



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis de dos Carboxamidas Bencimidazólicas Diseñadas
por Docking como Posibles Inhibidores de la Triosafosfato
Isomerasa de *Entamoeba histolytica***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DENISE REYES GARCIA



MÉXICO D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: GLORIA PÉREZ CENDEJAS

VOCAL: Profesor: ALFONSO SEBASTIAN LIRA ROCHA

SECRETARIO: Profesor: MARÍA ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS

1er SUPLENTE: Profesor: RODOLFO ÁLVAREZ MANZO

2º SUPLENTE: Profesor: JUAN GÓMEZ DUEÑAS

La síntesis se desarrolló en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia,
Edificio E. Facultad de Química, UNAM.

Asesor

M. en C. María Alicia Hernández Campos

Sustentante

Denise Reyes García

A mis padres Marco y Tere, y a mi hermano Marco.

*“La ciencia moderna aun no ha producido un medicamento
tranquilizador tan eficaz como lo son unas pocas palabras bondadosas.”*

Sigmund Freud



AGRADECIMIENTOS

A la Maestra Alicia Hernández por los buenos momentos, por su guía, por todos los consejos y por el apoyo que me brindó en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Castillo y al Dr. Francisco Hernández por el apoyo y los momentos de esparcimiento.

A la Dra. Lilian Yépez Mulia y a la Biol. Amparo Tapia por la determinación de la actividad antiparasitaria llevada a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI.

Al personal de la USAI por sus determinaciones espectroscópicas y espectrométricas.

A Israel Velazquez por sus consejos y asesoría.

A mis amigas Antonia, Lourdes, Rocío, Alma, Mónica y Lidia que compartieron conmigo grandes momentos durante mi estancia en la universidad.

Gracias a mis compañeros de carrera y del laboratorio 122 en especial a Antonio, Carlos y Jaime por sus consejos, amistad y por formar parte de unos lindos recuerdos en mi vida.

A la UNAM y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de crecer en su seno.

Al CONACyT por el apoyo al proyecto 80093 del cual este trabajo forma parte.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 La <i>Entamoeba histolytica</i> un protozooario de interés mundial.	3
2.1.1 Ciclo vital	5
2.1.2 Tratamiento	7
2.2 <i>EhTIM</i> como blanco para el diseño de fármacos	9
2.3 Encimidazol molécula con actividad antiparasitaria	12
2.3.1 SAR en Bencimidazoles	14
2.3.2 Bisbencimidazoles como antiprotozoarios	16
2.3.3 Síntesis de Bencimidazoles.	17
2.3.3.1 Método de Phillips	17
2.3.3.2 Síntesis de bencimidazoles a partir de <i>o</i> -(<i>N</i> -acil)anilinas	17
2.3.3.3 Síntesis de <i>N</i> -metilbencimidazoles	18
2.4 Síntesis de carboxamidas en microondas con agentes acoplantes	18
2.4.1 Carboxamidas	18
2.4.2 Agentes acoplantes	19
2.4.3 CDI Agente acoplante del grupo carboxilo	20
2.5 Microondas	22
2.5.1 Las microondas	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO	28

INDICE

6. METODOLOGÍA

6.1 Parte Química	29
6.1.1 Secuencia de Síntesis para la Preparación de las dos Carboxamidas Bencimidazólicas	29
6.1.1.1 Síntesis del 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -Bencimidazol-2-amina (12)	30
6.1.1.2 Síntesis del Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> - bencimidazol-5-carboxílico (7)	31
6.1.1.3 Síntesis del Ácido 2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (19)	33
6.1.1.4 Acoplamiento de los precursores para la obtención de las carboxamidas B2-14 y B1-21	34
6.2 Parte Biológica	35
6.2.1 Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> para protozoarios	36
6.2.2 Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> para las TIM de <i>Leishmania sp.</i> , <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	36

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados de la Parte Química	38
7.1.1 Propiedades físicas de los compuestos finales	38
7.1.2 Obtención del Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (7)	39
7.1.3 Obtención de la 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-amina (12)	42

INDICE

7.1.4 Obtención del precursor Ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (19)	43
7.1.5 Obtención de las carboxamidas bencimidazólicas	44
7.1.6 Espectros en dos dimensiones	48
7.1.7 Constantes espectroscópicas y espectrométricas	55
7.2 Resultados de la Parte biológica	58
7.2.1 Inhibición de la actividad enzimática de TIM	59
7.2.2 Actividad antiprotozoaria	59
8. CONCLUSIONES	63
9. BIBLIOGRAFÍA	66
10. ANEXO A. Parte Experimental	
10.1 Instrumentación	71
10.2 Sistemas cromatográficos	72
10.3 Métodos sintéticos	73
11. ANEXO B. Espectros	93

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El protozooario *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) es el parásito causante de la amibiasis humana que hasta hoy sigue teniendo importancia significativa en las cifras de morbilidad y mortalidad. La amibiasis es la cuarta causa de mortalidad debida a infecciones por protozoarios después de la malaria, tripanosomiasis africana y leishmaniasis y la tercera causa de morbilidad después de la malaria y tricomoniasis. La epidemiología de estas parasitosis se relaciona directamente con factores ecológicos, socioeconómicos y culturales.

México es considerado como un país endémico de infecciones amibianas por lo que las infecciones por *E. histolytica* aún son un serio problema de salud pública. A nivel mundial la quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y barato para controlar casi todas las parasitosis. Las dosis elevadas o de larga duración en tratamientos con Metronidazol, el medicamento de elección, se asocian con algunos signos de toxicidad tales como la leucopenia, la neutropenia, un riesgo aumentado de neuropatía periférica o toxicidad del sistema nervioso central y aparición de una lengua negra.

Con el objetivo de disminuir los efectos colaterales y aumentar la eficacia de los tratamientos antiparasitarios se han propuesto nuevas dianas terapéuticas y nuevas moléculas dirigidas a estas. La enzima Trifosfato Isomerasa (TIM) es una proteína que se ha estudiado profundamente y que se ha usado como una diana biológica para el diseño de fármacos contra patógenos glicolíticos, su función es

1. INTRODUCCIÓN

esencial para la producción de ATP en la vía glicolítica. En pruebas de inactivación enzimática, algunos derivados de bencimidazol mostraron actividad como potenciales inhibidores de la enzima. Usando esta información experimental en trabajos precedentes se utilizó el método de acoplamiento molecular (Docking) para diseñar una serie de moléculas y predecir el modo de unión con la enzima EhTIM. El propósito del presente trabajo de tesis es la síntesis y evaluación antiprotozoaria de dos de las moléculas resultantes del estudio anterior. Se trata de dos compuestos bencimidazólicos híbridos unidos a través de un enlace carboxamida.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La *Entamoeba histolytica* un protozooario de interés mundial

Los protozoarios se han adaptado prácticamente a cualquier tipo de hábitat existente sobre la faz de la Tierra, incluido el cuerpo humano. Unos 20 protozoarios diferentes causan enfermedades humanas que afectan a millones de personas en todo el mundo, son ejemplos: amibiasis, giardiasis, paludismo y tricomoniasis.

La amibiasis humana es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*; esta parasitosis tiene gran importancia en las cifras de morbilidad y mortalidad, sobre todo en países en vía de desarrollo. Por esta enfermedad se reportan anualmente a nivel mundial hasta 100 000 defunciones.⁵ La amibiasis ocupa el cuarto lugar en mortalidad debida a infecciones por protozoarios después de la malaria, tripanosomiasis africana y leishmaniasis; y el tercero en morbilidad después de la malaria y la tricomoniasis.²

En México las infecciones por *E. histolytica* aún son un serio problema de salud pública. México es considerado como un país endémico de infecciones amibianas. Un estudio seroepidemiológico, usando la prueba de hemaglutinación indirecta, mostró un índice de seroprevalencia de 8.4%; sin embargo el índice de incidencia nacional para amibiasis intestinal y absceso hepático durante el año 2000 fue 1353.43 y 6.37/100 000 habitantes, respectivamente.³

En el territorio mexicano la frecuencia de individuos con anticuerpos amibianos varía entre 2.2% y 11.4%, dependiendo esto fundamentalmente de la edad, sexo y

2. Marco Teórico

condiciones sanitarias de la población. En la ciudad de México el porcentaje de individuos con anticuerpos amibianos fue de 4.37%, pero varió de 1.68% en San Ángel (zona residencial, de casas solas y nivel económico elevado) a 3.86% en Tlatelolco (zona de departamentos con buenos servicios sanitarios y densidad elevada de población), hasta 7.52% en Netzahualcóyotl (zona de habitaciones proletarias, mal saneada y de nivel económico bajo).⁴

La amibiasis no produce síntomas en el 90% de los individuos afectados, en los cuales el parásito se encuentra en forma de quiste. La infección se localiza en la mucosa del intestino grueso, donde sólo la especie *E. histolytica* y en particular las cepas invasoras dañan el tejido y ocasionan enfermedades intestinales o extraintestinales que afectan otros órganos. Entre los factores que favorecen la difusión y perpetuación parasitaria se encuentran la contaminación fecal del suelo, el saneamiento básico ambiental deficiente por mal manejo de los productos de desecho del ser humano, el clima, factores socioeconómicos, factores culturales y la susceptibilidad del huésped, determinada por los factores inmunitarios, genéticos y nutricionales de cada persona.

Recientemente, la *E. histolytica* ha sido reclasificada en las especies patogénica (*E. histolytica sensu stricto*) y no patogénica (*E. dispar*). Existe discrepancia entre el número de personas infectadas por este protozoario así como en los índices de morbilidad y mortalidad las cuales son explicadas por la existencia de las dos especies morfológicamente idénticas.

2. Marco Teórico

La *E. histolytica* se define como un organismo eucarionte unicelular con la siguiente morfología:

- Trofozoítos o forma móvil. Se multiplica por fisión binaria y es muy sensible al jugo gástrico y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz y pared del colon y especialmente el ciego y el recto. Cuenta con un núcleo único y un diámetro de 20-40 μm .
- Quistes. Pueden sobrevivir en el agua y los alimentos, constituyen la forma infectiva por ingestión. Miden de 10 a 16 μm de diámetro, son esféricos en microscopía de campo claro, los quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* no pueden diferenciarse.

2.1.1 Ciclo vital

La infección (**Figura 1**) se produce por ingestión de un quiste maduro del parásito. El desenquistamiento se produce en la región inferior del intestino delgado y el metaquiste se divide rápidamente para dar lugar a ocho pequeños trofozoítos. Éstos penetran en el intestino grueso, experimentan fisión binaria, después de esto pueden ocurrir cualquiera de los siguientes tres eventos:

- 1) Invadir los tejidos del huésped a través del flujo sanguíneo, sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones, resultando en manifestaciones patológicas.
- 2) Vivir en la luz del intestino grueso sin invasión.
- 3) Evolucionar a quistes y ser expulsados del huésped con las heces.⁶

2. Marco Teórico

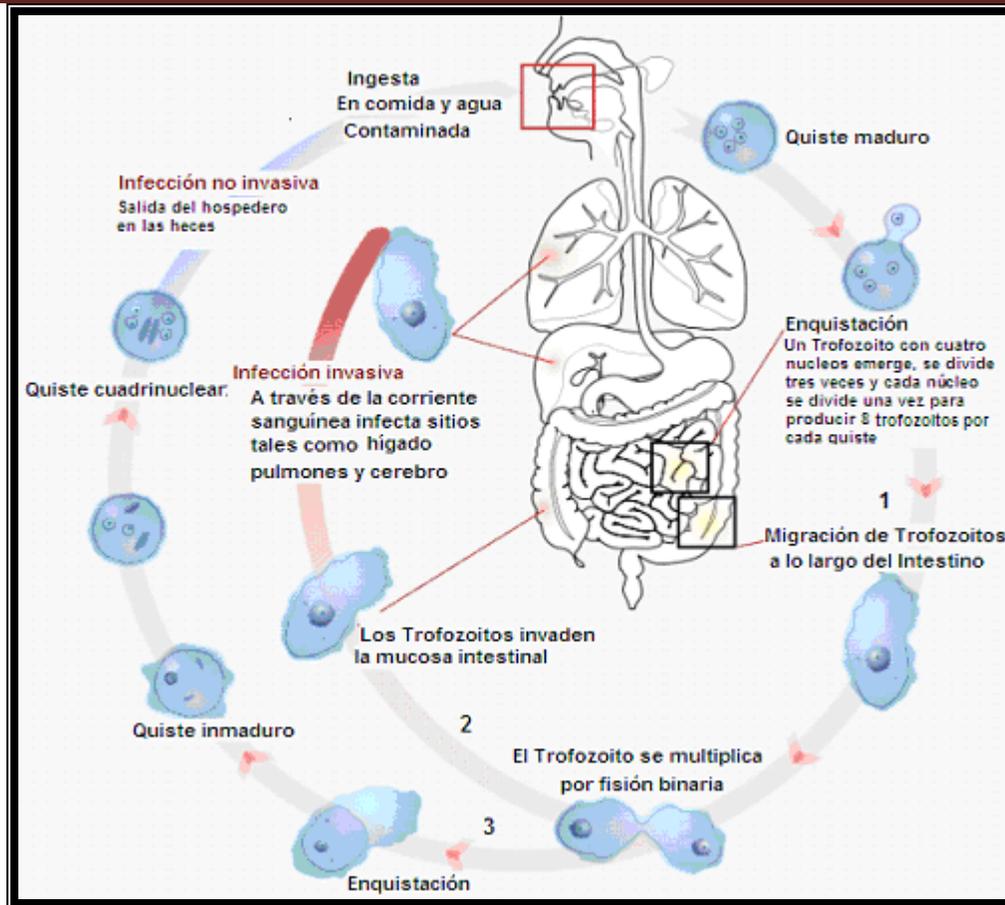


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.⁹

Se han descrito tres pasos básicos en la patogénesis de la amibiasis: colonización, reducción/disrupción de la mucosa y citólisis. Durante estos procesos, múltiples quimioatrayentes y citocinas proinflamatorias son liberadas por las células epiteliales, iniciando la respuesta inflamatoria aguda. La adherencia se realiza gracias a la acción citolítica de las enzimas proteolíticas que el parásito posee. La extensión y profundidad de la acción citolítica determinan la aparición de úlceras de diversos tamaños, las cuales, generalmente, terminan en la perforación de la luz de la pared intestinal. La lectina es una molécula central en el proceso de colonización, enquistamiento e invasión de *E. histolytica*. La lisis tisular, en la que participan los mecanismos de defensa del huésped, ocurre gracias a que la amiba contiene

2. Marco Teórico

enzimas llamadas “formadoras de poros”, que son enzimas proteolíticas (colagenasas y proteasas) que facilitan la invasión de los tejidos, permeabilizan la membrana y se insertan en la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana; éstas proteasas solubles, denominadas amebaporos, son uno de los mayores factores patógenos de la *E. histolytica*, cuya función primaria es eliminar las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas digestivas y pueden inducir la necrosis de células epiteliales y leucocitos durante la invasión del parásito. Las proteasas de cisteína se consideran como uno de los ejes centrales de las interacciones de la *E. histolytica* con la respuesta inmune y no inmune del huésped, están involucradas en la evasión de la respuesta inmune debido a que degradan inmunoglobulinas, como IgA e IgG. *E. histolytica* ingiere las células muertas del huésped por fagocitosis con lo que limita igualmente la respuesta inflamatoria y permite su establecimiento como una infección persistente.¹⁰ Las manifestaciones clínicas van desde un rango de colonización asintomática de la mucosa intestinal hasta el síndrome clínico disentérico. La colitis amébrica aguda dura de 1 a 4 semanas que usualmente resuelve dentro de unos pocos días con el tratamiento apropiado. Si embargo casos severos de disentería pueden evolucionar a perforación del colon, colitis fulminante, megacolon tóxico o amoeboma. Los síntomas de estas complicaciones son severo dolor abdominal, e intensos tenesmos (20 o más episodios de diarrea sanguinolenta por día).

2.1.2 Tratamiento

En la actualidad existen tratamientos para el control de la amibiasis; los fármacos usados en la quimioterapia de la amibiasis son de dos clases: amebicidas luminare para quistes (Paramomicina, Iodoquinol y Furoato de diloxanida) y amebicidas de

2. Marco Teórico

tejido para trofozoítos (nitroimidazoles: Metronidazol, Tinidazol, y Dehidroemetina). La enfermedad invasiva debe ser tratada con un amebicida de tejido seguido por un amebicida luminal. Para asegurarse que el tratamiento ha sido exitoso se realiza un examen de las heces. La quimioprofilaxis no es recomendable porque puede conducir a la resistencia a los fármacos y limitar la utilidad de los mismos.

Si bien el Metronidazol es el fármaco de elección contra la amibiasis, se encuentra catalogado como potencial carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, aunque parece tener un potencial riesgo cancerígeno bajo y, en casi todos los casos, los beneficios del tratamiento son mayores que tan baja probabilidad. Sin embargo cuando los tratamientos son largos y las dosis son altas aparecen síntomas de toxicidad como el ennegrecimiento de la lengua, leucopenia, neutropenia, irritación de la mucosa gástrica y daño de los espermatozoides; por otro lado estudios bioquímicos han identificado en *E. histolytica* enzimas de fermentación similares a las de las bacterias las cuales tienen como objetivo principal el Metronidazol.⁵

En un intento por disminuir la toxicidad y aumentar la efectividad en los tratamientos antiamebicos se han sugerido nuevas metas para los medicamentos. Una de las herramientas que se han tomado para la obtención de nuevas moléculas para el tratamiento de la amibiasis ha sido la identificación de nuevas dianas para los posibles fármacos. La observación de que *E. histolytica* depende exclusivamente de la glicólisis para el suministro de ATP y que una serie de sus enzimas glicolíticas muestran importantes diferencias comparadas con las enzimas humanas, las

2. Marco Teórico

enzimas glicolíticas de *E. histolytica* se han convertido en un punto importante de la investigación. Una vez identificadas las enzimas participantes en los pasos que controlan el flujo de la glicólisis, estas llegan a ser dianas potenciales para el diseño de nuevos fármacos.⁸

2.2 La EhTIM como diana biológica para el diseño de fármacos

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una enzima que se ha investigado ampliamente y se ha usado como una diana para el diseño de fármacos contra patógenos glicolíticos (protozoarios como por ejemplo el *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas), cuya función es esencial para la producción total de ATP en la glicólisis. La reacción catalizada por la Triosafosfato Isomerasa es el quinto paso de la glicólisis y es el último paso de la "Fase de Gasto de Energía", aquí se genera la segunda molécula de Gliceraldehído-3-fosfato al isomerizar a dihidroxiacetona-fosfato debido a que esta última no puede continuar en los pasos restantes de la glicólisis.

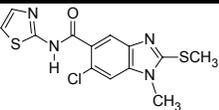
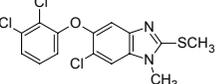
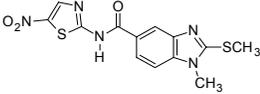
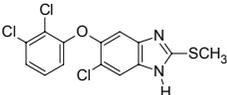
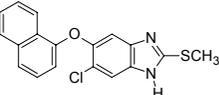
Se ha observado que el sitio catalítico de la TIM es muy similar en todas las especies estudiadas. En mesófilos, la TIM es un dímero cuya interfaz ha sido considerada una diana para el diseño de inhibidores selectivos que interactúan con los sitios de unión entre subunidades o con algunos aminoácidos no conservados de la molécula¹²; por ejemplo los residuos de cisteína localizados en esta interfaz al interactuar con reactivos de tiol específicos producen agregación e inactivación de la enzima. Las TIM que carecen de este residuo, tal como la TIM humana, son menos afectadas. La TIM de *Entamoeba histolytica* (EhTIM) tiene en la interfaz un residuo de cisteína y

2. Marco Teórico

presenta 10 inserciones más, comparada con la enzima de otros patógenos. Este residuo de cisteína existe en la TIM de una serie de patógenos (Cys14 en TbTIM, Cys15 en TcTIM y Cys16 en LmTIM). Una característica importante en la interfaz de EhTIM es un enlace de hidrógeno entre subunidades (3.52Å) entre His86 (monómero A) y Cys14 (monómero B).¹¹

En la tesis doctoral de Fabián López Vallejo¹³ se reporta la actividad inhibitoria de 97 compuestos entre ellos varios bencimidazoles, cuyo valor de CI_{50} contra *E. histolytica* fue determinado *in vitro*. Se encontró que cinco compuestos de los estudiados mostraron cierto potencial de inhibición contra la EhTIM. En la **Tabla 1** se muestra la estructura de los bencimidazoles estudiados, el porcentaje de actividad residual de la enzima, así como la CI_{50} en unidades de potencia contra el parásito.

Tabla 1. Porcentaje de actividad residual de la EhTIM por acción de cinco compuestos bencimidazólicos, pCI_{50} frente a *Entamoeba histolytica* y ClogP

Compuesto	Estructura	% actividad residual de la EhTIM	pCI_{50}^a	ClogP ^b
1		47	7.21	2.45
2		46	5.86	6.40
3		42	7.59	2.27
4		55	6.38	6.44
5		34	7.58	6.53

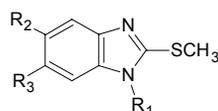
a $pCI_{50} = -\log CI_{50}$. **b** ClogP= Coeficiente de partición octanol/agua calculado.¹³

2. Marco Teórico

El estudio computacional (metodología Docking) de estos compuestos brindó valiosa información sobre la forma en que éstos interactúan con la enzima de *E. histolytica* así como con la del humano. De esta manera se diseñaron nuevos prototipos con mayor probabilidad de ser más activos que las moléculas a partir de las cuales fueron diseñadas.¹³

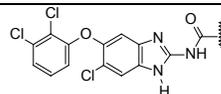
En la **Tabla 2** se muestran los resultados del estudio de los compuestos diseñados por *docking*, el valor de la energía libre de unión a la TIM de *E. histolytica* y TIM de humano, así como la diferencia energética entre ambas; todos los compuestos, estructuralmente hablando, son amidas bisbencimidazólicas y tuvieron muy buenas energías de unión a la EhTIM. El compuesto con mayor selectividad por la EhTIM es **B3** y el menos selectivo es **B5**.

Tabla 2. Valores de energía libre de unión determinados mediante acoplamiento molecular (*docking*)



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	ΔG EhTIM (kcal/mol)	ΔG HsTIM (kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ (ΔG_{EhTIM} - ΔG_{HsTIM})
B1-21 ^a	H	DFBAC	H	-10.71	-8.38	-2.33
B2-14 ^a	CH ₃	DFBAC	H	-9.99	-9.11	-0.88
B3	CH ₃	H	DFBAC	-11.25	-8.76	-2.49
B4	H	DFBAC	Cl	-10.09	-8.67	-1.42
B5	CH ₃	DFBAC	Cl	-8.9	-9.5	0.6
B6	CH ₃	Cl	DFBAC	-10.65	-9.28	-1.37

DFBAC: 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]aminocarbonilo



^a 14 y 21 Pertenecen al numeral consecutivo en el esquema de reacción.

En el presente trabajo sólo se reporta la síntesis de los dos primeros compuestos de la serie **B1-21** y **B2-14**. Se trata de dos moléculas compuestas cada una por dos

2. Marco Teórico

bencimidazoles, un 2-metiltiobencimidazol y un 2-aminobencimidazol, unidos a través de un enlace carboxamida; con $\Delta\Delta G$ calculado de -2.33 y de -0.88 Kcal/mol para **B1-21** y **B2-14**, respectivamente.

Del trabajo computacional se obtuvieron las siguientes conclusiones: los ligandos diseñados se unen al sitio de unión de la EhTIM (interfaz) ocupando un mayor volumen que los compuestos experimentales (**Figura 2**). Los ligandos diseñados tienen una mejor energía de unión que los ligandos experimentales, por tanto se espera que éstos inactiven la EhTIM en una proporción mayor.

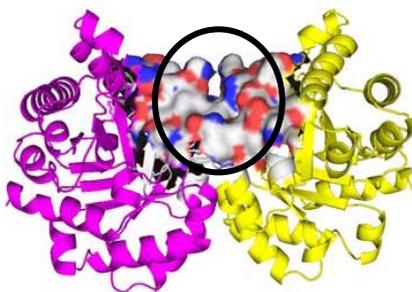


Figura 2. EhTIM, interfaz del dímero protéico.

2.3 Bencimidazol molécula con actividad antiparasitaria

El bencimidazol (BZD) es un heterociclo de nitrógeno que fue sintetizado por primera vez por Hoebreckner y después por Ladenberg y Wundt durante 1872-1878¹⁵. Los bencimidazoles con actividad antiparasitaria pueden ser agrupados como: BZDs tiazolilo, BZD carbamatos de metilo, pro-BZD y BZD halogenados. Su potencial terapéutico en quimioterapia de parásitos fue reconocido sólo después de 80 años cuando ICI (Imperial Chemical Industries) introdujo una combinación de 2-Fenilbencimidazol con Fenotiacina como un antihelmíntico para ovejas. En 1961, los

2. Marco Teórico

laboratorios Merck Sharp Dohme descubrieron el 2-(1,3-Tiazol-4-il)-Bencimidazol (Tiabendazol) como un antihelmíntico de amplio espectro.

La introducción del Tiabendazol en el tratamiento de infecciones helmínticas de humanos y animales domésticos puede ser considerada como el marcador de un gran avance en el diseño de una nueva generación de antiparasitarios. La facilidad de los bencimidazoles para someterse a reacciones electrofílicas, nucleofílicas y ciclocondensaciones permite la obtención de compuestos estables, que han hecho posible sintetizar una gran variedad de bencimidazoles sustituidos y bencimidazoheterociclos, muchos de los cuales han surgido como fármacos efectivos para el tratamiento de infecciones parasitarias en humanos y animales domésticos como caballos, borregos, puercos, cabras, gatos, perros y aves de corral. Unos pocos bencimidazoles también se ha usado en el control de varias pestes.¹⁵

Aunque el Tiabendazol muestra una actividad de amplio espectro contra diferentes helmintos en humanos y animales tiene el inconveniente de sufrir un rápido metabolismo de primer paso que lo transforma a la forma inactiva 5-Hidroxitiabendazol, que tiene una vida media de sólo once minutos en ratas. Para prevenir esta hidroxilación enzimática de los bencimidazoles en la posición 5, los científicos han sintetizado una variedad de BZD 5-sustituidos que han mostrado un gran aumento en su tiempo de vida media.

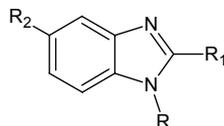
Posteriormente, el descubrimiento del Parbendazol por los laboratorios Smith Kline estimuló, en diferentes compañías farmacéuticas del mundo, una intensiva búsqueda

2. Marco Teórico

de mejores bencimidazoles antihelmínticos. Pronto un gran número de fármacos

(**Tabla 3**) fueron introducidos en medicina veterinaria y humana.

Tabla 3 . Algunos Fármacos bencimidazólicos en medicina clínica



Nombre genérico	R	R ₁	R ₂	Inventor/ Fabricante
Tiabendazol	H	4-tiazolil	H	MSD
Carbendazim ^a	H	NHCOOMe	H	duPont
Benomil	CONH <i>n</i> -Bu	H	H	duPont
Parbendazol	H	NHCOOMe	<i>n</i> -Bu	SKF
Mebendazol	H	NHCOOMe	COC ₆ H ₅	Janssen
Fenbendazol	H	NHCOOMe	SC ₆ H ₅	Hoechst
Albendazol	H	NHCOOMe	S-IPr	SKF
Triclabendazol ^b	H	SMe	OC ₆ H ₃ Cl ₂ -2,4	Ciba-Geigy

^a Principalmente un agente antifúngico; también conocido como Medamin.

^b También contiene un 6-Cl .

2.3.1 SAR en Bencimidazoles

Las modificaciones estructurales sobre el núcleo de bencimidazol se han realizado en diferentes posiciones, como resultado se han obtenido moléculas con diferentes propiedades farmacológicas y, en consecuencia, una relación estructura actividad (SAR) que constituye un voluminoso capítulo en química medicinal. Los cuatro sitios principales de modificación estructural en el anillo de bencimidazol se indican en la

Figura 3.

2. Marco Teórico

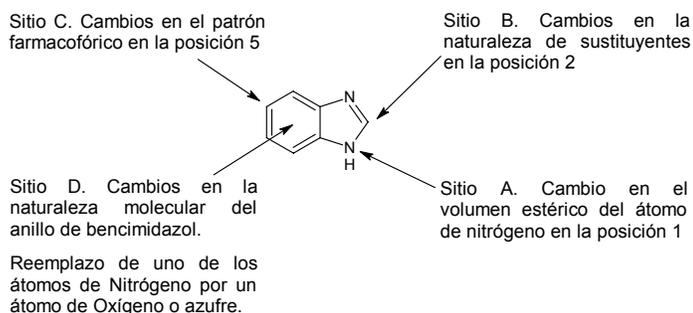


Figura 3. Sitios de modificación estructural en el anillo de bencimidazol.²⁷

Diferentes modificaciones (**Figura 3**) se han realizado en el anillo con series de análogos con el fin de encontrar las propiedades idóneas para evocar una respuesta antihelmíntica en bencimidazoles. Su actividad se basa en su afinidad por receptores específicos localizados en el interior del parásito. Consecuentemente, la entrada del fármaco en el parásito es crítica para la eficacia antiparasitaria. Las moléculas antiparasitarias necesitan pasar a través de las membranas celulares para alcanzar el sitio específico de localización del receptor. Los fármacos antiparasitarios pueden alcanzar su objetivo en parásitos a través de ingesta oral (de la sangre del hospedero, y/o contenido gastrointestinal) o por difusión a través de la superficie externa o por alguna combinación de ambas rutas. Al parecer la presencia del átomo de hidrógeno en la posición 1 del bencimidazol es esencial para la actividad antihelmíntica debido a que todos los bencimidazoles 1-sustituidos disminuyen o pierden actividad. Los únicos compuestos notables de esta clase son Benomil y Benacil, los cuales actúan como probencimidazoles liberando carbendazim como el metabolito activo en el cuerpo del hospedero.

2. Marco Teórico

2.3.2 Bisbencimidazoles como antiprotozoarios

En la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser usadas como antiprotozoarios han surgido diferentes propuestas, entre ellas se encuentra la asociación de dos moléculas a través de enlaces covalentes para formar una nueva estructura que potencie la acción de ambas (Fármacos gemelos o híbridos). Los bencimidazoles no han sido la excepción en esta asociación de moléculas y se ha demostrado, por ejemplo, que la adición de un segundo anillo de bencimidazol en la estructura del 2-amino bencimidazol y la geometría no planar son propicios para la actividad antiparasítica contra *T. spiralis larvae*,²¹ el reemplazo bioisostérico de un anillo de bencimidazol en lugar de una amidina en la pentamidina, resulta en un incremento en la actividad antiprotozoaria hacia *E. histolytica* y *L. mexicana*²².

Los bis-bencimidazoles Hoechst-333342 y -33258 son unos tintes fluorescentes que se utilizan en el marcaje de ADN en la microscopia fluorescente y que se han identificado como inhibidores selectivos de las Topoisomerasas (TOPs) de los parásitos protozoarios *Giardia lamblia*, *P. carinii* así como de los amastigotes de Leishmania. Debido a que la los tintes Hoechst se unen al ADN, pueden interrumpir la replicación del ADN durante la división celular. Por lo tanto son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos.²³

Existen otros bencimidazoles en el mercado y en el campo de la investigación dirigidos a otros padecimientos y a diversas dianas terapéuticas tales como el omeprazol (5-metoxi-2- [(4-metoxi-3, 5-dimetil-piridin-2-il) metilsulfinil] -3H-

2. Marco Teórico

bencimidazol) que es un inhibidor de la bomba de protones en el estómago usado en el tratamiento de la gastritis.

2.3.3 Síntesis de Bencimidazoles

2.3.3.1 Método de Phillips

Es el método más importante de síntesis de una amplia variedad de bencimidazoles 2-sustituidos, condensa *o*-diaminobencenos con ácidos carboxílicos o sus derivados. El bencimidazol puede hacerse con un 80% de rendimiento colocando una mezcla de *o*-fenilendiamina y ácido fórmico a temperatura ambiente por 5 días. A 100 °C el proceso toma lugar solo en 2 horas. Las condiciones de reacción son esenciales para obtener buenos rendimientos. Las condiciones más utilizadas en el método de Phillips es el calentamiento de los reactivos en presencia de ácido clorhídrico 4 M.

2.3.3.2 Síntesis de bencimidazoles a partir de *o*-(*N*-acil)anilinas

Otra de las rutas más comunes de síntesis de bencimidazoles emplea un compuesto de tipo arileno 1,2-diamino, en el cual uno de los grupos amino ha sido acilado o tioacilado, se cicla por termólisis, o con ácido acuoso o etanólico, o cloruro de fosforilo, o por calentamiento bajo reflujo en etanol.

Esta técnica se extiende al uso de *o*-nitroacilaminoarenos, los cuales ciclan a medida que se reduce el grupo NO₂ química o catalíticamente. Los rendimientos

2. Marco Teórico

generalmente son buenos y en ocasiones superiores a los obtenidos de la reacción entre un o-aminoanilina y un ácido carboxílico.

2.3.3.3 Síntesis de *N*-metilbencimidazoles

La síntesis de *N*-metilbencimidazoles se puede lograr cuando una vez obtenido el anillo bencimidazólico, éste se hace reaccionar con yoduro de metilo en medio básico generando una mezcla de isómeros en relación 1:1.

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

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.²⁸

2.4 Síntesis de carboxamidas en microondas con agentes acoplantes

2.4.1 Carboxamidas

La formación del enlace covalente amida es energéticamente desfavorable, la energía de activación para la formación y ruptura es muy alta estableciendo una limitación cinética al proceso. Es evidente que la formación no catalizada del enlace amida es extremadamente lenta por lo que se requiere la obtención de un buen agente acilante mediante la activación del grupo carboxilo. Esto se realiza

2. Marco Teórico

reemplazando el grupo OH por un sustituyente X atrayente de electrones, que aumenta la polarización del grupo carbonilo y la electrofilia de su átomo de carbono, facilitando de esta forma el ataque nucleofílico del grupo amino de la molécula que debe ser acilada.

2.4.2 Agentes acoplantes

Desde el tiempo de Theodor Curtius y Emil Fischer la formación de carboxamidas esta basada en la reacción de aminas con un ácido carboxílico activado tal como cloruro de ácido, anhídrido mixto, azida de acilo, o éster, o por una activación *in situ* con agentes acoplantes tal como el *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).¹⁶

El uso de 1-acilimidazoles como agentes acilantes es de gran importancia. Por su analogía con las amidas son nombradas imidazolidos. Sin embargo, en contraste con las amidas, el par de electrones del nitrógeno no se encuentra disponible para un mesomerismo amida. Por esta razón los carbonilimidazoles son mucho más reactivos que las *N,N*-dialquilamidas y así como los anhídridos de ácido y cloruros de ácido, son capaces de transferir el grupo acilo al agua, alcoholes, fenoles y aminas

Entre los agentes acoplantes más usados se encuentran el DCC el agente acoplante más barato, DC ó WSC: 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida y DIC, diisopropilcarbodiimida que se utiliza en SPPS (síntesis de péptidos en fase sólida). Normalmente, junto con las carbodiimidias antes mencionadas, se utilizan aditivos.

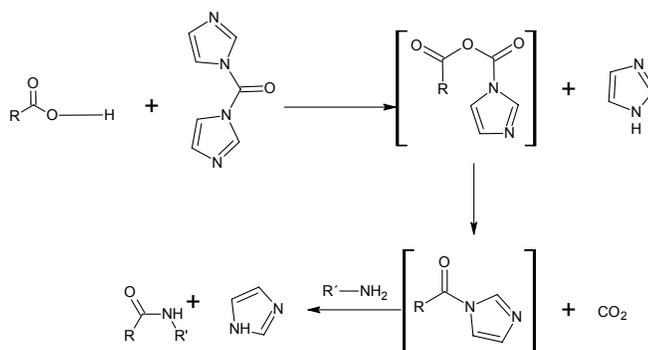
2. Marco Teórico

Los aditivos evitan la racemización y aumentan el rendimiento. La mayoría de estos aditivos son alcoholes del tipo aromáticos como HOBt, HOObt, pentafluorofenol, *N*-hidroxisuccinimida, etc.²⁰

2.4.3 CDI agente activante del grupo carboxilo

El *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) es un reactivo comúnmente usado para acoplar ácidos carboxílicos con aminas alifáticas o aromáticas para formar amidas. Desde su desarrollo inicial como un reactivo en 1960 se ha aplicado en investigaciones a pequeña escala y la fabricación a gran escala.¹⁷

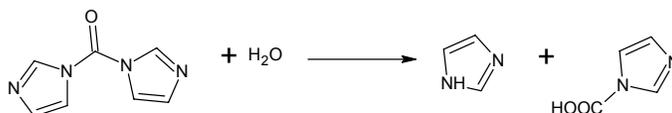
El CDI con ácidos carboxílicos en disolventes no próticos forma el 1-aciloxycarbonilimidazol el cual es capaz de una transacilación intermolecular. El resultante 1-acilimidazol puede ser usado como agente acilante, el imidazol actúa como un catalizador nucleofílico para la hidrólisis de derivados de ácidos carboxílicos (**Esquema 1**).¹⁷



Esquema 1. Acoplamiento de carboxilo-amina catalizado por CDI. La reacción transcurre a través de un intermediario imidazólido no aislable, que conduce a los ésteres o amidas por reacción con los correspondientes alcoholes o aminas.

2. Marco Teórico

El CDI reacciona fuertemente con el agua para dar imidazol y dióxido de carbono por lo que se recomienda realizar todos los experimentos bajo atmósfera de nitrógeno para mantener condiciones anhidras (**Esquema 2**).¹⁹

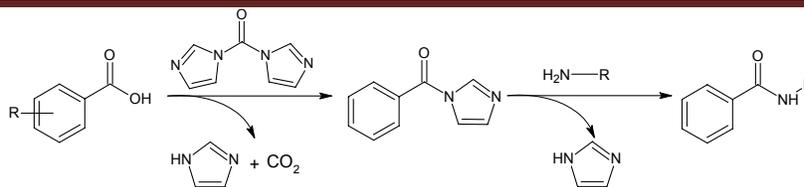


Esquema 2. La molécula de agua y de cualquier alcohol puede consumir el reactivo.

Este acoplamiento tiene una serie de beneficios como agente acoplante de amidas en la fabricación a gran escala. Es relativamente barato y fácilmente disponible en kilogramos, entre los subproductos se encuentra el dióxido de carbono que se considera benigno en las reacciones en pequeña escala, aunque es probable que cause problemas en grandes escalas.

El efecto imidazólido ha sido aplicado en el caso de aminas alifáticas y ha demostrado ser benéfico en las velocidades de la amidación mediadas por CDI, debido al incremento en la reactividad del intermediario conteniendo un grupo protonado o un grupo saliente imidazol (**Esquema 3**). Existe un inconveniente en las reacciones con aminas aromáticas debido a que las velocidades de reacción de los intermediarios CDI son demasiado lentas, lo cual ha limitado su uso en las reacciones de la industria farmacéutica y de química fina.¹⁶

2. Marco Teórico



Esquema 3. *Reacción de amidación con aminas alifáticas, el átomo del carbono central de un ácido carboxílico puede sufrir el ataque nucleofilo para dar un intermediario imidazólido, que no es más que un carboxilo activado que puede reaccionar con la molécula que contenga el grupo amino.*

2.5 Microondas

La industria química está interesada en los procesos que incrementen la producción de químicos. Ya sea con muy simples o muy complejas estructuras. Los procesos de intensificación consisten en el desarrollo de nuevos aparatos y técnicas que, comparadas con aquellas usadas hoy en día, lleven a la mejora dramática en manufactura y proceso, reduciendo substancialmente el tamaño de equipo/producción en relación a la capacidad de producción, consumo de energía, gasto de producción, y resultando finalmente en técnicas baratas y sustentables tales como la catálisis, que es invariablemente una parte integral del conocimiento de ingeniería básica que ha logrado la producción de grandes volúmenes de químicos los cuales son a menudo relativamente simples en estructura. Una manera común de aumentar las velocidades de reacción es aumentando el conocimiento transfiriendo en ocasiones técnicas de laboratorio a la producción industrial. Esta tecnología puede ser química y de ingeniería. La tecnología de microondas se explora para las velocidades de reacción y/o rendimientos y/o potenciar la selectividad.

2. Marco Teórico

2.5.1 Las microondas

El término “microondas” (microwave, MW) denota la técnica, conceptos usados y un rango de frecuencias. Las microondas viajan de la misma manera que las ondas de luz; son reflejadas por objetos metálicos, absorbidas por algunos materiales dieléctricos y transmitidas sin una absorción significativa por otros materiales dieléctricos. La irradiación por microondas es una introducción rápida de energía en un sistema químico de una manera diferente de los métodos tradicionales de calentamiento. La absorción de MW por los materiales esta principalmente asociada con las interacciones electromagnéticas las cuales son específicas para las moléculas polares (dipolos) y tienen un incremento importante cuando la polaridad del material aumenta. Sólo las moléculas polares absorben selectivamente la energía de microondas, las moléculas no polares son inertes a la pérdida dieléctrica de MW.

La irradiación de microondas (MW) consiste en ondas electromagnéticas en el rango de 0.3 a 300GHz (es decir longitud de onda de 1 cm a 1 m) todos los equipos estándar operan en una frecuencia de $\nu = 2.45$ GHz para evitar interferencias de radio y radar.



Figura 4. Espectro electromagnético.

2. Marco Teórico

Se han hecho comparaciones entre el método convencional de calentamiento y la irradiación de microondas para la síntesis de derivados de bencimidazol, justificados en el hecho de que muchos de los métodos reportados se encuentran varios inconvenientes, incluyendo bajos rendimientos, tiempos de reacción prolongados, el uso de agentes caros, procedimientos tediosos que involucran más de un paso en sus síntesis y la ocurrencia de una serie de reacciones laterales. Con el uso de un reagente de bajo costo, tiempos de reacción cortos y un perfil de reacción más limpio, se consiguen procesos atractivos para la síntesis rápida de compuestos bencimidazolicos y bis-bencimidazolicos de interés biológico.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una alternativa inmediata para el control de las enfermedades parasitarias es el tratamiento quimioterapéutico. Desafortunadamente, aunque se dispone de fármacos eficaces, estos fármacos muestran desventajas significativas, tales como: toxicidad, mala absorción, y existencia de cepas resistentes a ellos. Por lo cual es hace indispensable continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria.

En nuestro grupo de investigación se ha diseñado, mediante la metodología computacional *Docking*, una serie de moléculas como potenciales inhibidores de la enzima triosafosfatoisomerasa de la *E. histolytica*, las cuales van dirigidas hacia un blanco específico. Una vez que se han propuesto las moléculas, resulta imprescindible su síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* para con esto conocer sus actividades reales y validar el diseño computacional.

Algunos bencimidazoles han demostrado actividad inhibitoria sobre la EhTIM y se supone que una forma de inhibir su actividad es evitando que los dos monómeros de la enzima se unan para llevar a cabo su actividad catalítica. También que la cavidad de unión o interfaz de la EhTIM tiene una longitud de casi el doble de los compuestos bencimidazólicos que han mostrado actividad sobre dicha enzima, de ahí que se diseñaron moléculas bis-bencimidazólicas como posibles inhibidores de la enzima (**Tabla 2**).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por otro lado, históricamente los bencimidazoles han mostrado actividad antihelmíntica; pero en los últimos años se les ha encontrado que también son potentes antiprotozoarios, por ejemplo: son efectivos contra *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *T. cruzi*.

Con estas premisas en mente surge el siguiente planteamiento:

¿Es posible que la asociación de dos bencimidazoles unidos a través de un enlace carboxamida genere una molécula capaz de inhibir la actividad de la EhTIM?

¿Las nuevas moléculas tendrán una mejor actividad inhibitoria de la EhTIM que aquellas que sirvieron para su diseño?

¿Estos híbridos de bencimidazol tendrán actividad antiparasitaria *in vitro* sobre otro protozoario además de la *E. histolytica*?

4. HIPÓTESIS

4. HIPÒTESIS

Los compuestos bisbencimidazólicos serán capaces de inhibir la actividad de la EhTIM además de presentar una mejor actividad inhibitoria experimental sobre *E. histolytica* que aquellas que formaron la base para el diseño virtual (**Tabla 1**).

Estos compuestos serán activos contra otros protozoarios (*G. lamblia* y *T. vaginalis*) pero serán más potentes contra *E. histolytica*.

5. OBJETIVO

5. OBJETIVO

Sintetizar dos nuevas carboxamidas híbridas bisbencimidazólicas diseñadas por docking y evaluar su actividad antiparasitaria *in vitro* contra *E. histolytica* y otros protozoarios de interés clínico.

5.1 Objetivos Particulares

- Sintetizar las carboxamidas bisbencimidazólicas: *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**) y *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**)
- Determinar las constantes físicas de P_f , R_f y rendimientos de los compuestos sintetizados.
- Caracterizar los compuestos sintetizados mediante métodos espectroscópicos (RMN, IR) y espectrométricos (Masas).
- Suministrar los compuestos sintetizados para la evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima triosafosfatisomerasa de *E. histolytica* y de otros protozoarios como *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania* spp.; además de la TIM de Humano.
- Suministrar los compuestos sintetizados para evaluar su actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*, así como contra otros protozoarios (*Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*).
- Realizar el análisis de los resultados de las evaluaciones biológicas.

6. METODOLOGÍA

6. METODOLOGÍA

El Desarrollo del trabajo realizado en esta tesis se divide en dos partes, la química y la biológica. A continuación se describe cada una de estas partes.

6.1 PARTE QUÍMICA

En esta sección se describen las rutas sintéticas seguidas para obtener los compuestos **B2-14** y **B1-21**. Este trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, laboratorio L-122 del edificio E, UNAM, bajo la asesoría de la M. en C Alicia Hernández Campos.

Las metodologías involucradas para la preparación de cada uno de los intermediarios y productos finales, así como la comprobación estructural realizada por métodos espectroscópicos, se presentan en el Anexo A.

6.1.1 Secuencia de síntesis para la preparación de las dos carboxamidas bencimidazólicas B2-14 y B1-21

La síntesis de las carboxamidas **B2-14** y **B1-21** se dividió en cuatro partes. Primero se obtuvo la amina 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**12**) como se muestra en el **Esquema 4** que se utilizó como precursor común para lo dos carboxamidas finales. En la segunda y tercera etapa, se prepararon los ácidos **7** y **19** (**Esquema 5** y **Esquema 7**) respectivamente. Finalmente, en la

6. METODOLOGÍA

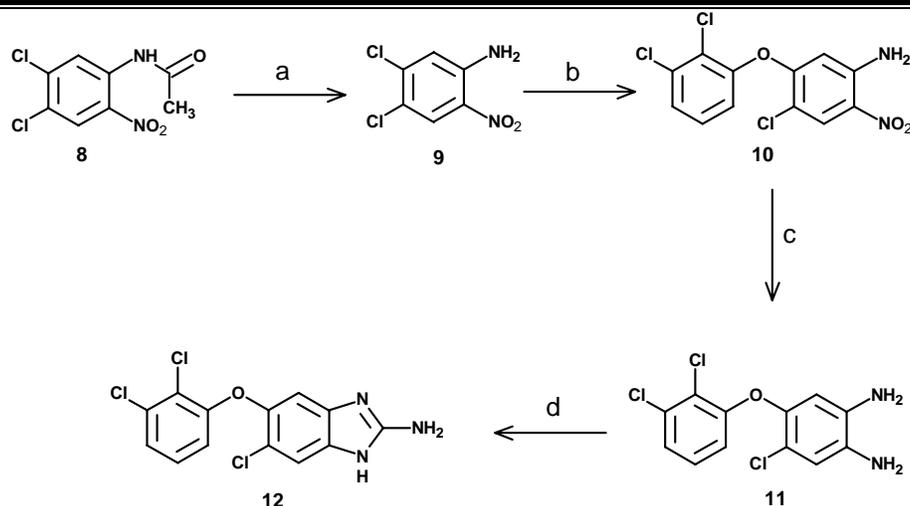
cuarta etapa se realizó el acoplamiento de los ácidos **7** y **19** con la amina **12** (**Esquema 8**).

6.1.1.1 Síntesis del precursor 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-amina (12)

Para la preparación de la amina bencimidazólica **12** se partió de la *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil) acetamida (**8**), sintetizada por nuestro grupo de investigación, la cual se sometió a hidrólisis en metanol caliente con KOH para generar la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**9**).

Posteriormente, **9** se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con 2,3-diclorofenol y K₂CO₃ en DMF a reflujo para generar la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**10**); el éter se sometió a una reducción catalítica, de su grupo nitro, con H₂ y Ni-Raney para dar la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (**11**). La ciclocondensación de **11** con BrCN en MeOH y sosa generó el 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**12**). (**Esquema 4**).

6. METODOLOGÍA



(a) NaOH/MeOH;(b)2,3-diclorofenol, DMF,K₂CO₃;(c) H₂, Ni-Raney, EtOH (d)BrCN, NaOH/H₂O, Calor.

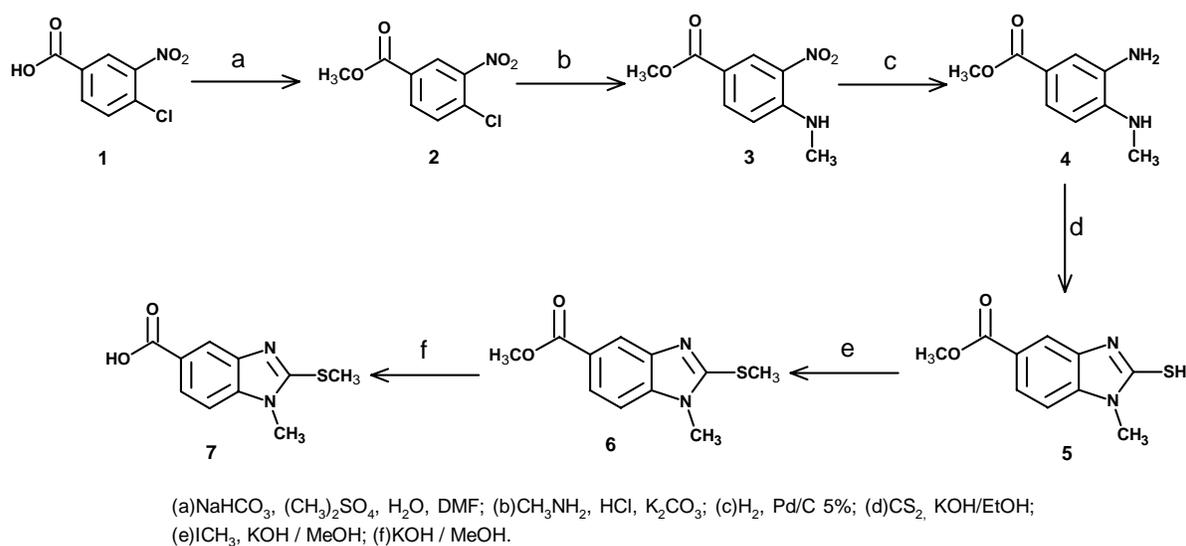
Esquema 4. Secuencia sintética para obtener el intermediario 12

6.1.1.2 Síntesis del precursor Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (7)

Para obtener el ácido **7** se siguió la ruta de reacción ilustrada en el **Esquema 5**, se partió del ácido-4-cloro-3-nitrobenzónico (**1**) comercial, el cual inicialmente se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 4-cloro-3-nitrobenzoato de metilo (**2**). Posteriormente **2** se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con clorhidrato de metilamina y carbonato de potasio a 130 °C en un reactor cerrado, para dar el 4-(metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (**3**). El compuesto **3** se sometió posteriormente a una hidrogenación catalítica a temperatura ambiente generando el 3-amino-4-(*N*-metilamino) benzoato de metilo (**4**). Enseguida **4** se trató inmediatamente con disulfuro de carbono en medio básico, para llevar a cabo la ciclocondensación, resultando así la formación del 1-metil-2-tiol-1*H*-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (**5**). El

6. METODOLOGÍA

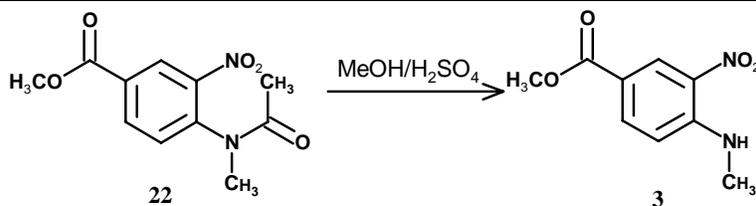
compuesto **5** se hizo reaccionar con CH_3I y KOH acuoso en acetona para dar como producto el 1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6**). Por último se llevó a cabo la hidrólisis del éster en metanol con potasa dando la sal del Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**7**), el tratamiento con HCl finalmente generó el sólido.



Esquema 5. Secuencia sintética para obtener el intermediario 7.

A continuación se muestra un método alternativo para la obtención del intermediario **3**. En el laboratorio se contaba con 4-[acetil(metil)amino]-3-nitrobenzoato de metilo (**22**), para aprovechar este sólido e integrarlo a la ruta sintética de **7**, se le realizó la hidrólisis ácida de **22**. Con ácido sulfúrico permite la obtención del compuesto **3** esperado (**Esquema 6**).

6. METODOLOGÍA

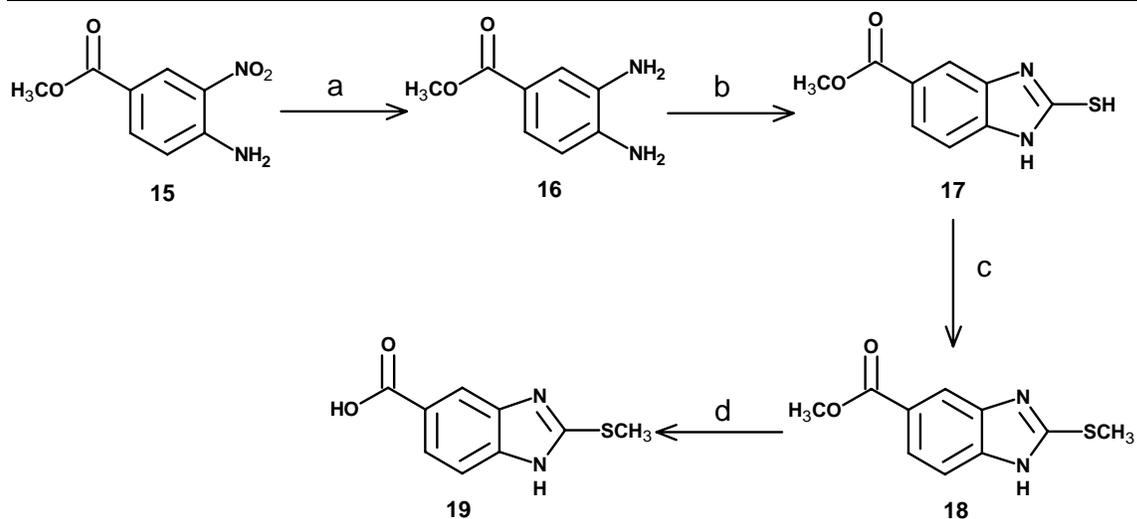


Esquema 6. Obtención de 3 a partir de la hidrólisis de 22.

6.1.1.3 Síntesis del precursor Ácido 2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)

La secuencia seguida para la preparación del ácido **19** se muestra en el **Esquema 7**. Se inició del 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**15**) el cual se sometió a una hidrogenación catalítica a temperatura ambiente generando el 3,4-diaminobenzoato de metilo (**16**); éste se trató inmediatamente con disulfuro de carbono en medio básico dando como resultado la formación de 2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**17**) que se trató con 1 equivalente de yoduro de metilo en medio básico a una temperatura entre 20 y 25 °C para metilar el azufre y obtener el compuesto **18**. Éste último se sometió a la hidrólisis básica del éster para dar el ácido bencimidazólico (**19**).

6. METODOLOGÍA



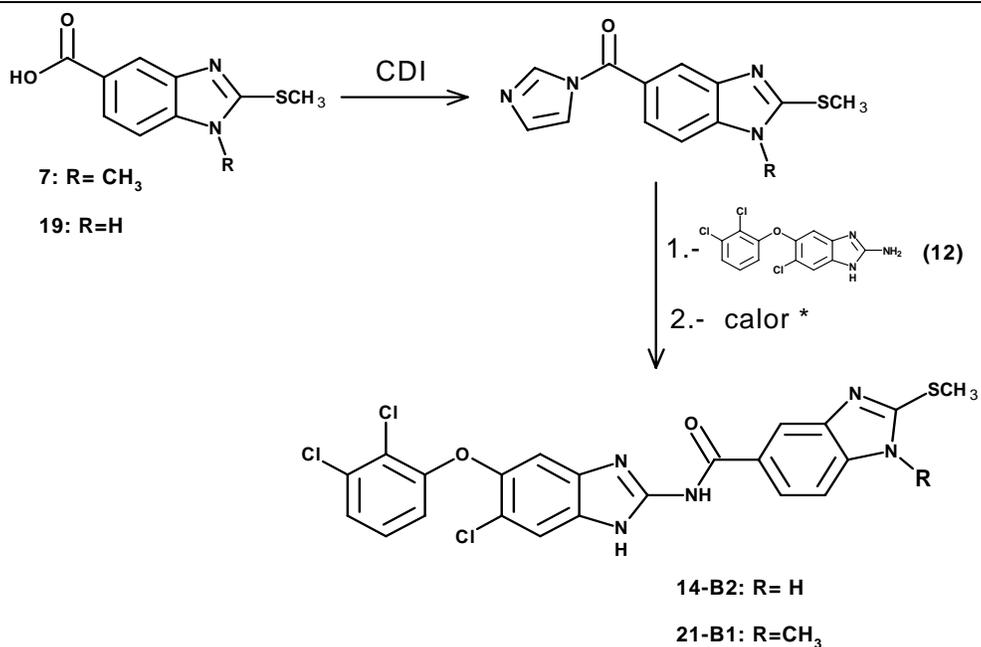
(a) H_2 , Ni-Raney, MeOH / AcOEt; (b) CS_2 , EtOH, H_2O , KOH; (c) ICH_3 /KOH, EtOH; (d) KOH / MeOH

Esquema 7. Secuencia sintética para obtener el intermediario 19

6.1.1.4 Acoplamiento de los precursores para la obtención de las carboxamidas B2-14 y B1-21

El **Esquema 6** muestra la última etapa de síntesis los ácidos **7** y **19** se hicieron reaccionar, por separado, con 1,1-carbonildiimidazol (CDI) bajo condiciones anhidras en DMF para dar lugar a la formación del intermediario reactivo **20**; éste, sin aislar, se hizo reaccionar con la amina **12** con calentamiento dando finalmente las carboxamidas **B2-14** y **B1-21**.

6. METODOLOGÍA



Esquema 8. Secuencia sintética para obtener los compuestos B2-14 y B1-21

* El calor fue suministrado por microondas o baño de aceite.

6.2 PARTE BIOLÓGICA

La evaluación biológica del compuesto sintetizado frente al protozooario *E. histolytica* se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI del IMSS, bajo la supervisión de la Dra. Lilian Yépez Mulia.

Uno de los propósitos del presente trabajo de investigación fue la evaluación de los compuestos sintetizados frente al protozooario *Entamoeba histolytica* y frente a la enzima TIM de *E. histolytica*; sin embargo, la falta de disponibilidad de la enzima de este protozooario para los ensayos nos hizo realizar las pruebas en otra enzima similar y las metodologías se describen a continuación.

6. METODOLOGÍA

6.2.1 Prueba de susceptibilidad in vitro para protozoarios

Para evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos, previamente estandarizado. Se incubaron 4×10^6 trofozoitos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* por 48 horas a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de la carboxamida correspondiente (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/ml), utilizando como compuestos de referencia albendazol, nitazoxanida y metronidazol, para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos empleando DMSO. Los experimentos se efectuaron dos veces por triplicado. Se inocularon 50µL de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos y se incubaron por 48h más. El número final de trofozoítos se determinó en un hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente, mediante análisis Probit, se calculó la CI_{50} que correspondió a la concentración que inhibió el crecimiento del 50% de los trofozoítos

6.2.2 Prueba de susceptibilidad in vitro para las TIM de *Leishmania sp.*, *T. brucei* y *T. cruzi*

Se empleó el método de cuantificación de NADH, previamente estandarizado. Se incubó la Triosafosfato isomerasa a una concentración de 5 mg/mL en 1 mL de **Medio 1^a** por dos horas a 36°C. Para el control negativo se empleó la TIM en medio libre de inhibidores.³¹

6. METODOLOGÍA

Después de la incubación se tomó una muestra de 1 mL de la solución anterior y se adicionó a 1 mL del medio de reacción para ensayo de actividad (**Medio 2^b**). Se cuantificó la disminución de absorbancia en la celda de reacción a 340 nm en un espectrofotómetro marca Hewlett-Packard equipado con termostato a 25°C. Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con el control.³¹

^a **Medio 1.** Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, 200 mg del compuesto a evaluar, pH=7.4.

^b **Medio 2.** Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, Gliceraldehído-3-fosfato 1 mM y 0.9 unidades de α -glicerol fosfato deshidrogenasa, pH = 7.4.²⁶

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados de la Parte Química

Las constantes físicas punto de fusión y Rf así como los rendimientos obtenidos para los compuestos finales sintetizados se muestran en la **Tabla 4**. Los mismos parámetros para los compuestos intermediarios se muestran en la **Tabla 5**.

7.1.1 Propiedades físicas de los compuestos finales

Tabla 4. Propiedades físicas de los precursores y compuestos finales

Compuesto	Pf (°C)	Rf (Sistema ^a)	Sistema de Cristalizado	Rendimiento Cristalizado
7	287.8-288.9	0.35 (II)	DMF:MeOH	-----
12	183.6-185.6	0.40 (VI+NH ₄ OH)	Tolueno:EtOH	73.95%
19	304.7-310.4	0.10 (II)	EtOH:Agua	41.10%
B2-14	300.4-301.1 ^b	0.43 (IX)	Lavado con MeOH	37.48%
B2-14	289.3-290.9 ^c	0.42 (IX)	Lavado con EtOH	18.9%
B1-21	268.7-271.54 ^c	0.38 (IX)	Lavado con EtOH	84%
B1-21	274.1-274.9 ^b	0.37 (IX)	Lavado con EtOH	25.6%

^a Los sistemas de elución se pueden consultar en el **Anexo A**.^b Síntesis con calentamiento convencional.

^c Preparación con calentamiento en horno de microondas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Propiedades físicas de los compuestos intermediarios obtenidos

Compuesto	Pf (°C)	Rf (Sistema ^a)	Recristalizado de	Rendimiento Cristalizado
2	81.1 - 81.7	0.37 (VII)	MeOH	34.66 %
3	144.5-145.6	0.47 (I+AcOH)	Glima/agua	72.83 %
4	---	0.40 (II)	---	---
5	254.2-255.4	0.43 (II)	EtOH/DMF10%	39.57 %
6	121.8-122.3	0.33 (VIII)	MeOH/Agua	84.62 %
9	178.8-179.2	0.47 (VII)	CH ₃ COOH	72.66 %
10	149.6-151.4	0.65 (I)	Tolueno	47.47 %
11	---	0.30 (I)	---	---
13	---	0.60 (IX)	---	---
16	---	0.17 (II)	---	---
17	Se descompone a 263.4	0.30 (I)	EtOH:DMF	70.39 %
18	87.7-87.8	0.19 (II)	EtOH:Agua	47.46 %
19	304.7-310.4	0.10 (II)	EtOH:Agua	41.10 %
20	---	0.34 (IX)	---	---

^a Los sistemas de elución se pueden consultar en el **Anexo A**.

7.1.2 Obtención del Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (7)

La obtención del ácido 1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (7) comenzó con la preparación del éster 4-cloro-3-nitrobenzoato de metilo (2), como se muestra en el esquema de reacción 5, mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular entre el sulfato de dimetilo y el ácido 4-cloro-3-nitrobenzónico (1) en medio básico. Esta reacción se realizó en tres medios de composición diferentes, **Tabla 6**. Dando un mejor rendimiento y un producto más limpio el método C. En esta reacción se obtuvo un rendimiento de 94.24% de un producto que crudo mostró una sola mancha por análisis en CCF analítica.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Variantes para la reacción de esterificación del ácido-4-cloro-3-nitrobenzónico (1)

N°	Materia Prima (g)	Método	Descripción Producto Crudo	Rendimiento (%)
1	15	A (84:16 Agua:DMF)	Sólido blanco; una sola mancha en CCF Pf 80.5-80.8	38.08
2	10	B MF)	Sólido amarillo; 2 manchas en CCF, la principal con Rf 0.37 P.f. 81.1-81.7°C	87.79
3	15	C (39.2 :34.8: 26 EtOH:Acetona:Agua)	Sólido blanco P.f. 80.2-82.0(50:50 Agua:D	94.24

El éster **2**, sin tratamiento alguno, se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática en un reactor cerrado a 130 °C, en medio básico, usando como disolvente DMF. De esta manera se obtuvo el 4-(*N*-metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (**3**), un sólido naranja con Pf de 144.5-145.6 °C. Otra manera por la cual se obtuvo el compuesto **3** fue por una hidrólisis ácida metanólica del 4-[acetil(metil)amino]-3-nitrobenzoato de metilo (**22**). En su espectro de RMN ¹H (**Espectro 1**) se observó una señal doble a 3.08 ppm que integró para tres protones y que se asignó al grupo metilo de la amina secundaria. El intercambio con óxido de deuterio (D₂O) provocó la simplificación de la señal, lo que indicó que existía un acoplamiento del grupo metilo con el protón de la amina. A 3.90 ppm se observó una señal simple que integró para tres protones y que corresponde al grupo metilo del éster aromático. La señal amplia a 8.34 ppm desapareció en el intercambio con D₂O por lo que se asignó al protón de la amina. Por otra parte, en su espectro de masas (**Espectro 2**) el pico a m/z= 210 (35 % ab. rel.) corresponde al M⁺ y peso molecular de la fórmula

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

condensada $C_9H_{10}N_2O_4$ y que está en concordancia con la estructura del compuesto esperado. La pérdida del fragmento M^+-31 , $m/z=179$, corresponde al grupo $-OCH_3$ del éster metílico. El espectro de IR (**Espectro 3**) mostró las bandas características para la amina secundaria ($Ar-NH-CH_3$) en 3367 y 1225 cm^{-1} , para el grupo éster ($-COOCH_3$) en 1709 y 1176 cm^{-1} y para el grupo nitro ($-NO_2$) en 1564 y 1322 cm^{-1} .

El siguiente paso fue la reducción catalítica del grupo nitro dando origen a la diamina correspondiente (**4**). Inmediatamente **4**, sin tratamiento posterior, se sometió a una reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio básico, tomando en cuenta que la formación del xantato de etilo se realizó en el mismo medio de reacción. Una temperatura al rededor de 65 °C y un pH de 9 fueron importantes para evitar hidrólisis del éster y permitir la formación del 1-metil-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**5**).

La metilación del tiol **5** con 1.2 equivalentes de yoduro de metilo en medio básico, a temperatura ambiente, dio origen al compuesto 2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo **6**, al cual se le realizó una hidrólisis básica a 60 °C para la obtención del ácido precursor **7**. Las características físicas y espectroscópicas fueron concordantes con las ya reportadas por nuestro grupo.²⁵

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.3 Obtención de la 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-amina (12)

Para la obtención de la amina precursora **12**, se comenzó con la preparación de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**9**) a partir de la hidrólisis básica de la correspondiente acetamida **8** con la cual se contaba en el laboratorio; **9** se obtuvo sin problema dando cristales amarillos cuyo p_f y R_f coincidieron con los reportados.²⁹ La siguiente reacción fue una sustitución nucleofílica aromática entre el 2,3-diclorofenol y la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**9**) en medio alcalino con DMF como disolvente. El éter **10** se obtuvo con un rendimiento moderado (47.47%) debido a que el producto se encontró contaminado con un compuesto menos polar que se logró eliminar por lavados con metanol. La reducción del grupo nitro de **10** se realizó por hidrogenación catalítica utilizando Ni-Raney como catalizador y posteriormente la ciclación de la diamina **11** con bromuro de cianógeno permitió la obtención del compuesto precursor (**12**). El tratamiento de la reacción con agua y sosa aseguró la descomposición del BrCN residual, así como la neutralización del cianuro de hidrógeno formado y la precipitación del producto en forma de un sólido resinoso difícil de manejar. El producto pudo aislarse de la suspensión por extracción con AcOEt. El producto crudo se recristalizó de Tolueno-EtOH.

La estructura de la amina bencimidazólica **12** se comprobó por el análisis de sus espectros. En su espectro de RMN ^1H (**Espectro 4**) se observaron dos señales

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

amplias a 10.81 y 1.91 ppm que integraron para uno y dos protones respectivamente. El intercambio con D₂O provocó la desaparición de las señales, lo que indicó que los protones pertenecían al NH en la posición uno y al NH₂ de la posición dos del anillo de bencimidazol. Los hidrógenos de las posiciones 4 y 7 del anillo de bencimidazol aparecieron como dos señales simples a 6.43 y 6.97 ppm, respectivamente. Las señales *dd* a 6.58, *t* a 7.24, y *dd* a 7.32 ppm, que integraron para 1H cada una, se asignaron a los tres hidrógenos del sustituyente 2,3-diclorofenoxi. Por otra parte, en su espectro de masas (**Espectro 5**), en la modalidad FAB⁺, el pico a $m/z = 328$ (100% ab. rel.) correspondió al M⁺+1 que está en concordancia con la masa del compuesto esperado. Además, se observó la contribución isotópica de los cloros de la molécula con los picos a $m/z = 330$ (95% ab. rel.), $m/z = 332$ (35% ab. rel.) y $m/z = 334$ (3% ab. rel.). El espectro de IR (**Espectro 6**) mostró una banda ancha en 3064 cm⁻¹ que fue asignada a la amina primaria en la posición dos del anillo de bencimidazol (Ar-NH₂) y al NH del anillo de imidazol, también se observaron bandas características de C=C y C=N de moléculas aromáticas entre 1697 y 1424 cm⁻¹; y la presencia del éter a 1224 cm⁻¹.

7.1.4 Obtención del Ácido 2-metilol-1H-bencimidazol-5-carboxílico (19)

La síntesis del compuesto **19** comenzó con la hidrogenación catalítica del 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**15**) el cual se redujo catalíticamente para dar lugar a la formación del 3,4-diaminobenzoato de metilo (**16**) que se sometió

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

posteriormente a la ciclación con CS₂ en medio alcalino y etanol; luego se realizó la S-metilación y posteriormente la hidrólisis básica del éster que produjo el ácido carboxílico **19** sin mayor problema tal como se realizó en la secuencia para la obtención del ácido **7**. Las características físicas y espectroscópicas fueron concordantes con las ya reportadas por nuestro grupo.²⁵

7.1.5 Obtención de las carboxamidas:

N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**) y

N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**)

Las amidas híbridas finales (**Figura 5**) se obtuvieron en dos pasos, primero se activaron los ácidos carboxílicos correspondientes **7** ó **19** (para la síntesis de **B2-14** y **B1-21** respectivamente) mediante el uso del agente acoplante CDI y sin aislar el imidazólido intermediario, se procedió a la reacción de sustitución nucleofílica. El imidazólido se formó en un tiempo corto de 2 h a 60 °C en DMF; la formación del intermedio se detectó por CCF, observándose bajo luz UV de onda corta una mancha principal azul brillante y 3 productos de menor polaridad en baja proporción. Una vez formado el intermedio se agregó a la mezcla de reacción anterior la amina precursora **12**. Para lograr la reacción de sustitución entre el ácido activado y la amina presentes en el medio se requirió proveer de energía al sistema, ésta fue suministrada mediante calentamiento en baño de

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aceite por dos días y medio o, como una alternativa rápida, 15 minutos en microondas con IR de 140 °C. Los sólidos de los híbridos obtenidos fueron poco solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos; incluso el híbrido **B2-14** precipitó en el medio de reacción por lo que los compuestos se purificaron por lavados sucesivos con diferentes disolventes y no por recristalización. Cabe señalar que cuando la reacción se hizo por calentamiento con microondas se obtuvieron productos muy contaminados y por tanto más difíciles de trabajar. Los compuestos obtenidos por calentamiento convencional contenían menos impurezas, lo que se reflejó en el estrecho rango de temperaturas en que fundieron y en que los valores fueron más altos.

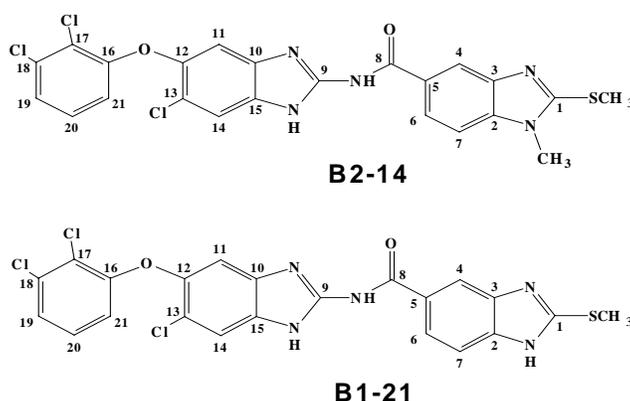


Figura 5. Numeración de los carbonos de los compuestos: *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (**B2-14**) y *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1H-benzimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (**B1-21**) asignada arbitrariamente.

El espectro de RMN ^1H de **B2-14** (**Figura 6, Espectro 7**) mostró dos señales simples que integraron para 3H cada una en 2.77 ppm y 3.74 ppm correspondientes a los dos grupos CH_3 unidos a S y N, respectivamente; además de dos señales simples que intercambiaron con D_2O en 12.59 y 12.08 ppm que fueron asignados a los NH del benzimidazol y la amida; la parte

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aromática en total integró para 8H y fue congruente con las señales y multiplicidad esperadas. En el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 9**) se observaron dos señales a 14.59 y 30.51 ppm que se asignaron a los metilos SCH_3 y NCH_3 respectivamente; la del carbono del carbonilo en 167.22 ppm. El espectro de masas (**Espectro 10**), en su modalidad FAB^+ , mostró en $m/z = 532$ (3% Ab. rel.) el peso concordante con la masa molecular esperada +1; también se observó la contribución isotópica de los tres cloros en $m/z = 534, 536$ y 538 con las abundancias relativas correspondientes. El espectro IR de **B2-14** (**Espectro 11**) mostró bandas en 3336, 1669 y 1564 cm^{-1} características de una amida secundaria (-CONH-) además dos bandas en 2930 y 1449 cm^{-1} correspondientes a los metilos (- CH_3), la banda presente en 1255 cm^{-1} fue asignada al enlace éter (-C-O-C-).

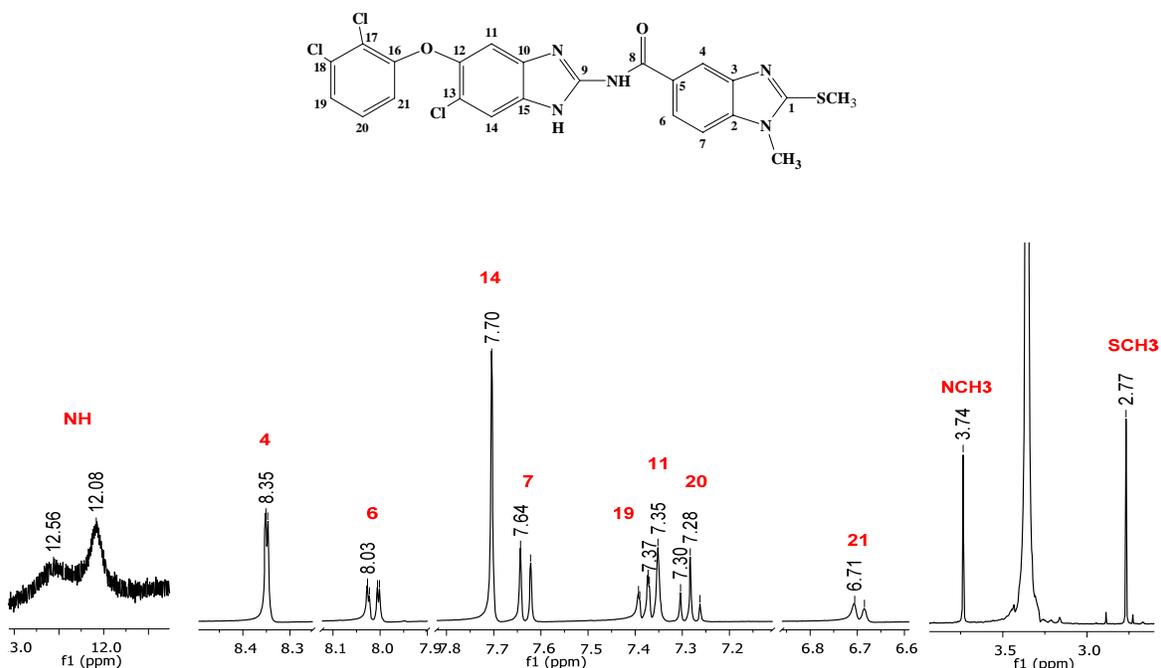
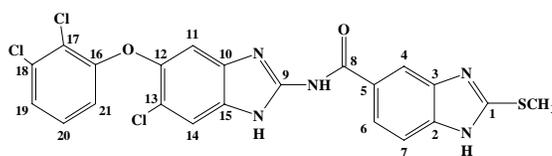


Figura 6. Espectro de RMN ^1H de **B2-14**.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de RMN ^1H de **B1-21** (**Figura 7, Espectro 15**) mostró una señal en 2.73 ppm correspondiente al CH_3 unido al S, además de dos señales amplias que integran para 3H en 12.91 y 12.43 ppm que fueron asignados a los NH de los dos núcleos de bencimidazol y al NH de la amida. Estas señales desaparecieron con D_2O . La resolución de las señales en la zona de los aromáticos (6.71–8.27 ppm) mejoró en el espectro de intercambio con D_2O (**Espectro 16**) lo que permitió la asignación adecuada de las señales siendo concordantes en multiplicidad e integrales con lo esperado. En el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 17**) se observó la señal a 14.18 ppm que correspondió al carbono del SCH_3 y el carbono del carbonilo apareció a 167.43 ppm. El Espectro de masas (**Espectro 18**), en su modalidad FAB^+ , mostró un ión de $m/z = 518$ (14% Ab. rel.) concordante con la masa molecular esperada +1; además de las correspondientes contribuciones isotópicas para los tres cloros a $m/z = 520$ y 522. El espectro IR (**Espectro 19**) mostró bandas en 3345, 1686, 1572 cm^{-1} características de una amida secundaria ($-\text{CONH}-$) además dos bandas en 2930, 1449 cm^{-1} correspondientes a la parte alifática de la molécula ($-\text{CH}_3$); la banda presente en 1250 cm^{-1} fue asignada al enlace éter ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$).



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

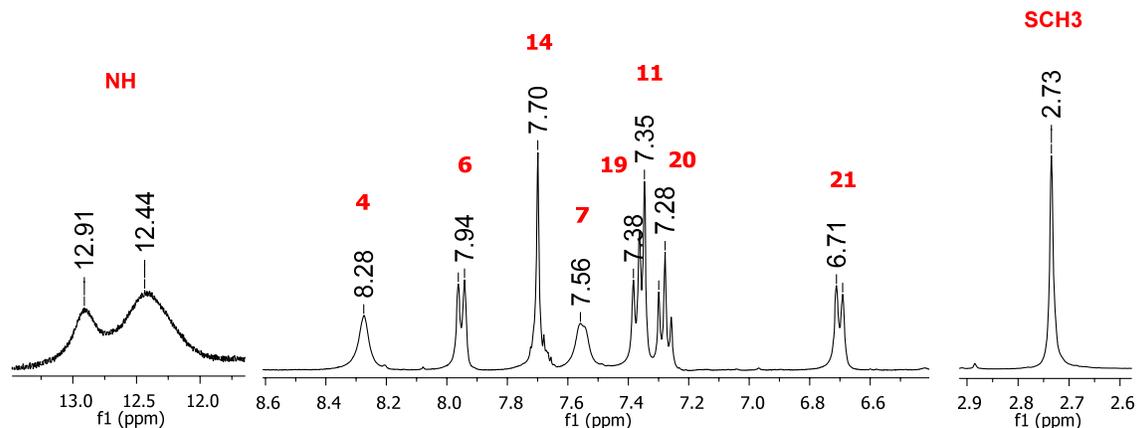


Figura 7. Espectro de RMN ^1H de B1-21.

7.1.6 Espectros de RMN ^1H en dos dimensiones

Para demostrar que el enlace amida se llevó a cabo entre el NH_2 en la posición 2 de la molécula **12** y el ácido carboxílico de **7** y **19** se realizaron una serie experimentos de RMN en dos dimensiones.

Primeramente para confirmar los enlaces C-H presentes en las moléculas se determinaron sus espectros en dos dimensiones HSQC. En este experimento cada señal representa la correlación entre un hidrógeno y un carbono a un enlace de distancia. Los espectros 12 y 20 del anexo B de esta tesis corresponden a los HSQC de **B2-14** y **B1-21**, respectivamente. Las correlaciones observadas se muestran en las Tablas 7 y 8 así como en las **Figuras 8** y **9**. Con esta información se pudo realizar la asignación de las señales de ^1H y ^{13}C para ambas moléculas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Desplazamientos en ppm de H y C en los experimentos de HSQC para la molécula **B2-14**

Número de H	Desplazamiento del H	Desplazamiento del C
4	8.35	118.16
6	8.03	122.23
7	7.64	109.47
19	7.37	124.53
20	7.28	129.00
21	6.71	115.44

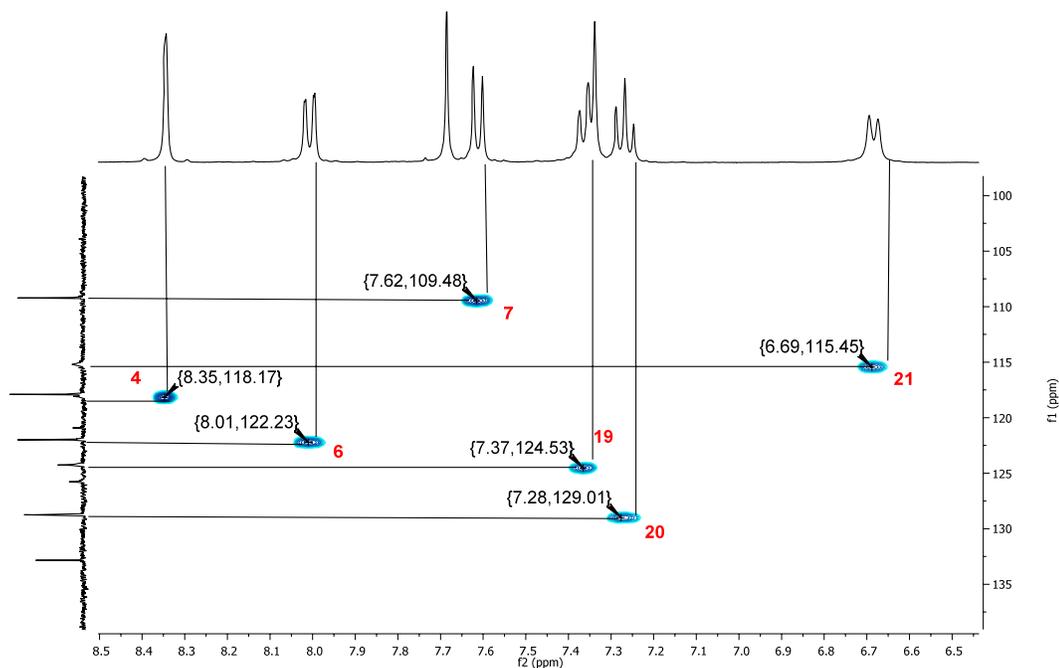


Figura 8. Correlaciones observadas en la zona aromática del experimento HSQC para la molécula **B2-14**.

Tabla 8. Desplazamientos en ppm de ^1H y ^{13}C en los experimentos de HSQC para la molécula **B1-21**

Número de H	Desplazamiento del H	Desplazamiento del C
4	8.28	118.16
6	7.94	122.23
7	7.56	109.47
19	7.38	124.53
20	7.28	129.00
21	6.71	115.44

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

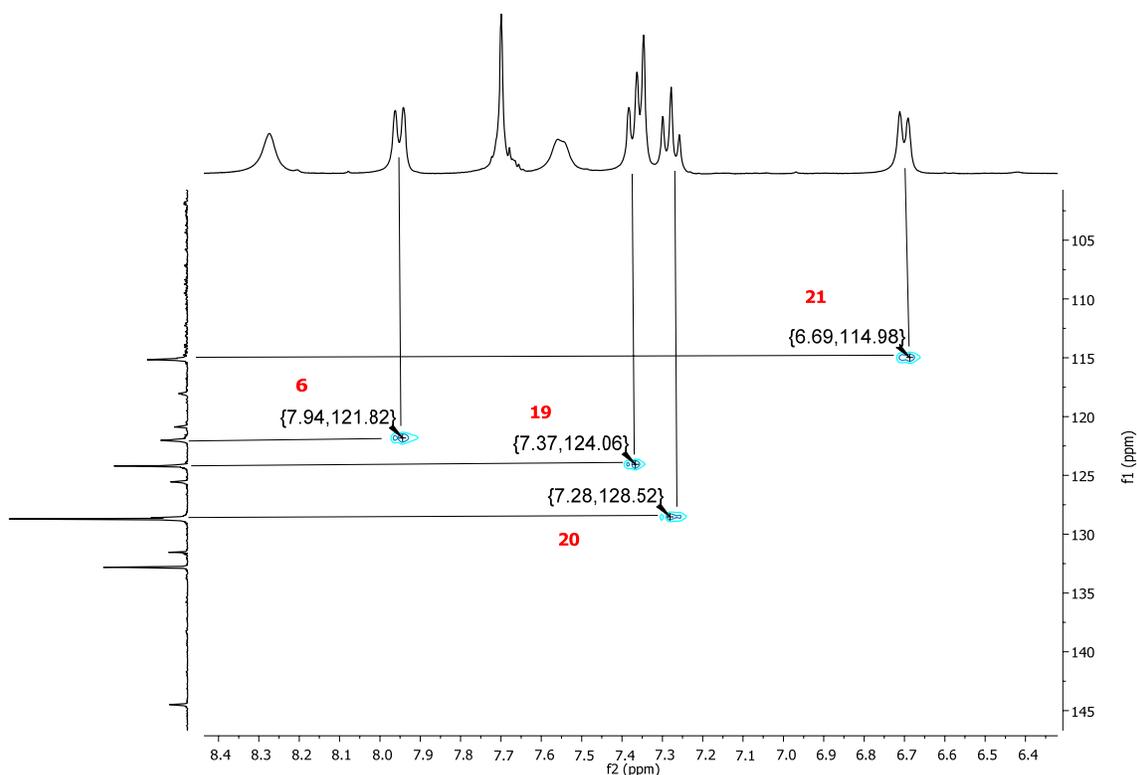


Figura 9. Correlaciones observadas en la zona aromática del experimento HSQC para la molécula **B1-21**.

También se realizaron los experimentos en dos dimensiones HMBC (**Espectros 13 y 21**), en estos espectros cada señal correlaciona hidrógenos con carbonos a dos, tres y hasta cinco enlaces de distancia con constantes de acoplamiento (J) de 2 a 15 Hz. Las correlaciones que se encontraron para **B2-14** y **B1-21** se muestran en las **Tablas 9 y 10**, respectivamente.

Tabla 9. Correlaciones observadas en el espectro HMBC de **B2-14**

Carbono al que esta unido el H	Desplazamiento del H (ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (ppm)
4	8.35	6	122.09
		2	140.19
		8	167.10
6	8.03	4	118.15
		2	140.20
		8	167.10
7	7.64	3 ó 5	125.96
		3 ó 5	142.62

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11	7.35	10	144.74
		15	118.26
14	7.70	10	144.78
		15	118.26
19	7.37	17	121.15
		21	115.34
20	7.28	16	155.04
		18	133.06
21	6.71	17	121.12
		19	124.43
SCH ₃	2.77	1	155.11
NCH ₃	3.74	1	155.11
		2	139.80

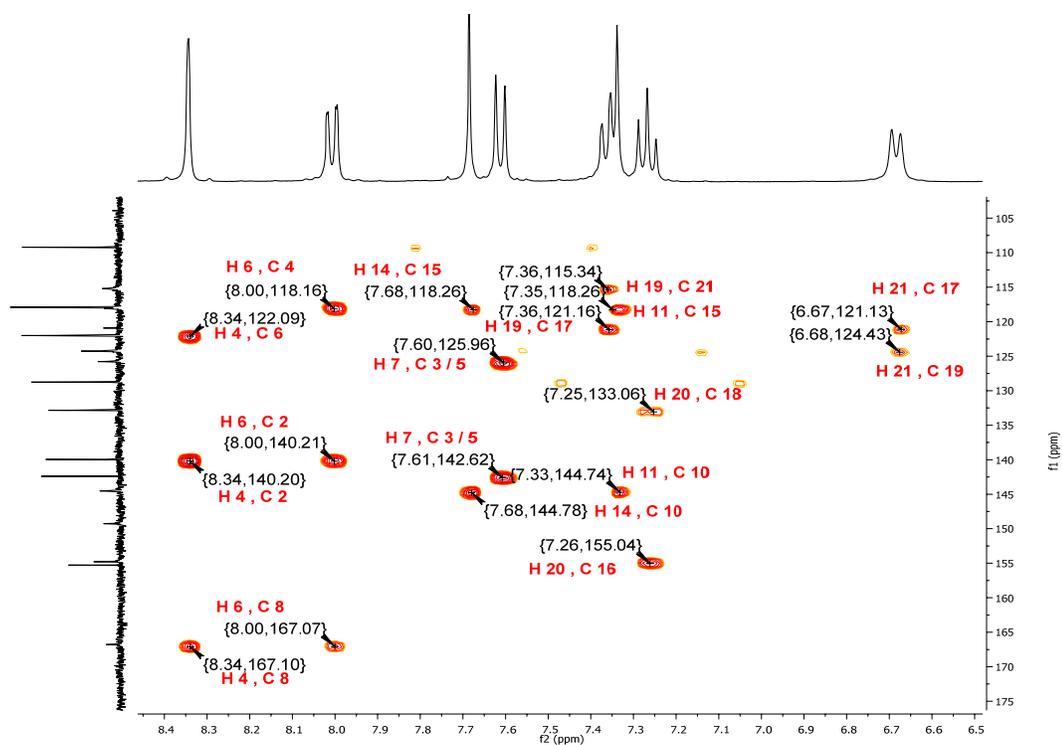


Figura 8. Correlaciones observadas en la zona aromática del espectro HMBC para la molécula

B2-14.

Tabla 10. Correlaciones observadas en el espectro HMBC B1-21

Carbono al que esta unido el H	Desplazamiento del H (ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (ppm)
6	7.94	C8	166.83
11	7.35	10, 15, 12 ó 13	117.99
		10, 15, 12 o 13	144.48

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

14	7.70	10, 15, 12 ó 13	117.99
		10, 15, 12 ó 13	144.48
19	7.38	17	120.85
		18	132.79
		21	115.10
20	7.28	18	132.74
		16	154.76
21	6.71	16	154.77
		17	120.87
		19	124.15
SCH ₃	2.73	1	154.43

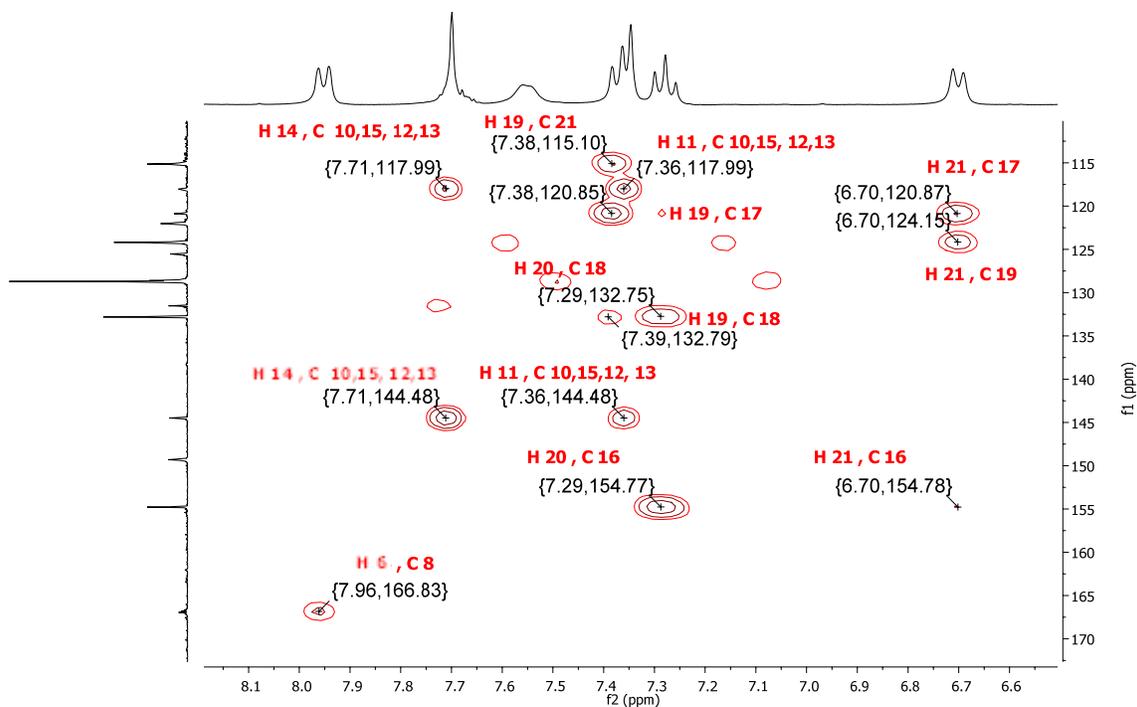


Figura 9. Experimento HMBC para la molécula B1-21.

Las correlaciones encontradas en los experimentos de HMBC y HSQC permitieron hacer la asignación de los desplazamientos en los espectros de carbono.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, las señales asignadas a C=O no mostraron correlaciones adicionales a las que se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Correlación del Carbonilo con el H en C4 y el H en C6 observadas en el HMBC

Amida	C=O, desplazamiento en ppm	H con el que correlaciona	Señales de H con que correlaciona
B2-14	167.10	4	8.35 (d, 1H, Jm=1.49)
		6	8.03 (dd, 1H, Jo=8.51, Jm=1.57),
B1-21	168.66	4	7.96 (dd, 1H, H-6, Jo=8.46, Jm=0.95)

Las correlaciones encontradas para el carbonilo son las mismas que se esperan para los ácidos **7** y **19**, precursores de **B2-14** y **B1-21**.

En el espectro del experimento NOESY de la amida **B2-14** (Figura 10, Espectro 14) sólo se logró observar tres correlaciones de los hidrógenos en el espacio, estas correlaciones son entre las posiciones 6 y 7, NCH₃ y 7 así como entre 20 y 21.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

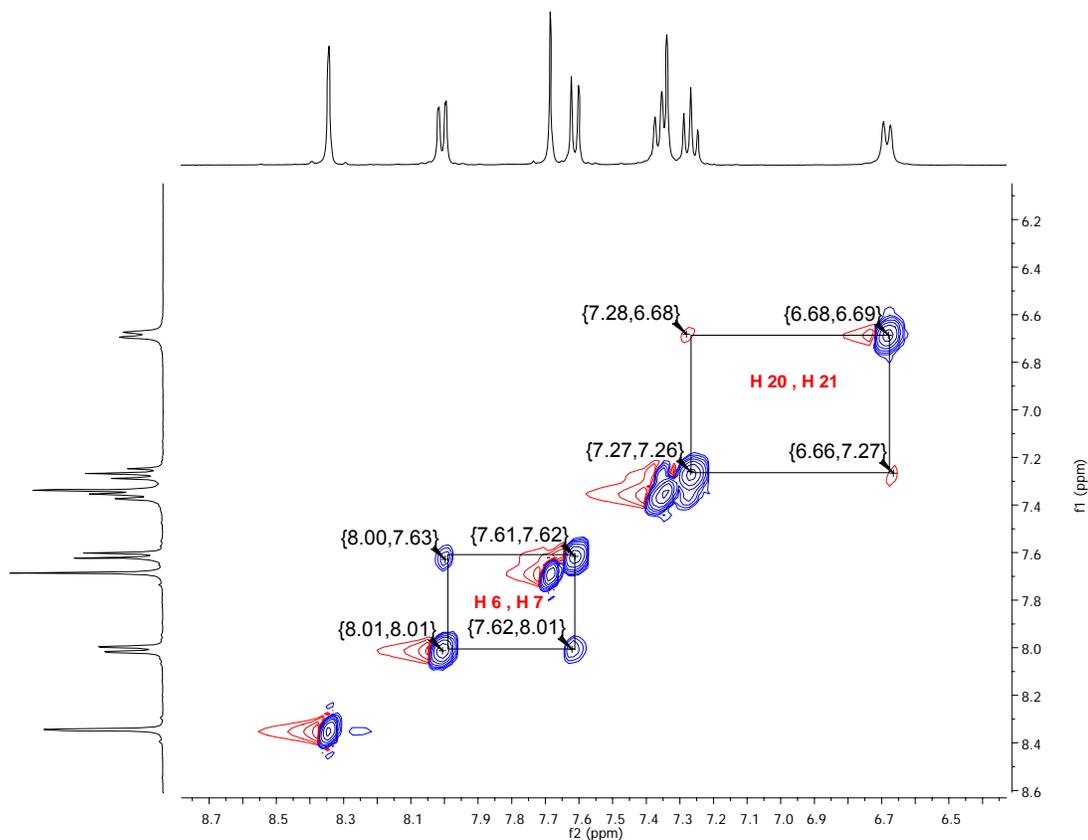


Figura 10. Zona aromática del espectro NOESY para la molécula B2-14.

En el experimento NOESY de **B1-21** (Figura 11, Espectro 22) se encontraron también tres correlaciones, estas fueron entre las posiciones 6 y 7, 19 y 20 así como 20 y 21. Es importante notar que en ambos espectros no se observó ninguna correlación espacial para las señales en 7.35 y 7.70 ppm correspondientes a las posiciones 11 y 14, lo que permite pensar que el enlace amida se formó con el NH_2 de la posición 2 del precursor **12** y el ácido carboxílico **7** ó **19**.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

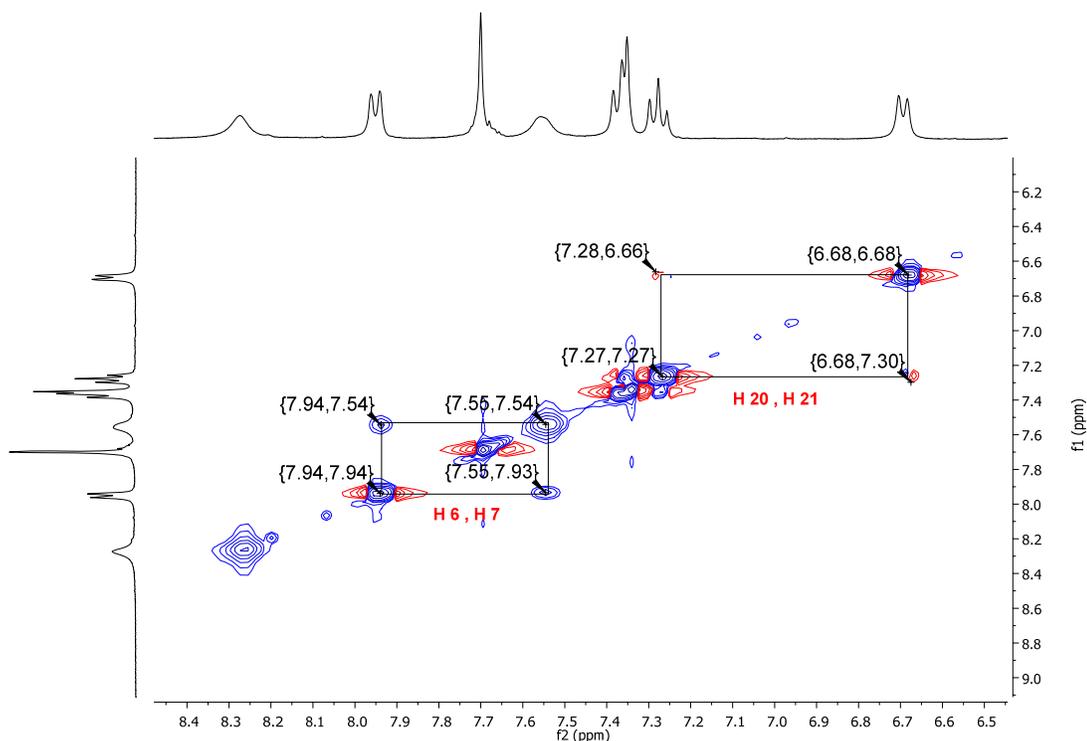


Figura 11. Zona aromática del espectro NOESY para la molécula B1-21.

Otra evidencia con la que se cuenta para demostrar que el enlace amida se realizó en la posición 2 y no en la uno del compuesto **12** es la ausencia de una señal intercambiable con D₂O que integrara para dos hidrógenos en RMN ¹H. Además la estabilidad de la molécula en medios próticos tales como MeOH y H₂O corroboran la formación de la amida con el nitrógeno de la posición dos del anillo bencimidazólico, de haberse unido por el nitrógeno uno, la amida sería muy inestable.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.7 Constantes espectroscópicas y espectrométricas

En la **Tabla 12** se presentan las constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H) y espectrométricas (EM) determinadas para los compuestos finales. Los espectros citados se pueden consultar en el Anexo B.

Símbolos para RMN

J: constantes de acoplamiento

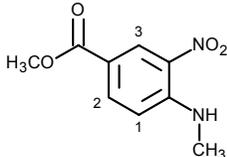
Para las señales observadas

s: simple, d: doble, dd: doble de doble, t: triple, c: cuádruple, m: múltiple compleja.

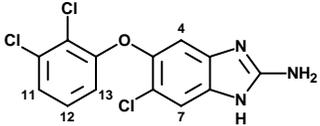
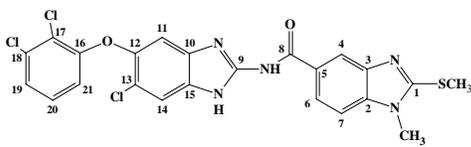
Símbolos para EM

m/z (masa carga), FAB⁺ (Técnica de bombardeo rápido de átomos), CG (cromatografía de gases), M⁺ (ión molecular).

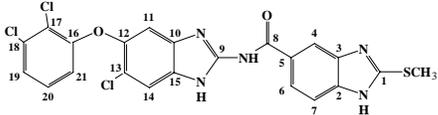
Tabla 12. Constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H) y espectrométricas (EM) de los compuestos finales

COMPUESTO	SEÑALES
<p>4-(N-metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (3)</p> 	<p>RMN ^1H Espectro 1 (CDCl₃, 400MHz, δ ppm): 3.08 (d, 3H, -NCH₃, Jm=5.14Hz); 3.90 (s, 3H, -CO₂CH₃); 6.86 (d, 1H, H-1, Jo=9.04Hz); 8.08 (dd, 1H, H-2, Jm=1.92, Jo=9.01Hz); 8.34 (s, 1H, -NH-, Int. con D₂O); 8.88 (d, 1H, H-3, Jm=2.05Hz).</p> <p>EM Espectro 2 IE/ID, m/z:211 (M⁺, 35%).</p> <p>IR Espectro 3 (Pastilla KBr) 3367, 1363 (Ar-NH-R);</p>

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	1709, 1176 (-COOCH ₃ -); 1523 (-NO ₂); 2920 (-CH ₃).
<p style="text-align: center;">6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-amina (12)</p> 	<p>RMN ¹H Espectro 4 (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm) 1.91 (s, 2H, -NH₂, Int. con D₂O); 6.43 (s, 1H, H-4); 6.58 (dd, 1H, H-13, Jm=1.36, Jo=8.31); 6.97 (s, 1H, H-7); 7.24 (t, 1H, H-12, J=4.12); 7.32 (dd, 1H, H-11); 10.81 (sa, 1H, NH₂, Int. con D₂O).</p> <p>EM Espectro 5 FAB⁺ m/z: 328 (M⁺+1, 100%).</p> <p>IR Espectro 6 (Pastilla KBr) 3064 (Ar-NH₂); 2749 (Ar-H); 1697(C=N);1447 (Ar-H); 1156, 1247 (C-O-C); 1017 (C-Cl).</p>
<p style="text-align: center;">N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (B2-14)</p> 	<p>RMN ¹H Espectro 7 (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm) 2.77(s, 3H, S-CH₃), 3.74 (s, 3H, N-CH₃), 6.71(d, 1H, H-21, Jo=8.26), 7.28(t, 1H, H-20, Jo=8.23), 7.35(s, 1H, H-11), 7.37(dd, 1H, H-19, Jo=8.09, Jm=1.06), 7.64(d, 1H, H-7, Jo=8.53), 7.70 (s, 1H, H-14), 8.03(dd, 1H, H-6, Jo=5.52, Jm=1.57), 8.35 (d, 1H, H-4, Jm=1.49), 12.08 (s, 1H, Int. con D₂O;-NHCO-), 12.56 (s, 1H, Int. con D₂O;-NH-).</p> <p>RMN ¹³C Espectro 9 (DMSO d₆, 100MHz, δ ppm) 14.59 (SCH₃), 30.51 (NCH₃), 109.66 (C-7), 115.65 (C-21), 118.35 (C-4), 121.37 (C-17), 122.44 (C-6), 124.70 (C-19), 126.22 (C- 3 ó 5), 129.20 (C-20), 133.29 (C-18), 140.41 (C-2),142.84 (C- 3 ó 5), 144.98 (C-10), 149.75, 155.22 (C-16), 155.73, 167.22 (C-8).</p> <p>EM Espectro 10 FAB⁺ m/z: 532 (M⁺+1, 3%).</p> <p>IR Espectro 11 (Pastilla KBr) 3336 1669 1564 (-CONH-); 2930 1449 (-CH₃); 1255 (-O-).</p>

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<p><i>N</i>-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida</p> <p>(B1-21)</p> 	<p>RMN ¹H Espectro 15, (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm) 2.73 (s, 3H, -SCH₃); 6.71 (d, 1H, H-21, Jo=7.41); 7.28 (t, 1H, H-20, Jo=7.66); 7.35 (m, 2H, H-11,H-11); 7.38 (d, 1H, H19); 7.56 (d, 1H, H-7, J=8.4); 7.70 (s, 1H, H-14); 7.94 (d, 1H, H-6, Jo=6.44); 8.28 (dd, 1H, H-4, J=7.4); 12.44 (s, 2H, Int. con D₂O ; -NHCO-); 12.91 (s, 1H, Int. con D₂O; -NH-).</p> <p>RMN ¹³C Espectro 17 (DMSO d₆, 100MHz, δ ppm) 14.18 (SCH₃), 115.63 (C-21), 118.49 (C- 10, 12, 13 ó 15), 121.32 (C-17), 122.45 (C-6), 124.65 (C-19), 126.00, 129.06 (C-20), 129.15, 131.98, 132.13 (C-18), 133 25, 144.95 (C-14), 149.74, 155.22 (C-1), 167.43 (C-8).</p> <p>EM Espectro 18 FAB⁺ m/z: 518 (M⁺+1, 14%).</p> <p>IR Espectro 19 (Pastilla KBr) 3345, 1686, 1572 (-CONH-); 2930, 1449 (-CH₃); 1250 (-O-); 1641, 912 (-NH₂).</p>
---	--

7.2 RESULTADOS DE LA PARTE BIOLÓGICA

Los compuestos preparados en el presente trabajo tenían el propósito de ser evaluados frente a la EhTIM; sin embargo no fue posible debido a la falta de disponibilidad de la enzima; no obstante, debido a que se tienen otras enzimas TIM de otros protozoarios (*Leishmania sp*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*) el ensayo de inhibición se realizó con las disponibles cuyos resultados son también de mucho interés para eel diseño de antiprotozoarios. Por otro lado, también se realizó el ensayo *in vitro* de las carboxamidas bisbencimidazólicas

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

frente a *E. histolytica*; adicionalmente se evaluó la actividad biológica con otros protozoarios (*Giardia. Intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*). Los estudios de evaluación se discuten a continuación.

7.2.1 Inhibición de la Actividad Enzimatica de TIM

En la **Tabla 13** se presentan las actividades enzimáticas residuales o conservadas para las TIM de *Leishmania sp*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* después de evaluar su actividad con los compuestos **B2-14** y **B1-21**. Ambas amidas en general tuvieron poca o nula capacidad de inhibición de la actividad de las tres enzimas; de las dos, la más activa fue la **B2-14**. La TIM de *T. cruzi* fue la más sensible a los compuestos.

Tabla 13. Porcentaje de actividad conservada para TIM

Compuesto	Actividad (%)		
	TIM <i>Leishmania sp.</i>	TIM <i>T. brucei</i>	TIM <i>T. cruzi</i>
B2-14	100	100	73
B1-21	100	100	78

7.2.2 Actividad Antiprotozoaria

En la **Tabla 14** se presentan los valores de CI_{50} resultado de las pruebas de susceptibilidad biológica *in vitro* de los compuestos **B2-14** y **B1-21** comparados con los fármacos ABZ, NTZ y MTZ utilizados para el tratamiento de las protozoosis, frente a *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Actividad antiprotozoaria *in vitro* frente a protozoarios de los compuestos **B2-14** y **B1-21** así como para Albendazol, Nitazoxanida y Metronidazol.

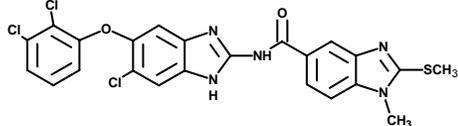
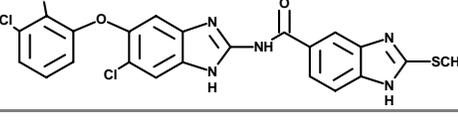
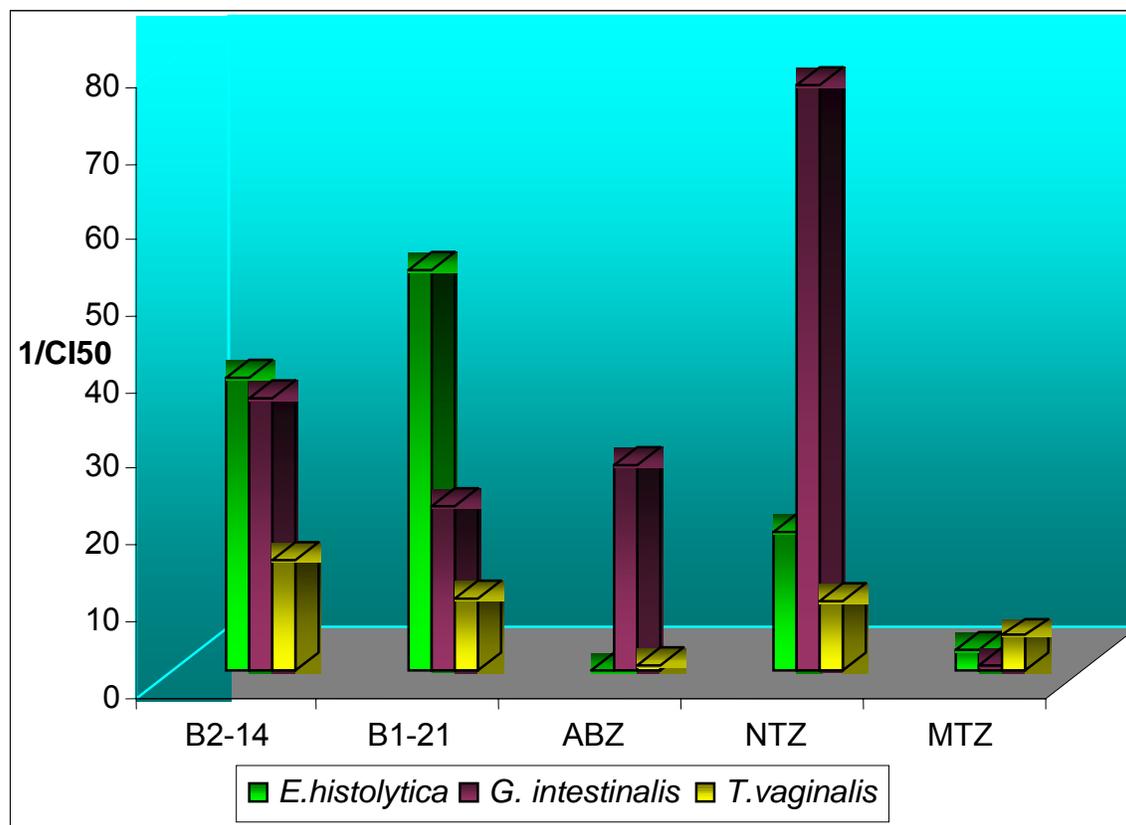
COMPUESTO	CI ₅₀ (µM)		
	<i>E. histolytica</i>	<i>G.intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
B2-14 	0.026	0.028	0.068
B1-21 	0.019	0.046	0.104
ABZ	56.6	0.037	1.592
NTZ	0.055	0.013	0.110
MTZ	0.350	1.226	0.216

Tabla 15. pCI₅₀ para los compuestos sintetizados y los de referencia frente a los tres protozoarios

Compuesto	pCI ₅₀ ^a		
	<i>E.histolytica</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>T.vaginalis</i>
B2-14	7.59	7.55	7.17
B1-21	7.72	7.34	6.98
ABZ	4.25	7.43	5.80
NTZ	7.26	7.89	6.96
MTZ	6.46	5.91	6.67
Compuesto 1^b	7.21		
Compuesto 2^b	5.86		
Compuesto 3^b	7.59		
Compuesto 4^b	6.38		
Compuesto 5^b	7.58		

^a pCI₅₀: -log CI₅₀ (M); ^b ver Tabla 1, marco teórico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 1. Comparación de las potencias presentadas para los tres protozoarios.

En la **Gráfica 1** se puede observar que en lo que respecta a *E. histolytica* los dos compuestos sintetizados, **B2-14** Y **B1-21**, superan en potencia a los tres fármacos de referencia; con respecto a la Nitazoxanida **B2-14** y **B1-21** son 2.1 y 2.9 veces más potentes, respectivamente. El compuesto **B1-21** es el de mayor potencia.

En lo que respecta a *G. intestinalis* de los compuestos sintetizados en el presente trabajo, **B2-14** es el que mostró mejor actividad; no obstante la Nitazoxanida es más potente contra este parásito.

Para *T. vaginalis*, **B2-14** fue más potente que **B1-21** y mejor que los fármacos de referencia los valores de CI_{50} de **B1-21** y NTZ son similares.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de estos ensayos se concluye que los dos compuestos, carboxamidas bisbencimidazólicas **B2-14** Y **B1-21**, sintetizados en este trabajo de tesis resultaron ser potentes amebicidas y tricomonicidas comparados con los fármacos de elección. Además es importante resaltar que fueron más activos contra *E. histolytica*.

Con respecto a los resultados de actividad biológica, de **B2-14** y **B1-21**, comparados con los reportados para los compuestos que sirvieron como base para el diseño (ver Tabla 1, marco teórico), no podemos hacer comparaciones con respecto a la capacidad inhibitoria de la EhTIM dado que no se realizó el ensayo. Sin embargo, si podemos decir que el compuesto **B2-14** fue igual de potente, con $pCl_{50}=7.59$ (Tabla 12), que el mejor de la serie (compuesto 3) que además es uno de los más activos inhibiendo a la EhTIM; **B1-21** fue más potente ($pCl_{50}=7.77$) que los compuestos que sirvieron para el diseño, por lo que se espera que estos nuevos compuestos tengan buen porcentaje de inhibición enzimática.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró la síntesis de las dos carboxamidas bisbencimidazólicas (**B2-14** y **B1-21**), por un método convergente en cantidad suficiente para su evaluación biológica
- ❖ Como se planteó en la hipótesis los nuevos compuestos sintetizados **B2-14** y **B1-21** fueron activos *in vitro* contra *E. histolytica*; **B1-21** fue 1.3 veces más potente que **B2-14**, y mejor que los fármacos de referencia, resalta el hecho de que éste fue 2.9 veces más activo que la Nitazoxanida.
- ❖ Al comparar la actividad de estos nuevos bencimidazoles, diseñados como posibles inhibidores de la EhTIM con la reportada para los compuestos que sirvieron como base del diseño, podemos decir que el compuesto **B2-14** fue igual de potente, *in vitro* (con $pCl_{50} = 7.59$ (**Tabla 15**); que el mejor de la serie (compuesto 3, **Tabla 1**) base del diseño. **B1-21** fue más potente que sus predecesores ($pCl_{50} = 7.77$).
- ❖ A pesar de estos buenos resultados, no podemos hacer comparaciones con respecto a la capacidad inhibitoria de la enzima EhTIM dado que no se realizó el ensayo; se espera que estos nuevos compuestos, **B2-14** Y **B1-21**, presenten igual o mejor porcentaje de inhibición que los compuestos más activos que les dieron lugar. De no ser así será necesario replantear el diseño.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La mayor potencia, *in vitro*, del compuesto **B1-21** es congruente con el mejor valor de ΔG de unión con la EhTIM lo que sugiere que esta enzima sea su posible diana o blanco farmacológico; sin embargo es necesario realizar la prueba de inhibición enzimática para comprobarlo.
- ❖ Los nuevos compuestos sintetizados **B2-14** y **B1-21** también fueron activos contra otros protozoarios como *G.intestinalis* y *T. vaginalis*; en ambos casos **B1-21** fue más activo que **B2-14**, que ABZ y MTZ pero poco menos potente que NTZ frente a *G. Intestinales* y mejor que ésta contra *T. vaginalis*. Se concluye que **B2-14** y **B1-21** son compuestos con buen potencial como amebicidas y trichomonocidas.
- ❖ En cuanto a la síntesis de los compuestos finales el método de calentamiento convencional fue el mejor en nuestras manos; sin embargo fue posible la síntesis de las carboxamidas en microondas. Se tendrán que probar otras condiciones para obtener los productos más limpios y con mayor rendimiento.
- ❖ El análisis de los experimentos de RMN ^1H en una y dos dimensiones, la ausencia de señales en IR y RMN ^1H de amina primaria así como el peso molecular, aunado a la estabilidad de las moléculas en medios próticos comprueban la obtención de las dos carboxamidas objetivo de este trabajo.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La baja solubilidad de las moléculas en los disolventes comunes dificultó su purificación y la obtención de los espectros. La purificación de **B2-14** se facilitó debido a que precipitó en el medio de reacción (DMF).
- ❖ Se logró mejorar la purificación de la amina **12**, intermediario clave para la obtención de los compuestos finales, obteniendo cristales con un buen rendimiento y características físicas constantes.
- ❖ Se adquirió el conocimiento para aplicar las herramientas de química farmacéutica, así como la experiencia en química orgánica para la obtención de nuevos compuestos de interés farmacéutico en el campo de la parasitosis.

9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ximénez, C.; Moran, P.; Rojas, L.; Valadez, A.; Gómez, A. *Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art*. Infect Genet Evol. **2009**(9): 1023-1032.
2. M. Ali, I.; Clark, G.; Petri Jr, W. *Molecular Epidemiology of amebiasis*. Infect. Genet. Evol. **2008**(8): 698–707.
3. Ramos, F.; Moran, P.; González, E.; et.al. *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: Prevalence infection in a rural mexican community*. Experimental Parasitology. **2005**(110): 327–330.
4. Gutiérrez, G.; Ludlow, J.; Espinoza, A.; Sepúlveda, J. *Encuesta Serológica Nacional II Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en La República Mexicana*. Salud Pública de México. [En línea]. **1992**(34): 242-254. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>. [2010, Septiembre 2]
5. Boletín Epidemiológico.Organización Panamericana de la Salud. [En línea]. **1997**(18): no. 1. Disponible en: http://amro.who.int/spanish/sha/BE_v18n1.pd. [2010, Septiembre 2].
6. Laboratory diagnosis of amebiasis. (sin fecha). *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*. [En línea]. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Disponible en: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/entamoeba_benchaid.pdf [2010, Septiembre 2].
7. Manual of Clinical Microbiology. Murray, P.; Baron, E.; Jorgensen, J.; Landry, M. L.; Pfaller, M (Eds). 9th edi. Vol 2. Editorial Board, Washington D.C. **2007**.

9. BIBLIOGRAFÍA

8. Moreno, R.; Encalada, R.; Marín, A.; Saavedra, E.; *Experimental validation of metabolic pathway modeling: An illustration with glycolytic segments from Entamoeba histolytica*. FEBS Journal. **2008**(275): 3454–3469.
9. Imagen: Entamoeba histolytica life cycle-en.svg. Villareal M. Russian.jpg. [En línea]. Archivo SVG, 1.029 x 976 pixeles, tamaño de archivo 267 KB. 11 de Marzo de **2008**. Disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Entamoeba_histolytica_life_cycle-en.svg. [2010, Septiembre 4].
10. Trejos, J.; Castaño, J.C.; *Factores de virulencia del patógeno intestinal Entamoeba histolytica*. Infection. **2009**(13): 100-110.
11. Rodríguez, A.; Hernández, A.; del Pozo, L.; Kornhauser, A. and Fernández, D.A.; *Structure and Inactivation of Triphosphate Isomerase from Entamoeba histolytica*. J Mol Biol. **2002**(322): 669–675.
12. Landa, A.; Rojo, A.; Jiménez, L.; Fernández, D. A. *Sequencing, expression and properties of triphosphate isomerase from Entamoeba histolytica*. Eur J Biochem. **1997**(247): 348-355.
13. López Vallejo, F. *Estudios De Modelado Molecular De Bencimidazoles Activos Contra Entamoeba Histolytica Y Diseño De Análogos Antiamebianos*. Tesis Dr. Cien. México D.F. UNAM. Fac. Quím. **2007**.
14. Alvarez, L; Moreno G.; Moreno, L.; Ceballos L.; Shaw, L.; Fairweather, I. and Lanusse, C.; *Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on Fasciola hepatica eggs*. Veterinary Parasitology. **2009**(164): 211–216.

9. BIBLIOGRAFÍA

15. Anand, N. *Benzimidazoles*. En: Approaches to design and Synthesis of antiparasitic drugs. Amsterdam. Elsevier Science. **1997**. pp 195-225.
16. Cardullo, F.; Donati, D.; Merlo, G.; Paio, A.; Petricci, E.; Taddei. *Microwave-Assisted Aminocarbonylation of Aryl Bromides at Low Carbon Monoxide Pressure*. Synlett. **2009**(1): 47-50
17. Eicher, T.; Hauptmann, S. *The Chemistry Of Heterocycles Structure; reactions, synthesis and applications*. 2 nd. ed. Germany. Wiley-VCH. **2007**. pp 166-177.
18. Loupy, A. *Microwaves In Organic Synthesis*. Volume 1. Michigan. Wiley-VCH. **2008**. pp 499.
19. Woodman, E.K.; Chaffey, J.; Hopes, P.; Hose, D.; Gilday, J. *N,N'-Carbonyldiimidazole - Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole-HCl*. Org Process Res Dev. **2009**(13):106–113.
20. Carbodiimidas y aditivos. 10 de Octubre de **2008**. (Disponible en: <http://quiorgsint.blogspot.com/2008/10/carbodiimidas-y-aditivos.html>) [2009, Noviembre 2].
21. Mavrova, A.; Denkova, P.; Tsenov, YA.; Anichina, KK.; Vutchev, DI. *Synthesis and antitrichinellosis activity of some bis(benzimidazol-2-yl)amines*. Bioorg Med Chem. **2007**(15): 6291–6297.
22. Torres-Gómez, H.; Hernández-Núñez, E.; León-Rivera, I.; Guerrero-Alvarez, J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M del C.; Chan-Bacab, MJ.; Navarrete-Vázquez, G.. *Design*,

9. BIBLIOGRAFÍA

- synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids*. Bioorg Med Chem Lett. **2008**(18): 3147–315.
23. Jean-Moreno, V.; Rojas, R.; Goyeneche, D.; Coombs, G.; Walker, J. *Leishmania donovani: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays*. Experimental Parasitology. **2006**(112): 21–30.
24. Hasaninejad, A.; Niknam, K.; Zare, A.; Farsimadan, E.; Shekouhy, M. *Silphox [POCl₃-n(SiO₂)_n] as a New, Efficient, and Heterogeneous Reagent for the Synthesis of Benzimidazole Derivatives Under Microwave Irradiation*; Taylor & Francis Group, LLC; **2009**(184):147–155.
25. López Balbiaux, N. *Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de nuevas carboxamidas bencimidazólicas 1-metiladas*. Tesis Mstr. Cien. Quím. México D.F. UNAM. Fac. Quím. **2005**.
26. Téllez-Valencia, A.; Olivares Iliana, V.; Hernández-Santoyo, A.; Pérez Monfort, R.; Costas, M.; Rodríguez-Romero, A.; López-Calahorra, F.; Tuena De Gómez-Puyou, A. *Inactivation of Triphosphate Isomerase from Trypanosoma cruzi by an Agent that Perturbs its Dimer Interface*, J Mol Biol. **2004** (341): 1355-1365.
27. Sharma, S. *Design of New Drugs for Helminth Diseases: Lead Optimization in Benzimidazoles*. Advances in Drug Research. **1994**(25):103-172.
28. Middleton, R.W.; Monney, H.; *N-Methylation of Heterocycles with Dimethylformamide DimethylAcetal*. Synthesis, Communications. **1984**, 740–743.

9. BIBLIOGRAFÍA

29. Bustos, S. *Síntesis y Actividad Antiparasitaria de Análogos del 1H-Bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo*. Tesis Mstr Cien Quim. México D.F. UNAM. Fac Quim. **2008**.
30. PLM Diccionario de especialidades farmacéuticas. ULSEN. Thomson. **2004**. Disponible en: <http://www.libreriamedica8a.com/productos/2639.htm> [04 de Octubre de 2010].
31. Aguilar, S. *Síntesis de 2-(1H-bencimidazol-2-iltio)acetamidas sustituidas diseñadas por docking como potenciales agentes de la triosafosfato isomerasa (TIM) de Tripanosoma cruzi*. Tesis Mstr Cien Quim. México D.F. UNAM. Fac Quim. **2010**.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

10. PARTE EXPERIMENTAL

10.1 Instrumentación

- ❖ Las hidrogenaciones catalíticas se realizaron en un hidrogenador marca Parr Modelo 3916EG con 60 lb/in² y 80 °C como capacidad máxima, adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizadores Ni-Raney marca Aldrich y Paladio sobre Carbono (Pd/C) marca Aldrich.
- ❖ Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato Büchi Modelo B-540, utilizando capilares de vidrio.
- ❖ La concentración de las soluciones se llevaron a cabo en un rotaevaporador marca Büchi Modelo R-144 con vacío generado con bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F y compresora VWR Scientific Modelo 1107.
- ❖ Los espectros de masas (EM) cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), con ionización por impacto electrónico (70 eV) y/o bombardeo rápido de átomos (FAB⁺) en un aparato marca 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 Pekín Elmer Modelo 1605, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales son reportadas en cm⁻¹.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

- ❖ Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y RMN ^{13}C así como los experimentos bidimensionales determinaron en un equipo Varian Modelo VRX-300 MHz utilizando como disolventes dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), acetona deuterada (acetona- d_6) y deuterocloroformo (CDCl_3). 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 doblete, sa = singulete amplio, dd = doble de dobles, m = multiplete.
- ❖ El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos fueron revelados con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a vapores de yodo. Los sistemas de elución utilizados fueron los siguientes:

10.2 Sistemas cromatográficos

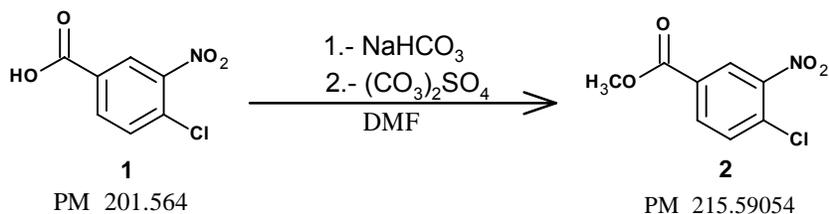
SISTEMA	COMPONENTES	PROPORCIÓN
I	CHCl_3 :MeOH	99.5:0.5
II	CHCl_3 :MeOH	95:5
III	CHCl_3 :MeOH	98:2
IV	CHCl_3 :MeOH	90:10
V	CHCl_3 :MeOH	85:15
VI	CHCl_3 :MeOH	80:20
VII	hexano:AcOEt	90:10
VIII	hexano: CHCl_3 :AcOEt	50:35:15
IX	AcOEt:acetona	90:10
X	hexano:AcOEt	50:50

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

10.3 Métodos sintéticos

4-Cloro-3-nitrobenzoato de metilo (2)

ESTERIFICACIÓN



Método A

En un matraz bola con tres bocas esmeriladas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición, columna Vigreux en posición de reflujo y baño de agua se suspendieron 15 g (74.4 mmoles) del ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico en 25 mL de DMF y se adicionaron 12.5 g (149 mmoles) de NaHCO₃ (2 equivalentes) disueltos en 130 mL de agua; la mezcla se calentó entre 30-40 °C por 30 min y se verificó que el pH de la mezcla estuviera básico (pH 8). Posteriormente, se adicionaron lentamente 11.3 mL (119 mmoles) de sulfato de dimetilo (1.6 equivalentes), la mezcla se calentó a 60-65 °C y se mantuvo así con agitación hasta que la CCF mostró el consumo total del ácido (5.5 h). Luego la mezcla de reacción se filtró. El sólido residual se lavó con agua repetidas veces y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 6.11 g (38.08% de rendimiento) de un crudo sólido blanco cristalino con Pf = 80.5 - 80.8 °C; una sola mancha por CCF (Rf = 0.7, sistema II).

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

Método B

En un matraz bola con tres bocas esmeriladas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición, columna Vigreux en posición de reflujo y baño de agua se disolvieron 10 g (49.6 mmoles) del ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico (**1**) en 30mL de DMF a 40 °C. Después de la disolución completa se adicionaron 12.5 g (149 mmoles) de NaHCO₃ (2 equivalentes), 30 mL de agua y gota a gota se adicionaron 7 mL (74 mmoles) de Sulfato de dimetilo (1.5 equivalentes). La mezcla de reacción se calentó entre 60-70° C durante 1.5 h. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se vertió en agua, se filtró al vacío y se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 9.39 g (87.79% de rendimiento crudo) de un sólido amarillo. Un gramo del sólido se recristalizó de metanol (80% de rendimiento) dando unos cristales amarillos brillantes con Pf = 81.1-81.7 °C; una sola mancha por CCF (Rf = 0.37, sistema VII).

Método C

En un matraz bola con tres bocas esmeriladas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición, columna Vigreux en posición de reflujo y baño de agua se disolvieron 15 g (74.4 mmoles) del ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico (**1**) en 45 mL de Etanol y 40 mL de acetona a 40 °C. Después de la disolución completa se adicionaron 17.5 g (208 mmoles) de NaHCO₃ (2.8 equivalentes), 30ml de agua y gota a gota se adicionaron 15.6 mL (185 mmoles) de Sulfato de dimetilo (2.2 equivalentes). La mezcla de reacción se calentó entre

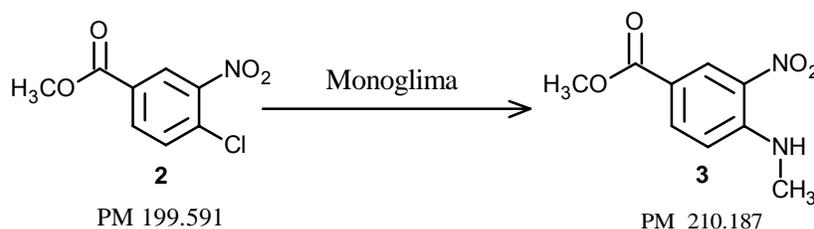
10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

60-70 °C y se mantuvo así durante 1.5 h. Pasado este tiempo se evaporó el disolvente en el rotaevaporador hasta observar cristalización, se filtró al vacío y se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 15.12 g de un sólido blanco que se recrystalizó de metanol (93% de rendimiento de reacción) dando unos cristales blancos brillantes con Pf = 81.4-82.0 °C; una sola mancha por CCF (Rf = 0.37, sistema VII).

4-Metilamino-3-nitrobenzoato de metilo (3)

SUSTITUCIÓN NUCLEOFÍLICA

Método A



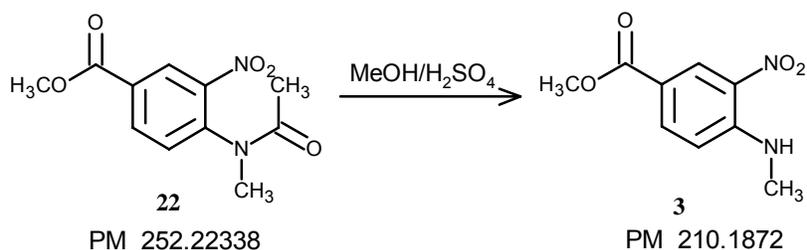
En un reactor Paar de 300 mL se mezclaron 7.20 g (33.4 mmoles) de **2**, 13.54 g (98.0 mmoles) de K₂CO₃, 8.92 g (64.6 mmoles) de CH₃NH₂·HCl, 7.0 mL de H₂O y 200 mL de monoglima. El reactor se cerró y se calentó con agitación a 130 °C durante 2.5 h. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el líquido sobrenadante se decantó y se concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un sólido amarillo ocre que se suspendió en agua, se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua fría. Se obtuvieron 6.39 g de producto crudo (91.02% de rendimiento). Una recrystalización de 0.6 g de monoglima-agua dio 0.48 g (80% de cristalización) de cristales naranjas con un Pf = 144.5-145.6 °C, una sola mancha en CCF con Rf = 0.39 (Sistema I más una gota de NH₄OH).

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

4-Metilamino-3-nitrobenzoato de metilo (3)

HIDRÓLISIS

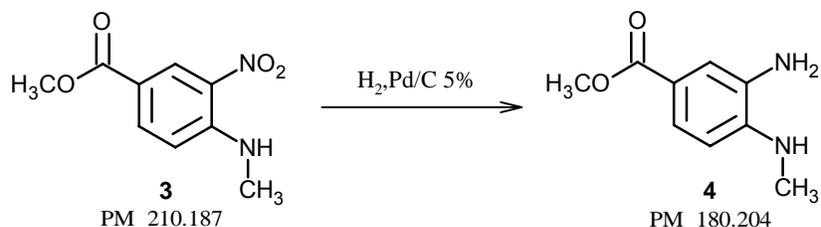
Método B



En un vaso de 50 mL equipado con agitación magnética y termómetro se colocaron 4 g (17.35 mmol) de **22** en 40 mL de MeOH y 3 mL de H₂SO₄ concentrado, después de 20 h a 60 °C con reflujo se observó el consumo total de materia prima. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, observándose la aparición de un sólido amarillo (2.74 g) que se filtró al vacío y se lavó con agua fría hasta pH neutro (81.33% de rendimiento crudo). El sólido anterior se recristalizó de EtOH y se lavó con agua helada repetidas veces, se obtuvieron 2.42 g (39% de rendimiento) de un sólido amarillo paja con Pf 146.3-148.3 °C (Rf = 0.38 sistema I).

3-Amino-4-(metilamino)benzoato de metilo (4)

HIDROGENACIÓN

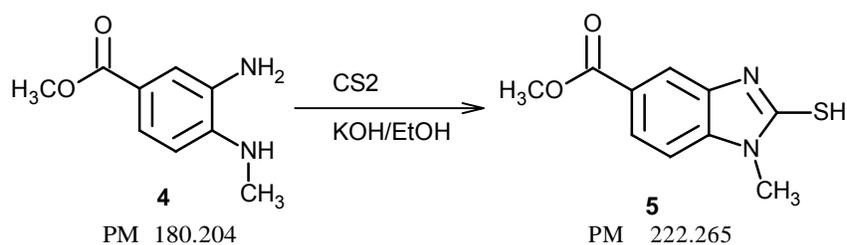


10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

En un matraz de hidrogenación de vidrio de 500 mL se suspendieron 10 g (47.5 mmol) del compuesto **3** en 100 mL de MeOH y 3.3 g (30%) de catalizador Ni-Raney, el cual fue previamente lavado 3 veces con agua y MeOH. Una vez instalado el matraz en el sistema de hidrogenación, envuelto con una camisa de calentamiento. Se realizaron tres lavados con 30 lb/in² de hidrógeno; después se cargó con 60 lb/in² de hidrógeno y se inició la reacción; ésta se llevó a cabo a temperatura ambiente por 1 hora 20 minutos consumiéndose 113 lb/in² de hidrógeno. La CCF reveló una mancha principal con R_f = 0.40 (Sistema II), por lo que la mezcla de reacción se procesó filtrando el catalizador al vacío a través de una cama de celita. El filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador obteniéndose un sólido color morado; el cual sin posterior tratamiento se sometió a la siguiente reacción.

2-Mercapto-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**5**)

CICLOCONDENSACIÓN



En un matraz de tres bocas de 250 mL, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmósfera de nitrógeno se disolvieron 47.5 mmoles de la diamina **5**, obtenida en la reacción anterior, en 40 mL de etanol a temperatura ambiente. Una vez en solución se le adicionaron 3.2 g (0.0556 mol, 1.5 equivalentes) de KOH disueltos en 20 mL de etanol.

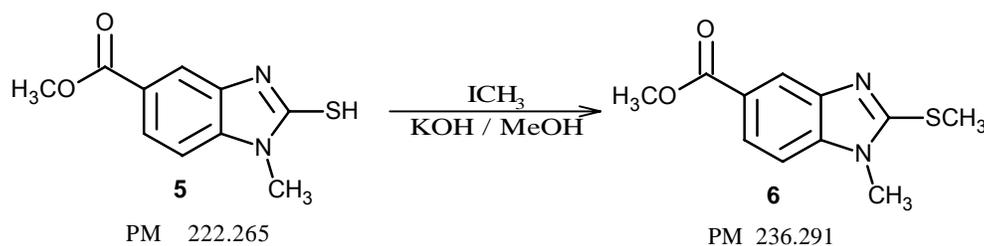
10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

Posteriormente se adicionaron lentamente 4.4 mL (1.5 equivalentes) de disulfuro de carbono (CS₂), verificando que el pH fuera 9. Terminada la adición la mezcla se calentó a 65 °C por 4 horas. Una CCF mostró que aún había presencia de materia prima por lo que se adicionaron 0.5 mL (8.05X10⁻³ mol) más de CS₂ y un poco de KOH disuelto en etanol para mantener el pH 9. Se dejó reaccionar por una hora más.

Una vez consumida la materia prima, a la mezcla de reacción se adicionó ácido acético glacial al 5% hasta llegar a pH 5. El sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido color crema, con R_f = 0.55 (Sistema II), que al oxidarse se torna gris, el peso fue de 4.37 g (74.85% de rendimiento), de las aguas madres se recuperaron 0.40 g más de producto (7.47%). 1 g del producto crudo se recristalizó de EtOH + 10% DMF y se lavó con una solución al 2% de hidrosulfito de sodio, obteniéndose 0.4227 g (42% de rendimiento) de un sólido color crema con punto de fusión de 254.2-255.4 °C.

1-Metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6)

METILACIÓN

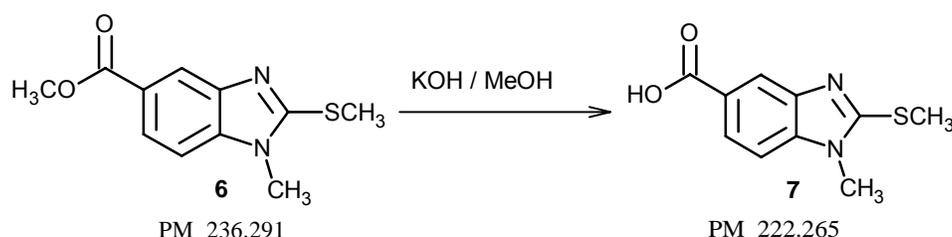


10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

En un matraz de tres bocas de 100 mL provisto de termómetro, embudo de adición y atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 4 g (17.9 mmol) del compuesto **5** en 28 mL de acetona junto con 1.11 g (19.8 mmol, 1.1eq) de KOH acuoso. Una vez en solución se adicionaron gota a gota 1.2 mL (19.8 mmol, 1.1eq) de CH₃I a temperatura ambiente. Terminada la adición se dejó en agitación por 1h. Una CCF mostró el consumo total de materia prima. La mezcla de reacción se vertió posteriormente en 100 mL de agua-hielo verificando que el pH se encontrara neutro. El sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido de color gris que pesó 3.9983 g (94.02% de rendimiento crudo). 1.5 g del producto se recrystalizaron de MeOH-agua dando 1.35 g (90% de rendimiento de reacción) de cristales color crema con Pf = 121.1-122.3 °C y Rf = 0.33 de (Sistema VIII).

Ácido 1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**7**)

HIDRÓLISIS



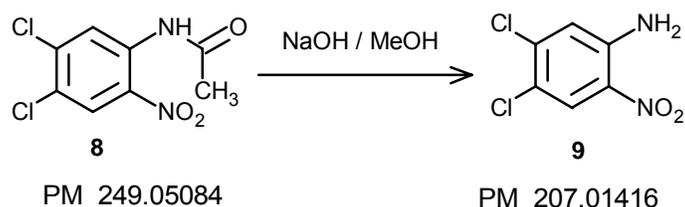
En un vaso de 100 mL equipado con agitación magnética y termómetro se colocaron 2 g (8.464 mmol) del compuesto **6** suspendidos en 8 mL de MeOH. Se incorporó a la mezcla, a temperatura ambiente y con agitación constante, una solución de 0.81 g (1.7 equivalentes) de KOH en 4 mL de agua, manteniendo la

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

temperatura entre 20 y 25 °C. Con el paso del tiempo (2 h) se observó el consumo total de materia prima. El sólido obtenido se suspendió en 25 mL de agua en un vaso de precipitados con agitación magnética, poco a poco se aciduló con una solución de HCl al 25% hasta la formación de un precipitado que se separó por filtración al vacío. Se obtuvieron 1.84 g de un sólido blanco grisáceo (98.0%), que en CCF mostró una mancha principal con $R_f = 0.35$ (Sistema II). El producto se recrystalizó de DMF-MeOH y se lavó con agua helada repetidas veces, se obtuvieron cristales grises (67% rendimiento de recrystalización) con $P_f = 287.8$ - 288.9 °C y $R_f = 0.35$ (Sistema II).

4,5-Dicloro-2-nitroanilina (9)

HIDRÓLISIS



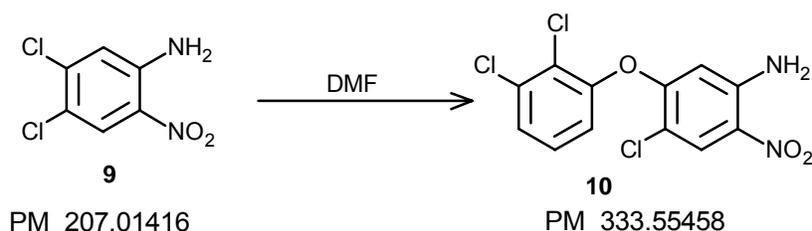
En un vaso de 250 mL equipado con agitación magnética y termómetro se colocaron 10 g (40.1 mmol) de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida suspendidos en 100 mL de MeOH. Se incorporó a la mezcla a temperatura ambiente y con agitación constante 1.4454 g (1.2 equivalentes) de NaOH en 2 mL de agua, cuidando que la temperatura no se elevara más de 40 °C. Después de 1 h, una CCF mostró el consumo total de materia prima. El precipitado formado se filtró al

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

vacío y se lavó con MeOH frío. Se obtuvieron 6.89 g (82.89% de rendimiento) de un compuesto amarillo canario con $P_f = 178.3-179.3\text{ }^\circ\text{C}$ y $R_f = 0.52$ (Sistema I).

4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (10)

Sustitución Nucleofílica Aromática



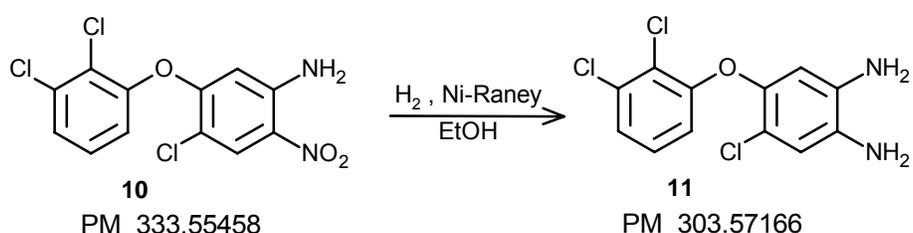
En un matraz redondo de tres bocas, provisto de agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo y termómetro se colocaron 10 g (48 mmol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina, 11.025 g (67.5 mmol, 1.1 eq) de 2,3-diclorofenol, 12.01 g (8.5 mmol, 1.5 eq) de K_2CO_3 y 100 mL de DMF. La mezcla de reacción se calentó a $115\text{ }^\circ\text{C}$ con un baño de aceite por 18 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Mediante CCF se observó el consumo total de la nitroanilina **9**. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró al vacío, para eliminar las sales formadas, y se evaporó el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador. El líquido viscoso color café intenso obtenido se suspendió en metanol, se agitó y se enfrió en un baño de hielo-sal; se obtuvo un precipitado que al filtrarse al vacío dio 8.11 g (50.33% de rendimiento) de de cristales amarillos que se lavaron con metanol frío. Las aguas madres se concentraron y se les realizó el tratamiento anterior con metanol, precipitaron 5.3522 g de un sólido impuro que se recristalizó de tolueno

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

obteniéndose 4.1560 g de cristales amarillos con Pf = 149.6-151.4 °C y Rf = 0.65 (Sistema I).

4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (11)

HIDROGENACIÓN CATALÍTICA

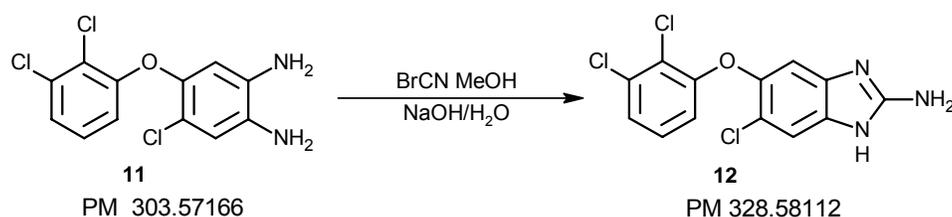


En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 4.8 g (14.4 mmol) del compuesto **10**, 130 mL de EtOH y 0.48 g de catalizador Ni-Raney. El Ni-Raney se lavó previamente con agua y etanol. La botella de reacción se colocó en el hidrogenador, se cubrió con la mantilla de calentamiento. Una vez cerrado el sistema, éste se purgó mediante tres lavados de 30 lb/in² de H₂. La reacción se llevó a cabo calentando aproximadamente a 30 °C durante 6 horas, consumiéndose 56 lb/in². La solución obtenida se filtró a través de una cama de celita para separar el catalizador. El filtrado se concentró en el rotaevaporador obteniéndose un aceite café transparente. La CCF mostró el consumo total de materia prima con una mancha principal con Rf = 0.23 (Sistema II). El producto sin tratamiento posterior se sometió a la siguiente reacción.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-amina (12)

CICLOCONDENSACIÓN

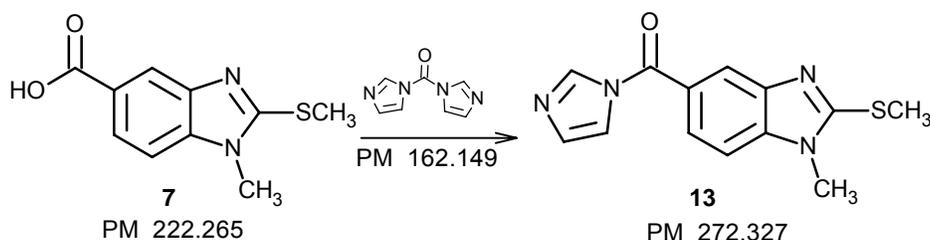


En un matraz bola de 10 mL, adaptador con condensador a reflujo se mezclaron 2.7 g (8.89 mmol) de la diamina **11**, recién preparada, y 240 mL de MeOH, la mezcla se agitó bajo atmósfera de N₂ hasta disolución total. A la solución fría, a temperatura ambiente, se le agregaron 1.12 g (10.6 mmoles, 1.2 equivalentes) de BrCN y se dejó reaccionar durante 30 minutos a reflujo. Una vez concluida la reacción, la mezcla se dejó enfriar y se agregaron 0.9 g de NaOH disuelto en la mínima cantidad de agua, de nuevo se calentó a reflujo por una hora más. La mezcla de reacción fría se pasó a un matraz bola de un litro con agua fría. Con agitación constante se agregaron 10 mL de acetato de etilo y sal de mesa hasta la formación de dos fases que se separaron en un embudo de separación. A la fase acuosa se le hicieron tres extracciones más con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se juntaron, se trataron con Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente en el rotaevaporador hasta sequedad; al residuo se le agregó 5 mL de benceno, el cual se evaporó con el rotaevaporador en dos ocasiones para eliminar residuos de agua. El sólido que se obtuvo se recristalizó de tolueno-etanol dando 1.9775 g (87%) de un sólido rosa pálido con Pf = 183.6-185.6 °C y Rf = 0.45 (Sistema VI + NH₄OH).

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

5-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonil)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (13)

ACTIVACIÓN DEL GRUPO CARBOXILO

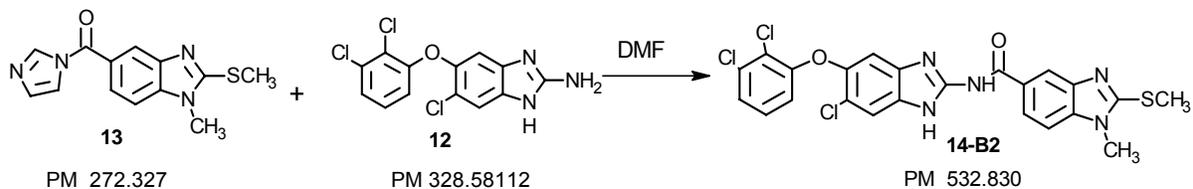


En un matraz de tres bocas de 100mL provisto de agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad y termómetro, se colocó 1 g (0.45 mmol) del ácido **7** más 1.1 g (1.5 eq) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI) disueltos en 10 mL de DMF anhidra. La solución se calentó a 70 °C durante 1.5 h, la CCF reveló el consumo total de materia prima y la formación de un compuesto con Rf = 0.60 con el sistema IX. La mezcla de reacción se dejó enfriar y sin tratamiento posterior se continuó con la siguiente reacción.

N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (14-B2)

HIBRIDACIÓN

Método A. Calentamiento convencional



10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

Una vez concluida la reacción anterior, se adicionaron 1.6 g (4.9 mmoles, 1.2 eq) de la amina **12**. La mezcla de reacción se calentó durante 24 h a 60 °C con agitación constante. Después de este tiempo, se formó un precipitado de color crema que se separó por filtración al vacío. El sólido se trató con MeOH caliente para eliminar los restos del intermediario imidazólido. Se obtuvieron 0.9074 g (37.5% de rendimiento) de un sólido blanco con punto de fusión de 300.4-301.1 °C y $R_f = 0.43$ (Sistema IX).

HIBRIDACIÓN

Método B. Calentamiento por microondas

5 mL de la mezcla de reacción anterior (intermediario **13**, amina **12** y DMF) se distribuyeron en 3 viales de 4 mL, a éstos se les colocó una barra magnética; se cerraron los viales con los tapones y se colocaron en el rotor G64 del horno Synthos 3000. Además se pusieron 13 viales con 2 mL de DMF cada uno para completar las 16 posiciones del rotor. Una vez instalado el rotor en el microondas se programaron las siguientes condiciones: IR 130 °C, Potencia 300 W, rampa 2 min, tiempo de reacción 15min, tiempo de enfriamiento 10min, fan 1 (para el tiempo de reacción) y fan 2 (para enfriamiento).

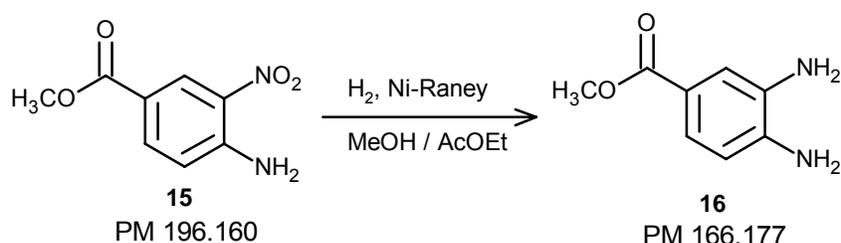
Una vez terminado el programa se realizó una CCF para confirmar que la reacción hubiera concluido. Posteriormente el contenido de los viales se vertió en agua fría se agitó con una varilla de vidrio y se separó por filtración al vacío. El sólido obtenido se suspendió en EtOH frío hasta obtener una solución ambar y un sólido

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

blanco suspendido. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con EtOH frío. Se obtuvieron 29.6 mg de un sólido color crema con Pf = 289.3 - 290.9 °C y Rf = 0.42 (sistema IX).

3,4-Diaminobenzoato de metilo (16)

REDUCCIÓN CATALÍTICA

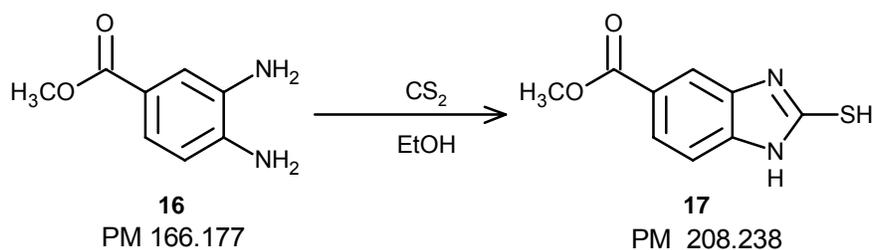


En un matraz de hidrogenación de vidrio de 500 mL se suspendieron 15 g (65 mmol) del 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**15**) en una mezcla de MeOH/AcOEt (150 mL/100 mL) y 4.5 g (30%) de catalizador Ni-Raney, el cual fue previamente lavado tres veces con agua y MeOH. Una vez instalado el matr az en el sistema de hidrogenación, envuelto en una camisa de calentamiento, la manta sólo se us  para conservar el calor de la reacción, el aire del matr az se eliminó por tres lavados de 30 lb/in² de hidrógeno; la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 4 horas consumiéndose 374 lb/in² de hidrógeno. La CCF mostró una mancha principal con un Rf = 0.17 (Sistema II), por lo que la mezcla de reacción se procesó filtrando el catalizador al vacío, el filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador y sin posterior tratamiento se continuó con la siguiente reacción.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

2-Mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (17)

CICLOCONDENSACIÓN

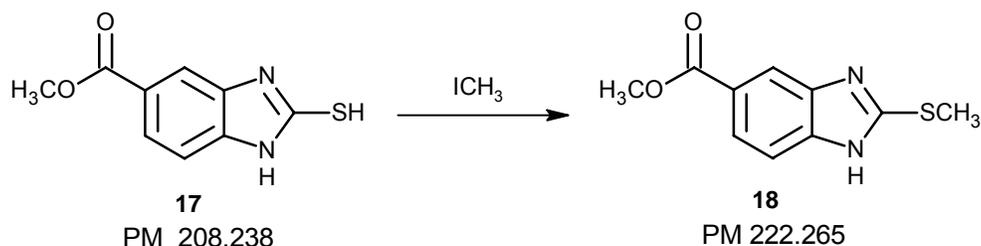


En un matraz de tres bocas de 250 mL, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmósfera de nitrógeno se disolvieron 65 mmoles de la diamina **16**, obtenido en la reacción anterior, en 40 mL de etanol a temperatura ambiente. Una vez en solución se le adicionaron 6.4g (114.4 mmol, 1.5eq) de KOH disueltos en 140 mL de etanol. Posteriormente se adicionaron lentamente 7.1 mL (1.5eq) de disulfuro de carbono (CS₂), verificando que el pH fuera 9. Terminada la adición la mezcla se calentó a 65 °C por 4 horas. Una vez consumida la materia prima, a la mezcla de reacción se adicionó ácido acético glacial al 15% hasta llegar a pH 5. El sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido color café, con R_f = 0.30 (Sistema I) pesó 14.0117g (87.99% de rendimiento). El sólido se recrystalizó de EtOH +10% DMF, carbón activado y 2% de hidrosulfito de sodio. Se obtuvieron 14.01 g (87.99% de rendimiento) de un sólido crema que funde con descomposición a 249 °C.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

2-Metiltiol-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (18)

METILACIÓN

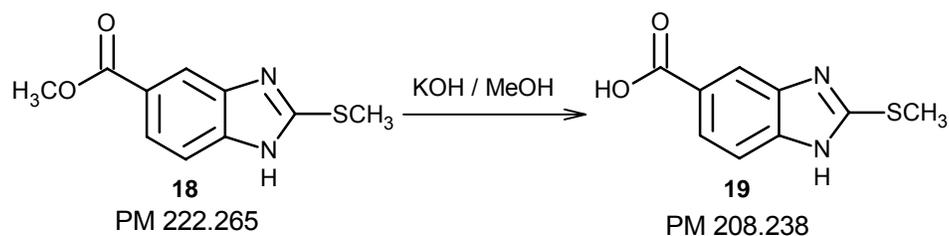


En un matraz de tres bocas de 100 mL provisto de termómetro, embudo de adición, atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 4 g (19.20 mmol) del compuesto **5**, 40 mL de acetona y 1.1 g (19.8 mmol, 1.1eq) de KOH acuoso. Una vez en solución se adicionaron gota a gota 1.2 mL (19.8 mmol, 1.1eq) de CH₃I. Terminada la adición se dejó en agitación por 2 horas manteniendo a temperatura entre 0 y 5 °C. Una CCF mostró el consumo total de materia prima. La mezcla de reacción se vertió posteriormente en 100 mL de agua-hielo verificando que el pH se encontrara neutro. El sólido formado se filtró al vacío y se lavó repetidas veces con agua. El producto crudo fue un sólido de color gris que pesó 3.5021g (82.03% de rendimiento). 1 g del producto se recrystalizó de EtOH-agua dando 0.5786g de cristales color crema con punto de fusión de 87.7-87.8 °C y R_f = 0.19 de (Sistema II).

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

Ácido 2-metiltiol-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (19)

HIDRÓLISIS

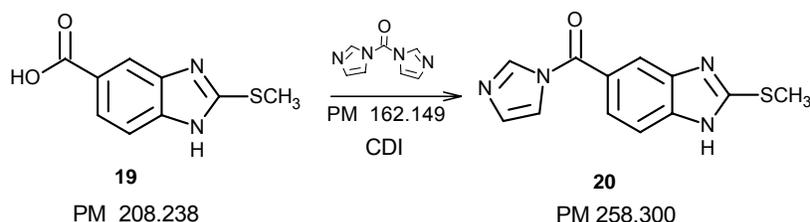


En un matraz Tepler de 10 mL con 3 bocas, acondicionado un termómetro, embudo de adición y condensador en posición de reflujo, se suspendieron 1.5 g del compuesto **9** en 15 mL de EtOH. A temperatura ambiente se adicionaron 1.1 g (3 equivalentes, 20.25 mmol) de KOH en solución acuosa, se observó disolución total del sustrato en el medio de reacción. Posteriormente, la mezcla se calentó a 50-60 °C por 1 hora. Una vez observado el consumo total de **18** por CCF, la reacción se vertió en 20 mL de agua y aciduló con H₂SO₄ al 10% hasta pH 4. El sólido formado se filtró al vacío, lavó con agua y se secó al aire dando 0.6319 g (45.2%) de un sólido color crema que analizado por CCF presentó una mancha con R_f = 0.1 (Sistema II). El producto crudo se recristalizó de etanol dando unos cristales blancos brillantes con un rendimiento de 91.0%. El punto de fusión determinado fue de 304.7-310.4 °C.

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

5-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (20)

ACTIVACIÓN DEL GRUPO CARBOXILO

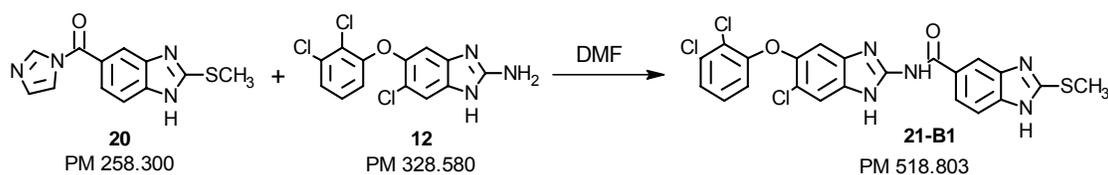


En un matraz Tepler de 10mL provisto de una barra magnética de agitación refrigerante en posición de reflujo, trampa de humedad y termómetro, se colocaron 0.5g (2.4×10^{-3} mol) del compuesto **19** más 0.5g (1.5 eq) de 1,1-carbonildiimidazol (CDI) disueltos en 5ml de DMF anhidra. La mezcla se calentó a 60 °C durante 2h; Se dejó con agitación y a reflujo durante 2h, la CCF reveló el consumo total de materia prima y la formación de un compuesto con $R_f = 0.34$ con el sistema IX. La mezcla de reacción se dejó enfriar y sin posterior tratamiento se continuó con la siguiente reacción.

N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-metiltiol-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (21-B1)

HIBRIDACIÓN

Método A. Con calentamiento convencional



10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

Una vez concluida la reacción anterior de formación del intermediario (**20**), se adicionaron 0.78 g (2.3 mmoles, 1 equivalente) del compuesto **12**. La reacción se calentó con agitación durante 2 días a 60 °C apareciendo después de este tiempo, un precipitado de color crema que se separó por filtración al vacío. El sólido se trató con MeOH caliente para eliminar los restos del intermediario imidazólido. Se obtuvieron 0.1113 g de un sólido blanco con punto de fusión de 274.1-274.9 °C y $R_f = 0.37$ (Sistema IX).

HIBRIDACIÓN

Método B. Calentamiento por microondas

5 ml de la mezcla de reacción anterior (intermediario **20**, amina **12** y DMF) se distribuyeron en 3 viales de 4 mL, a éstos se les colocó una barra magnética; se cerraron los viales con los tapones y se colocaron el rotor G64 del horno Synthos 3000. Además se colocaron 13 viales con 2 mL de DMF cada uno para completar las 16 posiciones del rotor. Se colocó el rotor en el microondas y se programaron las siguientes condiciones: IR 130 °C, Potencia 300 W, rampa 2 min, tiempo de reacción 15 min, tiempo de enfriamiento 10 min, fan 1 (para el tiempo de reacción) y fan 2 (para enfriamiento).

Una vez terminado el programa se realizó una CCF para confirmar que la reacción hubiera concluido. Posteriormente el contenido de los viales se vertió en agua fría se agitó con una varilla de vidrio y se separó el sólido. El producto se suspendió en EtOH frío hasta obtener una solución ámbar y un sólido blanco suspendido. La

10. Anexo A. PARTE EXPERIMENTAL

suspensión se filtró y el sólido lavó con EtOH frío. Se obtuvieron 21.15 mg de un sólido color crema con Pf = 268.7-271.54 °C, Rf = 0.43 sistema IX.

11. Anexo B. ESPECTROS

10083-1H_D3703

10083

USAI/UNAM

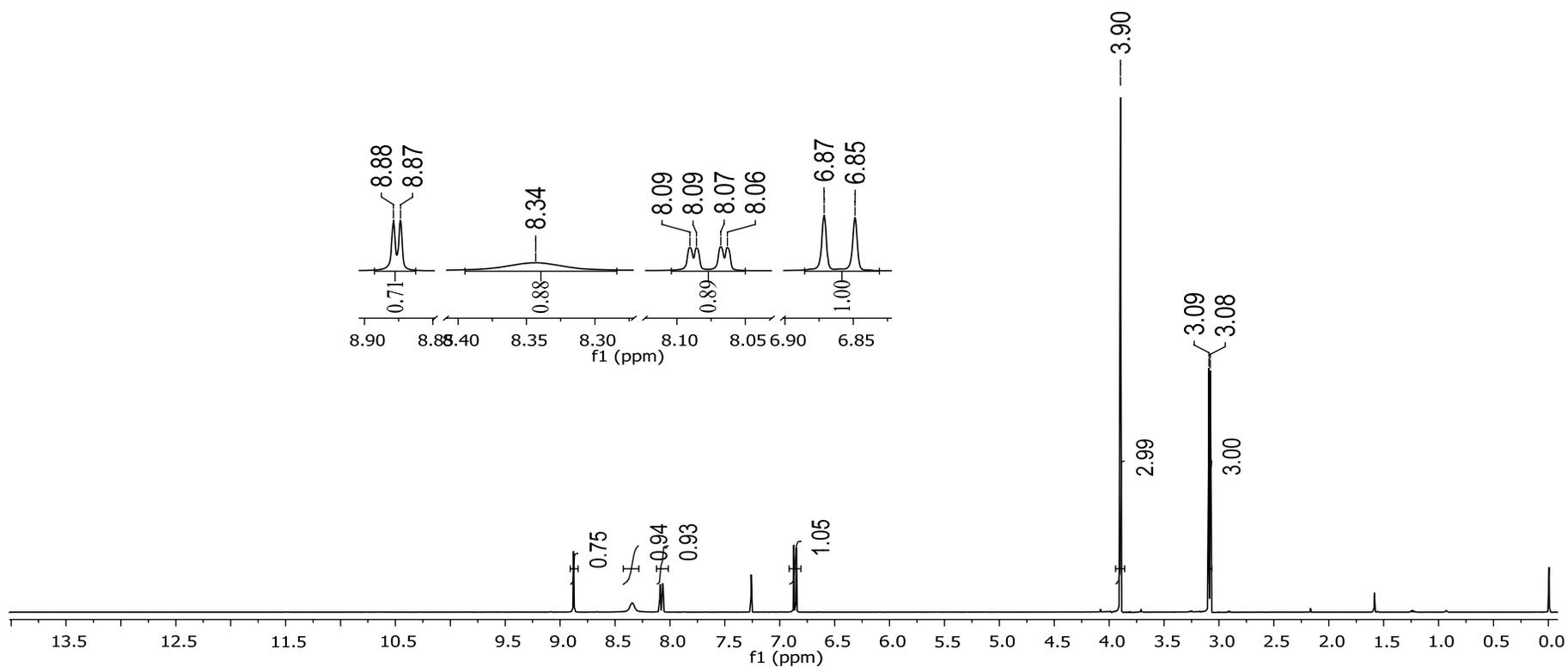
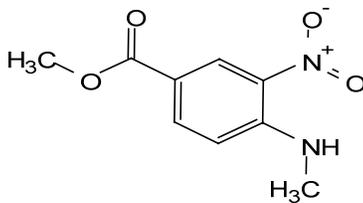
02-abril-09

M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes

D3703 / CDCl₃

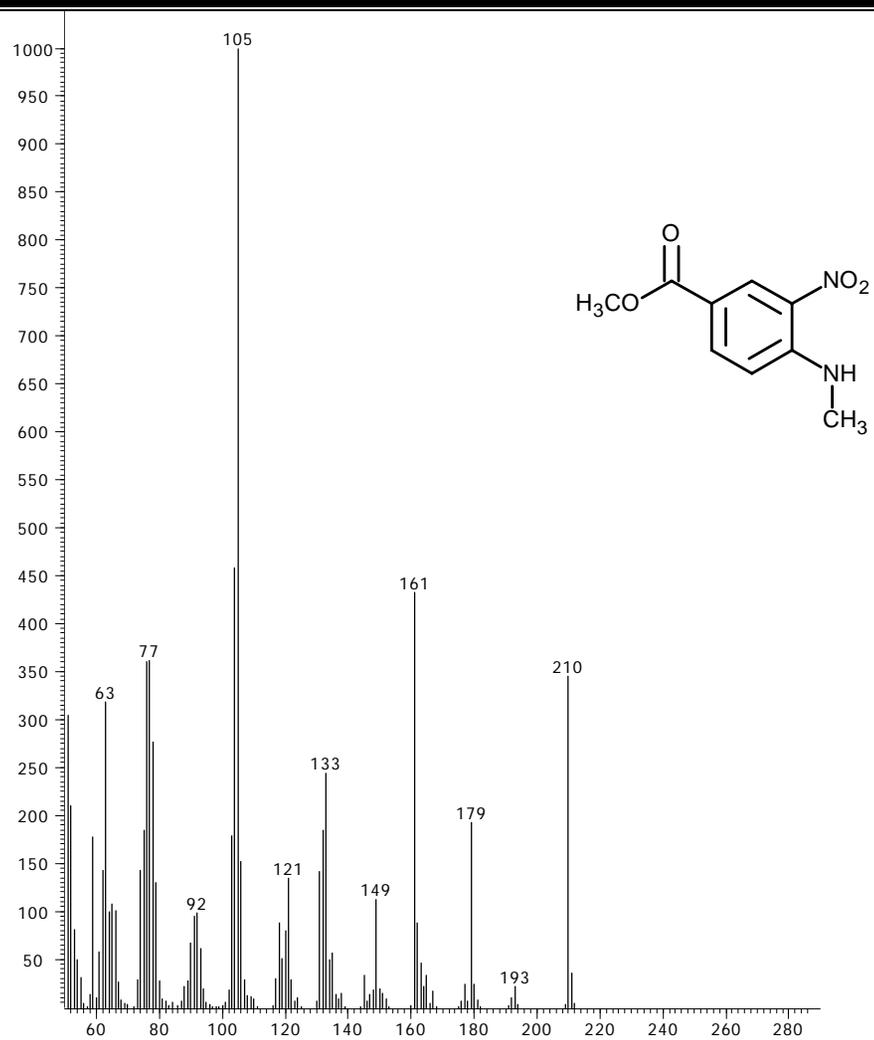
1H 400 MHz

400-VNMRS



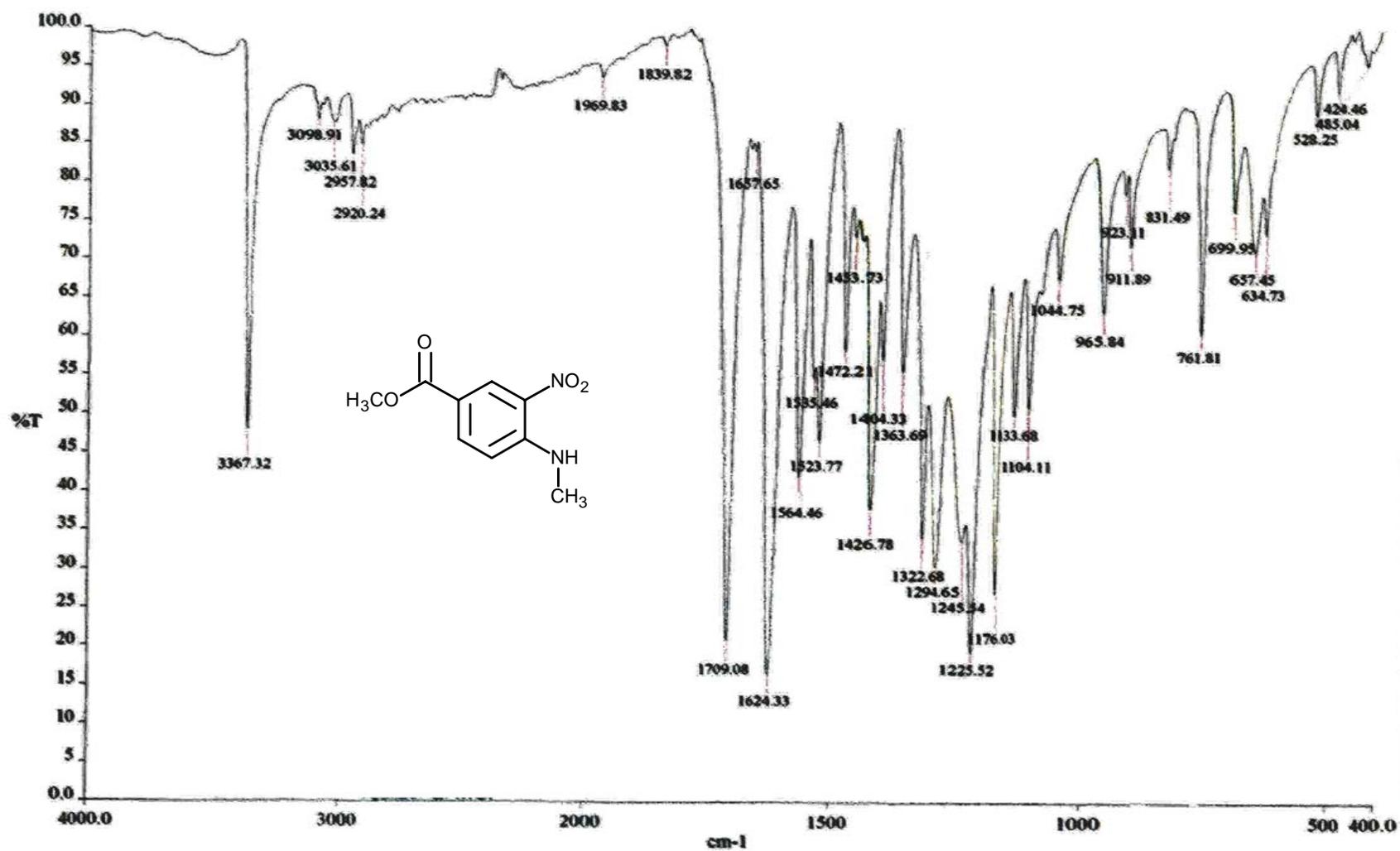
Espectro 1. RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz, δ ppm) del 4-(*N*-metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (**3**).

11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 2.EM (IE) 4-(*N*-metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (**3**).

11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 3. IR (Pastilla KBr) del 4-(*N*-metilamino)-3-nitrobenzoato de metilo (**3**).

11. Anexo B. ESPECTROS

10390

USAI-UNAM

24/Junio/2009

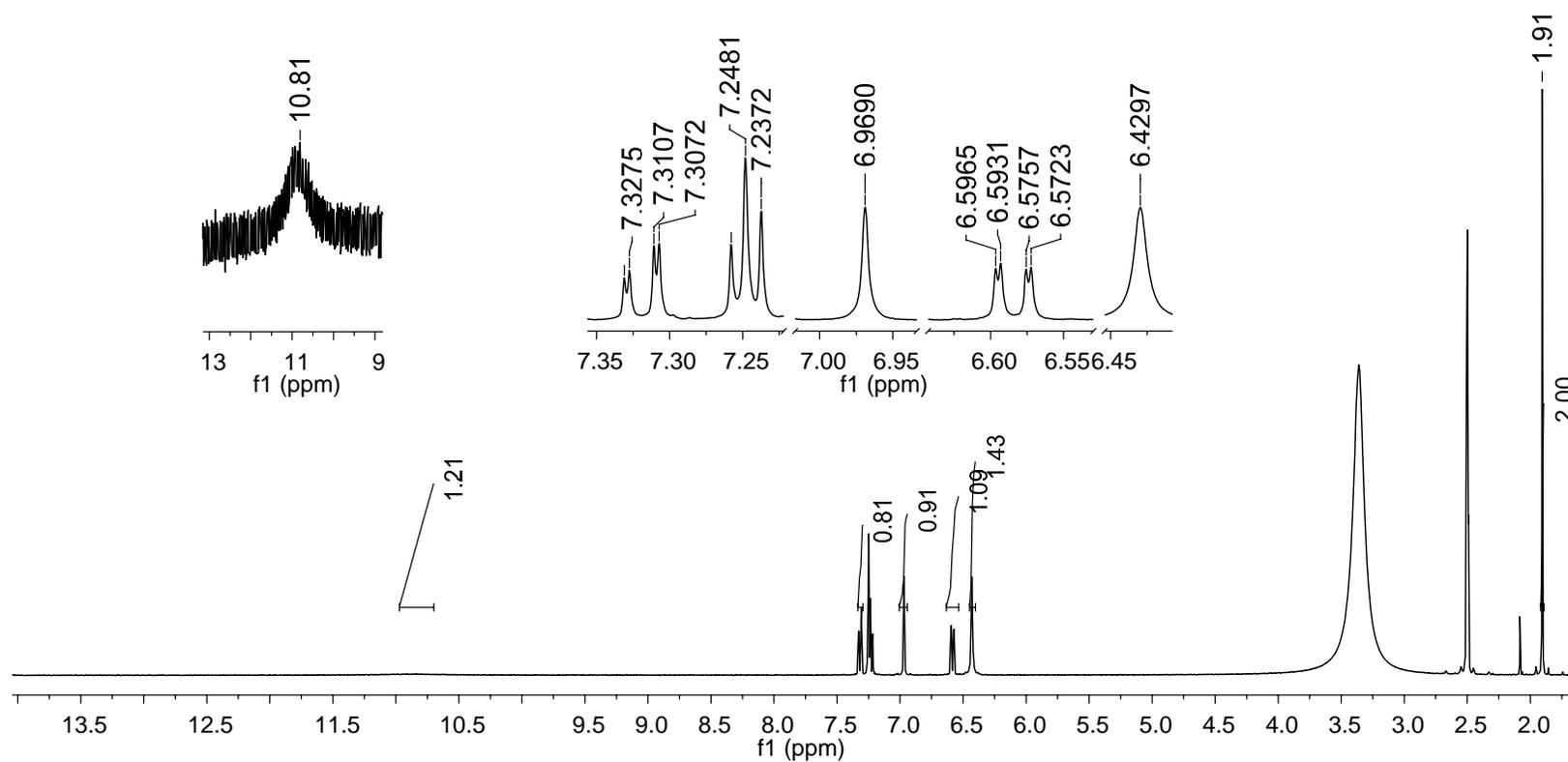
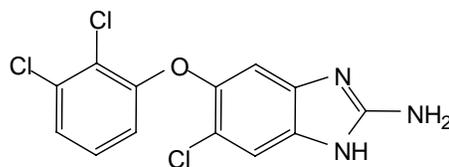
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes

DRG62 / DMSO-d6

1H 400 MHz

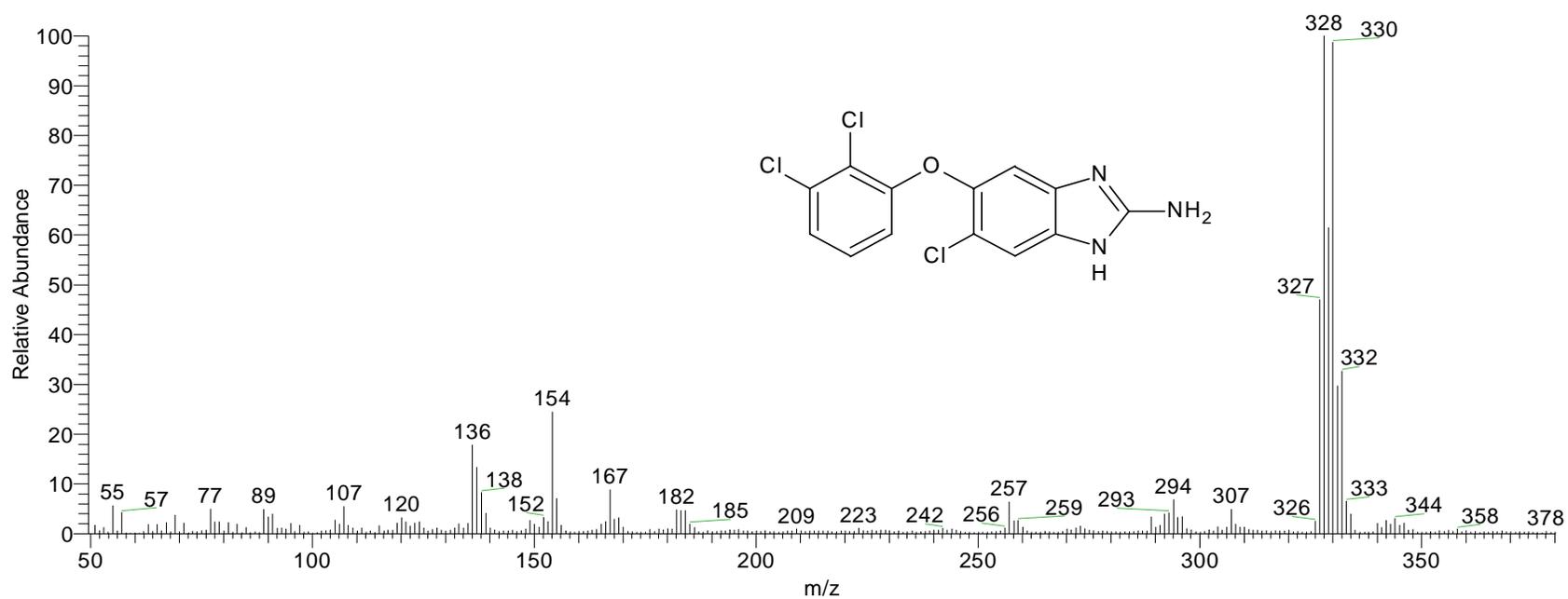
400-MR

RDM



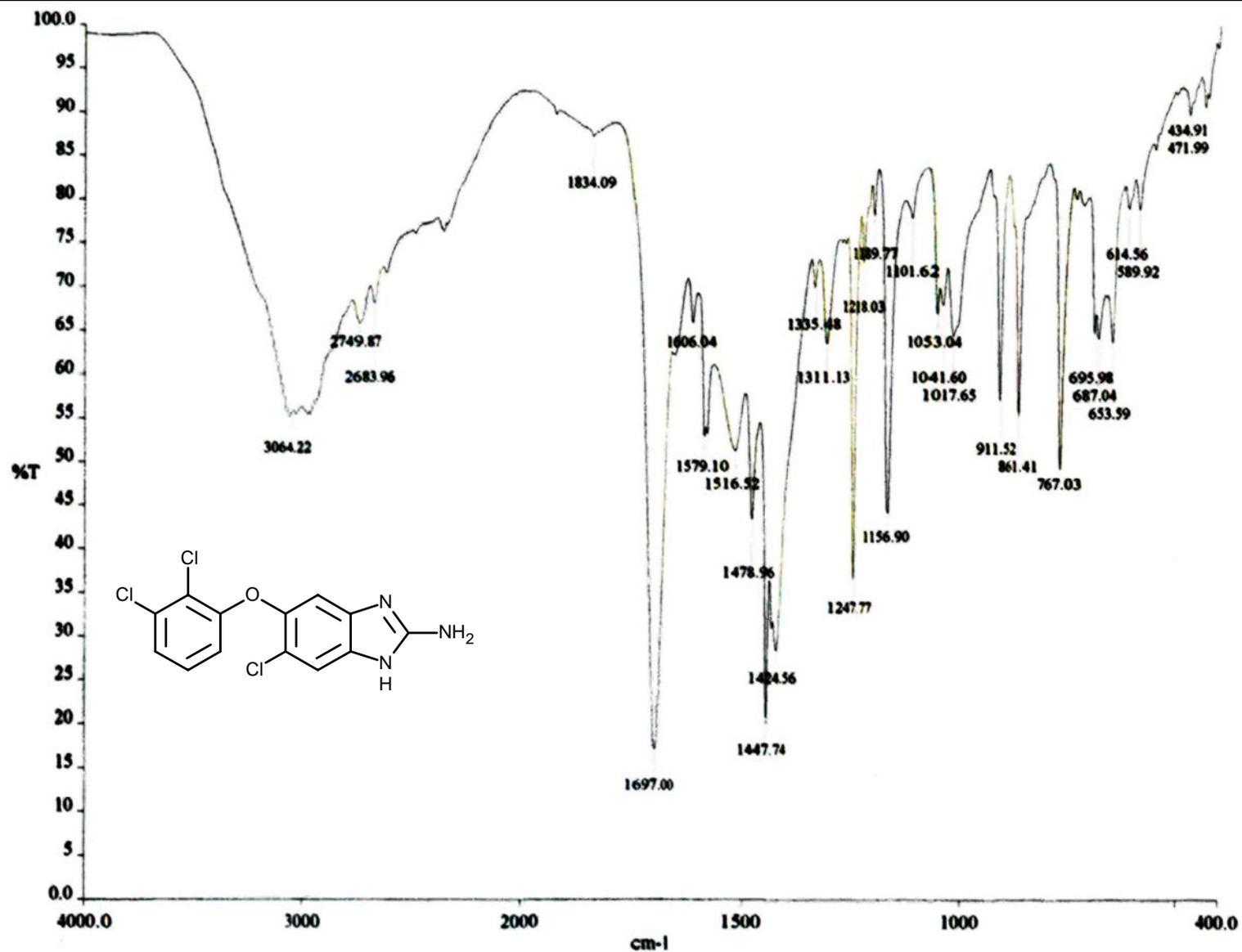
Espectro 4. RMN ^1H (DMSO-d₆, 400MHz, δ ppm) de 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-amina (**12**).

11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 5.EM (FAB⁺) de 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-amina (12)

11. Anexo B. ESPECTROS

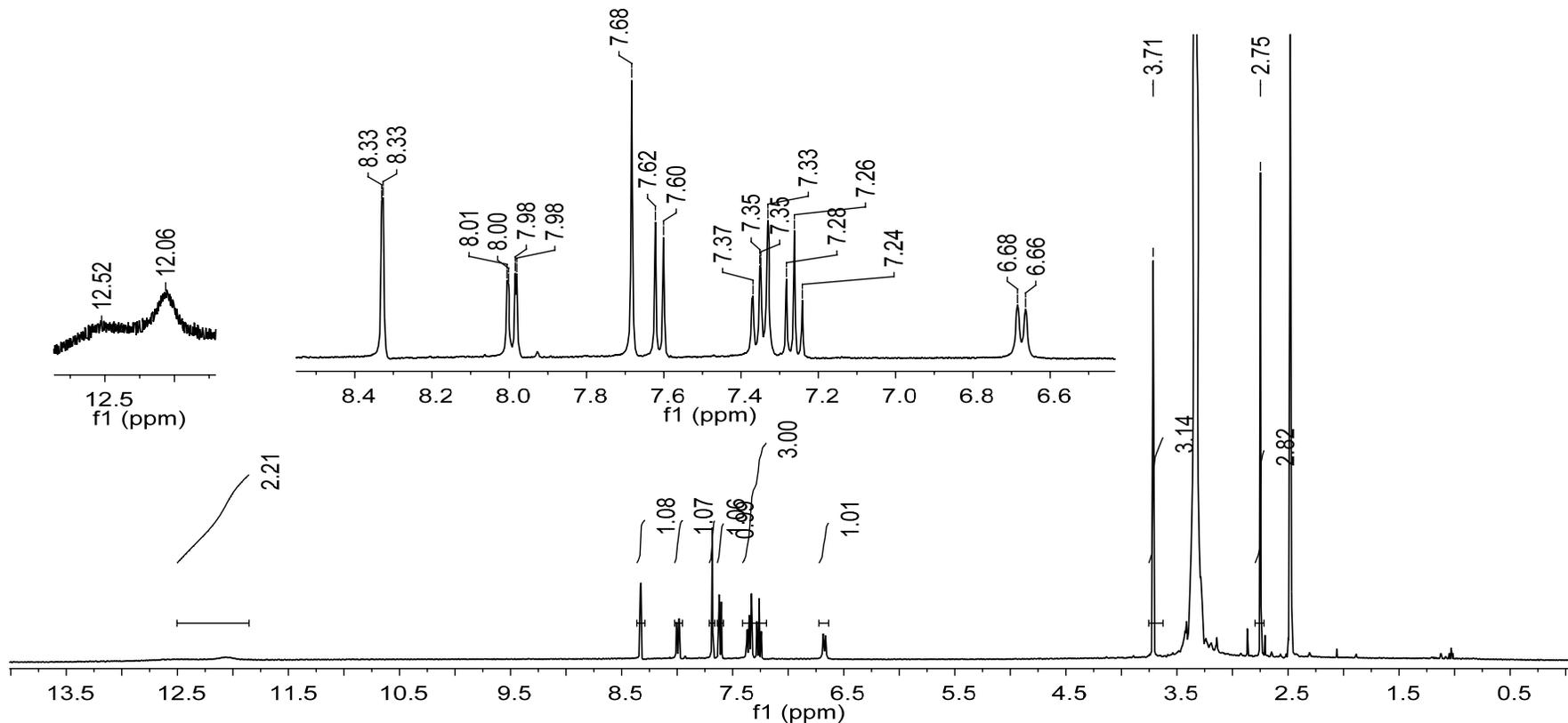
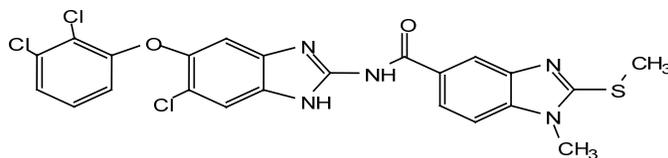


Espectro 6. IR (Pastilla KBr) de 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-bencimidazol-2-amina (12).

11. Anexo B. ESPECTROS

10607

USAI-UNAM
 14/SEPTIEMBRE/2009
 M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
 D7004 / DMSO-d6
 1H 400 MHz
 400-MR
 Realizo: M. en C. Rosa I. Del Villar M.

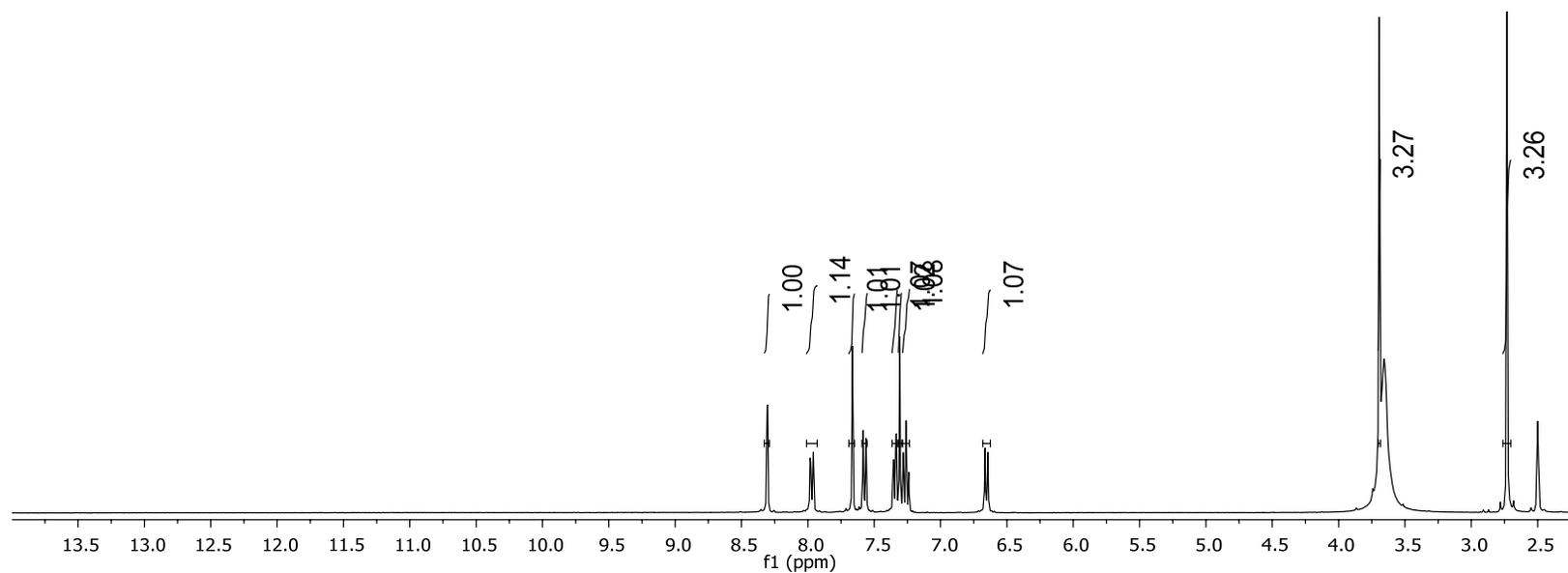
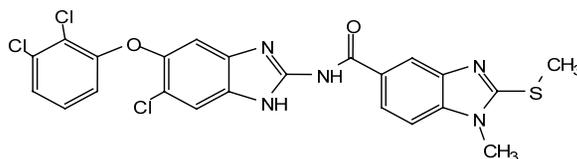


Espectro 7. RMN ¹H (DMSO d₆, 400MHz, δ ppm) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**)

11. Anexo B. ESPECTROS

10607

USAI-UNAM
17/Septiembre/2009
M. en C. Alicia Hernandez
D7004-2 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM

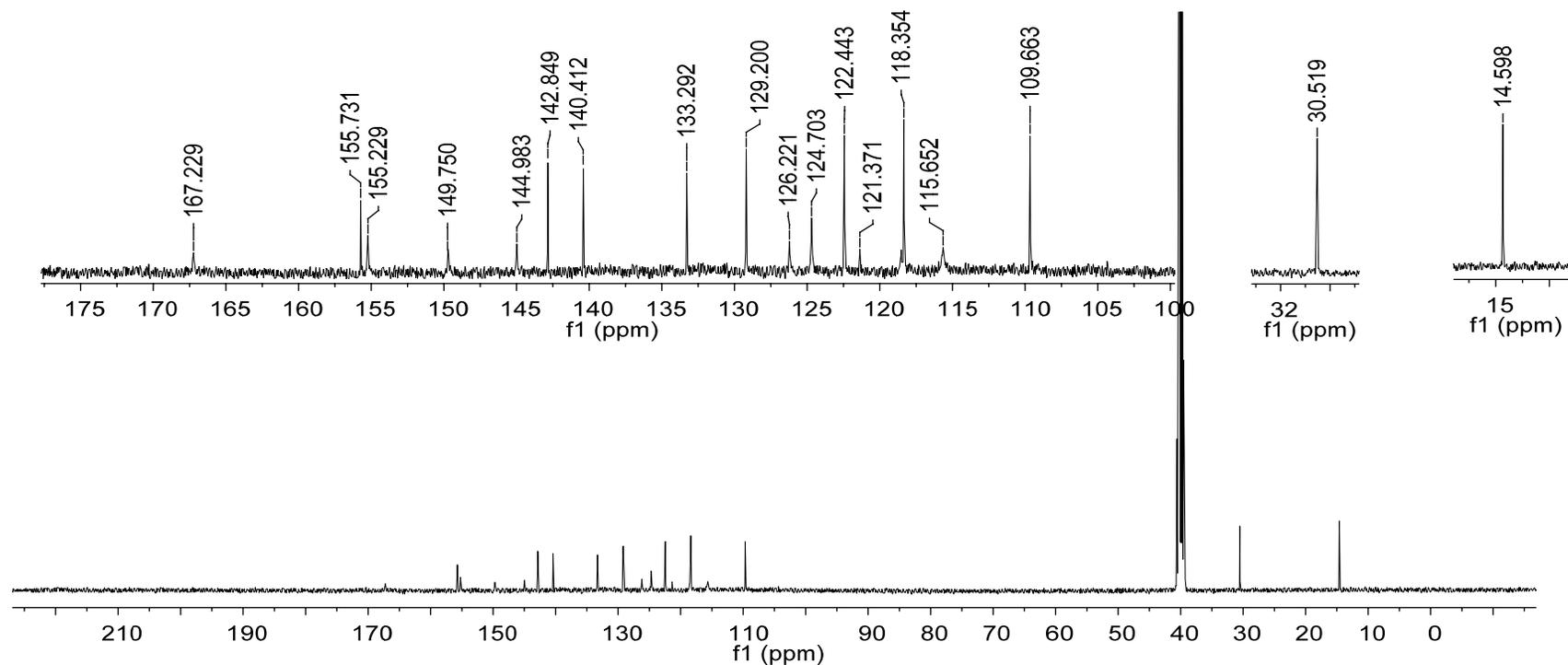
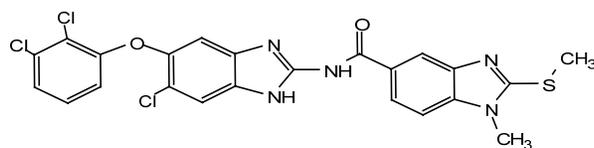


Espectro 8.RMN ^1H , Intercambio con D_2O (DMSO d_6 , 400MHz, δ ppm) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**)

11. Anexo B. ESPECTROS

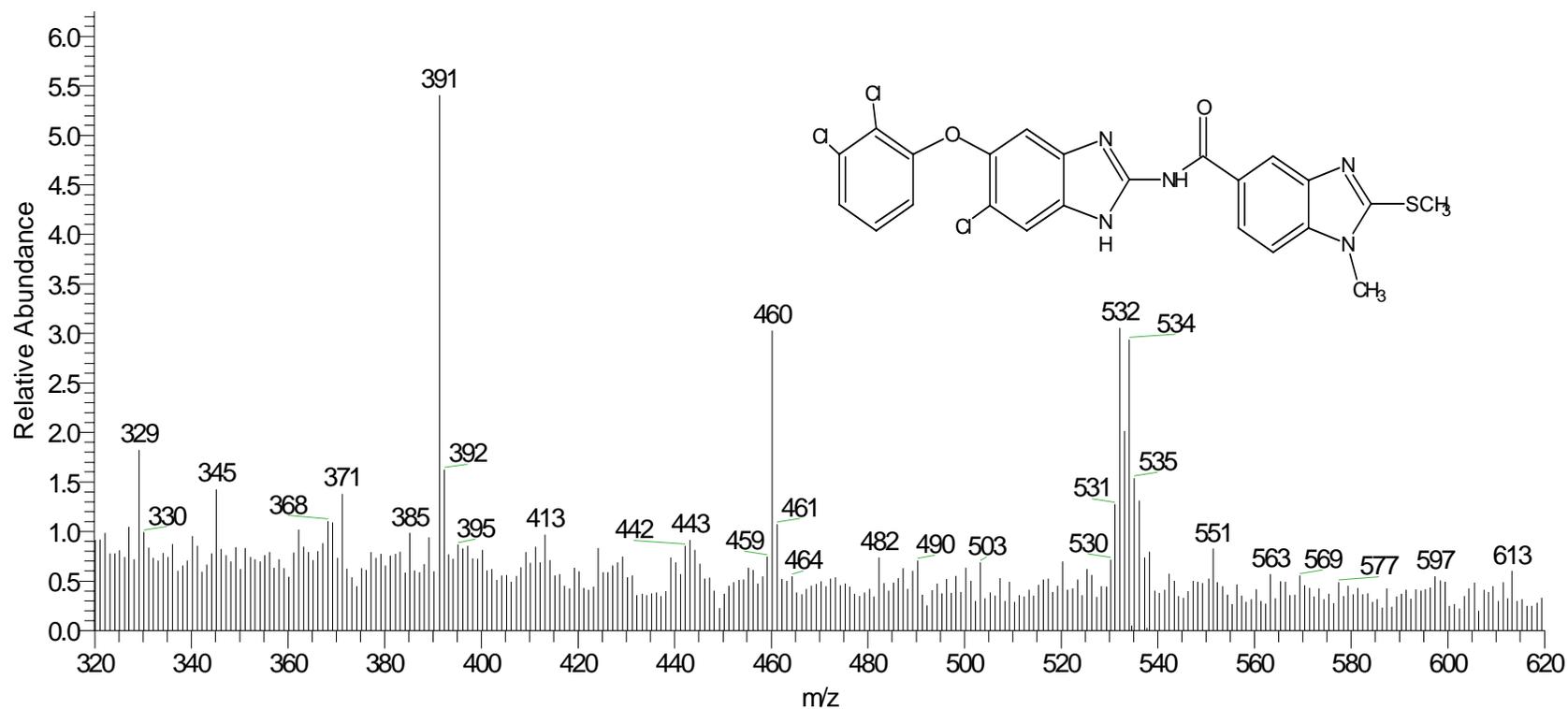
10607-13C_D7004-2
10607

USAI-UNAM
21/SEPTIEMBRE/2009
M. enC. Alicia Hernandez
D7004-2 / DMSO
1H 400 MHz
400-MR
RDM



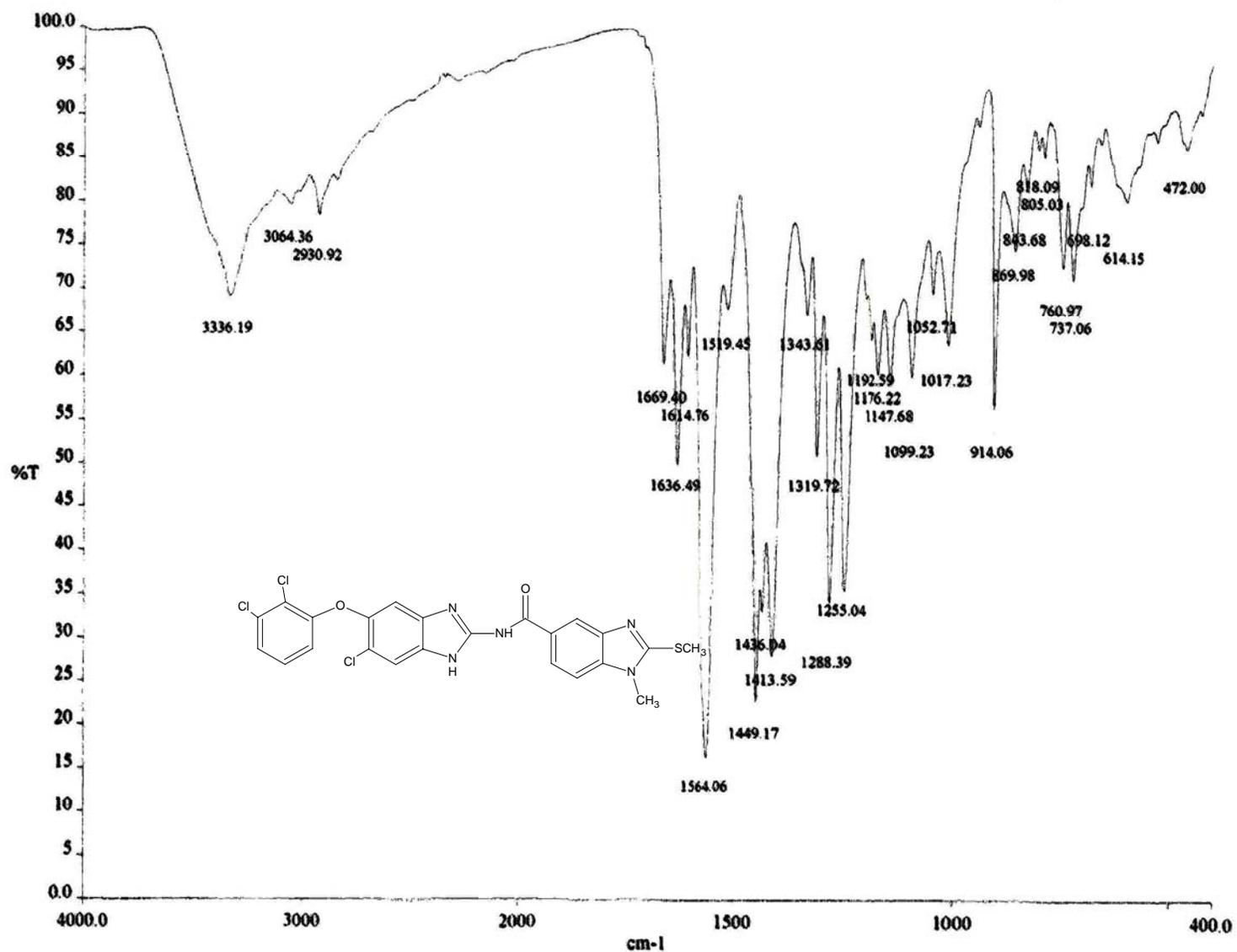
Espectro 9. RMN ^{13}C (DMSO d_6 , 100MHz, δ ppm) de *N*-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio) -1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**)

11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 10. EM (FAB⁺) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**)

11. Anexo B. ESPECTROS

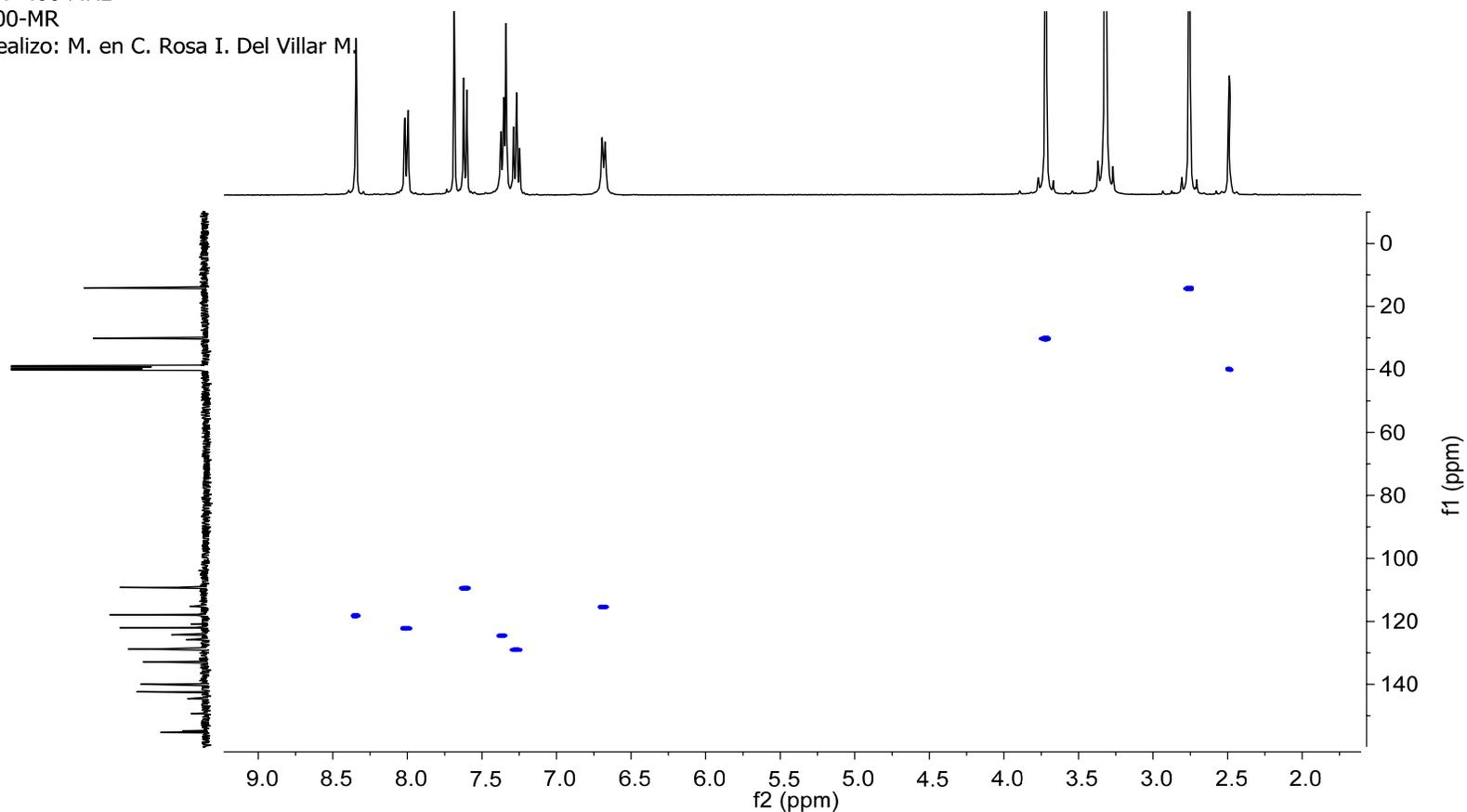


Espectro 11. IR (Pastilla KBr) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (B2-14)

11. Anexo B. ESPECTROS

10607-HSQC_D7004-2
10607

USAI-UNAM
14/SEPTIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
D7004 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
Realizo: M. en C. Rosa I. Del Villar M

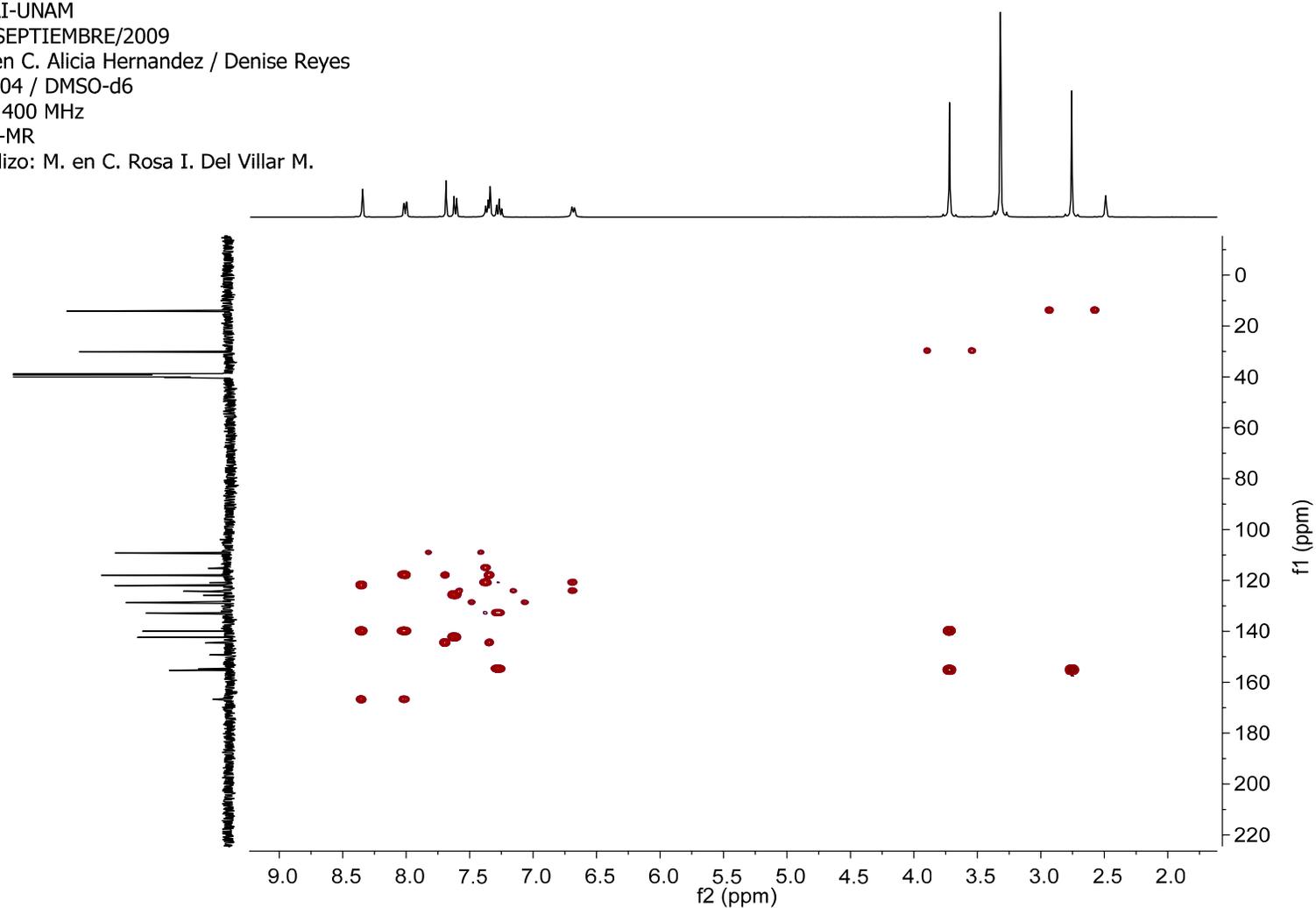


Espectro 12. Espectro HSQC (^{13}C - ^1H , DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**).

11. Anexo B. ESPECTROS

10607-HMBC_D7004-2
10607

USAI-UNAM
14/SEPTIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
D7004 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
Realizo: M. en C. Rosa I. Del Villar M.

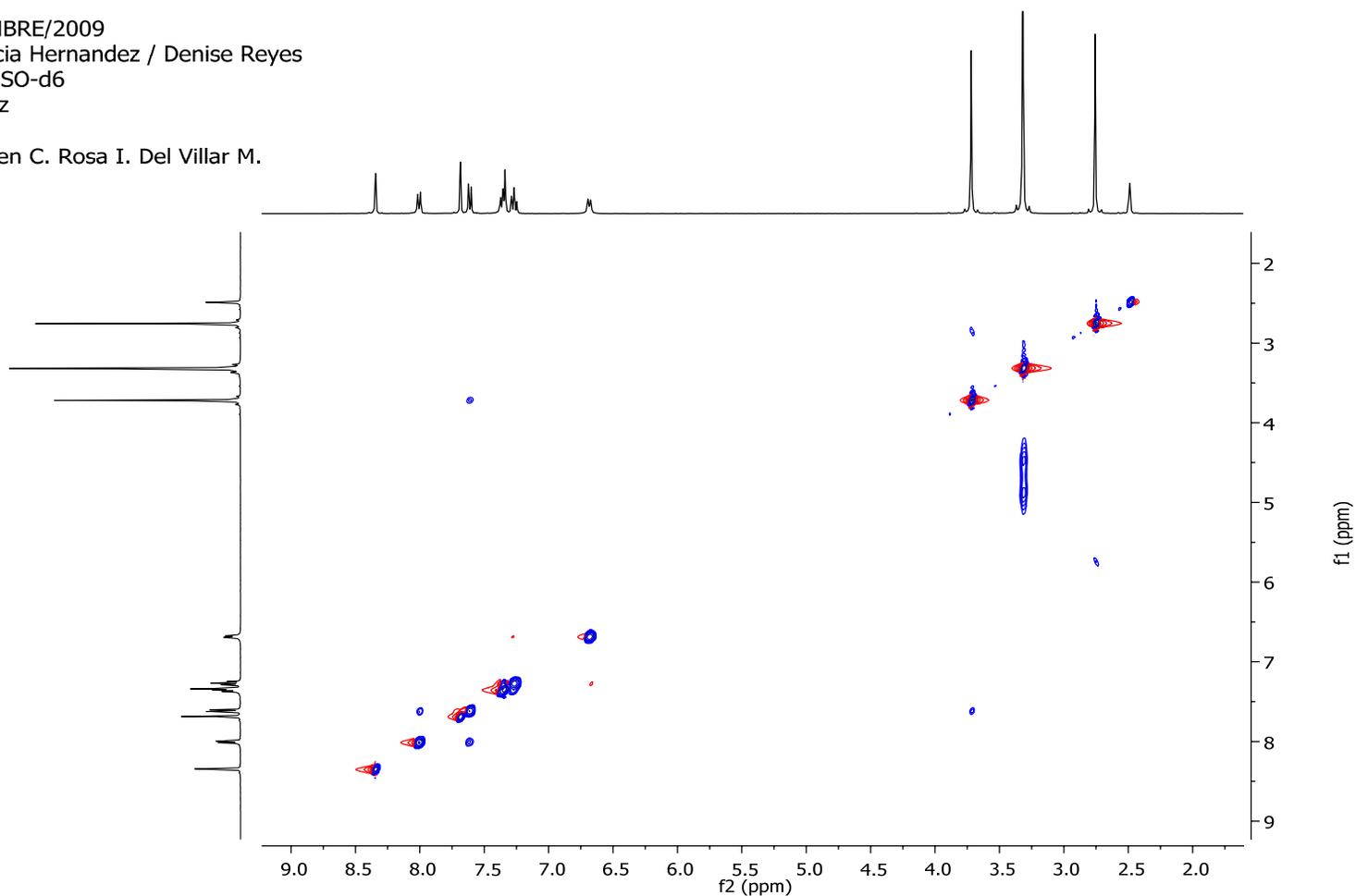


Espectro 13. Espectro HMBC (^{13}C - ^1H , DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**).

11. Anexo B. ESPECTROS

10607-NOESY_D7004-2
10607

USAI-UNAM
14/SEPTIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
D7004 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
Realizo: M. en C. Rosa I. Del Villar M.

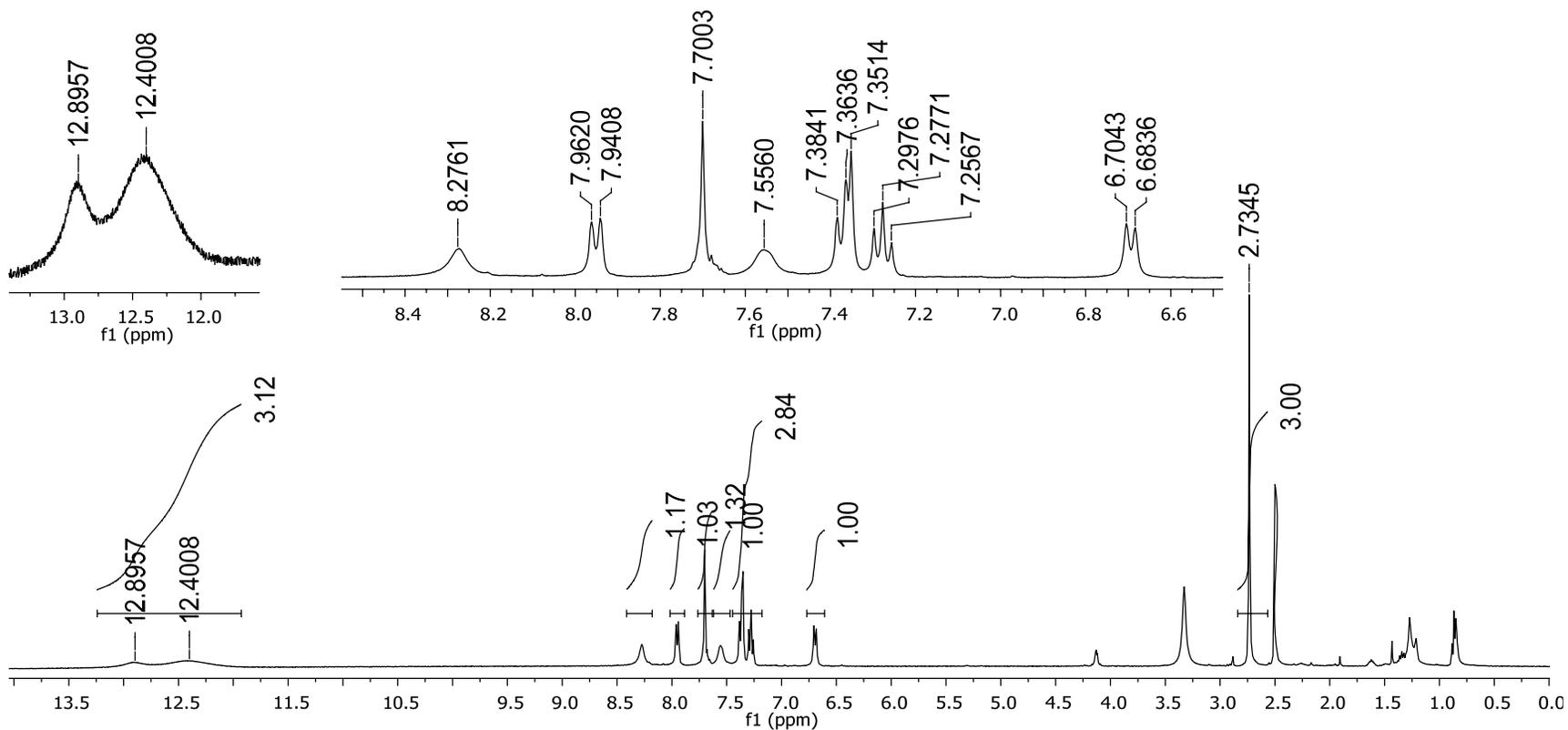
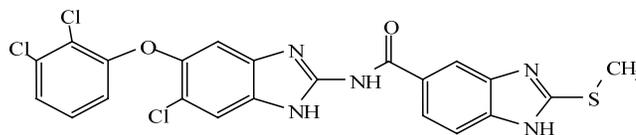


Espectro 14. Espectro NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$, DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B2-14**).

11. Anexo B. ESPECTROS

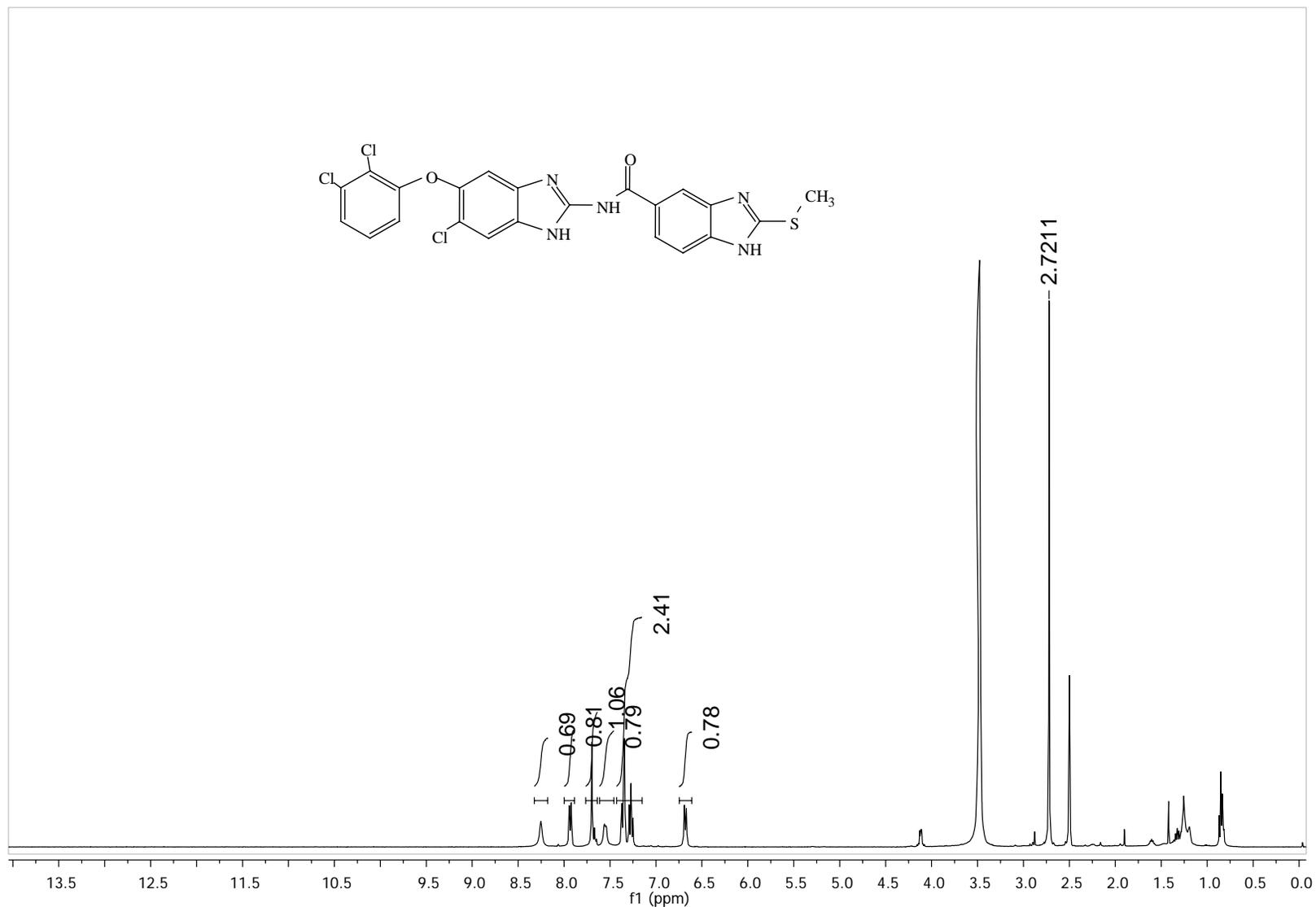
10821-1H-completo_8726-3
10821

USAI-UNAM
04/NOVIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
8726-3 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM



Espectro 15. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).

11. Anexo B. ESPECTROS

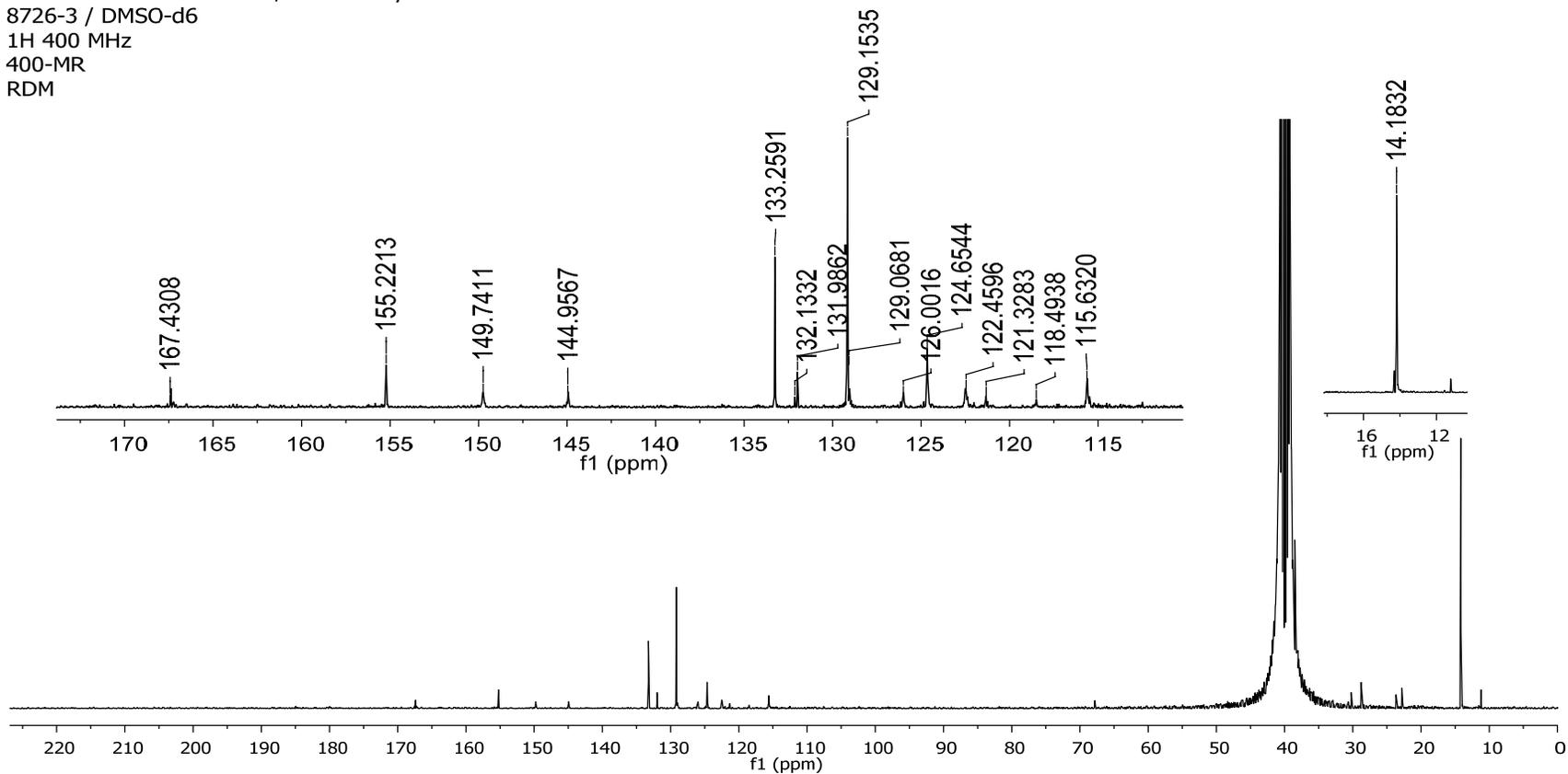


Espectro 16. RMN ¹H, Intercambio con D₂O (DMSO-d⁶, 400 MHz, δ ppm) de N-[6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1H-benzimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (**B1-21**)

11. Anexo B. ESPECTROS

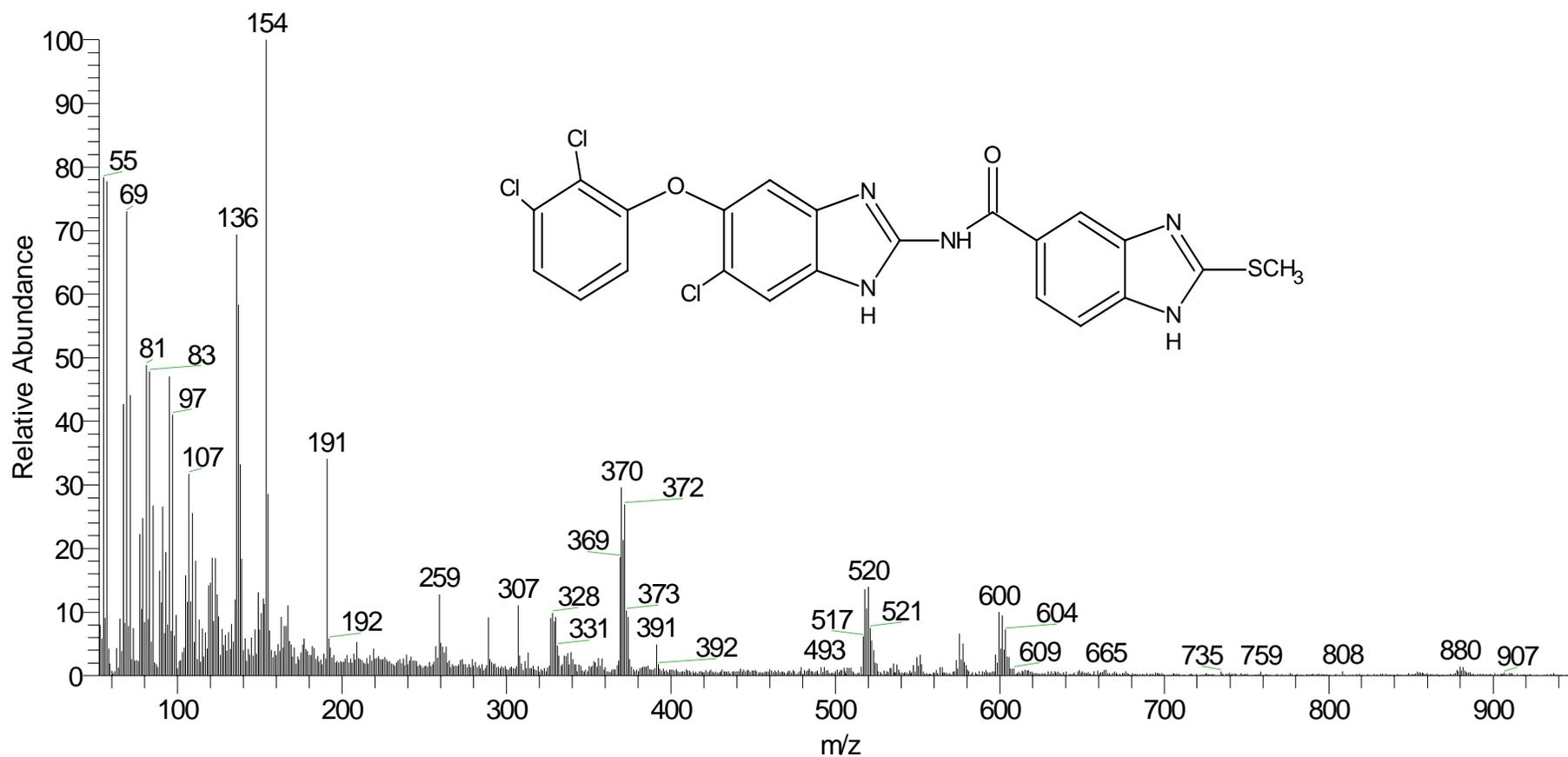
(3) 10821-13C_8726-3
10821

USAI-UNAM
04/NOVIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise Reyes
8726-3 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM



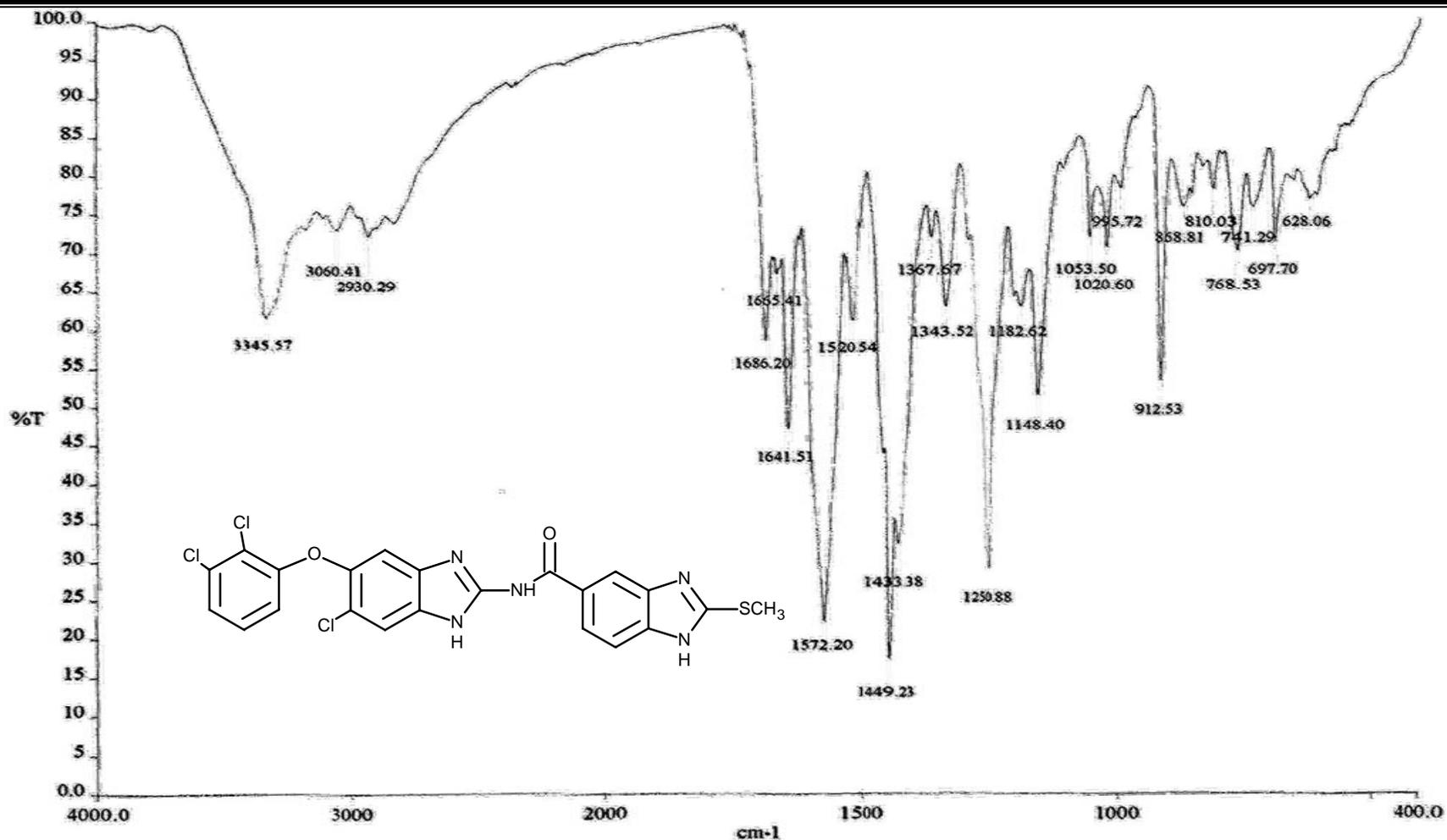
Espectro 17. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).

11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 18. EM (FAB⁺) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1*H*-benzimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).

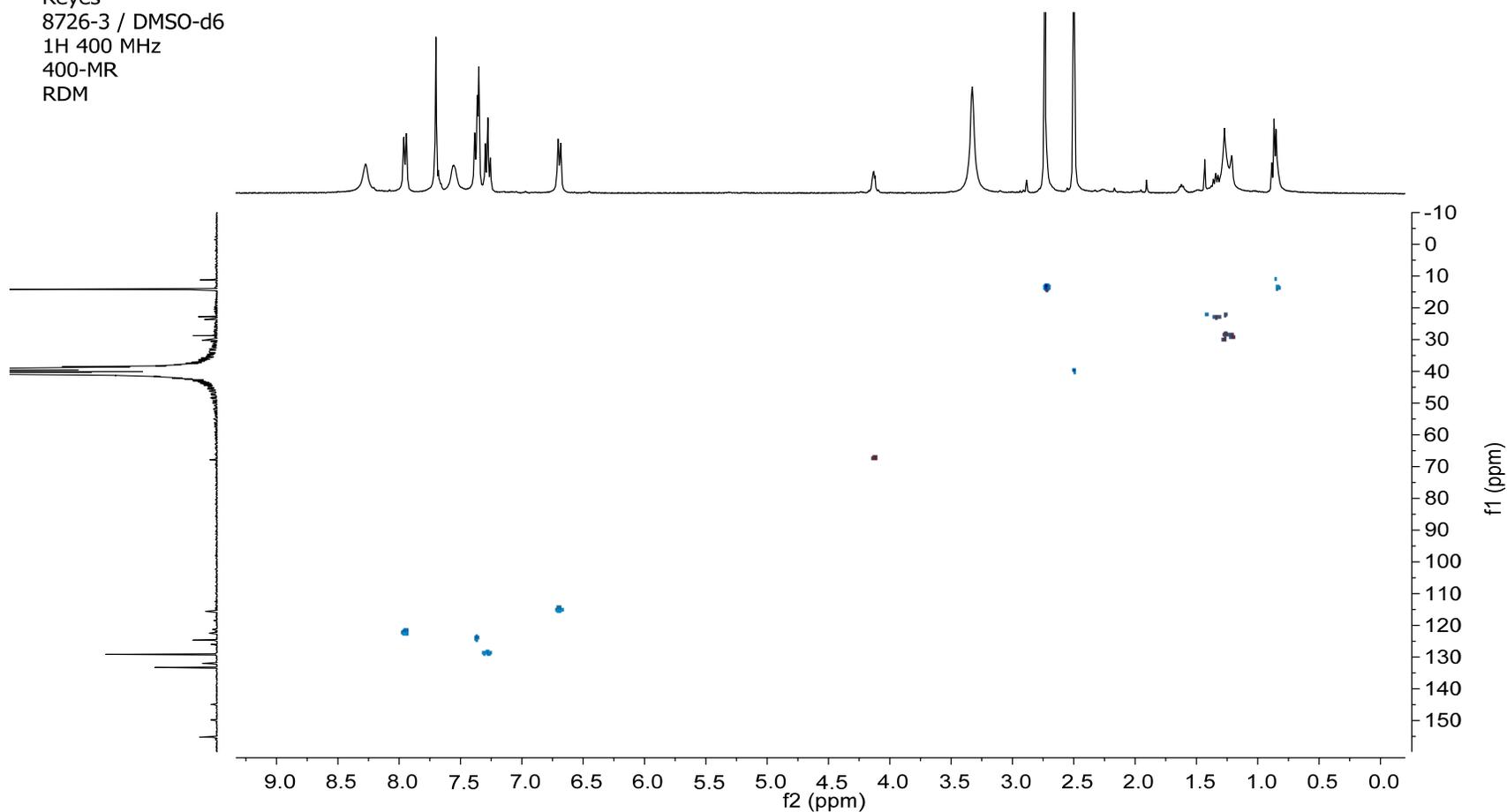
11. Anexo B. ESPECTROS



Espectro 19. IR (Pastilla KBr) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (B1-21).

11. Anexo B. ESPECTROS

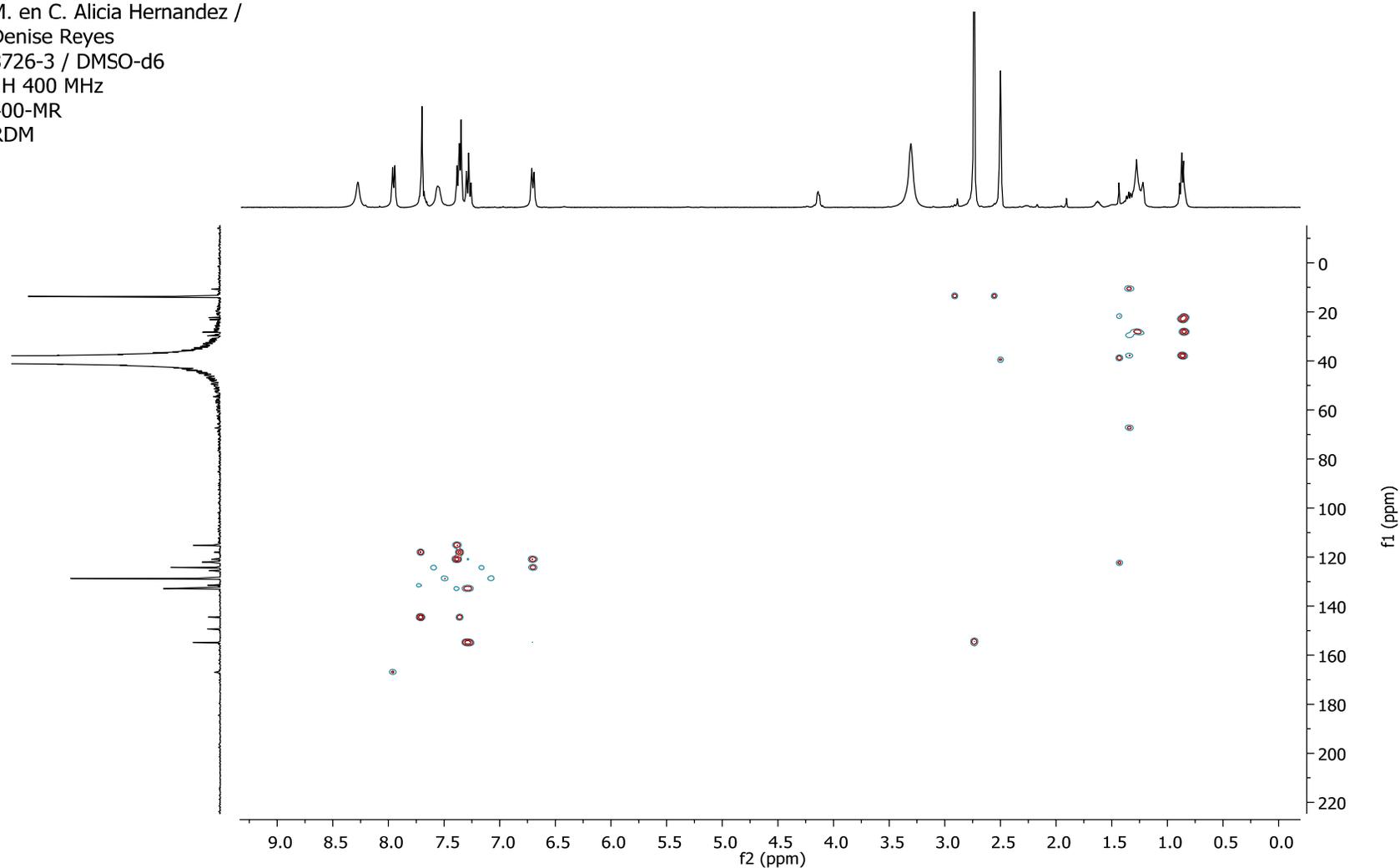
USAI-UNAM
04/NOVIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise
Reyes
8726-3 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM



Espectro 20. Espectro HSQC (^{13}C - ^1H , DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).

11. Anexo B. ESPECTROS

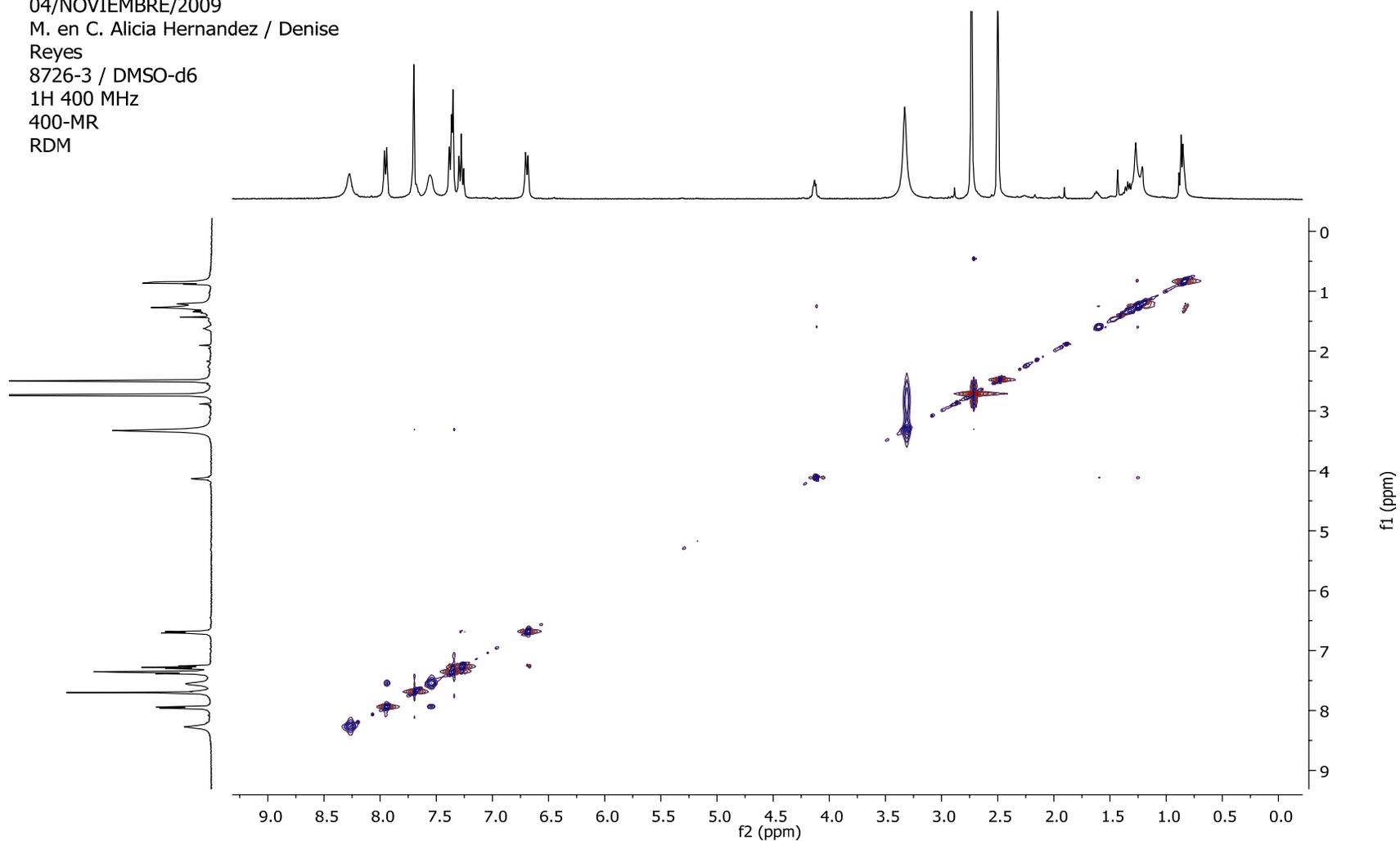
USAI-UNAM
04/NOVIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez /
Denise Reyes
8726-3 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM



Espectro 21. Espectro HMBC (^{13}C - ^1H , DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).

11. Anexo B. ESPECTROS

USAI-UNAM
04/NOVIEMBRE/2009
M. en C. Alicia Hernandez / Denise
Reyes
8726-3 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-MR
RDM



Espectro 22. Espectro NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$, DMSO-d6) de *N*-[6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]-2-(metiltiol)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**B1-21**).