



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE  
N-(6-CLORO-5-(2,3-DICLOROFENOXI)-1H-  
BENCIMIDAZOL-2-IL)BENCENSULFONAMIDAS**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**César Sebastian Huerta García**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Rafael Castillo Bocanegra**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
**VOCAL:** Q. Juan Gómez Dueñas  
**SECRETARIO:** Dra. Cristina del Carmen Jiménez Curiel  
**1er. SUPLENTE:** Dra. Susana Porcel García  
**2° SUPLENTE:** Dra. María Alicia Hernández Campos

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,  
LABORATORIO 122, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Rafael Castillo Bocanegra**

---

**SUPERVISORA TÉCNICA:**

**Dra. María Alicia Hernández Campos**

---

**SUSTENTANTE:**

**César Sebastian Huerta García**

---

- **AGRADECIMIENTOS**

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado al proyecto 251726 para la realización de este proyecto y por la beca otorgada para la realización de esta tesis con el número de becario 25691.
- A la DGAPA-PAPIIT proyecto IN221416 y al PAIP proyecto 5000-9133, los cuales fueron de gran importancia para el desarrollo de esta tesis.
- A la Dra. Lilián Yépez Mulia y a la M. en C. Rocío Nieto de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional, IMSS, por la determinación de la actividad tripanocida y citotóxica de los compuestos sintetizados en esta tesis.
- Al grupo de investigación bajo la dirección del Dr. Alfredo Téllez Valencia por la determinación de la actividad sobre la Triosafosfato Isomerasa de los compuestos sintetizados en esta tesis, llevada a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

- **RESUMEN**

En el presente trabajo se reporta la síntesis y la evaluación de la actividad biológica de 5 nuevas bencensulfonamidas bencimidazólicas (**CSHG1–CSHG5**) diseñadas a partir de un bencimidazol híbrido formado por un 2-aminobencimidazol y un 2-metiltiobencimidazol unidos por un enlace carboxamida (**B4**), previamente sintetizado y evaluado por nuestro grupo de investigación con buenos resultados de actividad sobre la TcTIM y *T. cruzi*.

Se estudiaron diferentes metodologías para la síntesis de bencensulfonamidas bencimidazólicas y para el caso de los compuestos **CSHG1–CSHG4** fue posible establecer una ruta de síntesis adecuada, pero aún con bajos rendimientos, a través de la formación de un derivado dimetil(fenilsulfonil)carbonoditioimidato adecuadamente sustituido y su condensación con la *o*-feniléndiamina correspondiente; mientras que para **CSHG5** no fue posible encontrar una ruta de síntesis que nos permitiera obtener el compuesto.

Los compuestos **CSHG1–CSHG4** no pudieron ser evaluados contra la TcTIM debido a problemas de solubilidad, por otro lado sí se pudo determinar su actividad tripanocida, dentro de las que destaca la actividad de **CSHG3** superando en las cepas Y1 y TR la actividad de **B4**; sin embargo, todos los compuestos presentaron valores de citotoxicidad elevados teniendo en la mayoría de los casos un IS menor a 1.

Los estudios de acoplamiento molecular permitieron conocer la afinidad de los compuestos por la TIM de *T. cruzi* y comparar la misma con la obtenida con la TIM de otras especies y sobre todo con la de humano, con la que se pudo determinar su selectividad. Estos estudios de acoplamiento molecular, así como los llevados a cabo con muchos inhibidores de la TcTIM previamente propuestos por nuestro grupo de investigación o encontrados en la literatura, cuya actividad real sobre la TcTIM se encontraba ya reportada, nos permitieron establecer las bases para un modelo que relacione el acoplamiento molecular con el Índice de Eficiencia del Ligando, que sea de utilidad para la predicción de la actividad de nuevos compuestos diseñados como tripanocidas.

• ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|                             |  |       |   |
|-----------------------------|--|-------|---|
| %                           | Porcentaje   | EhTIM | Triosafosfato isomerasa de <i>E. histolytica</i>  |
| °C                          | Grado Celsius  | ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> /Ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas  |
| µg                          | Microgramos  | eq.   | Equivalentes  |
| µL                          | Microlitros  | ETD   | Enfermedad Tropical Desatendida   |
| µM                          | Micromolar   | EtOH  | Etanol  |
| Ac <sub>2</sub> O           | Anhídrido acético  | FDA   | <i>Food and Drug Administration</i> /Administración de Fármacos y Alimentos   |
| AcOET                       | Acetato de etilo   | g     | Gramo   |
| ADN                         | Ácido Desoxirribonucleico  | G3P   | Gliceraldehído-3-fosfato  |
| Arg                         | Arginina   | GiTIM | Triosafosfato isomerasa de <i>G. intestinalis</i>   |
| ARN                         | Ácido Ribonucleico   | Glu   | Glutamato   |
| ATCC                        | <i>American Type Culture Collection</i> /Colección Americana de Cultivos Tipificados | Gly   | Glicina   |
| Atm                         | Atmósfera  | h     | Horas   |
| ATP                         | Adenosín trifosfato  | HMBC  | <i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i> /Espectroscopía de correlación heteronuclear a múltiples enlaces de distancia |
| cat.                        | Catalítico   | HSQC  | <i>Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i> /Espectroscopía de correlación heteronuclear a un enlace de distancia        |
| CC <sub>50</sub>            | Concentración citotóxica 50  | HsTIM | Triosafosfato isomerasa de <i>H. sapiens</i>  |
| CCF                         | Cromatografía en capa fina   | Hz    | <i>Hertz</i> /Hercio  |
| CD4 <sup>+</sup>            | Expresa proteína de superficie CD4   | IEL   | Índice de Eficiencia de Ligando   |
| CDC                         | Centro de Control de Enfermedades  | Ile   | Isoleucina  |
| CI <sub>50</sub>            | Concentración inhibitoria 50   |       |   |
| COSY                        | <i>Correlation spectroscopy</i> /Espectroscopía de correlación                       |       |   |
| d                           | Señal doble  |       |   |
| D <sub>2</sub> O            | Agua deuterada   |       |   |
| dd                          | Señal doble de dobles  |       |   |
| DHAP                        | Dihidroxiacetona fosfato   |       |   |
| DMAP                        | 4-dimetilaminopiridina   |       |   |
| DMF                         | Dimetilformamida   |       |   |
| DMSO                        | Dimetilsulfóxido   |       |   |
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> | Dimetilsulfóxido hexadeuterado   |       |   |
| EDTA                        | Ácido etilendiaminotetracético   |       |   |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|                          |  |               |  |
|--------------------------|--|---------------|--|
| <b>IS</b>                | Índice de selectividad   | <b>Phe</b>    | Fenilalanina   |
| <b>J</b>                 | Constante de acoplamiento  | <b>pKa</b>    | Logaritmo negativo de la constante de acidez                   |
| <b>Kg</b>                | Kilogramo  | <b>PM</b>     | Peso molecular   |
| <b>lb/in<sup>2</sup></b> | Libra sobre pulgada cuadrada   | <b>ppm</b>    | Partes por millón  |
| <b>LIT</b>               | <i>Liver Infusion</i><br>Tryptose/Infusión de hígado-triptosa                              | <b>Rf</b>     | Factor de retención  |
| <b>LmTIM</b>             | Triosafosfato isomerasa de <i>L. mexicana</i>  | <b>RMN</b>    | Resonancia magnética nuclear                                   |
| <b>m</b>                 | Señal múltiple   | <b>RPMI</b>   | Medio Roswell Park Memorial Institute                          |
| <b>MeCN</b>              | Acetonitrilo   | <b>s</b>      | Señal simple   |
| <b>MeOH</b>              | Metanol  | <b>SFB</b>    | Suero fetal bovino   |
| <b>mg</b>                | Miligramo  | <b>SNAr</b>   | Sustitución nucleofílica aromática                             |
| <b>mL</b>                | Mililitro  | <b>t</b>      | Triplete   |
| <b>mmHg</b>              | Milímetros de mercurio   | <b>ta.</b>    | Temperatura ambiente   |
| <b>NADH</b>              | Nicotinamida adenina dinucleótido  | <b>TBAB</b>   | Bromuro de tetrabutilamonio                                    |
| <b>NBS</b>               | <i>N</i> -bromosuccinimida   | <b>TbTIM</b>  | Triosafosfato isomerasa de <i>T. brucei</i>                    |
| <b>ND</b>                | No determinado   | <b>TcTIM</b>  | Triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i>                     |
| <b>Ni-Raney</b>          | Niquel Raney   | <b>TE</b>     | Buffer Tris, EDTA  |
| <b>NK</b>                | Célula natural killer  | <b>Thr</b>    | Treonina   |
| <b>nm</b>                | Nanómetros   | <b>TIM</b>    | Triosafosfato isomerasa  |
| <b>NoADH</b>             | Número de átomos diferente de hidrógeno  | <b>Tyr</b>    | Tirosina   |
| <b>NOESY</b>             | <i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> /Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser | <b>UI</b>     | Cantidad de sustancia basada en la actividad biológica         |
| <b>OMS</b>               | Organización Mundial de la Salud   | <b>UNAM</b>   | Universidad Nacional Autónoma de México                        |
| <b>PCR</b>               | Reacción en cadena de la polimerasa  | <b>USAI</b>   | Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria |
| <b>PDB</b>               | <i>Protein Data Bank</i> /Banco de datos de proteínas                                      | <b>UV</b>     | Luz Ultravioleta   |
| <b>pf</b>                | Punto de fusión  | <b>α-GPDH</b> | Alfa glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa                          |
| <b>PfTIM</b>             | Triosafosfato isomerasa de <i>P. falciforme</i>  |               |  |
| <b>pH</b>                | Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio                                   |               |  |

- **ÍNDICE GENERAL**
- **RESUMEN**..... III
- **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**.....IV
- **ÍNDICE GENERAL**.....VI
  - ÍNDICE DE FIGURAS..... IX
  - ÍNDICE DE TABLAS .....XI
  - ÍNDICE DE ESPECTROS.....XII
- 1. INTRODUCCIÓN**..... 1
- 2. ANTECEDENTES** ..... 3
  - 2.1. LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS COMO PROBLEMA DE SALUD .... 3
  - 2.2. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA  
..... 4
    - 2.2.1. Distribución geográfica y prevalencia ..... 4
    - 2.2.2. Agente etiológico ..... 6
    - 2.2.3. Desarrollo y diagnóstico de la enfermedad..... 7
    - 2.2.4. Prevención..... 10
  - 2.3. FÁRMACOS PARA TRATAMIENTO ..... 10
    - 2.3.1. Nitroheterociclos ..... 11
    - 2.3.2. Dianas farmacológicas ..... 13
    - 2.3.3. La vía glucolítica ..... 14
  - 2.4. DISEÑO DE LA SERIE CSHG ..... 17
    - 2.4.1. El núcleo de bencimidazol como estructura privilegiada ..... 17
    - 2.4.2. Bencimidazoles con actividad inhibitoria de la TcTIM..... 17
    - 2.4.3. Serie CSHG ..... 18
  - 2.5. SÍNTESIS DE BENCENSULFONAMIDAS BENCIMIDAZÓLICAS..... 19
    - 2.5.1. A partir del 2-Aminobencimidazol ..... 20
    - 2.5.2. A partir del (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo..... 20
    - 2.5.3. A partir del 2-Bromobencimidazol..... 21
  - 2.6. DISEÑO DE FÁRMACOS ASISTIDO POR COMPUTADORA ..... 22
    - 2.6.1. Acoplamiento molecular ..... 22
    - 2.6.2. Índice de eficiencia del ligando ..... 23
- 3. JUSTIFICACIÓN** ..... 25
- 4. HIPÓTESIS**..... 27
- 5. OBJETIVOS** ..... 28
  - 5.1. OBJETIVO GENERAL ..... 28
  - 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES ..... 28



|   |           |
|---|-----------|
| <b>6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>30</b> |
| 6.1. PARTE QUÍMICA .....  | 30        |
| 6.1.1. Síntesis de las Bencensulfonamidas bencimidazólicas .....  | 30        |
| 6.2. PARTE BIOLÓGICA .....  | 34        |
| 6.2.1. Actividad inhibitoria de la TcTIM .....  | 34        |
| 6.2.2. Actividad tripanocida.....   | 34        |
| 6.2.3. Actividad citotóxica .....   | 35        |
| 6.3. PARTE COMPUTACIONAL.....   | 36        |
| 6.3.1. Estudios de acoplamiento molecular .....   | 36        |
| 6.3.2. Índice de eficiencia del ligando.....  | 37        |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>38</b> |
| 7.1. PARTE QUÍMICA.....   | 38        |
| 7.1.1. Síntesis de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina ( <b>6</b> ) ....   | 38        |
| 7.1.2. Síntesis de las <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-il]bencensulfonamidas ( <b>CSHG1–CSHG5</b> ) ..... | 41        |
| 7.2. PARTE BIOLÓGICA .....  | 68        |
| 7.2.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de la TcTIM .....   | 68        |
| 7.2.2. Evaluación de la actividad tripanocida.....  | 68        |
| 7.3. PARTE COMPUTACIONAL.....   | 73        |
| 7.3.1. Estudios de acoplamiento molecular entre la TcTIM y HsTIM de los compuestos sintetizados.....  | 73        |
| 7.3.2. Estudios de acoplamiento molecular entre la TIM de diversas especies y los compuestos diseñados.....                                   | 78        |
| 7.3.3. Índice de Eficiencia del Ligando (IEL).....  | 80        |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>91</b> |
| <b>11. ANEXO I-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....</b>   | <b>96</b> |
| 11.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES .....  | 96        |
| 11.2. TÉCNICAS PARA LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS .....   | 97        |
| 11.2.1. <i>N</i> -(3,4-Diclorofenil)acetamida ( <b>2</b> ).....   | 97        |
| 11.2.2. <i>N</i> -(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida ( <b>3</b> ) .....  | 98        |
| 11.2.3. <i>N</i> -[4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida ( <b>4</b> ) .....  | 99        |
| 11.2.4. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina ( <b>5</b> ).....  | 100       |
| 11.2.5. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina ( <b>6</b> ) .....   | 100       |
| 11.2.6. Procedimiento general de síntesis de las Bencensulfonamidas ( <b>12-16</b> ).....   | 101       |

|   |            |
|---|------------|
| 11.2.7. Procedimiento general de síntesis de los<br>(Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo ( <b>22-26</b> ).....   | 103        |
| 11.2.8. Procedimiento general de síntesis de las <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-<br>diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-il]bencensulfonamidas ( <b>CSHG1-CSHG5</b> ) | 105        |
| <b>12. ANEXO II–DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....</b>   | <b>108</b> |
| 12.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....   | 108        |
| 12.1.1. Determinación de la actividad inhibitoria de la TcTIM.....  | 108        |
| 12.1.2. Determinación de la actividad tripanocida .....   | 108        |
| 12.1.3. Determinación de la actividad citotóxica .....  | 109        |
| <b>13. ANEXO III–ESPECTROS .....</b>  | <b>110</b> |
| 13.1. (FENILSULFONIL)CARBONODITIOIMIDATO DE DIMETILO ( <b>22</b> ) .....  | 110        |
| 13.2. [(4-METOXIFENIL)SULFONIL]CARBONODITIOIMIDATO DE DIMETILO ( <b>23</b> ).....   | 112        |
| 13.3. [(4-METILFENIL)SULFONIL]CARBONODITIOIMIDATO DE DIMETILO ( <b>24</b> ) .....   | 114        |
| 13.4. [(4-BROMOFENIL)SULFONIL]CARBONODITIOIMIDATO DE DIMETILO ( <b>25</b> ) .....   | 116        |
| 13.5. <i>N</i> -[6-CLORO-5-(2,3-DICLOROFENOXI)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-2-<br>IL]BENCENSULFONAMIDA ( <b>CSHG1</b> ) .....   | 118        |
| 13.6. <i>N</i> -[6-CLORO-5-(2,3-DICLOROFENOXI)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-2-IL]-4-<br>METOXIBENCENSULFONAMIDA ( <b>CSHG2</b> ) .....                                    | 124        |
| 13.7. <i>N</i> -[6-CLORO-5-(2,3-DICLOROFENOXI)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-2-IL]-4-<br>METILBENCENSULFONAMIDA ( <b>CSHG3</b> ).....                                      | 130        |
| 13.8. 4-BROMO- <i>N</i> -[6-CLORO-5-(2,3-DICLOROFENOXI)-1 <i>H</i> -BENCIMIDAZOL-2-<br>IL]BENCENSULFONAMIDA ( <b>CSHG4</b> ) .....                                    | 136        |

○ Índice De Figuras

**Figura 1.** Número de ETDs presentes por país. .... 3

**Figura 2.** Distribución de casos de infección con *Trypanosoma cruzi*, basado en estimados mundiales oficiales entre 2006 y 2009. .... 5

**Figura 3.** Total de casos estimados de enfermedad de Chagas en México al 2013. .... 6

**Figura 4.** Ciclo vital del parásito *Trypanosoma cruzi*. .... 7

**Figura 5.** Señales en el portal de entrada..... 8

**Figura 6.** Estructura química del Atoxil y Fucsina..... 11

**Figura 7.** Glucólisis en sangre de *Trypanosoma cruzi*..... 14

**Figura 8.** Reacción catalizada por la TIM. .... 15

**Figura 9.** Triosafofosfato isomerasa de *Trypanosma cruzi* (TcTIM). .... 16

**Figura 10.** Fármacos clínicamente aprobados conteniendo el núcleo de bencimidazol. .... 17

**Figura 11.** Derivados del bencimidazol con actividad inhibitoria de la TcTIM sintetizados por nuestro grupo de investigación..... 18

**Figura 12.** Diseño de la serie **CSHG**. .... 19

**Figura 13.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del (Fenilsulfonil)ditioimidocarbonato de dimetilo (**22**)..... 46

**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del (Fenilsulfonil)ditioimidocarbonato de dimetilo (**22**)..... 46

**Figura 15.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **CSHG1**..... 53

**Figura 16.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto **CSHG1**. .... 53

**Figura 17.** Espectro COSY del compuesto **CSHG1**..... 54

**Figura 18.** Espectro NOESY del compuesto **CSHG1**. .... 55

**Figura 19.** Espectro de HSQC del compuesto **CSHG1**. .... 56

**Figura 20.** Espectro de RMN de HSQC del compuesto **CSHG1**. .... 57

**Figura 21.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido de la mezcla de productos..... 64

**Figura 22.** Superposición de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H (rojo) y de intercambio con D<sub>2</sub>O (azul) de la mezcla de productos. .... 64

**Figura 23.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H obtenido del producto de la condición b)..... 65

**Figura 24.** 1/IC<sub>50</sub> de los compuestos **CSHG1-CSHG4**, **B4** y fármaco de referencia. .... 69

**Figura 25.** 1/CC<sub>50</sub> de los compuestos **CSHG1-CSHG4** y fármaco de referencia en macrófagos de ratón J774.2..... 71

**Figura 26.** IS de los compuestos **CSHG1-CSHG4**, **B4** y fármaco de referencia. . 72

**Figura 27.** *Docking* del compuesto **CSHG3** con la TcTIM. .... 74

**Figura 28.** *Docking* del compuesto **CSHG2** con HsTIM y TcTIM..... 75

**Figura 29.** *Docking* con TIMs de diversas especies.. .... 80

**Figura 30.** Gráfica de N°ADH vs (-)ΔG<sub>unión</sub> obtenido del score de *docking*. .... 81

**Figura 31.** Grafica de N°ADH vs IEL<sub>docking</sub>. ..... 82

**Figura 32.** Gráfica de N°ADH vs pIC<sub>50</sub> de la inhibición de la TcTIM. .... 83

**Figura 33.** Gráfica de N°ADH vs IEL<sub>inhibitorio</sub>. ..... 83

**Figura 34.** Gráfica de IEL<sub>docking</sub> vs IEL<sub>inhibitorio</sub>. ..... 84

**Figura 35.** Gráfica de IEL<sub>inhibitorio</sub> vs (-)ΔG<sub>unión</sub>. ..... 85

**Figura 36.** Gráfica de IEL<sub>inhibitorio</sub> vs (-)ΔG<sub>unión</sub> con los datos con mejor tendencia. 86

○ Índice De Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Información general sobre el Nifurtimox y el Benznidazol.....  | 12 |
| <b>Tabla 2.</b> Potenciales dianas farmacológicas contra <i>T. cruzi</i> . .....   | 13 |
| <b>Tabla 3.</b> Identificación dentro del PDB de las diferentes TIM usada.....   | 36 |
| <b>Tabla 4.</b> Resultados de R <sub>f</sub> , punto de fusión y rendimiento de compuestos (1-6)..   | 40 |
| <b>Tabla 5.</b> Resultados de la síntesis de las bencensulfonamidas (12-16). .....   | 42 |
| <b>Tabla 6.</b> Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos (22-26) .....  | 47 |
| <b>Tabla 7.</b> Condiciones probadas para la síntesis de las bencensufonamidas<br>bencimidazólicas finales (CSHG1-CSHG5).....  | 48 |
| <b>Tabla 8.</b> Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos CSHG1–<br>CSHG4.....   | 59 |
| <b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis elemental de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -<br>bencimidazol-2-amina (27).....                                      | 62 |
| <b>Tabla 10.</b> Condiciones probadas con 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -<br>bencimidazol-2-amina (27) y cloruro de bencensulfonilo (7). .....              | 62 |
| <b>Tabla 11.</b> Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de los compuestos CSHG1-CSHG4,<br>B4, fármaco de referencia y valores de citotoxicidad de los mismos .....  | 69 |
| <b>Tabla 12.</b> Resultados del <i>docking</i> de los compuestos CSHG1-CSHG5 sobre la<br>TcTIM y la HsTIM .....  | 73 |
| <b>Tabla 13.</b> Comparación de los resultados de <i>docking</i> de CSHG1–CSHG4 sobre la<br>TcTIM con los resultados de actividad tripanocida y de citotoxicidad. .... | 77 |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados de <i>docking</i> de los compuestos CSHG1-CSHG5 con las TIM<br>de diversas especies.....   | 79 |
| <b>Tabla 15.</b> Sistemas cromatográficos utilizados.....  | 97 |

○ Índice De Espectros

|  |     |
|--|-----|
| <b>Espectro 1.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz): (Fenilsulfonyl)ditioimidocarbonato de dimetilo (22).....  | 110 |
| <b>Espectro 2.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz): (Fenilsulfonyl)ditioimidocarbonato de dimetilo (22).....   | 111 |
| <b>Espectro 3.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz): [(4-Metoxifenil)sulfonyl]carbonoditioimidato de dimetilo (23).....  | 112 |
| <b>Espectro 4.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz): [(4-Metoxifenil)sulfonyl]carbonoditioimidato de dimetilo (23).....   | 113 |
| <b>Espectro 5.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz): [(4-Metilfenil)sulfonyl]ditioimidocarbonato de dimetilo (24).....   | 114 |
| <b>Espectro 6.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz): [(4-Metilfenil)sulfonyl]ditioimidocarbonato de dimetilo (24).....  | 115 |
| <b>Espectro 7.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz): [(4-Bromofenil)sulfonyl]carbonoditioimidato de dimetilo (25).....   | 116 |
| <b>Espectro 8.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz): [(4-Bromofenil)sulfonyl]carbonoditioimidato de dimetilo (25).....  | 117 |
| <b>Espectro 9.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....  | 118 |
| <b>Espectro 10.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....  | 119 |
| <b>Espectro 11.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento COSY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....  | 120 |
| <b>Espectro 12.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento NOESY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....   | 121 |
| <b>Espectro 13.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento HSQC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....             | 122 |
| <b>Espectro 14.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento HMBC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG1</b> ).....             | 123 |
| <b>Espectro 15.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> ).....  | 124 |
| <b>Espectro 16.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> ).....   | 125 |
| <b>Espectro 17.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de COSY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> ).....  | 126 |
| <b>Espectro 18.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de NOESY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> ).....   | 127 |
| <b>Espectro 19.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HSQC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> )..... | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Espectro 20.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HMBC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida ( <b>CSHG2</b> )..... | 129 |
| <b>Espectro 21.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....   | 130 |
| <b>Espectro 22.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....  | 131 |
| <b>Espectro 23.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de COSY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....   | 132 |
| <b>Espectro 24.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de NOESY de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....  | 133 |
| <b>Espectro 25.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HSQC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....  | 134 |
| <b>Espectro 26.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HMBC de la <i>N</i> -[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida ( <b>CSHG3</b> ).....  | 135 |
| <b>Espectro 27.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> ).....  | 136 |
| <b>Espectro 28.</b> RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> ).....   | 137 |
| <b>Espectro 29.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de COSY de la 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> ).....  | 138 |
| <b>Espectro 30.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz). Experimento de NOESY de la 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> ).....   | 139 |
| <b>Espectro 31.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HSQC de la 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> )..... | 140 |
| <b>Espectro 32.</b> RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz), RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz). Experimento de HMBC de la 4-Bromo- <i>N</i> -[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]bencensulfonamida ( <b>CSHG4</b> )..... | 141 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por parásitos son un grave problema de salud pública en países en vías de desarrollo y, en los últimos años, en países desarrollados. Dentro de las más graves se encuentran las llamadas Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD), entre las cuales se encuentra la enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Se estima que 16 a 18 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, de las cuales alrededor de 670,000 personas manifiestan la enfermedad al año. Los fármacos utilizados actualmente para su tratamiento tienen eficacia controversial y actúan dando lugar a reacciones tóxicas en los pacientes que lo reciben.

En un proyecto previo, en este laboratorio se llevó a cabo la síntesis y evaluación de una serie de seis bencimidazoles híbridos entre un 2-aminobencimidazol y un 2-metiltiobencimidazol unidos por un enlace carboxamida. Todos los compuestos fueron más activos que el fármaco de referencia, Nifurtimox, contra el tripomastigote de la cepa INC5, destacando el compuesto **B4** como el más activo y menos tóxico; además de ser el más potente en su actividad inhibitoria contra la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM). Al evaluar a los precursores sintéticos de **B4** el ácido carboxílico correspondiente y la amina, ya que es una carboxamida, no se encontró actividad inhibitoria para el ácido, pero sí para la amina 6-cloro-5-(1,2-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**Am-B4**), por lo que se sugiere que esta parte de la estructura es muy importante para la actividad inhibitoria de la enzima TcTIM.

A partir de esta información, y tomando en consideración los estudios previos de acoplamiento molecular con la enzima, se diseñó una serie de compuestos (Serie **CSHG**) derivados del compuesto **Am-B4**, en éstos se ha funcionalizado el grupo amino en forma de sulfonamida aromática 4-sustituida con grupos electrodonadores o electroattractores en la posición 4 del fenilo de la sulfonamida con el propósito de estudiar la influencia de estos sustituyentes en la actividad biológica.

En el presente trabajo se describe el estudio llevado a cabo para encontrar una ruta de síntesis para los compuestos de la serie **CSHG**, y posterior evaluación de su actividad inhibitoria de la TcTIM, así como su evaluación *in vitro* contra



tripomastigotes de *T. cruzi* y citotoxicidad. Por otro lado, se estudia en este trabajo la relación entre algunos de los métodos computacionales usados actualmente en la química farmacéutica y la actividad real observada en los compuestos, para determinar la mejor manera de utilizar los mismos en la predicción de la actividad durante el diseño de nuevos agentes tripanocidas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Las Enfermedades Tropicales Desatendidas como problema de salud

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son un conjunto de enfermedades infecciosas, muchas de ellas parasitarias, que afectan principalmente a las poblaciones más pobres y con un limitado acceso a los servicios de salud.<sup>1</sup> La combinación de las condiciones climatológicas, el crecimiento descontrolado de ciudades y la pobreza favorecen la transmisión de estas enfermedades.<sup>2</sup> Se estima que alrededor de 1.5 billones de personas en el mundo padecen al menos una ETD y cerca de 3 billones de personas están en riesgo de contraer alguna, con aproximadamente 170,000 personas al año muriendo a causa de las mismas.<sup>3</sup>

La investigación de un tratamiento efectivo para estas enfermedades es sin duda un proceso que requiere de una inversión significativa tanto de recursos humanos como económicos, usualmente disponibles en las grandes compañías farmacéuticas. Sin embargo, las pocas ganancias que se obtendrían, resultan en una falta de compromiso de parte de las mismas para la erradicación de estas enfermedades, clasificándolas entonces como desatendidas.<sup>4</sup>

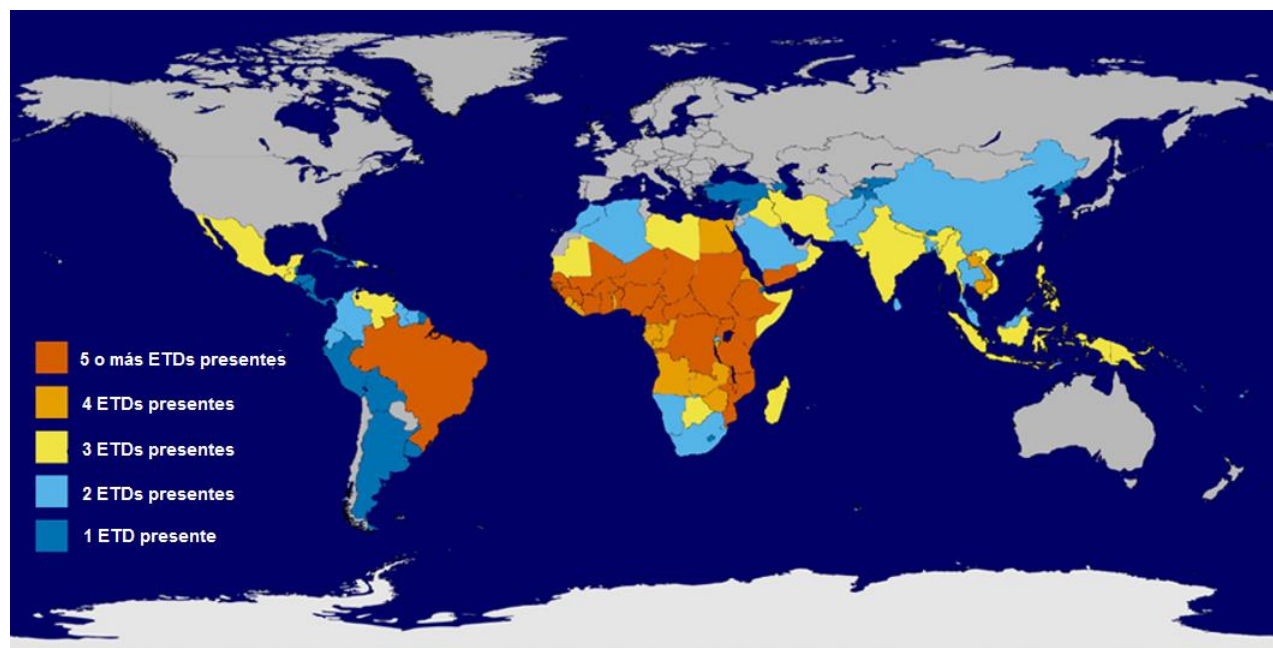


Figura 1. Número de ETDs presentes por país.<sup>5</sup>

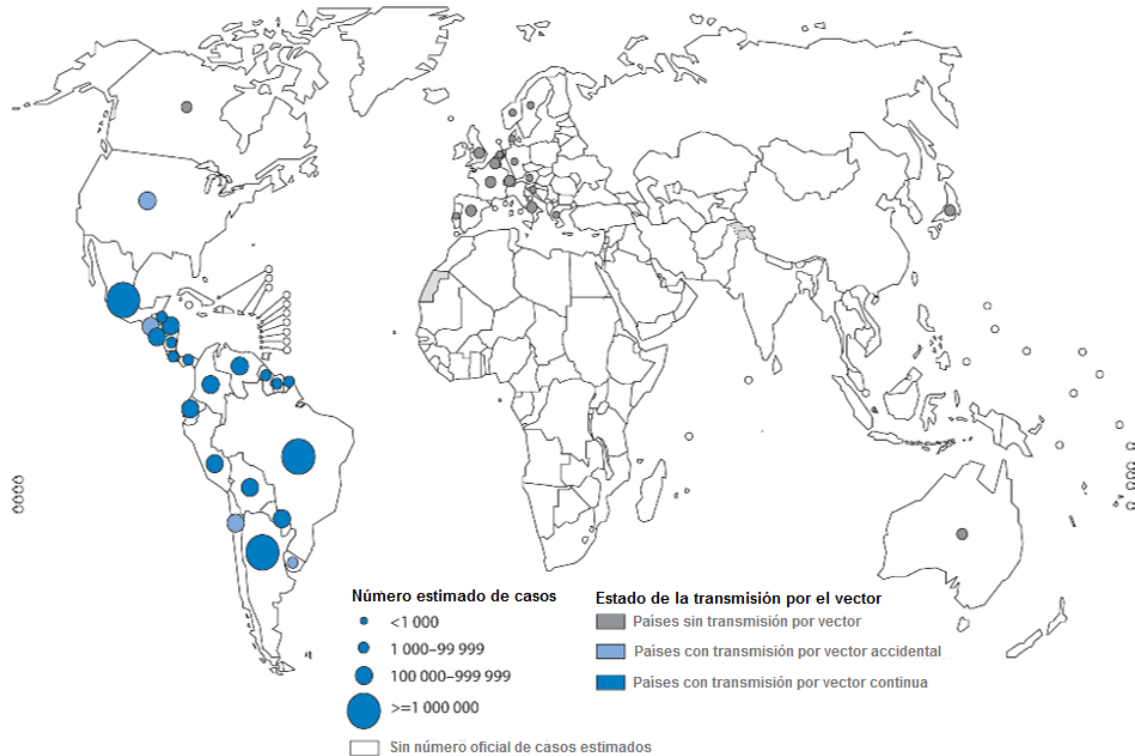
La enfermedad de Chagas, nombrada así por Carlos Chagas su descubridor en 1909, es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 13 principales ETDs; esta parasitosis ha sido un problema para la humanidad desde la antigüedad y continúa siendo un problema social y económico en al menos 21 países de Latino América, afectando alrededor de 8 millones de personas.<sup>6,7</sup>

## **2.2. Generalidades de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana**

### **2.2.1. Distribución geográfica y prevalencia**

Alrededor de 8 millones de personas en el mundo están infectadas con *Trypanosoma cruzi* principalmente en Latino América, donde la enfermedad continúa siendo uno de los principales problemas en salud pública al considerarse la enfermedad parasitaria con mayor carga económica debido a su cronicidad prolongada, causando la incapacidad de muchos de los individuos infectados y más de 10,000 muertes al año, 7.5 veces más que las causadas por malaria.<sup>8</sup> Se consideran en riesgo de infección al menos a 110 millones de individuos en 21 países (México, Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Colombia, Guyana Francesa, Guyana, Surinam, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Belice y Guatemala).<sup>6,9</sup>

Por mucho tiempo la enfermedad de Chagas era considerada un padecimiento exclusivo de zonas rurales, pero cambios socio-económicos, deforestación y urbanismo han transformado el perfil epidemiológico de la enfermedad, convirtiéndola también en un fenómeno urbano y por lo tanto en un riesgo mundial, causando que se considere como emergente en países no endémicos como Estados Unidos, España, Francia, Alemania, entre otros.<sup>9</sup>



**Figura 2.** Distribución de casos de infección con *Trypanosoma cruzi*, basado en estimados mundiales oficiales entre 2006 y 2009.<sup>10</sup>

La Organización Panamericana de la Salud (OPAS) en 2006 estimó que en México existían aproximadamente 1,100,000 individuos afectados y 29,500,000 en riesgo de contraer la infección. En el periodo comprendido de 2000 a 2012, la Secretaría de Salud registró 5,559 casos nuevos principalmente entre los 25 y 44 años, siendo los estados de mayor incidencia Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas, Guerrero y Jalisco, mientras que en el 2013 y 2014 se registraron 762 y 729 nuevos casos respectivamente, además de un total de 371 defunciones registradas, la mayoría en los estados de Oaxaca (54.7%) y Guerrero (15.4%).<sup>9</sup> En dos terceras partes del territorio mexicano existen condiciones para que se lleve a cabo la transmisión vectorial con 32 especies de triatóminos, siendo los principales en el país *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*, que viven principalmente en las grietas de paredes de barro y techos de paja de las casas rurales.<sup>8,9,11,12</sup>

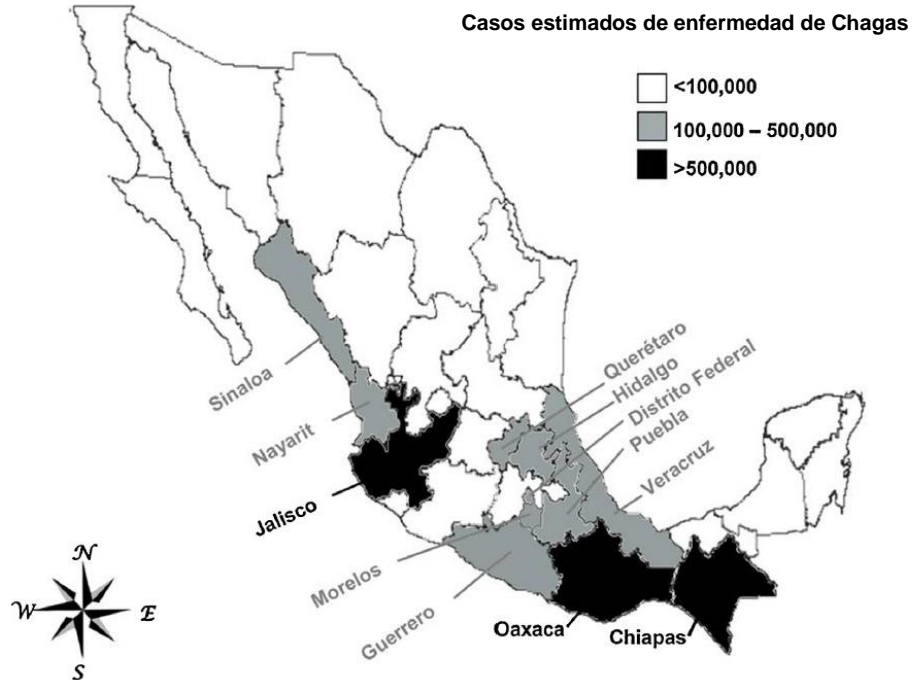


Figura 3. Total de casos estimados de enfermedad de Chagas en México al 2013.<sup>12</sup>

### 2.2.2. Agente etiológico

El agente etiológico causante de la enfermedad es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual gana acceso al torrente circulatorio humano a través de heces infectadas de los insectos de la subfamilia de los triatóminos (Hemiptera: Reduviidae), también conocidos como “chinchas besuconas”, por heridas en la piel (piquetes) o superficies mucosas.<sup>11</sup> Otros medios de transmisión son mediante transfusión sanguínea con sangre contaminada, recibir un órgano o médula ósea contaminados durante un trasplante y rutas congénitas (de madre a hijo durante el embarazo).<sup>7,8</sup>

El parásito tiene un ciclo de vida complejo, que involucra al portador invertebrado y al vertebrado, pasando a través de distintas etapas en las que *T. cruzi* migra al insecto vector, al torrente sanguíneo humano y a la vacuola digestiva intracelular.<sup>4</sup> De forma esquemática, el ciclo vital de este parásito se muestra en la Figura 4.

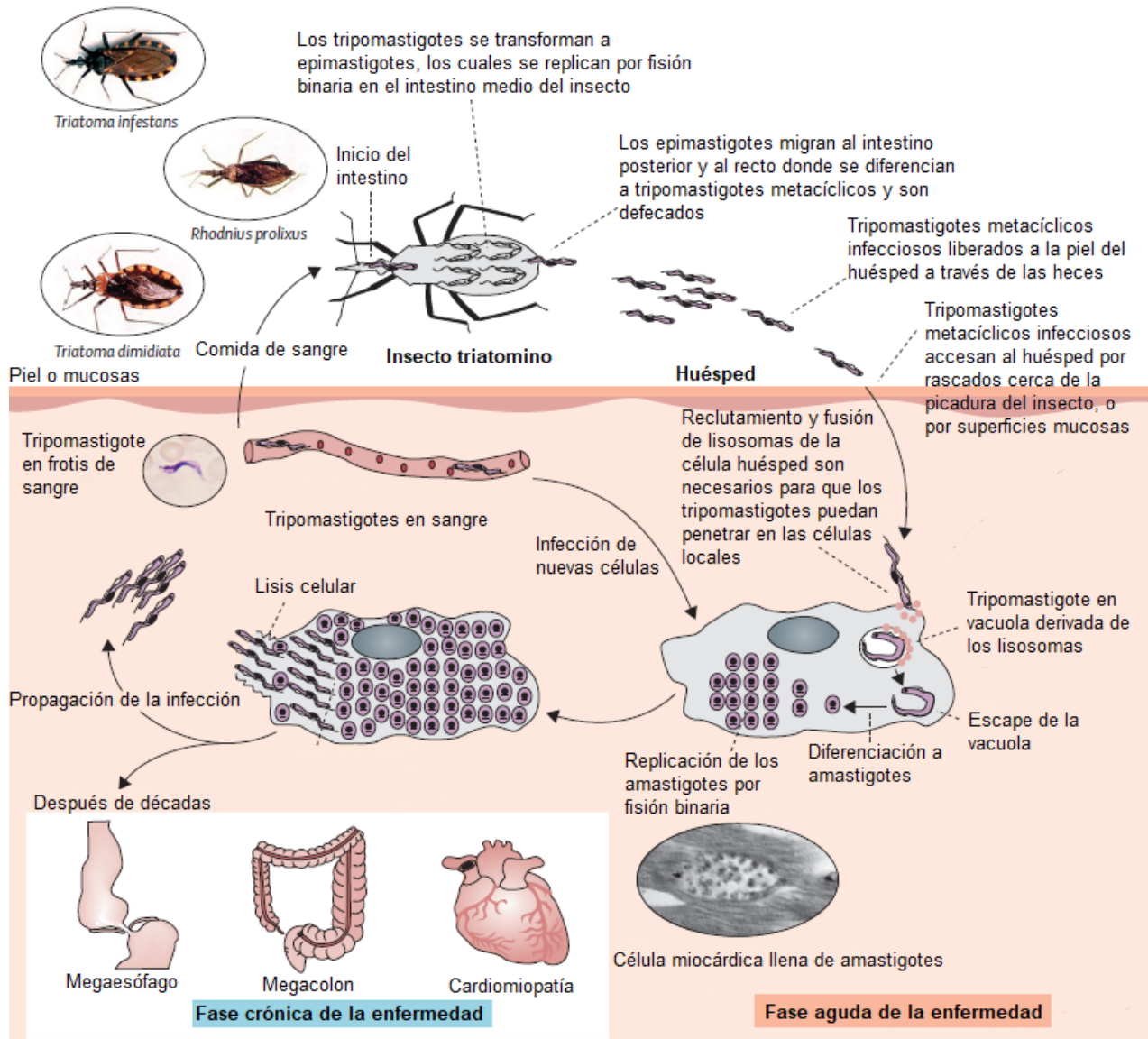


Figura 4. Ciclo vital del parásito *Trypanosoma cruzi*.<sup>7</sup>

### 2.2.3. Desarrollo y diagnóstico de la enfermedad

No importa cuál sea la forma de transmisión, la enfermedad de Chagas en humanos se caracteriza por tres etapas bien definidas: aguda, indeterminada y crónica.<sup>4</sup>

- Fase Aguda

Comienza de 1 a 2 semanas después del contacto con el insecto triatómino. Tiene una duración de 4 a 8 semanas en las que la mayoría de los afectados presenta síntomas como fiebre y edema en el sitio de infección (chagoma, o signo de Romaña

al ocurrir cerca del párpado), que pueden pasar desapercibidos o confundirse con síntomas de malestar general comunes a otras infecciones. También puede ser observada hepatoesplenomegalia y linfadenopatía, además de edema facial y en otras partes del cuerpo, así como también anomalías en el electrocardiograma del paciente. La tasa de mortalidad en esta etapa es baja, en un rango entre 0.25 y 0.50%.<sup>4,7</sup>

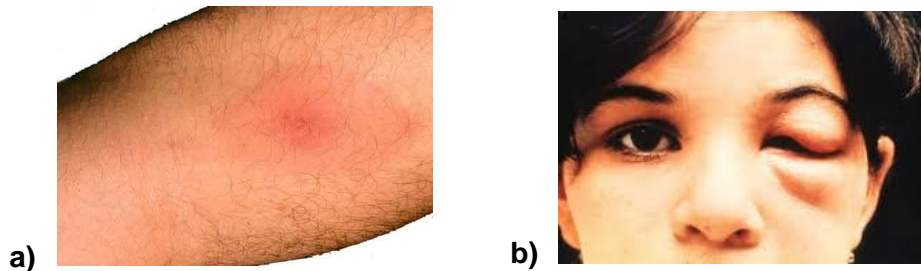


Figura 5. Señales en el portal de entrada: a) Chagoma, b) Signo de Romaña

- Fase indeterminada

Esta fase comprende un periodo de entre 10 y 20 años en las que no hay presencia de síntomas.

- Fase crónica

Aproximadamente 30% de los pacientes en fase indeterminada desarrollan la fase, esta puede tener tres diferentes manifestaciones clínicas: la cardíaca, la digestiva o de manera simultánea la cardiodigestiva. Se pueden presentar síntomas como dolor de pecho, palpitaciones, mareo y edema periférico, aunque también se puede presentar arritmia cardíaca, tromboembolismo, falla cardíaca y muerte súbita. Dependiendo de la región geográfica, esta enfermedad también produce megavíscera, cardiomegalia, megaesófago y megacolon. De los pacientes que entran a la fase, 60% muere entre los 7 meses y los 2 años después de iniciados los síntomas.<sup>4,7,8</sup>

La evidencia soporta que la respuesta inmune inflamatoria del huésped es el determinante más importante de la progresión de la enfermedad al estado crónico, acompañado también de factores como la virulencia de la cepa de *T. cruzi* y el tropismo tisular. El cuerpo requiere de una respuesta inmune inflamatoria para

combatir la enfermedad que se compone de células inmunes innatas (*natural killer* (NK), neutrófilos) y macrófagos activados por el interferón- $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  liberado por la NK, así como de células-T mediadas y específicas CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, una falla en la regulación de esta respuesta parece jugar un papel determinante en la patogenia, cuando una predominancia del ambiente inflamatorio puede llevar a las manifestaciones clínicas cardiacas y digestivas más severas de la enfermedad.<sup>8,13</sup>

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en la evaluación clínica, epidemiológica y pruebas de laboratorio.<sup>4,7,8,13</sup> Para el diagnóstico de laboratorio, los exámenes adecuados dependen de la etapa clínica del paciente.

- a) En la fase aguda, las células de *T. cruzi* pueden ser fácilmente detectables en sangre, la parasitemia decrece gradualmente al progresar la infección, disminuyendo drásticamente hasta hacer imposible un diagnóstico parasitológico directo. El método del microhematocrito resulta también un método útil en el diagnóstico por su alta sensibilidad y la baja cantidad de sangre necesaria. Se puede también realizar la detección de anticuerpos antichagásicos IgG e IgM.
- b) En las fases indeterminada y crónica la parasitemia suele ser muy baja, por lo que se hacen pruebas para detectar anticuerpos antichagásicos IgG por al menos dos métodos serológicos diferentes con el fin de confirmar el diagnóstico (ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta).
- c) Estudios de amplificación del ADN de *T. cruzi* por PCR pueden ayudar a confirmar el diagnóstico en cualquier etapa, pero no suele ser lo más ocupado ante la carencia de infraestructura, falta de estandarización del método y contaminación cruzada de ADN.



#### **2.2.4. Prevención**

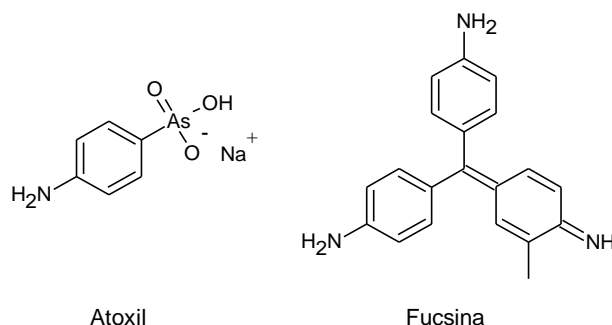
Aún no existe una vacuna para la enfermedad de Chagas, el control de la población del vector con insecticidas en casas y áreas circundantes continúa siendo el método más efectivo de prevención en Latino América, esto sumado al mejoramiento habitacional y de limpieza, profilaxis personal (red en camas), buenas prácticas de higiene en preparación, transporte, almacenamiento y consumo de alimentos, control serológico de bancos de sangre y de donadores de órganos o tejidos, así como de hijos de personas afectadas.<sup>6</sup>

En los pasados años se implementó el control serológico de bancos de sangre y se establecieron diferentes programas para el control del vector (Iniciativa de Salud del Cono Sur, Iniciativa del Pacto Andino e Iniciativa de América Central), lo que ha reducido substancialmente los casos de infección en Latino América. Sin embargo, México aún no establece ni forma parte de un programa en el que se trabaje de manera oficial en la erradicación de esta enfermedad.<sup>7</sup>

En algunas regiones se ha logrado erradicar con éxito esta enfermedad, sobre todo en regiones rurales; sin embargo, la cronicidad de la enfermedad y la ausencia de tratamiento masivo ponen en peligro el control alcanzado, si la vigilancia disminuye una vez que la velocidad de transmisión llegue al nivel deseado.

#### **2.3. Fármacos para tratamiento**

La historia de la quimioterapia en la enfermedad de Chagas tuvo su inicio poco después del descubrimiento de la enfermedad en 1909 con el empleo de compuestos basados en arsénico (Atoxil), colorante rosanilin (Fucsina), antimoniales y cloruro de mercurio, cada uno de ellos sin resultados efectivos y con muchos efectos secundarios.



**Figura 6.** Estructura química del Atoxil y Fucsina.

El descubrimiento, en los años 1950's y 1960's, de los fármacos con grupos nitrofurano en su estructura incrementó los esfuerzos para encontrar el tratamiento de la infección por *T. cruzi*; no obstante, los resultados obtenidos con estos compuestos son controversiales debido a sus efectos adversos por lo que su utilidad clínica es cuestionable.<sup>4</sup>

La OMS propuso que el fármaco ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debía cumplir con una serie de requisitos:<sup>6</sup>

- Eliminar el parásito tanto en la fase aguda como en la crónica.
- Ser efectivo en periodos de tratamiento cortos o con pocas dosis y sin necesidad de hospitalización.
- Bajo costo.
- No tener efectos colaterales o teratogénicos.
- No inducir la generación de cepas resistentes del parásito.

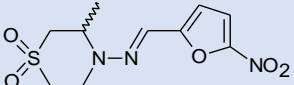
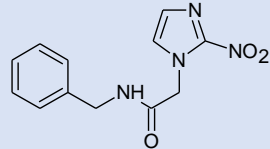
Esta lista de requisitos no ha sido cumplida por ningún compuesto probado hasta la fecha.

### 2.3.1. Nitroheterociclos

Descubiertos en los años 1960's y 1970's, el Nifurtimox (Lampit, Bayer) y el Benznidazol (Rochagan, Roche) continúan siendo la única alternativa disponible para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Estos compuestos muestran muy baja especificidad en su mecanismo de acción, contribuyendo a los efectos de citotoxicidad observados durante el tratamiento con los mismos. Además, la acción

de estos fármacos está directamente afectada por diversas condiciones como duración del tratamiento, edad, distribución geográfica de los pacientes, entre otras. Actualmente no se encuentran aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) de EUA y únicamente se pueden obtener a través de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) para ser usados en protocolos de investigación.<sup>4,8</sup> Las tasas de curación obtenidas de ensayos clínicos para estos fármacos se encuentran en el 71.5% para la fase aguda de la enfermedad mientras que en un 5.9% para la fase crónica.<sup>14</sup> Algunas de las características de estos fármacos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Información general sobre el Nifurtimox y el Benznidazol<sup>4,8</sup>

| Fármaco                    | Nifurtimox  | Benznidazol  |
|----------------------------|---|--|
| <b>Nombre comercial</b>    | Lampit, Bayer   | Rochagan, Roche  |
| <b>Nombre IUPAC</b>        | (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamino)tetrahydro-4H-1,4-tiazino-1,1-dioxido)   | N-bencil-2-nitroimidazolacetamida  |
| <b>Estructura</b>          |    |   |
| <b>Dosis</b>               | 8-15 mg/Kg/día  | 5-7.5 mg/Kg/día  |
| <b>Posología</b>           | 3-4 dosis/día durante 90 días   | 2 dosis/día durante 60 días  |
| <b>Mecanismo de acción</b> | Inducción de estrés oxidativo en el parásito, activa reducción por una nitrorreductasa eucariótica tipo I, inhibe la actividad deshidrogenasa del parásito, afecta el potencial de la membrana mitocondrial | Induce la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos dentro del parásito, induce lesiones en el ADN mitocondrial del parásito  |
| <b>Desventajas</b>         | Efectos adversos: anorexia, pérdida de peso, mareos, náuseas, vómito y cólicos intestinales, dolor de cabeza, bipolaridad, insomnio, mialgia, neuropatía periférica.  | Efectos adversos: Hipersensibilidad, dermatitis alérgica, edema generalizado, fiebre, linfadenopatía, dolor en músculo y articulaciones, neutropenia, agranulocitosis, trombocitopenia, neuropatía periférica, parestesia, neuropatía periférica, anorexia, nausea o vómito. |
|                            | Su eficacia en la fase crónica es incierta.   |  |
|                            | El paciente suele abandonar su uso por los efectos adversos   |  |

### 2.3.2. Dianas farmacológicas

El avance en la comprensión de las vías metabólicas y la genómica de *T. cruzi* ha permitido la identificación de nuevas dianas farmacológicas potencialmente útiles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.<sup>15</sup> Algunas de las principales vías metabólicas que están siendo estudiadas actualmente como dianas viables se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Potenciales dianas farmacológicas contra *T. cruzi*<sup>4,15-17</sup>

| Ruta metabólica objetivo                             | Función  | Enzima u organelo celular inhibido   |
|--|--|--|
| <b>Proteasas o peptidasa</b>                         | Múltiples funciones.   | Cisteín-peptidasas, serín-peptidasas, treonin-peptidasas   |
| <b>Biosíntesis de esterol</b>                        | Esencial para la composición estructural de las membranas, mitocondria y citoplasma.   | Esterol 14-dimetilasa, escualeno epoxidasa, farnesil difosfato sintasa, farnesil transferasa, $\Delta$ -24(25) esterol metiltransferasa. |
| <b>Vía glucolítica</b>                               | Producción de energía.   | Triosafosfato isomerasa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa, transportadores de glucosa   |
| <b>Biosíntesis de lípidos</b>                        | Esencial en las membranas celulares.   | Alquil-lisofosfolípidos, glicoesfingolípidos, <i>N</i> -acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa, fosfatidilserina descarboxilasa        |
| <b>Metabolismo dependiente de grupos tiol (R-SH)</b> | Mecanismo de defensa contra estrés oxidativo.  | Tripanotiona reductasa, tripanotiona sintetasa, triparedoxina peroxidasa.  |
| <b>Familia de proteínas quinasas</b>                 | Producción de energía.   | Arginina quinasa, fosfatidilinositol-3-quinasa.  |
| <b>Síntesis de nucleótidos</b>                       | Precusores de síntesis de material genético.   | Purina fosforibosil transferasa, dihidrofolato reductasa, pteridina reductasa.   |
| <b>Transferencia de ácido salicílico</b>             | Transferencia de ácido a partir de glicoconjugados de hospedero e incorporación en moléculas de mucina ligadas a membrana de parásito. | <i>Trans</i> -sialidasa.   |
| <b>ADN topoisomerasas</b>                            | Replicación del ADN de <i>T. cruzi</i> .   | ADN topoisomerasa I, ADN topoisomerasa II  |
| <b>Replicación celular</b>                           | Sostener la proliferación mitótica de células madre  | Familia PUF de proteínas de unión a ARN  |
| <b>Síntesis de poliaminas</b>                        | Regulan replicación, transcripción y traducción de ADN durante la replicación.   | Poliamina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa  |

### 2.3.3. La vía glucolítica

Una característica importante del metabolismo de *T. cruzi* es su dependencia de la glucólisis, ya que es su única fuente de energía (producción de ATP), la cual es indispensable para su supervivencia celular. Por tanto, las enzimas de esta vía representan excelentes dianas farmacológicas para la búsqueda de moléculas que puedan inhibir selectivamente al parásito, afectando su función metabólica.

Se ha observado que en general los kinetoplastos (*Trypanosoma* y *Leishmania*) contienen las primeras siete enzimas de la glucólisis en un organelo separado, el cual denominaron glicosoma, a diferencia de otras células eucariotas donde la glucólisis se lleva a cabo completamente en el citoplasma. Esta es una diferencia entre la glucólisis del parásito y del hospedero que puede favorecer el desarrollo de nuevas moléculas que inhiban de manera selectiva esta vía metabólica.<sup>18</sup>

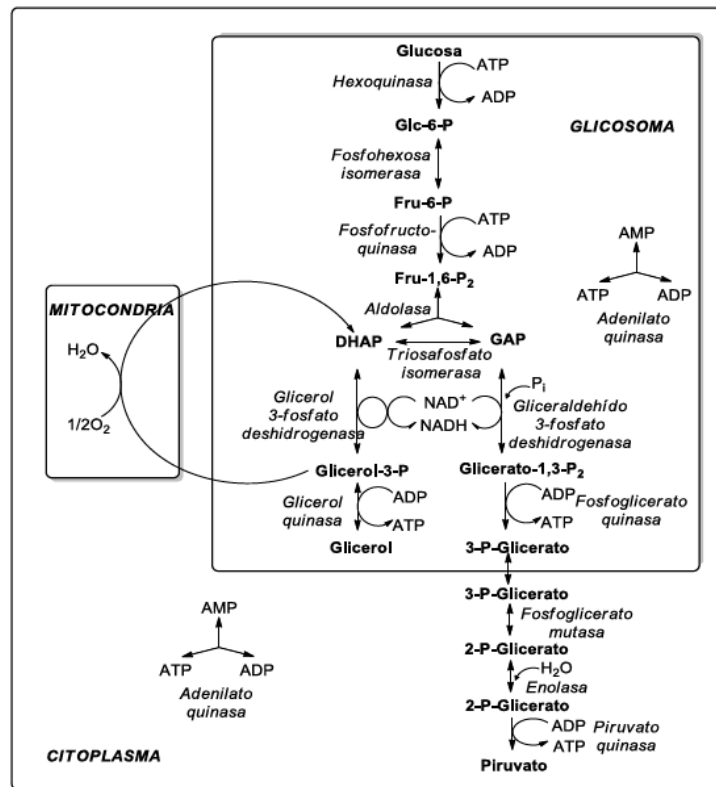


Figura 7. Glucólisis en sangre de *Trypanosoma*.<sup>15,18</sup>

### 2.3.3.1. La triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*

La triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) está implicada en la producción de ATP durante la conversión de glucosa a piruvato, y por lo tanto es esencial para el mantenimiento de la vida bajo condiciones aeróbicas del parásito. La TcTIM ha sido propuesta como una diana farmacológica validada para el diseño de inhibidores selectivos que permitan encontrar un fármaco contra la enfermedad de Chagas. La triosafosfato isomerasa (TIM) cataliza la isomerización del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), en el quinto paso de la glucólisis.<sup>19</sup>

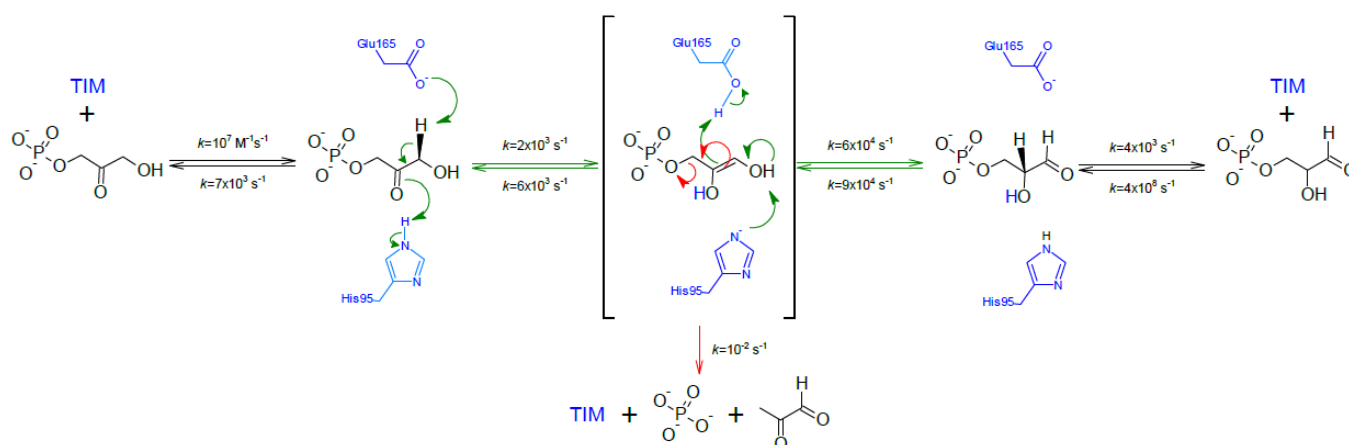
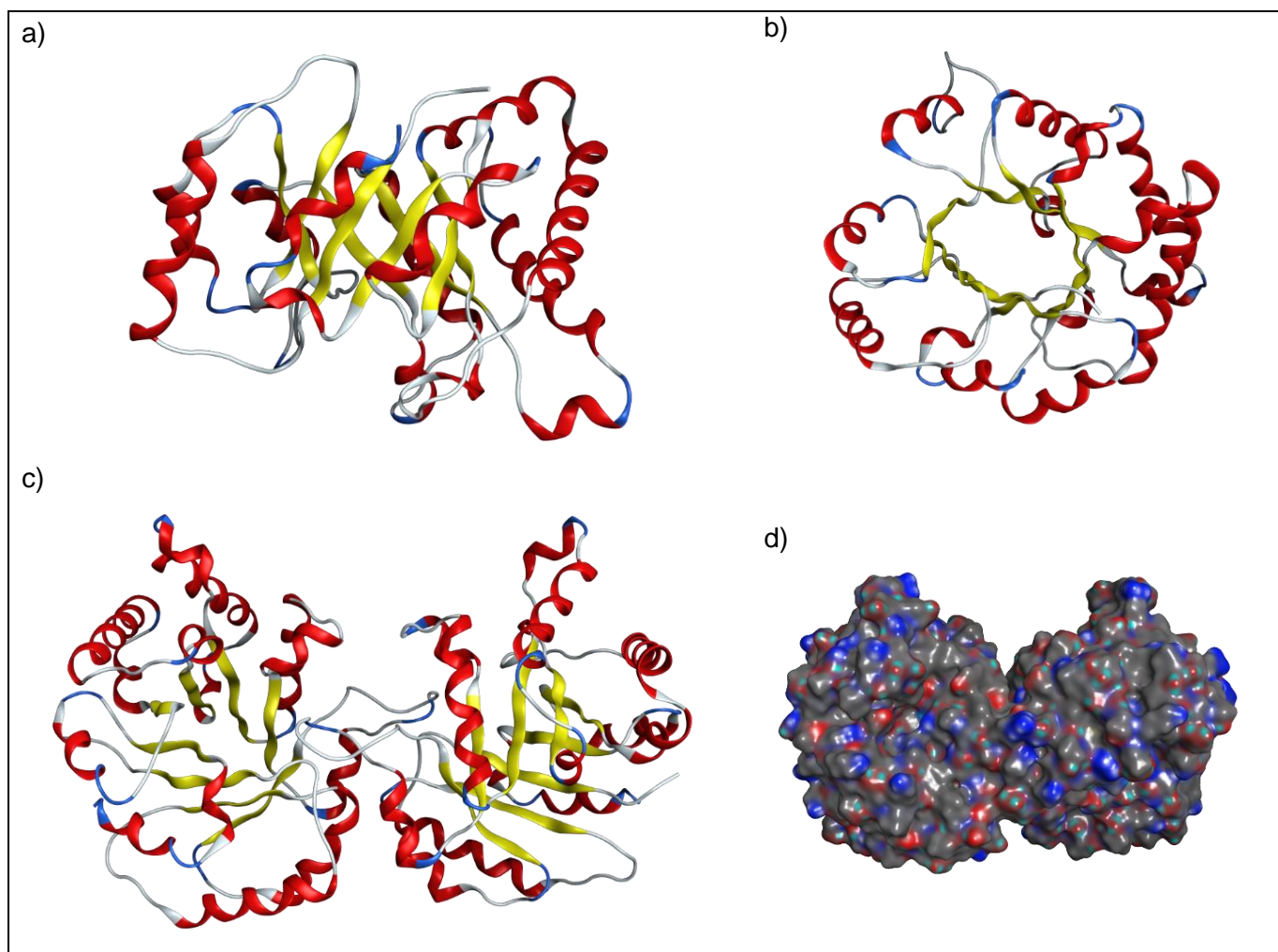


Figura 8. Reacción catalizada por la TIM.<sup>20</sup>

Estructuralmente las TIMs son homodímeros, donde cada monómero está formado por 250 y 251 aminoácidos respectivamente y cada uno consta de un dominio estructural denominado barril TIM o barril (beta/alfa)<sub>8</sub>, el cual consiste en ocho hojas plegadas  $\beta$  en paralelo, circundadas por ocho hélices  $\alpha$  formando una especie de barril compacto, ver Figura 9. La interface, región que une ambos monómeros, está formada por alrededor de 32 residuos, esta ocupa una porción significativa del área superficial molecular de cada monómero, aproximadamente de 1496 Å.<sup>19,21</sup>

Se ha observado que la TcTIM solo es activa en su forma dimérica, por lo tanto, el uso de moléculas pequeñas que interactúen con la interface de la TcTIM puede inducir modificaciones de la estructura cuaternaria y alterar la integridad del dímero, provocando la inactivación de la enzima.<sup>22</sup> La triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM) y la TcTIM presentan 68-74% de identidad estructural entre ambas

enzimas, especialmente en el sitio catalítico. En contraste, la identidad de los 32 residuos de la interface de TcTIM y HsTIM es de 52% aproximadamente. Esto genera que el sitio pueda ser propuesto como un centro de control putativo “alostérico” para la inhibición de la enzima, el cual es además extremadamente hidrofóbico.<sup>23</sup> Por lo que teóricamente es posible encontrar moléculas que exhiban alta especificidad por la interface de la enzima TcTIM.<sup>19</sup>



**Figura 9.** Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). a) Vista lateral del barril de un monómero de la TcTIM. b) Vista superior del barril del mismo monómero de a) de la TcTIM. c) Forma dimérica de la TcTIM. d) Forma dimérica de la TcTIM con superficies.<sup>24</sup>

## 2.4. Diseño de la serie CSHG

### 2.4.1. El núcleo de bencimidazol como estructura privilegiada

Los bencimidazoles son un sistema de anillos heterocíclicos caracterizados por la fusión de un benceno en las posiciones 4,5 del imidazol. Esta estructura cobró interés en los 1950's una vez que se encontró que este núcleo formaba una parte integral de la vitamina B<sub>12</sub> como 5,6-dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)bencimidazol. Desde entonces este núcleo ha atraído a muchos investigadores alrededor del mundo para evaluar su potencial como agente terapéutico encontrando diversas actividades biológicas, dentro de las que se encuentran actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria, antitumoral, entre otras.<sup>25,26</sup>

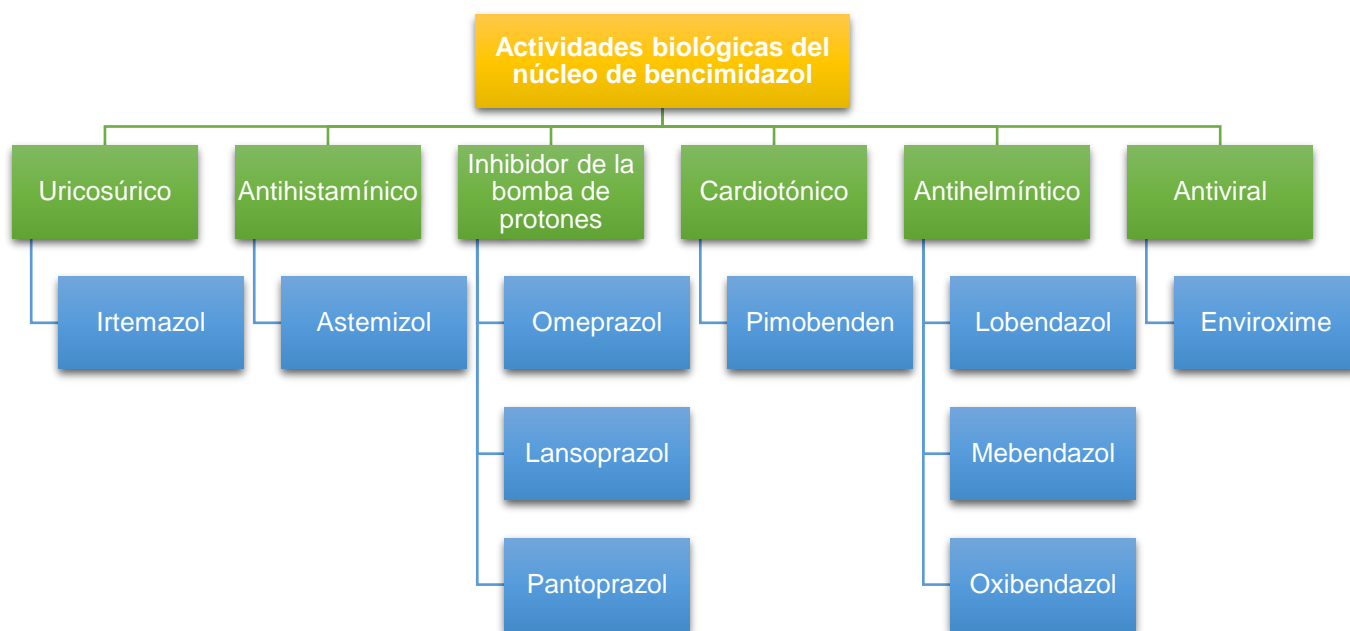
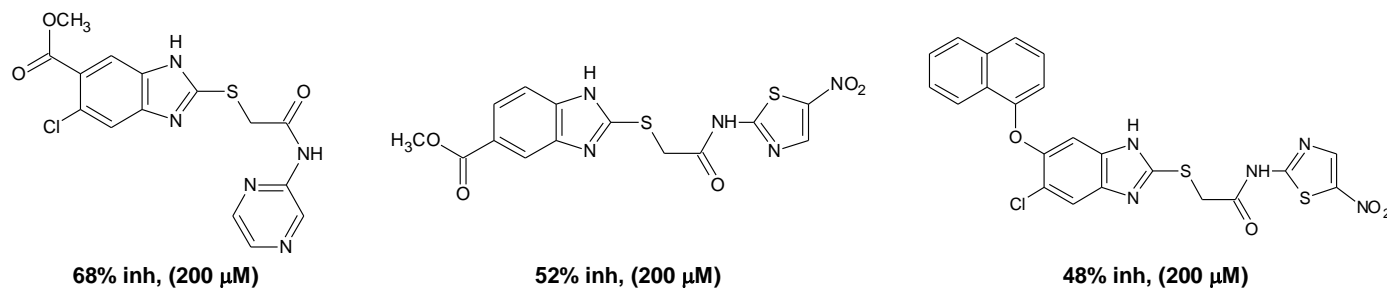


Figura 10. Fármacos clínicamente aprobados conteniendo el núcleo de bencimidazol.<sup>25</sup>

### 2.4.2. Bencimidazoles con actividad inhibitoria de la TcTIM

En nuestro grupo de investigación del laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, se han sintetizado una gran variedad de derivados del bencimidazol en la búsqueda de compuestos con posible actividad antiparasitaria. Algunos de estos compuestos presentaron actividad como inhibidores de la TcTIM con un porcentaje de inhibición entre 5 y 68% a una concentración de 200  $\mu$ M.<sup>15</sup> En la Figura 11 se pueden ver algunos ejemplos.





**Figura 11.** Derivados del bencimidazol con actividad inhibitoria de la TcTIM sintetizados por nuestro grupo de investigación.<sup>23,27</sup>

### 2.4.3. Serie CSHG

En un proyecto previo realizado en nuestro laboratorio se llevó a cabo la síntesis y evaluación de seis bencimidazoles híbridos entre un 2-aminobencimidazol y un 2-metilbencimidazol unidos por un enlace carboxamida. Los compuestos mostraron interesante actividad *in vitro* contra dos cepas de *T. cruzi* (INC5 y NINOA), todos los compuestos fueron más activos que el fármaco de referencia, Nifurtimox (Nfx), en el caso de la cepa INC5. Dentro de los compuestos evaluados, **B4** sobresale como el más activo en ambas cepas y el menos tóxico, además de ser el más potente en su actividad inhibitoria contra la TcTIM mostrando un 71% de inhibición a 100  $\mu\text{M}$ .<sup>28</sup>

Al evaluar a los precursores sintéticos de la carboxamida **B4** (el ácido carboxílico correspondiente y la amina), no se encontró actividad inhibitoria para el ácido (**Ac-B4**) pero sí para la amina 2-amino-5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**Am-B4**) con un 40% de inhibición de la TcTIM a 200  $\mu\text{M}$ , por lo que se sugiere que esta parte de la estructura es muy importante para la actividad inhibitoria de la enzima TcTIM. A partir de esta información se diseñó una serie de compuestos (Serie **CSHG**) derivados del compuesto **Am-B4** en la cual se funcionalizó el grupo amino en forma de sulfonamida aromática 4-sustituida, tomando en cuenta los estudios previos de acoplamiento molecular, que sugieren que para tener afinidad por la interfaz de la enzima se requiere de por lo menos dos núcleos aromáticos y un aceptor de puente de hidrógeno en la parte de la amida.<sup>23,28</sup> Adicionalmente se ha agregado un sustituyente en la posición 4 del fenilo de la sulfonamida con grupos

electrodonadores o electroattractores, con el propósito de evaluar el efecto de estos sustituyentes en la actividad biológica.

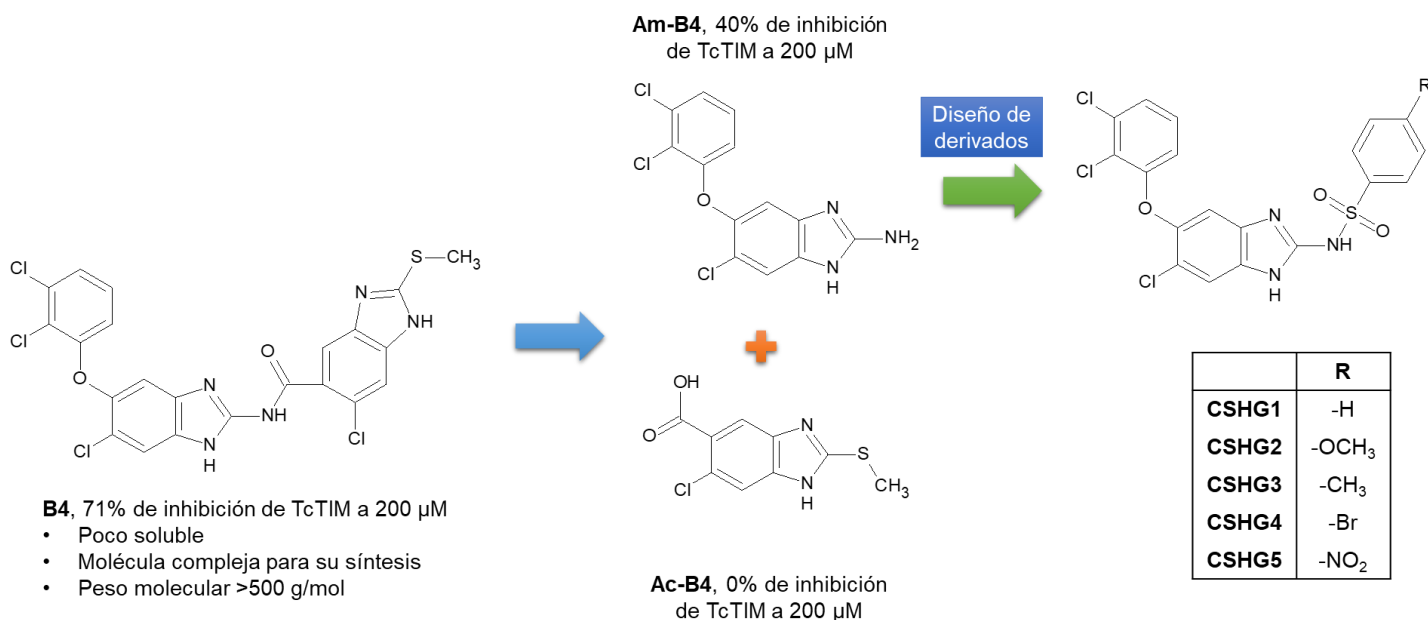
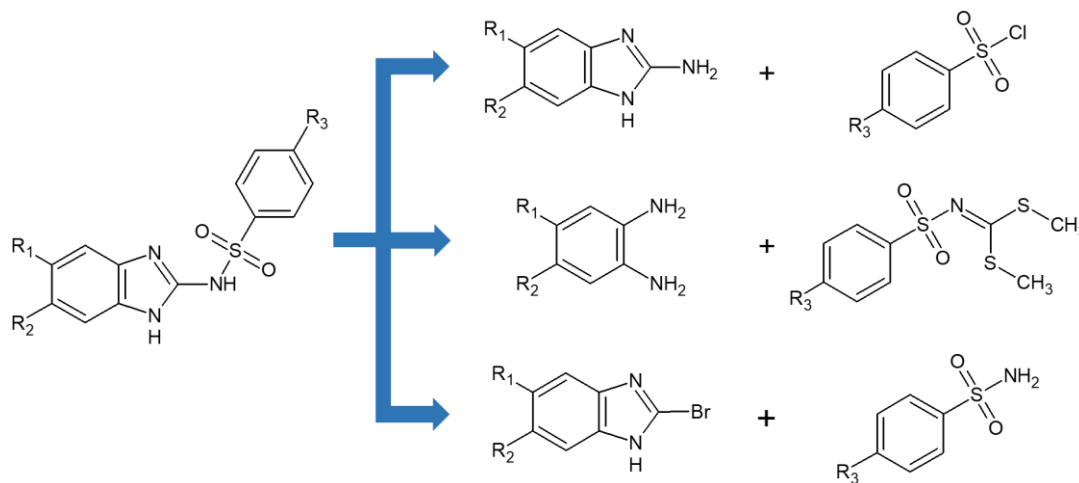


Figura 12. Diseño de la serie CSHG.

## 2.5. Síntesis de bencensulfonamidas bencimidazólicas

La síntesis de sulfonamidas en la posición 2 del anillo del bencimidazol es un área poco explorada por nuestro grupo de investigación, por lo tanto, en este trabajo se investigó sobre algunos de los métodos reportados actualmente para la síntesis de sulfonamidas en esa posición, y a partir de los mismos fue posible proponer algunas estrategias que nos permitieran obtener los compuestos deseados.

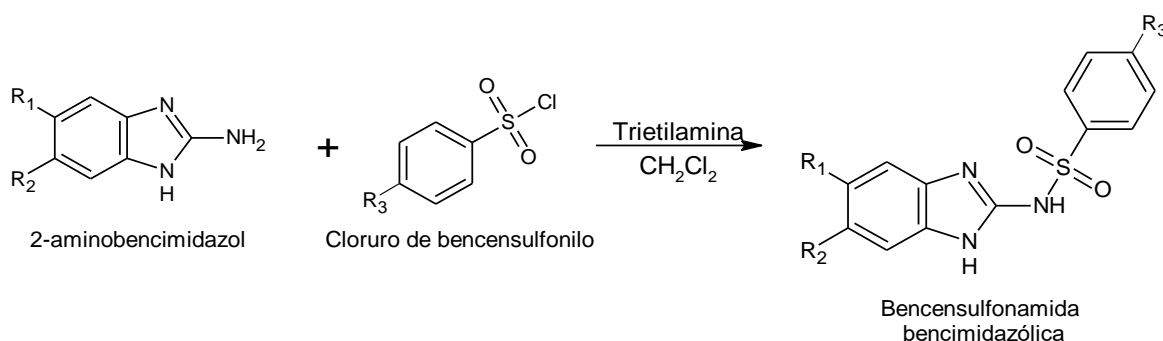


Esquema 1. Estrategias propuestas para la síntesis de bencensulfonamidas bencimidazólicas.

### 2.5.1. A partir del 2-Aminobencimidazol

Este método es una primera aproximación a la síntesis debido a que el cloruro de bencensulfonilo y sus derivados 4-sustituidos son comercialmente accesibles; además, a la aparente facilidad de síntesis del 2-aminobencimidazol, cuya síntesis se encuentra reportada ampliamente por nuestro grupo de investigación.<sup>28</sup>

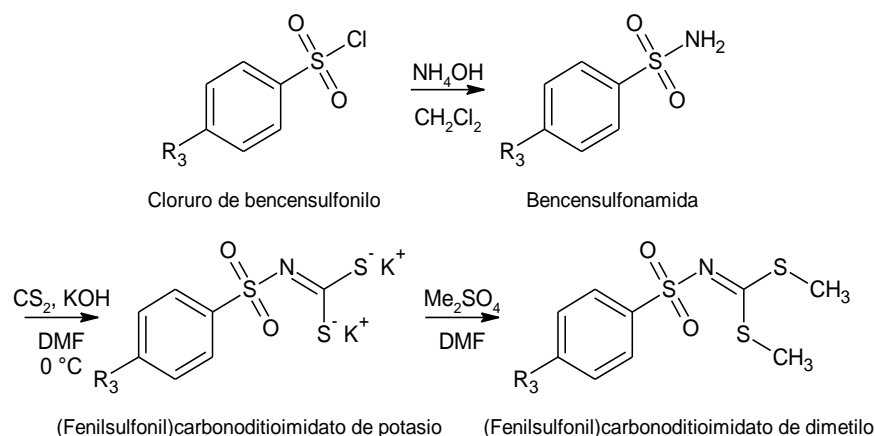
Esta propuesta aprovecha el poder nucleofílico del grupo amino en la posición 2 del bencimidazol, así como el buen centro electrofílico en el azufre del correspondiente cloruro de bencensulfonilo, para llevar a cabo una reacción sencilla de sustitución nucleofílica sobre el cloruro del ácido sulfónico.



**Esquema 2.** Síntesis de sulfonamidas bencimidazólicas a partir del 2-aminobencimidazol.

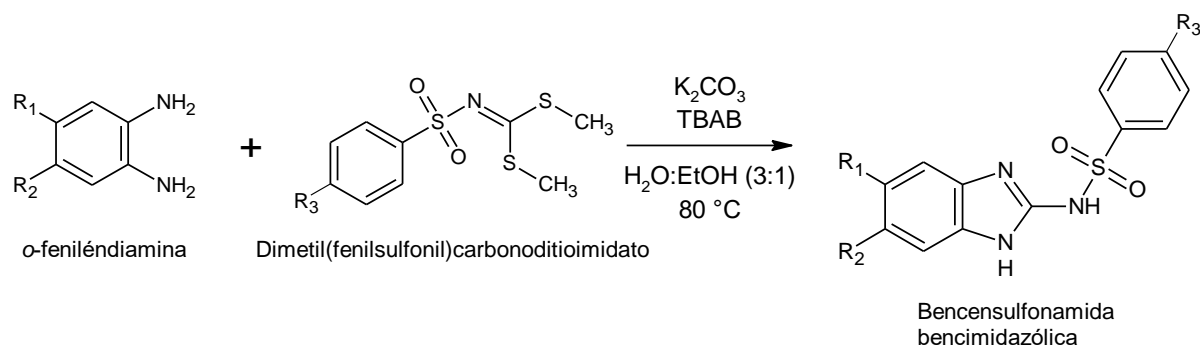
### 2.5.2. A partir del (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo

Este método involucra la síntesis de (2-bencimidazolil)sulfonamidas a partir de un derivado (fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo, el que a su vez se prepara por reacción directa del cloruro de bencensulfonilo adecuado e hidróxido de amonio, para obtener la bencensulfonamida y ésta posteriormente se trata con  $\text{CS}_2$  y  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ . (Esquema 3).



**Esquema 3.** Síntesis del (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo.

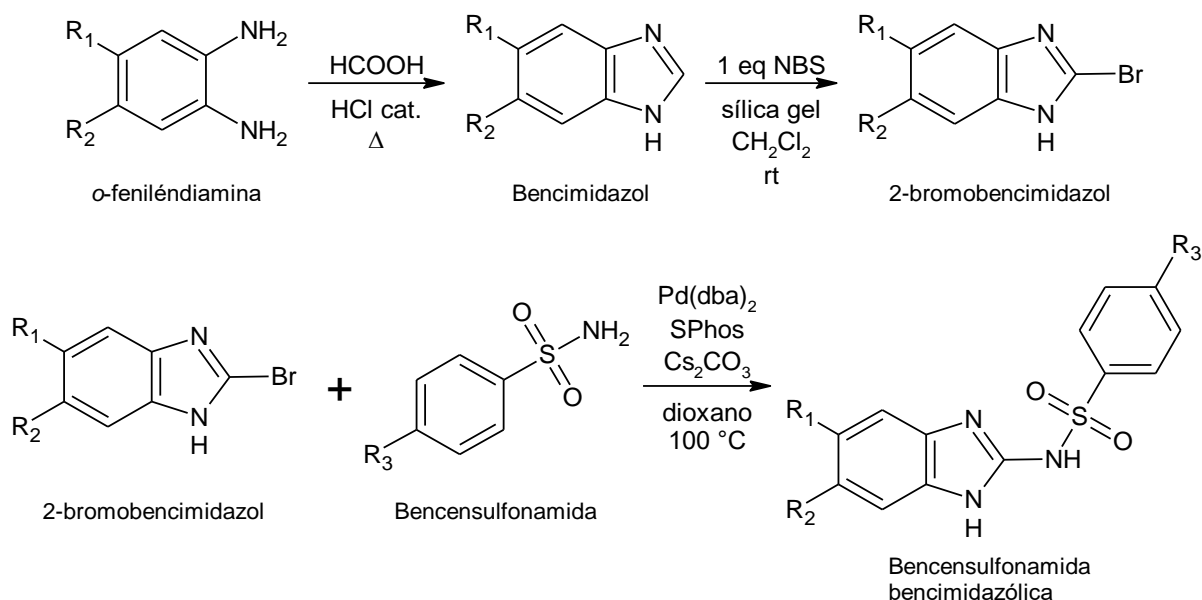
Este derivado tiene un centro electrofílico que reacciona con facilidad con aminas, por ejemplo las *orto*-feniléndiaminas, para generar el anillo del bencimidazol, aprovechando la capacidad del metanotiol como un buen grupo saliente (Esquema 4). Una ventaja importante de este método es que en caso de ser exitosa la reacción se asegura que la posición de la sulfonamida en el anillo del bencimidazol sea en la posición 2, evitando que los nitrógenos en las posiciones 1,3 del anillo de bencimidazol sean las que formen la sulfonamida.<sup>29</sup>



**Esquema 4.** Síntesis de sulfonamidas bencimidazolicas a partir del (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo.

### 2.5.3. A partir del 2-Bromobencimidazol

En este caso la estrategia es sintetizar inicialmente el 2-bromobencimidazol adecuadamente sustituido en las posiciones 5 y 6 para posteriormente realizar un acoplamiento de Buchwald-Hartwig con la sulfonamida correspondiente (Esquema 5). En este método también se tendría la ventaja de en caso de ser exitosa la reacción, asegurar que la sulfonamida se forme en la posición deseada.



**Esquema 5.** Síntesis de bencensulfonamidas bencimidazólicas a partir del 2-bromobencimidazol.

## 2.6. Diseño de fármacos asistido por computadora

En la evolución constante de la química farmacéutica, la tecnología computacional ha surgido como una herramienta poderosa capaz de incrementar la tasa de descubrimiento de nuevos fármacos de una manera más costeable, disminuyendo la inversión económica y de tiempo requeridos para que una sustancia llegue a los anaqueles en farmacias y hospitales. Esto a través de procedimientos como el cernimiento de grandes bibliotecas de compuestos, optimización de *leads* para incrementar su afinidad u optimizar sus propiedades farmacocinéticas, o por el diseño de nuevos compuestos a través del uso de núcleos de actividad privilegiada.<sup>30,31</sup>

### 2.6.1. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o *docking* tiene como objetivo el predecir el modo de unión experimental y la afinidad de moléculas pequeñas dentro de un sitio de unión de una diana farmacológica en particular; actualmente se usa como una herramienta computacional en el diseño de fármacos para la optimización de *leads*.<sup>32,33</sup> Dicho proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: considerando a los átomos y a los

enlaces entre ellos como una serie de vectores o coordenadas atómicas, se predice su asociación “correcta” al unirse.

El algoritmo de búsqueda y la función de evaluación son las dos partes básicas dentro de un estudio de acoplamiento molecular que permitirá generar y evaluar las conformaciones del ligando dentro del sitio de unión.<sup>32</sup>

El algoritmo de búsqueda se usa para explorar el panorama de energía libre para encontrar las mejores conformaciones enzima-ligando a través de funciones energéticas; el algoritmo puede ser de tipo sistemático, estocástico o determinístico. Dentro de los algoritmos estocásticos encontramos a los algoritmos evolutivos, los cuales son métodos de optimización basados en la teoría de evolución biológica de las poblaciones por métodos de selección natural, dentro de estos algoritmos encontramos el algoritmo genético.<sup>32</sup>

Durante el proceso de *docking*, los algoritmos de búsqueda generan un gran número de conformaciones ligando-enzima. Las funciones de evaluación son funciones matemáticas que califican la bondad del ajuste enzima-ligando, guiando a los algoritmos de búsqueda únicamente a las conformaciones relevantes; éstas pueden basarse en la geometría del ligando y del sitio de unión (evaluación topológica), o en un cálculo de la energía de unión enzima-ligando (evaluación energética).<sup>32</sup>

### 2.6.2. Índice de eficiencia del ligando

La potencia, representada por la energía de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ), la constante de inhibición ( $K_i$ ) o la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), son criterios importantes para evaluar *leads*; sin embargo, la potencia por si sola es muchas veces un falso profeta. Incrementos en la potencia llevan a incrementos de peso molecular, que resultan en compuestos saliendo de los parámetros para tener un perfil adecuado en cuanto a sus propiedades de absorción y permeabilidad. Surge entonces el Índice de Eficiencia del Ligando (IEL) como un concepto que permite comparar moléculas a partir de la energía de unión por átomo. Éste es un simple parámetro que puede ser útil en la evaluación de *leads*, proporcionando una forma de normalizar la potencia

y el peso molecular de un compuesto con el fin de obtener una comparación útil entre compuestos con diferentes intervalos de potencia y pesos moleculares.<sup>34,35</sup>

$$\text{IEL} = \frac{\text{pCl}_{50} \text{ o pKi o } \Delta G_{\text{unión}}}{\# \text{ átomos diferentes a hidrógeno en la molécula}}$$

### 3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que la enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica de Latino América así como emergente en países de primer mundo, aunado a que los tratamientos disponibles actualmente tienen una eficacia controversial en todas las fases de la enfermedad y su uso se acompaña de una gran cantidad de efectos adversos, resulta imperante la búsqueda de nuevos fármacos con eficacia en todas las etapas de la enfermedad, que sean efectivos a dosis bajas, que su síntesis tenga un costo accesible y que produzcan la menor cantidad de efectos adversos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una gran cantidad de compuestos con actividad antiparasitaria y de manera más específica contra *T. cruzi* teniendo como blanco a la TcTIM. El análisis de estos compuestos por diferentes métodos computacionales, así como de sus resultados de actividad *in vitro*, ha permitido continuar con el diseño de nuevos compuestos con potencial actividad tripanocida que presenten mejor actividad inhibitoria de la TcTIM, un peso molecular más bajo, mayor solubilidad y menor citotoxicidad.

En el presente trabajo se plantea la síntesis de 5 nuevos derivados del bencimidazol (**CSHG1–CSHG5**), diseñados a partir del fragmento **Am-B4** (6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina) del compuesto **B4**, funcionalizando el grupo amino del mismo en forma de sulfonamida aromática. Adicionalmente se ha agregado un sustituyente en la posición 4 del fenilo de la sulfonamida con grupos electrodonadores o electroattractores, lo que dará más información sobre los requerimientos estructurales que deben de tener los bencimidazoles para presentar actividad contra *T. cruzi*, así como para inhibir la actividad enzimática de la TcTIM.

Esto se complementa con estudios de acoplamiento molecular, que permiten relacionar la actividad *in vitro* observada con las posibles interacciones ligando–proteína que están ocurriendo en el sitio de unión. De la misma manera, el *score* obtenido del acoplamiento molecular, así como la  $Cl_{50}$  determinada para la TcTIM permitirá calcular los IEL, que correlaciona la potencia mostrada por el acoplamiento molecular y la potencia real. Esta relación ayudará a establecer que tan efectivo resulta el predecir la potencia que los compuestos tendrán sobre la TcTIM a partir



del acoplamiento molecular, y con suerte, asentar las bases para la construcción de un modelo para la predicción de la actividad inhibitoria de la TcTIM de nuevos compuestos diseñados en el futuro a partir de su acoplamiento molecular.

#### 4. HIPÓTESIS

Las nuevas bencensulfonamidas bencimidazólicas (**CSHG1–CSHG5**) presentarán mejor actividad inhibitoria de la TcTIM que la presentada por su precursor **Am-B4**, así como mejor actividad tripanocida que la presentada por los fármacos de referencia Nifurtimox y Benznidazol.

Los estudios de *docking* nos permitirán observar un buen acoplamiento entre los compuestos **CSHG1–CSHG5** y la TcTIM, además de una buena selectividad entre la misma y la HsTIM.

El IEL indicará que un aumento en el peso molecular de los compuestos lleva a disminuciones en la potencia de inhibición de la TcTIM, adicionalmente el IEL permitirá confirmar el acoplamiento como un método confiable para la predicción de la actividad real de los inhibidores de la TcTIM.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Sintetizar, evaluar la actividad tripanocida e inhibitoria de la TcTIM y realizar estudios de acoplamiento molecular de 5 nuevas bencensulfonamidas bencimidazólicas diseñadas a partir de estudios previos como moléculas con potencial actividad contra *T. cruzi* y la TcTIM.

### 5.2. Objetivos particulares

Se plantearon los siguientes objetivos específicos para el desarrollo del presente proyecto:

- Diseñar una ruta de síntesis para obtener de manera viable los compuestos **CSHG1–CSHG5**, a partir de las síntesis previamente reportadas por nuestro grupo de investigación, así como por la búsqueda bibliográfica realizada.
- Sintetizar los compuestos **CSHG1–CSHG5** a escala de 1 g. a partir de la ruta de síntesis propuesta.
- Comprobar la estructura de los intermediarios de síntesis, así como de los compuestos finales mediante las técnicas espectroscópicas de IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C; y en el caso de los compuestos finales también de NOESY, COSY, HMBC y HSQC, así como análisis elemental.
- Someter a los compuestos **CSHG1–CSHG5** a pruebas de actividad inhibitoria de la TcTIM para determinar el porcentaje de inhibición y la IC<sub>50</sub> para los casos en los que sea posible.
- Someter a los compuestos **CSHG1–CSHG5** a pruebas de actividad tripanocida.
- Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados sobre la TcTIM, así como sobre la TIM de diferentes parásitos y de la humana con el fin de evaluar la selectividad.
- Calcular el IEL de los nuevos compuestos y encontrar una relación entre el peso molecular de los compuestos diseñados como inhibidores de la TcTIM y su actividad real.

- Comparar el IEL calculado a partir del score de *docking* con el calculado a partir de los resultados de actividad biológica experimental, para determinar la funcionalidad del *docking* como un modelo para predecir la actividad de los inhibidores de la TcTIM.

## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la presente sección se describe la ruta sintética utilizada para obtener las bencensulfonamidas bencimidazólicas **CSHG1–CSHG5**, la determinación de su actividad tripanocida e inhibitoria de la TcTIM, y finalmente los estudios de acoplamiento molecular y de IEL llevados a cabo.

### 6.1. Parte química

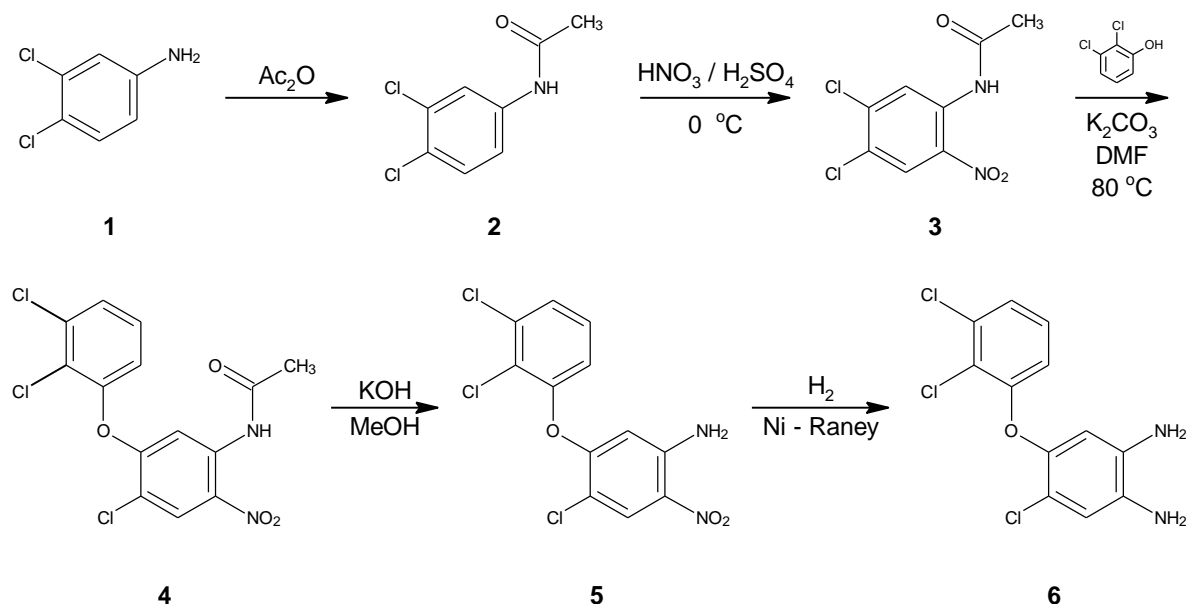
#### 6.1.1. **Síntesis de las Bencensulfonamidas bencimidazólicas**

La parte sintética de este trabajo se divide en cuatro secciones: síntesis de la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (**6**), preparación de la 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**), obtención de los (fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo (**22–26**) y las síntesis de las bencensulfonamidas bencimidazólicas finales (**CSHG1–CSHG4**). Los métodos detallados de las reacciones que se llevaron a cabo se pueden encontrar en el Anexo I.

##### 6.1.1.1. Síntesis de la 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (6)

La síntesis del compuesto **6** se realizó de acuerdo a la secuencia de reacciones que se muestran en el Esquema 6. La síntesis partió de la 3,4-dicloroanilina comercial (**1**) en la cual se protegió el grupo amino con anhídrido acético para dar la *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (**2**), esto permitió, posteriormente, llevar a cabo la nitración en la posición 2 deseada usando una mezcla sulfonítrica a 0 °C para obtener la *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**). Posteriormente se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleofílica aromática con el 2,3-diclorofenol usando un sistema de vacío para favorecer la reacción y disminuir la temperatura de la reacción evitando así la formación de productos resinosos, lo que llevó a la obtención de la *N*-(4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil)acetamida (**4**), la cual se hidrolizó en medio básico para así obtener la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5**). Al tener la 2-nitroanilina (**5**) adecuadamente sustituida ésta se sometió a una reducción catalítica en presencia de hidrógeno y catalizador de Ni-Raney, lo que llevó a la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (**6**). Cada compuesto (**1–5**) se caracterizó

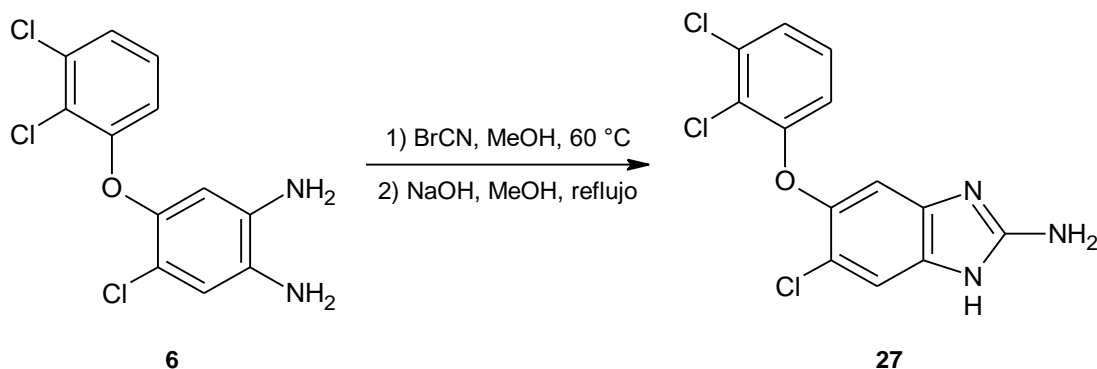
comparando su Rf y punto de fusión con los previamente reportados por nuestro grupo de investigación. El compuesto (**6**) se utilizó de inmediato en la siguiente reacción debido a su rápida oxidación por lo que no fue posible determinar su punto de fusión y Rf.



**Esquema 6.** Síntesis de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benzeno-1,2-diamina (**6**).

#### 6.1.1.2. Síntesis de 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-amina (**27**)

Para obtener la amina (**27**), la diamina **6** se hizo reaccionar con bromuro de cianógeno en metanol a 60 °C durante toda la noche. Posteriormente se agregó NaOH hasta pH = 10 y se calentó a reflujo durante una hora. La caracterización de (**27**) se llevó a cabo comparando el Rf y punto de fusión obtenido con el reportado previamente por nuestro grupo de investigación, así como por análisis elemental.

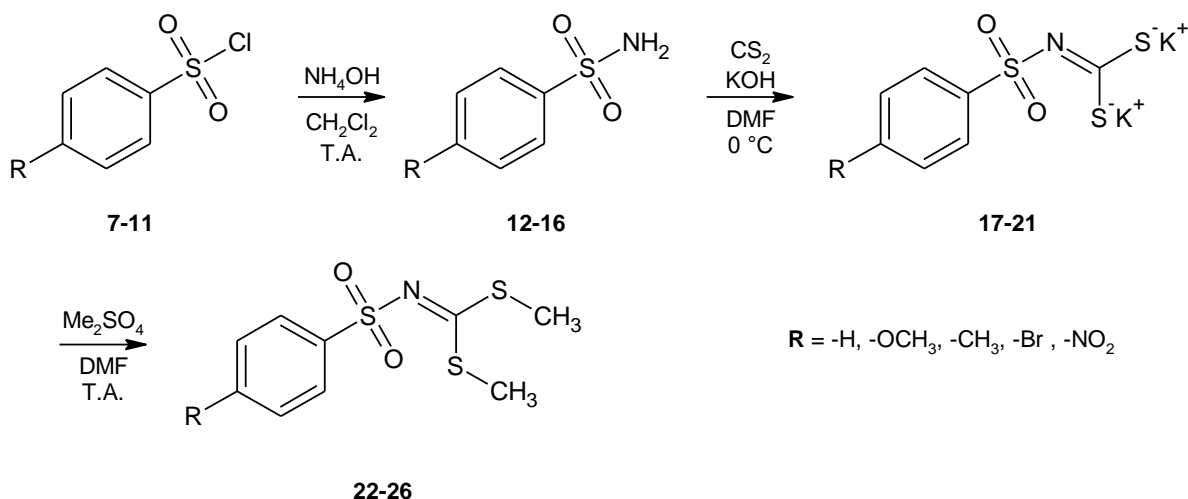


**Esquema 7.** Síntesis de 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**).

### 6.1.1.3. Síntesis de los (Fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo (**22–26**)

La síntesis de los (fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo (**22–26**) se realizó de acuerdo a la secuencia de reacciones mostradas en el Esquema 8. Se partió del cloruro de bencensulfonylo comercial apropiado (**7–11**) el cual se trató con  $\text{NH}_4\text{OH}$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente para llevar a cabo una reacción de sustitución nucleofílica y obtener las bencensulfonamidas (**12–16**). Posteriormente, éstas se hicieron reaccionar con disulfuro de carbono e hidróxido de potasio en DMF a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  para obtener los intermediarios correspondientes (fenilsulfonyl)carbonoditioimidato de potasio (**17–21**), los cuales se trataron de inmediato con sulfato de dimetilo a temperatura ambiente para obtener los compuestos **22–26**.

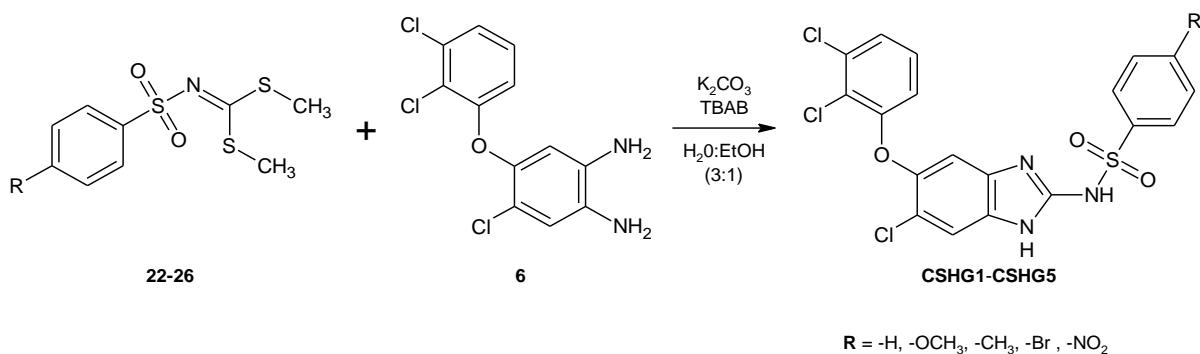
Para la caracterización de los compuestos (**7–26**) se compararon sus  $p_f$  y  $R_f$  con los reportados en la literatura, en el caso de existir, además por sus espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  de todos ellos.



Esquema 8. Síntesis de los (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo (19-22).

#### 6.1.1.4. Síntesis de las Bencensulfonamidas bencimidazólicas (CSHG1–CSHG5)

La 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxi)benceno-1,2-diamina (**6**) se hizo reaccionar con los (fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo (**22–26**) en un sistema etanol-agua usando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base y bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) como catalizador de transferencia de fases para formar los compuestos finales (CSHG1–CSHG5).



Esquema 9. Síntesis de los compuestos finales (CSHG1-CSHG5).

La estructura de los compuestos (CSHG1–CSHG5) se comprobó con sus espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , COSY, NOESY, HMBC y HSQC, así como también se determinó su composición de C, H, N y S por análisis elemental.

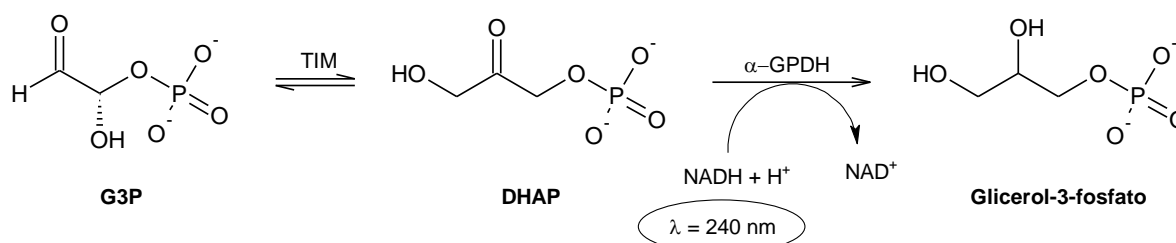


## 6.2. Parte biológica

Esta sección se presenta en tres partes: en la determinación de la inhibición de la actividad de la TcTIM, la determinación de la actividad tripanocida y por último, la determinación de la actividad citotóxica. Los procedimientos detallados de estos experimentos se encuentran descritos en el Anexo II.

### 6.2.1. Actividad inhibitoria de la TcTIM

La actividad residual de la enzima después de la exposición de ésta a un compuesto determinado se determinó mediante un método indirecto que cuantifica NADH, acoplado a la enzima  $\alpha$ -Glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GPDH). Esquema 10.



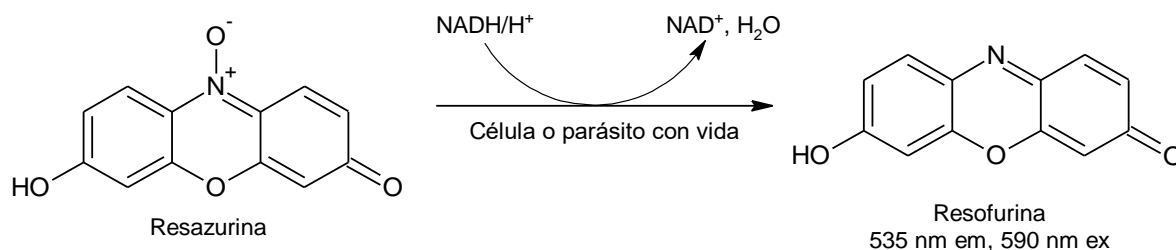
**Esquema 10.** Reacciones enzimáticas involucradas en la determinación de la actividad de la TcTIM.

### 6.2.2. Actividad tripanocida

La evaluación tripanocida se realizó sobre tres diferentes cepas de *T. cruzi*, la cepa de referencia Y1 (ATCC 50832) aislada de un paciente con Chagas en Belo Horizonte, Brazil en 1953; y las cepas ITRI y TR aisladas de *T. dimidata* en Chiapas, México. Los estudios en las tres cepas se realizaron en la fase de epimastigote del parásito debido a la ventajas que representa experimentalmente: no necesita huésped para crecer por lo que se pueden cultivar en medios de cultivo tradicionales obteniendo cantidades considerables del parásito, lo que permite el uso de métodos colorimétricos para su cuantificación, y además se considera una fase no infectiva, lo que brinda seguridad al investigador.

Los compuestos **CSHG1–CSHG4** y Nifurtimox se disolvieron en DMSO (la concentración final de disolvente no es mayor al 1%) y se hicieron las diluciones adecuadas con agua destilada para probarse a 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78  $\mu\text{g/mL}$ . La actividad se evaluó usando resazurina (colorante vital), ver

Esquema 10, cuyo producto de oxidación, la resofurina, se lee espectrofotométricamente a 535 nm emisión y 590 nm excitación. Se calculó el porcentaje de viabilidad de los parásitos y se determinó la  $CI_{50}$  mediante análisis Probit. Los experimentos se realizaron por triplicado.



**Esquema 11.** Reacción de la resazurina con el NADH proveniente de parásitos vivos (actividad tripanocida) o de células viables (citotoxicidad).

### 6.2.3. Actividad citotóxica

La evaluación de la actividad citotóxica de los derivados bencimidazólicos se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Denizot y Lang<sup>36</sup>, con algunas modificaciones. Se utilizó la línea celular de macrófagos de ratón J774.2 en medio RPMI suplementado con SFB, incubando los compuestos en el rango de concentraciones mencionadas para la evaluación de la actividad tripanocida. La actividad se evaluó usando resazurina (Esquema 10). Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células y se determinó la  $CC_{50}$  mediante análisis Probit. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Con los datos de la actividad tripanocida contra epimastigotes ( $CI_{50}$ ) y la citotoxicidad ( $CC_{50}$ ) se calculó el Índice de selectividad (IS) mediante la siguiente fórmula.

$$IS = CC_{50} / CI_{50}$$

Dato que nos permitió determinar la afinidad de los compuestos por el parásito.

### 6.3. Parte computacional

#### 6.3.1. Estudios de acoplamiento molecular

##### 6.3.1.1. Preparación de los ligandos

Los compuestos se construyeron y minimizaron sus estructuras usando el método semiempírico PM6 en Spartan 10. Posteriormente se identificaron los enlaces rotables (raíz y ramas torsionales) utilizando el programa AutoDockTools 1.5.6, y se asignaron cargas atómicas Gasteiger-Marsilli fusionando los hidrógenos no polares a su carbono adyacente. Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT apropiado para su uso en Autodock4.0.

##### 6.3.1.2. Preparación de las proteínas

Las estructuras cristalográficas de las diferentes TIM se obtuvieron de la base de datos en línea del Protein Data Bank<sup>37</sup> (Tabla 3). Estas estructuras se acondicionaron para el estudio usando la herramienta de preparación presente en el módulo Biopolymer en SYBYL<sup>38</sup> 8.0, con el que se removieron las moléculas de agua cristalográficas, contra-iones y ligandos presentes en las estructuras. Posteriormente, a las estructuras se les añadieron todos los hidrógenos y finalmente se relajaron 2000 pasos usando el campo de fuerza AMBER02 con una constante dieléctrica de 20. Utilizando AutoDockTools 1.5.6<sup>39</sup>, a las estructuras se les asignaron cargas Gasteiger-Marsilli y los hidrógenos no polares se fusionaron a su carbono adyacente. Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT apropiado para su uso tanto por Autogrid 4.0 como por Autodock 4.0.

Tabla 3. Identificación dentro del PDB de las diferentes TIM usadas<sup>37</sup>

| Especie                      | PDB ID | Resolución (Å) |
|------------------------------|--------|----------------|
| <i>Trypanosoma cruzi</i>     | 1TCD   | 1.83           |
| <i>Homo sapiens</i>          | 1HTI   | 2.80           |
| <i>Trypanosoma brucei</i>    | 1IIG   | 2.60           |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1M6J   | 1.50           |
| <i>Giardia intestinalis</i>  | 3PF3   | 2.10           |
| <i>Leishmania mexicana</i>   | 1AMK   | 1.83           |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 1LYX   | 1.90           |

### 6.3.1.3. Acoplamiento molecular

Se calcularon los mapas atómicos o *grids* necesarios para el acoplamiento molecular en Autogrid 4.0, usando una malla de prisma rectangular de 70 x 60 x 60 Å centrada en la interfaz de las enzimas con un espaciamiento de 0.375 Å.

Los estudios de *docking* se realizaron en Autodock 4.0 usando un algoritmo genético de tipo Lamarckiano como método de búsqueda conformacional. Se realizaron 30 corridas con un número máximo de evaluaciones energéticas de 2,500,000 y una población inicial de 150 confórmeros, el resto de los parámetros se dejó en sus valores predeterminados.

### 6.3.2. Índice de eficiencia del ligando

A partir de los resultados de este trabajo, así como de trabajos previos de nuestro grupo de investigación<sup>23,27,28,40</sup> y de otros grupos encontrados en la literatura,<sup>19</sup> se construyó una biblioteca de 123 diferentes compuestos diseñados como inhibidores de la TcTIM. Se llevó a cabo el estudio de acoplamiento molecular con estos compuestos y la TcTIM siguiendo la metodología descrita previamente para los estudios de acoplamiento molecular, y se tomó el mejor  $\Delta G_{\text{unión}}$  de cada uno de ellos, cuyo valor negativo se invirtió a positivo con fines de análisis. Se pudo calcular el  $IEL_{\text{docking}}$  dividiendo el  $\Delta G_{\text{unión}}$  entre el número de átomos diferentes de hidrógeno ( $N^{\circ}\text{ADH}$ ) presentes en la molécula. El  $IEL_{\text{docking}}$ ,  $\Delta G_{\text{unión}}$ , y  $N^{\circ}\text{ADH}$  obtenidos se usaron en diferentes gráficas para analizar los resultados.

$$IEL_{\text{docking}} = \frac{\Delta G_{\text{unión}}(\text{Score})}{N^{\circ}\text{ADH}}$$

De los 123 compuestos de la biblioteca creada, 20 tienen reportado su  $CI_{50}$  de actividad inhibitoria real sobre la TcTIM, por lo que para éstos se determinó la  $pIC_{50}$  y se calculó el  $IEL_{\text{inhibición}}$  dividiendo la misma entre el  $N^{\circ}\text{ADH}$ . El  $IEL_{\text{inhibición}}$ , la  $pIC_{50}$  y el  $N^{\circ}\text{ADH}$  se usaron en diferentes gráficas para analizar los resultados.

$$IEL_{\text{inhibición}} = \frac{pIC_{50}}{N^{\circ}\text{ADH}}$$

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de mostrar claramente los resultados obtenidos en esta investigación, así como una discusión más digerible de los mismos, este apartado se divide como se describe a continuación. Primeramente la sección de la síntesis química, donde se expondrán los resultados de las diversas metodologías empleadas, así como la caracterización física y espectroscópica de los compuestos obtenidos. Enseguida se abordará la sección de ensayos biológicos, donde se muestran los resultados de inhibición de la enzima TcTIM, para después discutir los datos de la actividad tripanocida, así como los resultados de la actividad citotóxica. Por último, se buscará tratar de explicar los resultados de evaluación biológica a través del acoplamiento molecular, así como se buscará encontrar una relación entre los mismos y el *docking* usando el IEL.

### 7.1. Parte Química

#### 7.1.1. Síntesis de 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (6)

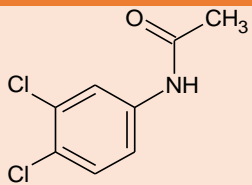
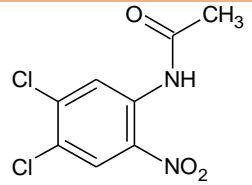
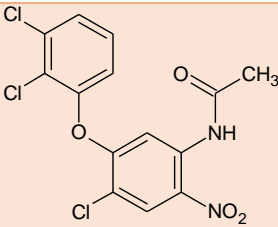
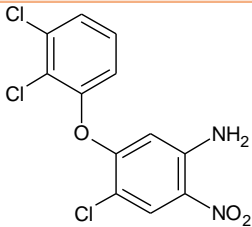
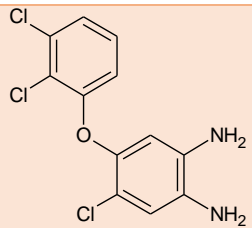
La síntesis de (6) inició partiendo de la 3,4-dicloroanilina comercial (1) en la cual se protegió el grupo amino por acetilación con anhídrido acético para evitar la protonación de este grupo y al mismo tiempo dirigir la nitración a la posición 6 obteniendo así la 3,4-diclorofenilacetamida (2). Con el grupo amino protegido se realizó la nitración en frío usando una mezcla sulfonítrica y se obtuvo la *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3); es importante llevar a cabo esta reacción a muy bajas temperaturas, así como en las condiciones más anhidras posibles para evitar dentro de lo posible la formación de subproductos en la reacción, como serían los compuestos nitrados en la posición 5, 2 o ambas.

A continuación se llevó a cabo la sustitución nucleofílica aromática (S<sub>N</sub>Ar) con el fin de sustituir el cloro por un 2,3-diclorofenoxi en la posición 5; para esta reacción se probaron diferentes condiciones con el fin de evitar el número y proporción de impurezas presentes en la reacción por lo que ésta se discute a mayor detalle más adelante. Una vez que se realizó la S<sub>N</sub>Ar, se hidrolizó la acetamida en condiciones básicas obteniendo así la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (5).

Finalmente, con el fin de obtener la *o*-fenilendiamina (**6**) se hizo una reducción del grupo nitro usando H<sub>2</sub> y Ni-Raney como catalizador, esto debido a que el uso de otros catalizadores como Pd/C ocasionan la pérdida de los Cl de la molécula por hidrogenólisis. Este compuesto se usó de inmediato en la siguiente reacción y no se caracterizó debido a la inestabilidad característica de las *o*-fenilendiaminas, quienes en presencia de oxígeno y luz se oxidan fácilmente a las diiminas de la *o*-benzoquinona, reaccionando con otras moléculas de *o*-fenilendiamina presentes.<sup>41</sup>

Los resultados obtenidos de esta serie de reacciones se muestran en la Tabla 4. Al tratarse de compuestos previamente reportados por nuestro grupo de investigación únicamente se determinó y comparó el punto de fusión y R<sub>f</sub> para su caracterización, coincidiendo adecuadamente.

Tabla 4. Resultados de Rf y punto de fusión de compuestos (1-6)

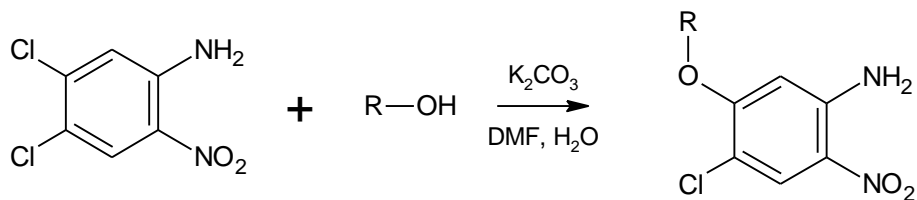
| Clave | Estructura  | Rf   | Sistema de elución* | Punto de fusión determinado(°C) | Punto de fusión reportado (°C) |
|-------|---|------|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| (2)   |    | 0.30 | III                 | 123.0–123.5                     | 123.7–124.3                    |
| (3)   |    | 0.40 | V                   | 124.6–125.0                     | 125.8–126.6                    |
| (4)   |    | 0.56 | IV                  | 160.5–161.4                     | 160.5–161.2                    |
| (5)   |   | 0.65 | II                  | 150.9–151.8                     | 149.0–150.0                    |
| (6)   |  |      |                     | No determinado                  |                                |

\*Los sistemas de elución se pueden consultar en el Anexo I.

#### 7.1.1.1. Sustitución nucleofílica aromática (SNAr)

Reportes anteriores<sup>42</sup> describen esta reacción a partir de 1 eq. del compuesto 4,5-dicloro-2-nitroanilina, 1.1 eq. de 2,3-diclorofenol y 1.5 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O/DMF a 120 °C durante 8 h. (Esquema 12); sin embargo, en estudios previos de esta reacción por nuestro grupo de investigación<sup>43</sup> se observó la formación de subproductos derivados de la descomposición de la DMF, al poner en contacto una base, H<sub>2</sub>O y altas temperaturas, generando dimetilamina y ácido fórmico. Así, la

dimetilamina funcionó como nucleófilo llevando a cabo la SNAr sobre la materia prima (**3**). El tratamiento de purificación de esta reacción es complicado ya que se obtiene una resina, la cual se purifica en una columna cromatográfica. Para solucionar esta problemática nuestro grupo de investigación previamente probó una metodología diferente haciendo uso de vacío de 150-200 mmHg, para sintetizar un compuesto análogo al que se buscó sintetizar en este trabajo.



Esquema 12. Sustitución nucleófilica aromática reportada.<sup>42</sup>

La metodología surge de una patente<sup>44</sup> que describe un nuevo proceso de síntesis del triclabendazol en la que se sintetizó el intermediario SNAr utilizando *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**) y 2,3-diclorofenol con vacío obteniendo altos rendimientos. Esta metodología permitió la síntesis del compuesto deseado utilizando 1 eq. de (**3**), 1.1 eq. de 2,3-diclorofenol, 1.5 eq. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF y vacío de 150-200 mmHg a 70 °C por 6 h. Consecutivamente se evaporó el disolvente a presión reducida y se adicionó agua, generando un sólido amarillo con buen rendimiento. El éxito de esta reacción surge de evitar la descomposición de la DMF al trabajar a temperaturas menores y en ausencia de agua. El vacío aplicado ayudó a mantener el reflujo, además de que las moléculas tuvieran la energía necesaria para generar el choque y se llevara a cabo la SNAr. El producto de reacción obtenido por este método se pudo usar como tal para la siguiente reacción, sin necesidad de un tratamiento más elaborado.

### 7.1.2. Síntesis de las *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]bencensulfonamidas (CSHG1–CSHG5)

#### 7.1.2.1. A partir de los (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo

A partir de la búsqueda en la literatura se encontró un método usado previamente para la síntesis de sulfonamidas bencimidazólicas, en el cual se parte de una *o*-



feniléndiamina, como en nuestro caso, de la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (**6**) y de un derivado (fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo, que se puede preparar a partir del cloruro de bencensulfonilo correspondiente disponible comercialmente.<sup>29</sup>

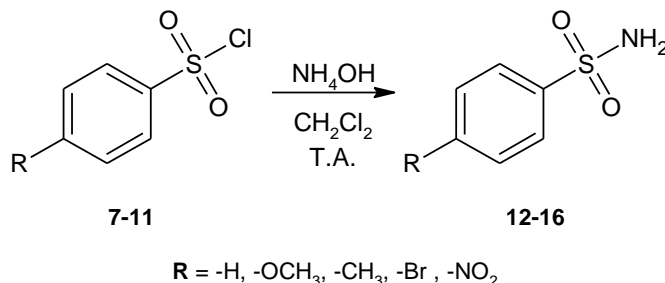
#### 7.1.2.1.1. Síntesis de los (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo

Se comenzó con la reacción para la formación de las sulfonamidas a partir de los cloruros de bencensulfonilo y de NH<sub>4</sub>OH, la cual procedió con facilidad obteniendo un único producto con buenos rendimientos. Los compuestos (**12–16**) ya se encontraban previamente reportados en la literatura por lo que como método de caracterización se procedió únicamente a comparar su punto de fusión con los reportados en la literatura, todos coincidieron.

**Tabla 5.** Resultados de la síntesis de las Bencensulfonamidas (**12–16**)

| Clave     | R                 | Punto de fusión reportado (°C) | Punto de fusión determinado (°C) | R <sub>f</sub> | Sistema de elución* |
|-----------|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------|---------------------|
| <b>12</b> | -H                | 152–153 <sup>45</sup>          | 153.5–153.7                      | 0.27           | VII                 |
| <b>13</b> | -OCH <sub>3</sub> | 110–112 <sup>46</sup>          | 111.9–112.4                      | 0.21           | VII                 |
| <b>14</b> | -CH <sub>3</sub>  | 137–138 <sup>47</sup>          | 137.2–137.8                      | 0.30           | VII                 |
| <b>15</b> | -Br               | 166–167 <sup>48</sup>          | 166.8–167.4                      | 0.37           | VII                 |
| <b>16</b> | -NO <sub>2</sub>  | 178–180 <sup>49</sup>          | 179.5–180.2                      | 0.30           | VII                 |

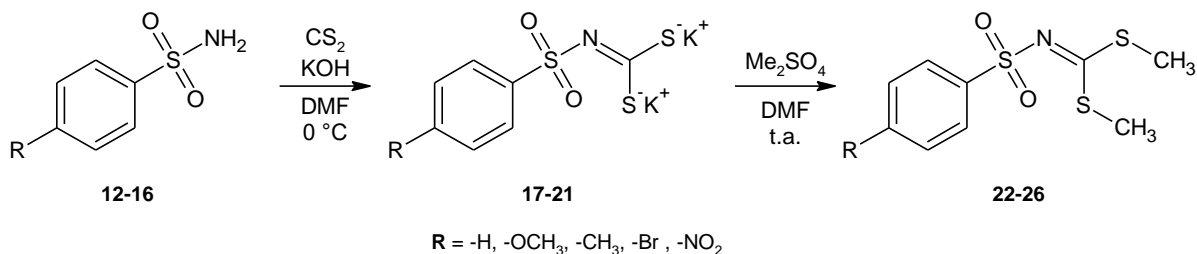
\*Los sistemas de elución se pueden consultar en el Anexo I.



**Esquema 13.** Síntesis de las Bencensulfonamidas (**12–16**).

Posteriormente, las bencensulfonamidas (**12–16**) se trataron con CS<sub>2</sub>, KOH y DMF a 0 °C para obtener el (fenilsulfonil)carbonoditioimidato de potasio correspondiente

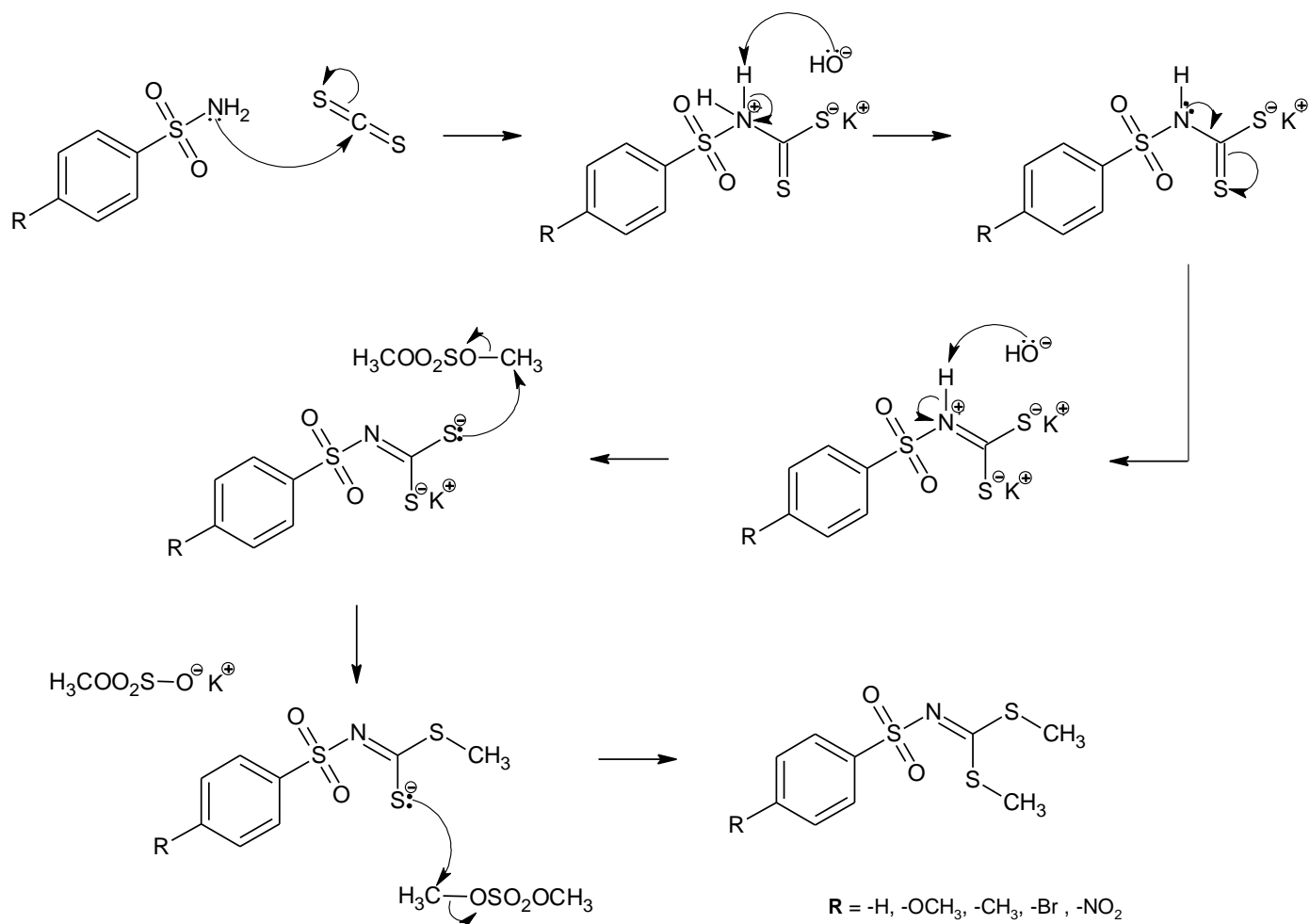
(17–21), los cuales no se aislaron. De inmediato, en este mismo medio, se llevó a cabo la reacción de metilación correspondiente usando  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  para obtener los compuestos (22–26) como se muestra en el Esquema 14.



**Esquema 14.** Síntesis de los (Fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo (22–26).

Se propone que la reacción de obtención de los compuestos (22–26) transcurre siguiendo el mecanismo de reacción mostrado en el Esquema 15.

La obtención del (fenilsulfonyl)carbonoditioimidato de dimetilo **26**, el 4-nitrosustituido, desafortunadamente no procedió. El efecto electroattractor causado por el nitro resultó de mucha ayuda en la síntesis de la bencensulfonamida (**16**) ya que el azufre del cloruro de 4-nitrobencensulfonylo (**11**) actúa como buen electrófilo; sin embargo, en las siguientes reacciones el efecto electroattractor del sustituyente resultó contraproducente, al restarle poder nucleofílico considerable al nitrógeno para llevar a cabo el ataque al disulfuro de carbono y más adelante los azufres al  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , lo que probablemente le impidió llevar a cabo esta transformación.



**Esquema 15.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los (Fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo.

No todos los productos (**22–25**) se encuentran reportados en la literatura, por lo que para su caracterización además de determinar el punto de fusión y compararlo para aquellos que estuvieran disponibles, se determinaron sus constantes espectroscópicas de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C con lo que se pudo demostrar la obtención con éxito de los cuatro compuestos (Tabla 6). A continuación como ejemplo se muestran y analizan los espectros obtenidos para el (fenilsulfonyl)carbonoditioimidato de dimetilo (**22**), el resto de los espectros se puede encontrar en el Anexo III.

En el caso del espectro de RMN de <sup>1</sup>H podemos observar en 2.54 ppm el singulete con integración para 6H correspondiente a los protones de los carbonos alifáticos

de los dos  $-SCH_3$ . Las señales en 7.60, 7.68 y 7.91 ppm, que juntas integran para 5H, corresponden a los hidrógenos del anillo aromático.

En el caso del espectro de RMN de  $^{13}C$  podemos observar en 16.57 ppm la señal correspondiente a los dos carbonos alifáticos de los metilos, mientras que en 186.69 ppm se encuentra la señal del carbono unido a los tiometilos y al nitrógeno de la sulfonamida. Por último las señales en 140.82, 133.56, 129.64 y 127.10 ppm se encuentran en la región de los aromáticos por lo que corresponden a los carbonos del anillo aromático.

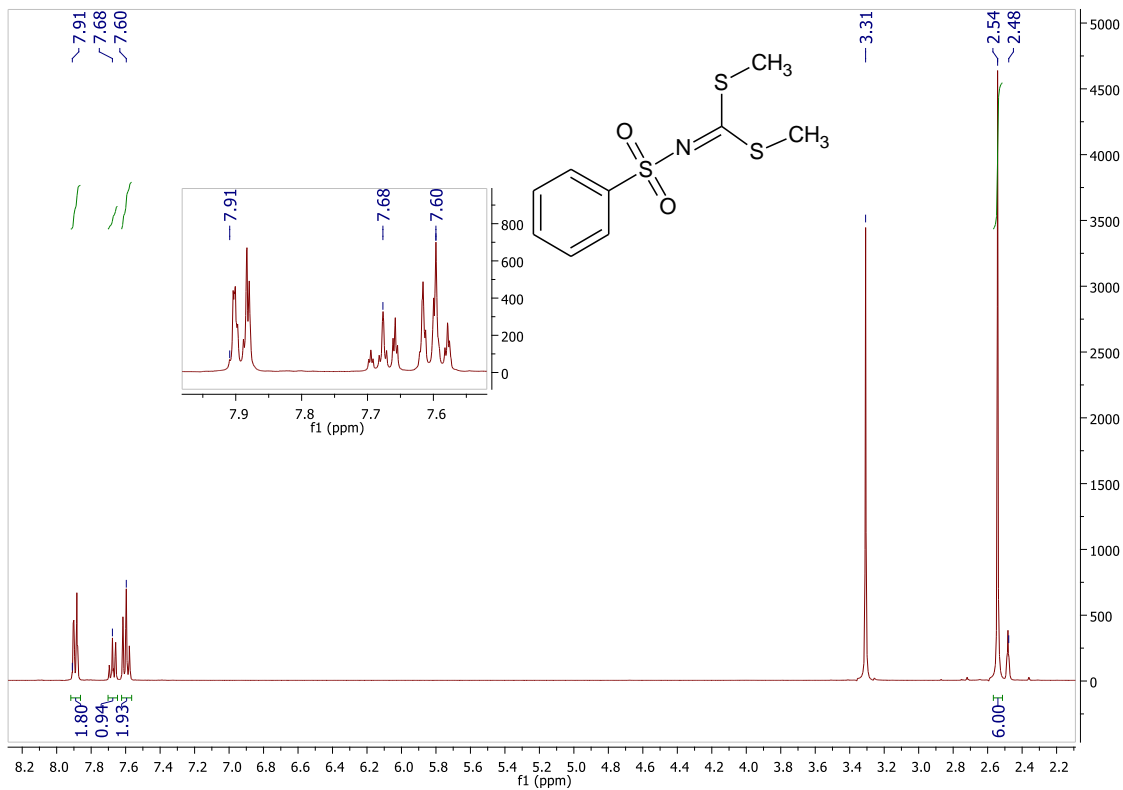


Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del (Fenilsulfonyl)ditioimidocarbonato de dimetilo (22).

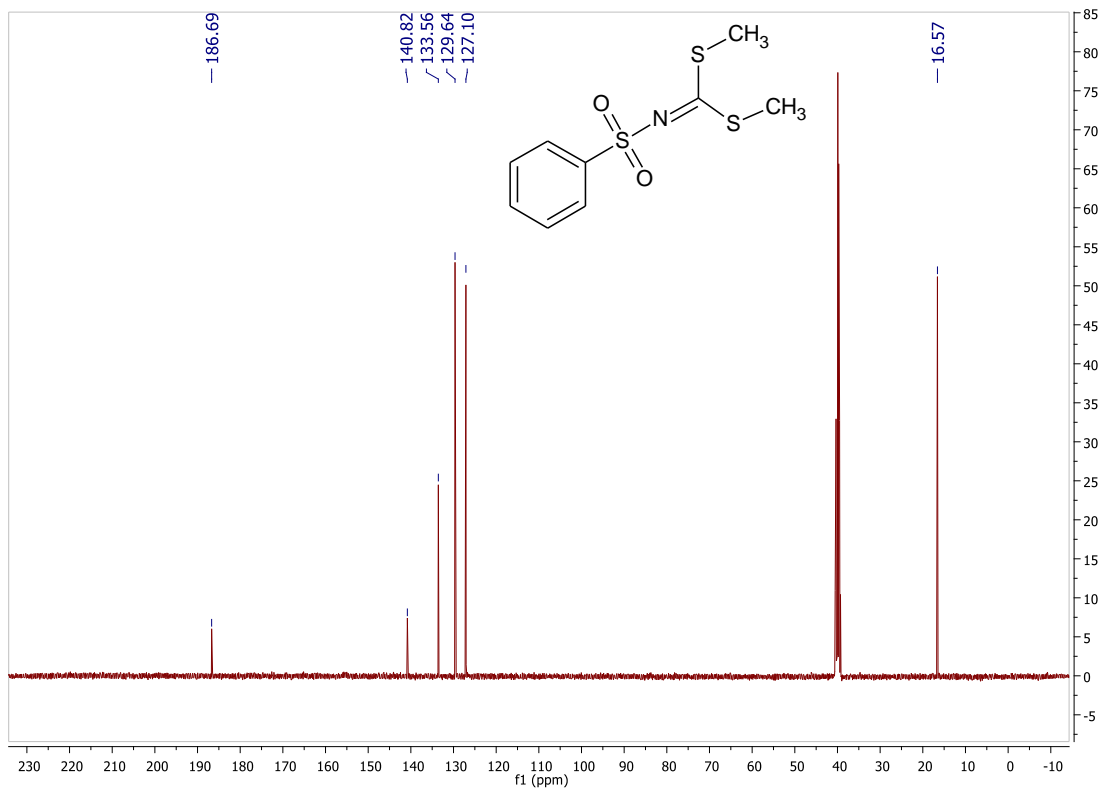
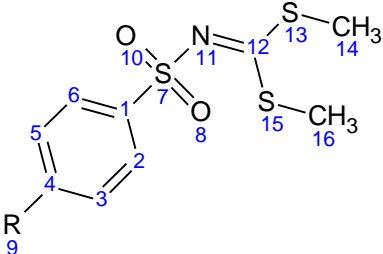


Figura 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del (Fenilsulfonyl)ditioimidocarbonato de dimetilo (22).

Tabla 6. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos (22-26)

|       |                   |    |
|-------|-------------------|--|
| Clave | R                 | Constantes físicas y espectroscópicas <sup>*,**</sup>  |
| 22    | -H                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 104.7–106.1 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.30 (Sistema VI)</li> <li>• <b>Espectro 1, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.54 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.58-7.62 (m, 2H, H-2,6); 7.65-7.70 (m, 1H, H-4); 7.88-7.91 (m, 2H, H-3,5).</li> <li>• <b>Espectro 2, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.57 (-S-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 127.10; 129.64; 133.56; 140.82; 186.69.</li> </ul>   |
| 23    | -OCH <sub>3</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 80.1–81.6 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.23 (Sistema VI)</li> <li>• <b>Espectro 3, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.52 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 7.09-7.11 (m, 2H, H-3,5); 7.80-7.83 (m, 2H, H-2,6).</li> <li>• <b>Espectro 4, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.48 (S-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 56.14 (-O-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 114.76; 129.48; 132.32; 163.10; 185.49.</li> </ul>                                       |
| 24    | -CH <sub>3</sub>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 109.8–110.4 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.34 (Sistema VI)</li> <li>• <b>Espectro 5, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.38 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.38-7.40 (d, 2H, <i>J</i> = 8.05 Hz, H-3,5); 7.76-7.78 (d, 2H, <i>J</i> = 8.24 Hz, H-2,6).</li> <li>• <b>Espectro 6, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.52 (S-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 21.48 (-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 127.21; 130.05; 137.92; 143.99; 186.13.</li> </ul> |
| 25    | -Br               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 106.5–107.3 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.41 (Sistema VI)</li> <li>• <b>Espectro 7, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.55 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.81 (s, 4H, H-2,3,5,6).</li> <li>• <b>Espectro 8, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.65 (S-<u>C</u>H<sub>3</sub>); 127.47; 129.17; 132.75; 140.07; 187.58.</li> </ul>   |

\*Los espectros se pueden consultar en el Anexo III.

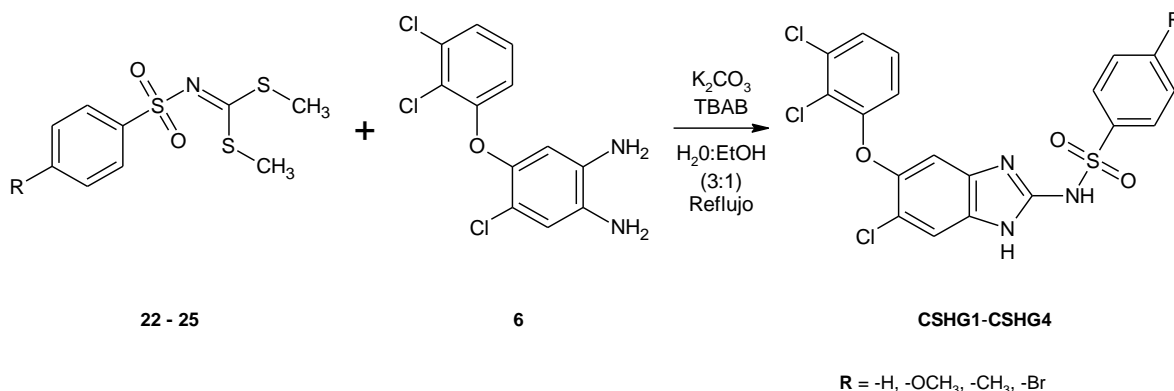
\*\*Los sistemas de elución se pueden consultar en el Anexo I.

7.1.2.1.2. Síntesis de las *N*-(6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il)bencensulfonamidas

Una vez obtenidos los (fenilsulfonil)ditiimidocarbonatos de dimetilo (**22–25**) se procedió a hacer reaccionar los mismos con la 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (**6**) a partir de una serie de metodologías encontradas en la literatura para la síntesis de bencensulfonamidas bencimidazolicas. En la tabla 7 se muestran las condiciones probadas para la reacción de ciclación. En todas las reacciones se usó  $K_2CO_3$  como base, se emplearon tres diferentes disolventes, DMF, EtOH y  $H_2O:EtOH$  (3:1), y solo en una se utilizó TBAB como catalizador de transferencia de fase.<sup>29</sup>

**Tabla 7.** Condiciones probadas para la síntesis de las Bencensulfonamidas bencimidazólicas finales (**CSHG1–CSHG5**)

| Condición | Disolvente        | Catalizador | Resultado   |
|-----------|-------------------|-------------|-------------|
| a)        | DMF               | -----       | No procedió |
| b)        | EtOH              | -----       | No procedió |
| c)        | $H_2O:EtOH$ (3:1) | TBAB        | Procedió    |



**Esquema 16.** Condición ideal para la obtención de las Bencensulfonamidas bencimidazólicas **CSHG1 – CSHG4**.

Las condiciones a) y b) no mostraron la formación de ningún producto al ser monitoreadas por CCF aún después de varios días de mantenerse a temperatura de reflujo. Por otro lado, la condición c) procedió con facilidad usando un sistema de  $H_2O:EtOH$  (3:1). El etanol favorece la solubilidad de las materias primas (**6**) y (**22–25**), mientras que el agua hace que la solubilidad del  $K_2CO_3$  se vea favorecida

a diferencia de la baja solubilidad que tiene en la DMF o en el etanol solo. Una vez que todo se tiene disuelto pero en disolventes diferentes, se consideró que el uso de un catalizador de transferencia de fase resultó fundamental para asegurar que las materias primas y la base entraran en contacto adecuadamente.

Los catalizadores de transferencia de fase permiten la reacción en sistemas heterogéneos entre compuestos orgánicos solubles en disolventes orgánicos y compuestos solubles en agua como sales inorgánicas, en este caso el  $K_2CO_3$ . El uso de estos catalizadores tiene además la ventaja de poder usar disolventes orgánicos más baratos y accesibles y agua, en lugar de DMSO o DMF.<sup>50</sup> El catalizador al ser soluble en ambos disolventes, transporta los aniones de las sales inorgánicas, en este caso  $CO_3^{2-}$ , al disolvente orgánico y luego los regresa a la fase acuosa. Este tipo de catalizadores son sales cuaternarias de amonio con cadenas alifáticas largas, en este caso el bromuro de tetrabutilamonio (TBAB). A pesar del gran avance que este catalizador representa tiene ciertas limitaciones debido a que para su uso se prefiere usar bases débiles como carbonatos, ya que la presencia de agua en la reacción y una base más fuerte como KOH puede causar reacciones hidrolíticas indeseadas o la transformación de la sal de amonio por eliminación de Hoffman.<sup>51</sup>

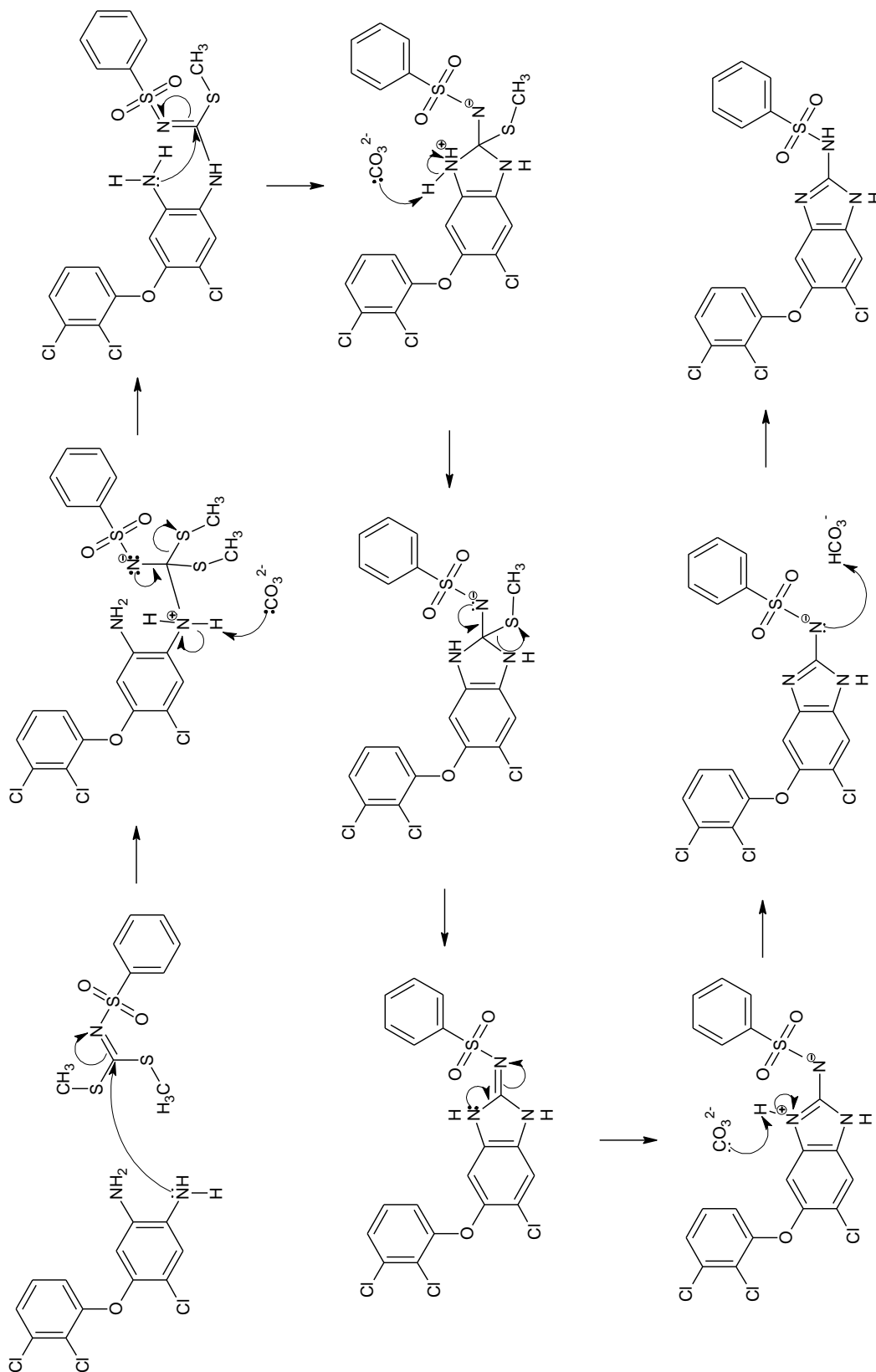
La reacción bajo la condición c) permitió obtener las cuatro bencensulfonamidas bencimidazólicas **CSHG1–CSHG4** produciendo un solo producto para cada caso que no requirió de métodos sofisticados o tardados para su purificación. Los rendimientos obtenidos fueron bajos, salvo para el compuesto **CSHG3** (72%). Al ser reacciones que requirieron de un tiempo de reflujo largo, hubo que reponer el disolvente perdido en varias ocasiones, siendo así difícil mantener las proporciones de los disolventes todo el tiempo en (3:1). Al irse formando el producto de reacción, éste precipita en el medio causando posiblemente que alguna materia prima o la base no estuviera completamente disuelta todo el tiempo y por lo tanto disponible para reaccionar.

Ninguno de los compuestos había sido previamente sintetizado por lo que para su caracterización se determinaron los espectros de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$ , NOESY, COSY,



HMBC y HSQC de cada uno de los compuestos, así como se llevó a cabo un análisis elemental para conocer los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno de los mismos. A continuación como ejemplo se muestran los espectros obtenidos para la *N*-(6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il)bencensulfonamida (**CSHG1**), así como el análisis y la asignación de señales en los mismos, el resto de los espectros puede ser encontrado en el Anexo III.

Además se propone que la reacción de obtención de las *N*-(6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il)bencensulfonamidas ocurre siguiendo el mecanismo mostrado en el Esquema 17.



**Esquema 17.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de las *N*-(6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1*H*-benzimidazol-2-il)bensulfonamidas.

En cuanto a la RMN, en el espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 15) se observa en la región entre 6.78 y 7.87 ppm las señales de todos los protones unidos a carbono aromático en la molécula, las cuales integran para un total de 10H. La presencia de 2 singuletes en 7.05 y 7.44 ppm con integración de 1H cada uno, corresponden a los hidrógenos del anillo de bencimidazol, por otro lado, los dos dobles de dobles y un triplete en 6.78, 7.27 y 7.38 ppm que integran juntos para 3H corresponden a los hidrógenos del anillo del diclorofenoxi, y por último en 7.51 y 7.87 ppm una señal múltiple y un doble de dobles integran juntos para 5H, los cuales pertenecen al anillo de la sulfonamida. Además, en 12.2 ppm se encuentra una señal que integra para 2H correspondiente a los H unidos a nitrógeno en la molécula, uno del anillo de bencimidazol y otro de la sulfonamida.

Para el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16) se observan en la región entre 100 y 150 ppm, la región correspondiente a carbonos aromáticos, 16 señales correspondientes a el número de carbonos aromáticos químicamente diferentes presentes en el compuesto.

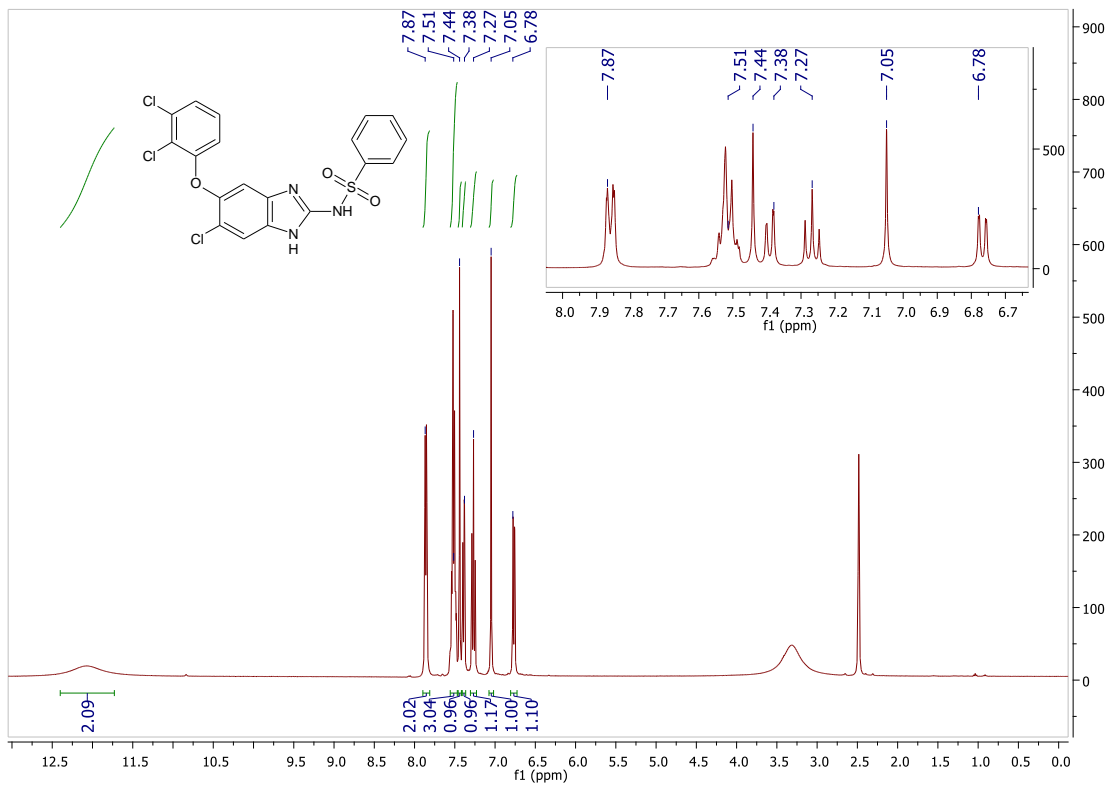


Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto CSHG1.

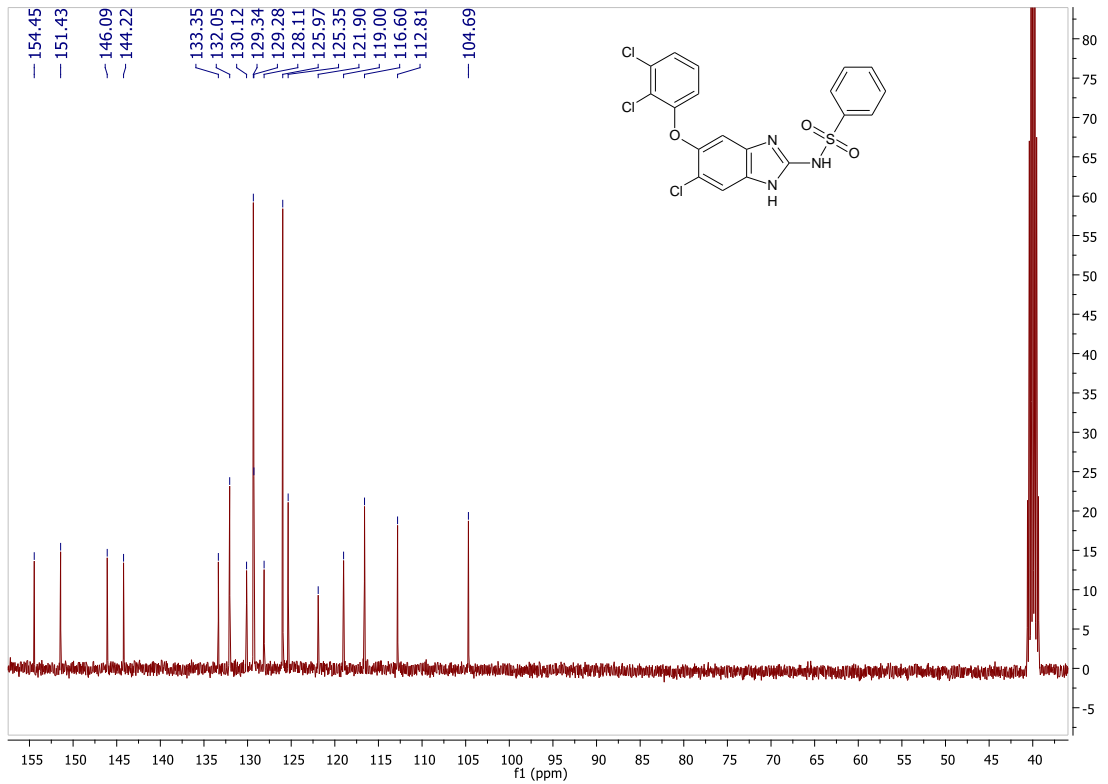


Figura 16. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto CSHG1.

El espectro COSY (Figura 17) nos permite observar las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual en este caso resulta útil para confirmar a qué sistema aromático corresponden las señales observadas en el espectro de  $^1\text{H}$ , buscando además no encontrar ninguna otra relación en la molécula, siendo los hidrógenos de los anillos de benceno en la molécula los únicos vecinos entre ellos. Esto coincide con el espectro, en  $\{6.77,7.25\}$  y  $\{7.25,7.39\}$  ppm se observa la relación de las señales de los hidrógenos del diclorofenoxi, en  $\{7.51,7.86\}$  ppm se encuentra la relación entre las señales del benceno de la sulfonamida, y por último en  $\{7.05, 7.04\}$  y  $\{7.44,7.44\}$  ppm se encuentran las señales de los singuletes del bencimidazol sobre la diagonal del espectro, demostrando que no tienen vecino a ningún otro tipo de hidrógeno.

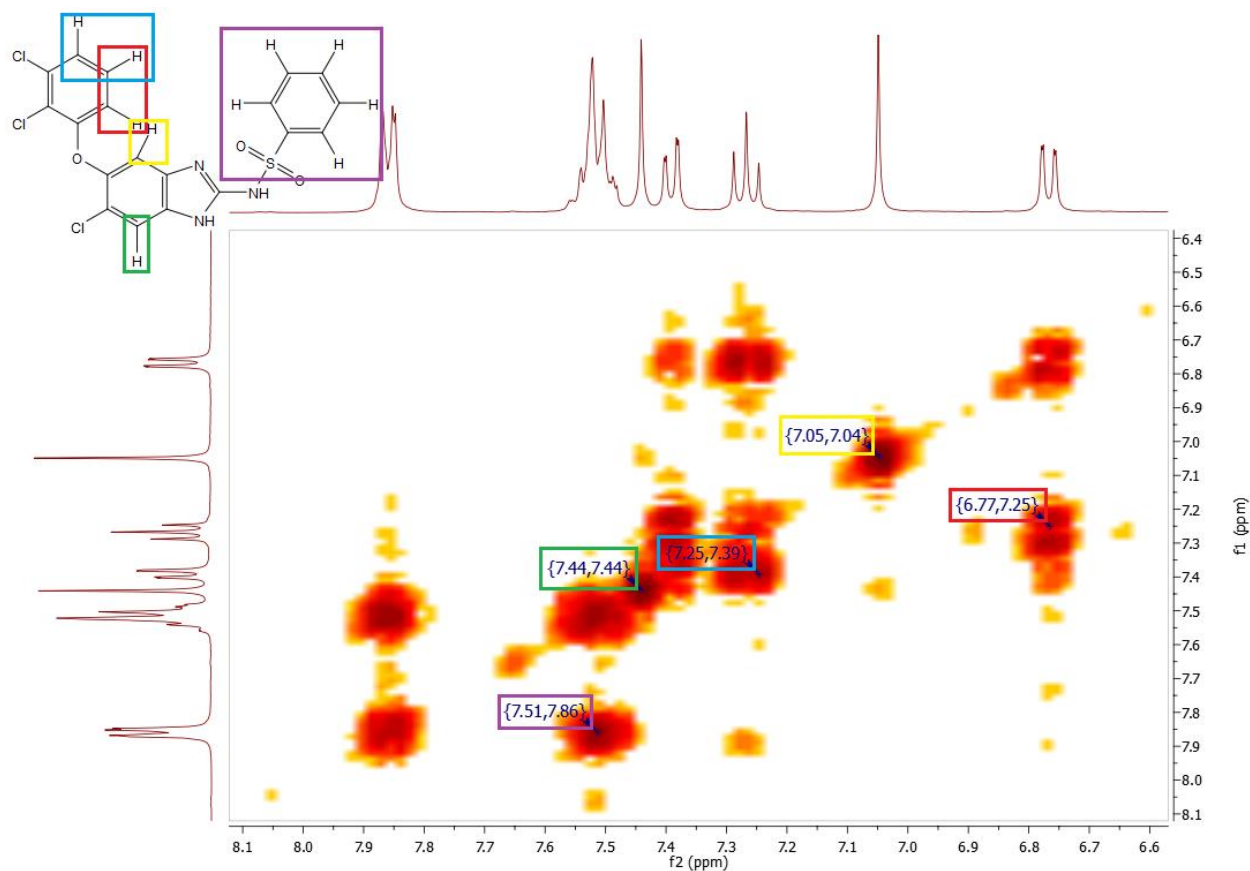


Figura 17. Espectro COSY del compuesto **CSHG1**.

El espectro NOESY permite observar las interacciones en el espacio de aquellos hidrógenos que se encuentran de 4 a 6 Å de distancia uno del otro. Este espectro resulta de mucha utilidad para comprobar que la sulfonamida efectivamente se encuentra en la posición deseada. En la Figura 18 se observa que no existen señales de interacción entre estos grupos, únicamente se observa cómo interaccionan los hidrógenos de los anillos del diclorofenoxi entre ellos mismos en {7.40, 7.25} y {6.76, 7.27} ppm; y los de la sulfonamida de la misma manera en {7.50, 7.86} ppm. Por otro lado se aprecia también en {7.05, 6.76} ppm la interacción entre el hidrógeno en la posición 4 del bencimidazol y el de la posición 6 del diclorofenoxi, permitiéndolo distinguir de los dos singuletes observados en el espectro de  $^1\text{H}$ , cual corresponde al hidrógeno en la posición 4 y cuál al de la posición 7 del bencimidazol, así como cuál de los dos dobles de dobles del anillo del diclorofenoxi corresponde a la posición 4 ó 6 de ese anillo.

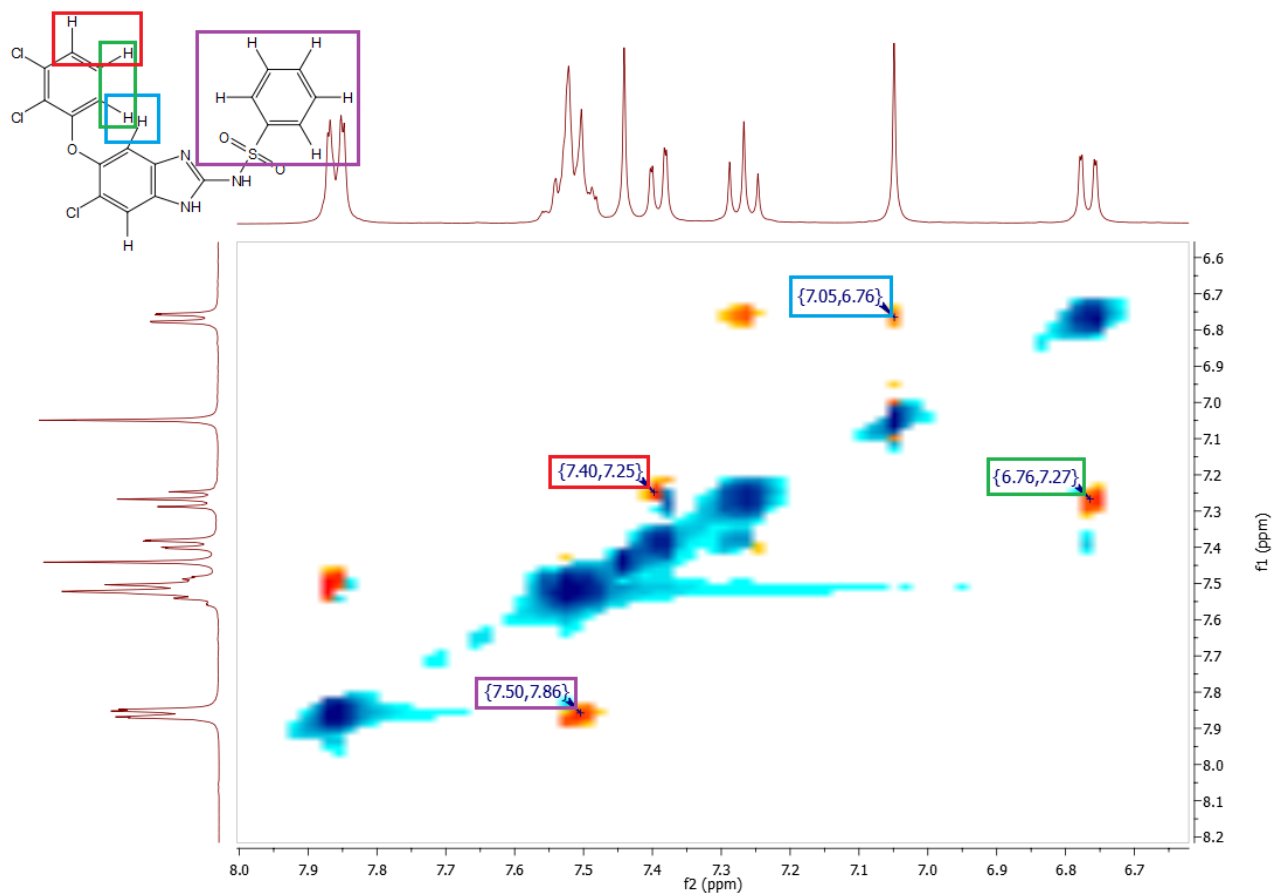


Figura 18. Espectro NOESY del compuesto CSHG1.

Los espectros HSQC y HMBC resultan de gran utilidad para poder asignar a qué carbono en la molécula pertenece cada señal observada en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , haciendo uso de las asignaciones llevadas a cabo en el espectro de  $^1\text{H}$ ; lo más conveniente resulta empezar con el espectro de HSQC.

El espectro de HSQC permite observar a los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a qué señal del espectro de  $^1\text{H}$  corresponde el mismo, pudiendo así asignar de qué carbono en la molécula se trata esa señal en el espectro de  $^{13}\text{C}$ . Como se puede observar en la Figura 19 se tiene un total de 8 señales en el espectro, lo que corresponde con la cantidad de carbonos químicamente diferentes presentes en la molécula con hidrógeno unido a ellos.

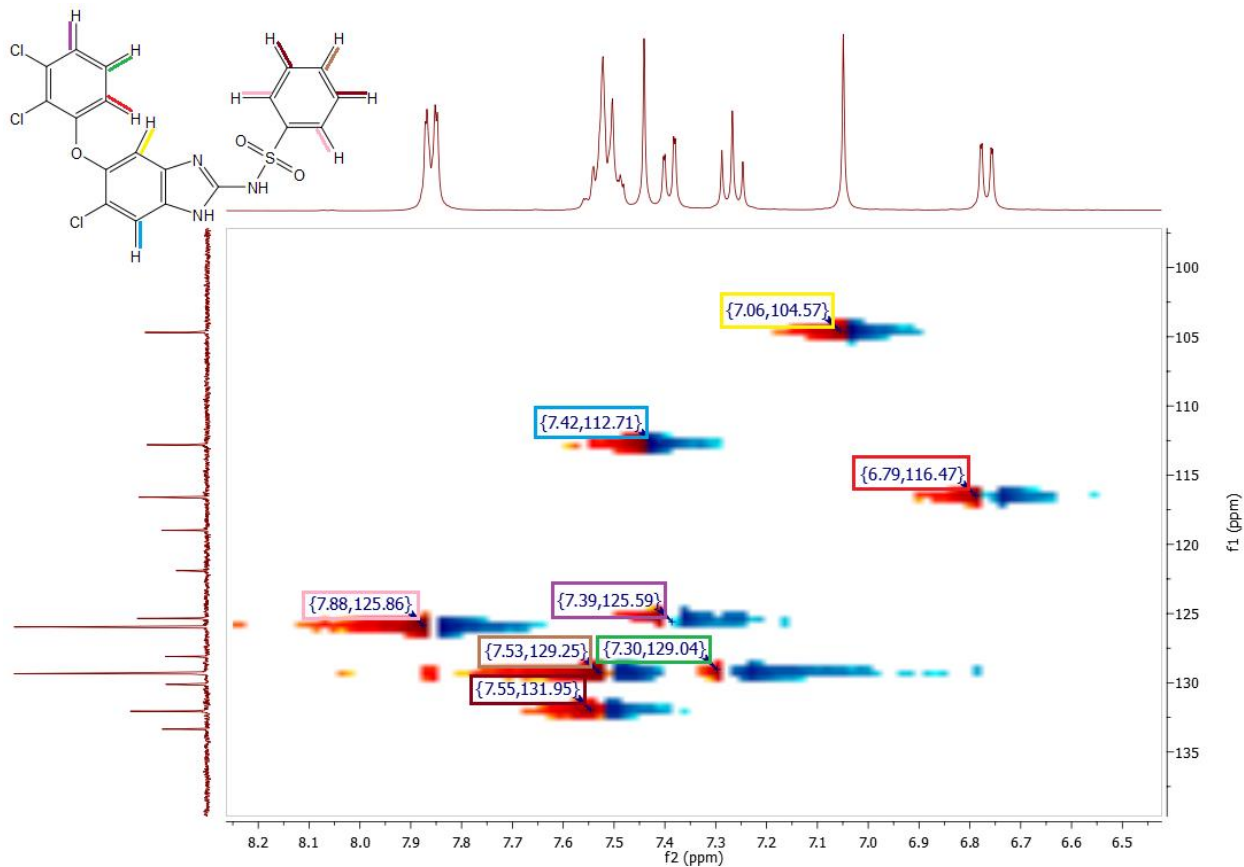


Figura 19. Espectro de HSQC del compuesto CSHG1.

Para asignar las señales del espectro de  $^{13}\text{C}$  faltantes se utilizó el espectro HMBC el cual permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se encuentran a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia. En el espectro observado en la Figura 20, se han eliminado las señales de los carbonos ya previamente asignados por HSQC, aquellos con hidrógeno unido directamente, para mejorar la visualización de los que aún no son asignados. Con un círculo en la molécula se aprecia el carbono que se está asignando y siguiendo las líneas de su mismo color se llega a los hidrógenos con los que está teniendo correlación. Las señales observadas en el espectro corresponden adecuadamente con el compuesto **CSHG1** y de esta manera se pudieron asignar todas las señales del espectro de  $^{13}\text{C}$ .

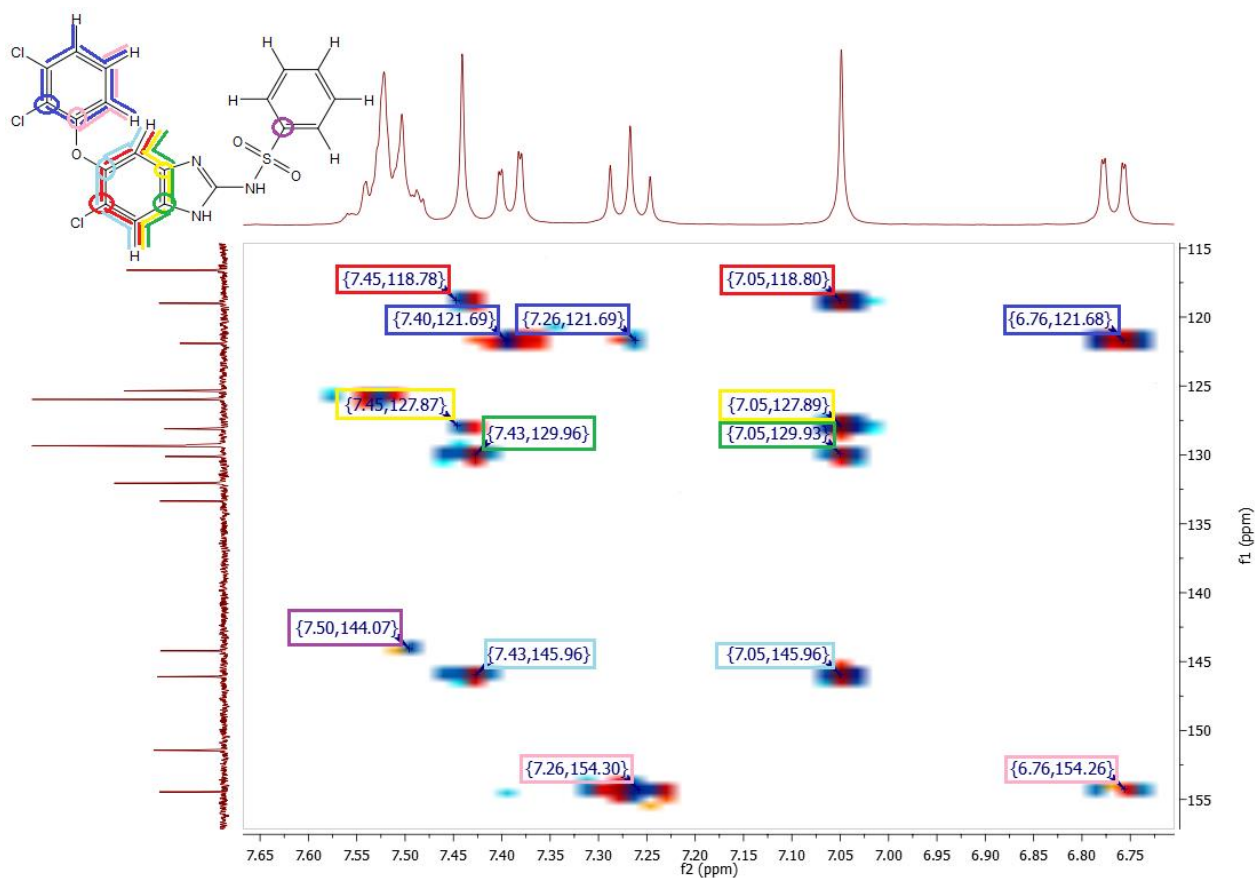


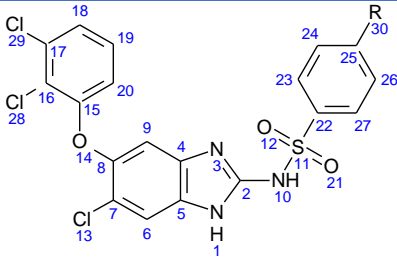
Figura 20. Espectro de RMN de HSQC del compuesto **CSHG1**.



Los resultados de RMN de los compuestos **CSHG2–CHSG4** tuvieron un comportamiento similar al mostrado aquí para el compuesto **CSHG1**, coincidiendo de manera adecuada con cada compuesto.

Finalmente como una prueba de confirmación de estos resultados, se decidió someter a los compuestos a un análisis elemental. Los resultados del análisis elemental mostrados en la Tabla 8 se encuentran en la mayoría de los casos dentro del intervalo de variación permitido para este tipo de resultados ( $\pm 0.4\%$ ), únicamente variando el porcentaje de carbono de **CSHG1** y de hidrógeno de **CSHG2** por 0.5 % cada uno, y de carbono de **CSHG4** por 1.9 %, estas variaciones presentadas no resultan de importancia en el caso de **CSHG1** y **CSHG2** donde se podría tener la interferencia de trazas de algún disolvente o agua, que como observamos en los espectros de resonancia estaba presente en todas las muestras, y por lo tanto se podría decir que son aceptables. Por otro lado la variación en **CSHG4** es considerable, pero al variar únicamente en carbono sería importante correr una nueva muestra ya que la obtención de ese resultado se puede deber a un error ocurrido durante en el proceso de determinación.

Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos CSHG1–CSHG4

|  |                   |  |
|--|-------------------|--|
| Clave  | R                 | Constantes físicas y espectroscópicas***   |
| CSHG1  | -H                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 313.0–313.8 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.70 (Sistema II)</li> <li>• <b>Rendimiento:</b> 25.84%</li> <li>• <b>Análisis elemental:</b> C: 48.19%, H: 2.11%, N: 8.93%, S: 6.63% (Teórico: C: 48.68%, H: 2.58%, N: 8.96%, S: 6.84%)</li> <li>• <b>Espectro 9, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 6.76-6.78 (dd, 1H, H-20, <i>J</i> = 1.15, 8.32 Hz); 7.05 (s, 1H, H-9); 7.25-7.29 (t, 1H, H-19, <i>J</i> = 8.24 Hz); 7.38-7.40 (dd, 1H, H-18, <i>J</i> = 1.17, 8.12 Hz); 7.44 (s, 1H, H-6); 7.49-7.54 (m, 3H, H-24,25,26); 7.85-7.87 (d, 2H, H-23,27, <i>J</i> = 8.16 Hz); 12.07 (s, 2H, H-1,10).</li> <li>• <b>Espectro 10, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 104.69 (C-9); 112.81 (C-6); 116.60 (C-20); 119.00 (C-7); 121.90 (C-16); 125.35 (C-18); 125.97 (C-23,27); 128.11 (C-4); 129.28 (C-25); 129.34 (C-19); 130.12 (C-5); 132.05 (C-24,26); 133.35 (C-17); 144.22 (C-22); 146.09 (C-8); 151.43 (C-2); 154.45 (C-15).</li> </ul>   |
| CSHG2  | -OCH <sub>3</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 298.0–298.9 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.68 (Sistema II)</li> <li>• <b>Rendimiento:</b> 13.43%</li> <li>• <b>Análisis elemental:</b> C: 48.62%, H: 2.12%, N: 8.90%, S: 6.28% (Teórico: C: 48.16%, H: 2.83%, N: 8.42%, S: 6.43%)</li> <li>• <b>Espectro 15, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 3.78 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 6.76-6.78 (dd, 1H, H-20, <i>J</i> = 1.21, 8.34 Hz); 7.01-7.04 (d, 2H, H-24,26, <i>J</i> = 9.67 Hz); 7.04 (s, 1H, H-9); 7.25-7.29 (t, 1H, H-19, <i>J</i> = 8.25 Hz); 7.38-7.40 (dd, 1H, H-18, <i>J</i> = 1.23, 8.13 Hz); 7.43 (s, 1H, H-6); 7.78-7.80 (d, 2H, H-23,27, <i>J</i> = 8.87 Hz); 12.02 (s, 2H, H-1,10).</li> <li>• <b>Espectro 16, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 55.97 (-O-CH<sub>3</sub>); 104.57 (C-9); 112.71 (C-6); 114.46 (C-24,26); 116.65 (C-20); 119.01 (C-4); 121.94 (C-17); 125.39 (C-18); 127.84 (C-8); 128.04 (C-23,27); 129.29 (C-19); 129.86 (C-5); 133.36 (C-16); 136.10 (C-22); 146.14 (C-7); 151.16 (C-2); 154.42 (C-15); 162.04 (C-25).</li> </ul> |

|       |                  |   |
|-------|------------------|---|
| CSHG3 | -CH <sub>3</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 334.2–335.2 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.62 (Sistema II)</li> <li>• <b>Rendimiento:</b> 72.36%</li> <li>• <b>Análisis elemental:</b> C: 49.30%, H: 2.50%, N: 8.68%, S: 6.54% (Teórico: C: 49.76%, H: 2.92%, N: 8.70%, S: 6.64%)</li> <li>• <b>Espectro 21, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.31 (s, 3H, H-30); 6.74-6.77 (dd, 1H, H-20, <i>J</i> = 1.17, 8.33 Hz); 7.04 (s, 1H, H-9); 7.22-7.32 (m, 3H, H-19, 24, 26); 7.35-7.40 (dd, 1H, H-18, <i>J</i> = 1.21, 8.13 Hz); 7.42 (s, 1H, H-6); 7.69-7.77 (d, 2H, H-23, 27, <i>J</i> = 8.19 Hz); 11.99 (s, 2H, H-1, 10).</li> <li>• <b>Espectro 22, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 21.33 (C-30); 104.67 (C-9); 112.72 (C-6); 116.53 (C-20); 118.81 (C-8); 121.86 (C-10); 125.30 (C-18); 126.05 (C-23, 27); 128.40 (C-4); 129.27 (C-19); 129.70 (C-24,26); 130.40 (C-5); 133.34 (C-15); 141.53 (C-22); 142.04 (C-25); 145.93 (C-7); 151.62 (C-2); 154.51 (C-17).</li> </ul> |
| CSHG4 | -Br              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 290.5–291.3 °C</li> <li>• <b>Rf:</b> 0.66 (Sistema II)</li> <li>• <b>Rendimiento:</b> 13.78%</li> <li>• <b>Análisis elemental:</b> C: 39.73%, H: 1.74%, N: 7.33%, S: 5.22% (Teórico: C: 41.67%, H: 2.02%, N: 7.67%, S: 5.86%)</li> <li>• <b>Espectro 27, RMN <sup>1</sup>H:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 6.66-6.68 (d, 1H, H-20, <i>J</i> = 8.33 Hz); 6.99 (s, 1H, H-9); 7.22-7.26 (t, 1H, H-19, <i>J</i> = 8.24 Hz); 7.34-7.36 (m, 2H, H-6,18); 7.64-7.66 (d, 2H, H-24,26, <i>J</i> = 8.52 Hz); 7.76-7.78 (d, 2H, H-23,27, <i>J</i> = 8.56 Hz).</li> <li>• <b>Espectro 28, RMN <sup>13</sup>C:</b> (DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 105.10 (C-9); 112.56 (C-6); 115.88 (C-20); 117.50 (C-4); 121.38 (C-16); 124.77 (C-18); 124.80 (C-25); 128.37 (C-24, 26); 129.15 (C-19); 131.86 (C-8); 131.95 (C-23, 27); 133.09 (C-7); 133.20 (C-5); 144.63 (C-22); 154.02 (C-2); 154.98 (C-17).</li> </ul>   |

\*Los espectros se pueden consultar en el Anexo III.

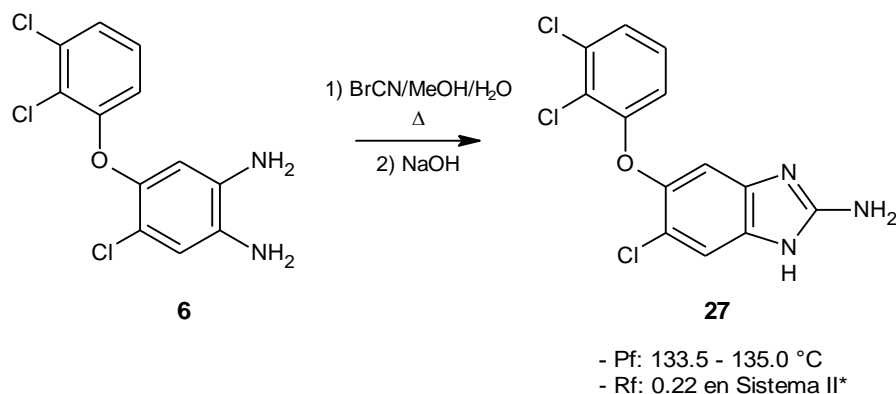
\*\*Los sistemas de elución se pueden consultar en el Anexo I.

#### 7.1.2.2. A partir del 2-Aminobencimidazol

Adicionalmente, se decidió incursionar en los otros métodos descritos en los antecedentes para la preparación de bencensulfonamidas bencimidazólicas. A partir de la información obtenida de la literatura, las experiencias previas de nuestro grupo de investigación y de los recursos disponibles en el laboratorio se decidió intentar llevar a cabo la síntesis de los compuestos finales a partir de la reacción

entre los cloruros de bencensulfonilo correspondientes disponibles comercialmente y la 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**). Este método aparentaba ser el más razonable ya que aprovecharía el poder nucleofílico del amino en la posición 2 del bencimidazol, así como el buen centro electrofílico generado en el azufre del cloruro de bencensulfonilo para llevar a cabo una reacción sencilla de sustitución nucleofílica sobre el cloruro del ácido sulfónico. Además, la preparación de la 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**) a partir de la cloro-5-(2,3-diclorofenil)-1,2-feniléndiamina (**6**) se trata de un proceso previamente explorado por nuestro grupo de investigación con éxito.<sup>28</sup>

La síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**) se llevó a cabo a partir de la reacción que se muestra en el Esquema 18. Al tratarse de un compuesto previamente sintetizado por nuestro grupo de investigación, se caracterizó a través de su *R<sub>f</sub>* y punto de fusión, los cuales coincidieron con los reportados.<sup>28</sup> Además como una confirmación y ante la falta de RMN por problemas técnicos en la USAII al momento de sintetizar este compuesto, se decidió someter el compuesto a un análisis elemental, cuyos resultados se muestran en la Tabla 9; los mismos difieren del calculado teórico posiblemente por la presencia de algún disolvente en la muestra, pero es importante mencionar que al calcular los porcentajes teóricos de productos secundarios que se pudieran haber obtenido, ninguno es más cercano a los resultados obtenidos que el producto esperado.



\*Los sistemas de elución se pueden consultar en el Anexo I.  
**Esquema 18.** Síntesis de la 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**).

**Tabla 9.** Resultados del análisis elemental de la 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**)

|              | Carbono (%) | Hidrógeno (%) | Nitrógeno (%) |
|--------------|-------------|---------------|---------------|
| Teórico      | 47.520      | 2.454         | 12.788        |
| Experimental | 48.805      | 2.060         | 11.410        |

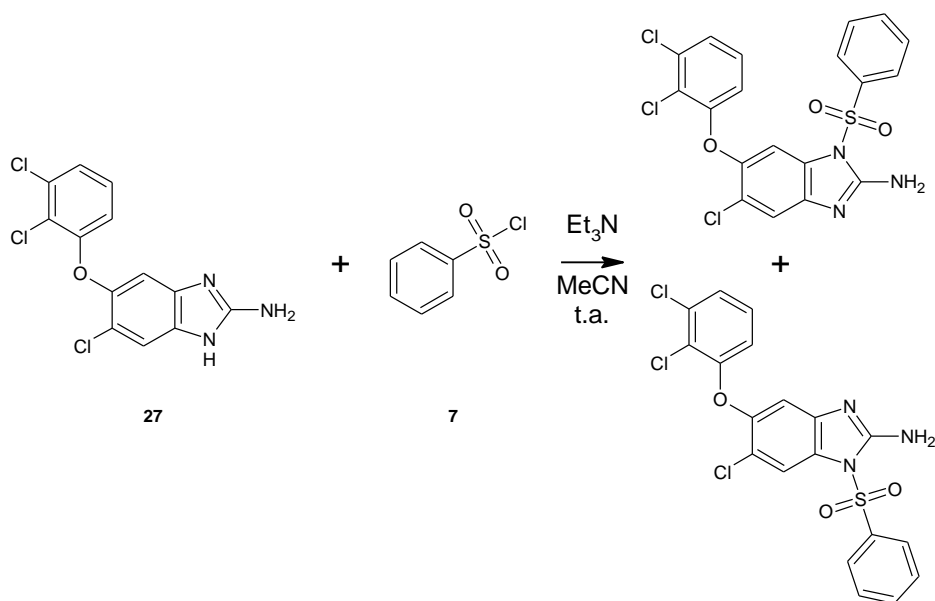
Una vez obtenida la 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**), ésta se sometió al cloruro de bencensulfonilo (**7**) bajo diferentes condiciones como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones probadas con la 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**27**) y el cloruro de bencensulfonilo (**7**)

| Condición | Disolvente    | Base         | Catalizador | Calentamiento    | Tiempo  |
|-----------|---------------|--------------|-------------|------------------|---------|
| <b>a)</b> | Acetonitrilo  | Trietilamina | -----       | t.a.             | 12 h.   |
| <b>b)</b> | Acetonitrilo  | Trietilamina | -----       | Reflujo          | 2 h.    |
| <b>c)</b> | Diclorometano | Trietilamina | DMAP        | t.a              | 24 h.   |
| <b>d)</b> | Acetonitrilo  | Trietilamina | -----       | MW 150 W, 130 °C | 15 min. |

Al monitorear la condición a) por CCF, se observó el consumo completo de la materia prima y la aparición de dos productos en la misma proporción y de Rf cercano. Las características del sólido, así como lo difícil que resultó separar los productos, fueron indicativos de que se trataba de la mezcla de regioisómeros obtenida de la reacción de los nitrógenos del anillo del bencimidazol que se encuentran en un equilibrio tautomérico con el cloruro de bencensulfonilo (Esquema 19).<sup>52</sup>

Esta mezcla de productos se analizó por RMN de <sup>1</sup>H (Figura 21) donde se observó que las señales coincidieron con el espectro reportado de la materia prima (**27**)<sup>28</sup>, observando en 6.78, 7.30 y 7.41 ppm los dos dobles de dobles y el triplete correspondientes al anillo del diclorofenoxi, en 7.18 y 7.59 ppm los singuletes del anillo del bencimidazol y en 8.65 ppm el singulete del grupo amino que al integrar para 2H nos confirma que no hay nada nuevo enlazado a él.



**Esquema 19.** Posibles productos obtenidos de la condición a).

Por otro lado, en la región entre 7.30 y 7.59 ppm encontramos señales que por sus características y su integración para 5H, corresponderían a las del anillo de la sulfonamida, sumado a la aparición en 9.79 ppm de un singulete que podría corresponder a la sulfonamida, ya que además al hacer un intercambio con D<sub>2</sub>O (Figura 22) es la única señal que desaparece.

En 1.16 ppm se observan señales alifáticas intensas que deben corresponder a algún disolvente o producto de descomposición de la reacción. A pesar de tratarse de una mezcla de dos productos, el espectro no pareciera mostrar la mezcla de dos compuestos diferentes, lo que soporta la hipótesis de la obtención de los dos regioisómeros.

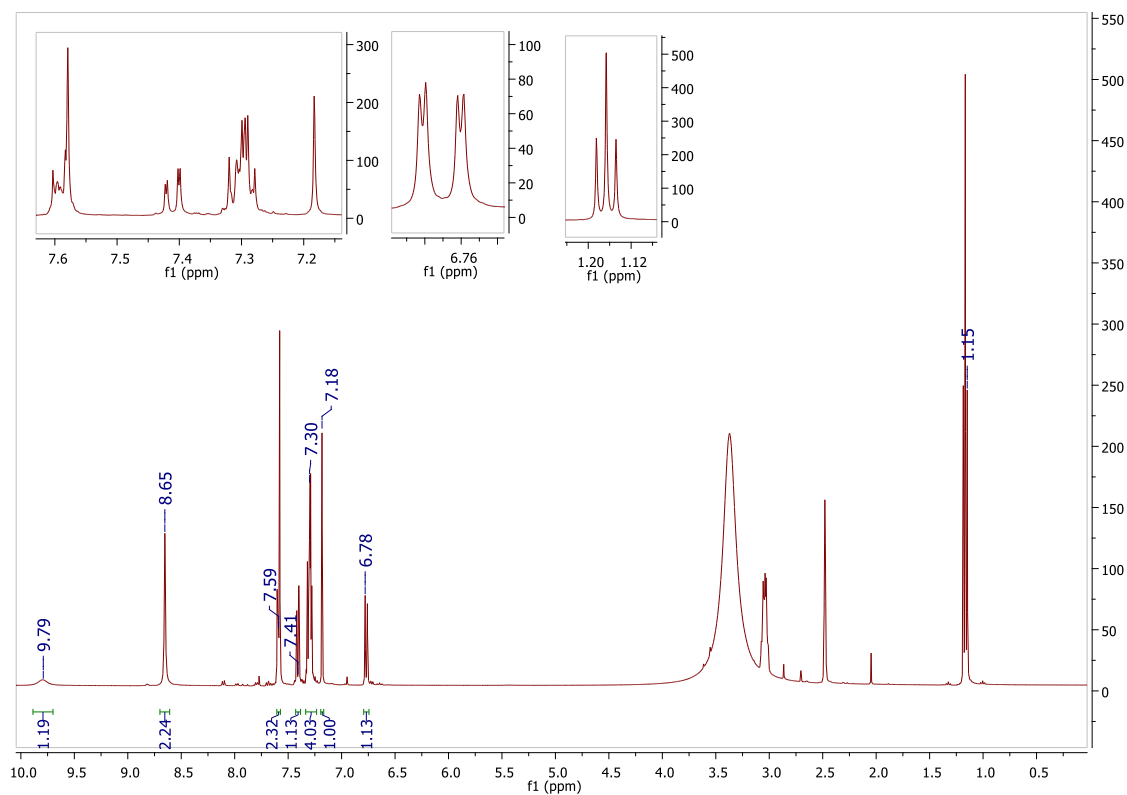


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido de la mezcla de productos de la condición a).

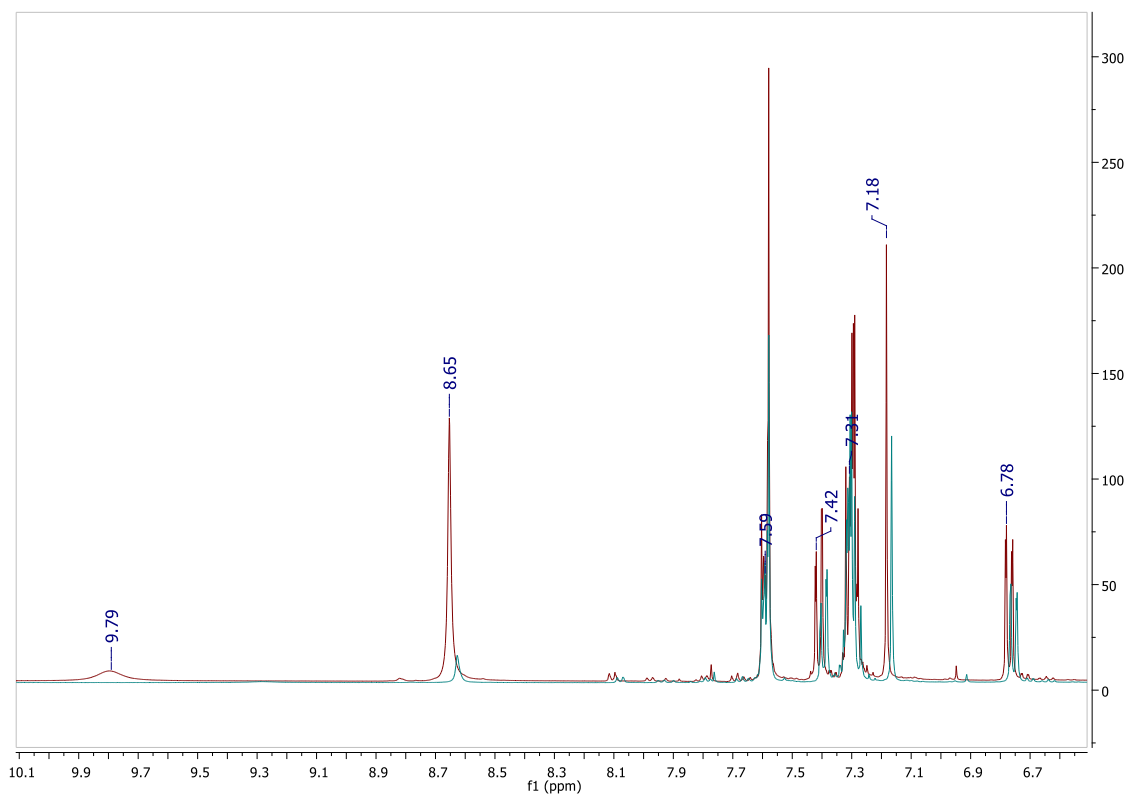
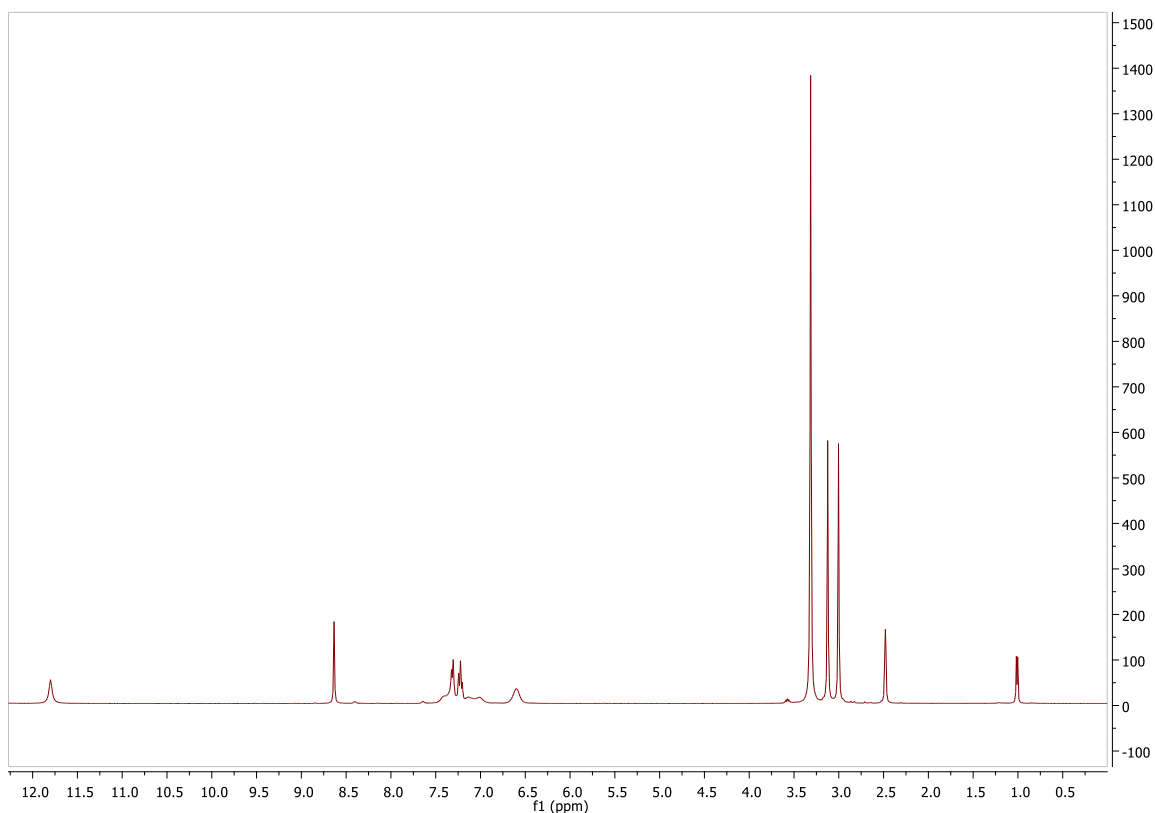


Figura 22. Superposición de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (rojo) y de intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$  (azul) de la mezcla de productos observada en condición a).

Ante estos resultados, se decidió probar condiciones de la reacción en las que se modificaron factores como la temperatura, el método de calentamiento o el uso de un catalizador, para de esta manera favorecer el poder nucleofílico del nitrógeno de la amina y no el de los del anillo del bencimidazol. En el caso de la condición b), que involucra temperatura de reflujo, se observó por CCF el consumo de las materias primas y la aparición de una sola mancha. Esto en un principio parecía prometedor; sin embargo, al analizar este producto por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23) se observó que no había presencia de las señales correspondientes a los sistemas aromáticos y además había presencia de señales alifáticas importantes que indican la descomposición de alguna de las materias primas en la reacción.



**Figura 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtenido del producto de la condición b).

Al probar la condición c) usando 4-dimetilaminopiridina (DMAP), la cual es un catalizador nucleofílico que suele reaccionar inicialmente con los cloruros de ácido generando una especie mucho más disponible para ser atacada por el nucleófilo,<sup>53</sup>

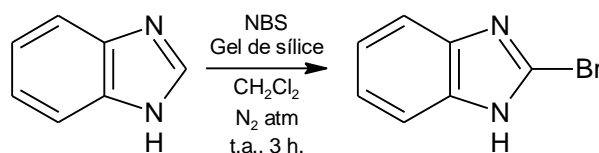


los resultados fueron similares a los obtenidos en a), obteniendo la mezcla de los regioisómeros.

Por último, al observar que ni la temperatura ambiente ni el calentamiento convencional permitía obtener los resultados esperados, se decidió probar usando una diferente fuente de energía de calentamiento, en este caso el microondas. La síntesis asistida por microondas se caracteriza por un calentamiento uniforme a partir de radiación emitida remotamente atravesando las paredes del vial de reacción para de esta manera calentar reactivos y disolventes de manera directa, reduciendo el número de productos secundarios o de descomposición.<sup>54</sup> Sin embargo, a pesar de las ventajas de esta fuente de energía, el resultado fue igual que con la condición b), que involucra calentamiento convencional, observando únicamente la descomposición de las materias primas.

#### 7.1.2.3. A partir del 2-Bromobencimidazol

A partir de una patente publicada para la síntesis de pirimidilsulfonamidas<sup>55</sup> en la que llevaron a cabo con éxito la formación de la sulfonamida con la cloropirimidina y la sulfonamida correspondiente usando un acoplamiento de Buchwald-Hartwig, se decidió intentar usar esta reacción para la síntesis de las bencensulfonamidas bencimidazólicas; para esto se requería sintetizar el 2-bromo-5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**29**).



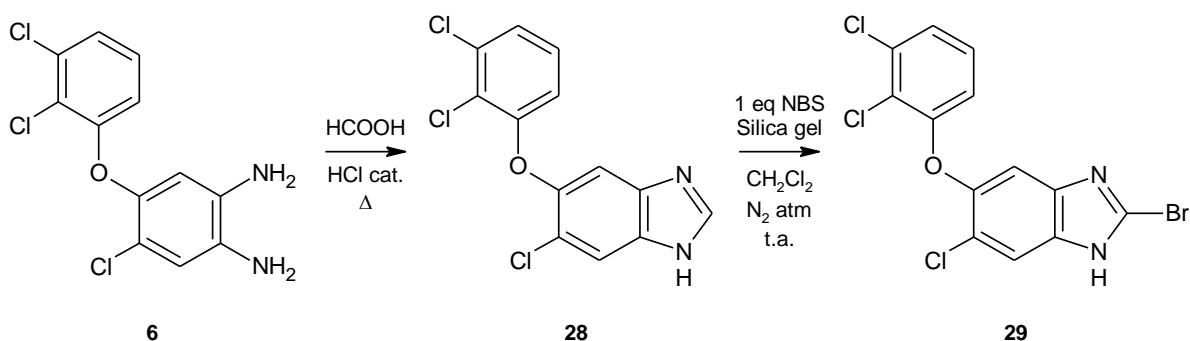
**Esquema 20.** Síntesis del 2-Bromobencimidazol.

Al no tener experiencia previa en la síntesis de (**29**), se decidió inicialmente llevar a cabo la síntesis del 2-bromobencimidazol como se reporta en la literatura (Esquema 20),<sup>56</sup> con el fin de estudiar el comportamiento de la reacción sin hacer uso de la materia prima (**6**). La reacción procedió con facilidad obteniendo un solo producto y se observó además que la cantidad de *N*-bromosuccinimida (NBS) utilizada era determinante para evitar el producto dibromado en las posiciones 2 y 5, ya que al

agregar más de 1 equivalente de NBS a la reacción, se comienza a ver la formación de más de un producto en la reacción.

Una vez estudiada la reacción de bromación con el bencimidazol, se procedió a intentarlo a partir de la materia prima (**6**). Inicialmente se procedió a formar el 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**28**) sometiendo a (**6**) a un reflujo de ácido fórmico con HCl como catalizador; esta se trata de una reacción previamente reportada<sup>57</sup> por nuestro grupo de investigación por lo que no se tuvieron dificultades para realizarla, obteniendo un solo producto con punto de fusión y Rf igual al reportado.

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de obtención de (**29**); sin embargo, al monitorear la reacción por CCF no se observó ningún cambio en la materia prima (**28**), posiblemente debido a la presencia del diclorofenoxi y el cloro en las posiciones 5 y 6 respectivamente del anillo de bencimidazol, quienes generan un fuerte efecto electroattractor, disminuyendo drásticamente la reactividad de la posición 2. Al observar esta falta de reactividad se decidió agregar tolueno y calentar la reacción con el fin de ayudar a la materia prima (**28**) a vencer la barrera energética necesaria para que le fuera posible reaccionar con el NBS, pero aún con el calentamiento la reacción no procedió. Al no poder obtener a (**29**), no se llevó a cabo el acoplamiento de Buchwald-Hartwig para obtener los compuestos finales a través de este método.



**Esquema 21.** Propuesta de síntesis del 2-Bromo-6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol (**29**).

## 7.2. Parte biológica

### 7.2.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de la TcTIM

Al ser compuestos diseñados para determinar la actividad tripanocida y de manera más específica la actividad sobre la TcTIM, se consideró importante llevar a cabo la evaluación de la actividad inhibitoria sobre dicha enzima, estas evaluaciones se realizan a una concentración de los compuestos de 200  $\mu\text{M}$ . Lamentablemente, al preparar el sistema en el que se prueba la actividad a esa concentración, y aun haciendo uso de DMSO a una concentración del 10%, los compuestos precipitaron, evitando así que se pudiera llevar a cabo la evaluación de la actividad sobre la TcTIM de los mismos. Se propone más adelante llevar a cabo esta evaluación comenzando con una concentración de compuesto de 100  $\mu\text{M}$  o menor.

### 7.2.2. Evaluación de la actividad tripanocida

Las sulfonamidas **CSHG1–CSHG4** se sometieron a pruebas de actividad *in vitro* contra tres diferentes cepas de *T. cruzi*, la cepa Y1, ITRI y TR, en donde se midió la susceptibilidad ( $\text{CI}_{50}$ ) de las diferentes cepas del parásito a los compuestos sintetizados mediante el método de resazurina, los resultados se encuentran en la Tabla 11 y Figura 24. Adicionalmente, en la misma tabla se pueden encontrar los resultados de inhibición del parásito por el compuesto **B4**, compuesto del que surge el diseño de las sulfonamidas planteadas en este trabajo, así como del Nifurtimox, uno de los fármacos usado actualmente en el tratamiento de la tripanosomiasis, con el fin de comparar y determinar si se presentó una mejora o no en la actividad biológica.

Por otro lado se realizó una evaluación sobre el perfil de seguridad de los compuestos utilizando una línea celular de macrófagos de ratón J774.2, las cuales fueron cultivadas en medio RPMI, determinando el efecto citotóxico ( $\text{CC}_{50}$ ) de los compuestos por ensayo con resazurina. Los resultados se muestran también en la Tabla 11 y en la Figura 25.

El compuesto **CSHG2** es el que presenta mejor actividad tripanocida en la cepa Y1, seguido muy de cerca por **CSHG3**, mientras que este último es el que mejor

inhibición del parásito tiene en las cepas ITRI y TR. **CSHG1** y **CSHG4** presentan actividades en general muy alejadas de las presentadas por los dos compuestos antes mencionados.

**Tabla 11.** Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos **CSHG1–CSHG4**, **B4**, fármaco de referencia y valores de citotoxicidad de los mismos

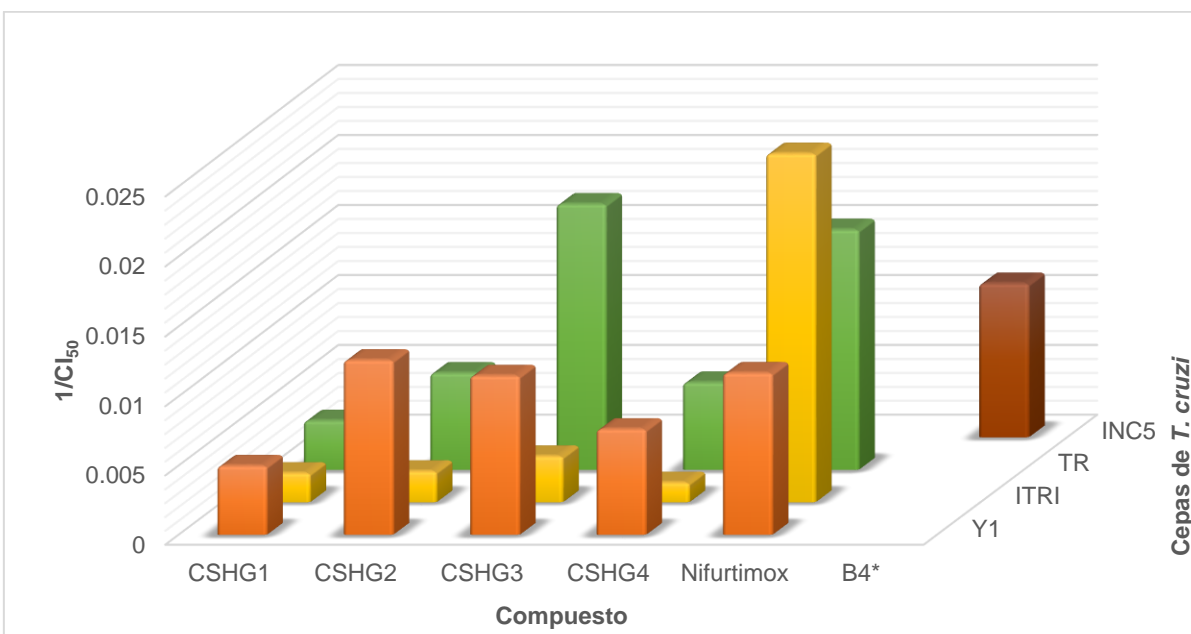
| Clave             | CC <sub>50</sub> <sup>a</sup><br>(μM) | Y1                                    |                 | ITRI                                  |                 | TR                                    |                 | INC5                                  |                 |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
|                   |                                       | CI <sub>50</sub> <sup>b</sup><br>(μM) | IS <sup>c</sup> | CI <sub>50</sub> <sup>b</sup><br>(μM) | IS <sup>c</sup> | CI <sub>50</sub> <sup>b</sup><br>(μM) | IS <sup>c</sup> | CI <sub>50</sub> <sup>b</sup><br>(μM) | IS <sup>c</sup> |
| <b>CSHG1</b>      | 69.14                                 | 200.47                                | 0.35            | 472.95                                | 0.15            | 281.31                                | 0.25            | ---                                   | ---             |
| <b>CSHG2</b>      | 80.67                                 | 79.36                                 | 1.02            | 444.02                                | 0.18            | 143.22                                | 0.56            | ---                                   | ---             |
| <b>CSHG3</b>      | 65.78                                 | 87.06                                 | 0.76            | 300.33                                | 0.22            | 52.48                                 | 1.25            | ---                                   | ---             |
| <b>CSHG4</b>      | 31.79                                 | 130.85                                | 0.24            | 700.24                                | 0.05            | 158.41                                | 0.20            | ---                                   | ---             |
| <b>B4</b>         | 361.50 <sup>d</sup>                   | ---                                   | ---             | ---                                   | ---             | ---                                   | ---             | 90.66                                 | 3.98            |
| <b>Nifurtimox</b> | 286.24                                | 85.58                                 | 3.34            | 38.13                                 | 7.51            | 58.06                                 | 4.93            | ---                                   | ---             |

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub>: concentración que produce la citotoxicidad en 50% de macrófagos de ratón J774.2.

<sup>b</sup>CI<sub>50</sub>: concentración que produce la inhibición de 50% del parásito en la forma epimastigote.

<sup>c</sup>IS: Índice de selectividad=CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

<sup>d</sup>CC<sub>50</sub> determinada usando línea celular Vero.



**Figura 24.** 1/CI<sub>50</sub> de los compuestos **CSHG1–CSHG4**, **B4** y fármaco de referencia.

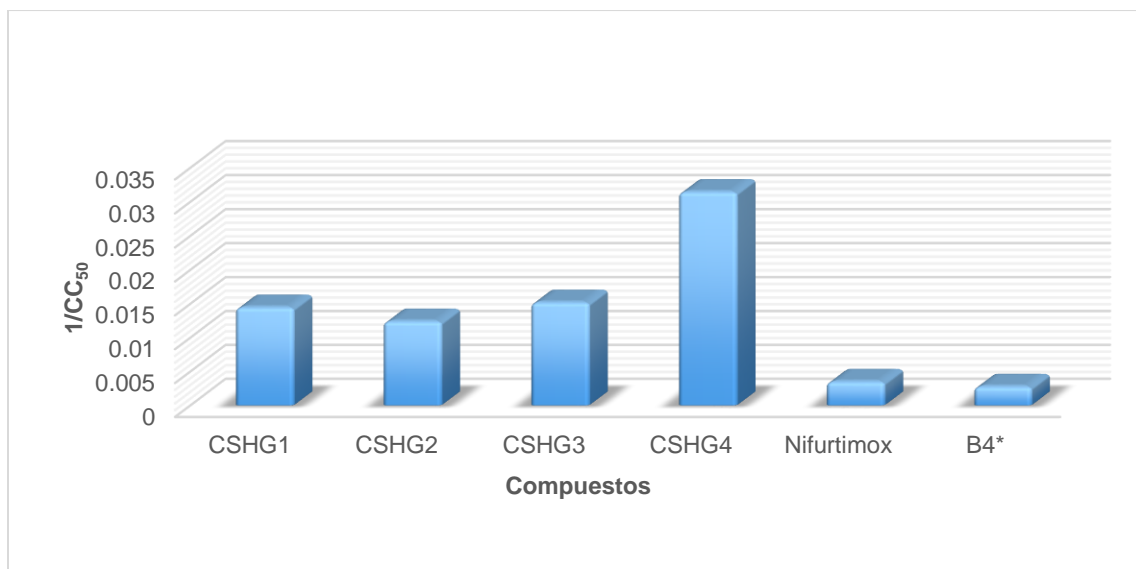
Al comparar los resultados de los compuestos de la serie con los de Nifurtimox, se observa que **CSHG2** y **CSHG3** superan la actividad del fármaco de referencia en el

caso de la cepa Y1, mientras que **CSHG3** lo supera también en la cepa TR. Todos los compuestos presentaron muy mala actividad *in vitro* en la cepa ITRI comparados con el Nifurtimox, siendo en el mejor de los casos (**CSHG3**) 7.9 veces menos activos que el fármaco de referencia.

Al examinar el comportamiento entre cepas, se observa que los compuestos presentan una actividad similar en las cepas Y1 y TR, mientras que su actividad se ve muy reducida para el caso de la cepa ITRI. Las cepas ITRI y TR aún no se encuentran debidamente clasificadas debido a su aún reciente aislamiento del insecto vector, pero una vez que lo estén resultaría de interés observar que características de la cepa ITRI difieren de las otras dos cepas para tratar de entender su gran resistencia presentada a la serie **CSHG**.

Es difícil hacer una comparación con **B4**, precursor en el diseño de la serie **CSHG**, debido a que su actividad fue evaluada con una cepa de *T. cruzi* diferente, INC5 del Instituto Nacional de Cardiología, en los trabajos previos de nuestro grupo de investigación. Sin embargo se puede ver que las actividades de **CSHG3** en las cepas Y1 y TR, y de **CSHG2** en la cepa Y1, superan la actividad de **B4** en la cepa INC5, representando una pequeña mejora en la actividad tripanocida.

Al analizar las diferencias entre los compuestos de la serie, se puede decir que en general la presencia de un sustituyente en la posición 4 del anillo de la sulfonamida favorece la actividad tripanocida, pero cuando el sustituyente tiene un efecto electrodonador en el anillo, como en el caso de **CSHG2** y **CSHG3**, la actividad es aún mejor, favoreciéndose incluso la presencia de un sustituyente que sea electrodonador únicamente por efecto inductivo y no por la presencia de pares de electrones sin compartir como el caso del  $-\text{OCH}_3$  en **CSHG2**.



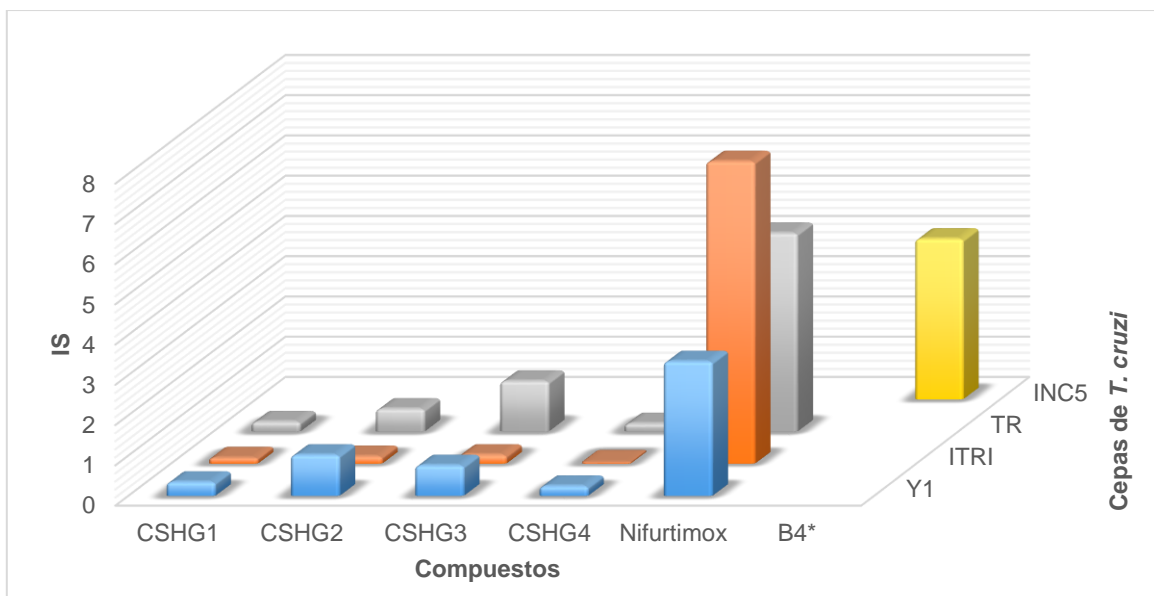
\*Para B4 se usaron células Vero.

**Figura 25.** 1/CC<sub>50</sub> de los compuestos **CSHG1–CSHG4** y fármaco de referencia en macrófagos de ratón J774.2.

Por otro lado, en relación a la actividad citotóxica, para comenzar es importante observar que el Nifurtimox no tiene actividad tóxica sobre macrófagos, por lo que el método usado para medir la viabilidad celular es confiable. En este caso se podría decir que es confiable al presentar una CC<sub>50</sub> alta así como un IS alto (CC<sub>50</sub>: 286.24  $\mu$ M).

La actividad citotóxica se midió por el método de resazurina. Este compuesto es de color azul no fluorescente, la resazurina es reducida a resofurina, de color rosado altamente fluorescente, por oxidoreductasas que se encuentran en la mitocondria de células viables. Esto indica que se está midiendo la integridad de la mitocondria en la célula, organelo fundamental en el proceso de obtención de energía, por lo que, si el efecto tóxico está siendo tan fuerte como para hacer que un organelo tan fundamental como la mitocondria sea inhabilitado, se está hablando de un efecto citotóxico grave.

Los resultados indican que todos los compuestos de la serie **CSHG** fueron más citotóxicos que el fármaco de referencia Nifurtimox (Figura 25), y también que **B4**, aunque esto último debe tomarse con reserva, ya que la citotoxicidad de **B4** se determinó en otro tipo de células.



**Figura 26.** IS de los compuestos **CSHG1–CSHG4**, **B4** y fármaco de referencia.

Con estos resultados se calculó el IS (Tabla 11 y Figura 26), el cual resultó menor en todos los casos que el obtenido para el fármaco de referencia, así como para **B4**, siendo incluso en la mayoría de los casos menor a 1 indicando un efecto de citotoxicidad importante en el que se ve favorecido el ataque a las células de mamífero en lugar de las del parásito. Los únicos casos en los que el IS es mayor a 1 es para **CSHG2** en la cepa Y1 y para **CSHG3** en la cepa TR.

Los resultados obtenidos por las sulfonamidas más activas, a pesar de su gran efecto citotóxico, resultan de gran importancia al ser pocos los compuestos que presentan un buen efecto sobre este protozooario. Los resultados proporcionan además, información importante para posteriores estudios de correlación estructura-actividad que permitan diseñar compuestos más potentes y menos citotóxicos.

### 7.3. Parte computacional

#### 7.3.1. Estudios de acoplamiento molecular entre la TcTIM y HsTIM de los compuestos sintetizados

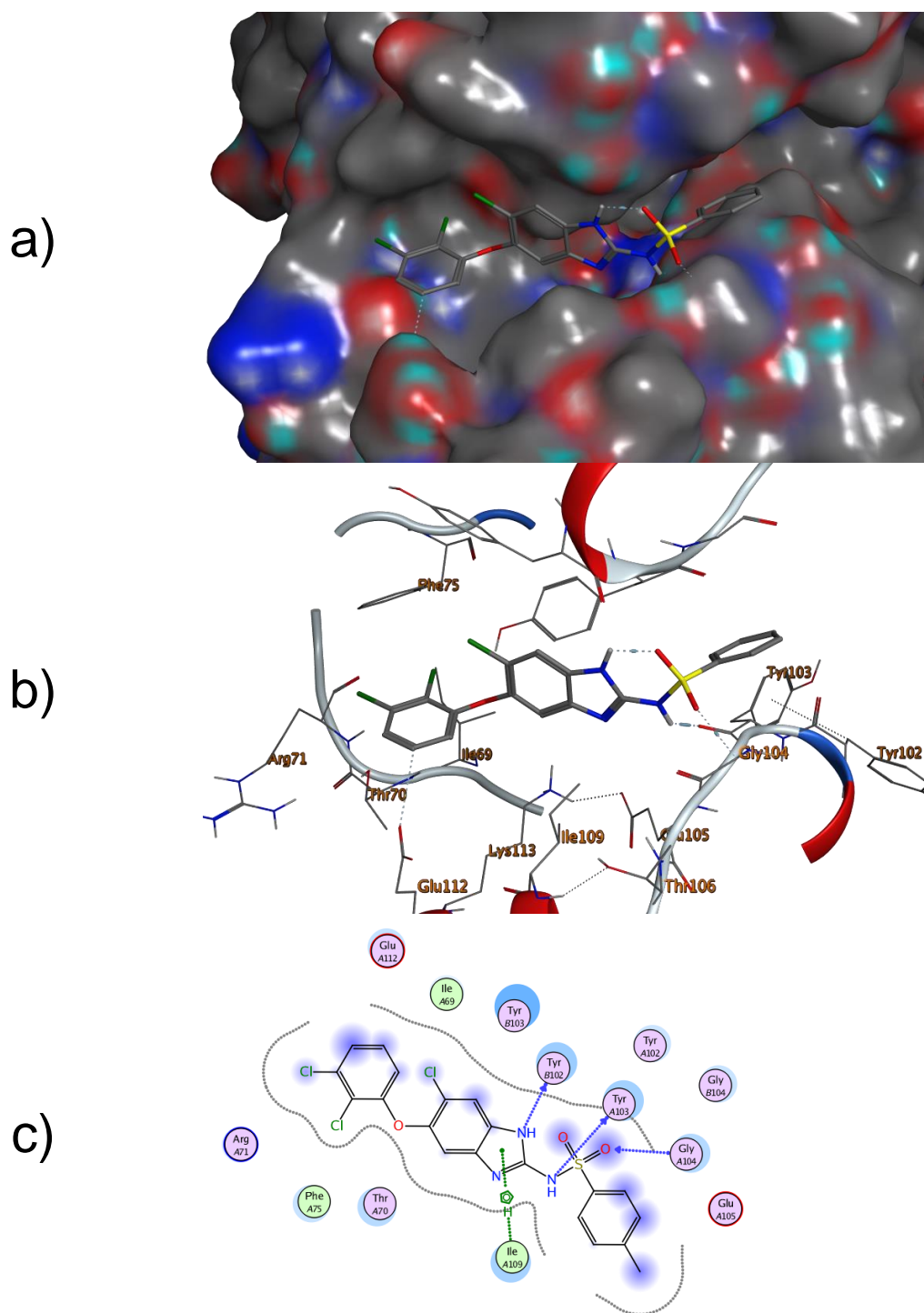
De manera inicial, esta herramienta de la Química Farmacéutica permite explicar los resultados obtenidos en la evaluación biológica, así como también permite saber qué características estructurales resultan de utilidad, o no, para la inhibición de la TcTIM. En la Tabla 12 se muestran los valores de energía de unión obtenidos para los compuestos de la serie CSHG con la TcTIM y la HsTIM.

**Tabla 12.** Resultados del *docking* de los compuestos **CSHG1–CSHG5** sobre la TcTIM y la HsTIM

| Clave        | R                 | TcTIM                                |                     | HsTIM                                |                     | Selectividad<br>( $\Delta G_{TcTIM} - \Delta G_{HsTIM}$ )<br>(Kcal/mol) |
|--------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------|---|
|              |                   | (-) $\Delta G_{unión}$<br>(Kcal/mol) | Veces en el cluster | (-) $\Delta G_{unión}$<br>(Kcal/mol) | Veces en el cluster |   |
| <b>CSHG1</b> | -H                | -7.73                                | 7                   | -7.61                                | 6                   | -0.12   |
| <b>CSHG2</b> | -OCH <sub>3</sub> | -7.21                                | 5                   | -7.86                                | 11                  | 0.65  |
| <b>CSHG3</b> | -CH <sub>3</sub>  | -8.02                                | 9                   | -7.51                                | 12                  | -0.51   |
| <b>CSHG4</b> | -Br               | -8.06                                | 6                   | -7.90                                | 7                   | -0.16   |
| <b>CSHG5</b> | -NO <sub>2</sub>  | -7.94                                | 5                   | -8.29                                | 5                   | 0.35  |

Los compuestos mostraron afinidad por la enzima de interés, con valores de  $\Delta G_{unión}$  negativos, indicando que la unión ligando-receptor genera complejos estables. Los ligandos **CSHG1**, **CSHG3** y **CSHG4** mostraron una mayor afinidad por la TcTIM que por la HsTIM, mientras que **CSHG2** y **CSHG5** mostraron una mayor afinidad por la HsTIM.



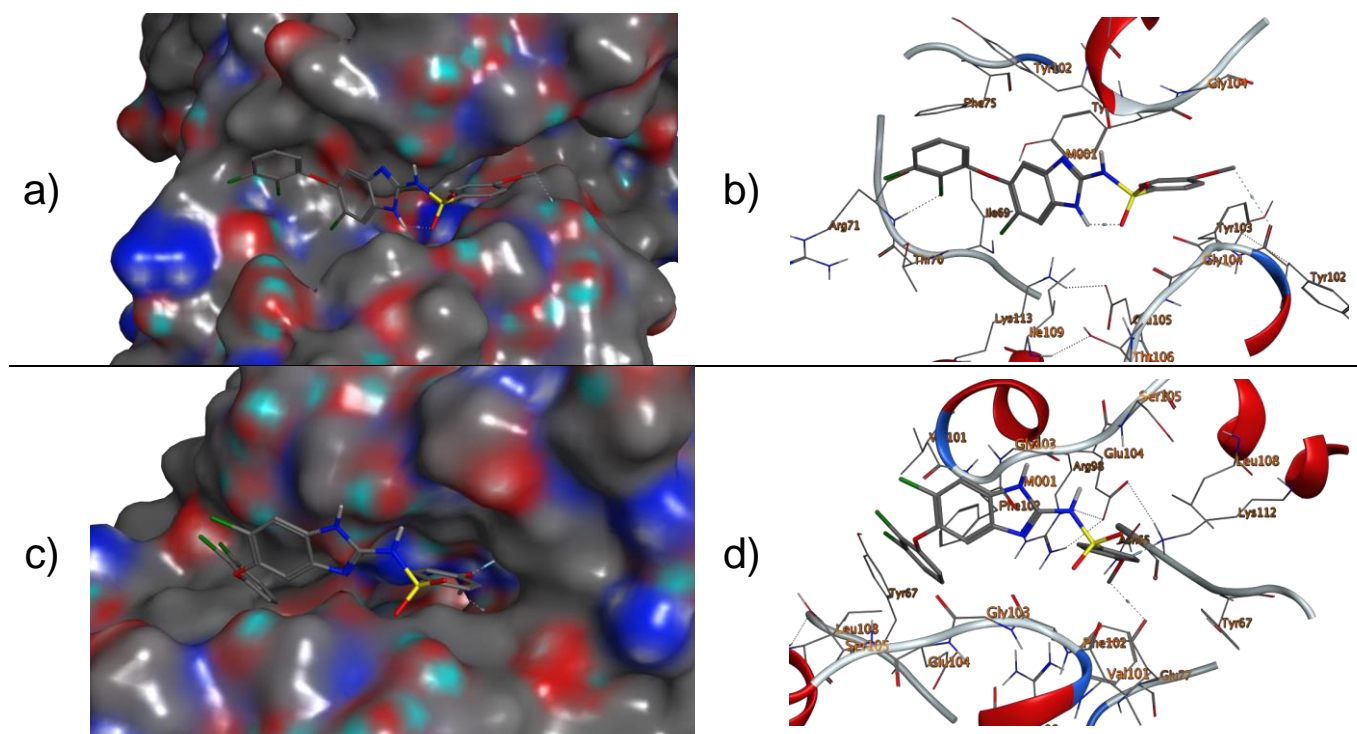


**Figura 27.** Docking del compuesto **CSHG3** con la TcTIM. a) Vista de **CSHG3** en el sitio de unión de la proteína con superficies. b) Vista de las interacciones de los aminoácidos del sitio de unión con **CSHG3**. c) Diagrama de interacciones de **CSHG3** con los aminoácidos del sitio de unión.

De todos los ligandos propuestos la sulfonamida **CSHG3** es una de las que presentó mayor afinidad, se encontró un número de veces considerable dentro de ese modo

de acoplamiento (*cluster*) y también es en la que se tiene mejor selectividad por la TcTIM. En el diagrama de interacciones (Figura 27c y 27d) se observa que los residuos que están llevando a cabo esta interacción con el ligando son de la cadena A: Glu112, Ile69, Tyr102, Tyr103, Glu105, Gly104, Arg71, Phe75, Thr70 y Ile109; mientras que de la cadena B: Tyr102, Tyr103, y Gly104.

Por otro lado, la sulfonamida **CSHG2** es la que presenta menor energía de unión con el receptor, un número de veces bajo dentro de ese modo de acoplamiento (*cluster*) y además es la que presenta peor selectividad por la TcTIM, favoreciéndose su interacción con la HsTIM.



**Figura 28.** Docking del compuesto **CSHG2** con HsTIM y TcTIM. a) Vista del sitio de unión de la TcTIM con superficies. b) Interacciones de **CSHG2** con los aminoácidos del sitio de unión de la TcTIM. c) Vista del sitio de unión de la HsTIM con superficies. d) Interacciones de **CSHG2** con los aminoácidos del sitio de unión de la HsTIM.

Los ligandos se acoplan a lo largo de la interfaz de la TcTIM y se estabilizan con el conjunto aromático de Tyr102, Tyr103 y Phe75 de la cadena A y Tyr102 y Tyr103 de la cadena B debido a la presencia de grupos aromáticos en su estructura. También se observó la formación de diferentes puentes de hidrógeno, entre las Tyr102 o Tyr103 y el nitrógeno protonado del anillo de bencimidazol o el nitrógeno de la sulfonamida y entre Gly104 de la cadena A y el oxígeno de la sulfonamida,

favoreciendo la estabilización del complejo. Una interacción más que resulta interesante observar es de tipo  $\pi$ -H entre la parte del anillo de 5 miembros del bencimidazol y la Ile109 de la cadena A.

Es importante resaltar que las interacciones de puentes de hidrógeno descritas, así como la interacción  $\pi$ -H no se observaron en los dos compuestos que presentaron mayor selectividad por la HsTIM, **CSHG2** y **CSHG5**.

En todos los compuestos se observa que se favorece un acomodo en el que todo un lado del compuesto queda expuesto fuera de la proteína, observándose los oxígenos de la sulfonamida, el cloro en la posición 6 del bencimidazol, el cloro en la posición 3 del diclorofenoxi, el nitrógeno no protonado del bencimidazol y el sustituyente del anillo de la sulfonamida todos fuera del sitio de unión.

Los resultados del *docking* muestran que los compuestos **CSHG1**, **CSHG3** y **CSHG4**, que tienen como sustituyente en posición 4 de la bencensulfonamida un -H, -CH<sub>3</sub> y -Br respectivamente, presentaron las mejores energías de unión, sugiriendo que se prefiere evitar sustituyentes con pares de electrones sin compartir en esa posición. Sobre todo los compuestos **CSHG3** y **CSHG4** muestran las mejores energías de unión, esto se explica debido a que si bien no es necesario tener un sustituyente completamente electrodonador, la presencia de un sustituyente en esa posición favorece una interacción de tipo covalente con la proteína, que estabiliza más el complejo.

Los compuestos restantes, **CSHG2** y **CHSG5**, presentaron una menor energía de unión debido probablemente a la presencia de átomos que pueden formar puentes de hidrógeno con las Tyr102 y Tyr103, evitando que los nitrógenos del bencimidazol y de la sulfonamida formen los puentes de hidrógenos previamente descritos; además, esta interacción provoca un desplazamiento de los compuestos haciendo que no puedan ser estabilizados de manera completa por el complejo de residuos aromáticos también previamente discutido y que tampoco puedan formar el puente de hidrógeno con el oxígeno de la sulfonamida.

La pérdida de selectividad por la TcTIM de **CSHG2** y **CSHG5** también es debido a la presencia de átomos con pares de electrones libres. Como se observa en la Figura 28 a **CSHG2** como ejemplo, la flexibilidad de los compuestos debido a la cantidad de enlaces rotables presentes les permite adoptar una configuración muy doblada en busca de interactuar vía puentes de hidrógeno con Lys112 y Leu108, quienes se encuentran dentro de esa cavidad. Además, una vez ya adentro de la cavidad el complejo se vuelve estable por la formación de una interacción  $\pi$ -H entre el anillo de la sulfonamida y Phe102.

### 7.3.1.1. Relación del estudio de acoplamiento molecular con la actividad tripanocida

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la actividad tripanocida, así como los de citotoxicidad, comparados con las energías de unión obtenidas del estudio de acoplamiento molecular. Esta comparación de manera estricta se debió llevar a cabo entre las energías de unión del acoplamiento molecular y los ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la TcTIM, pero al no poder contar con esos resultados se intentó encontrar una relación con los resultados de actividad tripanocida.

**Tabla 13.** Comparación de los resultados de *docking* de **CSHG1–CSHG4** sobre la TcTIM con los resultados de actividad tripanocida y de citotoxicidad

| Clave        | CC <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | Cl <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Cl <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | Cl <sub>50</sub><br>( $\mu$ M) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) |
|--------------|--------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
|              |                                | HsTIM                                       | Y1                             | ITRI                           | TR                             | TcTIM                                       |
| <b>CSHG1</b> | 69.136                         | -7.61                                       | 200.465                        | 472.951                        | 281.310                        | -7.73                                       |
| <b>CSHG2</b> | 80.667                         | -7.86                                       | 79.359                         | 444.019                        | 143.216                        | -7.21                                       |
| <b>CSHG3</b> | 65.783                         | -7.51                                       | 87.061                         | 300.326                        | 52.477                         | -8.02                                       |
| <b>CSHG4</b> | 31.791                         | -7.90                                       | 130.851                        | 700.235                        | 158.410                        | -8.06                                       |

Dentro de estos resultados es difícil encontrar una correlación entre la actividad tripanocida y las energías de unión; no obstante hay algunos resultados aislados que vale la pena mencionar. Se puede observar que **CSHG3**, propuesta en el estudio de *docking* como el compuesto con los mejores resultados de energía de unión y selectividad, es efectivamente el compuesto más activo en las cepas ITRI y

TR y el segundo más activo en la cepa Y1. Además su actividad tripanocida es mejor que la citotoxicidad para el caso de la cepa TR, en el resto de las cepas la toxicidad supera su actividad tripanocida, aunado a que no se trata del compuesto con menor citotoxicidad como se supondría a partir de los resultados de *docking*.

El compuesto **CSHG2**, planteado como el peor en los estudios de *docking*, es en las cepas ITRI y TR el segundo mejor compuesto mientras que en la cepa Y1 es el mejor, incluso teniendo en este último caso un IS mayor a 1. Por otro lado se trata del compuesto con mayor energía de unión para la HsTIM y resultó ser el menos citotóxico de los cuatro sintetizados. El compuesto **CSHG3** tuvo la mejor energía de unión a la HsTIM y efectivamente es el que tiene una actividad citotóxica más alta, pero también tuvo la energía de unión más alta a la TcTIM y es de los que peor actividad tripanocida tiene en todas las cepas.

La sulfonamida **CSHG1** tuvo valores intermedios de energía de unión tanto para la TcTIM como para la HsTIM, así como también tuvo valores intermedios de actividad tripanocida, pero en ningún caso tiene un IS mayor a 1, contrario a lo que se hubiera esperado con el *docking*.

En conclusión, a pesar de que el acoplamiento molecular se ha constituido como una metodología muy poderosa para el diseño de fármacos, no hay que perder de vista que los resultados de actividad biológica *in vitro* se ven influenciados no solo por el receptor, cuya actividad aislada no pudo ser evaluada en este caso, sino por muchos otros factores en el parásito como la presencia de membranas y una gran cantidad de enzimas que también pueden estar funcionando como blanco. Aún no existe un método computacional que nos permita tomar en cuenta todos los factores de manera simultánea.

### **7.3.2. Estudios de acoplamiento molecular entre la TIM de diversas especies y los compuestos diseñados**

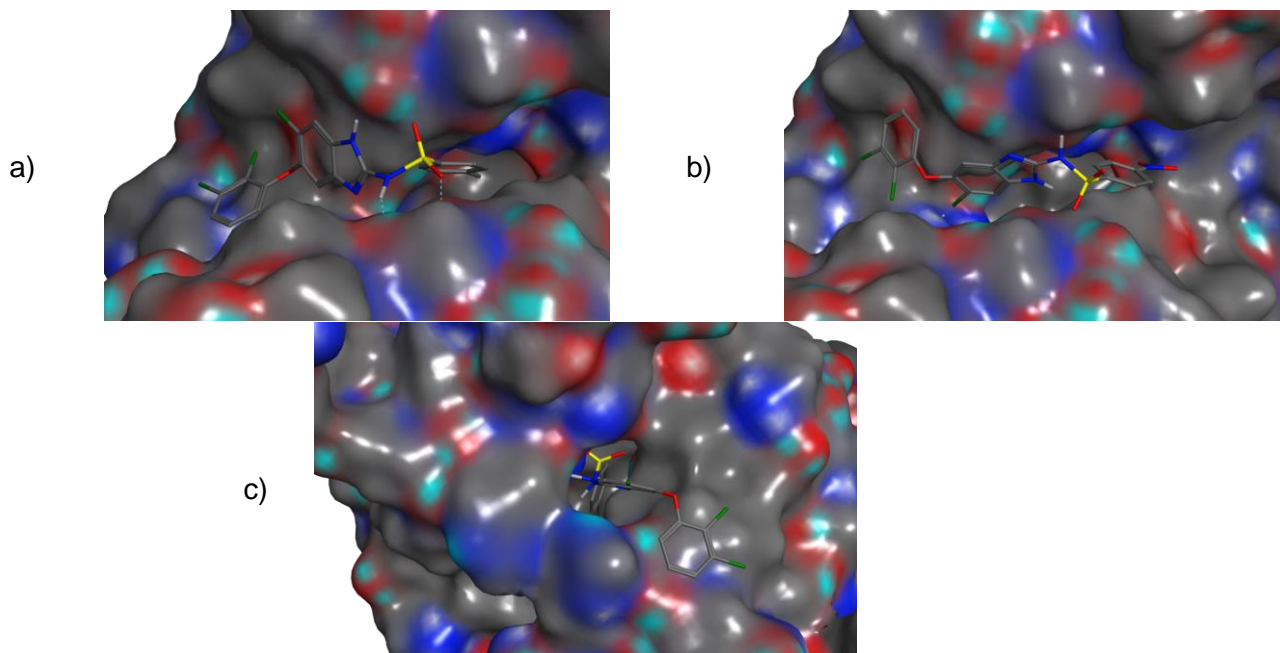
Como objetivo particular se planteó llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular con las TIMs de diferentes parásitos con el objetivo de encontrar alguno en el que la energía de unión superara a aquella de la TcTIM y que presentara una

mejor selectividad por el respectivo parásito al comparar con la HsTIM, los resultados se muestran en la Tabla 14 y en la Figura 29.

**Tabla 14.** Resultados de *docking* de los compuestos **CSHG1–CSHG5** con las TIM de diversas especies

| Clave        | TcTIM                                       | HsTIM                                       | TbTIM                                       | EhTIM                                       | GiTIM                                       | LmTIM                                       | PfTIM                                       |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|
|              | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) | (-) $\Delta G_{\text{unión}}$<br>(Kcal/mol) |
| <b>CSHG1</b> | -7.73                                       | -7.61                                       | -7.78                                       | -8.01                                       | -7.77                                       | -7.53                                       | -7.02                                       |
| <b>CSHG2</b> | -7.21                                       | -7.86                                       | -7.98                                       | -9.7  | -7.91                                       | -7.27                                       | -6.85                                       |
| <b>CSHG3</b> | -8.02                                       | -7.51                                       | -8.28                                       | -8.27                                       | -7.4  | -7.64                                       | -7.04                                       |
| <b>CSHG4</b> | -8.06                                       | -7.9  | -8.12                                       | -7.81                                       | -7.9  | -7.72                                       | -7.8  |
| <b>CSHG5</b> | -7.94                                       | -8.29                                       | -8.43                                       | -7.08                                       | -8.17                                       | -7.13                                       | -7.98                                       |

Se presentaron valores de energía de unión mejores que los obtenidos en la TcTIM en el caso de la TIM de *T. brucei* con **CSHG3** y **CSHG5**, y con *E. histolytica* con **CSHG3**. Como observamos en la Figura 29 los compuestos se acoplan bien a la interfaz de la TIM, nuevamente favoreciéndose para **CSHG3** en la TbTIM al igual que como vimos para la TcTIM la presencia de un sustituyente sin la capacidad de formar puentes de hidrógeno, pero que sí sea capaz de tener interacciones no covalentes con los aminoácidos en el área (Tyr102, Tyr103, Gly104 e Ile109) para favorecer la estabilización del complejo; mientras que en este caso **CSHG5** tiene una mejor interacción debido a que no está la cavidad como en la HsTIM, que lo fuerza a doblarse para poder tener interacción con los residuos. En el caso de la EhTIM observamos cómo **CSHG3** se introduce en el túnel formado por el conjunto aromático de Phe109, Tyr81 y Trp75 que estabiliza la unión entre monómeros y de la misma manera genera interacciones con el compuesto que estabilizan el complejo. Por lo tanto se cree que sería conveniente la evaluación de los compuestos contra las TIM de *T. brucei* y *E. histolytica*.



**Figura 29.** Docking con TIMs de diversas especies. a) Vista del sitio de unión de TbTIM con superficies y **CSHG3**. b) Vista del sitio de unión de TbTIM con superficies y **CSHG5**. c) Vista del sitio de unión con superficies de EhTIM con superficies y **CSHG3**.

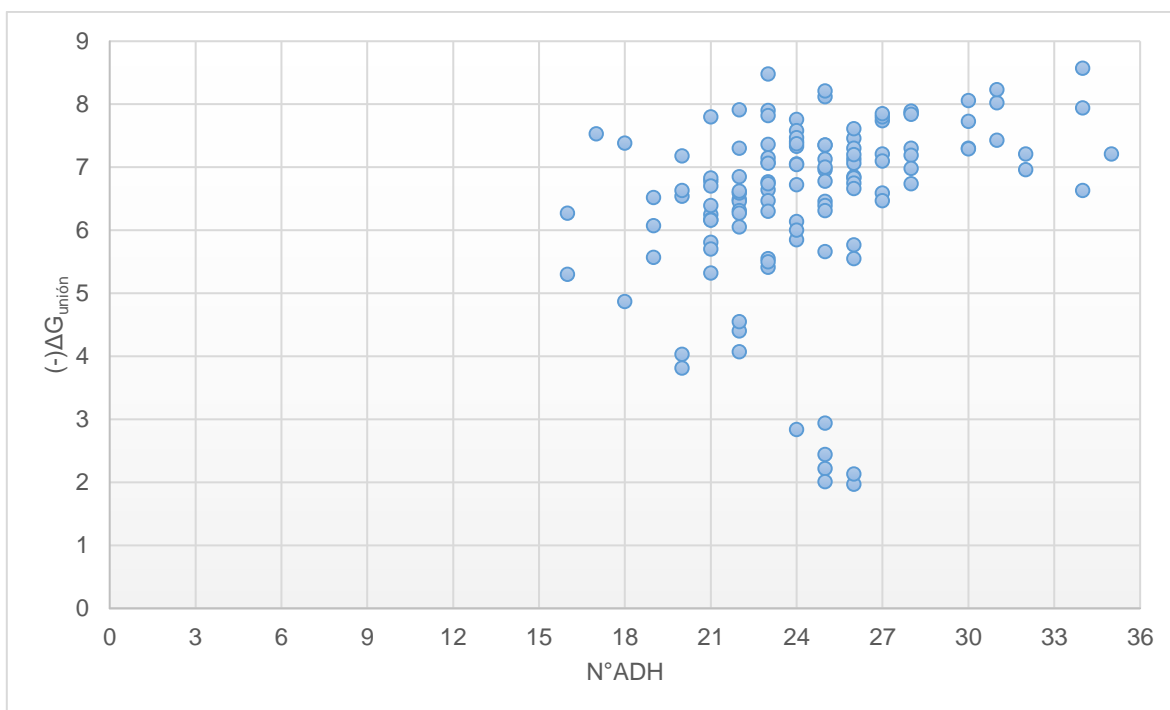
### 7.3.3. Índice de Eficiencia del Ligando (IEL)

Con lo reportado en los diferentes trabajos de tesis y/o publicaciones se obtuvo una biblioteca de 123 compuestos diseñados como inhibidores de la TcTIM. Una vez llevado a cabo el acoplamiento molecular con los mismos, se tomó el mejor valor de  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  para cada uno de ellos, invirtiendo su signo de negativo a positivo para facilitar los análisis posteriores.

Al graficar el  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  contra el número de átomos diferentes de hidrógeno ( $N^{\circ}\text{ADH}$ ) en la molécula (Figura 30), se encontró como era de esperarse, que el valor de  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  aumenta de manera proporcional al  $N^{\circ}\text{ADH}$  debido a que una mayor cantidad de átomos pesados tiene la posibilidad de generar un mayor número de interacciones con los residuos de la proteína.

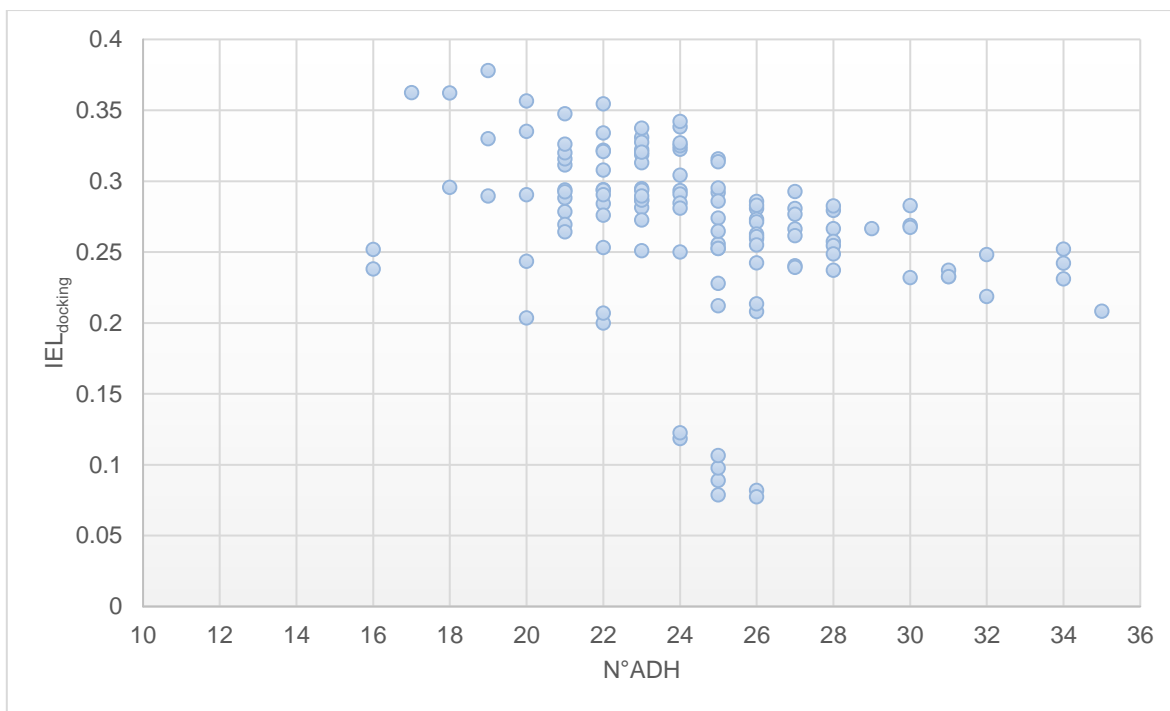
El IEL, como se ha mencionado, permite evaluar la eficiencia de la unión normalizando la potencia para compuestos con diferentes pesos moleculares, obteniendo la eficacia por átomo. Se esperaría que el aumento de manera proporcional observado entre el  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  y el  $N^{\circ}\text{ADH}$  se observara también al

graficar el  $IEL_{\text{docking}}$  contra el  $N^{\circ}\text{ADH}$ ; sin embargo, como observamos en la gráfica de la Figura 31, esto no es así. El aumento en el  $N^{\circ}\text{ADH}$  lleva a la disminución del  $IEL_{\text{docking}}$ , señalando así que de acuerdo a los  $\Delta G_{\text{unión}}$  obtenidos de *docking*, la eficiencia de la unión disminuye conforme aumenta el  $N^{\circ}\text{ADH}$  en la molécula y que por lo tanto la potencia como tal, en este caso representada por  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$ , no necesariamente será siempre un buen indicador de una buena unión del ligando a la proteína.



**Figura 30.** Gráfica de  $N^{\circ}\text{ADH}$  vs  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$  obtenido del score de *docking*.





**Figura 31.** Grafica de N°ADH vs IEL<sub>docking</sub>.

Al hacer un tratamiento similar pero con los  $CI_{50}$  de actividad inhibitoria de la enzima, se obtuvieron las gráficas mostradas en las Figuras 32 y 33. En este caso es difícil poder encontrar una tendencia debido al bajo número de compuestos con  $CI_{50}$  disponible, pero se puede observar en el caso de la Figura 32,  $pCI_{50}$  contra el N°ADH, que una serie de compuestos sí siguen una tendencia de aumento de la  $pCI_{50}$  de manera proporcional al N°ADH. Posteriormente se obtuvo el IEL<sub>inhibitorio</sub> y se graficó el mismo contra el N°ADH en la que a diferencia de lo observado con el *docking*, sí se conserva la relación de un aumento proporcional del IEL<sub>inhibitorio</sub> y el N°ADH, así como se observó entre la  $pCI_{50}$  y el IEL<sub>inhibitorio</sub>.

El hecho de que en este caso tanto la  $pCI_{50}$  como el IEL<sub>inhibitorio</sub> tengan una relación de aumento directamente proporcional con el N°ADH, se puede derivar del mecanismo por el cual los compuestos inhiben la enzima, esto es, tratando de bloquear la interfaz existente entre los dos monómeros, como es sabido que lo hacen para llevar a cabo su función biológica de la isomerización del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), en el quinto paso de la glucólisis.

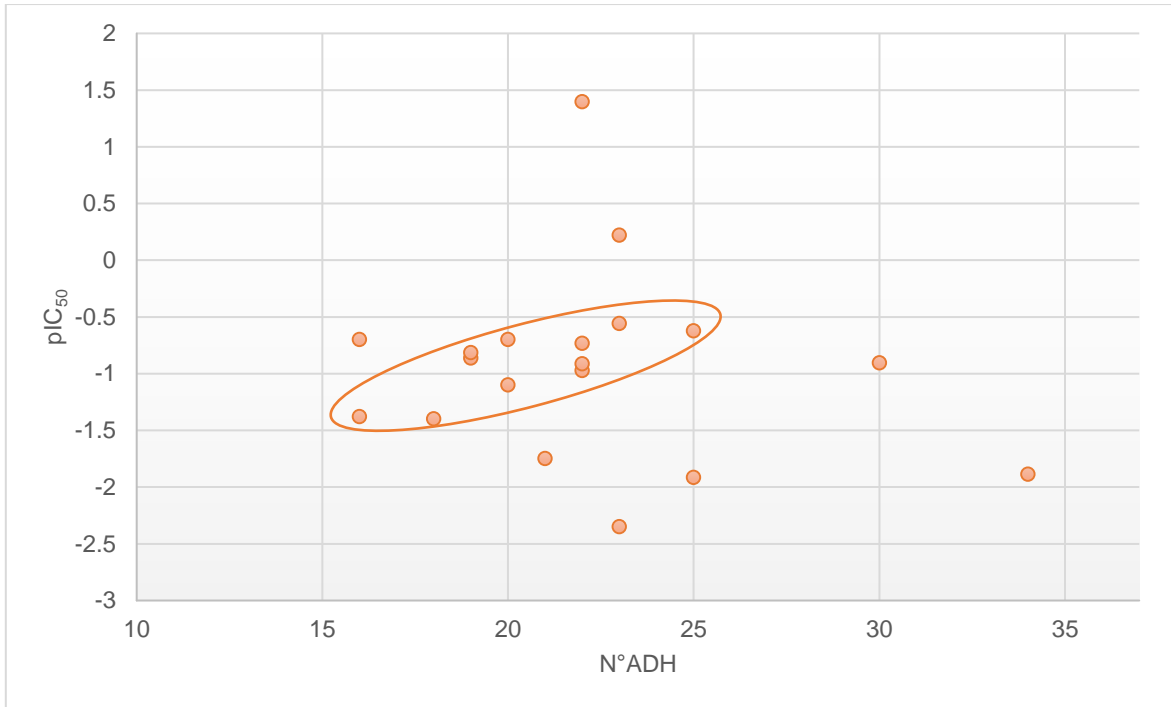


Figura 32. Gráfica de N°ADH vs pIC<sub>50</sub> de la inhibición de la TcTIM.

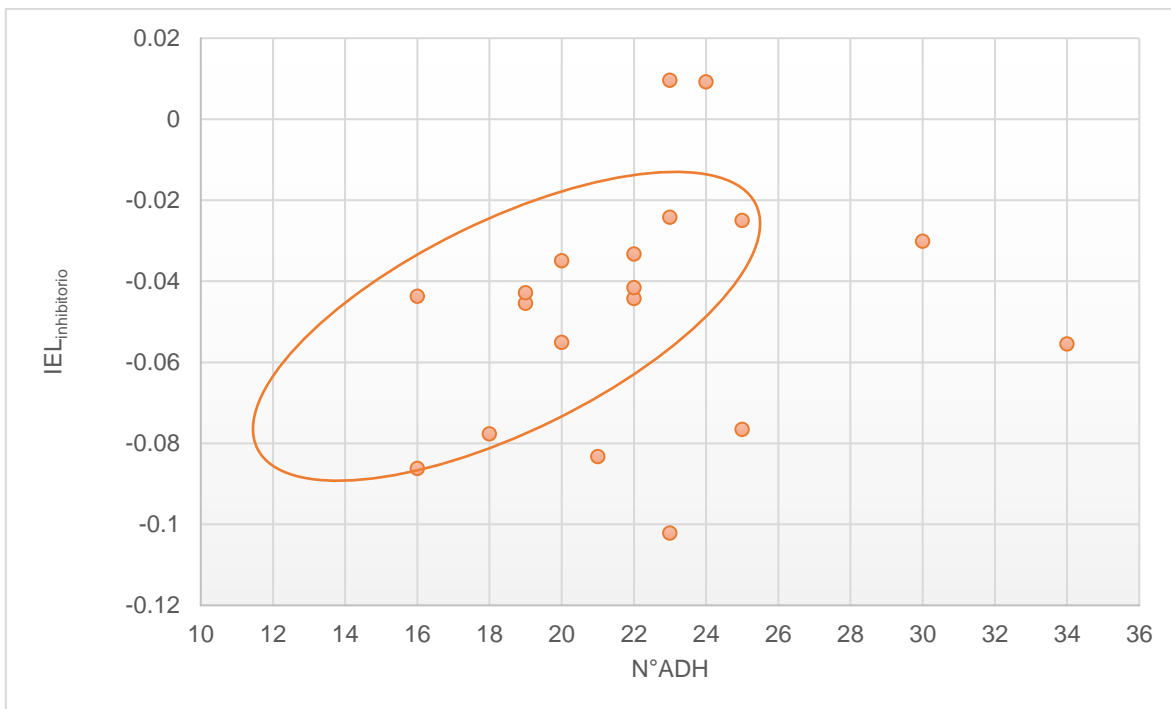
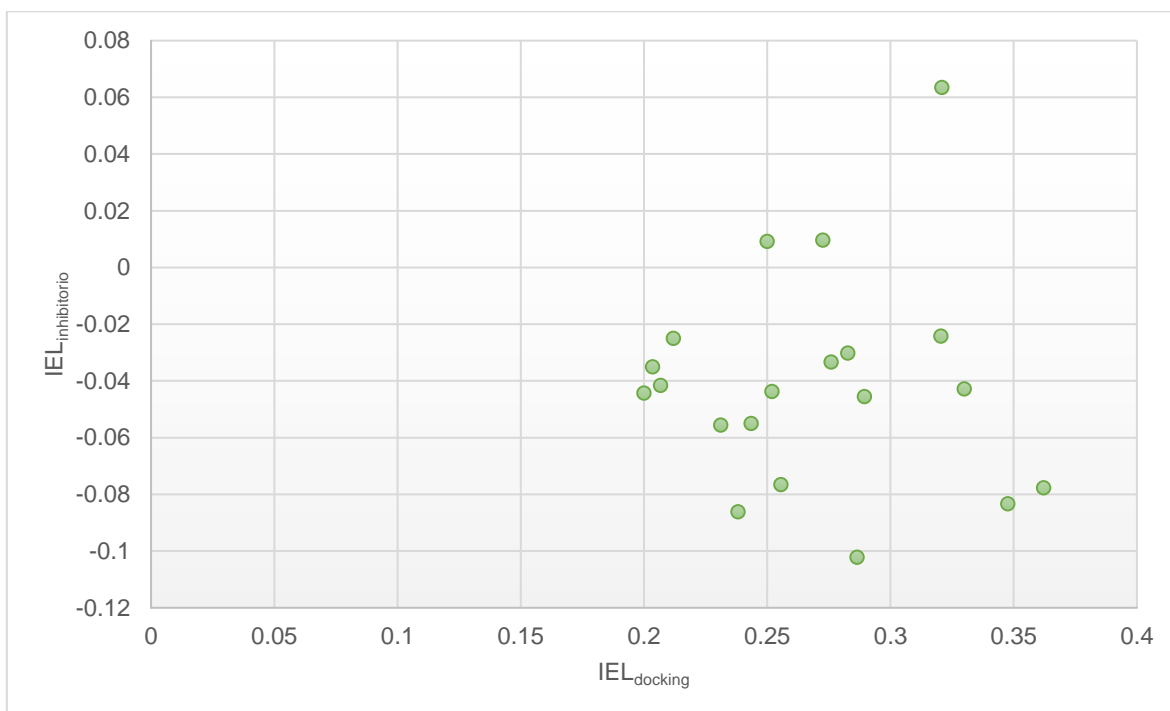


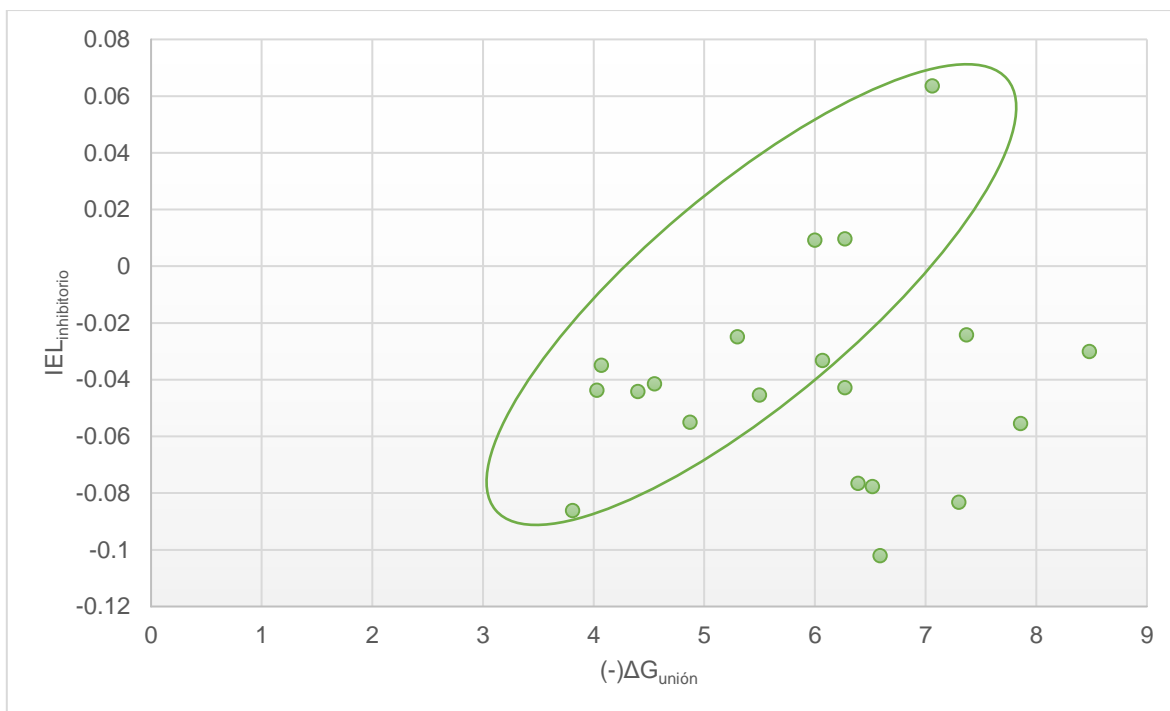
Figura 33. Gráfica de N°ADH vs IEL<sub>inhibitorio</sub>.

Una vez que se observó que la pIC<sub>50</sub> y el IEL<sub>inhibitorio</sub> siguen una misma tendencia de aumento directamente proporcional respecto al N°ADH, resultó importante

determinar si el *docking*, en este caso, es útil para predecir esta tendencia, ya fuera a través de la potencia obtenida directamente como  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  o con el  $\text{IEL}_{\text{docking}}$ . Para esto se obtuvieron las gráficas de las Figuras 34 y 35, en las que se grafica el  $(-\Delta G_{\text{unión}})$  o el  $\text{IEL}_{\text{docking}}$  contra el  $\text{IEL}_{\text{inhibitorio}}$ .



**Figura 34.** Gráfica de  $\text{IEL}_{\text{docking}}$  vs  $\text{IEL}_{\text{inhibitorio}}$ .



**Figura 35.** Gráfica de  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  VS  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$ .

En el caso de la gráfica de la Figura 34 entre los IELs, es difícil observar una tendencia debido a la baja cantidad de datos disponibles, además de que muestra información contradictoria; compuestos con buenos  $IEL_{\text{docking}}$  presentan  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  bajos, por lo que el  $IEL_{\text{docking}}$  no resulta un parámetro confiable para predecir la actividad inhibitoria real de la TcTIM. Por otro lado, en la gráfica de  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  contra  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$  mostrada en la Figura 35, a pesar de la baja cantidad de datos disponibles es más fácil observar una tendencia en la que ambos aumentan de manera proporcional mostrando buenos valores de  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  para compuestos que presentaron buena  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$ . Esto nos dice que el  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$  a diferencia del  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  sí puede funcionar como un método predictivo de la actividad inhibitoria de la TcTIM.

Al tomar de la gráfica de  $IEL_{\text{inhibitorio}}$  contra  $(-)\Delta G_{\text{unión}}$  únicamente los valores que mejor presentan la tendencia y obtener una regresión lineal de los mismos (Figura 36), podemos tener una ecuación que describe el comportamiento de la tendencia y que además al hacer el tratamiento de las unidades mostrado a continuación, nos permitiría establecer un modelo en el que a partir del conocimiento del  $N^{\circ}\text{ADH}$  y (-

) $\Delta G_{\text{unión}}$  obtenido del *docking* con la TcTIM, se pudiera predecir la  $pCI_{50}$  real de los compuestos.

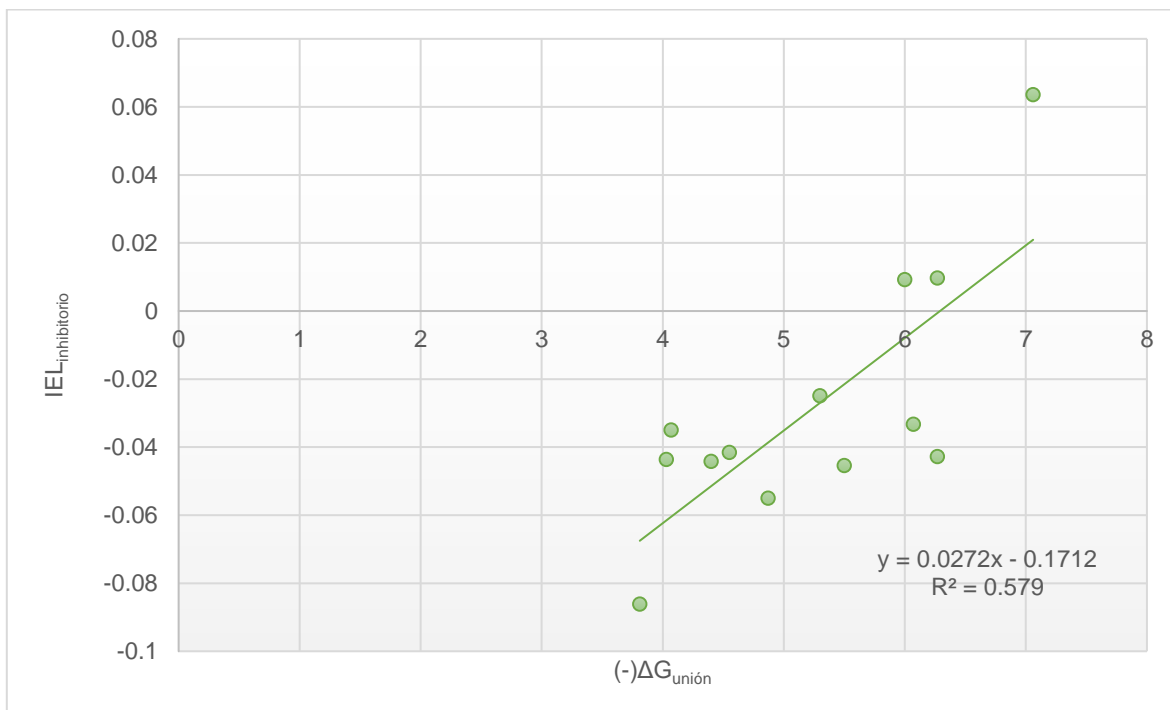


Figura 36. Gráfica de IEL<sub>inhibitorio</sub> vs (-)ΔG<sub>unión</sub> con los datos con mejor tendencia.

$$1) y = 0.0272x - 0.1712$$

si  $y = IEL_{\text{inhibitorio}}$ ,  $x = \Delta G_{\text{unión}}$

$$2) IEL_{\text{inhibitorio}} = 0.0272(\Delta G_{\text{unión}}) - 0.1712$$

si  $IEL = \frac{pCI_{50}}{N^{\circ}ADH}$

$$3) \frac{pCI_{50}}{N^{\circ}ADH} = 0.0272(\Delta G_{\text{unión}}) - 0.1712$$

$$4) pCI_{50} = (N^{\circ}ADH)(0.0272(\Delta G_{\text{unión}}) - 0.1712)$$

Como se observa en la Figura 36, el modelo aún no cuenta con muchos datos y la  $R^2$  calculada aún no es muy buena, por lo que antes de probar validarlo sería conveniente aumentar la base de datos con resultados de  $pCI_{50}$  experimentales, y

una vez que el modelo se componga de una mayor cantidad de datos y una mejor  $R^2$ , lo conveniente sería validarlo y probarlo con nuevos compuestos diseñados como inhibidores de la TcTIM. El contar con un modelo validado para el diseño de fármacos inhibidores de la TcTIM a partir de los resultados de *docking* sería de gran utilidad para aumentar el número de *hits* y aumentar la velocidad a la que se obtienen los mismos; evitando compuestos que posiblemente no presentarán una buena actividad, ahorrando así valiosos recursos humanos y económicos.

Ahora, si bien es cierto que las tendencias observadas en las gráficas indican que un compuesto con un mayor número de átomos tendrá una mejor actividad inhibitoria de la TcTIM, no debemos perder de vista el hecho de que por lo general, aumentos en el tamaño de los compuestos lleva a favorecer una disminución en las propiedades biofarmacéuticas de los mismos, tendiendo a la obtención de compuestos con baja solubilidad acuosa, alta capacidad de ser metabolizados rápidamente o una elevada citotoxicidad.

Por otro lado, es importante mencionar que de funcionar el modelo, los compuestos obtenidos con buena actividad contra la TcTIM, no necesariamente tendrán una buena actividad tripanocida, ya que al probar la actividad *in vitro* se tiene la influencia de muchos otros factores que por el momento no están considerados, como la capacidad de atravesar membranas, la presencia de muchas otras enzimas o biomoléculas que pueden funcionar como posibles blancos terapéuticos o su solubilidad. Es por eso que una vez habiendo probado la actividad de esos compuestos con el parásito, sería conveniente en base a los resultados elaborar diferentes modelos que nos permitan ver la interacción de los factores mencionados con la actividad tripanocida, con el fin de mejorar el diseño y optimización de moléculas con actividad contra *T. cruzi*.

## 8. CONCLUSIONES

- Una vez probados diferentes métodos para la obtención de bencensulfonamidas bencimidazólicas, se estableció una metodología a través de la cual fue posible obtener a los compuestos **CSHG1–CSHG4** con bajos rendimientos. No fue posible obtener a **CSHG5** debido al fuerte efecto electroattractor generado por el grupo nitro en la posición 4.
- El método por el cual se pueden obtener las bencensulfonamidas **CSHG1–CSHG4** en la posición 2 del bencimidazol es a partir de la síntesis de los intermediarios (fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetilo apropiadamente sustituidos y su condensación con la 4-cloro-5-(2,3-diclorofeniloxy)-1,2-feniléndiamina.
- Se identificaron los intermediarios de síntesis previamente reportados por nuestro grupo de investigación a partir de la determinación de su R<sub>f</sub> y punto de fusión.
- Se comprobó la estructura de los intermediarios de síntesis nunca antes reportados por nuestro grupo de investigación a partir de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C, mientras que las de los compuestos finales **CSHG1–CSHG4** se logró a partir de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, NOESY, HSQC, HMBC y análisis elemental.
- No fue posible determinar la actividad inhibitoria de la TcTIM de los compuestos **CSHG1–CSHG4** debido a problemas de solubilidad.
- Se determinó la actividad tripanocida de los compuestos **CSHG1–CSHG4** sobre tres diferentes cepas de *T. cruzi*, dentro de las que destacan las actividades presentadas por **CSHG2** y **CSHG3** sobre las cepas Y1 y TR superando la actividad de su antecesor **B4**, identificando la utilidad de la presencia de sustituyentes pequeños electrodonadores en la posición 4 del anillo de la sulfonamida para favorecer la actividad.
- Se evaluó la seguridad de los compuestos obteniendo valores de citotoxicidad elevados, así como índices de selectividad bajos.
- Los estudios de acoplamiento molecular entre los compuestos sintetizados y la TcTIM muestran buenos valores de afinidad y un buen modo de acoplamiento; sin embargo, al llevar a cabo el acoplamiento con la HsTIM en el caso de **CSHG2**

y **CSHG5**, se observó una mayor selectividad por la TIM humana que por la del parásito.

No se encontró una relación entre los resultados de acoplamiento molecular y de actividad tripanocida, esto debido a la cantidad de factores involucrados en esta última que aún no son posibles de tomar en cuenta en los estudios computacionales.

- Se observó que la energía de unión obtenida del *docking* sigue una relación de aumento directamente proporcional con el  $IEL_{inhibitorio}$ , proponiendo a la energía de unión como un parámetro que permite predecir la actividad de los compuestos sobre la TcTIM.

A partir de esta información se sentaron las bases para la elaboración de un modelo que permita predecir la actividad de los compuestos en diseños futuros.



## 9. PERSPECTIVAS

- Variar las condiciones encontradas para la formación de los derivados (fenilsulfonyl)carbonodithioimidatos de dimetilo con el fin de poder sintetizar el [(4-nitrofenil)sulfonyl]carbonodithioimidato de dimetilo, o en todo caso buscar una ruta de síntesis diferente a las probadas que nos permita llegar al compuesto **CSHG5**.
- Variar las condiciones encontradas para la reacción final de la síntesis de las bencensulfonamidas bencimidazolicas **CSHG1–CSHG4** con el fin de mejorar el rendimiento de obtención de las mismas.
- Llevar a cabo la evaluación de la actividad inhibitoria de la TcTIM comenzando con una concentración más baja de los compuestos para permitir su solubilidad en el medio, así como en caso de ser posible, determinar la  $CI_{50}$  del o los compuestos con mejor porcentaje de inhibición presentado.
- Evaluar la actividad de **CSHG3** y **CSHG5** contra la TIM de *E. histolytica* así como contra el parásito; y la de **CSHG3** contra la TIM de *T. brucei* así como contra el parásito.
- Una vez clasificadas las cepas ITRI y TR analizar las diferencias que llevan a ITRI a ser una cepa mucho más resistente a los compuestos sintetizados que TR y Y1.
- Evaluar la actividad de **B4** contra las cepas Y1, ITRI y TR de *T. cruzi*, así como su actividad citotóxica contra macrófagos de ratón de la línea J774.2 con el fin de poder hacer una comparación adecuada de la actividad con los compuestos sintetizados y saber si realmente hubo una mejora o no.
- Llevar a cabo la evaluación de la  $CI_{50}$  de los compuestos de la biblioteca generada con mejor energía de unión presentada en el acoplamiento molecular, con el fin de tener una cantidad de datos considerable que nos permita observar tendencias con mayor facilidad al comparar con la energía de unión o con la eficiencia del ligando.

Una mayor cantidad de datos también nos permitirá mejorar el modelo establecido para la predicción de la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la TcTIM, así como más adelante poder llevar a cabo su validación.

**10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) OPS OMS | Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores. URL: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=37&Itemid=40760](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=37&Itemid=40760) (consultado Jul 4, 2017).
- (2) Parasitic Infections in Humans | NEB. URL: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/parasitic-infections-in-humans> (consultado Jul 4, 2017).
- (3) NTD Overview. URL: <http://www.end.org/whatwedo/ntdoverview> (consultado Jul 4, 2017).
- (4) Silva-Jardim, I.; Thiemann, O. H.; Anibal, F. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (10), 1810–1823.
- (5) CDC - Neglected Tropical Diseases - Diseases. URL: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (consultado Jul 4, 2017).
- (6) WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). URL: <http://www.who.int/chagas/en/> (consultado Jul 4, 2017).
- (7) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. *Lancet* **2010**, *375* (9723), 1388–1402.
- (8) Bern, C.; Longo, D. L.; Bern, C. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (5), 456–466.
- (9) Salazar-Schettinoa, P. M.; Bucio-Torresa, M. I.; Cabrera-Bravo, M.; Citlalli de Alba-Alvaradob, M.; Castillo-Saldañac, D. R.; Zenteno-Galindoa, E. A.; Rojo-Medinad, J.; Fernández-Santose, A.; Perera-Salazarf, M. G. *Rev. la Fac. Med. la UNAM* **2016**, *59* (3), 6–16.
- (10) WHO - NTD | Distribution of cases of *Tripanosoma cruzi* infection. URL: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_chagas\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png) (consultado Jul 4, 2017).

- (11) Cruz-Reyes, A.; Pickering-López, J. M. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101* (4), 345–354.
- (12) Carabarin-Lima, A.; González-Vázquez, M. C.; Rodríguez-Morales, O.; Baylón-Pacheco, L.; Rosales-Encina, J. L.; Reyes-López, P. A.; Arce-Fonseca, M. *Acta Trop.* **2013**, *127* (2), 126–135.
- (13) Andrade, D. V.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8* (7), e3010.
- (14) Guedes, P. M. M.; Silva, G. K.; Gutierrez, F. R. S.; Silva, J. S. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9* (5), 609–620.
- (15) Velázquez-López, J. M. Síntesis y actividad tripanocida de nuevos derivados del bencimidazol, Facultad de Química, UNAM, **2016**.
- (16) The TDR Targets Database. URL: <http://tdrtargets.org/> (consultado Jul 6, 2017).
- (17) Mansour, T. E. *Chemotherapeutic Targets in Parasites: Contemporary Strategies*, 1st ed.; Cambridge University Press: Cambridge, **2002**; Vol. 1.
- (18) Opperdoes, F. R.; Michels, P. A. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31* (5–6), 482–490.
- (19) Aguilera, E.; Varela, J.; Birriel, E.; Serna, E.; Torres, S.; Yaluff, G.; de Bilbao, N. V.; Aguirre-López, B.; Cabrera, N.; Díaz Mazariegos, S.; de Gómez-Puyou, M. T.; Gómez-Puyou, A.; Pérez-Montfort, R.; Minini, L.; Merlino, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Alvarez, G. *ChemMedChem* **2016**, *11* (12), 1328–1338.
- (20) Wierenga, R. K.; Kapetaniou, E. G.; Venkatesan, R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (23), 3961–3982.
- (21) Álvarez, G.; Aguirre-López, B.; Varela, J.; Cabrera, M.; Merlino, A.; López, G. V.; Lavaggi, M. L.; Porcal, W.; Di Maio, R.; González, M.; Cerecetto, H.; Cabrera, N.; Pérez-Montfort, R.; De Gómez-Puyou, M. T.; Gómez-Puyou, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5767–5772.

- (22) Téllez-Valencia, A.; Olivares-Illana, V.; Hernández-Santoyo, A.; Pérez-Montfort, R.; Costas, M.; Rodríguez-Romero, A.; López-Calahorra, F.; Tuena De Gómez-Puyou, M.; Gómez-Puyou, A. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341* (5), 1355–1365.
- (23) Romo-Mancillas, A.; Téllez-Valencia, A.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R. *J. Mol. Graph. Model.* **2011**, *30*, 90–99.
- (24) Gao, X.-G.; Maldonado, E.; Pérez-Montfort, R.; Garza-Ramos, G.; de Gómez-Puyou, M. T.; Gómez-Puyou, A.; Rodríguez-Romero, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (18), 10062–10067.
- (25) Yadav, G.; Ganguly, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97* (1), 419–443.
- (26) Keri, R. S.; Hiremathad, A.; Budagumpi, S.; Nagaraja, B. M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86* (1), 19–65.
- (27) Velázquez-López, J. M.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Téllez-Valencia, A.; Flores-Carrillo, P.; Nieto-Meneses, R.; Castillo, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (17), 4377–4381.
- (28) Trejo-Soto, P. J. Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la triosafosfato isomerasa (TIM) de Entamoeba histolytica, Facultad de Química, UNAM, **2011**.
- (29) Zali-Boeini, H.; Najafi, Z.; Abtahi, B.; Ghaleshahi, H. G. *Mol. Divers.* **2015**, *19* (2), 283–292.
- (30) Romo-Mancillas, A. Diseño por acoplamiento molecular, síntesis de análogos del bencimidazol y pruebas de inhibición selectiva de la enzima Triosafosfato isomerasa, Facultad de Química, UNAM, **2014**.
- (31) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66* (1), 334–395.
- (32) Guedes, I. A.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. *Biophys. Rev.* **2014**, *6*

- (1), 75–87.
- (33) Sousa, S. F.; Ribeiro, A. J. M.; Coimbra, J. T. S.; Neves, R. P. P.; Martins, S. A.; Moorthy, N. S. H. N.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (18), 2296–2314.
- (34) Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (10), 430–431.
- (35) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121.
- (36) Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89* (2), 271–277.
- (37) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Research.* **2000**, pp 235–242.
- (38) Tripos International. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, E.U. **2001**.
- (39) Sanner, M. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* **1999**, pp 57–61.
- (40) Pérez-Villanueva, J.; Romo-Mancillas, A.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Castillo, R. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (24), 7351–7354.
- (41) In *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2012**; pp 216–235.
- (42) Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **2002**, *50* (5), 649–652.
- (43) Flores Ramos, M. Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonooximetil bencimidazoles, Facultad de Química, UNAM, **2016**.
- (44) Ramkrishna Appaji, R.; Sudhakar, V.; Thangavel, A. Process for preparation

- of triclabendazole. WO 2012070068 A2, **2012**.
- (45) Graham, S. L.; Scholz, T. H. *Synthesis (Stuttg)*. **1986**, 1986 (12), 1031–1032.
- (46) Bonk, J. D.; Amos, D. T.; Olson, S. J. *Synth. Commun.* **2007**, 37 (12), 2039–2050.
- (47) Grünanger, P.; Vita Finzi, P. *Tetrahedron Lett.* **1963**, 4 (26), 1839–1840.
- (48) Aly, F. M.; El-Sayed, A. S.; Bedair, A. H.; Madboli, S. A. *Egypt. J. Chem.* **1987**, 30 (6), 339–344.
- (49) Baker, R. H.; Dodson, R. M.; Riegel, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68 (12), 2636–2639.
- (50) Landini, D.; Rolla, F. *Synthesis (Stuttg)*. **1974**, 1974 (8), 565–566.
- (51) Qafisheh, N.; Mukhopadhyay, S.; Joshi, A. V.; Sasson, Y.; Chuah, G. K.; Jaenicke, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, 46 (10), 3016–3023.
- (52) Rastogi, R.; Sharma, S. *Synthesis (Stuttg)*. **1983**, 1983 (11), 861–882.
- (53) Carey, F.; Sundberg, R. *Advanced Organic Chemistry*; Plenum Press, **2007**.
- (54) Shah, J. J.; Mohanraj, K. *Indian J. Pharm. Sci.* **2014**, 76 (1), 46–53.
- (55) Meghani, P.; Robbins, A.; Stonehouse, J. Pyrimidyl Sulfonamide Derivative and it's use for the Treatment of Chemokine Mediated Diseases, **2010**.
- (56) Mistry, A. G.; Smith, K.; Bye, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27 (9), 1051–1054.
- (57) Soria-Arteche, O. Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados bencimidazólicos híbridos con nitrotiazol, Facultad de Química, UNAM, **2014**.

## **11. ANEXO I-PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

### **11.1. Instrumentación y materiales**

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius A210P o bien en una balanza granataria Scientech SL600.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante, se empleó una parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura, modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador IKA modelo RV 10, con un baño de calentamiento IKA modelo HB10 acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand, modelo 4c y un condensador conectado a un enfriador Brinkmann modelo IC-30.
- La hidrogenación catalítica se realizó en un hidrogenador marca Parr, modelo 3916 EG con 60 lb/in<sup>2</sup>, empleando una botella de 500 mL de capacidad e hidrógeno de la casa Praxair, y como catalizador Ni-Raney de la casa de Aldrich.
- Las reacciones con calentamiento por microondas se llevaron a cabo en un reactor Synthos 3000 de Anton Paar, usando el rotor 64MG5, con sensor externo de IR para medición de temperatura.
- Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Büchi B-540, utilizando capilares de vidrio, y no están corregidos.
- Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas y de análisis elemental pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, NOESY, HSQC, HMBC) se realizaron en un espectrómetro Varian de 400 MHz usando tetrametilsilano como referencia interna. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetil sulfóxido y agua. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm. Las constantes de acoplamiento  $J$  se reportan en Hertz. La simbología empleada es: s=señal simple, d=señal doble, t=señal triple, c=señal cuádruple, m=señal múltiple, dd=señal doble de dobles.

Los Análisis Elementales se realizaron en un Analizador Elemental PerkinElmer Series II CHNS/O Modelo 2400 usando cistina para la calibración.

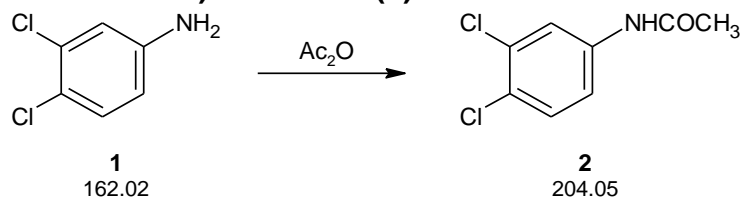
- Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck GF-254. La visualización de los compuestos se realizó con una lámpara UV UVGL-25 Mineralight.
- Las cromatografías en columna (flash) se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck con una distribución de tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm.
- Los sistemas de elución utilizados fueron los siguientes:

Tabla 15. Sistemas cromatográficos

| Sistema | Disolventes                  | Proporción |
|---------|------------------------------|------------|
| I       | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 85:15      |
| II      | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 90:10      |
| III     | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 95:5       |
| IV      | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 98:2       |
| V       | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 99:1       |
| VI      | CHCl <sub>3</sub> :MeOH      | 99.5:0.5   |
| VII     | Hex:AcOEt                    | 60:40      |
| VIII    | Hex:CHCl <sub>3</sub> :AcOEt | 50:35:15   |

## 11.2. Técnicas para la síntesis de los compuestos

### 11.2.1. *N*-(3,4-Diclorofenil)acetamida (**2**)



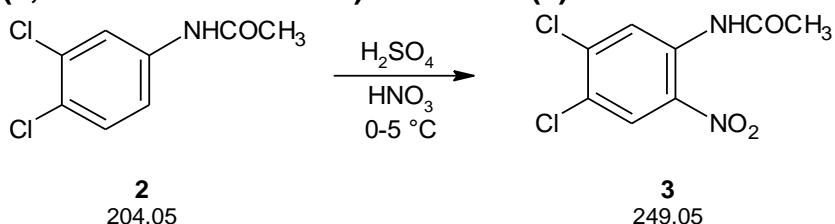
Se pesaron 50 g de 3,4-dicloroanilina (**1**) y se pulverizaron por completo con la ayuda de un mortero. En un vaso de precipitados de 250 mL se vertieron 2 eq. de anhídrido acético. La 3,4-dicloroanilina (**1**) se agregó poco a poco al vaso conteniendo el anhídrido acético manteniendo una agitación constante con ayuda de un agitador de teflón. Al elevarse la temperatura del vaso durante la adición, este



se introdujo en un baño de agua, una vez que regresó a la temperatura ambiente se retiró del baño y se continuó con la adición. Una vez acabada la adición se dejó reposar unos minutos hasta observar que el contenido del vaso se solidificó, este sólido se transfirió con ayuda de una cuchara metálica a un vaso de precipitados de 500 mL, conteniendo 200 mL de agua. Se agitó hasta tener un sólido de partícula fina. El sólido obtenido se separó al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro. Se dejó secar al vacío. Se verificó el consumo completo de la materia prima por CCF (Sistema III).

Rf: 0.29 (Sistema III). Pf: 123.0–123.5 °C.

### 11.2.2. *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (3)



Se colocaron dos vasos de precipitados de 150 mL, equipados con una barra de agitación magnética en un baño de hielo; a uno se le agregaron 38 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y a otro 20 mL de HNO<sub>3</sub>. Una vez que ambos vasos alcanzaron una temperatura de 0-5 °C se procedió a transferir el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gota a gota al vaso conteniendo al HNO<sub>3</sub>, cuidando que la temperatura no rebasara los 10°C. Una vez acabada la adición, la mezcla sulfonítrica se transfirió a un embudo de adición adecuado.

De manera simultánea a la preparación de la mezcla sulfonítrica, se colocó un vaso de precipitados de 250 mL equipado con una barra de agitación magnética en un baño de hielo; en este se agregaron 93 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Una vez que el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alcanzó una temperatura de 0-5 °C se agregaron lentamente 58.39 g. (0.2862 mol) de la materia prima *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (2) cuidando que la temperatura no rebasara los 10 °C. Se mantuvo en agitación hasta la disolución de la materia prima, de ser necesario se agregó más H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lentamente.

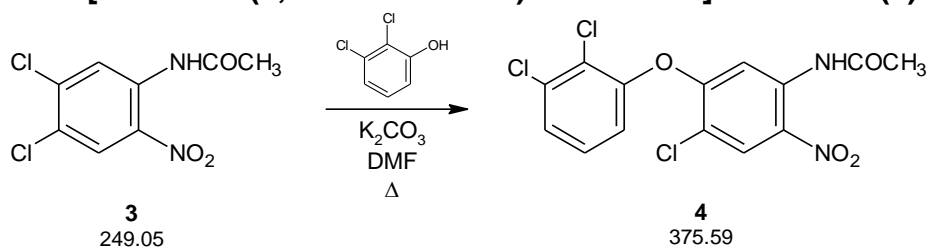
El embudo de adición conteniendo la mezcla sulfonítrica se colocó sobre el vaso conteniendo la materia prima previamente disuelta en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla sulfonítrica se adicionó gota a gota al vaso, cuidando que la temperatura en el vaso se

mantuviera siempre por debajo de los 5 °C. Una vez acabada la adición se mantuvo en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Se verificó con CCF (Sistema VIII) el consumo completo de la materia prima.

La mezcla de reacción se vertió de manera lenta y con agitación vigorosa en hielo. Se mantuvo en agitación hasta observar un sólido con tamaño de partícula uniforme. El sólido obtenido se aisló por filtración al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro. El producto se recrystalizó por par de disolventes MeOH:H<sub>2</sub>O.

**Rf:** 0.52 (Sistema V). **Pf:** 124.6–125.0 °C

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

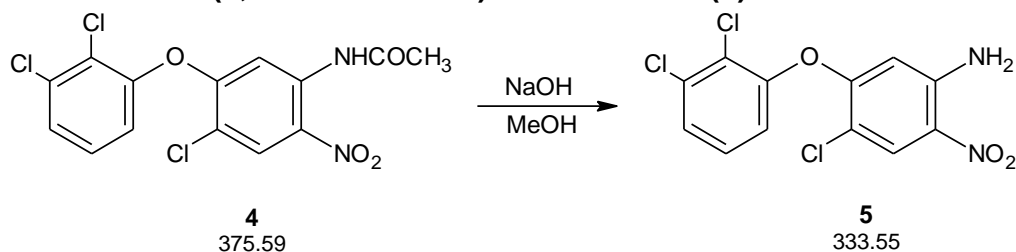


En un matraz bola de 250 mL, equipado con una barra de agitación magnética, se disolvieron 20.17 g. de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**3**) usando DMF. Por otro lado en un matraz bola de 100 mL también equipado con barra de agitación magnética, se disolvieron 13.20 g. (1.1 equivalentes) de 2,3-diclorofenol usando DMF. Una vez disuelto el 2,3-diclorofenol se agregaron en este mismo matraz 16.8 g. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 equivalentes) y se mantuvo en agitación vigorosa por 10 min.

Se transfirió el contenido del matraz con el 2,3-diclorofenol al matraz conteniendo la acetamida (**3**), asegurando una transferencia completa haciendo uso de DMF. Se adaptó una columna Vigreux y un sistema de vacío (150-200 mmHg) al matraz con la mezcla de reacción. Se calentó a 80°C durante 4 h. Se retiró el sistema de vacío y se dejó agitando por 12 h. bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se monitoreó el consumo completo de la materia prima (**3**) por CCF (Sistema II). Se retiró toda la DMF posible por destilación a presión reducida. El líquido restante se vertió en hielo lentamente y con agitación vigorosa. Se mantuvo en agitación hasta obtener un sólido de partícula uniforme. El sólido obtenido se separó al vacío. El producto se purificó por recrystalización por par de disolventes (tolueno-EtOH, 80:20).

**Rf:** 0.61 (Sistema IV). **Pf:** 160.5 – 161.4 °C.

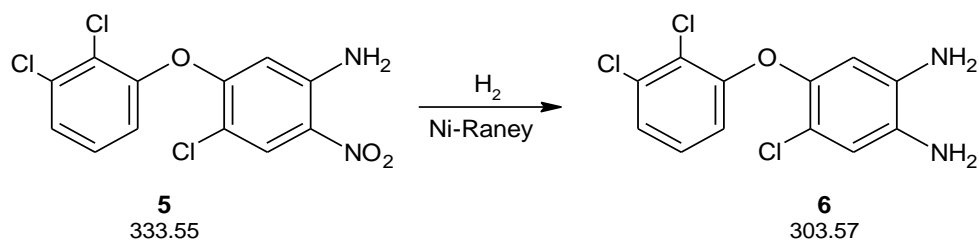
## 11.2.4. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (5)



En un matraz bola de 250 mL se suspendieron 23.297 g (0.0620 mol) de *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (**4**) en 230 mL de metanol (1:10 p/v). Se adicionaron 3.72 g (1.5 equivalentes) de NaOH previamente disueltos en la menor cantidad posible de H<sub>2</sub>O. Se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación constante durante 1 hora. Se monitoreó el consumo completo de la materia prima por CCF (Sistema II). Se concentró a presión reducida hasta obtener un sólido naranja. Se agregó agua con hielo y se agitó hasta obtener un sólido de partícula uniforme. El sólido se separó al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro. El producto se purificó por recristalización por par de disolventes (tolueno-EtOH, 80:20).

Rf: 0.74 (Sistema IV). Pf: 150.9–151.8 °C.

## 11.2.5. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benzeno-1,2-diamina (6)

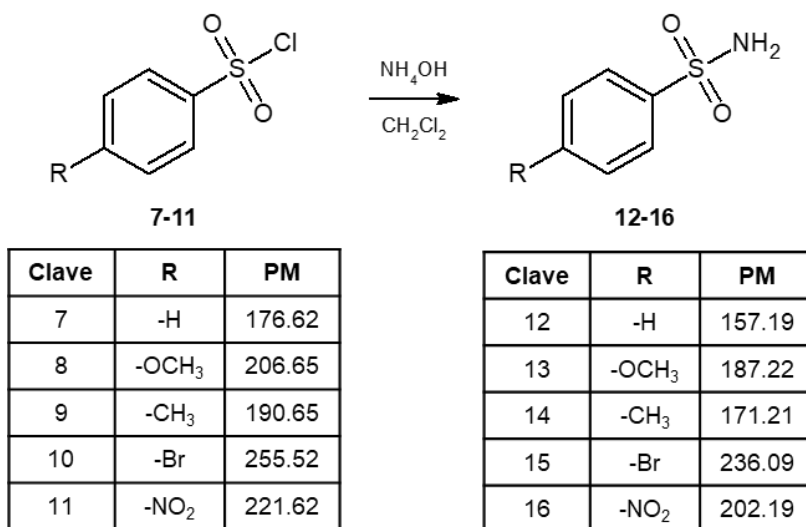


Se pesaron 15.2293 g (0.0457 mol) de 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5**) en una botella de 500 mL para hidrogenaciones. Por otro lado se pesaron 4.568 g de catalizador de Ni-Raney (30% en peso de la materia prima) y se lavaron con agua y metanol. Luego se transfirió el catalizador a la botella conteniendo la materia prima (**5**). Se agregaron 100 mL de metanol y 3 mL de acetato de etilo al cilindro. La botella se colocó en el hidrogenador y se inició la reacción cargandola con una presión de 50 lb/in<sup>2</sup> de H<sub>2</sub> y con temperatura de 60 °C. Cada vez que la presión bajó a 25 lb/in<sup>2</sup> se recargó hasta 50 lb/in<sup>2</sup>. Una vez que la presión se mantuvo constante

se detuvo la reacción y se monitoreó el consumo completo de la materia prima por CCF (Sistema I). Se filtró el contenido del cilindro por una cama de celita y el líquido obtenido se llevó a sequedad con destilación a presión reducida. El producto se usó de inmediato en la siguiente reacción.

Rf: ND Pf: ND

### 11.2.6. Procedimiento general de síntesis de las Bencensulfonamidas (12-16)



En un matraz bola de 100 mL se preparó una solución 1:10 de 0.014 mol del cloruro de bencensulfonilo apropiado (7–11) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El matraz se sumergió en un baño de hielo para llevar la solución a 0-5 °C. Se agregaron 8 equivalentes de NH<sub>4</sub>OH el cual se encontraba en una concentración de 28% en H<sub>2</sub>O. Se agitó por 30 min manteniendo la temperatura a 0-5 °C. Se llevó a temperatura ambiente y se dejó en agitación por 6 h., para dar la correspondiente bencensulfonamida. Se monitoreó el consumo de la materia prima con CCF usando el Sistema VII.

#### 11.2.6.1. Bencensulfonamida (12)

El sólido precipitado se separó al vacío y se lavó con abundante H<sub>2</sub>O hasta pH neutro.

Rf: 0.27 (Sistema VII). Pf: 153.5–153.7 °C.

11.2.6.2. 4-Metoxibencensulfonamida (13)

Se concentró el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por destilación a presión reducida. El producto se extrajo del agua usando AcOEt por triplicado, posteriormente se lavó el AcOEt con salmuera y se retiraron remanentes de H<sub>2</sub>O usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, finalmente se concentró el AcOEt con destilación a presión reducida.

**Rf:** 0.21 (Sistema VII). **Pf:** 111.9–112.4 °C.

11.2.6.3. 4-Metilbencensulfonamida (14)

Se concentró el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con destilación a presión reducida, el producto precipitado se separó al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro.

**Rf:** 0.30 (Sistema VII). **Pf:** 137.2–137.8 °C.

11.2.6.4. 4-Bromobencensulfonamida (15)

Se concentró el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con destilación a presión reducida, el producto precipitado se separó al vacío y se lavó con abundante agua hasta pH neutro.

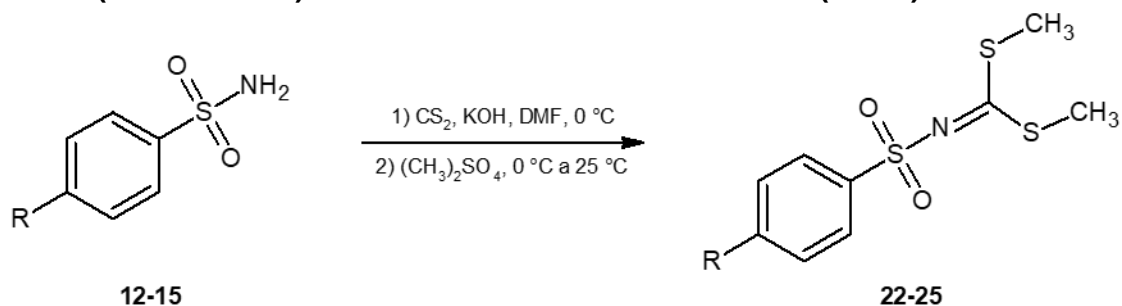
**Rf:** 0.37 (Sistema VII). **Pf:** 166.8–167.4 °C.

11.2.6.5. 4-Nitrobencensulfonamida (16)

Se concentró el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por destilación a presión reducida. El producto se extrajo del agua usando AcOEt por triplicado, posteriormente se lavó el AcOEt con salmuera y se retiraron remanentes de H<sub>2</sub>O usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, finalmente se concentró el AcOEt con destilación a presión reducida.

**Rf:** 0.30 (Sistema VII). **Pf:** 179.4–180.2 °C.

### 11.2.7. Procedimiento general de síntesis de los (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo (22-26)



| Clave | R                 | PM     |
|-------|-------------------|--------|
| 12    | -H                | 157.19 |
| 13    | -OCH <sub>3</sub> | 187.22 |
| 14    | -CH <sub>3</sub>  | 171.21 |
| 15    | -Br               | 236.09 |

| Clave | R                 | PM     |
|-------|-------------------|--------|
| 22    | -H                | 261.38 |
| 23    | -OCH <sub>3</sub> | 291.41 |
| 24    | -CH <sub>3</sub>  | 275.41 |
| 25    | -Br               | 340.28 |

En un matraz de tres bocas de 100 mL, equipado con barra de agitación magnética se pesaron 0.013 mol de la bencensulfonamida adecuada (**12–16**). Se agregaron 26 mL de DMF y se agitó hasta disolver el sólido por completo. Se pesaron 3 eq. (1.95 g) de KOH, los cuales se molieron en un mortero y posteriormente se agregaron al matraz con agitación vigorosa. Se adaptó un embudo de adición, termómetro y una columna Vigreux. La reacción se llevó a 0 °C usando un baño de hielo. Se agregaron 3 equivalentes de CS<sub>2</sub> gota a gota de manera lenta usando el embudo de adición. Se agitó por 30 min manteniendo la temperatura en 0 °C. Se verificó el consumo de la materia prima (**12–16**) con CCF usando el sistema VII. Se agregaron 2.2 equivalentes de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gota a gota de manera lenta usando el embudo de adición. Una vez acabada la adición se llevó a temperatura ambiente. Se verificó el consumo del intermediario de reacción con CCF usando el sistema IV. Se retiró toda la DMF posible destilándola a presión reducida. El remanente se vertió en H<sub>2</sub>O y se agitó hasta tener el correspondiente sólido de partícula uniforme. El sólido se separó al vacío y se lavó con abundante H<sub>2</sub>O y posteriormente MeOH.

#### 11.2.7.1. (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo (**22**)

**Rf:** 0.30 (Sistema VI). **Pf:** 104.7–106.1 °C. **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.54 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.58-7.62 (m, 2H); 7.65-7.70 (m, 1H, H-4); 7.88-7.91 (m, 2H). **RMN**

**<sup>13</sup>C:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.57 (-S-CH<sub>3</sub>); 127.10; 129.64; 133.56; 140.82; 186.69. Anexo III-**Espectros 1 y 2.**

11.2.7.2. [(4-Metoxifenil)sulfonil]carbonoditioimidato de dimetilo (23)

**Rf:** 0.23 (Sistema VI). **Pf:** 80.1–81.6 °C. **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.52 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 7.09-7.11 (m, 2H); 7.80-7.83 (m, 2H). **RMN <sup>13</sup>C:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.48 (S-CH<sub>3</sub>); 56.14 (-O-CH<sub>3</sub>); 114.76; 129.48; 132.32; 163.10; 185.49. Anexo III-**Espectros 3 y 4.**

11.2.7.3. [(4-Metilfenil)sulfonil]carbonoditioimidato de dimetilo (24)

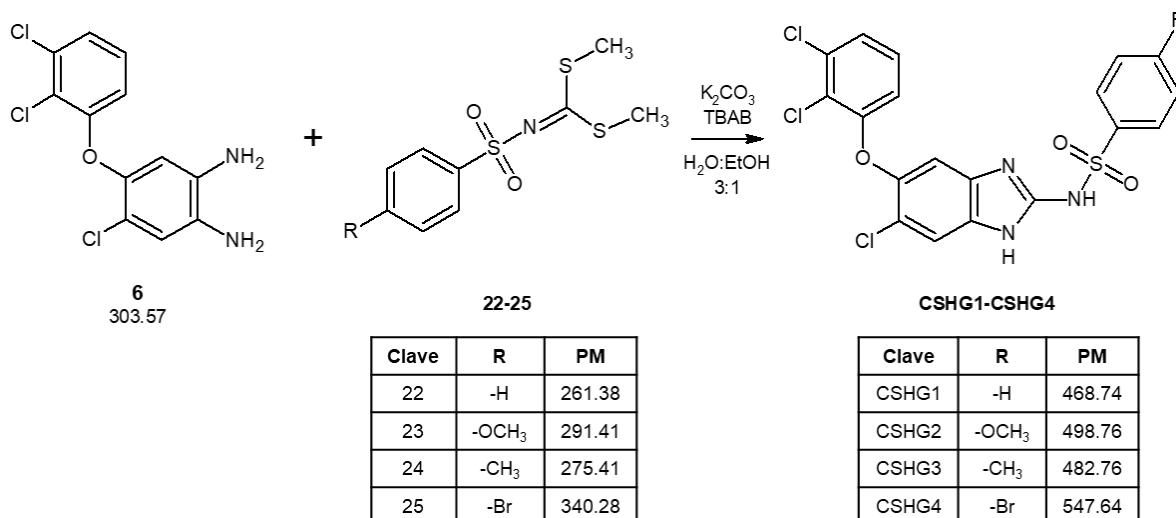
**Rf:** 0.34 (Sistema VI). **Pf:** 109.8–110.4 °C. **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.38 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.38-7.40 (d, 2H, *J* = 8.05 Hz); 7.76-7.78 (d, 2H, *J* = 8.24 Hz). **RMN <sup>13</sup>C:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.52 (S-CH<sub>3</sub>); 21.48 (-CH<sub>3</sub>); 127.21; 130.05; 137.92; 143.99; 186.13. Anexo III-**Espectros 5 y 6.**

11.2.7.4. [(4-Bromofenil)sulfonil]carbonoditioimidato de dimetilo (25)

El sólido presenta una impureza por CCF (Sistema VI), por lo que se preparó una columna de 3.5 cm de diámetro con 7 pulgadas de gel de sílice flash, el compuesto se adsorbió en la gel de sílice y se adicionó a la columna. Se eluyó usando un sistema Hex-AcOEt, 65:35 con ayuda de una bomba de aire recolectando fracciones de 12 mL. Se monitoreó el avance de la columna por CCF (Sistema VI) y el producto puro se colectó entre las fracciones 10 y 20.

**Rf:** 0.41 (Sistema VI). **Pf:** 106.5–107.3 °C. **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 2.55 (s, 6H, -S-CH<sub>3</sub>); 7.81 (s, 4H, H-2,3,5,6). **RMN <sup>13</sup>C:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 16.65 (S-CH<sub>3</sub>); 127.47; 129.17; 132.75; 140.07; 187.58. Anexo III-**Espectros 7 y 8.**

### 11.2.8. Procedimiento general de síntesis de las *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]bencensulfonamidas (CSHG1-CSHG5)



En matraz bola de una boca de 50 mL, equipado con barra de agitación magnética se pesaron 0.0053 mol (1.608 g) de 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina (**6**), 1.5 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.1 eq. de TBAB. Se agregaron 21.2 mL de H<sub>2</sub>O/EtOH (3:1). Se calentó a 40 °C y una vez alcanzada la temperatura, se agregaron con agitación constante 1.1 eq. del (fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo adecuado (**22–25**). Se calentó a reflujo y se monitoreó el consumo de las materias primas (**6**, **22–25**) con CCF usando el sistema II. Una vez observada la formación de producto por CCF, se separó al vacío el correspondiente sólido obtenido.

El sólido obtenido se transfirió a un vaso de precipitados de 50 mL y se agregó etanol. Se mantuvo con agitación hasta la aparición de un producto de partícula uniforme el cual se separó al vacío y se lavó con abundante EtOH frío.

#### 11.2.8.1. *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG1)

**Rf:** 0.70 (Sistema II). **Pf:** 313.0–313.8 °C. **Rendimiento:** 25.84%. **Análisis elemental:** C: 48.19%, H: 2.11%, N: 8.93%, S: 6.63% (Teórico: C: 48.68%, H: 2.58%, N: 8.96%, S: 6.84%). **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 6.76-6.78 (dd, 1H, H-20, *J* = 1.15, 8.32 Hz); 7.05 (s, 1H, H-9); 7.25-7.29 (t, 1H, H-19, *J* = 8.24 Hz);



7.38-7.40 (dd, 1H, H-18,  $J = 1.17, 8.12$  Hz); 7.44 (s, 1H, H-6); 7.49-7.54 (m, 3H, H-24,25,26); 7.85-7.87 (d, 2H, H-23,27,  $J = 8.16$  Hz); 12.07 (s, 2H, H-1,10). **RMN  $^{13}\text{C}$** : (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) ppm: 104.69 (C-9); 112.81 (C-6); 116.60 (C-20); 119.00 (C-7); 121.90 (C-16); 125.35 (C-18); 125.97 (C-23,27); 128.11 (C-4); 129.28 (C-25); 129.34 (C-19); 130.12 (C-5); 132.05 (C-24,26); 133.35 (C-17); 144.22 (C-22); 146.09 (C-8); 151.43 (C-2); 154.45 (C-15). Anexo III–**Espectros 9 y 10**.

11.2.8.2. *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (**CSHG2**).

**Rf**: 0.68 (Sistema II). **Pf**: 298.0–298.9 °C. **Rendimiento**: 13.43%. **Análisis elemental**: C: 48.62%, H: 2.12%, N: 8.90%, S: 6.28% (Teórico: C: 48.16%, H: 2.83%, N: 8.42%, S: 6.43%). **RMN  $^1\text{H}$** : (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) ppm: 3.78 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 6.76-6.78 (dd, 1H, H-20,  $J = 1.21, 8.34$  Hz); 7.01-7.04 (d, 2H, H-24,26,  $J = 9.67$  Hz); 7.04 (s, 1H, H-9); 7.25-7.29 (t, 1H, H-19,  $J = 8.25$  Hz); 7.38-7.40 (dd, 1H, H-18,  $J = 1.23, 8.13$  Hz); 7.43 (s, 1H, H-6); 7.78-7.80 (d, 2H, H-23,27,  $J = 8.87$  Hz); 12.02 (s, 2H, H-1,10). **RMN  $^{13}\text{C}$** : (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) ppm: 55.97 (-O-CH<sub>3</sub>); 104.57 (C-9); 112.71 (C-6); 114.46 (C-24,26); 116.65 (C-20); 119.01 (C-4); 121.94 (C-17); 125.39 (C-18); 127.84 (C-8); 128.04 (C-23,27); 129.29 (C-19); 129.86 (C-5); 133.36 (C-16); 136.10 (C-22); 146.14 (C-7); 151.16 (C-2); 154.42 (C-15); 162.04 (C-25). Anexo III–**Espectros 15 y 16**.

11.2.8.3. *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (**CSHG3**).

**Rf**: 0.62 (Sistema II). **Pf**: 334.2–335.2 °C. **Rendimiento**: 72.36%. **Análisis elemental**: C: 49.30%, H: 2.50%, N: 8.68%, S: 6.54% (Teórico: C: 49.76%, H: 2.92%, N: 8.70%, S: 6.64%). **RMN  $^1\text{H}$** : (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) ppm: 2.31 (s, 3H, H-30); 6.74-6.77 (dd, 1H, H-20,  $J = 1.17, 8.33$  Hz); 7.04 (s, 1H, H-9); 7.22-7.32 (m, 3H, H-19, 24, 26); 7.35-7.40 (dd, 1H, H-18,  $J = 1.21, 8.13$  Hz); 7.42 (s, 1H, H-6); 7.69-7.77 (d, 2H, H-23, 27,  $J = 8.19$  Hz); 11.99 (s, 2H, H-1, 10). **RMN  $^{13}\text{C}$** : (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) ppm: 21.33 (C-30); 104.67 (C-9); 112.72 (C-6); 116.53 (C-20); 118.81 (C-8); 121.86 (C-10); 125.30 (C-18); 126.05 (C-23, 27); 128.40 (C-4); 129.27 (C-19);

129.70 (C-24,26); 130.40 (C-5); 133.34 (C-15); 141.53 (C-22); 142.04 (C-25); 145.93 (C-7); 151.62 (C-2); 154.51 (C-17). Anexo III–Espectros 21 y 22.

11.2.8.4. 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4)

**Rf:** 0.66 (Sistema II). **Pf:** 290.5–291.3 °C. **Rendimiento:** 13.78%. **Análisis elemental:** C: 39.73%, H: 1.74%, N: 7.33%, S: 5.22% (Teórico: C: 41.67%, H: 2.02%, N: 7.67%, S: 5.86%). **RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 6.66-6.68 (d, 1H, H-20, *J* = 8.33 Hz); 6.99 (s, 1H, H-9); 7.22-7.26 (t, 1H, H-19, *J* = 8.24 Hz); 7.34-7.36 (m, 2H, H-6,18); 7.64-7.66 (d, 2H, H-24,26, *J* = 8.52 Hz); 7.76-7.78 (d, 2H, H-23,27, *J* = 8.56 Hz). **RMN <sup>13</sup>C:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) ppm: 105.10 (C-9); 112.56 (C-6); 115.88 (C-20); 117.50 (C-4); 121.38 (C-16); 124.77 (C-18); 124.80 (C-25); 128.37 (C-24, 26); 129.15 (C-19); 131.86 (C-8); 131.95 (C-23, 27); 133.09 (C-7); 133.20 (C-5); 144.63 (C-22); 154.02 (C-2); 154.98 (C-17). Anexo III–Espectros 27 y 28.

## **12. ANEXO II-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **12.1. Técnicas experimentales**

#### **12.1.1. Determinación de la actividad inhibitoria de la TcTIM**

Se incubó la TcTIM recombinante a una concentración de 5 µg/mL a 36 °C en una solución amortiguadora a pH 7.4 compuesta por trietanolamina 100 mM y EDTA 10 mM (buffer TE) junto con el compuesto a evaluar disuelto en DMSO al 10%, en una concentración final de éste último 200 µM. Después de 2 h., se tomó 1 µL de esta solución y se añadió a la mezcla de reacción para el ensayo de actividad (solución TE, NADH 0.2 mM, G3P 1 mM y 0.9 UI de α-GPDH). Se cuantificó la disminución de la absorbancia en la celda de la reacción a 240 nm en un espectrofotómetro y se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con el control negativo (la enzima libre de inhibidores). Se hicieron controles usando al sustrato solo y a la enzima con DMSO en donde no se afectó la actividad de la enzima utilizada en la determinación indirecta.

#### **12.1.2. Determinación de la actividad tripanocida**

Epimastigotes de las cepas Y1 (Referencia), ITRI y TR (aislados de *T. dimidata* de Chiapas) de *T. cruzi* se utilizaron en este estudio. Los epimastigotes se hicieron crecer en medio líquido LIT a 28 °C. Los experimentos se llevaron a cabo usando placas de 96 pozos conteniendo  $1 \times 10^5$  epimastigotes/mL. Se prepararon soluciones *stock* (10 mg/mL) de cada compuesto y fármaco de referencia usando DMSO, las cuales posteriormente se diluyeron a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 µg/mL usando medio líquido LIT. Las diferentes mezclas y sus concentraciones correspondientes se agregaron a los pozos y las placas fueron incubadas a 28 °C por 48 h. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Se usaron controles sin la presencia de compuesto y con la presencia únicamente de DMSO en donde se observó que este no tiene efecto en la actividad de los parásitos.

Después de la incubación se colocó a cada pozo 20 µL de una solución de resazurina 2.5 mM, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia, 535 nm

excitación y 590 nm emisión. Se calculó el porcentaje de viabilidad de los parásitos y se determinó la  $CI_{50}$  mediante análisis Probit.

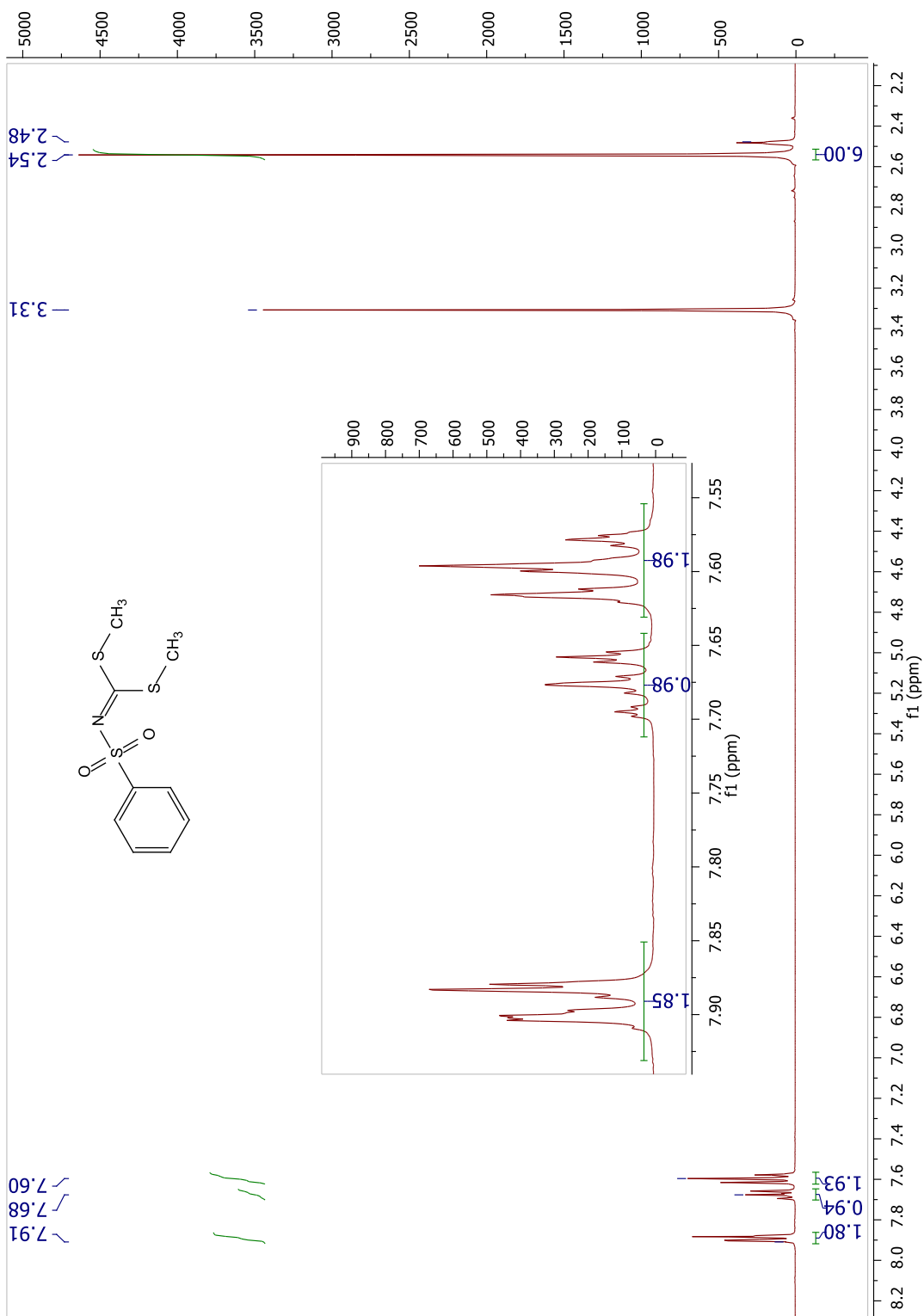
### **12.1.3. Determinación de la actividad citotóxica**

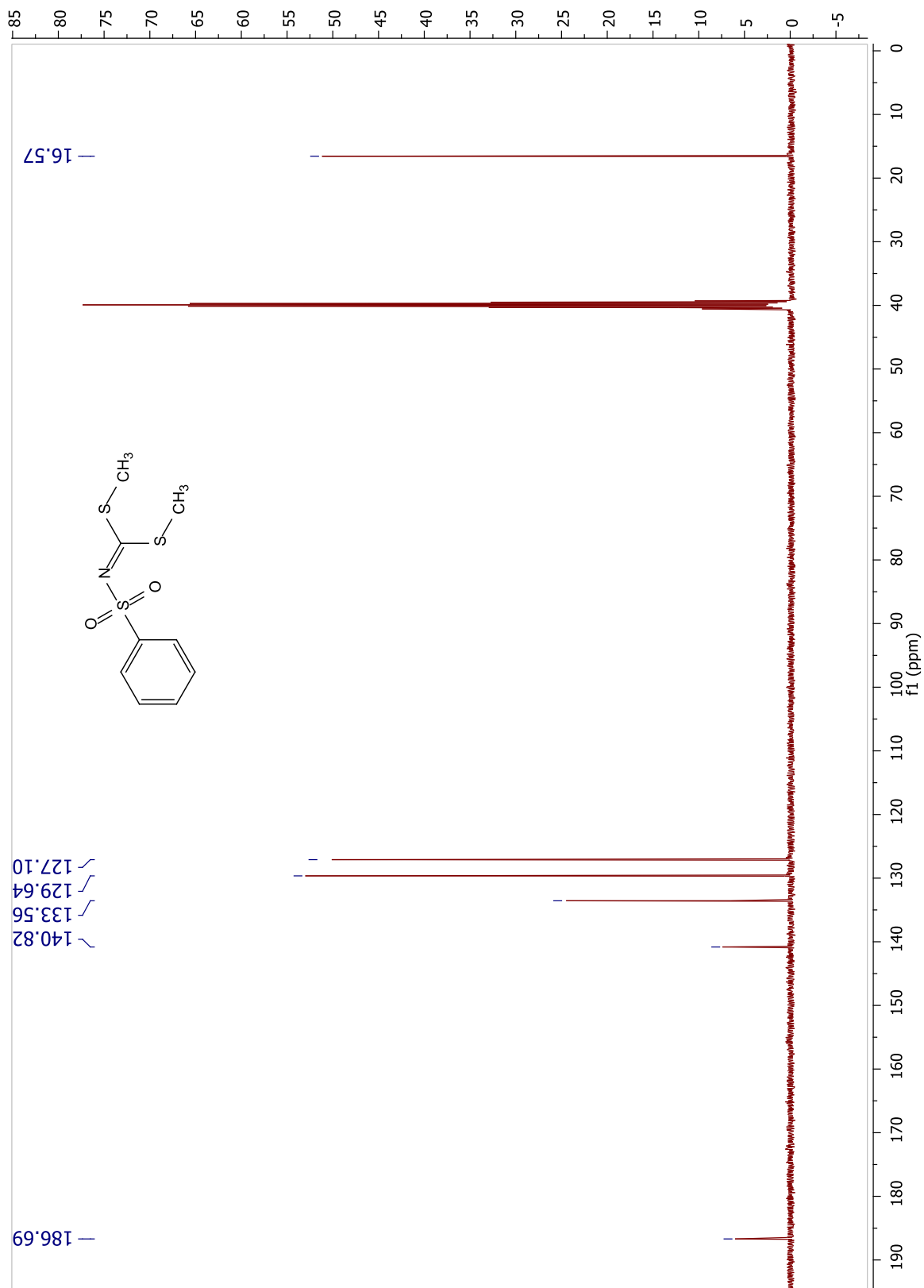
La citotoxicidad de los derivados bencimidazólicos se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Denizot y Lang<sup>36</sup>, con algunas modificaciones. A partir de una caja de cultivo T-25 con un 100% de confluencia de macrófagos de ratón de la línea celular J774.2 se realizaron pases seriados. Se colocaron  $5 \times 10^5$  células/mL en cajas de 96 pozos y cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% SFB y se incubaron con los compuestos en el intervalo de concentraciones evaluado en la actividad tripanocida con un volumen final de 200  $\mu$ L por 48h a 37 °C/5%  $CO_2$ . Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado cada uno.

Como control negativo se incluyeron células en presencia de la concentración máxima de DMSO (0.1%), en donde se observó que éste no tiene efecto en la viabilidad celular, y Milt como control positivo. Después de la incubación se colocó a cada pozo 20  $\mu$ L de una solución de resazurina 2.5 mM, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia, 535 nm excitación y 590 nm emisión. Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células y se determinó la  $CC_{50}$  mediante análisis Probit.

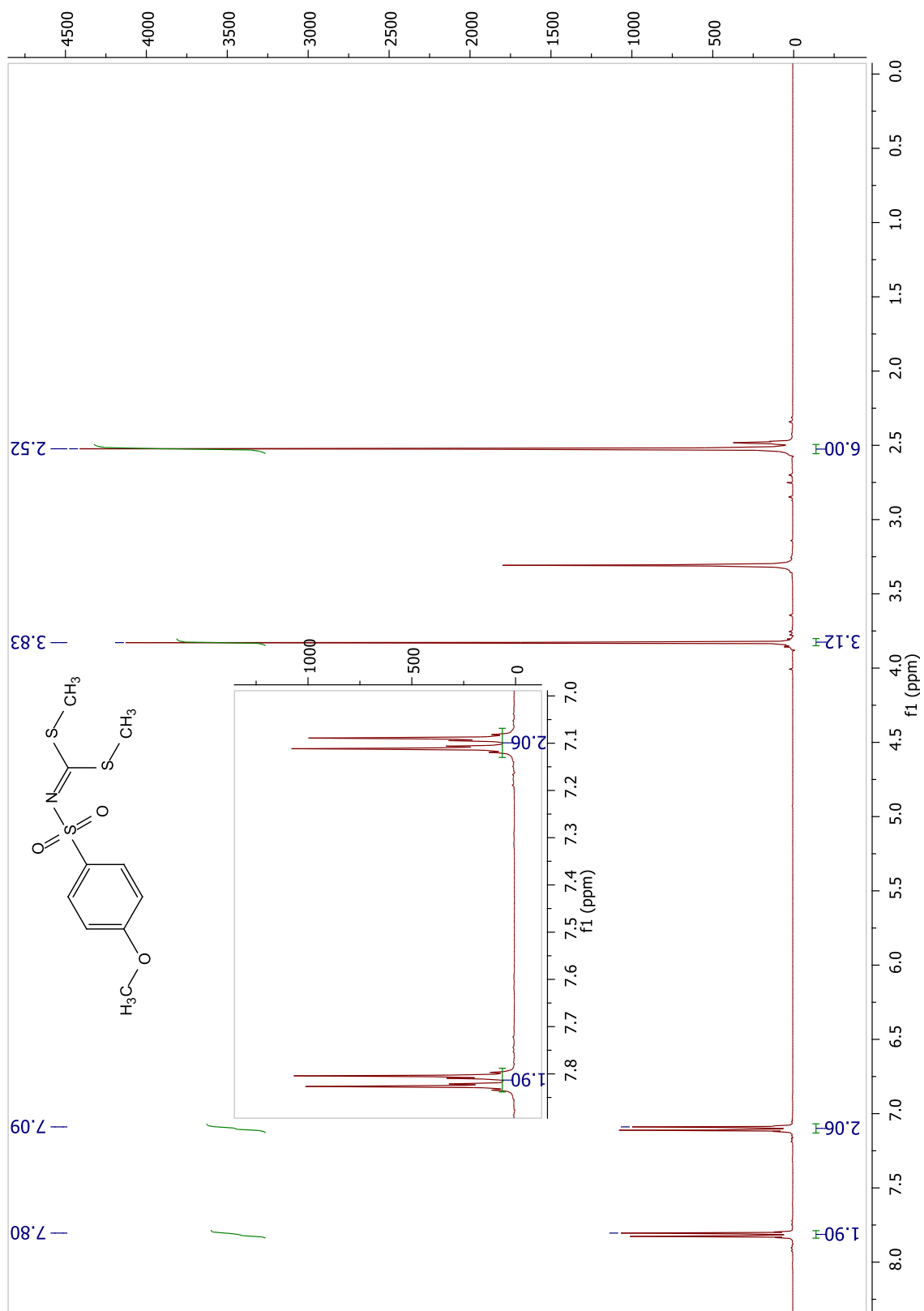
## 13. ANEXO III-ESPECTROS

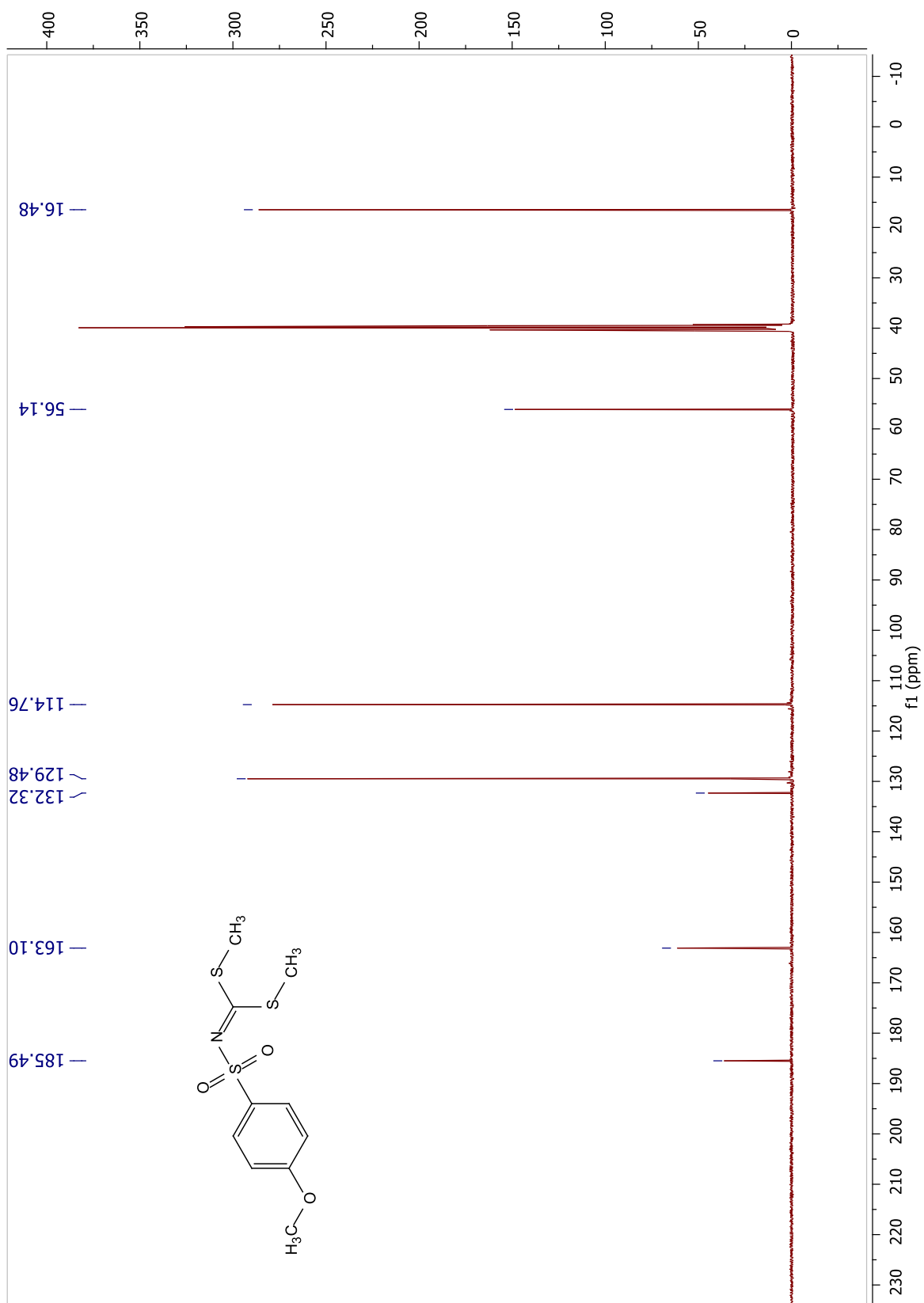
## 13.1. (Fenilsulfonil)carbonoditioimidato de dimetilo (22)

Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): (Fenilsulfonil)ditoimidocarbonato de dimetilo (22).



Espectro 2. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz): (Fenilsulfonil)ditiimidocarbonato de dimetilo (22).

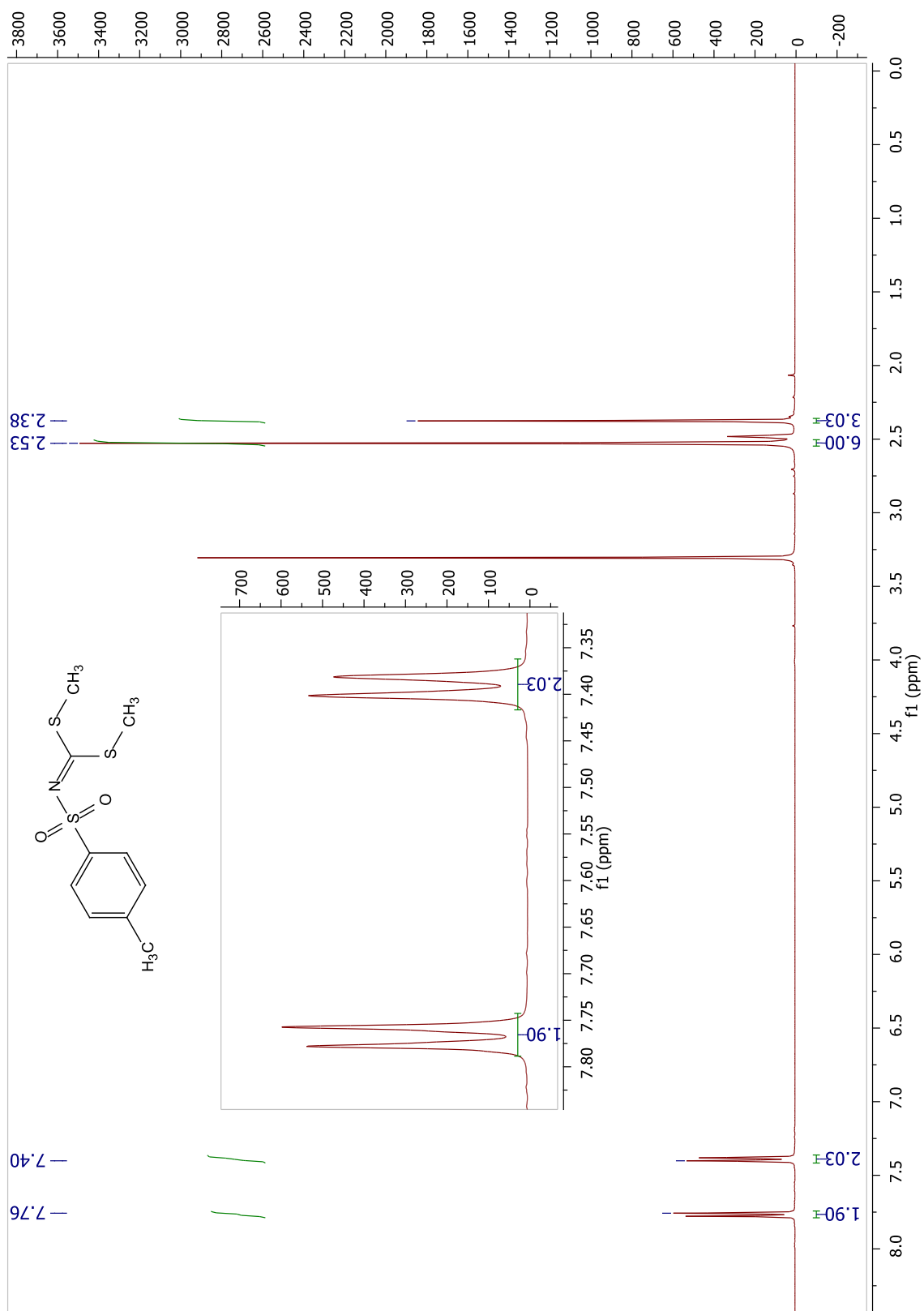
**13.2. [(4-Metoxifenil)sulfoni]carbonoditiimidato de dimetilo (23)****Espectro 3.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz): [(4-Metoxifenil)sulfoni]carbonoditiimidato de dimetilo (23).

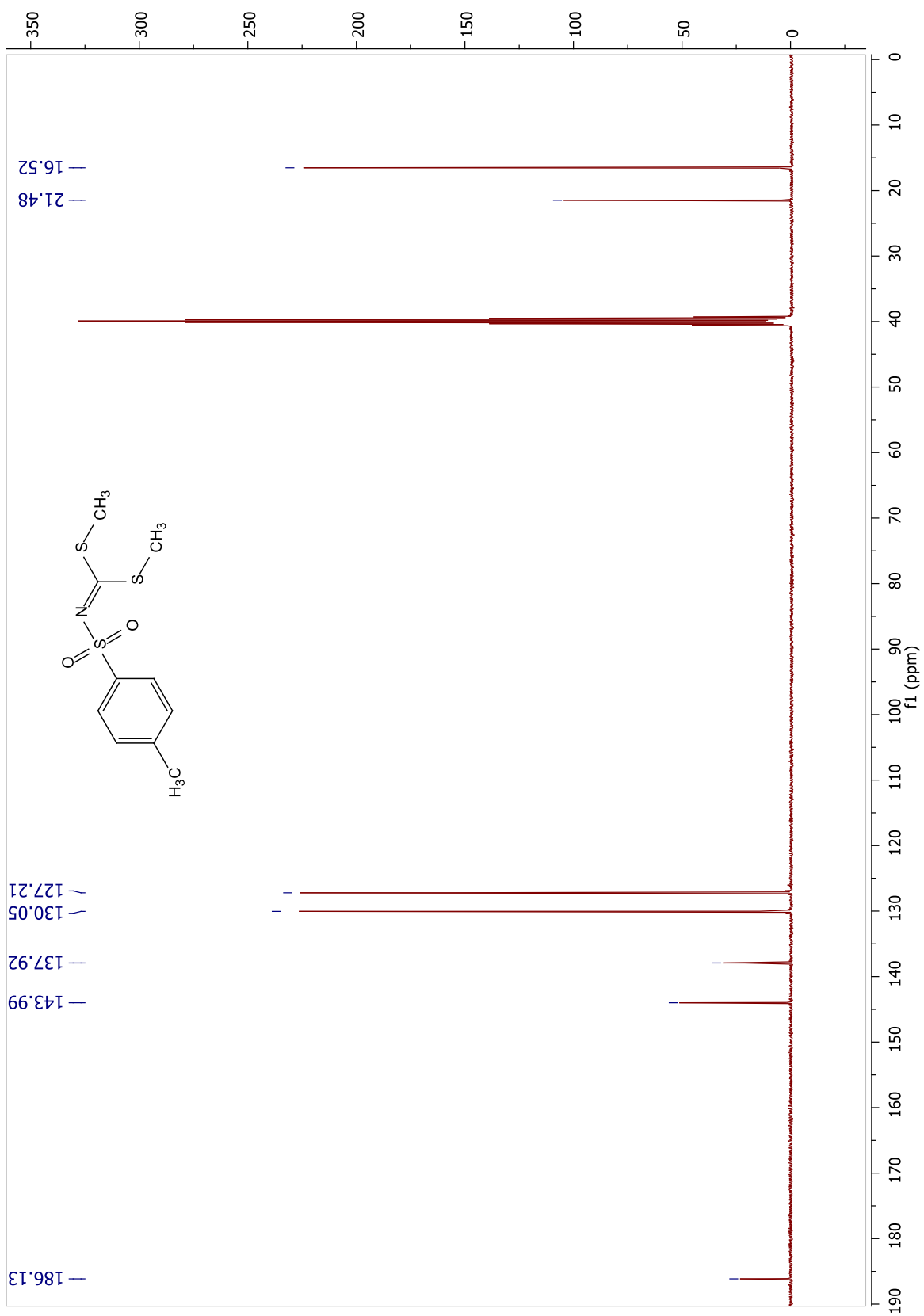


**Espectro 4.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz): [(4-Metoxifenil)sulfonil]carbonoditioimidato de dimetilo (23).

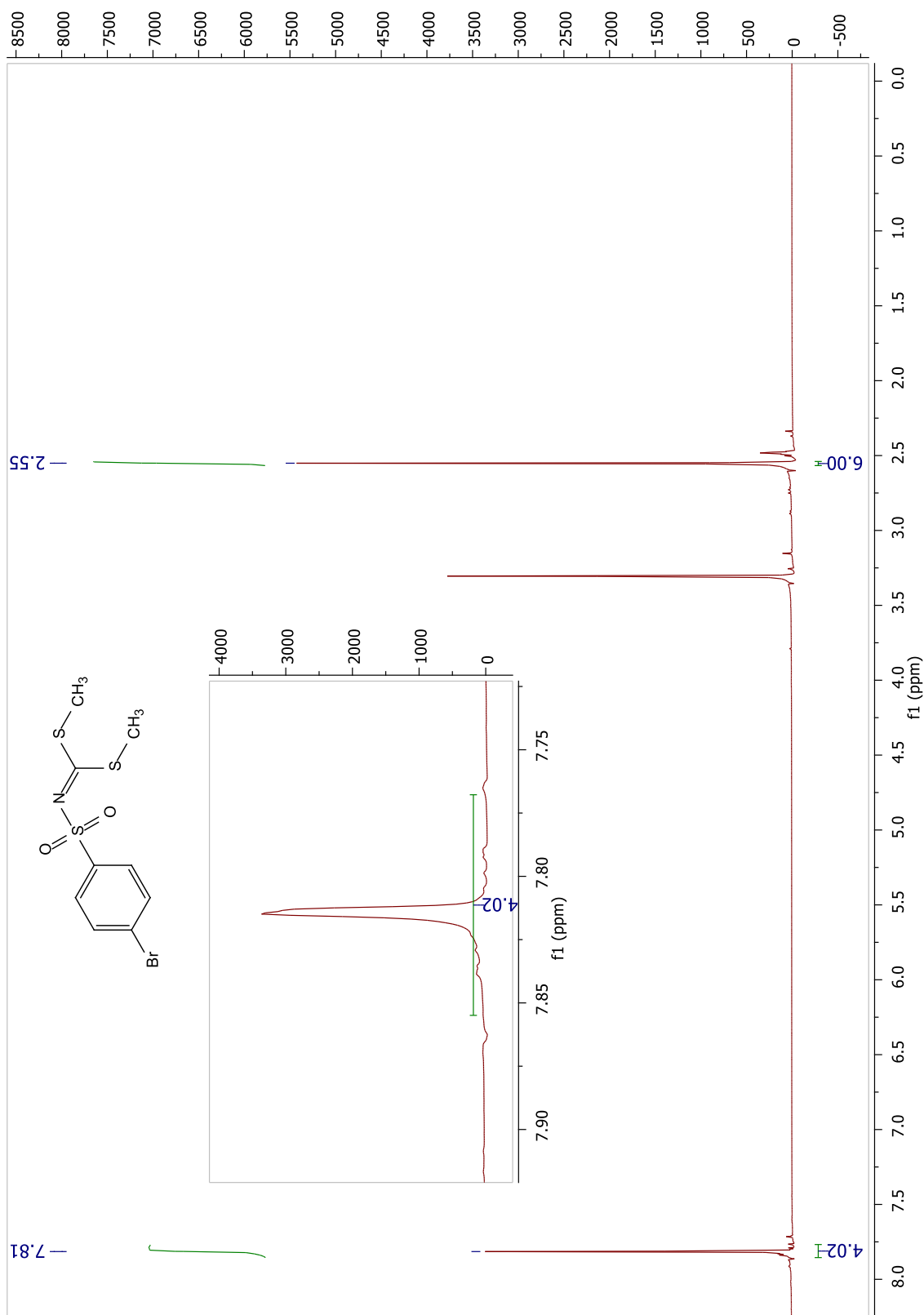


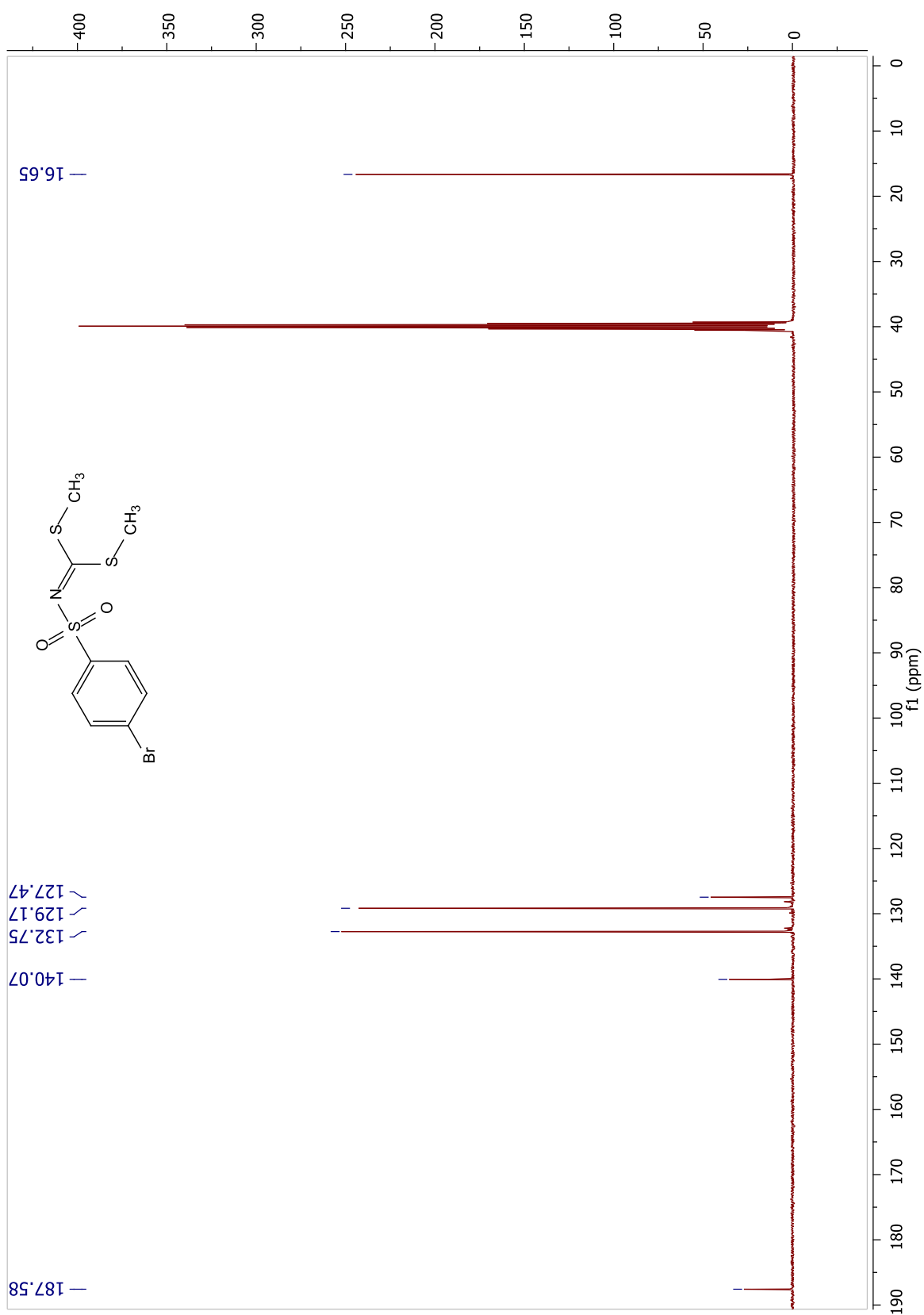
## 13.3. [(4-Metilfenil)sulfonil]carbonoditioimidato de dimetilo (24)

Espectro 5. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): [(4-Metilfenil)sulfonil]ditiimidocarbonato de dimetilo (24).



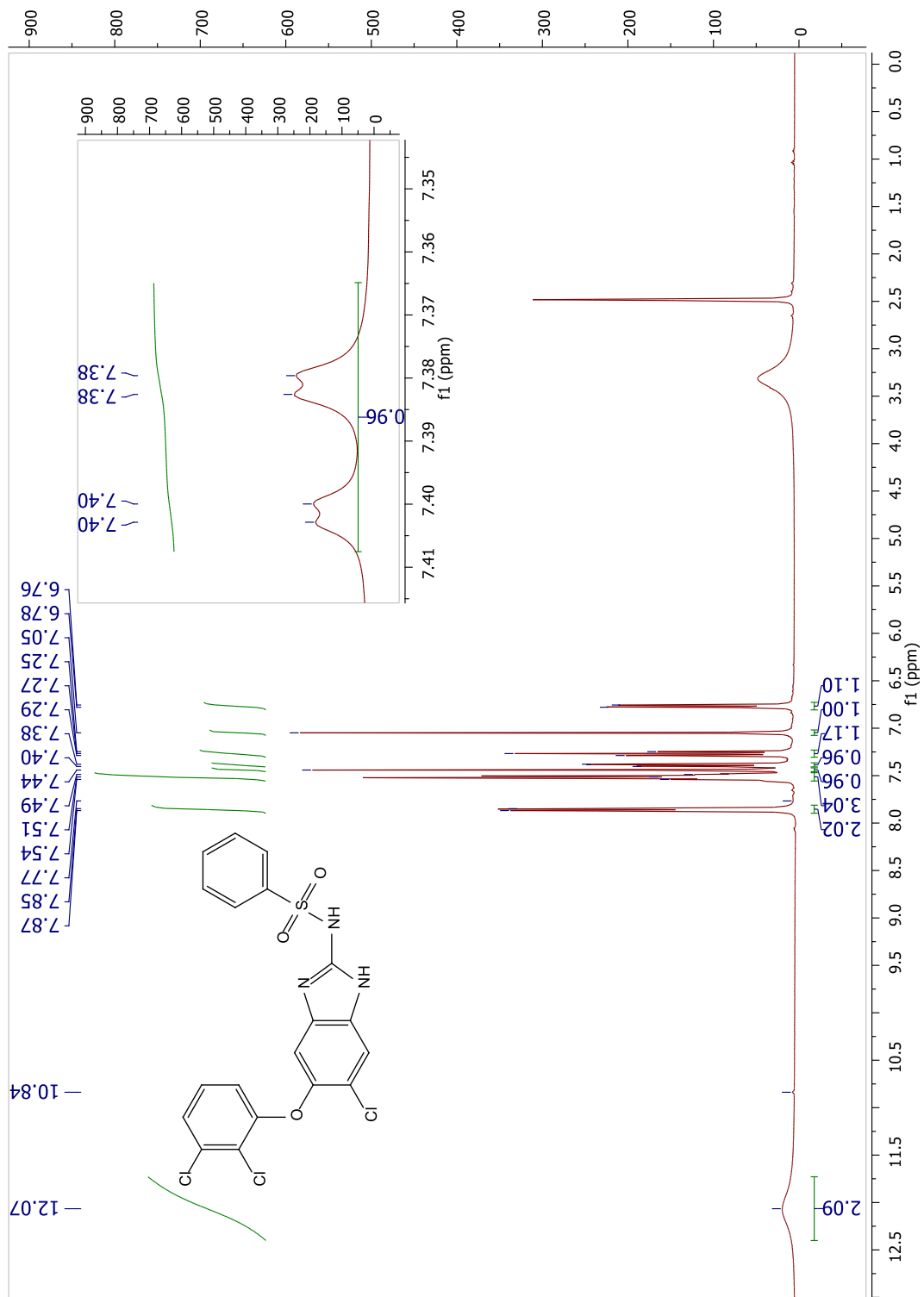
**Espectro 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz): [(4-Metilfenil)sulfonil]ditiimidocarbonato de dimetilo (24).

**13.4. [(4-Bromofenil)sulfonil]carbonoditiimidato de dimetilo (25)****Espectro 7.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz): [(4-Bromofenil)sulfonil]carbonoditiimidato de dimetilo (25).

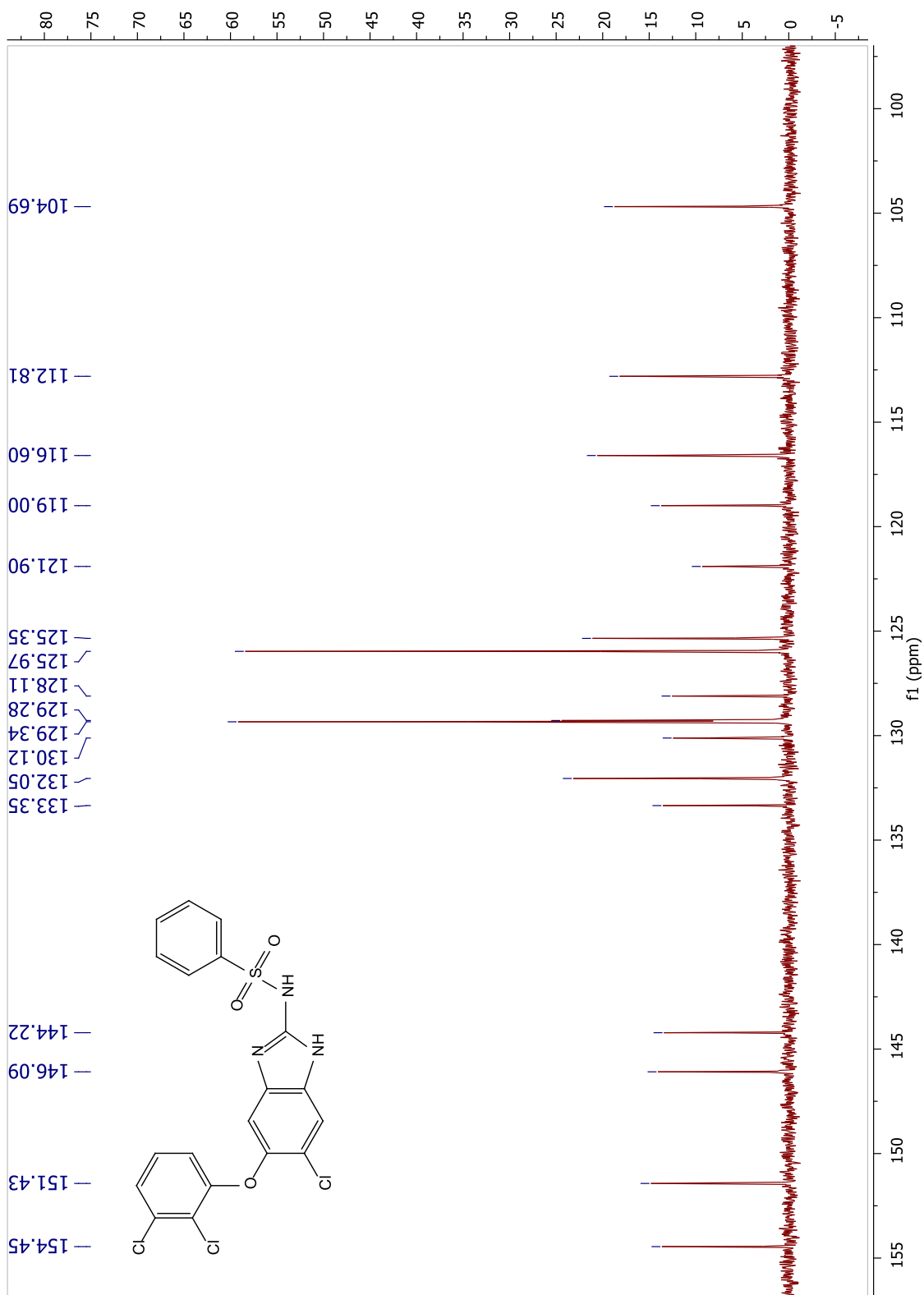


**Espectro 8.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz): [(4-Bromofenil)sulfonyl]carbonoditioimidato de dimetilo (25).

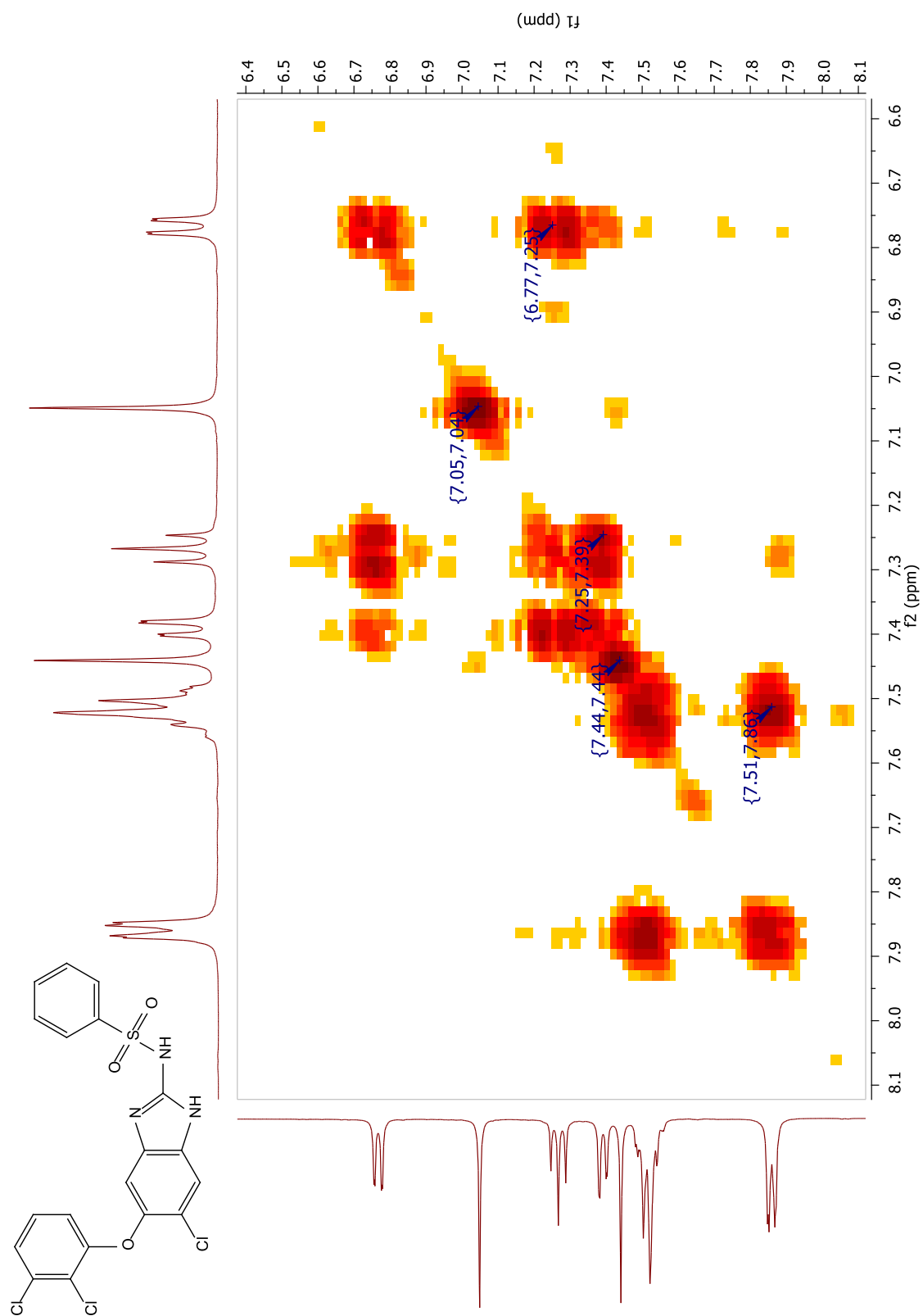
**13.5. N-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG1)**



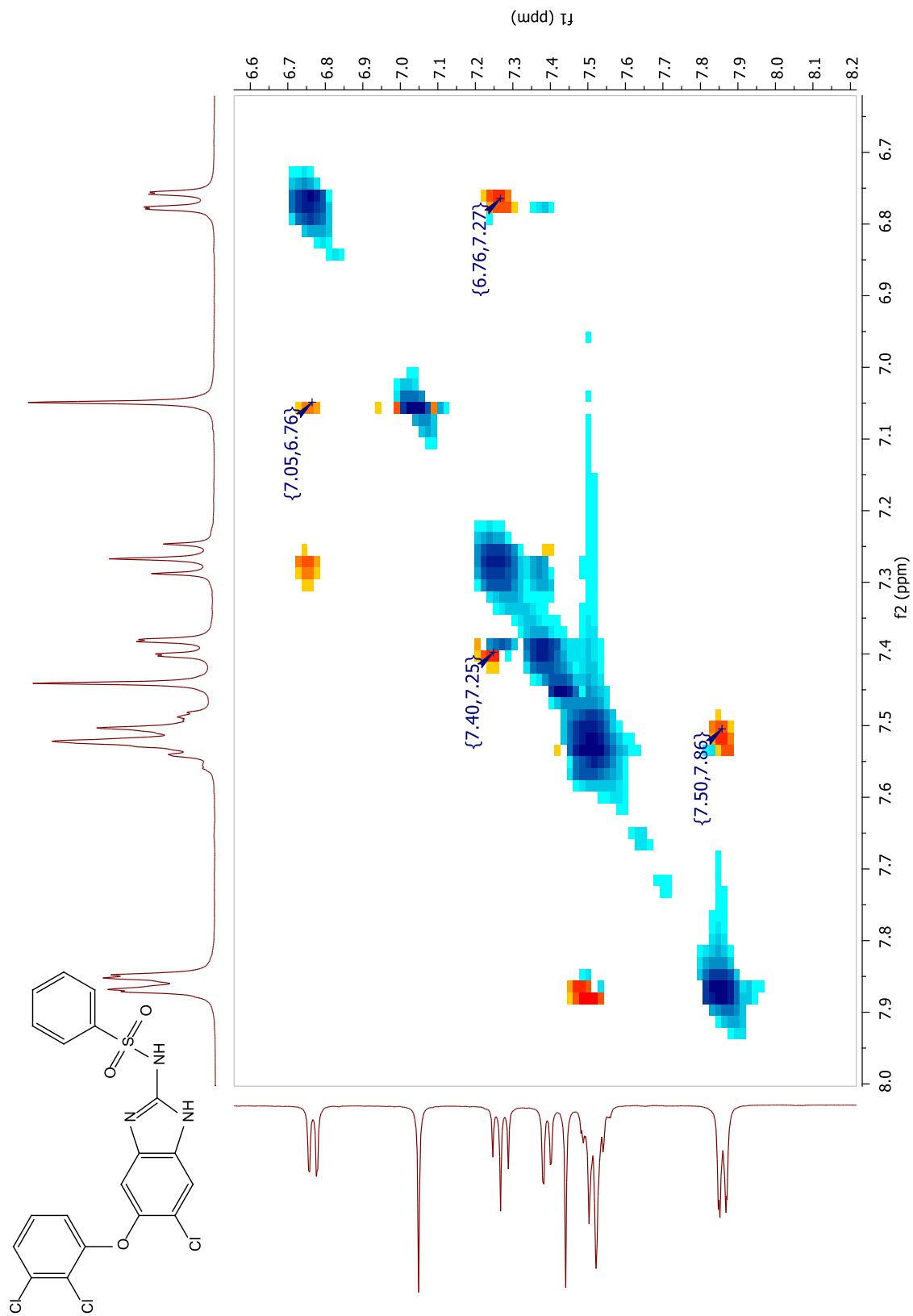
**Espectro 9.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG1).



**Espectro 10.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG1).

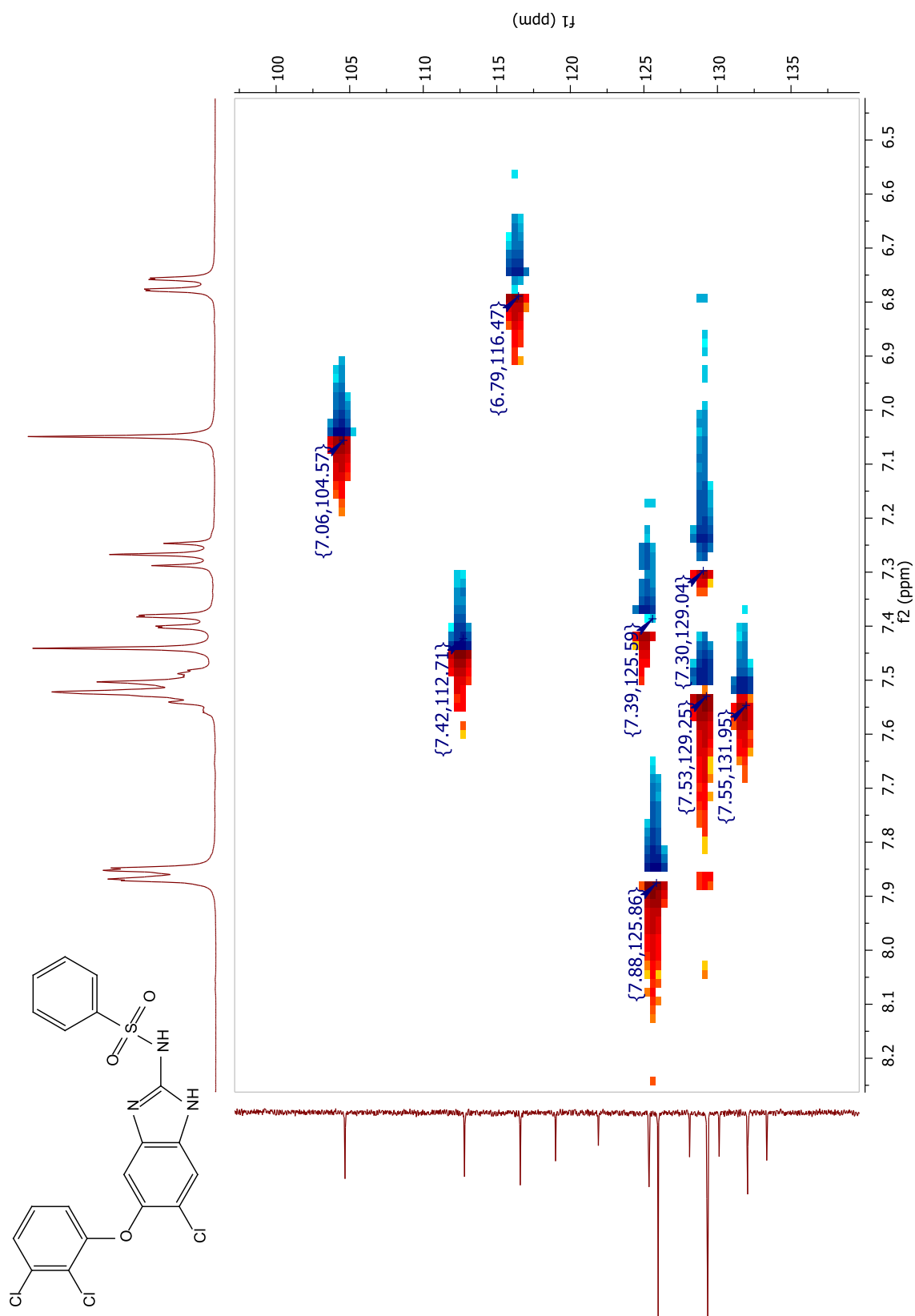


**Espectro 11.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz). Experimento COSY de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG1**).

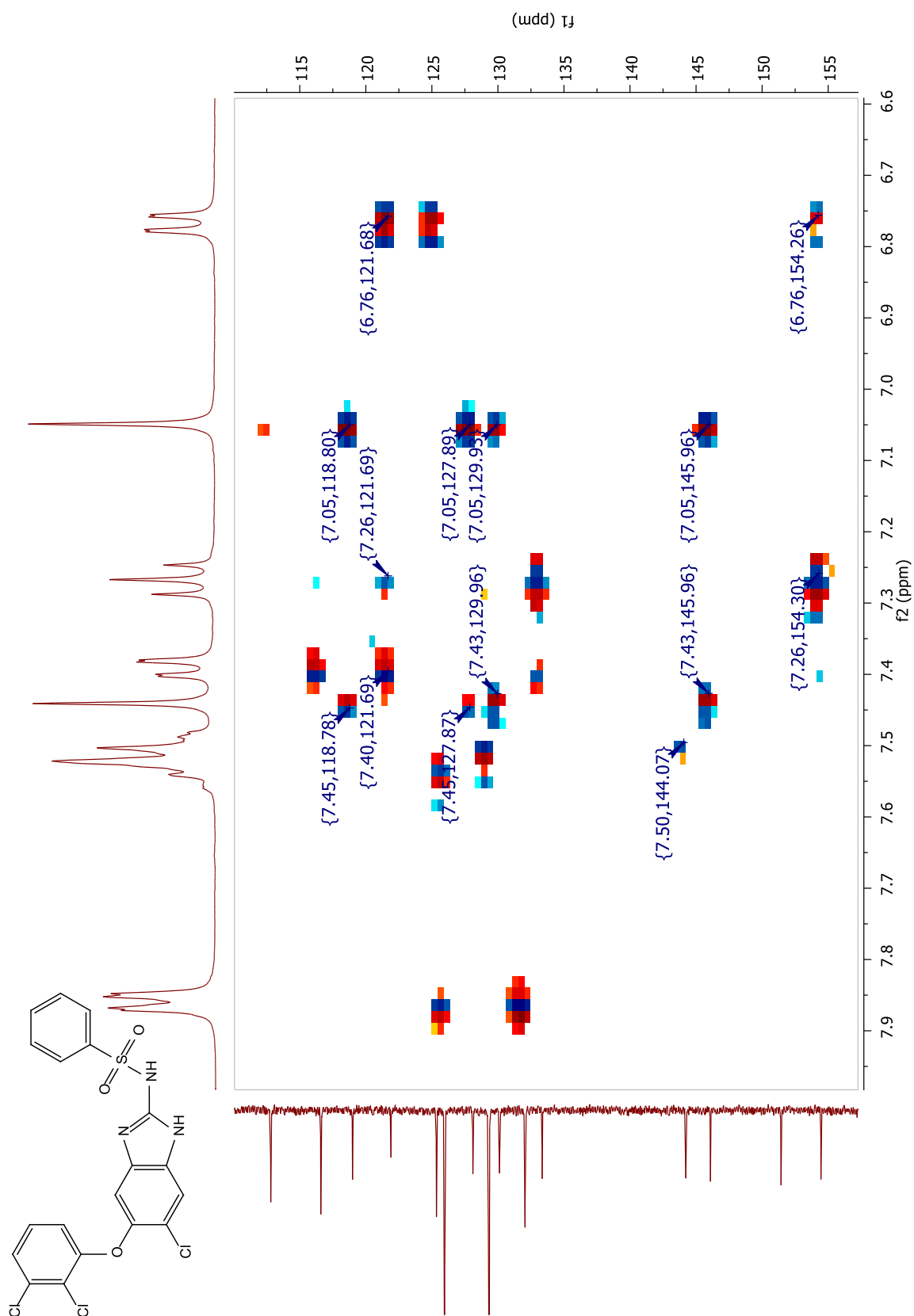


**Espectro 12.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz). Experimento NOESY de la *N*-[6-Chloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG1**).



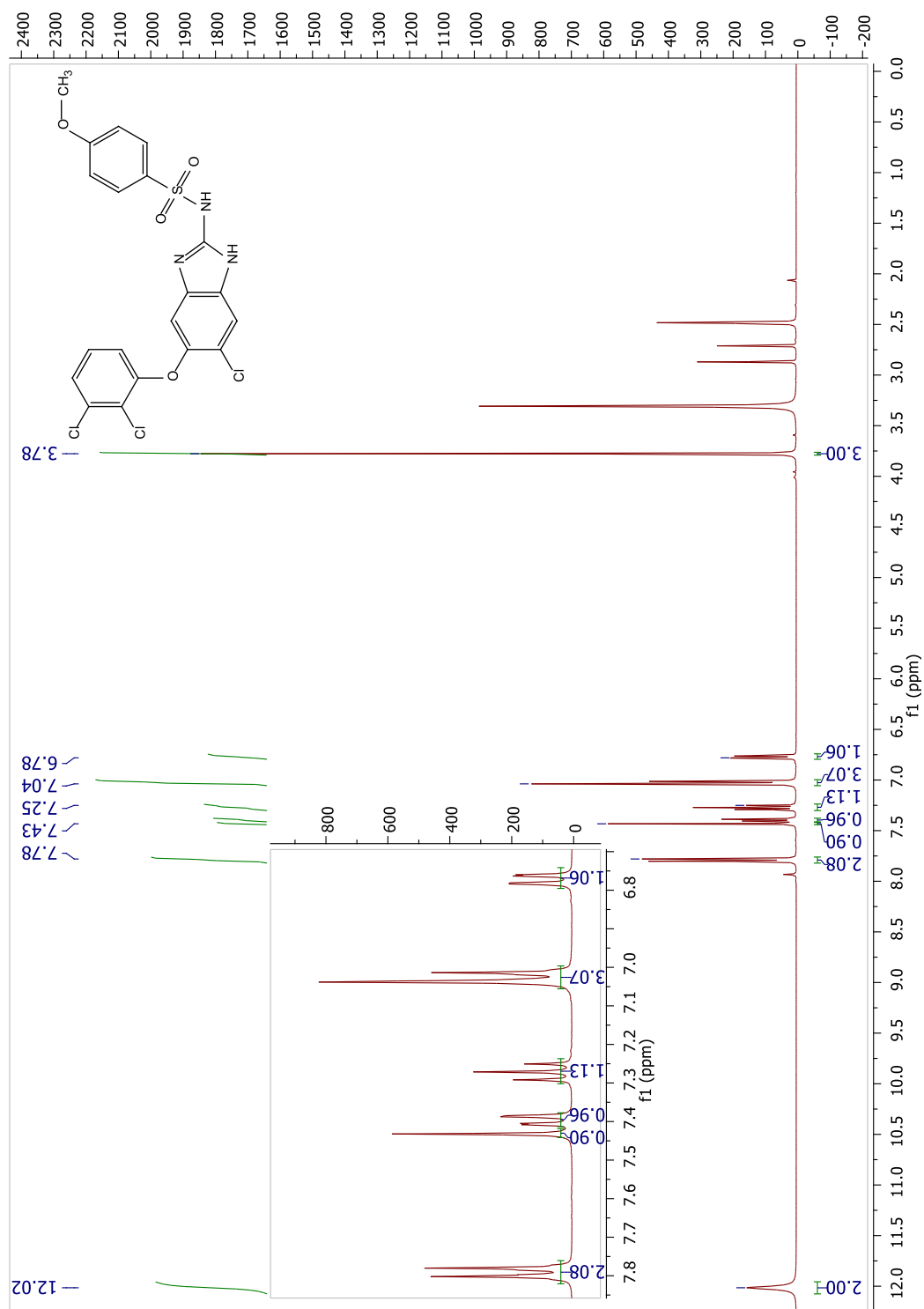


**Espectro 13.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento HSQC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG1**).

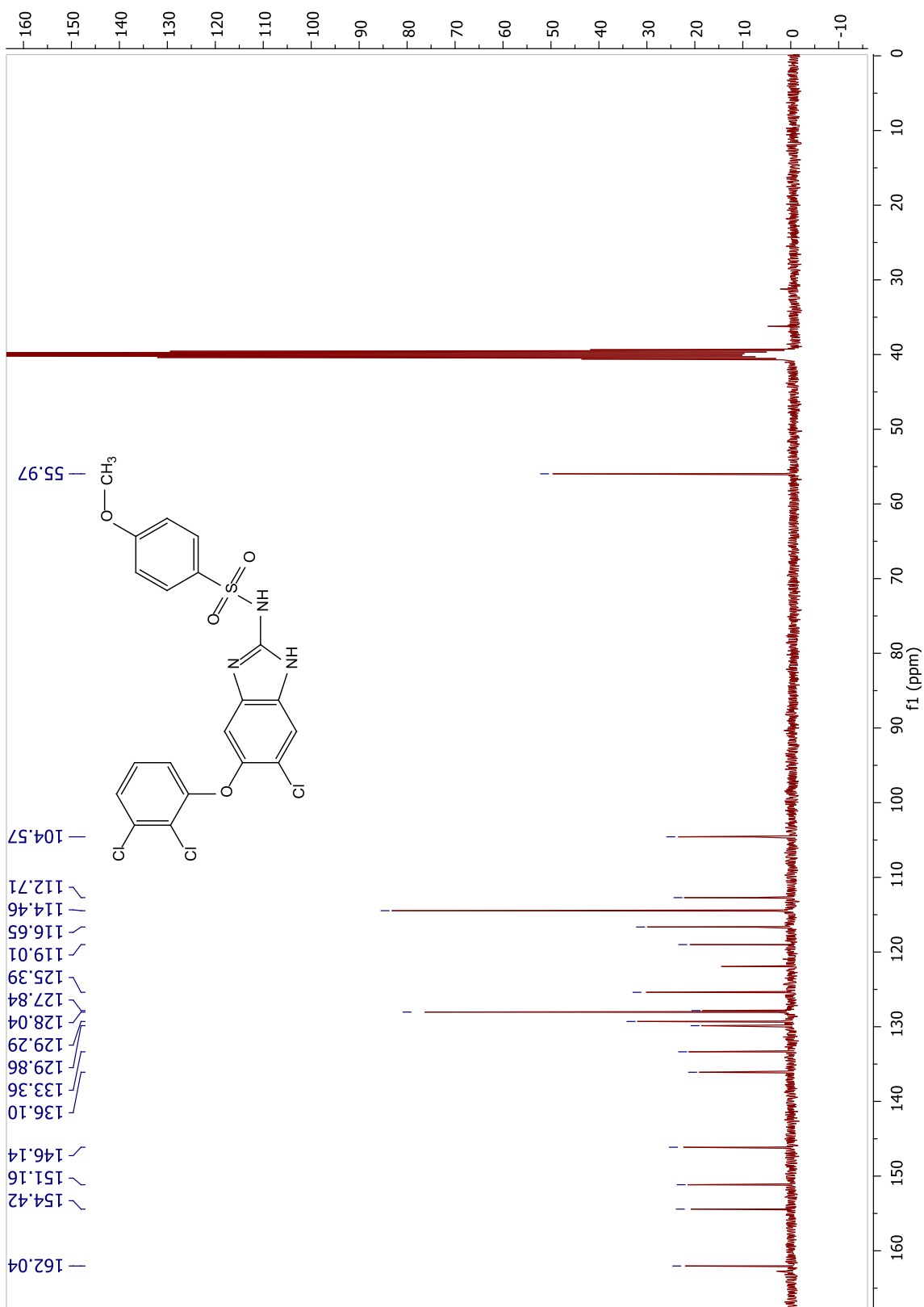


**Espectro 14.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz), RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz). Experimento HMBC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG1**).

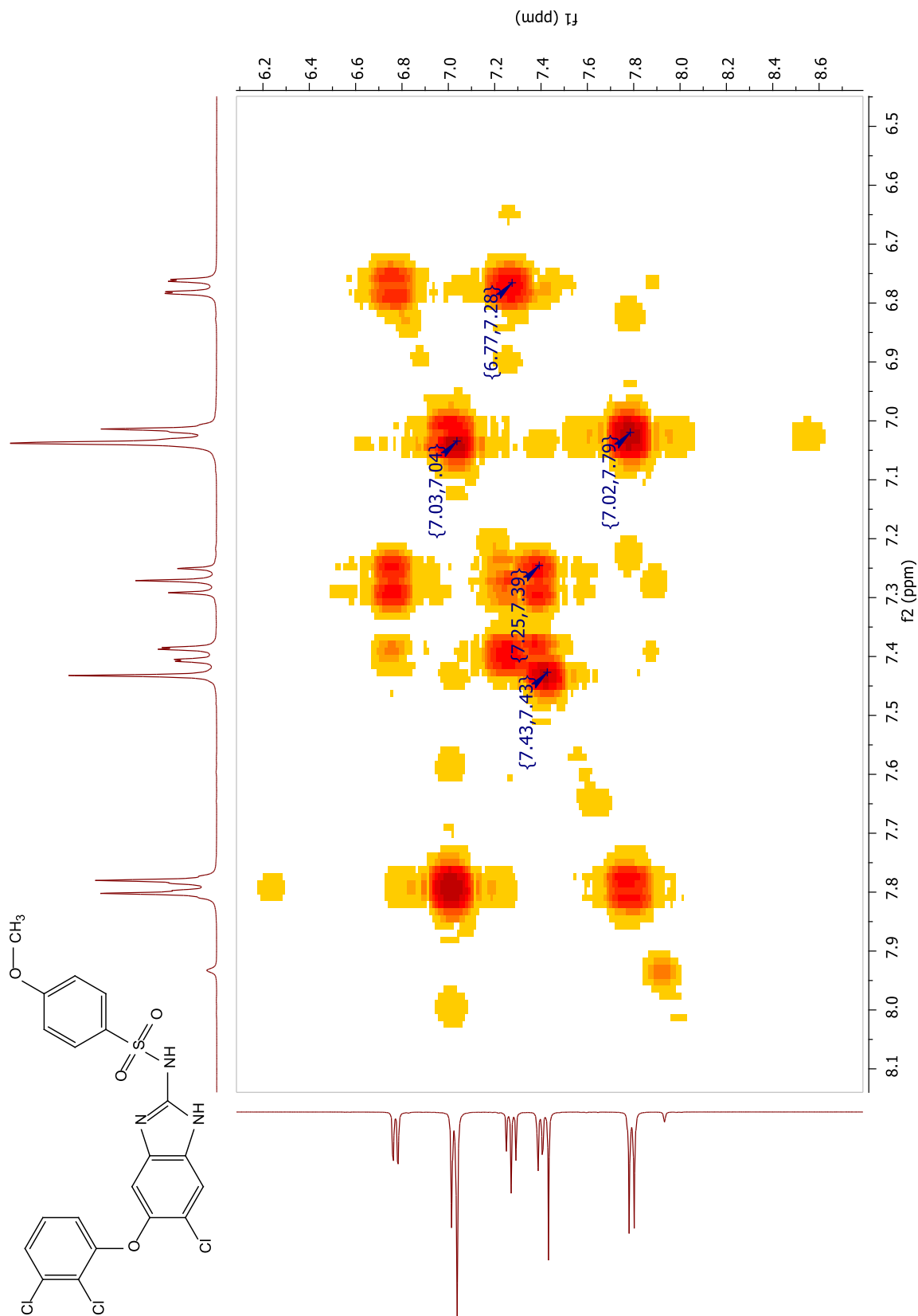
**13.6. *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (CSHG2)**



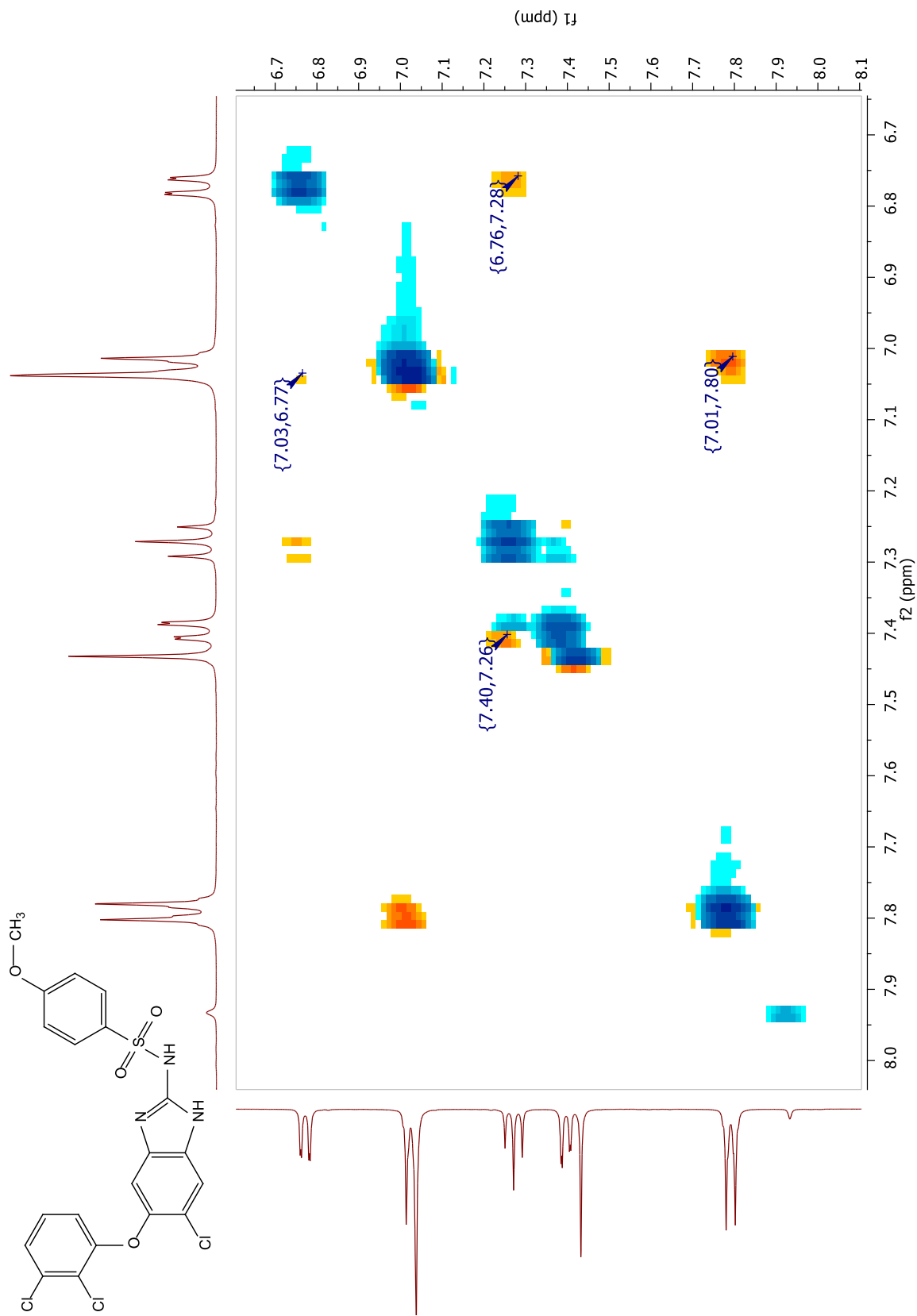
**Espectro 15.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (CSHG2).



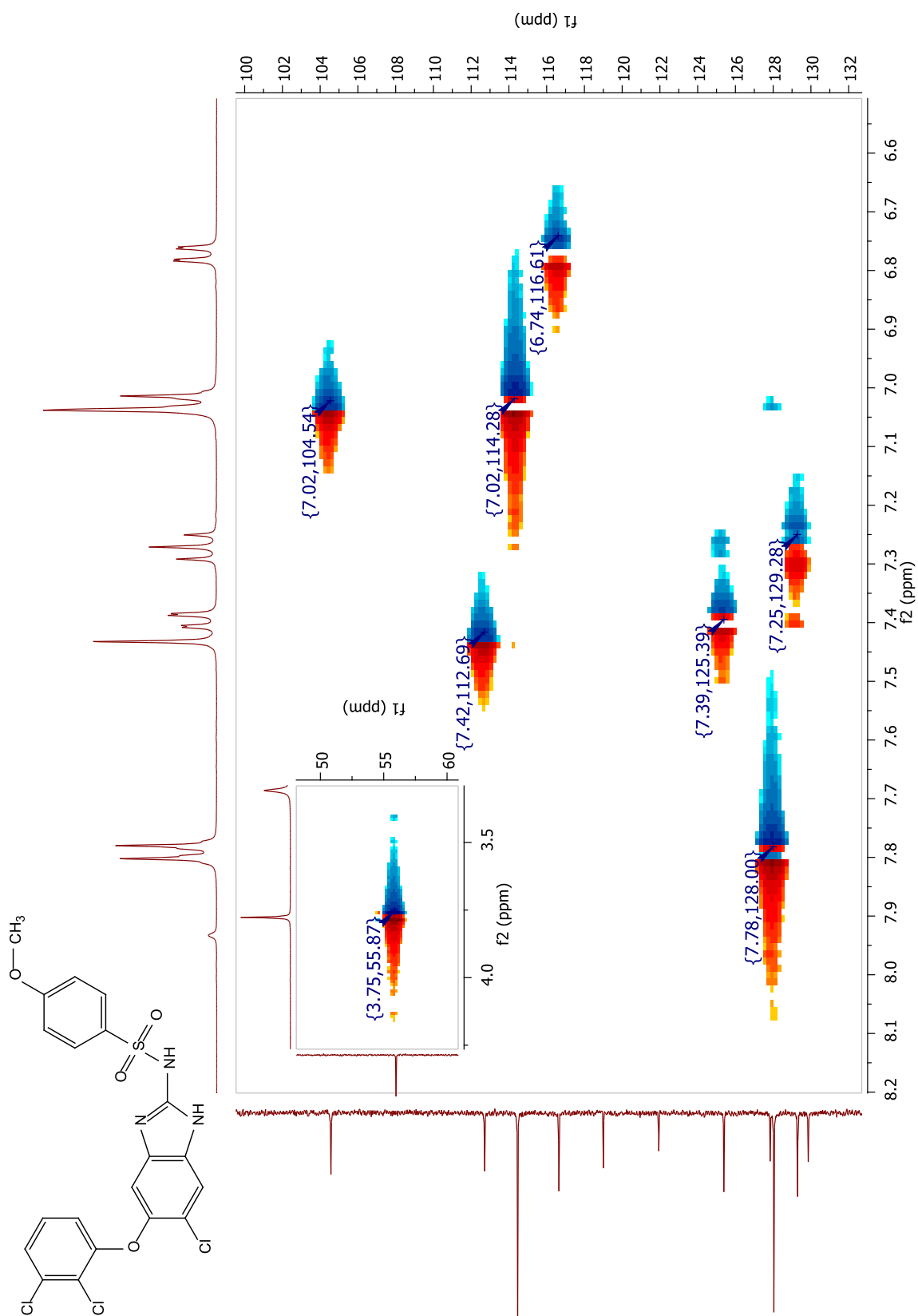
**Espectro 16.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) de *N*-[6-Chloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (CSHG2).



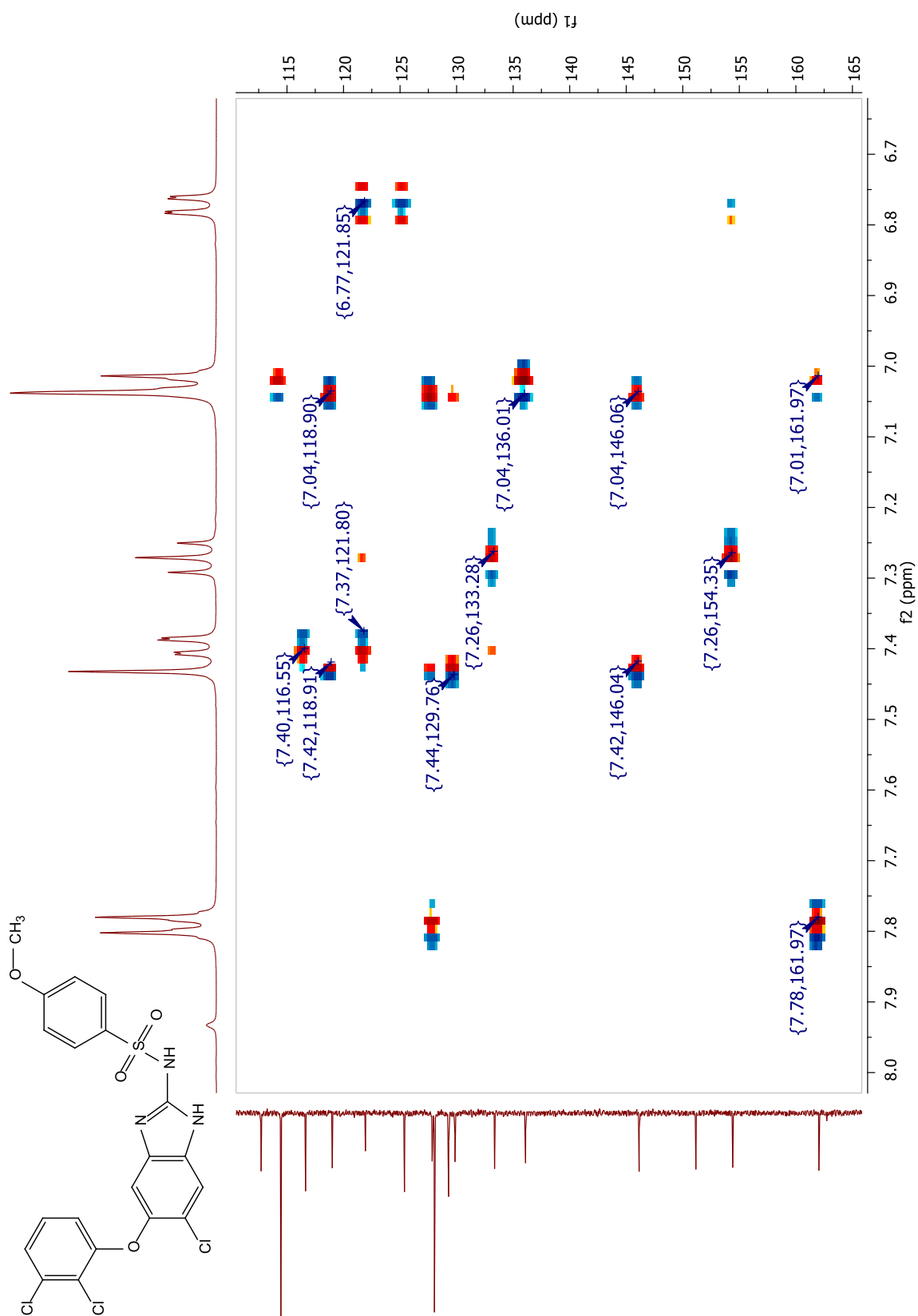
**Espectro 17.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz). Experimento de COSY de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (**CSHG2**).



**Espectro 18.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz). Experimento de NOESY de la *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (CSHG2).



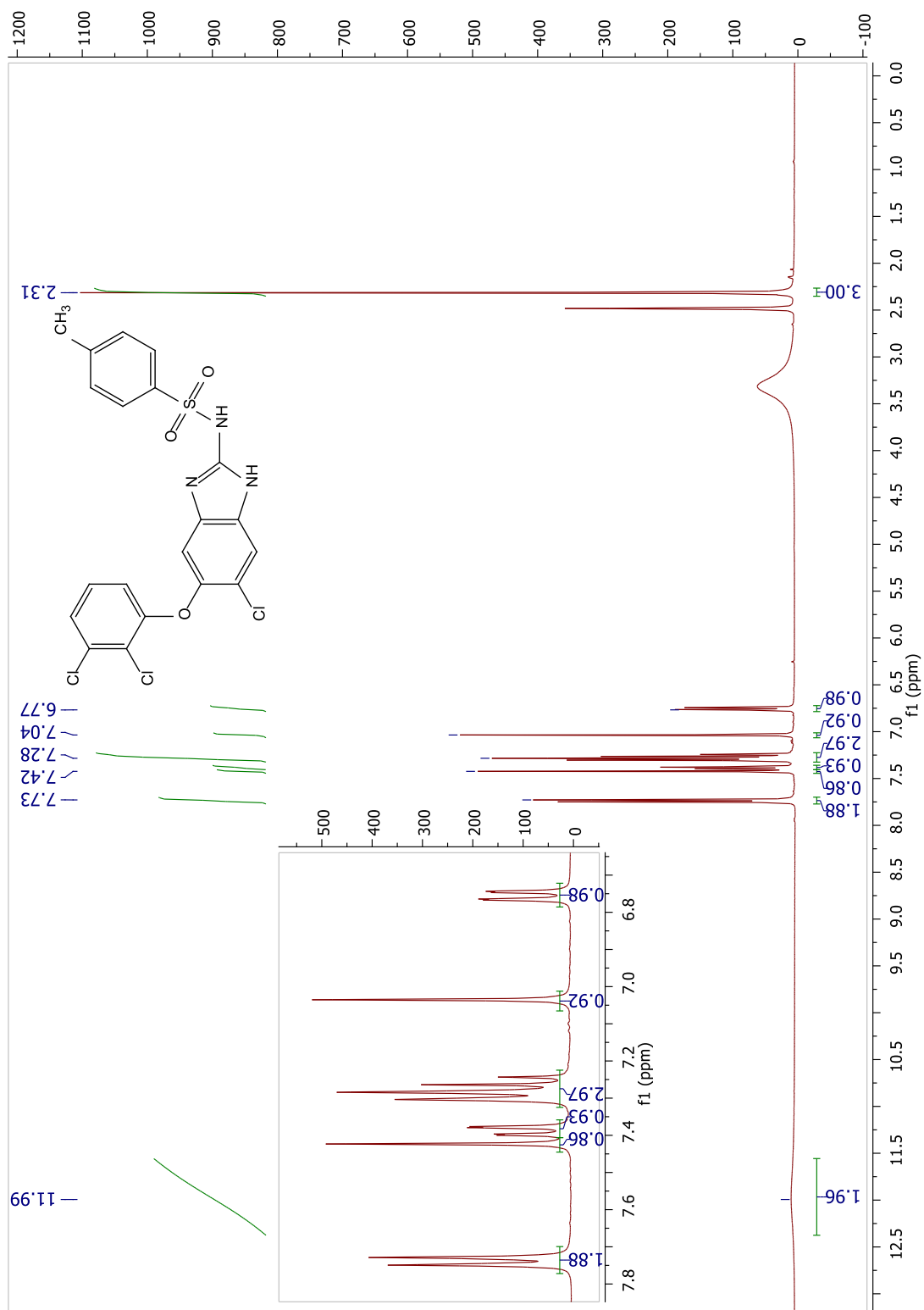
**Espectro 19.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HSQC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metoxibencensulfonamida (**CSHG2**).



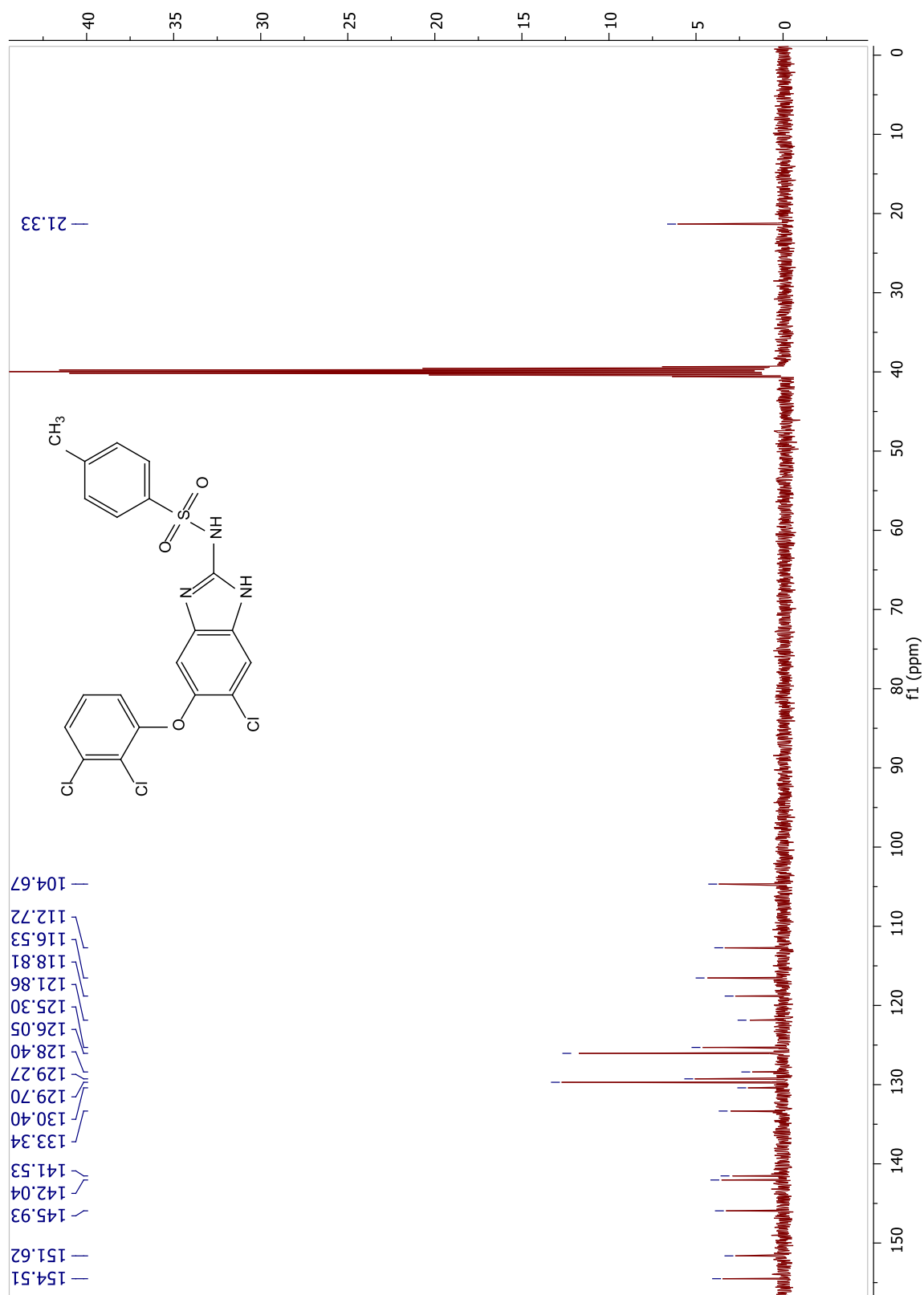
**Espectro 20.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HMBC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-*il*]-4-metoxibencensulfonamida (**CSHG2**).



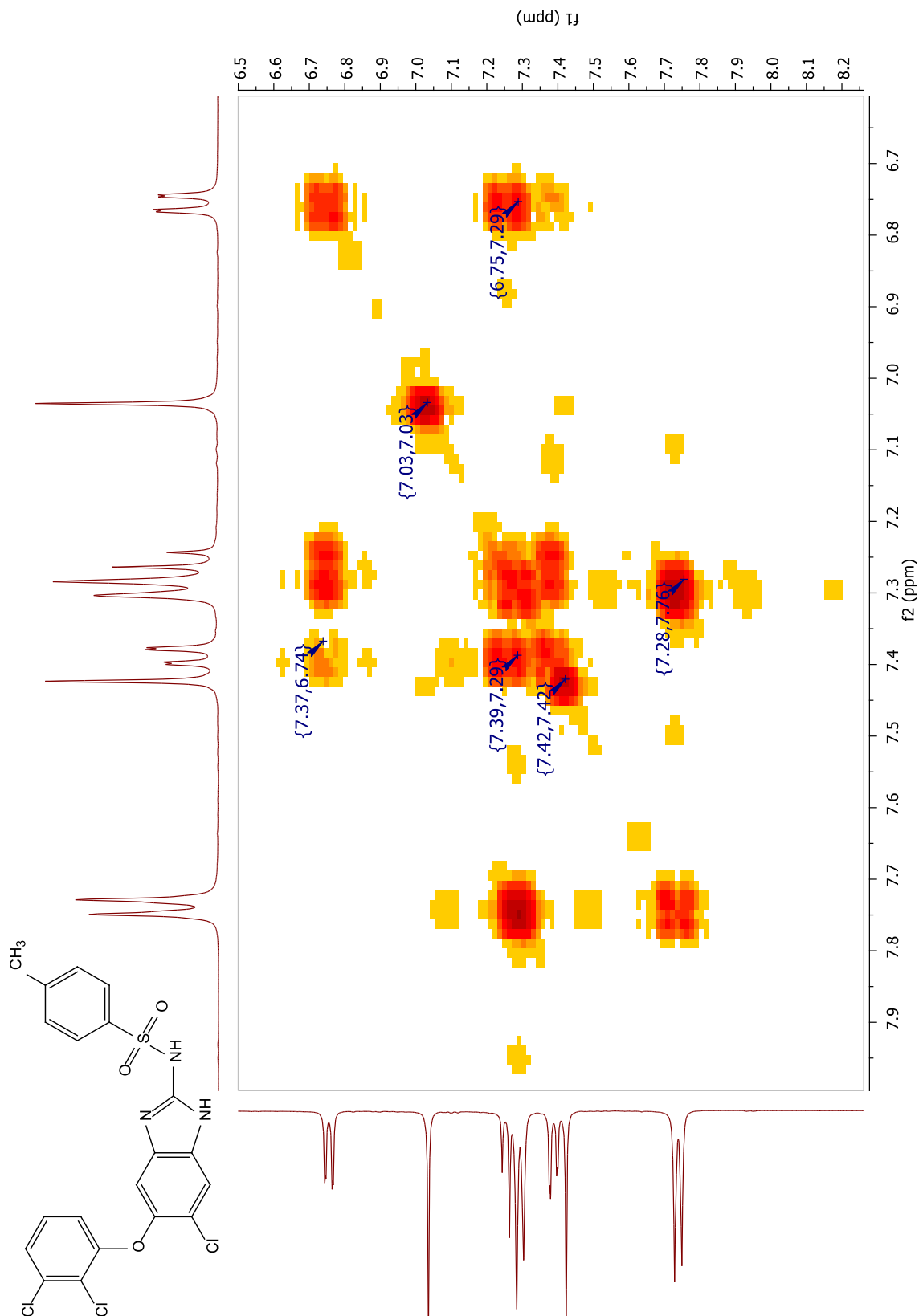
**13.7. *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (CSHG3)**



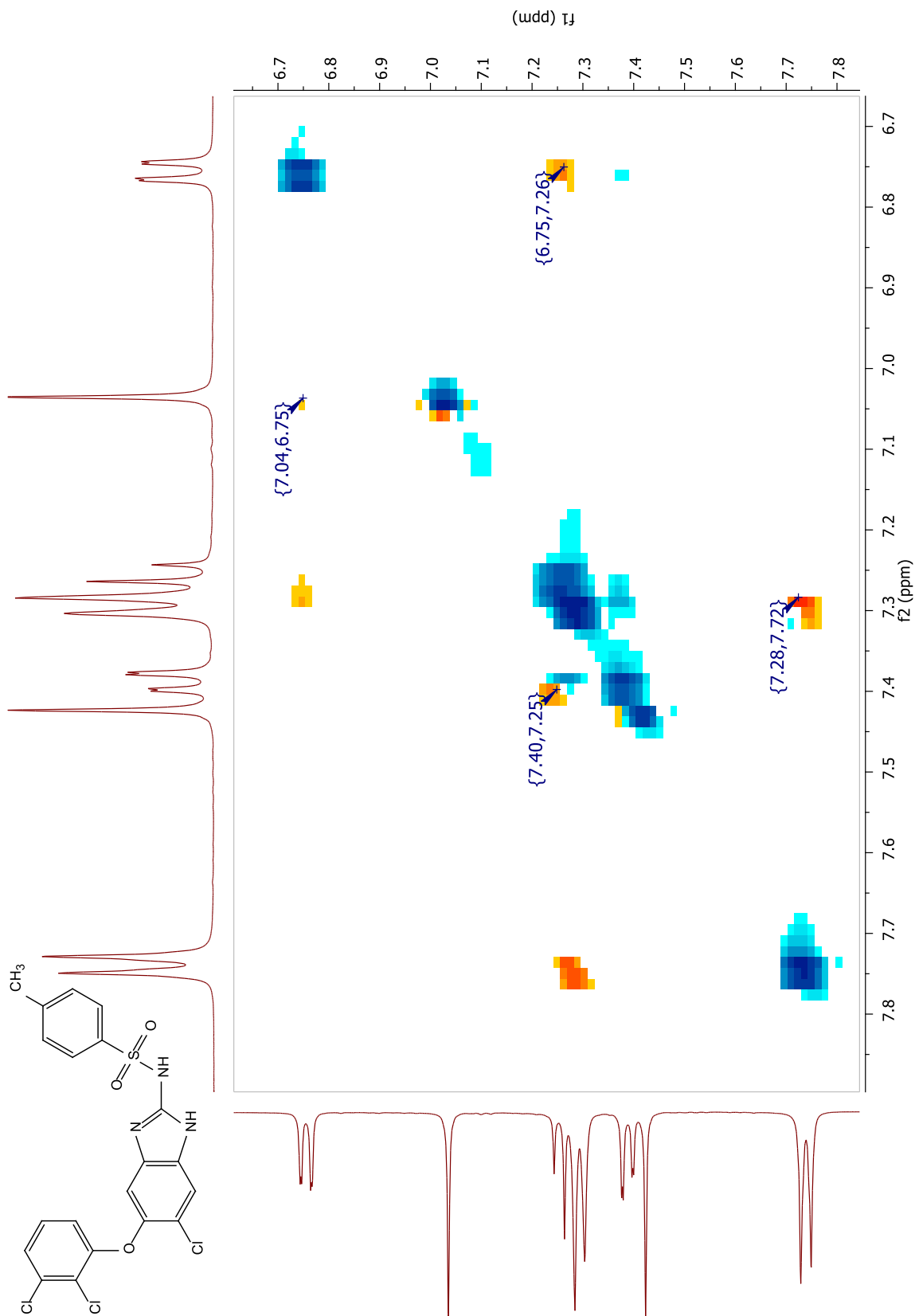
**Espectro 21.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (CSHG3).



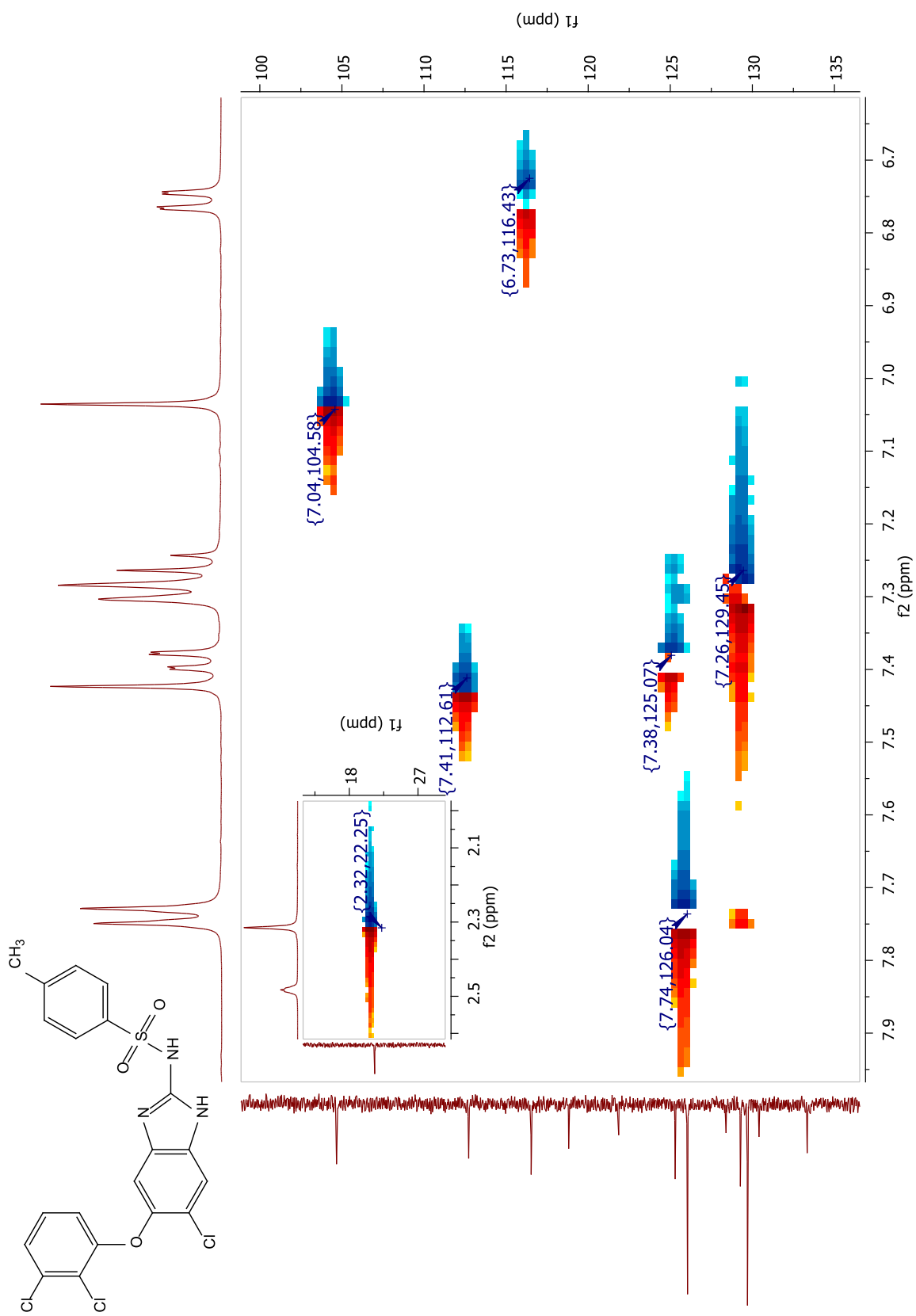
**Espectro 22.** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) de *N*-[6-Chloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (CSHG3).



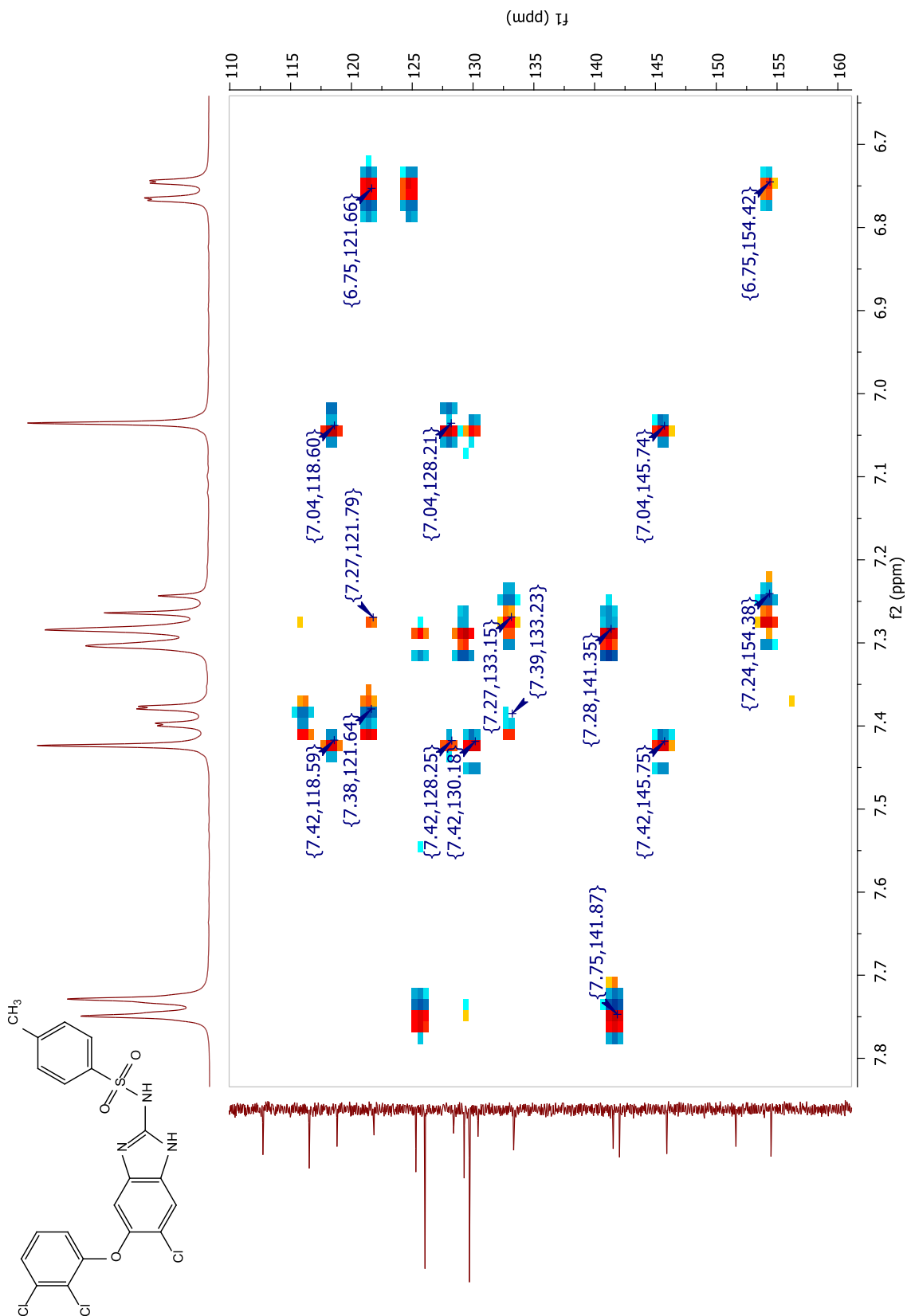
**Espectro 23.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz). Experimento de COSY de la N-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (CSHG3).



**Espectro 24.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz). Experimento de NOESY de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (CSHG3).

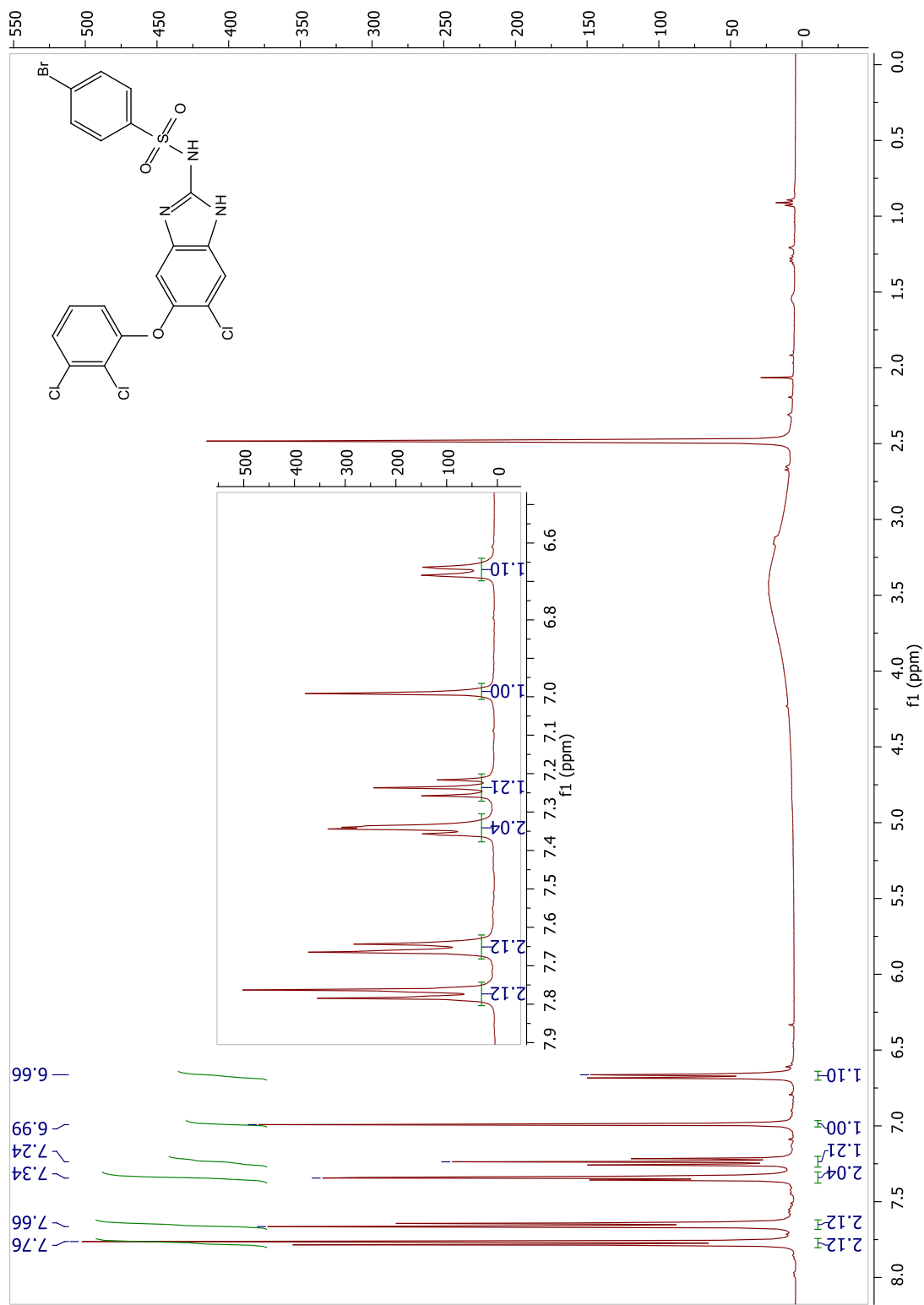


**Espectro 25.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HSQC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (**CSHG3**).

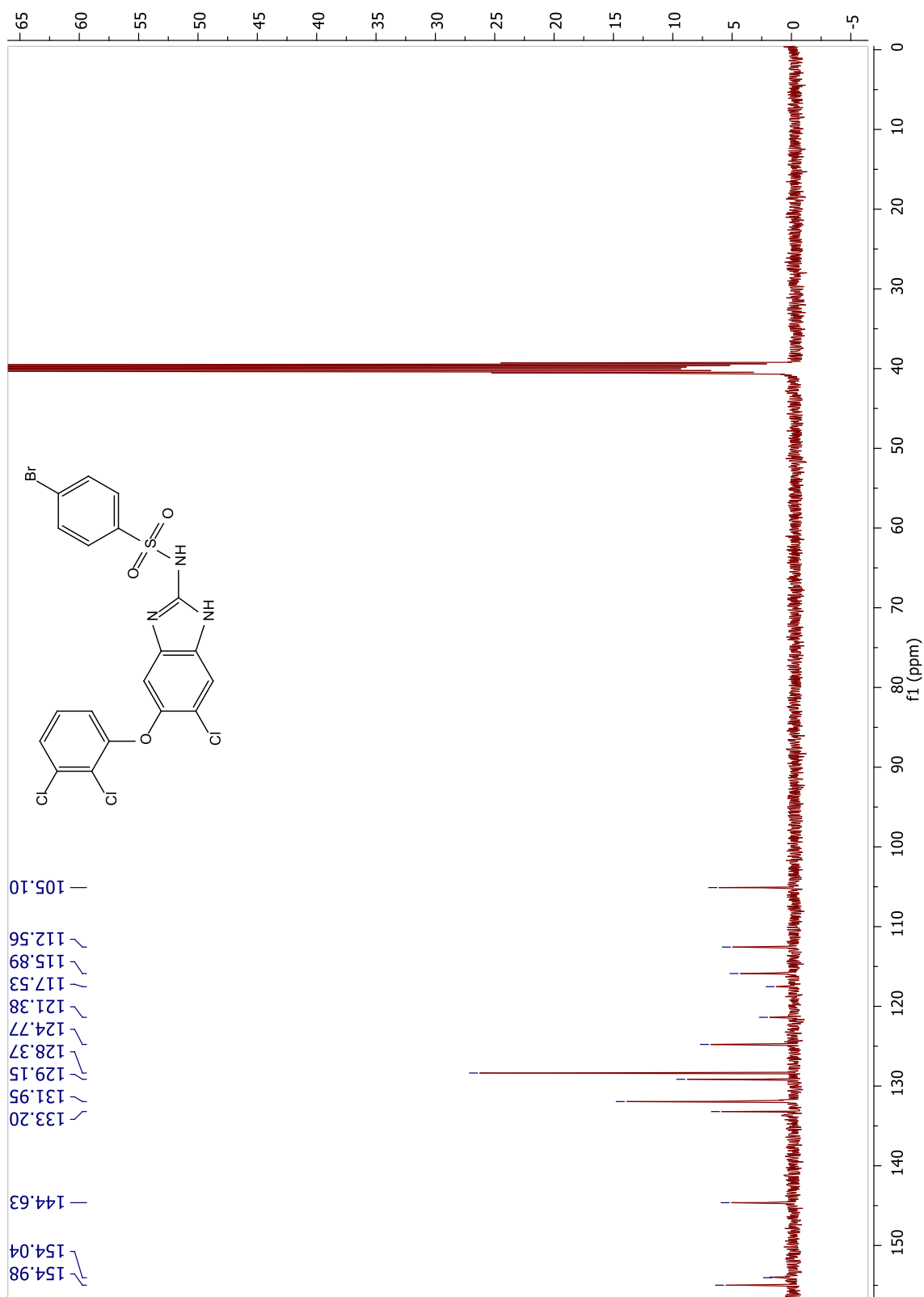


**Espectro 26.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HMBC de la *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-4-metilbencensulfonamida (**CSHG3**).

**13.8. 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4)**

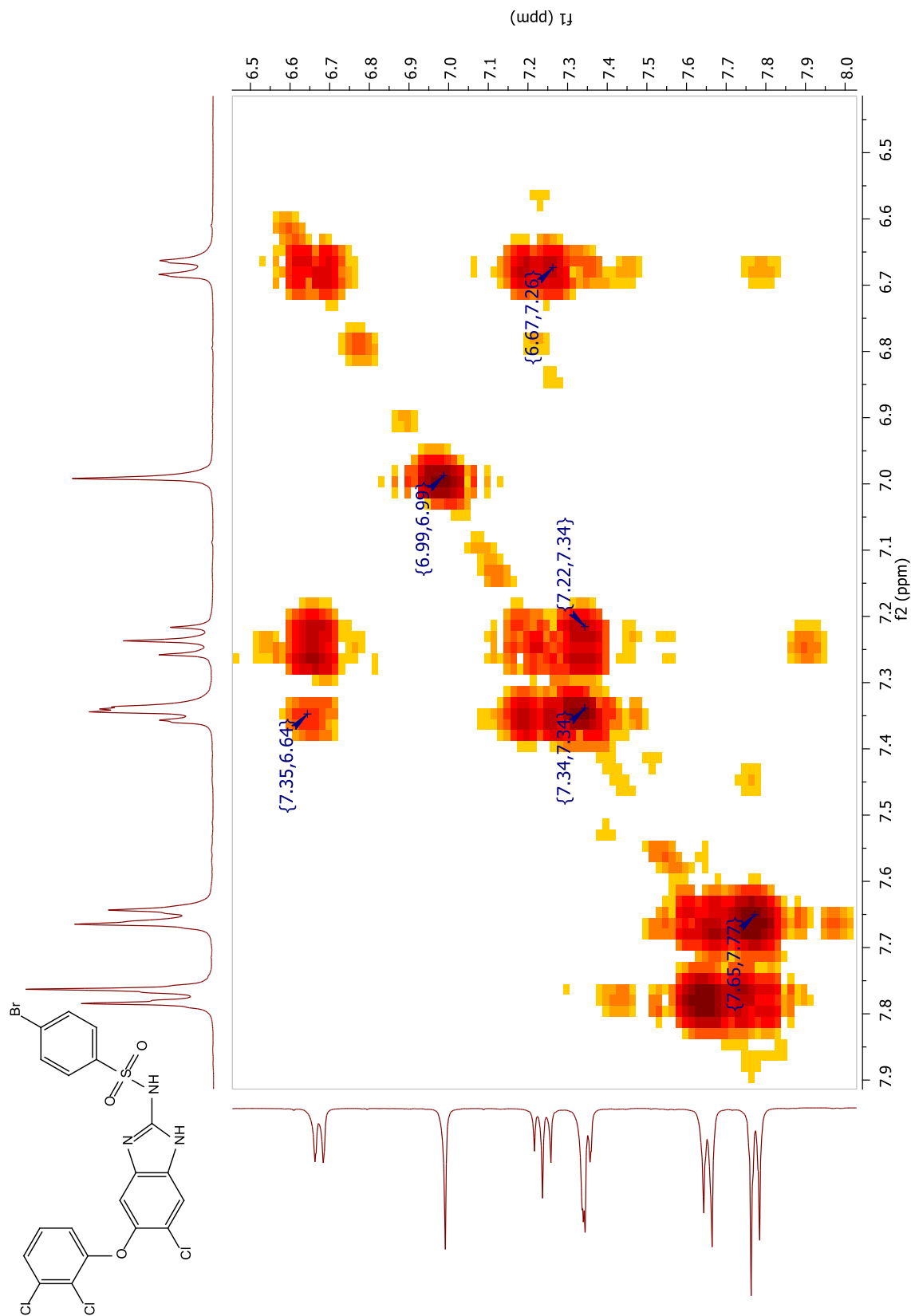


**Espectro 27.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) de 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4).

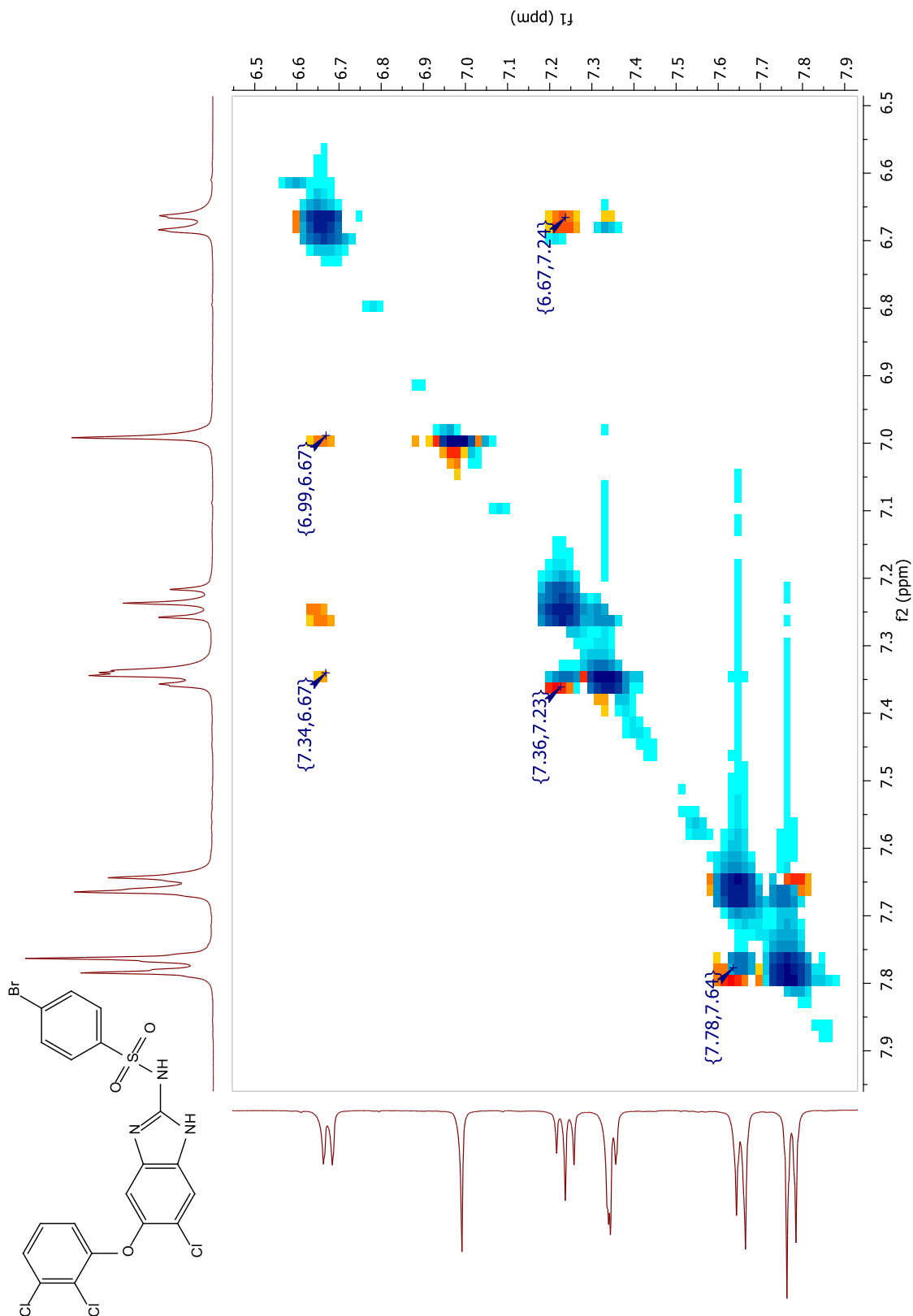


**Espectro 28.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz) de 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4).

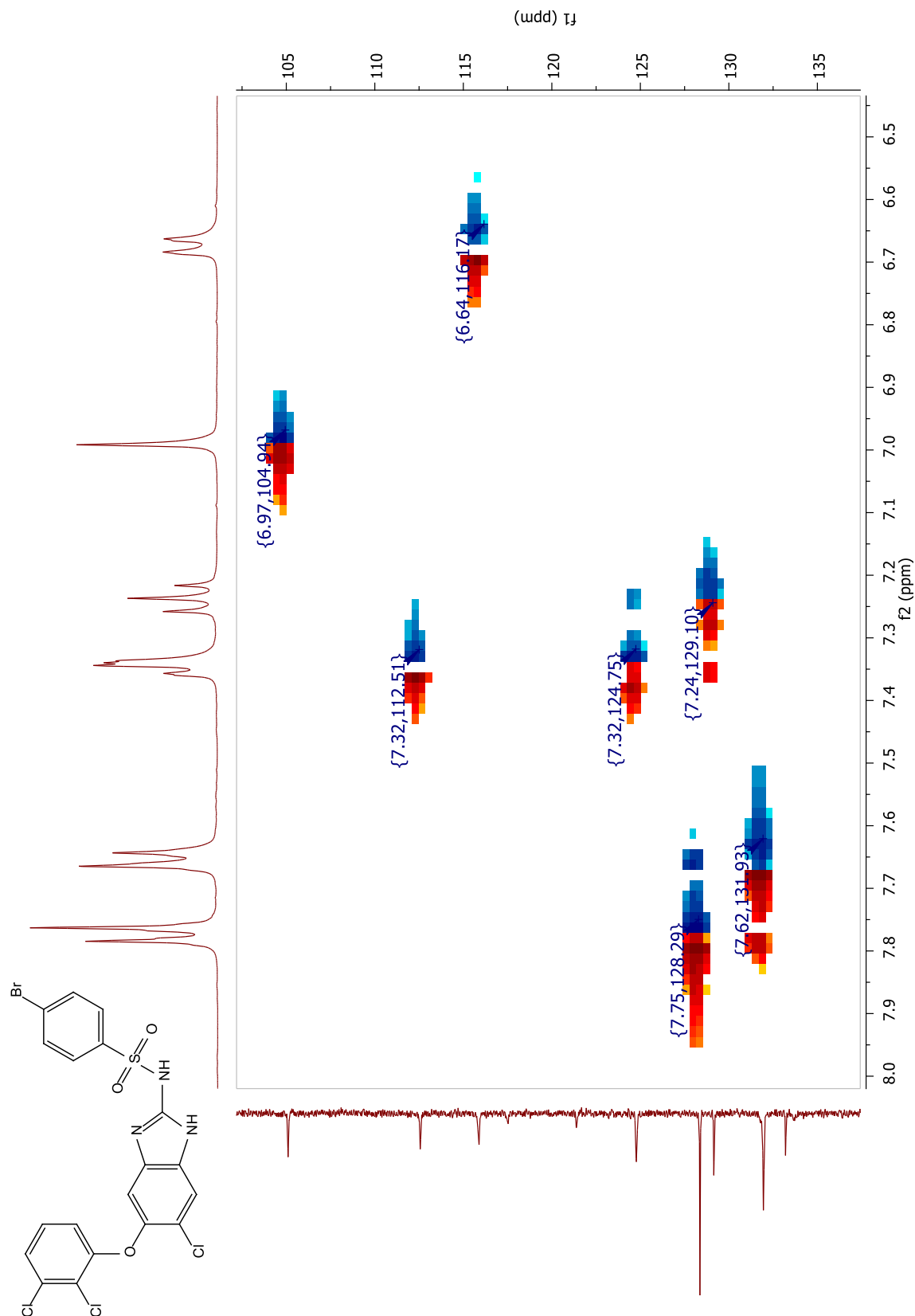




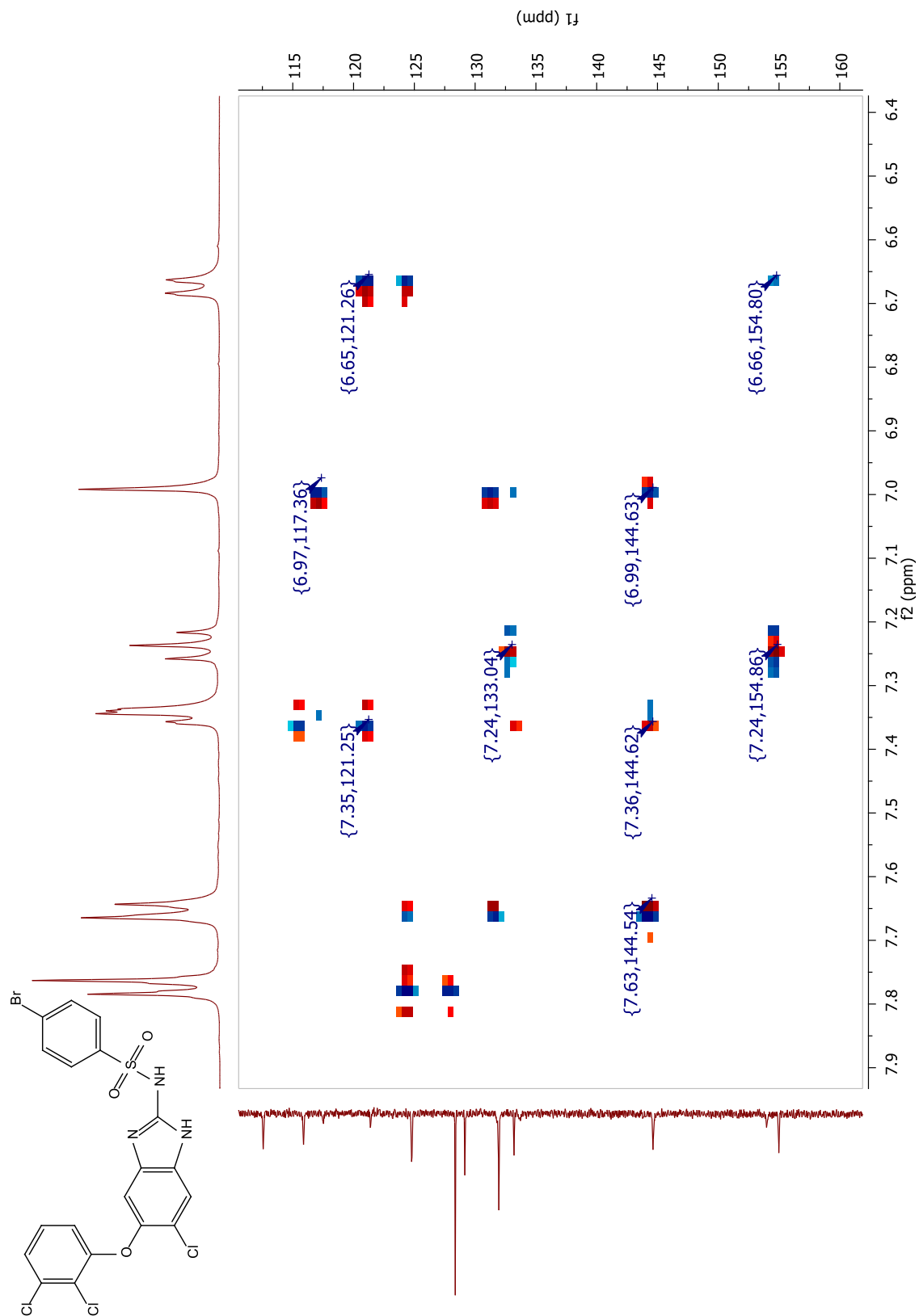
**Espectro 29.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz). Experimento de COSY de la 4-Bromo-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG4**).



**Espectro 30.** RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz). Experimento de NOESY de la 4-Bromo-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]bencensulfonamida (**CSHG4**).



**Espectro 31.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HSQC de la 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4).



**Espectro 32.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz). Experimento de HMBC de la 4-Bromo-N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]bencensulfonamida (CSHG4).