

00524
89



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE NUEVOS
DERIVADOS BENCIMIDAZOLICOS 1-METILADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
NAYELI LOPEZ BALBIAUX



MEXICO, D.F.

2003



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.

... a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo receptivo

JURADO ASIGNADO:

NOMBRE: Nayeli López Balbiaux
FECHA: 4-abril-2003
FIRMA: [Firma]

PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO
1er SUPLENTE
2do SUPLENTE

Prof. Rafael Castillo Bocanegra
Prof. Consuelo García Manrique
Prof. María Alicia Hernández Campos
Prof. Rosa Luz Cornejo Rojas
Prof. Lira Rocha Alfonso Sebastián

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 122, del Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DE TESIS

[Firma]
M. en C. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO

[Firma]
M. en C. Sergio Rodríguez Morales

SUSTENTANTE

[Firma]
Nayeli López Balbiaux

Dedicatorias

A mis padres, por la fuerza con la que siempre han luchado para que salga adelante, por todo el apoyo y confianza brindado en cada etapa de mis estudios. Mil gracias porque esto también forma parte de su logro.

A Itzel, por todos y cada uno de los momentos de reflexión que he pasado a tu lado, porque contigo he aprendido a valorar muchas cosas de las que ya había olvidado.
Te quiero y admiro mucho hermanita.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formar parte de ella, por permitir mi formación desde la preparatoria.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento y beca otorgados a través del proyecto PAPIIT IN 204998.

Al CONACYT por el apoyo brindado al proyecto G-34851-M y por la beca otorgada durante la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros de trabajo de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), en especial a *Rosa Isela del Villar, Oscar Yáñez, Margarita Guzmán, Georgina Duarte, Yeni Islas y Marisela Gutiérrez*, por su colaboración en la realización de los espectros.

A todos mis maestros de la Licenciatura por compartirme sus conocimientos, por sus orientaciones y consejos que me siguen motivando el interés por esta disciplina.

A las familias *Campirano Covarrubias y Zarza González* por todo su cariño y apoyo en todo el trayecto de mi vida. Gracias por recibirme como un miembro más de sus casas, les quiero mucho.

A mis tías *Lola y Guadalupe* por todo el apoyo, cariño y buenos deseos que siempre me han brindado a mí y a mi familia.

A *Fernando* por toda tu paciencia, por estar a mi lado, por todos los momentos de alegría y enojos que hemos vivido juntos. Por darle paz a mi vida. Te quiero mucho chaparro.

A mis grandes amigas: *Nayhely Bautista, Olivia León, Nancy Salgado, Patricia Soto y Yuridia Méndez* por estar siempre a mi lado. Porque de cada una de ustedes he aprendido que la amistad no es un estandarte sino el tesoro máspreciado que se lleva siempre en el alma. Mil gracias las quiero muchísimo. De igual manera a *Diana Zepeda* porque aunque ya no estés cerca de mí, te debo todos los momentos tan agradables que pasamos juntas en la Universidad, por apoyarme siempre, por ser la persona con la que más conviví, por hacerme reír tanto, te quiero y extraño mucho.

A todos mis compañeros del laboratorio 122, por formar parte de un gran grupo, por ser como de mi familia, por compartir tanto. En verdad los aprecio mucho, en especial a *Sergio Rodríguez Morales y Gabriel Navarrete Vázquez* por ser además mis maestros en este laboratorio, mis hermanos mayores consentidos. Gracias por todo su apoyo.

A *Yeni y Eduardo* porque además de ser compañeros, son grandes amigos. Gracias por crecer conmigo y por estar en las buenas y en las malas cerca de mí. Los adoro mucho.

A

A *Margarita, Oscar e Isela* por formar parte de una nueva etapa en mi vida. En especial a *Rosa Isela* porque además de ser mi guía en estos momentos, es una brillante persona y amiga. Gracias por depositar tu confianza en mí, te respeto y admiro mucho *Rosa*.

A mis nuevos compañeros y amigos del Posgrado, en especial a *Lilia Cherigo e Israel Velázquez* por apoyarme en este momento que tanto lo necesito.

Pero especialmente....

Al *Dr. Rafael Castillo Bocanegra* por ser parte de su equipo de trabajo, por hacerme sentir como en una gran familia, por su sencillez y su gran corazón. Por todas sus orientaciones, confianza y consejos para mi desarrollo profesional. Se le aprecia y admira mucho Doc.

A la *M. en C. Ma. Alicia Hernández Campos* porque además de participar como mi asesora en este trabajo, dos renglones no es suficiente para expresar la admiración, respeto y el inmenso cariño que le tengo, tanto como maestra como persona. Mil gracias por toda su paciencia, y por creer en mí. Gracias por enseñarme y por motivar el interés por esta disciplina. Te quiero mucho Jefa.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Panorama actual de las parasitosis en México.....	3
2.2. Evolución de los fármacos antiparasitarios.....	5
2.2.1. Fármacos antihelmínticos.....	5
2.2.2. Fármacos antiprotozoarios.....	8
2.3. Modificaciones estructurales de los bencimidazoles.....	9
2.4. Mecanismos de acción de los bencimidazoles.....	12
2.5. <i>Trichinella spiralis</i> como modelo de helminto.....	14
2.6. <i>Giardia lamblia</i> como modelo de protozoario.....	16
2.7. Métodos de síntesis de 1-metilbencimidazoles.....	17
2.7.1. A partir de bencimidazoles.....	17
2.7.2. A partir de 2-nitroanilinas.....	18
2.8. Métodos de síntesis de carboxamidas.....	21
2.8.1. A partir de halogenuros de acilo.....	21
2.8.2. A partir de ésteres.....	22
2.8.3. A partir de ácidos utilizando un agente acoplante.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	26

6

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
5.1. Secuencia de síntesis para la preparación de las dos carboxamidas bencimidazólicas 1-metiladas.....	28
5.2. Pruebas de Susceptibilidad Biológica.....	30
5.2.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antihelmíntica contra <i>T. spiralis</i>	30
5.2.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiprotozoaria contra <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i>	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Resultados de la Parte Química.....	32
6.2. Resultados de la Parte Biológica.....	58
6.2.1. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	58
6.2.2. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre <i>G. lamblia</i>	59
6.2.3. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre <i>T. vaginalis</i>	60
7. PARTE EXPERIMENTAL	62
7.1. Instrumentación.....	62
7.2. Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales.....	64
8. CONCLUSIONES	85
9. LITERATURA CITADA	87
10. APÉNDICE	92

1. INTRODUCCIÓN.

A pesar de los avances tecnológicos y científicos en materia de salud, las infecciones parasitarias, causadas por helmintos y protozoarios, continúan siendo una de las causas más frecuentes de morbilidad. Estas infecciones aquejan principalmente a la población infantil de nuestro país y de otros países en vías de desarrollo. Aunque la mortalidad ocasionada por estas infecciones es relativamente baja, las complicaciones no son raras y constantemente requieren atención hospitalaria.¹

La frecuencia con que se presentan estas parasitosis varía notablemente en los diversos grupos de la población; pero al igual que otras enfermedades, la prevalencia está determinada por las condiciones sanitarias. Se observa mayor incidencia en poblaciones marginadas, de bajo nivel socioeconómico, con mala disponibilidad de agua y deficiente eliminación de excretas. En términos generales, mala higiene comunal, familiar y personal.² También son más frecuentes en climas tropicales; además, su importancia se ve incrementada, con el crecimiento de los nuevos problemas de salud pública, de los cuales el sida es un ejemplo.³

El impacto significativo de estas infestaciones sobre el desarrollo económico del país se ha manifestado, de manera sobresaliente, en el sector veterinario, con la consecuente pérdida en la producción animal, contribuyendo a la vez con ello, a la introducción de nuevos parásitos en la población humana. Es por esta razón, probablemente, que los avances más importantes en la quimioterapia de las helmintosis ha venido del área veterinaria, ya que se sabe que el tratamiento de las infecciones helmínticas mejora las defensas inmunitarias de los animales y por consecuencia su peso.⁴

Actualmente se dispone de diversas alternativas terapéuticas para combatir estas infecciones. El tratamiento médico con fármacos antiparasitarios, principalmente derivados bencimidazólicos, sigue siendo el método más eficaz y barato para controlar este tipo de infecciones; sin embargo, actualmente se conoce que los fármacos disponibles presentan ciertas desventajas que disminuyen

su eficacia cuando se han administrado por tiempo prolongado en algunas poblaciones, ya sean animales o humana.

Se ha señalado, por ejemplo, que la toxicidad y rápido metabolismo^{5,6} que presenta el Tiabendazol, la baja absorción de los carbamatos bencimidazólicos (CB), que limita su uso a parasitosis gastrointestinales,⁵ los efectos colaterales que presentan los fármacos antiprotozoarios; así como la resistencia⁷ que han desarrollado algunos parásitos por determinados fármacos, son algunos de los problemas que se han observado en este tipo de compuestos; y es por tanto, lo que hace necesario la presencia de nuevos o mejores productos para combatir las infecciones, principalmente sistémicas, como la cisticercosis, filariosis, triquinosis, entre otras enfermedades.⁸

Es por eso que los estudios en el campo de la investigación Química-Farmacéutica están dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios: que ofrezcan un mayor espectro terapéutico, con mejores propiedades intrínsecas de las moléculas; y que a su vez, sean menos tóxicos y más económicos a los ya existentes. Es por tal motivo que esta tesis presenta la síntesis de nuevos compuestos bencimidazólicos 1-metilados y su evaluación biológica, sobre *Trichinella spiralis*, *Giardia lamblia* y *Tricomonas vaginalis*. Con este trabajo se pretende contribuir a la investigación sobre los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria, y con ello, acrecentar una base de datos ya existente para el diseño racionalizado de fármacos antiparasitarios.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Panorama actual de las parasitosis en México

Las parasitosis intestinales constituyen un grupo muy variado de padecimientos causados por diversos, nematodos, cestodos y protozoarios.^{2,9} Se estima que alrededor de 3,500 millones de habitantes en el mundo se ven afectados, 450 millones de los cuales se enferman.³ La prevalencia de estas infecciones, en la República Mexicana, muestra que los helmintos más comunes que se pueden encontrar infectando al hombre son: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Ancylostoma duodenale*. En cuanto a los protozoarios que causan la mayoría de las infecciones están: *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (Tabla 1).¹⁰

Tabla 1. Casos estudiados de parasitosis en 5935 niños en el Hospital Infantil de México.²

Parásito	%
<i>Giardia lamblia</i>	18.7
<i>Ascaris lumbricoides</i>	18.2
<i>Trichuris trichiura</i>	15.1
<i>Ancylostoma duodenale</i>	13.2
<i>Hymenolepis nana</i>	12.3
<i>Entamoeba histolytica</i>	7.2
Uncinarias	1.9

Ascaris lumbricoides, agente etiológico de la ascariosis, es otro parásito, que junto con *Necator americanus* (uncinarias) causan el 40% de infecciones helmínticas a nivel nacional. Su incidencia es un aspecto importante, ya que provocan grandes problemas de desnutrición y anemia. Su distribución, en la República Mexicana, se concentra en los grupos de individuos menores de 15 años, siendo los más afectados los niños de 1 a 4 años de edad.¹⁰

Las infecciones causadas por el helminto *Trichinella spiralis* también han sido reportadas en animales carnívoros (incluyendo roedores) y humanos, debido al consumo de carne de cerdo mal cocida. Aunque no son de gran incidencia con respecto a las demás parasitosis, durante el periodo de 1952 a 1997, se han reportado 758 casos de triquinosis en toda la República Mexicana. Los estados más afectados por este helminto fueron Durango, Zacatecas, Distrito Federal y el Estado de México.¹¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La giardiasis es una de las infecciones con más alta prevalencia distribuida homogéneamente en toda la República Mexicana. Aunque no es una causa de mortalidad importante, su fisiopatología tiene graves implicaciones en las tasas de crecimiento de la población infantil, presentándose desde cuadros de diarreas agudas, e incluso crónicas, hasta síntomas relacionados con la anemia.^{12,13} Se estima que más de 200 casos por cada 100,000 habitantes están infectadas con este parásito.¹⁰

La amebiosis intestinal es una infección producida por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Ésta se aloja en el humano y puede vivir como comensal en el intestino grueso, causando infecciones generalmente asintomáticas que llegan a adquirir importancia clínica.¹³ El estudio epidemiológico para el año 2002 en la República Mexicana, señala 662,752 casos hasta la semana 33, siendo Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Veracruz los estados más afectados por este parásito.¹³

Otra de las infecciones causadas por protozoarios, que resulta de interés para nuestro estudio, es la *Trichomonas vaginalis*, ya que al no ser un protozooario intestinal, su importancia como parásito extraintestinal se ve reflejada causar importantes infecciones urogenitales. La prevalencia de este flagelado en los países desarrollados oscila del 5 al 20%, entre las mujeres, y del 2 al 10% entre los hombres.¹³

En la **Gráfica 1** se muestran las estadísticas sobre la incidencia de algunas parasitosis en nuestro país, en los últimos dos años. Se aprecia una ligera disminución de la tasa de morbilidad para el año 2002; aunque esto es favorable, la incidencia sigue siendo un problema preocupante por el comportamiento de persistencia con el transcurso de los años, a pesar del incremento en medidas higiénicas, sanitarias y tratamientos masivos con fármacos antiparasitarios. En un principio, esta última medida ha sido de gran utilidad en el control de las infecciones parasitarias; sin embargo, a últimas fechas, su uso ha favorecido la persistencia de parásitos resistentes.

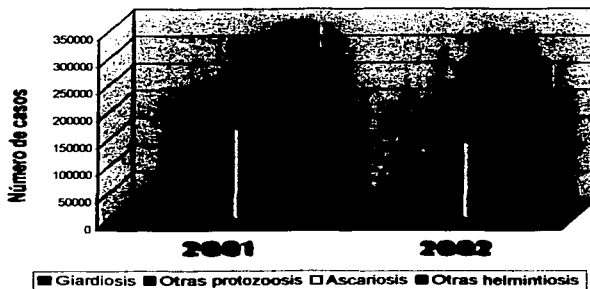


Gráfico 1. Casos de morbilidad por infecciones intestinales en México reportados hasta la semana 26 del 2002.¹⁴

2.2. Evolución de los fármacos antiparasitarios

2.2.1. Fármacos antihelmínticos

Desde hace varios años, la quimioterapia de las infecciones parasitarias ha estado asistida por un gran número de fármacos con diversidad de estructuras químicas. El uso de agentes terapéuticos en el siglo pasado dio origen a numerosos compuestos de diversa naturaleza, como las piperazinas y el tetracloruro de carbono para el tratamiento de las helmintosis, como las salicilanilidas, derivados pirimídicos, nitroimidazoles y derivados bencimidazólicos entre otros (Tabla 2), siendo estos últimos los de mayor uso común actualmente (Figura 1).¹⁵

La trascendencia de los fármacos bencimidazólicos, a lo largo del tiempo, comenzó con el descubrimiento del Tiabendazol.⁵ A pesar de tener un alto índice terapéutico contra nematodos gastrointestinales, estudios posteriores mostraron su poca utilidad ya que éste se metaboliza rápidamente por hidroxilación en la posición 5 del anillo bencimidazólico, lo cual lleva a una inactivación y pronta eliminación.⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Diversas clases de agentes terapéuticos utilizados como antiparasitarios.

Grupo Químico	Fármacos
Salicilanilidas	Closantel, Niclosamida, Diamfenetide
Acridinas	Quinacrina
Bencimidazoles	Albendazol, Tiabendazol, Mebendazol, Levamisol, Flubendazol, Triclabendazol
Pirimidinas	Pamoato de Pirantel, Pamoato de Oxantel
Nitroimidazoles	Metronidazol, Tinidazol, Nimorazol
Avermectinas	Ivermectinas
Otros	Nitazoxanida, Praziquantel, Furazolidona, Diyodohidroxiquinoleína

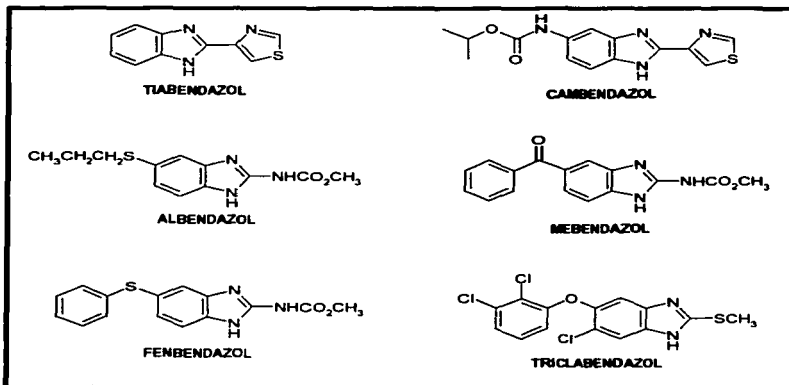


Figura 1. Algunos fármacos bencimidazólicos utilizados en el tratamiento de infecciones helmínticas

Además, estudios posteriores demostraron que la utilidad del Tiabendazol, para enfermedades helmínticas, se vio limitada a la medicina veterinaria, por la alta toxicidad que este compuesto presenta en los humanos.

Con la finalidad de enfrentar la inactivación metabólica, "Merck" desarrolló una serie de tiabendazoles 5-sustituídos, de los cuales el Cambendazol, 2-(4-tiazolil)-5[(isopropilcarbonil)amino]bencimidazol, mostró una mejor actividad antihelmíntica, pero con la limitante de presentar efectos teratogénicos en varios animales.⁵ Esto motivó a otros grupos a la búsqueda de nuevos compuestos antihelmínticos, hasta encontrar posteriormente a los 2-carbamatos bencimidazólicos 5-sustituídos, de los cuales el Albendazol, Mebendazol y Fenbendazol son los más representativos de este grupo (Tabla 3).^{5,16} El uso de estos fármacos para combatir las helmintosis, es, todavía, una buena alternativa terapéutica para la erradicación de parásitos que habitan en el tracto gastrointestinal.

Tabla 3. Características de algunos bencimidazoles de mayor uso en la terapéutica

Fármaco	Ventajas	Desventajas
Tiabendazol (Mintezol) ¹⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Antihelmíntico de amplio espectro. • Alta biodisponibilidad. • Ampliamente usado en el sector veterinario. 	<ul style="list-style-type: none"> • Corto tiempo de vida media. • Mayor frecuencia de efectos secundarios. • Tóxico para el humano.
Mebendazol (Vermox, Vermicol) ¹⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Antihelmíntico antiprotosoario de amplio espectro. • Escasos efectos secundarios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja solubilidad en agua y por lo tanto baja absorción. • Dosis múltiple. • Uso limitado a parasitosis gastrointestinales. • Biodisponibilidad baja.
Albendazol (Zentel, Vermin-plus, Vermilan) ¹⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Antihelmíntico antiprotosoario de amplio espectro. • Escasos efectos secundarios. • Utilizado tanto en parasitosis gastrointestinales como sistémicas. • Dosis única. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja solubilidad en agua y por lo tanto baja absorción. • Biodisponibilidad baja.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Otro compuesto bencimidazólico, ampliamente usado en la medicina veterinaria, es el Triclabendazol. Este antihelmíntico surgió en 1978, y ahora es considerado como el fasciolicida de excelencia, ya que actúa contra los estados maduros e inmaduros de la *Fasciola hepática* (Figura 1).^{18,19}

2.2.2. Fármacos antiprotozoarios

Existen otros fármacos, no bencimidazólicos, que actúan contra diversos protozoarios. A pesar de ser eficaces, resultan ser tóxicos a dosis terapéuticas; tal es el caso del Metronidazol y la Nitazoxanida, los cuales se utilizan actualmente (Figura 2). El surgimiento de estos agentes, para el tratamiento de las protozoosis nació en 1955 con la síntesis de la Azomicina (2-nitroimidazol), el cual mostró actividad contra *Trichomonas vaginalis*.²⁰

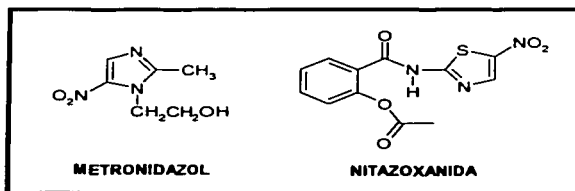


Figura 2. Agentes antiprotozoarios comúnmente empleados en la terapéutica.

Posteriormente, se demostró que el Metronidazol, un derivado nitroimidazólico, también tenía actividad contra el protozoario *Trichomonas vaginalis* en el tratamiento de las infecciones urogenitales. Después se encontró que era efectivo contra protozoarios anaeróbicos patógenos, como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, agentes causales de la amibiosis y la giardiosis respectivamente. Es por este motivo que actualmente se le considera como el fármaco de elección en el tratamiento de la amibiosis, giardiosis y tricomoniasis, así como de algunas infecciones bacterianas.^{21,22}

La Nitazoxanida es otro fármaco con amplio espectro terapéutico, que se utiliza tanto en la amebiasis intestinal aguda, como en el tratamiento de la giardiosis y de la tricomoniasis sintomática; también se ha probado contra el nematodo *Fasciola hepática*; sin embargo, no se usa en la terapéutica de este parásito.²³ Su actividad antiprotozoaria se debe a la reducción de su grupo nitro, lo que le permite introducirse y atacar el ciclo del DNA del parásito, conduciendo finalmente a la destrucción del mismo.^{17,21}

Recientemente se ha demostrado que el Albendazol y el Mebendazol son tan efectivos *in vitro*, como el Metronidazol, contra protozoarios tales como *Giardia lamblia* y *Tricomonas vaginalis*.²⁴⁻²⁶ Estudios *in vitro*, realizados con *Giardia lamblia* en presencia de estos carbamatos bencimidazólicos, mostraron que el Albendazol y Mebendazol son 30 y 50 veces más activos que el Metronidazol, y a su vez se demostró que el Albendazol es 6 veces más efectivo que el Mebendazol, por lo que en la actualidad, este último fármaco se ha reemplazado por el Albendazol en el tratamiento de diversas parasitosis.

La participación de estos fármacos para combatir las enfermedades parasitarias ha sido de gran apoyo, sin embargo pocas innovaciones se han hecho al respecto para incrementar su eficacia; además, nuevos problemas se han presentado debido a la resistencia que determinados parásitos han desarrollado por algunos fármacos.^{7,27} Es por tal motivo que nuevas propuestas las cuales serán descritas en las siguientes secciones, están llevándose a cabo para mejorar las propiedades intrínsecas de las moléculas actuales y de esta forma contribuir a la preparación de nuevos agentes terapéuticos.

2.3. Modificaciones estructurales de los bencimidazoles

Actualmente, no solo se conoce que el núcleo bencimidazólico ejerza actividad antihelmíntica y antiprotozoaria, sino que también se ha visto que esta molécula puede tener propiedades antibacterianas, anticancerígenas, insecticidas y antifúngicas, entre otras actividades. Es por tal motivo que este heterociclo, con amplia funcionalidad, ha despertado el interés a muchos investigadores a enfocarse a su estudio.²⁸

Algunas propiedades de los bencimidazoles ya han sido revisadas ya anteriormente. Se conoce que la solubilidad limitada de éstos afecta con ello la absorción del fármaco una vez que ha sido administrado, tal es el caso de los CB, los cuales muestran escasa solubilidad acuosa que limita su uso a parasitosis intestinales; y poseen altos puntos de fusión.^{5 16}

En este sentido se han realizado una gran cantidad de modificaciones al anillo de bencimidazol principalmente en las posiciones 1, 2, 5 y 6, con la finalidad de encontrar la relación estructural que permita obtener un fármaco con mejor actividad antiparasitaria y amplio espectro de acción. De un gran número de derivados probados, se encontró que la modificación del grupo carbamato de metilo de los CB por un metiltio, tal como se observa en el Triclabendazol, ha permitido mejorar la solubilidad y con ello la absorción de este fármaco (Figura 1).^{18,19} Por otro lado, con la sustitución isostérica del grupo diclorofenoxi de esta molécula por un grupo naitiloxi, se ha logrado obtener a un compuesto denominado ALFA, el cual ahora resulta ser una nueva alternativa para el tratamiento de la *Fasciola hepática* en animales (Figura 3).²⁹

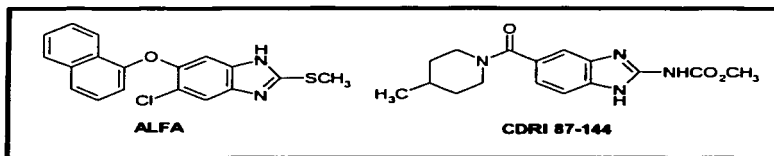
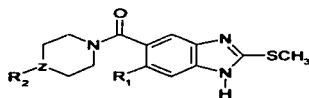


Figura 3. Ejemplos de algunas modificaciones estructurales realizadas al anillo bencimidazólico.

Otras modificaciones han sido realizadas en la posición 5 con la finalidad de evitar el metabolismo en esta posición y para incrementar la respuesta antihelmíntica con parásitos que habitan tanto en el tracto gastrointestinal, como aquellos que tienen diseminación sistémica. De esta forma se encontró que con la introducción de un grupo aminocarbonil en la posición 5 del carbamatos bencimidazólico, se obtenía un compuesto de amplio espectro antihelmíntico *in vitro* llamado CDRI 87-144 (Figura 3).³⁰ Con estos antecedentes se estructuró un proyecto de investigación en nuestro laboratorio, encaminado a la obtención de nuevos derivados bencimidazólicos, que pudieran brindar información

básica sobre los requerimientos estructurales para la acción antihelmíntica y antiprotozoaria. En una parte de este proyecto amplio de investigación se diseñaron y sintetizaron los compuestos que se muestran en la **Tabla 4**. En ellos se aprecia un grupo metilíto en la posición 2 del anillo bencimidazólico y un grupo aminocarbonil en la posición 5(6). El grupo metilíto se consideró por la capacidad de aumentar la liposolubilidad y absorción, como el Triclabendazol, así como la de poder formar el sulfóxido, que en el caso del triclabendazol, es la especie activa. El grupo amino carbonil se consideró por el espectro amplio de actividad mostrado por el compuesto CDRI 87-144. La actividad antihelmíntica *in vitro* contr *T. spiralis* también se muestra en la **Tabla 4**. Los resultados de estos estudios indican que los derivados de piperazina (I y II) y los de piperidina (V y VI) tuvieron una actividad antihelmíntica equiparable a la del Albendazol.³¹

Tabla 4. Actividad antihelmíntica de carboxamidas 2-(metilthio)-1H-bencimidazólicas.



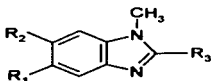
Compuesto	R ₁	R ₂	Z	% de mortalidad				
				0.017	0.033	0.067	0.133	0.267
I	H	H	CH	61	39	28	24	10
II	Cl	H	CH	48	29	19	15	12
III	H	CH ₃	CH	27	20	5	0	0
IV	Cl	CH ₃	CH	35	25	23	18	9
V	H	H	N	45	35	30	17	0
VI	Cl	H	N	40	35	28	21	0
VII	H	CH ₃	N	27	21	19	17	0
VIII	Cl	CH ₃	N	30	6	2	0	0
ABZ*				46	35	27	25	18

ABZ = Albendazol.

La introducción de un grupo metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol también ha sido reportada por nuestro grupo de investigación.^{32,33} El diseño de estos compuestos se basó en la mejora de las propiedades intrínsecas de la molécula, como solubilidad, disminución de la polaridad y además de evitar el efecto tautomérico que sufre el anillo de bencimidazol. Como resultado de estos

estudios se observó actividad antiprotozoaria en algunos casos, con mejor actividad que el Metronidazol, Albendazol y Nitazoxanida (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad antiprotozoaria de 1-metilbencimidazoles sobre *T. vaginalis* y *G. lamblia*.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	DL ₅₀ (µM) <i>T. vaginalis</i>	DL ₅₀ (µM) <i>G. lamblia</i>
IX	Cl	H	CH ₃	3.277	0.044
X	Cl	H	NH ₂	142.760	0.132
XI	Cl	H	SH	0.505	0.020
XII	Cl	H	SCH ₃	1.094	0.122
XIII	Cl	Cl	CH ₃	17.705	0.056
XIV	Cl	Cl	NH ₂	4.883	0.074
XV	Cl	Cl	SH	26.426	0.008
XVI	Cl	Cl	SCH ₃	8.455	0.024
Nitazoxanida				0.110	0.013
Albendazol				1.592	0.037
Metronidazol				0.216	1.228

2.4. Mecanismos de acción de los bencimidazoles

Para explicar el modo de acción de los bencimidazoles se han llevado a cabo extensos estudios. Se ha encontrado para que estos compuestos ejercen la actividad antihelmíntica es a través del enlace directo de la molécula de bencimidazol con la tubulina de los parásitos, una proteína que forma parte del citoesqueleto de estos organismos. Se ha visto que esta unión altera la formación de los microtúbulos citoplasmáticos de los helmintos, incluso la inhibición de la polimerización de la tubulina, ocasionando con ello la pérdida de las funciones celulares, la disminución de los niveles energéticos y finalmente la inmovilización y muerte posterior del parásito.³⁴⁻³⁶ Se ha sugerido que para que la molécula del carbamato bencimidazólico ejerza su efecto sobre la tubulina, éste debe tener un hidrógeno en la posición 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los 1*H*-bencimidazoles existen como mezcla de dos compuestos debido al equilibrio tautomérico que presenta este heterociclo. Este fenómeno, que se explica por la migración del hidrógeno 1 a la posición 3 afecta las posiciones 5 y 6 de la molécula (Figura 4);⁴ sin embargo estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado la actividad antihelmíntica y particularmente antiprotozoaria de compuestos 1-metilbencimidazólicos, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente al de los carbamatos bencimidazólicos (CB).³³



Figura 4. Tautomería que sufre el anillo bencimidazólico

Existen otros postulados que ponen de manifiesto el mecanismo de acción de estos compuestos, algunos incluyen la inhibición de la enzima fumarato reductasa la cual se encuentra involucrada en el metabolismo de la glucosa, el bloqueo irreversible de la captación de este mismo monosacárido, así como la inhibición del metabolismo de lípidos de estos parásitos.³⁷ Sin embargo, algunas hipótesis revelan que estos transformos bioquímicos podrían ser consecuencia de la interacción de algunos compuestos bencimidazólicos con la tubulina (Figura 5), por lo que faltaría por establecer, de manera precisa, el mecanismo dependiente de estos efectos bioquímicos y fisiológicos con esta proteína.¹⁶

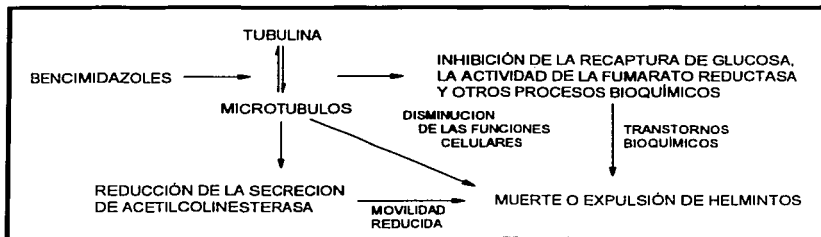


Figura 5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

2.5. *Trichinella spiralis* como modelo de helminto

Trichinella spiralis es el agente etiológico de la trichinelosis, una enfermedad zoonótica y tisular, que se presenta como resultado de la ingestión de carne cruda, o mal cocida, infectada con larvas enquistadas.³⁸ La importancia de este nematodo como modelo de helminto, para el estudio de la evaluación biológica de compuestos con potencial antiparasitario, radica en las características biológicas poco comunes que este organismo presenta sobre otros. Las ventajas principales provienen del ciclo de vida del parásito, ya que un solo huésped cubre las funciones de huésped definitivo e intermediario, permitiendo con ello que no se presenten estadios de vida libre, facilitando la localización de las larvas en diferentes regiones del huésped.²

La **Figura 6** ilustra el ciclo de vida de este parásito, en el cual se muestra que la infección comienza con el huésped definitivo que ingiere carne con larvas enquistadas, las cuales se liberan en el intestino delgado y penetran a la mucosa intestinal donde se realizan los procesos de desarrollo, maduración, y copulación en un periodo no mayor de 48 horas. Tras la liberación de la nueva generación de larvas, en menos de siete días, éstas pasan al torrente sanguíneo, sistema linfático diseminándose en el cuerpo. Posteriormente, las larvas se ubican en los músculos estriados de mayor actividad, adoptando una forma espiral que está en continuo movimiento dentro de la célula muscular. Hacia la tercera semana estas larvas empiezan el cuarto estadio de desarrollo, donde se convierten en quistes y resultan potencialmente infectantes para otro huésped.^{2,39}

Debido a su gran capacidad metabólica y a que su ciclo de vida puede ser mantenido en animales de laboratorio en un tiempo relativamente corto, es de interés particular el estudio de este helminto como modelo para evaluaciones biológicas; además, las fases de desarrollo del parásito se pueden obtener fácilmente, lo que permite evaluar la susceptibilidad del parásito a compuestos recién sintetizados, tanto a nivel enteral, como parenteral.⁴⁰

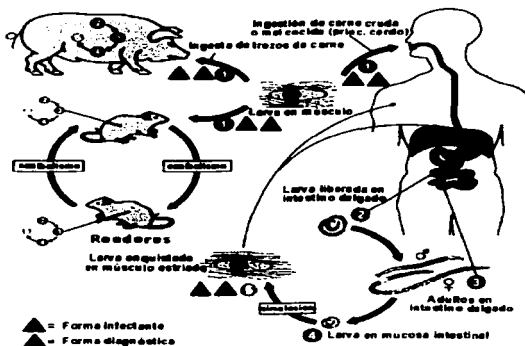


Figura 6. Ciclo de vida de *T. spiralis*

Para la determinación del efecto antihelmíntico sobre este parásito se emplea comúnmente el método colorimétrico de MTT. En esta técnica se calcula el porcentaje de reducción de la capacidad metabólica, tanto de la larva muscular (fase sistémica), como de la larva adulta (fase intestinal), del parásito. Este método, el cual se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán por deshidrogenasas de células viables, es fácilmente cuantificado por espectrofotometría; además con el objetivo de disminuir tiempos de incubación, se utiliza el acarreador metasulfato de fenazina (PMS) como catalizador de la reacción (Figura 7).⁴¹

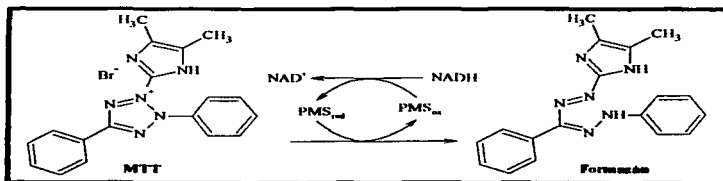


Figura 7. Reacción de la reducción celular del MTT catalizada por PMS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6. *Giardia lamblia* como modelo de potozoario

Giardia lamblia es el parásito flagelado más común que causa la mayoría de las infecciones por protozoarios.⁴² Al ser uno de los organismos de mayor incidencia patogénica intestinal en el mundo, representa una buena alternativa como modelo de estudio para la evaluación biológica de compuestos con potencial antiprotozoario. La detección del parásito por microscopía electrónica de barrido ha sido una herramienta útil para saber que éste puede existir en la forma de trofozoito o como quiste, siendo este último la forma infectante para un hospedero.¹² Una de las estructuras más importantes del trofozoito es el disco adhesivo, que se encuentra en la superficie ventral, con el que se adhiere a la mucosa del intestino delgado.² Además, se ha visto que su estructura en general está constituida por un prominente citoesqueleto formado principalmente por tubulina. Actualmente se ha evaluado la eficacia que muestra el Albendazol con este parásito, y se ha encontrado que a bajas concentraciones se altera el citoesqueleto y desaparece el disco adhesivo, alterando por lo tanto la formación de los microtúbulos.²¹

Alternativamente a este estudio microscópico se utiliza la técnica de subcultivos para evaluar el efecto de compuestos recién sintetizados sobre este parásito, donde se emplea como patrón de referencia al Metronidazol, por ser el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis. La información proporcionada por este método, y mediante análisis Probit, es la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) la cual es referida a la concentración en la que la mitad de la población de un sistema en estudio pierde viabilidad.⁴³

Estas razones muestran que la disponibilidad de las técnicas para evaluar alteraciones estructurales así como viabilidad del organismo y el tiempo relativamente corto de incubación para realizar subcultivos en un estudio *in vitro*, proporcionan una ventaja más para evaluar la actividad y la eficacia que podrían mostrar nuevos agentes antiparasitarios.

2.7. Métodos de síntesis de 1-metilbencimidazoles

Para la preparación de 1-metilbencimidazoles se han establecido varias secuencias de síntesis las cuales dependen de la naturaleza y diversidad de los grupos sustituyentes presentes en el anillo bencimidazólico, de esta forma encontramos que se pueden sintetizar a partir del bencimidazol mismo y de 2-nitroanilinas como se muestra a continuación.

2.7.1. A partir de bencimidazoles

1

La síntesis de *N*-metilbencimidazoles se puede lograr cuando una vez obtenido el anillo bencimidazólico sustituido. Éste se hace reaccionar con yoduro de metilo en medio básico generando a una mezcla de isómeros en relación 1:1 (Figura 8).⁴⁴

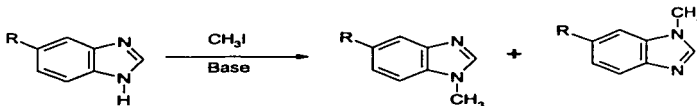


Figura 8. Metilación de bencimidazoles 5(6)-sustituídos

La mezcla de isómeros sólo se obtiene cuando los sustituyentes en 5 y 6 son diferentes; de lo contrario, cuando la molécula de bencimidazol es simétrica, la metilación directa lleva a la formación de un solo derivado.

2

La *N*-metilación directa del anillo bencimidazólico utilizando acetales dimetilados de dimetilformamida bajo condiciones anhidras, representa otra alternativa cuando la molécula de bencimidazol es simétrica (Figura 9).⁴⁵

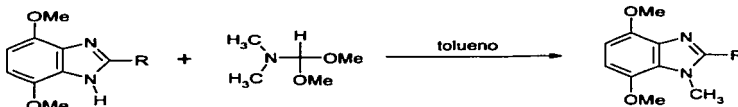


Figura 9. Metilación de bencimidazoles con acetales dimetilados

Esta técnica puede resultar con gran ventaja, ya que se alcanzan mayores rendimientos que cuando se usa sulfato de dimetilo o yoduro de metilo en medio básico; además la preparación del acetal se realiza sin dificultad o incluso están comercialmente disponibles.

3

La reacción de metilación vía aminación reductiva, usando paraformaldehído y cianoborohidruro de sodio en ácido acético, es otra alternativa atractiva para la formación de 1-metilbencimidazoles con rendimientos aceptables (Figura 10).⁴⁶

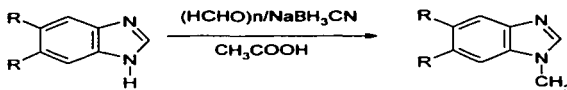


Figura 10. Metilación de bencimidazoles vía aminación reductiva

2.7.2. A partir de 2-nitroanilinas

Otros métodos constituyen la preparación de precursores adecuadamente sustituidos para posteriormente ser ciclocondensados y formar el anillo de bencimidazol. Tal es el caso de las *N*-metil-*o*-fenilendiaminas, cuyo precursor inmediato son las *N*-metil-2-nitroanilinas. Los métodos de preparación más representativos se describen a continuación.

1

La metilación de las 2-nitroanilinas con sulfato de dimetilo en medio básico, sin catalizador de transferencia de fases, es una de las reacciones más usadas que da buenos rendimientos (Figura 11).⁴⁷

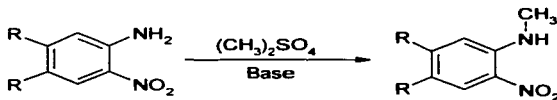


Figura 11. Metilación directa de 2-Nitroanilinas

2

Una variante a la técnica anterior es la metilación de las acetanilidas, seguidas de nitración, usando catalizador de transferencia de fases y sulfato de dimetilo en medio básico (Figura 12).⁴⁸

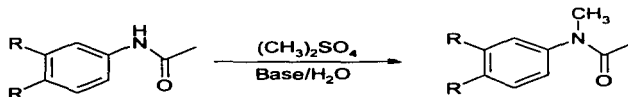


Figura 12. Metilación usando catalizador de transferencia de fases

La versatilidad de esta reacción depende tanto de los sustituyentes presentes así como del manejo de la técnica, ya que cuando aún se tengan las cantidades adecuadas de los reactivos, la adición de la base y del reactivo son un punto crítico para que la reacción se lleve a cabo fácilmente. Otra consideración importante es la selección correcta del disolvente.

3

Otro método lo conforma la *N*-metilación del 2-cloronitrobenzoceno sustituido mediante la sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) con metilamina. Aunque es un método clásico, no es una reacción que de buenos rendimientos, ya que generalmente se obtienen productos secundarios, difíciles de separar, además su preparación requiere tiempos reacción prolongados (Figura 13).⁴⁹

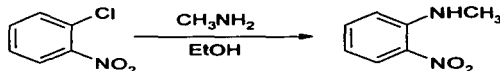


Figura 13. Metilación por sustitución nucleofílica aromática

4

Un método más reciente y selectivo reportado por Katritzki y cols.(1994) es la reacción de benzotriazolimetilación,⁴⁴ donde utiliza como sustrato a una nitroanilina sustituida con un grupo electrodonador en la posición 4 y como reactivos al benzotriazol y formaldehído para la formación de un intermediario clave XVIII, que posteriormente por medio de una secuencia de reacciones como se muestra en la Figura 14 da como resultado el bencimidazol *N*-metilado.

El rendimiento global reportado para esta ruta de síntesis es de 62%, realizada en una serie de cuatro pasos.

Una modificación a esta secuencia de síntesis consiste en hacer inicialmente una secuencia de reacciones, como la bencensulfonación del grupo amino con cloruro de bencensulfonilo y la reducción del grupo nitro con cloruro estanoso para generar a la amina **XXIV**, que inmediatamente reacciona con el benzotriazol y formaldehído para dar el intermediario ya ciclado (**XXV**), que finalmente se reduce con borohidruro de sodio para dar al 6-metoxi-1-metilbencimidazol (**XXVI**). El rendimiento global para esta ruta es del 50% en cuatro pasos.

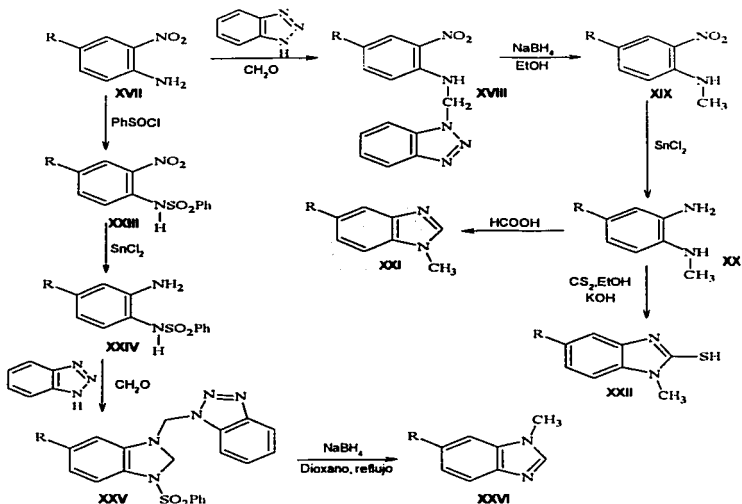


Figura 14. Secuencia reportada por Katritzki y cols. para la preparación de 1-metilbencimidazoles.

2.8. Métodos de síntesis de carboxamidas

Las amidas son compuestos cuya representación estructural se denota por $-\text{CONR}_2$, siendo éste el grupo funcional clave en la estructura de las proteínas. La importancia de estos compuestos no sólo se ve reflejada en la síntesis de péptidos, sino también en la preparación de muchos compuestos de interés farmacéutico y productos naturales.⁵⁰ Las carboxamidas, que es el término involucrado para referirnos a este trabajo, es utilizado como sufijo en la formación de la nomenclatura sistemática para denotar el grupo $-\text{CONH}_2$.

La elaboración de estos compuestos resulta un poco difícil cuando directamente se hace reaccionar ácidos carboxílicos y aminas, debido a que la reacción ácido-base entre ellos da como resultado la formación de la sal.⁵¹ Entre los procedimientos reportados para la preparación de carboxamidas se han adoptado las condensaciones entre ácidos carboxílicos y aminas, vía la activación del ácido. Estas reacciones involucran el aislamiento o formación *in situ* de derivados de ácidos reactivos, por ejemplo halogenuros de ácido, anhídridos, amidas activadas y ésteres activados.⁵²

2.8.1. A partir de halogenuros de acilo

El método más común consiste en la reacción de halogenuros de acilo con amoníaco o aminas. Su preparación involucra el empleo de dos equivalentes de la amina, o alguna otra base, como piridina, o NaOH para captar el ácido producido en la reacción (reacción de Schotten-Bauman). En general, la reacción entre el cloruro de acilo y la amina tiene lugar a temperatura ambiente y produce un buen rendimiento (Figura 15).⁵³

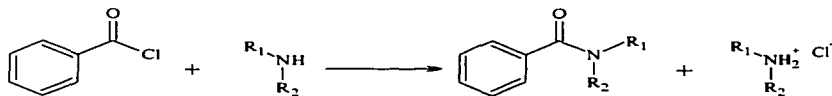


Figura 15. Formación de carboxamidas a partir de halogenuros de ácido

2.8.2. A partir de ésteres

Los ésteres sufren sustitución nucleofílica en sus carbonos acílicos cuando se les trata con amoníaco o con aminas primarias y secundarias. Estas reacciones ocurren con más lentitud que las de que las de los cloruros y anhídridos de acilo, por lo que generalmente no se utiliza (Figura 16).⁵²

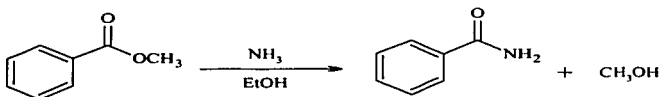


Figura 16. Formación de carboxamidas a partir de ésteres

2.8.3. A partir de ácidos utilizando un agente acoplante

Un método excelente para la preparación de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos utiliza *N,N'*-diciohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo activante. Los rendimientos son generalmente elevados y las condiciones sumamente suaves como para permitir la utilización de este reactivo muy costoso en muchas síntesis de péptidos complejos (Figura 17).^{52,53}

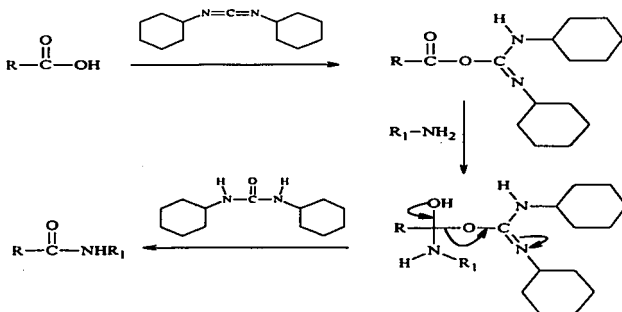


Figura 17. Formación de carboxamidas utilizando el agente acoplante DCC

Otro método de preparación de carboxamidas, utilizando un agente acoplante, consiste en la reacción de ácidos carboxílicos con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). Se forma un intermediario llamado imidazólido, al cual posteriormente se le adiciona la amina para finalmente obtener la amida correspondiente. Este método reporta buenos rendimientos y es relativamente fácil (Figura 18).⁵⁴

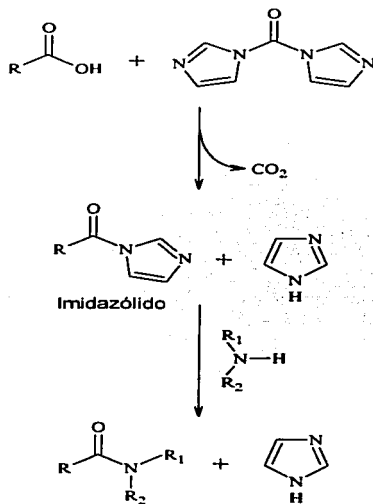


Figura 18. Formación de carboxamidas utilizando CDI.

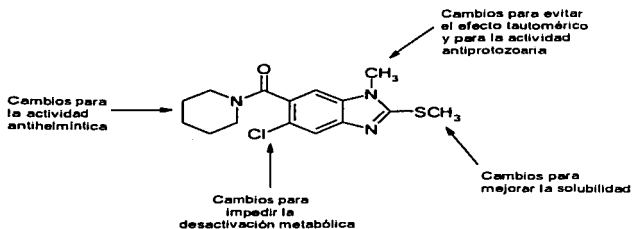
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien es cierto que existen actualmente fármacos disponibles, principalmente derivados bencimidazólicos, para combatir diversas enfermedades causadas por helmintos y protozoarios en nuestro país, desafortunadamente los estudios relacionados con las propiedades biofarmacéuticas de estos fármacos han revelado que presentan ciertas desventajas; tal es el caso de los problemas de solubilidad de los 2-carbamatos bencimidazólicos y el rápido metabolismo que presenta el Tiabendazol.

Basándose en esto, y en las modificaciones estructurales que se han llevado a cabo en el anillo de bencimidazol, hoy se conoce por nuestro grupo de investigación, que los compuestos 1*H*-bencimidazoles han mostrado actividad contra el helminto *T. spiralis*; sin embargo, aunado a esto, también se sabe que estos compuestos pueden existir como mezcla de tautómeros. Por consiguiente, es importante contar con estructuras bien definidas como los 1-metilbencimidazoles, para saber si es necesario el hidrógeno para la actividad biológica, y si no es así, conocer también cuál de los dos isómeros es responsable de la actividad antihelmíntica.

Por otro lado, a lo que concierne con la actividad antiprotozoaria, se conoce que los derivados 1-metilbencimidazoles, sintetizados por nuestro grupo de investigación, han mostrado tener importante actividad antiprotozoaria, por lo que habría de hacerse las siguientes preguntas ¿los nuevos compuestos 1-metilados a sintetizar en este trabajo presentarán actividad contra los protozoarios *G. lamblia* y *T. vaginalis*?, ¿existe la posibilidad de que la introducción del grupo metilo en la posición 1, así como el patrón de sustitución en las posiciones 2,5 y 6 del anillo bencimidazólico mejore la actividad a los compuestos ya reportados?. Es por este motivo que se pretende evaluar la síntesis de dos nuevos compuestos considerando las siguientes variables:

Planteamiento del Problema



1. La introducción de un grupo voluminoso tipo carboxamida (piperidina o metilpiperidina) en la posición 6 tomando en consideración la actividad antihelmíntica presentada por el CDRI 87-144 (Figura 3).
2. Un grupo metilto en la posición 2, para mejorar las características de solubilidad y por tanto la absorción del fármaco basándonos en el diseño del Triclabendazol (Figura 1).
3. Un átomo de cloro en la posición 5 para definir los requerimientos estereoelectrónicos e impedir la desactivación metabólica.
4. La introducción de un grupo metilo en la posición 1, con la finalidad de evitar el efecto tautomérico que sufre la molécula del bencimidazol, además de incrementar la solubilidad y de conocer su importancia con respecto a sus análogos 1*H*-bencimidazoles que han mostrado actividad antihelmíntica (Tabla 4). Además, para conocer su importancia antiprotozoaria con respecto a otros 1-metilbencimidazoles ya reportados por nuestro grupo de investigación.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis

Siendo los compuestos 1*H*-bencimidazoles (**Tabla 4**) la base del diseño para la síntesis de las dos nuevas carboxamidas 1-metilbencimidazólicas en este trabajo, y que además los derivados 1-metilbencimidazólicos han presentado actividad antiprotozoaria (**Tabla 5**):

- a) Es posible que mediante una secuencia de síntesis que nos lleve a la preparación de estas carboxamidas bencimidazólicas, estructuralmente diferentes en la posición 1 de los 1*H*-bencimidazoles, se pueda tener compuestos con estructuras definidas, que permitan mostrar una buena actividad antihelmíntica sobre el parásito *T. spiralis*, preferentemente un isómero sobre otro.
- b) Se espera que con la introducción del grupo metilo en la posición 1 se logre, mediante la técnica de subcultivos, una buena actividad antiprotozoaria preferentemente un isómero sobre otro.

4.2. Objetivos

Los objetivos que se pretenden alcanzar en este trabajo de tesis son los siguientes:

- ✓ Realizar la síntesis del 5-cloro-1-metil-2-(metiltio)-6-[(1-piperidinil)carbonil]-1*H*-bencimidazol (**13**) y 5-cloro-1-metil-6-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**15**) a partir del ácido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**11**).
- ✓ Purificar y caracterizar los intermediarios y productos finales mediante el empleo de las diferentes técnicas de separación y purificación convencionales, así como las técnicas espectroscópicas y espectrométricas, con la finalidad de comprobar su estructura química.

Objetivos e hipótesis

- ✓ Evaluar la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria, utilizando como modelo de helminto a *Trichinella spiralis* y como modelo de protozoarios a *Giardia lamblia* y *Tricomonas vaginalis*.
- ✓ Analizar y comparar los resultados de la actividad antiparasitaria con sus análogos 1*H*-bencimidazoles y otros bencimidazoles 1-metilados reportados por nuestro grupo de investigación.
- ✓ Adquirir experiencia en la preparación de compuestos de interés biológico.

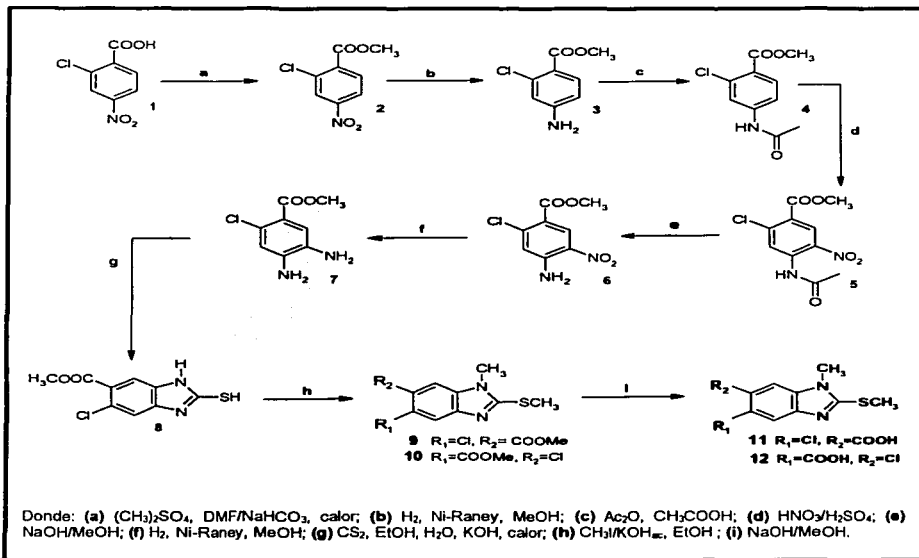
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para una mejor comprensión de las actividades llevadas a cabo, esta sección se dividió en dos partes donde primero se comprende la secuencia de síntesis que nos llevó a la preparación de los compuestos de interés, así como una breve descripción de la misma. En la segunda parte, se presentan la descripción de los ensayos preliminares de la actividad biológica a la que fueron sometidos los compuestos sintetizados. Las metodologías involucradas para la preparación de cada uno de los intermediarios y productos finales, así como la comprobación estructural realizada por métodos espectroscópicos y espectrométricos, se presentan en otra sección.

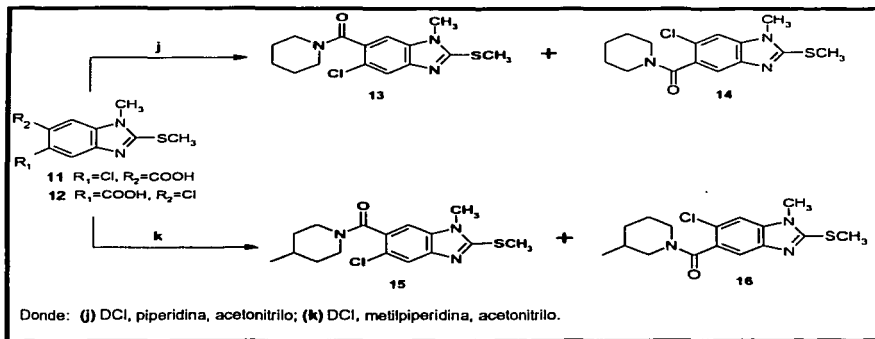
5.1 Secuencia de síntesis para la preparación de las dos carboxamidas bencimidazólicas 1-metiladas

Con la finalidad de obtener las carboxamidas **13** y **15** fue necesario preparar el Ácido 5-cloro-1-metil-2-metiló-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**11**), **Esquema 1**. Para lo cual inicialmente se partió del Ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**), el cual inicialmente se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el producto **2**, que posteriormente por medio de una reducción catalítica del grupo nitro, se obtuvo al 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**). Este compuesto se acetiló inmediatamente con Ac_2O y se nitró con mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas (0-5 °C) para dar el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). La posterior hidrólisis selectiva del grupo acetamido, y la reducción del grupo nitro por medio de una hidrogenación catalítica a temperatura ambiente, generó a la *o*-fenilendiamina (**7**), que inmediatamente se ciclocondensó con disulfuro de carbono en medio básico para dar el anillo de bencimidazol sustituido (**8**). El tratamiento posterior de este compuesto con yoduro de metilo en medio básico originó la metilación tanto del nitrógeno como del azufre del anillo bencimidazólico, obteniéndose la mezcla de isómeros (**9**, **10**) debido al efecto tautomérico que presenta el anillo de 1*H*-bencimidazol. Posteriormente, la mezcla isomérica como tal, se sometió a la hidrólisis básica del éster para dar la mezcla de ácidos bencimidazólicos (**11**, **12**). Finalmente, mediante el empleo del 1,1-carbonildiimidazol y las aminas correspondientes, ya sea

piperidina o 4-metilpiperidina se obtuvieron los productos finales (**13**, **14**, **15**, **16**) como mezcla de isómeros los cuales fueron separados por cromatografía en columna flash (**Esquema 2**).



Esquema 1. Secuencia de síntesis para la preparación del ácido Acido 5-cloro-1-metil-2-metilthio-1H-benzimidazol-6-carboxílico (**11**).



Esquema 2. Secuencia para la preparación de las carboxamidas bencimidazólicas 1-metiladas (13 y 15)

5.2. Pruebas de Susceptibilidad

5.2.1. Evaluación *in vitro* de la actividad antihelmíntica contra *T. spiralis*

La metodología seguida en el ensayo preliminar contra el parásito *T. spiralis* se basó en la exposición de las larvas a 5 concentraciones crecientes (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$) de los compuestos sintetizados, usando como control positivo al Albendazol a las mismas concentraciones y como control negativo a las larvas musculares con el disolvente utilizado. Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito por Denis y cols.⁵⁵ Posteriormente, éstas fueron incubadas en el medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero de bovino, por tres días a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5%, con cambio diario del medio de cultivo y el compuesto. Después de la incubación, la determinación de la viabilidad de los parásitos se realizó mediante un método colorimétrico reportado por Townson y cols. con algunas modificaciones.^{56, 41} El cálculo del porcentaje de reducción de la viabilidad fue finalmente determinado comparándolo a través del control negativo.

5.2.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia* y *T. vaginalis*

El ensayo biológico para la determinación de la actividad antiprotozoaria se llevó a cabo por el método descrito por Cedillo-Rivera y Muñoz,^{55,43} el cual se basó en la incubación de 4×10^4 trofozoitos/mL de *G. lamblia* y 4×10^4 trofozoitos/mL de *T. vaginalis* a 37 °C por 48 horas, con concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500 ng/mL de los diferentes compuestos de prueba, además del Albendazol, Nitazoxanida y Albendazol a las mismas concentraciones como controles positivos. Como control negativo se emplearon trofozoitos en medio libre de fármacos. Después de la incubación, los trofozoitos fueron lavados y subcultivados en medio fresco por otras 48 horas más. Al final de este periodo, los trofozoitos se contaron para posteriormente realizar el cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento con respecto al control. Finalmente la dosis letal 50 (DL₅₀) se determinó por análisis Probit.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Resultados de la parte Química

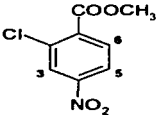
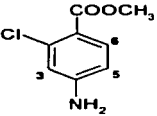
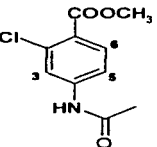
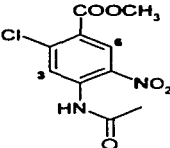
Los intermediarios y los productos finales sintetizados en este trabajo, así como rendimientos se muestran en las **Tablas 6 y 7**, donde también se resume la caracterización realizada para cada uno de éstos, mediante las propiedades físicas más importantes, y elucidación estructural por medio de las técnicas espectroscópicas de IR, RMN ^1H y espectrometría de masas.

Tabla 6. Constantes físicas de los compuestos sintetizados

Compuesto	Rendimiento Crudo (%)	Disolvente de Recristalización	Rendimiento Recristalizado (%)	pf (°C)	R _f (sistema)
2	98.11	Etanol	95.32	76-77	0.24 (I)
3	99.13	Agua	94.56	107-108	0.43 (I)
4	89.10	Tolueno	86.70	113-114	0.23 (I)
5	90.92	Acetato de etilo	83.49	140-141	0.65 (I)
6	96.69	Etanol	90.10	222.5-223	0.67 (I)
7	97.33	—	—	—	0.17 (I)
8	99.22	Etanol-DMF	88.21	253.5-254.2	0.26 (I)
9	34.00*	Etanol	89.40	124-124.5	0.32 (III)
11	91.74*	Etanol	87.14	252.5-254.4	0.44 (I)
13	25.00*	AcCN-MeOH	93.27	207.7-208.1	0.53 (I)
15	18.00*	AcCN-MeOH	—	157.5-158.9	0.55 (I)

*Obtenidos por cromatografía en columna flash.

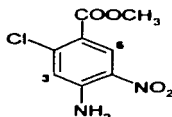
Tabla 7. Elucidación estructural de los compuestos sintetizados

COMPUESTO	SEÑALES
<p>2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)</p> 	<p>Espectro 1, IR (KBr) cm^{-1}: 3099 (C-H aromático); 2965 (CH_3 de éster); 1720 (C=O de éster); 1528 y 1356 (NO_2); 1297 (C-O de éster).</p> <p>Espectro 2, EM (IE/D) m/z: M^+ 215 (32%); $M+2$ 10%; 184 (100%).</p> <p>Espectro 3, RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 3.99 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6); 8.16 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, H-5); 8.32 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-3).</p>
<p>4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)</p> 	<p>Espectro 4, IR (KBr) cm^{-1}: 3426 y 3336 (NH_2); 3221 (C-H aromático); 2951 (CH_3 de éster); 1703 (C=O de éster); 1248 (C-O de éster).</p> <p>Espectro 5, EM (IE/D) m/z: M^+ 185 (45%); $M+2$ 15%; 154 (100%).</p> <p>Espectro 6, RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$) ppm: 3.71 (s, 3H, CH_3 de éster); 6.17 (sa, 2H, int. con D_2O, NH_2); 6.49 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, H-5); 6.61 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3); 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6).</p>
<p>4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)</p> 	<p>Espectro 7, IR (KBr) cm^{-1}: 3260 ($-\text{NH}-$); 3089 (C-H aromático); 2951 (CH_3 de éster); 1730 (C=O de éster); 1677 (C=O de amida); 1249 (C-O de éster).</p> <p>Espectro 8, EM (IE/D) m/z: M^+ 227 (44%); $M+2$ 15%; 154 (100%).</p> <p>Espectro 9, RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 2.07 (s, 3H, CH_3 de amida); 3.80 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.53 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, 1H, H-5); 7.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6); 7.89 (sd, 1H, H-3); 10.38 (sa, 1H, int. con D_2O, $-\text{NH}-$).</p>
<p>4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)</p> 	<p>Espectro 10, IR (KBr) cm^{-1}: 3342 (NH de amida); 3124 (C-H aromático); 2953 (CH_3 de éster); 1732 (C=O de éster); 1716 (C=O de amida); 1529 y 1336 (NO_2); 1230 (C-O de éster).</p> <p>Espectro 11, EM (IE/D) m/z: M^+ 272 (15%); $M+2$ 5%; 230 (100%).</p> <p>Espectro 12, RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 2.13 (s, 3H, CH_3 de acetamida); 3.86 (s, 3H, CH_3 de éster); 8.02 (s, 1H, H-3); 8.42 (s, 1H, H-6); 10.53 (s, 1H, int. con D_2O, N-H de acetamida).</p>

COMPUESTO

SEÑALES

4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)

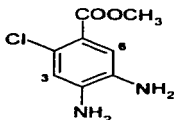


Espectro 13, IR (KBr) cm^{-1} : 3451 y 3341 (NH_2); 3120 (C-H aromático); 2952 (CH_3 de éster); 1714 (C=O de éster); 1549 y 1326 (NO_2); 1286 (C-O de éster).

Espectro 14, EM (IE/CG) m/z : M^+ 230 (62%); $\text{M}+2$ 21%; 199 (100%).

Espectro 15, RMN ^1H (TMS, acetona- d_6) ppm: 3.85 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.21 (s, 1H, H-3); 7.58 (sa, 2H, int. con D_2O , NH_2); 8.70 (s, 1H, H-6).

4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (7)

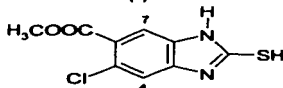


Espectro 16, IR (KBr) cm^{-1} : 3403 y 3325 (NH_2); 3081 (C-H aromático); 2952 (CH_3 de éster); 1712 (C=O de éster); 1209 (C-O de éster).

Espectro 17, EM (IE/CG) m/z : M^+ 200 (100%); $\text{M}+2$ 34%.

Espectro 18, RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) ppm: 3.70 (s, 3H, CH_3 de éster); 4.84 (sa, 2H, int. con D_2O , NH_2); 5.48 (sa, 2H, int. con D_2O , NH_2); 6.53 (s, 1H, H-3); 7.10 (s, 1H, H-6).

5-Cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (8)

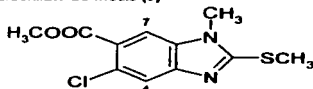


Espectro 19, IR (KBr) cm^{-1} : 3268 (N-H), 3116 y 3038 (C-H aromático); 2908 (CH_3 de éster); 2784 (SH); 1710 (C=O de éster); 1252 (C-O de éster).

Espectro 20, EM (IE/AD) m/z : M^+ 242 (100%); $\text{M}+2$ 38%.

Espectro 21, RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) ppm: 3.82 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.22 (s, 1H, H-4); 7.52 (s, 1H, H-7); 12.91 (s, 2H, N-H).

5-Cloro-1-metil-2-(metilto)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (9)



Espectro 22, IR (KBr) cm^{-1} : 3017 (C-H aromático); 2942 (CH_3 de éster); 1726 (C=O de éster); 1230 (C-O de éster).

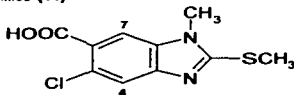
Espectro 23, EM (IE/CG) m/z : M^+ 270 (100%); $\text{M}+2$ 39%.

Espectro 24, RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 2.85 (s, 3H, SCH_3); 3.69 (s, 3H, NCH_3); 3.95 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.73 (s, 1H, H-4); 7.77 (s, 1H, H-7).

COMPUESTO

SEÑALES

Ácido 5-cloro-1-metil-2-metilio-1*H*-bencimidazol-6-carboxílico (**11**)

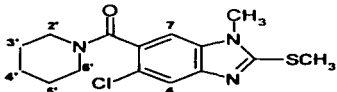


Espectro 25, IR (KBr) cm^{-1} : 2935 (OH de ácido); 1726 (C=O de éster); 1189 cm^{-1} (C-O de éster).

Espectro 26, EM (IEAD) m/z : M^+ 256 (100%); $M+2$ 42%.

Espectro 27, RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 2.70 (s, 3H, SCH₃); 3.69 (s, 3H, NCH₃); 7.64 (s, 1H, H-4); 7.96 (s, 1H, H-7); 13.12 (sa, 1H, int. con D₂O, O-H de ácido).

5-Cloro-1-metil-2-metilio-6-[[1-piperidinil]carbonil]-1*H*-bencimidazol (**13**)

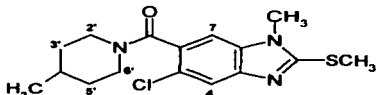


Espectro 28, IR (KBr) cm^{-1} : 3035 (C-H aromático); 2934 y 2852 (C-H alifático); 1625 (C=O de amida).

Espectro 29, EM (IEAD) m/z : M^+ 323 (40%); $M+2$ 15%, 239 (100%).

Espectro 30, RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 1.40-1.43 (m, 2H, H-4'); 1.56-1.62 (m, 4H, H-3', H-5'); 2.71 (s, 3H, S-CH₃); 3.03-3.09 (m, 2H, H-2' o H-6'); 3.53-3.58 (m, 1H, H-2' o H-6'); 3.66 (s, 4H, N-CH₃, H-2' o H-6'); 7.53 (s, 1H, H-4); 7.64 (s, 1H, H-7)

5-Cloro-1-metil-6-[[4-metilpiperidinil]carbonil]-2-metilio-1*H*-bencimidazol (**15**)



Espectro 31, IR (KBr) cm^{-1} : 2924 y 2856 (NCH₃ y SCH₃); 1614 (C=O de amida); 1467 y 1421 (C=N).

Espectro 32, EM (IECG) m/z : M^+ 337 (92%); $M+2$ 35%, 239 (100%).

Espectro 33, RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 0.89 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH₃ en 4'); 0.94-1.14 (m, 2H, H-3' o H-5'); 1.43-1.72 (m, 3H, H-4', H-3' o H-5'); 2.71 (s, 4H, S-CH₃, H-2' o H-6'); 2.87-3.01 (m, 1H, H-2' o H-6'); 3.17-3.25 (m, 1H, H-2' o H-6'); 3.66 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, N-CH₃); 4.50 (sd, 1H, H-2' o H-6'); 7.49 y 7.55 (s, 1H, H-4); 7.63 y 7.64 (s, 1H, H-7).

Pa esterificar el ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**) se optó por emplear sulfato de dimetilo en medio básico, en vez de metanol y ácido inorgánico, usados en la esterificación de Fisher, ya que cuando el ácido es aromático, la reacción es lenta, emplea grandes cantidades de disolvente y da bajos rendimientos. En nuestro caso, se obtuvo el compuesto **2** en poco tiempo (40 min) y con altos rendimientos (98%). La confirmación del cambio estructural fue fácilmente identificado a través de la espectroscopia de RMN ^1H , donde se demostró la presencia del metilo del éster por un singulete a

3.99 ppm. La espectrometría de masas confirmó el peso molecular del compuesto con m/z de 215 (32.5%), así como el fragmento M^+-31 correspondiente a la pérdida del $O-CH_3$ que originó el pico base del espectro.

La hidrogenación catalítica de **2** empleando Ni-Raney como catalizador a temperatura ambiente, dio origen a la amina correspondiente (**3**) con un buen rendimiento del producto crudo. La selección del catalizador fue un aspecto importante para la preparación de este compuesto, ya que se ha visto que al usar Pd/Carbono se promueve la hidrogenólisis parcial del sustrato dando rendimientos bajos. El análisis espectroscópico de IR mostró dos bandas amplias a 3426 y 3336 cm^{-1} características de las aminas primarias. El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z 185 (45%) que concuerda con la masa molecular esperada, también se observó la señal de $M+2$ con una abundancia relativa del 15%, debida a la presencia del cloro y un pico base de m/z 154 generado por la pérdida del OCH_3 . La espectroscopia de RMN 1H mostró una señal amplia a 6.17 ppm debida a la amina primaria, la cual desapareció cuando se intercambió con D_2O .

La acetamida **4** se obtuvo a partir de **3** mediante la adición de anhídrido acético a temperatura ambiente. Esta reacción procedió rápidamente dando buenos rendimientos. El espectro de IR mostró, además del carbonilo del éster a 1730 cm^{-1} , la banda característica del carbonilo de la acetanilida a 1677 cm^{-1} , así como una banda intensa a 1591 cm^{-1} correspondiente al N-H de la amida. En el espectro de masas se observó el ión molecular con una relación m/z de 227 y una abundancia relativa del 44.5% que correspondió al peso molecular esperado. Así mismo se observó el $M+2$ con un 15% de abundancia relativa. El pico base del espectro apareció en una relación m/z de 154 generado a partir de la pérdida del acetilo de la amida y del OCH_3 del éster. El espectro de RMN 1H mostró un singulete a 3.80 ppm correspondiente al metilo de la acetanilida, así como una señal amplia a 10.38 ppm característica del N-H de la acetanilida, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D_2O .

La nitración del compuesto **4** con mezcla sulfonítrica entre 4 y 9 $^{\circ}C$, se logró originando mezcla de isómeros, los cuales se separaron mediante cristalización fraccionada con AcOEt. Se obtuvo así el compuesto **5** un buen rendimiento para el producto esperado. En el espectro de IR se observaron las

bandas características al grupo nitro en 1529 y 1336 cm^{-1} . El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z de 272 (15%) confirmado por la pérdida del grupo nitro en m/z de 226. Además, el pico base del espectro apareció con m/z de 230, que equivale a la molécula cuando se ha roto el enlace de la acetanilida. El análisis espectroscópico de RMN ^1H además comprobó el cambio estructural por la pérdida de la multiplicidad de las señales, apareciendo únicamente dos señales simples a 8.02 y 8.42 ppm correspondientes a los hidrógenos H-3 y H-6 respectivamente.

La hidrólisis de la acetamida **5** se realizó por tratamiento básico a 5 °C, obteniéndose **6** con un buen rendimiento. La elucidación estructural por IR mostró dos bandas intensas en 3451 y 3347 cm^{-1} correspondientes a la amina primaria. La espectrometría de masas señaló la presencia del ión molecular con m/z de 230 (62%), un M+2 del 21% de abundancia relativa y un pico base con un M-31 característico de la pérdida del O-CH₃. En el espectro de RMN ^1H se comprobó la presencia de la amina por medio de un singlete amplio a 7.58 ppm, que desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O. Además se observó un singlete a 3.70 ppm que comprobó que el éster no se hidrolizó.

La diamina **7** se obtuvo con buen rendimiento (97.33%), a través de la reducción catalítica del grupo nitro en **6**, a 32 °C. Cuando se obtuvo este compuesto fue importante procesarlo rápidamente para evitar su oxidación, por lo que una vez obtenido puro se sometió a la siguiente reacción. Una pequeña muestra fue rápidamente analizada por espectroscopia IR donde se observó dos bandas intensas a 3403 y 3325 cm^{-1} correspondientes a la amina primaria; se observó también la desaparición de las señales características del grupo nitro a 1549 y 1326 cm^{-1} . En espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto por el ión molecular con m/z de 200, que correspondió al pico base del espectro; además se observó la señal de M+2 con una abundancia relativa del 34%. En el espectro de RMN ^1H , la presencia de las dos aminas se comprobó por medio de dos singletes aislados a 4.84 y 5.48 ppm que integraron para dos hidrógenos y que desaparecieron cuando se realizó el intercambio con D₂O.

El tiol **8** se obtuvo de forma cuantitativa a través de la ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio básico; la formación del xantato de etilo fue importante para la obtención del anillo

bencimidazólico. Con la preparación previa del xantato se evitó la hidrólisis del éster, aun a 67-72°C. En el espectro de IR se observó una banda de intensidad débil a 3268 cm^{-1} característica del enlace N-H; la señal para C-H aromático, a 3038 y 3116 cm^{-1} ; una banda débil se observó a 2784 cm^{-1} , correspondiente al enlace S-H. El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z de 242, que correspondió al pico base del espectro, además, la señal de M+2 con una abundancia del 38%, indicativo de los efectos sumados de los isótopos cloro y azufre para este compuesto. En el espectro de RMN ^1H apareció a 7.21 ppm un singulete que integró para un hidrógeno, el cual comprobó la presencia del H-4 del anillo bencimidazólico; de igual forma, en 7.52 ppm se observó otro singulete que integró para un hidrógeno, indicativo del H-7; y a 12.91 ppm un singulete que integró para dos hidrógenos y que desapareció con el intercambio con D_2O , éste comprobó los hidrógenos unidos a nitrógenos en posición 1,3 del anillo de bencimidazol, cuando éste se encuentra en forma de tiona.

La metilación del compuesto **8** con dos equivalentes de yoduro de metilo en medio básico originó una mezcla de isómeros (**9** y **10**) debido al efecto tautomérico intrínseco del anillo bencimidazólico (Figura 19). El producto, como mezcla, se obtuvo con un rendimiento aceptable (76.95%), el cual se mejoró cuando se recuperó de las aguas madres otra porción (Rend. Total = 83.67%). Para determinar las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto **9**, una parte de la mezcla isomérica se separó mediante la técnica de cromatografía en columna flash,⁵⁷ donde se obtuvo un rendimiento muy bajo para cada isómero obtenido. El de R_f menor (compuesto **10**) se obtuvo en un 36%, mientras que el de R_f mayor (el compuesto de interés, **9**) se obtuvo en un 34%. La espectroscopia de IR mostró una banda débil para el enlace C-H de tipo aromático a 3017 cm^{-1} , la banda correspondiente a los enlaces C-H de tipo alifático se observó a 2942 cm^{-1} . En el espectro de masas se comprobó la masa molecular del compuesto por el ión molecular con m/z de 270 que también originó al pico base del espectro. Se observó también el M+2 correspondiente a la isotopía presentada por el cloro y azufre. La doble alquilación del compuesto se demostró por el M-15 correspondiente a la pérdida de un metilo. En el espectro de RMN ^1H se observaron señales aisladas a 2.84 y 3.69 ppm, singuletes característicos del grupo metililo y N-metilo respectivamente.

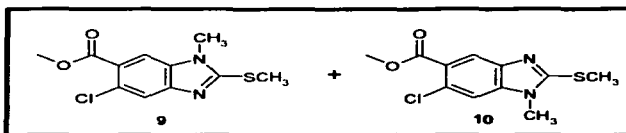


Figura 19. Mezcla de isómeros benzimidazólicos obtenidos.

Para confirmar la estructura del compuesto 9 y diferenciarla de su isómero (10) se recurrió al experimento NOESY de RMN (Efecto Nuclear Overhauser en dos dimensiones), donde se mostró la correlación del H-7 del anillo aromático con el N-metilo, como se muestra en la Figura 20. Además esta correlación se comprobó mediante CCF, donde se verificó que el producto separado de la columna (9) fue diferente al compuesto 10 sintetizado por separado por nuestro grupo de investigación.⁵⁸

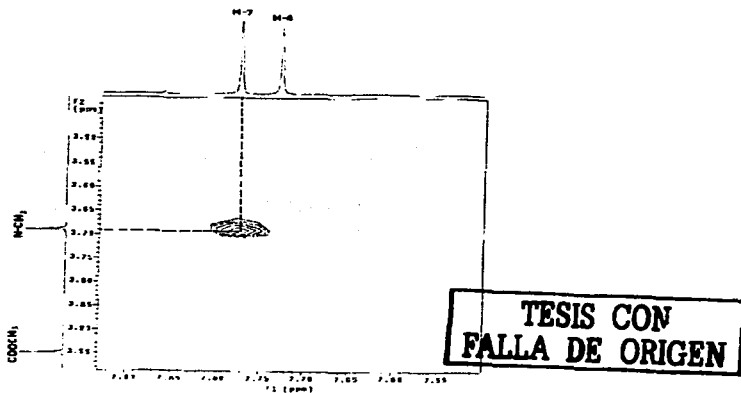


Figura 20. Espectro NOESY para el compuesto 9

El ácido carboxílico **11** se obtuvo mediante la hidrólisis básica a 50-60 °C de la mezcla isomérica (**9** y **10**) obtenida de la reacción anterior. El producto nuevamente se obtuvo como una mezcla de isómeros con un buen rendimiento (91.74%). La determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **11**, se logró por la hidrólisis del producto de metilación puro (**9**). El espectro de IR mostró una banda amplia a 2935 cm^{-1} que comprobó el grupo hidroxilo del ácido; así mismo, se observó una banda intensa, característica del carbonilo del grupo COOH, a 1726 cm^{-1} . El espectro de masas mostró el ión molecular con m/z de 256 y correspondió al pico base del mismo; también se observó el M+2 con un 42% de abundancia relativa. Además se comprobó la presencia del ácido bencimidazólico por el fragmento M⁺-18, característico de la pérdida de agua para los ácidos carboxílicos. El análisis por RMN ¹H mostró la presencia del grupo COOH, por la señal amplia observada a 13.12 ppm correspondiente al OH y que desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O.

La síntesis de la carboxamida **13** se obtuvo a partir de la mezcla de isómeros (**11** y **12**) obtenida de la reacción anterior. La técnica utilizada para su preparación no involucró los reactivos comunes para la formación de amidas, por ejemplo el uso de cloruro de tionilo. Como agente acoplante se utilizó 1,1-carbonildiimidazol (CDI), el cual tiene la ventaja de reaccionar rápidamente generando al imidazólido intermediario a una temperatura de 25-30 °C, para posteriormente hacerlo reaccionar con la piperidina para dar el compuesto final con un buen rendimiento. Debido a que como materia prima se usó la mezcla de ácidos **11** y **12**, también el producto se obtuvo como mezcla de carboxamidas (**13** y **14**). Posteriormente estas carboxamidas se separaron por cromatografía en columna flash, dando un rendimiento muy pequeño para cada compuesto. El de R_f menor (compuesto **14**) se obtuvo en un 37.5%, mientras que el compuesto de interés (el de R_f mayor, **13**) se obtuvo en un 25.0%. La identificación de este último compuesto se basó principalmente en el análisis espectroscópico de RMN ¹H, donde se observó la desaparición de la señal debida al COOH en 13.12 ppm; así mismo se observaron las señales debidas a los hidrógenos relacionados con el anillo de la piperidina a campos altos. Las señales debidas a los hidrógenos 4 y 7 se observaron como singuletes aislados a 7.53 y 7.64 ppm respectivamente.

Para asignar correctamente las señales correspondientes a este compuesto por RMN se realizó el experimento HETCOR (RMN de dos dimensiones a un enlace de distancia), donde se demostró claramente la correlación de los hidrógenos del metililo (2.71 ppm) y del metilo unido al nitrógeno de la posición 1 (3.66 ppm) con sus carbonos respectivos (14.10 y 30.08 ppm); así mismo, se observaron las correlaciones debidas a los hidrógenos con los carbonos del anillo de la piperidina (Figura 21).

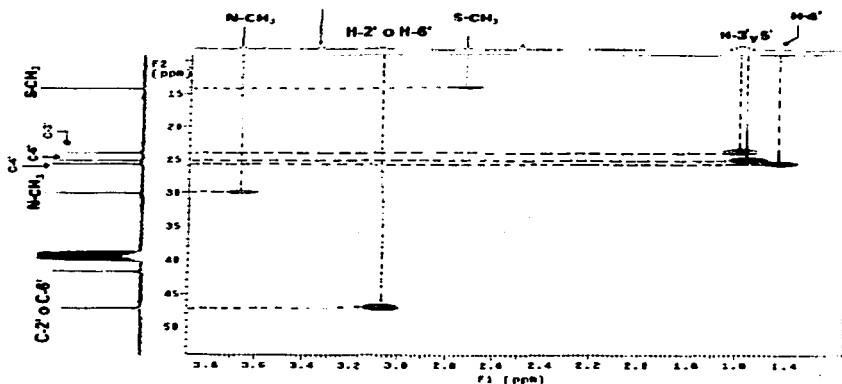


Figura 21. Espectro HETCOR de la carboxamida 13.

En el espectro de masas se observó el ión molecular con una relación m/z de 323 (40%) y un pico base con m/z de 239 generado a partir de la ruptura del enlace amida. La señal vista en 322 correspondió a la pérdida de un hidrógeno, como lo muestra la Figura 22.

La carboxamida 15 se obtuvo de igual forma a partir de la mezcla isomérica de ácidos bencimidazólicos (11 y 12) mediante el 1,1-carbonildiimidazol y la 4-metilpiperidina. El producto crudo se obtuvo de forma cuantitativa, sin embargo, la separación por cromatografía en columna flash dio

rendimientos muy bajos para cada isómero obtenido. El compuesto de R_f menor (compuesto **16**) se obtuvo en un 24%, mientras que el de R_f mayor (producto de interés, **15**) se obtuvo en un 18%.

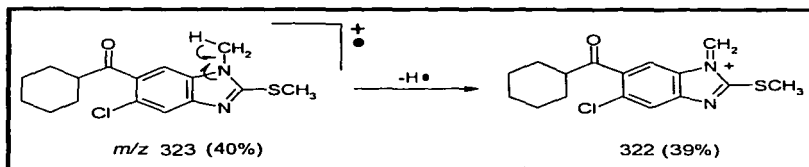


Figura 22. Especie M^+-1 generado en el espectro de masas para la carboxamida **13**.

La caracterización de este compuesto se basó inicialmente en la espectroscopia de RMN 1H donde nuevamente se demostró la desaparición de la señal debida al OH del ácido a 13.12 ppm; así mismo, se observaron las señales correspondientes a los hidrógenos del anillo de la metilpiperidina a campos altos, y a diferencia del compuesto anterior (**13**) un doblete a 0.8 ppm se observó debido al CH_3 de la metilpiperidina. También se observaron las señales de los hidrógenos 4 y 7 en la zona aromática del espectro, presentadas como señales dobles o duplicadas para cada hidrógeno debidas a un efecto poco común en este tipo de compuestos conocido como *isomería rotacional restringida* o *atropoisomerismo*.

Con el experimento NOE diferencial de RMN (análisis unidimensional) se confirmó la estructura del compuesto, ya que se mostró la correlación del grupo metilo de la posición 1 (30.08 ppm) con el hidrógeno de la posición 7 del anillo benzimidazólico (7.64 ppm). Con este análisis, se comprobó la obtención del compuesto de interés que guarda relación 1,6 con respecto a la amida (**Figura 23**). Además, como en el caso anterior, se observó el efecto de isomería rotacional restringida por las dos señales a 7.63 y 7.64 que correspondieron a un solo hidrógeno, esto es, para H-7.

Isomería Rotacional Restringida: Clase de isomería que ocurre como resultado de la rotación de un enlace sencillo.⁵⁵

El análisis por espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto por medio del ión molecular con m/z de 337 (91%), un $M+2$ del 35% y un pico base de m/z de 239 originado por la pérdida de la metilpiperidina. De igual forma que en el caso anterior, se observó el $M-1$ correspondiente a la pérdida de un hidrógeno del $N-CH_3$ del anillo bencimidazólico.



Figura 23. Espectro de NOE diferencial de la carboxamida 15.

En cuanto al efecto observado en el espectro de RMN 1H llamado isomería rotacional restringida o atropoisomerismo, es de notar la importancia que tiene el metilo de la metilpiperidina en la duplicación de las señales ya que de otra forma este mismo fenómeno se hubiera presentado en el espectro de RMN 1H de la carboxamida 13. Estudios relacionados con el análisis conformacional realizado a esta molécula (utilizando el software Caché) puso de manifiesto la presencia de cuatro conforméros estables, obtenidos como resultado de la rotación alrededor del enlace de la amida (Figura 24).

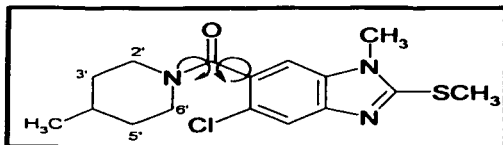


Figura 24. Estructura que presenta atropoisomerismo debida a la rotación del enlace de la amida.

Esto pone en evidencia que los cambios electrónicos que ocurren en la molécula y que son observados en RMN son debidos por una parte a la interacción estérica de los de los H-2' o H-6' con el átomo de cloro, teniendo de esta forma dos arreglos distintos en el espacio uno con el carbonilo de la amida hacia arriba y otro con el carbonilo hacia abajo. La otra parte la constituye el anclaje de la molécula por efecto del metilo del anillo de metilpiperidina teniendo otros dos conformeros en ambientes químicos distintos (**Figura 25**).

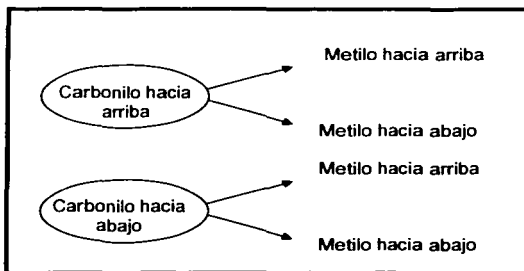


Figura 25. Formación de los cuatro conformeros

Es importante considerar que la interconversión de estos isómeros conformacionales depende de la energía que se le aplique a la molécula para que se observen los distintos arreglos como se muestra en la **Figura 26**. Sin embargo, a través del cálculo de desplazamientos químicos teóricos se podrían conocer los dos conformeros que se observan en RMN.

Por otro lado, cabe mencionar que esta secuencia de síntesis, fue la que llevó a la preparación de los compuestos finales; sin embargo, la obtención de isómeros fue lo que motivó a la incursión en otras rutas de síntesis con la finalidad de obtener la *o*-fenilendiamina adecuadamente sustituida y *N*-metilada para que posteriormente al ciclocondensarla, se obtuviera al anillo de bencimidazol *N*-metilado y con ello evitar la formación de isómeros.

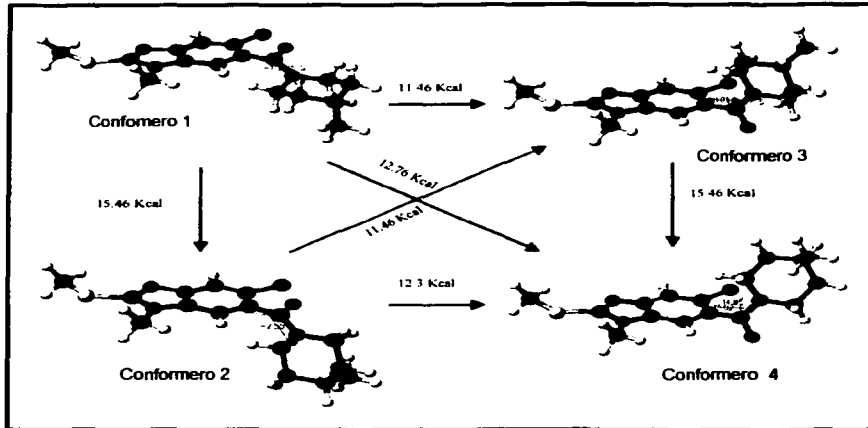


Figura 26. Estructura tridimensional de los cuatro conformeros obtenidos por análisis conformacional.

Para esto, se propusieron diversas alternativas de síntesis como lo muestra la Figura 27, con la finalidad de obtener a la *o*-fenilendiamina *N*-metilada. El primer método, señalado como A, involucró una modificación a lo que es la ruta de Katrinzky y cols, para la obtención de bencimidazoles *N*-metilados. (Esquema 3). Esta secuencia de síntesis que involucra a la misma materia prima que se presentó en el Esquema 1 (Ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico), tiene como punto clave la obtención de un intermediario cíclico formado a partir con benzotriazol y formaldehído para posteriormente formar la *o*-fenilendiamina *N*-metilada. La serie de reacciones posteriores que involucran la ciclocondensación, la metilación del tiol, hidrólisis del éster y la formación de las amidas son las mismas reacciones que se presentaron en el Esquema 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

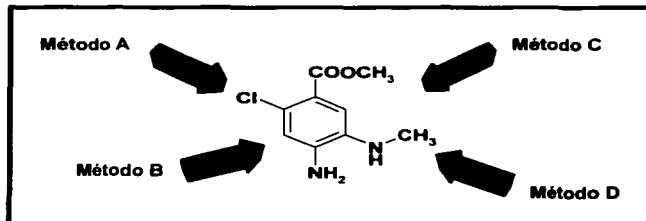
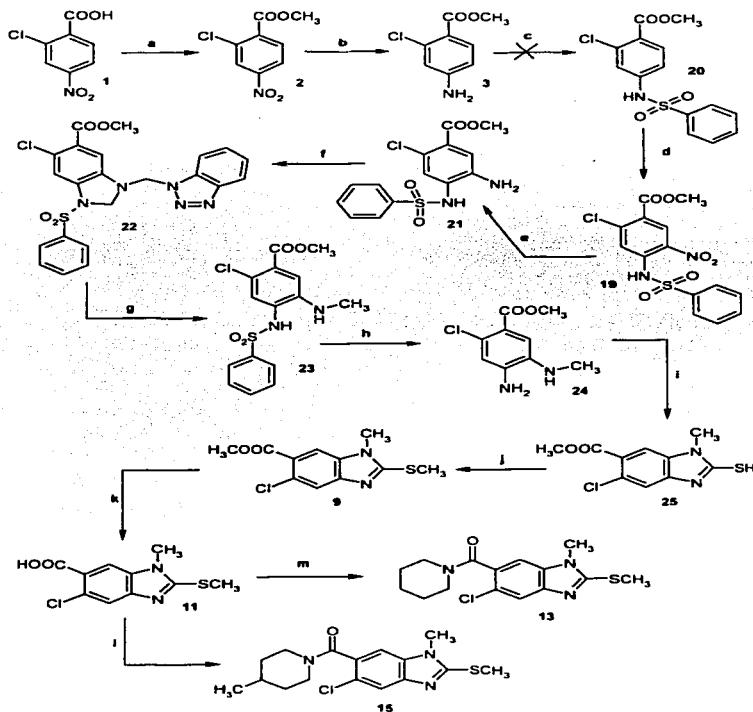


Figura 27. Diversas metodologías planteadas para la obtención de la *o*-fenilendiamina *N*-sustituida.

Para la formación del intermediario cíclico (**22**) se llevó a cabo las reacciones de esterificación de la materia prima y reducción del grupo nitro como anteriormente fueron descritas. El compuesto **3** posteriormente se intentó sulfonar, utilizando como reactivo al cloruro de bencensulfonilo en medio aprótico, sin embargo su formación nunca se logró debido a la alta desactivación del anillo benzénico, ya que visto en CCF originó una serie de manchas (incluyendo la materia prima) que no fueron separadas para su análisis.

Ante esta problemática se llevó a cabo la metodología señalada como **B**, donde a partir del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**) presentado en el Figura 28 se redujo catalíticamente empleando Ni-Raney como catalizador para obtener al compuesto **17** que rápidamente fue analizado por espectroscopia de IR donde se demostró la presencia de dos bandas intensas correspondientes a la amina primaria (Tabla 8). Este producto posteriormente fue sometido a la reacción de *N*-metilación, donde se obtuvieron resultados poco favorables para la preparación del compuesto (**18**), ya que a pesar de tener cuidado con la temperatura y la cantidad de yoduro de metilo, la CCF realizada mostró varias manchas que fueron posteriormente separadas por una placa preparativa utilizando como medio de elución $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10. Las tres fracciones colectadas fueron analizadas por espectrometría de masas donde se observó que el compuesto mayoritario correspondió al producto de ciclación el cual se favoreció por efecto de la temperatura. Las otras fracciones correspondieron al producto esperado y al producto dimetilado en una pequeña proporción (Figura 29).



Donde: (a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, DMF/ NaHCO_3 , calor; (b) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (c) $\text{p-SO}_2\text{Cl}$, acetona; (d) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; (e) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (f) BTAA/ CH_2O ; (g) NaBH_4 ; (h) H_2SO_4 , calor; (i) CS_2 , EtOH, H_2O , KOH, calor; (j) $\text{CH}_3\text{I}/\text{KOH}_{\text{ac}}$, EtOH; (k) NaOH, MeOH; (l) DCI, metilpiperidina, acetonitrilo; (m) DCI, piperidina, acetonitrilo.

Esquema 3. Ruta de síntesis alterna para la preparación de carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas

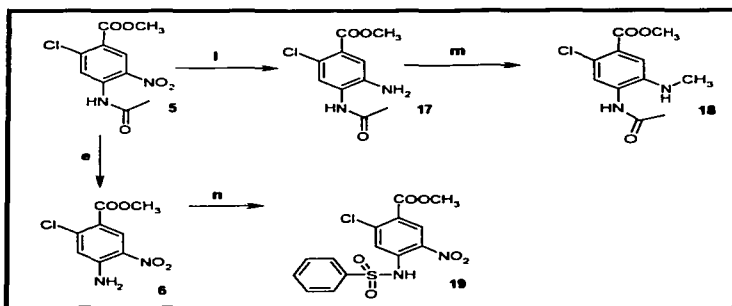
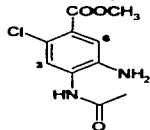


Figura 28. Obtención del compuesto *N*-metilado

Tabla 8. Datos espectroscópicos de IR del compuesto 17

4-Acetamido-5-amino-2-clorobenzoato de metilo (17)



Espectro IR (KBr) cm^{-1} : 2426, 3357 y 3254 (NH₂ y NH de la acetanilida); 1699 (C=O de éster); 1660 (C=O de amida); 2951 (CH₃ de éster), 1244 (C-O del éster).

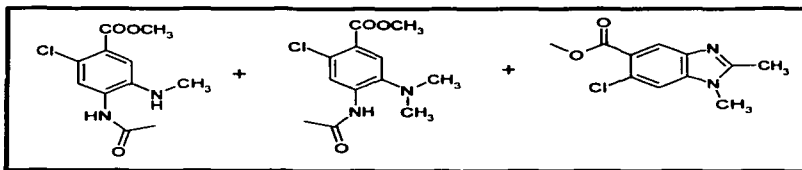
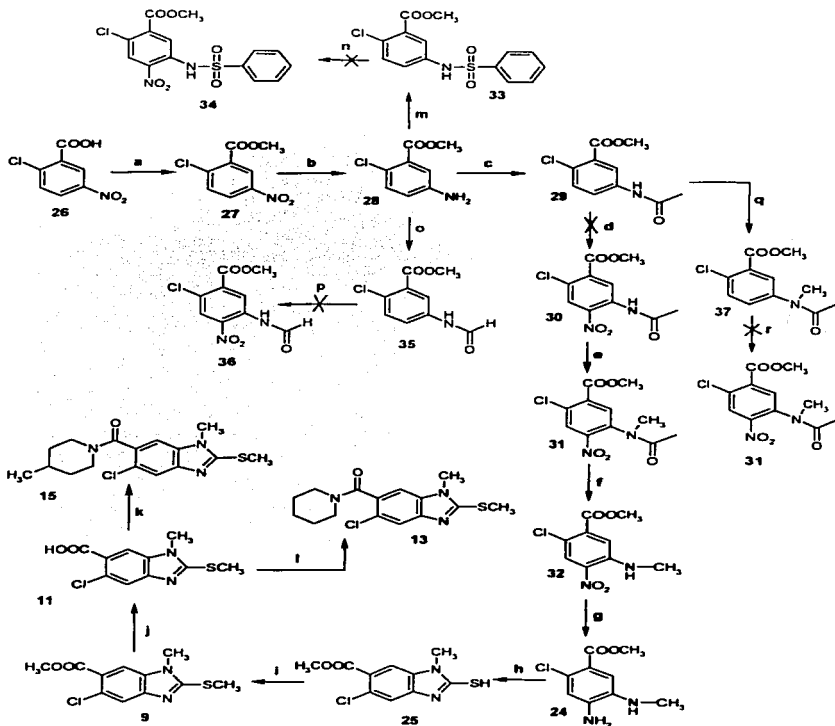


Figura 29. Productos obtenidos de la *N*-metilación, analizados por espectrometría de masas.

Otro punto de modificación a la ruta de síntesis planteada en este esquema fue la preparación del compuesto **19** a partir del 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**), mediante la modificación a la técnica de sulfonación, empleando hidruro de sodio y cloruro de bencensulfonilo como reactivo. El producto observado por CCF nunca pudo ser aislado, se trató de optimizar esta técnica, sin embargo no se tuvo éxito, por lo que se llevo a cabo la modificación mostrada como **C**.

Para ello se planteó otra secuencia de síntesis como lo muestra el **Esquema 4**, donde a partir de una materia prima diferente, el ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**26**), mediante una secuencia de reacciones tal como la esterificación del ácido, reducción del grupo nitro, acetilación y nitración que llevaría a la formación del compuesto **30**, el cual al ser tratado con sulfato de dimetilo en medio básico daría al compuesto *N*-metilado (**31**). La serie restante de reacciones como la ciclocondensación, metilación del tiol, hidrólisis del ácido y formación de los productos finales son reacciones que ya fueron presentadas arriba.

Para la realización de esta ruta de síntesis, inicialmente el ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico (**26**) se esterificó por medio de sulfato de dimetilo en medio básico, arrojando buenos resultados, ya que se obtuvo al producto deseado de una manera rápida y con un buen rendimiento. La elucidación estructural por medio de IR mostró una señal intensa a 1731 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster, así mismo se observó una señal a 2957 cm^{-1} la cual fue indicativa de la parte alifática del éster. En el espectro de masas se observó el ión molecular con m/z de 215 (25%), así como el fragmento $M-31$ correspondiente a la pérdida del O-CH_3 que originó el pico base del espectro. Los datos arrojados por RMN ^1H mostraron un singulete a 4.0 ppm que integró para tres protones que son característicos del metilo del éster.



Donde: (a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$, DMF/ NaHCO_3 , calor; (b) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (c) Ac_2O ; (d) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$; (e) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2/\text{KOH}$; (f) NaOH/MeOH ; (g) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (h) CS_2 , EtOH, H_2O , KOH, calor; (i) $\text{CH}_3\text{I}/\text{KOH}$, EtOH; (j) NaOH/MeOH ; (k) DCI, metaperidina, acetato; (l) DCI, piperidina, acetato; (m) $\text{p-SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCO}_2$, acetona; (n) $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$; (o) $\text{HCOOH}/\text{Ac}_2\text{O}$, THF; (p) $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$.

Esquema 4. Nueva propuesta de síntesis para la preparación de carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas

La reducción posterior del compuesto **27** por hidrogenación catalítica, utilizando Ni-Raney como catalizador y calor (28-40 °C), originó al compuesto **28** con un buen rendimiento. En el espectro de IR se demostró la reducción del grupo nitro por las bandas de amina primaria a 3463 y 3376 cm^{-1} , además de la desaparición de las señales de 1525 y 1349 cm^{-1} correspondientes al grupo nitro aromático. En el espectro de masas se observó el ión molecular con m/z de 185 que concuerda con la masa molecular esperada y corresponde al pico base del espectro (100%), además se comprobó por la desaparición de la señal correspondiente a la pérdida del grupo nitro (M-46). Así mismo se observó la presencia del M+2 con un 45% de abundancia relativa, debida a la presencia del cloro, el cual se pudo comprobar por la señal M-35 con una abundancia del 5%. En el espectro de RMN ^1H se registró a 5.53 ppm una banda amplia característica del grupo NH_2 , que desapareció con D_2O . No se obtuvo el dato de punto de fusión debido a que no se aisló el producto por la inestabilidad que presenta frente al medio ambiente (aun cuando este se mantuvo en condiciones inertes); además, el producto se obtuvo en su mayoría como producto puro ya que visto en CCF mostró una mancha de aproximadamente 90% de abundancia con respecto al intermediario. El producto se observó como una mancha brillante a la luz de onda corta del UV.

El compuesto **29** se obtuvo por acetilación de **28** en anhídrido acético, dando un buen rendimiento. El cambio estructural fue confirmado por espectroscopia de IR donde se observó una banda intensa a 1697 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de la amida, así como una banda intensa a 3345 cm^{-1} correspondiente al N-H de la amida. En el análisis espectrométrico de masas se observó al ión molecular con m/z de 227 con un 35.0% de abundancia relativa y un pico base de m/z de 154 originado por la pérdida del acetilo de la amida y por la pérdida del OCH_3 del éster. El análisis de espectroscopia de RMN ^1H mostró una señal a 2.18 ppm que integró para tres protones, correspondiente al metilo de la acetanilida, y una banda amplia a 7.89 ppm característica del N-H de la acetanilida, la cual desapareció cuando se hizo el intercambio con D_2O .

El compuesto nitrado **30** se intentó preparar disolviendo al compuesto **29** en H_2SO_4 concentrado y haciéndolo reaccionar con una mezcla sulfonítrica entre 0 y 5 °C; sin embargo, no se logró obtener a este compuesto de manera satisfactoria, ya que se obtuvo como mezcla de isómeros en proporción

1:1 aproximadamente (visto en CCF). Esta técnica se modificó variando la temperatura de 25-30 °C y de 42-58 °C en un tercer intento, dando los mismos resultados. La mezcla de isómeros se separó por cromatografía en columna, las dos fracciones colectadas mostraron en RMN ¹H que el producto de nitración en la posición requerida correspondía al de mayor *R_f*, mientras que el otro isómero obtenido a la mancha de *R_f* menor (**Figura 30**). El rendimiento obtenido de esta separación fue del 16% para el producto esperado y 25% para el producto secundario.

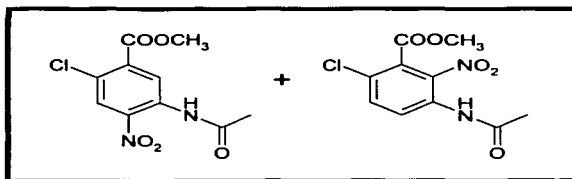


Figura 30. Mezcla de isómeros obtenidos de la reacción de nitración

La técnica de nitración nuevamente se trató de optimizar empleando una mezcla recién preparada de nitrato de acetilo, la cual se hizo a partir de anhídrido acético y ácido nítrico fumante, donde a diferentes condiciones de temperatura, la reacción dio los mismos resultados. Ante la problemática de obtener al compuesto **30** debido a la alta desactivación del anillo benzénico, se propuso como método alternativo a esta secuencia de síntesis, la introducción de un grupo más voluminoso como una bencensulfonamida, en lugar de la acetanilida inicialmente propuesta, con la finalidad de que al realizar posteriormente la nitración, el efecto del impedimento estérico que genera este grupo voluminoso promoviera la obtención del producto esperado y de esta forma evitar la formación del otro isómero.

Para llevar a cabo esta modificación, el compuesto **28** se disolvió en acetona junto con la cantidad adecuada de bicarbonato de sodio, para después ser tratado con el reactivo cloruro de bencensulfonilo a 40-45 °C. El producto obtenido con un buen rendimiento (94.70%), mostró en IR una banda intensa a 1315 cm⁻¹ correspondiente a la sulfonamida y una señal a 3232 cm⁻¹ debida al

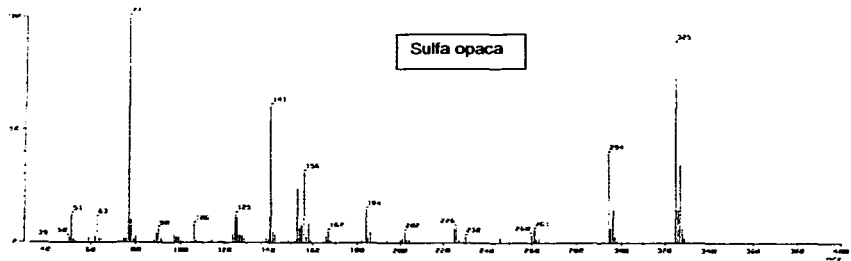
N-H del mismo grupo funcional. La espectrometría de masas mostró el ión molecular con una relación m/z de 325 (94.5%) y un $M+2$ de 38% de abundancia relativa. El pico base apareció con m/z de 184 que equivale a la ruptura del enlace de la sulfonamida (R-NH-SO₂-p). El análisis espectroscópico de RMN ¹H mostró señales características de la bencensulfonamida en la zona de 7-7.8 ppm, así como una señal amplia debida al N-H de la bencensulfonamida que desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O.

En un primer intento, cuando se realizó la nitración a este compuesto (**34**) con mezcla sulfonítrica, variando las proporciones de ácidos y condiciones de temperatura, el resultado fue el mismo al obtenido anteriormente donde se obtuvo la mezcla de isómeros, pero cuando se modificó la técnica por nitrato de acetilo a 40-50 °C se obtuvo sólo al compuesto esperado, que en el espectro de IR mostró una banda intensa a 1614 cm⁻¹ correspondiente al grupo nitro. En el espectro de masas se observó al ión molecular con una relación m/z de 370 (82%), el $M+2$ con un 33% de abundancia relativa, así como el pico base con m/z de 77 correspondiente al anillo aromático de la bencensulfonamida. El espectro de RMN ¹H fue decisivo para la determinación estructural del producto esperado ya que se observaron dos señales aisladas a 7.95 ppm y 8.74 ppm, singuletes característicos de los protones 6 y 3 del anillo aromático principal.

Sin embargo, esta técnica no fue reproducible, ya que aún cuando se realizó repetidas ocasiones, no volvió a generar los mismos resultados. En primera instancia se pensó como a una posible causa, la técnica misma o las condiciones de los reactivos; después se demostró que esta diferencia de resultados se debió a la naturaleza de la bencensulfonamida (materia prima), ya que por CCF se notó que el producto **33** obtenido de las replicas revelaba distinto al obtenido inicialmente, a pesar de tener el mismo *R_f*. El producto obtenido de las replicas se observó como una mancha brillante a la luz corta del UV, mientras que el producto obtenido inicialmente era opaco a esta misma longitud de onda. La espectroscopia de IR para el producto obtenido de las réplicas solo varió en la intensidad de sus bandas con respecto al que ya había sido analizado anteriormente, en 1604 y 1315 cm⁻¹ se observaron bandas cortas correspondientes al grupo bencensulfonamida, mientras que se habían obtenido bandas intensas a esta misma longitud de onda. De igual forma se observaron diferencias en el espectro realizado de RMN ¹H donde se observaron el mismo tipo de señales, con el mismo

patrón de integración, pero en diferentes desplazamientos químicos; además, la espectrometría de masas mostró los mismos fragmentos, pero con diferentes intensidades. En la **Tabla 9** y **Figura 31**, se muestran las señales correspondientes a estos productos.

Una forma alternativa para la preparación del compuesto nitrado, fue mediante la formilación del compuesto **28**, con el objeto de disminuir el efecto estérico y posteriormente realizar la reacción de nitración. Para la primera etapa, se realizó la formación del anhídrido mixto (anhídrido acético fórmico), para después formar la amida correspondiente. Este producto se obtuvo con buen rendimiento. Su identificación se basó por espectrometría de masas, donde se demostró la presencia del ión molecular con m/z de 213 que concuerda con la masa molecular esperada y que correspondió al pico base del espectro. En el análisis por RMN ^1H se observó un singlete dobleteado a 8.31 ppm característico del hidrógeno del formamido, así mismo una señal amplia que desapareció al intercambiar con D_2O se asignó al NH del formamido. La nitración posterior de este compuesto con mezcla sulfonítrica a 0-5 °C no tuvo éxito, ya que como en el caso anterior se obtuvo mezcla de compuestos imposibles de separar.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

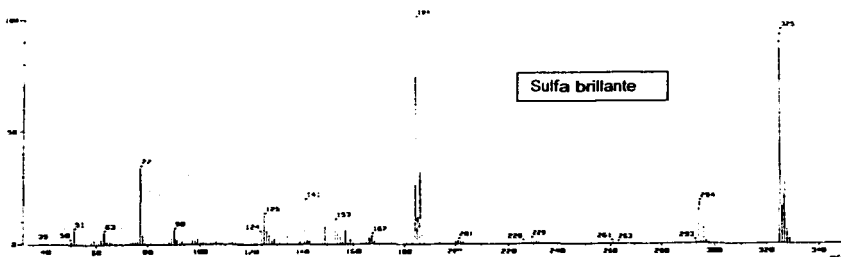
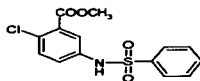


Figura 31. Espectros de masas para las sulfas obtenidas

Tabla 9. Diferencias en las señales mostradas por las sulfas.

**Sulfa Opaca**

Espectro IR (KBr) cm^{-1} : 3228 (NH bencensulfonamida), 1704 (C=O de éster), 1601 intensa (R-NH-R), 1312 corta (R-SO₂-N), 1165 (C-O éster).

Espectro EM (CG/E) m/z : M⁺ 325 con 88% de abundancia relativa, p.b. 77, M⁺ 2 con 35% de abundancia relativa.

Espectro ¹H RMN (CDCl₃) ppm: 3.88 (s, 3H, CH₃ de éster); 7.07 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, H-4); 7.20 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-6); 7.45 (sa, 1H, int. con D₂O, NH); 7.49-7.52 (m, 1H, H-4'); 7.56-7.62 (m, 2H, H-3', H-5'); 7.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 7.85-7.88 (m, 2H, H-2', H-6')

Sulfa Brillante

Espectro IR (KBr) cm^{-1} : 3232 (NH bencensulfonamida), 1693 (C=O de éster), 1604 corta (R-NH-R), 1315 intensa (R-SO₂-N), 1167 (C-O de éster).

Espectro EM (CG/E) m/z : M⁺ 325 con 94.5% de abundancia relativa, p.b. 184, M⁺ 2 con 38% de abundancia relativa.

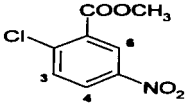
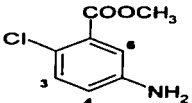
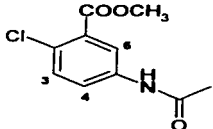
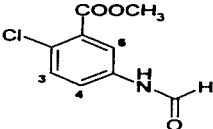
Espectro ¹H RMN (CDCl₃) ppm: 3.89 (s, 3H, CH₃ de éster); 7.24 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4); 7.30 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 7.42-7.48 (m, 2H, H-3', H-5'); 7.53-7.56 (m, 1H, H-4'); 7.58 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6); 7.64 (sa, 1H, int. con D₂O, NH); 7.78-7.82 (m, 2H, H-2', H-6')

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con los resultados anteriores se planteó otro experimento en donde se involucró la *N*-metilación de la acetanilida (**29**), para después hacer la nitración correspondiente. Esta primera reacción llevada a cabo en medio básico, generó al producto esperado por un periodo largo de tiempo (8 horas), sin verse el consumo total de materia prima. Una vez obtenido al producto crudo (**37**) fue caracterizado por espectrometría de masas y por RMN ¹H. En el primer caso, se observó el ión molecular con una relación de *m/z* de 241 (30%), así como el *M*+2 con un 10% de abundancia relativa. El pico base con *m/z* de 199 correspondió a la pérdida del acetilo de la acetanilida. En el espectro de RMN se observó la presencia del *N*-metilo por un singulete a 3.26 que integró para tres protones. La nitración posterior de este compuesto con ácido nítrico fumante no generó resultados satisfactorios.

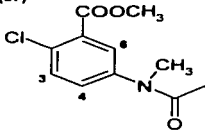
Al no tener resultados satisfactorios de esta secuencia de síntesis, solo se resume en la **Tabla 10**, la caracterización de los intermediarios obtenidos del **Esquema 4**.

Tabla 10. Elucidación estructural de los compuestos sintetizados en el Esquema 4.

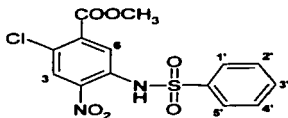
COMPUESTO	SEÑALES
<p>2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (27)</p> 	<p>Espectro IR (KBr) cm^{-1}: 3107 (C-H aromático); 2957 (CH_3 de éster); 1731 (C=O de éster); 1525 y 1349 (NO_2); 1251 (C-O de éster).</p> <p>Espectro 42, EM (IE/CG) m/z: M^+ 215 (25%); $M+2$ 10%; 184 (100%).</p> <p>Espectro 43, RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 4.00 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 8.28 (dd, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4); 8.71 (d, $J = 2.9$, 1H, H-6).</p>
<p>5-Amino-2-clorobenzoato de metilo (28)</p> 	<p>Espectro IR (KBr) cm^{-1}: 3463 y 3376 (NH_2); 3225 (C-H aromático); 2951 (CH_3 de éster); 1722 (C=O de éster); 1240 (C-O de éster).</p> <p>Espectro EM (IE/CG) m/z: M^+ 185 (100%); $M+2$ 45%.</p> <p>Espectro RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) ppm: 3.79 (s, 3H, CH_3 de éster); 5.53 (sa, 2H, int. con D_2O, NH_2); 6.69 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4); 6.96 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-6); 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3).</p>
<p>5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29)</p> 	<p>Espectro IR (KBr) cm^{-1}: 3345 (N-H de amida); 3040 (C-H aromático); 2955 (CH_3 de éster); 1714 (C=O de éster); 1697 (C=O de amida); 1248 (C-O de éster).</p> <p>Espectro EM (IE/CG) m/z: M^+ 227 (35%); $M+2$ 15%; 185 (100%).</p> <p>Espectro RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 2.18 (s, 3H, CH_3 de amida); 3.90 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 7.68 (dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4); 7.89 (sa, 1H, int. con D_2O, H de amida); 7.94 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6).</p>
<p>2-Cloro-5-formamidobenzoato de metilo (35)</p> 	<p>Espectro EM (IE/CG) m/z: M^+ 213 (100%); $M+2$ 35%.</p> <p>Espectro RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) ppm: 3.84 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 7.71 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4); 8.11 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-6); 8.31 (sd, 1H, CHO); 10.49 (sa, 1H, int. con D_2O, N-H de formamido).</p>

COMPUESTO

2-cloro-5-(*N*-metilacetamido)benzoato de metilo (37)



5-Bencensulfonamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (34)



SEÑALES

Espectro EM (IE/CG) m/z : M^+ 241 (30%); $M+2$ 10%; 199 (100%).

Espectro RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 1.90 (s, 3H, CH_3 del acetamido); 3.26 (s, 3H, N- CH_3); 3.96 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.27-7.29 (m, 1H, H-4); 7.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3); 7.69 (d, $J = 2.4$ 1H, H-6).

Espectro IR (KBr) cm^{-1} : 3234 (N-H bencensulfonamida); 3119 (C-H aromático); 2956 (CH_3 de éster); 1719 (C=O de éster); 1614 y 1549 (NO_2); 1353 (R- SO_2 -N); 1171 (C-O de éster).

Espectro EM (IE/CG) m/z : M^+ 370 (82%); $M+2$ 33%; 77 (100%).

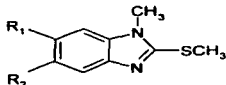
Espectro RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 3.93 (s, 3H, CH_3 de éster); 7.53-7.68 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'); 7.93-7.96 (m, 2H, H-1', H-5'); 7.95 (s, 1H, H-6); 8.74 (s, 1H, H-3); 10.19 (s, 1H, int.con D_2O , H de bencensulfonamida).

6.2. Resultados Parte Biológica:

6.2.1. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*

Los ensayos de la prueba antihelmíntica *in vitro* de las carboxamidas 13 y 15, utilizando al Albendazol como control positivo, no mostraron reducción significativa de la capacidad metabólica de la larva muscular de *T. spiralis*, por lo que no se tienen datos numéricos para este ensayo. Estos resultados se compararon con otras carboxamidas 1-metilbencimidazólicas (recién evaluadas en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Parasitarias e Infecciosas del IMSS)^{58,60} para observar la relación que tienen los sustituyentes en diferentes posiciones sobre la actividad biológica, sin embargo los datos recolectados para estos compuestos fueron los mismos a los obtenidos para los compuestos sintetizados en este trabajo (Tabla 11).

Tabla 11. Evaluación antihelmíntica de compuestos 1-metilbencimidazólicos.



Compuesto	R ₁	R ₂	% de reducción de la capacidad metabólica de <i>T. spiralis</i>
15	4-metilpiperidinilcarbonil	Cl	NR
13	Piperidinilcarbonil	Cl	NR
XVII	Cl	Piperidinilcarbonil	NR
XVIII	Cl	4-metilpiperidinilcarbonil	NR
XIX	Piperidinilcarbonil	H	NR
XX	4-metilpiperidinilcarbonil	H	NR

NR = No redujo

Por otro lado, comparando estos resultados con sus análogos carboxamidas 1*H*-bencimidazólicas mostradas en la **Tabla 4**, se observó que los compuestos I, II, V y VI si fueron activos y que además la actividad es equiparable a la presentada por el Albendazol. Esto finalmente nos indica que el efecto del metilo en la posición 1 del anillo de bencimidazol para los compuestos presentados arriba (**Tabla 11**), anula para la actividad antihelmíntica sobre este parásito.

6.2.2. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre *Giardia lamblia*

Los resultados de la prueba *in vitro* de la actividad antiprotozoaria de las dos carboxamidas sintetizadas y de los fármacos empleados como controles positivos se muestran en la **Tabla 12**, en la cual se puede apreciar que fueron activos contra los trofozoitos del parásito. La efectividad de estos compuestos fue superior a la mostrada por el Metronidazol, pero menos efectivos para la Nitazoxanida y el Albendazol.

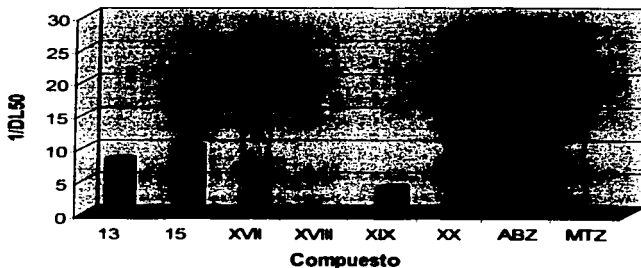
Tabla 12. Evaluación antiprotozoaria de las carboxamidas **13** y **15** sobre *G. lamblia*

Compuesto	DL ₅₀ (µM)	Dosis* (µg/mL)				
		0.005	0.010	0.050	0.100	0.500
13	0.122	19.60	21.50	45.80	76.45	87.75
15	0.099	13.55	38.15	51.00	79.95	83.20
Nitazoxanida	0.013					
Albendazol	0.037					
Metronidazol	1.228					

*Porcentaje de mortalidad a diferentes concentraciones

Esto a la vez nos mostró que el efecto producido sobre este parásito resulta ser mejor cuando se trata con la carboxamida **15** que para la **13**, como se pudo observar en la DL₅₀ obtenida mediante el análisis Probit.

Al comparar estos datos con las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas mostradas en la **Tabla 11**, se observó que el compuesto **XX** fue más activo que todos los demás compuestos y que los compuestos **XVII** y **XVIII** no tuvieron actividad sobre este parásito. Esto nos hace ver que los compuestos con el metilo en relación 1,6 (con respecto a la amida) ejercen una gran influencia sobre la actividad antiprotozoaria sobre *G. lamblia*, comparado con los compuestos con el metilo en la relación 1,5, que no mostraron actividad (**Gráfico 2**).



ABZ = Albendazol, MTZ = Metronidazol

Gráfico 2. Comparación de las DL₅₀ de carboxamidas 1-metilbencimidazólicas en *G. lamblia*

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.2.3. Efecto de las carboxamidas 1-metilbencimidazólicas sobre *Tricomonas vaginalis*

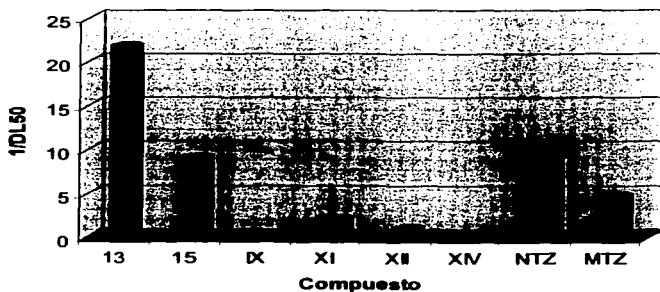
En la **Tabla 13** se muestran los resultados de la prueba de susceptibilidad *in vitro* de *T. vaginalis* de la carboxamida **15**, en donde se puede apreciar que muestra una actividad equiparable con la presentada por la Nitazoxanida, pero superior a la mostrada por el Metronidazol y Albendazol. En el caso de la carboxamida **13** se observa que fue más activa que los tres fármacos utilizados como control positivo.

Tabla 13. Evaluación antiprotozoaria de las carboxamidas **13** y **15** sobre *T. vaginalis*

Compuesto	DL ₅₀ (μ M)	Dosis* (μ g/mL)				
		0.005	0.010	0.050	0.100	0.500
13	0.046	20.10	56.40	62.00	89.90	97.50
15	0.111	30.85	36.80	46.10	64.50	76.60
Nitazoxanida	0.110					
Albendazol	1.592					
Metronidazol	0.216					

*Porcentaje de mortalidad a diferentes concentraciones

Comparando la DL₅₀ (obtenida mediante análisis Probit) de estos compuestos con una serie de bencimidazoles 1-metilados sintetizados previamente en nuestro laboratorio (**Tabla 5**), se observó que solo los compuestos **XI** y **XII** mostraron efectividad superior al Albendazol, pero resultaron menos activos que el Metronidazol y Nitazoxanida (**Gráfico 3**). Esto nos demostró que la actividad obtenida para las dos compuestos sintetizados en este trabajo con un grupo voluminoso en la posición 6 del anillo de bencimidazol resulta ser mejor a la presentada por la serie de compuestos ya reportada. Sería interesante conocer la actividad de los compuestos mostrados en la **Tabla 11** para conocer la relación que guardan las posiciones de estos sustituyentes con la actividad sobre este parásito.



NTZ = Nitazoxanida, MTZ = Metronidazol

Gráfica 5. Comparación de las DL₅₀ de carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas en *T. vaginalis*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Instrumentación

- ✓ Las hidrogenaciones catalíticas se realizaron en un hidrogenador marca Parr Modelo 3916EG con 60lb/in² y 80 °C como capacidad máxima, adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney marca Aldrich.
- ✓ La determinación de los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Büchi Modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos
- ✓ La concentración de las soluciones se llevaron a cabo en un rotaevaporador marca Büchi Modelo R-114 con vacío generado con bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F y compresora VWR Scientific Modelo 1107.
- ✓ Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra (ID), en un aparato marco Jeol Modelo JMS-SX102A. La simbología utilizada es M⁺ = ión molecular, m/z = relación masa/carga y p.b. = pico base.
- ✓ Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer Modelo 1605, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales son reportadas en cm⁻¹
- ✓ Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H) de 300 MHz se determinaron en un equipo Varian Modelo VRX-300 MHz, utilizando como disolventes dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), acetona deuterada (acetona-*d*₆) y deuterocloroformo (CDCl₃). Como Referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm). La simbología empleada son: s = singulete, d = doblete, sd = singulete dobleteado, sa = singulete amplio, dd = doble de dobles, m = multiplete.

Parte Experimental

- ✓ El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos fueron visualizados con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a vapores de yodo. Los sistemas de elución utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo:Metanol	95:5
II	Cloroformo:Metanol	90:10
III	Cloroformo:Metanol	98:2
IV	Cloroformo :Acetona	95:5

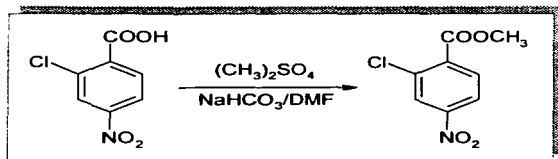
- ✓ La separación de los intermediarios de síntesis se llevó a cabo por cromatografía en columna, utilizando gel de sílice 60 (Merck), con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm y malla ASTM 70-230.
- ✓ La separación de los productos bencimidazólicos se llevó a cabo por cromatografía en columna Flash, utilizando una columna de vidrio empacada con gel de sílice 60 (Merck), con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm y malla 230-400. Se empleó una velocidad de flujo de in^2/min lograda mediante una bomba a 5.5 lb/in^2 de presión.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7.2. Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

7.2.1. 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)

Esterificación

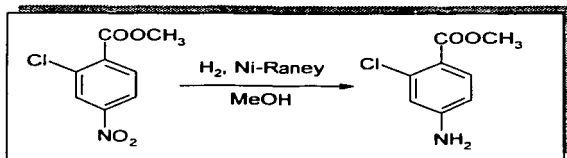


En un matraz de 1L de 3 bocas, provisto de termómetro, columna vigreux y embudo de adición, se disolvieron 150g (0.744 mol) del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**) en 450 mL de DMF a 50°C. Posteriormente se adicionó 125g (2 equivalentes, 1.48 mol) de NaHCO₃ en suspensión acuosa; se verificó que el pH estuviera en 7 y se agregó gota a gota 105.6 mL (1.5 equivalentes, 1.11 mol) de sulfato de dimetilo a una temperatura de 60-65°C. Terminada la adición se dejó reaccionando por 40 minutos en las mismas condiciones. Después una CCF reveló el consumo total de materia ($R=0.24$, sistema I), por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua, filtró al vacío y lavó repetidas veces con agua. El producto crudo, el cual tenía una apariencia color amarillo claro, pesó 157.4g (98.11%); Una pequeña parte se recristalizó de EtOH dando unos cristales amarillos brillantes (95.32%) con p.f. de 76-77°C.

La espectroscopia IR mostró en KBr las siguientes señales: 3099 cm⁻¹ (C-H aromático), 2965 cm⁻¹ (CH₃ de éster), 1720 cm⁻¹ (C=O de éster), 1528 y 1356 cm⁻¹ (NO₂ aromático), 1297 cm⁻¹ (C-O de éster). La espectrometría de masas (CG/ID) mostró un M⁺ de 215 con un 32% de abundancia relativa, un M+2 del 10% y un p.b. de m/z de 184. La espectroscopia de RMN ¹H en CDCl₃ mostró las siguientes señales: 3.99 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 7.97 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6), 8.16 ppm (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, H-5), 8.32 ppm (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-3).

7.2.2. 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)

Hidrogenación catalítica.

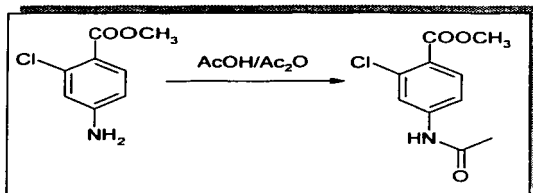


En un matraz de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 30g (0.1392 mol) del 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2) y 9g (30%) de catalizador Niquel-Raney, previamente lavado con agua y MeOH en 230 mL de MeOH. El matraz se colocó en el sistema de hidrogenación y se purgó el aire presente mediante tres lavados de aproximadamente 30 lb/in² de hidrógeno, después se inyectó hidrógeno hasta una presión de 60 lb/in². La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 2 horas, consumiéndose 647 lb/in² de hidrógeno. La suspensión translúcida se procesó eliminando el catalizador por filtración al vacío. El filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador, dando un sólido color blanco con R_f 0.43 (sistema 1+ 2 gotas de NH₄OH), el cual pesó 25.6g (99.13%). Una pequeña parte se recrystalizó de agua obteniéndose de esta forma un sólido blanco cristalino (94.56%) con un p.f. de 107-108 °C.

El IR en KBr mostró bandas características a 3246 y 3336 cm⁻¹ (NH₂ aromático), 3221 cm⁻¹ (C-H aromático), 2951 cm⁻¹ (CH₃ de éster) 1703 cm⁻¹ (C=O de éster), 1248 cm⁻¹ (C-O del éster). La espectrometría de masas (CG/ID) mostró un M⁺ de 185 con un 45% de abundancia, un M+2 del 15% y un p.b. de m/z de 154. La espectroscopia de RMN ¹H en DMSO-d₆ mostró las siguientes señales: 3.71 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 6.17 ppm (sa, 2H, desap. con D₂O, NH₂), 6.49 ppm (dd, J₁=8.4 Hz, J₂= 2.4 Hz, 1H, H-5), 6.61 ppm (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.62 ppm (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6).

7.2.3. 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)

Acetilación

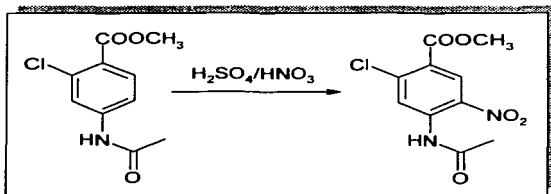


En un matraz bola de 250 mL de una boca provisto de una columna vigreux y trampa de humedad, se disolvieron 53.9g (0.290 mol) del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3) en 47 mL de ácido acético glacial a temperatura ambiente. Posteriormente, a esta temperatura y con agitación constante, se adicionó 21 mL de anhídrido acético y se dejó reaccionar por 20 min. aproximadamente. La CCF reveló el consumo total de materia prima, por lo que la mezcla de reacción se procesó vertiéndola en 150 mL de agua helada, el sólido formado se separó por filtración al vacío, lavó con agua y finalmente secó en la estufa dando 58.9g (89.10%) de un sólido blanco que en CCF presentó una sola mancha ($R_f = 0.23$, sistema I). Una pequeña parte se recrystalizó de tolueno. El p.f. determinado fue de 113-114°C.

La espectroscopia IR en KBr mostró las siguientes señales: 3260 cm^{-1} (-NH-), 3089 cm^{-1} (C-H aromático), 2951 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1730 cm^{-1} (C=O de éster), 1677 cm^{-1} (C=O de amida), 1249 cm^{-1} (C-O del éster). La espectrometría de masas (CG/ID) mostró un M^+ de 227 con una abundancia relativa de 44%, un $M+2$ del 15% y un p.b. de m/z de 154. La espectroscopia de RMN ^1H en CDCl_3 mostró a 2.07 ppm (s, 3H, CH_3 de amida), 3.80 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.53 ppm (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, 1H, H-5), 7.82 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6), 7.89 ppm (sd, 1H, H-3), 10.38 ppm (sa, 1H, desap. con D_2O , N-H de la acetamida).

7.2.4. 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)

Nitración con mezcla sulfonítrica.



En un vaso de precipitados de 500 mL, acondicionado con termómetro, embudo de adición y sumergido en un baño de hielo con sal, se disolvieron 58.9g (0.258 mol) del 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4) en 110 mL de H_2SO_4 concentrado a una temperatura entre 2-7°C. Una vez disuelto el sustrato se le adicionó, poco a poco, 50 mL de mezcla sulfonítrica (1:1) preparada como se describe abajo.

La temperatura de adición se realizó entre 4-9°C; una vez terminada la adición (aproximadamente 1 hora), se realizó la CCF donde se mostró el consumo total de la materia prima, así como la formación de 2 productos en relación 8:2, por lo que ésta se vertió inicialmente en 200 mL de agua helada y hielo picado. Se neutralizó con NaHCO_3 y se filtró al vacío. De esta forma se obtuvieron 64.2g de un sólido amarillo claro (90.92%). Todo el producto crudo se recrystalizó de AcOEt dando unos cristales amarillos brillantes que pesaron 58.7 g (83.49%) y con un R_f de 0.65 (sistema I). El p.f. determinado fue de 140-141°C.

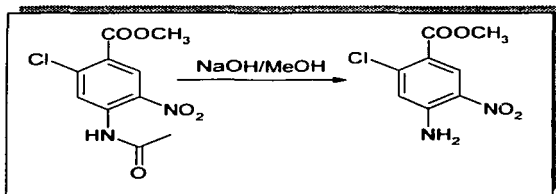
Preparación de la mezcla sulfonítrica: 25 mL de H_2SO_4 conc y 25 mL de HNO_3 conc se colocaron por separado en vasos de precipitados de 50 mL en un baño de hielo con sal. Cuando se alcanzó una temperatura de 0°C se empezó la adición del H_2SO_4 al HNO_3 , elevándose la temperatura en las primeras adiciones hasta 9°C. Cuando la temperatura descendió a 3°C otra vez se agregó más H_2SO_4 y así sucesivamente hasta tener los 50 mL juntos. Posteriormente, el vaso de precipitados se tapó y se colocó en el baño de hielo con sal hasta alcanzar una temperatura de 0°C para que

finalmente fuera colocado su contenido en un embudo de adición. La preparación de esta mezcla tomó aproximadamente una hora.

El análisis espectroscópico de IR en KBr mostró las siguientes señales: 3342 cm^{-1} (N-H de amida), 3124 cm^{-1} (C-H aromático), 2953 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1732 cm^{-1} (C=O de éster), 1716 cm^{-1} (C=O de amida), 1529 y 1336 cm^{-1} (NO_2 aromático), 1230 cm^{-1} (C-O de éster). La espectrometría de masas por CG/ID mostró un M^+ de 272 con un 15% de abundancia relativa, un $\text{M}+2$ del 5% y un p.b. de m/z de 230. La espectroscopia de RMN ^1H en CDCl_3 mostró las siguientes señales: 2.13 ppm (s, 3H, CH_3 de acetamida), 3.86 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 8.02 ppm (s, 1H, H-3), 8.42 ppm (s, 1H, H-6), 10.53 ppm (s, 1H, desap. con D_2O , N-H de acetamida).

7.2.5. 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)

Hidrólisis



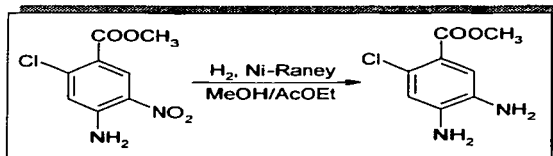
En un matraz de 1 L con 3 bocas, adaptado con termómetro y embudo de adición y sumergido en un baño de hielo, se colocaron 584 mL de MeOH junto con un equivalente (10.31g) de NaOH acuosa. A 3°C, y con agitación constante, se incorporó, poco a poco 70.3g (0.257 mol) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5) cuidando de que la temperatura no se elevara más de 5°C. La primera CCF realizada mostró además del producto, presencia de materia prima, por lo que se dejó elevar la temperatura a 15°C por 1½ horas. La segunda CCF realizada mostró consumo total de materia prima, por lo que la mezcla de reacción se neutralizó con AcOH al 20% donde se observó la presencia de un precipitado, el cual se separó por filtración al vacío y se lavó con MeOH repetidas veces. De esta forma se obtuvo 57.5g (96.69%) de un sólido color amarillo limón que en CCF presentó una sola

mancha ($R_f = 0.67$, sistema I). Una pequeña parte fue recristalizada de EtOH dando 90.10% de rendimiento. El p.f. encontrado fue de 222.5-223°C.

La espectroscopia IR en KBr mostró las siguientes bandas: 3451 y 3341 cm^{-1} (NH_2 aromático), 3120 cm^{-1} (C-H aromático), 2952 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1714 cm^{-1} (C=O de éster), 1549 y 1326 cm^{-1} (NO_2 aromático), 1286 cm^{-1} (C-O del éster). La espectrometría de masas por CG/IE mostró un M^+ de 230 con un 62% de abundancia relativa, un $M+2$ del 21% y un p.b. de m/z de 199. La espectroscopia de RMN ^1H en acetona- d_6 mostró las siguientes señales: 3.85 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.21 ppm (s, 1H, H-3), 7.58 ppm (sa, 2H, desap. con D_2O , NH_2), 8.70 ppm (s, 1H, H-6).

7.2.6. 4,5-Diamina-2-clorobenzoato de metilo (7)

Reducción catalítica

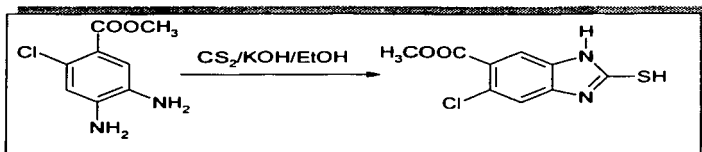


En un matraz de hidrogenación de vidrio de 500 mL se suspendieron 15g (0.0650 mol) del 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6) en una mezcla de MeOH/AcOEt (150mL/100mL) y 4.5g (30%) de catalizador Niquel-Raney, el cual fue previamente lavado 3 veces con agua y MeOH. Una vez instalado el matraz en el sistema de hidrogenación, el aire del matraz se eliminó por tres lavados de 30 lb/in² de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a 32°C por 2½ horas consumiéndose 407 lb/in² de hidrógeno. La CCF reveló una mancha principal con un R_f de 0.17 (sistema 1 + 2 gotas de NH_4OH), por lo que la mezcla de reacción se procesó filtrando el catalizador al vacío, el filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador obteniéndose un sólido color morado, el cual pesó 12.7g (97.33%).

El análisis espectroscópico de IR mostró en KBr las siguientes señales: 3403 y 3325 cm^{-1} (NH_2 aromático), 3081 cm^{-1} (C-H aromático), 2952 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1712 cm^{-1} (C=O de éster), 1209 cm^{-1}

(C-O del éster). La espectrometría de masas por CG/IE mostró un M^+ de 200 con un 100% de abundancia relativa y un $M+2$ del 34%. La espectroscopia de RMN 1H en DMSO- d_6 dió señales a 3.70 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 4.84 ppm (sa, 2H, desap. con D_2O , NH_2), 5.48 ppm (sa, 2H, desap. con D_2O , NH_2), 6.53 ppm (s, 1H, H-3), 7.10 ppm (s, 1H, H-6).

7.2.7. 5-Cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-6-carboxilato demetilo (8)
Cidocondensación.



En un matraz "taper Kontes" de 500 mL, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 23g (0.1147 mol) de la *o*-fenilendiamina (7) en 173 mL de EtOH a temperatura ambiente. A la solución enfriada a 10°C se le adicionó lentamente una mezcla de xantato de etilo recién preparada como se indica abajo.

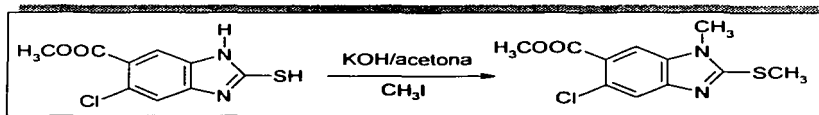
Terminada la adición, se colocó un baño de agua caliente para elevar la temperatura entre 65-72°C, y se dejó reaccionando por 2 horas. La primera CCF realizada reveló además del producto, presencia de materia prima, el pH del medio se determinó que era de 9, por lo que tuvo que se adicionaron 3 mL más de CS_2 , dejándolo reaccionar por 2 horas más.

Una vez consumida la materia prima, la mezcla de reacción se vertió en 700 mL de agua y con agitación magnética continua se adicionó AcOH al 10% para ajustar el pH a 5. El sólido formado finalmente se separó por filtración al vacío y se lavó con agua repetidas veces. El producto crudo, el cual se observó como un sólido color café pesó 27.6g (99.22%), y su análisis por CCF dio una sola mancha con $R_f = 0.26$ (sistema I). Una pequeña parte del producto crudo se recrystalizó de EtOH + 10% de DMF usando carbón activado, el rendimiento de la recrystalización fue del 88.21%. De esta forma se obtuvieron unos cristales blancos cuyo p.f. fue de 253.5-254.2 °C.

Preparación del Xantato deetilo: En un matraz bola de 150 mL de 2 bocas adaptado con termómetro y embudo de adición, se disolvieron 13.8 mL (2 equivalentes, 0.098 mol) de CS₂ en 29.4 mL de EtOH en un baño de agua fría y con agitación constante. Posteriormente se le gotearon 12.86g de KOH disueltos en 13mL de H₂O (2 equivalentes, 0.098 mol). Terminado el goteo y cuando el medio de reacción se tornó de color naranja, el matraz se dejó aproximadamente 15 min. en un baño de agua fría para posteriormente pasar su contenido al embudo de adición colocado en el matraz que contenía al sustrato ya disuelto

El espectro de IR en KBr mostró las siguientes bandas: 3268 cm⁻¹ (N-H), 3116 y 3038 cm⁻¹ (C-H aromático), 2908 cm⁻¹ (CH₃ de éster), 2784 cm⁻¹ (SH), 1710 cm⁻¹ (C=O de éster), 1252 cm⁻¹ (C-O de éster). La espectrometría de masas (CG/ID) dio un M⁺ de 242 con un 100% de abundancia relativa y un M+2 del 38%. El espectro de RMN ¹H en DMSO-d₆ mostró a 3.82 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 7.22 ppm (s, 1H, H-4), 7.52 ppm (s, 1H, H-7), 12.91 ppm (s, 2H, desap. con D₂O, NH).

**7.2.8. 5-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (9)
6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)**
Metilación.



En un matraz "taper Kontes" de 250 mL, provisto de termómetro, embudo de adición, atmósfera de nitrógeno y sumergido en un baño de agua helada, se disolvieron 12g (0.049 mol) del compuesto **8** en 120 mL de acetona Q.P. junto con 5.55g (2 equivalentes, 0.098 mol) de KOH acuosa. Posteriormente a una temperatura de 10-12°C, se adicionó gota a gota 6.16 mL (2 equivalentes, 0.098 mol) de CH₃I. Terminada la adición se le quitó el baño de agua para dejar que la reacción procediera a temperatura ambiente. La primera CCF realizada mostró presencia de materia prima, por lo que el pH de reacción se ajustó a 9 agregando 1.2g más de KOH acuosa, además de 2 mL de CH₃I. Después de 4 horas se observó la presencia de un sólido en el fondo del matraz. La última CCF realizada mostró los 2

productos de metilación (**9,10**), por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua, neutralizó, filtró al vacío y lavó repetidas veces con agua. De esta forma se obtuvo un sólido color café claro el cual pesó 10.3g (76.95%). De las aguas madres se recuperaron 0.9g (rend. total= 83.67%) de un sólido más oscuro que el inicial. Los R_f mostrados para los dos isómeros obtenidos fueron R_{f1} = 0.22 (**10**), R_{f2} = 0.32 (**9**), [Sistema CHCl_3 :MeOH 98:2].

Una parte del producto como tal se sometió a la siguiente reacción, mientras que el resto (5g), se separó a través de una columna cromatográfica flash utilizando CHCl_3 como fase móvil y gel de sílice como fase estacionaria, con un flujo de 1.5 in/min. Se obtuvo 1.8g (36%) del isómero de R_f menor, y 1.7g (34%) del compuesto de interés (del R_f mayor), el cual se recrystalizó de EtOH, dando unos cristales blancos nacarados cuyo p.f. fue de 124-124.5 °C

El análisis espectroscópico de IR en KBr mostró señales a 3017 cm^{-1} (C-H aromático), 2942 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1726 cm^{-1} (C=O de éster), 1230 cm^{-1} (C-O de éster). El análisis espectrométrico de masas (IE/CG) mostró un M^+ de 270 con 100% de abundancia relativa y un $\text{M}-2$ del 39%. El espectro de RMN ^1H en CDCl_3 mostró las siguientes señales: 2.85 ppm (s, 3H, SCH_3), 3.69 ppm (s, 3H, NCH_3); 3.95 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.73 ppm (s, 1H, H-4), 7.77 ppm (s, 1H, H-7).

7.2.9. Acido 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-6-carboxílico (11**)
Acido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**12**)**
Hidrólisis



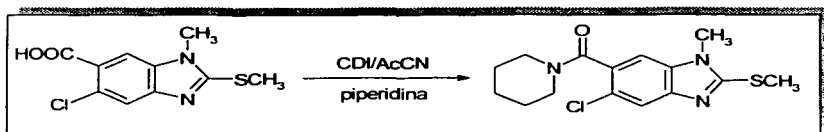
En un matraz "taper Kontes" de 100 mL con 3 bocas, acondicionado con termómetro, embudo de adición y condensador en posición de reflujo, se suspendieron 10g de la mezcla obtenida de la reacción anterior (**9,10**) en 40 mL de MeOH. A temperatura ambiente se adicionó 4.14g (2 equivalentes, 0.073 mol) de KOH en solución acuosa, se observó disolución total del sustrato en el medio de reacción. Posteriormente, la mezcla se calentó a 50-60°C por una hora. Terminada la

materia prima, la reacción se vertió en 120 mL de agua y se aciduló con H_2SO_4 al 20% a pH de 4. El sólido formado se separó al vacío, lavó con agua y se secó al aire dando 8.7g (91.74%) de un sólido color crema, que analizado por CCF presentó dos manchas con $R_{f1}=0.44$, $R_{f2}=0.41$ (sistema I).

Para la determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **11**, se utilizó las aguas madres del producto separado de la reacción anterior para someterlo a la hidrólisis. Se obtuvo 100 mg los cuales se recristalizaron de EtOH dando unos cristales blancos brillantes con un R_f de 0.43 (sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5). El punto de fusión determinado fue de 252.5-254.4 °C.

El espectro de IR en KBr mostró bandas a 2935 cm^{-1} (OH de ácido), 1726 cm^{-1} (C=O de éster), 1189 cm^{-1} (C-O de éster). El espectro de masas (IE/ID) mostró un M^+ de 256 con un 100% de abundancia relativa y un $\text{M}+2$ del 42%. El análisis por espectroscopia de RMN ^1H en $\text{DMSO}-d_6$ mostró las siguientes señales: 2.70 ppm (s, 3H, SCH_3); 3.69 ppm (s, 3H, NCH_3); 7.64 ppm (s, 1H, H-4); 7.96 ppm (s, 1H, H-7); 13.12 ppm (sa, 1H, int. con D_2O , O-H de ácido).

7.2.10. 5-Cloro-1-metil-2-metiltio-6-[(1-piperidinil)carbonil]-1H-bencimidazol (13)
6-Cloro-1-metil-2-metiltio-5-[(1-piperidinil)carbonil]-1H-bencimidazol (14)
Formación de la amida bencimidazólica



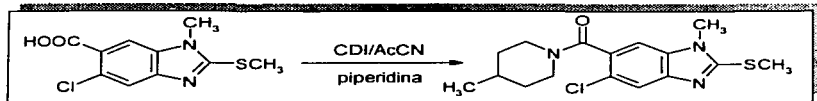
En un matraz de 3 bocas de 100 mL sellado con 3 septums, se colocaron bajo condiciones anhidras, 4.54g (1.5 equivalentes, 0.027 mol) de 1,1'-carbonildiimidazol, 4.8g (0.0186 mol) del sustrato obtenido de la reacción anterior (**11,12**) y 20 mL de AcCN. Inmediatamente, al matraz se le adaptaron un refrigerante, trampa de humedad, embudo de adición y termómetro; luego se sumergió en un baño de agua tibia para que se alcanzara una temperatura de 45-50°C. En un lapso corto de tiempo se observó completa disolución y evolución de CO_2 de la mezcla de reacción. Trascurrida 1 hora se

realizó una CCF la cual mostró una mancha brillante a la luz corta del UV correspondiente a la formación del imidazolóido intermediario con R_f 0.26 (sistema IV). Posteriormente la mezcla de reacción se dejó enfriar a 10 °C, luego se le incorporó 3.69 mL (2 equivalentes, 0.037 mol) de piperidina disuelta en 3 mL de AcCN. La mezcla de reacción se calentó nuevamente a 65°C por 2½ horas. Terminada la reacción la mezcla se concentró en el rotaevaporador hasta sequedad, el sólido formado se disolvió en 50 mL de AcOEt, se lavó primero con una solución de HCl al 5%, luego con una solución de NaHCO₃ al 5% y finalmente con agua salada. Posteriormente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se llevó a sequedad en el rotaevaporador de alto vacío. De esta forma se obtuvo una miel altamente viscosa de 6.2g (103.19%) que analizado por CCF mostró dos manchas con R_{f1} = 0.46 y R_{f2} =0.53 (Sistema I).

4g del producto crudo se separaron por cromatografía de columna flash, donde se utilizó como sistema de elución CHCl₃ al 100% al inicio, y posteriormente se cambió la polaridad al 99% (CHCl₃:MeOH). El flujo fue de 2 in/min. El producto de R_f menor se obtuvo como miel con un peso de 1.5g (37.5%) mientras que el de R_f mayor (compuesto de interés) también se obtuvo como una miel que pesó 1.0g (25%). Ambos productos fueron precipitados con éter de petróleo y éste último fue recristalizado de una mezcla de AcCN:MeOH (2:0.5) el cual dio unas agujas blancas brillantes de p.f. de 207.7-208.1 °C.

El análisis espectroscópico por IR (KBr) mostró las siguientes señales: 3035 cm⁻¹ (C-H aromático), 2934 cm⁻¹ y 2852 cm⁻¹ (NCH₃ y S-CH₃), 1625 cm⁻¹ (C=O de amida). En el espectro de masas (EI/D) se observó el M⁺ de m/z 323 con un 40% de abundancia relativa, un M+2 del 15% así como el p.b. del espectro a una relación de m/z de 239. El análisis espectroscópico de RMN ¹H en DMSO-*d*₆ mostró señales a 1.40-1.43 ppm (m, 2H, H-4'), 1.56-1.62 ppm (m, 4H, H-3',H-5'), 2.71 ppm (s, 3H, S-CH₃); 3.03-3.09 ppm (m, 2H, H-2' o H-6'); 3.53-3.58 ppm (m, 1H, H-2' o H-6'); 3.66 ppm (s, 4H, N-CH₃, H-2' o H-6'); 7.53 ppm (s, 1H, H-4); 7.64 ppm (s, 1H, H-7).

7.2.11. 5-Cloro-1-metil-6-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (15)
 6-Cloro-1-metil-5-[(4-metilpiperidinil)carbonil]-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (16)
 Formación de la amida bencimidazólica



En un matraz de 3 bocas de 100 mL, sellado con 3 septums, se colocaron bajo condiciones anhidras 3.47g (1.5 equivalentes, 0.021 mol) de 1,1'-carbonildiimidazol, 3.66g (0.0142 mol) de materia prima (mezcla isomérica de ácidos) y 15 mL de AcCN. Inmediatamente, al matraz se le adaptaron un refrigerante, trampa de humedad, embudo de adición y termómetro; después se sumergió en un baño de agua tibia para que se alcanzara una temperatura de 45-50°C. En un lapso corto de tiempo se observó completa disolución y evolución de CO₂ de la mezcla de reacción. Trascorrida 1 hora se realizó una CCF la cual mostró una mancha brillante a la luz corta del UV correspondiente a la formación del imidazólido intermediario con $R_f=0.27$ (sistema IV). Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 10°C, después se le incorporó 3.37 mL (2 equivalentes, 0.028 mol) de metilpiperidina disuelta en 2.5 mL de AcCN. La mezcla de reacción se calentó nuevamente a 65°C por 2½ horas. Terminada la reacción, la mezcla se concentró en el rotaevaporador hasta sequedad, el sólido formado se disolvió en 50 mL de AcOEt, se lavó primero con una solución de HCl al 5%, luego con una solución de NaHCO₃ al 5% y finalmente con agua salada. Posteriormente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se llevó a sequedad en el rotaevaporador. De esta forma se obtuvo 5.0g de una miel altamente viscosa, que analizada por CCF mostró dos manchas con $R_{f1}=0.48$ y $R_{f2}=0.55$ (Sistema CHCl₃/MeOH 95:5).

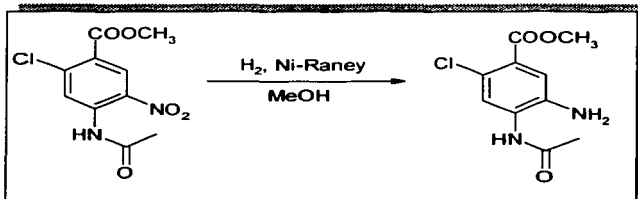
5g del producto crudo se separaron por cromatografía de columna flash, donde se utilizó como sistema de elución CHCl₃ al 100% como inicio, luego se cambió la polaridad al 99% (CHCl₃:MeOH). El flujo fue de 2 in/min. El producto de R_f menor (14), se obtuvo como miel con un peso de 1.2g (24%) mientras que del R_f mayor (compuesto de interés, 15) también se obtuvo como una miel que pesó 0.9g (18%). Ambos productos fueron precipitados con éter de petróleo y ciclohexano y éste último

intentó ser recristalizado de una mezcla de AcCN:EtOH, sin embargo solo se obtuvo un sólido color crema de p.f. 157.5-158.9 °C.

El análisis espectroscópico de IR en KBr mostró señales a 2924 cm^{-1} y 2856 cm^{-1} (NCH₃ y SCH₃), 1614 cm^{-1} (C=O de amida), 1467 cm^{-1} y 1421 cm^{-1} (C=N). La espectroscopia de masas por IE/CG mostró el M⁺ en *m/z* de 337 con un 92% de abundancia relativa, un M+2 del 35% y un p.b. de *m/z* de 239. En el espectro de RMN ¹H en DMSO-*d*₆ mostró las siguientes señales: 0.89 ppm (d, *J* = 6.3 Hz 3H, CH₃ en 4'), 0.94-1.14 ppm (m, 2H, H-3' o H-5'), 1.43-1.72 ppm (m, 3H, H-4', H-3' o H-5'), 2.71 ppm (s, 4H, S-CH₃, H-2' o H-6'), 2.87-3.01 ppm (m, 1H, H-2' o H-6'), 3.17-3.25 ppm (m, 1H, H-2' o H-6'), 3.66 ppm (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, N-CH₃), 4.50 ppm (sd, 1H, H2' o H6'), 7.52 ppm (s, 1H, H-4), 7.63 ppm (s, 1H, H-7).

7.2.12. 4-Acetamido-5-amino-2-clorobenzoato de metilo (17)

Reducción catalítica.



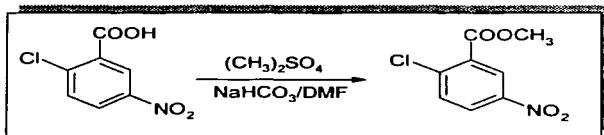
En un matraz de hidrogenación de 500 mL se colocaron 0.5g (0.0018mol) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5), 50 mL de MeOH y 0.125 g (25%) de catalizador Ni-Raney, el cual previamente fue lavado con agua y MeOH. Una vez colocado el matraz en el sistema de hidrogenación, se purgo el aire del matraz por inyección de aproximadamente 30 lb/in² de hidrógeno tres veces. La reacción se inició inyectando hidrógeno a una presión de 60 lb/in² a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo en 8 horas, hasta que el consumo de hidrógeno cesó. Una CCF mostró el consumo total de la materia prima (*R_F* = 0.053, sistema 1 + 2 gotas de NH₄OH), por lo que la mezcla de reacción fue procesada eliminando el catalizador por filtración al vacío y el filtrado se

concentró en el rotaevaporador, obteniéndose un sólido amarillo que inmediatamente fue analizado por IR, donde se demostró que era el producto esperado. El producto crudo se utilizó como tal para la siguiente reacción.

El espectro de IR en KBr mostró señales a 2426, 3357 y 3254 cm^{-1} (NH_2 y NH de la acetanilida), 1699 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ de éster), 1660 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ de amida), 2951 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1244 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ del éster).

7.2.13. 2-Cloro-5-nitrobenzoato de metilo (27)

Esterificación.

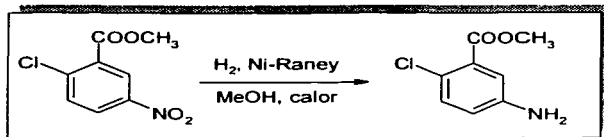


En un matraz bola de 250 mL de 3 bocas, adaptado con termómetro, embudo de adición y condensador en posición de reflujo, se disolvieron con agitación constante 40g (0.1985 mol) del ácido 2-cloro-5-nitrobenzoico comercial (**26**) en 120 mL de DMF a 50 °C en un baño de agua caliente. A la solución se le adicionó lentamente 33.35g (2 equivalentes, 0.397 mol) de NaHCO_3 en suspensión acuosa y posteriormente se verificó que el pH de la mezcla de reacción estuviera en 7. A este pH y a 60°C se adicionaron gota a gota 27.2 mL (1.5 equivalentes, 0.297 mol) de sulfato de dimetilo y se dejó reaccionando por 2½ horas a 75°C. Una vez consumida la materia prima, la mezcla de reacción se dejó enfriar para posteriormente verterla sobre 800 mL de agua donde se observó un precipitado color amarillo claro. El sólido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua repetidas veces y se secó al aire dando 41.3g (96.54%) de producto crudo, el cual posteriormente se recristalizó de EtOH, dando unos cristales amarillos brillantes (91.52%) que en CCF dieron una sola mancha ($R_f = 0.78$, sistema II + una gota de ácido acético). El punto de fusión determinado fue 67.5-70 °C.

La espectroscopia IR (KBr) mostró las siguientes señales: 3107 cm^{-1} (C-H aromático), 2957 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1731 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ del éster), 1525 y 1349 cm^{-1} (NO_2 aromático), 1251 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$ del éster). La espectrometría de masas (CG/IE) mostró un M^+ de 215 con un 25% de abundancia relativa, un

M+2 de 10% y un p.b. de $m/z = 184$. La espectroscopia de RMN ^1H en CDCl_3 presentó señales a 4.0 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.66 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3), 8.28 ppm (dd, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 8.71 ppm (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H-6).

7.2.14. 5-Amino-2-clorobenzoato de metilo (28)
Hydrogenación catalítica.



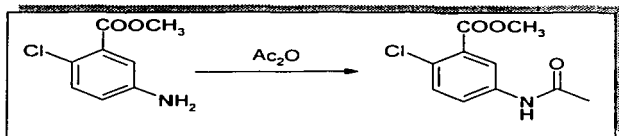
En un matraz de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 10g (0.0464 mol) del 2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**27**) en 200 mL de MeOH y 2g (20%) de catalizador Ni-Raney; previamente lavado con agua y MeOH. El matraz se adaptó al sistema de hidrogenación y el aire contenido en el matraz de hidrogenación se lavó por inyección y expulsión de 30 lb/in² de hidrógeno en tres ocasiones. La reacción se inició inyectando hidrógeno a una presión de 40 lb/in². La mezcla se calentó a 38-40 °C por medio de un reóstato. La reacción se llevó a cabo en 2½ horas consumiéndose 195 lb/in² de hidrógeno.

Posteriormente, la mezcla de reacción fue procesada eliminando el catalizador por filtración al vacío y el filtrado se concentró en el rotaevaporador dando una miel color café oscura que pesó 8.5g (98.83%). Este producto crudo, el cual dio una mancha principal en CCF $R_f = 0.46$ (sistema II + 2 gotas de NH_4OH), se utilizó como tal para la siguiente reacción.

La espectroscopia IR realizada en película mostró bandas características a 3463 y 3376 cm^{-1} (NH_2), 3225 cm^{-1} (C-H aromático), 2951 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1722 cm^{-1} (C=O de éster), 1240 cm^{-1} (C-O de éster). La espectrometría de masas (CG/IE) mostró un M+ de 185 con un 100% de abundancia relativa, así como un M+2 del 45%. La RMN ^1H mostró a 3.79 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 5.53 ppm (sa, 2H, desap. con D_2O , NH_2), 6.69 ppm (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 6.96 ppm (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-6), 7.13 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3).

7.2.15. 5-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29)

Acetilación



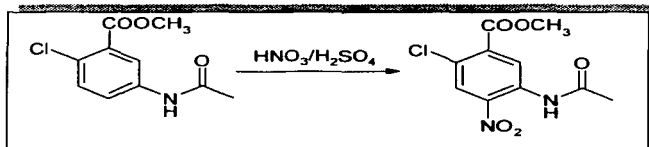
En un matraz bola de 250 mL de una boca, provisto con una columna vigreux y trampa de humedad, se colocaron 8.5g (0.0458 mol) de la amina **28**, obtenida de la reducción anterior (considerándola al 100%), y se trató en 13 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionando a temperatura ambiente y con agitación constante. El producto precipitó en la mezcla de reacción, por lo que se procesó vertiéndola en agua fría y desintegrando la pasta obtenida. Posteriormente el sólido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua varias veces dando de esta forma un sólido color crema el cual pesó 9.8g (94.0%). El producto en CCF mostró una sola macha ($R_f = 0.614$, sistema II), éste se recrystalizó de una mezcla de etanol-agua obteniendo unos cristales blancos que pesaron 9.6g (92.17%).

La espectroscopia IR (KBr) mostró las siguientes bandas: 3345 cm^{-1} (N-H de amida), 3040 cm^{-1} (C-H aromático), 2955 cm^{-1} (CH_3 de éster), 1714 cm^{-1} (C=O de éster), 1697 cm^{-1} (C=O de amida), 1248 cm^{-1} (C-O de éster). La espectrometría de masas CG/IE mostró un M^+ de 227 con un 35% de abundancia relativa, un $M+2$ del 15% y un p.b. de $m/z = 185$. La espectroscopia de RMN ^1H en CDCl_3 mostró señales a 2.18 ppm (s, 3H, CH_3 de amida), 3.90 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.36 ppm (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1H, H-3), 7.68 ppm (dd, $J_1 = 9.0\text{ Hz}$, $J_2 = 2.7\text{ Hz}$, 1H, H-4), 7.89 ppm (sa, 1H, desap. con D_2O , N-H de amida), 7.94 ppm (d, $J = 2.4\text{ Hz}$, 1H, H-6).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

7.2.16. 5-Acetamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (30)

Nitración con mezcla sulfonítrica



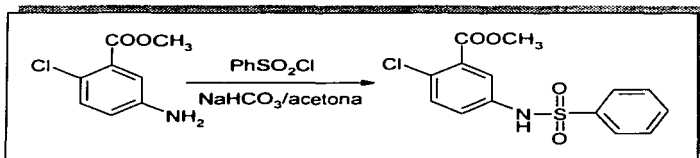
En un vaso de precipitados de 50 mL, provisto de termómetro y agitación magnética, se disolvieron 4g (0.0175 mol) del 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (29) en 8 mL de H₂SO₄ concentrado, a una temperatura de 0-5°C; posteriormente, se le adicionó, gota a gota, una mezcla sulfonítrica preparada como se describe abajo.

La adición de esta mezcla sulfonítrica al medio de reacción no se elevó más de 5°C. Cuando se consumió aproximadamente la mitad de la mezcla agregada, se realizó una CCF la cual mostró el consumo total de la materia prima y la formación de dos productos en relación 1:1 R_{11} = 0.56, R_{12} = 0.68. La mezcla de reacción finalmente se vertió en agua helada, filtró al vacío, y lavó con agua repetidas veces hasta su neutralización. El sólido obtenido, el cual pesó 3.9g (81.39%), se intentó recrystallizar de EtOH, sin embargo, no se logró conseguir la separación de los isómeros. Se realizó una cromatografía en columna, usando CHCl₃ como medio de elución para la separación de los productos y las fracciones colectadas se analizaron por espectroscopia de RMN.

Mezcla sulfonítrica: 3 mL de H₂SO₄ conc se colocaron en un vaso de precipitados de 5 mL en un baño de hielo con sal; de igual forma se colocaron en otro vaso 3 mL de HNO₃ conc. Cuando ambos ácidos se encontraban a 0°C la mezcla se hizo vertiendo lentamente el H₂SO₄ sobre el HNO₃ alcanzando una temperatura máxima de 5°C. Posteriormente esta mezcla a 0°C se colocó en un embudo de adición.

7.2.17. 5-Bencensulfonamido-2-clorobenzoato de metilo (33)

Sulfonación.

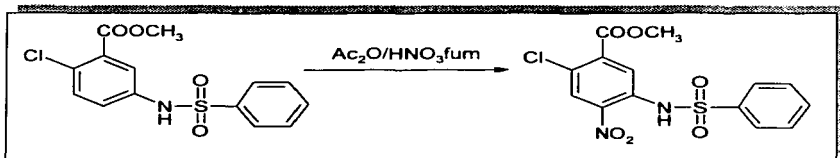


En un matraz bola de 150 mL de 3 bocas, adaptado con termómetro, columna vigreux y embudo de adición, se disolvieron 18.84g (0.1015 mol) de la miel obtenida de la reducción (considerándola al 100%) en 84.5 mL de acetona R.A. junto con 8.53g (1 equivalente) de NaHCO₃. La disolución se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación constante y se verificó que el pH estuviera en 7. Una vez disuelto y a esta temperatura se adicionó lentamente 14.28 mL (1.1 equivalentes) de cloruro de bencensulfonilo. Terminada la adición se colocó un baño de agua caliente para elevar la temperatura entre 40-45°C. La reacción procedió por 7 horas, donde una vez consumida la materia prima, la mezcla de reacción se vertió en 250 mL de agua, posteriormente se filtró al vacío dando un sólido de color crema, el cual pesó 31.3g (94.70%). La CCF dio una mancha opaca a la luz UV, el R_T obtenido fue de 0.36 sistema (sistema I). El producto crudo como tal se usó para la siguiente reacción.

La espectroscopia IR (KBr) mostró las siguientes bandas: 3228 cm⁻¹ (N-H de la bencensulfonamida), 2959 cm⁻¹ (CH₃ de éster), 1704 cm⁻¹ (C=O del éster), 1601 cm⁻¹ (R-NH-R), 1312 cm⁻¹ (R-SO₂-N), 1165 cm⁻¹ (C-O del éster). La espectrometría de Masas CG/IE mostró un M⁺ de 325 con un 94.5% de abundancia relativa, un M+2 del 35% y un p.b. de m/z = 77. La espectroscopia de RMN ¹H en CDCl₃ mostró señales a 3.88 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 7.07 ppm (dd, J₁= 8.7 Hz, J₂= 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.20 ppm (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 7.45 (sa, 1H, desap. con D₂O, N-H), 7.49-7.52 ppm (m, 1H, H-4'), 7.56 ppm (m, 2H, H-3', H-5'), 7.76 ppm (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-3), 7.85-7.88 ppm (m, 2H, H-2', H-6').

7.2.18. 5-Bencensulfonamido-2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (34)

Nitración con mezcla de nitrato de acetilo.



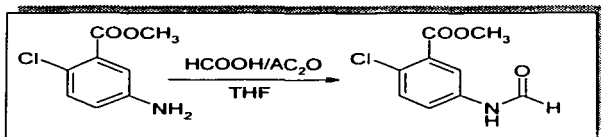
En un matraz de 25 mL de 3 bocas, adaptado con termómetro, embudo de adición, columna vigreux y trampa de humedad, se disolvieron con agitación constante 2g (0.0061 mol) del 5-bencensulfonamido-2-clorobenzoato de metilo (33) en 5.6 mL (9 equivalentes, 0.054 mol) de anhídrido acético a una temperatura de 45-50°C. Posteriormente, a una temperatura de 40°C se adionó, poco a poco, una mezcla de nitrato de acetilo, la cual se preparó vertiendo en frío 5 equivalentes (1.23 mL) de HNO₃ fumante sobre 5 equivalentes (3.13 mL) de anhídrido acético contenidos en un vaso de precipitados.

La adición de la mezcla de nitrato de acetilo al medio de reacción se llevó entre 40-50°C y una vez consumida la materia prima, la mezcla de reacción se vertió en 20 g de hielo, este se neutralizó con NaHCO₃ y se filtró al vacío. El sólido obtenido pesó 1.5g (75.54%) y se recristalizó de isopropanol dando unos cristales amarillos brillantes (70.27%) (*R_f* 0.78, sistema II), con punto de fusión de 147.7-148°C.

La espectroscopia IR en KBr mostró las siguientes señales: 3234 cm⁻¹ (N-H de bencensulfonamida), 3119 cm⁻¹ (C-H aromático), 2956 cm⁻¹ (CH₃ de éster), 1719 cm⁻¹ (C=O de éster), 1614 y 1549 cm⁻¹ (NO₂ aromático), 1353 cm⁻¹ (R-SO₂-N), 1287.75 y 1171 cm⁻¹ (C-O del éster). La espectrometría de masas (CG/IE) mostró un M⁺ de 370 con una abundancia relativa del 82%, un M+2 del 33%, así como un p.b. de *m/z* = 77. La espectroscopia de RMN ¹H en CDCl₃ dió señales a 3.93 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 7.53-7.68 ppm (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 7.93-7.96 ppm (m, 2H, H-2', H-6'), 7.95 ppm (s, 1H, H-6), 8.74 ppm (s, 1H, H-3), 10.19 ppm (s, 1H, desap. con D₂O, N-H de la bencensulfonamida).

7.2.19. 2-Cloro-5-formamidobenzoato de metilo (35)

Formilación.



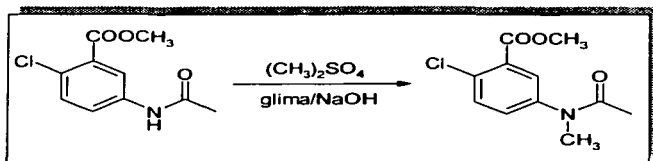
En un matraz de dos bocas de 100 mL, provisto de trampa de humedad y embudo de adición, se disolvieron 4.2g del 5-amino-2-clorobenzoato de metilo (**28**) en 5 mL de THF. Posteriormente, a temperatura ambiente, se adicionó 6.4 mL del anhídrido acético-fórmico, el cual fue preparado como se indica abajo.

Cuando ya no hubo presencia de materia prima (R_f 0.56, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10), la mezcla de reacción se concentró en el rotaevaporador y el sólido se lavó con agua. Finalmente, éste se separó por filtración al vacío dando un sólido color rosa pálido el cual pesó 4.56g (94.33%).

Preparación del anhídrido acético-fórmico: En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto de trampa de humedad, septum y sumergido en un baño de hielo, se colocaron 4.39 mL de Ac_2O junto con 1.97 mL de ácido fórmico. Esta mezcla se dejó reaccionando durante 1½ horas con agitación constante para que posteriormente fuera colocado en el embudo de adición de la mezcla de reacción.

La espectrometría de masas (IE/CG) mostró un M^+ 213 del 100% y un $M+2$ del 35%. La espectroscopia de RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$) mostró señales a 3.84 ppm (s, 3H, CH_3 de éster), 7.51 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3), 7.71 ppm (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 8.11 ppm (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-6), 8.31 ppm (sd, 1H, CHO), 10.49 ppm (sa, 1H, int. con D_2O , N-H de formamido).

7.2.20. 2-Cloro-5-(*N*-metilacetamido)benzoato de metilo (37)
N-metilación.



En un matraz de 50 mL de dos bocas, acondicionado con un termómetro y condensador en posición de reflujo, se disolvieron 3g (0.0131 mol) del 5-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**29**) en 3.5 mL de monoglima junto con 1.25 mL de sulfato de dimetilo, a 37-40°C. Posteriormente, a una temperatura de 32°C se le adicionó, poco a poco un equivalente (0.527g, 0.0131 mol) de NaOH acuosa al 5%. La primera CCF que se realizó mostró, además del producto, presencia de materia prima, por lo que se adicionó un equivalente más de NaOH y un equivalente de sulfato de dimetilo. La temperatura máxima alcanzada fue de 37°C y la segunda CCF realizada no mostró más avance, por lo que la mezcla de reacción se procesó vertiéndola en 20 mL de agua; el sólido formado, 2.2g (73.81%) se separó por filtración al vacío, y se lavó con agua repetidas veces. El producto crudo, el cual dio una sola mancha en CCF $R_f = 0.52$ (sistema II), se usó como tal para la siguiente reacción.

El producto analizado por espectrometría de masas (CG/IE) mostró un M^+ de 241 con un 30% de abundancia relativa, un $M+2$ del 10% y un p.b. de m/z de 199. La espectroscopia de RMN ¹H en CDCl₃ mostró señales a 1.90 ppm (s, 3H, CH₃ del acetamido), 3.26 ppm (s, 3H, N-CH₃), 3.96 ppm (s, 3H, CH₃ de éster), 7.27-7.29 ppm (m, 1H, H-4), 7.52 ppm (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3), 7.69 ppm (sd, 1H, H-6).

8. CONCLUSIONES.

Después de realizar la síntesis de las dos carboxamidas 1-metilbencimidazólicas y de evaluar su actividad contra el helminto *T. spiralis* y los protozoarios *G. lamblia* y *T. vaginalis*, los resultados alcanzados en el presente trabajo indicaron que tanto la carboxamida **13** como la **15** mostraron buena actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia* y *T. vaginalis*, no siendo así para el caso de la actividad antihelmintica sobre *T. spiralis*, ya que no se mostró efecto de los compuestos sobre dicho parásito.

Para probar la primera hipótesis de trabajo, se prepararon las dos carboxamidas 1-metilbencimidazólicas (**13** y **15**) mediante la secuencia de síntesis señalada en el **Esquema 1**. La síntesis de los intermediarios se llevó a cabo con rendimientos aceptables, aunque en las últimas reacciones (metilación, hidrólisis y formación de amidas) disminuyó el rendimiento por problemas de purificación, ya que al existir los compuestos como mezclas de isómeros, involucró su separación por medio de cromatografía en columna flash dando rendimientos muy pequeños. Una de las primeras cosas a demostrar fue si los compuestos **13** y **15** presentaban actividad antihelmintica al evitar el efecto tautomérico que sufre el anillo de bencimidazol; los resultados señalaron que ambos compuestos no mostraron reducción de la capacidad metabólica de *T. spiralis*, comprobando con ello la ausencia de actividad antihelmintica sobre este parásito y con ello se puede descartar la hipótesis inicialmente planteada. Con estos resultados de este experimento y comparando con sus análogos 1*H*-bencimidazoles, además se comprobó que el metilo en la posición 1 no es requerido para la actividad antihelmintica.

Por otra parte, con la introducción de un grupo metilo en la posición 1, además de anclar la molécula y observar el efecto antihelmintico, también se esperaba que las dos carboxamidas (**13** y **15**) tuvieran actividad antiprotozoaria, como se ha observado con otros compuestos bencimidazólicos 1-metilados sintetizados en nuestro laboratorio. La técnica de subcultivos, fue la manera en como se obtuvo los resultados de actividad antiprotozoaria, ya que mediante los datos de IC₅₀ se demostró que ambas carboxamidas (**13** y **15**), tuvieron actividad contra los protozoarios *G. lamblia* y *T. vaginalis*, comprobando con ello la segunda hipótesis planteada.

En el caso de la actividad antiprotozoaria contra el parásito *G. lamblia*, se demostró que la carboxamida **15** fue más eficaz que la carboxamida **13**, y en la actividad contra *T. vaginalis*, se demostró que la carboxamida **13** fue más activa que la **15**. Al comparar los resultados obtenidos para *G. lamblia* con otros derivados 1-metilados (recién evaluados en la unidad del IMSS), se observó que la relación estructural preferida para la actividad fue la 1,6 la cual mostró mejores resultados. Por otra parte, los resultados obtenidos con *T. vaginalis* se compararon con otros compuestos 1-metilbencimidazólicos con diversos sustituyentes en la posición 2 (**Tabla 5**), donde se demostró que los compuestos preparados en este trabajo (**13 y 15**), fueron más efectivos que los previamente sintetizados en nuestro laboratorio.

Con lo que respecta a la parte de síntesis o preparación de los compuestos de interés (**13 y 15**), es de importancia también notar que se propusieron secuencias de síntesis alternas para la obtención del compuesto *N*-metilado, con la finalidad de evitar el efecto tautomérico del anillo de bencimidazol, sin embargo ninguna condujo a la formación de este compuesto, por lo que los compuestos finales se obtuvieron como mezclas isoméricas y separados por cromatografía en columna flash.

Finalmente, es importante resaltar, que para haber obtenido los resultados presentados en este trabajo, todos los compuestos (tanto intermediarios como productos finales) tuvieron que ser purificados empleando las técnicas de cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía preparativa y recristalización simple, además de ser caracterizados mediante sus propiedades físicas más importantes como punto de fusión, *R_f* y por métodos espectroscópicos (RMN, IR) y espectrometría de masas. Además es importante señalar que con la preparación de estos compuestos, se adquirió experiencia en el laboratorio experimental para la obtención de moléculas nuevas de interés medicinal.

9. LITERATURA CITADA.

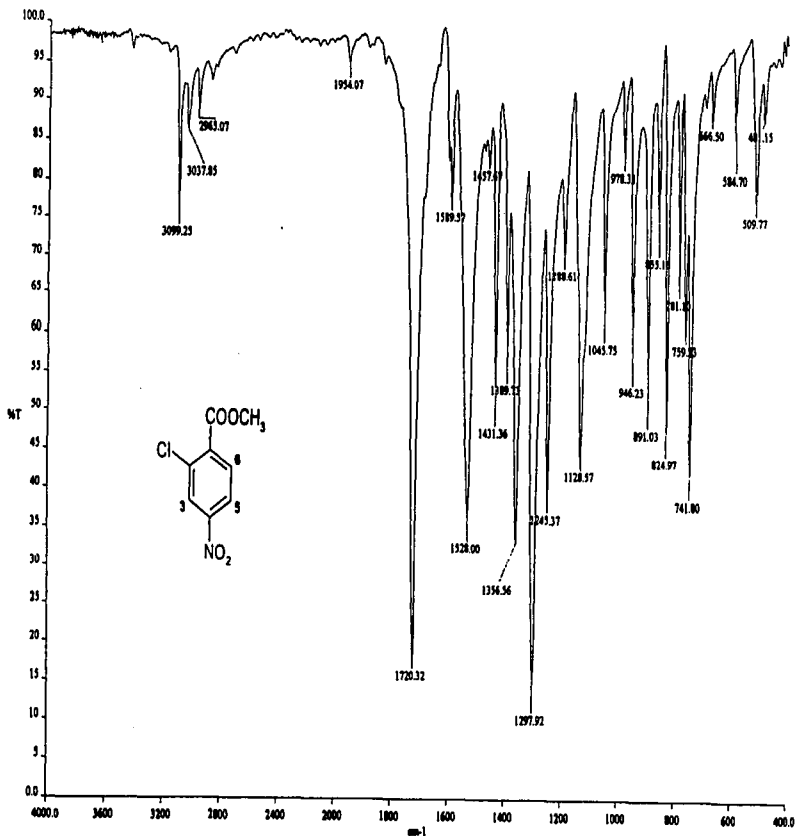
1. Ocampo, G.; Salgado, C.; La Omnipresencia de las Helmintiasis. *Salud Pública de México*, **1992**; 34(3).
2. Kumate, J.; Gutiérrez, G.; Muñoz, O.; Santos, J.; **Manual de Infectología Clínica**, 15ª Edición, Méndez Editores, México, D.F. **1998**; pp. 101.
3. Las parasitosis a fin de siglo. <http://www.funcei.org.mx>
4. Horton, R.J.; Benzimidazoles in a Wormy World. *Parasitology Today*, **1990**; 6(4):106.
5. Townsed, L.B., Wise, D.S.; The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today*, **1990**; 6(4):107.
6. Gottschall, D.W.; Wang, R.; The Metabolism of Benzimidazole Anthelmintics. *Parasitology Today*, **1990**; 6(4):115.
7. Roos, M.H.; The Molecular Nature of Benzimidazole Resistance in Helminths. *Parasitology Today*, **1990**; 6(4):125.
8. James, W.; Tracy y Leslie, T.; Webster, J.; **Quimioterapia de las parasitosis**. Ed. Limusa, pp. 132
9. Markell, R; Voge, J.; **Parasitología Médica**, **1990**; Ed. Iberoamericana, pp. 151.
10. Ximénez, G.C.; Las parasitosis intestinales en México. Cuadernos funsalud No. 36. Fundación Mexicana para la Salud, **2002**. <http://www.funsalud.org.mx>.
11. Ortega-Pierres; Arriaga, C.; Yépez-Mulia, L.; Epidemiology of trichinellosis in México, Central and South America. *Veterinary Parasitology*, **2000**; 93:201-225.
12. Rodríguez, G.R.; Rodríguez, G.L.; Cruz, C.A.; Eficacia y Seguridad de Mebendazol contra Nitazoxanida en el tratamiento de *Giardia lamblia* en niños. *Revista Gastroenterológica*, México **1999**; 64(3):122-126.
13. Murray, R.P.; Kobayashi, S.G.; Pfaller, A.M.; Rosenthal, S.K.; **Microbiología Médica**, **2001**; 2da. Edición, Ediciones Harcourt, España.
14. Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, 2002. <http://www.ssa.gob.mx>

15. Islip, P.J.; Burger's Medicinal Chemistry, Manfre E. Eolff, Ed. John Wiley & Sons, N.Y., **1981**; Cap. 21.
16. Sharma, S. Design New Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles, *Adv. Drug. Res.* **1994**, 25, pp. 105-163
17. PLM, Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, **2002**.
18. Boray, J.C.; Crowfoot, P.D.; Strong, M.B.; Schellenbaum, M.; Vonorelli, M.; Sarasin, G.; Allison, J.R.; Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with Triclabendazole, *Vet. Rec.*, **1983**; 113:315-317.
19. Turner, K.; Armour, J.; Richards, R.J.; Anthelmintic efficacy of Triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep, *Vet. Rec.*, **1984**; 114:41-42.
20. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Médico Panamericana, México, D.F., **1996**: Vol. 2, pp. 1049-1060, 1073-1091.
21. Gardner, B.T.; Hill, R.D.; Treatment of Giardiasis, *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**; 14(1):114
22. Johnon, P.J., Metronidazole and Drug Resistance, *Parasitology Today*, **1993**; 9(5):183-186.
23. Romero Cabello; Robert Guerrero; Muñóz García; Geyne Cruz; Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1997**; 91, 701-703.
24. Meloni, B.P.; Thompson, R.C.; Reynoldson, J.A.; Seville, P.; Albendazole: A more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1990**; 84:375.
25. Hall, A.; Nahar, G.; Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1993**; 87:84.
26. Edlind, T.D.; Hang, T. L.; Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro, *The Journal of Infection Diseases*, **1990**; 162:1408-1411.
27. Waller, P.J.; Resistence in Nematode Parasites of Livestock to the Benzimidazoles Anthelmintics. *Parasitology Today*, **1990**; 6(4):127.
28. Kus, C.; Göker, H.; Altanlar, N.; Synthesis and antimicrobial activities of 5-fluoro-1,2,6-trisubstituted benzimidazole carboxamide and acetamide derivatives, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **2001**; 334:361-365.

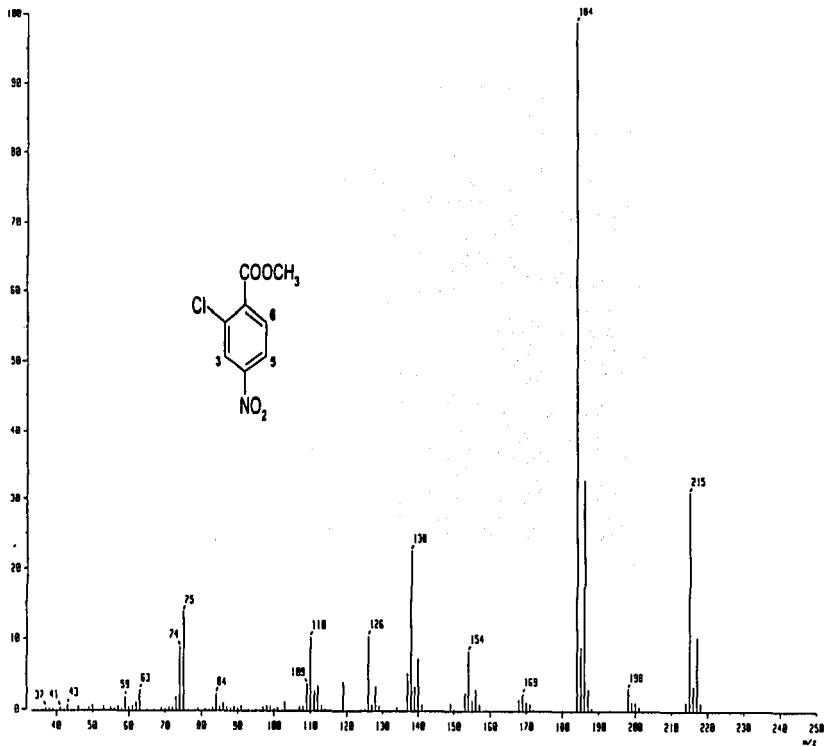
29. Alicia Hernández-Campos; Froylán Ibarra-Velarde; Yolanda Vera-Montenegro; Norma Rivera-Fernández; Rafael Castillo; Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylloxy)-1H-benzimidazole, *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**; 50(5):649-652.
30. Gupta, S.; Khan, A.M.; Jain, M.K.; Katiyar, J.C.; Anthelmintic profile of methyl 5(6)-(4-methylpiperidin-1-yl)carbonylbenzimidazole-2-carbamate in experimental helminthiasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, **1990**; 28:475
31. Comunicación personal de la M. en C. Ma. Alicia Hernández Campos del artículo escrito para su publicación en *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
32. Castillo, R.; Sánchez, R.; Cedillo, R.; Tapia, A.; Chávez, B.; Hernández-Campos A.; Hernández-Luis, F.; Yépez, L.; Onofre, M.; Synthesis and Giardicidal Activity of 1-Methylbenzimidazoles, 213th American Chemical Society Meeting. San Francisco, C.A., USA. Abril 13 al 17, **1997**; pp. 259.
33. Sánchez Díaz, M.R. Tesis de Maestría. Síntesis de Derivados del 1-metilbenzimidazol con Actividad Antihelmíntica Potencial. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **1999**.
34. Köler, P.; The Biochemical basis of Anthelmintic action and Resistance, *International Journal for Parasitology*, **2001**; 31.
35. Morgan, U.M.; Reynoldson, J.A.; Thompson, C.A.; Activities of Several Benzimidazoles and Tubulin Inhibitors against *Giardia spp.* In vitro, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**; 37(2):328.
36. Lacey, E.; Mode of Action of Benzimidazoles, *Parasitology Today*, **1990**; 6(4): 112.
37. Sarwal, R.; Sanyal, S.N.; Khera, S.; In vitro Effect of Benzimidazole Drugs on the Enzymes of Lipid Metabolism in *Trichuris globulosa*. *J. Parasitol.*, **1989**; 75(5):808.
38. Gajadhar, A.; Gamble, H.; Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology*, **2000**; 93:183.
39. <http://www.dpd.cdc.gov>
40. Basilio Espeites, P. Tesis de Licenciatura. Evaluación de la actividad biológica de compuestos derivados del Triclabendazol empleando a *T. spiralis* como modelo experimental. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, D.F., **1998**.

41. Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A.; Muñóz, O.; A rapid colorimetric assay with the tetrazolium SALT MTT and phenazine methasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.*, **1992**; 23:59-61.
42. Thompson, R.C.; Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, **2000**; 30:1259.
43. Roberto Cedillo-Rivera, Bibiana Chávez, Arturo González-Robles, Amparo Tapia, Lilian Yépez Mulia, *In vitro* Effect of Nitazoxanide Against *Etmamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Tricomonas vaginalis* Trophozoites; *Journal Eukaryot Microbiology*, **2002**; 49(3):201-208.
44. Katritzky, A.R.; Rachwal, S.; New Routes to Selectively Methylated Benzimidazoles. *J. Heterocyclic Chem.*, **1994**; 31:775.
45. Middleton, R.W.; Monney, H.; Parrick, N-Methylation of Heterocycles with Dimethylformamide Dimethyl Acetal. Synthesis, *Communications*, **1984**; 740-743
46. Kasturi. T.R.; Jois, H.R.; Mathew, L.; A Novel Transformation of 3-Alkoxyisoquinolines to 3-Chloroisoquinolines and an Unusual Decyanation of 1,3-Dialkoxy-4-cyano-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines Under Vilsmeier-Haack Conditions, *Communications*, **1987**; 708.
47. Mendoza Romero, L. Tesis de Licenciatura. Síntesis de *N*-metil-2-nitroanilinas. Materia primas para la preparación de 1-metilbencimidazoles antiparasitarios. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **2001**.
48. Brehme, R.; Phasentransfer-Katalysiert. *Synthesis*, **1976**; 113
49. Belstein *Organische Chemie*. Band XII, pp. 730, (Blanskma, R 21, 276).
50. Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, T.; Tani, S.; Formation of Carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol-and water-soluble condensing agent: DMT-MM, *Tetrahedron*, **2001**; 57:1551-1558.
51. Mc.Murry, *Química Orgánica*, **1999**, Ed. Iberoamericana, pp. 781-793.
52. Solomons, G.; *Fundamentos de Química Orgánica*, Ed. Limusa, México, **1990**.
53. Pine, S.; Hedrickson, J.; Cram, D.J.; Hammond, G.S.; *Química Orgánica*, 4ta. Edición, Ed. McGRAWHILL, pp. 346-348.
54. Staab, H.A.; *Angew. Chem.*, **1962**; 74:407.
55. Dennis, D.T.; Despommier, D.; Davis, N. ; *J. Parasitol.*, **1970**; 56, 974-977.

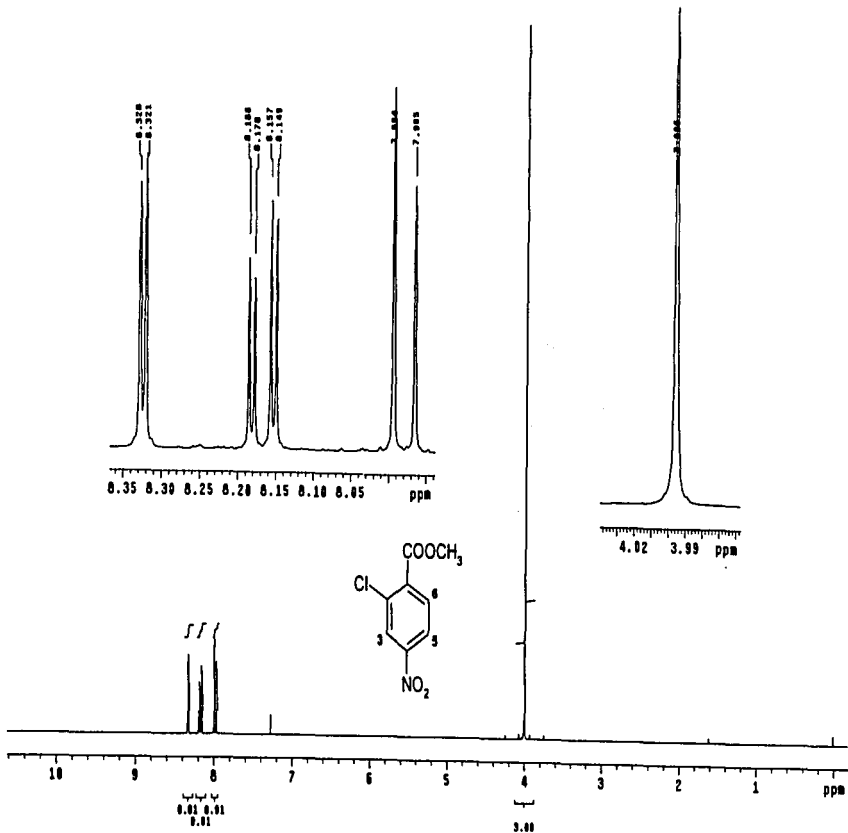
56. Towson, D.H. & Morris, D.L.; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989**; 83, 664-669.
57. Clarck, S.W., Kahn, M., Mitru, A., Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.*, **1978**; 2923-2925.
58. Sandoval Rivera E. Tesis de Licenciatura. Síntesis de carboxamidas 1-metilbencimidazólicas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química, UNAM., México, D.F., **2003**.
59. Rodríguez Morales, S, Tesis de Maestría. Síntesis y Actividad Biológica de *N*-fenilcarbamatos de metilo 4-sustituidos como Antihelmínticos y Herbicidas. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **1998**.
60. Islas Fonseca, Y., Tesis de Licenciatura. Síntesis alterna de dos 1-metil-6-carboxamidas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **2003**.



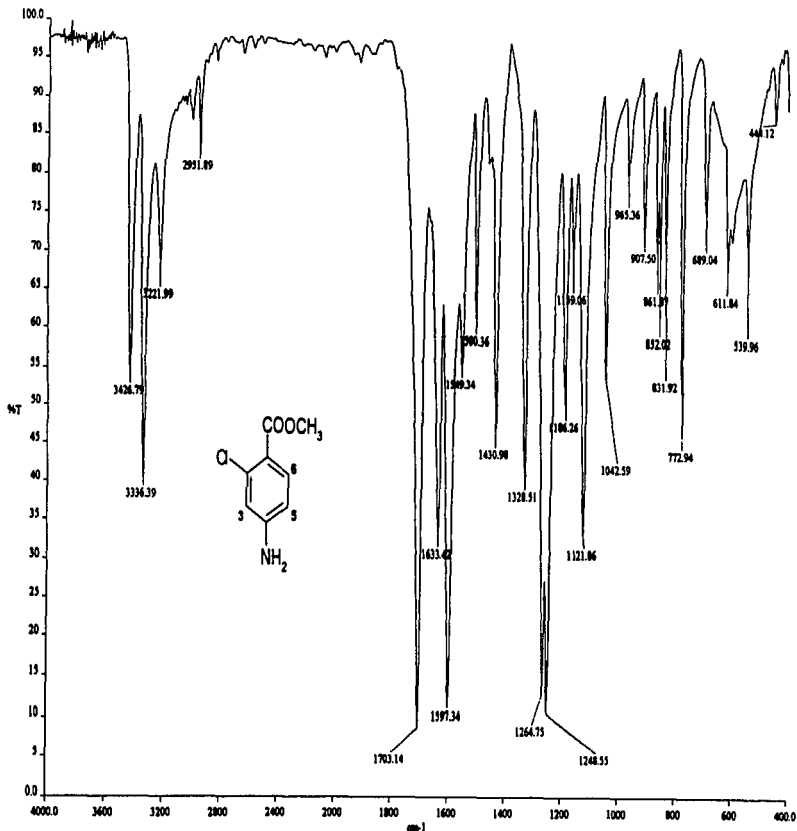
ESPECTRO No. 1. IR (KBr) cm^{-1} : 2-CLORO-4-NITROBENZOATO DE METILO (2)



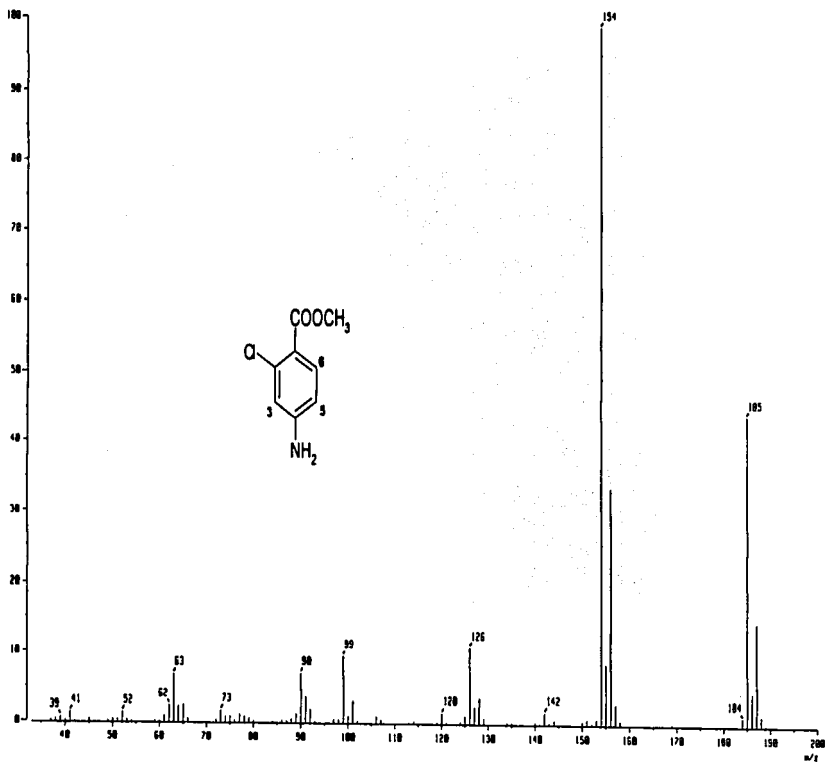
ESPECTRO No. 2. EM (E/D) m/z: 2-CLORO-4-NITROBENZOATO DE METILO (2)



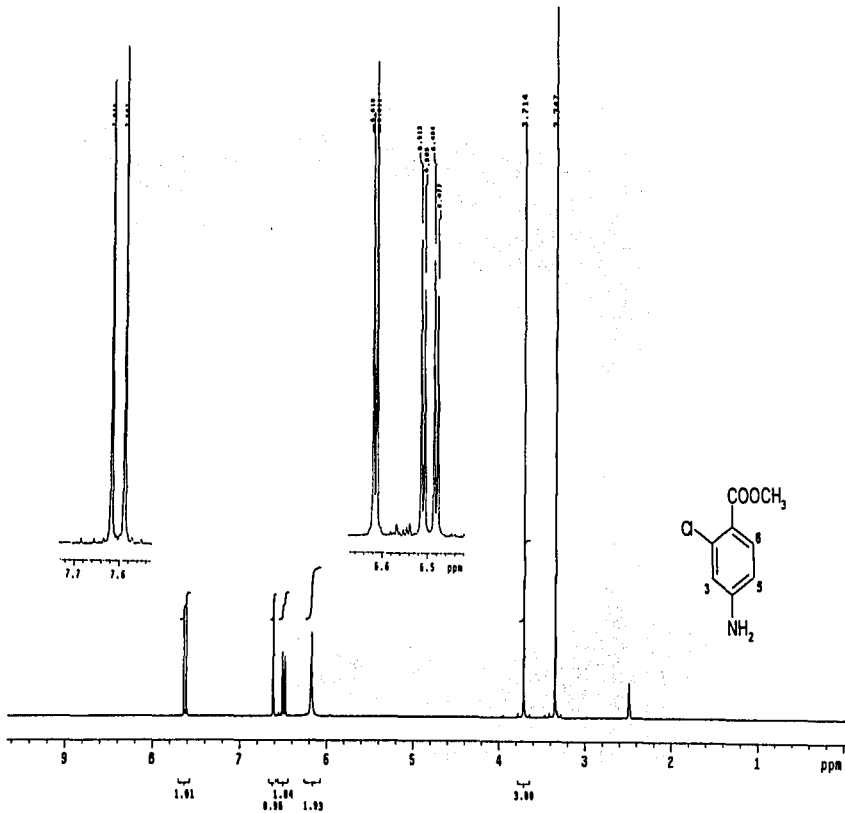
ESPECTRO No. 3. RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 2-CLORO-4-NITROBENZOATO DE METILO (2)



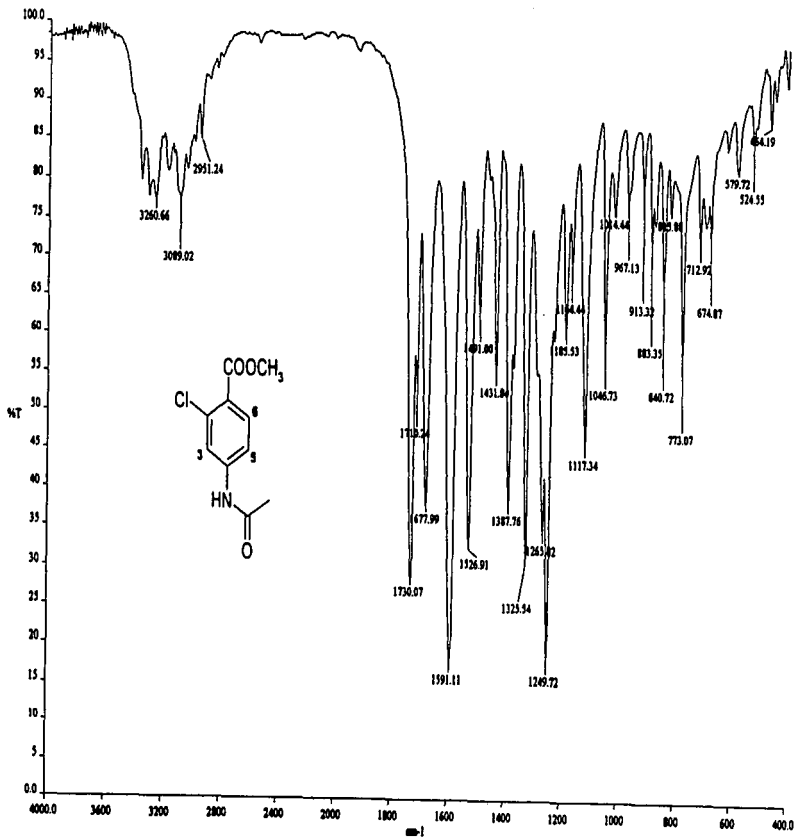
ESPECTRO No. 4. IR (KBr) cm⁻¹: 4-AMINO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (3)



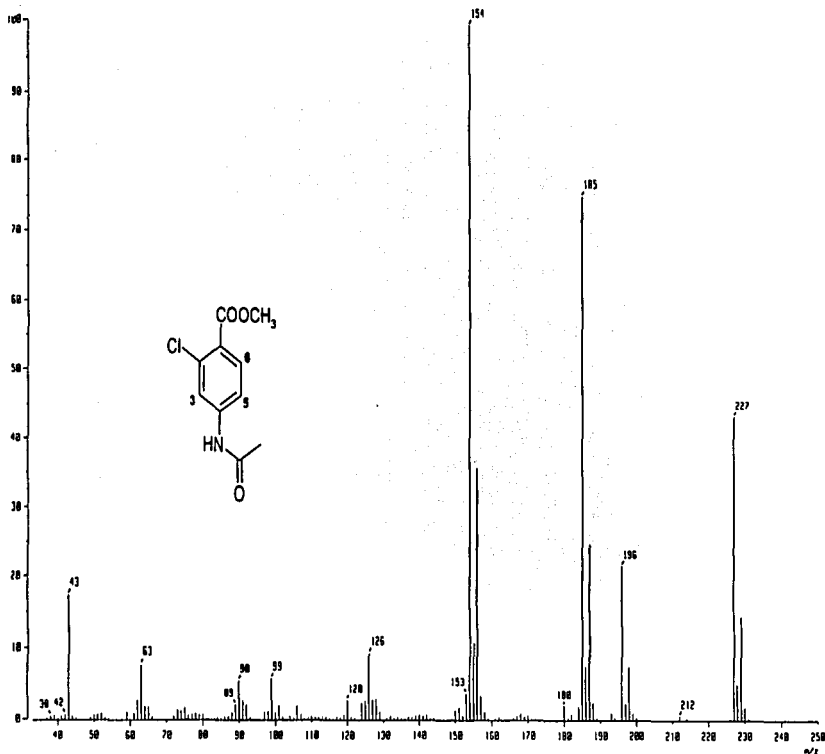
ESPECTRO No. 5. EM (IE/D) m/z: 4-AMINO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (3)



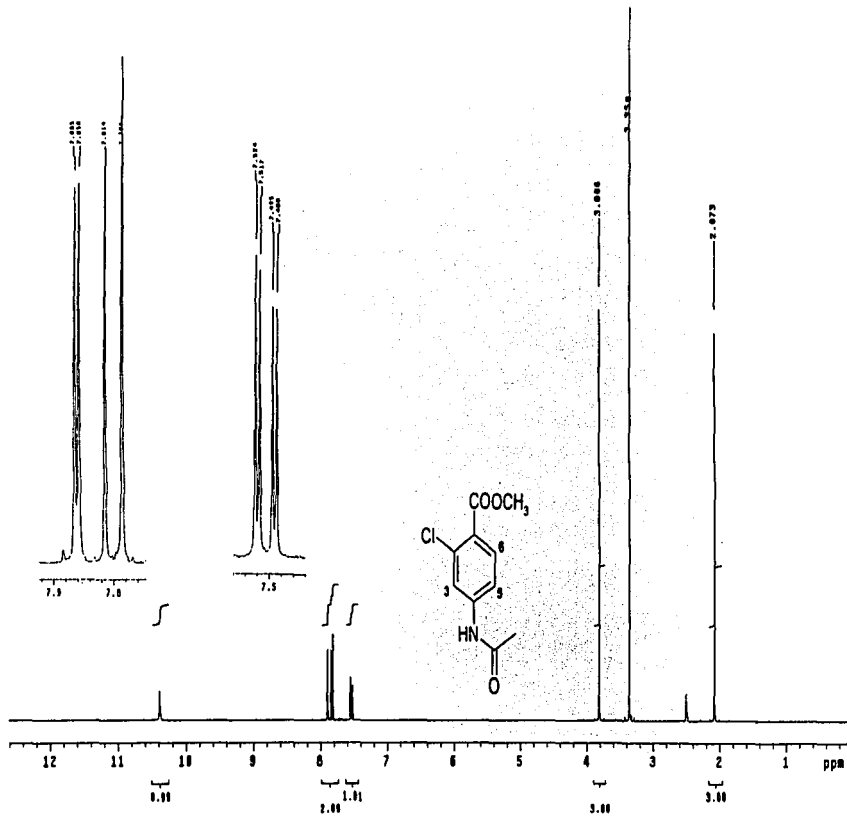
ESPECTRO No. 6. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 4-AMINO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (3)



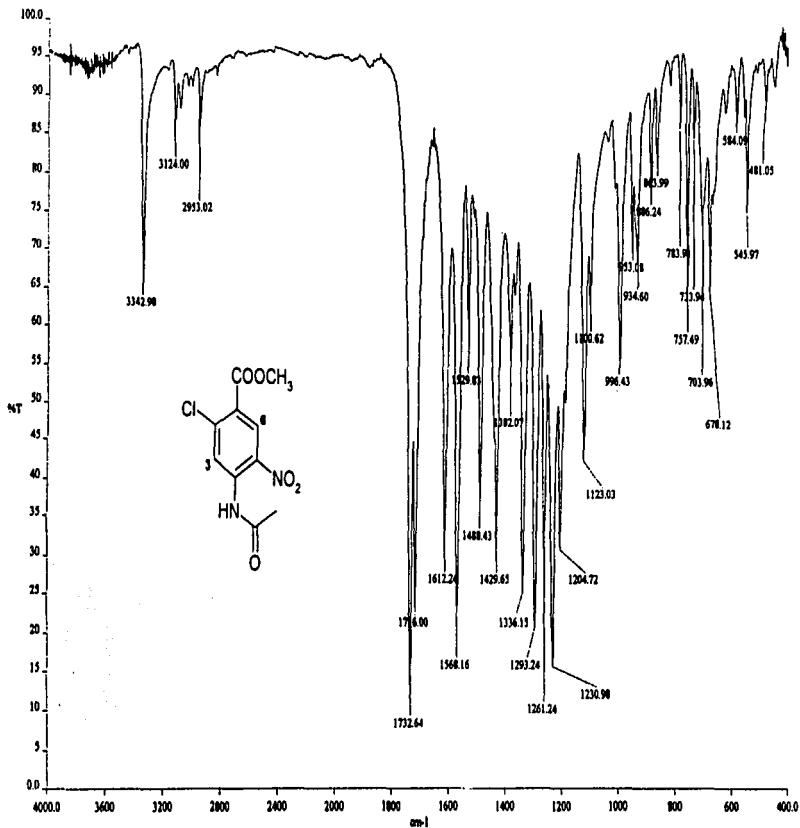
ESPECTRO No. 7. IR (KBr) cm^{-1} : 4-ACETAMIDO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (4)



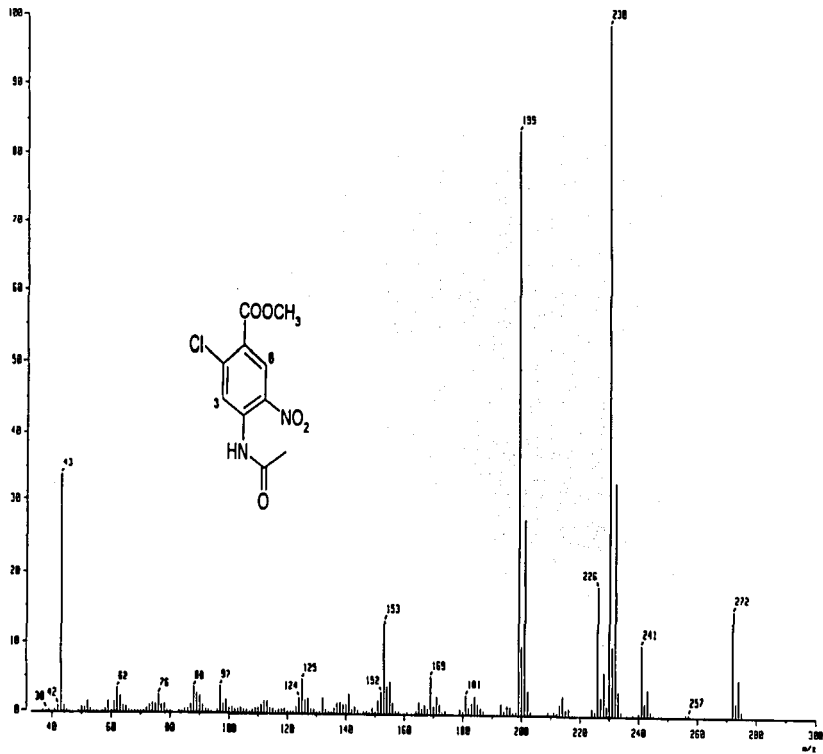
ESPECTRO No. 8. EM (E/D) m/z: 4-ACETAMIDO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (4)



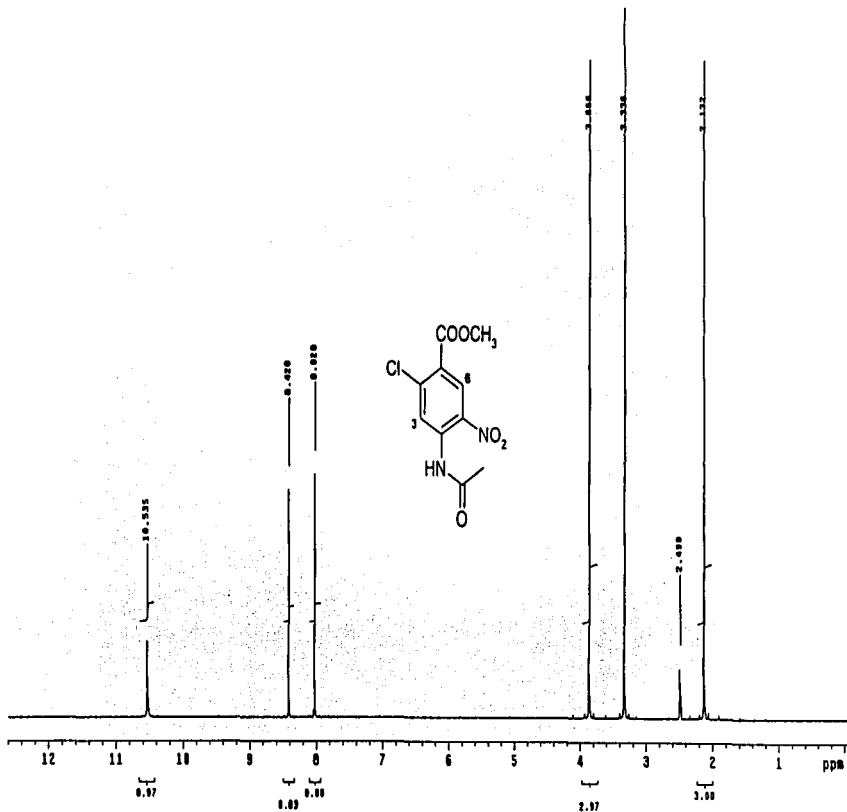
SPECTRO No. 9. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: 4-ACETAMIDO-2-CLOROBENZOATO DE METILO (4)



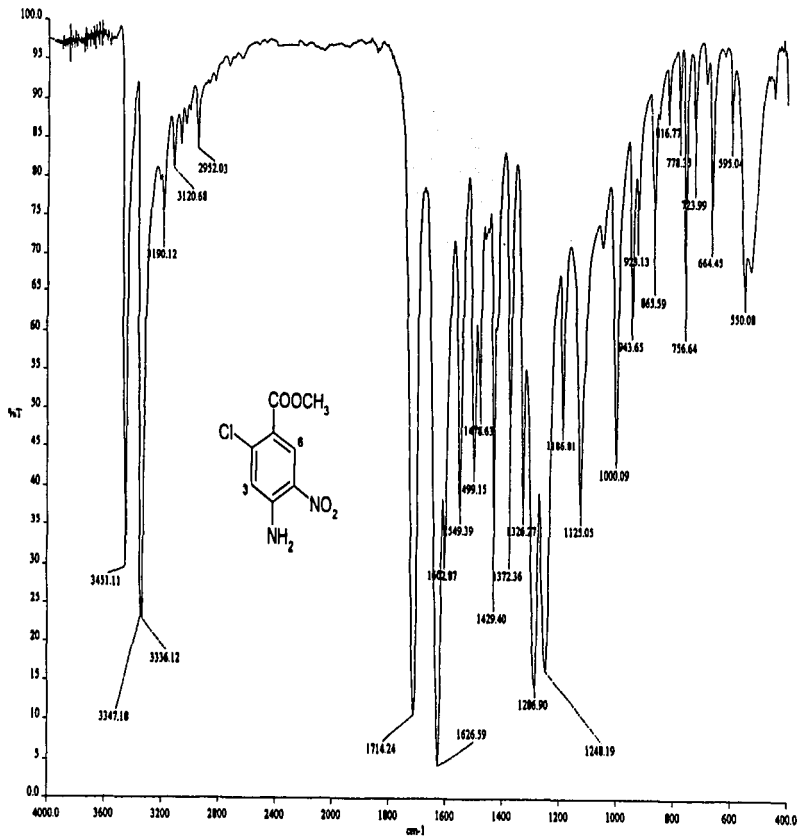
ESPECTRO No. 10. IR (KBr) cm⁻¹: 4-ACETAMIDO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (5)



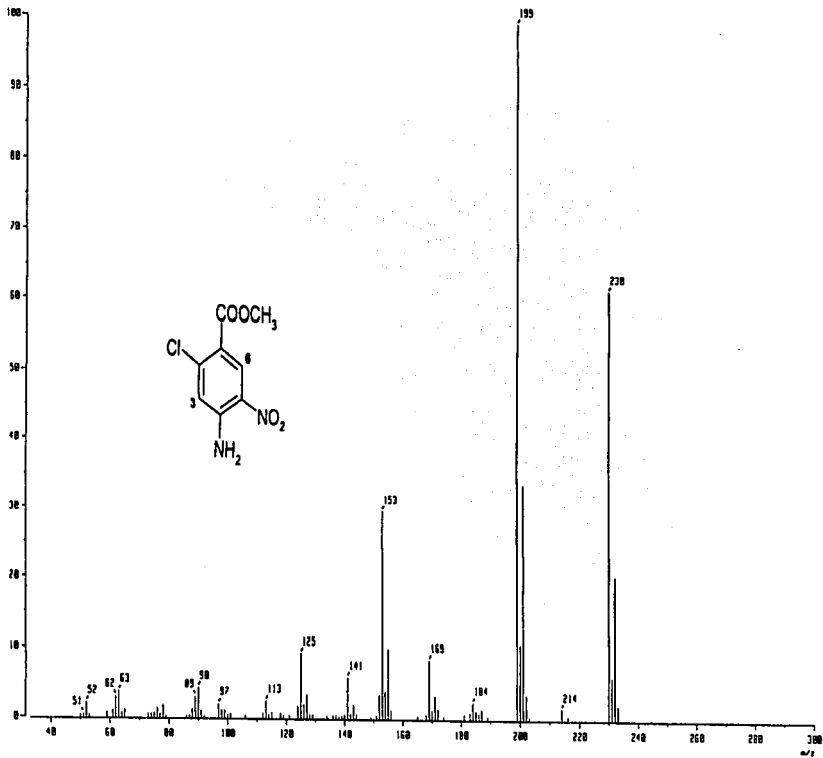
ESPECTRO No. 11. EM (E/D) *m/z*: 4-ACETAMIDO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (5)



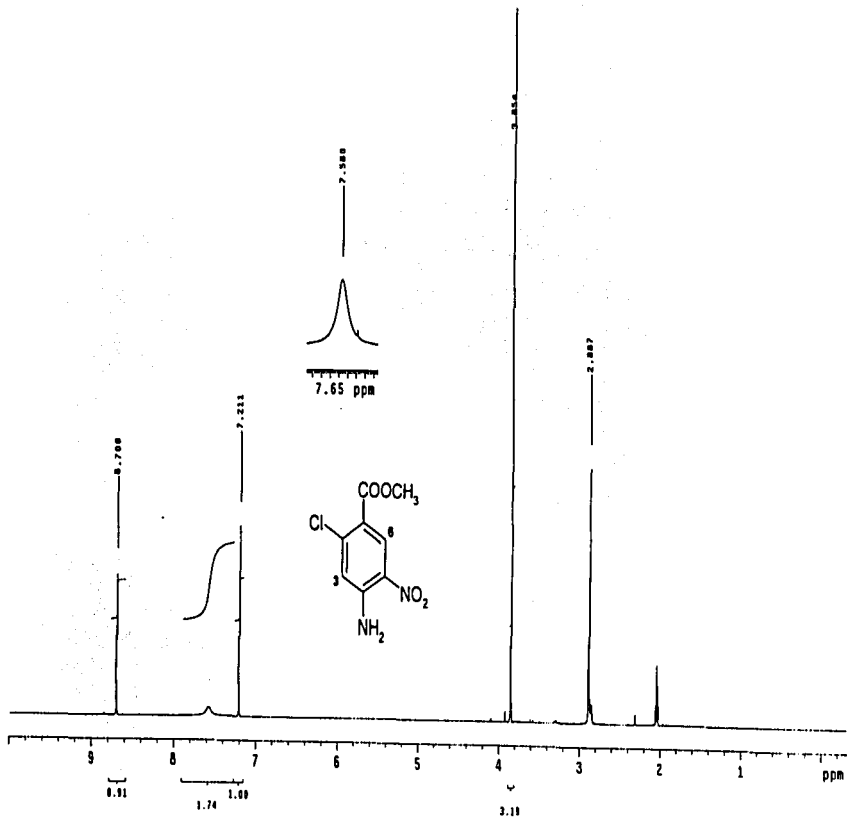
ESPECTRO No. 12. RMN ¹H (TMS, CDCl₃) ppm: 4-ACETAMIDO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (5)



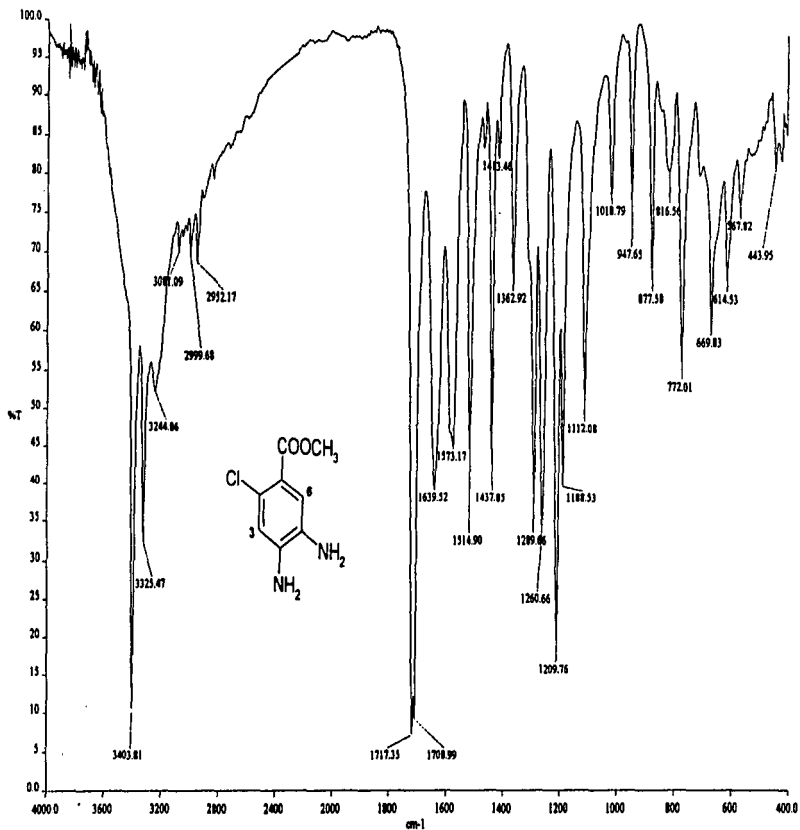
ESPECTRO No. 13. IR (KBr) cm⁻¹: 4-AMINO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (6)



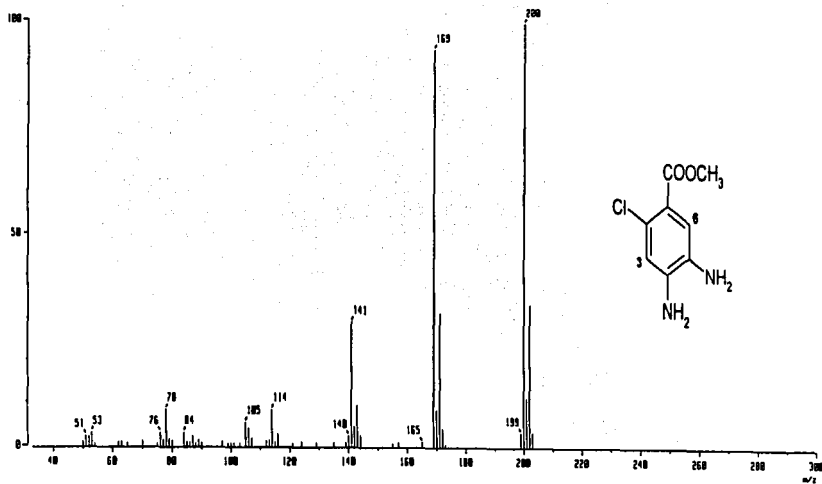
ESPECTRO No. 14. EM (IE/CG) m/z : 4-AMINO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (6)



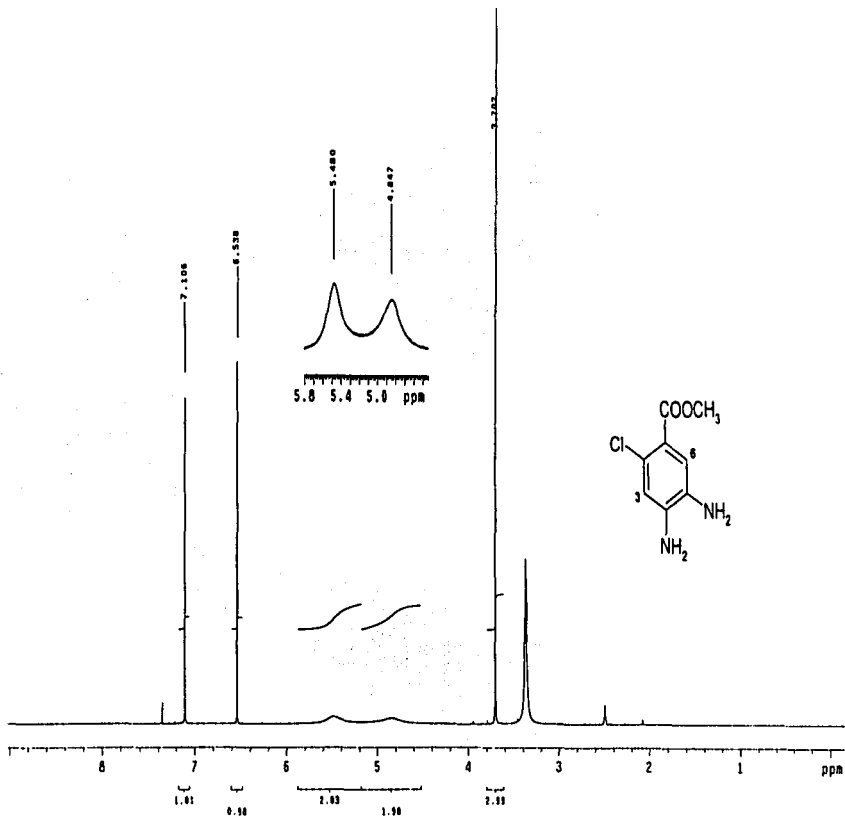
ESPECTRO No. 15. RMN ¹H (TMS, acetona-d₆) ppm: 4-AMINO-2-CLORO-5-NITROBENZOATO DE METILO (6)



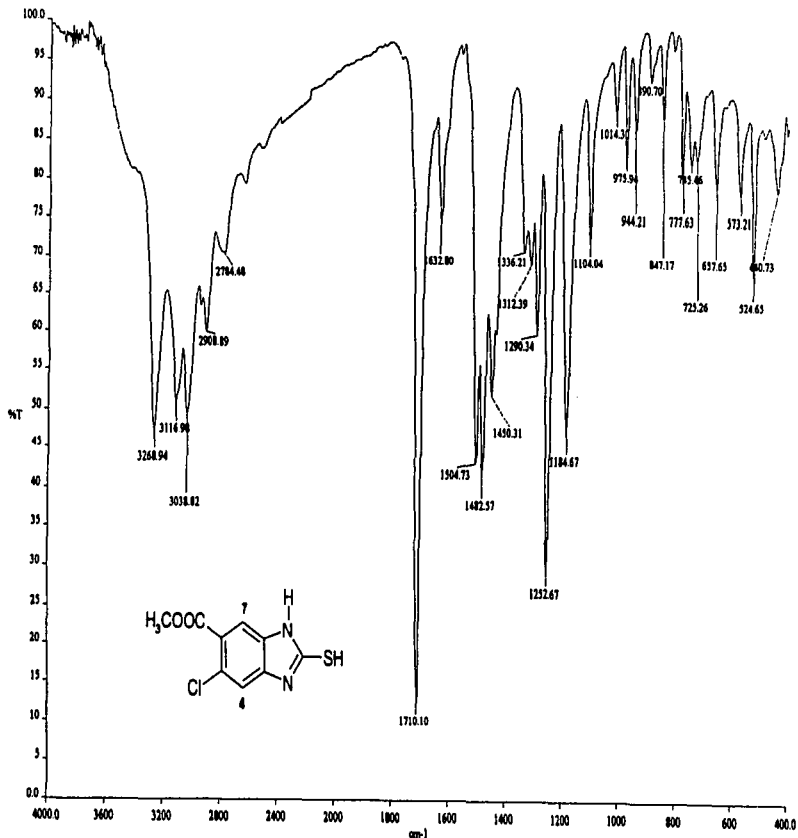
ESPECTRO No. 16. IR (KBr) cm⁻¹: 4,5-DIAMINA-2-CLORO BENZOATO DE METILO (7).



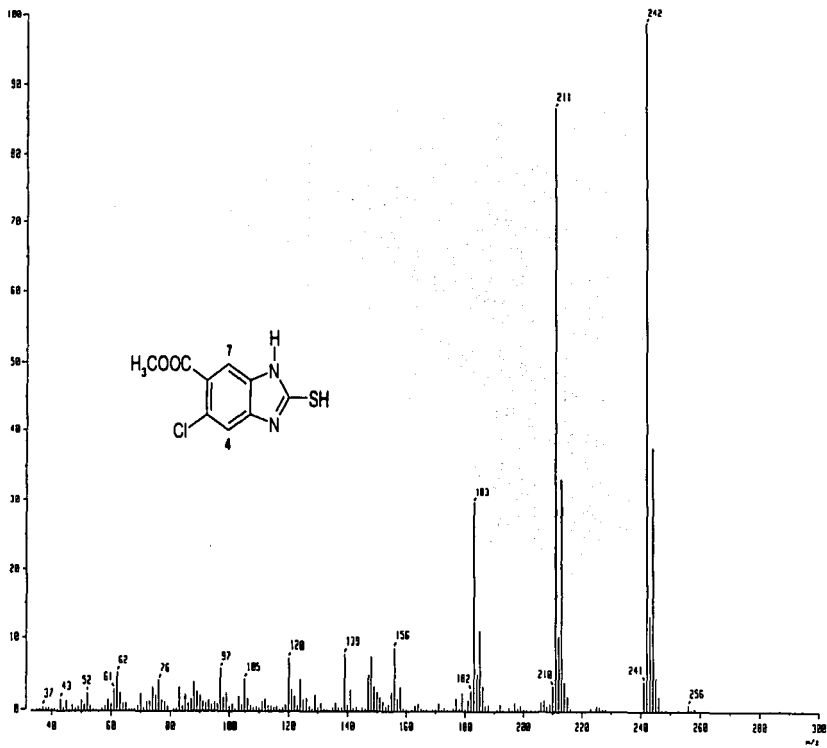
ESPECTRO No. 17. EM (IE/G) m/z : 4,5-DIAMINA-2-CLOROBENZOATO DE METILO (7)



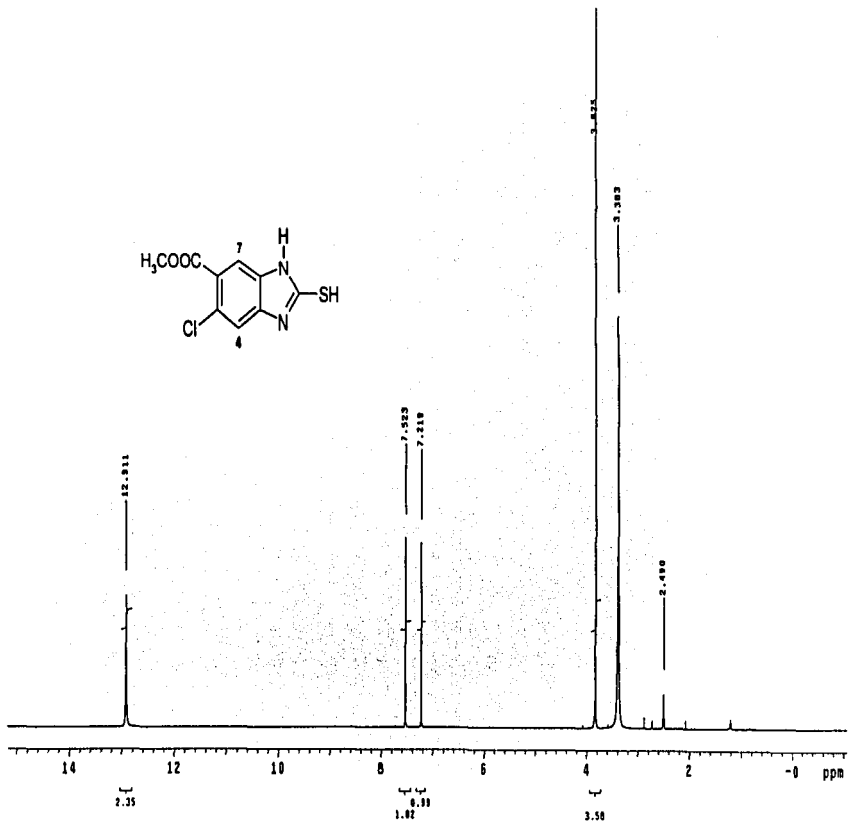
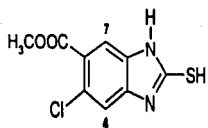
ESPECTRO No. 18. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 4,5-DIAMINA-2-CLOROBENZOATO DE METILO (7)



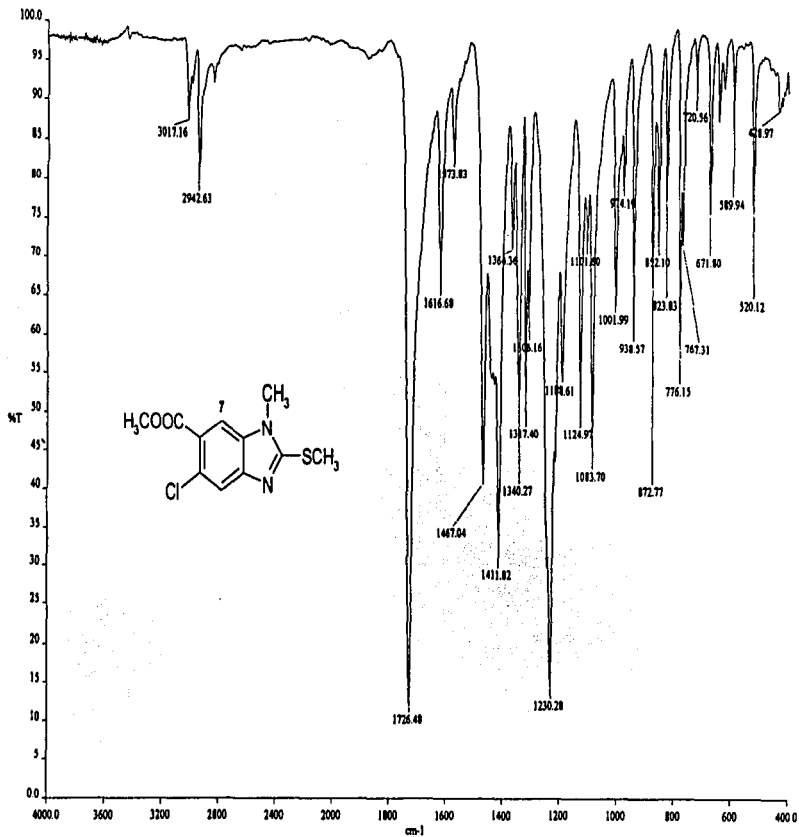
ESPECTRO No. 19. IR (KBr) cm⁻¹: 5-CLORO-2-MERCAPTO-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (8)



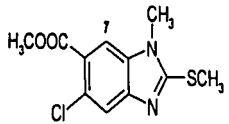
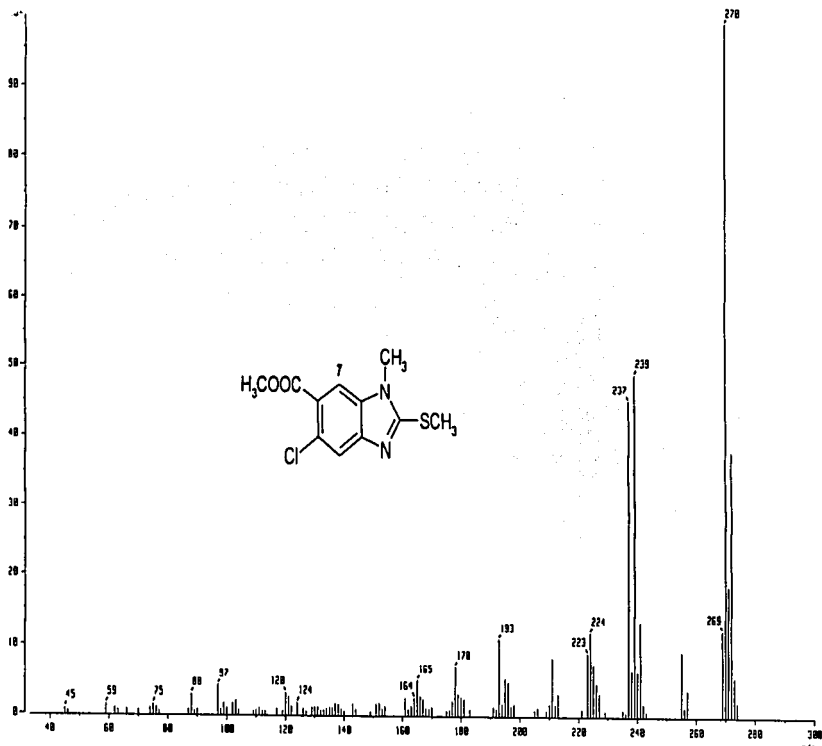
ESPECTRO No. 20. EM (IE/D) *m/z*: 5-CLORO-2-MERCAPTO-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (8)



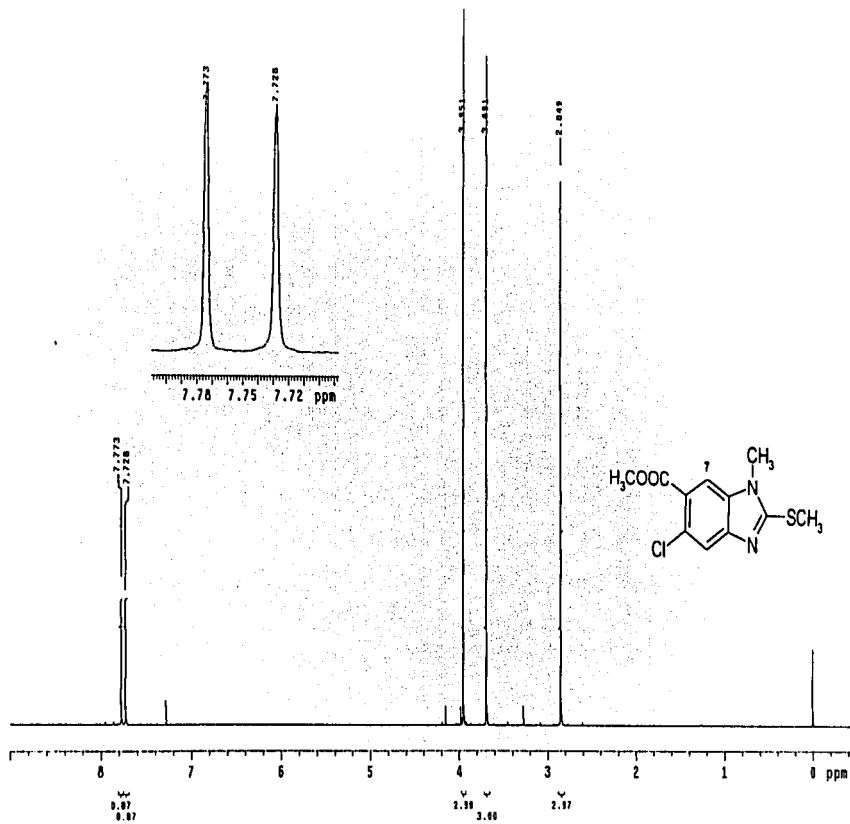
ESPECTRO No. 21. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 5-CLORO-2-MERCAPTO-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (8)



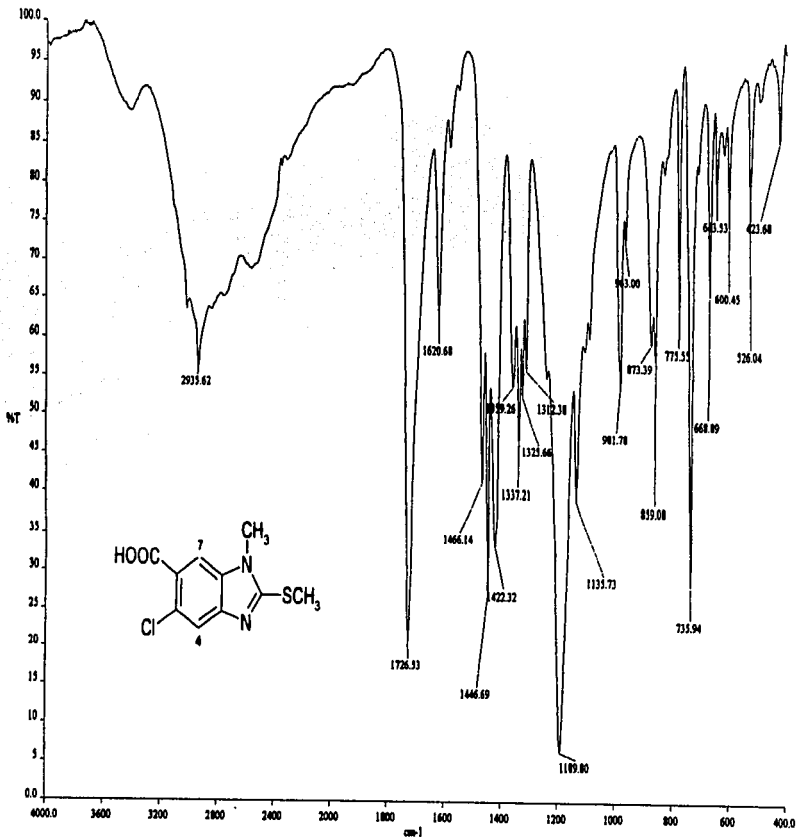
ESPECTRO No. 22. IR (KBr) cm⁻¹: 5-CLORO-1-METIL-2-(METILTIO)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (9)



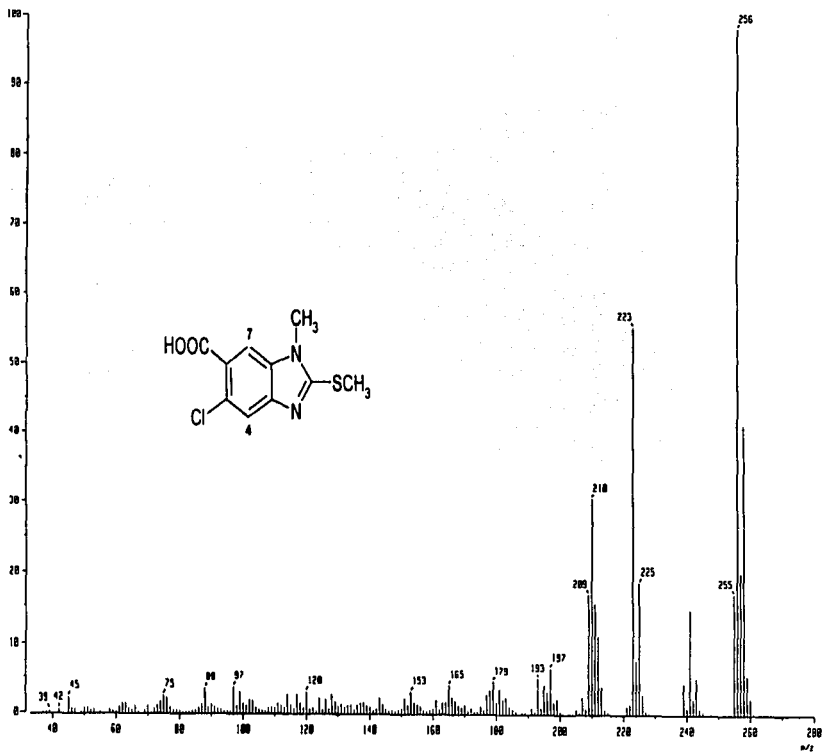
ESPECTRO No. 23. EM (IECG) m/z: 5-CLORO-1-METIL-2-(METILTIO)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (9)



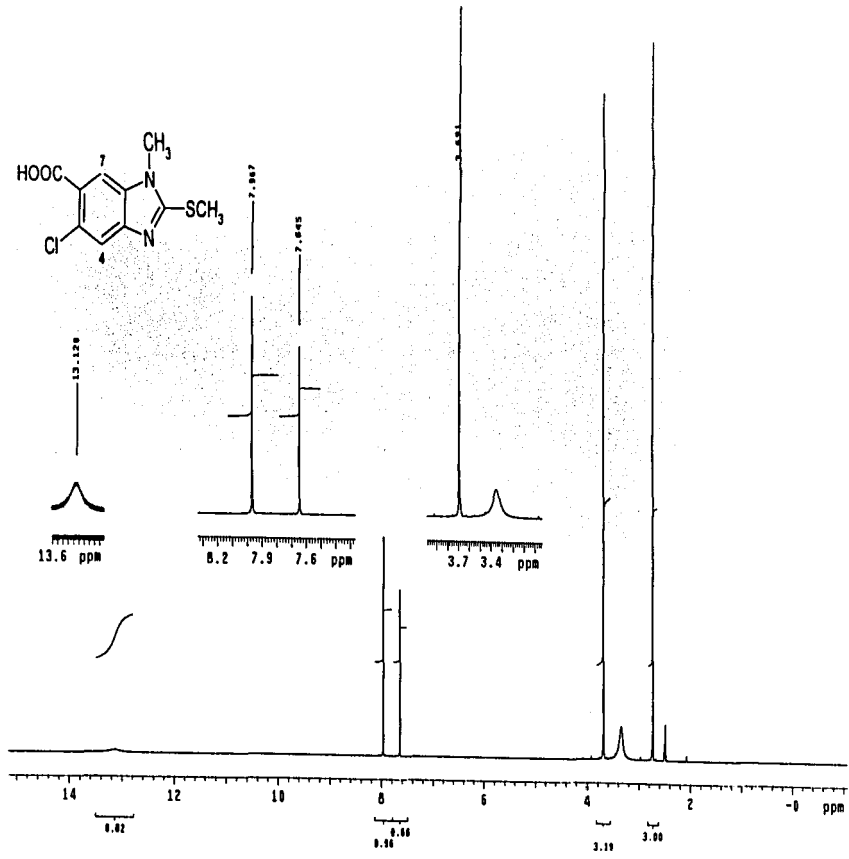
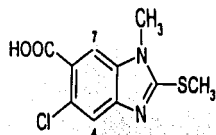
ESPECTRO No. 24. RMN ^1H (TMS, CDCl_3) ppm: 5-CLORO-1-METIL-2-(METILIO)-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXILATO DE METILO (9)



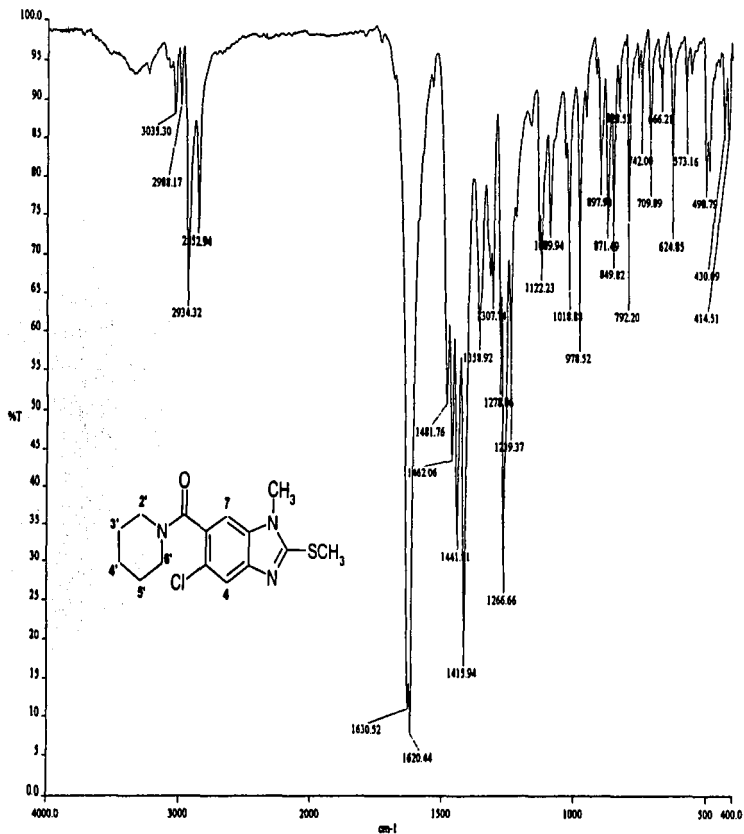
ESPECTRO No. 25. IR (KBr) cm⁻¹: ÁCIDO 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-1H-BENZIMIDAZOL-6-CARBOXÍLICO (11).



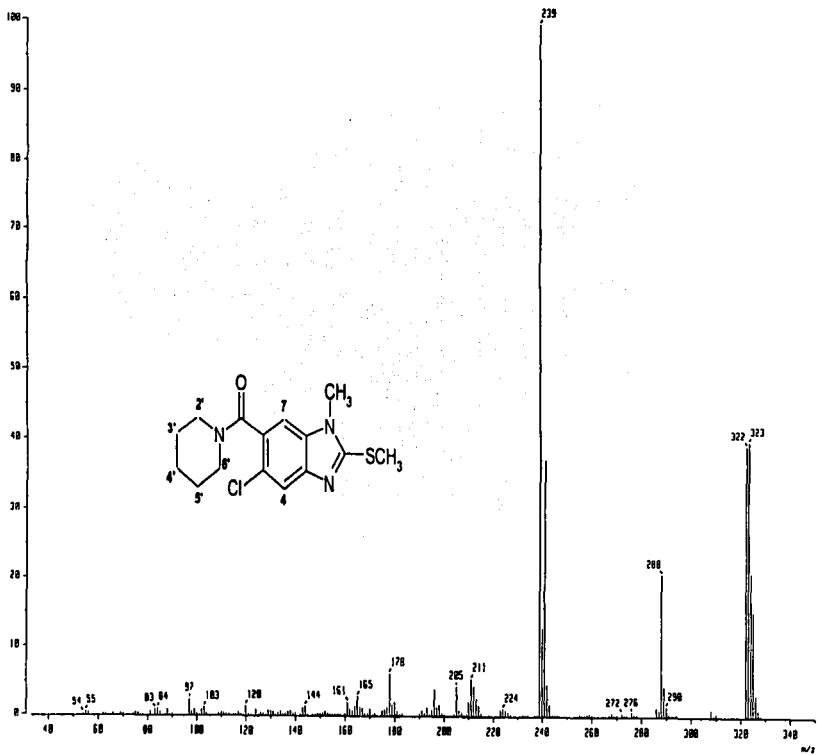
ESPECTRO No. 26. EM (I/RO) *m/z*: ÁCIDO 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXÍLICO (11)



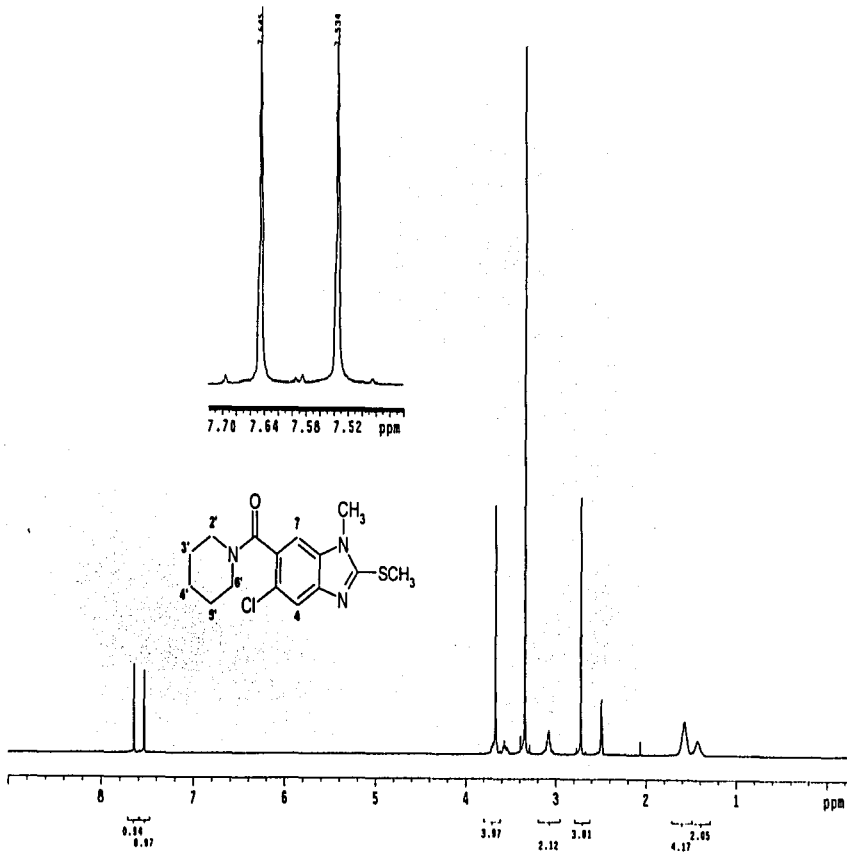
ESPECTRO No. 27. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: ÁCIDO 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-1H-BENCIMIDAZOL-6-CARBOXÍLICO (11)



ESPECTRO No. 28. IR (KBr) cm⁻¹: 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-6-[(1-PIPERIDINIL)CARBONIL]-1H-BENCIMIDAZOL (13)

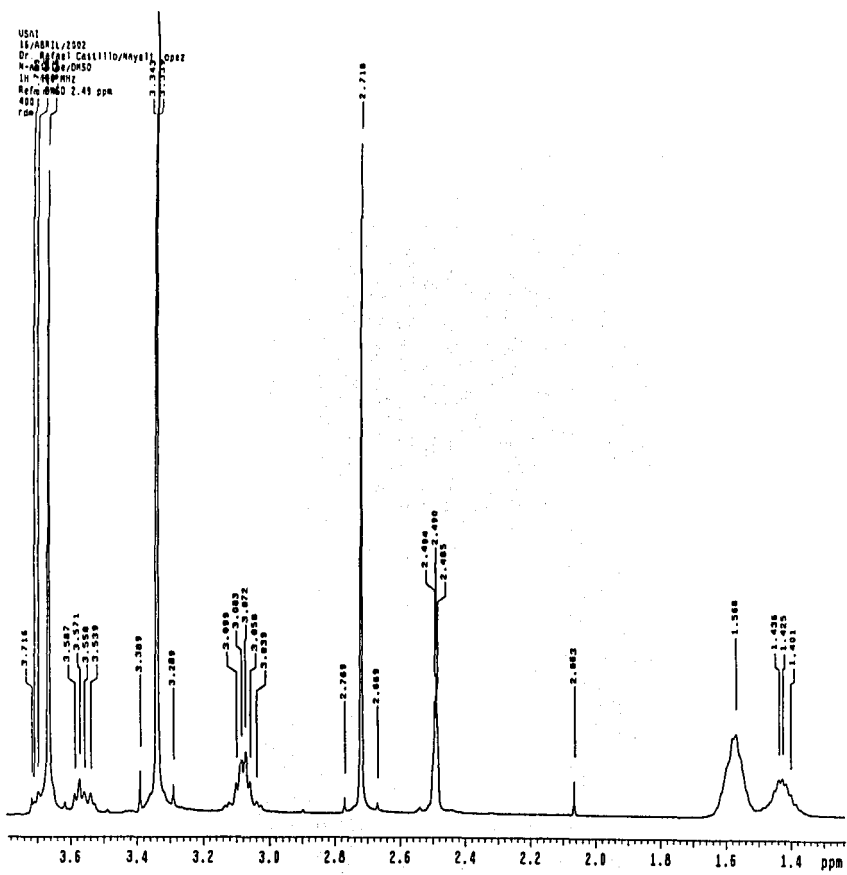


ESPECTRO No. 29. EM (E/D) m/z : 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-6-((1-PIPERIDINIL)CARBONIL)-1H-BENCIMIDAZOL (13)

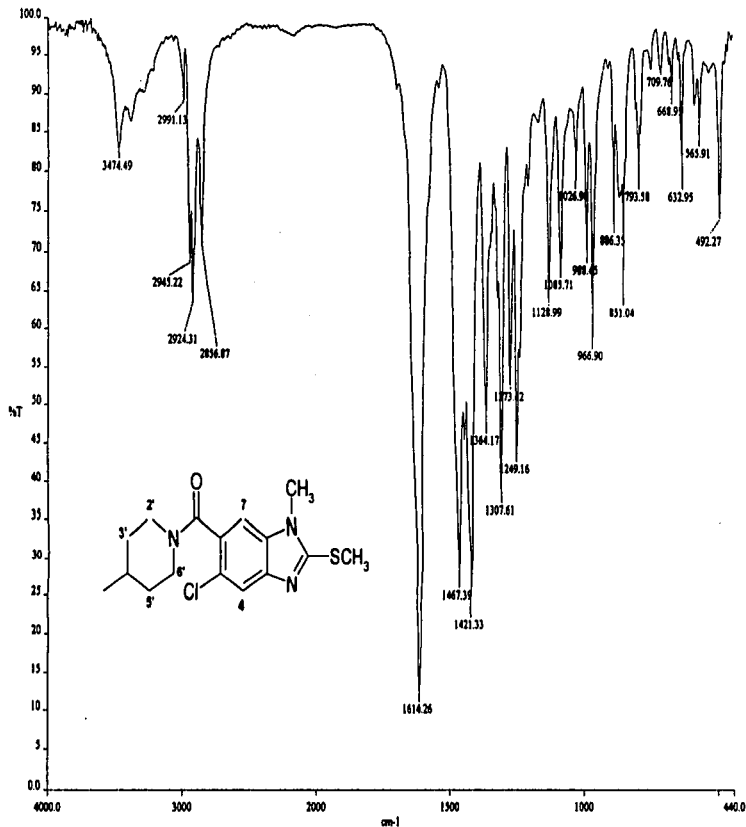


ESPECTRO No. 30. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 5-CLORO-1-METIL-2-METILTIO-6-((1-PIPERIDINIL)CARBONIL)-1H-BENCIMIDAZOL (13)

USAT
 16/ABR11/2002
 Dr. Rafael Castellano/Maya1
 X-AB-2007/0150
 1H-NMR
 Ref: DMG 2.49 ppm
 492 /
 Tm

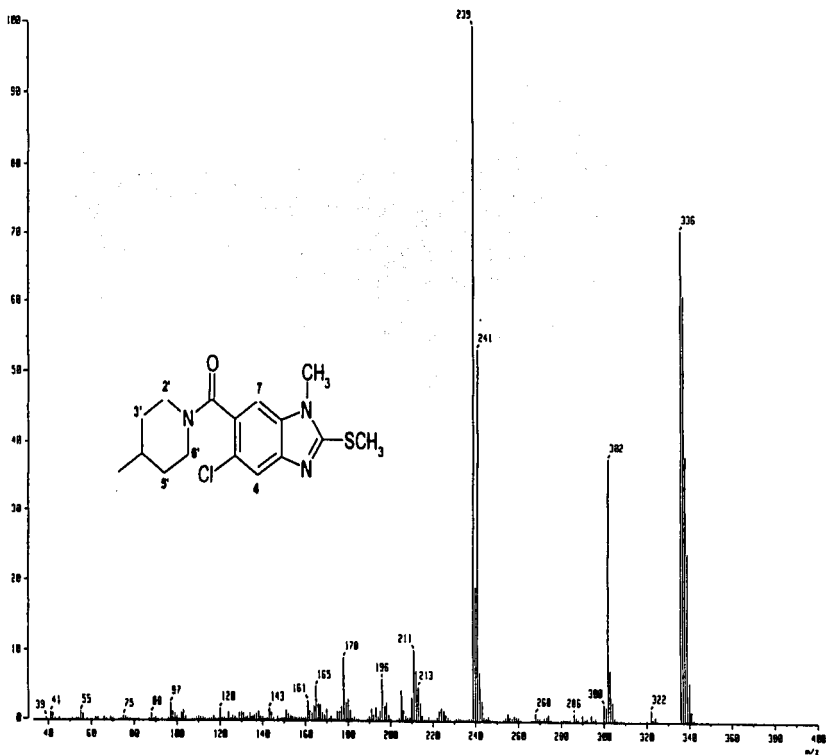


Aptitude



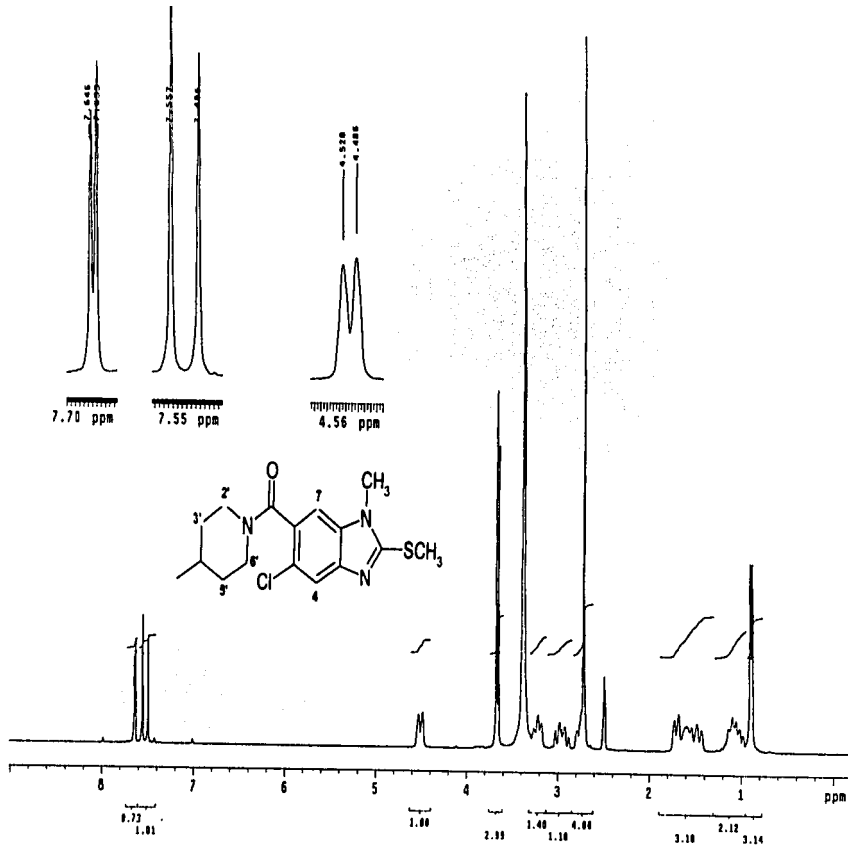
ESPECTRO No. 31. IR (KBr) cm⁻¹: 5-CLORO-1-METIL-4-[(4-METILPIPERIDINIL)CARBONIL]-2-(METILTIO)-1H-BENCIMDAZOL (15)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



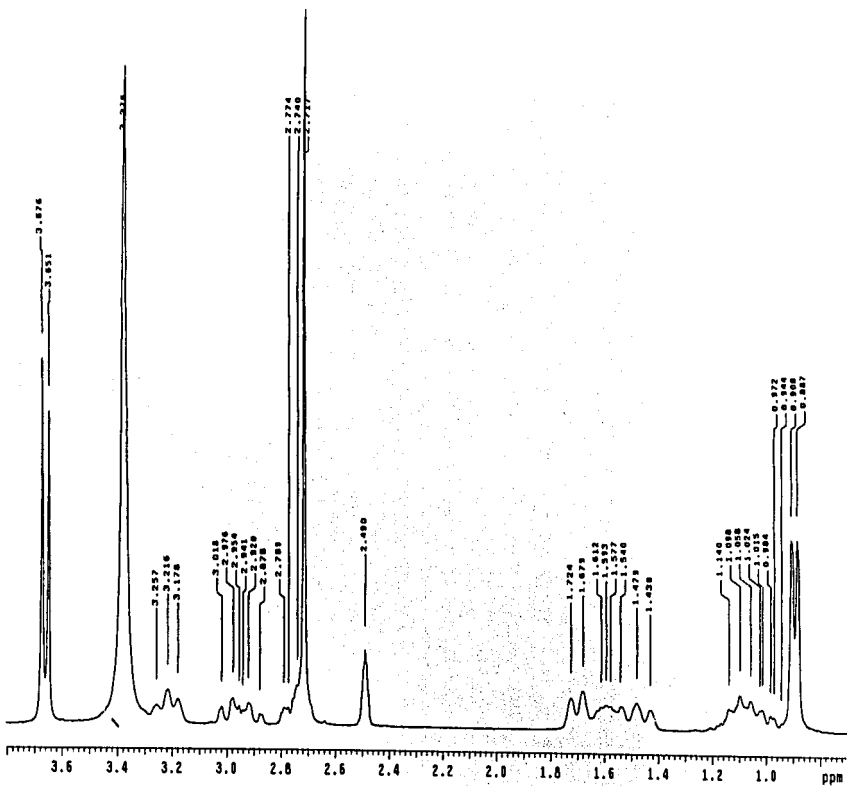
ESPECTRO No. 32. EM (E/C) m/z: 5-CLORO-1-METIL-6-[(4-METILPIPERIDINIL)CARBONIL]-2-(METILTIO)-1H-BENCIMIDAZOL (19)

TESIS CON :
FALLA DE ORIGEN



Espectro No. 33. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 5-CLORO-1-METIL-6-[[4-METILPIPERIDINIL]CARBONIL]-2-(METILIO)-1H-BENCIMIDAZOL (15)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN