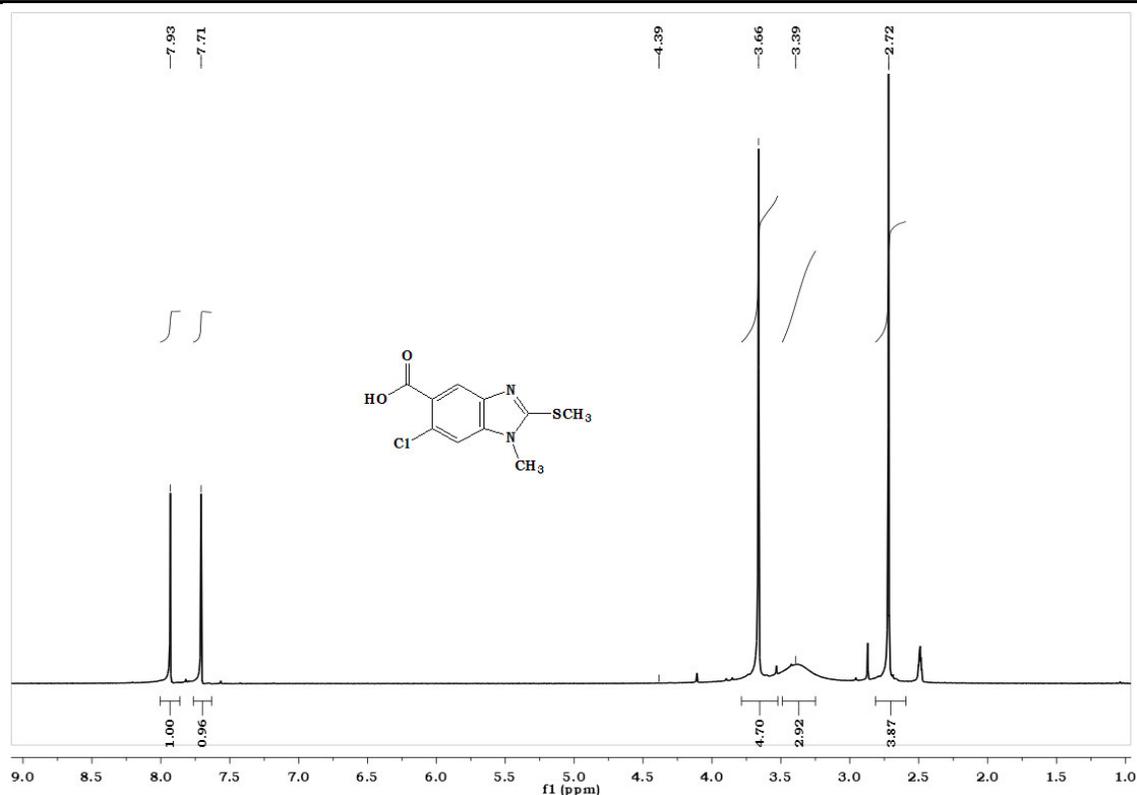
Espectro 8. RMN ¹H de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10). DMSO-d₆



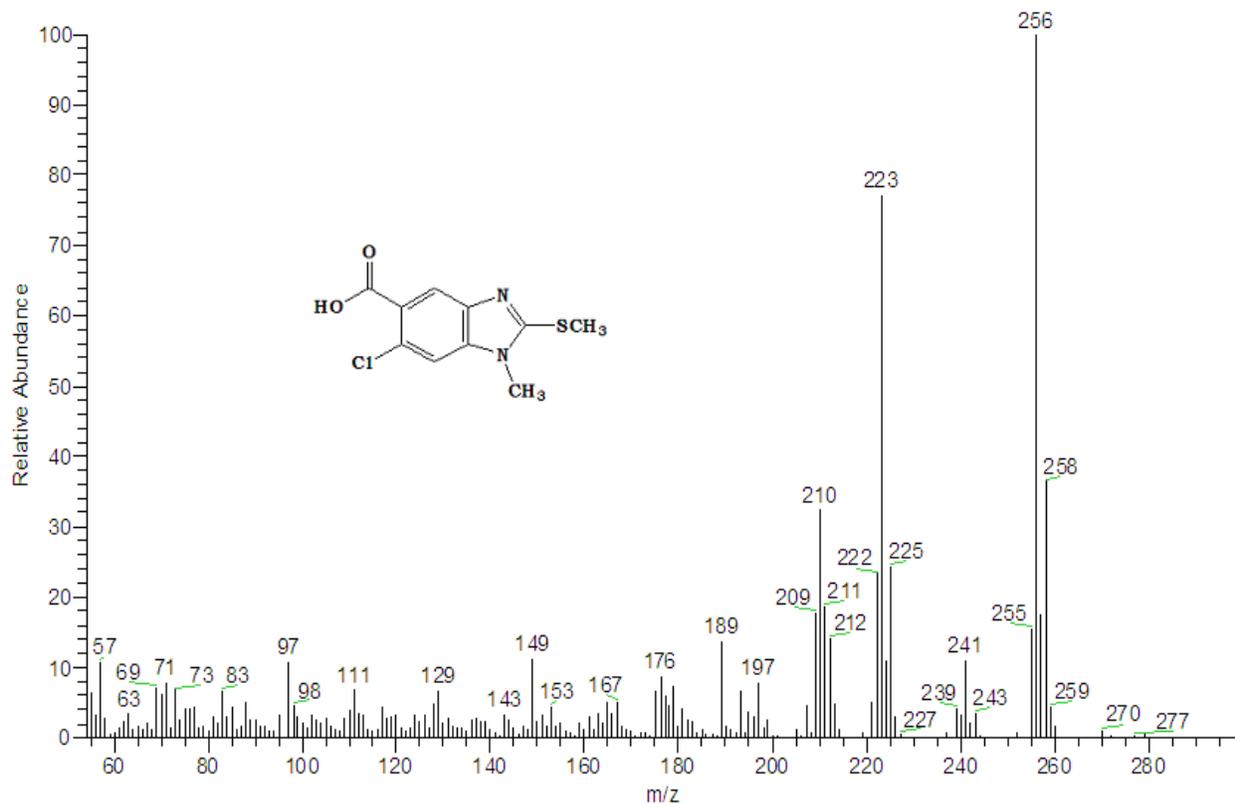
Espectro 9. EM(IE) de 6-Cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)



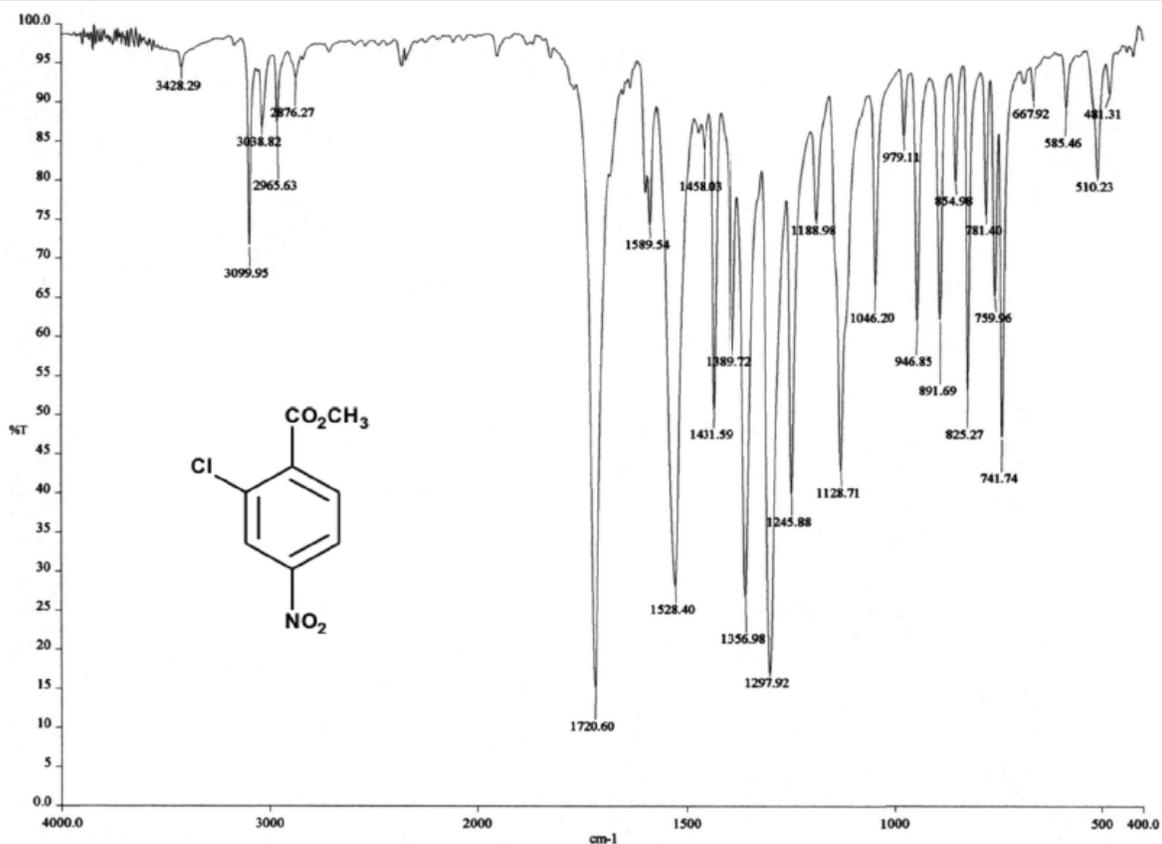
Espectro 10. IR de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (11)



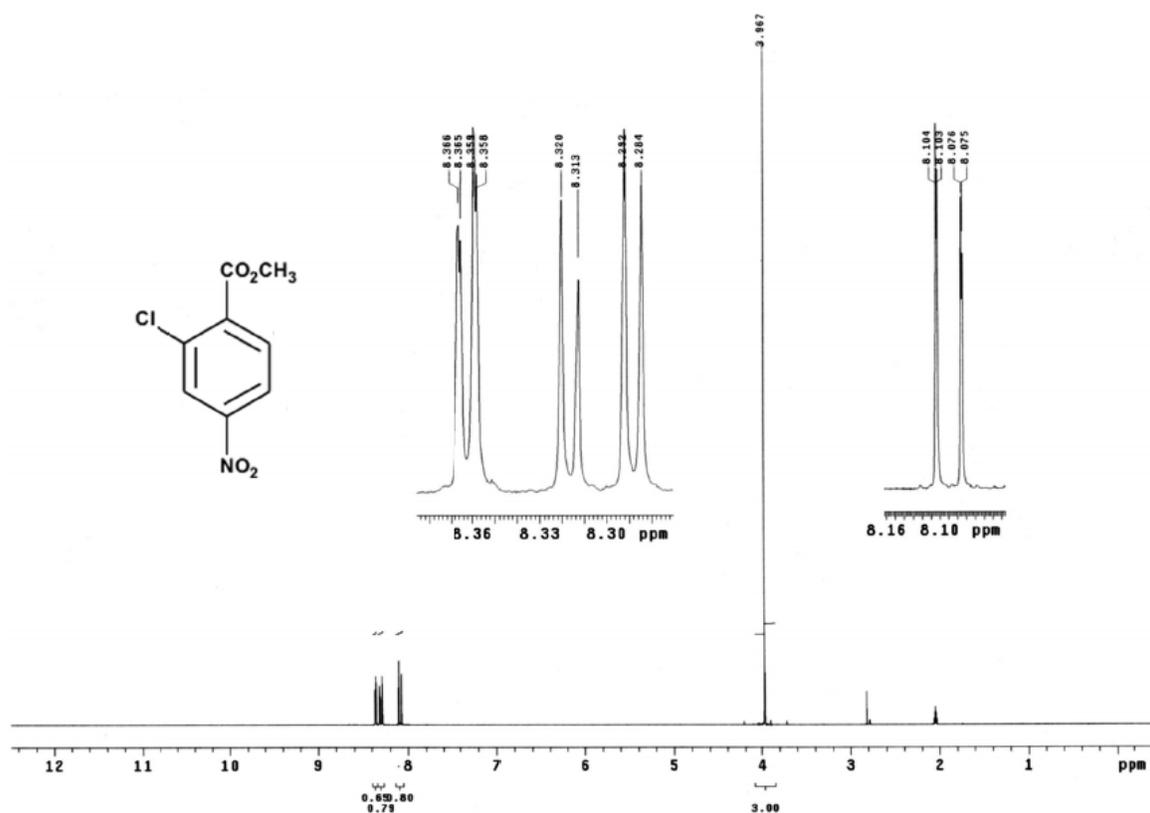
Espectro 11. RMN ^1H de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (11). DMSO- d_6

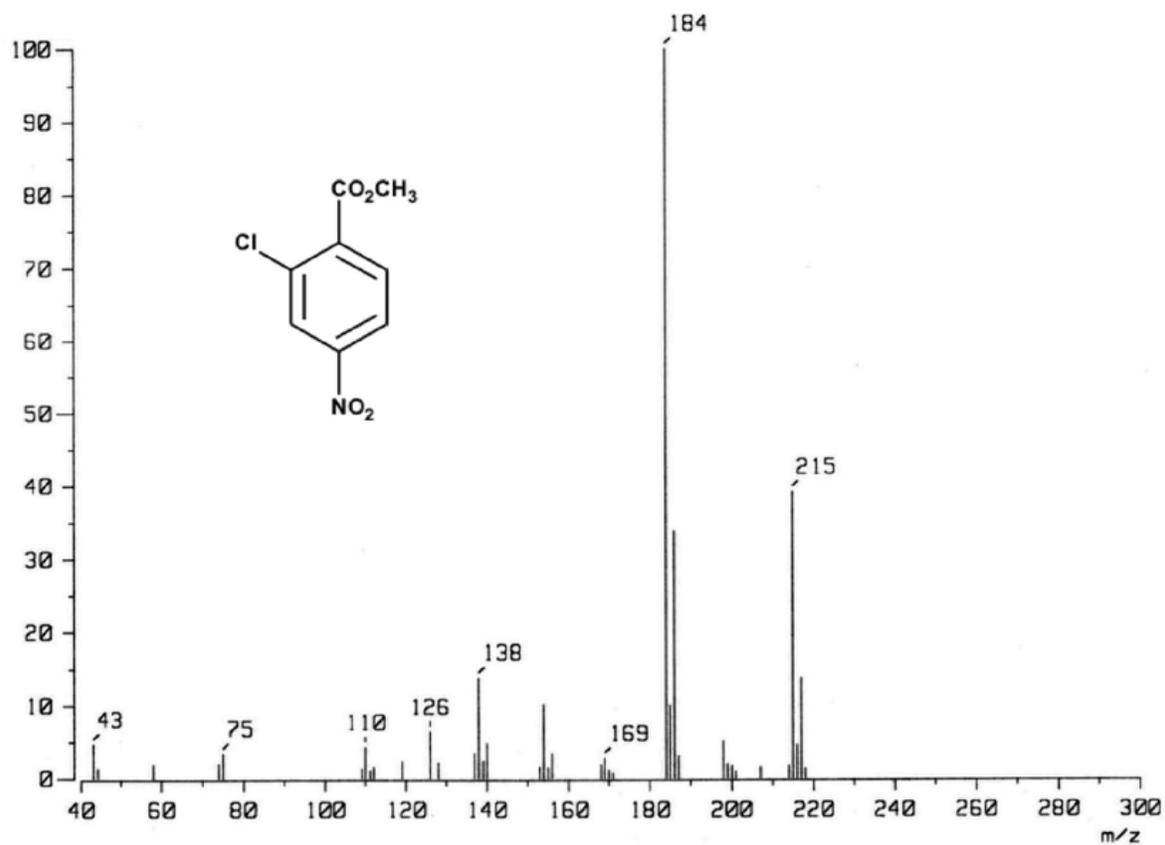


Espectro 12. EM(IE) de Ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (11)

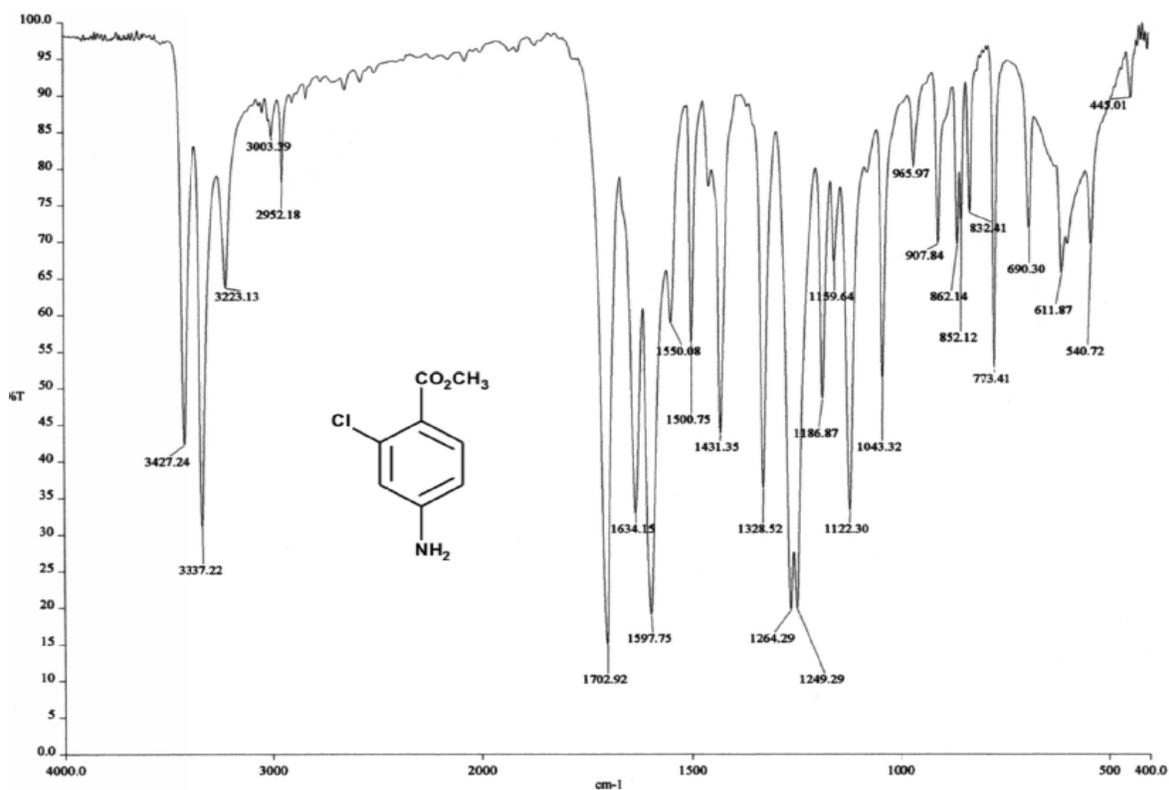


Espectro 13. IR de 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)

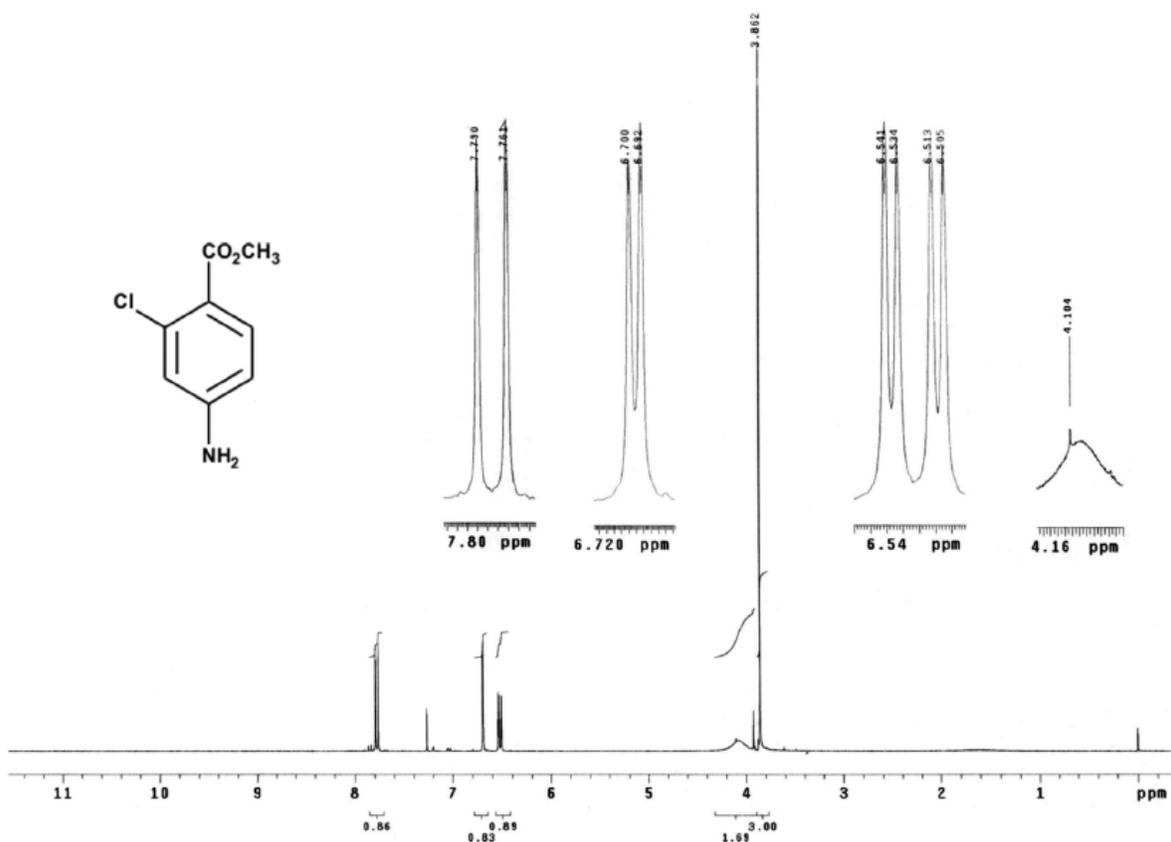




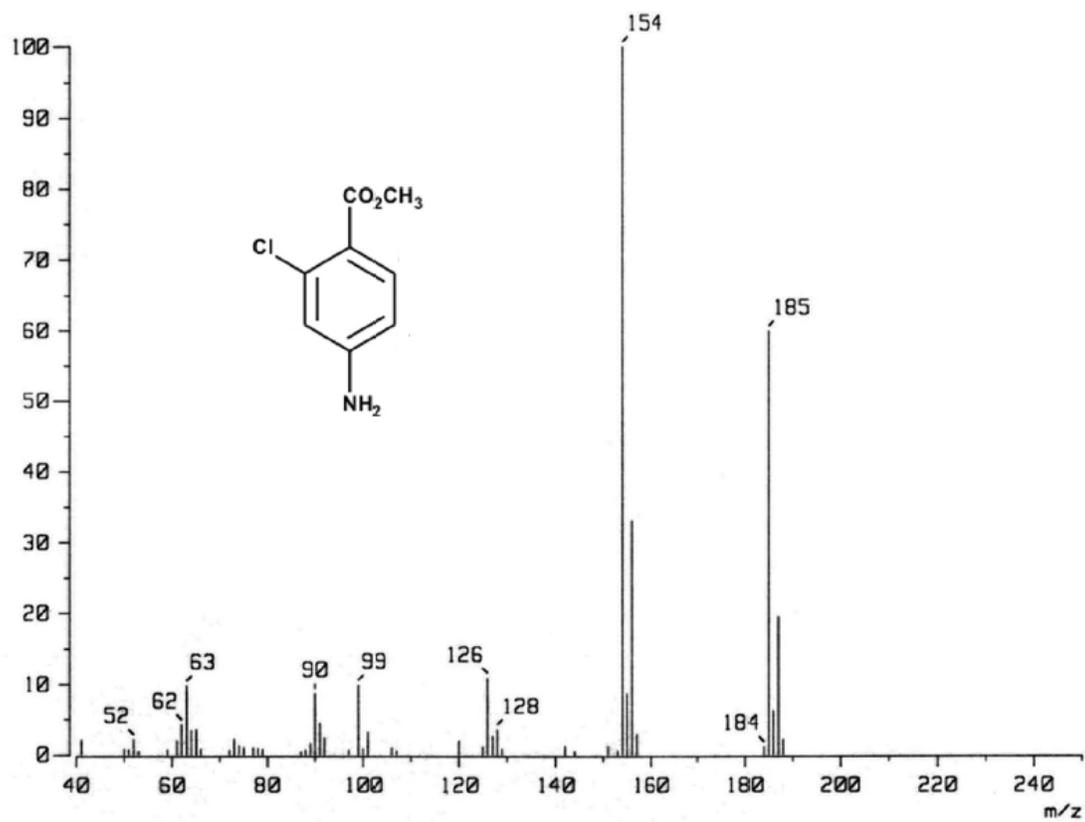
Espectro 15. EM(IE) de 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)



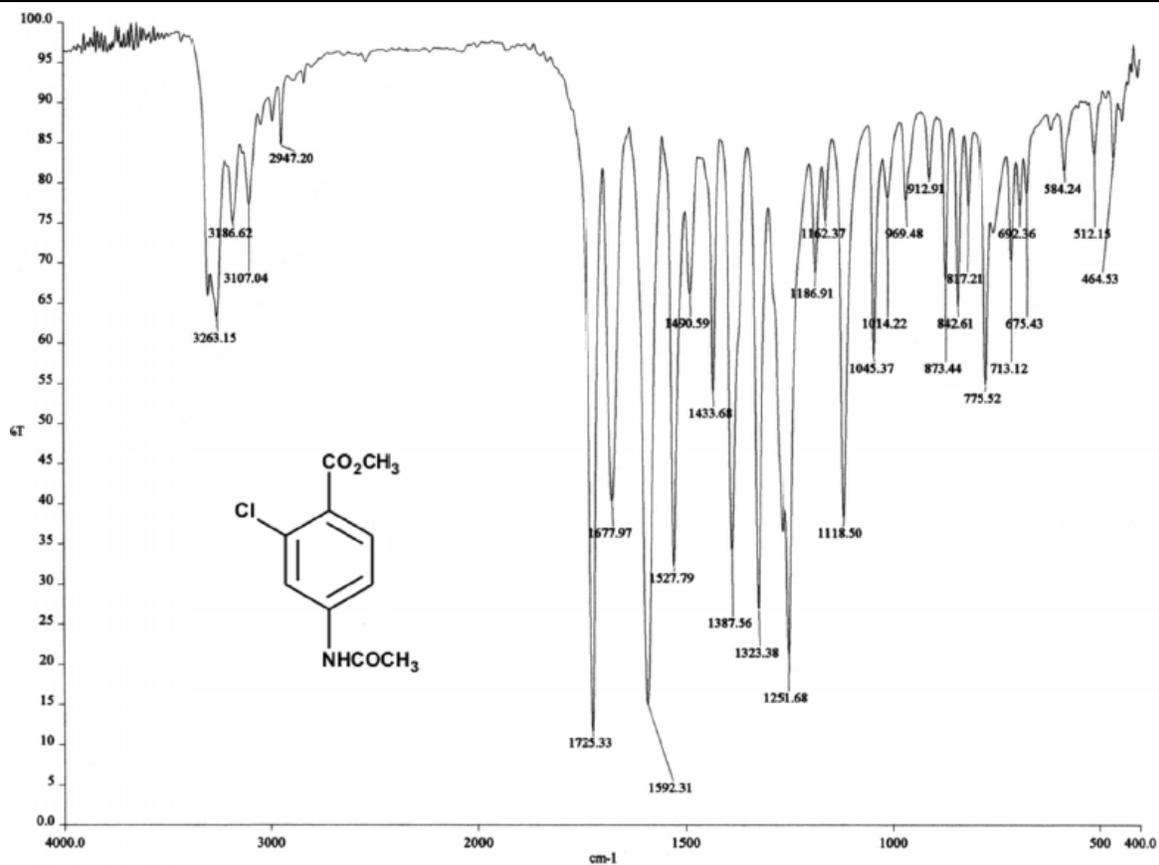
Espectro 16. IR de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)



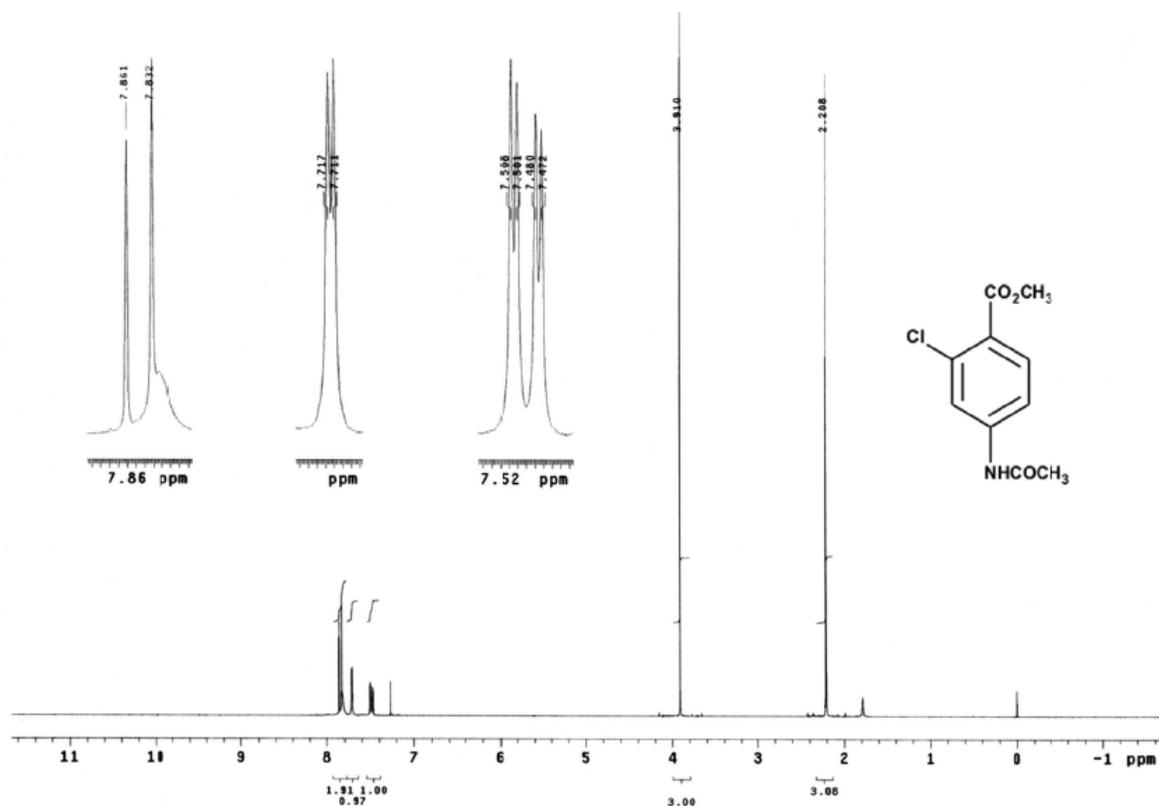
Espectro 17. RMN ¹H de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3). CDCl₃

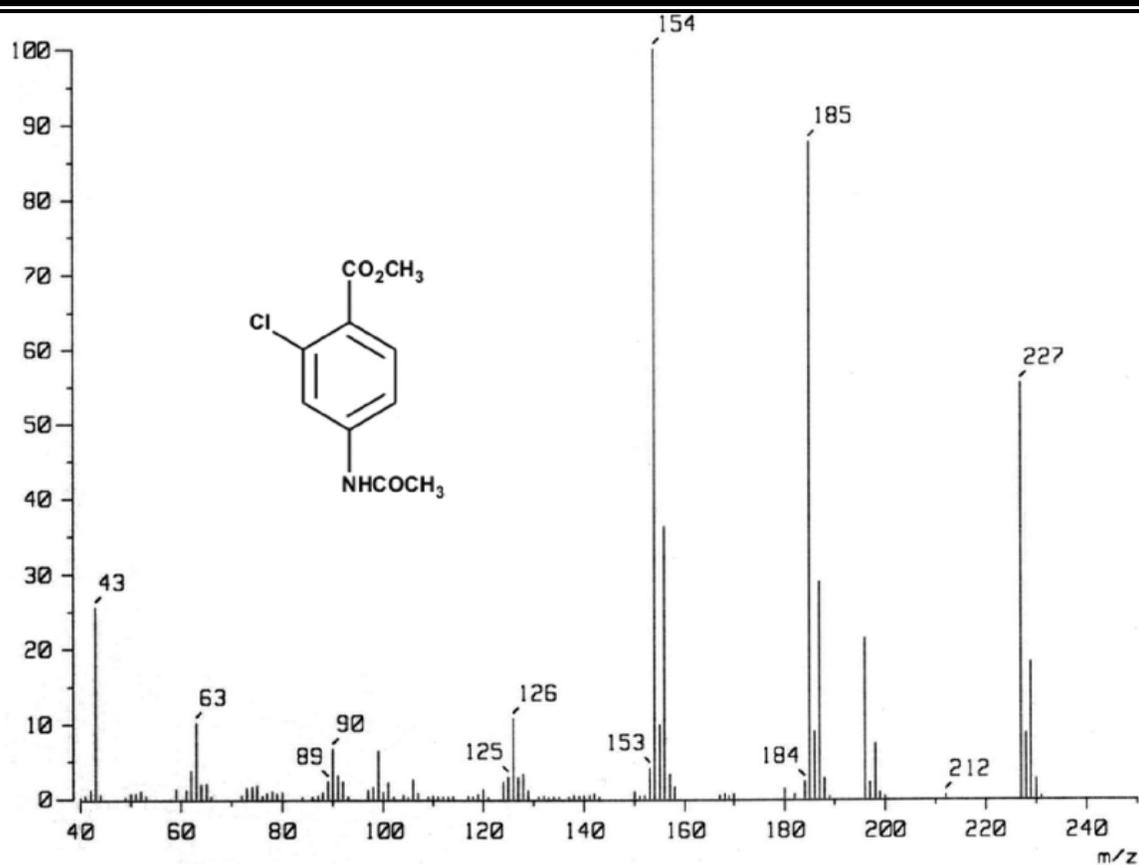


Espectro 18. EM(IE) de 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)

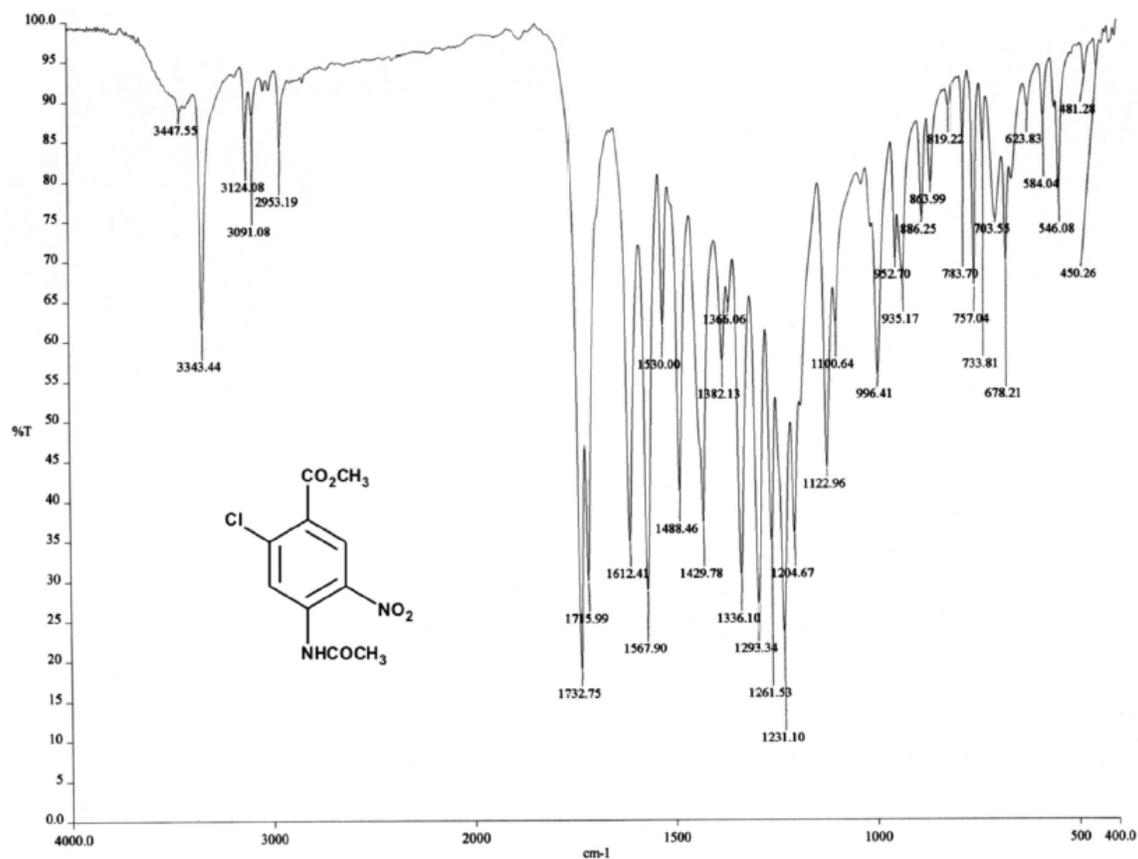


Espectro 19. IR de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)

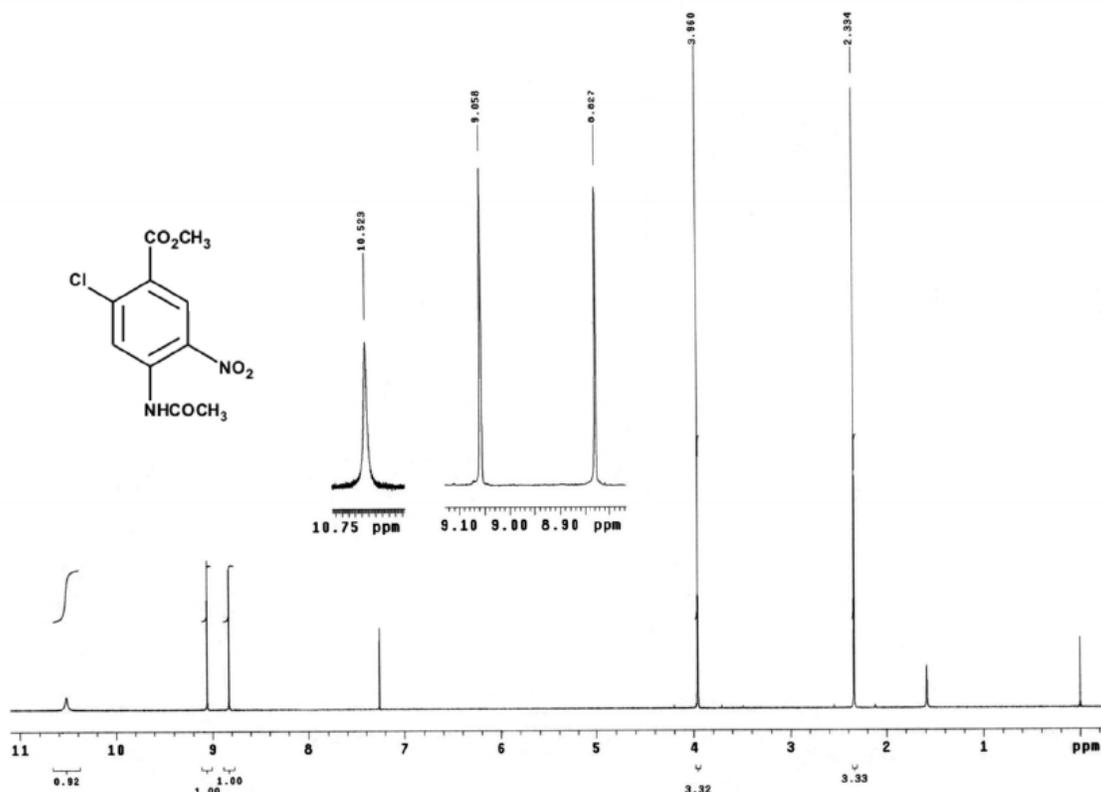
Espectro 20. RMN ^1H de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4). CDCl_3



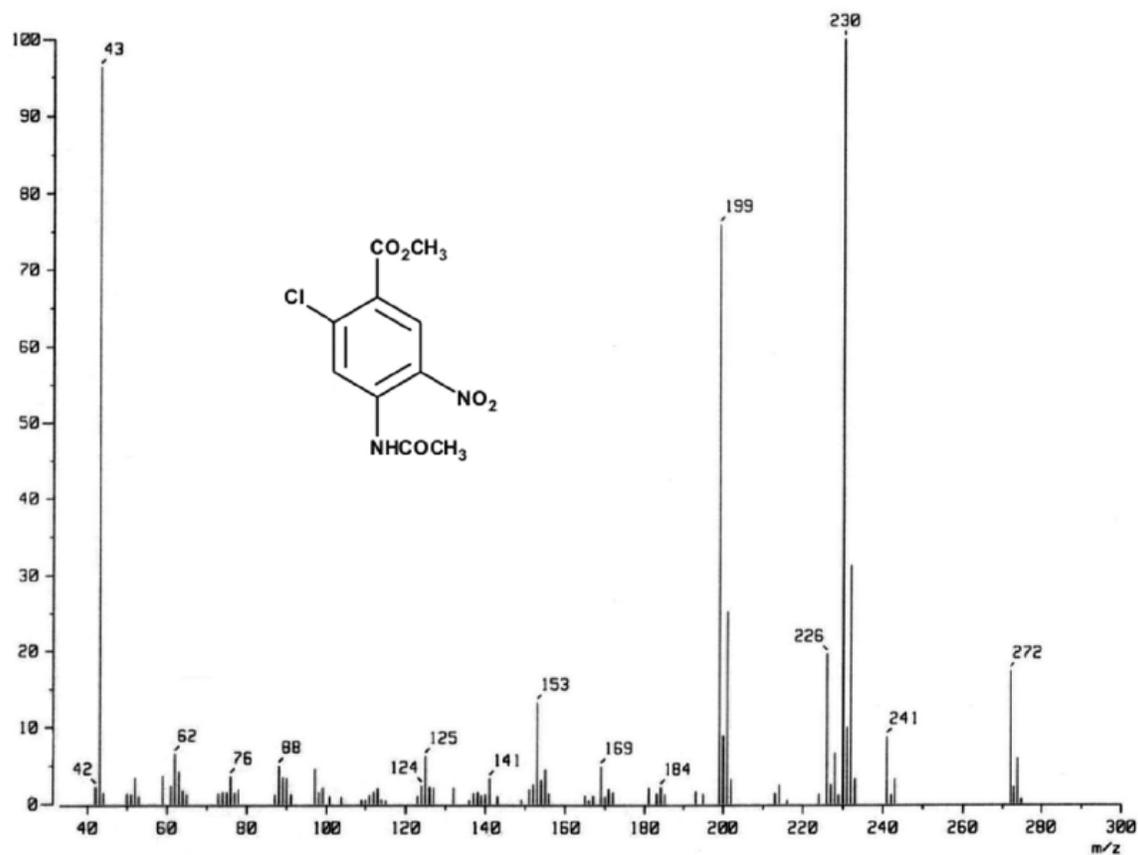
Espectro 21. EM(IE) de 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)



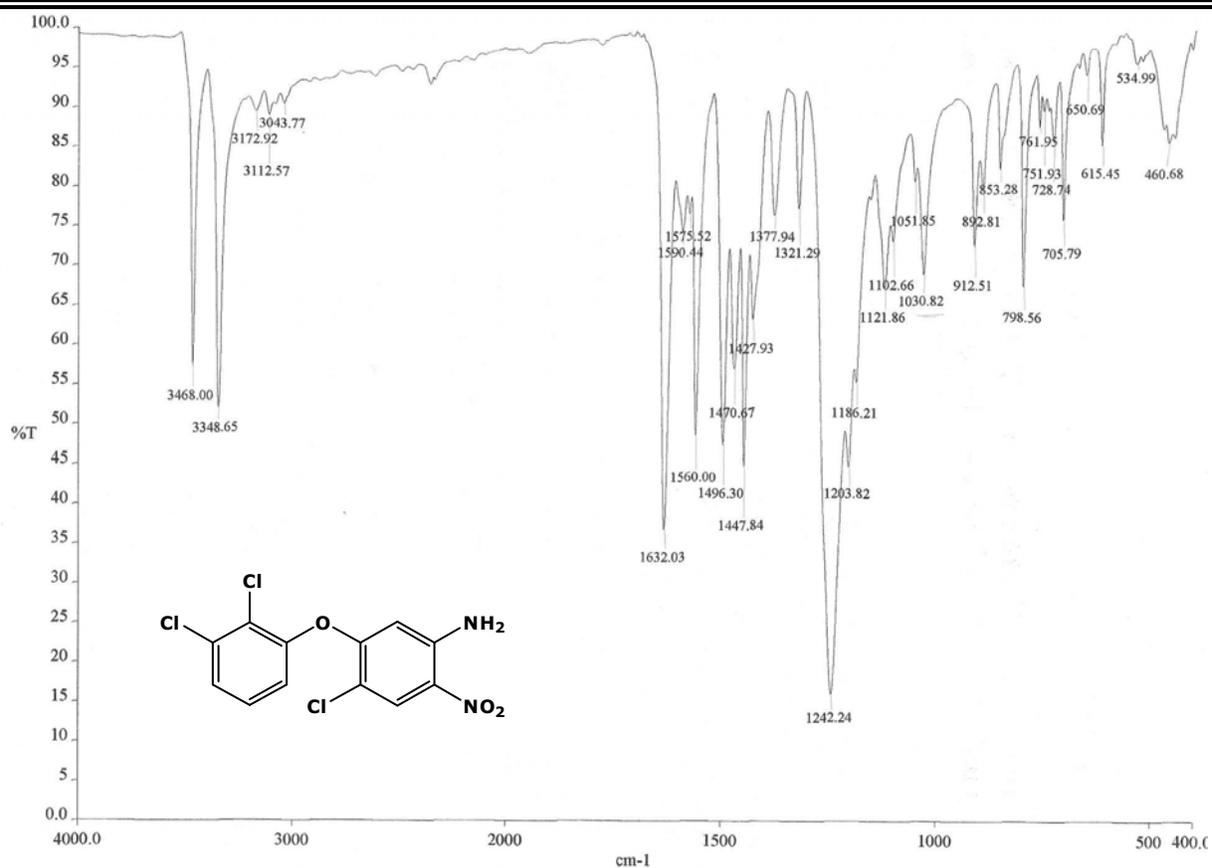
Espectro 22. IR de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)



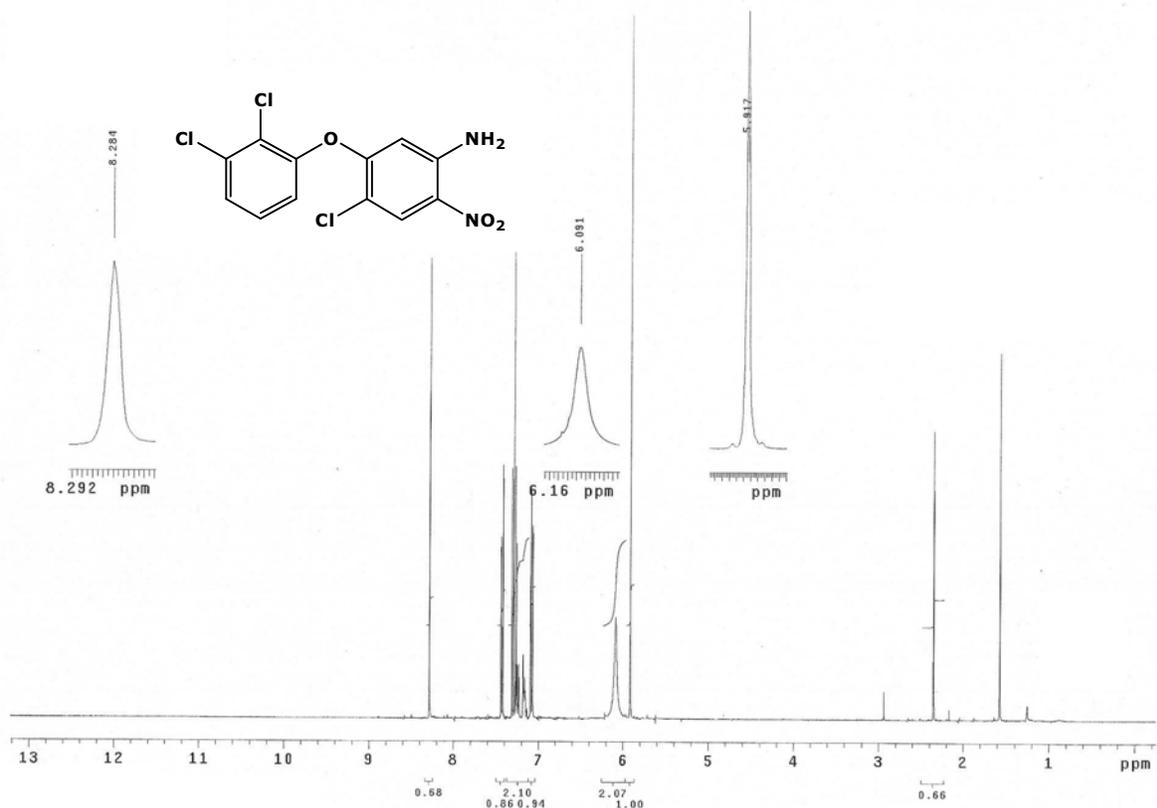
Espectro 23. RMN ^1H de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5). CDCl_3

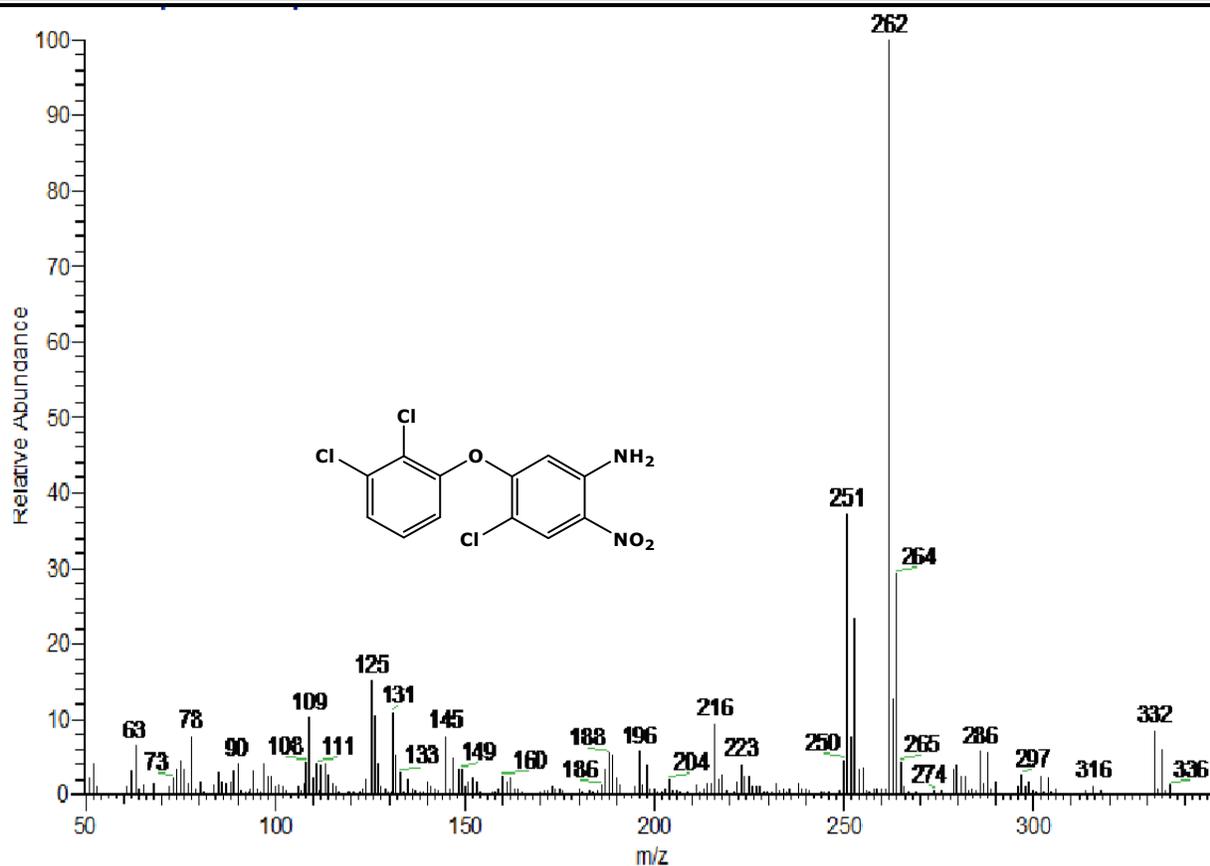


Espectro 24. EM(IE) de 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)

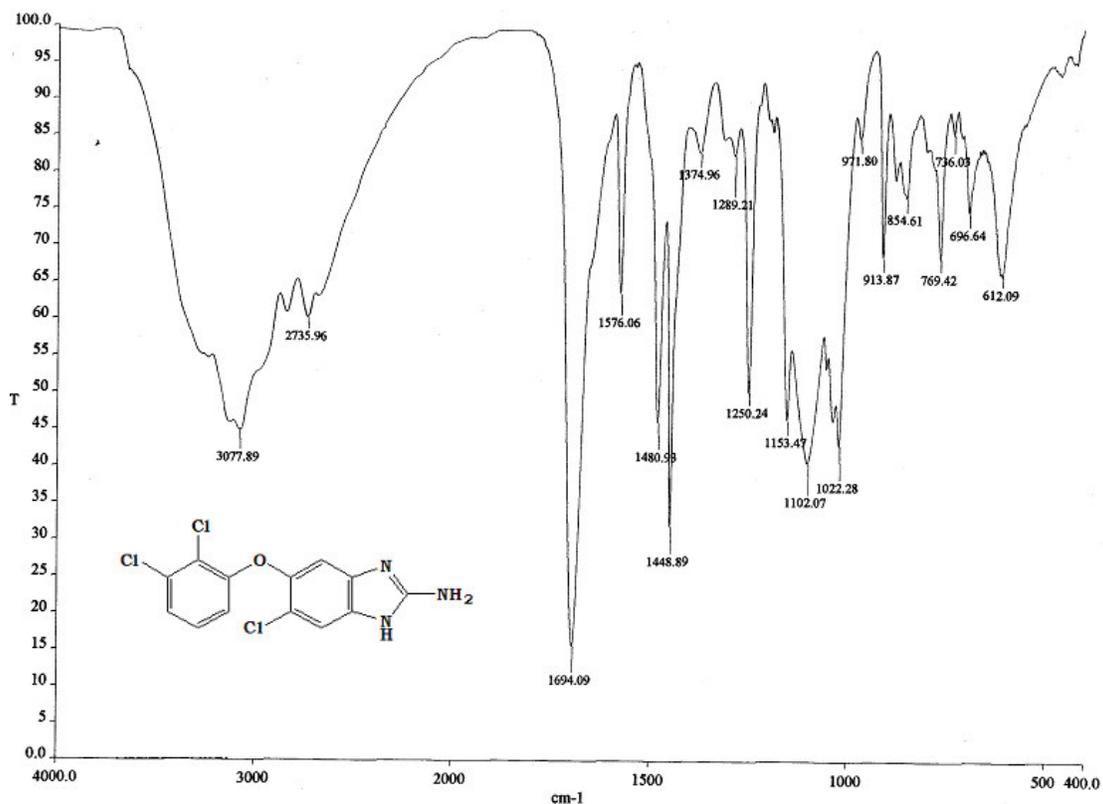


Espectro 25. IR de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)

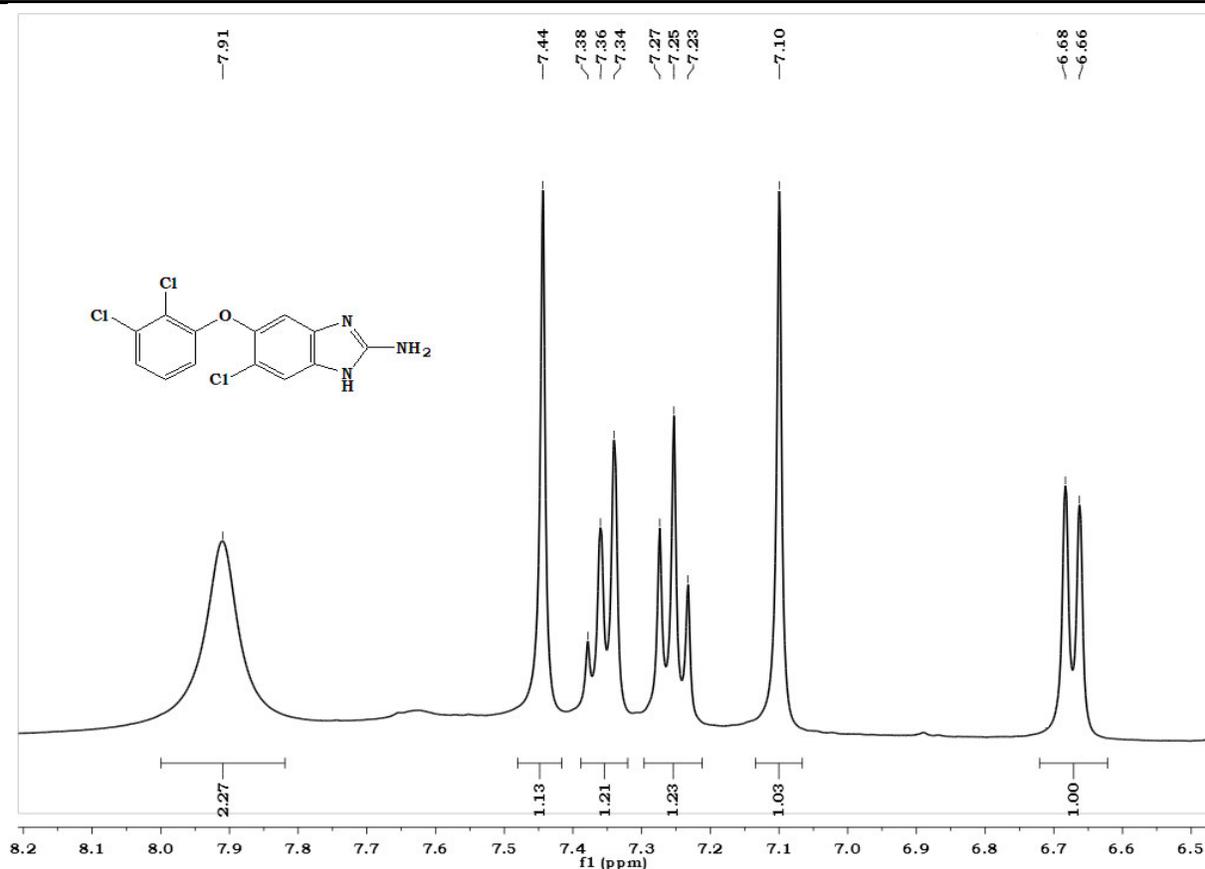
Espectro 26. RMN ¹H de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20). CDCl₃



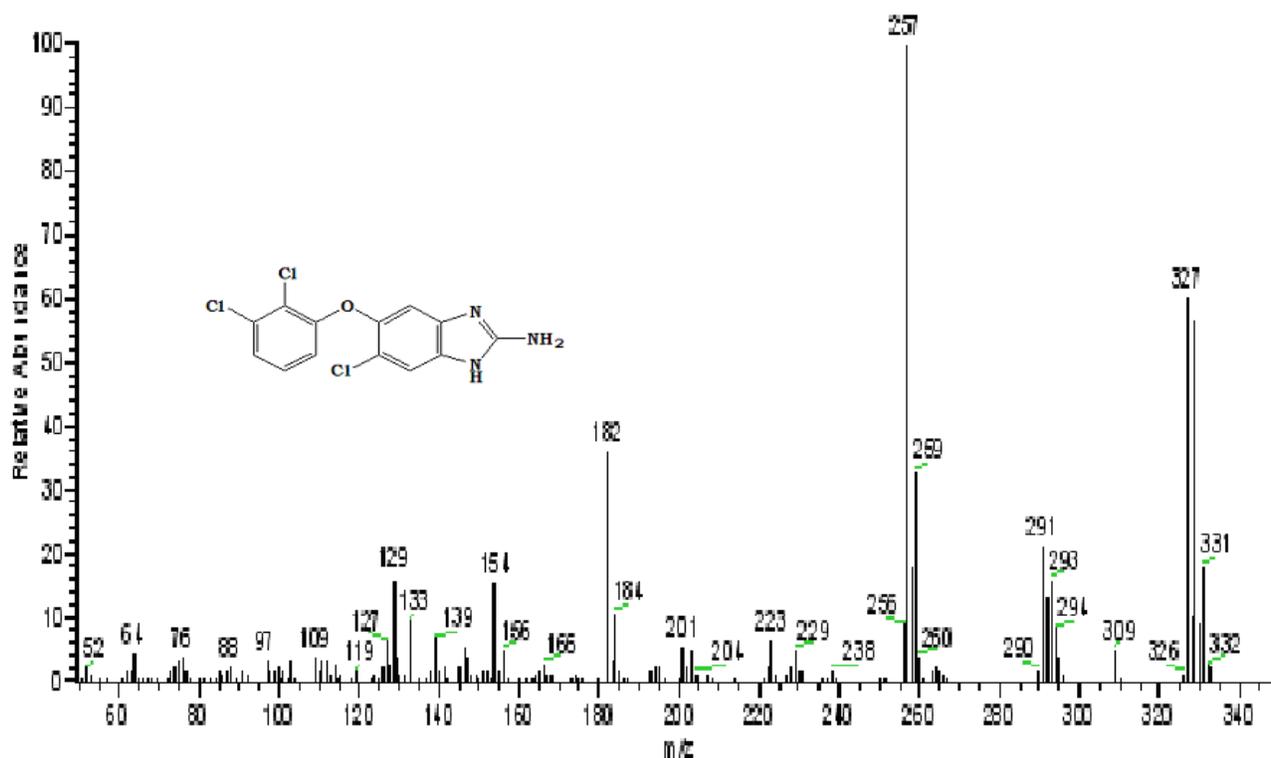
Espectro 27. EM(IE) de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (20)



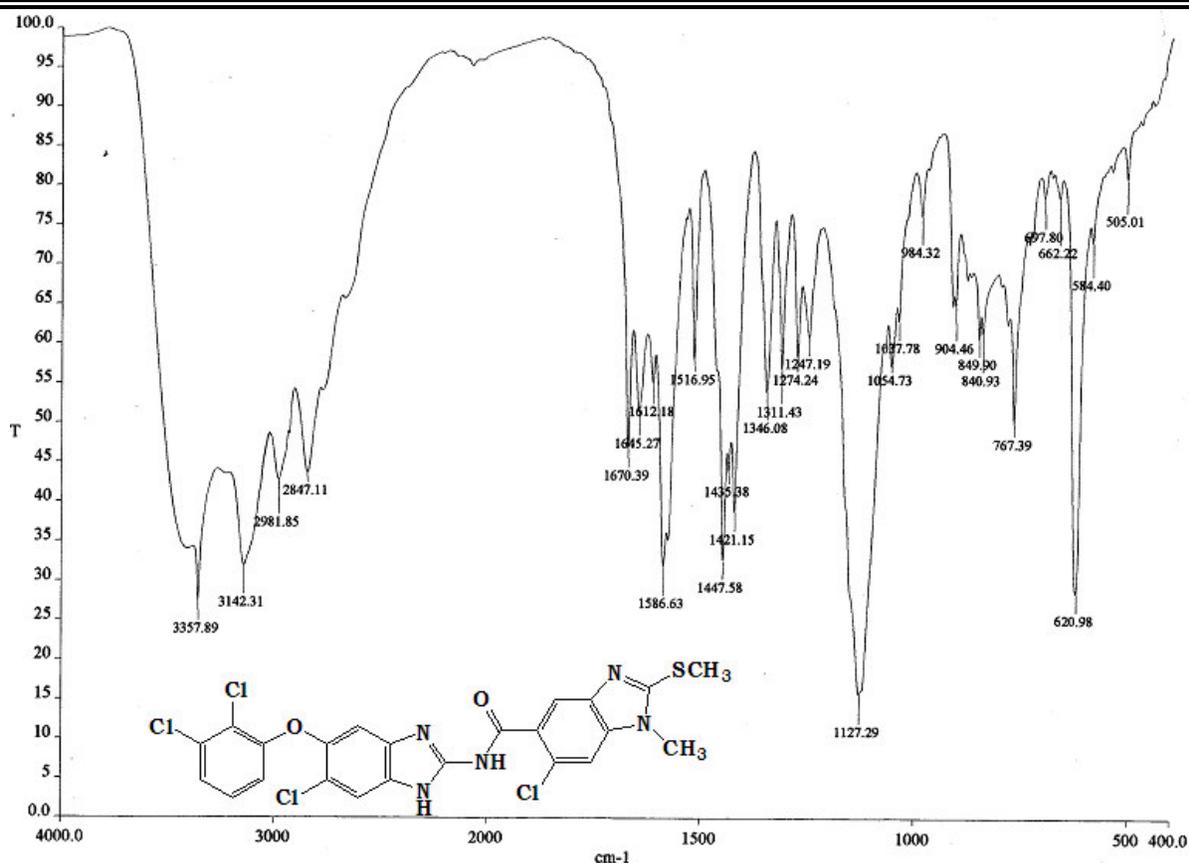
Espectro 28. IR de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il] amina (22)



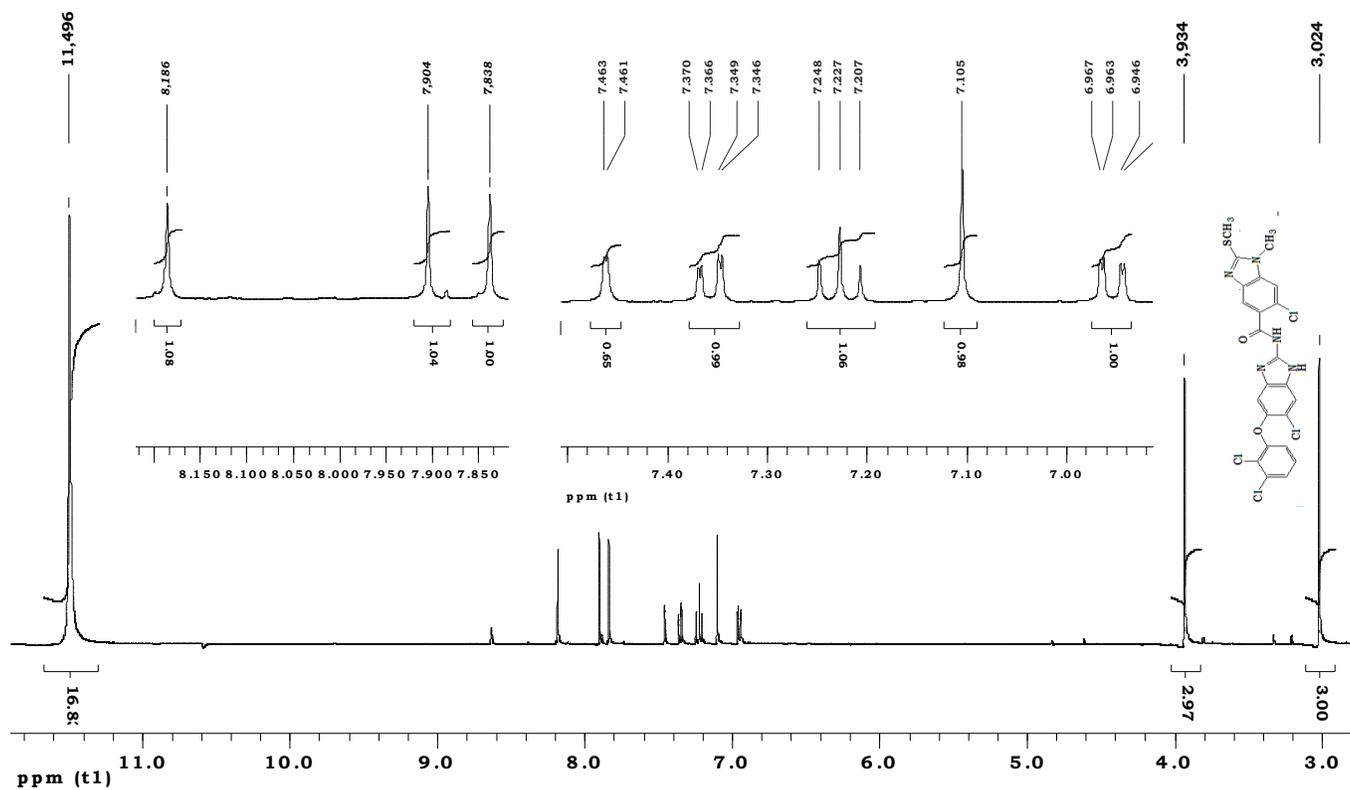
Espectro 29. RMN ^1H de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il] amina (22). DMSO



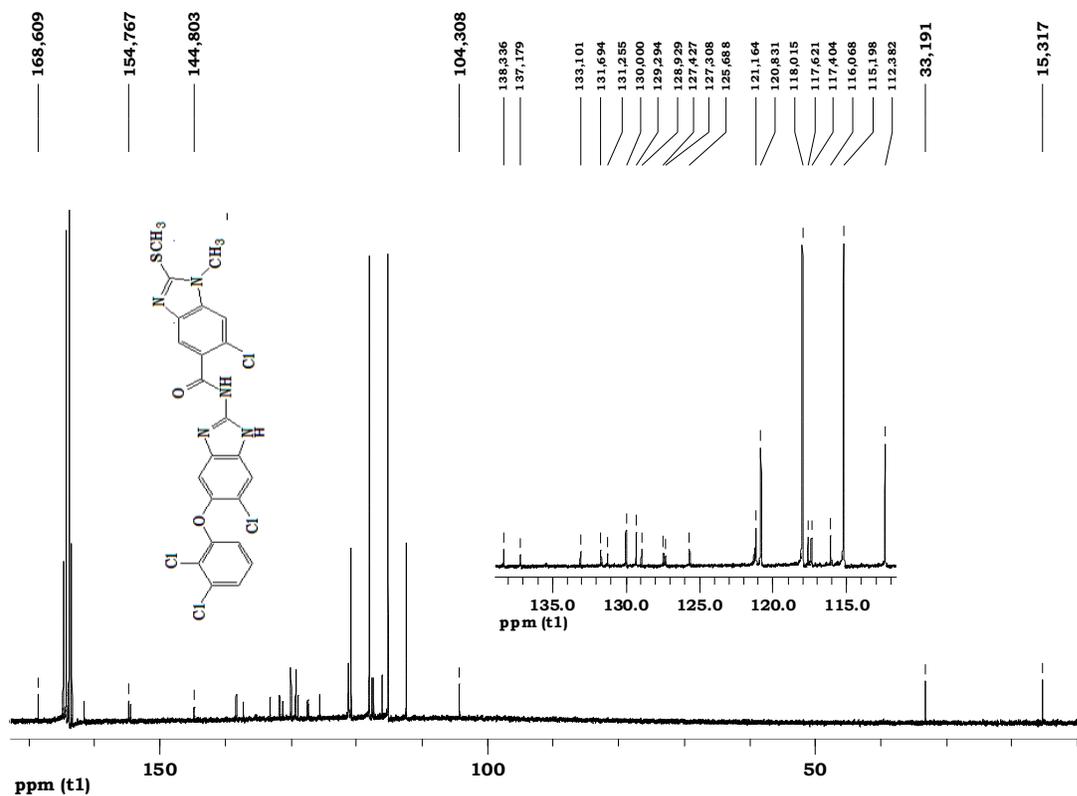
Espectro 30. EM(IE) de [5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il] amina (22)



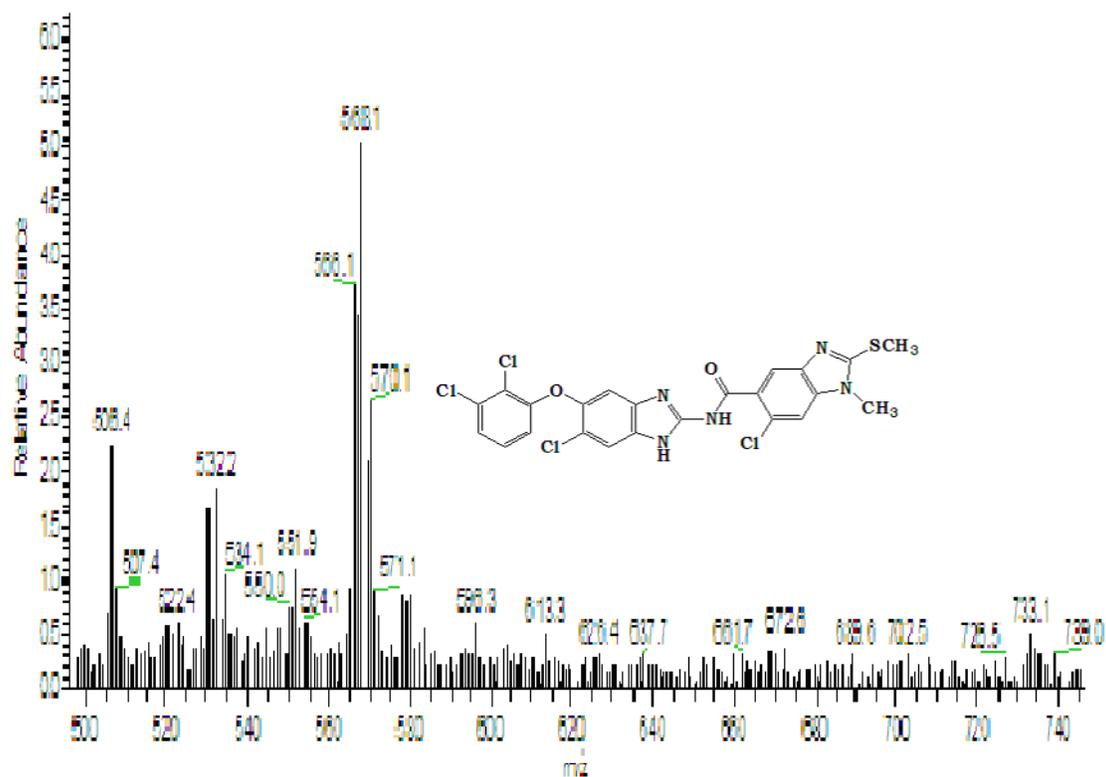
Espectro 31. IR de 6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (23).



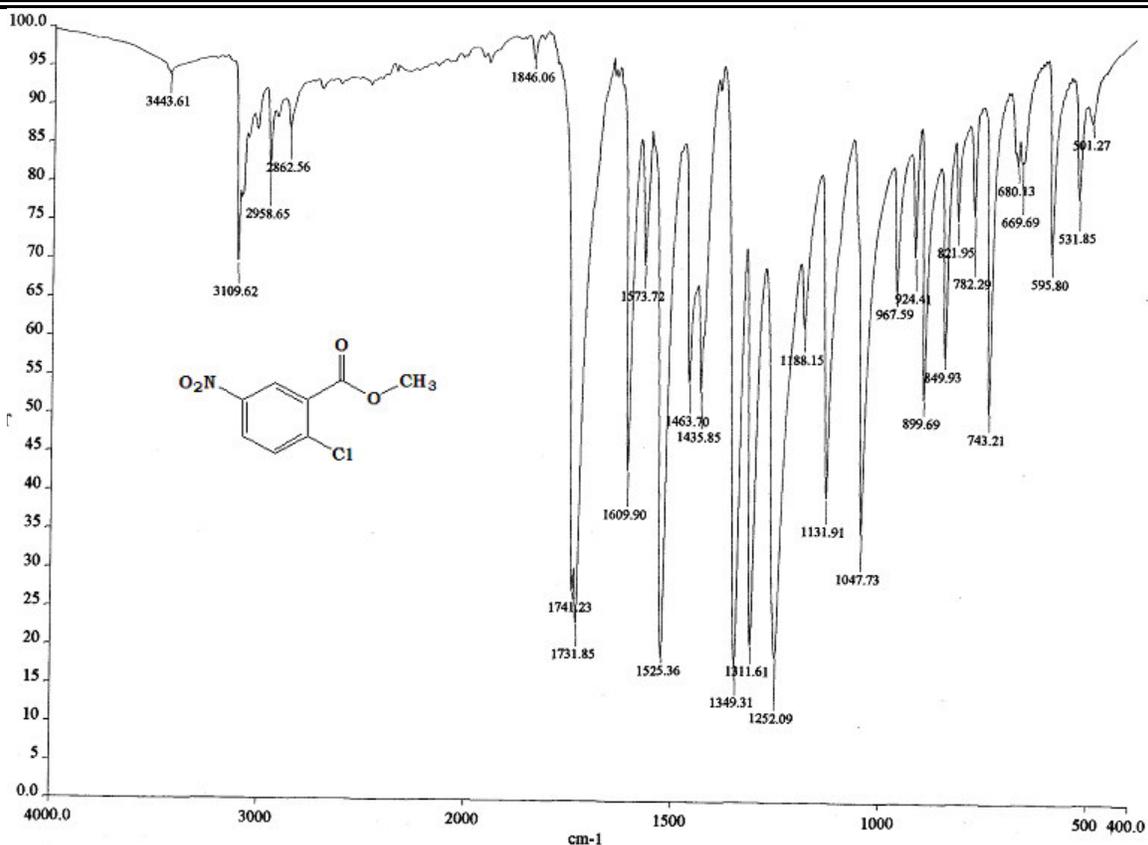
Espectro 32. RMN ¹H de 6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (23). DMSO



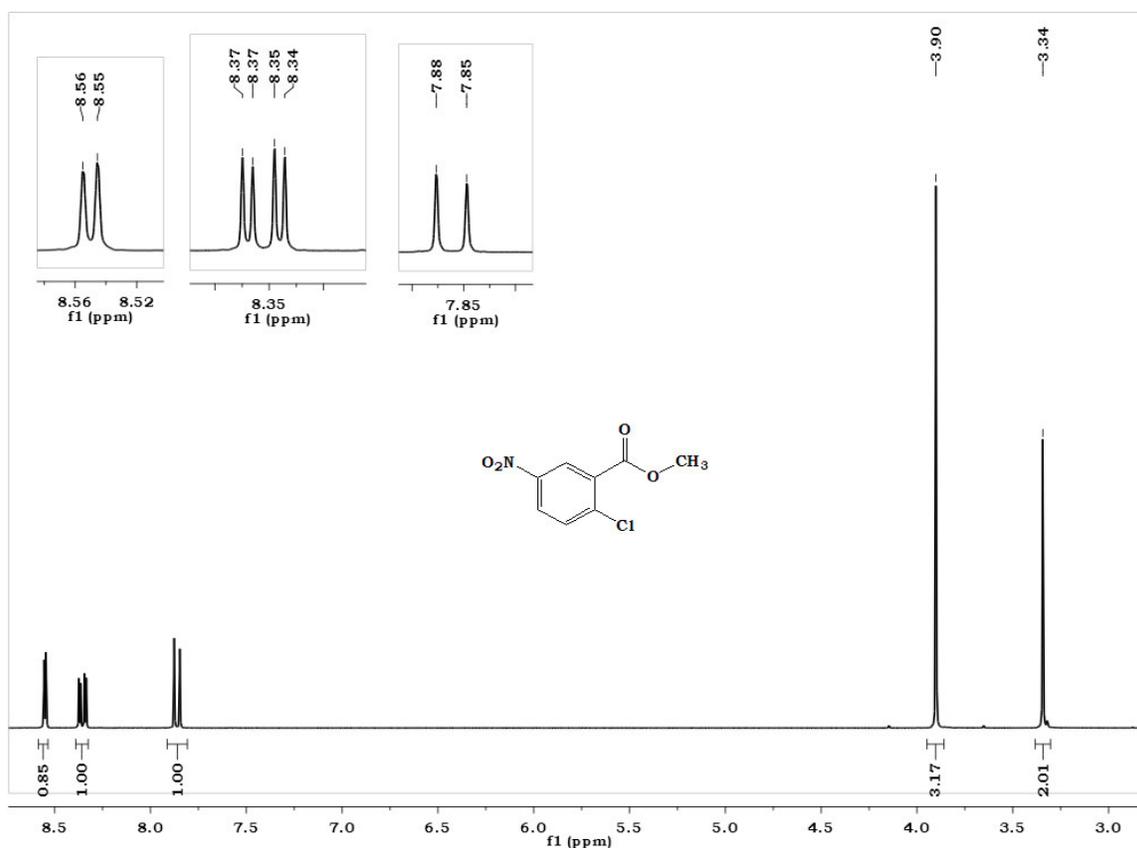
Espectro 33. RMN ^{13}C de 6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (23). DMSO

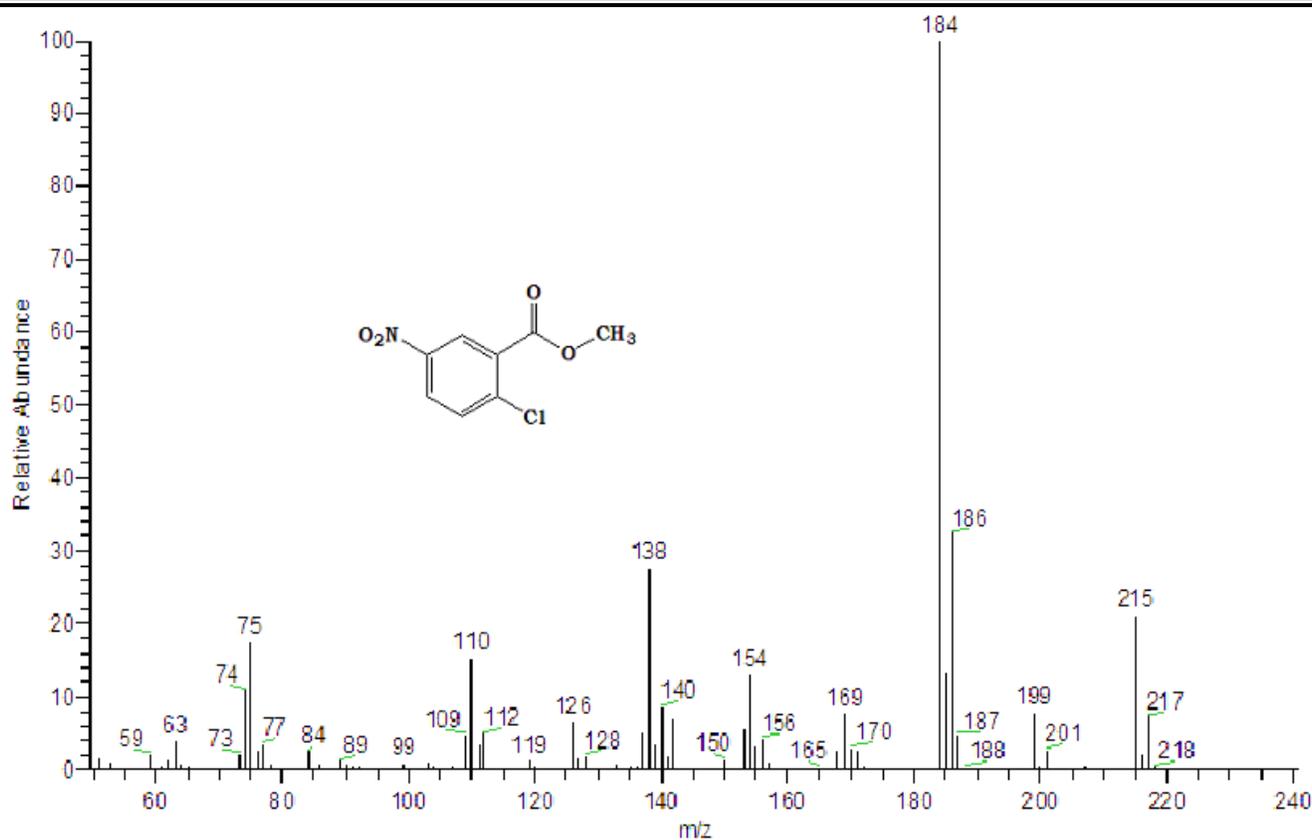


Espectro 34. EM(FAB) de 6-Cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (23).

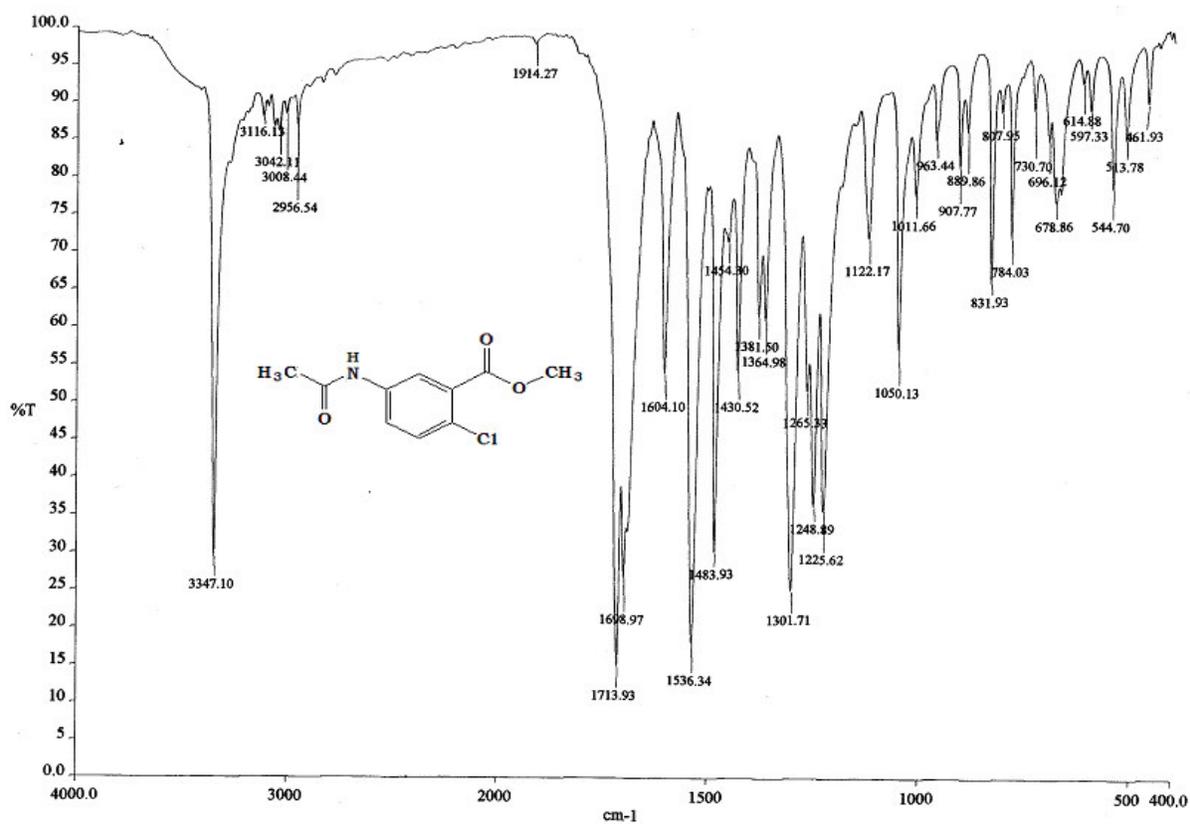


Espectro 35. IR de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo

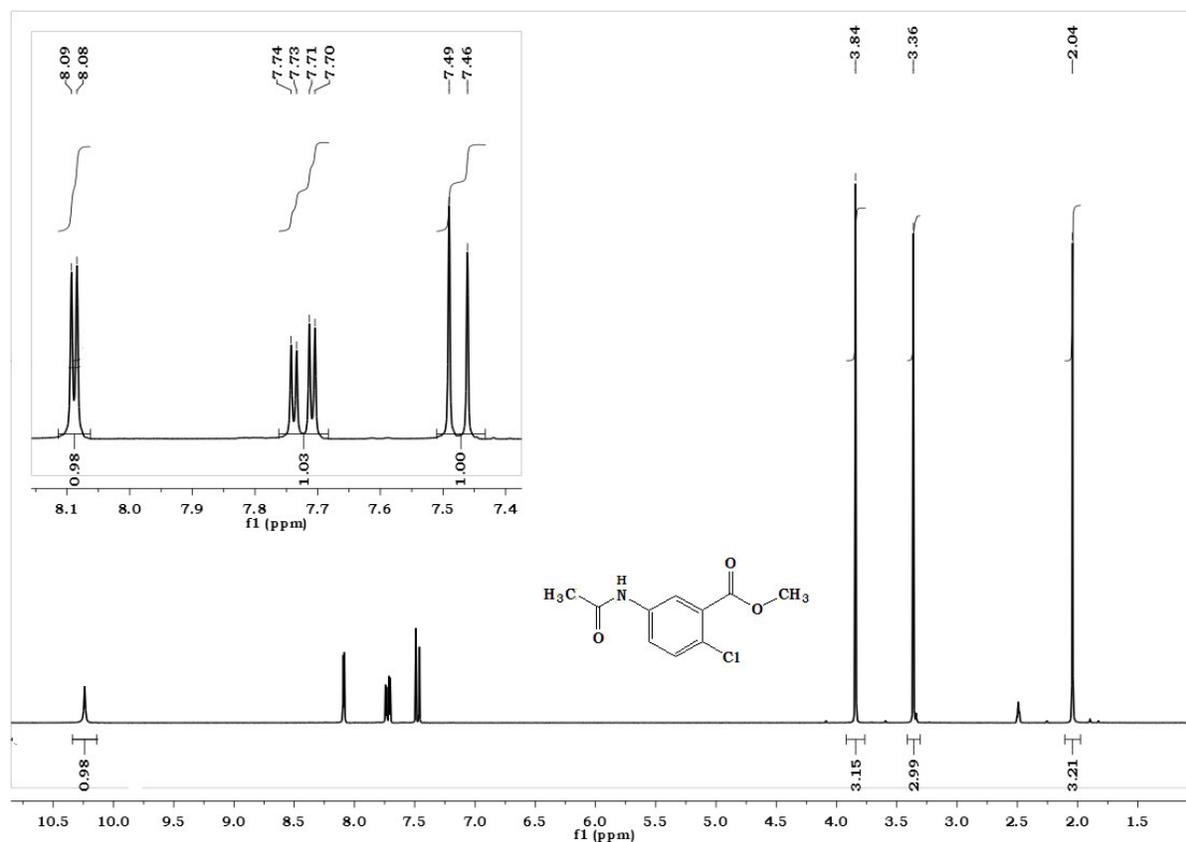
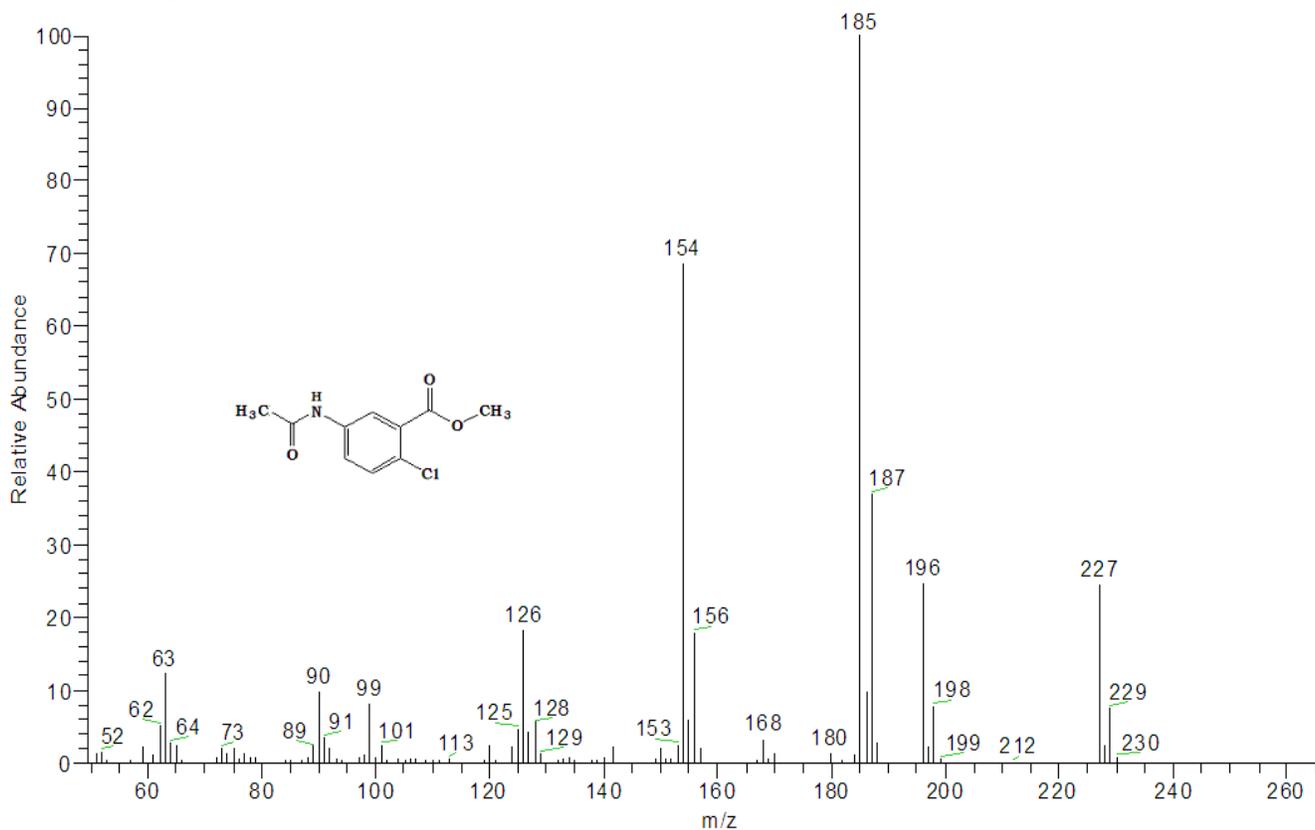
Espectro 36. RMN ¹H de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo. DMSO



Espectro 37. EM(IE) de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo



Espectro 38. IR de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo

Espectro 39. RMN ^1H de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo. DMSO

Espectro 40. EM(IE) de 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo