



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

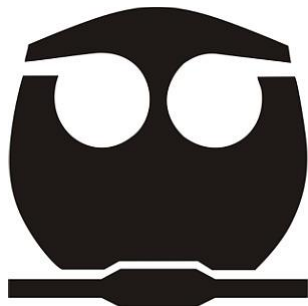
**Diseño por acoplamiento molecular, síntesis y
evaluación de derivados de bencimidazol como
inhibidores de la enzima PTP1B**

TESIS

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

PRESENTA

CARLOS ALEXIS CARVENTE GARCÍA



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Presidente: | Dra. María Alicia Hernández Campos |
| Vocal: | Dr. Francisco Hernández Luis |
| Secretario: | Q. María de los Ángeles Olvera León |
| 1er. Suplente: | Q. Reina García Sánchez |
| 2do. Suplente: | Dr. José Luis Medina Franco |

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 122, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Dra. María Alicia Hernández Campos

Asesor

M. en C. Pedro Josué Trejo Soto

Supervisor Técnico

Carlos Alexis Carvente García

Sustentante



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Definición..... | 3 |
| 2.2 Epidemiología..... | 3 |
| 2.3 Clasificación..... | 5 |
| 2.3.1 Diabetes mellitus tipo 1..... | 5 |
| 2.3.2 Diabetes mellitus tipo 2..... | 5 |
| 2.4 Fisiopatología, signos y síntomas..... | 6 |
| 2.4.1 Manifestaciones básicas..... | 6 |
| 2.4.2 Complicaciones agudas..... | 6 |
| 2.4.3 Complicaciones crónicas..... | 7 |
| 2.5 Tratamiento..... | 7 |
| 2.5.1 Fármacos antidiabéticos..... | 8 |
| 2.5.1.1 Insulina..... | 8 |
| 2.5.1.2 Antidiabéticos orales..... | 9 |
| 2.5.1.2.1 Biguanidinas..... | 9 |
| 2.5.1.2.2 Sulfonilureas..... | 10 |
| 2.5.1.2.3 Meglitinidas..... | 10 |
| 2.5.1.2.4 Fármacos relacionados con las incretinas..... | 11 |
| 2.6 Diseño de fármacos..... | 11 |
| 2.6.1 Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)..... | 13 |
| 2.6.1.1 Diseño basado en el ligando..... | 13 |
| 2.6.1.2 Diseño de novo..... | 14 |
| 2.6.1.3 Acoplamiento molecular (<i>docking</i>)..... | 15 |
| 2.7 Desarrollo de nuevas moléculas con actividad antidiabética..... | 17 |
| 2.7.1 Proteína Fosfatasa de Tirosina 1B (PTP1B) como blanco para el diseño de fármacos..... | 17 |
| 2.7.2 Sitios de unión blanco de la PTP1B para el diseño de fármacos..... | 18 |



| | |
|---|-----------|
| 2.7.3 Derivados de bencimidazol como inhibidores de PTP1B..... | 20 |
| 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 21 |
| 4 HIPÓTESIS..... | 22 |
| 5 OBJETIVOS..... | 23 |
| 5.1 Objetivo general..... | 23 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 23 |
| 6 METODOLOGÍA..... | 25 |
| 6.1 Parte computacional..... | 25 |
| 6.1.1 Obtención y minimización de estructuras cristalográficas..... | 25 |
| 6.1.1.1 Preparación de los ligandos..... | 25 |
| 6.1.1.2 Preparación de la proteína..... | 26 |
| 6.1.2 Acoplamiento molecular..... | 26 |
| 6.2 Parte química..... | 26 |
| 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 32 |
| 7.1 Parte computacional..... | 32 |
| 7.2 Parte química..... | 43 |
| 7.2.1 Síntesis de los precursores 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-amina (10), 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-tiol (11) y 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2- (metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol (12)..... | 45 |
| 7.2.2 Síntesis de <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol- 2-il]acetamida CCG2_1..... | 48 |
| 7.2.3 Síntesis del precursor 2-cloro- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)acetamida (3c)..... | 49 |
| 7.2.4 Síntesis de 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol- 2-il]sulfanil]- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)acetamida CCG1_1..... | 49 |
| 7.2.5 Síntesis de ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-sulfónico CCG1_2..... | 50 |
| 7.2.6 Síntesis de ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> - bencimidazol-2-il]sulfanil} acético CCG1_4..... | 52 |



| | |
|---|-----------|
| 7.2.7 Síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfonil)-1H-benzimidazol CCG1_3..... | 53 |
| 7.3 Evaluación Biológica..... | 55 |
| 8 CONCLUSIONES..... | 57 |
| 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |
| 10 APÉNDICE..... | 64 |
| 10.1 PARTE EXPERIMENTAL..... | 64 |
| 10.2 ESPECTROS..... | 81 |



1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por una elevación en las concentraciones de glucosa en sangre debido a una disminución en la producción de insulina y/o incremento en la resistencia a la acción de esta hormona.¹ Actualmente la diabetes afecta a más de 415 millones de personas en el mundo, donde México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 8.7 millones de diabéticos.^{2,3}

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la más común de las formas de diabetes, en la cual hay una deficiencia en la cascada de señalización de la insulina. A pesar de las opciones farmacológicas para tratar la DM2 actualmente no hay un fármaco que por sí solo sea capaz de disminuir las concentraciones de glucosa en sangre dentro de un rango normal por un periodo de tiempo sostenido.⁴ Esto hace indispensable continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antidiabética. En este sentido, se han identificado múltiples blancos moleculares con el objetivo de generar moléculas que modifiquen la actividad de éstos y así regular los niveles de glucosa. Estas moléculas pueden ser diseñadas mediante técnicas avanzadas como el DiFAC (Diseño de Fármacos Asistido por Computadora), en particular, haciendo uso del acoplamiento molecular (*docking*) cuando se cuenta con información estructural de blancos biológicos involucrados en la patología de la enfermedad.

Uno de los blancos propuestos en la búsqueda de moléculas con actividad antidiabética es la Proteína Fosfatasa de Tirosina 1B (PTP1B), la cual es un regulador negativo de la cascada de señalización de la insulina. En procesos celulares normales, la insulina es reconocida por el receptor de insulina presente en la membrana celular, el cual se autofosforila desencadenando una cascada de señalización que permite la entrada de glucosa a la célula. La PTP1B interacciona con el receptor o con los sustratos del receptor de insulina fosforilado removiendo los grupos fosfato de los residuos de tirosina presentes en la subunidad beta del receptor, lo que impide que la señalización por insulina se lleve a cabo.⁵



La inhibición de la actividad de PTP1B ha demostrado regular los niveles de glucosa en sangre en modelos murinos; con lo cual en la literatura se han reportado diversos inhibidores de esta enzima.⁶

En la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antidiabética nuestro grupo de investigación identificó un compuesto con actividad inhibitoria sobre la PTP1B, éste es un derivado de bencimidazol identificado como **PTSB6**, 5-cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofenilo)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida, el cual presentó una CI_{50} de 16 μ M. Este compuesto se consideró un *hit experimental* el cual sirvió como modelo para proponer nuevos inhibidores.

Con base en este hallazgo se planteó el presente trabajo de tesis cuyo objetivo fue el diseño basado en la estructura y la síntesis de derivados de bencimidazol a partir del *hit experimental* **PTSB6**. Los compuestos diseñados y sintetizados en estudios próximos serán evaluados en la enzima PTP1B para validar el diseño y encontrar nuevos agentes antidiabéticos.



2. ANTECEDENTES

2.1 Definición

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no responde de manera eficiente a la acción de la insulina producida, lo que causa altos niveles de glucosa (hiperglicemia) en sangre de manera crónica.³

Los criterios para considerar a un individuo diabético son:

- Sintomatología característica como polidipsia, poliuria, sequedad de mucosas, polifagia y deshidratación.
- Glucemia incidental o fortuita igual o mayor de 200 mg/dL.
- Glucemia igual o mayor de 126 mg/dL en más de una ocasión con por lo menos 8 horas de ayuno.
- Glucemia de 200 mg/dL o más a las dos horas de una carga oral de 75 g glucosa en agua.

2.2 Epidemiología

La diabetes mellitus es un problema de salud a nivel mundial, alrededor del mundo hay más de 415 millones de personas con diabetes y se estima que para el año 2040 esta cifra alcance los 642 millones, de los cuales la diabetes tipo 2 representa aproximadamente un 90% de los casos.⁷

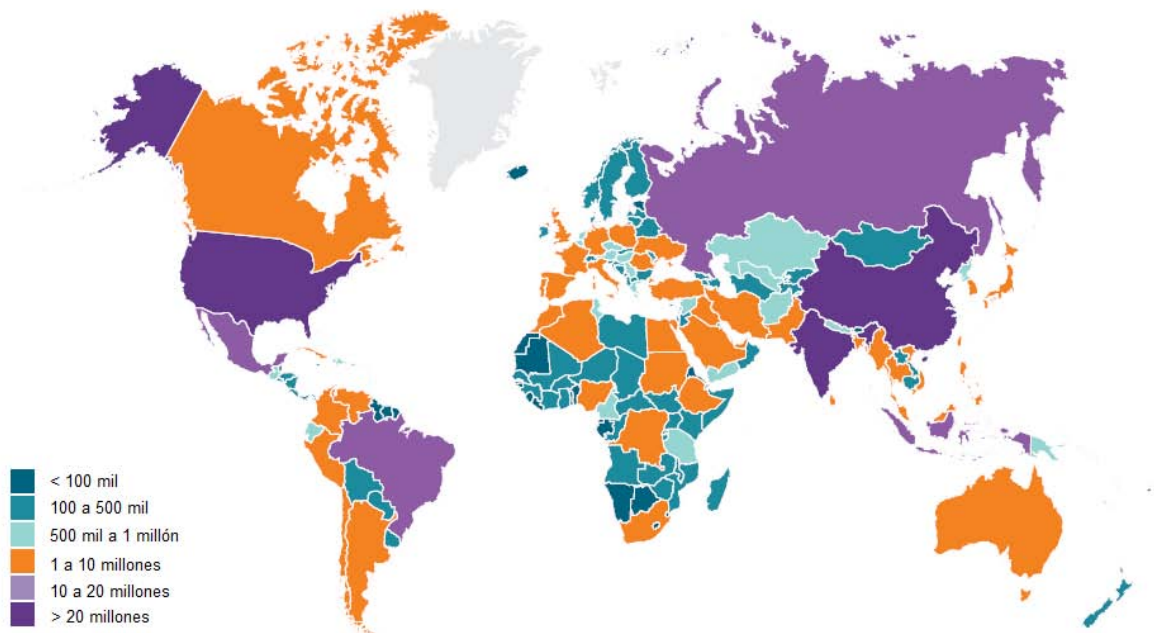


Fig. 1. Estimado total de adultos con diabetes (20-79 años) en el 2015.⁷

En el 2015 representó la causa directa de 5 millones de muertes, de las cuales entre el 50% y 80% de las defunciones se debieron a causas cardiovasculares.

Cabe señalar que existe una gran discrepancia en el gasto de salud para la diabetes entre regiones y países. En países en vías de desarrollo, donde el 75.4% de las personas con diabetes viven, sólo se designó el 19% del gasto sanitario mundial para esta enfermedad. En comparación con las personas que viven en países desarrollados, las que viven en países subdesarrollados pagan la mayor parte de su tratamiento con sus propios ingresos, esto debido a que no cuentan con acceso a servicios médicos. En países de América Latina, por ejemplo, las familias pagan entre el 40% y el 60% de sus gastos médicos.⁷

Cambios en el estilo de vida pueden prevenir o retrasar algunos casos de diabetes y con esto reducir la carga económica que la diabetes genera. Muchas de estas intervenciones son rentables incluso en países en desarrollo.



En México se reportaron 25,114 casos de diabetes mellitus en 2014, de los cuales, los estados de Tabasco, Hidalgo y México representan las entidades con mayor número de casos registrados, siendo ésta la segunda causa de muerte para nuestro país.^{8,9}

2.3 Clasificación

Existen dos principales tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

2.3.1 Diabetes mellitus tipo 1

También llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia, se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas que lleva a una deficiencia total en la secreción de insulina. Generalmente es causada por una reacción autoinmune donde se generan anticuerpos contra las células β del páncreas productoras de insulina y anticuerpos contra la insulina, lo que conlleva al decremento endógeno de insulina y la manifestación de hiperglicemia.¹⁰ La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad pero generalmente se desarrolla en niños o adultos jóvenes. Pacientes con este tipo de diabetes necesitan inyecciones de insulina todos los días con el fin de controlar los niveles de glucosa en sangre.⁷

2.3.2 Diabetes mellitus tipo 2

También llamada no-insulino dependiente, representa al menos el 90% de todos los casos de diabetes. Esta enfermedad se caracteriza por el déficit en la secreción de insulina por las células β del páncreas y/o la resistencia en los tejidos a la acción de esta hormona.¹¹ Las manifestaciones de este tipo de diabetes pueden ocurrir a cualquier edad; sin embargo, puede permanecer sin ser detectadas durante muchos años y el diagnóstico a menudo se hace cuando las complicaciones de esta enfermedad aparecen. La DM2 está asociada con sobrepeso y/o obesidad, que a su vez puede causar resistencia a la insulina y conducir a altos niveles de glucosa en



sangre, por lo tanto pacientes con esta enfermedad pueden manejar su condición a través del ejercicio y la dieta; sin embargo, con el tiempo la mayoría requieren tratamiento farmacológico.⁷

2.4 Fisiopatología, signos y síntomas

2.4.1 Manifestaciones básicas

Las manifestaciones clínicas de la diabetes se deben a las alteraciones metabólicas que ocasiona la falta de insulina aún en situación de hiperglucemia, estas alteraciones son fundamentalmente:

- Incremento en la producción de glucosa hepática y una disminución de su metabolismo en tejidos periféricos.
- Movilización de grasa desde tejidos periféricos hasta el hígado.
- Pérdida de proteínas corporales, especialmente musculares.

Todos estos fenómenos metabólicos producen pérdida de los depósitos, tanto de carbohidratos como de proteínas y grasas, generando otras manifestaciones como polifagia, poliuria y polidipsia que inducen a pérdida de peso muy característica en la diabetes.¹⁰

2.4.2 Complicaciones agudas

Las complicaciones agudas pueden dar lugar a alteraciones importantes en caso de no tratarse adecuadamente, entre las más comunes se encuentran:¹²

- Cetoacidosis diabética: Debida a una hiperglucemia extrema y a la formación masiva de cuerpos cetónicos producidos por un aumento de la razón glucagón/insulina.
- Coma hiperosmolar: Suele ocurrir tras una ingesta exagerada de carbohidratos, la suspensión de tratamiento o por una situación de estrés.
- Hipoglucemias: Estado definido por una concentración de glucosa en la sangre anormalmente baja, inferior a 50-60 mg /dL, causadas por el exceso o



error en la dosis de insulina, disminución o retraso en las tomas de alimento, ejercicio físico fuera de lo habitual o disminución de la función renal y/o hepática.¹⁰

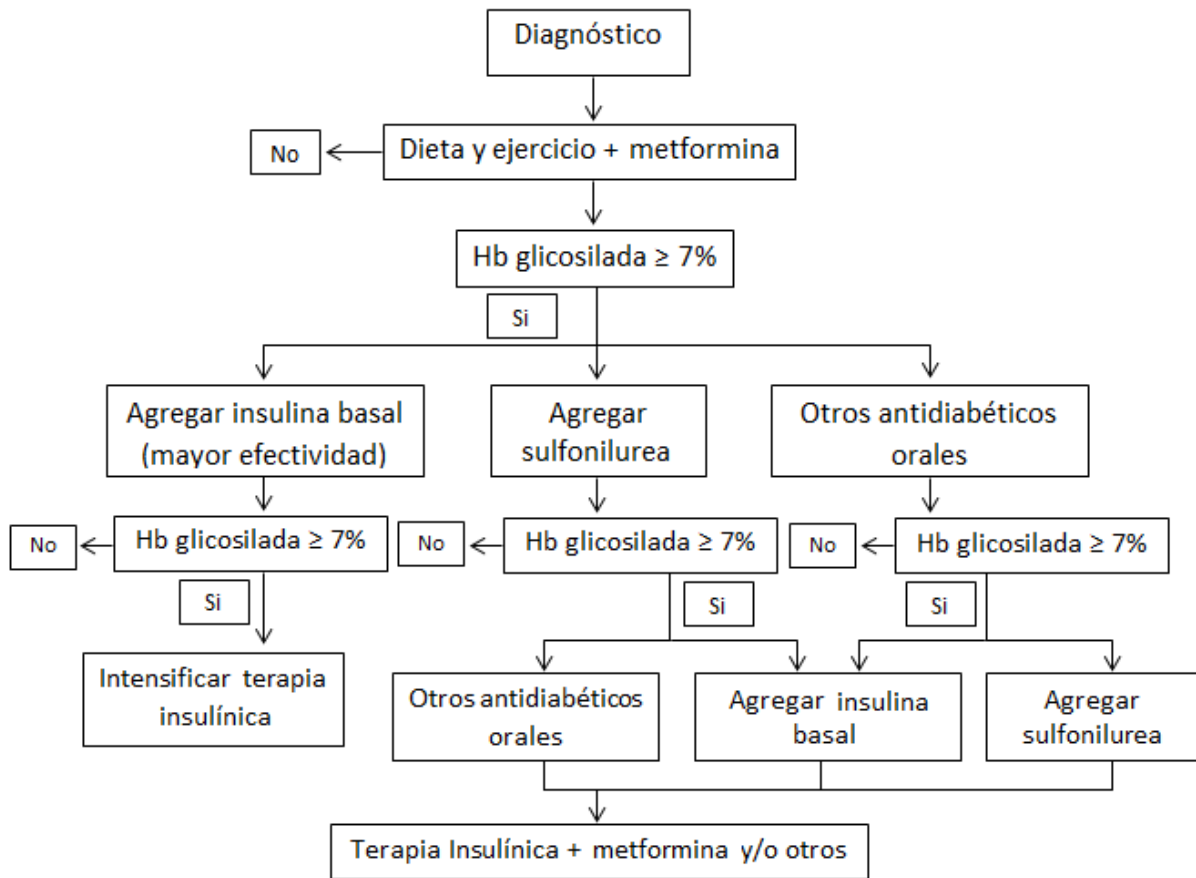
2.4.3 Complicaciones crónicas

Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican en tres principales grupos: macrovasculares, que afectan a las arterias en general produciendo enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica; microvasculares, que incluyen la retinopatía, nefropatía y neuropatía; y pie diabético, que aparece como consecuencia de la neuropatía y/o de la afección vascular de origen macroangiopático.¹²

2.5 Tratamiento

La estrategia terapéutica de la diabetes se fundamenta en el conocimiento de su fisiopatología. La administración de insulina es esencial en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1, en cambio, en pacientes con diabetes tipo 2 es más complejo porque existe un déficit tanto de secreción como en la acción de esta hormona. Por lo tanto, la selección del tratamiento dependerá de la etapa de la enfermedad así como las características individuales del paciente (**Esquema 1**).¹³

En cualquiera de los casos la educación diabetológica que recibe el paciente es esencial para conseguir los objetivos terapéuticos. Así, el correcto autoanálisis de la glucemia permite descubrir en qué momento del día existe peor control glucémico, o bien identificar hipoglucemias inadvertidas, de igual manera una dieta y ejercicio adecuado representan parte fundamental del tratamiento.^{13,14,15}



Esquema 1. Intervención terapéutica diabetes mellitus tipo 2.

2.5.1. Fármacos antidiabéticos

2.5.1.1 Insulina

La administración de insulina constituye el tratamiento fundamental de la diabetes mellitus tipo 1, sin embargo también se emplea en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 cuando la dieta y los hipoglucemiantes orales no bastan para obtener un control metabólico correcto.

La insulina endógena, producida por las células β , está formada por dos cadenas peptídicas unidas por un puente disulfuro. Cuando ésta es sintetizada por el páncreas, constituye una sola cadena de 86 aminoácidos, denominada proinsulina, que solo es activa tras la eliminación de una parte conocida como péptido C. Por su parte, las insulinas semisintéticas comercializadas parten de ésta doble cadena, que



previa modificación en la secuencia de aminoácidos consiguen propiedades farmacocinéticas diferentes (**Tabla 1**).¹⁴

Tabla 1. Tipos de insulina y velocidad de acción

| Insulina | Acción (horas) | | |
|--------------------------|----------------|---------|----------|
| | Inicio | Pico | Duración |
| Lispro | 0.2 | 0.2-1.2 | 2-5 |
| Aspart | 0.2 | 1-2 | 3-5 |
| Glulisina | 0.2 | 1-2 | 4-6 |
| Normal | 0.5 | 1-3 | 5-8 |
| Lispro protoamina | 1-2 | 4-8 | 18-24 |
| Protoamina (NPH) | 1-1.5 | 2-12 | 12-24 |
| Detemir | 1-6 | -- | 18-24 |
| Glargina | 2-6 | -- | 14-24 |

2.5.1.2 Antidiabéticos orales

Cuando no se logra un control metabólico aceptable en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya sea porque el paciente no se adapta al cambio de estilo de vida, o bien porque a pesar de cumplir con la dieta y realizar ejercicio de forma regular no se alcanzan los objetivos terapéuticos, debe iniciarse el tratamiento farmacológico.

2.5.1.2.1 Biguanidinas

La metformina es un agente antihiper glucémico de tipo biguanida usado en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Actúa disminuyendo los niveles de glucosa sanguínea mediante la inhibición de producción hepática de glucosa, y mejora la sensibilidad a la insulina mediante el aumento de la captación de glucosa periférica. Estos efectos están mediados por la activación inicial de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), enzima del hígado fundamental en la señalización de la insulina y del metabolismo de la glucosa y ácidos grasos.



Esta biguanida representa el fármaco de elección para pacientes con DM2 y obesidad, no causa hipoglucemia; sin embargo, puede potenciar los efectos hipoglucemiantes de la insulina y sulfonilureas por lo que debe evitarse en aquellos con pacientes con insuficiencia renal.^{16,17}

2.5.1.2.2 Sulfonilureas

Antidiabéticos orales indicados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 que actúan incrementando la liberación de insulina (secretagogo).

Las sulfonilureas como glibenclamida y gliclazida mejoran los niveles de glucosa sanguínea mediante la estimulación de secreción de insulina por las células β del páncreas. Su acción se inicia tras la unión al receptor de sulfonilurea (SURs) presente en los canales de potasio dependientes de ATP, provocando su bloqueo con la subsecuente disminución de flujo de potasio y despolarización de la membrana celular, lo que incrementa la concentración de calcio al interior de la célula, activando un sistema celular que causa el desplazamiento de los gránulos secretores a la superficie celular con la subsecuente expulsión de insulina. También se ha descrito un efecto hipoglucemiante crónico debido a un aumento de receptores de insulina o de su unión a ellos en los tejidos sensibles a la misma.^{18,19}

2.5.1.2.3 Meglitinidas

Repaglinida y nateglinida son meglitinidas de acción similar a las sulfonilureas con especial interés en la corrección de hiperglucemias postprandiales, actúan estimulando la secreción de insulina por inhibición de canales potasio dependientes de ATP de las células β del páncreas. Estos compuestos aportan la ventaja de tener un comienzo de acción rápido (30 min) y de corta duración (4 h) circunscrito al periodo postprandial, por lo tanto requieren la presencia de glucosa para ejercer su acción. En monoterapia se han observado descensos en las cifras de glucemia basal y hemoglobina glucosilada (HbA1c) similares a los descritos por las sulfonilureas.¹⁸



2.5.1.2.4 Fármacos relacionados con las incretinas

Las incretinas son hormonas producidas en el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de alimentos con efecto sobre las células de los islotes de Langerhans, las cuales aumentan la secreción y liberación de insulina. Las principales incretinas son péptido similar al glucagón (GLP1) y polipéptido insulinitrópico dependiente de glucosa (GIP). El efecto de las incretinas se puede aumentar de dos formas: producir un GLP1 que no sea inactivado por la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), enzima implicada en la inactivación de hormonas incretinas, es decir, un análogo de GLP1; o mediante la inhibición de la DPP-4. Exenatide y liraglutide (análogos de GLP1); y sitagliptina, vildagliptina y saxagliptina (inhibidores de DPP-4) mejoran la glucemia en pacientes con DM2 con un perfil de seguridad adecuado, baja posibilidad de hipoglucemias y sin incremento o disminución de peso en los pacientes.²⁰

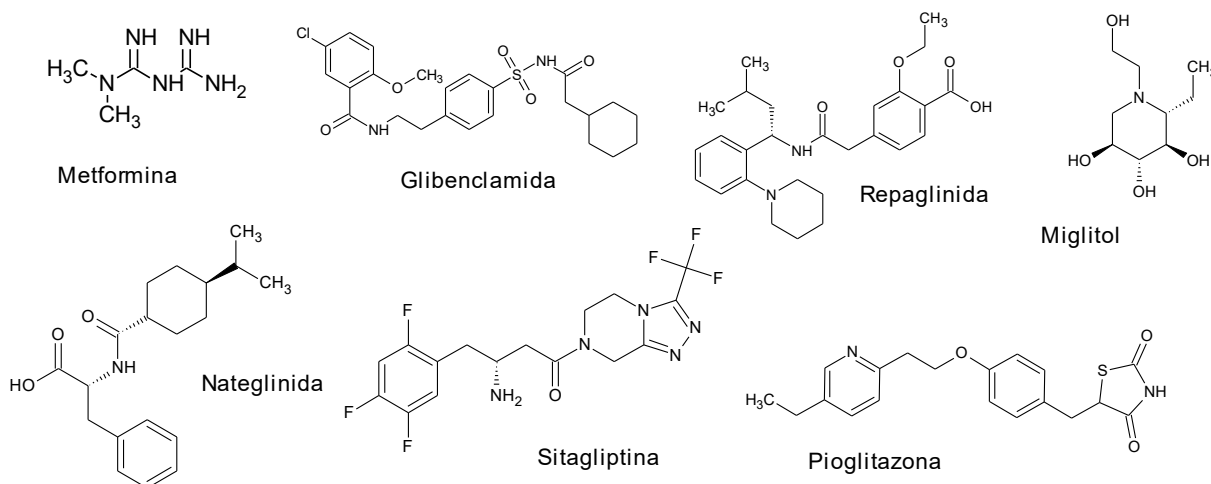


Figura 2. Estructura química de los principales antidiabéticos orales.

2.6 Diseño de fármacos

El arsenal terapéutico del que se dispone actualmente se ha desarrollado a partir de un número pequeño de compuestos conocidos como “moléculas líder”, es decir, compuestos que presentan alguna actividad biológica de interés, pero tienen algunas características indeseables, tales como, alta toxicidad, dificultades de absorción, insolubilidad, etc.^{21,22}



Las estrategias empleadas para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas ha evolucionado de un modo paralelo al de las diferentes ciencias que participan en este campo, algunas de estas estrategias son:

- Modificación estructural de moléculas activas: usando metodologías como alargamiento de cadenas, hibridación molecular y cambios isostéricos.
- *High Throughput Screening* (HTS): evaluación de una gran cantidad de compuestos en blancos macromoleculares para probar su actividad biológica.
- Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC): diseño de moléculas usando métodos computacionales.²³

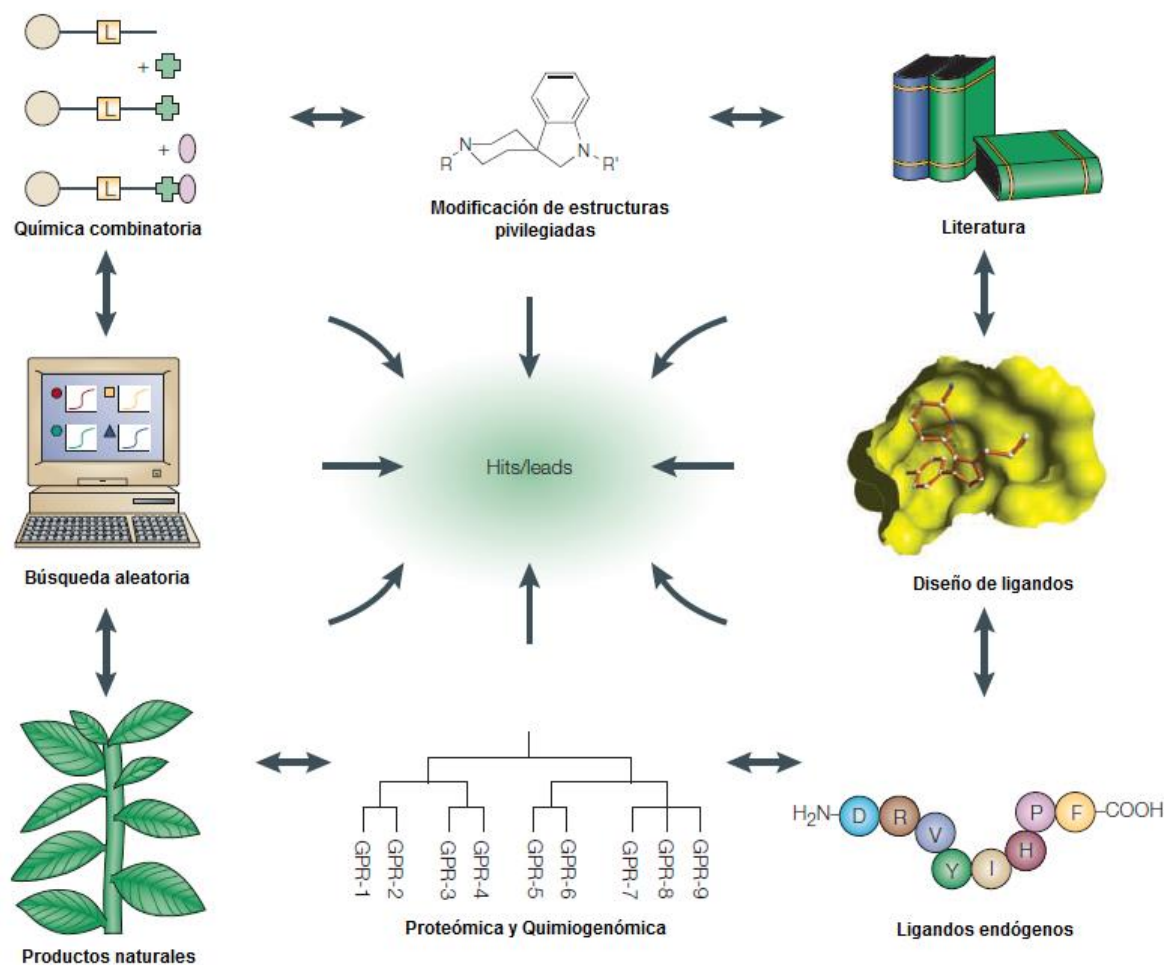


Figura 3. Estrategias para la identificación de moléculas *hit* o *líder*.²⁴



2.6.1 Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC)

Esta metodología incluye cualquier aplicación basada en procedimientos computacionales con el propósito de establecer un criterio que relacione su actividad con su estructura.²⁵ Estos métodos computacionales se basan en el postulado de que las moléculas farmacológicamente activas actúan por interacción con su biomacromolécula blanco involucrada en el proceso patológico, principalmente proteínas o ácidos nucleicos. Los principales factores de esta interacción son de tipo estérico, fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas e interacciones puente de hidrógeno.²⁶

El estudio DiFAC para el descubrimiento y optimización de moléculas líder puede ser dividido con base a dos estrategias:

- Si la estructura de dicho blanco se desconoce, se emplean métodos de *diseño basado en el ligando*. En este caso, se analiza un conjunto de ligandos para revelar las propiedades comunes de estas moléculas que se relacionen con su actividad biológica. (*Structure-Activity Relationship*, SAR de sus siglas en inglés).
- Si se conoce la estructura del blanco o diana, se aplican métodos de *diseño basado en el receptor*. En este caso, compuestos con propiedades complementarias son diseñados basándose en el conocimiento de las propiedades y características de la estructura del blanco (acoplamiento molecular y *diseño de novo*).^{23,26}

2.6.1.1 Diseño basado en el ligando

Estos métodos dependen de la información disponible para una serie de estructuras químicas con actividad biológica conocida. Se incluyen aquí las técnicas de búsqueda de similitud mediante el desarrollo de modelos farmacofóricos (identificación del conjunto de características estructurales de un ligando directamente relacionadas con los sitios claves de interacción de un receptor), técnicas de *shape matching* (superposición de la forma de dos ligandos) y estudios



de relaciones cuantitativas estructura-actividad (del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR).²⁷

Cualquier método QSAR puede definirse como la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos al problema de encontrar relaciones empíricas (conocidos como modelos QSAR) de la forma $P_i = k(D_1, D_2, \dots, D_n)$, donde P_i son las actividades biológicas o alguna propiedad de interés de las moléculas; D_1, D_2, \dots, D_n son propiedades estructurales calculadas o medidas experimentalmente de los compuestos, las cuales se conocen como descriptores. En la expresión $P_i = k(D_1, D_2, \dots, D_n)$, k representa alguna transformación matemática establecida empíricamente que se debe aplicar a los descriptores para calcular el valor de la propiedad P_i de todas las moléculas. La relación entre los descriptores D y la propiedad P puede ser lineal, donde la propiedad puede calcularse directamente a partir del valor de los descriptores, o no lineal, donde el valor de los descriptores se utilizan para caracterizar la similitud química entre las moléculas.²⁷ Aunque el factor de ensayo y error implicado en el desarrollo de un nuevo fármaco no puede ser ignorado por completo, los estudios QSAR disminuyen el número de compuestos a sintetizar debido a que los modelos obtenidos de este tipo de estudios permiten predecir la actividad biológica de nuevas estructuras, facilitando la selección de los candidatos más prometedores.

2.6.1.2 Diseño de novo

El diseño *de novo*, consiste en construir desde cero moléculas con propiedades farmacológicas deseadas directamente en el receptor. Como es de esperarse, este enfoque de diseño se enfrenta a un espacio de búsqueda virtualmente infinito, por lo que el proceso de construcción sistemática y de evaluación de cada compuesto individual se basa en el principio de optimización local. En este proceso se incorpora una gran cantidad de información acerca de la estructura del espacio químico en un algoritmo de diseño que facilita la búsqueda hacia una zona objetivo la cual presente núcleos base o grupos funcionales que tengan mayor probabilidad de interactuar con el receptor.



Ésta metodología raramente producirá nuevas estructuras con gran actividad en primer instancia debido a la vasta cantidad de estructuras que se pueden generar; sin embargo, probablemente proporcionará ejemplos de nuevas moléculas prospecto que requerirán una mayor optimización.²⁸

2.6.1.3 Acoplamiento molecular (*docking*)

Docking es un término usado en el área computacional cuyo propósito es encontrar la "mejor" interacción entre dos moléculas: un receptor y un ligando. El acoplamiento molecular simula esencialmente la interacción de la superficie de la proteína con su ligando, la cual puede ser descrita por modelos matemáticos o descriptores de su forma geométrica. Esta simulación se basa en el entendimiento de las interacciones fármaco-receptor que constituyen las bases fundamentales de la farmacología molecular.²⁹

Ésta metodología requiere principalmente de dos componentes que pueden ser caracterizados, en forma general, como la etapa de "búsqueda" y la etapa de "evaluación". La búsqueda se refiere a la exploración del espacio configuracional accesible para el ligando dentro del receptor. Por su parte, la etapa de evaluación se refiere a la asignación de un valor numérico, generalmente energía libre de unión, a cada una de las configuraciones generadas durante la etapa de búsqueda.²⁷

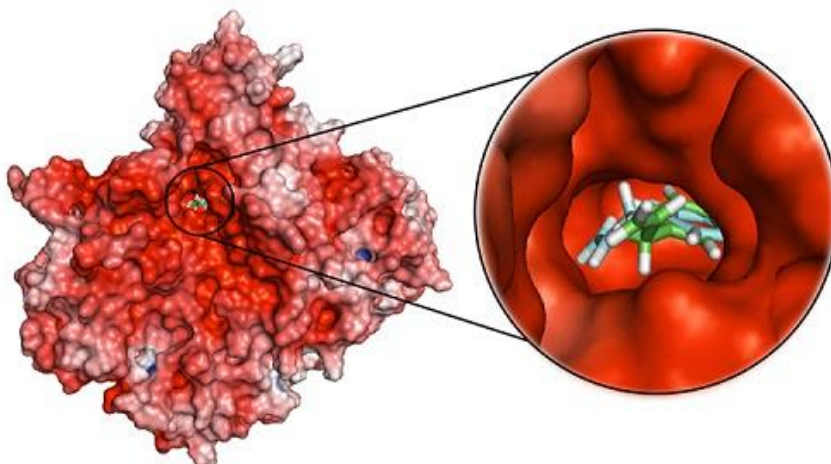


Figura 4. Representación del acoplamiento molecular (*docking*).³⁰



La energía libre de unión del complejo formado (comúnmente expresada como energía libre de Gibbs, ΔG) generalmente considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la molécula, formación de puentes de hidrógeno así como desolvación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.²³

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

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{disolvente} + \Delta G_{conformación} + \Delta G_{interacción} + \Delta G_{rotación} + \Delta G_{tr} + \Delta G_{vibración}$$

donde:

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

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

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

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

ΔG_{tr} es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.

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

Cabe señalar que es necesario realizar pruebas experimentales para comprobar dichas predicciones; aun así, la técnica de acoplamiento molecular hace más eficiente la búsqueda de moléculas bioactivas logrando evaluar una gran cantidad de compuestos en un lapso de tiempo menor.



2.7 Desarrollo de nuevas moléculas con actividad antidiabética

2.7.1 Proteína Fosfatasa de Tirosina 1B (PTP1B) como blanco para el diseño de fármacos

La insulina es una hormona que regula el nivel de glucosa en sangre mediante el estímulo de diversas respuestas fisiológicas en sus tejidos diana. En el músculo esquelético y tejido adiposo la insulina promueve la translocación de transportadores de glucosa GLUT4 desde sus vesículas de almacenamiento a la membrana plasmática, lo que facilita la absorción de glucosa sistémica.³¹

Las proteínas fosfatasa de tirosina (PTP's) son enzimas que catalizan la remoción de grupos fosfato en proteínas fosforiladas, éstas pueden ser transmembranales o localizarse en la cara citoplásmica del retículo endoplasmico. En los seres humanos existen más de un centenar de PTP's que pueden funcionar ya sea como moduladores negativo o positivo en varias vías de transducción de señal.

En particular, la Proteína Fosfatasa de Tirosina 1B (PTP1B) se propone como un blanco para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad debido a que esta enzima actúa como regulador negativo de la cascada de señalización de la insulina.⁶

En procesos celulares normales, la insulina es reconocida por su receptor el cual se autofosforila desencadenando una cascada de señalización que permite la entrada de glucosa a la célula. La PTP1B, entre otras acciones, interacciona con el receptor o los sustratos del receptor de insulina fosforilado y remueve los grupos fosfato de los residuos de tirosina, lo que impide que la señalización por insulina se lleve a cabo. **(Figura 5.)**³² Se ha demostrado que la ausencia de PTP1B en ratones knockout los protege de presentar hiperglicemia, lo hace de esta enzima un blanco atractivo para el desarrollo de moléculas que bloqueen su actividad.⁵

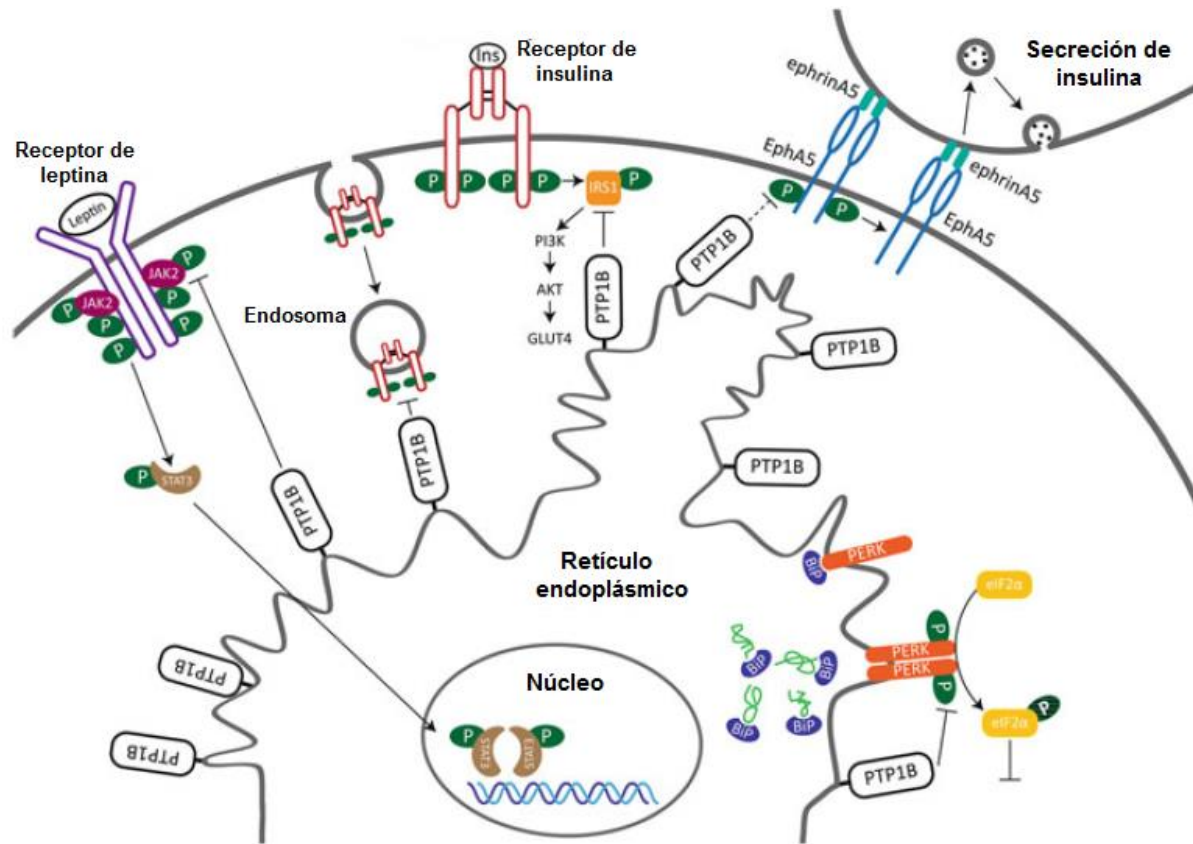


Figura 5. Interacción y señalización de los sustratos de la PTP1B.³²

2.7.2 Sitios de unión blanco de la PTP1B para el diseño de fármacos

La selectividad es una de las cuestiones más importantes en el desarrollo de inhibidores de la enzima PTP1B. Debido a que todas las PTP comparten una alta homología estructural en el sitio activo (fosfotirosina), el diseño de inhibidores con alta afinidad y selectividad para la PTP1B plantea un desafío. Afortunadamente, estudios sobre PTP's han demostrado que la unión al sitio activo fosfotirosina por sí solo no es suficiente para obtener una gran afinidad por esta enzima, ya que los residuos y sitios de unión adyacentes al sitio activo PTP1B son importantes para el reconocimiento del sustrato con esta enzima. El aumento de la afinidad de inhibidores bidentados se basa en el principio de aditividad de energía libre de unión, esto es, la interacción de un inhibidor con dos sitios independientes sobre la PTP1B



le confiere alta especificidad sobre otras PTP's que no posean una segunda interacción.⁶

Estudios previos han demostrado la inhibición competitiva de la PTP1B por parte de los ligandos que interaccionan con el área A1 del sitio activo, la cual se encuentra a los alrededores del aminoácido Cys215. Por otro lado, se ha descrito un segundo sitio de unión cercano al sitio catalítico, conocido como área A2, el cual se encuentra alrededor de los aminoácidos Tyr46, Arg47 y Asp48. Ligandos bidentados pueden unirse simultáneamente al área A1 y a un tercer o cuarto sitio de unión llamados, área B y C, localizados en las cercanías del aminoácido Arg24 y Lys41 respectivamente.

Además de los inhibidores que interaccionan con el sitio catalítico de la PTP1B, se han encontrado interacciones con sitios alostéricos, alrededor de los aminoácidos Lys197, Asn193, Ala189 y Phe280.³³ Por estas razones ha surgido un nuevo diseño de inhibidores bidentados que se espera se unan tanto al sitio activo como a sitios adyacentes a este.

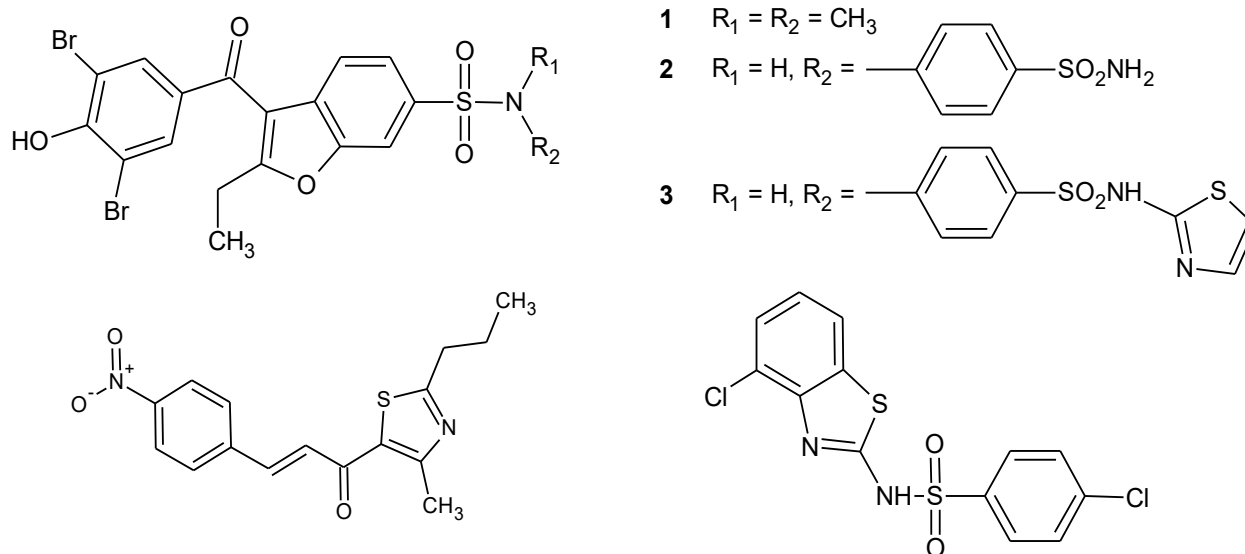


Figura 6. Compuestos bidentados inhibidores de PTP1B.^{6,33}



2.7.3. Derivados de bencimidazol como inhibidores de PTP1B

En la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antidiabética, nuestro grupo de investigación identificó un compuesto con actividad inhibitoria sobre la PTP1B; éste es un derivado de bencimidazol etiquetado como **PTSB6**, 5-cloro-*N*-[5-cloro-6-(2,3-diclorofeniloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida. Este compuesto se consideró un *hit experimental* puesto que presentó una CI_{50} de 16 μM en la enzima.

Dado los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición de PTP1B, en este trabajo se propone una serie de nuevas estructuras derivadas de la molécula **PTSB6** que fueron diseñadas con el propósito de generar nuevos compuestos que puedan interactuar con mayor afinidad en la cavidad del sitio activo y así inhibir la función de PTP1B. Con esto en mente, la estructura de la molécula líder se simplificó, generando moléculas de menor tamaño, con un sustituyente polar en posición dos del anillo de bencimidazol que favorezca la unión al sitio activo y sintéticamente más accesibles. Estas nuevas estructuras se evaluaron mediante estudios de acoplamiento molecular con el propósito de obtener moléculas candidatas para su síntesis y posterior evaluación *in vitro* sobre la PTP1B (**Figura 8**).

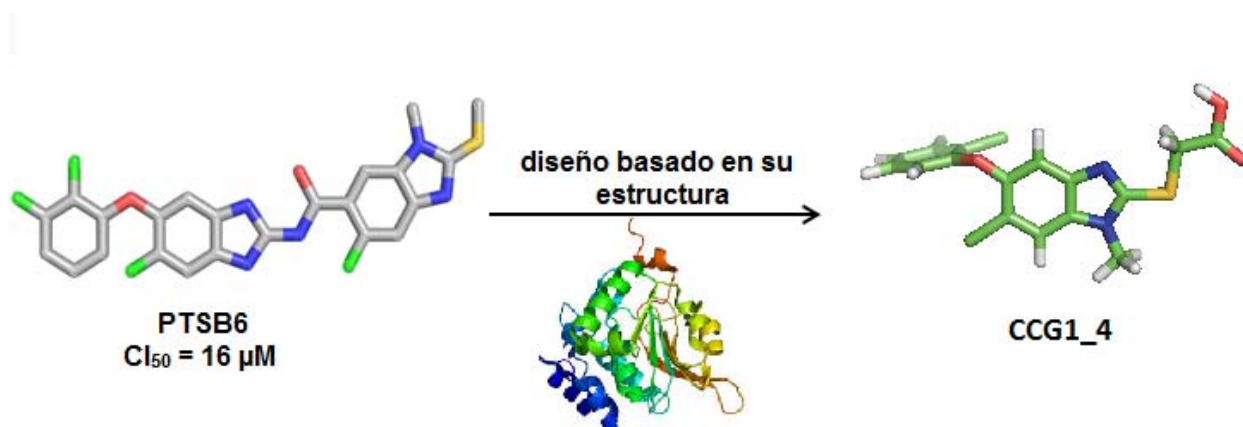


Figura 8. Estrategia utilizada para el diseño de inhibidores de la PTP1B.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día la diabetes es un problema de salud a nivel mundial que afecta a más de 415 millones de personas, de los cuales la diabetes tipo 2 representa aproximadamente un 90% de los casos.

En la actualidad se encuentran disponibles diversos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad, tales como la insulina, biguanidinas y sulfonilureas; sin embargo, no hay un fármaco que por sí solo sea capaz de disminuir las concentraciones de glucosa en sangre dentro de un rango normal por un periodo de tiempo sostenido.

Teniendo esto en mente, la búsqueda de nuevos blancos moleculares así como de moléculas con actividad antidiabética es indispensable para mejorar el tratamiento de esta enfermedad. Un blanco molecular que llama la atención es la PTP1B, ya que la inhibición de esta enzima ha demostrado regular los niveles de glucosa en sangre.

En la búsqueda de inhibidores, los derivados de bencimidazol son estructuras que han mostrado actividad inhibitoria sobre la PTP1B, tal es el caso del compuesto **PTSB6**, en cuya estructura presenta dos núcleos bencimidazólicos, por lo que ésta se puede optimizar para el desarrollo de nuevos antidiabéticos. Con este argumento surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Modificaciones estructurales simplificando la molécula **PTSB6**, eliminando un núcleo de bencimidazol y adicionando grupos polares como sustituyentes en posiciones 2 y 5(6), presentarán una mejor afinidad sobre la PTP1B en estudios *in silico*?
- ¿Estudios de acoplamiento molecular sobre la PTP1B, proporcionarán información que nos ayude a establecer una relación estructura-actividad y proponer nuevas estructuras como posibles inhibidores?



- ¿Las moléculas evaluadas por *docking* que presentaron una mejor energía de unión que el ligando co-cristalizado sobre la PTP1B tendrán actividad inhibitoria en estudios *in vitro*?

4. HIPÓTESIS

Las moléculas elegidas para su síntesis y evaluación inhibitoria de la PTP1B diseñadas a partir del *hit experimental* **PTSB6**, por simplificación molecular, adición de grupos polares y mediante estudios de acoplamiento molecular, tendrán actividad inhibitoria de la enzima.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar por acoplamiento molecular una serie de compuestos derivados de bencimidazol 2-sustituidos, diseñados a partir del *hit experimental* **PTSB6** como inhibidores de la enzima PTP1B. Seleccionar y sintetizar cinco moléculas candidatas a inhibidores de la PTP1B.

5.2 Objetivos particulares

- Aprender y estudiar la metodología del diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC), en especial el acoplamiento molecular.
- Diseñar y evaluar por medio de *docking* una serie de compuestos derivados de la molécula **PTSB6**.
- Estudiar mediante acoplamiento molecular la interacción de los compuestos de interés con la PTP1B, así como aportar información para establecer una relación estructura-actividad y proponer nuevas estructuras como posibles inhibidores.
- Sintetizar y purificar los bencimidazoles precursores de los cinco compuestos candidatos a inhibidores de la PTP1B, a partir de materias primas comerciales.
- Determinar las constantes físicas de punto de fusión, *Rf* y rendimientos de los compuestos sintetizados.



| Clave | Molécula | Clave | Molécula |
|---------------|----------|---------------|----------|
| CCG2_1 | | CCG1_2 | |
| CCG1_3 | | CCG1_4 | |
| CCG1_1 | | | |

- Caracterizar estructuralmente, por métodos espectroscópicos y espectrométricos, los compuestos finales así como sus intermediarios claves.



6. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental que se siguió en este trabajo se dividió en dos partes: la parte computacional y la parte química. La parte computacional se realizó en el laboratorio 122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, bajo la supervisión del M. en C. Pedro Josué Trejo Soto. La parte química describe la secuencia de síntesis empleada para la preparación de los compuestos diseñados, ésta se llevó a cabo en el mismo sitio bajo la asesoría de la Dra. María Alicia Hernández Campos.

6.1 Parte computacional

6.1.1 Obtención y minimización de estructuras cristalográficas

La enzima de estudio se localizó en el *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), la cual fue identificada como PDB ID 2F71.

La enzima se descargó usando el programa SYBYL X, donde las moléculas de agua, iones y otros ligandos co-cristalizados presentes fueron removidos utilizando el módulo de preparación de proteínas presente en el programa. Posteriormente, la enzima se relajó a su conformación de menor energía empleando mecánica molecular como nivel de teoría usando el campo de fuerza AMBER 02 con una constante dieléctrica definida de 20 Debyes, se guardaron en formato *pdb* para su posterior empleo en el estudio de acoplamiento molecular.

6.1.1.1 Preparación de los ligandos

Las moléculas (ligandos) se construyeron en el programa Spartan 10. La optimización de la geometría de los ligandos se llevó a cabo mediante mecánica molecular usando el campo de fuerza MMFX94. Posteriormente, por medio del programa Autodock 4.2 y su interfaz gráfica *AutoDockTools* 1.5.4 (ADT), se eliminaron los hidrógenos no polares, se les adicionó cargas Gasteiger-Marsili, se detectaron automáticamente los centros de torsión, enlaces rotables y se permitió el



libre giro de los enlaces sencillos con excepción de los enlaces carbono-nitrógeno (N-CO) de amida, que se consideraron rígidos.

6.1.1.2 Preparación de la proteína

La proteína, después de su minimización de energía se preparó empleando el programa ADT 4.2 donde se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno, y se corrigieron las cargas de las histidinas presentes a su estado neutro.

6.1.2 Acoplamiento molecular

Con el programa ADT, usando el programa auxiliar *AutoGrid 4.2*, se generó la caja de búsqueda o *grid* la cual se posicionó en el centro de la interfaz de la enzima, el *grid* empleado tuvo la siguiente dimensión: 80x80x60 Å. La búsqueda de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó usando *AutoDock 4.2*, empleando un algoritmo genético del tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150, 2×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Por último, se seleccionó el mejor modelo de acoplamiento ligando-PTP1B relajado a su mínima energía; de esta manera se lograron observar cambios conformacionales de la interfaz que afecten la conformación tridimensional del sitio catalítico.

6.2 Parte química

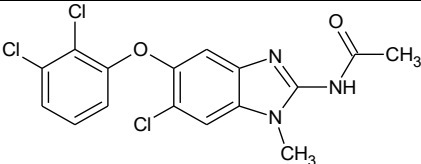
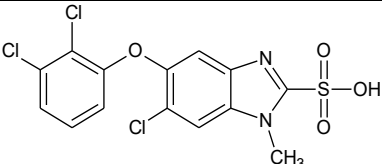
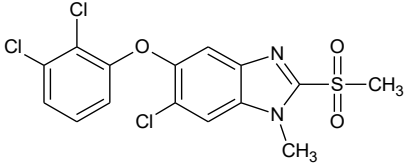
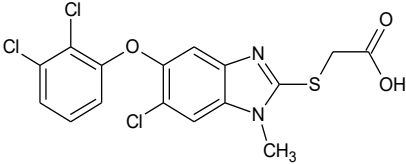
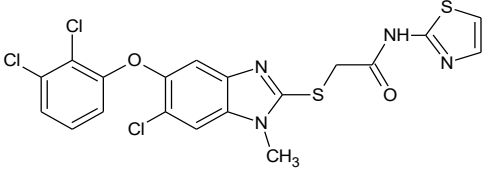
Los resultados obtenidos mediante el acoplamiento molecular llevaron a la propuesta de síntesis de una serie de cinco compuestos (**CCG1_1 – CCG1_4 y CCG2_1**). La síntesis de estas moléculas se desarrolló en tres etapas.

1. Síntesis de los bencimidazoles precursores 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**10**), 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**11**), y 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-bencimidazol (**12**) para la preparación de las moléculas finales.



2. Síntesis de la molécula **CCG1_1** a partir del compuesto **10**.
3. Síntesis de las moléculas **CCG1_2 – CCG1_4** y **CCG2_1** a partir de los bencimidazoles precursores.

Tabla 2. Serie 1 de moléculas finales

| Clave | Molécula | Clave | Molécula |
|---------------|--|---------------|---|
| CCG2_1 |  | CCG1_2 |  |
| CCG1_3 |  | CCG1_4 |  |
| CCG1_1 |  | | |

1. Síntesis de los bencimidazoles **10**, **11** y **12**, precursores para la preparación de las moléculas finales.

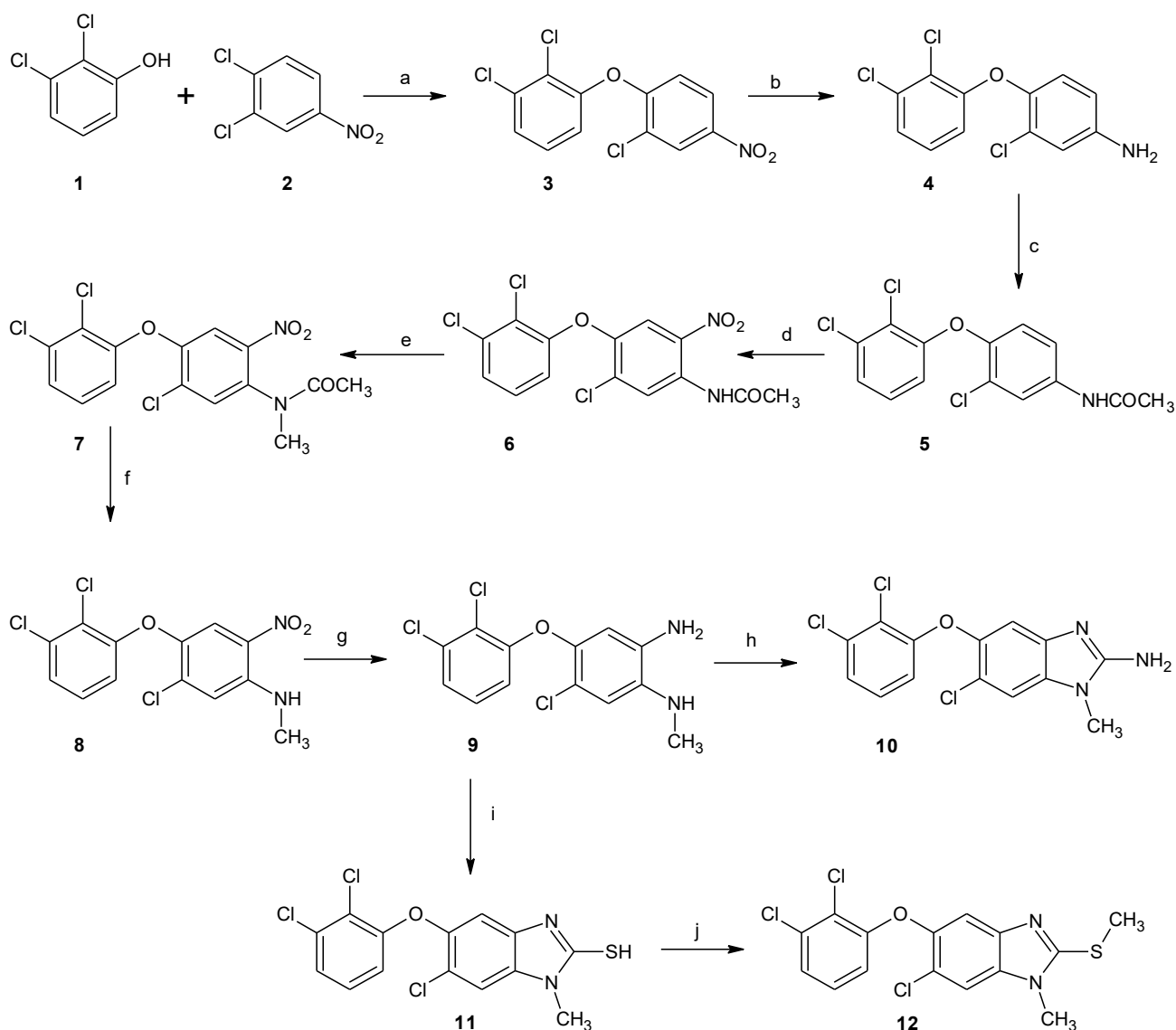
Para la obtención de los precursores 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**10**), y 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**11**) se siguió la ruta de síntesis mostrada en el **Esquema 2**.

Se partió del 1,2-dicloro-4-nitrobenzoceno comercial el cual mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática con 2,3-diclorofenol en condiciones básicas se obtuvo el diariléter **3**, éste se redujo empleando $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o catalítica usando



Níquel-Raney como catalizador, obteniendo así la amina correspondiente **4**, la cual fue acetilada con anhídrido acético para dar la acetamida **5**.

Después se efectuó una reacción de nitración empleando una mezcla de $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$, obteniendo el intermediario **6**. La *orto*-nitroacetanilida **6** se trató con sulfato de dimetilo en condiciones alcalinas para obtener el producto de *N*-metilación **7**. La posterior hidrólisis en medio básico del grupo acetamida permitió obtener la *N*-metil-2-nitroanilina **8**, la cual se redujo catalíticamente usando como catalizador Níquel-Raney en metanol para así obtener la *orto*-fenilendiamina **9**. La diamina **9** inmediatamente se hizo reaccionar mediante una reacción de ciclocondensación con bromuro de cianógeno en medio alcalino para obtener la amina **10** (6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina); o bien con disulfuro de carbono en medio básico para obtener el tiol **11** (6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol), éste último se hizo reaccionar con yoduro de metilo en medio básico para obtener el compuesto 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-bencimidazol (**12**).



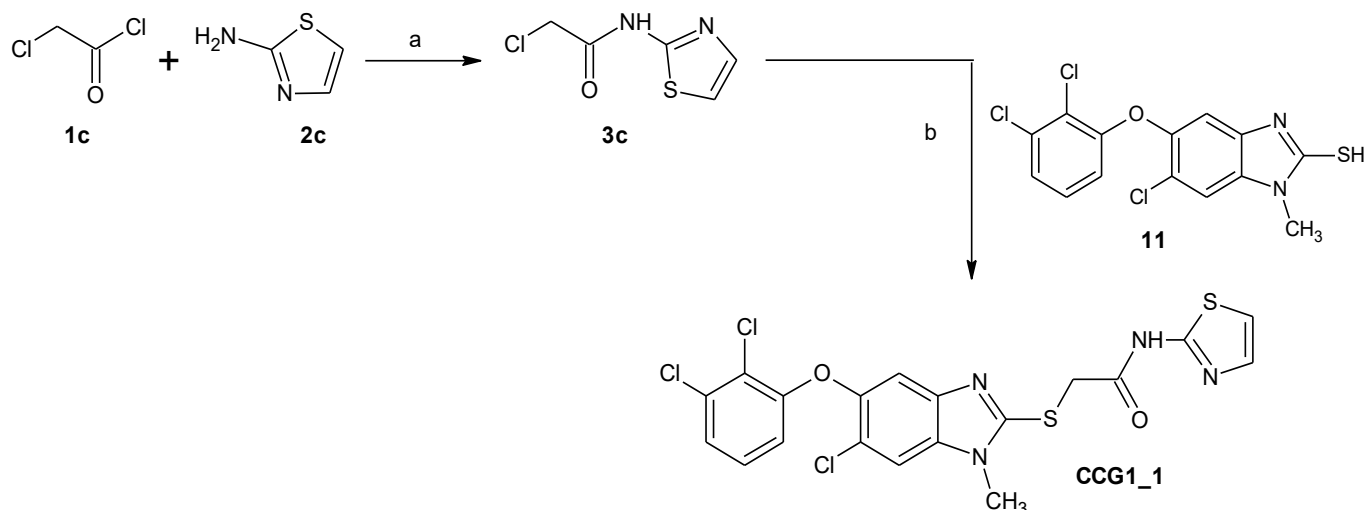
Esquema 2. Ruta sintética para la preparación de los precursores **10**, **11** y **12**. Reactivos y condiciones: (a) K_2CO_3 , DMF; (b) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ o H_2 , Ni-Raney; (c) Ac_2O ; (d) HNO_3/Ac_2O ; (e) $(CH_3)_2SO_4$, KOH, glima, 40 °C; (f) NaOH/MeOH; (g) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ o H_2 , Ni-Raney (h) $BrCN/EtOH$, KOH; (i) CS_2 , KOH, EtOH; (j) CH_3I/KOH , Acetona, 0°C.

2. Síntesis de CCG1_1 por acoplamiento de sus moléculas precursoras.

El **Esquema 3** muestra la ruta de síntesis para la obtención del compuesto **CCG1_1**. Se partió del cloruro de cloroacetilo comercial, el cual se hizo reaccionar por



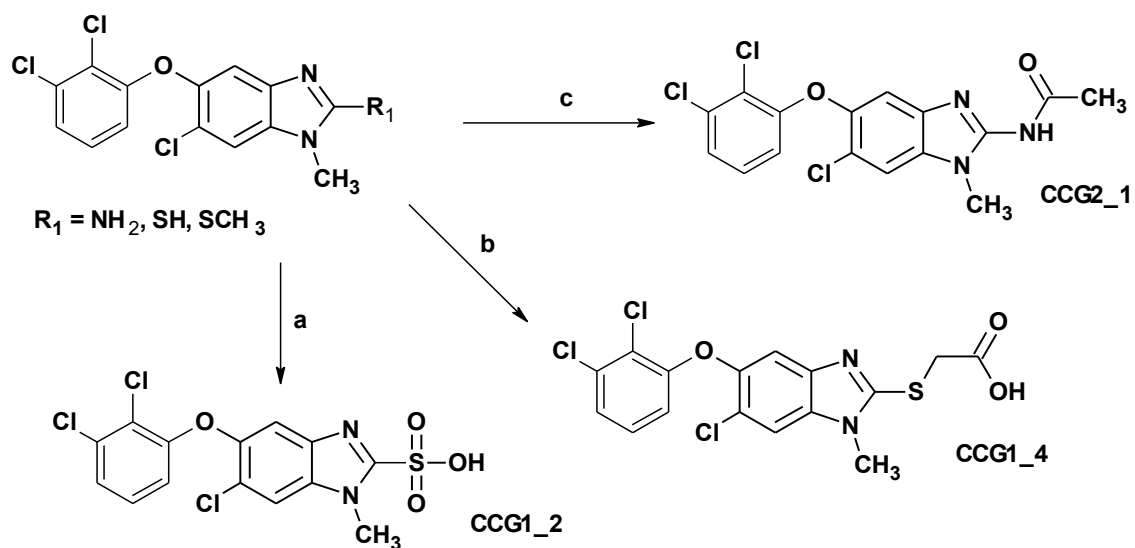
sustitución con 2-aminotiazol, generando así el intermediario **3c**, este precursor se hizo reaccionar con el tiol **11** bajo condiciones alcalinas a 0°C para obtener el compuesto final **CCG1_1**.



Esquema 3. Ruta sintética para la obtención del compuesto final **CCG1_1**. (a) Et₃N, CHCl₃, 0°C; (b) Acetona, K₂CO₃, 0°C.

3. Síntesis de las moléculas **CCG1_2**, **CCG1_4** y **CCG2_1** a partir de los bencimidazoles precursores.

Para la obtención de los compuestos finales se siguió la ruta de síntesis mostrada en el **Esquema 4**. La oxidación del bencimidazol-2-tiol precursor (**11**) con permanganato de potasio en medio básico a 100°C permitió obtener el compuesto **CCG1_2**. En el caso del compuesto **CCG1_4**, el tiol precursor **11** se hizo reaccionar con ácido cloroacético en medio básico y metanol como disolvente. Por último, el compuesto **CCG2_1** se obtuvo haciendo reaccionar el 2-aminobencimidazol **10** en anhídrido acético y cloroformo como disolvente a temperatura ambiente.



Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos **CCG1_2**, **CCG1_4** y **CCG2_1**. Reactivos y condiciones: a) $\text{KMnO}_4/\text{NaOH}$, 100°C ; b) ClCH_2COOH , MeOH , K_2CO_3 , Δ ; c) Ac_2O , CHCl_3 .



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Parte computacional

Estudios previos mostraron que el compuesto **PTSB6** presentó una CI_{50} de 16 μM , con base en estos resultados y la previa identificación del sitio activo de fosfotirosina de la PTP1B así como sitios de unión adyacentes al mismo que pudieran tener afinidad o interactuar con los ligandos diseñados (**Figura 9**) se llevó a cabo el diseño de 60 moléculas, las cuales conservaron el núcleo de bencimidazol y un sustituyente polar con alta densidad electrónica en posición dos del anillo de bencimidazol. En esta posición se incluyeron grupos polares como ácidos carboxílicos y algunos isómeros de éstos,³⁴ los cuales han presentado alta afinidad al sitio catalítico al interactuar vía puente de hidrógeno con los residuos cercanos al aminoácido Cys215, el cual es crucial para su actividad catalítica.

A la par, se redujo el tamaño de los ligandos para facilitar la entrada de éstos en una mayor proporción en la cavidad del sitio de unión, se modificaron los demás sustituyentes del anillo bencimidazólico en distintas posiciones con el propósito de generar una mayor interacción con los residuos adyacentes al sitio catalítico y se modificó la posición uno del anillo con el propósito de estudiar la interacción de este sustituyente con la penetración de los ligandos en el sitio catalítico generando así una mayor afinidad de unión con la enzima PTP1B.

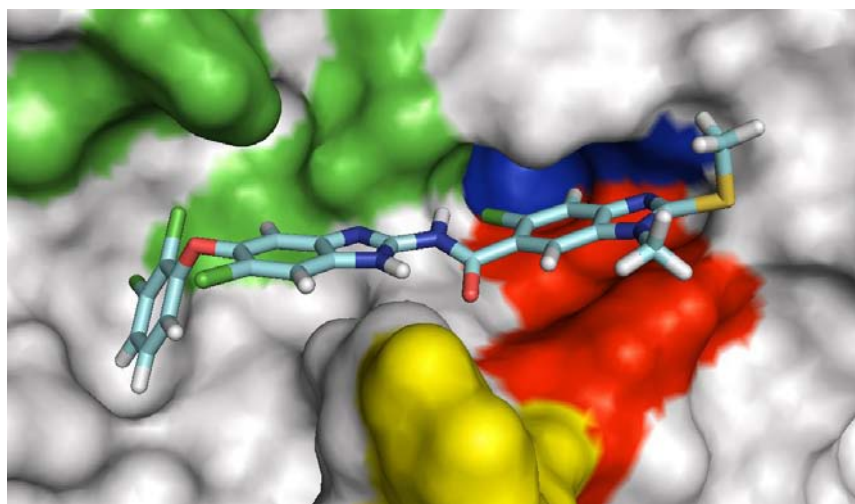


Figura 9. Acoplamiento molecular de la molécula PTB6 con la PTP1B.



En la **Tabla 3** se muestran los ligandos diseñados a partir de **PTSB6** así como sus respectivas energías de unión, en los cuales se conservó la estructura de bencimidazol y se modificaron los sustituyentes en posición cinco de este anillo con el fin de generar una mayor interacción con los residuos adyacente al sitio catalítico, dentro del diseño de éstos ligandos se incluyeron sustituyentes de tipo quinolino, bencilaminocarbonil, sulfonamida, piridina y/o bencilo, mientras que en posición dos se consideraron grupos sulfonamida, amida, carboximetilamino, ácido sulfónico, tiazolidindiona, rodaninas e hidantoína con el fin de incrementar la densidad electrónica y polaridad en esta posición, además de que puedan introducirse al sitio catalítico. De manera complementaria, se realizó el estudio de una serie de compuestos 1-metilbencimidazólicos con el propósito de estudiar el efecto del sustituyente metilo en esta posición.

Tabla 3. Energía de unión de ligandos diseñados como inhibidores de la enzima PTP1B

| Molécula | R ₁ | R ₂ | R ₃ | X | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) |
|----------|-----------------------------------|------------------|------------------|---|----------------------------|
| S8_3 | SOCH ₃ | H | H | C | -7.65 |
| S8_4 | SO ₂ CH ₃ | H | H | C | -7.58 |
| S9_1 | NHSO ₂ CH ₃ | OCH ₃ | OCH ₃ | C | -8.95 |
| S9_2 | NHSO ₂ CH ₃ | Cl | Cl | C | -9.18 |
| S9_3 | NHSO ₂ CH ₃ | H | H | N | -8.53 |
| S9_4 | NHSO ₂ CH ₃ | H | H | N | -8.23 |
| S9_5 | NHSO ₂ CH ₃ | Cl | Cl | N | -8.89 |
| S10_1 | NHCH ₂ COOH | OCH ₃ | H | C | -7.25 |
| S10_2 | NHCH ₂ COOH | Cl | H | C | -7.78 |
| S10_3 | NHCH ₂ COOH | H | H | N | -7.20 |
| S10_4 | NHCH ₂ COOH | H | CH ₃ | N | -6.66 |
| S10_5 | NHCH ₂ COOH | Cl | H | N | -7.36 |
| S11_1 | COCOOH | OCH ₃ | H | C | -7.57 |



Tabla 3. (Continuación)

| | | | | | | | |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S11_2 | COCOOH | Cl | H | C | -7.69 | | |
| S11_3 | COCOOH | H | H | N | -7.36 | | |
| S11_4 | COCOOH | H | CH ₃ | N | -6.82 | | |
| S11_5 | COCOOH | Cl | H | N | -7.65 | | |
| R₁ | | R₂ | | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | | | |
| S8_1 | SOCH ₃ | 5,6-diclorofenil-1-oxi | | -7.29 | | | |
| S8_2 | SO ₂ CH ₃ | 5,6-diclorofenil-1-oxi | | -7.41 | | | |
| | | | | | | | |
| Molécula | R₁ | R₂ | R₃ | R₄ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | | |
| S2_3 | H | H | H | H | -4.89 | | |
| S4_1 | Cl | H | H | H | -4.37 | | |
| S4_2 | H | Cl | H | H | -5.26 | | |
| S4_3 | H | H | Cl | H | -5.40 | | |
| S4_4 | H | Cl | H | Cl | -4.38 | | |
| S5_1 | H | NO ₂ | H | H | -4.83 | | |
| S5_2 | NO ₂ | H | H | H | -4.43 | | |
| S5_3 | H | H | NO ₂ | H | -3.03 | | |
| S5_4 | H | SO ₂ NH ₂ | H | H | -4.50 | | |
| S6_1 | H | CF ₃ | H | H | -1.94 | | |
| S6_2 | H | CF ₃ | H | CF ₃ | -1.38 | | |
| S6_3 | CF ₃ | H | H | H | -3.22 | | |
| S7_3 | H | COOH | H | H | -5.98 | | |
| | | | | | | | |
| Molécula | R₁ | R₂ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | Molécula | R₁ | R₂ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) |
| S12_1 | H | NHCH ₂ COOH | -7.0 | S12_0-M | CH ₃ | NHSO ₂ CH ₃ | -8.97 |
| S12_2 | H | NHCOCOOH | -6.79 | S12_1-M | CH ₃ | NHCH ₂ COOH | -7.67 |
| S12_3 | H | NHCOCF ₃ | -6.62 | S12_2-M | CH ₃ | NHCOCOOH | -7.54 |
| S12_0 | H | NHSO ₂ CH ₃ | -5.56 | S12_3-M | CH ₃ | NHCOCF ₃ | -7.51 |



Tabla 3. (Continuación)

| S1_3 | X = S | R ₁ = | S2_1 | X = S | R ₁ = | |
|----------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|----------|-------------------------------|--|
| S1_4 | X = S | R ₁ = | S2_2 | X = N | R ₁ = | |
| S1_5 | X = N | R ₁ = | S3_1 | X = S | R ₁ = | |
| S1_6 | X = N | R ₁ = | S3_6 | X = N | R ₁ = | |
| S1_1 | X = N | R ₂ = | S3_4 | X = N | R ₂ = | |
| S1_2 | X = N | R ₂ = | S3_5 | X = S | R ₂ = | |
| S1_7 | X = S | R ₂ = | S3_6 | X = N | R ₂ = | |
| S2_6 | X = N | R ₂ = | S7_1 | X = S | R ₂ = | |
| S3_3 | X = S | R ₂ = | S7_2 | X = S | R ₂ = | |
| S2_4 | | | S2_5 | | | |
| Molécula | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | Molécula | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | Molécula | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | |
| S1_3 | -7.00 | S2_6 | -5.47 | S3_4 | -5.48 | |
| S1_4 | -7.03 | S3_3 | -5.64 | S3_5 | -4.64 | |
| S1_5 | -5.41 | S2_4 | -7.47 | S3_6 | -6.25 | |
| S1_6 | -4.52 | S2_1 | -5.43 | S7_1 | -2.03 | |
| S1_1 | -3.58 | S2_2 | -7.74 | S7_2 | +8.31 | |
| S1_2 | -2.93 | S3_1 | -7.04 | S2_5 | -6.39 | |
| S1_7 | +7.46 | S3_6 | -6.25 | | | |



Mediante el estudio de acoplamiento molecular, se observó la interacción de los distintos ligandos diseñados a partir de la **PTSB6** con la PTP1B, se identificaron las principales zonas de interacción del sitio catalítico de la enzima, así como los residuos que participan en la interacción con estas moléculas (**Figura 10**).

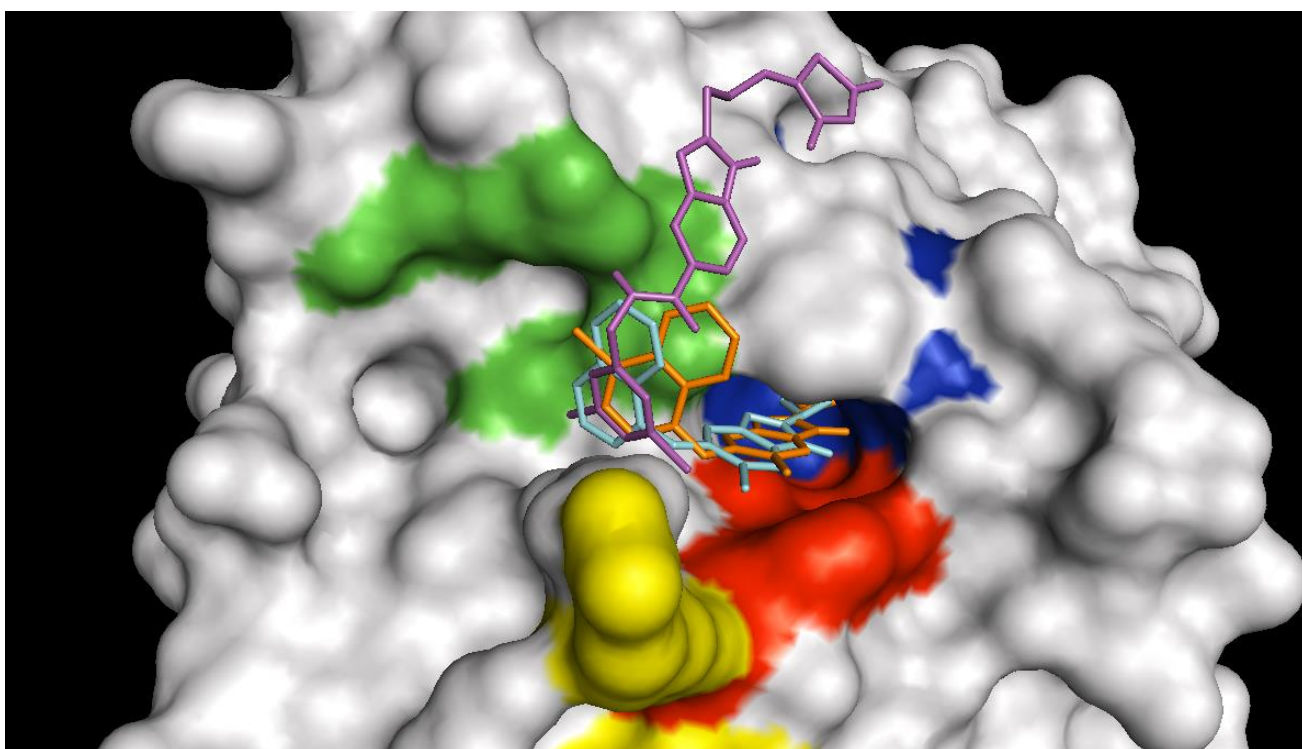
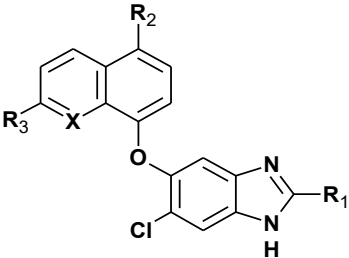
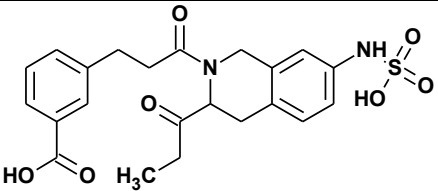
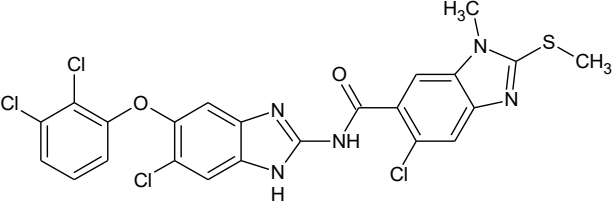


Figura 10. Acoplamiento molecular de los ligandos **S4_4**, **S10_3** y **S10_5** en las distintas zonas de unión: azul, zona A1; rojo, zona A2; verde, zona B; y amarillo, zona C.

De 60 moléculas diseñadas, 55 mostraron mejor afinidad que el ligando co-cristalizado presente en la estructura seleccionada del PDB, los 10 mejores resultados se muestran en la **Tabla 4** mientras que la **Figura 11** y **12** muestra el acoplamiento molecular de los ligandos que presentaron una mejor afinidad con PTP1B.



Tabla 4. Acoplamiento molecular de compuestos diseñados

|  | | | | | | |
|---|--|------------------|-----------------|---|-------------------------------------|----------------------------|
| Molécula | R ₁ | R ₂ | R ₃ | X | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | |
| S9_2 | NHSO ₂ CH ₃ | Cl | H | C | -9.18 | |
| S9_1 | NHSO ₂ CH ₃ | OCH ₃ | H | C | -8.95 | |
| S9_5 | NHSO ₂ CH ₃ | Cl | H | N | -8.89 | |
| S9_3 | NHSO ₂ CH ₃ | H | H | N | -8.53 | |
| S9_4 | NHSO ₂ CH ₃ | H | CH ₃ | N | -8.23 | |
| S10_2 | NHCH ₂ COOH | Cl | H | C | -7.78 | |
| S11_2 | COCOOH | Cl | H | C | -7.69 | |
| S11_5 | COCOOH | Cl | H | N | -7.65 | |
| S8_3 | SOCH ₃ | H | H | C | -7.65 | |
| S8_4 | SOOCH ₃ | H | H | C | -7.58 | |
| Ligando cocrystalizado |  | | | | -2.74 | |
| PTSB6 |  | | | | ΔG (kcal/mol) | Actividad (200 μ M) |
| | | | | | -7.85 | 100% |

De acuerdo a los resultados de acoplamiento molecular, las moléculas con grupos sulfonamida (**S9_1-S9_5**) o derivados de glicina (**S10_2**) en posición R₁ presentaron los mejores resultados de energía de unión, ya que estos grupos favorecen las interacciones por puente de hidrógeno con los residuos Asp181 y Arg221 presentes en la zona A1 del sitio activo. El sustituyente naftilo o quinolino presentó interacción de tipo catión- π con el residuo Arg24 de la zona B. Los sustituyentes en R₂ como cloro o metoxilo favorecen la interacción con los residuos Tyr20 y Arg24. Mientras que la sustitución R₃ no modificó sustancialmente la energía de unión por lo que en



dicha posición la interacción es más estérica que electrónica. Como se observa en la **Figura 11**, las moléculas **S9_1-S9_5** adoptan una conformación similar en el sitio activo de la PTP1B, donde las interacciones entre los sustituyentes en R_1 y R_2 son indispensables para dicha afinidad. Este resultado indica que las moléculas **S9_1-S9_5** y **S10_2**, con la disposición estructural propuesta (sustituyentes naftilo o quinolino y grupos sulfonamida o derivados de glicina en posición R_1) tienen potencial de presentar actividad inhibitoria sobre la enzima.

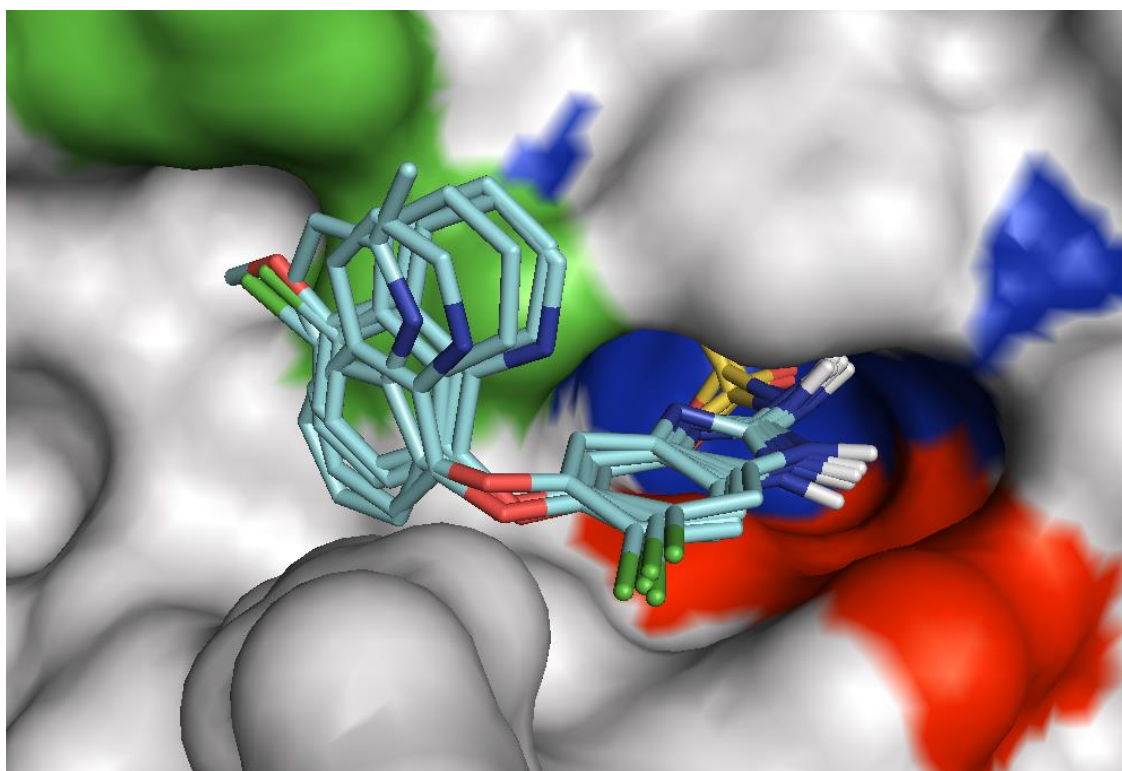


Figura 11. Acoplamiento molecular de los ligandos **S9_1-S9_5** en la cavidad del sitio activo. La zona A1 se representa en color rojo, A2 en azul y la zona B del sitio de activo en verde.

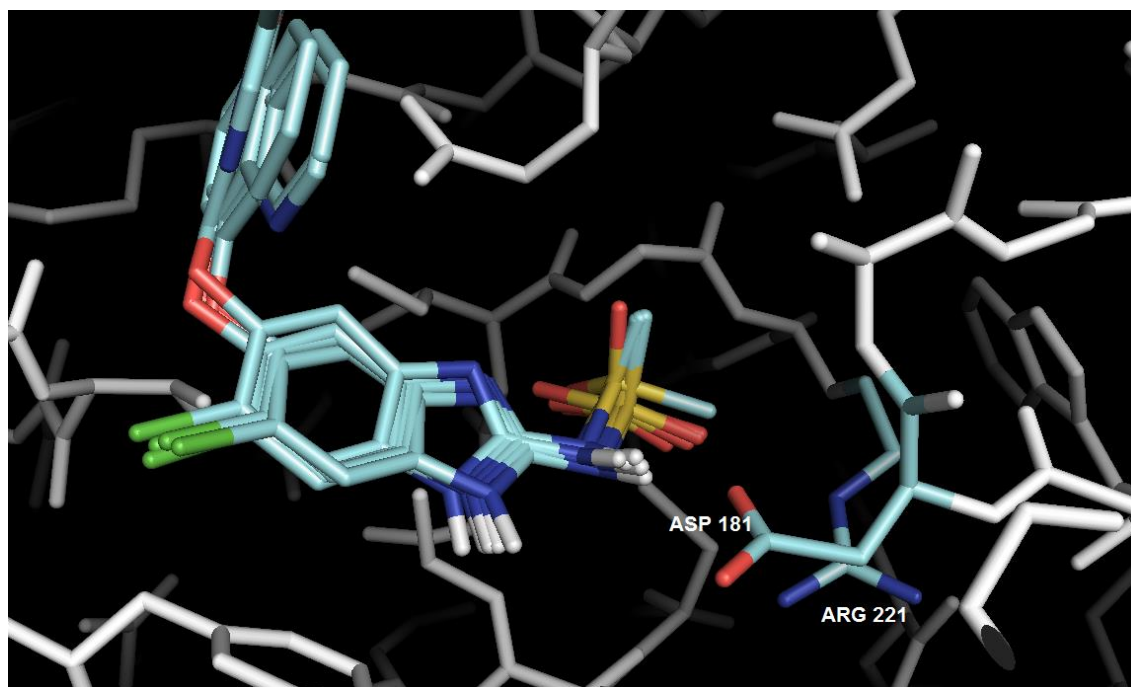


Figura 12. Interacciones puente de hidrógeno de las moléculas **S9_1-S9_5** con los residuos ASP 181 y ARG 221.

Se evaluó la importancia de la presencia de un hidrógeno en posición 1 del anillo de bencimidazol, para ello se evaluaron los derivados metilados del **S9_1 – S9_5**, los resultados del estudio de acoplamiento molecular de la serie de ligandos 1-metilbencimidazol se muestran en la **Tabla 5**. Todos los compuestos evaluados mostraron una mayor afinidad por la PTP1B que el ligando co-cristalizado, además los derivados 1-metilbencimidazol presentaron una mejor afinidad hacia la PTP1B que su estructura análoga con hidrógeno en la misma posición.



Tabla 5. Acoplamiento molecular de compuestos 1-metilbencimidazol diseñados a partir de la molécula PTSB6

| Molécula | R ₁ | R ₂ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) | Molécula | R ₁ | R ₂ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) |
|-------------------------|----------------|-----------------------------------|--|----------|-----------------|-----------------------------------|--|
| S12_0 | H | NHSO ₂ CH ₃ | -5.56 | S12_0-M | CH ₃ | NHSO ₂ CH ₃ | -8.97 |
| S12_1 | H | NHCH ₂ COOH | -7.0 | S12_1-M | CH ₃ | NHCH ₂ COOH | -7.67 |
| S12_2 | H | NHCOCOOH | -6.79 | S12_2-M | CH ₃ | NHCOCOOH | -7.54 |
| S12_3 | H | NHCOCF ₃ | -6.62 | S12_3-M | CH ₃ | NHCOCF ₃ | -7.51 |
| Ligando co-cristalizado | | | | | | | -2.74 |

Como se observa en la **Figura 12**, el grupo polar (sulfonamida o ácido carboxílico) presente en los derivados 1-metilados se introduce en la cavidad del sitio activo e interacciona por puente de hidrógeno con los residuos Ser216 y Tyr46 de la zona A2; además, el grupo metilo adopta una conformación que bloquea la cavidad del sitio activo. En contraste, el grupo polar de los análogos con hidrógeno en posición 1 no se introduce por completo en la cavidad generando complejos menos estables que los análogos metilados de estos compuestos.

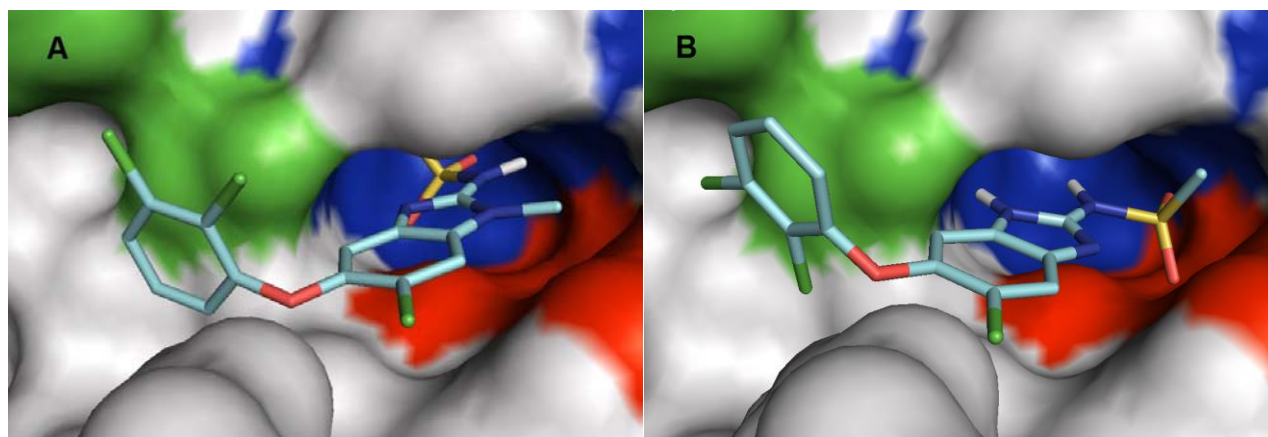
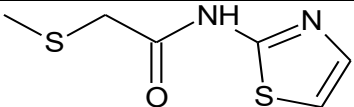
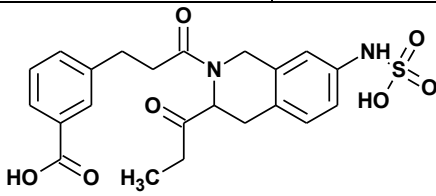


Figura 13. (A) Acoplamiento molecular de ligando 1-metilbencimidazol S12_0-M, (B) Acoplamiento molecular de ligando no metilado S12_0.



Con base a los resultados obtenidos en los estudios de *docking*, se realizó el diseño de una nueva serie de compuestos cuyos resultados de acoplamiento molecular se muestran en la **Tabla 6**. Esta nueva serie de ligandos conservó la estructura base de bencimidazol, así como un sustituyente metilo en posición uno, el cual aumentó la afinidad con el sitio de unión en los acoplamientos previos, así mismo tienen presente el grupo 2,3-diclorofenoxi el cual mostró tener alta afinidad por la zona B del sitio de unión y se decidió modificar los sustituyentes en posición 2 del bencimidazol por otro tipo de grupos polares.

Tabla 6. Acoplamiento molecular de ligandos a sintetizar y evaluar *in vitro* sobre la PTP1B

| Molécula | R ₁ | AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol) |
|-------------------------|---|-------------------------------------|
| CCG1_1 |  | -5.71 |
| CCG1_2 | SO ₃ H | -6.15 |
| CCG1_3 | SO ₂ CH ₃ | -6.73 |
| CCG1_4 | SCH ₂ COOH | -6.28 |
| CCG2_1 | NHCOCH ₃ | -6.61 |
| Ligando co-cristalizado |  | -2.74 |

En el estudio de acoplamiento molecular, los compuestos de esta nueva serie de ligandos presentaron una mayor afinidad por la PTP1B que el ligando co-cristalizado; las moléculas **CCG2_1** y **CCG1_3** presentaron interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos Asp181 y Arg221 presentes en la zona A1 del sitio activo, mientras que el sustituyente 2,3-diclorofenoxi nuevamente presentó interacciones de tipo catión- π con el residuo Arg24 de la zona B de la enzima, ver **Figura 14**. Las moléculas **CCG1_1**, **CCG1_2** y **CCG1_4** presentaron una alta



afinidad con la zona C de la enzima, la cual es considerada esencial para el desarrollo de inhibidores específicos,³³ esta interacción se produjo vía puente de hidrógeno con los residuos de Lys41 y Arg47, además se presentó una interacción tipo catión- π con el residuo Lys36 a través el sustituyente 2,3-diclorofenil-1-oxi de cada molécula.

De las 65 moléculas propuestas, las cuales en general mostraron alta probabilidad de inhibir a la PTP1B, los compuestos **CCG1_1-CCG1_4** se seleccionaron para su síntesis a pesar de no presentar los mejores resultados de energía de unión de todos los ligandos estudiados en éste trabajo; sin embargo, sus estructuras son un poco más sencillas y accesibles desde el punto de vista sintético. Estos compuestos presentan características estructurales que de acuerdo a los estudios teóricos pueden inhibir a esta enzima, por lo que su obtención dará la pauta para validar el estudio computacional y proseguir con la obtención de otras moléculas contempladas en este trabajo.

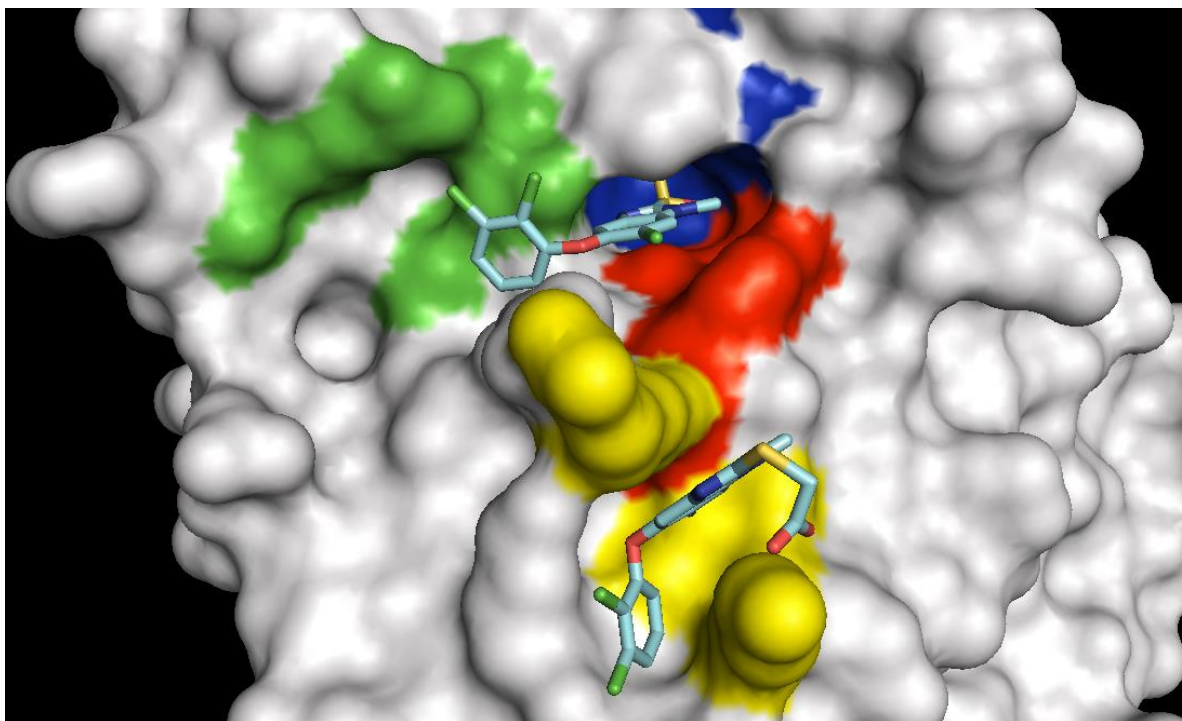


Figura 14. Acoplamiento molecular de los ligandos **CCG1_3** y **CCG1_4** en las distintas zonas de inhibición; azul zona A1, rojo zona A2, verde zona B y amarillo zona C.



7.2 Parte química

Las constantes físicas, punto de fusión y *R_f*, así como los rendimientos obtenidos de los intermediarios y productos finales sintetizados se muestran en la **Tabla 7**, mientras que las constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y de espectrometría de masas así como las asignaciones para cada compuesto se resumen en la **Tabla 8**.

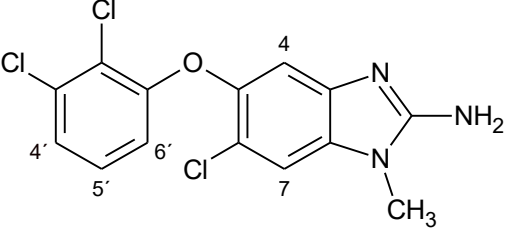
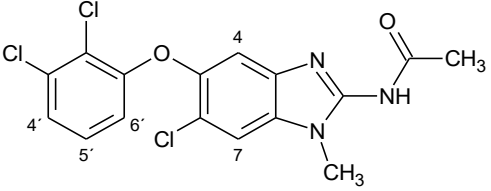
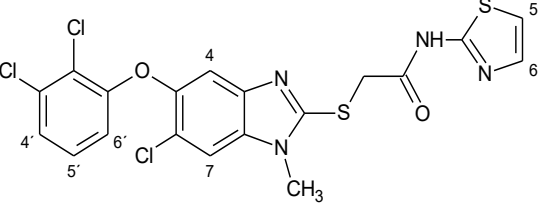
Tabla 7. Constantes físicas de los intermediarios y compuestos finales sintetizados

| Compuesto | Rendimiento crudo (%) | Disolvente de recristalización | Rendimiento de recristalizado (%) | Punto de fusión (°C) | <i>R_f</i> (sistema) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 3¹ | 92 | Tolueno | 69 | 117.5-119 | 0.70 (I) |
| 3c¹ | 95 | Tolueno | 64 | 168.2-169.4 | 0.43 (VII) |
| 4¹ | Nd | nd | Nd | nd | 0.33 (I) Quim. 0.43 (I) Cat. |
| 5¹ | 84 | Tolueno | 59 | 131.4-131.9 | 0.30 (VII) |
| 6¹ | 80 | Metanol | 92 | 168.3-169.7 | 0.51 (I) |
| 7¹ | 96 | AcOEt | 72 | 131.7-132.8 | 0.61(VI) |
| 8¹ | 99 | Metanol | 66 | 141.5-143.9 | 0.68 (VI) |
| 9¹ | Nd | nd | Nd | nd | 0.32 (I) Quim. 0.32 (I) Cat. |
| 10 | 97 | nd | Nd | 244.4-246.0 | 0.43 (X) |
| CCG2_1 | 42 | Etanol | 84 | 237.5-238.9 | 0.57 (IV) |
| 11¹ | 60 | Etanol-DMF | 75 | 296.6-299.7 | 0.45 (VII) |
| CCG1_1 | 82 | Lavados de éter diisopropílico | 70 | 214.0-215.4 | 0.28 (VI) |
| CCG1_2 | 74 | Isopropanol/MeOH | 73 | 294.2-296.3 | 0.43 (VII**) |
| CCG1_4 | 97 | Metanol | 68 | 220.0-222.2 | 0.51 (IX) |
| 12¹ | 99 | Etanol/Agua | 91 | 184.0-184.7 | 0.62 (VI*) |

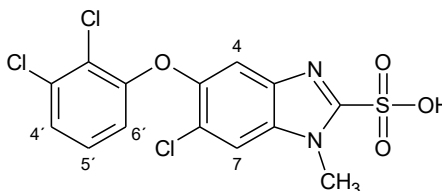
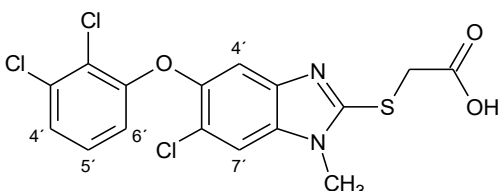
¹La determinación de punto de fusión y *R_f* de estos compuestos coincide con lo reportado en trabajos previos;^{35,36} **Una gota de ácido acético; *Una gota de hidróxido de amonio; nd: no determinado.



Tabla 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados

| Compuesto | Contantes espectroscópicas y espectrométricas |
|---|---|
| 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-amina (10)  | Espectro 1, IR: FTIR (ATR): 3446 (C-NH ₂), 3302 (C=NH), 3081 (C-H Ar.), 1649, 1574, 1542, 1407 (C=C, N=C), 1252 (C-O-C), 935 (C-Cl). Espectro 2, RMN ¹H: (TMS, DMSO-d ₆ , 300 MHz): 6.701 (s, 2H, NH ₂); 3.517 (s, 3H, NCH ₃); 6.561 (dd, 1H, J ₁ = 8.1 Hz, J ₂ = 1.5 Hz, H-6'); 6.977 (s, 1H, H-4); 7.228 (t, 1H, J ₁ = 8.4 Hz, J ₂ = 8.1 Hz, H-5'); 7.317 (dd, 1H, J ₁ = 8.1 Hz, J ₂ = 1.5 Hz, H-4'); 7.408 (s, 1H, H-7). Espectro 3, EM: ESI <i>m/z</i> : 342 (M+1, 9%), 364 (M+Na, 100%). |
| <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]acetamida; CCG2_1  | Espectro 4, IR: FTIR (ATR): 3237, 1637 (CONH), 3062 (C-H Ar.), 2934 (C-H Alif.), 1637, 1591, 1563, 1450 (C=C, N=C), 1251 (C-O-C), 911 (C-Cl). Espectro 5, RMN ¹H: (TMS, DMSO-d ₆ , 300 MHz): 2.142 (s, 3H, COCH ₃); 3.325 (s, 1H, NHCO); 3.608 (s, 3H, CH ₃ N); 6.647 (dd, 1H, J ₁ = 8.4 Hz, J ₂ = 0.9 Hz, H-6'); 7.240 (t, 1H, J ₁ = 8.1 Hz, J ₂ = 8.4 Hz, H-5'); 7.361 (dd, 1H, J ₁ = 8.1 Hz, J ₂ = 1.5 Hz, H-4'); 7.423 (s, 1H, H-4); 7.881 (s, 1H, H-7). Espectro 6, AE: Calculado para C ₁₆ H ₁₂ Cl ₃ N ₃ O ₂ : C, 49.96; H, 3.14; N, 10.9. Encontrado: C, 49.82; H, 2.57; N, 10.6. Espectro 7, EM: ESI <i>m/z</i> : 406 (M+Na, 100%), 431 (M+Na, 12%). |
| 2-[[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]sulfanil]- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)acetamida; CCG1_1  | Espectro 8, IR: FTIR (ATR): 3347 1678 (CONH), 3074 (C-H Ar.), 2910 (C-H Alif.), 1679, 1260 (CONH), 1622, 1576, 1541, 1470 (C=C, N=C), 1450 (CH ₃), 1217 (C-O-C), 913 (C-Cl). Espectro 9, RMN ¹H: (TMS, DMSO-d ₆ , 300 MHz): 3.766 (s, 3H, N-CH ₃); 4.442 (s, 2H, S-CH ₂); 6.640 (dd, 1H, J ₁ = 8.4 Hz, J ₂ = 1.2 Hz, H-6'); 7.258 (m, 2H, H-5', H-5); 7.382 (dd, 1H, J ₁ = 8.1 Hz, J ₂ = 1.5 Hz, H-4'); 7.449 (s, 1H, H-4); 7.504 (d, 6-H); 7.950 (s, 1H, H-7); 12.501 (s, 1H, NHCO). Espectro 10, AE: Calculado para C ₁₉ H ₁₃ Cl ₃ N ₄ O ₂ S ₂ : C, 45.66; |



| | |
|---|---|
| | H, 2.62; N, 11.21; S, 12.83. Encontrado: C, 45.66; H, 2.22; N, 11.11; S, 12.30. Espectro 11, EM: ESI <i>m/z</i> : 401 (M-100, 100%), 501 (M+3, 15%), 523 (M+Na, 15%). |
| Ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-sulfónico; CCG1_2  | Espectro 12, IR: FTIR (ATR): 3054 (C-H Ar.), 2891 (C-H Alif.), 1640, 1574, 1513, 1449 (C=C, N=C), 1244 (C-O-C); 1344, 1160 (SO ₃ -H), 914 (C-Cl). Espectro 13, RMN ¹H: (TMS, DMSO-d ₆ , 300 MHz): 4.128 (s, 3H, CH ₃ N); 6.892 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.1 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.2 Hz, H-6'); 7.337 (t, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.1 Hz, <i>J</i> ₂ = 8.1 Hz, H-5'); 7.404 (s, 1H, H-4); 7.478 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.1 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.5 Hz, H-4'); 8.392 (s, 1H, H-7). Espectro 14, EM: ESI <i>m/z</i> : 406 (M+1, 35%), 343 (M-63, 100%), 327 (M-79, 54%). |
| Ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-yl]sulfanil} acético; CCG1_4  | Espectro 15, IR: FTIR (ATR): 3075 (C-H Ar.), 2930 (C-H Alif.), 1623, 1604, 1574, 1448 (C=C, N=C-S), 3211 (COOH), 1240 (C-O-C), 913 (C-Cl), 669 (C-S-C). Espectro 16, RMN ¹H: (TMS, DMSO-d ₆ , 300 MHz): 3.685 (s, 3H, N-CH ₃); 3.840 (s, 2H, S-CH ₂); 6.599 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.2 Hz, H-6'); 7.239 (t, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 8.1 Hz, H-5'); 7.373 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8.4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.2 Hz, H-4'); 7.409 (s, 1H, H-4); 7.819 (s, 1H, H-7). Espectro 17, EM: ESI <i>m/z</i> : 463 (M+2Na, 100%). |

7.2.1 Síntesis de los precursores 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (10), 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (11) y 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (12)

Para la obtención del 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metilbenceno-1,2-diamina (9), intermediario común para la obtención de los compuestos 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (10), 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (11), se partió de los productos comerciales 2,3-



diclorofenol (**1**) y 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (**2**) (**Esquema 2**). Se efectuó una reacción de sustitución nucleofílica aromática en medio alcalino y calor, esta reacción fue posible debido al ataque nucleofílico del fenol en forma de fenolato, presente en el diclorofenol hacia el carbono uno del 1,2-dicloro-4-nitrobenceno. La acción electroattractora del cloruro y grupo nitro en posición 2 y 4 respectivamente favoreció el ataque nucleofílico al carbono en posición 1 y no en posición 2, con lo cual solo se obtuvo el producto de sustitución en dicha posición. A pesar de poseer grupos electroattractores en posición *orto* y *para* con respecto al grupo saliente, el tiempo de reacción fue prolongado, no obstante se obtuvo un compuesto de alta pureza y buen rendimiento el cual fue posible cristalizar. La determinación de punto de fusión y *R_f* de este compuesto coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

El compuesto 3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)anilina (**4**) se obtuvo mediante la reducción del grupo nitro. Esta reacción se ensayó por dos metodologías distintas; reducción química y reducción catalítica. En el caso de la reducción química se utilizó $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agente reductor y metanol como disolvente a reflujo, mientras que en la reducción catalítica se empleó Ni-Raney como catalizador, evitando el uso de Pd/C por la generación de productos de hidrogenólisis del sustrato.^{37,38} Se obtuvieron buenos rendimientos con ambas metodologías: sin embargo, la purificación del producto en la reducción química es muy laboriosa, esto debido a la gran cantidad de sales de estaño formadas por esta técnica las cuales son eliminadas tras varios lavados con agua. La amina **4** recién formada y sin tratamiento posterior se procesó rápidamente para evitar su oxidación y se sometió a una reacción de acetilación con anhídrido acético y catálisis ácida con el fin de favorecer el ataque nucleofílico por parte del grupo amino, originando al compuesto *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (**5**) con buenos rendimientos. La determinación de punto de fusión y *R_f* coincide con lo reportado en trabajos previos.^{35,36}

Una vez obtenida la acetamida **5**, se prosiguió con la síntesis del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (**6**), para esto se disolvió el



compuesto **5** en anhídrido acético a una temperatura entre 0-5°C y se goteó lentamente ácido nítrico, esto permitió formar nitrato de acetilo el cual es el agente nitrante en la reacción. Cabe señalar que es de suma importancia evitar que la temperatura de reacción exceda los 10 °C, ya que un aumento de la temperatura favorece la formación de diferentes regioisómeros y productos de polinitración que disminuyen el rendimiento. El producto obtenido de ésta reacción se cristalizó obteniendo rendimientos moderados. La determinación de punto de fusión y *Rf* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

El siguiente paso fue obtener la *N*-metilacetamida **7** a partir de la nitroacetamida **6** y sulfato de dimetilo como agente alquilante en medio básico a 40°C. Al emplear estas condiciones de reacción la adición hidróxido de potasio debe realizarse lentamente de manera que en primer lugar reaccione con el hidrógeno ácido de la acetamida (aumentando su nucleofilia) y no hidrolize la acetamida o bien reaccione con el sulfato de dimetilo. Teniendo en mente lo anterior, la reacción procedió rápidamente, obteniendo muy buenos rendimientos con alta pureza. La determinación de punto de fusión y *Rf* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

Posteriormente, se realizó la hidrólisis del grupo acetamida del compuesto **7** en medio alcalino a 40 °C, dando origen al compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (**8**). La determinación de punto de fusión y *Rf* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

Por último, el compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metilbenceno-1,2-diamina (**9**) se obtuvo mediante la reducción del grupo nitro del compuesto **8**, que al igual que en la síntesis del compuesto **3**, se llevó a cabo mediante dos metodologías distintas; reducción química y reducción catalítica. De manera análoga, en el caso de la reducción química se utilizó SnCl₂•2H₂O como agente reductor y Ni-Raney como catalizador a temperatura ambiente. Se obtuvieron buenos rendimientos con ambas metodologías. Para evitar la oxidación de la diamina **9** recién formada, ésta se procesó rápidamente para la síntesis de los intermediarios **10**, **11** y **12**.



Para la obtención del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**10**), ver **Esquema 2**, la diamina **9** se hizo reaccionar mediante una ciclocondensación con bromuro de cianógeno en metanol como disolvente y posterior tratamiento alcalino. En primera instancia el rendimiento crudo de la reacción es bastante bueno; sin embargo, el producto presenta ligeras impurezas de mayor polaridad y una coloración rojiza, por lo que al realizarse sucesivos tratamientos con carbón activado su rendimiento bajó considerablemente. En el espectro de resonancia magnética de ^1H se observaron las señales correspondientes a los hidrógenos tanto del NCH_3 a 3.517 ppm, como del NH_2 a 6.701 ppm.

La síntesis del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**11**), se realizó por ciclocondensación de la diamina **9** con xantato de etilo recién preparado a 70°C. La determinación de punto de fusión y *Rf* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

Finalmente, la síntesis del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-bencimidazol (**12**) se llevó a cabo mediante la metilación del tiol **11** con un equivalente de yoduro de metilo en medio alcalino a una temperatura controlada (0-5°C) con el fin de evitar la formación de subproductos de *N*-metilación. Se obtuvo el producto deseado con un gran rendimiento y alta pureza. La determinación de punto de fusión y *Rf* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁵

7.2.2 N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida CCG2_1

Para obtener la acetamida final *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida (**CCG2_1**), el 2-aminobencimidazol **10** previamente sintetizado, fue sometido a una reacción de acetilación con anhídrido acético en exceso y cloroformo como disolvente a temperatura ambiente. Si bien los electrones del grupo amino en posición 2 del bencimidazol están comprometidos en resonancia



en el anillo de bencimidazol, la reacción generó una mezcla de impurezas difícil de purificar. Para resolver esto, se decidió agregar anhídrido acético en proporciones estequiométricas y aumentar el tiempo de reacción; aún con este cambio en la metodología los rendimientos de esta reacción resultaron ser moderados. El estudio IR de ésta molécula denotó la aparición de las bandas correspondientes a la amida a 3337 y 1637 cm^{-1} . En el espectro de RMN ^1H se observó el singulete a 2.142 ppm que integró para 3H, lo que indicó la presencia de un metilo correspondiente al grupo acetilo, también se observó el singulete a 3.608 ppm, que integró para 3H asignado al N-CH₃; las señales aromáticas aparecieron con los acoplamientos representativos del núcleo del bencimidazol a 7.423 ppm y 7.881 ppm correspondientes al H-4 y H-7 respectivamente. El análisis elemental coincidió con el resultado esperado.

7.2.3 Síntesis del precursor 2-cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida (**3c**)

Para la obtención del precursor 2-cloro-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida (**3c**), primeramente se partió de los productos comerciales cloruro de cloroacetilo (**1c**) y 1,3-tiazol-2-amina (**2c**) (**Esquema 3**), éstos se hicieron reaccionaron mediante una sustitución nucleofílica de segundo orden. El orden de adición de los sustratos, así como la temperatura de reacción fueron puntos clave para llevar a cabo la síntesis de este compuesto, ya que primeramente se debe disolver el sustrato **2c** bajo condiciones alcalinas y posteriormente adicionar el sustrato **1c** gota a gota sin exceder los 5 °C, esto con el fin de evitar productos de disustitución. Se obtuvo el producto deseado con alta pureza y excelentes rendimientos. La determinación de punto de fusión y *R_f* coincide con lo reportado en trabajos previos.³⁶

7.2.4 2-[[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil]-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida, CCG1_1

La síntesis del compuesto 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil]-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida, (**CCG1_1**), se llevó a cabo mediante el acoplamiento de los compuestos previamente obtenidos **3c** y **11**. El producto de ésta síntesis se llevó a cabo mediante una reacción de sustitución nucleofílica de



segundo orden en medio alcalino, la cual se vio favorecida al emplear un disolvente polar aprótico como acetona. Debido a la baja solubilidad en agua del compuesto obtenido, su purificación se logró con relativa facilidad, generando así un producto de alta pureza y buenos rendimientos. La formación de la amida aromática se evidenció por las bandas a 3347 y 1678 cm^{-1} en el espectro de IR, mientras que en el espectro de RMN ^1H la señal a 4.442 ppm que integró para 2H denotó la presencia de hidrógenos correspondientes a SCH_2 , mientras que la señal a 12.501 ppm corresponde al hidrógeno del grupo amida. Además, el análisis elemental coincidió con el resultado esperado.

7.2.5 Ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-sulfónico CCG1_2

La síntesis del ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-sulfónico (**CCG1_2**) se llevó a cabo mediante la oxidación del tiol precursor **11** empleando dos equivalentes de KMnO_4 en condiciones alcalinas y calor. Las sales de MnO_2 generadas durante la reacción se separaron por filtración en caliente, mientras que el producto se recuperó acidulando las aguas de filtrado, obteniendo de esta reacción altos rendimientos y buena pureza del producto deseado. El producto de oxidación se caracterizó primeramente por IR donde se observan bandas a 1344 cm^{-1} y 1160 cm^{-1} correspondientes al SO_3H , mientras que en el espectro de RMN ^1H se observaron las señales aromáticas correspondientes al anillo de bencimidazol, siendo representativas las asignadas a los hidrógenos H-4 y H-7 a 7.404 ppm y 8.392 ppm respectivamente. Sin embargo, la presencia del hidrógeno ácido a campo bajo del espectro no se logró observar, por lo que se decidió derivatizar el ácido como éster metílico mediante una O-metilación del compuesto **CCG1_2** con el propósito de evidenciar la presencia del grupo ácido sulfónico presente en el compuesto de interés. Para ello, **CCG1_2** se trató con sulfato de dimetilo y bicarbonato de sodio como base a temperatura moderada por 24 h. El análisis espectroscópico de RMN ^1H del producto de metilación (**CCG1_2-**



Met) mostró la presencia de una nueva banda a 4.250 ppm que integró para 3H's, lo que indicó la presencia del producto de O-metilación (**Figura 15**).

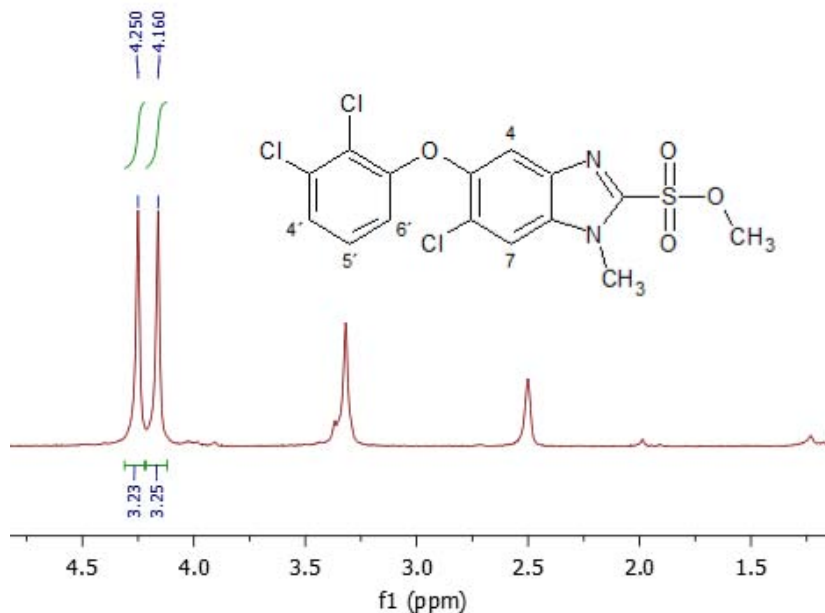
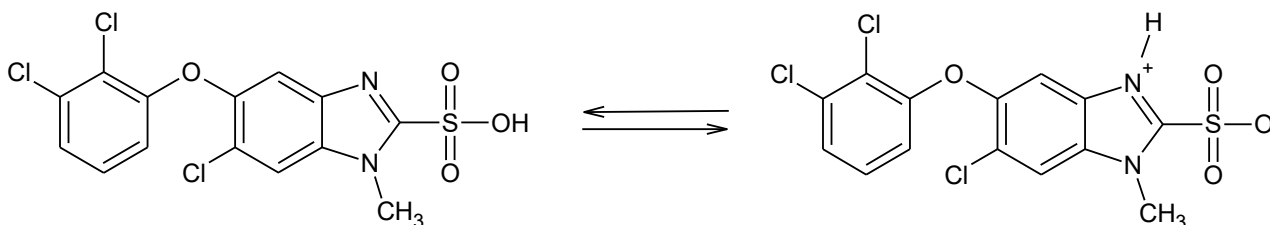


Figura 15. Señales alifáticas del producto de O-metilación (**CCG1_2-Met**).

Con este resultado se evidenció la presencia del ácido sulfónico en el compuesto **CCG1_2**. La ausencia de la señal en RMN ^1H del hidrógeno ácido de este compuesto puede atribuirse a una reacción ácido-base, (**Esquema 5**) ya que debido a la acidez de este hidrógeno el nitrógeno de la posición 3 del anillo de bencimidazol puede actuar como base, generando un equilibrio que puede impedir que en RMN ^1H no se pueda definir esta señal.



Esquema 5. Reacción ácido-base intramolecular, **CCG1_3-OH**.



7.2.6 Ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil} acético **CCG1_4**

Para la obtención del ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil}acético (**CCG1_4**), el tiol precursor **11** se hizo reaccionar por sustitución nucleofílica SN2 con ácido cloroacético bajo condiciones alcalinas a temperatura ambiente. Para obtener el compuesto de interés, al término de la reacción la mezcla se vertió en agua fría y se aciduló hasta pH 4 obteniendo un sólido, el cual se trató con carbón activado para eliminar impurezas polares y color obteniendo un producto con buena pureza y rendimientos moderados. El análisis IR mostró a 669 cm⁻¹ y 3211 cm⁻¹ las bandas de torsión y estiramiento correspondientes a los enlaces C-S-C y ácido carboxílico respectivamente; el espectro de RMN ¹H además de mostrar las señales correspondientes al bencimidazol se observó una señal a 3.840 ppm que integró para 2H correspondientes a los hidrógenos del metileno (-CH₂-) presente en la molécula. De igual manera que el compuesto **CCG1_2**, la señal a campo bajo correspondiente al hidrógeno ácido del grupo carboxilo no se logró observar, por lo que se decidió realizar la respectiva O-metilación del compuesto **CCG1_4**, empleando sulfato de dimetilo como agente alquilante con el propósito de evidenciar la presencia del grupo carboxilo. El análisis espectroscópico del compuesto metilado (**CCG1_4-Met**) mostró la presencia de una nueva señal a 3.739 ppm que integró para 3H lo que indicó la metilación del grupo carboxilo y con esto se demostró la estructura del compuesto **CCG1_4** (**Figura 16**). De manera similar, la razón por la cual no se observan las señales del hidrógeno ácido en el espectro de RMN de la molécula **CCG1_4** se debe a una reacción ácido-base intramolecular para la formación del zwitterion.

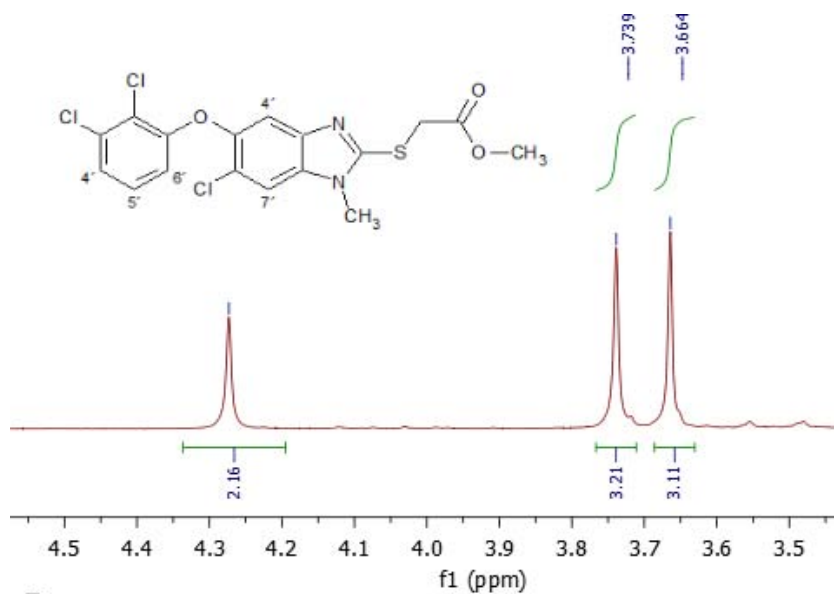
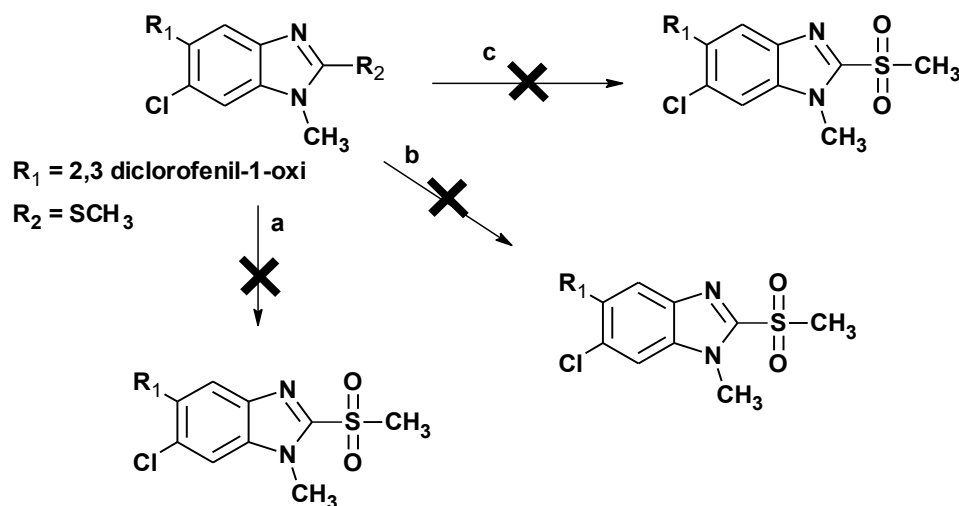


Figura 16. Señales alifáticas del producto de O-metilación (CCG1_4-Met).

7.2.7 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfonyl)-1H-benzimidazol CCG1_3

El **Esquema 6** muestra las diferentes metodologías empleadas para síntesis de la sulfona 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilsulfonyl)-1H-benzimidazol (**CCG1_3**). Primeramente el precursor metiltiolbenzimidazol **12** se trató con ácido *meta*-cloroperoxibenzóico (mCPBA) como agente oxidante en acetonitrilo; sin embargo, a pesar del tiempo prolongado de reacción y exceso de agente oxidante, no se observó la total transformación de la materia prima.



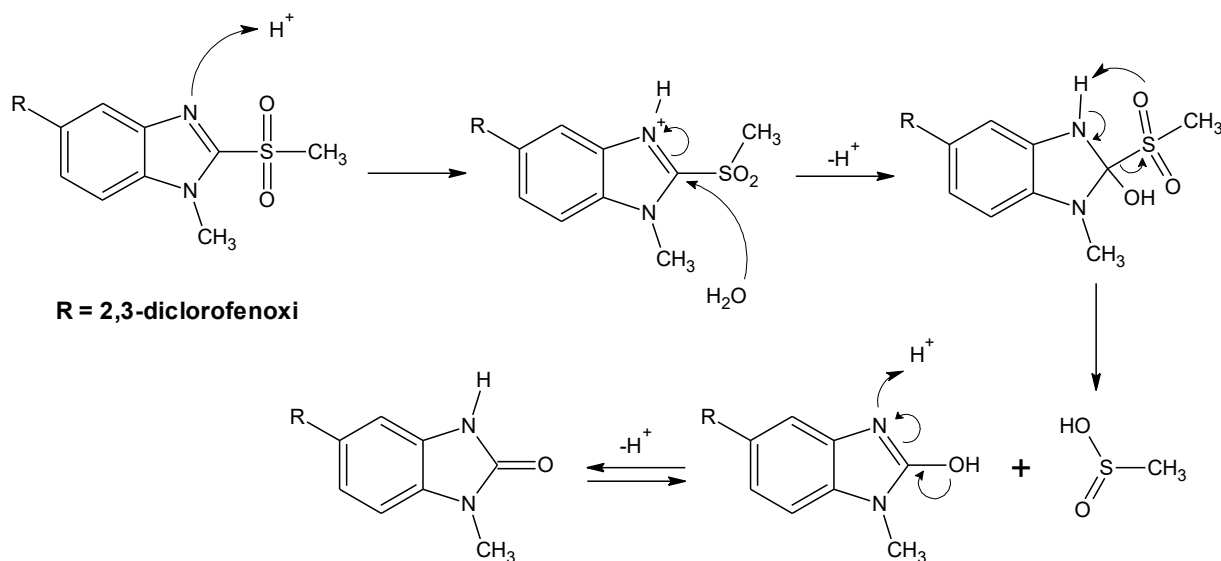
Esquema 6. Rutas de síntesis para la obtención del compuesto **CCG1_3**. Reactivos y condiciones: a) mCPBA, Acetonitrilo/Ac. Acético 1:1, 70°C; b) NaIO₄, Acetonitrilo/Ác. Acético; c) H₂O₂/Ác. Acético 1:1.

Se modificó la técnica variando el agente oxidante, utilizando NaIO₄ en una mezcla 1:1 de Acetonitrilo/Ácido acético y H₂O₂ en ácido acético, sin embargo los resultados que se obtuvieron tras el análisis por ccf fueron similares al no observarse un avance de reacción significativo.

Finalmente, se probó como agente oxidante al Na₂WO₄ en una mezcla 1:2 H₂O₂/AcOH a 50°C por 24 horas. La ccf mostró un solo producto con Rf distinto al de la materia prima. El análisis espectroscópico reveló un cambio estructural con respecto a la materia prima. En el análisis IR de este producto, se observaron las bandas características de la molécula de bencimidazol, además de la aparición de dos bandas definidas a 1706 y 1690 cm⁻¹ características de una cetona aromática C=O. En el espectro de RMN ¹H se observó una señal de tipo singulete a 3.296 ppm que integró para 3H correspondiente al metilo de la posición 1 del bencimidazol; sin embargo, no se observó la señal correspondiente al grupo sulfona del producto esperado (-SO₂-CH₃), en vez de esto, se encontró una señal a 11.2 ppm el cual integró para 1H la cual desapareció al adicionar agua deuterada, indicando la presencia de un hidrógeno ácido. La espectrometría de masas mostró el ion con masa carga 403 Da. Con estos resultados la estructura obtenida de esta reacción



corresponde al compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona, el cual posee un grupo carbonilo el cual se observó en IR, así mismo, un hidrógeno ácido que está en tautomería identificado en RMN, mientras que el peso molecular coincidió con EM y análisis elemental. La formación de este producto así como su tautomería puede explicarse de acuerdo a la propuesta de mecanismo mostrada en el **Esquema 7**, en donde el medio ácido favorece el ataque nucleofílico del agua en posición dos del benzimidazol con la subsecuente liberación de ácido metanosulfónico.



Esquema 7. Mecanismo de formación y tautomería presente en la molécula **CCG1_3-OH**.

7.3 Evaluación biológica

A la fecha de publicación de este trabajo de tesis sólo se ha determinado la actividad inhibitoria del compuesto **CCG2_1**, empleando un método colorimétrico que cuantifica la hidrólisis de *p*-nitrofenilfosfato a *p*-nitrofenol el cual se lee a 405 nm.³⁹ El estudio preliminar de actividad biológica de **CCG2_1** mostró una inhibición de 70% a 200 μ M, en comparación con la molécula **PTSB6** la cual mostró 100% de inhibición a la misma concentración. Este resultado indica que la simplificación de la estructura al remover un anillo benzimidazólico, la presencia del sustituyente polar acetamida en posición 2, así como el sustituyente metilo en posición 1 del anillo de benzimidazol mantiene la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1B. Los resultados



complementarios de evaluación del resto de la serie permitirán concluir si las modificaciones moleculares consideradas para el diseño así como los estudios de *docking* validan la hipótesis planteada.



8. CONCLUSIONES

- De acuerdo a lo planteado en la hipótesis, los resultados obtenidos por medio del acoplamiento molecular evidenció distintos sitios de unión de los compuestos diseñados a partir del *hit experimental* **PTSB6** sobre la enzima PTP1B así como los aminoácidos involucrados en este tipo de interacciones, permitiendo el diseño de una nueva serie de moléculas a sintetizar. De este estudio se concluye lo siguiente:
 - Compuestos con grupos sulfonamida y derivados de glicina en posición dos del bencimidazol presentan una mayor interacción tipo puente de hidrógeno con los residuos Asp181 y Arg221 en la zona A1 del sitio activo.
 - Sustituyentes naftilo o quinolino mejoran la unión teórica con la enzima ya que presentan interacción de tipo catión- π con el residuo Arg24 de la zona B de la PTP1B, mientras que sustituyentes en R₂ como cloro o metoxilo favorecen la interacción con los residuos Tyr20 y Arg24.
 - Ligandos derivados de 1-metilbencimidazol evitan la interacción puente de hidrógeno con la zona A2, lo que permite una mayor afinidad con la zona A1 por parte de los sustituyentes en posición 2 del anillo con el sitio catalítico de la enzima.
- Se realizó la síntesis e identificación de 4 moléculas derivadas del *hit experimental* **PTSB6**, que en el estudio de acoplamiento molecular presentaron mejor afinidad que el ligando cocrystalizado con rendimientos de moderados a buenos designadas como **CCG1_1**, **CCG1_3**, **CCG1_4** y **CCG2_1**, así como sus precursores bencimidazólicos correspondientes.
- La síntesis de las moléculas propuestas se realizó sin inconveniente alguno, con excepción de la molécula (**CCG1_3**) la cual tras aplicar distintas



estrategias de síntesis y tras no coincidir el análisis estructural con lo esperado, se dedujo la formación de un derivado carbonílico 1*H*-bencimidazol-2-(3*H*)-ona.

- Cada uno de los compuestos finales así como sus intermediarios, además de ser caracterizados mediante sus propiedades físicas más importantes como punto de fusión y *R_f*, el uso de experimentos de RMN ¹H, IR y análisis elemental permitió corroborar la estructura de cada uno de estos compuestos.
- Los resultados preliminares obtenidos de la evaluación biológica denotan que la simplificación molecular de la **PTSB6** y la adición de sustituyentes polares en posición dos del bencimidazol conservan la actividad inhibitoria sobre PTP1B.
- Las moléculas sintetizadas se plantearon como inhibidores de la enzima PTP1B. Los ensayos de inhibición enzimática se realizarán en breve usando la enzima PTP1B recombinante, y con estos resultados se validará lo diseñado y sintetizado con el objetivo de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para la DM2.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consumer reports. Treating Type 2 Diabetes: The Oral Diabetes Drugs Comparing Effectiveness, Safety, and Price, 2007.
2. Han, H., *IDF Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation, Seventh Edition, 2015.
3. Organización mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>, consultada en Enero de 2016.
4. Gershell L., Type 2 diabetes market. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4, 2005, 367-368.
5. Goldstein B., Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry* 2000 (275), 4283–4289.
6. Zhang S., PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discovery Today* 2007 (12), 373–381.
7. International diabetes federation, <http://www.idf.org/about-diabetes>, consultada en Enero de 2016.
8. Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2011 SINAVE/DGE/SALUD/.
9. Boletín de diabetes tipo 2, 2014.
10. Dolores M., Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre diabetes. Universidad de Sevilla, 2003.



11. Wajchenberg B., β -Cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocrinal Reviews* 2007 (28), 187-218.
12. Mediavilla J., Complicaciones de la diabetes mellitus, diagnóstico y tratamiento. *Semergen* 2001 (27), 132-145.
13. Simó R., Tratamiento de la diabetes mellitus: objetivos generales y manejo en la práctica clínica. *Revista Especial de Cardiología* 2002 (55), 845-860.
14. Oviedo M., Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica del IMSS* 2003 (41), 27-46.
15. Zinman B., Physical activity/exercise and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003 (26), 73-77.
16. Drugbank; drug and drug target data base. <http://www.drugbank.ca/>, consultada en Enero de 2016.
17. DeRuiter J., Overview of the antidiabetic agents. *Endocrine Pharmacotherapy Module* 2003.
18. Fernández F., Actualización en antidiabéticos orales. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 2001 (25), 33-45.
19. Mohan B., Clinical trials to clinical practice: role of sulfonylureas in today's practice 2013, *chapter 87*, 393–398.
20. Quintanilla C., El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2 *Revista Médica del IMSS* 2010 (48), 509-520.



21. Calviño G., Seminario de introducción a la problemática de la química. Universidad Nacional del Rosario, 2013.
22. Richard B. The organic chemistry of drug design and drug action. Second Edition. Elsevier, USA, 2004.
23. Trejo Soto Pedro. *Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de entamoeba histolytica*. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2011.
24. Alanine A., Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003 (2), 369-378.
25. Hopfinger A., Computer-Assisted Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 1885 (28), 1133-1139.
26. Veselovsky A. V., Strategy of computer-Aided Drug Design. *Current Drug Targets – Infectious Disorders*, 2003 (3), 33-40.
27. Medina J., Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*. 2006 (17), 452-457.
28. Schneider G., Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews*, 2005 (4), 649-663.
29. Halperin I., Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 2002 (47), 409-443.



30. Kelly R., Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. *Molecules*, 2014 (19), 17926-17942.
31. Satoh T., Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphates in skeletal muscle and adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 2014 (15), 18677-18692.
32. Bence K., Protein tyrosine phosphatase control of metabolism, Springer, University of Pennsylvania, 2013.
33. Eleftheriou A., Prediction of enzyme inhibition and mode of inhibitory action based on calculation of distances between hydrogen bond donor/acceptor groups of the molecule and docking analysis: An application on the discovery of novel effective PTP1B inhibitors. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 2015 (26) 557-576.
34. Holmes P., PTP1B inhibitors: Synthesis and evaluation of difluoromethylenephosphonate bioisosteres on a sulfonamide scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008 (18) 2719-2724.
35. Hernández Campos Alicia. *Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol*. Tesis Doctorado, Facultad de Química, UNAM, 2014.
36. Velazquez López José. *Síntesis y actividad tripanocida de nuevos derivados del bencimidazol*. Tesis Doctorado, Facultad de Química, UNAM, 2016.



37. López Balbiaux Nayeli. *Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazólicos 1-metilados*. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2003.
38. Albers P., Poisoning and deactivation of palladium catalysts. *Journal of Molecular Catalysis* 2001 (173), 275-286.
39. Saifudin A., The potent inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B from the fruits of *Melaleuca leucadendron*. *Pharmacognosy Research* 2016 (8), 38-41.



10. APÉNDICE

10.1 PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

Las materias primas se pesaron en una balanza analítica Sartorius A210P y en una balanza granataria Scientech SL600.

El avance de cada reacción química fue monitoreado por cromatografía en capa fina (ccf) en placas de vidrio con gel sílice G-25 UV (Macherey-Nagel). La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con lámpara de luz ultravioleta a longitud de onda corta y larga (254 y 365 nm respectivamente), y por exposición a vapores de yodo.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron mediante capilar en un aparato marca Büchi modelo B-450.

La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador IKA modelo RV 10 con un baño de calentamiento IKA modelo HB10 acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand modelo 4C y un condensador conectado a un enfriador Brinkmann modelo IC-30.

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

Los equipos utilizados en las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarrojo (IR) y análisis elemental (AE) pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. La determinación de espectroscopía de masas (EM) se realizó en el laboratorio 113 del departamento de Biofarmacia a cargo de la Dra. Inés Fuentes Noriega.

La determinación de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se realizaron en un equipo Oxford de 300 MHz empleando tetrametilsilano como referencia interna. Se



emplearon disolventes deuterados como dimetilsulfóxido (DMSO- d_6), cloroformo ($CDCl_3$) y agua deuterada (D_2O) para el intercambio de hidrógenos ácidos; los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Los EM se determinaron en un equipo Agilent 1100 Series LC/MSD Trap utilizando la técnica de electrospray (ESI). El análisis elemental se determinó en un aparato FISON S EA11108 CHNSO. Los compuestos conocidos se identificaron por sus constantes físicas y no se caracterizaron espectroscópicamente.

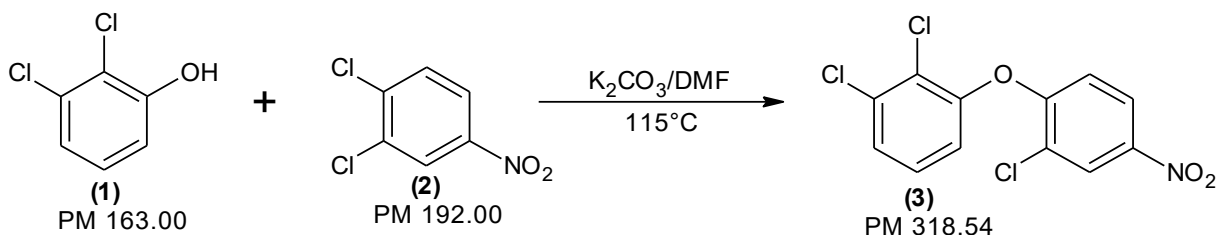
Tabla 8. Sistemas de elución utilizados para ccf

| Sistema | Componentes | Proporción |
|---------|-------------------------|------------|
| I | Hexano/ $CHCl_3$ /AcOEt | 50:35:15 |
| II | Hexano/AcOEt | 60:40 |
| III | Hexano/AcOEt | 50:50 |
| IV | AcOEt/Acetona | 98:2 |
| VI | $CHCl_3$ /MeOH | 99:1 |
| VII | $CHCl_3$ /MeOH | 98:2 |
| VIII | $CHCl_3$ /MeOH | 95:5 |
| IX | $CHCl_3$ /MeOH | 90:10 |
| X | $CHCl_3$ /MeOH | 80:20 |

** una gota de ácido acético, *una gota de hidróxido de amonio

Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

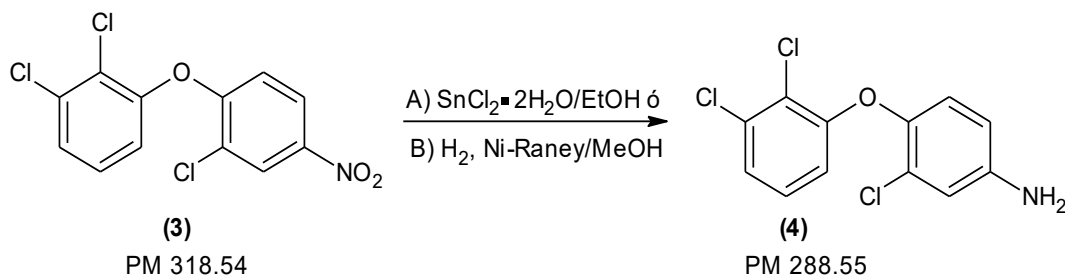
2-Cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (3)





el cual se separó por filtración a vacío y lavó con agua fría. Se obtuvieron 1.68 g (95 %) de un sólido beige que en ccf mostró una sola mancha. Una muestra de 0.15 g se recristalizó de tolueno dando 0.096 g (64%) de cristales blancos con punto de fusión de 168.2-169.4 °C y *Rf* de 0.43 (sistema VIII).

3-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)anilina (**4**)



Método A. Reducción química

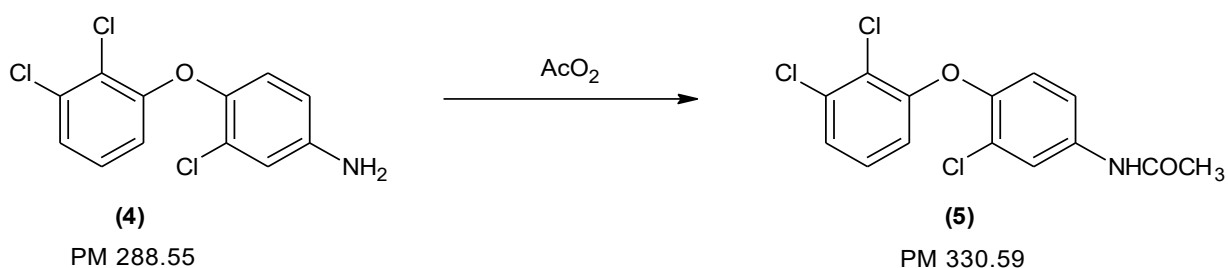
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 250 mL adaptado con agitador magnético, termómetro, refrigerante en posición de reflujo y atmósfera de N_2 , se disolvieron 10.6 g (0.033 mol) de 2-Cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (**3**) en 150 mL de EtOH, la mezcla se reacción se calentó a 70°C con lo que se observó una disolución por completo de la materia prima, posteriormente se agregaron 45.34 g (0.201 mol, 6 eq.) de cloruro de estaño dihidratado, la mezcla se dejó en calentamiento a reflujo por 4 horas. La ccf mostró el consumo total de la materia prima **3**, por lo que la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se llevó a pH 9 con Na_2CO_3 formando un sólido el cual fue filtrado a vacío, el sólido obtenido se dividió en tres fracciones, disolviendo cada una en 50 mL de AcOEt, cada fracción fue lavada con una solución saturada de NaCl, finalmente cada fracción fue recolectada y concentrada a sequedad en rotaevaporador. Se obtuvo un sólido de aspecto resinoso, que al analizarlo por ccf, mostró una sola mancha con *Rf* de 0.33 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción



Método B. Reducción catalítica

En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 16.6 g (0.052 mol) de 2-cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (**3**), 5 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH (15 mL x 3), en 150 mL de MeOH. La botella se adaptó al aparato de hidrogenación, el sistema se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂ c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo de 4 horas consumiendo un total de 240 lb/in² de H₂. Posteriormente, la suspensión se filtró en un büchner con celita para separar el catalizador mientras que el filtrado se concentró en un rotaevaporador. Se obtuvo un sólido de aspecto resinoso, que al analizarlo por ccf, se observó una sola mancha con *Rf* de 0.43 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

N-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (**5**)

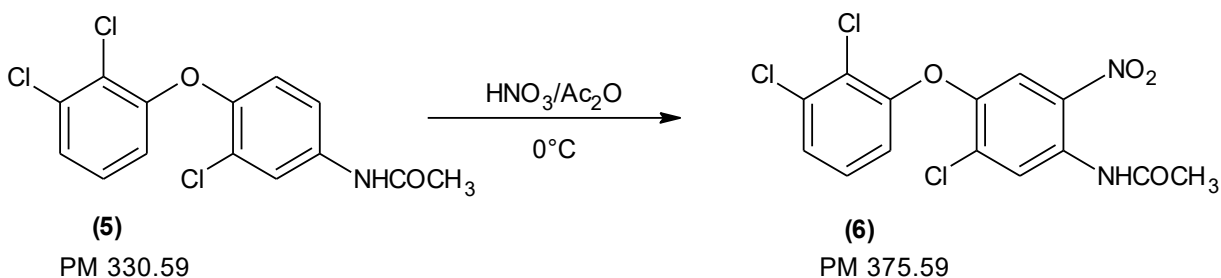


En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 250mL adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, termómetro y atmósfera de nitrógeno se adicionó la 3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)anilina (**4**) y 10 mL de anhídrido acético gota a gota evitando que la temperatura excediera los 50°C, terminada la adición el sistema se dejó en agitación por 30 minutos, pasado este tiempo la ccf indicó el consumo total de la materia prima **4**. La mezcla de reacción se vertió en agua fría y se dejó en agitación vigorosa por 30 min más, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire. Se obtuvieron 16.2 g (84%) de un sólido beige, el sólido obtenido se recrystalizó de tolueno más 10% de carbón activado dando 9.69 g



de cristales blancos (59%), con *Rf* de 0.3 (sistema VII) y punto de fusión 131.4-132.9 °C.

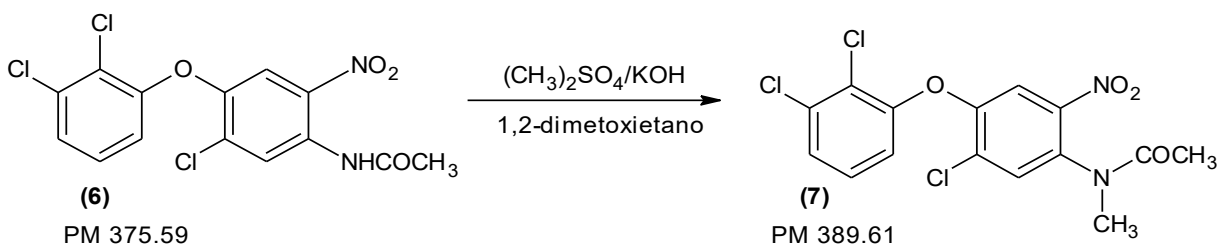
***N*-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (6)**



En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250 mL adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, termómetro, se disolvieron 15.7 g (0.047 mol) de *N*-[3-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (5) en 157.8 mL (1.66 mol, 35.3 eq.) de anhídrido acético. A la solución fría entre 0-5°C (en un baño de hielo con sal) se adicionó, lentamente y sin que la temperatura excediera los 5°C, 26.3 mL HNO₃ (0.63 mol, 13.4 eq.). Terminada la adición (60 minutos) la reacción se dejó en agitación a 5°C por 2 horas más. La ccf mostró materia prima por lo que se agregó 1.9 mL (0.047 mol, 1 eq.) de ácido nítrico y anhídrido acético suficiente para solubilizar el sólido formado, se dejó reaccionar por 16 horas más a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la ligera formación de un subproducto de mayor polaridad, por lo que la mezcla de reacción se vertió en hielo, se agitó vigorosamente hasta la aparición de un precipitado amarillo, el cual se separó por filtración a vacío, se lavó repetidas veces con agua fría y se secó al aire obteniéndose 14.5 g (80%) de un sólido amarillo opaco. Para purificar el producto, éste se suspendió en MeOH a temperatura ambiente por 30 minutos, pasado este tiempo el producto se filtró al vacío obteniéndose 13.4 g (92%) de un sólido amarillo claro, que se analizó por ccf, observándose una sola mancha con *Rf* de 0.51 (sistema I). Una muestra de 0.15 g se recristalizó de metanol dando 0.14 g (92%) de cristales color beige con punto de fusión 168.3-169.7 °C.

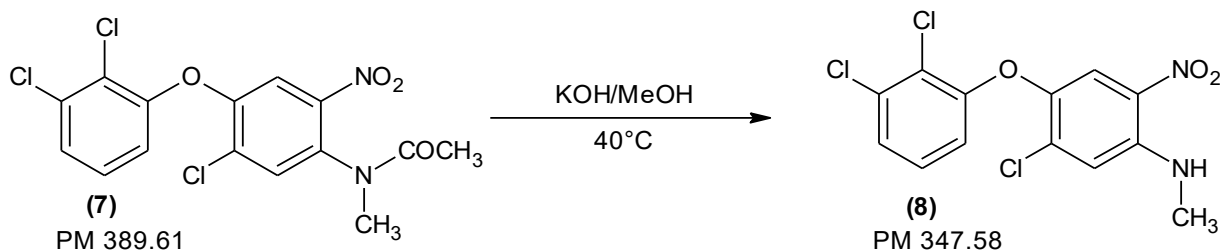


***N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (7)**



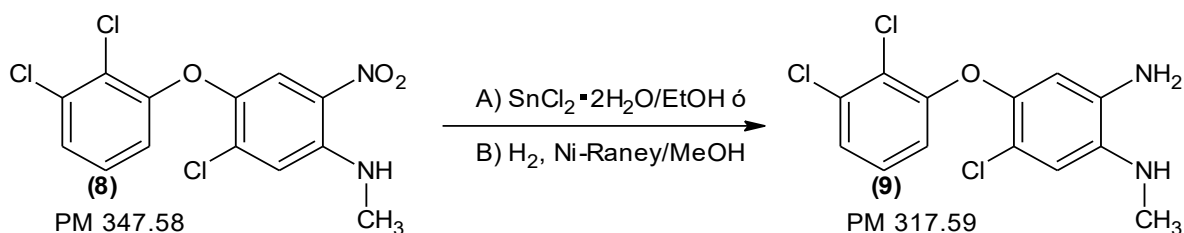
En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250 mL adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, termómetro y atmósfera de N_2 , se disolvieron 13.4 g (0.035 mol) de *N*-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (**6**) en 100 mL de 1,2-dimetoxietano. La solución generada se calentó a 40°C y posteriormente se trató con 1.43 g (0.035 mol, 1 eq.) de KOH previamente disuelto en la mínima cantidad de agua, a esta temperatura se adicionaron gota a gota 6.6 mL (0.07 mol, 2 eq.) de $(CH_3)_2SO_4$ y se dejó reaccionar por 90 min. La ccf mostró materia prima por lo que se agregó 0.7g (0.017 mol, 0.5 eq) de KOH disueltos en la mínima cantidad de agua y gota a gota, 6.6 mL (0.07 mol, 2 eq.) de $(CH_3)_2SO_4$; la reacción se mantuvo bajo las mismas condiciones 30 minutos más, transcurrido este tiempo la ccf mostró ausencia de materia prima. Enseguida, se eliminó el disolvente en el rotaevaporador, el residuo se vertió en hielo y el producto obtenido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire. Se obtuvieron 12.0 g (96 %) de un sólido ligeramente amarillo, una muestra de 0.15 g se recristalizó de acetato de etilo dando 0.10 g (72 %) de cristales de amarillos con punto de fusión 131.7-132.8 °C y *Rf* 0.61 (sistema VI).

5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-2-nitroanilina (8)



En un matraz bola de dos bocas esmeriladas 24/40 de 250mL adaptado con columna Vigreux, agitador magnético y termómetro se suspendieron 12.0 g (0.030 mol) de *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (**8**) en 100 mL de MeOH. Posteriormente, la solución se trató con 3.9 g (0.06 mol, 2 eq.) de KOH previamente disueltos en la mínima cantidad de agua. La solución generada se calentó a 40°C y se dejó reaccionar por 2 horas. La ccf mostró materia prima, por lo que la mezcla de reacción se dejó reaccionar 18 horas más a temperatura ambiente. Pasado este tiempo el MeOH se retiró con rotaevaporador, el residuo se vertió en agua fría, se dejó en agitación por 10 minutos precipitando un sólido el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua fría. Se obtuvieron 11.0 g (99 %) de un sólido anaranjado, una muestra de 0.15 g se cristalizó de metanol dando 0.10 g (66 %) de cristales de rojos con punto de fusión 141.5-143.9 °C y *Rf* 0.68 (sistema VI).

5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-1,2-fenilendiamina (**9**)



Método A. Reducción química

En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 250 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, refrigerante en posición de reflujo y atmósfera de N₂, se disolvieron 3 g (0.008 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-2-nitroanilina (**8**) en 100 mL de EtOH, posteriormente se agregaron a la mezcla de reacción 12.17 g

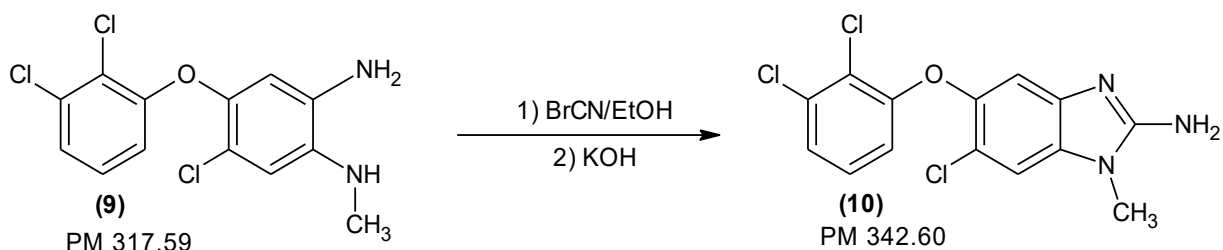


(0.053 mol, 6.6 eq.) de cloruro de estaño dihidratado, la mezcla se dejó en calentamiento a reflujo por 4 horas. La ccf mostró el consumo total de la materia prima **8**, por lo que la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó solución saturada de Na₂CO₃ hasta pH=9 formandose un sólido el cual fue filtrado a vacío. El sólido obtenido se disolvió en 50 mL de AcOEt y fue lavado múltiples ocasiones con una solución saturada de NaCl, finalmente el disolvente fue eliminado en rotaevaporador. Se obtuvo un sólido de aspecto resinoso que al analizarlo por ccf se observó una sola mancha con *R_f* de 0.30 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

Método B. Reducción catalítica

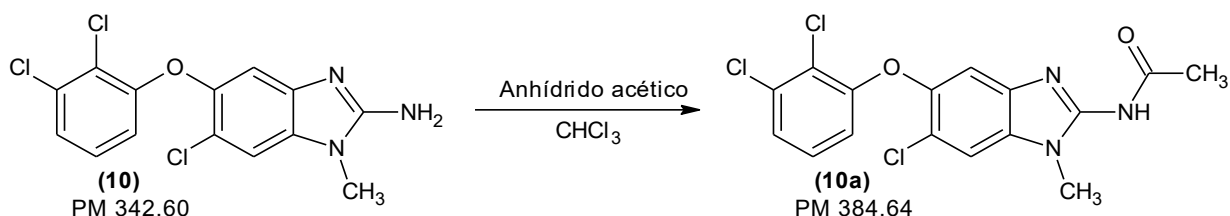
En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 6 g (0.052 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (**8**) y 1.8 g de catalizador Ni-Raney, previamente lavado con agua y MeOH (15 mL x 3), en 100 mL de mezcla MeOH/AcOEt (1:1 v/v). La botella se adaptó al aparato de hidrogenación, el sistema se purgó con tres cargas de H₂ de 30 lb/in² c/u y se inició la agitación. La reacción se llevó a cabo a 40 °C por un tiempo de 90 minutos, consumiendo un total de 160 lb/in² de H₂. Posteriormente, la suspensión se filtró en un büchner con celita para separar el catalizador mientras que el filtrado se concentró por medio de rotaevaporador. Se obtuvo un líquido de aspecto resinoso, que al analizarlo por ccf se observó una sola mancha con *R_f* de 0.30 (sistema I). El producto obtenido se utilizó sin tratamiento posterior para la siguiente reacción.

6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (10)



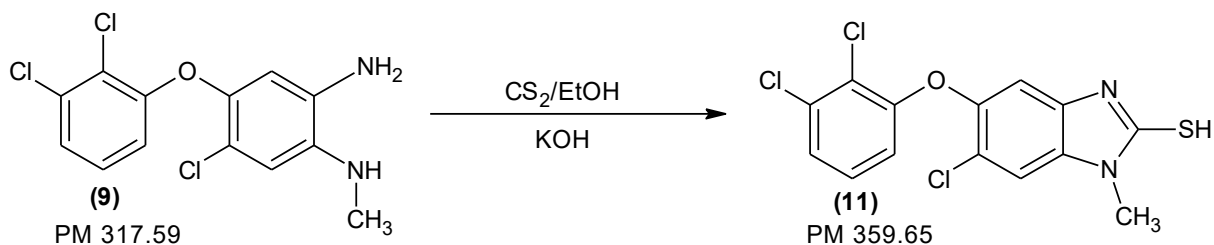
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 100 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, y termómetro se disolvieron 1.0 g (0.003 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-1,2-fenilendiamina (**9**) en 50 mL de MeOH; a la solución se agregaron a temperatura ambiente 0.33 g (0.003 mol, 1 eq.) de BrCN y se dejó reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente. La ccf mostró materia prima por lo que se aumentó la temperatura a 50 °C y se dejó reaccionar por 90 minutos más, transcurrido este tiempo se adicionó 0.15 g (15%) de carbón activado, la mezcla se calentó a reflujo por 30 minutos, después se separó el carbón activado por filtración a través de celita y se realizaron lavados con MeOH caliente. El filtrado se llevó a pH 9 con una solución de NaOH al 20%. El producto se trató dos veces más con carbón activado, obteniendo 1.0 g (97%) de un sólido rosado que mostró ser una mancha en ccf con *R_f* de 0.43 (sistema X) y con punto de fusión 244.4-246.0 °C.

***N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida CCG2_1
(10a)**



En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 100 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético y termómetro se suspendieron 0.46 g (0.001 mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**10**) en 50 mL de CHCl₃, posteriormente se añadieron gota a gota 0.13 mL (0.001 mol, 1 eq.) de anhídrido acético a temperatura ambiente y se dejó reaccionar por 24 horas. Pasado este tiempo la ccf indicó consumo total de la materia prima **10**, por lo que aproximadamente el 80% del disolvente fue retirado con rotaevaporador, el sólido formado fue filtrado a vacío y lavado repetidamente con AcOEt frío y secado al aire, obteniendo 0.163 g (42%) de un sólido blanco, una muestra de 0.60 g se recrystalizó de etanol dando 0.50 g (84%) de cristales blancos que mostraron una mancha en ccf con *R_f* de 0.57 (sistema IV) y un punto de fusión 237.5-238.9 °C.

6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**11**)

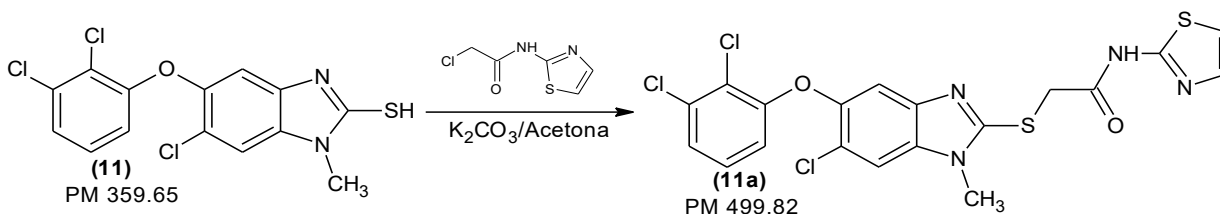


En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y atmósfera de N₂, se disolvieron 6.0 g (0.018 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-1,2-fenilendiamina (**9**) en 50 mL de EtOH, a la solución se le adicionaron 1.3 g (0.27 mol, 1.5 eq.) de KOH y 1.7 mL (0.27 mol, 1. eq.) de CS₂ previamente disueltos en la mínima cantidad de agua. La mezcla de reacción se calentó a 70°C por 20 horas, pasado este tiempo, la mezcla de reacción mostró ausencia de materia prima por lo



que se vertió en hielo y se llevó a pH 4 con una solución de HCl 1M, el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y se secó al aire obteniendo 5.7 g (88%) de un sólido ligeramente rosado. Una muestra de 2.5 g se disolvió en 50 mL de MeOH, se agregaron 0.50 g (0.007 mol, 1.1 eq.) de KOH y 0.37 g (15%) de carbón activado, la mezcla se calentó a reflujo por 48 horas, luego se filtró en caliente, se ajustó a pH 4 con una solución de HCl 1M, y el sólido se filtró a vacío y se secó al aire obteniendo 1.5 g (60%) de un sólido color beige, una muestra de 0.15 g se recristalizó de etanol/DMF dando 0.11 g (75%) de cristales café claro que mostraron ser una mancha en ccf con R_f de 0.45 (sistema VII) y punto de fusión 296.6-299.7 °C.

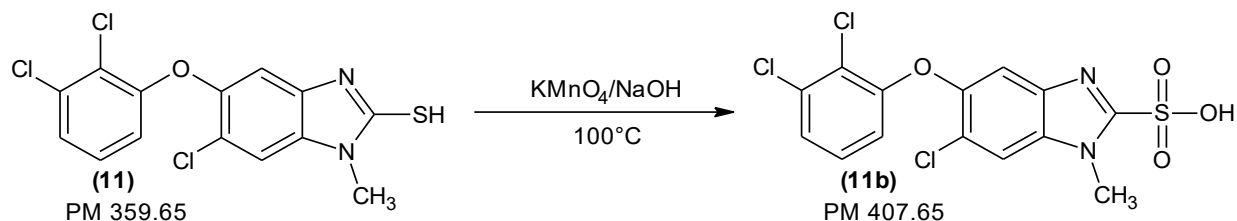
2-[[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-il]sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-il)acetamida, CCG1_1 (11a)



En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, y termómetro se suspendieron 0.6 g de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-tiol (**11**) y 0.32 g (0.001 mol, 1 eq.) de K_2CO_3 en 25 mL de acetona. La reacción se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 20 horas, al cabo de este tiempo la ccf indicó la ausencia de materia prima por lo que la mezcla de reacción se vertió en hielo, el sólido formado se separó por filtración a vacío y se secó al aire. Posteriormente, bajo agitación vigorosa (en un baño de hielo) el filtrado se suspendió en 50 mL de MeOH por 1 hora, se filtró al vacío, se lavó repetidamente con el mismo disolvente y se secó al aire obteniéndose 0.76 g (82%) de un sólido blanco, que se analizó por ccf, observándose una sola mancha con R_f de 0.28 (sistema VI) y tuvo un punto de fusión 214.0-215.4 °C.



Ácido **6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-sulfónico**
CCG1_2 (11b)



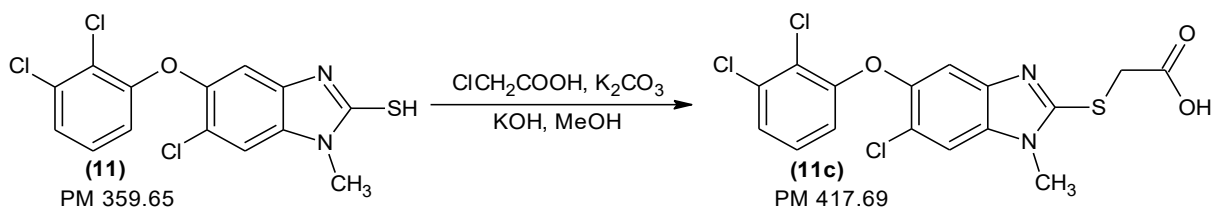
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y atmósfera de N_2 se suspendieron 1.36 g (0.03 mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-tiol (**11**) en 20 mL de MeOH, luego se adicionó 1.15 g (0.003 mol, 1 eq) de NaOH, y 1.2 g (0.006 mol, 2 eq.) de KMnO_4 previamente disueltos en la mínima cantidad de agua. La reacción se dejó a reflujo por 6 horas. La ccf mostró el consumo total del tiol **11** por lo que la mezcla se filtró en caliente, después el pH se ajustó a 1 con una solución de HCl 1M precipitando un sólido el cual se filtró a vacío y se deja secar al aire. Posteriormente, bajo agitación vigorosa (en un baño de hielo) el filtrado fue suspendido en 50 mL de CHCl_3 por 1 hora, luego se filtró al vacío, se lavó repetidamente con el mismo disolvente y se secó al aire obteniendo 0.9 g (73%) de un sólido blanquecino. Una muestra analítica de 0.11 g se recrystalizó de isopropanol-MeOH obteniendo 0.08 g (73%) de cristales blancos con un punto de fusión de $294.2\text{-}296.3^\circ\text{C}$ y R_f de 0.43 (sistema VI**).

6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-sulfonato de metilo
CCG1_2-Met



En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético y termómetro se suspendieron 0.08 g (2×10^{-4} mol) del ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-sulfónico (**CCG1_2**) y 0.02 g (2×10^{-4} mol, 1.5 eq.) de NaHCO_3 en 15 mL de 1,2-dimetoxietano, posteriormente se añadieron gota a gota 0.020 mL (2×10^{-4} mol, 1.1 eq.) de sulfato de dimetilo, previamente diluídos en 5 mL de 1,2-dimetoxietano, la mezcla se dejó reaccionar a 50°C por 16 horas. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la formación de un producto mayoritario, por lo que se eliminó el disolvente en rotaevaporador y el residuo se vertió en agua fría. El sólido formado se separó por filtración a vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire, obteniendo 0.040 g (48%) de un sólido amarillo claro que en ccf mostró una sola mancha con *Rf* de 0.70 (sistema X**).

Ácido **{[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-yl]sulfanil}acético CCG1_4 (11c)**



En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, y termómetro se suspendieron 1.0 g (0.002 mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**11**), 0.2 g (0.005 mol, 1.2 eq) de NaOH , previamente disuelta en la mínima cantidad de agua, y 0.45 g (0.002 mol, 1.eq) de K_2CO_3 en 20 mL de MeOH; posteriormente se añadieron 0.42 g (0.004



mol, 1.6 eq.) de ácido cloroacético y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 16 horas. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la formación de un producto mayoritario, por lo que se eliminó el disolvente en rotaevaporador; después el residuo se vertió en agua fría y se aciduló con HCl 1M hasta pH 4. El sólido formado se separó por filtración a vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire, obteniendo 1.13 g (97%) de un sólido rosado que en ccf mostró una sola mancha. El filtrado obtenido se disolvió en MeOH y se trató con 0.02 g (15%) de carbón activado, la mezcla se calentó a reflujo por 48 horas, luego se filtró en caliente y se dejó enfriar para favorecer la cristalización, obteniendo 0.77 g (68%) de un sólido blanco que mostró ser una mancha en ccf con R_f de 0.51 (sistema IX*) y con punto de fusión 220.0-222.2 °C.

{[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-il]sulfanil}acetato de metilo CCG1_4-Met

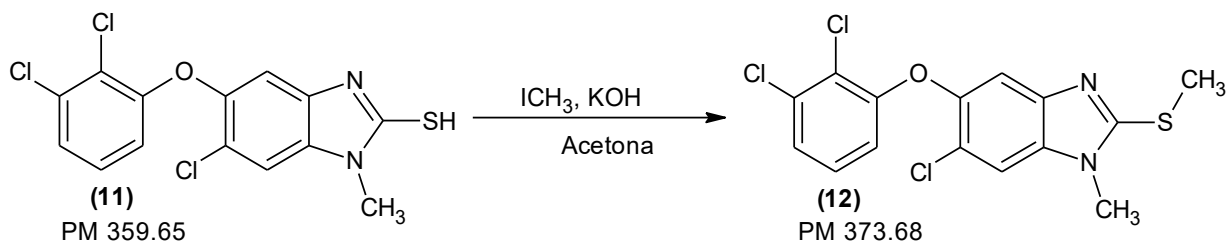


En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, y termómetro se suspendieron 0.08 g (2×10^{-4} mol) de ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-il]sulfanil}acético (**CCG1_4**) y 0.024 g (2×10^{-4} mol, 1.5 eq.) de NaHCO₃ en 15 mL de 1,2-dimetoxietano; posteriormente se añadieron gota a gota 0.019 mL (2×10^{-4} mol, 1.1 eq.) de sulfato de dimetilo, previamente diluidos en 5 mL de 1,2-dimetoxietano, la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 2 horas. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la formación de un producto mayoritario, por lo que se eliminó el disolvente en rotaevaporador y el residuo se vertió en agua fría. El sólido formado se separó por filtración a vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire, obteniendo 0.056 g (68%) de un



sólido con una tonalidad verdosa que en ccf mostró una sola mancha con R_f de 0.73 (sistema X**).

6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (12)

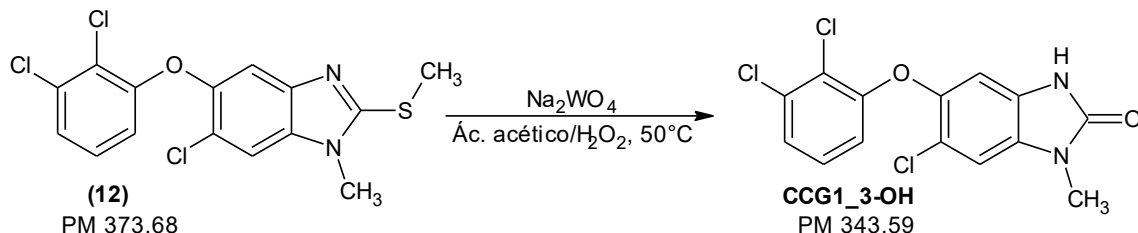


En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético, y termómetro se suspendieron 1.9 g (0.005 mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-bencimidazol-2-tiol (**11**) en 25 mL de acetona, a la suspensión se le adicionó 0.38 g (0.005 mol, 1.1 eq) de KOH previamente disueltos en la mínima cantidad de agua. A la mezcla de reacción fría entre 0-5°C (en un baño de hielo con sal) se adicionó lentamente y sin que la temperatura excediera los 5°C, 0.32 mL (0.005 mol, 1 eq) de ICH₃. Terminada la adición (30 min) la reacción se dejó en agitación a 5°C por 30 minutos más. La ccf indicó la ausencia de materia prima, por lo que la reacción se vertió en agua fría y el sólido formado se filtró a vacío, se lavó con agua y se secó al aire. Se obtuvieron 1.9 g (99%) de un sólido color amarillo-opaco, una muestra de 0.15 g se cristalizó de etanol/agua dando 0.14 g (91%) cristales anaranjados que mostraron una sola mancha en ccf con R_f de 0.62 (sistema VI*) y con punto de fusión 184.0-184.7 °C.



6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-ona

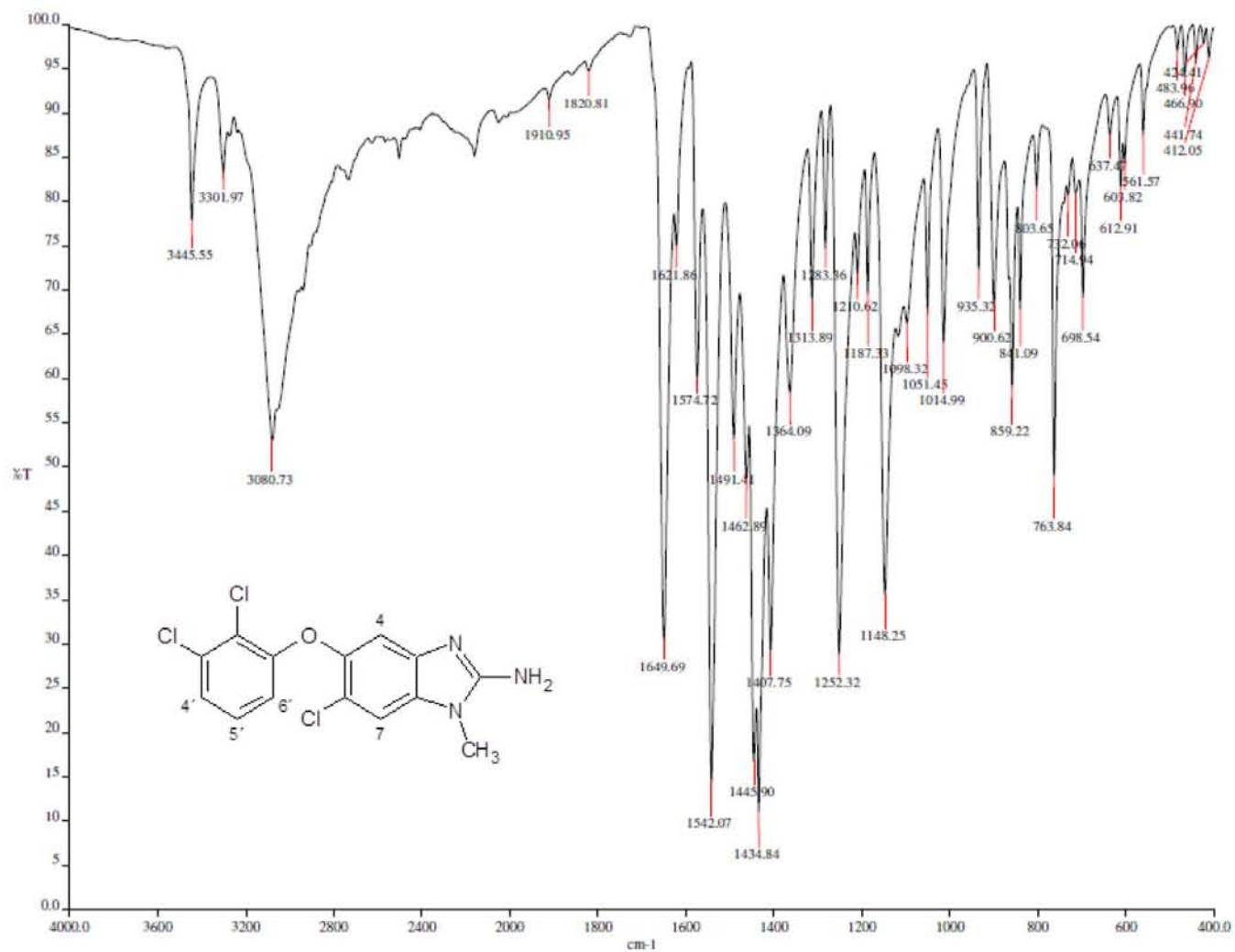
CCG1_3-OH



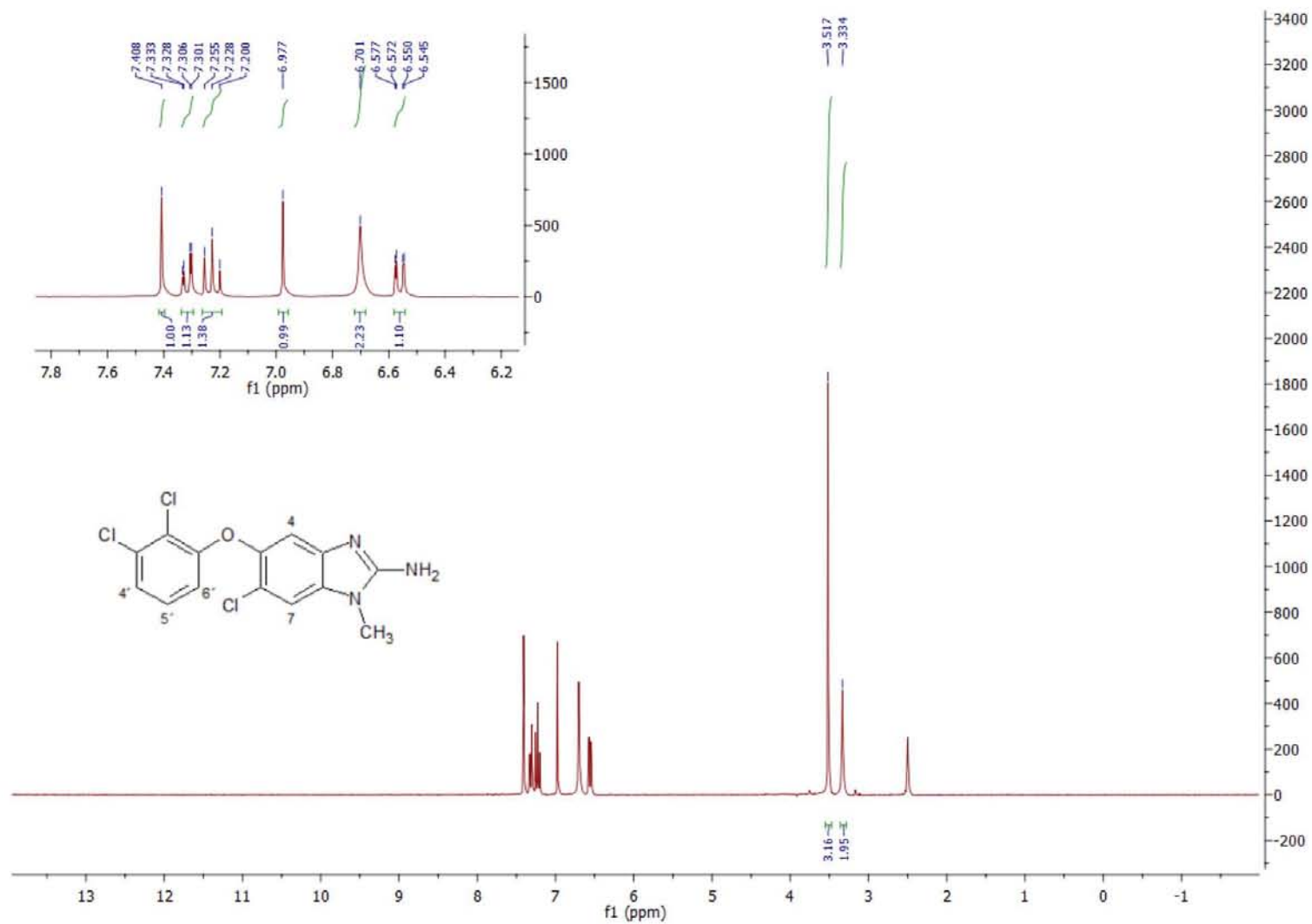
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado con columna Vigreux, agitador magnético y termómetro se suspendieron 1.5 g (4.0×10^{-4} mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-bencimidazol-2-tiol (**12**) en 5 mL de ácido acético y se dejó en agitación por 10 minutos, posteriormente se añadieron gota a gota 0.013 g (10%) de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, previamente disueltos en 3 mL de H_2O_2 , la mezcla se dejó reaccionar a 50°C por 24 horas. Pasado este tiempo, la ccf mostró el consumo total de la materia prima y la formación de un producto mayoritario, el residuo obtenido se vertió en agua fría y llevó a pH 6 con NaHCO_3 , se dejó en agitación por 10 minutos, precipitando un sólido el cual se separó por filtración al vacío el cual finalmente se lavó con agua fría. Se obtuvieron 0.106 g (77%) de un sólido blanco con punto de fusión de $253.8\text{-}256.4^\circ\text{C}$ y $R_f 0.66$ (sistema IX**).



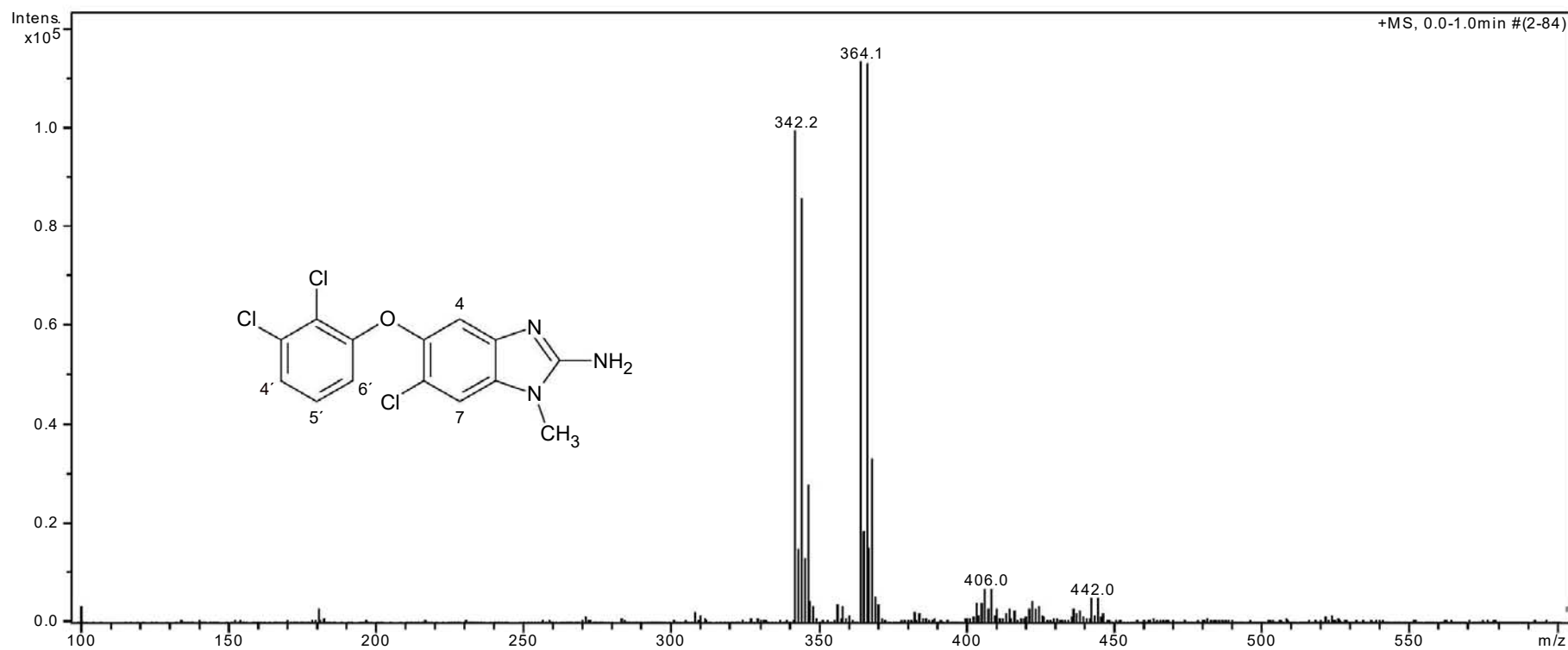
10.2 ESPECTROS



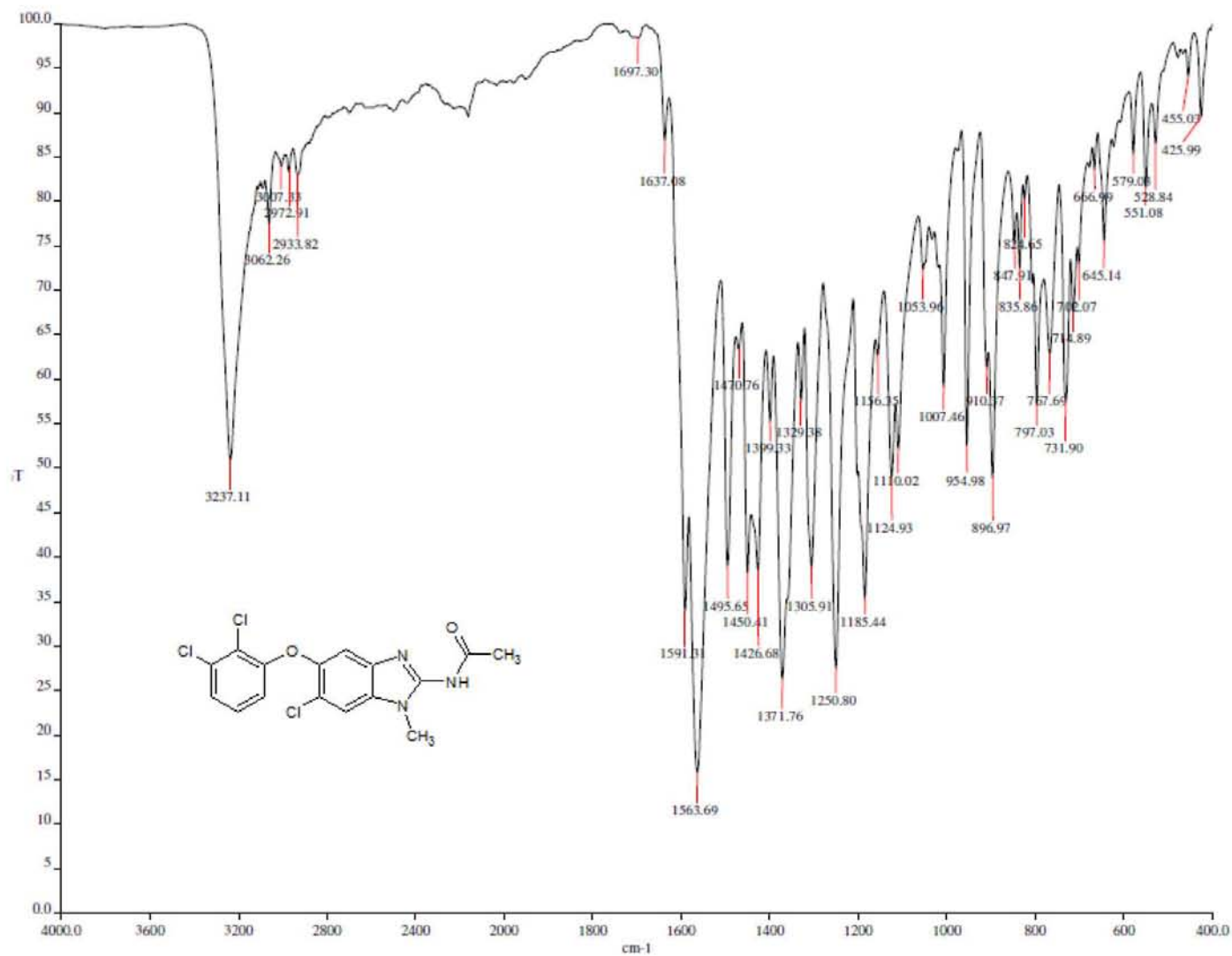
Espectro 1. IR FTIR (ATR) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-benzimidazol-2-amina.



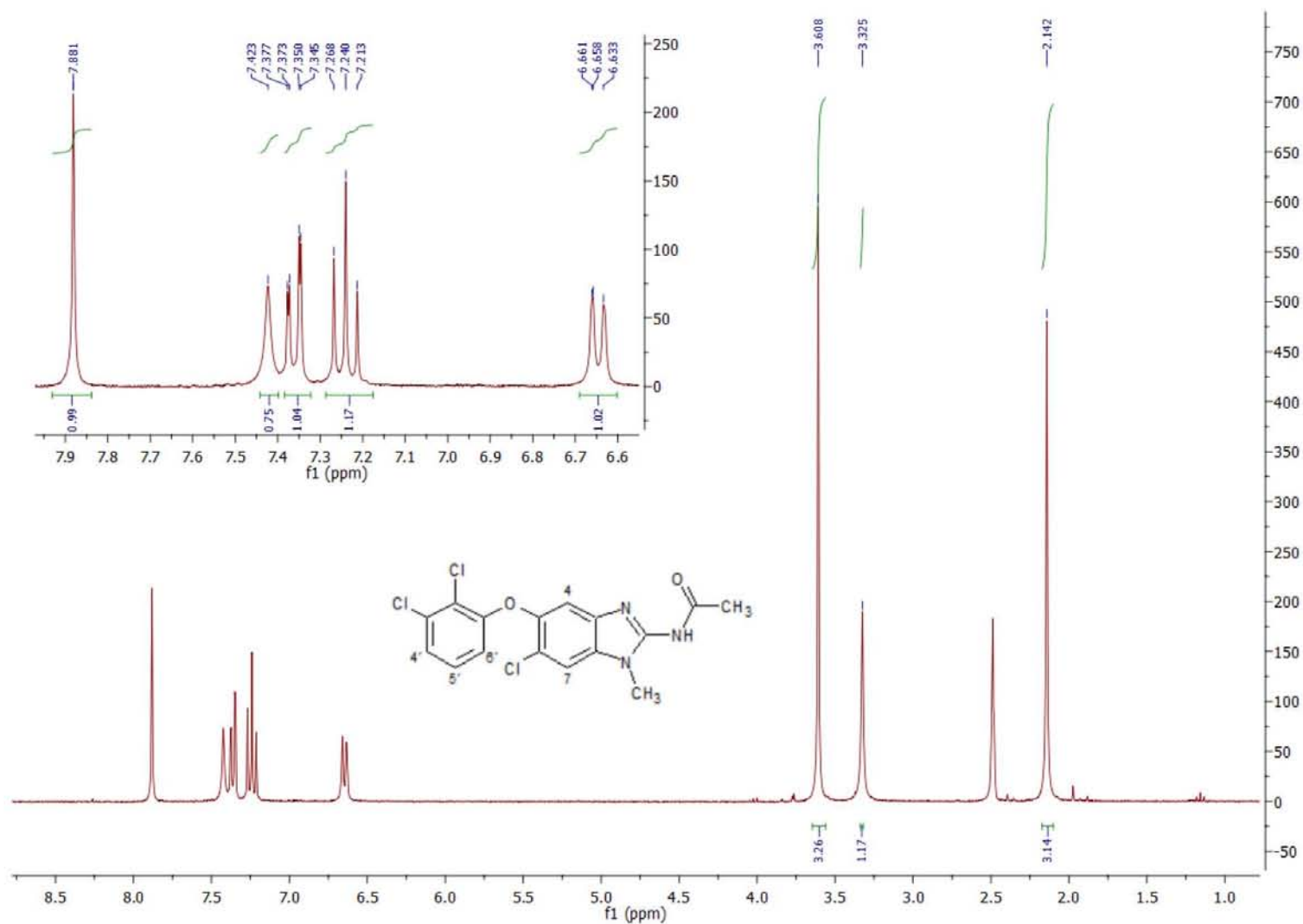
Espectro 2. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6 , 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-benzimidazol-2-amina.



Espectro 3. EM: (ESI, m/z) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-amina.



Espectro 4. IR FTIR (ATR) del compuesto *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida.



Espectro 5. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6 , 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-il]acetamida.

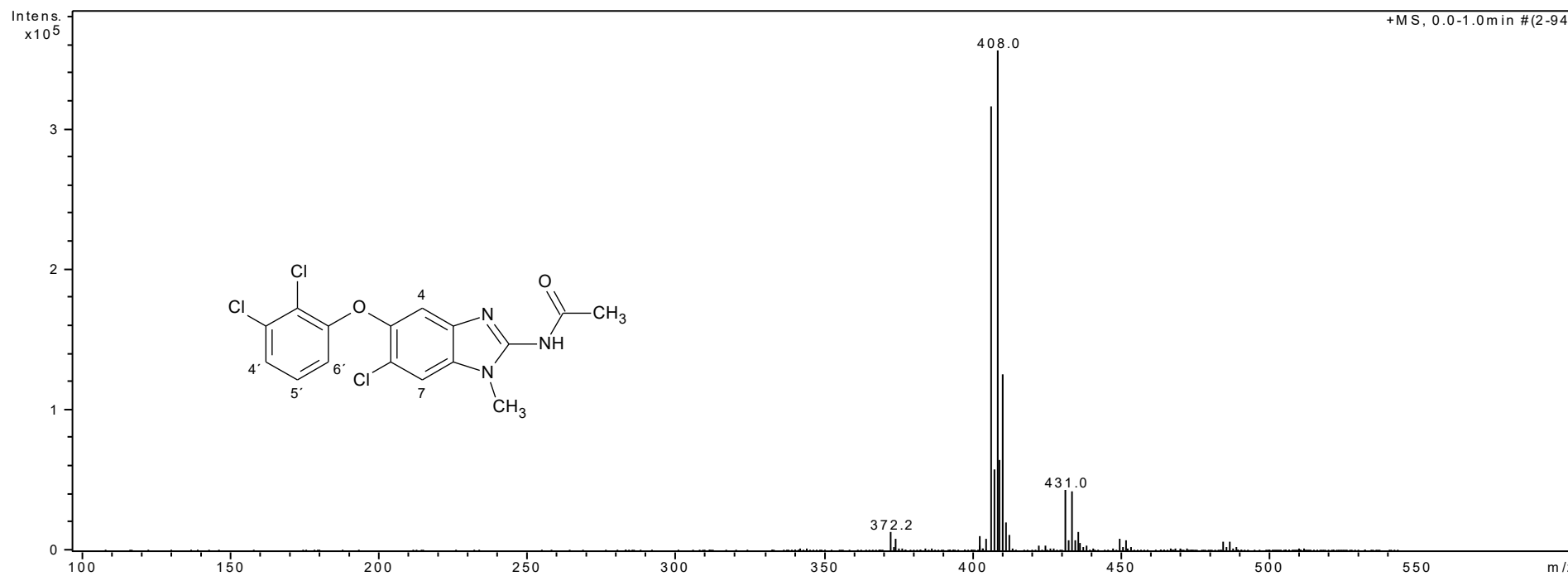


UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA
INDUSTRIA (USAI)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

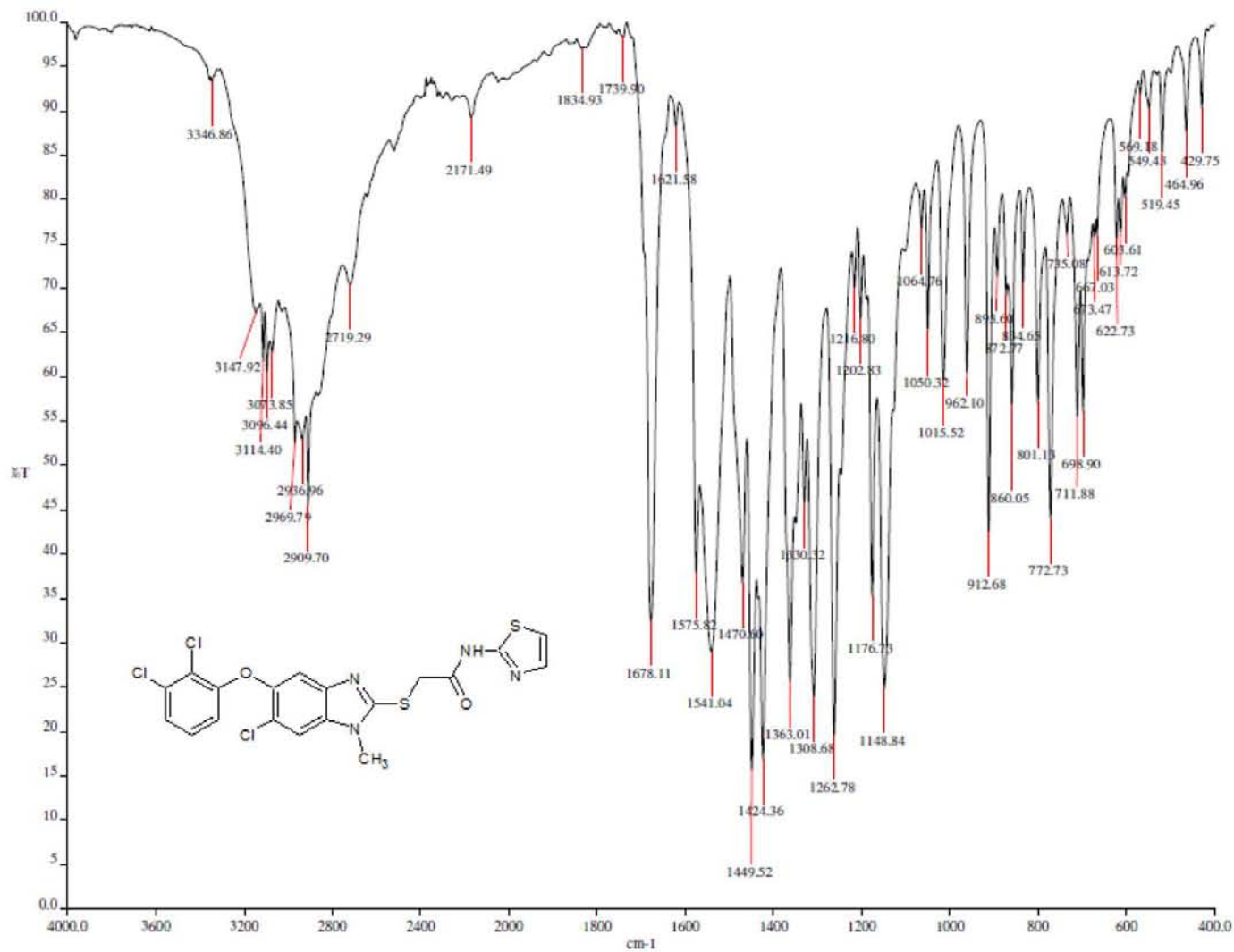
| | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| Date of report | 3/18/2016 9:19:33AM | |
| User ID | M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus | |
| Comments | Muestra: CCG21 | Realizo: M. en C. Nayeli L. Balbiaux |

| Run | Weight | Carbon | Hydrogen | Nitrogen | Sulfur | Created on |
|--------------------|--------|--------|----------|----------|--------|----------------------|
| 8097876367B | 2.014 | 49.79% | 2.43% | 10.72% | -0.28% | 3/16/2016 5:07:37 PM |
| 8097876367A | 1.56 | 49.85% | 2.71% | 10.48% | -0.28% | 3/16/2016 5:00:38 PM |
| | Weight | Carbon | Hydrogen | Nitrogen | Sulfur | |
| Average | 1.787 | 49.820 | 2.570 | 10.600 | -0.280 | |
| Variance | 0.103 | 0.002 | 0.039 | 0.029 | 0.000 | |
| Standard Deviation | 0.321 | 0.042 | 0.198 | 0.170 | 0.000 | |

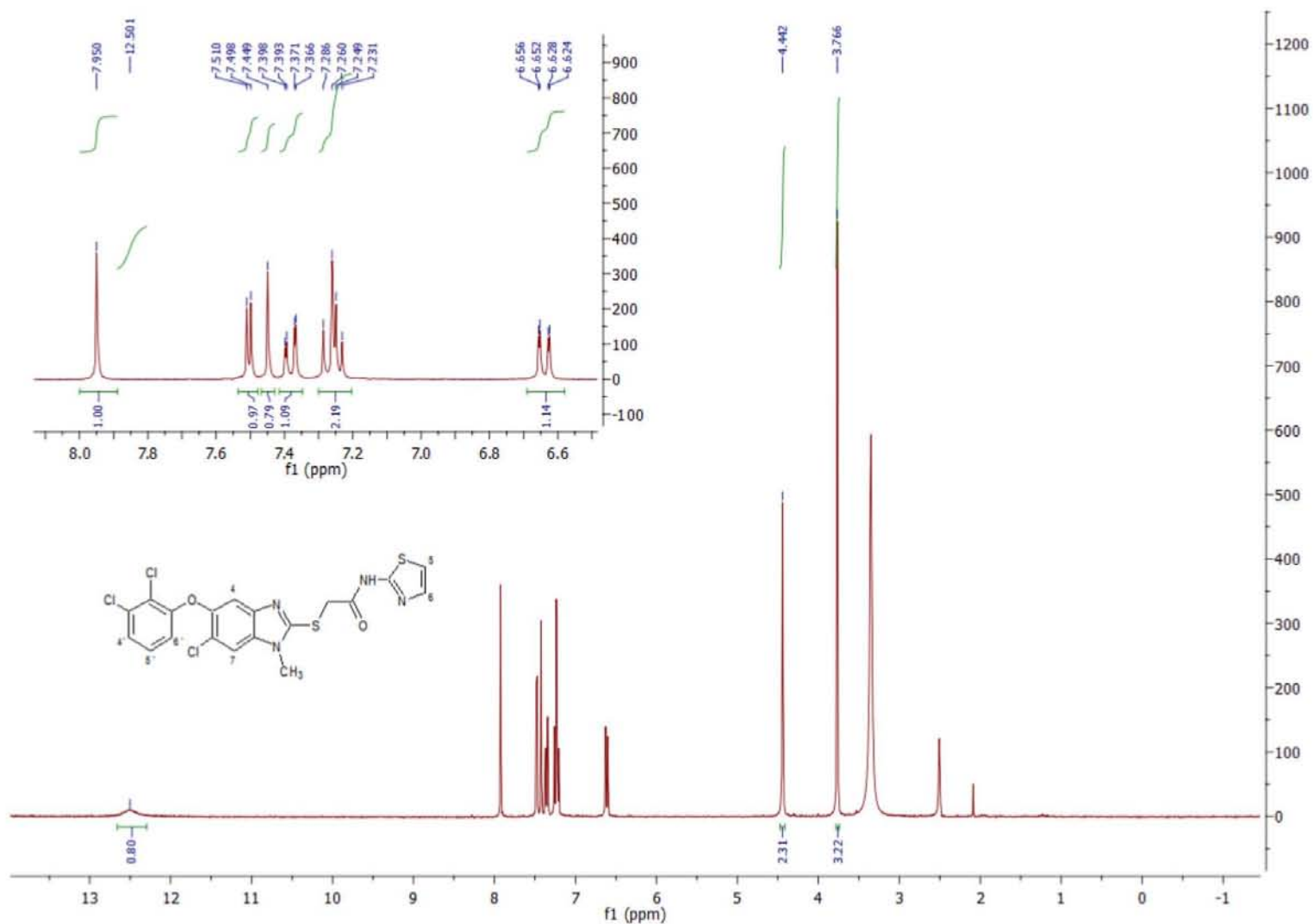
Espectro 6. Resultados de análisis elemental del compuesto *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida.



Espectro 7. EM: (ESI, m/z) del compuesto *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]acetamida.



Espectro 8. IR FTIR (ATR) del compuesto 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-bencimidazol-2-il]sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-il)acetamida.



Espectro 9. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-benzimidazol-2-il]sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-il)acetamida.

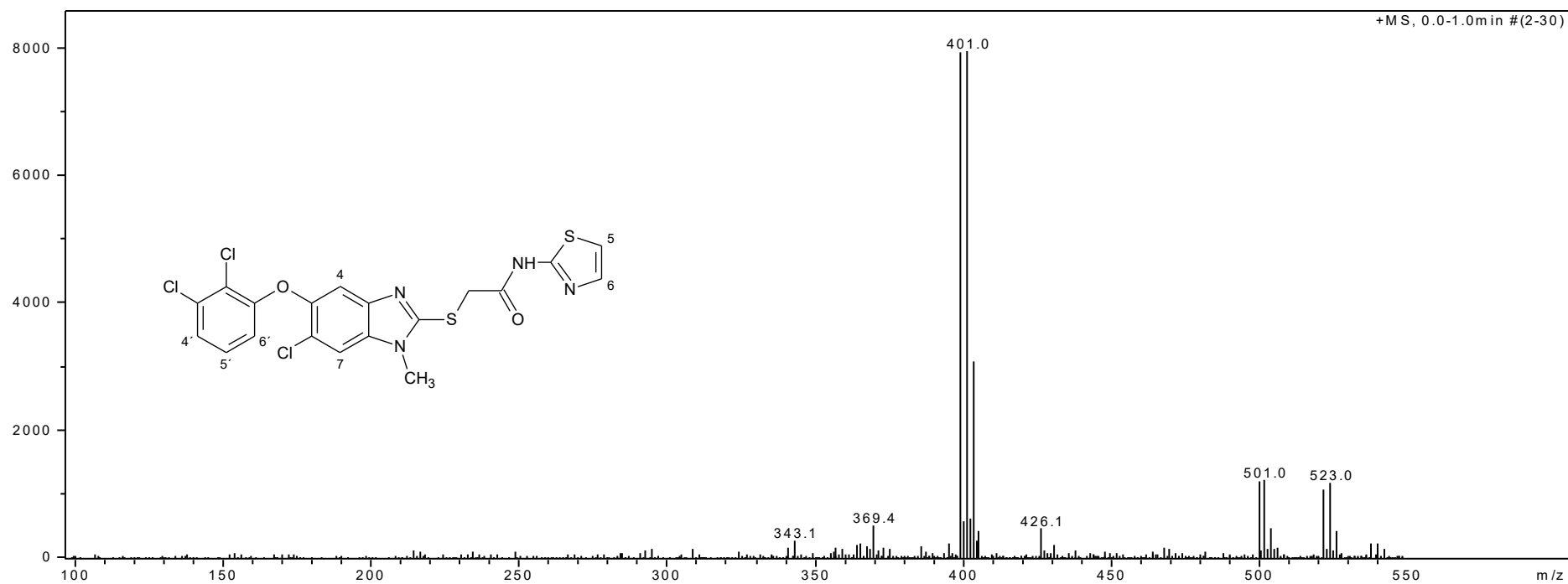


UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA
INDUSTRIA (USAI)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

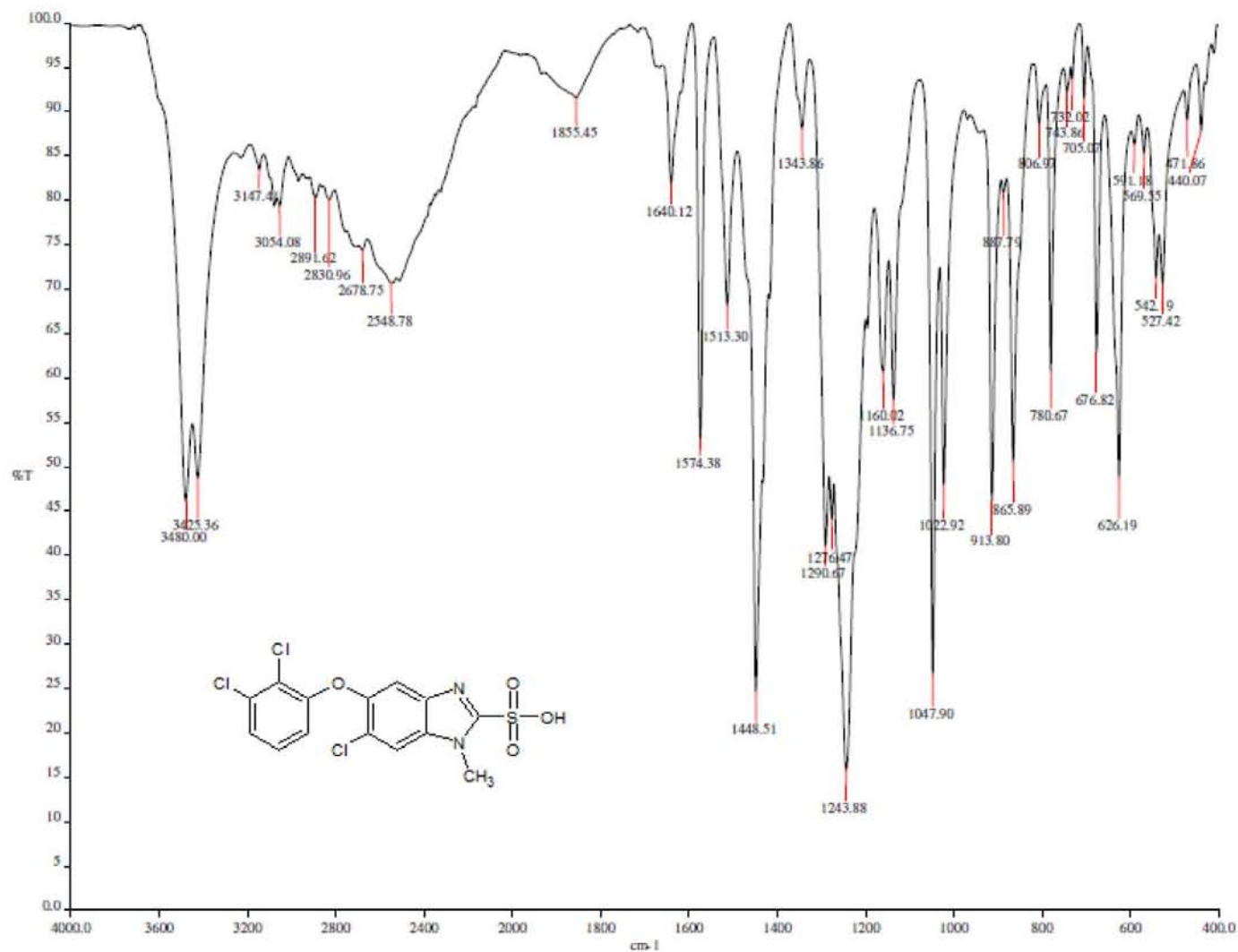
| | |
|-----------------------|--|
| Date of report | 3/18/2016 9:02:36AM |
| User ID | M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus |
| Comments | Muestra: CCG11 Realizo: Nayeli / Victor |

| Run | Weight | Carbon | Hydrogen | Nitrogen | Sulfur | Created on |
|--------------------|--------|--------|----------|----------|--------|----------------------|
| 2510878489C | 2.429 | 45.6% | 2.19% | 11.16% | 12.17% | 3/17/2016 2:20:03 PM |
| 2510878489B | 1.754 | 45.68% | 1.96% | 10.92% | 12.33% | 3/16/2016 3:15:22 PM |
| 2510878489A | 2.004 | 45.67% | 2.51% | 11.27% | 12.41% | 3/16/2016 3:08:22 PM |
| | Weight | Carbon | Hydrogen | Nitrogen | Sulfur | |
| Average | 2.062 | 45.650 | 2.220 | 11.117 | 12.303 | |
| Variance | 0.116 | 0.002 | 0.076 | 0.032 | 0.015 | |
| Standard Deviation | 0.341 | 0.044 | 0.276 | 0.179 | 0.122 | |

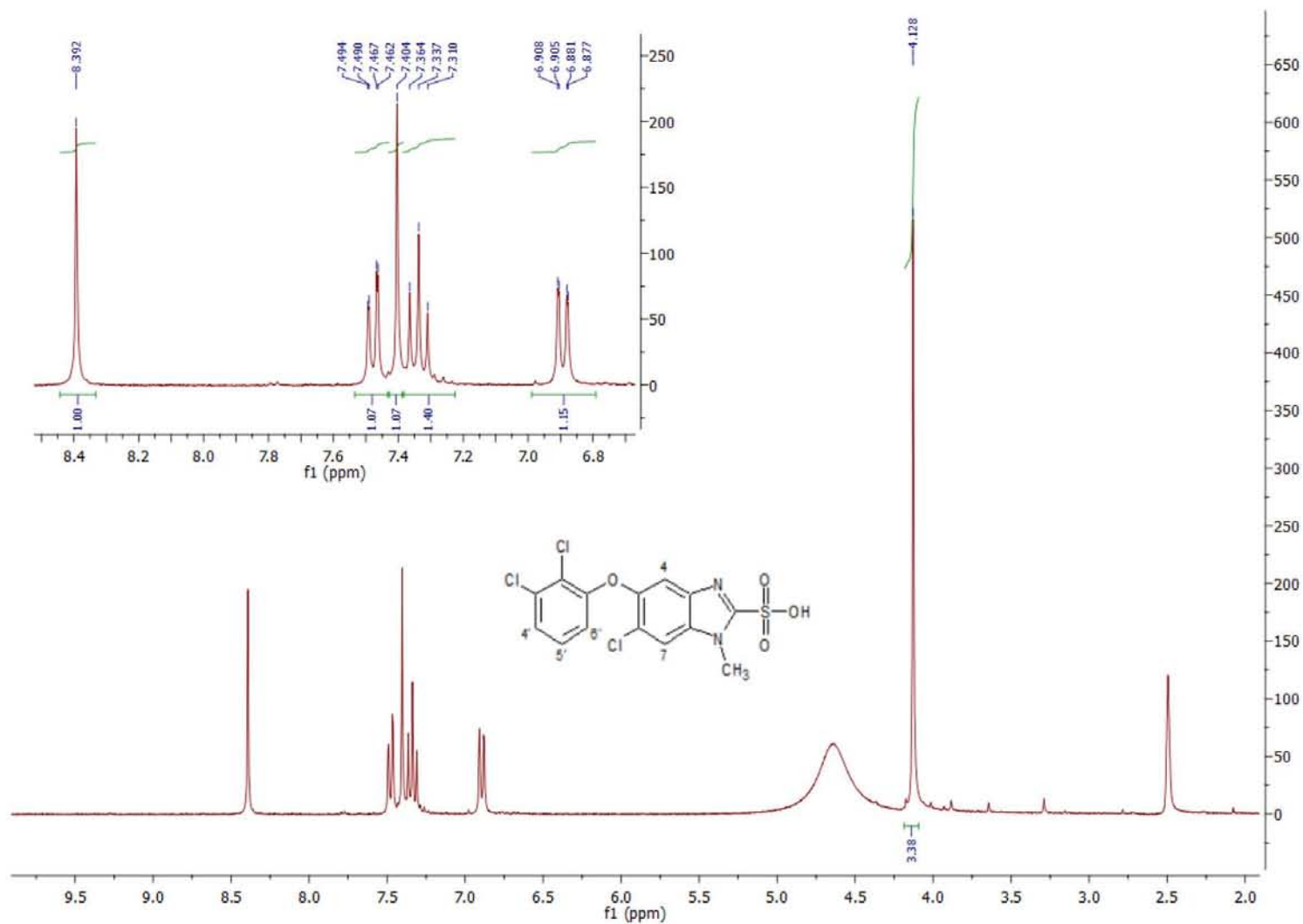
Espectro 10. Resultados de análisis elemental del compuesto 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil]-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida.



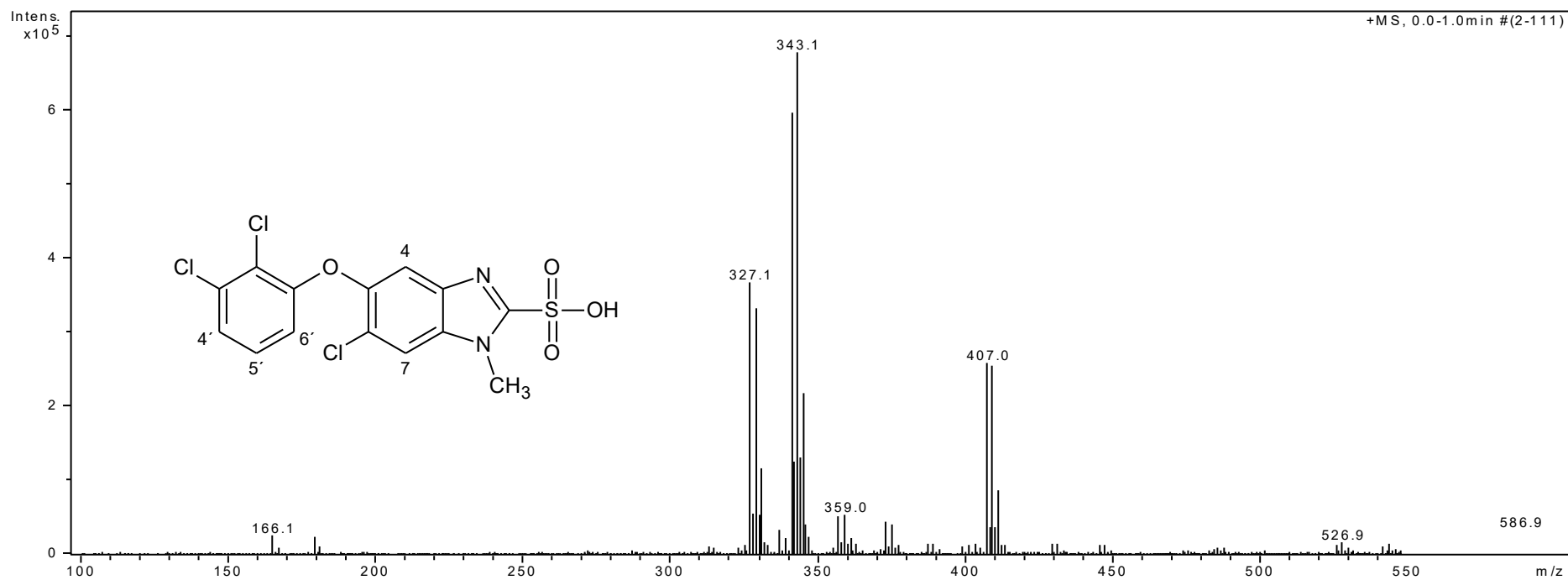
Espectro 11. EM: (ESI, m/z) del compuesto 2-[[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil]-*N*-(1,3-tiazol-2-il)acetamida



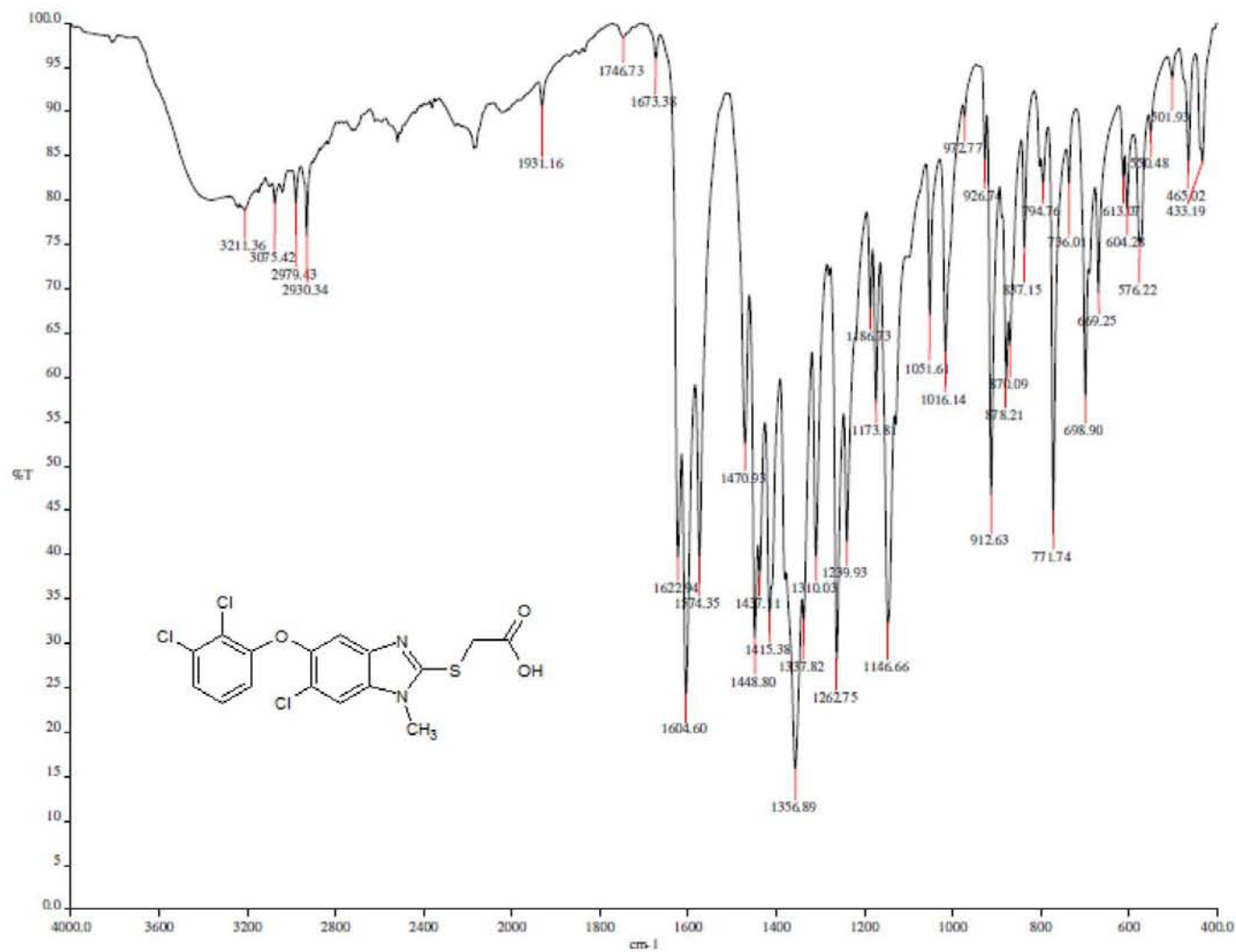
Espectro 12. IR FTIR (ATR) del compuesto ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-sulfónico.



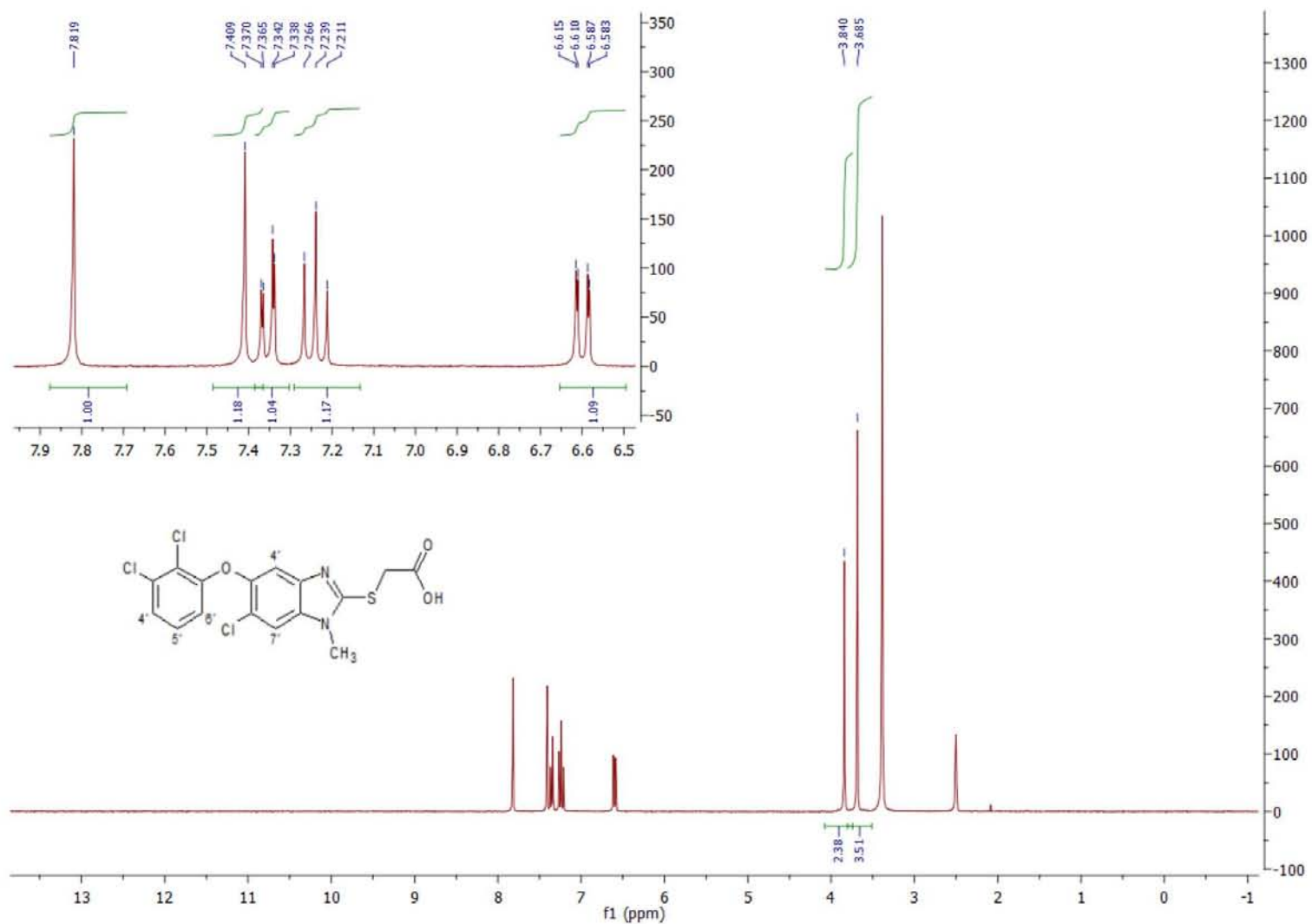
Espectro 13. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6 , 300 MHz, δ en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-benzimidazol-2-sulfónico.



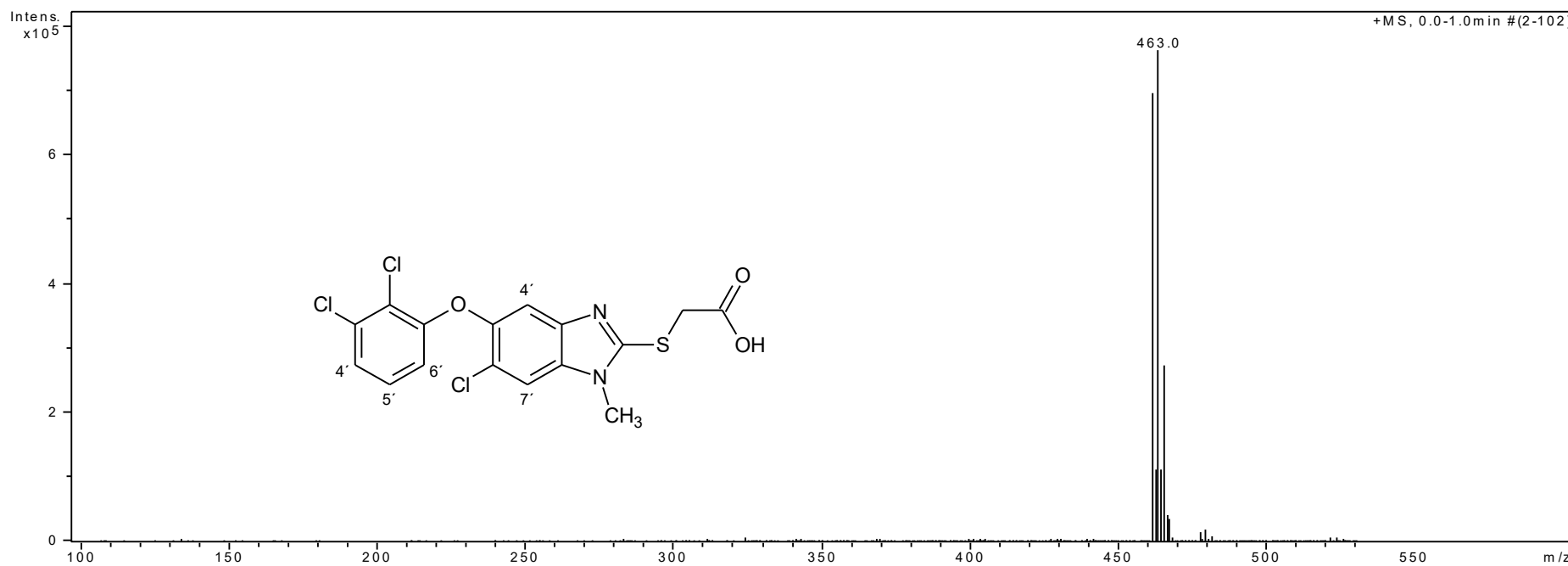
Espectro 14. EM: (ESI, m/z) del compuesto ácido 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-sulfónico.



Espectro 15. IR FTIR (ATR) del compuesto ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il]sulfanil}acético.



Espectro 16. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6 300 MHz, δ en ppm) del compuesto ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-bencimidazol-2-yl]sulfanil}acético.



Espectro 17. EM: (ESI, m/z) del compuesto ácido {[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-yl]sulfanil}acético.