



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE BENCIMIDAZOLES 1,2,7-  
TRISUSTITUIDOS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. ADRIANA LISSETH LUQUE DIAZ

TUTOR

Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO JUNIO 2016



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE BENCIMIDAZOLES 1,2,7-  
TRISUSTITUIDOS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. ADRIANA LISSETH LUQUE DIAZ



CIUDAD DE MÉXICO

2016

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente:	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal:	Dr. Roberto Martínez
Vocal:	Dra. Lilián Yépez Mulia
Vocal:	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez
Secretario:	Dr. Alejandro Cordero Vargas

## **LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Este trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Laboratorio 122, del Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Parte de este proyecto se presentó en el siguiente congreso:

“XII reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica”, poster “Síntesis de bencimidazoles 1,2,7–trisustituidos”, marzo 10–11, 2016, Silao, Guanajuato, México.

*A Dios por ser la mejor compañía y fortaleza que he podido tener*

*A mis padres Mónica y Arturo, gracias a ellos he llegado hasta donde estoy*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y crecer en el ámbito científico y personal.

Al doctor Rafael Castillo Bocanegra por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación durante el desarrollo de este trabajo y por compartir sus conocimientos y experiencia científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 308208 otorgada durante la realización de mis estudios de maestría. También agradezco al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia a congresos y la impresión de tesis.

Al Dr. Alfredo Téllez Valencia por realizar las evaluaciones de inhibición enzimática reportadas en este documento.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Dra. Minerva Monroy y M. en C. Maricela Gutiérrez Franco, por la determinación de los espectros de RMN e IR respectivamente, y a la Dra. Inés Fuentes Noriega, del Laboratorio de Biofarmacia, por facilitar el uso del equipo de masas.

Al comité sinodal: Dra. Rachel Mata, Dr. Roberto Martínez, Dra. Lilián Yépez, Dr. José Alfredo Vázquez y el Dr. Alejandro Cordero por sus observaciones y recomendaciones al presente trabajo de grado.

A todos aquellos que de alguna forma me dieron su apoyo y compañía durante mi estancia en México, especialmente a mis amigos colombianos y compañeros del 122.

A mi familia, mis papás y hermanos que siempre me acompañaron con los mejores deseos a pesar de la distancia.

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ATP	Adenosín Trifosfato
ATR	Reflectancia Total Atenuada
cm	Centímetros
CCF	Cromatografía en Capa Fina
COSY	Espectroscopía de Correlaciones (Correlation Spectroscopy)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionización por electronebulización (Electrospray ionization)
eV	Electronvoltios
MS	Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)
g	Gramos
g/mol	gramos por mol
h	Horas
HMBC	Correlación heteronuclear a varios enlaces (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HMRS	Espectrometría de masas de alta resolución (High-Resolution Mass Spectrometry)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica sencilla (Heteronuclear Single-Quantum Correlation)
Hz	Hertzios

IR	Infrarrojo
$J$	Constante de acoplamiento
$m/z$	Relación masa carga
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mmoles	Milimoles
min	Minutos
NOESY	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pf	Punto de fusión
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	partes por millón
$R_f$	Retention Factor
RMN $^{13}\text{C}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN $^1\text{H}$	Resonancia Magnética Nuclear de protón
TcTIM	Triosafosfato isomerasa del <i>Trypanosoma cruzi</i>
HsTIM	Triosafosfato isomerasa de Humano
$\nu$	Longitud de onda
$\delta$	Desplazamiento químico
$\mu\text{M}$	Micromolar



## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1. ENFERMEDADES PARASITARIAS COMO PROBLEMA DE SALUD GLOBAL	2
1.2. TRIPANOSOMIASIS AMERICANA	3
1.3. ASPECTOS SINTÉTICOS DE BENCIMIDAZOLES 2-SUSTITUIDOS	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1. OBJETIVO GENERAL	14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. PARTE EXPERIMENTAL	15
5.1. PREPARACIÓN DEL 2,3-DIAMINOBENZOATO DE METILO ( <b>8</b> )	16
5.2. SÍNTESIS DE 2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <b>9</b> )	20
5.3. PREPARACIÓN DE 2-AMINO-3-[(4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO}BENZOATO DE METILO ( <b>10</b> )	21
5.4. CICLOCONDENSACIÓN INTRAMOLECULAR DE 2-AMINO-3-[(4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO}BENZOATO DE METILO ( <b>10</b> )	22
5.5. REACCIÓN DE METILACIÓN DE 2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <b>9</b> ) Y 2-(4-NITROBENCIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <b>12</b> )	23
5.6. SÍNTESIS DE 1-METIL-2-(4-NITROBENZOIL)-1H-BENCIMIDAZOL-4-CARBOXILATO DE METILO ( <b>14</b> )	25

5.7.	HIDRÓLISIS BÁSICA DE LOS ÉSTERES <u>13a,b</u> . OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXÍLICO ( <u>15a</u> ), 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-4-CARBOXÍLICO ( <u>15b</u> )	26
5.8.	PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA TIM DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
6.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
6.1.	PREPARACIÓN DE 2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <u>9</u> )	30
6.2.	OBTENCIÓN DE 2-AMINO-3-[[{(4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO}BENZOATO DE METILO ( <u>10</u> )	36
6.3.	SÍNTESIS DEL 2-(4-NITROBENCIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <u>12</u> )	39
6.4.	REACCIÓN DE METILACIÓN DE 2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <u>9</u> ) Y 2-(4-NITROBENCIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO ( <u>12</u> )	40
6.5.	OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-7-CARBOXÍLICO ( <u>15a</u> ), 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-4-CARBOXÍLICO ( <u>15b</u> )	48
6.6.	ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> EN LA ENZIMA TcTIM	50
	CONCLUSIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA	53

## RESUMEN

En la actualidad, existe un gran número de estudios en los que se ha comprobado que los compuestos que contienen un núcleo de bencimidazol exhiben un amplio espectro de actividad biológica, como antiinflamatorios, antimicrobianos, anticancerígenos, antihistamínicos, antibacterianos, analgésicos, antiprotozoarios, entre otros. Por esta razón es de gran interés el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas que permitan acceder a este tipo de compuestos, y una vez obtenidos realizar la correspondiente evaluación de su actividad biológica.

Debido a que un gran número de derivados del bencimidazol se han perfilado como potenciales antiprotozoarios y algunos de éstos como candidatos prometedores en la búsqueda de nuevos inhibidores de la enzima triosoafosfato isomerasa del *Trypanosoma Cruzi* (TcTIM). En el presente Trabajo de Investigación se ha desarrollado la síntesis de una serie de derivados del 1-metilbencimidazol, para los cuales se presentan por primera vez sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas. La obtención de dichos compuestos se logró mediante la implementación de una ruta sintética empleando el 2,3-diaminobenzoato de metilo como material de partida y se desarrolló en 3 pasos, dentro de los cuales se destacan dos transformaciones: una reacción *one-pot* entre dicho sustrato y el 4-nitrobenzaldehído en presencia de un sistema  $H_2O_2/HCl$ , y una serie de reacciones en las que ocurre el acoplamiento entre el mismo sustrato y el ácido 4-nitrofenilacético empleando DCC, seguido de la ciclocondensación del producto monoacilado a reflujo en presencia de ácido acético.

Los estudios de actividad inhibitoria sobre la enzima triosoafosfato isomerasa recombinante de *Trypanosoma Cruzi* arrojaron resultados negativos para los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol ya que estos no presentaron ningún porcentaje de inhibición; sin embargo, aquellos que poseen en su estructura el grupo N-H lograron inhibir la enzima, siendo el compuesto **9** el más activo (72%).

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias continúan siendo uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial ya que generan altos índices de mortalidad. Dentro de estas enfermedades se encuentran las causadas por los parásitos del género *trypanosoma*: las tripanosomiasis. Dentro de éstas destaca la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, un tipo de enfermedad cardíaca que se desarrolla después de décadas de adquirir la infección por un parásito llamado *Trypanosoma cruzi*. Esta infección es de por vida, y los serios problemas cardíacos y gastrointestinales que caracterizan la enfermedad en su fase crónica se hacen evidentes en el 10–30% de las personas infectadas.

Esta enfermedad que se transmite a través del contacto con los insectos en las zonas rurales de muchos países de Centro y Sudamérica, las transfusiones de sangre o trasplantes de órganos de personas infectadas, solo cuenta con dos medicamentos para su tratamiento, nifurtimox y benznidazol,<sup>1</sup> los cuales actualmente son los más recomendados; sin embargo, éstos han presentado muchas limitaciones, tales como la falta de eficacia, poca tolerancia y producción limitada.<sup>2</sup> Con este panorama se hace evidente la necesidad de desarrollar fármacos más seguros y eficaces.

Mediante el uso de acoplamiento molecular se demostró que es posible diseñar derivados del bencimidazol que inactivan selectivamente a una enzima vital, la triosafosfato isomerasa (TcTIM), la cual se encuentra involucrada en los procesos energéticos del parásito causante de la tripanosomiasis americana. En el presente trabajo se planteó la posibilidad de acceder a este tipo de derivados mediante una ruta de síntesis propuesta, de tal manera que una vez que fueran identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, se pudiera evaluar su potencial para inactivar dicha enzima en estudios *in vitro*.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. ENFERMEDADES PARASITARIAS COMO PROBLEMA DE SALUD GLOBAL

Desde hace algunas décadas, las enfermedades causadas por protozoos han sido reconocidas como una amenaza mundial significativa, debido a que dichos organismos poseen un gran potencial para ocasionar epidemias a través del agua o los alimentos.<sup>3</sup> Estos seres unicelulares además presentan con frecuencia ciclos evolutivos complejos y tienen la capacidad de adaptarse y replicarse donde se hospedan. Este fenómeno explica su larga supervivencia en varios órganos, inclusive en ausencia de síntomas clínicos. A varios protozoos se les ha atribuido un comportamiento oportunista, es decir, que atacan principalmente a pacientes con inmunodeficiencia; entre ellos se encuentran *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *microsporidia*, *Giardia lamblia* y *Cyclospora cayetanensis*. Los parásitos de la malaria, o plasmodios, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Balantidium coli* no presentan este comportamiento oportunista.<sup>4</sup>

Dentro de las parasitosis causadas por protozoarios mencionadas anteriormente se incluye al género *Trypanosoma*, el cual se transmite principalmente por invertebrados, tales como insectos picadores, o aquellos que penetran la piel. Algunas especies representativas son *T. brucei*, causante de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño y *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Como *T. brucei* se encuentra principalmente en África y *T. cruzi* en América, también es frecuente referirse a estas especies como tripanosomas africanos y tripanosomas americanos, respectivamente.<sup>5</sup>

## **1.2. TRIPANOSOMIASIS AMERICANA**

### **1.2.1. Generalidades y epidemiología**

La Tripanosomiasis americana, también conocida como la enfermedad de Chagas, es una enfermedad que se encuentra dentro de las enfermedades tropicales desatendidas y constituye un problema de salud pública en muchos países de Latinoamérica durante las últimas décadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado la tripanosomiasis americana como la cuarta enfermedad más transmisible de gran impacto en la salud pública de Latinoamérica después de la malaria, la tuberculosis y la esquistosomiasis.<sup>6</sup>

En la última década han ocurrido cambios epidemiológicos y la enfermedad se ha expandido a zonas no endémicas. Actualmente, la tripanosomiasis americana es una enfermedad emergente en Europa y Norte América, gracias a la migración de miles de pacientes asintomáticos de países endémicos.<sup>7</sup> Esta infección se presenta durante toda la vida y las personas con la infección prolongada desarrollan los problemas cardiacos y gastrointestinales que caracterizan la enfermedad crónica.

### **1.2.2. Diagnóstico**

#### **Fases de la Enfermedad**

La Tripanosomiasis americana tiene dos diferentes fases: aguda y crónica. La mayoría de casos agudos son asintomáticos, al menos por 6–12 semanas, y ocurre durante la infancia.<sup>8,9</sup> Los síntomas se desarrollan después de alrededor de 8 a 10 días de la invasión del parásito o 20 a 40 días después de una infección por transfusión de sangre; incluyen fiebre prolongada, inflamación del hígado, el bazo y los ganglios linfáticos, y edemas

subcutáneos (localizados o generalizados). Si la transmisión se da por picadura de insecto, frecuentemente hay inflamación en el sitio de infección produciéndose una hinchazón edematosa conocida como chagoma o signo de Romaña, si ésta está cerca de los párpados.<sup>10</sup>

La fase crónica comienza 2 a 3 meses después de la infección, y los pacientes se vuelven asintomáticos, algunos de ellos mostrando señas en electrocardiografía y radiografía de pecho. Alrededor del 60% a 70% de estos casos permanecen en este estado por el resto de su vida. Sin embargo, el 30%–40% restante desarrollan la forma crónica de la enfermedad, que se caracteriza fundamentalmente por compromiso visceral irreversible: cardiomiopatía chagásica, o de tubo digestivo, con mayor frecuencia en intestino o esófago (megasíndromes).<sup>11</sup>

### 1.2.3. Ciclo de vida del *T. cruzi*.

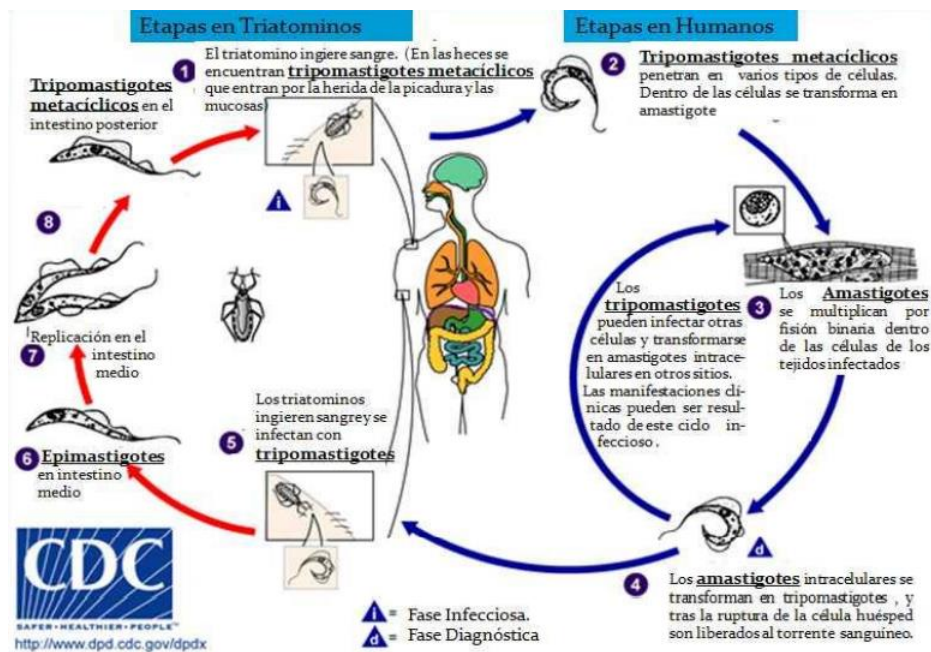


Figura 1. Ciclo vital del *trypanosoma cruzi*(traducción).<sup>12</sup>

El ciclo inicia cuando un triatomino recoge la infección parasitaria al alimentarse de la sangre de un animal o humano infectado. Una vez adentro, el parásito se divide rápidamente en el intestino del insecto y sale en sus heces. Los humanos son infectados por la transmisión del *trypanosoma* por medio de la mordida del triatomino hematófago. El animal defeca al mismo tiempo que bebe la sangre que emana de la herida de la picadura. El parásito es capaz de penetrar a través de heridas en la piel o de la piel delgada como la de los ojos y boca. Este puede infectar las células debajo de tejidos blandos, y luego entrar dentro del torrente sanguíneo y así llegar hasta otros tejidos corporales. El parásito no es selectivo, ya que puede infectar todas las células mamíferas.<sup>13</sup>

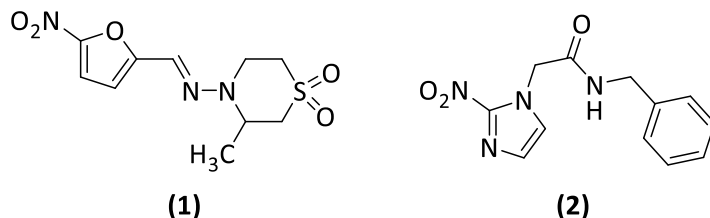
#### **1.2.4. Tratamiento**

Existen 2 tripanocidas, comercialmente no disponibles, para tratar la tripanosomiasis americana: benznidazol (**1**) y nifurtimox (**2**) (Figura 2). Son útiles contra tripomastigotes de *T. cruzi* circulantes e incluso contra amastigotes. Su eficacia varía en pacientes de diversas zonas geográficas expuestas a diferentes cepas de *T. cruzi* debido a una respuesta diferente a los fármacos tripanocidas.<sup>14</sup> El benznidazol es un derivado del nitroimidazol, mientras que el nifurtimox es un derivado del nitrofurano. Ninguno de los dos fármacos están disponibles en formulación pediátrica o en formulación intravenosa;<sup>15</sup> sin embargo, las tasas de eficacia que se presentan son más altas en infantes (casi el 100%) y en niños (60–85%).<sup>16,17</sup> Se observa para estos fármacos resultados positivos en la fase aguda, no obstante, la eficacia de estos tripanocidas en la fase crónica es limitada, y se requieren más evidencias clínicas para recomendarlos en la infección crónica asintomática por *T. cruzi*.

Los efectos adversos son relativamente comunes y dependen del tiempo y la dosis. Se han reportado efectos adversos sistémicos y sobre el sistema nervioso central para ambos



fármacos. La tolerabilidad de benznidazol está inversamente relacionada con la edad de los pacientes, los adultos y los ancianos tienen más efectos adversos que los niños.<sup>18</sup>



**Figura 2.** El tratamiento actual de la enfermedad de Chagas se basa en dos fármacos, nifurtimox (Nfx, Lampit®) (1) y Benznidazol (Bnz, Rochaga®, Roche, ahora producido por LAFEPE, Brasil) (2).<sup>19</sup>

### 1.2.5. Blancos terapéuticos

Se ha propuesto el uso de varias vías metabólicas del parásito que no están presentes en las células de mamíferos como blancos terapéuticos,<sup>20</sup> ya que actualmente se encuentran avances en el conocimiento en la bioquímica y biología del *T. cruzi* que permiten la identificación de rutas biosintéticas y enzimas cruciales para su supervivencia y desarrollo intracelular. Dichos avances han resultado en propuestas de diferentes blancos terapéuticos para el diseño de nuevos fármacos, incluyendo inhibidores de la síntesis de la poliamina y de enzimas del parásito como las topoisomerasas y la prolina racemasa.<sup>21</sup>

#### Triosafosfato isómerasa

Una característica importante en el metabolismo de los tripanosomátidos es su dependencia en la glucólisis como una fuente de energía para el trabajo celular. Por lo tanto las enzimas involucradas en este proceso constituyen un excelente blanco para la búsqueda de nuevas moléculas que las inhiban y afecten su función metabólica. En este

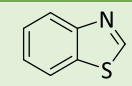
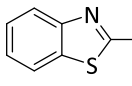
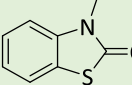
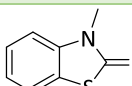
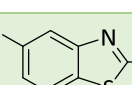
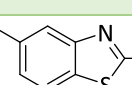
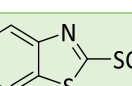
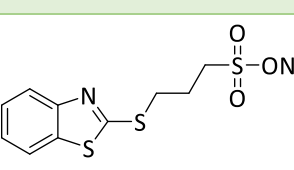
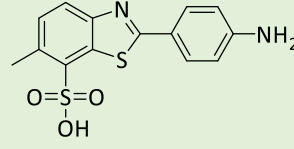
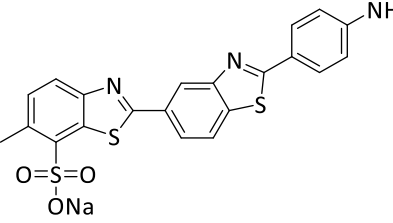
contexto, muchos grupos han propuesto la triosafosfato isomerasa (TIM) como un blanco para el diseño de fármacos en contra de enfermedades parasitarias.<sup>22,23</sup>

La TIM cataliza la isomerización del gliceraldehído 3–fosfato y la dihidroxiacetona fosfato en el quinto paso de la vía glicolítica, justo entre las fases de uso y producción de ATP, por lo que el bloqueo de esta enzima provocaría la disminución drástica del flujo metabólico, además de provocar la acumulación de 2–oxopropanol (metilglioxal) que es tóxico para el parásito.<sup>24</sup>

Estructuralmente, la mayoría de las enzimas TIM conocidas son homodímeros, cada monómero consta de ocho  $\beta$ –hebras paralelas que juntas forman un barril, rodeado por ocho  $\alpha$ –hélices. La interfaz entre monómeros ocupa una parte significativa de la superficie molecular de cada monómero, alrededor de 1.496 Å en la TIM de *T. cruzi* (TcTIM). Curiosamente, la TIM es activa sólo en su forma dimérica;<sup>25,26</sup> por lo tanto, la localización de pequeñas moléculas a la interfaz de la TIM puede potencialmente inducir modificaciones estructurales y alterar la integridad del dímero y de esta manera provocar la inactivación de la enzima.

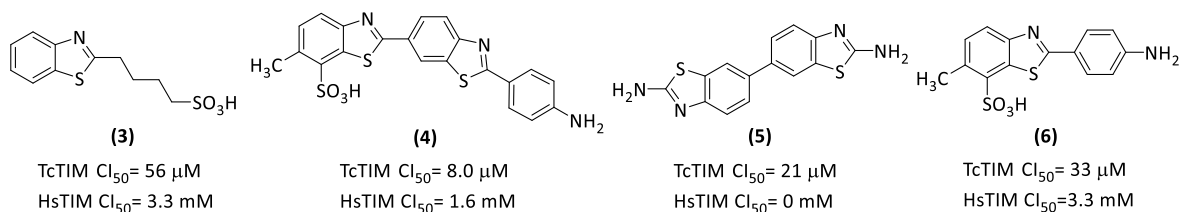
La TIM está presente tanto en las células humanas (HsTIM) como en las del parásito *T. cruzi* (TcTIM), y este contiene un sitio catalítico altamente conservado. Este hecho hace difícil diseñar fármacos que se centren en este sitio. Por lo tanto, se propone inhibir esta enzima en un sitio alostérico, que es extremadamente hidrófobo y que se encuentra en la interfaz homodimérica.<sup>27</sup> Se han hecho numerosos esfuerzos en la búsqueda de inhibidores selectivos de la TcTIM, entre los cuales se encuentran sistemas heterocíclicos como dióxido de fenazina, tiadiazoles y tiazoles, entre otros, que fueron evaluados mediante tecnología de selección de alto rendimiento, y un grupo de derivados del benzotiazol que fueron ampliamente estudiados *in silico*,<sup>28,29</sup> y que demostraron tener actividad (baja a media) como inhibidores de TcTIM (Tabla 1).<sup>23,30</sup>

**Tabla 1.** Efecto de algunos benzotiazoles sobre la TcTIM<sup>30</sup>

COMPUESTO	ESTRUCTURA	INACTIVACIÓN (%)
1		25
2		0
3		0
4		14
5		4
6		47
7		8
8		95
9		91
10		95

Otro conjunto de benzotiazoles fueron descubiertos como inhibidores irreversibles de TcTIM. Cabe resaltar que este grupo (Figura 3), inhibió a la enzima TcTIM en más bajas

concentraciones que a la enzima HsTIM, incluso uno de ellos no inhibió a la HsTIM, mostrando selectividad.<sup>31</sup>

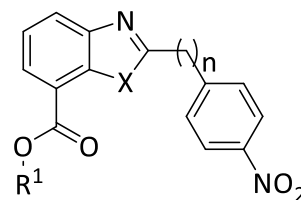


**Figura 3.** Compuestos derivados del benzotiazol inhibidores de la TcTIM.

En trabajos previos desarrollados en nuestro grupo de investigación se sintetizaron derivados del benzotiazol y del bencimidazol para evaluar su capacidad inhibitoria sobre la TcTIM (Tabla 2).<sup>32</sup> De los resultados obtenidos se pudo observar que los derivados del benzotiazol **ARM-1a** y **ARM-3b** presentaron mayores porcentajes de inhibición (68 y 99%) frente a sus análogos derivados del bencimidazol **ARM-5a** y **ARM-7b** (11 y 28%), lo que sugiere que para este tipo de compuestos la formación de puente de hidrógeno en esta posición desfavorece significativamente la actividad.

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de TcTIM y HsTIM de benzotiazoles de la serie ARM.

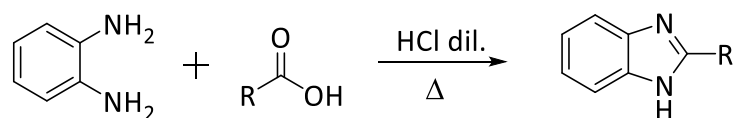
Clave	X	R <sup>1</sup>	n	% inhibición	
				TcTIM	HsTIM
<b>ARM-1a</b>	S	H	1	68	25
<b>ARM-3a</b>	S	H	0	7	0
<b>ARM-5a</b>	NH	H	1	11	2
<b>ARM-7a</b>	NH	H	0	0	5
<b>ARM-1b</b>	S	CH <sub>3</sub>	1	0	0
<b>ARM-3b</b>	S	CH <sub>3</sub>	0	99	80
<b>ARM-5b</b>	NH	CH <sub>3</sub>	1	8	5
<b>ARM-7b</b>	NH	CH <sub>3</sub>	0	28	0



### 1.3. ASPECTOS SINTÉTICOS DE BENCIMIDAZOLES 2-SUSTITUIDOS

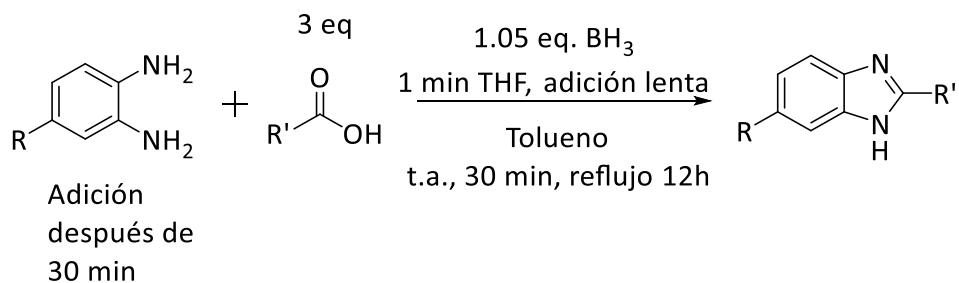
Se han desarrollado un gran número de protocolos para la síntesis de derivados del bencimidazol, entre los cuales se encuentran las siguientes reacciones:

Una reacción ampliamente empleada en la construcción del núcleo del bencimidazol, es la condensación de *orto*-fenilendiaminas con ácidos carboxílicos en presencia de ácidos minerales, conocida como reacción de Phillips.<sup>33</sup>



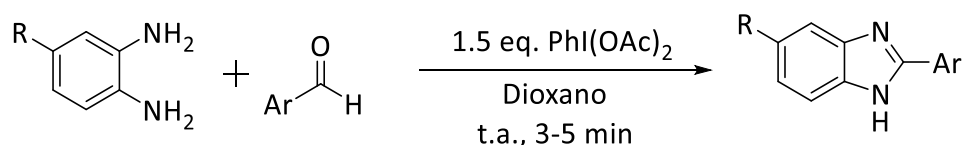
**Esquema 1.** Preparación de bencimidazoles mediante la reacción de Phillips.

Una reacción “one-pot” en condiciones suaves permite la preparación de bencimidazoles partiendo de *orto*-fenilendiaminas e intermediarios triaciloxiboranos, generados *in situ* a partir de ácidos carboxílicos y un complejo de borano-THF. Este tipo de reacción tolera grupos funcionales lábiles en medio ácido.<sup>34</sup>



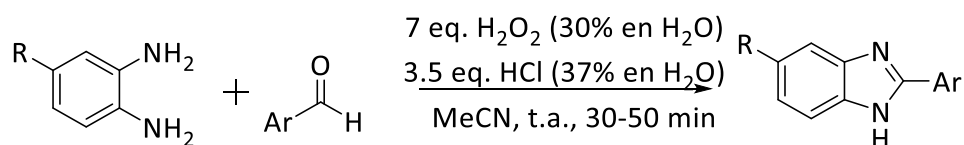
**Esquema 2.** Síntesis de bencimidazoles 2-sustituidos a partir de intermediarios triaciloxiboranos.

Varios 2–arilbencimidazoles fueron sintetizados al hacer reaccionar fenilendiaminas y aldehídos mediante una reacción de un solo paso usando yodo hipervalente como oxidante. Este método transcurre bajo condiciones suaves, tiempos de reacción cortos, rendimientos altos y un procedimiento simple.<sup>35</sup>



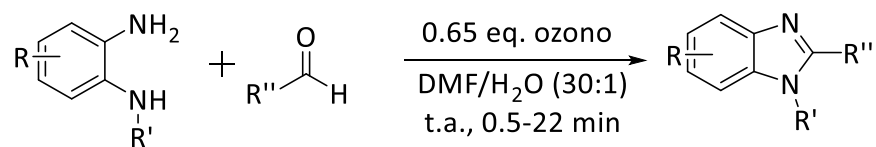
**Esquema 3.** Preparación de bencimidazoles empleando yodo hipervalente como oxidante.

Un método simple y eficiente para la síntesis de bencimidazoles sustituidos descrito por Bahrami y colaboradores es el que transcurre mediante una ciclocondensación entre *orto*-fenilendiaminas y aril aldehídos en presencia de una mezcla de peróxido de hidrógeno y HCl en acetonitrilo a temperatura ambiente. Esta reacción transcurre en tiempos cortos, presenta aislamiento fácil y rápido de productos, además de rendimientos altos.<sup>36</sup>



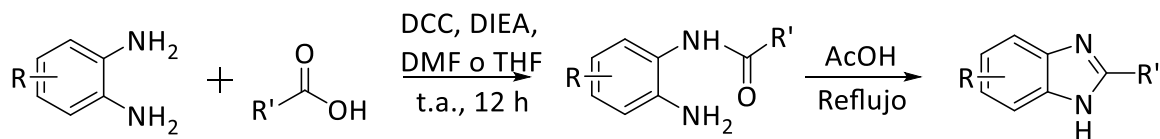
**Esquema 4.** Síntesis one–Pot de bencimidazoles 2–sustituidos.

Otra reacción de oxidación consiste en la adición de ozono a una mezcla de 1,2–fenilendiamina y un aldehído en DMF húmeda, la cual da como resultado la rápida formación del correspondiente bencimidazol bajo condiciones suaves. Los productos son obtenidos con altos rendimientos en alta pureza, en la mayoría de casos por precipitación en medio acuoso. La reacción es aplicable a una amplia gama de sustratos, pero no permite la conversión de aldehídos que son sensibles al ozono bajo condiciones de reacción ácidas.<sup>37</sup>



**Esquema 5.** Obtención de bencimidazoles trisustituídos empleando ozono como agente oxidante.

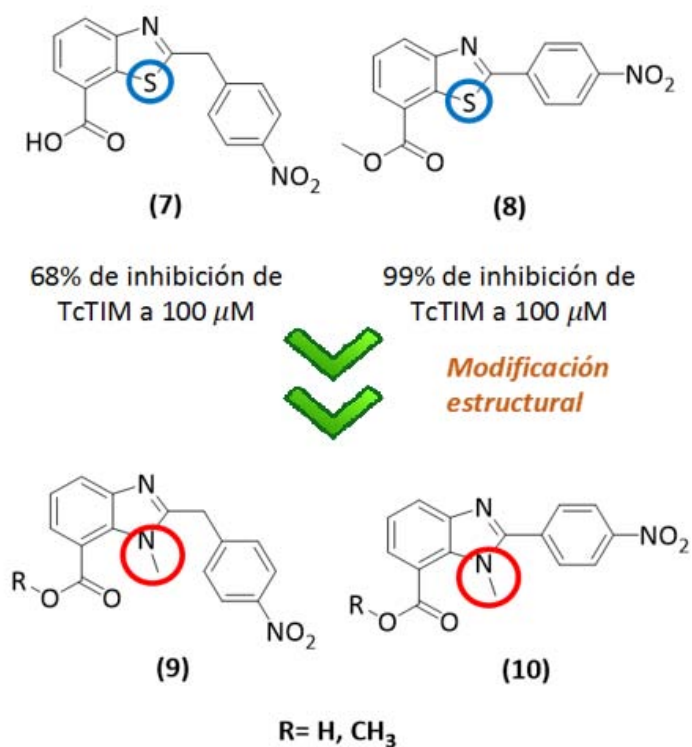
*Orto*-fenilendiaminas reaccionan con ácidos carboxílicos para dar como resultado la formación de amidas en presencia de agentes acoplantes como la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Dichas amidas en presencia de ácido acético y ausencia de disolvente pueden ciclocondensarse y de esta manera dar como resultado la formación de bencimidazoles disustituídos.<sup>38</sup>



**Esquema 6.** Formación de bencimidazoles a partir de amidas preparadas empleando DCC como agente acoplante.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Debido a que los fármacos actualmente disponibles para tratar la tripanosomiasis americana son inadecuados, de escasa eficacia clínica, poseen efectos secundarios adversos, y con frecuencia se requiere ingreso hospitalario para su administración, existe la necesidad urgente del desarrollo de nuevos fármacos que demuestren gran eficacia y baja toxicidad. Teniendo en cuenta que en trabajos previos se encontró que los benzotiazoles (7) y (8) presentan una alta inhibición sobre la TcTIM y que sus análogos derivados del bencimidazol mostraron una baja actividad,<sup>32</sup> en este trabajo se propone mejorar estos resultados al realizar una sustitución del átomo de azufre por un nitrógeno metilado que da como resultado los 1-metilbencimidazoles (9) y (10), con el fin de evitar la formación de puentes de hidrógeno ya que probablemente la presencia del grupo N-H es la causante de la disminución considerable de la actividad.



**Esquema 7.** Diseño racional de los 1-metilbencimidazoles.



### 3. HIPÓTESIS

La sustitución del átomo de azufre presente en el anillo de los benzotiazoles (**7**) y (**8**) por un nitrógeno metilado dará como resultado los bencimidazoles (**9**) y (**10**), los cuales tendrán una mejor actividad inhibitoria sobre la enzima TcTIM recombinante.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar *in vitro* la capacidad de inhibición de los nuevos derivados del bencimidazol trisustituidos propuestos sobre la enzima TcTIM de *T. cruzi*.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1. Sintetizar el precursor 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**).
- 4.2.2. Obtener los bencimidazoles 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**) y 2-(4-nitrobencil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).
- 4.2.3. Preparar los 1-metilbencimidazoles: 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**13a**), 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (**13b**) y 1-metil-2-(4-nitrobencil)-1*H*-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (**13c**).
- 4.2.4. Realizar la hidrólisis de la función éster de los 1-metilbencimidazoles **13a,b**.
- 4.2.5. Evaluar la capacidad inhibitoria de los bencimidazoles sintetizados sobre la enzima TcTIM y determinar el efecto del cambio del átomo de azufre por el nitrógeno metilado en la actividad.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos y disolventes usados en las diferentes reacciones, en las recristalizaciones y como mezclas de eluyentes en la cromatografía de capa fina fueron las marcas J. T: Baker, Aldrich, Merck y Q.P.

La concentración de las disoluciones se llevó a cabo en un rotaevaporador marca Büchi R-215. El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía de capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas por gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> (Merck), las cuales se visualizaron con una lámpara UV modelo UVGL-25 a longitudes de onda de 254/365 nm.

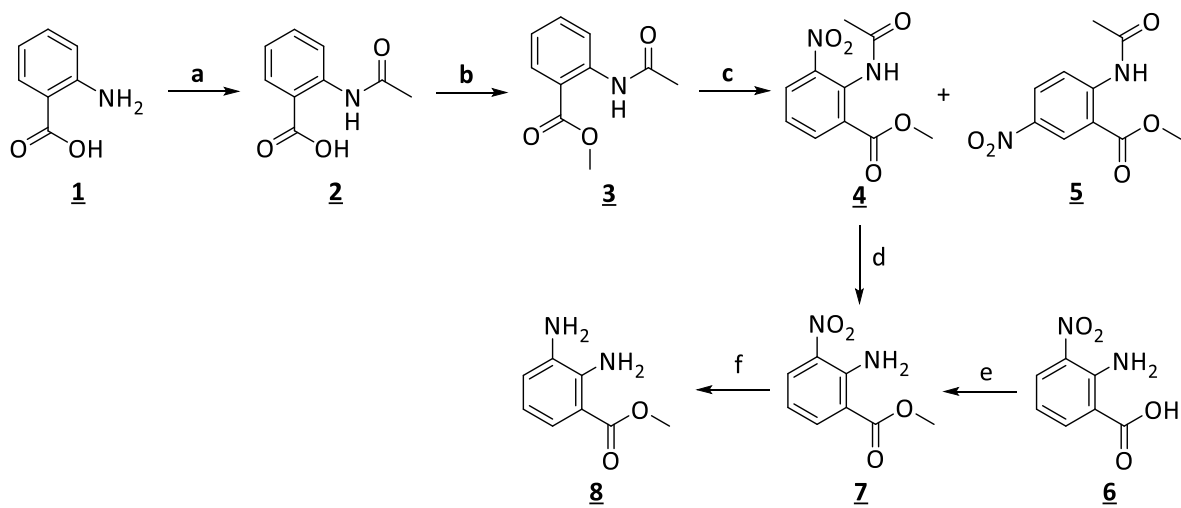
Las hidrogenaciones catalíticas se llevaron a cabo en un equipo de hidrogenación marca Parr modelo 3916EG a 60 lb/in<sup>2</sup> a temperatura ambiente y 120 mL como capacidad máxima e hidrógeno INFRA y como catalizador Pd/C (Aldrich) al 10%.

Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato marca Büchi, modelo B-540, empleando capilares de vidrio. Los espectros de IR fueron tomados en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1600, por reflectancia ATR. Las señales se reportan en cm<sup>-1</sup>.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H) y de carbono (RMN <sup>13</sup>C) se obtuvieron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 400 MHz, utilizando como disolventes DMSO-d<sub>6</sub>, ácido trifluoroacético-d<sub>1</sub> y cloroformo-d<sub>1</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm).

Los espectros de masas se registraron en un equipo Agilent 1100 Series acoplado a un detector de trampa iónica de masas selectiva de baja resolución (ESI-MS).

### 5.1. PREPARACIÓN DEL 2,3-DIAMINOBENZOATO DE METILO (**8**)



**Esquema 8.** Síntesis del precursor 2,3-diaminobenzoato de metilo **8**: a) Ac<sub>2</sub>O; b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; c) HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; d) MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; e) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; f) H<sub>2</sub>, Pd/C.

**Ácido 2-(acetilamino)benzoico (**2**).** En un vaso de precipitados de 250 mL se depositaron 120 mL de anhídrido acético y se adicionaron poco a poco 8.0 g (58.33 mmol) de ácido antranílico. Una vez finalizada la adición, se dejó la masa de reacción en agitación por un periodo de 30 minutos, luego la masa de reacción se vertió sobre agua helada con agitación constante. El producto formado se separó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua hasta llevarlo a pH neutro. Se obtuvieron 8.37 g (46.71 mmol, 80.13 %) de **2**, C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (179.06 g/mol), como un sólido blanco, Pf 182.6–183.9 °C (agua). (Reportado para **2**: 184–186 °C).<sup>39</sup> *R<sub>f</sub>* = 0.67 (butanol-ácido acético-agua, 4:1:1).

**2-(Acetilamino)benzoato de metilo (**3**).** En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de un condensador se introdujeron 14.54 g (81.15 mmol) de ácido 2-(acetilamino)benzoico (**2**) y 17.20 g (162.30 mmol) de carbonato de sodio. A la mezcla resultante se le adicionó acetona hasta cubrirla totalmente y se calentó a 60 °C, luego se

adicionaron lentamente 15.39 mL (162.30 mmol) de sulfato de dimetilo. Después de 19 horas se dejó llegar a la temperatura ambiente y se adicionó agua fría hasta precipitación total del producto para posteriormente aislarlo por filtración al vacío. Se obtuvieron 15.60 g (81.31 mmol, 99.57 %) de **3**,  $C_{10}H_{11}NO_3$  (193.07 g/mol), como un sólido blanco, Pf 99.3–100.5 °C (agua). (Reportado para **3**: 97–99 °C).<sup>40</sup>  $R_f = 0.80$  (hexano–acetato de etilo, 3:2).

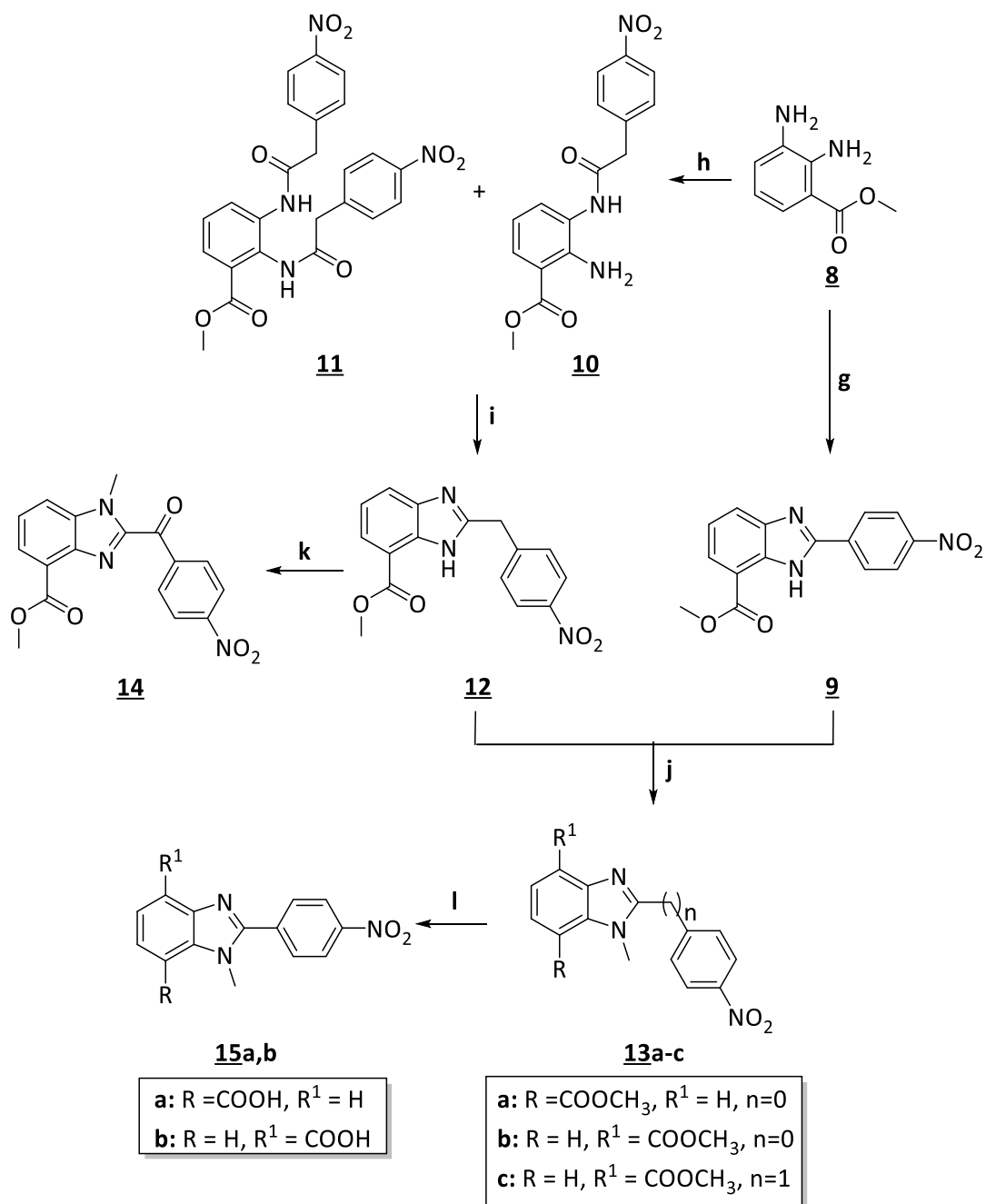
**2–(Acetilamino)–3–nitrobenzoato de metilo (4) y 2–(Acetilamino)–5–nitrobenzoato de metilo (5).** En un matraz bola de dos bocas de 100 mL, provisto de un embudo de adición y termómetro, se introdujeron 5.00 g de 2–(acetilamino)benzoato de metilo (**3**) y se agregó anhídrido acético hasta su completa disolución. La mezcla resultante se introdujo en un baño de hielo a 0–5 °C y mientras se encontraba en agitación se adicionaron gota a gota 5 mL de mezcla nitrante de  $HNO_3$  y  $H_2SO_4$  (1:1). Finalizada la adición, la masa de reacción se dejó en agitación constante por un periodo de 30 min sin que la temperatura superara los 5 °C. Transcurrido este periodo de tiempo se vertió la masa de reacción sobre hielo y el producto formado se separó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente hexano–acetato de etilo con incremento gradual de la polaridad (60:1, 10:1). Se obtuvieron 2.23 g (9.37 mmol, 36.17%) de **4**,  $C_{10}H_{10}N_2O_5$  (238.06 g/mol), como sólido anaranjado claro, Pf 116.9–119.5 °C (hexano),  $R_f = 0.44$  (hexano–acetato de etilo, 3:2) y 2.30 g (9.66 mmol, 37.30%) de **5**,  $C_{10}H_{10}N_2O_5$  (238.06 g/mol), como un sólido anaranjado, Pf 176.3–178.2 °C (hexano),  $R_f = 0.73$  (hexano–acetato de etilo, 3:2). (Pf reportados para **4**: 120–122 °C y **5**: 177–181°C).<sup>41</sup>

**2–amino–3–nitrobenzoato de metilo (7). (Reacción d)** En un matraz de fondo redondo de 100 mL de capacidad se depositaron 2.02 g (8.49 mmol) de 2–(acetilamino)–3–nitrobenzoato de metilo (**4**) y sobre éste se depositó una mezcla de metanol–ácido sulfúrico (80:10), luego, la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 4 horas. Después, la masa de reacción se vertió sobre agua–hielo con agitación constante. El producto formado

se separó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua hasta llevarlo a pH neutro. Se obtuvieron 1.44 g (7.35 mmol, 85.54 %) de **7**. (**Reacción e**) En un matraz de fondo redondo de 250 mL se mezclaron 4.78 g (26.26 mmol) de ácido 2-amino-3-nitrobenzoico (**6**) y 5.57 g (52.53 mmol) de carbonato de sodio con 15 mL de acetona, y la mezcla se calentó a 60 °C con agitación. Se adicionaron entonces 6.13 mL (52.53 mmol) de sulfato de dimetilo. Después de 3 horas se adicionó agua fría y se esperó a que precipitara el producto esterificado, para posteriormente aislarlo por filtración al vacío. Se obtuvieron 4.33 g (81.31 mmol, 84.09 %) de **7**, C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (196.05 g/mol), como un sólido amarillo, Pf 176.3–180.2 °C (hexano), *R<sub>f</sub>* = 0.62 (hexano–acetato de etilo, 3:2). IR (ATR): 3450 (N–H), 3314 (N–H), 1697 (C=O), 1512 (C=C<sub>arom</sub>), 1101 (C–O asim) cm<sup>-1</sup>. *m/z* (EI, %): 196 (M<sup>+</sup>, 100), 164 (75), 119 (47), 90 (76), 63 (51). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.91 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 6.64 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 1 H, 5–H), 8.22 (dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1 H, 6–H), 8.36 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1 H, 4–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 52.4 (–O–CH<sub>3</sub>), 114.1 (5–C), 114.5 (1–C), 132.4 (4–C), 133.4 (3–C), 139.6 (6–C), 147.4 (2–C), 167.5 (–COO–).

**2,3-diaminobenzoato de metilo (8)**. En una botella de hidrogenación se suspendieron 3.97 g (20.30 mmol) del éster 2-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**7**) en 150 mL de metanol y 0.39 g de catalizador paladio sobre carbono 10 %. Se cargó el sistema con hidrógeno y dejó en agitación durante una hora hasta que ya no se consumió más hidrógeno. Se consumieron 73 lb/in<sup>2</sup>. La mezcla de reacción se filtró con vacío sobre una cama de celita y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto obtenido **8**, 3.35 g (20.29 mmol, 99.70 %), C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (166.07 g/mol), *R<sub>f</sub>* = 0.51 (diclorometano–acetona, 90:10), fue aislado como una resina de color marrón claro, se utilizó inmediatamente en la siguiente reacción.

**SÍNTESIS DE LOS 1-METILBENCIMIDAZOLES 13a-c Y 15a,b.**



**Esquema 9.** Reactivos y condiciones para la obtención de los 1-metilbencimidazoles: g) 4-nitrobenzaldeído, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl, CH<sub>3</sub>CN, t.a.; h) ácido 4-nitrofenilacético, DCC, DIEA, DMF, t.a.; i) AcOH; j) CH<sub>3</sub>I, KOH, acetona, t.a.; k) CH<sub>3</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona, t.a.; l) NaOH, HCl, 40 °C.

## 5.2. SÍNTESIS DE 2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO (9)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se preparó una disolución de 0.70 g (4.20 mmol) del 2,3-diaminobenzoato de metilo (8) y 0.67 g (4.41 mmol) de 4-nitrobenzaldehído en 63 mL de MeCN y una pequeña cantidad de sulfato de magnesio. La disolución se agitó una hora a temperatura ambiente y se le adicionó una mezcla de 2.37 mL (29.37 mmol) de peróxido de hidrógeno al 30 % y 1.29 mL (14.74 mmol) de HCl al 37%. Después de una hora se eliminó el sulfato de magnesio mediante filtración a través de alúmina neutra y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se lavó con diclorometano y finalmente mediante recristalización con metanol se obtuvieron 0.74 g (2.49 mmol, 59 %) de 2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (9),  $C_{15}H_{11}N_3O_4$  (297.07 g/mol) como un sólido marrón claro, Pf 206.2–209.1 °C (metanol),  $R_f = 0.82$  (diclorometano–acetona, 90:10). IR (ATR): 3433 (N–H), 1719 (C=O), 1601 (C=N), 1512 (C=C<sub>arom</sub>), 1103 (C–O<sub>asim</sub>)  $cm^{-1}$ . HRMS calculado para  $^{12}C_{15}^{1}H_{12}^{14}N_3^{16}O_4$  [M + H]<sup>+</sup>: 298.08278, encontrado: 298.08147.  $m/z$  (ESI–MS, %): 320 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 398 ([M+DMSO+Na]<sup>+</sup>, 23.1). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>)  $\delta$ : 4.14 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 7.78 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1 H, 5–H), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H, 4–H), 8.37 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H, 6–H), 8.41 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H, 2'–H/6'–H), 8.53 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H, 3'–H/5'–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>)  $\delta$ : 53.1 (–O–CH<sub>3</sub>), 116.0 (7–C), 120.1 (4–C), 124.7 (3'–C/5'–C), 126.5 (7a–C), 127.9 (5–C/1'–C), 130.1 (2'–C/6'–C), 130.6 (6–C), 131.8 (3a–C), 149.1 (2–C), 151.0 (4'–C), 167.4 (–COO–).

### 5.3. PREPARACIÓN DE 2-AMINO-3-[[[4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO]BENZOATO DE METILO (**10**)

A una solución de 4.17 g (23.01 mmol) del ácido 4-nitrofenilacético en 91 mL de DMF contenida en un matraz de fondo redondo de 250 mL, provisto de un embudo de adición, se le goteó una solución de 2.40 g de DCC (11.64 mmol) en 11.64 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4.72 mL (27.08 mmol) de DIEA (*N,N*-Diisopropiletilamina) y 1.80 g (10.83 mmol) del 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) a 10–15 °C. Después de 20.50 horas de agitación, la mezcla fue filtrada y el disolvente evaporado a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna empleando un sistema CHCl<sub>3</sub>–MeOH (99:1). Se obtuvieron 2.16 g (6.56 mmol, 61 %) de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**) C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (329.10 g/mol), como un sólido blanco, Pf 256.9–258.0 °C (cloroformo), *R<sub>f</sub>* = 0.81 (cloroformo–acetona, 85:15) y 0.61 g (1.24 mmol, 17 %) de un sólido blanco correspondiente al 2,3-bis[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**11**) C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (492.13 g/mol), Pf 249.2–250.1 °C (cloroformo), *R<sub>f</sub>* = 0.89 (cloroformo–acetona, 85:15).

**10**, IR (ATR): 3226 (O=C–N–H), 1719 (O=C–N–H), 1643 (C=O), 1605 (O=C–N–H<sub>flex</sub>), cm<sup>-1</sup>. *m/z* (ESI–MS, %): 352 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO–d<sub>6</sub>) δ: 3.80 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 2 H, –CH<sub>2</sub>–), 6.49 (sa, 2 H, –NH<sub>2</sub>), 6.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5–H), 7.35 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1 H, 4–H), 7.66–7.62 (m, 3 H, 6–H y 2'–H/6'–H), 8.21 (dt, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2 H, 3'–H/5'–H), 9.49 (s, 1 H, O=C–N–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO–d<sub>6</sub>) δ: 42.1, (–CH<sub>2</sub>–), 52.6 (–O–CH<sub>3</sub>), 110.2 (1–C), 114.3 (5–C), 123.3 (3'–C/5'–C), 124.0 (3–C), 128.4 (6–C), 130.7 (2'–C/6'–C), 131.4 (4–C), 144.2 (1'–C), 145.8 (2–C), 146.3 (4'–C), 167.9 (–COO–), 168.7 (O=C–N–H).

**11**, IR (ATR): 3277 (O=C–N–H), 1710 (O=C–N–H), 1702 (O=C–N–H), 1653 (C=O), 1604 (O=C–N–H<sub>flex</sub>), cm<sup>-1</sup>. *m/z* (ESI–MS, %): 515 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO–d<sub>6</sub>) δ: 3.60 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 2 H, –CH<sub>2</sub>''), 3.88 (s, 2 H, –CH<sub>2</sub>'–), 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5–H), 7.52 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1 H, 6–H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 4 H, 2'–H/6'–H y 2''–H/6''–H), 7.79 (dd, *J* = 8.8, 0.8 Hz, 1 H, 4–H), 8.19–8.13 (m, 4 H, 3'–H/5'–H y 3''–H/5''–H), 9.66 (s, 1



H, 3-(H'-N-C=O)), 9.72 (s, 1 H, 2-(H''-N-C=O)). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 42.0, (-CH<sub>2</sub>''), 42.3, (-CH<sub>2</sub>'-), 52.0 (-O-CH<sub>3</sub>), 123.2 (3'-C/5'-C), 123.3 (3''-C/5''-C), 126.0 (5-C), 126.3 (6-C), 128.3 (4-C), 128.8 (3-C), 130.7 (2'-C/6'-C), 130.9 (2''-C/6''-C), 133.6 (1-C), 143.6 (1'-C), 143.7(1''-C), 146.4 (4'-C/4''-C), 166.4 (-COO-), 168.5 (3-(H'-N-C=O)), 168.7 (2-(H''-N-C=O)).

#### 5.4. CICLOCONDENSACIÓN INTRAMOLECULAR DE 2-AMINO-3-[(4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO}BENZOATO DE METILO (10)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se depositó 1.0 g (3.04 mmol) de la amida (10), y 16 mL de ácido acético. Posteriormente esta mezcla fue sometida a reflujo durante 1 hora. Una vez culminada la reacción, el disolvente fue evaporado y el residuo fue disuelto con 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y lavado con una solución diluida de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 mL), la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posteriormente el disolvente fue eliminado por destilación al vacío. Se obtuvieron 0.88 g (2.84 mmol, 93 %) de 12, C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (311.09 g/mol), como un sólido blanco, Pf 157.2–159.1 °C (diclorometano), R<sub>f</sub> = 0.68 (cloroformo-acetona, 85:15). IR (ATR): 3115–2744 (C-H<sub>arom</sub>), 1706 (C=O), 1599 (C=N), cm<sup>-1</sup>. HRMS calculado para <sup>12</sup>C<sub>16</sub><sup>1</sup>H<sub>14</sub><sup>14</sup>N<sub>3</sub><sup>16</sup>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 312.09843, encontrado: 312.09852. m/z (ESI-MS, %): 334 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 412 ([M+DMSO+Na]<sup>+</sup>, 3.71). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 3.95 (s, 3 H, -O-CH<sub>3</sub>), 4.45 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>-), 7.26 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, 5-H), 7.62 (dt, J = 8.8, 2.2 Hz, 2 H, 2'-H/6'-H), 7.79 (dd, J = 7.6, 1.2, 1 H, 6-H), 7.84 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1 H, 4-H), 8.19 (dt, J = 8.8, 2.2 Hz, 2 H, 3'-H/5'-H), 12.54 (s, 1 H, N-H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 34.0, (-CH<sub>2</sub>-), 52.1 (-O-CH<sub>3</sub>), 113.3 (7-C), 121.0 (5-C), 123.6 (3'-C/5'-C), 123.8 (6-C), 124.0 (4-C), 130.2 (2'-C/6'-C), 133.6 (7a-C), 144.5 (3a-C), 145.6 (1'-C), 146.3 (4'-C), 154.4 (2-C), 165.7 (-COO-).

## 5.5. REACCIÓN DE METILACIÓN DE 2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO (9) Y 2-(4-NITROBENCIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO (12)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL de capacidad se depositaron los bencimidazoles (9) y (12), los cuales se disolvieron con acetona (2 mL por 0.10 g de bencimidazol); una vez se homogenizó la disolución se le adicionó KOH (relación molar 1:1.3, bencimidazol: KOH) disuelto en agua (2 mmol de KOH en 0.7 mL de H<sub>2</sub>O), y transcurridos 15 minutos en agitación se adicionó gota a gota el yoduro de metilo (relación molar 1:1.5, bencimidazol:CH<sub>3</sub>I). Después de 27 horas la acetona presente en el medio de reacción fue destilada a presión reducida y el residuo fue disuelto en 40 mL de diclorometano y la solución resultante se lavó con agua (2 x 40 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, el disolvente se evaporó, y el residuo orgánico se sometió a purificación por cromatografía en columna, usando como eluyente una mezcla de hexano-cloroformo-acetato de etilo (50:35:15).

- **1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (13a) y 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (13b)**. De 0.50 g (1.68 mmol) del 2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (9), una solución de KOH (0.12 g/0.76 mL de H<sub>2</sub>O) y 0.16 mL (2.52 mmol) de yoduro de metilo se obtuvieron 0.16 g (0.53 mmol, 31 %) del isómero 13a, C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (311.09 g/mol), como un sólido amarillo claro, Pf 219.3–221.2 °C (diclorometano), *R<sub>f</sub>* = 0.62 (cloroformo-metanol, 95:5) y 0.34 g (1.09 mmol, 65 %) del isómero 13b, C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (311.09 g/mol), como un sólido amarillo, Pf 200.1–201.6 °C (diclorometano), *R<sub>f</sub>* = 0.47 (cloroformo-metanol, 95:5).

**13a**, IR (ATR): 3095–2852 (C–H<sub>arom</sub>), 1711 (C=O), 1599 (C=N), cm<sup>-1</sup>. *m/z* (ESI–MS, %): 298 ([M–14+H]<sup>+</sup>, 4.85), 312 ([M+H]<sup>+</sup>, 100), 334 ([M+Na]<sup>+</sup>, 8.41). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 4.17 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 4.20 (s, 3 H, N–CH<sub>3</sub>), 7.81 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H,

5-H), 8.11(d,  $J = 8.0$ , 1 H, 4-H), 8.13 (d, 2 H, 2'-H/6'-H), 8.25 (d,  $J = 7.6$ , 1 H, 6-H), 8.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H, 3'-H/5'-H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, ácido trifluoroacético- $d_1$ )  $\delta$ : 36.8, (N-CH<sub>3</sub>), 53.4 (-O-CH<sub>3</sub>), 119.0 (4-C), 119.2 (7-C), 124.7 (3'-C/5'-C), 127.1 (1'-C), 127.8 (5-C), 130.7 (6-C), 130.9 (7a-C), 131.3 (3a-C), 131.4 (2'-C/6'-C), 150.3 (2-C), 150.7 (4'-C), 167.6 (-COO-).

**13b**, IR (ATR): 3386–2849 (C-H<sub>arom</sub>), 1710 (C=O), 1598 (C=N),  $\text{cm}^{-1}$ .  $m/z$  (ESI-MS, %): 334 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 412 ([M+DMSO+Na]<sup>+</sup>, 4.29). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.90 (s, 3 H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.97 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 7.45 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H, 6-H), 7.86 (dd,  $J = 7.6$ , 1.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.97 (dd,  $J = 8.2$ , 1.0, 1 H, 7-H), 8.18 (dt,  $J = 8.8$ , 2.2 Hz, 2 H, 2'-H/6'-H), 8.43 (dt,  $J = 8.8$ , 2.2 Hz, 2 H, 3'-H/5'-H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 32.1, (N-CH<sub>3</sub>), 51.9 (-O-CH<sub>3</sub>), 115.8 (7-C), 121.0 (4-C), 122.4 (6-C), 123.8 (3'-C/5'-C), 124.9 (5-C), 130.9 (2'-C/6'-C), 135.9 (1'-C), 137.9 (7a-C), 140.9 (3a-C), 148.1 (4'-C), 152.4 (2-C), 166.1 (-COO-).

- **1-Metil-2-(4-nitrobenzil)-1H-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (13c)**. De 0.10 g (0.32 mmol) del 2-(4-nitrobenzil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**), una solución de KOH (0.02 g/0.15 mL de H<sub>2</sub>O) y 0.03 mL (0.48 mmol) de yoduro de metilo se obtuvieron 0.03 g (0.10 mmol, 31 %) de **13c**, C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (325.11 g/mol), como un sólido amarillo claro, Pf 76.4–77.1 °C (diclorometano),  $R_f = 0.38$  (cloroformo-metanol, 95:5). IR (ATR): 3196–2852 (C-H<sub>arom</sub>), 1698 (C=O), 1599 (C=N),  $\text{cm}^{-1}$ .  $m/z$  (ESI-MS, %): 348 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 426 ([M+DMSO+Na]<sup>+</sup>, 3.52). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.74 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 3.87 (s, 3 H, -O-CH<sub>3</sub>), 4.56 (s, 2 H, -CH<sub>2</sub>-), 7.33 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1 H, 6-H), 7.55 (dt,  $J = 8.8$ , 2.2 Hz, 2 H, 2'-H/6'-H), 7.76 (dd,  $J = 7.6$ , 0.8, 1 H, 5-H), 7.79 (dd,  $J = 8.0$ , 0.8 Hz, 1 H, 7-H), 8.19 (dt,  $J = 8.8$ , 2.2 Hz, 2 H, 3'-H/5'-H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 30.1, (N-CH<sub>3</sub>), 32.7 (-CH<sub>2</sub>-), 51.8 (-O-CH<sub>3</sub>), 114.9 (7-C), 120.3 (4-C), 121.3 (6-C), 123.7 (3'-C/5'-C), 124.0 (5-C), 130.0 (2'-C/6'-C), 137.0 (7a-C), 140.9 (3a-C), 144.8 (1'-C), 146.4 (4'-C), 154.2 (2-C), 165.3 (-COO-).

## 5.6. SÍNTESIS DE 1-METIL-2-(4-NITROBENZOIL)-1H-BENCIMIDAZOL-4-CARBOXILATO DE METILO (**14**)

En un matraz de fondo redondo de 25 mL se depositaron 0.10 g (0.32 mmol) del 2-(4-nitrobencil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**) y se disolvió con 3 mL de acetona, una vez se homogenizó la disolución se le adicionaron 0.05 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.35 mmol) y transcurridos 15 minutos en agitación se adicionaron gota a gota 0.02 mL (0.38 mmol) de yoduro de metilo. Después de 15 horas la acetona presente en el medio de reacción fue destilada a presión reducida y el residuo fue disuelto en 15 mL de diclorometano y la solución resultante se lavó con agua (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, el disolvente se evaporó, y el residuo orgánico se sometió a purificación por cromatografía en columna, usando como eluyente una mezcla de diclorometano-acetona (98:2). Se obtuvieron 0.04 g (0.12 mmol, 37 %) de **15**, C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (339.09 g/mol), como un sólido blanco, Pf 212.5–213.5 °C (diclorometano), *R<sub>f</sub>* = 0.80 (cloroformo-metanol, 95:5). IR (ATR): 3104–2852 (C–H), 1705 (–O–C=O), 1660 (C=O), 1601 (C=N), cm<sup>-1</sup>. *m/z* (ESI–MS, %): 326 ([M–14+H]<sup>+</sup>, 15.58), 362 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 4.15 (s, 3 H, –O–CH<sub>3</sub>), 4.39 (s, 3 H, N–CH<sub>3</sub>), 8.00 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, 6–H), 8.28–8.23 (m, 3 H, 7–H/2′–H/6′–H), 8.49 (d, *J* = 6.1, 2 H, 3′–H/5′–H), 8.55 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, 5–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 33.0, (N–CH<sub>3</sub>), 53.3 (–O–CH<sub>3</sub>), 117.0 (4–C), 119.0 (7–C), 124.4 (3′–C/5′–C), 128.6 (3a–C), 129.2 (6–C), 131.4 (2′–C/6′–C), 132.0 (5–C), 133.8 (7a–C), 138.5 (1′–C), 142.4 (2–C), 151.8 (4′–C), 166.7 (–COO–), 178.5 (C=O).

**5.7. HIDRÓLISIS BÁSICA DE LOS ÉSTERES 13a,b. OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXÍLICO (15a), 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-4-CARBOXÍLICO (15b)**

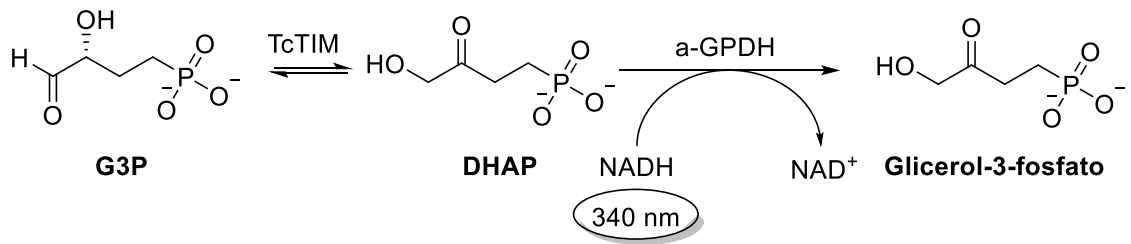
En un matraz de fondo redondo de 10 mL se depositaron los ésteres 13a,b en metanol (relación peso: volumen, 0.10 g de éster: 3 mL de MeOH). Posteriormente mientras la mezcla se encontraba en agitación y a 40 °C, se le goteó una solución de hidróxido de sodio 1N (relación peso: volumen, 0.10 g de éster: 1.5 mL de solución de NaOH). Después de 26–29 horas, a la mezcla de reacción se le adicionaron 20 mL de agua y posteriormente se adicionó gota a gota una solución de HCl 1 M hasta llegar a un pH: 3–4. Finalmente, el precipitado obtenido se separó mediante filtración al vacío.

- **Ácido 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxílico (15a)**. De 0.09 g de 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (13a) en 2.7 mL de metanol y 1.35 de una solución 1N de NaOH, después de 26 horas se obtuvieron 0.07 g (0.24 mmol, 80 %) del ácido 15a, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (297.07 g/mol), como un sólido rosa claro, Pf 318.1–319.2 °C (metanol), R<sub>f</sub> = 0.45 (cloroformo–metanol–ácido acético, 70:30:1 gota). IR (ATR): 3396(O–H), 2963–2849 (C–H<sub>arom</sub>), 1705 (C=O), 1607 (C=N), cm<sup>-1</sup>. m/z (ESI–MS, %): 298 ([M+H]<sup>+</sup>, 100). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 4.19 (s, 3 H, N–CH<sub>3</sub>), 7.77 (t, J = 8.0 Hz, 1 H, 7–H), 8.05 (d, J = 8.8 Hz, 2 H, 2'–H/6'–H), 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 4–H), 8.38 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, 6–H), 8.54 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, 3'–H/5'–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 37.2, (N–CH<sub>3</sub>), 118.1 (7–C), 119.9 (4–C), 124.7 (3'–C/5'–C), 127.1 (1'–C), 127.7 (5–C), 131.1 (7a–C), 131.4 (2'–C/6'–C), 131.5 (3a–C), 131.9 (6–C), 150.4 (2–C), 150.6 (4'–C), 169.50 (–COO–).
- **Ácido 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-4-carboxílico (15b)**. De 0.10 g de 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (13b) en 3 mL de metanol y 1.5 de una solución 1N de NaOH, después de 27 horas se obtuvieron 0.07 g

(0.24 mmol, 76 %) del ácido **15b**, C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (297.07 g/mol), como un sólido blanco, Pf 288.0–288.9 °C (metanol), *R<sub>f</sub>* = 0.58 (butanol–ácido acético–agua, 4:1:1). IR (ATR): 3455(O–H), 3095–2704 (C–H<sub>arom</sub>), 1736 (C=O), 1599 (C=N), cm<sup>-1</sup>. *m/z* (ESI–MS, %): 298 ([M+H]<sup>+</sup>, 100). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 4.12 (s, 3 H, N–CH<sub>3</sub>), 7.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 6–H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2'–H/6'–H), 8.11 (d, *J* = 8.8 1 H, 7–H), 8.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5–H), 8.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, 3'–H/5'–H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, ácido trifluoroacético–d<sub>1</sub>) δ: 32.0, (N–CH<sub>3</sub>), 51.9 (–O–CH<sub>3</sub>), 115.6 (4–C), 118.6 (7–C), 124.4 (3'–C/5'–C), 126.4 (1'–C), 127.7 (6–C), 129.6 (3a–C), 131.0 (5–C), 131.5 (2'–C/6'–C), 133.6 (7a–C), 149.6 (2–C), 150.6 (4'–C), 168.6 (–COO–).

#### **5.8. PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA TIM DE *Trypanosoma cruzi***

En este ensayo se evaluó la actividad de los bencimidazoles **9** y **12**, los productos de metilación **13a–c** y los ácidos **15a,b** sobre la triosafosfato isomerasa del *T. cruzi*, mediante un método de cuantificación de NADH, previamente estandarizado. La proteína recombinante TcTIM a una concentración de 5 µg/mL se incubó a 36 °C en una solución amortiguadora que contenía 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, pH 7.4 y el compuesto correspondiente a ser probado disuelto en 10% de DMSO, en una concentración de 200 µM de este último. Después de 2 horas, 1 µL se trasvasó a 1 mL de mezcla de reacción, que contenía NADH, gliceraldehído 3–fosfato y α–glicerol fosfato deshidrogenasa, para el ensayo de actividad. La inhibición de TcTIM se cuantificó indirectamente por el consumo de la cantidad de NADH por la reducción de DHAP por la α–glicerolfosfato deshidrogenasa. Se cuantificó la disminución de la absorbancia en la celda de reacción a 340 nm en un espectrofotómetro y se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con el control negativo (la enzima libre de inhibidores) (Esquema 10).



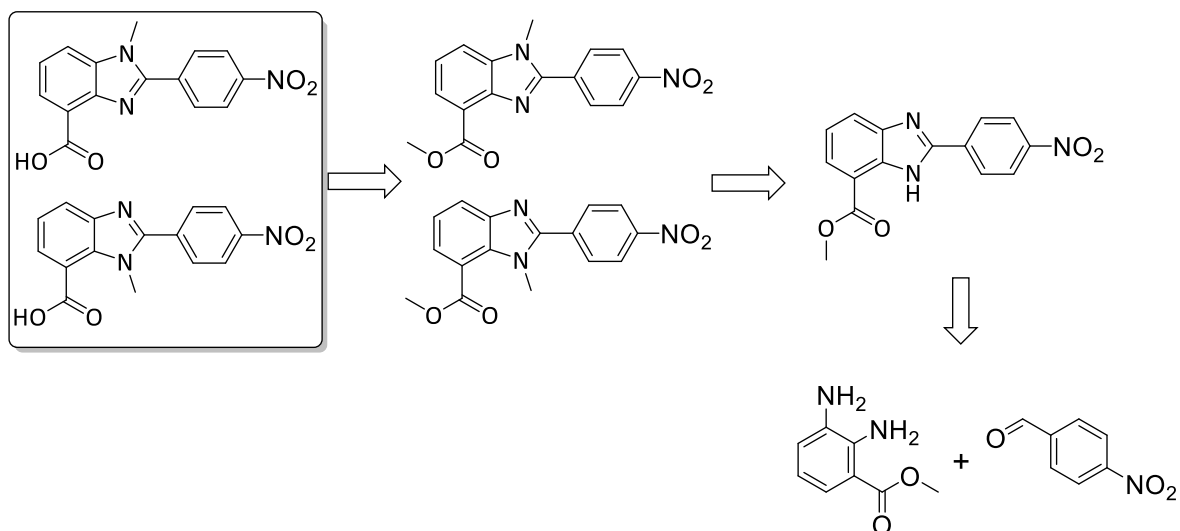
**Esquema 10.** Secuencia de reacciones del método utilizado para medir la inhibición de la TcTIM.

La curva de concentración–actividad del bencimidazol **9** se realizó evaluando la actividad de la TcTIM recombinante a diferentes concentraciones (0–300  $\mu$ M).

## 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo tuvo como objetivo principal la búsqueda de nuevos protocolos que permitieran acceder a los nuevos derivados del 1–metilbencimidazol, debido a que estos han demostrado ser de gran interés como antiprotozoarios como ya se ha reportado en trabajos previos.<sup>27</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó la posibilidad de acceder a derivados del 1–metilbencimidazol sustituidos en la posición 2 y en la posición 7 ó 4 a través de dos estrategias de síntesis que sólo varían en la formación del núcleo del bencimidazol.

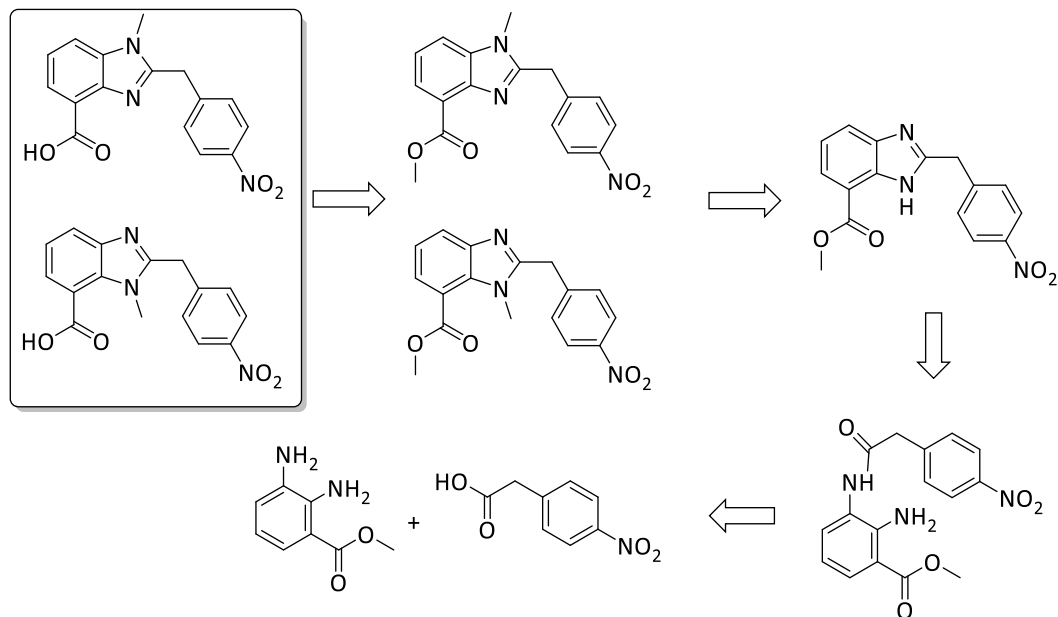


**Esquema 11.** Análisis retrosintético de los ácidos 1–metil–2–(4–nitrofenil)–1H–bencimidazol–7 carboxílico y 1–metil–2–(4–nitrofenil)–1H–bencimidazol–4 carboxílico.

Como se muestra en el Esquema 11, la formación del núcleo del bencimidazol se presenta en un solo paso a partir del 2,3–diaminobenzoato de metilo y el 4–nitrobenzaldehído, mediante una reacción “one pot” en la que ocurre una ciclocondensación intramolecular y una posterior oxidación, mientras que para la construcción del 2–(4–nitrobencil)–1H–bencimidazol se presentan dos transformaciones, donde inicialmente se hace reaccionar



el 2,3-diaminobenzoato de metilo con el ácido 4-nitrofenilacético y posteriormente la amida generada sufre una ciclocondensación intramolecular (Esquema 12).



**Esquema 12.** Análisis retrosintético de los ácidos 1-metil-2-(4-nitrobenzil)-1H-bencimidazol-7 carboxílico y 1-metil-2-(4-nitrobenzil)-1H-bencimidazol-4 carboxílico.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la validación de cada una de las reacciones involucradas en la ruta de síntesis diseñada.

### 6.1. PREPARACIÓN DE 2-(4-NITROFENIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO (9)

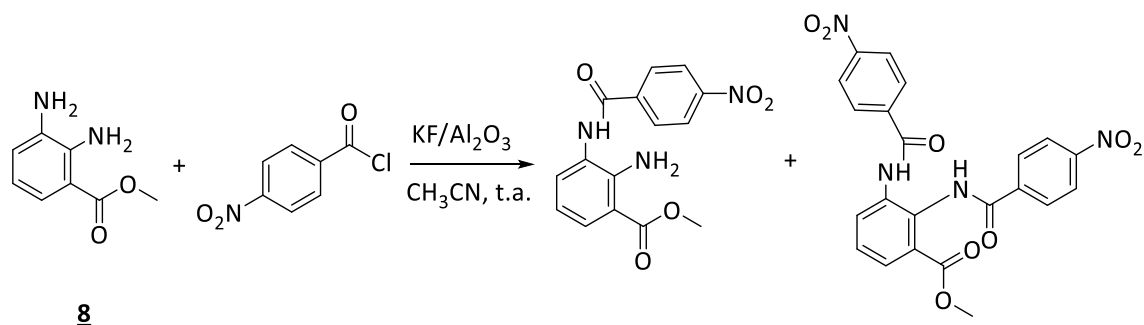
Para la síntesis del bencimidazol **9** se planteó como primera opción realizar la reacción de Phillips, haciendo reaccionar el 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) con el ácido 4-nitrobenzoico (relación molar 1:1.1, diamina: ácido) en presencia de una solución de ácido clorhídrico 4N (por cada 1 mmol de diamina, 3 mL de HCl 4N) a 100 °C,<sup>42</sup> pero los

resultados obtenidos fueron desfavorables, ya que se observó la formación de productos de descomposición después de media hora de reacción. La variación de la relación molar diamina: ácido (1:2), tampoco permitió la obtención del producto esperado, presentando de igual manera productos de descomposición. Como una segunda alternativa se intentó promover la ciclocondensación entre el 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) y el ácido 4-nitrobenzoico (relación molar 1:1.2, diamina: ácido) empleando ácido polifosfórico (PPA) (relación en peso 1:3, ácido: PPA) a 140 °C y en atmosfera de nitrógeno,<sup>43</sup> pero nuevamente los resultados obtenidos fueron productos de descomposición. Un tercer intento para lograr la síntesis del 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**) fue empleando un protocolo de una reacción "one pot" en el que inicialmente se preparó un derivado triacilborano a partir del ácido 4-nitrobenzoico (2 mmol) y el borano-THF (1M, 0.70 mmol) al ser mezclados en tolueno (10 mL) durante 30 min a temperatura ambiente y una vez generado se hizo reaccionar con el 2,3-diaminobenzoato de metilo a reflujo dando como resultado productos de descomposición después de 1.5 horas.<sup>34</sup>

Teniendo en consideración lo anterior, se realizó la búsqueda de otras estrategias sintéticas fundamentadas en condiciones de reacción más suaves, especialmente temperaturas más bajas y tiempos de reacción más cortos que permitieran la formación del bencimidazol **9**.

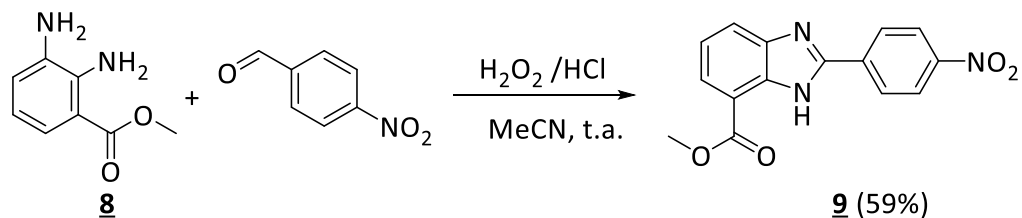
Como un primer intento se disolvieron 0.18 g del 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) (1.07 mmol) en 5 mL de acetonitrilo seco y a la mezcla resultante se le adicionaron 0.05 g (0.27 mmol) de KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, un catalizador básico heterogéneo de fase sólida y 64 mg de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Mientras que la mezcla se encontraba en agitación se le gotearon 0.19 g (1.07 mmol) de cloruro de 4-nitrobenzoilo disueltos en 5.35 mL de acetonitrilo seco.<sup>44</sup> Como se observa en el Esquema 13, después de 3 horas se obtuvieron 0.02 g (0.06 mmol, 6%) del correspondiente 2-amino-3-(4-nitrobenzamido)benzoato de metilo y el 2,3-bis(4-nitrobenzamido)benzoato de metilo 0.03 g (0.06 mmol, 9%). Por los bajos rendimientos

con los que fue aislada la amida generada y por la ausencia de la formación del producto de ciclocondensación se puede inferir que la intervención del catalizador fue poca o nula durante la reacción.



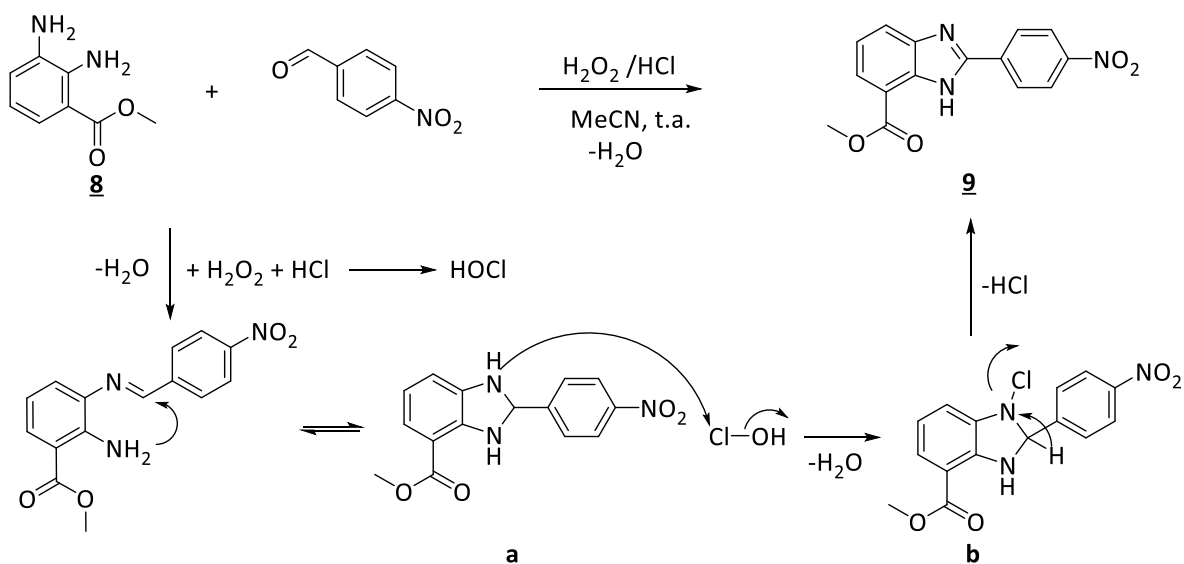
**Esquema 13.** Reacción catalizada por el  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Debido a los bajos rendimientos en la formación del 2-amino-3-(4-nitrobenzamido)benzoato de metilo y que no se presentó la formación del 2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**), se procedió a implementar otra reacción "one pot" pero esta vez empleando un sustrato diferente, el 4-nitrobenzaldehído, el cual se hizo reaccionar con el 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) en presencia del sistema oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$  /HCl en acetonitrilo. Esta reacción condujo a la formación de **9** con un rendimiento del 59% (Esquema 14).



**Esquema 14.** Obtención del bencimidazol 2,7-disustituido mediante una reacción "one-pot".

Respecto al mecanismo del paso de la oxidación, como se puede observar en el Esquema 15, la reacción probablemente involucra la formación de ácido hipocloroso mediante la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el ácido clorhídrico, y éste a su vez reacciona con el 2,3-dihidrobencimidazol (**a**) para conducir a la formación del intermediario **b**, seguido de la abstracción de hidrógeno para dar el correspondiente bencimidazol **9**.<sup>36</sup>



**Esquema 15.** Propuesta de mecanismo y posibles intermediarios en la síntesis del bencimidazol **9**.

La caracterización estructural del 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**) se realizó mediante el uso de técnicas convencionales tales como la espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C) uni y bidimensional.

Mediante los espectros de IR (anexo 1.1) se pudo obtener de forma preliminar, una evidencia de la formación de **9**. Se puede observar una banda absorción en 3433 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la vibración de tensión del enlace N-H del grupo amino secundario;

además se observan las señales correspondientes a las vibraciones de tensión del enlace C=O del grupo éster a  $1719\text{ cm}^{-1}$  y del enlace C=N presente en el anillo imidazolinico.

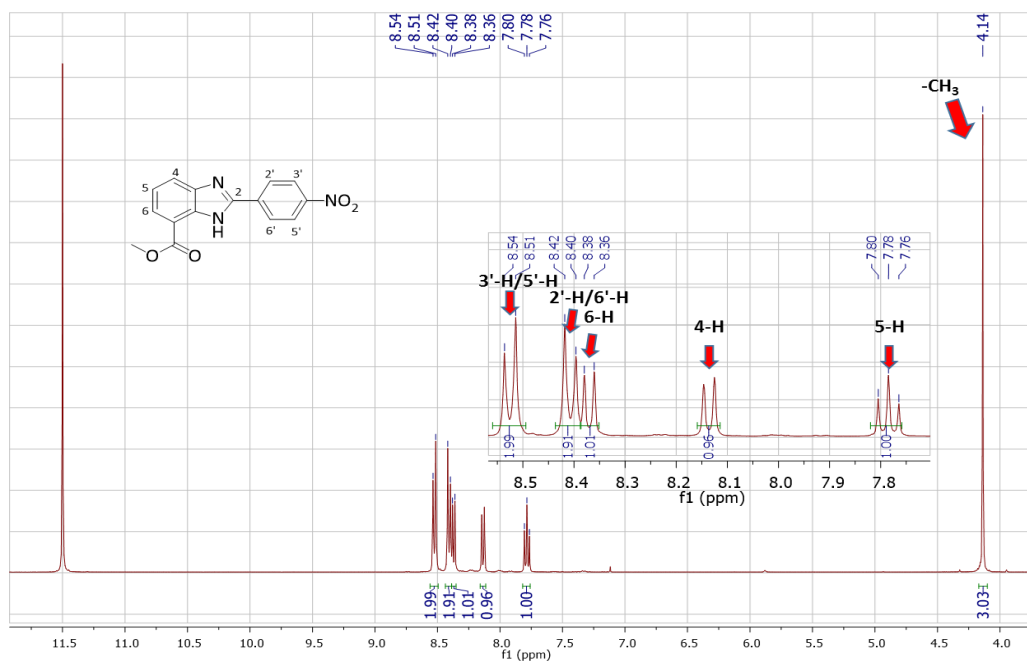
Dada la naturaleza altamente polar del compuesto **9**, éste fue analizado mediante espectrometría de masas de ionización por Electrospray (ESI-MS), por inyección directa de la muestra y operando en el modo positivo. Por esta técnica se pudo corroborar la masa del bencimidazol **9** ya que en el espectro de masas (anexo 1.2), se observa la formación de un pseudo-ión molecular con el sodio  $[M+23]^+$  (ión pico de base), además de un pseudo-ión con el disolvente (DMSO),  $[M+78+23]^+$  (ver parte experimental).

La estructura de **9** quedó plenamente confirmada con el análisis de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (anexo 1.3), RMN  $^{13}\text{C}$  (anexo 1.4), COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (anexo 1.5), HMBC y HSQC (anexos 1.6 y 1.7).

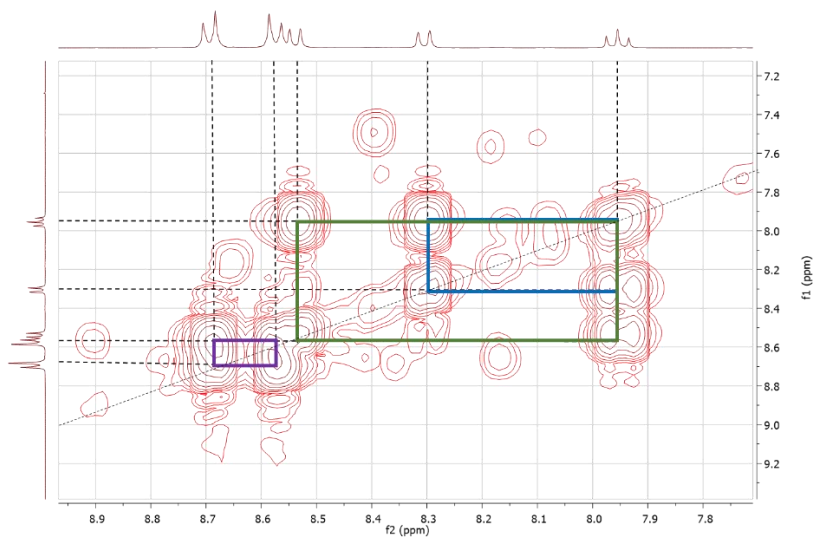
En el espectro RMN  $^1\text{H}$ , que se reproduce en la Figura 4, se observa la ausencia de la señal del grupo amino a campo bajo, debida al intercambio de deuterio con el ácido trifluoroacético deuterado empleado como disolvente. En la región de campo alto se encuentra la señal generada por los protones metílicos del grupo metoxilo como un singulete a 4.14 ppm; hacia frecuencias más altas, en un rango de 8.39–7.75 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones aromáticos presentes en el núcleo del bencimidazol, la señal que se puede identificar como un triplete (t) centrado a 7.78 ppm pertenece al protón 5-H, mientras que las siguientes dos señales identificadas como dobletes (d) a 8.14 y 8.37 corresponden a los protones 4-H y 6-H, respectivamente. Los dos dobletes ubicados entre 8.56–8.39 pertenecen a los 4 protones del anillo aromático ubicado en la posición 2 del bencimidazol.

Las asignaciones de los protones alifáticos y aromáticos del compuesto **9** se verificaron con la ayuda de los espectros de correlación homonuclear COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (Figura 5). En este espectro se observan las interacciones del protón 5-H con los protones 4-H (línea verde) y 6-H (línea azul). Así mismo, se observa la correlación entre los protones del anillo aromático que sustituye la posición 2 del bencimidazol (línea morada).

El análisis de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  con el que se pudo asignar el desplazamiento químico a cada uno de los carbonos del 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**), fue realizado de manera conjunta con los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear HMBC y HSQC.



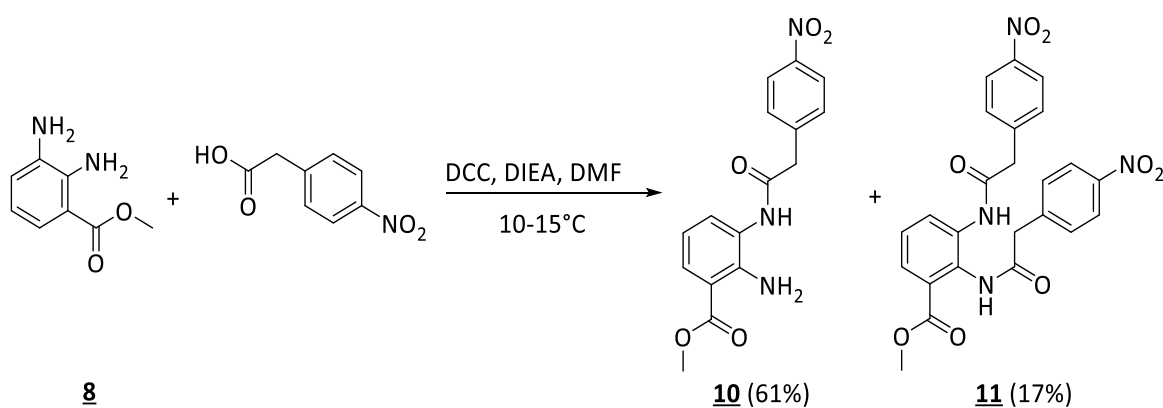
**Figura 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del bencimidazol **9**.



**Figura 5.** Ampliación del espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del bencimidazol **9**.

## 6.2. OBTENCIÓN DE 2-AMINO-3-[[[4-NITROFENIL)ACETIL]AMINO]BENZOATO DE METILO (**10**)

La formación del 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**) resulta de hacer reaccionar el 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) con el ácido 4-nitrofenilacético en presencia de la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF (Esquema 16).



Esquema 16. Reacción de acoplamiento empleando DCC.

La orientación de esta reacción está dirigida hacia la formación de la amida **10** (61 %), ya que el 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) cuenta con un grupo amino en la posición 3 del anillo aromático menos impedido y más nucleofílico que el que se encuentra en la posición 2, orto al grupo éster. Sin embargo, dicha posición presenta cierta disponibilidad para atacar a otra molécula del ácido 4-nitrofenilacético y así generar el subproducto **11** (17 %). Es importante tener en cuenta que la temperatura juega un papel muy importante en esta reacción, ya que al elevar la temperatura a ambiente se presenta un incremento en el rendimiento del producto **11** (29 %) y una disminución en el del producto de interés **10** (35 %). Por no ser de interés para nuestro estudio, la diamida **11** no será analizada en este trabajo.

La primera evidencia de la formación del 2-amino-3-[[4-nitrofenil)acetil]amino}benzoato de metilo (**10**) se aprecia en el espectro de IR (anexo 2.1), en el que se logra observar la banda que corresponde a la vibración de tensión del enlace N–H a  $3226\text{ cm}^{-1}$ . Además, se presentan las señales que corresponden a la vibración de tensión de los enlaces C=O del grupo amida y éster a  $1719$  y  $1643\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, y la banda de vibración de flexión del enlace N–H del grupo amida a  $1605\text{ cm}^{-1}$ .

Mediante el análisis del espectro de masas (anexo 2.2) fue posible corroborar la identidad de **10**, ya que se observa un único pseudo-ión, que por su masa se puede presumir que corresponde a la formación del pseudo-ión molecular con sodio  $[M+23]^+$ .

La estructura del 2-amino-3-[[4-nitrofenil)acetil]amino}benzoato de metilo (**10**) quedó completamente corroborada con el análisis de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (anexo 2.3), RMN  $^{13}\text{C}$  (anexo 2.4), NOESY  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  (anexo 2.5), HMBC y HSQC (anexos 2.6 y 2.7).

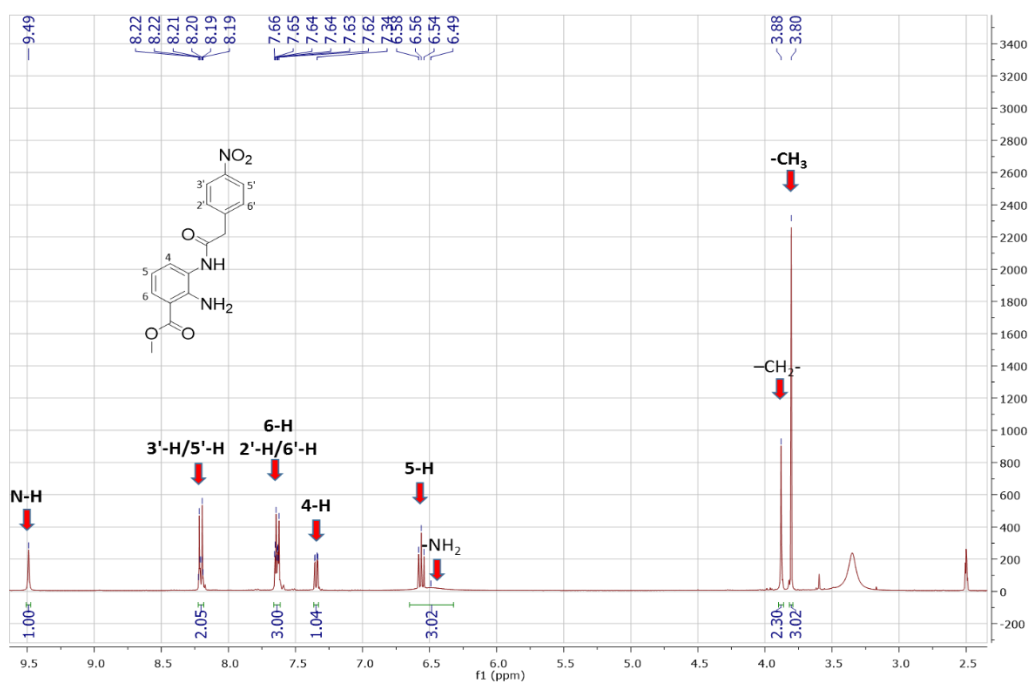
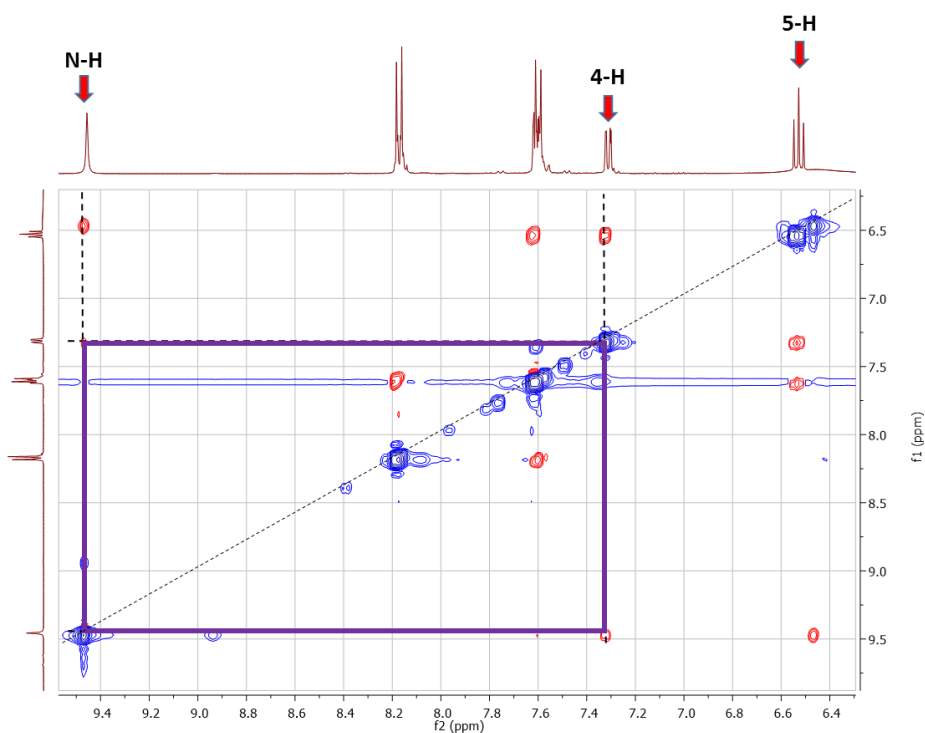


Figura 6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la amida **10**.



En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  que se reproduce en la figura 6 se observa que la señal del hidrógeno  $-\text{N}-\text{H}$  se registra a campo bajo, a 9.49 ppm, desplazamiento que se explica por el desapantallamiento que se genera por la conjugación del par de electrones de no enlace del átomo de nitrógeno con los electrones pi del sistema carbonílico.

En la región de campo alto se presentan dos singuletes (s) situados a 3.80 y 3.88 ppm que corresponden a los protones del grupo metoxilo y a los metilénicos ( $-\text{CH}_2-$ ), respectivamente. En la región aromática, además de las señales de los protones aromáticos del 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) de partida, se observan las dos señales ubicadas entre 8.24–7.60 ppm que coinciden con los 4 protones del nuevo anillo aromático, y la que corresponde a los protones  $2'-\text{H}/6'-\text{H}$  se solapa con el protón  $6-\text{H}$  del otro anillo aromático para generar un multiplete (m) ubicado entre 7.66–7.62 ppm. La señal del grupo  $-\text{NH}_2$  se presenta como un singulete ancho (sa) a 6.49 ppm que se solapa con el triplete (t) que corresponde al protón  $5-\text{H}$ , pero sin alterar su multiplicidad.

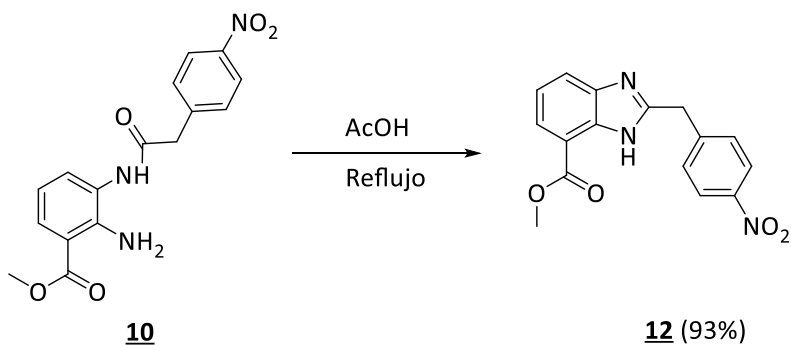


**Figura 7.** Ampliación del espectro NOESY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  del compuesto **10**.

La formación preferencial de la amida en la posición 3 del 2,3-diaminobenzoato de metilo (**8**) pudo corroborarse al analizarse el espectro NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 7) del compuesto **10** donde se aprecia claramente las interacciones espaciales entre el protón N-H de la amida con los protón aromático 4-H (línea morada).

### 6.3. SÍNTESIS DEL 2-(4-NITROBENCIL)-1H-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXILATO DE METILO (**12**)

Aprovechando las características estructurales presentes en el 2-amino-3-[[4-nitrofenil]acetil]amino}benzoato de metilo (**10**), tales como un grupo amino libre capaz de actuar como nucleófilo y un grupo amida provisto de un carbono electrodeficiente, se procedió a promover la ciclación intramolecular de este sustrato en presencia de ácido acético, que además de actuar como catalizador actúa como disolvente (Esquema 17).



**Esquema 17.** Obtención del 2-(4-nitrobencil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).

En estas condiciones a reflujo, el 2-(4-nitrobencil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**) se obtuvo con un rendimiento del 93.4% después de una hora de agitación. El primer indicio de que la reacción de ciclocondensación tuvo lugar, se encuentra en los espectros de IR (anexo 3.1), en donde se aprecia la desaparición de la banda de tensión

del enlace N–H del grupo amida del precursor, así como la permanencia de la banda de tensión del enlace C=O de la función éster en 1706 cm<sup>-1</sup>. Por otro lado, también se puede constatar la formación del nuevo enlace C=N del bencimidazol en 1599 cm<sup>-1</sup>.

El análisis del espectro de masas del 2–(4–nitrobencil)–1*H*–bencimidazol–7–carboxilato de metilo (**12**) también aportó información que permitió confirmar la formación de este compuesto. En dicho espectro (anexo 3.2) se presenta el pseudo–ion molecular con sodio [M+23]<sup>+</sup>, además del pseudo–ion con el disolvente y el sodio [M+78+23]<sup>+</sup>, pero con una abundancia relativa muy baja. (Ver parte experimental)

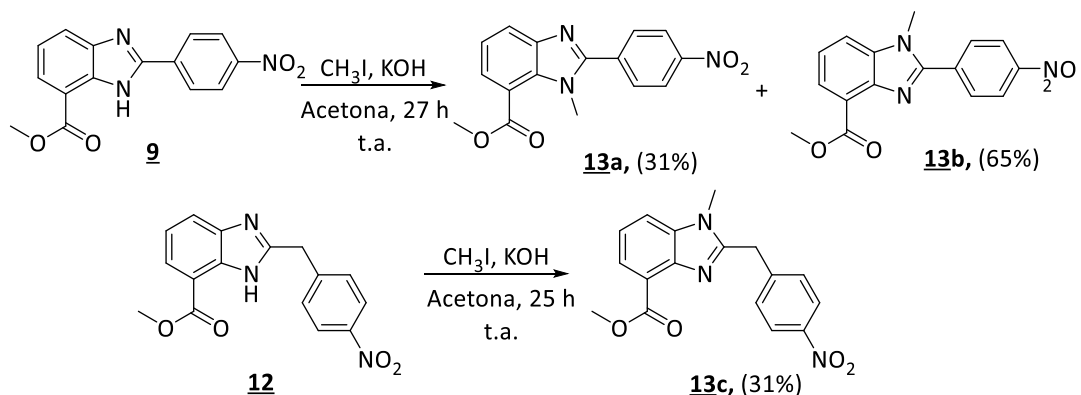
La identidad del bencimidazol **12** quedó confirmada mediante el análisis de los espectros de RMN <sup>1</sup>H (anexo 3.3), RMN <sup>13</sup>C (anexo 3.4), HMBC y HSQC (anexos 3.5 y 3.6).

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del bencimidazol **12** se observan las mismas señales descritas anteriormente para el bencimidazol **9** con ligeras diferencias en los desplazamientos químicos de cada una de las señales y la aparición del singulete a 4.45 ppm que corresponde a los protones metilénicos del grupo bencilo situado en la posición 2 del bencimidazol.

#### **6.4. REACCIÓN DE METILACIÓN DE 2–(4–NITROFENIL)–1*H*–BENCIMIDAZOL–7–CARBOXILATO DE METILO (**9**) Y 2–(4–NITROBENCIL)–1*H*–BENCIMIDAZOL–7–CARBOXILATO DE METILO (**12**)**

Teniendo en mente que el propósito principal de este proyecto era la obtención de los derivados del 1–metilbencimidazol, los bencimidazoles **9** y **12**, por separado, se metilaron con yoduro de metilo en presencia de hidróxido de potasio y acetona como disolvente. Los regioisómeros: 1–Metil–2–(4–nitrofenil)–1*H*–bencimidazol–7–carboxilato de metilo (**13a**) y 1–Metil–2–(4–nitrofenil)–1*H*–bencimidazol–4–carboxilato de metilo (**13b**), obtenidos a partir de **9**, fueron separados mediante cromatografía en columna y se pudo

constatar la regioselectividad de la reacción, siendo el isómero **13b** el producto mayoritario con un rendimiento de 65.0% y el isómero **13a** el minoritario con el 31.3%. El bajo rendimiento de **13a** puede ser atribuido al impedimento estérico generado por el grupo éster. Por otro lado, bajo las mismas condiciones de reacción el bencimidazol **12** generó el compuesto **13c** con rendimientos bajos y a su vez condujo a la formación de productos de descomposición (Esquema 18).

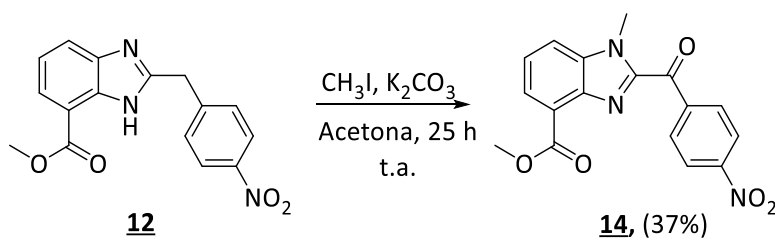


**Esquema 18.** Reacción de metilación de los bencimidazoles **9** y **12**.

Debido al bajo rendimiento con el que fue aislado el producto **13c** y la ausencia de su correspondiente isómero, se decidió explorar otras condiciones de reacción que permitieran mejorar los resultados obtenidos. En primera instancia, se hizo reaccionar el bencimidazol **12** con el yoduro de metilo (relación molar 1: 4, bencimidazol:  $\text{CH}_3\text{I}$ ) en acetona a temperatura ambiente. Después de 44 horas se observó que los nitrógenos presentes en el anillo de imidazol poseen la suficiente nucleofilia para atacar al yoduro de metilo sin la necesidad de generar un anión mediante catálisis básica, ya que fue posible constatar la formación del producto **13c** (27%); sin embargo, nuevamente se presentó la formación de varios productos de descomposición y no fue posible aislar el isómero de **13c**.

Continuando con la búsqueda de las mejores condiciones para la reacción de metilación del bencimidazol **12**, éste se hizo reaccionar con el yoduro de metilo en presencia de

$K_2CO_3$  (relación molar 1: 1.2:1.1, bencimidazol:  $CH_3I$ :  $K_2CO_3$ ) con acetona como disolvente a temperatura ambiente durante 15 horas. Bajo estas condiciones de reacción no se observó la formación del compuesto **13c**; sin embargo, se logró aislar y caracterizar el producto de oxidación **14**. En este punto no fue posible tener la certeza de si la variación de la base condujo a estos resultados o si un agente externo pudo intervenir en el proceso de oxidación. A la luz de estos resultados se decidió repetir nuevamente la reacción bajo las mismas condiciones, pero lo que se observó fue que después de 16 horas de reacción se presentaba la formación del producto **13c** con los productos de descomposición antes observados. Sin embargo, después de 24 horas de reacción el producto **13c** ya no estaba presente en el medio de reacción y se dio lugar a la formación del producto **14** (Esquema 19).

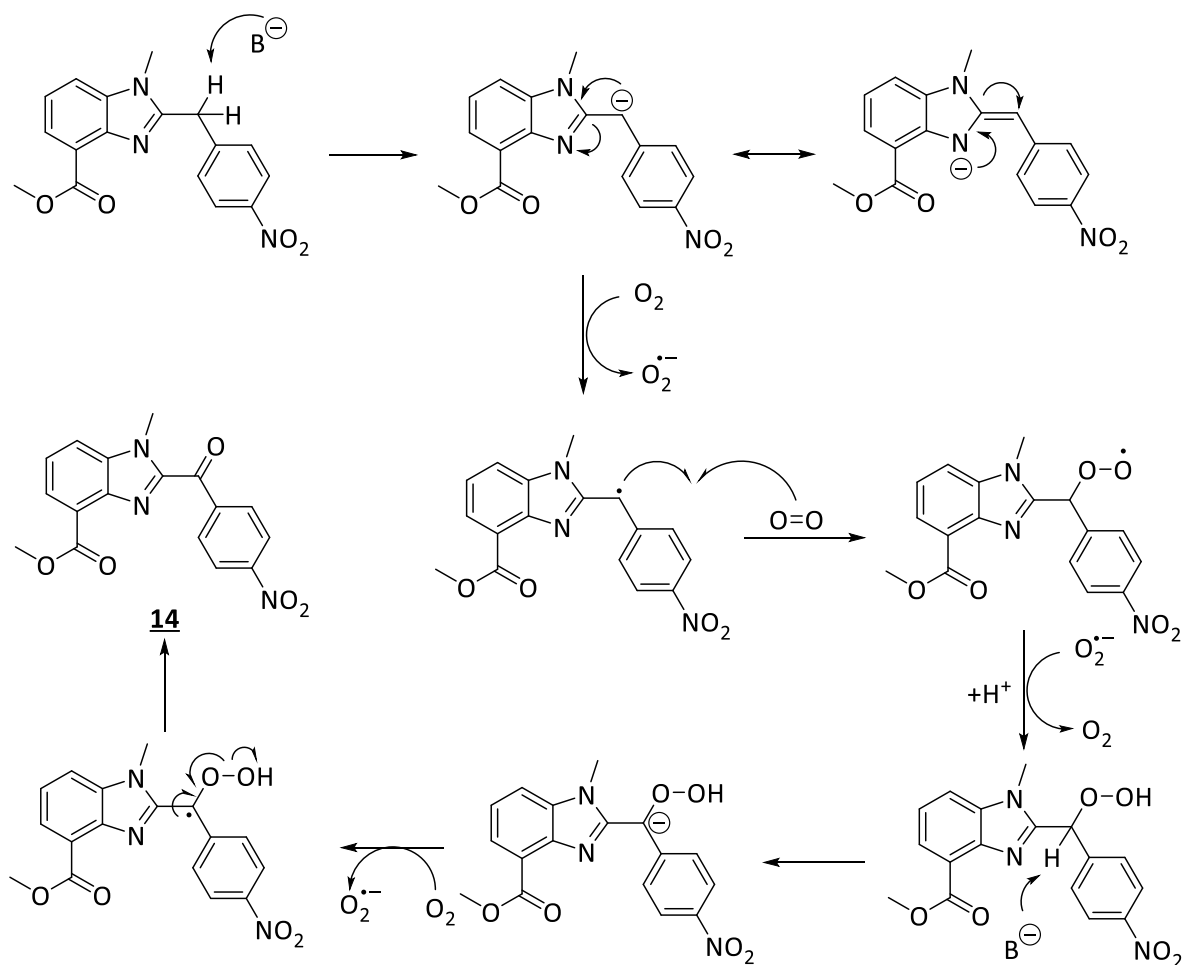


**Esquema 19.** Formación del 1-metil-2-(4-nitrobenzoil)-1H-benzimidazol-4-carboxilato de metilo (**14**).

Teniendo en consideración los resultados obtenidos al realizar las variaciones mencionadas anteriormente, se presume que la base ( $K_2CO_3$ ) representa un papel importante en la oxidación del bencimidazol **12**, por lo que se puede inferir que una vez se forma el producto de metilación **13c**, la reacción probablemente transcurre a través de la deprotonación del  $CH_2$  del grupo bencílico que permite la formación de una enamina que es fácilmente oxidable con oxígeno molecular. En principio, al inicio de la reacción la base abstrae de forma preferente el hidrógeno presente en el enlace  $N-H$  de **12** haciendo que la formación de la enamina transcurra después de la metilación del nitrógeno en el anillo

imidazólico (Esquema 20). Es importante tener en cuenta que la molécula **13c** cuenta con características estructurales que facilitan la formación de un intermediario radicalario, ya que cuenta con un núcleo de bencimidazol (sistema  $\pi$  excedente) y un anillo aromático (sistema  $\pi$  deficiente) conectados mediante un puente metilénico, los cuales trabajan sinérgicamente para activar los enlaces C–H del metileno mediante un efecto captodativo

45



**Esquema 20.** Propuesta de mecanismo de reacción para la formación del producto de oxidación **14**.

La caracterización estructural de los derivados **13a-c** y **14**, se realizó mediante el uso de técnicas convencionales tales como la espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C) uni y bidimensional.

El primer indicio de que la reacción de metilación tuvo lugar, se encuentra en los espectros de IR (anexo 4.1), en los que se observa la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace N-H y la aparición de la señal que coincide con el enlace N-CH<sub>3</sub> ubicada en la región de 1197-1203 cm<sup>-1</sup>. Por otro lado se registran las señales del enlace C=O entre 1698-1711 cm<sup>-1</sup>, el enlace C=N del anillo imidazólico entre 1599-1602 cm<sup>-1</sup> y la aparición del nuevo grupo carbonilo en 1660 cm<sup>-1</sup> para el caso particular de la molécula **14**.

Los espectros de masas (anexo 4.2) también confirman la formación de los 1-metilbencimidazoles **13a-c** y **14**. Para el caso del par de isómeros **13a,b** se observan diferencias en la formación de los pseudo-iones moleculares ya que durante la toma de espectro de masas para **13a** fue necesaria la adición de ácido fórmico con el fin de mejorar la ionización de este compuesto, por lo que se presenta el pseudo-ión molecular, que además coincide con el ión pico de base como [M+1]<sup>+</sup>, mientras que para su isómero **13b** el pseudo-ión molecular se observa como [M+23]<sup>+</sup>. Para el caso de los productos de la reacción de metilación **13c** y **14** el ión pico de base coincide con el pseudo-ión molecular que corresponde a [M+23]<sup>+</sup>.

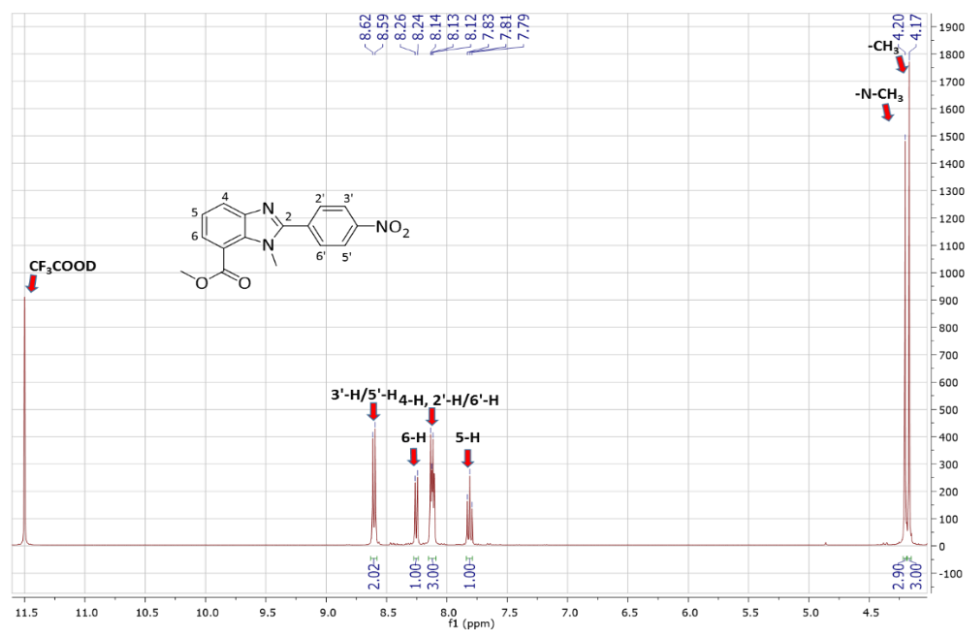
La identidad de los compuestos obtenidos mediante las reacciones de metilación quedó plenamente establecida con el análisis del conjunto de espectros de RMN <sup>1</sup>H (anexo 4.3) y RMN <sup>13</sup>C (anexo 4.4), así como los espectros de correlación homonuclear COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (anexo 4.5), y de correlación heteronuclear HMBC y HSQC (anexos 4.6 y 4.7); mediante el análisis de las correlaciones espaciales que se observan en los espectros NOESY (anexo 4.8), fue posible determinar su isomería.

El análisis de los espectros de RMN de **13a,b** que se presenta a continuación, se centra en la identificación y determinación de la regioisomería del par de isómeros **13a** y **13b**, el cual

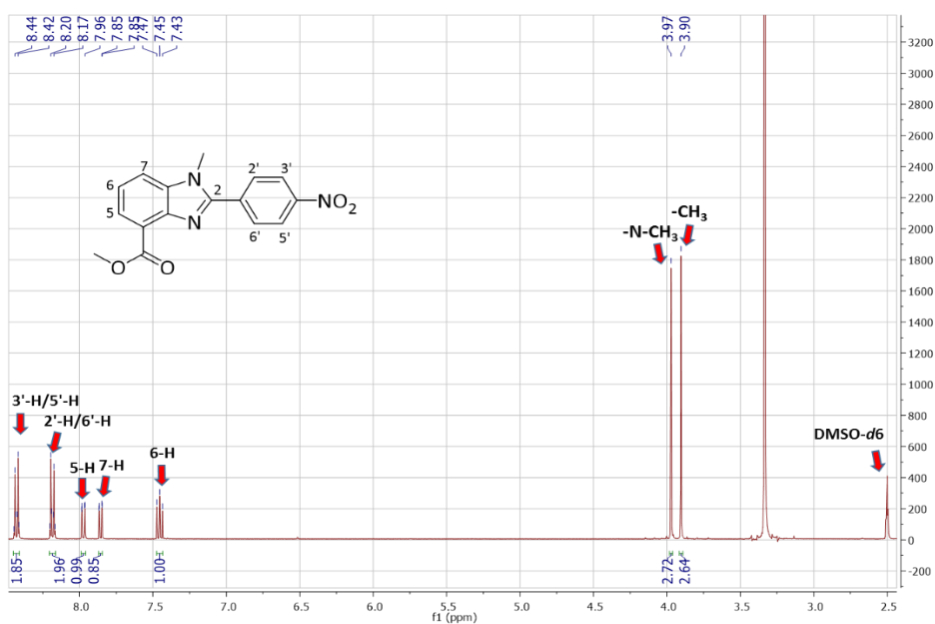
resulta de gran interés debido a que permite evidenciar la selectividad de la reacción de metilación para este tipo de bencimidazoles.

La primera evidencia de la formación de estos compuestos es la desaparición de la señal del protón del enlace N–H presente en su precursor **9**, y la aparición de la señal correspondiente a los protones del metilo recién incorporado (N–CH<sub>3</sub>) a campo alto como un singulete (s) a 4.20 ppm para **13a** y 3.97 ppm para **13b**. Los protones correspondientes al grupo metoxilo se registran como singuletes (s) a 4.17 ppm para **13a** mientras que para **13b** a 3.90 ppm. Si se analizan las señales en el orden en que aparecen de campo alto a campo bajo, se advierte, en primera instancia, la presencia de un triplete (t) generado por el protón 5–H a 7.81 ppm para **13a** mientras que para **13b** esta señal corresponde a 6–H y se encuentra a 7.45 ppm; a continuación se registra para **13a** un doblete (d) ubicado a 8.11 ppm que coincide con el protón 4–H, y que a su vez se encuentra alternado entre el doblete (d) situado a 8.13 ppm que corresponde a los dos protones aromáticos 2'–H/6'–H. Por otro lado las señales de estos protones para **13b** aparecen a 7.97 ppm (7–H) como un doblete de doblete (dd) y a 8.18 ppm (2'–H/6'–H) como doblete de triplete (dt). La señal que se asigna para **13a** como 6–H resuena a 8.25 ppm como un doblete (d) mientras que para su isómero **13b** esta señal corresponde a 5–H y aparece como un doblete de doblete (dd) a 7.45 ppm. A campo más bajo, se registra otra señal para **13a** como doblete (d) que integra para dos protones y coincide con los protones aromáticos 3'–H/5'–H a 8.60 ppm y para **13b** esta señal se asigna como un doblete de triplete (dt) a 8.43 ppm. Es importante tener en cuenta que las diferencias encontradas en los desdoblamientos de cada una de las señales radican en la diferencia de disolventes deuterados en los que fueron disueltos cada uno de los regioisómeros (Figuras 8 y 9).





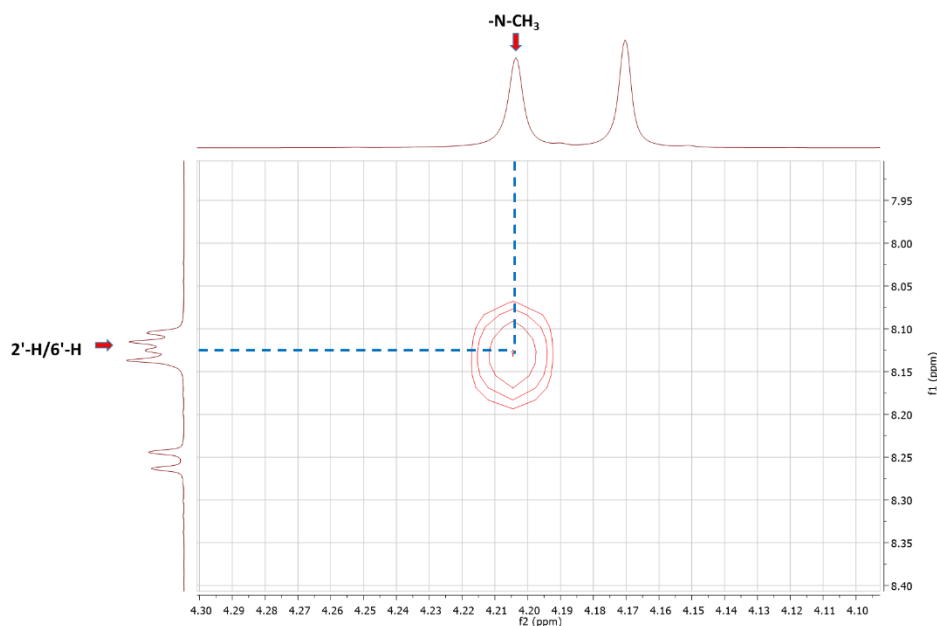
**Figura 8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**13a**).



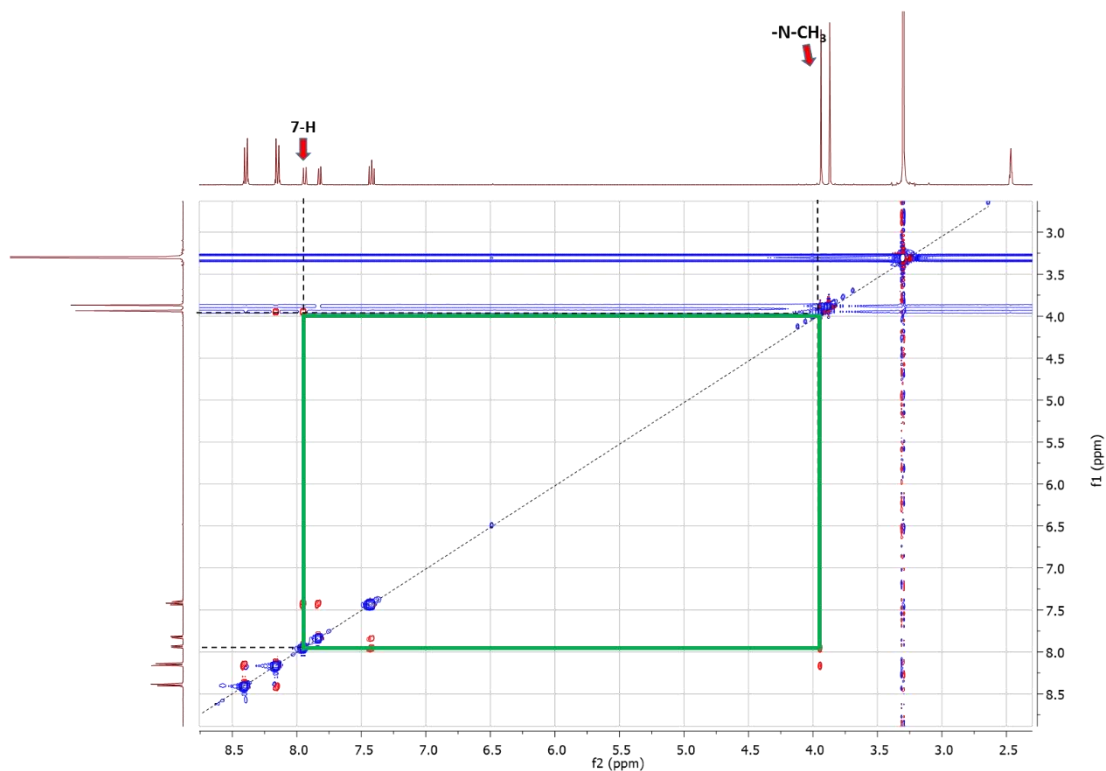
**Figura 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-4-carboxilato de metilo (**13b**).

La regioisomería de los productos **13a,b** aislados se determinó inequívocamente mediante la interpretación de sus espectros de correlación espacial NOESY, encontrándose que **13a** corresponde al isómero 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo, y **13b** al isómero 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-4-carboxilato de metilo.

En la Figura 10 se presenta la ampliación del espectro NOESY de **13a**, donde solo se puede apreciar a pesar del solapamiento entre las señales de 4-H y los protones aromáticos 2'-H/6'-H, la interacción espacial que existe entre los protones del metilo (N-CH<sub>3</sub>) y los protones 2'-H/6'-H, a diferencia de **13b** que como se puede ver en la Figura 11, presenta una clara interacción espacial entre el protón 7-H y los protones del metilo (N-CH<sub>3</sub>) haciendo posible de esta forma identificar los dos regioisómeros.



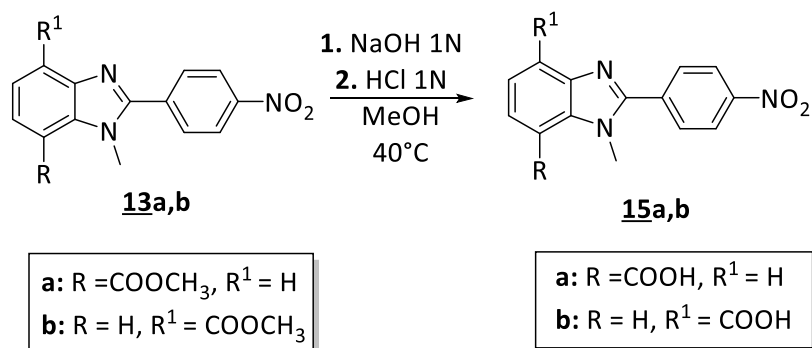
**Figura 10.** Ampliación del espectro de NOESY del regioisómero **13a**.



**Figura 11.** Espectro NOESY del regioisómero **13b**

#### 6.5. OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1*H*-BENCIMIDAZOL-7-CARBOXÍLICO (**15a**), 1-METIL-2-(4-NITROFENIL)-1*H*-BENCIMIDAZOL-4-CARBOXÍLICO (**15b**)

En la última etapa de la ruta sintética diseñada se llevó a cabo la preparación de los ácidos 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxílico (**15a**) y 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-4-carboxílico (**15b**), compuestos que constituyen uno de los principales objetivos de este Trabajo de Investigación. La preparación de estos compuestos se hizo de forma sencilla y eficiente mediante una hidrólisis básica (Esquema 21). Mediante esta metodología fue posible obtener los productos deseados con altos rendimientos (80–77 %).



**Esquema 21.** Hidrólisis básica de los regioisómeros **13a,b**.

La caracterización de los ácidos **15a,b**, se efectuó mediante espectroscopia de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

Mediante el análisis de los espectros de IR (anexo 5.1) se pudo observar la señal correspondiente a la vibración de tensión del enlace C=O de la función carboxílica ubicada entre 1704–1735 cm<sup>-1</sup> así como la señal de la vibración de tensión del enlace C=N del núcleo del bencimidazol entre 1599–1607 cm<sup>-1</sup>.

La información obtenida a partir del análisis de los espectros de masas (anexo 5.2) es que los pseudo-iones moleculares para ambos isómeros se registran como [M+1]<sup>+</sup> y su masa coincide con las fórmulas condensadas de los respectivos cationes esperados.

La interpretación de los espectros monodimensionales y bidimensionales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (anexos 5.3 a 5.6) de **15a,b**, permitió realizar la completa identificación de estos nuevos ácidos, así como la determinación de su isomería. Mediante el análisis riguroso de los espectros de RMN <sup>1</sup>H se constató que la hidrólisis de los respectivos ésteres **13a,b** había transcurrido completamente, siendo la ausencia de la señal correspondiente al metilo del fragmento carboxilato la principal evidencia. Al analizar las señales de los protones del núcleo del bencimidazol se observa que éstas se resuelven mejor si se comparan con las señales de los protones homólogos de sus precursores.

## 6.6. ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA *in vitro* EN LA ENZIMA TcTIM

Una vez que se realizó la evaluación de la capacidad inhibitoria de los compuestos **9**, **12**, **13a-c** y **15a,b** sobre la enzima TcTIM a una concentración de 200  $\mu$ M se pudo observar claramente que los derivados del 1-metilbencimidazol no presentaron ningún porcentaje de inhibición, mientras que aquellos que contaban con el grupo N-H lograron inhibir la enzima, siendo el bencimidazol **9** (**AL14C**) el más activo de la serie ya que se registra un 72% de inhibición para este compuesto (Tabla 3).

La presencia de un grupo N-H en el núcleo de bencimidazol favorece la actividad como ocurre en los compuestos **9** y **12**, lo cual sugiere que es posible la interacción con un aceptor de puentes de hidrógeno y que por esta razón dichos compuestos presentaron mejor actividad que sus homólogos metilados. Por otro lado, estos resultados rechazan la hipótesis planteada y también los resultados obtenidos en trabajos previos del laboratorio;<sup>32</sup> Sin embargo, se fortalece la idea de que para este tipo de compuestos es necesaria la presencia del átomo de azufre ya que los derivados del benzotiazol siguen teniendo el mayor porcentaje de inhibición.

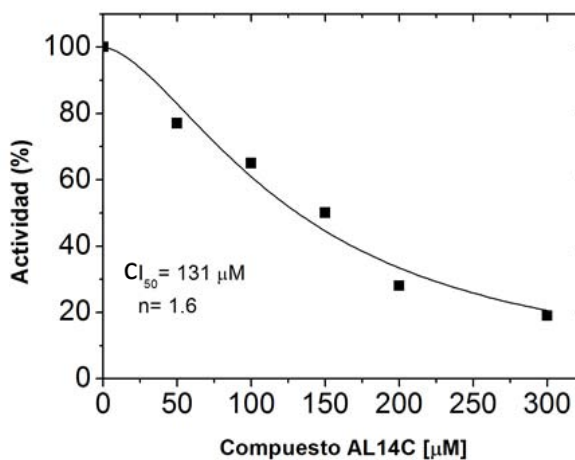
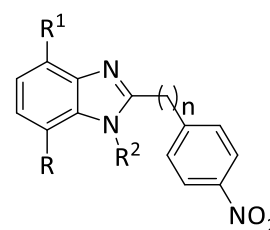
Otra característica importante que se pudo observar al comparar los resultados obtenidos para los compuestos **9** y **12** es que una mayor flexibilidad en la molécula como pasa con el grupo bencilo del compuesto **12** afecta de forma negativa la capacidad inhibitoria, mientras que la rigidez del grupo fenilo en el compuesto **9** favoreció de forma significativa la actividad.

Con el objetivo de calcular la  $CI_{50}$  del compuesto **9** se realizó una curva en la que se representa su capacidad inhibitoria a diferentes concentraciones (Figura 12) y se observa que esta presenta un comportamiento sigmoide y un valor obtenido para "n" de 1.6, lo que sugiere que se requiere más de una molécula para inhibir a la enzima. Lo anterior se

podría deber a que la interface de la enzima es relativamente grande, por lo que da cabida perfectamente a moléculas relativamente pequeñas como el bencimidazol **9**.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición de TcTIM de los compuestos evaluados.

Clave	Compuesto	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	% inhibición
						TcTIM
AL14c	<b>9</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	H	0	72
AL22BF1	<b>13a</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	0	0
AL22BF2	<b>13b</b>	H	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0	0
AL24	<b>15a</b>	COOH	H	CH <sub>3</sub>	0	0
AL26	<b>15b</b>	H	COOH	CH <sub>3</sub>	0	0
AL21BF2	<b>12</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	H	1	27
AL25CF4	<b>13c</b>	H	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1	0



**Figura 12.** Curva de inactivación de la TcTIM del compuesto **9**. La Cl<sub>50</sub> se calculó de acuerdo a lo establecido en la referencia.<sup>30</sup>

## CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar 8 bencimidazoles con rendimientos de reacción moderados a buenos, los cuales presentaron estabilidad química. Se pudieron establecer condiciones apropiadas para la obtención de dos series de compuestos a partir de un mismo precursor.

La reacción de acilación con DCC depende de la temperatura, y presenta los mejores rendimientos en la formación de la amida **10** a bajas temperaturas.

Se estableció que la reacción de metilación del bencimidazol **9** es regioselectiva y conduce a la formación de dos isómeros, siendo el isómero **13b** el producto mayoritario con un rendimiento de 65 % y el isómero **13a** el minoritario con el 31 %. Por otro lado, esta misma reacción para el bencimidazol **12** solo condujo a la formación de uno de los dos posibles isómeros, el producto **13c** y con bajos rendimientos.

La formación del producto **14** evidencia que el  $-CH_2-$  del grupo bencilo presente en el bencimidazol **13c** es fácilmente oxidable bajo condiciones aeróbicas en presencia de carbonato de potasio.

Los productos de la reacción de metilación no mejoraron la capacidad inhibitoria registrada para los derivados del benzotiazol (**7**) y (**8**) ya que no presentaron ninguna actividad sobre la enzima TcTIM, mientras que los compuestos con un grupo N-H en el núcleo de bencimidazol sí mostraron inhibición de esta enzima, dentro de los cuales el derivado **9** presenta el mayor porcentaje de inhibición (72 %). Sin embargo, ninguno de estos resultados superó o igualó los registrados para los derivados del benzotiazol, demostrándose de esta manera la importancia del átomo de azufre en el sistema aromático.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Controversies and Advances. *Trends Parasitol.* **2003**, *19* (11), 495–501.
- (2) Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Alvarez, M. G.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Armenti, A. Side Effects of Benznidazole as Treatment in Chronic Chagas Disease: Fears and Realities. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2009**, *7* (2), 157–163.
- (3) Chacín–Bonilla, L. Las Enfermedades Parasitarias Intestinales Como Un Problema de Salud Global. *Invest. Clin.* **2013**, *54* (1), 1–4.
- (4) Ferreira, M. S. Infections by Protozoa in Immunocompromised Hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95* (SUPPL. 1), 159–162.
- (5) Cevallos, Ana Maria, Hernandez, R. Trypanosoma Cruzi Y La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
- (6) Moncayo, Á.; Silveira, A. C. Current Epidemiological Trends for Chagas Disease in Latin America and Future Challenges in Epidemiology, Surveillance and Health Policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104* (SUPPL. 1), 17–30.
- (7) Carod–Artal, F. J.; Gascon, J. Chagas Disease and Stroke. *Lancet Neurol.* **2010**, *9* (5), 533–542.
- (8) Chagas, C. Nova Tripanozomíaze Humana: Estudos Sobre a Morfolojia E O Ciclo Evolutivo Do Schizotrypanum Cruzi N. Gen., N. Sp., Ajente Etiolojico de Nova Entidade Morbida Do Homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1909, pp 159–218.
- (9) Borborema, M.; De Oliveira, J.; Lacerda, M. V. G. de. Meningoencephalitis in a Patient with Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41* (5), 520–521.



- (10) Pinto, A. Y. D. N.; Valente, S. A.; Valente, V. D. C.; Ferreira, A. G.; Coura, J. R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. Estudo de 233 Casos do Pará Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41* (6), 602–614.
- (11) Rassi, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26* (2), 275–291.
- (12) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm) (accessed Apr 11, 2016).
- (13) Clayton, J. Chagas Disease 101. *Nature* **2010**, *465* (7301), S4–S5.
- (14) Villar, J.; Jg, P.; Ol, C.; Pepper, R. A.; Ja, M.–N.; Gh, G.; Villar, J. C.; Perez, J. G.; Cortes, O. L.; Riarte, A.; et al. Trypanocidal Drugs for Chronic Asymptomatic Trypanosoma Cruzi Infection (Review). **2009**, No. 1.
- (15) Muñoz, M. J.; Murcia, L.; Segovia, M. The Urgent Need to Develop New Drugs and Tools for the Treatment of Chagas Disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9* (1), 5–7.
- (16) de Andrade, A. L.; Zicker, F.; de Oliveira, R. M.; Almeida Silva, S.; Luquetti, A.; Travassos, L. R.; Almeida, I. C.; de Andrade, S. S.; de Andrade, J. G.; Martelli, C. M. Randomised Trial of Efficacy of Benznidazole in Treatment of Early Trypanosoma Cruzi Infection. *Lancet (London, England)* **1996**, *348* (9039), 1407–1413.
- (17) Estani, S. S.; Segura, E. L.; Ruiz, A. M.; Velazquez, E.; Porcel, B. M.; Yampotis, C. Efficacy of Chemotherapy with Benznidazole in Children in the Indeterminate Phase of Chagas' Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *59* (4), 526–529.
- (18) Altcheh, J.; Moscatelli, G.; Moroni, S.; Garcia–Bournissen, F.; Freilij, H. Adverse Events after the Use of Benznidazole in Infants and Children with Chagas Disease.

*Pediatrics* **2011**, *127* (1), e212–e218.

- (19) X, W.; H, S. *Metal Complexes in the Treatment of Tropical Diseases: Malaria, Trypanosomiasis, and Leishmaniasis*; Elsevier Ltd., 2013.
- (20) Liñares, G. E. G.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (3), 335–360.
- (21) Soeiro, M. N. C.; de Castro, S. L. Trypanosoma Cruzi Targets for New Chemotherapeutic Approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13* (1), 105–121.
- (22) Gómez–Puyou, a; Saavedra–Lira, E.; Becker, I.; Zubillaga, R. a; Rojo–Domínguez, a; Pérez–Montfort, R. Using Evolutionary Changes to Achieve Species–Specific Inhibition of Enzyme Action—Studies with Triosephosphate Isomerase. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 847–855.
- (23) Tellez–Valencia, A.; Olivares–Illana, V.; Hernandez–Santoyo, A.; Perez–Montfort, R.; Costas, M.; Rodriguez–Romero, A.; Lopez–Calahorra, F.; Tuena De Gomez–Puyou, M.; Gomez–Puyou, A. Inactivation of Triosephosphate Isomerase from Trypanosoma Cruzi by an Agent That Perturbs Its Dimer Interface. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341* (5), 1355–1365.
- (24) Michels, P. A. M.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V. Metabolic Functions of Glycosomes in Trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **2006**, *1763* (12), 1463–1477.
- (25) Maldonado, E.; Soriano–García, M.; Moreno, A.; Cabrera, N.; Garza–Ramos, G.; Tuena de Gómez–Puyou, M.; Gómez–Puyou, A.; Perez–Montfort, R. Differences in the Intersubunit Contacts in Triosephosphate Isomerase from Two Closely Related Pathogenic Trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **1998**, *283* (1), 193–203.
- (26) Zabori, S.; Rudolph, R.; Jaenicke, R. Folding and Association of Triose Phosphate

Isomerase from Rabbit Muscle. *Z.Naturforsch C.* **1980**, 35 (11–12), 999–1004.

- (27) Romo–mancillas, A.; Téllez–valencia, A.; Yépez–mulia, L.; Hernández–luis, F.; Hernández–campos, A.; Castillo, R. Journal of Molecular Graphics and Modelling The Design and Inhibitory Profile of New Benzimidazole Derivatives against Triosephosphate Isomerase from Trypanosoma Cruzi : A Problem of Residue. *J. Mol. Graph. Model.* **2011**, 30, 90–99.
- (28) Espinoza–Fonseca, L. M.; Trujillo–Ferrara, J. G. Exploring the Possible Binding Sites at the Interface of Triosephosphate Isomerase Dimer as a Potential Target for Anti–Tripanosomal Drug Design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (12), 3151–3154.
- (29) Espinoza–Fonseca, L. M.; Trujillo–Ferrara, J. G. Structural Considerations for the Rational Design of Selective Anti–Trypanosomal Agents: The Role of the Aromatic Clusters at the Interface of Triosephosphate Isomerase Dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 328 (4), 922–928.
- (30) Tellez–Valencia, Alfredo Avila–Rios, S.; Perez–Montfort, R.; Rodriguez–Romero, A.; Tuena de Gómez–Puyou, M.; Lopez–Calahorra, F.; Gomez–Puyou, A. Highly Specific Inactivation of Triosephosphate Isomerase from Trypanosoma Cruzi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 295 (4), 958–963.
- (31) Olivares–Illana, V.; Pérez–Montfort, R.; López–Calahorra, F.; Costas, M.; Rodríguez–Romero, A.; De Gómez–Puyou, M. T.; Puyou, A. G. Structural Differences in Triosephosphate Isomerase from Different Species and Discovery of a Multitrypanosomatid Inhibitor. *Biochemistry* **2006**, 45 (8), 2556–2560.
- (32) Romo–mancillas, A. Diseño Por Acoplamiento Molecular, Síntesis de Análogos Del Bencimidazol Y Pruebas de Inhibición Selectiva de La Enzima Triosafosfato Isomerasa, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- (33) Valdez–Padilla, D.; Rodríguez–Morales, S.; Hernández–Campos, A.; Hernández–Luis, F.; Yépez–Mulia, L.; Tapia–Contreras, A.; Castillo, R. Synthesis and Antiprotozoal

- Activity of Novel 1-Methylbenzimidazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (4), 1724–1730.
- (34) Cui, W.; Kargbo, R. B.; Sajjadi-Hashemi, Z.; Ahmed, F.; Gauuan, J. F. Efficient One-Pot Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles from Triacyloxyborane Intermediates. *Synlett* **2012**, No. 2, 247–250.
- (35) Du, L. H.; Wang, Y. G. A Rapid and Efficient Synthesis of Benzimidazoles Using Hypervalent Iodine as Oxidant. *Synthesis* **2007**, No. 5, 675–678.
- (36) Bahrami, K.; Knodaei, M. M.; Kavianiinia, I. A Simple and Efficient One-Pot Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles. *Synthesis* **2007**, 547–550.
- (37) Beaulieu, A.; Haché, B.; Moos, E. Von. A Practical Oxone<sup>®</sup> – Mediated, High-Throughput, Solution-Phase Synthesis of Benzimidazoles from 1, 2-Phenylenediamines and Aldehydes and Its Application to Preparative Scale *Synthesis* **2003**, 1683–1692.
- (38) Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Foufelle, F.; Hainault, I.; Bizot-Espiard, J.-G.; Caignard, D.-H.; Sergheraert, C. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potent AMP-Activated Protein Kinase Activators. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4490–4518.
- (39) Yu, J.; Zhang-Negrerie, D.; Du, Y. TBHP/CoCl<sub>2</sub> –Mediated Intramolecular Oxidative Cyclization of N-(2-Formylphenyl)amides: An Approach to the Construction of 4H-3,1-Benz-oxazin-4-Ones. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 566 – 568.
- (40) Errede, L. A.; Martinucci, P. D.; McBrady, J. J. Influence of Hydrogen Bonding on the Reaction of Acetylanthranil with Ammonia. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (6), 3009–3017.
- (41) Huang, S. T.; Hsei, I. J.; Chen, C. Synthesis and Anticancer Evaluation of Bis(benzimidazoles), Bis(benzoxazoles), and Benzothiazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (17), 6106–6119.

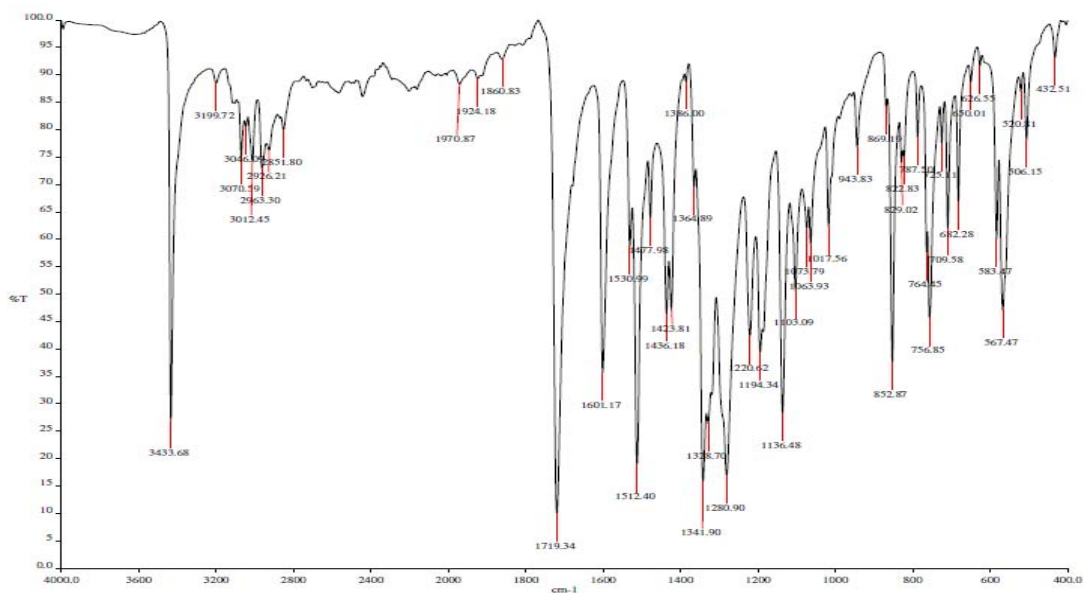
- (42) Raymond, A. N.; Guan, J.; Alford, V. C.; Lanter, J. C.; Allan, G. F.; Sbriscia, T.; Linton, O.; Lundeen, S. G.; Sui, Z. Synthesis and SAR of Potent and Selective Androgen Receptor Antagonists: 5,6-Dichloro-Benzimidazole Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (3), 784–788.
- (43) Wang, J.; Feng, J. Theoretical Studies of the Structures and Optical Properties of the Bi Uorene and Its Derivatives. *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, No. February, 130–137.
- (44) Khalili, S. B.; Sardarian, A. R. KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: An Efficient Solid Heterogeneous Base Catalyst in One-Pot Synthesis of Benzimidazoles and Bis-Benzimidazoles at Room Temperature. *Monatsh. Chem.* **2012**, *143* (5), 841–846.
- (45) Alcalde, E.; Gisbert, M.; Perez-garcia, L. Design of Unusual Captodative Methylene Substrates : *Tetrahedron* **1995**, *51*, 13365–13378.

## **ANEXOS**

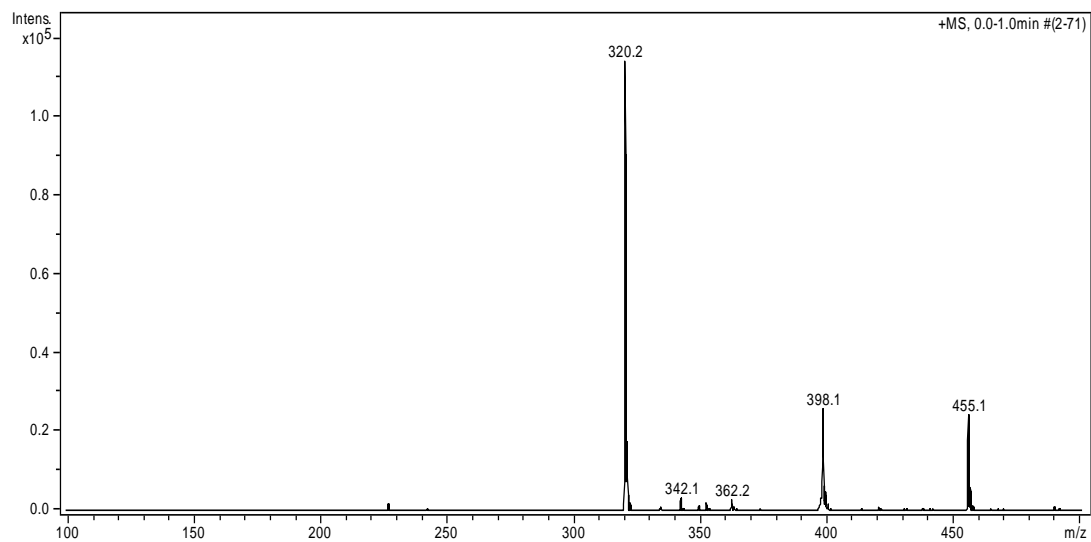
**(ESPECTROS DE IR, EM, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$ , HSQC Y NOESY)**

**Anexos 1. Espectros IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y HSQC de bencimidazol 9.**

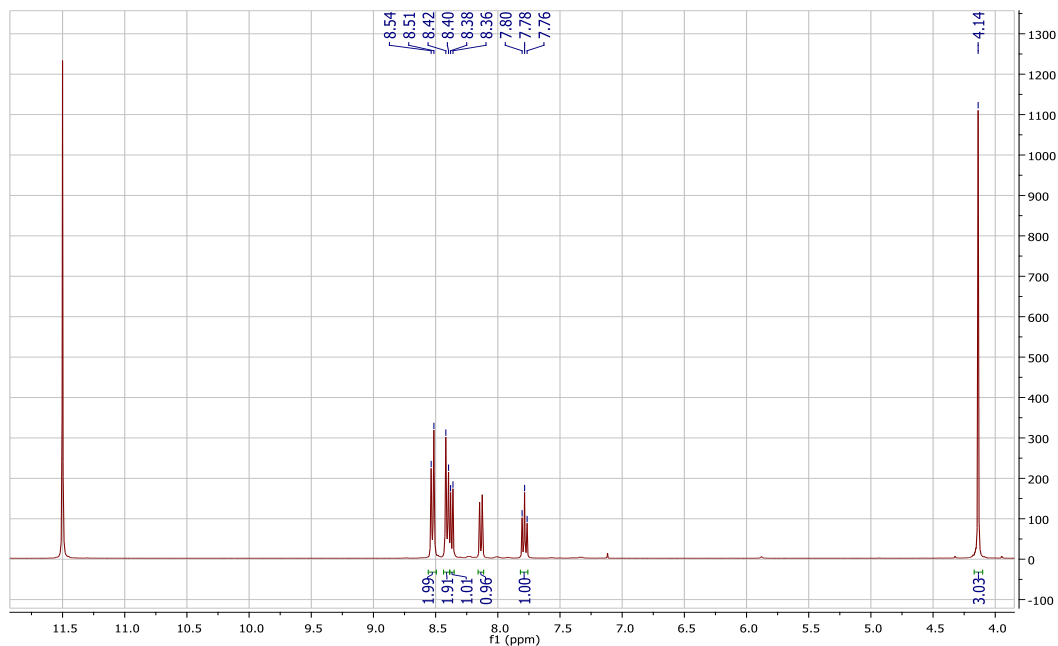
**Anexo 1.1. Espectro de IR de 2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (9).**



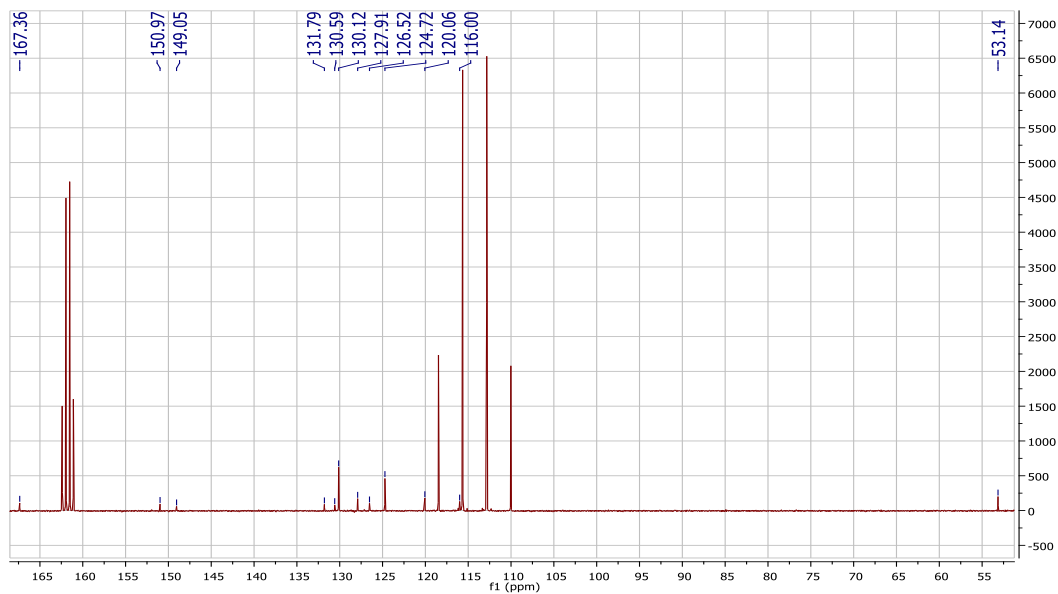
**Anexo 1.2. Espectro de ESI-MS de 2-(4-nitrofenil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (9).**



**Anexo 1.3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**).

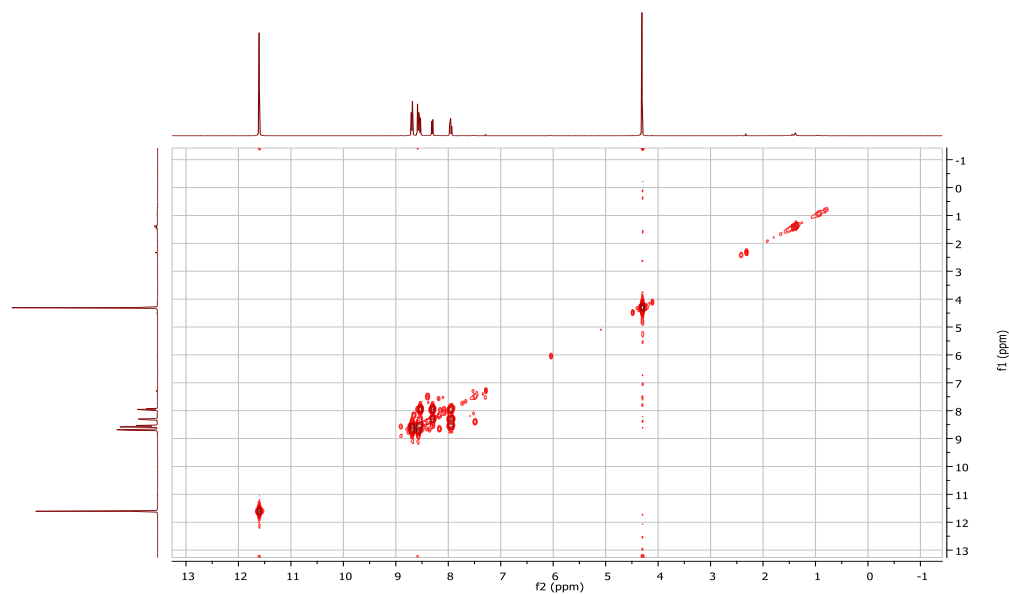


**Anexo 1.4.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**).

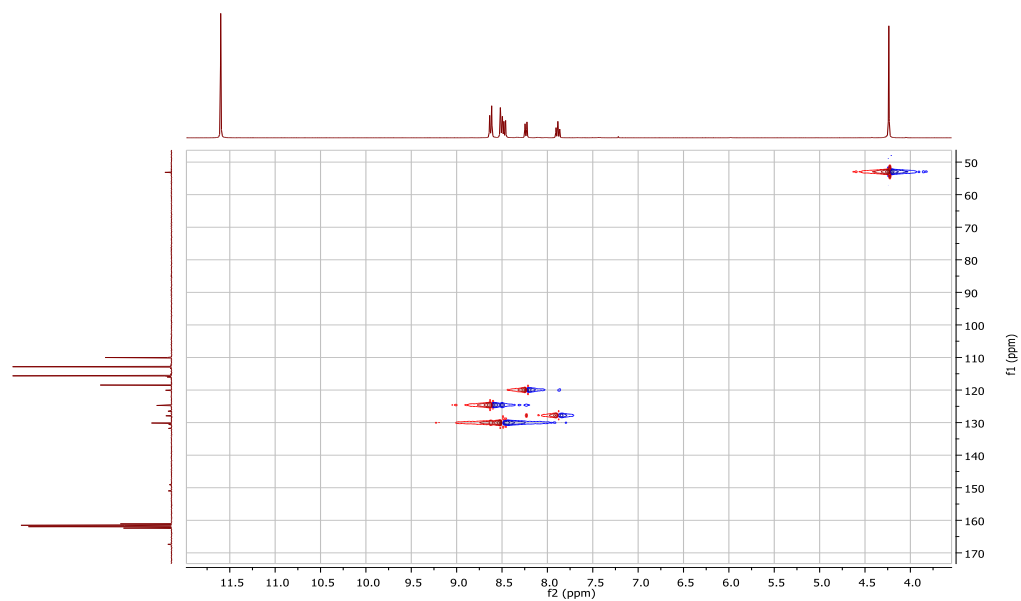




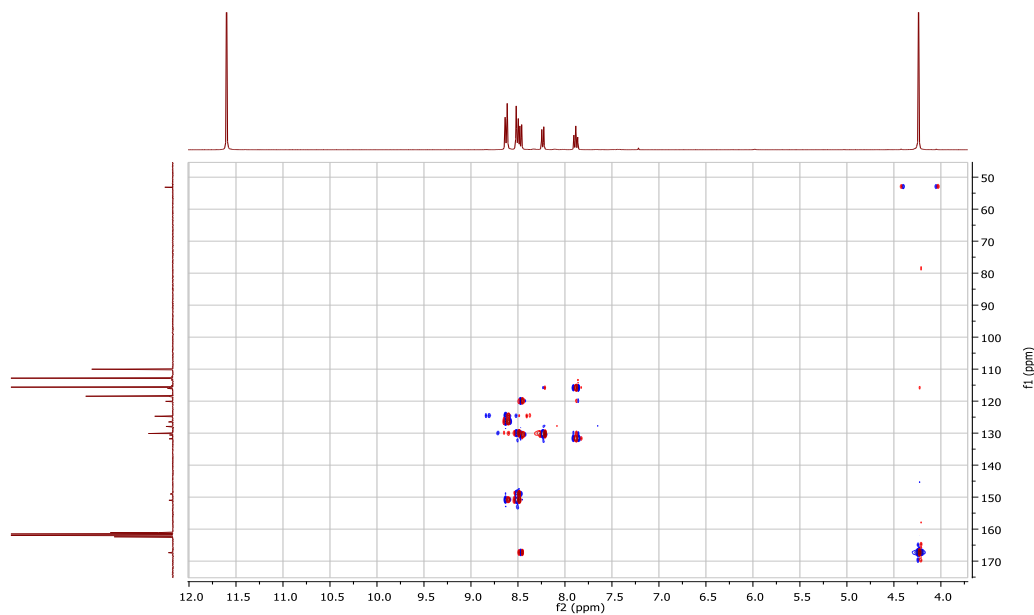
**Anexo 1.5.** Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**).



**Anexo 1.6.** Espectro de correlación heteronuclear HSQC de 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**).

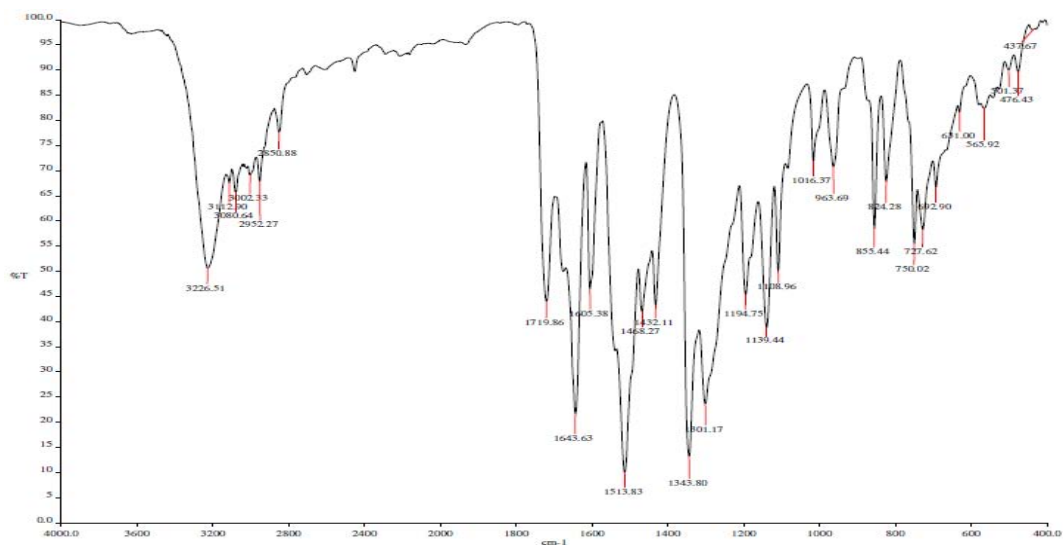


**Anexo 1.7.** Espectro de correlación heteronuclear HMBC de 2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**9**).

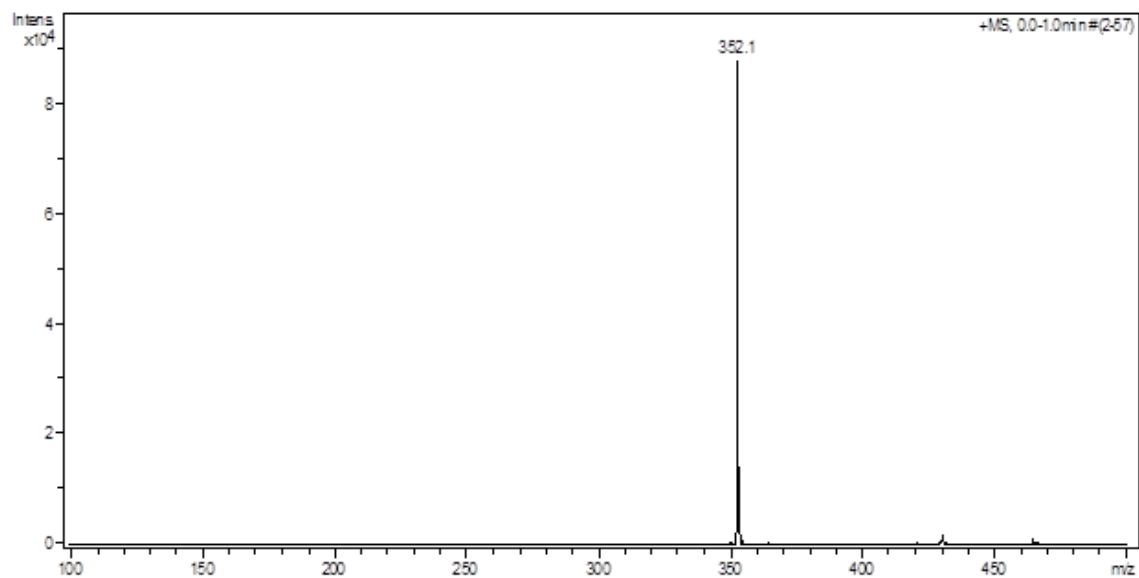


**Anexos 2.** Espectros IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, HMBC, HSQC, NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H del éster **10**.

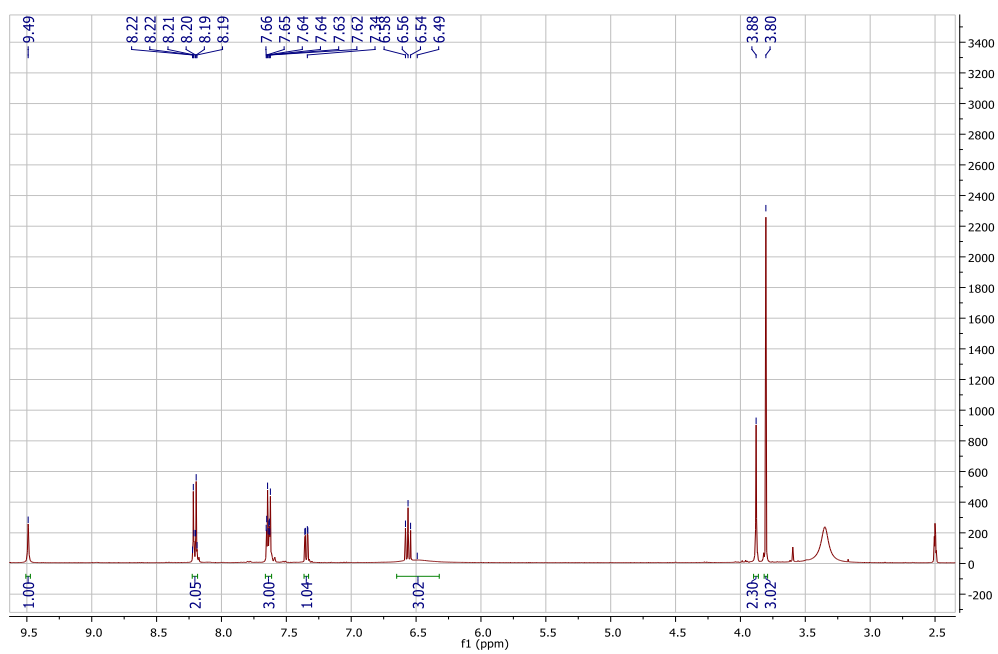
**Anexo 2.1.** Espectro de IR de 2-amino-3-[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**).



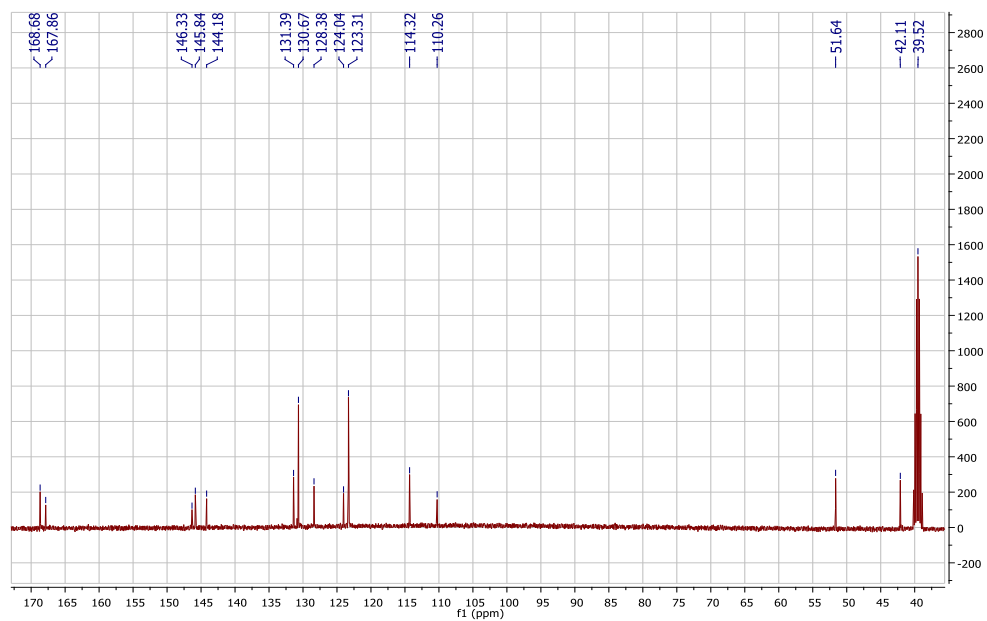
**Anexo 2.2.** Espectro de ESI-MS de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**).



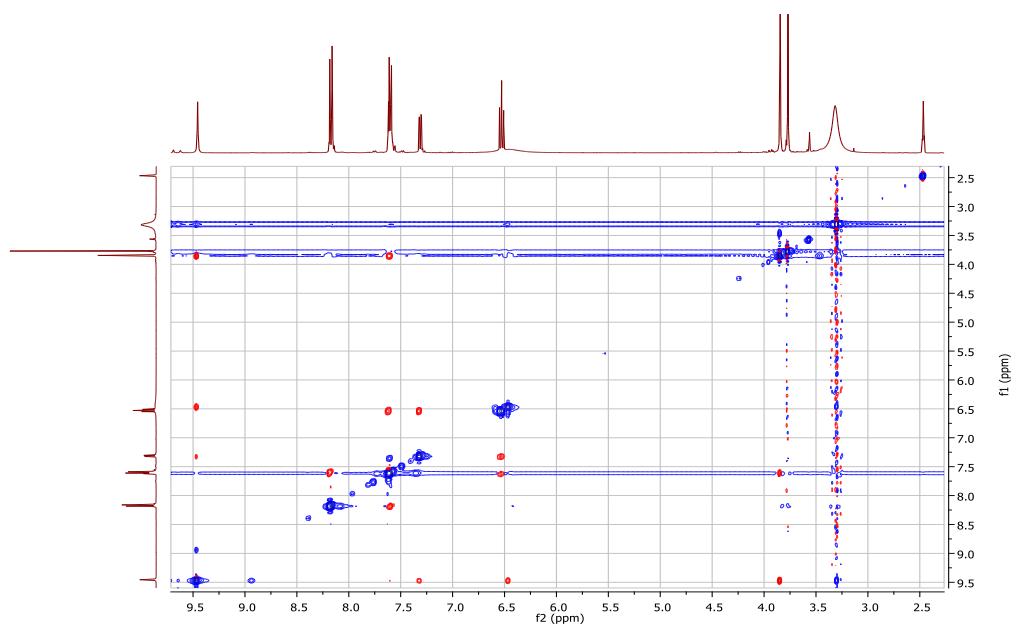
**Anexo 2.3.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**).



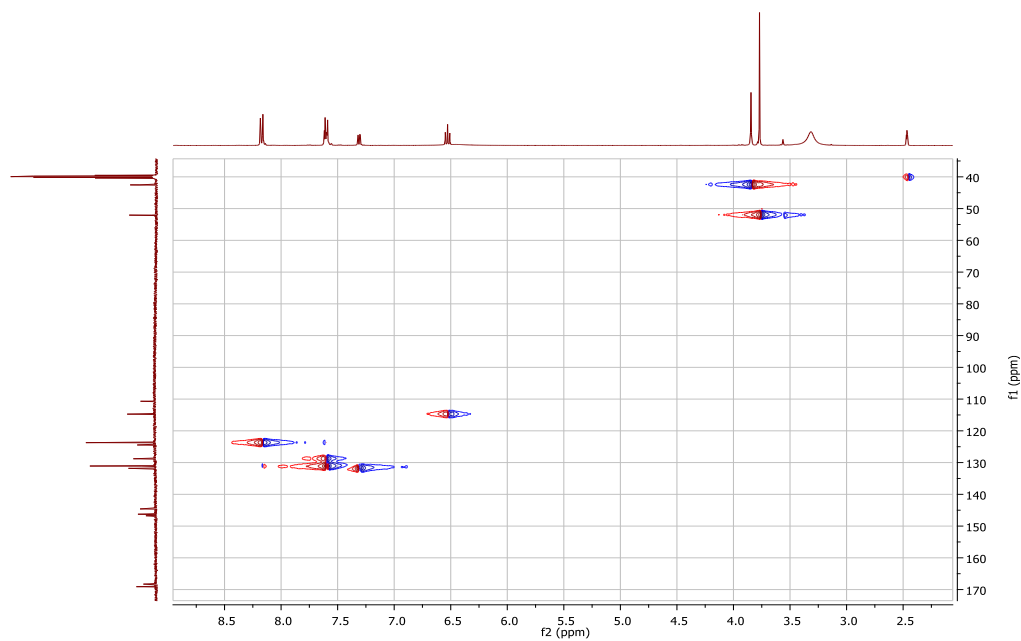
**Anexo 2.4.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**).



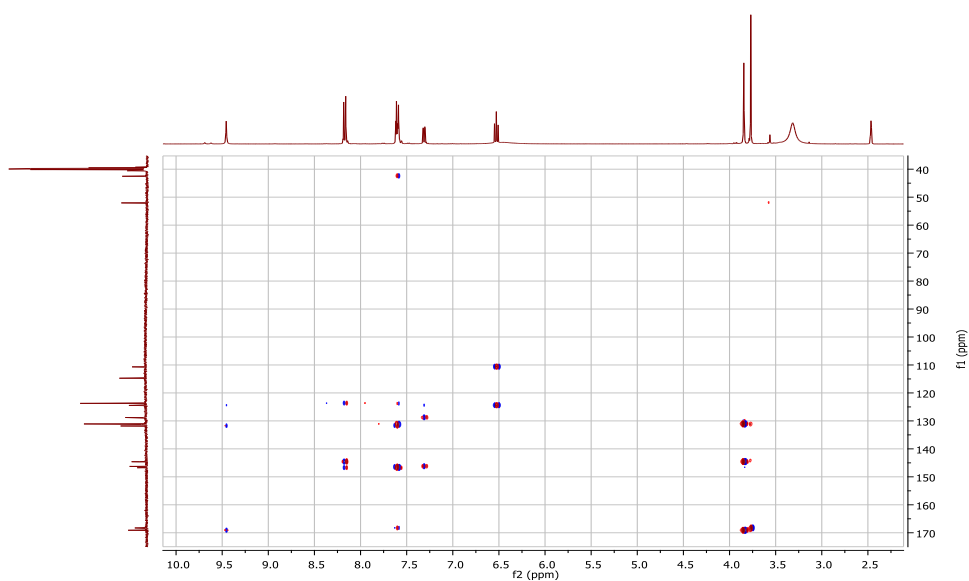
**Anexo 2.5.** Espectro de correlación homonuclear NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino]benzoato de metilo (**10**).



**Anexo 2.6.** Espectro de correlación heteronuclear HSQC de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino}benzoato de metilo (**10**).

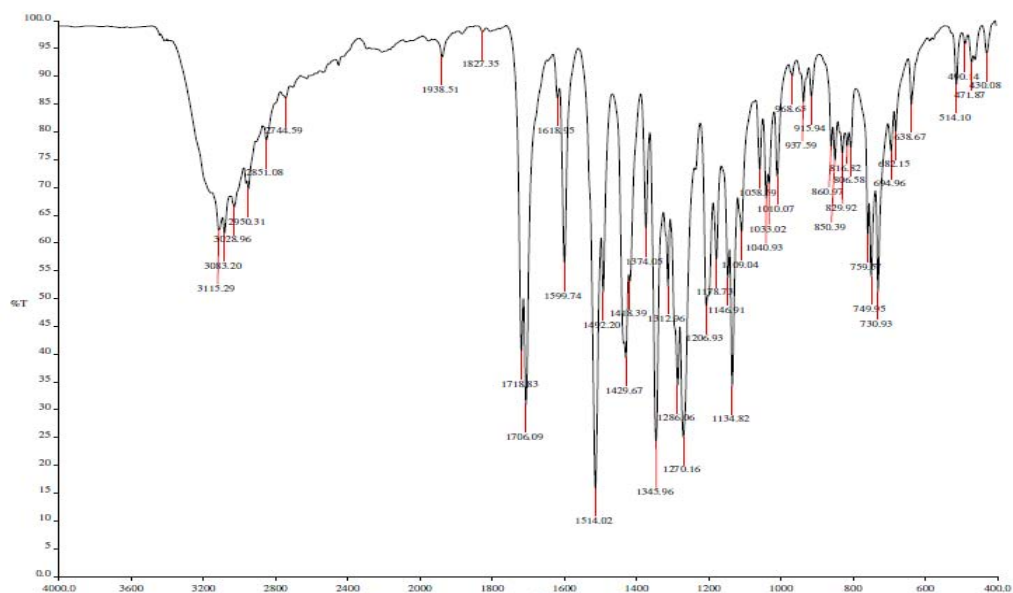


**Anexo 2.7.** Espectro de correlación heteronuclear HMBC de 2-amino-3-[[[4-nitrofenil)acetil]amino}benzoato de metilo (**10**).

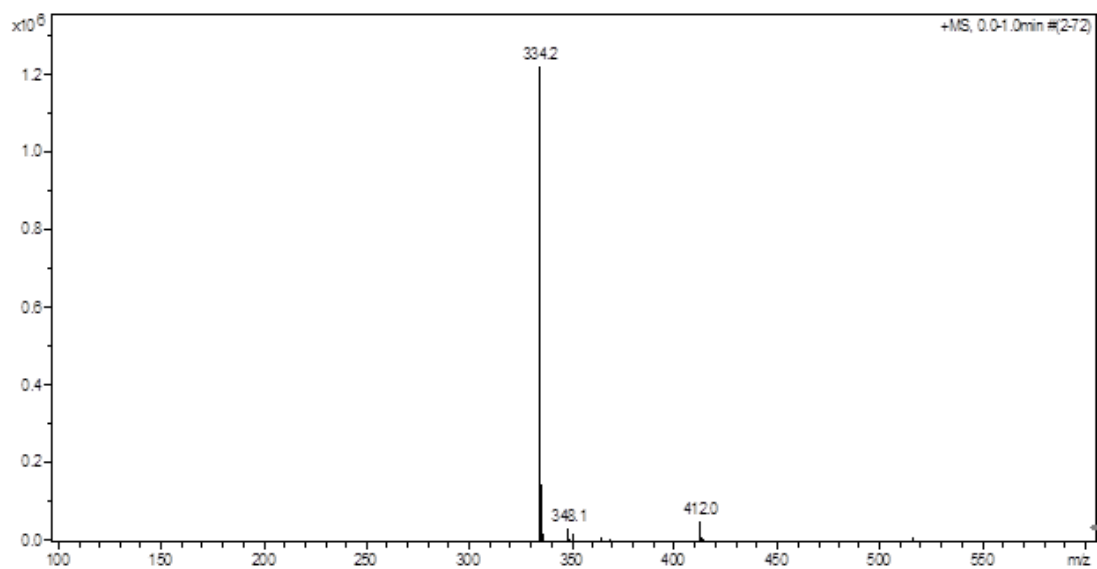


### Anexos 3. Espectros IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, HMBC y HSQC del bencimidazol 12.

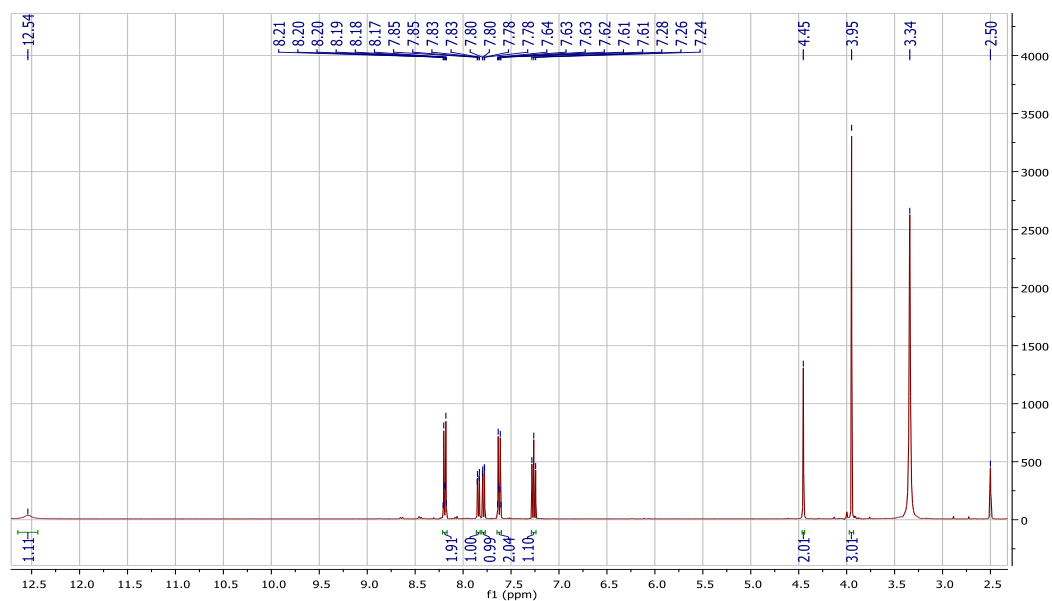
#### Anexo 3.1. Espectro de IR de 2-(4-nitrobenzil)-1H-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (12).



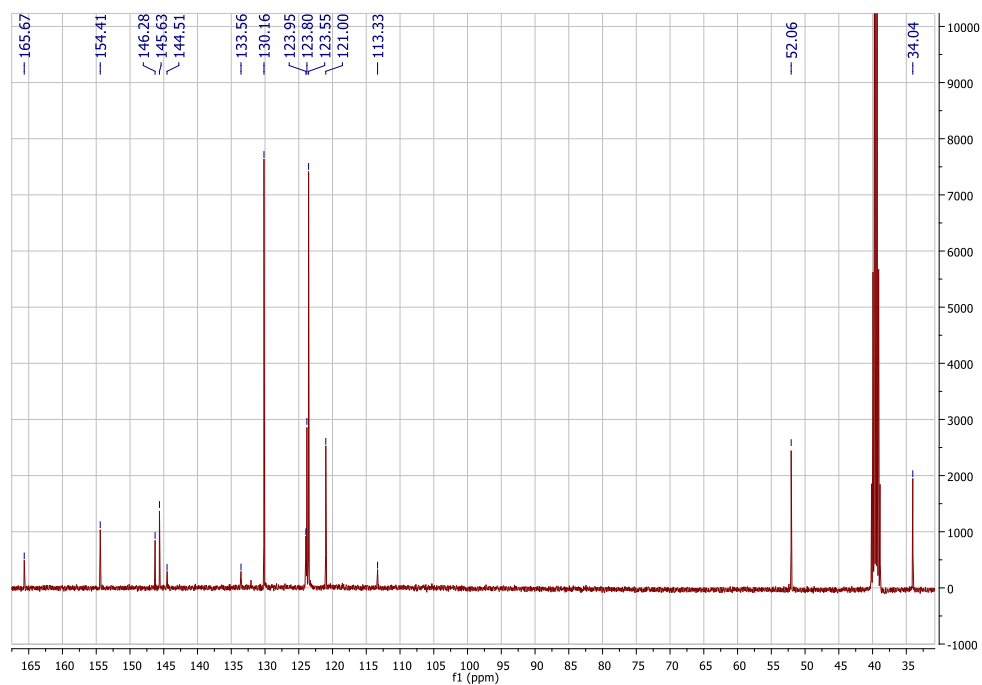
#### Anexo 3.2. Espectro de ESI-MS de 2-(4-nitrobenzil)-1H-benzimidazol-7-carboxilato de metilo (12).



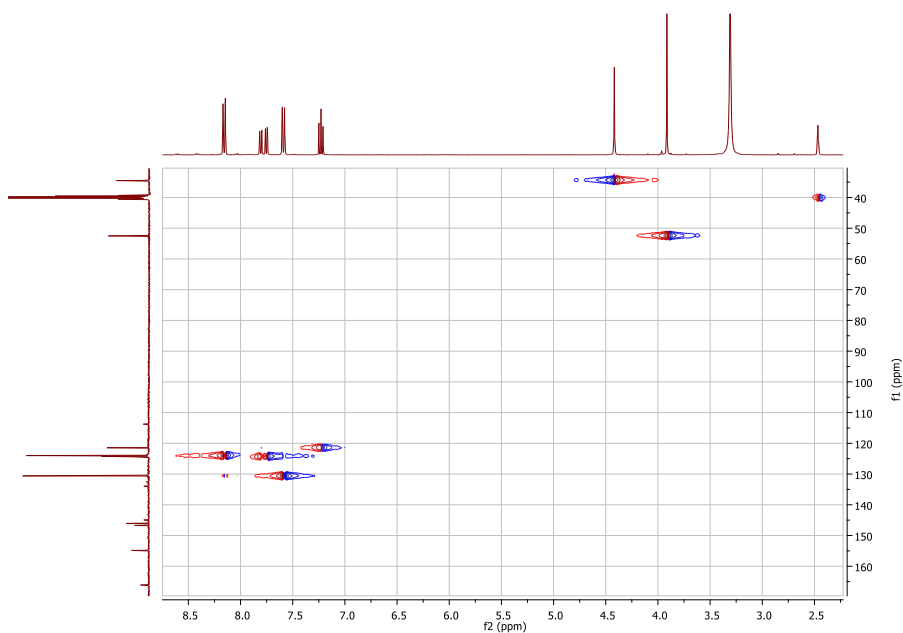
**Anexo 3.3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2-(4-nitrobenzil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).



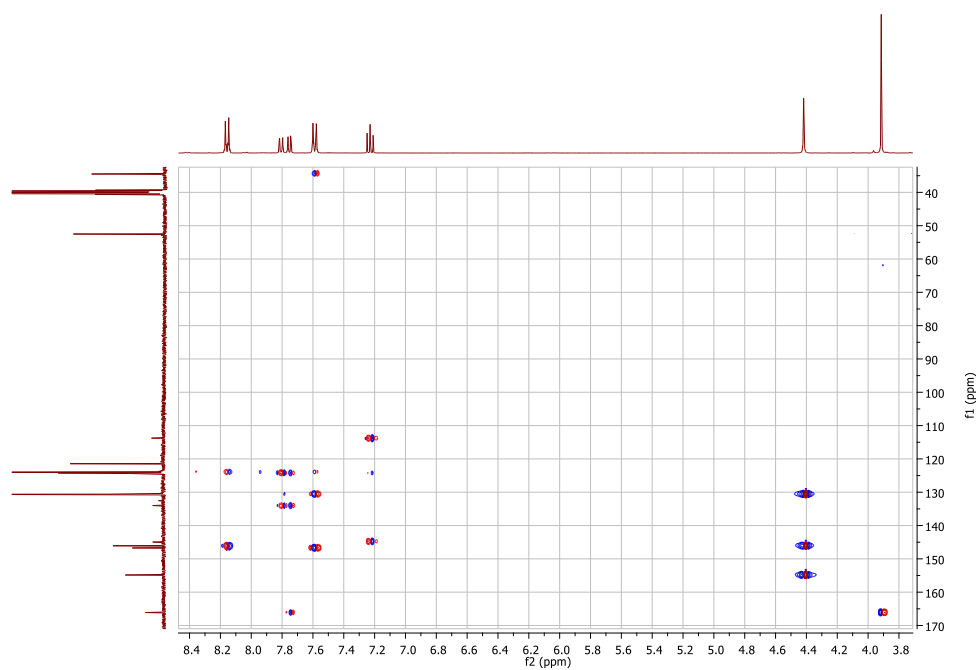
**Anexo 3.4.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 2-(4-nitrobenzil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).



**Anexo 3.5.** Espectro de correlación heteronuclear HSQC de 2-(4-nitrobenzil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).



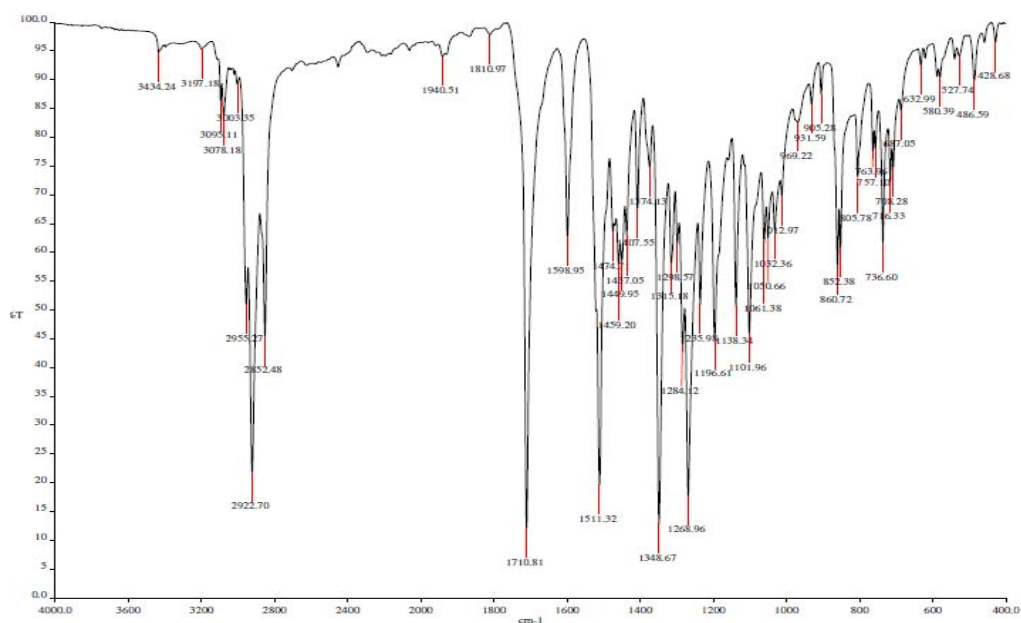
**Anexo 3.6.** Espectro de correlación heteronuclear HMBC de 2-(4-nitrobenzil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxilato de metilo (**12**).



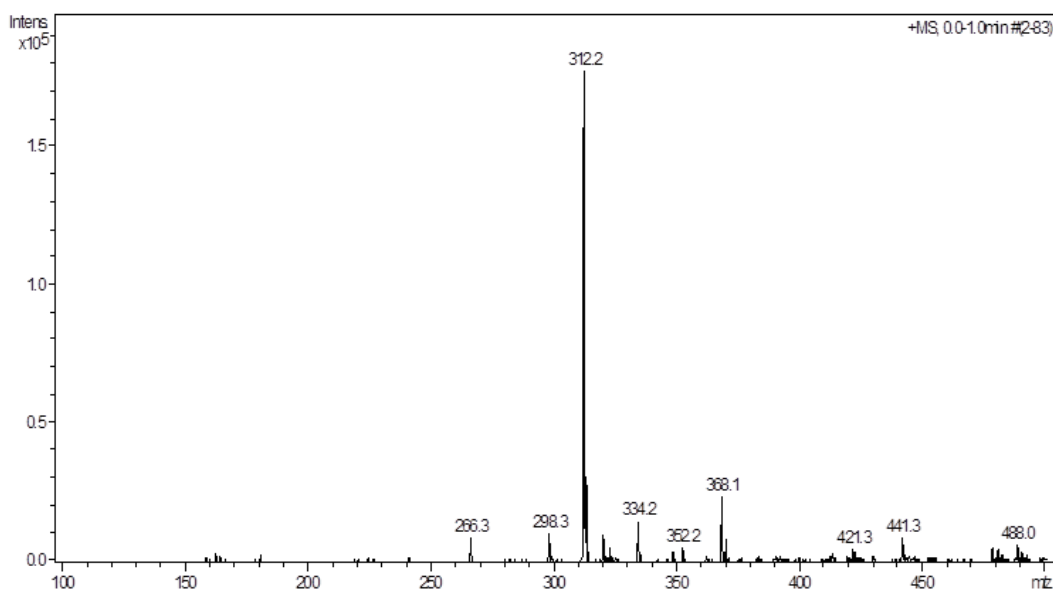


**Anexos 4. Espectros IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC y HMBC del 1-Metil-2-(4-nitrofenil)-1H-benzimidazol-7-carboxilato de metilo (13a).**

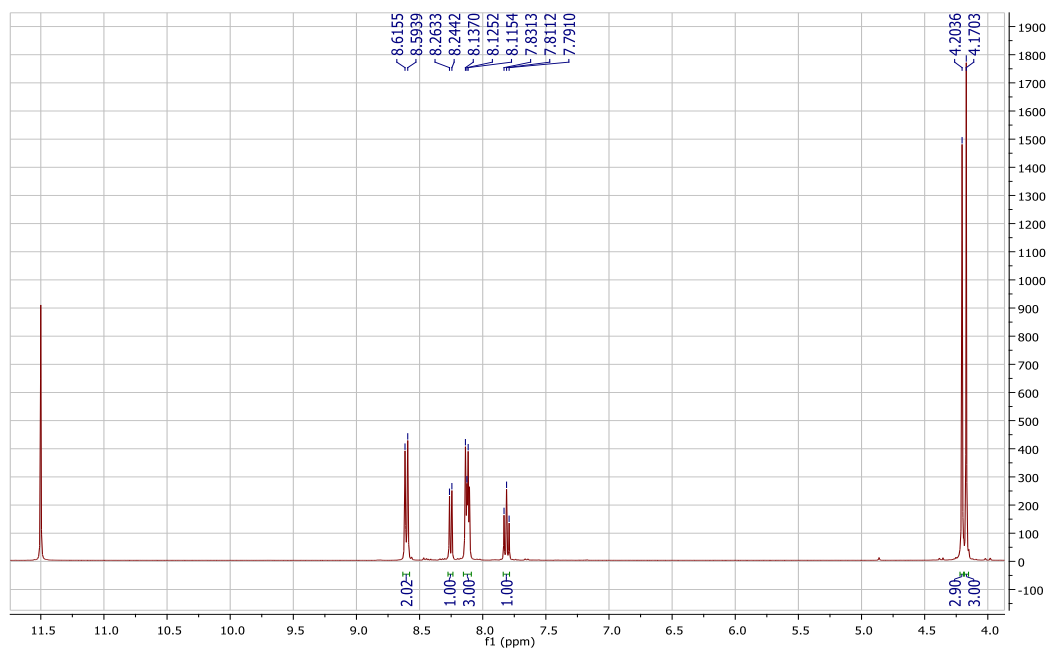
**Anexo 4.1. Espectro de IR del regioisómero (13a).**



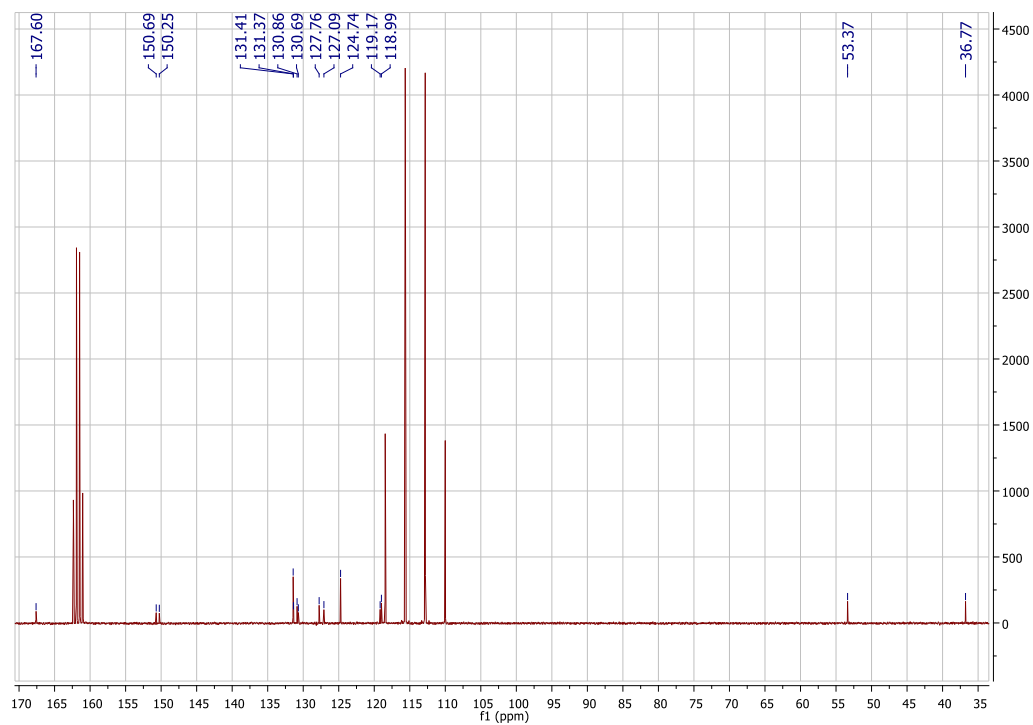
**Anexo 4.2. Espectro de ESI-MS del regioisómero (13a).**



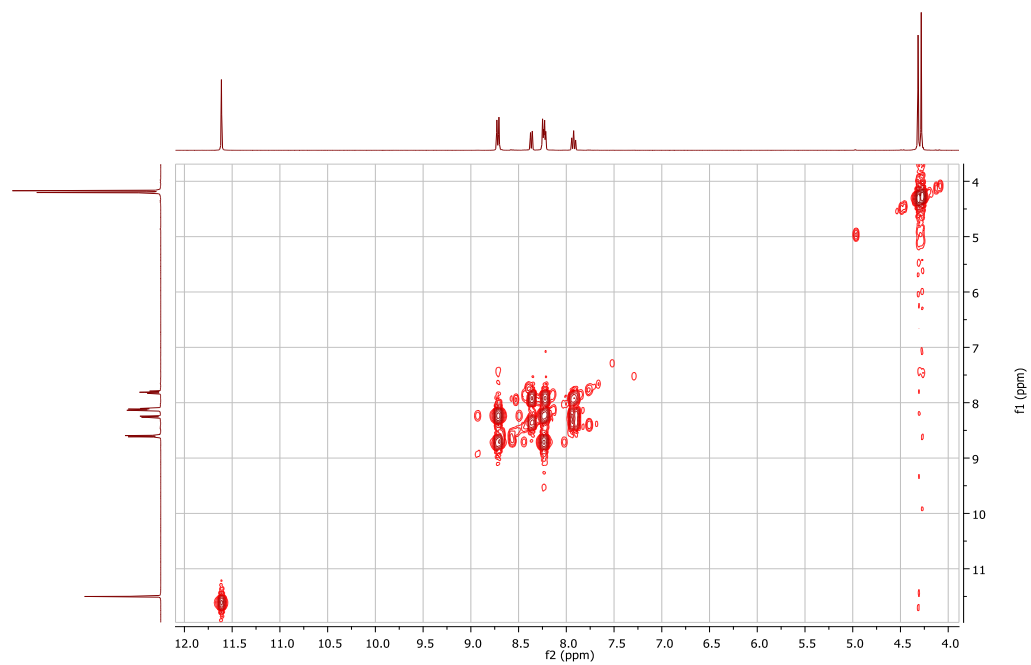
Anexo 4.3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del regioisómero (**13a**).



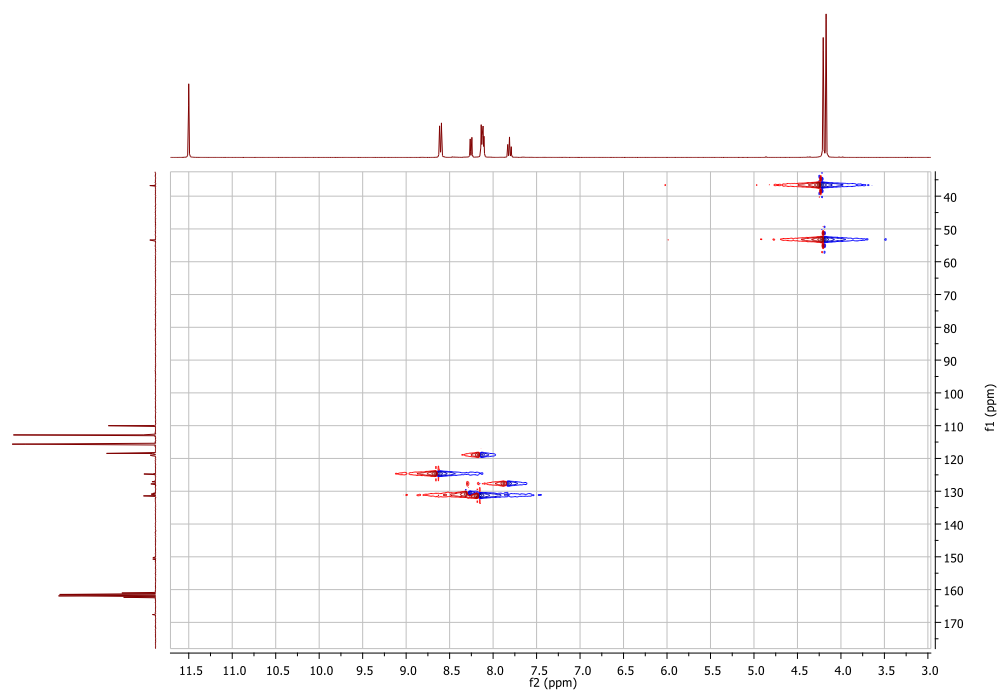
Anexo 4.4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del regioisómero (**13a**).



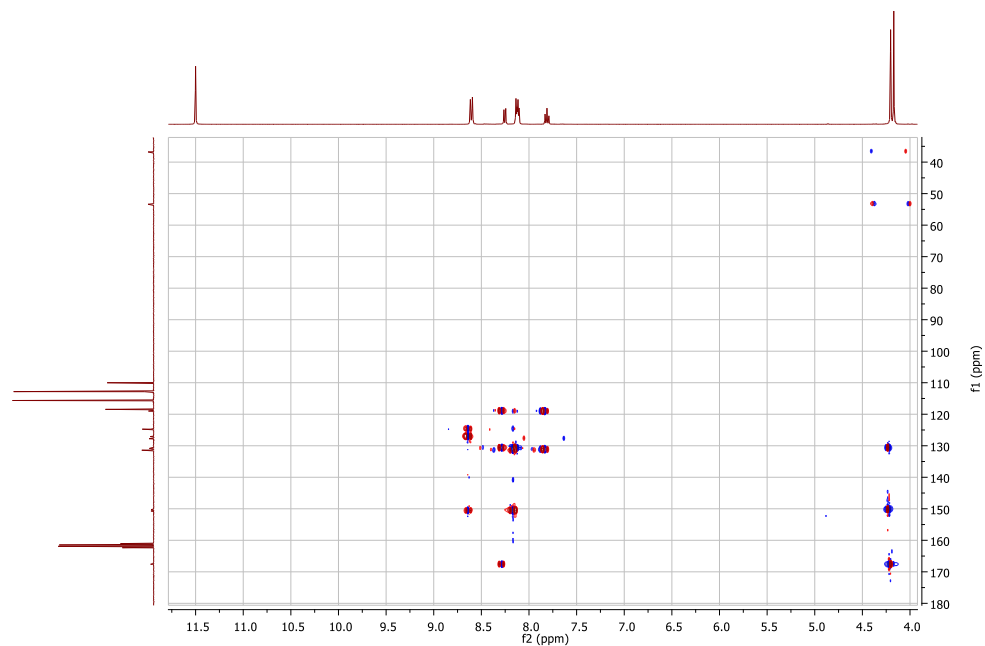
Anexo 4.5. Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del regioisómero (**13a**).



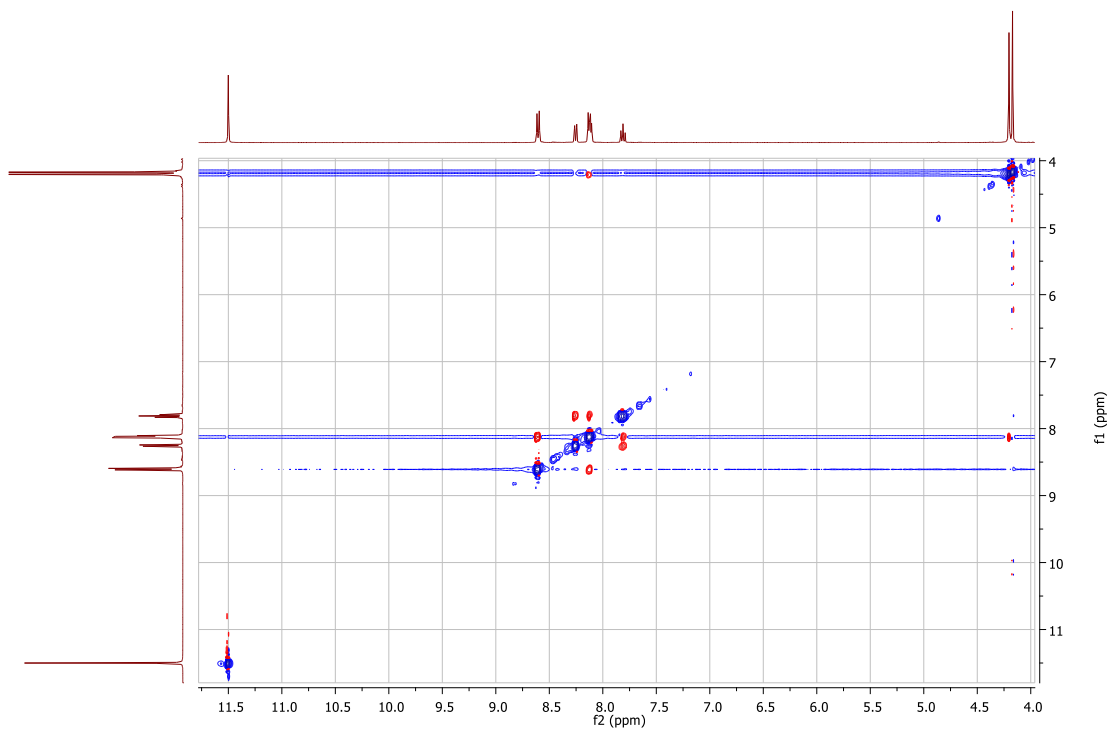
Anexo 4.6. Espectro de correlación heteronuclear HSQC del regioisómero (**13a**).



Anexo 4.7. Espectro de correlación heteronuclear HMBC del regioisómero (**13a**).

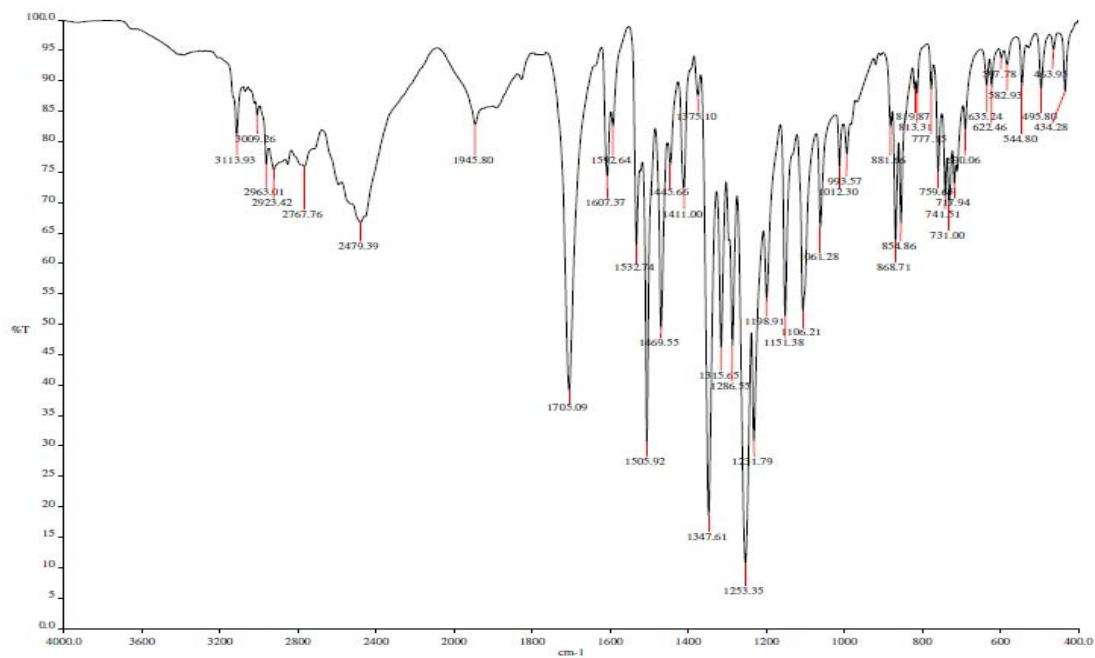


Anexo 4.8. Espectro de correlación homonuclear NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  del regioisómero (**13a**).

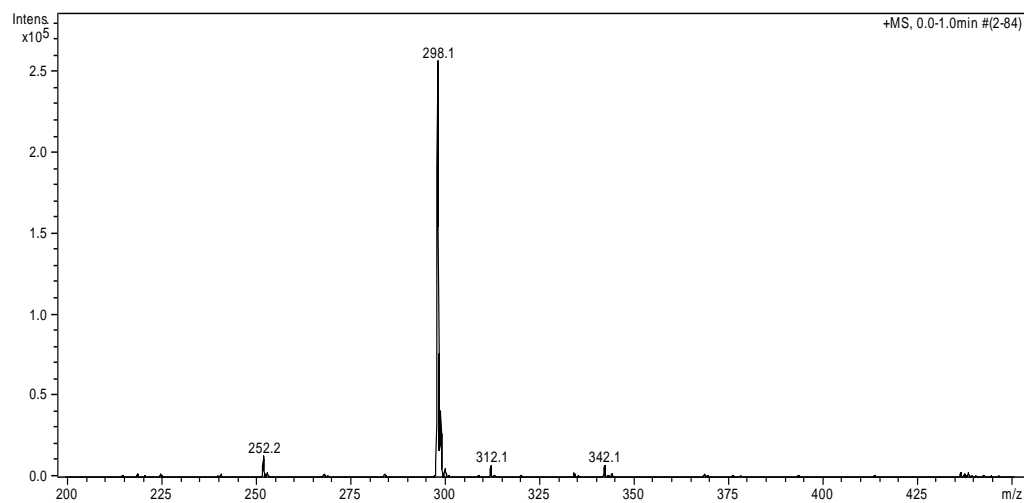


**Anexos 5. Espectros IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, y HSQC del ácido 1-metil-2-(4-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-7-carboxílico (15a).**

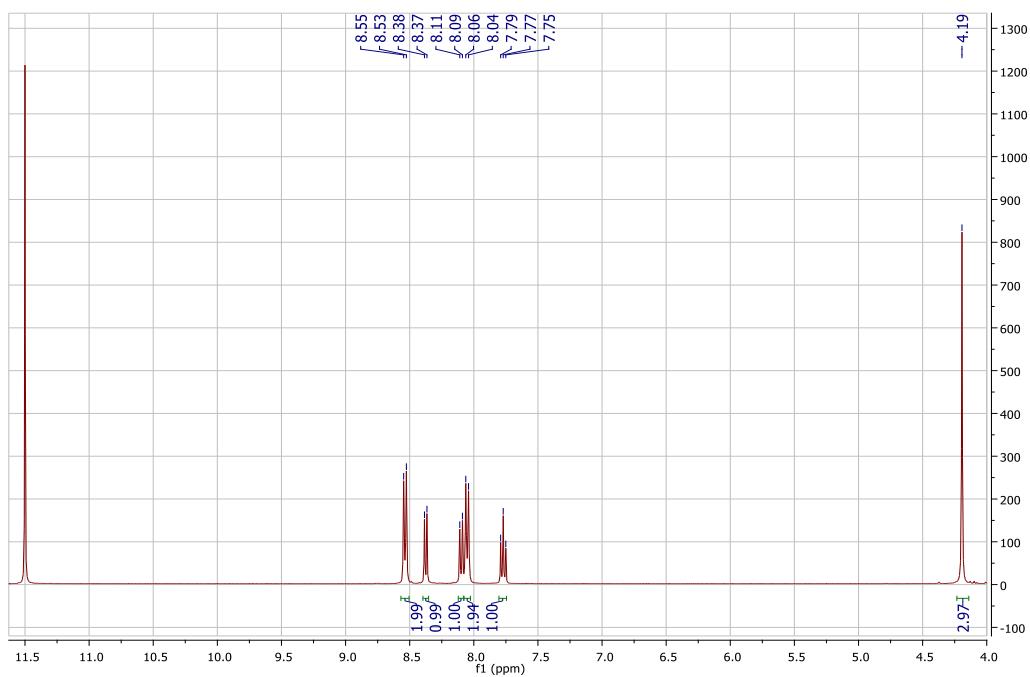
**Anexo 5.1. Espectro de IR del 1-metilbencimidazol (15a).**



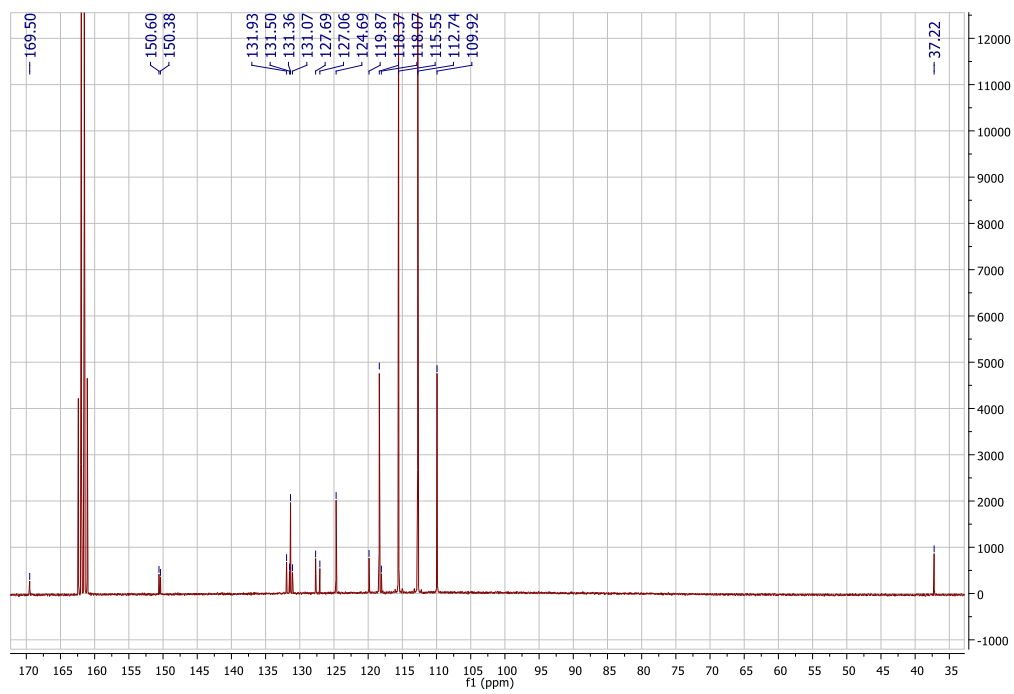
**Anexo 5.2. Espectro de ESI-MS del 1-metilbencimidazol (15a).**



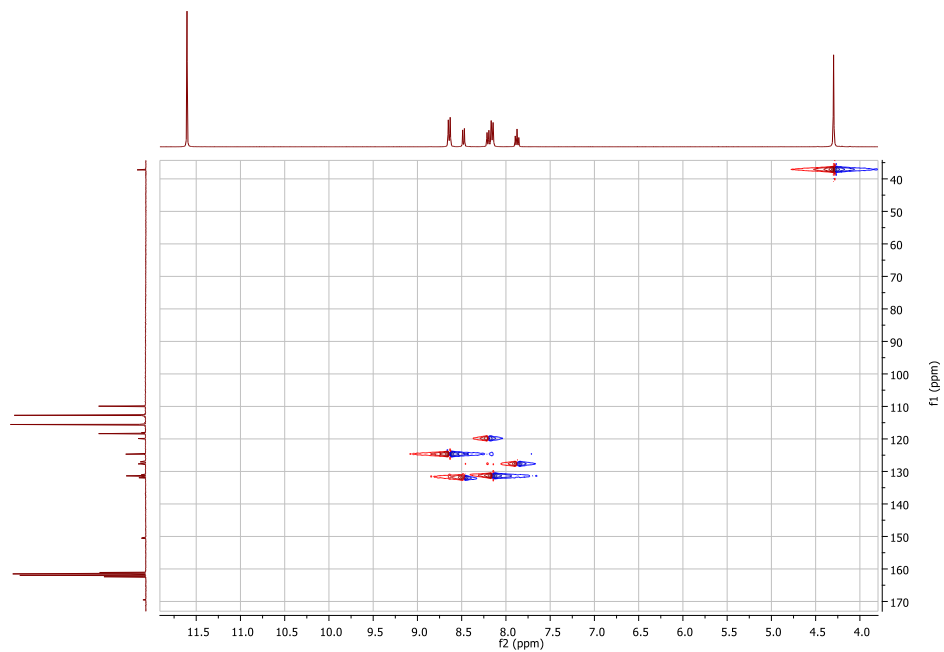
Anexo 5.3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 1-metilbencimidazol (**15a**).



Anexo 5.4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 1-metilbencimidazol (**15a**).



Anexo 5.5. Espectro de correlación heteronuclear HSQC del 1-metilbencimidazol(**15a**).



Anexo 5.6. Espectro de correlación heteronuclear HMBC del 1-metilbencimidazol (**15a**).

