



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Síntesis de *N*-(1*H*-bencimidazol-2-
il)benzamidias diseñadas como inhibidores
de la Triosafofato Isomerasa (TIM) de
Trypanosoma cruzi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

Carlos Naranjo Castañeda

Director: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Asesor Interno: Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez



CIUDAD DE MÉXICO, 2021



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.



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 está protegida por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y además 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.

Dedicatoria

A mis padres: Beatriz Castañeda y José Naranjo.

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

A mis hermanos, Luis, Fernando, Antonio y Betty, por sus consejos y por las experiencias que hemos vivido juntos. Gracias por estar a mi lado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la que me siento orgulloso de pertenecer, por darme la oportunidad de desarrollarme dentro de sus instalaciones desde el punto de vista académico, así como personal.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por su guía, asesoramiento, comentarios y ocurrencias hechos durante mi estancia en el 122. Ha sido un honor, un privilegio y un placer formar parte de su excelente grupo de trabajo.

Quiero agradecer a la Dra. Alicia Hernández Campos por haberme brindado su apoyo, su atención, su experiencia, consejos y sobre todo por su bonita amistad.

Al Dr. Adelfo Reyes, por el apoyo y consejos brindados en la revisión del proyecto.

Al Dr. Miguel Flores, por las pláticas divertidas, experiencias compartidas, y consejos para conseguir mis objetivos.

A mis amigos del 121 y 122: Sebastián, Hugo, David, Cristian, Dany, Diana, Marlene, Cecy, Ulises, Diego, Gabriel, Andrés, por su ayuda y los buenos tiempos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

Al personal de la USAII de la Facultad de Química de la UNAM, por la adquisición de los espectros de IR, RMN y EM.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis dentro del proyecto 251726, titulado “síntesis y actividad de nuevos derivados del bencimidazol contra *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*”, con el número de becario 29265.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el diseño, síntesis y evaluación de una serie de compuestos bencimidazólicos como inhibidores de la enzima triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM), enzima crucial en el metabolismo energético del agente causal de la tripanosomiasis americana.

Los compuestos sintetizados son carboxamidas bencimidazolicas, cuya característica estructural es tener un grupo electrodonador (metoxilo) o electroatractor (nitro) en posición *para* respecto a la carboxamida, con uno y/o 2 cloros en las posiciones 5 y 6 del bencimidazol.

La parte sintética se abordó por rutas distintas, una a través de un intermediario de la familia de los imidatos, específicamente benzoilcarboniditioimidatos, que se condensaron con 1,2-fenilendiamina y la otra por reacción directa entre el 2-amino-1*H*-bencimidazol con el cloruro de benzoilo correspondiente; con el objetivo de conseguir buenos rendimientos y asegurar la posición del grupo benzoilo sustituido en la posición C-2 del 2-amino-1*H*-bencimidazol. Los compuestos fueron caracterizados por propiedades físicas como: punto de fusión (pf), factor de retención (R_f), así como por el uso de técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) e Infrarrojo (IR), y por espectrometría de masas (EM).

Se realizó la evaluación enzimática a todos los compuestos, y se encontraron resultados satisfactorios. Dos de los compuestos, **CN3** y **CN7**, superaron el porcentaje de inhibición de las moléculas C12-C20 que son precedentes de la serie **CN**.

Se hicieron estudios de acoplamiento molecular frente a las enzimas TIM de *T. cruzi* y de *H. sapiens* con el fin de explicar los resultados del ensayo enzimático, se calcularon los valores de score, se observaron los modos de unión y las interacciones con los residuos de la interfaz de la enzima. Además, se utilizó un método de validación del acoplamiento molecular mediante el cálculo del valor de RMSD que resultó ser aceptable.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Acetato de etilo	AcOEt
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Monofosfato de Adenosina	AMP
Trifosfato de adenosina	ATP
Agua deuterada	D ₂ O
Alfa glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa	α-GPDH
Arginina	Arg
Atmósfera	Atm
Benznidazol	Bnz
Constante de acoplamiento	J
Cromatografía en capa fina	ccf
Diagramas de interacción de ligando	DIL
Dihidroxiacetona fosfato	DHAP
Dimetilformamida	DMF
Dimetilsulfóxido hexadeuterado	DMSO- <i>d</i> ₆
Enzima superóxido dismutasa	SOD
Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima	ELISA
Espectrometría de masas de alta resolución	EMAR
Equivalente químico	eq.
Etanol	EtOH
Factor de retención	R _f
Fenilalanina	Phe
Glicina	Gly
Glutamato	Glu
Glutación	GSH
Grado Celsius	°C
Gramo	g
Gliceraldehido-3-fosfato	GAP
Hertz/Hercio	Hz
Hora	h
Infrarrojo (attenuated total reflection)	IR (ATR)
Inmunofluorescencia indirecta	IFI
Ionización química a presión atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization)	APCI
Kilogramo	kg
Libra sobre pulgada cuadrada	lb/in ²
Lisina	Lys
Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio	pH
Logaritmo negativo de la constante de acidez	pKa
Luz Ultravioleta	UV
Metanol	MeOH
Microgramos	μg
Microlitros	μL
Micromolar	μM

Miligramo	mg
Mililitro	mL
Minutos	min
Modelo parametrizado 3/Parameterized Model Number 3	PM3
Nanómetros	nm
Nicotinamida adenina dinucleótido	NADH
Nifurtimox	Nfx
Níquel Raney	Ni-Raney
No determinado	ND
Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy/ Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser	NOESY
Organización Mundial de la Salud	OMS
Partes por millón	ppm
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Peso molecular	PM
Porcentaje	%
Protein Data Bank/ Banco de datos de proteínas	PDB
Punto de fusión	pf
Químicamente puro	QP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Señal doble	d
Señal doble de dobles	dd
Señal múltiple	m
Señal simple	s
Serina	Ser
Sistema nervioso central	SNC
Sistema retículo endotelial	SRE
Sustitución nucleofílica	S _N
Temperatura ambiente	t.a.
Tetrahidrofurano	THF
Tirosina	Tyr
Treonina	Thr
Trietilamina	TEA
Triosafosfato isomerasa	TIM
Triosafosfato isomerasa de <i>H. sapiens</i>	HsTIM
Triosafosfato isomerasa de <i>T. cruzi</i> .	TcTIM
Tripanotión	T(SH) ₂
Triplete	t
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>
Unidad de masa atómica	uma
Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria	USAI
Universidad Nacional Autónoma de México	UNAM
Universidad Juárez del Estado de Durango	UJED
Valina	Val
World Health Organization	WHO
4-Dimetilaminopiridina	DMAP

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	II
RESUMEN	III
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	IV
ÍNDICE GENERAL	VI
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Tablas.....	VIII
Índice de Esquemas.....	IX
índice de Espectros.....	X
INTRODUCCIÓN	1
SECCIÓN I. MARCO TEÓRICO.....	3
1. Antecedentes.....	4
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.1.1 Morfología	5
1.1.2 Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2 Vector de transmisión.....	7
1.2.1 Patogenia y Diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana	8
1.3 Tratamiento de la Tripanosomiasis Americana	9
1.3.1 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol	10
1.4 Prevención	11
1.5 La vía glucolítica.....	12
1.5.1 Triosafofato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.5.2 Triosafofato isomerasa de <i>Homo sapiens</i>	14
1.6 Los bencimidazoles	14
1.7 Química Farmacéutica y Tecnología Computacional	15
1.7.1 Acoplamiento molecular	15
SECCIÓN II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	17
2. PRECEDENTE DEL PROYECTO	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general.....	23

4.2	Objetivos específicos	23
5.	HIPÓTESIS	23
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL	24
7.	METODOLOGÍA	25
7.1	PARTE QUÍMICA	25
7.1.1	Síntesis de la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 (compuestos 3 y 7 respectivamente).....	27
7.1.2	Síntesis del intermediario benzoilcarboniditioimidato de dimetilo.	27
7.1.3	Formación de <i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)benzamida	28
7.2	PARTE ENZIMÁTICA.....	29
7.2.1	Metodología para la realización de las evaluaciones de inhibición enzimática sobre la TcTIM	29
7.3	PARTE COMPUTACIONAL	29
7.3.1	Identificación de la diana biológica	30
7.3.2	Preparación de las enzimas	30
7.3.3	Preparación de los ligandos	31
7.3.3	Acoplamiento molecular	31
7.3.3	Validación del acoplamiento molecular	32
SECCIÓN III. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		34
8.	RESULTADOS	35
8.1	PARTE QUÍMICA SINTÉTICA	35
8.1.1	ANÁLISIS DE LA PARTE QUÍMICA	43
8.2	PARTE ENZIMÁTICA.....	68
8.2.1	Ensayos de inhibición de la TcTIM por los derivados del bencimidazol ...	68
8.3	PARTE COMPUTACIONAL	70
SECCIÓN IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....		77
9.	CONCLUSIONES	78
10.	PERSPECTIVAS	79
11.	REFERENCIAS	80
SECCIÓN V. ANEXOS.....		84
ANEXO I		85
12.1	INSTRUMENTOS, MATERIALES Y EQUIPO.....	85

ANEXO II.....	86
12.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	86
ANEXO III.....	95
12.3 ESPECTROS DE INTERMEDIARIOS Y PRODUCTOS FINALES	95

Índice de Figuras

Figura 1. Principales estructuras y organelos encontrados de <i>T. cruzi</i> (Tripomastigote metacíclico). ⁹	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . ¹²	7
Figura 3. Distribución de triatomíneos en México, 2015. ⁴	8
Figura 4. Estructura monómerica de la TIM. ²⁴	13
Figura 5. Forma dimérica de Triosafofato isomerasa de <i>T. cruzi</i> . ²⁴	13
Figura 6. Forma dimérica de Triosafofato isomerasa de <i>H. sapiens</i> . ²⁷	14
Figura 7. Vitamina B12. En rojo el núcleo del bencimidazol. ²⁰	15
Figura 8. Molécula B4.....	18
Figura 9. a) Interfaz de TcTIM con un ligando de benzotiazol, b) malla cúbica centrada en la interfaz de la HsTIM, c) malla cúbica centrada en la interfaz de la TcTIM.	32
Figura 10. Modelado de reacción de trasposición del grupo benzoilo sustituido en para con metoxilo en el núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.	64
Figura 11. Modelado de reacción de trasposición del grupo benzoilo sustituido en para con nitro en el núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.	66
Figura 12. Simbología del tipo de interacción.....	76

Índice de Tablas

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la tripanosomiasis americana.	10
Tabla 2. Compuestos plantilla con el fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida. Derivados C12-C20.....	20
Tabla 3. Compuestos objetivo con el fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida.	21
Tabla 4. Variables de estudio.	24
Tabla 5. Sustituyentes de las moléculas con el fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida.....	26
Tabla 6. Constantes físicas de los compuestos sintetizados.....	35
Tabla 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados.	38
Tabla 8. Condiciones y proporciones para la reacción de formación de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.....	45
Tabla 9. Condiciones experimentadas para la reacción de formación de la N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida.....	51
Tabla 10. Parámetros calculados del modelado molecular del núcleo 2-amino-1H-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con metoxilo.	63
Tabla 11. Parámetros calculados del modelado molecular del núcleo 2-amino-1H-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con nitro.	65
Tabla 12. Diferencias entre los modelados moleculares del núcleo 2-amino-1H-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con metoxilo o nitro.	67
Tabla 13. Actividad inhibitoria de los compuestos CN en la enzima TcTIM.....	69
Tabla 14. Valores calculados de puntuación de energía de interacción entre una conformación determinada del ligando y las enzimas TcTIM y HsTIM.	73
Tabla 15. Los principales residuos de la interfaz de las enzimas TcTIM y HsTIM que interactúan con los ligandos.	74
Tabla 16. Sistemas de elusión utilizados en cromatografía en capa fina.	85
Tabla 17. Instrumentos, materiales y equipos usados en la realización del trabajo experimental.	85

Índice de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazol. ⁽¹⁶⁾	11
Esquema 2. Vía glucolítica de <i>T. cruzi</i> . ⁽²⁰⁾	12
Esquema 3. Concepción del fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida	19
Esquema 4. Retrosíntesis del fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida	26
Esquema 5. Reducción catalítica de la 5-cloro-2-nitroanilina.	27
Esquema 6. Síntesis de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina.	27
Esquema 7. Síntesis de benzamidas.	28
Esquema 8. Síntesis de benzoilcarbonitioimidato de dimetilo.	28
Esquema 9. Formación de las N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamidas.....	28
Esquema 10. Reacción para cuantificar NADH. ⁽²⁰⁾	29
Esquema 11. Método para los estudios de acoplamiento molecular.	30
Esquema 12. Mecanismo de reacción para obtener los benzoilcarbonitioimidatos de dimetilo.	47
Esquema 13. Mecanismo de reacción para obtener los compuestos N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6.	48
Esquema 14. Ruta de síntesis para obtener N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN1).....	48
Esquema 15. Ruta de síntesis para obtener N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).....	48
Esquema 16. Ruta de síntesis para obtener N-(5,6-dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).	49
Esquema 17. Reacción general propuesta para la reacción de formación de la N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida.	50
Esquema 18. Ruta de Síntesis de las N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6.	53
Esquema 19. Reacción de protección de 2-amino-1H-bencimidazol.....	54
Esquema 20. Reacción de sustitución nucleofílica con el compuesto I al grupo acilo del cloruro de 4-nitrobenzoilo.....	54
Esquema 21. Reacción de metilación del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4).	55
Esquema 22. Ruta de síntesis para obtener N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4).	56
Esquema 23. Ruta de síntesis para obtener N-(5-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	56
Esquema 24. Ruta de síntesis para obtener N-(5,6-dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	56
Esquema 25. Núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.	58
Esquema 26. Regioselectividad de alquilación/acilación del núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.....	59
Esquema 27. Síntesis para obtener (2-amino-1H-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona.....	60
Esquema 28. Tautómeros del núcleo de 2-amino-1H-bencimidazol sustituido en posición 1 por el grupo acilo aromático.....	61
Esquema 29. Tautómeros del núcleo de 2-amino-1H-bencimidazol sustituido en el nitrógeno de la posición 2 por el grupo acilo aromático.	61
Esquema 30. Mecanismo de reacción de transposición del grupo acilo.	61
Esquema 31. Alineación de acoplamientos calculados con los diferentes programas computacionales.	71
Esquema 32. Interacción en 2D y 3D y modelado molecular entre los ligandos y las enzimas TcTIM y HsTIM.	74

índice de Espectros

Espectro 1. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (5).....	95
Espectro 2. IR (ATR) del compuesto N-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (5).....	95
Espectro 3. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (6).....	96
Espectro 4. IR (ATR) del compuesto 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (6).....	96
Espectro 5. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-metoxibenzamida (d).....	97
Espectro 6. IR (ATR) del compuesto 4-metoxibenzamida (d).....	97
Espectro 7. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-nitrobenzamida (e).....	98
Espectro 8. IR (ATR) del compuesto 4-nitrobenzamida (e).....	98
Espectro 9. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de metilo.....	99
Espectro 10. IR (ATR) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de metilo.....	99
Espectro 11. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (M). 100	
Espectro 12. IR (ATR) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (M).....	100
Espectro 13. CG- EM (IE) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (M) P.M. 255.35 g/mol.....	101
Espectro 14. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (N).....	101
Espectro 15. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (N). 102	
Espectro 16. IR (ATR) del compuesto (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (N).....	102
Espectro 17. CG- EM (IE) del compuesto (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (N), P.M. 270.32 g/mol.....	103
Espectro 18. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN1). 103	
Espectro 19. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN1). 104	
Espectro 20. IR (ATR) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN1).....	104
Espectro 21. EMAR (APCI) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida P.M. 267.28. g/mol (CN1).....	105
Espectro 22. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (2-amino-1H-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (CN1.1).....	105
Espectro 23. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto (2-amino-1H-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (CN1.1).....	106
Espectro 24. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto (2-amino-1H-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (CN1.1).....	106
Espectro 25. NOESY del compuesto (2-amino-1H-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (CN1.1). 107	
Espectro 26. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).....	107
Espectro 27. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2). 108	
Espectro 28. IR (ATR) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).....	108
Espectro 29. EMAR (APCI) de N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2), P.M. 301.72. g/mol. 109	
Espectro 30. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).....	109
Espectro 31. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).....	110
Espectro 32. IR (ATR) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).....	110
Espectro 33. EMAR (APCI) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3), P.M. 336.17. g/mol. 111	
Espectro 34. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-1H-bencimidazol (F).....	111
Espectro 35. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto 2-amino-1H-bencimidazol (F). 112	
Espectro 36. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-aminobencimidazol-1-carboxilato de terc-butilo (I). 112	
Espectro 37. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto 2-aminobencimidazol-1-carboxilato de terc-butilo (I). 113	
Espectro 38. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) (producto obtenido por la ruta de protección). 113	
Espectro 39. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) (producto obtenido por la ruta directa). 114	
Espectro 40. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4). 114	
Espectro 41. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) .. 115	
Espectro 42. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) (comparación de productos entre ambas rutas de síntesis). 115	
Espectro 43. NOESY del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) (producto obtenido por la ruta de protección). 116	

Espectro 44. NOESY del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4) (producto obtenido por la ruta directa).	116
Espectro 45. IR (ATR) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4).	117
Espectro 46. EMAR (APCI) del compuesto N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4), P.M. 282.25. g/mol.	117
Espectro 47. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5-cloro-1H-bencimidazol (G).	118
Espectro 48. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto 2-amino-5-cloro-1H-bencimidazol (G).	118
Espectro 49. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	119
Espectro 50. NOESY del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	119
Espectro 51. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	120
Espectro 52. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	120
Espectro 53. IR (ATR) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).	121
Espectro 54. EMAR (APCI) del compuesto N-(5(6)-cloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5), P.M. 317.05 g/mol.	121
Espectro 55. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5,6-Dicloro-1H-bencimidazol (H).	122
Espectro 56. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5,6-Dicloro-1H-bencimidazol (H).	122
Espectro 57. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	123
Espectro 58. NOESY del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	123
Espectro 59. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	124
Espectro 60. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	124
Espectro 61. IR (ATR) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).	125
Espectro 62. EMAR (APCI) del compuesto N-(5,6-Dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6), P.M. 351.14. g/mol.	125
Espectro 63. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).	126
Espectro 64. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) D ₂ O del compuesto N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).	126
Espectro 65. RMN ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).	127
Espectro 66. IR (ATR) del compuesto N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).	127
Espectro 67. EMAR (APCI) del compuesto de N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7), P.M. 296.28. g/mol.	128

INTRODUCCIÓN

Las afecciones causadas por parásitos representan un grave problema de salud en México y otros países de América Latina, y en los últimos años, en países desarrollados. Entre estas enfermedades se encuentra la tripanosomiasis americana mejor conocida como la enfermedad de Chagas, siendo el agente causal *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que es un protozoo de la clase *Zoomastigophorea*. La mayoría de los casos de transmisión de *T. cruzi* son vectoriales por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* y su importancia radica en su elevada prevalencia, incurabilidad, tratamientos costosos y altos índices de morbilidad y mortalidad. Dicha enfermedad es endémica de América Latina, pero es considerada enfermedad emergente y desatendida por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina.

A pesar de los avances científico-tecnológicos existen pocas alternativas para su prevención, control y tratamiento dado que no existe vacuna y la quimioterapia disponible es limitada e ineficaz. Hasta el momento los fármacos de elección utilizados como tratamiento son el Nifurtimox (un derivado de nitrofurano, Nfx; Lampit® Bayer) y el Benznidazol (un derivado de 2-nitroimidazol, Bnz; Rochagan® Roche) que comenzaron su comercialización en la década de los 70's. Estas sustancias sólo funcionan dependiendo de la fase de la enfermedad, la dosis, la duración del tratamiento, edad del paciente y resistencia o susceptibilidad variable de *T. cruzi*, aunado a los efectos secundarios y adversos propios de los mismos fármacos.

Esto resalta la importancia del desarrollo de nuevos fármacos y el uso de nuevas estrategias para su diseño. Además, se busca que sean moléculas más potentes, eficaces y con la menor cantidad de efectos colaterales. Nuestro grupo de investigación en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM ha trabajado en la síntesis de derivados de bencimidazol como agentes antiparasitarios con la intención de encontrar sustancias activas contra *T. cruzi*; algunos derivados bencimidazólicos han resultado atractivos para su optimización y mejora en la actividad trypanocida.

El presente proyecto trata sobre la síntesis de una serie de *N*-(1*H*-bencimidazol-2-*il*)benzamidas las cuales en su estructura poseen como núcleo base el bencimidazol con cloro como sustituyente en 5 o 5 y 6, y un grupo benzamida en posición 2 sustituido con un nitro o metoxilo en posición *para* como ejemplos de grupos electroatractor y electrodonador, respectivamente. Estas carboxamidas fueron diseñadas para actuar como inhibidores de la TcTIM, la cual es una enzima de la vía glucolítica, única vía del parásito de obtención de energía.

En el transcurso del proyecto se realizó la caracterización de los intermediarios de síntesis, así como de la serie de compuestos finales mediante técnicas espectroscópicas de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y EM. Se realizó la evaluación enzimática de los compuestos frente a las enzimas y se explicó las interacciones moleculares mediante modelado molecular computacional.

SECCIÓN I.

MARCO TEÓRICO

1. Antecedentes

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas fue descubierta en 1909 por el Doctor Carlos Chagas, quien reveló en sus investigaciones al agente, vector, patología clínica y epidemiología.¹ A pesar del tiempo que ha pasado desde el descubrimiento, su correcta y eficaz prevención, control y atención de la afección sigue siendo un desafío ya que la enfermedad de Chagas es una dolencia generada en la inequidad y pobreza de millones de habitantes de los más variados ámbitos sociales y ecosistemas del continente, con un denominador común, la vivienda y un estilo de vida pobre e insalubre.

La forma de transmisión es por parásitos que ingresan al organismo en las heces u orina infectadas del insecto después de una picadura, por transfusión de sangre, rutas congénitas (de madre a hijo), por trasplante de órganos y accidentes de laboratorio.¹

De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés World Health Organization), se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* mayormente en América Latina² donde esta enfermedad es endémica; mientras que en los últimos años como resultado del flujo de las migraciones internacionales legales e ilegales se ha propagado a países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, 17 países europeos y algunos del Pacífico occidental.^{3,4}

En México, la parasitosis prácticamente se encuentra distribuida en todo el territorio nacional debido a las condiciones sociales, económicas, geográficas y biológicas. Se estima que 1.1 millones de personas están infectadas en el país teniendo una incidencia en 2012 de 0.70 por 100,000 habitantes, en 2017 de 0.71 por cada 100,000 habitantes. Las tasas de incidencia más altas se registraron en Yucatán, Oaxaca, Veracruz e Hidalgo.^{4,5,6}

1.1 *Trypanosoma cruzi*

El protozooario *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es un protista unicelular que pertenece al género *Trypanosoma* de la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, que pasa por diferentes etapas morfológicas en sus hospederos vertebrados e invertebrados.^{7,8}

1.1.1 Morfología

T. cruzi presenta distintas formas con variaciones en su estructura y organelos dependiendo del ambiente en el cual se encuentra (Figura 1).

Tripomastigote metacíclico, es la forma infectiva. Es una célula alargada que consta de un núcleo centralizado y un cinetoplasto en el extremo posterior del cuerpo. Mide 12 - 30 μm , incluyendo el flagelo que inicia en la parte posterior del parásito, y emerge libre en el extremo anterior, formando en su trayecto submembranar una membrana ondulada.^{9,10}

Amastigote intracelular, es redondeado u ovoide, mide 1.5 - 4.0 μm . En él pueden apreciarse el núcleo, el cinetoplasto y cuerpo basal. Carece tanto de flagelo como de membrana ondulada. Los amastigotes infectan las células del músculo liso (con una afinidad particular por el músculo cardíaco).^{9,10}

Epimastigote, es ligeramente más pequeño que el tripomastigote. Se encuentra en cultivos y en el insecto vector dado que están especializados para sobrevivir en el entorno hostil de los intestinos del vector. También puede encontrarse en vertebrados, como forma de transición. El cinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el flagelo libre, la membrana ondulada es pequeña y emerge de la parte media del protozoo.^{9,10}

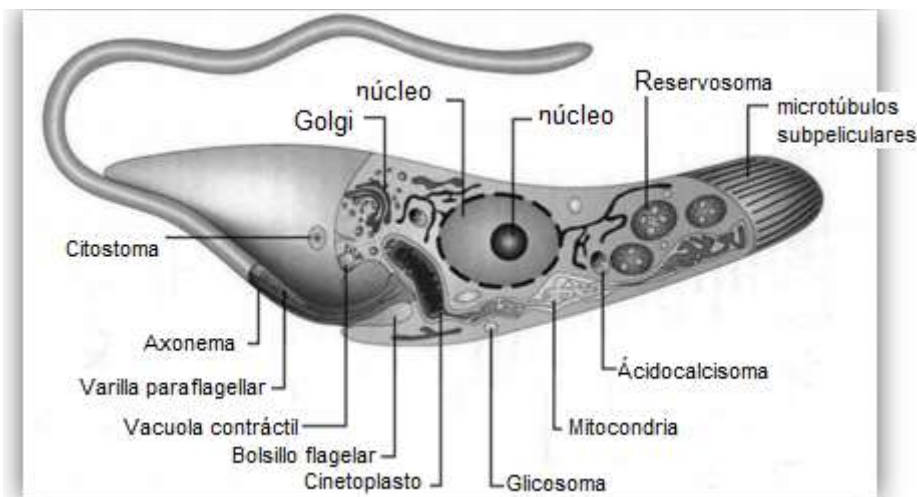


Figura 1. Principales estructuras y organelos encontrados de *T. cruzi* (Tripomastigote metacíclico).⁹

1.1.2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* consiste en tres formas de desarrollo principales ya antes mencionadas. Cuando el insecto hematófago, conocido como chinche besucona, portador del parásito *T. cruzi* se alimenta de sangre de un mamífero, frecuentemente

emite una gota de deyección de parásitos, provocando la contaminación debido a que el huésped se frota la zona provocando pérdida de piel o pequeñas lesiones, ocasionando la entrada de tripomastigotes metacíclicos a través de grietas o heridas en la piel, membranas mucosas o conjuntivas. De igual forma cuando el insecto succiona las formas tripomastigotes que se encuentran en la circulación sanguínea del hospedero infectado, los tripomastigotes en el intestino del triatomíneo se transforman en epimastigotes, los cuales se reproducen por fisión binaria longitudinal.¹¹

La presencia de los parásitos en la circulación facilita la propagación de la infección al dirigirse hacia otros tejidos. *T. cruzi* es un parásito que se reproduce en las células del sistema fagocítico mononuclear por lo que, al ser fagocitado, los tripomastigotes se transforman en amastigotes dentro de los macrófagos; éstos se reproducen dentro de la célula hasta que la rompen, quedando libres en la circulación y transformándose nuevamente en tripomastigotes, los cuales pueden invadir nuevas células, tales como células del sistema fagocítico mononuclear, células de tejido muscular estriado y células nerviosas. Una vez dentro de estas células se vuelven a reproducir. Además de lisis de las células, queda la posibilidad de que cuando sea picado este mamífero por un triatomíneo succione sangre e ingiera las formas circulantes. De manera ilustrativa en la figura 2 se puede apreciar con detalle el ciclo biológico.¹²

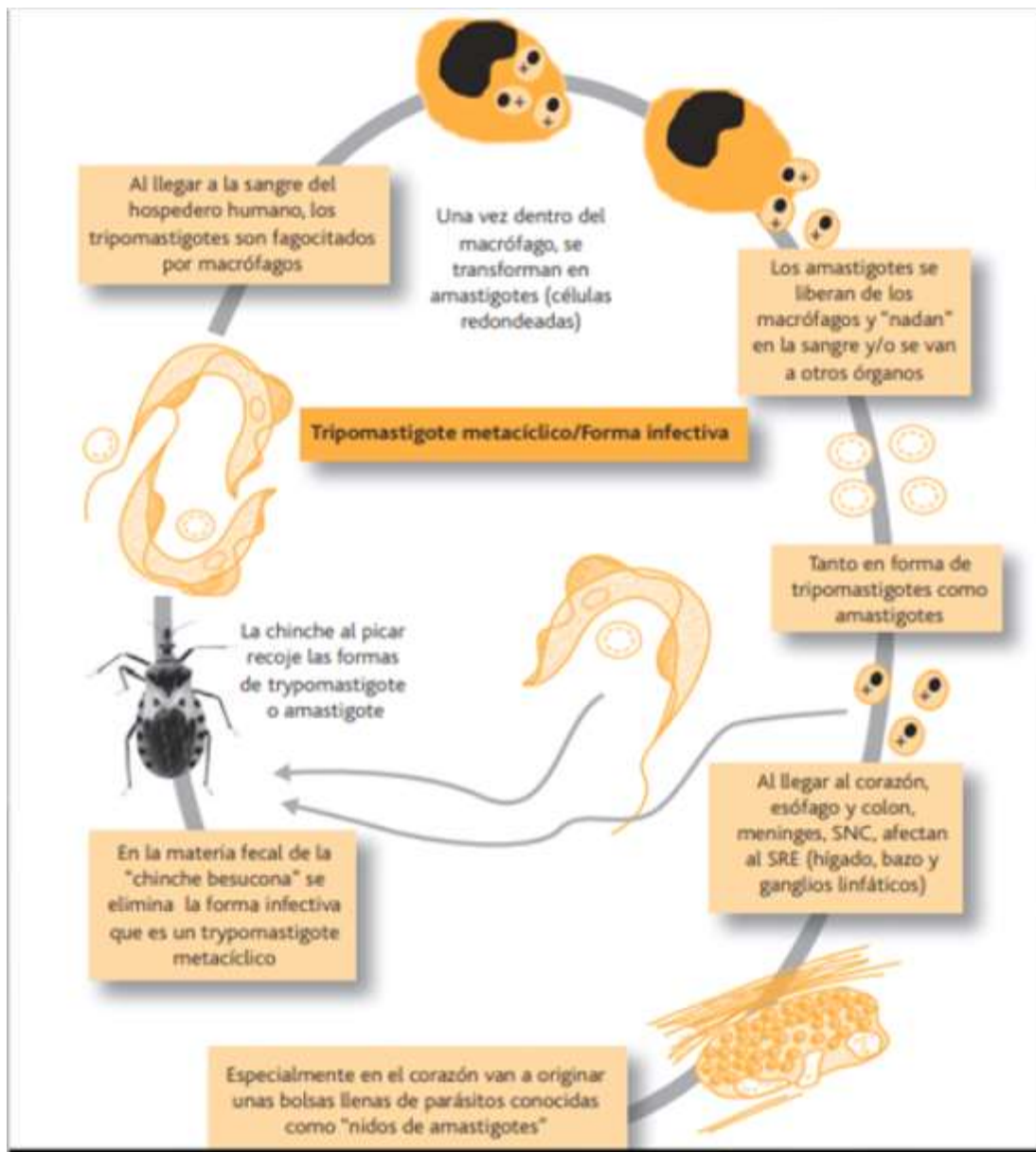


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*.¹²

1.2 Vector de transmisión

Las especies intradomiciliarias son *Triatoma barberi*, asociada con miocardiopatías y megas (dilataciones) de órganos del tracto digestivo, y *Triatoma dimidiata*, distribuida desde los países andinos y de Centroamérica hasta México.

En México se han detectado ocho géneros y 31 especies de triatoma. En dos terceras partes del territorio existen las condiciones para que se lleve a cabo la transmisión vectorial (Figura 3). Las principales especies identificadas en 2018 en la República fueron *Triatoma longipennis* (34%), *Triatoma pallidipennis* (23%) y *Triatoma dimidiata* (29%).⁴

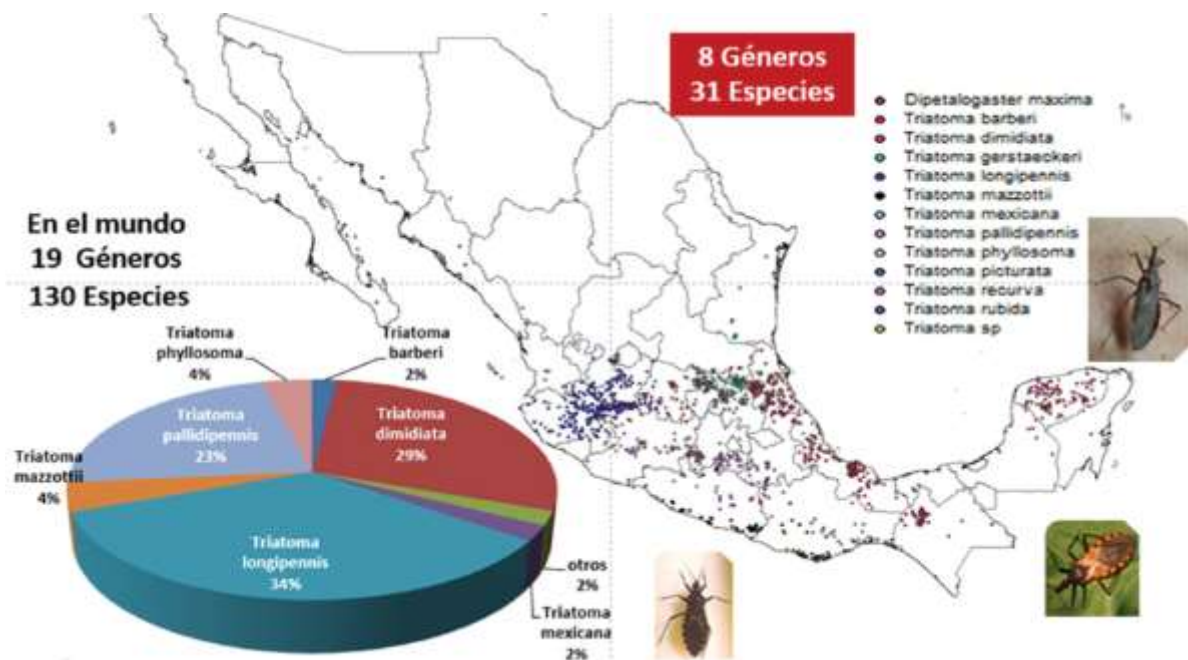


Figura 3. Distribución de triatominos en México, 2018. ⁴

1.2.1 Patogenia y Diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana

Después de un periodo de incubación de 7-10 días, se desarrolla la enfermedad que consta de tres periodos definidos: agudo, crónico latente o indeterminado y crónico determinado.

Agudo (1 a 4 meses). Caracterizado por una alta parasitemia en sangre y una extensa parasitosis de tejidos locales, suele pasar desapercibida debido a la ausencia de síntomas específicos. Sólo 5% desarrollan la forma aguda sintomática, que tiene mayor frecuencia e importancia en niños; el signo de Romaña es el evento clásico de esta fase, que se caracteriza por edema bpalpebral unilateral de color violáceo como “ojo en tinta” u “ojo morado”.⁸ Para el diagnóstico se realiza examen directo en fresco, gota gruesa, método de concentración de Strout, con el fin de visualizar los tripomastigotes sanguíneos. Otros estudios auxiliares son el xenodiagnóstico, hemocultivo y PCR.¹³

Fase indeterminada (10 años a décadas). Este periodo por definición es asintomático. Entre el 60-70% de los infectados presenta este periodo y dentro del 30-40% de ellos permanecen en él por toda la vida.⁸

A) Periodo crónico determinado

Forma cardiaca: Es la más importante por su alta morbimortalidad en zonas endémicas. Se observan en este periodo inflamación crónica, miocitólisis y fibrosis progresiva que compromete las tres capas del corazón.¹¹

Formas digestivas: Si bien las lesiones afectan todo el tubo digestivo, las más importantes comprometen el esófago y el colon terminal, es decir, los segmentos que tienen contenidos más sólidos, originando alteraciones motoras, anatómicas, así como de absorción y secreción.

Forma nerviosa: El compromiso del sistema nervioso central SNC puede ser difuso o focal con escasa repercusión clínica. El perfil psicológico del paciente chagásico crónico es el de una persona que actúa como si estuviera permanentemente estresado.^{8, 11}

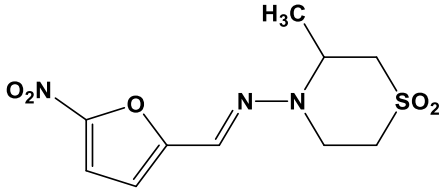
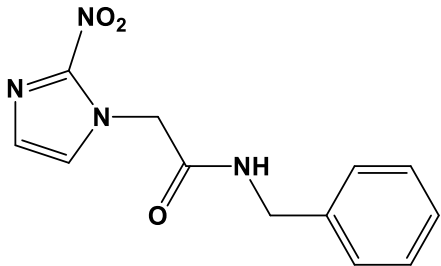
Para el diagnóstico se utilizan los métodos inmunodiagnósticos como ELISA, IFI, hemoaglutinación indirecta y fijación del complemento; también se emplea el xenodiagnóstico.¹³

1.3 Tratamiento de la Tripanosomiasis Americana

Existe hoy en día el consenso de que la enfermedad de Chagas deberá ser tratada en todos sus periodos, agudo, crónico indeterminado y crónico determinado, excepto en el periodo crónico terminal, ya que la terapia en fase terminal es poco competente, y si es aplicada puede modificar la evolución natural de la enfermedad.⁸ Los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son el nifurtimox, un nitrofurano (Lampit® Bayer); y un derivado nitroimidazólico, el benznidazol (Rochagan® Radanil, Roche),¹⁴ ver tabla 1.

Ambos compuestos presentan una significativa actividad durante la fase aguda, logrando más del 80% de la cura parasitológica en pacientes bajo tratamiento. Sin embargo, su eficacia varía de acuerdo con el área geográfica, dependen de la fase de la enfermedad, la dosis, la duración del tratamiento, edad del paciente y resistencia o susceptibilidad variable de *T. cruzi*, aunado a los efectos secundarios y adversos propios de los fármacos.¹⁵

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la tripanosomiasis americana.

FÁRMACO	CONSIDERACIONES ESPECIALES
NIFURTIMOX 	Tratamiento para la fase aguda. Con este fármaco, una alta proporción de pacientes presenta anorexia, alteraciones gastrointestinales, cefalea, reacciones alérgicas, debilidad, polineuritis, fatiga, desórdenes del sueño. Está contraindicado en pacientes con antecedentes o neuropatía periférica, epilepsia, enfermedades psiquiátricas, daño cerebral, daño hepático, daño renal. No se tiene información sobre su seguridad en el embarazo.
BENZNIDAZOL 	Con este fármaco es común la aparición de convulsiones, parestesias y coloración rojiza de la piel. Está contraindicado en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad. No se tiene información sobre su seguridad en el embarazo.

El tratamiento se puede realizar con Nifurtimox (60 días) o Benznidazol (30 días). Nifurtimox, las dosis recomendadas son:

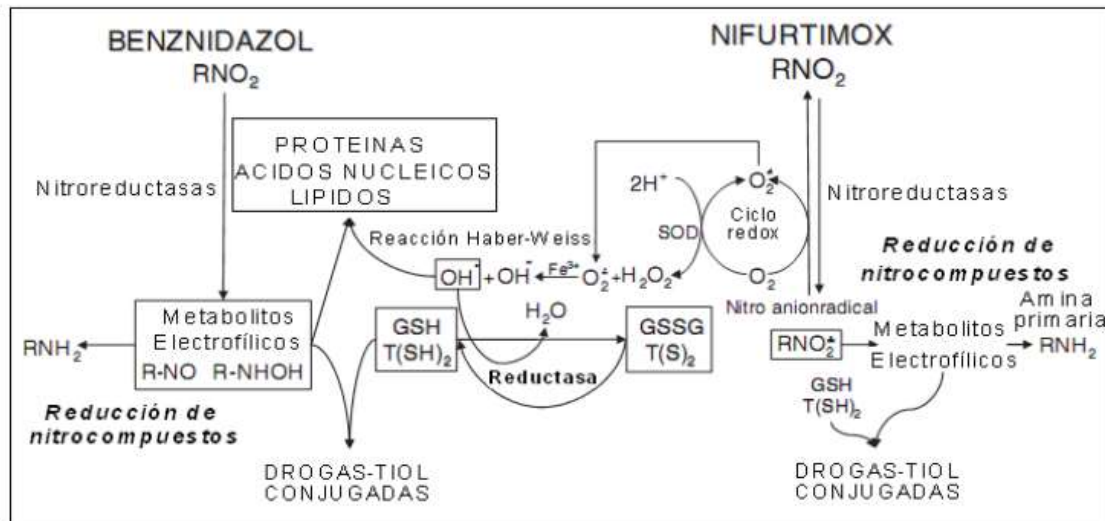
- Hasta los 2 meses de edad: 12 a 15 mg/kg.
- Primera y segunda infancia: 12 a 15 mg/kg cada 8 h.
- Adolescentes y adultos: 8 a 10 mg/kg cada 8 h.

Benznidazol: la dosis recomendada es la misma para todas las edades (5 mg/kg cada 12 h), aunque algunos sugieren que en los niños se pueden aplicar dosis de hasta 10 mg/kg/día.¹¹

1.3.1 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol

Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bnz) actúan a través de la formación de radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de nitrorreductasas relacionadas con el citocromo P450 de *T. cruzi*. Este radical nitroanión del Nfx puede unirse directamente al glutatión (GSH) y tripanotión (T(SH)₂) del parásito o bien puede entrar a un ciclo

óxido-reducción y formar H_2O_2 por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden a su vez formar el radical hidroxilo, el cual va a unirse a las macromoléculas del parásito (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos), así como el glutatión (GSH) y tripanotión libre (TSH)₂ (Esquema 1). La actividad parasiticida de benznidazol contra parásitos tanto intracelulares como circulantes varía entre 60 y 90%, con una respuesta de diferentes cepas de *T. cruzi* que varían ampliamente.^{16, 17}



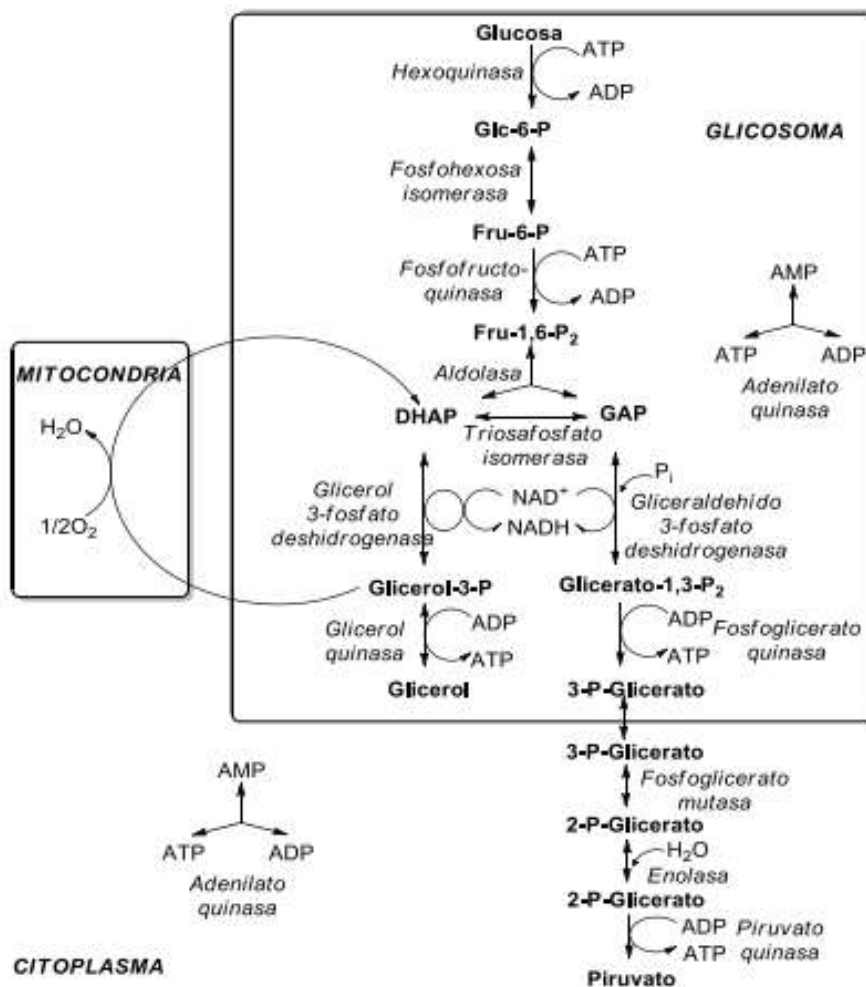
Esquema 1. Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazol.¹⁶

1.4 Prevención

En general existen cuatro niveles de prevención de la enfermedad de Chagas: el primer nivel se basa en acciones que eviten la transmisión del parásito a personas susceptibles. La única forma viable, hasta el presente, es reducir las oportunidades de interacción entre los seres humanos y los insectos vectores utilizando insecticidas de tercera generación (piretroides) para matar a los triatomíneos domiciliados, acompañada del mejoramiento de la vivienda rural, a fin de impedir la colonización por los vectores. El segundo nivel es prevenir el daño e incapacidad de los infectados. El tercer nivel es disminuir la incapacidad instalada. Para ello la prevención de tripanosomiasis por transfusión sanguínea se debe realizar mediante controles serológicos obligatorios. Por último, el cuarto nivel, la educación sanitaria es sin lugar a duda lo más importante en la prevención; sin ella no hay control de la transmisión.^{8,11,18}

1.5 La vía glucolítica

Trypanosoma cruzi posee numerosas características estructurales y metabólicas que lo diferencian de sus huéspedes mamíferos. Una característica importante es en su metabolismo y 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 blancos o dianas farmacológicas para la búsqueda y el diseño de moléculas que puedan inhibir selectivamente al parásito, afectando su función metabólica. En particular, la TIM tiene un rol importante en la regulación de la obtención de energía.¹⁹



Esquema 2. Vía glucolítica de *T. cruzi*.²⁰

1.5.1 Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*

La TIM cataliza la conversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en el quinto paso de la glucólisis, ver esquema 2. Por lo tanto, si se inhibe esta enzima causaría una ineficiencia en la ruta metabólica, además de provocar la acumulación de DHAP el cual se convierte en metilglioxal que es tóxico para el parásito.²¹

Estructuralmente la TIM es homodimérica, donde cada monómero está formado por 250 y 251 aminoácidos respectivamente y cada uno consta de un dominio estructural denominado barril TIM, el cual consiste en ocho hojas plegadas β en paralelo, circundadas por ocho hélices α , conectados por asas formando una especie de barril compacto (Figuras 4 y 5).²¹ En su estructura, las asas 3 y 6 cobran especial importancia, ya que el asa 3 forma parte de la interfaz con una dimensión de 1463 \AA^2 y el asa 6 contiene los residuos catalíticos. Ambas asas se encuentran relativamente cerca una de la otra y la inmovilización de cualquiera de las dos asas causa la inactivación de la enzima. A pesar que cada monómero cuenta con un sitio catalítico, éste sólo es activo cuando el monómero forma la enzima activa, y cada sitio activo del dímero permanece inactivo de forma alternada.^{22, 23}

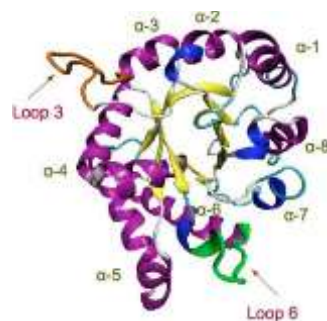


Figura 4. Estructura monomérica de la TIM.²⁴

α -helix en morado, β -sheets (hojas) en amarillo y las asas 3 y 6 en naranja y verde respectivamente.

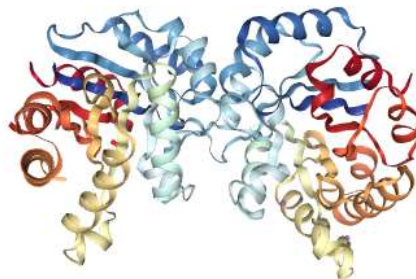


Figura 5. Forma dimérica de Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*.²⁴

1.5.2 Triosafosfato isomerasa de *Homo sapiens*

Triosafosfato isomerasa de *Homo sapiens* (HsTIM), figura 6, de igual forma es una enzima glucolítica que convierte la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en gliceraldehído 3-fosfato (GAP), con la excepción que no es un paso obligatorio para el flujo glucolítico. El sitio catalítico se encuentra altamente conservado entre las especies, sólo variando la posición de los residuos; por tanto, un diseño enfocado hacia el sitio catalítico podría traer implicaciones de tipo toxicológico para el uso del compuesto como futuro fármaco, dificultando el diseño de un inhibidor selectivo de la TIM.^{25, 26}

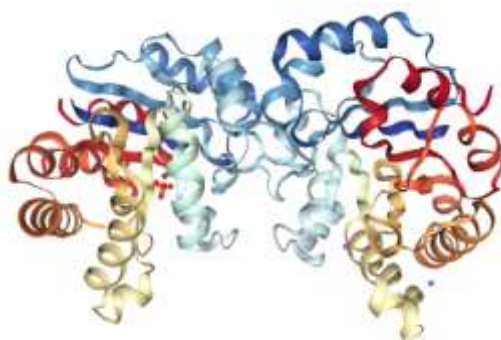


Figura 6. Forma dimérica de Triosafosfato isomerasa de *H. sapiens*.²⁷

A diferencia del sitio catalítico, la secuencia total de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) guarda un 53% de similitud con respecto a la TIM del ser humano (HsTIM). Esta diferencia hace posible proponer un “sitio de control alostérico” putativo localizado en la interfaz de la enzima, el cual es altamente hidrofóbico: el sitio de la interfaz de TcTIM está conformada principalmente por residuos aromáticos, mientras que el de la HsTIM está conformada por residuos hidrofóbicos alifáticos y aromáticos distintos a los presentes en TcTIM, abriendo una posibilidad para el diseño de inhibidores selectivos a TcTIM.²⁵

1.6 Los bencimidazoles

La estructura de la molécula del bencimidazol consiste en un sistema de anillos caracterizados por la fusión de un benceno en las posiciones 4 y 5 del imidazol. Esta estructura despertó el interés en los bencimidazoles, cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil)bencimidazol (Figura 7) formaba parte de la estructura de la vitamina B₁₂. Desde 1950 se le ha brindado importancia como un núcleo base para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos potenciales debido a la facilidad de llevar a cabo varias reacciones orgánicas en dicho núcleo y su asociación con biomoléculas, lo que ha permitido obtener cientos de compuestos que tienen un amplio espectro de

actividad biológica como: antihelmínticos, antimicrobianos, pesticidas, anticancerígenos, antiprotozoarios, entre otras actividades farmacológicas.^{28,29}

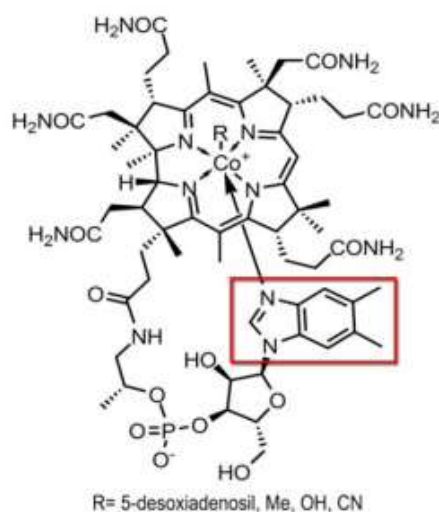


Figura 7. Vitamina B12. En rojo el núcleo del bencimidazol.²⁰

1.7 Química Farmacéutica y Tecnología Computacional

Como todos sabemos, el proceso de desarrollo de fármacos es largo y costoso, y el índice de desgaste en la generación de una nueva entidad química es muy alto (debido a las diferencias biológicas de las cepas y especies involucradas en los ensayos biológicos), especialmente en las etapas del proceso de desarrollo de fármacos (durante varias fases de los ensayos clínicos).³⁰

La química farmacéutica ha surgido como una disciplina indispensable para la terapéutica moderna, cuya razón de ser ha sido y es la búsqueda, optimización e investigación de nuevas sustancias para el tratamiento de las enfermedades. En la evolución constante de la química farmacéutica, la tecnología computacional ha surgido como una herramienta poderosa para cumplir su propósito, aprovechando la evolución de esta tecnología.³¹

1.7.1 Acoplamiento molecular

La metodología de acoplamiento o *docking* tiene como objetivo predecir los modos de unión experimentales y las afinidades de moléculas pequeñas dentro del sitio de unión de dianas receptoras particulares, y se usa actualmente como una herramienta computacional estándar en el diseño de fármacos para la optimización de compuestos. El estudio de acoplamiento es la aplicación de modelos para predecir la mejor orientación de ajuste de un ligando (nueva entidad química o fármacos) que se une a un receptor particular de interés. Estos estudios podrían ser útiles para predecir

la conformación de los fármacos (ligando) en el sitio activo de un receptor particular de interés que puede proporcionar una mejor comprensión de la complejidad de los sistemas vivos.^{30, 32}

Las herramientas básicas de una metodología de acoplamiento incluyen un algoritmo de búsqueda y una función de puntuación de energía para generar y evaluar posturas de ligandos. 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 de 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).^{30, 32}

A pesar que el acoplamiento molecular se ha constituido como una metodología muy poderosa para el diseño de fármacos,³³ hay que considerar lo siguiente:

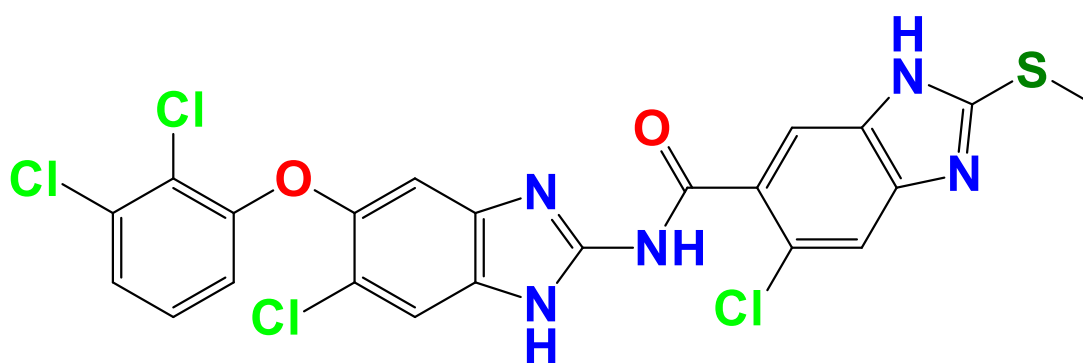
1. La afinidad es sólo un atributo de la unión fármaco-receptor.
2. Una buena afinidad observada no implica un modo de unión correcto.
3. Los resultados son altamente dependientes de las estructuras del ligando y del receptor. Por tanto, fenómenos como el origen y preparación de las estructuras, conformación inicial utilizada, estado de protonación y flexibilidad del sistema, afectan el resultado.
4. Entre más complejo es el ligando, menor será la reproducibilidad de resultados.
5. Ligandos similares pueden tener modos de unión distintos y los compuestos poco activos pueden no tener afinidad por el receptor estudiado.
6. En los resultados habrá una alta proporción de falsos positivos y falsos negativos.
7. Son necesarias funciones de evaluación que den resultados acordes con lo observado experimentalmente.

Conforme la teoría que sustenta el acoplamiento molecular vaya avanzando y evolucionando, estas limitaciones serán subsanadas. Mientras tanto, si el modelo estudiado por acoplamiento molecular toma en cuenta lo anterior y trata de superar estas limitaciones, el modelo será más representativo del sistema ligando-receptor estudiado.

SECCIÓN II.
DESARROLLO
EXPERIMENTAL

2. PRECEDENTE DEL PROYECTO

En trabajos previos en el laboratorio L-122 del departamento de Farmacia de Facultad de Química de la UNAM se llevó a cabo la síntesis y evaluación de seis bencimidazoles híbridos entre un 2-amino-1*H*-bencimidazol y un 2-metiltio-1*H*-bencimidazol 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 (Figura 8) sobresale como el más activo en ambas cepas y el menos tóxico. Además de ser el más potente en su actividad inhibitoria contra la Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) mostrando un 71% de inhibición a 100 μ M.



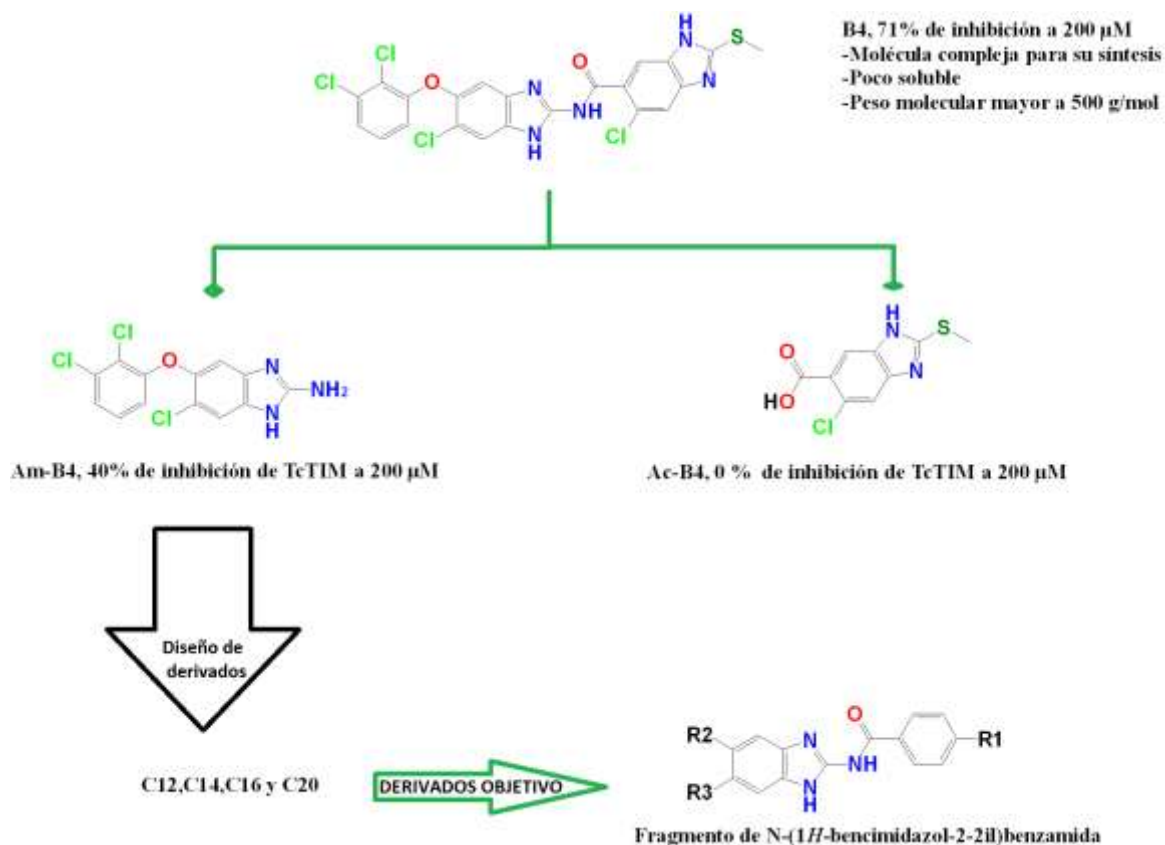
5-Cloro-*N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metilsulfanil)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamida

Figura 8. Molécula B4.

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 μ M, por lo que se sugiere que esta parte de la estructura es muy importante para la actividad inhibitoria de la enzima TcTIM (Esquema 3). A partir de esta información se diseñó una serie de compuestos (Serie C12-C20) derivados del compuesto Am-B4 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.³⁴

Al comparar las actividades de C12-C20 sobre la TcTIM se encontró que C20 tuvo el 33% de inhibición, por lo que además de no ser una molécula tan grande compite con los anteriores que son aún más grandes. Además, a consecuencia del sustituyente naftilo se compromete la solubilidad de los compuestos (Tabla 2).³⁵

Es por ello por lo que la relevancia del proyecto radica en la síntesis de 6 derivados de bencimidazol diseñados a partir del fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida los cuales en su estructura poseen como núcleo base el bencimidazol con cloro como sustituyente en 5 o 6 unido mediante un enlace amida a un benceno sustituido en posición *para*, ya sea con un grupo electroatractor o electrodonador (Tabla 3), diseñados para actuar como inhibidores de la TcTIM.



Molécula	R1	R2	R3
1	Metoxilo (MeO)	---	---
2	Metoxilo (MeO)	Cloro (Cl)	---
3	Metoxilo (MeO)	Cloro (Cl)	Cloro (Cl)
4	Nitro (NO ₂)	---	---
5	Nitro (NO ₂)	Cloro (Cl)	---
6	Nitro (NO ₂)	Cloro (Cl)	Cloro (Cl)

Esquema 3. Concepción del fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida.

Tabla 2. Compuestos plantilla con el fragmento N-(1H-bencimidazol-2-il)benzamida. Derivados C12-C20.

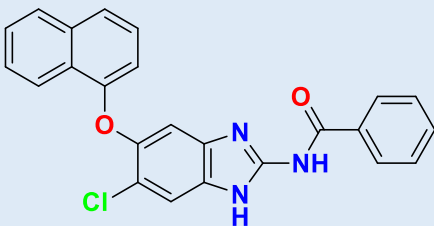
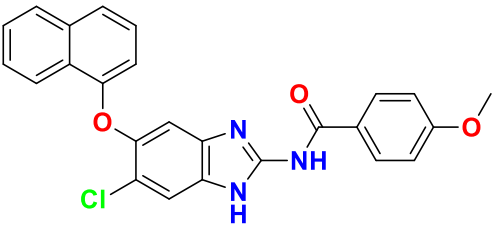
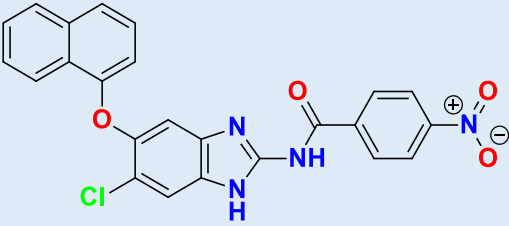
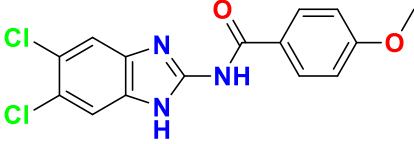
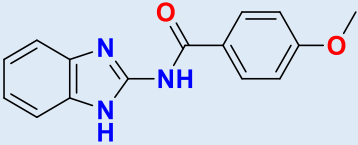
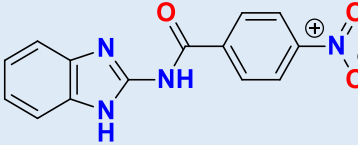
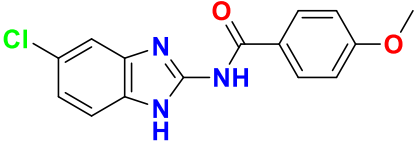
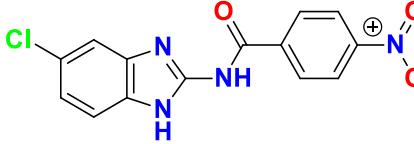
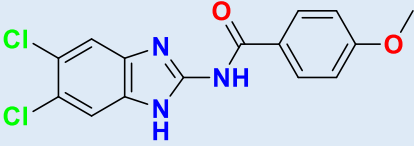
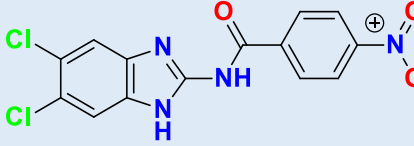
Denominación por el investigador	% de Inactivación de TcTIM	Estructura y nombre
C12	30 (100 μ M)	 <p><i>N</i>-[6-cloro-5-(naftalen-1-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]benzamida</p>
C14	35 (100 μ M)	 <p><i>N</i>-[6-cloro-5-(naftalen-1-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]-4-metoxibenzamida</p>
C16	33 (100 μ M)	 <p><i>N</i>-[6-cloro-5-(naftalen-1-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]-4-nitrobenzamida</p>
C20	33 (100 μ M)	 <p><i>N</i>-(5,6-dicloro-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida</p>

Tabla 3. Compuestos objetivo con el fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida.

CLAVE	Compuestos con metoxilo	CLAVE	Compuestos con nitro
CN1	 <p><i>N</i>-(1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida</p>	CN4	 <p><i>N</i>-(1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida</p>
CN2	 <p><i>N</i>-(5(6)-cloro-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida</p>	CN5	 <p><i>N</i>-(5(6)-cloro-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida</p>
CN3	 <p><i>N</i>-(5,6-dicloro-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida</p>	CN6	 <p><i>N</i>-(5,6-dicloro-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida</p>

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y en México la parasitosis prácticamente se encuentra distribuida en todo el territorio nacional.²⁵

Las enfermedades causadas por parásitos son un grave problema de salud pública y tomando en cuenta que la enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica de Latino América, así como emergente en países de primer mundo es de suma importancia su investigación en México, dada la alta incidencia, los daños a la salud y la falta de un tratamiento eficaz en todas las fases de la enfermedad para las que no se cuenta con fármacos seguros.

Con estos problemas presentes es importante realizar investigación con el propósito de contribuir en el desarrollo de nuevas moléculas activas que inhiban selectivamente dianas farmacológicas de rutas metabólicas vitales del parásito en cualquier estadio, que sean efectivas a dosis bajas, que su síntesis tenga un costo accesible y que produzcan la menor cantidad de efectos adversos, para de esta manera hacer más eficiente la terapia en la enfermedad. En este sentido, en el laboratorio L-122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM se ha trabajado en la síntesis de derivados de bencimidazol con actividad antiparasitaria y de manera más específica contra *T. cruzi*. De acuerdo con los resultados encontrados se busca contar con moléculas de menor peso molecular y con las características estructurales necesarias para presentar actividad inhibitoria de la TcTIM, y con ello aumentar la base de datos para poder realizar correlaciones estructura-actividad biológica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar seis compuestos derivados de bencimidazol del tipo *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida y evaluar la actividad inhibitoria de los mismos contra la TcTIM.

4.2 Objetivos específicos

- Diseñar una ruta de síntesis para obtener de manera viable los compuestos, a partir de las síntesis previamente reportadas por nuestro grupo de investigación, así como por la búsqueda bibliográfica.
- Llevar a cabo la caracterización estructural de los intermediarios de síntesis (serie **CN**), así como de los compuestos finales mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad inhibitoria de la enzima TcTIM de los compuestos obtenidos (serie **CN**).
- Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados (serie **CN**) sobre la TcTIM y la HsTIM.

5. HIPÓTESIS

Se espera que la serie de seis derivados del bencimidazol diseñados a partir del fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida, las cuales tienen en su estructura el sustituyente metoxilo o nitro en posición 4 de la benzamida y con uno o dos Cl en posiciones 5 y 6 del bencimidazol, tendrán una optimización respecto a la solubilidad y su actividad inhibitoria frente a la enzima trifosfato isomerasa de *T. cruzi* con respecto a los compuestos previos utilizados para su diseño (C12-C20).

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Experimental, descriptivo, comparativo y prospectivo.

Población de estudio:

6 compuestos con el fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida

Tabla 4. Variables de estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Compuestos con fragmento <i>N</i>-(1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)benzamida	Serie CN las cuales tienen en su estructura el sustituyente metoxilo o nitro en posición 4 de la benzamida y con o sin sustituyentes de uno o dos Cl en posiciones 5 o 5 y 6 del bencimidazol.	Síntesis química y caracterización fisicoquímica y estructural de los compuestos de la serie CN mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
Actividad inhibitoria de los compuestos contra la TcTIM	Cuando se inhibe la enzima TcTIM causa una ineficiencia en la ruta metabólica de la vía glucolítica, además de provocar la acumulación de DHAP el cual se convierte en metilglioxal que es tóxico para el parásito.	Estudios de inhibición contra la enzima TcTIM y acoplamiento molecular de los compuestos de la serie CN

Criterios de Inclusión: Serie de 6 derivados del bencimidazol diseñados a partir del fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida denominadas de manera general “serie **CN**” las cuales tienen en su estructura el sustituyente metoxilo o nitro en posición 4 de la benzamida y con o sin sustituyentes de uno o dos Cl en posiciones 5 o 5 y 6 del bencimidazol y que además cumplan con la caracterización fisicoquímica y estructural mediante el uso de técnicas de punto de fusión, cromatografía, espectroscópicas y espectrométricas.

Criterios de Exclusión: Aquellos compuestos que no cumplan con la caracterización fisicoquímica y estructural mediante el uso de técnicas de punto de fusión, cromatografía, espectroscópicas y espectrométricas.

Criterios de Eliminación: cambio en sus propiedades físicas de los compuestos y/o contaminados.

7. METODOLOGÍA

El trabajo realizado para esta tesis se dividió en tres partes operativas: la parte química sintética, la parte enzimática y la parte computacional. La parte química sintética y la parte computacional se llevaron a cabo en el laboratorio 122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, dentro de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra y la supervisión de la Dra. María Alicia Hernández Campos; mientras que la parte enzimática se desarrolló en la Facultad de Medicina de la UJED por el Dr. Alfredo Téllez Valencia.

7.1 PARTE QUÍMICA

En trabajos previos en nuestro grupo de investigación se ha trabajado con carboxamidas unidas en posición 2 del núcleo de bencimidazol, este sustituido en las posiciones 5 o 5 y 6 por átomos o grupos grandes. En dichos proyectos se obtuvieron resultados poco convenientes, si bien se obtenían los compuestos, sus rendimientos eran muy bajos; o los métodos de purificación no eran tan efectivos lo que hacía que su caracterización fuera poco confiable. Por esta razón, se planearon rutas de síntesis que aseguraran la sustitución de la carboxamida en posición 2 del núcleo del bencimidazol y así tener la certeza de que se están obteniendo los compuestos objetivo.

La parte química sintética de este trabajo se divide en dos secciones:

Sección 1. Síntesis de las N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamidas sustituidas en 5 o 5 y 6

1. Síntesis de la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5.
2. Preparación de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo y preparación de (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.
3. Reacción de ciclocondensación entre la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 con el (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.

Sección 2. Síntesis de las N-(1H-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6

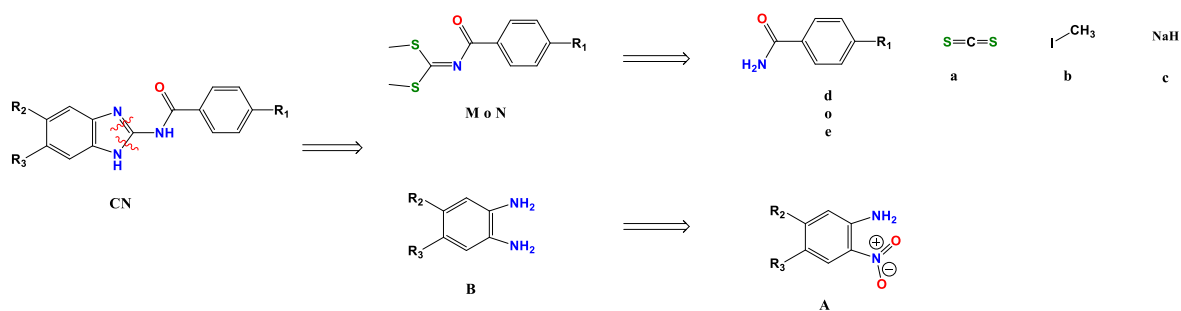
Estrategia 1:

Reacción de ciclocondensación entre la 1,2-fenilendiamina con el (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.

Estrategia 2:

1. Reacción de protección del Nitrógeno 1 de 2-amino-1*H*-bencimidazol con dicarbonato de di-*tert*-butilo.
2. Sustitución nucleofílica entre el 2-aminobencimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo con del cloruro de 4-nitrobenzoilo.
3. Desprotección de 2-(4-nitrobenzamido)-1*H*-1,3-benzodiazol-1-carboxilato de *tert*-butilo.
4. Método de comprobación de la adición en posición 2 del bencimidazol por metilación del compuesto CN4.
5. Reacción directa entre 2-amino-1*H*-bencimidazol sustituido en 5 o 5 y 6 con cloruro de 4-nitrobenzoilo.

De forma general, en el esquema 4 se presenta el análisis retrosintético para la obtención de los compuestos objetivo. Al realizar una desconexión en el grupo amida de la *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida (**CN**) se obtienen los intermediarios benzoilcarboniditioimidato de dimetilo sustituidos en *para* con metoxilo y nitro denominados **M** y **N** respectivamente.^{36, 37} y la 1,2-fenilendiamina (**B**) sustituida en 4 o 4 y 5. El intermediario **M** o **N** se puede sintetizar a partir de disulfuro de carbono CS₂ (**a**), la benzamida sustituida en 4 con metoxilo o nitro (**d** o **e**) y el yoduro de metilo CH₃I (**b**) con hidruro de sodio NaH (**c**) en tetrahidrofurano (THF) anhidro. Mientras que la 1,2-fenilendiamina (**B**) parte de la reducción de 2-nitroanilina (**A**) sustituida en 4 o 4 y 5.^{37, 38}



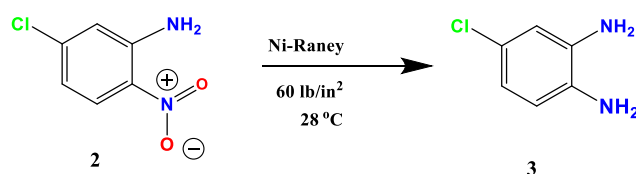
Esquema 4. Retrosíntesis del fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida.

Tabla 5. Sustituyentes de las moléculas con el fragmento *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida.

Molécula	R1	R2	R3
CN1	MeO	H	H
CN2	MeO	Cl	H
CN3	MeO	Cl	Cl
CN4	NO ₂	H	H
CN5	NO ₂	Cl	H
CN6	NO ₂	Cl	Cl

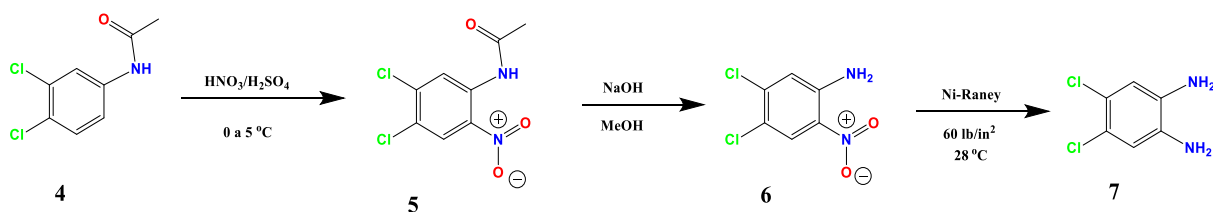
7.1.1 Síntesis de la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 (compuestos 3 y 7 respectivamente).

Para la síntesis del compuesto **3** se partió de la 4-cloro-2-nitroanilina (**2**), la cual se sometió bajo condiciones de hidrogenación catalítica usando como catalizador de Ni-Raney,²⁰ de donde se obtuvo la 4-cloro-1,2-fenilendiamina (**3**). Todo esto, de acuerdo a la reacción que se muestra en el esquema 5.



Esquema 5. Reducción catalítica de la 5-cloro-2-nitroanilina.

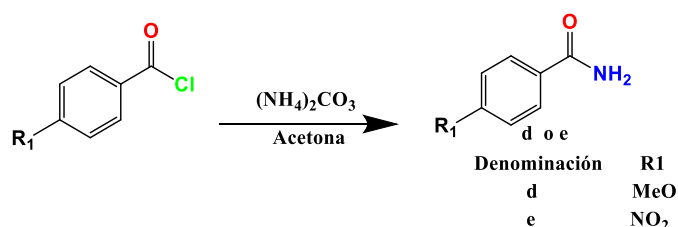
Para obtener el compuesto 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (**7**) se siguió la secuencia de las reacciones que se muestran en el esquema 6. La síntesis inició de *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (**4**), la cual al tener la amina previamente protegida permitió llevar a cabo la nitración en la posición 2 deseada usando una mezcla sulfonítrica a 0-5 °C para obtener la *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**5**). Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis en medio básico para así obtener la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**6**) la cual se sometió a una reducción catalítica en presencia de H₂ y como catalizador de Ni de Raney, lo que llevó a la 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina.²⁰



Esquema 6. Síntesis de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina.

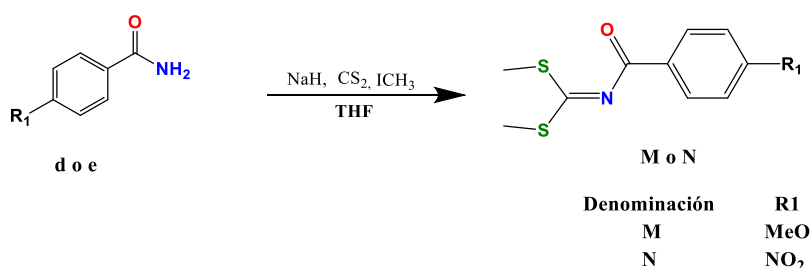
7.1.2 Síntesis del intermediario benzoilcarboniditioimidato de dimetilo.

La síntesis de los benzoilcarboniditioimidatos de dimetilo (**M** o **N**) se realizó de acuerdo con las secuencias de reacciones mostradas en los esquemas 7 y 8. Se partió del cloruro de benzoilo adecuadamente sustituido disponibles comercialmente los cuales se trataron con (NH₄)₂CO₃ en acetona a temperatura de 0 °C para llevar a cabo una reacción de Sustitución nucleofílica (S_N) y obtener las benzamidas correspondientes (**d** o **e**).



Esquema 7. Síntesis de benzamidas.

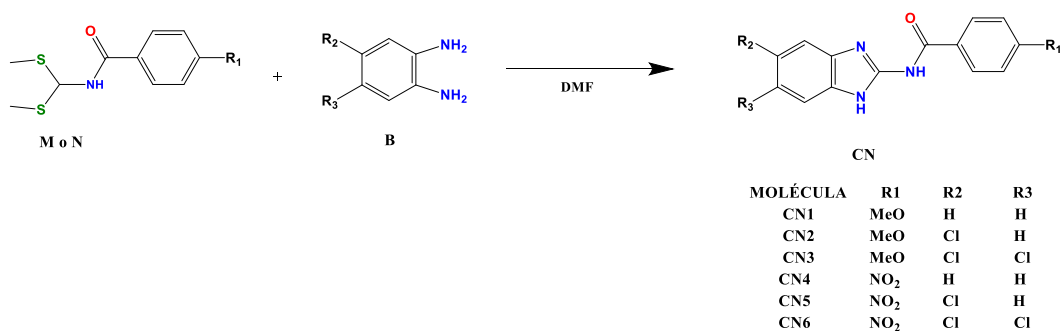
Posteriormente para obtener la molécula **M** o **N**, las benzamidas **d** o **e** se agregaron a una solución de tetrahidrofurano anhidro (THF) con NaH disperso en aceite mineral, CS₂ y CH₃I la cual fue calentada a temperatura de reflujo.³⁷



Esquema 8. Síntesis de benzoilcarbonitioimidato de dimetilo.

7.1.3 Formación de *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida

La 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 (**B**) reacciona con el compuesto **M** o **N** en dimetilformamida (DMF) a reflujo para formar los compuestos finales **CN1-6**, esquema 9.

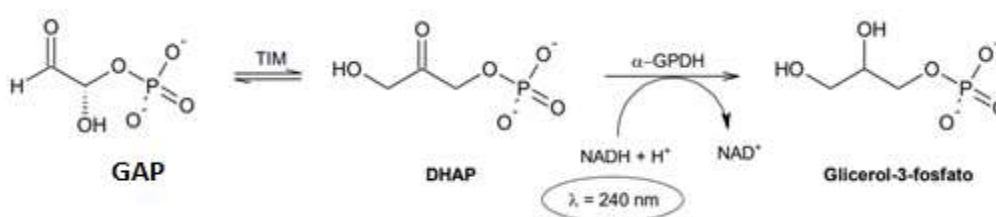


Esquema 9. Formación de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamidas.

7.2 PARTE ENZIMÁTICA

7.2.1 Metodología para la realización de las evaluaciones de inhibición enzimática sobre la TcTIM

La actividad inhibitoria de la TcTIM se evaluó mediante la actividad residual de la enzima después de la exposición de ésta con los compuestos sintetizados a una concentración de 10-100 μM . Se determinó mediante un método indirecto que cuantifica NADH, la actividad de la TcTIM se midió con un sistema acoplado utilizando α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α GDH), en la dirección de gliceraldehido 3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a 25 °C, esquema 10. La mezcla de reacción (1 mL) contenía 100 mM de trietanolamina, 10 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 0.2 mM de NADH, 0.9 unidades de α GDH, y 1 mM de GAP a pH 7.4. La reacción se inició con la TcTIM (10 ng/mL). El decremento en absorbancia a 240 nm del NADH⁺ respecto al tiempo se utilizó para calcular la actividad de la TcTIM. Los ensayos de inhibición se realizaron agregando a la mezcla de reacción los compuestos (disueltos en DMSO) a la concentración indicada (Tabla 14) y la cantidad de DMSO correspondiente para mantener una concentración final de 10%, la cual se comprobó previamente que no afectó la actividad de la TcTIM.

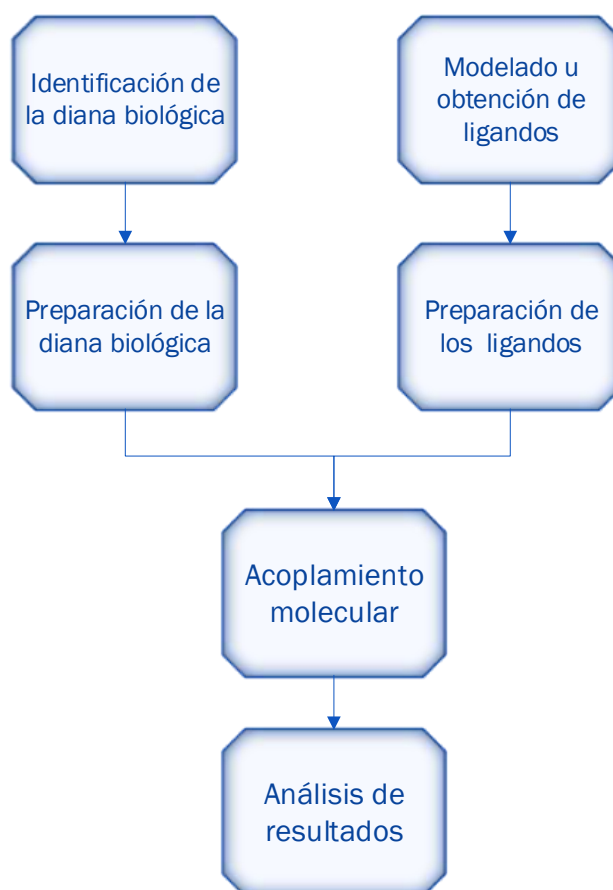


Esquema 10. Reacción para cuantificar NADH.²⁰

7.3 PARTE COMPUTACIONAL

Los estudios de acoplamiento molecular entre los ligandos (serie **CN**) y las enzimas TcTIM y HsTIM, tienen como antecedente el porcentaje de inhibición enzimático de la molécula líder C-20 (**CN3**). Y el objetivo es observar si los compuestos mejoran las posibles interacciones con la TcTIM, al mismo tiempo que se observa si se disminuye la afinidad de estos con la HsTIM.

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular de este proyecto, se siguió el esquema de trabajo ilustrado a continuación.



Esquema 11. Método para los estudios de acoplamiento molecular.

7.3.1 Identificación de la diana biológica

Actualmente el proceso para identificar la diana biológica, implica conocer la estructura del receptor ya sea por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear.³⁹ Si no se dispone de esta información para realizar estudios de acoplamiento molecular, la estructura tridimensional de la diana biológica se puede estimar mediante homología a partir de otras proteínas similares utilizando herramientas de modelado molecular.⁴⁰ Para este estudio en particular se trabajó con las enzimas previamente preparadas por nuestro grupo de investigación de HsTIM y TcTIM.

7.3.2 Preparación de las enzimas

Las estructuras cristalográficas de TcTIM (PDB: 1TCD, resolución 1.83 Å) y de HsTIM (PDB: 1HTI, resolución 2.80 Å) se obtuvieron de la base de datos en línea del Protein Data Bank (PDB). Estas estructuras fueron acondicionadas para el acoplamiento molecular, para esto se removieron las moléculas de agua cristalográficas, contra-iones y ligandos presentes en las estructuras. Posteriormente a las estructuras se añadieron todos los hidrógenos (ya que la estructura cristalográfica carece de ellos) y finalmente fueron relajadas 2000 pasos usando el campo de fuerza AMBER02 con

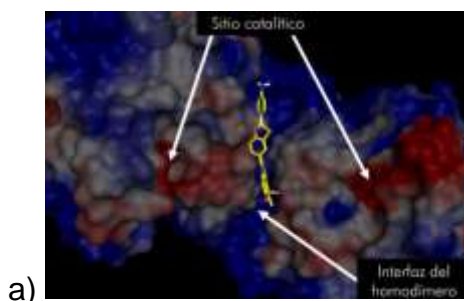
una constante dieléctrica de 20.114. Utilizando AutoDockTools 1.5.4,⁴¹ a las estructuras se les asignaron cargas Gasteiger-Marsilli y los hidrógenos no-polares se fusionaron a su carbono adyacente. Estas estructuras fueron guardadas en el formato PDBQT.

7.3.3 Preparación de los ligandos

Los compuestos enlistados en la tabla 3, fueron construidos en Spartan 14 del paquete de wavefunction, INC.⁴² y minimizados usando el método semiempírico PM3 (Parameterized Model Number 3). Posteriormente, usando el programa AutoDock Tools 1.5.6 (ADT), los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron al carbono al que estaban unidos y se detectaron automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables, marcándose como excepción los enlaces carbono-nitrógeno (N-CO) de amida, que se consideraron rígidos. Se identificaron los enlaces rotables (raíz y ramas torsionales). Estas estructuras fueron guardadas en el formato PDBQT.

7.3.3 Acoplamiento molecular

Se calcularon los mapas atómicos (grids) necesarios para el acoplamiento molecular en Autogrid 4.0, y con base a estudios previos del análisis del sitio y forma de unión de la TIM con un ligando de benzotiazol.⁴³ Se evaluaron los compuestos **CN** con el objeto de mejorar la interacción con TcTIM y disminuir la afinidad con HsTIM, se trazó una malla cúbica centrada en la interfaz de las enzimas con las coordenadas (x, y, z) para HsTIM de -1.521, 15.163 y 14.283 y para TcTIM de 10.073, 6.171, 6.934 (Figura 9).



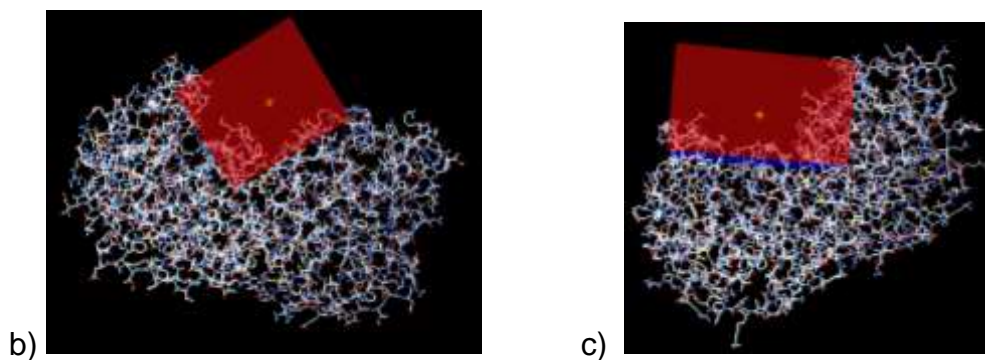


Figura 9. a) Interfaz de TcTIM con un ligando de benzotiazol, b) malla cúbica centrada en la interfaz de la HsTIM, c) malla cúbica centrada en la interfaz de la TcTIM.

Los primeros estudios generados se realizaron con Autodock 4.260, y los resultados fueron tomados como referencia para generar un consenso con los acoplamientos calculados con Autodock vina y Ledock. En el caso de Autodock los estudios de acoplamiento se efectuaron usando un algoritmo genético de tipo Lamarckiano como método de búsqueda conformacional, se realizaron 100 corridas con un número máximo de evaluaciones energéticas de 2,500,000 y una población inicial de 150 conformeros y se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables del conjunto de conformaciones más abundantes (mayor clúster). Mientras que para Autodock vina se trabajó con la interfaz de un programa computacional denominado PyRx de Python Prescription Virtual Screening Tool⁴³ en el que se realizaron 100 corridas y un área espacial similar a la que se utilizó en Autodock con las coordenadas (x,y,z) para HsTIM de 11.7669, 62.6357, 70.7268 y para TcTIM de 14.9657, 65.8667 y 65.0712 y en Ledock se trabajó en las mismas condiciones con la diferencia de que las especificaciones espaciales se programaron con Autodock.

7.3.3 Validación del acoplamiento molecular

Al finalizar el acoplamiento molecular, como resultados se obtienen: a) la conformación calculada como la más favorable para el ligando en el sitio de unión y b) un valor de puntuación o scoring que es la cuantificación de interacción entre una conformación determinada del ligando con el sitio de unión.⁴⁴ Por último, para tener certeza sobre la validez de los estudios de acoplamiento molecular y el modo de unión determinado por los tres programas utilizados Autodock4.260, Autodock vina y Ledock se llegó a un consenso entre los tres softwares tomando como referencia a las conformaciones con Autodock. El tratamiento de cribado virtual se consideró válido si dicho valor de RMSD era menor a 2.0.^{45, 46}

SECCIÓN III.

RESULTADOS Y

ANÁLISIS

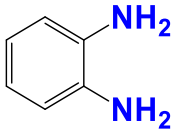
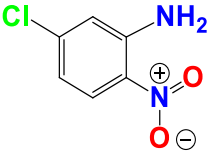
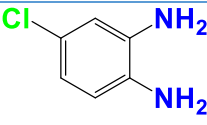
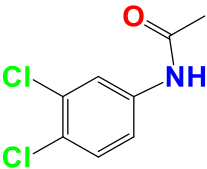
8. RESULTADOS

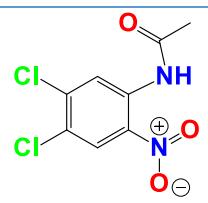
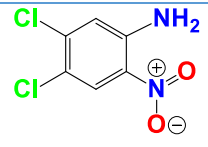
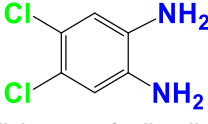
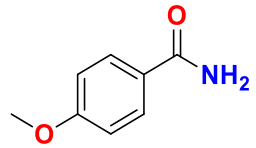
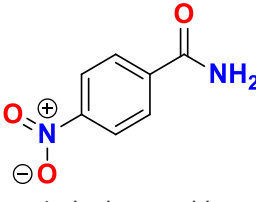
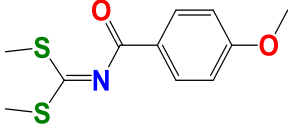
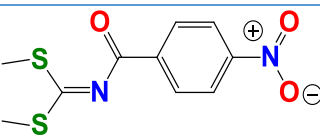
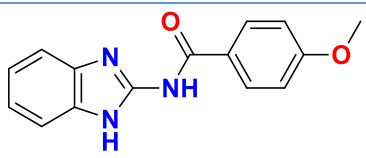
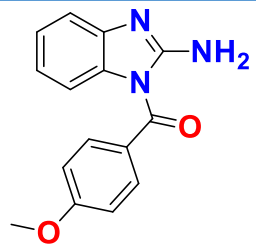
Los resultados obtenidos en esta investigación se muestran a continuación. En un inicio la síntesis química, donde se declaran los resultados de caracterización física y espectroscópica de los compuestos adquiridos. Enseguida se aborda la sección de ensayos enzimáticos, donde se muestran los resultados de inhibición de la enzima TcTIM. Por último, se explican los resultados de inhibición enzimática de la TcTIM y HsTIM mediante el estudio de acoplamiento molecular.

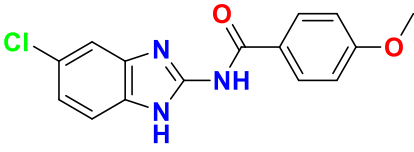
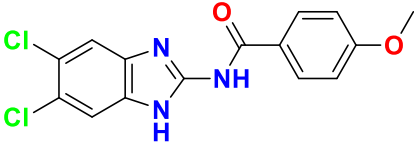
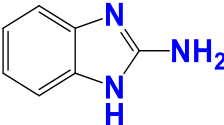
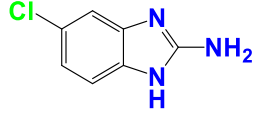
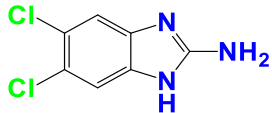
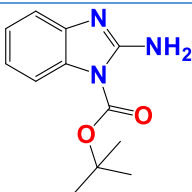
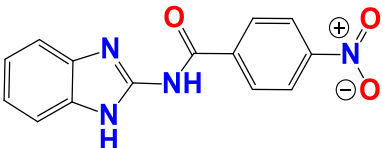
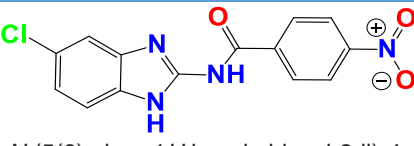
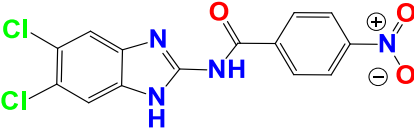
8.1 PARTE QUÍMICA SINTÉTICA

En la tabla 6 se muestran las propiedades fisicoquímicas más importantes de los intermediarios y productos finales sintetizados, mientras que los sistemas de elusión se encuentran en la tabla 16 (Anexo I). En la tabla 7 se resumen las constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y de espectrometría de masas, así como las asignaciones para cada compuesto, en tanto los espectros se pueden visualizar en el Anexo III (Espectros).

Tabla 6. Constantes físicas de los compuestos sintetizados.

Clave del compuesto	Estructura	Punto de fusión		Factor de Retención	Sistema de elusión
		Reportado	Determinado	Determinado	
---	 2-aminoanilina	102 - 103	101.3 - 103	0.25	I
2	 5-cloro-2-nitroanilina	126 - 128	125.4 - 126.7	0.58	III
3	 4-cloro-1,2-fenilendiamina	72 - 74	ND	0.41	III
4	 3,4-dicloroacetanilida	123.7 - 124.3	123.0 - 124.0	0.16	VI

5	 <p><i>N</i>-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida</p>	125.8 - 126.6	124.6 - 125.0	0.53	III
6	 <p>4,5-dicloro-2-nitroanilina</p>	178 -180	179.2 - 180.5	0.51	VII
7	 <p>4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina</p>	159 - 161	ND	0.62	III
d	 <p>4-metoxibenzamida</p>	165 - 167	164 - 166	0.28	I
e	 <p>4-nitrobenzamida</p>	198 - 200	196.1 - 198.3	0.26	I
M	 <p>(4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo</p>	60 - 61	58.1 - 58.6	0.38	IV
N	 <p>(4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo</p>	92 - 94	88.3 - 89.0	0.3	I
CN1	 <p><i>N</i>-(1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida</p>	247 - 249	248.1 - 249.4	0.28	III
CN1.1		ND	248.6 - 250.1	0.23	III

	(2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona					
CN2	 <i>N</i> -(5(6)-cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	ND	205.4 - 206.7	0.28	III	
CN3	 <i>N</i> -(5,6-dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	286.4 - 287.6	282.5 - 283.9	0.28	III	
F	 2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol	230 - 232	230 - 231.7	0.21	III	
G	 5(6)-cloro-2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol	168 - 170	168.6 - 170.3	0.22	III	
H	 5,6-dicloro-2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol	257 - 259	257.4 - 259.2	0.21	III	
I	 2-aminobencimidazol-1-carboxilato de <i>terc</i> -butilo	ND	213.6 - 215.1	0.25	III	
CN4	 <i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	ND	302.4 - 304.1	0.40	I	
CN5	 <i>N</i> -(5(6)-cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	ND	276.9 - 278.2	0.63	I	
CN6	 <i>N</i> -(5,6-dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	337.8 - 339.5	338.5 - 340.8	0.63	I	

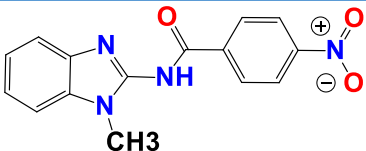
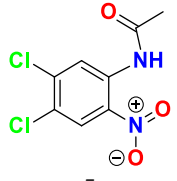
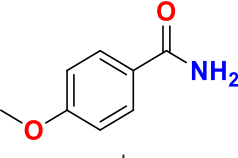
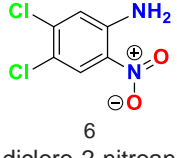
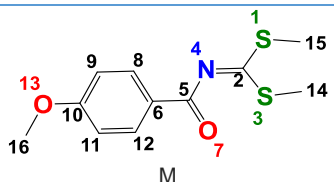
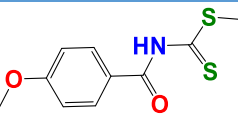
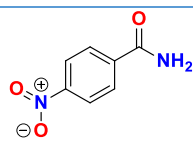
CN7	 <p>CH3 N-(1-metil-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida</p>	ND	308.2 - 309.7	0.62	III
-----	---	----	------------------	------	-----

Tabla 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados.

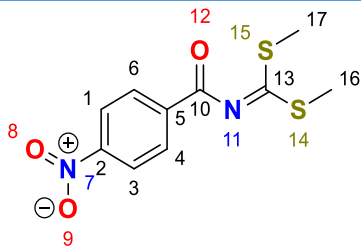
 <p>5 N-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida</p>	<p>IR (ATR) cm^{-1}: 416.21, 445.69 (C-Cl); 1098.98, 1137.95 (arC-H); 1333.75, 1537.18 (NO₂); 1676.07 (C=O); 3212.14 (N-H). Espectro 2 (E2)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 10.38 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 2.09 (s, 3H) (E1)</p>
 <p>d 4-metoxibenzamida</p>	<p>IR (ATR) cm^{-1}: 1249.43, 1022.90 (C-O-C); 1179.47 (arC-H); 1392.46, 1456.65 (-CH₃); 1615.66, 1672.49 (C=O); 3161.24, 3380.19 (N-H). (E6)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 6.97 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H). (E5)</p>
 <p>6 4,5-dicloro-2-nitroanilina</p>	<p>IR (ATR) cm^{-1}: 434.95, 446.87 (C-Cl); 1098.51, 1143.74 (arC-H); 1364.95, 1548.43 (NO₂); 3355.82, 3477.97 (-NH₂). (E4)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 8.12 (s, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.28 (s, 1H). (E3)</p>
 <p>M (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetil</p>	<p>IR (ATR) cm^{-1}: 590.20, 601.93 (C-S); 1455.61 (CH₃); 1159.67 (arC-H); 1247.79, 1026.54 (C-O-C); 1598.16 (N-C=O); 1636.91 (C=O); 2925.85 (N=C). (E12)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, Acetone-d₆, ppm): δ 8.51 (d, J = 9.0 Hz, 2H: H-9, H-11), 7.4 (d, J = 9.0 Hz, 2H: H-8, H-12), 4.33 (d, J = 1.9 Hz, 3H: H-16), 3.05 (s, 6H: H-14, H-15). (E11)</p> <p>CG- EM (IE): 255.04 uma (masa calculada), 255 m/z (masa obtenida), C₁₁H₁₃NO₂S₂ fórmula química. (E13)</p>
 <p>(4-metoxibenzoil)carboniditioato de metilo</p>	<p>IR (ATR) cm^{-1}: 619.47, 644.96 (C-S); 1165.20 (C=S) 1306.8 (NH); 1165.20 (arC-H); 1024.04, 1256.70 (C-O-C); 1601.88 (N-C=O); 1644.66 (C=O); 2932.04 (N=C); 3177.08 (NH). (E10)</p> <p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.10 – 7.05 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.41 (s, 3H). (E9)</p>



e
4-nitrobenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 1102.11, 1116.90 (arC-H); 1341.39, 1520.63 (NO_2); 1671 ($\text{C}=\text{O}$); 3120.36, 3160.71 (N-H). **(E8)**

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 8.29 (d, $J = 8.9$ Hz, 3H), 8.09 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.71 (s, 1H). **(E7)**



N
(4-nitrobenzoyl)carboniditioimidato de dimetilo

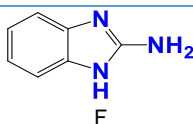
IR (ATR) cm^{-1} : 624.51, 634.54 (C-S); 1011.40 (arC-H); 1268.46 (CH_3); 1345.90, 1524.61 (NO_2); 1599.89 (N-C=O); 1635.29 ($\text{C}=\text{O}$); 2926.70 (N=C).

(E16)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 8.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.29 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 2.66 (s, 6H). **(E14)**

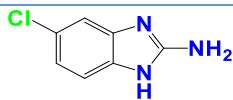
RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 171.90 (C-10), 150.06 (C-5), 130.918 (C-1, C-3), 123.94 (C-4, C-6), 15.92 (C-16, C-17). **(E15)**

CG- EM (IE): 270.32 uma (masa calculada), 270 m/z (masa obtenida), $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ fórmula química. **(E17)**



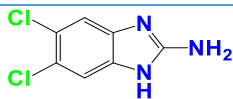
F
2-amino-1H-bencimidazol

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 7.09 (dd, $J = 5.8, 3.2$ Hz, 2H), 6.84 (dd, $J = 5.8, 3.2$ Hz, 2H), 6.16 (s, 3H) **(E34 y E35)**



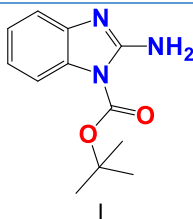
G
5-cloro-2-amino-1H-bencimidazol

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 10.82 (s, 1H), 7.1 (m, 2H), 6.8 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H), 6.35 (s, 2H). **(E47 y E48)**



5,6-dicloro-2-amino-1H-bencimidazol

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 10.9 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 6.54 (s, 2H). **(E55 y E56)**

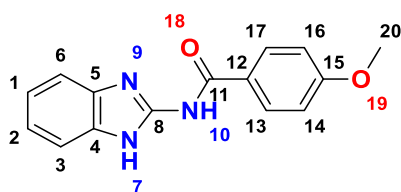


I
2-aminobencimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 7.5 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H); 7.16 (s, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 7.10 (dd, 1H); 6.97 (td, $J = 1.2$ Hz, 1H); 1.64 (s, 9H).

(E36 y E37)

MOLECULAS FINALES



CN1
N-(1H-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 3171.57 (NH); 3018.55 (N=C); 1572.24 (N-C=O); 1456.60, 1362.83 (-CH₃); 1019.03, 1253.53 (C-O-C); 1278.39 (C-N); 1169.39 (arC-H); 1671.54 (C=O); 1632.26, 1657.75 (C=C, C-C). **(E20)**

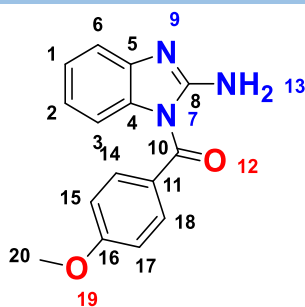
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.11 (s, 2H: NH-10 y NH-7); 8.13 (d, J = 8.9 Hz, 2H: H-13 y H-17); 7.46 (dd, J = 5.9, 3.2 Hz, 2H: H-1 y H-2); 7.1 (dd, J = 5.9, 3.2 Hz, 2H: H-3 y H-6); 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H: H-14 y H-16); 3.84 (s, 3H, CH₃-20).

(E18)

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 162.47 (C-11), 148.55 (C-8), 130.33 (C-13, C-17), 121.34 (C-1, C-2), 113.74 (C-14, C-16), 55.51 (C-20).

(E19)

EMAR (APCI): 267.28 uma (masa calculada), (M⁺ 267.97, M⁺ 268.1137, M⁺ 269.1141) m/z (masa obtenida), C₁₅H₁₃N₃O₂ fórmula química. **(E21)**

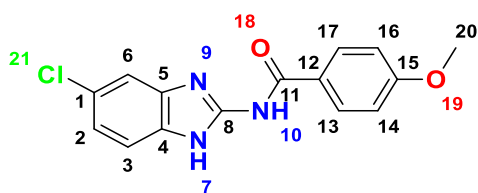


CN1.1
(2-amino-1H-benzimidazol-1-il) (4-metoxifenil)metanona

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7.7 (d, J = 8.8 Hz, 2H: H-15 y H-17); 7.2 (d, 1H: H-1) 7.1 (d, J = 7.7 Hz, 2H: H-14 y H-18); 7.0 (m, 3H: NH₂ y H-3); 6.7 (m, 1H: H-6); 6.3 (d, J = 7.9 Hz, 1H: H-2); 3.88 (s, 3H, CH₃-20). **(E22 y E23)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 168.67 (C-4), 163.32 (C-10), 154.54 (C-11), 143.03 (C-5), 131.73 (C-14) 125.33 (C-16), 123.55 (C-6), 119.25 (C-3), 115.75 (C-15), 114.26 (C-18), 112.28 (C-17), 55.70 (C-20). **(E24)**

IR (ATR) cm^{-1} : 444.81 (C-Cl); 3152.52 (NH); 3012.04 (N=C); 1564.29 (N-C=O); 1449.83, 1325.03 (-CH₃); 1016.58, 1254.42 (C-O-C); 1282.89 (C-N); 1173.48 (arC-H); 1667.82 (C=O); 1636.77, 1667.82 (C=C, C-C). **(E28)**

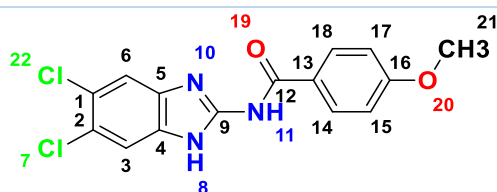


CN2
N-(5(6)-cloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.21 (s, 2H: NH y C-NH); 8.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H: H-14 y H-18); 7.48 (m, 2H: H-3 y H-6); 7.07 (d, J = 8.5 Hz, 2H: H-15 y H-17); 7.13 (d, J = 8.04 Hz, 1H: H-2) 3.84 (s, 1H, CH₃-20). **(E26)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 166.07 (C-11), 162.72 (C-15), 148.73 (C-8), 130.37 (C-13, C-17), 125.41 (C-2), 125.03 (C-1), 121.22 (C-12), 113.85 (C-14, C-16), 55.54 (C-20). **(E27)**

EMAR (APCI): 301.73 uma (masa calculada), M⁺ 302.0627 m/z (masa obtenida), C₁₅H₁₂ClN₃O₂ fórmula química. **(E29)**



CN3

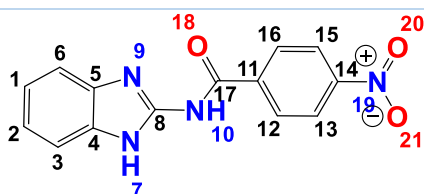
N-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 426.56, 444.83 (C-Cl) 3151.52 (NH), 3011.36 (N=C), 1565.90 (N-C=O), 1449.77, 1324.89 (-CH₃); 1016.57, 1254.56 (C-O-C); 1282.23 (C-N); 1173.63 (arC-H); 1667.75 (C=O) 1636.90, 1667.75 (C=C, C-C). **(E32)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.28 (s, 2H: NH y C-NH); 8.11 (d, *J*=8.08 Hz, 2H: H-14 y H-18); 7.67 (s, 2H: H-3 y H-6); 7.07 (d, *J*=8.9 Hz, 2H: H-15 y H-17), 3.84 (s, 3H: CH₃-21). **(E30)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 165.84 (C-12), 162.84 (C-16), 149.44 (C-9), 130.42 (C-14, C-18), 124.62 (C-1, C-2), 123.28 (C-14), 113.88(C-15, C-17), 55.55(C-21). **(E31)**

EMAR (APCI) *m/z*: 336.17 uma (masa calculada), (*M* 336.0356, *M*⁺ 337.0379, *M*⁺² 338.0328) *m/z* (masa obtenida), C₁₅H₁₁Cl₂N₃O₂ fórmula química. **(E33)**



CN4

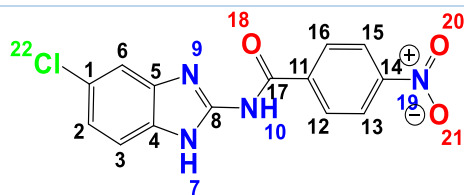
N-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 3141.37 (NH); 3009.39 (N=C); 1591.54 (N-C=O); 1526.51(-NO₂); 1331.51 (C-N); 1159.78 (arC-H); 1615.80 (C=O). **(E45)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.60 (s, 2H: H-10 y H-7); 8.35 (m, *J* = 9.0 Hz, 4H: H-12, H-13, H-15 y H-16); 7.4 (dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, 2H: H-3 y H-6); 7.2 (dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, 2H: H-1, H-2). **(E38, E39 y E40)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 112.54 (C-3, C-6), 122.90 (C-12, C-16), 123.78 (C-1, C-2), 130.13 (C-13, C-15), 143.35 (C-4, C-5), 149.41 (C-8), 152.32 (C-14), 170.52 (C-17). **(E41)**

EMAR (APCI): 282.26 uma (masa calculada), *M*⁺ 283.0894 *m/z* (masa obtenida), C₁₄H₁₀N₄O₃ fórmula química. **(E46)**



CN5

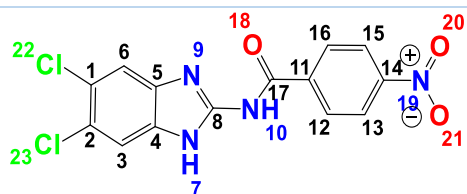
N-(5(6)-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 444.11 (C-Cl); 3362.18 (NH); 2829.62 (N=C); 1577.71 (N-C=O); 1513.13 (-NO₂); 1344.30 (C-N); 1173.48 (arC-H); 1635.89 (C=O); 1682.55 (C=C). **(E53)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.62 (s, 2H: NH y C-NH); 8.34 (s, 4H: H-12, H-13, H-15 y H-16); 7.4 (m, 2H: H-3 y H-6); 7.20 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H: H-2). **(E49 y E51)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 112.77(C-3), 114.10 (C-6), 122.09 (C-1), 123.45 (C-2), 129.76 (C-13, C-15), 126.19 (C-12, C-16), 141.03 (C-11), 149.30 (C-8), 150.68 (C-14), 168.16 (C-17) **(E52)**

EMAR (APCI): 316.70 uma (masa calculada), (*M* 317.0510, *M*⁺ 318.0542, *M*⁺² 319.0479) *m/z* (masa obtenida), C₁₄H₉ClN₄O₃ fórmula química. **(E54)**



CN6

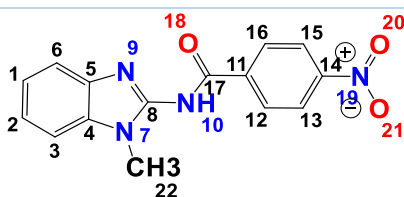
N-(5,6-dicloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 420.34, 440.94 (C-Cl) 3357.09 (NH); 2830.77 (N=C); 1572.52 (N-C=O); 1512.52(-NO₂); 1344.80 (C-N); 1168.98 (arC-H); 1637.35(C=O);1679.90(C=C). **(E61)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.66 (s, 2H: NH y C-NH); 8.34 (m, *J* = 8.9 Hz, 4H: H-12, H-13, H-15 y H-16); 7.69 (s, 2H: H-3 y H-6). **(E57 y E59)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 114.81(C-3, C-6), 123.91(C-1, C-2), 129.86 (C-13, C-15), 134.56(C-4, C-5), 139.58 (C-11), 149.54 (C-8), 150.08 (C-14), 166.75 (C-17). **(E60)**

EMAR (APCI) *m/z*: 351.14 uma (masa calculada), (M 351.0125, M⁺¹ 352.0153) *m/z* (masa obtenida), C₁₄H₈Cl₂N₄O₃ fórmula química. **(E62)**



CN7

N-(1-metilbenzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida

IR (ATR) cm^{-1} : 3273.60 (NH); 2927.46 (N=C); 1560.22 (N-C=O); 1531.08 (-NO₂); 1453.61 (CH₃); 1339.22 (C-N); 1150.67 (arC-H); 1612.58 (C=O). **(E67)**

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 12.85 (s, 1H: NH), 8.4 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H: H-12, H-16), 8.3 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H: H-13 y H-15), 7.5 (dd, *J* = 14.6, 7.3 Hz, 2H: H-3 y H-6), 7.28 (m, *J* = 15.1, 6.9 Hz, 2H: H-1 y H-2), 3.53 (s, 3H: CH₃-22). **(E63 y E64)**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 28.46 (C-22). 109.86 (C-3, C-6), 112.24 (s, 1H: NH), 122.98 (C-12, C-16), 123.32 (C-1, C-2), 128.76 (C-11), 129.97 (C-13, C-15), 144.01 (C-4, C-5), 148.98 (C-8), 152.18 (C-14), 171.21 (C-17) **(E66)**

EMAR (APCI): 296.29 uma (masa calculada), M⁺ 297.10 *m/z* (masa obtenida), C₁₅H₁₂N₄O₃ fórmula química. **(E68)**

8.1.1 ANÁLISIS DE LA PARTE QUÍMICA

Síntesis de la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5

Síntesis de 4-cloro-1,2-fenilendiamina (**3**)

La síntesis se desarrolló a partir de 5-cloro-2-nitroanilina (**2**) ésta se sometió a una reducción catalítica en presencia de H₂ y catalizador de Ni-Raney el cual se utilizó porque, aunque es posible que se remueva parte del halógeno de la posición 4, el Ni es el metal de transición que tiene menos problemas respecto a otros catalizadores como Pd/C, que ocasionan la pérdida de halógenos en mayor proporción de la molécula por deshalogenación.^{47, 48} De este producto únicamente se determinó el R_f dado su inestabilidad frente a la oxidación ambiental, finalmente se preparó para la reacción de ciclocondensación.

Síntesis de la 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (**7**)

La síntesis partió de *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (**4**), en la cual se protegió el grupo amino con anhídrido acético para dar la *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida, esto evitó, la protonación de la misma. Consecutivamente, se llevó 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. Es fundamental llevar a cabo esta reacción en condiciones anhidras y a bajas temperaturas para evitar la posible formación de productos no deseados, como lo son los compuestos nitrados en la posición 3, 6 o ambas. El rendimiento crudo de la reacción es del 91%; sin embargo, el sólido se obtuvo contaminado con una impureza de mayor R_f, debido a la formación de un producto secundario que se eliminó mediante extracción sólido-líquido empleando MeOH. Posteriormente, se realizó la recristalización del sólido crudo con MeOH. El rendimiento final del producto puro fue de 72%. Una vez obtenida la *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**5**), se llevó a cabo la hidrólisis en condiciones básicas obteniendo 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**6**) con un rendimiento del 92%.

A continuación, con el propósito de conseguir la 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (**7**) se realizó una reducción del grupo nitro usando H₂ y Ni-Raney como catalizador. Este compuesto se usó de inmediato en la siguiente reacción, de lo contrario se almacenó en atmósfera de N₂ por su limitada estabilidad. Característica propia de las *o*-fenilendiaminas quienes en presencia de oxígeno y luz se oxidan fácilmente a las diiminas de la benzoquinona⁴⁹ reaccionando con otras moléculas del mismo tipo.

Los compuestos **5** y **6** se caracterizaron por R_f , punto de fusión, RMN ^1H e IR ver tabla 6 y 7 (Espectros [1-4](#), anexo III). Además, estos mismos espectros fueron clave para la asignación de los compuestos finales.

Preparación de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**M**)

Se comenzó con la reacción para la formación de la 4-metoxibenzamida (**d**) a partir del cloruro de 4-metoxibenzoilo ya sea con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ o NH_4OH . Ambas reacciones dan rendimientos superiores al 80%. La diferencia recae en el proceso de reacción, siendo más laborioso con NH_4OH ya que esta reacción se ejecutó generando el NH_4^+ usando HCl y burbujeando el mismo en el sistema de reacción donde se encontraba la materia prima en diclorometano (CH_2Cl_2). Mientras que la reacción con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ únicamente se disuelven los reactivos en acetona a temperatura de $0\text{ }^\circ\text{C}$. El compuesto se caracterizó por RMN ^1H e IR (Espectros [5](#) y [6](#) en anexo III) así como por p_f y R_f (Tabla 6).

En lo concerniente a la síntesis de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**M**), Inicialmente se buscó en la literatura alguna metodología que permitiera su obtención de forma optimizada. Sin embargo, se encontró información limitada en la cual las condiciones de reacción daban bajos rendimientos. Por esta razón, se optimizó la reacción con la información proporcionada por los autores M. Sato y M. Augustin.^{37, 38} Subsecuentemente, para establecer las condiciones oportunas para la reacción de formación de **M** se realizaron microreacciones con las condiciones que se exponen en la tabla 8.

En los ensayos realizados se varió la cantidad de NaH , el tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo de reacción. Se encontró que para que la reacción se lleve a cabo necesita estar bajo condiciones anhidras a temperatura de reflujo de THF, con 12 equivalentes (eq) de NaH y **d**; posteriormente se adicionó una mezcla de CS_2 y CH_3I en THF manteniendo la temperatura de reacción a reflujo por 3.5 h.

Tabla 8. Condiciones y proporciones para la reacción de formación de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.

Experimento	4-metoxibenzamida mg	NaH eq	CS ₂ eq	CH ₃ I eq	Disolvente	Temperatura °C
1	100	2	3	3	DMF	0 a 5
2	100	3	3	3.2	THF	0 a 5
3	100	3.5	4	3.2	THF	0 a 5
4	100	3	4	3.2	DMF	0 a 5
5	100	4	4	3.2	DMF	0 a 5
6	100	5	4	3.2	DMF	Reflujo
7	100	6	4	3.2	THF	Reflujo
8	100	8	4	3.2	THF	Reflujo
9	100	10	4	3.2	THF	Reflujo
10	100	11	4	3.2	THF	Reflujo
11	100	12	4	3.2	THF	Reflujo

Después de la ejecución de la síntesis bajo las condiciones establecidas (Experimento 11), se realizó una ccf a la mezcla de reacción obteniéndose tres marcas siendo una de ellas la más representativa, enseguida la mezcla fue tratada por el método de separación líquido- líquido con AcOEt/H₂O la cual se concentró a presión reducida. Nuevamente se realizó una ccf del producto con el rf de la materia prima **d** y se observó el aumento de las marcas en la placa y una de ellas correspondiendo a **d**. Por esta razón, se tiene la sospecha que el producto sufre una transformación cuando está próximo a su temperatura de fusión. Lo anterior sugiere que el calentamiento durante la eliminación del disolvente para el recobro del producto es el problema, logrando mejorar el rendimiento con el cambio de disolvente a Diclorometano CH₂Cl₂ y únicamente extrayendo a presión reducida.

Caracterización de M

En un inicio, en las reacciones de la 1 a la 5 se obtuvo un compuesto que se aisló y caracterizó por RMN ¹H e IR (ATR) (Espectros No. [9](#) y [10](#), anexo III). En el espectro de RMN ¹H mostró una señal simple (s) en 2.98 ppm que integró para 3H, correspondientes a uno de los metilos unido al azufre, mientras que por IR se observó una señal a 3177.08 que corresponde al grupo NH. Se determinó que no se estaba realizando el procedimiento adecuado, puesto que la reacción no culminaba con la metilación del segundo azufre.

Después de realizar las modificaciones de reacción (Experimentos de 6 a 11), se obtuvo un segundo compuesto, el cual fue aislado y caracterizado por RMN ^1H (Espectro No. [11](#), anexo III) donde el análisis mostró una señal s en 3.05 ppm que integró para 6H correspondientes a los protones de los metilos unidos a los azufres y otra señal s en 4.34 que integró para 3H pertenecientes al metoxilo. Además, dos señales dobles (d) en 7.4 y 8.5 pertenecientes a los H del sistema aromático. Por tanto, se pudo demostrar la obtención del compuesto, lo cual se confirmó con IR (ATR) cm^{-1} : 590.20, 601.93 (C-S); 1455.61 (CH₃); 1159.67 (arC-H); 1247.79, 1026.54 (C-O-C); 1598.16 (N-C=O); 1636.91 (C=O); 2925.85 (N=C). (Espectro No. [12](#), anexo III) y espectrometría de masas EM/IE ión molecular m/z: 255 (Espectro No. [13](#), anexo III) contrastado frente a una masa teórica de 255.35 uma.

Preparación de (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**N**)

Se comenzó con la reacción para la formación de la 4-nitrobenzamida (**e**) a partir del cloruro de 4-nitrobenzoilo con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en acetona a 0 °C. El compuesto se caracterizó por RMN ^1H e IR (Espectros [7](#) y [8](#), anexo III) así como por p_f y R_f (Tabla 6).

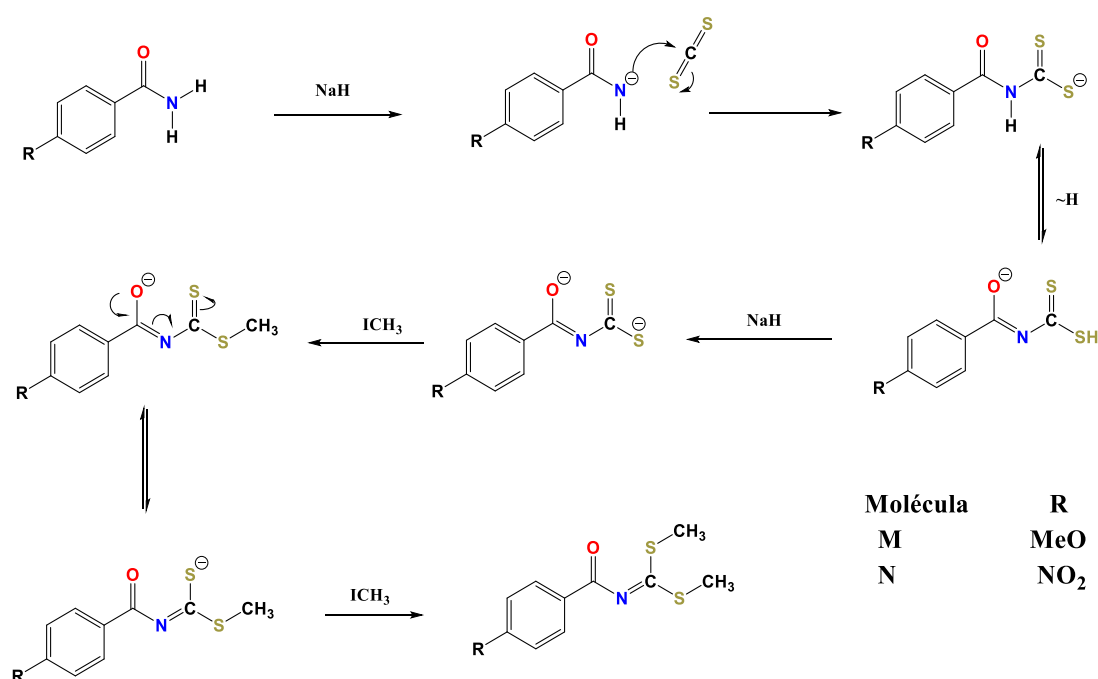
A lo referente a la preparación del (4-nitrobenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**N**), este se preparó en un inicio por el método optimizado para **M**, y efectivamente se obtuvo el producto deseado, con el inconveniente de que se producían otros productos secundarios en mayor proporción. Por esta razón se efectuó la técnica original descrita en la literatura,⁵⁰ siendo está a temperatura de 0 °C, con la adición de los reactantes individualmente entre tiempos de reacción de 40 min, y después de la adición, se conservó la reacción en agitación a temperatura ambiente (t.a.) por 24 h para así obtener un producto mayoritario con la mínima cantidad de impurezas posibles.

Caracterización del compuesto **N**

Se obtuvo un compuesto con similar R_f al compuesto **M** y en mayor proporción respecto a los demás, el cual se aisló y se caracterizó por RMN ^1H (Espectro No. [14](#), anexo III) mostrando una señal s en 2.66 ppm que integró para 6H que pertenecen a los protones de los metilos unidos a los azufres. Además, se presentó una señal múltiple (m) en 8.3 que corresponden a los H del sistema aromático. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro No. [15](#), anexo III) solo se observaron 5 de las 9 señales esperadas, lo cual puede ser explicado por la lenta relajación de los núcleos de tipo cuaternario lo que genera señales de intensidad muy baja. La obtención del

compuesto se confirmó también con IR (ATR) cm^{-1} : 624.51, 634.54 (C-S); 1011.40 (arC-H); 1268.46 (CH_3); 1345.90, 1524.61 (NO_2); 1599.89 (N-C=O); 1635.29 (C=O); 2926.70 (N=C) (Espectro No. [16](#), anexo III) y espectrometría de masas EM/IE 270, (Espectro No. [17](#), anexo III) contrastado con una masa teórica de 270.32 uma.

Se propone que la reacción de obtención de los compuestos benzoilcarboniditioimidatos de dimetilo transcurre siguiendo el mecanismo de reacción mostrado en el esquema 12.

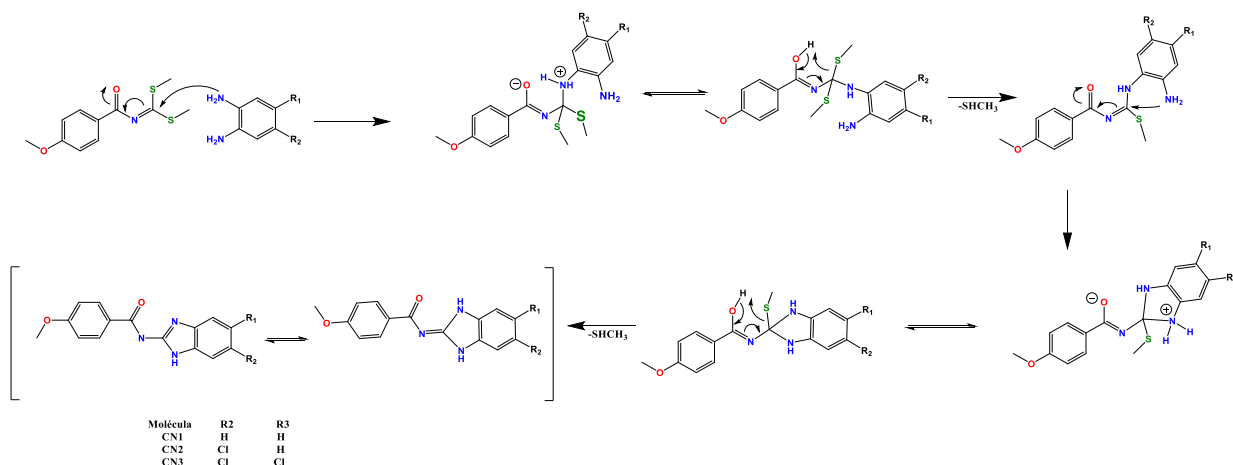


Esquema 12. Mecanismo de reacción para obtener los benzoilcarboniditioimidatos de dimetilo.

Reacción de ciclocondensación entre la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 y el (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo.

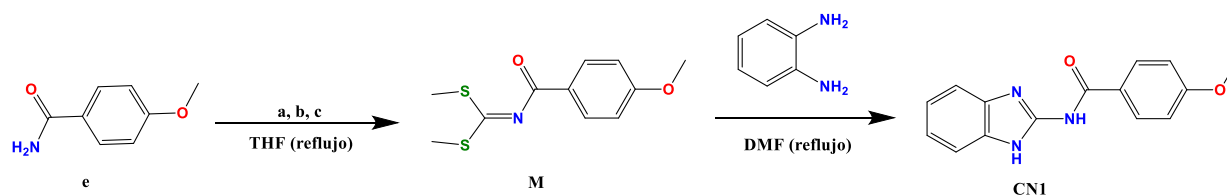
Después de obtener el compuesto **M**, éste no fue purificado a efecto de que el compuesto es inestable a la temperatura y a la presencia de humedad, únicamente se extrajo con CH_2Cl_2 y se eliminó el agua con Na_2SO_4 anhidro, se secó al vacío a t.a; y se preparó para la reacción de ciclocondensación.

Se propone que la reacción de obtención de los compuestos *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6 transcurre siguiendo el mecanismo de reacción mostrado en el esquema 13.

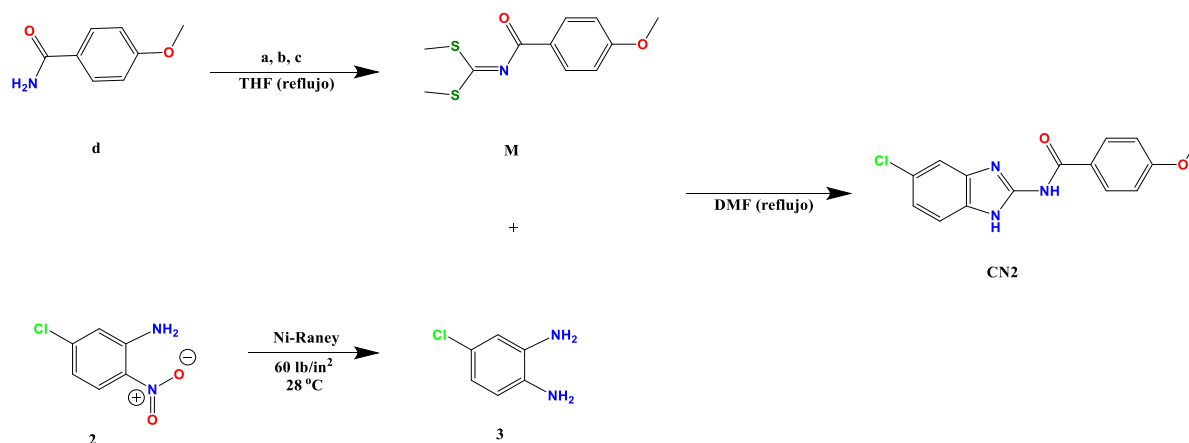


Esquema 13. Mecanismo de reacción para obtener los compuestos *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6.

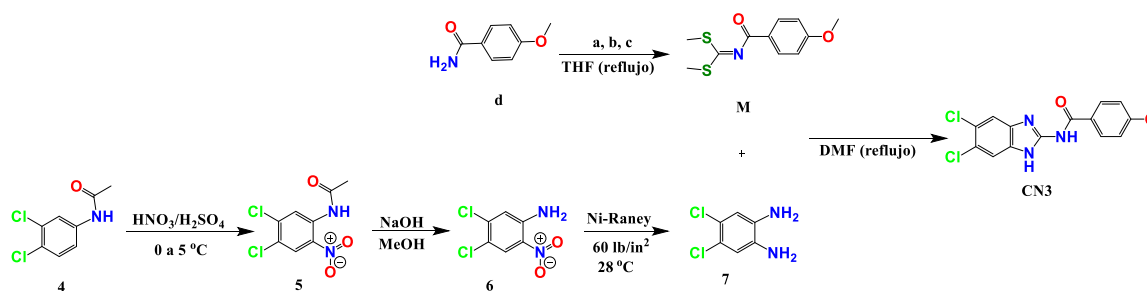
Particularmente, para cada molécula de *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6 se presentan los esquemas de las reacciones empleadas y la caracterización mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Las asignaciones se realizaron utilizando los espectros de las materias primas, así como lo reportado en la literatura.



Esquema 14. Ruta de síntesis para obtener *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN1).



Esquema 15. Ruta de síntesis para obtener *N*-(5(6)-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).



Esquema 16. Ruta de síntesis para obtener *N*-(5,6-dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN3**).

En los esquemas 14, 15 y 16 se muestran que para obtener la **CN1**, **CN2** y **CN3** se partió de la amida **d** que se sometió a reacción con el CS₂ (a) el CH₃I (b) y el NaH (c) en THF anhidro a reflujo y así obtener el metoxiditioimidato **M**, el producto no se purificó dada su inestabilidad, además de que la purificación resultó más sencilla para los compuestos finales obtenidos de cada reacción con la 1,2-fenilendiamina ya sea sustituida en 4 o 4 y 5. Una pequeña muestra se recrystalizó de MeOH para determinar sus constantes físicas y espectroscópicas.

Caracterización de **CN1**, **CN2** y **CN3**

Al ser moléculas similares se hizo una caracterización agrupada y de manera particular para cada molécula se puede revisar las tablas 6 y 7, así como en los espectros indicados para cada molécula en la tabla 7. En los espectros de RMN ¹H (Espectros No. [18](#), [26](#) y [30](#), anexo III) se observaron señales s en cercanas a 12 ppm que integraban para 2 H: uno corresponde al NH de la amida y el otro al NH de la posición 1 del benzimidazol. Por otra parte, para **CN1**, se observaron dos señales una d en 7.05 ppm y una doble de dobles (dd) en 7.1 ppm que integraban cada una para 2H, mientras que para **CN2** dos señales d en 7.0 ppm que integra para 2H y la otra en 7.1 ppm que integra para 1H, en tanto para **CN3** se observó una señal s en 7.67 ppm que integra para 2H. Todas estas asignaciones correspondientes a los H del benceno unido al imidazol. Además, se mostraron dos señales una dd en 7.4 ppm y la otra señal d en 8.1 ppm para **CN1**. En tanto para **CN2** se mostraron dos señales una triple (t) en 7.4 ppm y la otra señal d en 8.1 ppm; mientras que para **CN3** se mostraron dos señales d en 7.0 ppm y la otra en 8.1 ppm. Las señales integraron para los 4H del sistema aromático unido a la carboxamida. Por último, se observó una señal s en 3.8 ppm para los H del metoxilo que integra para 3. En el espectro de RMN ¹³C de **CN1** y **CN2** y **CN3** (Espectros No. [19](#), [27](#) y [31](#), anexo III) se observaron 11, 9 y 8 respectivamente de las 15 señales esperadas. Se observó la señal característica del

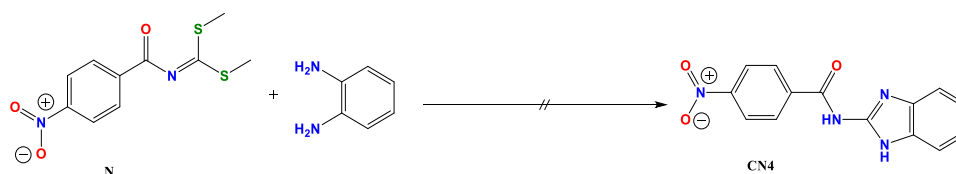
carbonilo alrededor de 165 ppm y en 55.5 ppm la señal para el carbono del metilo. Las señales restantes fueron asignadas respecto a la literatura.³⁵ Adicionalmente, se confirmaron con IR (ATR) cm^{-1} : para **CN2** y **CN3** que son compuestos que contienen Cl como sustituyentes, sus bandas de absorción aparecieron alrededor de 444 cm^{-1} . Por otra parte, se observaron señales simples para NH entre 3151-3171, mismas que indican la posición 2 de sustitución del grupo benzoilo en el núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol. Adicionalmente se observaron señales cercanas a 3018 (N=C); 1572 (N-C=O); 1456, 1362 (-CH₃); 1019, 1253 (C-O-C); 1278, 1671 (C=O) (Espectros No. [20](#), [28](#) y [32](#), anexo III). Espectrometría de masas: para **CN1**, EMAR (APCI) m/z : 268.28 M^{+H} (masa calculada), 268.1137 (masa obtenida), C₁₅H₁₃N₃O₂ fórmula química. En tanto para **CN2** EMAR (APCI) m/z : 302.73 M^{+H} (masa calculada), 302.0627 (masa obtenida), C₁₅H₁₂ClN₃O₂ fórmula química. Y para **CN3** EMAR (APCI) m/z : 338.17 M^{+2} (masa calculada), 338.0379 (masa obtenida), C₁₅H₁₁Cl₂N₃O₂ fórmula química. (Espectros No. [21](#), [29](#) y [33](#), Anexo III).

Síntesis de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6

Reacción de ciclocondensación entre la 1,2-fenilendiamina sustituida en 4 o 4 y 5 y nitroditioimidato **N**.

Estrategia 1

Como no se encontró una metodología en la literatura para la síntesis nitrobenzamidazolicas, se estudiaron las condiciones de reacción. En el esquema 17 se muestra la reacción general y en la tabla 9 se exponen las condiciones que se llevaron a cabo para la reacción de ciclocondensación. En todas las reacciones se empleó como disolvente Dimetilformamida (DMF) ya sea sola o como una mezcla con H₂O. Además, cabe destacar que se practicó con dos bases diferentes K₂CO₃ y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP); y solo en una se utilizó bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) como catalizador de transferencia de fase.



Esquema 17. Reacción general propuesta para la reacción de formación de la *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida.

Tabla 9. Condiciones experimentadas para la reacción de formación de la *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida.

Ensayo	Disolvente	Catalizador	Base	Temperatura	Resultado
A	DMF	---	---	Reflujo	varias marcas en ccf
B	DMF	---	---	t.a.	varias marcas en ccf
C	DMF	---	K ₂ CO ₃	Reflujo	Degradación de N
D	DMF	---	DMAP	Reflujo	Degradación de N
E	DMF/H ₂ O (3:1)	TBAB	K ₂ CO ₃	100 °C	Degradación de N

Con el propósito de estudiar el efecto de la temperatura en la reacción entre el nitroditioimidato **N** con la 1,2-fenilendiamina (**3**) en DMF fueron realizadas una a temperatura de reflujo y otra a t.a. (Ensayo A y B respectivamente). En ambas reacciones se observó la aparición de varias marcas en ccf, pero ningún producto principal que pudiera ser recuperado después de verter la mezcla de reacción en agua con hielo. No obstante, sí se observó un cambio en el pH de la mezcla siendo este ácido. Se considera que cuando se tiene un pH ácido el ditioimidato tiende a hidrolizarse.

Posteriormente, se efectuó el ensayo C: en donde el compuesto **N** se somete a reacción con la fenilendiamina **3** en DMF y K₂CO₃ para mantener alcalino el medio de reacción. De igual forma, el resultado fue la aparición de bastantes marcas en ccf, el medio ligeramente ácido y ningún sólido después del tratamiento.

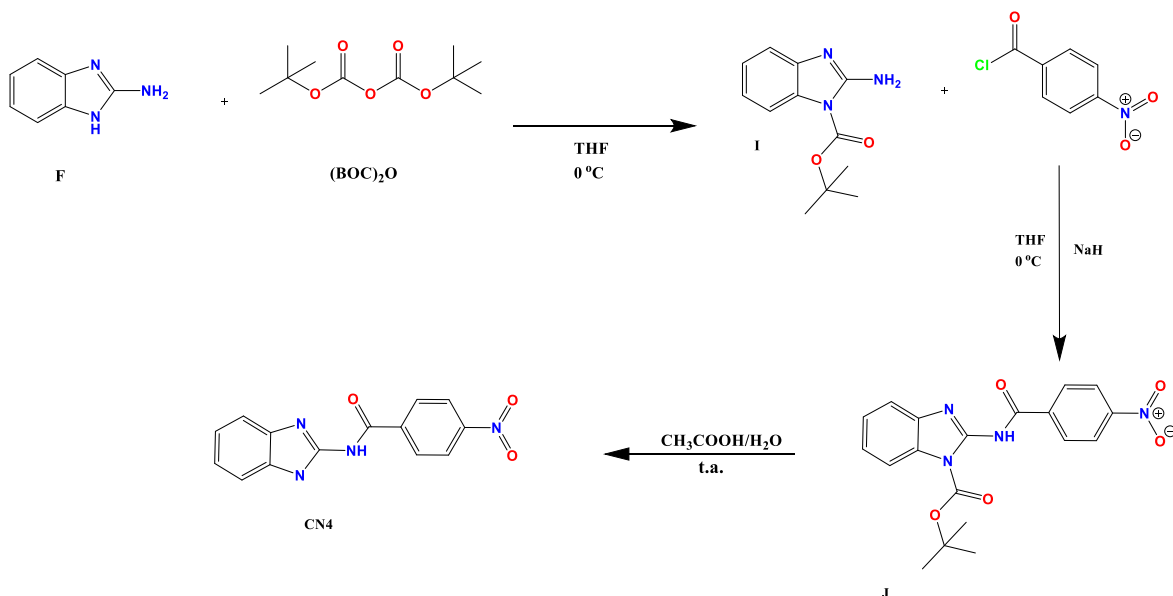
La baja solubilidad que tiene el K₂CO₃ en DMF es 7.5 mg/mL relativamente inferior respecto a la DMAP en DMF que es más soluble 61 mg/mL. De los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se planteó el ensayo D, donde se sometió a reaccionar al compuesto **N** con el compuesto **3** y como base DMAP a reflujo. Como resultado de este ensayo no obtuvimos varias marcas en ccf, pero sí se obtuvo una marca representativa que era sin lugar a duda la marca de la 4-nitrobenzamida (**e**) y la desaparición del **N**, con esto se llegó a la conclusión de que efectivamente esté último estaba siendo degradado.

En otra experimentación, (ensayo E) se utilizó un sistema DMF-H₂O (3:1) usando K₂CO₃ como base y TBAB como catalizador de transferencia de fases a temperatura de 100 °C por 7 h. Por una parte, la DMF facilita la solubilidad de las materias primas: el compuesto **N** y el compuesto **3**, en tanto que el agua hace que la solubilidad del K₂CO₃ se vea favorecida y el TBAB funciona para asegurar que las materias primas y la base entraran en contacto adecuadamente. Se conoce que los catalizadores de transferencia de fase facilitan la reacción en sistemas heterogéneos entre compuestos orgánicos solubles en disolventes orgánicos y compuestos solubles en agua como sales inorgánicas como el K₂CO₃. El catalizador de transferencia de fases al ser soluble en ambos disolventes transporta los aniones de las sales inorgánicas, al disolvente orgánico y luego los regresa a la fase acuosa. ²⁰

Como resultado se obtuvo algo similar en el ensayo D, por este motivo se decidió cambiar de estrategia. Con los resultados obtenidos, a consecuencia del grupo nitro se tiene que para la formación del ditioimidato **N** es más simple que la del ditioimidato **M**, esto es por el efecto electroattractor que hace que aumente el carácter ácido de los protones de la amida. Sin embargo, en la siguiente reacción (ciclocondensación), el efecto resultó contraproducente; posiblemente se lleve el primer paso de acoplamiento entre el nitrógeno de la diamina y el carbono del ditioimidato **N** (Esquema 13), pero quizá sea bastante la fuerza electrónica del grupo nitro que no permite que culmine la reacción con el otro nitrógeno de la diamina, y el ditioimidato termine por desintegrarse.

Estrategia 2

Síntesis de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamidias sustituidas en 5 o 5 y 6

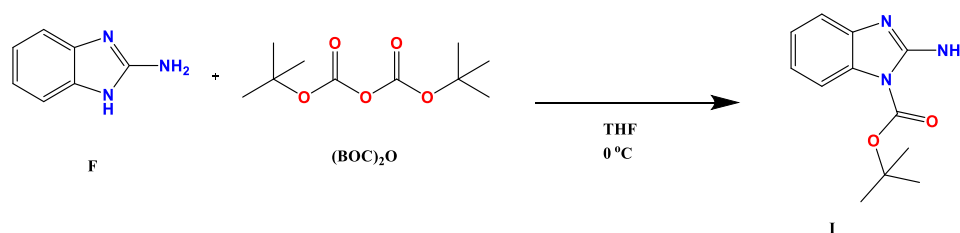


Esquema 18. Ruta de Síntesis de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamidias sustituidas en 5 o 5 y 6.

En el esquema 18, se puede apreciar que inició la síntesis a partir del 2-amino-1*H*-bencimidazol (**F**) el cual se protegió en la posición 1 usando dicarbonato de di-*tert*-butilo (BOC)₂O y como base trietilamina (TEA) en THF anhidro a 0 °C. Después se llevó a cabo una S_N empleando el 2-aminobencimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**I**), y el cloruro de 4-nitrobenzoilo y NaH en THF anhidro a 0 °C, con lo que se obtiene el 2-(4-nitrobenzamido)-1,3-bencimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**J**), el cual se desprotege adicionando unas gotas de una disolución 1M de ácido acético.

El interés particular de esta estrategia fue proteger el nitrógeno de la posición 1 de manera regioselectiva para obtener la sustitución deseada en NH₂ de la posición 2 del bencimidazol **I**, como una metodología alterna a la estrategia 1. Por otro lado, para cerciorarse que se estaba trabajando por una ruta acertada, se sometió al compuesto **F** de forma directa con el cloruro de 4-nitrobenzoilo en THF y NaH a 0 °C. El efecto se plasmó primeramente en el espectro de RMN ¹H, en el análisis de los espectros se confirma que en ambos procesos de síntesis se obtiene el mismo compuesto (Espectros No. [38](#), [39](#) y [42](#), anexo III) debido a que se obtuvieron desplazamientos iguales bajo la misma multiplicidad de las señales. De manera estratégica, al producto final **CN4** se le hizo una reacción de metilación para asegurar que el grupo amido quedo en la posición 2 y el alquilo en la posición 1 del bencimidazol.

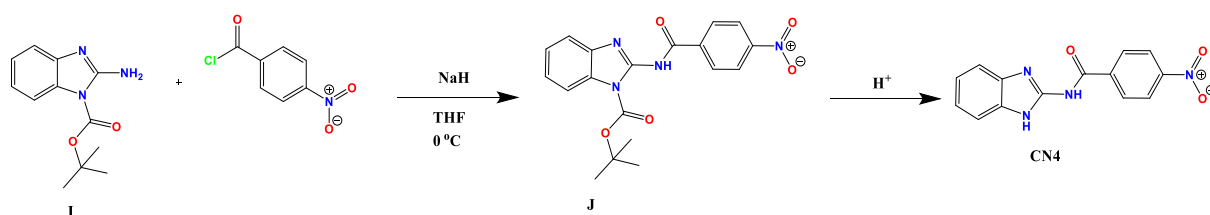
Reacción de protección de 2-amino-1H-benzimidazol (**F**) con dicarbonato de di-terc-butilo



Esquema 19. Reacción de protección de 2-amino-1H-benzimidazol.

Para conseguir el compuesto **I**⁵¹ se efectuó la reacción entre **F** con TEA en THF anhidro a 0 °C por 20 min; posteriormente, se adicionó (BOC)₂O y se dejó reaccionar por 2 h, esquema 19. El compuesto obtenido se extrajo con AcOEt y una disolución de NaHCO₃ saturada para evitar la desprotección del benzimidazol.⁵² Como producto se obtuvo el monoprotegido confirmándose este por RMN ¹H (Espectro No. [36](#), anexo III) donde en su espectro se logra apreciar una señal s en 7.19 ppm que integró para 2H, que corresponden al NH₂ de la amida. Además, al hacer un intercambio con D₂O (Espectro No. [37](#), anexo III) es la única señal que desaparece. También, una señal s en 1.63 ppm que integra para 9H misma que confirmó la presencia del grupo protector. Adicionalmente, se mostraron 3 señales asimétricas: tres d, una dd y dos señales d; mismas que pertenecen a los protones del benzimidazol. Estas señales fueron claves para inferir sobre la posición de la carboxamida en el nitrógeno del exocíclico del benzimidazol, porque cuando la posición 1 del benzimidazol está ocupada los nitrógenos del benceno son asimétricos y cuando no lo está son simétricos.

Sustitución nucleofílica con el 2-aminobenzimidazol-1-carboxilato de terc-butilo (**I**) al grupo acilo del cloruro de 4-nitrobenzoilo.

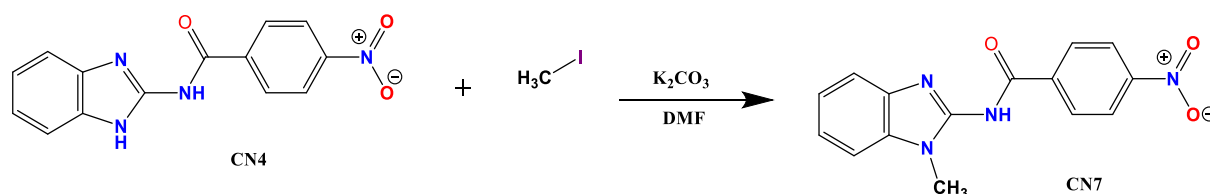


Esquema 20. Reacción de sustitución nucleofílica con el compuesto **I** al grupo acilo del cloruro de 4-nitrobenzoilo.

El diseño de la reacción recae en la evaluación de la acidez de los protones de la amina en posición 2 del benzimidazol siendo estos de un pka de 16.75 siendo menos ácidos respecto al protón de la posición 1 del benzimidazol que es de 12.5. Por tal motivo se usó NaH para formar el anión, se eligió THF por su carácter polar aprótico

y la fácil solubilidad de las materias primas.⁵¹ Esta reacción se llevó a cabo en medio alcalino en THF anhidro a 0 °C, esquema 20. Posteriormente la liberación del grupo protector se originó acidificando el medio; se observó un precipitado y se aisló un producto. Se caracterizó por RMN ¹H, (Espectro No. [38](#), anexo III) en el cual se puede apreciar una señal s en 12.6 que integró para 2H, uno corresponde al NH de la amida, y al NH del nitrógeno endocíclico. Además, al hacer un intercambio con D₂O (Espectro No. [40](#), anexo III) es la única señal que desaparece. A 8.36 ppm se aprecia un multiplete que integra para 4H que son los que corresponden al sistema aromático unido a la carboxamida. Asimismo, en 7.4 y 7.2 ppm se aprecian dos señales múltiples que integran cada una para 2H correspondiendo estas a los protones del conjunto aromático del bencimidazol.

*Método de comprobación de la adición de la carboxamida en posición 2 del bencimidazol: metilación de **CN4**.*



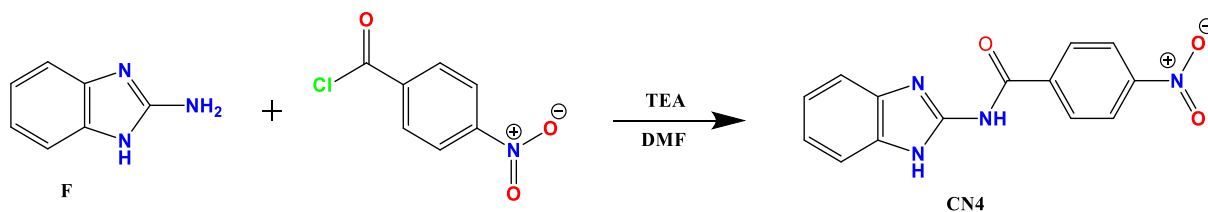
Esquema 21. Reacción de metilación del compuesto *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**).

Para este propósito se comenzó con **CN4** que se sometió a reacción con CH₃I y K₂CO₃ (los bencimidazoles más ácidos son solubles en soluciones ligeramente alcalinas⁵³ en DMF anhidra a 0 °C y se completó en un lapso de 2.5 h, esquema 21. El producto final se aisló y caracterizó por RMN ¹H (Espectro No. [63](#), anexo III). se observó una señal s en 12.85 ppm que integró para 1H que corresponde al NH de la amida, esta fue asignada por intercambio D₂O (Espectro No. [64](#), anexo III). Se observó una señal s en 3.53 ppm que integró para 3H pertenecientes al metilo, una d en 8.4 ppm que integró para 2H que corresponden los protones en *orto* respecto a la carboxamida en el sistema aromático. Además, una señal d a 8.3 ppm que integra para 2H que pertenecen a las posiciones *meta* respecto a la carboxamida. En cuanto al sistema aromático del bencimidazol se observaron desplazamientos tales como: un dd en 7.5 ppm que corresponde a los protones de las posiciones 4 y 7 del anillo y una señal m en 7.2 ppm que pertenece a los protones en 5 y 6. En el espectro de RMN ¹³C se observaron 11 de las 15 señales esperadas, se observó la señal característica del carbonilo en 171.21 ppm, y la señal del metilo a 28.46 (Espectro No. [66](#), anexo III) Adicionalmente, este se confirmó con IR (ATR) cm⁻¹: 3273.60 (NH); 2927.46 (N=C);

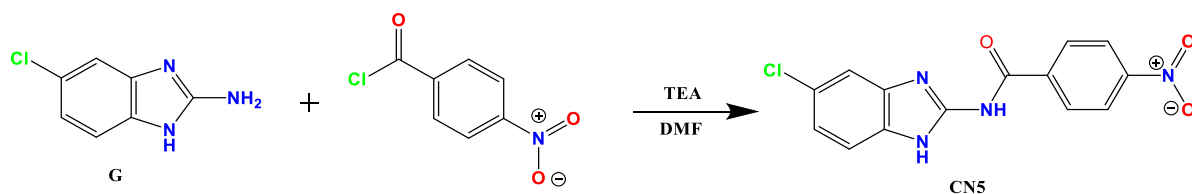
1560.22 (N-C=O); 1531.08 (-NO₂); 1453.61 (CH₃); 1339.22 (C-N); 1150.67 (arC-H); 1612.58 (C=O) (Espectro No. [67](#), anexo III). Espectrometría de masas EMAR (APCI): 296.29 uma (masa calculada), M+ 297.1064 m/z (masa obtenida), C₁₅H₁₂N₄O₃ fórmula química. (Espectro No. [68](#), anexo III)

Con los resultados de la estrategia 2 se encontró que el método funcionaba, con el cual se obtuvo un buen rendimiento y la purificación fue sencilla para **CN4**. Por lo tanto, se empleó la técnica para la síntesis de los compuestos **CN5** y **CN6**.

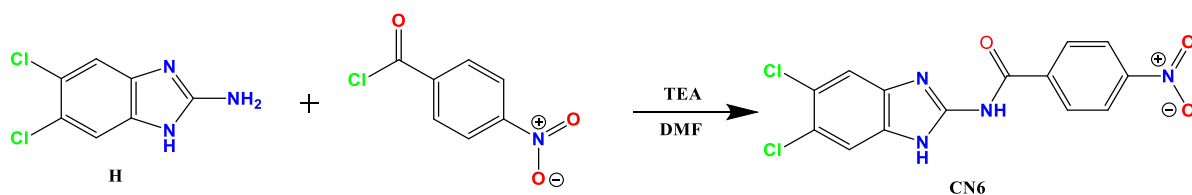
Particularmente para cada molécula de *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida sustituida en 5 o 5 y 6 **CN4-CN6**, se presentan los esquemas de las reacciones empleadas y la caracterización mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Las asignaciones se realizaron utilizando los espectros de las materias primas, así como lo reportado en la literatura.



Esquema 22. Ruta de síntesis para obtener *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**).



Esquema 23. Ruta de síntesis para obtener *N*-(5-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN5**).



Esquema 24. Ruta de síntesis para obtener *N*-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN6**).

En los esquemas 22, 23 y 24 se aprecia que para obtener la **CN4**, **CN5** y **CN6** se inició de **F**, **G** y **H**; estos últimos sustituidos con cloro en las posiciones 5 o 5 y 6 del compuesto **F**, se sometieron a reacción con cloruro de 4-nitrobenzoilo y TEA en DMF anhidra a 0 °C. El recobro del producto fue mediante una extracción sólido-líquido y

finalmente, una pequeña muestra se recristalizó de EtOH para determinar sus constantes físicas y espectroscópicas.

*Caracterización de **CN4**, **CN5** y **CN6***

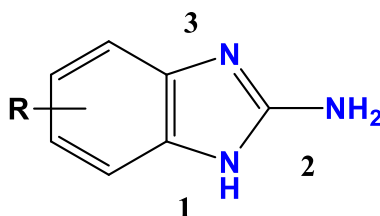
Al ser moléculas similares se realizó una caracterización agrupada; sin embargo, la caracterización individual se puede consultar en las tablas 6 y 7, y visualizar los espectros en el anexo III. En los espectros de RMN ^1H (Espectros No. [39](#), [49](#) y [57](#), anexo III) se observó una señal s a 12.6 ppm que integró para 2H: uno corresponde al NH de la amida y el otro al NH de la posición 1 de bencimidazol siendo dos protones experimentalmente equivalentes, mismas que se confirmaron con los espectros de intercambio con D_2O (Espectros No. [40](#), [51](#) y [59](#), anexo III). Por otra parte, para **CN4**, se observaron 2 señales dd uno en 7.2 y otra en 7.4 ppm que integraron para 2H; mientras que para **CN5**, se observaron 2 señales: una señal m en 7.4 ppm que integra para 2H. Una señal dd en 7.2 ppm que integró para 2H; en tanto para **CN6**, se observó una señal s a 7.6 ppm que integra para 2H. Estas asignaciones correspondieron a los H de las posiciones 4 y 7 del bencimidazol. Además, para **CN4** se mostró una señal m en 8.35 ppm, para **CN5** una señal s en 8.34 ppm y para **CN6** una señal m en 8.3 ppm, mismas que integraron para 4H que corresponden al sistema aromático unido a la carboxamida. Para confirmar la sustitución en NH_2 de la posición 2 del bencimidazol en los tres casos se realizó un experimento bidimensional NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) en este se demostró que no hay ninguna interacción espacial entre los hidrógenos de los grupos aromáticos y si existe alguna es entre hidrógenos vecinos unidos a un mismo anillo (Espectros No. [44](#), [50](#) y [58](#), anexo III). En el espectro de RMN ^{13}C para **CN4**, **CN5** y **CN6** se observaron 8, 10 y 8 de las 14 señales esperadas. Se observó la señal característica del carbonilo cercanas a 170 ppm. (Espectros No. [41](#), [52](#) y [60](#), anexo III). Adicionalmente, se confirmaron con IR (ATR): para **CN5** y **CN6** que son compuestos que contienen grupos Cl, sus bandas de absorción aparecieron alrededor de 440 cm^{-1} . Por otra parte, se observaron señales simples para NH entre $3141\text{--}3362\text{ cm}^{-1}$, mismas que indican la sustitución del grupo benzoilo en la posición 2 del 2-amino-1*H*-bencimidazol. Adicionalmente se observaron señales cercanas a 3009 cm^{-1} (N=C); 1590 cm^{-1} (N-C=O); 1525 cm^{-1} (-NO₂); 1331 cm^{-1} (C-N); 1159.78 cm^{-1} (arC-H); 1615.80 cm^{-1} (C=O) (Espectros No. [45](#), [53](#) y [61](#), anexo III). Espectrometría de masas: para **CN4** EMAR (APCI): 282.26 M (masa calculada), 283.0894 M⁺H (masa obtenida), C₁₄H₁₀N₄O₃ fórmula química. En tanto para **CN5**, EMAR (APCI): 317.70 M⁺H (masa calculada), (317.0510 M⁺H, 318.0542 M^{+2H},

319.0479 M^{+3H}) m/z (masa obtenida), C₁₄H₉ClN₄O₃ fórmula química. Y para **CN6** espectrometría de masas EMAR (APCI): 351.14 M (masa calculada), (351.0125 M, 352.0153 M^{+H}) m/z (masa obtenida), C₁₄H₈Cl₂N₄O₃ fórmula química. (Espectros No. [46](#), [54](#) y [62](#), anexo III).

Regioselectividad de la S_N en el núcleo 2-amino-1H-bencimidazol

La caracterización espectroscópica y espectrométrica anteriormente descrita para la serie **CN**, se utilizó como modelo para la caracterización de los siguientes compuestos, productos de la reacción de acilación y alquilación a las que fue sometido el 2-amino-1H-bencimidazol, así mismo, con lo encontrado en la literatura se logró ubicar las diferentes capacidades de enlace que tienen cada uno de los nitrógenos frente a la alquilación y la acilación.

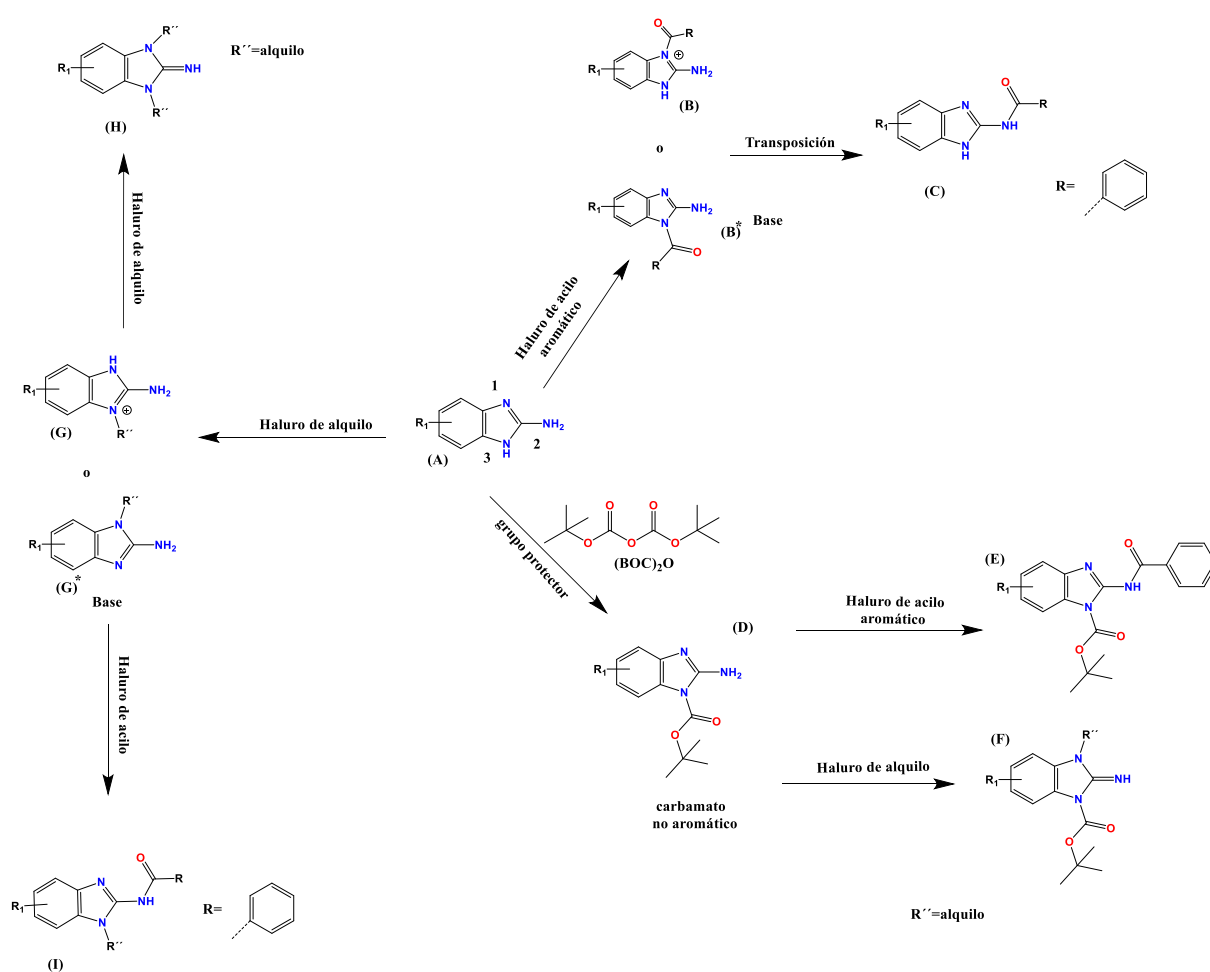
El núcleo 2-amino-1H-bencimidazol tiene características muy peculiares, a simple vista se puede observar que el nitrógeno más nucleofílico es el de la posición 3, mientras que el protón más ácido el de la posición 1 y el menos ácido el que está fuera del ciclo en posición 2, esquema 25. Dadas estas características cualquiera podría asegurar que la reactividad frente acilaciones y alquilaciones en un inicio se dan en cualquiera de los nitrógenos dentro del ciclo, y es correcto solo que en el ocurren reacciones de transposición peculiares propias del núcleo.⁵⁴



Esquema 25. Núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.

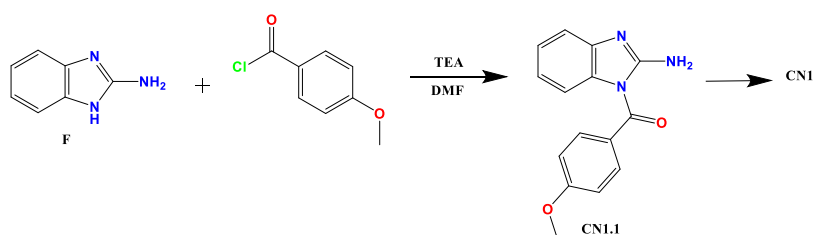
Con las experimentaciones realizadas y con la búsqueda en la literatura se dedujo lo siguiente, esquema 26: si la reacción inicial es una acilación entonces el nitrógeno endocíclico N1 reacciona con el agente acilante que produce intermediarios de bencimidazolínio de tipo **(B)** y según las condiciones de acidez a las que se someta ya que en un ambiente básico primero ocurre una desprotonación del N1 volviéndolo más nucleofílico. Y solo si el agente acilante es un cloruro de ácido aromático este pasará por una migración de acilo para producir los compuestos de tipo 2-acilamino **(C)**. Por otra parte, si el agente acilante es un alcóxicarbonil como el presente en el dicarbonato de di-*terc*-butilo (BOC)₂O la acilación ocurre en un nitrógeno endocíclico

produciendo compuestos de tipo carbamato no aromático (**D**). Cuando compete un grupo alcoxycarbonil y un agente acilante aromático el que tiene preferencia por la posición del nitrógeno del exocíclico es el grupo benzoilo (**E**) y esto depende de factores electrónicos y estructurales, ya que la estabilización del estado de transición está en función de los orbitales frontera HOMO y LUMO. El que podría migrar es el grupo benzoilo dado que el anillo aromático le confiere una mayor estabilidad durante el proceso, a este efecto también se le conoce como dureza local empírica⁵⁵. Por otra parte, si se alquila el compuesto protegido, este reacciona con el otro nitrógeno endocíclico formando un compuesto de tipo 1,3-disustituidos (**F**). En el caso de la alquilación esta ocurre primero en un nitrógeno endocíclico según las condiciones de acidez a las que se someta ya que una desprotonación de N1 aumenta el carácter nucleofílico y producirá compuestos de estructura general (**G**). Un segundo paso de alquilación posterior generalmente produce los compuestos 1,3-disustituidos (**H**). Si la segunda reacción es una acilación aromática entonces los productos obtenidos (**I**) tienen la 1,2-regioselectividad.^{59, 60}



Esquema 26. Regioselectividad de alquilación/acilación del núcleo 2-amino-1H-benzimidazol.

Actualmente existen dos patentes de los años 1968⁵⁶ y 1976⁵⁷ de carboxamidas bencimidazolicas donde describen una ruta de síntesis muy diferente a lo que se realizó en este trabajo. Para su síntesis, se encontró que estos compuestos pasan primero por la sustitución en posición 1 o 3 y después *in situ*, se transponen con calor al nitrógeno de la posición 2.^{58, 59} Para tener más claro lo que acontecía, se sintetizó nuevamente el compuesto (**CN1**) por acilación directa, para así hacer la diferenciación de las moléculas con el sustituyente electrodonador y electroattractor.



Esquema 27. Síntesis para obtener (2-amino-1*H*-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona.

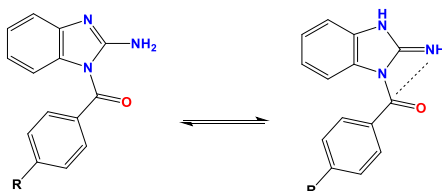
El objetivo en este caso fue aislar el compuesto acilado en posición 1 del 2-amino-1*H*-bencimidazol. Para esto se trabajó a bajas temperaturas donde se hizo reaccionar el compuesto **F** con 4-metoxibenzoilo con TEA en DMF, (Esquema 27). El compuesto **CN1.1** fue obtenido y caracterizado por espectroscopía de RMN. Como estrategia se tomó una parte del compuesto y se sometió a temperatura de reflujo. Se llegó a la conclusión que efectivamente con el suministro de calor se llegaba al compuesto **CN1**, confirmándose únicamente por *pf* y *R_f*.

Caracterización del compuesto **CN1.1**

Para **CN1.1**, en el espectro de RMN ¹H (Espectro No. [22](#), anexo III) se observan dos señales d, una a 7.7 y otra a 7.1 ppm, cada una integra para 2H a los protones del grupo metoxibenzoilo. Además, se muestran 2 señales d, una en 7.2 y otra en 6.3 ppm que integran para 1H cada una, correspondientes a los protones de las posiciones 5 y 6 del bencimidazol respectivamente, adicional a estas, se observa una señal m a 6.7 ppm que integra para 1H correspondiente al H en la posición 4 y una señal s sobrepuesta con una señal m que integra para 3H a 7.0 ppm; la primera señal corresponde al protón de la posición 7 y la segunda corresponde a los protones de la amina. Esta última se confirmó con el experimento de intercambio D₂O (Espectro No. [23](#), anexo III). Para confirmar la *S_N* en el nitrógeno de la posición 1 del bencimidazol se realizó un estudio bidimensional NOESY, en él se logra visualizar las interacciones considerando la numeración programada en la imagen de la tabla 8, entre los dos protones del metilo con los protones 14 y 16; entre los H de las posiciones 1 y 6 del

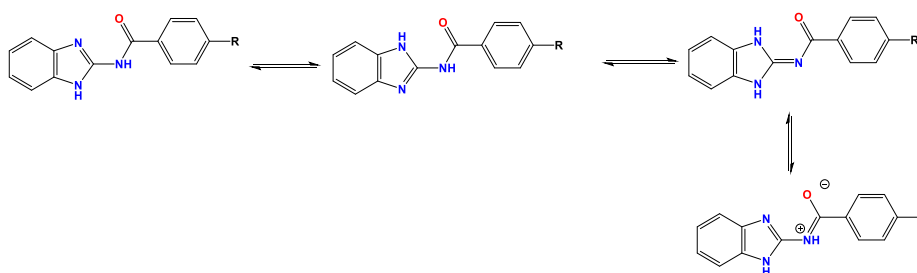
bencimidazol; entre 3 y 14; entre 2 y 13; entre 13 y 14 (Espectro No. [25](#), anexo III). En el espectro de RMN ^{13}C se observaron 12 de las 15 señales esperadas, se observó la señal del carbonilo en 163.32 ppm, y la señal del metilo a 55.70 ppm (Espectro No. [24](#), anexo III).

Se encontró que las moléculas estudiadas cuando están sustituidas en posición 1 pueden generar 2 tautómeros, esquema 28.⁶⁰



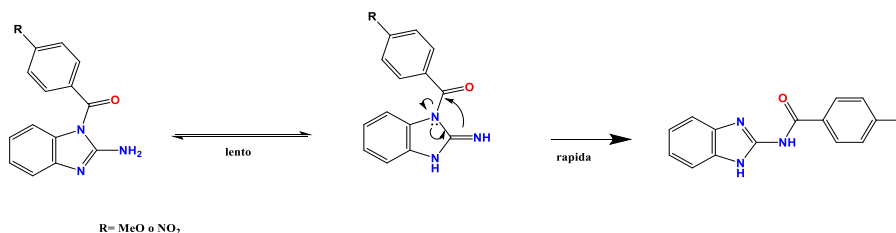
Esquema 28. Tautómeros del núcleo de 2-amino-1*H*-bencimidazol sustituido en posición 1 por el grupo acilo aromático.

Mientras que cuando están en la posición 2 del Nitrógeno exocíclico tiene 4 tautómeros lo que les proporciona mayor estabilidad, esquema 29.



Esquema 29. Tautómeros del núcleo de 2-amino-1*H*-bencimidazol sustituido en el nitrógeno de la posición 2 por el grupo acilo aromático.

Se propone que la reacción de transposición de los grupos acilo aromáticos sustituidos con un electrodonador (metoxilo) o electroatractor (nitro); puede transcurrir siguiendo el mecanismo de reacción mostrado en el esquema 30.



Esquema 30. Mecanismo de reacción de transposición del grupo acilo.





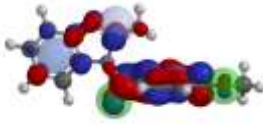




Cuando el compuesto sustituido en posición 1 del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol se ve afectado por una energía térmica lo suficientemente efectiva para la formación del tautómero de imino, esto tiene efecto colocando en el mismo plano los orbitales π del nitrógeno del exocíclico y a sí interactuar con el sistema π antienlazante del carbonilo.

Modelado Molecular de la transposición en el núcleo de 2-amino-1H-bencimidazol

Desde una perspectiva computacional se construyeron las moléculas implicadas en los mecanismos de reacción expuestos previamente y se realizaron cálculos con el programa spartan 14 del paquete de wavefunction, INC⁴². Además, se minimizaron las energías moleculares usando el método semiempírico PM3 (Parameterized Model Number 3). Se calcularon los valores de energía de mayor estabilidad, las distancias entre los átomos de N del bencimidazol con el carbonilo, así como los valores de energía de los orbitales HOMO y LUMO con el método de cálculo geométrico de los estados de transición (densidad funcional) B3LYP con la base 6-31*G, en vacío. Los resultados obtenidos con la simulación molecular muestran que la geometría y la tensión interfacial e intermolecular entre los dos anillos aromáticos es clave para que se dé la transposición.⁶¹ A partir de este hecho se calcularon las distancias entre los átomos de N del núcleo del 2-amino-1*H*-bencimidazol con el carbono del grupo acilo. Para que el grupo acilo pueda emigrar al nitrógeno más próximo es necesario un suministro de energía. Consecuentemente, el aumento de energía tiene efecto en la formación del estado tautomérico; en dicho estado los orbitales HOMO y LUMO se ven modificados y su contenido energético relativamente alto para HOMO (electrones fácilmente disponibles o “movibles”) y LUMO relativamente bajo (orbitales fácilmente accesibles), da pie a la generación de nuevos orbitales a causa de transposición del grupo benzoilo dentro del núcleo del bencimidazol.

En la tabla 10 se presentan los parámetros calculados por modelado molecular con el grupo metoxilo en la reacción de transposición, así como los modelos generados HOMO y LUMO.

Tabla 10. Parámetros calculados del modelado molecular del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con metoxilo.

(2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il) (4-metoxifenil)metanona (estado 1)		Tautómero (2-imino-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il) (4-metoxifenil)metanona (estado 2)		<i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (estado 3)							
 <p>Energía 11.07 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 1.452 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.670 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 3.176 Å</p>		 <p>Energía 16.25 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 1.438 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.731 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 3.159 Å</p>		 <p>Energía 10.67 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 3.641 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.166 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 1.431 Å</p>							
<p>HOMO</p>  <p>-8.75 eV</p>		<p>LUMO</p>  <p>-0.63 eV</p>		<p>HOMO</p>  <p>-8.56 eV</p>		<p>LUMO</p>  <p>-0.45 eV</p>		<p>HOMO</p>  <p>-8.77 eV</p>		<p>LUMO</p>  <p>-0.45 eV</p>	

De manera ilustrativa en la figura 10 se puede observar el proceso de reacción de transposición del grupo 4-metoxibenzoilo en función de la energía. Para que tenga lugar, es preciso aportarle una cierta energía de activación (E_a) para alcanzar el punto denominado complejo activado (punto B) que genera posteriormente el tautómero de la molécula (punto C). Para dar pie a la migración del grupo benzoilo, los enlaces deben llegar a un estado que les permita romperse, para esto, la molécula debe retorcerse (doblarse o deformarse), generar un estado inestable (punto D), y de manera simultánea el nitrógeno del exocíclico atacar al carbonilo y así generar el compuesto en 2 (punto E).

Teóricamente, la primera energía de activación es de 15.03 kJ/mol y la diferencia en energía de la reacción del punto A al punto C es de 5.18 kJ/mol lo que hace suponer que el tautómero es más inestable. La segunda energía de activación es de 15 kJ/mol y la diferencia de energía del punto C al punto E es de -5.58 kJ/mol lo que indica que se llegó a una forma estable. La diferencia de energía de la reacción global es de -0.4 kJ/mol y esto nos permite inferir que la reacción no ocurre de manera espontánea, debido a que el grupo benzoilo tanto en posición 1 como en 2 tienen estabilidades similares y para generar la transposición de 1 a 2 se necesita un aporte de energía.

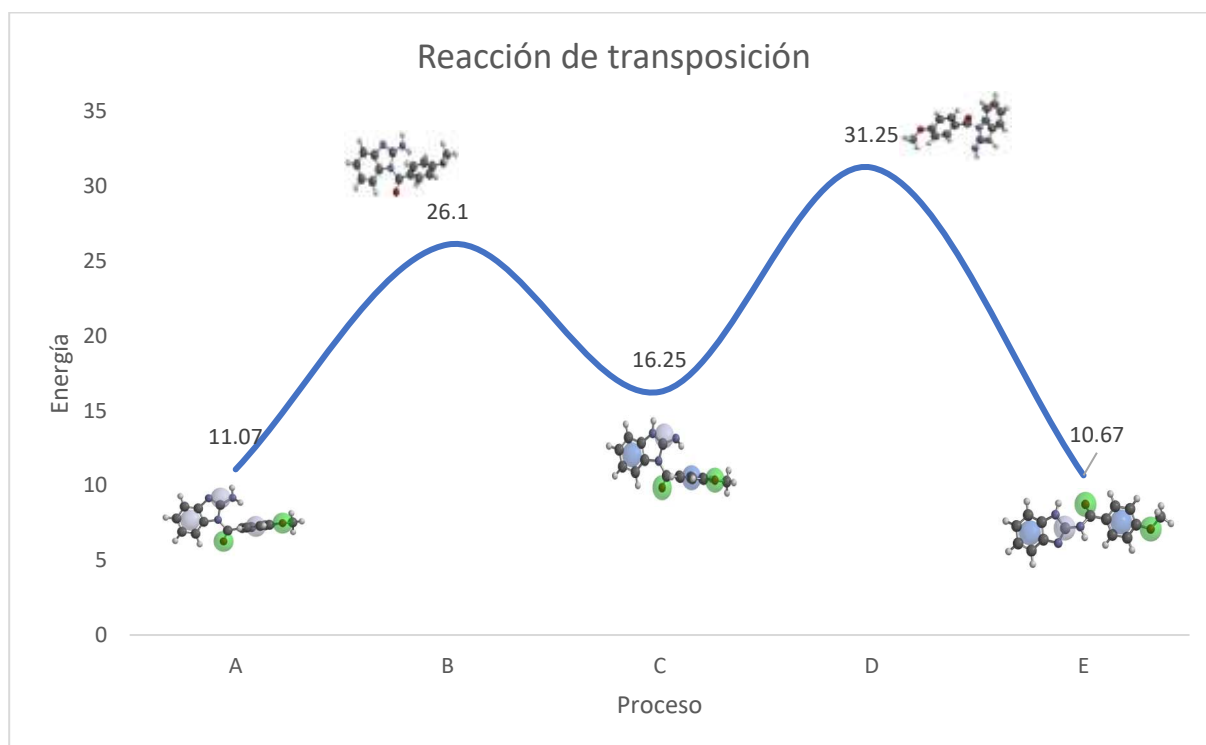
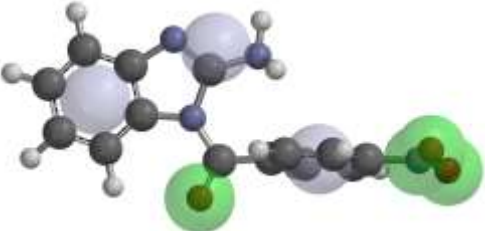

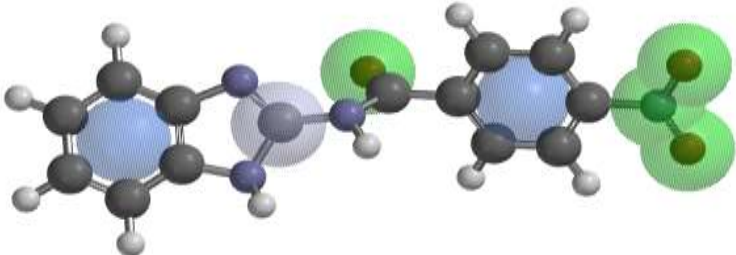



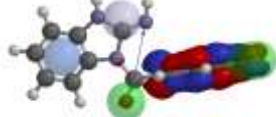
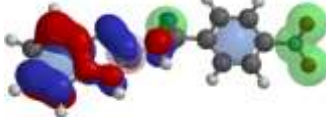



Figura 10. Modelado de reacción de trasposición del grupo benzoilo sustituido en *para* con metoxilo en el núcleo 2-amino-1*H*-benzimidazol.

En la tabla 11 se presentan los parámetros calculados por modelado molecular con el grupo nitro en la reacción de transposición, así como los modelos generados HOMO y LUMO.

Tabla 11. Parámetros calculados del modelado molecular del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con nitro.

(2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)(4-nitrofenil)metanona (estado 1)		Tautómero (2-imino-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il)(4-nitrofenil)metanona (estado 2)		<i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (estado 3)	
 <p>Energía 144.21 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 1.431 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.645 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 3.182Å</p>		 <p>Energía 147.80 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 1.429 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.642 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 3.160 Å</p>		 <p>Energía 122.95 kJ/mol Distancia entre Carbonilo y N1 3.620 Å Distancia entre Carbonilo y N3 3.176 Å Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 1.428Å</p>	
HOMO	LUMO	HOMO	LUMO	HOMO	LUMO
 <p>-9.15 eV</p>	 <p>-1.72 eV</p>	 <p>-8.96 eV</p>	 <p>-1.21 eV</p>	 <p>-9.06 eV</p>	 <p>-1.68 eV</p>

De manera arbitraria, podemos decir que HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital = Orbital Molecular ocupado más alto) indica donde se encuentra el par de electrones que más fácilmente puede perder o ceder la molécula y LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital = Orbital Molecular vacante más bajo) indica el lugar donde más fácilmente la molécula aceptaría un par de electrones.⁶²

De forma análoga al proceso de transposición del 4-metoxibenzoilo en la figura 11 se puede observar el proceso de reacción con el 4-nitrobenzoilo en función de la energía. Según los cálculos realizados y contrastado con lo experimental, el aporte de energía térmica no es necesario, debido a que por sí sola la molécula tiene la energía suficiente para iniciar el proceso. La chispa que da pie a la reacción es la energía mecánica que se genera con las interacciones moleculares, la energía de activación es generada mientras transcurre el tiempo y a su vez se genera el complejo activado (punto B) que posteriormente genera el tautómero de la molécula (punto C). Para dar pie a la migración del grupo benzoilo de igual forma la energía mecánica toma un papel importante, las interacciones moleculares generaran un segundo estado de transición, los enlaces se vuelven más inestables (punto D), y de manera simultánea el nitrógeno del exocíclico atacara al carbonilo para generar el compuesto en 2 (punto E). Teóricamente, la primera energía de activación es de 18.43 kJ/mol y el ΔG de la reacción del punto A al punto C es de 3.59 kJ/mol lo que hace suponer que el tautómero es relativamente más inestable, pero puede existir mayor tiempo. La segunda energía de activación es de 6.81 kJ/mol y el ΔG del punto C al punto E es de -24.85 kJ/mol que indica que se llegó a una forma estable. El ΔG de la reacción global es de -21.26 kJ/mol y esto nos permite inferir que la reacción ocurre de manera espontánea, debido a que el grupo 4-nitrobenzoilo tiene una mayor estabilidad en la posición 2 que en la posición 1 de bencimidazol.

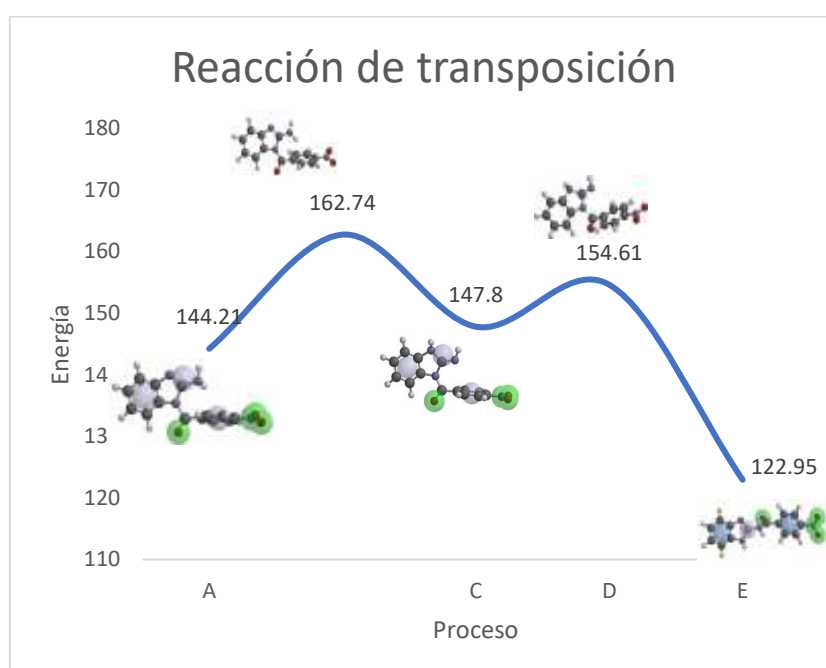


Figura 11. Modelado de reacción de trasposición del grupo benzoilo sustituido en para con nitro en el núcleo 2-amino-1H-bencimidazol.

Tabla 12. Diferencias entre los modelados moleculares del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol con el grupo benzoilo sustituido en para con metoxilo o nitro.

2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol con 4-metoxibenzoilo	2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol con 4-nitrobenzoilo
Distancia el Carbonilo y N exocíclico 3.176 Å en estado 1	Distancia entre el Carbonilo y N exocíclico 3.182 Å en estado 1
Distancia entre el Carbonilo y N exocíclico 3.159 Å en estado 2	Distancia entre el Carbonilo y N exocíclico 3.160 Å en estado 2
Distancia entre Carbonilo Y N1 1.452 Å estado 1	Distancia entre Carbonilo Y N1 1.431 Å estado 1
Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 1.431 Å estado 3	Distancia entre Carbonilo y N exocíclico 1.428 Å estado 3
Energía	Energía
E estado 2 > E estado 1 > estado 3	E estado 2 > E estado 1 > estado 3
Energía HOMO	Energía HOMO
E estado 2 > E estado 1 > estado 2	E estado 1 > E estado 3 > estado 2
Energía LUMO	Energía HOMO
E estado 1 > E estado 2 = estado 3	E estado 1 > E estado 3 > estado 2
Necesita aporte de energía térmica	No necesita aporte de energía térmica
Se rige por energía mecánica	Se rige por energía mecánica
Primera energía de activación 15.03 kJ/mol	Primera energía de activación 18.43 kJ/mol
ΔG del punto A al punto C 5.18 kJ/mol	ΔG del punto A al punto C 3.59 kJ/mol
Segunda energía de activación 15 kJ/mol	Segunda energía de activación 6.81 kJ/mol
ΔG del punto C al punto E -5.58 kJ/mol	ΔG del punto C al punto E -24.85 kJ/mol
ΔG de la reacción global es de -0.4 kJ/mol	ΔG de la reacción global es de -21.26 kJ/mol

El proceso de transposición del grupo benzoilo sustituido con un electrodonador o un electroattractor, depende principalmente de la magnitud de la energía a las que se someta la molécula. Desde una perspectiva química resulta importante la geometría, los ángulos de enlace, los estados tautoméricos, las distancias entre átomos que participan en la migración, la energía, etc. En la tabla 12 se puede apreciar la variación de las distancias en los tres estados del proceso, es notable que el estado 3 es favorecido antes y/o después de la migración. Además, la energía calculada para cada estado la más favorable es la que tiene menor valor, esto en relación con las propiedades termodinámicas. Por otra parte, se puede observar en las tablas 10 y 11 las imágenes de las moléculas, los orbitales HOMO en estado tautomérico, y la distribución de la densidad electrónica en los nitrógenos del núcleo 2-aminobencimidazol. A sí mismo, los orbitales LUMO se perciben en el carbonilo lo que indica que existe deficiencia de electrones. Además, al comparar la distribución de los orbitales HOMO y LUMO en los estados 1 y 3 se puede observar que es necesaria la presencia del estado tautomérico para poder diferenciar los orbitales disponibles LUMO para que opere la migración del grupo acilo. Por último, el tipo de energía proporcionada al sistema depende del grupo sustituido en el benzoilo, esto tendrá efecto en la cantidad de E_a y el tiempo que se necesite para que se desarrolle el

fenómeno migratorio, es decir con el grupo metoxilo se requiere un menor aporte de energía para llegar al tautómero que con grupo nitro, sin embargo, el proceso migratorio conlleva mayor energía con el grupo metoxilo que con el grupo nitro y esto debido a las propiedades electrónicas de cada molécula.

8.2 PARTE ENZIMÁTICA

8.2.1 Ensayos de inhibición de la TcTIM por los derivados del bencimidazol

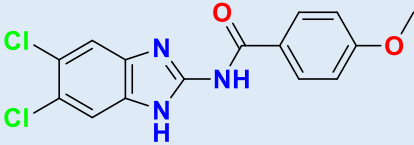
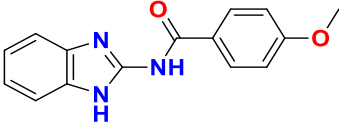
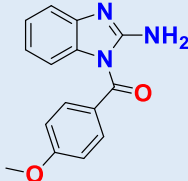
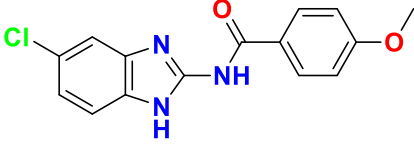
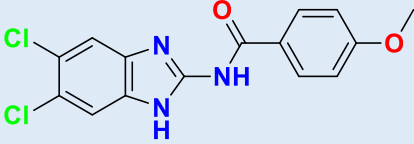
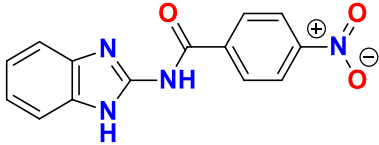
Para este ensayo se empleó el método de cuantificación de NADH, el cual es un método indirecto que determina la actividad residual de la enzima después de la exposición a un determinado compuesto. La actividad de la TcTIM se midió con un sistema acoplado utilizando α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α GDH), en la dirección de gliceraldehido 3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El decremento en absorbancia a 340 nm del NADH⁺ respecto al tiempo se utilizó para calcular la actividad de la TcTIM.

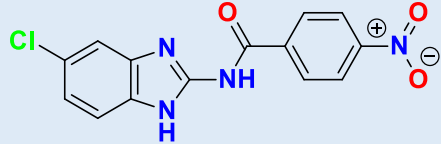
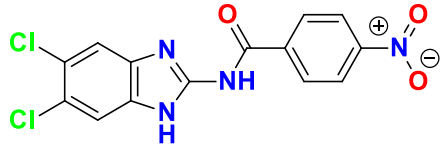
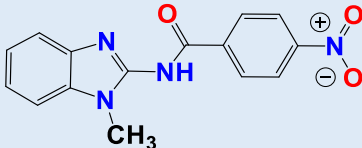
Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 13, donde se puede apreciar que en general los compuestos presentaron de una variada actividad inhibitoria con una disminución de 5 a 38% a diferentes concentraciones. La razón por la que se trabajó a diferentes concentraciones es que los compuestos presentaban problemas de solubilidad, tal es el caso de **CN5** que no se logró disolver en el sistema de reacción. Por otra parte, **CN3** se muestra como líder respecto a las moléculas objetivo. Sin embargo, de todas las moléculas sintetizadas **CN7** sobresale de todas las demás donde se obtuvo una inhibición del 38% a una concentración del 10 μ M. Además, el menos activo fue **CN1** con 5% de inhibición a 100 μ M. Los compuestos diclorados en las posiciones 5 y 5,6 (**CN3** y **CN6**) presentaron la mayor actividad en comparación de sus análogos no clorados (**CN1-CN4**), lo que parece indicar que tener dos cloros puede favorecer la afinidad por la enzima. Se puede apreciar que entre **CN1** y **CN4** el que presenta mayor actividad es **CN4**, esto indica que el grupo nitro aumenta la actividad inhibitoria. La actividad de **CN1.1** fue de 35% a una concentración de 50 μ M superando a **CN1**, esto indica que posiblemente la asociación con la enzima es mejor con el isómero cuando el acilo se encuentra en posición 1 de núcleo de bencimidazol que con el isómero acilado en la posición 2. En cuanto a **CN2** la evaluación muestra que el tener solo un cloro no beneficia la solubilidad y por ende son poco activos.

Al comparar a **CN3** con **C20**, siendo la misma molécula se puede apreciar que **CN3** supera a **C20**, con mismo porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones. Esto

se puede explicar que la actividad será la misma a diferentes concentraciones. Es importante mencionar que para la evaluación enzimática de **CN3** y **C20** fueron distintos lotes de la TcTIM, donde la variación fue la temperatura y el tiempo de inhibición: 25 °C con (3 min) y 36 °C (5 min) respectivamente.

Tabla 13. Actividad inhibitoria de los compuestos **CN** en la enzima TcTIM.

CLAVE	Compuesto	Concentración ensayada	% de inhibición
C20	 <i>N</i> -(5,6-Dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	100 μM	33
CN1	 <i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	100 μM	5
CN1.1	 (2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazol-1-il) (4-metoxifenil)metanona	50 μM	35
CN2	 <i>N</i> -(5(6)-cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	50 μM	28
CN3	 <i>N</i> -(5,6-Dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida	10 μM	33
CN4	 <i>N</i> -(1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	10 μM	16

CN5	 <chem>Clc1ccc2c(c1)n(c2)NC(=O)c3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem> <i>N</i> -(5(6)-cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	---	ND
CN6	 <chem>Clc1c(Cl)ccc2c(c1)n(c2)NC(=O)c3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem> <i>N</i> -(5,6-Dicloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	10 μ M	31
CN7	 <chem>Cn1c2ccccc2n1NC(=O)c3ccc([N+](=O)[O-])cc3</chem> <i>N</i> -(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida	10 μ M	38

8.3 PARTE COMPUTACIONAL

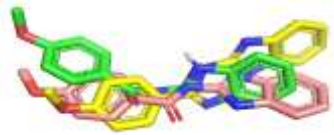






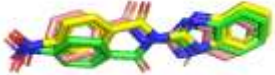
Acoplamiento molecular

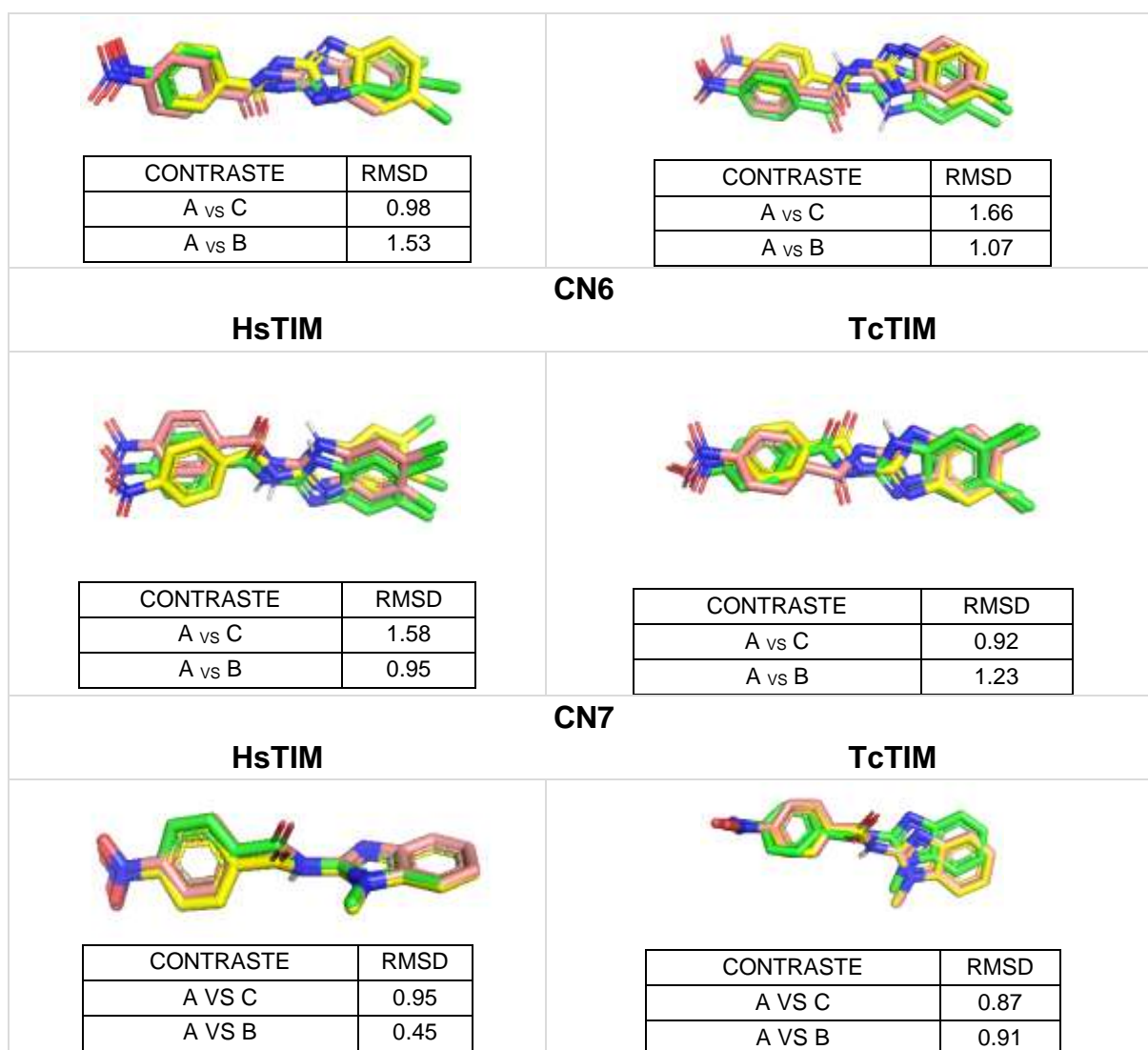
Se realizó el estudio *in silico* de los compuestos de la serie **CN** frente a las dianas farmacológicas HsTIM y TcTIM, con la finalidad observar las interacciones presentes entre ambos elementos y obtener el docking score.

Además, para evaluar los acoplamientos moleculares de los compuestos obtenidos se realizó un consenso de poses con distintos programas como un criterio de validación del estudio de acoplamiento molecular, con lo que se obtuvo el valor de RMSD con el servidor en línea DSXONLINE v0.88 - Scoring Functions for Protein-Ligand Complexes (Esquema 31).⁶³

Alineación de acoplamientos moleculares de la serie **CN** en HsTIM y TcTIM: Verde: Autodock (A); Marrón: Autodock Vina (B); Amarillo: LeDock (C).

Esquema 31. Alineación de acoplamientos calculados con los diferentes programas computacionales.

HsTIM		CN1	TcTIM													
																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>2.4</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.9</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	2.4	A vs B	1.9		<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>1.52</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>0.75</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	1.52	A vs B	0.75
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	2.4															
A vs B	1.9															
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	1.52															
A vs B	0.75															
HsTIM		CN2	TcTIM													
																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>1.40</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.59</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	1.40	A vs B	1.59		<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.7</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	2.3	A vs B	1.7
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	1.40															
A vs B	1.59															
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	2.3															
A vs B	1.7															
HsTIM		CN3	TcTIM													
																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>1.43</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.35</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	1.43	A vs B	1.35		<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>2.35</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.05</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	2.35	A vs B	1.05
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	1.43															
A vs B	1.35															
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	2.35															
A vs B	1.05															
HsTIM		CN4	TcTIM													
																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>4.17</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>0.86</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	4.17	A vs B	0.86		<table border="1"> <thead> <tr> <th>CONTRASTE</th> <th>RMSD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A vs C</td> <td>1.37</td> </tr> <tr> <td>A vs B</td> <td>1.61</td> </tr> </tbody> </table>		CONTRASTE	RMSD	A vs C	1.37	A vs B	1.61
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	4.17															
A vs B	0.86															
CONTRASTE	RMSD															
A vs C	1.37															
A vs B	1.61															
HsTIM		CN5	TcTIM													



Se puede observar en el consenso de los acoplamientos estudiados la variación de los valores de RMSD, esto es atribuible a que los ligandos al ser moléculas pequeñas en una interfaz tan grande como la de la TIM, los ligandos pueden encontrar variadas poses, tal es el caso de **CN4** en HsTIM, **CN3** en TcTIM, **CN2** en TcTIM, **CN1** en HsTIM siendo estos los que superaron el valor 2 de RMSD. El propósito de calcular el RMSD fue para medir la calidad de reproducibilidad de cada pose de unión predeterminada, en este caso la pose de referencia con Autodock 4.260, respecto a los otros dos programas computacionales. Si bien la mayoría de los valores de RMSD estuvieron por debajo de 2, otros lo superaron. Eso no quiere decir que la pose este mal o que se tenga que repetir, si no que al reproducir el acoplamiento el programa encontró otra forma de unión. En otras palabras, los resultados en el sitio de unión son altamente dependientes de la interacción del ligando con el receptor y la pose solo es un atributo de la unión entre el ligando-receptor. Otro factor importante es el tamaño del clúster

de trabajo en cada acoplamiento, existiendo variaciones en el área del grid definido, factor que no se puede reproducir entre los tres programas únicamente se logran aproximar las dimensiones.

*Datos obtenidos del acoplamiento de la serie **CN** y la HsTIM*

Después del experimento de validación del acoplamiento molecular, se analizaron los datos obtenidos a partir del acoplamiento calculado con Auto dock que fue el que se manejó como referencia en un inicio. En la tabla 14 se muestran los valores obtenidos de puntuación de interacción (Score) entre las conformaciones determinadas por el ligando en el sitio de unión en la TcTIM y la HsTIM, así como la diferencia que existe entre el ligando y la proteína.

Tabla 14. Valores calculados de puntuación de energía de interacción entre una conformación determinada del ligando y las enzimas TcTIM y HsTIM.

Compuesto	Score TcTIM	Score HsTIM	Score TcTIM-score HsTIM)
CN1	-3.95	-3.78	0.17
CN2	-4.50	-4.31	0.19
CN3	-7.12	-5.66	1.46
CN4	-4.13	-4.03	0.1
CN5	-4.48	-4.47	0.01
CN6	-5.26	-5.03	0.23
CN7	-6.68	-6.96	0.28

Los compuestos mostraron afinidad por las enzimas, con valores de score, indicando que la unión ligando-receptor genera complejos estables. Los ligandos mostraron una mayor afinidad por la TcTIM en comparación con la HsTIM.

De todos los ligandos propuestos, el compuesto **CN3 y CN6** fueron los que presentaron la mayor afinidad por TcTIM, esto se ve reflejado en el ensayo enzimático que si bien no fueron las mejores sobresalen en el grupo. mientras que la **CN1 y CN4** fue la que presento menor score para ambas enzimas, lo que confirma el hecho de que, tener átomos de cloro hace que el compuesto se ligue con mayor fuerza al receptor.

Mediante el estudio de acoplamiento molecular también se encontraron los residuos principales de la interfaz que interactúan con los ligandos, tabla 15.

Tabla 15. Los principales residuos de la interfaz de las enzimas TcTIM y HsTIM que interactúan con los ligandos.

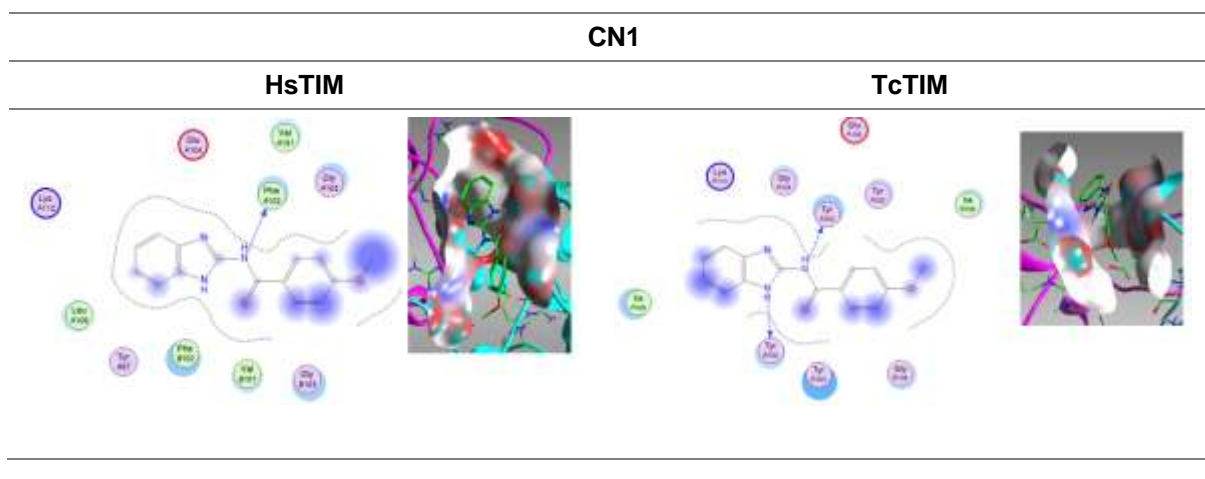
Compuesto	Residuos de interacción TcTIM	Residuos de interacción HsTIM
CN1	Tyr B102 y Tyr A103	Phe A102
CN1.1	Tyr B102 y Tyr A103	Phe A102 y Arg B98
CN2	Tyr B102	Phe A102 y Phe B102
CN3	Tyr B102 y Gly A104	Phe A102, Val B101 y Gly A103
CN4	Tyr B102, Arg A71 y Thr 070	Phe A102, Ser A105 y Ser B105
CN5	Gly A104 y Tyr B102	Phe A102 y Lys A68
CN6	Tyr B102 y Tyr A103	Phe A102, Glu A104 y Ser A105
CN7	Gly B104, Tyr B102, Lys A113 y Glu A105	Phe B102, Lys B68 y Val A101

Como se observa en la tabla 15 los principales residuos de interacción fueron Tyr B102, Tyr A102 para TcTIM y Phe A102 para HsTIM. A pesar de estas coincidencias, la presencia de otros residuos hace que los ligandos interactúen de manera diferente con cada sitio de unión y eso se ve reflejado con el tipo de interacción.

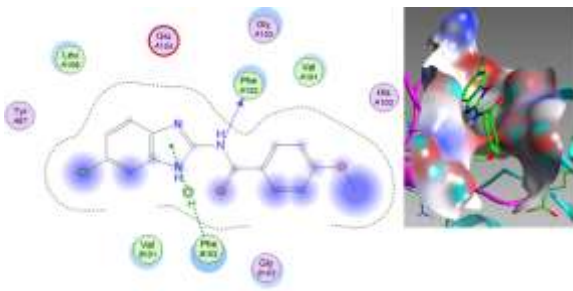
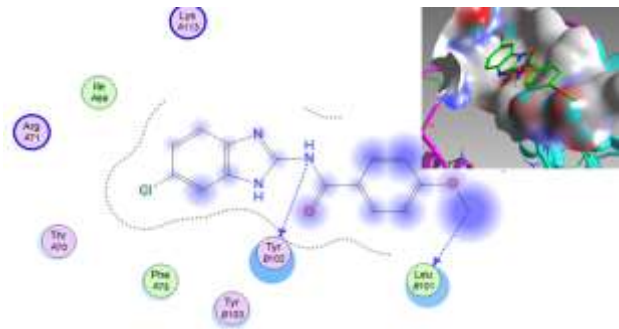
Para observar de una manera más clara la interacción de estos compuestos con TcTIM, se calcularon los diagramas de interacción de ligando (DIL) de la serie **CN** para cada acoplamiento.

En el esquema 32 se puede observar en 2D y 3D el arreglo y el tipo de interacción de acuerdo con el modelado molecular cuando el ligando se une al sitio de unión a lo largo de la interfaz de TcTIM y HsTIM. En la figura 11 se puede observar la simbología usada para la designación del tipo de interacción en cada diagrama.

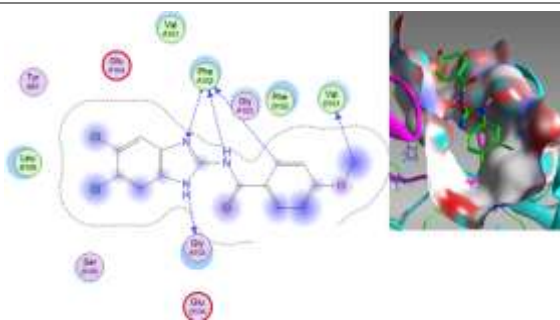
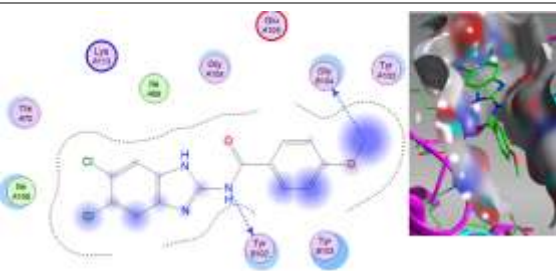
Esquema 32. Interacción en 2D y 3D y modelado molecular entre los ligandos y las enzimas TcTIM y HsTIM.



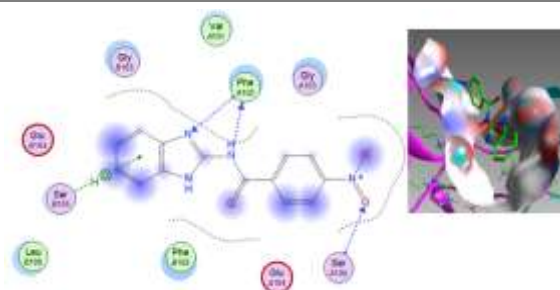
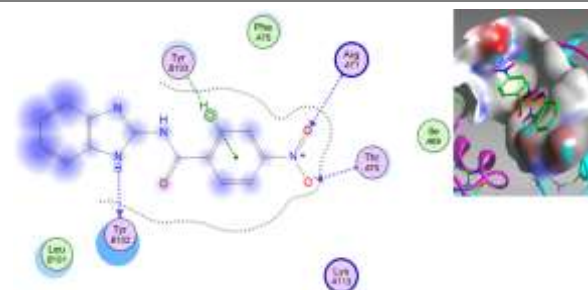
CN2

HsTIM**TcTIM**

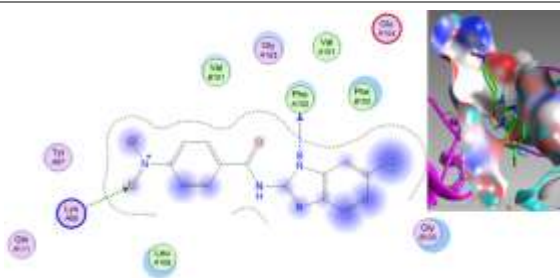
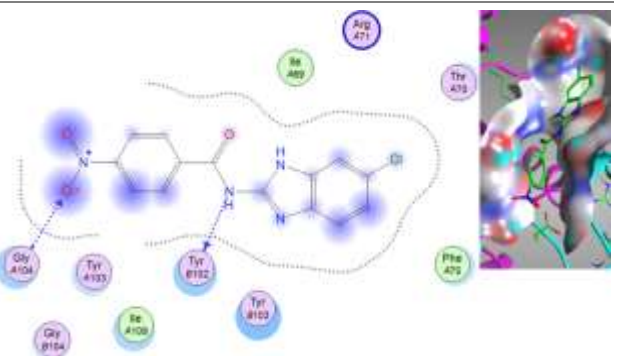
CN3

HsTIM**TcTIM**

CN4

HsTIM**TcTIM**

CN5

HsTIM**TcTIM**

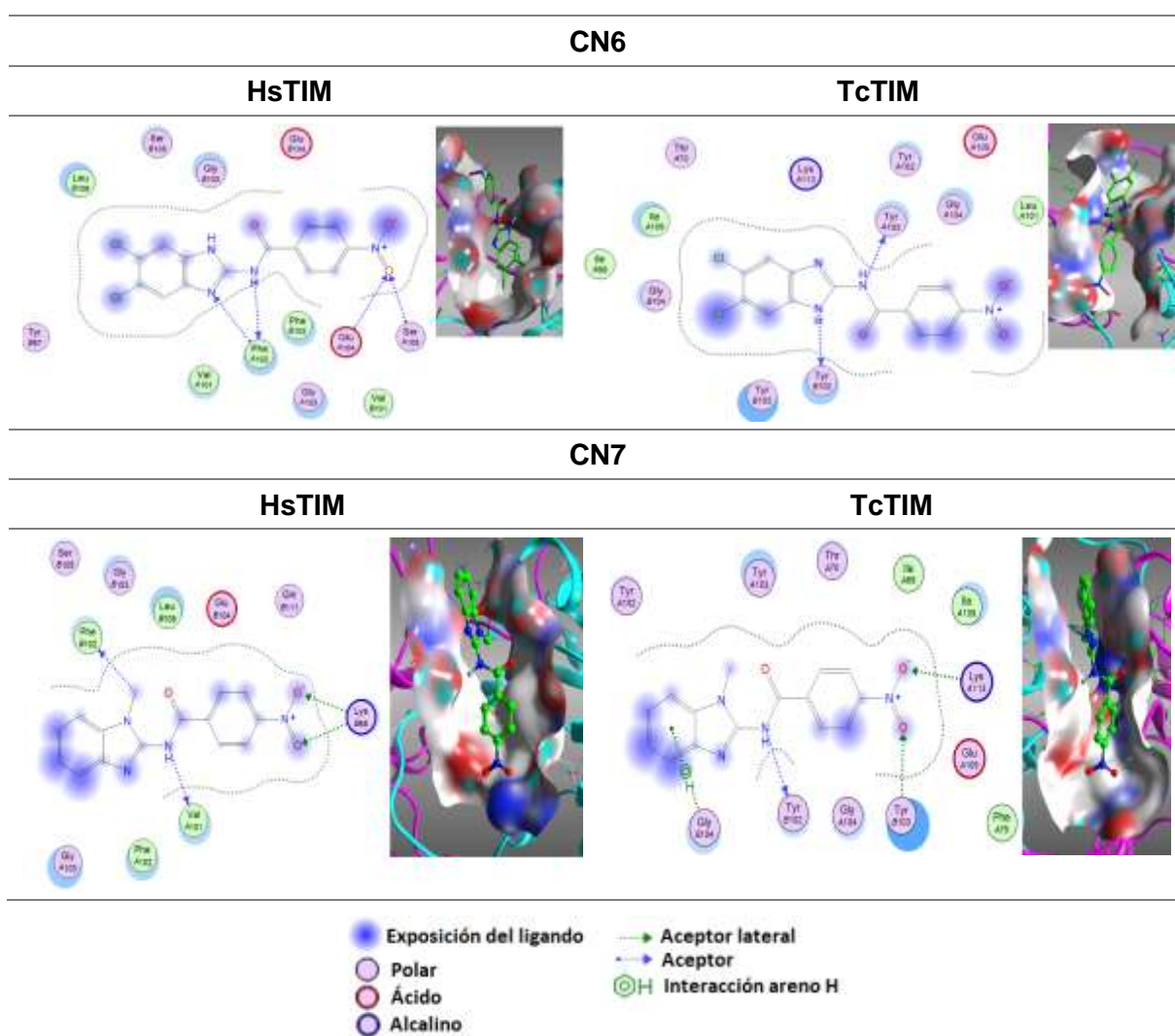


Figura 12. Simbología del tipo de interacción.

El tipo de interacción más frecuente con HsTIM fue de manera lateral con el residuo Phe y Val con la parte central del ligando, y aunque los cloros no las tuvieron con los residuos, los grupos metoxilo y nitro si las presentaron de forma directa. Por otra parte, las interacciones con TcTIM presentaron mayor variedad de interacciones, desde directas, laterales y con los arenos de los residuos. Esto posiblemente indica que los ligandos se unen con mayor fuerza en la interfaz de la TcTIM respecto a HsTIM.

SECCIÓN IV.

CONCLUSIONES Y

PERSPECTIVAS

9. CONCLUSIONES

Se sintetizaron los compuestos de la serie **CN**, con base a la información encontrada en la literatura, con un reajuste en las condiciones y cantidades estequiométricas de los reactivos. Además, se encontró una metodología alterna para la preparación de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)benzamida que modela reactividad entre el 2-aminobencimidazol y el grupo acilo que bajo ciertas condiciones se puede obtener la discriminación entre la sustitución en 1 o en posición 2 en el núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol, este método resulto ser reproducible, más eficiente, de menor costo y tiempo.

A consecuencia de los experimentos se compararon las reacciones de acilación y alquilación en vista de que fueron las reacciones a las que se sometió el núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol y con lo encontrado en la literatura se logró ubicar las diferentes capacidades de enlace que tienen cada uno de los nitrógenos frente a la alquilación y la acilación a diferentes condiciones de reacción.

Se realizó un modelado Molecular del fenómeno de la transposición en el núcleo de 2-amino-1*H*-bencimidazol y se encontró que la migración del grupo 4-metoxibenzoilo no ocurre de manera espontánea, mientras que con el grupo 4-nitrobenzoilo si ocurre deliberadamente.

Se caracterizaron cada uno de los intermediarios y productos finales, determinando las propiedades fisicoquímicas y se compararon con los ya reportados en la literatura, así como la elucidación estructural de cada uno de ellos mediante las técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Además, con los experimentos de RMN ¹H NOESY, para los compuestos finales, se permitió comprobar la estructura y ratificar la posición del enlace de la carboxamida en el 2-aminobencimidazol.

Se evaluó la actividad inhibitoria de 8 compuestos finales frente a TcTIM y se encontró que los compuestos tuvieron una mejor actividad respecto a los ensayos con la serie C12-C20. Especialmente **CN3** y **CN7** son las que sobresalen frente a la serie completa superando el 33 %. Para consolidar los estudios experimentales, se realizó el análisis mediante acoplamiento molecular de los compuestos finales frente a las enzimas TcTIM y HsTIM, y se encontró que para tener una mejor asociación entre el ligando y el sitio de unión es necesario que la molécula cuente en su estructura con las

posiciones 5 y 6 cloradas, así como el grupo nitro en posición *para* respecto a la carboxamida, adicionalmente se encontró que la sustitución del grupo acilo en la posición 1 del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol tiene un mayor efecto en la inhibición de la enzima y este se puede visualizar en **CN1.1** que supera a su isómero acilado en la posición 2 (**CN1**).

10. PERSPECTIVAS

Para complementar el trabajo se recomienda realizar estudios de actividad biológica frente al parásito *T. cruzi* con las moléculas **CN3**, **CN7** y **CN.1**, así como estudios de evaluación citotóxica con la HsTIM.

Podría probarse la actividad de este tipo de moléculas contra otros parásitos y/o organismos que presenten la enzima TIM.

La sustitución del Nitrógeno 1 del núcleo 2-aminobencimidazol le confiere mayor afinidad con el sitio de unión de la enzima, por esto, sería interesante observar en estudios de acoplamiento molecular el comportamiento del núcleo 2-amino-1*H*-bencimidazol sustituido con grupos de mayor tamaño de tipo carboxamido que le confieran una mejor asociación con los residuos en el sitio de unión.

11. REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud. *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*. (2007).
2. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO (2018). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
3. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
4. J. Medina, C. R.-M. *Gaceta Médica de México*. (2018). Disponible en: http://gacetamedicademexico.com/frame_esp.php?id=202.
5. Secretaria de Salud. Prevención y control de la Enfermedad de Chagas. (2014).
6. R. Medina, J. Ruiz, C. Salazar, Schettino, M. & González. Enfermedad de Chagas en México. *Gac. Med. Mex.* **154**, 605–612 (2018).
7. Bárbara Novelo, America Peña, J. G. Detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *IMSS* (2010).
8. A. Werner. *Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas)*. (2013).
9. T. Uribarren. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. (2018). Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomiasis.html>.
10. D. Scott. Stanford University. Parasites & Pestilence: Infectious Public Health Challenges. (2006). Disponible en: https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/T_cruzi/lifecycle.htm.
11. O. de la Garza. *Trypanosoma cruzi* in *Parasitología médica* (ed. Moderno, E. manual) 153–162 (2013).
12. Tay J, Gutiérrez-Quiroz M, Rodríguez-Quintanilla M, López Martínez R, Romero-Cabello R. *Microbiología y Parasitología médicas*. 3ª Edición. Méndez Editores SA de CV; México 2003.
13. López M, Corredor A, Nicholls R, Agudelo C, Álvarez C, et al. *Atlas de Parasitología*. Colombia: El Manual Moderno; 2006
14. J. A. Urbina, R. D. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**, (2013).
15. B. Carrilero, L. Murcia, L. Martínez, M. S. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev. Española en Quimioter.* **24**, (2011).
16. J.D. Maya, K. Bruce, P. I. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Trends Parasitol.* **35**, (2006).
17. IBM Watson Health provides its products AS. IBM Micromedex. (2018). Disponible en: https://www-micromedexsolutions-com.pbidi.unam.mx:2443/micromedex2/librarian/CS/86C342/ND_PR/evidencex

- pert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/BF19E3/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFActionId/evi.
18. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-032-SSA2-2010, PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR.
 19. R. Opperdoes, P. M. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int. J. Parasitol.* **31**, (2001).
 20. C. S. Huerta. Síntesis y actividad antiprotozoaria de *N*-(6-Cloro-5-(2,3-Diclorofenoxi)-1H-Benzimidazol-2-il)Bencensulfonamidas. (Tesis, UNAM, 2017).
 21. A. Cortés, A. Pérez, N. S. A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Springer-Verlag Parasitol Res.* **102**, (2007).
 22. Gómez-Puyou, A.; Saavedra-Lira, E.; Becker, I.; Zubillaga, R. A. R. A.; Rojo-Domínguez, A.; Pérez-Montfort, R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 847–855 (1995).
 23. Witmans, C. An approach to the rational design of new inhibitors for *Trypanosoma brucei*: Triosephosphate isomerase. *Univ. Groningen* 166 (1995).
 24. H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. D. Crystal structure of Triosephosphate isomerase from *Trypanosome cruzi*. *PDB* (2007).
 25. Maldonado, E. *et al.* Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* **283**, 193–203 (1998).
 26. Pérez-Montfort, R. *et al.* Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* **38**, 4114–4120 (1999).
 27. H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. D. Structure of human triose phosphate isomerase. *PDB* (2016).
 28. J. Velazquez. Síntesis y actividad tripanocida de nuevos derivados del bencimidazol. (Tesis, UNAM, 2016).
 29. K. Rangappa, A. H. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry. *Cent. Nano Mater. Sci. Jain Univ.* **86**, (2014).
 30. A. Guedes, S. de Magalhaes, E. D. Receptor–ligand molecular docking. *Springer-Verlag Berlin* **6**, (2013).
 31. Chen, W. Chemoinformatics: Past, Present, and Future. *Journal of Chemical Information and Modeling.* **46** (6), 2230-2255 (2006)
 32. Gupta, Meenakshi *et al.* “Docking techniques in pharmacology: How much promising?.” *Computational biology and chemistry* vol. 76: 210-217 (2018).
 33. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J*

- Mol Sci.;20(11):278 (2019)
34. Soto, P. J. T. Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de *Entamoeba histolytica*. (Tesis, UNAM, 2011).
 35. N. González. Diseño de nuevos Bencimidazoles Tripanomicidas. (Tesis, UNAM, 2018).
 36. Kutschy, P., Ficeri, V. & Dzurilla, M. Synthesis of 2-Acylaminobenzimidazoles from Acyl Isothiocyanates and o-Phenylenediamine. *Chem. Pap.* 39–42 (1994).
 37. M. Sato, N. Fukada, M. Kurauchi, T. T. New Synthesis of Dimethyl N-Aroylcarbimidodithioates and 3-Aryl-5-methylthio-1H-1,2,4-triazoles. *Thieme Synth.* (1981).
 38. M. Augustin, M. R. Reaktionen mit N-Acylimino-dithiokohlensaurediester. *J. Für Prakt. Chemie* **322**, (1980).
 39. Gago, F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. (2011). doi:<http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.338>
 40. F. Hernández, A. Lira, J. L. M. *Manual de Químioinformática*. (Manual, UNAM, 2017).
 41. Morris, G. M. & Goodsell, D. S. AutoDock. (2013). Available at: <http://autodock.scripps.edu/>.
 42. V. Karman. Spartan 14. (2014). Disponible en: <https://www.wavefun.com/>.
 43. A. Romo-Mancillas. Diseño por acoplamiento molecular, síntesis de análogos del bencimidazol y pruebas de inhibición selectiva de la enzima Triosafosfato isomerasa. (Tesis, UNAM, 2014)
 44. Wang, Z. *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 12964–12975 (2016).
 45. Jain, A. N. Bias, reporting, and sharing: Computational evaluations of docking methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **22**, 201–212 (2008).
 46. Cole, J. C., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D. & Taylor, R. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **60**, 325–332 (2005).
 47. Alonso, F., Beletskaya, I. P. & Yus, M. Metal-mediated reductive hydrodehalogenation of organic halides. *Chem. Rev.* **102**, 4009–4091 (2002).
 48. R. Benitez. Estudio de las propiedades catalíticas del Pd en la hidrogenación selectiva de fenilacetileno y en la hidrodechloración catalítica de hidrocarburos. (Tesis, Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica, 1999).
 49. Hartwig, A. In *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. *John Wiley Sons* 216–235 (2013).
 50. Augustin, M. & Richter, M. Reaktionen. N-Acylimino-dithiokohlensaurediestern. (1980).
 51. Ortega, J. A. *et al.* Pharmacophore Identification and Scaffold Exploration to Discover Novel, Potent, and Chemically Stable Inhibitors of Acid Ceramidase in Melanoma Cells. *J. Med. Chem.* **60**, 5800–5815 (2017).

52. Zhou, H. J. *et al.* Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J. Med. Chem.* **58**, 9480–9497 (2015).
53. wright, J. B. The chemistry of the benzimidazoles. *Chem. Rev.* **48**, 397–541 (1951).
54. Preston, P. N. *Benzimidazoles and cogeneric tricyclic compounds part 2.* (1981).
55. L. Meneses, A. Araya, F. Pilaquina. Theoretical Studies of Reactivity and Selectivity in Some Organic Reactions. *Int. J. Quantum Chem.* **111**, 4020–4029 (2011).
56. Craig, P. N. & Hoover, J. R. E. United States Patent Office. *J. Am. Soc. Nav. Eng.* **39**, 620–622 (1968).
57. Montoliu, J. procedimiento para la preparación de compuestos heterocíclicos derivados de ácidos bencimidazolicos. 1–12 (1976).
58. M. Hernandez. Síntesis de bencimidazoles con actividad antihelmintica potencial. (Tesis, UNAM, 1990).
59. R. Rastogi, S. S. 2-aminobenzimidazoles in Organic Syntheses. *Div. Med. Chem.* 861–1096 (1986).
60. J. Stoermer, S. E. Acylierung von Heterocyclen mit Kohlensäurederivaten. II. Endo- und exo-Carbamoylierung von 2-Amino-benzimidazol-Derivaten mit Isocyanaten. Mechanismus der Acylgruppenwanderung. (University of Queensland).
61. Stewart, J. J. P., Császár, P. & Pulay, P. *Fast semiempirical calculations. Journal of Computational Chemistry* **3**, (1982).
62. I.Rabadán, A. A. *Orbitales Moleculares, Densidad Electrónica y Potencial Electrostático. Página de Docencia en Química Física Teórica.* Disponible en: <http://www.qfa.uam.es/informatica/Informatica/practica7.pdf>
63. G.Neudert, H. Velec, P. Block, G. K. DSXONLINE. (2019). Disponible en: <http://pc1664.pharmazie.uni-marburg.de/drugscore/index.php>.

SECCIÓN V.

ANEXOS

ANEXO I

12.1 INSTRUMENTOS, MATERIALES Y EQUIPO

Tabla 16. Sistemas de elusión utilizados en cromatografía en capa fina.

Sistema	Composición	Proporción
I	CHCl ₃ : MeOH	90:10
II	CHCl ₃ : MeOH	99:1
III	CHCl ₃ : MeOH	95:5
IV	Hex: AcOEt	90:10
V	CHCl ₃ : AcOEt	90:10
VI	Hexano/CHCl ₃ /AcOEt	50:35:15
VII	CHCl ₃ : MeOH	99.5:0.5

Tabla 17. Instrumentos, materiales y equipos usados en la realización del trabajo experimental.

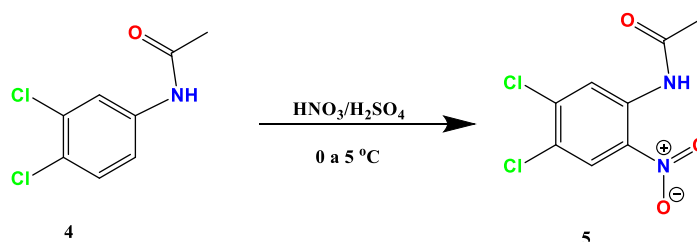
Instrumentos, materiales y equipos	
Instrumento/ Equipo/ material	Diseño, Marca(s) y modelo(s)
Placas para cromatografía en capa fina (CCF)	Placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F254 20X20 cm.
La cromatografía en columna con sílice 60 Merck	La cromatografía en columna (flash) se llevó a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck® con una distribución de tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm.
Reactivos y disolventes	J.T. Baker®, Sigma Aldrich®, Merck® y Q.P.
balanza analítica	Sartorius A210P y SCIENTECH SL600.
Parrilla automática	IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura, modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
Lámpara UV	lámpara UV UVGL-25 Mineralight.
Equipo para determinar el punto de fusión	La temperatura de fusión (pf) se determinó utilizando capilares de vidrio en un aparato marca Büchi modelo B-540 y no están corregidos.
Rota evaporador, baño de agua, bomba de vacío y condensador	La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida por medio de un rota evaporador Büchi R-114 con baño B-480 acoplado a una bomba de vacío marca Gast 0523-V47-6528DX y un condensador de alta eficiencia conectado a un enfriador VWR Scientific modelo 1107, o bien, acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30. Para disminuir la presión del sistema se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2.
Hidrogenador catalítico	La hidrogenación catalítica se realizó empleando un hidrogenador marca Parr Modelo 3916 EG con 60 lb/pulg ² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Ni-Raney (al 30%) marca Aldrich.
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.	
Espectroscopia infrarroja (IR)	Espectrofotómetro de transformada de Fourier Perkin Elmer® FT-IR 1600, los espectros se obtuvieron con el accesorio de reflectancia por ATR.
Resonancia magnética nuclear (RMN)	Espectrómetro Varian® Unity Inova de 400 MHz; los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. Se uso tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; los disolventes deuterados usados fueron cloroformo, acetona y dimetilsulfóxido; Las constantes de acoplamiento J se dan en Hertz. Los símbolos correspondientes a la multiplicidad de las señales son: s = señal simple, d = señal doble, dd = señal doble de doble, t = señal triple, m = señal múltiple.
Espectrometría de Masas (EM)	Espectrómetro JEOL® The AccuTOF JMST100LC; la técnica utilizada fue DART (Direct Analysis in Real Time); utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) y Ionización química a presión atmosférica (APCI) y Cromatografía de Gases.

ANEXO II

12.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Síntesis de *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**5**)

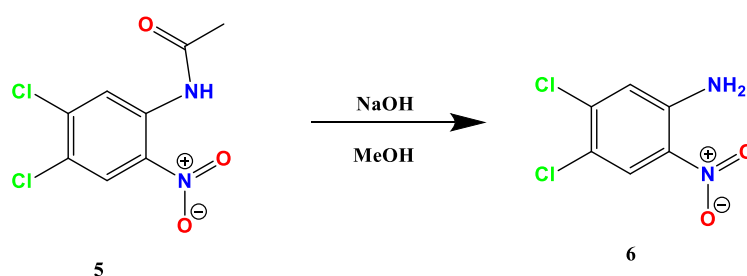


En un vaso de precipitados de 250 mL equipado con una barra de agitación magnética en un baño de hielo con sal granular a 0 °C; se agregaron 23.8 mL de H₂SO₄. Una vez que se alcanzó una temperatura de 3 °C, se agregaron lentamente 15 g (73.32 mmol) de la materia prima 3,4-Dicloroacetanilida(**4**) conservando la mezcla por debajo de 8 °C.

La formación de la mezcla sulfonítrica se realizó *in situ*: en dos vasos de precipitados de 50 mL, equipados con una barra de agitación magnética en un baño de hielo con sal granular, a uno de ellos se agregaron 9.7 mL de H₂SO₄ y al otro se adiciono 6.2 mL de HNO₃. Una vez que ambos vasos alcanzaron la temperatura de 4 °C se procedió a transferir gota a gota el H₂SO₄ al vaso de HNO₃, manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C. Terminada la adición, la mezcla sulfonítrica se mantuvo en el baño de hielo con suave agitación.

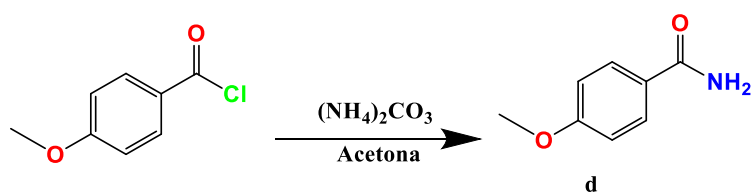
Con ayuda de una pipeta pasteur se adicionó la mezcla sulfonítrica gota a gota al vaso con la materia prima **4**, observando que la temperatura en el vaso se mantuviera cercana a 5 °C. Una vez acabada la adición se mantuvo en agitación por 15 min y después por 1 h a t.a. con agitación vigorosa. La reacción fue monitoreada con ccf (sistema III), La mezcla de reacción se vertió de manera lenta en un vaso con agua-hielo y con agitación vigorosa hasta observar un sólido; en un principio con una consistencia chiclosa, pero conforme transcurría el tiempo se trasformaba en una suspensión de partículas con tamaño uniforme. El sólido obtenido se separó por filtración al vacío y lavó con abundante agua hasta pH neutro. El producto crudo se resuspendió en 15 mL de metanol (únicamente que humedeciera el sólido), permaneció en agitación por 20 min, se filtró con vacío y lavó con metanol frio. El producto **5** fue recristalizado con MeOH, de donde se obtuvieron 13.44 g (74%) de un sólido amarillo pálido, el cual mostró ser un solo compuesto, R_f: 0.53 (sistema III), pf: 124.6–125 °C.

Síntesis de 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (**6**)



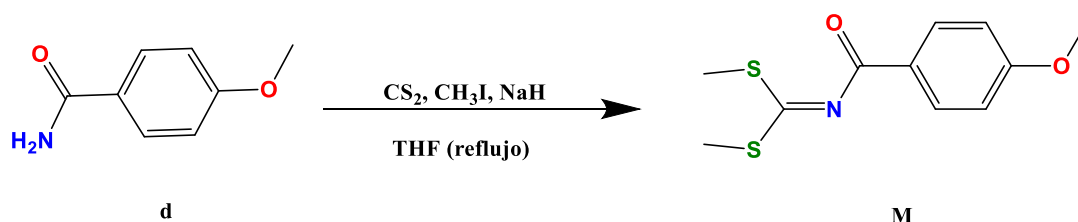
En un matraz bola de 250 mL se suspendieron 6.23 g (25.01 mmol) del compuesto **5** en 50 mL de MeOH, se le adicionó lentamente una disolución de 1.5 g (37.3 mmol, 1.5 eq) de NaOH en 5 mL de H₂O, la mezcla fue agitada a t.a. durante 1 h y monitoreada por ccf usando el sistema I. Finalmente la mezcla de reacción se vertió en 50 mL de agua-hielo formando un sólido amarillo, fue filtrada al vacío y se lavó con agua helada hasta pH neutro. El rendimiento fue de 4.79 g (92.7%), con aspecto sólido amarillento, que mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.51 (sistema VII) y pf 179.2-180.5 °C.

Síntesis de 4-metoxibenzamida (**d**)



En un matraz bola de 50 mL equipado con barra de agitación magnética en un baño de hielo, se adicionaron 30 mL de acetona grado QP y 6.71g (69.83 mmol) de carbonato de amonio. Posteriormente se agregaron lentamente 3 g (17.58 mmol) de la materia prima cloruro de 4-metoxibenzoilo. Esta fue agitada por 40 min hasta la completa disolución y después se mantuvo por 1 h a t.a. Se verificó el consumo de la materia prima con ccf usando el sistema I. A la mezcla de reacción se le agregó H₂O hasta pH neutro y agitó por 20 min; la solución se filtró al vacío y se obtuvieron 2.51 g (94.7%) del compuesto **d**, como un sólido blanco de partícula uniforme, que mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.57 (sistema I) y pf 164-166 °C.

Síntesis de (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**M**)



En un matraz de dos bocas de 250 mL se pesaron 950 mg de NaH y adicionaron 15 mL de THF anhidro, fue equipado con una barra de agitación magnética y un condensador con tapón de hule lo que permitió acondicionar la reacción con atm de N₂. El matraz se ajustó a un baño de aceite mineral sobre una parrilla de agitación y calentamiento.

En un embudo de adición fueron pesados 0.5 g de 4-metoxibenzamida y se adicionaron 0.7 mL, 0.8 mL y 2.5 mL de CH₃I, CS₂ y THF anhidro respectivamente. El embudo de adición estuvo sellado con un tapón de goma y se colocó en una de las boquillas del matraz.

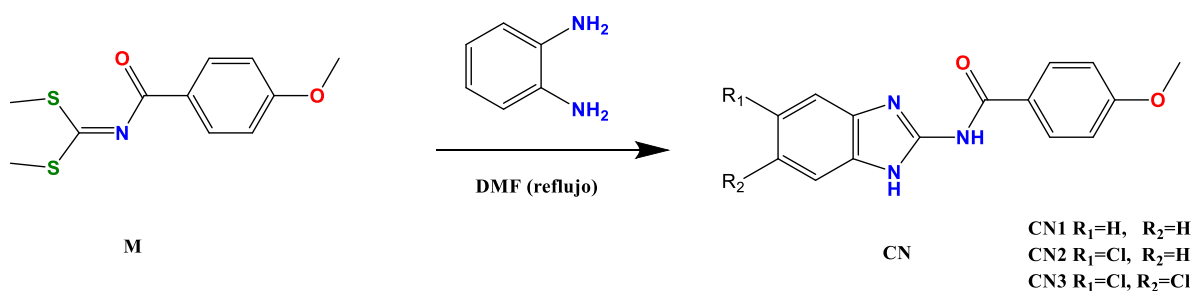
Con una jeringa con una cánula larga que contenía 2 mL de THF anhidro se perforó el tapón del embudo de adición. El sistema fue calentado a 90°C y cuando se llegó a

dicha temperatura se inició la siguiente maniobra: simultáneamente se abrió la llave de paso del embudo de adición y se inyectó el THF asegurándose de que todos los componentes quedaran dentro del matraz bola (se cerró rápidamente la llave de paso), y se aumentó la agitación dejándolos reaccionar por 3.5 h.

Finalizada la reacción, el sistema fue enfriado, este se verificó por ccf usando el sistema IV. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de agua-hielo de manera lenta y con agitación suave ya que efervesce de forma violenta.

Posteriormente, la mezcla se agitó de forma vigorosa hasta que se desvaneciera todo el hielo. El producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con CH_2Cl_2 , se retiraron los remanentes de H_2O usando Na_2SO_4 anhidro, y concentró el producto en el rotavapor sin aplicación de temperatura. El sólido presenta 2 impureza por ccf (sistema IV), por lo que fue purificado con una columna de 3.5 cm de diámetro, 7 pulgadas de gel de sílice flash, utilizando CH_2Cl_2 . Se eluyó usando el sistema IV con ayuda de una bomba de aire recolectando fracciones de 12 mL. Se monitoreó el avance de la columna por ccf (sistema IV), fue colectado entre las fracciones 8 y 12, tiene un aspecto aceitoso color traslucido blanquecino, mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.38 (sistema IV) y pf 58.1-58.6 °C.

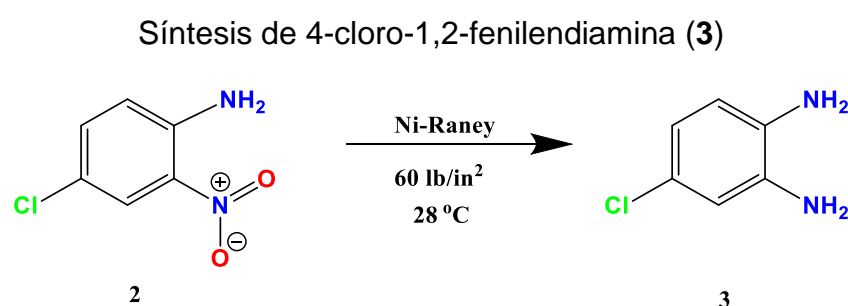
Método general: síntesis de las *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida sustituidas en 5 o 6 (**CN1**, **CN2** y **CN3**)



Después de obtener el intermediario **M** sin purificar y previamente colocado en un matraz bola de 250 mL (previamente pesado). Se adicionaron 15 mL de DMF anhidra y 0.5 g (4.6 mmol) de 1,2-fenilendiamina sustituida según el producto al que se quiera llegar.

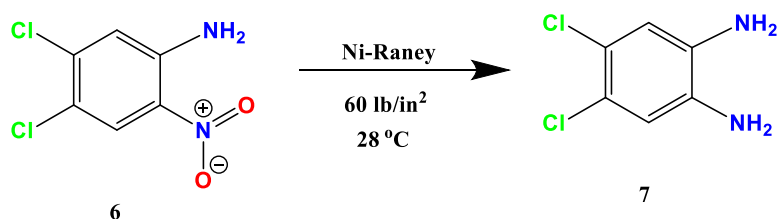
El matraz se equipó con un condensador, un baño de aceite y una parrilla de agitación con calentamiento. En el extremo superior del condensador tenía una llave de paso conectado a una trampa con disolución de hipoclorito de sodio (NaClO).

El sistema de reacción fue calentado a temperatura de reflujo por 7.5 h; posteriormente, se dejó enfriar la reacción, y vertió la mezcla de reacción en 50 mL de agua-hielo de forma lenta y con agitación vigorosa hasta que se desvaneciera todo el hielo; y a su vez formarse el sólido. Este se separó por filtración al vacío y lavó con agua helada hasta pH neutro. Se resuspendió en metanol con agitación y nuevamente filtrado con metanol frío sobre celita. El rendimiento promedio es de 50%, las propiedades físicas y espectroscópicas se resumen en la tabla 6 y 7.



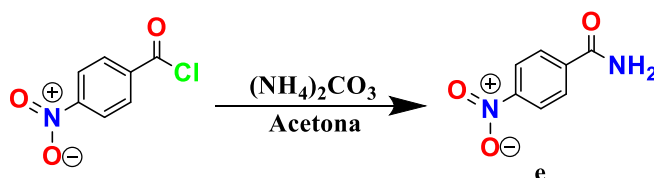
Se pesaron 500 mg de 5-cloro-2-nitroanilina (**2**) en un vaso de precipitados de 25 mL, este se vertió en un recipiente de vidrio (reactor) y disolvió con 10 mL de MeOH. En otro vaso de precipitados de 10 mL se pesaron 200 mg de Ni-Raney (30% en peso de la materia prima) libre de agua, se adicionó al reactor y llevó a un volumen de 50 mL con MeOH. Posteriormente, se acondicionó la reacción al aparato de hidrogenación catalítica. La mezcla de reacción fue agitada con cargas constantes de 60 lb/in² de H₂ a 28 °C por 2h, y monitoreada por ccf. Finalizada la reacción, el catalizador se eliminó por filtración al vacío sobre celita y el filtrado concentrado a presión reducida, el producto mostró ser un sólido de color marrón oscuro, con un R_f de 0.41, sistema III.

Síntesis de 4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (7)



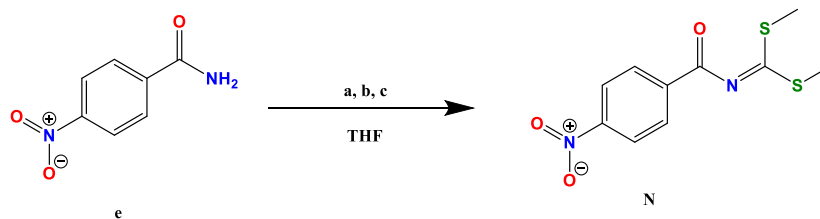
Se emplearon 500 mg de 4,5-Dicloro-2-nitroanilina en un vaso de precipitados de 25 mL, éste se colocó en un recipiente de vidrio (reactor) y disolvió con 10 mL de MeOH. En otro vaso de precipitados de 10 mL se pesaron 200 mg de Ni-Raney (30% en peso de la materia prima) libre de agua, se adicionó al reactor y llevó a un volumen de 50 mL con MeOH. Posteriormente se habilitó la reacción en el aparato de hidrogenación catalítica. La mezcla de reacción fue agitada con cargas constantes de 60 lb/in² de H₂ a 28 °C, y monitoreada por ccf. Finalizada la reacción, el catalizador se eliminó por filtración al vacío sobre celita y concentrada a presión reducida con lo que se obtuvo el compuesto 4,5-Dicloro-1,2-fenilendiamina (7). se obtuvo un sólido de color marrón oscuro, que por ccf mostró un R_f de 0.62, sistema III.

Síntesis de 4-nitrobenzamida (e)



En un matraz bola de 50 mL en un baño de hielo, equipado con barra de agitación magnética. Se adicionaron 30 mL de acetona grado QP, 6.71 g (69.83 mmol) de (NH₄)₂CO₃. Una vez que alcanzó una temperatura de 0 °C se agregaron lentamente 3 g (17.58 mmol) de la materia prima cloruro de 4-nitrobenzoilo. Se agitó hasta disolver el sólido por 40 min y después 1 h a t.a; se verificó el consumo de la materia prima con ccf usando el sistema I. A la mezcla de reacción se le agregó H₂O hasta pH neutro y agitó por 20 min; la solución se filtró al vacío. El sólido obtenido fue lavado con H₂O hasta pH neutro y filtrado al vacío. Se obtuvieron 2.51 g (94.7%) de un sólido blanco que mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.26 (sistema I) y pf 196.1-198.3 °C.

Síntesis de (4-nitrobenzoyl)carboniditioimidato de dimetilo (**N**)

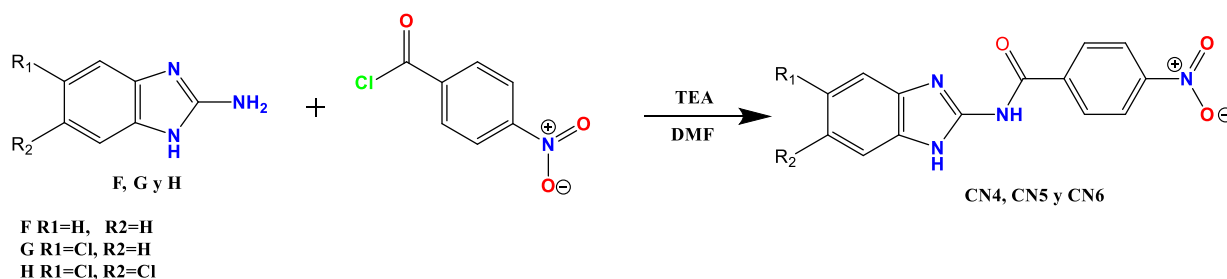


En un matraz de dos bocas de 250 mL, se pesaron 950 mg de NaH en aceite mineral (**c**) y adicionaron 15 mL de THF anhidro, se equipó con una barra de agitación magnética y con tapón de hule para acondicionar con atmósfera de N₂; este sistema fue ajustado a un baño de hielo sobre una parrilla de agitación. Por otra parte, en un vaso de precipitados de 10 mL se pesaron 0.5 g de 4-nitrobenzamida (**e**) y se adicionaron al matraz de dos bocas. Se dejó reaccionar por 40 min y posteriormente, se adicionaron 0.7 mL de CS₂ (**a**) dejándose reaccionar por 40 min; después, se adicionaron 0.6 mL de CH₃I (**b**) manteniendo la reacción por 3.5 h a temperatura de 0 °C, y luego 24 h más a t.a.

Finalizada la reacción, se verificó el consumo de la materia prima con ccf usando el sistema I. Se vertió la mezcla de reacción en agua-hielo de forma lenta y con agitación suave ya que efervesce de modo violento. Enseguida, se colocó en agitación vigorosa hasta que se desvaneciera todo el hielo. El producto fue extraído con AcOEt, y con Na₂SO₄ anhidro los remanentes de H₂O fueron retirados. Finalmente, se concentró con destilación a presión reducida.

El sólido presenta 3 impureza por ccf (sistema I), Por esta razón, la purificación se realizó por cromatografía en columna usando una columna de 3.5 cm de diámetro con 9 pulgadas de gel de sílice flash, el compuesto fue adsorbido en el gel (utilizando CH₂Cl₂). El sistema IV fue el que eluyó en el sistema y con ayuda de una bomba de aire fracciones de 10 mL fueron recolectadas. Se monitoreó el avance de la columna por ccf (sistema IV y I) y el producto puro se colectó entre las fracciones 11 y 15. El compuesto es un sólido blanco translúcido que mostró una sola marca en ccf con R_f de 0.3 (sistema I) y pf 88.3-89.0 °C.

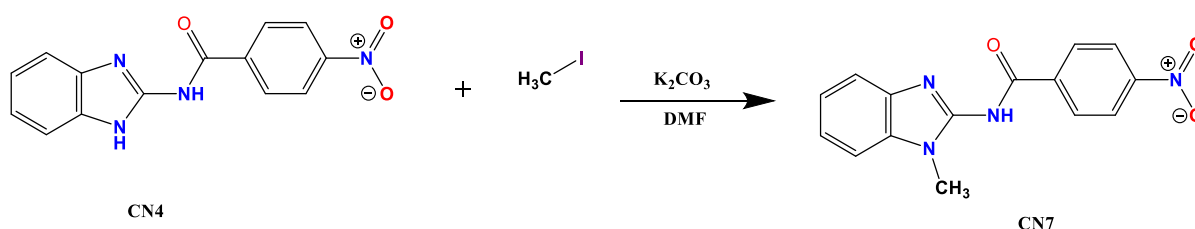
Método general: síntesis de las N-(1H-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida sustituidas en 5 o 5 y 6 (**CN4**, **CN5**, **CN6**)



250 mg (3.75 mmol) del compuesto 2-amino-1H-benzimidazol sustituido en 5 o 6 (**F**, **G** o **H**) según el producto que se requiera, se colocaron en un matraz bola de 50 mL (previamente pesado). Se agregaron 10 mL de DMF anhidra y 0.75 mL (3 eq) de trietilamina TEA. El matraz fue equipado con un tapón de hule y dispuesto bajo atm de N_2 ; en un baño de hielo, sobre una parrilla de agitación. Se dejó reaccionar por 20 min y se adicionó de forma lenta una disolución de 200 mg de (1eq) cloruro de 4-nitrobenzoilo en 5 mL de DMF anhidra. Reaccionó por 2 h y monitoreo la reacción por ccf.

Se vertió la mezcla de reacción en 30 mL agua-hielo de manera lenta y con agitación vigorosa hasta que fundió todo el hielo; posteriormente, se acidificó el medio hasta pH entre 6-7 con una solución de ácido acético al 10%. Un precipitado fue aislado de la mezcla de reacción y filtrado al vacío hasta su sequedad, se resuspendió en metanol en un matraz bola, y acondiciono en un sistema para un reflujo. Ebulló con agitación por 10 min y se filtró en caliente. El rendimiento promedio de reacción fue de 84% y las propiedades físicas y espectroscópicas se resumen en la tabla 6 y 7.

Síntesis de N-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN7**)



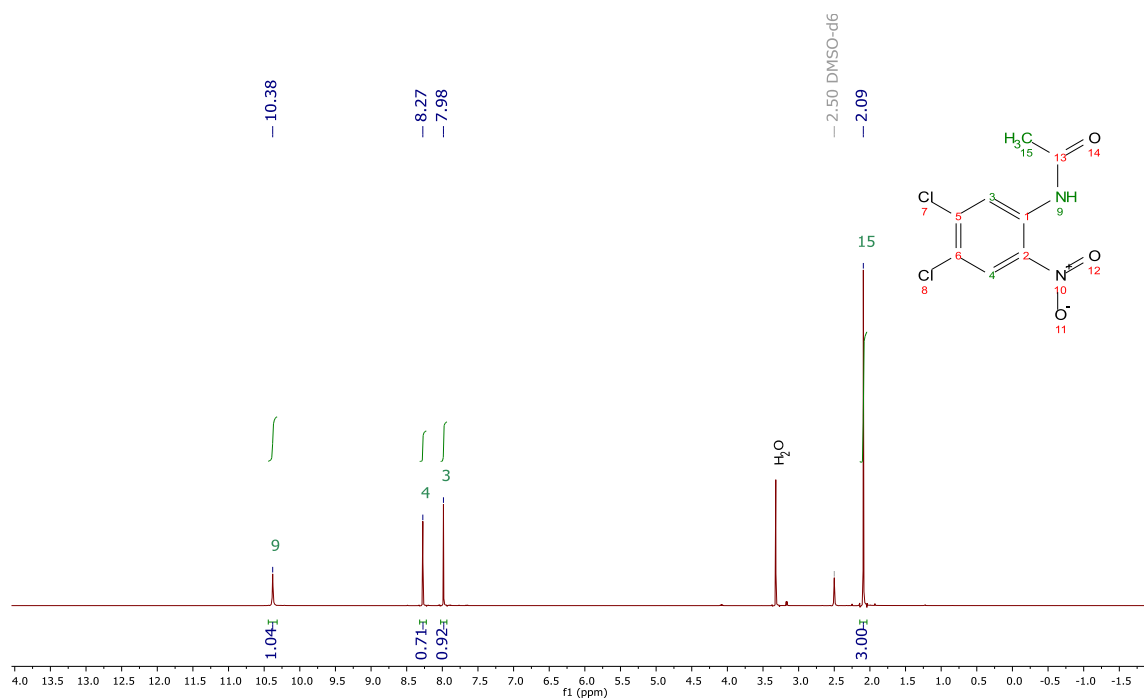
Se colocaron 200 mg (3.75 mmol) del compuesto **CN4** en un matraz bola de 50 mL y adicionaron 10 mL de DMF anhidra más 100 mg (1eq) de K_2CO_3 . El matraz se equipó con un tapón de hule y colocó bajo atm de N_2 en un baño de hielo sobre una parrilla de agitación. Se dejó reaccionar por 30 min, y agregó de forma lenta una disolución

de 0.05 mL (1eq) de yoduro de metilo en 5 mL de DMF anhidra. La reacción continuó por 2 h y se monitoreo por ccf.

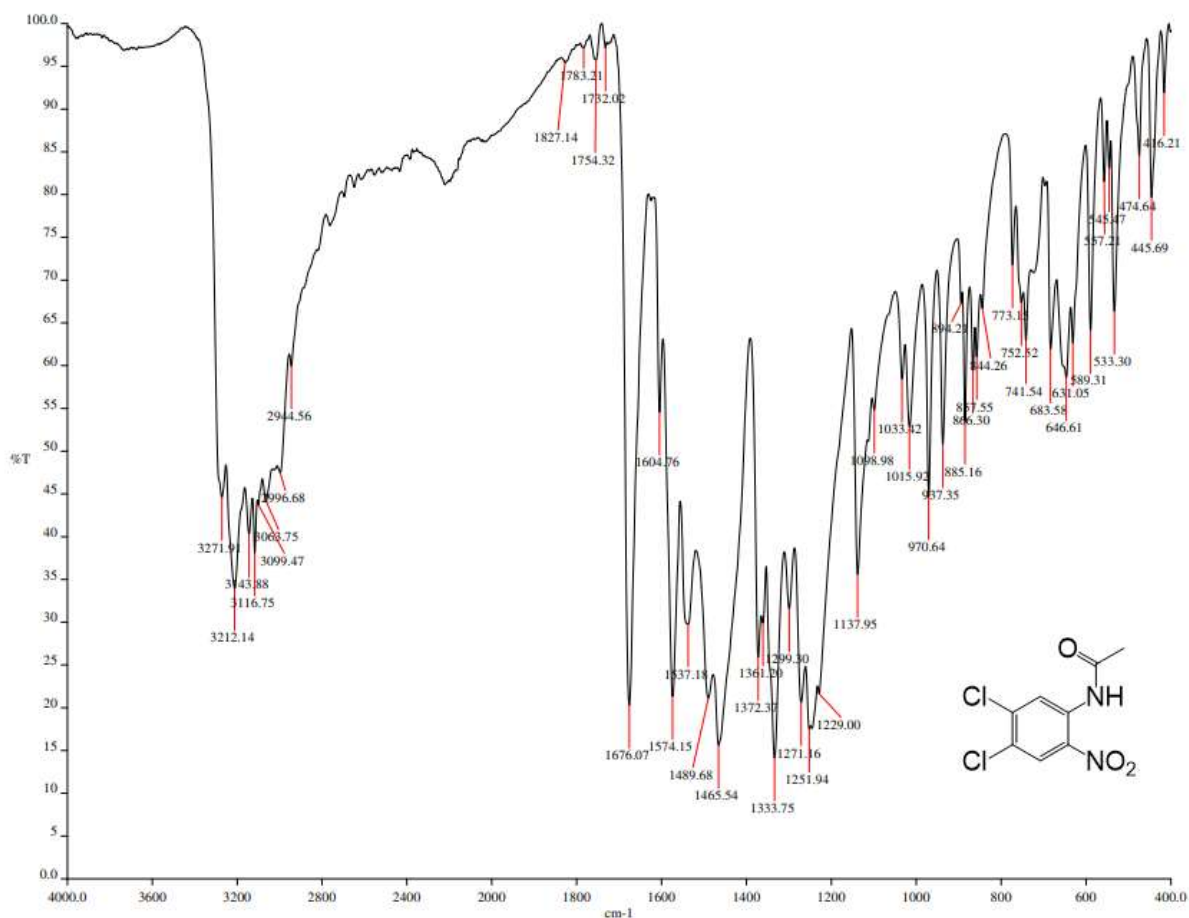
La mezcla de reacción fue trasvasada a un vaso con 20 mL agua-hielo de manera lenta y con agitación vigorosa hasta que se disipó el hielo; posteriormente, se acidificó el medio hasta pH entre 6-7 con una solución de ácido acético al 10%. Se observó un precipitado y este fue aislado por filtración al vacío hasta su sequedad. Se resuspendió en metanol en un matraz bola, y acondicionado para un reflujo. Se dejó en agitación a ebullición por 10 min y se filtró en caliente. Se obtuvieron 180 mg (85%) de un sólido amarillo que mostró ser un solo compuesto en ccf con R_f de 0.62, sistema III y pf 308.2-309.7 °C.

ANEXO III

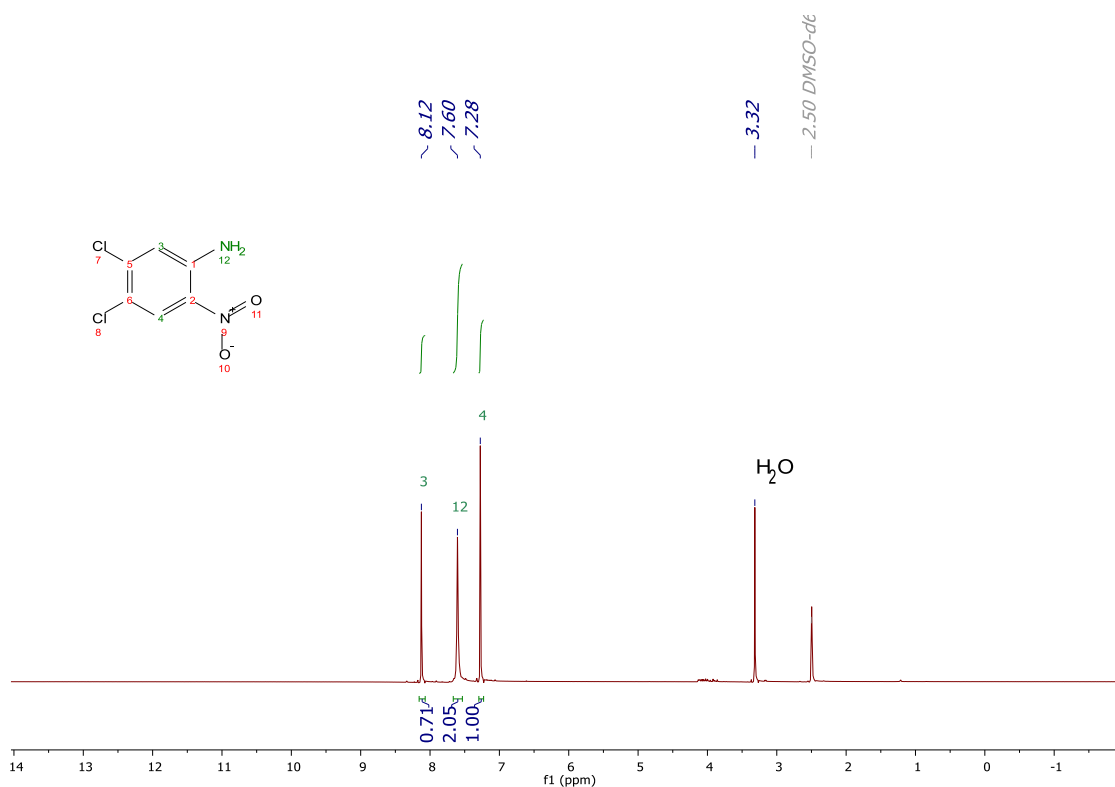
12.3 ESPECTROS DE INTERMEDIARIOS Y PRODUCTOS FINALES



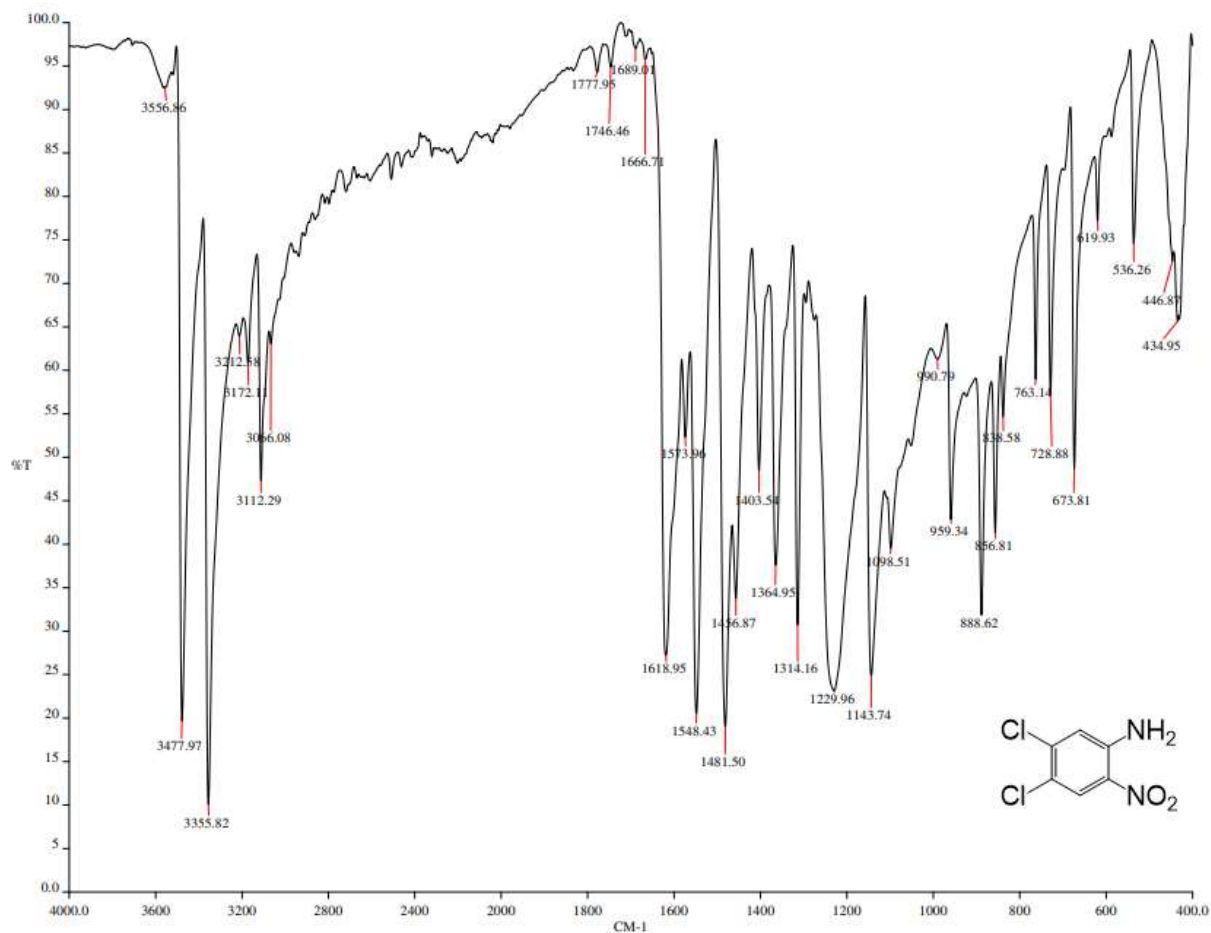
Espectro 1. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (5).



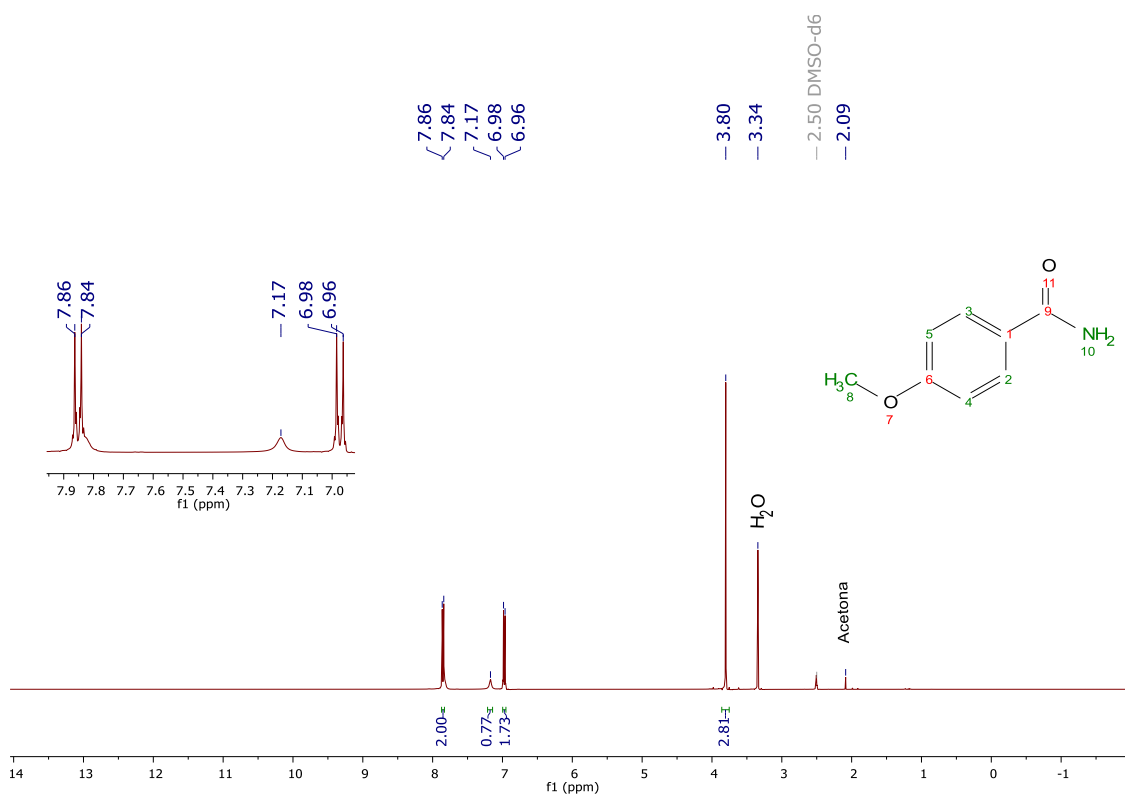
Espectro 2. IR (ATR) del compuesto *N*-(4,5-Dicloro-2-nitrofenil)acetamida (5).



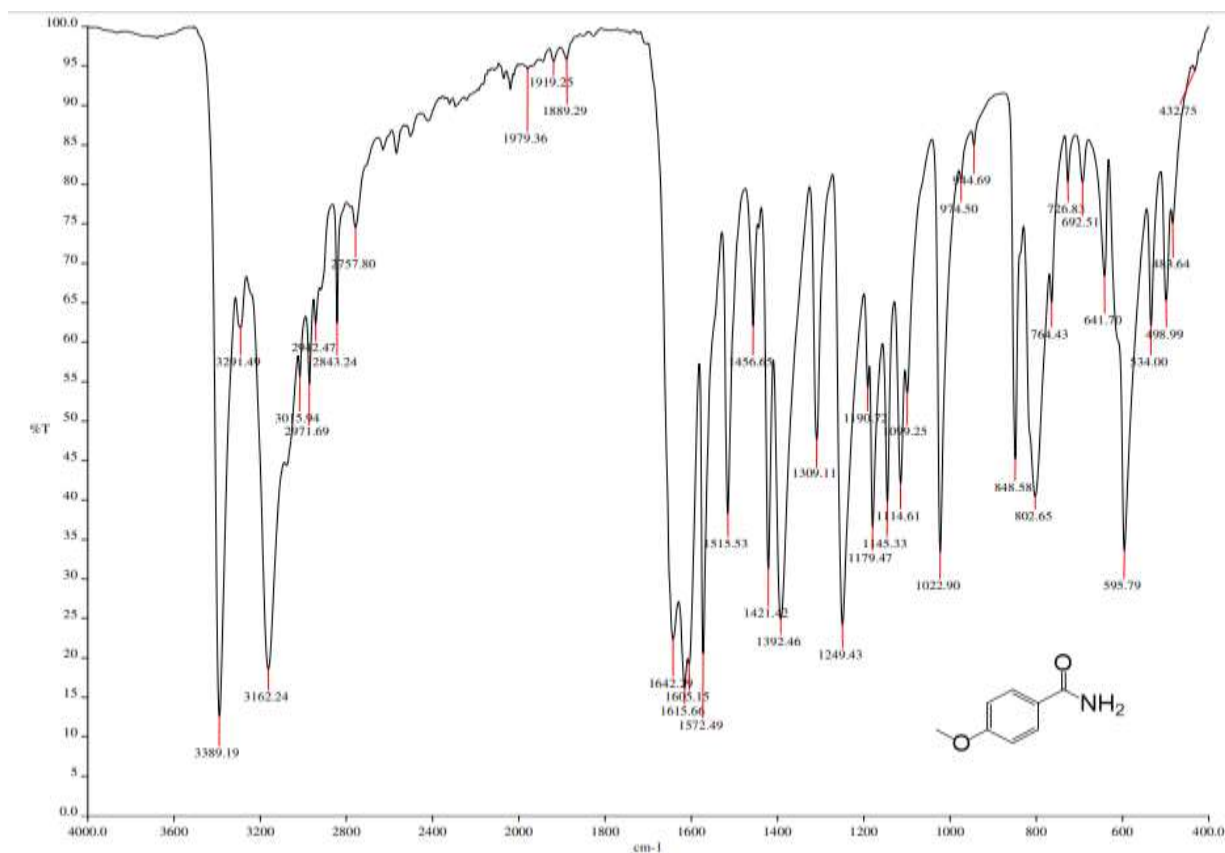
Espectro 3. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (6).



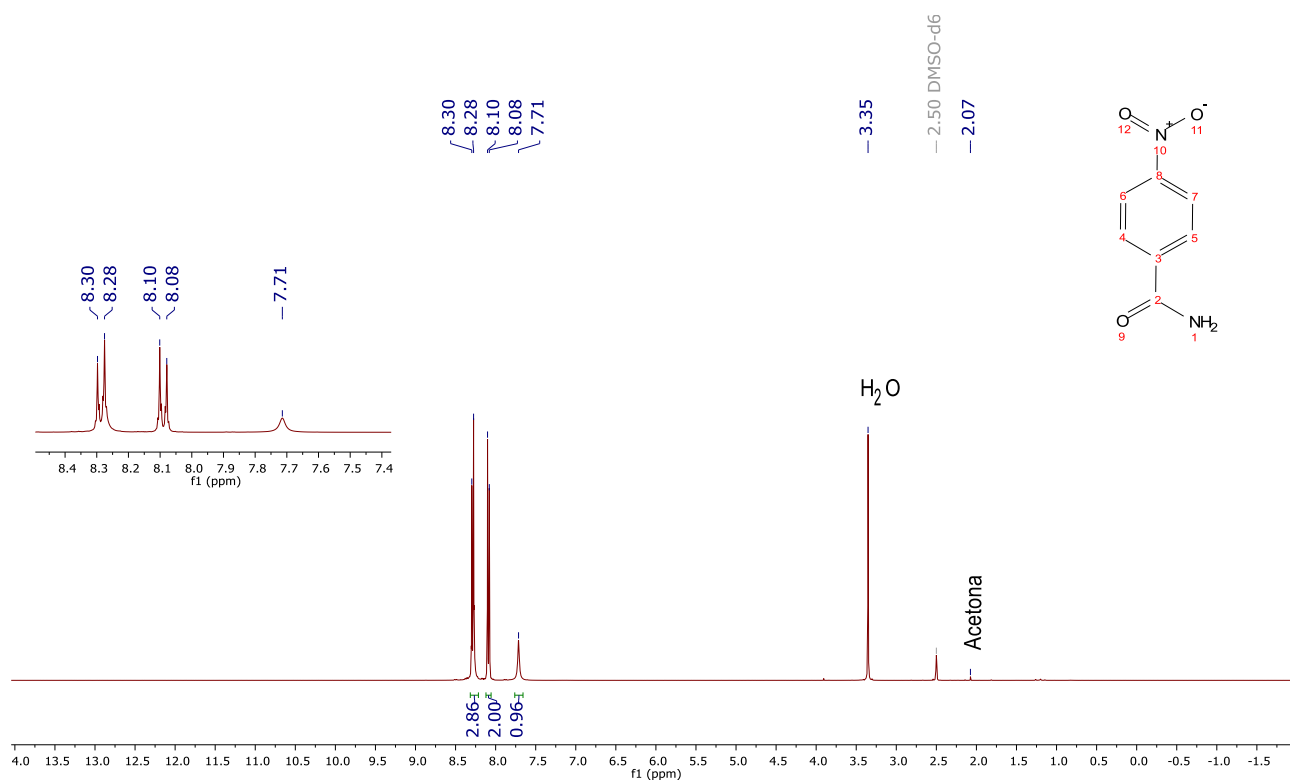
Espectro 4. IR (ATR) del compuesto 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (6).



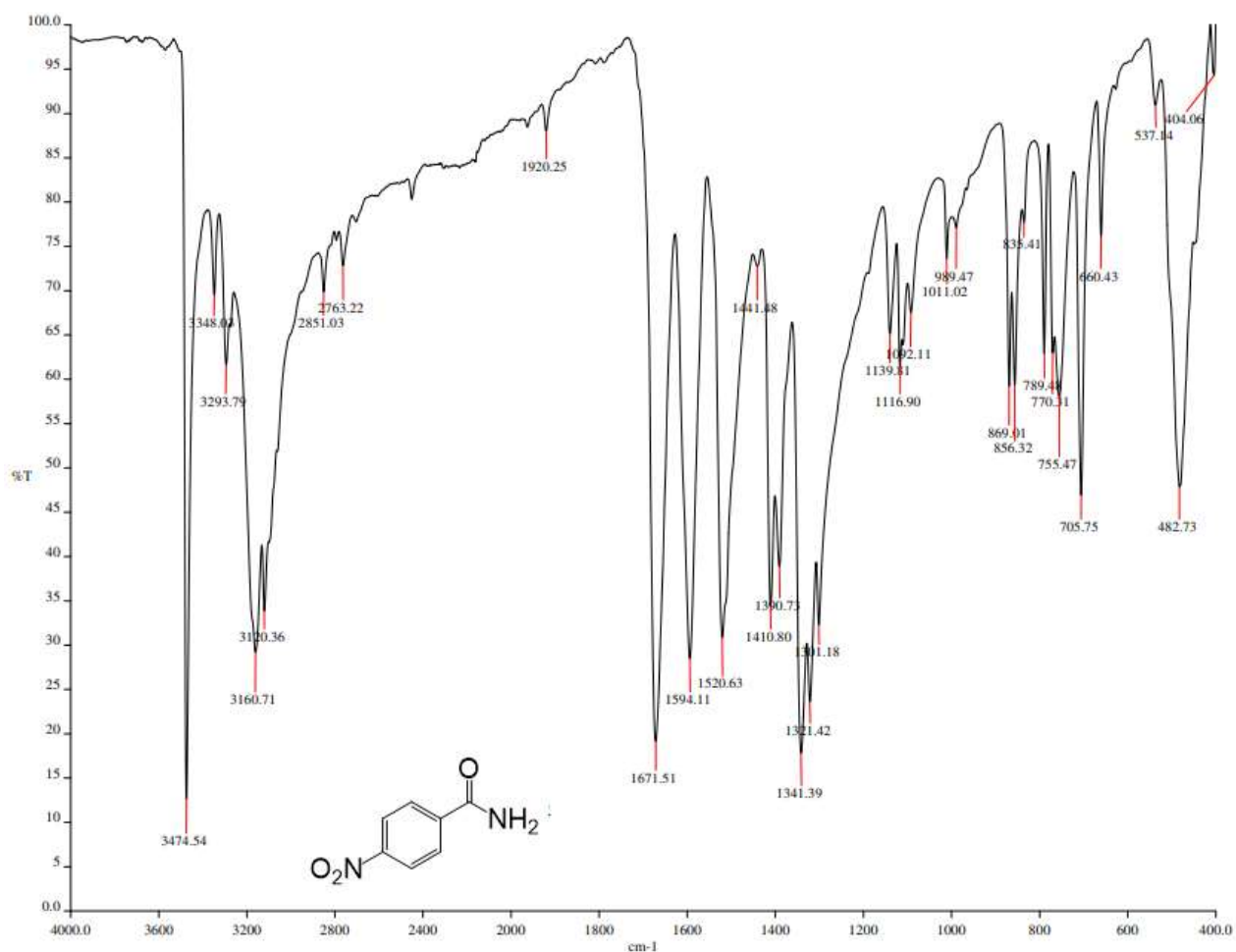
Espectro 5. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-metoxibenzamida (d).



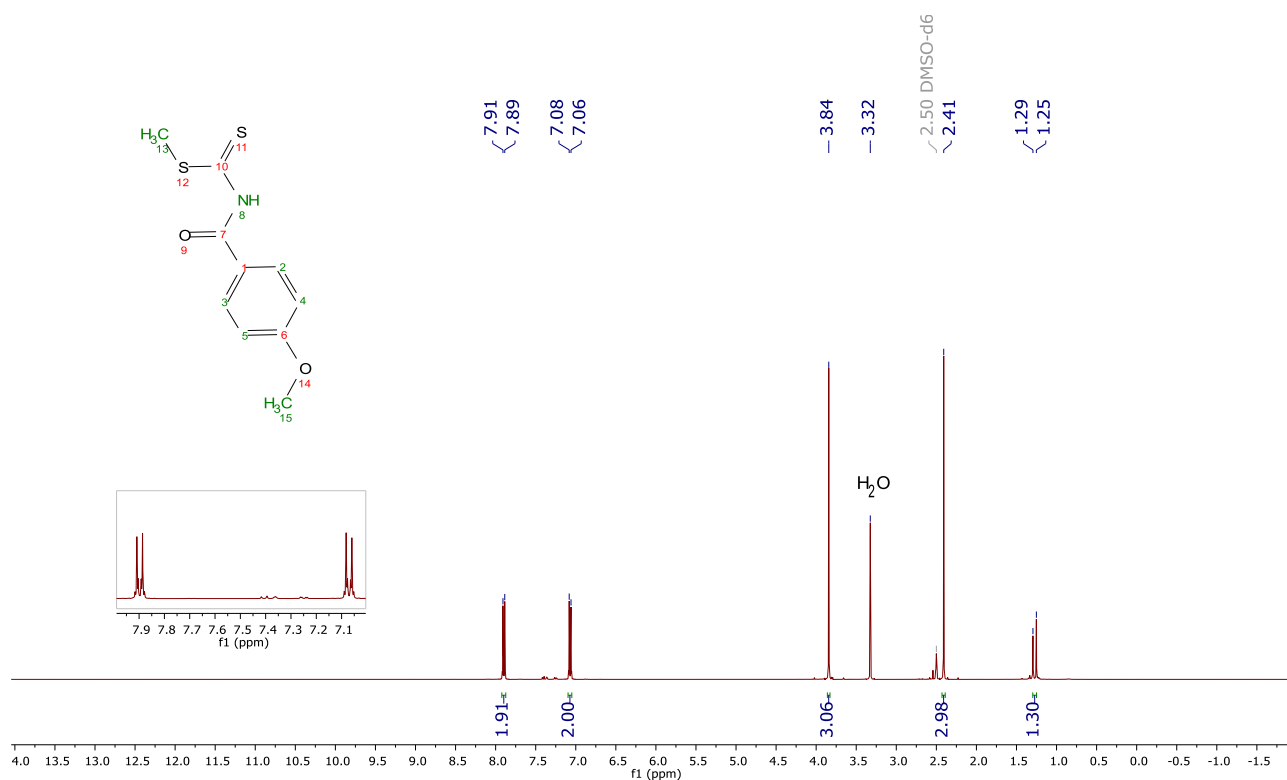
Espectro 6. IR (ATR) del compuesto 4-metoxibenzamida (d).



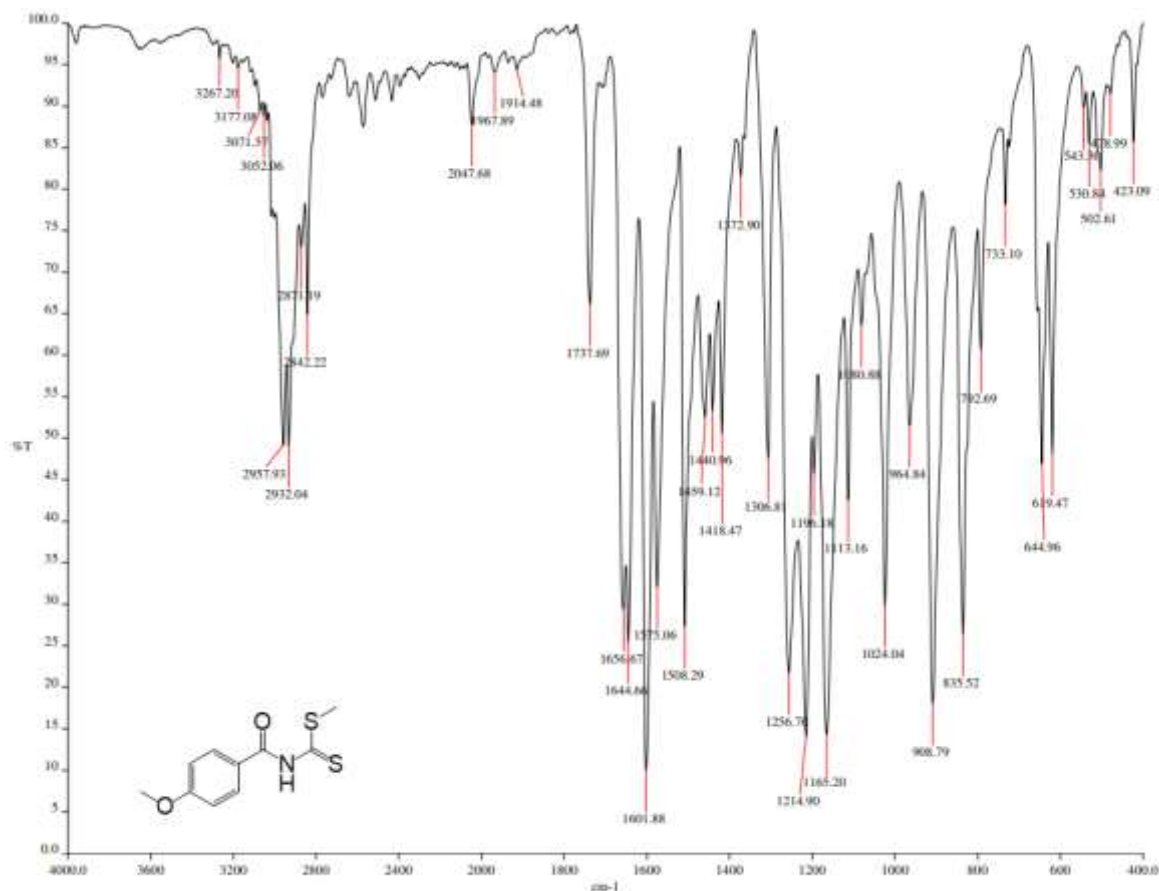
Especro 7. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-nitrobenzamida (e).



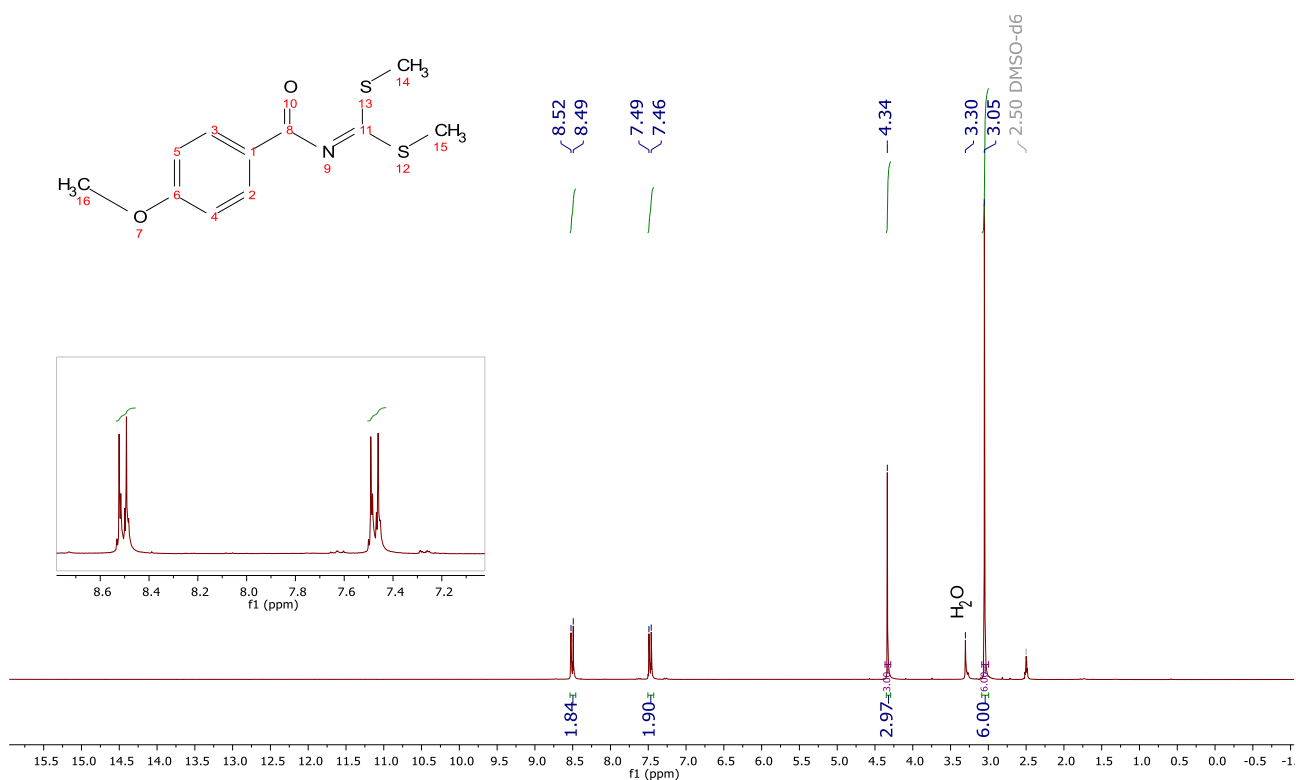
Especro 8. IR (ATR) del compuesto 4-nitrobenzamida (e)



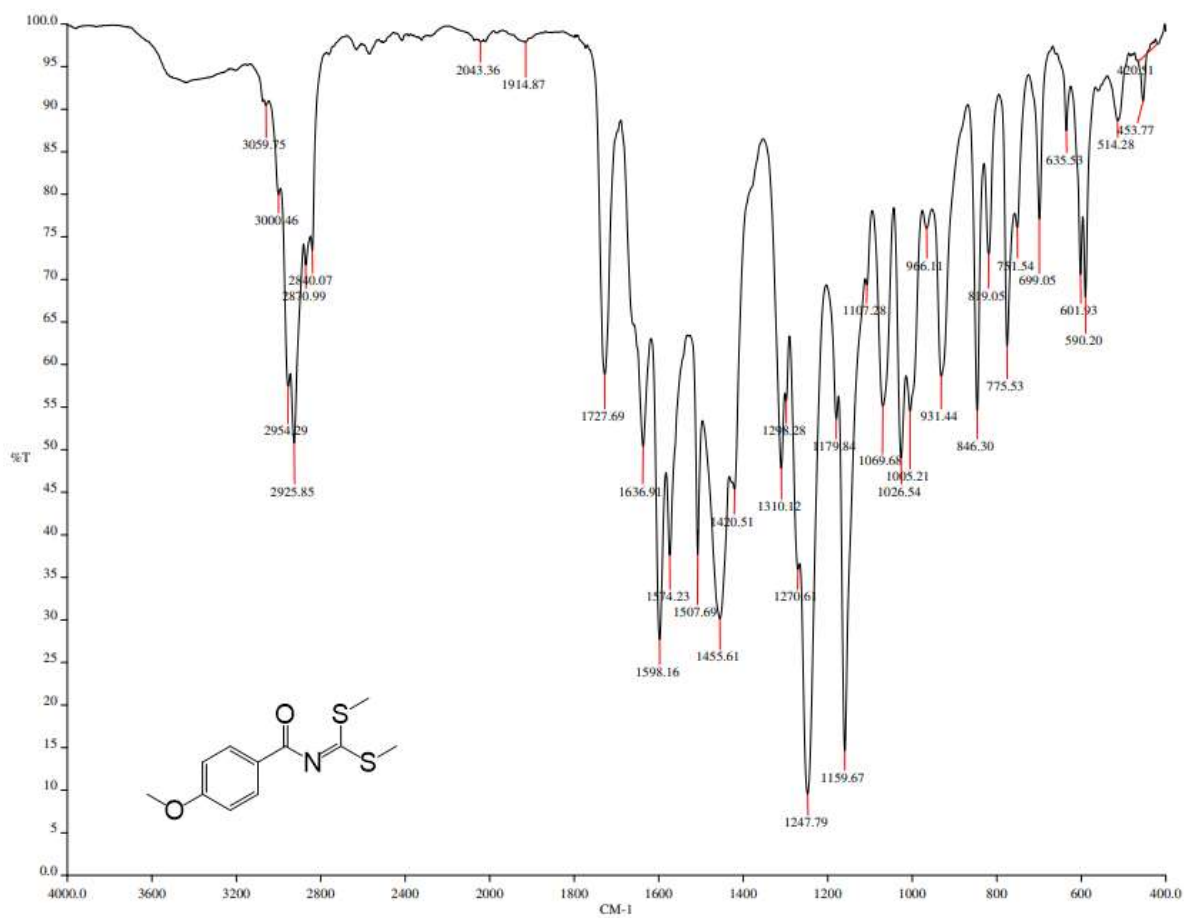
Espectro 9. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-metoxibenzoil)carbonidtioimidato de metilo.



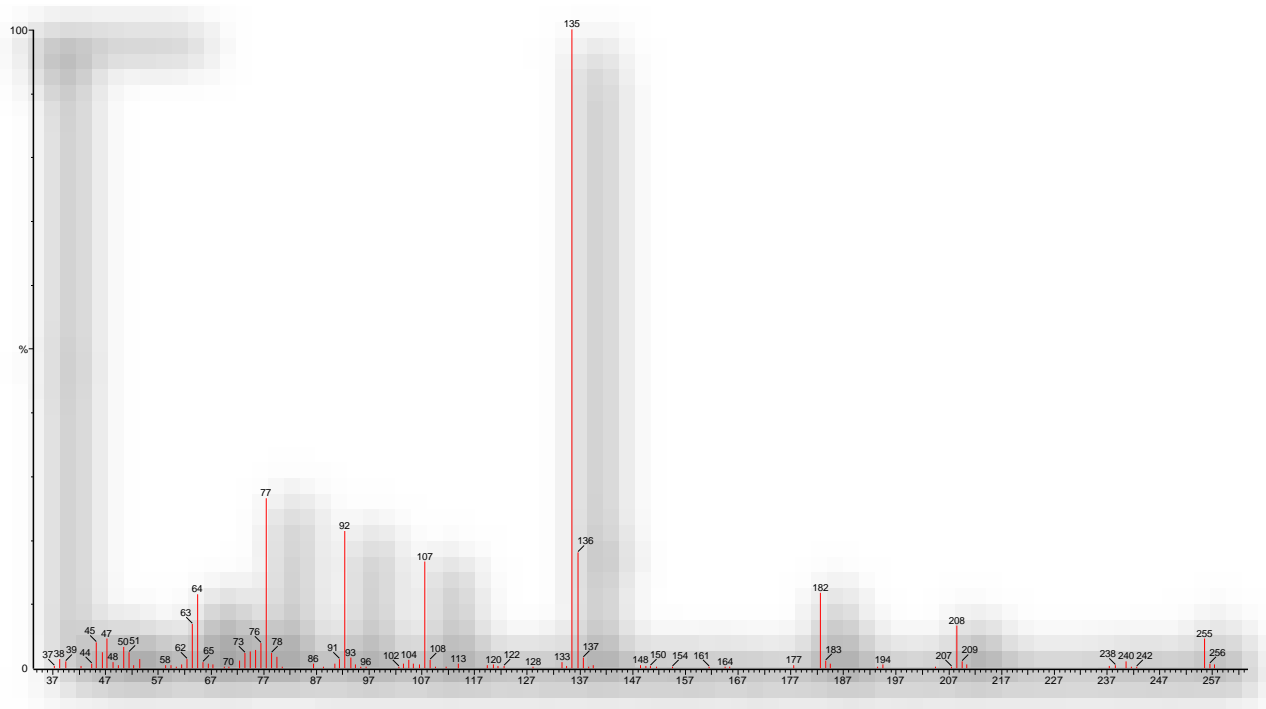
Espectro 10. IR (ATR) del compuesto (4-metoxibenzoil)carbonidtioimidato de metilo.



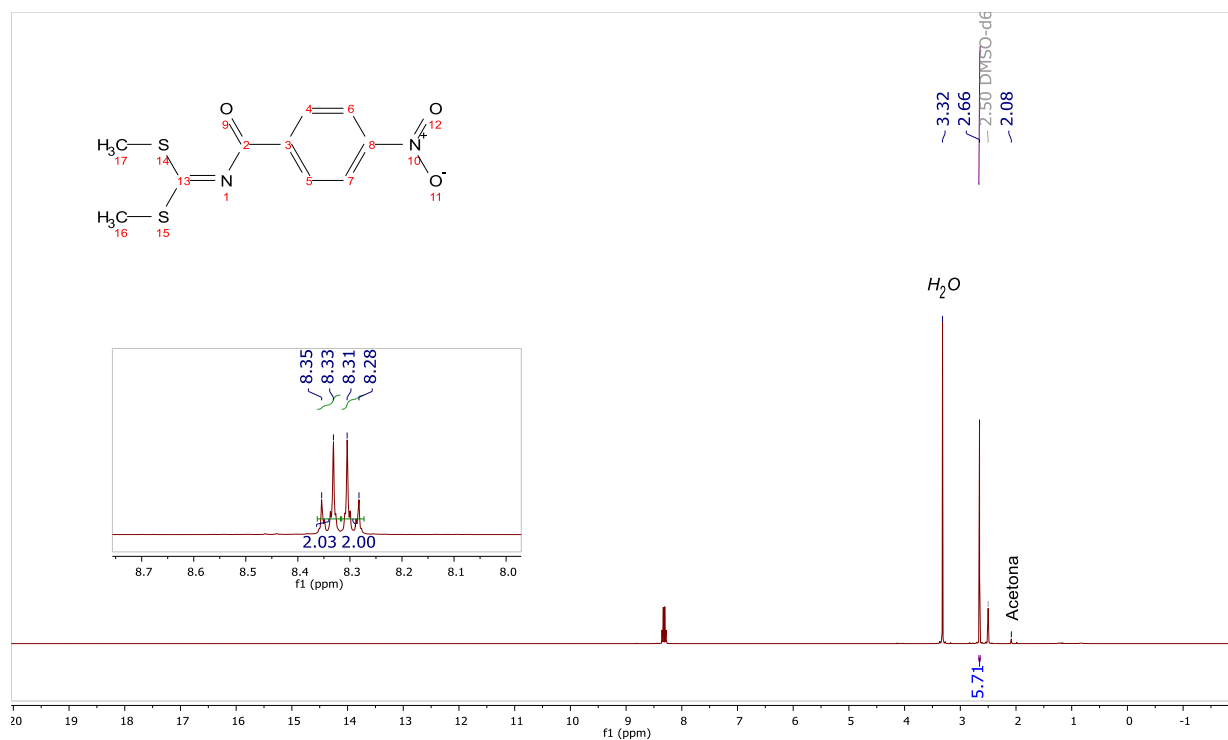
Espectro 11. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**M**).



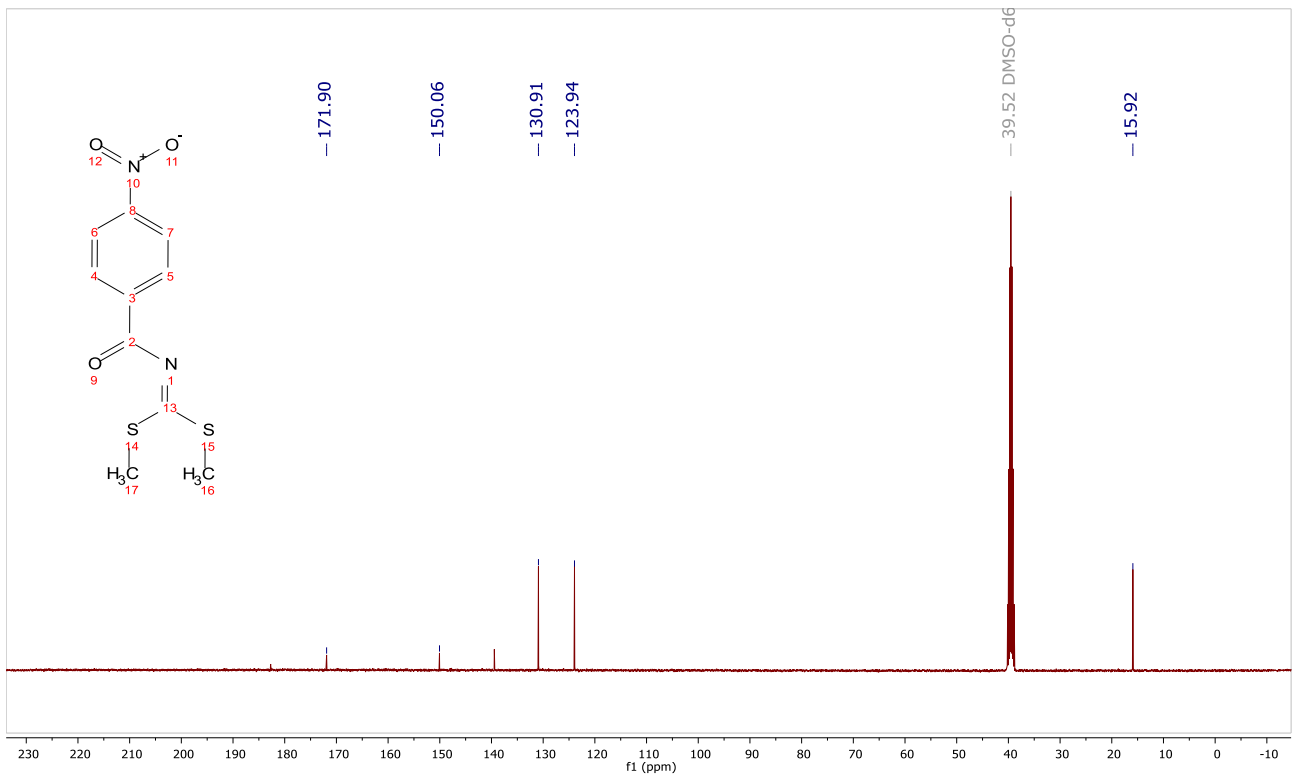
Espectro 12. IR (ATR) del compuesto (4-metoxibenzoil)carboniditioimidato de dimetilo (**M**).



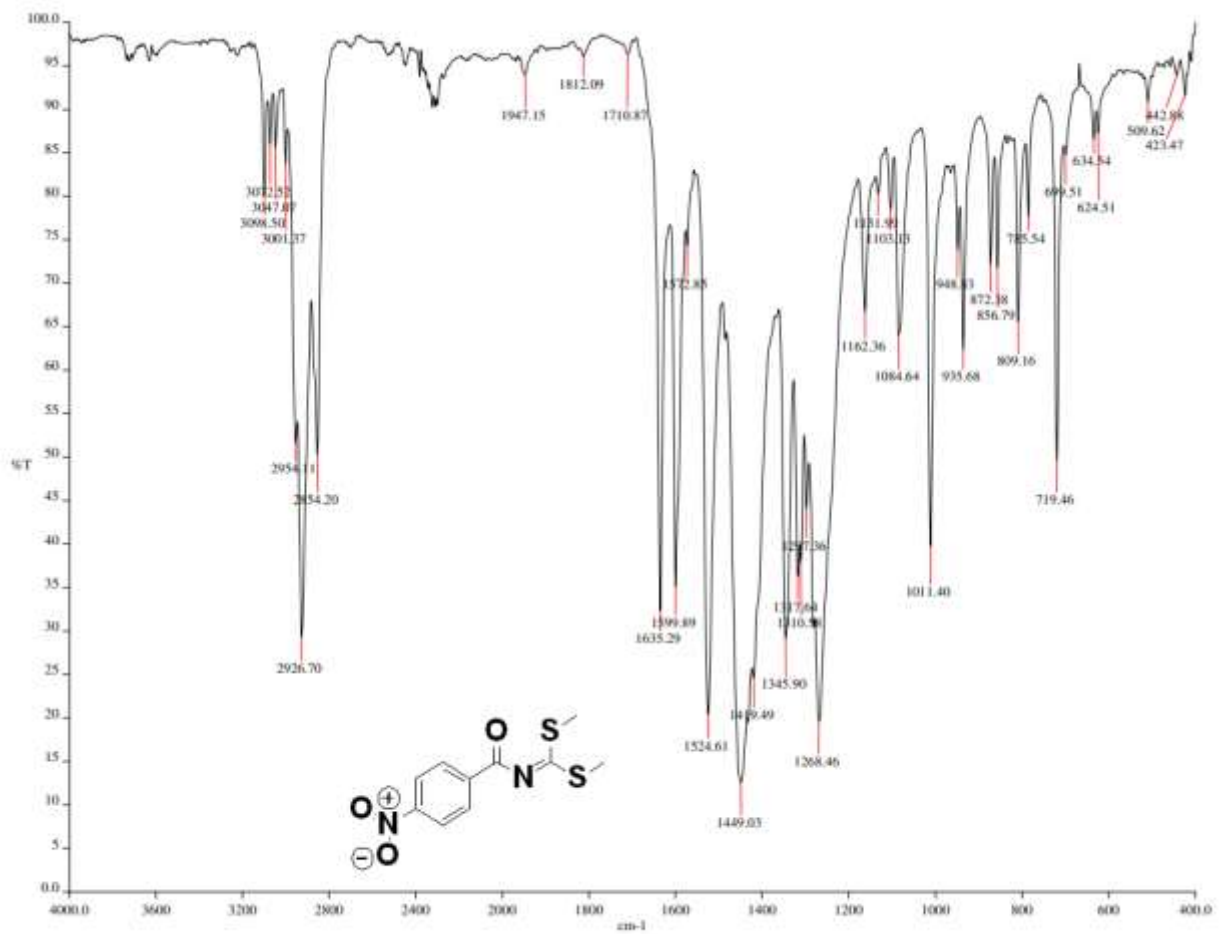
Espectro 13. CG-EM (IE) del compuesto (4-metoxibenzoil)carbonitioimidato de dimetilo (**M**) P.M. 255.35 g/mol.



Espectro 14. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-nitrobenzoil)carbonitioimidato de dimetilo (**N**).



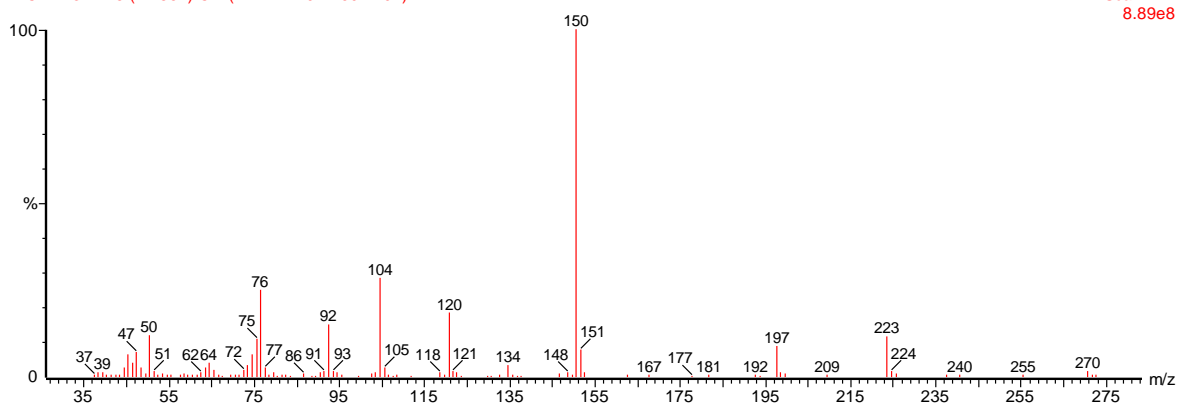
Espectro 15. RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) (4-nitrobenzoyl)carbonitioimidato de dimetilo (*N*).



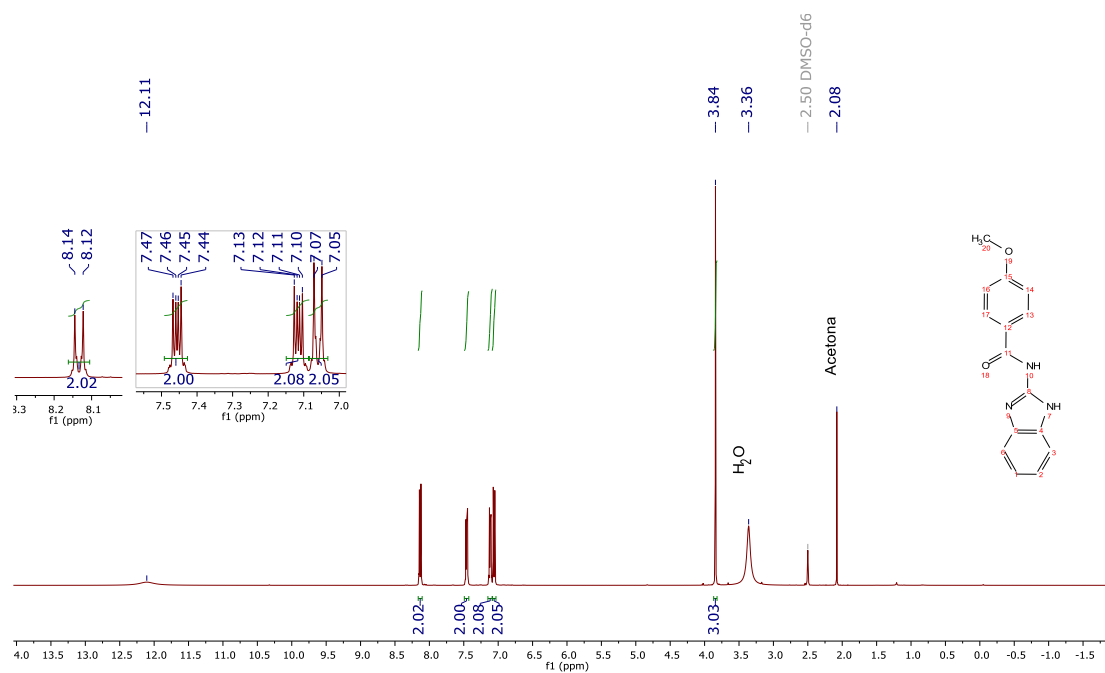
Espectro 16. IR (ATR) del compuesto (4-nitrobenzoyl)carbonitioimidato de dimetilo (*M*).

NBCDIM-3 1448 (14.862) Cm (1447:1449-1469:1497)

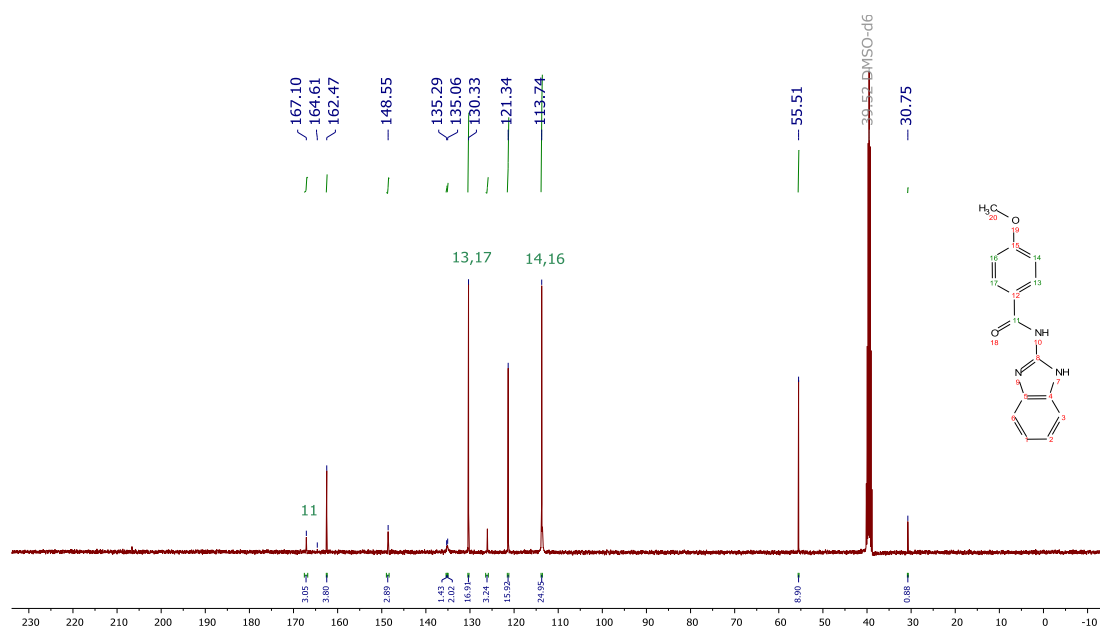
Scan E1+
8.89e8



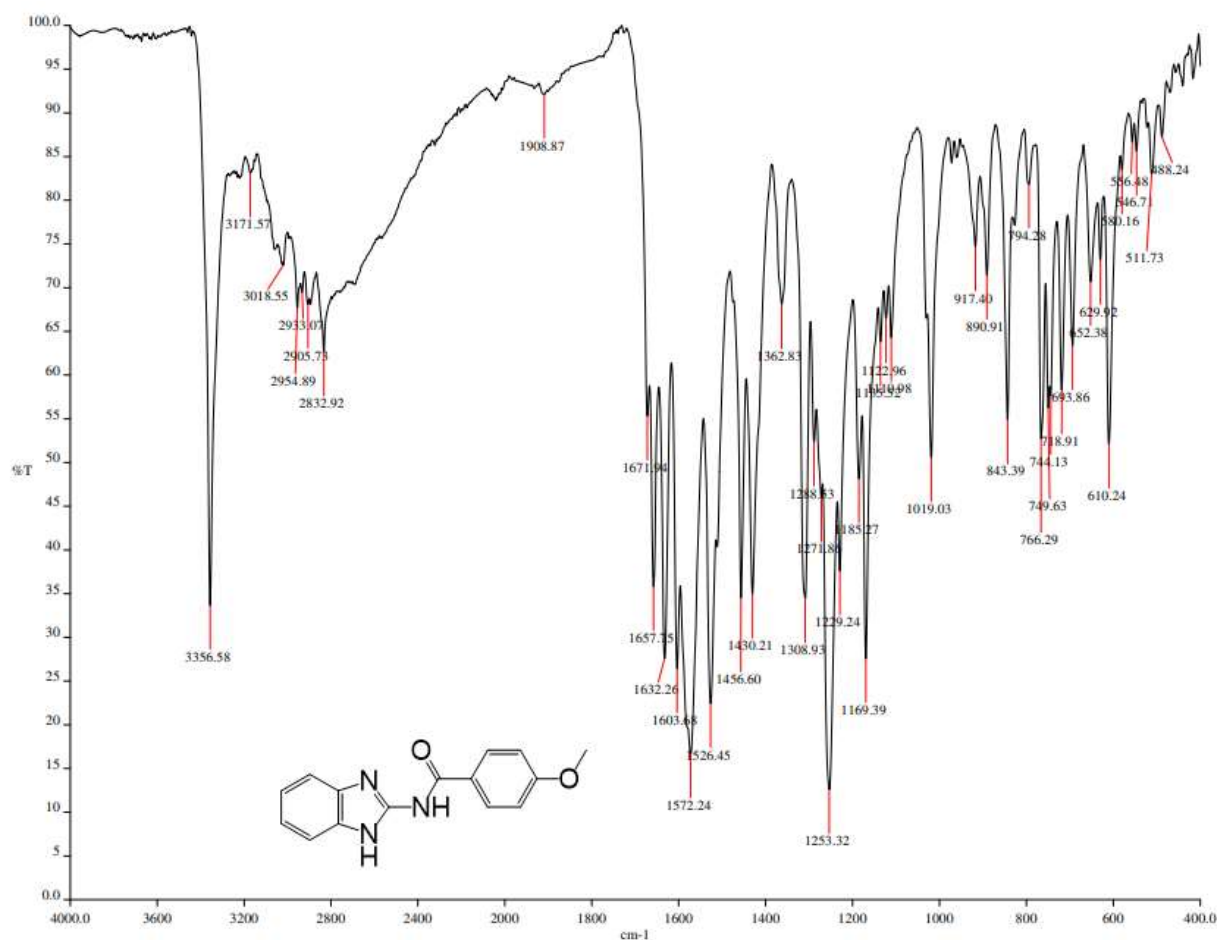
Espectro 17. CG- EM (IE) del compuesto (4-nitrobenzoyl)carbonitioimidato de dimetilo (**N**), P.M. 270.32 g/mol.



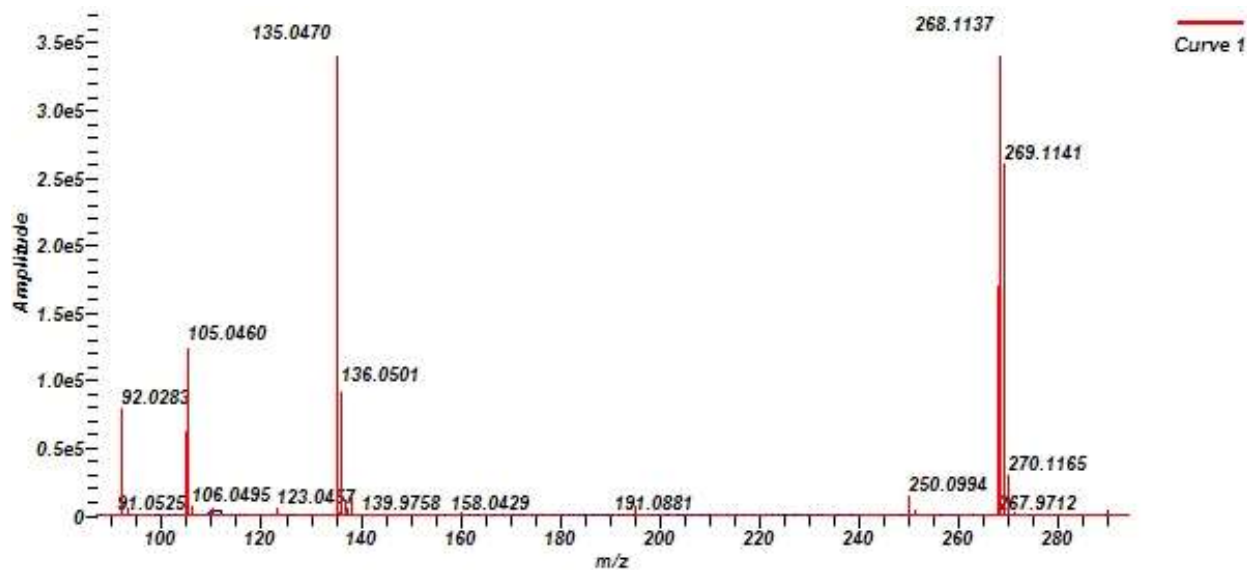
Espectro 18. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN1**).



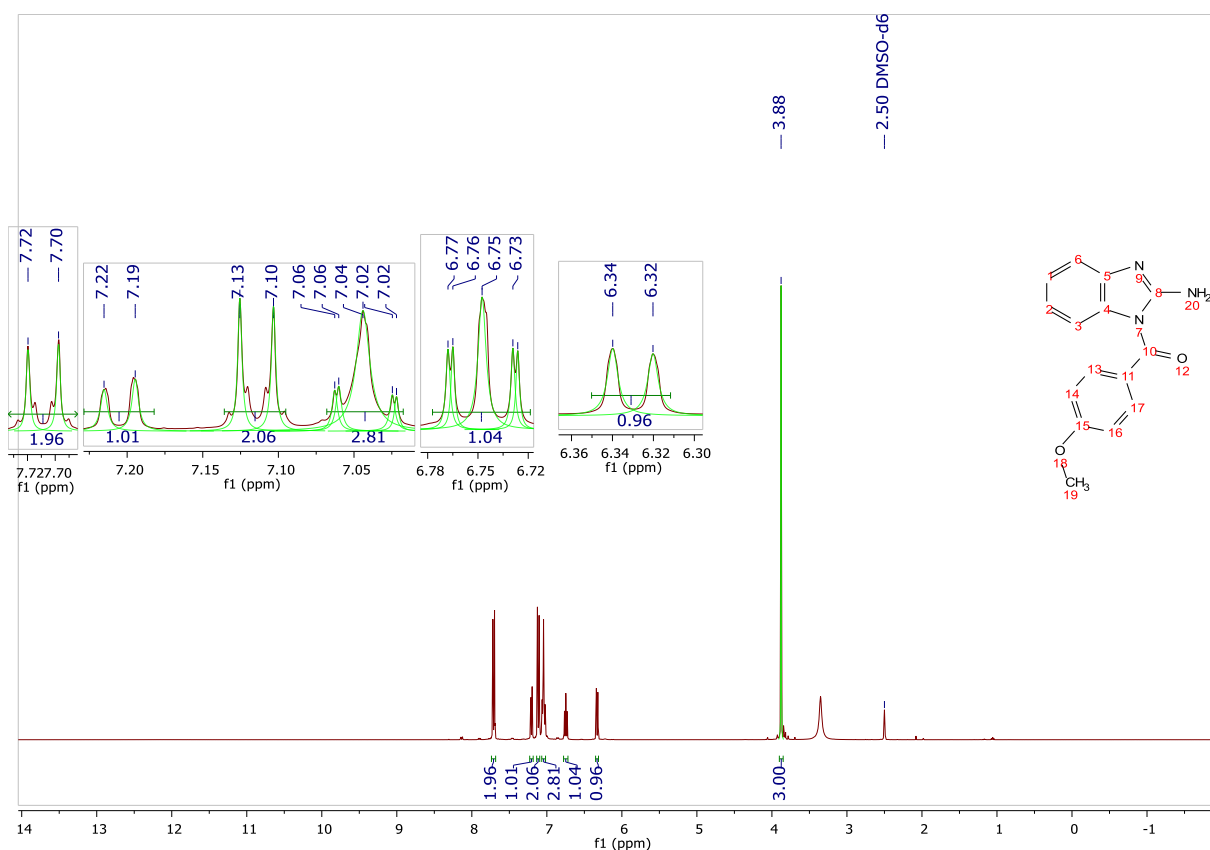
Espectro 19. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN1**).



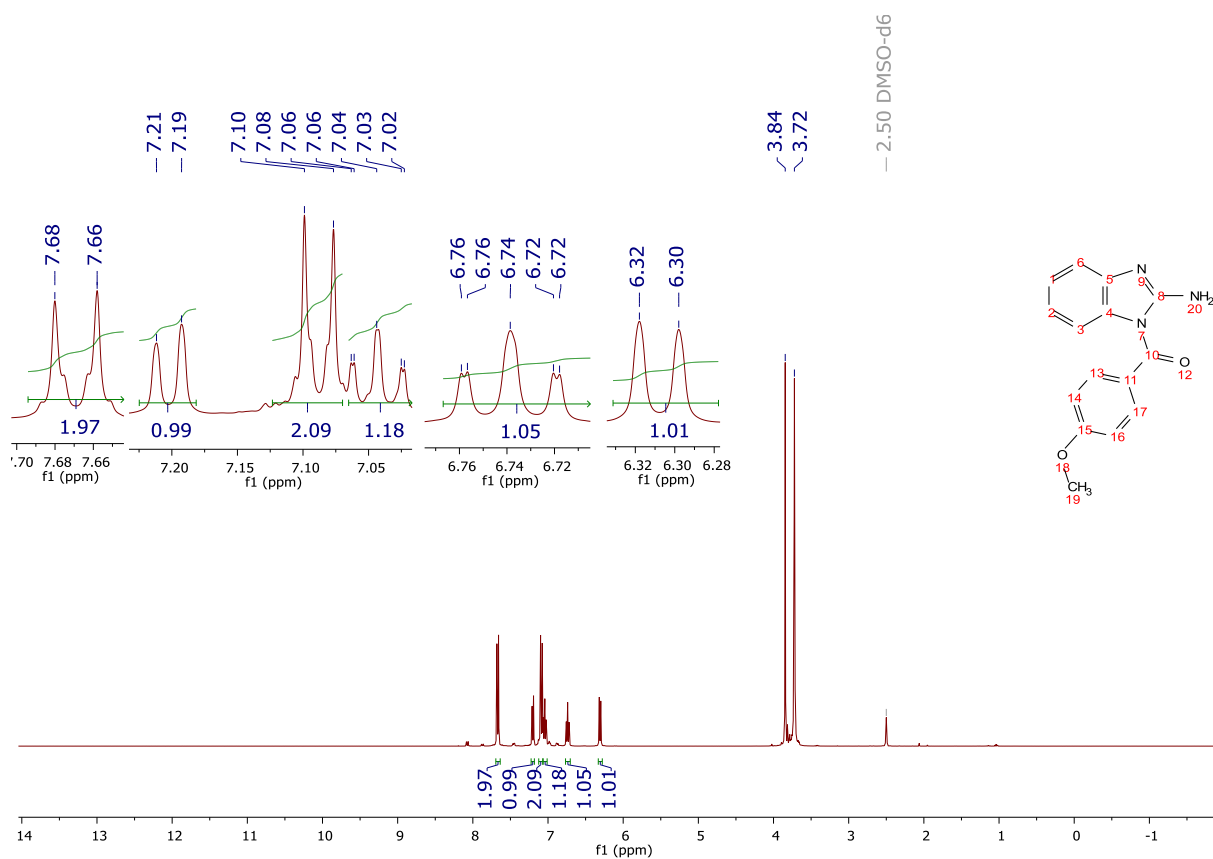
Espectro 20. IR (ATR) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN1**).



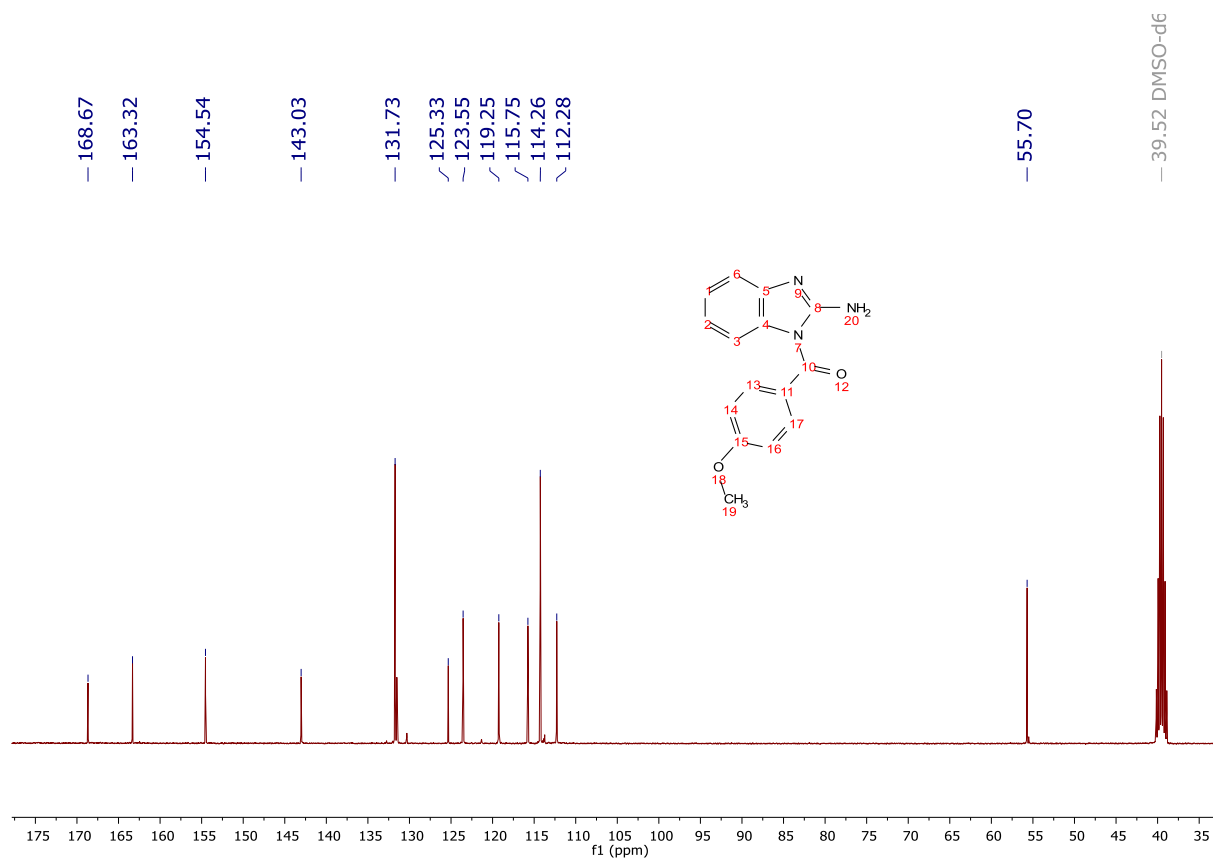
Espectro 21. EMAR (APCI) del compuesto *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida P.M. 267.28. g/mol (**CN1**).



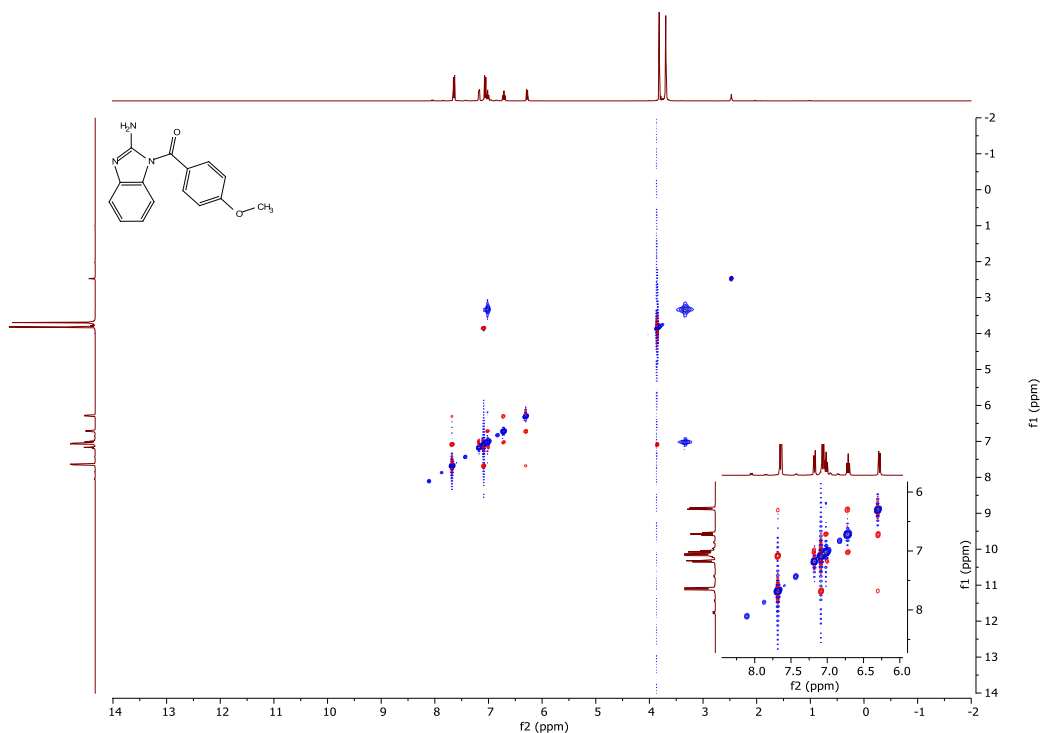
Espectro 22. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (2-amino-1*H*-bencimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**CN1.1**).



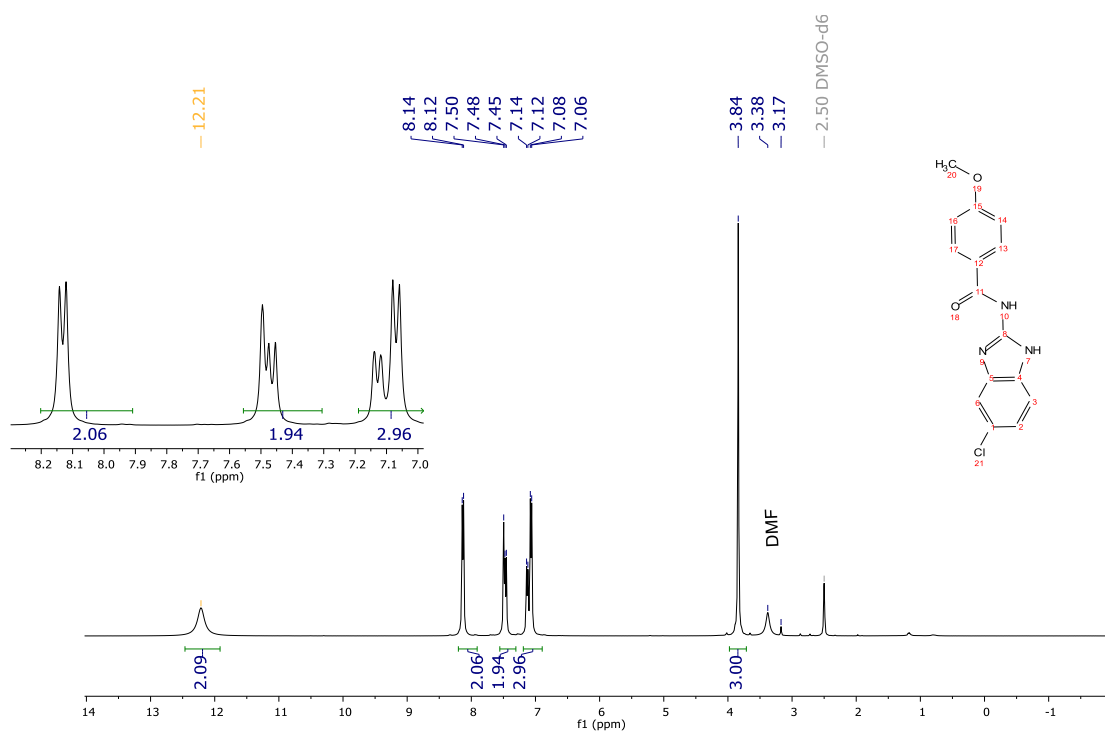
Espectro 23. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) D₂O del compuesto (2-amino-1H-benzimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**CN1.1**).



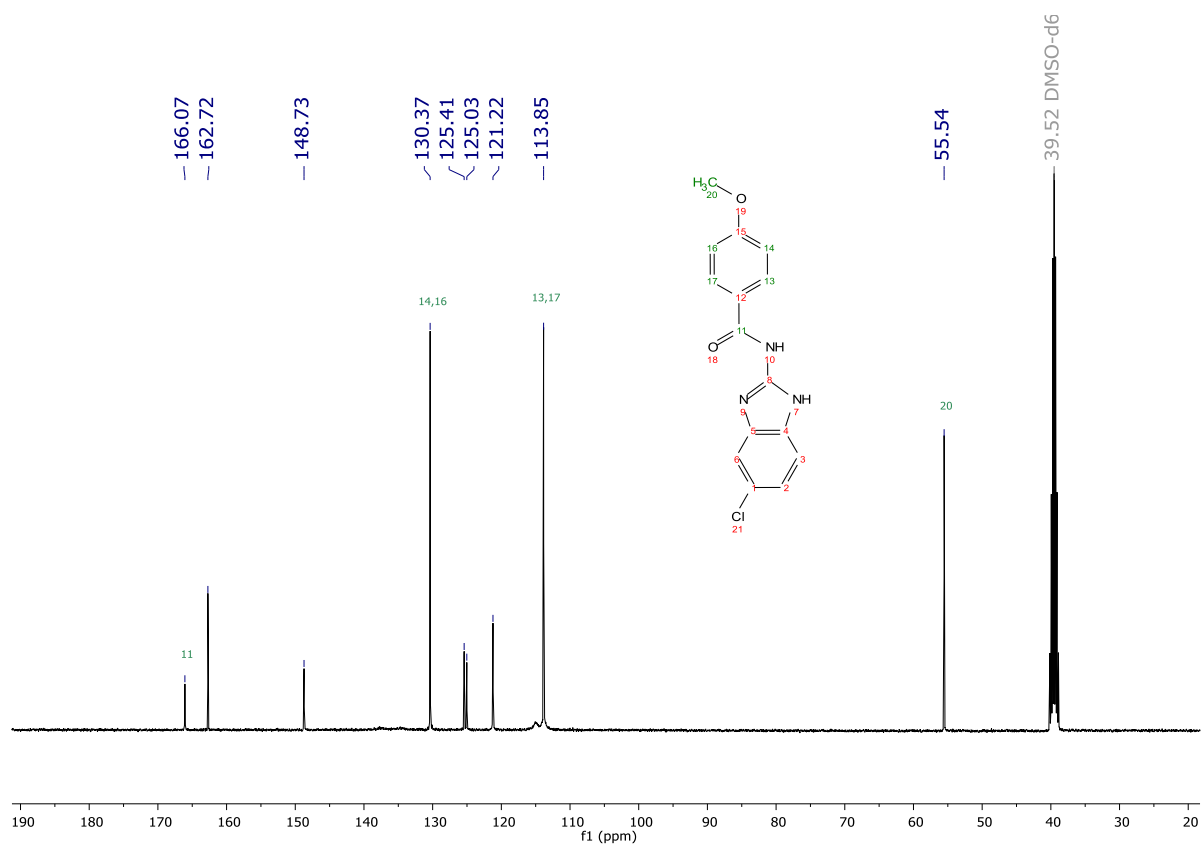
Espectro 24. RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto (2-amino-1H-benzimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**CN1.1**).



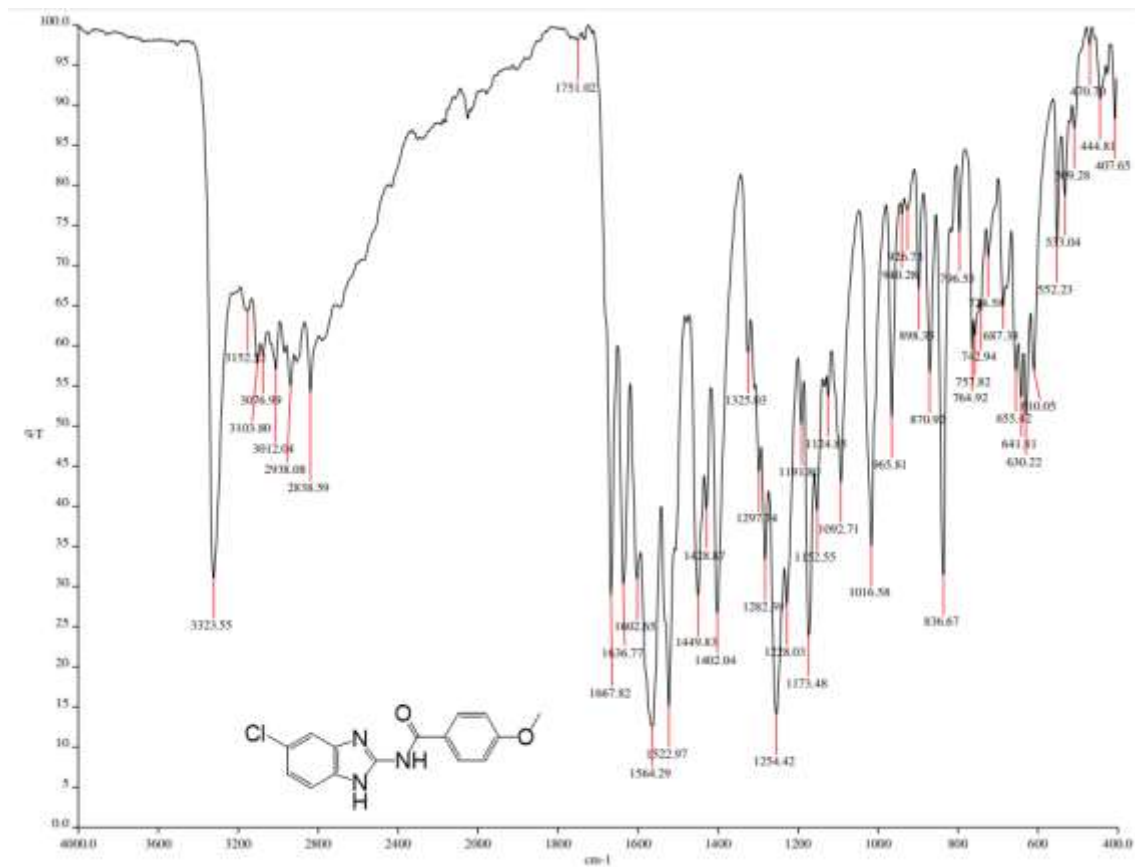
Espectro 25. NOESY del compuesto (2-amino-1*H*-benzimidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**CN1.1**).



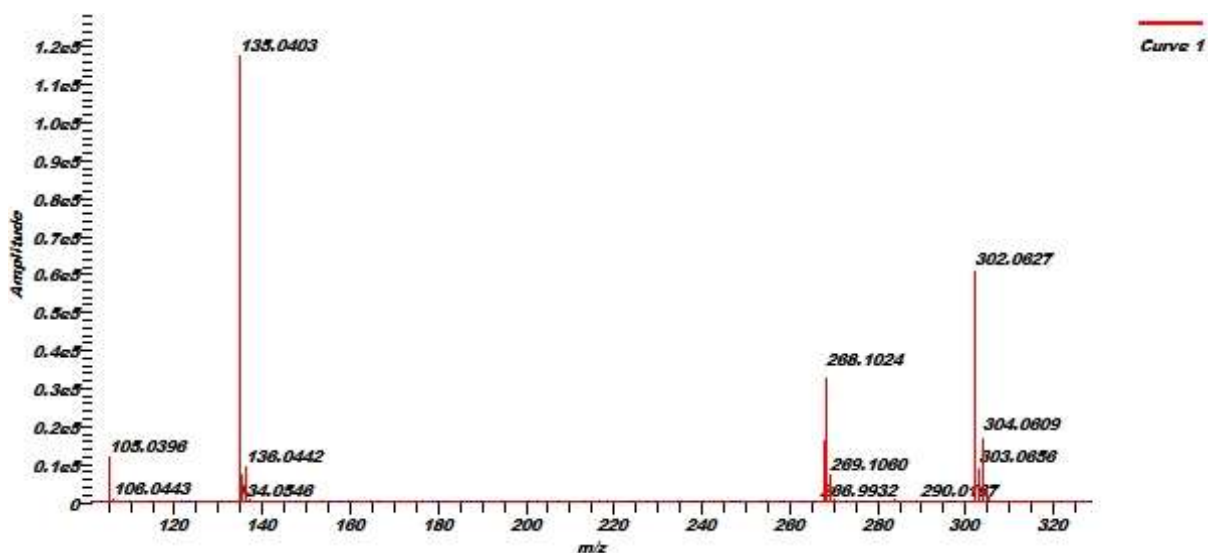
Espectro 26. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN2**).



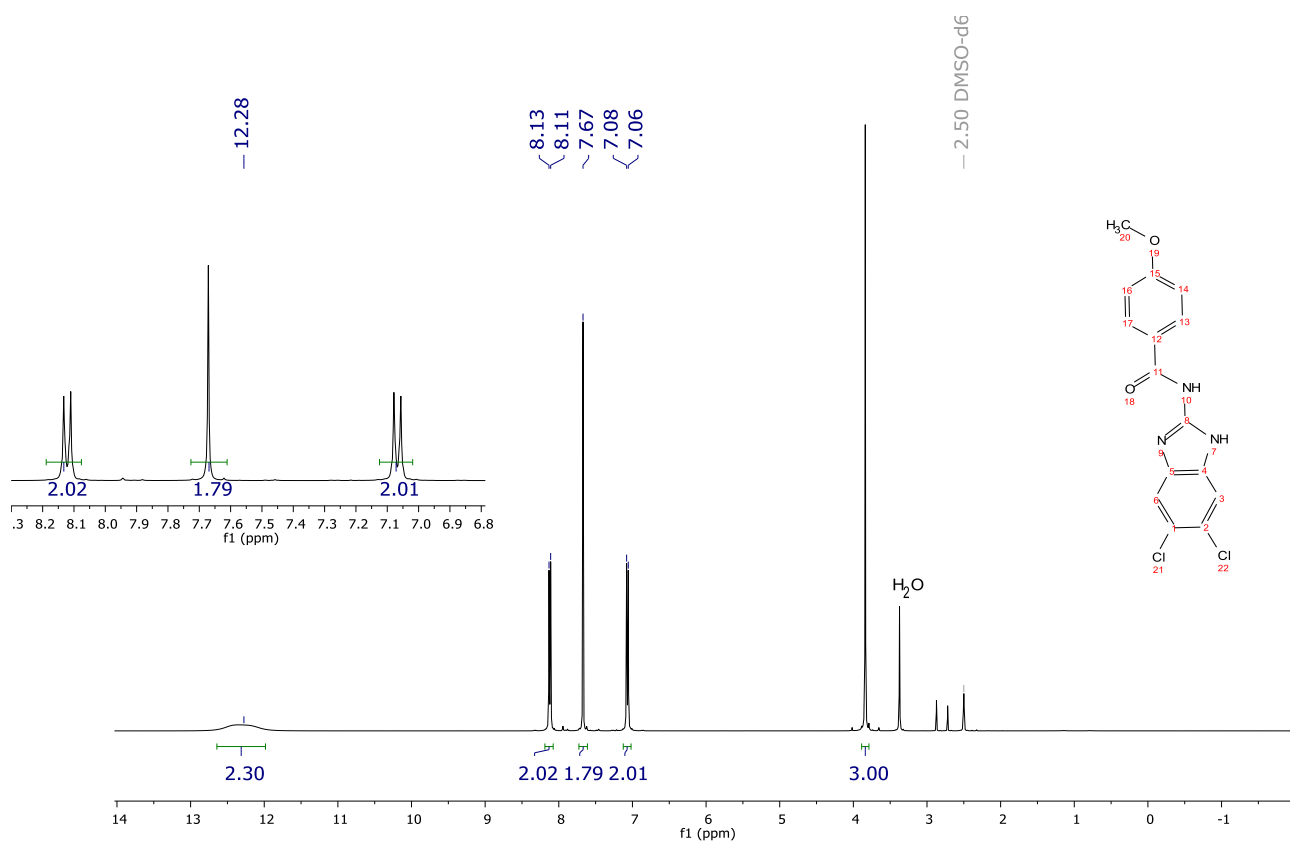
Espectro 27. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).



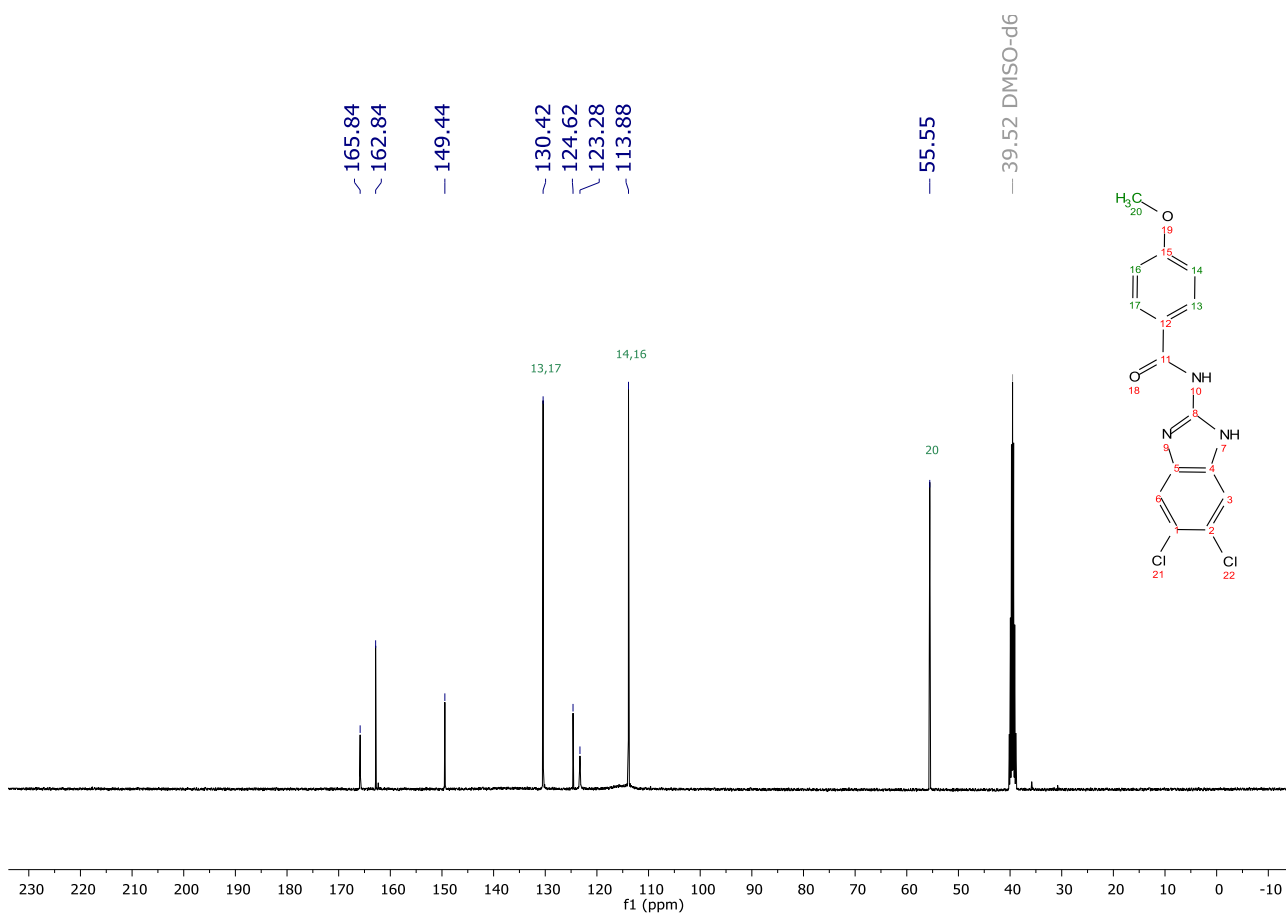
Espectro 28. IR (ATR) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN2).



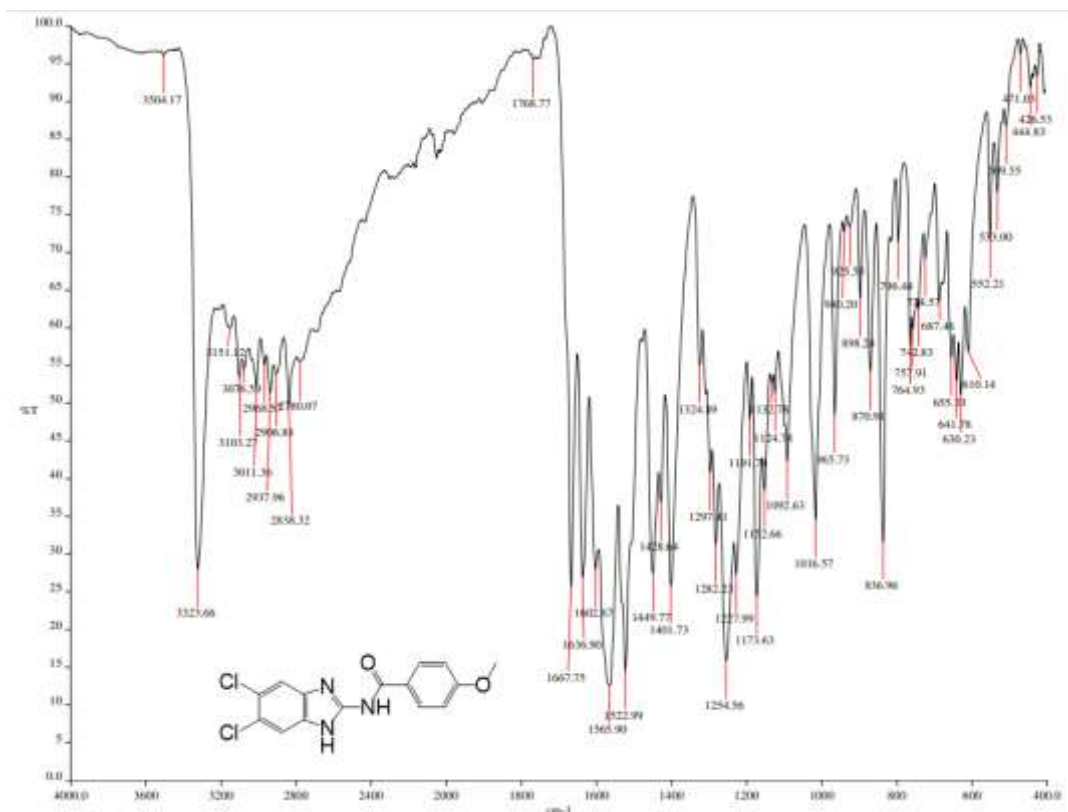
Espectro 29. EMAR (APCI) de *N*-(5(6)-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN2**), P.M. 301.72. g/mol.



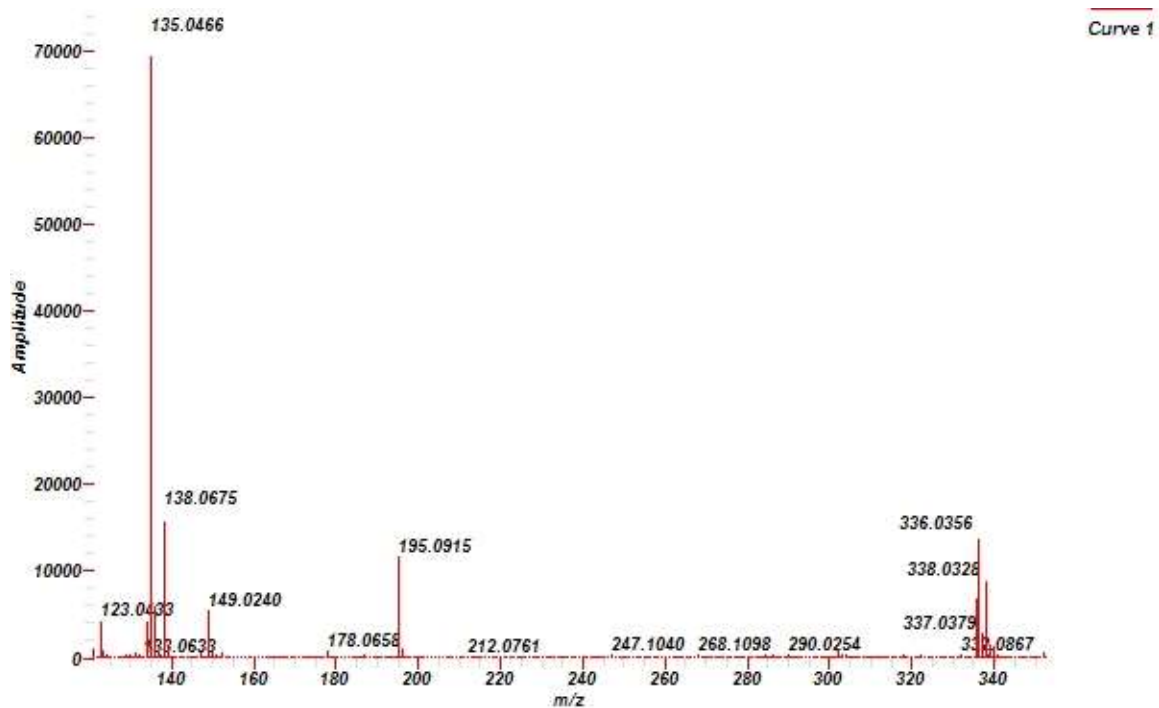
Espectro 30. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN3**).



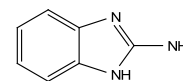
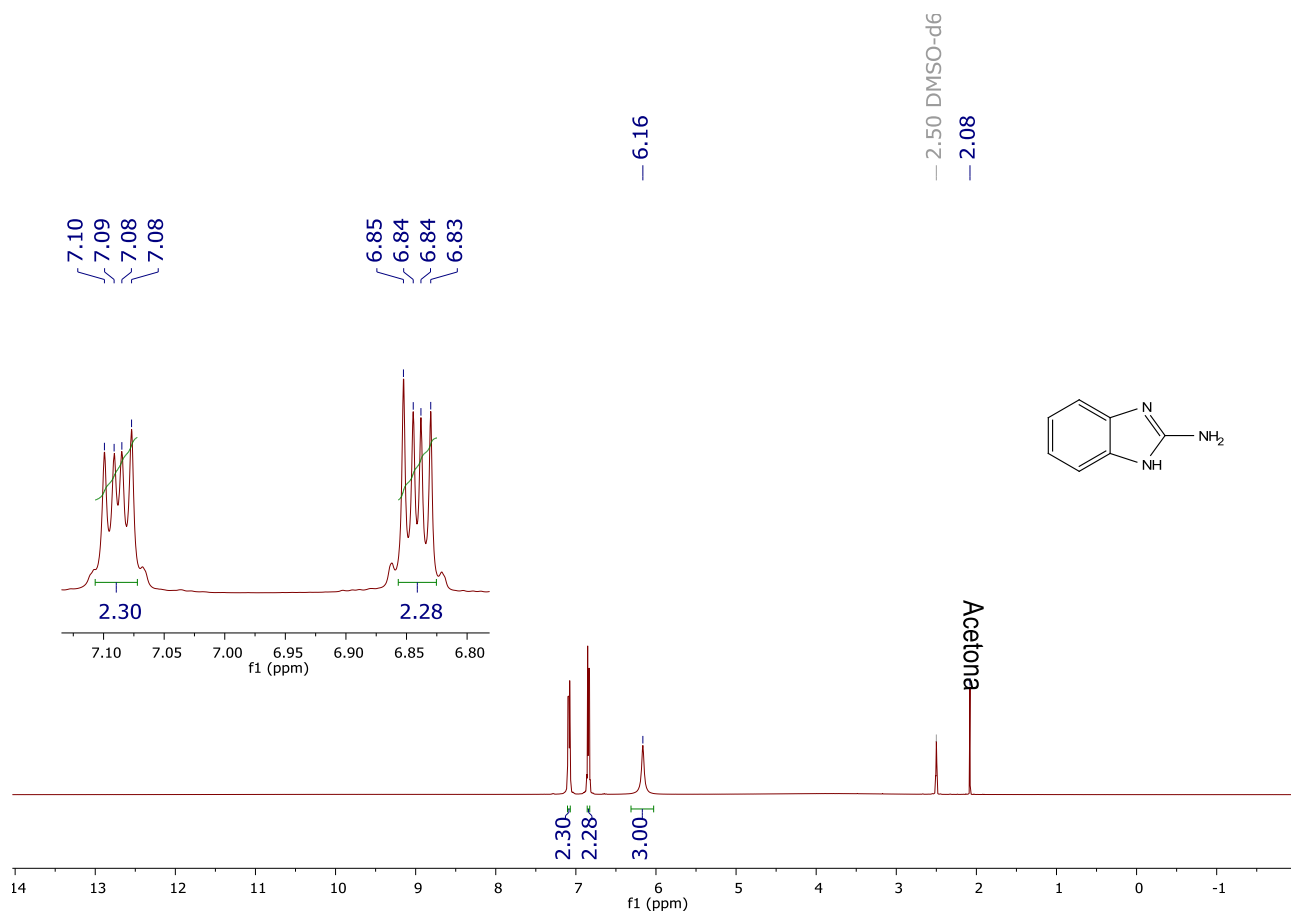
Espectro 31. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).



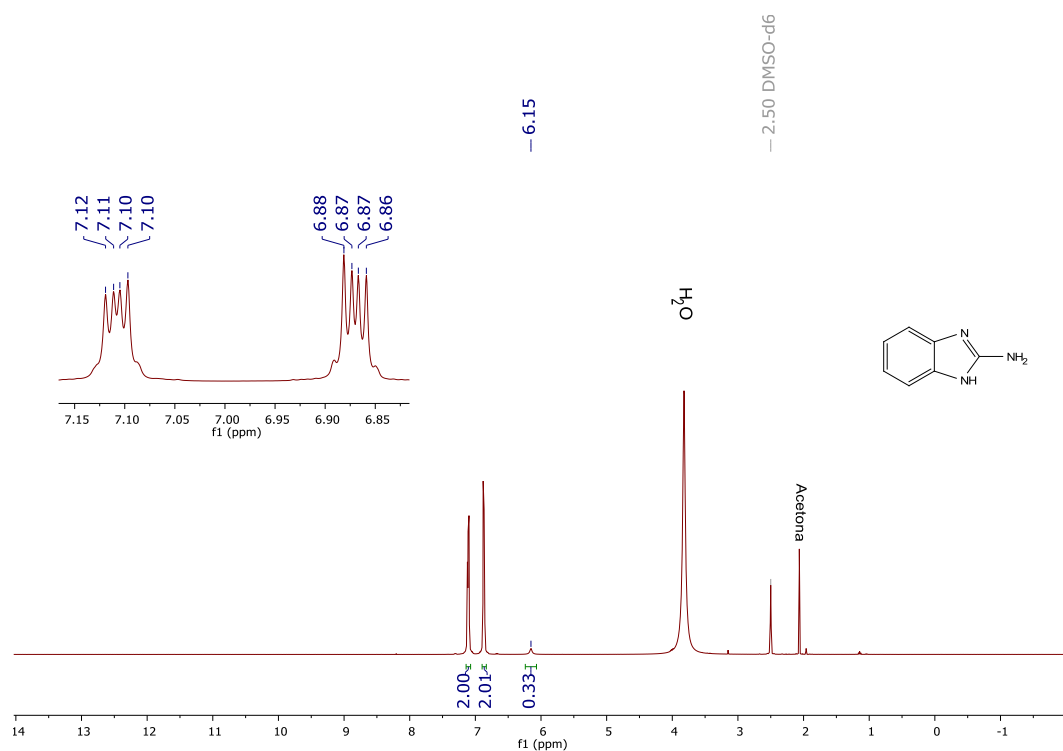
Espectro 32. IR (ATR) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (CN3).



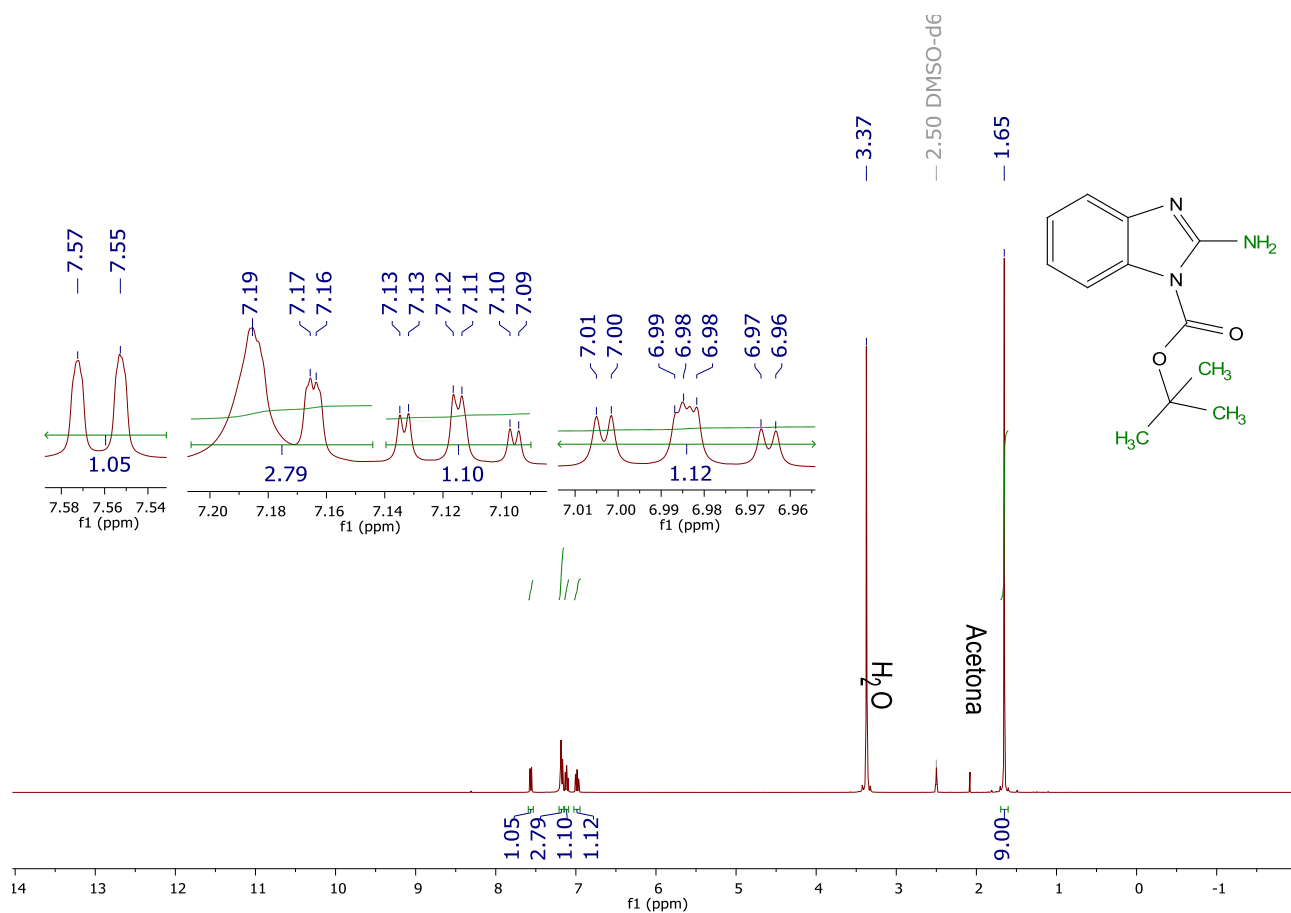
Espectro 33. EMAR (APCI) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-metoxibenzamida (**CN3**), P.M. 336.17. g/mol.



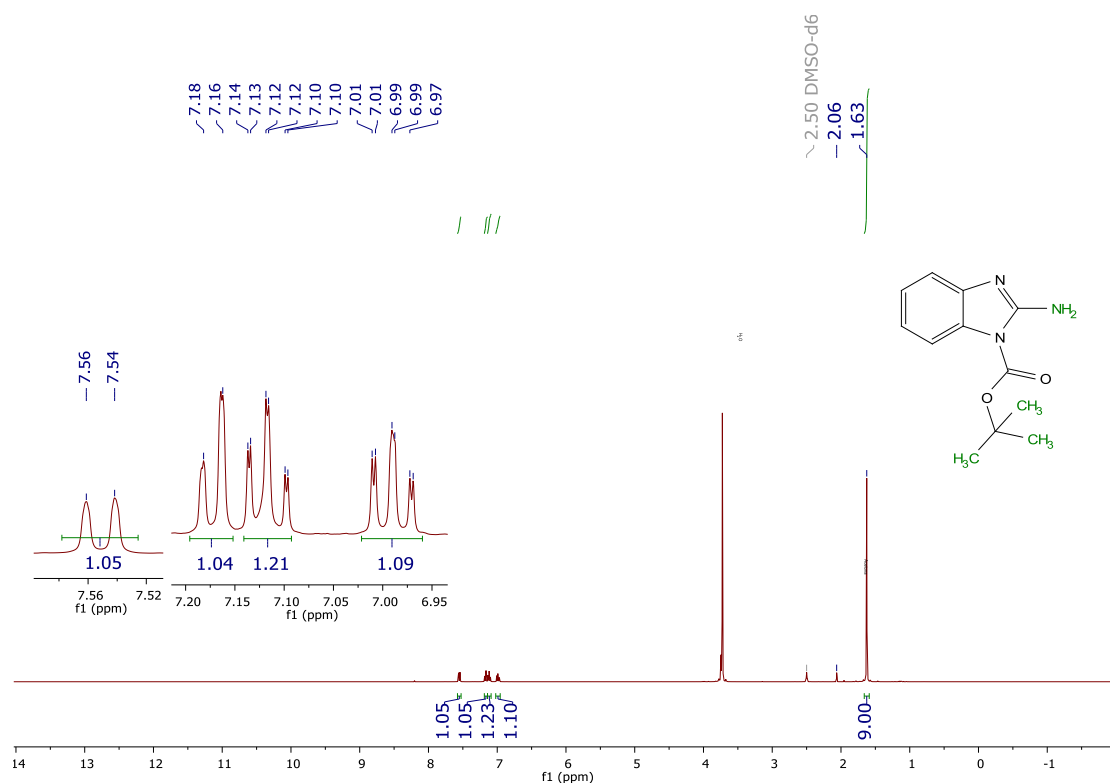
Espectro 34. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-1*H*-bencimidazol (**F**).



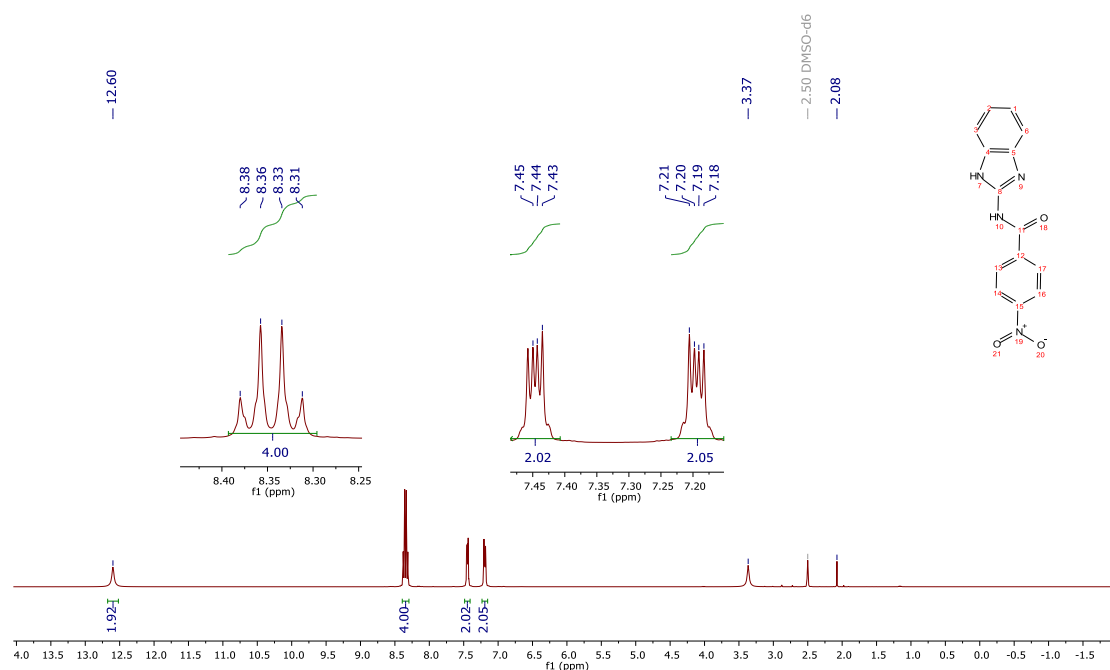
Espectro 35. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) D₂O del compuesto 2-amino-1*H*-benzimidazol (F).



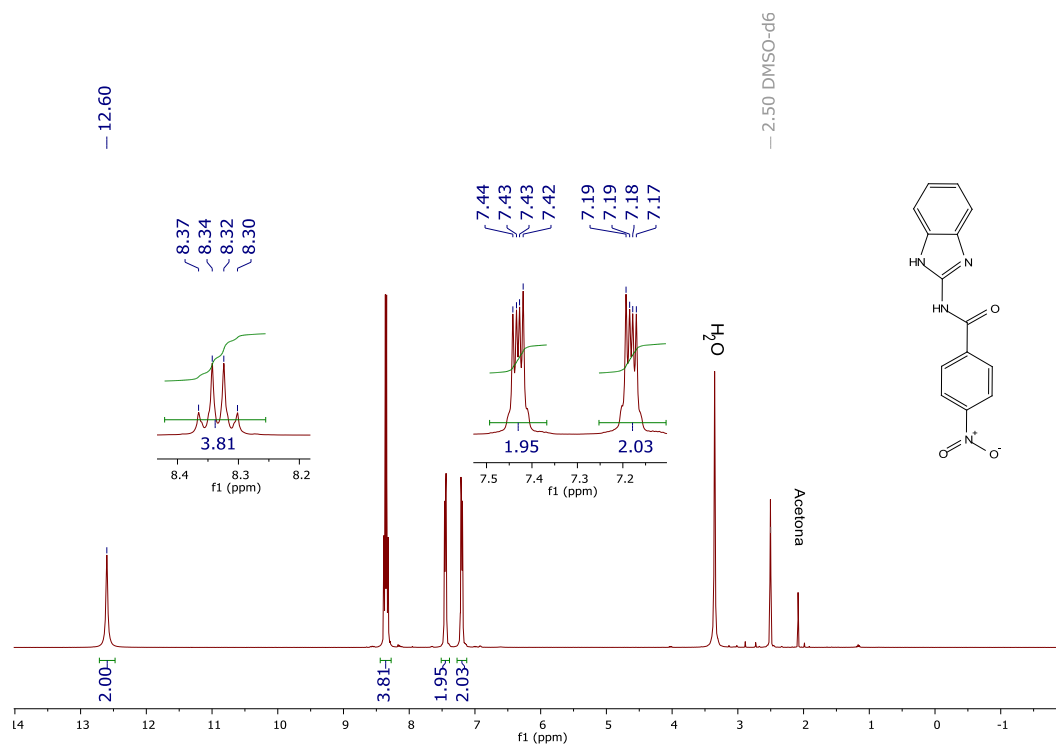
Espectro 36. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-aminobenzimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (I).



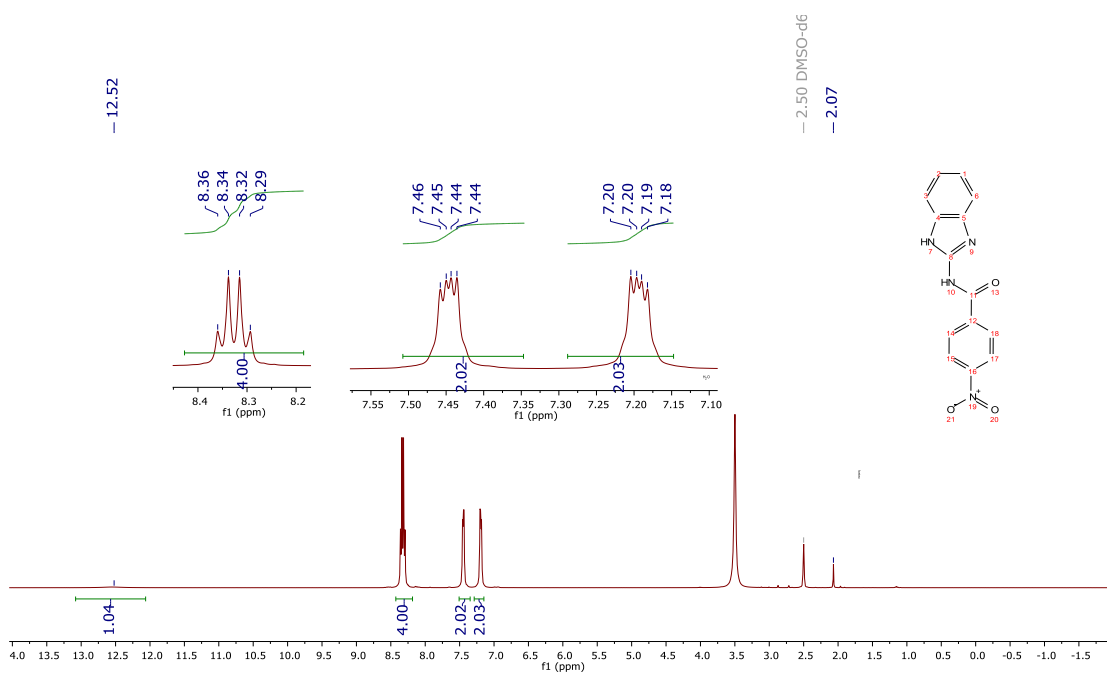
Espectro 37. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) D $_2$ O del compuesto 2-aminobenzimidazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**I**).



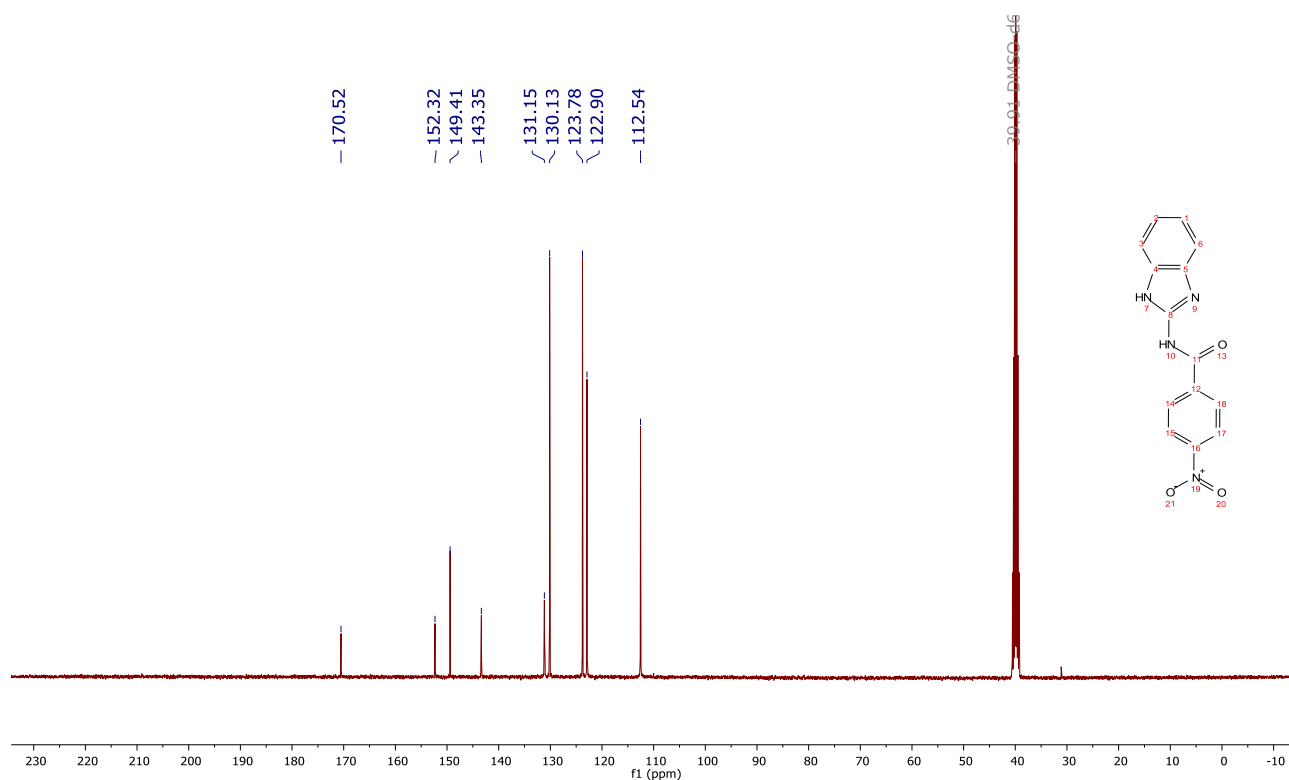
Espectro 38. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1H-benzimidazol-2-yl)-4-nitrobenzamida (**CN4**) (producto obtenido por la ruta de protección).



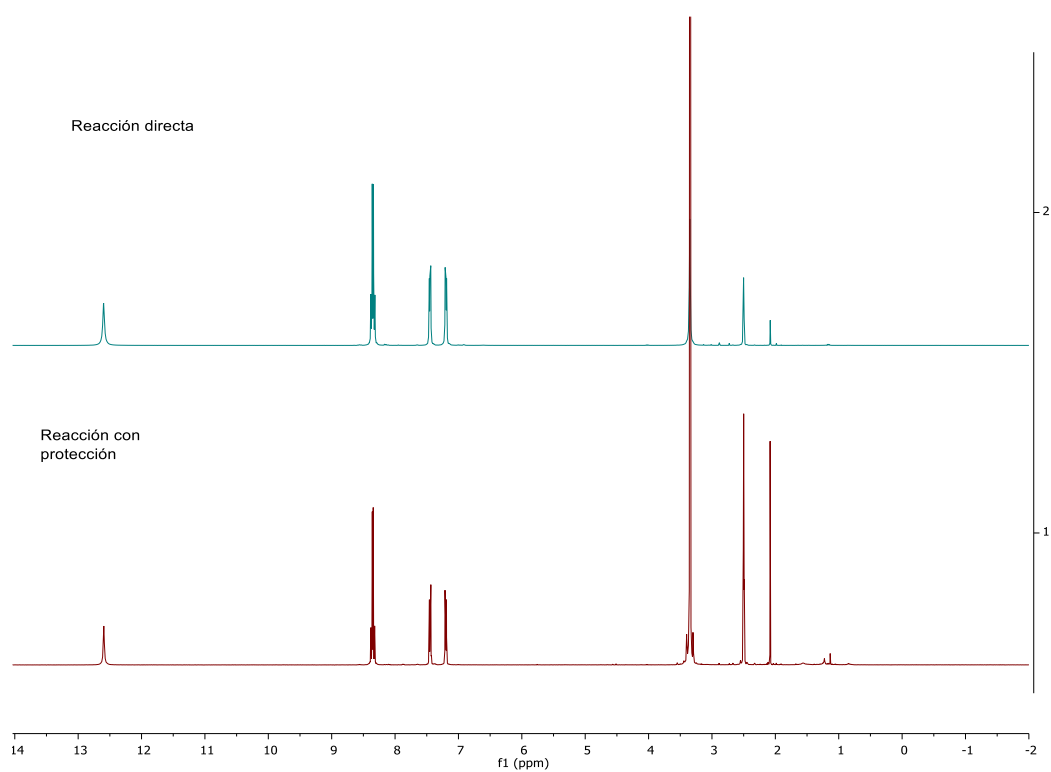
Espectro 39. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**) (producto obtenido por la ruta directa).



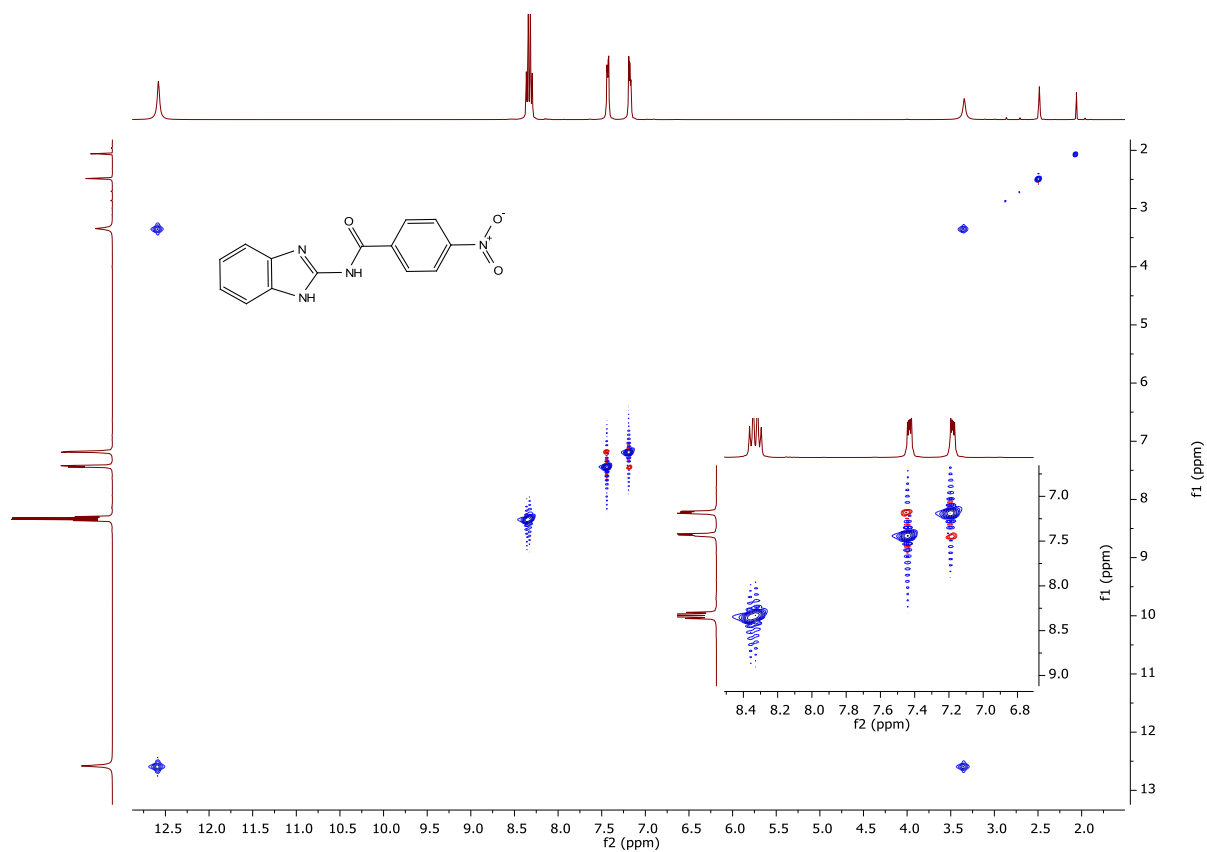
Espectro 40. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) D_2O del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**).



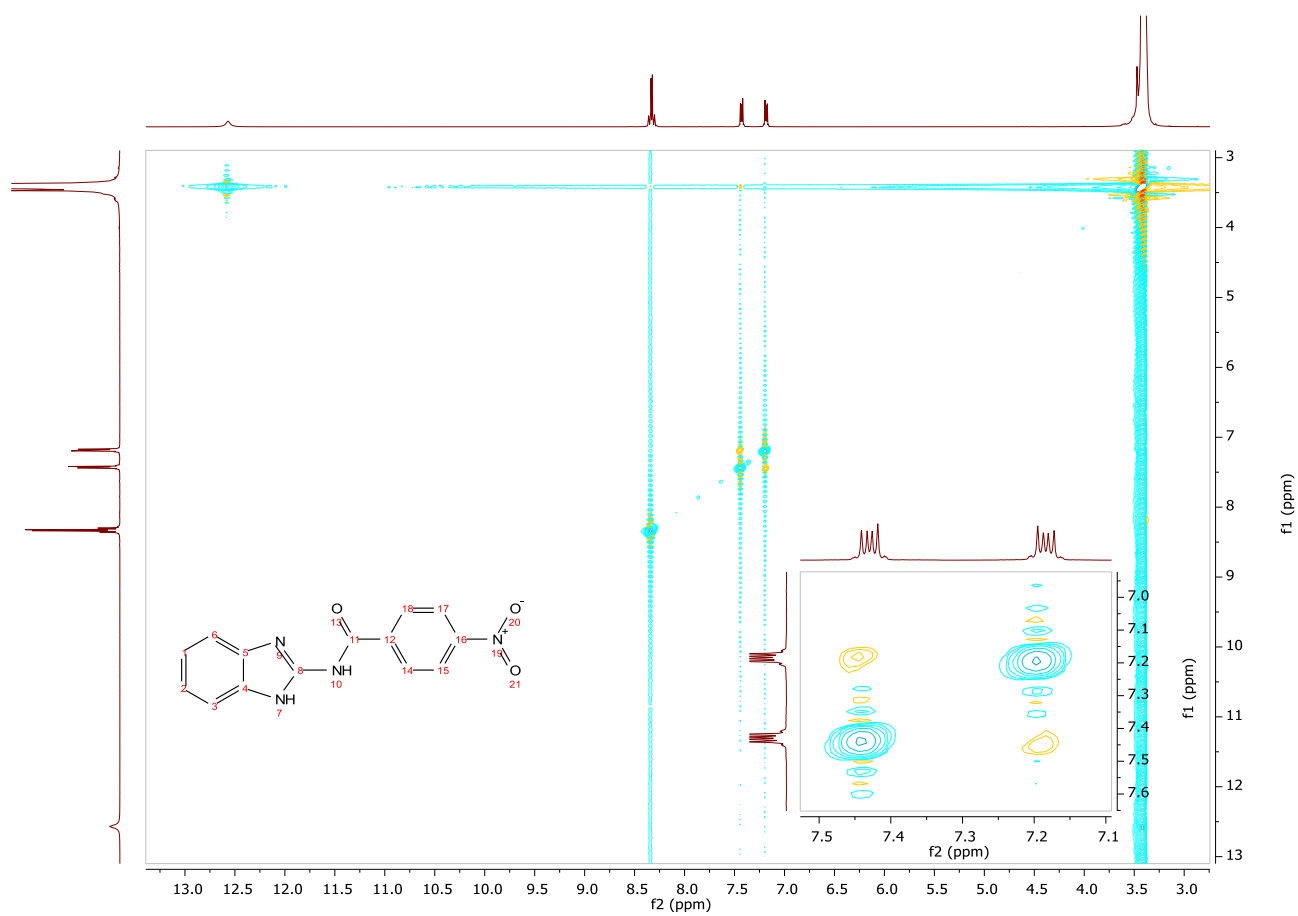
Espectro 41. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**).



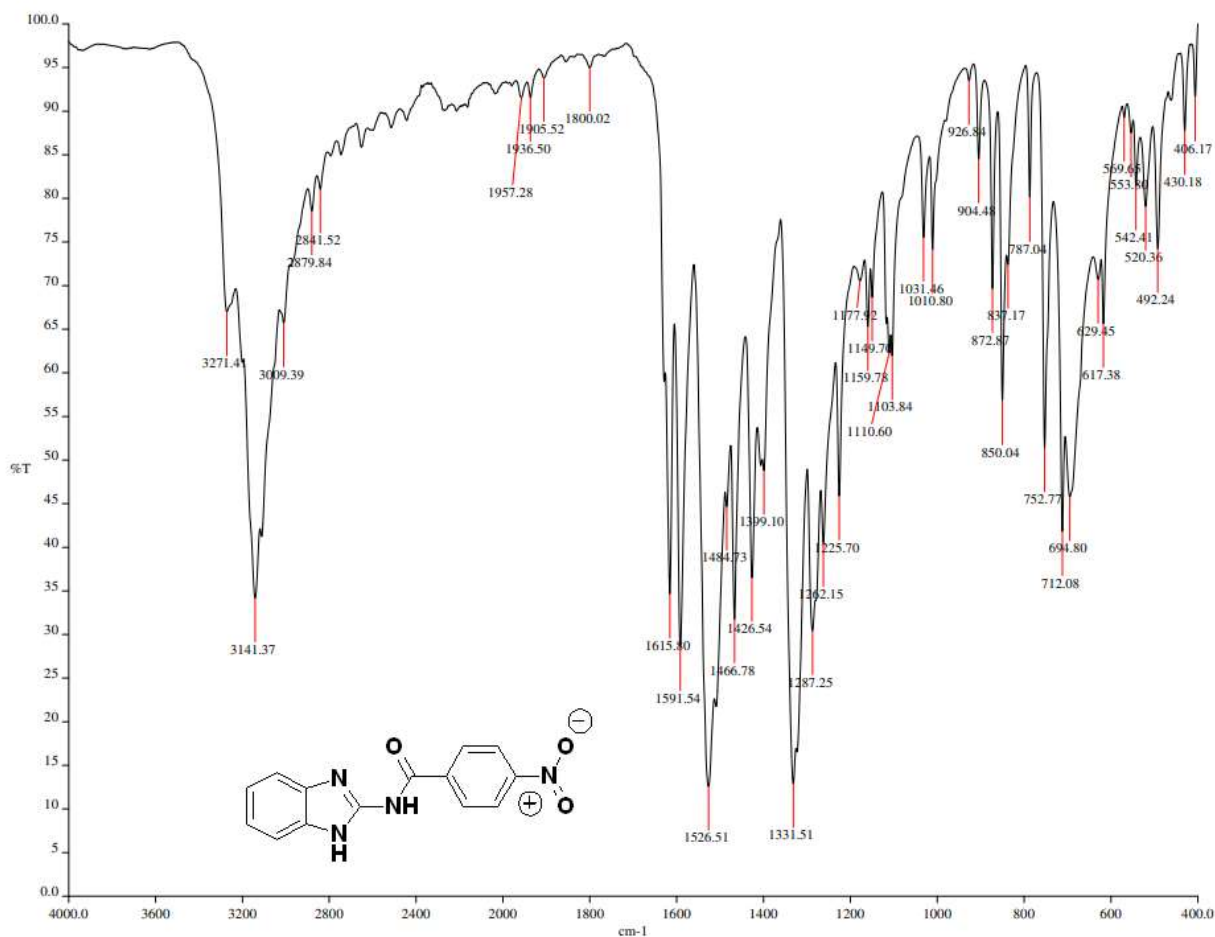
Espectro 42. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**) (comparación de productos entre ambas rutas de síntesis).



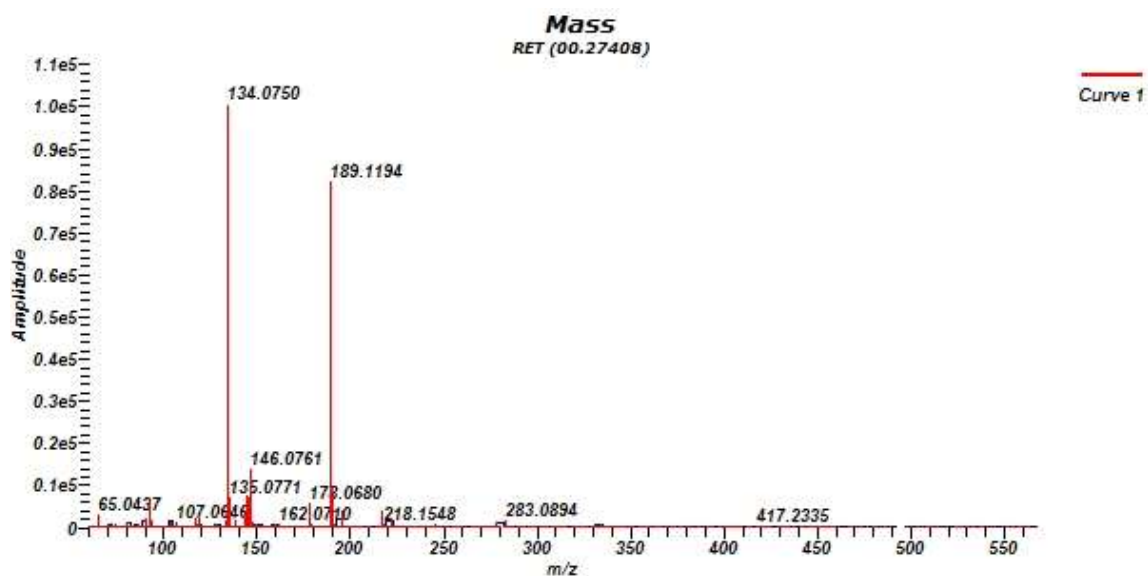
Espectro 43. NOESY del compuesto *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**) (producto obtenido por la ruta de protección).



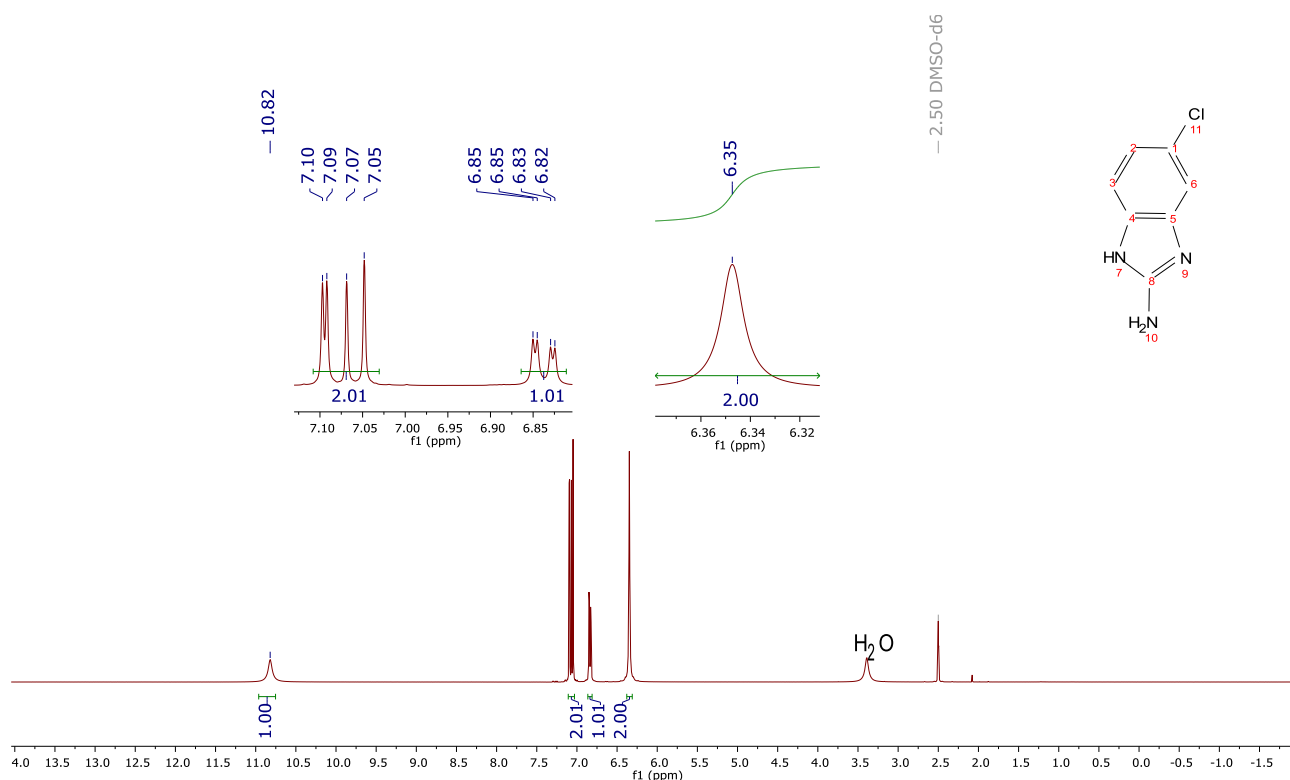
Espectro 44. NOESY del compuesto *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN4**) (producto obtenido por la ruta directa).



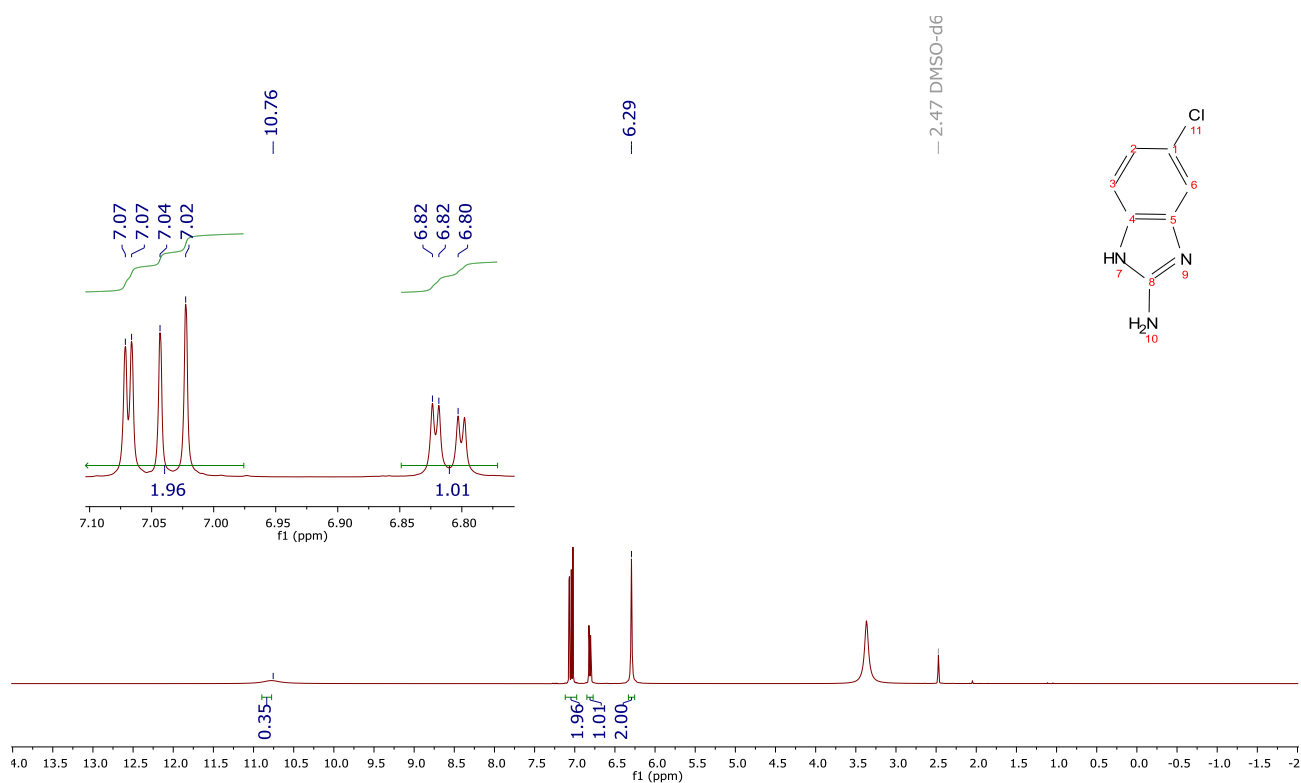
Espectro 45. IR (ATR) del compuesto *N*-(1H-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4).



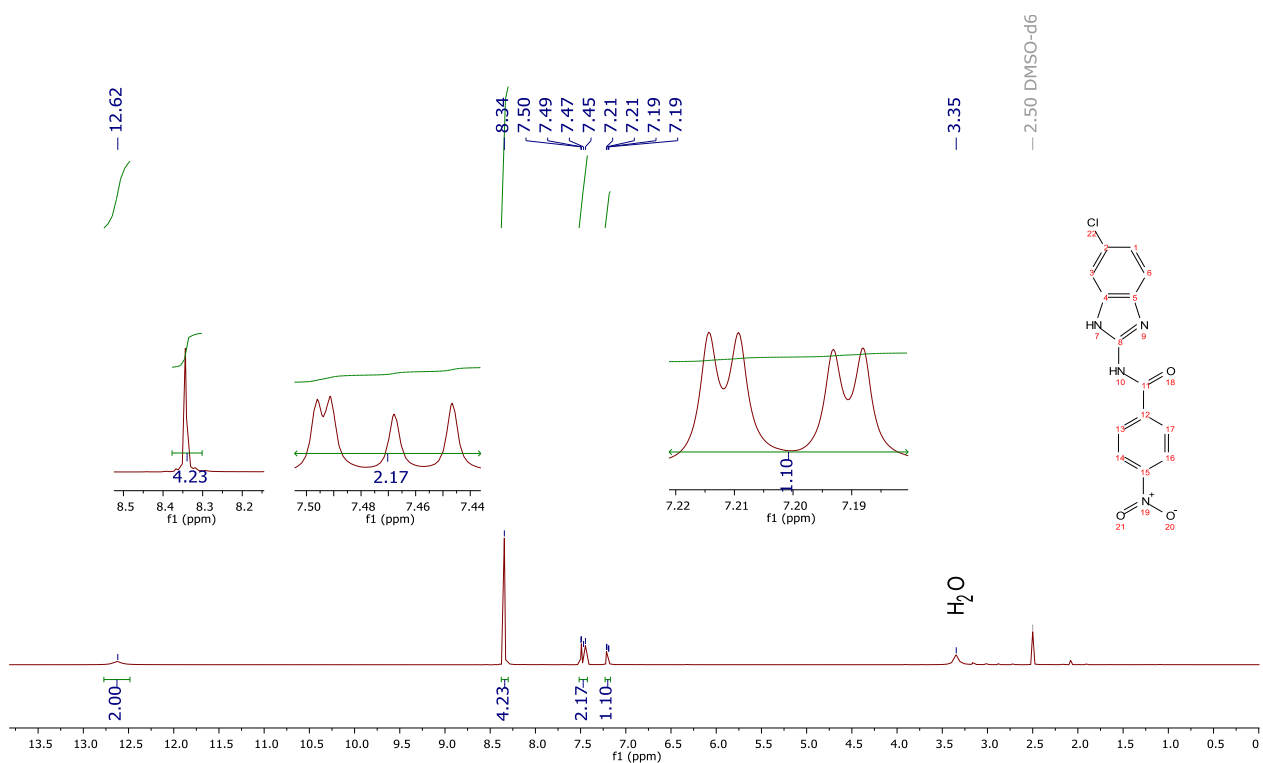
Espectro 46. EMAR (APCI) del compuesto *N*-(1H-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN4), P.M. 282.25. g/mol.



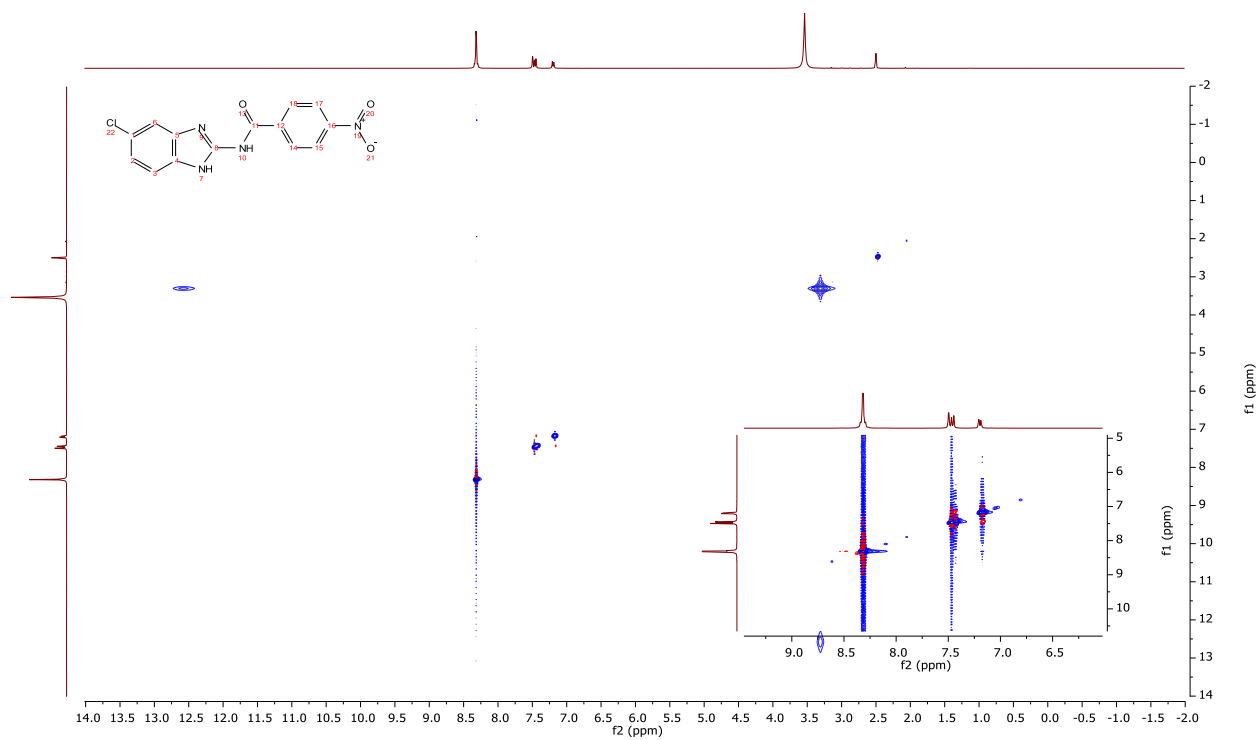
Espectro 47. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5-cloro-1*H*-bencimidazol (G).



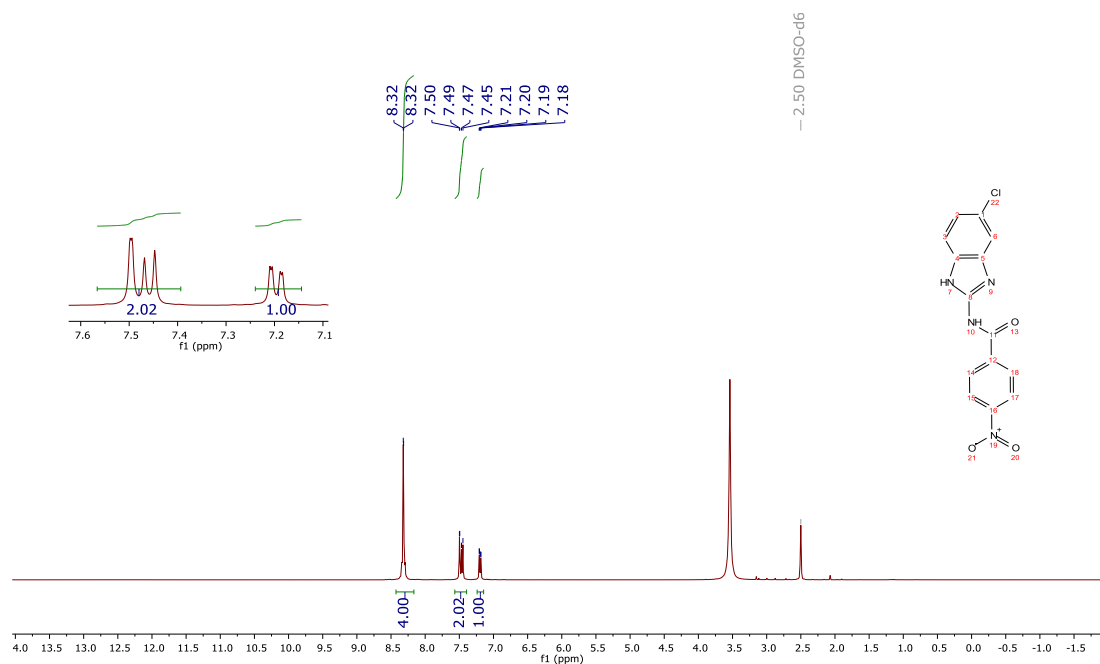
Espectro 48. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) D₂O del compuesto 2-amino-5-cloro-1*H*-bencimidazol (G).



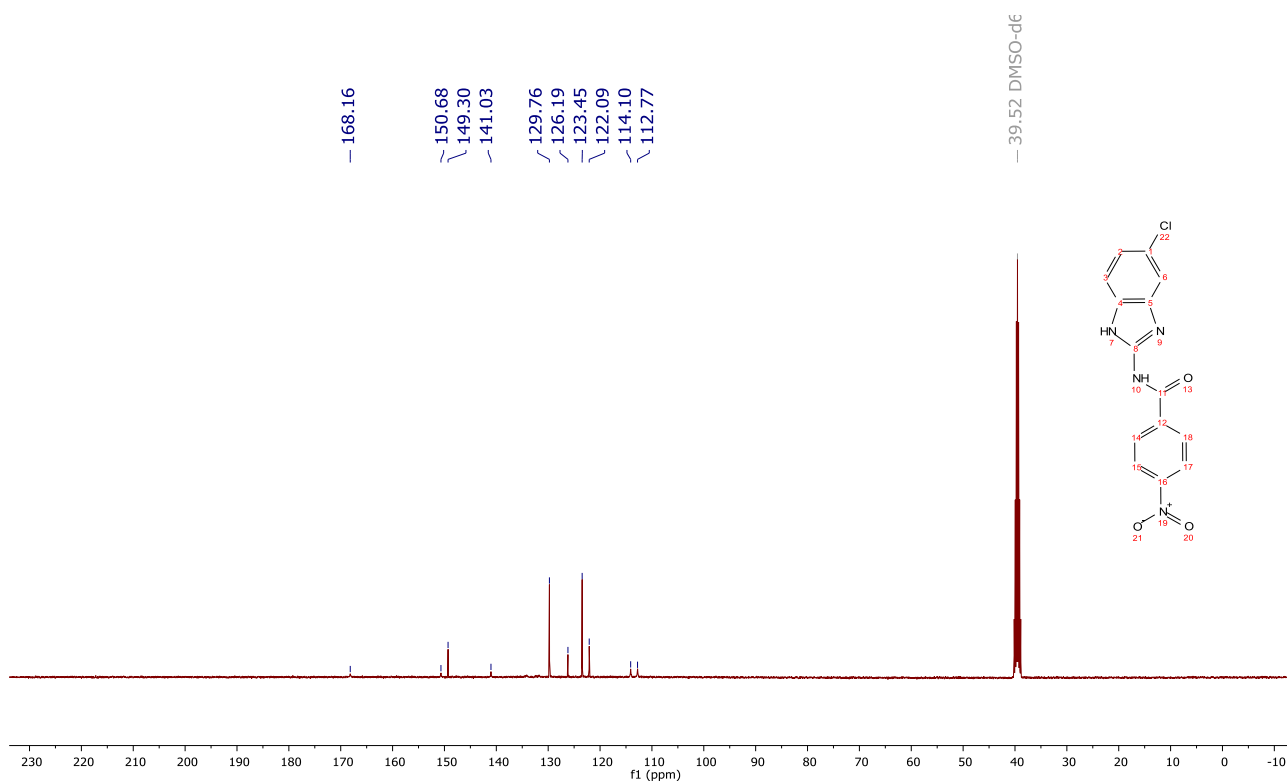
Espectro 49. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).



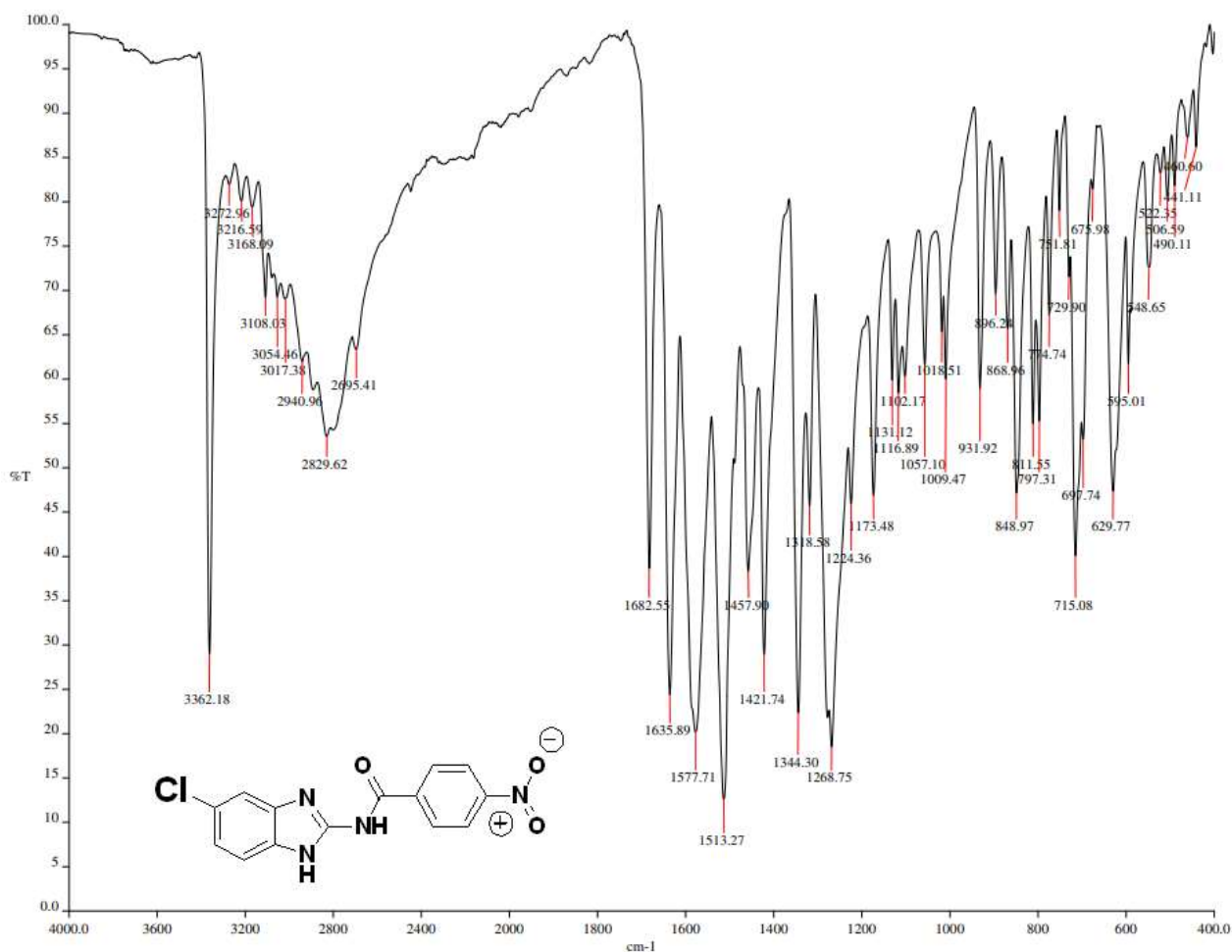
Espectro 50. NOESY del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).



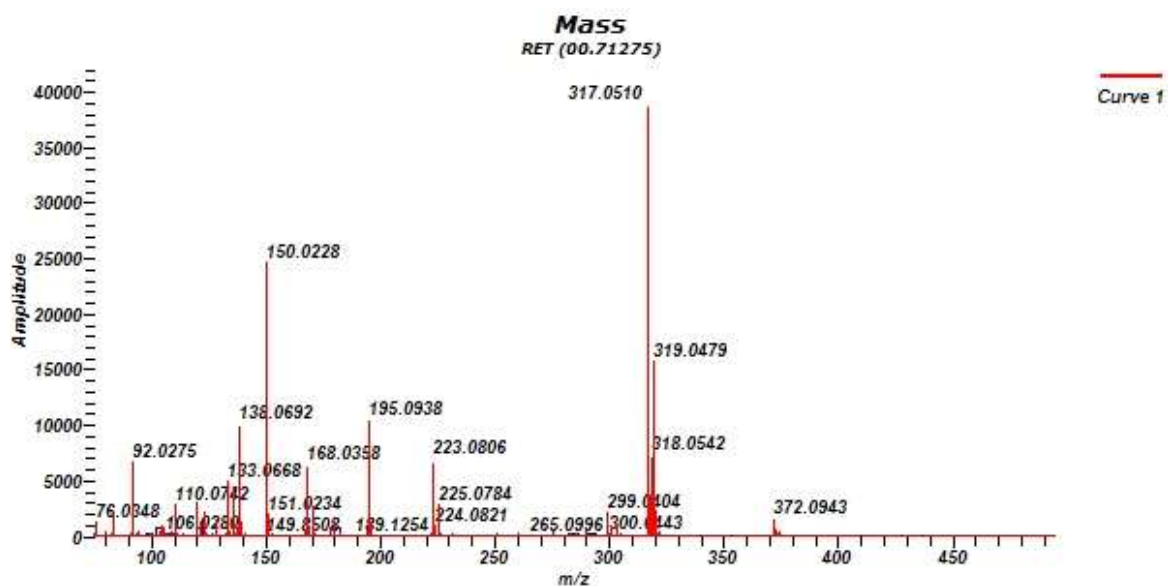
Espectro 51. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) D₂O del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN5**).



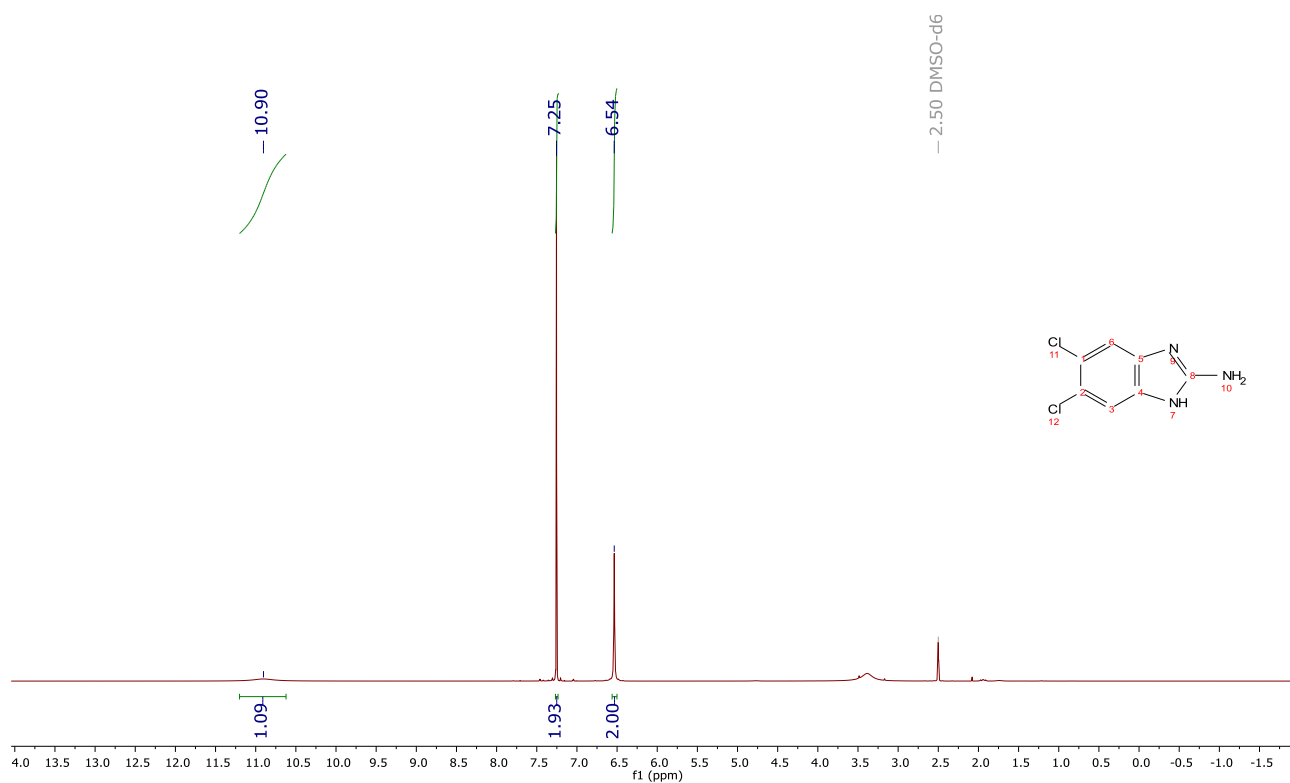
Espectro 52. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN5**).



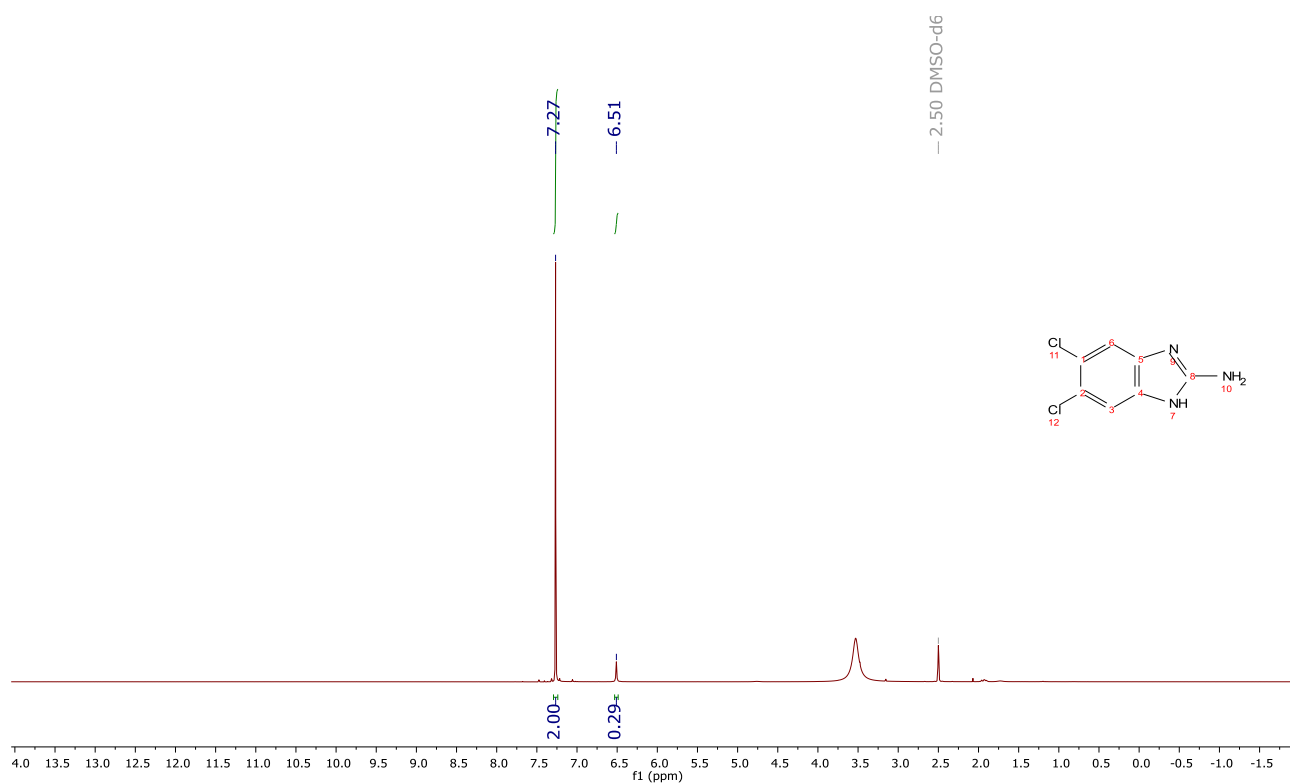
Espectro 53. IR (ATR) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5).



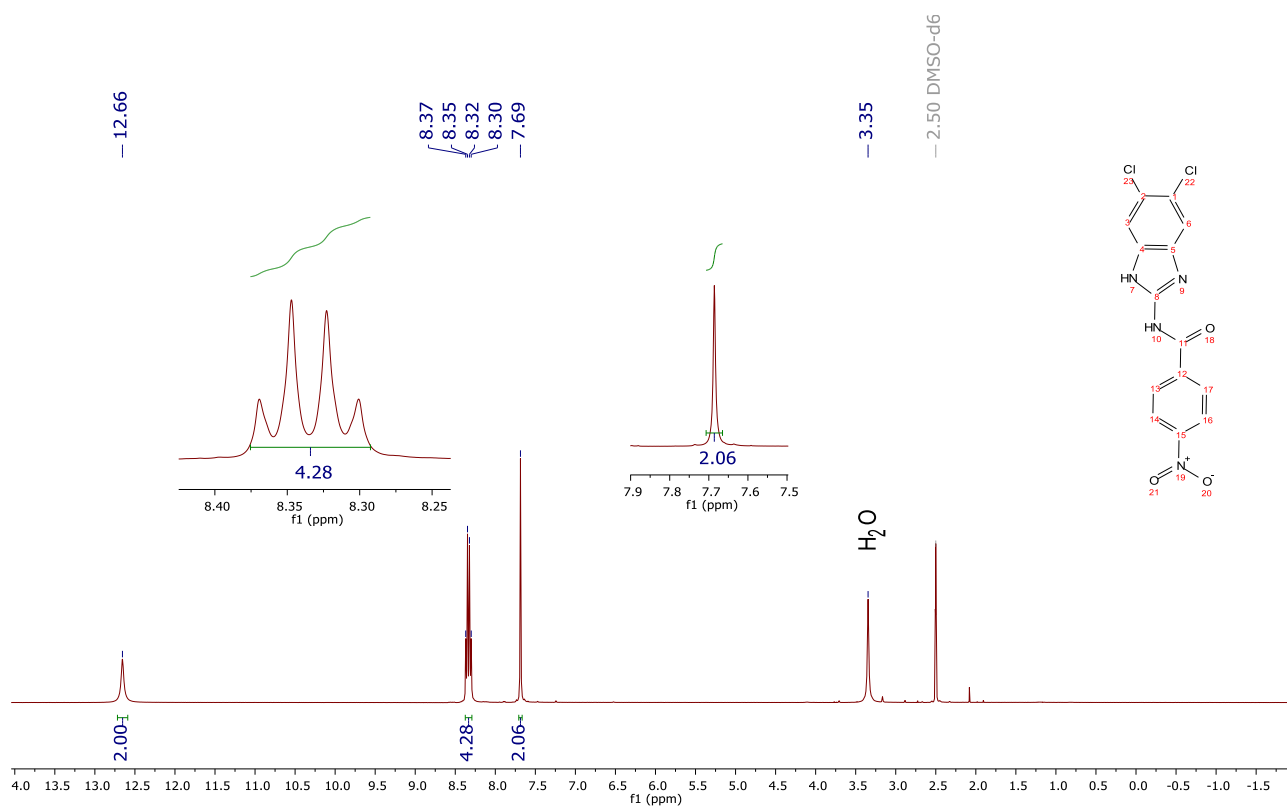
Espectro 54. EMAR (APCI) del compuesto *N*-(5(6)-cloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN5), P.M. 317.05 g/mol.



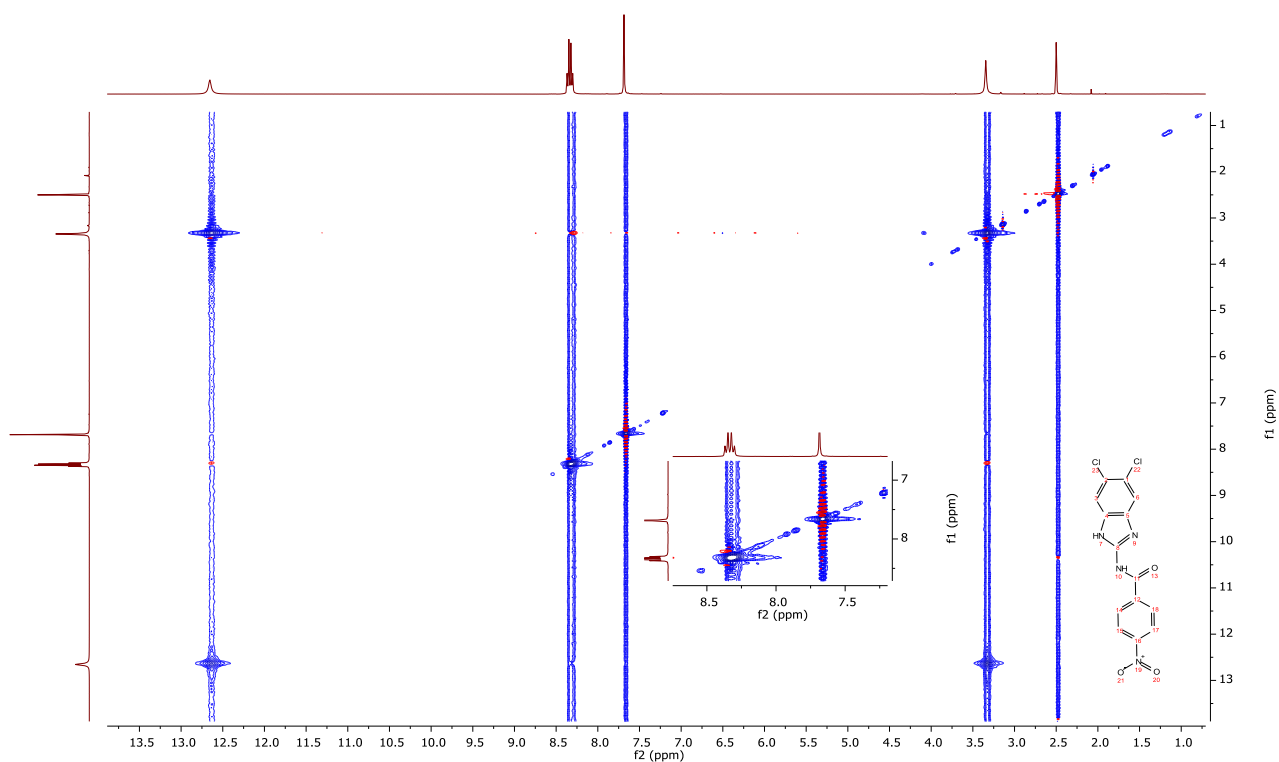
Espectro 55. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5,6-Dicloro-1H-benzimidazol (**H**).



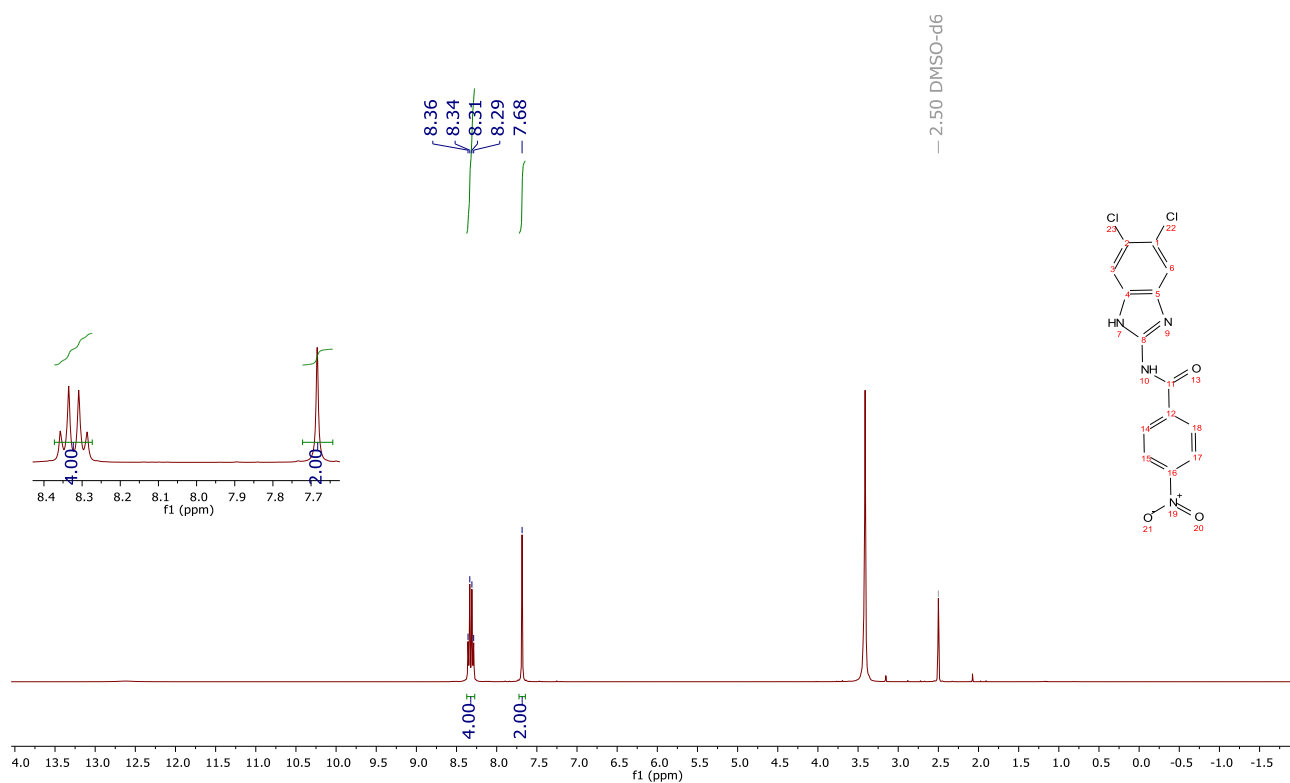
Espectro 56. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-5,6-Dicloro-1H-benzimidazol (**H**).



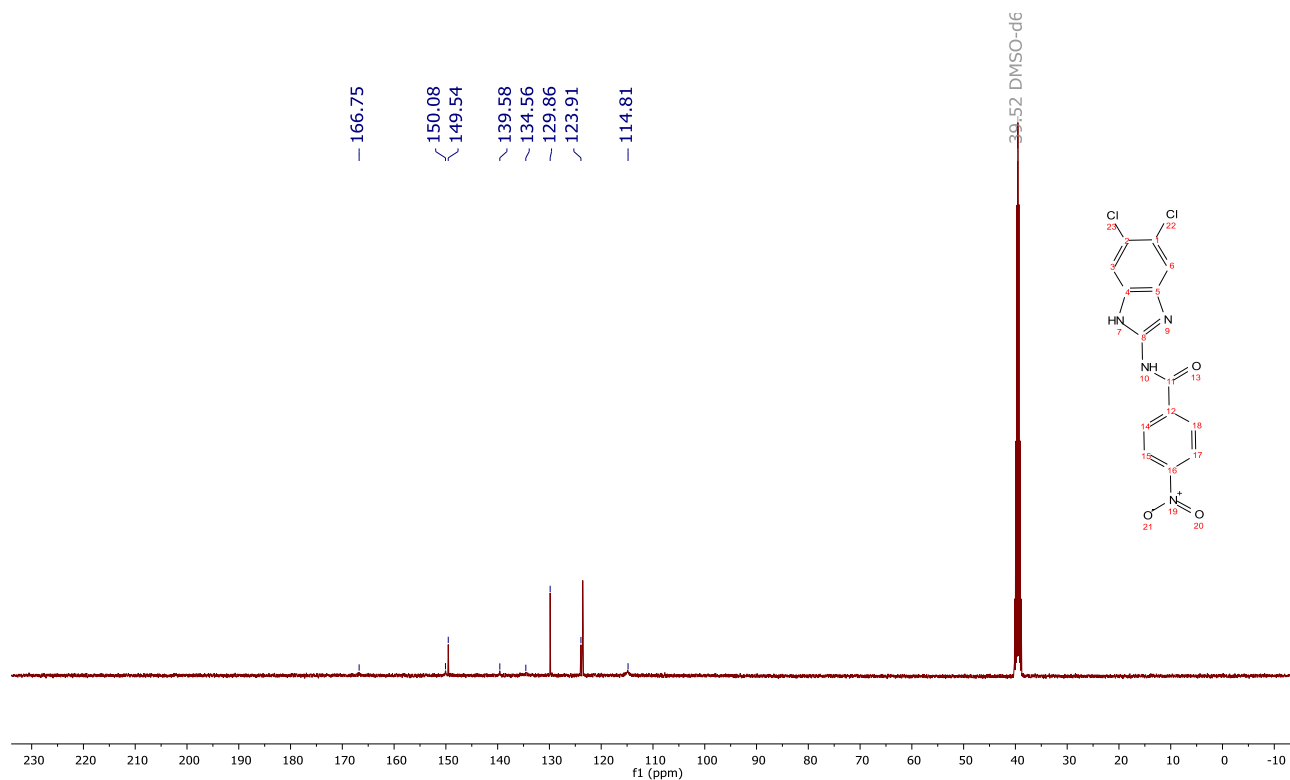
Espectro 57. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN6**).



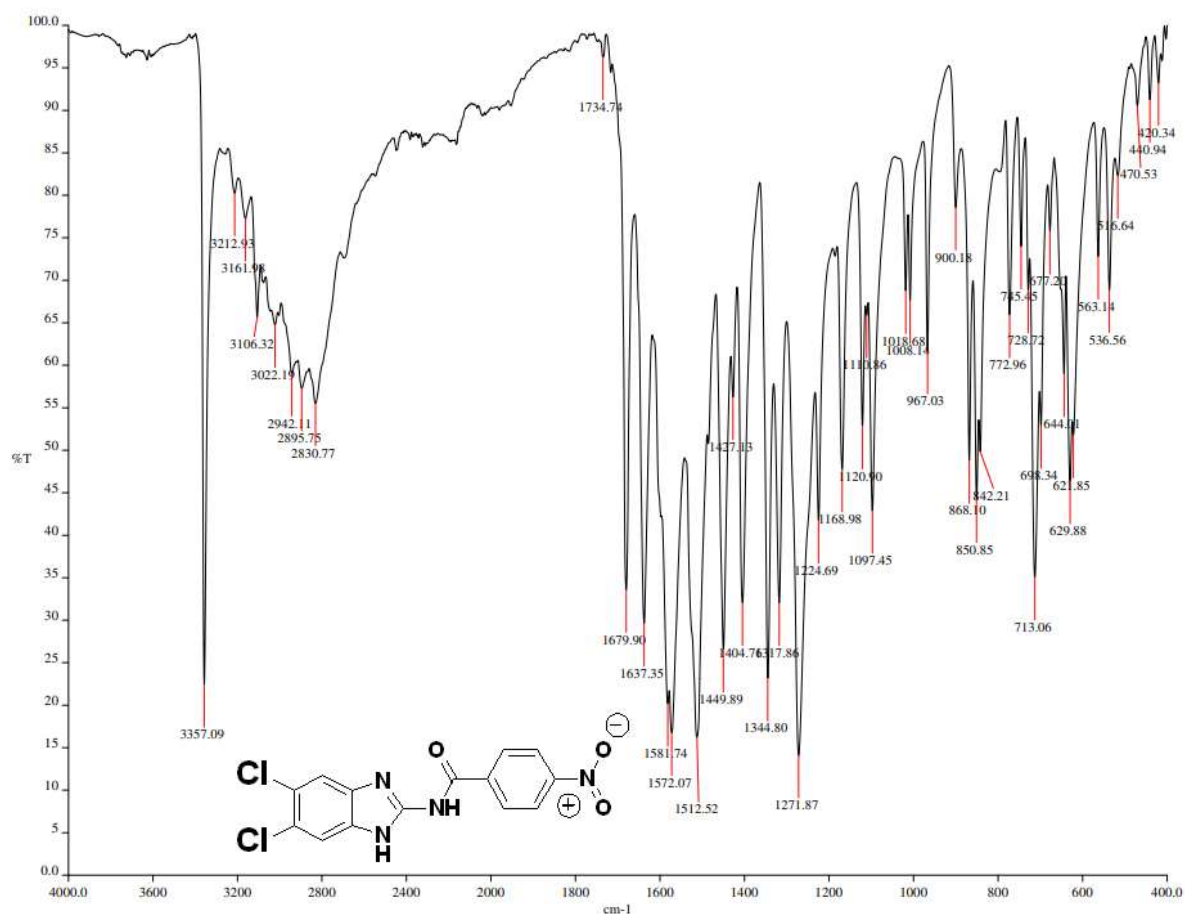
Espectro 58. NOESY del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN6**).



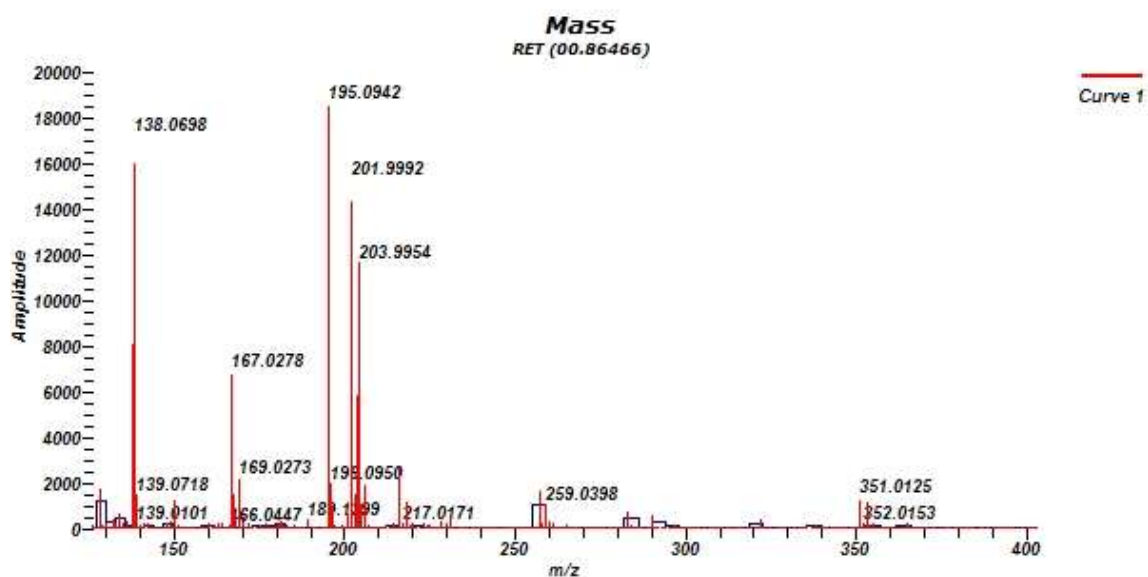
Espectro 59. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) D_2O del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN6**).



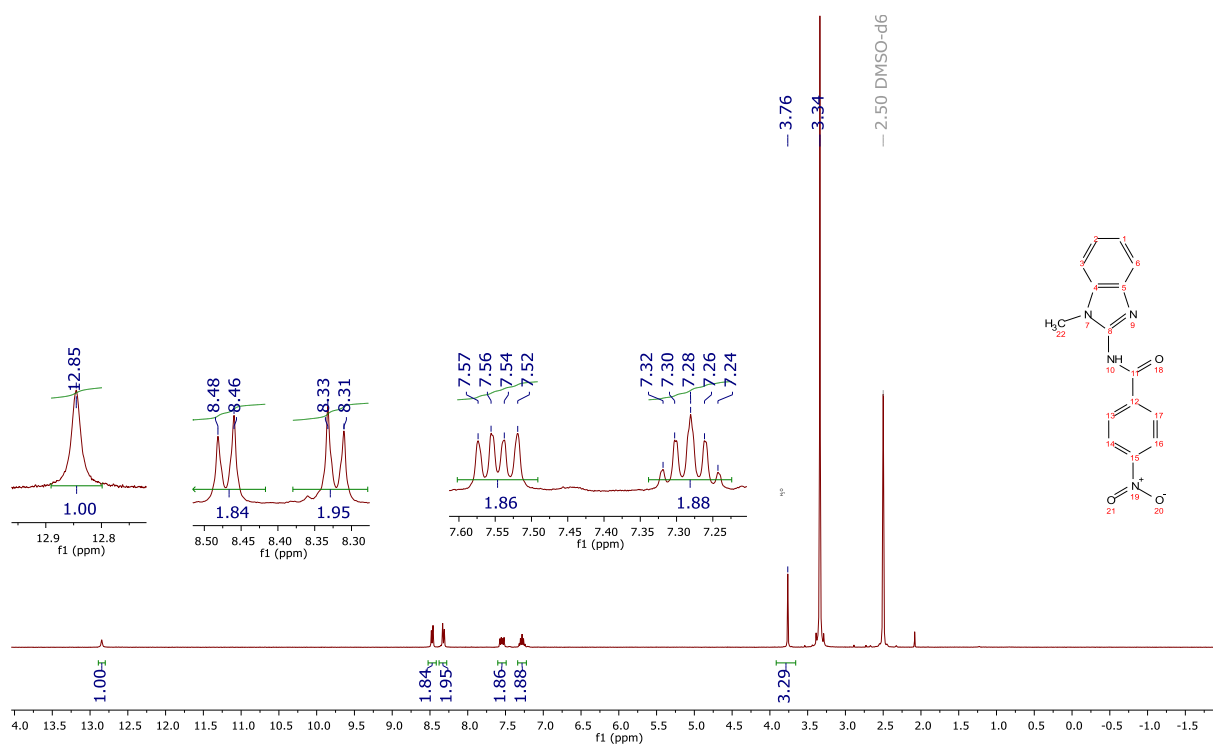
Espectro 60. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN6**).



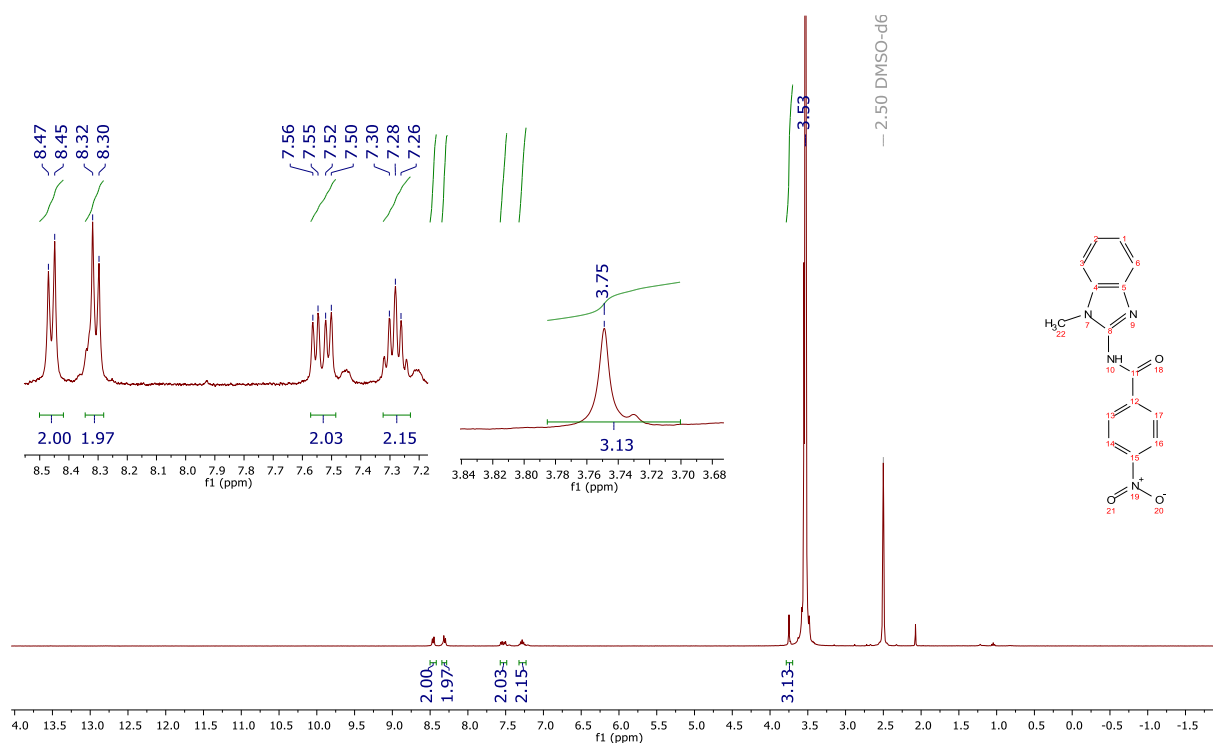
Espectro 61. IR (ATR) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6).



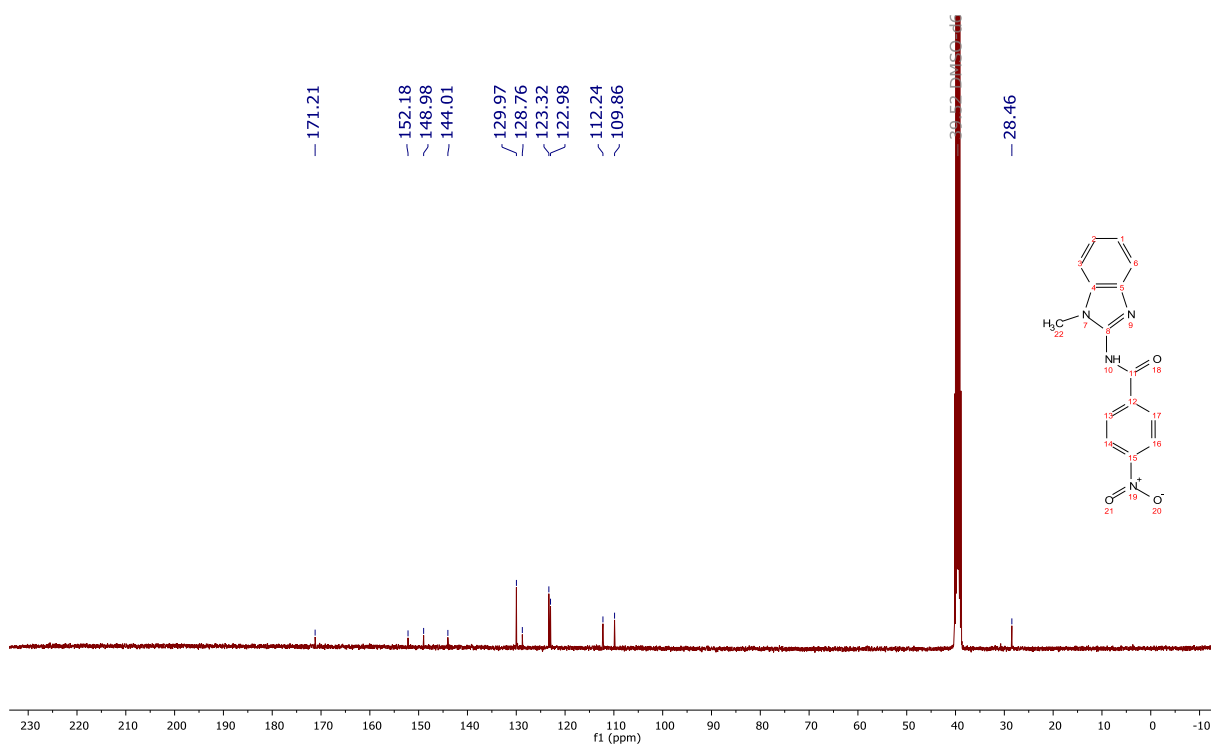
Espectro 62. EMAR (APCI) del compuesto *N*-(5,6-Dicloro-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN6), P.M. 351.14. g/mol.



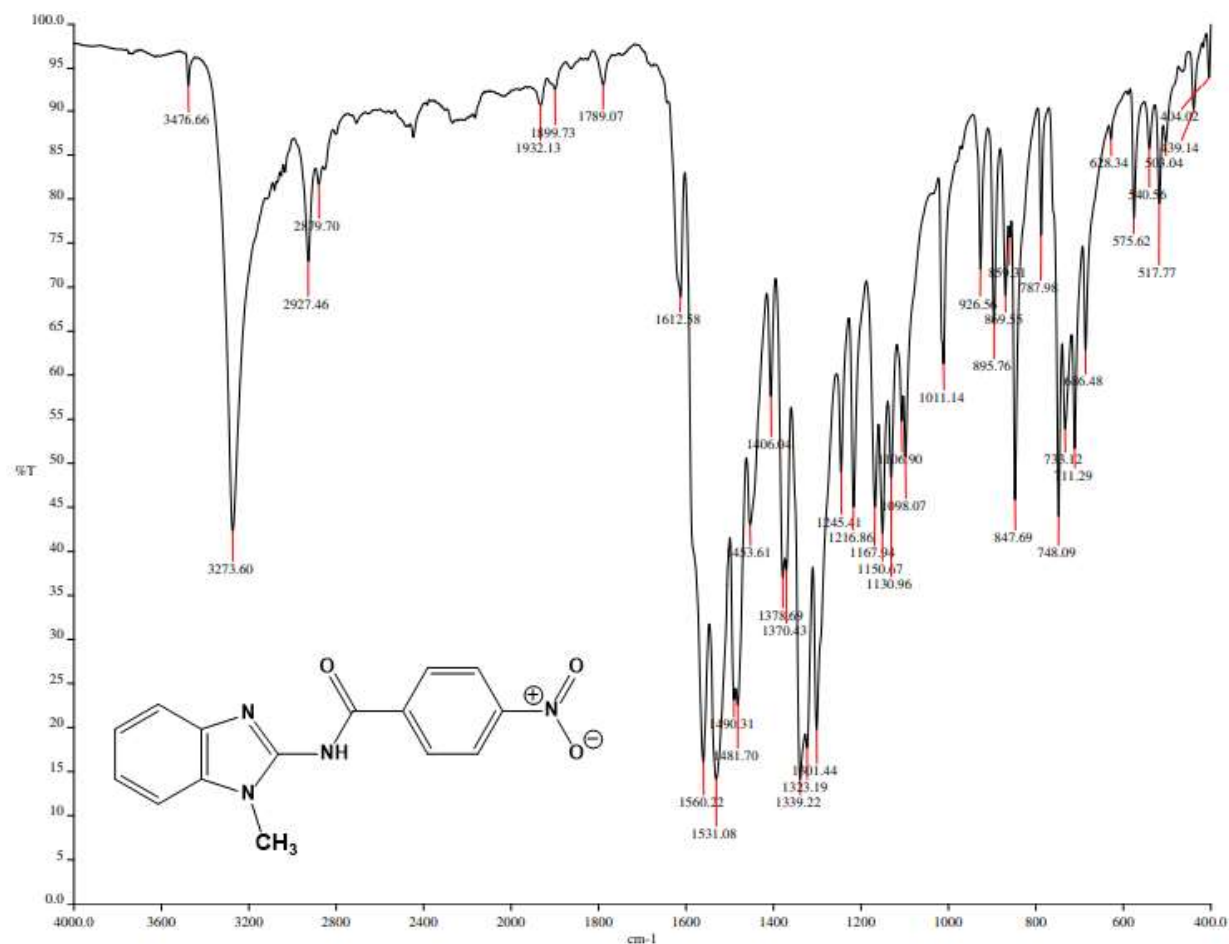
Espectro 63. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1-metilbenzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN7**).



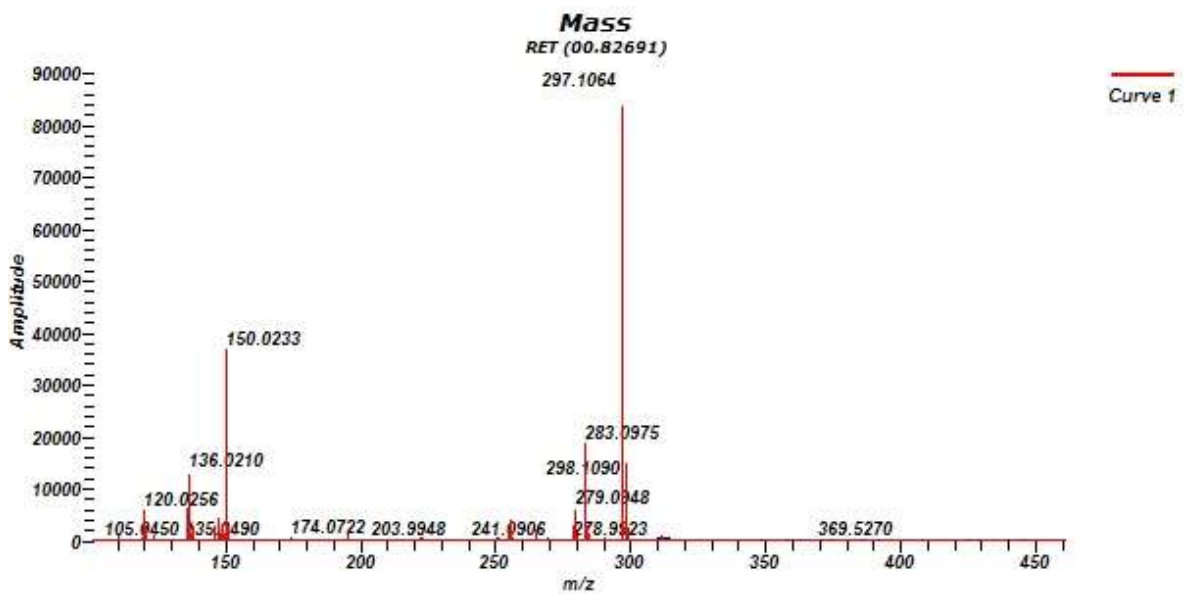
Espectro 64. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) D_2O del compuesto *N*-(1-metilbenzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN7**).



Espectro 65. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(1-metilbenzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).



Espectro 66. IR (ATR) del compuesto *N*-(1-metilbenzimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (CN7).



Espectro 67. EMAR (APCI) del compuesto de *N*-(1-metilbencimidazol-2-il)-4-nitrobenzamida (**CN7**), P.M. 296.28. g/mol.