



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas
diseñadas por *docking* como inhibidores potenciales
de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de *Entamoeba*
histolytica

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Pedro Josué Trejo Soto



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



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:	Eugene Athanas Bratoeff Titeff
VOCAL:	José Federico del Río Portilla
SECRETARIO:	María Alicia Hernández Campos
1er. SUPLENTE:	Rodolfo Álvarez Manzo
2° SUPLENTE:	Guillermina Yazmín Arellano Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 122, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma México**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Rubén Antonio Romo Mancillas

SUSTENTANTE:

Pedro Josué Trejo Soto

Dedicatorias

A mi mamá y papá

Por ser los mejores padres que pude haber tenido .

Gracias por el enorme esfuerzo que han realizado para sobrellevar mi educación, por el apoyo incondicional que me han brindado, su amor y por siempre exhortarme a realizar mis sueños y metas; este trabajo también es de ustedes, los amo.

A mis hermanos

Por las aventuras que hemos vivido juntos, siempre serán parte de mi vida, gracias por estar a mi lado, los amo

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por haberme brindado la oportunidad de estudiar en sus instalaciones, de darme las herramientas y los conocimientos para formarme en el ámbito profesional y personal.

Al Dr. Rafael Castillo, por haberme aceptado como parte del grupo de investigación del laboratorio 122, gracias por el apoyo en la realización y revisión de esta tesis.

Quiero agradecer especialmente a la maestra Alicia Hernández Campos por permitirme trabajar a su lado, por haberme brindado su apoyo, su atención, su experiencia, consejos y sobre todo la confianza que me tuvo durante la realización de este trabajo; todos los chistes, simplezas y la gran ayuda en los momentos buenos y malos me hacen sentir como en casa. Maestra Alicia la estimo mucho y no hay palabras ni maneras que expresen lo tan agradecido que estoy con usted, de verdad Gracias!!!

Al Dr. Francisco Hernández Luis que como profesor, a título personal, es de los mejores que tenemos en la facultad; el conocimiento brindado y su experiencia son de gran ayuda en mi formación profesional.

A Nayeli López Balbiaux, que gracias a la relación académica que se presentó surgió una entrañable amistad, gracias por haberme traído a este maravilloso laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en el proyecto 80093 para la realización de esta tesis.

Al colegio de profesores de la Facultad de Química (CoCoCol) y la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo económico brindado para la realización y presentación escrita por este trabajo de tesis, al otorgarme la cátedra “Helio Flores Ramírez” semestre 2010-2.

A los miembros del jurado por su oportuna y exhaustiva revisión del presente escrito, así como por los consejos, correcciones y observaciones del mismo.

A los miembros del laboratorio 122: Eduardo, Carlos, Jaime, Armando, Oscar, Silvia, Rodrigo, Bere, Jeshua, Laura, Norma A., Israel, Irene, Miguel, Norma B., por su compañerismo, consejos y la amistad que se generó a lo largo de mi estancia.

Mención especial tiene Antonio Romo-Mancillas, gracias por brindarme tu apoyo, tener mucha paciencia, compartir tus experiencias y tu amistad.

Al personal de la USAI, por la asistencia técnica en la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear, de masas e infrarrojo. Quiero agradecer en especial a la M. en C. Rosa Isela del Villar por la ayuda dada en la resolución en los espectros.

A la M. en C. Olivia Soria Arteché por compartir y permitir publicar parte de sus espectros de su tesis doctoral en este trabajo.

A la Dra. Lilian Yépez, Amparo Tapia y a todo su equipo por la determinación de las pruebas *in vitro* de los compuestos sintetizados.

Al Dr. Alfredo Téllez Valencia y su equipo por la realización de las pruebas de inhibición enzimática de los compuestos sintetizados.

A mis amigos: Viri Zup, Sam y Sujhey, por los gratos momentos que pasamos juntos, todas las risas, las horas de laboratorio que fueron pura diversión (y claro que hacíamos las prácticas) y las buenas charlas juntos, se los agradezco chicos.

A todos los del hospicio: Gaby (te quiero mucho amiga); Lalo, Rojo, Joel, Macedo, Pancho, Luis, Rodolfo, Tomas (por las largas retas de fútbol); Rocío (por haber estado a mi lado mucho tiempo y soportarme, muchas gracias); Susy, Laura, Diana Leticia. Y a los que fui conociendo: Paulina, Diana Rivera, Viri Luna, Narda, Carlos, Luz, Karla, Piby, Viri Calzada, les agradezco su amistad.

Y a las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de esta tesis y en general a mi formación profesional o personal, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Epidemiología de la Amebiasis	2
2.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	2
2.2.1. Morfología	2
2.2.2. Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
2.2.3. Sintomatología	4
2.3. Tratamiento	5
2.3.1. Mecanismo de acción de los nitroimidazoles	6
2.3.2. Limitaciones de los nitroimidazoles	7
2.4. Bencimidazoles como compuestos alternativos	7
2.5. Diseño de Fármacos	8
2.5.1. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)	9
2.5.1.1. Acoplamiento molecular (docking)	10
2.5.1.2. Diseño de novo	12
2.6. Aplicación de la Síntesis Orgánica Asistida por Microondas en el desarrollo de fármacos	13
2.7. Desarrollo de nuevos agentes anti- <i>E. histolytica</i>	14
2.7.1. Triosafofato Isomerasa (TIM) como blanco para el diseño de fármacos	14
2.7.2. La interfaz de la TIM como blanco para el diseño de fármacos	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo General	22
5.2. Objetivos particulares	22
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Parte química	24
6.2. Parte biológica	31
6.2.1. Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> para protozoarios	31
6.2.2. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma brucei</i>	31
6.3. Parte computacional	32
6.3.1. Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización	32

6.3.2. Consideraciones previas para el diseño de ligandos	32
6.3.2.1. Preparación de los ligandos	33
6.3.2.2. Preparación de la proteína	33
6.3.2.3. Acoplamiento molecular	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1. Parte química	34
7.1.1. Obtención del ácido 1-metil-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxílico (9)	44
7.1.2. Obtención de los compuestos ácido 6-cloro-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (18) y ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxílico (25)	47
7.1.3. Obtención del intermediario común [6-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]amina (30)	51
7.1.4. Obtención de las carboxamidas finales B3 , B4 y B6	54
7.1.5. Caracterización de las carboxamidas finales B3 , B4 y B6	55
7.1.5.1. Caracterización de la carboxamida B3	55
7.1.5.2. Caracterización de la carboxamida B4	59
7.1.5.3. Caracterización de la carboxamida B6	63
7.2. Parte biológica	68
7.2.1. Ensayos de susceptibilidad <i>in vitro</i> en los parásitos	68
7.2.1. Ensayos de inhibición enzimática <i>in vitro</i> con Triosafosfato Isomerasa ...	72
7.3. Parte computacional	75
7.3.1. Diseño de nuevas moléculas afines a la interfaz de la EhtIM como agentes inactivantes. Diseño <i>de novo</i>	78
7.3.1.1. Diseño <i>de novo</i> propio	78
7.3.1.2. Biblioteca de fragmentos	82
8. CONCLUSIONES	88
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
10. APÉNDICE	96
10.1. PARTE EXPERIMENTAL	96
10.2. ESPECTROS	125

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por helmintos y protozoarios representan en la actualidad un severo problema de salud en todo el mundo, afectando principalmente a países en vías de desarrollo y en menor grado a países desarrollados.

La Organización Mundial de la Salud estima que más de la mitad de la población mundial está infectada con parásitos, principalmente por helmintos y ameba; siendo la amebiasis la segunda enfermedad parasitaria más importante en el mundo y la primera en México.

Si bien la mortalidad por parasitosis es baja, presentando hasta cien mil muertes por año para amebiasis, la magnitud del número de personas infectadas, su alta prevalencia y su amplia distribución mundial debido al flujo de la población hacen comprender la magnitud del problema.

Aún cuando en la actualidad existen fármacos disponibles para combatir enfermedades causadas por protozoarios tales como los derivados nitroimidazoles y del bencimidazol, algunos estudios relacionados con su toxicidad y la generación de resistencia a los fármacos de elección, hacen indispensable continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria. El empleo de técnicas avanzadas como el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC) es una opción de vanguardia para el diseño y optimización de moléculas biológicamente activas. Cuando se tiene un blanco o diana biológica, como lo sería una enzima de alguna vía metabólica vital para el parásito, una de las metodologías computacionales más usadas es el acoplamiento molecular o *docking*.

El propósito del presente trabajo es la síntesis de carboxamidas bencimidazólicas potencialmente inhibidoras de la enzima triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica* (EhTIM) diseñadas por *docking*, así como el aprendizaje de la metodología computacional aplicada para su diseño, además de continuar con los estudios exploratorios de acoplamiento molecular para tratar de explicar los resultados experimentales obtenidos y proponer nuevas moléculas que presenten afinidad por la EhTIM.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la Amebiasis

Las parasitosis intestinales causadas por helmintos y protozoarios son un problema de salud en el mundo, afectando sobre todo a países que están en vías de desarrollo. Se estima que más de 3 mil millones de personas padecen algún tipo de parasitosis.¹

La protozosis con mayor incidencia en el mundo es la Amebiasis, causada por el parásito *Entamoeba histolytica*, siendo la segunda causa de infección y muerte ocasionada por parásitos en el mundo. Se han reportado 500 millones de personas que están infectadas por el protozoario, de los cuales solo del 4 al 10% presentan síntomas clínicos, además se estima que 40 mil a 100 mil personas mueren cada año.¹ En México se reportaron 496 595 casos de Amebiasis en 2009, siendo la principal infección parasitaria en nuestro país.²

2.2. *Entamoeba histolytica*

Se conocen dos especies de *Entamoeba*, *Entamoeba dispar* una especie comensal y *Entamoeba histolytica*, la especie patógena presente en la mayoría de las afecciones.³ Esta clasificación surgió de las observaciones y trabajos de Brumpt (1925) y las investigaciones de Sargeant y colaboradores en individuos asintomáticos.

2.2.1. Morfología

Entamoeba histolytica presenta dos formas o fases en su desarrollo: la fase de quiste donde el parásito permanece latente o infectante, y la fase de trofozoíto que corresponde a la fase invasiva.

Los quistes son de forma redonda u oval, miden entre 10-15 μm de diámetro con una pared retráctil que posee quitina. En su interior, tienen cuatro núcleos, glucógeno y cuerpos llamados cromatoides. Los quistes resisten los ácidos estomacales, viajan a través del intestino donde al llegar al íleon o colon maduran para desarrollarse a trofozoítos.

Los trofozoítos son muy móviles, miden de 10-50 μm de diámetro, son altamente pleomórficos y se reproducen por fisión binaria. El ambiente del colon es propicio para la invasión; sin embargo, cuando son excretados por el hospedero mueren rápidamente. Se alimentan por fagocitosis de bacterias, células de tejidos dañados y otras partículas.

La principal vía de obtención de energía del parásito es la glucólisis por conversión anaeróbica de glucosa a piruvato. El parásito no posee mitocondria, las enzimas de la vía glucolítica se encuentran en su citoplasma y se cree que muchas de ellas provienen por transferencia de genes de bacterias procariontas.³

2.2.2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*

El ciclo se observa en la **Figura 1**. La transmisión se puede dar de diferentes maneras:

- Al colocar cosas en boca que hayan estado en contacto con las heces de una persona infectada con *E. histolytica*.
- Al ingerir algo, como agua o los alimentos, que estén contaminados con *E. histolytica*.
- Al tocar y llevarse a la boca quistes adquiridos de superficies que están contaminadas con *E. histolytica*.

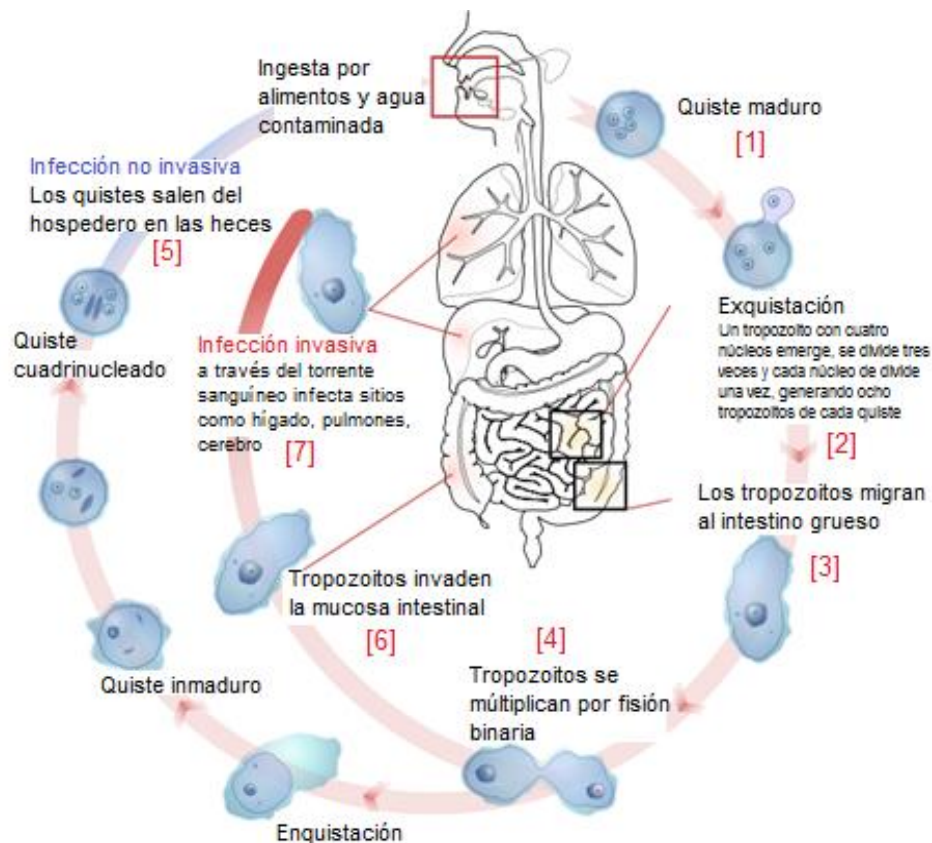


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.⁴

Los quistes y trofozoítos son transmitidos a través de las heces. Los quistes se encuentran generalmente en heces normales, mientras los trofozoítos se encuentran en heces diarreicas. La infección por *Entamoeba histolytica* se produce por la ingestión de quistes maduros presentes en los alimentos, el agua, o las manos con contaminación fecal [1]. La exquistación sucede en el intestino delgado [2] donde se liberan los trofozoítos, que migran al intestino grueso [3]. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria los cuales se pueden transformar a quistes, ambas formas se pasan en las heces [4]. A causa de la protección conferida por las paredes, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el ambiente externo y son responsables de la transmisión. Los trofozoítos en las heces son rápidamente destruidos una vez fuera del cuerpo y si se ingieren no sobreviven a la exposición al medio ambiente gástrico. En muchos casos, los trofozoítos permanecen en la luz intestinal del íleon o colon (infección no invasiva) de los individuos que son portadores asintomáticos, pasando quistes en sus heces [5]. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal) [6] y pueden pasar al torrente sanguíneo distribuyéndose a sitios extraintestinales, como el hígado, cerebro y pulmones (enfermedad extraintestinal) presentando manifestaciones patológicas [7].⁴

2.2.3. Sintomatología

Gastrointestinal. Muchos de los individuos infectados no presentan síntomas clínicos y pueden vivir sin signos por mucho tiempo. Sin embargo, del 4 al 10% de los infectados lo están con *E. histolytica*. Los síntomas comunes son diarrea, dolor abdominal y fiebre. Si la infección es grave se presenta colitis amébrica, donde la intensidad de la diarrea es mayor, hay presencia de sangrado en heces, pus, fiebre, pérdida de peso y anorexia, la cual si no es tratada debidamente puede desencadenar una colitis amébrica fulminante la cual es mortal en un 40% de los casos.

Hepática. El hígado es el órgano más afectado por la amebiasis extraintestinal formando abscesos en este órgano, la mortalidad es baja del 1 al 4% si se diagnostica y trata efectivamente. La formación de los abscesos puede tardar años sin que el portador los detecte o sienta algún malestar, hasta que éste es lo suficientemente grande, presentando fiebre, dolor en la región hepática e ictericia, pérdida de peso y anorexia en los casos crónicos.

Respiratoria. Se presenta tos, dolor de pecho y dificultad para respirar debido a la presencia del parásito en la pleura, ocasionado principalmente por la ruptura de abscesos en el hígado; la mortalidad ocurre en 30% de los pacientes.

Cerebral. La formación de abscesos en el cerebro es raro, presentándose en menos del 0.1% de los pacientes con abscesos en hígado. La sintomatología consiste en dolor de cabeza, vómito y cambios de conducta. El progreso es rápido y la mitad de los pacientes muere.^{3,4}

2.3. Tratamiento

En la década entre 1950 y 1960 se introdujeron al mercado los nitroheterociclos, fármacos que eran efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram positivas, gram negativas y protozoarios patógenos.^{3,5} Fue hasta 1966 donde se demostró que el metronidazol, fármaco nitroheterocíclico, era efectivo en la amebiasis; subsecuentemente surgieron nuevos fármacos para controlar la enfermedad. Los fármacos antiamebícos se clasifican en tres grupos: los que actúan a nivel del lumen intestinal, en tejidos cuando el parásito se disemina y los de acción mixta. El metronidazol es el fármaco de elección de los nitroheterociclos (a nivel sistémico o tejidos), y otros derivados nitroimidazolicos como el tinidazol, secnidazol y ornidazol también son efectivos (a nivel de lumen intestinal). El furoato de diloxanida, diiodohidroquina, paromomicina, la emetina, la cloroquina y la nitazoxanida también son usados como alternativas (actuando a nivel del lumen intestinal).^{7,8}

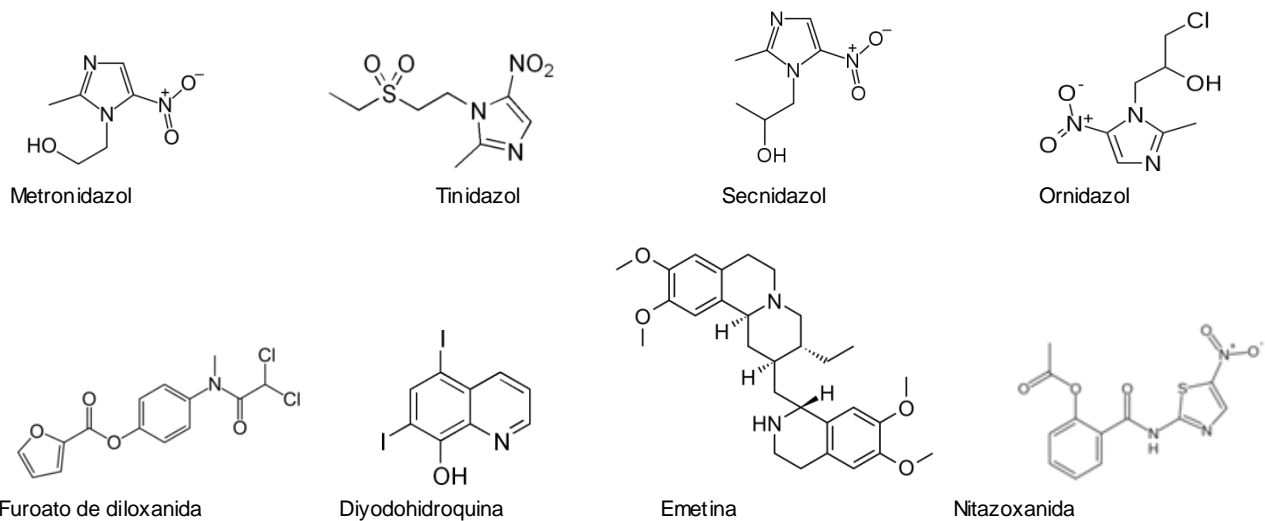


Figura 2. Estructura química de los fármacos de elección.

Los nitroimidazoles son efectivos en la fase de trofozoíto del parásito, pero no funcionan cuando el parásito se encuentra como quiste. El furoato de diloxanida y cloroquina se usan en pacientes asintomáticos y son efectivos en la fase de quiste. La cloroquina se puede usar con metronidazol y emetina para amebiasis hepática; sin embargo, la combinación con emetina aumenta la toxicidad.⁷

2.3.1. Mecanismo de acción de los nitroimidazoles

Los nitroimidazoles se reducen en el interior del parásito generando radicales nitro, compuestos citotóxicos de vida media corta, los cuales posteriormente se unen inespecíficamente al ADN y enzimas del parásito causando la muerte del mismo.

La vía de reducción de los nitroimidazoles para generar los radicales reactivos proviene de enzimas de vías metabólicas anaerobias, donde el complejo enzimático Ferredoxina-Piruvato: ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) transfiere electrones a los compuestos nitroimidazólicos generando especies reactivas de oxígeno los cuales atacarán al material genético y enzimas causando daño irreversible para posteriormente producir la muerte.^{5,6,9}

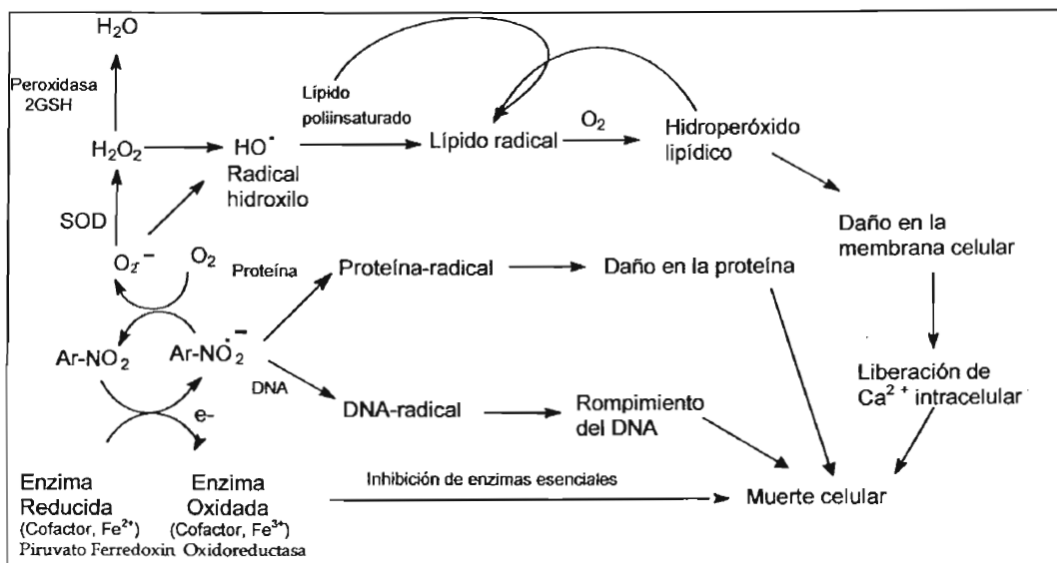


Figura 3. Vía propuesta para la reducción anaerobia de nitroimidazoles.

2.3.2. Limitaciones de los nitroimidazoles

Los efectos adversos son comunes en este tipo de compuestos, éstos incluyen náuseas, vómito, sabor metálico, diarrea y anorexia. Los efectos más graves se reportan en el sistema nervioso central los cuales incluyen neuropatía periférica, ataxia, vértigo, dolores de cabeza, confusión y convulsiones. Aún no hay suficientes estudios que indiquen actividad carcinogénica o teratogénica de los nitroimidazoles; no obstante, se ha reportado actividad genotóxica en 48 compuestos en estudios con microorganismos.⁵

La presencia de mecanismos de resistencia a estos compuestos presentes en cepas aisladas ha aumentado significativamente, haciendo ineficientes los tratamientos. Estudios en las cepas aisladas muestran reducción e incluso pérdida en la expresión de enzimas que activan a los nitroimidazoles, tales como ferredoxina o la PFOR, así mismo hay evidencia de aumento de glicoproteína P, la cual expulsa a los fármacos del interior del parásito, y recientemente se ha detectado la presencia de superóxido dismutasa y peroxiredoxina las cuales son enzimas antioxidantes que evitan la formación de las especies reactivas.^{5,7}

2.4. Bencimidazoles como compuestos alternativos

Los bencimidazoles se introdujeron al mercado primeramente para controlar infecciones por nemátodos en animales; su amplio espectro, baja toxicidad y eficacia los hicieron fármacos de elección como antihelmínticos de uso en humanos.¹⁰ El primer bencimidazol que se introdujo para infecciones en humanos fue el tiabendazol en 1961, efectivo pero con muchos efectos adversos. Posteriormente se generaron nuevos bencimidazoles 2-carbamatos de metilo (BC) como el mebendazol y el albendazol que tuvieron un gran éxito debido a que podían eliminar céstodos y tremátodos. Estos compuestos son muy efectivos, los efectos adversos son mínimos y presentan baja toxicidad, por lo que son de uso común en la clínica para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

Si bien estos compuestos son efectivos, la baja solubilidad y rápido metabolismo limitan esta efectividad, haciendo que las dosis sean altas por tiempos prolongados; como por ejemplo en infecciones extraintestinales como la neurocisticercosis.¹¹

El mecanismo de acción por el cual actúan los bencimidazol-carbamatos es inhibiendo la polimerización de la tubulina en los microtúbulos del parásito generando pérdida de funciones enzimáticas y de movimiento llevando a la muerte. También participan impidiendo la toma de glucosa exógena consumiendo el glucógeno endógeno lo cual consume el ATP producido; y algunos pueden inhibir la enzima fumarato reductasa bloqueando la formación de succinato el cual es necesario para generar ATP.^{6, 13, 14}

Se ha demostrado que también los bencimidazoles presentan actividad contra protozoarios.^{11, 12} Trabajos reportados por el grupo de investigación del laboratorio 122 del departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM, han sintetizado y evaluado algunos derivados de bencimidazol, no carbamatos, que han sido efectivos en pruebas *in vitro* en protozoarios incluyendo *E. histolytica*. Muchos de estos compuestos presentaron mayor actividad que el metronidazol.^{15, 16}

2.5. Diseño de Fármacos

Por cientos de años el hombre hizo uso de compuestos químicos procedentes en su mayoría de plantas para aliviar sus afecciones, los cuales fueron descubiertos por observación o serendipia. Fue hasta el siglo XIX que la revolución en la química sintética permitió identificar las estructuras de los compuestos activos presentes en los “remedios”; el aislamiento de éstos permitió realizar modificaciones para hacerlos más efectivos. Los compuestos activos ahora se conocen como moléculas líder. Desde entonces el diseño de moléculas activas procura basarse en un conocimiento racional.

El desarrollo de nuevas moléculas bioactivas ha seguido diversas estrategias para encontrar nuevas moléculas líder, algunas son:

- Modificación estructural de moléculas activas: usando metodologías como alargamiento de cadenas, hibridación molecular, cambios bioisostéricos.
- *High Throughput Screening* (HTS): evaluación de una gran cantidad de compuestos en blancos macromoleculares para probar su actividad biológica.
- Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC): diseño de moléculas usando métodos computacionales.

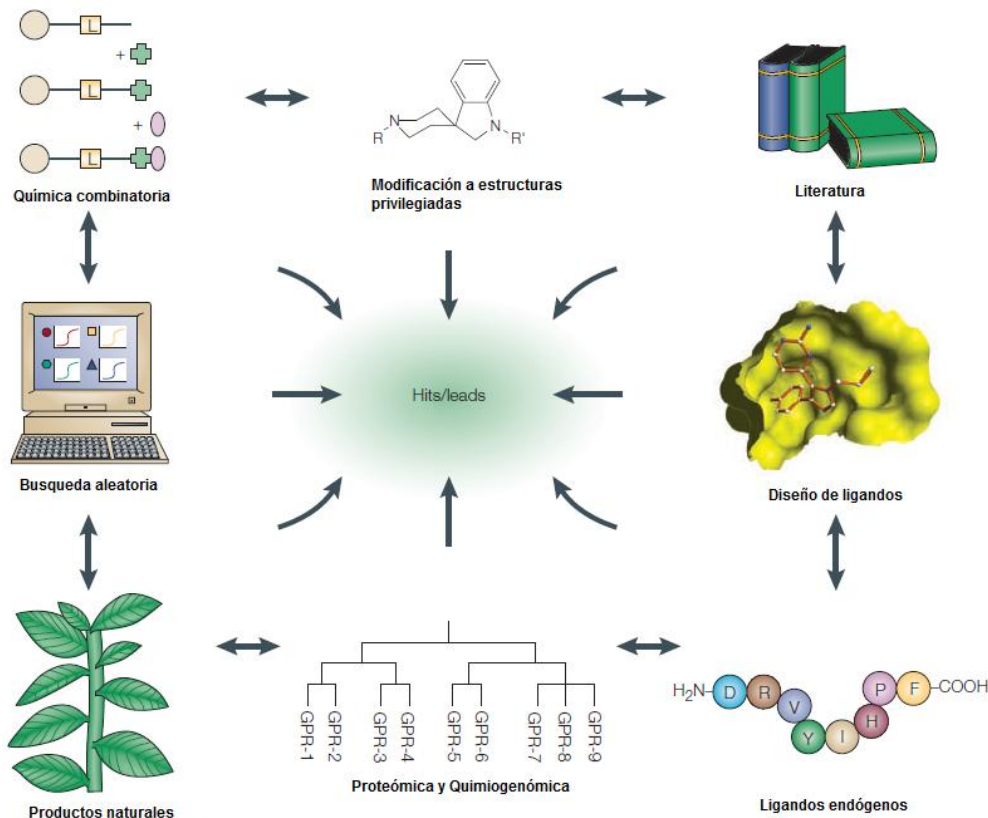


Figura 4. Diversas estrategias para la identificación de *hits*.¹⁷

2.5.1. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)

El DiFAC emplea diversas técnicas, métodos y algoritmos computacionales para relacionar la actividad biológica de una molécula con su estructura química, con esta disciplina del diseño racional de fármacos se pueden identificar y optimizar compuestos. Los métodos computacionales se basan en la idea de que las moléculas bioactivas actúan por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, estéricas y puentes de hidrógeno con una macromolécula-receptor (blanco) involucrada en un proceso de la enfermedad.^{18, 19}

Se utilizan dos estrategias para el descubrimiento y optimización de prototipos moleculares: cuando no se conoce la estructura del receptor pero se conoce la estructura de una serie de moléculas con la misma actividad biológica, conocido como **diseño basado en el ligando** (relaciones estructura-actividad); y cuando se conoce la estructura del blanco o receptor, comúnmente se usan métodos derivados del **diseño basado en el receptor** (acoplamiento molecular y diseño *de novo*).^{20, 21, 22}

2.5.1.1. Acoplamiento molecular (*docking*)

Cuando se conoce la estructura del receptor (ya sea por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o modelado por homología), el acoplamiento molecular es la técnica para el escaneo virtual (*virtual screening*) más frecuentemente empleada.^{23, 24} Con el acoplamiento molecular se estudia la conformación y orientación del ligando dentro del receptor, generalmente medido en unidades de energía. La energía de unión del complejo ligando-receptor (que puede ser expresada en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs, ΔG) generalmente considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno así como desolvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.²⁵

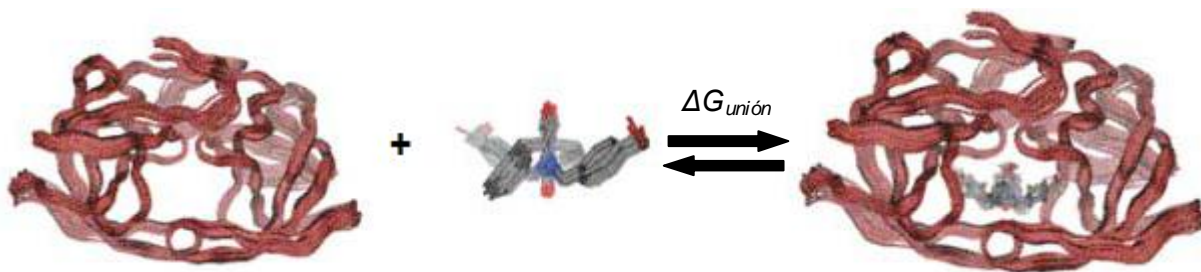


Figura 5. Ejemplificación de la metodología del *docking*.²³

El acoplamiento molecular se puede llevar a cabo de varias maneras; sin embargo, todos los métodos de acoplamiento molecular constan de dos partes principales: el método de búsqueda y la evaluación de los resultados. El procedimiento más empleado consiste básicamente en tres pasos: representación del sistema en el espacio por medio de mallas (*grid*) que contienen la información de la contribución energética del receptor para la unión del ligando; la búsqueda del espacio conformacional accesible al ligando (permitiendo encontrar las diferentes conformaciones y orientaciones del ligando en el receptor), y la evaluación de las soluciones obtenidas por medio de funciones de evaluación. Éstas permiten calcular un puntaje (por ejemplo, la energía libre de unión) del complejo formado.^{26,}

²⁷

En el caso del programa *Autodock*®, la energía de unión se describe en términos aditivos de varios componentes que contribuyen a la energía de formación del complejo ligando-receptor, mostrados en la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{t/r}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

donde:

$\Delta G_{\text{disolvente}}$ es la contribución debida a efectos del disolvente, como interacciones disolvente-ligando, disolvente-proteína y disolvente complejo ligando-receptor.

$\Delta G_{\text{conformación}}$ es la energía debida a cambios conformacionales en la proteína y el ligando.

$\Delta G_{\text{interacción}}$ es la energía libre asociada a las interacciones ligando-receptor.

$\Delta G_{\text{rotación}}$ es la pérdida de energía asociada a la pérdida de grados de libertad de rotación interna de la proteína y el ligando.

$\Delta G_{\text{t/r}}$ es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.

$\Delta G_{\text{vibración}}$ corresponde a los cambios de energía libre debido a cambios en los modos vibracionales.

La técnica de acoplamiento molecular es una técnica que ha adquirido relevancia en la búsqueda de nuevas moléculas, ya que se pueden evaluar miles o millones de compuestos *in silico* obteniendo *hits* computacionales, esta evaluación se conoce como *virtual screening*.²⁸ La aplicación de “filtros”, como criterios estándar o de relevancia biológica atribuidos a los fármacos, permiten mejorar la búsqueda para la selección de los *hits* los cuales pueden ser candidatos para pruebas subsecuentes.²⁹

Actualmente se analizan bibliotecas moleculares virtuales, en las cuales se encuentran miles o millones de estructuras, ejemplos de ellas son:

- ZINC: más de 13 millones de compuestos disponibles, de libre acceso. (<http://zinc.docking.org/>).
- Instituto Nacional del Cáncer (NCI): 250 000 compuestos. (<http://dtp.nci.nih.gov>).
- Drug Bank: 4 800 compuestos (<http://www.drugbank.ca/>).

Así mismo, técnicas recientes en el estudio de acoplamiento de múltiples moléculas pequeñas o fragmentos y modelado de farmacóforo basado en la estructura permiten diseñar *de novo* estructuras para la generación de nuevas bibliotecas virtuales (bibliotecas con estructuras nuevas).^{30, 31}

2.5.1.2. Diseño *de novo*

El diseño *de novo* utilizando fragmentos es una estrategia usada recientemente para el descubrimiento de nuevos fármacos, se utilizan partes de moléculas (átomos, grupos funcionales o fragmentos moleculares de bajo peso molecular) conocidos como bloques de construcción o “*building blocks*” que han mostrado cierta actividad biológica.^{32, 33} A los fragmentos seleccionados se les calcula su afinidad por métodos computacionales (*virtual screening*) en ciertas porciones de una proteína blanco y después se unen mediante conectores químicos o directamente para construir un ligando. Los ligandos generados luego se someten a optimización usando técnicas de dinámica molecular, algoritmos genéticos y de evolución, y algoritmos de puntos múltiples con el propósito de obtener nuevas moléculas líder (*leads*).³⁴

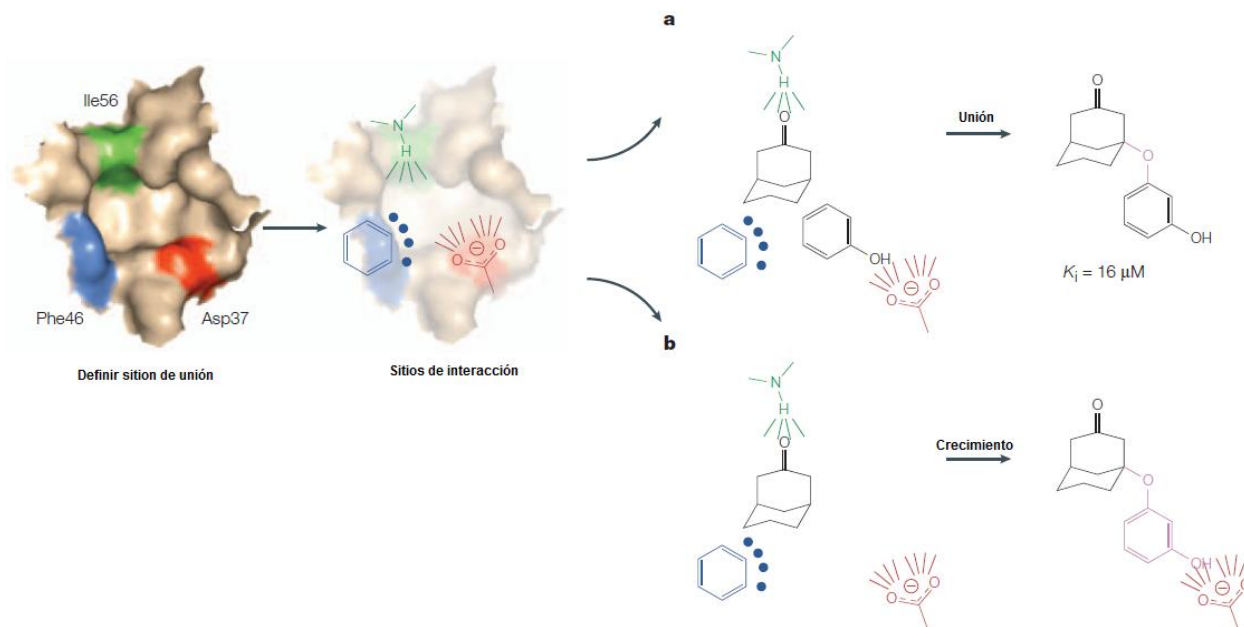


Figura 6. Principio del diseño de ligandos basado en fragmentos. Identificación del sitio de unión y de los residuos de interacción. Evaluación de un conjunto de fragmentos. (a) Formación de los ligandos por unión directa o por conectores; (b) por adición de estructuras para favorecer interacción.³⁵

2.6. Aplicación de la Síntesis Orgánica Asistida por Microondas en el desarrollo de fármacos

Actualmente la obtención de nuevas moléculas líder o bien fármacos está caracterizada por la falta de eficacia en los procesos de síntesis para la obtención de los mismos. Los métodos tradicionales de *High Throughput Screening* que evalúan miles de compuestos en determinadas blancos farmacológicos y el surgimiento de nuevas tecnologías de cómputo que permiten generar librerías virtuales de miles de estructuras hacen que la obtención de estas moléculas quede rezagado, lo cual conlleva a la tardía identificación de posibles moléculas activas.

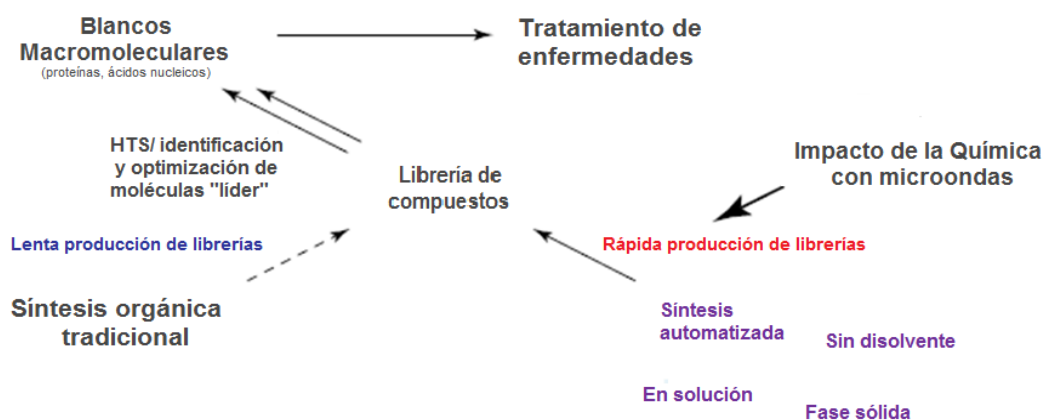


Figura 7. Impacto que tiene la SOAM en proceso de descubrimiento de fármacos.³⁶

La síntesis orgánica asistida por microondas (SOAM) es una nueva metodología en donde debido al calentamiento más eficiente y por efecto de la energía de microondas, permite obtener de manera más rápida y eficiente, además de que esta técnica permite realizar múltiples reacciones a la vez agilizando los procesos de sintéticos.

El impacto que ha tenido la SOAM en la investigación química se ve reflejada en la rapidez de los procesos de obtención de moléculas, la simplicidad de los ensayos y su alta productividad.^{37, 38}

2.7. Desarrollo de nuevos agentes anti-*E. histolytica*

2.7.1. Triosafosfato Isomerasa (TIM) como blanco para el diseño de fármacos

La glucólisis es una vía metabólica en donde la glucosa se degrada a piruvato. Está presente en organismos aerobios y anaerobios, el proceso se lleva a cabo en el citoplasma celular. Se ha propuesto que las enzimas que participan en la glucólisis pueden ser un blanco para el diseño de fármacos.³⁹ El parásito *E. histolytica* obtiene energía sólo de la vía glucolítica, por tal razón, si se bloquea la producción de energía en el parásito éste conduciría a su muerte.⁴⁰

La Triosafosfato Isomerasa (TIM), enzima participante en la vía glucolítica, cataliza la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona-3-fosfato (DHAP). La DHAP necesita ser convertida a G3P por acción de la TIM para continuar la ruta de la glucólisis.

En humanos, mutaciones en el gen que regula la expresión de la TIM pueden causar acumulación de DHAP y de otros intermediarios, lo cual causa degeneración neuromuscular y la muerte.⁴¹

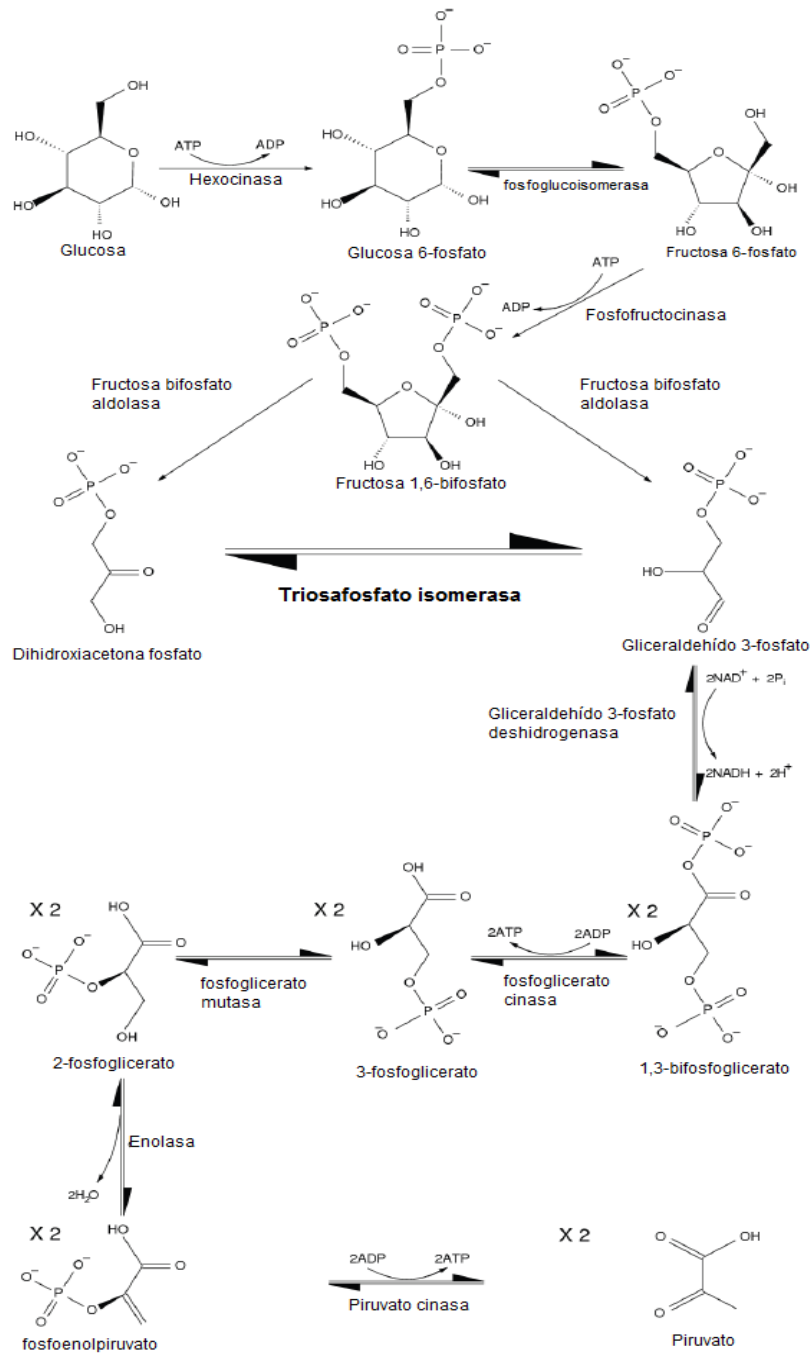


Figura 8. Diagrama de la glucólisis. Se resalta la actividad catalítica de la TIM.

Morfológicamente, la TIM es una enzima homodimérica con estructura de barril (α - β)₈, con excepción de *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus* organismos en los que la enzima se encuentra en forma tetrámero.⁴² Cada subunidad se constituye por 8 láminas β -plegadas y 8 α -hélices unidas por 8 asas (*loops*), además cada monómero tiene un sitio activo y la enzima sólo es activa en la forma dimérica.⁴³

Los residuos del sitio catalítico implicados en la interconversión de DHAP y G3P están altamente conservados en todas las especies incluyendo la de humano. Estos residuos son: ácido glutámico (Glu), histidina (His) y lisina (Lys). En particular para *E. histolytica*, éstos corresponden a Glu174, His102 y Lys13. El mecanismo catalítico propuesto ocurre vía la formación de un intermediario endiol o endiolato, en donde la cadena lateral del residuo Glu174 toma un protón del C1 de la DHAP, el par electrónico se deposita en el C2 formando un doble enlace y el oxígeno-2 toma un protón unido al nitrógeno de la His102 formando el endiol. Posteriormente la carga negativa del átomo de nitrógeno de la His102 toma el protón del oxígeno-1, el par electrónico se deposita en el C1 y el Glu174 deposita el protón en el C2 para convertirlo en G3P.^{44, 45, 46, 47}

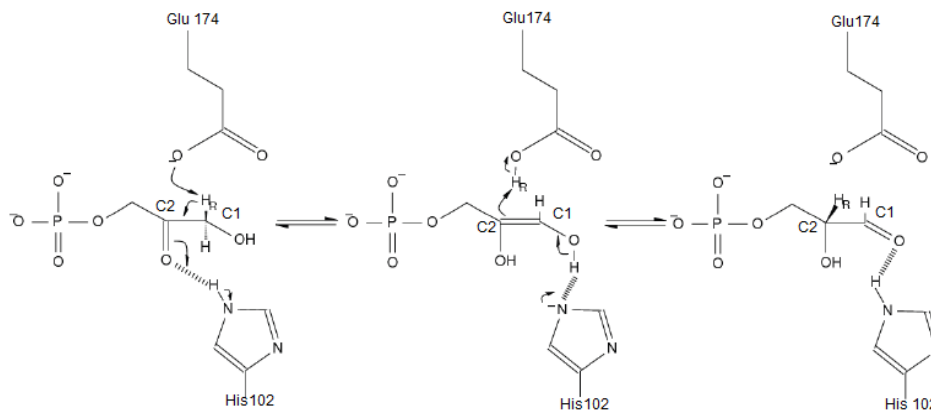


Figura 9. Mecanismo para la interconversión de DHAP a G3P.

Existen diversos trabajos sobre la inactivación experimental de la TIM. Por ejemplo, el uso de inhibidores suicidas basados en intermediarios sintéticos de DHAP y G3P; sin embargo, han tenido poco éxito ya que son poco selectivos. Otra manera es realizando modificaciones en la cisteína de la interfaz dimérica con metilmetanosulfonato, ya que este residuo está

presente sólo en la enzima del parásito y es fundamental para la estabilidad y función de la enzima; a pesar de esto, este agente se puede unir a otras enzimas con residuos de cisteína.⁴⁸

La inactivación alostérica ha mostrado buenos resultados, ya que pequeños péptidos y moléculas se unen a la interfaz modificando el sitio activo y disminuyendo la actividad.⁴⁹

2.7.2. La interfaz de la TIM como blanco para el diseño de fármacos

Diversas proteínas en los seres vivos realizan sus funciones siendo oligoméricas, es decir, son asociaciones de subunidades. La asociación o disociación en las proteínas permite regular su función, además el buen funcionamiento puede ser provocado o detenido a través de la comunicación alostérica entre subunidades.⁴⁹ Debido a que el sitio catalítico está conservado en todas las especies, incluyendo el humano, la búsqueda de otro sitio de unión es necesaria para el diseño de fármacos.

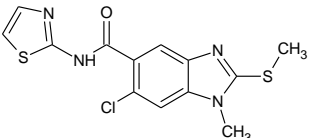
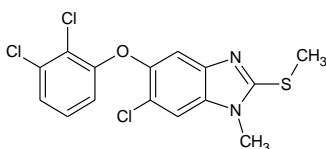
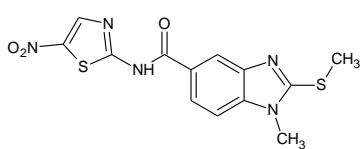
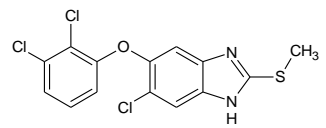
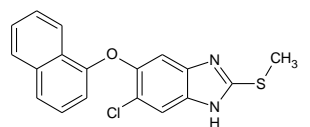
Los aminoácidos presentes en la interfaz de unión de los monómeros que conforman la forma activa de la TIM juegan un papel importante en la estabilidad y función de ésta, por lo que estas características pueden ser aprovechadas para el diseño de moléculas que puedan interactuar en la interfaz e inhibir la actividad catalítica de la TIM.

Se han reportado varios ejemplos en los que se han utilizado moléculas que actúan a nivel de la interfaz. El uso de pequeños péptidos que se introducen e inactivan a la TIM de *Plasmodium falciparum* (PfTIM)⁵⁰, al igual que algunos colorantes aniónicos⁵¹ y moléculas aisladas de extractos naturales han mostrado afinidad en la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM).⁵²

En estudios recientes usando el acoplamiento molecular con las estructuras cristalográficas de las TIM de PfTIM, TcTIM, EhTIM y humano (HsTIM) se han evaluado derivados de benzotiazol para explicar los modos de unión de estos derivados en la interfaz de la TIM y determinar de manera teórica la selectividad de los derivados con las enzimas del parásito y la del humano.^{53, 54, 55}

En nuestro grupo de investigación, se evaluó experimentalmente, el efecto sobre la actividad de la EhTIM de 97 compuestos a una concentración de 250 μ M, la mayoría de los compuestos eran derivados de bencimidazol y otros intermediarios de su síntesis.⁵⁶ Los resultados de esta evaluación permitieron estudiar de manera computacional la forma en que los compuestos activos interactúan con la enzima EhTIM (**Tabla 1**).

Tabla 1. Moléculas activas frente a la EhTIM en estudios *in vitro* y resultados de *docking* en las enzimas del parásito y humano.⁵⁶

Compuesto	Estructura	% actividad residual de la EhTIM	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM
1		47	9.03	10.18
2		46	8.64	9.80
3		42	9.51	9.93
4		55	8.38	9.50
5		34	10.15	9.95

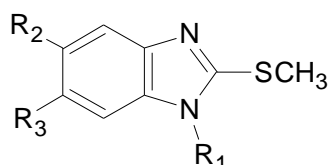
A partir de este estudio se diseñaron 83 nuevas estructuras, cuya característica es el tamaño de las moléculas, las cuales presentan el doble de tamaño que los bencimidazoles probados, con el objetivo de cubrir la interfaz y tener un mayor efecto de inhibición en la enzima.

Este cambio estructural brindó información sobre el modo de interacción de los ligandos en la enzima de *E. histolytica* y humano.

Una serie de seis compuestos derivada de este estudio, designados como **B1-B6**, fue candidata para ser sintetizada y evaluada en las enzimas de ambos organismos.

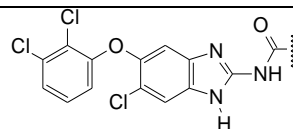
En la **Tabla 2** se muestran los resultados del estudio de los compuestos diseñados (**B1-B6**) por *docking*, así como su energía de unión a la EhTIM y HsTIM y la diferencia energética entre ambas. Todos los compuestos propuestos son estructuralmente amidas en donde la parte ácida es un bencimidazol, lo mismo que la parte de la amina.

Tabla 2. Compuestos (**B1-B6**) diseñados por *docking* como inhibidores de la TIM de *E. histolytica*.⁵⁶



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	EhTIM	HsTIM	ΔΔG(ΔG _{EhTIM} -ΔG _{HsTIM})
				(-) ΔG _{unión} (Kcal/mol)	(-) ΔG _{unión} (Kcal/mol)	(Kcal/mol)
B1	H	DFBAC	H	-10.71	-8.38	-2.33
B2	CH ₃	DFBAC	H	-9.99	-9.11	-0.88
B3	CH ₃	H	DFBAC	-11.25	-8.76	-2.49
B4	H	DFBAC	Cl	-10.09	-8.67	-1.42
B5	CH ₃	DFBAC	Cl	-8.9	-9.5	0.6
B6	CH ₃	Cl	DFBAC	-10.65	-9.28	-1.37

DFBAC: 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]aminocarbonilo



Debido a estos datos computacionales previamente obtenidos, es interesante llevar a cabo la síntesis de algunas de estas propuestas para evaluar su potencial como inhibidores de la TIM.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado el problema actual que representa la amebiasis para la salud, buscar nuevos agentes amebicidas surge como necesidad para tratamientos más eficaces contra la enfermedad. Si bien actualmente se dispone de fármacos que combaten las enfermedades causadas por parásitos, tales como los nitroheterociclos y derivados del bencimidazol, hay datos que señalan la aparición de resistencia de los parásitos hacia estos fármacos así como indeseables propiedades farmacocinéticas que presentan, como baja solubilidad y rápido metabolismo, hacen poco eficaces los tratamientos contra la enfermedad. Con estos problemas presentes es indispensable el desarrollo de nuevas opciones al tratamiento, como es la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria y de posibles blancos moleculares, para de esta manera hacer más eficiente la terapia en la enfermedad.

Nuevas técnicas están siendo utilizadas para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas. El DiFAC es una opción muy usada actualmente, y dentro de las técnicas que se utilizan en DiFAC, el acoplamiento molecular (*docking*) permite evaluar diversos compuestos en un blanco biológico conocido, como por ejemplo una enzima como la TIM, involucrada en la vía metabólica vital para la obtención de energía con lo cual produciría la muerte del parásito. Los bencimidazoles han sido moléculas que han mostrado actividad antiparasitaria, por lo que se pueden diseñar y evaluar estas moléculas para determinar si pueden inhibir a la TIM.

Con los nuevos avances tecnológicos en química sintética una alternativa que es posible aplicar es la síntesis orgánica asistida por microondas para poder obtener de manera más rápida y eficiente los diversos compuestos previamente diseñados con posible actividad inhibitoria en esta enzima.

Con este precedente y con base en las características estructurales de los compuestos previamente diseñados, se pueden plantear las siguientes preguntas:

- ¿Los compuestos que estructuralmente son derivados de bencimidazol y que fueron diseñados por *docking* como inhibidores de la TIM tendrán actividad contra la EhTIM en estudios *in vitro*?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

- ¿Los compuestos propuestos serán activos contra *E. histolytica* en pruebas *in vitro*?
- ¿Al ser bencimidazoles, los compuestos diseñados tendrán actividad contra otros protozoarios como *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*?
- ¿Será posible diseñar nuevas moléculas que tengan buena afinidad por la EhTIM mediante la técnica de *docking*, las cuales estructuralmente puedan mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas?
- ¿Una biblioteca virtual de fragmentos podrá brindar estructuras para la generación de nuevas moléculas o bien optimizar las que se tienen?

4. HIPÓTESIS

Debido a que los compuestos fueron diseñados aplicando la metodología del *docking*, usando para ello la estructura tridimensional de la EhTIM en donde éstos cubren la interfaz de la enzima, entonces éstos mostrarán actividad inhibitoria sobre la enzima EhTIM. Así mismo, serán activos contra *E. histolytica* en pruebas *in vitro* y debido a sus características de tener dos núcleos de bencimidazol en su estructura serán activos sobre otros parásitos como *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

Por otro lado, se espera que los ligandos diseñados en nuevos estudios computacionales muestren una mayor afinidad por la enzima y que los estudios de acoplamiento molecular usando fragmentos proporcionen nuevas estructuras con posibilidades de inhibir a la EhTIM.

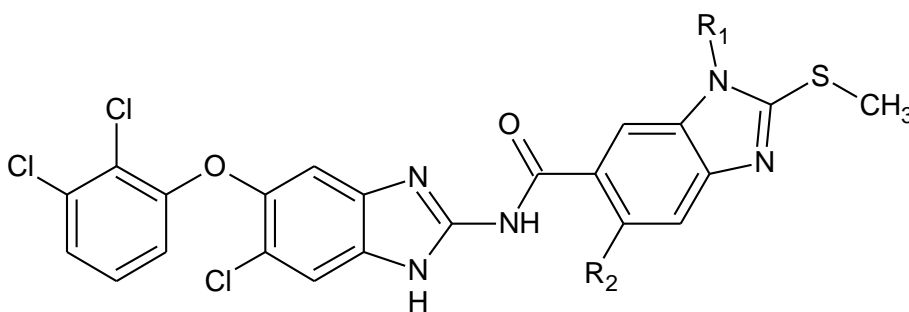
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Sintetizar las carboxamidas bencimidazólicas designadas como **B3**, **B4** y **B6** diseñadas por *docking*; evaluar su actividad antiparasitaria contra *E. histolytica* así como contra otros protozoarios como *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Así mismo, proponer nuevas estructuras como posibles agentes inhibidores de triosafosfato isomerasa utilizando la metodología del *docking* y por el diseño *de novo*.

5.2. Objetivos particulares

- Sintetizar y purificar las carboxamidas bencimidazólicas **B3**, **B4** y **B6**.



B3: $R_1=CH_3$, $R_2=H$

B4: $R_1=H$, $R_2=Cl$

B6: $R_1=CH_3$, $R_2=Cl$

- Determinar las constantes físicas y caracterizar estructuralmente los compuestos finales mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima EhTIM de las carboxamidas finales.
- Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* de las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6** contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.
- Optimizar algunos pasos de síntesis en la obtención de los compuestos finales usando el calentamiento por microondas.

- Estudiar de manera computacional mediante acoplamiento molecular (*docking*) la interacción de los compuestos con la enzima EhTIM.
- Proponer nuevas estructuras que puedan interactuar con la interfaz de TIM y de esta manera inhibir a la enzima.
- Determinar si los datos obtenidos con el *docking* pueden predecir adecuadamente los resultados de inhibición de la EhTIM de los compuestos sintetizados y de los nuevos a diseñar.
- Enriquecer la base de datos de compuestos antiparasitarios derivados del bencimidazol, de esta manera se puede establecer información del tipo relación estructura-actividad.

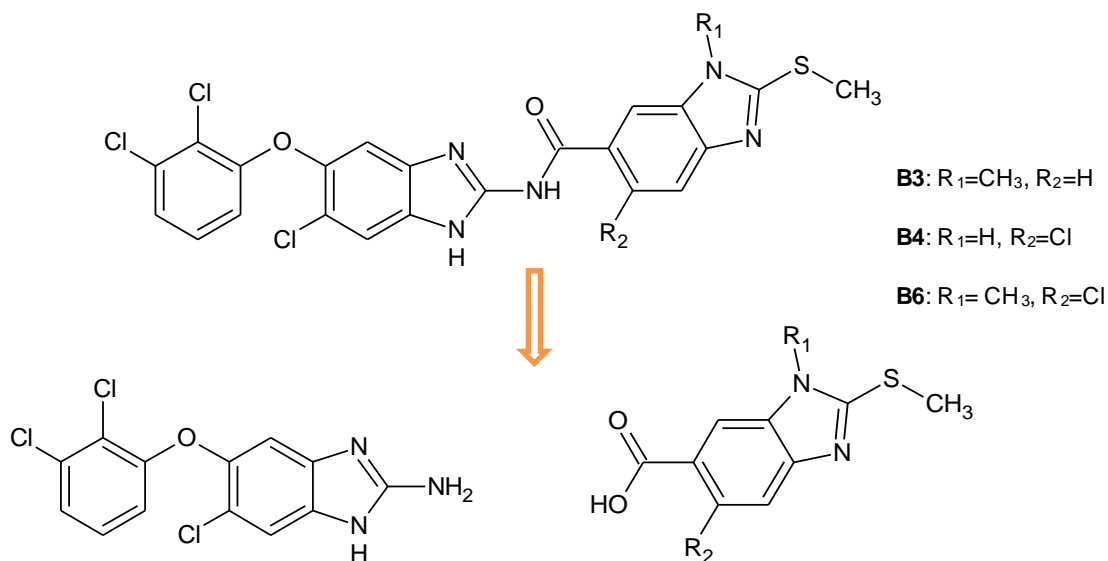
6. METODOLOGÍA

El trabajo realizado para esta tesis se dividió en tres partes operativas: la parte química, la parte biológica y la parte computacional. La parte química se llevó a cabo en el laboratorio 122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. María Alicia Hernández Campos. La parte computacional se realizó en el mismo sitio bajo la supervisión del M. en C. Antonio Romo Mancillas y con ayuda del QFB. Oscar Méndez Lucio. La parte de evaluación biológica de los compuestos finales sintetizados se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI, bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia; mientras que la parte de inhibición enzimática se realizó en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango, bajo la supervisión del Dr. Alfredo Téllez Valencia.

6.1. Parte química

La síntesis de los compuestos **B3**, **B4** y **B6** se propuso por un método convergente a partir de los ácidos bencimidazolcarboxílicos y la [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina como lo muestra el esquema de retrosíntesis (**Esquema 1**). La síntesis se desarrolló en tres partes.

1. Síntesis de los ácidos bencimidazolcarboxílicos precursores para la preparación de las carboxamidas finales.
2. Síntesis del compuesto precursor [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina.
3. Acoplamiento de los dos compuestos precursores para la formación de las carboxamidas propuestas **B3**, **B4** y **B6**.

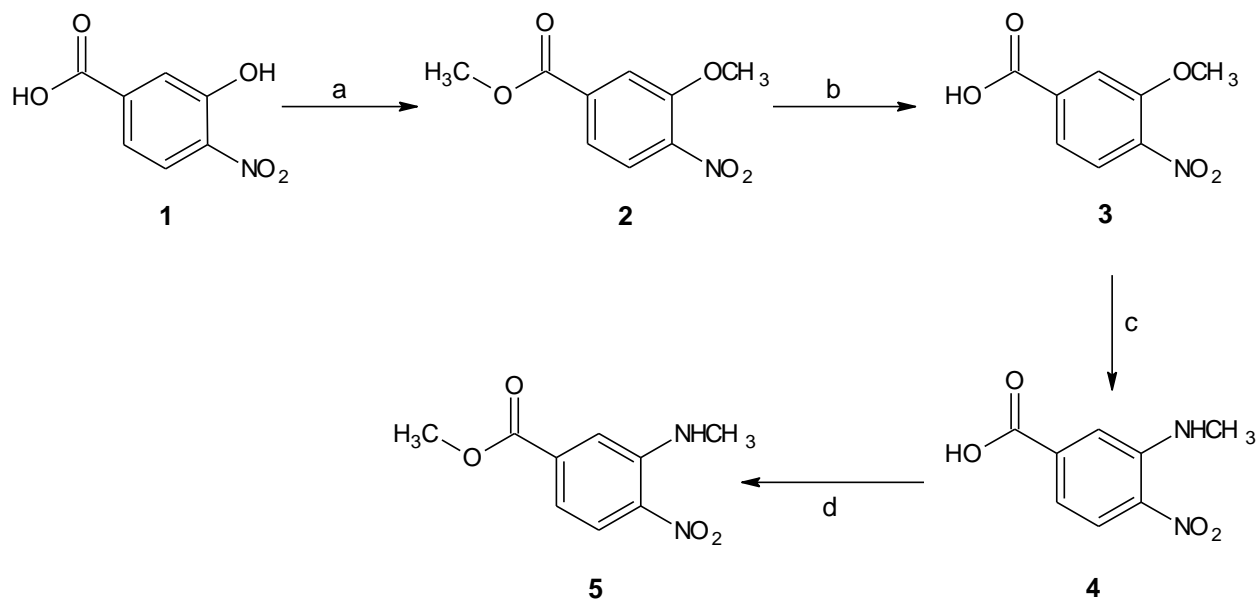


Esquema 1. Análisis retrosintético para los compuesto **B3**, **B4** y **B6**.

1. Síntesis de los ácidos bencimidazolcarboxílicos 9, 18 y 25 precursores para la preparación de las amidas finales

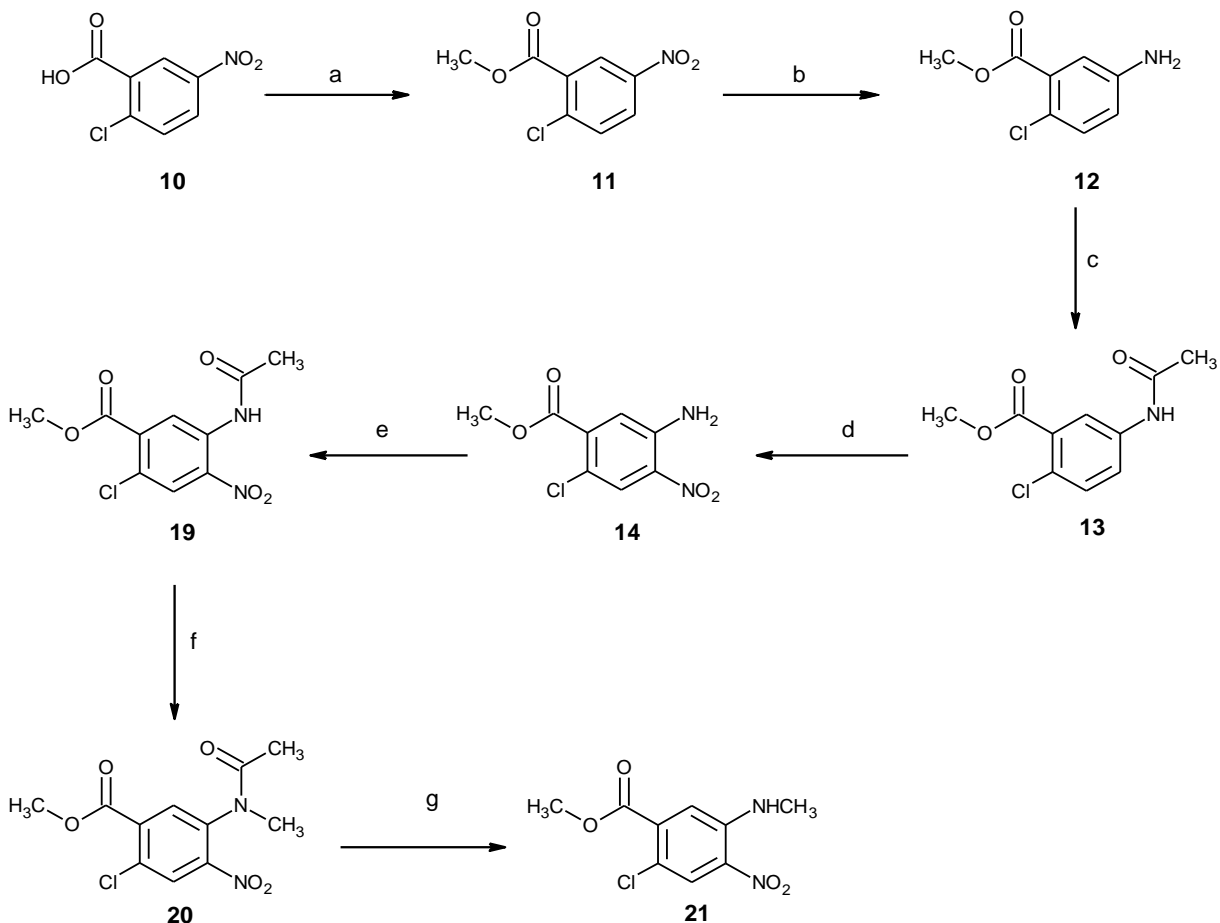
Para la obtención de estos compuestos se sintetizaron inicialmente los benzoatos de metilo adecuadamente sustituidos, siguiendo las rutas sintéticas mostradas en los **Esquemas 2 y 3**. Una vez obtenidos dichos compuestos se procedió a la preparación de los ácidos bencimidazolcarboxílicos siguiendo la ruta sintética mostrada en **Esquema 4**.

La obtención del benzoato de metilo **5** se inició usando el ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico comercial (**1**) el cual se dialquiló con sulfato de dimetilo en medio alcalino dando el 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (**2**), posteriormente se realizó una hidrólisis del grupo éster en medio alcalino y el posterior tratamiento en medio ácido generó el ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (**3**). Luego se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica aromática a presión con clorhidrato de metilamina en medio básico obteniendo como producto de sustitución el ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (**4**), el cual se esterificó con metanol y ácido sulfúrico generando el 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (**5**).



Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de **5**. (a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , acetona/agua; (b) 1) KOH , MeOH , Δ , 2) H^+ ; (c) $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{-HCl}$, K_2CO_3 , agua; (d) $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, reflujo.

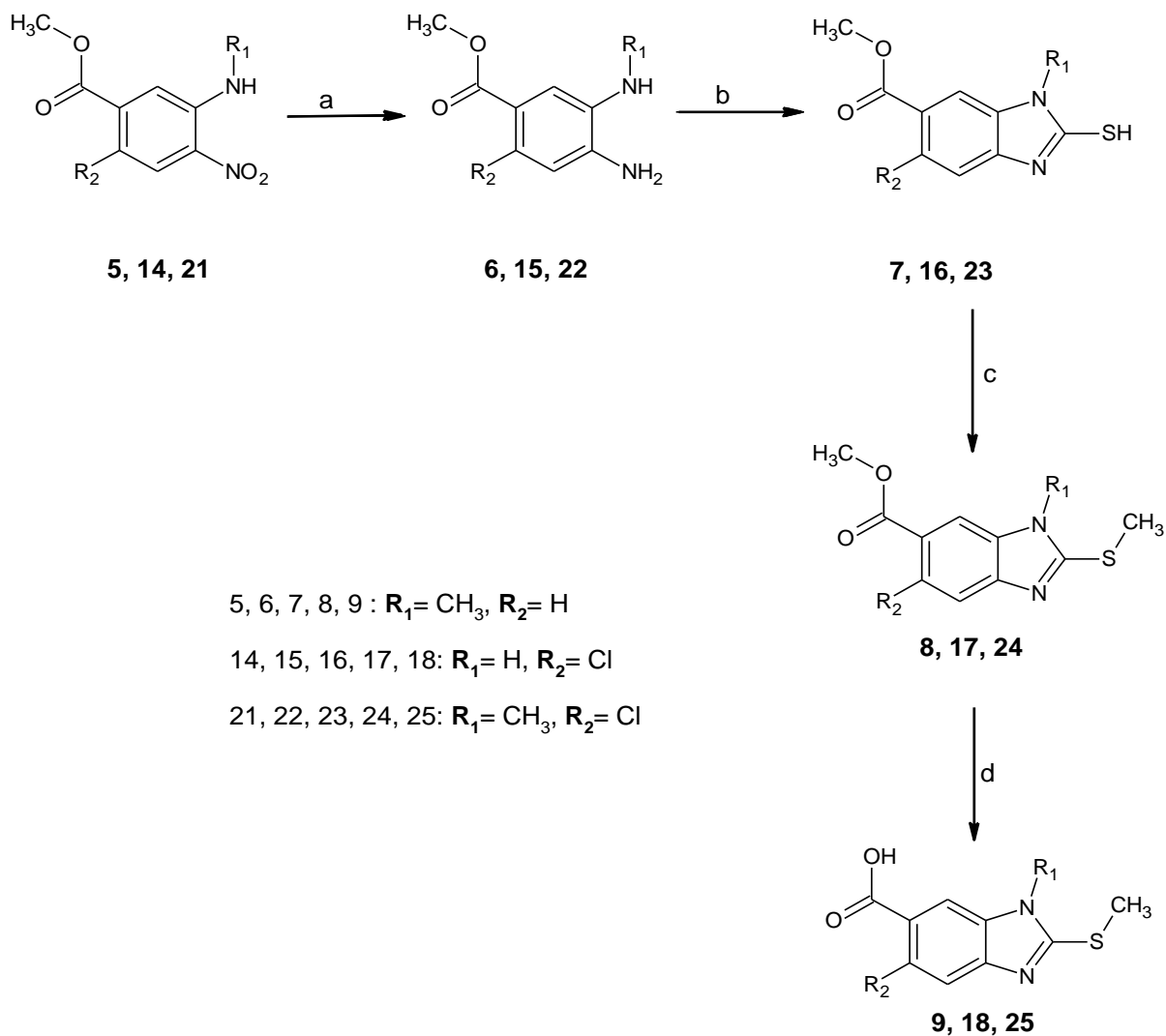
Para la obtención de los benzoatos de metilo **14** y **21**, se inició a partir del ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico comercial (**10**) el cual se esterificó con bicarbonato de sodio y sulfato de dimetilo para dar el 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**11**). Posteriormente, este se sometió a reducción catalítica utilizando hidrógeno a presión y Ni-Raney como catalizador en metanol generando el 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (**12**); este compuesto se acetiló con anhídrido acético obteniéndose el 5-acetilamino-2-clorobenzoato de metilo (**13**), seguido de una reacción de nitración usando mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas ($0\text{-}5\text{ }^\circ\text{C}$); se obtuvo el 5-acetilamino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**19**) mezclado con su isómero de posición, el compuesto nitrado en posición 2. El posterior tratamiento con ácido sulfúrico en solución metanólica dio el 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**14**). Posteriormente, para obtener el benzoato de metilo **21** se hizo reaccionar a **14** con anhídrido acético obteniendo así el 5-acetilamino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**19**), este se *N*-metiló con sulfato de dimetilo en medio básico dando el 5-(acetilmetil)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**20**). Finalmente se realizó una hidrólisis del grupo acetilo en medio alcalino obteniendo el 2-cloro-5-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (**21**).



Esquema 3. Ruta sintética para la obtención de **14** y **21**. (a) NaHCO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, DMF; (b) $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$, MeOH; (c) Ac_2O , H^+ ; (d) 1) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 0°C , 2) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, reflujo; (e) Ac_2O , H^+ ; (f) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaOH, glima; (g) KOH, MeOH

Una vez obtenidos los benzoatos de metilo adecuadamente sustituidos **5**, **14**, **21**, éstos se sometieron a hidrogenación catalítica a presión usando como catalizador Ni-Raney en metanol obteniendo así las diaminas **6**, **15** y **22** que inmediatamente se sometieron a una ciclocondensación en presencia de disulfuro de carbono en medio básico para obtener los 2-mercaptobencimidazoles **7**, **16** y **23**. Estos últimos se hicieron reaccionar con yodometano en potasa etanólica para de esta manera dar los 2-metilbencimidazoles carboxilato de metilo **8**, **17** y **24**.

Por último, los ésteres se hidrolizaron con potasa metanólica en caliente y posterior tratamiento con ácido sulfúrico diluido obteniéndose los ácidos bencimidazolcarboxílicos correspondientes **9**, **18** y **25**.

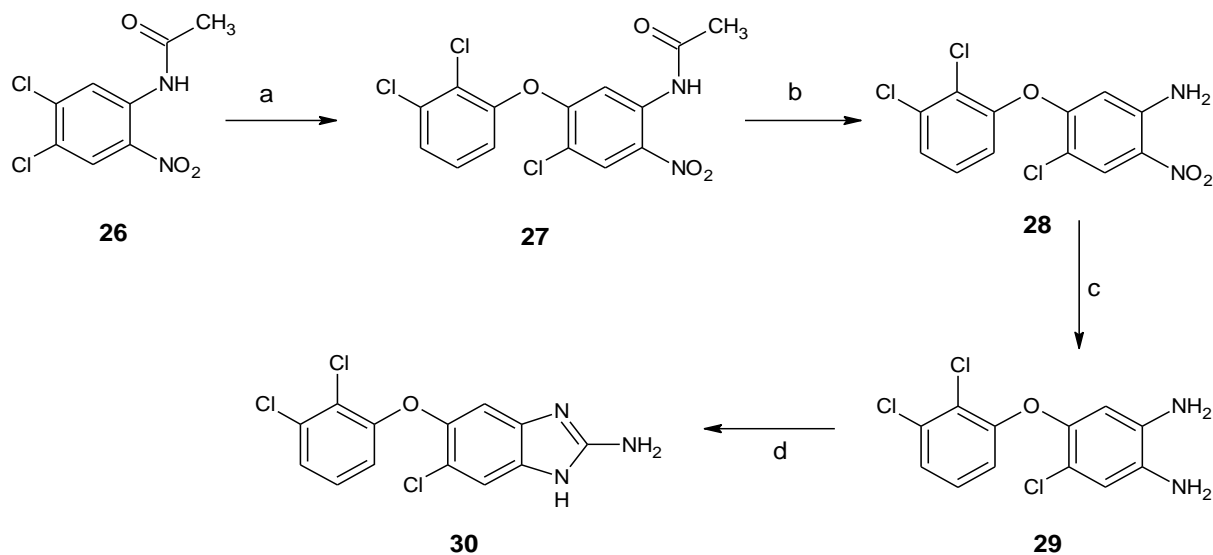


Esquema 4. Ruta sintética para generar los ácidos bencimidazolcarboxílicos **9**, **18** y **25**. (a) $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$, MeOH , (b) CS_2 , KOH , EtOH , calor; (c) CH_3I , KOH , acetona; (d) 1) KOH , MeOH , Δ , 2) H_2SO_4

2. Síntesis del compuesto precursor [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina **30**

Se partió del compuesto *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetanilida (**26**), previamente sintetizada en el laboratorio, la cual se sometió a una sustitución nucleofílica aromática en presencia de 2,3-diclorofenol en DMSO y K₂CO₃ como base, obteniendo el producto de sustitución *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil]acetamida (**27**). Así mismo, se realizó una prueba usando el calentamiento por microondas para la obtención de **27**.

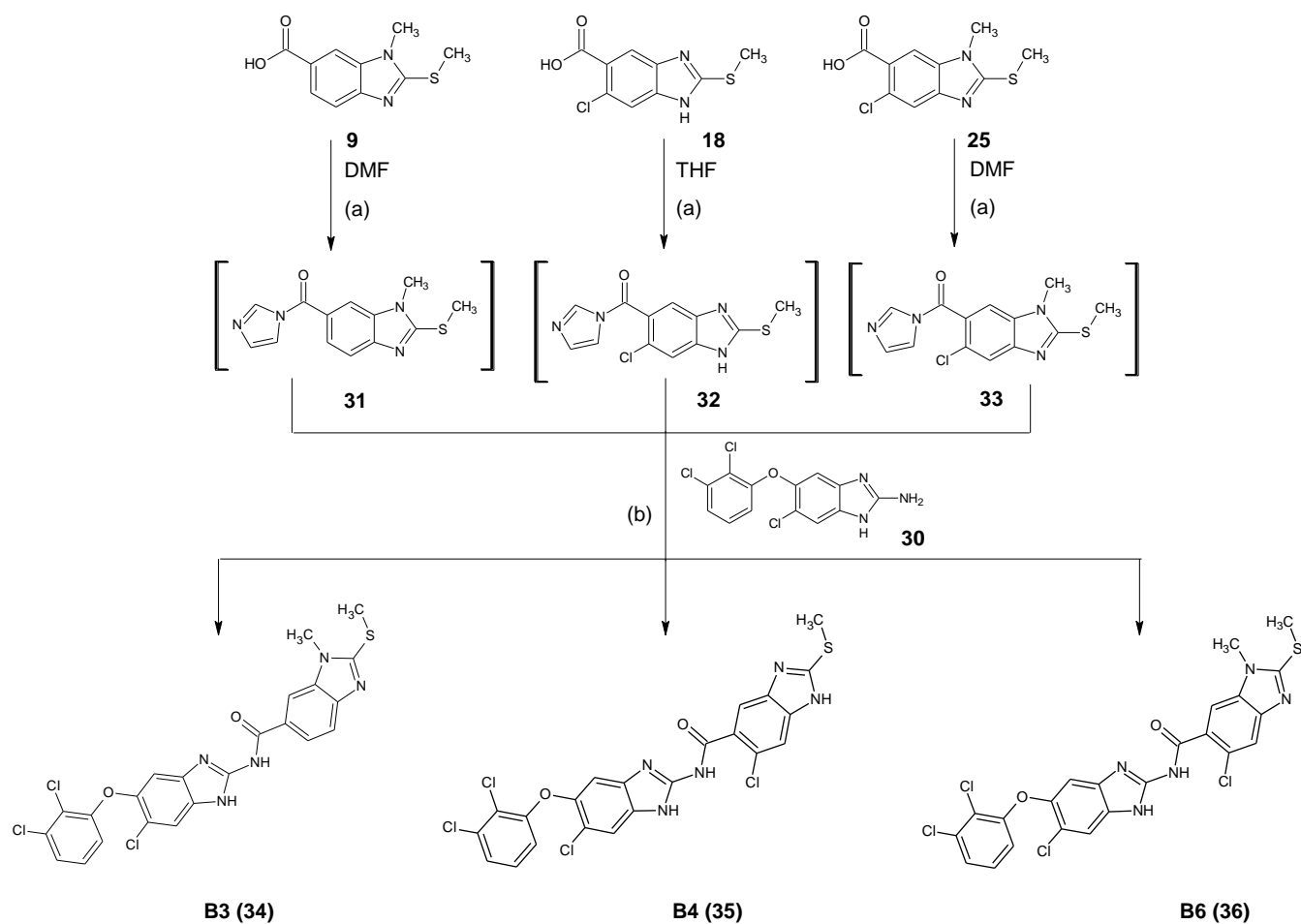
Posteriormente, el grupo acetilo se hidrolizó con NaOH acuosa y calor generando el compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (**28**) el cual se redujo catalíticamente utilizando hidrógeno a presión y Ni-Raney obteniendo la correspondiente diamina 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1,2-fenilendiamina (**29**), que inmediatamente se sometió a una ciclocondensación con bromuro de cianógeno en metanol y sosa acuosa para dar el precursor [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**).



Esquema 5. Secuencia sintética para la obtención del precursor **30**. (a) 2,3-diclorofenol, K₂CO₃, DMSO, Δ, (a') MW 140 °C, 300W; (b) NaOH/H₂O, calor; (c) H₂/Ni-Raney, MeOH (d) BrCN, MeOH, NaOH/H₂O

3. Acoplamiento de los dos compuestos precursores para la formación de las carboxamidas propuestas B3, B4 y B6

El **Esquema 6** muestra la última etapa para la obtención de las carboxamidas. Los ácidos bencimidazolcarboxílicos correspondientes **9**, **18** y **25** se activaron con 1,1-carbonildiimidazol (CDI) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, para obtener los intermediarios reactivos **31**, **32** y **33**, una vez formados se hicieron reaccionar con la amina **30** a temperatura moderada (60-80 °C) y por tiempo prolongado o bien usando calentamiento por microondas a 180 °C por 10 minutos, para obtener las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6**.



Esquema 6. Ruta sintética para la obtención de las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6**. (a) CDI, T Amb.; (b) 60-80°C, 3 a 7 días ó MW 180 °C, 10 min.

6.2. Parte biológica

6.2.1. Prueba de susceptibilidad *in vitro* para protozoarios

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos, previamente estandarizado. De forma breve, el procedimiento es el siguiente. Se incubaron 4×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* por 48 horas a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de la carboxamida correspondiente (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL), utilizando como compuestos de referencia albendazol, nitazoxanida y metronidazol, para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármaco empleando DMSO.

Se inocularon 50 µL de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos y se incubaron por 48 horas más. 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 Concentración Inhibitoria 50 (C_{I50}), que correspondió a la concentración que inhibió el crecimiento del 50 % de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron dos veces por triplicado.

6.2.2. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*

Debido que a este momento no se contaba con la TIM de *E. histolytica*, pero si con otras como la de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, se decidió evaluar la actividad de los compuestos **B3**, **B4** y **B6** sobre estas enzimas. En este ensayo se empleó el método de cuantificación de NADH, previamente estandarizado, éste es un método indirecto que determina la actividad residual de la enzima después de la exposición a un determinado compuesto. Se incubó la triosafosfato isomerasa a una concentración de 5 mg/mL en 1 mL de **Medio 1^a** por dos horas a 36 °C. Para el control negativo se empleó la TIM en medio libre de inhibidores. Después de la incubación se tomó una muestra de 1 mL de la solución anterior y se adicionó a 1 mL del medio de reacción para ensayo de actividad, **Medio 2^b**. En la celda de reacción a 340 nm en un espectrofotómetro marca Hewlett-Packard equipado con termostato a 25 °C se siguió la desaparición de NADH. Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con el control.

^a**Medio 1.** Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, compuesto, pH= 7.4.

^b**Medio 2.** Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, gliceraldehído-3-fosfato 1mM, 0.9 unidades de α-glicerol fosfato deshidrogenasa, pH= 7.5.

6.3. Parte computacional

6.3.1. Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización

Las enzimas de estudio se localizaron en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>), las cuales fueron identificadas como:

- Triosafosfato isomerasa de *E. histolytica* ID PDB **1M6J**.
- Triosafosfato isomerasa de *H. sapiens* ID PDB **1HTI**.

Las enzimas se descargaron usando el programa *Sybyl 8.0*⁵⁹, donde se removieron las moléculas de agua, iones y otros ligandos utilizando el módulo de preparación de proteínas presente en el programa. Posteriormente, se añadieron todos los átomos de hidrógeno (ya que la estructura cristalográfica carece de ellos) y se asignaron cargas de Gasteiger-Marsili a todos los átomos.

Finalmente se realizó una minimización de energía de las proteínas empleando mecánica molecular como nivel de teoría usando el campo de fuerza AMBER FF02 con una constante dieléctrica de 20 Debyes, se guardaron en formato *pdb* para su posterior empleo en el estudio de acoplamiento molecular.

6.3.2. Consideraciones previas para el diseño de ligandos

Los ligandos fueron generados usando dos estrategias. Primeramente se observó la interacción de las moléculas con la enzima, con base en estudios previos⁵⁶, esto permitió identificar zonas de la enzima EHTIM que podían ser aprovechadas para generar ligandos que pudiesen interactuar de mejor manera con la enzima; esto llevó a la obtención *de novo* de 63 moléculas las cuales tienen en común un núcleo de bencimidazol y distintos sustituyentes, esto con la finalidad de interactuar de mejor manera con la enzima.

Otra estrategia del diseño *de novo* que se usó fue el diseño basado en fragmentos. Los fragmentos son moléculas pequeñas y de bajo peso molecular (< 300Da) que son probadas en receptores, las cuales tendrán afinidad por ciertas regiones del receptor para posteriormente ser unidas por enlaces generando así moléculas de mayor tamaño y que tendrán mayor afinidad.

Adicionalmente, una serie de compuestos procedentes de librerías virtuales comerciales se probaron en la interfaz de la enzima EhTIM.

6.3.2.1. Preparación de los ligandos

Los ligandos se construyeron en el programa *Sybyl 8.0*, se les asignaron cargas Gasteiger-Marsili a los átomos y se optimizó su geometría empleando mecánica molecular usando el campo de fuerza Tripos. Posteriormente, usando el programa *Autodock 4.2*⁶⁰ y su interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4* (ADT),⁶¹ los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron al carbono al que estaban unidos y se detectaron automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables, marcándose como excepción de los enlaces carbono-nitrógeno (N-CO) de amida, que se consideraron rígidos.

Para la biblioteca de fragmentos, éstos se descargaron de la base de datos de Enamine (<http://www.enamine.net/>) que contiene 1190 moléculas. La optimización de la geometría se realizó usando el campo de fuerza OPLS-2005 en el programa *Maestro 9.1* de Schrödinger.⁶²

6.3.2.2. Preparación de la proteína

Las proteínas, después de su minimización de energía, se prepararon empleando el programa ADT 1.5.4 donde sólo se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno, y se corrigieron las cargas de las histidinas presentes a su estado neutro.

6.3.2.3. Acoplamiento molecular

Con ADT, usando el programa auxiliar *Autogrid 4.0*, se generaron las mallas de búsqueda (*grid*) las cuales se posicionaron en el centro de la interfaz de las enzimas, las mallas tuvieron las siguientes dimensiones: 70x60x60 Å para EhTIM y 74x50x50 Å para HsTIM.

La búsqueda de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó usando *AutoDock 4.2*, empleando un algoritmo genético del tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150, 5×10^6 de evaluaciones y 20 corridas. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables del conjunto de conformaciones más abundante (mayor clúster).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**7.1. Parte química**

En la **Tabla 3** se muestran las características fisicoquímicas más importantes de los intermediarios y productos finales sintetizados. En la **Tabla 4** se resumen las constantes espectroscópicas de IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y de espectrometría de masas así como las asignaciones para cada compuesto.

Tabla 3. Constantes físicas de los compuestos sintetizados

Compuesto	Rendimiento crudo (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Rendimiento recristalizado (%)	Punto de fusión (°C)	Rf(sistema)
2	77.5	Metanol	59	91.8-92.3	0.55 (VII)
3	96.9	Metanol/agua	75	234-234.6	0.36 (VII**)
4	96.8	Metanol	41	286.5-286.9	0.26 (VII**)
5	89.4	Metanol	80	135.7-136.6	0.53 (VII)
6	84.3	nd	nd	nd	0.48 (I)
7	73.4	Etanol	73.3	248.7-249.5	0.4 (I*)
8	76	Etanol	60	147.3-148.2	0.66 (I*)
9	93.9	Etanol	80	257.6-258.5	0.11 (I)
11	91	Etanol	79.4	70.1-70.3	0.63 (V)
12	93.4	nd	nd	nd	0.54 (V)
13	92.6	Metanol/agua	59	96.2-96.5	0.51 (V)
14	30.4	Metanol	80	186.6-187	0.52 (V)
15	99.6	nd	nd	nd	0.23 (I)
16	88.4	Etanol	78	260.2-260.9	0.15 (III*)
17	91.8	Etanol	82	138-139	0.24 (III*)

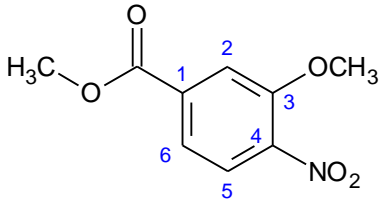
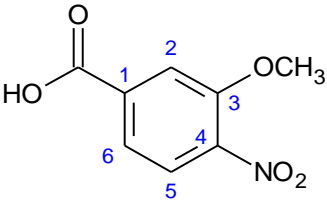
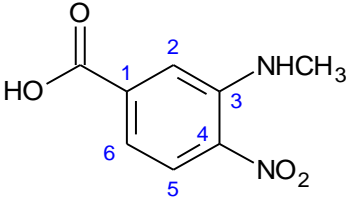
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

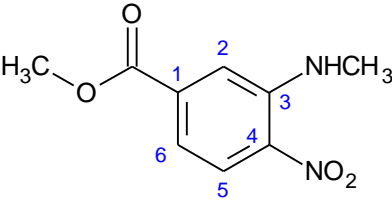
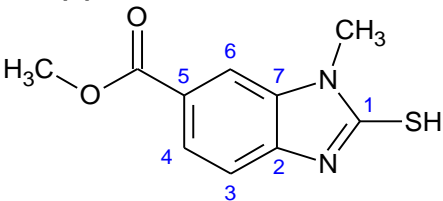
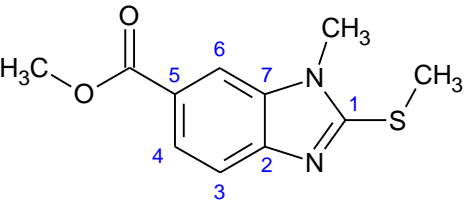
Compuesto	Rendimiento crudo (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Rendimiento recristalizado (%)	Punto de fusión (°C)	R _f (sistema)
18	82	Etanol	90	216.3-216.5	0.18 (VI ^{**})
19	99.7	Metanol	76	116.5-116.7	0.44 (V)
20	94.8	Isopropanol	63	118.9-119.7	0.21 (VI)
21	100.7	Metanol	87	135-136.5	0.46 (VI)
22	95.6	nd	nd	nd	0.48 (I)
23	73.4	Etanol	61	230.5-231.4	0.64 (II [*])
24	94	Etanol	58	123.6-125	0.73 (II [*])
25	97.3	Etanol		254.9-256.1	0.22 (V ^{**})
27	92.9 MW	Tolueno/Etanol	78.4	162.5-163.5	0.46 (IX)
28	95.3	Tolueno	58	150.8-151.6	0.56 (IX)
29	98.4	nd	nd	nd	0.22 (IX)
30	92.3	Etanol	78.7	185.2-187.4	0.22 (IV [*])
B3 (34)	72.8 conv. 93.3 MW	Lavados de THF	22 conv. 89.9 MW	317.6-318.2	0.55 (VIII)
B4 (35)	89 conv. 87.8 MW	Lavados de éter diisopropílico	43 conv. 50.3 MW	213.5-215.1	0.44 (VIII)
B6 (36)	81.6 conv. 91.5 MW	Lavados de THF	23.2 conv 89.5 MW	268.6-269.6	0.59 (VIII)

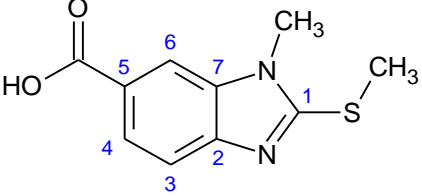
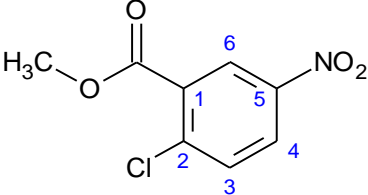
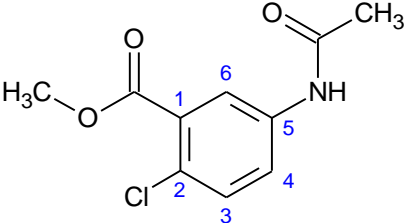
^{**} una gota de ácido acético; ^{*} una gota de hidróxido de amonio

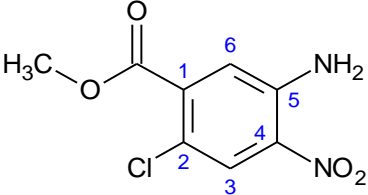
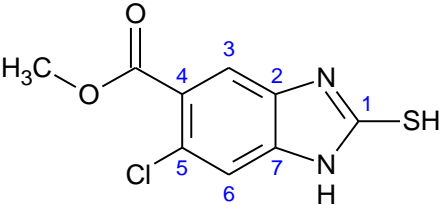
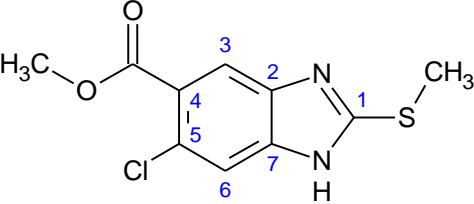
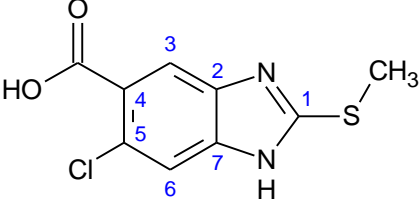
nd: no determinado

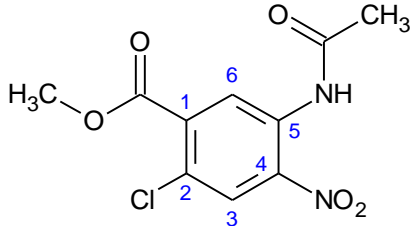
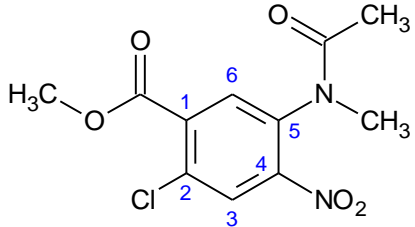
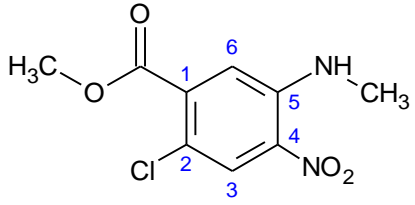
Tabla 4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados^a

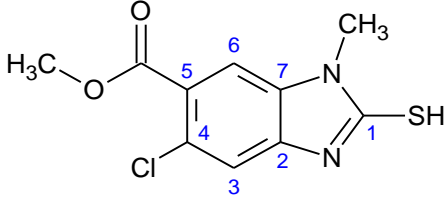
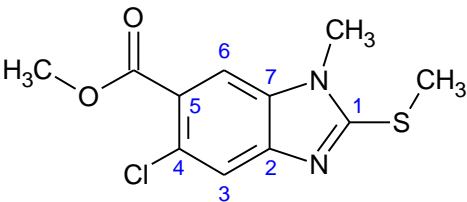
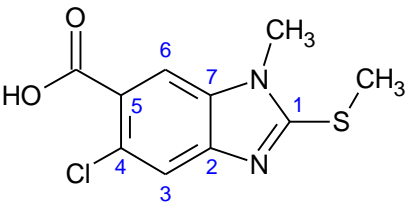
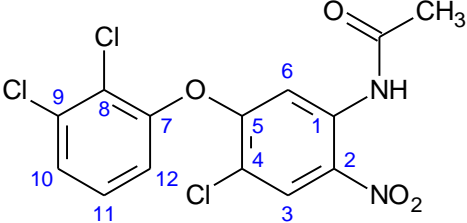
<p>3-Metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2)</p> 	<p>Espectro 1, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3116-3016 (C-H Ar), 2959 (-CH₃), 1730 (C=O), 1527, 1349 (Ar-NO₂), 1291, 1304 (CO-OCH₃) y 1247 (Ar-O-CH₃).</p> <p>Espectro 2, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 400 MHz) ppm: 3.974 (s, 3H, -O-CH₃); 4.023 (s, 3H, -CO-O-CH₃); 7.698 (dd, $J_1= 8.4$ Hz, $J_2= 1.6$ Hz, 1H, H-6); 7.764 (d, $J= 1.6$ Hz, 1H, H-2); 7.843 (d, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-5).</p> <p>Espectro 3, EM: CG/IE m/z: 211 (M⁺, 100%), 180 (M-31, 77%), 164 (M-47, 83%).</p>
<p>Ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3)</p> 	<p>Espectro 4, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3436, 3060-2543 (HO-, C-H de Ar, -CH₃), 1697 (C=O), 1536, 1358 (Ar-NO₂), 1306 (CO-OCH₃) y 1247 (Ar-O-CH₃).</p> <p>Espectro 5, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 3.972 (s, 3H, -O-CH₃); 7.629 (dd, $J_1= 8.25$ Hz, $J_2= 1.65$ Hz, 1H, H-6); 7.751 (d, $J= 1.5$ Hz, 1H, H-2); 7.952 (d, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-5); 13.686 (sa, 1H, HO-, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 6, EM: ID/IE m/z: 197 (M⁺, 100%), 180 (M-17, 10%), 167 (M-30, 92%), 150 (M-47, 96%).</p>
<p>Ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4)</p> 	<p>Espectro 7, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3397 (NH), 3000-2953 (HO-, C-H de Ar, -CH₃), 1697 (C=O), 1579, 1321 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 8, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 2.975 (d, $J= 4.8$ Hz, 3H, -HN-CH₃); 3.330 (sa, 1H, NH, int. con D₂O); 7.112 (dd, $J_1= 8.8$ Hz, $J_2= 1.7$ Hz, 1H, H-6); 7.448 (d, $J= 1.7$ Hz, 1H, H-2); 8.116 (d, $J= 8.8$ Hz, 1H, H-5); 13.478 (sa, 1H, HO-, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 9, EM: ID/IE m/z: 196 (M⁺, 100%), 179 (M-17, 13%), 161 (M-35, 51%).</p>

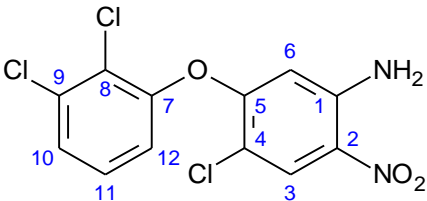
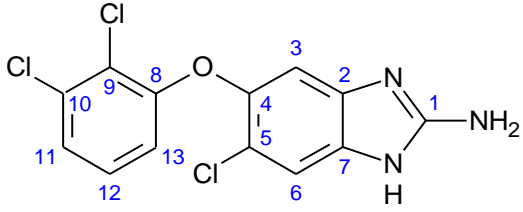
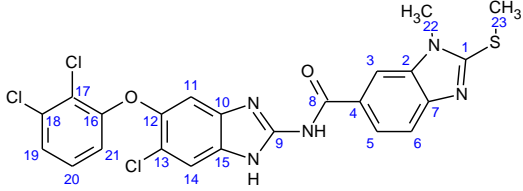
<p>3-Metilamino-4-nitrobenzoato metilo (5)</p> 	<p>de Espectro 10, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3376 (NH), >3000 (C-H de Ar), 2933 (-CH₃), 1730 (C=O), 1576, 1318 (Ar-NO₂), 1226, 1271 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 11, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 300 MHz) ppm: 3.092 (s, 3H, N-CH₃); 3.954 (s, 3H, -CH₃); 7.245 (dd, $J_1=8.8$ Hz, $J_2=1.8$ Hz, 1H, H-6); 7.555 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-2); 8.219 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, H-5).</p> <p>Espectro 12, EM: ID/IE m/z 210 (M⁺, 100%), 179 (M-31, 21%), 161 (M-49, 69%).</p>
<p>1-Metil-2-mercapto-1H-bencimidazol-6-carboxilato metilo (7)</p> 	<p>de Espectro 13, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3128 (NH de tiona), 3065 (C-H de Ar), 2945 (-CH₃), 1714 (C=O), 1221 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 14, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 3.688 (s, 3H, N-CH₃); 3.860 (s, 3H, -OCH₃); 7.247 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, H-3); 7.815 (dd, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 1H, H-4); 7.877 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-6); 13.088 (s, 1H, -SH, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 15, EM: ID/IE m/z 222 (M⁺, 100), 191 (M-31, 41%), 163 (M-59, 22%).</p>
<p>1-Metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (8)</p> 	<p>Espectro 16, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: >3000 (C-H de Ar), 2997 (-CH₃), 1709 (C=O), 1255 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 17, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 300 MHz) ppm: 2.843 (s, 3H, S-CH₃); 3.716 (s, 3H, N-CH₃); 3.946 (s, 3H, -O-CH₃); 7.676 (dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=0.6$ Hz, 1H, H-3); 7.946 (dd, $J_1=8.55$ Hz, $J_2=1.8$ Hz, 1H, H-4); 7.981 (dd, $J_1=1.65$ Hz, $J_2=0.9$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 18, EM: CG/IE m/z: 236 (M⁺, 100%), 221 (M-15, 23%), 203 (M-33, 71%), 189 (M-47, 18%).</p>

<p>Ácido 1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-6-carboxílico (9)</p> 	<p>Espectro 19, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3456-2593 (HO-, C-H de Ar, -CH₃), 1654 (C=O), 1255 (C-OH).</p> <p>Espectro 20, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.735 (s, 3H, S-CH₃); 3.710 (s, 3H, N-CH₃); 7.564 (dd, $J_1= 8.4$ Hz, $J_2= 0.6$ Hz, 1H, H-3); 7.773 (dd, $J_1= 8.25$ Hz, $J_2= 1.8$ Hz, 1H, H-4); 8.050 (d, $J= 1.5$ Hz 1H, H-6); 12.742 (sa, 1H, HO-, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 21, EM: ID/IE m/z 222 (M⁺, 100), 207 (M-15, 12%), 189 (M-33, 56%), 176 (M-46, 29%).</p>
<p>2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)</p> 	<p>Espectro 22, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3120 y 3085 (C-H de Ar), 2959 (-CH₃), 1729 (C=O), 1522 (Ar-NO₂), 1249 (C-O-C).</p> <p>Espectro 23, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 400 MHz) ppm: 3.947 (s, 3H, -OCH₃); 7.608 (d, $J= 8.8$ Hz, 1H, H-3); 8.224 (dd, $J_1= 8.8$, $J_2= 2.8$ Hz, 1H, H-4); 8.659 (d, $J= 2.7$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 24, EM: ID/IE m/z: 215 (M⁺, 22%), 217 (M+2, 7%), 184 (M-31, 100%).</p>
<p>5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (13)</p> 	<p>Espectro 25, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3292 (NH), 3128 (C-H de Ar), 2949 (-CH₃), 1747 (CO-C=O), 1713 (NH-C=O), 1664 (N-C=O), 1242 (C-O-CH₃).</p> <p>Espectro 26, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 400 MHz) ppm: 2.180 (s, 3H, -O-CH₃); 3.898 (s, 3H, NCO-CH₃); 7.362 (d, 1H, $J= 9.2$ Hz, H-3); 7.679 (dd, 1H, $J_1= 9.0$ Hz, $J_2= 2.4$ Hz, H-4); 7.955 (d, 1H, $J=2.4$ Hz, H-6); 8.022 (sa, 1H, NH, int. D₂O).</p> <p>Espectro 27, EM: ID/IE m/z 227 (M⁺ 31%), 229 (M+2, 10%), 196 (M-31, 27%), 185 (M-42, 100%), 154 (M-73, 46%).</p>

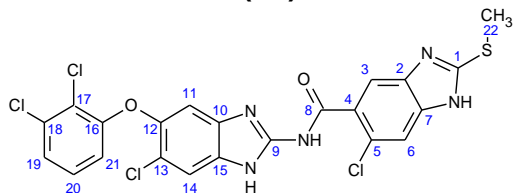
<p>5-Amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (14)</p> 	<p>Espectro 28, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3476 y 3358 (Ar-NH₂), 3186 (C-H de Ar), 2958 (-CH₃), 1702 (C=O), 1635 (-C=C, -NH₂), 1566 y 1305 (Ar-NO₂), 1246 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 29, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz) ppm: 3.333 (s, 1H, -OCH₃); 7.454 (s, 1H, H-6); 7.642 (sa, 2H, int. con D₂O, -NH₂); 8.022 (s, 1H, H-3).</p> <p>Espectro 30, EM: ID/IE <i>m/z</i> 230 (M⁺, 100%), 232 (M+2, 23%), 199 (M-31, 27%).</p>
<p>6-Cloro-2-mercapto-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxilato metilo (16)</p> 	<p>Espectro 31, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3241 (NH-Ar), 3042 (C-H de Ar), 2912 (-CH₃), 1704 (C=O), 1632 (C=N), 1253 (C=S de tiona), 1182 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 32, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 3.827 (s, 3H, -OCH₃); 7.216 (s, 1H, H-6); 7.522 (s, 1H, H-3); 12.898 (s, 2H, NH de tiona, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 33, EM: ID/IE <i>m/z</i> 242 (M⁺, 100%), 244 (M+2, 37%), 211 (M-31, 72%).</p>
<p>6-Cloro-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17)</p> 	<p>Espectro 34, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3319 (NH-Ar), 2839 (-CH₃), 3010 (C-H de Ar), 1710 (C=O), 1624 (C=N), 1292 (S-CH₃), 1187 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 35, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 300 MHz) ppm: 2.712 (s, 3H, S-CH₃); 3.839 (s, 3H, -OCH₃); 7.571 (s, 1H, H-6); 7.87 (s, 1H, H-3); 8.255 (s, 2H, NH, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 36, EM: ID/IE <i>m/z</i> 256 (M⁺, 100%), 258 (M+2, 36%), 225 (M-31, 66%).</p>
<p>Ácido 6-cloro-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxílico (18)</p> 	<p>Espectro 37, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3497 (NH-Ar), 3258, 2933, 2465 (C-H de Ar, -CH₃, C-OH), 1706 (C=O), 1617 (C=N).</p> <p>Espectro 38, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.695 (s, 3H, S-CH₃); 7.548 (s, 1H, H-6); 7.853 (s, 1H, H-3); 12.953 (sa, 2H, NH y HO, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 39, EM: ID/IE <i>m/z</i> 242 (M⁺, 100%), 244 (M+2, 34%), 209 (M-33, 65%).</p>

<p>5-Acetamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (19)</p> 	<p>Espectro 40, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3372 (NH), 3121 (C-H de Ar), 2959 (-CH₃), 1731 (CH₃-O-C=O), 1617 (NH-C=O), 1572 y 1339 (Ar-NO₂), 1219 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 41, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.058 (s, 3H, -OCH₃); 3.883 (s, 3H, -NCO-CH₃); 8.017 (s, 1H, H-6); 8.134 (s, 1H, H-3); 10.473 (sa, 1H, NH int. con D₂O).</p> <p>Espectro 42, EM: ID/IE <i>m/z</i> 272 (M⁺, 29%), 274 (M+2, 11%), 230 (M-42, 100%), 199 (M-73, 29%).</p>
<p>5-[Acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (20)</p> 	<p>Espectro 43, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3102 (C-H de Ar), 2962 (-CH₃), 1718 (C-O-C=O), 1669 (N-C=O), 1524 y 1397 (Ar-NO₂), 1260 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 44, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 400 MHz) ppm: 1.846 y 2.248 (s, 3H, -COCH₃); 3.204 y 3.451 (s, 3H, -NCH₃); 3.974 y 4.008 (s, 3H -OCH₃); 7.802 y 7.861 (s, 1H, H-6); 8.038 y 8.074 (s, 1H, H-3).</p> <p>Espectro 45, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 286 (M⁺, 1%), 244 (M-42, 100%), 195 (M-91, 88%).</p>
<p>2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (21)</p> 	<p>Espectro 46, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3389 (NH), 3113 (C-H de Ar), 2950 (-CH₃), 1733 (C=O), 1571 y 1396 (Ar-NO₂), 1223 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 47, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.936 (d, 3H, <i>J</i>= 5.1 Hz, NH-CH₃); 3.864 (s, 3H, -OCH₃); 7.279 (s, 1H, H-6); 8.102 (s, 1H, H-3); 8.242 (d, 1H, <i>J</i>= 3.9 Hz, NH int. D₂O).</p> <p>Espectro 48, EM: ID/IE <i>m/z</i> 244 (M⁺, 62%), 246 (M+2, 21%), 213 (M-31, 37%), 59 (M-190, 100%).</p>

<p>5-Cloro-2-mercapto-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxilato metilo (23)</p> 	<p>Espectro 49, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3376 (NH), 3105 y 3056 (C-H de Ar), 2944 (-CH₃), 1694 (C=O), 1243 (C=S de tiona).</p> <p>Espectro 50, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 3.641 (s, 3H, N-CH₃); 3.854 (s, 3H, -OCH₃); 7.244 (s, 1H, H-3); 7.786 (s, 1H, H-6); 13.082 (sa, 1H, NH de tiona, int. D₂O).</p> <p>Espectro 51, EM: ID/IE <i>m/z</i> 256 (M⁺, 100%), 258 (M+2, 36%), 225 (M-31, 61%), 197 (M-59, 34%).</p>
<p>5-Cloro-1-metil-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxilato metilo (24)</p> 	<p>Espectro 52, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: <3000 (C-H Ar), 2925 (-CH₃), 1722 (C=O), 1616 (C=N), 1269 (CO-O-CH₃).</p> <p>Espectro 53, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 300 MHz) ppm: 2.784 (s, 3H, S-CH₃); 3.70 (s, 3H, -NCH₃); 3.875 (s, 3H, -OCH₃); 7.684 (s, 1H, H-3); 7.977 (s, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 54, EM: ID/IE <i>m/z</i> 270 (M⁺, 100%); 272 (M+2, 36%); 239 (M-31, 47%).</p>
<p>Ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxílico (25)</p> 	<p>Espectro 55, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3433, 3000, 2922, 2429 (HO-, C-H de Ar, -CH₃), 1699 (C=O), 1614 (C=N), 1266, 1196 (CO-OH, C-S).</p> <p>Espectro 56, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.723 (s, 3H, -SCH₃); 3.679 (s, 3H, -NCH₃); 7.629 (s, 1H, H-3); 7.950 (s, 1H, H-6); 13.109 (sa, 1H, HO-, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 57, EM: ID/IE <i>m/z</i> 256 (M⁺, 100%), 258 (M+2, 36%), 239 (M-17, 10%), 223 (M-33, 60%).</p>
<p><i>N</i>-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil] acetamida (27)</p> 	<p>Espectro 58, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3321 (NH), 3109 (C-H de Ar), 1707 (C=O), 1569 y 1366 (Ar-NO₂), 1264 (C-O-C).</p> <p>Espectro 59, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 300 MHz) ppm: 2.214 (s, 3H, -NCO-CH₃); 7.123 (dd, <i>J</i>₁= 8.2 Hz, <i>J</i>₂= 1.5 Hz, 1H, H-12); 7.317 (ψt, <i>J</i>₁= 8.2 Hz, <i>J</i>₂= 8.2 Hz, 1H, H-11); 7.441 (dd, <i>J</i>₁= 8.2 Hz, <i>J</i>₂= 1.5 Hz, 1H, H-10); 8.242 (s, 1H, H-6); 8.404 (s, 1H, H-3); 10.498 (s, 1H, NH).</p> <p>Espectro 60, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 374 (M⁺, 18%), 376 (M+2, 16%), 378 (M+4, 5%) 332 (M-43, 95%), 262 (M-114, 100%).</p>

<p>4-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-2-nitroanilina (28)</p> 	<p>Espectro 61, IR: pastilla (KBr) cm^{-1}: 3468 y 3348 (Ar-NH₂), 3172 (C-H Ar), 1560 (Ar-NO₂), 1242 (C-O-C).</p> <p>Espectro 62, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃, 400 MHz) ppm: 5.918 (s, 1H, H-6); 6.090 (s, 2H, NH₂); 7.082 (dd, $J=8.2$ Hz, 1H, H-12,); 7.294 (Ψt, $J_1=8.2$ Hz, $J_2=8.2$ Hz, 1H, H-11); 7.431 (dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=1.4$ Hz, 1H, H-10); 8.284 (s, 1H, H-3).</p> <p>Espectro 63, EM: ID/IE m/z 332 (M⁺ 10%), 334 (M+2, 8%), 336 (M+4, 1%), 262 (M-70, 100%).</p>
<p>[6-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]amina (30)</p> 	<p>Espectro 64, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3563 y 3447 (Ar-NH₂), 3366 (NH Ar), 1647 (C=N), 1248 (C-O-C).</p> <p>Espectro 65, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 6.472 (sa, 2H, -NH₂, int. con D₂O); 6.578 (dd, $J_1=8.3$ Hz, $J_2=1.4$ Hz, 1H, H-13); 6.970 (s, 1H, H-3); 7.221 (Ψt, $J_1=8.2$ Hz, $J_2=8.2$ Hz, 1H, H-12); 7.247 (s, 1H, H-6); 7.302 (dd, 1H, $J_1=8.1$ Hz, $J_2=1.4$ Hz, H-11).</p> <p>Espectro 66, EM: FAB⁺ m/z: 327 (M⁺, 60%), 328 (M+H, 55%).</p>
<p><i>N</i>-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-carboxamida B3 (34)</p> 	<p>Espectro 67, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3362 (NH), >3000 (C-H de Ar), 2933 (-CH₃), 1671 (C=O), 1565 (HN-CO-), 1259 (C-O-C).</p> <p>Espectro 68, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 2.759 (s, 3H, S-CH₃); 3.746 (s, 3H, N-CH₃); 6.694 (dd, $J_1=8.3$, $J_2=1.0$ Hz, 1H, H-21); 7.270 (Ψt, $J_1=8.2$ Hz, $J_2=8.2$ Hz, 1H, H-20); 7.345 (s, 1H, H-11); 7.368 (dd, $J_1=8.1$, $J_2=1.3$ Hz, 1H, H-19); 7.641 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-6); 7.696 (s, 1H, H-14); 7.955 (dd, $J_1=8.5$, $J_2=1.7$ Hz, 1H, H-5); 8.401 (d, $J=1.4$ Hz, 1H, H-3); 12.308 (sa, 2H, NH, int. con D₂O).</p> <p>Espectro 70, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 101 MHz) ppm: 14.48 (S-CH₃); 31.04 (N-CH₃); 110.29 (C-3); 115.63 (C-21); 117.42 (C-6); 118.48 (C-15); 121.33 (C-17); 122.45 (C-5); 124.63 (C-19); 125.62 (C-4); 129.10 (C-20); 133.23 (C-18); 136.99 (C-2); 144.95 (C-13); 146.37 (C-7); 149.65 (C-9); 155.16 (C-16); 156.79 (C-1); 166.86 (C-8).</p> <p>Espectro 74, EM: ID/IE m/z 531 (M⁺, 8%), 533 (M+2, 10%), 535 (M+4, 3%), 205 (M-327 100%).</p>

6-Cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**



Espectro 75, IR: FTIR reflectancia cm^{-1} : 3340 (NH), 3042 (C-H de Ar), 2969 (-CH₃), 1640 (C=O), 1574 (HN-CO), 1251 (C-O-C).

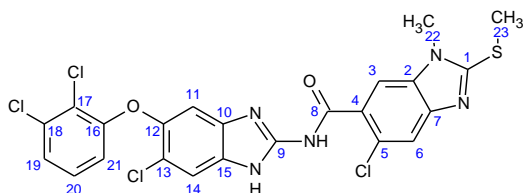
Espectro 76, RMN ¹H: (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz) ppm: 2.708 (s, 3H, S-CH₃); 6.674 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-21); 7.265 (Ψt, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 8.2 Hz, 1H, H-20); 7.333 (s, 1H, H-11); 7.366 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-19); 7.609 (s, 1H, H-14); 7.596 (s, 1H, H-6); 7.708 (s, 1H, H-3); 12.477 (sa, 3H, NH, int. con D₂O).

Espectro 78, RMN ¹³C: (DMSO-*d*₆, 100 MHz) ppm: 13.73 (S-CH₃); 115.15 (C-21); 118.19 (C-6 y/o 15); 120.92 (C-17); 123.18 (C-5); 124.24 (C-19); 127.52 (C-4); 128.70 (C-20); 132.83 (C-18); 148.27 (C-9); 144.54 (C-7 y/o 13); 154.73 (C-16); 155.25 (C-1); 166.48 (C-8).

Espectro 82, EM: ID/IE *m/z* 551 (M⁺, 5%), 553 (M+2, 7%), 555 (M+4, 4%), 518 (M-35, 12%), 225 (M-327, 100%).

HR (IE): calc. para C₂₂H₁₃O₂N₅Cl₄S₁ *m/z* 550.9539, encontrada 550.9527.

5-Cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida **B6 (36)**



Espectro 83, IR: FTIR reflectancia cm^{-1} : 3354 (NH), >3000 (C-H de Ar), 2937 (-CH₃), 1672 (C=O), 1578 (HN-CO), 1253 (C-O-C).

Espectro 84, RMN ¹H: (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz) ppm: 2.753 (s, 3H, S-CH₃); 3.717 (s, 3H, N-CH₃); 6.687 (dd, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H, H-21); 7.275 (Ψt, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 8.2 Hz, 1H, H-20); 7.330 (s, 1H, H-11); 7.374 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz 1H, H-19); 7.685 (s, 1H, H-14); 7.712 (s, 1H, H-6); 7.911 (s, 1H, H-3); 12.400 (sa, 1H, NH, int. con D₂O).

Espectro 86, RMN ¹³C: (DMSO-*d*₆, 100 MHz) ppm: 14.48 (S-CH₃); 30.56 (N-CH₃); 110.93 (C-3); 115.64 (C-21); 118.45 (C-6); 118.59 (C-15); 121.36 (C-17); 123.73 (C-5); 124.69 (C-19); 127.79 (C-4); 129.11 (C-20); 133.23 (C-18); 135.63 (C-2); 144.89 (C-7); 145.04 (C-13); 148.58 (C-9); 155.10 (C-16); 157.27 (C-1); 166.85 (C-8).

Espectro 90, EM: ID/IE *m/z* 565 (M⁺, 7%), 567 (M+2, 9%), 569 (M+4, 5%), 532 (M-35, 14%), 239 (M-327, 100%).

^aLa numeración de los carbonos ha sido asignada arbitrariamente y no coincide con la numeración sistemática para la nomenclatura.

7.1.1. Obtención del ácido 1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (9)

Para la obtención del ácido 1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (9) se comenzó con el ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico comercial (1; ver página 26, **Esquema 2**), el cual se dialquiló con sulfato de dimetilo en medio alcalino, generando el metoxilo que comparado con el grupo hidroxilo es mejor grupo saliente en la reacción de S_NAr (reacción posterior), además de que el éster es más fácil de manipular que su precursor ácido. El tiempo de la reacción fue prolongado posiblemente por el uso de la mezcla de disolventes de acetona/agua, sin embargo son de mejor manejo y de fácil recuperación; a pesar de esto, se obtuvo un compuesto de muy buena pureza y con buen rendimiento. El cambio estructural fue identificado a través de espectroscopia. En el espectro de IR se observó la banda de C=O de éster a 1730 cm⁻¹ y la del éter metílico a 1247 cm⁻¹. El espectro de RMN ¹H mostró la presencia de dos señales de tipo singlete a 3.974 ppm y 4.023 ppm que integraron para 3 hidrógenos (3H) cada una, éstas correspondieron al metilo del grupo metoxilo y del metilo del éster respectivamente. La espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto con el ión de *m/z* 211 (100%), así como el fragmento de *m/z* 180 que correspondió a la pérdida del OCH₃ del grupo éster.

El compuesto 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2) se sometió a hidrólisis básica en potasa metanólica a temperatura moderada y por tiempo prolongado dando la sal del ácido, la cual con posterior tratamiento con ácido clorhídrico diluido hasta pH de 4 dio el ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3). La hidrólisis de 2 se realizó con la finalidad de usar agua como disolvente en la reacción siguiente de S_NAr y evitar el uso de disolventes orgánicos. El espectro de IR mostró una banda amplia a 3436 cm⁻¹ característica del grupo hidroxilo del ácido, así mismo se observó una banda intensa característica de carbonilo del grupo -COOH a 1697 cm⁻¹. En el espectro de RMN ¹H se observó un singlete amplio a 13.686 ppm correspondiente al -COOH que desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O. El espectro de masas mostró el ión molecular de *m/z* 197 que también correspondió al pico base.

Ya preparado el ácido 3, se hizo reaccionar con clorhidrato de metilamina en agua alcalina mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática en un reactor cerrado a presión dando como producto de sustitución el ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4). El uso de agua como disolvente para esta reacción fue una opción alternativa para evitar disolventes

orgánicos, el rendimiento fue bueno y el producto crudo obtenido presentó buena pureza. Sin embargo, la temperatura y el tiempo de reacción (5 días) no fueron los adecuados ya que cuando se subió la temperatura de 105 a 135 °C la reacción se completó en 6 horas. En el espectro de IR del producto se observó la banda característica de amina secundaria a 3397 cm^{-1} , así como una señal a 1697 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del grupo -COOH. La RMN ^1H mostró una señal de tipo doblete a 2.98 ppm, que integró para 3H y simplificó al intercambio con D_2O , correspondiente al metilo unido a la amina; además, una señal a 3.33 ppm que integró para 1H que desapareció al realizar el intercambio con D_2O correspondiente al hidrógeno unido al nitrógeno de la amina. La espectrometría de masas señaló la presencia del ión molecular con m/z de 196 que también correspondió con el pico base.

Posteriormente el ácido **4** nuevamente se convirtió en su éster metílico por el método de Fisher, usando una mezcla de ácido sulfúrico y metanol a reflujo, lo cual permitió una mejor manipulación en las reacciones posteriores, dando el 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (**5**) con un buen rendimiento. Debido a la nucleofilia de la amina se evitó el uso de agentes alquilantes, para no generar productos de polialquilación. En el espectro de IR se observó una banda a 3376 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H de la amina, así como a 1730 cm^{-1} se observó una banda correspondiente al carbonilo del éster. En el espectro de RMN ^1H se identificaron 2 singuletes a 3.092 y 3.954 ppm que integraron para 3H cada uno, los cuales corresponden a los metilos del grupo amino y éster respectivamente. El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z de 210 que correspondió al pico base, además el fragmento de m/z 179 (21% de abundancia) correspondió con la pérdida del OCH_3 del éster.

El siguiente paso fue la obtención de la diamina **6** (ver página 28, **Esquema 4**) la cual se obtuvo a través de la reducción catalítica del grupo nitro del compuesto **5** a temperatura ambiente. La diamina **6**, sin posterior tratamiento se procesó rápidamente para evitar su oxidación, por lo que sometió a la reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio básico obteniendo el 1-metil-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**7**). La mezcla de los reactivos, al inicio de la reacción, se hizo a temperatura ambiente con el propósito de provocar la formación del xantato de etilo *in situ*. La temperatura entre 60-65 °C y un pH alcalino no mayor de 9-10 fueron factores importantes a controlar para evitar la hidrólisis del grupo éster.

En el espectro de IR, se observaron bandas a 3129 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H del anillo de bencimidazol, así como una banda a 1714 cm^{-1} de carbonilo del éster. En RMN ^1H se observaron dos señales simples que integraron par 3H cada una, a 3.688 y 3.86 ppm correspondiendo al metilo de la posición del anillo bencimidazólico y al del éster respectivamente, y a 13.088 ppm una señal simple que integró para 1H y que desapareció al realizar el intercambio con D_2O con lo que se comprobó la presencia del hidrógeno unido al nitrógeno 3 del anillo de bencimidazol cuando se encuentra en forma de tiona. El espectro de masas mostró el ión molecular de m/z 222 que correspondió al pico base y el fragmento con m/z de 191 (41% de abundancia) que correspondió a la pérdida del OCH_3 .

Posteriormente se llevó a cabo una reacción de S-alkilación con un equivalente de yoduro de metilo como agente alquilante en el producto **7** para obtener el 2-metilbencimidazol **8**; la metilación procedió de manera rápida y con buena pureza. El espectro de RMN ^1H mostró el cambio estructural por la presencia de un singulete a 2.843 ppm correspondiente al metilo unido al átomo de azufre, junto con las señales a 3.716 y 3.946 ppm que también integraron para 3H asignadas a los metilos unidos a nitrógeno y al oxígeno del éster respectivamente. La espectrometría de masas indicó el ión molecular de m/z 236 que correspondió al pico base.

Finalmente, el ácido 1-metil-2-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**9**) se obtuvo por hidrólisis básica a $65\text{ }^\circ\text{C}$ del éster **8**. El espectro de IR mostró una banda amplia a 3456 cm^{-1} asignada al grupo OH del ácido, junto con una banda característica de carbonilo a 1654 cm^{-1} . En RMN ^1H se identificó un singulete amplio a 12.742 ppm correspondiente al OH del grupo ácido que desapareció al realizarse el intercambio con D_2O , a 2.735 y 3.710 ppm dos singuletes que integraron para 3H cada uno correspondieron a los metilos del S y N respectivamente y la ausencia del OCH_3 a 3.946 ppm. Los hidrógenos del anillo aromático mostraron la multiplicidad esperada para un sistema ABX de 3 hidrógenos no equivalentes en la molécula; dos doble de dobles a 7.564 (H-3) y 7.773 (H-4) ppm y un doblete a 8.05 ppm (H-6). Con espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto por el ión de m/z 222, que también originó al pico base.

7.1.2. Obtención de los compuestos ácido 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**18**) y ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**25**)

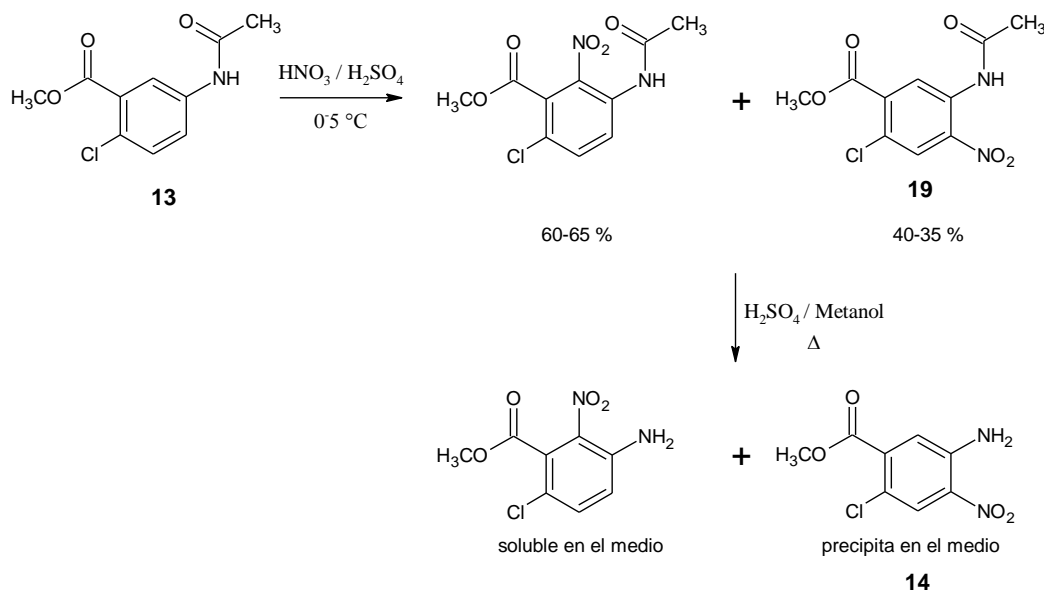
Para la síntesis de estos ácidos se siguió una ruta sintética común (**Esquema 2 y 3**), preparando inicialmente los benzoatos de metilo adecuadamente sustituidos para posteriormente generar los ácidos bencimidazolcarboxílicos correspondientes.

Para la obtención del ácido **18** primeramente se partió del ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico comercial (**10**; ver página 27, **Esquema 3**), el cual se esterificó usando sulfato de dimetilo en medio básico a 70 °C. En esta ocasión se utilizó DMF como disolvente y la reacción procedió de manera rápida con muy buen rendimiento y pureza del producto; el inconveniente es el manejo de un disolvente de alto punto de ebullición. El producto de esterificación **11** mostró señales en el espectro de IR a 1729.5 y 1188 cm⁻¹ correspondientes al grupo carbonilo y al OCH₃ de éster. En RMN ¹H un singulete a 3.95 ppm que integró para 3H que se asignó al metilo del éster. La espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto con el ión de *m/z* 215 y abundancia de 22 %, así como la contribución isotópica del átomo de cloro con *m/z* de 217 (7 %), la presencia del éster metílico se ratificó por el fragmento con *m/z* de 184 que generó el pico base debido a la pérdida del OCH₃.

El éster metílico se sometió a reducción catalítica con hidrógeno a presión y Ni-Raney como catalizador, generando el 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (**12**). La amina obtenida se acetiló inmediatamente con anhídrido acético y catálisis ácida a temperatura ambiente, obteniendo la acetamida **13**. La reacción procedió rápidamente y con muy buenos rendimientos. El espectro de IR mostró el cambio estructural por las bandas a 3292 cm⁻¹ del NH de la amida y a 1747 y 1713 cm⁻¹ del carbonilo del éster y amida respectivamente. En RMN ¹H se identificaron dos singuletes a campo alto que integraron para 3H cada uno y que correspondieron a los metilos del éster y acetilo. En el espectro de masas, el ión con *m/z* de 227 correspondió a la masa molar del compuesto y el fragmento con *m/z* de 185 indicó la pérdida del acetilo.

El siguiente paso fue la nitración de la acetamida **13**, la cual se realizó por la formación *in situ* de la mezcla sulfonítrica, adicionando ácido nítrico sobre la acetamida disuelta en ácido sulfúrico entre 0-5 °C. La reacción de nitración fue un paso crítico en la obtención del compuesto 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**14**), un intermediario común para la

obtención de los ácidos **18** y **25**, ya que en la reacción de nitración se generaron dos productos de nitración **19** y el isómero de posición 3-acetamido-6-cloro-2-nitrobenzoato de metilo (obteniéndose en mayor proporción este último, **Esquema 7**) disminuyendo dramáticamente el rendimiento. El control de la temperatura fue un factor importante a considerar, ya que el aumento de temperatura favorece la formación del isómero en posición 2, así como la hidrólisis del grupo éster.



Esquema 7. Reacción de nitración e hidrólisis de **13** para la obtención selectiva del compuesto **14**.

La hidrólisis del grupo acetilo del producto de nitración crudo, con ambos isómeros, con H_2SO_4 en metanol fue un método muy efectivo que permitió separar ambos isómeros por recristalización fraccionada y obtener puro a **14**. El espectro de IR mostró dos bandas a 3476 y 3358 cm^{-1} de amina primaria; otras a 1702 cm^{-1} de carbonilo, 1566 cm^{-1} y 1305 cm^{-1} de grupo nitro. El análisis espectroscópico de RMN ^1H comprobó el cambio estructural, las señales se simplificaron notablemente con respecto a los anteriores intermediarios, debido a la pérdida del sistema ABX apareciendo señales simples a 7.45 y 8.02 ppm que integraron para 1H cada una correspondientes a los H-6 e H-3 respectivamente, así como una señal ancha a 7.64 ppm que desapareció al realizar el intercambio con D_2O perteneciente a la amina. La espectrometría de masas corroboró la estructura por el ión de m/z 231 y el fragmento con m/z de 199 correspondientes a la masa molar del compuesto y a la pérdida del OCH_3 .

La reducción catalítica de **14** con hidrógeno a presión y Ni-Raney generó la *o*-fenilendiamina (**15**; ver página 28, **Esquema 4**), la cual sin posterior tratamiento de purificación se sometió a la siguiente reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio alcalino a temperatura moderada, generando el 2-mercaptobencimidazol **16**. En el espectro de IR se notaron bandas a 3241 cm^{-1} de NH del anillo de bencimidazol, 1704 cm^{-1} de carbonilo y una banda intensa a 1253 cm^{-1} correspondiente a la forma de tiona. El espectro de RMN ^1H mostró una señal simple a 12.898 ppm que integró para 2H y que desapareció con el intercambio con D_2O , comprobó los hidrógenos unidos a nitrógenos en posición 1,3 del anillo de bencimidazol, cuando se encuentra en forma de tiona. En el espectro de masas el ion m/z de 242 que coincidió con el ión molecular esperado.

La metilación del tiol **16** con un solo equivalente de yoduro de metilo en medio básico se realizó a bajas temperaturas para evitar la metilación en el NH del anillo de bencimidazol, dando origen al compuesto **17**. El control de temperatura fue importante, ya que si se excede de los $10\text{ }^\circ\text{C}$ la metilación se lleva a cabo en el átomo de nitrógeno del anillo bencimidazólico. El espectro de RMN ^1H mostró una señal simple a 2.712 ppm que integró para 3H y que se asignó al metilo unido al azufre, además de las señales correspondientes al O-CH₃ y a los hidrógenos aromáticos. La espectrometría de masas mostró el ión molecular con m/z de 256 (100% de abundancia) correspondiendo a la masa molar del compuesto.

Por último, el ácido 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**18**) se obtuvo mediante hidrólisis alcalina a $70\text{ }^\circ\text{C}$ de **17**. El espectro de IR mostró una banda 3497 cm^{-1} del NH del anillo de bencimidazol, a 2465 del grupo hidroxilo y 1706 cm^{-1} del carbonilo del ácido. El espectro de RMN ^1H mostró una sola señal a campo alto a 2.695 ppm que integró para 3H perteneciente al metilo unido al azufre, la presencia de una señal simple a 12.953 ppm que desapareció al realizar intercambio con D_2O correspondió al hidrógeno del ácido carboxílico, las señales simples a 7.548 y 7.853 ppm cada uno que integró para 1H asignadas las posiciones H-6 e H-3 respectivamente, corroborando la estructura de **18**. En el espectro de masas el ión molecular y pico base con m/z de 242 correspondió a la masa molar del compuesto, la contribución isotópica del átomo de cloro se presentó con m/z de 244, además el fragmento m/z 209 (M-33) comprobó la presencia del grupo mercapto.

Por otra parte, para la obtención del ácido 5-cloro-1-metil-2-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**25**), se empezó por usar el intermediario 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**14**), el cual se obtuvo previamente en la preparación del ácido **18**, este se acetiló usando anhídrido acético y catálisis ácida para obtener la acetamida **19**. En IR se observaron la banda característica de amida secundaria a 3372 cm^{-1} y 1617 cm^{-1} , así como la correspondiente al carbonilo del éster a 1731 cm^{-1} . La espectrometría de masas confirmó la masa molar del compuesto con la identificación del ión molecular de m/z 272.

Posteriormente **19** se *N*-alquilo usando sulfato de dimetilo en medio alcalino. La concentración y adición lenta de sosa a la reacción así como el control de la temperatura evitó la hidrólisis del éster y sobre todo del acetamido evitando así la polialquilación del átomo de nitrógeno. Mediante el espectro de IR se observó la desaparición de la banda de amina secundaria. En el espectro de RMN ^1H se observó un aumento notable de las señales debido al efecto de atropoisomería de la molécula, además se observó una nueva banda a 3.20 y 3.45 ppm que integró para 3H correspondiente al *N*-metilo. Mediante espectrometría de masas se confirmó la masa molecular del compuesto con ión molecular de m/z de 286, el pico base se identificó con m/z de 244 generado por la pérdida del acetilo de la amida.

A la acetamida *N*-metilada **20** se le realizó una hidrólisis ácida en metanol, obteniendo de esta manera al 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**21**). En el espectro de IR se identificó a 3389 cm^{-1} una banda característica de amida secundaria, y en 1733 cm^{-1} de carbonilo del éster. En RMN ^1H un doblete a 2.94 ppm que integró para 3H correspondió al metilo unido a la amina; la señal simple a 3.86 ppm correspondió al metilo de éster y en 8.25 ppm un doblete ancho que integró para 1H y que desapareció con el intercambio con D_2O correspondió con el hidrógeno de la amina. En este caso no se observó multiplicidad de señales, lo que comprueba el efecto del acetilo en el fenómeno antes observado. En el espectro de masas la masa molar del compuesto se comprobó por la presencia del ión de m/z 244, además del fragmento de m/z 213 correspondiente a la ruptura del grupo éster.

El grupo nitro del producto **21** se redujo catalíticamente con hidrógeno a presión y Ni-Raney obteniendo de esta manera la diamina **22**, la cual por su estabilidad se procedió a usarla sin tratamiento posterior en la siguiente reacción. De forma análoga al compuesto **15**, la *o*-fenilendiamina **22** se trató con disulfuro de carbono en medio alcalino, obteniendo el tiol **23**.

En el espectro de RMN ^1H se observó una señal amplia a 13.082 ppm que desapareció al realizar el intercambio con D_2O correspondiente al NH del anillo de bencimidazol además los desplazamientos de los hidrógenos aromáticos coinciden con los calculados por el programa *ACD labs* a la forma de tiona. El ión molecular y pico base en espectrometría de masas se presentó con m/z de 256 coincidente con la masa molar del compuesto, el ión de m/z 225 correspondió a la pérdida del OCH_3 corroborando la presencia del éster.

Una *S*-alquilación del tiol **23** con yoduro de metilo a temperatura ambiente permitió obtener el compuesto 2-metilbencimidazol **24**. Señales simples en el espectro de RMN ^1H a 2.784, 3.70 y 3.87 ppm que integraron para 3H cada una correspondieron a los metilos unidos a S, N y O del éster respectivamente. La espectrometría de masas mostró el ión molecular y pico base con m/z de 270 correspondiente a la masa molar del compuesto.

Por último, se efectuó una hidrólisis básica sobre el éster de **24** a 75 °C, el tratamiento posterior con H_2SO_4 diluido hasta pH de 4 generó el ácido 5-cloro-1-metil-2-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**25**). El espectro de IR mostró bandas características de grupo ácido a 3433 cm^{-1} del hidroxilo y a 1699 cm^{-1} del carbonilo. En RMN ^1H , dos singuletes que integraron para 3H cada uno a 2.723 y 3.679 ppm correspondieron a los metilos unidos a S y N respectivamente, para el sistema aromático dos señales simples cada una para 1H a 7.629 y 7.95 ppm se asignaron a los H-3 e H-6, así como una señal amplia a campo bajo que desapareció al realizar intercambio con D_2O correspondió al H del ácido carboxílico. La masa molar del compuesto se corroboró con la espectrometría de masas con el ión molecular que generó el pico base de m/z 256, la contribución isotópica por parte del átomo de cloro se detectó con el ión molecular de m/z de 258 (M+2).

7.1.3. Obtención del intermediario común [6-Cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**)

Para la obtención del compuesto **30**, amina precursora para la formación de las carboxamidas finales, se siguió la ruta clásica reportada por nuestro grupo⁵⁷ con algunas modificaciones (**Esquema 5**). Se comenzó por usar el *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**26**), el cual previamente se había sintetizado en nuestro laboratorio, este compuesto se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) usando como nucleófilo al 2,3-diclorofenol en medio alcalino.

Este tipo de reacciones por lo general requieren condiciones drásticas de calor, incluso presión y tiempo prolongado lo cual lleva a la generación de subproductos que hacen difícil purificar los compuestos de interés. En este caso, se aplicó la técnica de síntesis orgánica asistida por microondas usando el horno Synthos 3000 de Anton Paar, para mejorar el rendimiento, la pureza y disminuir el tiempo de la reacción de SNAr. Se hicieron pruebas con *N,N*-dimetilformamida (DMF), un disolvente usado por nuestro equipo en este tipo de reacciones y dimetilsulfóxido (DMSO). Así mismo, se usaron varios tipos de base, carbonato de potasio (K_2CO_3), trietilamina (TEA) y potasa (KOH), en las cantidades necesarias (ver **Tabla 5**).

Se encontró que las condiciones óptimas en las que la reacción se completó fueron 140 °C a 300 W de potencia con irradiación constante y tiempo de 5 minutos en el rotor 64MG del Synthos 3000. La relación de reactivos que mejor funcionó fue 1:1:1.5 (sustrato, nucleófilo, K_2CO_3 como base) en dos mililitros de volumen de disolvente, el DMSO fue la mejor opción ya que en éste se observó la mayor transformación y menor formación de subproductos; en cambio la DMF presentó una mayor generación de subproductos. El uso de otras bases distintas al carbonato de potasio provocó generación de subproductos, permanencia de materias primas y dificultad para el aislamiento del producto de la reacción.

Tabla 5. Comparación de las reacciones de SNAr en MW modificando disolvente y el tipo de base.

Disolvente	Base	Condiciones	Reacción
DMF	K_2CO_3	140 °C, 300W, 5 min	Incompleta, subproductos
DMSO	TEA	140 °C, 300W, 10 min	No hay avance
	KOH	140 °C, 300W, 10 min	Poco avance
	K_2CO_3	140 °C, 300W, 5 min	Completa

El escalamiento de la reacción se hizo usando calentamiento convencional, con la misma relación de reactivos y se usó DMSO como disolvente. La reacción se completó en un tiempo de 30 minutos a 130 °C, comparado con las 3-4 horas que se requieren cuando el disolvente es DMF.

Si bien el tiempo de reacción se abatió drásticamente, la pureza y rendimiento se mejoraron, el uso del DMSO como disolvente es una opción poco viable debido a que prácticamente no puede recuperarse, por su alto punto de ebullición, por lo que es importante seguir buscando nuevas opciones. La obtención del éter **27** se confirmó por el cambio estructural observado en RMN ^1H por el aumento en la complejidad de las señales por la presencia de dos sistemas aromáticos; una señal simple a 2.21 ppm que integró para 3H correspondiente al $-\text{CH}_3$ del acetilo, dos singuletes que integraron para 1H cada uno a 8.24 y 8.40 ppm correspondientes a los H-6 e H-3 respectivamente, dos doble de dobles a 7.12 y 7.44 ppm y un pseudotriplete 7.32 ppm que integraron para un total de 3H correspondieron a los H-12, H-10 e H-11 respectivamente.

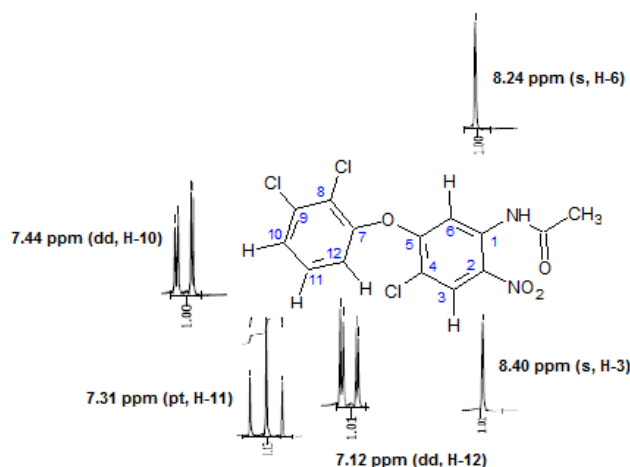


Figura 10. Multiplicidad y asignación de posiciones del compuesto **27**.

Obtenido el compuesto **27**, la acetamida se hidrolizó en medio alcalino obteniendo el producto, la nitroanilina **28**. El espectro de IR mostró dos bandas claras de amina primaria a 3468 y 3348 cm^{-1} . En RMN ^1H una señal amplia a 6.09 ppm que integró para 2H y que desapareció al realizar intercambio con D_2O correspondió al grupo amino. La espectrometría de masas mostró el ión molecular con m/z de 374, correspondiente a la masa molar del compuesto.

Una reducción catalítica con Ni-Raney e hidrógeno a presión sobre el grupo nitro de **28** a temperatura ambiente generó la *o*-fenilendiamina **29**, la cual debido a su inestabilidad se sometió inmediatamente a la reacción de ciclocondensación con bromuro de cianógeno en metanol a temperatura moderada ($50\text{ }^\circ\text{C}$) y posterior tratamiento alcalino; obteniendo de esta

manera el [6-cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**). Si bien, el rendimiento del producto crudo es muy bueno, la purificación de éste es complicado ya que se intentó recristalizar en distintos disolventes; tratamientos sucesivos con carbón activado en etanol permitieron obtener puro el compuesto, pero con bajo rendimiento. El espectro de IR presentó tres bandas a 3563, 3447 y 3366 cm^{-1} correspondiente a la amina primaria (Ar-NH₂) y al NH; otra banda en 1694 cm^{-1} correspondió enlace C=N del anillo de bencimidazol. En RMN ¹H se presentó una señal amplia a 6.46 ppm que integró para 2H y desapareció con el intercambio de D₂O correspondiendo al grupo amino de la molécula; las señales de los hidrógenos aromáticos correspondieron con las integrales y multiplicidades esperadas. El espectro de masas determinado por la técnica de FAB⁺, mostró el ión molecular a 327 de *m/z*, también el [M+H] a 328 de *m/z* así como la contribución isotópica de tres átomos de cloro por la abundancia relativa de los iones M+2 y M+4.

7.1.4. Obtención de las carboxamidas finales B3, B4 y B6

La formación de las carboxamidas se realizó en dos pasos. Primeramente se activaron los ácidos bencimidazolcarboxílicos **9**, **18** y **25** usando 1,1-carbonildiimidazol (CDI), obteniéndose los intermediarios imidazólidos reactivos correspondientes.

La activación de los ácidos se hizo en condiciones anhidras, para evitar la hidrólisis del CDI y de los intermediarios formados y a temperatura ambiente en un tiempo de 3 a 4 horas. Una vez formados los intermediarios se procedió a la reacción de amidación adicionando, a la mezcla, la amina **30**. Las reacciones requirieron calentamiento a 90-100 °C por tiempo prolongado de 4-7 días sin que se observara el consumo total de las materias primas, por lo que las carboxamidas finales se obtuvieron con rendimientos bajos.

Debido al prolongado tiempo de reacción y los bajos rendimientos, se optó por aplicar la metodología de calentamiento por microondas para optimizar las reacciones; primeramente se activaron los correspondientes ácidos con CDI, luego se transfirió la mezcla más la amina **30** al sistema de MW. Las condiciones de calentamiento fueron: 180 °C por 10 minutos e irradiación constante, usando como disolvente en todos los casos DMF. Las reacciones para **B3** y **B6** se completaron en solo 10 minutos y los rendimientos aumentaron considerablemente de 22 a 89.9% para **B3** y de 23.2 a 89.5% para **B6**. En el caso de la

amida **B4**, al aplicar las mismas condiciones previamente usadas no mostraron ser la mejor opción ya que se generaban subproductos. Una prueba posterior usando mezcla de THF/MeCN (1:1) en lugar de DMF en las mismas condiciones de temperatura hizo que la reacción se completara obteniéndose **B4**; sin embargo, la generación de subproductos y debido a la poca cantidad que se puso a reaccionar hicieron difícil su purificación; aún así con la técnica de calentamiento con MW se tuvo una ganancia de poco más de 10% que por calentamiento convencional y se redujo el tiempo de 7 días a 10 minutos.

Tabla 6. Comparación de condiciones de reacción para la obtención de las carboxamidas finales.

Carboxamida	Calentamiento	Disolvente	Condiciones	Rendimiento
B3	Convencional	DMF	60 °C, 5 días	22 %
	MW	DMF	180 °C, 10 min	89.9 %
B4	Convencional	THF	T Amb, 7 días	43 %
	MW	THF/MeCN	180 °C, 10 min	50.3 %
B6	Convencional	DMSO	70 °C, 3 días	23.2 %
	MW	DMF	180 °C, 10 min	89.5 %

7.1.5. Caracterización de las carboxamidas finales **B3**, **B4** y **B6**

Para la caracterización de los compuestos finales se usaron las técnicas espectroscópicas y espectrométricas comunes complementadas con los experimentos de RMN en dos dimensiones (HSQC, COSY y HMBC).

7.1.5.1. Caracterización de la carboxamida **B3**

Para la carboxamida *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**B3**), el espectro de IR mostró una sola banda a 3362 cm⁻¹ asignada al NH de amida secundaria, así como una señal a 1671 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo y en 1259 cm⁻¹ al grupo éter. En el espectro de RMN ¹H se observaron claramente dos señales simples a 2.76 y 3.75 ppm que correspondieron a los grupos metilo unidos a azufre y nitrógeno respectivamente, en cuanto a la región del espectro que compete a la parte aromática de la molécula ésta integró para 8H; el número de señales así como la multiplicidad presentada (ver **Tabla 4**), concordó con lo esperado para la estructura de **B3**. Con relación al espectro de RMN ¹³C, solo se pudieron observar 19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

señales de las 23 esperadas, esto puede ser explicado por la lenta relajación de algunos núcleos de ^{13}C (en especial los de tipo cuaternario) lo que conlleva a que el equipo no lo detecte o bien la intensidad de señal mostrada sea pequeña. En el espectro de RMN de ^{13}C resaltaron las señales de los metilos alifáticos a 14.48 (S- CH_3) y 31.04 ppm (N- CH_3), así como la señal a 166.86 ppm asignada al C=O de la amida.

Mediante el experimento HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) presentado en la **Figura 11**, se realizó una primera asignación de las señales, las correlaciones se enlistan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Correlaciones de ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HSQC de la carboxamida **B3**.

Posición del H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Desplazamiento del C (δ en ppm)
3	8.40	110.29
5	7.96	122.45
6	7.64	117.42
19	7.37	124.63
20	7.27	129.10
21	6.69	115.63
22	3.75	31.04
23	2.76	14.48

Mediante el experimento COSY (Correlation Spectroscopy), de correlación homonuclear, presentado en la **Figura 12**, se encontraron las correlaciones de los acoplamientos de hidrógenos vecinos, observándose esto por las señales que se presentaron fuera de la diagonal. El H-21 se acopla con el H-20, una correlación del H-5 con H-6 y una correlación que se observó poco debido a la cercanía de las señales con H-19 con H-20 (**Tabla 8**). Este experimento complementó la asignación hecha en el HSQC.

Tabla 8. Correlación de ^1H - ^1H observadas en el espectro COSY de la carboxamida **B3**.

Posición de los Hidrógenos acoplados	Desplazamiento (δ en ppm)
H-5; H-6	7.96; 7.64
H-19; H-20	7.37; 7.27
H-20; H-21	7.27; 6.69

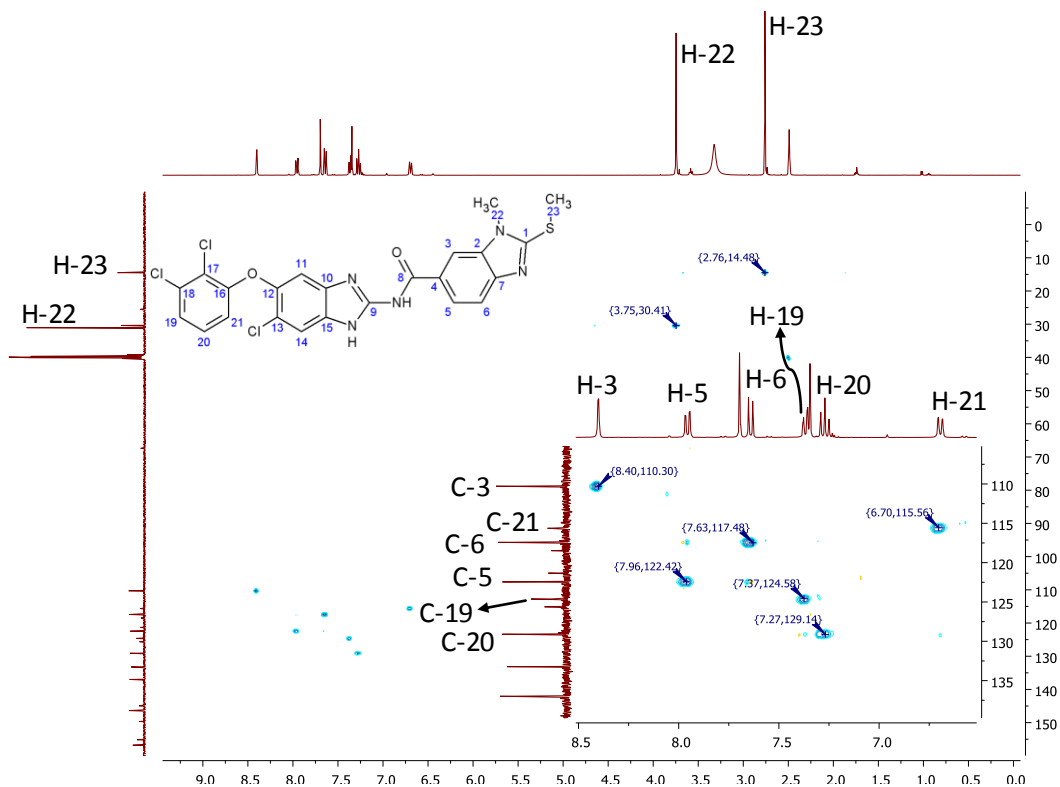


Figura 11. Espectro HSQC de la carboxamida B3 (numeración arbitraria). La ampliación corresponde a la región del espectro de la parte aromática de la molécula.

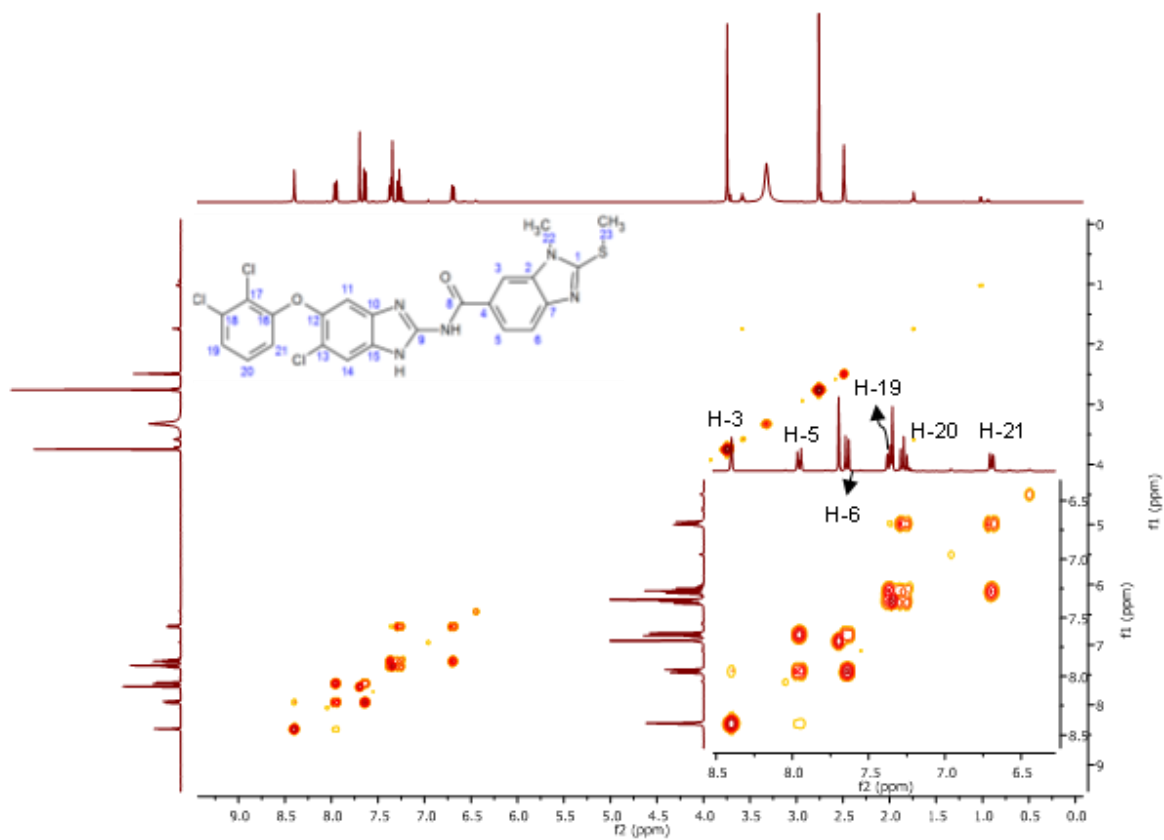


Figura 12. Espectro COSY de la carboxamida B3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de RMN para ^{13}C junto con el experimento de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), presentado en la **Figura 13**, permitió la asignación de las posiciones de los núcleos restantes, las correlaciones se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Correlaciones de ^1H y ^{13}C observadas en el espectro HMBC de la carboxamida **B3**.

Posición de H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (δ en ppm)
3	8.40	2	139.99
		5	122.45
		7	146.37
		8	166.86
5	7.96	3	110.29
		7	146.37
		8	166.86
6	7.64	2	139.99
		4	125.62
11	7.34	13	144.95
		15	118.48
14	7.70	13	144.95
		15	118.48
19	7.37	17	121.33
		18	133.23
		21	115.63
20	7.27	16	155.16
		18	133.23
21	6.69	17	121.33
		19	124.63
22 (N-CH ₃)	3.75	1	156.79
		2	136.99
23 (S-CH ₃)	2.76	1	156.79

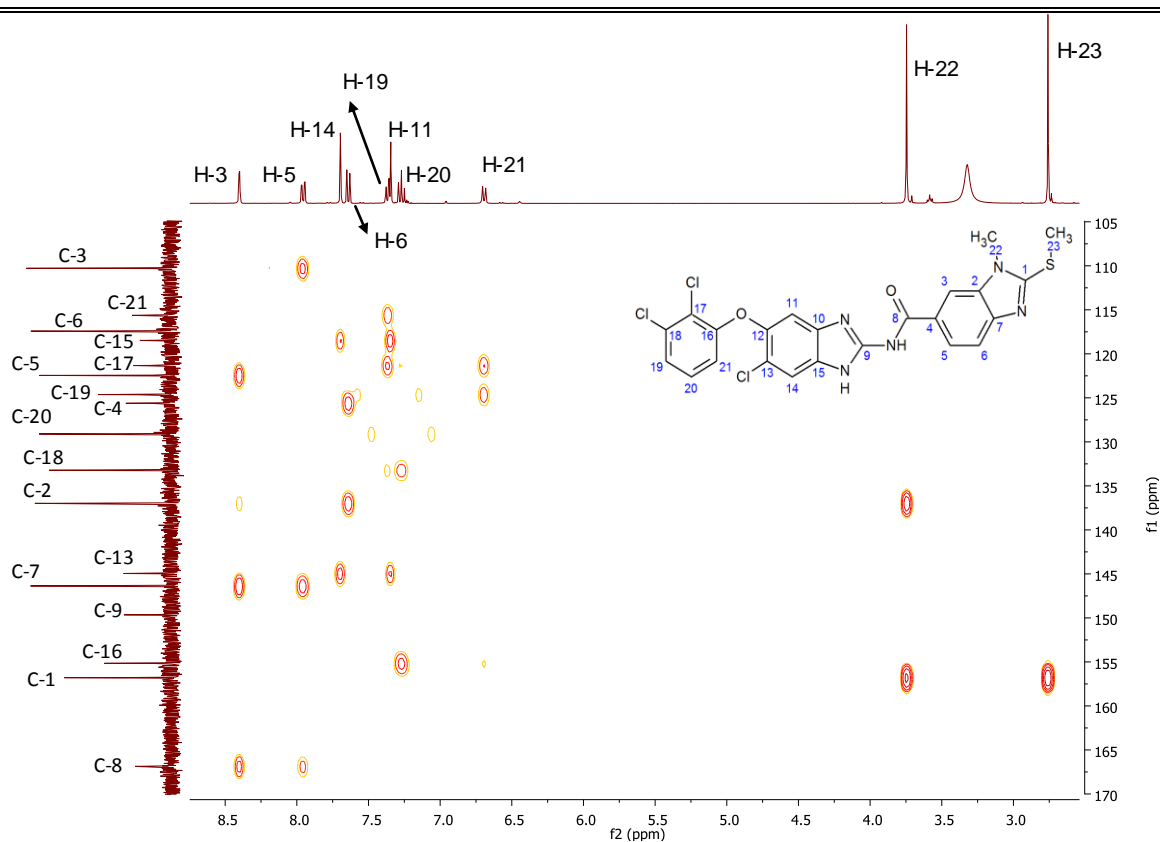


Figura 13. Espectro HMBC de la carboxamida **B3**.

La espectrometría de masas mostró el ión molecular de m/z 531 que fue concordante con la masa del compuesto, la contribución isotópica por parte de los átomos de cloro se observó en el ión de m/z 533 (M+2) y 535 (M+4). El pico base se originó por la ruptura del enlace amida generando el ión de m/z 205 correspondiente al fragmento del ácido.

7.1.5.2. Caracterización de la carboxamida **B4**

Para la carboxamida 6-cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B4**), su espectro de IR mostró bandas a 3340 cm^{-1} de NH del bencimidazol y de la amida, la banda de carbonilo se presentó a 1640 y a 1574 cm^{-1} una banda asignada al estiramiento C=N del anillo bencimidazólico aromático. En el espectro de RMN ^1H se observó una señal a 2.71 ppm que integró para 3 hidrógenos asignada al metilo unido a azufre, la región del espectro correspondiente a la parte aromática de la molécula integró para 7 hidrógenos y presentó la multiplicidad esperada, además una señal amplia a 12.48 ppm que integró para 3 hidrógenos que se asignaron a los hidrógenos unidos a nitrógeno de la molécula.

Mediante el experimento HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) presentado en la **Figura 14**, se asignaron los hidrógenos unidos a carbono, aunque sólo se observaron cuatro señales, estas correlaciones se enlistan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Correlaciones de ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HMQC de la carboxamida **B4**.

Posición del H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Desplazamiento del C (δ en ppm)
19	7.37	124.24
20	7.27	128.70
21	6.67	115.15
22	2.71	13.73

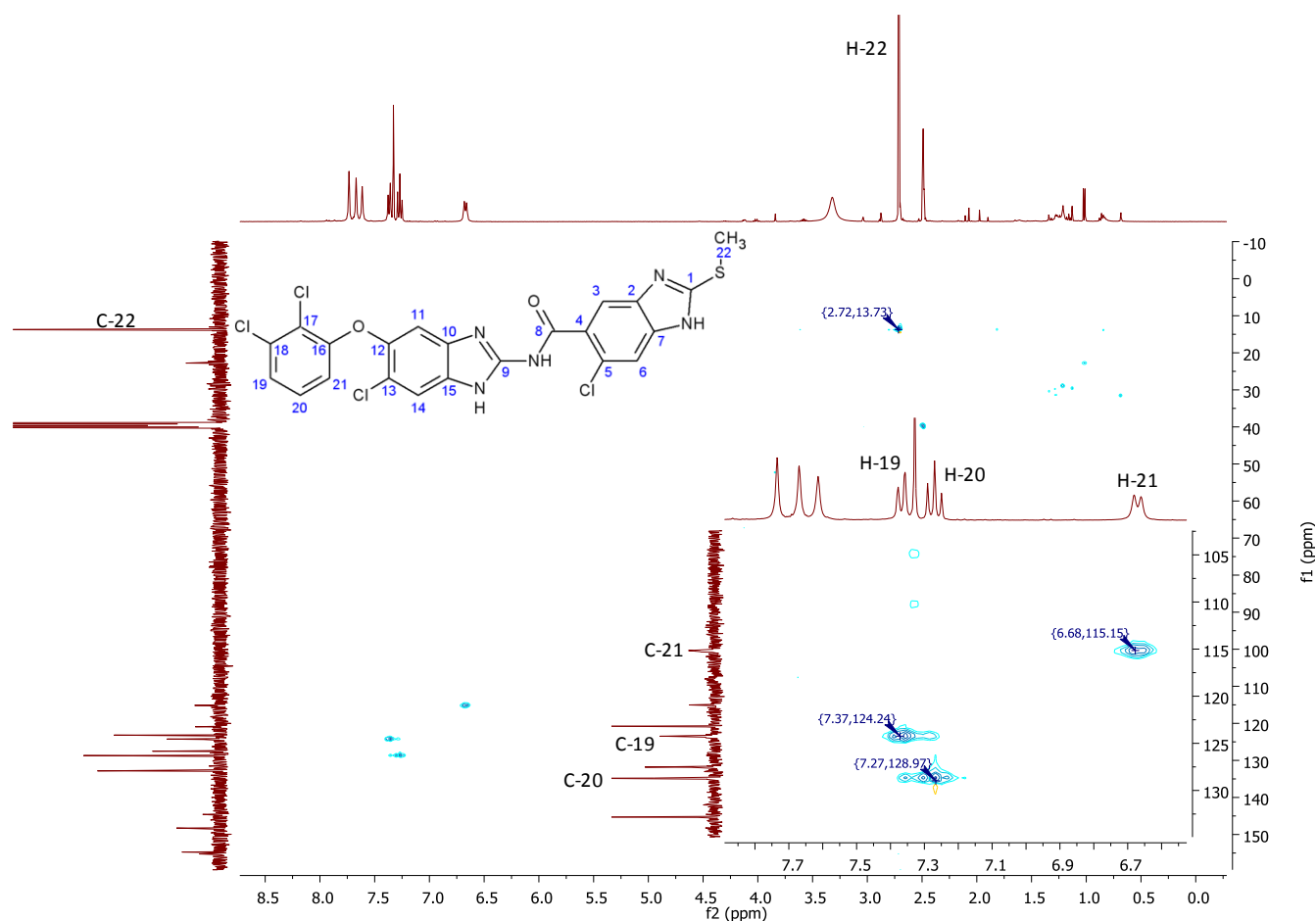


Figura 14. Espectro HMQC de la carboxamida **B4**.

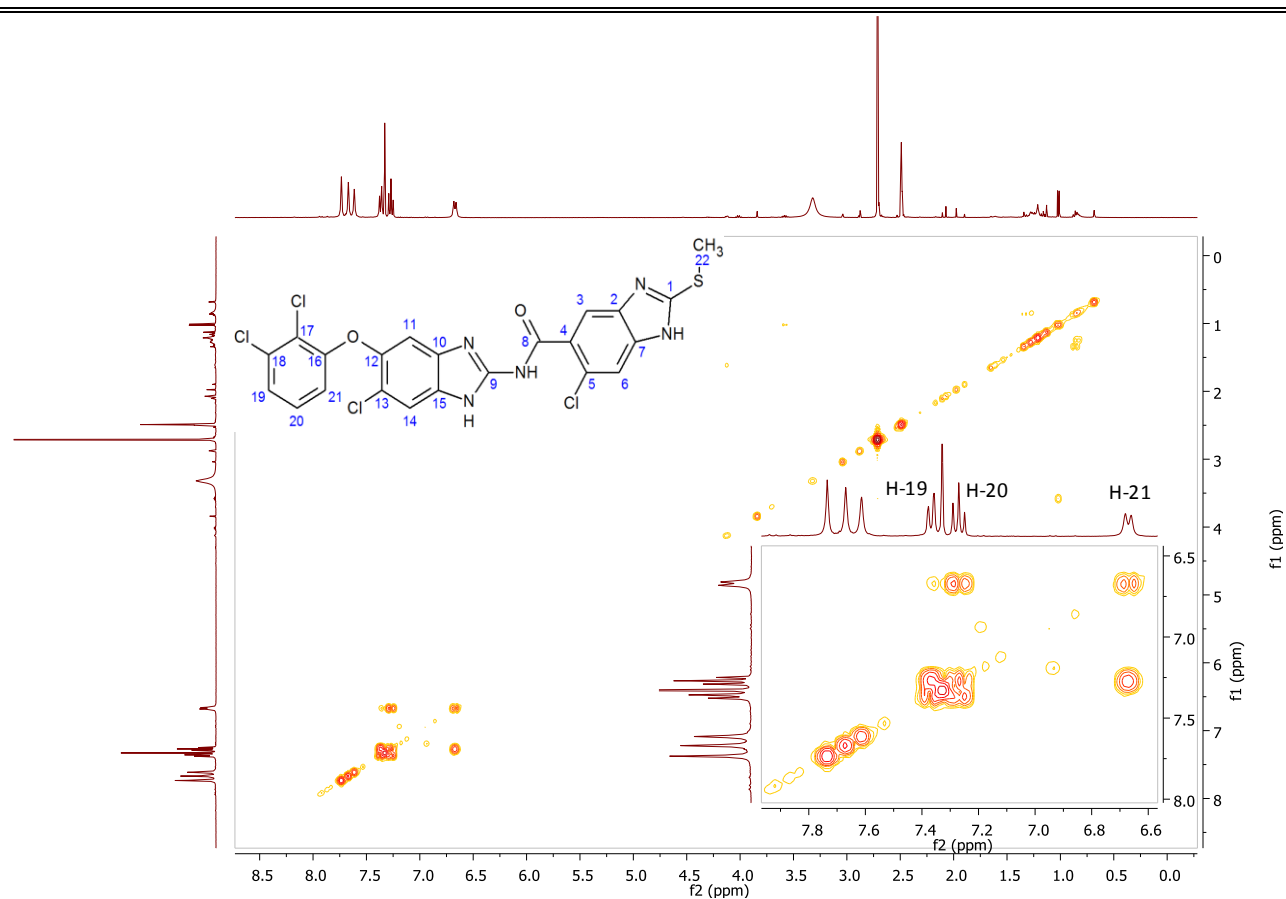


Figura 15. Espectro COSY de carboxamida **B4**.

En el espectro COSY, que se muestra en la **Figura 15**, sólo se observaron las correlaciones entre H-20 e H-21 y se aprecian poco las de H-19 con H-20.

Tabla 11. Correlación de ^1H - ^1H observadas en el espectro COSY de la carboxamida **B4**.

Posición de los Hidrógenos acoplados	Desplazamiento (δ en ppm)
H-19; H-20	7.37; 7.27
H-20; H-21	7.27; 6.67

Con el espectro de RMN ^{13}C conjuntamente con el de HMBC, mostrado en la **Figura 16**, se realizaron las asignaciones faltantes. Cabe señalar que sólo se observaron para el espectro de ^{13}C 14 señales, de las 22 esperadas, éstas se muestran en la **Tabla 12**. Esta falta de señales también puede ser explicada por la lenta relajación que presentan ciertos núcleos de ^{13}C , en especial de los de tipo cuaternario como lo son los átomos de carbono que se encuentran formando la unión entre ambos ciclos aromáticos.

Tabla 12. Correlaciones de ^1H y ^{13}C observadas en el espectro HMBC de la carboxamida **B4**.

Posición de H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (δ en ppm)
3	7.73	5	123.18
		8	166.48
6	7.67	7 ó 13	144.54
11	7.33	6 ó 15	118.19
		7 ó 13	144.54
19	7.37	17	120.92
		18	132.83
		21	115.15
20	7.27	16	154.73
		18	132.83
21	6.67	17	120.92
		19	124.24
22 (S-CH ₃)	2.71	1	155.25

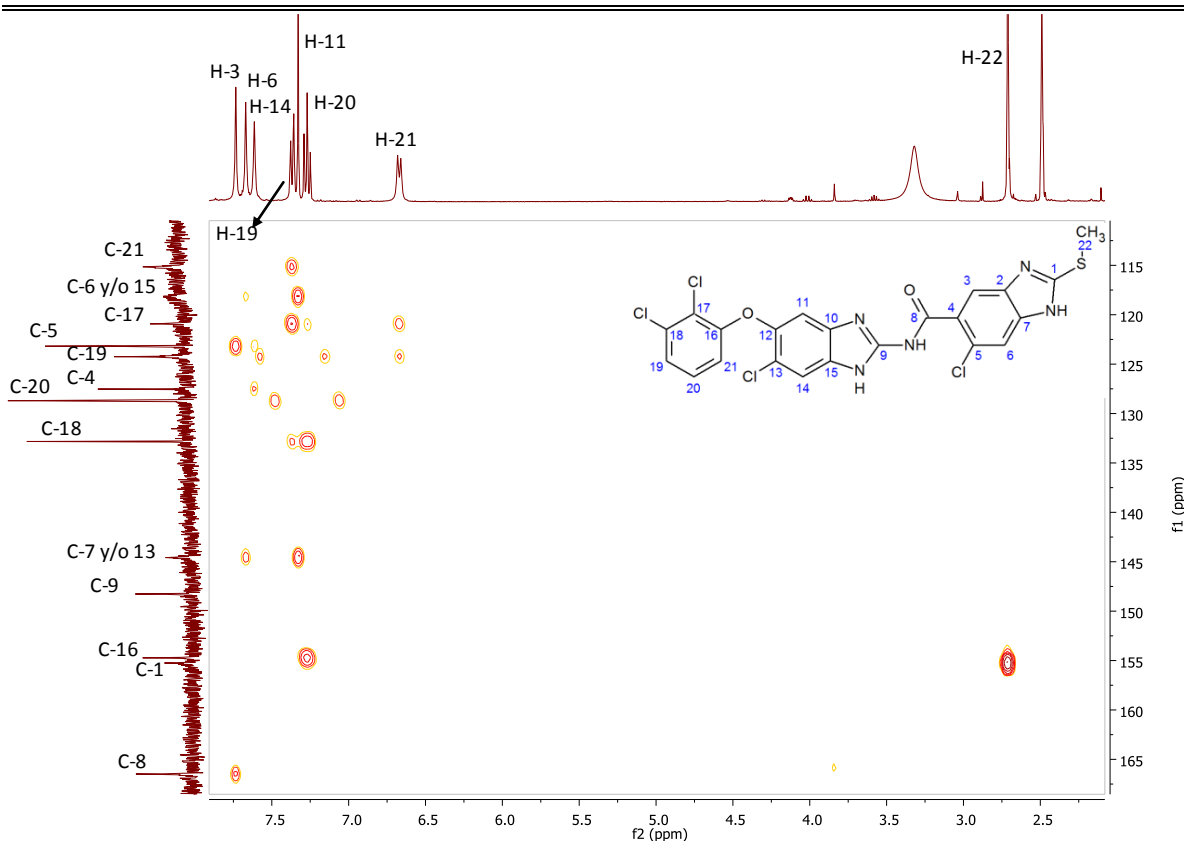


Figura 16. Espectro HMBC de la carboxamida **B4**.

La espectrometría de masas mostró el ión de m/z 551 perteneciente a la masa del compuesto, además la contribución isotópica de los átomos de cloro se observó por los iones de m/z 553 ($M+2$) y 555 ($M+4$), el pico base se originó por la ruptura del enlace amida generando el ión de m/z 225 correspondiente a la parte ácida de la molécula.

7.1.5.3. Caracterización de la carboxamida **B6**

Para la comprobación de la estructura de la carboxamida 5-cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**B6**), la espectroscopía de RMN ^1H permitió realizar una primera identificación de señales. En el espectro se observaron dos señales simples a campo alto que integraron para 3 hidrógenos cada uno correspondientes a los metilos unidos a azufre y nitrógeno. La región del espectro correspondiente a la parte aromática de la molécula integró para 7 hidrógenos y presentó la multiplicidad esperada (ver **Tabla 4**). Además dos señales amplias a 12.25 y 12.51 ppm que integraron para 2 hidrógenos y desaparecieron con el intercambio con D_2O correspondieron a los hidrógenos unidos a nitrógeno de la molécula.

Mediante el experimento HSQC, mostrado en la **Figura 17**, se asignaron primeramente los hidrógenos unidos a carbono, las correlaciones se enlistan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Correlaciones de ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HSQC de la carboxamida **B6**.

Posición del H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Desplazamiento del C (δ en ppm)
3	7.91	110.93
6	7.71	118.45
19	7.36	124.69
20	7.27	129.11
21	6.69	115.64

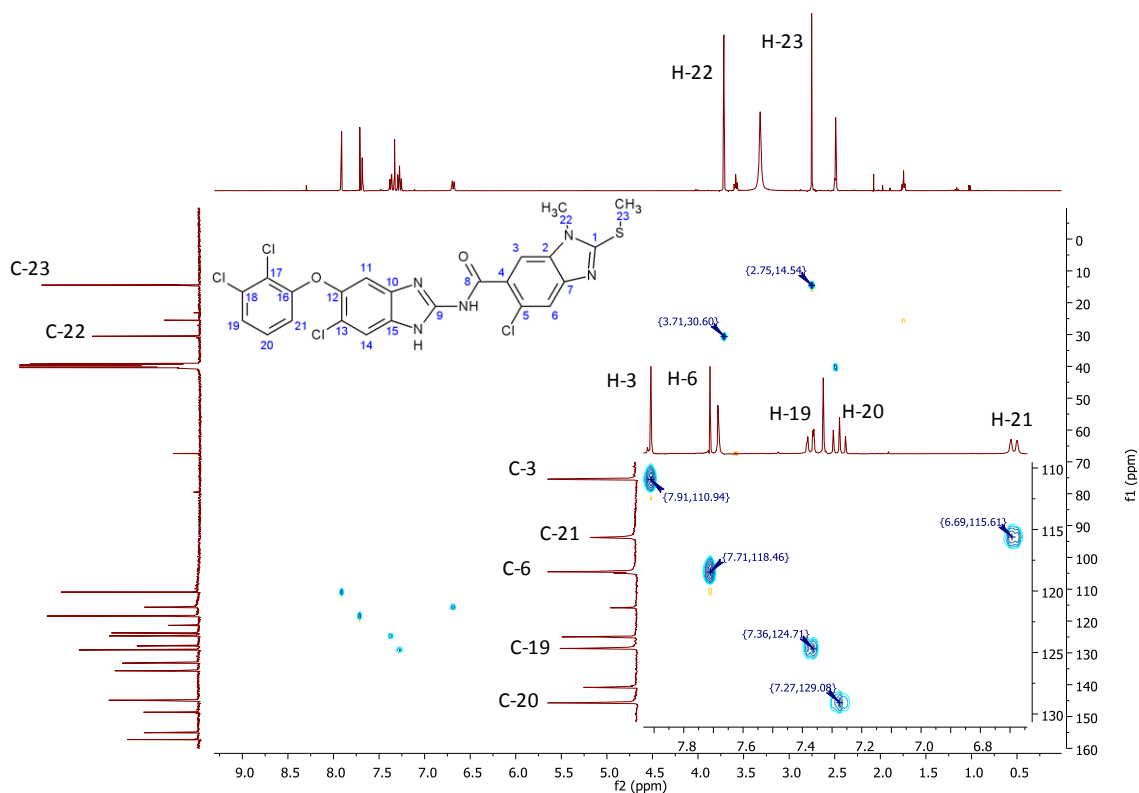


Figura 17. Espectro HSQC de la carboxamida **B6**.

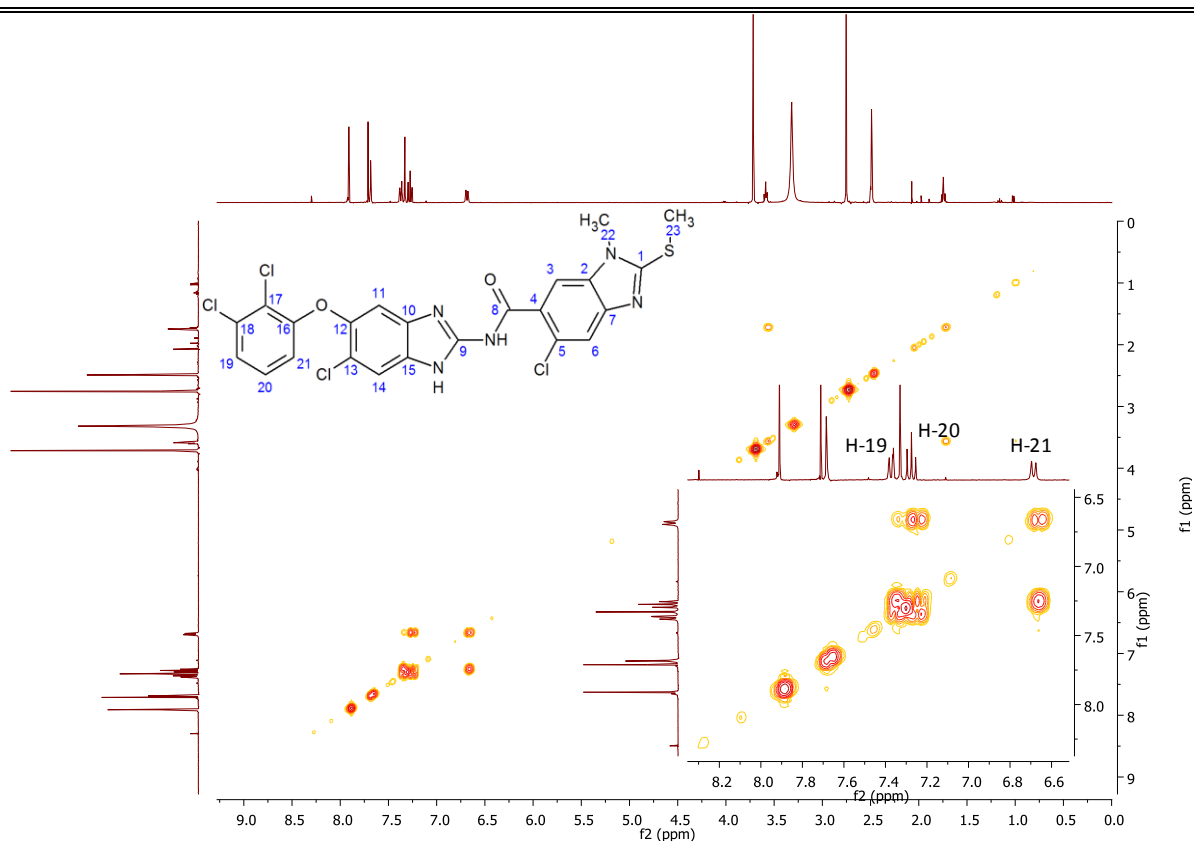


Figura 18. Espectro COSY de la carboxamida **B6**.

Con el espectro COSY, mostrado en la **Figura 18**, sólo se encontraron interacciones entre los H-20 y H-21, y H-19 con H-20.

Tabla 14. Correlación de ^1H - ^1H observadas en el espectro COSY de la carboxamida **B6**.

Posición de los Hidrógenos acoplados	Desplazamiento (δ en ppm)
H-19; H-20	7.37; 7.27
H-20; H-21	7.27; 6.69

Posteriormente, mediante el espectro de RMN ^{13}C complementado con el experimento HMBC, mostrado en la **Figura 19**, se realizaron las demás asignaciones, las correlaciones encontradas se enlistan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Correlaciones de ^1H y ^{13}C observadas en el espectro HMBC de la carboxamida **B6**.

Posición de H	Desplazamiento del H (δ en ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (δ en ppm)
3	7.91	2	135.63
		5	123.73
		6	118.45
		7	144.89
		8	166.85
6	7.71	2	135.63
		3	110.93
		4	127.79
		5	123.73
		7	144.89
11	7.33	13	145.04
		15	118.59
14	7.68	13	145.04
		15	118.59
19	7.37	17	121.36
		21	115.64
20	7.27	16	155.10
		18	133.23
21	6.69	17	121.36
		19	124.69
22 (N-CH ₃)	3.72	1	157.27
		2	135.63
23 (S-CH ₃)	2.75	1	157.27

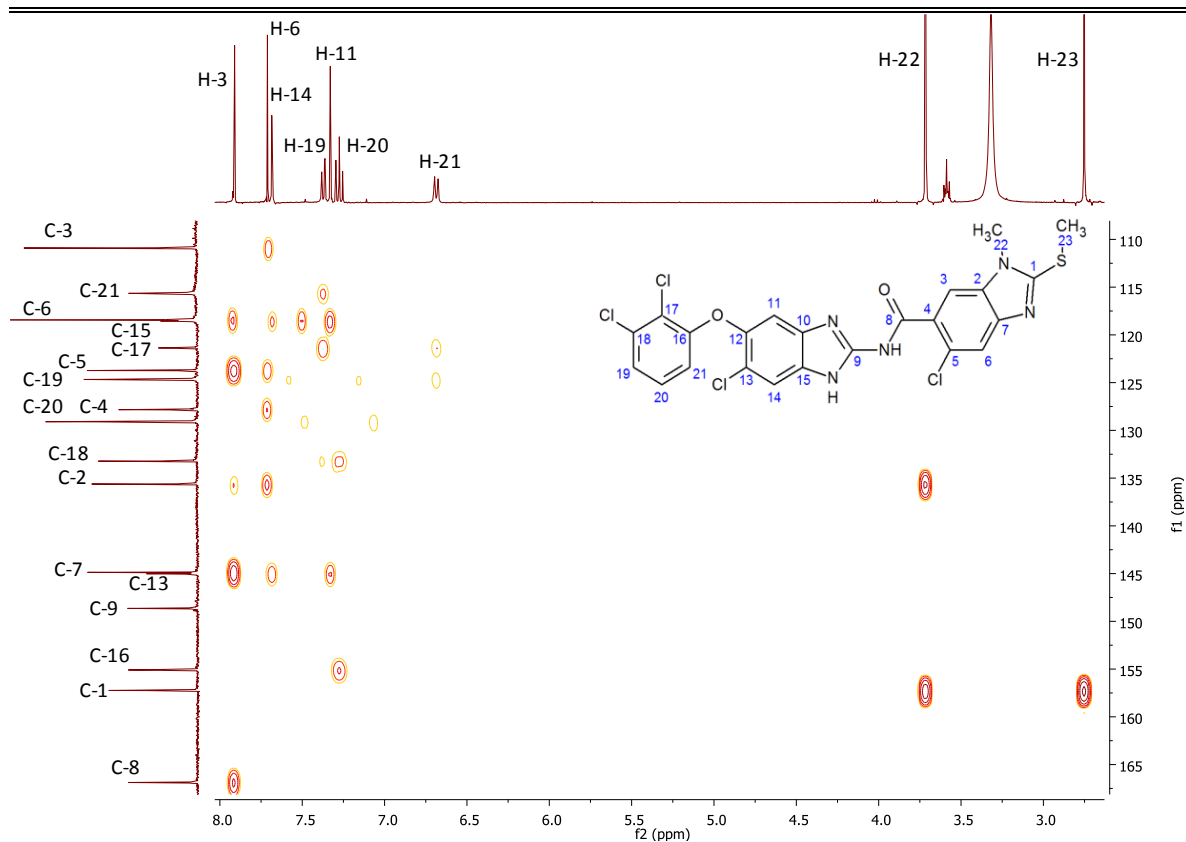


Figura 19. Espectro HMBC de la carboxamida **B6**.

La espectrometría de masas mostró la presencia del ión molecular de m/z 565 concordante con la masa del compuesto, la contribución isotópica de los cuatro átomos de cloro se observó en los iones de m/z 567 (M+2) y m/z 569 (M+4), el fragmento de m/z 239 se originó por la ruptura del enlace amida que fue el ión más abundante (pico base).

Cabe señalar que la estabilidad de las carboxamidas en medios próticos como metanol o agua y a los tratamientos realizados para su purificación confirman su obtención y que la unión se llevó a cabo en el grupo amino y no el átomo de nitrógeno del anillo de bencimidazol; además en el espectro de IR todas las carboxamidas muestran una banda característica de amina secundaria, ya que de haberse realizado la unión en el nitrógeno del anillo bencimidazólico se observarían dos bandas características de amina primaria, las cuales no se observan en ningún espectro de IR.

7.2. Parte biológica

7.2.1. Ensayos de susceptibilidad *in vitro* en los parásitos

Las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6** se sometieron a pruebas de actividad *in vitro* contra *E. histolytica* además de los parásitos *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, en donde se midió la susceptibilidad (CI₅₀) de estos protozoarios a los compuestos mediante el método de subcultivos. Los resultados se muestran en la **Tabla 16** y el **Gráfico 1**.

Tabla 16. Actividad antiprotozoaria *in vitro* y 1/CI₅₀ de las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6**, y de fármacos de referencia.

Compuesto	<i>E. histolytica</i>		<i>G. intestinalis</i>		<i>T. vaginalis</i>	
	CI ₅₀ (µM)	1/CI ₅₀	CI ₅₀ (µM)	1/CI ₅₀	CI ₅₀ (µM)	1/CI ₅₀
B3	0.0159	62.83	0.019	52.63	0.505	1.98
B4	0.017	61.35	0.493	2.00	0.159	6.3
B6	0.0185	54.05	0.040	25.0	0.485	2.06
Albendazol (ABZ)	56.33	0.02	0.038	26.32	3.39	0.29
Metronidazol (MTZ)	0.350	2.86	1.226	0.82	0.236	4.24
Nitazoxanida (NTZ)	0.055	18.18	0.013	76.92	0.110	9.09

Todos los compuestos fueron más potentes que los fármacos de referencia contra *E. histolytica*, siendo el compuesto **B3** el más activo. En general, las carboxamidas fueron hasta 3500 veces más potentes que ABZ, 3 a 3.5 veces mejores que NTZ y 19 a 22 veces más activos que MTZ.

Para el caso de *G. intestinalis*, **B3** fue el que presentó la mayor actividad antiprotozoaria. En general, los compuestos fueron iguales o incluso superiores en actividad al ABZ y marcadamente superiores que el MTZ; sin embargo, ninguno superó la potencia de la NTZ.

Los resultados de evaluación contra *T. vaginalis* mostraron que los compuestos son poco activos en contra de este parásito; si bien presentaron mayor actividad comparada con ABZ, no superan las presentadas por MTZ y NTZ.

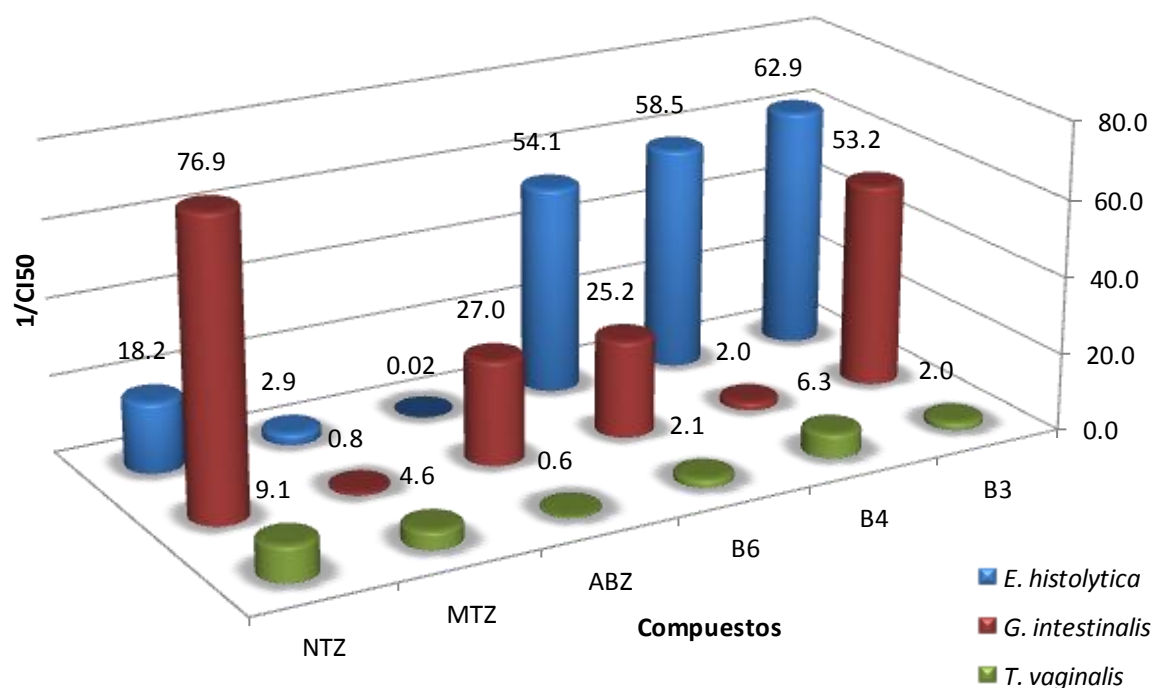


Gráfico 1. Comparación de las potencias presentadas por los compuestos **B3**, **B4** y **B6** evaluados en los distintos parásitos.

Con las carboxamidas híbridas obtenidas en este trabajo se completo la serie de moléculas diseñadas previamente⁵⁶, por lo que los resultados de actividad biológica obtenidos en trabajos previos^{57, 58} se recopilaron y se analizaron, estos resultados se presentan en la **Tabla 17** y **Gráfico 2**.

Tabla 17. Actividad antiprotozoaria *in vitro* y 1/CI₅₀ de las carboxamidas y de fármacos de elección.

Compuesto	<i>E. histolytica</i>		<i>G. intestinalis</i>		<i>T. vaginalis</i>	
	CI ₅₀ (μM)	1/ CI ₅₀	CI ₅₀ (μM)	1/ CI ₅₀	CI ₅₀ (μM)	1/ CI ₅₀
B1	0.019	52.63	0.046	21.74	0.104	9.62
B2	0.026	38.46	0.028	35.71	0.068	14.71
B3	0.016	62.89	0.019	52.63	0.505	1.98
B4	0.017	61.35	0.493	2.00	0.160	6.3
B5	0.020	50	0.025	40	0.039	25.64
B6	0.019	54.05	0.040	25.0	0.485	2.06
Albendazol (ABZ)	56.33	0.02	0.037	26.32	1.592	0.29
Metronidazol (MTZ)	0.350	2.86	1.226	0.82	0.216	4.24
Nitazoxanida (NTZ)	0.055	18.18	0.013	76.92	0.110	9.09

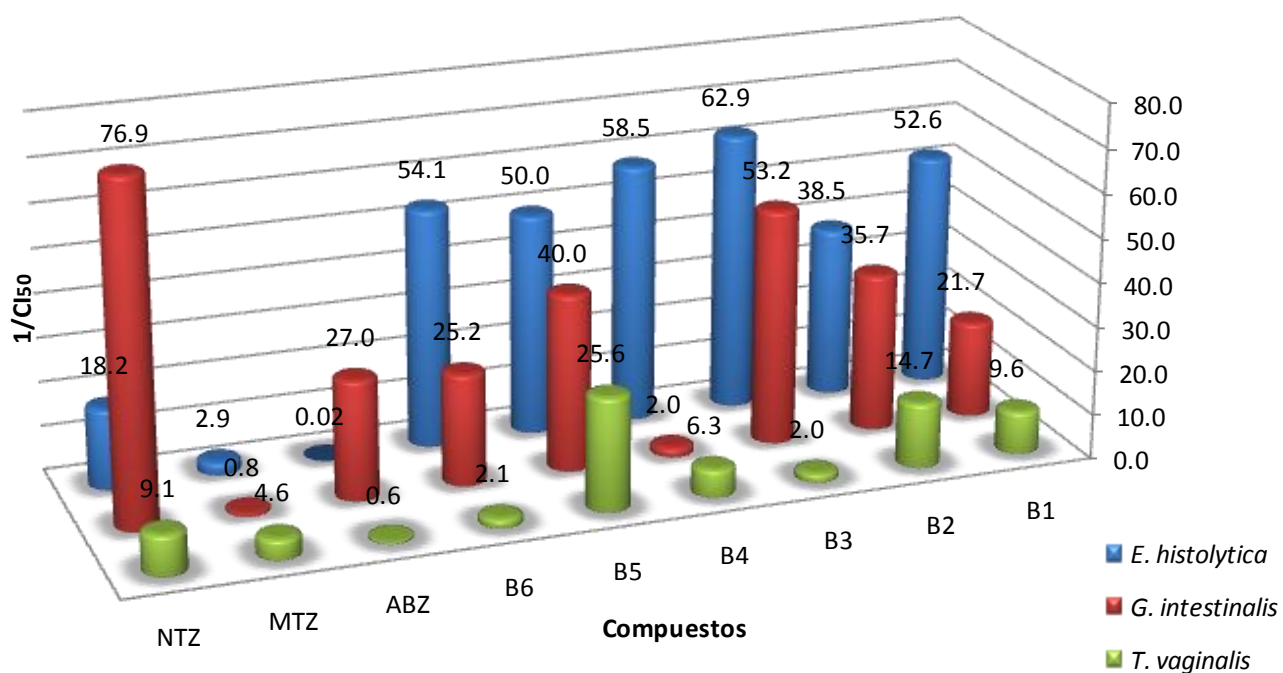


Gráfico 2. Comparación de las potencias presentadas por las carboxamidas evaluadas en los distintos parásitos.

En el ensayo contra *E. histolytica*, todos los compuestos fueron superiores en potencia a los fármacos usados para el tratamiento de esta parasitosis (MTZ y NTZ) y por consiguiente mucho más activos que ABZ, el cual no está clasificado como amebicida. El compuesto **B3** fue el que presentó la mayor actividad de todos los compuestos de la serie, mientras que **B2** fue el que presentó la menor actividad; sin embargo, aún así fue superior a los fármacos de referencia. Al parecer la disposición 1,6 del sustituyente voluminoso con respecto al CH₃ en la posición 1 del anillo bencimidazol, de la parte ácida de la amida, tiene gran relevancia en la actividad.

Contra *G. intestinalis*, la potencia que presentó la NTZ no fue superada por los compuestos diseñados, **B3** fue el que tuvo mayor actividad giardicida seguido por **B5**, los menos activos fueron **B1** y **B4**. En general todos los compuestos tuvieron una potencia equiparable o superior a las de ABZ y MTZ.

En el caso de *T. vaginalis*, los compuestos **B5** y **B2** fueron los que mayor potencia mostraron; **B3**, el más activo con los otros dos parásitos, fue el compuesto que tuvo menor actividad junto con **B6** y no superó las presentadas por MTZ y NTZ. Para este protozoo la relación estructural entre el sustituyente voluminoso y el CH₃ en 1 del bencimidazol, es opuesta a lo encontrado para *E. histolytica*. Los resultados de actividad que presentaron las carboxamidas más activas, son también de gran importancia debido a que son pocos los compuestos, además de los comerciales, que tienen efecto sobre este protozoo.

Como resultado de estos ensayos se concluye que las carboxamidas sintetizadas en este trabajo, así como las previamente obtenidas, resultaron ser potentes amebicidas destacando entre ellas **B3** que fue la de mayor actividad. En cuanto respecta a los otros parásitos, los compuestos son efectivos pero la potencia es equiparable o ligeramente superior a los fármacos de elección. Los resultados obtenidos proporcionan información muy importante para posteriores estudios de correlación estructura-actividad que permitan diseñar compuestos más potentes. Cabe resaltar que el compuesto **B3** fue el más activo para los parásitos que residen principalmente en el tracto gastrointestinal (*E. histolytica* y *G. Intestinalis*) y su opuesto **B5** para *T. vaginalis*.

7.2.1. Ensayos de inhibición enzimática *in vitro* con Triosafosfato Isomerasa

La evaluación de la capacidad inhibitoria de las carboxamidas obtenidas y de sus precursores inmediatos, el 2-aminobencimidazol **30** y los ácidos bencimidazolcarboxílicos correspondientes **9**, **18** y **25**, se realizó en las TIM de *T. cruzi* (TcTIM) y *T. brucei* (TbTIM) debido a la falta de disponibilidad de la enzima de *E. histolytica*, para la cual fueron diseñados; sin embargo, dado que los resultados obtenidos fueron interesantes, se presentan en este trabajo. Los resultados se muestran en la **Tabla 18** y **Gráfico 3**.

Tabla 18. Actividad inhibitoria de los compuestos en la enzima TIM a distintas concentraciones.

Compuestos	% actividad inhibitoria TcTIM	% actividad inhibitoria TbTIM
9	0 (200µM)	0 (200µM)
18	0 (200µM)	0 (200µM)
25	5 (200µM)	0 (200µM)
30	40 (200µM)	0 (200µM)
B3	62 (200µM)	0 (100µM)
B4	71 (100µM)	84 (100µM) 50 (10µM)
B6	66 (200µM)	4 (100µM)

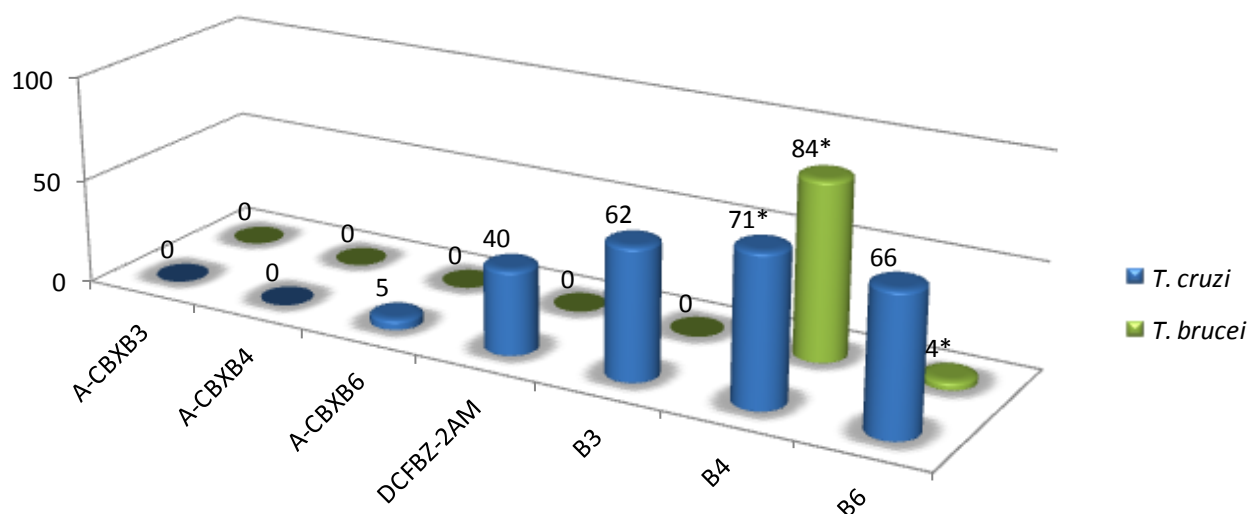


Gráfico 3. Actividad inhibitoria a la concentración de 200 µM TcTIM y TbTIM de los compuestos sintetizados y sus precursores.* Ensayos realizados a 100 µM.

Los precursores presentaron muy baja o nula actividad inhibitoria, con excepción del compuesto **30** que inhibió en 40% a la TcTIM.

Las carboxamidas **B3**, **B4** y **B6** presentaron capacidad inhibitoria de modera a buena, en especial para la TcTIM, resaltando la actividad de **B4**, el más activo en las enzimas de ambas especies incluso a la concentración de 10 μ M, para la TbTIM.

Con los resultados obtenidos previamente^{57, 58} se comparó la actividad de la serie en estas enzimas, los resultados se muestran en la **Tabla 19** y **Gráfico 4**.

Tabla 19. Comparativa de actividad inhibitoria de los compuestos en la enzima TIM a distintas concentraciones.

Compuestos	% actividad inhibitoria	
	TcTIM	TbTIM
A-CBXB1	15 (200 μ M)	13 (200 μ M)
A-CBXB2	11 (200 μ M)	0 (200 μ M)
A-CBXB3 (9)	0 (200 μ M)	0 (200 μ M)
A-CBXB4 (18)	0 (200 μ M)	0 (200 μ M)
A-CBXB5	0 (200 μ M)	8 (200 μ M)
A-CBXB6 (25)	5 (200 μ M)	0 (200 μ M)
DCFBZ-2AM (30)	40 (200 μ M)	0 (200 μ M)
B1	22 (200 μ M)	0 (200 μ M)
B2	27 (200 μ M)	0 (200 μ M)
B3	62 (200 μ M)	0 (100 μ M)
B4	70 (100 μ M)	84 (100 μ M) 50 (10 μ M)
B5	0 (100 μ M)	0 (100 μ M)
B6	66 (200 μ M)	4(100 μ M)

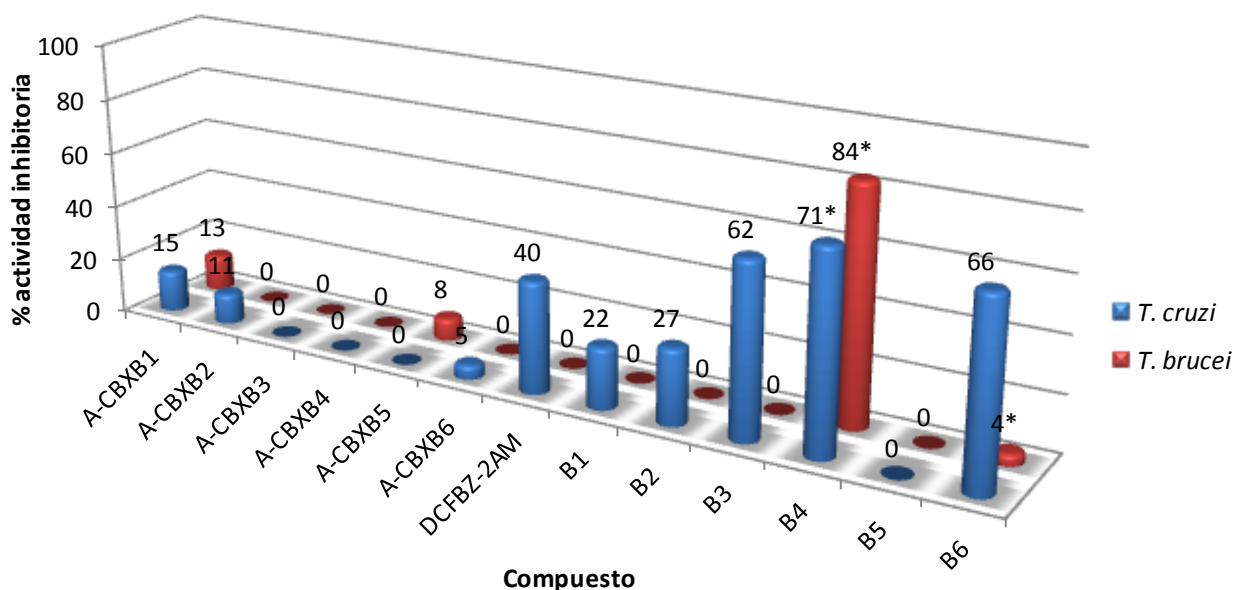


Gráfico 4. Actividad inhibitoria a la concentración de 200 µM sobre la TcTIM y TbTIM de los compuestos y sus precursores.* Ensayos realizados a 100 µM.

Para la TIM de *T. cruzi*, en general los compuestos presentaron de regular a buena actividad inhibitoria con una disminución de 22 a 71% de la actividad enzimática, en donde **B4** fue el más activo presentando 71% de inhibición a la concentración de 100 µM, el menos activo fue la carboxamida **B5**. Los compuestos clorados en la parte ácida de la amida (**B4-B6**) presentaron la mayor actividad en comparación de sus análogos no clorados (**B1-B3**), lo que parece indicar que tener cloro puede favorecer la afinidad por la enzima así como la disposición 1,6 entre el grupo voluminoso y el CH₃ y/o el H del tautómero de **B4**.

En cuanto a la evaluación de la TIM de *T. brucei*, los compuestos son poco activos o no presentaron actividad inhibitoria. La carboxamida **B4** fue el más activo llegando a inhibir la actividad hasta en un 50%, actividad relativamente buena tomando en cuenta que la concentración fue de 10 µM. A pesar de ser un dato interesante la relación de actividades de **B4** con los demás compuestos tiene un comportamiento sospechoso, lo que hace suponer que se trate de un falso positivo. Es importante realizar un nuevo estudio sobre la actividad inhibitoria de los compuestos con la TbTIM.

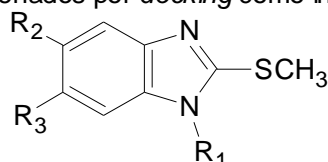
7.3. Parte computacional

Estudios de acoplamiento molecular y diseño de nuevos agentes inhibidores de la triosafato isomerasa de *E. histolytica* (EhTIM)

Con esta herramienta de la Química Farmacéutica se intentaron explicar los resultados obtenidos en las pruebas de actividad biológica; además, permitió generar información acerca de los requerimientos estructurales para inhibir a la EhTIM.

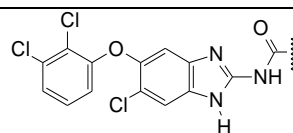
Retomando los resultados y observaciones realizadas anteriormente⁵⁶ sobre las moléculas que se diseñaron y evaluaron en las TIM de *E. histolytica* y humano *in silico*, se observó el modo de acoplamiento de las moléculas de la serie sobre ambas enzimas, de esta manera se identificaron los residuos que participan en la interacción con los ligandos detectándose zonas de la interfaz de la TIM del parásito importantes que pudieran interactuar de mejor manera y ser más selectivos, como se describirá más adelante.

Tabla 20. Compuestos (**B1-B6**) diseñados por *docking* como inhibidores de la TIM de *E. histolytica*.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	EhTIM (-) $\Delta G_{unión}$ (Kcal/mol)	HsTIM (-) $\Delta G_{unión}$ (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G(\Delta G_{EhTIM} - \Delta G_{HsTIM})$ (Kcal/mol)
B1	H	DFBAC	H	-10.71	-8.38	-2.33
B2	CH ₃	DFBAC	H	-9.99	-9.11	-0.88
B3	CH ₃	H	DFBAC	-11.25	-8.76	-2.49
B4	H	DFBAC	Cl	-10.09	-8.67	-1.42
B5	CH ₃	DFBAC	Cl	-8.9	-9.5	0.6
B6	CH ₃	Cl	DFBAC	-10.65	-9.28	-1.37

DFBAC: 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]aminocarbonilo



En la **Tabla 20** se muestran los valores de energía de unión calculados para la EhTIM y la HsTIM, los compuestos mostraron afinidad por la enzima, con valores de ΔG negativos, indicando que la unión ligando-receptor genera complejos estables. Los ligandos mostraron una mayor afinidad por la EhTIM en comparación con la HsTIM, con excepción de **B5** que tuvo mayor afinidad por ésta última.

De todos los ligandos propuestos, la carboxamida **B3** fue la que presentó la mayor afinidad y también selectividad por EhTIM. Mediante el estudio de acoplamiento molecular los residuos de la interfaz que interactúan con el ligando para ambos monómeros son: Trp75, Arg105, Ile108, Phe108, His110, Glu111, Gln115 y Lys119.

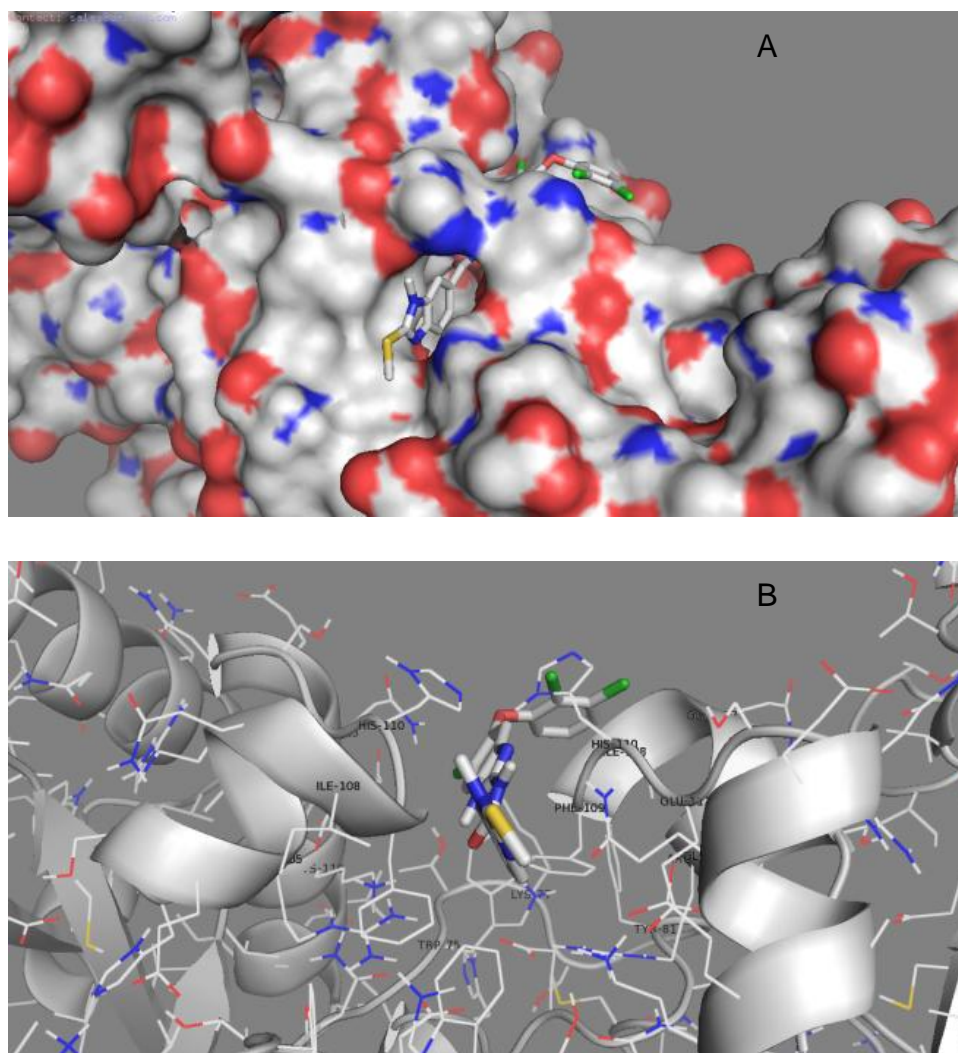


Figura 20. Acoplamiento de la carboxamida **B3**. (A) representación en mapas de superficie electrostática de la enzima, ligando en líneas; (B) acercamiento a la interfaz de la enzima, residuos que participan en la interacción.

Algunos residuos que están presentes en la interfaz de la TIM son aromáticos. Estos residuos forman un conjunto aromático, el cual estabiliza la unión entre los monómeros, el cual está formado entre la Phe109 de una cadena con los residuos Tyr81 y Trp75 de la otra cadena y viceversa.

Los ligandos se acoplan a lo largo de la interfaz y se estabilizan con el conjunto aromático de Phe109, Tyr81 y Trp75 debido a la presencia de grupos aromáticos en su estructura. También se observó que la formación de un puente de hidrógeno entre la His110 y el nitrógeno del anillo bencimidazólico de las moléculas favorece la estabilización del complejo.

Los resultados del *docking* muestran que los compuestos **B1**, **B2** y **B3**, que tienen como característica particular la carencia de cloro en la parte del ácido precursor de la amida (2-metilbencimidazol-5-carboxílico), presentaron la mayor energía de unión. Esto se explica debido a que la parte aromática de las moléculas puede acceder de mejor manera a la interfaz e interactuar mejor con los residuos aromáticos antes mencionados. Los compuestos restantes (**B4**, **B5** y **B6**) presentaron una menor energía de unión debido probablemente al volumen estérico que presenta el átomo de cloro impidiendo la interacción con los residuos aromáticos.

La presencia del grupo CH₃, así como la disposición espacial en relación al grupo voluminoso es importante para la interacción. El compuesto **B3** que tiene el grupo metilo en relación 1,6 con el grupo voluminoso fue el que presentó la mayor afinidad, además tampoco tiene cloro características que le permiten mejor acomodo en la interfaz. Cuando la relación entre el metilo (CH₃) y el grupo carboxamido es 1,5; como en **B2**, disminuyó considerablemente la interacción posiblemente se debe a que el volumen estérico del grupo metilo en esta posición impide una buena entrada de la molécula a la interfaz. La energía de unión del compuesto **B1** que carece del CH₃ y en su lugar un H en la posición 1 tuvo un valor intermedio entre **B3** y **B2** reafirmado la importancia estérica de la posición del grupo carboxamido.

Un dato importante a destacar es que el patrón de sustitución que presenta **B5** (relación CH₃ grupo voluminoso 1,5 y cloro en la posición 6) favorece la afinidad por la HsTIM, lo que es un dato importante a considerar en los estudios posteriores.

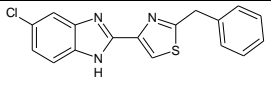
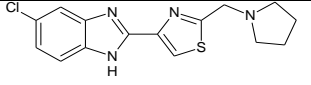
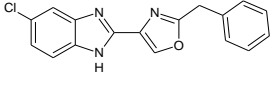
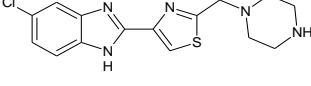
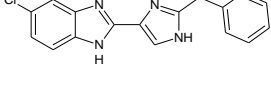
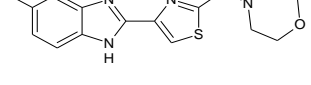
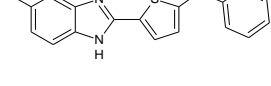
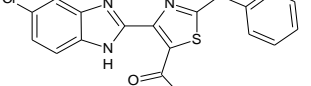
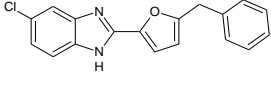
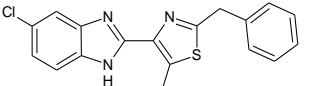
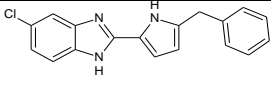
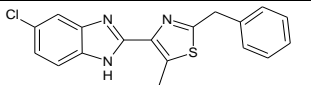
Los residuos de las cavidades de las interfaces de HsTIM y EhTIM tienen 25% de identidad. Estas diferencias fueron importantes para construir ligandos con cierta selectividad hacia EhTIM. La HsTIM, al igual que las demás TIM, se estabiliza por un conjunto aromático, este caso Phe102, Phe74 y Tyr67 de los monómeros.

7.3.1. Diseño de nuevas moléculas afines a la interfaz de la EhTIM como agentes inactivantes. Diseño *de novo*

Teniendo en cuenta los requerimientos antes mencionados, se diseñaron 65 moléculas. Los ligandos se diseñaron por visualización directa de su ambiente en la proteína y por reemplazo isostérico.

7.3.1.1. Diseño *de novo* propio

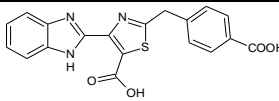
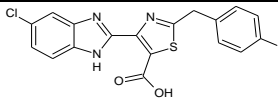
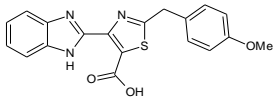
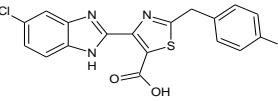
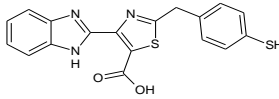
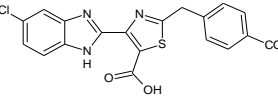
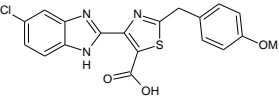
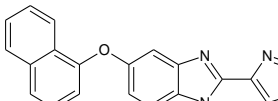
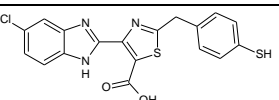
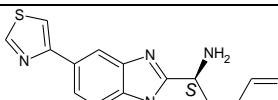
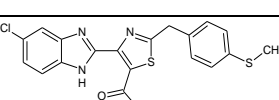
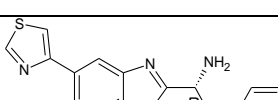
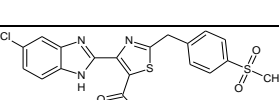
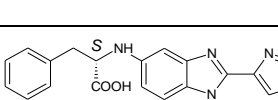
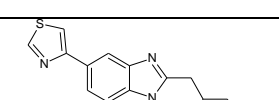
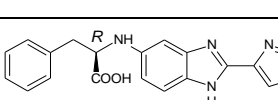
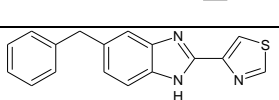
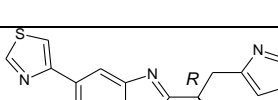
Tabla 21. Ligandos diseñados como posibles moléculas inhibitoras de la EhTIM y comparación de energías de unión con HsTIM

Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)	Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)
	7.99	6.95		8.13	7.02
	8.11	7.43		7.81	7.13
	7.57	6.16		7.77	6.63
	8.07	6.83		9.01	6.61
	7.92	6.76		9.69	6.98
	8.64	6.72		8.35	6.68

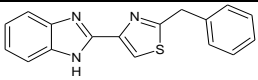
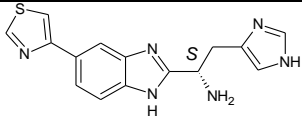
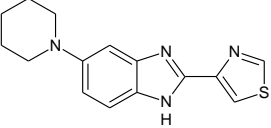
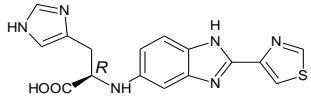
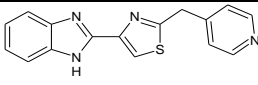
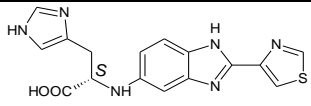
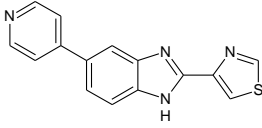
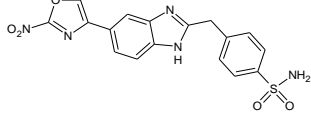
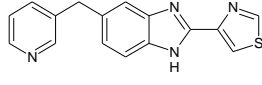
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)	Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)
	8.1	7.38		8.42	6.97
	7.97	6.73		8.21	7.04
	8.59	6.89		8.82	7.20
	9.01	7.06		9.38	7.33
	9.54	7.32		8.53	7.0
	8.69	7.16		10.22	6.45
	8.36	6.88		9.94	7.44
	8.86	6.74		9.73	7.42
	8.95	6.91		9.34	6.86
	8.83	7.08		9.49	7.71

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)	Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)
	9.12	6.91		9.37	7.49
	7.32	6.86		8.99	7.16
	7.37	6.35		10.04	7.19
	8.82	7.04		8.6	7.68
	9.36	7.15		9.4	6.7
	8.83	7.34		8.78	6.87
	8.54	6.79		9.31	7.37
	8.19	6.41		9.05	7.06
	7.4	6.35		7.7	6.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)	Ligando	(-) $\Delta G_{unión}$ EhTIM (Kcal/mol)	(-) $\Delta G_{unión}$ HsTIM (Kcal/mol)
	7.63	7.21		9.11	6.0
	7.69	6.35		7.97	6.94
	7.7	6.76		8.09	7.21
	7.58	7.29		9.52	7.93
	7.56	6.39			

Las nuevas moléculas tienen como características estructurales el presentar un anillo del tipo benzimidazol el cual ha demostrado tener actividad antiamebiana, hidrógeno en la posición uno del benzimidazol, sustituyentes con grupos aromáticos carbocíclicos o heterocíclicos para favorecer la interacción con la zona aromática de la enzima, grupos metileno (-CH₂-) adicionales los cuales disminuyen la rigidez de la molécula que podrían permitir un mejor acomodo, diferentes grupos funcionales para favorecer las interacciones, en especial del tipo puente de hidrógeno.

Con los resultados obtenidos se observó que ninguno de los ligandos diseñados superó las energías de unión que presentaron las carboxamidas diseñadas y sintetizadas en esta tesis. Sólo 17 ligandos presentaron energías menores de $\Delta G = -9$ Kcal/mol y 2 presentaron energías menores de $\Delta G = -10$ Kcal/mol (recordando que entre menor energía de unión presente el complejo ligando-receptor mayor afinidad se presentará).

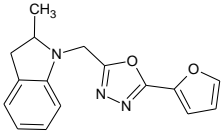
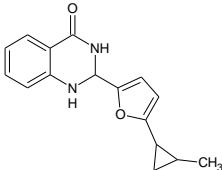
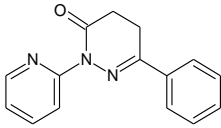
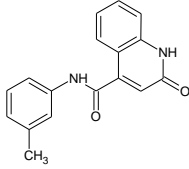
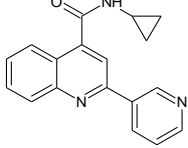
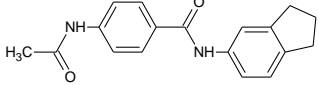
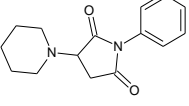
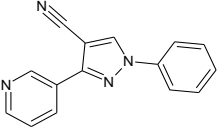
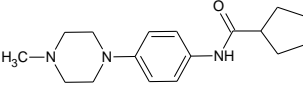
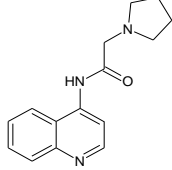
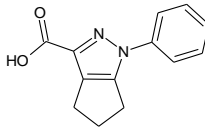
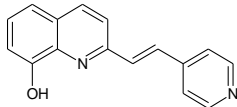
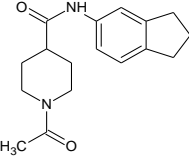
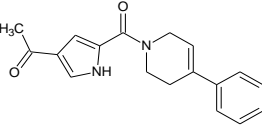
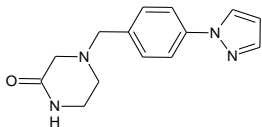
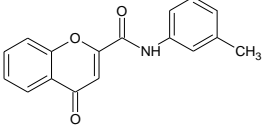
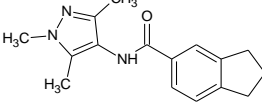
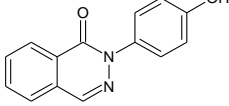
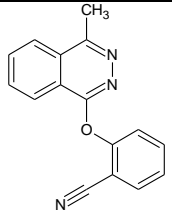
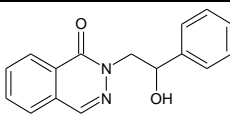
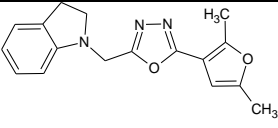
Cabe señalar que si bien los ligandos no presentaron energías superiores a las carboxamidas obtenidas, las características estructurales como la presencia de grupos polares tales como: carboxilato, amino o hidroxilo; podrían conferir a las moléculas mayor solubilidad acuosa, lo cual representa una ventaja sobre las carboxamidas sintetizadas, ya que éstas presentan muy baja solubilidad en medios acuosos. La presencia de anillos aromáticos en los ligandos es importante para permitir la interacción con el conjunto aromático de la interfaz. Adicionalmente, el átomo de cloro favoreció la interacción pero es posible que otro halógeno sobre todo flúor u otro sustituyente en esta posición favorezcan aún más la interacción. Además una región polar conformada por Arg105 y Glu84 presentes en la interfaz interactúan con los grupos polares de los ligandos, así mismo centros quirales con configuración absoluta (S) parecen favorecer la interacción con la enzima.

7.3.1.2. Biblioteca de fragmentos

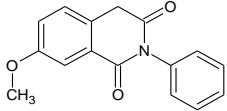
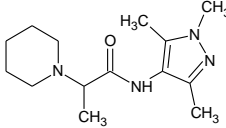
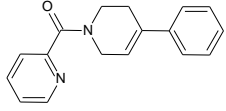
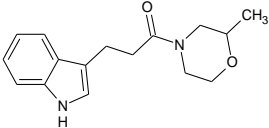
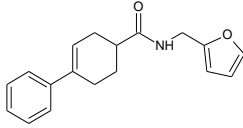
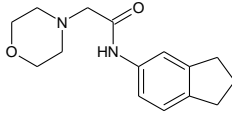
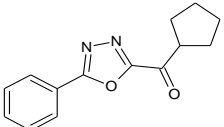
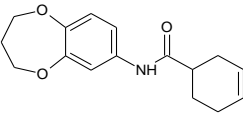
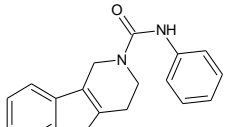
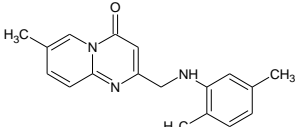
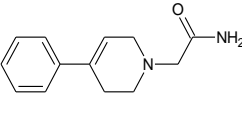
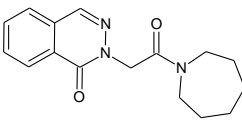
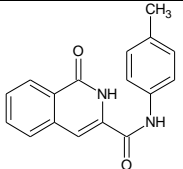
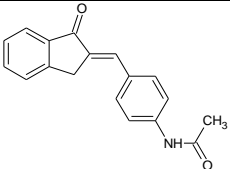
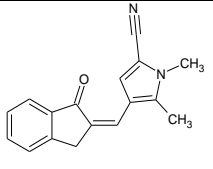
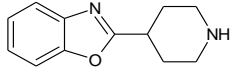
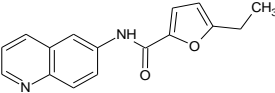
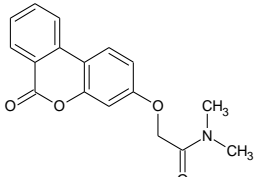
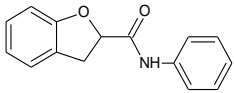
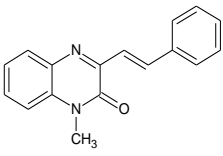
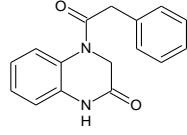
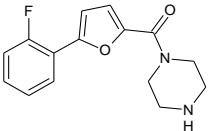
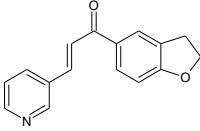
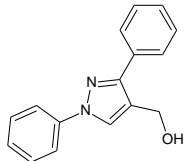
Para el diseño *de novo* utilizando fragmentos se descargó la librería de fragmentos comercial de Enamine (<http://www.enamine.net/>) con 1190 estructuras. Éstas se presentaron en su estructura tridimensional, se optimizó su geometría y se consideró el pH fisiológico para fijar su estado de protonación.

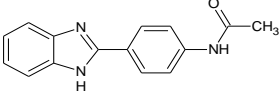
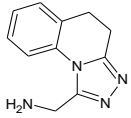
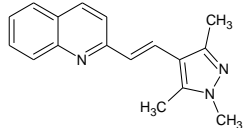
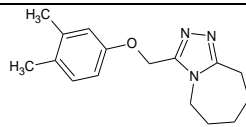
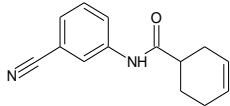
Se consideraron las 50 estructuras que presentaron la menor energía de unión, las cuales se presentan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Fragmentos obtenidos del *virtual screening*

Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM
	-9.09		-8.51		-8.39
	-8.93		-8.48		-8.38
	-8.83		-8.45		-8.37
	-8.76		-8.44		-8.36
	-8.69		-8.43		-8.33
	-8.69		-8.41		-8.28
	-8.57		-8.39		-8.27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM
	-8.25		-8.16		-8.08
	-8.24		-8.15		-8.07
	-8.24		-8.15		-8.05
	-8.21		-8.14		-8.04
	-8.21		-8.13		-8.04
	-8.21		-8.13		-8.04
	-8.19		-8.13		-8.03
	-8.18		-8.10		-8.03

Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM	Estructura	$\Delta G_{unión}$ EhTIM
	-8.17		-8.10		-8.02
	-8.17		-8.08		

Las moléculas obtenidas de este estudio computacional usando fragmentos moleculares presentaron buenas energías de unión (comparadas con las energías de unión de las moléculas de la serie, **B1-B6**, sintetizadas) la cuales fueron menores a -8 kcal/mol, siendo estos resultados inesperados considerando el tamaño y la poca sustitución que presentan las estructuras. Dicha energía de unión de los fragmentos, en general, superaron en energía de unión a algunas de las moléculas diseñadas y estudiadas, mencionadas previamente.

Todas las moléculas obtenidas presentan en su estructura núcleos aromáticos o bien ciclos alifáticos los cuales, como se había mencionado anteriormente, interactúan con la región predominantemente hidrofóbica en la interfaz de la enzima. Los grupos funcionales que mayor se presentaron fueron carbonilo, amidas, aminas y nitrilos, los cuales favorecen la interacción del tipo puente de hidrógeno con la enzima.

La región polar constituida por los residuos de Arg105 y Glu84 forman una cavidad (*pocket*) en la interfaz de la enzima en donde se observó que varios heterociclos de las moléculas se introducen y forman interacciones del tipo π -catión principalmente con el grupo guanidino de Arg105 y los heterociclos, además varias aminas cíclicas también se introducen en este hueco favoreciendo la interacción (ver **Figura 22**).

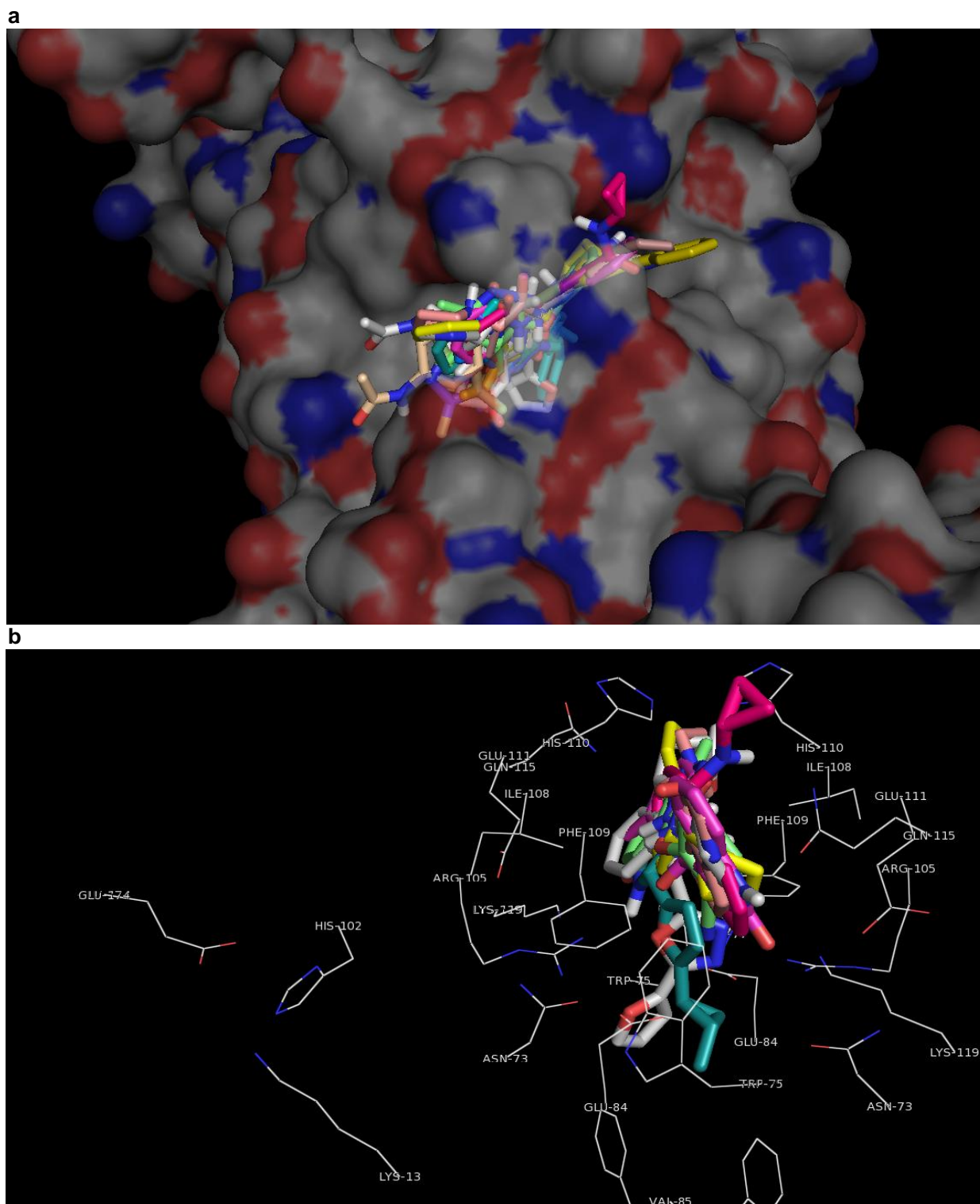


Figura 21. (a) Mejores conformaciones de los fragmentos (líneas de color) dentro de la interface de la EhtIM (superficie). (b) Residuos involucrados en la interacción con los fragmentos (líneas de color) y la EhtIM (carbono en gris, oxígeno en rojo, nitrógeno en azul); nótese la cercanía del sitio activo (Glu174, His102, Lys13) con los residuos que interaccionan con los fragmentos.

Con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los fragmentos se diseñaron 65 ligandos, los cuales presentaron energías de unión en general buenas aunque sólo 2 de ellos presentaron una energía de unión menor de -10 kcal/mol. Los ligandos diseñados presentaron en su estructura núcleos aromáticos lo cual favorece la interacción con la enzima, grupos nitro, nitrilo y carboxilato en la estructura favorecen una mayor unión a la enzima y centros quirales hacen que la moléculas sean más selectivas hacia EhTIM cuando la configuración absoluta es (S).

Los resultados obtenidos de la biblioteca de fragmentos son interesantes, ya que las moléculas obtenidas presentan núcleos aromáticos o ciclos alifáticos, lo cual parece ser importante para la unión. La energía de unión calculada fue buena tomando en cuenta su tamaño y sustituciones presentes. Los fragmentos resultantes contienen estructuras y ciclos nuevos así como formas de unión en la interfaz que pueden servir para posteriores estudios.

Los resultados de ambos estudios computacionales nos dan la pauta para el diseño u optimización de ligandos que presenten en su estructura núcleos distintos del bencimidazol, con el propósito de diseñar una nueva biblioteca virtual de compuestos respaldada con estudios de acoplamiento molecular sobre la EhTIM; y de ahí proponer ligandos de mayor afinidad y selectividad a los presentados en este trabajo, los cuales pueden ser futuros candidatos a ser sintetizados y probados contra la enzima.

8. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron e identificaron las tres carboxamidas propuestas, designadas como **B3**, **B4** y **B6**, así como sus precursores ácidos carboxílicos correspondientes y el precursor común de tipo 2-aminobencimidazol.
- La aplicación de la técnica de síntesis orgánica asistida por microondas, en el paso de amidación para la obtención de **B3**, **B4** y **B6**, disminuyó drásticamente los tiempos de reacción de 4-7 días a 10 minutos y además se incrementaron casi al triple los rendimientos en el caso de **B3** y **B6** y un 10% para **B4**; por lo que mostró ser una muy buena herramienta para la síntesis de compuestos orgánicos.
- Los compuestos finales así como sus intermediarios se caracterizaron por sus constantes físicas más importantes (punto de fusión y *R_f*) y usando métodos espectroscópicos y espectrométricos. El uso de experimentos de RMN ¹H en dos dimensiones, para los compuestos finales, permitió comprobar la estructura y ratificar la posición del enlace carboxamido entre el 2-aminobencimidazol (**30**) y los ácidos 5(6)-bencimidazolcarboxílicos (**9**, **18** y **25**); así como la correcta asignación de las señales de los espectros de RMN.
- Las tres carboxamidas sintetizadas presentaron mayor actividad biológica contra *E. histolytica* que contra los otros protozoarios probados; la cual fue notablemente superior a los fármacos de referencia metronidazol, albendazol y nitazoxanida. El compuesto **B3** fue más activo y **B6** el menos activo de los tres.
- Así mismo los compuestos presentaron buena actividad *in vitro* contra *T. vaginalis* y *G. intestinalis*; sin embargo, esta actividad fue equiparable o inferior a las presentadas por los fármacos de referencia.
- Al comparar los resultados de actividad biológica de la serie completa (**B1-B6**) contra *E. histolytica* se observa que todos superan la potencia de los fármacos de referencia. El compuesto **B3** fue el que presentó la mayor actividad antiamebiana, mientras que **B2** fue el menos potente de la serie.

Los resultados de susceptibilidad de *E histolytica* a las carboxamidas **B1-B6** son congruentes con los valores de energía ($-\Delta G$) de afinidad calculados en su diseño; siendo más activos los compuestos no clorados en donde la relación estructural entre el CH_3 de la posición 1 del bencimidazol y el grupo voluminoso de la carboxamida es 1,6. Cuando se tiene cloro y relación 1,5 entre el CH_3 y la amida, se observa la menor actividad biológica por lo que es muy posible que la TIM sea el blanco o diana biológica para la actividad de estos compuestos contra *E histolytica*.

Con estos resultados de actividad biológica y las propiedades fisicoquímicas que presentan las carboxamidas, en especial **B3** la de mayor potencia de la serie, los convierten en buenos candidatos como fármacos antiamebianos.

- Para *G. intestinalis* los compuestos en general presentaron buena actividad sobresaliendo **B3** como el más potente pero no superaron la potencia presentada por la nitazoxanida; en general los compuestos 1-metilados fueron más activos. Con respecto a *T. vaginalis*, la actividad que mostraron los compuestos fue moderada siendo **B5** fue el compuesto más activo superando a todos los fármacos de referencia.
- Los resultados de inhibición enzimática frente a las TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* mostraron que las carboxamidas presentaron de regular a buena actividad superando a sus precursores, la amina **30** y los ácidos **9**, **18** y **25**, que las componen. Resalta la actividad de **B4**, el cual que inhibió 71 y 84 % a las enzimas de *T. cruzi* y *T. brucei* respectivamente a una concentración de 100 μM .
- A pesar de los buenos resultados que se presentaron en la pruebas de actividad biológica, no se pueden hacer comparaciones respecto a la capacidad inhibitoria en la enzima de EhTIM.
- Con base en los estudios de acoplamiento molecular se observó el modo de unión de los compuestos diseñados y posteriormente sintetizados en la interfaz de la enzima, identificando zonas como el grupo aromático y aminoácidos que fueron tomados en cuenta para favorecer la interacción y aumentar la selectividad de los ligandos que posteriormente se propusieron.

- Se propusieron 65 nuevas moléculas las cuales mostraron buena afinidad y selectividad por la EhTIM. Las energías de unión calculadas para estos ligandos en general fueron buenas pero no superaron las la obtenidas para los compuestos más activos (**B3** y **B4**) sintetizados en esta tesis.

Los ligandos propuestos presentan en sus estructuras ciclos aromáticos, importantes para la unión con la enzima, así como diversos sustituyentes que favorecen la afinidad por la enzima.

A partir de la biblioteca de fragmentos se obtuvieron 50 estructuras con buena afinidad por la enzima, tomando en cuenta el tamaño y grado de sustitución de las mismas. Las moléculas presentan en común diversos grupos aromáticos lo cual muestra ser importante para la unión a la enzima. Así, el uso de fragmentos muestra ser una opción para obtener nuevas estructuras las cuales pueden ayudar a generar estructuras más activas y selectivas.

De ambos estudios teóricos de acoplamiento molecular el diseño basado en fragmentos mostró ser la mejor opción, ya que se obtuvieron estructuras que presentaron una mayor afinidad por la EhTIM.

- Los estudios computacionales dan la pauta para el diseño u optimización de ligandos que presenten en su estructura núcleos distintos del bencimidazol, con el propósito de diseñar una nueva biblioteca virtual de compuestos respaldada con estudios de acoplamiento molecular sobre la EhTIM.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la salud. <http://www.who.int/>, consultada en Julio de 2010.
2. Boletín de vigilancia epidemiológica 2009, <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/indice-2009.htm>, consultada en Julio de 2010.
3. Stanley S. Amoebiasis. *Lancet* 2003 (361), 1025–1034.
4. Centro de control y prevención de enfermedades (CDC, USA) <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm>, consultada en Julio de 2010.
5. Townson S., *et al.* Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropica*, 1994 (56), 173-194.
6. Frayha G., *et al.* The mechanisms of action of antiprotozoal and antihelminthic drugs in man. *General Pharmacology* 1997 (28), 273-299.
7. Mahajan R. C., *et al.* Drug resistance in amoebiasis. *Indian Journal of Medicinal Research* 2006 (123), 115-118.
8. Petri W. Therapy of intestinal protozoa. *TRENDS in Parasitology* 2003 (19), 523-526.
9. Prichard R. How do antihelminthic drugs work? *The Veterinary Journal* 1997 (154), 5-7.
10. Campbell W. C. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitology Today*, 1990 (6), 130-133.
11. Horton R. J. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitology Today*, 1990 (6), 106.
12. Cook G. C. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiasis: indications and efficacy. *Parasitology Today*, 1990 (6), 133-136.
13. Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 1990 (6), 112-115.
14. Martin R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal* 1997 (154), 11-34.
15. Valdez J., *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2002 (12), 2221–2224.
16. Navarrete-Vázquez G., *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2001 (11), 187-190.
17. Alanine A., *et al.* Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003 (2), 369-378.

18. Hopfinger A. J. Computer-Assisted Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 1985 (28), 1133-1139.
19. Cohen F. E., Sun E. Computer-assisted drug discovery - a review. *Gene* 1993 (137), 127-132.
20. Kapetanovic I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): *In silico*-chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interactions* 2008 (171), 165–176.
21. Veselovsky A. V., Ivanov A. S. Strategy of Computer-Aided Drug Design. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2003 (3), 33-40.
22. Greer J., *et al.* Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* 1994 (37), 1035-1054.
23. Bajorath J., *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004 (3), 935-949.
24. Halperin I., *et al.* Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 2002 (47), 409–443.
25. Krovat E. M., *et al.* Recent Advances in Docking and Scoring. *Current Computer-Aided Drug Design* 2005 (1), 93-102.
26. Goodford P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry* 1985 (28), 849-857.
27. Cohen C., *et al.* Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 1990 (33), 883-894.
28. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today* 2006 (11), 580-594.
29. Shoichet B. K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004 (432), 862-865.
30. Lengauer T., *et al.* Novel technologies for virtual screening. *Drug Discovery Today* 2004 (9), 27-34.
31. Yang S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today* 2010 (15), 444-450.

32. Greer J., Hajduk Philip. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007 (6), 211-219.
33. Erlanson Daniel, McDowell Robert, O'Brien Tom. Fragment-Based Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004 (47), 3463-3482.
34. Woody Sherman, Loving Kathryn, Alberts Ian. Computational Approaches for Fragment-Based and De Novo Design. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2010 (10), 14-32.
35. Fechner Uli, Schneider Gisbert. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005 (4), 640-663.
36. Larhed M., Hallberg A. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2001 (6), 406-416.
37. Mavandali F., Lidström P. Microwave-assisted chemistry in drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004 (3), 773-792.
38. Larhed M., Hallberg A. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2001 (6), 406-416.
39. Verlinde, *et al.* Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates* 2001 (4), 1-14.
40. Saavedra E., *et al.* Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Journal* 2005 (272), 1767-1783.
41. Gnerer J. P., *et al.* Drosophila mutation in triosephosphate isomerase, causes paralysis, neurodegeneration, and early death. *PNAS* 2006 (103), 14987-14993.
42. Kohlhoff M., *et al.* Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic archaea. *FEBS letters* 1996 (383), 245,250.
43. Rodríguez-Romero A., *et al.* Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Journal of Molecular Biology* 2002 (322), 669-675.
44. Alahuhta M. Protein crystallography of triosephosphate isomerases: functional and protein engineering studies. *Acta Universitatis Ouluensis* 2008 (508), 1-84.
45. Karplus M., Cui Q. Triosephosphate Isomerase: A theoretical comparison of alternative pathways. *Journal of American Chemical Society* 2001 (123), 2284-2290.
46. Friesner A., *et al.* Computational modeling of the catalytic reaction in triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology* 2004 (337), 227-239.

47. Jogl G., *et al.* Optimal alignment for enzymatic proton transfer: Structure of the Michaelis complex of triosephosphate isomerase at 1.2-Å resolution. *PNAS* 2003 (100), 50-55.
48. Perie J., *et al.* Glycolysis and Proteases as Targets for the Design of New Anti-Trypanosome Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002 (2), 439-456.
49. Montfort R., *et al.* The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002 (2), 457-470.
50. Singh, S. K., *et al.* Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Letters* 2001 (501), 19-23.
51. Louw A. I., *et al.* Structure-based inhibitor screening: a family of sulfonated dye inhibitors for malaria parasite triosephosphate isomerase. *Proteins* 2001 (45), 136–143.
52. Gayosso-De-Lucio J., *et al.* Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* Rose. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009 (19), 5936–5939.
53. Espinoza-Fonseca M.; Trujillo-Ferrera J. Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-tripanosomal drug design. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2004 (14), 3151–3154.
54. Espinoza-Fonseca M.; Trujillo-Ferrera J. Structural considerations for the rational design of selective anti-tripanosomal agents: The role of the aromatic clusters at the interface of triosephosphate isomerase dimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 (328), 922–928.
55. Espinoza-Fonseca M.; Trujillo-Ferrera J. Toward a rational design of selective multi-tripanosomatid inhibitors: A computational docking study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2006 (16), 6288–6292.
56. López Vallejo Fabián. *Estudios de modelado molecular de bencimidazoles activos contra Entamoeba histolytica y diseño de análogos antiamebianos*. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM, 2007.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

57. Vargas Osorio Zulema. *Síntesis de una carboxamida bencimidazólica diseñada por docking como posible agente inactivante de la triosafosfato isomerasa (TIM) de Entamoeba histolytica*. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2009.
58. Reyes García Denise. *Síntesis de dos carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como posibles inhibidores de la triosafosfato isomerasa de Entamoeba histolytica*. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2010.
59. Sybyl v8.0, Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, USA.
60. Autodock v4.2, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA.
61. AutoDock Tools 1.5.4, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA.
62. Maestro v9.1, Schrödinger, Inc. New York, NY, USA.

10. APÉNDICE

10.1. PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

Las materias primas se pesaron en una balanza analítica Santorius A210P y en una balanza granataria SCIENTECH SL600.

El avance de las reacciones químicas realizadas se monitoreó por cromatografía en capa fina (ccf) en placas de vidrio con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con lámpara de luz ultravioleta a longitud de onda corta y larga, y por exposición a vapores de yodo.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron mediante capilar en un aparato marca Büchi modelo B-540.

La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador Büchi R-205 con un baño de calentamiento Büchi B-490 acoplado a una bomba de vacío Büchi modelo V-800 y un condensador conectado a un enfriador Brinkmann IC-30, o bien en un rotaevaporador R-215 con un baño de calentamiento Büchi B-491 acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC-30 conectado a una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC-2.

Las reacciones de hidrogenación catalítica se realizaron empleando un hidrogenador marca Parr modelo 3916 EG con 60 lb/in² y un vaso reactor de 500 mL de capacidad, utilizando hidrógeno envasado en tanque por la casa INFRA.

Las reacciones a temperaturas y presiones elevadas se realizaron en un reactor a presión Parr modelo 4561M de 300 mL de capacidad adaptado a un regulador digital de temperatura Parr modelo 4842.

Las reacciones con calentamiento por microondas se llevaron a cabo en un reactor Synthos 3000 de Anton Paar, usando el rotor 64MG5, con sensor externo de IR para medición de temperatura.

Las reacciones se llevaron a cabo en viales de vidrio de 5 mL de capacidad y 20 bares de presión, o bien usando el rotor 16MF100. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de plástico revestidos de PTFE con 50 mL de volumen máximo y 20 bares de presión, chaquetas individuales de PEEK y sensor interno de presión y temperatura.

Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas y espectrométricas pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. La determinación de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se realizó en un espectrómetro Varian MRS 400MHz utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, se emplearon disolventes deuterados como dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$), cloroformo (CDCl_3) y agua deuterada (D_2O) para el intercambio de hidrógenos ácidos; los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Los espectros de masas (EM) se determinaron en un equipo JEOL modelo JMS-SX102 utilizándose la técnica de introducción directa (ID) e impacto electrónico (IE) y/o bombardeo rápido de átomos (FAB^+ por sus siglas en inglés).

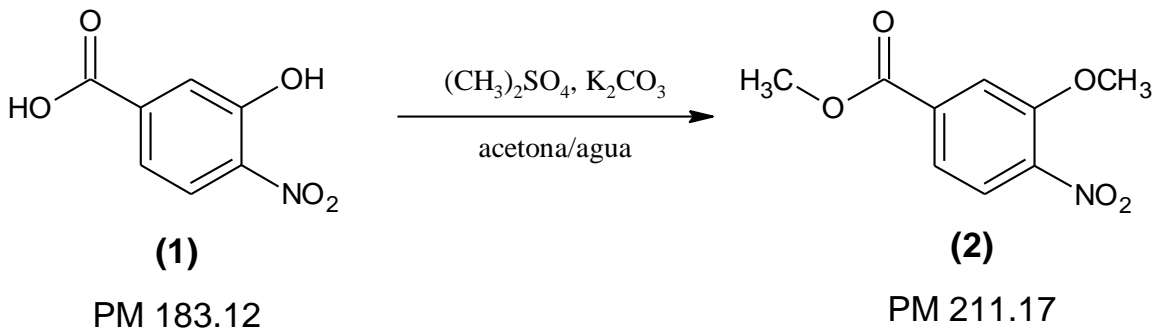
Tabla 23. Sistemas de elución utilizados para ccf

Sistema	Componentes	Proporción
I	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	95:5
II	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	98:2
III	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	99:1
IV	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	90:10
V	Hexano/AcOEt	50:50
VI	Hexano/AcOEt	60:40
VII	Hexano/ CHCl_3 /AcOEt	50:35:15
VIII	AcOEt/acetona	98:2
IX	CH_2Cl_2	1

** una gota de ácido acético; * una gota de hidróxido de amonio.

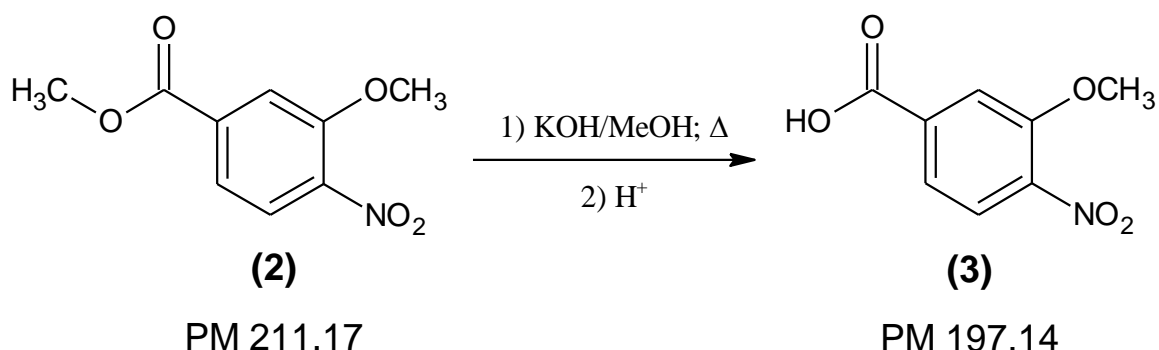
Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

3-Metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2)



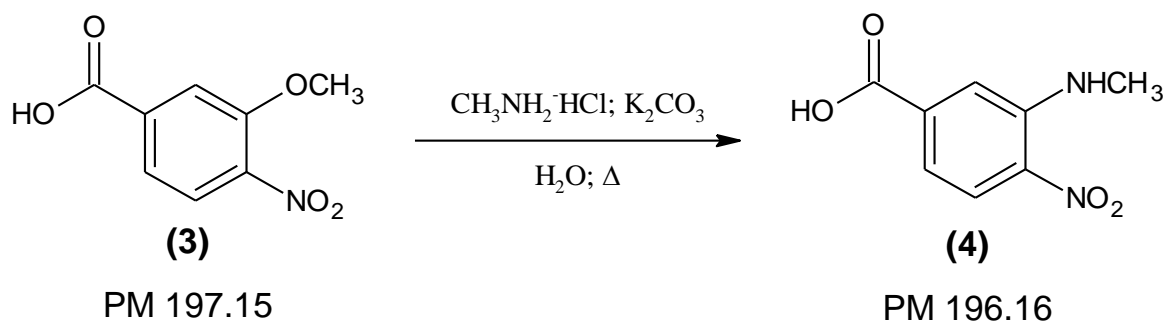
En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro y columna Vigreux, se disolvieron 10 g (0.055 mol) de ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico (1) en 150 mL de una mezcla acetona/agua (2:1). Posteriormente la solución se trató con 22.6 g (0.165 mol, 3 eq.) de K_2CO_3 . La suspensión generada se calentó a 50 °C y a esta temperatura a la mezcla de reacción se adicionaron 15.6 mL (0.165 mol, 3 eq.) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ y se dejó reaccionar por 2 horas. La ccf mostró materia prima por lo que se agregó un exceso de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (2.6 mL, 0.5 eq.); la reacción se mantuvo bajo las mismas condiciones por 12 horas más. En seguida se eliminó el disolvente en el rotaevaporador, el residuo se vertió en hielo, el producto obtenido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire. Se obtuvieron 9 g (77.5%, rendimiento crudo) de un sólido color crema. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de 0.14 g en MeOH dando 0.083 g (59 %) de cristales amarillo claro con punto de fusión de 91.8-92.3 °C y R_f de 0.55 (sistema VII).

Ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3)



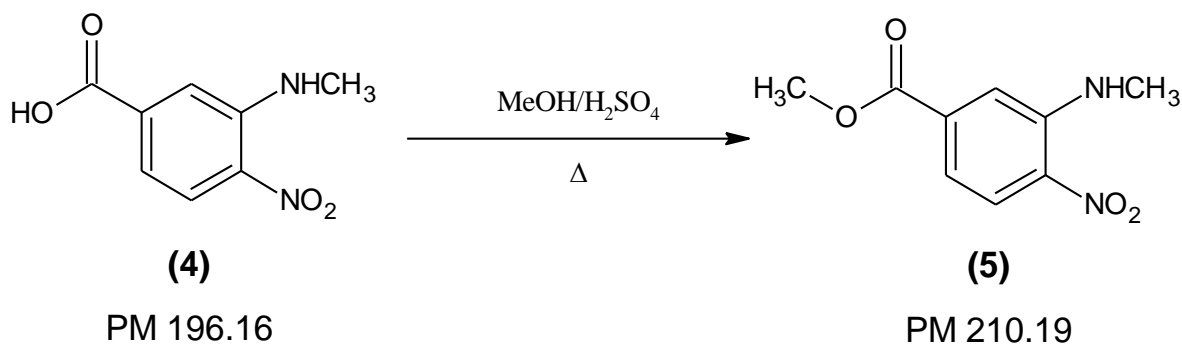
En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250 mL, adaptado con columna Vigreux y agitador magnético, se preparó una solución de 4.52 g (0.08 mol, 1.1 eq.) de KOH en 200 mL de MeOH, a ésta se le adicionaron 15 g (0.071 mol) de 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (**2**). La mezcla se calentó a 40 °C por 18 horas; la ccf indicó presencia de materia prima por lo que se agregaron 0.3 g más de KOH en 10 mL de MeOH y se dejó reaccionar una hora más. El MeOH se retiró con el rotaevaporador; el residuo sólido formado se disolvió en 150 mL de agua y se trató con solución de HCl al 10 % hasta pH de 4; el producto formado se separó por filtración al vacío, lavó con agua y se secó al aire obteniéndose 13.56 g de un sólido color amarillo (96.9%). Una muestra analítica se recrystalizó de MeOH/agua (par de disolventes) obteniéndose cristales amarillo claro con punto de fusión de 234-234.6 °C y *Rf* de 0.36 (sistema VII**).

Ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4)



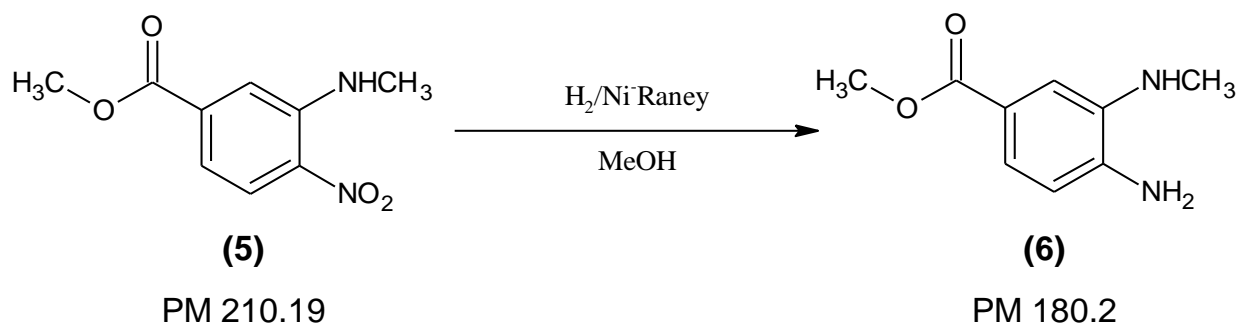
En un vaso de reactor Parr de 500 mL se mezclaron 12 g (0.061 mol) de ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (**3**), 34 g (0.246 mol, 4 eq.) de K_2CO_3 y 120 mL de agua; la mezcla se agitó manualmente hasta que la formación de burbujas cesó; posteriormente se adicionaron 12.33 g (0.183 mol, 3 eq.) de $CH_3NH_2 \cdot HCl$; el reactor se cerró inmediatamente y se calentó a 105 °C con agitación moderada por 5 días. La ccf mostró materia prima por lo que se aumentó la temperatura a 135 °C por 6 horas. Tras consumirse la materia prima **3**, el equipo se desmontó; luego la mezcla de reacción se vertió en 500 mL de agua y se aciduló con HCl al 10% hasta pH de 4. El producto formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire obteniéndose 11.58 g (96.8%) de un sólido color naranja que en ccf mostró ser una mancha. Una muestra de 0.22 g se recrystalizó de MeOH dando 0.090 g (41 %) de cristales rojo brillante con punto de fusión de 286.5-286.9 °C y R_f de 0.26 (sistema VII**).

3-Metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (**5**)



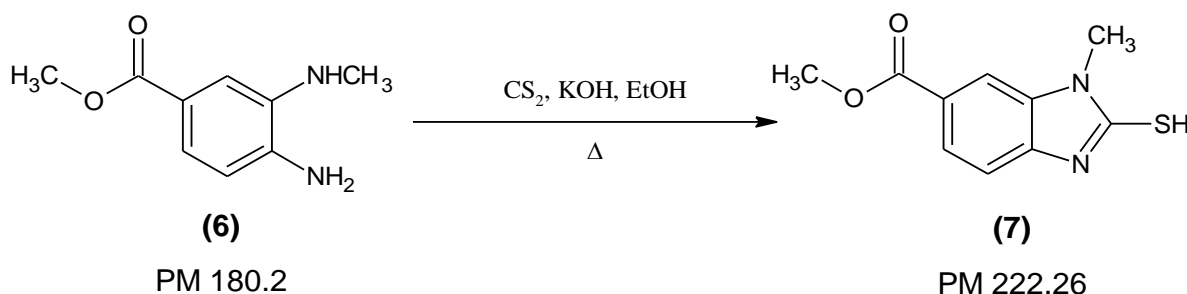
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 250 mL, adaptado con agitador magnético y refrigerante en posición de reflujo, se disolvieron 5 g (0.025 mol) de ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (**4**) en 100 mL de MeOH:H₂SO₄ (9:1), la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 4 horas. La ccf mostró el consumo total del ácido **4**, luego el MeOH se retiró con rotaevaporador y el líquido restante se vertió sobre hielo, la suspensión se neutralizó con NaHCO₃, después se filtró al vacío, el sólido separado se lavó con agua hasta pH neutro y se secó al aire. Se obtuvieron 4.7 g (89.4%) de compuesto color naranja que por ccf mostró un producto principal. Una muestra de 0.4 g se recrystalizó de MeOH obteniéndose 0.32 g (80%) de cristales color naranja con punto de fusión de 135.7-136.6 °C y un R_f de 0.53 (sistema VII).

4-Amino-3-(metilamino) benzoato de metilo (6)



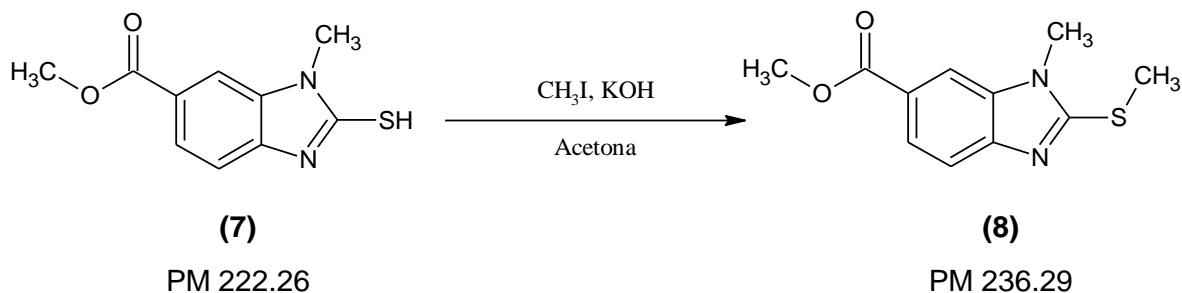
En una botella de hidrogenación de 300 mL se suspendieron 10 g (0.048 mol) de 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (5) y 3 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH (15mL x 3), en 100 mL de MeOH; la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, el sistema se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo de 2 horas, consumiendo un total de 149 lb/in² de H₂. Posteriormente la suspensión se filtró en un Büncher con celita para separar el catalizador y el filtrado se concentró en el rotaevaporador. Se obtuvieron 7.29 g (84.3%) de un sólido color café claro, el producto se analizó por ccf, observándose una sola mancha con *R_f* de 0.48 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

1-Metil-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (7)



En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 14/20 de 100mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y atmósfera de N₂, se disolvieron 7.29 g (0.041 mol) de 4-amino-3-metilaminobenzoato de metilo (**6**) en 100 mL de EtOH, posteriormente se agregaron 5.16 g de KOH (0.082 mol, 2eq.) disueltos en 10 mL de agua y 4.9 mL de CS₂ (0.082 mol, 2 eq.). La mezcla de reacción se calentó a 70 °C por 24 horas, la ccf mostró el consumo de la diamina **6** por lo que la mezcla se vertió sobre 300 mL de agua con hielo, después el pH se ajustó a 4 con ácido acético glacial dando un sólido el cual se separó por succión, se lavó repetidas veces con agua fría y se secó al aire, dando 6.69 g (73.4%) de un compuesto color beige que en ccf mostró una sola mancha. Se recrystalizaron 0.6 g de EtOH obteniendo 0.44 g de cristales finos color beige (73.3%) con *R_f* de 0.4 (sistema I*) y un punto de fusión 248.7-249.5 °C.

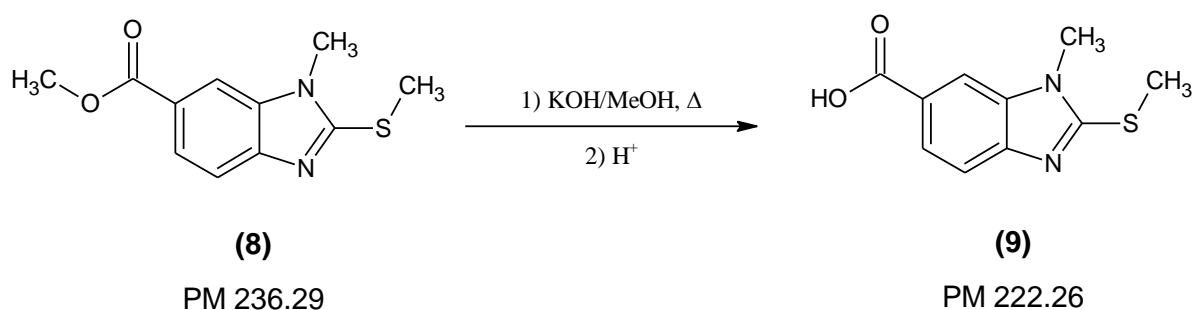
1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**8**)



En un matraz bola de 2 bocas esmeriladas 14/20 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro y embudo de adición se suspendieron 6 g de 1-metil-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**7**) (0.027 mol) en 60 mL de acetona, posteriormente se adicionaron 2 g de KOH (0.032 mol, 1.2 eq.) disueltos en 10 mL de agua, observándose total disolución de la materia prima. A la solución fría a 5 °C (en baño de hielo) se le añadieron, gota a gota, 2.2 mL de CH₃I (0.035 mol, 1.3 eq.) sin que la temperatura excediera los 10 °C.

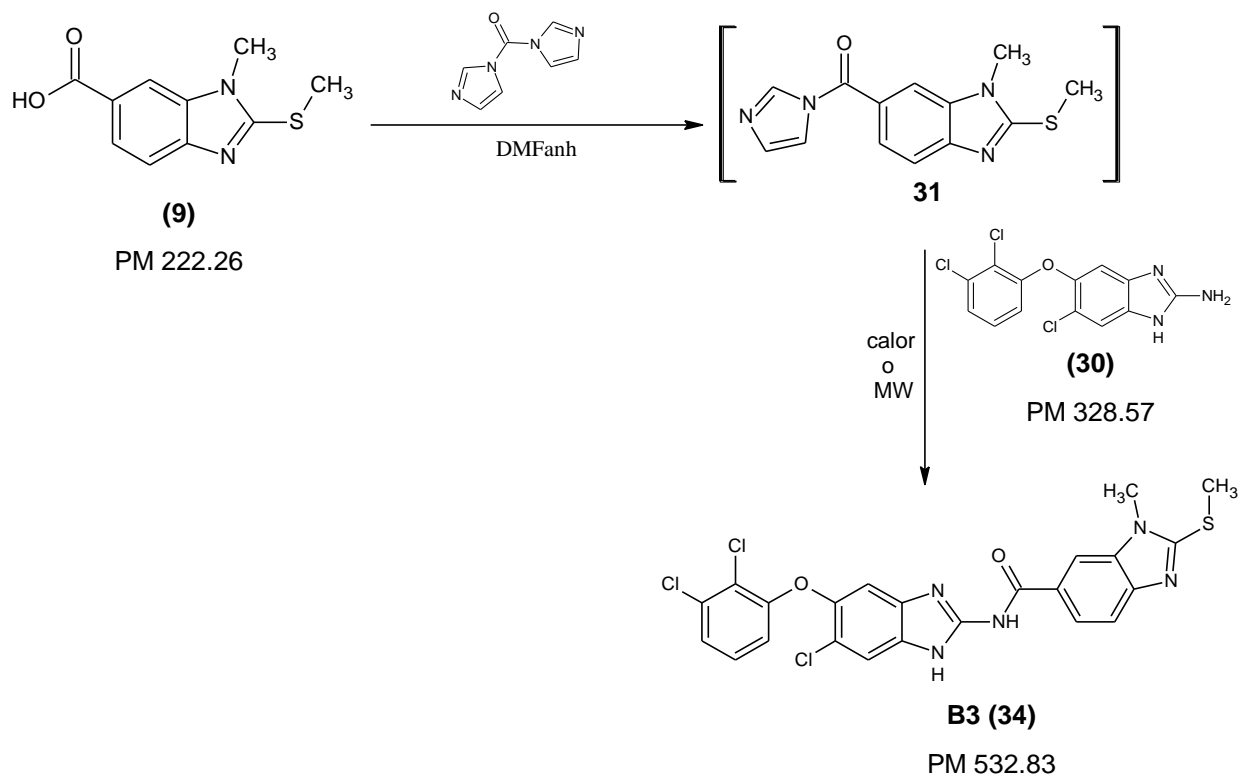
Terminada la adición, la mezcla de reacción se dejó bajo agitación a 5 °C por una hora; pasado este tiempo la ccf indicó consumo total de la materia prima **7**, por lo que la solución se vertió en 150 mL de agua fría, se neutralizó con solución de HCl al 10% y se dejó en agitación precipitando un sólido el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua fría. Se obtuvieron 4.85 g (76%) de un sólido blanco que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se recrystalizó de EtOH dando cristales blancos con un punto de fusión 147.3-148.2 °C y *Rf* de 0.66 (sistema I*).

Ácido 1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**9**)



En un matraz bola de 100 mL de dos bocas esmeriladas 14/20, el cual se adaptó con agitador magnético, termómetro y refrigerante en posición de reflujo, se disolvieron 3.5 g (0.015 mol) de 1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**8**) en 40 mL de MeOH, a la solución se le adicionaron 1.98 g (0.032 mol, 2.1 eq.) de KOH disueltos en 6 mL de agua, la mezcla se calentó a 65 °C por 4 horas, la ccf indicó que la materia prima se había consumido, por lo que la mezcla fría, a temperatura ambiente, se vertió en 150 mL de agua fría, se aciduló con H₂SO₄ al 20% hasta pH de 4 formándose un sólido el cual se colectó por filtración al vacío se colectó, se lavó repetidas veces con agua fría y se secó al aire. Se obtuvieron 3.13 g (93.9%) de un sólido blanco que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se recrystalizó de EtOH dando un polvo fino color blanco con un punto de fusión de 257.6-258.5 °C y *Rf* de 0.11 (sistema I).

***N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida B3 (34)**



Método A. Calentamiento convencional

En un matraz bola de 3 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL, adaptado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo, atmósfera de Nitrógeno y termómetro, se disolvieron 0.445 g (0.002 mol) de ácido 1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**9**) en 10 mL de DMF anhidra. La solución se trató, a temperatura ambiente, con 0.49 g (0.003 mol, 1.5 eq.) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI); luego la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas consumiéndose en su totalidad el ácido materia prima **9**, por lo que se adicionaron 0.657 g (0.002 mol, 1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**) La mezcla de reacción se calentó a 95 C, utilizando un baño de aceite, por 48 horas tiempo en el cual la ccf indicó un 50 % de avance, por lo que se continuó el calentamiento de la reacción a 60 °C por 72 horas más.

Pasado este tiempo, la mezcla fría a temperatura ambiente se vertió en 60 mL de agua fría, a la suspensión acuosa se le agregó sal hasta saturación y se dejó en agitación por una hora, el sólido formado se aisló por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se secó al aire, dando 0.776 g (72.8%) de un sólido crudo color beige que en ccf mostró una mancha principal y varios subproductos en menor proporción. El producto se purificó por lavados sucesivos con dos disolventes. Primero, el producto se suspendió en THF, se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente, después el sólido se separó por filtración al vacío y se lavó con THF; posteriormente el producto se resuspendió en éter diisopropílico, se dejó en agitación por 30 minutos, el sólido se recuperó por filtración al vacío, se lavó con éter diisopropílico y se secó al aire. Se obtuvo 0.168 g (22%) de un polvo fino color blanco que en ccf mostró una sola mancha, con R_f de 0.55 (sistema VIII) y punto de fusión de 317.6-318.2 °C.

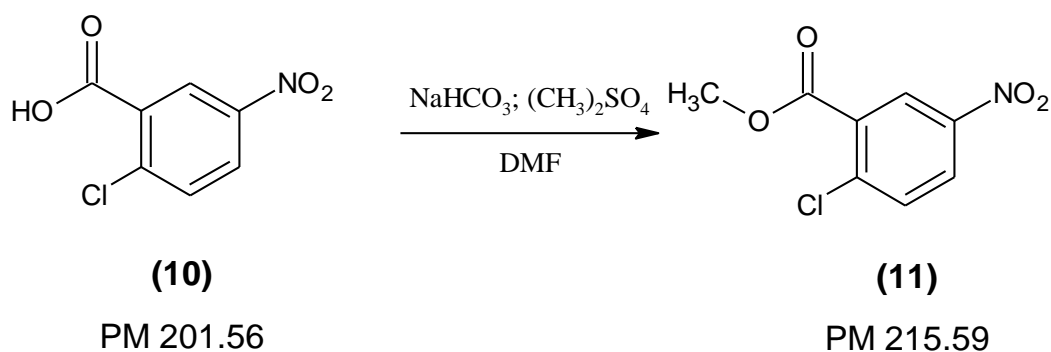
Método B. Calentamiento por microondas

En un matraz bola de 2 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL, adaptado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron 0.5 g (0.0023 mol) de ácido 1-metil-2-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**9**) en 7 mL de DMF anhidra. La solución se trató, a temperatura ambiente, con 0.57 g (0.0035 mol, 1.5 eq.) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI); luego la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas consumiéndose en su totalidad el ácido materia prima **9**.

Posteriormente, la mezcla se transfirió rápidamente a un tubo para reacción en MW de plástico recubierto de PTFE de 100 mL de capacidad. A la mezcla conteniendo el intermediario imidazólido se le adicionó 0.739 g (0.0023 mol, 1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**); el tubo con la mezcla de reacción se acondicionó con agitador magnético, después se adaptó al sensor interno de presión y temperatura (p/T) y a su chaqueta protectora de PEEK, se cerró al igual que las válvulas de salida de gases y se colocó en el rotor 16MF100 en la posición correspondiente junto con 3 tubos, llenos con 50 mL de DMF, cerrados con sus cubiertas de PEEK (procedimiento requerido para la función del equipo). Las condiciones de operación programadas fueron: temperatura a 180 °C, 2 minutos de rampa (tiempo en el cual la mezcla de reacción alcanza la temperatura seleccionada), 10 minutos de reacción, 20 min de enfriamiento, IR 180 °C y

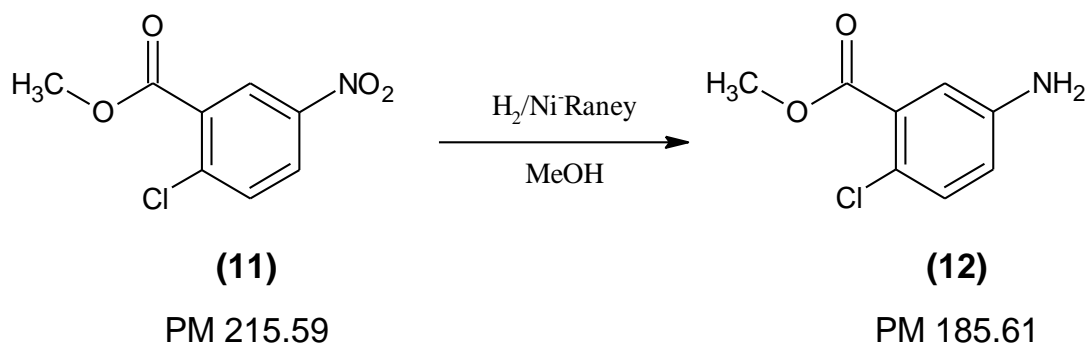
nivel de agitación 3. Pasado este tiempo, se abrió el sistema de reacción; la ccf mostró el consumo de las materias primas. El sólido que precipito en el tubo de reacción se colectó por filtración al vacío, se lavó con DMF fría y secó al aire obteniendo 0.49 g de sólido color beige; posteriormente de las aguas madres se recuperaron por destilación del disolvente 0.63 g de un sólido cuyo *Rf* coincidió con el del producto aislado primeramente dando un total de 1.12 g (93.3 %). El producto se purificó por lavados de THF obteniendo 1.08 g (89.9 %) de un polvo fino color blanco que en ccf mostró una mancha con *Rf* de 0.55 (sistema VIII) y punto de fusión de 317.6-318.2 °C, coincidentes con lo descrito en el método anterior.

2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11)



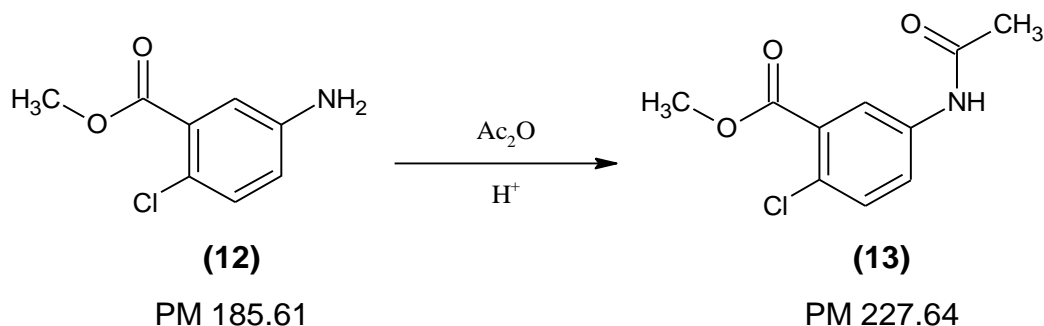
En un matraz bola de 500 mL con tres bocas esmeriladas 24/40, provisto con agitador magnético, termómetro, columna Vigreux y embudo de adición, se disolvieron 50 g (0.248 mol) de ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**10**) en 200 mL de DMF y 50 mL de agua, posteriormente se adicionaron 21 g (0.25 mol, 1 eq.) de NaHCO₃, se verificó que el pH fuese neutro o ligeramente alcalino, a la mezcla caliente a 70 °C se le adicionaron, poco a poco y con agitación constante 25.8 mL (0.273 mol, 1.1 eq.) de (CH₃)₂SO₄. La mezcla se dejó reaccionar hasta que por ccf se observó el consumo de la materia prima (1 hora y 20 minutos). Posteriormente se concentró el disolvente hasta una tercera parte del volumen inicial; luego, el concentrado se vertió en 500 mL agua fría formándose un precipitado el cual se separó por filtración al vacío, se lavó varias veces con agua fría y se secó al aire, se obtuvieron 48.59 g (91%) de un sólido amarillo-verdoso que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra de 5 g se recrystalizó de EtOH dando 3.86 g de cristales nacarados (79.4%) con un punto de fusión de 70.1-70.3 °C y *Rf* de 0.63 (sistema V).

5-Amino-2-clorobenzoato de metilo (12)



En una botella de hidrogenación de 300 mL, se suspendieron 25 g (0.116 mol) de 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**11**) y 7 g de catalizador Ni- Raney, previamente lavado con agua y MeOH (15 mL x 3), en 200 mL de MeOH; la botella se adaptó al aparato de hidrogenación, el sistema se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo de 4 horas, consumiendo un total de 580 lb/in², posteriormente la suspensión se filtró en un Büncher con celita, para separar el catalizador y el filtrado se concentró en el rotaevaporador obteniendo 20.1 g (93.4%) de un líquido viscoso color café claro; el producto se analizó por ccf observándose una sola mancha con *R_f* de 0.54 (sistema V). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

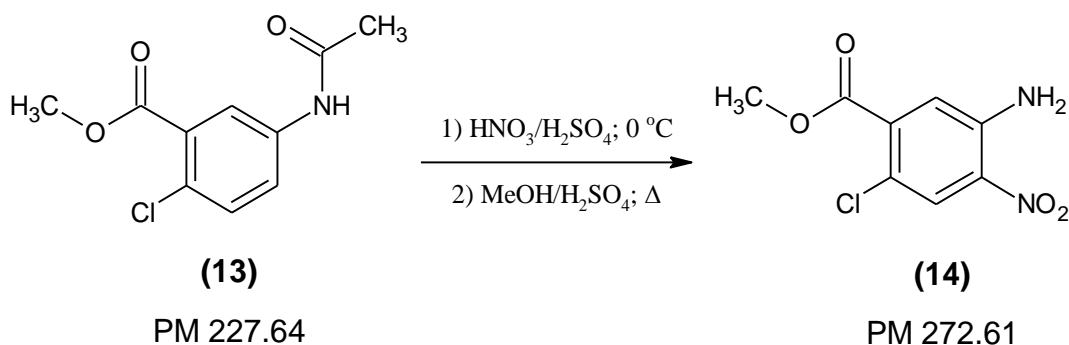
5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (13)



En un vaso de precipitados de 250 mL provisto con agitador magnético y termómetro, se adicionaron 40 mL de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado.

Posteriormente bajo agitación vigorosa se adicionaron lentamente 20 g de 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (**12**) evitando que la temperatura excediera los 50°C, terminada la adición se dejó en agitación por 30 minutos más; la ccf mostró el consumo total de la amina **12**, por lo que la mezcla de reacción se vertió en 300 mL de hielo formándose un sólido el cual se colectó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se secó al aire, obteniendo 22.8 g (92.9%) de un sólido color blanco. 1 g de producto se recrystalizó de MeOH/H₂O dando 0.59 g (59%) cristales blancos, con *Rf* de 0.51 (sistema V) y punto de fusión de 96.2-96.5 °C.

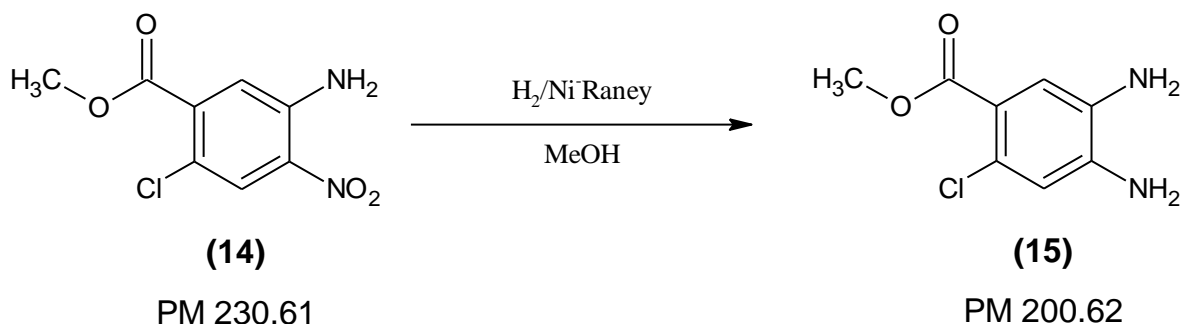
5-Amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**14**)



En un vaso de precipitados de 1 L se disolvieron 31 g (0.136 mol) de 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**13**) en 300 mL de H₂SO₄ a temperatura ambiente; posteriormente, a la solución fría entre 0-5 °C, se le adicionó, gota a gota y sin exceder los 5 °C, 9.4 mL HNO₃ al 70%. Terminada la adición, (2 horas) se dejó reaccionar por una hora más a la misma temperatura con agitación vigorosa. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la formación de dos productos en proporción 3:2 aproximadamente, por lo que la mezcla de reacción se vertió en 600 mL de hielo, se agitó muy bien hasta la aparición de un precipitado amarillo, el cual se separó por filtración al vacío, lavó repetidas veces con agua fría hasta pH neutro y se secó al aire obteniéndose 36.02 g (97%) de un sólido amarillo claro. Todo el producto crudo se suspendió en solución de MeOH/H₂SO₄ (9:1), se calentó a reflujo por 12 horas; durante el proceso precipitó un producto cristalino de rojo. Los cristales se separaron por filtración al vacío, se lavaron con agua hasta pH neutro y se secaron al aire.

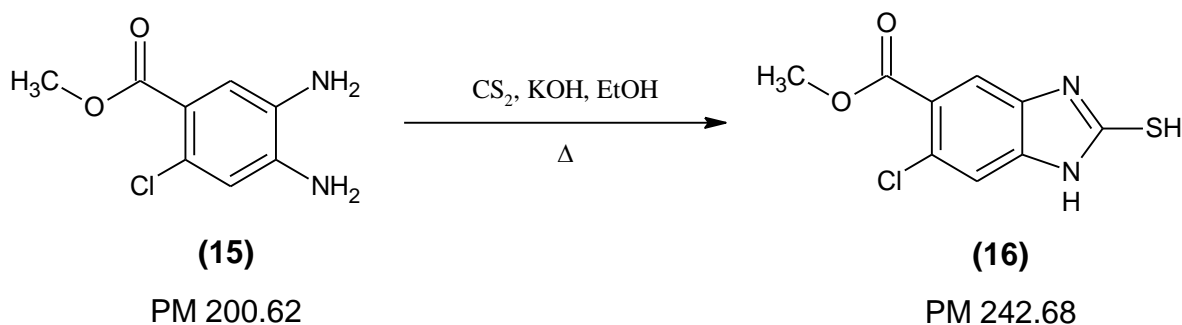
Se obtuvieron 9.26 g (30.4%) de cristales en forma de agujas color naranja con punto de fusión de 186.6-187 °C y *Rf* de 0.52 (sistema V).

4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (15)



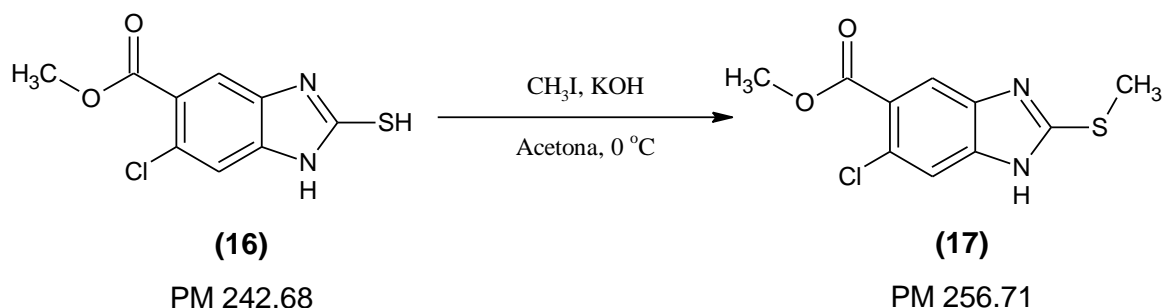
En una botella de hidrogenación de 300 mL, se suspendieron 6 g (0.026 mol) de 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (14) y 2 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH (15 mL x 3), en 150 mL de MeOH; la botella se adaptó al aparato de hidrogenación y el sistema se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo de 2 horas, consumiendo un total de 96 lb/in², posteriormente la solución se filtró en un Büncher con celita, para separar el catalizador y el filtrado se concentró en el rotaevaporador obteniendo 5.2 g (99.6%) de un sólido color café claro, que se analizó por ccf, observándose una sola mancha con *Rf* de 0.23 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

6-Cloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (16)



En un matraz de dos bocas esmeriladas 14/20 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y atmósfera de N₂, se disolvieron 5.2 g (0.026 mol) de 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**15**) en 50 mL de EtOH, a la solución después se adicionaron 2.5 g de KOH (0.039, 1.5 eq.) disueltos 2 mL de agua y 2.4 mL (0.039 mol, 1.5 eq.) de CS₂. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C por 4 horas. La ccf indicó la ausencia de la diamina **15** por lo que la mezcla de reacción se vertió en 100 mL de agua fría, La mezcla se aciduló con ácido acético hasta ajustar el pH a 4, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y se secó al aire. Se obtuvieron 5.58 g (88.4 %) de un sólido color beige que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se recristalizó de EtOH dando un polvo color beige con *R_f* de 0.15 (sistema III*) y un punto de fusión de 260.2-260.9 °C.

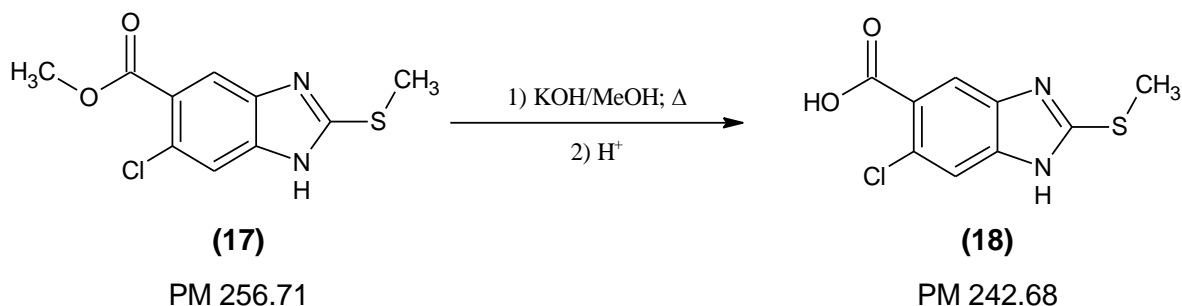
6-Cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**17**)



En un matraz bola de 3 bocas esmeriladas 14/20 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, y embudo de adición, se suspendieron 5 g (0.021 mol) de 6-cloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**16**) en 60 mL de acetona; a la suspensión se le adicionó 1.34 g de KOH (0.021 mol, 1 eq.) disueltos en 3 mL de agua observándose disolución total. A la solución fría entre 0-5 °C (en un baño de hielo con sal) se adicionó, lentamente y sin que la temperatura excediera los 5 °C, 1.57 mL de CH₃I (0.021 mol, 1 eq.). Terminada la adición (90 minutos) la reacción se dejó en agitación a 5 °C por 30 minutos más. La ccf indicó ausencia de materia prima, por lo que la reacción se vertió en 100 mL de agua fría, se neutralizó con ácido acético al 20%, el sólido formado se filtró al vacío, se lavó con agua y se secó al aire.

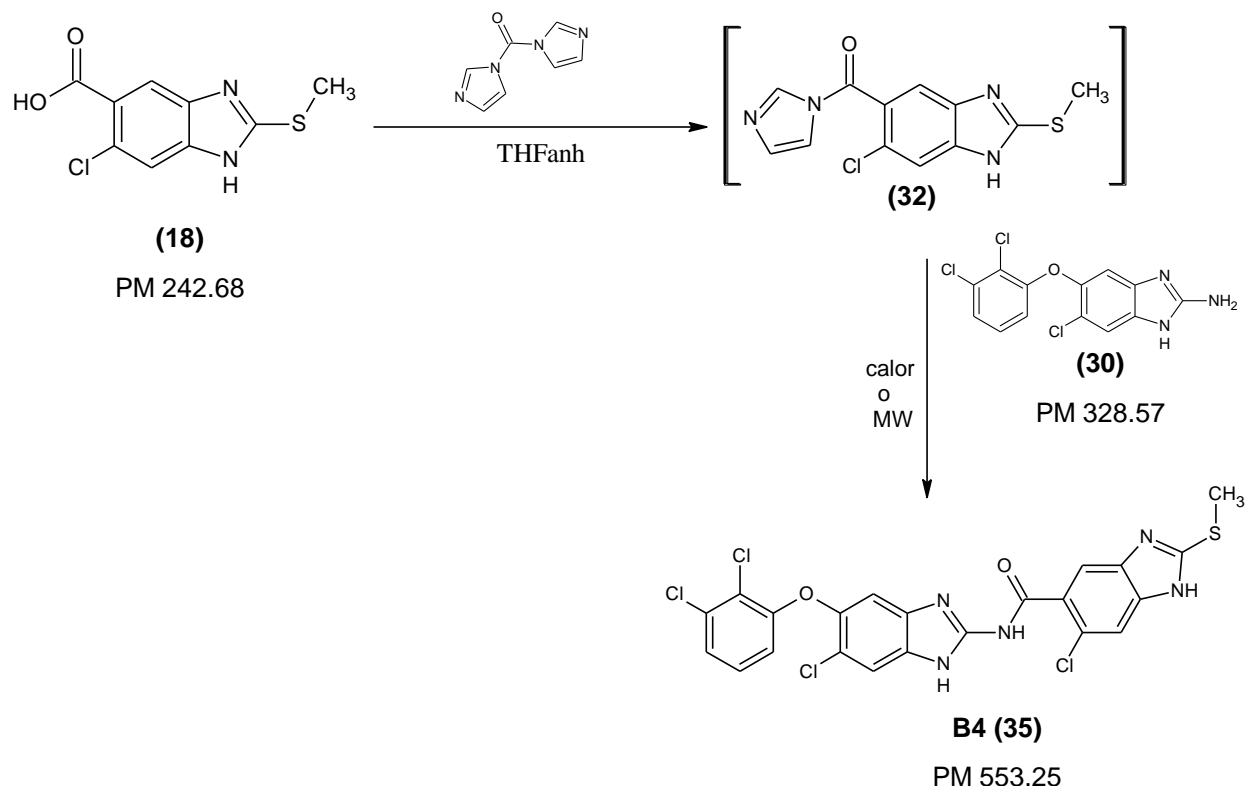
Se obtuvieron 4.95 g (91.8%) de un sólido color café claro; una muestra analítica se recrystalizó de EtOH dando un polvo blanco de punto de fusión de 138-139 °C y *Rf* de 0.24 (sistema III*).

Ácido 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (18)



En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 14/20 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro y condensador en posición de reflujo se suspendieron 4.5 g (0.018 mol) de 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (17) en 40 mL de MeOH, se adicionaron 2.64 g (0.041 mol, 2.3 eq.) de KOH disueltos en 6 mL de agua, la solución de calentó a 65-70 °C por 24 horas. La ccf indicó la ausencia del éster materia prima por lo que la reacción fría a temperatura ambiente se vertió en 50 mL de agua y se aciduló con H₂SO₄ al 20% hasta pH de 4. El sólido formado se separó al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire, obteniendo 3.58 g (82%) de un sólido blanco que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se recrystalizó de EtOH dando un polvo de color blanco el cual en ccf presentó un *Rf* de 0.18 (sistema VI**) y un punto de fusión de 216.3-216.5 °C.

6-Cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida B4 (35)



Método A. Calentamiento convencional

En un matraz bola de 2 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL, adaptado con agitador magnético, columna Vigreux y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron en 15 mL de THF 0.1262 g (0.00052 mol) de ácido 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**18**) y 0.126 g de 1,1-carbonildiimidazol (0.00078 mol, 1.5 eq.), la reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas, consumiéndose en su totalidad el ácido materia prima **18**, por lo se agregaron 0.1711 g (0.00052 mol, 1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**) la mezcla se dejó a temperatura ambiente por 5 días al paso de los cuales la ccf indicó un avance aproximado del 80 %, por lo que la mezcla de reacción se mantuvo en las mismas condiciones por 48 horas más; sin embargo, la reacción no se completó.

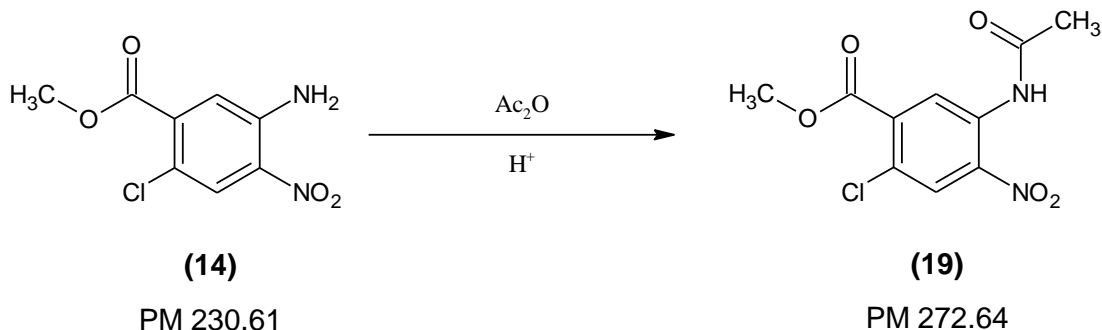
La mezcla de reacción se vertió en 50 mL de agua alcalina (pH=9), después el producto se extrajo con AcOEt 3 x 15 mL; las fases orgánicas se colectaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se concentró el disolvente hasta sequedad obteniéndose 0.258 g (89%) de un sólido color café oscuro. Todo el compuesto se purificó por cromatografía en placa preparativa usando como medio de elución CHCl₃/MeOH 90:10 + 5 mL de NH₄OH; se obtuvieron 0.11 g (43%) de un sólido color beige con punto de fusión de 213.5-215.1 °C y *R_f* de 0.44 (sistema VIII*).

Método B. Calentamiento por microondas

En un matraz bola de 2 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL, adaptado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron 0.1025 g (0.00042 mol) de ácido 6-cloro-2-metiltilio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**18**) en 7 mL de THF/MeCN (3:2) anhidros. La solución se trató, a temperatura ambiente, con 0.11 g (0.00063 mol, 1.5 eq.) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI); la reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 horas consumiéndose en su totalidad el ácido materia prima **18**. Posteriormente, la mezcla se transfirió rápidamente a un tubo para reacción en MW de plástico recubierto de PTFE de 100 mL de capacidad. A la mezcla conteniendo el intermediario imidazólido se le adicionó 0.138 g (0.00042 mol, 1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**); el tubo con la mezcla de reacción se acondicionó con agitador magnético, después se adaptó al sensor interno de presión y temperatura (p/T) y a su chaqueta protectora de PEEK, se cerró al igual que las válvulas de salida de gases y se colocó en el rotor 16MF100 en la posición correspondiente junto con 3 tubos, llenos con 50 ml de DMF, cerrados con sus cubiertas de PEEK (procedimiento requerido para la función del equipo). Las condiciones de operación programadas fueron: temperatura a 180 °C, 2 minutos de rampa (tiempo en el cual la mezcla de reacción alcanza la temperatura seleccionada), 10 minutos de reacción, 20 min de enfriamiento, IR 180 °C y nivel de agitación 3. Pasado este tiempo, se abrió el sistema de reacción; la ccf mostró el consumo de las materias primas. La mezcla se transfirió a un matraz de bola y el disolvente se retiró con rotaevaporador, se obtuvieron 0.202 g (87.8%) de un sólido color café. Todo el producto se trató con EtOH y carbón activado en caliente; después de retirar el catalizador, el EtOH se eliminó hasta sequedad y el residuo sólido se lavó varias veces con éter diisopropílico obteniendo 0.117 g (50.3%) de un polvo color beige con punto de fusión de

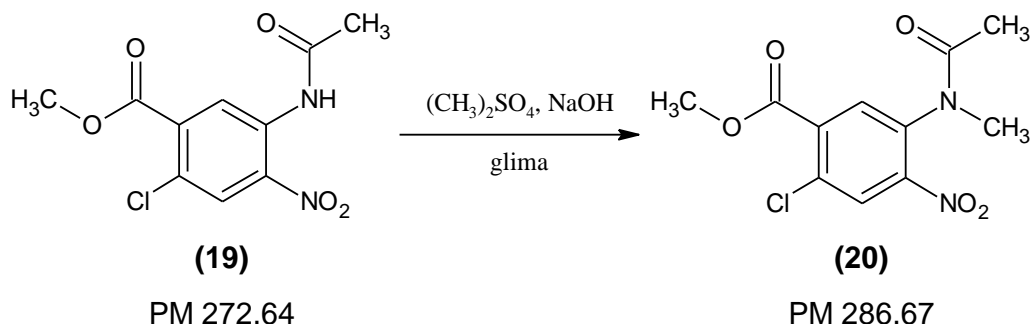
213.5-215.1 °C y *Rf* de 0.44 (sistema VIII*), coincidentes con lo descrito en el método anterior.

5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (19)



En un vaso de precipitados de 150 mL, adaptado con agitador magnético y termómetro, se mezclaron 20 mL de anhídrido acético, 20 mL de ácido acético glacial y una gota de ácido sulfúrico. Posteriormente bajo agitación vigorosa se agregó lentamente 9.5 g (0.041 mol) de 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo **(14)**, evitando que la temperatura excediera los 50°C, al término de la adición la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos. La ccf mostró ausencia de materia prima por lo que la mezcla de reacción se vertió en 200 mL de hielo dando un sólido el cual se filtró, se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro y se secó al aire, obteniendo 11.15 g (99.7%) de sólido color amarillo claro que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra de 0.75 g se recrystalizó de MeOH dando 0.57 g (76%) de cristales amarillos, con *Rf* de 0.44 (sistema V) y punto de fusión de 116.5-116.7 °C.

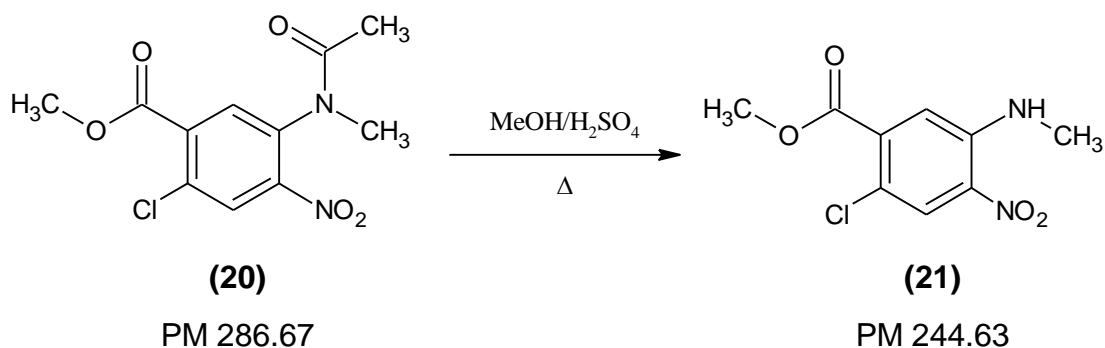
5-[Acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (20)



En un matraz bola de 250 mL con 2 bocas esmeriladas 24/40, adaptado con agitador magnético, columna Vigreux, termómetro y embudo de adición, se disolvieron 11.15 g (0.041 mol) de 5-(acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo **(19)** en 50 mL de glime.

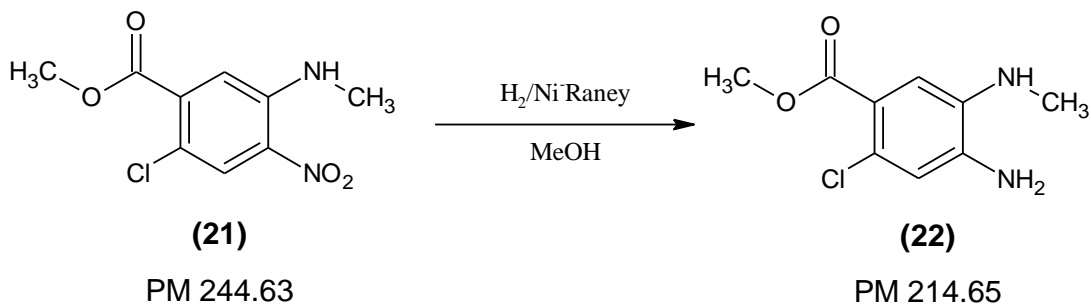
A la solución tibia a 30 °C se adicionaron 7.75 mL (0.081 mol, 2 eq.) de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$; luego se agregó gota a gota 2.46 g (0.0615 mol, 1.5 eq.) de NaOH, disueltos en 5 mL de agua, manteniendo un promedio de temperatura de 32 °C. Terminada la adición (90 minutos) la mezcla se dejó reaccionar por 30 minutos más a la misma temperatura; después de este tiempo la ccf mostró materia prima **19**, por lo que se adicionó un exceso de $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ y NaOH (0.25 mL y 0.3 g respectivamente). La reacción se completó después de 30 minutos. Luego de retirar el disolvente con rotaevaporador, la mezcla de reacción se vertió en 200 mL de agua con hielo, se agitó vigorosamente, se saturó la solución con sal formándose un precipitado, éste se separó al vacío, lavó con agua y se secó al aire, obteniendo 11.11 g (94.8%) de un sólido naranja claro que mostró ser una mancha en ccf. Una muestra analítica se recristalizó de isopropanol obteniendo cristales color amarillo que en ccf presentaron un *Rf* de 0.21 (sistema VI) y un punto de fusión de 118.9-119.7 °C.

2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**21**)



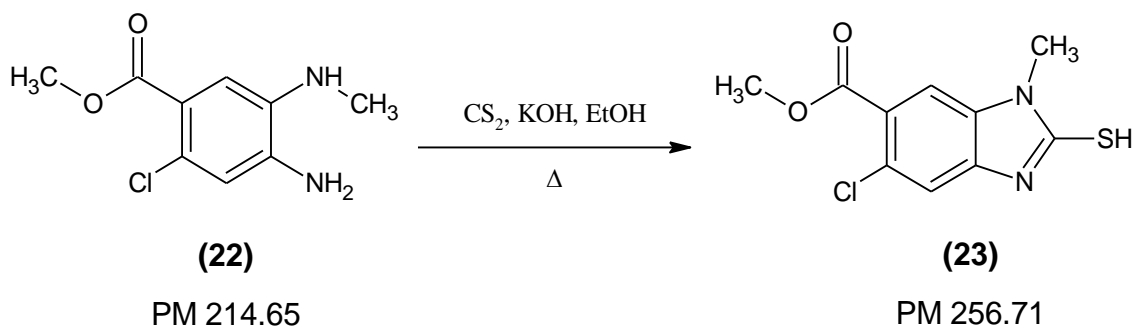
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 250 mL, adaptado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, se disolvieron 5.65 g (0.02 mol) de 5-[acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**20**) en 100 mL de MeOH/H₂SO₄ (9:1). La solución se calentó a 60 °C por 24 horas, durante este tiempo se formó un sólido en forma de agujas de color rojo, las cuales se colectaron por filtración al vacío, se lavaron repetidas veces con agua hasta pH neutro y se secaron al aire. Se obtuvieron 4.86 g (100.7%) de cristales en forma de agujas color rojo que en ccf mostraron un solo producto con *Rf* de 0.46 (sistema VI) y punto de fusión de 135-136.5 °C.

4-Amino-2-cloro-5-(metilamino) benzoato de metilo (22)



En una botella de hidrogenación de 300 mL, se suspendieron 5.14 g (0.021 mol) de 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**21**) y 1.6 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y luego con MeOH (15 mL x 3), en 25 mL de MeOH. La botella se adaptó al aparato de hidrogenación y se purgó el sistema mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en un tiempo de 3 horas consumiendo 158 lb/in² de H₂, la ccf mostró el consumo de la materia prima y la formación de un producto con *Rf* de 0.48 (sistema I). Posteriormente la solución se filtró al vacío sobre celita; luego, el disolvente se retiró con rotaevaporador formándose un sólido blanco el cual pesó 4.31 g (95.6%); este se usó sin tratamiento posterior en la siguiente reacción.

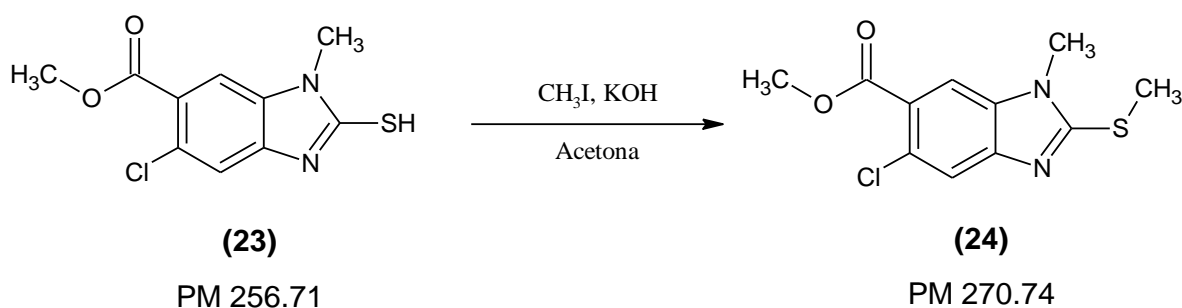
5-Cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (23)



En un matraz de dos bocas esmeriladas 14/20 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y atmosfera de N₂, se disolvieron 4.31 g (0.020 mol) de 4-amino-2-cloro-5-(metilamino) benzoato de metilo (**22**) en 60 mL de EtOH, a la solución se le adicionaron 2.36 g de KOH (0.042 mol, 2.1 eq.) disueltos 2 mL de agua y 2.54 mL (0.042 mol, 2.1 eq.) de CS₂.

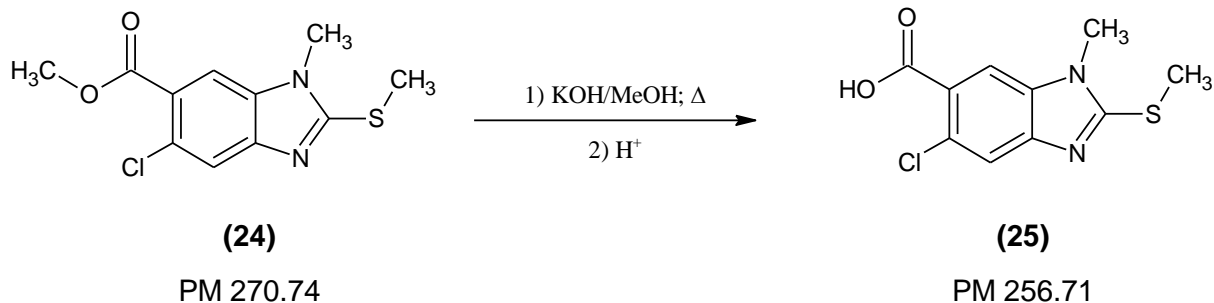
La mezcla de reacción se calentó a 70 °C por 72 horas, sin embargo la ccf mostró presencia de materia prima por lo que el pH se ajustó a 10 con solución concentrada de KOH y se adicionó 0.25 mL (0.2 eq.) de CS₂, la mezcla se dejó en agitación a 45°C por 2 horas más. Después de este tiempo, la ccf indicó la ausencia de materia prima. La mezcla de reacción se vertió en agua fría, se adicionó ácido acético hasta ajustar el pH a 4, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire, obteniendo 3.77 g (73.4%) de un sólido color beige. Una muestra de 3.77 g se recrystalizó de EtOH dando 2.29 g (61%) de cristales beige, con *Rf* de 0.64 (sistema II*) y punto de fusión de 230.5-231.4 °C.

5-Cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (24)



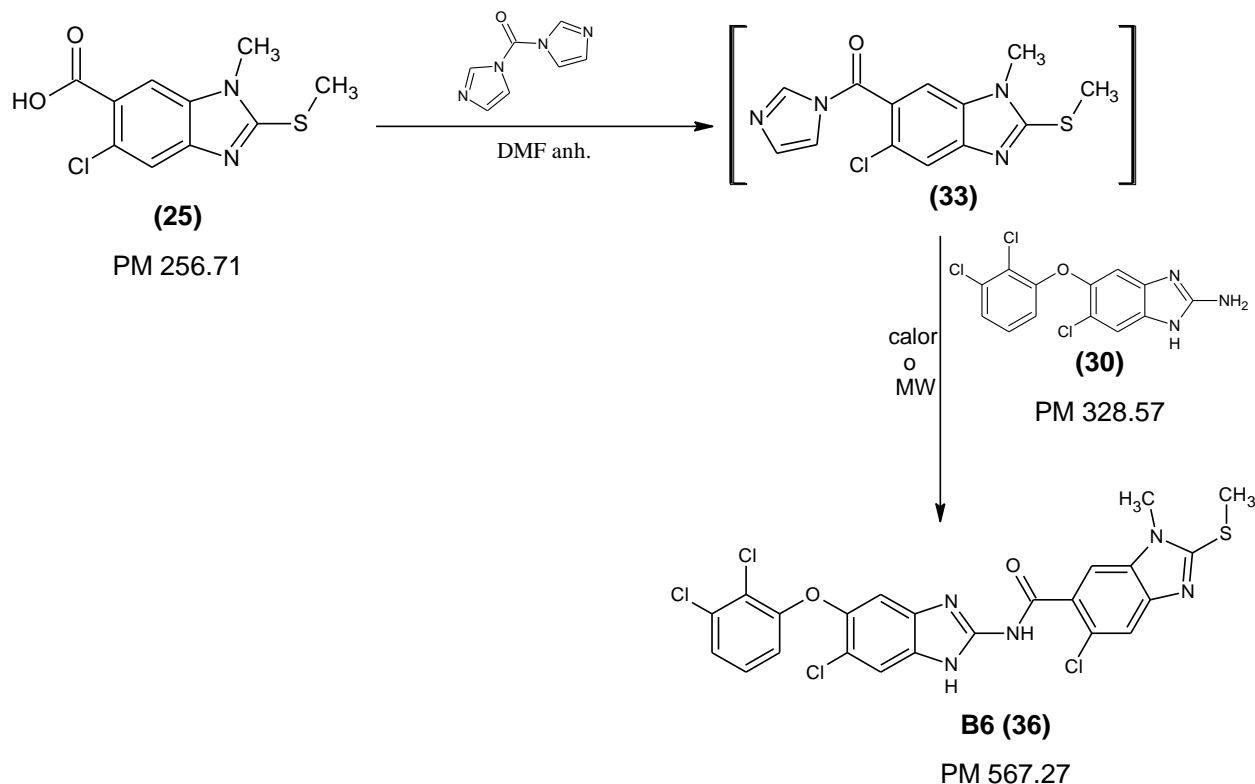
En un matraz bola de 100 mL de dos bocas esmeriladas 14/20, adaptado con agitador magnético y embudo de adición, se disolvieron 6 g (0.023 mol) de 5-cloro-2-mercapto-1-metil-1*H*-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**23**) en 50 mL acetona, a la suspensión se le adicionó 1.47 g de KOH (0.023 mol, 1 eq.) disueltos en 5 mL de agua; después se añadió lentamente y a temperatura ambiente 1.44 mL de CH₃I (0.023 mol, 1 eq.). Terminada la adición, la mezcla se dejó en agitación por una hora a la misma temperatura, la ccf mostró ausencia de **23**, por lo que se eliminó el disolvente en el rotaevaporador a un tercio de su volumen inicial; después, el residuo se vertió en 100 mL de agua fría precipitando un sólido el cual se separó al vacío, se lavó con agua fría y se secó al aire; obteniendo 5.96 g (94%) de un sólido color beige. 3.17 g se recrystalizaron de EtOH más 10% de carbón activado dando 1.84 g de cristales blancos (58%), con *Rf* de 0.73 (sistema II*) y punto de fusión de 123.6-125 °C.

Ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (25)



En un matraz bola de dos esmeriladas 14/20 bocas de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro y condensador en posición de reflujo, se suspendieron 3.5 g (0.013 mol) de 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**24**) en 40 mL de MeOH, se adicionó 1.66 g (0.026 mol, 2 eq.) de KOH disueltos en 3 mL de agua, la solución se calentó a 65-70 °C por 4 horas. La ccf indicó la ausencia de materia prima por lo que la mezcla de reacción fría, a temperatura ambiente, se vertió en 50 mL de agua y se aciduló con H₂SO₄ al 20% hasta pH de 4. El sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire, obteniendo 3.25 g (97.3%) de un sólido blanco que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se recrystalizó de EtOH dando un polvo fino color blanco el cual presentó un *R_f* de 0.22 (sistema V**) y punto de fusión de 254.9-256.1 °C.

5-Cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida B6 (36)



Método A. Calentamiento convencional

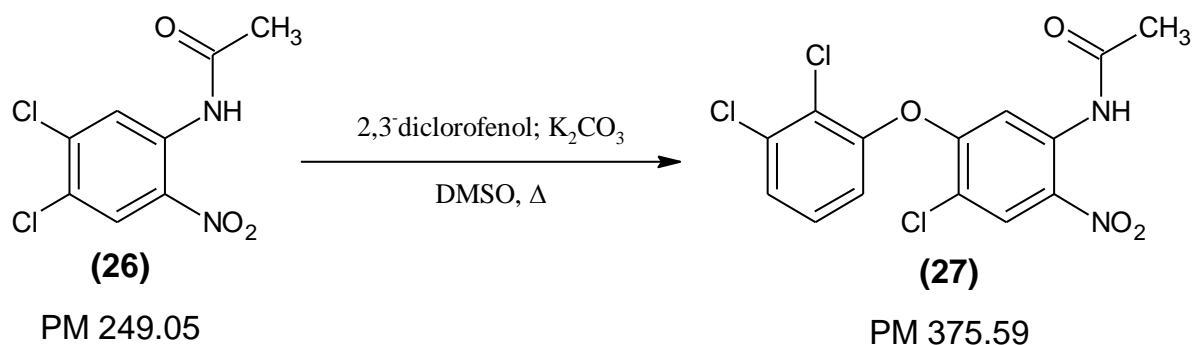
En un matraz bola de 3 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL al cual se le adaptó agitador magnético, columna Vigreux, atmósfera de Nitrógeno y termómetro se disolvieron 0.513 g (0.0019 mol) de ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**25**) en 7 mL de DMSO; la solución se trató con 0.49 g (0.0285 mol, 1.5 eq.) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI), la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4 horas, consumiéndose el ácido materia prima en su totalidad. Posteriormente se agregaron 0.690 g (0.0021 mol, 1.1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**) y se aumentó la temperatura a 100 °C, usando un baño de aceite, por 4 horas, después a 70 °C por 48 horas; la ccf reveló la formación de un producto principal y el consumo de los reactivos. La mezcla de reacción fría se vertió en 50 mL de agua helada, se saturó con sal y se dejó en agitación por 30 minutos, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se secó al aire, se obtuvo 0.88 g (81.6%) de un sólido crudo color beige.

El producto se purificó por lavados sucesivos, primero con THF, luego con agua alcalina (pH= 9), y por último con éter diisopropílico. En cada operación el producto se suspendió en el disolvente, se agitó por 30 min y después se separó por filtración, se lavó y dejó secar al aire. Se obtuvo un polvo fino color blanco que pesó 0.204 g (23.2%), que en ccf mostró sólo una mancha con R_f de 0.59 (sistema VIII) y punto de fusión de 268.6-269.6 °C.

Método B. Calentamiento por microondas

En un matraz bola de 2 bocas esmeriladas 14/20 de 25 mL, adaptado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron 0.5 g (0.00195 mol) de ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**25**) en 7 mL de DMF anhidra. La solución se trató, a temperatura ambiente, con 0.47 g (0.0029 mol, 1.5 eq.) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI). La reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas consumiéndose en su totalidad el ácido materia prima **25**. Posteriormente, la mezcla se transfirió rápidamente a un tubo de plástico recubierto de PTFE de 100 mL de capacidad, para reacción en MW. A la mezcla conteniendo el intermediario imidazólido se le adicionó 0.639 g (0.00195 mol, 1 eq.) de [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (**30**); el tubo con la mezcla de reacción se acondicionó con agitador magnético, después se adaptó al sensor interno de presión y temperatura (p/T) y a su chaqueta protectora de PEEK, se cerró al igual que las válvulas de salida de gases y se colocó en el rotor 16MF100 en la posición correspondiente junto con 3 tubos, llenos con 50 mL de DMF, cerrados con sus cubiertas de PEEK (procedimiento requerido para la función del equipo). Las condiciones de operación programadas fueron: temperatura a 180 °C, 2 minutos de rampa (tiempo en el cual la mezcla de reacción alcanza la temperatura seleccionada), 10 minutos de reacción, 20 min de enfriamiento, IR 180 °C y nivel de agitación 3. Pasado este tiempo, se abrió el sistema de reacción; la ccf mostró el consumo de las materias primas. La mezcla se transfirió a un matraz de bola y el disolvente se retiró con rotaevaporador; el residuo se trató con 30 mL de agua precipitando un sólido que se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 1.012 g (91.5%) de un sólido color beige. El producto se purificó por lavados con THF obteniendo 0.99 g (89.5%) de un polvo fino color blanco que en ccf mostró una mancha, con R_f de 0.59 (sistema VIII) y punto de fusión de 268.6-269.6 °C, coincidentes con lo descrito en el método anterior.

***N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil] acetamida (27)**



Método A. Calentamiento por microondas

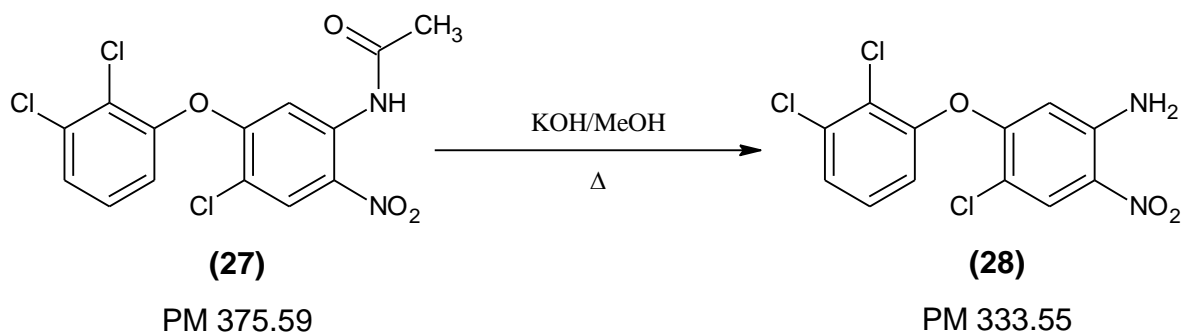
En un vial de vidrio de 5 mL de capacidad, adaptado con agitador magnético se mezclaron 250 mg (1 mmol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**26**), 207 mg (1.5 mmol) de K_2CO_3 , 179.3 mg (1.1 mmol) de 2,3-diclorofenol en 2 mL de DMSO, el vial se tapó con un septum de plástico de PTFE y tapón de rosca de PEEK, se colocó en el rotor 64MG5 en la posición establecida junto con 15 viales llenos de disolvente (necesarios para el funcionamiento del equipo). Las condiciones de operación programada fueron: IR: 140 °C, 300 W de potencia, 1 minuto de rampa, 10 minutos de reacción. La ccf mostró el consumo de los reactivos por lo que la mezcla de reacción se vertió en 50 mL de agua; después se agregó sal hasta saturación y se dejó en agitación por 30 minutos. El sólido que precipitó se colectó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire obteniendo 0.37 g (98.6%) de un sólido color amarillo que en ccf mostró ser un solo producto. El producto se recrystalizó de Tolueno-EtOH (par de disolvente) generando 0.29 g (78.4%) de cristales amarillos con *R_f* de 0.46 (sistema IX) y punto de fusión de 162.5-163.5 °C.

Método B. Calentamiento convencional

En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 500 mL, adaptado con agitador magnético, atmósfera de nitrógeno, termómetro y refrigerante en posición de reflujo se mezclaron 25 g (0.1 mol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**26**) en 200 mL de DMSO, 19.56 g (0.12 mol, 1.2 eq.) de 2,3-diclorofenol y 20.7 g de K_2CO_3 (0.15 mol, 1.5 eq.).

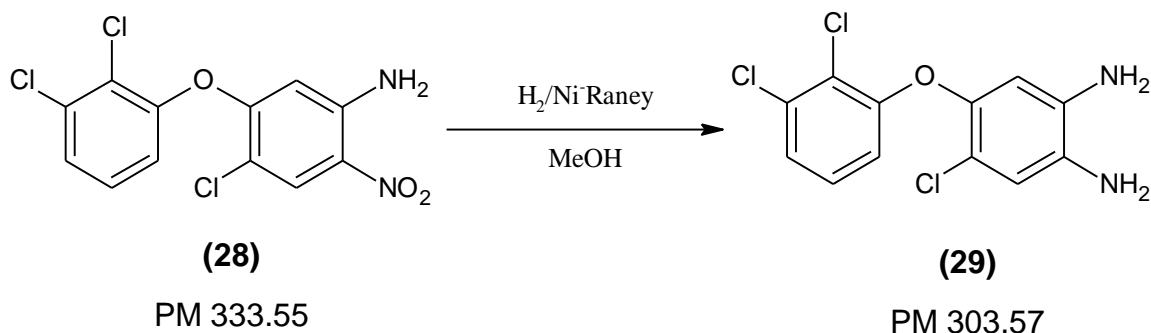
La mezcla de reacción se calentó en un baño de aceite a 130 °C; pasados 30 minutos, la ccf mostró el consumo total de la materia prima por lo que la reacción se dejó enfriar y posteriormente se vertió en 800 mL de agua con hielo, se añadió sal hasta saturación y se dejó en agitación toda la noche. El precipitado formado se colectó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se secó al aire, obteniendo 34.9 g (92.9%) de un sólido color amarillo que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra analítica se obtuvo por recristalización de 0.96 g de Tolueno-EtOH (par de disolvente) generando 0.71 g (73.2%) de cristales amarillos con *R_f* de 0.46 (sistema IX) y punto de fusión de 162.5-163.5 °C, congruentes con lo reportado en el método anterior.

4-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (28)



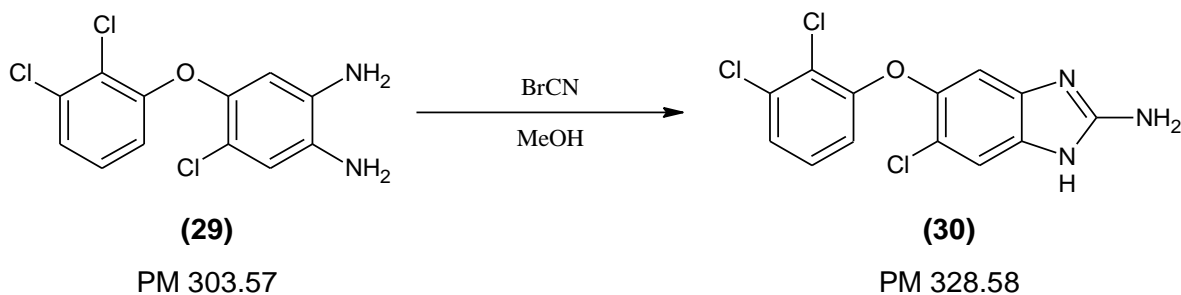
En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro y refrigerante en posición de reflujo y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron 15 g (0.40 mol) de *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil]acetamida (27) en 150 mL de MeOH, a la solución se adicionaron 5.1 g de KOH (0.080 mol, 2 eq.) disueltos en 5 mL de agua. La mezcla se calentó a 40 °C por 5 horas. La ccf mostró presencia de materia prima por lo que se adicionaron 0.51 g más de KOH (0.2 eq.) y se dejó reaccionar por una hora más. Terminada la reacción, la mezcla se vertió en 200 mL de agua con hielo, se neutralizó con solución de HCl al 10%, el precipitado se filtró al vacío, se lavó con agua y se secó al aire. El sólido amarillo colectado pesó 12.68 g (95.3%); una muestra analítica se recristalizó de tolueno dando cristales color naranja los cuales presentaron un punto de fusión de 150.8-151.6 °C y *R_f* de 0.56 (sistema IX).

4-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1,2-fenilendiamina (29)



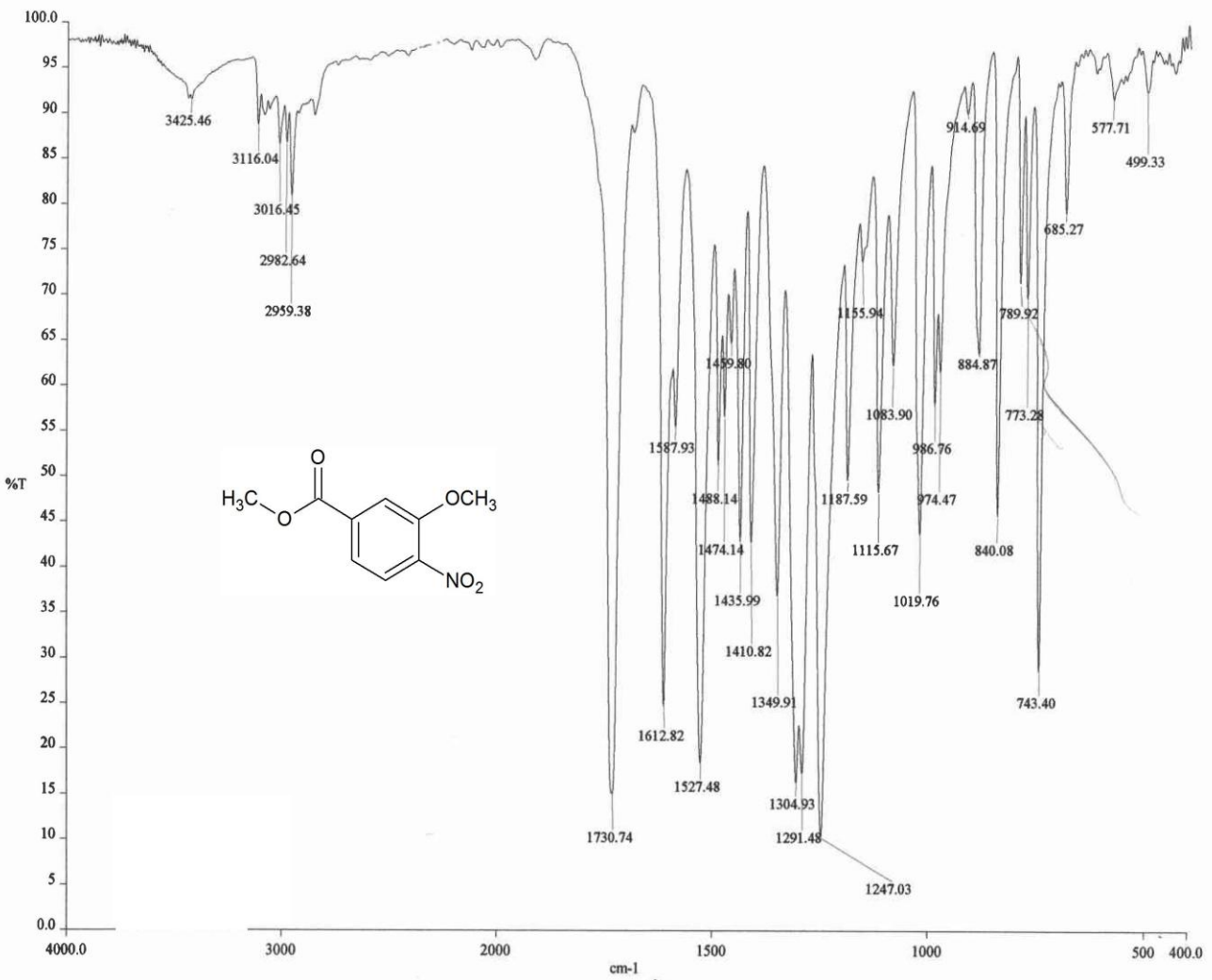
En una botella de hidrogenación de 300 mL, se suspendieron 10 g (0.030 mol) de 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (**28**) en 180 mL de MeOH junto con 4 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH por duplicado. La botella se adaptó al aparato de hidrogenación, se purgó con tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo de 2 horas, consumiendo un total de 113 lb/in². Cuando el consumo de hidrógeno cesó, una ccf mostró el consumo total de la materia prima **28** observándose una sola mancha; después, la suspensión se filtró en un Büncher con celita, para separar el catalizador y el filtrado se concentró en el rotaevaporador obteniéndose 8.96 g (98.4%) de un sólido color café claro con *Rf* de 0.22 (sistema IX). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

[6-Cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]amina (30)

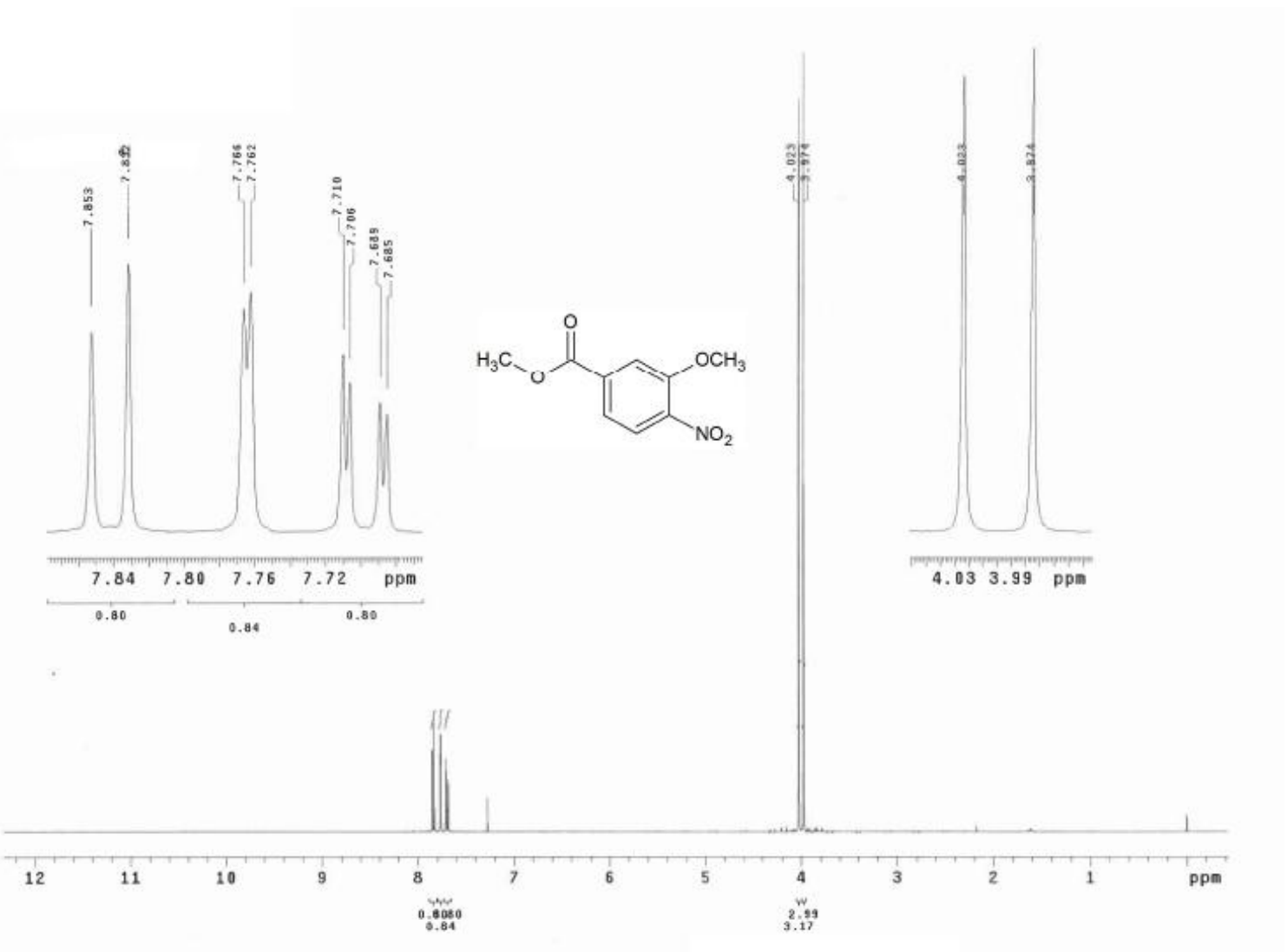


En un matraz bola de 250 mL, adaptado con condensador en posición de reflujo, barra magnética y atmósfera de Nitrógeno, se disolvieron 6.8 g (0.0224 mol) de 4-cloro-5-(2,3-diclorofenilo)-1,2-fenilendiamina (**29**) en 60 mL de MeOH; a la solución, posteriormente se agregaron a temperatura ambiente 2.9 g (0.0274 mol, 1.2 eq.) de BrCN y se dejó reaccionar por 3 horas a 50 °C. Por ccf se verificó el consumo de la materia prima por lo que se adicionó 1 g (15%) de carbón activado, la mezcla se calentó a reflujo por 90 minutos, después se separó el carbón activado por filtración con celita y se realizaron lavados con MeOH caliente. El filtrado se trató con 1.34 g (0.033 mol, 1.5 eq.) de NaOH en 10 mL de agua, se dejó en agitación por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se vertió en 800 mL de agua fría precipitando un sólido rosa claro y una resina color café la cual se dejó asentar, el sobrenadante con el sólido color rosa se separó por decantación y se reservó. El sólido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces y se secó obteniéndose 5.35 g de sólido color rosa claro que en ccf mostró ser un solo producto. La resina, que se separó anteriormente, se redisolvió con una mezcla de AcOEt/MeOH caliente precipitando un sólido color café claro, el cual por ccf mostró ser también el producto esperado (**30**). Se recuperaron 1.45 g de compuesto. En total se obtuvieron 6.8 g (92.3%) de producto crudo. El producto se recristalizó de EtOH con 10% de carbón activado dando 5.35 g (78.7%) de compuesto color blanco rosado con punto de fusión de 185.2-187.4 °C y *R_f* de 0.22 (sistema IV*).

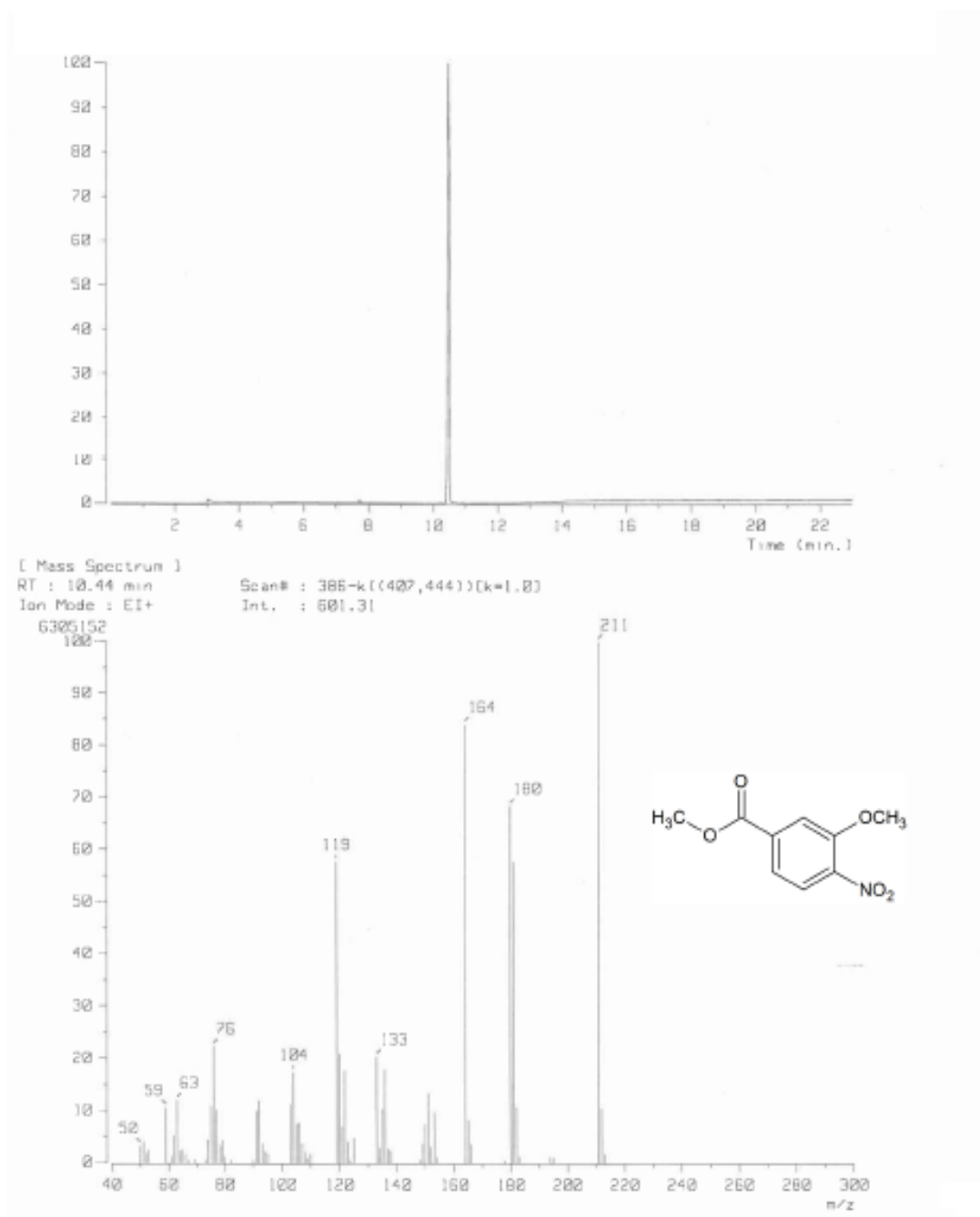
10.2. ESPECTROS



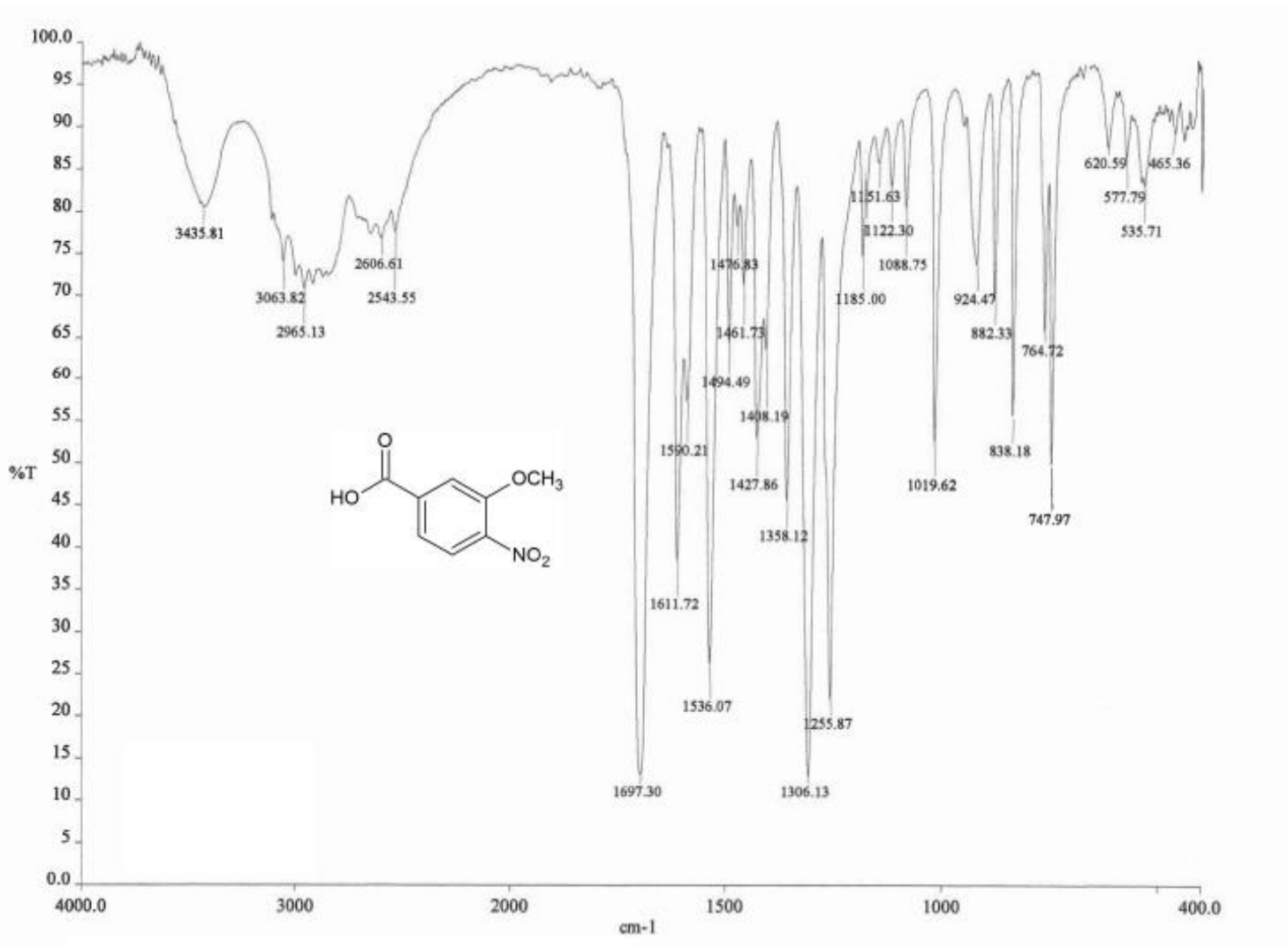
Espectro 1. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2).



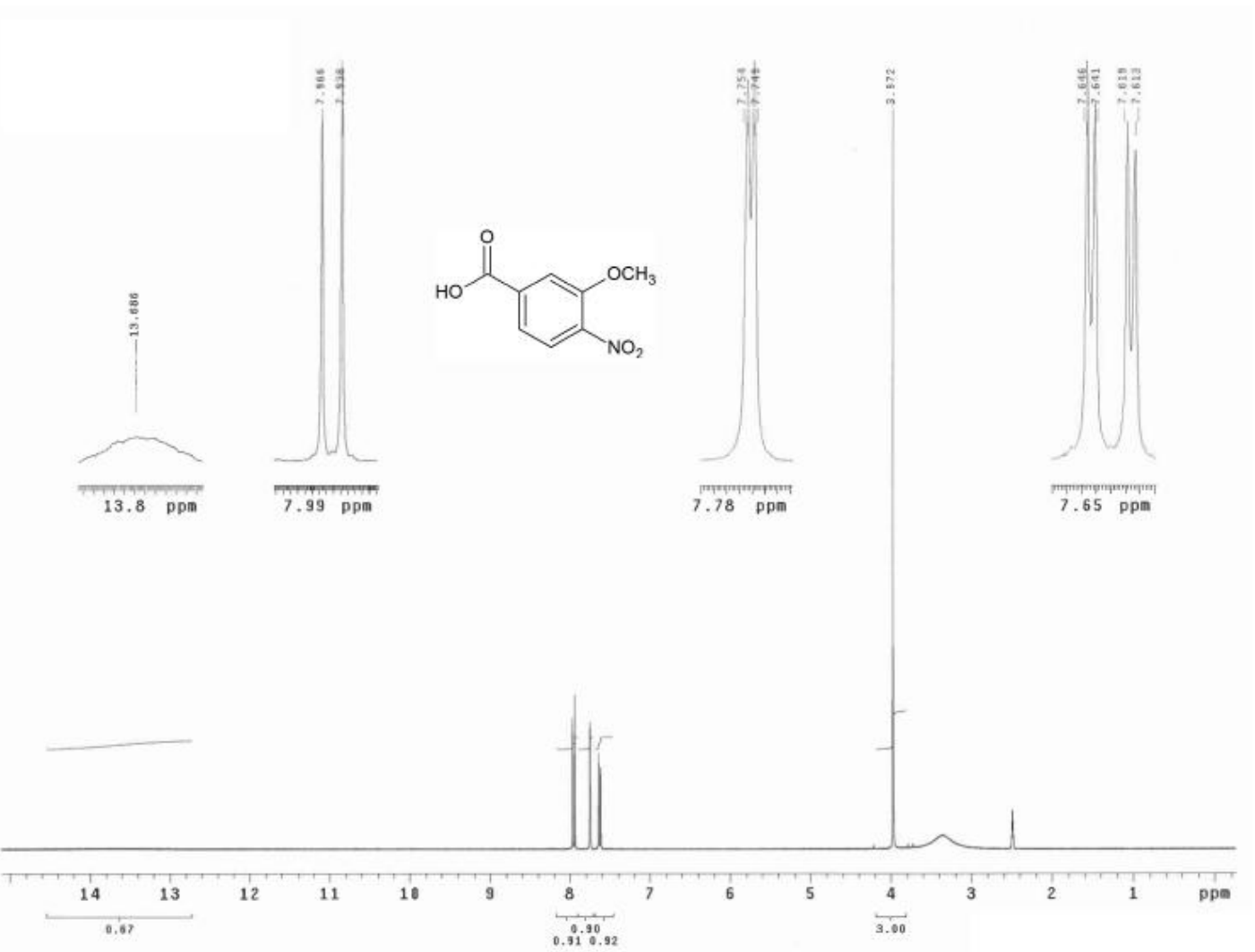
Espectro 2. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 400 MHz, δ en ppm) de: 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2).



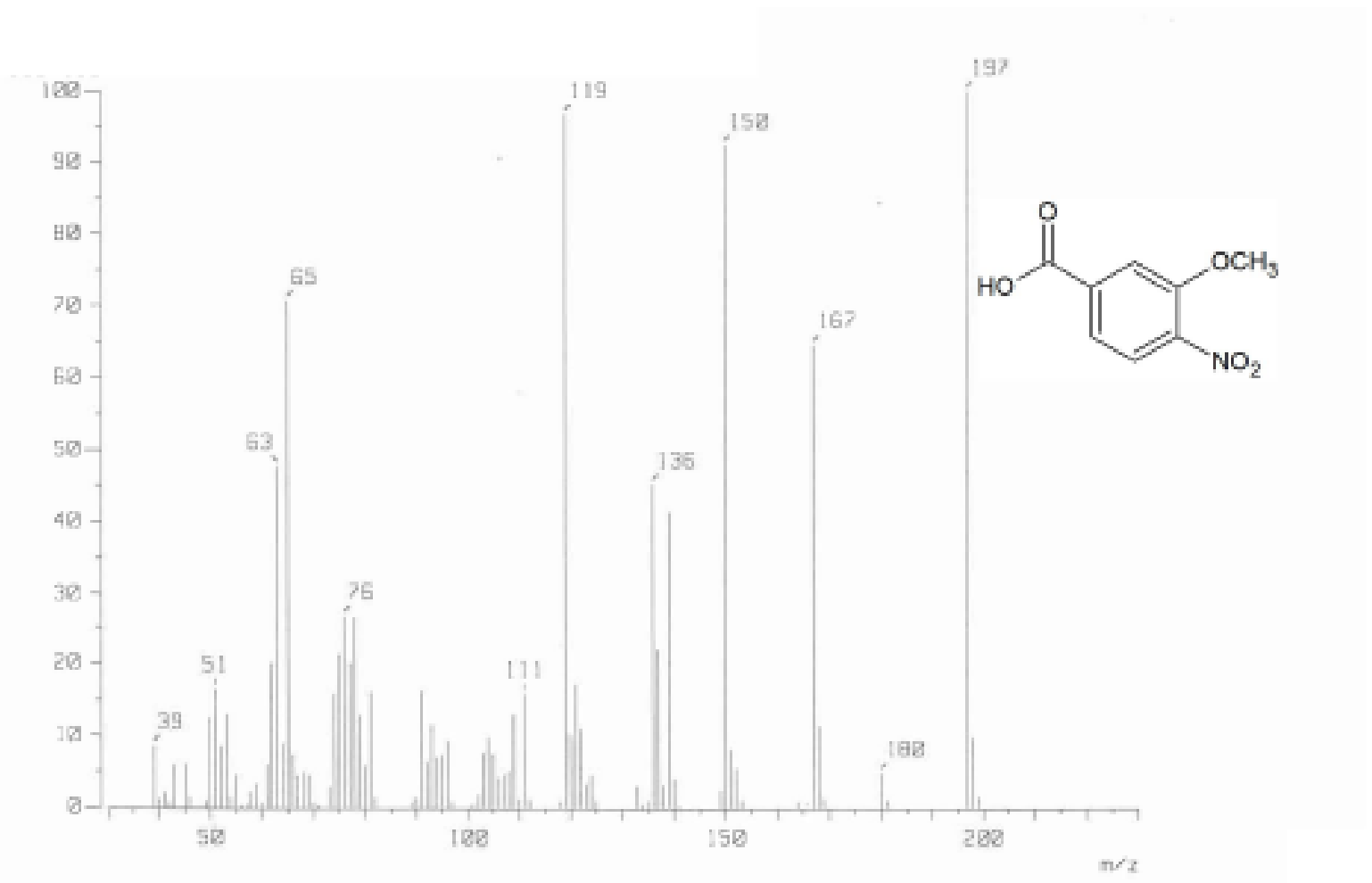
Espectro 3. EM (CG/IE, m/z) de: 3-metoxi-4-nitrobenzoato de metilo (2).



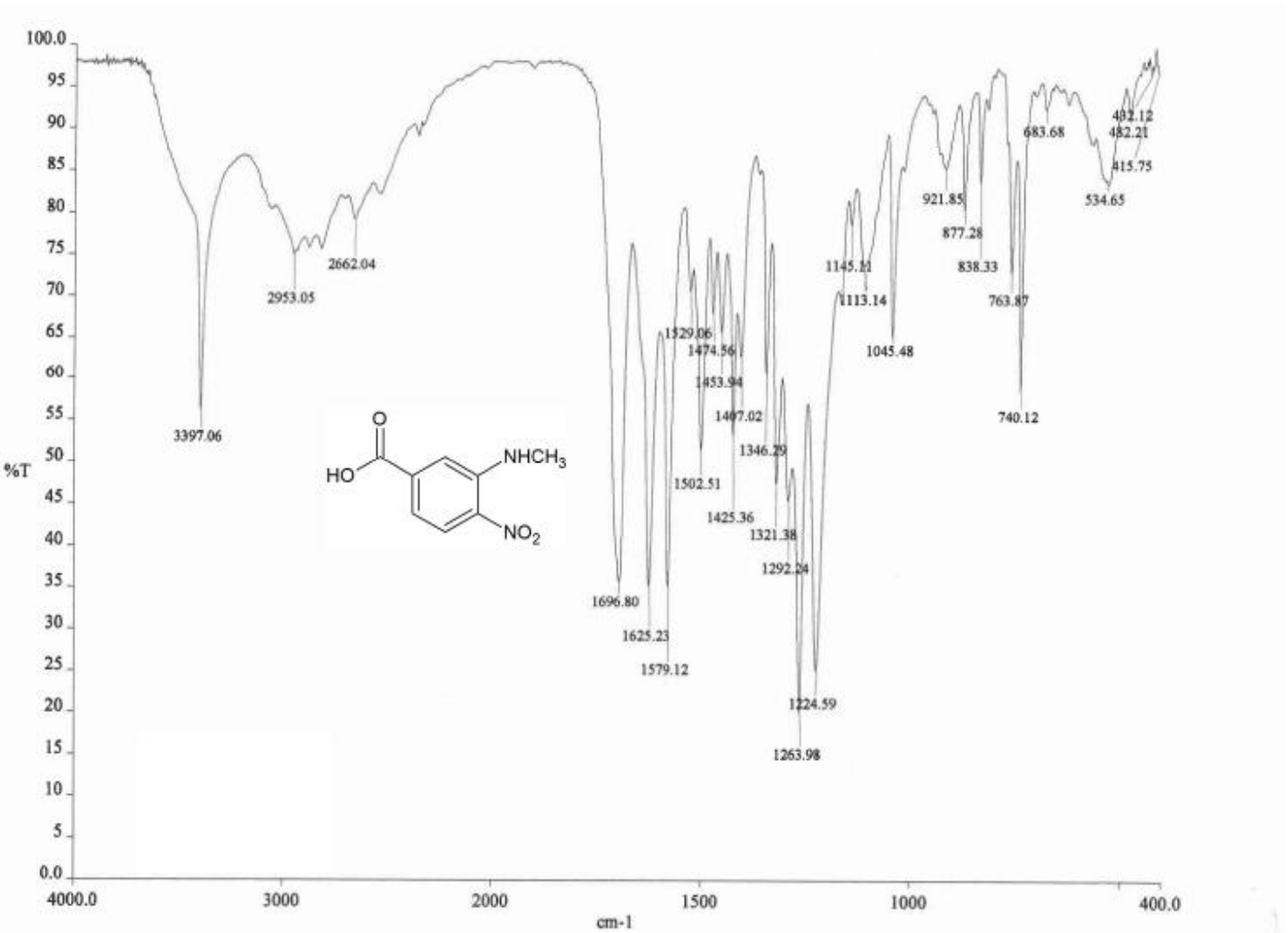
Espectro 4. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3).



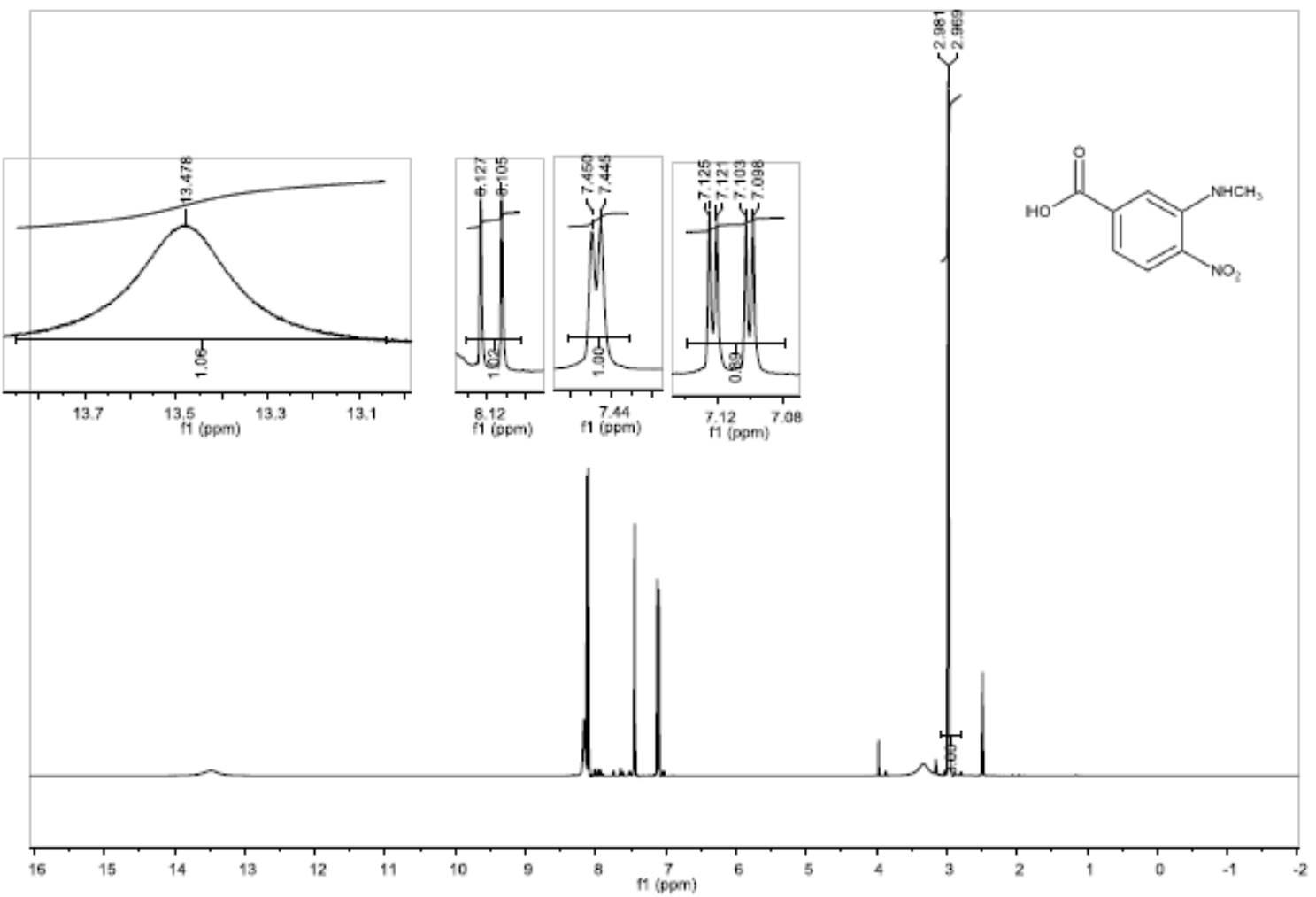
Espectro 5. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 300 MHz, δ en ppm) de: ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3).



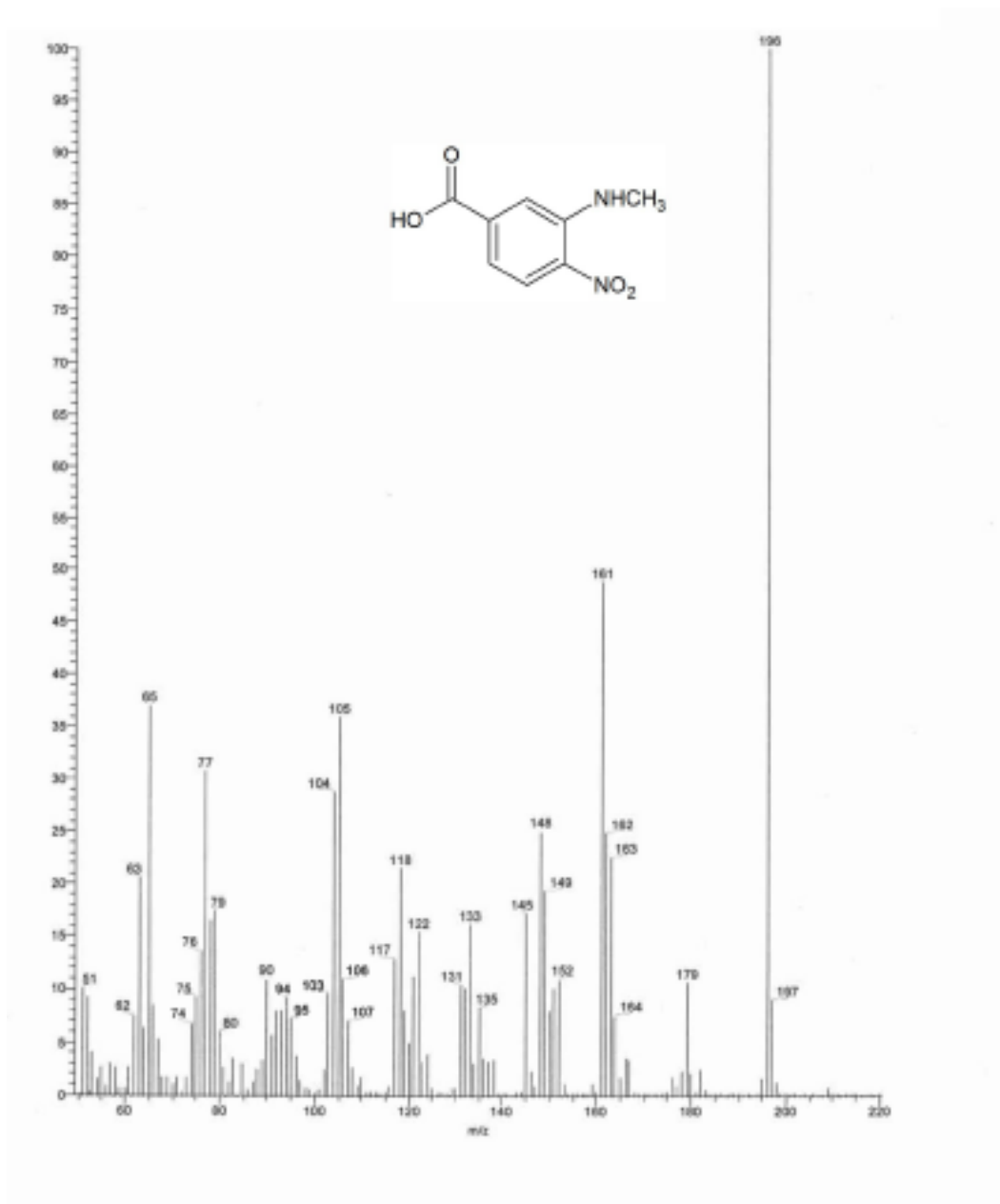
Espectro 6. EM (ID/IE, m/z) de: ácido 3-metoxi-4-nitrobenzoico (3).



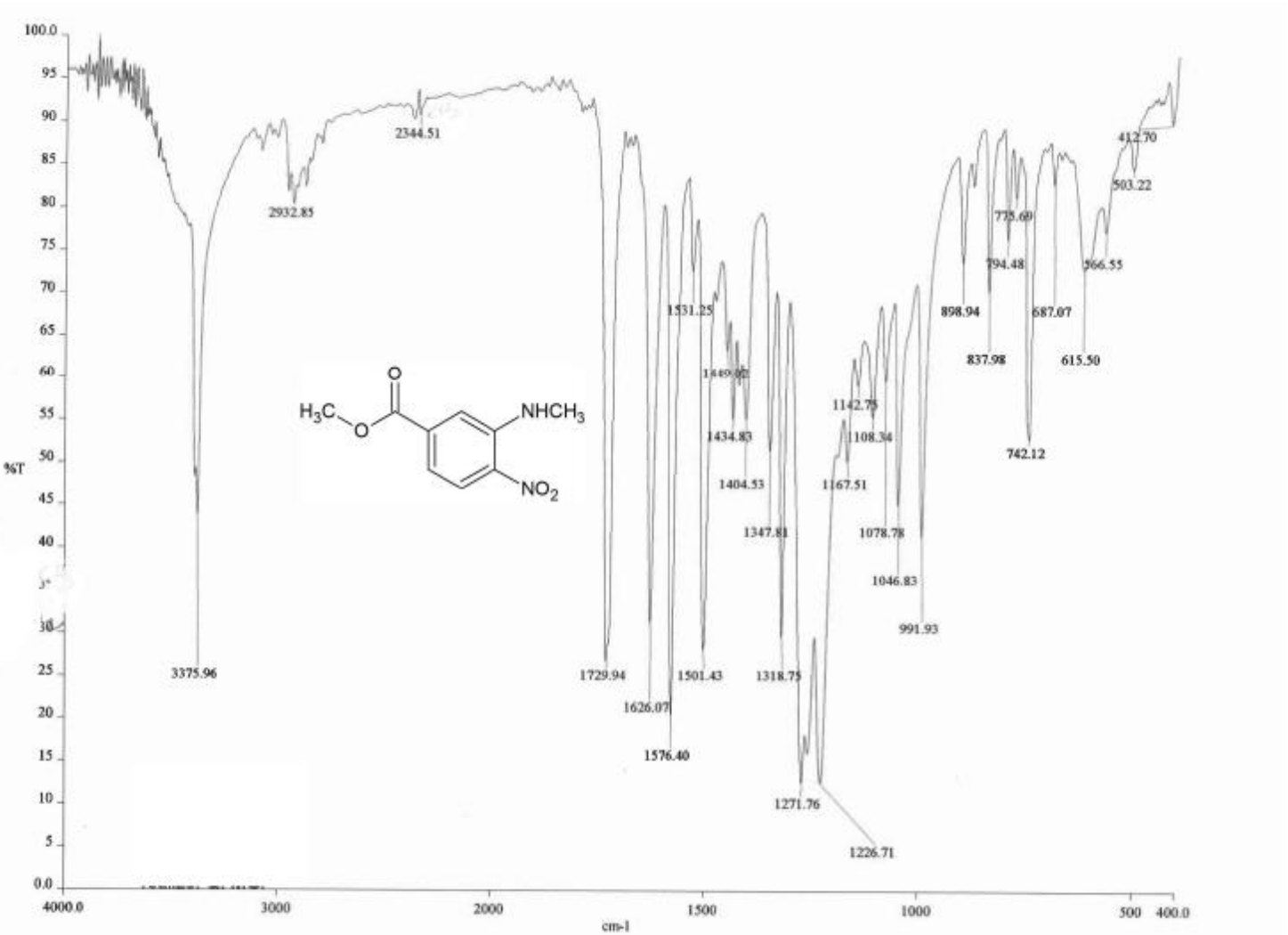
Espectro 7. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4).



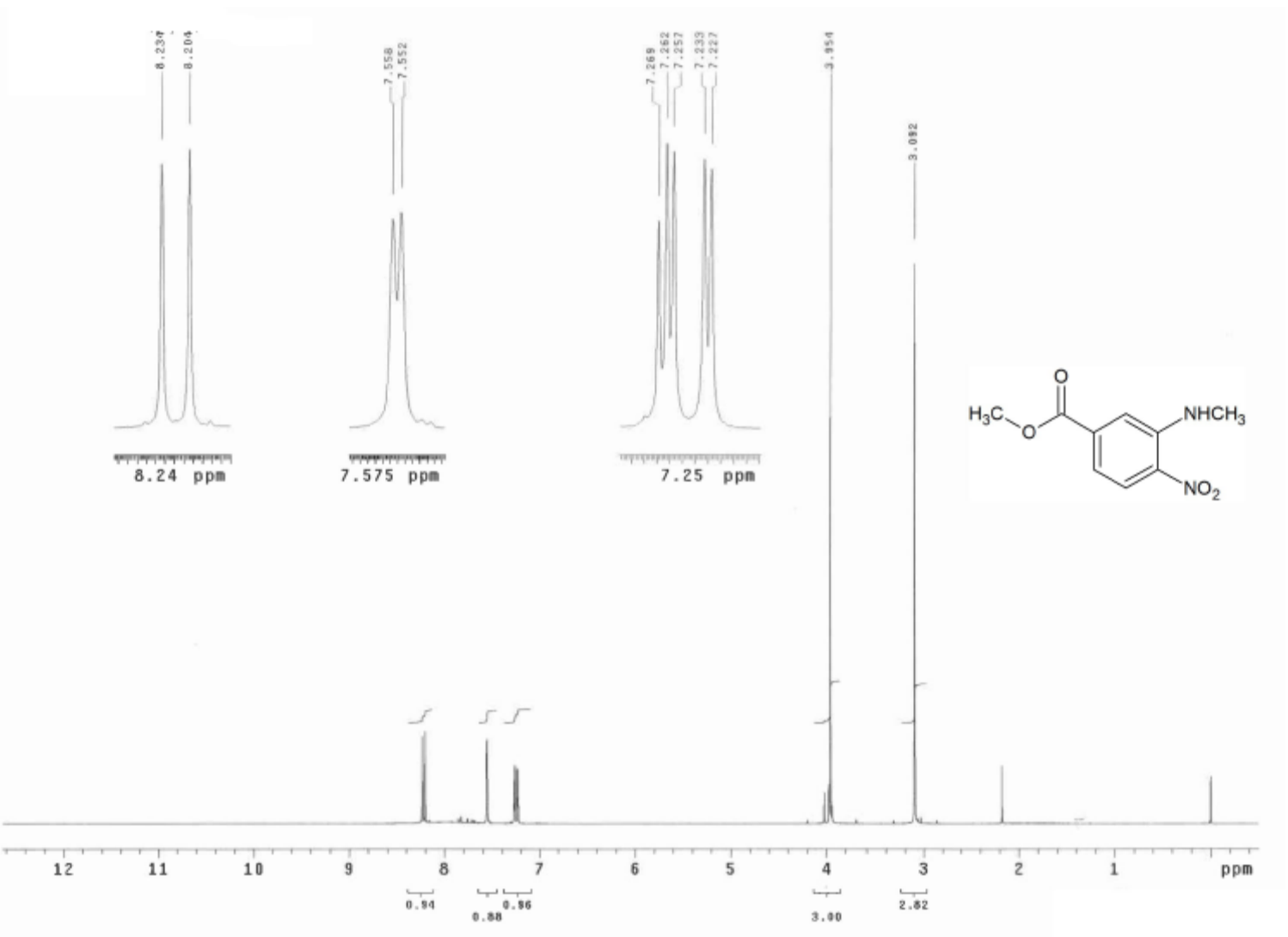
Espectro 8. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz, δ en ppm) de: ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4).



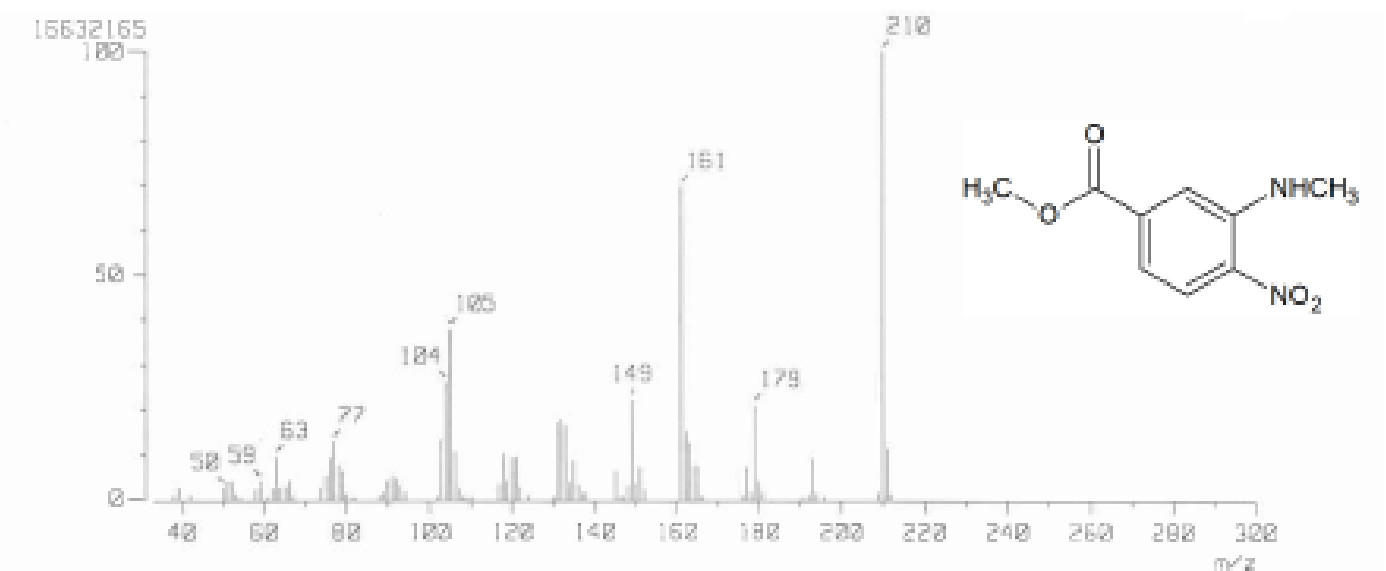
Espectro 9. EM (ID/IE, m/z) de: ácido 3-metilamino-4-nitrobenzoico (4).



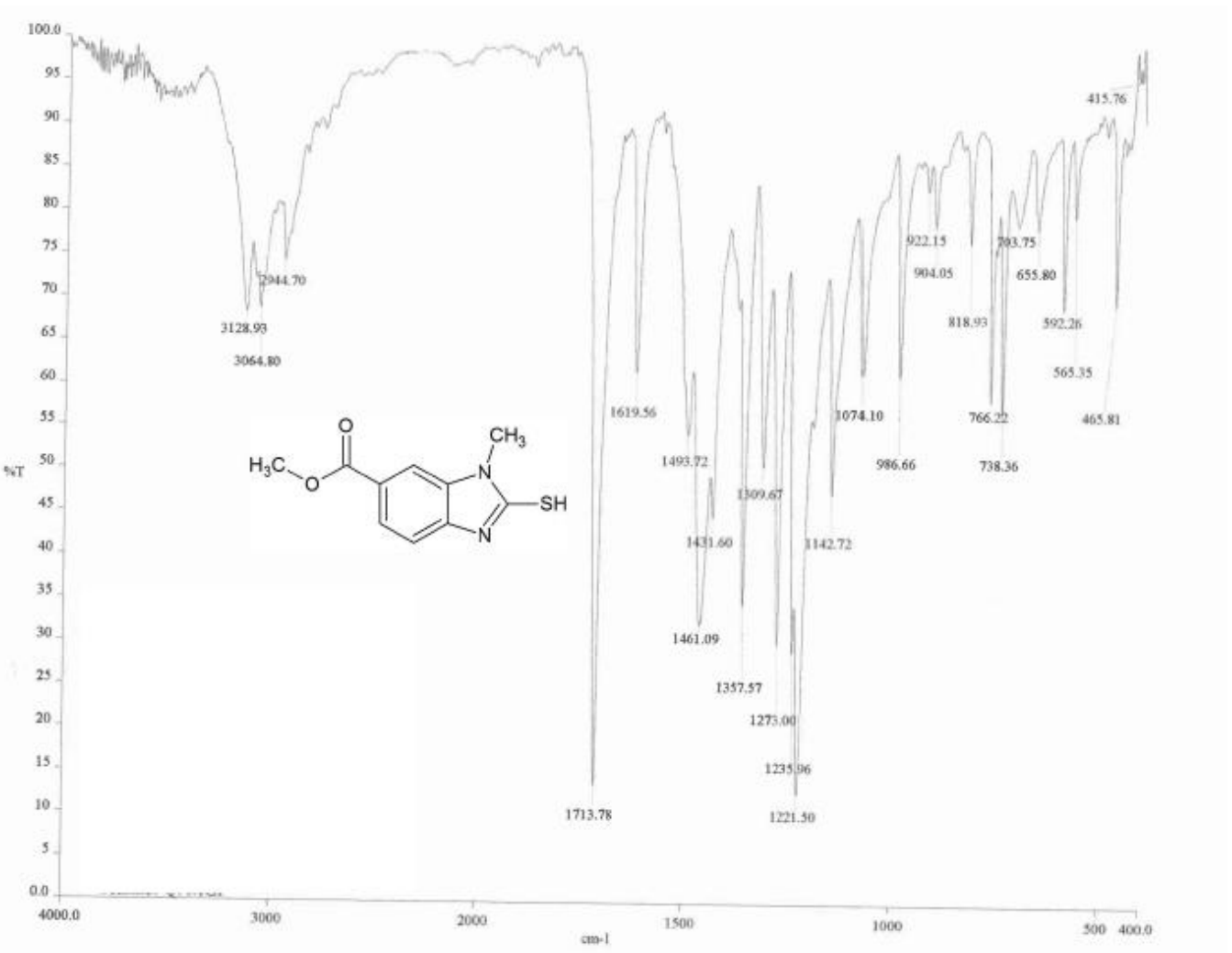
Espectro 10. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (5).



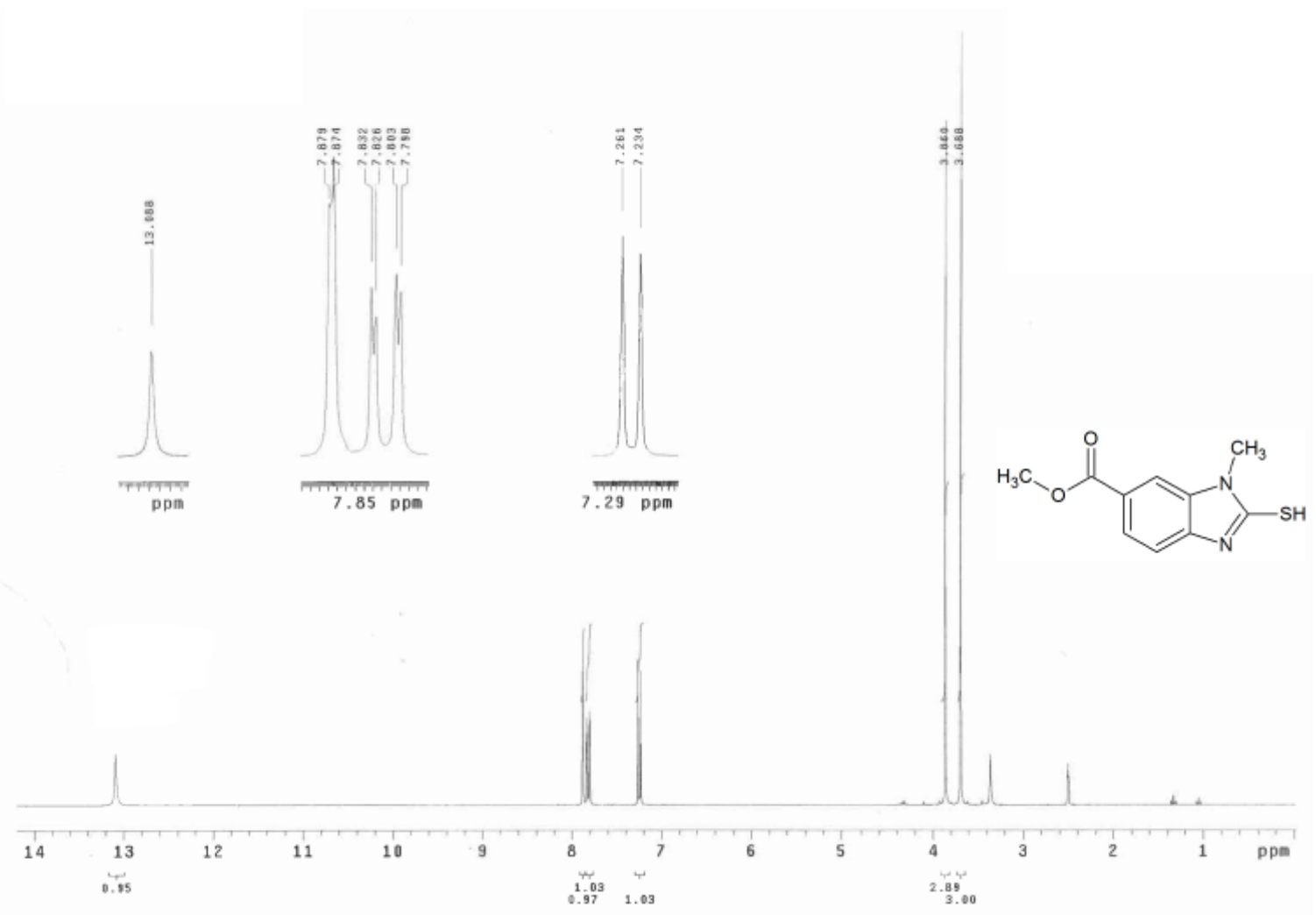
Espectro 11. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 300 MHz, δ en ppm) de: 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (5).



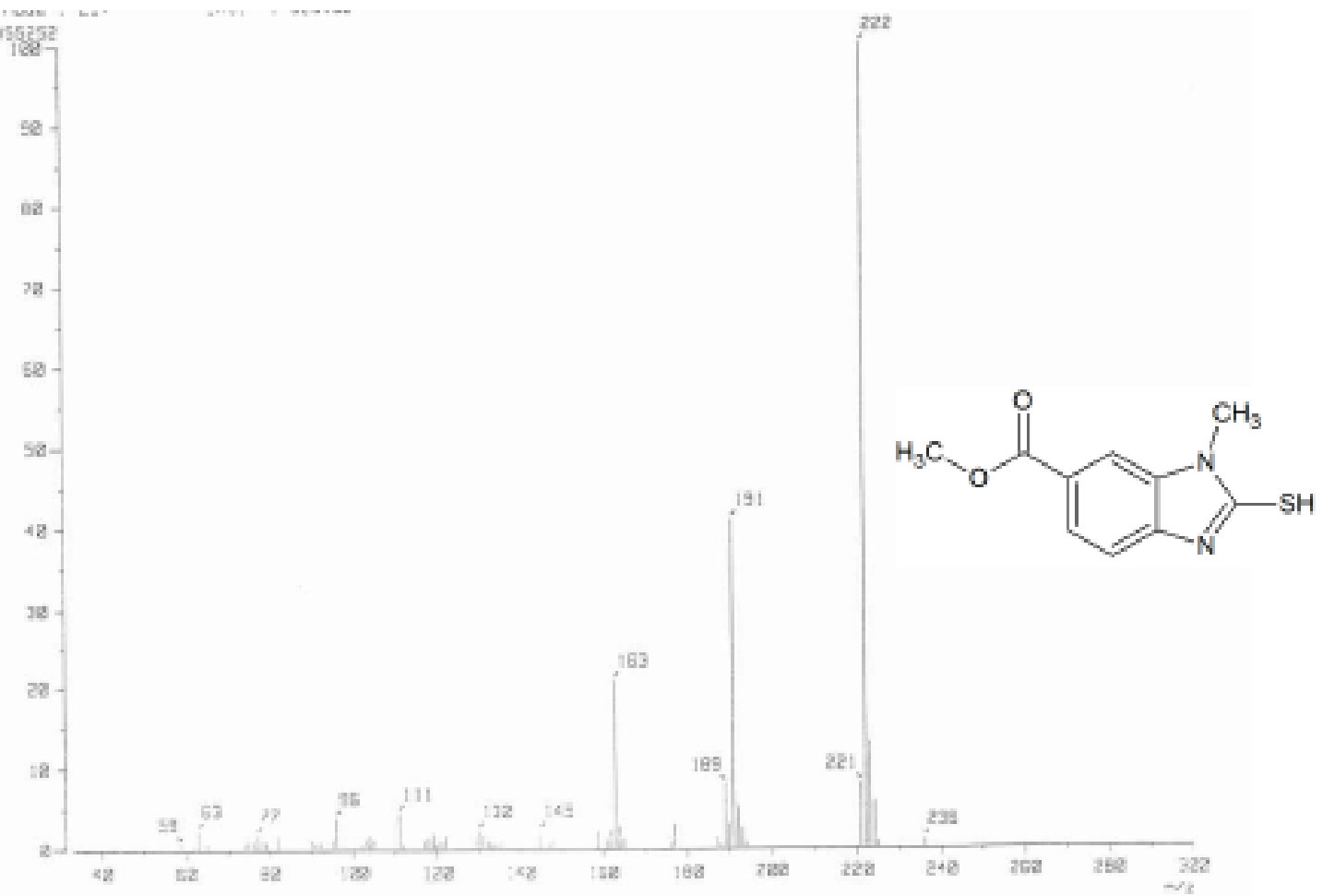
Espectro 12. EM (D/D/E, m/z) de: 3-metilamino-4-nitrobenzoato de metilo (5).



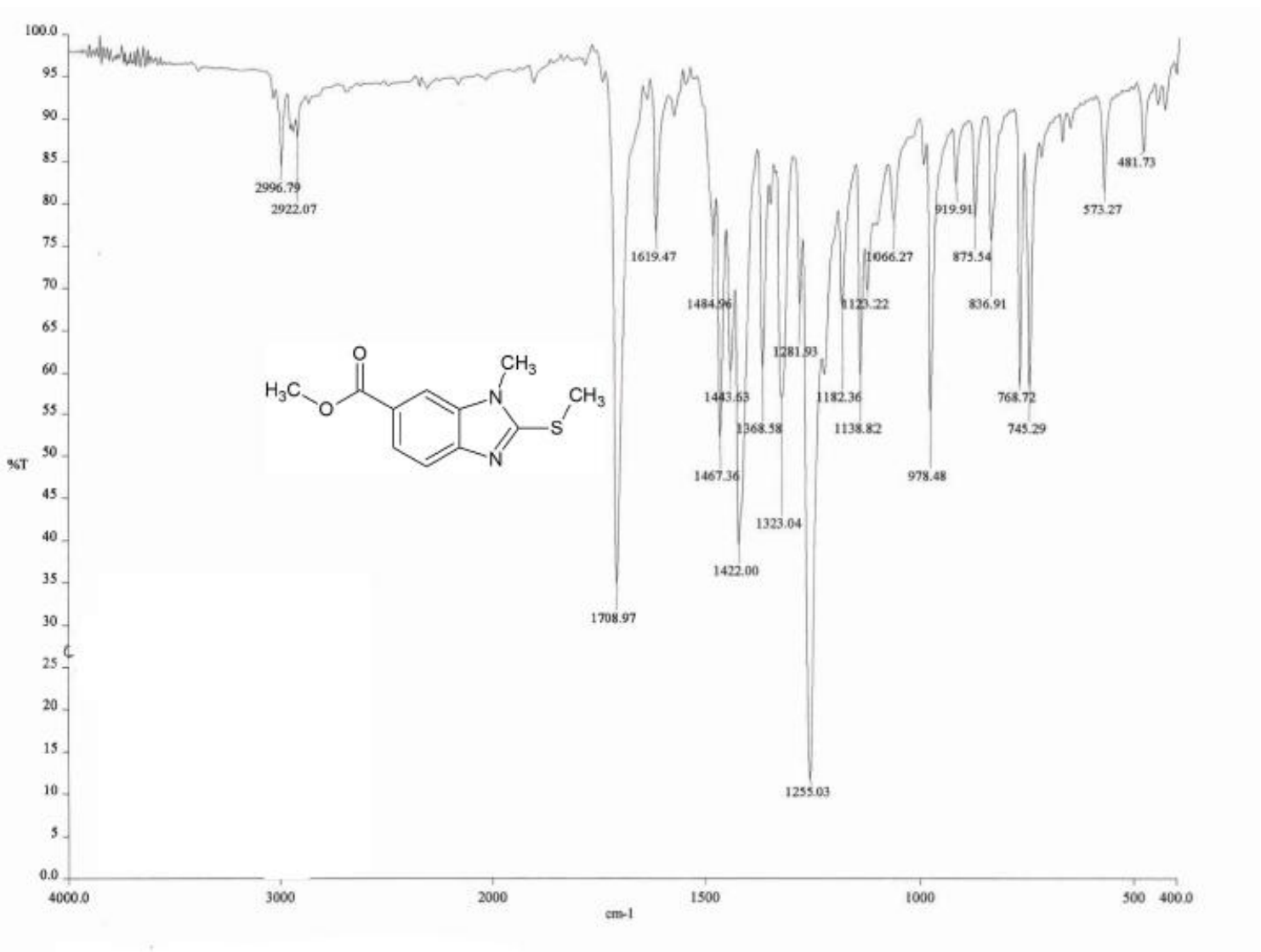
Espectro 13. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 1-metil-2-mercapto-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (7).



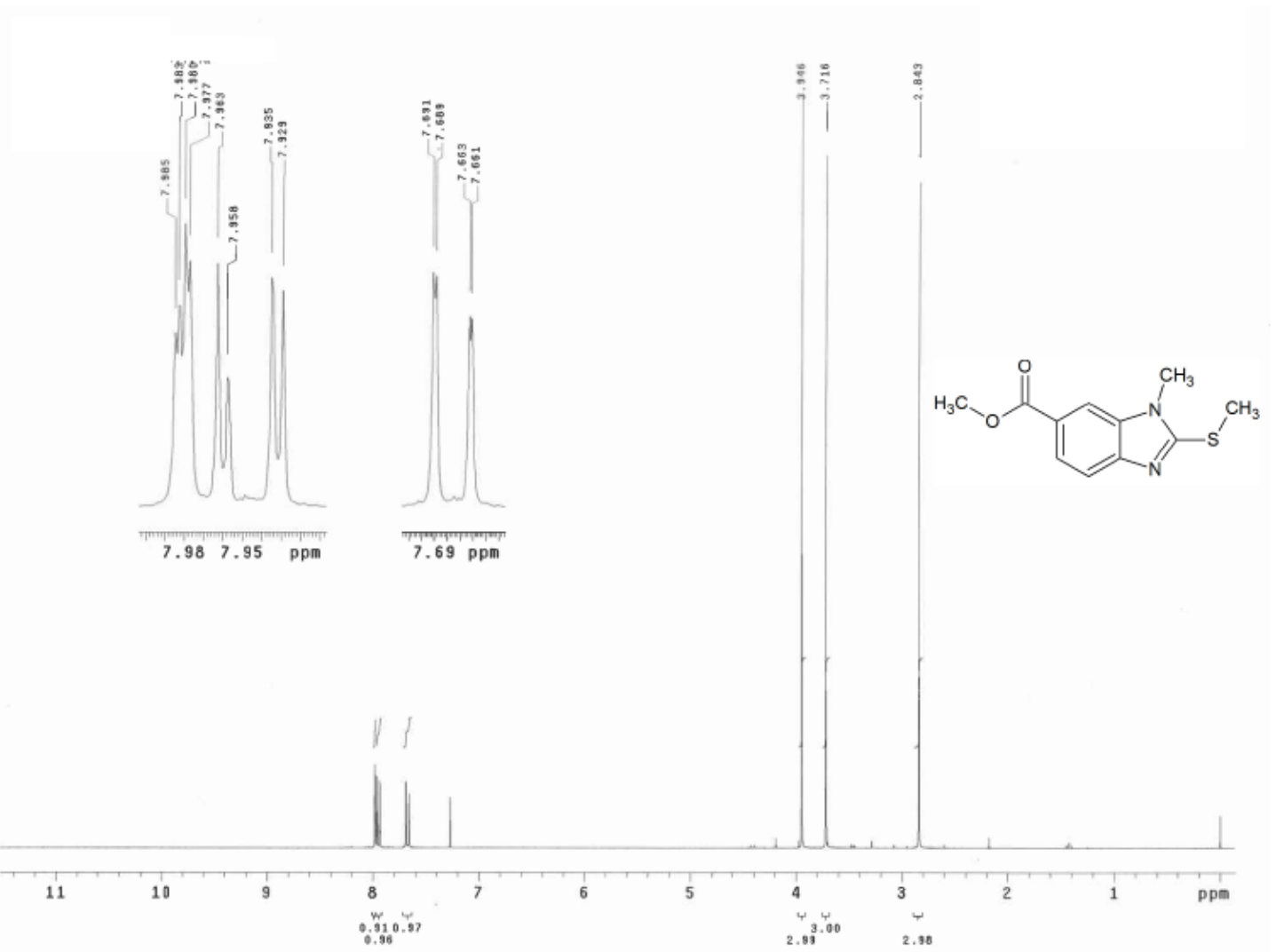
Espectro 14. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆; 300 MHz, δ en ppm) de: 1-metil-2-mercapto-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (7).



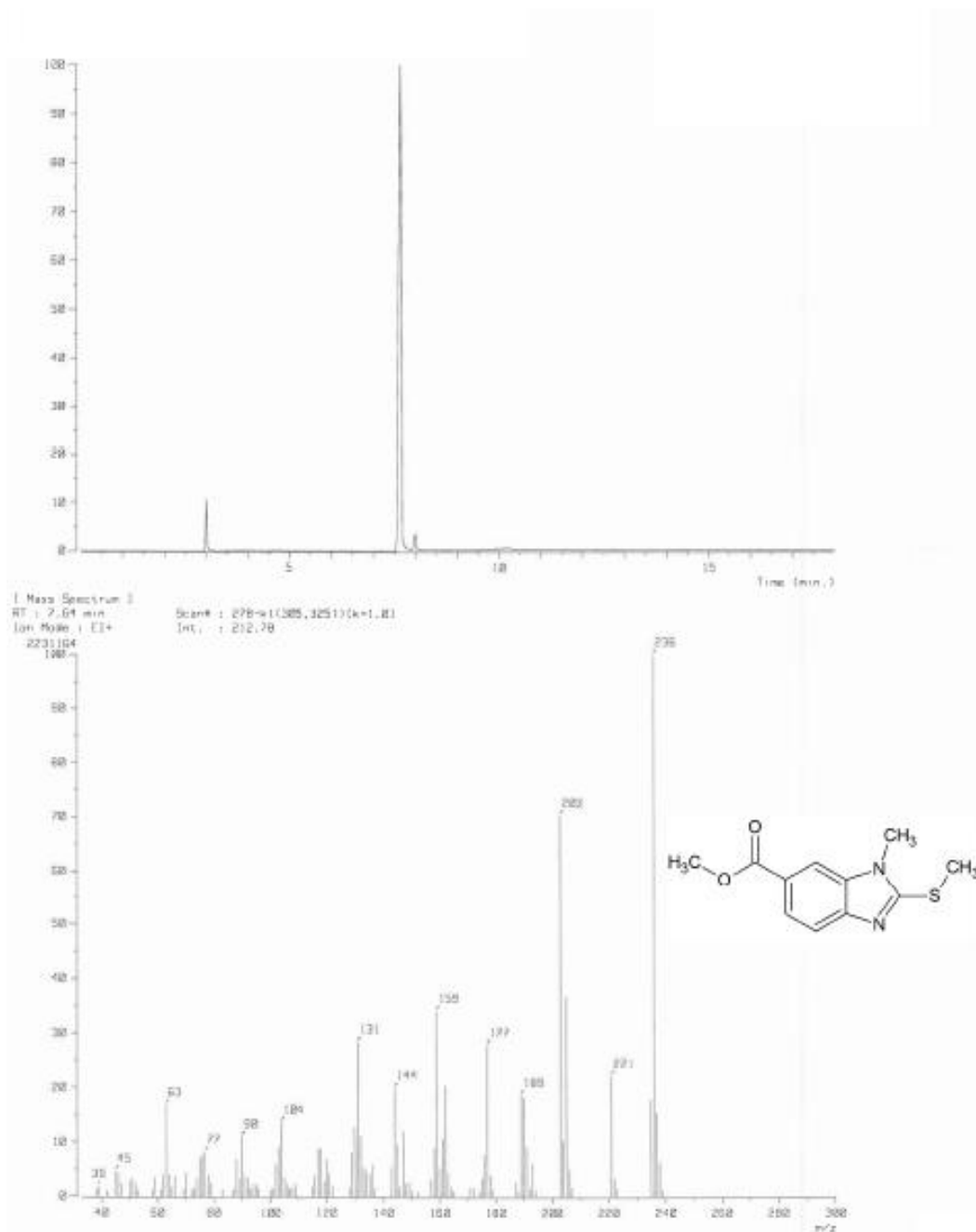
Espectro 15. EM (ID/E, m/z) de: 1-metil-2-mercapto-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (7).



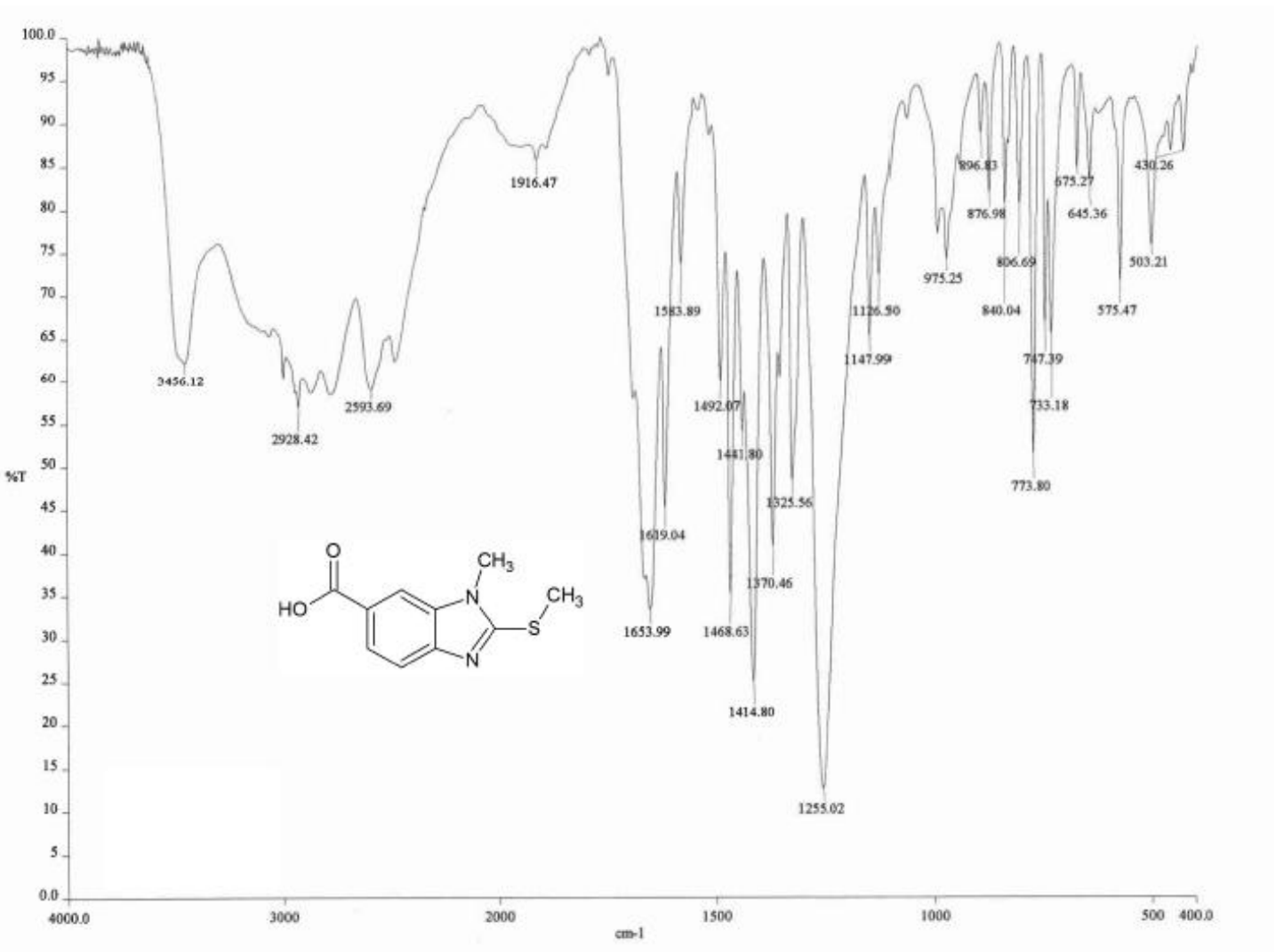
Espectro 16. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 1-metil-2-metilthio-1H-benzimidazol-6-carboxiato de metilo (8).



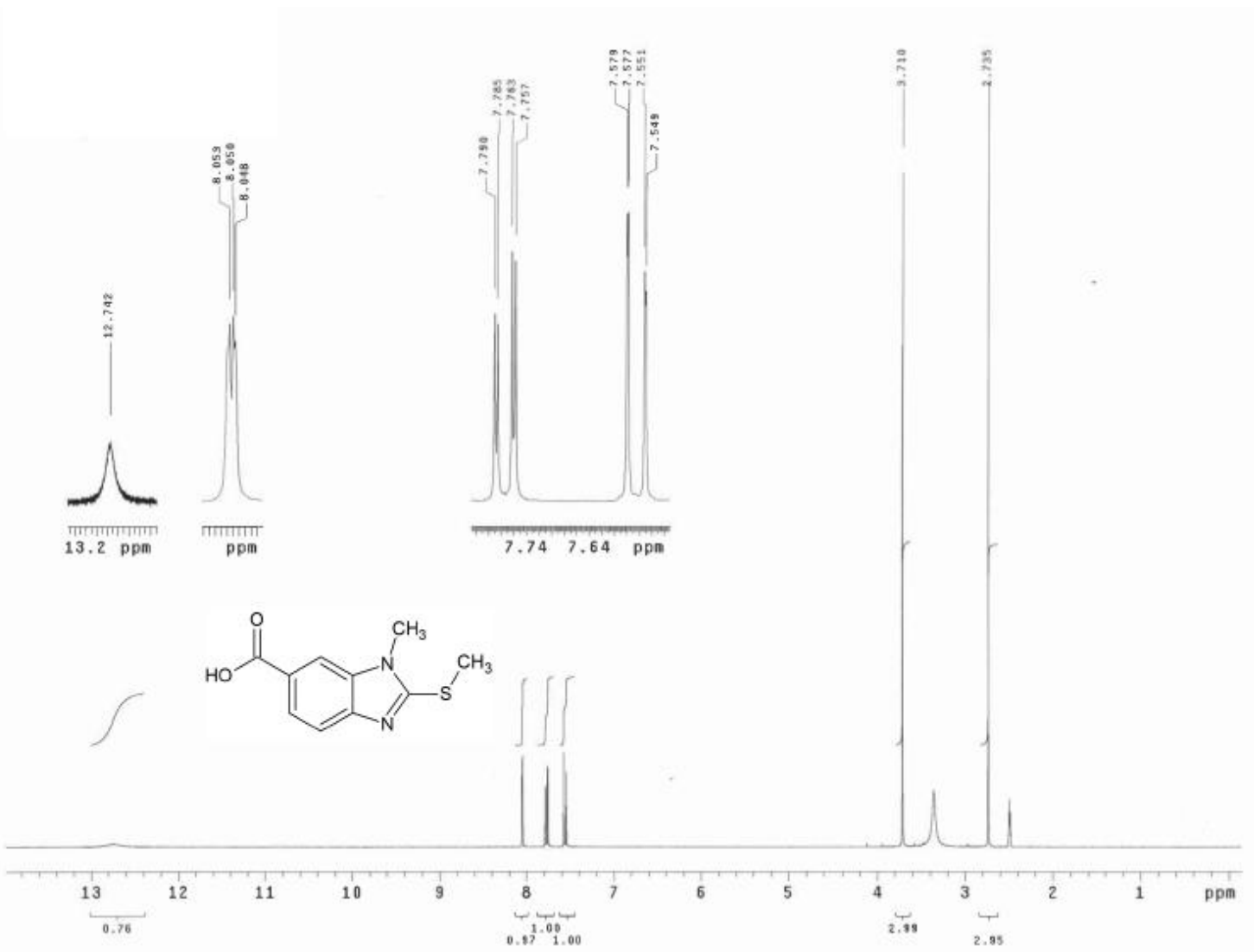
Espectro 17. RMH ¹H (TMS, CDCl₃, 300 MHz, δ en ppm) de: 1-metil-2-metilthio-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**8**).



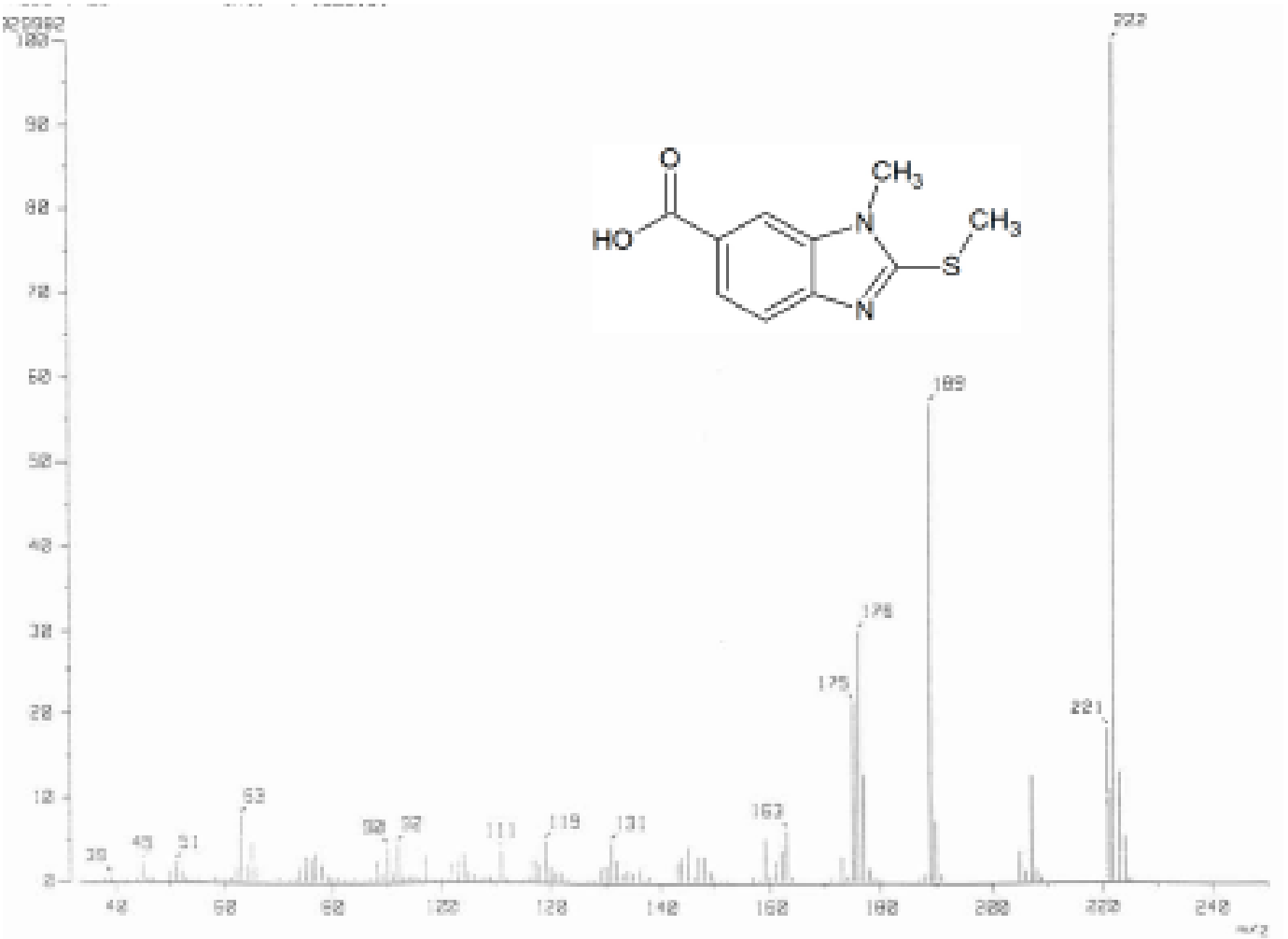
Espectro 18. EM (CG/IE, m/z) de: 1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**8**).



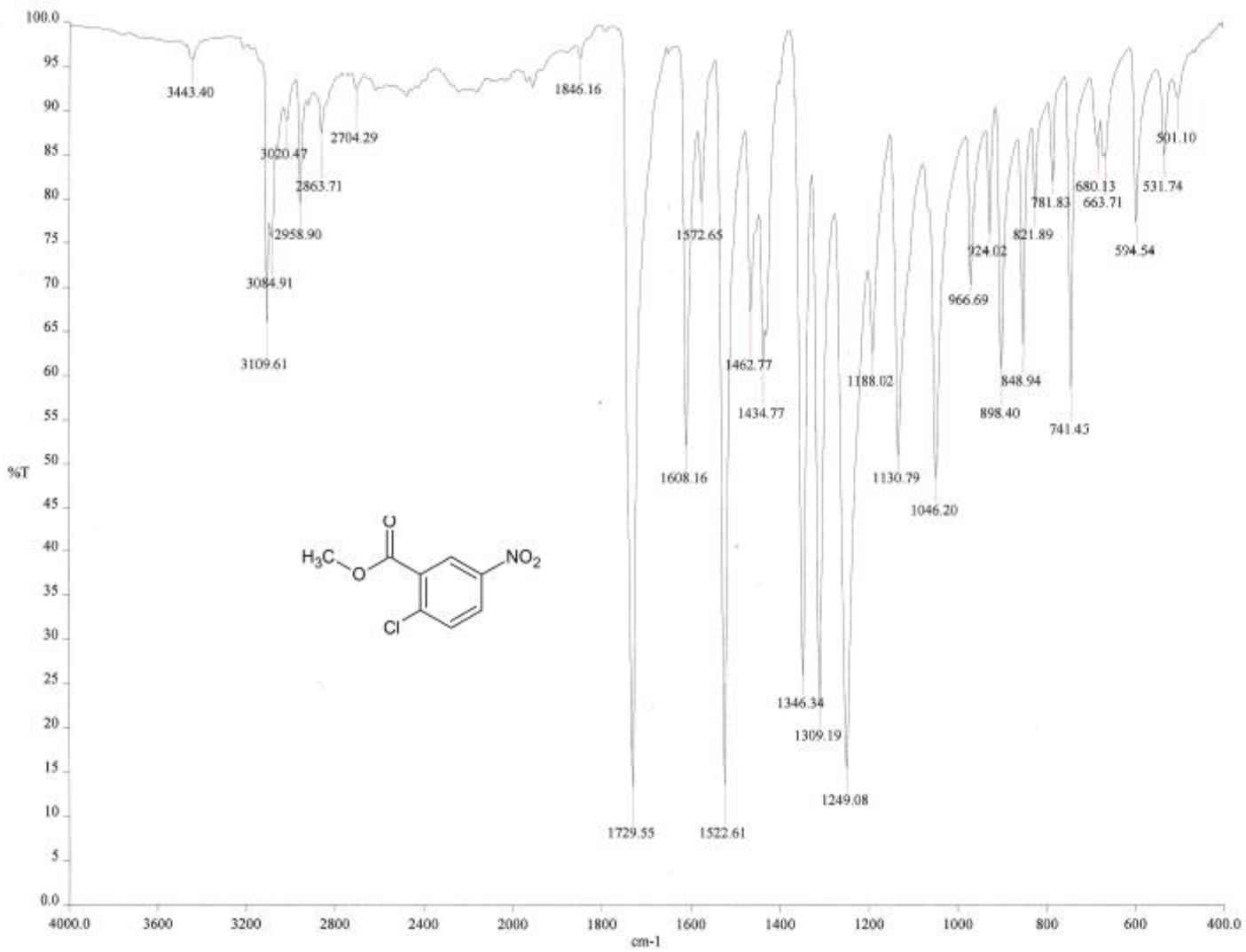
Espectro 19. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: ácido 1-metil-2-metilto-1H-benzimidazol-6-carboxílico (9).



Espectro 20. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) de: ácido 1-metil-2-metilto-1H-benzimidazol-6-carboxílico (9).

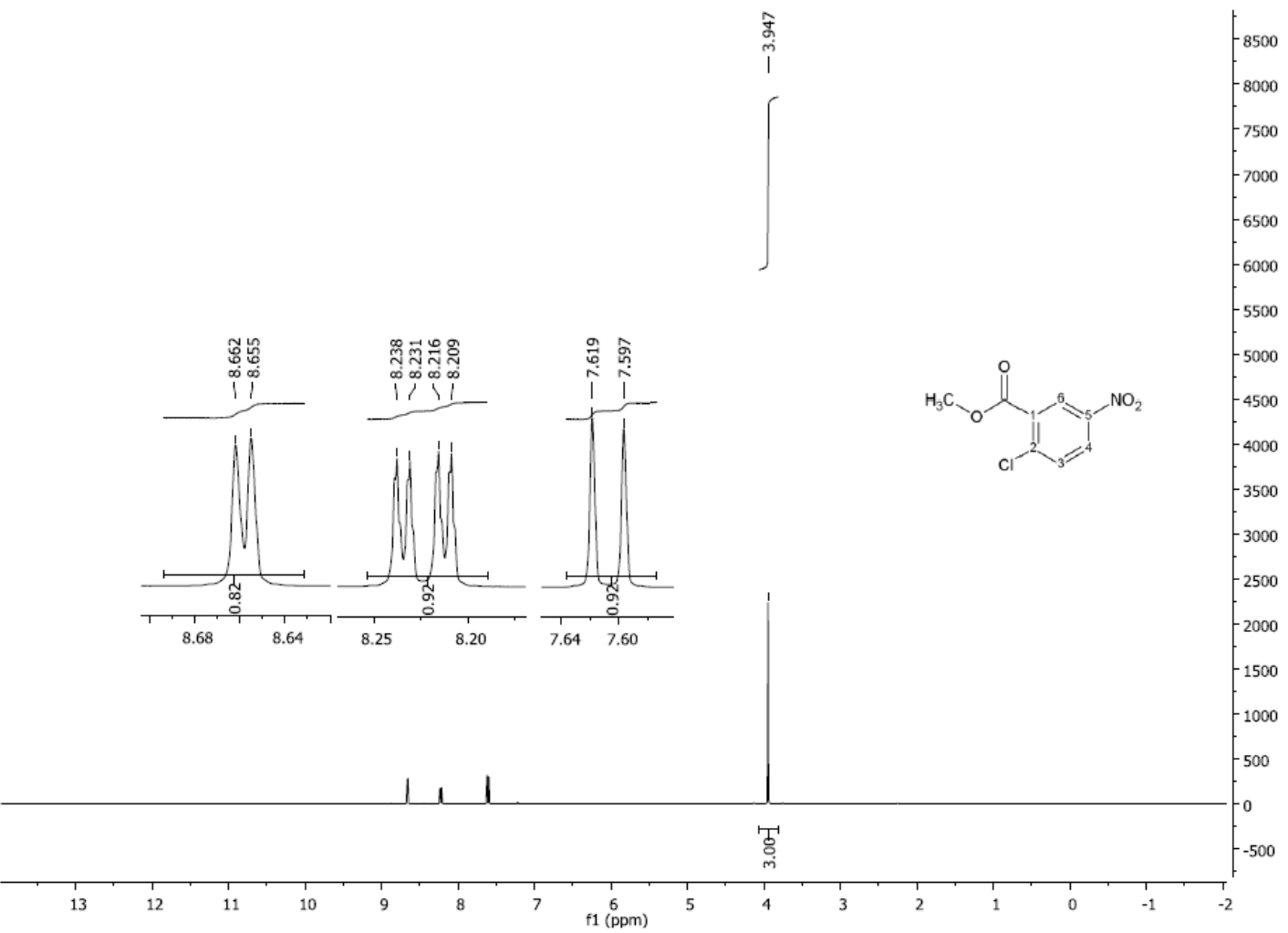


Espectro 21. EM (ID/E, m/z) de: ácido 1-metil-2-metilto-1-*H*-benzimidazol-6-carboxílico (9).

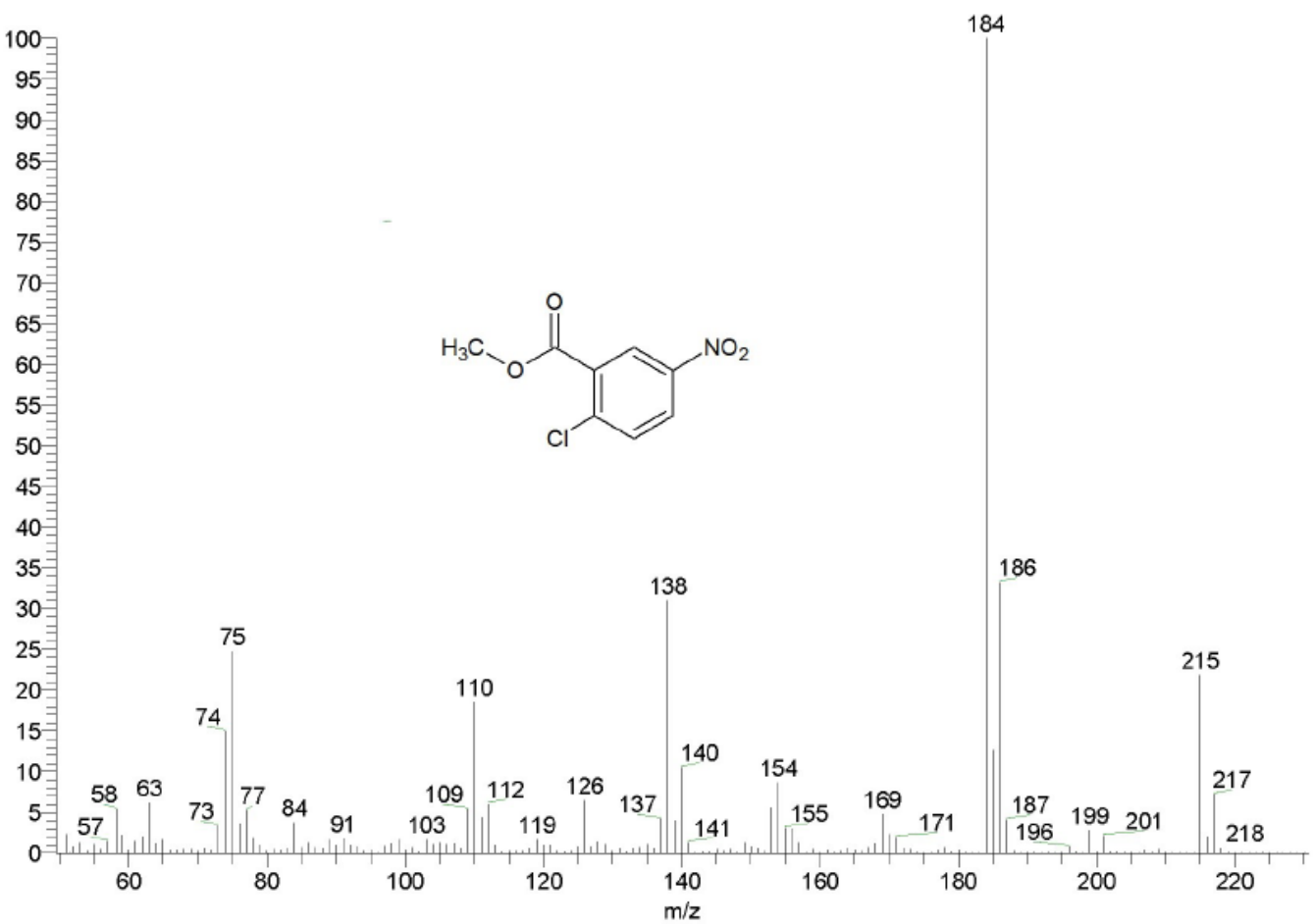


Espectro 22. IR (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11).

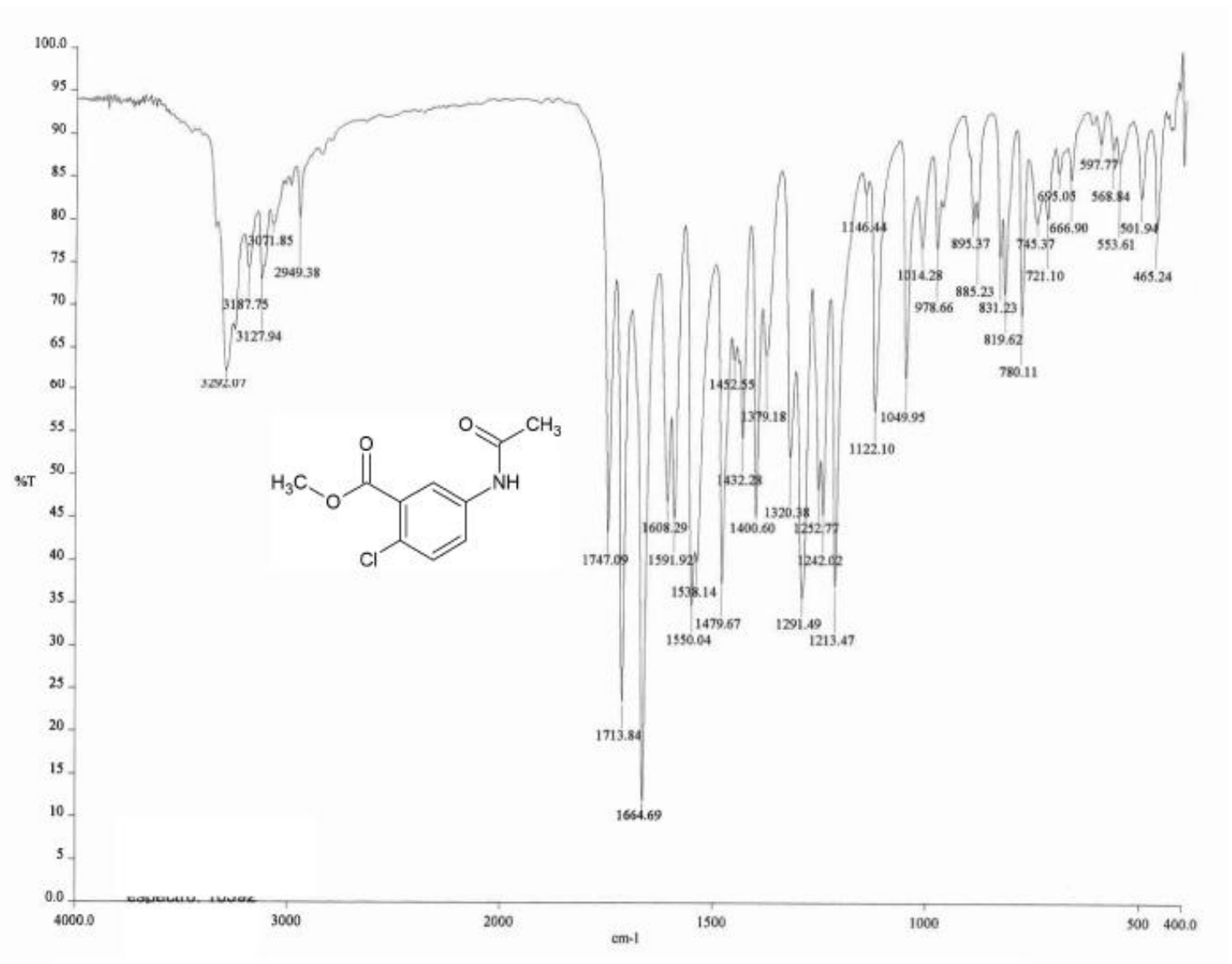
APÉNDICE II. ESPECTROS



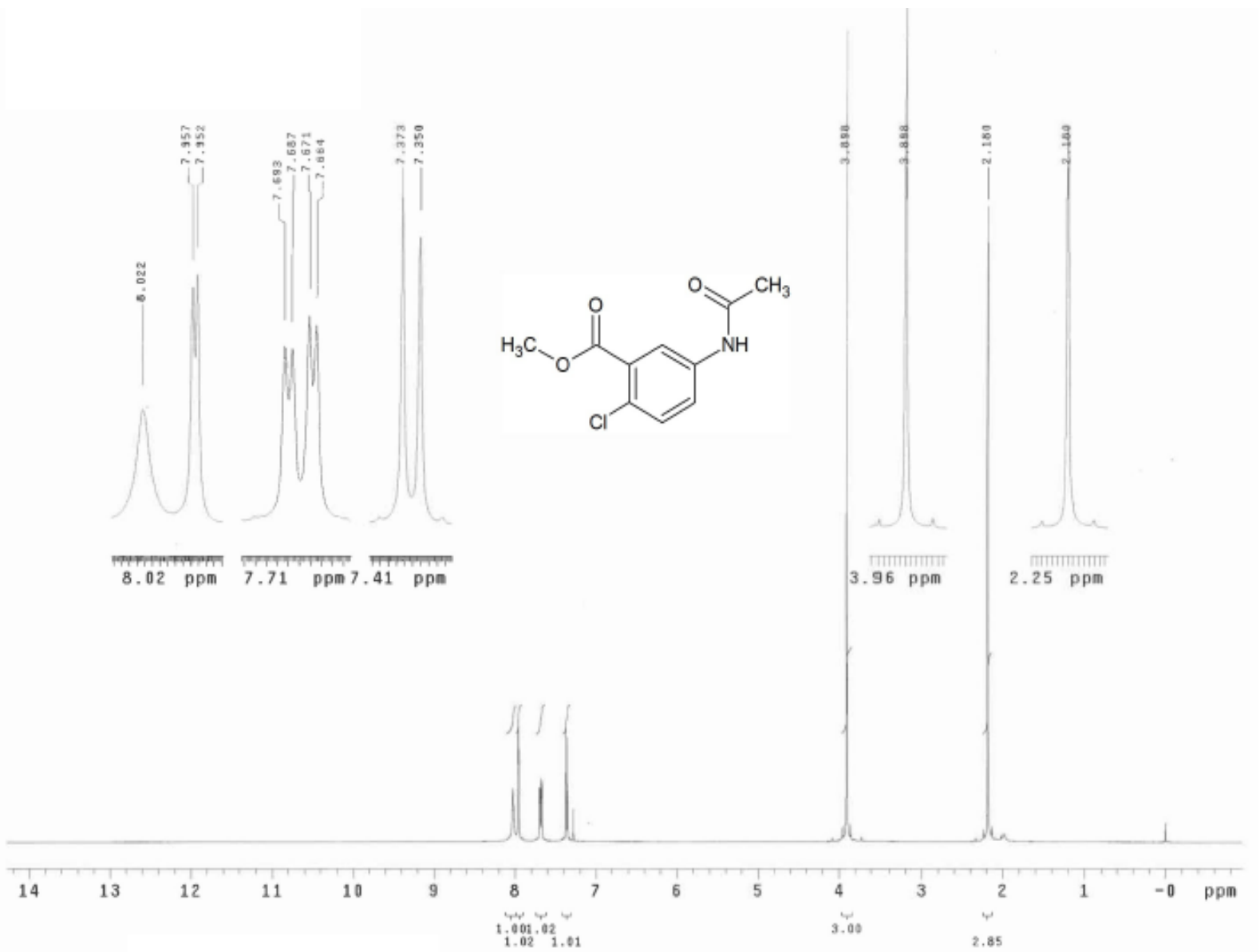
Espectro 23. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 400 MHz, δ en ppm) de: 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11).



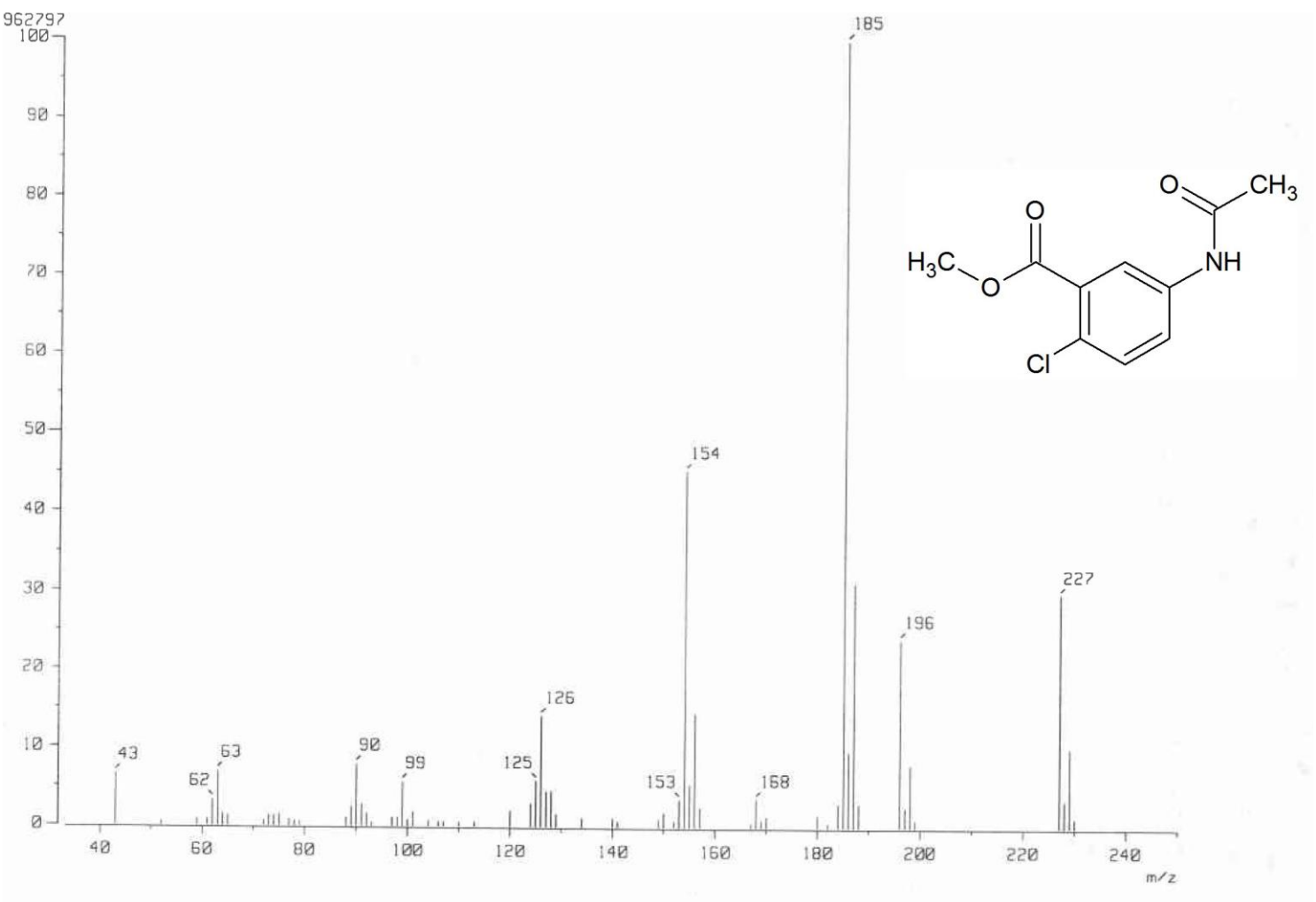
Espectro 24. EM (ID/IE, m/z) de: 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (11).



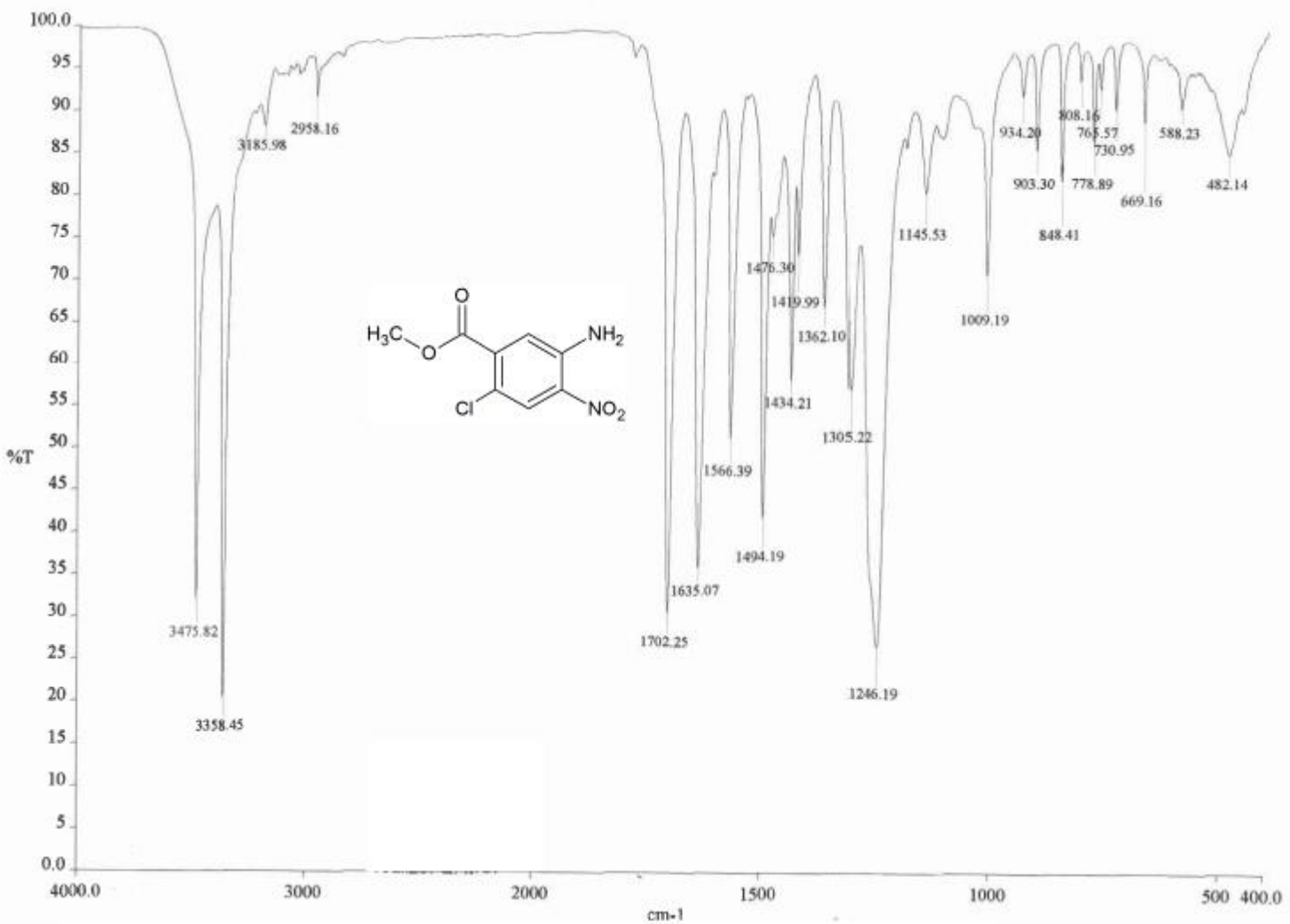
Espectro 25. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (13).



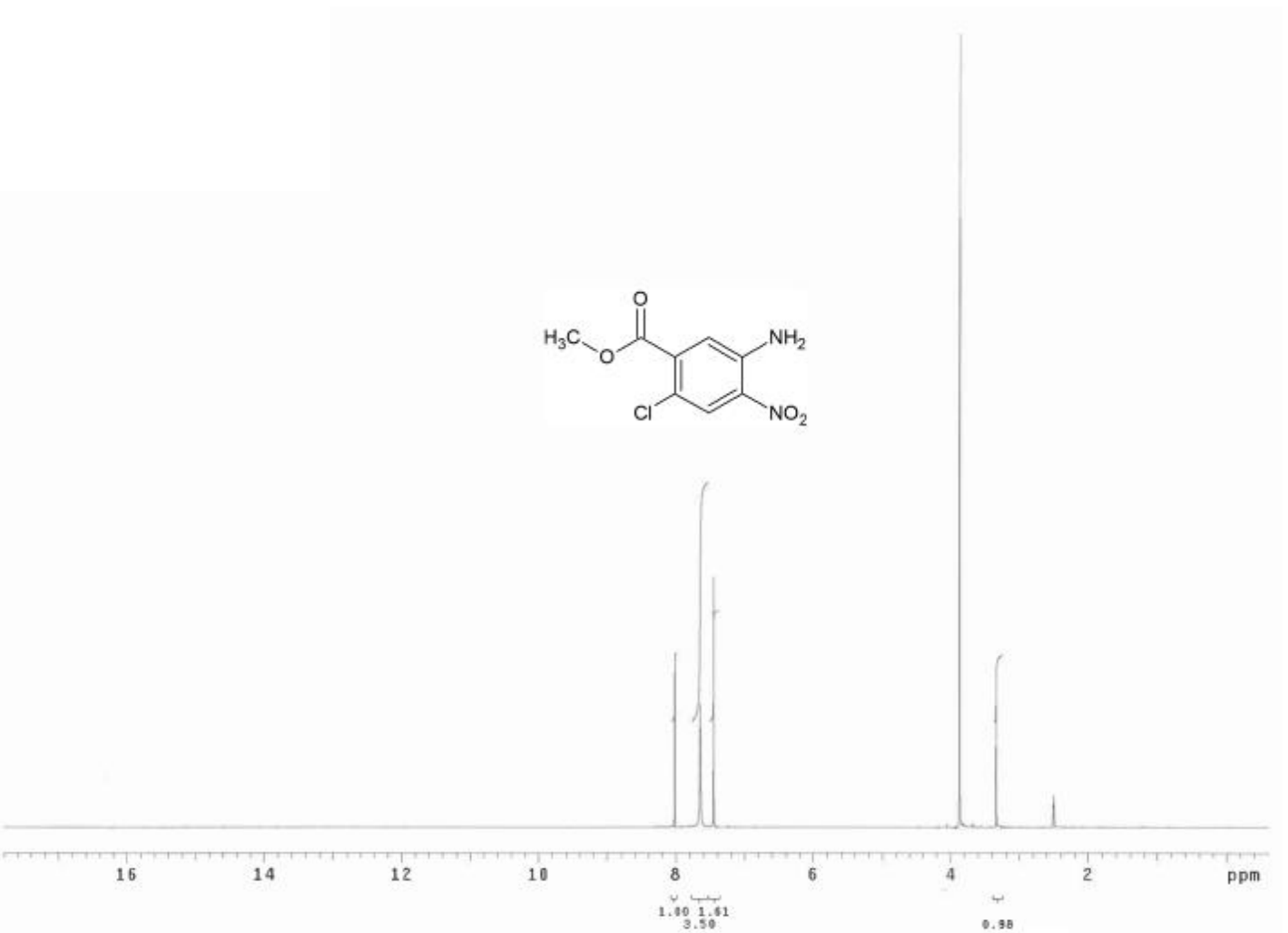
Espectro 26. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 400 MHz, δ en ppm) de: 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (13).



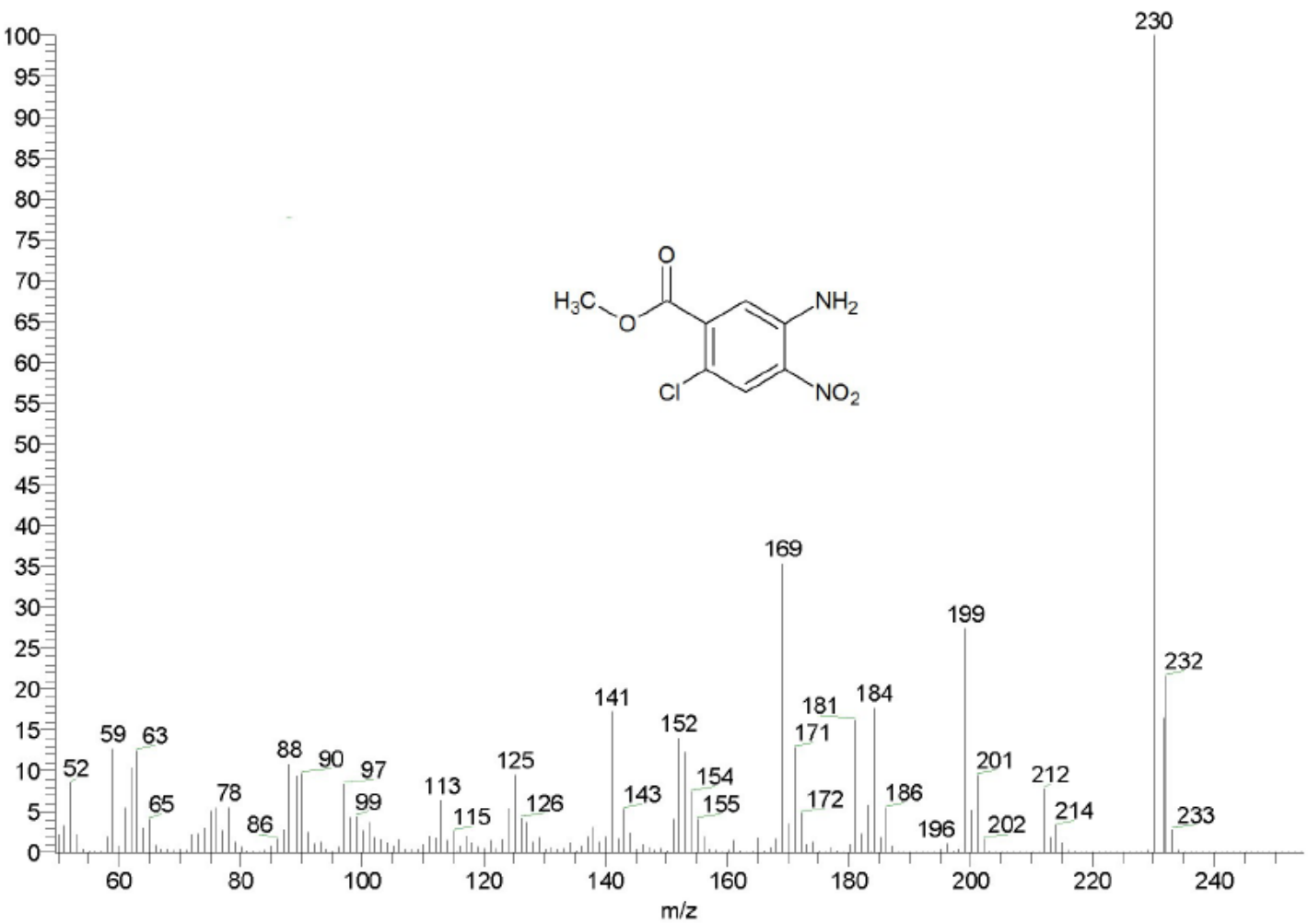
Espectro 27. EM (D/E, m/z) de: 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (13).



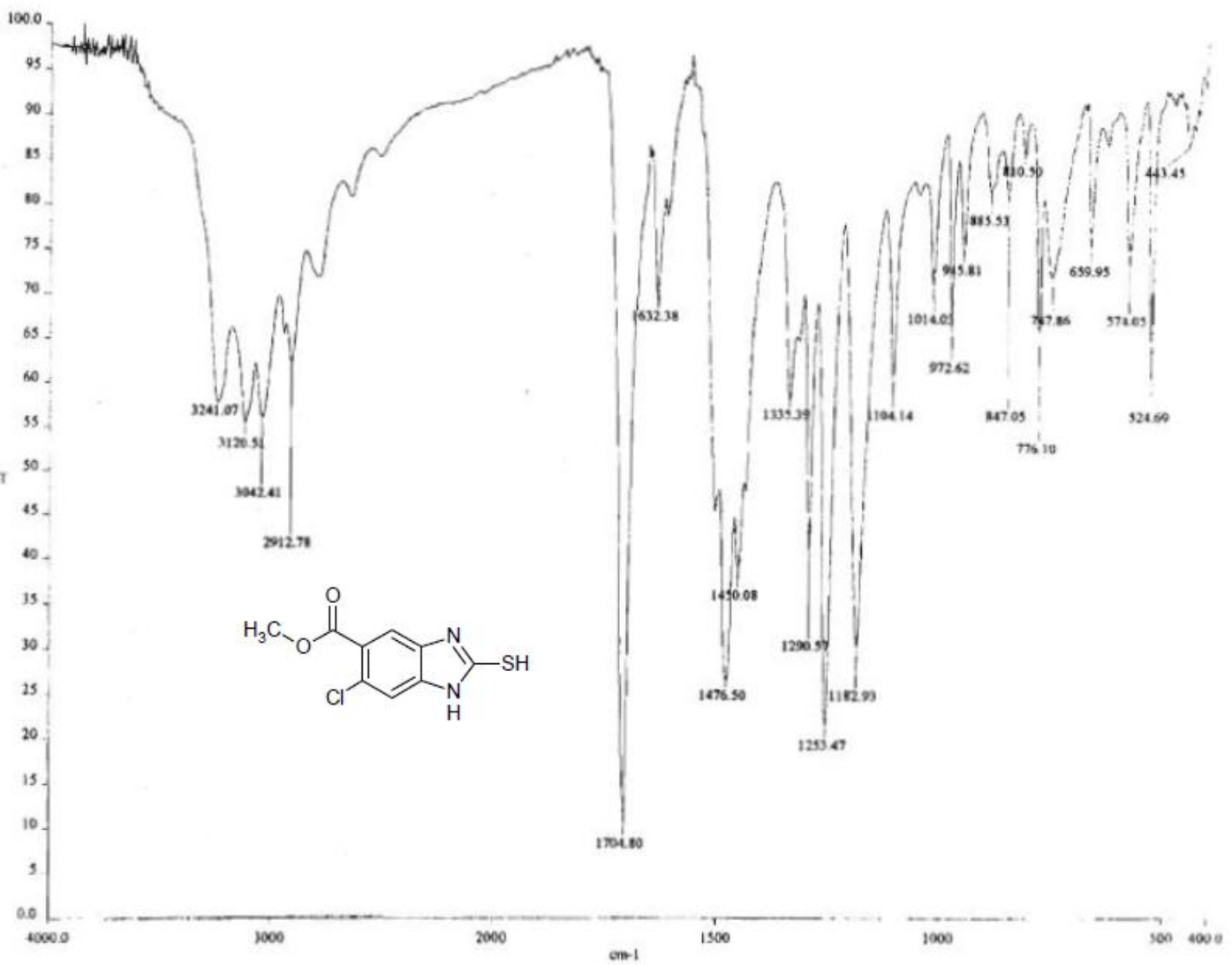
Espectro 28. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (14).



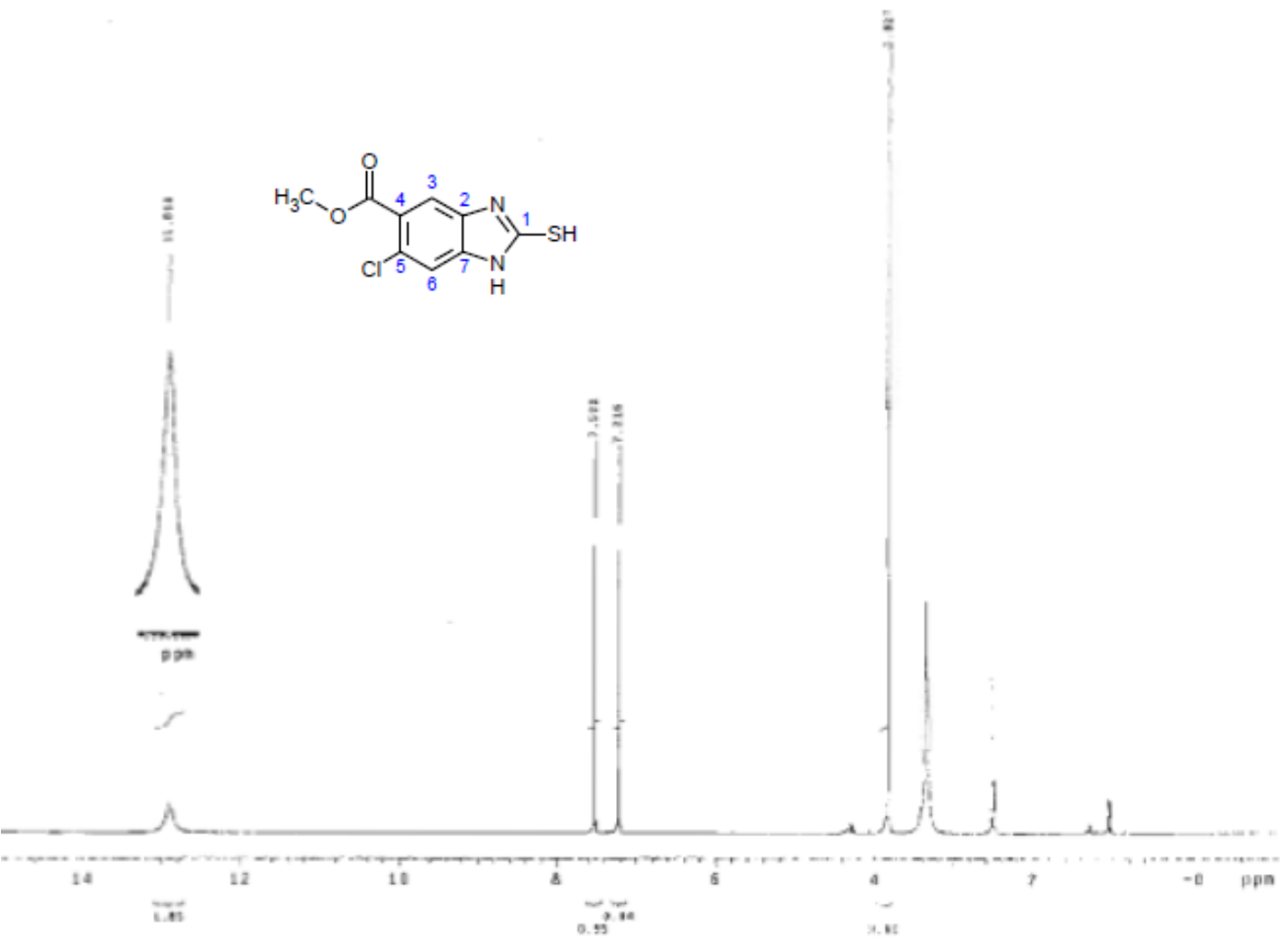
Espectro 29. RMN (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) de: 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**14**).



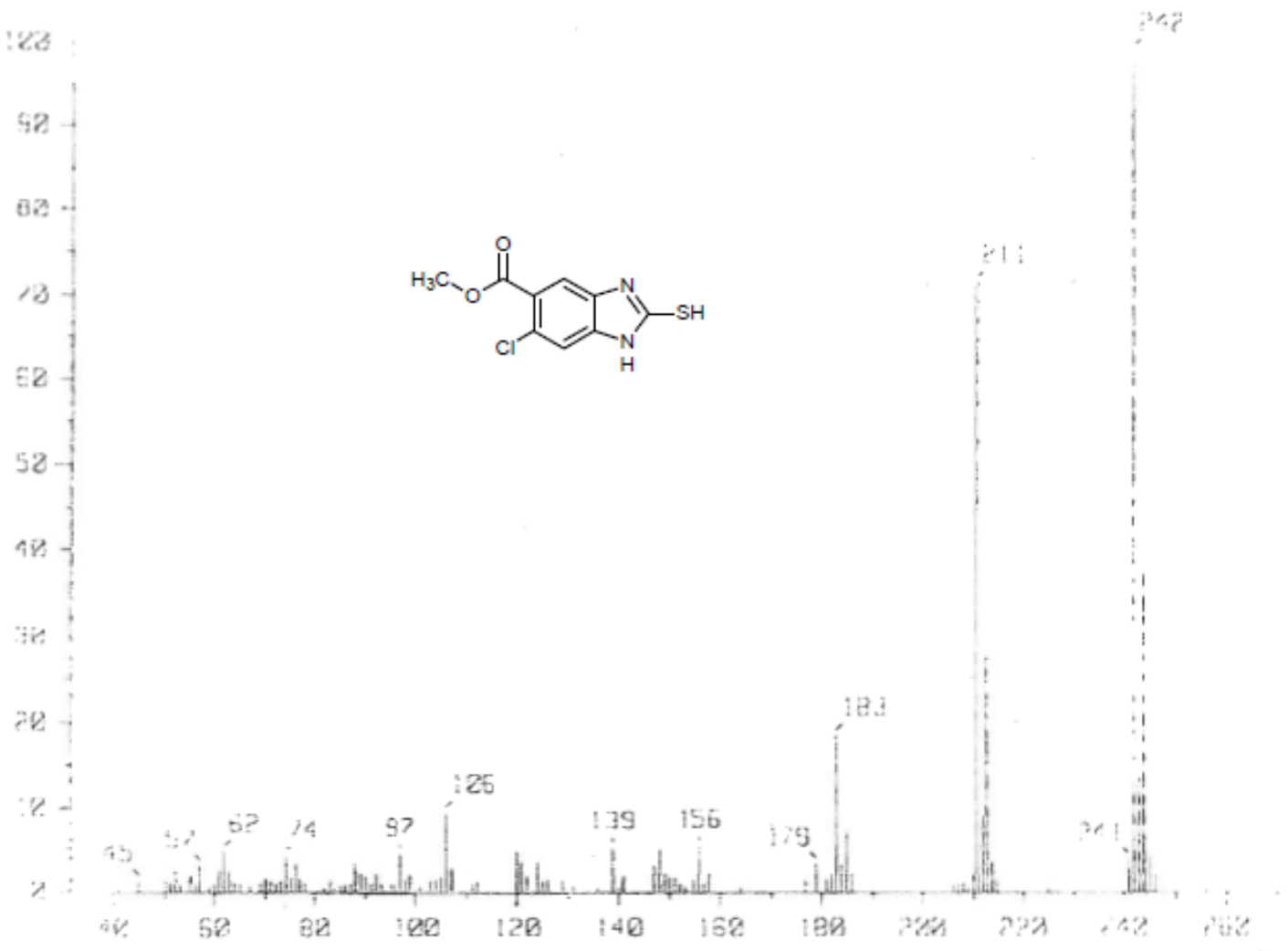
Espectro 30. EM (ID/E, m/z) de: 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (14).



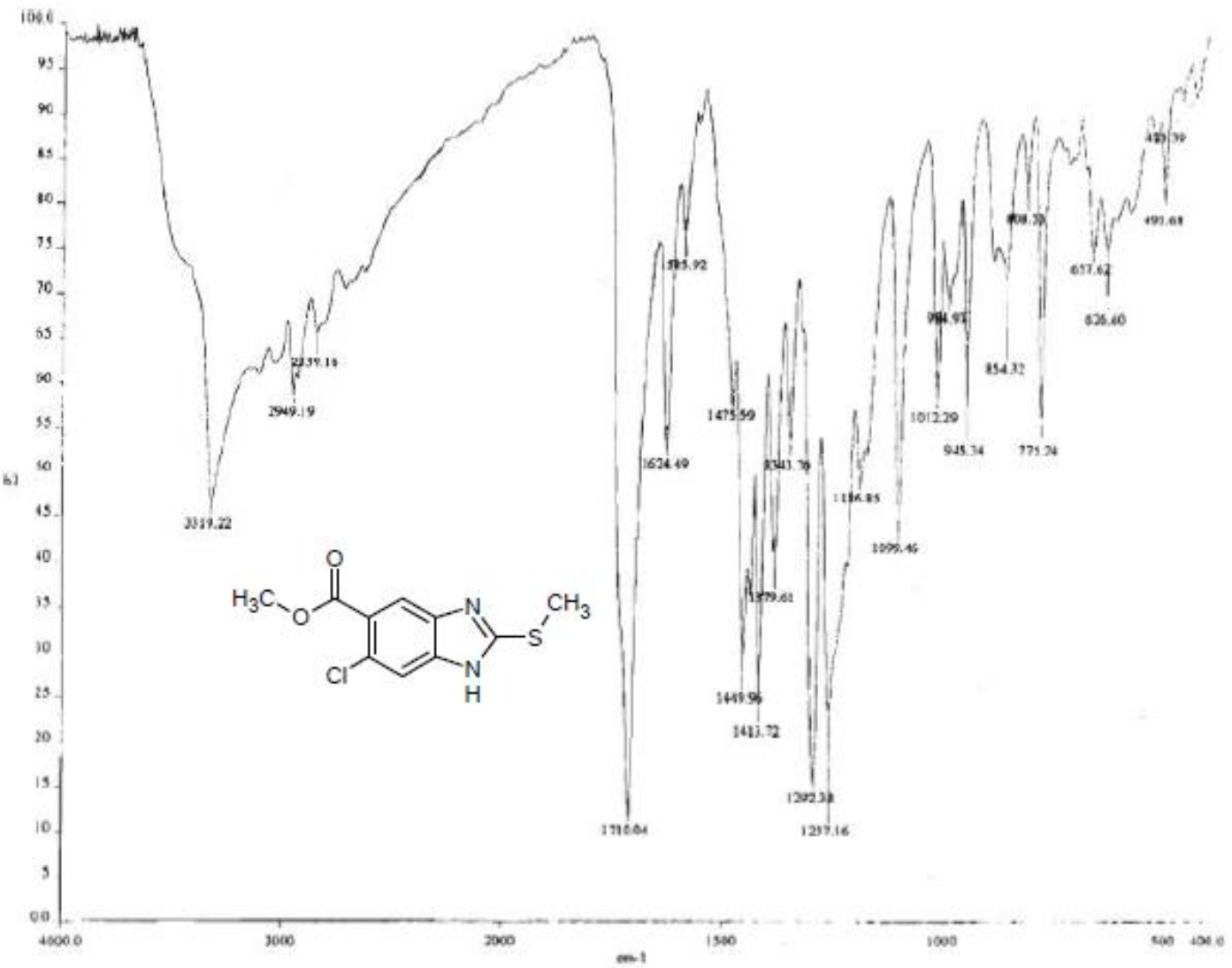
Espectro 31. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 6-cloro-2-mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (16).



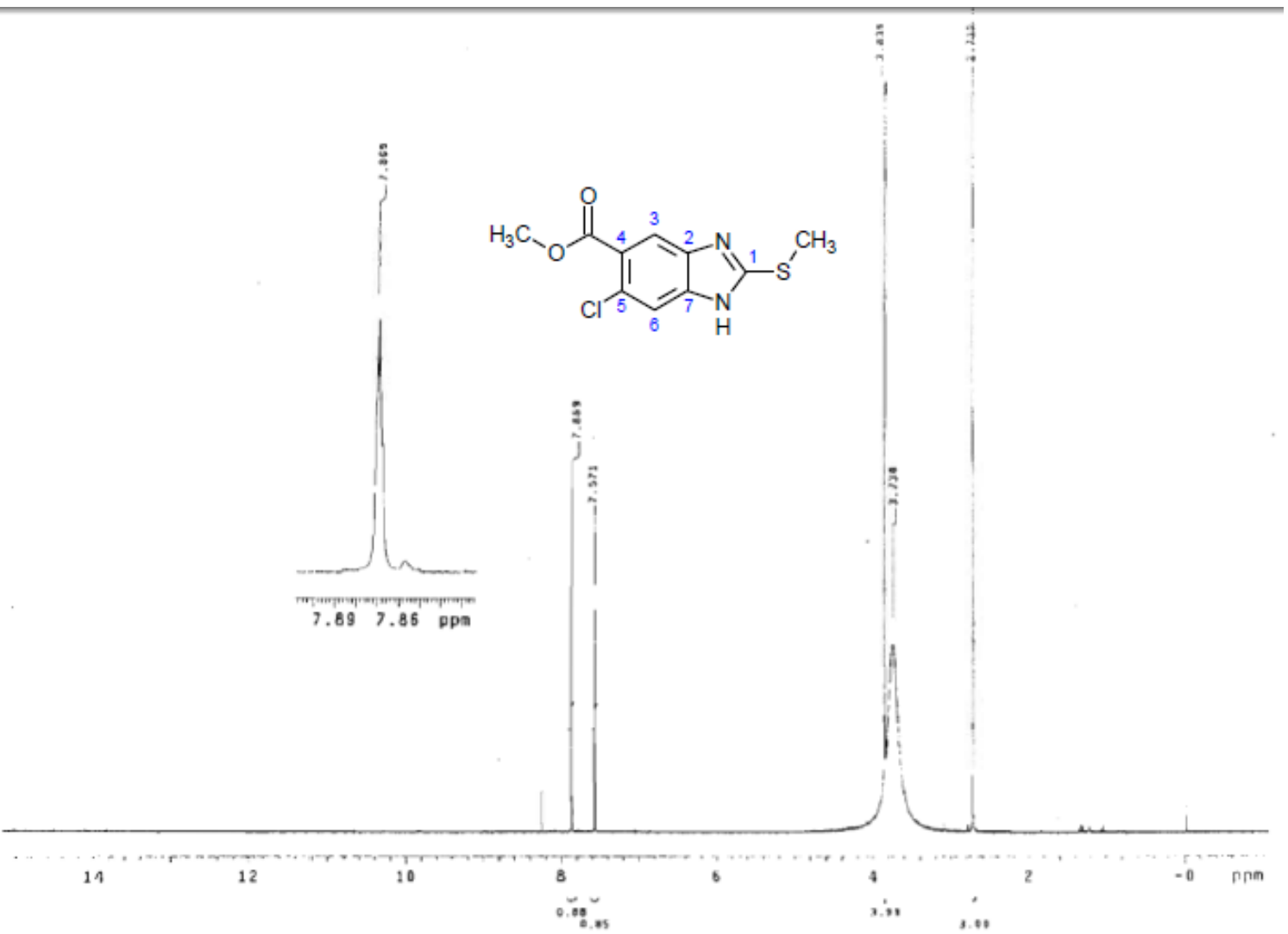
Espectro 32. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm): 6-cloro-2-mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (16).



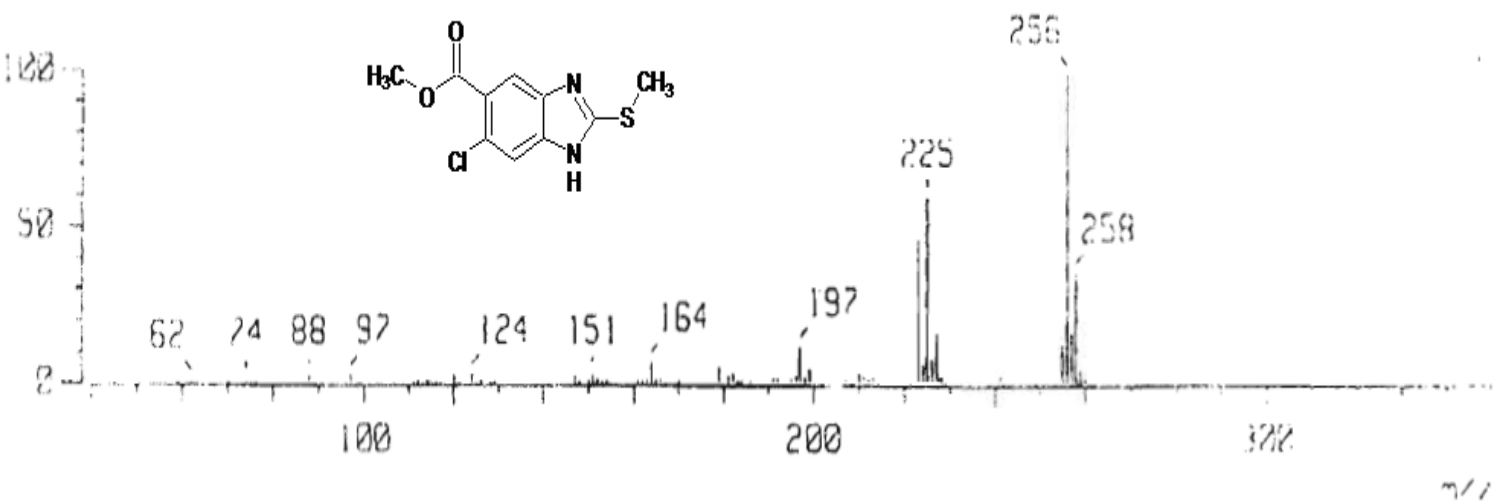
Espectro 33. EM (ID/IE, m/z) de: 6-cloro-2-mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (16).



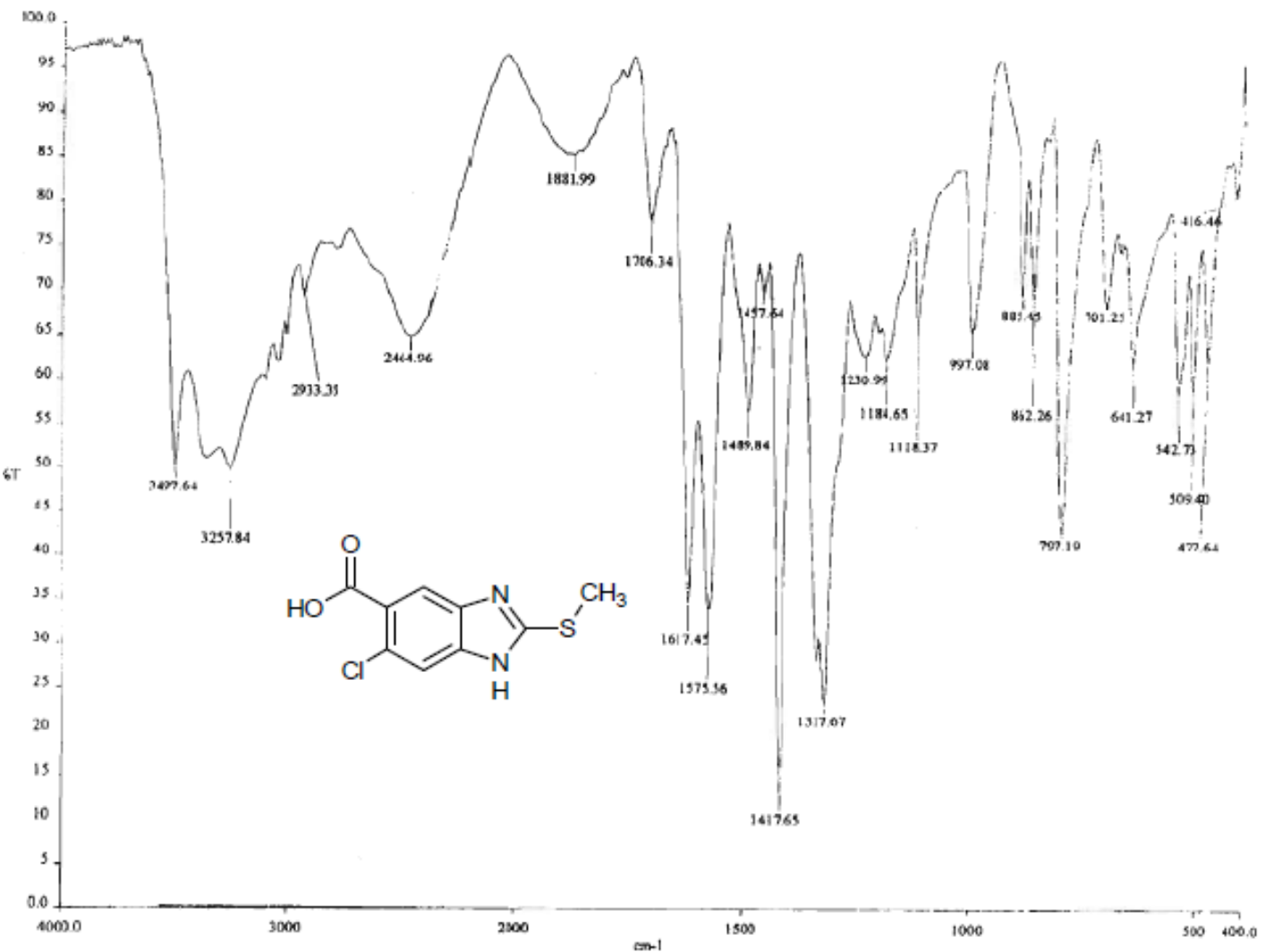
Espectro 34. IR (pastilla KBr, cm^{-1}) de: 6-cloro-2-metilthio-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (17).



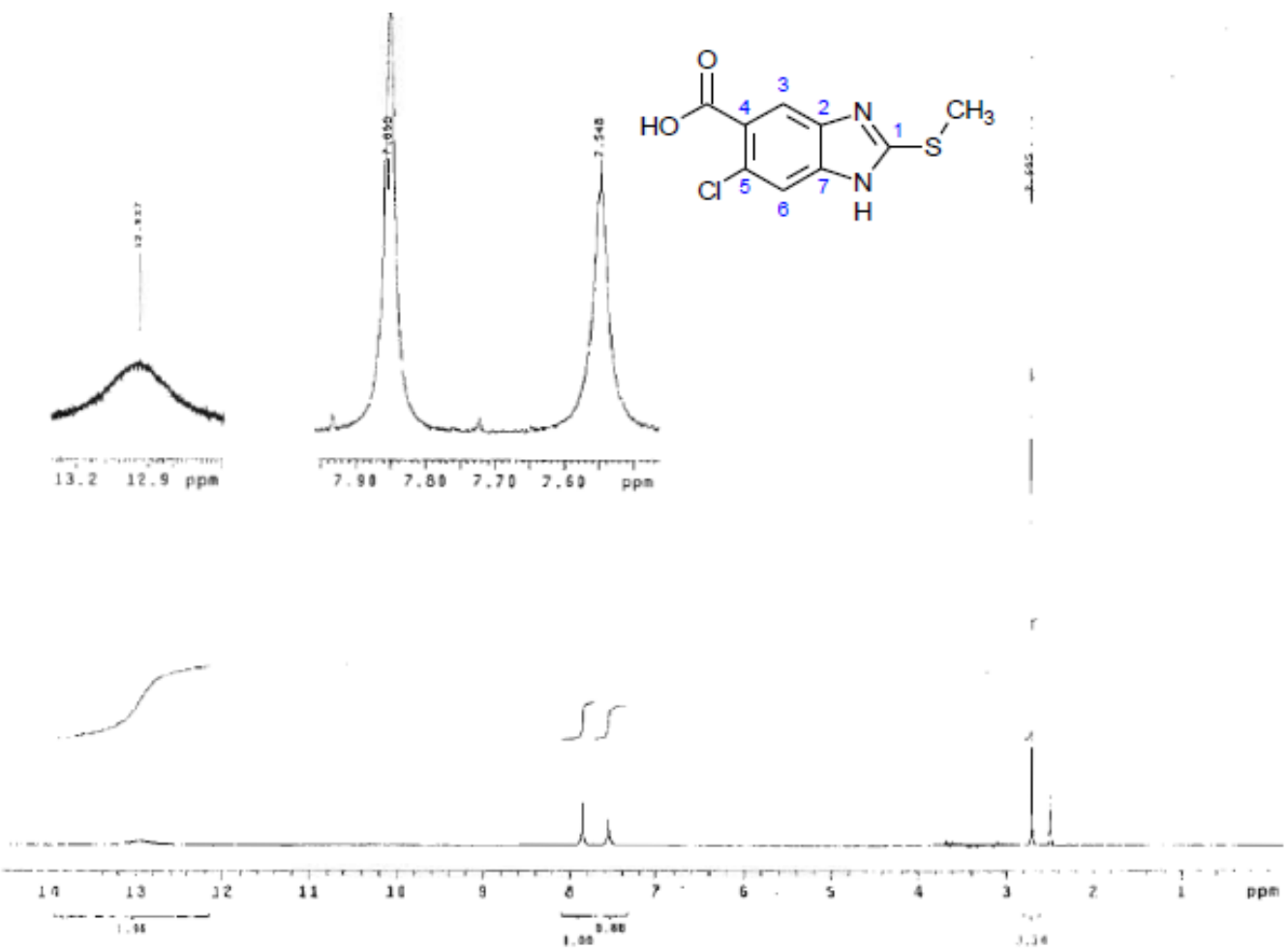
Espectro 35. RMN ¹H (TMS, CDCl₃, 300 MHz, δ en ppm): 6-cloro-2-metilo-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (17).



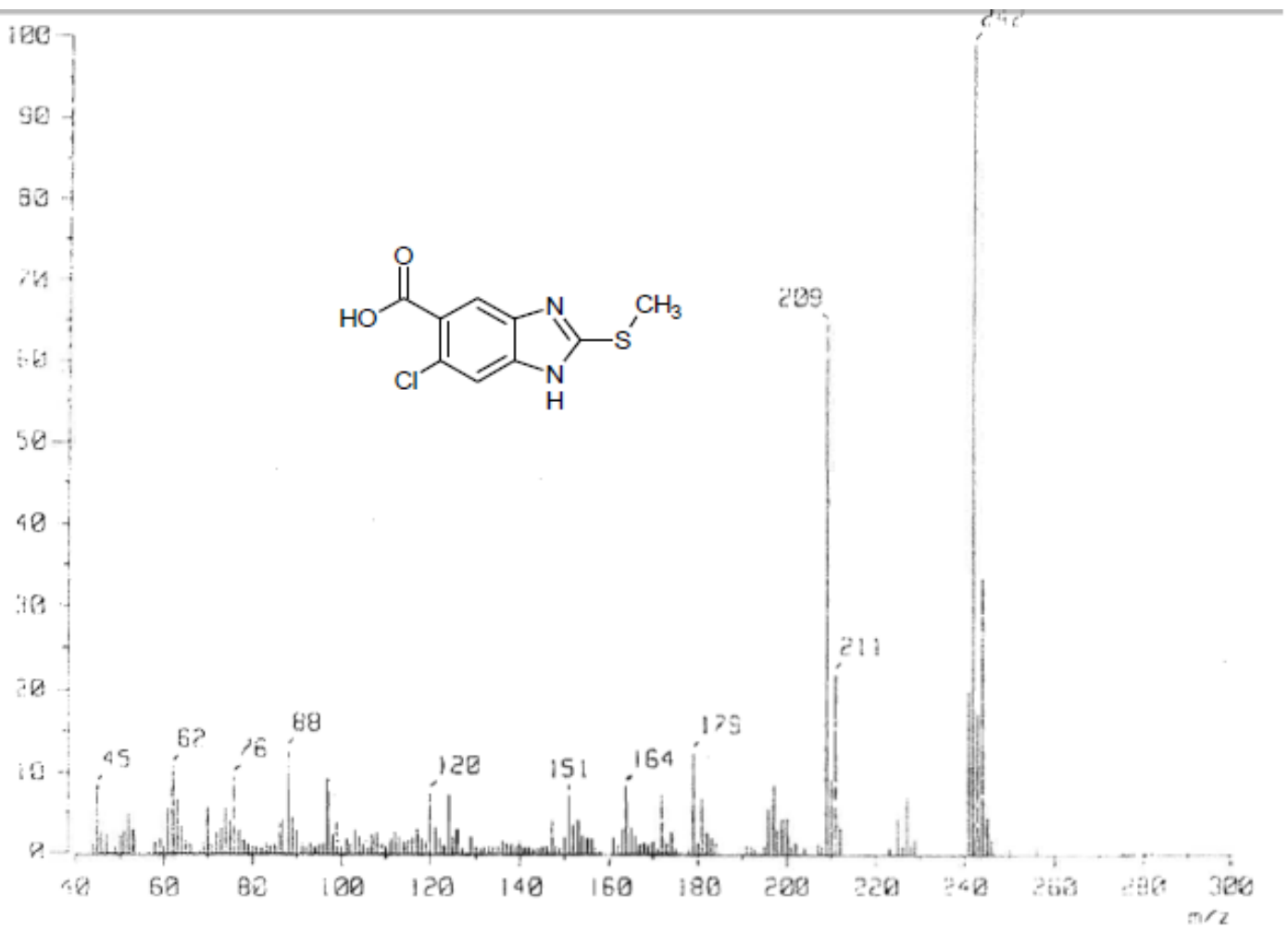
Espectro 36. EM (ID/IE, m/z) de: 6-cloro-2-metilo-1-*H*-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (17).



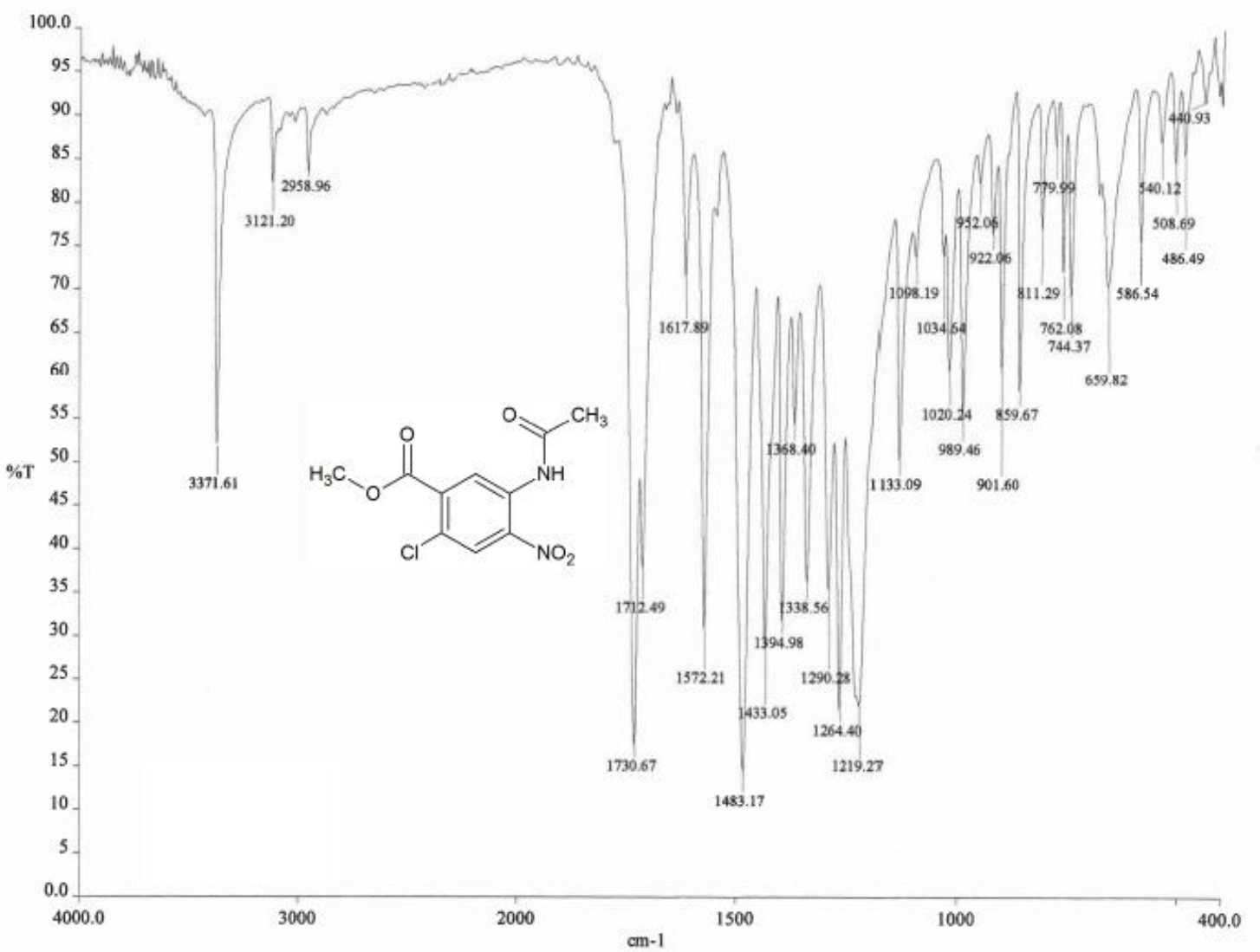
Espectro 37. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: ácido 6-cloro-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (18).



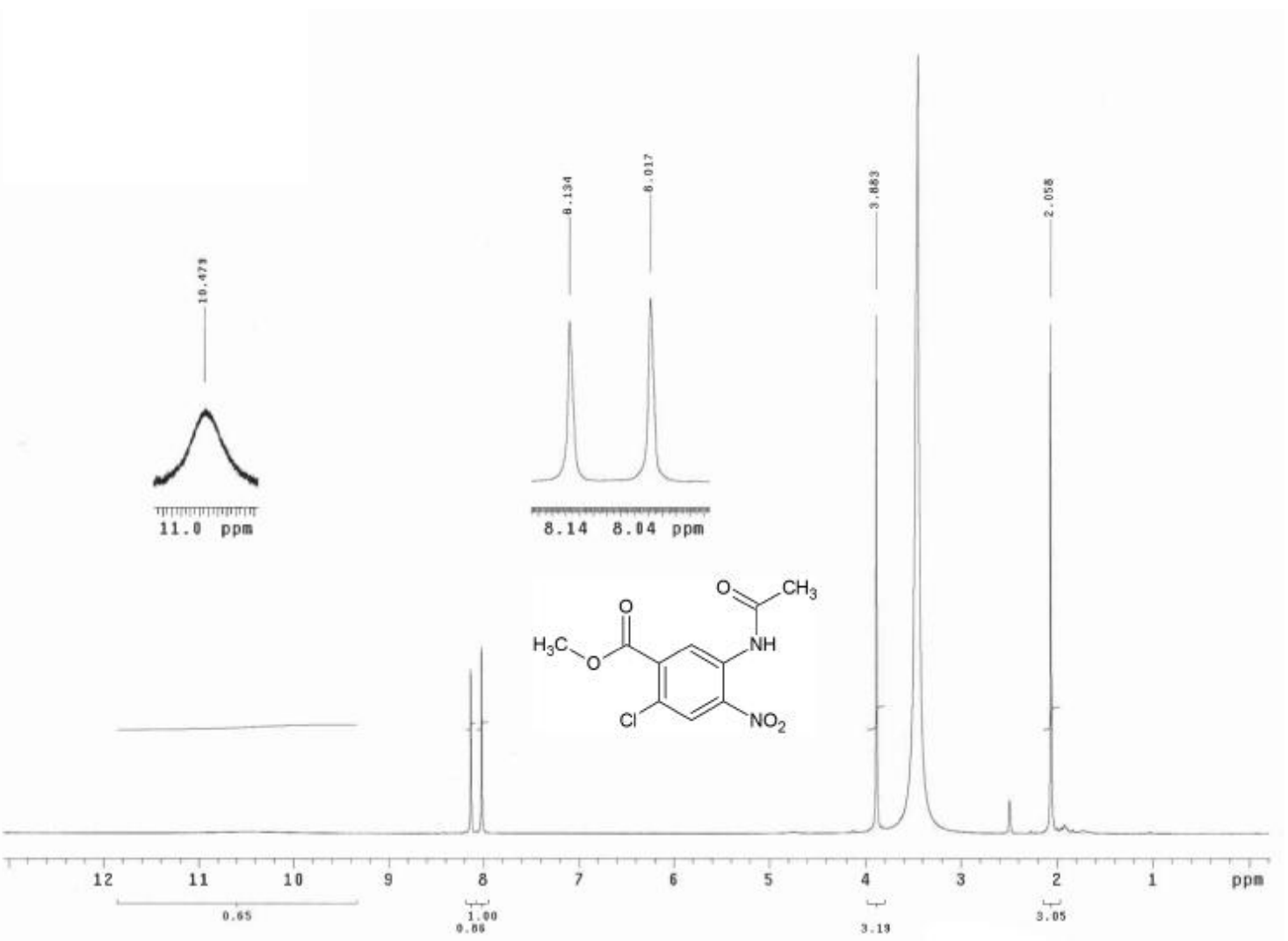
Espectro 38. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) de: ácido 6-cloro-2-metilito-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**18**).



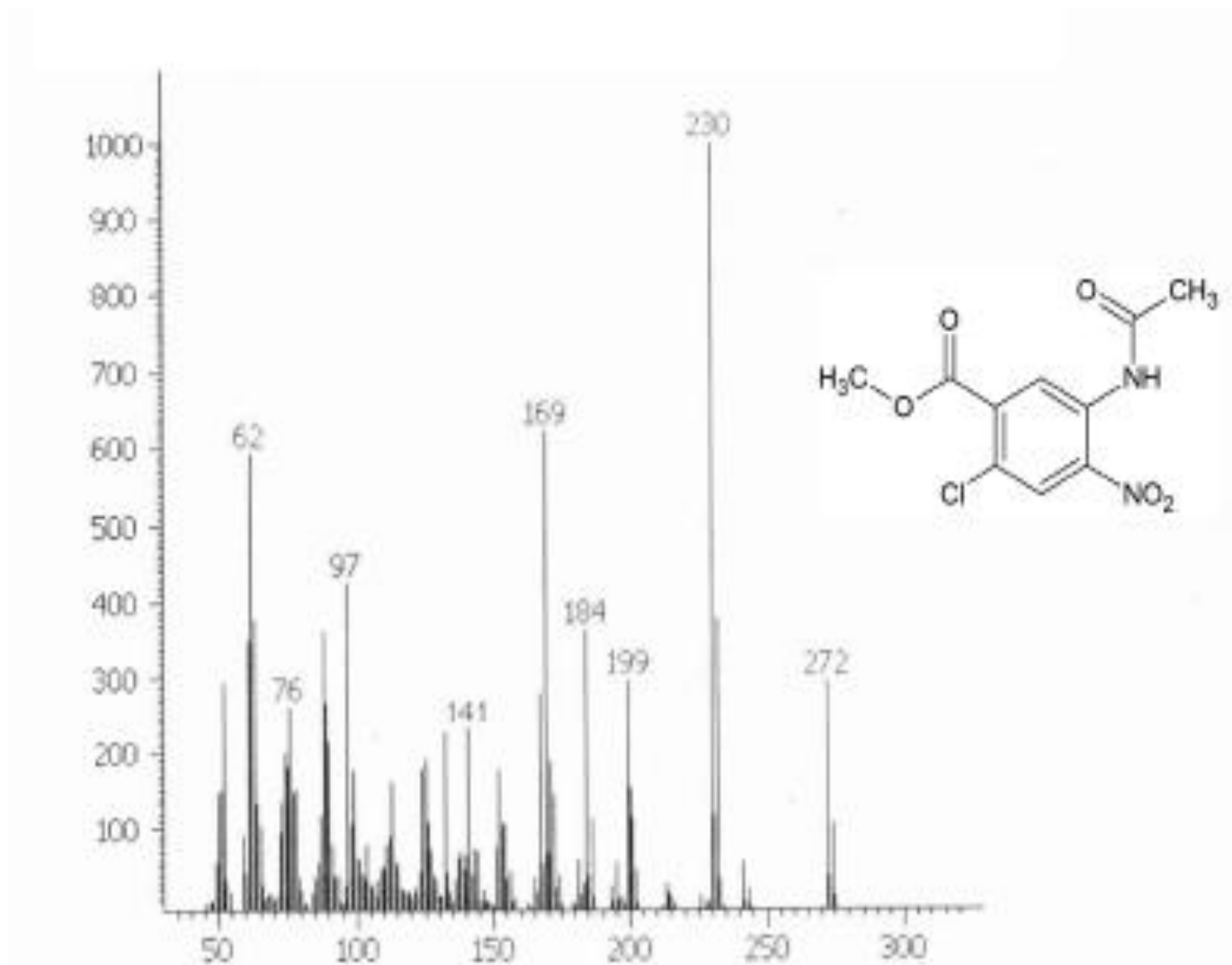
Espectro 39. EM (D/E, m/z) de: ácido 6-cloro-2-metilo-1-*H*-benzimidazol-5-carboxílico (18).



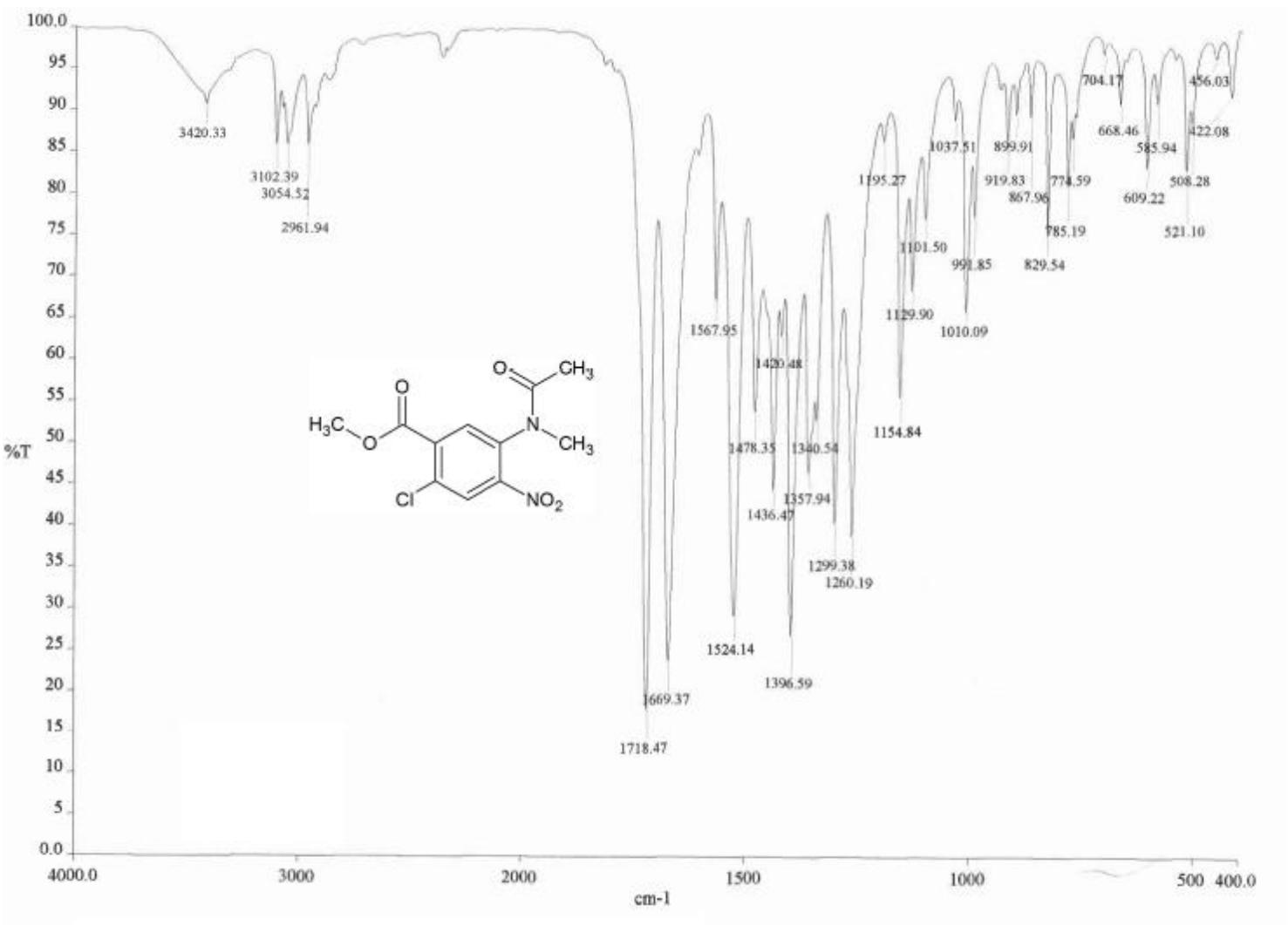
Espectro 40. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 5-acetamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (19).



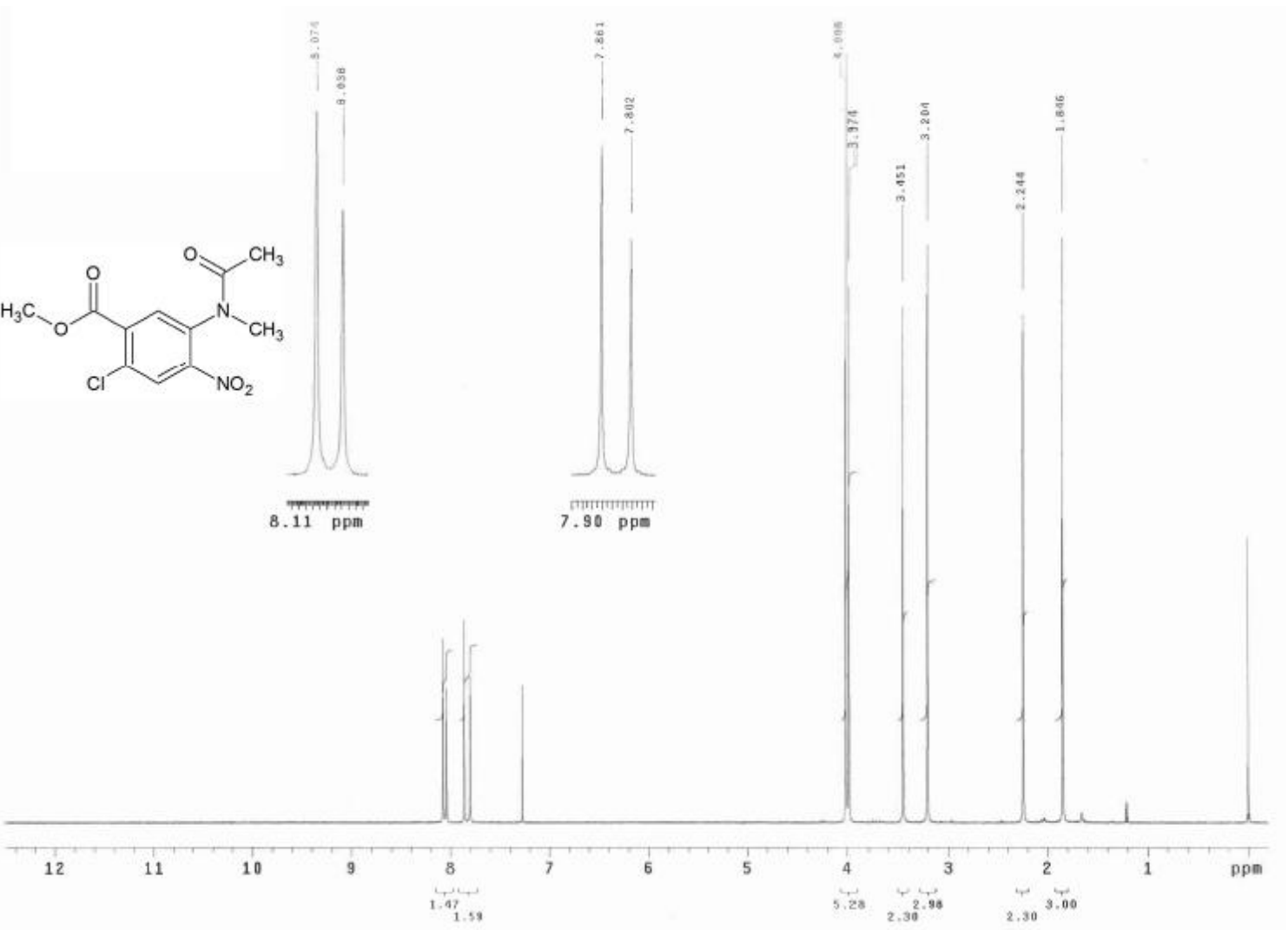
Espectro 41. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 300 MHz, δ en ppm) de: 5-acetamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (19).



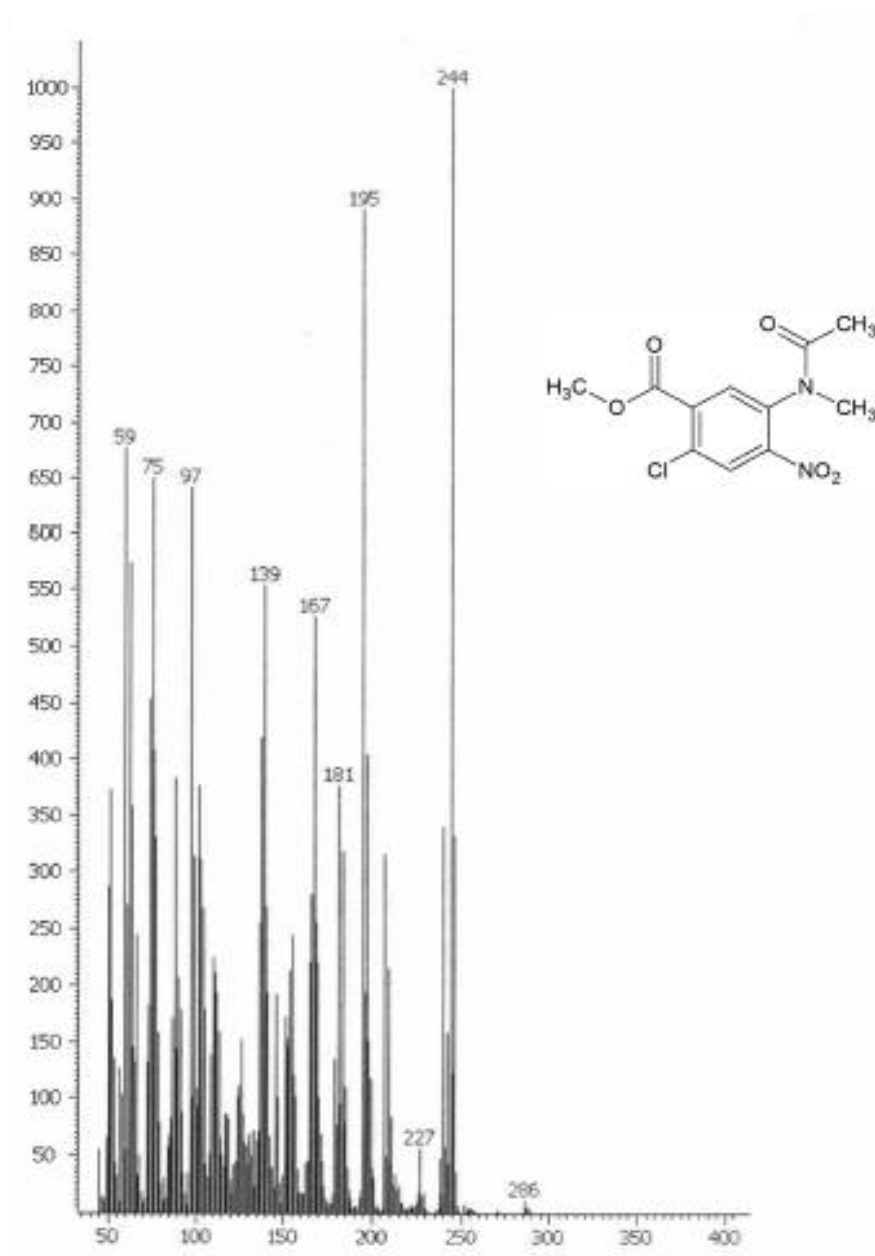
Espectro 42. EM (ID/IE, m/z) de: 5-acetamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (19).



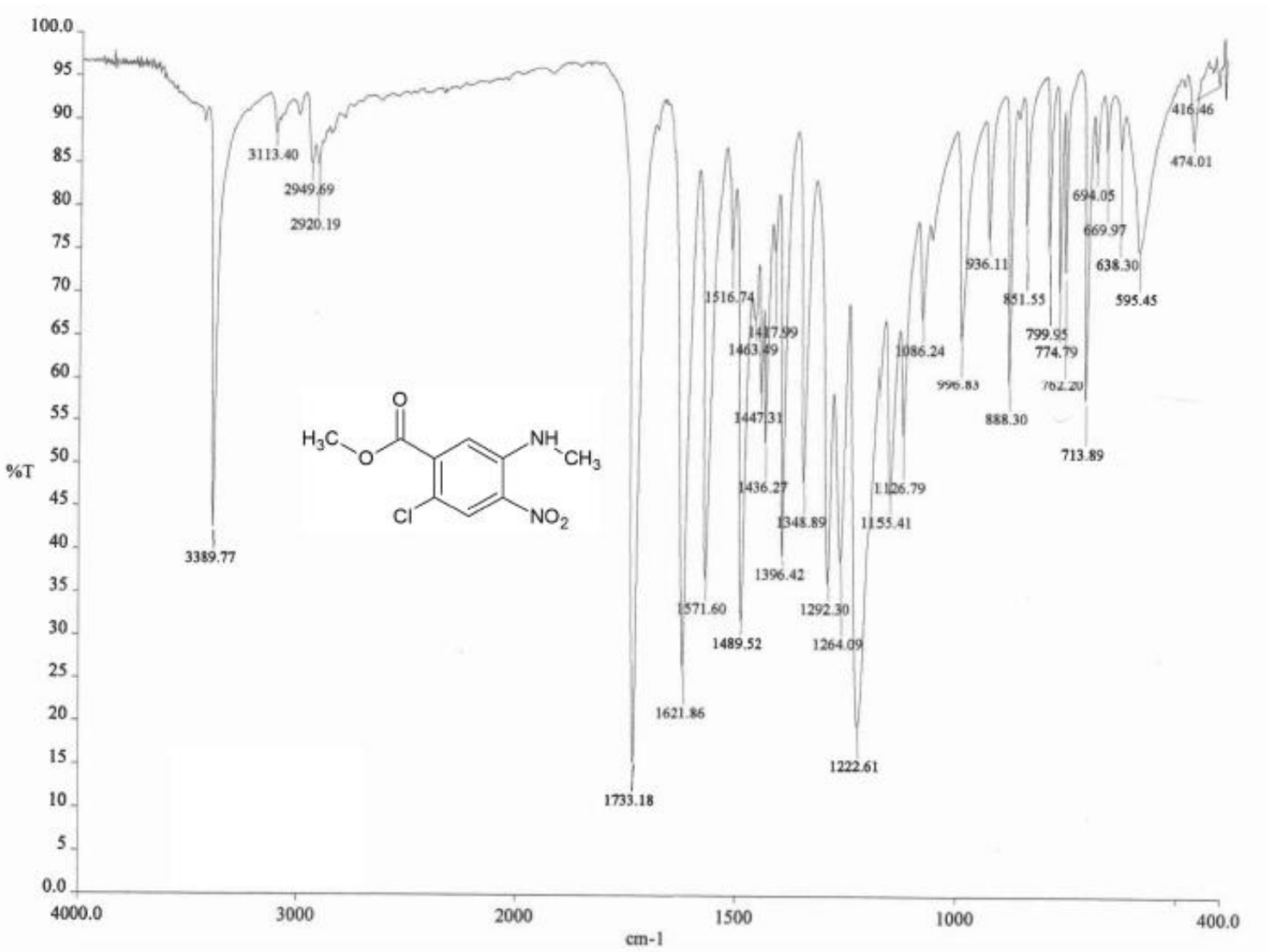
Espectro 43. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 5-[acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (20).



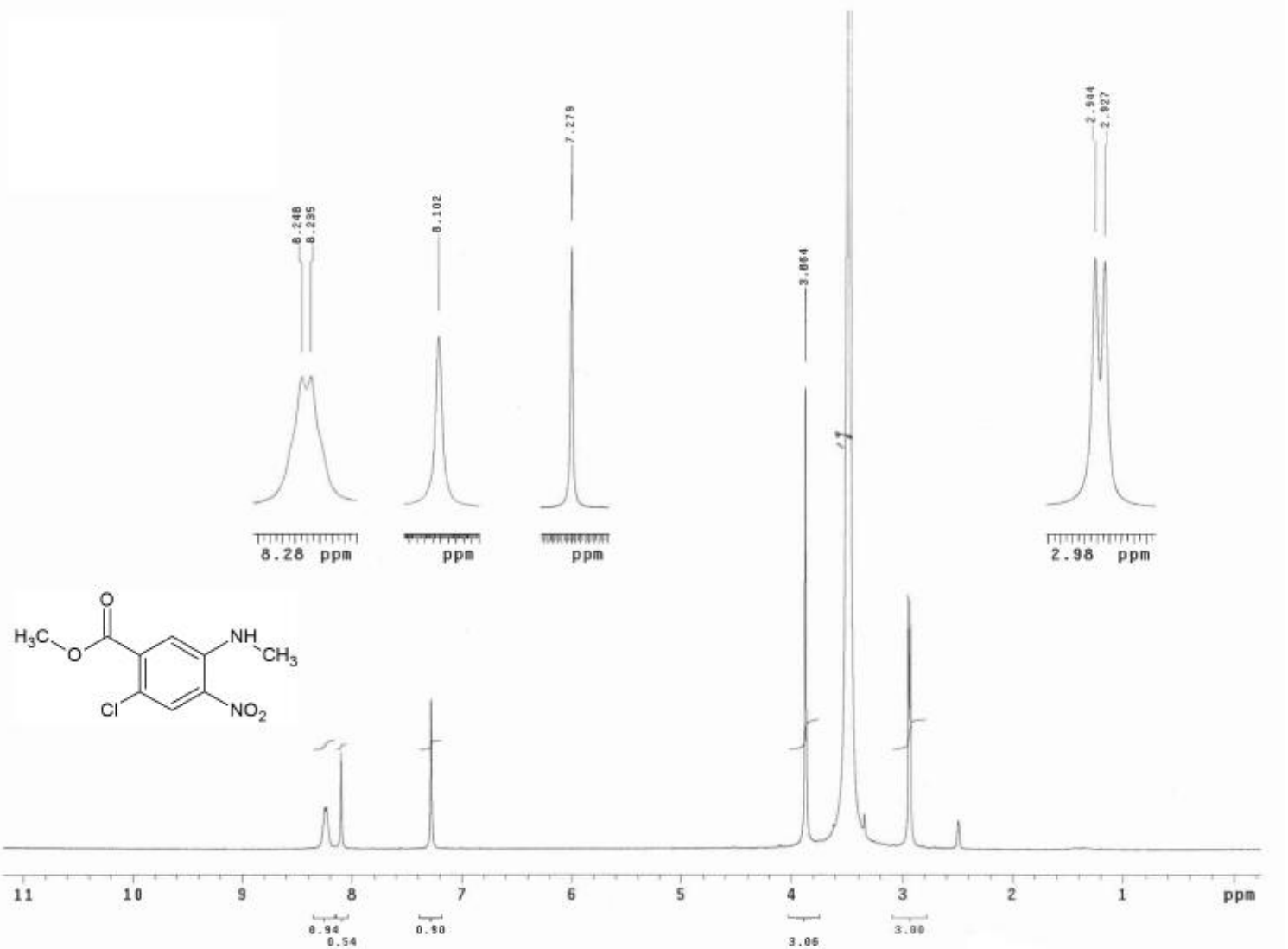
Espectro 44. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 400 MHz, δ en ppm) de: 5-[acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**20**).



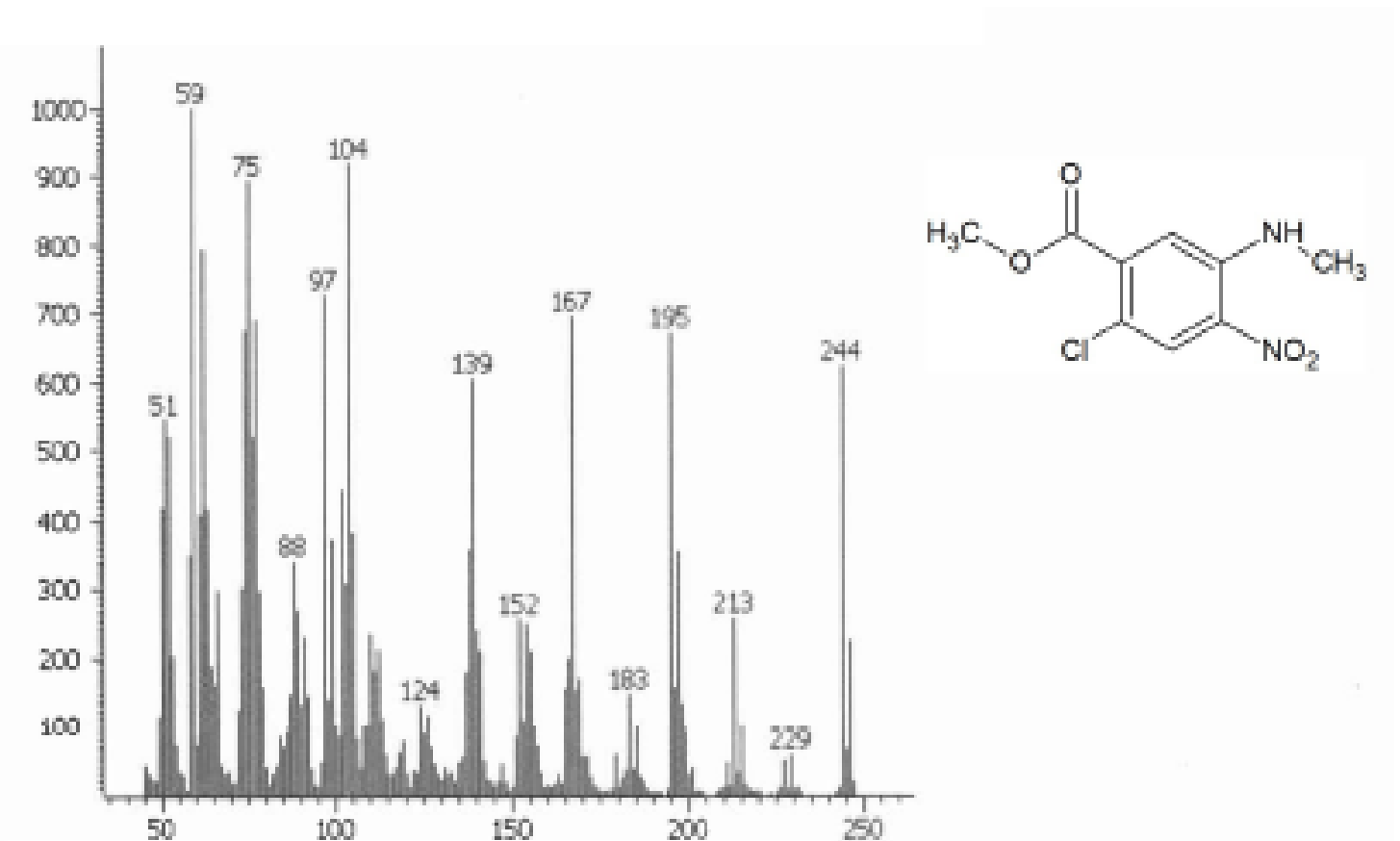
Espectro 45. EM (ID/IE, m/z) de: 5-[acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**20**).



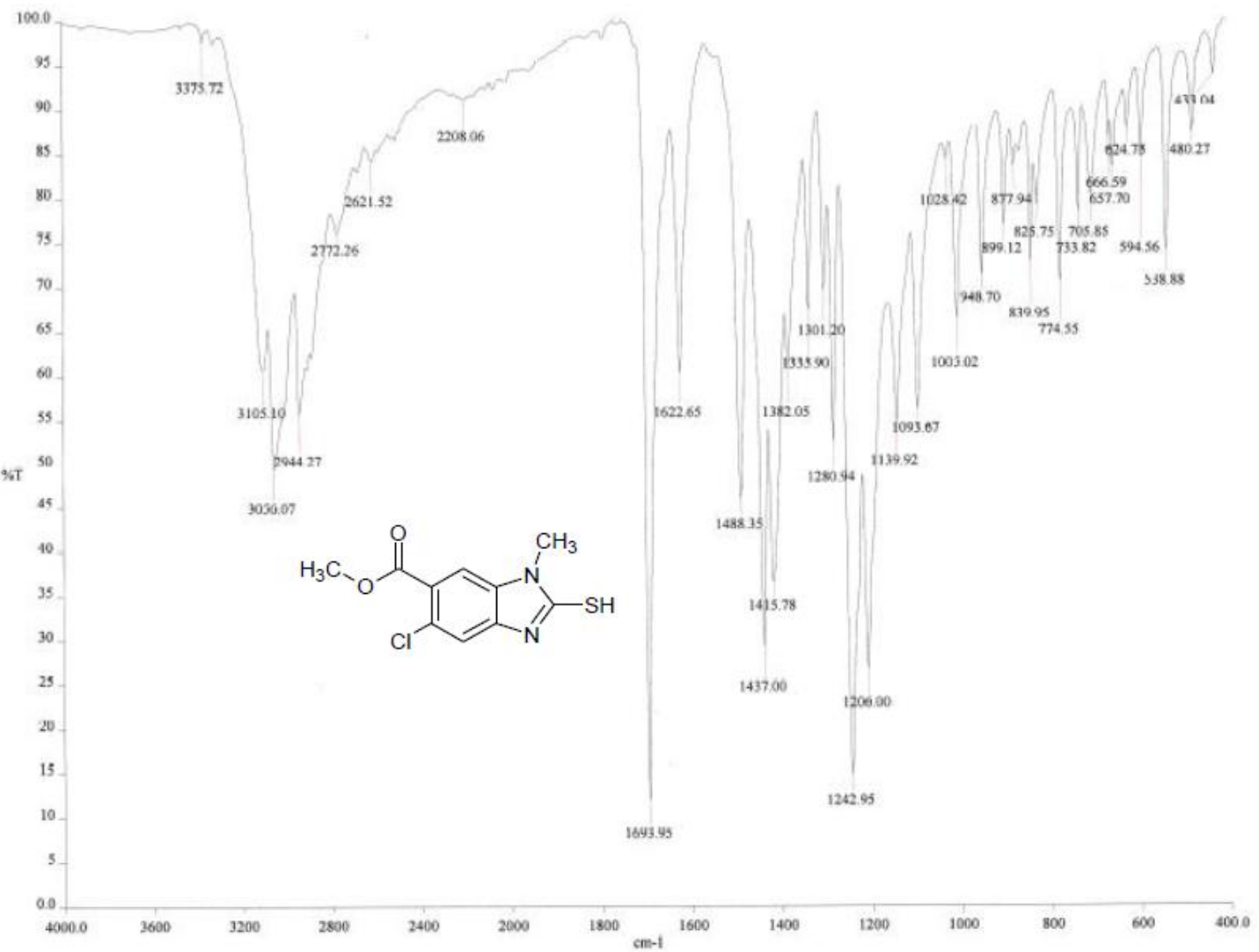
Espectro 46. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (21).



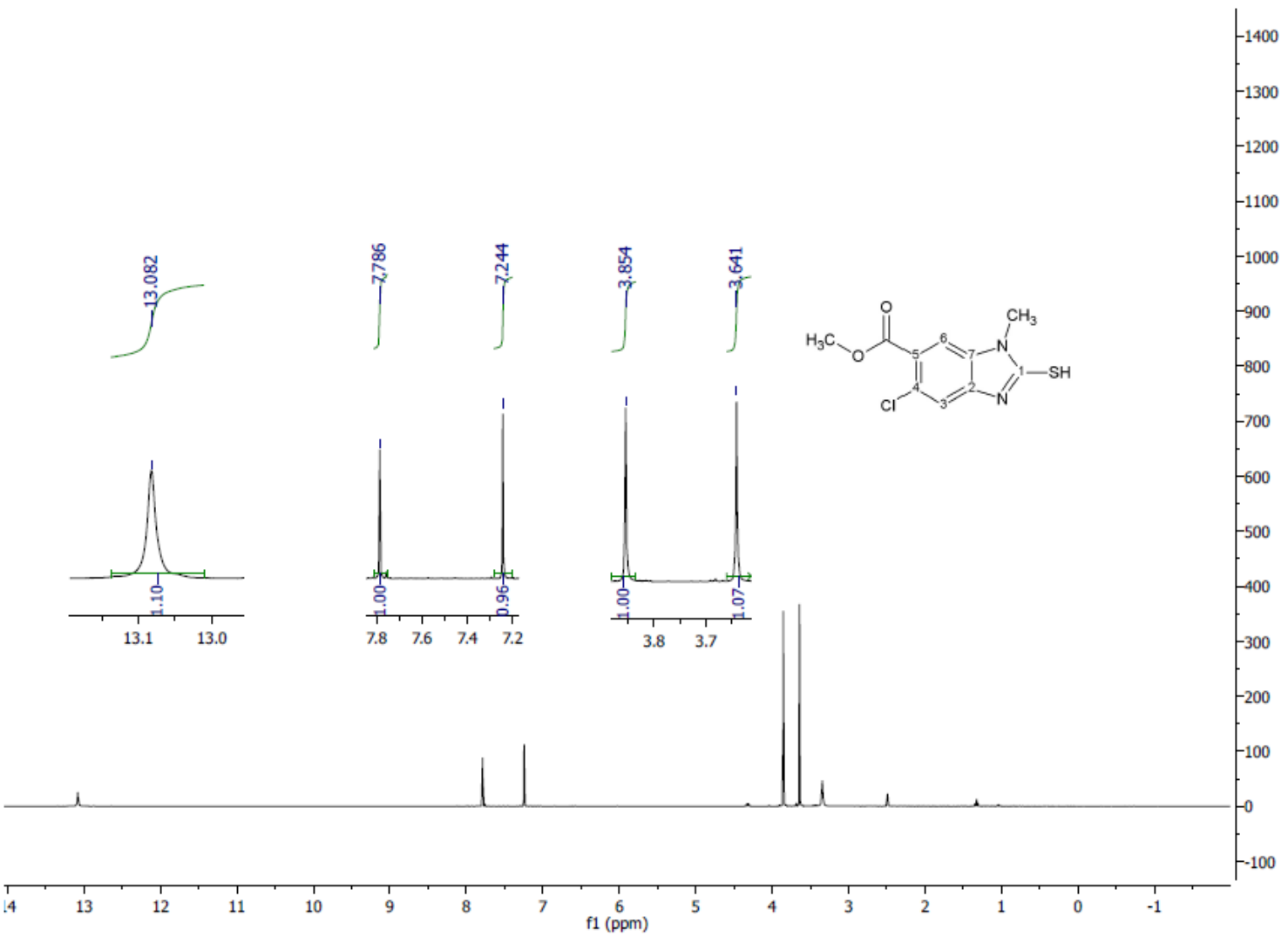
Espectro 47. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz, δ en ppm) de: 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**21**).



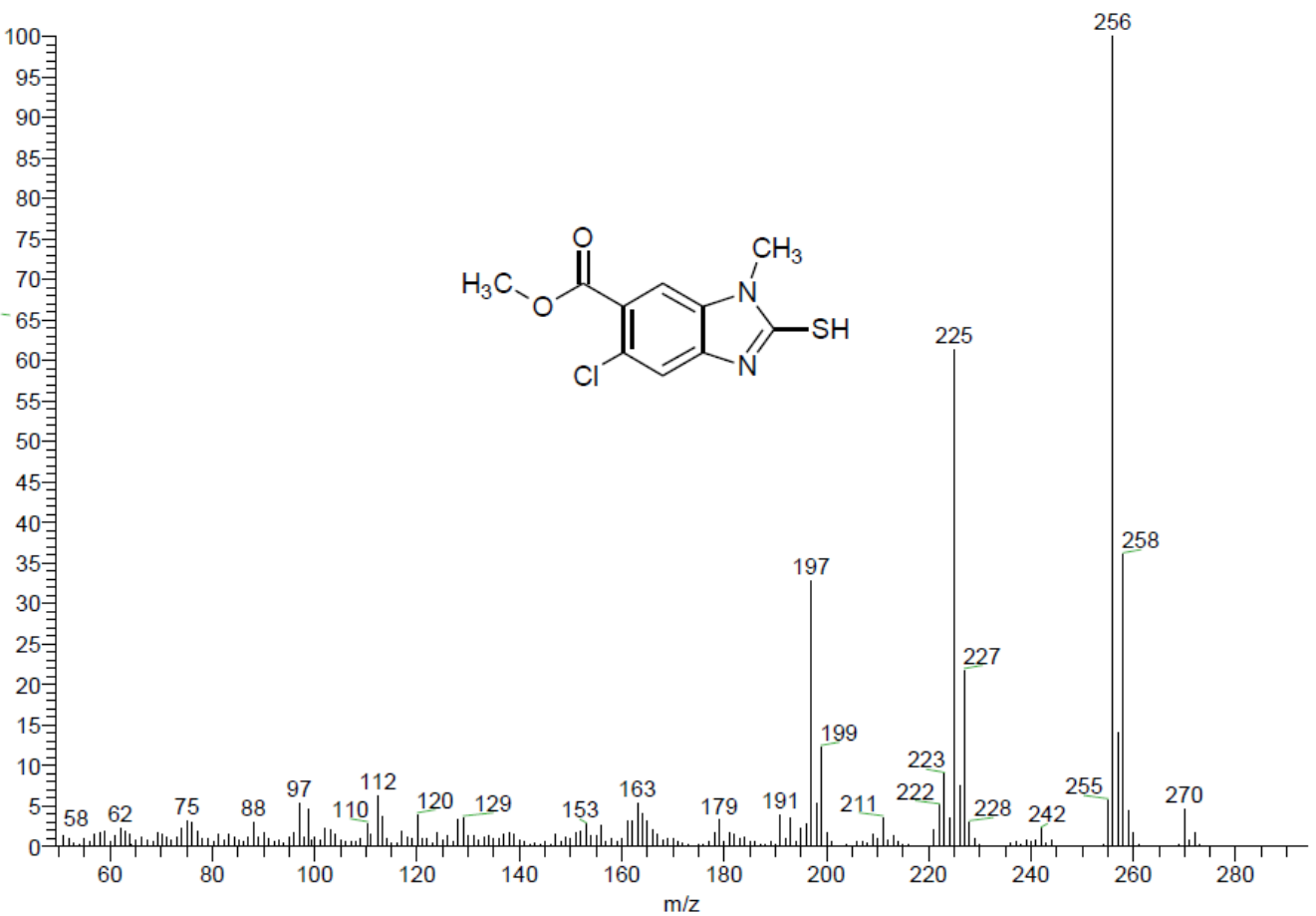
Espectro 48. EM (D/I/E, *m/z*) de: 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (21).



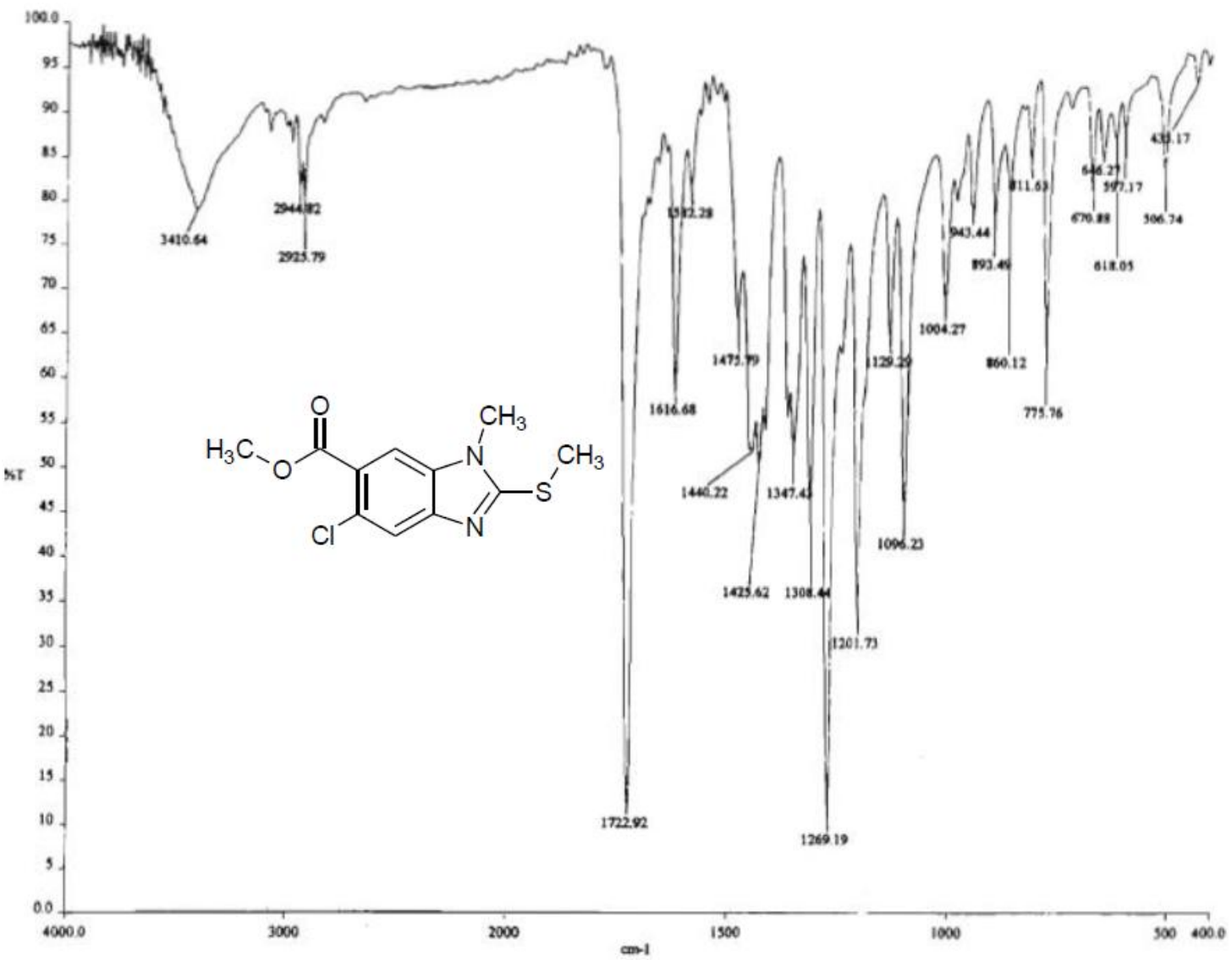
Espectro 49. IR (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: 5-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (23).



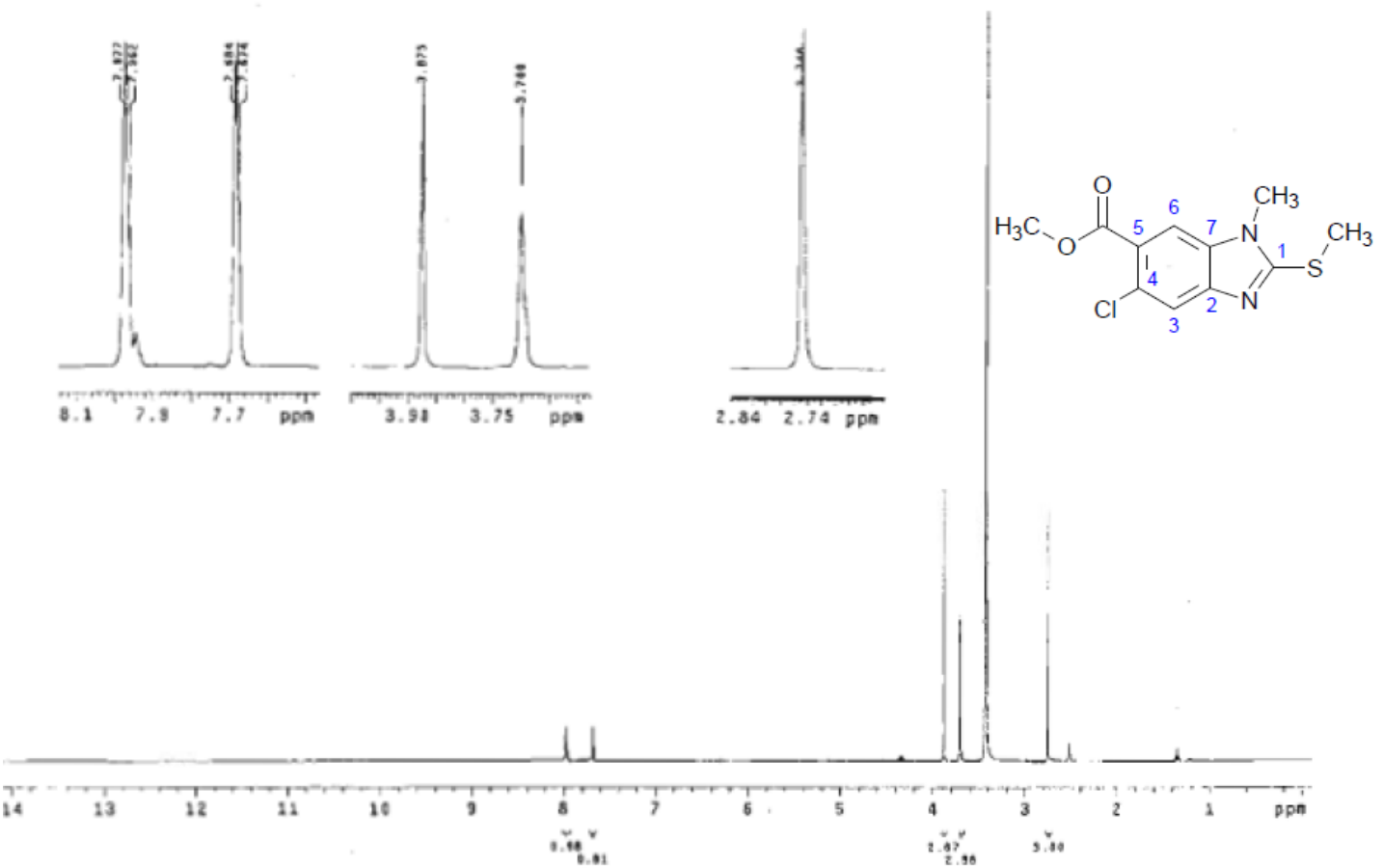
Espectro 50. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) de: 5-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**23**).



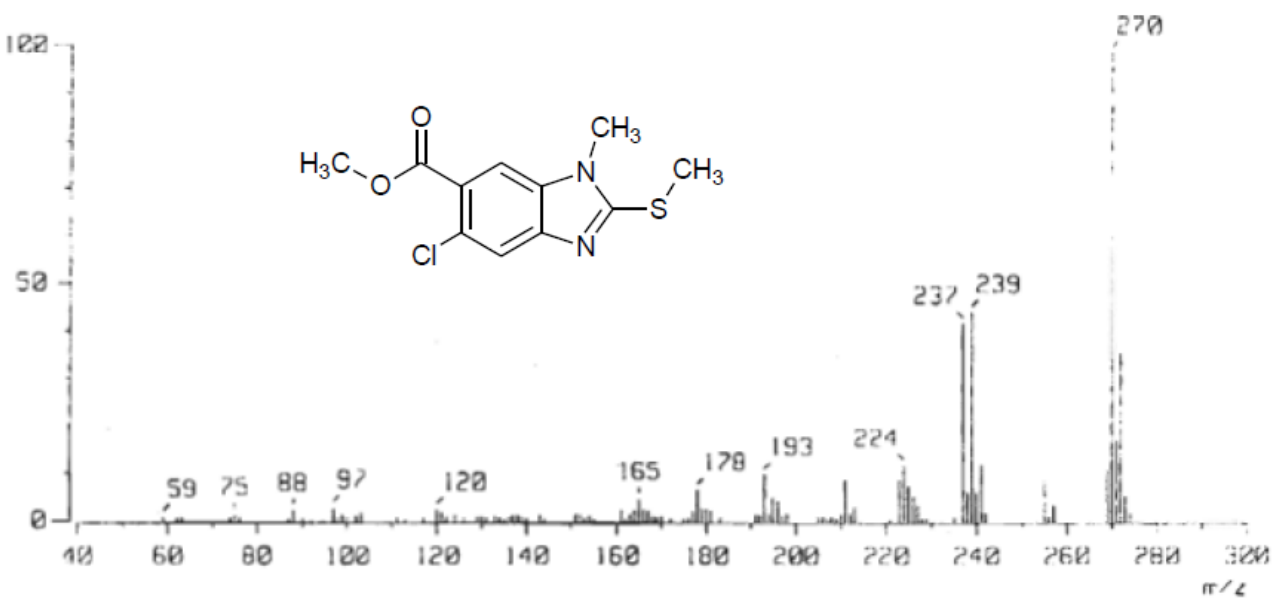
Espectro 51. EM (ID/E, *m/z*) de: 5-cloro-2-mercapto-1-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (23).



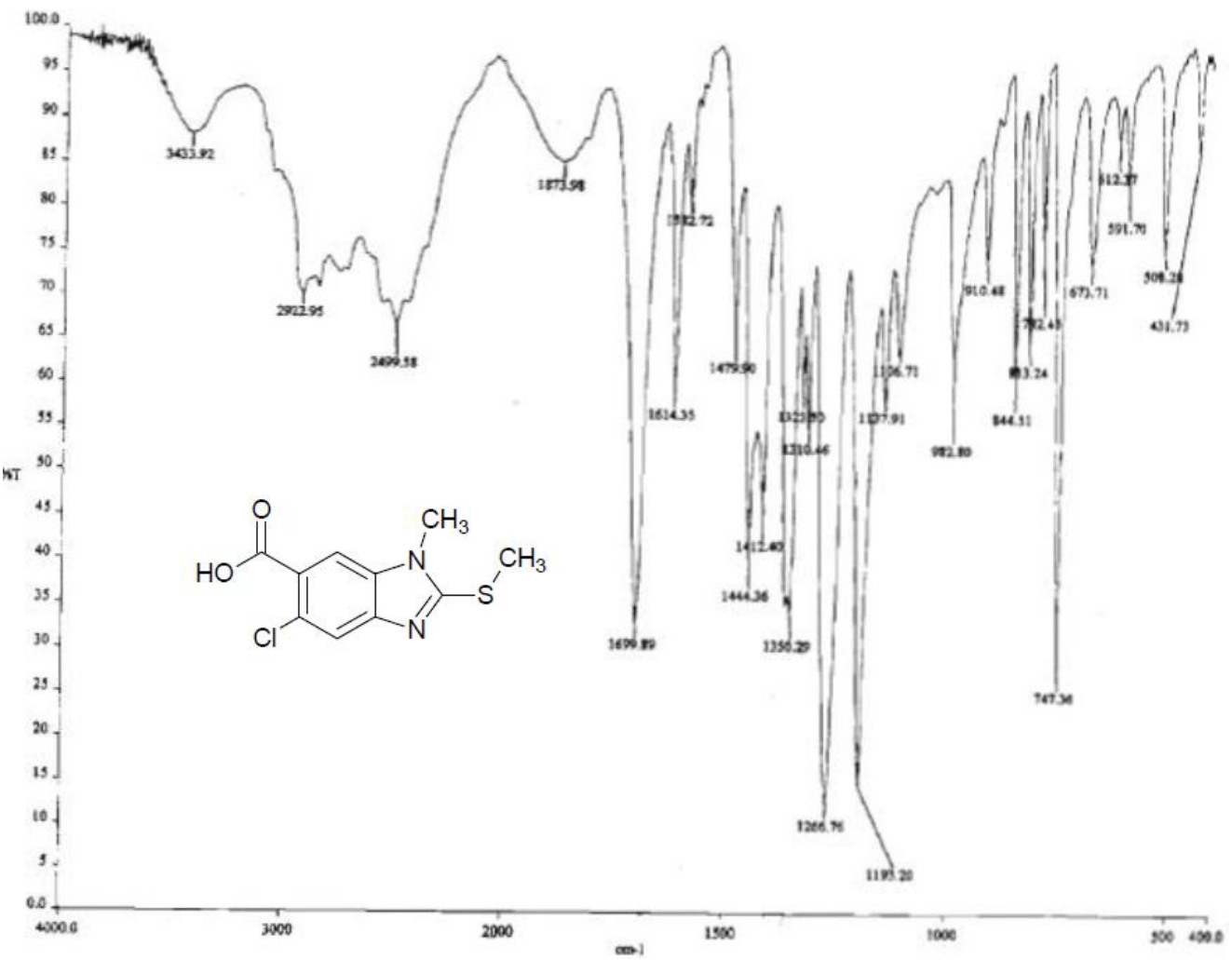
Espectro 52. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 5-cloro-1-metil-2-metil-tio-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (24).



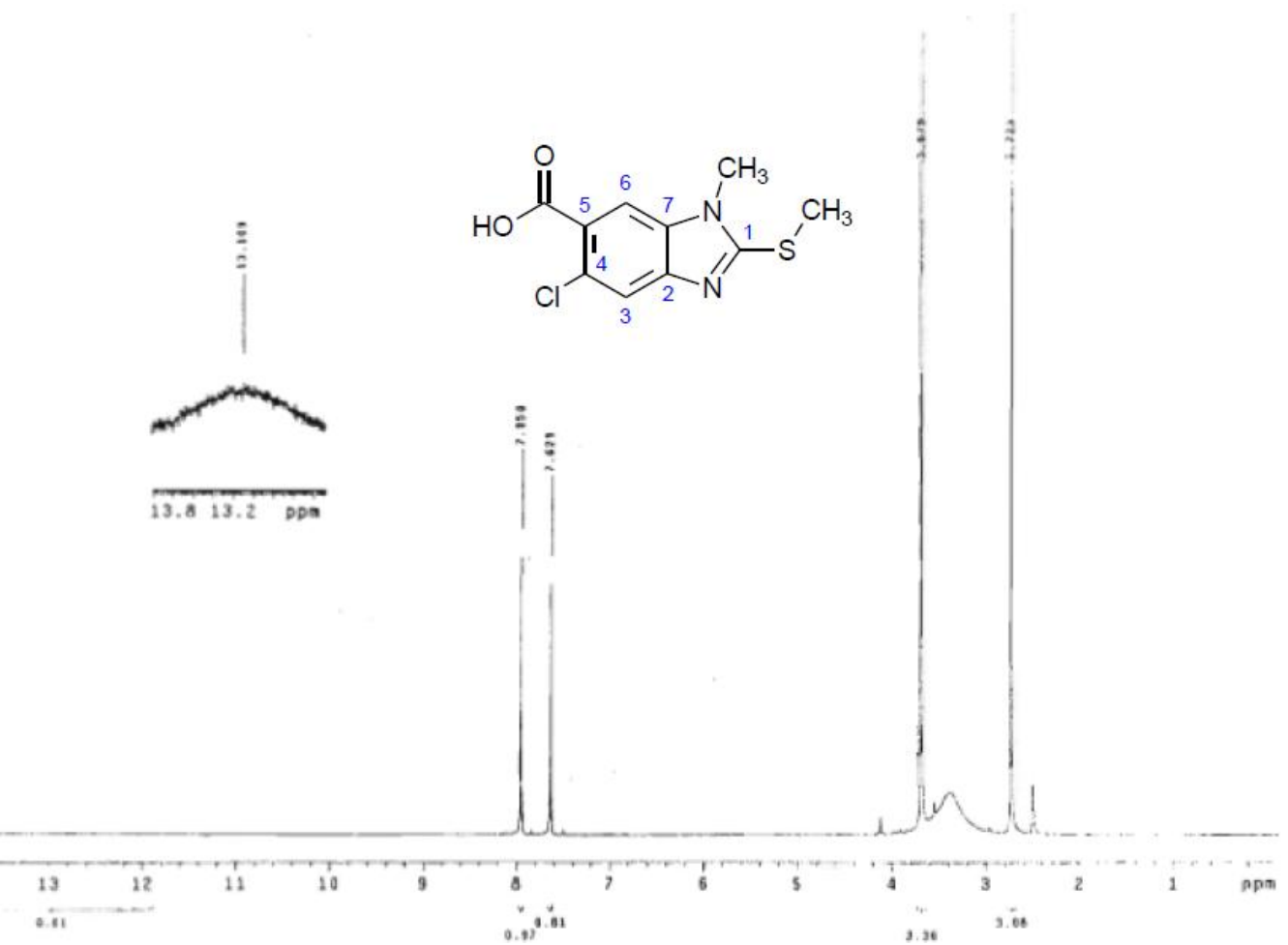
Espectro 53. RMN ¹H, (TMS, CDCl₃, 300 MHz, δ en ppm) de: 5-cloro-1-metil-2-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**24**).



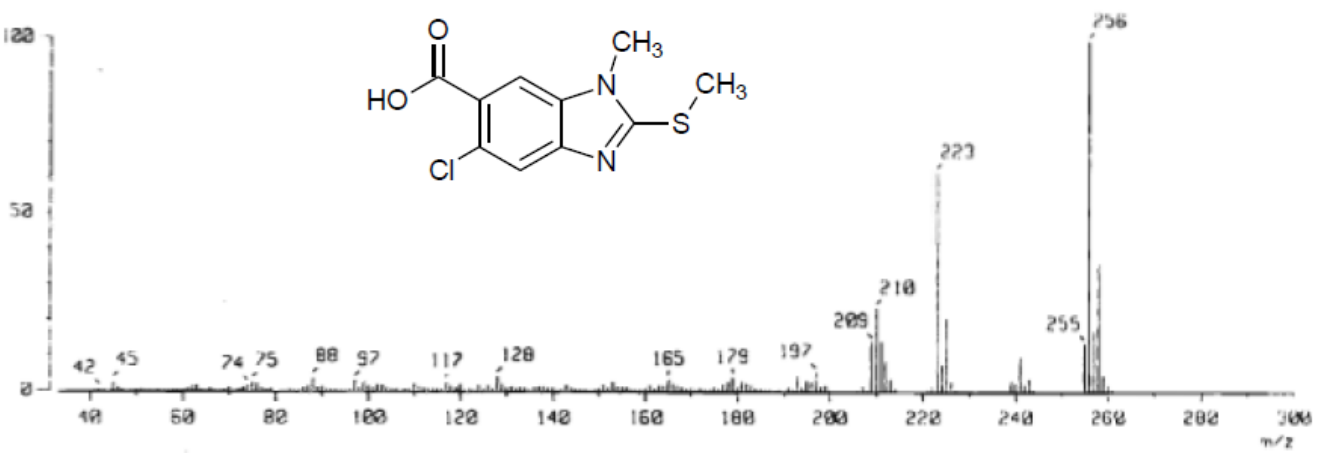
Espectro 54. EM (ID/IE, m/z) de: 5-cloro-1-metil-2-metilio-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**24**).



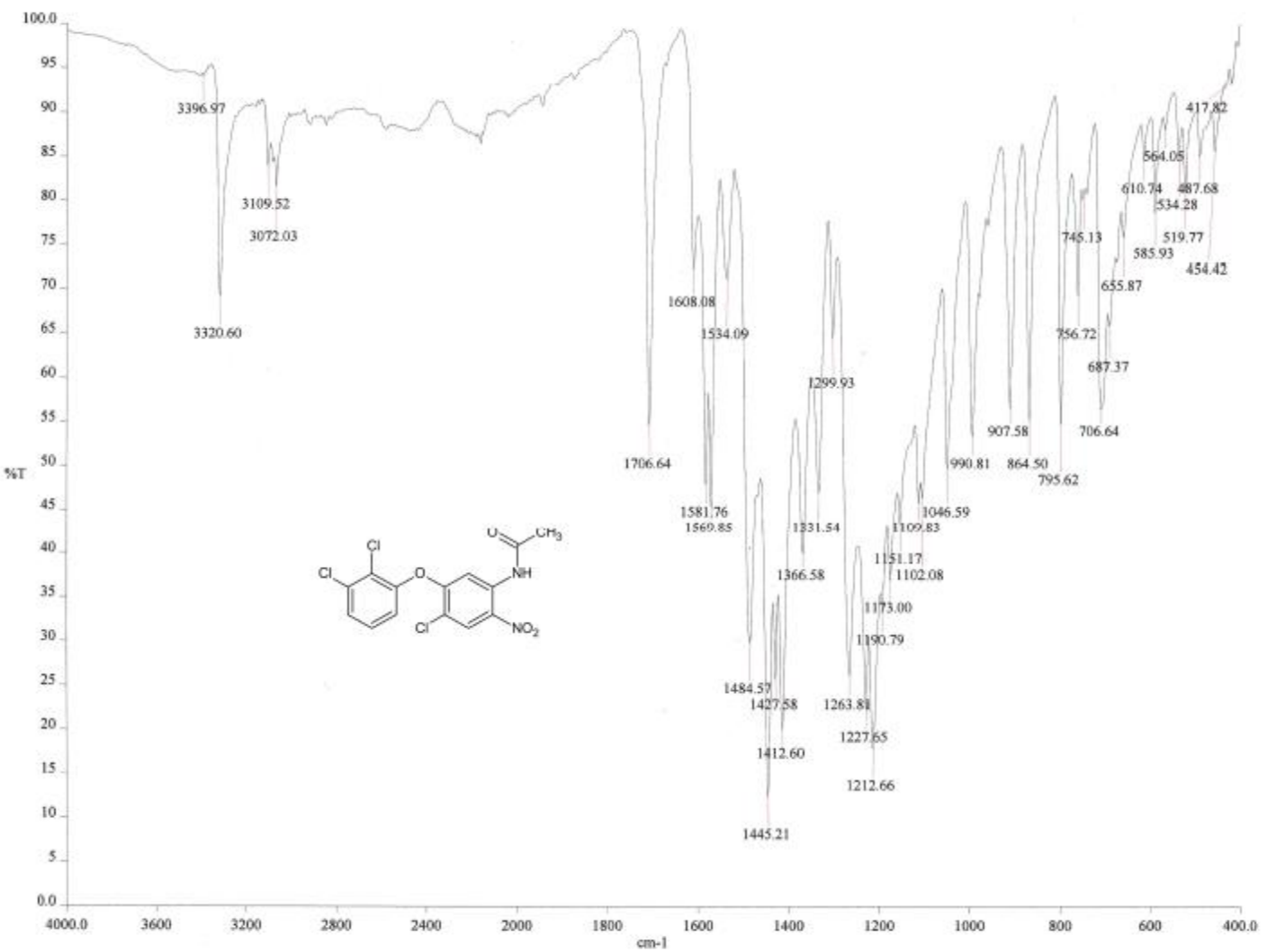
Espectro 55. IR (pastilla KBr, cm^{-1}) de: ácido 5-cloro-1-metil-2-metilto-1H-benzimidazol-6-carboxílico (25).



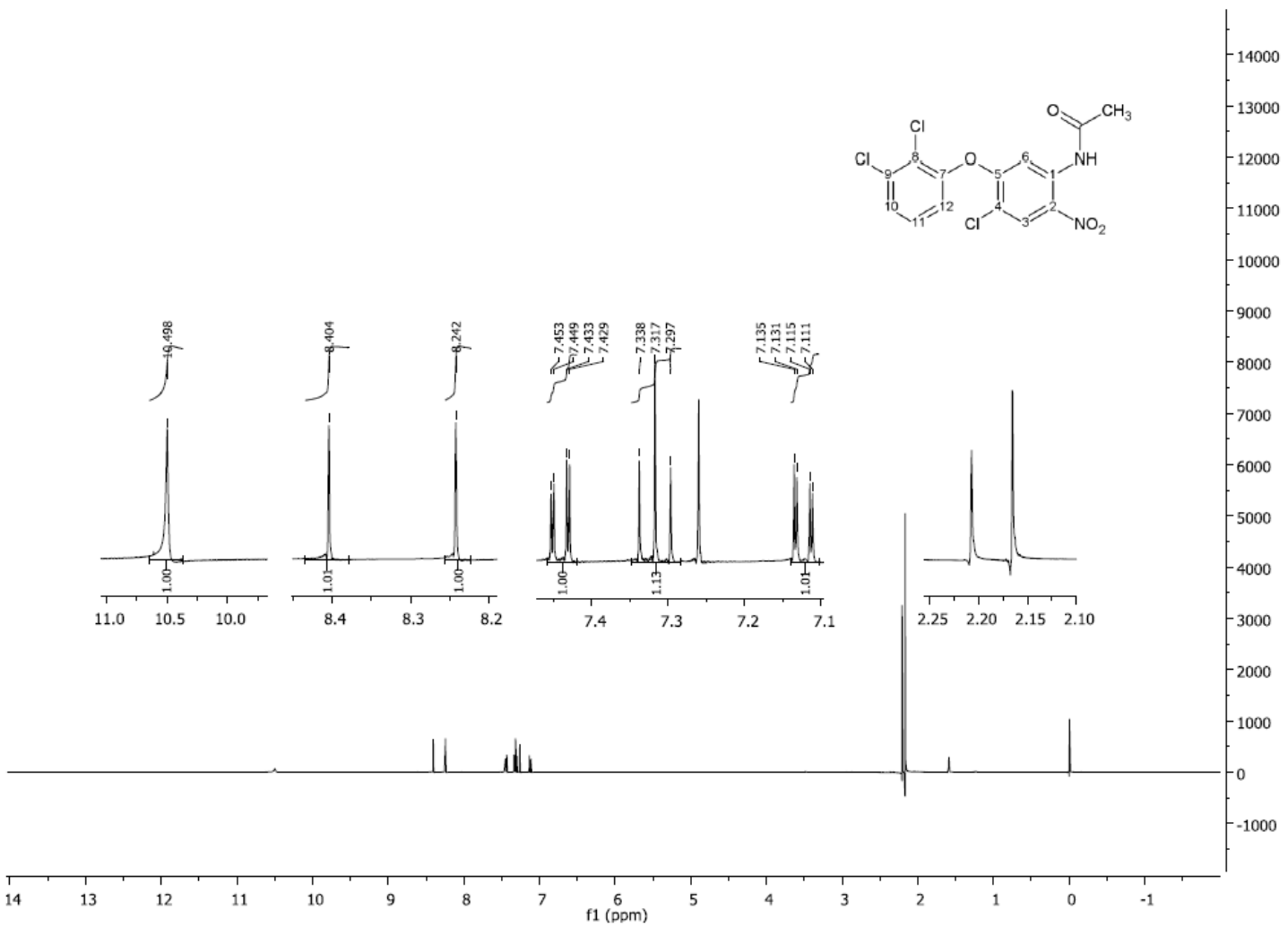
Espectro 56. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) de: ácido 5-cloro-1-metil-2-metil-1-*H*-benzimidazol-6-carboxílico (**25**).



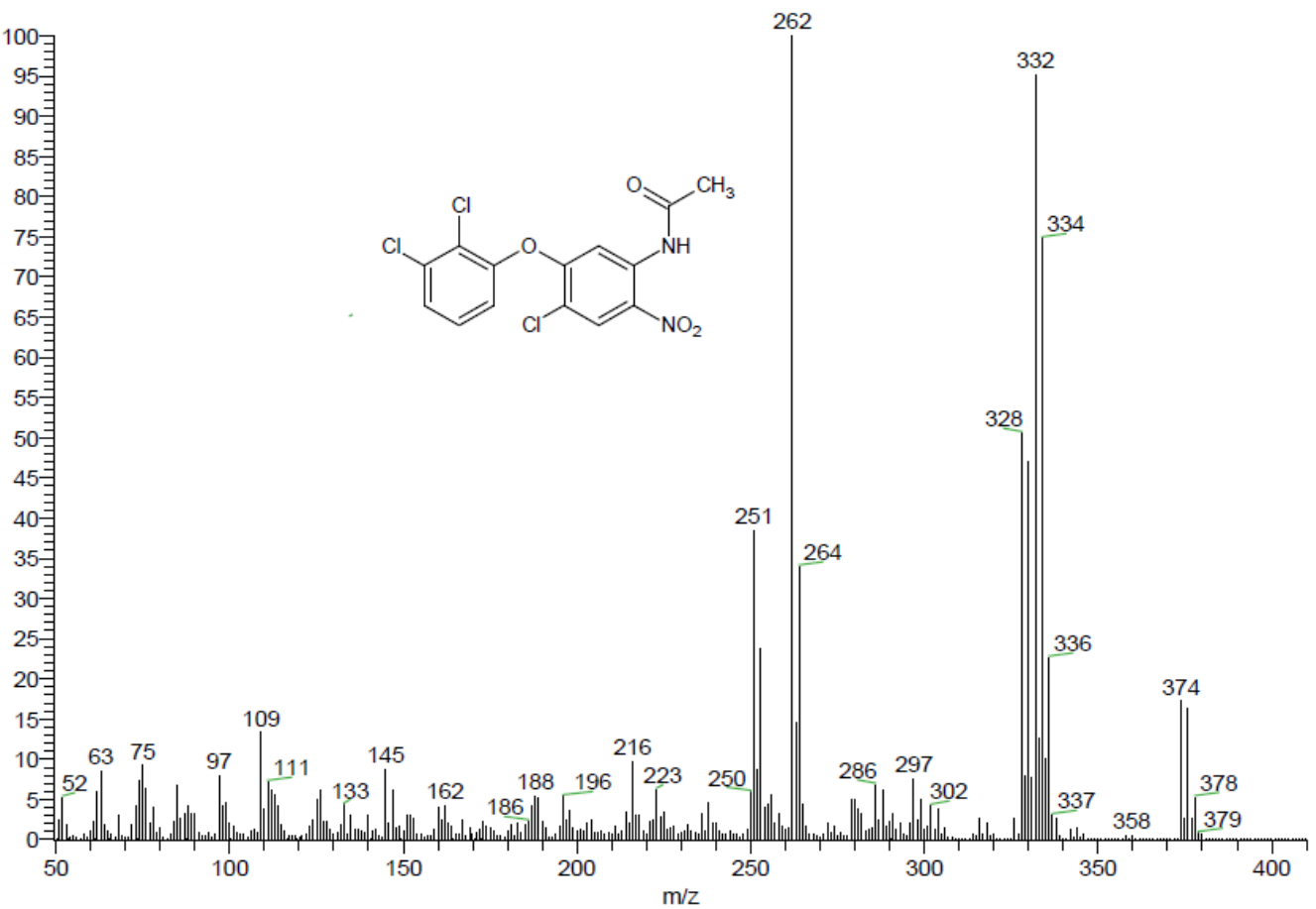
Espectro 57. EM (D/E, *m/z*) de: ácido 5-cloro-1-metil-2-metilto-1H-bencimidazol-6-carboxílico (25).



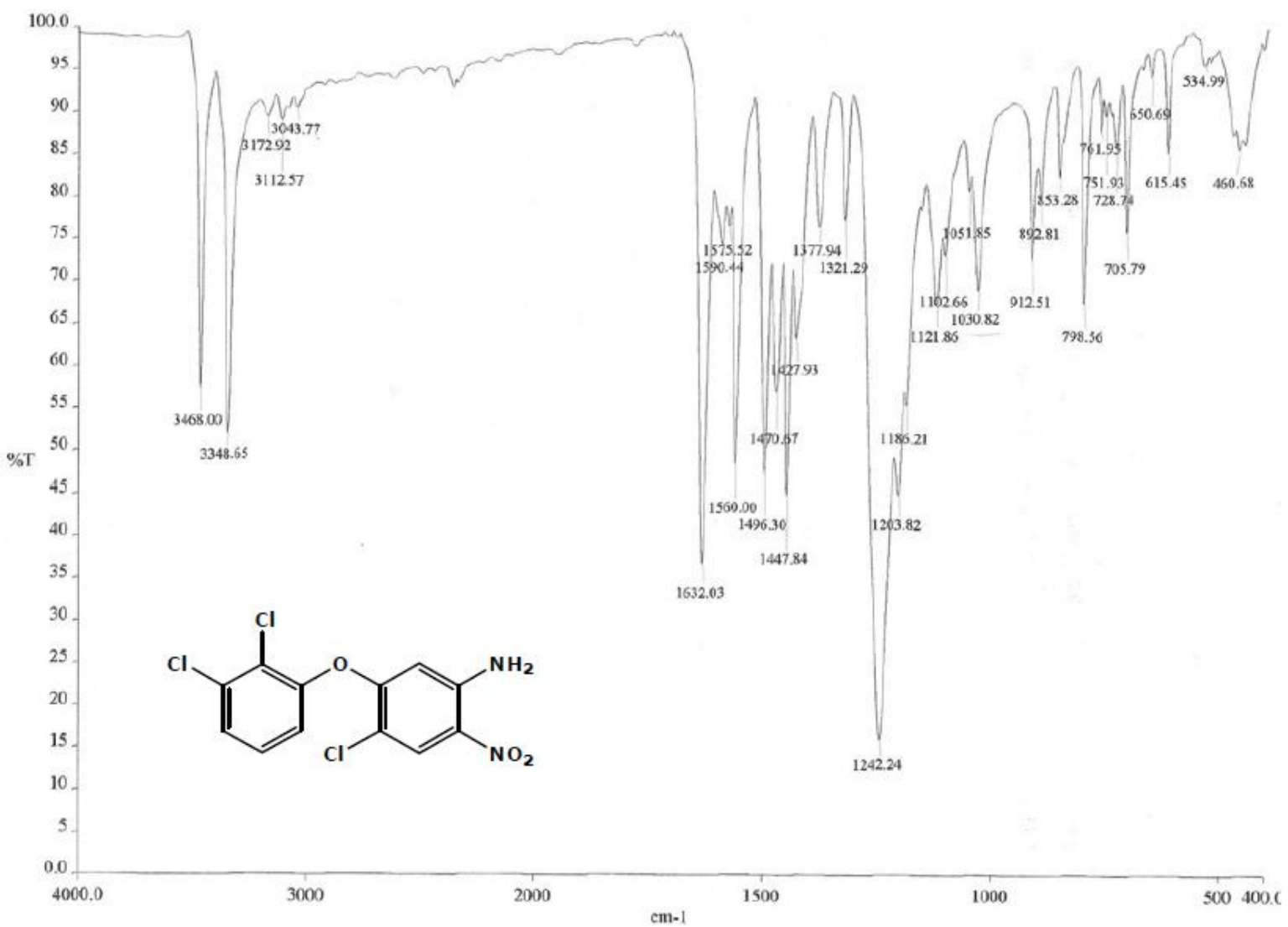
Espectro 58. IR (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: N-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil]acetamida (27).



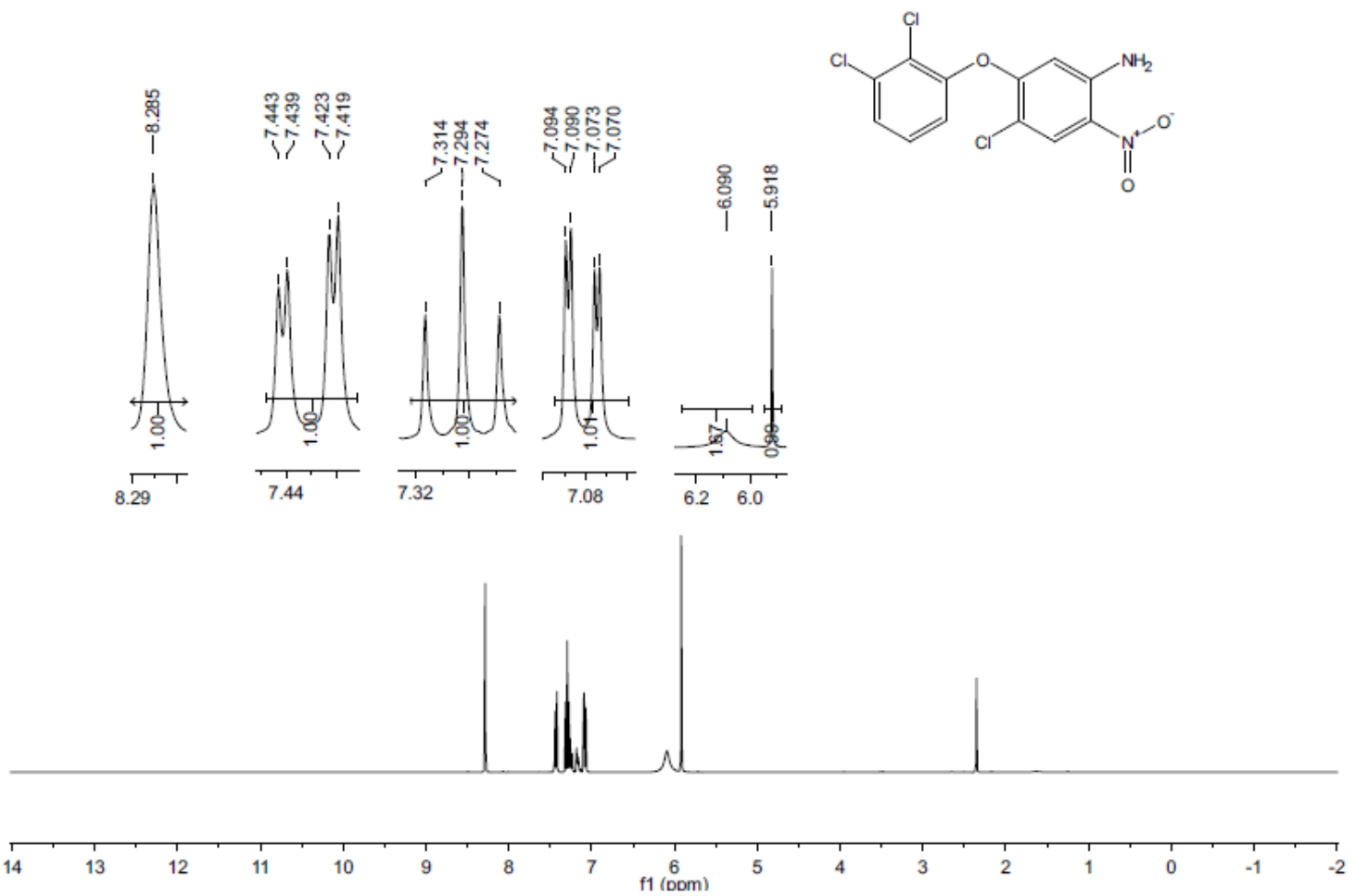
Espectro 59. RMN ¹H (TMS, CDCl₃, 300 MHz, δ en ppm) de: N-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitrofenil]acetamida (27).



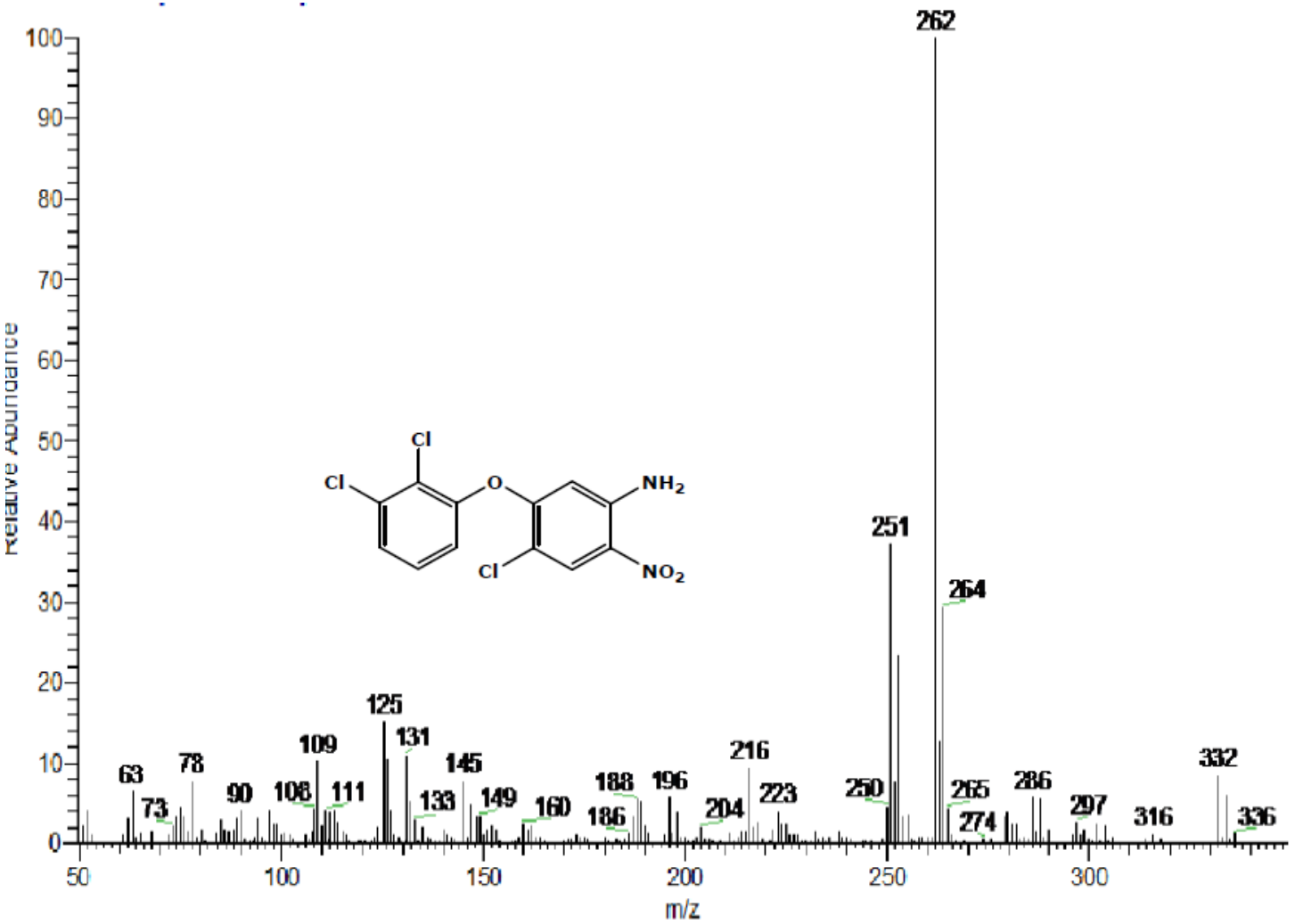
Espectro 60. EM (ID/E, m/z) de: N-[4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-2-nitrofenil]acetamida (27).



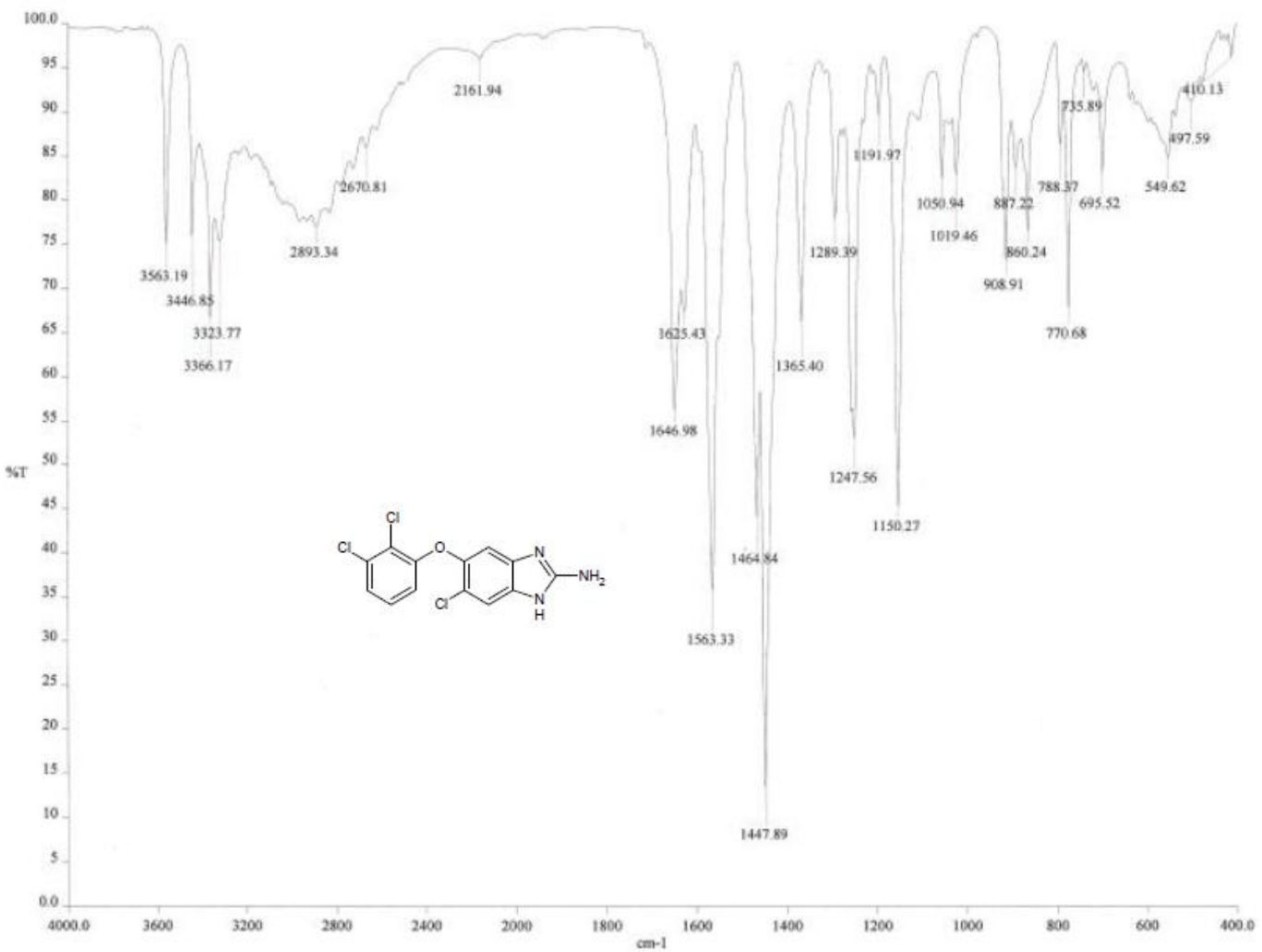
Espectro 61. IR (pastilla KBr, cm⁻¹) de: 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (28).



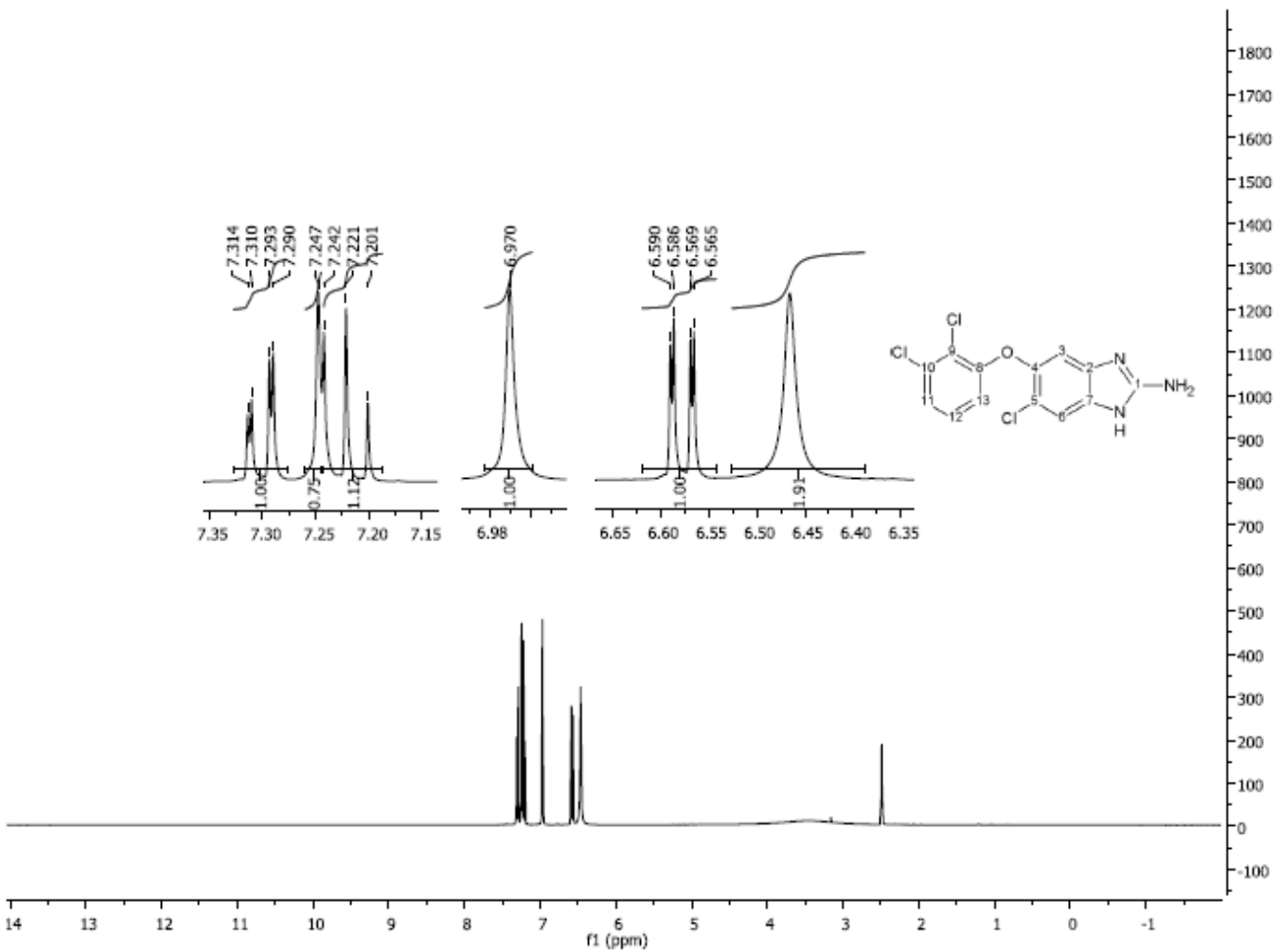
Espectro 62. RMN ¹H (TMS, CDCl₃, 300 MHz, δ en ppm) de: 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (**28**).



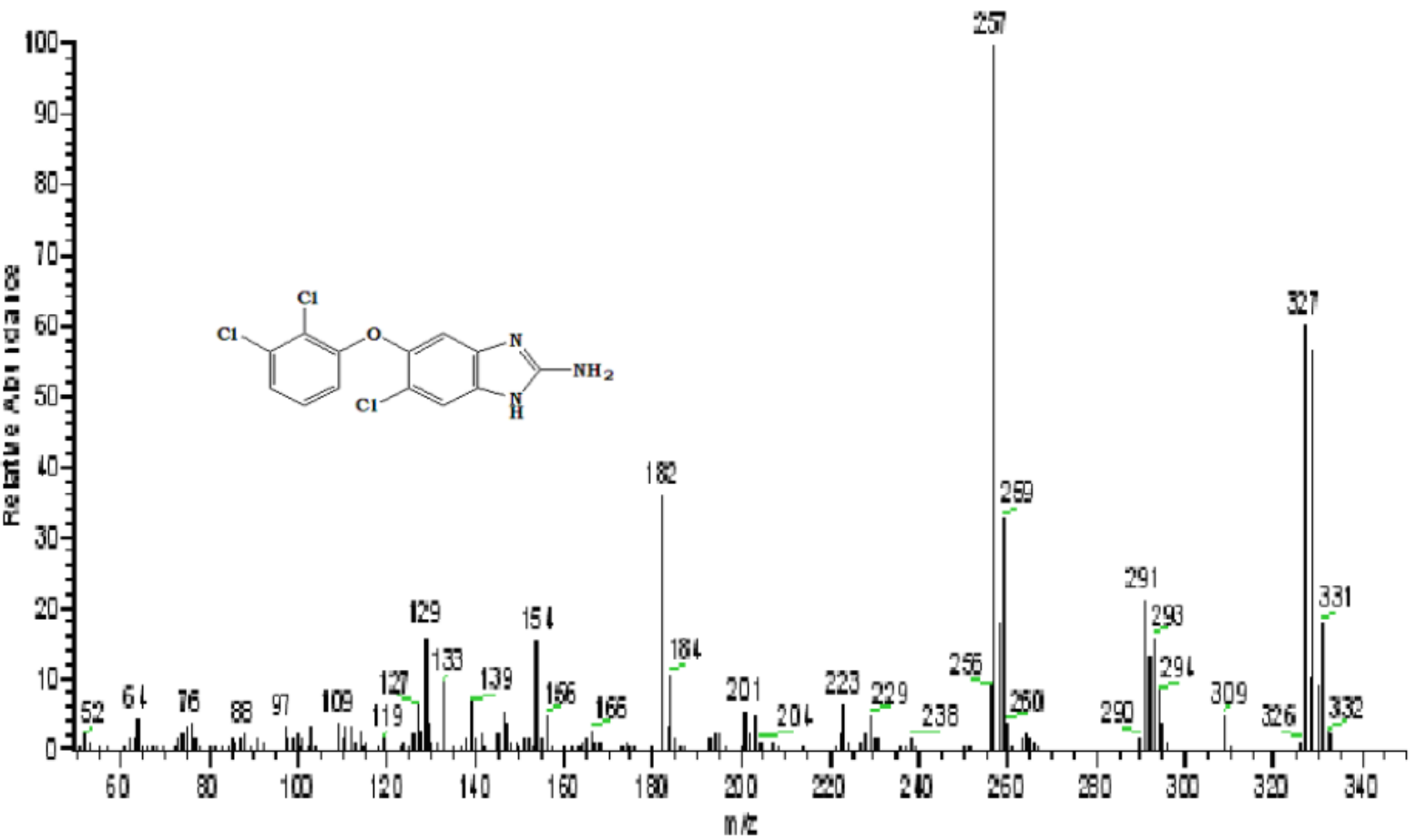
Espectro 63. EM (ID/E, m/z) de: 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-2-nitroanilina (28).



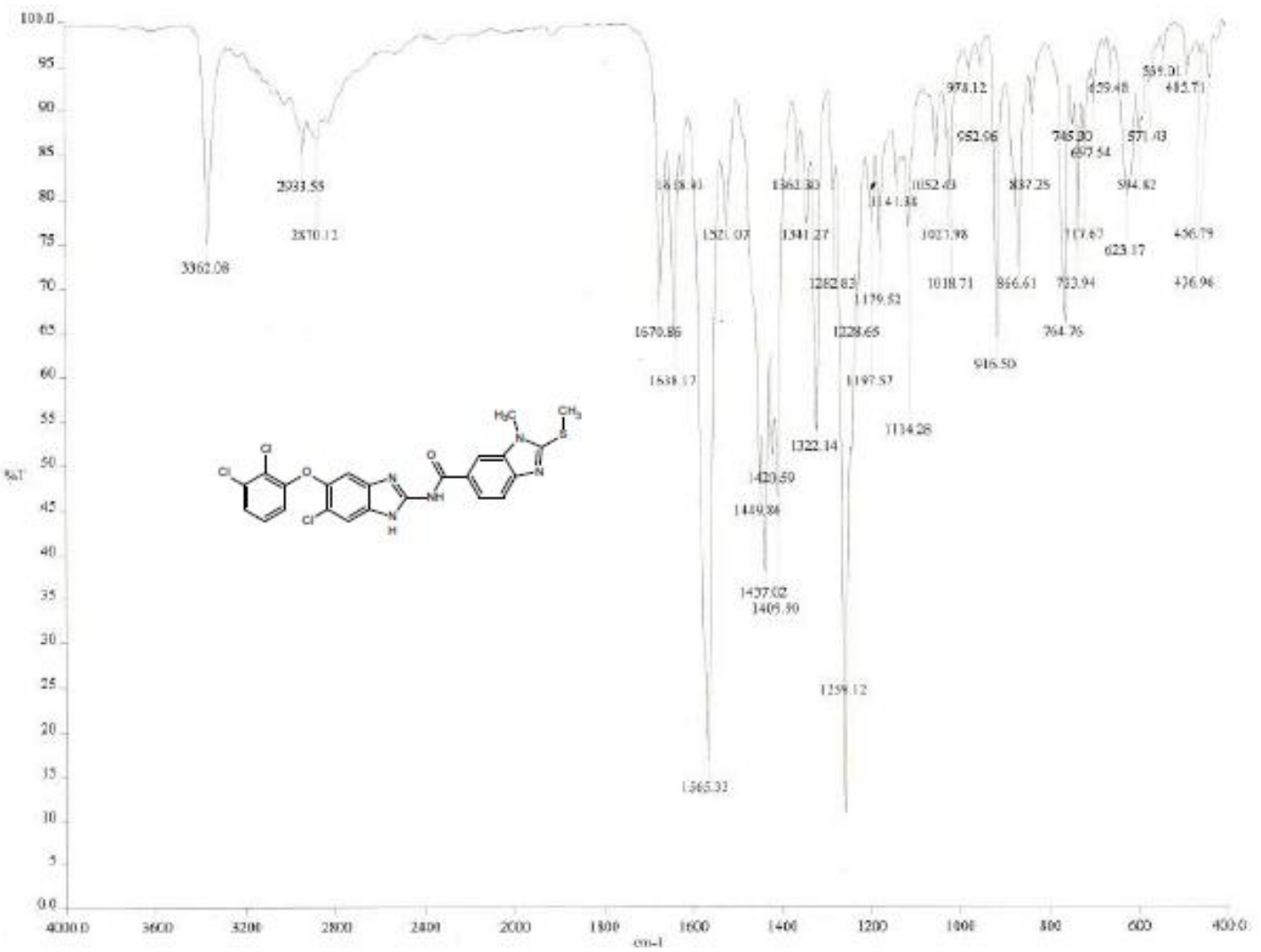
Espectro 64. IR (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1H-benzimidazol-2-il]amina (**30**).



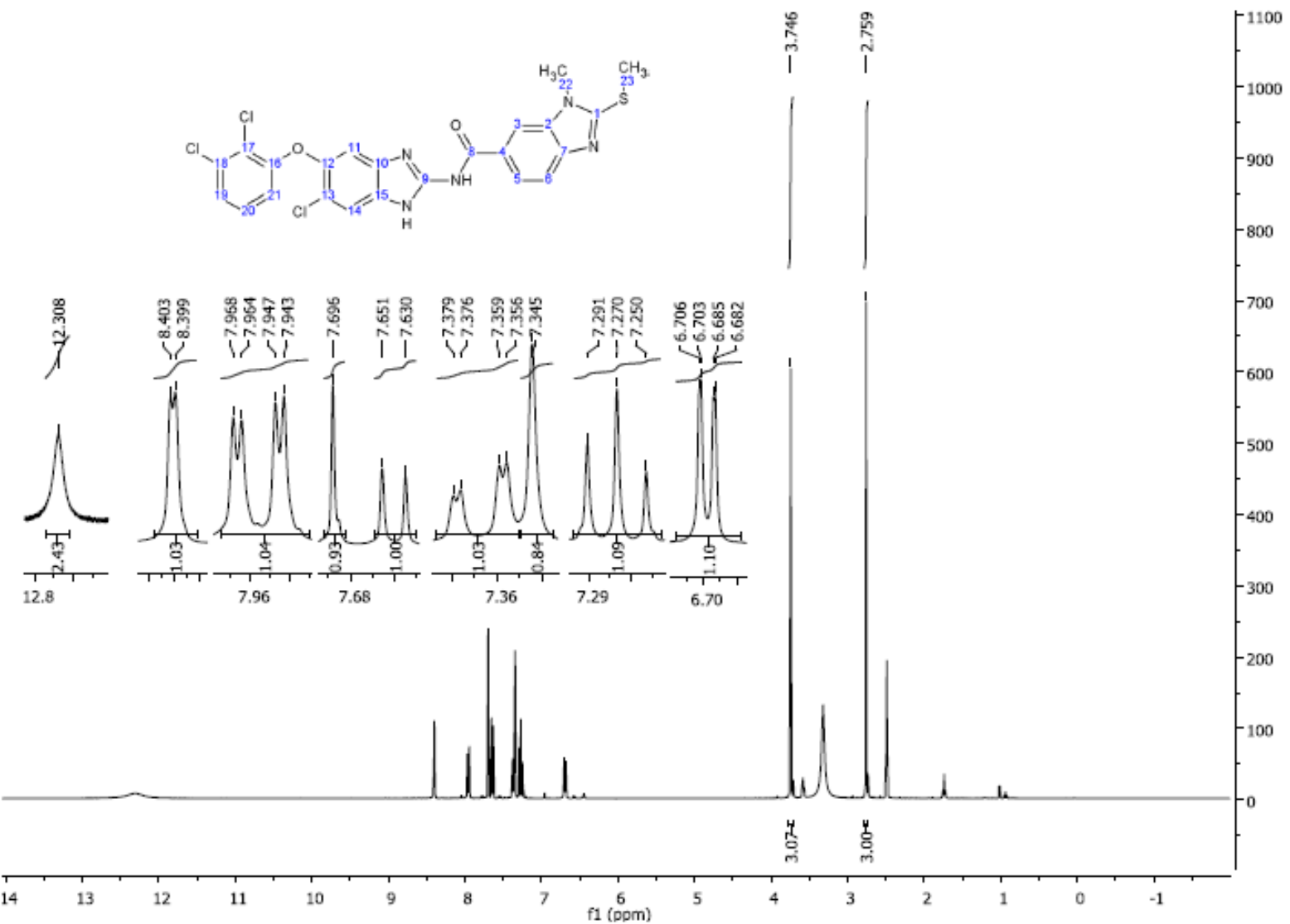
Espectro 65. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400MHz, δ en ppm) de: [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-bencimidazol-2-il]amina (**30**).



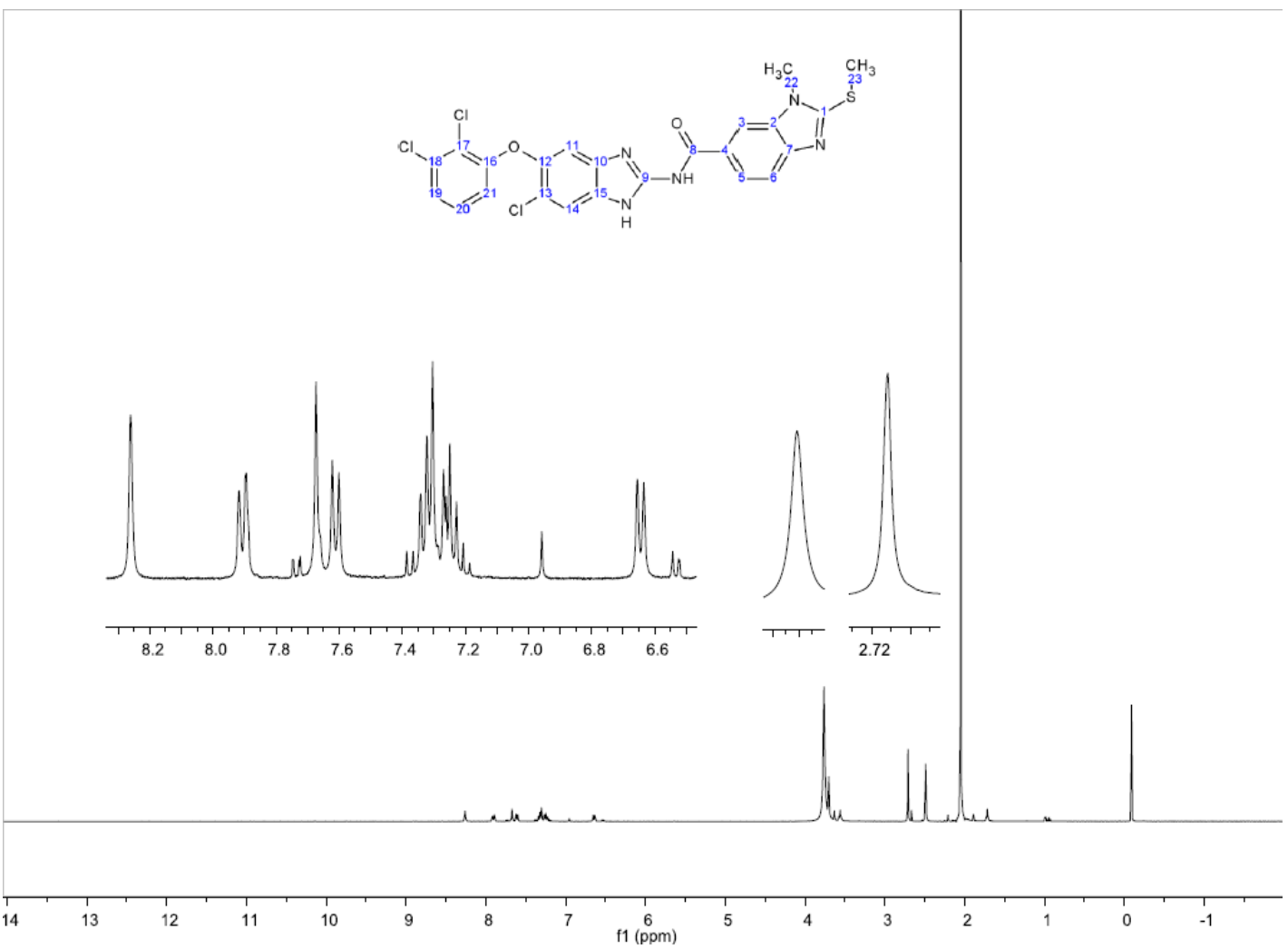
Espectro 66. EM (FAB⁺, *m/z*) de: [6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1H-bencimidazol-2-il]amina (30).



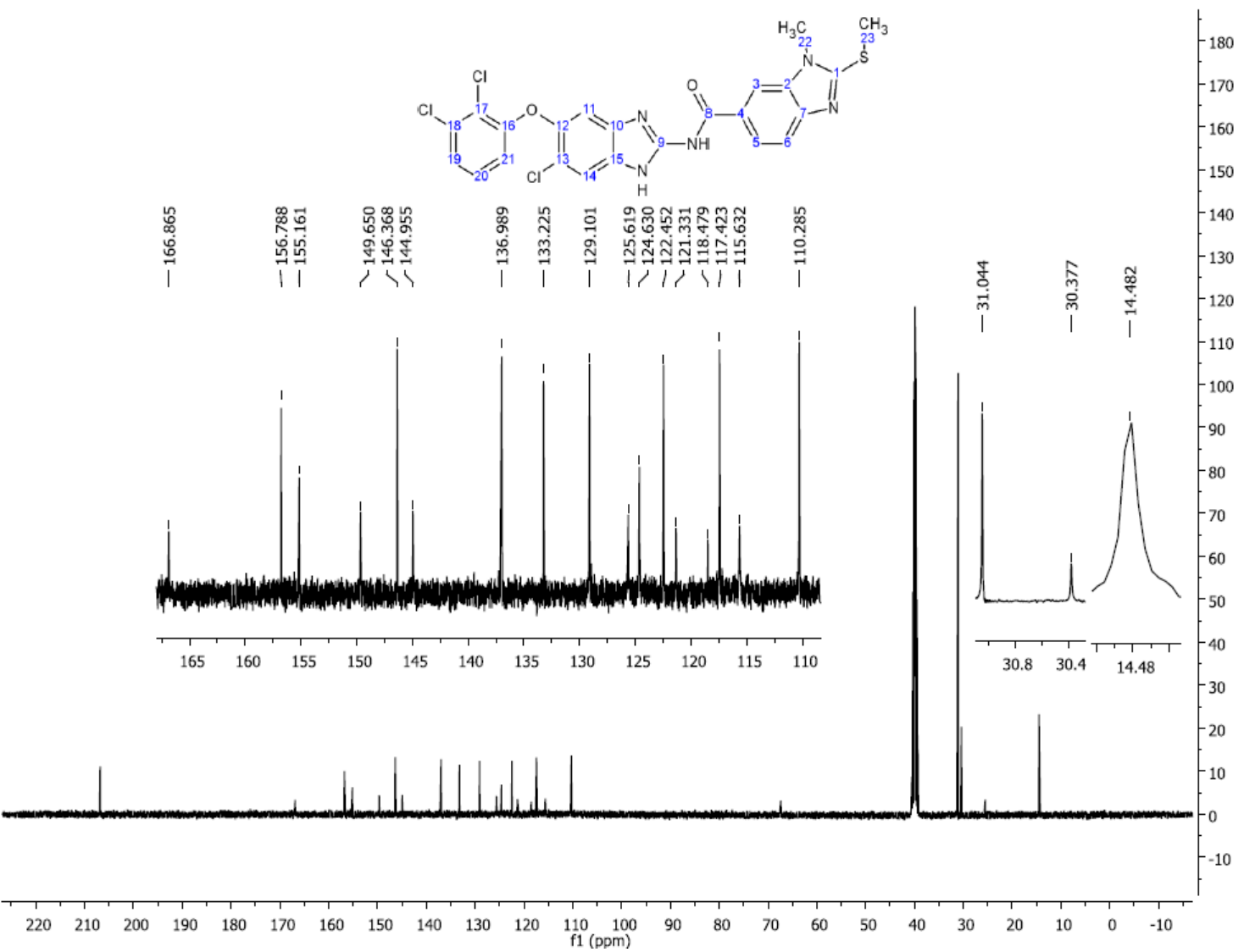
Espectro 67. IR (FTIR por reflectancia, cm^{-1}) de: N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-ilo]-1-metil-2-(metilo)-1H-benzimidazol-6-carboxamida **B3 (34)**.



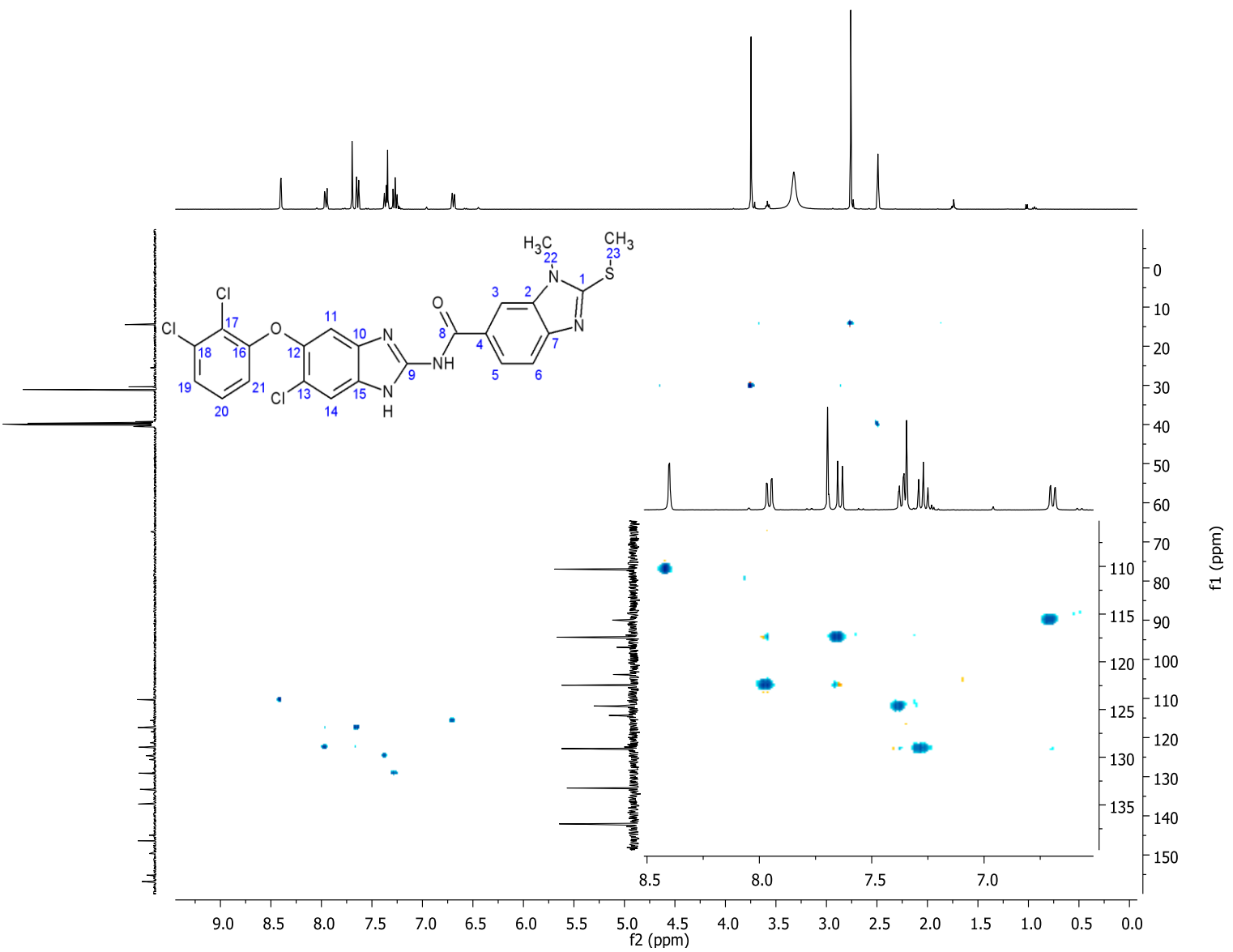
Espectro 68. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) de: N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metililo)-1H-benzimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



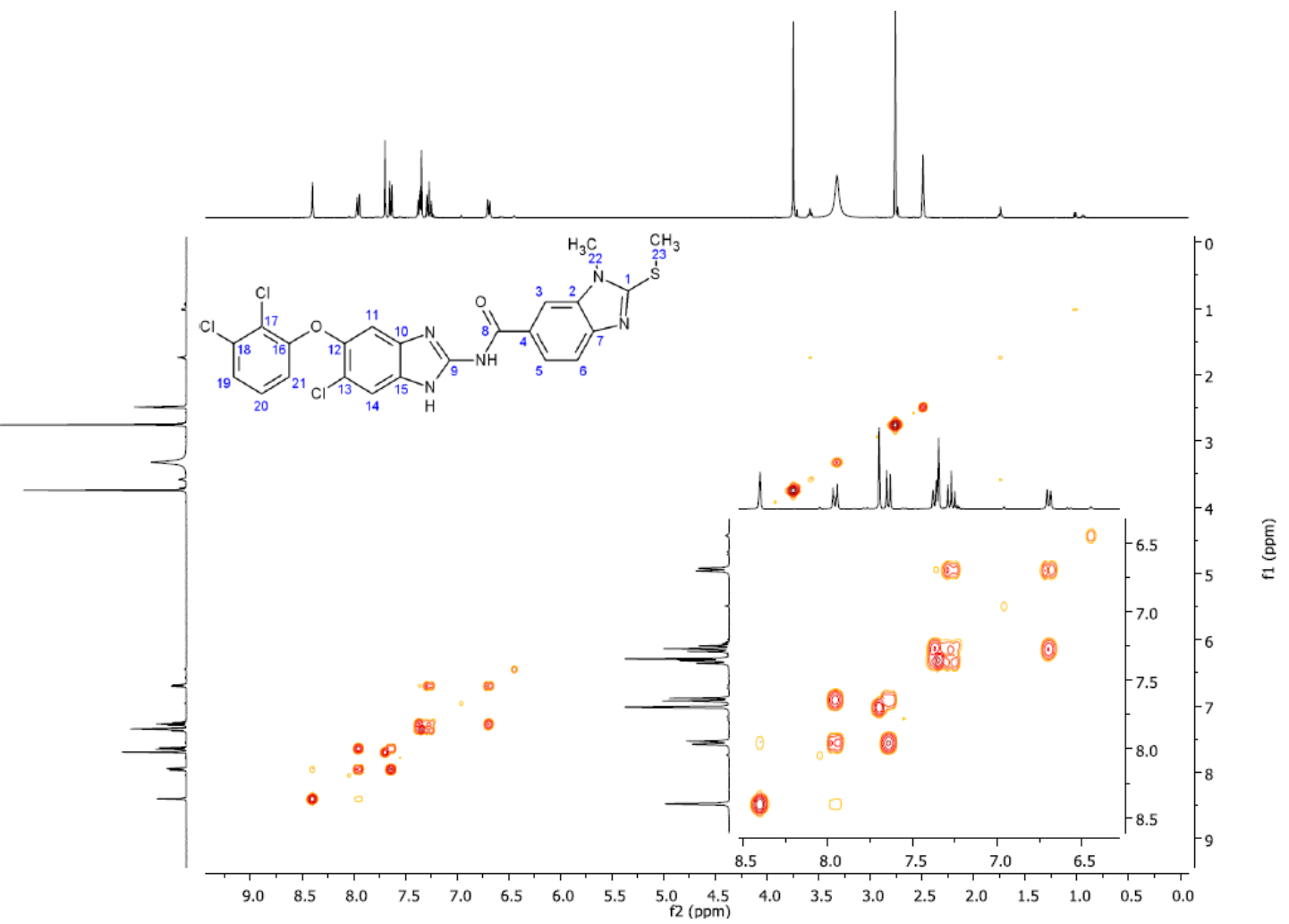
Espectro 69. RMN ^1H (int. con D_2O , δ en ppm) de: *N*[(6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*benzimidazol-2-il)-1-metil-2-(metilo)-1*H*benzimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



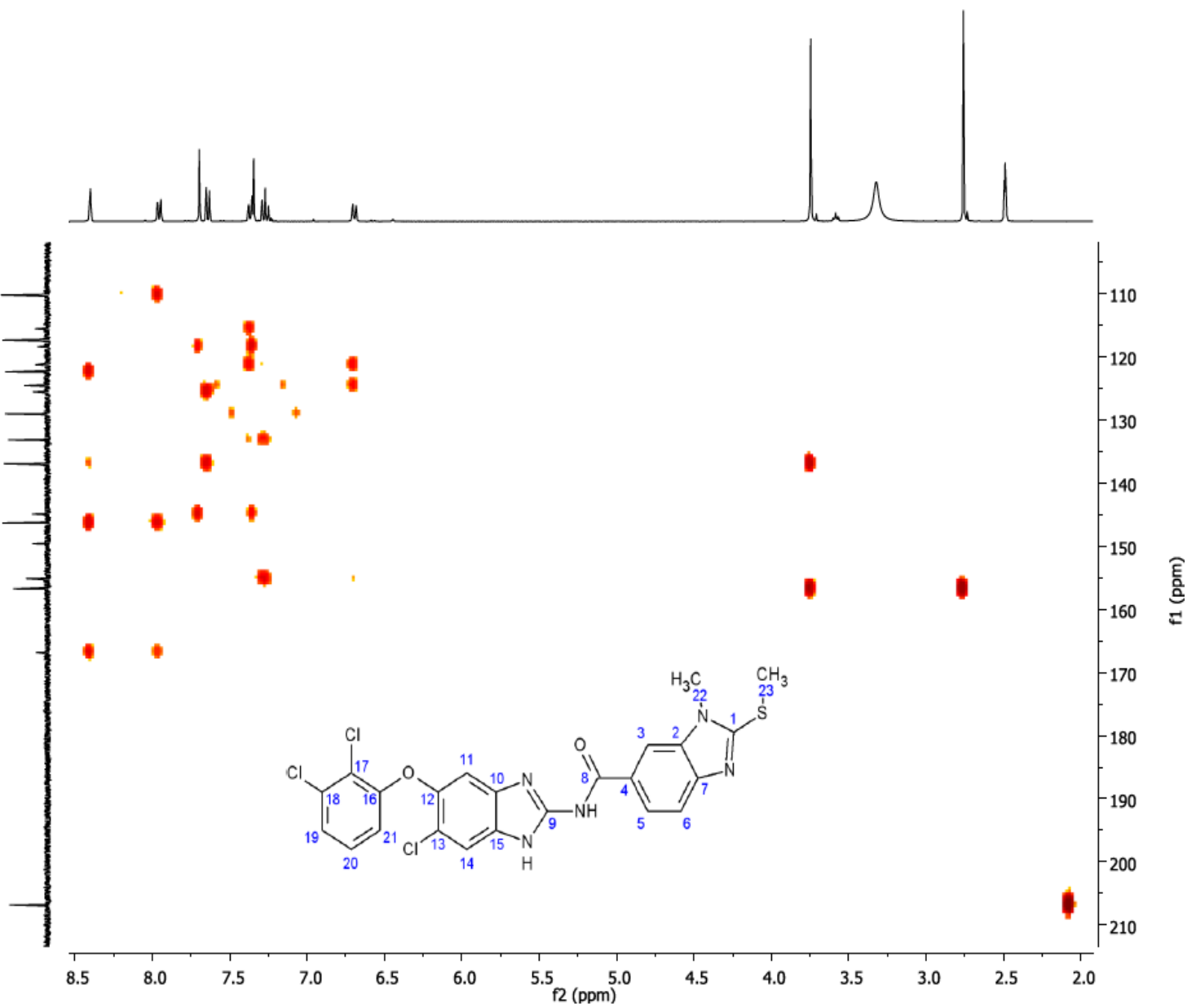
Espectro 70. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 101 MHz, δ en ppm) de: N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1-H-bencimidazol-2-[[1-(2-(militio)-1-H-bencimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



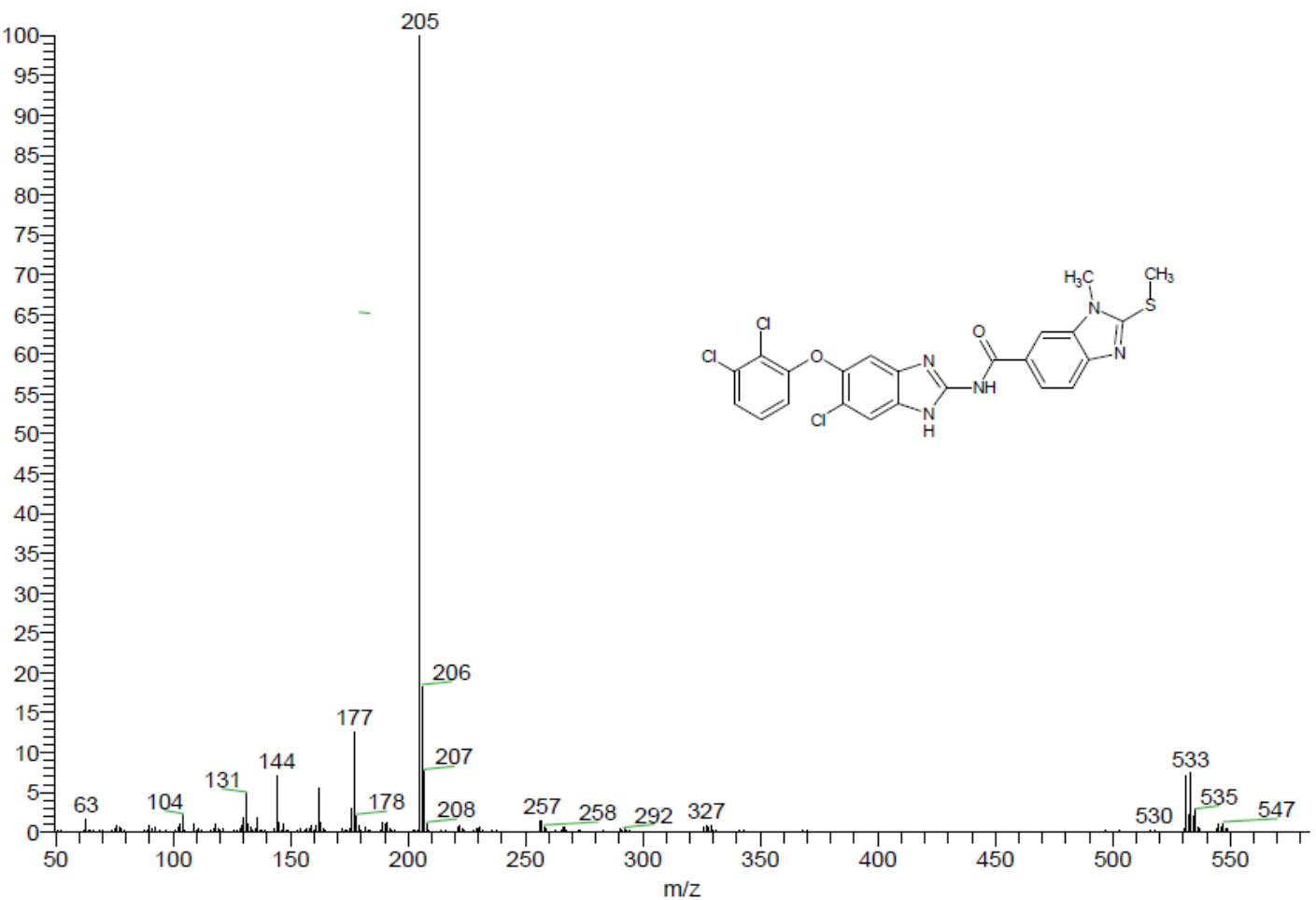
Espectro 71. HSQC (¹H-¹³C, δ en ppm) de: *N*[(6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilitio)-1*H*-benzimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



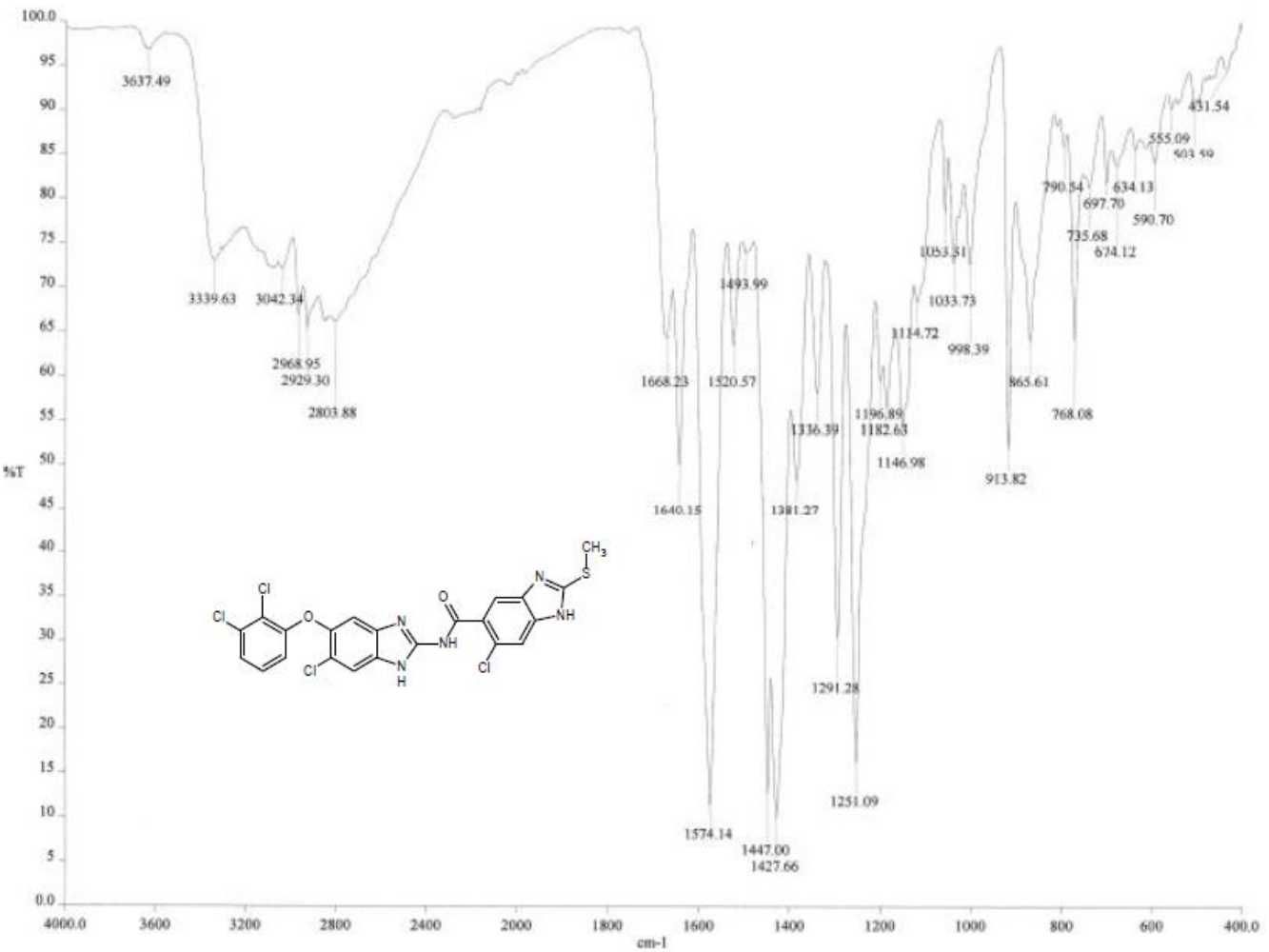
Espectro 72. COSY (^1H - ^1H , δ en ppm) de: *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilito)-1*H*-benzimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



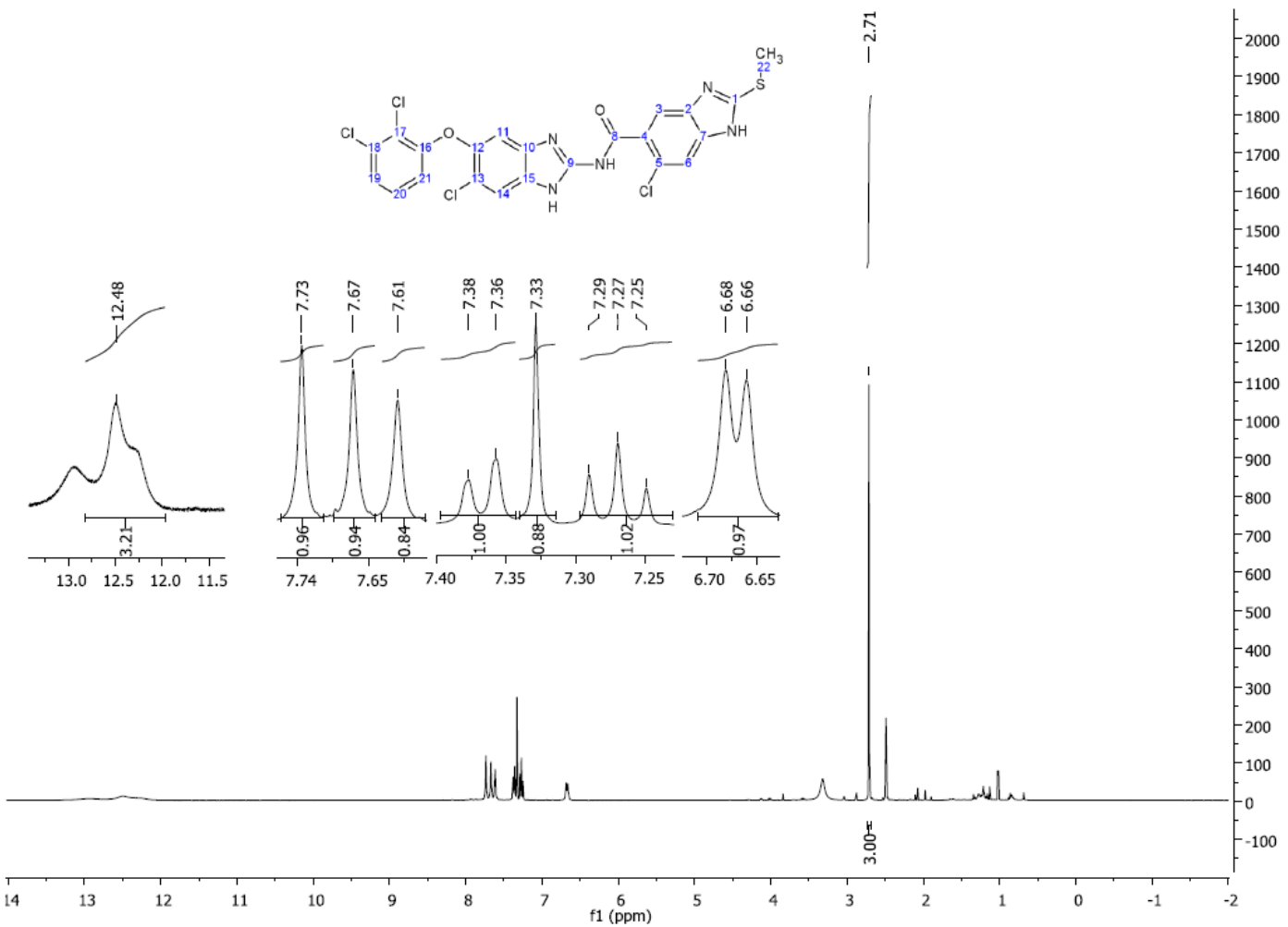
Espectro 73. HMBC (¹H-¹³C, δ en ppm) de: *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilto)-1H-benzimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



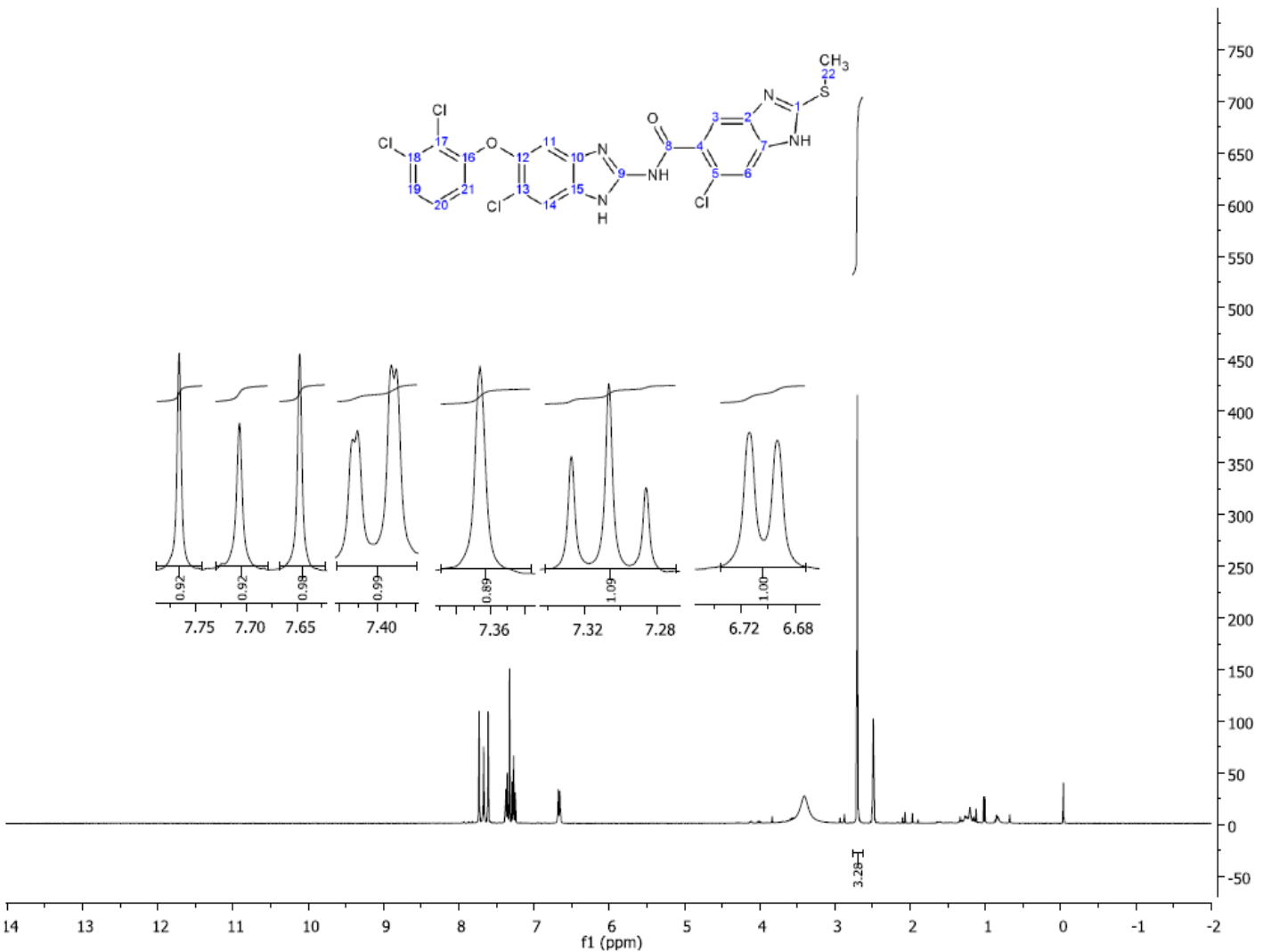
Espectro 74. EM (ID/E, m/z) de: *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida **B3** (**34**).



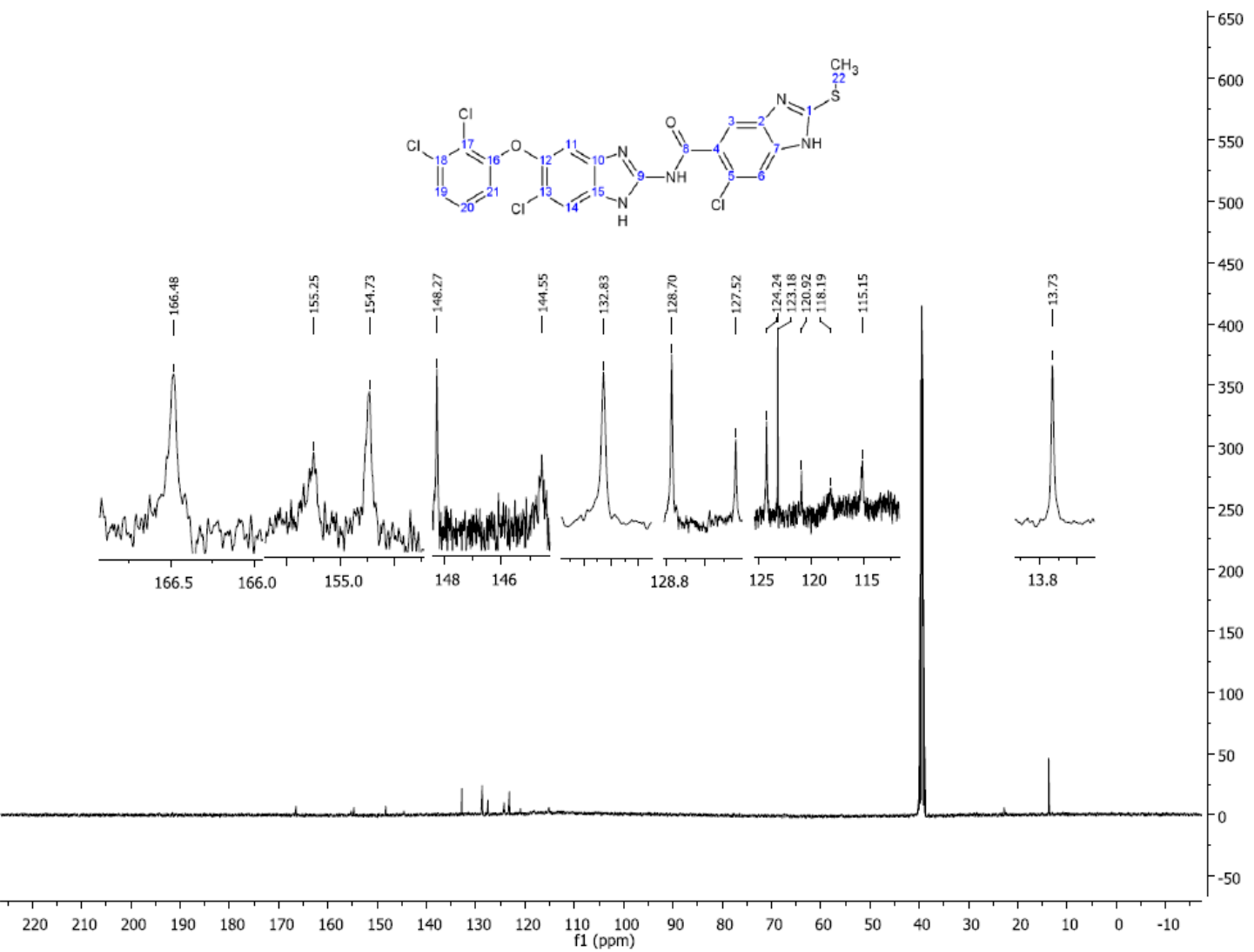
Espectro 75. IR (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: 6-cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-yl]-2-(metilito)-1H-benzimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**.



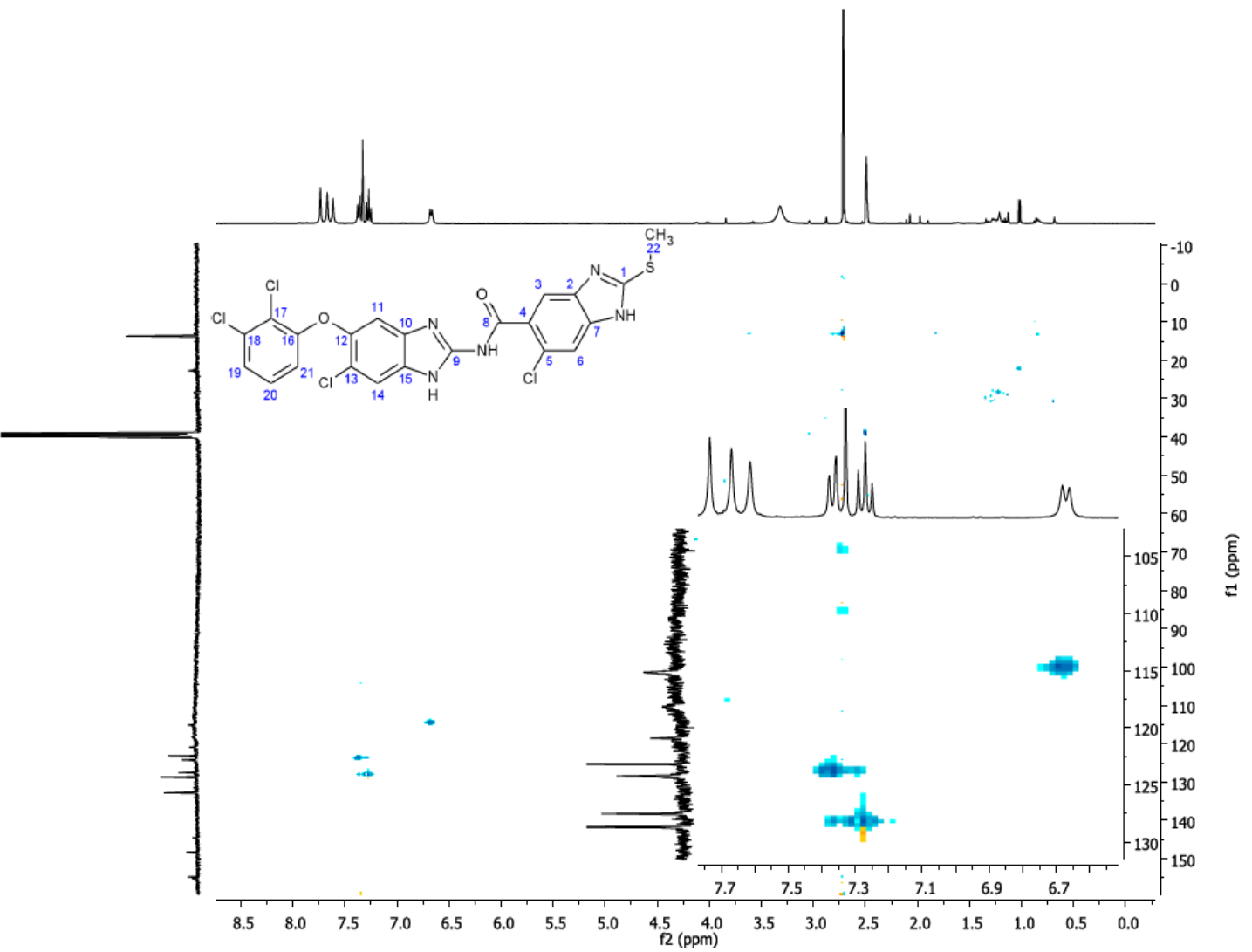
Espectro 76. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) de: 6-cloro-*N*[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1-*H*-benzimidazol-2-il]-2-(metilo)-1-*H*benzimidazol-5-carboxamida **B4** (35).



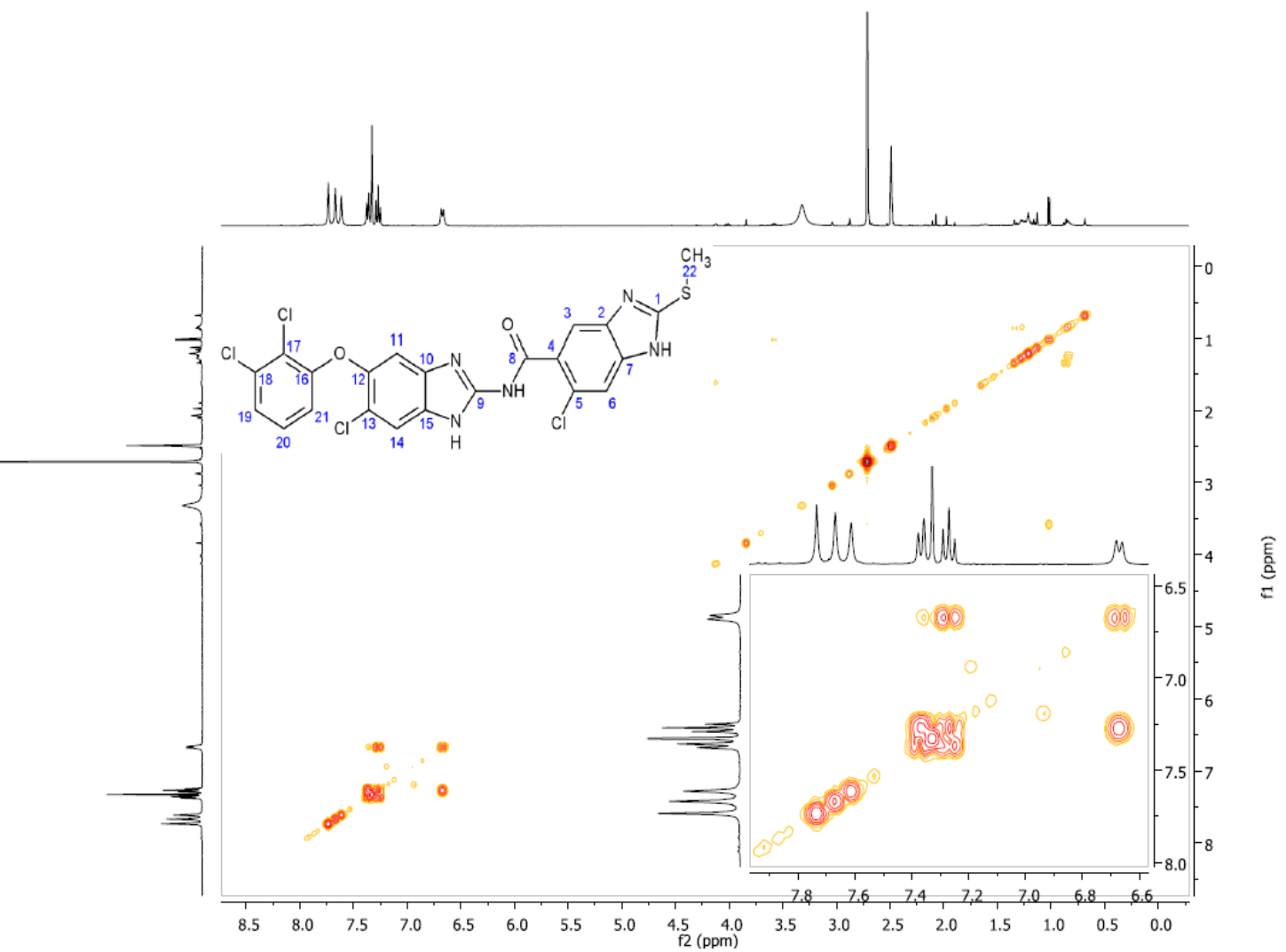
Espectro 77. RMN ^1H (int. con D_2O , δ en ppm) de: 6-cloro-N[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-bencimidazol-2-il]-2-(metilo)-1H-bencimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**.



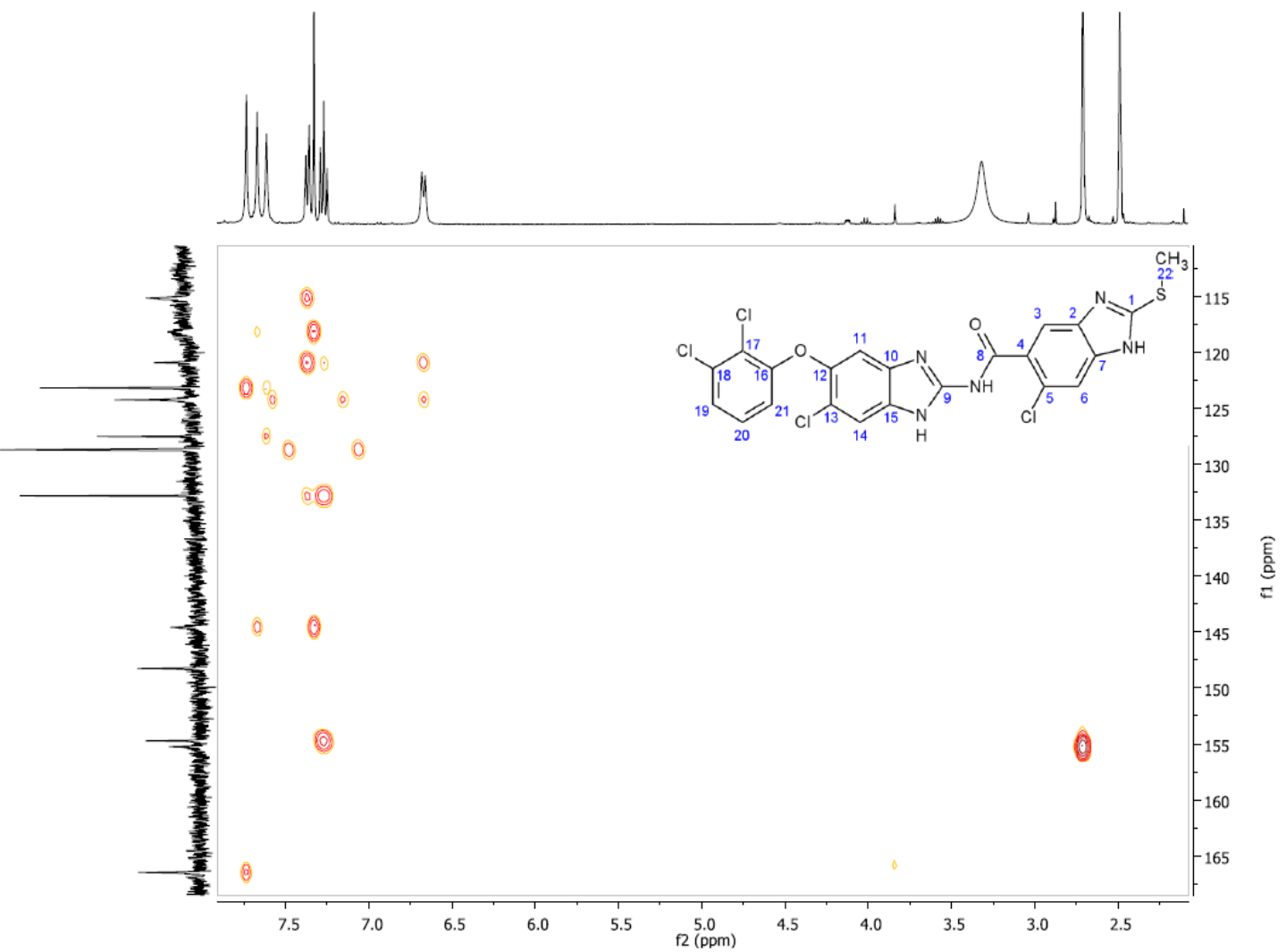
Espectro 78. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz, δ en ppm) de: 6-cloro-*N*[(6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metilo)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida **B4** (**35**).



Espectro 79. HMQC (^1H - ^{13}C , δ en ppm) de: 6-cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]-2-(metilitio)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**.

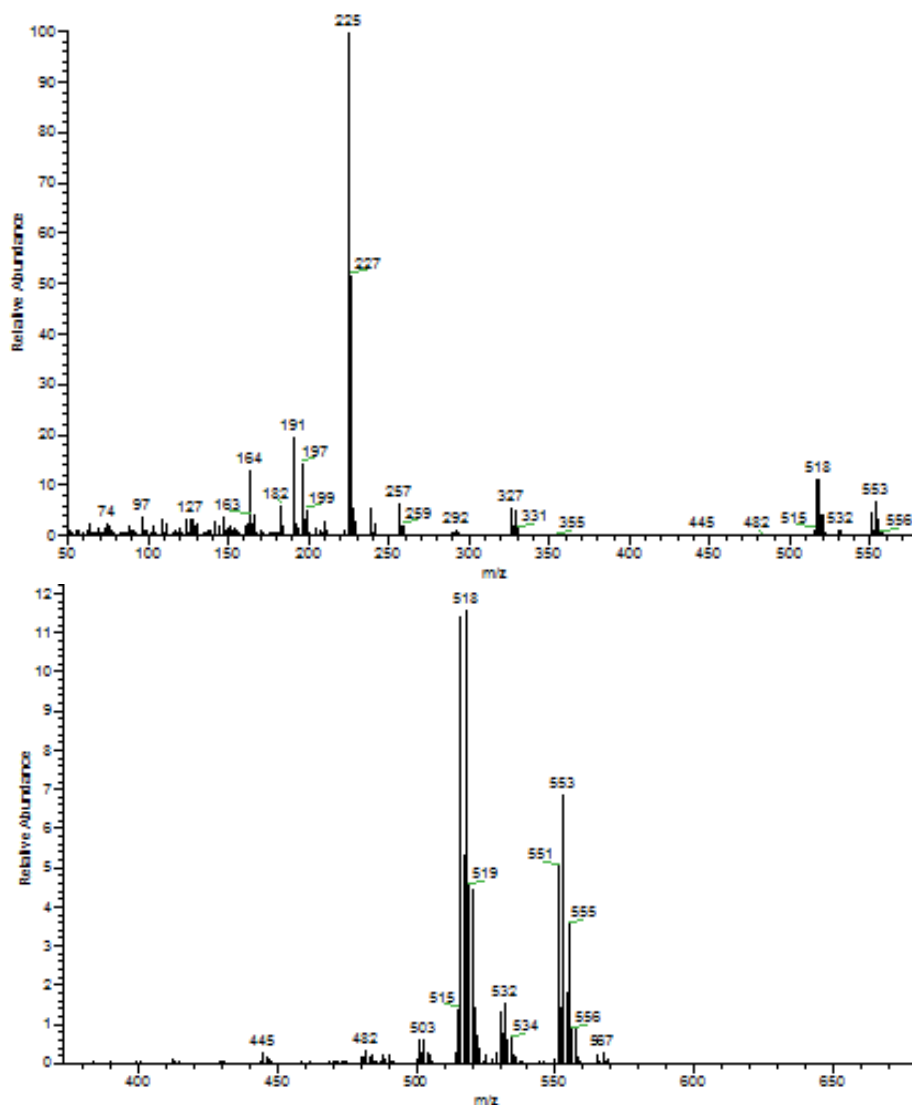


Espectro 80. COSY (¹H-¹H, δ en ppm) de: 6-cloro-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-il]-2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**.



Espectro 81. HMBC (^1H - ^{13}C , δ en ppm) de: 6-cloro-*N*[(6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*benzimidazol-2-il)-2-(metilto)-1*H*benzimidazol-5-carboxamida **B4** (**35**).

1.



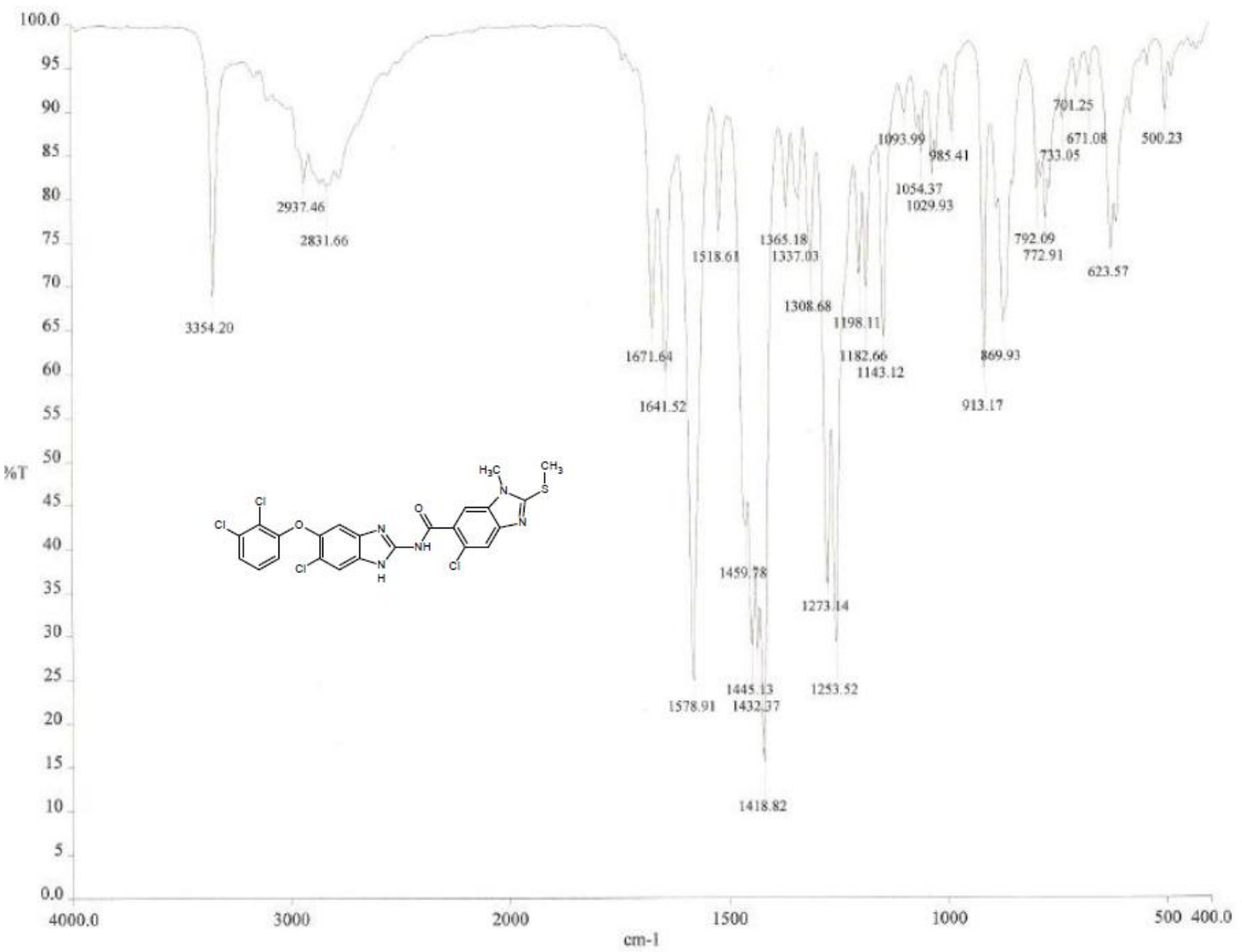
2.

Elemental composition search on mass 550.95

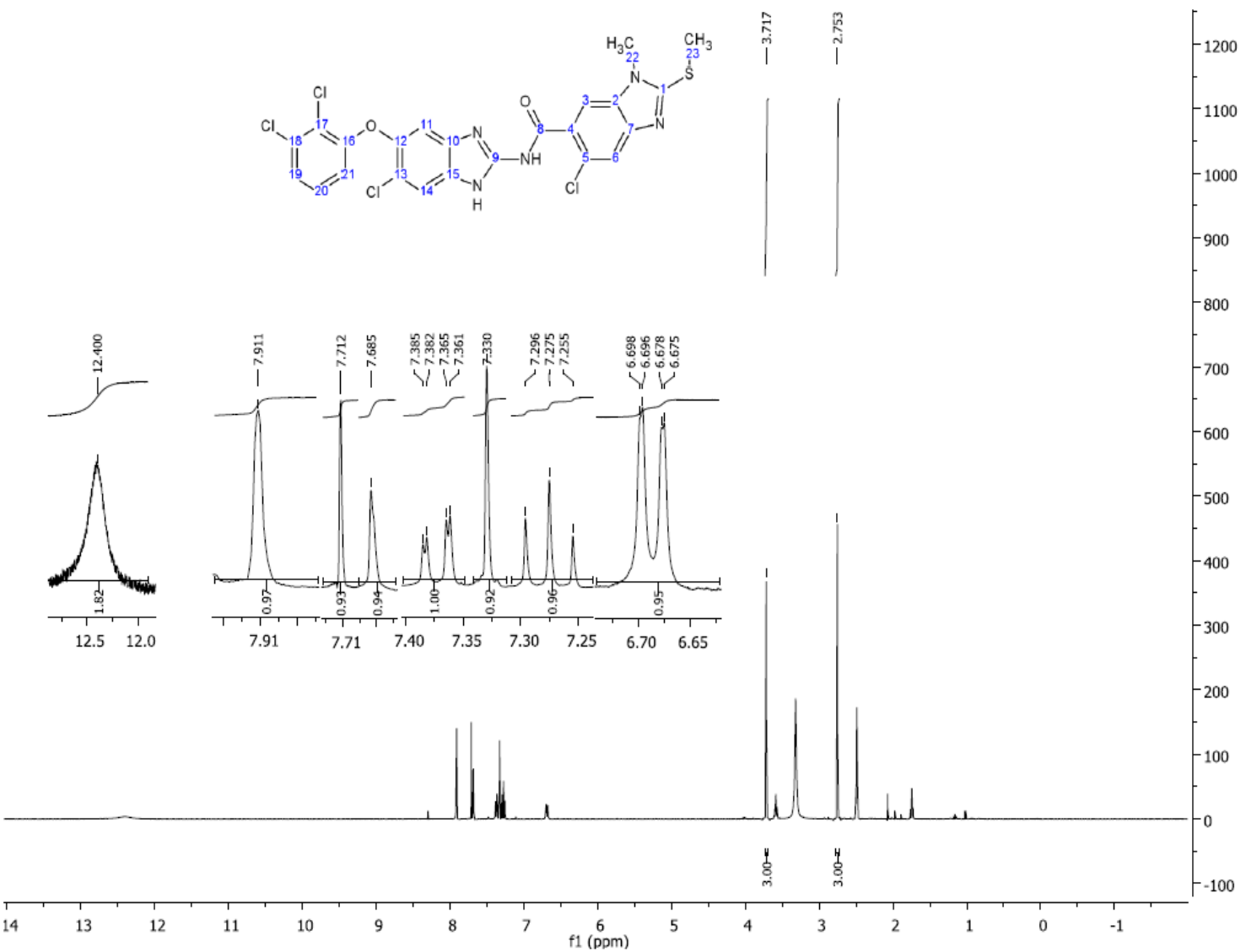
m/z= 545.95-555.95

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
550.9527	550.9539	-2.10	17.0	C ₂₂ H ₁₃ O ₂ N ₅ ³⁵ Cl ₄ ³² S ₁

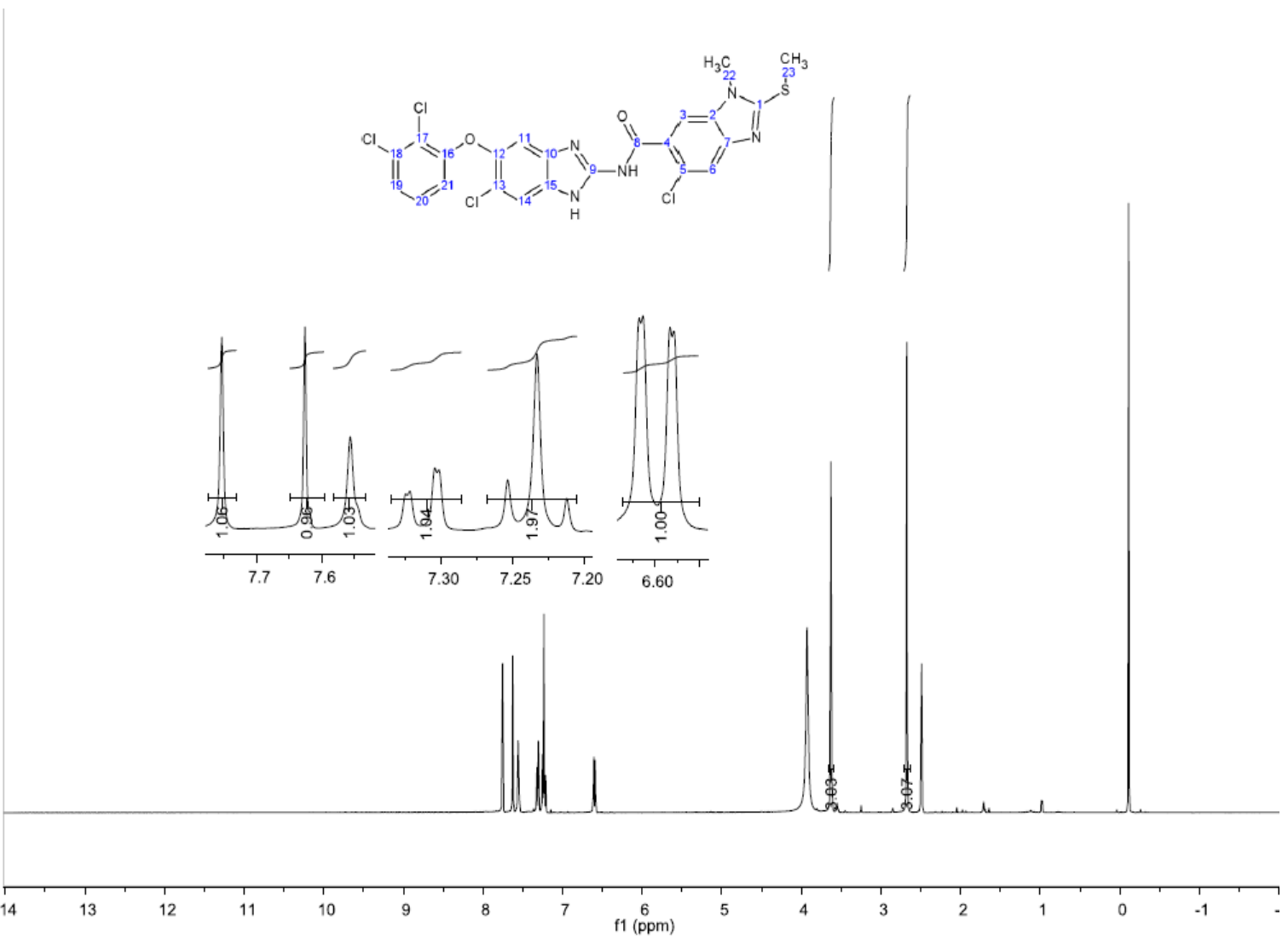
Espectro 82. 1) EM (ID/IE); 2) EM (HR/IE, *m/z*) de: 6-cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida **B4 (35)**.



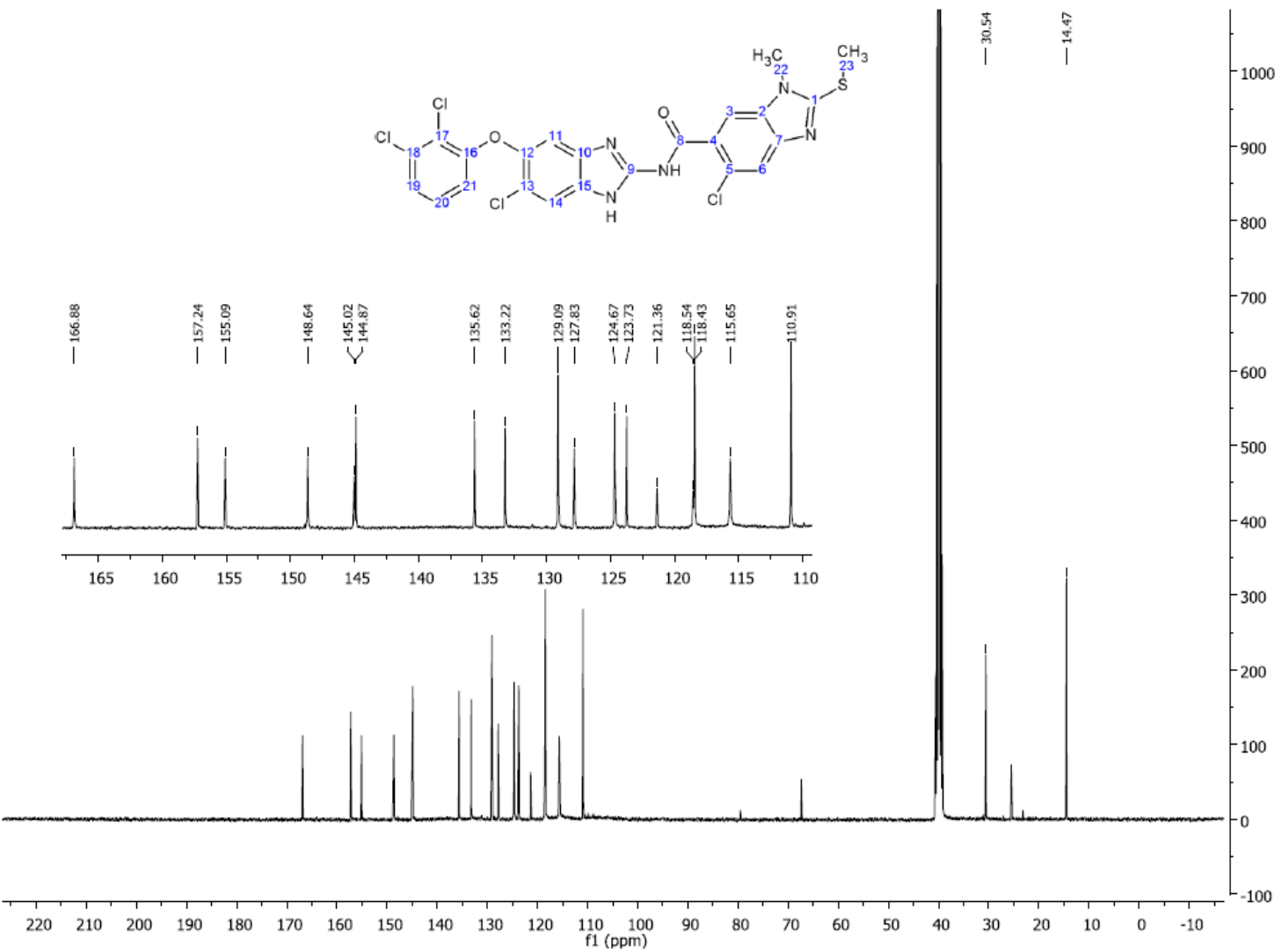
Espectro 83. (FTIR por reflectancia, cm⁻¹) de: 5-cloro-N-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metil)-1H-benzimidazol-6-carboxamida **B6 (36)**.



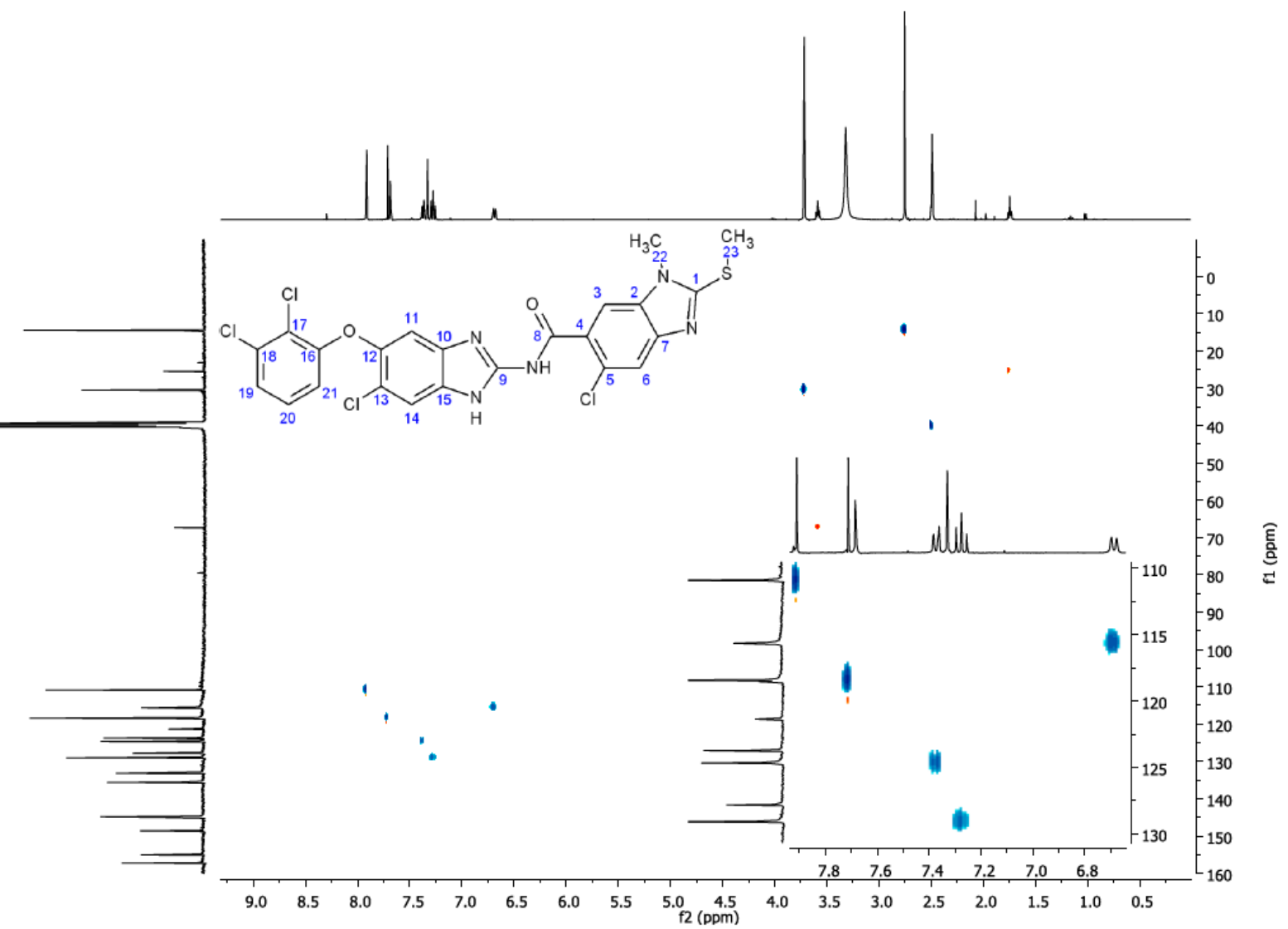
Espectro 84. (FTIR por reflectancia, cm^{-1} de: 5-cloro-N[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilo)-1H-bencimidazol-6-carboxamida **B6 (36)**).



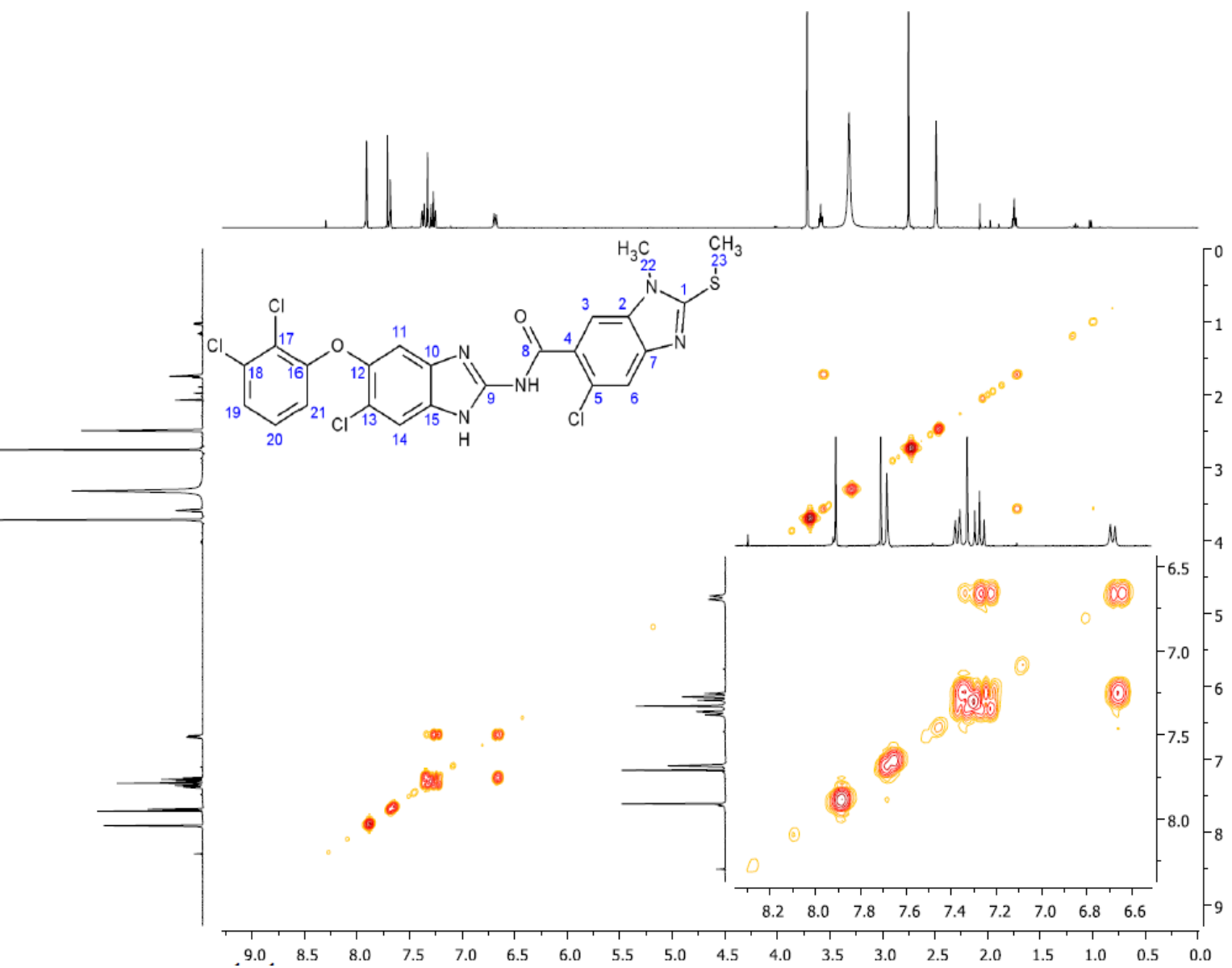
Espectro 85. ^1H (nt. con D_2O δ en ppm) de: 5-cloro-N[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilto)-1H-benzimidazol-6-carboxamida **B6** (**36**).



Espectro 86. Espectro 78, RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm) de: 5-cloro-*N*[(5-cloro-6-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida **B6** (**36**).

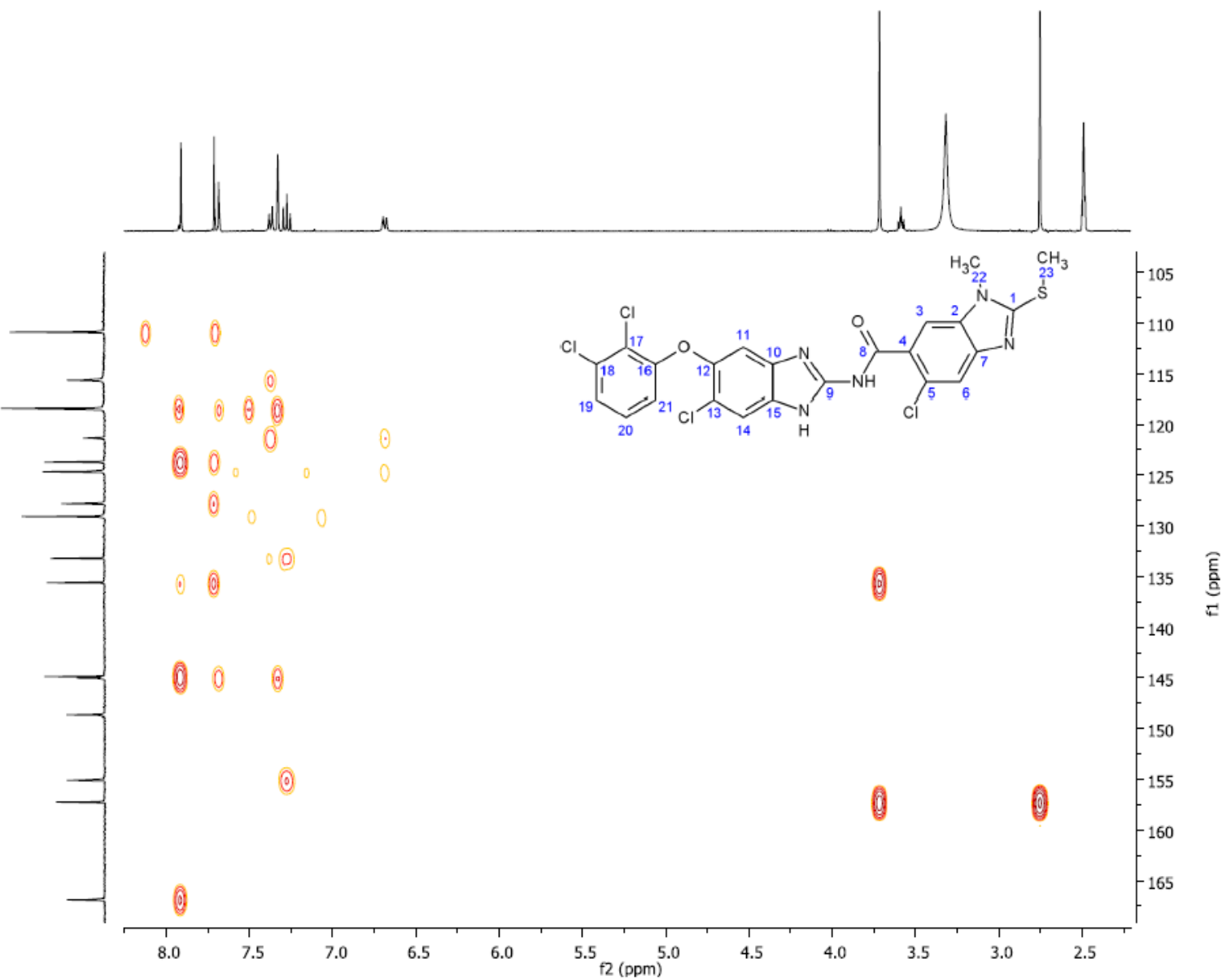


Espectro 87. HSQC (^1H - ^{13}C , δ en ppm) de: 5-cloro-*N*[(5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-benzimidazol-2-ilo)-1-metil-2-(metilo)-1*H*-benzimidazol-6-carboxamida **B6** (**36**).

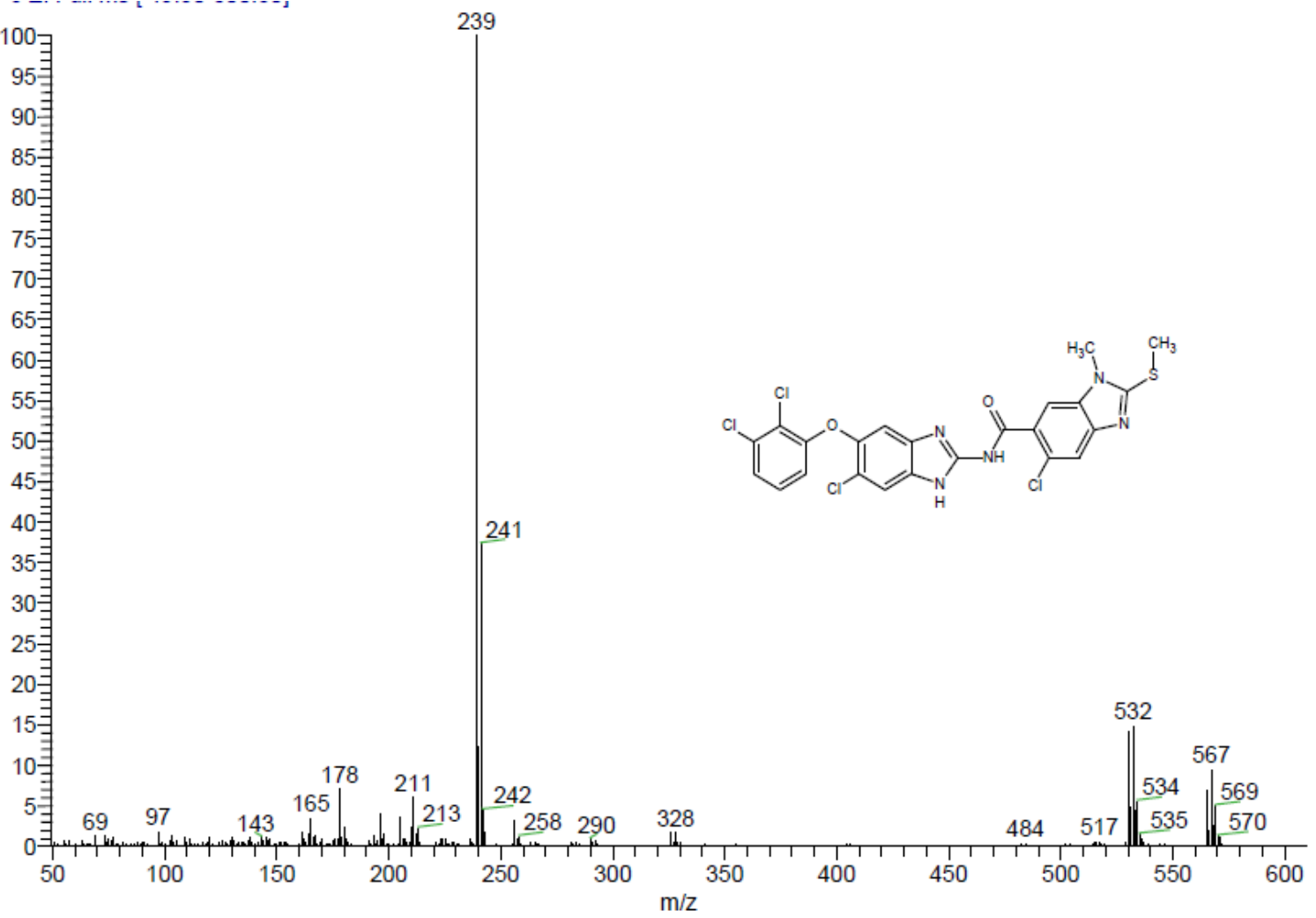


Espectro 88. COSY (^1H - ^1H , δ en ppm) de: 5-cloro-*N*-(5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il)-1-metil-2-(metil)-1*H*-benzimidazol-6-carboxamida **B6** (**36**).

APÉNDICE II. ESPECTROS



Espectro 89. HMBBC (^1H - ^{13}C , δ en ppm) de: 5-cloro-*N*[(5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxy)-1*H*-benzimidazol-2-il)-1-metil-2-(metil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida **B6** (36)].



Espectro 90. EM (ID/E, m/z) de: 5-cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida **B6 (36)**.