



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE DERIVADOS DE 5-CLORO-1-METIL-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO”**

### **TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

### **MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

QFB. CRUZ NORIEGA ABIGAIL

TUTOR

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO CD. MX. NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD GIARDICIDA DE DERIVADOS DE 5-CLORO-1-METIL-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO”**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**QFB. CRUZ NORIEGA ABIGAIL**



**México, CD. MX. 2016**

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente:</b>	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
<b>Vocal:</b>	Dr. Francisco Hernández Luis
<b>Vocal:</b>	Dr. René Miranda Ruvalcaba
<b>Vocal:</b>	Dr. Gabriel Navarrete Vázquez
<b>Secretario:</b>	Dr. Marcos Hernández Rodríguez

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

Este trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Laboratorio 122 del Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. La evaluación antiparasitaria se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico IMSS, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Parte de este proyecto se presentó en el siguiente congreso:

“Síntesis de compuestos 1-metilbencimidazólicos con probable actividad inhibitoria en la enzima ADI de *Giardia intestinalis*”. XII reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica”, marzo 10–11, 2016, Silao, Guanajuato, México.

## **Agradecimientos**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada (número de becario: **336075**) para la realización de mis estudios de maestría. Así como al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia al congreso y la impresión de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el financiamiento a través del proyecto con clave **CB-2011/168718**.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por sus valiosas aportaciones y asesoría para la realización del presente proyecto.

A la Dra. María Alicia Hernández Campos por el apoyo y consejos brindados durante mi estancia en el laboratorio.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Dra. Minerva Monroy y M. en C. Maricela Gutiérrez Franco, por la determinación de los espectros de RMN e IR respectivamente. De igual manera a la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales por la capacitación otorgada para el uso del equipo de RMN. Así también a la Dra. Inés Fuentes Noriega, del Laboratorio de Biofarmacia, por facilitar el uso del equipo de masas.

A la Dra. Lilián Yépez y a su grupo de investigación por la realización de los ensayos *in vitro* de los compuestos sintetizados.

A mis amigos y compañeros del lab 122: Lucía Cano, Elkin Sanabria, Adriana Luke, José Miguel Velázquez, Paulina Flores, Rodrigo Aguayo, Pedro Trejo. Por los momentos compartidos, ocurrencias y el apoyo brindado en el laboratorio durante estos años.

A mis amigos y compañeros del lab 125: Tania, Mario, Ale, Paco, Fonsy e Iván por los momentos dentro y fuera de la facultad en los que me divertía mucho.

*Con dedicatoria especial a mi familia; a mis hermanos Naty, Dany, Luis, Gus, Mariana, David por apoyarme todos los días y aguantar mi carácter. Sin ustedes nada de esto sería posible.*

*A mi mamá María Luisa Noriega por brindarme toda su comprensión, apoyo incondicional en todo momento y sobre todo por creer en mí.*

## Abreviaturas

<b>ABZ</b>	Albendazol
<b>ADH</b>	Arginina dehidrolasa
<b>ADI</b>	Arginina deiminasa
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>CK</b>	Carbamato cinasa
<b>COSY</b>	Espectroscopía de Correlaciones (Correlation Spectroscopy)
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetilo
<b>ESI</b>	Ionización por electronebulización (Electrospray ionization)
<b>h</b>	Horas
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HMBC</b>	Correlación heteronuclear a varios enlaces (Heteronuclear Multiple–Bond Correlation)
<b>HSQC</b>	Correlación heteronuclear cuántica sencilla (Heteronuclear Single–Quantum Correlation)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mmol</b>	Milimol
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)
<b>MTZ</b>	Metronidazol
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa carga
<b>NADPH</b>	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NOESY</b>	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
<b>OTC</b>	Ornitina carbamoiltransferasa
<b>pf</b>	Punto de fusión
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética de protón
<b>SAR</b>	Relación estructura actividad
<b>t.a</b>	Temperatura ambiente
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>d</b>	Señal doble en RMN <sup>1</sup> H
<b>t</b>	Señal triple
<b>m</b>	Señal múltiple
<b>s</b>	Señal simple
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>μM</b>	Micromolar

Índice General

	Página
<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo 2. Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
2.1. Enfermedades parasitarias .....	3
2.2. <i>Giardia intestinalis</i> como agente causal de giardiasis .....	3
2.2.1. Ciclo vital y fisiopatología .....	4
2.2.2. Transmisión y diagnóstico .....	5
2.2.3. Metabolismo .....	6
2.2.3.1. Metabolismo de carbohidratos .....	7
2.2.3.2. Metabolismo de lípidos .....	8
2.2.3.3. Metabolismo de aminoácidos .....	8
2.2.3.3.1. Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH) .....	8
2.2.3.3.2. Arginina deiminasa (ADI) .....	9
2.3. Tratamiento .....	9
2.3.1. Inconvenientes de los tratamientos empleados en Giardiasis .....	11
2.4. Importancia del núcleo de bencimidazol y su actividad antiprotozoaria .....	12
2.5. Derivados bencimidazólicos a partir del principio de hibridación molecular .....	13
2.6. Derivados bencimidazólicos 2-alcilto sustituidos en posición 5(6) .....	13
2.7. Enzimas de la vía metabólica de la ADH como potenciales blancos terapéuticos .....	14
<b>Capítulo 3. Planteamiento del problema .....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 4. Justificación.....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo 5. Hipótesis .....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo 6. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
6.1. Objetivos particulares .....	19
<b>Capítulo 7. Metodología.....</b>	<b>20</b>
7.1.1. Metodología de síntesis .....	20
7.1.2. Síntesis de 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9) .....	20
7.1.3. Síntesis de compuestos finales (ACN 1-4) .....	21
7.2. Evaluación antiprotozoaria de los compuestos (ACN 1-4) .....	24
7.2.1. Medio de cultivo y protozoarios .....	24
7.2.2. Ensayos de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	24
<b>Capítulo 6. Desarrollo experimental.....</b>	<b>26</b>
8.1. Síntesis química .....	26
8.1.1. Instrumentación .....	26
8.1.2. 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (2).....	27

<b>8.1.3.</b> 5-Amino-2-clorobenzoato de metilo ( <b>3</b> ).....	28
<b>8.1.4.</b> 5-(Acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo ( <b>4</b> ).....	29
<b>8.1.5.</b> 5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>5</b> ).....	29
<b>8.1.6.</b> 2-Cloro-5-[acetil(metil)amino]-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>6</b> ).....	31
<b>8.1.7.</b> 2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>7</b> ).....	32
<b>8.1.8.</b> 4-Amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo ( <b>8</b> ).....	32
<b>8.1.9.</b> 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo ( <b>9</b> ).....	33
<b>8.1.10.</b> 6-Cloro-1-(2-cianoetil)-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo ( <b>ACN 1</b> ).....	34
<b>8.1.11.</b> 5-Cloro-2-[(2,2-dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxilato de metilo ( <b>10a</b> ).....	35
<b>8.1.12.</b> 2-[[2-(carbamoilhidraziniliden)etil]sulfanil]-5-cloro-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxilato de metilo ( <b>ACN 2</b> ).....	36
<b>8.1.13.</b> 5-Cloro-1-metil-2-[(2-oxoetil)sulfanil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxilato de metilo ( <b>10b</b> ).....	36
<b>8.1.14.</b> Metodología para obtener <b>ACN 2</b> .....	36
<b>8.1.15.</b> 2-({2-[( <i>Tert</i> -butoxicarbonil)amino]etil} sulfanil)-5-cloro-1-metil-1 <i>H</i> -benzimidazol-6-carboxilato de metilo ( <b>11a</b> ).....	37
<b>8.1.16.</b> Metodología experimental para obtener <b>11a</b> .....	38
<b>8.1.17.</b> 2-[(2-Aminoetil)sulfanil]-5-cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxilato de metilo ( <b>11b</b> ).....	39
<b>8.1.18.</b> Método general de síntesis para la obtención de <b>ACN 3</b> y <b>ACN 4</b> .....	41
<b>Capítulo 9. Resultados y discusión</b> .....	<b>42</b>
<b>9.1.</b> Síntesis de intermediarios 2-9.....	42
<b>9.1.2.</b> Obtención de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo ( <b>2</b> ).....	42
<b>9.1.3.</b> Obtención de 5 Amino-2-clorobenzoato de metilo ( <b>3</b> ).....	43
<b>9.1.4.</b> Obtención de 5-(Acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo ( <b>4</b> ).....	43
<b>9.1.5.</b> Obtención de 5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>5</b> ).....	43
<b>9.1.6.</b> Obtención de 2-Cloro-5-[acetil(metil)amino]-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>6</b> ), 2-Cloro-5-(metilamino)4-nitrobenzoato de metilo ( <b>7</b> ) y 4-Amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo ( <b>8</b> ).....	44
<b>9.2.</b> Obtención de 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo ( <b>9</b> ).....	44
<b>9.3.</b> Caracterización de <b>ACN 1</b> .....	45
<b>9.4.</b> Obtención de <b>ACN 2</b> .....	48
<b>9.5.</b> Obtención de <b>ACN 3</b> y <b>ACN 4</b> .....	52
<b>9.6.</b> Evaluación de susceptibilidad de <i>G.intestinalis</i> frente a los compuestos sintetizados.....	57
<b>Conclusiones</b> .....	<b>60</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>60</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>61</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>66</b>

**RESUMEN**

Las enfermedades causadas por protozoos son graves problemas de salud a nivel mundial, sobre todo en países en desarrollo como el nuestro. Para su tratamiento la quimioterapia sigue siendo la mejor opción; sin embargo, se limita al uso de pocos fármacos, algunos, como el metronidazol, existentes desde hace más de 40 años, de variada eficacia y con severos efectos adversos. Por ello en nuestro grupo de investigación se han sintetizado y evaluado biológicamente más de 300 derivados del bencimidazol con el propósito de encontrar los requerimientos básicos para optimizar la actividad antiprotozoaria. De los diferentes derivados del bencimidazol se han sintetizado compuestos que han presentado actividad giardicida *in vitro*, superior o similar a los fármacos de elección.

De entre ellos surgió un nuevo grupo de bencimidazoles diseñados por acoplamiento molecular como inhibidores de la Arginina deiminasa (ADI) de *G. intestinales*. Anteriormente, esta enzima se estudió como blanco giardicida de derivados del bencimidazol y se sintetizaron compuestos híbridos con el grupo guanidino del sustrato natural (arginina), reconocido por la enzima, así como diferentes análogos del grupo mencionado y unidos al núcleo de bencimidazol. Estos compuestos se evaluaron *in vitro* en un primer estudio sobre trofozoítos de *Giardia intestinalis*; de estos resultados se encontró que los compuestos más activos fueron **ADI 4-6**. Con base en los resultados de actividad obtenidos y con el propósito de optimizar la estructura para la obtención de compuestos más activos, en la primera sección de este trabajo se presenta la síntesis de cuatro derivados de 1-metil-1*H*-bencimidazol de los cuales 3 se encuentran sustituidos en posición 2 con elementos análogos presentes en el sustrato natural de la enzima ADI, protegidos en las posiciones 5 y 6 del núcleo de bencimidazol con cloro y éster respectivamente. Con la finalidad de enriquecer la base de datos creada por nuestro grupo de investigación.

En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* contra los parásitos *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. A partir de los resultados de estos ensayos realizados contra el trofozoíto de *G. intestinalis* se observó que los cuatro compuestos sintetizados presentaron actividad mayor o similar que los fármacos de referencia, metronidazol y albendazol. El compuesto con mayor potencia, incluso superando en más del doble de potencia al albendazol, fue el compuesto **ACN 4**. Al comparar los compuestos análogos sin sustituyentes en las posiciones 6 (5) y los compuestos sintetizados se observó de manera general, un aumento de la actividad giardicida a excepción del compuesto **ACN 1**.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios constituyen un problema médico y sanitario a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las considera una de las principales causas de morbilidad relacionadas con condiciones higiénico-sanitarias, socioeconómicas y ambientales. De entre ellas la amebiasis y giardiasis son enfermedades intestinales que afectan a millones de personas cada año. Por estas razones se han generado diferentes estrategias para controlar estas enfermedades a través de medidas sanitarias y la prevención de la diseminación; sin embargo, la quimioterapia continúa siendo una herramienta fundamental para combatirlas.

Dentro de la quimioterapia se han desarrollado fármacos que poseen un amplio espectro de actividad en infecciones causadas por parásitos, el albendazol por ejemplo (ABZ) es un bencimidazol que muestra actividad antiprotozoaria, especialmente contra *G.intestinalis*; por otro lado, el metronidazol (MTZ) es un nitroheterociclo empleado en el tratamiento de una amplia gama de protozoarios anaeróbicos. Si bien este último fármaco comúnmente se emplea para combatir parasitosis, presenta serias desventajas, como son efectos adversos e inefectividad en ciertas fases del desarrollo del parásito y sobre todo se han desarrollado cepas resistentes a él. Por lo tanto es de suma importancia la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos que muestren ser una alternativa al tratamiento y presenten una mayor eficacia y seguridad.

De la gran diversidad de moléculas orgánicas que han surgido en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antiprotozoaria, destacan los derivados de bencimidazol. Siendo una estructura privilegiada el ser parte de biomolécula vitamina B12 y compuestos con diversas actividades biológicas, dando origen a un gran número de fármacos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antihipertensivas y antiparasitarias. En nuestro grupo de investigación ya se han sintetizado diversos grupos de derivados con el bencimidazol como núcleo base, a su vez en colaboración con la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias IMSS (UIMEIP-IMSS) del Centro Médico Nacional siglo XXI, se ha realizado la evaluación biológica de cada uno de ellos para obtener la actividad antiparasitaria y poder así optimizarla. En este trabajo se presenta la síntesis de 3 derivados de bencimidazol con elementos análogos de la arginina (sustrato natural de la enzima ADI), obtenidos a partir del estudio de enzimas de la vía de la ADH como potenciales blancos terapéuticos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Enfermedades parasitarias

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios constituyen un problema médico y sanitario a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las considera una de las principales causas de morbilidad relacionadas con condiciones higiénico-sanitarias, socioeconómicas y ambientales [1]. De entre ellas, la amebiasis y giardiasis son enfermedades intestinales que afectan a millones de personas cada año. Estas infecciones son las principales causas de diarrea, disentería y síntomas asociados a problemas gastrointestinales [2]. A nivel mundial, las enfermedades parasitarias afectan principalmente a países en vías de desarrollo, de estas protozoosis la giardiasis afecta a niños de muchos de estos países en aproximadamente el 100% de la población. Grandes epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua, infectando en algunos casos a miles de personas. Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública global. En este contexto es que la OMS la ha incluido en la última década en la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas [3].

En México algunas de las protozoosis más comunes son causadas por los protozoarios *Entamoeba histolytica* (amebiasis), *Giardia intestinalis* (giardiasis) y *Trichomonas vaginalis* (trichomoniasis). La giardiasis es de más alta prevalencia en nuestro país, siendo la segunda causa más común de parasitosis intestinal en niños y adultos. Se calcula que en México hay 9 millones de personas infectadas y se estima además que la frecuencia de la parasitosis es muy variable con cifras que fluctúan desde del 2% al 39% con un 15% de infectados en la población de estrato socioeconómico bajo y 19% de prevalencia en escolares y preescolares [4].

### 2.2. *Giardia intestinalis* como agente causal de giardiasis

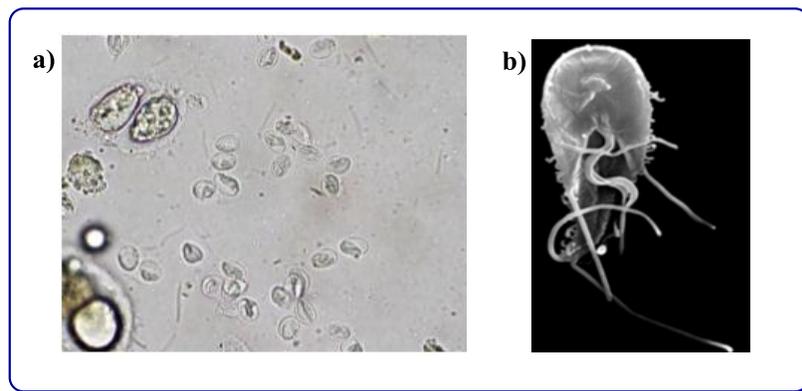
*Giardia intestinalis* (*Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*) es un protozoario binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos, es el agente responsable de la giardiasis, una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes [5]. Es además una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo y se estima que cerca de 200 millones de personas se infectan anualmente por *G. intestinalis* en Asia, África y América Latina [6]; sin embargo, la incidencia es mayor en regiones de clima templado. A su vez la población más afectada de estas regiones ocurre en niños de países en vías de desarrollo [7, 8]. La infección puede ocurrir a través de transmisión por agua, alimentos, brotes en guarderías o a partir de viajeros internacionales. Debido a que la transmisión de *G. intestinalis* requiere de la

ingestión de quistes del parásito, los niveles de sanidad ambiental juegan un papel clave durante el ciclo de transmisión, por lo tanto, la mayor prevalencia es debido a las diferencias en las condiciones sanitarias de los países en vías de desarrollado que en países avanzados. Con lo cual se infiere entonces la importancia de conocer el ciclo de vida del parásito [9].

### 2.2.1. Ciclo vital y fisiopatología

Durante su ciclo de vida *G. intestinalis* sufre significativos cambios bioquímicos y morfológicos que le permiten sobrevivir en ambientes y condiciones que de otro modo lo destruirían. Los estadios en los cuales se presentan estos cambios son el trofozoíto, y el quiste, éste último responsable de la transmisión al ser eliminado a través de las heces [10].

El trofozoíto tiene forma de pera invertida y mide entre 10-20  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro transversal. Presenta una estructura con dos núcleos simétricos, cuatro pares de flagelos que parten de un cuerpo basal y un disco de adherencia en su cara ventral que actúa como ventosa para fijarse a la mucosa intestinal (**Fig. 1**). El quiste es la forma infectante y puede sobrevivir en ambientes húmedos durante tiempo prolongado, ya que posee una rígida pared de glicoproteína externa. Presenta una forma ovoide y es más pequeño que el trofozoíto, con una pared doble y cuatro núcleos. Posee, además, un alto poder infectivo, ya que la ingestión de tan solo 10-15 quistes puede dar lugar a la infección [11].



**Figura 1.** Estadios de *G. intestinalis* a) quiste. b) Imagen de trofozoíto mediante microscopía electrónica [12, 13].

El ciclo de infección inicia entonces al ingerir quistes del protozooario, con lo cual comienza un ciclo interminable de transmisión. Los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de sus estadios le permiten infectar y sobrevivir en el hospedero; los quistes al ser ingeridos son transportados al estómago en donde se produce la desenquistación mediada por el pH ácido del mismo, liberando los

trofozoítos. Éstos colonizan el intestino delgado superior, mediante su replicación a través de fisión binaria, la cual ocurre en el duodeno y el yeyuno, para luego fijarse a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante su disco de adherencia [14]. El daño que causa *G. intestinalis* se debe principalmente a los efectos de la acción mecánica de adherirse y fijarse al epitelio intestinal. Esto provoca en el hospedero alteración de las microvellosidades intestinales, que conlleva la aparición de diversas alteraciones fisiológicas como el deterioro del proceso de absorción [17]. A lo largo del íleon se realiza la enquistación, favorecida por el medio alcalino que proporciona la secreción biliar y, finalmente, los quistes salen al medio ambiente a través de las heces pudiendo transmitirse a un nuevo hospedador por medio de mecanismos directos e indirectos (Fig. 2).

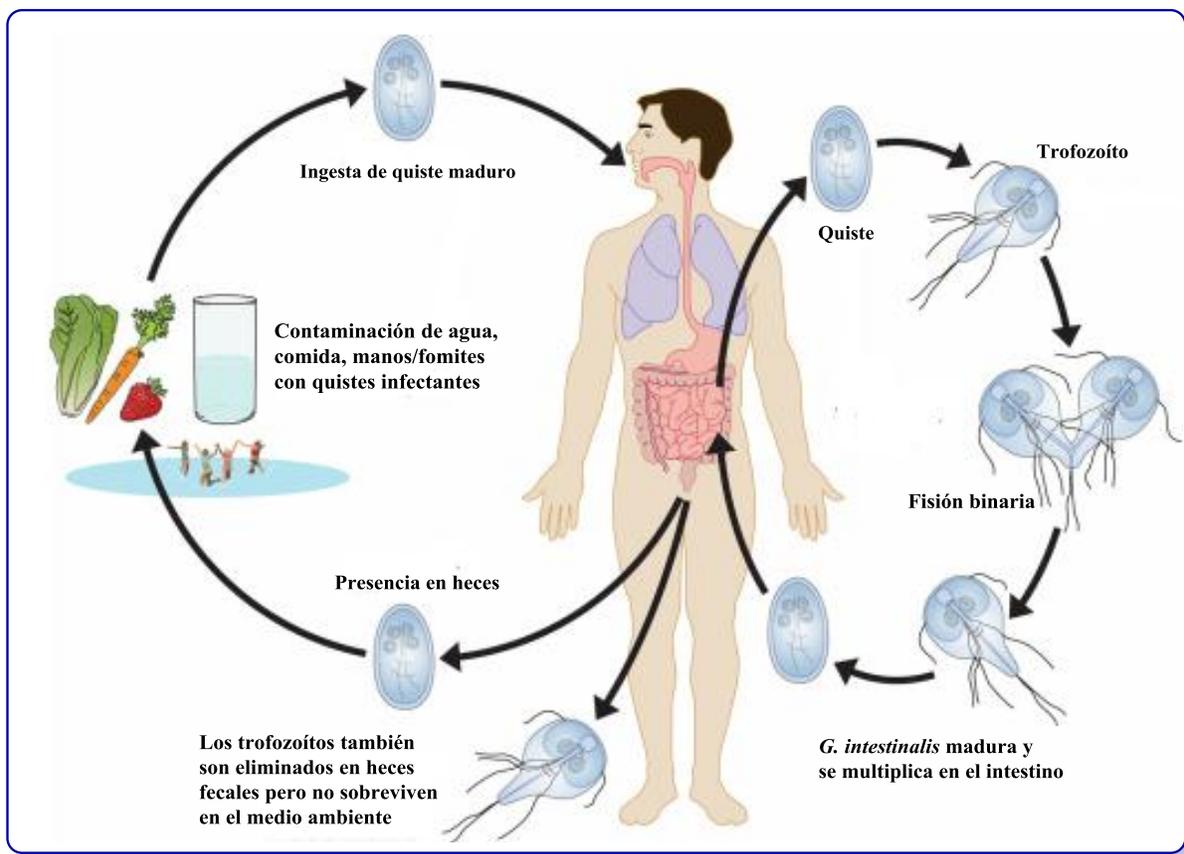


Figura 2. Ciclo biológico de *G. intestinalis* [15].

### 2.2.2. Transmisión y diagnóstico

La infección por giardia tiene un gran impacto en la salud pública dada la relación que existe entre la ocurrencia de esta parasitosis y los hábitos y condiciones socioeconómicas de las poblaciones afectadas [16]. En este contexto, conocer los mecanismos de transmisión es de

importancia para su prevención y tratamiento. La transmisión ocurre principalmente a través de mecanismos directos: mediante agua y alimentos contaminados, contacto directo fecal-oral, o de persona a persona a través de contacto sexual [17]. El agua es la principal fuente de transmisión, ya que los quistes de *G. intestinalis* son resistentes a ambientes hostiles. La transmisión por alimentos se da sobre todo al consumir comida cruda o poco cocinada, y la transmisión interpersonal es la responsable de la elevada prevalencia de esta parasitosis en niños y en hombres homosexuales que practican sexo anal [18].

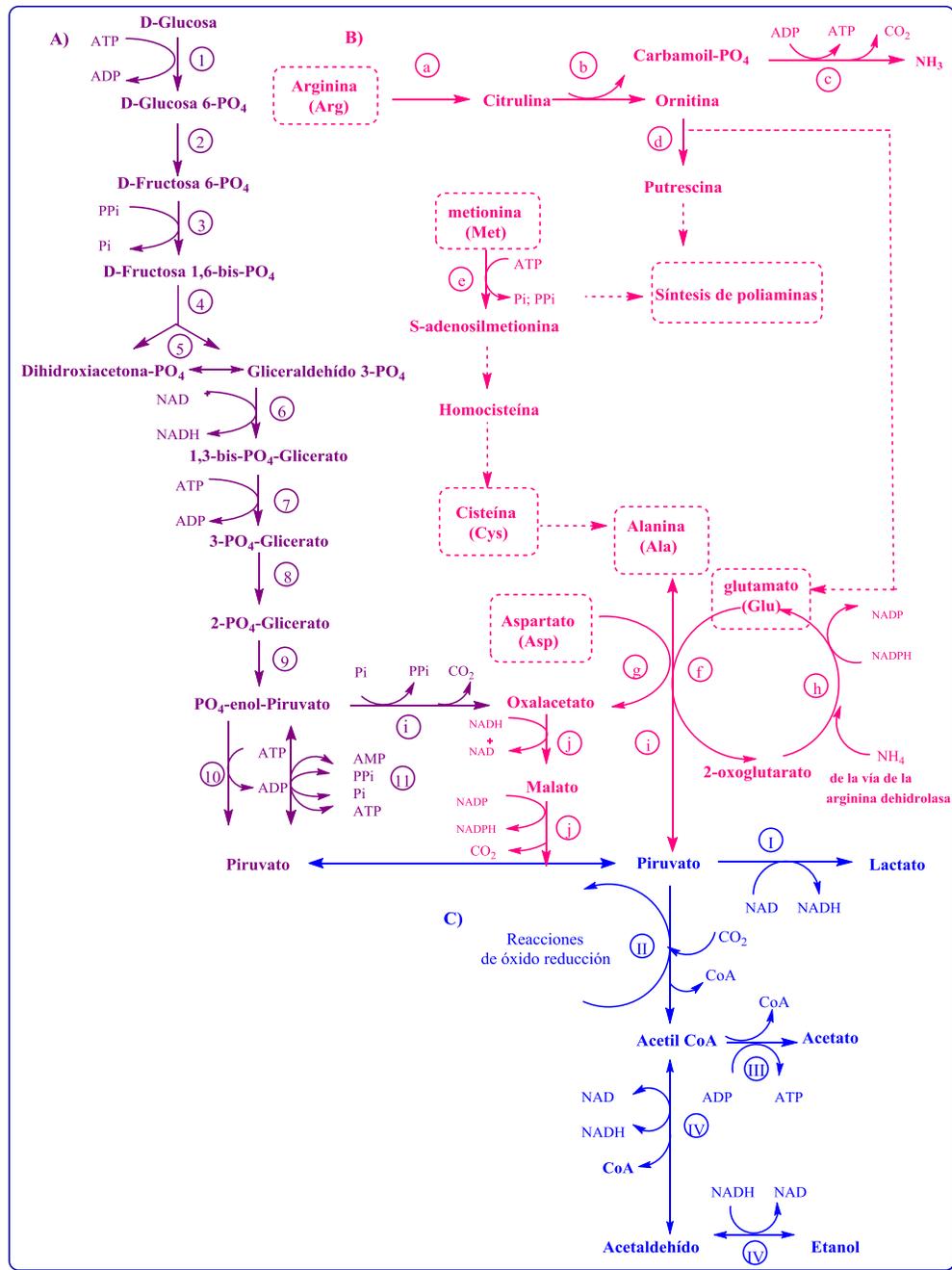
El diagnóstico se realiza con la identificación microscópica de los quistes y raramente de los trofozoítos, las alteraciones bioquímicas o hematológicas en el huésped no contribuyen de manera importante para el mismo. El análisis coproparasitoscópico de heces es tradicionalmente de elección en pacientes asintomáticos. En el caso de síndrome de mal absorción, la biopsia de la mucosa intestinal es de gran valor [19].

### **2.2.3. Metabolismo**

*G. intestinalis* posee características aeróbicas y anaeróbicas, vive en un ambiente con condiciones bajas de oxígeno y se considera un organismo aerotolerante o microaerofílico. Este protozooario se caracteriza por carecer de mitocondria y del proceso de fosforilación oxidativa, por lo que el metabolismo fermentativo es su principal mecanismo de conservación energética, incluso en presencia de oxígeno. En este contexto, la glucólisis y la vía metabólica de la arginina dehidrolasa constituyen las principales fuentes de obtención de energía en forma de ATP [20]. No presenta un metabolismo compartimentalizado, por lo que las reacciones metabólicas se llevan a cabo en el citoplasma o en la superficie membranal.

#### **2.2.3.1. Metabolismo de carbohidratos**

En *G. intestinalis* la glucosa no es oxidada hasta la formación de CO<sub>2</sub> y agua, sino que es catabolizada de manera incompleta hasta formación de acetato, etanol y alanina (**Fig. 3**). La glucosa promueve el crecimiento de los trofozoítos, pero no es esencial, por lo que otras fuentes de carbono que contribuyen al metabolismo energético, provienen probablemente del metabolismo de aminoácidos y proteínas [21, 22]. Los cambios en la concentración de oxígeno afectan el metabolismo del parásito. En condiciones anaerobias se produce alanina como producto mayoritario, mientras que en condiciones bajas de oxígeno se estimula la producción de etanol y se inhibe la producción de alanina.



**Figura 3.** A) glucólisis: 1) glucoquinasa/hexoquinasa, 2) glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3) fosfofructoquinasa, 4) fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, 5) triosafosfato isomerasa, 6) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 7) fosfoglicerato quinasa, 8) fosfoglicerato mutasa, 9) enolasa, 10) piruvato quinasa, y 11) piruvato fosfato diquinasa. B) metabolismo de aminoácidos: a) arginina deiminasa (ADI), b) ornitina carbamoiltransferasa (OTC), c) carbamato cinasa (CK), d) ornitina descarboxilasa, e) s-adenosil metionina sintetasa, f) glutamato deshidrogenasa, g) aspartato aminotransferasa, h) alanina aminotransferasa, i) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, j) malato deshidrogenasa. C) Fermentación láctica y alcohólica: I) lactato deshidrogenasa, II) piruvato-ferrodoxina-oxidorreductasa, III) acetil-CoA sintetasa, IV) alcohol deshidrogenasa [11].

### 2.2.3.2. Metabolismo de lípidos

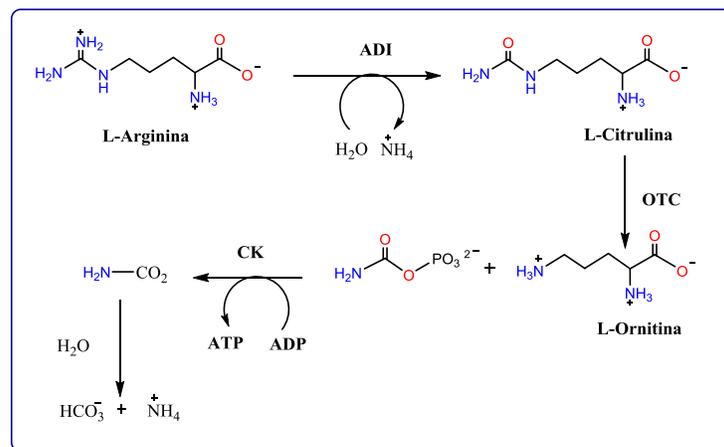
La bilis pancreática constituye una de las principales fuentes para el crecimiento del parásito en el duodeno y yeyuno, puesto que de ésta se obtienen componentes lipídicos y sales biliares. Este protozooario no tiene la capacidad de sintetizar de *novo* ácidos grasos de cadena larga, y además se ha reportado que algunos ácidos grasos son tóxicos para los trofozoítos [21, 23].

### 2.2.3.3. Metabolismo de aminoácidos

La captura de aminoácidos del medio extracelular y el metabolismo independiente de glucosa sugiere que los aminoácidos son una de las principales fuentes de energía del protozooario, siendo la vía de la arginina dehidrolasa la ruta más importante. En esta vía se genera ATP a partir de la conversión de arginina a amoníaco y ornitina, en donde esta última es transportada para el intercambio por arginina extracelular o se emplea para la síntesis de poliaminas [24, 25]. Los aminoácidos aspartato y alanina son componentes importantes para la obtención de energía, puesto que ambos son metabolizados hasta la formación de piruvato (**Fig. 3**).

#### 2.2.3.3.1. Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH)

En la vía metabólica de la ADH participan tres enzimas que transforman a la arginina en ornitina, amoníaco,  $\text{CO}_2$  y ATP (**Fig. 4**); estas enzimas son la arginina deiminasa (ADI), ornitina carbamoiltransferasa (OTC) y la carbamato cinasa (CK). El metabolismo de la arginina, por la vía de la arginina dehidrolasa tiene un papel muy importante y significativo en la producción de energía, ya que se producen de 7-8 veces más energía por esta vía que por el metabolismo de la glucosa [26].



**Figura 4.** Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH).

#### 2.2.3.3.2. Arginina deiminasa (ADI)

La ADI es la primera enzima en la vía de la ADH y cataliza la conversión de arginina a citrulina con liberación de amoníaco. Este tipo de enzima pertenece a la superfamilia de enzimas que metabolizan arginina a sus análogos *N*-metilados. Es una enzima de 580 aminoácidos (aa), estudios de electroforesis y de espectrometría de masas indican que tiene un peso de 64.2 kDa y se presenta en forma de dímero [27, 28]. El alineamiento de secuencias con otras enzimas reportadas muestra que el sitio catalítico se encuentra altamente conservado, en donde los aminoácidos del sitio catalítico se identifican como Cys424, His280, Asp175, Glu226 y Asp282 [29]. Hasta la actualidad no se ha logrado obtener una estructura cristalográfica de la enzima. Sin embargo, la ADI y la CK son enzimas que no se encuentran en el humano, por lo que se han propuesto como potenciales blancos para el diseño de fármacos [41].

La ADI juega un papel muy importante en la supervivencia de *G. intestinalis*, ya que al inducir silenciamiento del gen de esta enzima, se ha demostrado experimentalmente, que los trofozoítos no logran desarrollarse [30]. Otras de las funciones vitales que presenta esta enzima para la sobrevivencia del protozoo en el hospedero, además de la importancia que presenta la ADI en la obtención de energía, es también su función sobre la evasión del sistema inmune del hospedero. *G. intestinalis* libera ADI y otras enzimas (OTC, enolasa) en las células epiteliales del hospedero, disminuyendo significativamente la producción de óxido nítrico (NO), el cual se encuentra involucrado como segundo mensajero en la activación de la respuesta inmune innata del hospedero. A su vez también permite la evasión del sistema inmune humoral del hospedero, ya que se participa en procesos de variación antigénica; modificando la cola hidrofóbica de proteínas de superficie alterando así su estructura, haciéndolas resistentes a enzimas proteolíticas e impidiendo que los anticuerpos se unan a ellas [31].

### 2.3. Tratamiento

Los tratamientos farmacológicos recomendados actualmente para los protozoos intestinales en niños y adultos se presentan en la **Tabla 1**. Los fármacos de elección para el tratamiento de giardiasis son los nitroimidazoles (MTZ y Tinidazol) (**Tabla 2**). El MTZ fue el primer fármaco dentro de este grupo empleado para el tratamiento de la giardiasis [32], y desde su introducción al mercado en 1962, se convirtió en el tratamiento de elección para la terapia contra esta protozoosis. Entre los problemas más comunes que presentan estos fármacos son los efectos secundarios y la aparición de cepas resistentes [33].

La nitazoxanida es uno de los fármacos más recientes en el mercado, del tipo nitrotiazol benzamida con una alta efectividad contra infecciones intestinales causadas por protozoarios y helmintos, y aprobado por la FDA para el tratamiento de los síntomas causados por giardiasis. El tinidazol otro fármaco del grupo de los nitroimidazoles, por otro lado presenta una actividad similar al metronidazol; sin embargo, presenta biodisponibilidad y tiempo de vida media mejor que el metronidazol, por lo que puede ser administrado en una sola dosis, su inconveniente se presenta en su disponibilidad al no ser aprobado por la FDA.

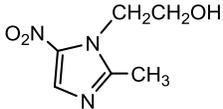
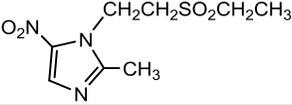
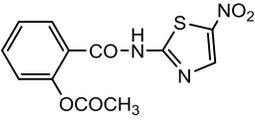
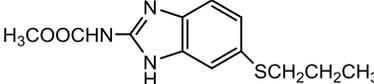
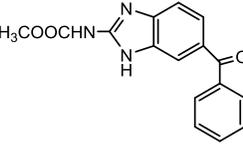
**Tabla 1.** Tratamiento farmacológico empleado en giardiasis [34]

Fármaco	Efectos adversos	Comentarios
<b>Metronidazol</b>	Náuseas, vómito, dolor abdominal, sabor metálico, neuropatía periférica.	Eficacia de 80-95%, 10% de cepas resistentes.
<b>Tinidazol</b>	Vértigo, náuseas, vómito, dolor abdominal.	Eficacia de 85-92%, no aprobado por FDA.
<b>Albendazol</b>	Anorexia y constipación, neutropenia reversible.	Eficacia de 24-81%, pero baja biodisponibilidad oral.
<b>Nitazoxanida</b>	Náuseas, diarrea, dolor de cabeza.	Eficacia de 76-80%, uso prolongado (12-47 meses).
<b>Furazolidona</b>	Náuseas, vómito, dolor de cabeza, coloración café en orina.	Eficacia de 80-95%, aprobado por FDA.
<b>Quinacrina</b>	Ictericia, sabor amargo, alteraciones neuropsiquiátricas, convulsiones.	Eficacia de 80-95%,

Por otro lado el ABZ y MTZ son dos fármacos bencimidazólicos empleados como antihelmínticos y a partir de la década de los 90 se propusieron para el tratamiento de la giardiasis. Los bencimidazoles se introdujeron al mercado por su amplio espectro, baja toxicidad y eficacia. El primer bencimidazol que se introdujo para infecciones en humanos fue el tiabendazol en 1961, efectivo pero con diversos efectos adversos, y baja biodisponibilidad ya que se metaboliza rápidamente por hidroxilación en la posición 5 del núcleo de bencimidazol, reduciendo así la efectividad de este fármaco [35]. El mecanismo de acción por el cuál actúan los bencimidazoles es inhibiendo la polimerización de la tubulina, generando pérdida de funciones enzimáticas y de movimiento llevando así al parásito a la muerte; impidiendo la toma de glucosa exógena evitando así el consumo de ATP, o inhibiendo enzimas involucradas en la formación de ATP, evitando así su

generación. Se ha observado que la interferencia de enzimas en las vías metabólicas de los parásitos minimiza el desarrollo de organismos resistentes [36].

**Tabla 2.** Estructura de fármacos comúnmente empleados en el tratamiento de enfermedades parasitarias [37]

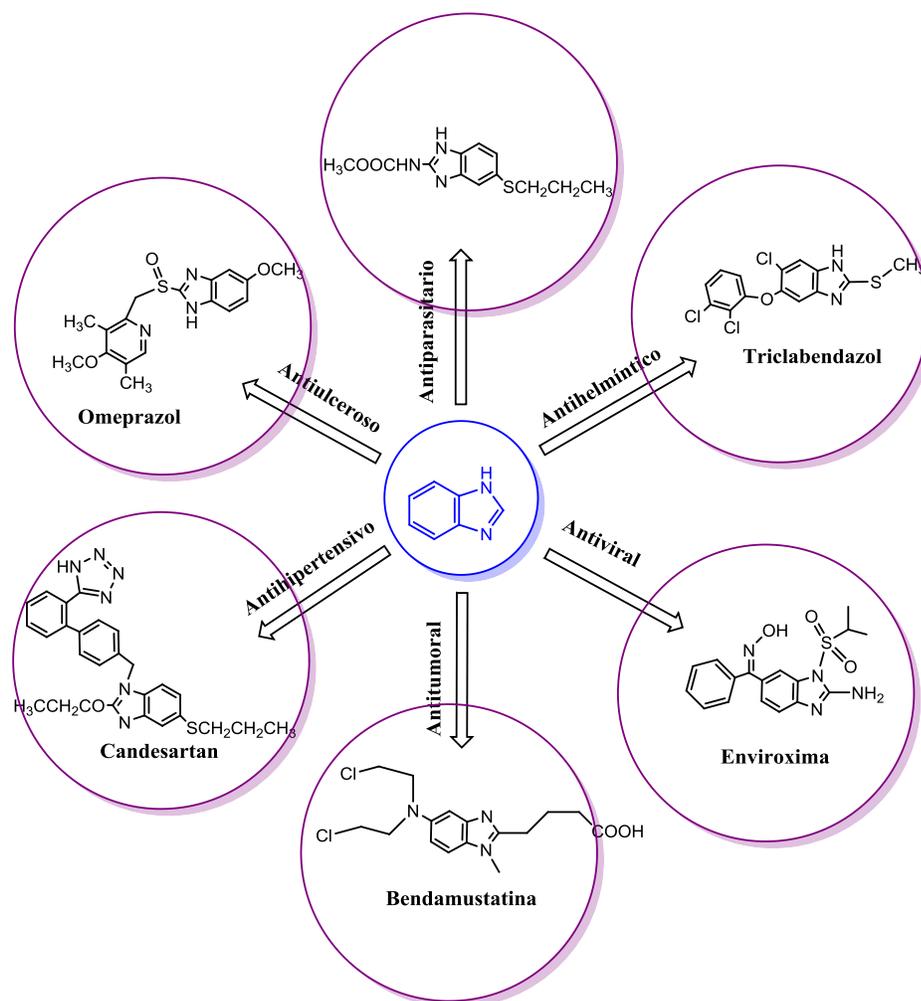
Estructura	Compuesto
	<b>Metronidazol</b>
	<b>Tinidazol</b>
	<b>Nitazoxanida</b>
	<b>Albendazol</b>
	<b>Mebendazol</b>

### 2.3.1. Inconvenientes de los tratamientos empleados en giardiasis

Hasta el presente, la única posibilidad de controlar la giardiasis es utilizando fármacos cuyos principios activos no son altamente eficaces, pueden presentar un gran número de efectos adversos y ya se han registrado cepas de giardia resistentes a los mismos, como ya se ha mencionado [38]. En este contexto se debe tomar en cuenta que a pesar de que los nitroimidazoles han sido la familia de fármacos de elección para el tratamiento de los protozoos anaeróbicos, *G. intestinalis* es menos susceptible a otros fármacos antiparasitarios, tales como furazolidona, albendazol y quinacrina [39]. Si bien estos compuestos son efectivos, la baja solubilidad y rápido metabolismo limitan esta efectividad, haciendo que las dosis sean altas y por tiempos prolongados (**Tabla 1**). Otro de los inconvenientes en el tratamiento de las protozoosis más frecuentes se ha limitado al uso de los ya existentes desde hace más de 40 años en el mercado [40].

## 2.4. Importancia del núcleo de bencimidazol y su actividad antiprotozoaria

El núcleo de bencimidazol se considera una molécula privilegiada ya que se encuentra en compuestos con diversas actividades biológicas, dando origen a un gran número de fármacos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antihipertensivo y antiparasitarias (Fig. 5).



**Figura 5.** Bencimidazol como molécula privilegiada.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria ha llevado al descubrimiento de un gran número de moléculas orgánicas, entre ellas destacan los derivados de bencimidazol. El núcleo de bencimidazol se considera una estructura privilegiada, al ser parte de la estructura de la vitamina B12, una biomolécula; con lo cual se infiere que los derivados de bencimidazol podrían ser bien tolerados y seguros. Otra de las ventajas de la estructura del bencimidazol, es que permite la múltiple sustitución con lo que se puede obtener un sin número de derivados de estructura variada,

que permite diseñar moléculas con características que favorezcan un determinado efecto a nivel biológico. Bajo estas premisas nuestro grupo de investigación ha sintetizado y evaluado biológicamente más de 300 derivados del bencimidazol con el propósito de encontrar los requerimientos básicos para optimizar la actividad antiprotozoaria [41]. De los diferentes derivados de bencimidazol se sintetizaron diversos grupos de compuestos que han presentado actividad giardicida *in vitro* superior o similar a los fármacos de elección.

### 2.5. Derivados bencimidazólicos a partir del principio de hibridación molecular

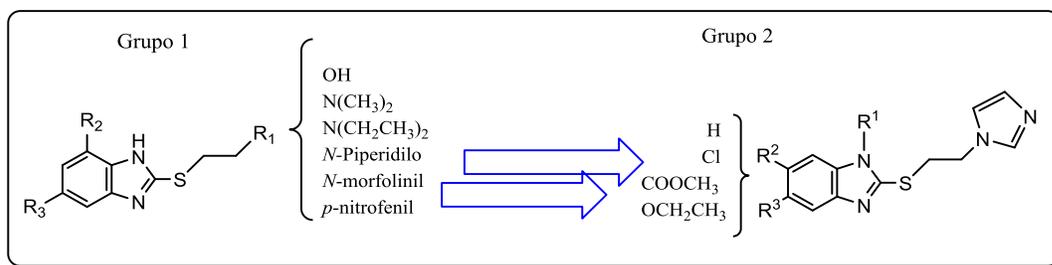
A partir de resultados de actividad giardicida obtenidos por la Facultad de Química UNAM y el Centro Médico Nacional del IMSS, se sintetizó una nueva generación de derivados mediante el principio de hibridación molecular, en la cual se asoció la estructura de la 2-(metiltio)bencimidazol-5(6)-sustituidos con el de la nitazoxanida [42]. En general, los compuestos presentaron buenas actividades contra *G. intestinalis* (0.005-1.095  $\mu\text{M}$ ). De esta serie destacaron los derivados con metiltio en posición 2 y la carboxamida del 5-nitrotiazol y cloro en las posiciones 5(6), en particular 5-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(5-nitro-1,2-tiazol-2-il)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida (**CMC20**).

Al compuesto **CMC20** se le realizaron estudios de proteómica con diferentes cepas de *G. intestinalis*, lo cual permitió identificar la disminución de la expresión, a nivel postraducciona, de las proteínas  $\beta$ -tubulina, enolasa, ADI, entre otras. Lo que sugiere que el compuesto ejerce su acción al unirse a estas proteínas, lo que resulta en la muerte del protozooario por falta de soporte estructural y/u obtención de energía [41].

### 2.6. Derivados bencimidazólicos 2-alkiltio sustituidos en posición 5(6)

Con base en el grupo de bencimidazoles 2-alkiltio (grupo 1) sintetizados en nuestro grupo de investigación y otros en donde se colocan los sustituyentes cloro, éster metílico y etoxilo, se diseñó y sintetizó una serie de compuestos (grupo 2, **Fig 6**) con un grupo 2-(1*H*-imidazol-1-il)etilsulfanilo en la posición 2 del núcleo de bencimidazol. Varios de los compuestos de esta serie mostraron actividades giardicidas superiores a la de los derivados a partir de los cuales fueron diseñados (0.008-0.117  $\mu\text{M}$ , **Tabla 3**) [43].

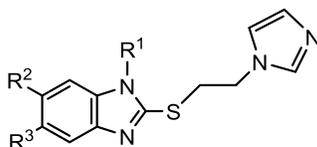
En la actualidad en nuestro grupo de investigación se están sintetizando nuevas moléculas que sustituyan el grupo imidazol por quinoxalinonas y piridinas entre otros; este trabajo contribuye entonces en enriquecer en particular este grupo de bencimidazoles al incluir ahora tres nuevos análogos del guanidino (**ACN 2,3 y 4**).



**Figura 6.** Grupo 2 de benzimidazoles sintetizado por nuestro grupo de investigación.

Los datos mostrados en la **Tabla 3**, fueron muy relevantes para este proyecto. Por ejemplo se debe hacer notar que los compuestos 1-metilados fueron más activos que sus análogos 1H, por ello se eligió sintetizar los compuestos metilados. La afirmación anterior puede verse en el caso de los compuestos I y II, en donde el aumento de potencia fue muy notorio. Por otra parte la presencia de sustituyentes tales como cloro y éster metílico en el anillo aromático, también mejoraron notablemente los resultados de actividad giardicida; como fue en el caso de los compuestos I y X. La presencia de los tres sustituyentes fue relevante para aumentar la actividad *in vitro* contra *G. intestinalis* en este grupo de compuestos [46].

**Tabla 3.** Estructura y actividad biológica de algunos derivados que poseen el grupo 2-(1H-imidazol-1-il)etilsulfanilo [43]



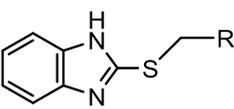
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> (μM) <i>G. intestinalis</i>
<b>I</b>	H	H	H	0.1167±0.0029
<b>II</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	0.0871±0.0082
<b>III</b>	CH <sub>3</sub>	H	Cl	0.0626±0.0039
<b>IV</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	H	0.0666±0.0024
<b>V</b>	H	COOCH <sub>3</sub>	H	0.0777±0.0023
<b>VI</b>	H	COOCH <sub>3</sub>	Cl	0.0549±0.0024
<b>VII</b>	CH <sub>3</sub>	H	COOCH <sub>3</sub>	0.0569±0.0045
<b>VIII</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	COOCH <sub>3</sub>	0.0556±0.0020
<b>IX</b>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H	0.0616±0.0067
<b>X</b>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	Cl	0.0442±0.0020

## 2.7. Enzimas de la Vía metabólica de la ADH como potenciales blancos terapéuticos

En nuestro grupo de investigación ya se ha estudiado a la ADI como un blanco potencial para el diseño de moléculas que impidan el desarrollo del protozoario *G. intestinalis*, ya que

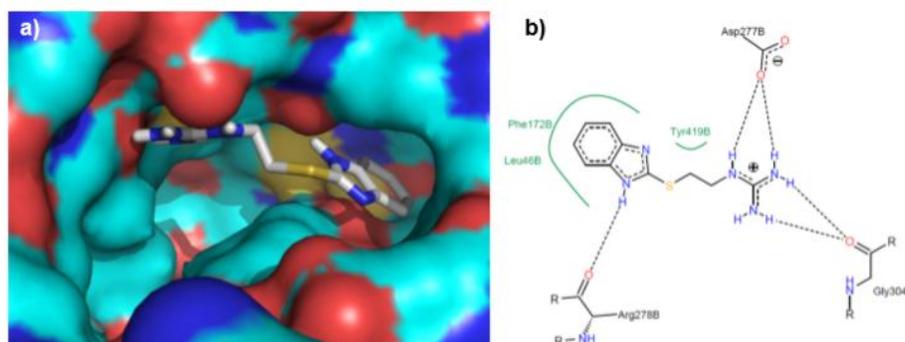
participa en procesos fundamentales, tales como la obtención de energía, evasión del sistema inmune y de enquistamiento. Además de que esta enzima es exclusiva de *Giardia*, disminuyendo así las posibilidades de toxicidad y efectos adversos en el ser humano. Por ende la enzima ADI muestra ser una alternativa efectiva para el diseño de fármacos giardicidas [44].

**Tabla 4.** Valores de energías de unión obtenidos a partir del docking de los compuestos diseñados como inhibidores de ADI de *G. intestinalis* [44]



Compuesto	R	Energía de unión Kcal/mol
a	R= CH <sub>2</sub> CN	-6.13
b	R= CH=N-NH-C(=O)NH <sub>2</sub> )	-6.52
c	R= CH <sub>2</sub> -NH-C(=NH) NH <sub>2</sub> )	-7.81

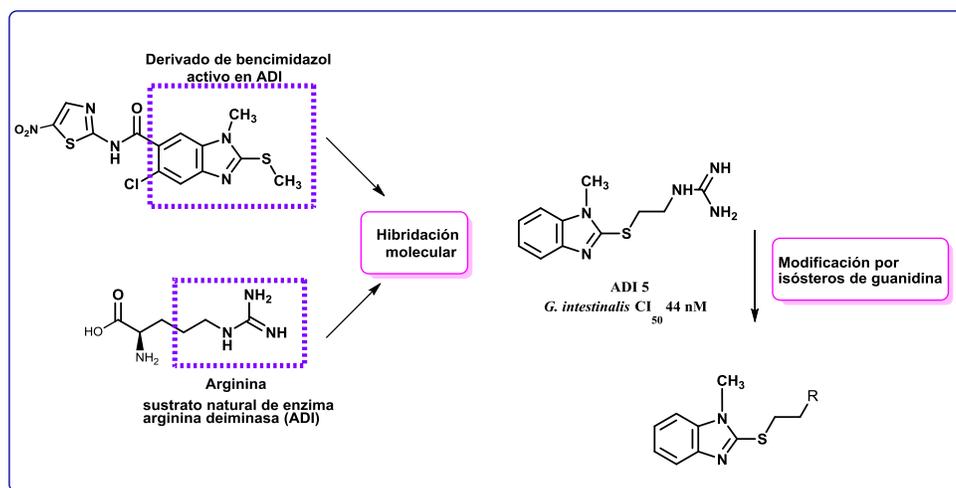
Dado que la estructura tridimensional de la ADI no ha sido co-cristalizada por ningún método experimental o teórico, Trejo Soto [44] realizó el estudio de modelado por homología para determinarla y además realizó el diseño de algunos inhibidores. En la **Tabla 4** se muestran algunos de los valores de energía de unión obtenidos para algunos de ellos.



**Figura 7.** a) Modo de unión del compuesto (c) en el sitio activo de ADI y b) residuos que participan en la interacción.

Los resultados obtenidos mostraron el modo de unión entre el compuesto (c) y la enzima ADI modelada, así como la interacción entre ellos. Este compuesto presentó la mejor energía de unión, como se esperaba, debido a su semejanza con el ligando natural de la enzima ADI, arginina. En la **Figura 7** se muestra, como este compuesto se une a la enzima ADI por la formación de puentes de

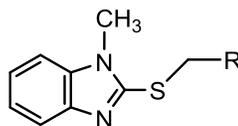
hidrógeno entre el grupo guanidino y los residuos Glu43 y Glu48; mientras que el anillo de bencimidazol se introduce en la cavidad del sitio activo.



**Figura 8.** Diseño de compuestos tomando la cadena lateral de la arginina y el núcleo de bencimidazol.

Uno de los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación a partir del diseño de moléculas que presentarán una interacción con la ADI, como lo hace su sustrato natural (arginina), fue el de Martínez Córdoba [44]. En ésta se sintetizaron compuestos diseñados en el trabajo de Trejo Soto [45], a partir de hibridación molecular, del compuesto **CMC20** (**Fig. 8**) y el grupo guanidino del sustrato natural (arginina) reconocido por la enzima. Obteniendo de esta manera la serie de compuestos **ADI 6-4**, los cuales fueron evaluados *in vitro* en un primer estudio sobre trofozoítos de *G. intestinalis* mostrando buena actividad giardicida, superando incluso a los compuestos de referencia (**Tabla 5**)

**Tabla 5.** Actividad giardicida de compuestos sintetizados como inhibidores de ADI de *G. intestinalis*



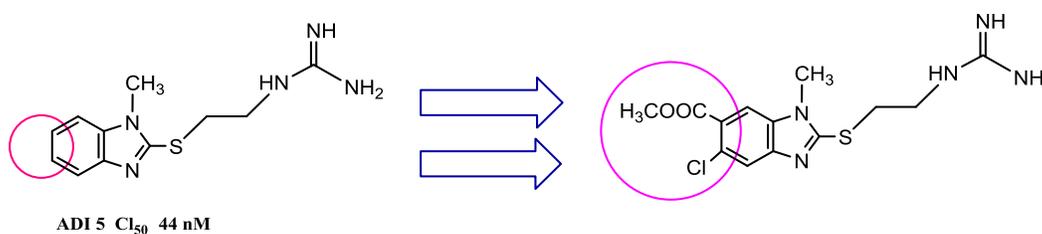
Compuesto	R	CI <sub>50</sub> (μM)
Metronidazol		1.22±1.75
Albendazol		0.037±0.003
<b>ADI 6</b>	R= CH <sub>2</sub> CN *	0.039±0.003
<b>ADI 4</b>	R= CH=N-NH-C(=O)NH <sub>2</sub> )	0.058±0.003
<b>ADI 5</b>	R= CH <sub>2</sub> -NH-C(=NH)NH <sub>2</sub> )	0.044±0.008

\*Producto obtenido en posición 3 del bencimidazol.

### 3. Planteamiento del problema

En la actualidad el tratamiento de la giardiasis es con metronidazol, otros nitroderivados azólicos y el albendazol; sin embargo, los efectos secundarios, y la existencia de cepas resistentes pone de manifiesto la necesidad de contar con nuevos fármacos giardicidas, más potentes y seguros, menos tóxicos y económicos, para no depender de los ya existentes.

Es debido a ello que en nuestro grupo de investigación se han sintetizado, evaluado y generado una base de datos con el propósito de encontrar los requerimientos básicos para optimizar la actividad antiprotozoaria [41]. De los diferentes derivados de bencimidazol que se han sintetizado en nuestro grupo se encuentran compuestos con actividad giardicida *in vitro* superior o similar a los fármacos de elección. De entre ellos surgió un nuevo grupo de bencimidazoles diseñados por acoplamiento molecular como inhibidores de la enzima ADI de *G. intestinalis* [44].



De esta manera, el diseño de moléculas con interacción en la ADI, llevó a la síntesis de compuestos híbridos con el grupo guanidino del sustrato natural (arginina) reconocido por la enzima, y el núcleo del bencimidazol. Estos compuestos fueron evaluados *in vitro* en un primer estudio sobre trofozoítos de *G. intestinalis*; de estos resultados se encontró que los compuestos más activos fueron **ADI 4-6 (Tabla 5)**.

Con base en los resultados biológicos *in vitro* obtenidos y en búsqueda de optimizar la actividad para la obtención de compuestos más activos; en este trabajo se planteó sintetizar tres compuestos análogos del guanidino y colocar en la posición 6 y 5 del núcleo de bencimidazol sustituyentes éster metílico y cloro respectivamente; los cuales fueron considerados tomando en cuenta que las sustituciones en posición 6 favorecen la actividad contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis* [42]. Lo anterior con la finalidad de comparar su efecto en la actividad giardicida frente a los análogos no sustituidos en las mismas posiciones. Y por otra parte disminuir la susceptibilidad de estas posiciones a la inactivación metabólica.

#### **4. Justificación**

En este trabajo se espera enriquecer la base de datos de derivados de bencimidazol obtenidos a partir de hibridación molecular entre el bencimidazol y grupos alquiltio; específicamente al grupo obtenido por acoplamiento molecular como inhibidores de la enzima ADI. Con respecto a la sustitución en las posiciones 5(6) del núcleo de bencimidazol; se había propuesto ya en el grupo de investigación colocar diferentes grupos funcionales en las posiciones 5 y/o 6 del núcleo del bencimidazol, tales como cloro, éster y/o etoxilo, para evitar o retardar el metabolismo de los compuestos bencimidazólicos. Anticipando de esta forma el aumento de la actividad de los compuestos [43]. Sin embargo, debido a que aún es poca la información sobre el efecto de sustituyentes en estas posiciones, es importante generar nuevos derivados y enriquecer la base de datos del grupo de investigación.

#### **5. Hipótesis**

De acuerdo a resultados de actividad giardicida obtenidos por nuestro grupo de investigación a partir de la sustitución con grupos éster y/o cloro en las posiciones 5(6) del núcleo de bencimidazol y grupos alquiltio en la posición 2, se espera que la actividad de los análogos del grupo guanidino de los compuestos sintetizados con éster y cloro en las posiciones 6 y 5 respectivamente, presenten mayor actividad giardicida que sus análogos desprotegidos en las posiciones mencionadas.

#### **6. Objetivo general**

Sintetizar y evaluar *in vitro* la actividad giardicida de cuatro nuevos derivados de 1-metil-1*H*-bencimidazol, sustituidos en posición 2 con elementos análogos presentes en el sustrato natural de la enzima ADI, y uno en posición 1 con un sustituyente alquilnitrito. Protegidos en las posiciones 6 y 5 del núcleo de bencimidazol con éster y cloro respectivamente.

##### **6.1. Objetivos particulares**

- Establecer una ruta de síntesis adecuada para sintetizar los compuestos finales a partir de un precursor común
- Caracterizar los compuestos sintetizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad *in vitro* mediante el método de subcultivos sobre trofozoítos de *G. intestinalis* y/o de *T. vaginalis*.

- Comparar el efecto de la sustitución en 5 y 6 frente a los compuestos no sustituidos análogos de guanidina, sobre la actividad giardicida *in vitro*.

## 7. Metodología

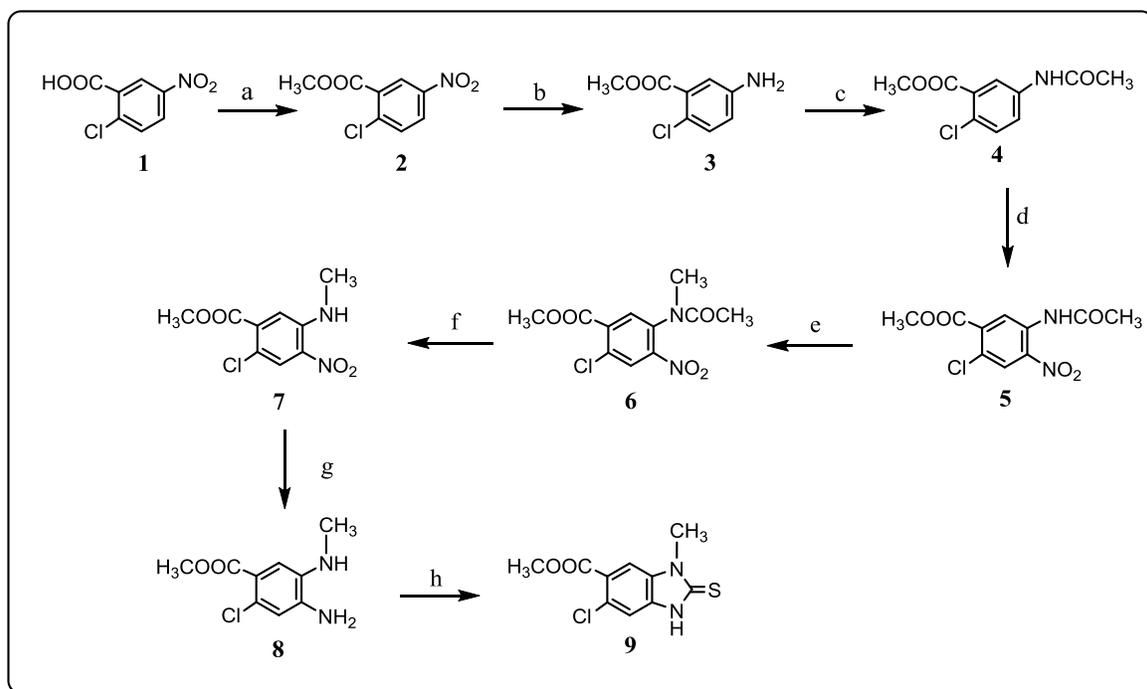
El trabajo realizado en esta tesis se divide en dos partes. En la primera, la química, se presenta la metodología sintética empleada para preparar los cuatro compuestos bencimidazólicos finales (**ACN 1-4**), con sustituyentes análogos de guanidina. En la segunda, la biológica, se presenta la descripción de los ensayos de actividad biológica *in vitro* contra trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* a la que se sometieron los compuestos sintetizados.

### 7.1.1. Metodología de síntesis

La síntesis del núcleo de bencimidazol para dar el intermediario común (**8**) se presenta en el **Esquema 1**. A su vez, la síntesis de los compuestos finales **ACN 1-4** se presenta en el **Esquema 2**. A continuación se describen los estudios de síntesis realizados.

### 7.1.2. 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**)

Se partió del ácido-2-cloro-5-nitrobenzoico comercial (**1**) el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**2**). Éste se sometió a una reducción catalítica empleado hidrógeno a presión de 60 lb/in<sup>2</sup> y Ni-Raney como catalizador en metanol. Se obtuvo el 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**), el cual se trató con anhídrido acético y se obtuvo el 5-(acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (**4**); seguidamente se realizó una reacción de nitración empleando mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas (0-5 °C), con lo cual se obtuvo una mezcla de productos nitrados, el principal, 5-(acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**5**), mezclado en poca cantidad con su isómero de posición, el 3-(acetilamino)-6-cloro-2-nitrobenzoato de metilo, el cual se eliminó fácilmente por lavados con metanol frío. La *N*-metilación de **5** con sulfato de dimetilo en medio básico llevó a la obtención de 5-[acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**6**), que por hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH dio el 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**7**). La reducción catalítica del grupo nitro con H<sub>2</sub>/Ni-Raney permitió obtener el 4-amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo (**8**). Este compuesto, se trató inmediatamente con disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) en medio básico y se obtuvo el precursor de los compuestos finales, el 5-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**9**).



**Esquema 1.** Reactivos y condiciones. (a)  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetona/agua; (b)  $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$ , MeOH; (c)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{H}^+$ ; (d)  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0-5 °C; (e)  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ , NaOH, diglima; (f)  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ , reflujo; (g)  $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$ , MeOH; (h)  $\text{CS}_2$ , KOH, 60 °C.

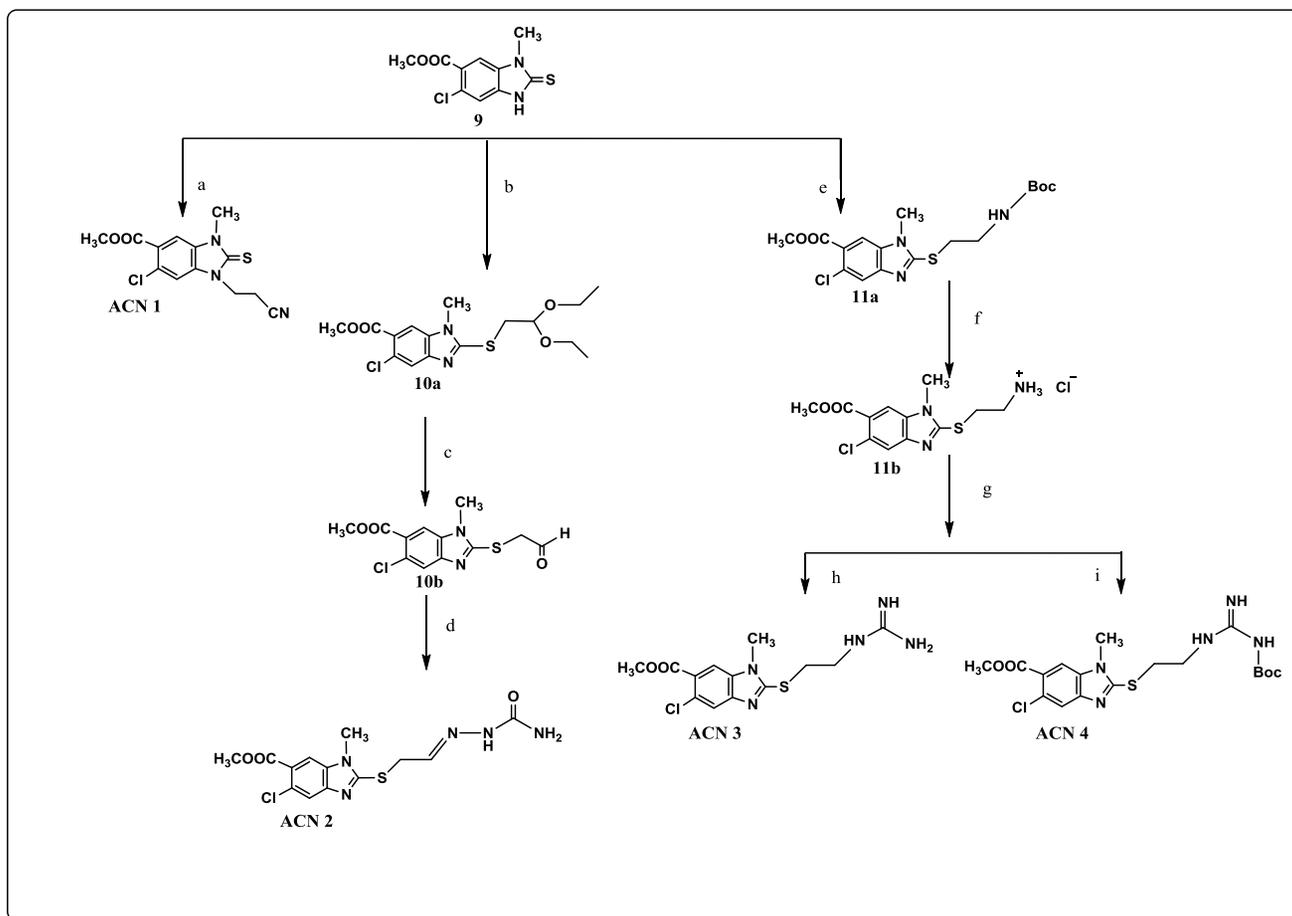
### 7.1.3. Síntesis de compuestos finales (ACN 1-4)

El intermediario **9** se hizo reaccionar con acrilonitrilo empleando como disolvente agua, lo que llevó a un solo producto de reacción, el ciano derivado **ACN 1**.

Para la síntesis de **ACN 2**, el compuesto **9** se trató con el dietil acetal del bromoacetaldehído en DMF a temperatura ambiente para formar el acetal **10a**, mediante *S*-alquilación a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica. Posteriormente se realizó una hidrólisis del acetal en medio ácido produciendo el aldehído intermediario **10b**. Éste se hizo reaccionar con clorhidrato de semicarbazida en medio básico y se obtuvo el derivado de semicarbazona **ACN 2**.

Por último, para sintetizar los compuestos **ACN 3** y **ACN 4**, el compuesto **9** se trató con la 2-bromoetilamina, previamente protegida con Boc, para obtener el intermediario **11a**. La reacción se llevó a cabo empleando DMF como disolvente, la base por otro lado se disolvió previamente en agua para ayudar a su solubilidad en la mezcla de reacción. Para sintetizar el intermediario 2-alquilamina sustituido **11b** se realizó la desprotección del grupo Boc a temperatura ambiente empleando una solución 2N de  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  en dioxano; el producto obtenido se extrajo en solución

básica para poder obtener la amina libre. El tratamiento de éste con 1*H*-pirazol-1-carboxamida y *N,N'*-di-boc-1*H*-pirazol-1-carboxamida en acetonitrilo a 60 °C llevó a la formación de dos productos de 2-alkilguanidina libre (**ACN 3**) y protegido (**ACN 4**).



**Esquema 2.** Reactivos y condiciones. (a) acrilonitrilo/agua, KOH, 0 °, t.a; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dietil acetal del bromoacetaldehído, DMF, t.a; (c) HCl/dioxano, t.a, 3 h; d) semicarbazida, NaHCO<sub>3</sub>, etanol, t.a; (e) (2-bromoetil)carbamato de *tert*-butilo, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona/agua, t.a; (f) HCl/dioxano, t.a, 6 h; (g) 1*H*-pirazol-1-carboxamidina, Et<sub>3</sub>N, MeCN, 60 °C, reflujo; h) *N,N'*-di-boc-1*H*-pirazol-1-carboxamidina, Et<sub>3</sub>N, MeCN, 60 °C, 24 h.

## 7.2. Evaluación antiprotozoaria de los compuestos ACN 1-4

Se determinó la susceptibilidad *in vitro* de los protozoarios *G. intestinalis* y *T. vaginalis* a los compuestos ACN 1-4, por tratamiento de los trofozoítos de los parásitos con concentraciones crecientes del compuesto a evaluar; los fármacos de referencia utilizados fueron MTZ y ABZ, el experimento se realizó por triplicado siguiendo el método de subcultivos previamente reportado [33]. Los ensayos se realizaron en el Hospital de Pediatría en la Unidad de Investigación Médica en enfermedades infecciosas del IMSS Centro Médico Siglo XXI (UIMEIP-IMSS), bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

### 7.2.1. Medio de cultivo y protozoarios

Las cepas de los microorganismos utilizados en los ensayos fueron: *G. intestinalis* cepa IMSS 0989 y *T. vaginalis* cepa GT15. *T. vaginalis* se mantuvo en el medio de cultivo TYI-S-33, suplementado con 10% de suero de bovino. El protozoario *G. intestinalis* se cultivó en el medio TYI-S-33 modificado, complementado con suero de ternera al 10% (**Tabla 6**). Las cepas se mantuvieron en condiciones axénicas y para los ensayos se emplearon las de la fase logarítmica de crecimiento.

**Tabla 6.** Composición de los medios de cultivo utilizados en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* [34]

---

**Medio de cultivo TYI-S-33\* y TYI-S-33\*\*  
modificado para  
*T vaginalis* y *G.intestinalis***

---

1.0 g Fosfato de potasio dibásico  
0.6 g Fosfato de potasio monobásico  
2.0 g Cloruro de sodio  
20.0 g Peptona de caseína  
10.0 g Extracto de levadura  
10.0 g Glucosa  
10.0 g L-Cisteína  
0.20 g Ácido ascórbico  
1.0 ml Citrato férrico de amonio (28.2 mg/ml)

---

Cantidades calculadas para un volumen final de 880 mL, pH=6.8\*. Cantidades calculadas para un volumen final de 880 mL, pH=7.0\*\*.

### 7.2.2. Ensayos de susceptibilidad *in vitro*

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los protozoarios *G. intestinalis* y *T. vaginalis* a los compuestos ACN 1-4, se llevaron a cabo utilizando un método descrito previamente [33]. Se preparó un stock de cada compuesto a concentración de 10 mg/ml utilizando DMSO, a partir de éstos se realizaron diluciones a concentraciones de 0.005, 0.010, 0.050, 0.100 y 0.500 µg/mL utilizando el medio de cultivo correspondiente para cada protozoario. Se emplearon como

compuestos de referencia ABZ, MTZ; para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármaco utilizando DMSO. A cada tubo de concentración distinta del compuesto a probar se inocularon  $6 \times 10^3$  trofozoítos de *T. vaginalis*; para el caso de *G. intestinalis* se inocularon  $5 \times 10^4$  trofozoítos. Los tubos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h. Transcurrido este tiempo se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de cada tubo, se agregaron a tubos con 950  $\mu\text{L}$  de medio fresco y se incubaron nuevamente a las mismas condiciones.

Finalmente se contaron los protozoarios utilizando una cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de trofozoítos comparado con los tubos control. El porcentaje de inhibición calculado se transformó en unidades probit, las cuales se graficaron contra las concentraciones en unidades logarítmicas; la mejor línea recta se determinó por análisis de regresión lineal y se calcularon los valores de concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ). Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos dos veces.

## **8. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

El desarrollo experimental del presente trabajo comprende el procedimiento experimental seguido para la síntesis química de cuatro nuevos compuestos finales derivados de 5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo.

### **8.1. Síntesis química**

#### **8.1.1. Instrumentación**

El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria SCIENTECH SL600, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P. Para llevar a cabo las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo RCT con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy. La hidrogenación catalítica se realizó en un hidrogenador marca Parr Modelo 3926EG con 60 lb/in<sup>2</sup> y 80 °C como capacidad máxima, adaptado con un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney marca Aldrich. La determinación de los puntos de fusión (pf) se realizó en un aparato Buchi modelo R-215, y no están corregidos.

La determinación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química, UNAM. Para ello se empleó un espectrómetro Varian Modelo Utility Inova de 300 y 400 MHz, empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, utilizando como disolventes DMSO-d<sub>6</sub> o CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm. Los espectros de masas se determinaron en un equipo Agilent modelo 1100 series acoplado a un detector de trampa iónica de masas selectiva de baja resolución (ESI-MS). Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1600, por reflectancia ATR. Las señales se reportan en cm<sup>-1</sup>.

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

Las materias primas iniciales se adquirieron de la casa Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ninguna purificación. De la misma casa se adquirió el catalizador Ni-Raney suspendido en agua alcalina.

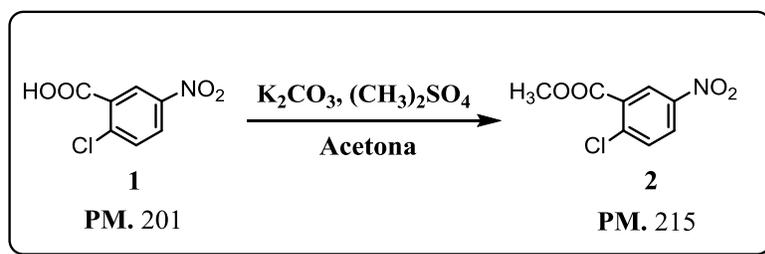
Los disolventes empleados para llevar a cabo las reacciones y las técnicas de purificación fueron del grado RA y QP.

EL avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se observó por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de vidrio cubiertas en gel de sílice 60 GF-254 (Merck), y se visualizaron con una lámpara UV modelo UVGL-25 a longitudes de onda 254/365 nm. Los sistemas de elución empleados en los sistemas cromatográficos se muestran en la Tabla 7:

**Tabla 7.** Sistemas de elución empleados en los sistemas cromatográfico

Sistema	Composición	Proporción
<b>I</b>	Tolueno-THF-Ácido acético	90:9:3
<b>II</b>	Hexano-Acetato de etilo	60:40
<b>III</b>	Hexano-cloroformo-Acetato de etilo	50:35:15
<b>IV</b>	Cloroformo-Metanol	80:20
<b>V</b>	Cloroformo-Metanol	90:10
<b>VI</b>	Cloroformo-Metanol	95:5
<b>VII</b>	Cloroformo-Metanol	99:1

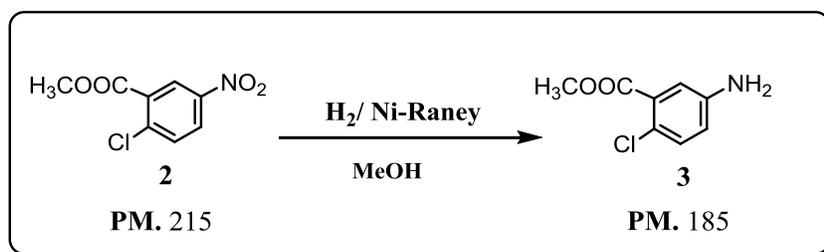
### 8.1.2. 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (2)



En un matraz de fondo redondo de dos bocas esmeriladas 24/40 de 500 mL, adaptado con un embudo de adición, se disolvieron 40 g (0.1985 mol) de ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**1**) en 150 mL de acetona. A continuación se adicionaron 26.29 (0.2183 mol, 1.1 eq.) de carbonato de potasio suspendidos en 20 mL de agua, en este punto la mezcla se mantuvo en agitación vigorosa durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se verificó que el pH fuera alcalino, por lo que se procedió a la adición mediante goteo continuo de 47.1 mL (0.2183 mol, 1.1 eq.) de sulfato de dimetilo. Terminada la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 60 °C durante

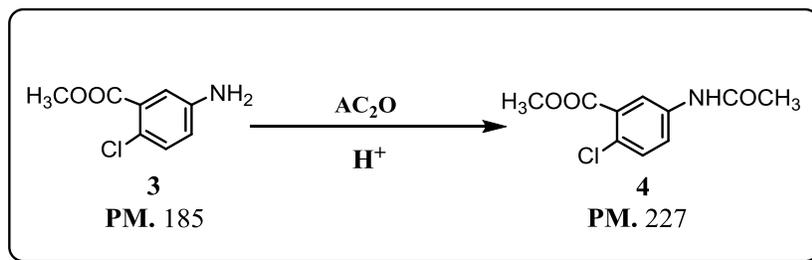
2 horas 30 minutos, tiempo en el cual la CCF reveló la ausencia de materia prima. El disolvente se concentró hasta una tercera parte del volumen inicial mediante destilación a presión reducida, empleando el rotaevaporador. Al residuo se le agregó agua con hielo, y se formó un sólido blanco, el cual se separó por filtración al vacío y lavó repetidamente con agua fría. Obteniendo finalmente 38.8 g (97%) de producto crudo. Una muestra de 5 g se recrystalizó de MeOH obteniendo 3.86 g (72%) de cristales blancos con Rf 0.80 (sistema V) y pf. 69.5-69.6 °C. **IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3120 y 3085 (C-H de aromático), 2959 (-CH<sub>3</sub>), 1729 (C=O), 1522 (Ar-NO<sub>2</sub>), 1249 (C-O-O). **Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 8.55 (d, *J*=2.7 Hz, 1H, H-6), 8.32 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.6, *J*<sub>2</sub>=2.2 Hz, 1H, H-4), 7.86 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, H-3), 3.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster). **RMN <sup>13</sup>C (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 164.9 (C=O de éster), 149.7 (C-5), 136.2 (C-2), 132.9 (C-1), 132.4 (C-3), 125.9 (C-4), 125.9 (C-6), 53.6 (CH<sub>3</sub> de éster). **EM ESI/ID (eV) *m/z* (% ar):** 215 (22) M<sup>+</sup>, 184(100) [M-31]<sup>+</sup>.

### 8.1.3. 5-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)



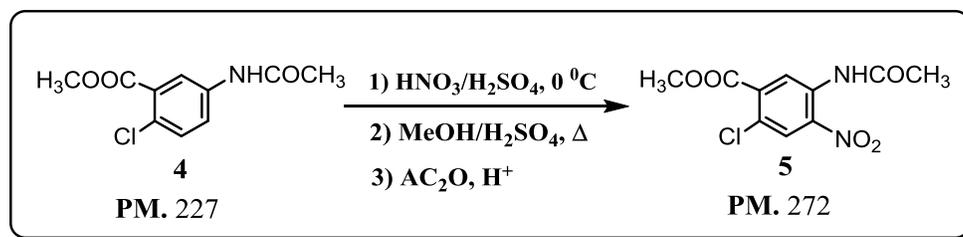
En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.116 mol) de 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**2**) en 150 mL de MeOH, en seguida se adicionaron 7.5 g (30% en peso) de catalizador Ni/Raney, previamente lavado con agua y posteriormente con MeOH. La botella de hidrogenación se colocó en el hidrogenador, se purgó por triplicado con hidrógeno; la reacción se llevó cabo a temperatura ambiente, con adición continua de hidrógeno. Después de 3 h y 30 minutos el consumo de hidrogeno cesó y la CCF mostró la ausencia de materia prima **2**. La mezcla de reacción se filtró en una cama de celita, posteriormente se concentró el disolvente mediante destilación reducida empleando el rotaevaporador. Se obtuvieron 23.64 g (95%) de un sólido café claro con Rf 0.27 (sistema II). **IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3426 y 3336 (Ar-NH<sub>2</sub>), 2951 (-CH<sub>3</sub>), 1702 (C=O de éster), 1264 (C-O-O de éster). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7.62 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H-3), 6.61 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H-6), 6.49 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.7, *J*<sub>2</sub>=2.4 Hz, 1H, H-4), 6.17 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster).

## 8.1.4. 5-(Acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (4)



En un vaso de precipitados de 1 L, provisto de termómetro, embudo de adición y baño de hielo, se adicionaron 40 mL de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente bajo agitación vigorosa se adicionaron 20 g (0.1077 mol) de 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (3) evitando que la temperatura excediera los 50 °C. Finalizada la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación vigorosa por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la CCF mostró una conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se agitó vigorosamente con una varilla de teflón y se formó un precipitado color hueso. El sólido se separó por filtración al vacío y se lavó repetidamente con agua fría, se obtuvieron 22.64 g (92.34%) de producto crudo. 1 g de producto se recrystalizó de MeOH/H<sub>2</sub>O, se obtuvieron 0.87 g (87.9%) de producto con un Rf 0.38 (sistema II) y pf. de 96.3-96.5 °C. **IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3260 (N-H), 3186 y 3106 (C-H aromático), 2292 y 2948 (-CH<sub>3</sub>), 1674 (C=O), 1250 (C-O-O de éster). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 10.39 (as, 1H, -NH), 7.93 (d, *J*=2 Hz, 1H, H-6), 7.86 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, H-3), 7.57 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.6, *J*<sub>2</sub>=2 Hz, 1H, H-4), 3.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de acetilo). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 169.7 (C=O de amida), 165.1 (C=O de éster), 143.8 (C-5), 133.6 (C-1), 132.9 (C-3), 123.3 (C-2), 120.4 (C-4), 117.7 (C-6), 52.6 (CH<sub>3</sub> de éster), 24.6 (CH<sub>3</sub> de acetilo). **EM ESI/ID (eV) *m/z* (% ar):** 227 M<sup>+</sup> (22), 154(100) [M-73]<sup>+</sup>.

## 8.1.5. 5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (5)

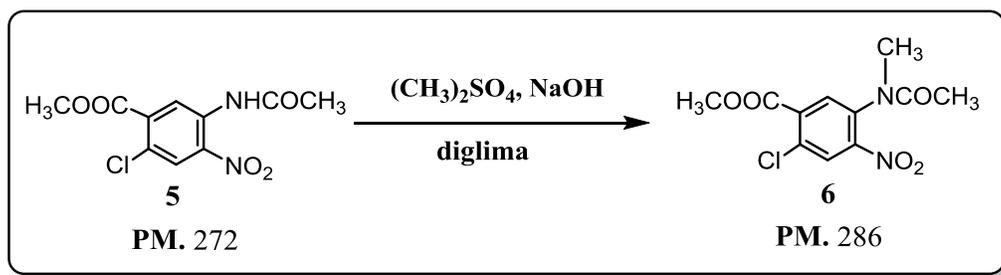


En un vaso de precipitados de 1 L, provisto de termómetro, embudo de adición y baño de hielo, se disolvieron 20 g (0.0890 mol) de 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**) en 40 mL de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo agitación vigorosa hasta obtener una solución homogénea, controlando la temperatura por debajo de 10 °C. Luego se adicionó gota a gota, 6.36 mL (0.1068 mol, 1.2 eq.) de ácido nítrico, manteniendo la temperatura entre 0-5 °C. Al término de la adición, 2 h 30 minutos, la CCF reveló la conversión total de la materia prima y la formación de dos productos en proporción 60:40 aproximadamente, presentando Rf 0.40 y Rf 0.51 (sistema II). La mezcla de reacción se vertió en 2 L de agua con hielo y se agitó vigorosamente. El sólido se separó por filtración al vacío, se lavó repetidamente con agua fría y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 17.9 g (89%) de un sólido amarillo claro.

La mezcla de productos se hidrolizó mediante la siguiente metodología. El producto crudo se colocó en un matraz redondo de 250 mL de una boca provisto de un condensador en posición de reflujo, se suspendió en 180 mL de MeOH a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron gota a gota, 1 mL de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación constante y atmosfera de nitrógeno durante 8 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se dejó enfriar al aire y se observó inmediatamente la formación de un precipitado en forma de agujas color naranja, el cual se filtró al vacío, se lavó con MeOH y posteriormente con agua fría, obteniéndose 5.5 g (25%) del producto 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo que presentó pf. de 181.6-184.1 °C. Al producto obtenido se le realizó una reacción de acetilación en anhídrido acético y catalizada por ácido para obtener finalmente 4.9 g (93%) del producto 5-(acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**5**) con un Rf 0.56 (sistema II) y pf. de 115.6-116.6 °C. El rendimiento global de los tres pasos de reacción para obtener al isómero (**5**) puro fue de 20%.

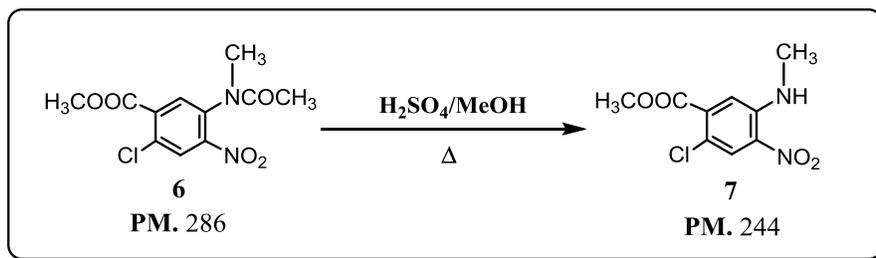
**IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3372 (N-H), 3121 y 3106 (C-H aromático), 2259 (-CH<sub>3</sub>), 1731 (C=O de éster), 1617 (C=O de amida), 1572 y 1339 (Ar-NO<sub>2</sub>), 1219 (C-O-O de éster). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 10.54 (sa, 1H, -NH), 8.43 (s, 1H, H-6), 8.04 (s, 1H, H-3), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster), 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de acetilo). **RMN <sup>13</sup>C (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 169.7 (C=O de amida), 165.1 (C=O de éster), 143.8 (C-5), 133.6 (C-1), 132.9 (C-3), 123.3 (C-2), 120.4 (C-4), 117.7 (C-6), 52.6 (CH<sub>3</sub> de éster), 33.5 (CH<sub>3</sub> de N-CH<sub>3</sub>), 24.6 (CH<sub>3</sub> de acetilo). **EM ESI/ID (eV) m/z (% ar):** 272 (8) M<sup>+</sup>, 230(97) [M-42]<sup>+</sup>, 199 (100) [M-73]<sup>+</sup>.

## 8.1.6. 5-[Acetil(metil)amino]-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (6)



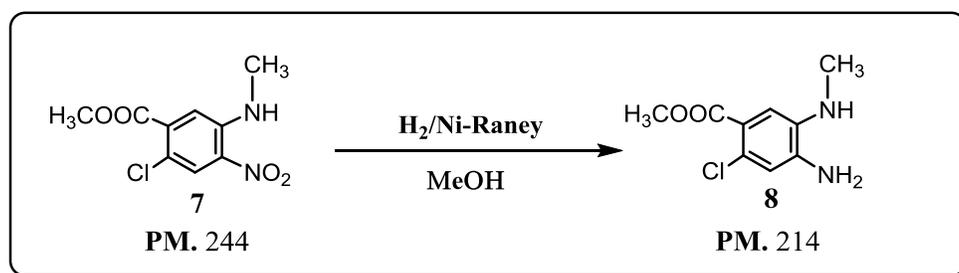
Se colocó 10.7 g (0.0247 mol) de **5** en un matraz redondo de 100 mL de dos bocas adaptado con baño de hielo, termómetro, embudo de adición, agitación magnética y atmosfera de nitrógeno. Se disolvió en 50 mL de diglima, se adicionó, mediante goteo continuo y agitación constante, 4.2 mL (0.016 mol, 1.5 eq.) de  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ . Posteriormente se goteó lentamente una solución concentrada de NaOH (3.2 g en 15 mL de agua) manteniendo la temperatura a 30 °C. Se monitoreo la reacción mediante CCF y al término de 50 minutos se comprobó la ausencia de materia prima. La mezcla de reacción se agregó a 100 mL de agua/hielo con lo que se formó un sólido amarillo, el cual se filtró al vacío y se lavó repetidas veces con agua fría obteniendo un rendimiento de 75%. El producto crudo obtenido se recrystalizó de hexano/AcOEt, los cristales obtenidos presentaron un Rf 0.21 (sistema II) y pf 116.7-118.7 °C. **IR**  $\text{cm}^{-1}$  (FT-ATR): 3051 y 3027 (C-H aromático), 2965 (-CH<sub>3</sub>), 1739 (C=O de éster), 1664 (C=O de amida), 1608 (-NO<sub>2</sub>), 1341 (C-O-O de éster). **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm: 8.43 (s, 1H, H-3), 8.04 (s, 1H, H-6), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster), 3.88 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de amida). **RMN** <sup>13</sup>C (TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm: 171.2 (C=O de amida), 164.1 (C=O de éster), 148.0 (C-4), 135.9 (C-5), 135.4 (C-1), 132.6 (C-6), 130.27 (C-2), 126.9 (C-6), 122.0 (C-3), 53.7 (CH<sub>3</sub> de éster), 33.6 (CH<sub>3</sub> de N-CH<sub>3</sub>), 36.4 (CH<sub>3</sub> de amida). **EM ESI/ID** (eV) *m/z* (% ar): 195 (76) [M-61]<sup>+</sup>, 244 (100) [M-42]<sup>+</sup>.

## 8.1.7. 2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (7)



En un matraz de fondo redondo de una boca de 100 mL, provisto de un condensador en posición de reflujo y agitación magnética, se suspendieron 10 g (0.0174 mol) de **6** en 50 mL de MeOH, posteriormente se adicionaron gota a gota 10 mL de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación constante durante 8 h. Transcurrido este tiempo la CCF mostró la conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, dando lugar a la formación de un precipitado rojo que posteriormente se separó por filtración al vacío, se lavó con 5 mL de MeOH y se dejó secar al aire. El producto crudo se recrystalizó de MeOH, obteniendo 8.2 g (82.3%) de cristales rojos con Rf 0.73 (sistema III) y pf 148.7-150.8 °C. **IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3389 (N-H), 3113 (C-H aromático), 2950 (-CH<sub>3</sub>), 1733 (C=O de éster), 1571 y 1396 (Ar-NO<sub>2</sub>), 1223 (C-O-O de éster). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 8.24 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H-3), 7.27 (s, 1H, H-6), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster), 2.93 (d, J=5.1 Hz, NH-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 163.7 (C=O de éster), 147.6 (C-5), 140.9 (C-1), 131.5 (C-4), 129.7 (C-2), 116.1 (C-3), 114.1 (C-6), 53.7 (CH<sub>3</sub> de éster), 33.6 (CH<sub>3</sub> de N-CH<sub>3</sub>). **EM ESI/ID (eV) m/z (% ar):** 246 (26) [M+2]<sup>+</sup>, 213 (37) [M-31]<sup>+</sup>.

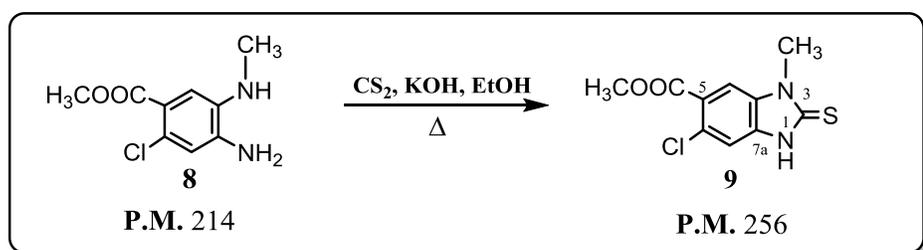
## 8.1.8. 4-Amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo (8)



En una botella de hidrogenación de 500 ml se suspendieron 5.14 g (0.021 mol) de 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**7**) en 50 ml de MeOH y en seguida se adicionaron 1.6 g (30% en peso) de Ni/Raney, previamente lavado con agua y MeOH. Una vez terminada la adición

del catalizador, la botella de hidrogenación se colocó en el hidrogenador, el sistema se purgó tres veces con H<sub>2</sub>. Durante 3 horas 30 minutos se llevó a cabo la adición de hidrógeno, a temperatura ambiente; después de este tiempo el consumo de hidrógeno cesó. La CCF demostró la conversión total de la materia prima (7), la mezcla de reacción se filtró en una cama de celita para retirar el catalizador y posteriormente se concentró el disolvente mediante el rotaevaporador. Se obtuvieron 4.20 g (81%) de un sólido café con un Rf 0.3 (sistema VI). El producto se utilizó en la siguiente reacción sin tratamiento posterior.

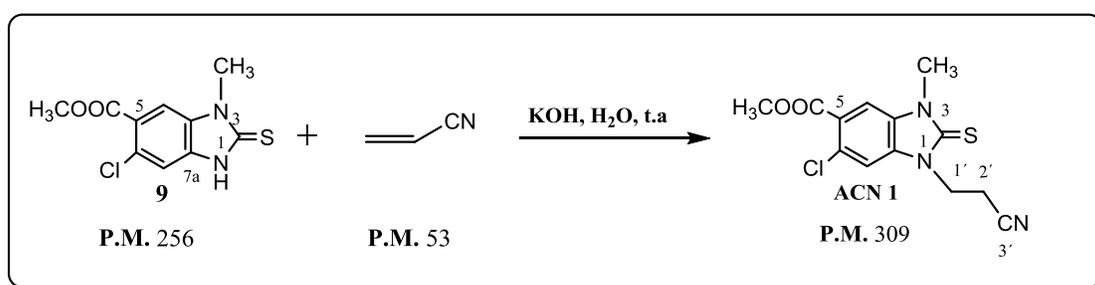
#### 8.1.9. 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)



En un matraz redondo de dos bocas de 250 mL, adaptado con agitador magnético, embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmósfera de N<sub>2</sub>, se disolvieron 4.31 g (0.020 mol) de 4-amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo (8) en 120 mL de EtOH a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó por goteo continuo una solución previamente preparada de etilxantato de potasio. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se calentó a una temperatura de 65 °C durante 6 horas, tiempo en el cual la CCF reveló la conversión total de la materia prima. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo, se colocó en agitación y luego se adicionó lentamente ácido acético glacial al 20%. El sólido formado se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar al aire. El producto crudo pesó 2.4 g (56%) como un sólido café claro que en CCF mostró una sola mancha con Rf 0.64 (sistema VII). Una muestra de 1 g se recrystalizó en EtOH-DMF obteniendo 0.61 g (61%) de cristales color beige con un pf. de 230.5-231.4 °C. **IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3242 (S-H), 3105 y 3056 (C-H de aromático), 2944 (-CH<sub>3</sub>), 1694 (C=O), 1243 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 13.10 (s, 1H, S-H), 7.66 (s, 1H, H-4), 7.56 (s, 1H, H-7), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub> de éster), 3.64 (s, 3H, C de N-CH<sub>3</sub>). **Espectro 2. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 171.5 (C-2), 165.7 (C=O de éster), 136.3 (C-7a), 129.1 (C-3a), 126.2 (C-6), 123.2 (C-5), 111.7 (C-7), 52.2 (CH<sub>3</sub> de éster), 30.1 (C de N-CH<sub>3</sub>). **EM ESI/ID (eV) m/z (% ar):** 225 (64) [M-31]<sup>+</sup>, 256 (100) M<sup>+</sup>, 258 (39) [M+2]<sup>+</sup>.

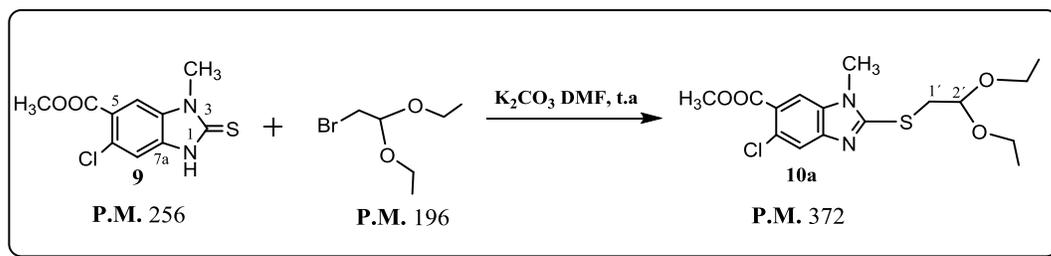
Preparación de etilxantato de potasio: En un matraz bola de 50 ml, adaptado con termómetro, embudo de adición y agitación magnética, se disolvieron 5.08 mL (0.043 mol, 2.3 eq.) de CS<sub>2</sub> en 10 ml de EtOH a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 4.72 g de KOH (0.040 mol, 2.1 eq.) disueltos en 5 ml de agua y se dejó en agitación constante durante 15 minutos; hasta que la reacción tomó un color naranja, se enfrió con un baño de hielo y se adicionó al medio de reacción para la formación de intermediario **9**.

**8.1.10. 6-Cloro-1-(2-cianoetil)-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (ACN 1)**



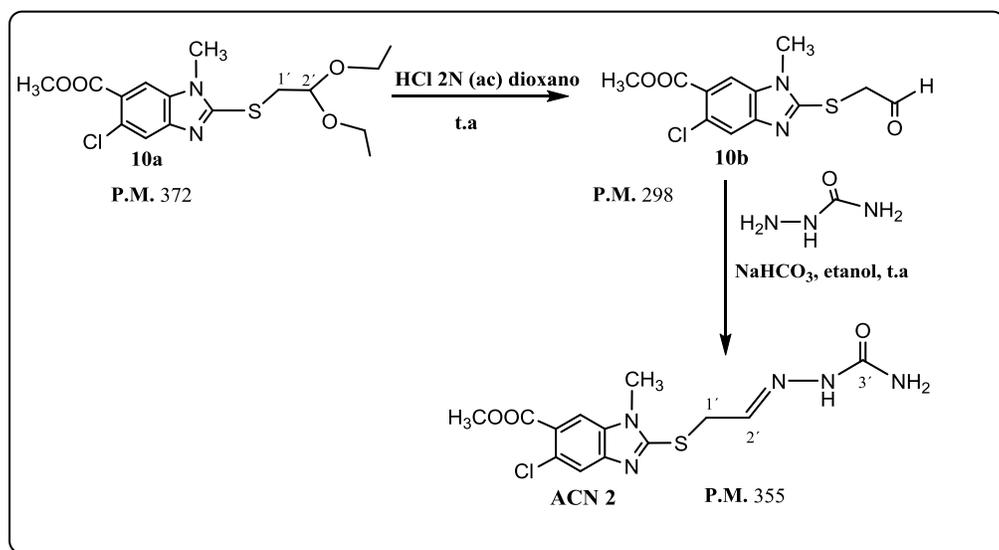
En un matraz de fondo redondo de una boca, provisto de agitación magnética, termómetro y adaptado con baño de hielo, se disolvieron 0.5 g (0.0195 mol) del intermediario **9** en 5 mL de agua. La solución se dejó en agitación por unos minutos y luego se adicionó, gota a gota 0.125 g (0.022 mol, 1.14 eq.) de KOH disueltos en 2 mL de agua, manteniendo la temperatura a 5 °C. La mezcla se agitó durante 1 h y se verificó que el pH fuera básico. Después se agregó lentamente 0.21 mL (0.021 mol, 1.5 eq) de acrilonitrilo y se retiró el baño de hielo. La reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante toda la noche; se monitoreó mediante CCF la cual reveló conversión total de la materia prima, y se observó la formación de un precipitado color blanco. La mezcla de reacción se filtró al vacío, se lavó con MeOH frío y se recrystalizó de AcOEt. Se obtuvieron 0.169 g (33%) de cristales blancos con pf. de 179.4-179.6 °C y Rf 0.72 (sistema VII). **Espectro 3. IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3374 (S-H), 3067 (C-H de aromático), 2928 (-CH<sub>3</sub>), 2248 (-CN), 1694 (C=O), 1261 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 8.09 (s, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-4), 4.60 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1'), 3.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.71 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.05 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-2'). **Espectro 5. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 171.1 (C-2), 165.7 (C=O de éster), 135.2 (C-7a), 130.1 (C-3a), 127.4 (C-5), 123.8 (C-6), 118.4 (C-3'), 112.4 (C-4), 112.0 (C-7), 53.0 (CH<sub>3</sub> de éster), 40.3 (C-1'), 31.6 (C de N-CH<sub>3</sub>), 16.04 (C-2'). **Espectro 6. EM ESI/ID (eV) *m/z* (% ar):** 332 (100) [M+23]<sup>+</sup>, 309 (32) M<sup>+</sup>, 310 (14) [M+1]<sup>+</sup>.

### 8.1.11. Síntesis de 5-Cloro-2-[(2,2-dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1H-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (10a)



En un matraz de fondo redondo de una boca de 10 mL, provisto de termómetro, agitación magnética, y adaptado con baño de hielo, se colocaron 2.5 g (0.0098 mol) de **9** en 15 mL de DMF. La mezcla se dejó en agitación por unos minutos y se adicionó gota a gota 1.9 g (0.0339 mol, 3.45 eq.) de  $K_2CO_3$  disueltos en 1 mL de agua, manteniendo la temperatura a 5 °C. La mezcla se dejó agitando durante 1 h y se verificó que el pH fuera alcalino. Luego se agregó lentamente 2.4 mL (0.0105 mol, 1.1 eq.) de dietil acetal del bromoacetaldehído, finalizada la adición se retiró el baño de hielo. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante toda la noche; se monitoreo mediante CCF la cual reveló conversión total de la materia prima, por lo que se retiró el disolvente de la mezcla de reacción mediante destilación empleando el rotaevaporador. Se obtuvieron 1.55 g (62%) g de producto crudo, un aceite color café oscuro que se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de  $CHCl_3$ -MeOH (99:1). El producto purificado pesó 0.54 g (35%), que se observó como un aceite color café que presentó un  $R_f$  0.58 (sistema VII). **Espectro 10.** RMN  $^1H$  (300 MHz, TMS,  $DMSO-d_6$ ) ppm: 7.93 (s, 1H, H-7), 7.74 (s, 1H, H-4), 4.77 (t,  $J = 4.5$  Hz, 1H,  $-SCH_2-(CH)O_2CH_2CH_3$ ), 3.83 (s, 3H,  $CH_3$  éster), 3.67 (s, 3H, N- $CH_3$ ), 3.62-3.51 (m, 4H,  $-SCH_2-(CH)O_2CH_2CH_3$ ), 1.10 (t, 6H,  $-SCH_2-(CH)O_2CH_2CH_3$ ).

### 8.1.12. 2-{{2-(carbamoilhidraziniliden)etil}sulfanil}-5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (ACN 2)



**Esquema 1.** Secuencia de reacciones para la obtención de ACN 2.

### 8.1.13. 5-Cloro-1-metil-2-[(2-oxoetil)sulfanil]-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (10b)

1.1 g (0.0029 mol) de intermediario **10a** se colocaron en un matraz de fondo redondo de 10 mL, provisto con termómetro, agitación magnética y adaptado con baño de hielo. Luego se agregó 4 mL de 1,4-dioxano y se añadió lentamente 3.6 mL de HCl (ac) 2N; al terminar la adición se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. Tiempo durante el cual se monitoreo la reacción mediante CCF y se observó la conversión total de la materia prima. La mezcla de reacción se neutralizó con bicarbonato de sodio, y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL) y lavados con solución de salmuera. La fase orgánica se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida con el rotaevaporador, se obtuvieron 0.495 g (45 %) de un aceite de color amarillo claro con Rf 0.68 (sistema VII), el cual fue utilizado sin tratamiento para la siguiente reacción.

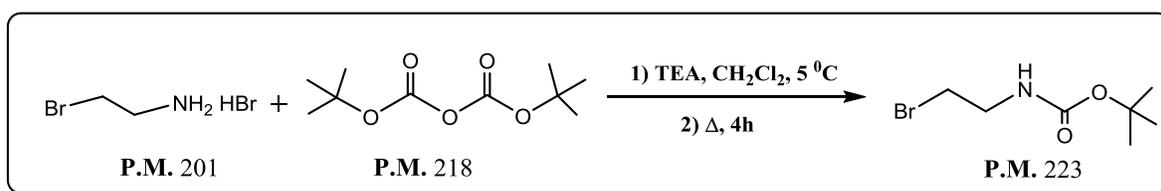
### 8.1.14. Metodología para obtener ACN 2

En un matraz redondo de fondo plano de una boca, provisto con agitación magnética, se disolvieron 0.495 g (0.0012 mol) de intermediario **10b** en 3 mL de etanol, e inmediatamente se agregó gota a gota una solución de 0.156 g (0.0014 mol, 1.2 eq.) de clorhidrato de semicarbazida en bicarbonato de sodio (0.0014 mol, 1.2 eq) disueltos en etanol. La mezcla de reacción se dejó en

agitación constante a temperatura ambiente y se monitoreo mediante CCF hasta observar la conversión total de la materia prima **10b**. Después de 2 h de agitación constante se observó la formación de un precipitado color café claro, el producto formado se separó por filtración, se lavó con agua y MeOH frío y se recrystalizó en isopropanol agua, obteniendo 0.0148 g (30%) del compuesto final **ACN 2** con un Rf 0.34 (sistema VI) y pf. de 196.7-197.1 °C. **Espectro 11. IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):**3067 (C-H de aromático), 2928 (-CH<sub>3</sub>), 1694 (C=O), 1261 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 12. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 10.07 (sa, 1H, -NH-), 7.98 (s, 1H, H-7), 7.81 (s, 1H, H-4), 7.34 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, -SCH<sub>2</sub>CH=N-), 6.21 (sa, 1H, -NH-), 4.13 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, -SCH<sub>2</sub>CH=N-), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.72 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>). **Espectro 13. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 166.15, (C=O de éster), 156.80 (C-3'), 154.95 (C-2), 141.33 (C-3a), 139.86 (C-7a), 137.49 (C-5), 125.65 (C-2'), 123.27 (C-7), 120.32 (C-6), 112.30 (C-4), 52.78 (CH<sub>3</sub> de éster), 33.70 (C de N-CH<sub>3</sub>), 30.76 (C-1'). **Espectro 14. EM ESI/ID (eV) *m/z* (% ar):** 378 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.

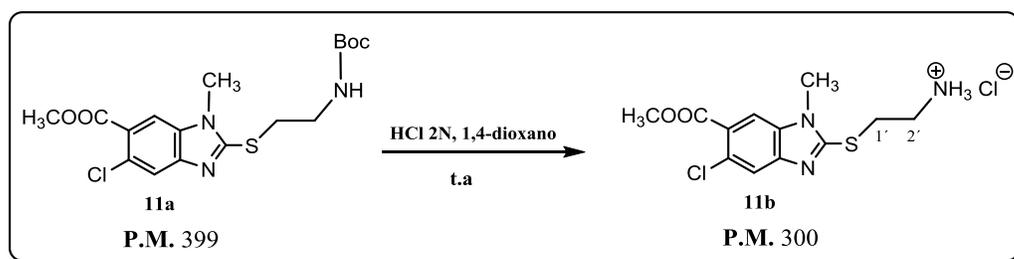
**8.1.15.** 2-({2-[(*Tert*-butoxicarbonil)amino]etil}sulfanil)-5-cloro-1-metil-1*H*-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**11a**)

Para obtener **11a** se sintetizó primero el intermediario 2-bromoetilcarbamato de *tert*-butilo, su síntesis se muestra a continuación:



En un matraz de fondo redondo de 100 mL dos bocas acondicionado con agitación magnética, termómetro y baño de hielo, se disolvieron 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 5 °C, 5.0 g (0.024 mol) de bromhidrato de 2-bromoetilamina y 3.3 mL (0.028 mol, 1.1 eq) de trietilamina, la mezcla se dejó en agitación por 20 min y se adicionó 15 mL de una solución de 5.2 g (0.024 mol) de dicarbonato de di-*tert*-butilo ( (Boc)<sub>2</sub>O) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se retiró el baño de hielo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante en atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 30 °C y se monitoreo por CCF durante 4 h. Se retiró el disolvente con el rotaevaporador, el producto obtenido se extrajo con 30 mL de AcOEt y lavados con solución de salmuera (3 x 20 ml). La fase orgánica se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío obteniendo un aceite de color amarillo. Para purificar el compuesto se destiló en un aparato Kulgelrohr, se obtuvo 3.6 g de 2-bromoetilcarbamato de *tert*-butilo (71%) como un aceite amarillo que presentó un Rf 0.26 en el

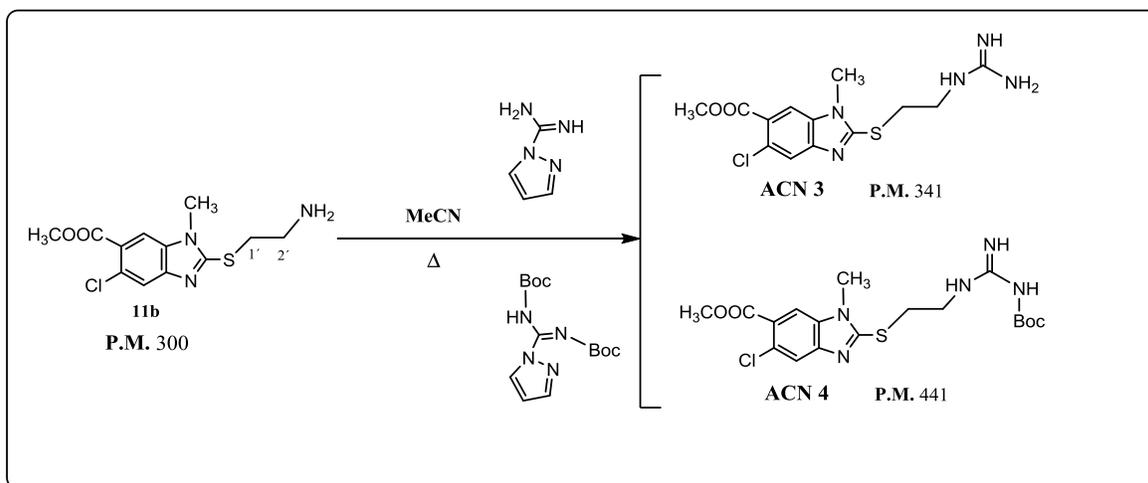


8.1.17. 2-[(2-Aminoetil)sulfanil]-5-cloro-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**11b**)

En un matraz de fondo redondo de una boca de 10 mL, provisto con agitación magnética atmosfera de nitrógeno, y baño de hielo, se colocaron 1.5 g (0.004 mol) de **11a**, y se adicionó lentamente 4 ml de una solución de HCl (ac) 2N en 1,4-dioxano (0.019 mol, 5 eq.) a 5 °C. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, siguiendo el avance de la reacción mediante CCF. Después de 6 horas de agitación constante se observó la ausencia de materia prima **11a** por lo que se procedió a retirar el disolvente empleando el rotaevaporador. Se obtuvieron 1.3 g (86%) de un sólido blanco, el cual se recrystalizó con MeOH y presentó un Rf 0.1 (sistema VI), pf. 146.9.0-147.0 °C. Se procedió a tomar una muestra de **11b** y formar la amina libre mediante extracción con AcOEt en medio básico para realizar la CCF, la cual al revelar en nihidrina presentó una coloración morada. **Espectro 19. IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 2826 (-NH), 2992 (-CH<sub>3</sub>), 1728 (C=O), 1260 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 20. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 8.51 (sa, 1H, -NH-), 7.88 (s, 1H, H-7), 8.03 (s, 1H, H-4), 5.08 (sa, 1H, -NH-), 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.75 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). **Espectro 21. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 165.9 (C=O de éster), 154.2 (C-2), 140.0 (C-3a), 138.8 (C-7a), 126.1 (C-5), 123.0 (C-7), 119.5 (C-6), 112.3 (C-4), 53.0 (CH<sub>3</sub> éster), 40.4 (C-1'), 31.0 (C-2'), 28.4 (CH<sub>3</sub> de N-CH<sub>3</sub>). **Espectro 22. EM ESI/ID (eV) *m/z* (% ar):** 300 (100) M<sup>+</sup>.

## 8.1.1.8. Método general de síntesis para la obtención de:

- 5-Cloro-2-((2-guanidinoetil)sulfanil)-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**ACN 3**)
- 2-[(2,3-Bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidinoetil)sulfanil]-5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**ACN 4**)



Para obtener los compuestos (**ACN 3** y **ACN 4**) se obtuvo primero la amina libre de **11b**, tratando 1.3 g (0.0032 mol) de este compuesto en medio básico y la posterior extracción en AcOEt (3 x 5 mL), las fracciones orgánicas se mezclaron, se trataron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se retiró el disolvente mediante destilación empleando el rotaevaporador, obteniendo un aceite color amarillo. El aceite obtenido no se aisló, se procedió a usar inmediatamente para la siguiente reacción. Se obtuvo 1.1 g (0.0027) de amina libre de (**11b**), la cual se colocó en un matraz de fondo redondo de dos boca adaptado con un condensador en posición de reflujo, agitación magnética y termómetro. Luego se adicionó 5 mL de acetonitrilo anhidro y una solución de 2.81 g de clorhidrato de 1*H*-pirazol-1-pirazolcarboxamidina (0.004 mol, 1.5 eq.) o de *N,N'*-di-boc-1*H*-pirazol-1-carboxamidina (0.004 mol, 1.5 eq.) en acetonitrilo para obtener **ACN 3** y **ACN 4** respectivamente, y 2.7 mL de trietilamina (0.0032 mol, 1.2 eq.). La solución se calentó a 60 °C durante 24 h en atmósfera de nitrógeno, y se monitoreó la reacción mediante CCF. Al término de la reacción, el sólido formado se filtró y lavó con acetonitrilo e isopropanol y al final con etanol caliente. Para purificar el sólido obtenido se realizó una recristalización en MeOH, se obtuvieron 0.715 g (65%) de un sólido blanco con pf. de 172.9-173.4 °C y R<sub>f</sub> 0.6 (sistema V) (**ACN 3**). Así como 0.594 g (54%) de un sólido blanco R<sub>f</sub> 0.7 (sistema V) y pf. de 146.6.4-146.8 °C (**ACN 4**). Datos espectroscópicos y espectrométricos para el compuesto **ACN 3**:

**Espectro 23. IR cm<sup>-1</sup> (FT-ATR):** 3321 (-N-H), 2948 (-CH<sub>3</sub>), 1717 (C=O), 1269 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 24. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 8.19 (sa, 1H, -NH-), 7.98 (s, 1H, H-7), 7.54 (sa, 1H, NH-), 7.29 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>-), 7.79 (s, 1H, H-4), 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.69 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.50-3.44 (m, *J* = 19.0 Hz, 4H). **Espectro 25. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 166.4 (C=O de éster), 157.5 (C-2), 155.7 (C-3'), 141.2 (C-3a), 139.0 (C-7a), 125.8 (C-5), 123.2 (C-6), 120.4 (C-7), 112.2 (C-4), 52.3 (CH<sub>3</sub> de éster), 40.5 (C-2'), 30.8 (C de N-CH<sub>3</sub>), 30.4 (C-

1'). **Espectro 26. EM ESI/ID (eV)  $m/z$  (% ar):** 342 (100)[M+1]<sup>+</sup>, 343 (30)[M+2]<sup>+</sup>, 344 (14)[M+3]<sup>+</sup>.

Datos espectroscópicos y espectrométricos para el compuesto **ACN 4: Espectro 30. IR  $\text{cm}^{-1}$  (FT-ATR):** 3987 (-N-H), 2948 (-CH<sub>3</sub>), 1728 (C=O), 1259 (CO-O-CH<sub>3</sub>). **Espectro 31. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 11.39 (s, 1H, -NH-Boc), 8.55 (s, 1H, -NH-), 7.97 (s, 1H, H-7), 7.78 (s, 1H, H-4), 3.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub> éster), 3.68 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.57-3.50 (m,  $J = 19.0$  Hz, 4H), 1.36 (s, 18H, CH<sub>3</sub> de Boc). **Espectro 32. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 163.92 (C=O de éster), 163.7 (C-3'), 155.5 (C=O de NH-BOC), 151.4 (C-2), 141.0 (C-3a), 139.3 (C-7a), 125.2 (C-5), 123.0 (C-7), 120.2 (C-6), 112.0 (C-4), 83.0 (-NH-(C=O)-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 78.4 (-N-(C=O)-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 52.5 (CH<sub>3</sub> de éster), 31.5 (C-2'), 30.6 (C-1'), 28.2 (C de N-CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub> de Boc). **Espectro 33. . EM ESI/ID (eV)  $m/z$  (% ar):** 564 (100)[M+Na]<sup>+</sup>.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera sección de este apartado se muestran los resultados obtenidos durante la síntesis de los compuestos finales **ACN 1-4** así como la caracterización estructural de los mismos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas y la determinación de algunas de sus propiedades físicas como son punto de fusión y Rf cromatográfico. En el segundo apartado se presentan los resultados de evaluación biológica *in vitro* contra el protozario *G. intestinalis* para evaluar la actividad giardicida de los compuestos sintetizados.

### 9.1. Síntesis de intermediarios 2-9

Para obtener el compuestos **9** fue necesario sintetizar los intermediarios **2-8**, los cuales se obtuvieron con rendimientos aceptables (**Tabla 8**). Sin embargo, el rendimiento global para la ruta sintética desde el ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**1**) hasta el compuesto 2-tioxobencimidazol (**9**) fue muy bajo (8%), debido principalmente a la etapa de nitración; donde se forman dos isómeros difíciles de separar.

**Tabla 8.** Rendimiento y punto de fusión de los intermediarios 2-9

Compuesto	Rendimiento (%)	pf (°C)
Ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico		
2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo ( <b>2</b> )	97	69.5-69.6
5-Amino-2-clorobenzoato de metilo ( <b>3</b> )	95	-
5-(Acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo ( <b>4</b> )	92	96.3-96.5
5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>5</b> )	20	115.6-116.5
2-Cloro-5-[acetil(metil)amino]-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>6</b> )	75	116.5-118.7
2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo ( <b>7</b> )	82	148.7-150.5
4-Amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo ( <b>8</b> )	81	-
6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo ( <b>9</b> )	56	230.5-231.4

#### 9.1.2. Obtención de 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**2**)

La síntesis planteada dio inicio con la esterificación del ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**1**), mediante una reacción de sustitución nucleofílica, empleando sulfato de dimetilo, como agente alquilante. El medio básico permitió disociar el ácido **1** y obtener su base conjugada nucleofílica, el anión carboxilato, para que se llevara a cabo el ataque nucleofílico al grupo metilo presente en el sulfato de dimetilo, en donde el grupo saliente fue el anión metil sulfato. La reacción se llevó a cabo con conversión total de la materia prima y alto rendimiento empleando como disolvente acetona, un disolvente polar aprótico que no atrapa al anión carboxilato y por otra parte permitió la solubilidad

de 1.

### 9.1.3. Obtención de 5 Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)

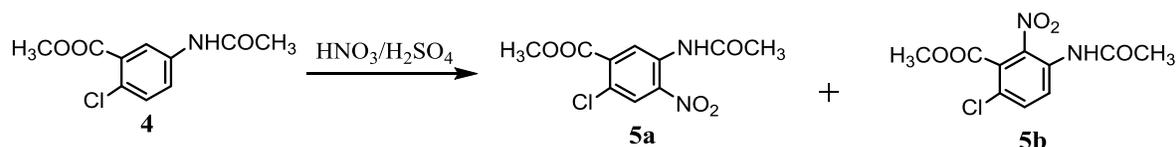
La reducción catalítica del grupo nitro presente en el compuesto **2** generó la amina **3**. Se decidió utilizar Ni/Raney como catalizador, ya que por experiencia previa en nuestro laboratorio, el uso de Pd/C como catalizador promueve la eliminación de halógenos en la molécula. La reacción procedió sin complicaciones y con alto rendimiento. El producto crudo de la reacción de reducción se empleó como tal en la siguiente reacción de acetilación.

### 9.1.4. Obtención de 5-(Acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (4)

El siguiente paso fue la acetilación del compuesto **3** con anhídrido acético para proteger el grupo amino en **5** antes de realizar la nitración, así la amina protegida sería menos susceptible a la oxidación y orientadora a la posición 4 del clorobenzoato de metilo en la reacción de nitración posterior. Esta reacción también procedió sin complicaciones y con alto rendimiento, a pasar que se empleó el producto crudo de reducción.

### 9.1.5. Obtención de 5-(Acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (5)

Posteriormente, el compuesto (**4**) se disolvió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. en frío, y posteriormente, la solución se trató con ácido nítrico conc., para formar el ion nitronio *in situ* a 0-5 °C. Cabe destacar que en la reacción de nitración se generaron dos productos; el compuesto principal buscado 5-(acetilamino)-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**5a**) y el isómero de posición 5b disminuyendo drásticamente el rendimiento.



El control de la temperatura fue un factor importante a considerar, ya que se observó que el aumento de la temperatura favorece la formación del isómero en posición 6, así como la hidrólisis del grupo éster. La mezcla con los dos productos de nitración se hidrolizó en medio ácido y se logró separar selectivamente el compuesto 5-amino-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo debido a que es insoluble en MeOH, al realizar su posterior acetilación se obtuvo el compuesto **5a** puro pero con muy bajo rendimiento (20%). Dado el impedimento estérico en la posición 6 del compuesto **4** se esperaba que la posición 4 fuera la más favorecida en la sustitución electrofílica; sin embargo, los

productos de nitración en 4 y 6 se obtuvieron en proporciones casi similares. No se realizaron más estudios al respecto.

#### **9.1.6. Obtención de 2-Cloro-5-[acetil(metil)amino]-4-nitrobenzoato de metilo (6), 2-Cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (7) y 4-Amino-2-cloro-5-(metilamino)benzoato de metilo (8)**

La *N*-metilación de **5** se logró fácilmente mediante el empleo de sulfato de dimetilo en medio básico utilizando diglima como disolvente. El control de la temperatura entre 10-15 °C y una buena agitación fueron críticos para obtener el producto de *N*-metilación, ya que a mayores temperaturas se observó la generación de dos productos secundarios debido a la hidrólisis del éster y del acetilamino. Aunque el rendimiento no fue alto, sí fue bueno y el producto se pudo purificar sin problema.

La hidrólisis del grupo acetilo del compuesto **6** procedió mejor en medio ácido en presencia de metanol, lo que llevó al 2-cloro-5-(metilamino)-4-nitrobenzoato de metilo (**7**). Al realizar la reacción en medio básico se observó la hidrólisis del éster como producto secundario. Finalmente, el grupo nitro se redujo catalíticamente con hidrógeno y Ni-Raney para obtener **8**, el cual se empleó como tal en la siguiente reacción de ciclación.

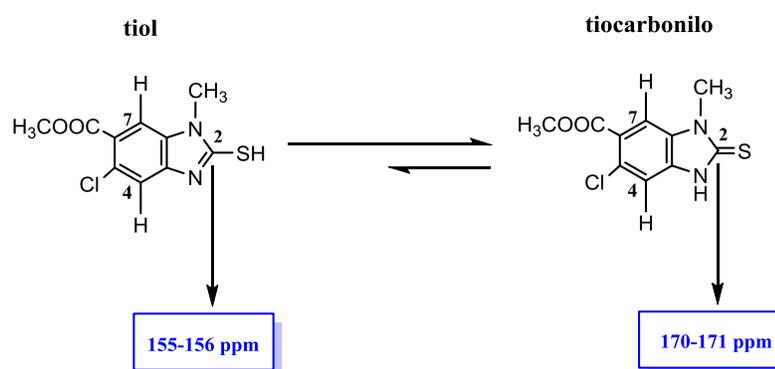
#### **9.2. Obtención de 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)**

La *N*-metil-*o*-fenilendiamina **8** se sometió a una reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono, etanol y medio básico (para generar el Xantato de potasio *in situ*) lo que permitió la obtención del compuesto **9**. La reacción procedió y dio el compuesto **9**, que recristalizado en EtOH-DMF proporcionó un 56 % de producto puro. Para confirmar la formación del compuesto **9** se analizó el espectro de RMN <sup>1</sup>H donde se apreció la señal en 13.15 ppm correspondiente al hidrógeno enlazado al nitrógeno del bencimidazol, ya que el equilibrio se encuentra desplazado a la forma tioxo y no de tiol. De cálculos teóricos reportados en la literatura se sabe que el desplazamiento al tautómero tioxo es 3-8 kcal/mol más estable en comparación al tautómero tiol [47]. La afirmación anterior se sostiene también a través de datos cristalográficos reportados, los datos corroboran que el tautómero tioxo predomina en el equilibrio, y que los electrones π del sistema -N-C=S (tioamida) se encuentran deslocalizados [48].

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C también se corroboró la ciclación y la presencia del enlace C=S. Ya que

se observaron dos señales a frecuencias altas, 165.5 y 171.7 ppm, correspondientes al carbono del carbonilo de éster y al enlace C=S, respectivamente.

No se observó una señal a 157 ppm correspondiente a un grupo C-SH de tiol, con lo cual se sugirió el predominio del tautómero tiona, por otra parte algunos reportes en la literatura [51, 52] han demostrado que la forma predominante en el equilibrio tiona/tiol depende también del disolvente utilizado en la determinación de las constantes espectroscópicas; en disolvente polares tales como metanol o DMSO- $d_6$  se observa abundancia de la tiona, el cual fue empleado dada la poca solubilidad del compuesto **9**.



**Figura 9.** Equilibrio tiol/tiona y diferencias en el desplazamiento químico de C-2 del núcleo de bencimidazol.

### 9.3. Caracterización de ACN 1

La caracterización de estructural del compuesto 6-Cloro-1-(2-cianoetil)-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**ACN 1**), se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas: tales como espectroscopia de infrarrojo (IR), RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas. La asignación de las señales de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se realizó con el apoyo de los experimentos de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (2D-RMN).

Mediante el espectro de IR se logró obtener de forma preliminar, evidencia de la formación del compuesto **ACN 1**. En el espectro se pueden observar (**Anexo, Espectro 3**) las bandas de absorción en  $1694\text{ cm}^{-1}$  y  $1619\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones de tensión del enlace C=O del grupo éster y del enlace C=N presente en el anillo imidazólico. Y la banda de absorción característica del grupo -CN en  $2248\text{ cm}^{-1}$ .

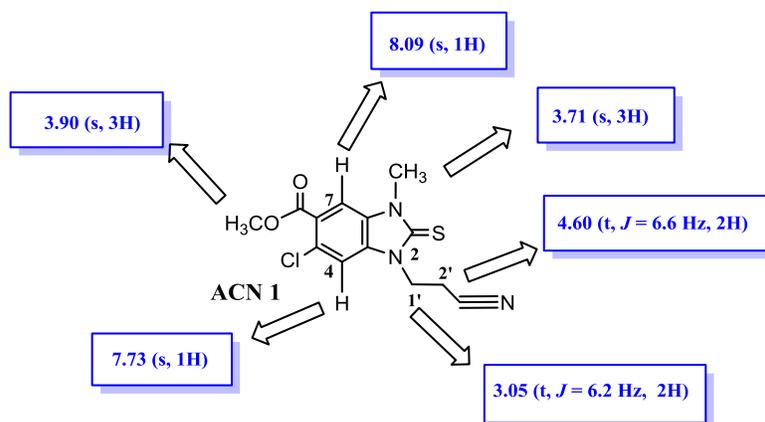


Figura 10.  $\delta$ , constante de acoplamiento ( $J$ ), multiplicidad, en RMN  $^1\text{H}$  de ACN 1.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **ACN 1** (Anexo, Espectro 4) se registró la presencia de seis diferentes señales; a campo bajo se logró identificar la presencia de dos tripletes (t), cada uno de los cuales integró para dos hidrógenos, asignados a los protones H-2' a un rango de desplazamiento de 3.05 ppm, y de H-1' (metileno unido a nitrógeno) a 4.60 ppm respectivamente. La diferencia entre los desplazamientos químicos de ambas señales triples se debe a los valores de electronegatividad de los átomos unidos a cada uno de los metilenos. La mayor electronegatividad del nitrógeno, hace que la densidad electrónica alrededor de los protones del metileno unido a él disminuya, por lo tanto se encuentran más desprotegidos electrónicamente y la señal correspondiente se ubica desplazada a campo bajo.

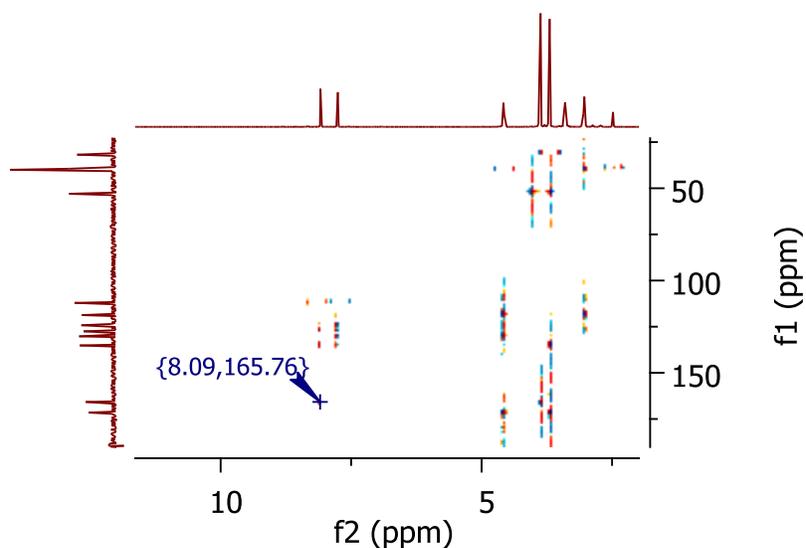
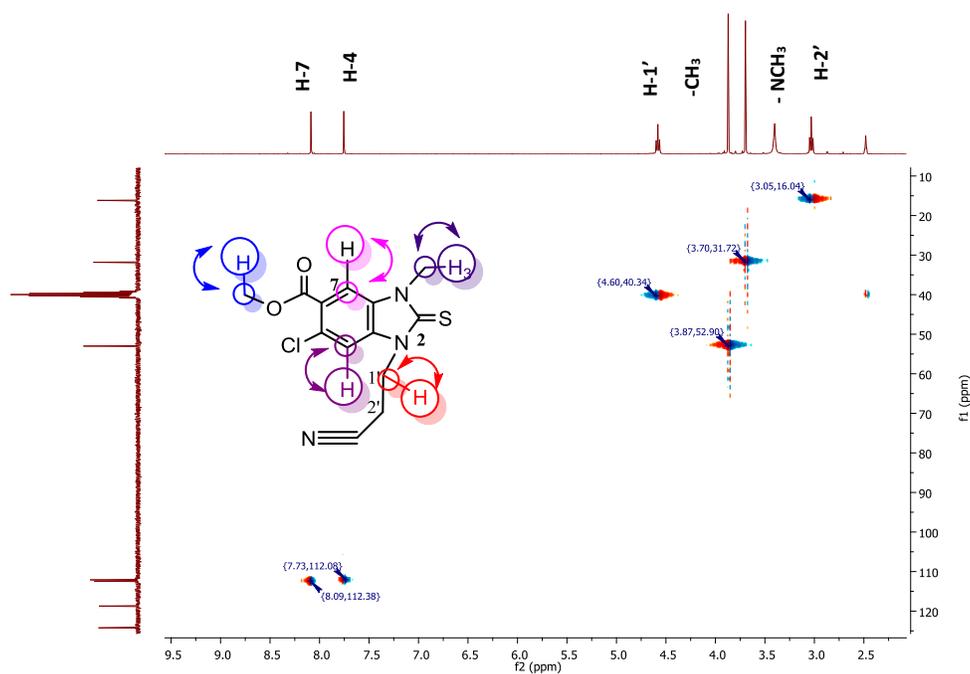


Figura 11. Espectro RMN HMBC (DMSO- $d_6$ ) del compuesto ACN 1.

A campo alto se observaron también dos señales simples, cada una íntegra para tres hidrógenos, una de ellas en 3.90 ppm, se asignó al metilo del grupo éster ( $\text{CH}_3\text{O}-$ ) y la otra en 3.71 ppm asignada a metilo unido a nitrógeno ( $\text{N}-\text{CH}_3$ ). Así también se observaron dos señales simples correspondientes a la zona aromática, que integraron cada una para un hidrógeno, la primera a 7.74 ppm generada por el H-4 y la segunda en 8.09 ppm asignada a H-7. La asignación anterior se puede corroborar a partir del espectro de RMN-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), en donde se observó la correlación entre la señal 8.09 ppm asignada al hidrógeno de la posición 7 del bencimidazol con la señal en 165.7 ppm asignada al carbonilo del grupo éster (**Fig. 10**). Así también se observó en el espectro RMN-HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) la correlación entre la señal cuyo desplazamiento es de 7.73 ppm y la señal en 112.08 ppm, a su vez la señal en 8.09 ppm correlacionó con la señal en 112.38 (**Fig. 11**), evidencia que corrobora la asignación del hidrogeno en posición 7 y 4 del núcleo de bencimidazol respectivamente.



**Figura 12.** Espectro RMN HSQC ( $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto ACN 1.

En la caracterización del compuesto ACN 1 mediante RMN de  $^{13}\text{C}$  se identificó la presencia de una señal a campo bajo (171.1 ppm) que corresponde al carbono 2 del anillo de bencimidazol, esta señal concuerda con una unión  $\text{C}=\text{S}$  [49, 50].

Dada la naturaleza altamente polar del compuesto ACN 1, éste fue analizado mediante espectrometría de masas de ionización por Electro spray (EM ES), por inyección directa de la

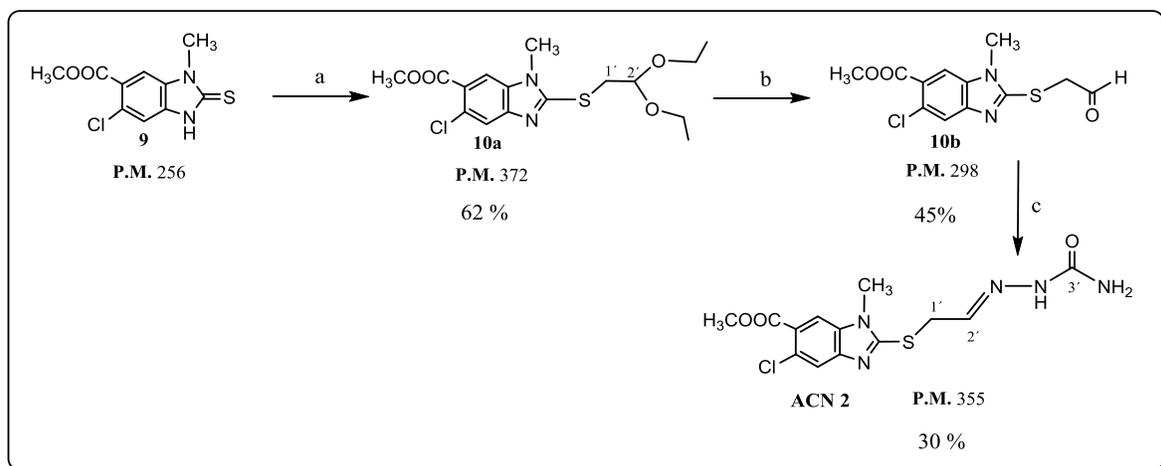
muestra y operando en el modo positivo. Por esta técnica se pudo corroborar la masa del bencimidazol **ACN 1** ya que en el espectro de masas (**Anexo, Espectro 6**), se observa la formación de un artefacto del ión molecular con sodio  $[M+23]^+$  en 332.

El análisis estructural del compuesto **ACN 1** sugirió la sustitución de la posición 3 del núcleo de bencimidazol. Para su síntesis se utilizó agua como disolvente y acrilonitrilo en medio básico (KOH); las ventajas de usar agua fueron en primer lugar la solubilidad del acrilonitrilo en ella, y la sencilla separación del producto esperado al precipitar en el medio, pudiendo obtener un único producto a través de una reacción de adición conjugada tipo Michael.

Para que la reacción se pudiera llevar a cabo, se realizó primero la formación del anión del intermediario **9**. Con la posibilidad de formarse dos sitios nucleofílicos, tanto en el átomo de nitrógeno o en el átomo de azufre. Sin embargo se observó la formación de un solo producto. Se ha reportado en la literatura la síntesis mediante adición nucleofílica en medio básico, sobre sistemas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, como es el caso del acrilonitrilo, en donde los resultados observados arrojan que la *N*-sustitución supera a la *S*-sustitución; mientras que las alquilaciones  $S_N2$  resultan invariablemente productos *S*-alquilados. Pudiendo así explicar la obtención del producto de sustitución en la posición 3 del bencimidazol y no en la posición 2. Una justificación en base a la literatura que trata de explicar la afirmación anterior, es por medio de la escala oxibase y su poder predictivo en aniones ambidentados [53]. A partir de estudios ya reportados en la literatura, se puede decir que en reacciones con reactivos electrofílicos polares el ataque se produce por el átomo más electronegativo (N) el cual posee la mayor densidad electrónica y en cambio en reacciones que proceden a través de un solo estado de transición, el enlace es formado con el átomo más polarizable (S).

#### **9.4. Obtención de ACN 2**

Para la obtención de la semicarbazona (**ACN 2**) fue necesario realizar tres pasos de síntesis (**Esquema 1**); la primera de ellas fue la reacción de formación del acetal **10a**, a partir del dietilacetal del bromoacetaldehído y el compuesto **9**. Se probaron distintas condiciones y disolventes, resumidos en la **Tabla 9**. De los resultados se observa que el mayor rendimiento obtenido fue empleando las condiciones **a** en DMF, a través de un mecanismo de reacción  $S_N2$ .



**Esquema 3.** Condiciones de reacción: (a)  $K_2CO_3$ , DMF, dietil acetal del bromoacetaldehído t.a. 12 h. (b) HCl (ac) 2 N, dioxano. (c) Semicarbazida,  $NaHCO_3$ , etanol, t.a., 2 h.

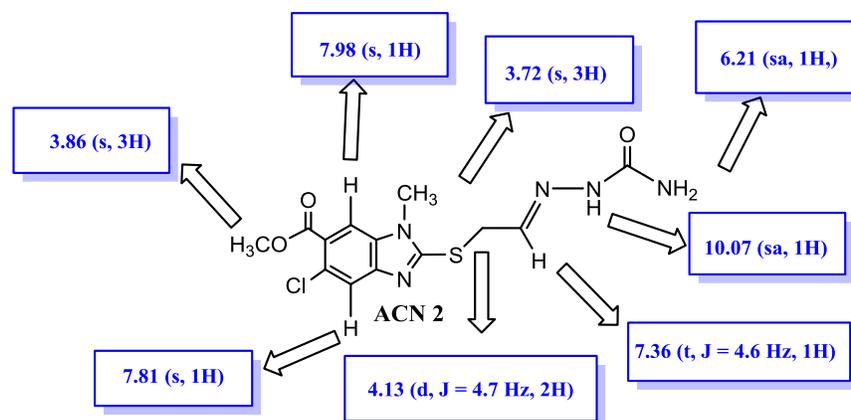
Como se puede observar en los resultados de la **Tabla 9**, a pesar de utilizar distintos disolventes polares apróticos, aumentar el tiempo de reacción o aplicar calentamiento, el rendimiento de la reacción no presentó cambios importantes. Por otro lado durante la realización de la reacción se encontró la formación de un único producto y la presencia de compuesto **9** sin reaccionar, razón por la cual el rendimiento de reacción no fue muy eficiente. Lo anterior se puede explicar debido a que esta reacción se considera transcurre lentamente dado el impedimento estérico en el haluro de alquilo (dietilacetal del bromoacetaldehído).

**Tabla 9.** Diferentes condiciones de reacción realizados para la obtención del intermediario 10a

Condiciones	Disolvente	Rendimiento
a) 12 h, t. a.	DMF	68.8%
b) 24 h, t. a.	DMF	62%
c) 20 h, t. a.	Acetona	45%
d) 24 h, 50 °C	DMSO	60%
e) 24 h, t.a.	Acetonitrilo	55%

Luego se realizó la hidrólisis del acetal en medio ácido, para sintetizar el aldehído **10b** como producto principal. El cual se hizo reaccionar inmediatamente a temperatura ambiente en etanol como disolvente y clorhidrato de semicarbazida [53, 54], para obtener finalmente el compuesto **ACN 2** (rendimiento global de 8.3%) correspondiente al producto de S-sustitución, a través de un mecanismo  $SN_2$ .

La caracterización de estructural del compuesto 2- $\{2-(\text{carbamoilhidraziniliden})\text{etil}\}$ sulfanil}-5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**ACN 2**), se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



**Figura 13. Figura 9.**  $\delta$ , constante de acoplamiento ( $J$ ), multiplicidad, en RMN  $^1\text{H}$  de **ACN 2**.

A partir del análisis del espectro de IR (**Anexo, Espectro 11**) se observó la presencia de la banda que corresponde a la vibración de tensión del enlace N–H a  $3183\text{ cm}^{-1}$ . Además, se presentan las señales que corresponden a la vibración de tensión de los enlaces C=O del grupo amida y éster a  $1721$ ,  $1662\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, y la banda de vibración de flexión del enlace N–H del grupo amida a  $1613\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Anexo, Espectro 12**) se observó a campo bajo la señal identificada como triplete (t) centrado en  $7.36\text{ ppm}$  y que integra para un hidrógeno, asignada al protón H-2'. Su desplazamiento se debe a la desprotección electrónica generada por el doble enlace unido a un heteroátomo electronegativo (N). La verificación de la incorporación del grupo semicarbazida en el núcleo de bencimidazol se logró en parte también debido a la presencia de una señal doble (d) centrada en  $4.13\text{ ppm}$  que integra para dos hidrógenos, asignada a los hidrógenos del metileno directamente unidos al átomo de azufre de la posición 2. Así también, la señal del grupo  $-\text{NH}_2$ , la cual se presenta como un singlete ancho (sa) en  $6.21\text{ ppm}$ . Con respecto a la zona aromática del bencimidazol, se observó la presencia de dos señales simples en  $7.98\text{ ppm}$  y  $7.81\text{ ppm}$ , asignadas a los protones H-7 e H-4 respectivamente. En la región de campo alto se presentan dos singletes (s) situados a  $3.86$  y  $3.72\text{ ppm}$  que corresponden a los protones de los metilos de éster y N- $\text{CH}_3$  respectivamente.

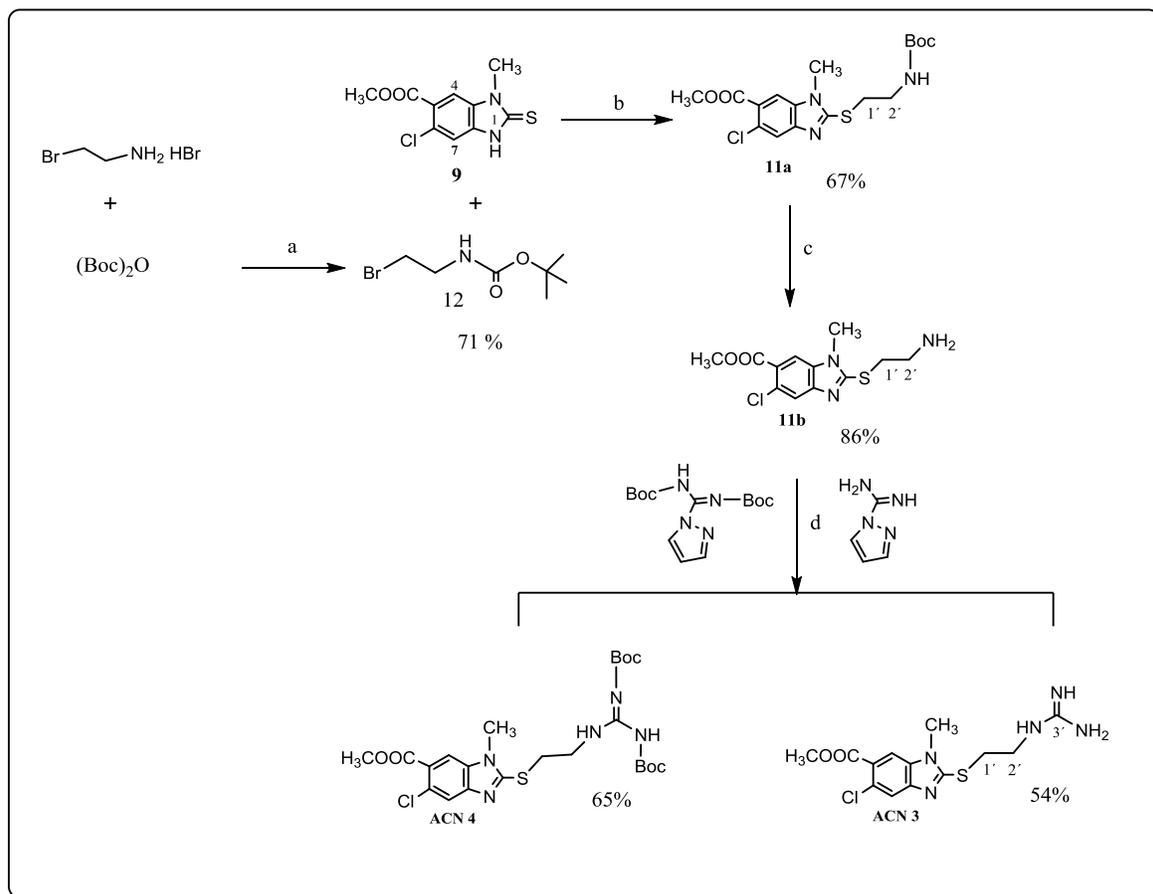
El análisis del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con el que se logró asignar el desplazamiento químico a cada uno de los carbonos del compuesto **ACN 2**, fue realizado de manera conjunta con los espectros

bidimensionales de correlación heteronuclear HMBC y HSQC. De la sección alifática, se observaron dos señales (**Anexo, Espectro 13**) a 30.7 y 52.7, la primera es atribuida al metileno unido al azufre y la segunda al metilo del grupo metoxilo de éster, debido a que el oxígeno es más electronegativo y desprotege al carbono desplazando la señal a campo bajo.

A campo bajo se localizaron dos señales correspondientes a carbonilos (C=O) 166.1 y 156.8 ppm, la segunda señal es asignada al C-3' del carbonilo del grupo amida, ya que el carbono se encuentra más desprovisto de densidad electrónica. Así como las señales en 125.6 y 156.8 ppm asignadas a los C-1' y C- 2' respectivamente. No se observó una señal a 171 ppm correspondiente a un grupo C=S de tiona, con lo cual se sugirió la substitución en la posición 2 del núcleo de bencimidazol. En la tesis de maestría de Martínez Córdoba [45], se observó la obtención de un solo isómero de los dos posibles a formarse, *E* o *Z*, dado que realizó un análisis del espectro de <sup>13</sup>C desacoplado fuera de resonancia, por medio del cual logró determinar la formación del isómero *E*. Al comparar la constante de acoplamiento carbono-hidrógeno del azometino en 168.6 Hz, correspondiente con el intervalo de semicarbazona de configuración *E* obtenido de la literatura [54, 55].

Dada la naturaleza altamente polar del compuesto **ACN 2**, éste fue analizado mediante espectrometría de masas de ionización por Electropray (EM ESI), por inyección directa de la muestra y operando en el modo positivo. Por esta técnica se pudo corroborar la masa del bencimidazol **ACN 2** ya que en el espectro de masas (**Anexo, Espectro 14**), se observa la formación de un artefacto del ión molecular en 378 que corresponde a [M+23]<sup>+</sup>.

## 9.5. Obtención de ACN 3 y ACN 4



**Esquema 4.** Condiciones de reacción: (a)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{N}_2$ , 4 h, 30 °C. (b)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetona, (2-bromoetil) carbamato de *tert*-butilo, t.a. 12 h. (c) 1)  $\text{HCl}$  (ac) 2 N, dioxano,  $\text{N}_2$ , T. a., 6 h. 2)  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{AcOEt}$ , 5 min. (d)  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1H-pirazol-1-carboxamida o *N,N'*-di-boc-1H-pirazol-1-carboxamida,  $\text{Et}_3\text{N}$ , 60 °C, 24 h,  $\text{N}_2$ .

Para obtener los compuestos **ACN 3** y **ACN 4** se decidió realizar la secuencia de reacciones del Esquema 2. La primera reacción fue la protección de la amina primaria (2-bromoetilamina) al emplear el grupo *t*-butil carbamato (Boc), obteniendo entonces la amina protegida necesaria para realizar la *S*-sustitución del núcleo de bencimidazol con mejor rendimiento y pureza. Una vez obtenido el producto *S*-alquil sustituido se desprotegió la amina del carbono terminal presente en el intermediario **11a**, para luego mediante una reacción de adición eliminación, formar la guanidina esperada.

El grupo *t*-butil carbamato (Boc) es un grupo protector muy empleado en aminas, sobre todo en aminas primarias ya que se han obtenido rendimientos eficientes en su protección. Otras ventajas de este grupo protector es su estabilidad a hidrólisis bajo condiciones básicas y su rápida desprotección

en condiciones ácidas [55]. Debido las características mencionadas y sobre todo a su estabilidad en condiciones básicas, se eligió para la protección de la amina primaria de la 2-bromoetilamina, la cual fue utilizada posteriormente para la reacción de S-sustitución, por ello la importancia de la estabilidad del grupo protector bajo estas condiciones.

**Tabla 10.** Diferentes condiciones de reacción para la obtención de 2-bromoetilcarbamato de *tert*-butilo

Condiciones	Disolvente	Rendimiento
a) 12 h, t. a., Et <sub>3</sub> N	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	43%
b) 4 h, 30 °C, Et <sub>3</sub> N	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	71%
c) 3 h, 30 °C, Et <sub>3</sub> N	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	65%

Para sintetizar el intermediario **11a** se intentó probar con tres distintas metodologías de reacción, con la finalidad de obtenerlo en mayor rendimiento y pureza (**Tabla 11**). En la primera de ellas se hizo reaccionar directamente al intermediario **9** con 2-bromoetilamina bajo la metodología **1**. Sin embargo el resultado de la reacción no fue satisfactorio, ya que se observó en CCF, la formación de por lo menos 3 productos y la presencia del compuesto **9**, los primeros revelaron con nihidrina, indicando que los productos formados probablemente se traten de productos de polialquilación. La ineficiencia de la metodología también puede deberse a la baja estabilidad de la amina en las condiciones empleadas.

**Tabla 11.** Diferentes metodologías para la obtención de intermediario **11a**

Metodología	Reactivo	Disolventes probados
1) KOH, t. a.	Compuesto <b>9</b> y 2-bromoetilamina	Acetona, DMF
2) KOH, t. a.	Compuesto <b>9</b> y (2-bromoetil) carbamato de <i>tert</i> -butilo	Acetona, DMF
3) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , t. a.	Compuesto <b>9</b> y (2-bromoetil) carbamato de <i>tert</i> -butilo	Acetona, DMF

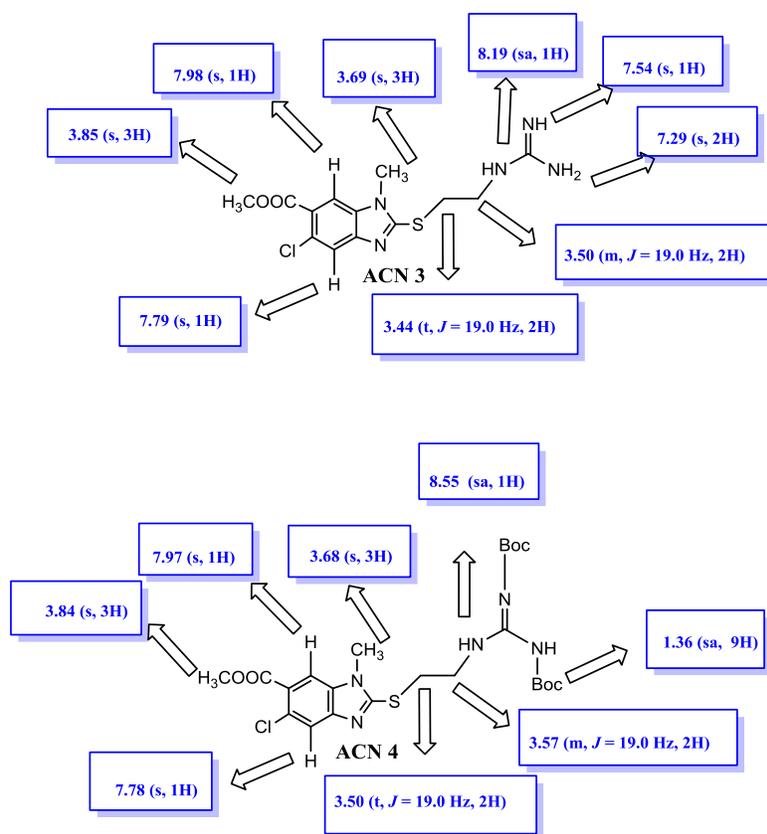
En base a los resultados obtenidos de la primera metodología, se optó por lo tanto proteger la amina y realizar la reacción de sustitución. Para ello se utilizaron las metodologías **2** y **3**, la primera de ellas no resultó en rendimientos favorables por lo que se optó en cambiar la base. Al cambiar la base y el disolvente, se encontró que la mejor metodología fue utilizar K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en acetona, debido a que en DMF, el producto final resultó con mayores impurezas.

Para desproteger la amina se optó por emplear condiciones ácidas ya que el grupo Boc se elimina fácilmente mediante estas condiciones. Una vez obtenida la amina libre **11b** se hizo reaccionar con 1*H*-pirazol-1-carboxamidina o *N,N'*-di-boc-1*H*-pirazol-1-carboxamidina y se probaron 6 diferentes disolventes, de los cuales el acetonitrilo fue el mejor para obtener mayor rendimiento (**Tabla 12**). Al reaccionar la amina con el grupo carboxamidina, se libera pirazol como grupo saliente, el cual es una sustancia aromática muy estable, y fue posible separarlo del crudo de reacción ya que es soluble en éter [56, 58].

**Tabla 12.** Diferentes condiciones de reacción para la obtención de **ACN 3**

Condiciones	Disolvente	Rendimiento %
a) 28 h, 60 °C., Et <sub>3</sub> N	DMF	57
b) 24 h, 60 °C., Et <sub>3</sub> N	CH <sub>3</sub> CN	65
c) 30 h, 60 °C., Et <sub>3</sub> N	THF	47
d) 32 h, 60 °C., Et <sub>3</sub> N	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	55
e) 26 h, 60 °C., Et <sub>3</sub> N	DMF	58
f) 28 h., 60 °C., Et <sub>3</sub> N	DMSO	60

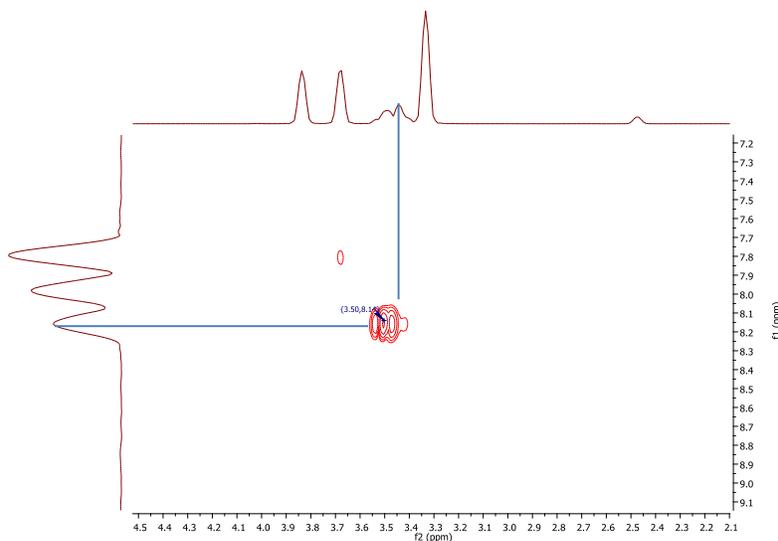
La caracterización estructural de los compuestos 5-Cloro-2-((2-guanidinoetil)sulfanil)-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**ACN 3**) y 2-(2,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidinoetil)sulfanil)-5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**ACN 4**), se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



**Figura 14.**  $\delta$ , constante de acoplamiento ( $J$ ), multiplicidad de los compuestos ACN 3 y ACN 4.

A partir del análisis de los espectros de IR (**Anexo, Espectro 23 y 30**) se observó la presencia de la banda que corresponde a la vibración de tensión del enlace N–H a  $3157\text{ cm}^{-1}$ . Además, se presentan las señales que corresponden a la vibración de tensión del enlace C=O del grupo éster a  $1673\text{ cm}^{-1}$ .

Dado que la estructura del compuesto **ACN 4** difiere en la estructura del compuesto **ACN 3**, únicamente en la protección de los nitrógenos de la guanidina con el grupo Boc; por lo tanto sus espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C presentan señales en común. En los espectros de RMN <sup>1</sup>H se observó la señal del hidrógeno –N–H a campo bajo, en 8.14 y 8.50 ppm. A campo bajo también se identificaron las señales de la zona aromática del núcleo de bencimidazol, como señales simples alrededor de 7.98-7.78 ppm, asignadas a los protones H-7 e H-4 respectivamente. Los protones alifáticos se presentaron como señal triple (t), que integró para dos protones centrada en 3.60 asignada al metileno unidos al azufre y un múltiplete en 3.44 asignado al metileno unido a nitrógeno.

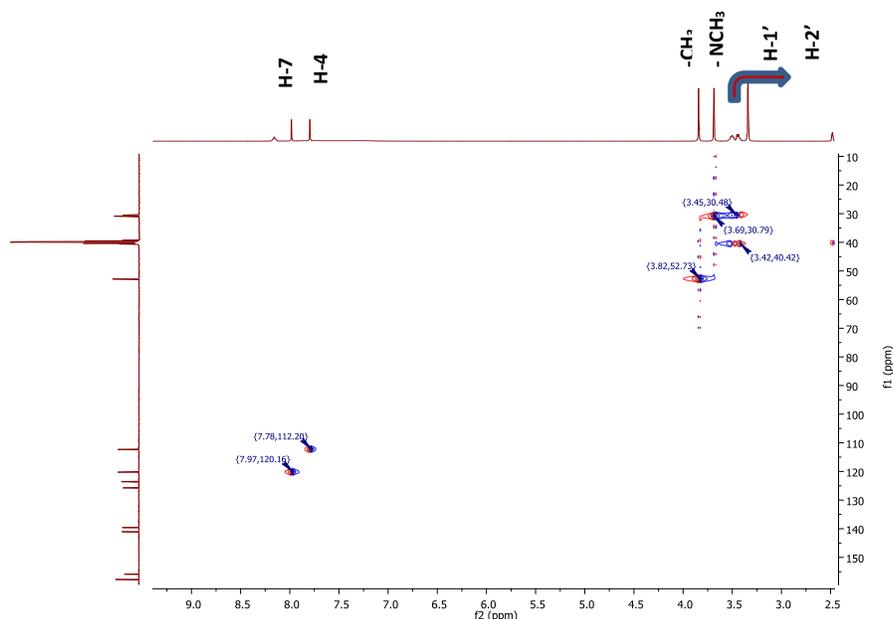


**Figura 15.** Ampliación del espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ) del compuesto **ACN 3**.

Las asignaciones de los protones alifáticos y aromáticos de los compuestos **ACN 3** y **ACN 4** se verificaron con la ayuda de los espectros de correlación homonuclear COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (**Fig. 15**). En este espectro se observan la interacción del protón de -NH con los protones H-2' (metileno).

Con respecto al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observaron las señales a campo alto, en el caso del espectro de **ACN 4** a diferencia del espectro de **ACN 3**, en 83.0 y 78.4 ppm asignados a los carbonos del grupo Boc .

En el caso del compuesto **ACN 3** se logro observar a partir de espectro HMBC 2D la correlación entre los prótones de H-7 y C-7, H-4 y C-4, H-1' y C-1', H-2' y C-2' (**Fig. 15**).



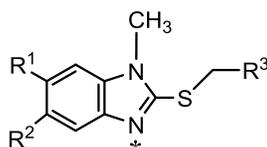
**Figura 16.** Espectro RMN HSQC (DMSO- $d_6$ ) del compuesto **ACN 3**.

Dada la naturaleza altamente polar de lo compuesto **ACN 3** y **ACN 4**, fueron analizados mediante espectrometría de masas de ionización por Electrospray (EM ESI), por inyección directa de la muestra y operando en el modo positivo. Por esta técnica se pudo corroborar la masa de ambos bencimidazoles mencionados ya que en sus espectros de masas (**Anexo, Espectro 26, 33**), se observa la formación del ion molecular en 342 que corresponde a  $[M+1]^+$  para el compuesto **ACN 3** y un artefacto con sodio del ión molecular en 564 que corresponde a  $[M+23]^+$  para el caso del compuesto **ACN 4**.

### 9.6. Evaluación de susceptibilidad de *G.intestinalis* frente a los compuestos sintetizados

Los compuestos **ACN 1-ACN 4** se sometieron a ensayos *in vitro* contra los protozoarios *G.intestinalis* y *T. vaginalis* cuyos resultados se muestran en la **Tabla 13**. De los cuatro compuestos sintetizados, tres presentaron mejor actividad (**ACN 2-ACN 4**) tanto giardicida y tricomonocida que los fármacos de referencia, Metronidazol y Albendazol.

**Tabla 13.** Resultados de ensayos de susceptibilidad *in vitro* de *G.intestinalis* frente a los compuestos sintetizados **ACN 1-4**



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> (nM) <i>G. intestinalis</i>	CI <sub>50</sub> (nM) <i>T. vaginalis</i>
<b>ACN 1</b>	COOCH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>2</sub> CN *	48±3	168±6
<b>ADI 6</b>	H	H	CH <sub>2</sub> CN *	39.1±3.3	82.8±1
<b>ACN 2</b>	COOCH <sub>3</sub>	Cl	CH=N-NH-C(=O)NH <sub>2</sub>	33±3	121±5
<b>ADI 4</b>	H	H	CH=N-NH-C(=O)NH <sub>2</sub>	58.9±2.7	91.1±8.1
<b>ACN 3</b>	COOCH <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>2</sub> -NH-C(=NH)NH <sub>2</sub>	29±3	131±5
<b>ADI 5</b>	H	H	CH <sub>2</sub> -NH-C(=NH)NH <sub>2</sub>	44.1 ±8.5	64.2±5.7
<b>ACN 4</b>	COOCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> -NH-C(=NBoc)NHBoc	13.8±1	55±6
Metronidazol	-	-	-	1226.9±175.3	236±16
Albendazol	-	-	-	37±3.6	1590.5±11.3

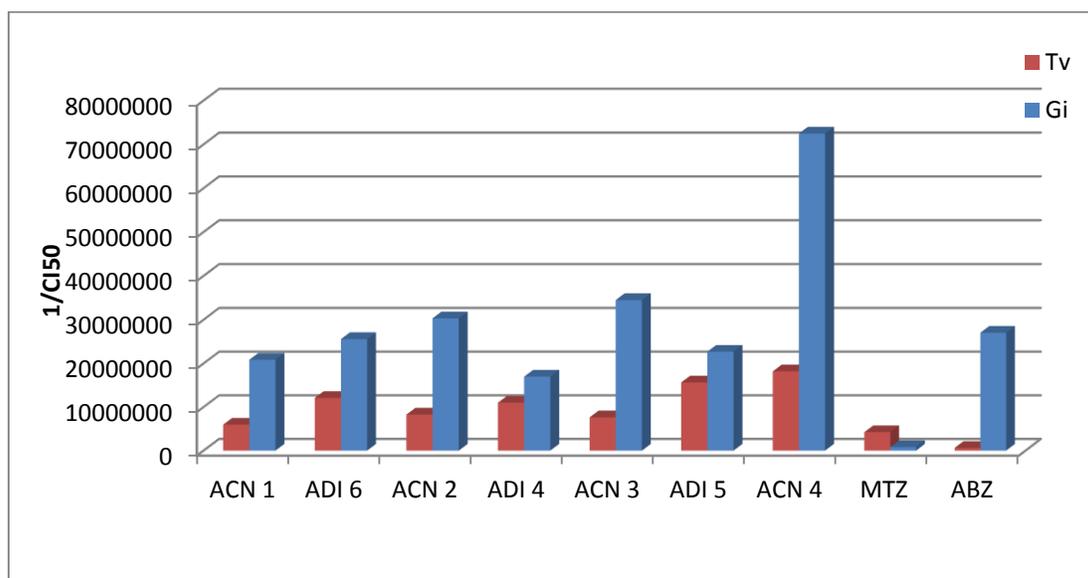
\*Producto obtenido en posición 3 del bencimidazol

A partir de los ensayos realizados contra el trofozoito de *G. intestinalis*, se obtuvo la concentración inhibitoria cincuenta (CI<sub>50</sub>) con lo cual se puede ver que todos los compuestos sintetizados resultaron ser más potentes que metronidazol y albendazol, a excepción del compuesto **ACN 1**, el cual no supero en potencia al albendazol, sin embargo presentó una potencia muy similar. El compuesto con mayor potencia, incluso superando el doble de potencia al albendazol, fue el compuesto **ACN 4**.

Se graficaron los valores del 1/CI<sub>50</sub> para observar de manera sencilla las diferencias de actividad entre los compuestos finales y los fármacos de referencia (**Gráfica 1**). A partir de ella se puede observar claramente, un aumento de la actividad giardicida desde **ACN 1-ACN4**. El compuesto **ACN 3** posee en su estructura el grupo guanidino (de la arginina), y el compuesto **ACN 4** se encuentra protegido en uno de los dos nitrógenos a través del grupo Boc. A partir de los resultados

obtenidos se puede decir que hay una tendencia en la actividad giardicida; conforme disminuye la semejanza con el grupo guanidino disminuye la actividad.

Por otro lado, con la finalidad de comparar el efecto de la presencia del grupo éster en posición 6 y cloro en 5, se incluyó en la gráfica 1, los compuestos sin sustituyentes en las posiciones mencionadas (**ADI 4, 5 y 6**). Donde de manera general se observa un aumento de la actividad giardicida. En este contexto se puede observar también una tendencia contraria con respecto a *T. vaginalis*, ya que la presencia de los sustituyentes en 6 y 5 disminuyen la actividad, a excepción del compuesto **ACN 4**, el cual mostró actividad contra ambos parásitos.



**Gráfica 1.** 1/CI<sub>50</sub> de los compuestos finales y fármacos de referencia.

Sin embargo de manera general se puede decir que todos los compuestos presentaron mayor potencia que los fármacos de referencia tanto en actividad giardicida como tricomonocida, excluyendo al compuesto **ACN 1**, el cual presentó una potencia similar al albendazol sobre *T. vaginalis*. En nuestro grupo de investigación ya se había observado la importancia de los sustituyentes alquiltio de la posición dos del núcleo de bencimidazol (2-(alquiltio)bencimidazoles: ej. S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(*N*-morfolinil), S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(*p*-nitrofenil) y más recientemente S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(1*H*-imidazol), ver **Fig. 6**) en la actividad antiprotozoaria, sobre todo en actividad giardicida y tricomonocida, observando que los compuestos que presentan actividad sobre *G. intestinalis* también presentan actividad sobre *T. vaginalis* [43].

### Conclusiones

- Se sintetizaron 4 compuestos bencimidazólicos sustituidos en 5 y 6 con cloro y éster metílico respectivamente.
- Se establecieron condiciones de reacción apropiadas para la obtención de los compuestos finales a partir de un precursor común.
- Los rendimientos obtenidos durante sus síntesis fueron moderados.
- Los cuatro compuestos sintetizados presentaron actividad giardicida y tricomonocida mayor o similar que los fármacos de referencia, MTZ y ABZ.
- El compuesto con mayor potencia incluso superando al ABZ en actividad giardicida, fue el compuesto **ACN 4**.
- El compuesto con mayor potencia incluso superando al MTZ en actividad tricomonocida, fue el compuesto **ACN 4**.
- La presencia de los sustituyentes cloro y éster metílico en 5 y 6 ocasionó un aumento de la actividad giardicida con excepción del compuesto **ACN 1**.
- La presencia de los sustituyentes cloro y éster metílico en 5 y 6 ocasionó una disminución de la actividad tricomonocida en los 4 compuestos sintetizados.

### Perspectivas

Evaluar los compuestos **ACN 1-4** en la enzima ADI de *G. intestinalis*, obtenida por técnicas de biología molecular.

La síntesis de compuestos con diferentes grupos en el extremo de la cadena alifática 2-alquiltio está abierta a mayor investigación, ya que los resultados obtenidos no son suficientes para hacer una conclusión definitiva en relación a estructura-actividad.

**Referencias**

- [1] Pérez-Arellano J.L.; *et. al.* Tratamiento de las enfermedades parasitarias (I): *Protozoosis*. Información terapéutica del sistema nacional de salud. **2007**. 31(1):3-16.
- [2] Luz Paniagua G; *et. al.* Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2007**. 6: 17.
- [3] Thompson RCA Monis PT. Variation in Giardia: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* **2004**. 58: 69-137.
- [4] Vázquez Tsuji O.; Campos Rivera T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev. Del Centro de Inv.* **2009**. 8 (31); 75-90.
- [5] Thompson R.C.A. Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **2000**. 30: 1259-67.
- [6] Sullivan P.B.; *et. al.* Parasitic infection of the Gut and Protein Losing enteropathy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1992**. 15: 404-407.
- [7] Oberhuber G.; Stolte M. Giardiasis: Analysis of Histological Changes in Biopsy Specimens of 80 Patients. *J. Clin. Pathol.* **1990**. 43: 641-643.
- [8] Muñoz FM. Treatment and Prevention of Giardiasis [en línea]. UpToDate. 2013. Disponible en: <http://www.uptodate.com>. Consultado el 30 de mayo de 2016.
- [9] Lujan D. H. Giardia y giardiasis. *Medicina.* **2006**. 66: 70-74.
- [10] Luján H.D.; Mowatt M.R.; Nash TE. The mechanisms of Giardia lamblia differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**. 61: 294-304.
- [11] Rodney D. A. Biology of Giardia lamblia. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**. 14(3): 447-475.
- [12] Scorza V. Update on the Diagnosis and management of Giardia spp. Infections in dogs and cats. *Top. Companion. Anim. Med.* **2010**. 25: 155-162.
- [13] Lappin R. M. Protozoal Diseases [en línea]. Sección 4. Elsevier. Consultado el 5 de mayo de 2016.
- [14] Cordero Bernabé R.; *et. al.* Amebiasis, Giardiasis y Trichomoniasis. *Medicine.* **2014**. 11(54): 3181-93.
- [15] Esch K. J.; Petersen C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clin. Microbiol Rev.* **2013**. 26 (1): 58-85.
- [16] Arroyo Salgado A.; *et. al.* Caracterización Génica por reacción en cadena de la Polimerasa de Giardia Intestinalis en muestras de Humanos y Perros del Caribe Colombiano. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2014**. 32(7): 424-427.
- [17] Alparó Herrera I. Giardiasis y desnutrición. *Rev. Soc. Bol. Ped.* **2005**. 44 (3): 166 -173.
- [18] Boreham P.F.; Upcroft J.Á.; Upcroft P. Changing Approaches to the Study of Giardia Epidemiology: 1681-2000. *Int. J. Parasitol.* **1990**. 20: 479-487.
- [19] Ekramul Hoque M. Giardiasis. *Conn's Current Therapy.* **2014**. 96: 96-100.

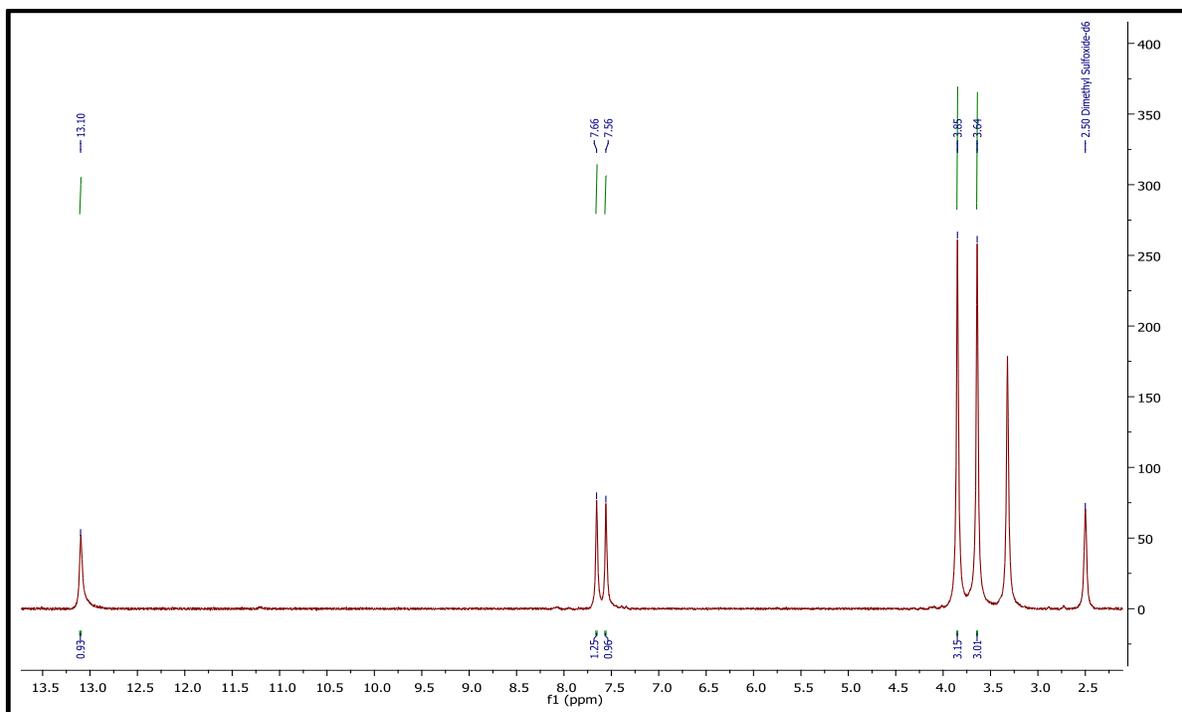
- [20] Schofield P. J.; Costello M; Edwards M. R. The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. *Int. J. Parasitol.* **1990**. 20: 697-699.
- [21] Jarroll E. L.; *et. al.* Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**. 2: 187-196.
- [22] Schofield P. J.; *et. al.* Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**. 45: 39-47.
- [23] Reiner D. S.; *et. al.* Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J. Infect. Dis.* **1986**. 154: 825-832.
- [24] Ringqvist E.; *et. al.* Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**. 159: 85-91.
- [25] Stadelmann B.; *et. al.* Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLOS one.* **2012**. 7(9): 1-11.
- [26] Schofield P. J.; *et al.* The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**. 51: 29-36.
- [27] Li Z.; *et. al.* Mechanisms of catalysis and inhibition operative in the arginine deiminase From the human pathogen *Giardia lamblia*. *Bioorg. Chem.* **2009**. 37: 149-161.
- [28] Linsky. T.; Fast W. Mechanistic similarity and diversity among the guanidine-modifying members of the protein superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**. 1804: 1943-1953.
- [29] Knodler L. A. *et. al.* *Giardia intestinalis*: purification and partial amino acid sequence of arginine deiminase. *Exp. Parasitol.* **1996**. 85: 77-80.
- [30] Rópolo A. S.; Touz M. C. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *Scientific World Journal.* **2010**. 10: 2019-2031.
- [31] a) Touz M. C; *et. al.* Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J. Cell. Sci.* **2008**. 121: 2930-2938. b) Prucca C. G.; Lujan H. D. Antigenic Variation in *Giardia lamblia*. *Cell. Microbiol.* **2009**. 11: 1706-1715.
- [32] Gardner T.B; Hill D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol Rev.* **2001**. 14; 1114-1128.
- [33] Cedillo Rivera R.; Muñoz O. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **1992**. 37:221-224.
- [34] Petri W. Therapy of Intestinal Protozoa. *Trends Parasitol.* **2003**. 19: 523-6.
- [35] Gottschall D.C; Wang R.; The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today.* **1990**. 6(4):115.
- [36] Upcroft P.; Upcroft J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**. 14(1): 150-164.
- [37] Rojo-Marcos G.; Cuadros-González J. Malaria y protozoos intestinales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2016**. 34(3):191-204.

- [38] Rodney D. A. Giardiasis. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. [En línea]. Consultado 25 de junio de 2016.
- [39] Bendesky A.; Menéndez D.; Ostrosky W.P. Is Metronidazole carcinogenic?. *Mutation Research*. **2002**. 511(2):133-144.
- [40] López Nigro M.; Palermo A.; Mudry M.; Caballo M. Cytogenetic Evaluation of two Nitroimidazole Derivatives. *Toxicol. In vitro*. **2003**. 17(1): 35-40.
- [41] Aguayo Ortiz R. Análisis quimioinformático y modelado molecular de derivados del bencimidazol para la selección eficiente de compuestos giardicidas y reposicionamiento en otras enfermedades. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. **2015**.
- [42] Pérez Villanueva J. Relaciones estructura actividad, diseño síntesis y actividad antiprotozoaria de derivados del bencimidazol. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM. México. **2013**.
- [43] Pérez Villanueva J.; Hernández-Campos M.; Yépez Mulia L. et. al. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-{[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl}-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2013**. 23: 4221–4224.
- [44] Trejo Soto P. J. Estudio de modelado por homología para determinar la estructura de la enzima arginina deiminasa de *Giardia intestinalis* y diseño de inhibidores. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. **2013**.
- [45] Martínez Córdoba G.A. Síntesis y actividad de derivados 1H- bencimidazol en la arginina deiminasa de *Giardia intestinalis*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. **2014**.
- [46] Flores Carrillo P. Síntesis y actividad antiprotozoaria de derivados del 6-cloro-2{[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil}-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. **2015**.
- [47] Carmen G. A.; Vargas R.; Morales G. E.  $1\pi \rightarrow 1\pi^*$  Ultraviolet Absorption Bands and Electronic Charge Transfers in Singlet Excited States of Sulfur Aromatic Heterocycles. *Spectroscopy Letters*. **2005**. 38: 605–616.
- [48] a) Form G. R. and Raper E. S. The Crystal and Molecular Structure of 2-Mercaptobenzimidazole. *Acta Cryst*. **1976**. B32, 345. b) Hizbullah K.; Badshah A.; Farkhanda S. 1-Methyl-1H-benzimidazole-2(3H)-thione. *Acta Cryst*. **2008**. E64, o1141.
- [49] Saxena, D.; Kajuria, R.; Suri, O. Synthesis and Spectral Studies of 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives. *J. Heterocyclic. Chem*. **1982**. 19, 681.
- [50] Anandarajagopal, K.; et. al. Synthesis and Characterization of 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives as Potential Analgesic Agens. *J. Chem. Pharm. Res*. **2010**. 2(3), 230.
- [51] Moran D.; et. al. Pyridinethiol/2-pyridinethione tautomeric equilibrium. A comparative experimental and computational study. *J. Org. Chem*. **2002**. 25:9061-9069.
- [52] Lopez Vallejo F; et al. Molecular modeling of some 1H-benzimidazole derivatives with biological activity againts *Entamoeba histolytica*: a comparative molecular field analysis study. *Bioorg. Medicin. Chem*. **2007**. 15(2): 1117-1126.

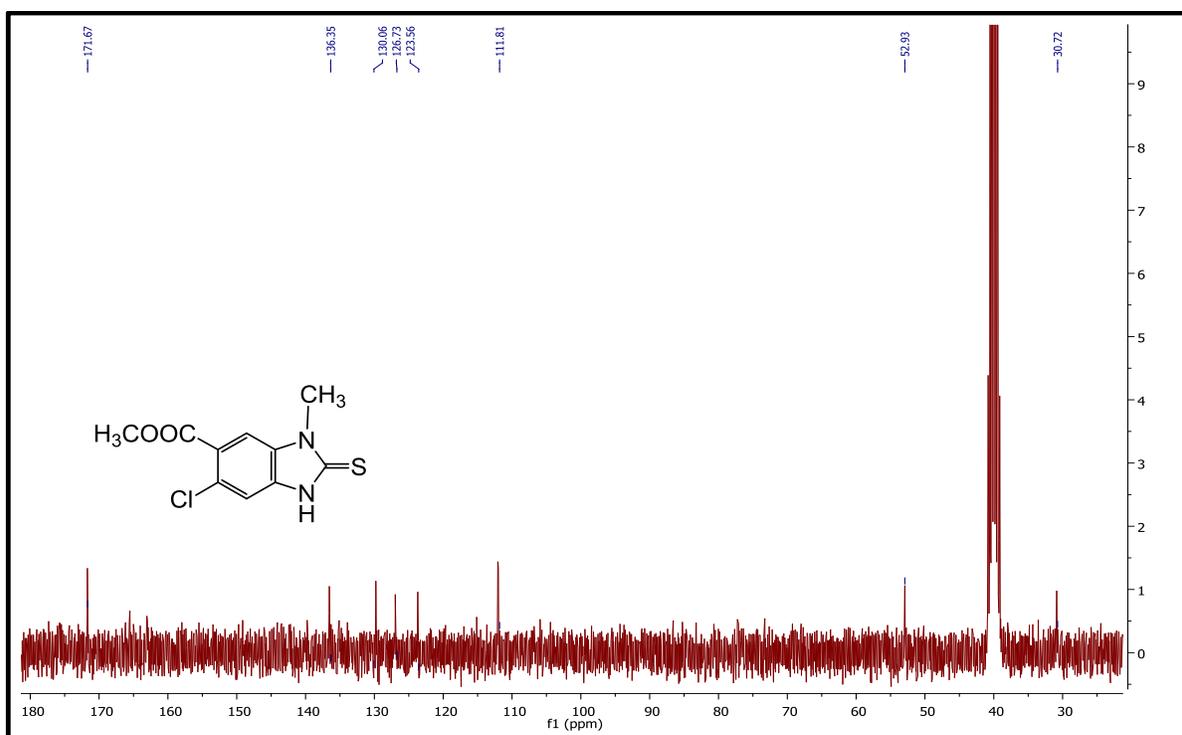
- [53] Halasa A. F.; Smith G.E. P. Smith. Michael and Mannich reactions with benzothiazole-2-thiol. *J. Org. Chem.* **1971**. 36 (5): 636–64.
- [54] Mikhaleva A. I.; *et al.* Directed Synthesis of semicarbazones, thiosemicarbazones, and guanylhydrazones of 1-vinyl-pyrrole- 2-carbaldehydes. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2008**. 44, 1384-1390.
- [55] Bjorgo B. J.; Boyd D. R.; Watson C. G. E-Z-Isomerism in aldimines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1974**. 2: 1081-1084.
- [56] Tom J. N.; Simon W. M.; Heather N. *et. al.* Deprotection of a primary Boc group under basic conditions. *Tetra. Letters.* **2004**. 45: 905–906.
- [57] Bernatowicz, M. S.; Wu, Y. L.; Matsueda, G. R. 1-*H*-Pyrazole-1-Carboxamidine Hydrochlorides An Attractive Reagent for Guanylation of Amines and Its Application to Peptide-Synthesis. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497–2502.
- [58] Drake B.; Patek. M.; Lebl M. A convenient Preparation of Monosubstituted N,N-di(Boc)-Protected Guanidines. *Synthesis.* **1994**. 5

# **ANEXOS**

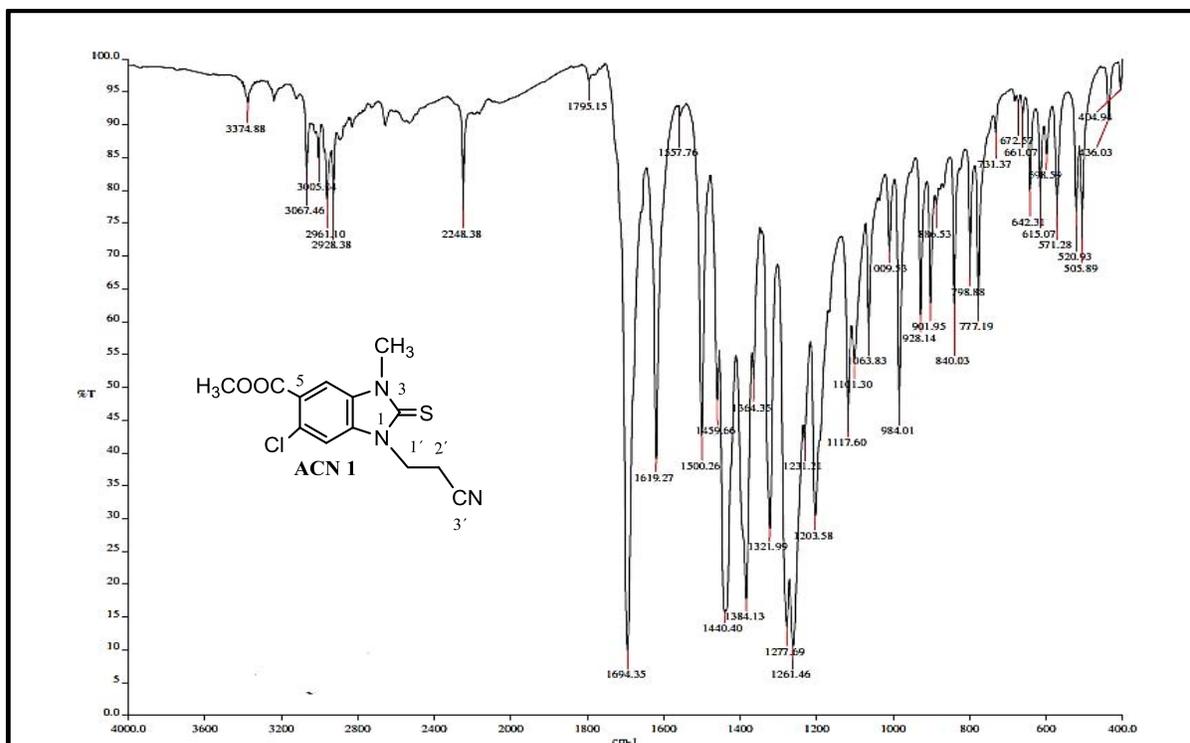
**(ESPECTROS DE IR, EM, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, RMN 2D)**



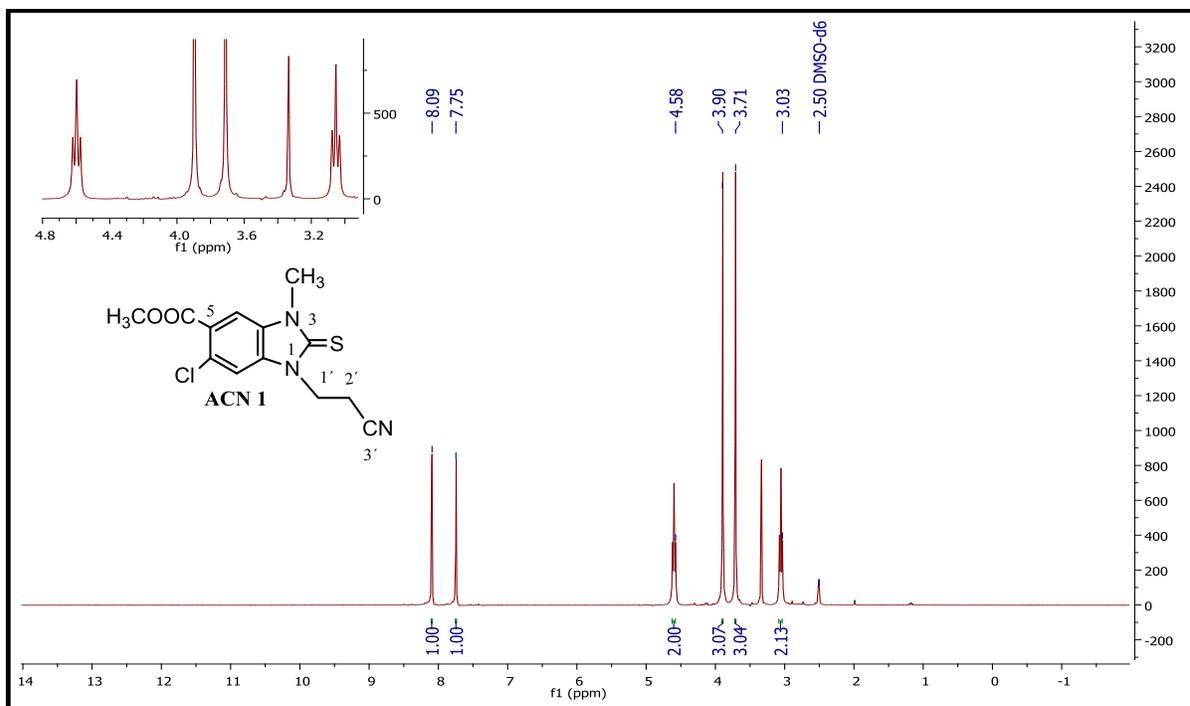
**Espectro 1.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de 6-Cloro-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (9).



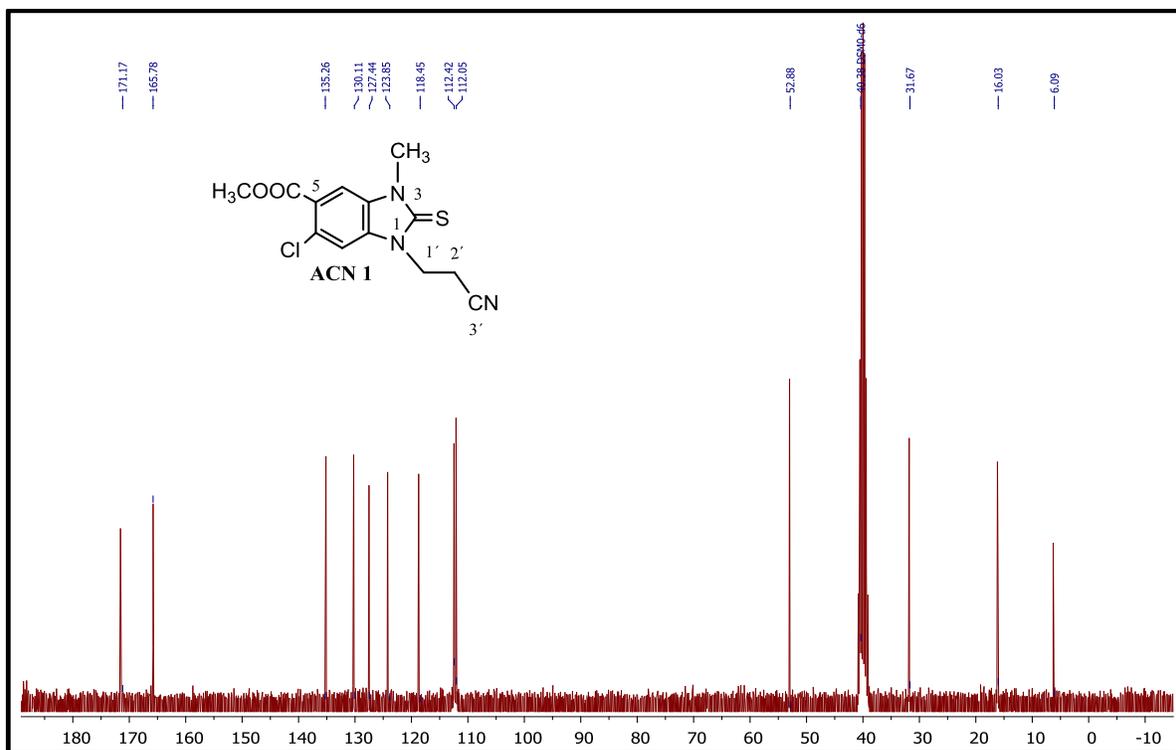
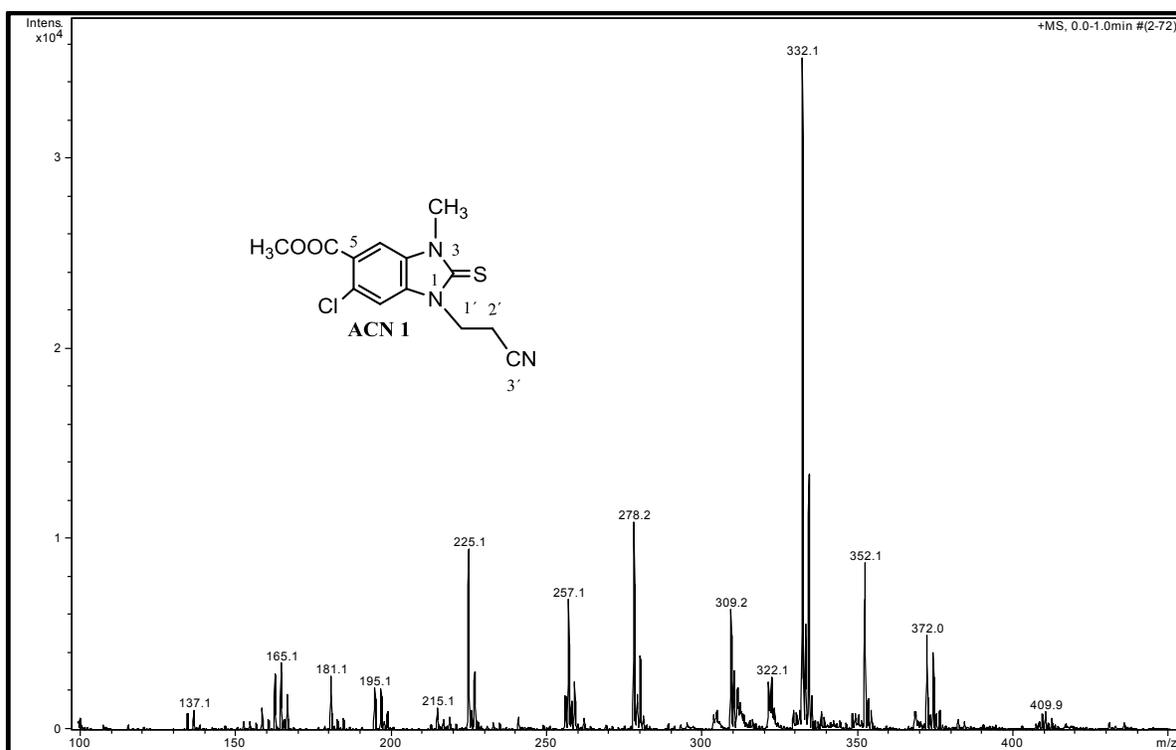
**Espectro 2.** RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de 9.



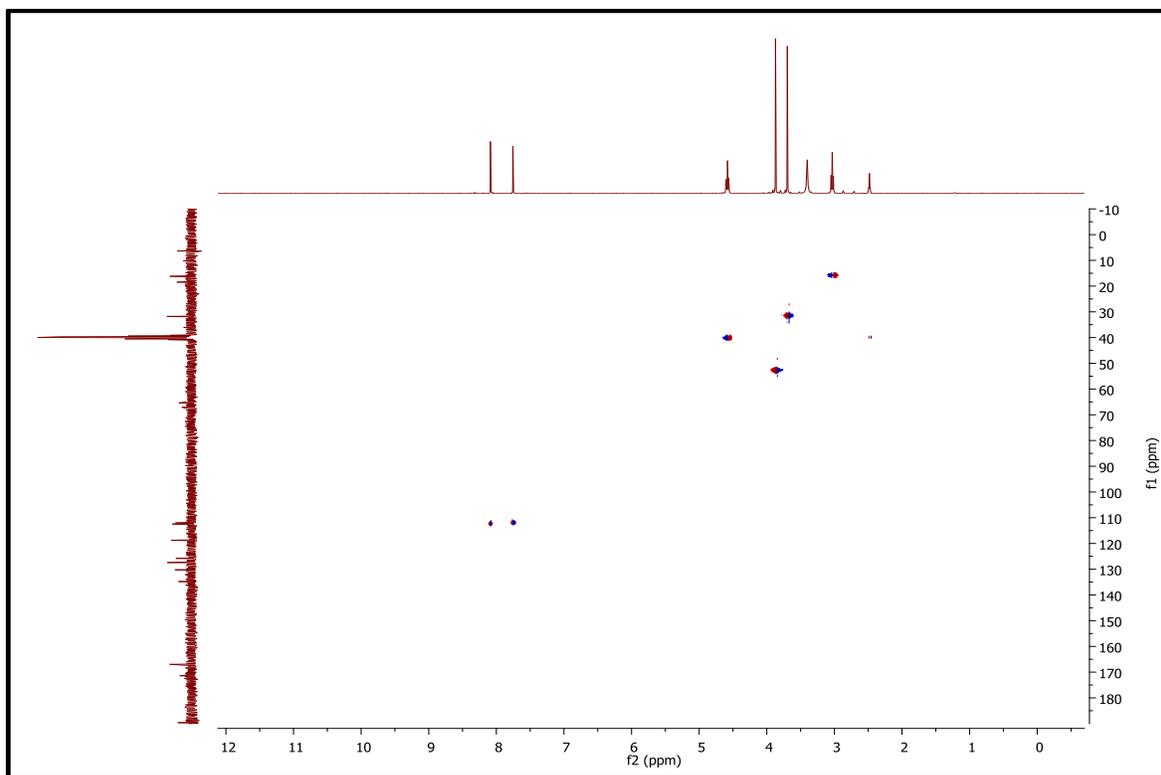
**Espectro 3.** IR de 6-Cloro-1-(2-cianoetil)-3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (ACN 1).



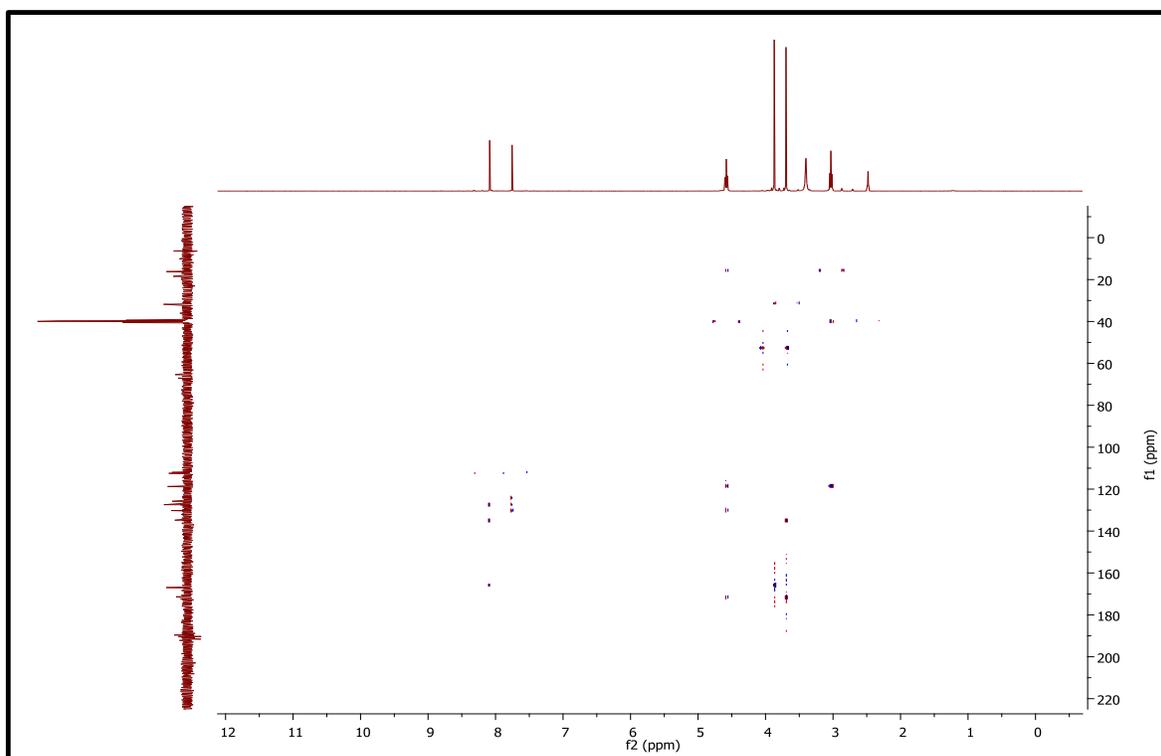
**Espectro 4.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de ACN 1.

Espectro 5. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, TMS, DMSO- $d_6$ ) de ACN 1.

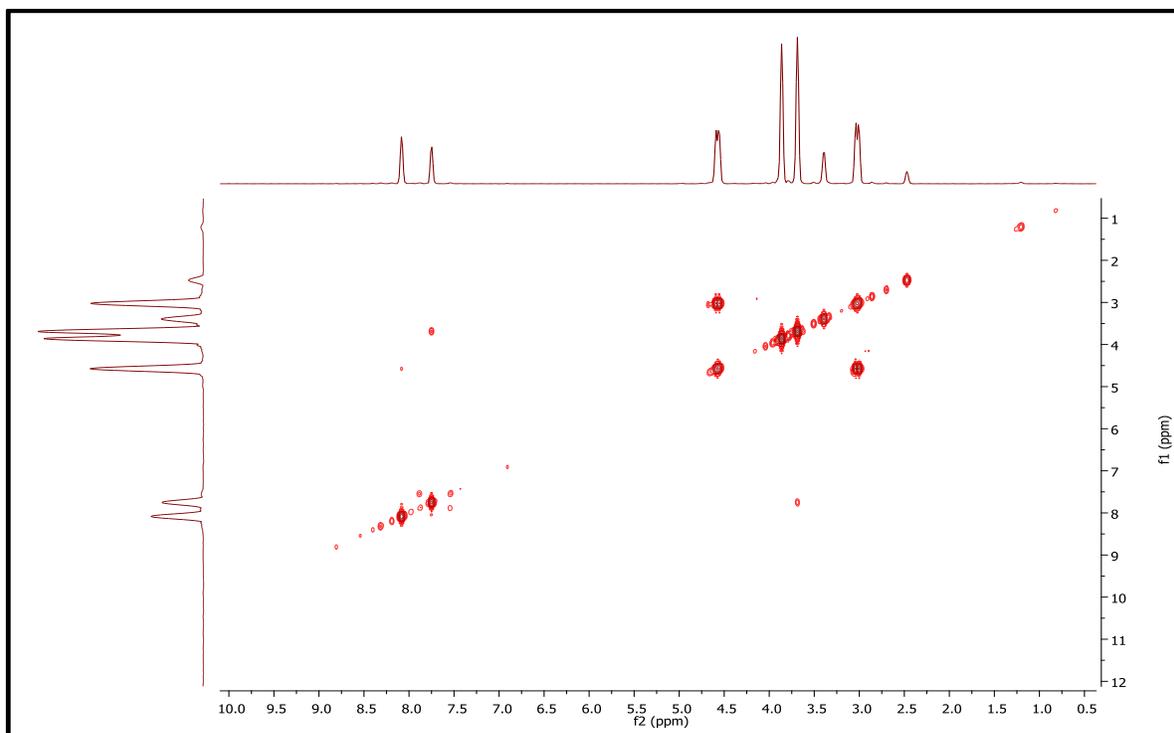
Espectro 6. EM ESI/ID de ACN 1.



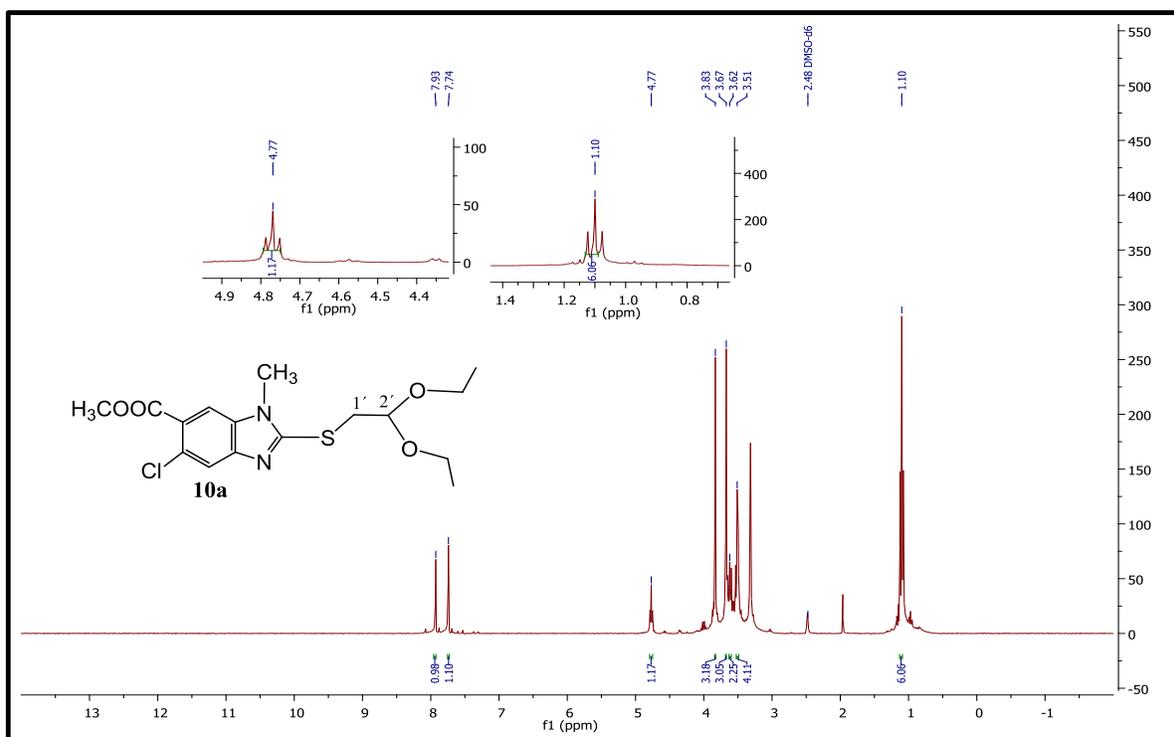
Espectro 7. Correlación heteronuclear HSQC de ACN 1.



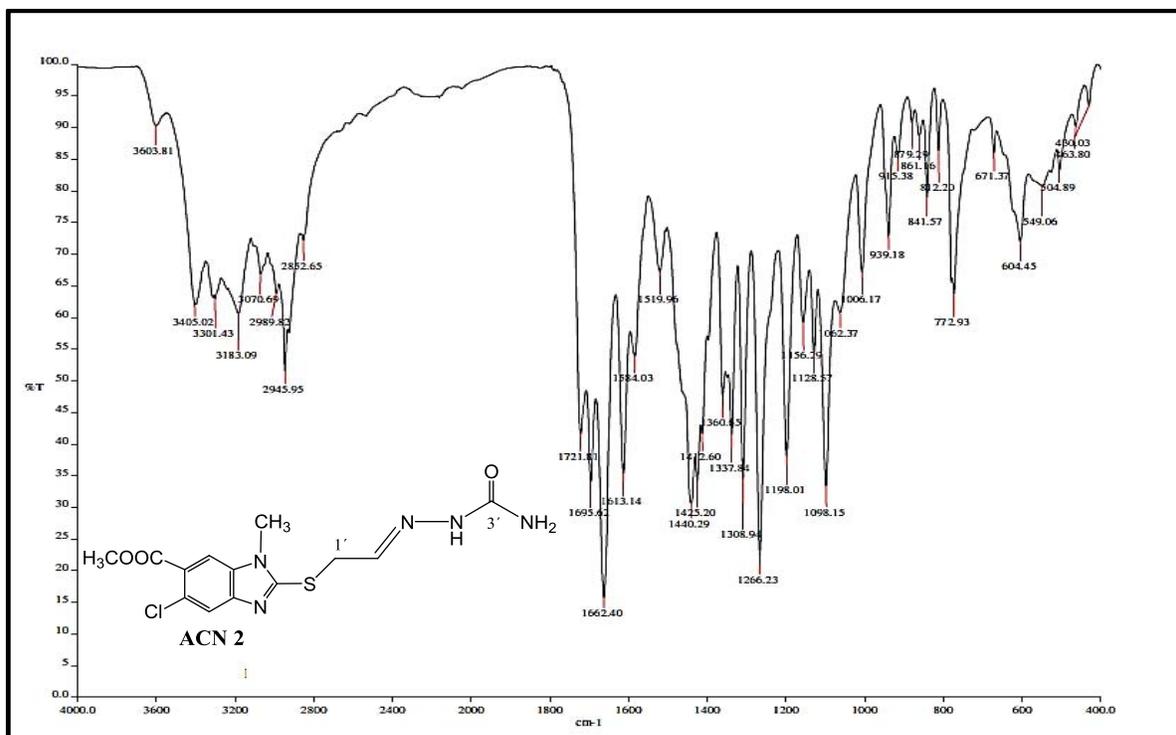
Espectro 8. Correlación heteronuclear HMBC de ACN 1.



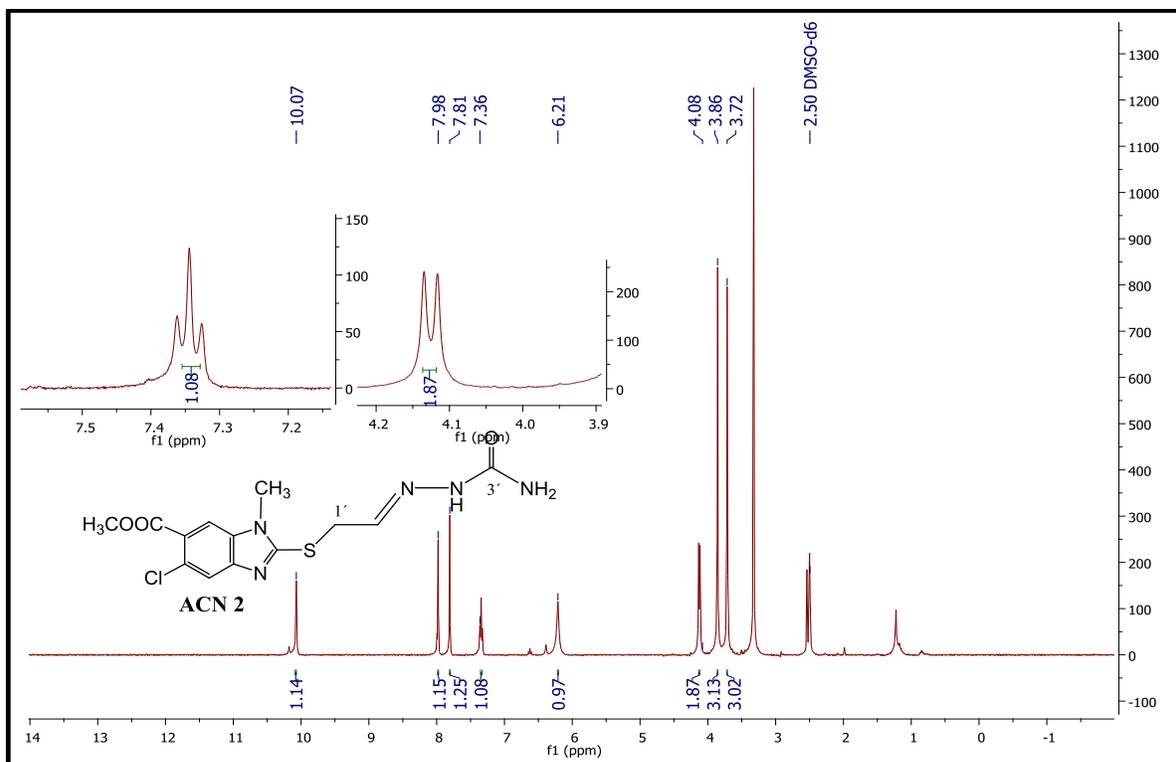
Espectro 9. COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de ACN 1.



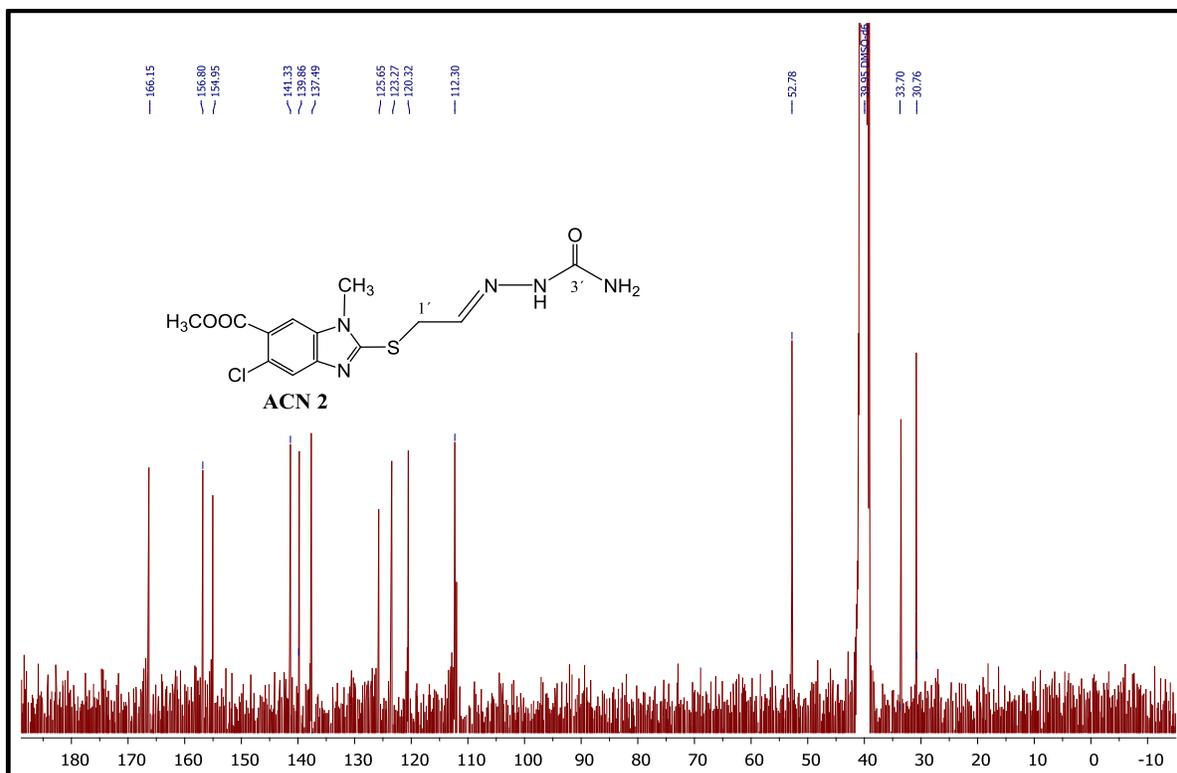
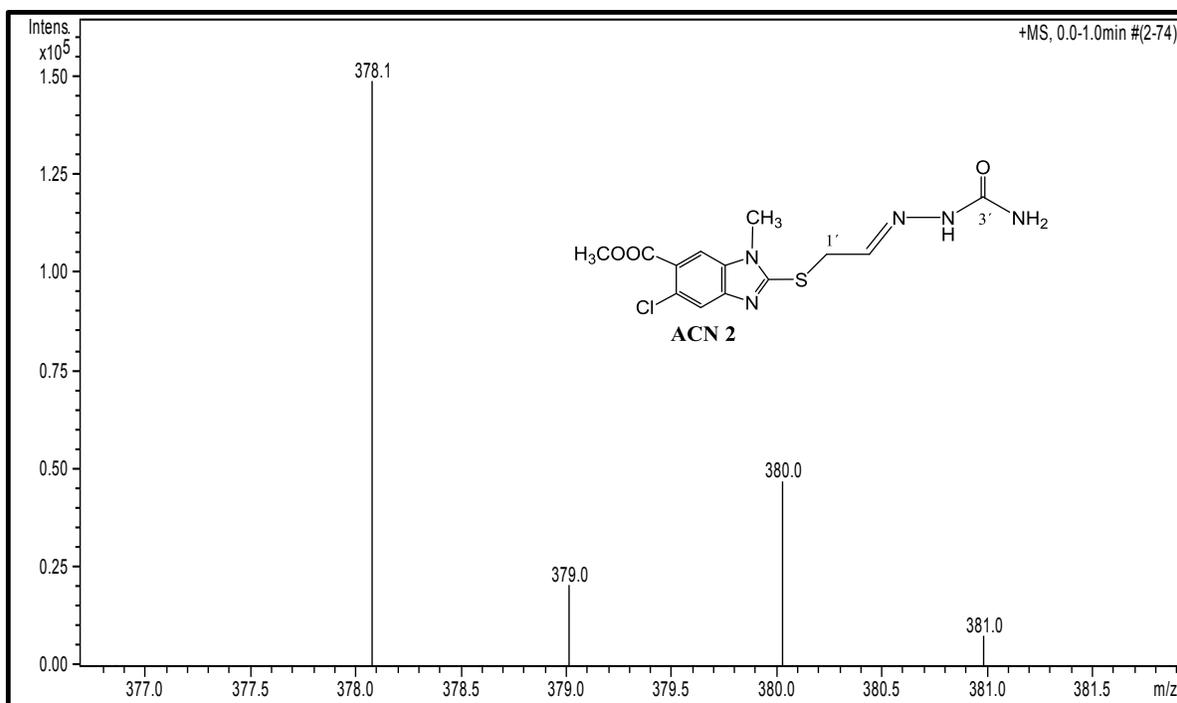
Espectro 10. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 5-Cloro-2-[(2,2-dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**10a**).



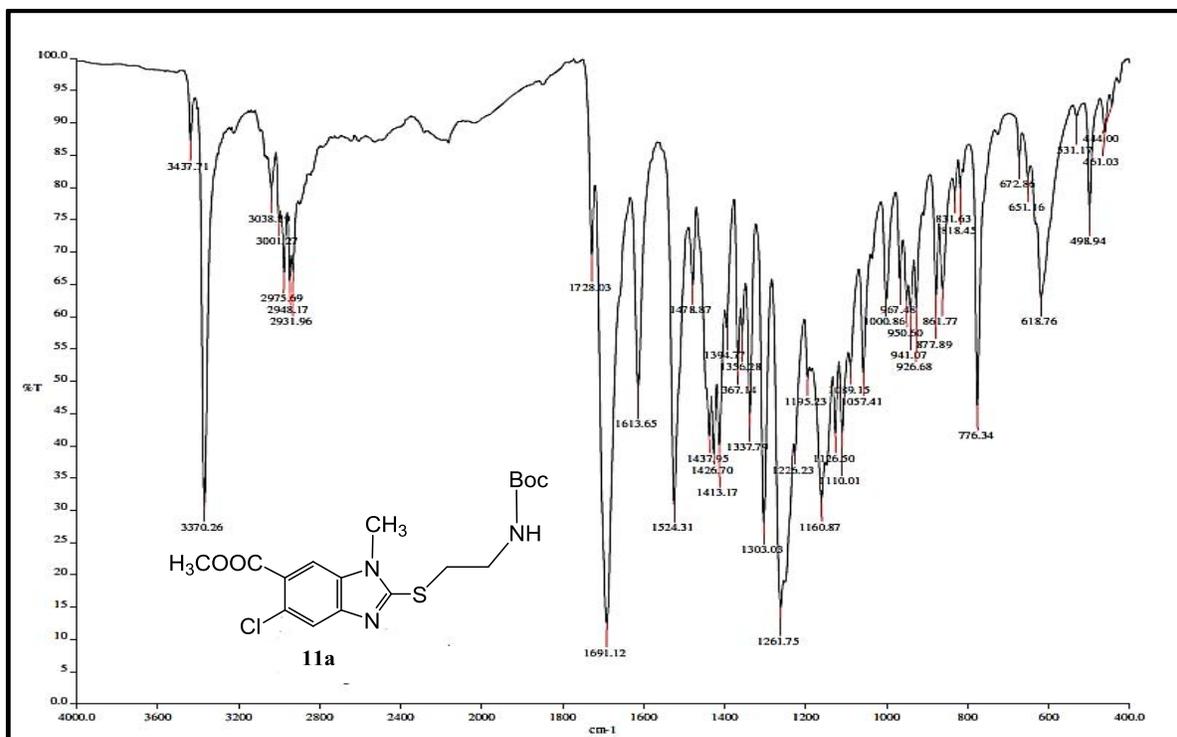
**Espectro 11.** IR de 2-[[2-(carbamoylhidraziniliden)etil]sulfanil]-5-cloro-1-metil-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (ACN 2).



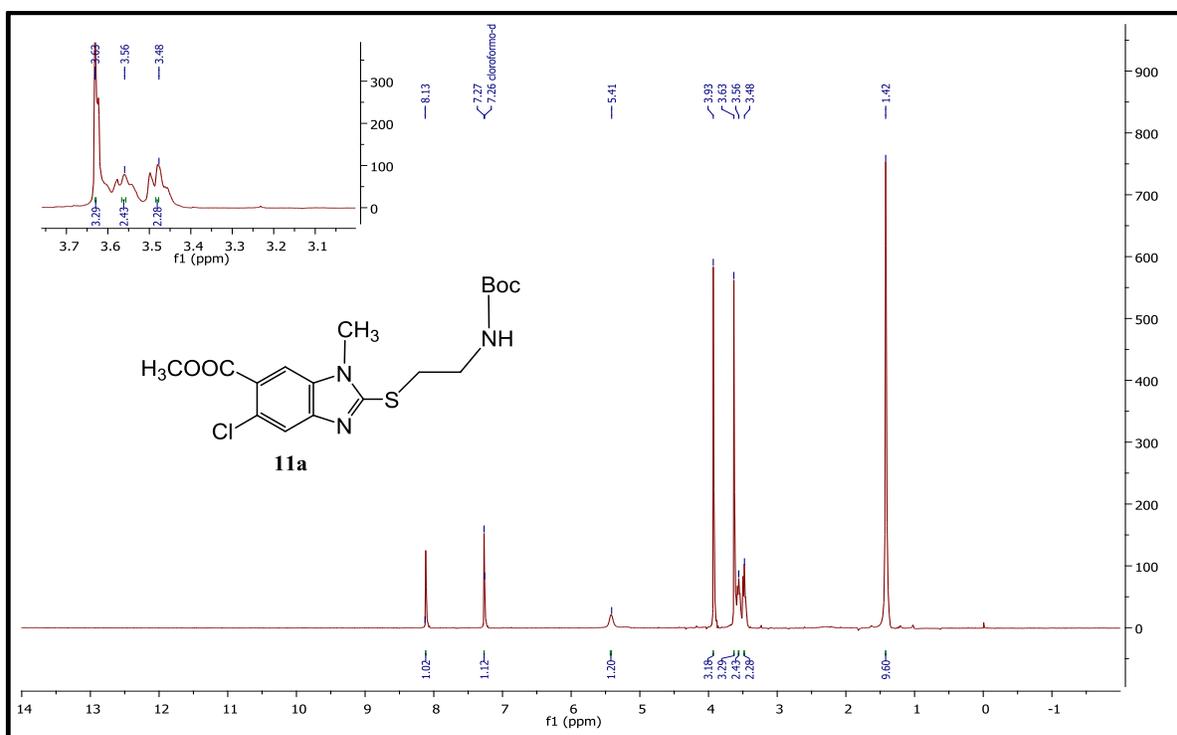
**Espectro 12.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de ACN 2.

Espectro 13. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS, DMSO- $d_6$ ) de ACN 2.

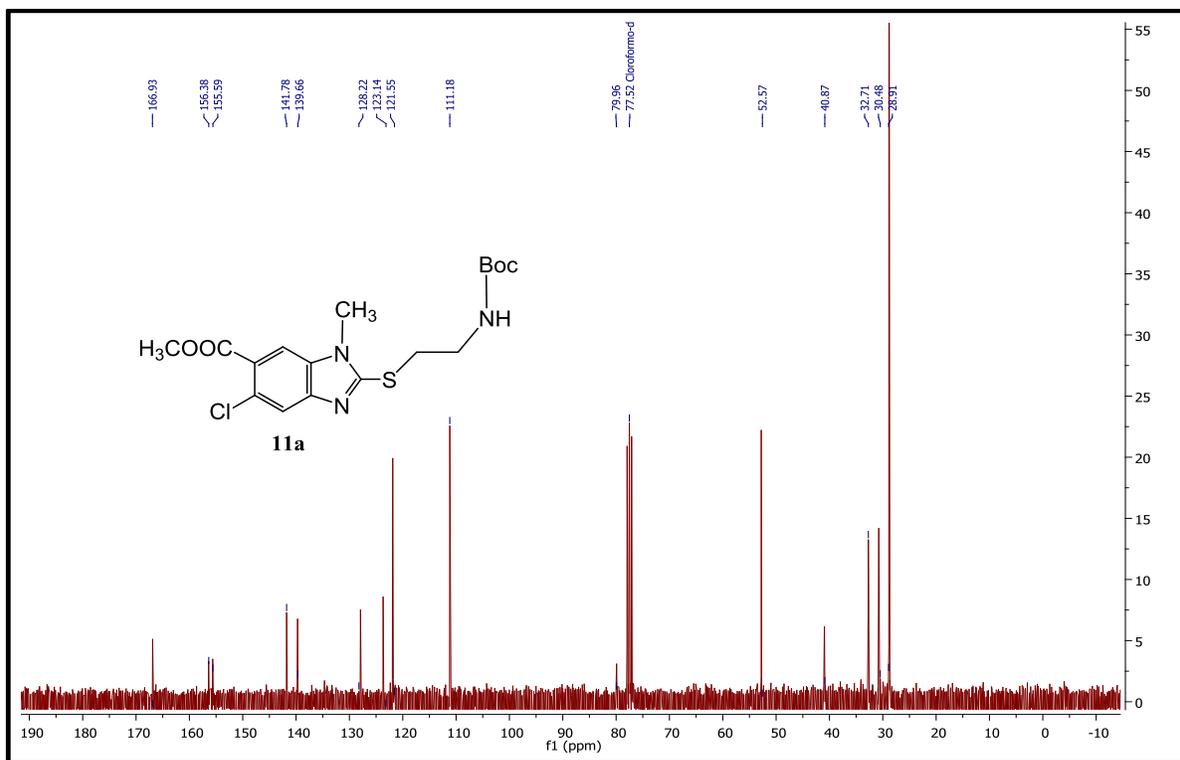
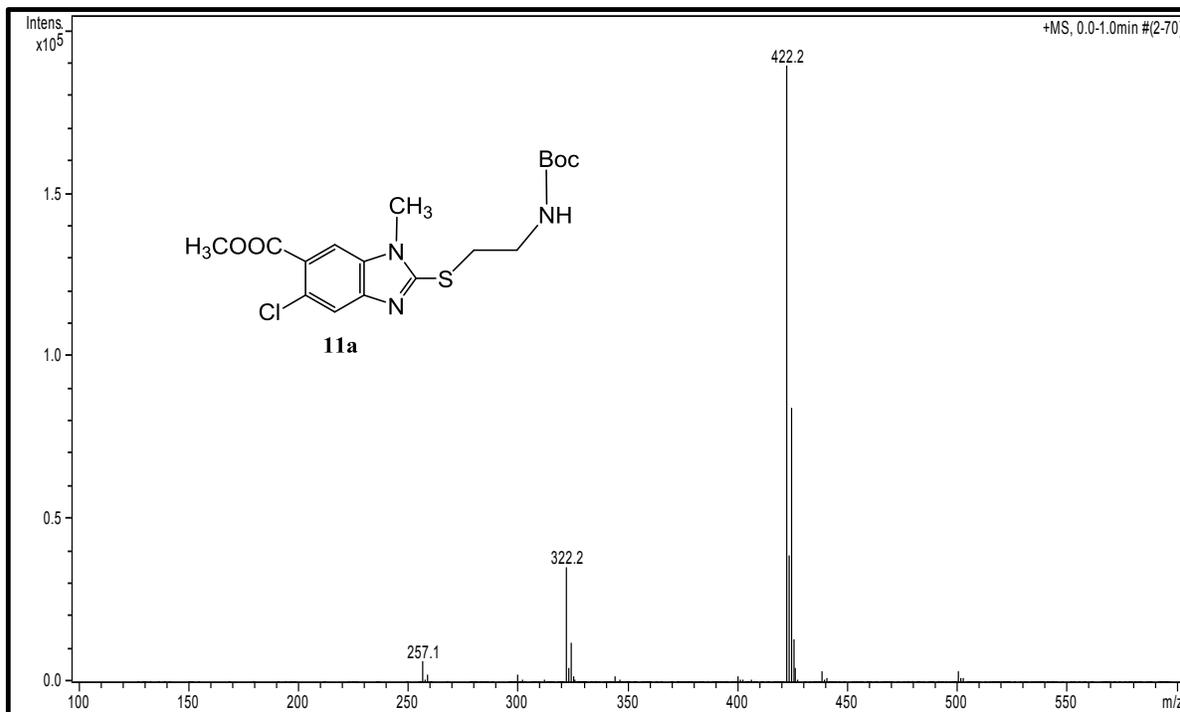
Espectro 14. EM ESI/ESI de ACN 2.

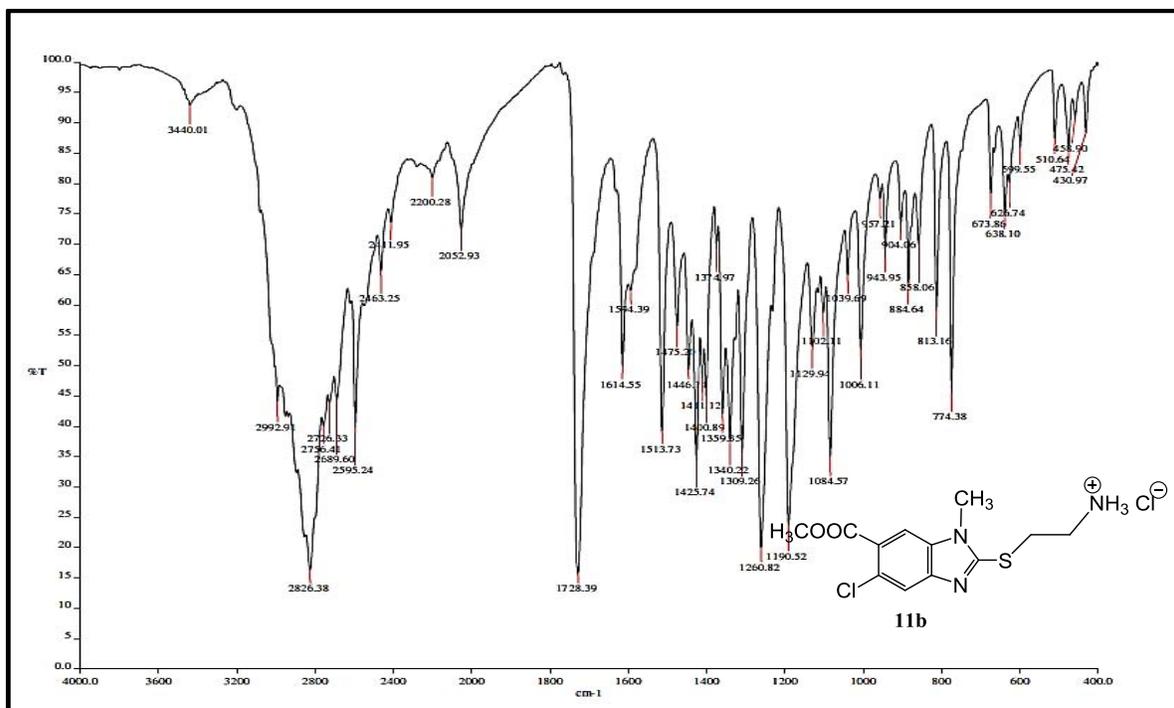


**Espectro 15. IR** 2-({2-[(*Tert*-butoxicarbonil)amino]etil} sulfanil)-5-cloro-1-metil-1*H*-benzimidazol-6-carboxilato de metilo (**11a**).

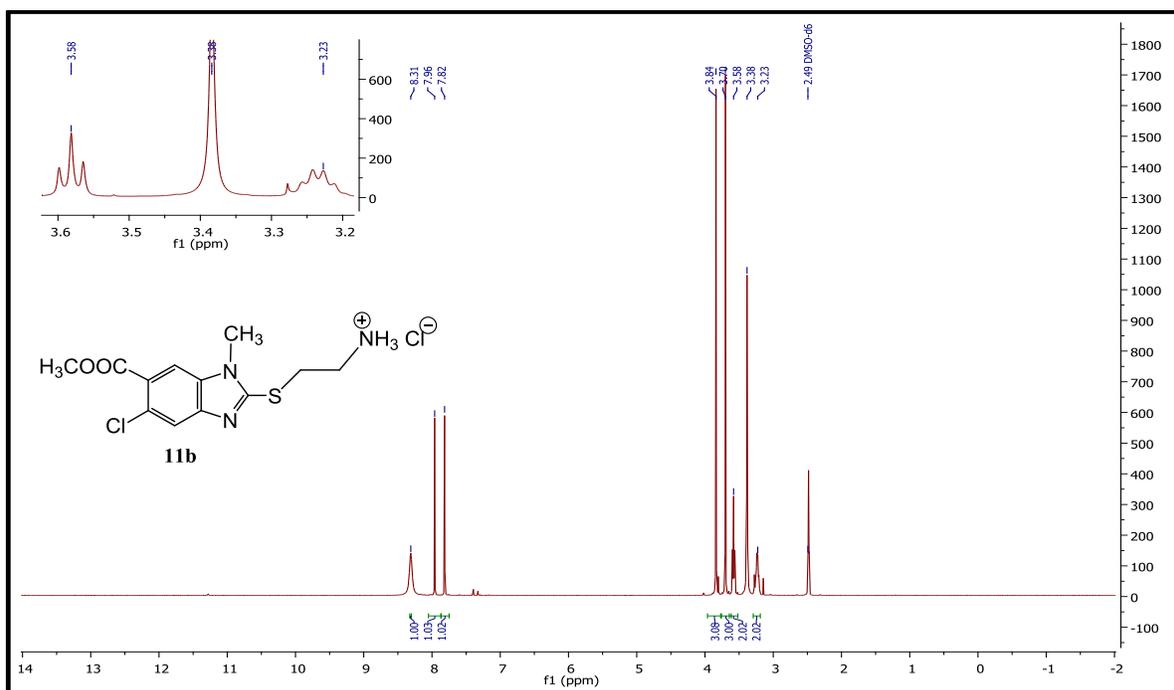


**Espectro 16. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, CDCl<sub>3</sub>) de 11a.**

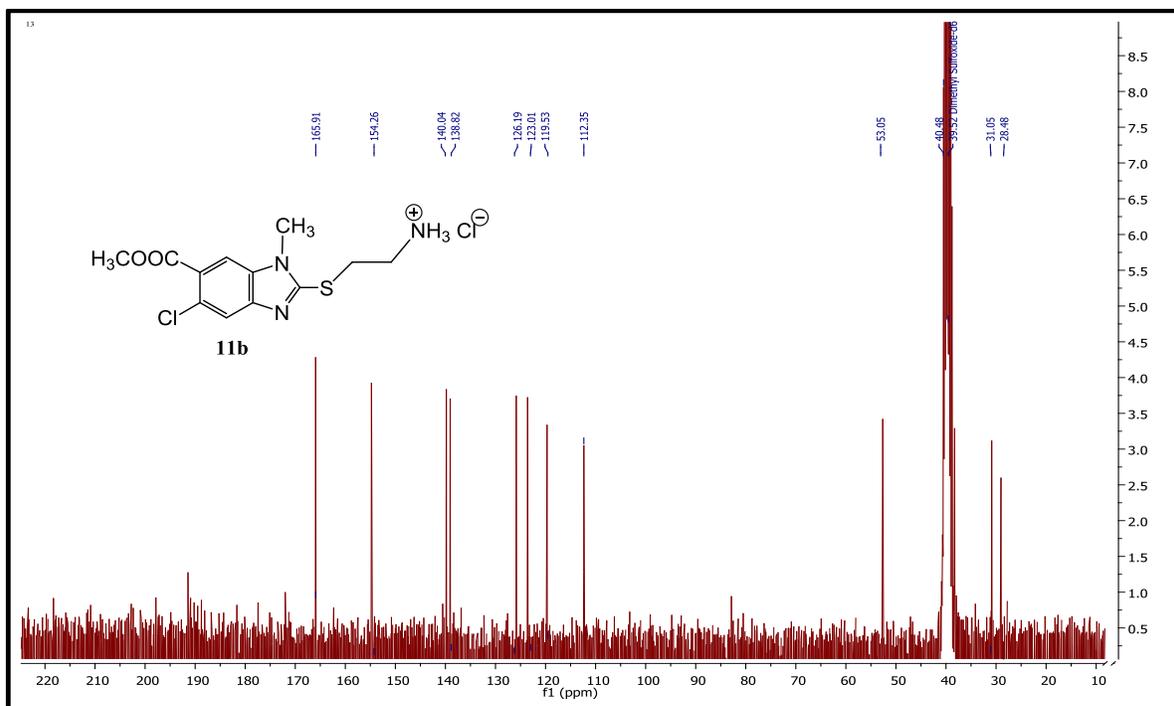
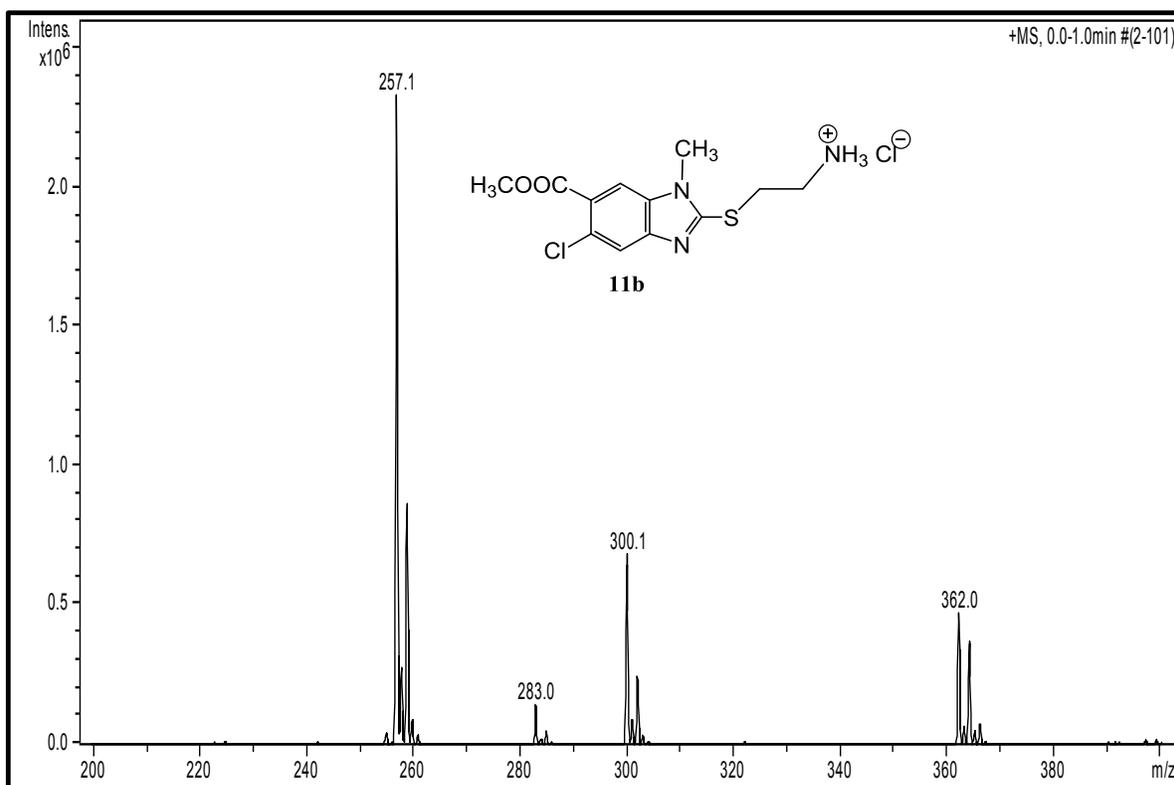
Espectro 17. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS,  $\text{CDCl}_3$ ) de **11a**.Espectro 18. EM ESI/ID de **11a**.



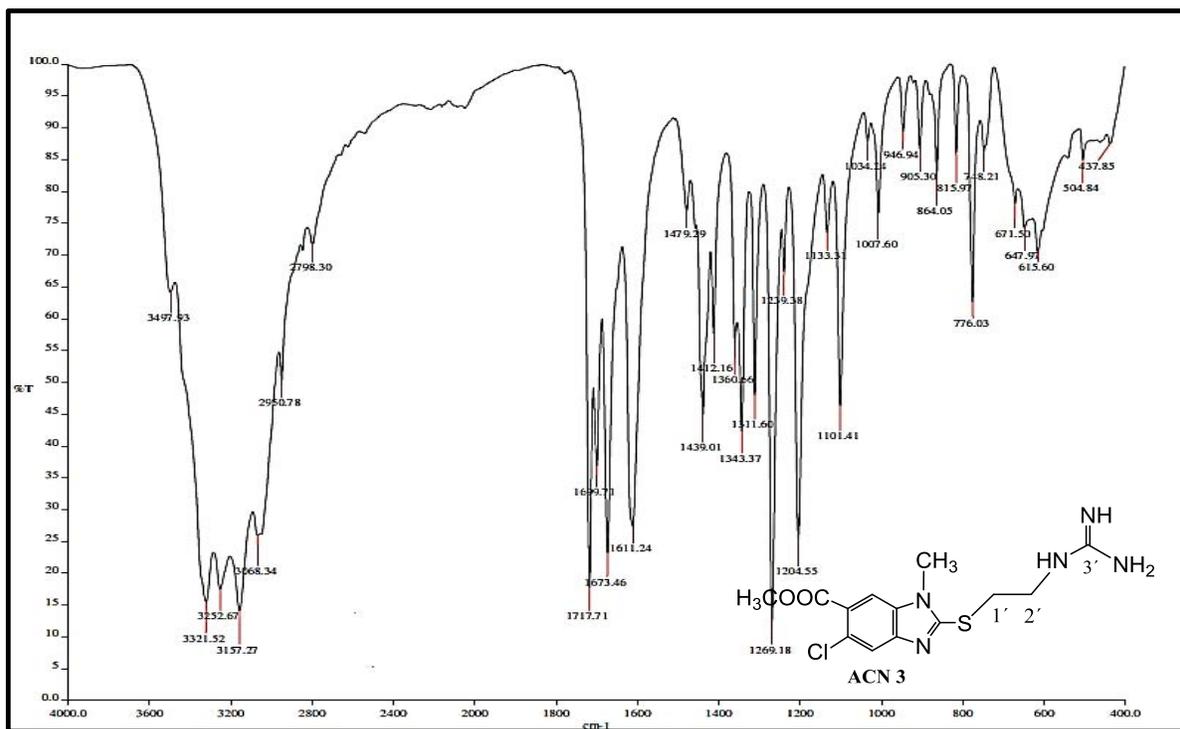
Espectro 19. IR de 2-[(2-Aminoetil)sulfanil]-5-cloro-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (11b).



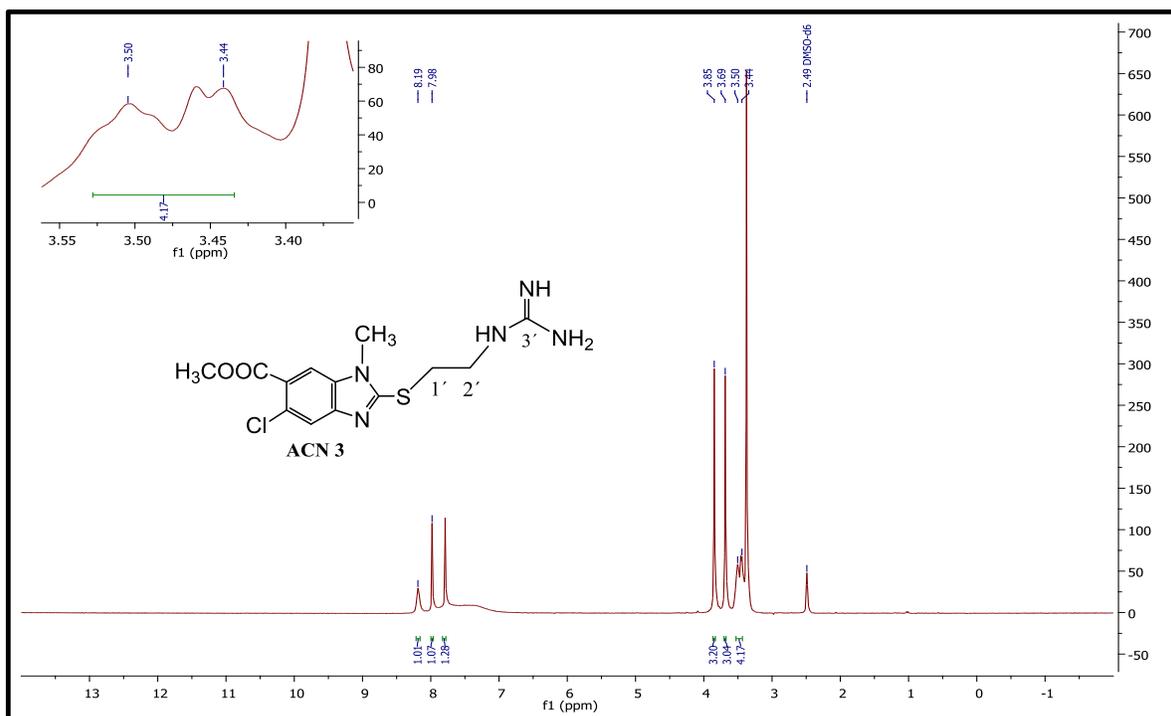
Espectro 20. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de 11b.

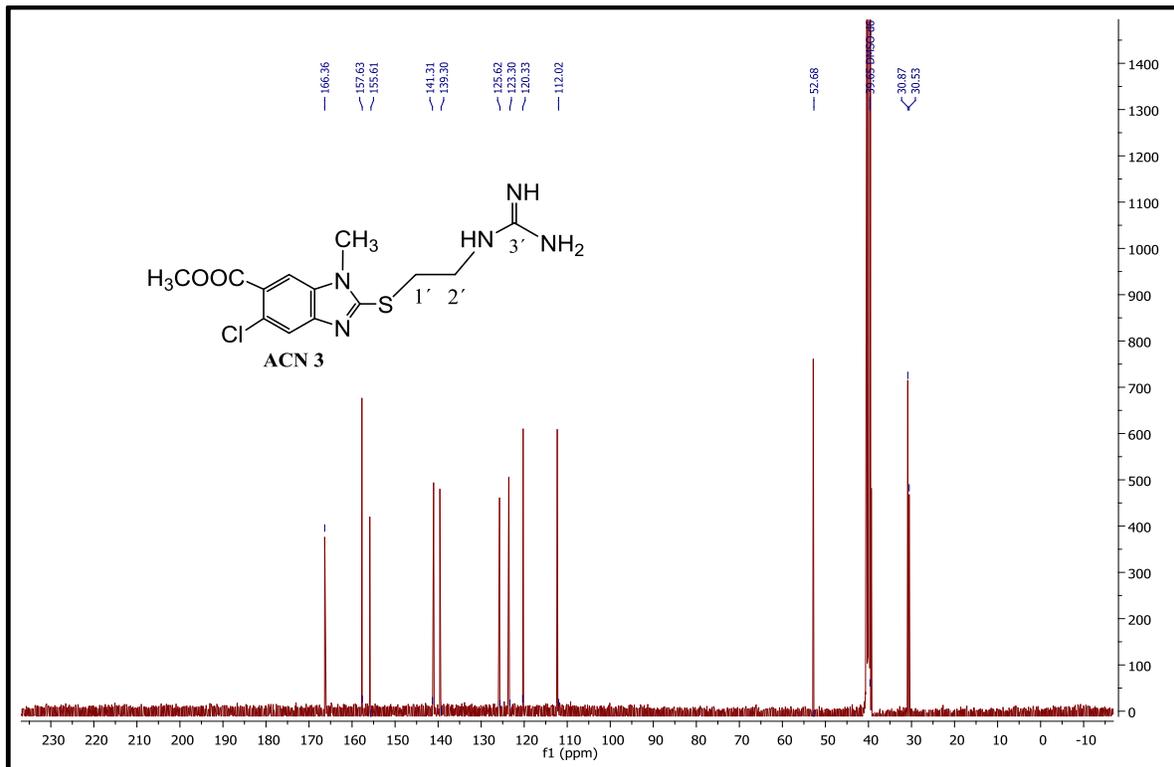
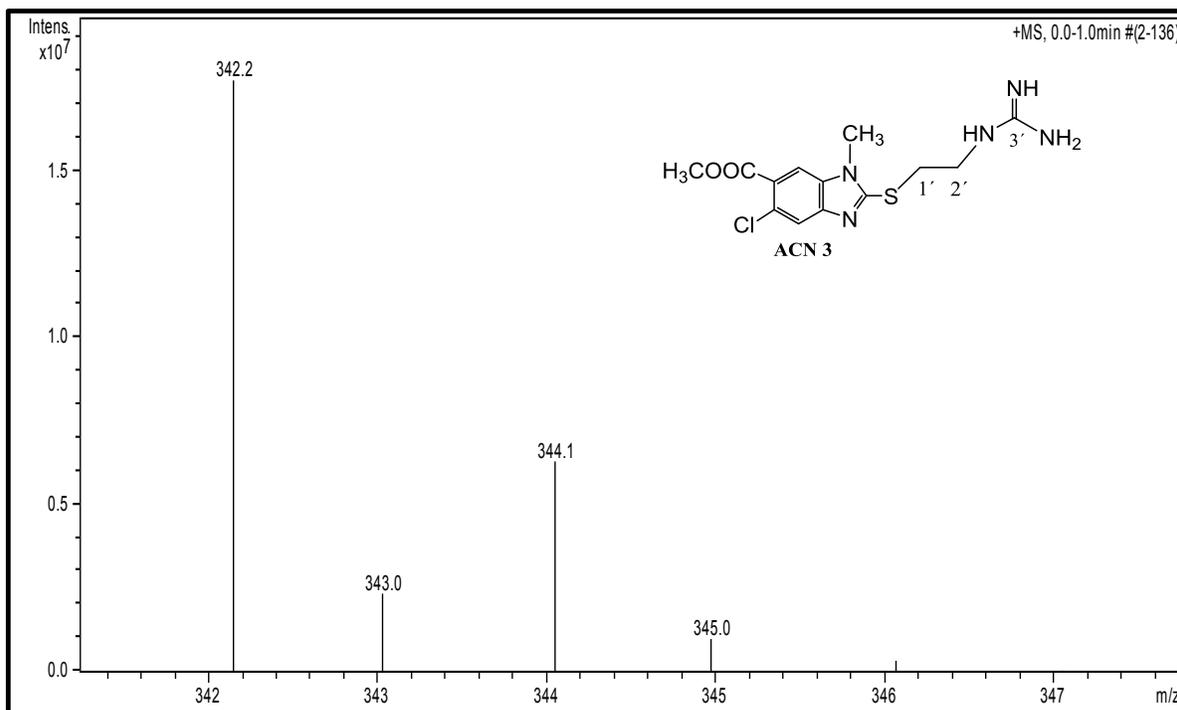
Espectro 21. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de 11b.

Espectro 22. EM ESI/ID de 11b.

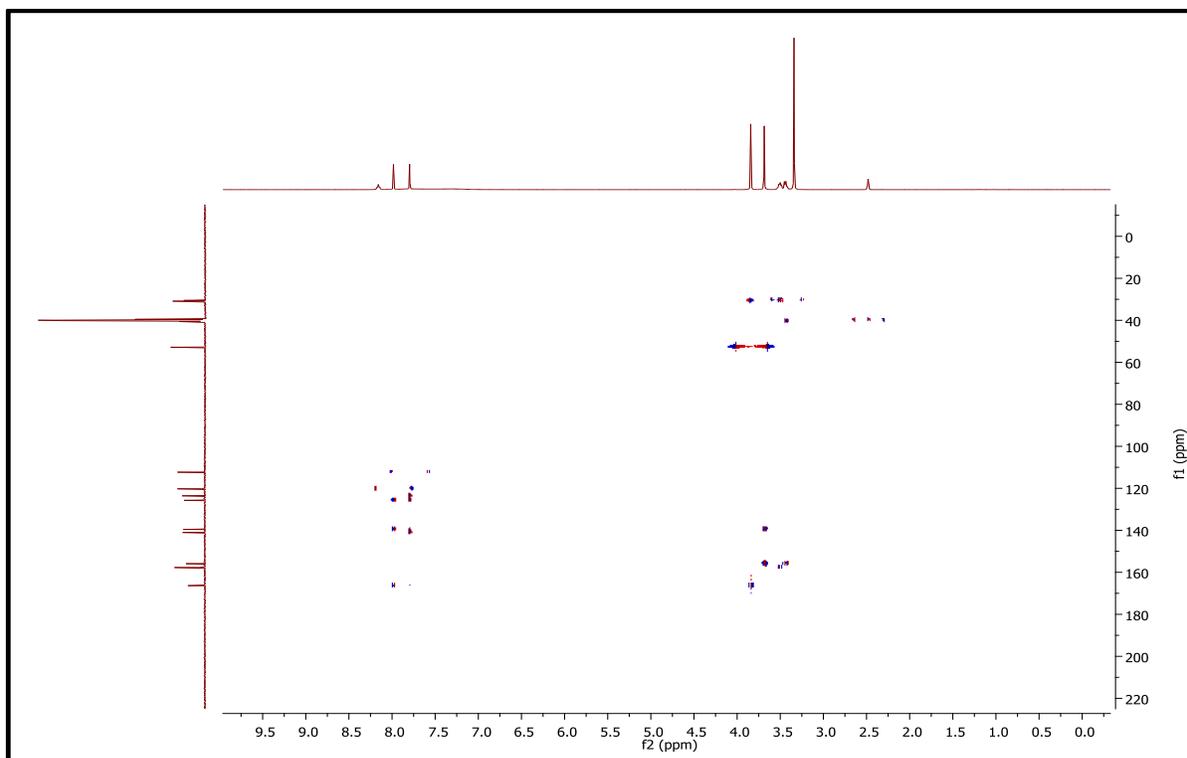


**Espectro 23.** IR de 5-Cloro-2-((2-guanidinoetil)sulfanil)-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (ACN 3).

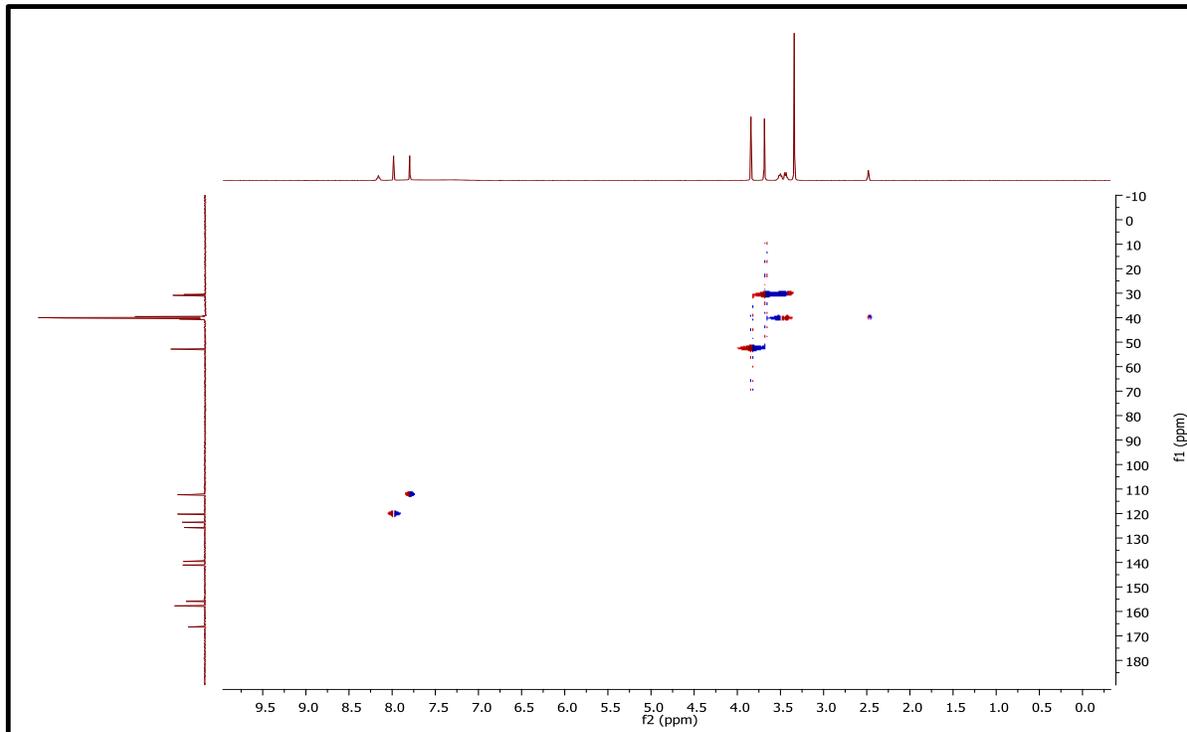


Espectro 24. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de ACN 3.Espectro 25. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de ACN 3.

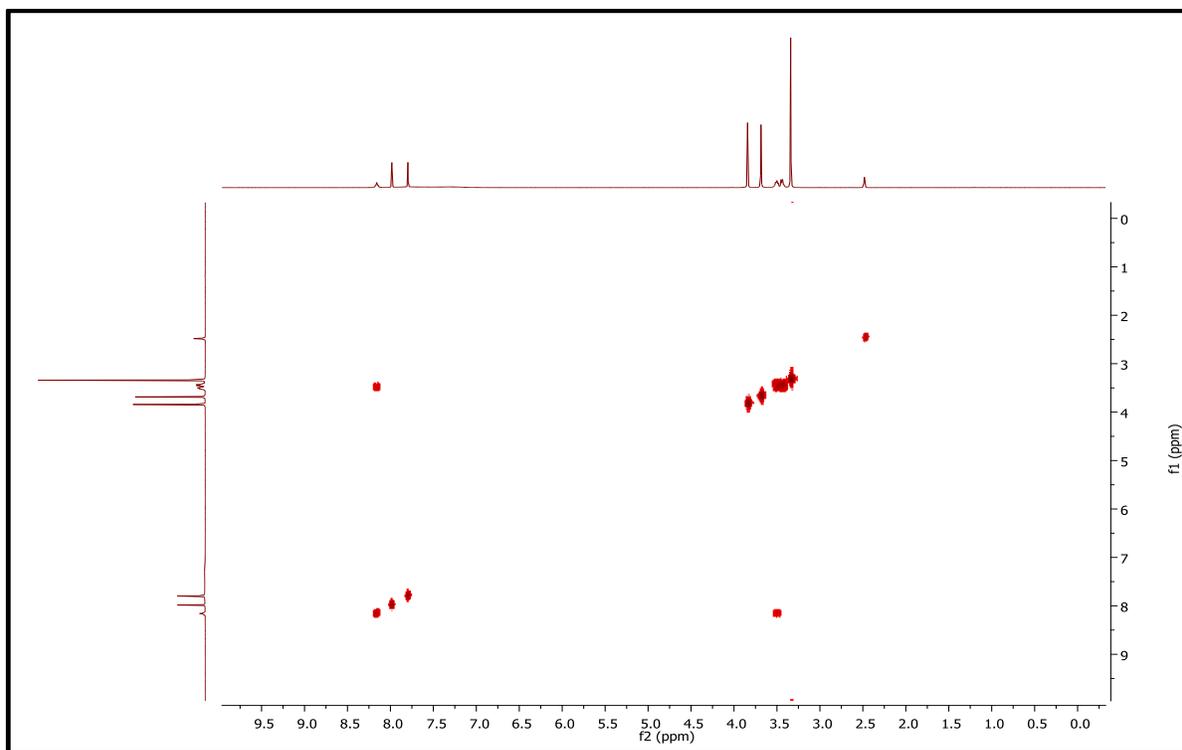
Espectro 26. EM ESI/ID de ACN 3.



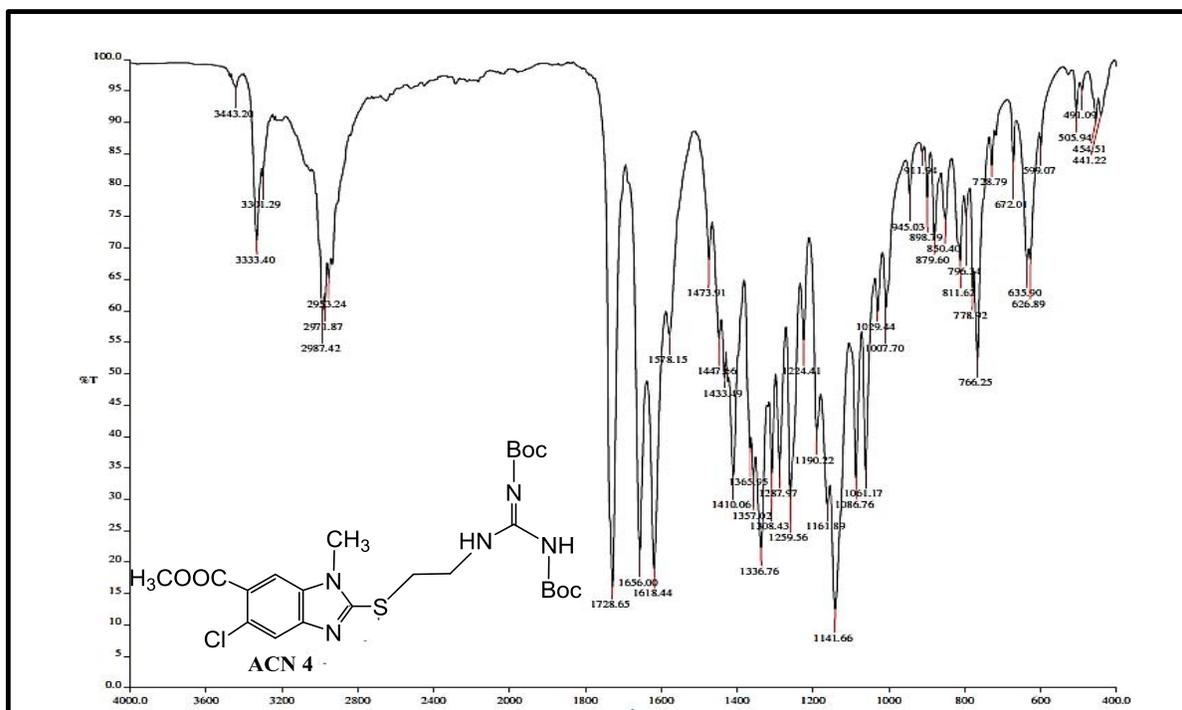
Espectro 27. Correlación heteronuclear HMBC de ACN 3.



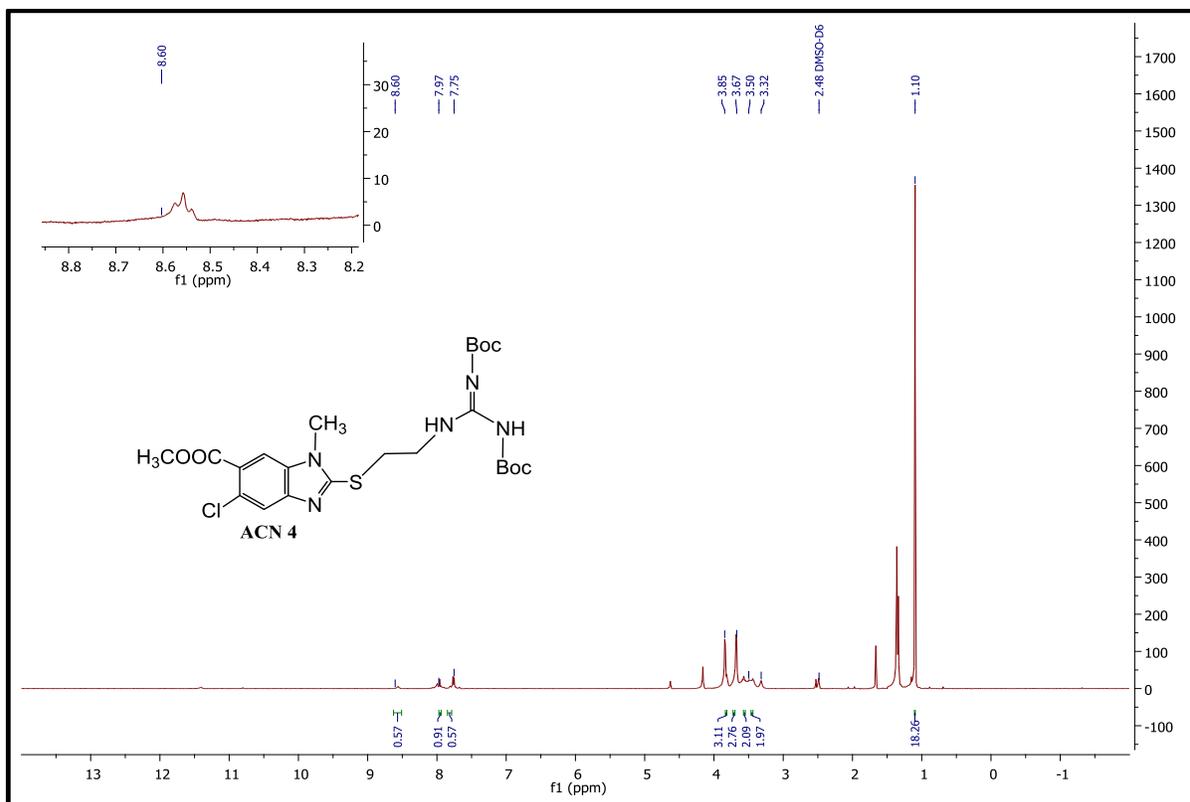
Espectro 28. Correlación heteronuclear HSQC de ACN 3.



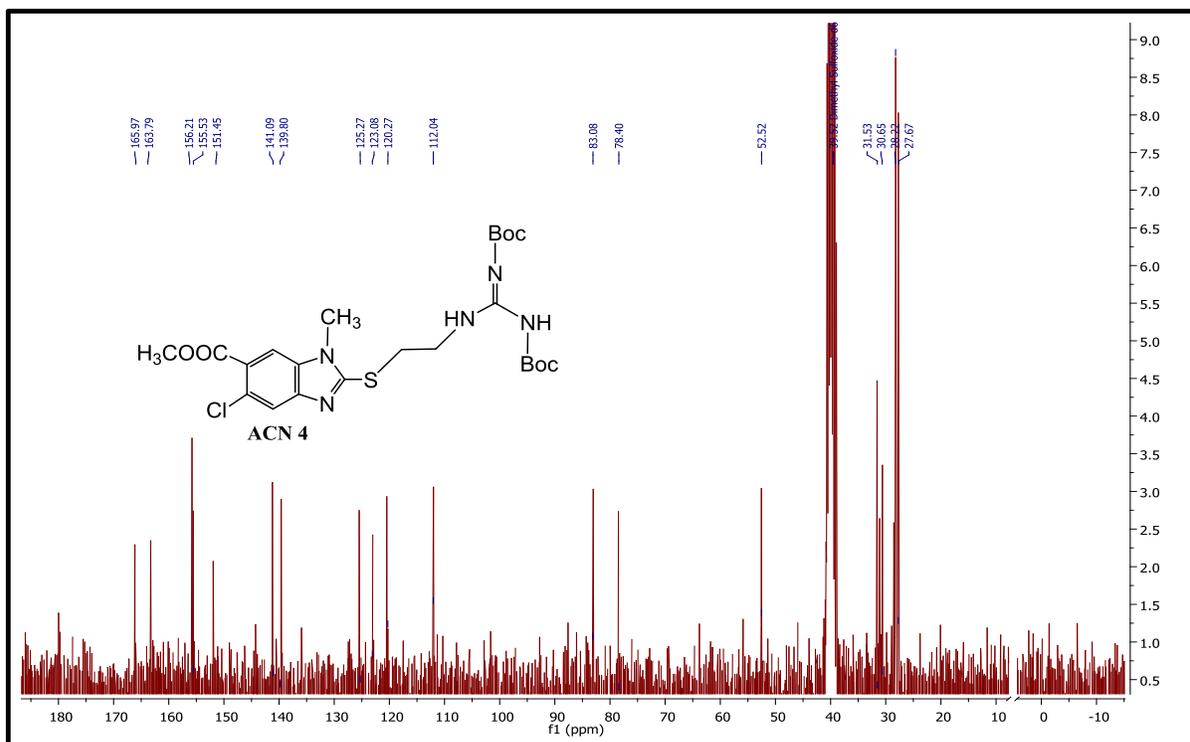
Espectro 29. COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de ACN 3.

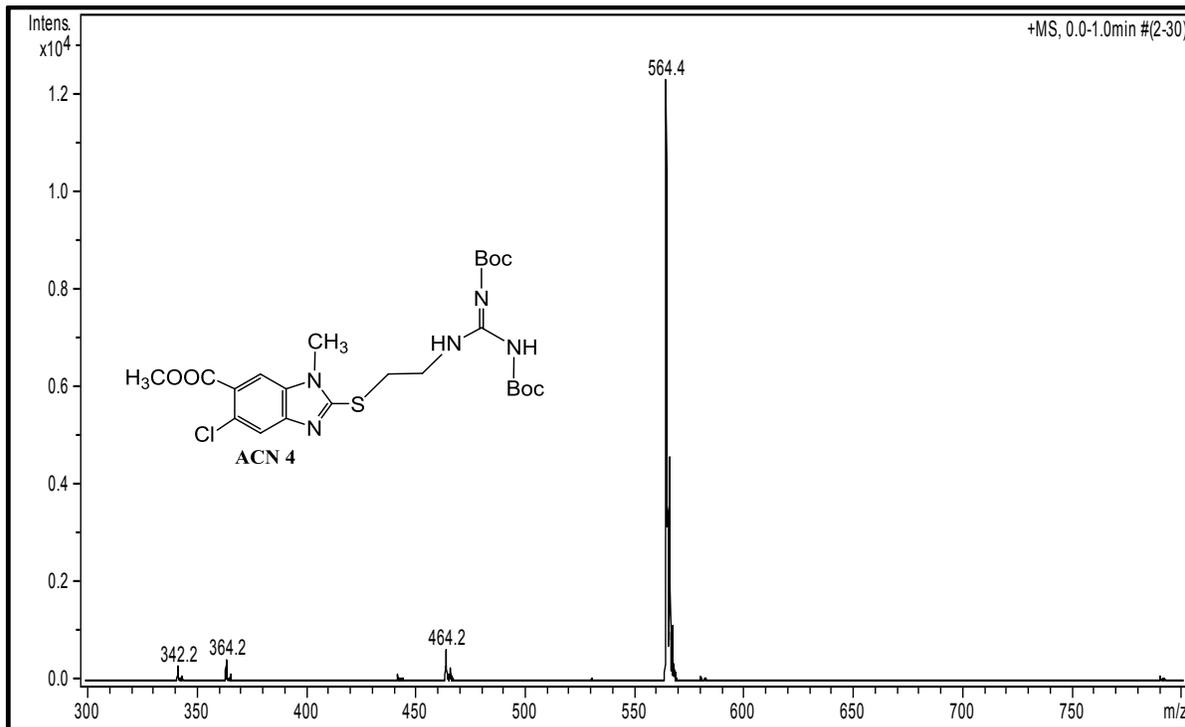


Espectro 30. IR de 2-[(2,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidinoetil)sulfanil]-5-cloro-1-metil-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (ACN 4).



Espectro 31. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) de ACN 4.



Espectro 32. RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz, TMS, DMSO- $d_6$ ) de ACN 4.

Espectro 33. EM ESI/ID de ACN 4.