



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“SÍNTESIS DE DERIVADOS DE CARBENDAZIM Y NICOTINAMIDA COMO
COMPUESTOS DE ACCIÓN ANTIPARASITARIA”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. SILVIA PATRICIA MELCHOR DONCEL DE LA TORRE



TUTOR: Dr. Francisco Hernández Luis

AÑO: 2011



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	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal	M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario	Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 122, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis.

AGRADECIMIENTOS:

A la UNAM y la Facultad de Química.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por tener la paciencia ante mis dudas y por escuchar atentamente los problemas que a lo largo de esta Tesis surgieron. Y su gran apoyo.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por compartir su experiencia y consejos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría. No de Becario: 235581

A los miembros del jurado por la oportuna revisión y observaciones del presente escrito.

A todo el personal de la USAI por la realización de los espectros de los compuestos sintetizados Margarita Guzmán, Georgina Duarte, Marisela Gutiérrez, Rosa I. del Villar, Nuria Esturau, Nayeli López y Víctor Lemus.

A la Dra. Francisca Palomares Alonso y el Q.F.B Victorino Juárez por la realización de las pruebas biológicas en el modelo *in vitro* de *T. crassiceps*.

Al Dr. Benjamin Nogueta Torres y Q.B.P. Rocío Nieto por la realización de las pruebas biológicas en el modelo *in vivo* de *H. diminuta* y los ensayos de citotoxicidad.

A Rodrigo Aguayo Ortiz por la realización de la parte computacional y por su valiosa amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 122 (Laura, Norma A., Norma B., Miguel, Pedro, Berenice, Irene, Carlos, Antonio, Yareli y Oscar) por el apoyo y consejos durante la realización de este trabajo pero principalmente por brindarme su amistad. En especial al M. en C. Israel Velázquez Martínez, al M. en C. Eduardo Hernández Vázquez y al M. en C. Cesar Mendoza Martínez por instruirme en el apasionante mundo de la síntesis orgánica y sus significativas aportaciones al presente trabajo.

*Dedico este trabajo a mis padres (Esther y Abel), mis hermanos (Gabriela y Abel)
y mi familia (Dolores, Eunice y Roberto).*

ABREVIATURAS

ABZ	albendazol
SNC	Sistema Nervioso Central
NCC	Neurocisticercosis
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
R _f	Factor de retención
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
EM	Espectrometría de Masas
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
EM(FAB)	Espectrometría de Masas (Técnica de FAB , iones positivos)
HR-EMFAB	FAB de alta resolución
CDI	<i>N,N'</i> -carbonildiimidazol
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
MeOH	metanol
CH ₃ COOH	ácido acético
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
CH ₃ ONa	metóxido de sodio
ccf	cromatografía en capa fina
DMSO	dimetil sulfóxido
<i>N</i> -BOC	<i>ter</i> -butoxicarbonilo
CF ₃ COOH	ácido trifluoroacético
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
CH ₃ CN	acetonitrilo
NaOH	hidróxido de sodio
MEM	Medio mínimo
MTT	Método del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
EPG	huevos por gramo de heces
MM	Masa molecular
DCC	<i>N,N'</i> -diclohexilcarbodiimida
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

CC ₅₀	Concentración que produce la citotoxicidad del 50% de las células
CE ₅₀	Concentración efectiva para matar el 50% de los parásitos

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la síntesis y evaluación biológica de diez moléculas híbridas. La elucidación estructural se realizó por espectroscopía de infrarrojo (técnica de ATR), espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , y espectrometría de masas (técnica de FAB).

La primera serie de compuestos (**1–5**) tiene como núcleo base la nicotinamida; ésta ha demostrado ser un inhibidor de la familia de proteínas SIR2, las cuales regulan diversos procesos celulares esenciales para la sobrevivencia de algunos parásitos de importancia médica. Los híbridos se diseñaron con la finalidad de obtener información sobre la posible actividad antihelmíntica de dichos derivados. Los rendimientos obtenidos en la síntesis de los compuestos del **1–5** abarcaron un rango de 64 al 84%. Aunque no mostraron actividad antihelmíntica al evaluarse en el modelo experimental *in vivo* de *Hymenolepis diminuta*; éstos derivados no mostraron alteraciones en la viabilidad de células de mamíferos VERO.

La segunda serie comprende cinco moléculas híbridas (**6–10**), las cuales contienen como núcleo base el carbendazim presente en el albendazol. Los rendimientos obtenidos fueron del 45 al 65%. Los compuestos **6–8** se evaluaron en el modelo experimental de *Taenia crassiceps*, alterno a *Taenia solium*. Los resultados indicaron que el compuesto **7** presentó una actividad comparable a la del sulfóxido del albendazol, lo cual lo convierte en un candidato para la realización de estudios biofarmacéuticos. Además con la finalidad de explicar los resultados de la actividad biológica se realizó un estudio de acoplamiento molecular donde se observó que los derivados del carbendazim, excepto el **10**, presentaron una conformación estructural similar a la del sulfóxido de albendazol en el sitio de unión de la β - tubulina del parásito, preparada por homología.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Cisticercosis en el humano.....	2
2.1.1. Ciclo de vida.....	3
2.1.2. Patogenia y cuadro clínico.....	5
2.1.3. Tratamiento.....	7
2.2. Bencimidazoles como agentes antihelmínticos.....	9
2.3. La nicotinamida como agente antiparasitario.....	11
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
6. METODOLOGÍA	16
6.1. Parte Química.....	16
6.1.1. Síntesis general de derivados de la nicotinamida.....	16
6.1.1.1. Síntesis de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1), de <i>N</i> -(4-nitrobencil)piridina-3-carboxamida (2) y la <i>N'</i> -(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).....	16
6.1.1.2. Síntesis de <i>N'</i> -[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4) y de <i>N'</i> -[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).....	17
6.1.2. Síntesis general de derivados del carbendazim.....	18
6.1.2.1. Síntesis del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).....	18
6.1.2.2. Síntesis de {5-[(4-nitrobencil)carbamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (7).....	19
6.1.2.3. Síntesis de (5-{[2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil}-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (8) y [5-{[2-[(5-nitro-2-furil)metileno]hidrazino]carbonil}-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (9).....	21
6.1.2.4. Síntesis de {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]bencil}carbamoil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).....	23
6.2. Evaluación Biológica.....	24
6.2.1. Derivados de la Nicotinamida.....	24
6.2.1.1. Citotoxicidad en células de mamífero.....	24
6.2.1.2. Determinación de la actividad cestocida <i>in vivo</i>	24
6.2.2. Derivados del carbendazim.....	25
6.2.2.1. Evaluación de la <i>in vitro</i> de la actividad cisticida.....	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1. Parte Química.....	26
7.1.1. Consideraciones para el diseño de los híbridos.....	33
7.1.2. Síntesis de los híbridos.....	35
7.1.2.1. Derivados de la nicotinamida.....	35
7.1.2.2. Derivados del carbendazim.....	37
7.1.3. Caracterización de los compuestos.....	43
7.1.3.1. Derivados de la nicotinamida.....	43
7.1.3.1.1. Espectroscopía de Infrarrojo.....	43

7.1.3.1.2. Espectrometría de Masas.....	44
7.1.3.1.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	44
7.1.3.2. Derivados del carbendazim.....	48
7.1.3.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo.....	48
7.1.3.2.2. Espectrometría de Masas y Análisis Elemental.....	49
7.1.3.2.3. Resonancia Magnética Nuclear.....	49
7.2. Evaluación Biológica.....	51
7.2.1. Derivados de la nicotinamida.....	51
7.2.1.1. Citotoxicidad en células de mamífero.....	51
7.2.1.2. Determinación de la actividad cestocida <i>in vivo</i>	52
7.2.2. Derivados del carbendazim.....	53
7.2.2.1. Evaluación de la actividad cisticida <i>in vivo</i>	53
7.3. Acoplamiento molecular de derivados del carbendazim.....	55
8. CONCLUSIONES	60
9. PERSPECTIVAS	61
10. REFERENCIAS	62
APÉNDICE 1. Parte Experimental.....	66
APÉNDICE 2. Espectros.....	87

1. INTRODUCCIÓN

Los parásitos constituyen una de las mayores causas productoras de enfermedades que afectan al hombre. Sus efectos provocan elevados índices de morbilidad y mortalidad, además conllevan a pérdidas económicas que comprometen al paciente, a su entorno familiar y a la comunidad en la cual está inserto. Como grupos, los parásitos se dividen en organismos unicelulares (protozoarios) y pluricelulares (helmintos). Una de las parasitosis ocasionadas por helmintos es la neurocisticercosis, donde el agente causal es el céstodo *Taenia solium*. Esta afección provoca con frecuencia discapacidad física y en ocasiones la muerte. Solamente se disponen de dos fármacos para combatirla: el praziquantel y el albendazol (ABZ), ambos introducidos en la terapéutica clínica hace más de 15 años; estos fármacos presentan un metabolismo extenso de primer paso que provoca una respuesta terapéutica variable en los pacientes. Adicionalmente, el ABZ, el cual es un derivado del carbendazim, es insoluble en agua, característica que limita su biodisponibilidad y formulación parenteral. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos eficaces, más resistentes al metabolismo y seguros para el tratamiento de esta enfermedad.

En éste ámbito, recientes investigaciones revelaron que una proteína llamada SIR2 (Silent Information Regulation 2) es indispensable para la sobrevivencia de protozoarios patógenos; además, se piensa que están presentes en los helmintos aunque en la actualidad no se han podido aislar en estos organismos. Por lo anterior, las SIR2 son consideradas un blanco terapéutico potencial. Algunos protozoarios donde la SIR2 ha sido aislada son *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* y *Trypanosoma spp.* Un inhibidor débil de SIR2 es la nicotinamida, por lo que puede ser considerado como una molécula prototipo en la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios.

Con el propósito de contar con moléculas antihelmínticas, particularmente cisticidas, en este trabajo se trató de aprovechar que el núcleo del carbendazim que está presente en algunos antiparasitarios, como el ABZ, y la nicotinamida como inhibidor de SIR2, para preparar derivados de estas estructuras prototipo.

Los compuestos obtenidos se caracterizaron estructuralmente por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los derivados del carbendazim se evaluaron contra *Taenia crassiceps* (modelo alterno a *T. solium*) y los derivados de nicotinamida contra el cestodo *Hymenolepis diminuta*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cisticercosis en el ser humano

El agente causal de la cisticercosis humana es el metacéstodo o cisticerco de la *Taenia solium* y puede afectar a diferentes tejidos del organismo. El cisticerco es una forma intermedia o larvaria en el desarrollo de este parásito. Puesto que el humano es el único huésped definitivo natural de la *T. solium*, la prevalencia de la cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales, en particular con el cerdo (principal huésped intermediario).¹

Cuando el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central (SNC) ocasiona la enfermedad llamada neurocisticercosis, cuyas manifestaciones clínicas dependen del número de parásitos y de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped. Por otro lado, cuando el cisticerco se ubica en otras partes del organismo (extraneurológica) generalmente no provoca síntoma alguno. La cisticercosis extraneurológica parece ser más recurrente en África y Asia, mientras que la forma neurológica abunda en América Latina.²

La cisticercosis es, por su frecuencia y gravedad, uno de los principales problemas de salud pública que enfrentan los países en desarrollo como México, donde se estima que el 3% de la población la padece y el 1 % muere por esta causa. La *Taenia* se encuentra distribuida prácticamente en todo el territorio nacional (Figura 1), sus niveles más altos se localizan en la zona del Bajío, el sureste y la Ciudad de México.^{2,3}



Figura 1. Distribución geográfica de la cisticercosis en México.

2.1.1. Ciclo de vida

La *T. solium* o solitaria habita únicamente en el intestino delgado del ser humano. Está constituida por un escólex o cabeza, que en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos. El conjunto de proglótidos más cercanos al cuello son jóvenes e indiferenciados. A su vez, los más distantes están totalmente diferenciados y contienen una gran cantidad de huevecillos (aproximadamente 50000), por lo que se dice que se encuentran grávidos. Los proglótidos grávidos, desprendidos espontáneamente por el gusano adulto, son evacuados hacia el exterior en las heces del huésped. La primera expulsión de proglótidos de la *T. solium* generalmente ocurre de dos a tres meses después de la infección.⁴

La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevos de *T. solium* (Figura 2) y es propiciada por una higiene deficiente como: personal, en la preparación de los alimentos, en el mal manejo de las excretas humanas y en particular, por la convivencia con un portador del gusano adulto. Una vez en el tubo digestivo del huésped, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación del embrión (también llamado oncoesfera) contenido en el huevecillo. Los embriones activados penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético, corazón, cerebro, ojos, etc.). Aunque se desconocen muchos eventos que ocurren después de la penetración de los embriones, lo que sí se sabe es que se requiere de cuando menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco y que este puede sobrevivir por varios años en los tejidos.^{5,6}

Cuando el ser humano ingiere cisticercos vivos presentes en la carne cruda o insuficientemente cocida. Nuevamente las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares del huésped, participan en la activación del cisticerco induciendo la envaginación del escólex y la fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos.³

Aunque el cerdo es el principal huésped intermediario de la *T. solium*, algunas otras especies, incluyendo al hombre, también pueden alojar cisticercos.⁷

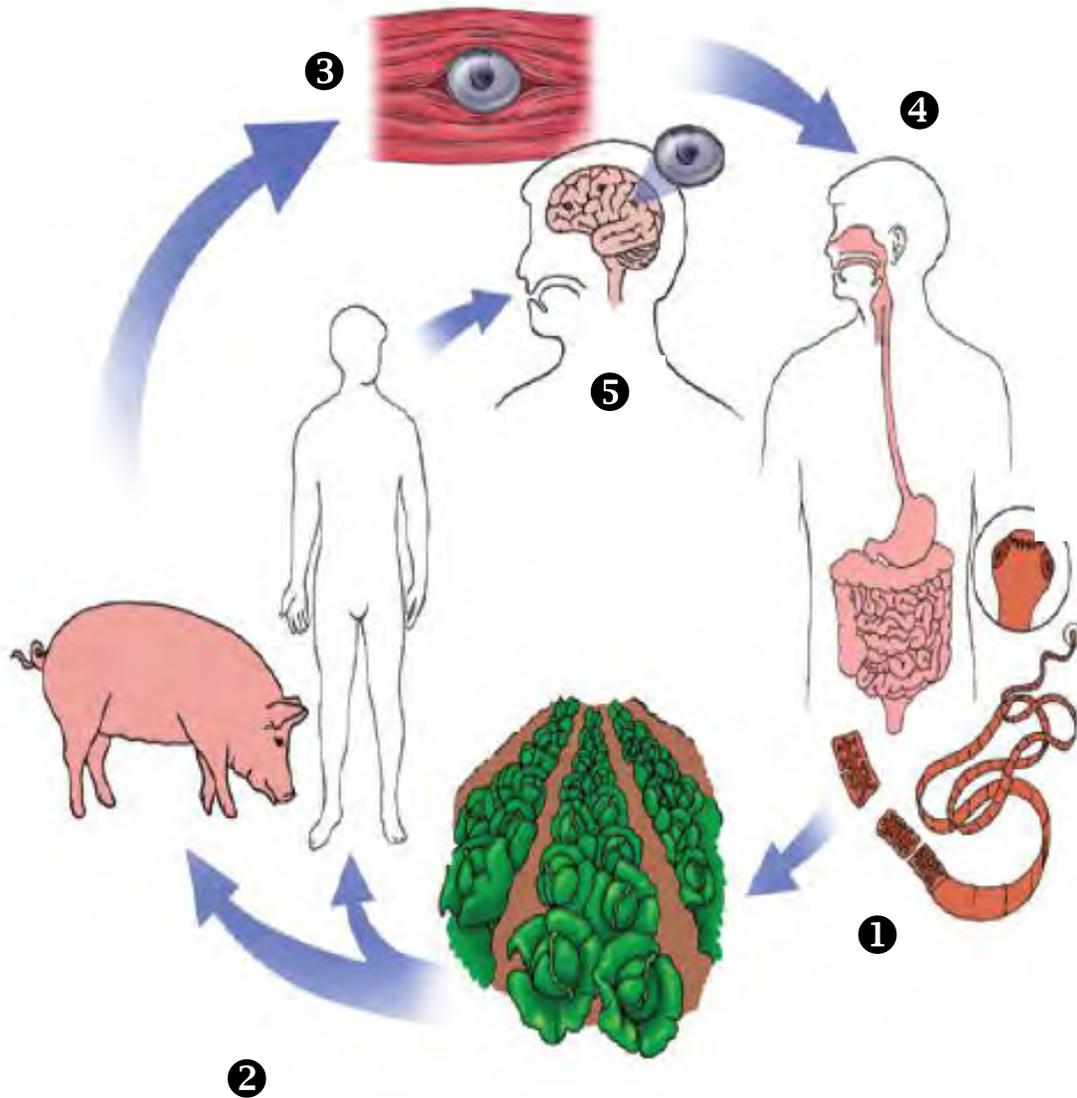


Figura 2. Ciclo de vida de la *T. solium*. En su estado adulto ❶, el parásito habita en el intestino delgado, infección conocida como teniasis. La tenia produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal. ❷ El cerdo y el humano se infectan al ingerir agua o comida contaminada donde hay huevos, o por autoinfección. ❸ Cada huevo tiene el potencial de convertirse en un cisticerco, forma larvaria del parásito. ❹ El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos. Estos últimos se fijan a las paredes del intestino humano donde maduran hasta convertirse en gusano adultos ❶. En el humano, los cisticercos pueden alojarse en tejidos como el cerebro (neurocisticercosis) ❺.¹

2.1.2. Patogenia y cuadro clínico de la cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad pleomórfica. Dicha característica se debe a diferencias individuales en el número y localización de los parásitos, así como a la amplia variación que existe en la respuesta inmune del huésped frente al parásito. La forma larvaria del parásito se localiza en el tejido subcutáneo, músculo esquelético, cerebro, médula espinal y ojos. El cerebro es la localización más frecuente de los cisticercos (60-90%). Esta predisposición particular por afectar el sistema nervioso origina una enfermedad denominada neurocisticercosis (NCC). Por esta razón así como por sus implicaciones en términos de morbilidad y mortalidad nos enfocaremos en este apartado a la NCC.

Una vez que los cisticercos entran en el sistema nervioso, estos se encuentran en un estado denominado vesicular, en el que los parásitos son viables y desencadenan cambios inflamatorios mínimos en el tejido cerebral adyacente. En algunos casos los cisticercos permanecen durante décadas en este estadio ya que sus mecanismos evasores evitan que el sistema inmune los destruya. Sin embargo, en otros casos los cisticercos entran, como resultado de un complejo ataque inmunológico del huésped, en un proceso degenerativo que termina con la muerte del parásito. Los estadios por los que atraviesan los cisticercos hasta su destrucción comprenden: estadio coloidal (Figura 3), estadio granular y estadio calcificado.⁸



Figura 3. Cisticercos en etapa coloidal.

La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente de la NCC, observándola en el 50% a 80% de los casos. La mayoría de estos enfermos tienen un examen neurológico normal y presentan crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas; por lo tanto, la práctica de estudios de neuroimagen es de fundamental importancia para confirmar o descartar la sospecha clínica de NCC.

Se ha descrito una gran variedad de signos, los más frecuentes incluyen déficit motor, ataxia cerebelosa y movimientos involuntarios. Estas manifestaciones usualmente siguen

un curso progresivo, por lo que es difícil el diagnóstico diferencial con neoplasias u otros procesos infecciosos del sistema nervioso central. En algunos casos los signos aparecen en forma súbita, especialmente cuando se relacionan con infartos cerebrales secundarios a angéitís cisticercosa.

Algunos enfermos presentan evidencia clínica de hipertensión endocraneal, la cual puede o no asociarse con crisis convulsivas, con signos focales o con alteraciones mentales. La causa más frecuente de este síndrome es la hidrocefalia. En la mayoría de los casos la hipertensión endocraneal sigue un curso lento y progresivo, el cual puede interrumpirse por episodios súbitos de pérdida de conciencia relacionados con movimientos de cabeza (síndrome de Bruns).

La encefalitis cisticercosa es una forma particularmente grave de la NCC que ocurre como resultado de la infección masiva de cisticercos con la subsecuente e intensa reacción inflamatoria del huésped. La encefalitis es más frecuente en niños y mujeres y se caracteriza por el deterioro de la consciencia, disminución de la agudeza visual, cefalea, vómito y papiledema.³

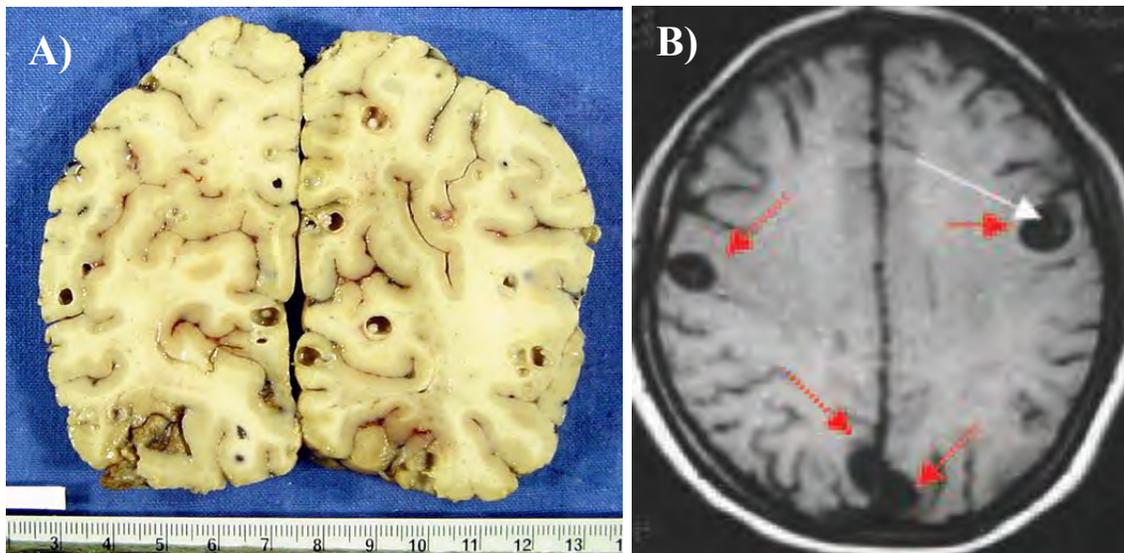


Figura 4. A) Corte de cerebro donde se muestran cisticercosis en los lóbulos parietales. B) Imagen por resonancia magnética de un paciente con NCC demostrando múltiples cisticercos dentro del cerebro (flechas rojas).

2.1.3. Tratamiento

Puesto que la cisticercosis se caracteriza por su gran heterogeneidad, su tratamiento debe ser individualizado tomando en cuenta la viabilidad, número, localización y tamaño de los parásitos, la intensidad de la reacción inflamatoria asociada y el estado clínico del paciente. Dos fármacos son actualmente utilizados: el praziquantel y el albendazol.

El praziquantel (Figura 5) es un derivado pirazinoisoquinolínico que fue utilizado por primera vez en 1979. El fármaco aumenta la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} por lo que se incrementa la actividad muscular del parásito, seguida por contracciones y parálisis. Diversos sitios sensibles al praziquantel se han sugerido como posibles blancos, pero el mecanismo molecular preciso aún se muestra esquivo. El praziquantel está contraindicado en la cisticercosis ocular porque la respuesta del huésped origina daño irreversible del ojo.^{9, 10, 11}

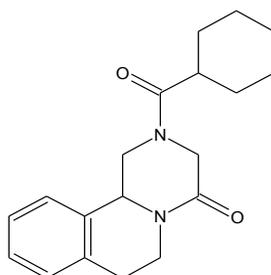


Figura 5. Estructura química del Praziquantel

El [5-(propiltio)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (albendazol) es un derivado del carbendazim que fue utilizado para la NCC por primera vez en 1987. Se utiliza de manera primaria contra diversos nemátodos intestinales y de tejidos, pero también contra las formas larvarias de ciertos céstodos. Hay pruebas de que la acción primaria del albendazol radica en la inhibición de la polimerización de los microtúbulos de la β -tubulina. La toxicidad selectiva de dicho compuesto se debe a que su unión a la β -tubulina del parásito se produce en concentraciones inferiores de las que se necesitan para unirse a otras proteínas de mamíferos.¹²

La absorción del ABZ es variable e irregular; después de ingerido aumenta su absorción por la presencia de alimentos adiposos y posiblemente también por las sales biliares. El fármaco se metaboliza con rapidez en el hígado, y quizá también en el intestino, al

sulfóxido de albendazol el cual tiene potente actividad antihelmíntica. Alrededor del 70% de albendazol está unido a proteínas plasmáticas y tiene una vida media plasmática muy variable, de casi 4 a 15 horas. El sulfóxido del albendazol es más soluble en agua pero presenta problemas de estabilidad química, ya que tiende a oxidarse a la sulfona correspondiente, que es inactiva como antiparasitario. (Figura 6)

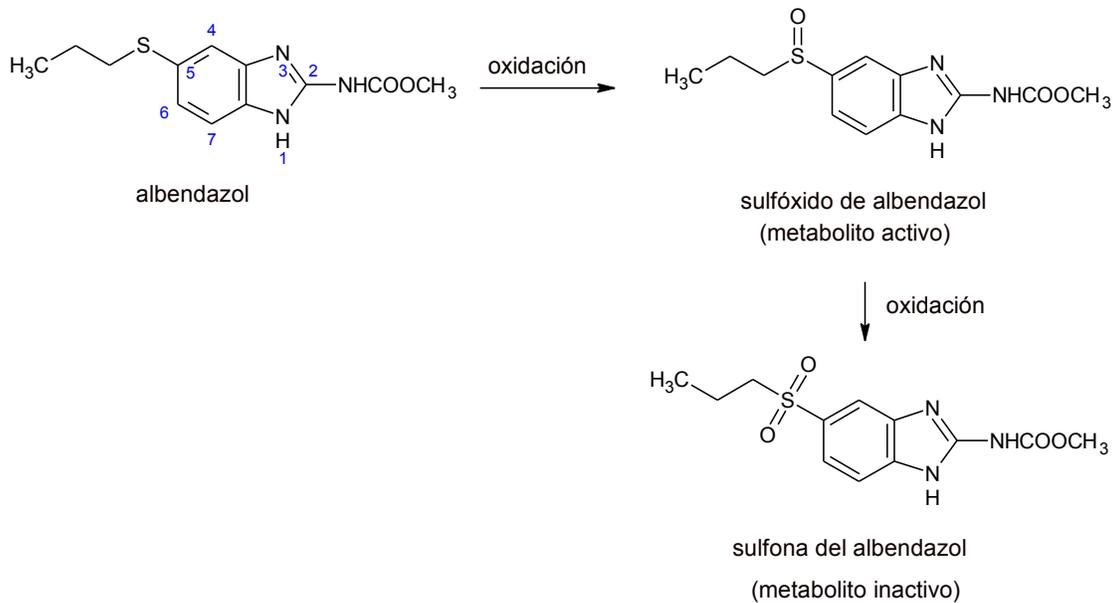


Figura 6. Metabolismo del albendazol

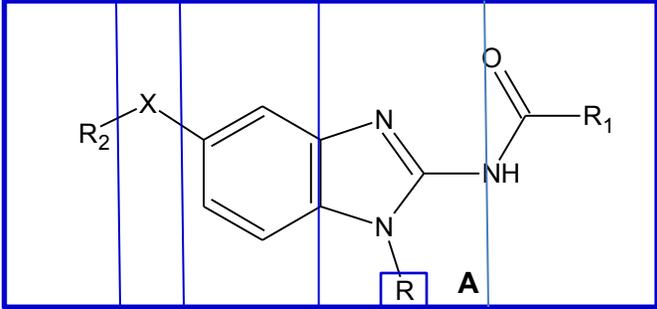
Su dosificación para la cisticercosis es de 15mg/kg de peso, durante 30 días consecutivos. El albendazol ocasiona pocos efectos adversos si se utiliza por corto tiempo. Es importante efectuar de manera seriada estudios de función hepática durante la administración de albendazol por largo tiempo. Algunos de los efectos adversos que han sido señalados durante la terapéutica duradera incluyen dolor en el tubo digestivo, cefaleas intensas, fiebre, fatiga, alopecia, leucopenia y trombocitopenia.⁹

2.2. Los derivados del bencimidazol como agentes antihelmínticos

El descubrimiento, hecho por Brown y colaboradores (1961), de que el tiabendazol poseía actividad potente contra nemátodos gastrointestinales, fue el punto de partida para obtener bencimidazoles como antihelmínticos de amplio espectro contra parásitos de interés en la medicina humana y veterinaria. Dentro de este grupo se encuentran los derivados de carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo) que se han utilizado principalmente como antihelmínticos: albendazol, flubendazol, mebendazol, oxibendazol, y fenbendazol. Entre los cientos de derivado probados, los que presentan mayor actividad terapéutica son aquellos que tienen modificaciones en las posiciones 2 y 5 del anillo de bencimidazol.^{13,14}

Por las razones expuestas anteriormente, en este trabajo se tomó la porción 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo como una estructura prototipo en la búsqueda de agentes cisticidas de mayor potencia. Los compuestos preparados se diseñaron considerando los requerimientos estructurales mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Requerimientos estructurales de los bencimidazoles para mostrar actividad antihelmíntica.¹⁵

		
Sito	Cambio estructurales realizados	Comentarios
A	R= H, Me, COR, Ar, CH ₂ OAr, (CH ₂) _n -R, etc.	Aparentemente la presencia de H es esencial
B	R ₁ = OMe, OEt, Me, Et, NRR'.	Actividad moderada puede obtenerse con derivados de acilo y ureas. La actividad óptima se logra en compuestos donde R ₁ = OMe
C	La sustitución de uno de los nitrógenos por átomos como O, S o CH.	La presencia del grupo guanidino es esencial para la actividad antihelmíntica. La sustitución de los nitrógenos por oxígeno o azufre produce compuestos con una actividad débil y reducida.
D	Inserción de un nitrógeno en el anillo de benceno	Actividad antihelmíntica débil
E	X=O, S, SO, SO ₂ , CO, CONH, NHCO, CH ₂ ,	En general los bencimidazoles donde X=OCO, S, SO, o CONH muestran una actividad elevada; sin embargo la actividad óptima se logra con compuestos que tienen X=O, CO.
F	R ₂ = alquilo, cicloalquilo, alqueno, arilo y heteroarilo	Los cambios estructurales del sitio F son cruciales para determinar el perfil de actividad de los bencimidazoles.

2.3. La nicotinamida como agente antiparasitario.

Investigaciones recientes revelaron que en los organismos eucariotes, el gen denominado SIR2 (*Silent Information Regulator 2*) es considerado como un regulador de la longevidad. Por lo que sus productos protéicos dieron lugar a investigaciones intensivas.¹⁶

Un miembro de esta familia de proteínas fue identificado por primera vez en 1996 en *Leishmania major*. Resultó interesante descubrir en estudios *in vitro* que al obligar al parásito a expresar un mínimo de proteína SIR2, era incapaz de *proliferar* en el macrófago y fue progresivamente eliminado durante una infección experimental en ratón. Por lo tanto, esta proteína SIR2 podría, en lo sucesivo, ser considerada como un nuevo blanco terapéutico potencial. Con el fin de apoyar esta hipótesis, los científicos sometieron a prueba la acción de inhibidores de las proteínas de la familia SIR2, como la nicotinamida, la cual presentó actividad leishmanicida en el estadio parasitario presente en el hospedero vertebrado.^{17, 18} Además de la leishmania, se sabe que el protozooario *Plasmodium spp* también posee proteínas de la familia SIR2.¹⁹

Por lo anterior, en nuestro grupo de trabajo se sintetizaron varios derivados de nicotinamida, tres de los cuales mostraron una CI_{50} menor a 10 μ M contra *Plasmodium berghei* (Figura 7).²⁰

Con la intención de generar un mayor conocimiento sobre los requerimientos estructurales para la actividad biológica de los derivados de nicotinamida, los híbridos sintetizados se evaluarán en un modelo experimental de *Hymenolepis diminuta*, con la finalidad de observar si la asociación de la nicotinamida con otras moléculas puede aumentar el espectro de actividad antiparasitaria, actualmente restringida a protozoarios.

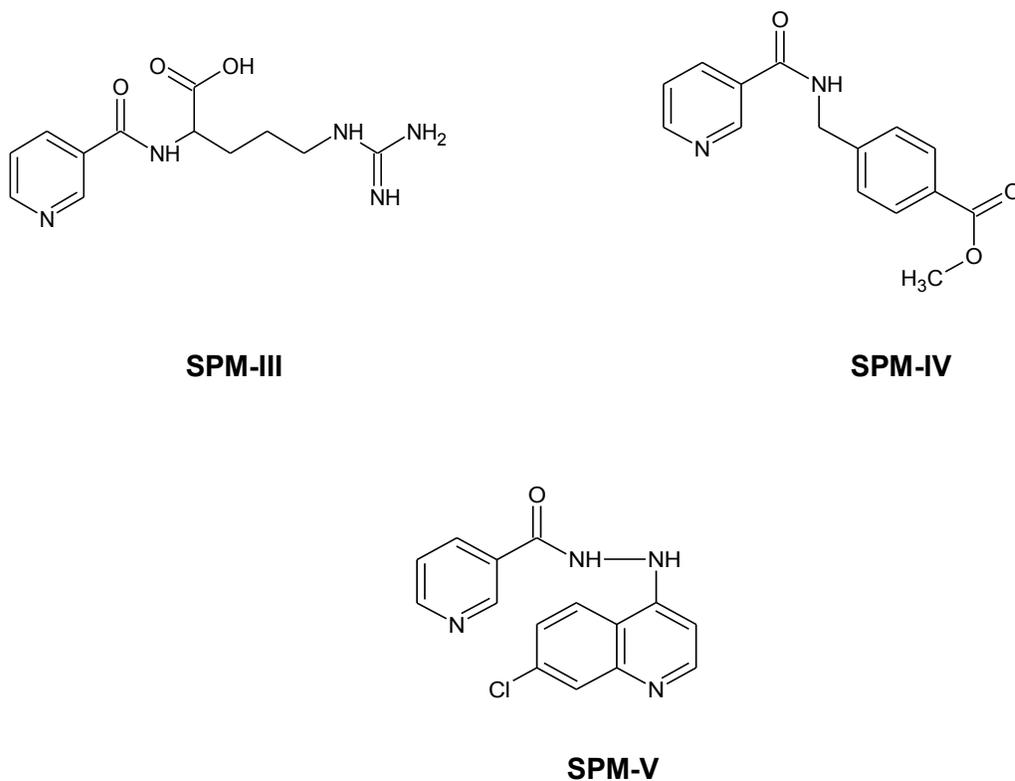


Figura 7. Nuevos derivados de nicotinamida; **SPM-III:** ácido 5-carbamimidamido-2[(piridin-3-ilcarbonil)amino]pentanoico, **SPM IV:** 4-[[[(piridin-3-ilcarbonil)amino]metil]benzoato de metilo, **SPM V:** *N'*-(7-cloroquinolin-4-il)nicotinohidrazida.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cisticercosis es un problema de salud pública en nuestro país; es prevalente, costosa y en algunos casos incapacitante. En la actualidad sólo se cuentan con el albendazol y el praziquantel para el tratamiento, los cuales manifiestan problemas de eficacia porque presentan metabolismo extenso de primer paso; y adicionalmente, uno de ellos (ABZ) tiene baja solubilidad acuosa que limita su biodisponibilidad y formulación. Por lo anterior, es importante realizar trabajos de búsqueda de nuevos antihelmínticos con perspectivas de mejores propiedades que favorezcan su eficacia. Considerando que la nicotinamida y el carbendazim pueden ser tomadas como estructuras prototipos ¿será posible contar con derivados de estos compuestos que posean actividad antiparasitaria con características estructurales que no propicien un metabolismo extenso de primer paso y una baja solubilidad acuosa?

4. HIPÓTESIS

Si a la nicotinamida o al carbendazim se les unen porciones estructurales de moléculas con actividad antiparasitaria conocida, entonces se obtendrán moléculas antihelmínticas contra los cestodos de *T. crassiceps* y *H. diminuta* con mejores características de solubilidad que el ABZ y con perspectivas estructurales de no sufrir un metabolismo extenso de primer paso.

5. OBJETIVOS

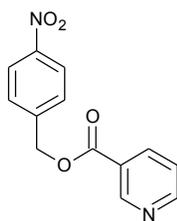
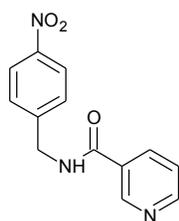
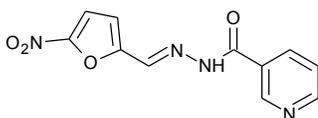
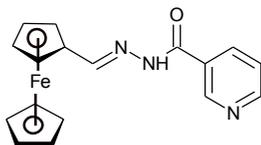
5.1. Objetivo general

Sintetizar derivados del carbendazim y de la nicotinamida con posible actividad antiparasitaria

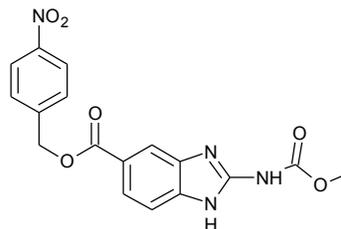
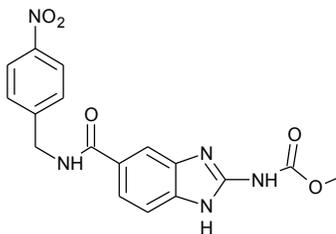
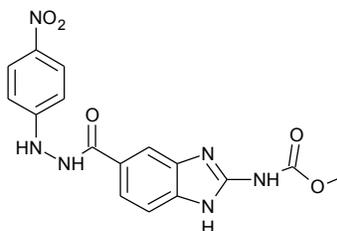
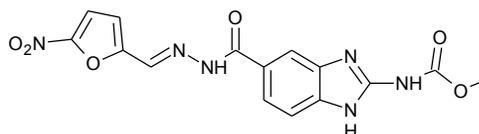
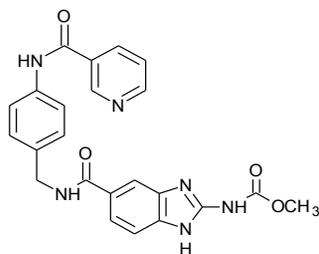
5.2. Objetivos particulares

- Sintetizar cinco derivados de la nicotinamida (Figura 8).
- Sintetizar cinco derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo) (Figura 8).
- Determinar las constantes físicas de los compuestos sintetizados, tales como punto de fusión y R_f .
- Caracterizar estructuralmente los compuestos sintetizados por métodos espectroscópicos (RMN e IR) y espectrométricos (EM-FAB).
- Enviar a evaluación de la actividad antiparasitaria de los derivados de nicotinamida en el modelo *in vivo* de *Hymenolepis diminuta*.
- Enviar a evaluación de la actividad antiparasitaria de los derivados del carbendazim en el modelo *in vitro* de *Taenia crassiceps*

Derivados de nicotinamida

**1****2****3****4****5**

Derivados del carbendazim

**6****7****8****9****10****Figura 8.** Derivados a sintetizar (1–10)

6. METODOLOGÍA.

6.1. Parte Química.

En el siguiente apartado se muestra una breve descripción de los procedimientos experimentales utilizados en la síntesis de los derivados propuestos en los objetivos. Este trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Laboratorio 122 del edificio E, UNAM. Los detalles de cada procedimiento se encuentran en el Apéndice 1.

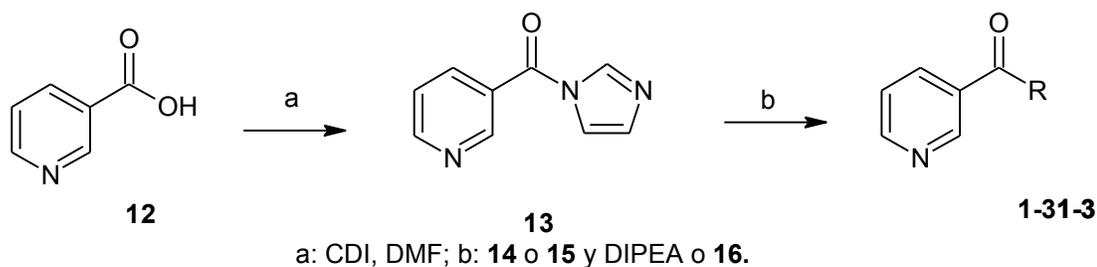
6.1.1. Síntesis general de derivados de la nicotinamida.

6.1.1.1. Síntesis del piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (**1**), *N*-(4-nitrobencil)piridina-3-carboxamida (**2**) y *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (**3**).

La síntesis de los compuestos (**1–3**) se inició con la activación del ácido nicotínico (**12**) con *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente. El producto de reacción fue la 3-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonil)piridina (**13**). Una vez formado el intermediario **13** se adicionó al matraz de reacción la amina o el alcohol correspondiente para obtener la amida o el éster deseado (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos utilizados.

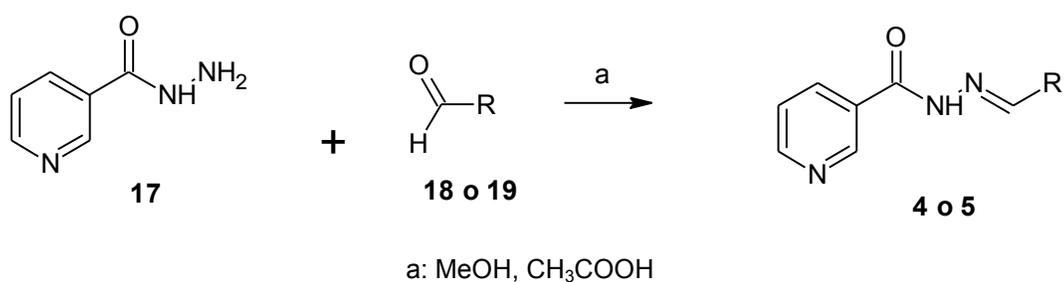
Compuesto	Amina o Alcohol (R)	Producto
14	alcohol 4-nitrobencílico	1
15	clorhidrato de (4-nitrobencil)amina	2
16	(4-nitrofenil)hidrazina	3



Esquema 1. Ruta sintética de derivados de la nicotinamida (**1-3**).²⁰

6.1.1.2. Síntesis de *N'*-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (**4**) y de *N'*-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (**5**).

La condensación de la nicotinohidrazina (**17**) con el aldehído **18** o **19** (Tabla 3) usando como disolvente metanol (MeOH) y catálisis ácida, dio origen al compuesto **4** o **5**.



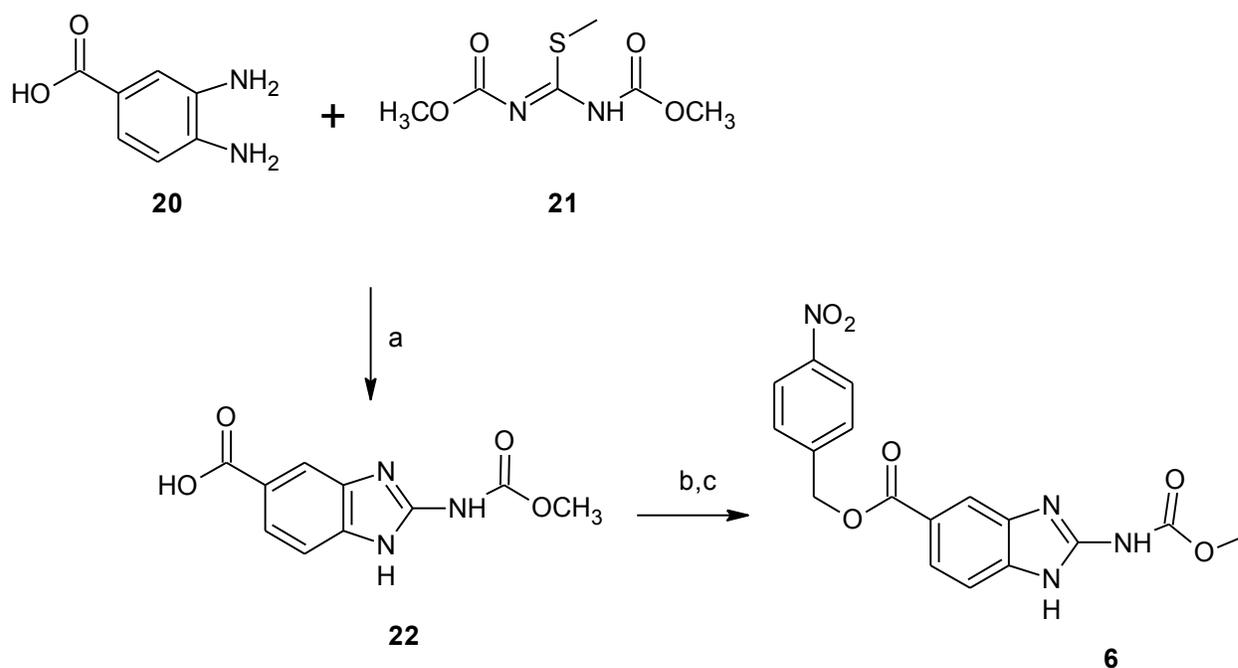
Esquema 2. Ruta sintética de derivados de la nicotinamida (**4-5**).

Tabla 3. Reactivos utilizados

Compuesto	Aldehídos	Producto
18	5-nitro-2-furfuraldehído	4
19	ferrocenocarbaldehído	5

6.1.2. Síntesis general de derivados del carbendazim.**6.1.2.1. Síntesis del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (**6**).**

La síntesis inició con la reacción de ciclocondensación del ácido 3,4-diaminobenzóico (**20**) y la 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metil-isotiourea (**21**), para formar el ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**22**). Posteriormente, en un matraz de dos bocas, adaptado con un condensador de reflujo bajo atmosfera de nitrógeno y agitación magnética, se colocó CDI, el compuesto **22** y DMF anhidra. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 48 h a 65°C. Después se agregó el alcohol 4-nitrobencílico (**14**) y se calentó a 80°C durante 48h adicionales para obtener **6**.²¹

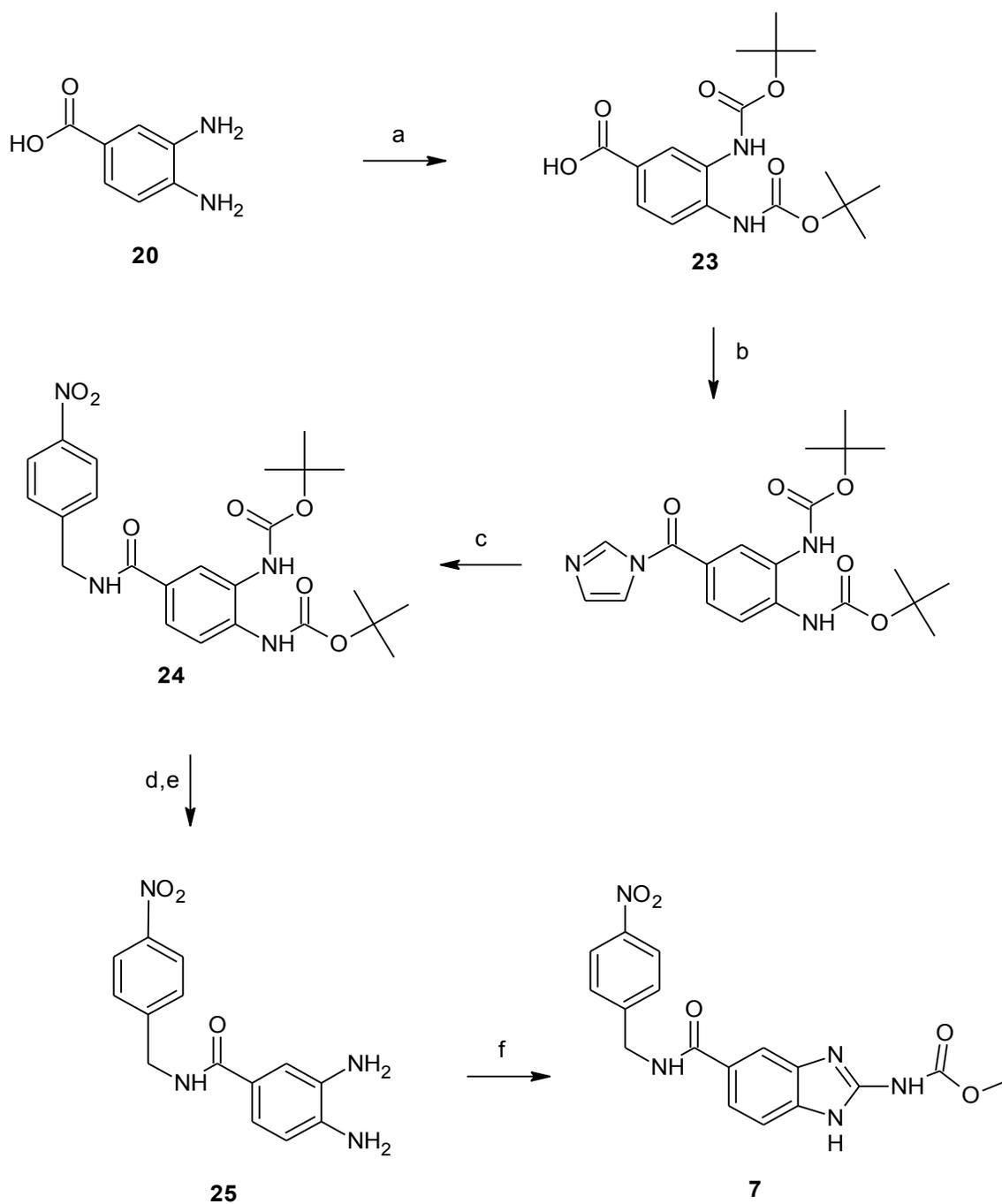


a: **21**, CH₃COOH, MeOH/H₂O ; b: CDI, DMF; c: **14**.

Esquema 3. Ruta sintética del derivado de carbendazim (**6**).

6.1.2.2. Síntesis de {5-[(4-nitrobencil)carbamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**7**).

La síntesis de **7** comenzó con el ácido 3,4-diaminobenzóico (**20**), el cual se hizo reaccionar con el pirocarbonato de di-*ter*-butilo para formar el ácido 3,4-bis[(*ter*-butoxicarbonil)amino]benzóico (**23**). Posteriormente, **23** se activó con CDI, empleando acetonitrilo como disolvente; una vez formado el intermediario [4-(1*H*-imidazol-1-ilcarbonil)-1,2-fenileno]biscarbamato de di-*ter*-butilo, se agregó el clorhidrato de (4-nitrobencil)amina (**15**) y DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) para formar (4-[(4-nitrobencil)amino]carbonil)-1,2-fenileno)biscarbamato de di-*ter*-butilo (**24**). Después se eliminó el grupo protector *N*-BOC con ácido trifluoroacético obteniéndose la 3,4-diamino-*N*-(4-nitrobencil)benzamida (**25**). Finalmente, la reacción de ciclocondensación de **25** con la 1,3-(dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea (**21**) generó **7**.



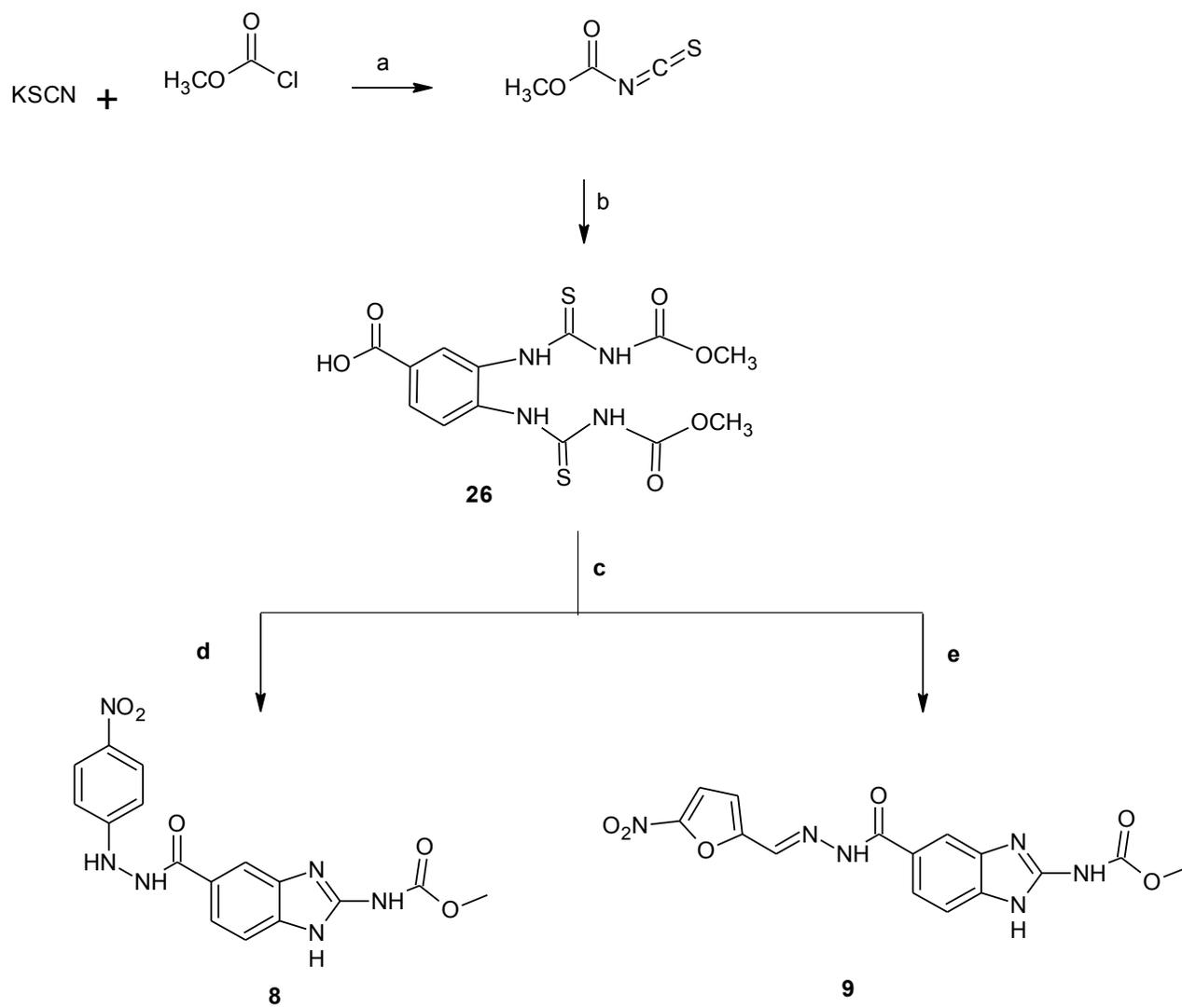
a: pirocarbonato de di-*ter*-butilo, KOH/ H₂O, *ter*butanol; b: CDI, CH₃CN; c: **15**, DIPEA; d: CF₃COOH; e: NaHCO₃; f: 1,3-(dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea (**21**), CH₃COOH, MeOH/H₂O.

Esquema 4. Ruta sintética del derivado de carbendazim **7**.

- 6.1.2.3. Síntesis de (5-{[2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil}-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**8**) y [5-{2-[(5-nitro-2-furil)metileno]hidrazino}carbonil]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**9**).

La preparación de los compuestos **8** y **9** se inicio con la síntesis del compuesto **26**. Para lo cual se formó un intermediario con tiocianato de potasio y cloroformiato de metilo; posteriormente se agregó el ácido 3,4-diaminobenzóico (**20**). La mezcla de reacción fue rápidamente adaptada a un sistema de tres frascos lavadores con hipoclorito de sodio. La suspensión se calentó a reflujo durante 1 hora para obtener **26**.

Después en un matraz de dos bocas, adaptado con un condensador de reflujo bajo atmosfera de nitrógeno y agitación magnética, se colocó CDI, el compuesto **26** y acetonitrilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 h a 60°C. Y finalmente se agregó el compuesto **16** o la hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehído (**30**) y se calentó a reflujo durante 48h adicionales para obtener **8** o **9**.²¹

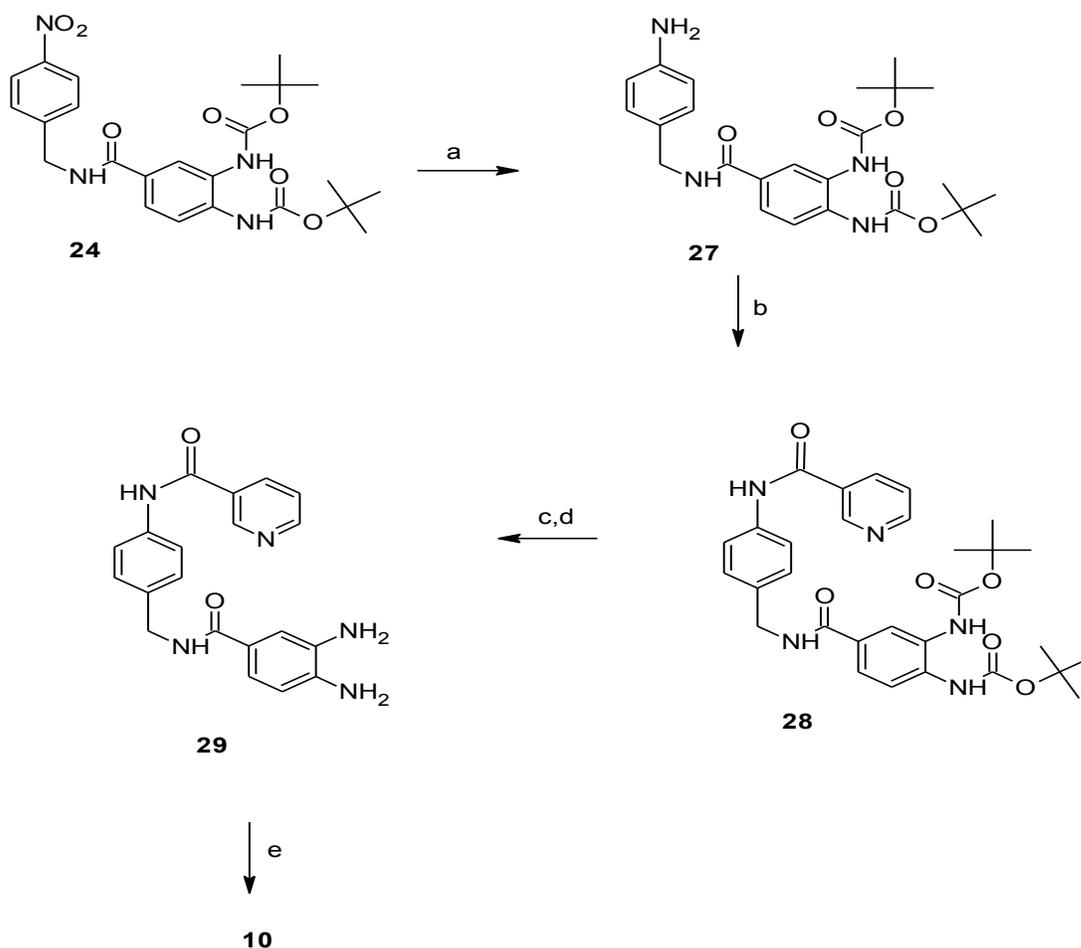


a:CH₃CN; b:20; c:CDI, d:16, DBU; e: hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehído (30), CH₃ONa.

Esquema 5. Ruta sintética de derivados del carbendazim (**8** y **9**).

6.1.2.4. Síntesis de {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]bencil}carbamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**10**).

Para la síntesis de **10** se partió del compuesto **24** el cual se sometió a una reducción catalítica con H₂ y Pd/C al 10% para formar **27**. Posteriormente se acopló el ácido nicotínico con **27** mediante el empleo de CDI para formar el {4-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)aminobencil]carbamoil)-1,2-fenileno}biscarbamato de di-*ter*-butilo (**28**). Después se eliminó el grupo protector *N*-BOC con ácido trifluoroacético para producir **29**. Finalmente, **10** se obtuvo mediante la reacción de ciclocondensación de **29** con la 1,3-(dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea (**21**).



a: H₂, Pd/C 10%, MeOH; b: **12**, CDI, CH₃CN; c: CF₃COOH; d: NaHCO₃; e: **21**, CH₃COOH, MeOH/H₂O.

Esquema 6. Ruta sintética del derivado del carbendazim **10**.

6.2. Evaluación biológica

En este apartado se describe brevemente los procedimientos experimentales correspondientes a la evaluación biológica de los híbridos sintetizados.

6.2.1. Derivados de la nicotinamida (1–5)

Los estudios que a continuación se describen fueron realizados en el Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) bajo la dirección del Dr. Benjamin Noguera Torres.

6.2.1.1. Citotoxicidad en células de mamífero

Se utilizó la línea celular Vero (células renales de mono verde, *Cercopithecus aethiops*), cultivadas en un medio mínimo (MEM al 10% con suero fetal bovino y una mezcla de antibiótico-antimicótico), y una concentración final sulfóxido de dimetilo en el medio de 1%, se incubaron a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa, con diferentes concentraciones de los compuestos y fármacos de referencia como controles. La citotoxicidad se determinó usando el ensayo colorimétrico de MTT.²²

6.2.1.2. Determinación de la actividad cestocida *in vivo* (modelo murino)

Se infectaron ratas albinas con larvas cisticercoides; a partir del día 21 post infección, se examinaron las heces para demostrar que la rata estaba infectada. Los huevos fueron contados por gramo de heces (EPG) y monitoreando a los animales durante 3 días consecutivos.²³

Los animales se dividieron en tres grupos de tres integrantes cada uno (n = 3):

- Grupo control positivo (fármaco de referencia: Nitazoxanida)
- Grupo control negativo (vehículo: polietilenglicol y propilenglicol)
- Grupos problemas (Compuestos a evaluar).

La administración tanto del fármaco de referencia (Nitazoxanida) como de los compuestos experimentales se dio en una dosis de 1 mg/Kg, durante un periodo de tres días. La actividad cestocida se evaluó en EPG.

6.2.2. Derivados del carbendazim (6–8)

Los estudios que a continuación se describen fueron realizados en el Laboratorio Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía a cargo de la Dra. Francisca Palomares Alonso.

6.2.2.1. Evaluación *in vitro* de la actividad cisticida

Se prepararon soluciones con concentraciones molares equivalentes a las concentraciones efectivas 50 y 90 para el sulfóxido de albendazol (SOALB) previamente reportadas contra cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF), las cuales son: 0.28 y 1.7 μM .²⁴ Como control negativo se preparó una solución de DMSO al 0.2 %. Para la evaluación se usaron placas de cultivo de 24 pozos y en cada pozo se colocaron 2 mL de medio de cultivo conteniendo cada molécula a evaluar y 10 cisticercos. Los parásitos se incubaron a 37°C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂ durante once días. Cada tercer día, se cambió el medio de cultivo. La mortalidad se registró cada tercer día utilizando un microscopio de luz invertida. Los criterios de mortalidad fueron: degradación de la membrana, pérdida de fluido quístico y pérdida del movimiento del parásito. El día 12, se realizó la prueba de azul de tripano para confirmar la muerte.^{25, 26}

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Parte Química.

Los resultados generados al realizar la síntesis de los derivados propuestos, así como los procedimientos experimentales para la obtención de estos, se reporta en esta sección. En la Tabla 4 se muestran las propiedades físicas de los compuestos finales obtenidos.

Tabla 4. Propiedades físicas y rendimientos de los compuestos finales.

Compuesto	Aspecto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Factor de retención (Rf)*
1	Sólido blanco	64.2	135.0-135.8	0.71
2	Sólido amarillo	80.5	143.7-144.5	0.58
3	Sólido café	71.9	214.5-215.3	0.38
4	Sólido amarillo	84.3	240.4-241.3	0.61
5	Sólido rojizo	79.3	201.5-202.2	0.83
6	Sólido Blanco	51	247.3-248.0	0.74
7	Sólido café claro	65.4	278.5-278.9	0.66
8	Sólido café	61.3	>300 ^a	0.51
9	Sólido café	30.4	>300 ^a	0.68
10	Sólido café claro	45.7	244.2-245.0	0.68

*Determinado en CHCl₃/MeOH 80:20; ^a funde con descomposición.

En la Tabla 5 se muestran las propiedades físicas de los intermediarios **21- 24, 26 y 30**. Los datos espectroscópicos y espectrométricos se encuentran en el Apéndice 2.

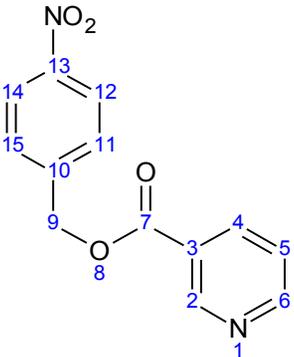
Tabla 5. Propiedades físicas y rendimientos de los intermediarios.

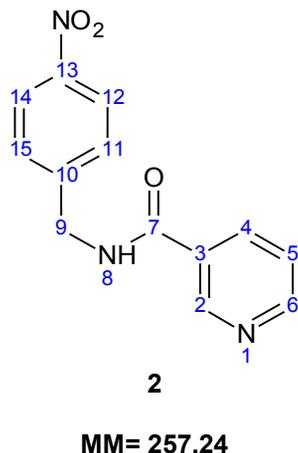
Compuesto	Aspecto	Rendimiento(%)	Punto de Fusión (°C)	Factor de Retención (Rf)*
21	Sólido blanco	71	99.4-100.1	0.74 ^a
22	Sólido café claro	90	>300	0.55 ^b
23	Sólido café claro	85	199.1-199.7	0.75 ^c
24	Sólido café claro	83.5	110.1-110.3	0.83 ^c
26	Sólido amarillo claro	81.2	146 ^d	0.61 ^c
30	Sólido anaranjado	73.2	164.8-165.4	0.69 ^c

*Determinado en ^a sistema IV; ^b sistema II; ^c sistema I. ^d punto de descomposición.

A continuación se muestran los datos espectroscópicos y espectrométricos, con los cuales fue posible la caracterización de los derivados sintetizados (Tabla 6). Los espectros de donde se obtuvieron estos datos, se encuentran en el Apéndice 2.

Tabla 6. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
<div style="text-align: center;">  <p>1</p> <p>MM=258.23</p> </div>	<p>Espectro 1. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3083 (C-H, aromático), 1720 (C=O, éster), 1516 (Ar-NO₂), 1347 (Ar-NO₂), 1286 y 1138 (C-O-C) cm⁻¹.</p> <p>Espectro 2. EM (FAB): 259 [M+1]. HR-EMFAB [M+1]: calculado para C₁₃H₁₁O₄N₂: 259.0713, encontrado: 259.0693.</p> <p>Espectro 3. RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400MHz) δ (ppm): 9.14 (s, 1H, H-2), 8.82 (d, 1H, <i>J</i>=4.4 Hz, H-6), 8.34 (d, 1H, <i>J</i>=8 Hz, H-4), 8.23 y 7.75 (AA'XX', 4H, H-12, H-14 y H-11, H-15), 7.58 (dd, 1H, <i>J</i>=4.8Hz, <i>J</i>=8Hz, H-5), 5.51 (s, 2H, H-9).</p> <p>Espectro 4. RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100MHz) δ (ppm): 164.89(C-7), 154.37 (C-2), 150.57 (C-6), 147.61(C-13), 143.97 (C-10), 137.49 (C-4), 129.03 (C-11, C-15), 125.72 (C-3), 124.43 (C-5), 124.06 (C-12, C-14), 65.77(C-9).</p>



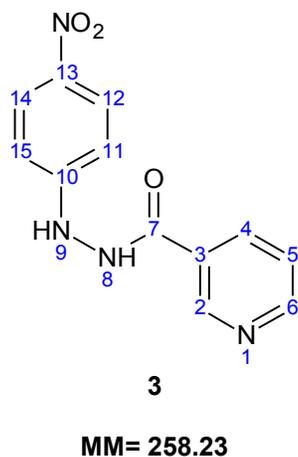
Espectro 5. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3314 (NH), 3074 (C-H, aromático), 1637 (C=O), 1591 (NH), 1527 (C=C, Ar), 1512 (Ar-NO₂), 1346 (Ar-NO₂) cm⁻¹.

Espectro 6. EM (FAB): 258 [M+1].

HR-EMFAB [M+1]: calculado para C₁₃H₁₂O₃N₃: 258.0873, encontrado: 258.0864.

Espectro 7. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 9.37 (t, 1H, *J*=6 Hz, H-8, int. con D₂O), 9.05 (d, 1H, *J*=2 Hz, H-2), 8.71 (dd, 1H, *J*=1.6 Hz, *J*=4.8 Hz, H-6), 8.22 (dt, 1H, *J*=2 Hz, *J*=8 Hz, H-4), 8.18 y 7.58 (AA'XX', 4H, H-12, H-14 y H-11, H-15), 7.51 (dd, 1H, *J*=4.8 Hz, *J*=8 Hz, H-5), 4.61 (d, 2H, *J*=6 Hz H-9).

Espectro 8. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 165.50 (C-7), 152.52 (C-2), 148.88 (C-6), 147.79(C-13), 146.93(C-10), 135.49 (C-4), 129.92 (C-3), 128.70 (C-11, C-15), 123.96 (C-12, C-14), 42.71(C-9).



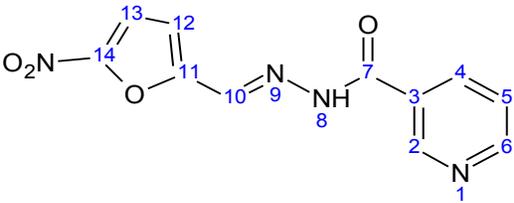
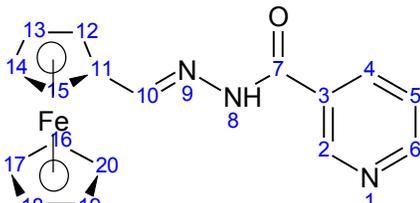
Espectro 9. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3316 y 3239 (NH), 3084 (C-H, aromático), 1630 (C=O), 1597 (NH), 1504 (Ar-NO₂), 1325 (Ar-NO₂) cm⁻¹.

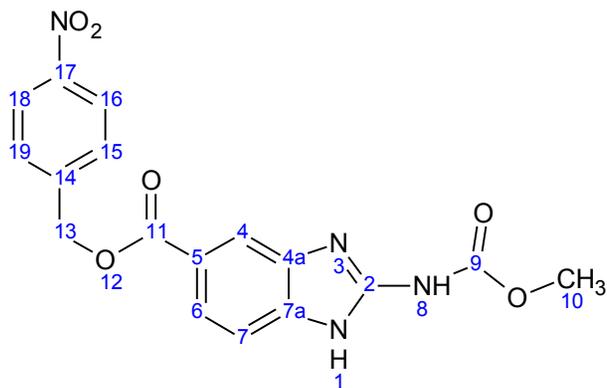
Espectro 10. EM (FAB): 259 [M+1].

HR-EMFAB [M+1]: calculado para C₁₂H₁₁O₃N₄: 259.0826, encontrado: 259.0815.

Espectro 11. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 10.829 (s, 1H, H-8, int. con D₂O), 9.27 (s, 1H, H-9, int. con D₂O), 9.09 (d, 1H, *J*=1.6 Hz, H-2), 8.77 (dd, 1H, *J*=1.2 Hz, *J*=4.8 Hz, H-6), 8.26 (dt, 1H, *J*=1.6 Hz, *J*=8 Hz, H-4), 8.07 y 6.87 (AA'XX', 4H, H-12, H-14 y H-11, H-15), 7.56 (dd, 1H, *J*=4.8 Hz, *J*=8 Hz, H-5).

Espectro 12. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 165.37 (C-7), 155.21 (C-10), 153.04 (C-2), 148.88 (C-6), 138.74 (C13), 135.73 (C-4), 128.55 (C-3), 126.36 (C-5), 124.14 (C-12, C-14), 111.30 (C-11, C-15).

 <p style="text-align: center;">4</p> <p style="text-align: center;">MM=260.21</p>	<p>Espectro 13. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3439 (NH), 3143 (C-H, aromático), 1655 (C=O), 1592 (NH), 1556 (Ar-NO₂), 1348 (C-NO₂), 1243 (C-O-C) cm⁻¹.</p> <p>Espectro 14. EM (FAB): 261 [M+1]. HR-EMFAB [M+1]: calculado para C₁₁H₉O₄N₄: 261.0618, encontrado: 261.0600.</p> <p>Espectro 15. RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400MHz) δ (ppm): 12.37 (s, 1H, H-8), 9.05 (s, 1H, H-2), 8.77 (d, 1H, <i>J</i>=4 Hz, H-6), 8.37 (s, 1H, H-10), 8.24 (d, 1H, <i>J</i>=7.6 Hz, H-4), 7.78 (d, 1H, <i>J</i>=3.2 Hz, H-12), 7.57 (dd, 1H, <i>J</i>=5.2 Hz, <i>J</i>=7.2 Hz, H-5), 7.29 (d, 1H, <i>J</i>=3.2 Hz, H-13).</p> <p>Espectro 16. RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100MHz) δ (ppm): 162.48 (C-7), 153.10 (C-14), 152.44 (C-6), 151.88 (C-10), 149.09 (C-2), 136.57 (C-11), 136.04 (C-4), 129.07 (C-5), 124.13 (C-3), 116.20 (C-13), 115.01 (C-12).</p>
 <p style="text-align: center;">5</p> <p style="text-align: center;">MM= 334.19</p>	<p>Espectro 17. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3438 (NH), 3152 (C=C-H), 1659 (C=C), 1581 (C=O), 1549 (NH y C=N), 1324 (NH), 815 (C-H, ferroceno) cm⁻¹.</p> <p>Espectro 18. EM (FAB): 335 [M+1]. HR-EMFAB [M+1]: calculado para C₁₇H₁₇O₁N₃Fe₁: 335.0716 encontrado: 335.0739.</p> <p>Espectro 19. RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) δ (ppm): 11.75 (s, 1H, H-8), 9.09 (s, 1H, H-2), 8.79 (d, 1H, <i>J</i>=4.2 Hz, H-6), 8.32 (s, 1H, H-10), 8.27 (d, 1H, <i>J</i>=7.8 Hz, H-4), 7.59 (dd, 1H, <i>J</i>=4.8 Hz, <i>J</i>=7.8 Hz, H-5), 4.71 (t, 2H, <i>J</i>=2Hz, H-13, H-14), 4.50 (t, 2H, <i>J</i>=2Hz, H-12, H-15), 4.28 (s, 5H, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20).</p>



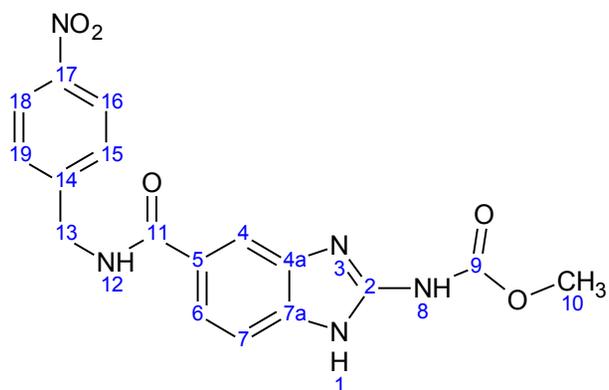
6
MM= 370 g/mol

Espectro 20. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3379 (NH), 2954 (CH₃), 1706 (C=O, éster), 1603 (C=O, carbamato), 1522 (Ar-NO₂), 1349 (Ar-NO₂), 1274 y 1183 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 21. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.24 y 7.77 (AA'XX', 4H, H-16, H-18 y H-15, H-19), 8.09 (s, 1H, H-4), 7.79 (dd, 1H, *J*=1.6 Hz, *J*=8.4 Hz, H-6), 7.47 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, H-7), 5.47 (s, 2H, H-13), 3.76 (s, 3H, H-10).

Espectro 22. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) δ (ppm): 167.47 (C-11), 155.04 (C-9), 149.12 (C-2, C-17), 149.09 (C-14), 148.62 (C-7a), 146.81 (C-4a), 128.59 (C-15, C-19), 127.43 (C-5), 123.91 (C-6), 123.79 (C-16, C-18), 120.98 (C-4, C-7), 53.07 (C-10), 49.04 (C-13).

Análisis Elemental: calculado C (55.14%), H (3.81%), N (15.13%); encontrado C (54.783%), H (3.706%), N (15.569%).



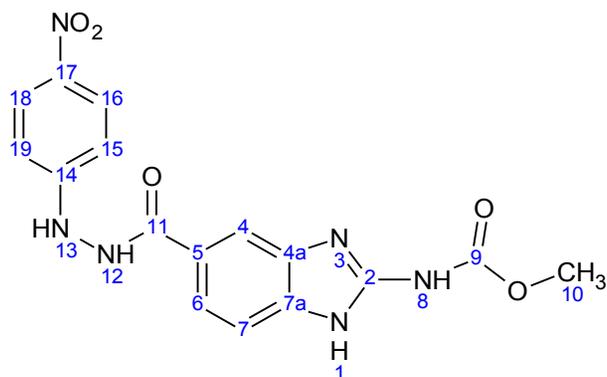
7
MM=369 g/mol

Espectro 23. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3373 y 3310 (NH), 1721 (C=O), 1627 (C=O), 1538 (NH), 1519 y 1343.48 (Ar-NO₂), 1274 y 1184 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 24. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 9.06 (t, 1H, *J*=6 Hz, H-12), 8.19 y 7.56 (AA'XX', 4H, H-16, H-18 y H-15, H-19), 7.97 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, H-4), 7.66 (dd, 1H, *J*=1.6 Hz, *J*=8.4 Hz, H-6), 7.42 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, H-7), 4.58 (d, 2H, *J*=6 Hz H-13), 3.74 (s, 3H, H-10).

Espectro 25. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 167.47 (C-11), 155.04 (C-9), 149.12 (C-2, C-17), 149.09 (C-14), 148.62 (C-7a), 146.81 (C-4a), 128.59 (C-15, C-19), 127.43 (C-5), 123.91 (C-6), 123.79 (C-16, C-18), 120.98 (C-4, C-7), 52.95(C-10), 42.80 (C-13).

Análisis Elemental: calculado C (55.28%), H (4.09%), N (18.96%); encontrado C (54.479%), H (4.085%), N (18.866%).

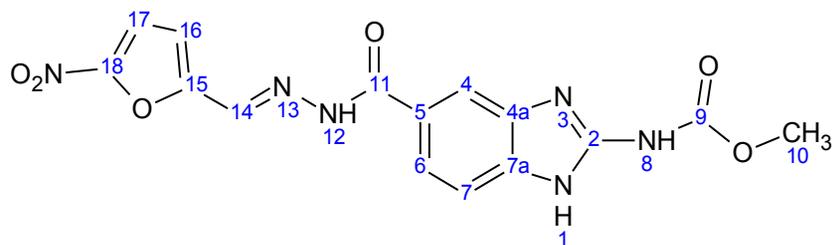


8
MM= 370 g/mol

Espectro 26. IR v_{\max} (Reflectancia): 3343 (NH), 1730 (C=O), 1651 (C=O), 1524 (Ar-NO₂), 1365 (Ar-NO₂), 1095.08 (C-O-C)cm⁻¹.

Espectro 27. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (ppm): 10. 57 (s, 1H, H-12), 9.24 (s, 1H, H-13), 8.13 y 6. 87 (AA'XX', 4H, H-16, H-18 y H-15, H-19), 8.05 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, H-4), 7.62 (s, 1H, H-6), 7.41 (s, 1H, H-7), 3.81 (s, 3H, H-10).

Análisis Elemental: calculado C (51.89%), H (3.81%), N (22.69%); encontrado C (50.429%), H (3.844%), N (22.796%).

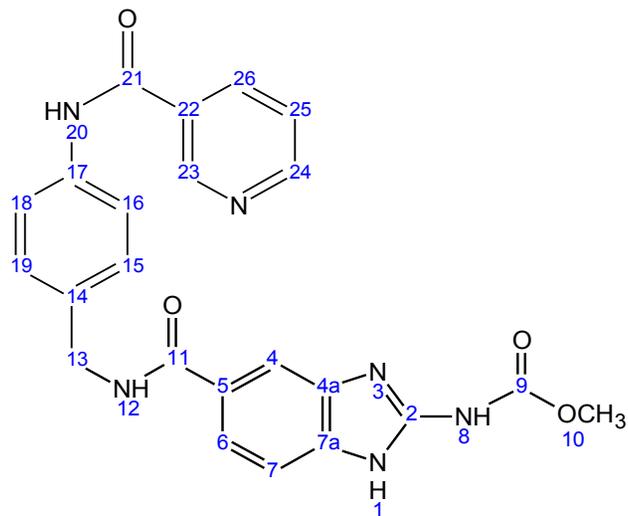


9
MM= 372 g/mol

Espectro 29. IR v_{\max} (Reflectancia): 3376 (NH), 1700 (C=O), 1654 (C=O), 1538.05 (NH), 1523.46 y 1343.48 (Ar-NO₂), 1274.87 y 1093.98 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 30. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (ppm): 12.12 (s, 1H, H-12), 8.27 (s, 1H, H-4), 7.98 (s, 1H, H-14), 7.93 (s, 1H, H-16), 7.73 (s, 1H, H-6), 7.42 (s, 1H, H-7), 7.19 (s, 1H, H-17), 3.82 (s, 3H, H-10).

Análisis Elemental: calculado C (48.39%), H (3.25%), N (22.57%); encontrado C (47.260%), H (3.184%), N (22.524%).


10
MM= 444 g/mol

Espectro 32. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3311 (NH), 2956 (CH₃), 2930 (CH₂), 1735 (C=O), 1599 (NH), 1476 (CH₃), 1457 (CH₂), 1263 y 1194 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 33. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 10.40 (s, 1H, H-20), 9.07 (d, 1H, *J*=1.6 Hz, H-23), 8.89 (t, 1H, *J*=6 Hz H-12), 8.73 (dd, 1H, *J*=1.6Hz, *J*=4.8 Hz, H-24), 8.27 (dt, 1H, *J*=1.6 Hz, *J*=8.8 Hz, H-26), 7.96 (d, 1H, *J*=1.6 Hz, H-4), 7.69 y 7.31 (AA'XX', 4H, H-16, H-18 y H-15, H-19), 7.65 (dd, 1H, *J*=2 Hz, *J*=8.4 Hz, H-6), 7.53 (ddd, 1H, *J*=0.8Hz, *J*=4.8 Hz, *J*=7.6 Hz, H-25), 7.41 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, H-7), 4.45 (d, 2H, *J*=6 Hz H-13), 3.74 (s, 3H, H-10).

Espectro 34. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 167.23 (C-11), 164.33 (C-22), 155.97 (C-9), 152.49 (C-24), 149.07 (C-27), 137.81 (C-17), 136.13 (C-4), 135.85 (C-25), 130.97 (C-4a), 129.38 (C-23), 127.97 (C-15, C-20), 123.91 (C-26), 122.89 (C-5), 120.98 (C-6), 120.79 (C-16, C-19), 109.98 (C-4), 108.07(C-7), 52.97 (C-10), 42.37 (C-13).

Análisis Elemental: calculado C (62.16%),H (4.54%), N (18.91%); encontrado C (61.398%), H(4.487%), N(18.200%).

7.1.1. Consideraciones para el diseño de los derivados sintetizados

En el campo de la Química Farmacéutica se emplea la herramienta de la Hibridación Molecular en la optimización de compuestos que han presentado actividad biológica. Consiste en asociar dos o más grupos farmacóforos (porción de un fármaco que interactúa con su diana farmacológica y, por lo tanto explica la acción biológica) a través de enlaces covalentes. Con el objeto de optimizar la actividad farmacológica, a fin de disponer de fármacos más selectivos y menos tóxicos, con mejor farmacocinética o sin problemas de formulación farmacéutica debidos a una solubilidad o estabilidad inadecuada.²⁷

En este caso, los derivados sintetizados, poseen una porción A, un conector y una porción B. Se tomaron dos estructuras como referencia: 1*H*-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo (carbendazim) o la nicotinamida para el fragmento A, por las razones expuestas en los antecedentes.

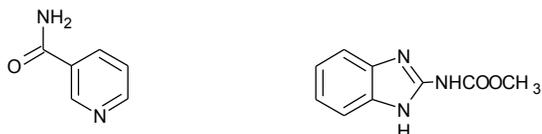


Figura 9. Estructuras de la nicotinamida y el carbendazim

Mientras que para el fragmento B se consideraron moléculas de acción antiparasitaria conocida:

- Fragmento de nitrobenilo: Se ha reportado que el grupo nitrobenilo otorga actividad antihelmíntica contra *T. crassiceps* (cepas ORF y WFU)²⁶ e *Hymenolpis nana*.²⁸

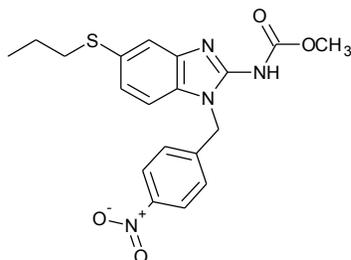


Figura 10. Derivado que presenta la porción del nitrobenilo activo contra *H.nana*.

- (4-nitrofenil)hidrazina: La hidrazina se utilizó como conector y con la idea de identificar si era necesaria la porción alquílica presente en la (4-nitrobencil)amina.

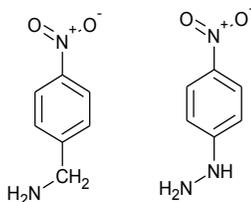


Figura 11. Estructuras de la (4-nitrobencil)amina y la (4-nitrofenil)hidrazina.

- hidrazona del 5-nitrofurfural: Forma parte del nifurtimox, un fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Diversos derivados del 5-nitrofurano se han sintetizado desde que se les ha asociado con actividades biológicas diversas. El nifurtimox es un tripanocida contra las formas de amastigote de *T. cruzi*. Las concentraciones de 1 μ M dañan a los amastigotes intracelulares *in vitro* e inhiben su desarrollo. Los tripomastigotes son menos sensibles. La presencia del grupo nitro en el nifurtimox es esencial para presentar la actividad contra *T. cruzi*.²⁹⁻³¹

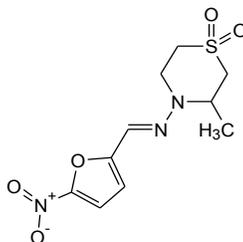


Figura 12. Estructura del Nifurtimox (Lampit, Bayer).

- Ferroceno: El núcleo del ferroceno es una porción atractiva para el diseño de fármacos. Los compuestos derivados de este núcleo, han demostrado ser potentes agentes antibacterianos, antifúngicos y antiparasitarios. Sobre la base de estas observaciones, se desarrolló la ferroquina (**A**, análogo de la cloroquina, Figura 13), la cual se encuentra en Fase II de los ensayos clínicos para el tratamiento de la Malaria. En trabajos recientes se sintetizaron moléculas en las cuales el núcleo del ferroceno está unido a un heterociclo vía una hidrazona como conector (linker). El compuesto **B** de la Figura 13 mostró una potente actividad contra *M. tuberculosis*.³²⁻³⁴

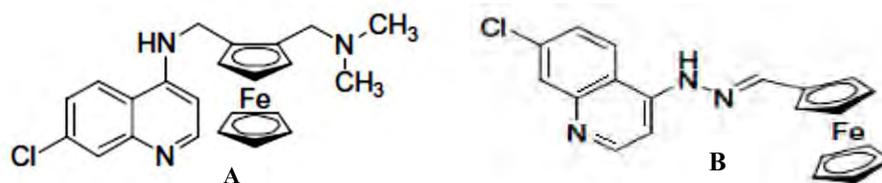


Figura 13. Estructuras de la ferroquina (A) y de un nuevo derivado antituberculoso (B).

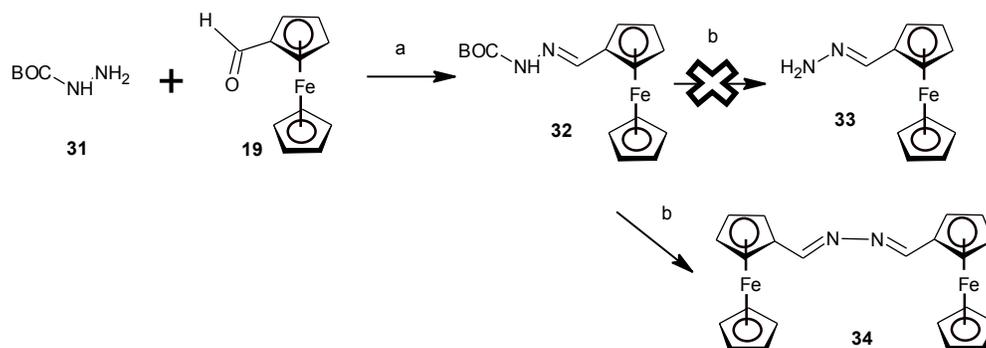
7.1.2. Síntesis de los derivados

7.1.2.1. Derivados de la nicotinamida

Los derivados del **1–3**, se sintetizaron mediante un procedimiento sencillo, en dos etapas. Fueron purificados por recristalización y se obtuvieron con rendimientos que van del 64 al 80%.

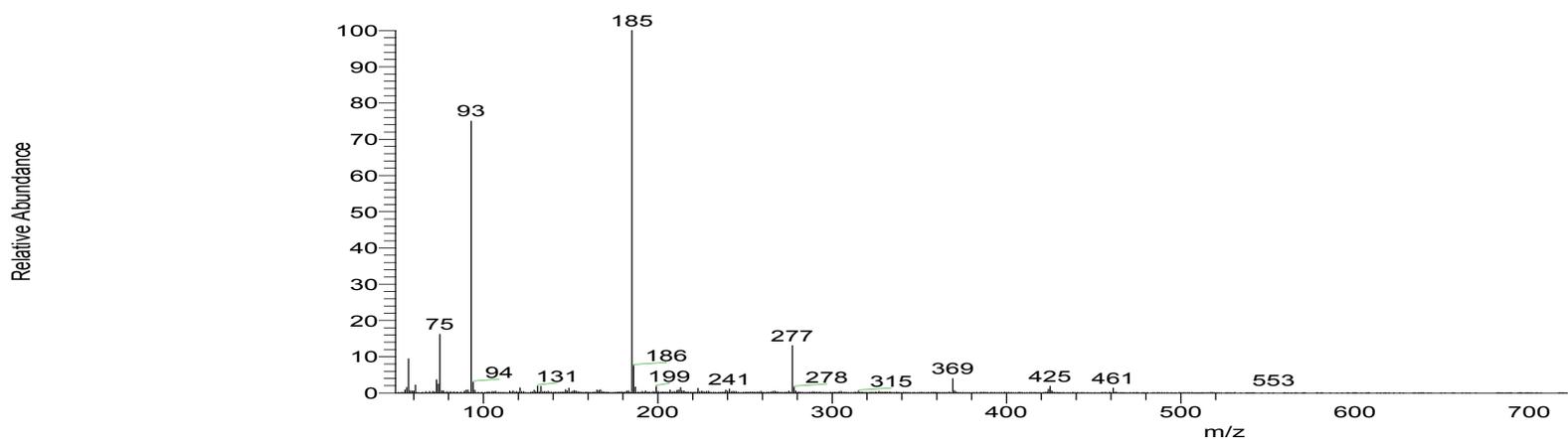
En el caso de **4**, el primer intento se llevó a cabo mediante la activación del ácido nicotínico con CDI, para formar un intermediario que posee un buen grupo saliente, imidazol. Este intermediario fue sustituido por la hidrazona del 5-nitrofurfuraldehído (**30**). El rendimiento en esta reacción fue del 10% debido al bajo poder nucleofílico de la hidrazona del 5-nitrofurfuraldehído (**30**), dado que el par electrónico del nitrógeno está comprometido por resonancia con el grupo nitro. Por este resultado, se optó por realizar la síntesis como se describe en la sección 6.1.1.2 de la Metodología y en el Apéndice 1 (página 70).

Para el compuesto **5** se trabajó con la síntesis de la hidrazona del ferrocenocarbaldehído de la siguiente forma: Se colocó el *ter*-butilcarbazato (1.1 equivalente) y el ferrocenocarbaldehído (1 equivalente) en metanol y se dejó 24 horas en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se observó el consumo total de la materia prima por lo que se evaporó el disolvente y al sólido obtenido se le agregaron 10 mL de diclorometano y 10 equivalentes de ácido trifluoroacético. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 12 horas. En la desprotección del grupo *ter*-BOC (Esquema 7), no se formó la hidrazona del ferrocenocarbaldehído, que tiene una masa molecular de 228 g/mol, sino la azina (**34**). El EM-FAB [M+1] mostró la presencia de la azina (**34**) cuya masa molecular es de 424 g/mol (Figura 14).



a: MeOH, b: CF₃COOH.

Esquema 7. Síntesis de la hidrazona del ferrocenocarbaldeído.



OT6058_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 8.70E6

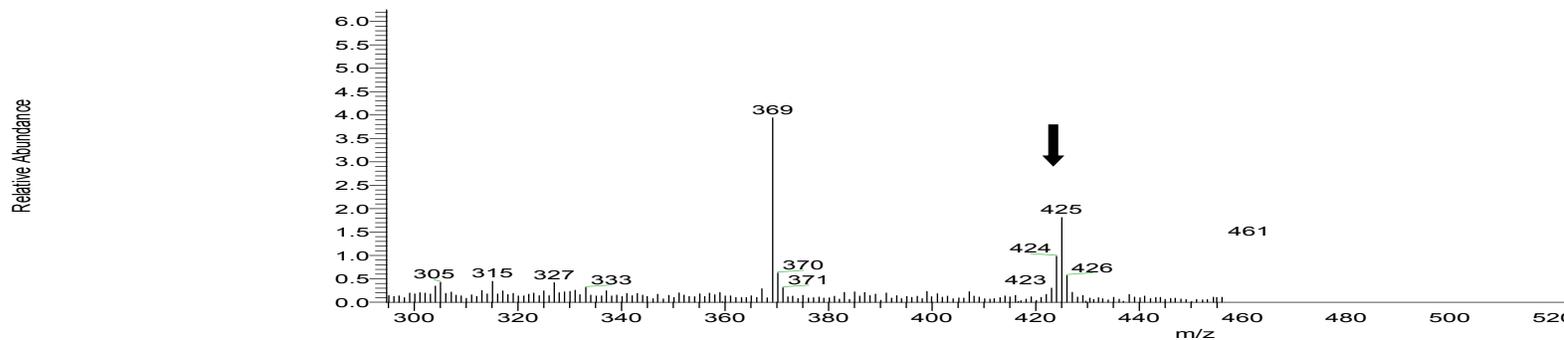
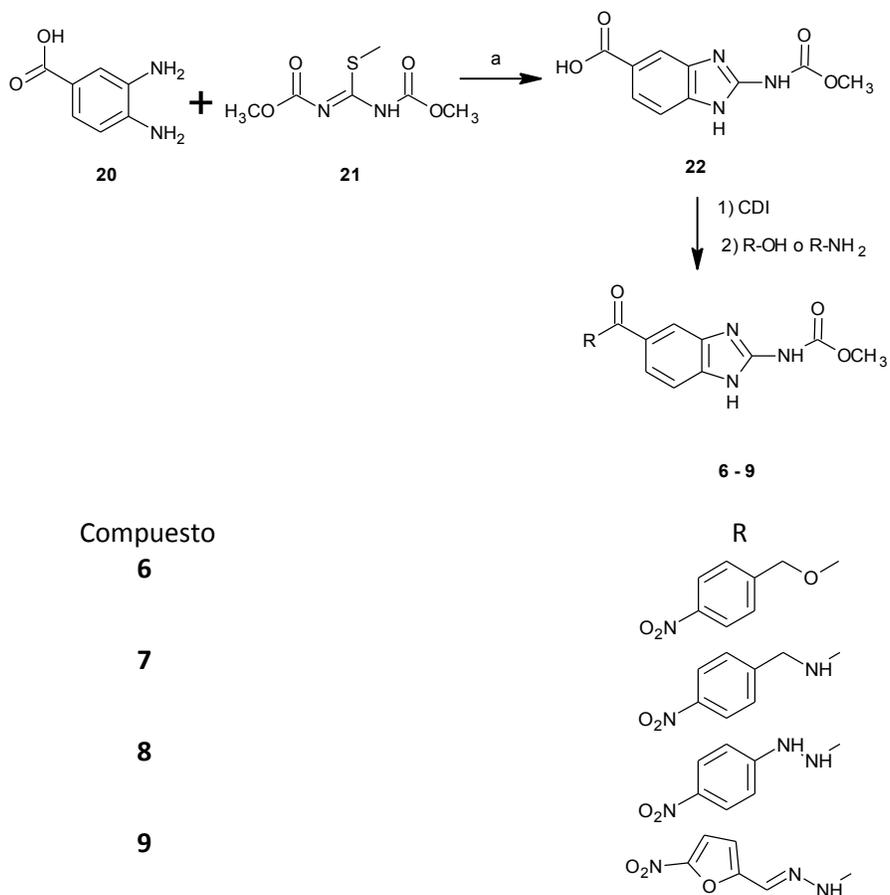


Figura 14. EM-FAB del compuesto 34.

Con el procedimiento descrito en el apartado 6.1.1.2. de la Metodología y en el Apéndice 1 (página 71) se logró la síntesis de 5.

7.1.2.2. Derivados del carbendazim

Originalmente se planteó realizar la síntesis de los derivados **6** al **9** como se muestra en el Esquema 8.



a: CH₃COOH, MeOH/H₂O

Esquema 8. Síntesis propuesta de los compuesto **6-9**

Por lo que se inició con la preparación del intermediario 1,3-dimetoxicarbonil-S-metil-isotiourea (**21**). Se obtuvo un sólido blanco cristalino, con un rendimiento del 71%. Las propiedades físicas del compuesto **21** coincidieron con los datos reportados en la literatura.³⁵

Posteriormente, se realizó la síntesis del ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**22**); cabe mencionar que este compuesto fue insoluble en acetona, metanol, etanol, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, tolueno y hexano;

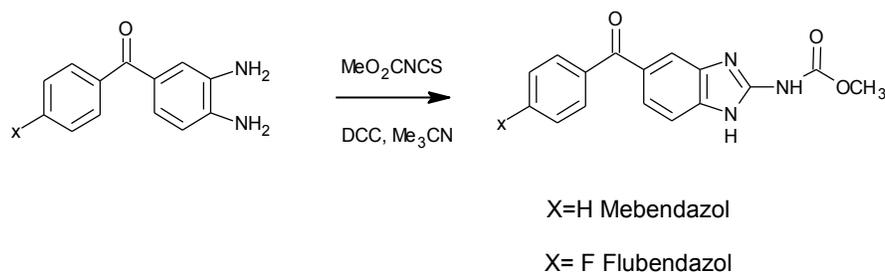
ligeramente soluble en DMF y DMSO. Además, presentó un punto de fusión elevado (>300°C).

Una vez obtenidas las materias primas se realizó la síntesis de compuesto **6**, pero la insolubilidad del compuesto **22** propició un rendimiento de 51% en la reacción.

En vista de los resultados obtenidos con el método propuesto en el Esquema 8, se utilizó como metodología alternativa para la síntesis del compuesto **7**, la descrita en el Esquema 4 (página 20).

La síntesis del híbrido **7** comenzó con la protección de los grupos amino presentes en la materia prima (**20**); la reacción se realizó con el pirocarbonato de di-*ter*-butilo. El intermediario **23** se obtuvo con un rendimiento de 85% y las propiedades físicas (R_f y punto de fusión) corresponden a las reportadas en la literatura²¹. El intermediario **24** fue el producto del acoplamiento de **23** con la (4-nitrobencil)amina usando CDI; esta reacción se realizó en DMF y en acetonitrilo, siendo este último disolvente, en donde se obtuvo un mejor resultado. Para la desprotección del grupo *N*-BOC se realizaron diversos ensayos empleando ácido clorhídrico (HCl) concentrado y ácido trifluoroacético; la desprotección con HCl, no procedió. Mientras que con el ácido trifluoroacético se obtuvo la 3,4-diamino-*N*-(4-nitrobencil)benzamida (**25**), que se empleó inmediatamente y sin purificar (debido a su inestabilidad) en la reacción de ciclocondensación para obtener el bencimidazol (**7**).

La síntesis del compuesto **8** se realizó en forma similar a la del compuesto **7** (Esquema 4), pero el rendimiento obtenido en la reacción de desprotección del grupo *N*-BOC fue bajo. Por tanto, se probó una metodología alternativa, reportada en la literatura para la síntesis del mebendazol y el flubendazol (Esquema 9).^{18, 36}

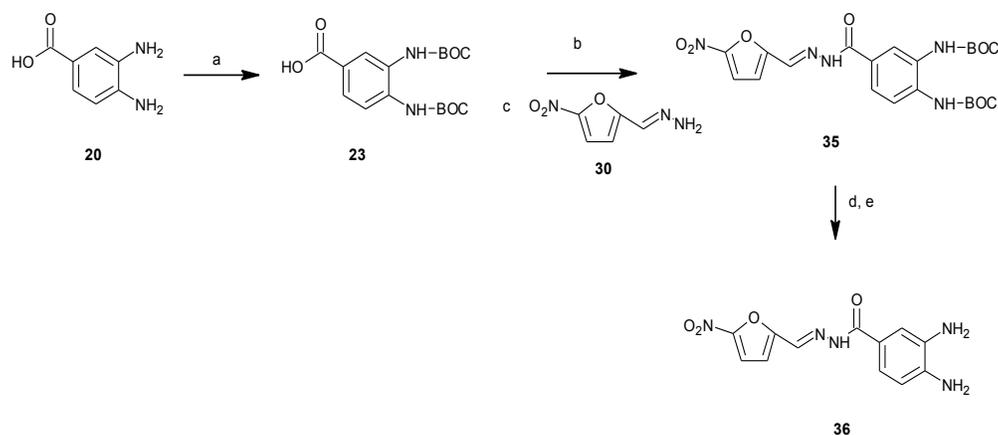


Esquema 9. Síntesis del Mebendazol y el Flubendazol.

En la síntesis del Esquema 9 se empleó *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente acoplante y deshidratante que favoreció la ciclación. En la reacción de acoplamiento con DCC se obtiene como producto secundario, la *N,N'*-diciclohexilurea que es insoluble en varios disolventes orgánicos (acetona, acetonitrilo, etc). En el procedimiento descrito en el apartado 6.1.2.3. de la metodología, se empleó CDI debido a la insolubilidad de los productos **8** y **9** en acetona, acetonitrilo y DMF.

El compuesto **9** se intentó sintetizar por diferentes métodos:

- **Ruta 1.** En la reacción de acoplamiento del compuesto **23** con la hidrazona del 5-nitrofurfuraldehído (**30**) empleando CDI se obtuvo 10% rendimiento, por lo que fue necesario agregar una base no nucleofílica; el primer intento se realizó con DIPEA, sin obtener buenos resultados; después se optó por DBU el cual aumentó el poder nucleofílico del compuesto **30**. Una vez que se obtuvo **35** (R_f de 0.63), se llevó a cabo la reacción de desprotección del *N*-BOC, al parecer en el medio ácido se hidrolizó el furano y/o el enlace de la hidrazona ya que en la ccf se observó la formación de 4 productos con R_f de 0.58, 0.48, 0.31 y 0.16.

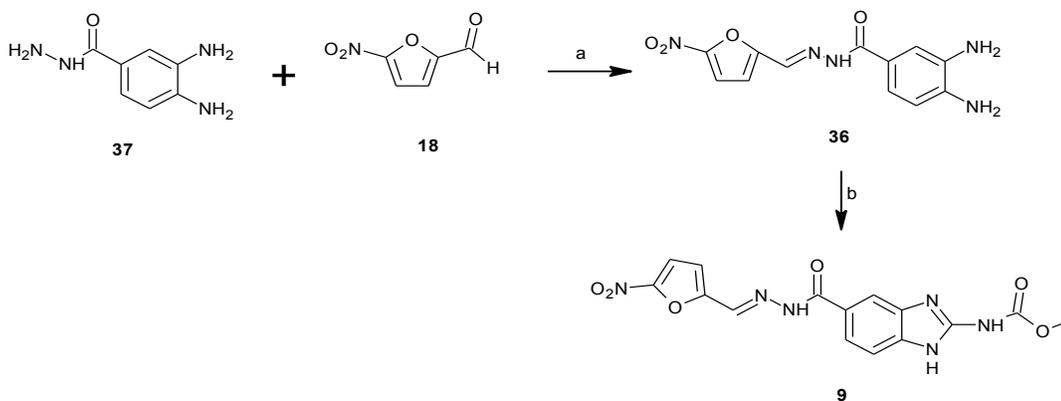


- a: pirocarbonato de di-*ter*-butilo, KOH, H₂O/*ter*butanol; b: CDI, CH₃CN; c: hidrazona del 5-nitrofurfuraldehído (**30**); d: CF₃COOH; e: NaHCO₃

Esquema 10. Ruta sintética 1 del compuesto **9**.

- **Ruta 2.** En este caso se colocó el 5-nitro-2-furfuraldehído (**18**) y la 3,4-diaminobenzohidrazida (**37**) en metanol. Después de 8 horas la ccf reveló la ausencia de las materias primas, por lo que se evaporó el disolvente. El sólido de color café-rojizo obtenido se envió a espectrometría de masas (técnica de FAB)

donde se observó el ion cuasimolar en 290 [M+1] (Figura 15). Se decidió proceder con la reacción de ciclocondensación, después de 12 horas se obtuvo un producto con un R_f de 0.68 en el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 80:20. El rendimiento obtenido fue del 5%.



a: MeOH, b: **21**, CH_3COOH , MeOH/ H_2O .

Esquema 11. Ruta sintética 2 del compuesto **9**.

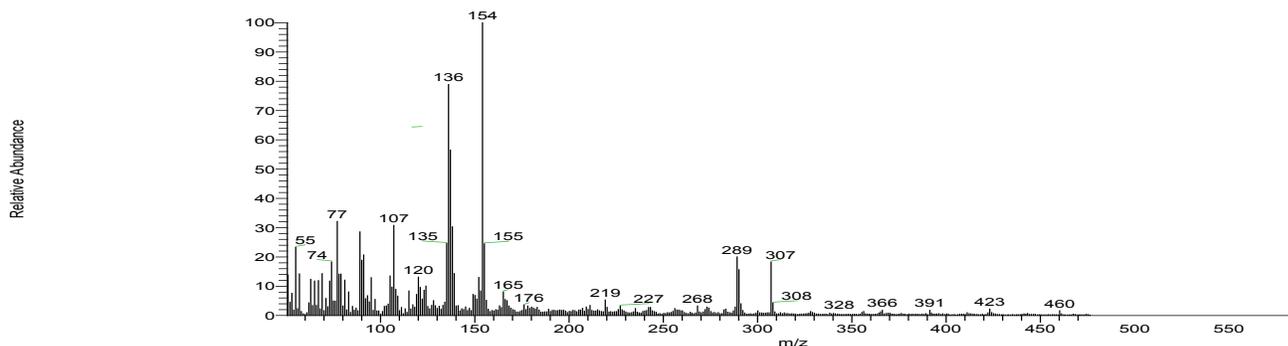
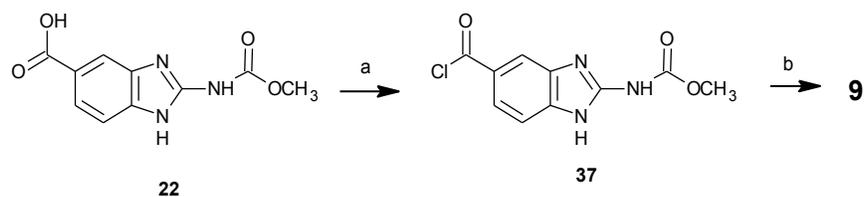


Figura 15. Espectro de masas compuesto **36**.

- **Ruta 3.** El compuesto **22** se disolvió en DMF y se adicionó cloruro de tionilo, La reacción se dejó 24 horas en agitación y observándose la formación de un precipitado de color café claro. Una vez agotada la materia prima (**22**), se agregó el compuesto **30** y DBU.

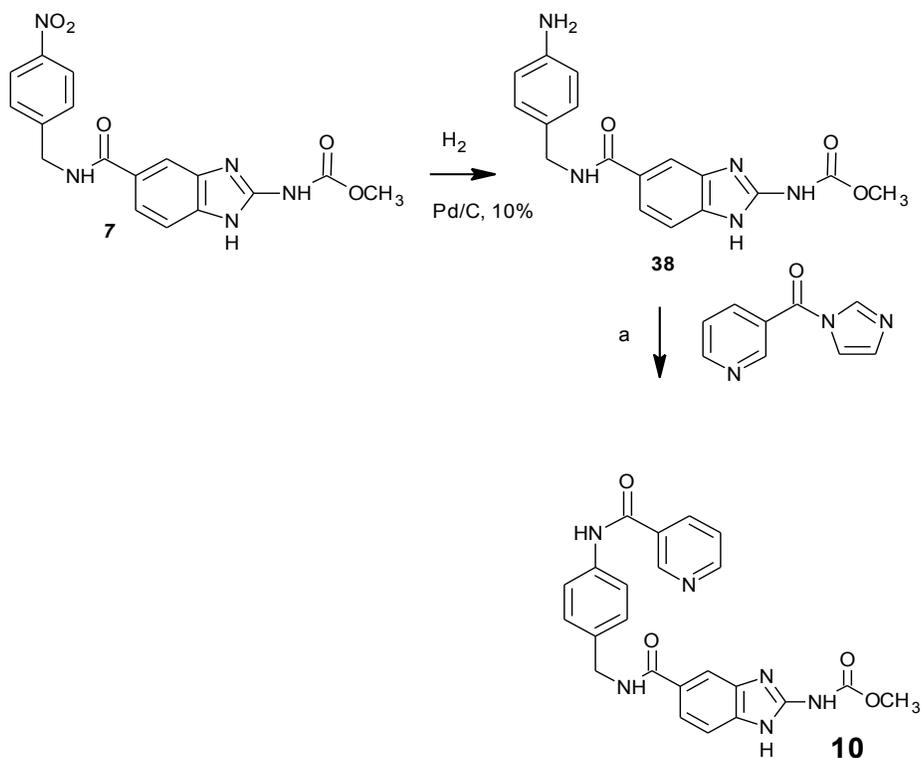


a: SOCl_2 , DMF; b: **30**, DBU.

Esquema 12. Ruta sintética 3 del compuesto **9**.

El mejor rendimiento en la síntesis del compuesto **9** fue por el método mostrado en el Esquema 5, usando CDI y metóxido de sodio (Apartado 6.1.2.3 o en el Apéndice 1, página 81).

El compuesto **10**, se planteó sintetizar como se muestra a continuación:

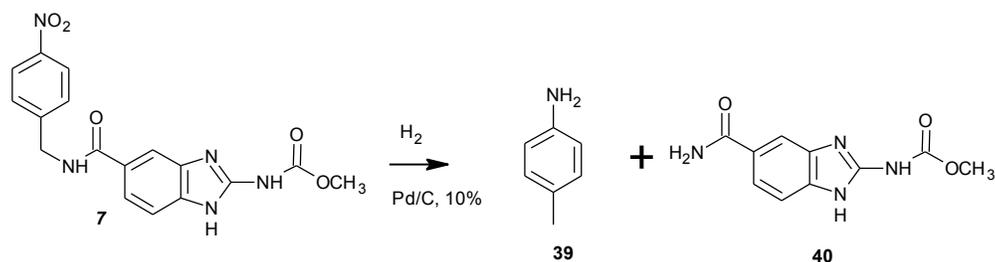


a: DMF

Esquema 13. Ruta sintética del híbrido **10**.

Una vez obtenido **7**, se realizó la reacción de hidrogenación utilizando Pd/C como catalizador. Se realizaron los siguientes ensayos:

- Metanol y Pd/C al 5%. No hubo reducción del grupo nitro.
- Metanol/DMF (1:1) y Pd/C al 5%. Reducción del grupo nitro en aproximadamente un 25%, después de 4 horas de reacción.
- DMF y Pd/C al 10%. Reducción del grupo nitro en aproximadamente un 50%, después de 4 horas de reacción.
- DMF, Pd/C al 10% y calentamiento (40°C). Se llevó a cabo la reacción de hidrogenólisis (Esquema 14) formándose como productos la 4-metilaniлина (**39**) y el 5-carbamoyl-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**40**). El compuesto **40** tiene un R_f similar al ácido-[(metoxicarbonil)amino]-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**22**).



Esquema 14. Hidrogenólisis del compuesto **7**.

Las reacciones anteriores fueron monitoreadas por ccf; en el inciso b y c, se observó la formación de un producto con un $R_f=0.52$, en el sistema I, que reveló con vapores de yodo. Los bajos rendimientos obtenidos se deben a la insolubilidad del híbrido **7**. Por lo cual se planteó la metodología alternativa, mostrada en el Esquema 6, para la síntesis del compuesto **10**. (Apartado 6.1.2.4 o en el Apéndice 1, página 82).

7.1.3. Caracterización de los compuestos

7.1.3.1. Derivados de la Nicotinamida

7.1.3.1.1. Espectroscopía de Infrarrojo

En los espectros de IR (reflectancia) de los compuestos **1–5**, se observaron las bandas características del estiramiento C-H en la región de 3150 cm^{-1} y hasta 4 bandas entre $1600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ características del estiramiento C=C en aromáticos.

El compuesto **1**, posee un grupo éster, para el cual fueron características tres bandas aproximadamente en 1700 , 1200 y 1100 cm^{-1} . La primera (1720 cm^{-1}), fue debida al estiramiento C=O. La segunda apareció en 1286 cm^{-1} provocada por el estiramiento asimétrico de los enlaces C-C y C-O unidos al C=O. La última en 1138 cm^{-1} fue el estiramiento O-C-C.

Las bandas características de las amidas secundarias se describen a continuación: En los compuestos **2**, **4** y **5** se observó una sola banda alrededor de 3400 y 3300 cm^{-1} . La banda debida al grupo carbonilo se encontró para los compuestos **2–5** entre 1680 y 1630 cm^{-1} ; cuya intensidad es moderada, consecuencia de la conjugación del par electrónico del nitrógeno de la amida con el C=O. La banda de torsión del enlace N-H se encontró en un rango de $1570\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$; esta banda fue tan intensa como la banda de C=O. Finalmente, la banda del estiramiento C-N usualmente apareció en $1310\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 7. Bandas representativas de los compuestos **2–5**.

Compuesto	Frecuencia de las bandas		
	Estiramiento N-H	Estiramiento C=O	Torsión N-H
2	3314	1637	1591
3	3316 y 3239	1630	1597
4	3439	1655	1592
5	3438	1659	1549

Los compuestos **1** al **4** mostraron las bandas características correspondientes al grupo nitro, principalmente dos bandas debidas al estiramiento asimétrico y simétrico.

Tabla 8. Bandas representativas del grupo nitro de los compuestos **1–4**.

Compuesto	Frecuencia de las bandas	
	Estiramiento asimétrico (NO ₂)	Estiramiento simétrico (NO ₂)
1	1516	1347
2	1512	1346
3	1504	1325
4	1556	1348

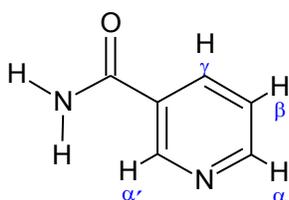
El espectro de IR del compuesto **5**, mostró la banda debida a la deformación C-H en el núcleo del ferroceno en 815 cm⁻¹.

7.1.3.1.2. Espectrometría de Masas

El método de ionización en la espectrometría de masas fue bombardeo con átomos rápidos (FAB): la técnica de baja resolución indicó la masa del ión cuasimolecular [M+1] de los compuestos, mientras que la de alta resolución la composición elemental (C, H, O y N).

7.1.3.1.3. Resonancia Magnética Nuclear

La Nicotinamida mostró los siguientes desplazamientos químicos (δ), usando DMSO-*d*₆ como disolvente a 400 MHz: 9.02 (H-2), 8.73 (H-6), 8.25 (H-4), 8.53 (H-5) ppm.



$$J_{\beta-\gamma}=7.9\text{Hz}$$

$$J_{\alpha-\beta}=4.9\text{ Hz}$$

$$J_{\alpha-\gamma}=1.7\text{ Hz}$$

$$J_{\alpha'-\gamma}=2.3\text{ Hz}$$

Los espectros de RMN de ¹H de los compuestos **1–5**, mostraron las señales esperadas para el núcleo de la nicotinamida, así como las constantes de acoplamiento. Las señales a campo más bajo correspondieron a los protones alfa (H-2 y H-6) de la piridina, que están desprotegidos en términos de la electronegatividad del nitrógeno presente en el

núcleo de la piridina. A continuación, el protón gamma (H-4), se encontró desprotegido por el grupo C=O, y finalmente, apareció la señal del protón beta (H-5).

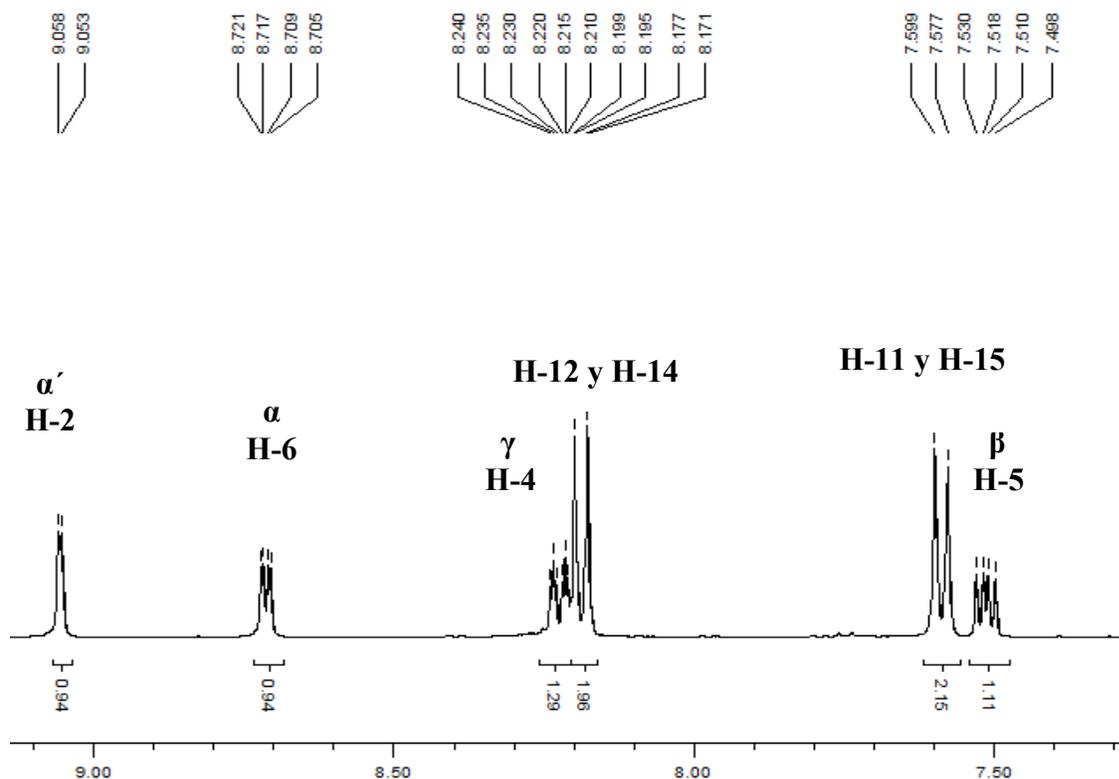


Figura 16. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **2**: zona de 9 a 7 ppm.

En los espectros de RMN de ^1H de los compuestos **1–3** se observaron las señales de los protones que corresponden al anillo aromático del nitrobenzilo (H-11, H-15 y H-12, H-14), cuyo sistema es un AA'XX'.

Para el compuesto **2**, el espectro de RMN de ^1H reveló en 9.37 ppm un triplete, por el acoplamiento con los hidrógenos del metileno adyacente al amino ($-\text{NH}-\text{CH}_2-$); esta señal desapareció con D_2O . En 4.61 ppm se observó un doblete, cuya integral de 2 protones correspondió a los hidrógenos del metileno; esta señal se observó como un singlete en el experimento con D_2O (Figura 17). Mientras en el compuesto **1**, se observó un singlete en 5.51 ppm, que integró para dos protones ($-\text{CH}_2-\text{O}-$).

Tabla 9. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamientos de los derivados de nicotinamida.

Proton	Compuesto	δ (ppm)	M*	J (Hz)
H-2	1	9.14	s	-
	2	9.05	d	$J_{\alpha'-\gamma} = 2$ Hz
	3	9.09	d	$J_{\alpha'-\gamma} = 1.6$ Hz
	4	9.05	s	-
	5	9.09	s	-
H-6	1	8.82	d	$J_{\alpha-\beta} = 4.4$ Hz
	2	8.71	dd	$J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz, $J_{\alpha-\gamma} = 1.6$ Hz
	3	8.77	dd	$J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz, $J_{\alpha-\gamma} = 1.2$ Hz
	4	8.77	d	$J_{\alpha-\beta} = 4.0$ Hz
	5	8.79	d	$J_{\alpha-\beta} = 4.2$ Hz
H-4	1	8.34	d	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz
	2	8.22	dt	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz, $J_{\alpha-\gamma} = 2$ Hz
	3	8.26	dt	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz, $J_{\alpha-\gamma} = 2$ Hz
	4	8.24	d	$J_{\beta-\gamma} = 7.6$ Hz
	5	8.27	d	$J_{\beta-\gamma} = 7.8$ Hz
H-5	1	7.58	dd	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz
	2	7.51	dd	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz
	3	7.56	dd	$J_{\beta-\gamma} = 8$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz
	4	7.57	dd	$J_{\beta-\gamma} = 7.2$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 5.2$ Hz
	5	7.59	dd	$J_{\beta-\gamma} = 7.8$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 4.8$ Hz

*M: multiplicidad

En el compuesto **3**, el protón H-8 apareció a campo más bajo que H-9 debido a la presencia del grupo carbonilo. Los H-8 y H-9 desaparecieron en el experimento con D₂O. (Figura 18)

Los espectros de RMN de ¹H de los compuestos **4** y **5**, mostraron H-9, alrededor de 8.3 ppm. El H-8 alrededor de 12 ppm, ambas señales disminuyeron su intensidad cuando se agregó D₂O.

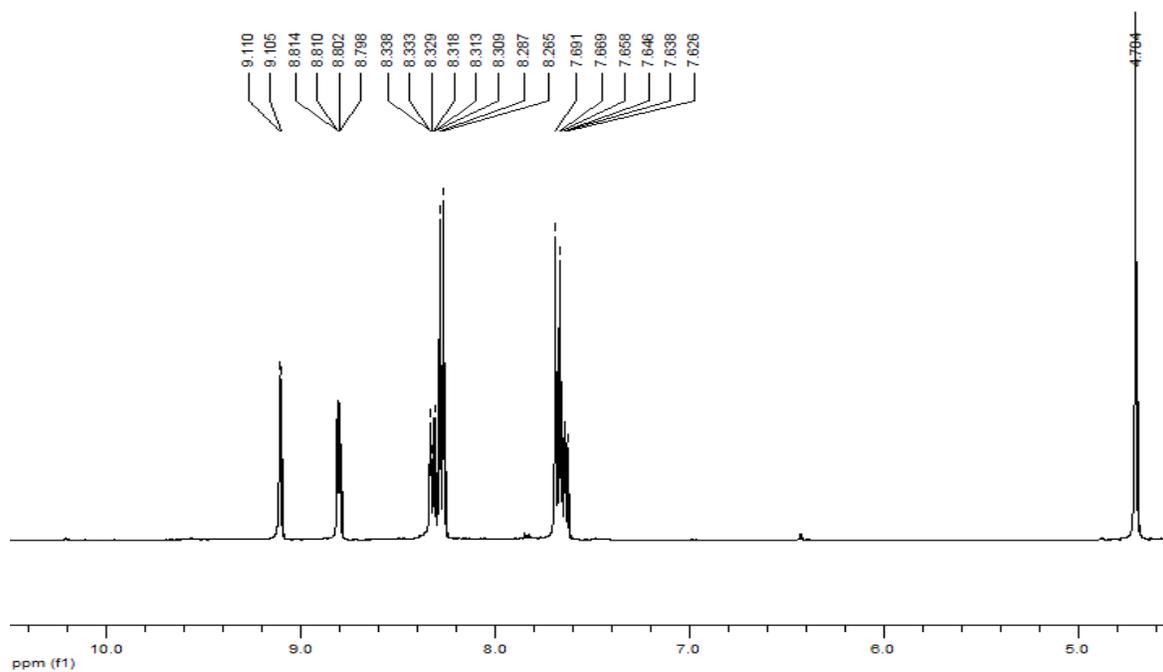


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **2**, intercambio con D_2O .

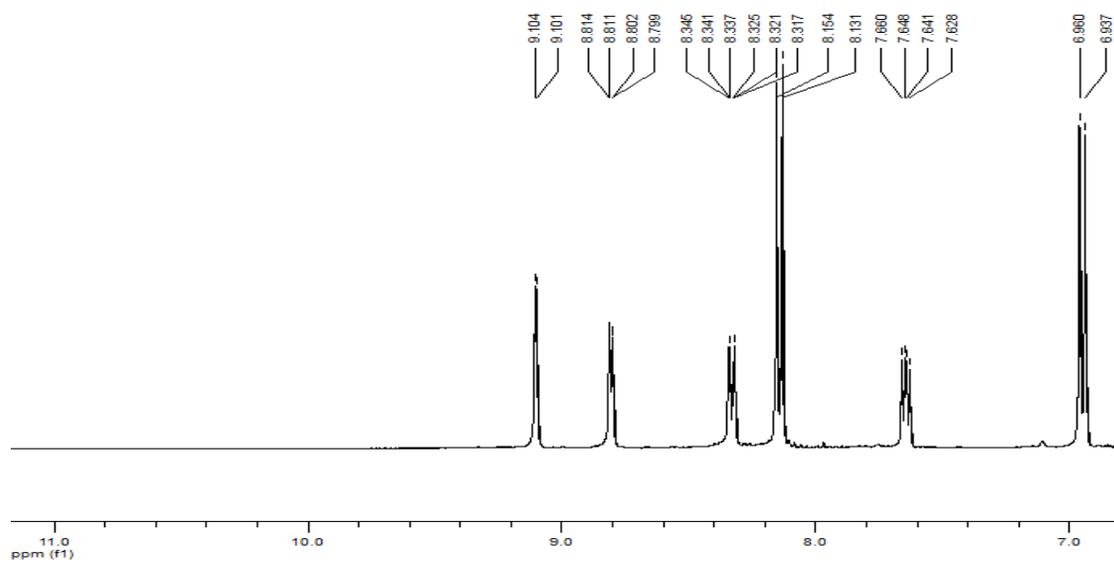


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **3**, intercambio con D_2O .

7.1.3.2. Derivados del carbendazim

7.1.3.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo

La espectroscopía de infrarrojo mostró para los compuestos **6–10**, bandas características para los estiramientos de compuestos aromáticos correspondientes al núcleo del bencimidazol de 1480-1440 cm^{-1} . La señal a 1600 cm^{-1} confirmó la presencia de un grupo carbamato.

El compuesto **6**, mostró las tres bandas correspondientes al grupo éster, debidas a los estiramientos C=O y C-O-C

En los espectros de IR se observaron las bandas características del grupo amida para los compuestos **7–10**. Y las bandas debidas a la presencia del grupo nitro para los compuestos **6– 9**.

Tabla 10. Bandas características de las amidas **7–10**.

Compuesto	Frecuencia de las bandas			
	Estiramiento N-H	Estiramiento C=O (amida)	Estiramiento C=O (carbamato)	Torsión N-H
7	3373	1721	1627	1538
8	3343	1701	1651	1595
9	3376	1700	1654	1596
10	3311	1735	1628	1599

Tabla 11. Bandas representativas del grupo nitro de los compuestos **6-9**.

Compuesto	Frecuencia de las bandas	
	Estiramiento asimétrico (NO_2)	Estiramiento simétrico (NO_2)
6	1522	1349
7	1519	1343
8	1524	1365
9	1523	1365

7.1.3.2.2. Espectrometría de masas y Análisis elemental

Los compuestos del **6–10** se enviaron a espectrometría de masas, pero el ion molecular no se observó por el método de ionización de impacto electrónico. Por FAB el ión cuasimolecular $[M+1]$, se observó poco intenso, debido a la gran insolubilidad de los compuestos en la matriz (glicerol o alcohol nitrobenílico, Figura 19). Por lo que se realizó un análisis elemental para conocer la composición de dichos compuestos.

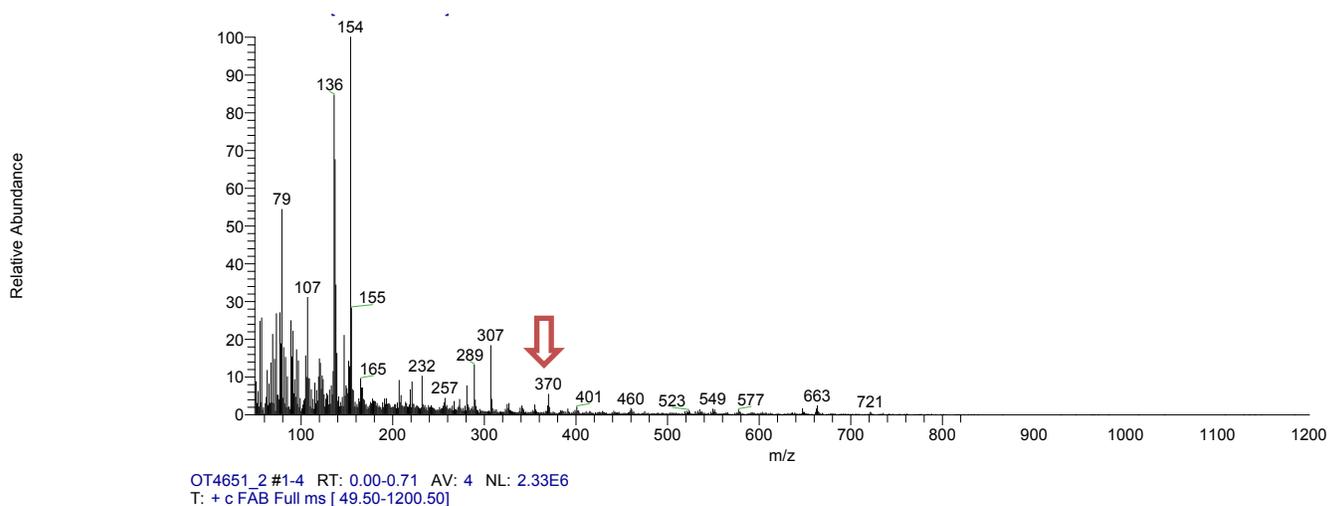


Figura 19. Espectro de masas del compuesto **7** por la técnica de FAB.

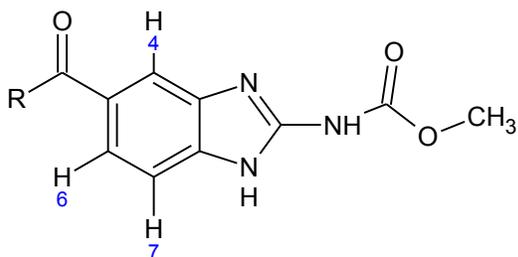
7.1.3.2.3. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN de ^1H de los compuestos **6–10**, mostraron alrededor de 3 ppm un singlete que integró para tres hidrógenos, señal que corresponde a los hidrógenos del metilo del grupo carbamato.

Para los compuestos **6, 7, 8** y **10** se observaron las señales de los protones presentes en el anillo aromático del nitrobenilo. Dichas señales corresponden a un sistema AA'XX'.

Mientras que para los compuestos **6, 7** y **10**, los espectros de RMN de ^1H , mostraron la señal debida a los hidrógenos del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). En el caso del compuesto **6** la señal apareció como un singlete ($-\text{CH}_2\text{-O}-$) en 5.47 ppm cuya integral fue de 2. Para los compuestos **7** y **10** se observó un doblete ($-\text{CH}_2\text{-NH}-$); dado el acoplamiento con el hidrógeno del grupo NH, en 4.58 y 4.45 ppm, respectivamente.

La espectroscopía de RMN de ^1H mostró las señales características del sistema ABX aromático del bencimidazol.



H-4, d, $J_{4-6} = 1.6$ Hz

H-6, dd, $J_{4-6} = 1.6$ Hz, $J_{6-7} = 8.4$ Hz

H-7, d, $J_{6-7} = 8.4$ Hz

El espectro de RMN de ^1H de **9**, mostró seis señales en la zona de 7-8 ppm, aunque la multiplicidad esperada no se observó, posiblemente a la baja solubilidad en DMSO. El ión molecular no se obtuvo en la espectrometría de masas por IE, ni el ión cuasimolecular por FAB. La composición elemental fue C (50.68%), H (3.82%), N (22.24%) que concuerda con la composición teórica para el compuesto **9**.

Para los espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **1–10**, los desplazamientos teóricos se calcularon en el programa ACD/Labs para asignar las señales de los carbonos. En los espectros ^{13}C RMN de los compuestos **1–10**, no se observaron todas las señales, posiblemente debido a que los carbonos cuaternarios presentaron un tiempo de relajación mayor, o por la sobreposición de señales.

7.2. Evaluación biológica

7.2.1. Derivados de la nicotinamida

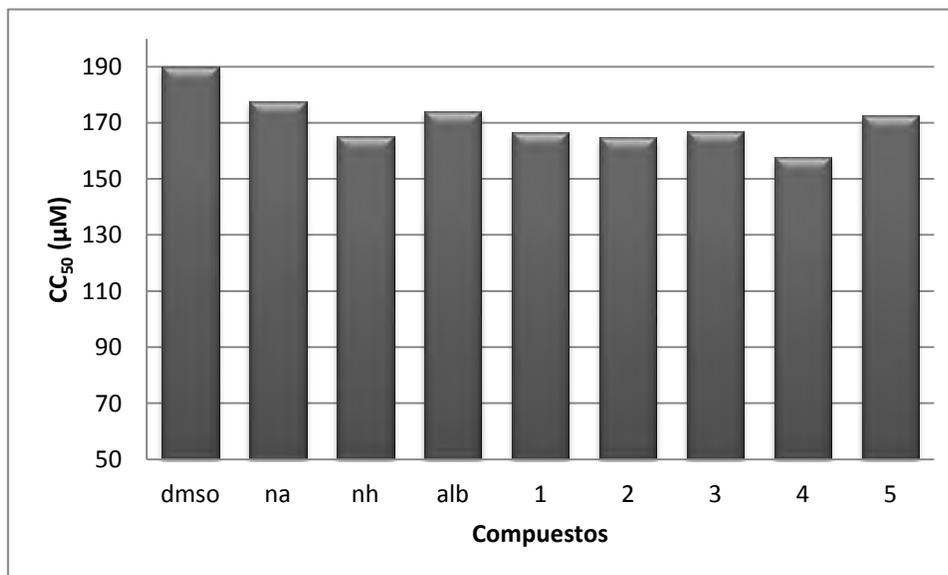
7.2.1.1. Citotoxicidad en células de mamífero

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos a tres concentraciones 100, 150 y 200 μM en la línea celular Vero, mediante el método de MTT y la concentración que produce la citotoxicidad del 50% en la línea celular Vero (CC_{50}).

Tabla 12. Citotoxicidad de los compuestos 1-5 en células Vero mediante el método de MTT.

Concentración (μM)	% Viabilidad									
	Compuesto									
	T. celular	DMSO ^a	NA ^b	NH ^c	ALB ^d	1	2	3	4	5
100	100	92.3	100	98.75	87.66	100	100	100	94.34	78.32
150	100	88.7	96.59	93.75	84.35	96.33	94.42	94.17	89.51	73.25
200	100	88.7	89.11	82.85	82.85	84.19	88.16	88.68	88.68	67.13
CC_{50}	-	190.2	177.4	165.3	174.2	166.7	164.7	166.7	157.6	172.4

DMSO^a; NA^b: Nicotinamida; NH^c: Nicotinohidrazida; ALB^d: Albendazol.

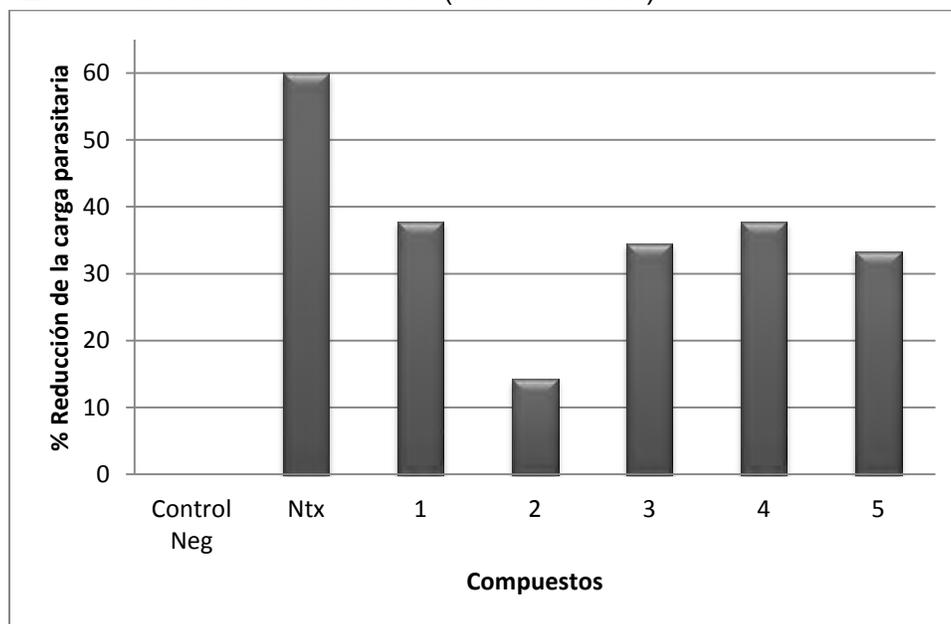


Gráfica 1. Concentración que produce la citotoxicidad del 50% de las células (CC_{50}).

El método de MTT es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, y es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos los derivados de la nicotinamida **1–5**, no mostraron alteraciones en la viabilidad de las células utilizadas en comparación con el DMSO y el fármaco de referencia (albendazol). La viabilidad de las células fue inversamente proporcional a la concentración del compuesto.

7.2.1.2. Actividad cestocida *in vivo* (modelo murino)



Ntx: nitazoxanida

Gráfica 2. Determinación de la actividad cestocida de los serie derivados **1-5**.

La actividad cestocida *in vivo* de los compuestos derivados de nicotinamida fue menor en comparación al fármaco de referencia (Nitazoxanida, Daxón). Ninguno de los compuestos sintetizados **1-5** tuvo actividad cestocida sobre *H. diminuta*.

7.2.2. Derivados del carbendazim.

7.2.2.1. Evaluación de la actividad cisticida *in vivo*.

Se evaluó la actividad cisticida de los híbridos **6**, **7** y **8** en larvas de *T. crassiceps* cepa ORF.

Tabla 13. Resultados de evaluación *in vitro* de actividad cisticida

Compuesto / Concentración	Mortalidad (%) ± DE°		
	0.28µM*	1.7 µM**	2.8µM***
SOALB	30±2.8	90±11.3	100
6	41±4.6	68±7	ND
7	0	80±2.1	100
8	0	9±1.4	32±22.62

° Desviación estándar, *CE50, **CE90 y ***10 veces CE50. SOALB= Sulfóxido de albendazol. ND: no determinada.

Tabla 14. Resultados *in vitro* de actividad cisticida de SOALB y el compuesto **7**.

Moléculas	C*	Observaciones	Mortalidad%
A) Medio de cultivo	-	0/10 Cisticercos normales: grandes, con movimientos y sin teñir	0
B) DMSO*	30%	1/10 Cisticercos sin fluido quístico sin movimiento y teñidos. 9/10 Cisticercos con pérdida parcial de fluido quístico, con movimiento lento y sin teñir	0
C) SOALB	2.8 µM	10/10 Cisticercos sin fluido quístico sin movimiento y teñidos.	100
D) 7	2.8µM	10/10 Cisticercos sin fluido, sin movimiento y teñidos	100

*C: Concentración.

En la Tabla 13, se presentan los resultados de actividad cisticida de los compuestos evaluados contra de *T. crassiceps* cepa ORF. Se observa que el compuesto **7** tiene una actividad cisticida similar a la del SOALB, mientras que la de compuesto **8** fue menor. Con base en estos resultados se determinó la CE₅₀ para el compuesto **7** y **8**.

Tabla 15. CE_{50} calculada para las moléculas análogas del albendazol

Compuesto	* CE_{50} (μM)
SOALB	0.55
7	0.36
8	3.02

* CE_{50} : Concentración efectiva para matar el 50% de los parásitos.

Los resultados mostraron que el compuesto **7**, tuvo una CE_{50} menor que la del sulfóxido de albendazol, lo cual lo convirtió en un buen candidato para continuar las pruebas *in vivo*.



A) Medio de cultivo



B) DMSO



C) SOALB



D) Compuesto 7

Figura. 20. Características observadas en los cisticercos con diferentes tratamientos.

7.3. Estudio de acoplamiento molecular de derivados del carbendazim (**6-10**). Esta parte del proyecto se realizó en el laboratorio 122 del departamento de Farmacia de la Facultad de Química. La metodología empleada se encuentra en el Apéndice 1.

Los resultados del estudio preliminar de acoplamiento molecular, se muestran a continuación:

Tabla 16. Resultados del acoplamiento molecular con *Autodock 4.2* con β -tubulina de *H. contortus* y *F. hepatica*.

Compuesto	Docking score (Kcal/mol)	% de Mortalidad a 1.7 μ M
SOALB	-8.32	90 \pm 11.3
6	-7.95	68 \pm 7
7	-7.58	80 \pm 2.1
8	-7.59	9 \pm 1.4
9	-5.88	-
10	-4.50	-
AOA-1	-5.68	10.5 \pm 2.1

Se conoce que los bencimidazoles ejercen su efecto terapéutico al unirse a la β -tubulina de los helmintos, provocando el rompimiento de los microtúbulos y por tanto; la interrupción de diversas funciones celulares (división celular, motilidad, transporte intracelular, transducción de señales, etc.), que culminan en la muerte del parásito.^{12, 37}

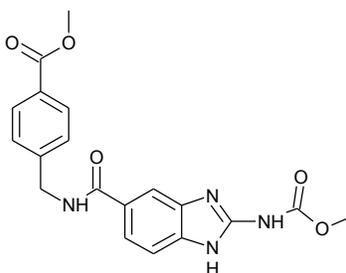


Figura 18. Estructura del compuesto **AOA-1**.

Sin embargo, el sitio de unión de los bencimidazoles en la β -tubulina no ha sido determinado. Para esclarecer el sitio de unión se han creado modelos de homología tomando como base proteínas cristalizadas de mamíferos. Un estudio computacional reciente mostró que el alineamiento de las secuencias de la β -tubulina de *H. contortus*, de

F. hepática y porcina (*S. scrofa*), tienen una gran similitud (semejanza del 96% y 92% entre los dos helmintos y la porcina, respectivamente).³⁸

La estructura de la β -tubulina de *H. contortus*, con el sulfóxido de albendazol (SOALB) acoplado, fue extraída del Protein Data Bank (PDB: 1OJ0); la estructura base proviene del estudio de homología de la β -tubulina de bovino (PDB:1JFF), y del estudio comparativo con la secuencia de *F. hepática*.³⁹⁻⁴¹

El estudio de acoplamiento molecular fue realizado con el programa *Autodock 4.2*. La proteína se preparó utilizando el módulo Protein Preparation Wizard del Programa *Maestro 9.0* de Schrödinger, eliminando las moléculas de agua, el SOALB y minimizando con un campo de fuerza OPLS-2005. A los ligandos, previamente optimizados, se les detectaron los centros de torsión y enlaces rotables. Se solicitó se diera flexibilidad al residuo Ile16. Se empleó el programa *Autogrid 4.0* para generar una malla (grid), con una dimensión de 40\AA^3 , en las coordenadas del sitio de unión. Se realizó el acoplamiento con *Autodock 4.2* empleando un algoritmo genético de tipo Lamarckiano. Se obtuvieron las energías de acoplamiento (docking score), en Kcal/mol, de los conformeros más estables.

El estudio de acoplamiento molecular se planteó con el objeto de intentar explicar los resultados de la actividad biológica.

Todos los compuestos (**6-9** y **AOA-1**), excepto **10** mostraron una afinidad por el sitio de unión del SOALB en la β -tubulina preparada. Los valores negativos, reportados en la Tabla 16, indican que la unión ligando-receptor es un proceso favorecido. En la Figura 21 se observa que los compuestos **6-9** y **AOA-1** tienen una orientación similar al sulfóxido de albendazol en el sitio de unión en la β -tubulina.

Mientras que el compuesto **10** mostró una baja afinidad y no se unió en el mismo lugar que el sulfóxido de albendazol (Figura 22).

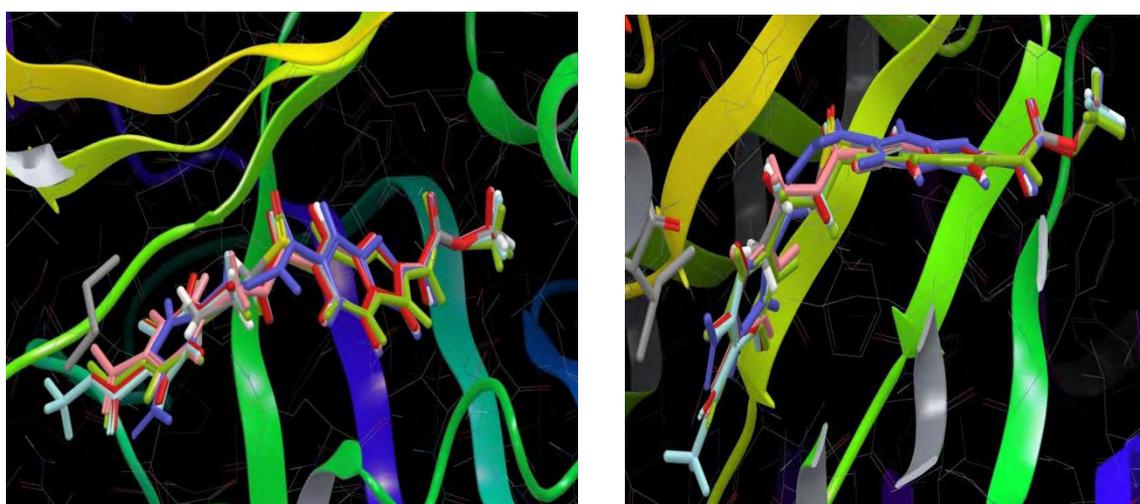


Figura 21. Sitio de unión del SOALB y los compuestos **6**, **7**, **8**, **9** y **AOA-1** en la β -tubulina de *H. contortus*

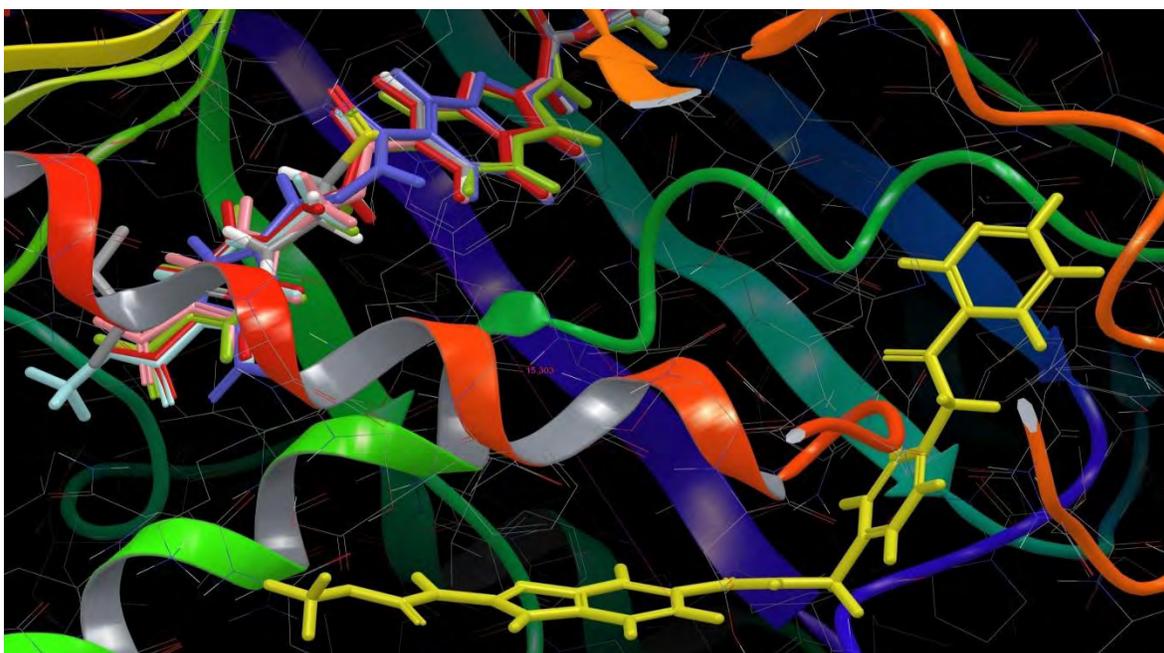


Figura 22. Acoplamiento molecular del compuesto **10** propuesto en el modelo de la β -tubulina de *H. contortus*.

Los aminoácidos del sitio de unión de la β -tubulina en el modelo de *Haemochus contortus* son: His6, Ile16, Phe20, Gln134, Thr136, Ser165, Phe167, Glu198, Phe200, Val229, Met233, Val236, Thr237, Asp249, Leu250, Leu253 y Met257.

Los aminoácidos con los que interaccionan el sulfóxido de albendazol son: Ser165 y Val236, a través de enlaces de hidrógeno.

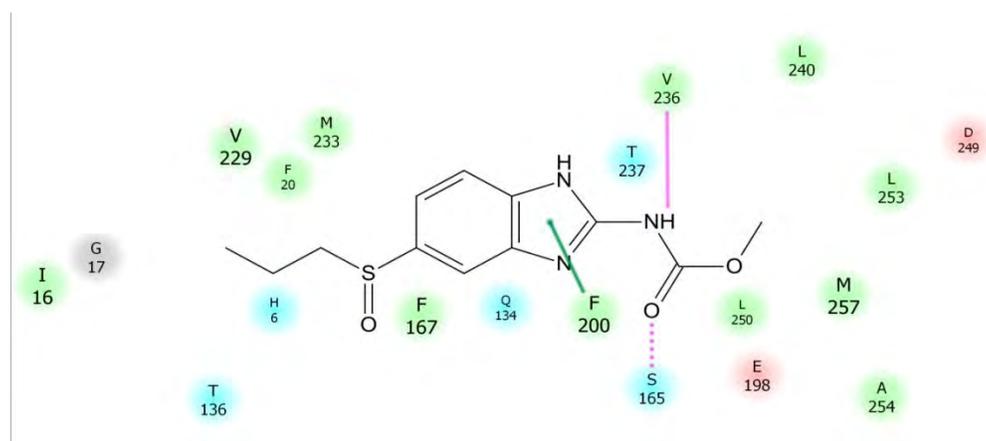


Figura 23. Principales interacciones del sulfóxido de albendazol en el sitio de unión en la β -tubulina en el modelo de *Haemochus contortus*.

Los compuestos más afines al sitio de unión en la β -tubulina en el modelo de *Haemochus contortus* fueron el sulfóxido de albendazol seguido de los compuestos **6**, **8** y **7**. En los resultados experimentales de la actividad cisticida en *T. crassiceps* cepa ORF de los híbridos sintetizados el compuesto **7** posee una mejor actividad cisticida. Esto se explica posiblemente a que el compuesto **6** puede ser susceptible a las hidrolasas plasmáticas formándose el compuesto **22**. Los compuestos **7** y **8** tienen valores muy semejantes de energía de acoplamiento, pero los resultados muestran que el compuesto **7** posee una mejor actividad cisticida. Ya que el grupo amino presente en **8** puede interactuar en otros sitios en la β -tubulina u otras proteínas, ocasionando una merma considerable de actividad. El compuesto **AOA-1**, tiene un porcentaje de mortalidad menor que los compuestos **6**, **7** y **8**; mientras que el estudio de acoplamiento molecular muestra también una baja afinidad por el sitio de unión en la β -tubulina de *H. contortus*.

Los compuestos **9** y **10** se han enviado a evaluación biológica en el modelo experimental de *T. crassiceps*. El compuesto **9** puede mostrar otro mecanismo a través de la formación de especies reactivas de oxígeno⁴²⁻⁴⁵. Mientras que el tamaño del compuesto **10** juega un papel importante para impedir la unión del mismo en el sitio de unión propuesto en la β -tubulina (Figura 22). Lo que se observa en este estudio de acoplamiento molecular es que los derivados sintetizados (**6-9**) pueden unirse en el mismo sitio del sulfóxido de albendazol de la β -tubulina de nemátodo o el céstodo.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten comprobar la hipótesis planteada en su totalidad en virtud, de que no todos los compuestos sintetizados presentaron actividades antiparasitarias en los modelos en que fueron evaluados.

Los cinco derivados de la nicotinamida (**1-5**) se obtuvieron con buenos rendimientos (64-84%) y se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Los compuestos **1-5** no afectaron la viabilidad de las células de mamíferos Vero; su CC_{50} fue similar a la del albendazol (fármaco de referencia). Estos datos indican que dichos compuestos no provocarían daño relevante al huésped si hubiesen sido antiparasitarios.

Al evaluar la actividad cestocida *in vivo*, en un modelo experimental de *H. diminuta*, ninguno de los derivados (**1-5**) logró una reducción de la carga parasitaria en una proporción mayor al fármaco de referencia (Nitazoxanida).

Los derivados del carbandazim (**6-10**), se sintetizaron con rendimientos que van del 45 al 65%. La caracterización de los derivados del carbandazim fue difícil debido a la gran insolubilidad que presentan en disolventes orgánicos (acetona, metanol, diclorometano, cloroformo, tolueno, hexano, DMF, e incluso DMSO).

El compuesto **7** posee una actividad cisticida en el modelo experimental de *T. crassiceps* cepa ORF semejante al sulfóxido de albendazol. Además, al poseer una amida en su estructura es más estable a hidrólisis enzimática que el compuesto **6**. Estos resultados convierten a **7** en un candidato para realizar estudios preclínicos posteriores.

El estudio de acoplamiento molecular mostró que las moléculas sintetizadas, excepto **10**, podrían unirse en el mismo sitio que el sulfóxido de albendazol. Las moléculas **6, 7 y 8** tienen una afinidad similar por el sitio de unión de la β -tubulina preparada por homología.

9. PERSPECTIVAS

- Explorar la inhibición de la proteína SIR 2 por los derivados de nicotinamida, como posible mecanismo de acción.
- Los resultados muestran que el compuesto **7**, podría ser un buen candidato para el tratamiento de la cisticercosis, por lo se continuara con sus evaluación para determinar su farmacocinética y biodisponibilidad.
- Concluir la evaluación biológica de los compuestos **9** y **10**, con la finalidad de establecer si existe una correlación entre los resultados de actividad biológica y los arrojados por el estudio de acoplamiento molecular.

10. REFERENCIAS

1. Kraft, R. **Cysticercosis: An emerging parasitic disease**. American Family Physician 2007; 76: 91-96.
2. Biagi, Francisco. **Enfermedades parasitarias**. México. Ediciones científicas.1998.
3. Larralde, C. **Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud**. Fondo de cultura económica. 2006.
4. Flisser, A. **Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments**. Veterinary Parasitology 2006; 139: 283–292.
5. <http://www.orgsyn.org/orgsyn/orgsyn/prepContent.asp?prep=cv2p0065>]Accesado 2011.
6. <http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/>] Accesado 2011.
7. <http://www.who.int/zoonoses/diseases/taeniasis/en/index.html>]Accesado 2011.
8. Manhanty, S. **Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system**. Progress in Neurobiology 2010; 91: 172–184.
9. Godmnan. **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. Mc-GrawHill. 2007.
10. García, H. **Health promotion approach for control of *Taenia solium* infection in Nepal**. Lancet 2003; 362, 547.
11. Becerril, Flores R. **Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad**. México. Ed. Mc-Graw-Hill.2004.
12. Lacey, E. **Mode of action of Benzimidazoles**. Parasitology Today 1990; 6: 112-115.
13. Horton, R. **Benzimidazoles in a Wormy World**. Parasitology Today 1990; 6: 106-109.
14. Sharma, S. et al. **The benzimidazole anthelmintics chemistry and biological activity**. Progress in Drug Research 1983; 27:85-161.
15. Sharma, S. **Design new drugs for helminth diseases: Lead optimization in benzimidazoles**. Advances in Drug Research 1994; 25: 105-163.
16. Milne, J. **The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging**. Current Opinion in Chemical Biology 2008. 12:11-17.
17. Sereno, D. **In Vitro Antileishmanial Activity of Nicotinamide. Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2005; 49: 808–812.

18. Townsend, L. **The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles**. *Parasitology Today* **1990**; 6(4): 107-112.
19. North, B. **Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases**. *Genome Biology* 2004; 5:224
20. Melchor, S. Tesis de Licenciatura. **Síntesis de derivados de la nicotinamida con posible actividad antiparasitaria**. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 2008.
21. Padierna, C. Tesis de licenciatura. **Preparación de moléculas híbridas de derivados del bencimidazol con el 2-amino-5-nitrotiazol como agentes antihelmínticos**. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 2007.
22. Mosman T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay**. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65:55-63.
23. Ostid, D. **The Hymenolepis diminuta–Golden Hamster (Mesocricetus auratus) Model for the Evaluation of Gastrointestinal Anticestode Activity**. *Journal of Parasitology* 2004; 90: 898–899.
24. Palomares, F. Tesis de doctorado. **Evaluación farmacodinámica y farmacocinética de nuevas formulaciones y análogos de albendazol con posible actividad cisticida**. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 2009.
25. Manhanty, S. **Sensitive *In Vitro* System to Assess Morphological and Biochemical Effects of Praziquantel and Albendazole on *Taenia solium* Cysts**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55:211–217.
26. Palomares, F. **Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives**. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 1794-1800.
27. Avendaño, López C. **Introducción a la Química Farmacéutica**. España, Ed. McGraw-Hill.2001.
28. Márquez-Navarro, A. **Anthelmintic activity of benzimidazole derivatives against *Toxocara canis* second-stage larvae and *Hymenolepis nana* adults**. *Acta Tropica* **2009**; 109(3): 232-235.
29. Maya, J. ***Trypanosoma cruzi*: Effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives**. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 999-1006.
30. Poza, R. **Synthesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15: 1417–1421.

31. Chauvière, G. **Synthesis and Biological Activity of Nitroheterocycles Analogous to Megazol, a Trypanocidal lead.** Journal of Medicinal Chemistry, 2003; 46: 427-440.
32. Mahaja, A. **Synthesis and in vitro antitubercular activity of ferrocene-based hydrazones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011; 21:2866-2868.
33. Mendoza, C. Tesis de Maestría. **Síntesis, evaluación biológica y estudios *in silico* de moléculas diseñadas como híbridos contra *T. cruzi*.** Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 2009.
34. Xiang, W. **Antimalarial Activity of Ferrocenyl Chalcones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2002; 12: 2299–2302.
35. Bustos, P. Tesis de Maestría. **Síntesis y actividad antiparasitaria de análogos de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.** Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 2008.
36. Ram, S. **An improved synthesis of methyl[5-benzoil- and 5-*p*-fluorobenzoylbenzimidazol-2-yl]carbamates.** Organic Preparations and Procedures International 1985; 17: 215-218.
37. Campell, C. **Benzimidazoles: Veterinary uses.** Parasitology Today 1990; 6: 130-133.
38. Robinson, M. **A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement.** Journal of Molecular Graphics and Modelling 2004; 23: 275–284.
39. Li, S. **Site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* β -tubulin: interaction between residue 167 and benzimidazole compounds.** FEBS Lett. 1996.385: 7–10.
40. Qiu, J. **Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β_2 -tubulin studied by site-directed mutagenesis.** Pest. Manag. Sci, 2011; 67: 191–198.
41. Fennell B. **Microtubules as a parasitic drug target.** Expert Opinion on Drug Discovery 2008; 3:501-518.
42. Aguirre, G. **In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofurfuryl containing semicarbazones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004; 12: 4885-4893

-
43. Viodé, C. **Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles**. *Biochemical Pharmacology* 1999; 57: 549-557.
 44. Raether, W. **Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity**. *Parasitology Research* 2003; 90: 19-39.
 45. Hassan, M. A **Modified method for the synthesis of nitrofurazone**. *Indian Journal of Pharmaceutical Research* **2003**.67-69.
 46. Kadam, R. **Comparative protein modeling and surface analysis of Leishmania sirtuin: A potential target for antileishmanial drug discovery**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16: 6013-6018.
 47. Vergnes, B. **Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in Leishmania survival and proliferation**. *Gene* 2005; 363: 85–96.
 48. Vargas, P. **Síntesis y actividad giardicida de carboxamidas bencimidazólicas**. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. **2005**.

APÉNDICE 1. PARTE EXPERIMENTAL

Información general

Los reactivos empleados en la síntesis de los compuestos de este trabajo fueron de la compañía Aldrich. Las masas de las sustancias se determinaron en una balanza granataria E4000 y en una analítica Sartorius A210P.

Para llevar a cabo las reacciones se empleó una parrilla automática IKA modelo IKA MAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKA TRON ETS-DH fuzzy.

Para concentrar las soluciones se empleó un rotaevaporador Büchi modelo RC-114 con baño de calentamiento modelo B-480, acoplado a una bomba de vacío de diafragma marca Vaccubrand modelo PC610 con regulador de vacío integrado CVC2 y un condensador de eficiencia conectado a un enfriador Birkman CI30 o bien con un evaporador rotario R-205 con baño de calentamiento R-400 acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un refrigerante en espiral Birkman modelo IC30 conectado a una bomba de vacío Büchi V-800 y controlador V-500.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi modelo B-540 usando capilares abiertos. Los puntos de fusión no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer de transformada de Fourier modelo Spectrum 400. Los espectros fueron obtenidos con el accesorio de reflectancia por ATR. La frecuencia de las señales se reporta en cm^{-1} .

Los espectros de masas se hicieron en un espectrómetro JEOL modelo SX-102 A. El método de ionización fue bombardeo de átomos rápidos usando glicerol o alcohol nitrobenzilico como matriz. Se empleó la siguiente simbología: relación m/z (masa/carga), $[M+1]$ (ion cuasimolecular).

Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Varian Unity Inova que operan a 300 o 400 MHz para la determinación del protón o a 75 o 100 MHz para el isótopo de ^{13}C . Usando como disolvente dimetilsulfóxido- d_6 y agua deuterada para el experimento de intercambio de hidrógenos ácidos. El tetrametilsilano se usó como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. La multiplicidad de las señales se denotan con las siguientes abreviaturas s para indicar una señal simple, d

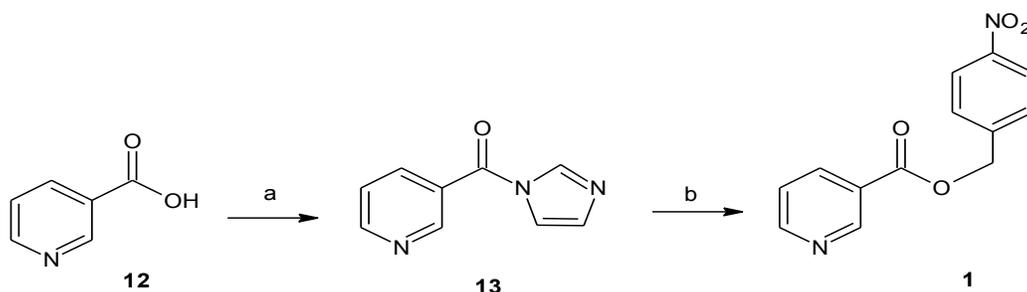
para una señal doble, t para una señal triple, dd para una señal doble de dobles y m para señales múltiples.

Cromatografía

El monitoreo de las reacciones y la pureza de los compuestos sintetizados se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF254 (Merck). Para visualizar los cromatogramas se empleó una lámpara de luz ultravioleta UVP Inc. modelo UVGL-25.

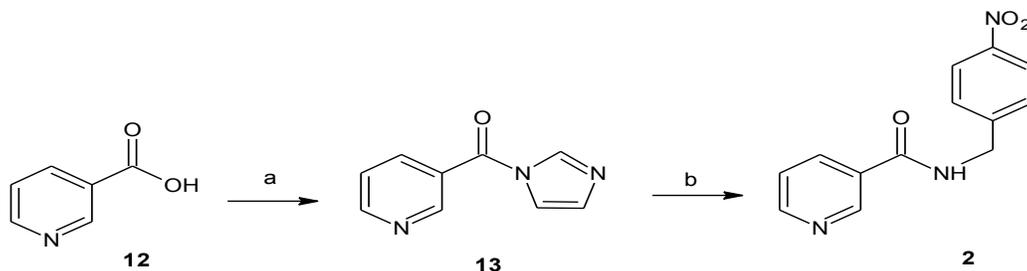
Sistemas cromatográficos empleados:

Sistema	Componentes	Proporción
I	cloroformo/metanol	80:20
II	cloroformo/metanol	90:10
III	cloroformo/acetona	90:10
IV	hexano/cloroformo/acetato de etilo	50:35:15

Metodología Sintética**Síntesis de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1).**

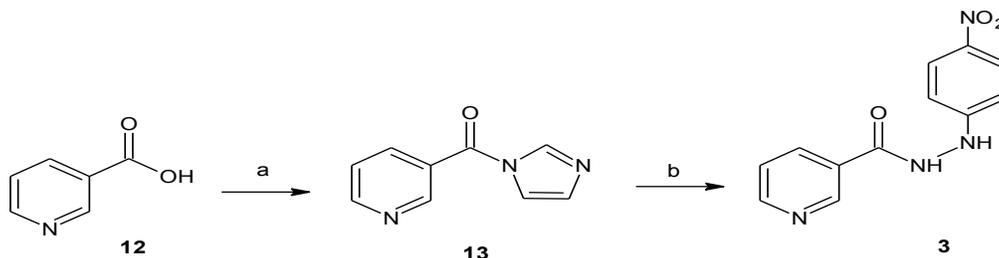
a: CDI, DMF; b: alcohol 4-nitrobencílico.

En un matraz bola de 100 mL de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 484.3 mg (2.9 mmol, 1.1 meq.) de CDI, 334.2 mg de ácido nicotínico (2.7mmol, 1 meq.) y 5 mL de dimetilformamida (DMF) anhidra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 5 horas, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima y la aparición de un intermediario de $R_f = 0.81$ en el Sistema III. Se agregaron 498.8 mg (3.2 mmoles, 1.2 meq.) de alcohol 4-nitrobencílico. La mezcla se dejó en agitación durante 24 horas, a 60°C. Terminada la reacción, se concentró la DMF, obteniéndose un aceite de color ámbar. Al aceite se le agregaron 20 mL de agua con lo que se formó un precipitado de color blanco, que se separó por filtración al vacío. El sólido blanco se recristalizó de metanol. Se obtuvo un sólido blanco fino (450.2 mg) que correspondió al 64.2% de rendimiento; con punto de fusión de 135.0-135.8°C y un R_f de 0.71 en el sistema I.

Síntesis de la *N*-(4-nitrobencil)piridina-3-carboxamida (2).

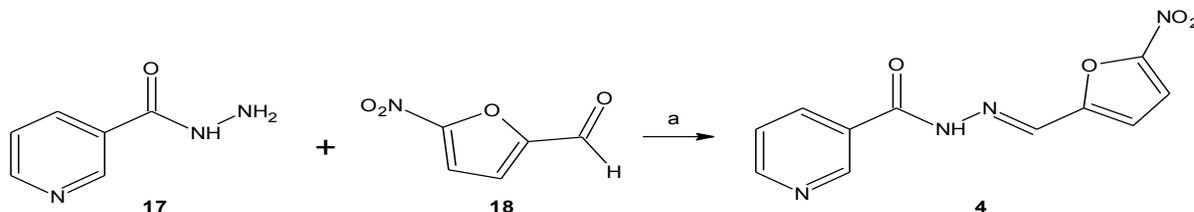
a: CDI, DMF; b: clorhidrato de (4-nitrobencil)amina, DIPEA.

En un matraz bola de 100 mL de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 882.1 mg (5.4 mmol, 1.1 meq.) de CDI, 608.8 mg de ácido nicotínico (4.9 mmol, 1 meq.) y 5 mL de DMF anhidra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 5 horas, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima y la aparición de un intermediario de $R_f = 0.81$ en el Sistema III. Se agregaron 1119 mg (5.9 mmol, 1.2 meq.) del clorhidrato de (4-nitrobencil)amina y 1 mL (5.9 mmol, 1.2 meq.) de DIPEA. La mezcla se dejó en agitación durante 12 horas, a 60°C. Terminada la reacción, se concentró la DMF, obteniéndose un aceite de color anaranjado. Al aceite se le agregaron 20 mL de agua con lo que se formó un precipitado de color amarillo, que se separó por filtración al vacío. El sólido amarillo se recrystalizó de metanol. Se obtuvo un sólido amarillo (1.0244 g) que correspondió al 80.5 % de rendimiento; con punto de fusión de 143.7-144.5°C y un R_f de 0.58 en el sistema I.

Síntesis de la *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).

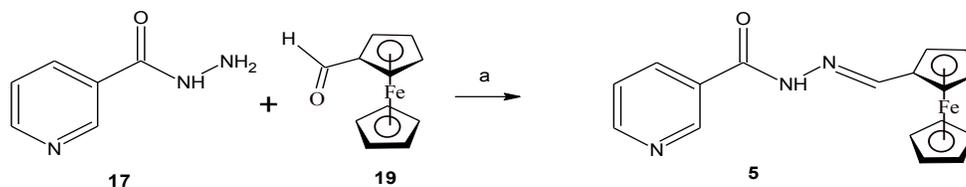
a: CDI, DMF; b: (4-nitrofenil)hidrazina.

En un matraz bola de 100 mL de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 858.7 mg (5.3 mmol, 1.1 meq.) de CDI, 592.6 mg (4.8 mmol, 1 meq.) de ácido nicotínico y 5 mL de DMF anhidra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 5 horas, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima y la aparición de un intermediario de $R_f = 0.81$ en el Sistema III. Se agregaron 884.7 mg (5.7 mmol, 1.2 meq.) de (4-nitrofenil)hidrazina. La mezcla se dejó en agitación durante 12 horas, a 60°C. Terminada la reacción, se concentró la DMF, obteniéndose un aceite de color café oscuro. Al aceite se le agregó 30 mL de agua con lo que se formó un precipitado de color café rojizo, que se separó por filtración al vacío. El sólido café rojizo se recristalizó de isopropanol. Se obtuvo un sólido café claro (894.4 mg) que correspondió al 71.9% de rendimiento; con punto de fusión de 214.5-215.3°C y un R_f de 0.38 en el sistema I.

Síntesis de *N'*-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).

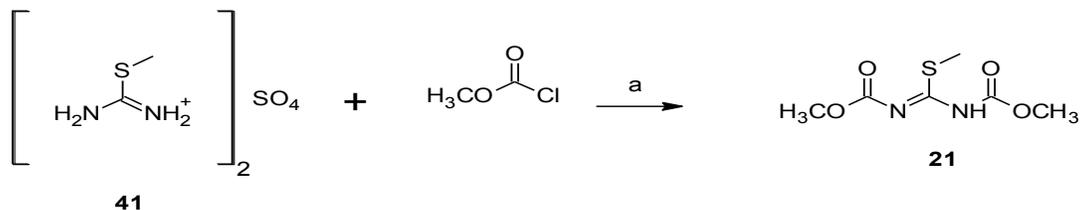
a: MeOH, CH₃COOH.

En un matraz bola de 100 mL adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 500 mg (3.6 mmol, 1 meq.) de nicotinohidrazida, 514.4 mg de 5-nitro-2-furfuraldehído (3.6 mmol, 1 meq.), 50 mL de metanol y una gota de ácido acético. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de las materias primas. En el matraz se encontraba un precipitado de color amarillo que se separó por filtración al vacío. El precipitado amarillo obtenido se disolvió en 50 mL de acetato de etilo, se adicionó 10% de carbón activado y se calentó a reflujo por 1 hora. Posteriormente se filtró sobre una cama de Celita para eliminar el carbón activado. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido amarillo (800.5 mg) que correspondió al 84.3% de rendimiento; con punto de fusión 240.4-241.3 °C; y un Rf de 0.64 en el sistema I.

Síntesis de *N*'-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).a: MeOH, CH₃COOH

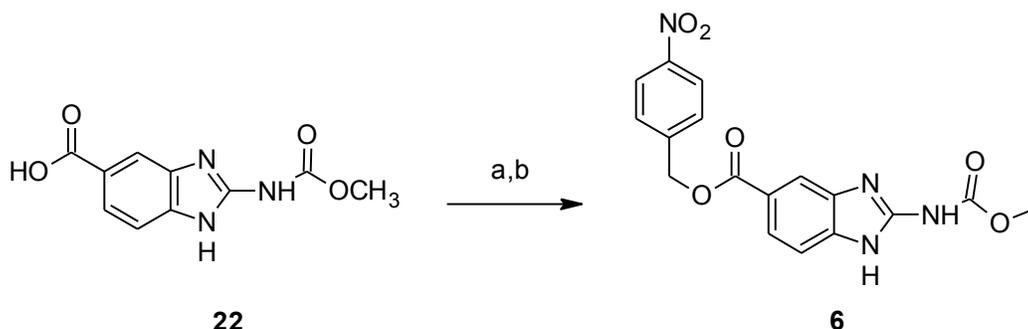
En un matraz bola de 100mL adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 500 mg (3.6 mmol, 1 meq.) de nicotinohidrazida, 780.4 mg de ferrocenocarbaldehído (3.6 mmol, 1 meq.), 50 mL de metanol y una gota de ácido acético. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 6 horas, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima. En el matraz se encontraba un precipitado de color rojizo que se separó por filtración al vacío. El precipitado rojizo obtenido se disolvió en 100 mL de cloroformo y se agitó por 1 hora. Posteriormente se filtró sobre una cama alúmina neutra. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido rojizo (800.5 mg) que correspondió al 79.3 % de rendimiento; con punto de fusión 201.5 -202.2 °C; y con un Rf de 0.83 en el sistema I.

Síntesis de 1,3-(dimetoxicarbonil)-S-metilisotiurea (21).



a: NaOH/H₂O.

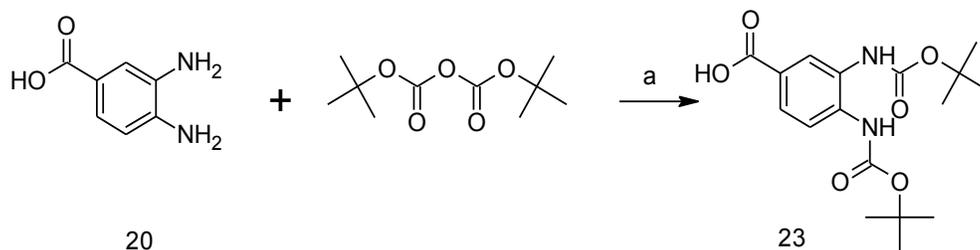
En un matraz de bola de 250 mL de tres bocas provisto de agitación magnética, termómetro y potenciómetro se suspendieron 7.61 g (0.0547 mol, 1 eq) de sulfato de 2-metil-2-tiopseudourea (**41**) en 30 mL de agua. El sistema se enfrió a 5 °C en baño de hielo, para posteriormente adicionar 8.5 mL (0.1094 mol, 2 eq.) de cloroformiato de metilo mediante un embudo de adición. A continuación se adicionó, gota a gota, una solución acuosa de NaOH al 25% (0.2188 mol, 4 eq) de tal manera que el pH se estableciera entre 7.0 - 7.5 y la temperatura entre 5-10 °C utilizando un baño de hielo. Durante la adición se observó la aparición de un sólido blanco. La adición de NaOH se detuvo cuando el pH de la mezcla se estabilizó (pH=7.3). El sólido blanco se separó por filtración al vacío y la ccf mostró la presencia de un producto principal (6.08 g) y como impureza el [(metilsulfanil)carbonoimidoil]carbamato de metilo cuyo R_f es de 0.59 en el sistema IV. Se recristalizó de metanol y se obtuvieron cristales blancos (5.41g) que correspondió al 71% de rendimiento, cuyo p.f es de 99.1-100.4°C; y un R_f de 0.74 en el sistema IV.

Síntesis del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).

a: CDI, DMF; b: **14**.

En un matraz bola de 100mL de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 782.5 mg (4.8 mmol, 1 eq.) de CDI, 1134 mg (4.8 mol, 1eq.) de **22** y 10 mL de DMF anhidra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 48 horas, a 65°C. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima y la aparición de un intermediario. Se agregaron 0.8871 g (5.7 mmol, 1.2 meq) del alcohol 4-nitrobencílico (**14**). La mezcla se dejó en agitación durante 24 horas, a 80°C. Terminada la reacción, se concentró la DMF, obteniéndose un sólido crema el cual se lavó con tolueno y después con metanol. Se obtuvo un sólido blanco (0.8925 g) que correspondió al 51% de rendimiento; con punto de fusión mayor de 300°C y un R_f de 0.74 en el sistema I.

Síntesis de ácido 3,4-bis[(*ter*-butoxicarbonil)amino]benzóico (23).



a: KOH/H₂O, *ter*butanol

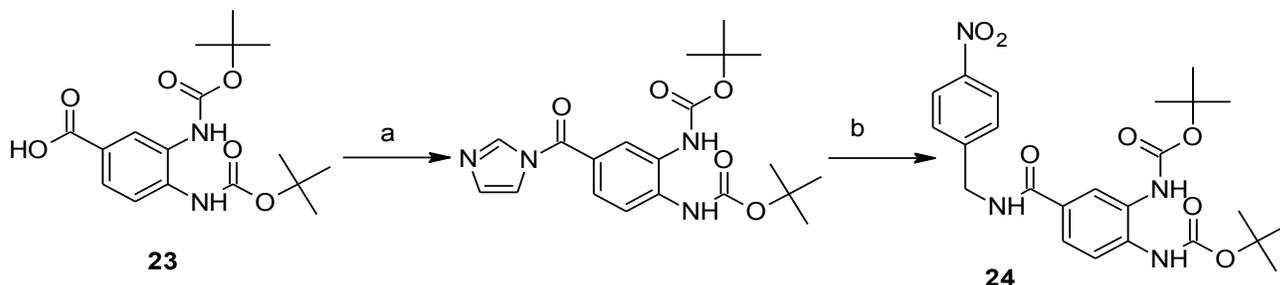
En un matraz bola de 250 mL equipado con agitación magnética y trampa anhidra de gel de sílice, se colocaron 4 g (26.2 mmol, 1meq) de **20** y 80 mL de agua. A esta mezcla se le agregó 6.7 g (0.1051 mmol, 4 meq.) de hidróxido de potasio (88%). Enseguida se añadieron 23.5 mL (0.1051 mol, 4meq.) de pirocarbonato de di *ter*-butilo y 60 mL de *ter*-butanol. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente la mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación y se lavó con 3x50 mL de hexano. La fase acuosa se recolectó en un vaso de precipitado donde se agregó ácido cítrico hasta pH=4 con lo cual precipitó un sólido de color café claro. Finalmente el sólido se separó por filtración al vacío. Se obtuvo un sólido café claro (7.8 g) que correspondió al 85% de rendimiento; con punto de fusión de 199.1-199.7°C y un R_f de 0.75 en el sistema I.

Espectro 39. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3262 (-OH y NH), 2975 (-CH₃), 1698 (C=O), 1682 (C=O), 1540 (C=C, Ar), 1248 y 1157 (C-O-C) cm⁻¹.

EspectroH 40. EM(FAB): 353 [M+1].

Espectro 41. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) δ (ppm): 12.8 (s, 1H, OH), 8.73 (s, 1H, NH, int. con D₂O), 8.68 (s, 1H, NH, int. con D₂O), 7.70 (s, 1H, H-2), 7.68 (s, 1H, H-5), 7.62 (dd, 1H, *J*=2 Hz, *J*=8.4 Hz, H-6), 1.5 (s, 18H, CH₃).

Síntesis de (4-[[[4-nitroencil)amino]carbonil]-1,2-fenileno)biscarbamato de di-ter-butilo (24).



a: CDI, CH₃CN; b: **15**, DIPEA

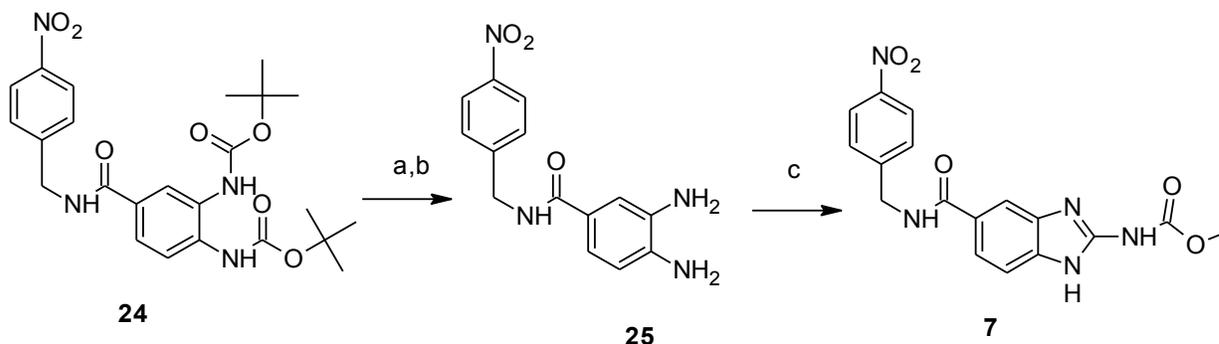
En un matraz bola de 100mL de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 1.3169 g (8.1 mmol, 1meq.) de CDI, 2.8618 g (8.1mmol, 1meq.) de **23** y 35 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 8 horas, a 60°C. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 8.9 mmol, 1.1 meq. de clorhidrato de (4-nitroencil)amina y 1.4 mL (8.9 mol, 1.2 eq.) de DIPEA. La mezcla se dejó en agitación durante 24 horas, a 80°C. Terminada la reacción, se concentró el acetonitrilo, obteniéndose un aceite de color café rojizo. Al aceite se le agregaron 50 mL de agua con lo que se formó un precipitado de color café claro, que se separó por filtración al vacío. Se obtuvieron 3.3 g del sólido café claro que correspondió al 83.5% de **24** cuyo punto de fusión es 110.1-110.6°C y un R_f de 0.83 en el sistema I.

Espectro 42. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3287 (-NH), 2979 (-CH₃), 1700 (C=O), 1517 (Ar-NO₂), 1344 (Ar-NO₂), 1241 y 1153 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 43. EM(FAB): 487 [M+1].

Espectro 44. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) δ (ppm): 9.14 (t, 1H, *J*=6 Hz, NH), 8.69 (s, 1H, H-3), 8.21 y 7.58 (AA'XX', 4H), 8.02 (s, 1H, H-6), 7.67 (m, 1H, H-5), , 4.58 (d, 2H, *J*=6Hz, CH₂), 1.49(s, 9H, CH₃), 1.48 (s, 9H, CH₃).

Síntesis de {5-[(4-nitroencil)carbamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (7).

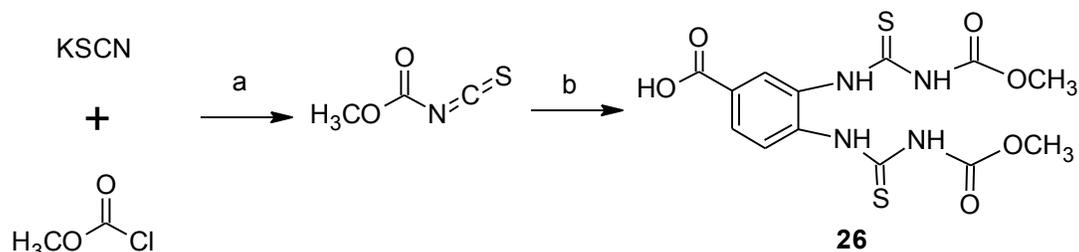


a: CF_3COOH ; b: NaHCO_3 ; c: 1,3-(dimetoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea (**21**), CH_3COOH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

En un matraz bola de 100mL equipado con agitación magnética y trampa anhidra de gel de sílice se colocaron 3.3 g (6.3 mmol, 1 eq.) de **24** en 5 mL (64 mmol, 10.1 eq.) de ácido trifluoroacético dejándose en agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se neutralizó con una solución saturada de NaHCO_3 , se obtuvo un precipitado de color amarillo que se separó por filtración al vacío. El sólido amarillo (**25**) obtenido se utilizó inmediatamente sin purificar para la reacción de ciclocondensación considerando el producto obtenido con un 100% de rendimiento (6.3 mmol).

En un matraz bola de 250 mL de dos bocas, adaptado con un tapón de hule, termómetro, refrigerante en posición de reflujo conectado a tres trampas de hipoclorito de sodio y agitación magnética, se colocó 3,4-diamino-*N*-(4-nitroencil)benzamida (**25**), 1.54 g (6.3 mmol, 1.1eq) de **21**, 50 mL de metanol, 50 mL de agua y 0.5mL de ácido acético como catalizador. Dicho matraz de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 8 horas. Una vez agotada la materia prima se agregó al matraz de reacción 50 mL de hielo. Finalmente se filtró al vacío obteniéndose un sólido de color café que se lavó con tolueno. Se obtuvo un sólido café claro (1.95 g) que correspondió al 65.4% de rendimiento; con punto de fusión de 278.5 – 278.9°C y un R_f de 0.71 en el sistema I.

Síntesis del ácido 3,4-bis[[[(metoxicarbonil)carbamoil]amino]benzóico (26).



a: CH₃CN; b: **20**

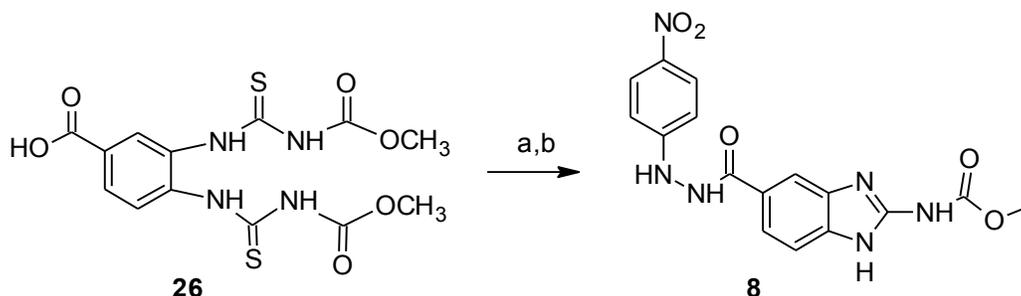
Para la formación del compuesto **26**, se pesaron 5.0g (51.4 mmol, 4 eq.) de tiocianato de potasio en un matraz bola y se agregaron 100mL de acetonitrilo con agitación constante. Posteriormente la reacción se colocó en un baño de hielo y se adicionaron gota a gota 3.9 mL (51.4 mmol, 4 eq.) de cloroformiato de metilo mediante un embudo de adición de líquidos. Una vez terminada la adición, se retiró el baño de hielo y la reacción permaneció en estas condiciones durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se adicionaron 2.0 g (12.8 mol, 1eq.) de **20**. La mezcla de reacción fue rápidamente adaptada a un sistema de tres frascos lavadores con hipoclorito de sodio. Y se calentó a reflujo durante 1 hora. Finalmente se dejó enfriar la reacción, el precipitado obtenido se separó por filtración al vacío y se lavó con diclorometano. Finalmente se obtuvo un sólido café (3.97 g) que correspondió al 81.2 % de rendimiento; con punto descomposición de 146 °C y un R_f de 0.61 en el sistema I.

Espectro 45. IR ν_{\max} (Reflectancia): 3300 y 3170 (OH y NH), 1724 (C=O), 1605 (C=O), 1240 (C=S) cm⁻¹.

Espectro 46. EM(FAB): 387 [M+1]

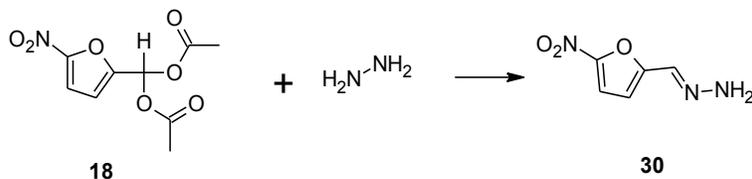
Espectro 47. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) δ (ppm): 11.59 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, NH), 11.56 (s, 1H, NH), 11.37 (s, 1H, NH), 8.27 (d, 1H, *J*=1.8 Hz, H-2), 8.13 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.93 (dd, 1H, *J*=1.8 Hz, *J*=8.4 Hz, H-6), 3.78 (s, 1H, CH₃), 3.77 (s, 1H, CH₃).

Síntesis de (5-{[2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil}-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (8).



a: CDI, b: **16**, DBU

En un matraz bola de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 0.7409 g (4.5 mmol, 1.5 meq.) de CDI, 1.177 g (3 mmol, 1 eq.) de **26** y 35 mL de acetonitrilo. La reacción se mantuvo en agitación durante una hora a 60°C, Una vez trascurrido este tiempo una ccf reveló el consumo de la materia prima y la formación de un compuesto con un R_f de 0.71. Por lo que se agregaron 0.5123 g (3.3 mmol, 1.1 eq.) de **16** y 0.7 mL (3.3 mmol, 1.1 eq.) de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y se calentó a 70°C durante 24 hrs. Cuando finalizó el tiempo de reacción, el disolvente se eliminó mediante una destilación a presión reducida. El aceite obtenido fue de color café-rojizo al cual se le agregaron 60 mL de agua y se dejó agitando durante una hora hasta la formación de un sólido color café. El precipitado obtenido se separó por filtración al vacío. El precipitado se lavó con tolueno y después con metanol. El sólido café (0.71g) corresponde al 63.9 % de rendimiento; con punto de fusión mayor de 300 °C y un R_f de 0.51 en el sistema I.

Síntesis de la hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehído (30).

a: MeOH

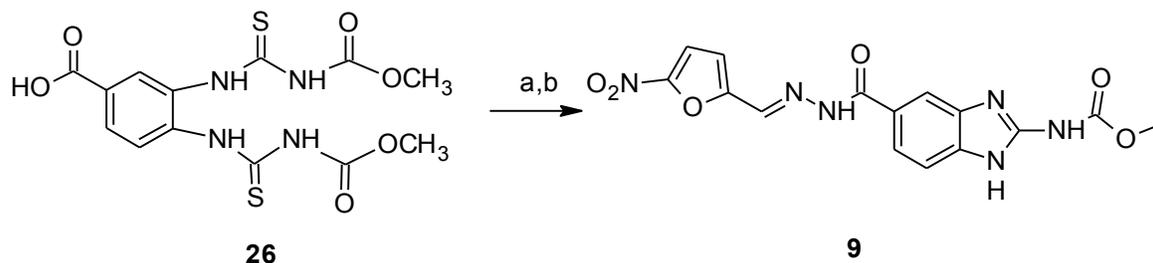
En un matraz bola de 250 mL de dos bocas, adaptado con termómetro y agitación magnética, se colocaron 4.863 g (20 mmol, 1 meq.) del diacetato del 5-nitrofurfuraldehído y se suspendieron en 100 mL de metanol. La mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Posteriormente se adicionaron lentamente 3mL de hidrato de hidrazina al 64% (60 mmol, 3 meq.). La reacción se dejó en agitación durante 12 horas. Terminada la reacción el sólido se separó por filtración al vacío y se lavó con metanol enfriado previamente. Se obtuvo un sólido anaranjado (2.2691g) que correspondió al 73.2%; con p.f. de 164.8 – 165.4 °C; y un R_f de 0.69 en el sistema I.

Espectro 48. IR ν_{max} (Reflectancia): 3438 (NH), 3152 (CH), 1660 (C=C), 1581 (C=N), 1550 (Ar-NO₂), 1338 (Ar-NO₂), 1228 (C-O-C) cm⁻¹.

Espectro 49. EM(FAB): 156 [M+1]

Espectro 50. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) δ (ppm): 8.04 (s, 2H, int. Con D₂O, NH), 7.74 (d, 1H, $J=4.2$ Hz, H-3), 7.60 (s, 1H, CH), 6.79 (d, 1H, $J=4.2$ Hz, H-4).

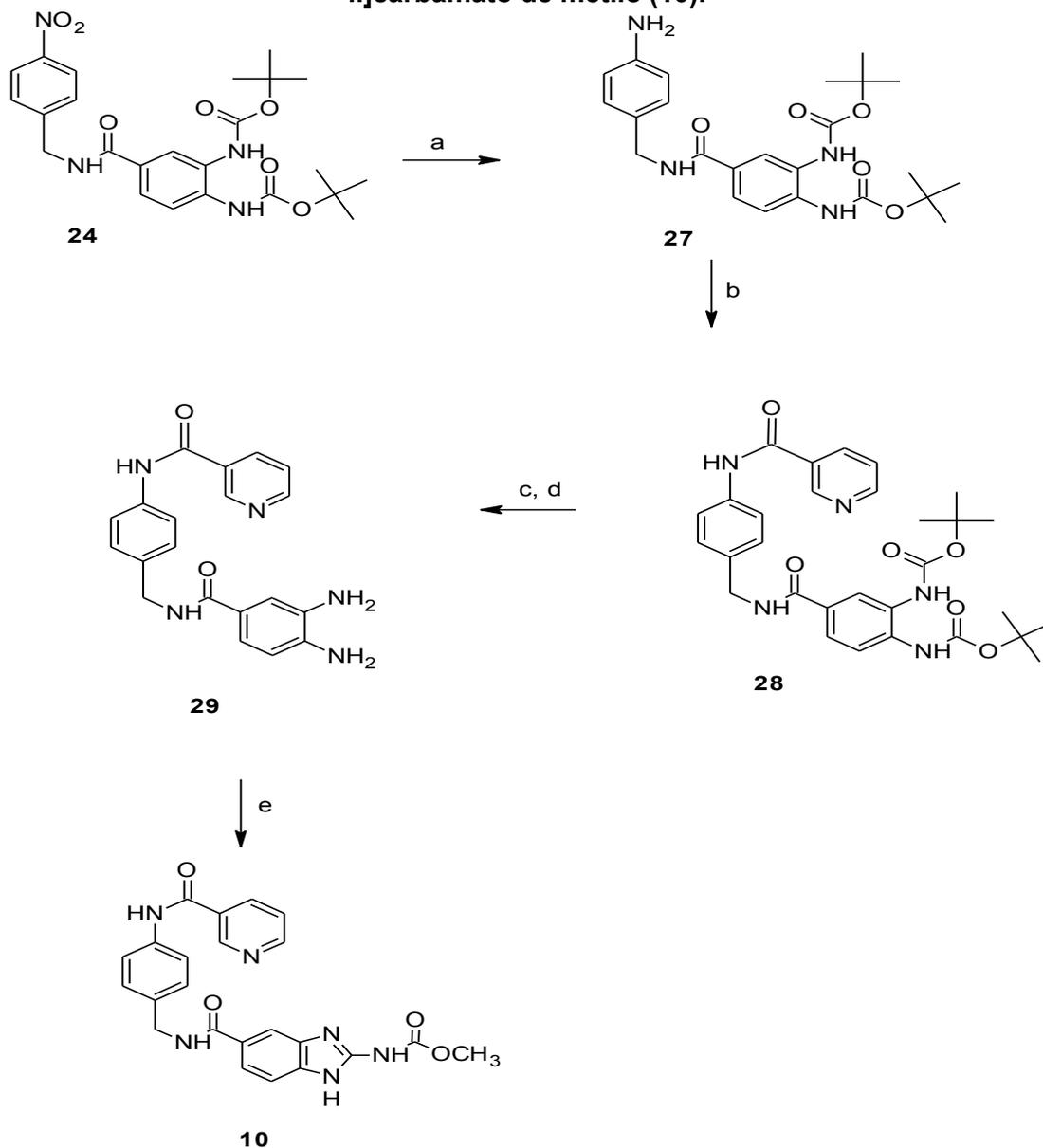
Síntesis del [5-({2-[(5-nitro-2-furil)metileno]hidrazino}carbonil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (9).



a: CDI; b: hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehído (**30**), CH₃ONa.

En un matraz bola de dos bocas, adaptado con una columna vigreux unida a un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 0.7409 g (4.5 mmol, 1.5 meq.) de CDI, 1,177 g (3 mmol, 1 meq.) de **26** y 35 mL de acetonitrilo. La reacción se mantuvo en agitación durante una hora a 60°C, Una vez transcurrido este tiempo una ccf reveló el consumo de la materia prima y la formación de un compuesto con un R_f de 0.71. Por lo que se agregaron 0.5168 g (3.3 mmol, 1.1 meq) de **30** y g (6.6 mmol, 2.2 meq.) de metóxido de sodio y se calentó a 70°C durante 24 hrs. Cuando finalizó el tiempo de reacción al matraz de reacción se agregaron 100 mL de agua, 30 mL de una solución de ácido cítrico 0.025M y se dejó agitando hasta la formación de un precipitado color café oscuro. El precipitado se lavó con metanol. Se obtuvo un sólido de color café rojizo (0.34 g) que correspondió al 30.4 % de rendimiento; con punto de fusión de descomposición mayor a 300 °C y con un R_f de 0.68 en el sistema I.

Síntesis de {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]bencil}carbamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**10**).



a: H_2 , Pd/C 10%, MeOH; b: **12**, CDI, CH_3CN ; c: CF_3COOH d: NaHCO_3 ; e: **21**, CH_3COOH .

En una botella de hidrogenación Parr de 500 mL se colocaron 1 g (2.1 mmol) de **24**, 0.1 g de catalizador Pd/C al 10% y se adicionaron lentamente bajo atmosfera de nitrógeno 40 mL de metanol grado R.A. y. La botella de reacción se colocó en el hidrogenador y se cargó con hidrógeno hasta 30 lb/pulg² succionado posteriormente con el vacío. Esta última operación se repitió 3 veces. Finalmente, la botella se llenó con hidrogeno hasta 60

lb/ pulg² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no consumió más hidrogeno (10 lb/ pulg² en dos horas). La mezcla resultante con aspecto verdoso traslúcido se filtró al vacío usando una cama celita para eliminar el catalizador. El filtrado se evaporó para usarse inmediatamente en la siguiente reacción. Obteniéndose un sólido cristalino de color amarillo (**27**). El producto mostró un R_f de 0.25 en el sistema I.

En un matraz bola de 100mL de dos bocas, adaptado con una columna unida vigreux un globo con nitrógeno, un septo y agitación magnética, se colocaron 381.6 mg (2.3 mmol, 1.1 meq.) de CDI, 0.2634 g de ácido nicotínico (2.1 mmol, 1 meq.) y 15 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 horas a 40°C. Una vez transcurrido este tiempo, una ccf reveló el consumo total de la materia prima y la aparición de un intermediario de R_f = 0.81 en el Sistema III. Por lo que se agregó el sólido amarillo (**27**) la reacción se mantuvo en agitación a 65°C durante 24 horas. Terminada la reacción, se evaporó la DMF, obteniéndose un aceite de color amarillo (**28**) el cual se empleó sin purificar en la siguiente reacción.

A continuación en un matraz bola de 50mL equipado con agitación magnética y trampa anhidra de gel de sílice se colocó **28** en 1.5 mL (21 mmol, 10 meq.) de ácido trifluoroacético dejándose en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se neutralizó con una solución saturada de NaHCO₃, se obtuvo un precipitado de color amarillo que se separó por filtración al vacío. El sólido amarillo (**29**) obtenido se utilizó inmediatamente y sin purificar, para la reacción de ciclocondensación considerando el producto obtenido con un 100% de rendimiento.

La reacción de ciclo condensación se realizó en un matraz bola de 250 mL de dos bocas, adaptado con un tapón de hule, termómetro, refrigerante en posición de reflujo conectado a tres trampas de hipoclorito de sodio y agitación magnética. En el cual se colocó **29**, 0.44 g (2.1 mmol, 1 meq.) de **21**, 50 mL de metanol, 50 mL de agua y 0.5mL de ácido acético como catalizador. Dicho matraz de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 24 horas. Una vez agotada la materia prima se agregó al matraz de reacción 50 g de hielo. Finalmente se filtró al vacío obteniéndose un sólido de color café claro que se lavó con tolueno. Se obtuvo un sólido (0.4255 g) que correspondió al 45.7% de rendimiento; un punto de fusión de 244.2-245.0°C y con un R_f de 0.76 en el sistema I.

Metodología del estudio de acoplamiento molecular (docking).

a) Obtención de la Estructura y Minimización.

La proteína de estudio se localizó en el Protein Data Bank (PDB) identificada como:

- Model of *H. contortus* Beta Tubulin bound to Albendazole **ID PDB 1OJ0**.

Esta proteína estructural es un Modelo Teórico desarrollado por M. Robinson³⁸, en el cual propone un inter-dominio para la unión de bencimidazoles, según lo expone en el Encabezado del PDB.

La proteína se descargó usando el programa *Maestro 9.0* de Schrödinger, y, empleando el módulo *Protein Preparation Wizard*, se preparó la proteína añadiendo todos los átomos de hidrógeno, asignando los órdenes de enlace y removiendo al SOALB (la proteína carece de moléculas de agua e iones por tratarse de un Modelo Teórico).

Se realizó la minimización de la energía de la proteína empleando Mecánica Molecular (MM), como nivel de teoría, y un campo de fuerza OPLS-2005. Una vez finalizada la minimización, se procedió a almacenar la proteína en formato *pdb* para su posterior empleo.

b) Preparación de los Ligandos

Los Ligandos se construyeron en el programa *Maestro 9.0* de Schrödinger, y se prepararon utilizando el Módulo *LigPrep*, en el cual se solicitó se empleara un Campo de Fuerza OPLS-2005 y se mantuviera el estado de ionización y estereoquímica original. Posteriormente, usando el programa *Autodock 4.2* y su interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4*, se detectaron automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables, marcándose como excepción los enlaces Nitrógeno-Carbonilo (N-CO) del carbamato, que se consideraron rígidos.

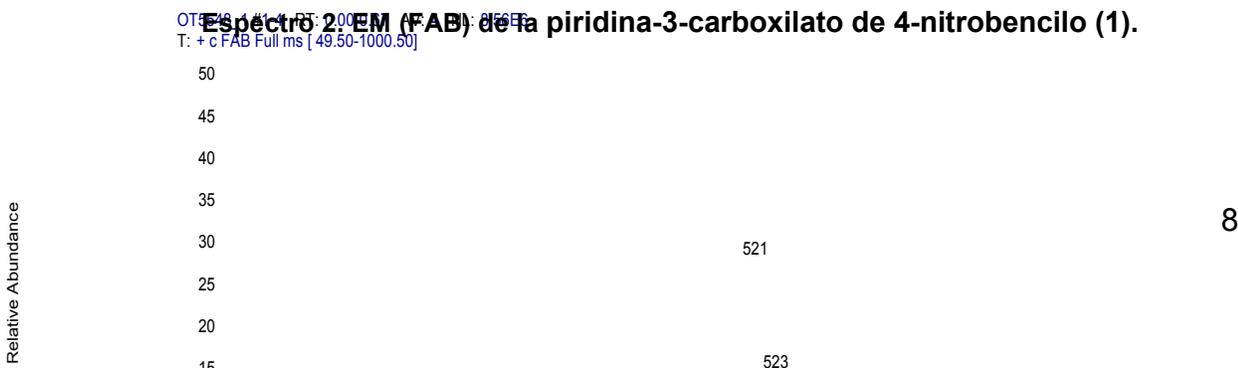
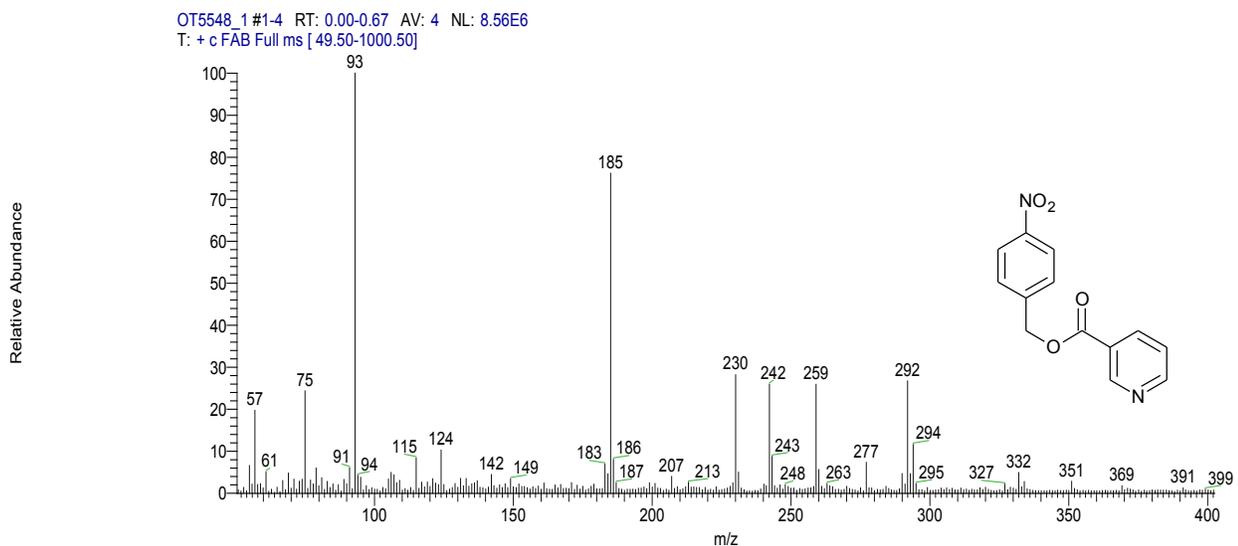
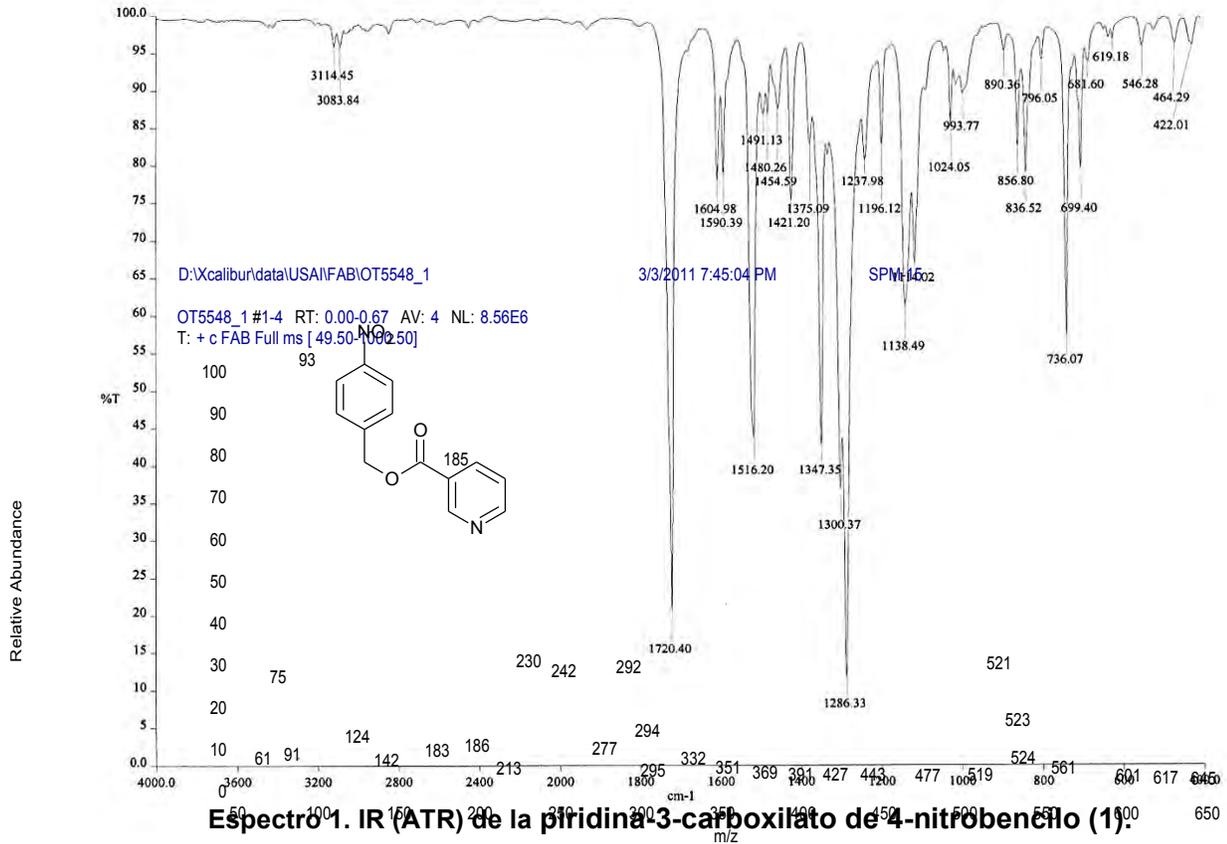
c) Residuos Flexibles

Estudios previos demostraron que existía un impedimento estérico de acoplamiento debido a la Isoleucina 16 (Ile16), por lo cual se decidió asignarle libertad de rotación a los enlaces entre los átomos CA-CB y CB-CG1 del residuo.

d) Acoplamiento Molecular

Se empleó el programa *Autogrid 4.0* de *AutoDock Tools 1.5.4*, para generar una malla (grid), con una dimensión de 40\AA^3 , en las coordenadas del sitio de unión. Se realizó el acoplamiento con *Autodock 4.2*, empleando un algoritmo genético de tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150, 2.5×10^6 de evaluaciones y 15 corridas. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables del conjunto de conformaciones más abundante. Las energías de acoplamiento (docking score) fueron obtenidas en Kcal/mol.

APÉNDICE 2. ESPECTROS

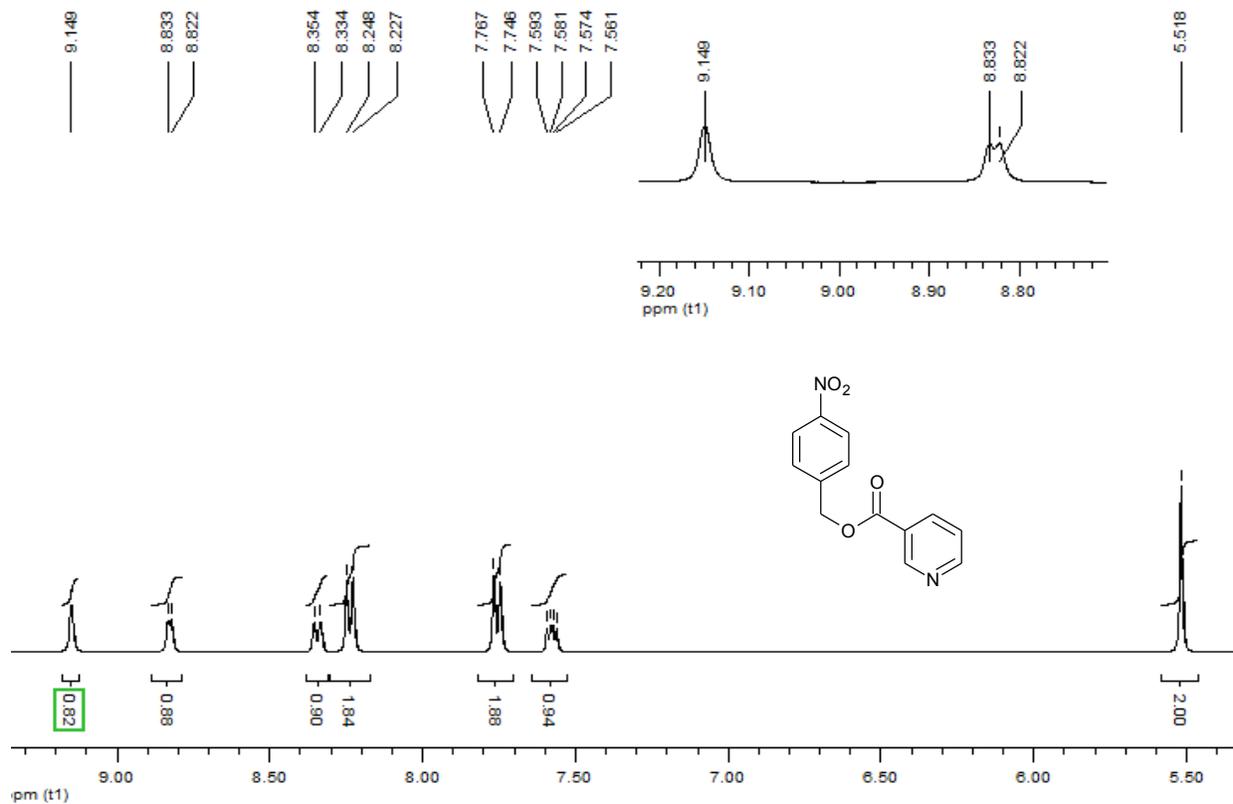


Elemental composition search on mass 259.07

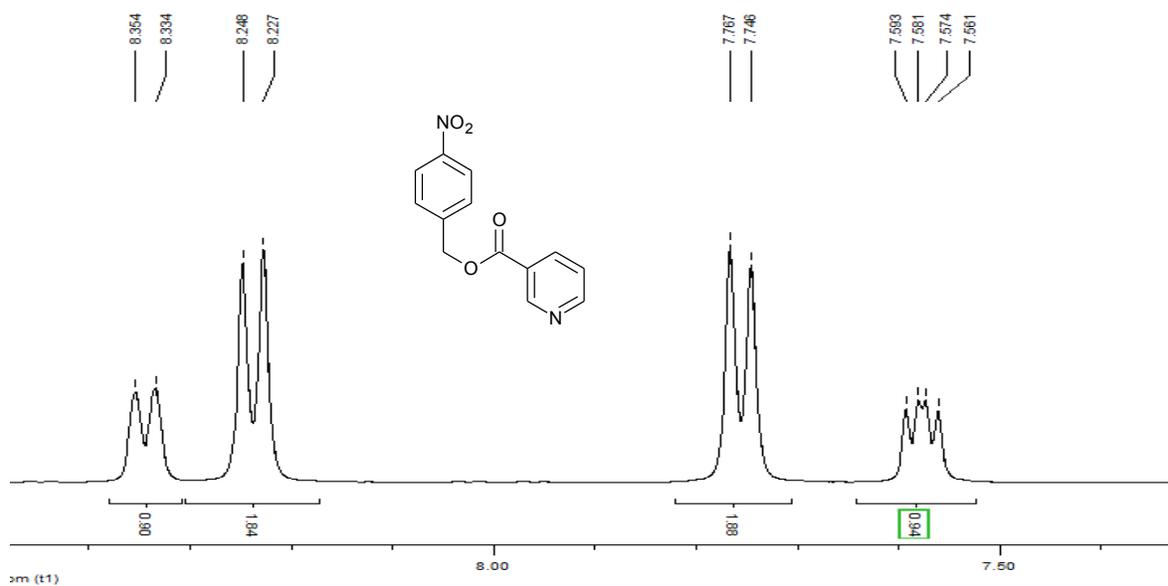
m/z = 254.07-264.07

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
259.0693	259.0713	-7.85	9.5	C ₁₃ H ₁₁ O ₄ N ₂
	259.0839	-56.39	9.0	C ₁₄ H ₁₃ O ₄ N ₁

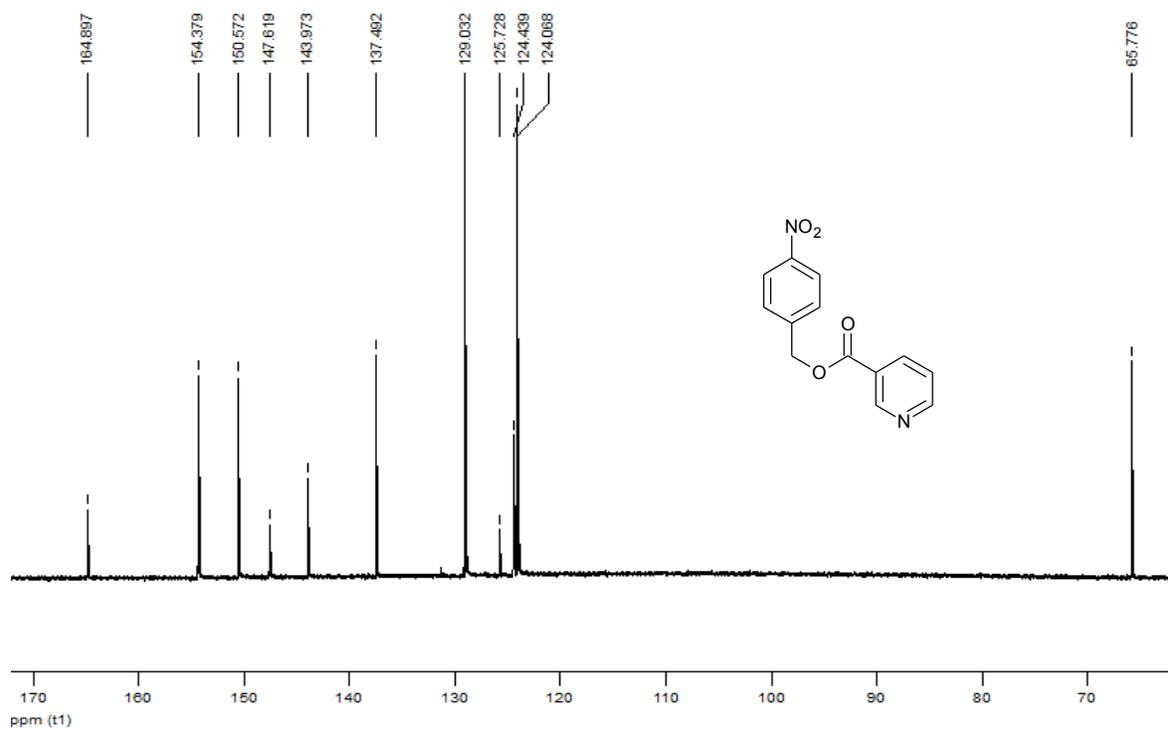
EM- HR de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1).



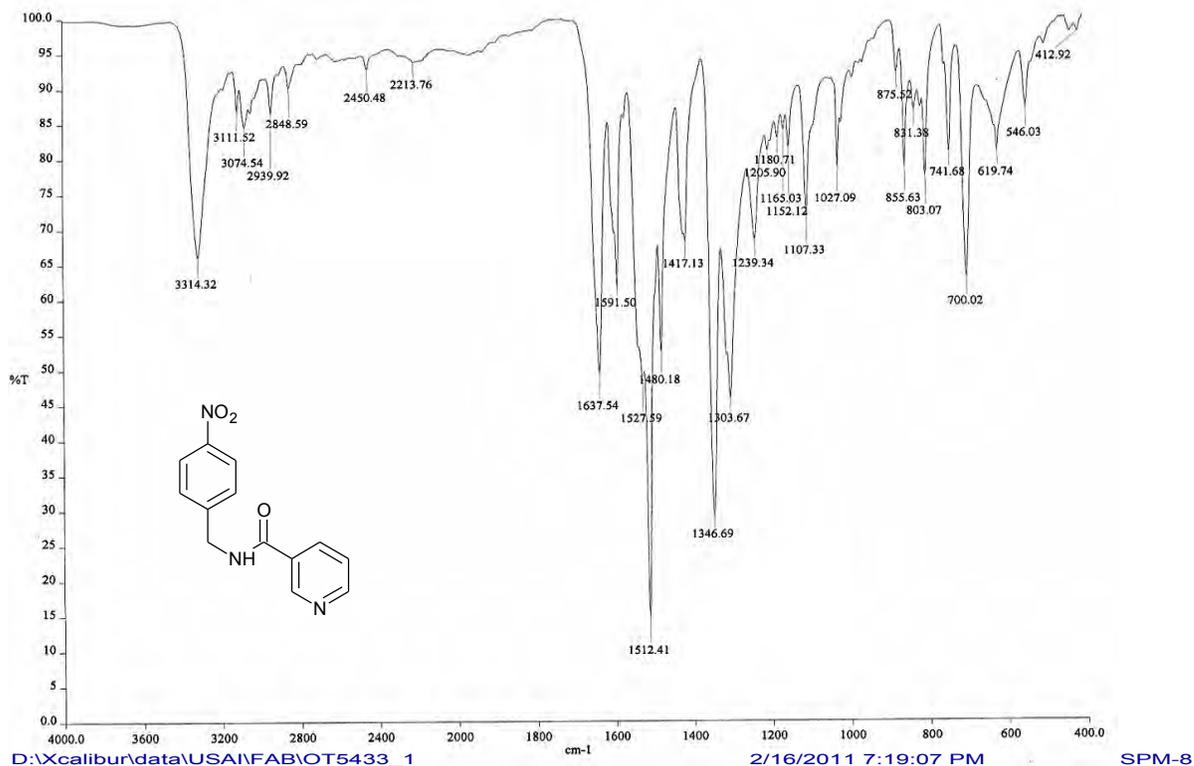
Espectro 3. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1).



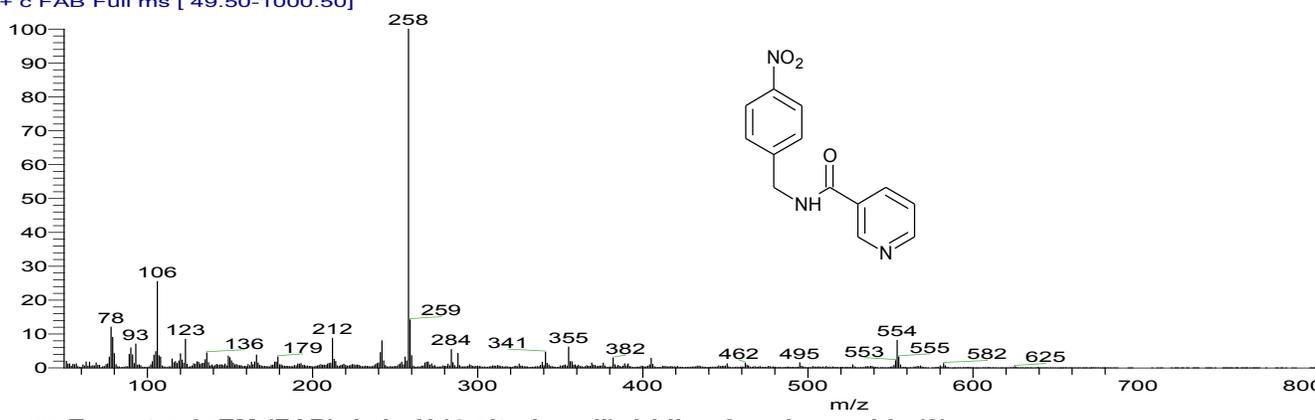
Espectro 3. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1).



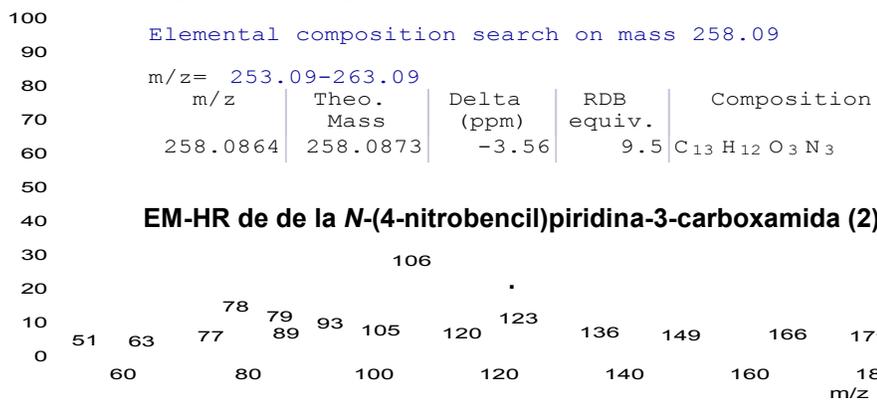
Espectro 4. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) de la piridina-3-carboxilato de 4-nitrobencilo (1).



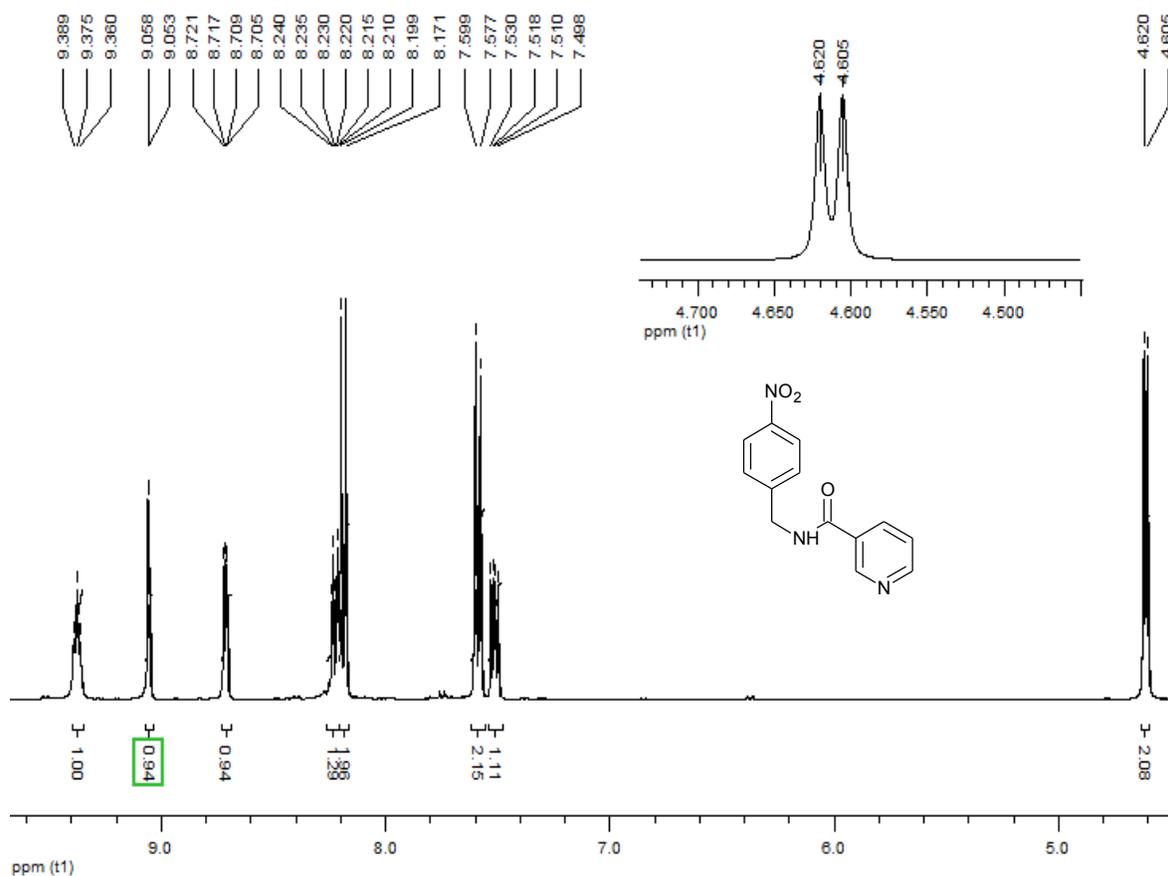
Espectro 5. IR (ATR) de la N-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



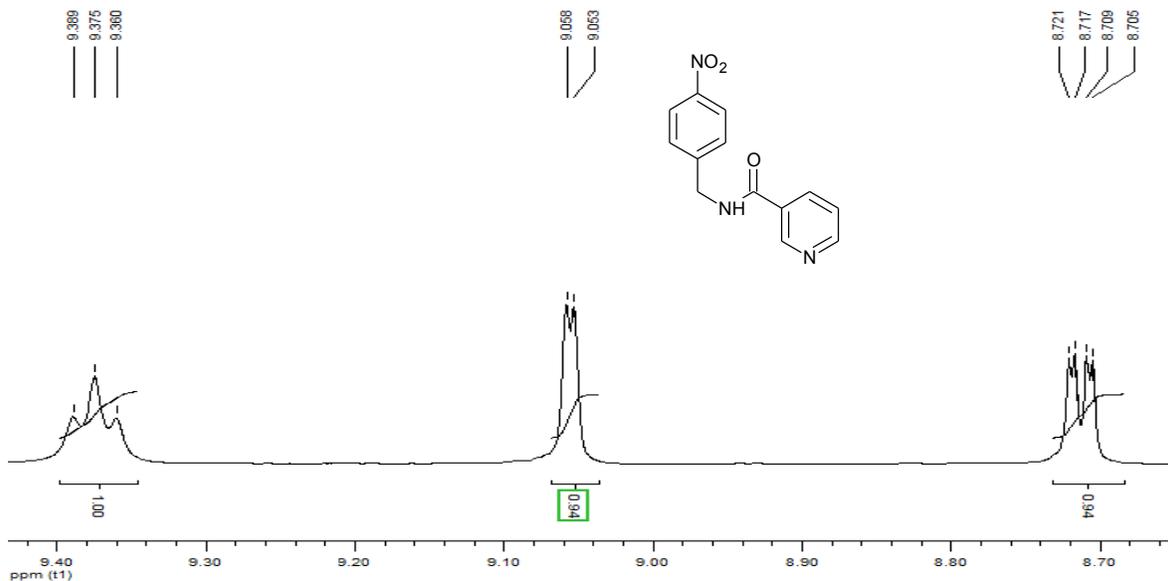
Espectro 6 EM (FAB) de la N-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



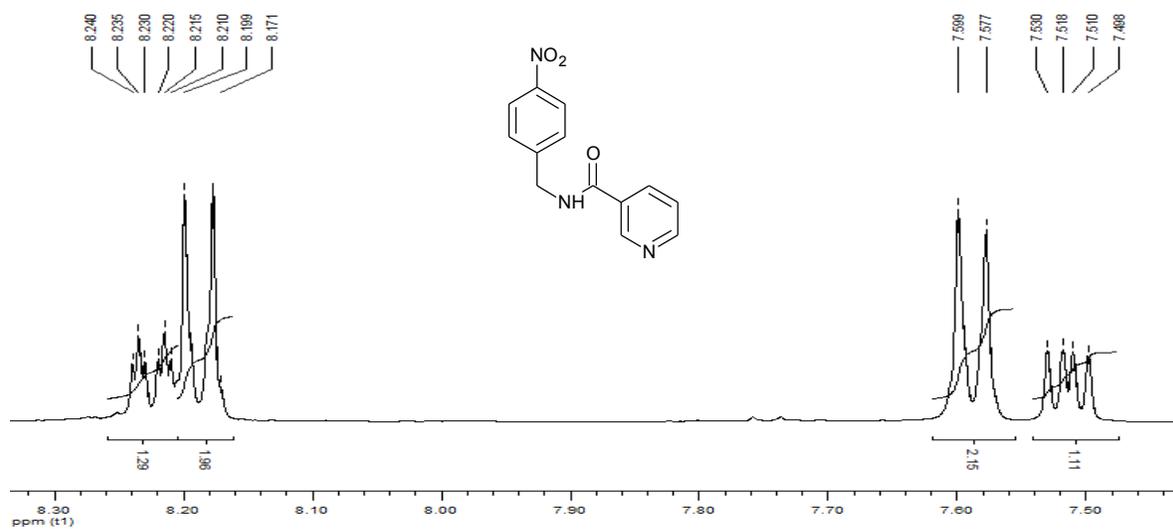
OT5433_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.24E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



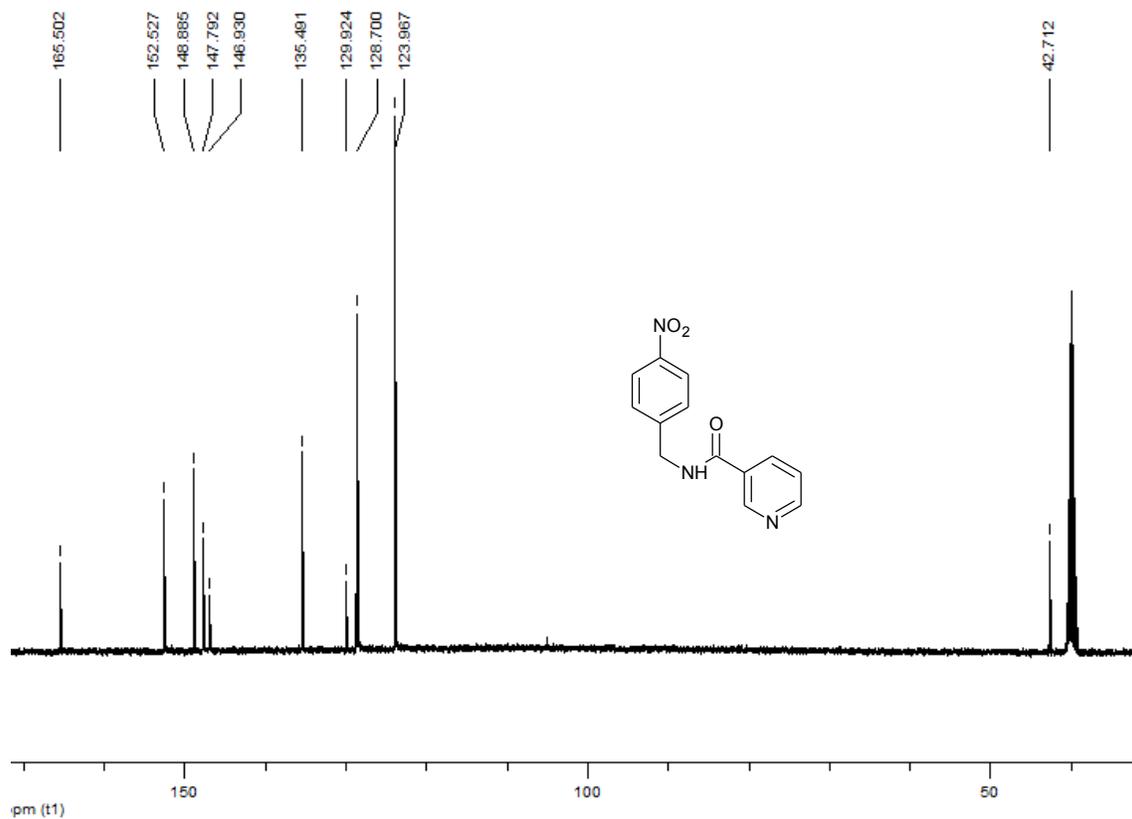
Espectro 7. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de la *N*-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



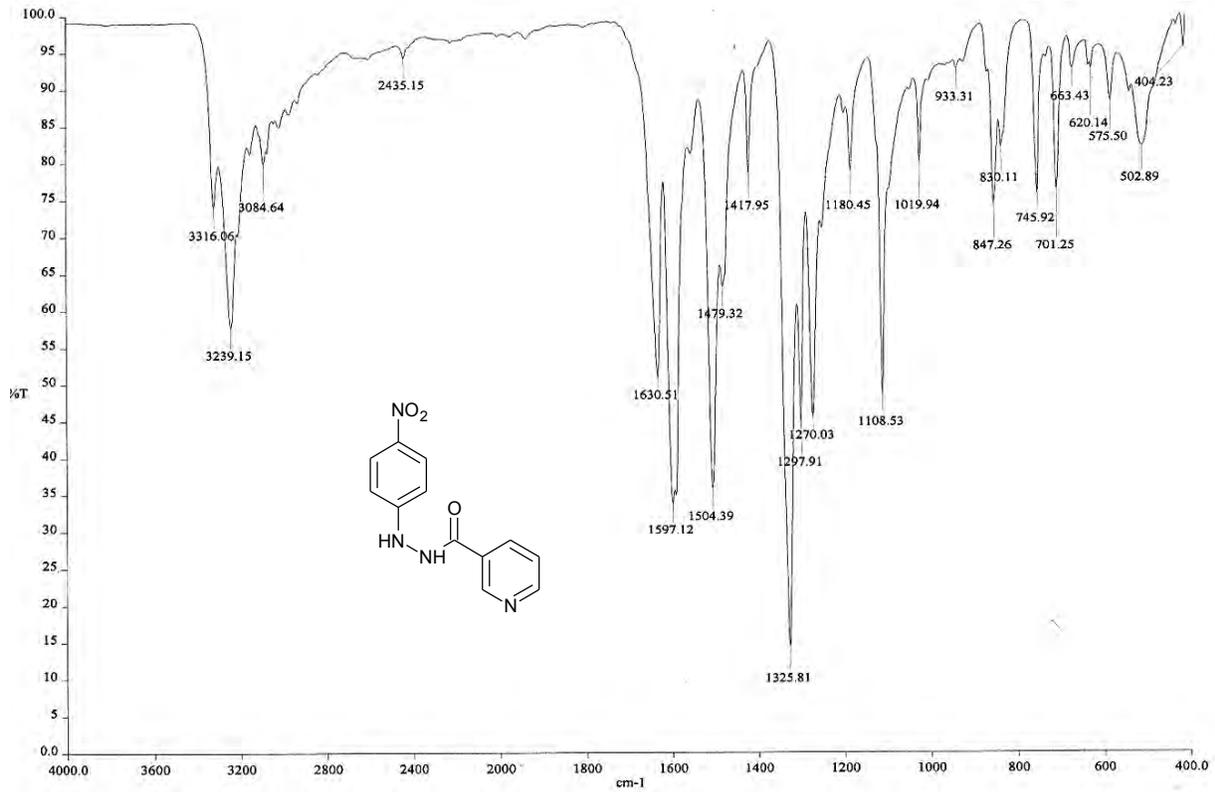
Espectro 7. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de la *N*-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



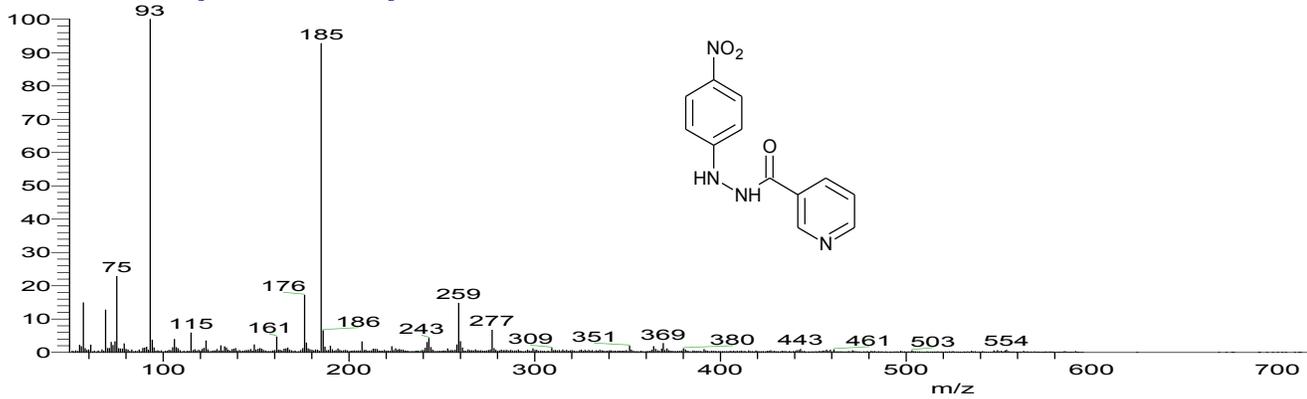
Espectro 7. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la *N*-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



Espectro 8. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) de la *N*-(4-nitrobenzyl)piridina-3-carboxamida (2).



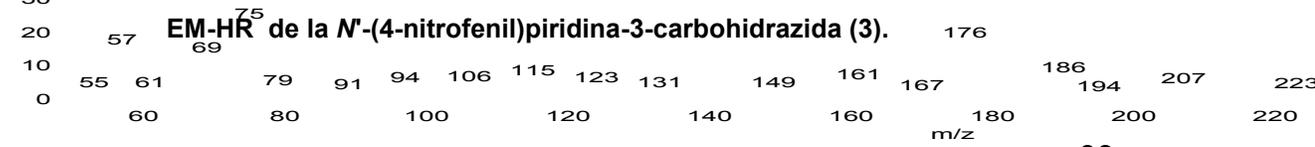
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5434_1 2/16/2011 7:22:17 PM SPM-10
Espectro 9. IR (ATR) de la N'-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).
 OT5434_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.24E7
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



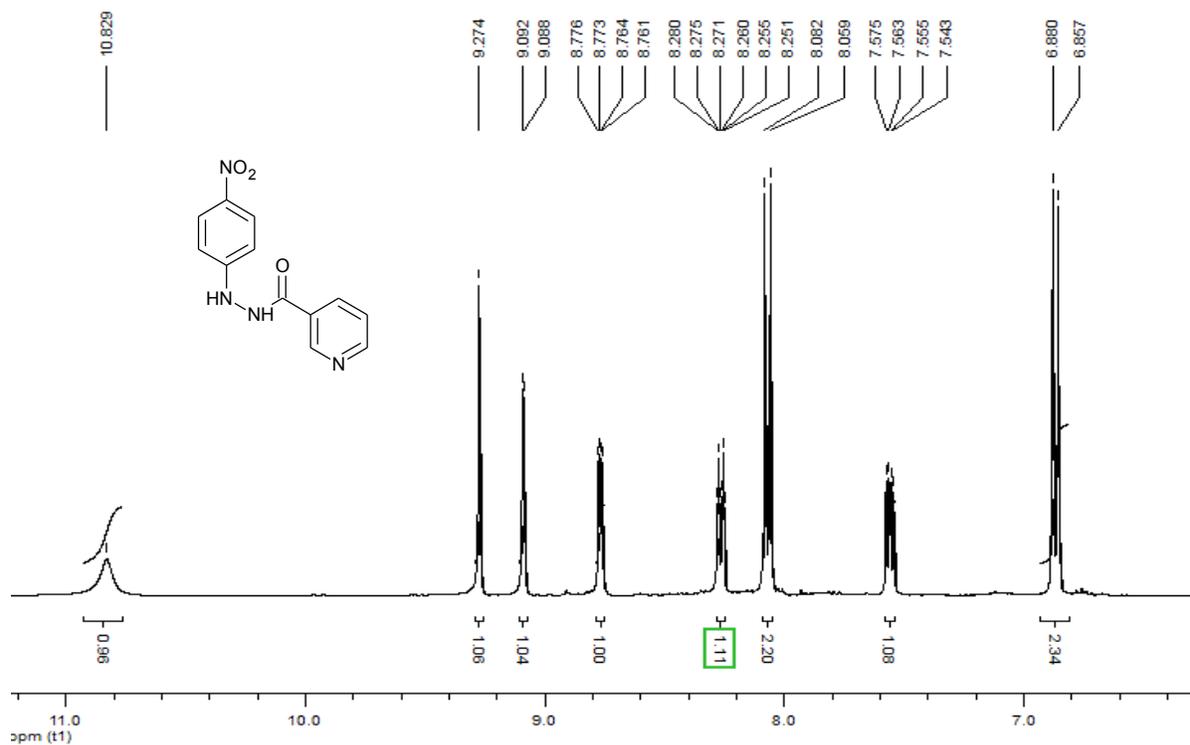
OT5434_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.24E7
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]
Espectro 10. EM (FAB) de la N'-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).

Elemental composition search on mass 259.08
 m/z = 254.08-264.08

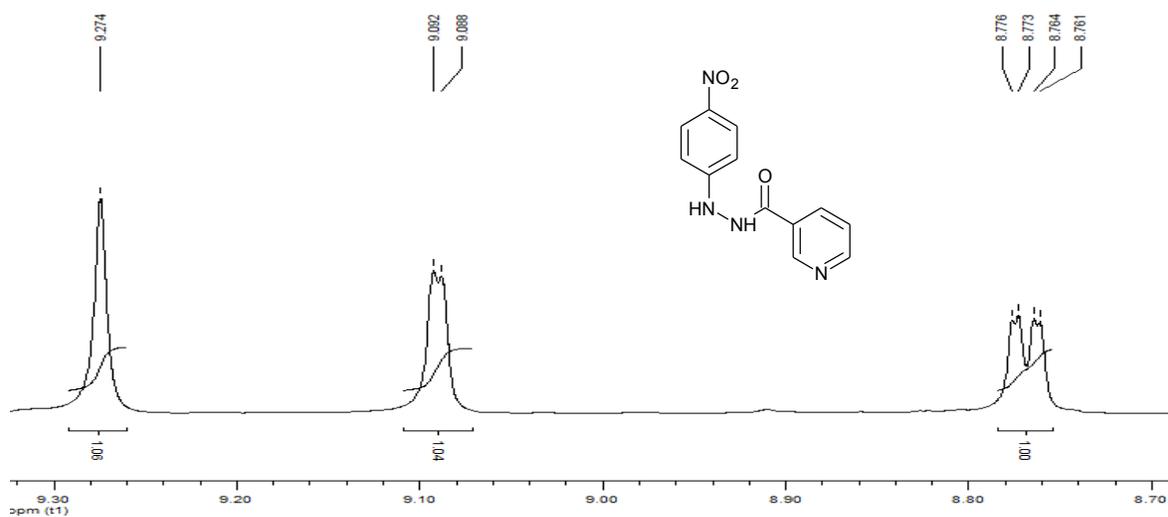
m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
259.0815	259.0826	-4.12	9.5	C ₁₂ H ₁₁ O ₃ N ₄



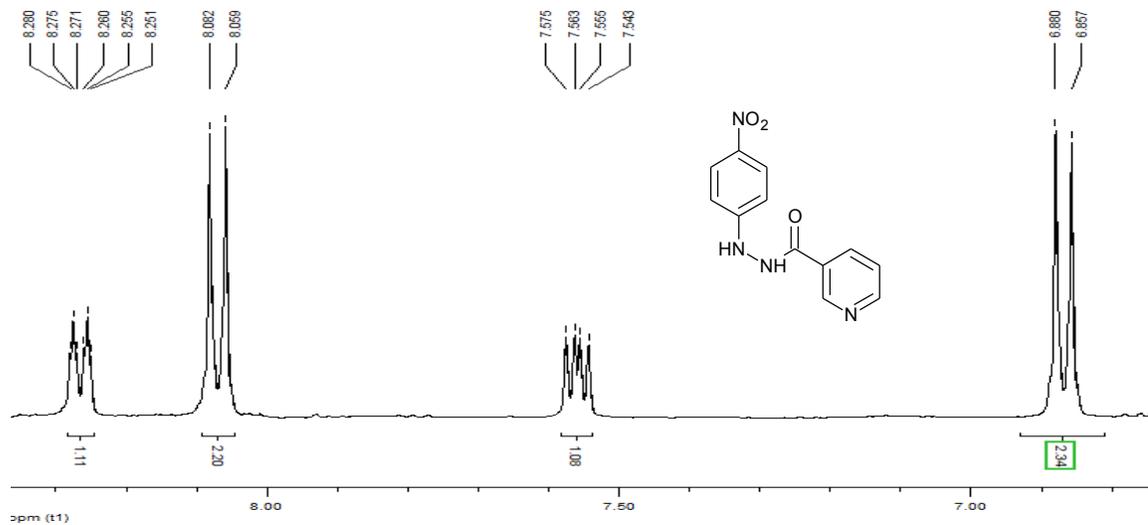
OT5434_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.24E7
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



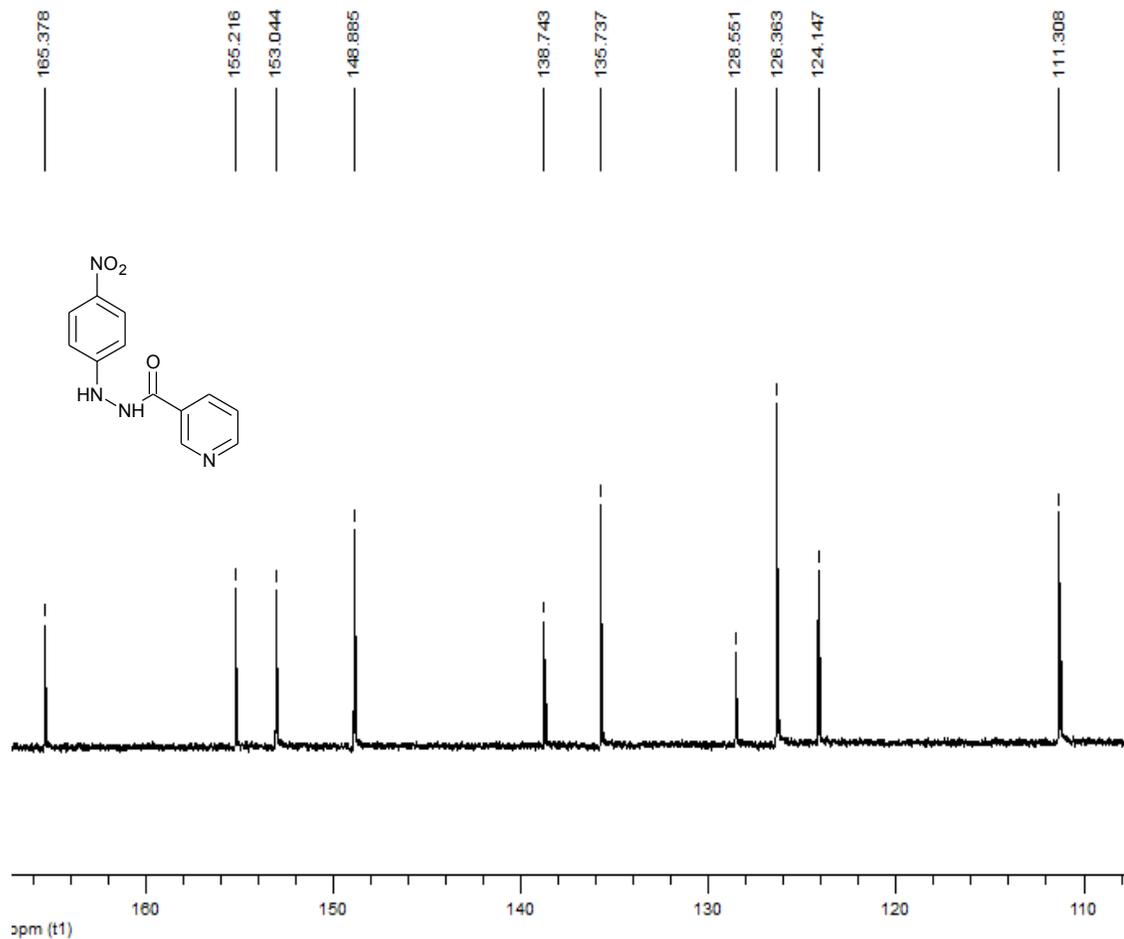
Espectro 11. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de la *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).



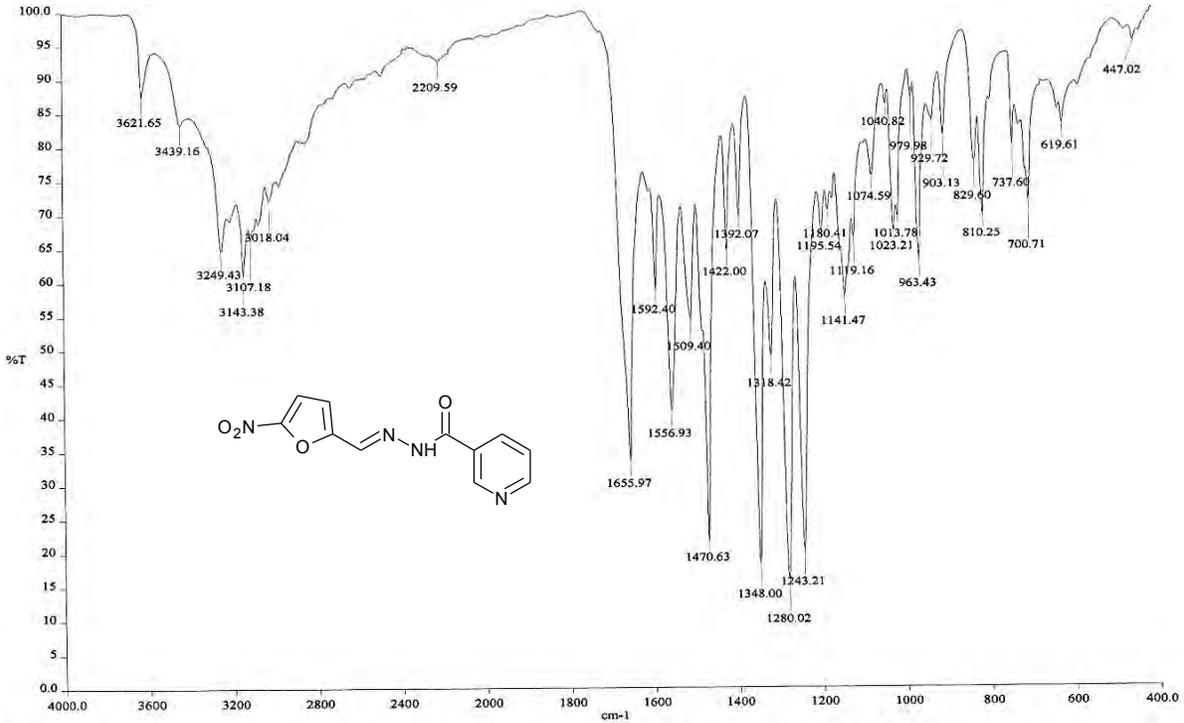
Espectro 11. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de la *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).



Espectro 11. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).

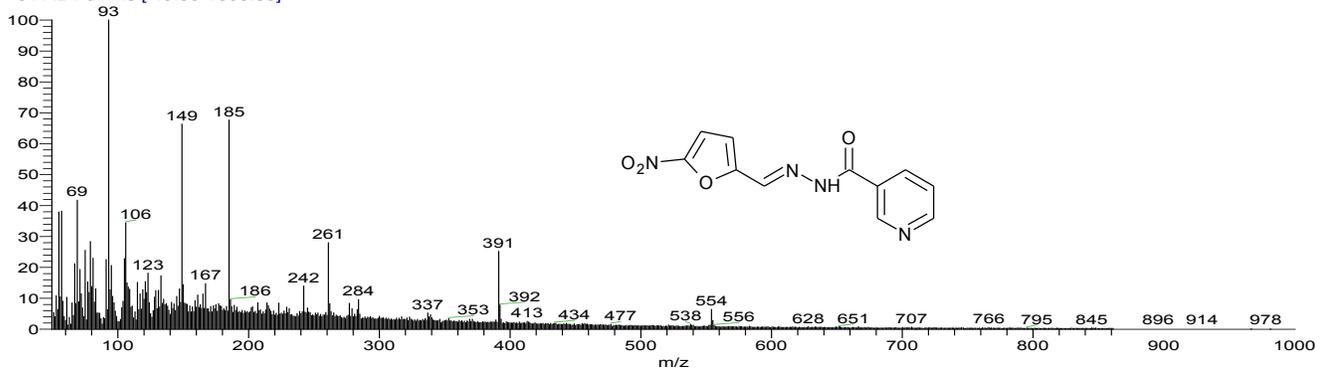


Espectro 12. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) de la *N'*-(4-nitrofenil)piridina-3-carbohidrazida (3).



Espectro 13. IR (ATR) de la N'-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5435_2
GLICEROL
OT5435_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.40E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



OT5435_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.40E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

Espectro 14. EM (FAB) de la N'-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).

Elemental composition search on mass 261.06

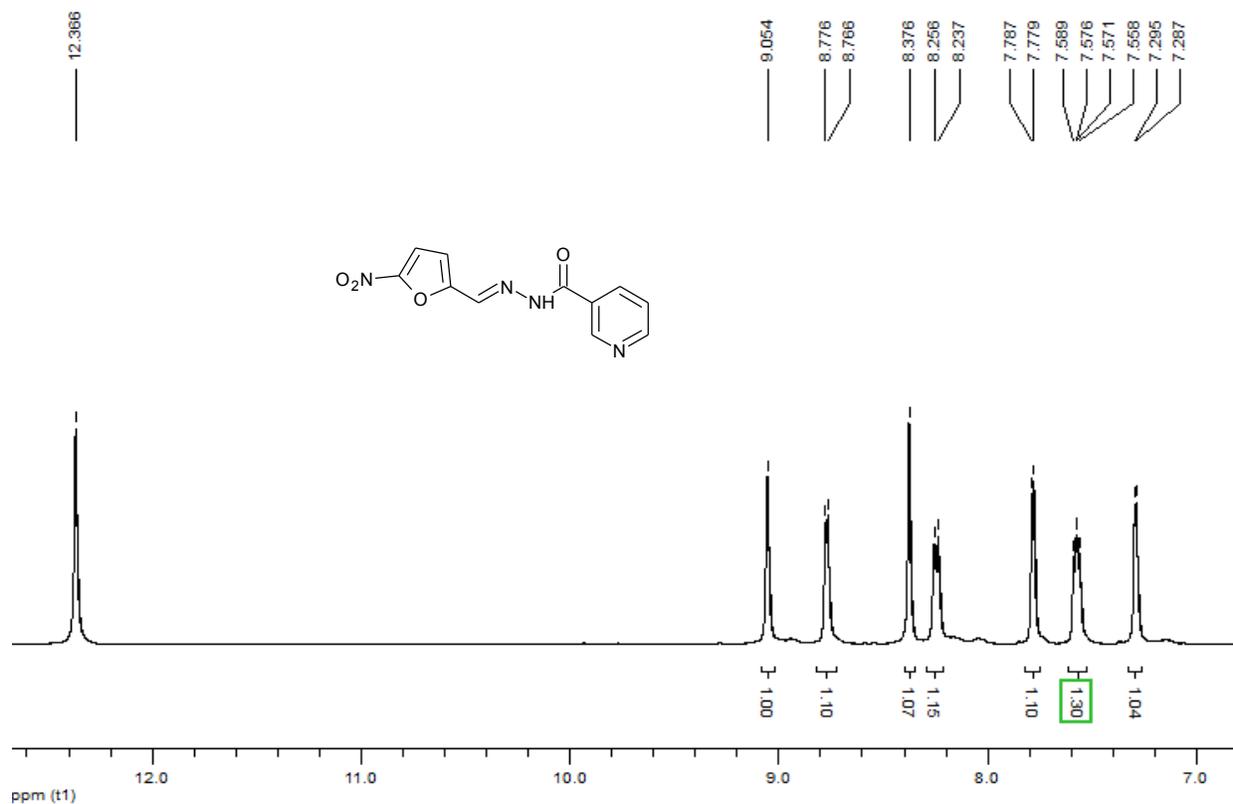
m/z = 256.06-266.06

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
57	261.0618	-7.02	9.5	C ₁₁ H ₉ O ₄ N ₄
61	261.0744	-5.47	9.0	C ₁₂ H ₁₁ O ₄ N ₃

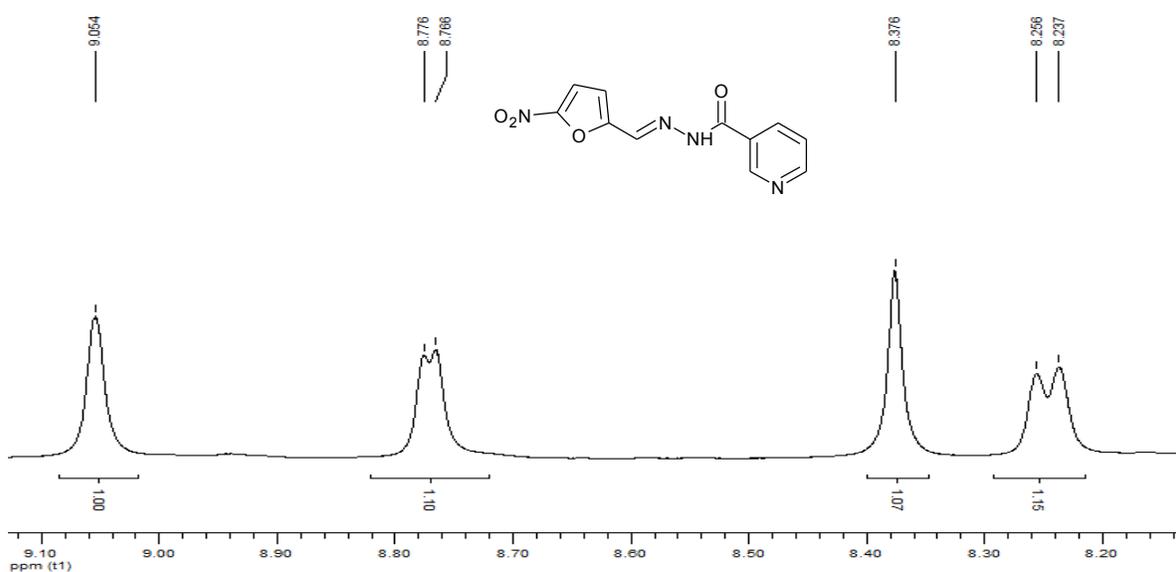
EM-HR de la N'-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).

OT5435_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.40E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

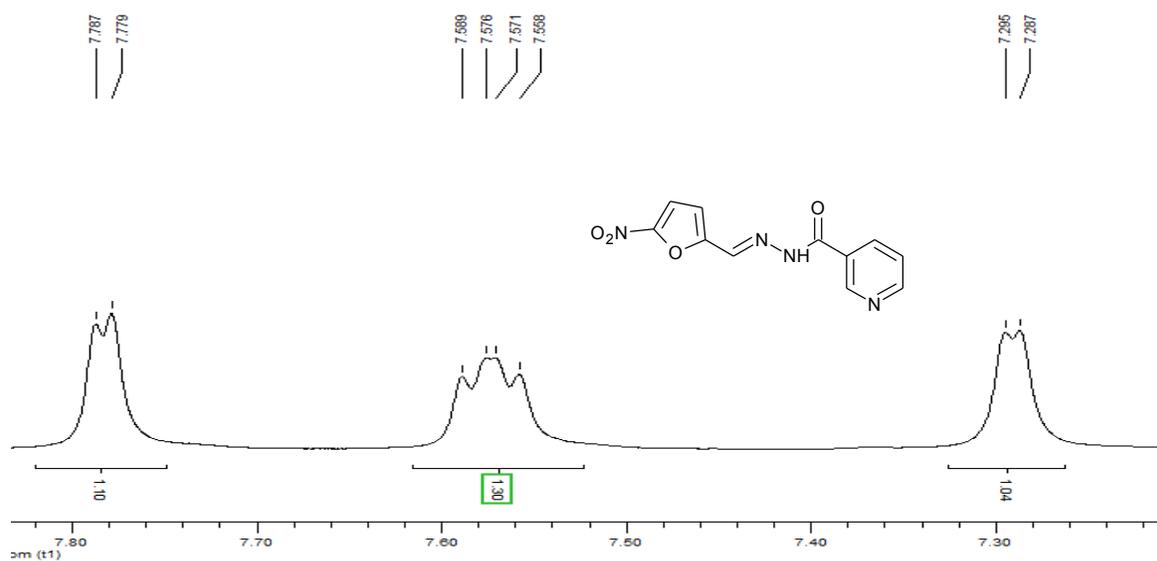




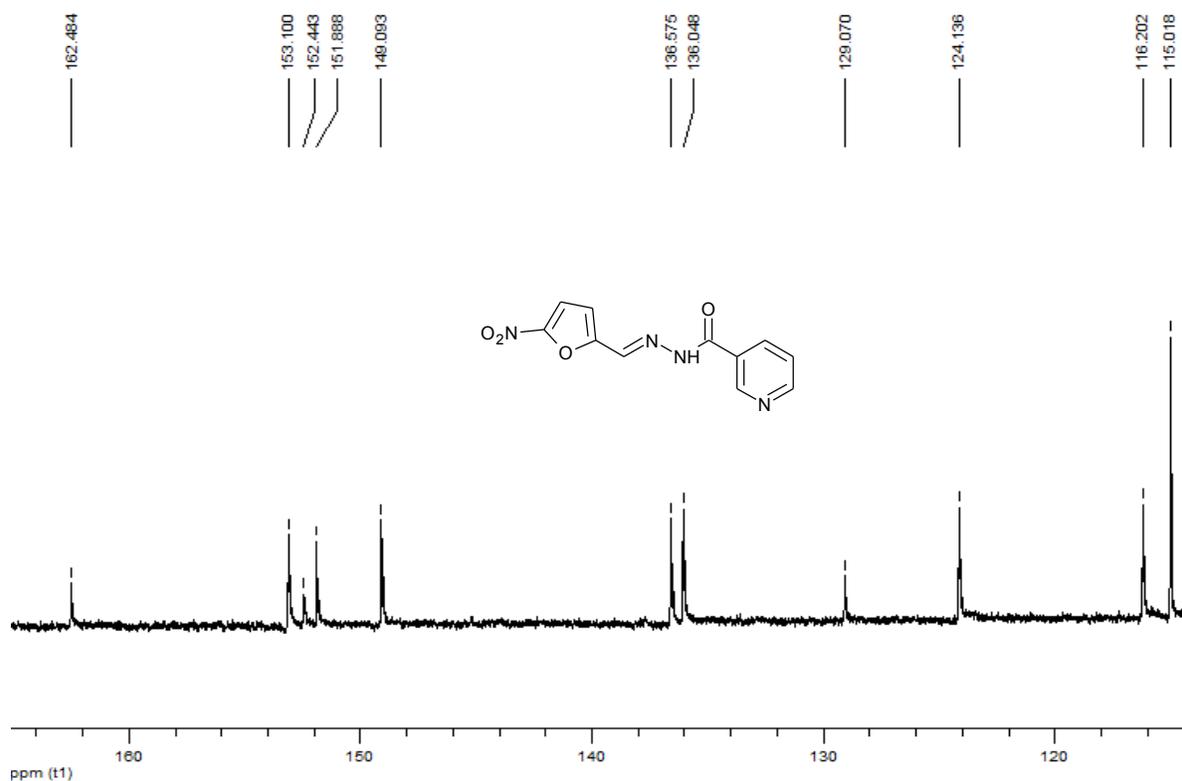
Espectro 15. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la *N'*-[(5-nitro-2-furil)mileno]nicotinoimidazida (4).



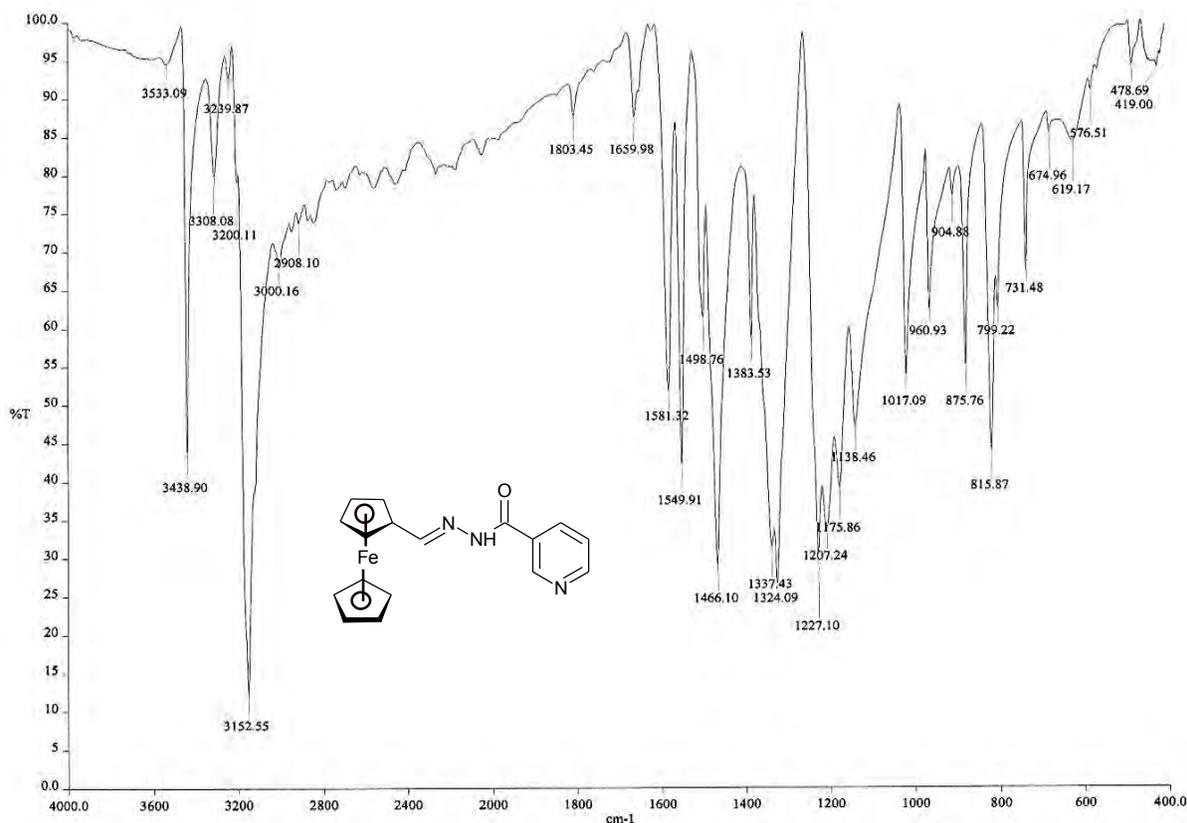
Espectro 15. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la *N'*-[(5-nitro-2-furil)mileno]nicotinoimidazida (4).



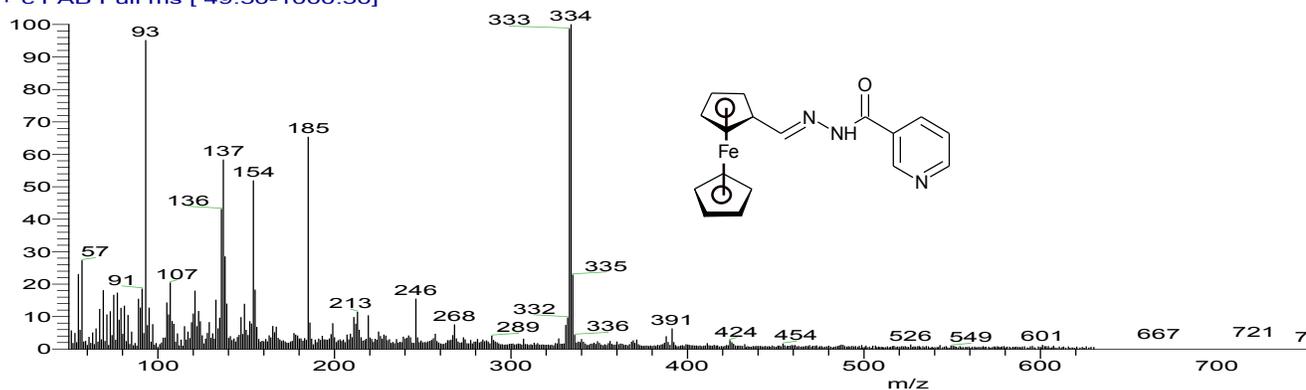
Espectro 15. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de la *N'*-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).



Espectro 16. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) de la *N'*-[(5-nitro-2-furil)metileno]nicotinohidrazida (4).



D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6059_1 5/26/2011 8:11:38 PM SPME-25
Espectro 17. IR (ATR) de la N-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).
 OT6059_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.60E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



OT6059_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.60E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

Espectro 18. EM (FAB) de la N-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).

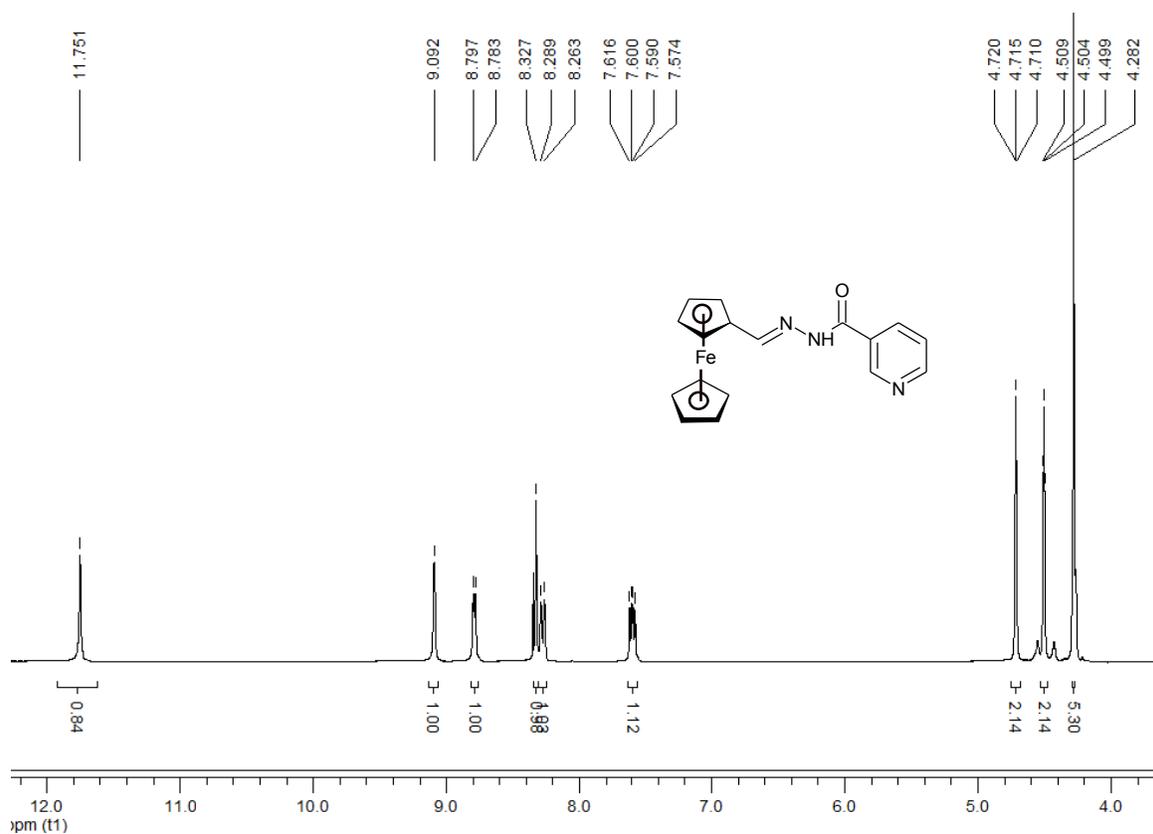
Elemental composition search on mass 335.07

m/z = 330.07-340.07

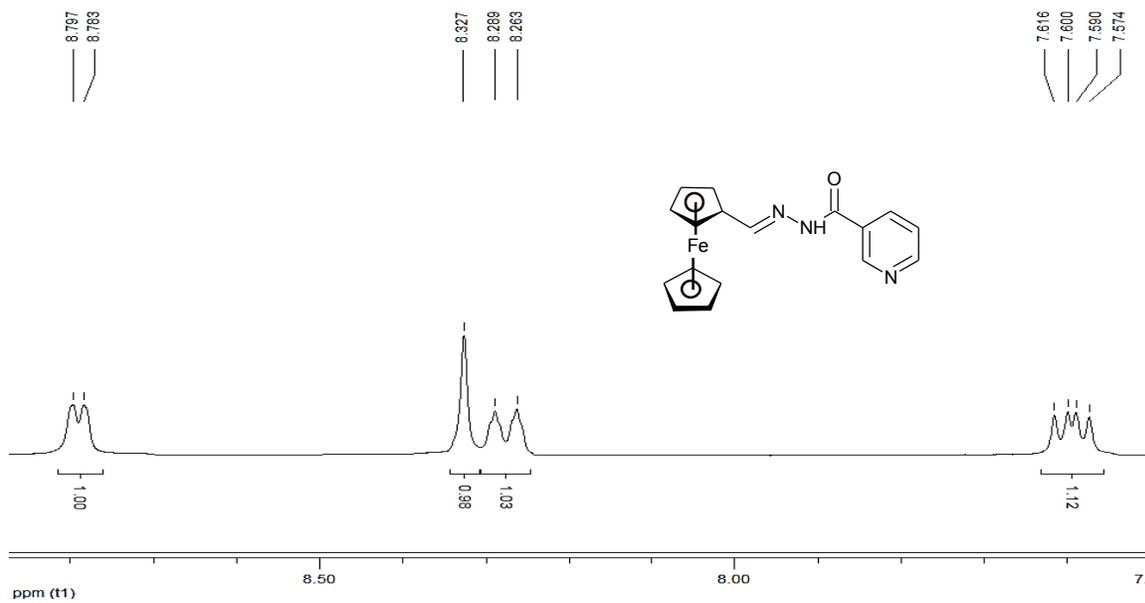
m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
335.0739	335.0716	7.00	11.0	C ₁₇ H ₁₇ O ₁ N ₃ ⁵⁶ Fe ₁



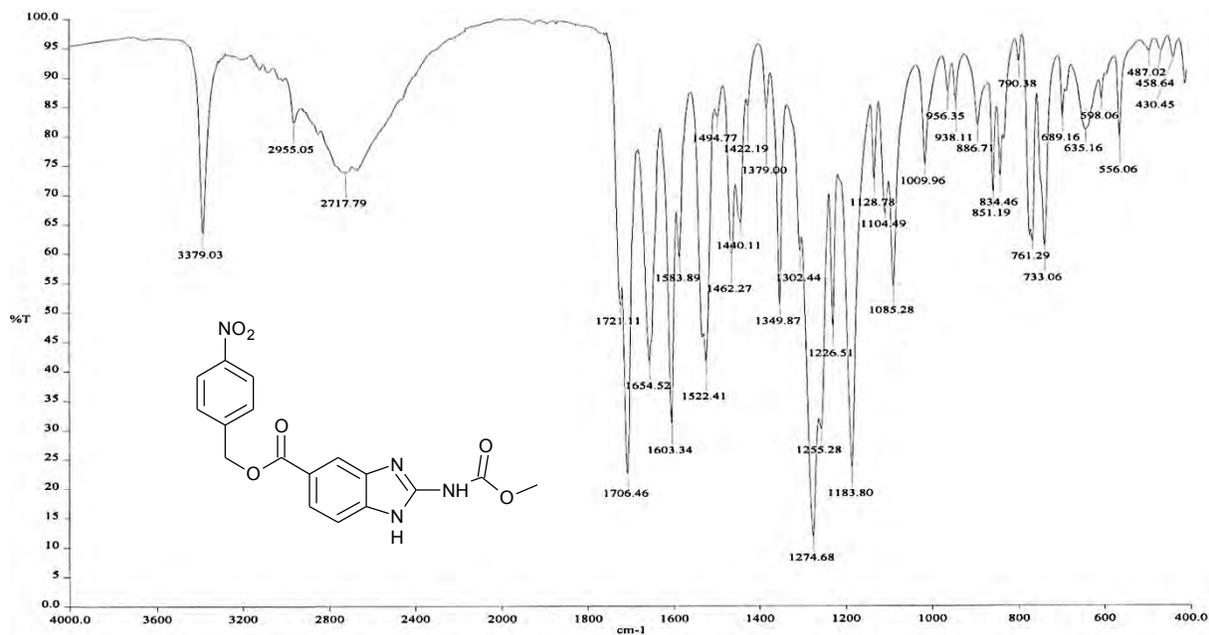
OT6059_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.60E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



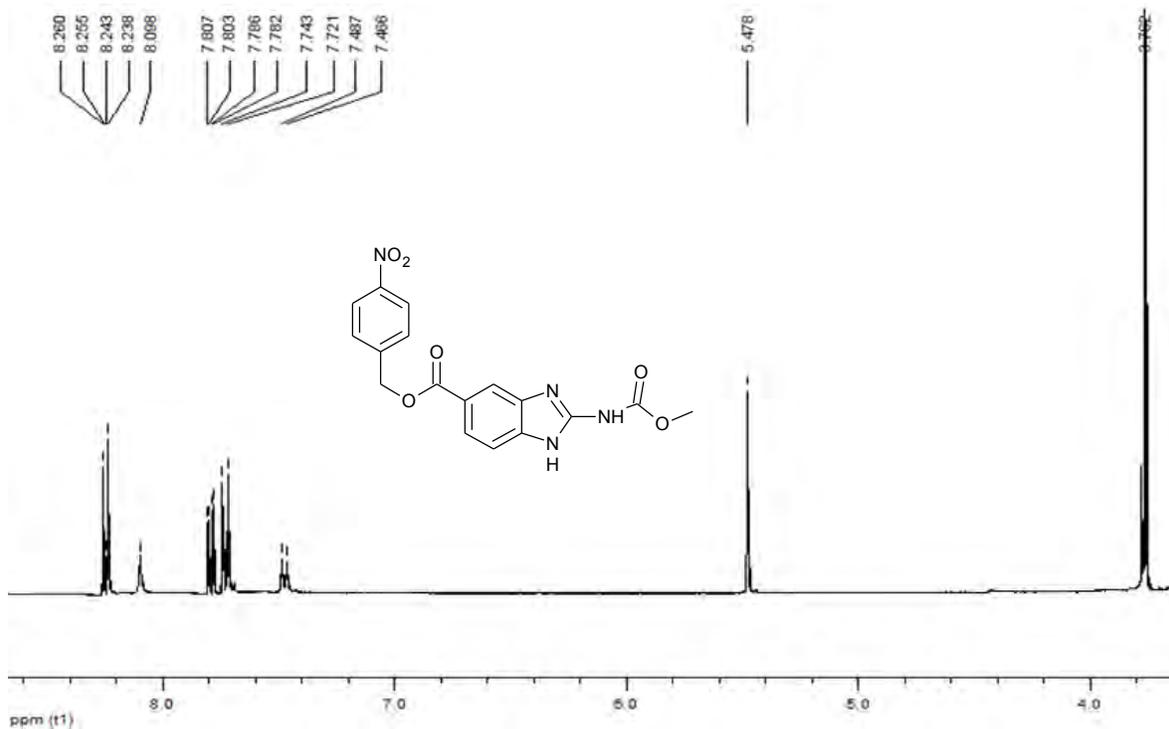
Espectro 19. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) de la N'-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).



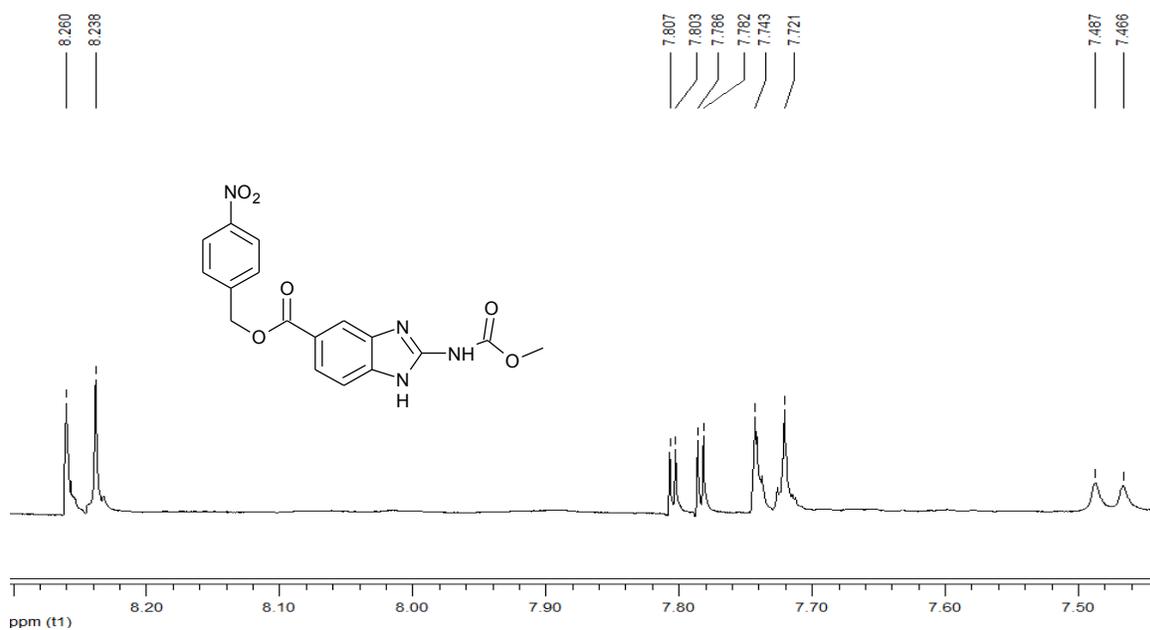
Espectro 19. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) de la N'-[(ferrocenil)metileno]nicotinohidrazida (5).



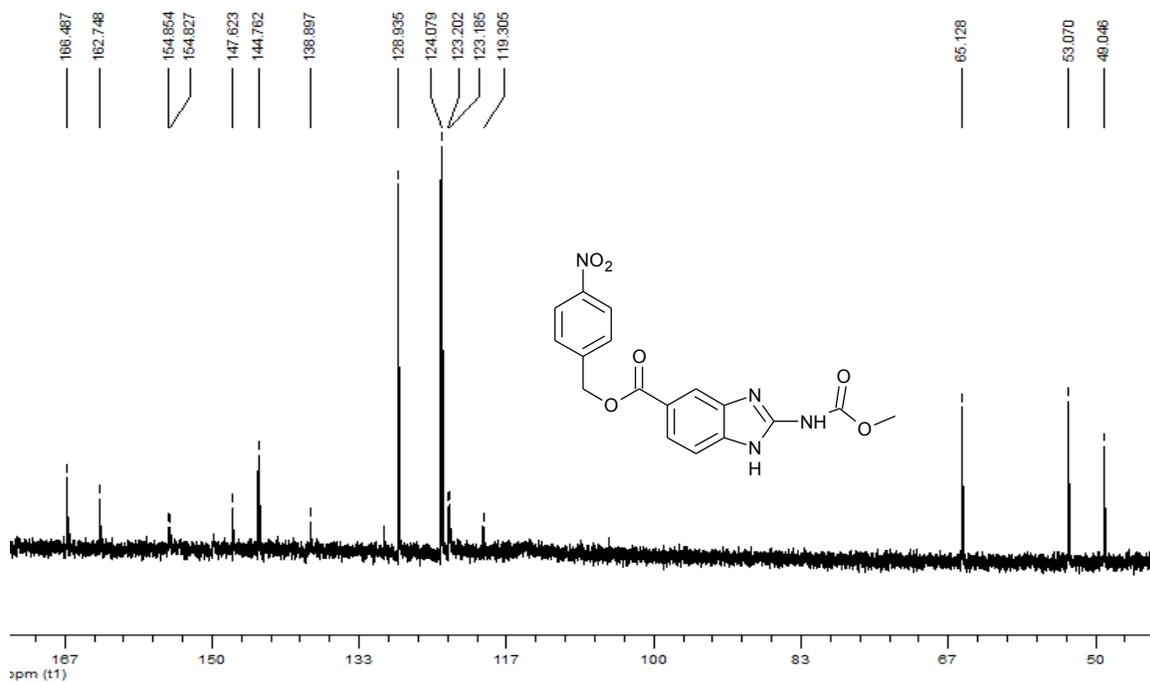
Espectro 20. IR (ATR) del 2-[(metoxycarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).



Espectro 21. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) del 2-[(metoxycarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).



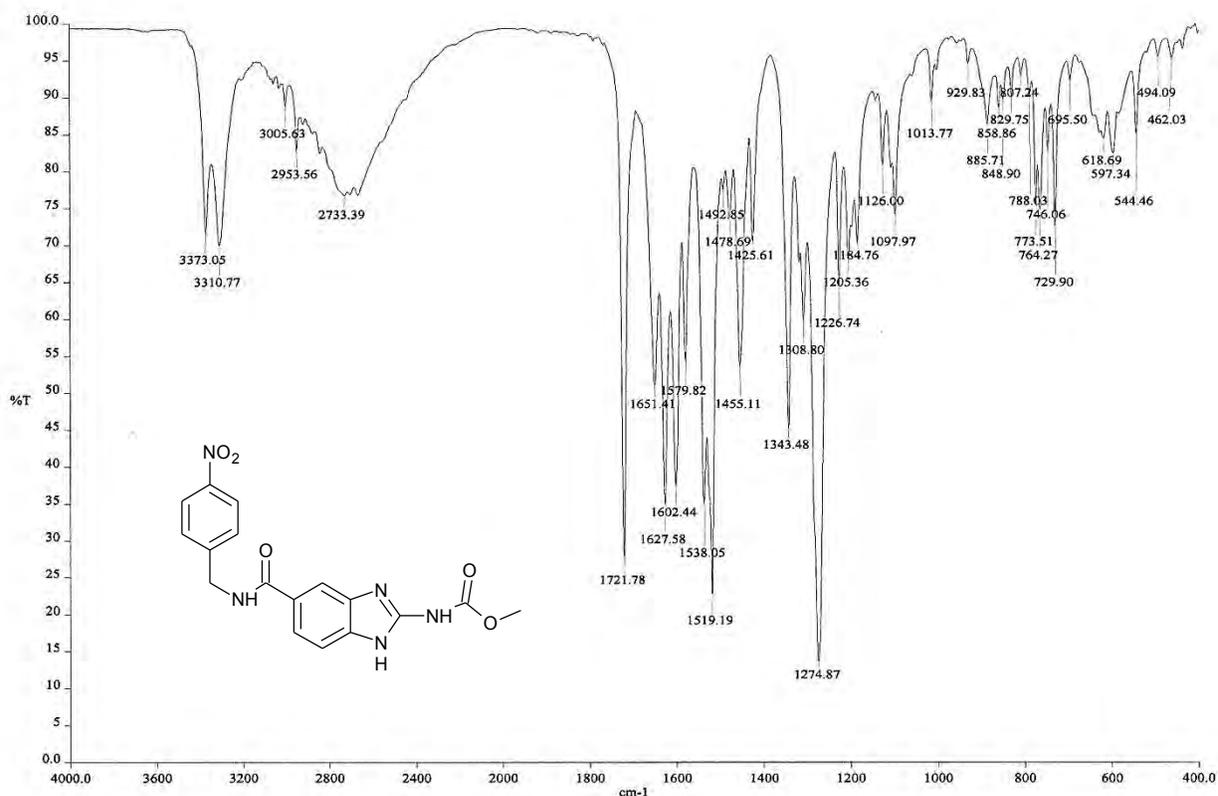
Espectro 21. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).



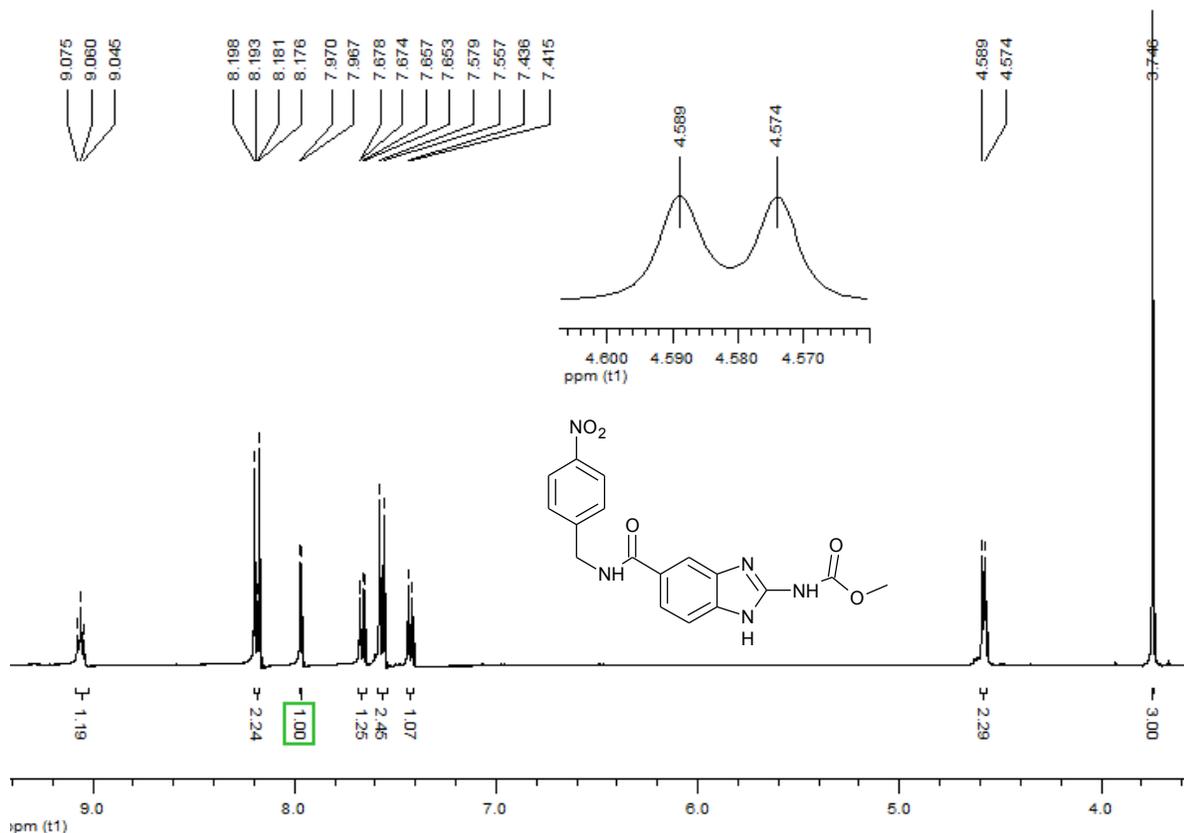
Espectro 22. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
OT9404B	1.679	54.748%	3.698%	15.577%	-0.524%	8/15/2011 3:54:38 PM
OT9404A	1.617	54.817%	3.714%	15.56%	-0.487%	8/15/2011 3:47:16 PM
Average	1.648	54.783	3.706	15.569	-0.506	
Variance	0.002	0.002	0.000	0.000	0.001	
Standard Deviation	0.044	0.049	0.011	0.012	0.026	

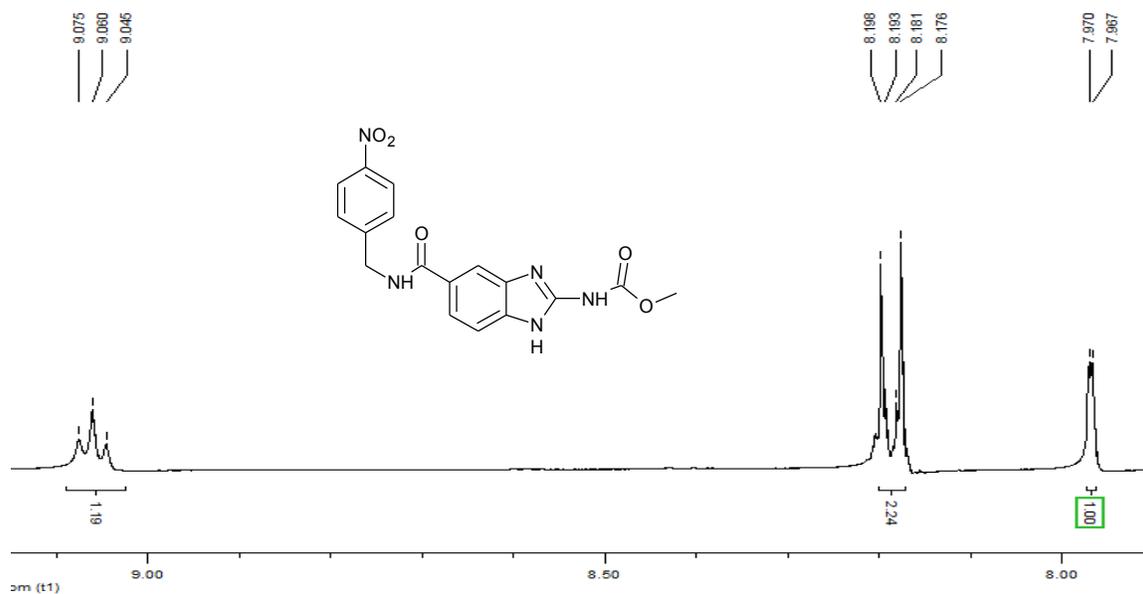
Análisis Elemental del 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-bencimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo (6).



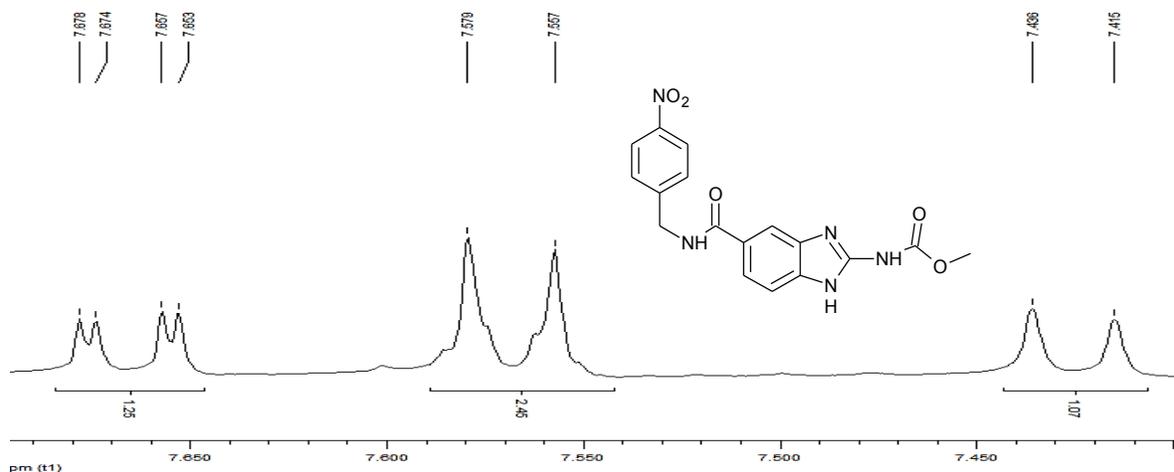
Espectro 23. IR (ATR) del {5-[(4-nitrobencil)carbamoi]-1H-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (7)}



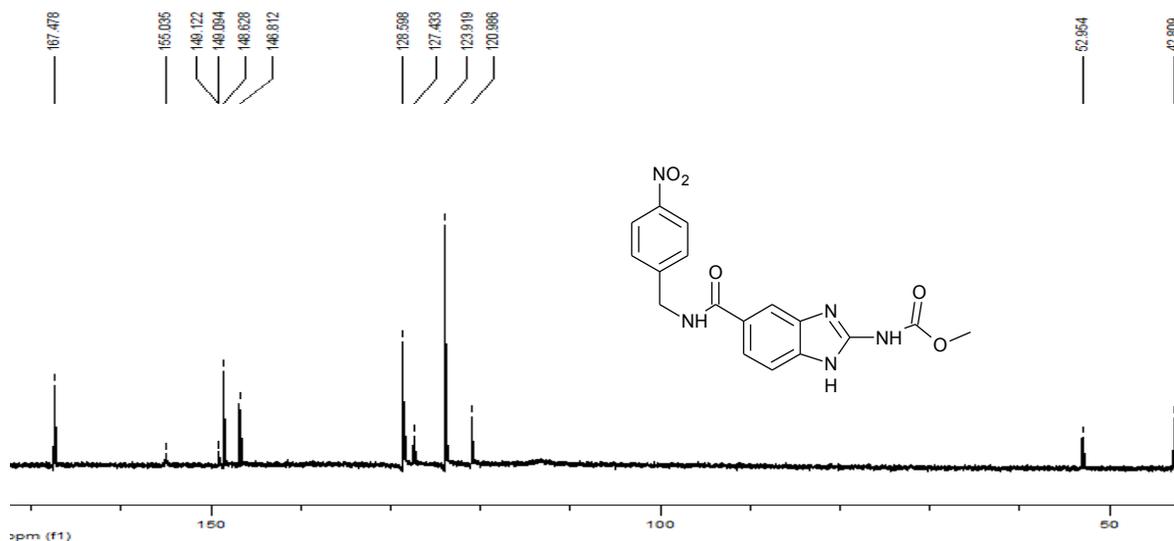
Espectro 24. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) del {5-[(4-nitrobenzyl)carbamoyl]-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (7).



Espectro 24. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz) del {5-[(4-nitrobenzyl)carbamoyl]-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (7).



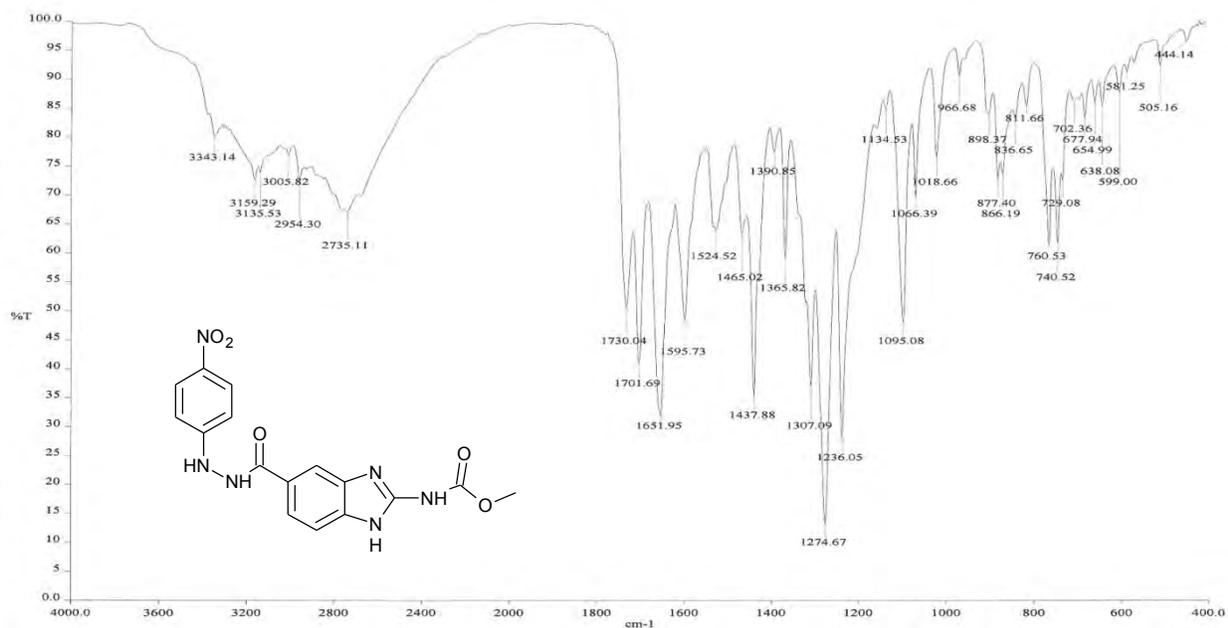
Espectro 24. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) del {5-[(4-nitrobenzyl)carbamoyl]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo (7).



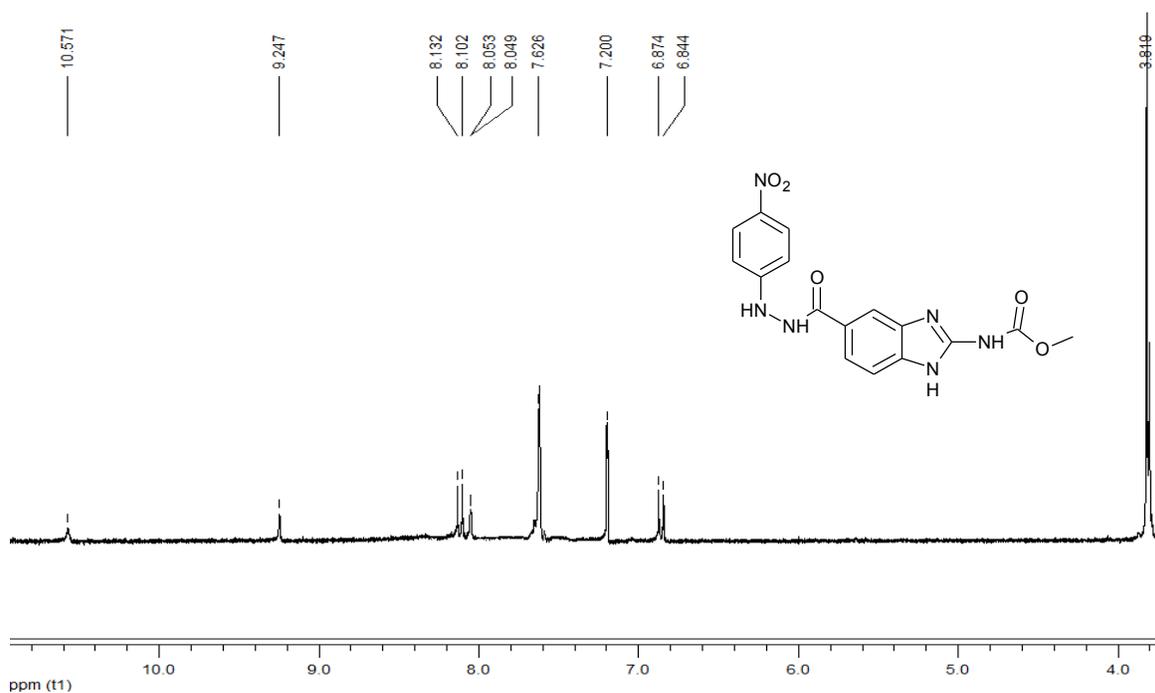
Espectro 25. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) del {5-[(4-nitrobenzyl)carbamoyl]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo (7).

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
OT9202B	2.251	54.488%	4.069%	18.848%	-1.653%	5/31/2011 3:00:02 PM
OT9202A	2.329	54.47%	4.1%	18.883%	-0.403%	5/31/2011 2:52:32 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	2.290	54.479	4.085	18.866	-1.028	
Variance	0.003	0.000	0.000	0.001	0.781	
Standard Deviation	0.055	0.013	0.022	0.025	0.884	
Relative Standard Deviation	2.408	0.023	0.537	0.131	85.981	

Análisis Elemental del {5-[(4-nitrobenzyl)carbamoyl]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo (7).



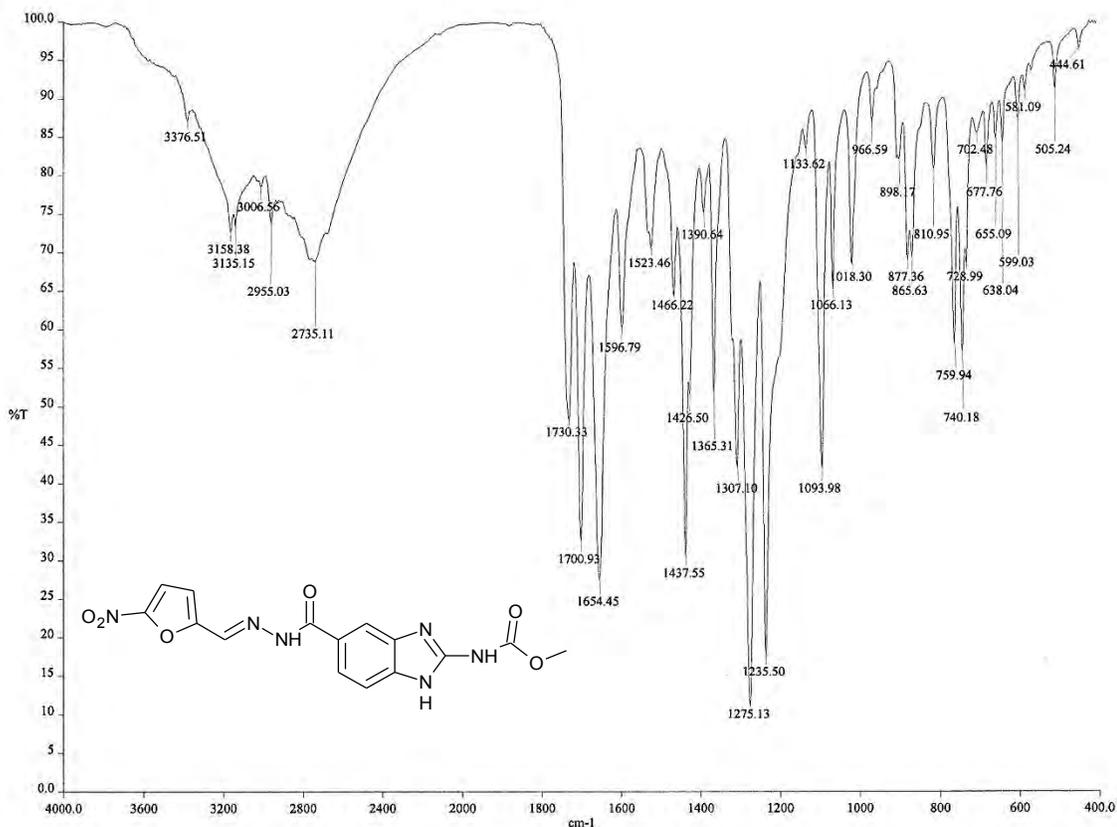
Espectro 26. IR (ATR) del (5-[[2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil]-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (8).



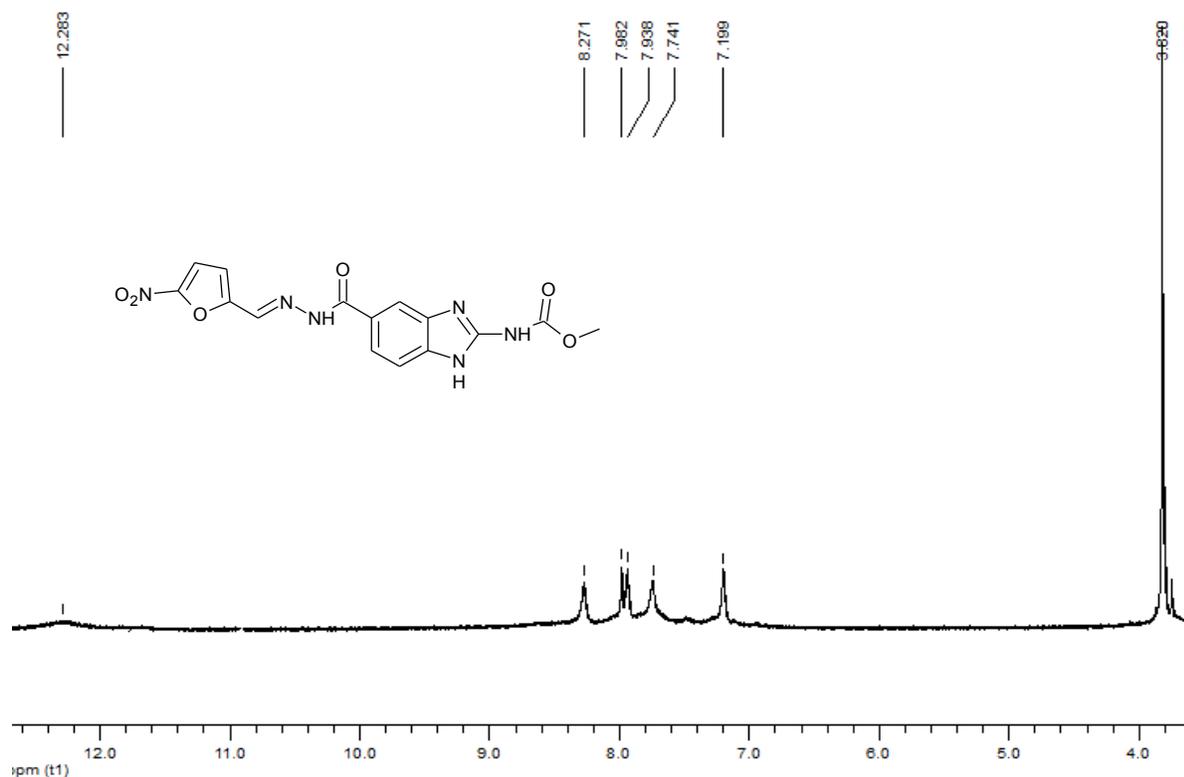
Espectro 27. RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz) del (5-[[2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil]-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (8).

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
OT9203B	2.265	50.414%	3.763%	22.931%	-2.158%	5/31/2011 3:15:04 PM
OT9203A	2.21	50.443%	3.925%	22.661%	-1.718%	5/31/2011 3:07:33 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	2.238	50.429	3.844	22.796	-1.938	
Variance	0.002	0.000	0.013	0.036	0.097	
Standard Deviation	0.039	0.021	0.115	0.191	0.311	
Relative Standard Deviation	1.738	0.048	2.980	0.964	16.054	

Análisis Elemental del (5-{{2-(4-nitrofenil)hidrazino]carbonil}-1H-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (8).



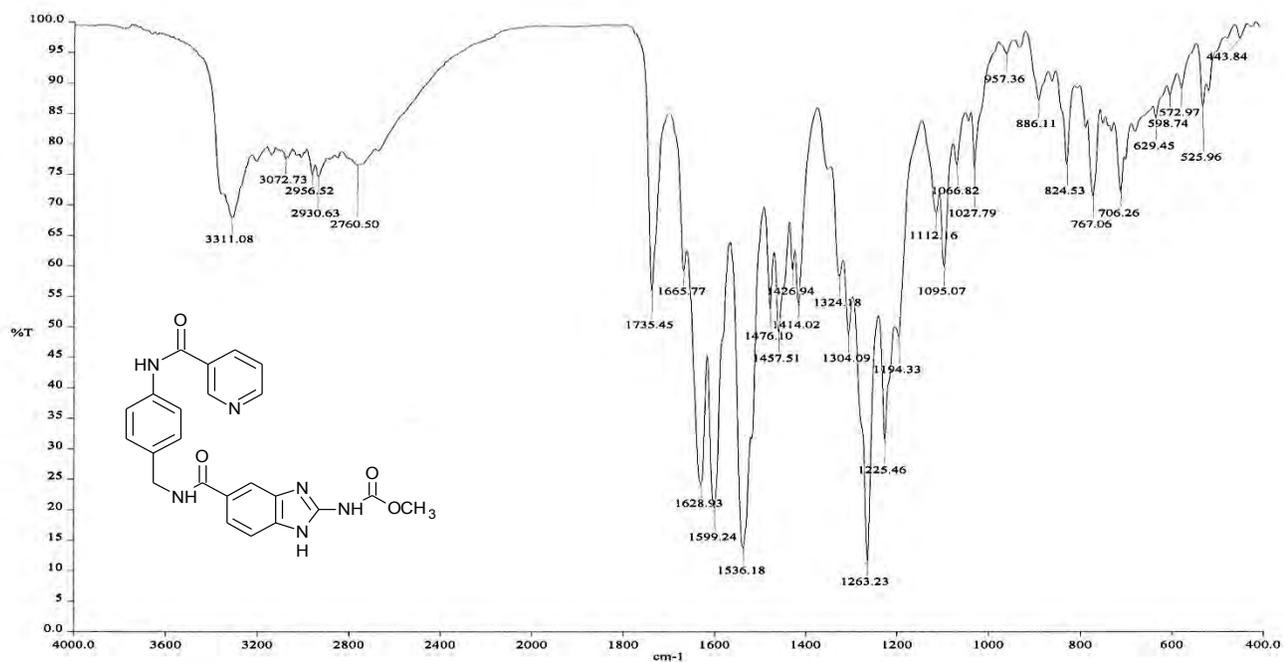
Espectro 29. IR (ATR) del [5-{{2-[(5-nitro-2-furil)metileno]hidrazino}carbonil}-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (9).



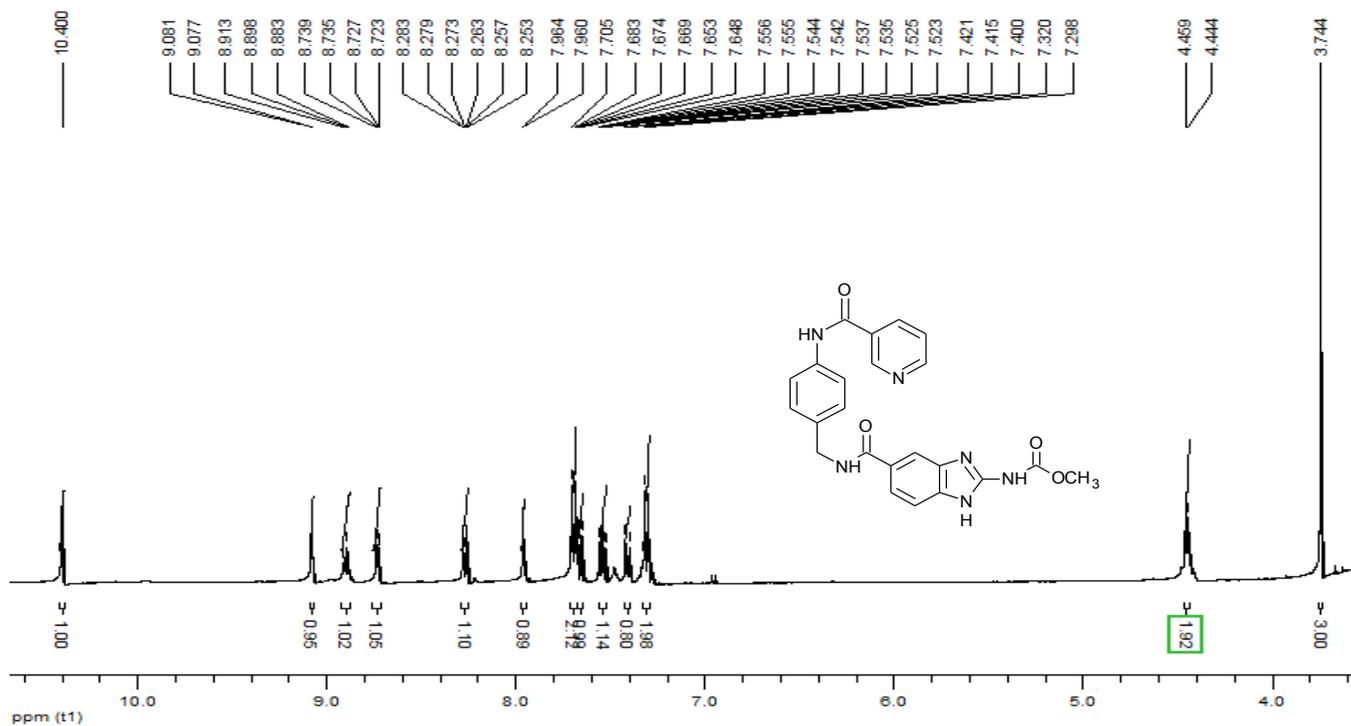
Espectro 30. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) del [5-({2-[(5-nitro-2-furil)metilen]hidrazino}carbonil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (9).

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
OT9070B	1.344	47.181%	3.119%	22.415%	-0.761%	4/13/2011 5:31:20 PM
OT9070A	1.644	47.339%	3.249%	22.632%	-0.573%	4/13/2011 5:23:40 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	1.494	47.260	3.184	22.524	-0.667	
Variance	0.045	0.012	0.008	0.024	0.018	
Standard Deviation	0.212	0.112	0.092	0.153	0.133	

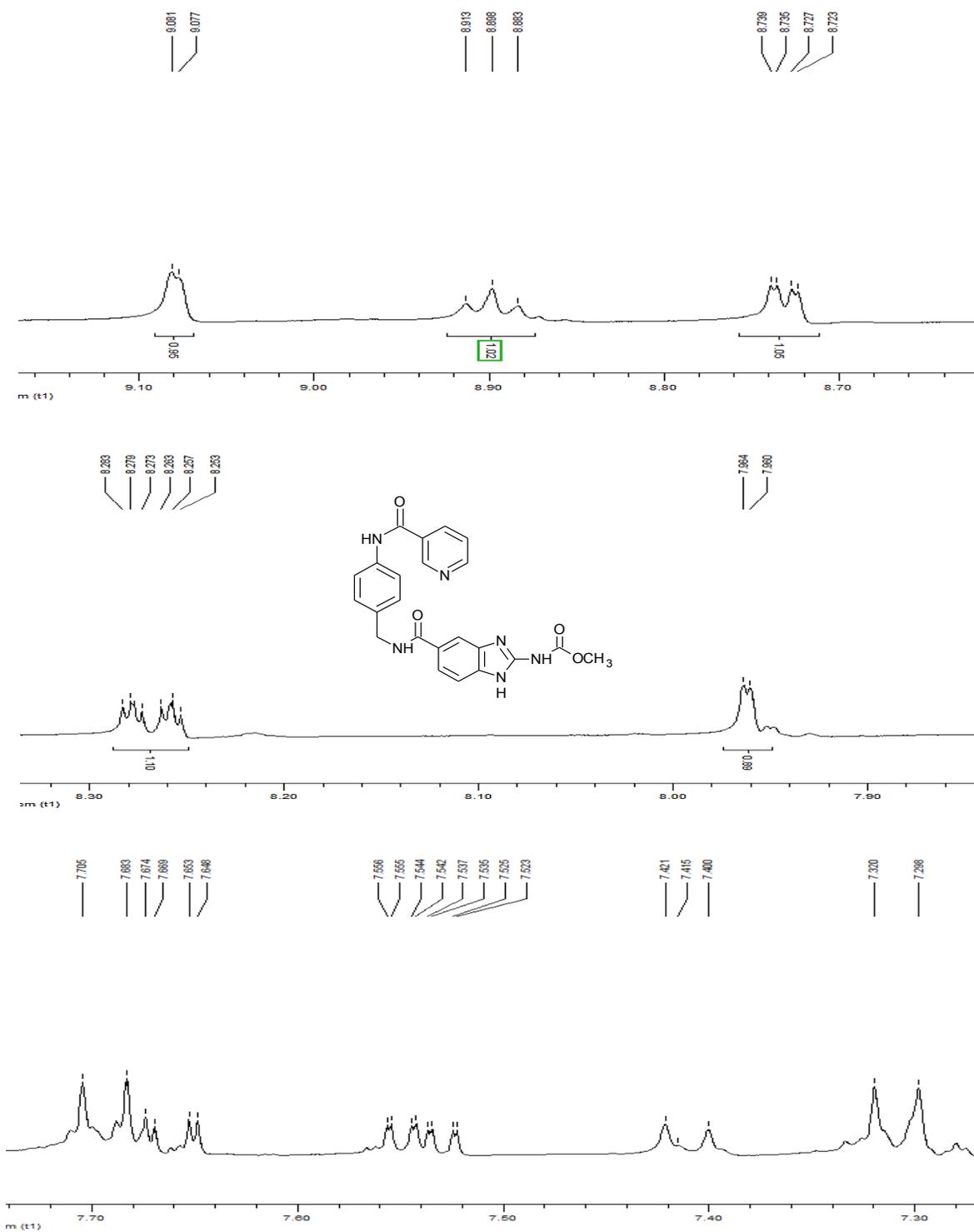
Análisis Elemental del [5-({2-[(5-nitro-2-furil)metilen]hidrazino}carbonil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (9).



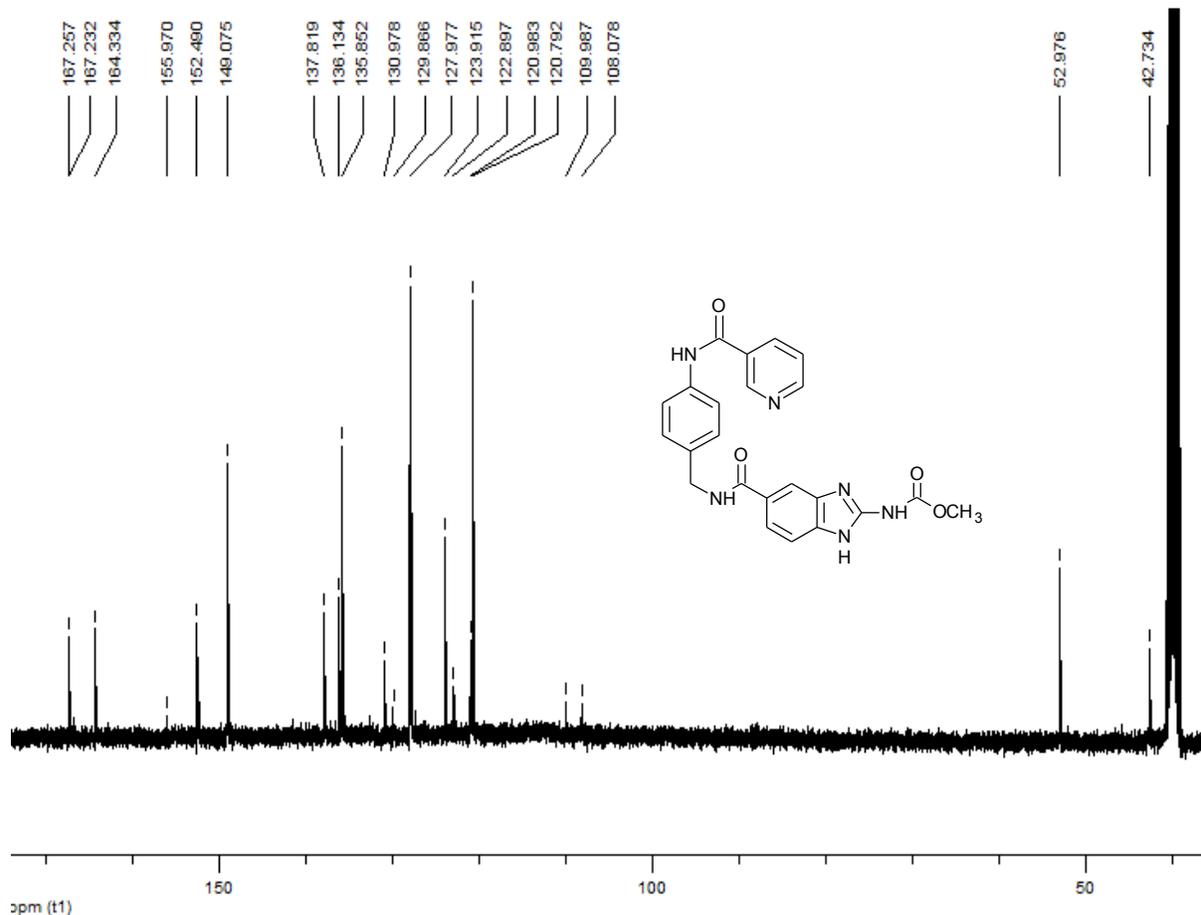
Espectro 32. IR (ATR) del {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]encil}carbamoil)-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).



Espectro 33. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz) de {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]encil}carbamoil)-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).



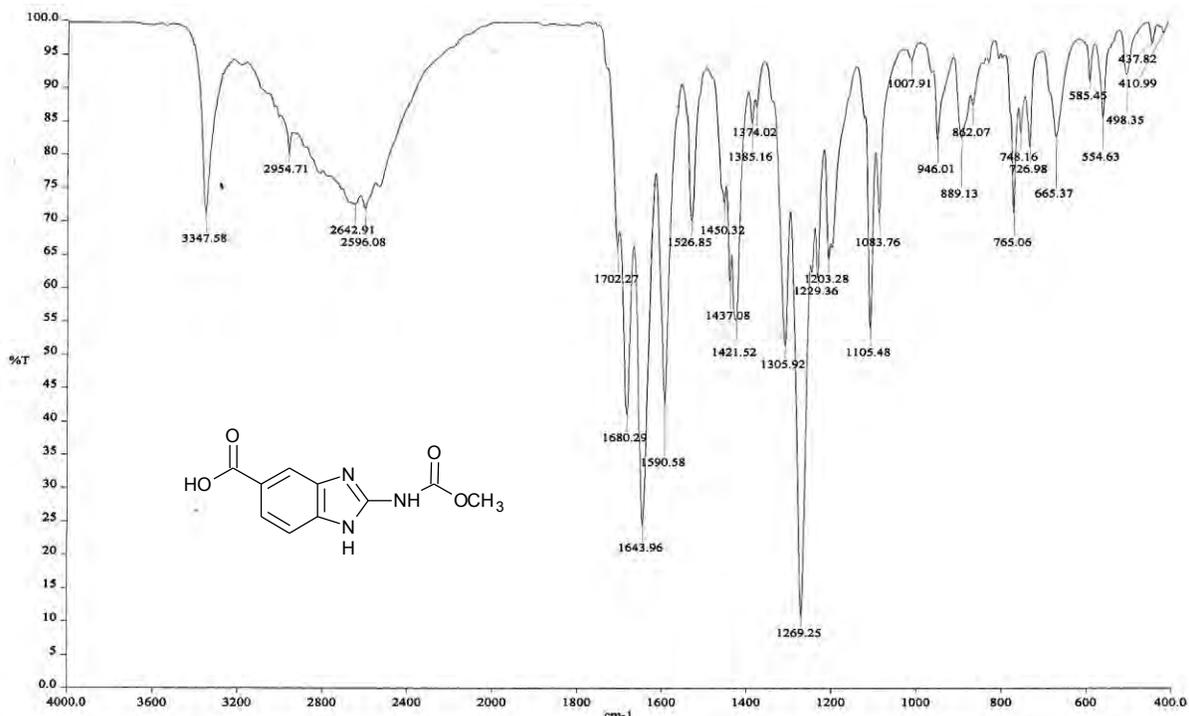
Espectro 33. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) del {5-({4-[(piridin-3-ilcarbonil)amino]bencil}carbamoil)-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).



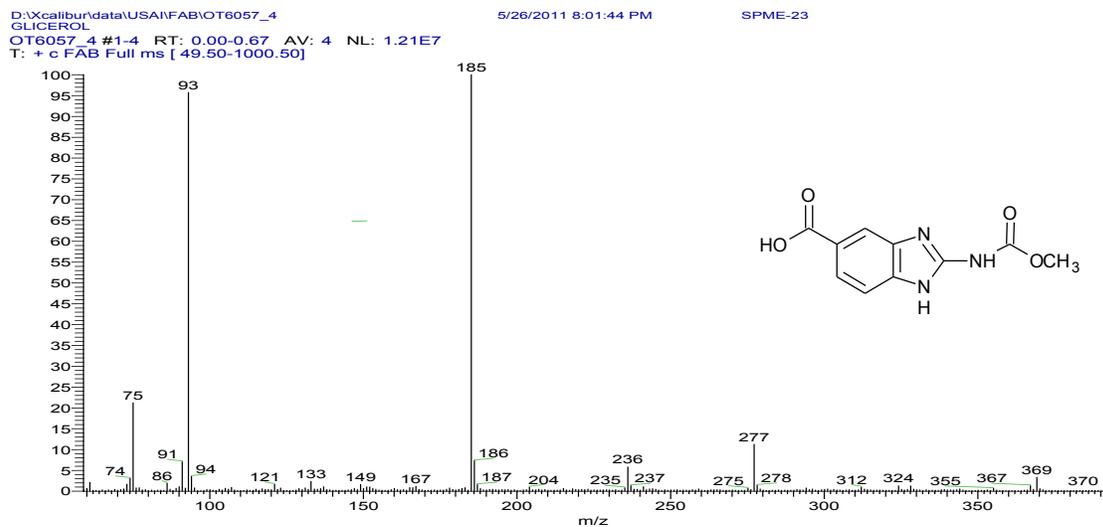
Espectro 34. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100MHz) del {5-({4-[(piridin-3-il)carbonilamino]encil}carbamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
OT9582B	1.921	61.455%	4.486%	18.208%	0.242%	9/22/2011 4:29:42 PM
OT9582A	2.364	61.341%	4.487%	18.191%	0.456%	9/22/2011 4:22:31 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	2.143	61.398	4.487	18.200	0.349	
Variance	0.098	0.006	0.000	0.000	0.023	
Standard Deviation	0.313	0.081	0.001	0.012	0.151	
Relative Standard Deviation	14.621	0.140	0.015	0.070	43.358	

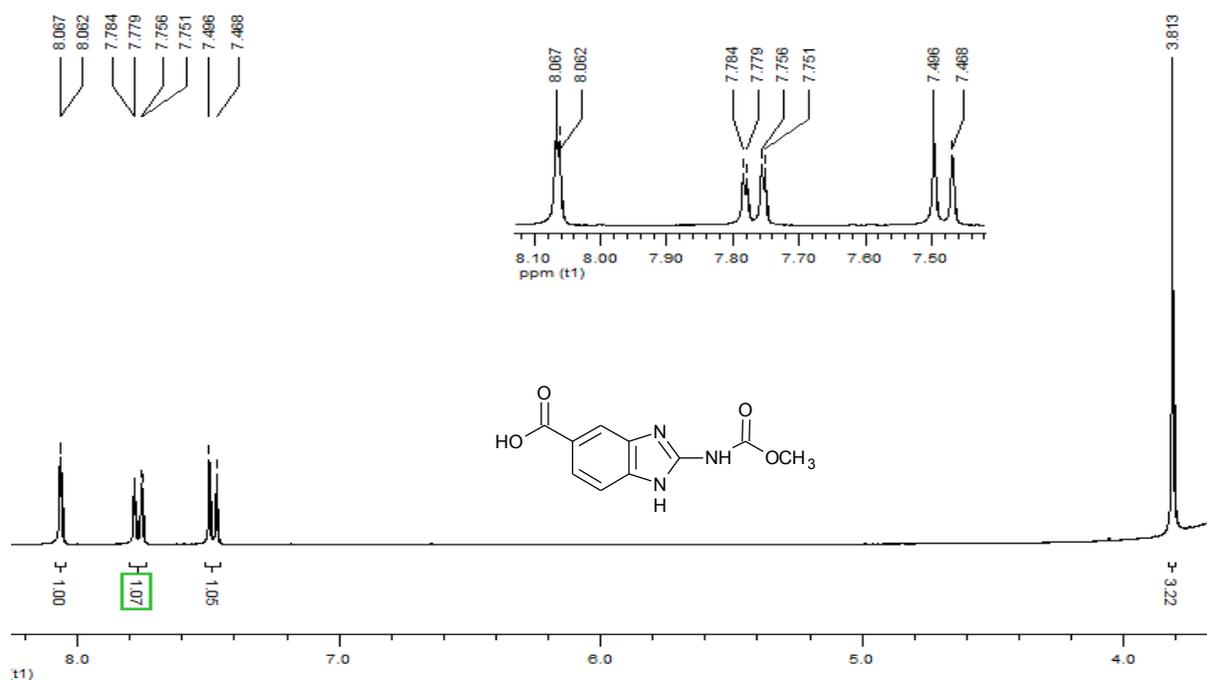
Análisis Elemental del {5-({4-[(piridin-3-il)carbonil]amino]encil}carbamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (10).



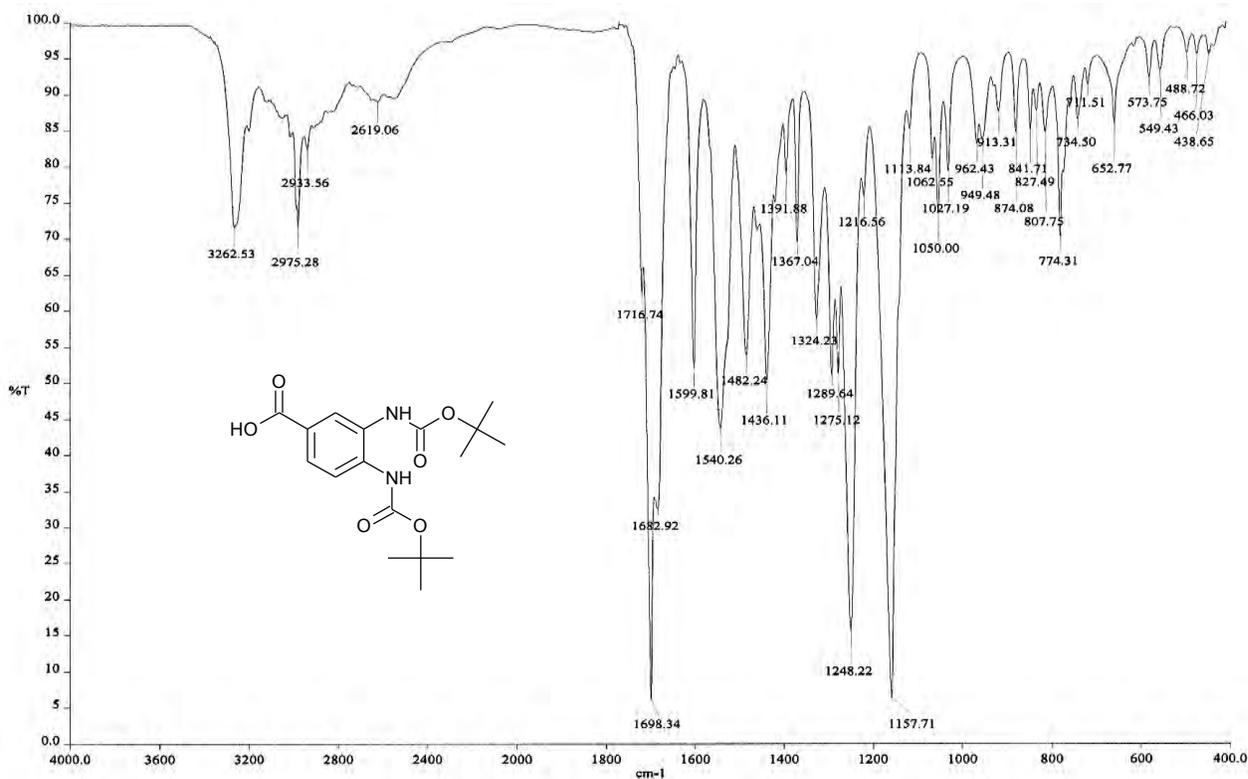
Espectro 36. Espectro IR (ATR) de ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxílico (22)



Espectro 37. Espectro EM (FAB) del ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxílico (22).



Espectro 38. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) del ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-carboxílico (22).



Espectro 39. IR (ATR) del ácido 3,4-bis[(*ter*-butoxicarbonil)amino]benzoico (23).

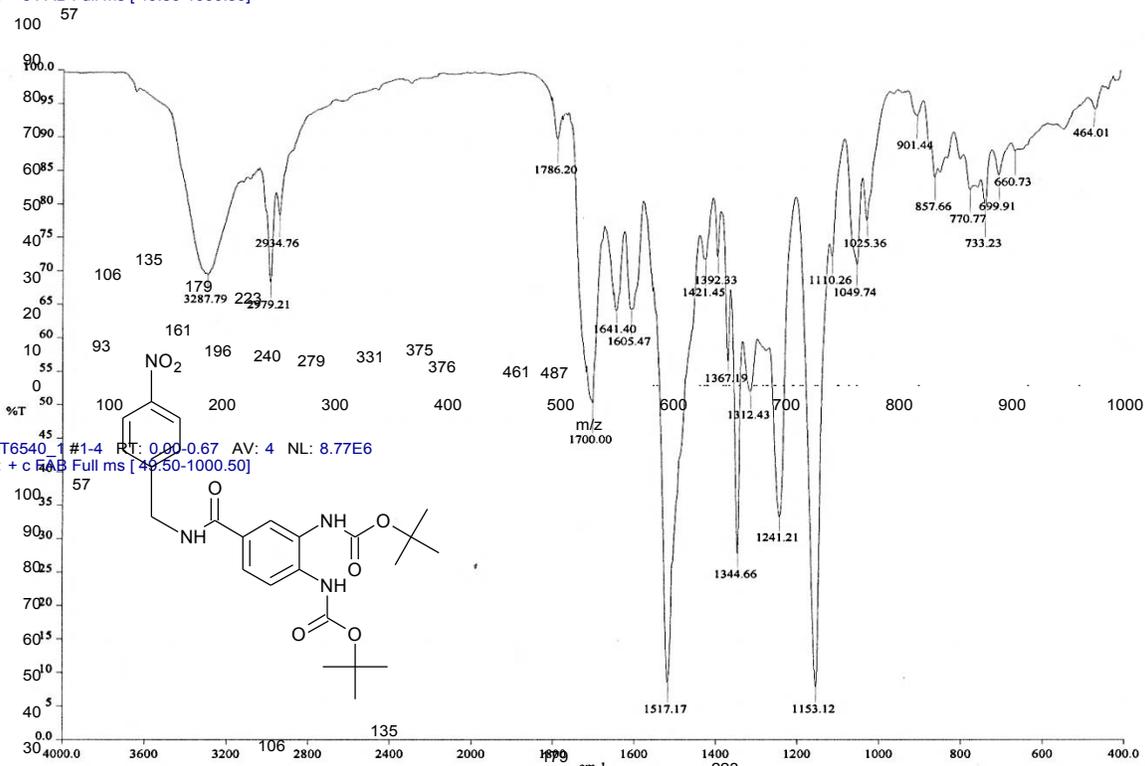
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6540_1

8/19/2011 8:05:31 PM

SPM-34

OT6540_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 8.77E6

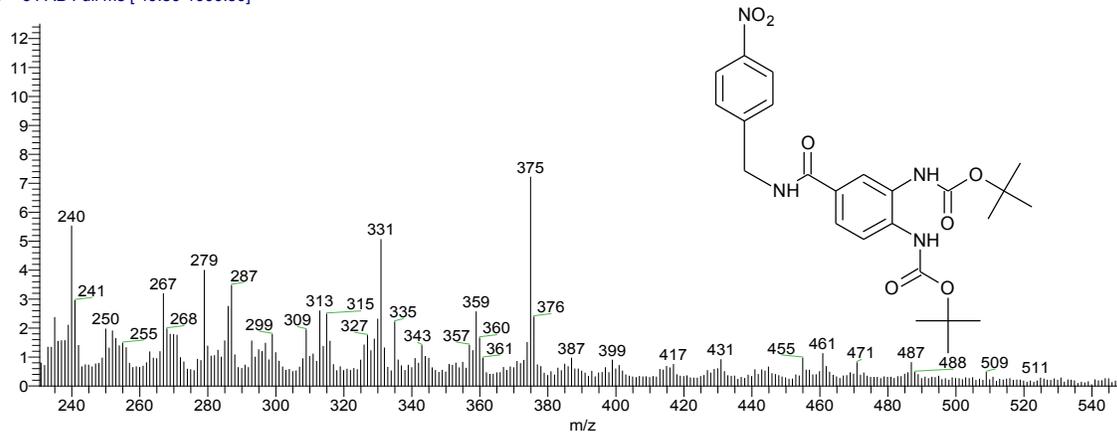
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



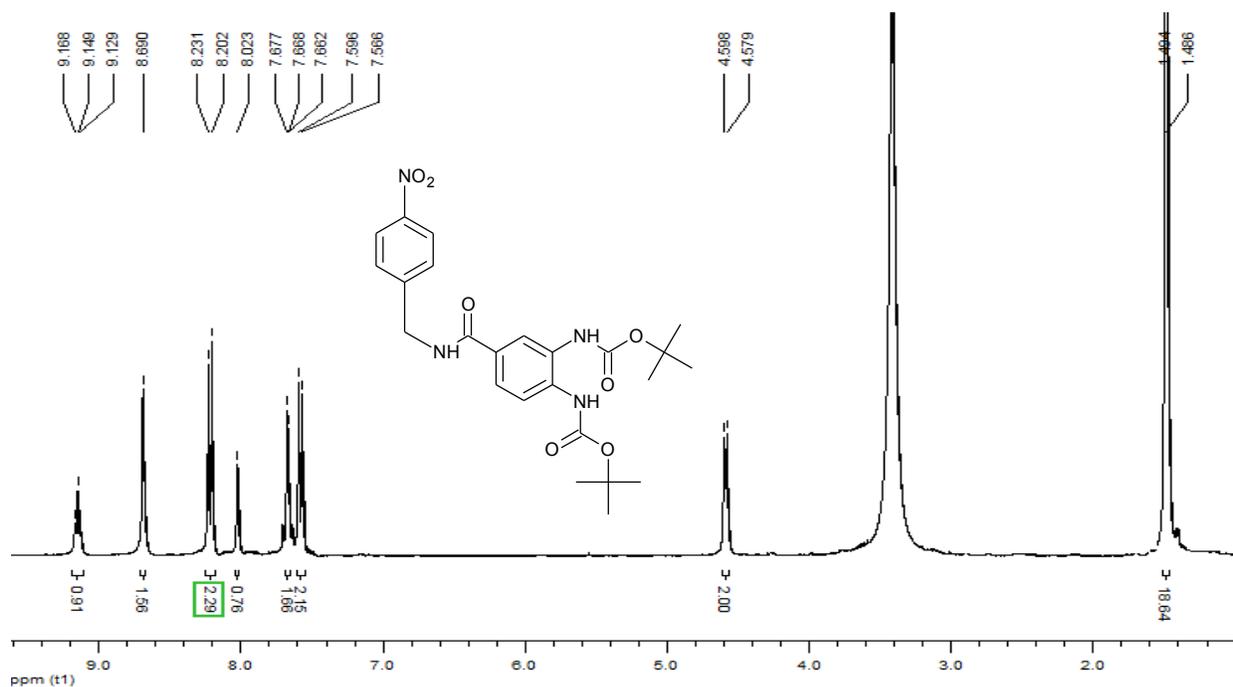
Espectro 42. IR (ATR) del (4-[[4-nitro(bencil)amino]carbonil]-1,2-fenileno)biscarbamato de di-ter-butilo (24).

OT6540_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 8.77E6

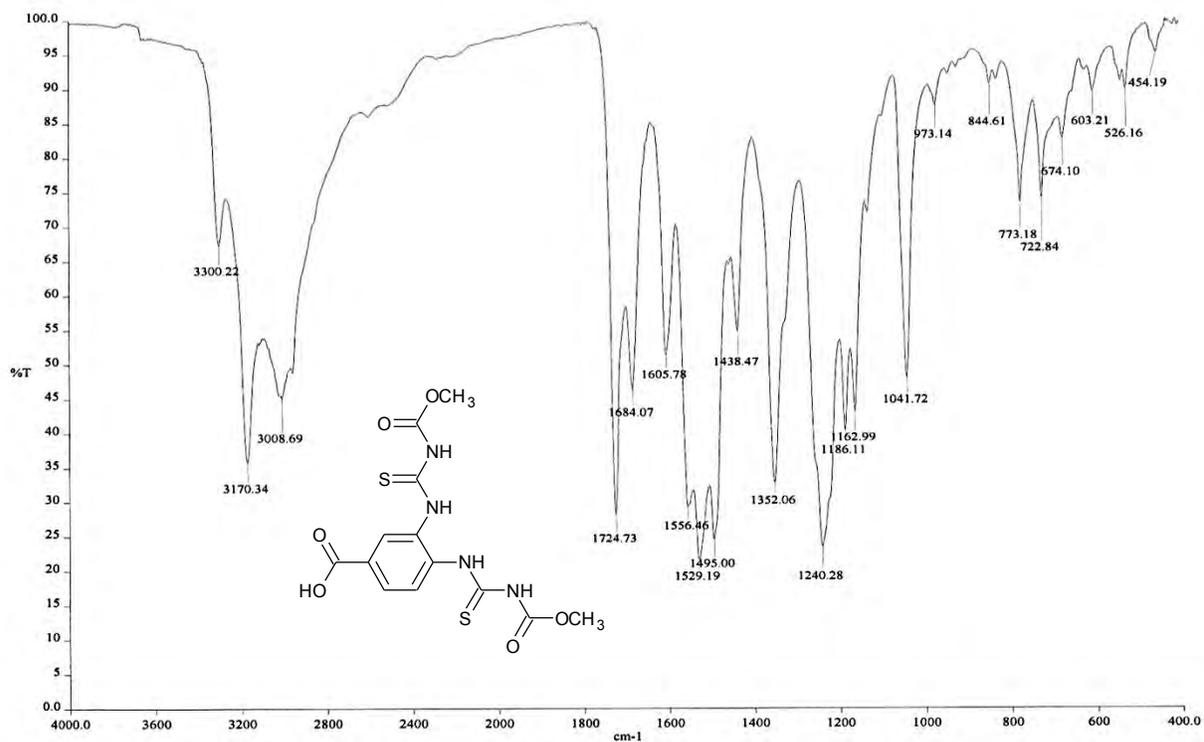
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 43. EM (FAB) del (4-[[4-nitro(bencil)amino]carbonil]-1,2-fenileno)biscarbamato de di-ter-butilo (24)



Espectro 44. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) de (4-[[4-(4-nitrobenzyl)amino]carbonyl]-1,2-phenileno)biscarbamato de di-ter-butilo (24).



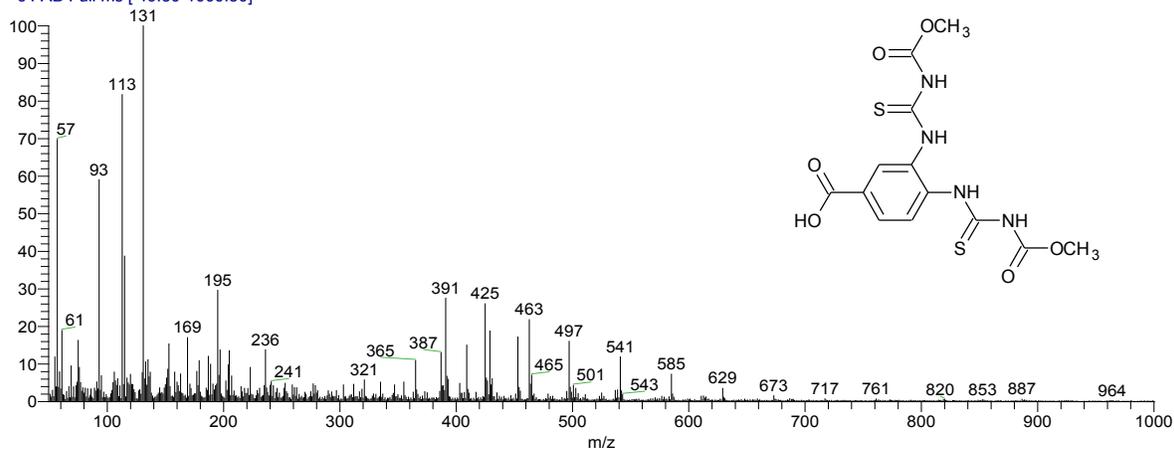
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6377_1

8/4/2011 3:22:01 PM

SPM-21

OT6377_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 5.02E6
Espectro 45. IR (ATR) del ácido 3,4-bis[[(metoxicarbonil)carbamotioil]amino]benzóico (26).
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

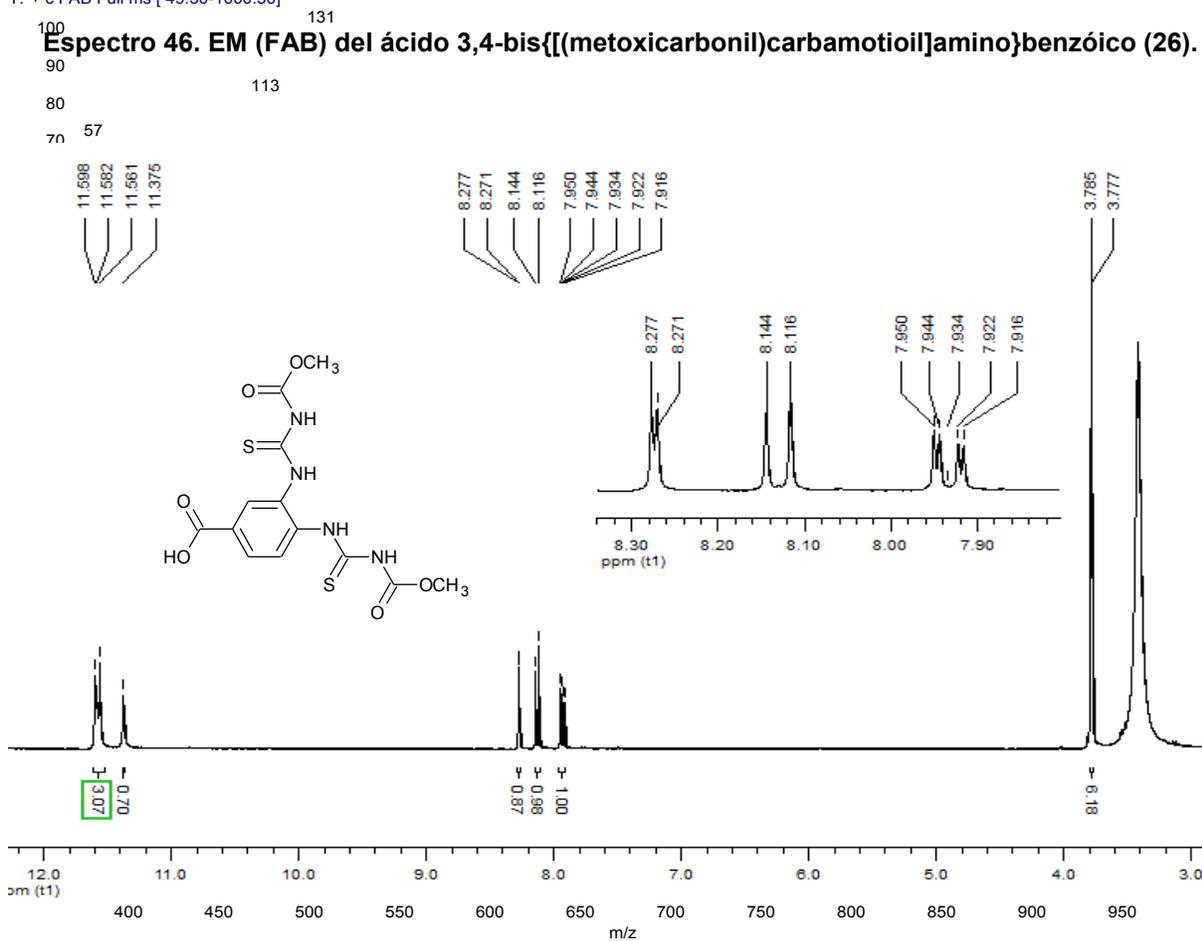
Relative Abundance



OT6377_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 5.02E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

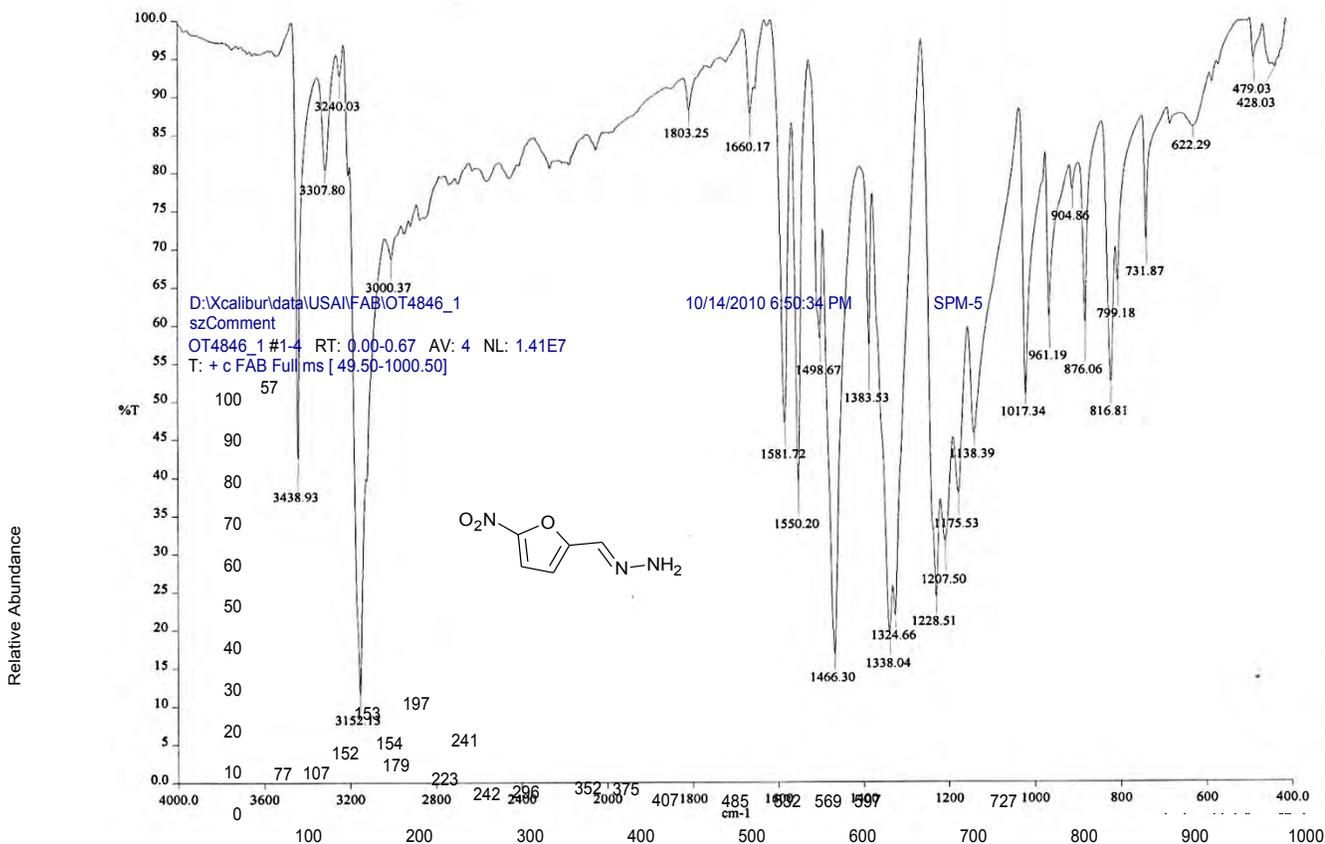
Espectro 46. EM (FAB) del ácido 3,4-bis[[(metoxicarbonil)carbamotioil]amino]benzóico (26).

Relative Abundance



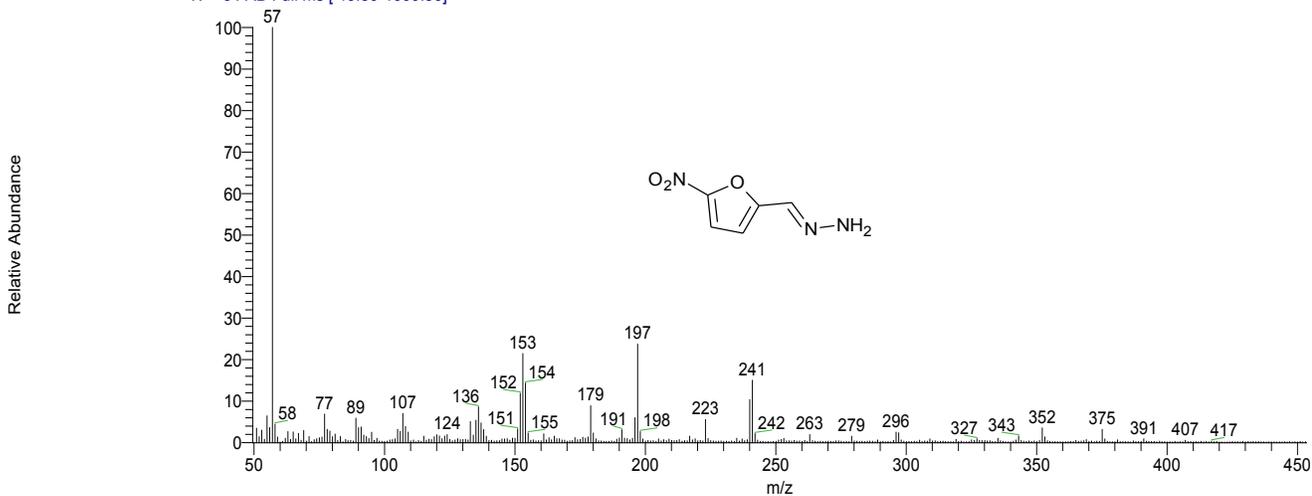
Relative Abundance

Espectro 47. RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz) del ácido 3,4-bis[[(metoxicarbonil)carbamotioil]amino]benzóico (26).



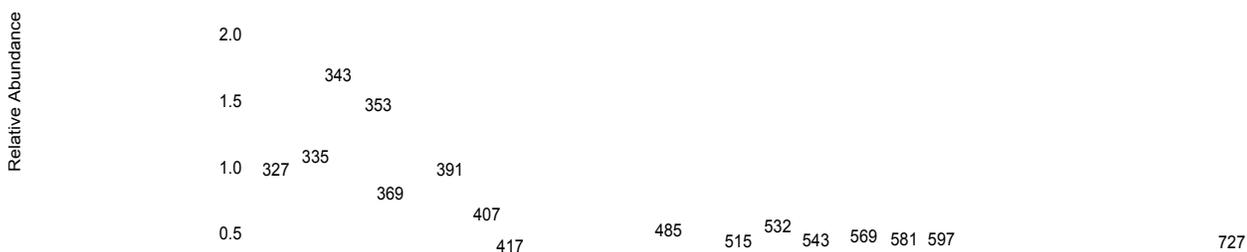
Espectro 48. IR (ATR) de la hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehido (30).

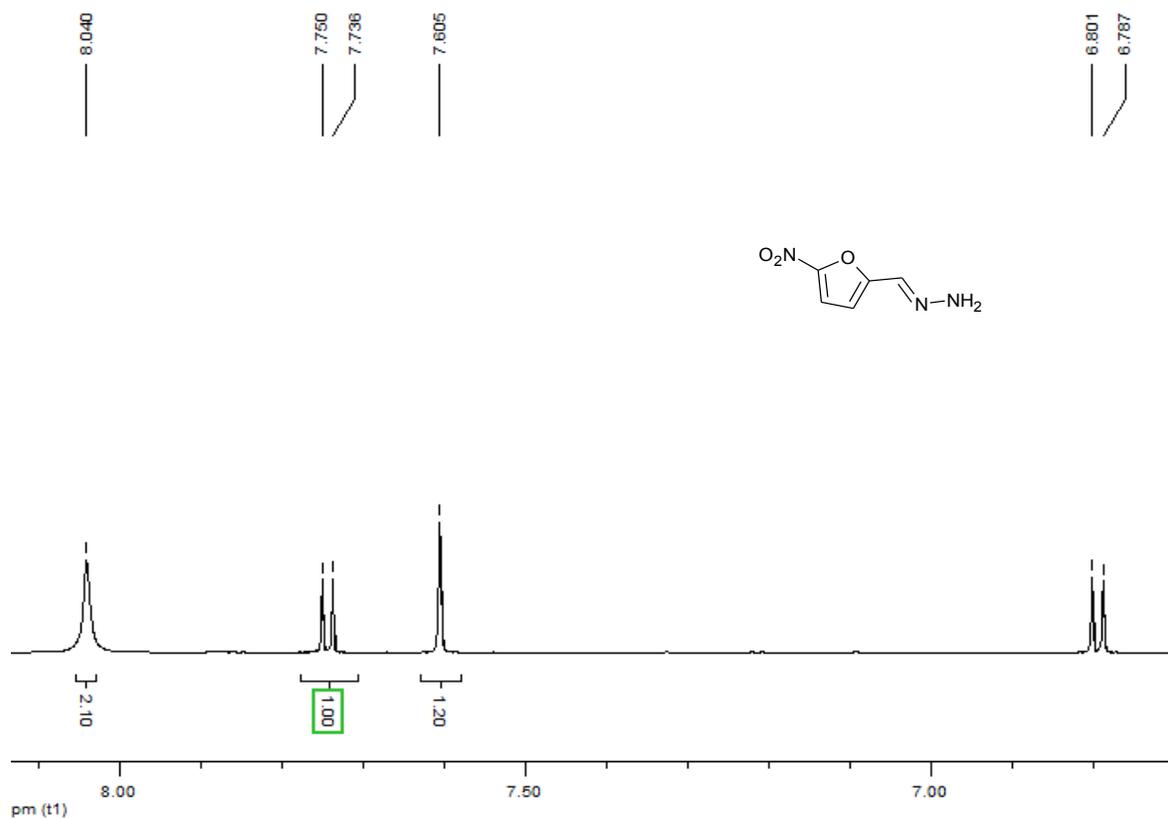
OT4846_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.41E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



OT4846_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.41E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

Espectro 49. EM (FAB) de la hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehido (30).





Espectro 50. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300MHz) hidrazona del 5-nitro-2-furfuraldehido (30).