



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**TEMA DE TESIS**

**Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

**M. en C. María Alicia Hernández Campos**



TUTOR: Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
Facultad de Química

AÑO: Marzo 2014

## **Jurado Asignado**

**Presidente**

Dra. Rachel Mata Essayag

**Vocal**

Dra. Lilián Yépez Mulia

**Vocal**

Dr. Andrés Navarrete Castro

**Vocal**

Dra. Helgi Jung Cook

**Secretario**

Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de crecer y desarrollarme bajo su techo, tanto desde el punto de vista académico como personal. Formar parte de sus filas es un verdadero honor.

Agradezco infinitamente al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por todas sus enseñanzas, por sus consejos, por la confianza depositada en mí, por permitirme desarrollar mis pequeños proyectos, por tantos gratos momentos, por su amistad y cariño incondicional. Muchas gracias Doc, todavía nos falta mucho camino por andar.

A los Doctores Froylán Ibarra Velarde y Yolanda Vera Montenegro del INIFAP y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por la realización de los estudios de evaluación fasciolicida, *in vitro* e *in vivo* del compuesto Alfa. Muchas gracias, porque además de crear un grupo de trabajo hemos cultivado un grupo de amigos.

Al Dr. Ian Fairweather, Dr. G. Brennan y Dra. Maeve McConville de la “School of Biology and Biochemistry the Queen’s University of Belfast” por la evaluación del compuesto Alfa contra fasciolas resistentes a Triclabendazol y por la determinación del efecto del compuesto Alfa sobre *Fasciola hepatica* a nivel de estructura.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia y la Bióloga Amparo Tapia del Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS por la determinación de la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria de los compuestos preparados en este trabajo y por la determinación de la permeabilidad de las carboxamidas en células CaCo-2. Gracias Dra. Yépez por tus enseñanzas y también por tu amistad.

A la Dra. Helgi Jung Cook y su grupo de investigación del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, por la realización de los estudios biofarmacéuticos en ovinos y bovinos del compuesto Alfa. Gracias también por la supervisión de las evaluaciones biofarmacéuticas del grupo de carboxamidas y por la evaluación biológica de éstas contra *Taenia crassiceps*.

Gracias a la M. en C. Socorro Alpízar del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química, UNAM, por la supervisión en los estudios sobre el desarrollo de una formulación en suspensión para el compuesto Alfa.

A los Doctores Alejandro Fernández de la Facultad de Medicina de la UNAM y Alfredo Téllez de la Facultad de Medicina de la UJED, por la realización de los ensayos de inhibición enzimática del compuesto Alfa, Triclabendazol y sus 1-metilderivados con las enzimas Triosafosfato isomerasa de *E. histolytica*, *T. cruzi* y *T. brucei*.

Un agradecimiento muy especial a todos los estudiantes de Licenciatura, Maestría y Doctorado que se titularon realizando como tema de tesis alguno de los estudios relacionados con la parte química o biológica plasmados en este trabajo.

Agradezco a Georgina Duarte, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez, Rosa Isela del Villar, Nayeli López y Víctor Lemus, personal de la USAI de la Facultad de Química de la UNAM, por la adquisición de los espectros de IR, RMN y EM y del Análisis Elemental de los compuestos sintetizados en este trabajo, sin los cuales éste estaría mutilado.

Mi más profundo agradecimiento a los miembros del Comité Académico del Doctorado en Ciencias Químicas y del SPIED y a la M. en C. Josefina Tenopala por darme la oportunidad de terminar con este ciclo tan importante en mi vida y obtener el Grado de Doctor.

Gracias a los miembros del Jurado asignado por sus valiosas sugerencias y comentarios al manuscrito de Tesis.

Agradezco al M. en C. Pedro Trejo Soto por su invaluable ayuda, comentarios y sugerencias en la edición del manuscrito de Tesis. Gracias Peter, ¡qué haría sin ti!

A mis profesores Dra. Ofelia Espejo, Dr. Eugene Bratoeff, Maestra Lupita Vélez, Maestra Mercedes. Gracias por sus enseñanzas y su cariño.

A todos mis alumnos (propios y/o prestados) tesisistas, de servicio social y de estancias de investigación por su confianza para elegirme como tutora.

A mis compañeros del Departamento de Farmacia: Francisco, Alfonso, Rachel, Isabel Aguilar, Elena, Mabel, Lourdes, Isabel Rivero, Rogelio, Fausto, Blanca, Inés, Juan Manuel, Mario, Andrés y Helgi, por su amistad.

A mis amigos del 122: Daniel, Remedios, José Luis, Cecy, Paty, Carlos, Agustín, Juan, Antonio, David Tamayo, Gabriel, Jaime, Oscar e Israel, por los buenos tiempos.

A los chicos del Lab. 122, en especial a Toño, Charly, Paulina, Peter, Gustavo, Armando, Berenice, Nayeli, Marco, los Rodrigos, los Migueles, Lucy y Carlos, por hacer que el trabajo sea una diversión.

Un agradecimiento especial para Anuar Flores Gahona por su ayuda en la revisión de los textos en inglés.

A mi familia porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos unidos.

Agradezco a mis amigos de siempre: Becky, Vita, Rosibel, Keiko, Beatriz, Olivia, Walter, Ignacio, Alfredo, Fabian, Sergio, Nayeli, Rosita y Víctor por estar siempre presentes en las buenas y en las malas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero a los proyectos: 25920-M, K0004, 34942-B, G-34851-M, V43629-M y 80093.

A la DGAPA-PAPIIT por el apoyo a los proyectos: IN204998, IN2279984, IN202101 y IX244704.

*Al Dr. Rafael Castillo, con admiración respeto y cariño*

*A mis Padres, José Lino y Beatriz; a mis tías, Lupita y Magdalena; a mis  
hermanos, Lino, Francisco, Carmen, Simón, Gerardo, Antonio, Lourdes,  
José de Jesús y Juan de Dios; con amor*

*A todos mis estudiantes, con profundo agradecimiento*

---

---

## Índice General

Resumen.....	1
Abstract .....	3
Capítulo 1. Introducción.....	5
Capítulo 2. Antecedentes Generales.....	7
2.1. Generalidades sobre las parasitosis.....	7
2.2. Transmisión de las parasitosis.....	8
2.3. Zoonosis, salud pública y animal.....	8
2.4. Parasitosis de importancia endémica en nuestro país.....	9
2.4.1. Giardiosis.....	9
2.4.2. Amoebiosis .....	10
2.4.3. Tricomonirosis .....	10
2.4.4. Trichinellosis.....	11
2.4.4.1. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .....	12
2.4.5. Fasciolosis.....	13
2.4.5.1. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .....	15
2.5. Tratamiento de las parasitosis.....	17
2.5.1. Tratamiento de las protozoosis .....	17
2.5.2. Tratamiento de las helmintosis.....	17
2.5.2.1. Tratamiento de la trichinellosis.....	18
2.5.2.2. Tratamiento de la fasciolosis.....	19
2.6. Bencimidazoles .....	20
2.6.1. Bencimidazoles antiparasitarios.....	21
2.6.1.2. SAR en bencimidazoles antiparasitarios .....	22
2.6.4. Química de los 1H-bencimidazoles .....	26
2.6.4.1. Síntesis de los 1H-bencimidazoles 2,5 y/o 6 sustituidos .....	26
2.7 Referencias.....	28
Capítulo 3. Objetivos.....	32
3.1. Objetivos generales.....	32
3.1.1. Objetivos particulares.....	32
Capítulo 4. Síntesis y actividad biológica del compuesto Alfa.....	33
4.1. Introducción.....	33
4.3. Mecanismo de acción del triclabendazol.....	34
4.4. Resistencia.....	35
4.5. Síntesis de triclabendazol.....	36
4.6. Bioisosterismo .....	37
4.6.1. División de Bioisosterismo .....	38
4.7. Diseño del compuesto Alfa.....	39
4.8. Evaluación fasciolicida del compuesto Alfa <i>in vitro</i> .....	40
4.9. Justificación.....	40
4.10. Metodología.....	40
4.10.1. Parte Química .....	40
4.10.1.1. Síntesis del compuesto Alfa .....	40
4.10.1.2. S-oxidación del compuesto Alfa.....	41
4.10.2. Parte Biológica.....	41
4.11. Resultados y discusión .....	42
4.11.1. Parte química .....	42

4.11.1.1. Síntesis del compuesto Alfa .....	42
4.11.2. Parte Biológica.....	54
4.11.2.1. Evaluación <i>in vitro</i> del compuesto Alfa.....	54
4.11.2.2. Evaluación del compuesto Alfa en ovinos.....	54
4.11.2.3. Evaluación del compuesto Alfa en bovinos.....	56
4.11.2.4. Desarrollo de una mejor formulación en suspensión del compuesto Alfa .....	58
4.11.2.5. Farmacocinética del compuesto Alfa .....	59
4.11.2.6. Estudios sobre el efecto del compuesto Alfa en la estructura y ultraestructura de la F. hepática.....	61
4.11.2.7. Actividad antiprotozoaria del compuesto Alfa.....	71
4.12. Conclusiones.....	72
4.12.1. Parte química.....	72
4.12.2. Parte biológica.....	72
4.13. Referencias.....	75
Capítulo 5. 1-Metiltriclabendazoles.....	78
5.1. Introducción.....	78
5.2. Espectro antihelmíntico del triclabendazol.....	79
5.3. Importancia de la <i>Trichinella spiralis</i> .....	79
5.4. 1-Metilbencimidazoles como antiparasitarios.....	80
5.5. Preparación de 1-metilbencimidazoles.....	81
5.5.1. A partir de bencimidazoles.....	81
5.5.2. A partir de N-metil-2-nitroanilinas.....	82
5.6. Justificación.....	83
5.7. Metodología.....	84
5.7.1. Parte química.....	84
5.7.1.1. Síntesis de los 1-metiltriclabendazoles <b>5-5</b> y <b>5-6</b> a partir de Triclabendazol.....	84
5.7.1.2. Síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol ( <b>5-5</b> ).....	85
5.7.1.3. Síntesis de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol ( <b>5-6</b> ).....	86
5.8.1. Parte biológica.....	87
5.8.1.1. Actividad antihelmíntica.....	87
5.8.1.2. Actividad antiprotozoaria.....	88
5.9. Resultados y Discusión.....	89
5.9.1. Parte química.....	89
5.9.1.1. Síntesis de los derivados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> a partir de triclabendazol.....	89
5.9.1.2. Síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol ( <b>5-5</b> ).....	90
5.9.1.3. Síntesis de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol ( <b>5-6</b> ).....	93
5.9.2. Parte biológica.....	103
5.9.2.1. Evaluación antihelmíntica vs <i>Trichinella spiralis</i> .....	103
5.9.2.12. Evaluación antiprotozoaria vs. <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	105
5.10. Conclusiones.....	107
5.11. Referencias.....	108
6. Análogos del Triclabendazol.....	110
6.1. Introducción.....	110
6.2. Modificación en la posición 5(6) del bencimidazol.....	112
6.3. Síntesis de amidas bencimidazólicas.....	113
6.3.1. Generalidades sobre la síntesis de amidas.....	113
6.3.2. Amidas bencimidazólicas.....	117
6.4. Síntesis de aminas bencimidazólicas.....	117
6.4.1. Sustitución nucleofílica aromática de halobencenos.....	117

6.4.2. Aminobencimidazoles .....	118
6.5. Justificación.....	118
6.6. Diseño de los análogos de triclabendazol.....	119
6.7. Metodología .....	120
6.7.1. Parte química .....	120
6.7.1.1. Síntesis de las carboxamidas <b>6-1-6-8</b> .....	120
6.7.1.2. Síntesis de las aminas <b>6-9-6-12, 6-13a, 6-14a, 6-15 y 6-16</b> .....	122
6.7.2. Parte biológica.....	124
6.7.2.1. Evaluación antihelmíntica .....	124
6.7.2.2. Evaluación antiprotozoaria.....	124
6.7.2.3. Evaluación biofarmacéutica.....	124
6.8. Resultados y Discusión.....	124
6.8.1. Amidas <b>6-1-6-8</b> .....	124
6.8.1.1. Resultados y Discusión de la Parte Química.....	124
6.8.1.2. Resultados y Discusión de la Parte Biológica, Amidas <b>6-1-6-8</b> .....	146
6.8.2. Aminas <b>6-9-6-16</b> .....	149
6.8.2.1. Resultados y Discusión de la Parte Química.....	149
6.8.2.2. Resultados y discusión parte biológica, Aminas <b>6-9-6-12, 6-15, 6-16 y 6-13a</b> .....	164
6.9. Conclusiones .....	164
6.10. Referencias.....	165
Capítulo 7. Conclusiones generales.....	168
Capítulo 8. Procedimientos experimentales.....	170
7.1. Parte química.....	170
7.1.1 Instrumentación.....	170
7.1.2. Programa computacional empleado para comprobar nombre y estructura de los compuestos orgánicos sintetizados .....	171
7.1.3. Cromatografía .....	172
7.2. Procedimientos para la obtención de los productos finales .....	172
7.2.1. Procedimiento general de formación de amidas .....	172
7.2.2. Procedimiento general de formación de sulfóxidos y sulfonas .....	176
7.2.3. Procedimiento general de S-alkilación con yoduro de metilo .....	177
7.2.4. Procedimiento general de obtención de clorhidratos.....	183
7.2.5. Procedimiento de obtención de 2-mercaptobencimidazoles .....	185
7.2.6. Procedimiento de obtención de 1,2-diaminobencenos (o-fenilendiaminas).....	190
7.3. Síntesis de precursores .....	193
7.3.1. Procedimiento general para la preparación de ésteres con sulfato de metilo .....	193
7.3.2. Procedimiento general de obtención de anilinas.....	194
7.3.3. Procedimiento general de acetilación.....	195
7.3.4. Procedimiento general de nitración utilizando mezcla sulfonítrica o anhídrido acético .....	197
7.3.5. Procedimiento general de hidrólisis ácida de acetamidas utilizando H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	198
7.3.6. Procedimiento general de hidrólisis alcalina de acetamidas .....	199
7.3.9. Procedimiento general de hidrólisis alcalina de ésteres.....	200
7.3.10. Procedimiento general de N-metilación de acetamidas.....	201
7.4. Método general para las reacciones de sustitución nucleofílica aromática.....	202
7.4.1. Utilizando fenoles como nucleófilo.....	202
7.4.2. Utilizando aminas como nucleófilo.....	204
7.5. Parte biológica.....	208
7.5.1. Prueba de susceptibilidad in vitro para protozoarios .....	208
7.5.2. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de Trypanosoma cruzi y Trypanosoma brucei.....	208



7.5.3. Ensayo general para la determinación de la actividad in vitro en <i>Trichinella spiralis</i> .....	209
7.5.4. Ensayo general para la determinación de la actividad in vitro en <i>Taenia crassiceps</i> .....	209
Apéndice 1. Espectros.....	211
Apéndice 2. Publicaciones.....	393

## Índice de Figuras, Tablas, Esquemas y Gráficas por capítulo

### Capítulo 2. Antecedentes

<b>Figura 2.1.</b> Interacciones que dan lugar a infecciones zoonóticas transmitidas por el agua	9
<b>Tabla 2.1.</b> Epidemiología de la trichinellosis reportada por la OMS por regiones, 1986-2009	11
<b>Tabla 2.2.</b> Total de casos e incidencia de infecciones por <i>Trichinella spp</i> , por la OMS en la región de las Américas	12
<b>Figura 2.2.</b> Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	13
<b>Tabla 2.3.</b> Niveles de infección en humanos alrededor del mundo	14
<b>Tabla 2.4.</b> Prevalencia de fasciolosis animal en México	15
<b>Figura 2.3.</b> Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	16
<b>Figura 2.4.</b> Fármacos nitroimidazólicos empleados como antiprotozoarios	17
<b>Figura 2.5.</b> Algunos derivados del bencimidazol antiparasitarios	18
<b>Tabla 2.5.</b> Farmacoterapia para el tratamiento de la trichinellosis humana	19
<b>Tabla 2.6.</b> Eficacia de algunos fármacos contra <i>Fasciola hepatica</i> en ovejas	20
<b>Tabla 2.7.</b> Espectro de eficacia de fármacos a las dosis recomendadas en ovejas	20
<b>Esquema 2.1.</b> Primeras síntesis de bencimidazoles	21
<b>Figura 2.6.</b> Bencimidazoles con diversas propiedades biológicas	21
<b>Figura 2.7.</b> Sitios de cambios en el patrón de sustitución del bencimidazol	23
<b>Figura 2.8.</b> Grupos usados como sustituyentes en las posiciones 1, 2, 5 y 6 del bencimidazol	24
<b>Figura 2.9.</b> Mecanismos de acción de los bencimidazoles	25
<b>Esquema 2.2.</b> pKas de un derivado del 1 <i>H</i> -bencimidazol	26
<b>Esquema 2.3.</b> Tautómeros y regioisómeros de bencimidazoles 5(6) sustituidos	26
<b>Esquema 2.4.</b> Síntesis de bencimidazoles 2,5 y/o 6 sustituidos	28
<b>Esquema 2.5.</b> Síntesis de <i>orto</i> -diaminobencenos sustituidos en 4 y/o 5.	28

### Capítulo 4. Síntesis y actividad del compuesto Alfa

<b>Esquema 4.1.</b> El triclabendazol y sus metabolitos	34
<b>Figura 4.1.</b> Diversidad estructural de compuestos fasciolicidas	36
<b>Esquema 4.2.</b> Preparación de triclabendazol según Gallay <i>et al</i>	37
<b>Esquema 4.3.</b> Preparación de la <i>o</i> -fenilendiamina: 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2- diamina	37
<b>Figura 4.2.</b> Evolución del concepto de bioisosterismo	38
<b>Figura 4.3.</b> Reemplazo bioisostérico clásico y no-clásico en la preparación del Pronetalol	39
<b>Figura 4.4.</b> Diseño del compuesto Alfa por reemplazo bioisostérico	39
<b>Esquema 4.4.</b> Método de síntesis del compuesto Alfa	41
<b>Esquema 4.5.</b> Metodología para la síntesis de los metabolitos más relevantes del compuesto Alfa	41
<b>Esquema 4.6.</b> Preparación de 4,5-dicloro-2-nitroanilina ( <b>4-2a</b> )	43
<b>Tabla 4.1.</b> Pruebas de <i>S<sub>N</sub>Ar</i> en diferentes condiciones para obtener el éter <b>4-3a</b> partir de 1 equivalente de 4,5-dicloro-2-nitroanilina ( <b>4-2a</b> )	44
<b>Tabla 4.2.</b> Comparación de las alternativas de síntesis de la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina ( <b>4-3a</b> )	47
<b>Tabla 4.3.</b> Reacciones de sustitución nucleofílica asistida por microondas para la obtención	47

de 4- cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina <b>4-3a</b> , a partir de 1 equivalente de <b>4-2a</b>	
<b>Tabla 4.4.</b> Constantes físicas y rendimientos de los compuestos <b>4-3a–4-6</b> obtenido por síntesis convencional	50
<b>Tabla 4.5.</b> Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos <b>4-3a–4-6</b>	51, 52
<b>Tabla 4.6.</b> Constantes físicas y espectroscópicas de los metabolitos del compuesto Alfa	53
<b>Tabla 4.7.</b> Actividad biológica <i>in vitro</i> del compuesto Alfa ( <b>4-6</b> ) contra metacercarias de <i>F. hepatica</i>	54
<b>Tabla 4.8.</b> Eficacia <i>in vivo</i> del compuesto Alfa a 4, 8 y 10 semanas de desarrollo de la <i>F. hepatica</i>	55
<b>Tabla 4.9.</b> Eficacia del compuesto Alfa vs. fasciolas juveniles y adultas en borregos infectados experimentalmente	56
<b>Tabla 4.10.</b> Porcentaje de efectividad del compuesto Alfa a diferentes dosis en ganado bovino	56
<b>Tabla 4.11.</b> Eficacia del compuesto Alfa contra <i>F. hepatica</i> de 3 días a 12 semanas de desarrollo en bovinos	57
<b>Tabla 4.12.</b> Componentes de la Formulación del compuesto Alfa	59
<b>Tabla 4.13.</b> $t_{1/2}$ y $t_{max}$ de los metabolitos de Alfa y TCBZ en ovinos bovinos	61
<b>Figura 4.5.</b> <i>Fasciola hepatica</i> a las 6 h (1), 12 h (2) y 24 h (3) tras exposición al compuesto Alfa	62
<b>Figura 4.6.</b> Microscopía electrónica de barrido de la superficie del tegumento de <i>Fasciola hepatica</i> resistentes a TCBZ después de 24 h de la exposición al metabolito AlfaSO.	63
<b>Figura 4.7.</b> Ensayos de inmunotinción de tubulina en células del tegumento de <i>F. hepatica</i> sin tratamiento (a), y tras su exposición al metabolito sulfóxido de Alfa a la concentración de 10 mg/mL a las 6 h (b) y 18 h (c)	65
<b>Figura 4.8.</b> (A) <i>F. hepatica</i> sin exposición al compuesto Alfa. El útero con huevos (Ut), el disco y zona de succión (OS y VS), glándula de Mehlis (Ot), membrana vitelina (V) y reservorio vitelino. (B) 24 h post-tratamiento	70
<b>Tabla 4.14.</b> Susceptibilidad de <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>T. vaginalis</i> al compuesto Alfa	71
 <b>Capítulo 5. 1-Metiltriclabendazoles</b>	
<b>Tabla 5.1.</b> Actividad del triclabendazol vs. helmintos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	79
<b>Tabla 5.2.</b> Actividad antihelmíntica de albendazol y sus derivados metilados	80
<b>Esquema 5.1.</b> Obtención de 1-metilbencimidazoles a partir de bencimidazol	81
<b>Esquema 5.2.</b> Preparación de de <i>N</i> -metil-2-nitroanilinas	82
<b>Esquema 5.3.</b> 1-Metilbencimidazoles vía reacción con formaldehído y benzotriazol	83
<b>Esquema 5.4.</b> Síntesis de los compuestos <b>5-5</b> y <b>5-6</b> a partir de triclabendazol	85
<b>Esquema 5.5.</b> Ruta sintética para la preparación de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol ( <b>5-5</b> )	86
<b>Esquema 5.6.</b> Ruta sintética para la preparación de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol ( <b>5-6</b> )	87
<b>Figura 5.1.</b> Diagrama de flujo seguido para la evaluación antihelmíntica vs. <i>T. spiralis</i>	88
<b>Figura 5.2.</b> EM (CG/IE, $m/z$ ) de la mezcla de compuestos 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol ( <b>5-5</b> ) y 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol ( <b>5-6</b> )	90
<b>Esquema 5.7.</b> Propuesta de formación de los iones $m/z$ [M–42] y 43 en la fragmentación de las acetanilidas <b>5-11–5-13</b>	92
<b>Esquema 5.8.</b> Reacción de $S_NAr$ para obtención del compuesto <b>5-17</b>	94
<b>Figura 5.3.</b> Duplicidad de señales en RMN del compuesto <b>5-18</b>	96
<b>Esquema 5.9.</b> Fragmentos más importantes en el espectro de masas para el compuesto <b>5-6</b> . El mismo tipo de iones pero con diferente abundancia relativa se obtuvieron para el compuesto <b>5-5</b>	97
<b>Tabla 5.3.</b> Constantes físicas y rendimientos de los compuestos <b>5-5</b> , <b>5-6</b> y TCBZ	98
<b>Tabla 5.4.</b> Características espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos <b>5-5</b> , <b>5-</b>	99

<b>6 y TCBZ (5-4)</b>	
<b>Tabla 5.5.</b> Rendimiento y constantes físicas de los intermediarios <b>5-9</b> a <b>5-16</b>	100
<b>Tabla 5.6.</b> Rendimiento y constantes físicas de los intermediarios <b>5-17</b> a <b>5-22</b>	100
<b>Tabla 5.7.</b> Características espectroscópicas y espectrométricas de los intermediarios de la síntesis de <b>5-5</b>	100-101
<b>Tabla 5.8.</b> Constantes espectroscópicas espectrométricas de los intermediarios de la síntesis de <b>5-6</b>	101-102
<b>Tabla 5.9.</b> Efecto de TCBZ y sus derivados 1-metilados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre el organismo adulto de la <i>T. spiralis</i>	103
<b>Gráfica 5.1.</b> Efecto de TCBZ y sus derivados 1-metilados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre el organismo adulto de la <i>T. spiralis</i>	103
<b>Tabla 5.10.</b> Efecto del TCBZ, y sus derivados 1-metilados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre la fertilidad el de las hembras de <i>T. spiralis</i>	104
<b>Gráfica 5.2.</b> Efecto, expresado en %, del TCBZ y sus derivados 1-metilados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre la fertilidad el de las hembras de <i>T. spiralis</i>	104
<b>Tabla 5.11.</b> Efecto del TCBZ, y sus derivados 1-metilados <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre la larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i>	105
<b>Gráfica 5.3.</b> Porcentaje de reducción de larvas musculares de <i>T. spiralis</i> por efecto de los compuestos TCBZ, <b>5-5</b> y <b>5-6</b>	105
<b>Tabla 5.12.</b> Susceptibilidad <i>in vitro</i> contra los protozoarios <i>G intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>T. vaginalis</i>	106
<b>Gráfica 5.4.</b> Actividad antiprotozoaria expresado como 1/CI <sub>50</sub> de los compuestos, TCBZ, <b>5-5</b> y <b>5-6</b> sobre <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> , y <i>T. vaginalis</i>	107
<b>Capítulo 6. Análogos del triclabendazol</b>	
<b>Figura 6.1.</b> Algunos fármacos empleados contra helmintosis extraintestinales	110
<b>Figura 6.2.</b> Modificaciones en la posición 5(6) del bencimidazol	112
<b>Figura 6.3.</b> Bencimidazoles con grupos piperazino o piperidino activos como micro y macrofilaricidas	113
<b>Esquema 6.1.</b> Formación de ésteres <i>versus</i> formación de amidas	114
<b>Tabla 6.1.</b> Métodos de activación de ácidos carboxílicos para la síntesis de amidas	115-116
<b>Esquema 6.2.</b> Estrategias para la preparación de amidas bencimidazólicas. (A) Formación de la amida antes de ciclar. (B) Formación de la amida después de ciclar	117
<b>Esquema 6.3.</b> S <sub>N</sub> Ar de aminas secundarias sobre 3,4-dicloronitrobenzoceno	118
<b>Esquema 6.4.</b> Preparación de aminas bencimidazólicas en 5(6)	119
<b>Tabla 6.2.</b> Análogos de triclabendazol con sustitución en 5(6) de tipo carboxamida	120
<b>Tabla 6.3.</b> Análogos de triclabendazol con sustitución en 5(6) de tipo amina	120
<b>Esquema 6.5.</b> Síntesis de las carboxamidas <b>6-1–6-8</b>	121
<b>Esquema 6.6.</b> Preparación de los precursores 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo ( <b>6-26</b> ) y 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo ( <b>6-27</b> )	122
<b>Esquema 6.7.</b> Ruta de síntesis para las aminas <b>6-9–6-12</b> , <b>6-13a</b> , <b>6-14a</b> , <b>6-15</b> y <b>6-16</b>	123
<b>Figura 6.4.</b> Patrón de multiplicidad en RMN <sup>1</sup> H para un compuesto 1,3,4 trisustituido. Ejemplo: 4-acetamido-3-nitrobenzoato de metilo	126
<b>Esquema 6.8.</b> Equilibrio tiol-tiona de los compuesto <b>6-30</b> y <b>6-31</b> , se indican los desplazamientos de RMN <sup>13</sup> C para los carbonos del éster y el C-2	127
<b>Figura 6.5.</b> Duplicidad de las señales par los carbonos aromáticos en el espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>6-32</b>	128
<b>Esquema 6.9.</b> Equilibrios ácido base y tautomérico para el ácido <b>6-34</b>	129
<b>Figura 6.6.</b> Duplicidad de las señales par los carbonos aromáticos en el espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>6-34</b>	129
<b>Figura 6.7.</b> Señales simples de la parte aromática del espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>6-35</b>	130
<b>Figura 6.8.</b> Amidas voluminosas	131

<b>Esquema 6.10.</b> Método alternativo para la preparación de la amida <b>6-5a</b>	132
<b>Figura 6.9.</b> Sistemas de acoplamiento encontrados en los espectros de RMN <sup>1</sup> H para los compuestos <b>6-1–6-8</b>	133
<b>Figura 6.10.</b> Parte aromática del espectro HETCOR del compuesto <b>6-4</b>	135
<b>Figura 6.11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del derivado 1 metilado del compuesto <b>6-4</b>	136
<b>Figura 6.12.</b> Tautómeros del compuesto <b>6-4</b> y sus energías calculadas por el método de DFT-B88-LYP Scf (DFT) la energía está dada en Hartrees	136
<b>Figura 6.13.</b> Parte aromática del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 6-4 a) 22.4 °C, b) 40 °C, c) 60 °C, d) 80 °C, e) 100 °C, f) 120 °C, g) 140 °C, h) 150 °C señales en 7.3 y 7.6 ppm	138
<b>Figura 6.14.</b> Parte aromática del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 6-4 a) 22.4 °C, b) -10 °C, c) -20 °C, d) -30 °C, e) -40 °C, f) -50 °C, g) -60 °C, h) -70 °C, i) -80 °C, j) -90 °C. Espectro adquirido en DMSO- <i>d</i> 6	139
<b>Figura 6.15.</b> Parte alifática del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 6-4 a) 22.4 °C, b) -90 °C	140
<b>Figura 6.16.</b> Digrama de equilibrio interconversión entre los 4 posibles rotámeros, los valores sobre las flechas indican la energía en kcal/mol relacionada en cada paso, obtenidas del mapa del potencial electrostático calculado por el método MM3	141
<b>Esquema 6.11.</b> [M-1] <sup>+</sup> de las amidas <b>6-1–6-4</b>	142
<b>Esquema 6.12.</b> Formación del ion acilio para las carboxamidas <b>6-1–6-8</b>	142
<b>Esquema 6.13.</b> Propuesta de fragmentación en la espectrometría de masas para las amidas <b>6-5a</b> y <b>6-6</b>	142
<b>Esquema 6.14.</b> Propuesta de fragmentación en la espectrometría de masas para las amidas <b>6-7–6-8</b>	144
<b>Tabla 6.4.</b> Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las carboxamidas finales	145
<b>Tabla 6.5.</b> Actividad de los compuestos <b>6-1–6-8</b> contra la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	146
<b>Tabla 6.6.</b> Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>G intestinalis</i> a los compuestos <b>6-1–6-8</b>	147
<b>Gráfica 6.1.</b> Actividad giardicida de las carboxamidas <b>6-1–6-8</b>	147
<b>Tabla 6.7.</b> Actividad antiparasitaria de algunas carboxamidas 1-metilbencimidazólicas	147
<b>Esquema 6.15.</b> Productos secundarios de la reacción de obtención de la amina <b>6-41</b> en DMF	148
<b>Tabla 6.8.</b> Constantes espectroscópicas de los productos de la reacción de obtención de <b>6-41</b> en DMF	149-150
<b>Esquema 6.16.</b> Ion [M-1] <sup>+</sup> más abundante en el espectro de masas de las aminas en las aminas <b>6-37–6-40</b>	151
<b>Tabla 6.9.</b> Reacciones de S <sub>N</sub> Ar realizadas por el método convencional y por microondas	151
<b>Esquema 6.17.</b> Equilibrio tautomérico tiol-tiona de los compuestos <b>6-55</b> y <b>6-69</b>	153
<b>Figura 6.18.</b> Superficie de la densidad del potencial electrostático para los tautómeros tiol-tiona, calculado por el método teoría de funcionales de la densidad (DFT, B3LYP/6-31 G*)	153
<b>Tabla 6-10.</b> Características espectroscópicas de las tionas <b>6-55–6-61</b>	153
<b>Esquema 6-18.</b> Equilibrio tautomérico de los compuesto <b>6-12</b> y <b>6-16</b>	155
<b>Figura 6.19.</b> Resonancia Magnética de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del compuesto <b>6-12</b>	156
<b>Figura 6.20.</b> Resonancia Magnética de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del compuesto <b>6-12</b> con intercambio con D <sub>2</sub> O	157
<b>Tabla 6.11.</b> Bandas característica de para las aminas <b>6-9– 6-14</b>	158
<b>Esquema 6.19.</b> Propuesta de fragmentación en la espectrometría de masas para las aminas <b>6-9–6-12</b>	159
<b>Esquema 6.20.</b> Propuesta de fragmentación en la espectrometría de masas para las aminas <b>6- 13a–6-14a</b>	160
<b>Esquema 6.21.</b> Propuesta de fragmentación en la espectrometría de masas para las aminas <b>6-15–6-16</b>	160
<b>Tabla 6.12.</b> Resumen de las propiedades físicas de las aminas	161-162
<b>Tabla 6.13.</b> Susceptibilidad <i>in vitro</i> contra los protozoarios <i>G intestinalis</i> y <i>E. histolytica</i>	163

## Abreviaturas generales

TCBZ	Triclabendazol	TCBZSO	Sulfóxido de triclabendazol
mg	miligramos	TCBZSO <sub>2</sub>	Sulfona de triclabendazol
ABZ	Albendazol	h	horas
kg	kilogramos	EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
nM	nanomolar	IR	Infrarrojo
Cl <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50	RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
g	gramos	RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
μM	micromolar	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro	δ	desplazamientos
μg	microgramos	ppm	partes por millón
mL	mililitros	s	Singulete
TIM	Triosafosfato isomerasa	sa	Singulete amplio
S <sub>N</sub> Ar	Reacción de sustitución nucleofílica aromática	d	Doblete
LM	Larva muscular	dd	Doble de dobles
MTZ	Metronidazol	t	Triplete
NTZ	Nitazoxanida	m	Multiplete
BZC	Bencimidazol-2-carbamato de metilo	pf	Punto de fusión
OMS	Organización Mundial de Salud	<i>R<sub>f</sub></i>	Factor de retención
mm	milímetros	<i>R<sub>t</sub></i>	Tiempo de retención
NTD	Del inglés: <i>Neglected Tropical Diseases</i>	EM	Espectrometría de masas
MBZ	Mebendazol	IE	Impacto electrónico
LXBZ	Luxabendazol	ID	Introducción directa
DMT	Dosis Máxima Tolerada	CG	Cromatografía de gases
IS	Índice de seguridad	<i>m/z</i>	Relación masa-carga
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución	Anal. (AE)	Análisis elemental
MET	Microscopía electrónica de transmisión	TMS	Tetrametilsilano
MEB	Microscopía electronica de barrido	MHz	Megahertz
SAR	Relaciones estructura-actividad	Hz	Hertz
pKa	Constante de disociación ácida	DFT	Del inglés: <i>Density Functional Theory</i>
logP	Coeficiente de partición	W	watts
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida	NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
EtOH	Etanol	AmCPB	ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
H <sub>2</sub> O	Agua	CMC	Carboximetilcelulosa
CH <sub>3</sub> I	Yoduro de metilo	Alfa	5-cloro-6-(1-naftiloxi)-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol

KOH	Hidróxido de potasio	GNV14	5-(2,3-Diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
NaOH	Hidróxido de sodio	SOCl <sub>2</sub>	Cloruro de tionilo
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Cloruro estañoso dihidratado	TEA	Trietilamina
CS <sub>2</sub>	Disulfuro de carbono	DIPEA	Diisopropiletilamina
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio	NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
MeOH	Metanol	DMAP	4-dimetilaminopiridina
Monoglima	1,2-dimetoxietano	CDI	1,1'-carbonildiimidazol
DMSO	Dimetilsulfóxido	THF	Tetrahidrofurano
AcOEt	Acetato de etilo	CH <sub>3</sub> CN	acetonitrilo
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de dimetilo	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano/cloruro de metileno
HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico	AcOH	ácido acético
HCl dil.	ácido clorhídrico solución		
CloP	Coeficiente de partición calculado		
BZ	Bencimidazol		

---

---

## Resumen

El propósito general de esta tesis fue la síntesis y evaluación biológica de compuestos diseñados como antihelmínticos y/o antiprotozoarios. Todos los compuestos sintetizados son bencimidazoles, basados en la estructura del triclabendazol (TCBZ), cuya característica estructural es tener un grupo metiltio en la posición 2 del bencimidazol, en vez del alcóxicarbonilamino clásico de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, como el albendazol (ABZ). El TCBZ es utilizado ampliamente contra los trematodos *Fasciola hepatica* y *Paragonimus* o fasciola del pulmón, que provocan importantes parasitosis extraintestinales.

En un primer estudio se sintetizó el compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol, llamado compuesto Alfa, diseñado como bioisómero de TCBZ. La síntesis se realizó a escala de 100 g con rendimiento global de 51.28% en un proceso de cinco pasos. El compuesto Alfa fue activo al 100% a 15 mg/kg de peso en borregos y 12 mg/kg de peso en bovinos, contra fasciolas juveniles y adultas. También se determinó su índice de seguridad en bovinos, el cual fue de 15 veces la dosis efectiva. Estudios de microscopía electrónica, de barrido y de transmisión, demostraron el efecto del compuesto sobre *F. hepatica* a nivel de ultraestructura, dañando a las espinas y el tegumento. También se observó el daño en la espermatogénesis y ovogénesis de los parásitos, con lo que se cree que actúa de manera semejante al TCBZ. Adicionalmente, también se evaluó la susceptibilidad de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* al compuesto Alfa. Se encontró que este compuesto fue selectivo contra *E. histolytica* con una  $CI_{50}$  de 26.4 nM.

En un segundo estudio se sintetizaron dos derivados 1-metilados del TCBZ a partir de materias primas accesibles. Los regioisómeros se evaluaron contra las fases entérica y tisular de *T. spiralis* en ensayos *in vivo*, resultando uno de ellos (compuesto **5-5**) tan activo como ABZ. Por otro lado, el TCBZ resultó ser un potente giardicida y tricomonocida, mejor que ABZ y metronidazol.

En un tercer estudio se diseñaron y sintetizaron dos series de análogos de TCBZ; una, con un grupo aminocarbonilo en 5(6) y otra con grupo amino directamente unido al bencimidazol. El tipo de aminas empleadas para la síntesis de estas series de amidas y aminas fue de tipo heterocíclico como piperidinas y piperazinas. Las amidas (compuestos **6-1-6-8**) resultaron ser mejores como antihelmínticos contra la larva muscular de *T. spiralis* que como antiprotozoarios. El grupo de aminas bencimidazólicas, compuestos **6-9-6-16**, sólo se evaluó

---

---

*in vitro* contra *G. intestinales* y *E. histolytica*, mostrando actividad moderada contra éstos parásitos.

En esta tesis también se describe la síntesis detallada de todos los compuestos finales e intermediarios, así como la elucidación estructural de los mismos. Se discuten los resultados de actividad biológica contra los helmintos: *F. hepatica*, *T. spiralis* y *T. crassiceps* y los protozoarios: *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*; y adicionalmente, en el caso del compuesto Alfa, se evaluó su capacidad inhibitoria sobre la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*.



---

---

## Abstract

The general purpose of the work contained in this thesis was to synthesize and carry out the biological evaluation of compounds designed to serve as anthelmintics and/or antiparasitics. All compounds synthesized were benzimidazoles based on the structure of triclabendazole (TCBZ), which contains a methylthio group at position 2 on the benzimidazole instead of the classic alkoxycarbonylamino group seen in methyl benzimidazol-2-carbamates such as albendazole (ABZ). TCBZ is utilized extensively against the trematodes *Fasciola hepatica* and *Paragonimus* (lung fasciola), which cause extraintestinal parasitic diseases.

In an initial study, the compound 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthyloxy)-1*H*-benzimidazole, named "compound alpha," was synthesized and designed as a bioisostere of TCBZ. The synthesis was scaled to 100 g with an overall yield of 51.28% utilizing a five-step process. Compound alpha was 100% active against juvenile and adult fasciolas in sheep at a dose of 15 mg/kg and in cattle at 12 mg/kg. Also, the compound's safety index in cattle was determined to be fifteen times the effective dose. Studies using transmission and scanning electron microscopy demonstrated the effect of the compound on the ultrastructure of *F. hepatica*, damaging the spines and tegument. Damage to the processes of spermatogenesis and oogenesis in the parasites was also observed, leading to the belief that compound alpha has a similar mechanism to that of TCBZ. Moreover, the susceptibility of *G. intestinalis*, *E. histolytica* and *T. vaginalis* to compound alpha was evaluated. It was found that this compound was selective toward *E. histolytica* with a  $IC_{50}$  of 26.4 nM.

In a second study, 1-methylated derivatives of TCBZ were synthesized using accessible raw materials. The regioisomers were evaluated against the enteral and parenteral phases of *T. spiralis in vivo*, one of them (compound **5-5**) resulting to be as active as ABZ. On another hand, TCBZ resulted a potent giardicidal and trichomonocidal agent, exceeding that achieved by ABZ and metronidazole.

In a third study, two series of TCBZ analogues were designed and synthesized; one, with an aminocarbonyl group at position 5(6); and another, with an amino group directly attached to the benzimidazole at the same position. The types of amines utilized in the synthesis of these series of amides and amines were heterocyclic in nature such as piperidines and piperazines. The amides (compounds **6-1–6-8**) resulted being more effective anthelmintic agents against *T. spiralis* muscle larvae, outshining their use as antiprotozoal agents. The group of

---

---

benzimidazole amines (compounds **6-9-6-16**) were only evaluated *in vitro* against *G. intestinalis* and *E. histolytica*, demonstrating moderate activity against these parasites.

In this thesis, the detailed syntheses of all reaction intermediates and final compounds are also described, along with the structural elucidation of each of these. The results obtained from the biological activities of these compounds against the helminths: *F. hepatica*, *T. spiralis* and *T. crassiceps* and the protozoans: *G. intestinalis*, *E. histolytica* and *T. vaginalis* are discussed. In the case of compound alpha, its effect on triosephosphate isomerase enzyme of *T. cruzi* is also discussed.

## Capítulo 1. Introducción

Las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos continúan siendo un problema de salud en el mundo, principalmente en los países en desarrollo, como el nuestro. Desafortunadamente, las condiciones de pobreza económica de muchos países tienen como consecuencia que los programas de salud sean deficientes, así como la educación; lo que trae consigo malas prácticas de higiene y convivencia entre humanos y animales. Esta convivencia extrema ha ocasionado la aparición de un buen número de zoonosis responsables de muchas muertes, y severos problemas en la industria pecuaria.

Dentro de las helmintosis que afectan tanto a humanos como a animales está la fasciolosis, ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Es una de las enfermedades parasitarias extraintestinales más importantes de los animales domésticos en países con climas templados o tropicales. En humanos, la incidencia de esta parasitosis va en aumento, siendo Bolivia y los países andinos los que más la padecen en América. Desde la aparición del triclabendazol (TCBZ) en 1978, un bencimidazol del tipo no carbamato de metilo, no se han propuesto nuevas alternativas de fármacos, para el tratamiento de la enfermedad, lo que ha ocasionado la aparición de cepas resistentes a TCBZ.

Otras helmintosis que se desarrollan a nivel gastrointestinal y tisular, de tipo zoonóticas, son la trichinellosis y la cisticercosis; para las cuales, desde hace décadas, el tratamiento está limitado al uso de albendazol (ABZ, un bencimidazol de la familia de los carbamatos) y praziquantel (PQZ, un derivado dihidroisoquinolínico).

Dentro de las parasitosis más comunes en el mundo, están las causadas por protozoarios, tales como la amebiosis y la giardiosis para los cuales el metronidazol (MTZ) por mucho tiempo ha sido el fármaco de elección; más recientemente se viene usando la nitazoxanida (NTZ). En las últimas dos décadas se ha puesto de manifiesto el uso de mebendazol (MBZ) y ABZ como antiprotozoarios.

Si bien, el tratamiento preventivo de las parasitosis a través de vacunas sería la estrategia ideal, la realidad es que todavía falta mucho por hacer en ese campo; por lo que el control de las parasitosis recae en la quimioterapia.

Ante la imperiosa necesidad de nuevos fasciolicidas, la Facultad de Química, Departamento de Farmacia de la UNAM, en colaboración con el Instituto de Investigaciones Forestales,

Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM emprendieron un proyecto amplio de colaboración encaminado a la obtención de nuevos fasciolicidas. Se sintetizaron nuevos derivados del bencimidazol entre los cuales surgió un isómero del TCBZ, al que se le denominó compuesto Alfa, que resultó con excelente actividad fasciolicida *in vitro*. En los estudios preliminares sobre la síntesis y actividad de este compuesto faltó información importante, entre otras, un procedimiento de síntesis escalable a nivel de gramos, las constantes espectroscópicas que permitieran establecer la estructura del compuesto Alfa inequívocamente y la determinación de la actividad *in vivo*. Parte de esta tesis trata sobre la obtención de esta información.

Por otro lado, no se sabe mucho acerca de los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica del TCBZ, y tomando en cuenta su estrecho espectro de acción, en esta tesis se exploró la actividad antiparasitaria de sus derivados 1-sustituidos.

Como se sabe, los derivados del bencimidazol conforman un grupo de compuestos con diversas actividades, destacándose la actividad antihelmíntica de los bencimidazol 2-carbamatos (BZC) contra parásitos gastrointestinales. A éste grupo de compuestos también se les ha encontrado actividad antiprotozoaria. Considerando la importancia de las enfermedades parasitarias en humanos la Facultad de Química, Departamento de Farmacia de la UNAM, en colaboración con la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS, (UIMEIP-IMSS) del Centro Médico Nacional Siglo XXI emprendieron un proyecto amplio de colaboración encaminado a la obtención de nuevos derivados del bencimidazol y a la determinación de la actividad antiparasitaria *in vitro* e *in vivo*, entre ellos aminas y carboxamidas bencimidazólicas. La otra parte de esta tesis trata sobre el diseño, la síntesis y la actividad antiparasitaria de este tipo de compuestos.

## Capítulo 2. Antecedentes Generales

### 2.1. Generalidades sobre las parasitosis

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios y helmintos siguen siendo un problema de salud pública en todo el mundo. Estas enfermedades están ampliamente distribuidas en áreas tropicales y subtropicales, en donde las instalaciones sanitarias y condiciones higiénicas son deficientes. La población afectada no solo incluye a los humanos, sino también a los animales domésticos e inclusive animales salvajes. En los primeros, los estragos son mayores en la población infantil y en los ancianos. En el sector pecuario también se tienen parasitosis que llevan a pérdidas económicas considerables que implican gastos elevados en la prevención y la curación de la enfermedad. Lo anterior repercute en la calidad de vida de las personas que las padecen y en la economía de los países afectados.

Para tener una idea de la problemática de las parasitosis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de la mitad de la población mundial, alrededor de 3,500 millones de habitantes, está parasitada, y aproximadamente 450 millones padecen de alguna o más enfermedades parasitarias; la mayor proporción corresponde a la población infantil en la que el desarrollo corporal e intelectual sufre un rezago.

Dentro de las parasitosis que afectan a los humanos destacan las helmintiosis, que afectan a más de 2,000 millones de personas en todo el mundo; a tal punto que 65,000 muertes anuales se atribuyen a infecciones por nematodos gastrointestinales.<sup>1</sup> Hay estimados que indican que el número de individuos infectados podría ser mayor a los reportados y que estas parasitosis pueden propagarse de manera inadvertida durante cierto tiempo. Entre las helmintiosis que afectan al ser humano están la uncinariosis, oxiuriasis, cisticercosis, fasciolosis, toxocariosis, trichinellosis y oncocercosis, por nombrar algunas.

Las protozoosis también son de gran importancia, especialmente aquellas causadas por *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*, agentes causales de episodios de diarrea en los países en desarrollo;<sup>2</sup> también las causadas por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* que no cuentan con tratamientos eficaces. El mayor número de casos de parasitosis ocurre en África, Latinoamérica y Asia. En los últimos veinte años se han realizado esfuerzos para controlar la prevalencia de las enfermedades parasitarias con campañas de higiene, sanitarias y tratamientos masivos.<sup>3</sup> En general, la quimioterapia se considera la estrategia

más eficaz y económica para el control de las parasitosis. Sin embargo, su aplicación ha provocado el desarrollo de parásitos resistentes a los fármacos de elección debido al mal uso de éstos. Aunado a lo anterior, la carencia de fármacos alternativos pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevas moléculas para combatir estos padecimientos.<sup>4</sup>

## 2.2. Transmisión de las parasitosis

Las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados con parásitos siguen siendo responsables de los altos niveles de morbilidad y mortalidad en la población en general, pero particularmente en los grupos de alto riesgo tales como los infantes, los ancianos y los grupos inmunocomprometidos.

Las enfermedades parasitarias se presentan de forma endémica y epidémica en los países menos desarrollados. Las formas de transmisión de los organismos patógenos más comunes son por la ruta fecal-oral en el agua que se bebe, por el suelo, o por contacto de persona a persona. La transmisión de patógenos también incluye la exposición e inhalación de las heces de humanos o animales infectados, o por el consumo de productos alimenticios contaminados por el agua de riego. Otra manera de contaminarse es por el consumo de carnes, pescados y mariscos crudos, o bien vegetales que crecen en el agua, como los berros. Entre los parásitos más comunes transmitidos por los alimentos están los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp*, *Cyclospora cayetanesis* y *Toxoplasma gondii*; entre los helmintos se encuentran los gusanos redondos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Trichinella spiralis*, los gusanos planos *Diphyllobothrium spp* y *Taenia spp.*; y los trematodos *Fasciola hepatica* y *Fasciola giganta*.

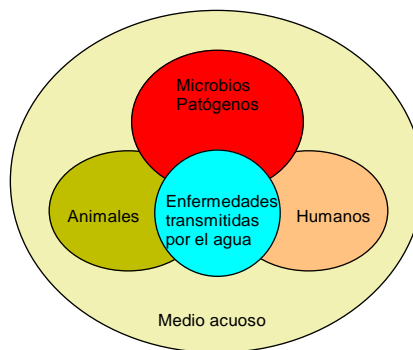
## 2.3. Zoonosis, salud pública y animal

La salud humana está estrechamente ligada a la salud y producción animal. Este vínculo entre humanos, animales y medio ambiente es especialmente estrecho en las regiones en desarrollo, donde los animales juegan un papel muy importante en la vida cotidiana, porque proveen, además de la alimentación, fuerza de trabajo y recursos económicos.

Un buen número de enfermedades se transmiten entre animales y humanos o viceversa, éstas se clasifican como zoonosis; conociéndose unas 200. Entre los patógenos que las causan están bacterias, hongos, virus y parásitos. Más del 60% de las infecciones que han afectado a los humanos en las últimas cinco décadas han sido provocadas por patógenos de

origen animal. El 70% de estas infecciones zoonóticas se originan en la vida silvestre.<sup>5</sup>

La aparición de zoonosis emergentes es un fenómeno multifactorial que incluye evolución ecológica, adaptación microbiana, factores demográficos, factores culturales, prácticas agrícolas y comercio. Muchas de estas enfermedades tienen potencial de esparcirse de muchas maneras y a larga distancia convirtiéndolas en un problema global de salud humana y animal, de aquí que son un obstáculo para el desarrollo socioeconómico general. De manera que la medicina veterinaria juega un papel importante en el control de las enfermedades zoonóticas. Las interacciones que dan lugar a infecciones zoonóticas transmitidas por el agua se ilustran en la Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Interacciones que dan lugar a infecciones zoonóticas transmitidas por el agua.<sup>5</sup>

## 2.4. Parasitosis de importancia endémica en nuestro país

### 2.4.1. Giardiosis

La giardiosis es considerada una enfermedad zoonótica que afecta a más de 40 especies animales.<sup>6</sup> Es causada por el protozooario *Giardia intestinalis* (también llamada *G. lamblia* y *G. duodenalis*). Infecta el intestino delgado del humano, puede ser asintomática o sintomática provocando diarrea aguda o crónica y síndrome de absorción deficiente, y en los infantes, alteraciones de crecimiento. Su prevalencia es alta en niños de países en desarrollo, pero decrece a 2-7% en países industrializados, por lo que en países en desarrollo la giardiosis es considerada una causa importante de morbilidad. En México se reportaron en 2007 alrededor de 25,500 casos de giardiosis.<sup>7</sup> Varios estudios clínicos han demostrado la emergencia de cepas de *G. intestinalis* resistentes a los fármacos en uso, complicando el tratamiento de la infección.<sup>8</sup>

#### 2.4.2. Amoebiosis

La amoebiosis también está catalogada como una enfermedad zoonótica. El agente causal de la amoebiosis intestinal y del absceso hepático amebiano es la *Entamoeba histolytica*, un protozooario que parasita a una gran variedad de animales además del hombre. En la mayoría de los casos puede causar la muerte de los individuos si no se da el tratamiento adecuado. Este parásito afecta a casi 50 millones de personas en el mundo, de las cuales 40,000 a 110,000 mueren cada año, haciendo de esta enfermedad la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias.<sup>6,9</sup> La mayoría de los individuos infectados con *E. histolytica* no presentan síntomas; sin embargo, cerca del 10% de los individuos asintomáticos infectados desarrollan la enfermedad después de un año de adquirir la infección. En México, la amoebiosis intestinal está entre las primeras 20 causas de morbilidad y es una de las principales infecciones parasitarias. En 2007 se reportaron cerca de 538,000 casos, casi la mitad de los reportados en 2003, y una incidencia de 600/100,000 habitantes<sup>10</sup> no obstante, se desconoce qué proporción de esta cifra es causada por *E. histolytica* y qué proporción por *E. dispar*.

#### 2.4.3. Tricomoniosis

La enfermedad conocida como tricomoniosis es causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis* el cual es transmitido sexualmente. Este protozooario flagelado es responsable de 180 millones de infecciones anuales.<sup>6</sup> El parásito infecta el epitelio escamoso del tracto genital, puede ser una infección asintomática o provocar una enfermedad inflamatoria severa. La infección con el parásito es causa de esterilidad y problemas en el embarazo.<sup>11</sup> La tricomoniosis, si bien no es una enfermedad zoonótica, ni se transmite por los alimentos, tiene una prevalencia alta en países en desarrollo. Además, la tricomoniosis incrementa la susceptibilidad a la infección con VIH. En México, la mayor incidencia se contempla entre los 20-49 años edad, con una tasa de infección de 127.48/100,000 habitantes.<sup>12</sup> Se considera que es más frecuente en las fronteras, zonas turísticas y D.F.; sin embargo, la validez de esta información sobre la distribución geográfica de la parasitosis es relativa ya que no todos los casos son registrados.



2.4.4. *Trichinellosis*

El nematodo *Trichinella spiralis* causa una parasitosis zoonótica de interés para los sistemas de salud pública, emergente y/o reemergente en varias regiones del mundo. Como patógeno, *T. spiralis* es responsable de numerosos brotes en humanos que ocurren en diversas partes del mundo, incluyendo a México. Se estima que 11 millones de personas pueden estar infectadas por *T. spiralis* a nivel mundial.<sup>13</sup> La trichinellosis es considerada como una de las enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional y su repercusión en el comercio internacional de animales y productos de origen animal es considerable.

Un análisis de los brotes reportados desde 1986 a 2009 ofreció los siguientes datos: 65,818 casos y 42 muertes en 41 países. La Organización Mundial de la Salud, Región Europea, indica que la trichinellosis representó el 86.47% de los casos, 50% de los cuales ocurrieron en Rumania. La región de las Américas ocupa el 10.90% de los casos, donde Argentina ocupa el primer lugar con 72.72% de los reportes, México está en el cuarto lugar de los países estudiados con el 4.88%. La trichinellosis afectó principalmente a adultos (edad media 33.1 años).<sup>14</sup>

**Tabla 2.1.** Epidemiología de la trichinellosis reportada por la OMS por regiones, 1986-2009

Región	No. de países con trichinellosis (%)	No. de infecciones documentadas en humanos (%)	No. de muertes (%)
África (46)	1 (2.17)	28 (0.04)	1 (3.57)
América (12)	5 (42.67)	7,179 (10.90)	10 (0.10)
Mediterráneo oriental (22)	2 (9.09)	50 (0.07)	0
Europa (50)	29 (58.00)	56,912 (86.47)	24 (0.04)
Sureste de Asia (11)	1 (9.69)	219 (0.33)	1 (0.50)
Pacífico occidental (27)	3 (11.11)	1,344 (2.04)	6 (0.40)
Otros*	NA	86 (0.13)	0
Total (168)	41 (24)	65,818 (100.00)	42 (0.40)

\*Infecciones adquiridas en países diferentes de donde se diagnosticaron. NA=No aplica.

**Tabla 2.2.** Total de casos e incidencia de infecciones por *Trichinella spp.*, por la OMS en la región de las Américas

Región/País	Años	No. casos	Promedio incidencia
Región de las Américas		7,179	
Argentina	1990–2005	5,221	1.48
Canadá	1987–2009	257	0.03
Chile	1991–2004	698	0.36
México	1986–2001	351	0.02
Estados Unidos	1987–2007	652	0.016–0.004

En México, la mayor parte de los reportes corresponde a brotes epidémicos, principalmente por consumo de carne de cerdo y sus derivados; también se han detectado caballos infectados, lo cual constituye un factor de riesgo, ya que su carne se consume debido a factores económicos. Otros animales en los que se ha detectado la infección son perros, gatos, ratas y algunos animales exóticos en zoológicos. Los estados de mayor endemidad son Zacatecas, Durango, Puebla, Edo. De México y Distrito Federal. Jalisco, Chihuahua y Michoacán reportan una incidencia media. El menor número de casos se ha encontrado en Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Colima, San Luis Potosí, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Sonora.<sup>15</sup>

#### 2.4.4.1. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

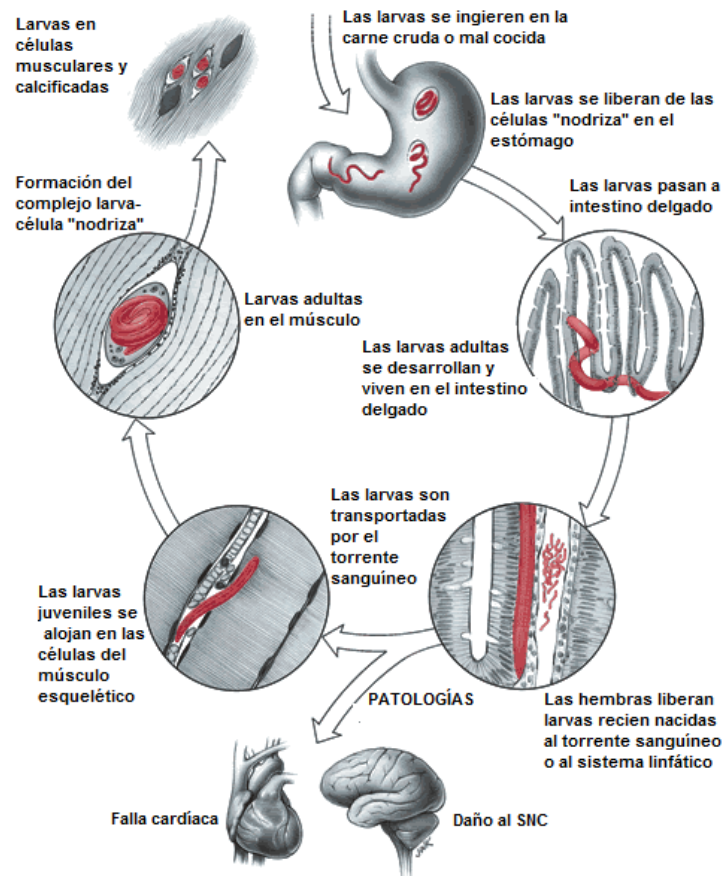
El parásito requiere de un solo hospedero, que alberga a las formas adultas y las larvas. En su ciclo de vida presenta dos fases:

**Fase entérica.** Las larvas musculares ingeridas con los alimentos (carne) se desarrollan a parásitos adultos en el intestino delgado y se reproducen.

**Fase parenteral.** Fase donde sucede la liberación de larvas recién nacidas y su establecimiento en músculo esquelético, en células nodriza.

Las larvas ingeridas en carne cruda o mal cocida se liberan en intestino delgado y ahí sufren 4 mudas de cutícula hasta convertirse en parásitos adultos al cabo de unos 2 días. La cópula ocurre con los nematodos embebidos en la mucosa intestinal (en un nicho multicelular). Las hembras liberan larvas recién nacidas (LRN) a los 7 días de la infección, durante semanas, hasta que la respuesta inmune del hospedero afecta su viabilidad.

*T. spiralis* representa un buen modelo experimental para la evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos, tanto a nivel enteral como parenteral, ya que su ciclo de vida se puede mantener de manera fácil en animales de laboratorio.<sup>16a,16b</sup>



**Figura 2.2.** Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

#### 2.4.5. Fasciolosis

Se conoce que hay más de 100 especies de trematodos que parasitan al humano y que afectan diversos órganos, entre ellos están las fasciolas del hígado, las fasciolas de pulmón y las fasciolas intestinales. Las infecciones causadas por trematodos son una de las principales enfermedades tropicales desatendidas en el mundo. Se estima que 40 millones de personas están infectadas por al menos una de las diferentes especies de trematodos y más del 10% de la población está en riesgo. Las "Food-borne trematodiosis" o trematodiosis transmitidas por los alimentos se encuentran dentro de las enfermedades tropicales menos atendidas (NTD).<sup>17</sup>

La enfermedad llamada fasciolosis es causada por el parásito *Fasciola hepatica*, un trematodo que constituye un problema severo de salud pública alrededor del mundo. Este trematodo, también conocido como duela del hígado, es el parásito trematodo más grande que infecta al ser humano: cada adulto mide 25-30 mm de largo por 10-15 mm de ancho.

Afecta principalmente a los animales domésticos, pero en las últimas décadas ha emergido como una importante zoonosis. Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, resaltando los países que tienen una importante industria pecuaria basada en la cría de ganado bovino, ovino y caprino. Por otro lado se estima que 2.4 a 17 millones de personas están infectadas.<sup>17</sup>

La importancia de salud pública de *F. hepatica* se ha incrementado en los últimos 25 años con un estimado de 7,071 casos en 51 países de todos los continentes,<sup>20</sup> llegándose a considerar como una de las enfermedades emergentes con síntomas muy leves o presentándose de manera sub-clínica.<sup>19</sup>

América: 3,267 casos. Europa: 2,951 casos.  
 Asia: 354 casos. África: 487 casos.  
 Oceanía: 12 casos.



El número real de casos es, sin duda, mucho mayor. En estimaciones actuales se considera que 17 millones de personas están infectadas con *F. hepatica*<sup>18-20</sup> y cerca de 180 millones están en riesgo de infección.<sup>18</sup> La gran presencia en humanos ya no se correlaciona con áreas en las cuales la fasciolosis es un problema veterinario mayor.

**Tabla 2.3.** Niveles de infección en humanos alrededor del mundo<sup>5</sup>

Nivel de infección	País	Porcentaje de población infectada
Muy bajo	Francia	0.00034 %
	Chile	0.7 %
Intermedio	Egipto (delta del río Nilo)	7.3 %
	Perú (Cajamarca)	10.7 %
	Puerto Rico (Corozal)	8.7 %
	Irán	variable
	Oeste de Europa	variable
Alto	Perú (Puno)	15.6 %
	Perú (valle Mantaro)	34.2%
	Bolivia	53-100%

Ejemplos de niveles muy bajos de infección son Basse-Normandía, Francia (0.34 casos por 100,000 habitantes) y en Chile (0.7% de los sujetos estudiados). Se han reportado niveles intermedios de infección en el delta del río Nilo, Egipto (7.3%), Cajamarca, Perú (8.7%), en Corozal, Puerto Rico (10.7%), Irán y el oeste de Europa; niveles altos de infección en la región de Puno (15.6%) y el valle Mantaro (34.2%) ambos en Perú, y en el altiplano boliviano (53-100%, dependiendo del método de detección) siendo ésta última la región de mayor presencia de fasciolosis humana en el mundo.<sup>19</sup> En años recientes (2002) se diagnosticaron 2,594 casos humanos en 42 países, entre ellos Argentina, Bolivia, Cuba, Perú y Puerto Rico, por lo que no debe ser subestimada la presencia del parásito.<sup>21,22</sup>

En México se han realizado diversos estudios en los diferentes estados de la república, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 2.4.** Prevalencia de fasciolosis animal en México<sup>22</sup>

Prevalencia	73-100%	31-70%	2.0–21.5%	< 2.0%	s/datos
Estados	Hidalgo	Guanajuato	Sonora	Baja California	Distrito Federal
	Tabasco	Tlaxcala	Chiapas	Yucatán	Campeche
	Estado de México	Morelos	Chihuahua	Quintana Roo	Guerrero
	Michoacán	Puebla	Coahuila		Colima
	Veracruz	Jalisco	Tamaulipas		Nayarit
		Durango	Zacatecas		Sinaloa
		Aguascalientes	San Luis Potosí		Nuevo León
		Oaxaca			Querétaro

Datos conservadores obtenidos en México muestran que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *F. hepatica*, en virtud de que el ganado se encuentra localizado en zonas reconocidas como “fasciolosas”. Sin embargo, estudios epidemiológicos, realizados en 2005,<sup>23</sup> muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados y si reconocemos que cada animal parasitado pierde en su vida productiva 30 kg de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$30 pesos, que en esa época costaba cada kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$4,500 millones pesos anualmente.

#### 2.4.5.1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*

La *F. hepatica* tiene un ciclo de vida complejo que incluye dos hospederos: un molusco gasterópodo (caracoles, babosas, etc.) y su huésped definitivo, un mamífero (humanos, vacas, ovejas, conejos, etc.).

La mayor fuente de infección del huésped definitivo son las plantas asociadas a cuerpos de agua. Cuando el estado infectivo enquistado (metacercaria) es ingerido, eclosiona en el

lumen del intestino y migra hacia el hígado donde se alimenta de las células de parénquima hepático, causando fuertes hemorragias. *F. hepatica* crece lentamente, alcanzando la madurez sexual a los dos meses de permanecer en los conductos biliares, es hermafrodita y puede ocurrir la auto-fecundación. Los huevecillos son producidos por cada gusano aproximadamente después de una semana de desarrollo, pasan del conducto biliar al duodeno y subsecuentemente a las heces. El huevo debe depositarse en agua fresca para completar su desarrollo y eclosión, que ocurre de 10-15 días hasta meses después, dependiendo de la temperatura. Inmediatamente después de la eclosión, los miracidios ciliados nadan activamente y buscan a un molusco, y, una vez penetrado sus tejidos, se desarrollan y multiplican asexualmente. En este estado es donde la morfogénesis procede del miracidio al esporocito y luego al estado de redia. Cada redia da origen a muchas cercarias, que salen del molusco al agua; las cercarias se enquistan cerca de plantas acuáticas o, incluso, el agua. La cercaria enquistada, o metacercaria, es resistente a cambios de temperatura así como a otros parámetros ambientales

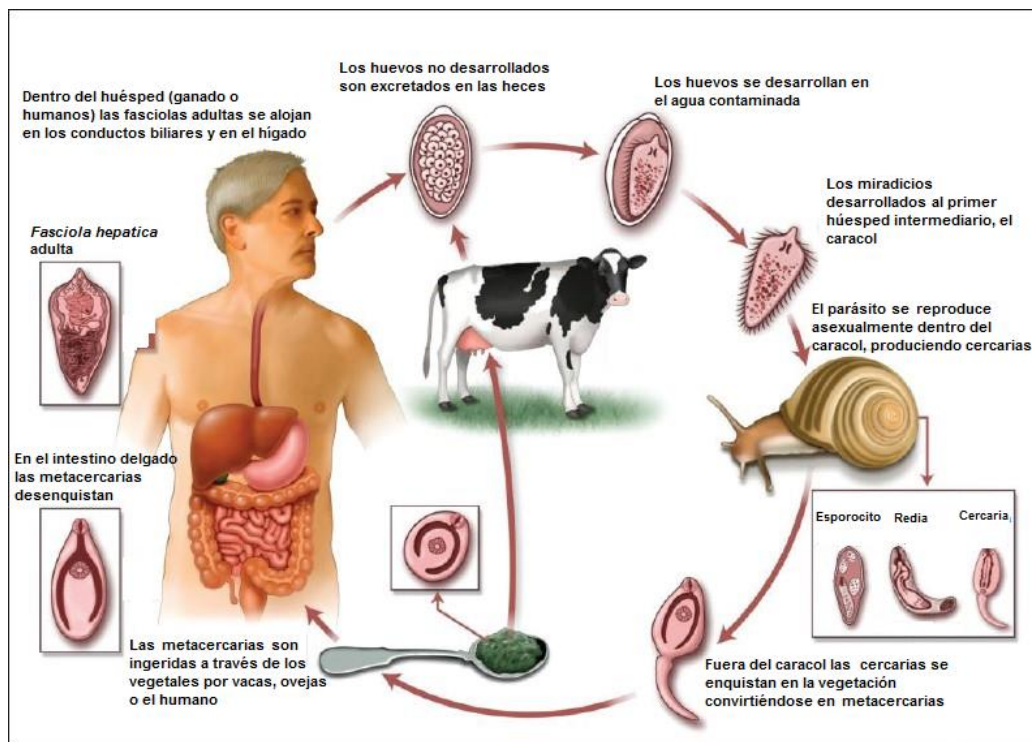


Figura 2.3. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*.<sup>18</sup>

La fasciolosis se adquiere por la ingestión de vegetación o agua contaminada con las metacercarias. Como se mencionó previamente, una vez en el hígado causa hemorragias y

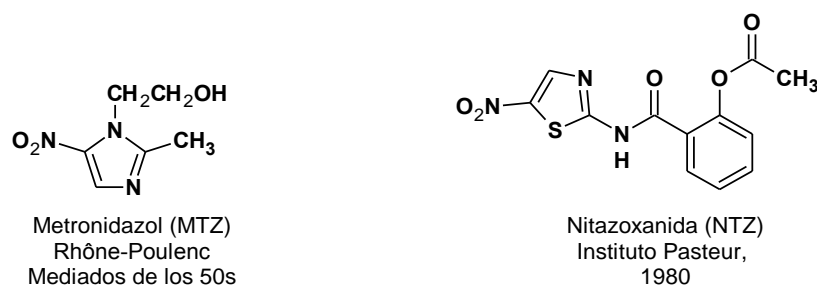
perforaciones. En esta fase aguda de la enfermedad puede ocurrir la muerte en el ganado infectado.

La fasciolosis es la infección por helmintos más común en el ganado, prevalece del 30 al 90%, sobre todo en zonas tropicales; es un problema de salud animal que repercute en la economía de las poblaciones que la padecen ya que la infección del ganado induce pérdidas de productividad del mismo con consecuencias económicas importantes. Las afectaciones económicas más comunes se deben al decomiso parcial o total de hígados infectados en los rastros, baja producción y mala calidad de leche, bajas tasas de crecimiento y mala conversión alimenticia, baja producción y mala calidad de lana y trastornos reproductivos, entre otros.<sup>23</sup>

## 2.5. Tratamiento de las parasitosis

### 2.5.1. Tratamiento de las protozoosis

En el tratamiento de infecciones causadas por *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se usa el metronidazol (MTZ), que ha sido por más de tres décadas el fármaco de elección. Sin embargo, ha habido un incremento en los casos de falla terapéutica debido a la aparición de cepas resistentes a este derivado 5-nitroimidazólico.<sup>24-26</sup> Una alternativa es el uso de nitazoxanida (NTZ), un derivado del 5-nitrotiazol cuya actividad *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. intestinalis* es 3 y 50 veces más que el metronidazol, respectivamente.<sup>29,32</sup> A raíz del descubrimiento por el grupo de Cedillo en el Centro Médico Nacional de que el ABZ y el MBZ afectan el disco ventral de *G. intestinalis*, inhibiendo su adhesión a las paredes del duodeno;<sup>30,31</sup> éstos se han empleado para el tratamiento de la giardiosis.<sup>27,28</sup>



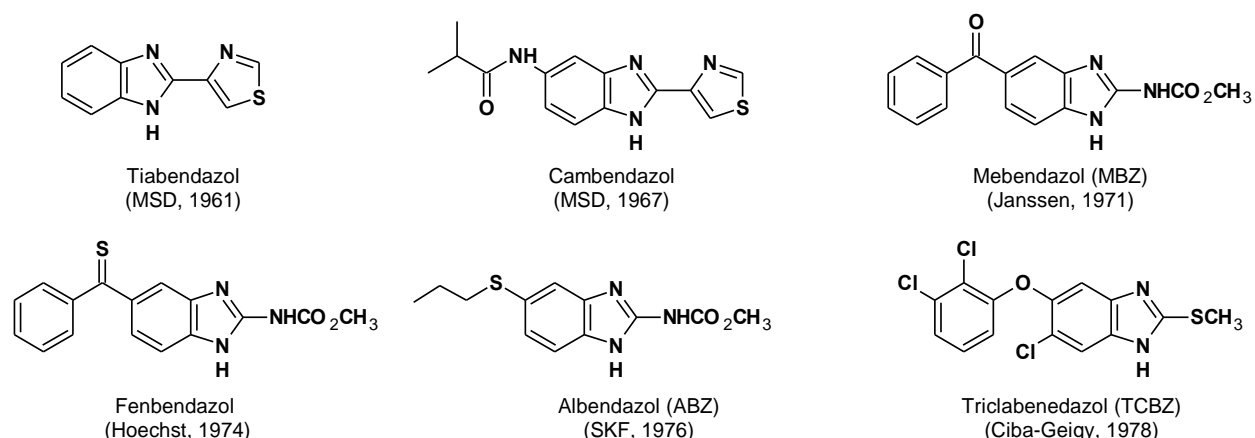
**Figura 2.4.** Fármacos nitroimidazólicos empleados como antiprotozoarios.

### 2.5.2. Tratamiento de las helmintosis

Los esfuerzos para el control de las helmintosis incluyen una gran variedad de métodos, entre ellos están la quimioterapia, mejoras en la educación, sanidad e higiene. En los países

desarrollados esto ha tenido resultados satisfactorios, no así en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, el problema se agrava cuando los helmintos que pertenecen a la clase nematoda, cestoda y trematoda invaden musculatura, circulación sanguínea, hígado, pulmones y cerebro en contraste con aquellos que habitan la zona gastrointestinal. La quimioterapia de esta clase de parásitos es algo difícil debido al índice terapéutico. Sin embargo, el tratamiento de algunas helmintosis que se diseminan en tejido es satisfactorio, mientras que otras necesitan mejores fármacos.<sup>18</sup>

El ABZ, levamisol, MBZ y pirantel son los fármacos antihelmínticos incluidos en la lista de los fármacos esenciales de la OMS para el tratamiento de nematodos intestinales.<sup>1</sup> Dentro del campo de la farmacoterapia con antiparasitarios, recientemente se ha desarrollado un fármaco con amplio espectro; este es la NTZ, utilizada en el tratamiento de infecciones por protozoarios y helmintos.<sup>34</sup> En la Figura 2.5 se muestra el primer antihelmíntico bencimidazólico, el tiabendazol, y los fármacos que derivan de su estructura utilizados en la quimioterapia antiparasitaria.



**Figura 2.5.** Algunos derivados del bencimidazol antiparasitarios.

### 2.5.2.1. Tratamiento de la trichinellosis

No se dispone de un tratamiento para la trichinellosis que sea 100% eficaz, pero el uso de los derivados del bencimidazol, como ABZ, MBZ o tiabendazol, es lo indicado en la terapia, especialmente, en la etapa de la fase entérica del parásito. Esta estrategia tiene como propósito detener la invasión muscular; ya que en esta fase es difícil el acceso de los fármacos, no obstante el albendazol es el fármaco que más efecto tiene sobre la larva muscular. Adicionalmente se administran antiinflamatorios y corticoesteroides con el fin de aliviar las mialgias y de evitar una reacción alérgica debida a la respuesta inmune.<sup>35</sup>



**Tabla 2.5.** Farmacoterapia para el tratamiento de la trichinellosis humana

Fármaco	Posología	Tipo de infección	Fase del parásito
Albendazol	15 mg/kg/d por 8-14 días; en dos tomas	Moderada a fuerte	Adulto, larvas recién nacidas
Mebendazol	15-20 mg/kg/d por 8-14 días, en tres tomas	Moderada a fuerte	Larva muscular Adulto, larvas recién nacidas
Tiabendazol	25 mg/kg/d por 8-14 d	Moderada a fuerte	Adulto, larvas recién nacidas
Prednisona	50 mg/d	Severa	-----
Analgésicos	-----	-----	-----

2.5.2.2. Tratamiento de la fasciolosis

El fármaco de elección para las trematodiosis adquiridas en la alimentación (food-borne trematodiosis) es el praziquantel, excepto para la fasciolosis. El tratamiento ideal en humanos es el usado en la amebiosis aguda: dehidroemetina a una dosis de 1 mg/kg por día durante 10 días;<sup>3</sup> sin embargo, en 1998 la OMS implementó un programa de control de la fasciolosis en humanos en Egipto con el triclabendazol (TCBZ), un derivado bencimidazólico no carbamato de metilo.<sup>36</sup>

El control de la infección animal se puede realizar en cualquier fase del desarrollo, o bien, reduciendo el número de hospederos intermediarios.

Varios compuestos químicos están disponibles para el tratamiento de la fasciolosis animal, incluyendo el ABZ, closantel, clorsulon, rafxamida, nitroxinil y TCBZ. Después de la dosificación, la concentración terapéutica de estos fármacos en la sangre se alcanza a los 1-2 días y sólo las infecciones ya presentes son curadas; sin embargo, los animales en pasturas contaminadas son susceptibles a la reinfección.

El TCBZ (Figura 2.5) requiere atención especial, debido a que es el único fármaco efectivo contra las primeras fases de la infección; por ejemplo, la fase juvenil, en donde hay migración al hígado provocando fasciolosis aguda. El TCBZ también es efectivo en la fase adulta del parásito. Este fármaco se distingue de otros derivados del bencimidazol porque tiene en su estructura un átomo de cloro en posición 5(6) y el grupo metiltio en posición 2, del núcleo del bencimidazol así como la ausencia del grupo carbamato de metilo, estos cambios estructurales confieren a la molécula un estrecho espectro de actividad antihelmíntica pero con alta eficacia contra *F. hepatica*, *F. gigantica*, y *Fascioloides magna*, careciendo de actividad contra nematodos y cestodos.<sup>37</sup>

A pesar de que varios derivados bencimidazólicos tienen actividad contra algunos cestodos y nematodos e incluso algunos trematodos, tienen poca o nula actividad contra *F. hepatica*. Sólo el albendazol se ha recomendado para su uso en la fasciolosis a pesar que su actividad se restringe a la fase adulta del parásito y requiere de dosis muy grandes. El luxabendazol (LXBZ) es otro bencimidazol con una gran eficacia contra organismos adultos e incluso de 6 semanas de edad pero no es muy usado.

**Tabla 2.6.** Eficacia de algunos fármacos contra *Fasciola hepatica* en ovejas<sup>37</sup>

Grupo químico	Fármaco	Ruta de administración	Dosis utilizada (mg/Kg)	Dosis máxima tolerada (mg/Kg)	Índice de seguridad	Edad mínima del parásito (semanas), eficiencia > 90%
Fenoles halogenados	Bitionol	Oral	75	75	1	>12
	Hexaclorofeno	Oral	15	40	2.6	12
	Niclofolano	Oral	4	12	3.0	12
	Nitroxinil	Subcutánea	10	40	4.0	8
Salicilamidas	Brotianida	Oral	5.6	27	4.8	12
	Closantel	Oral	7.5-10	40	4.0	6-8
	Oxiclozanida	Oral	15	60	4.0	12
	Rafoxanida	Oral	7.5	45	6.0	6
Bencimidazoles	Albendazol	Oral	4.75	30	8	>12
	Triclabendazol	Oral	10	200	20-40	1
Sulfonamidas	Clorsulon*	Oral	7	100	5	8
Fenoxialcanos	Diamfenetida	Oral	80-120	400	3.3-5.0	1 día-6 semanas

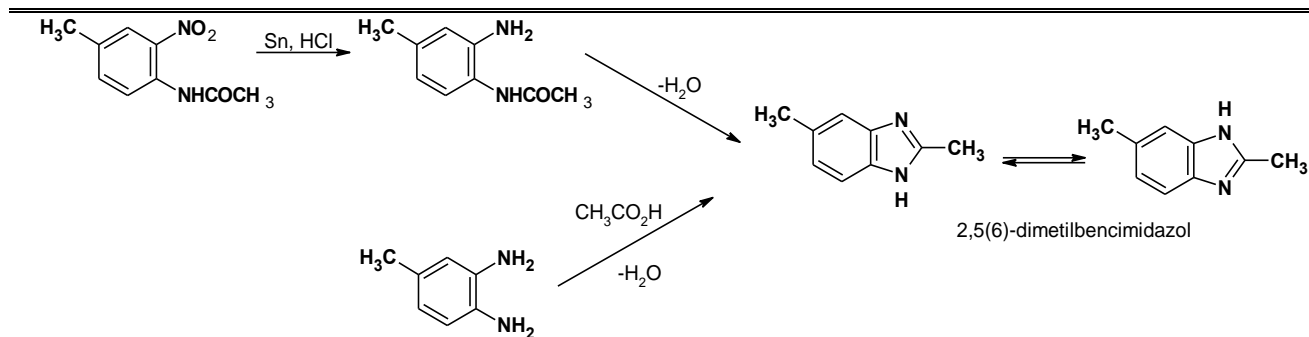
\*Datos para ganado vacuno.

**Tabla 2.7.** Espectro de eficacia de fármacos a las dosis recomendadas en ovejas<sup>37</sup>

Fármaco	Edad del parásito en semanas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bitionol, Hexaclorofeno														
Oxiclozanida, Niclofolano														
Albendazol														
Clorsulon+ivermectina (inyección)														
Clorsulon (oral)														
Nitroxinil, Closantel														
Rafoxanida														
Triclabendazol														
Diamfenetida														

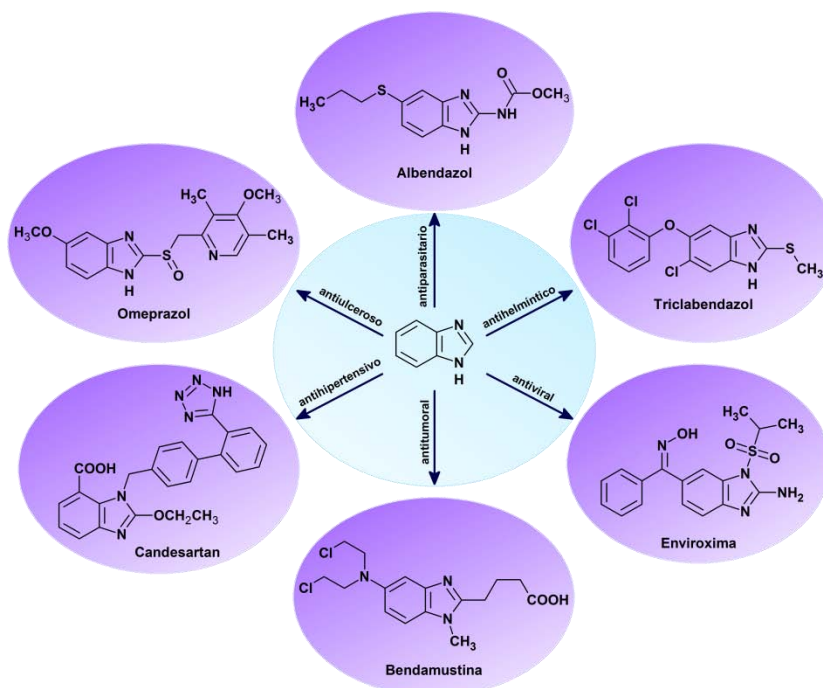
## 2.6. Bencimidazoles

El bencimidazol es uno de los heterociclos nitrogenados más antiguos que se conocen. Hoebrecker en 1872 preparó el 2,5 ó 2,6-dimetilbencimidazol a partir de la 2-nitro-4-metilacetanilida por reducción química con Sn y HCl. Después, Landernbur y Wundt obtuvieron el mismo compuesto a partir de 3,4-diamino tolueno y ácido acético a reflujo.<sup>38</sup>



**Esquema 2.1.** Primeras síntesis de benzimidazoles.

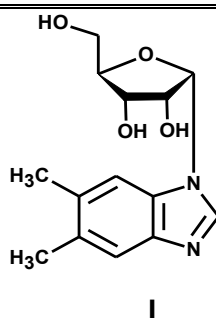
El núcleo de benzimidazol se dice que es una estructura privilegiada porque forma parte de la estructura de un gran número de moléculas con diferentes propiedades farmacológicas. Todas las posiciones del anillo pueden ser sustituidas con diversos grupos o entidades químicas, pero la mayoría de los compuestos con propiedades biológicas están sustituidos en las posiciones 1, 2, 5 ó 6. Entre las propiedades se incluyen antihipertensiva, antiinflamatoria, antiparasitaria, antihelmíntica, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiulcerosa, antitumoral, psicoactiva, etc. Figura 2.6.



**Figura 2.6.** Benzimidazoles con diversas propiedades biológicas.<sup>39</sup>

### 2.6.1. Benzimidazoles antiparasitarios

El interés por el núcleo del benzimidazol para desarrollar nuevos agentes terapéuticos se estableció en los 50s cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil)-1H-benzimidazol (**I**) era parte integral de la vitamina B<sub>12</sub>.<sup>42</sup>

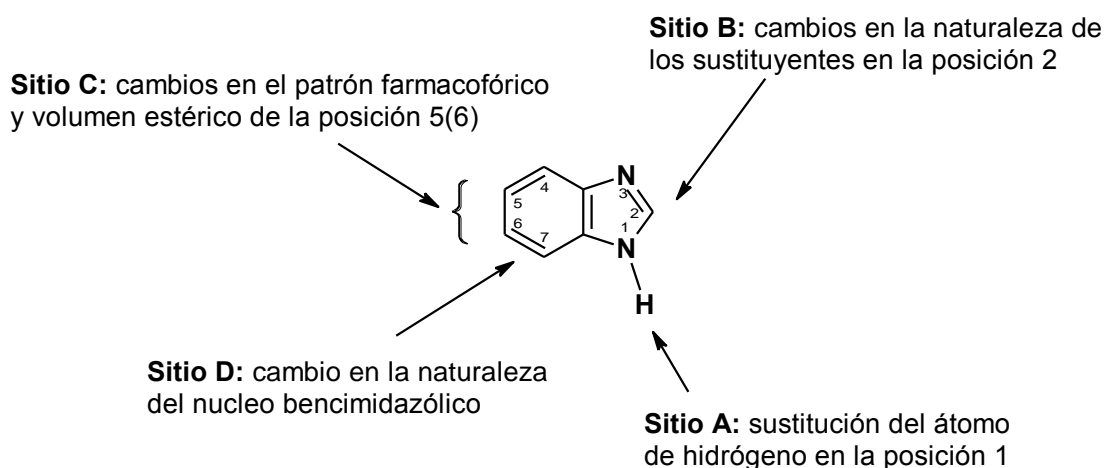


El potencial de los bencimidazoles en la quimioterapia como antiparasitario se demostró hasta la década de los años 60's con el 2-fenilbencimidazol (fencidol). En 1961 surge el tiabendazol como un antihelmíntico de amplio espectro para el tratamiento de las helmintosis humanas y de animales domésticos;<sup>40</sup> con su descubrimiento nace uno de los más importantes grupos de antihelmínticos que ha provisto de fármacos efectivos para infecciones intestinales y tisulares.

Debido a la inactivación por hidroxilación metabólica en la posición 5 del núcleo de bencimidazol, el tiabendazol tiene un tiempo de vida corto, por lo que los siguientes derivados que se diseñaron y sintetizaron están sustituidos en la posición 5(6), como el cambendazol. El reemplazó el anillo de tiazol en la posición 2 del bencimidazol, por un grupo alcóxicarbonilamino dio origen a la familia de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, por ejemplo parbendazol, MBZ, ABZ y flubendazol.<sup>41,42</sup> De la sustitución con grupos alquiltio en la posición 2 surgió el TCBZ.

#### 2.6.1.2. SAR en bencimidazoles antiparasitarios

Con el propósito de establecer las relaciones estructura actividad (SAR) biológica se han hecho modificaciones en cuatro sitios alrededor del núcleo de bencimidazol, las cuales se muestran en la Figura 2.7.



**Figura 2.7.** Sitios de cambios en el patrón de sustitución del bencimidazol.<sup>43</sup>

**Sitio A:** la sustitución del H de la posición 1 por un grupo alquilo, arilo o acilo disminuye la actividad antihelmíntica, pero no la antiprotozoaria.<sup>44,45</sup>

**Sitio B:** la naturaleza de los sustituyentes en la posición 2 del bencimidazol juega un papel importante en el espectro de actividad antiparasitaria. Por ejemplo, el grupo metoxicarbonilamino (carbamato de metilo) en el MBZ lo hace útil para parasitosis gastrointestinales;<sup>14,30</sup> los grupo metiltio en el TCBZ o trifluorometilo en el GNV14 les confiere actividad contra parasitosis extraintestinales.<sup>37,46</sup>

**Sitio C:** la presencia de farmacóforos diferentes en las posiciones 5 y/o 6, como cloro, éster, amida, amina, nitro, éter, tioéter, etc., determina el perfil biológico de los compuestos. Los sustituyentes en estas posiciones previenen que la molécula sufra de metabolismo oxidativo y pierda actividad;<sup>3,28</sup> sin embargo, en ocasiones el metabolismo del grupo o sustituyente puede dar lugar a compuestos más activos que el compuesto original (ej. sulfóxido de ABZ vs ABZ).<sup>47</sup> Por otro lado, los sustituyentes en estas posiciones ayudan a seleccionar la respuesta terapéutica hacia organismos entéricos o tisulares.<sup>48,49</sup>

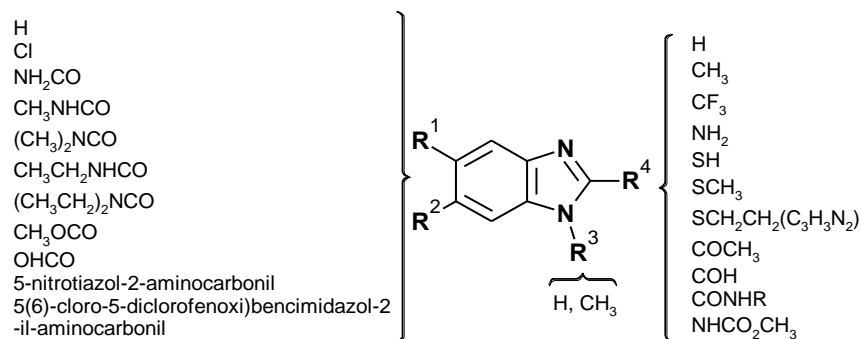
**Sitio D:** el cambio del núcleo heterocíclico del bencimidazol por otro núcleo; por ejemplo, por imidazopiridinas, azaindoles o indazoles, disminuye la actividad antihelmíntica.

El reemplazo del NH en la posición 1 del núcleo bencimidazólico por O o S para formar benzoxazoles o benzotiazoles respectivamente, disminuye la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria; sin embargo, un metilo en la posición 1 favorece la actividad antiprotozoaria y disminuye la actividad antihelmíntica.<sup>50,51</sup>

De la gran variedad de modificaciones que se han hecho por nuestro grupo y otros (Figura 2.8), el resultado es que los requerimientos estructuras para la actividad antihelmíntica son: un átomo de hidrógeno de la posición 1, un grupo metoxicarbonilamino en la posición 2, un grupo alquilo, arilo, o heteroarilo unido por un puente de CO, CHOH, CONN, S, SO u O. La actividad antihelmíntica disminuye cuando se cambia el metoxicarbonilamino en la posición 2 por etoxicarbonilamino, o si se reemplaza por un acetilamino, urea, alquilo, arilo, alquiltio o ariltio. Con algunas pocas excepciones a esta generalización, se destacan el tiabendazol, cambendazol, triclabendazol y algunos benzotiazoles.

En 1992 Cedillo *et al.* demostraron la actividad del mebendazol y albendazol contra los protozoarios *Giardia intestinales* y *Trichomonas vaginalis*. A partir de entonces se han sintetizado y evaluado una gran variedad de bencimidazoles con diferentes grupos en 2 y también sustituidos con un metilo en la posición 1 mostrando importante efecto sobre los protozoarios mencionados, pero también sobre *Entamoeba histolytica*.<sup>52,53</sup>

Estudios de microscopia electrónica han demostrado que los bencimidazoles que tienen actividad giardicida y que no son del grupo de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, los cuales inhiben la polimerización de la  $\beta$ -tubulina (Figura 2.9), no alteran el disco de adhesión de la *Giardia* (rico en  $\beta$ -tubulina), sino otras estructuras membranales, lo que sugiere un mecanismo de acción diferente.<sup>54</sup>



**Figura 2.8.** Grupos usados como sustituyentes en las posiciones 1, 2, 5 y 6 del bencimidazol.

### 2.6.3. Mecanismo de acción de los 1H-bencimidazoles

Borgers demostró, mediante estudios ultraestructurales, que el principal efecto del mebendazol sobre *Ascaris suum* era la desintegración de las estructuras microtubulares, por lo que concluyó que el mecanismo prioritario de acción de los bencimidazoles del tipo carbamato de metilo, como el albendazol, era a través de la inhibición de la polimerización de

la tubulina del parásito.<sup>55</sup> Existen reportes de estudios que se han enfocado en correlacionar las bases moleculares de resistencia con el mecanismo de acción, con el fin de localizar el sitio de unión de los bencimidazoles y las causas por las que modificaciones en el mismo, disminuyen la actividad antiparasitaria de los inhibidores.<sup>56</sup> Estudios recientes demuestran que las principales mutaciones que causan resistencia de los parásitos a los bencimidazoles se encuentran en uno de los monómeros que conforman a la unidad básica heterodimérica del microtúbulo, la  $\beta$ -tubulina.<sup>57-59</sup> Vale la pena mencionar que existen otros derivados del bencimidazol que no pertenecen al grupo de los carbamatos bencimidazólicos y que poseen el mismo mecanismo de acción, por ejemplo el TCBZ; sin embargo, se cree que tienen sitios de unión diferentes debido a que presentan actividad contra parásitos diferentes a los susceptibles a los carbamatos bencimidazólicos.<sup>57</sup>

Otro mecanismo propuesto es la inhibición del metabolismo anaeróbico de la glucosa mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa, que transforma el fumarato a succinato, en la mitocondria. Otra propuesta mecanística es la interferencia con la captación y transporte de la glucosa exógena a las células, lo que conduce a la disminución de la síntesis de ATP.<sup>60</sup> Algunos investigadores han demostrado en experimentos *in vitro* que los bencimidazoles inhiben el metabolismo de los lípidos. Se cree que estos trastornos bioquímicos están íntimamente relacionados con la inhibición de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina a microtúbulos, causando con ello una cascada de eventos que llevan a la muerte del parásito.<sup>61</sup>

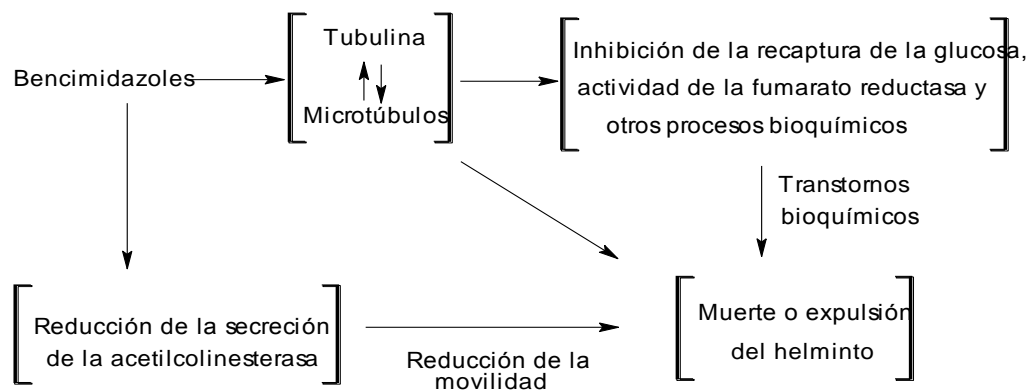
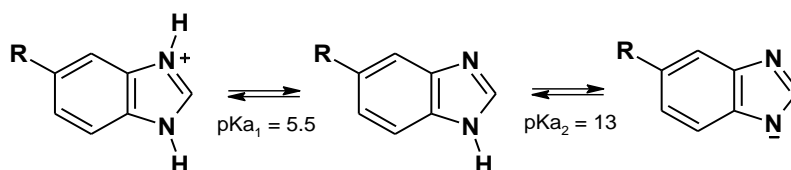


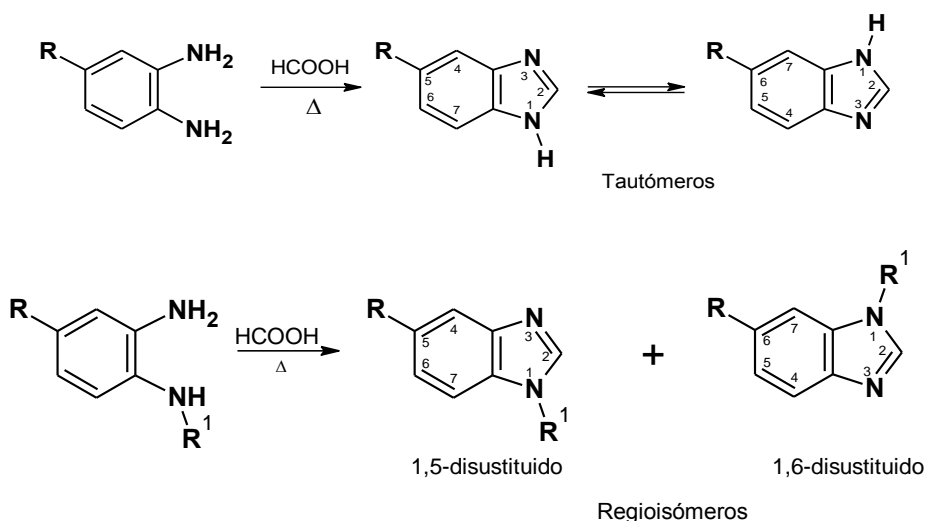
Figura 2.9. Mecanismos de acción de los bencimidazoles.

2.6.4. Química de los 1H-benzimidazoles

El 1H-benzimidazol y sus 1H-derivados presentan propiedades ácido-base, tienen dos pKa<sub>s</sub>,<sup>62</sup> lo que les permite formar sales (Esquema 2.2). Este tipo de compuestos tiene también la propiedad intrínseca de mostrar tautomería protónica (Esquema 2.3), entre las posiciones 1,3; por lo que existen como mezclas de tautómeros, cuando el núcleo del 1H-benzimidazol está asimétricamente sustituido. Cuando el núcleo del 1H-benzimidazol está sustituido en la posición 1 y es asimétrico, entonces forma regioisómeros.



Esquema 2.2. Pka<sub>s</sub> de un derivado del 1H-benzimidazol.



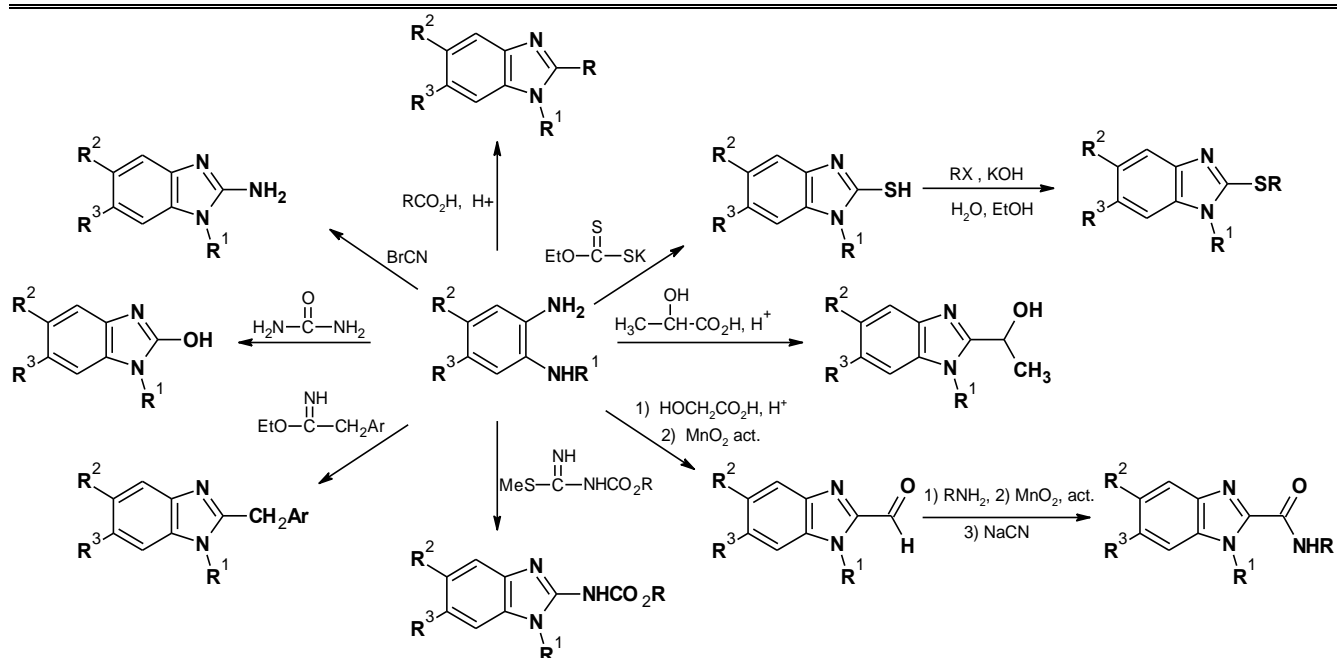
Esquema 2.3. Tautómeros y regioisómeros de benzimidazoles 5(6) sustituidos.

2.6.4.1. Síntesis de los 1H-benzimidazoles 2,5 y/o 6 sustituidos

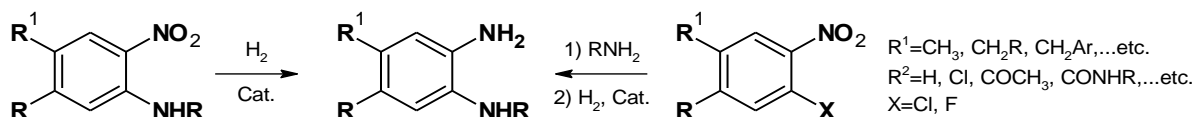
En la literatura existen muchos métodos de síntesis de benzimidazoles.<sup>63,64</sup> En general, la mayoría de los benzimidazoles con propiedades biológicas se preparan por ciclación de las *orto*-fenilendiaminas adecuadamente sustituidas en las posiciones 4 ó 5, que darán los grupos en las posiciones 5 y/o 6 del núcleo de BZ. El reactivo electrofílico con quien condensan debe poseer las características estructurales para dar origen a los diferentes tipos de sustitución en la posición 2 del BZ.



El método más usado para preparar los bencimidazoles 2-alquilo o 2-aril sustituidos es el de Phillips,<sup>65</sup> el cual consiste en calentar un ácido carboxílico con la *orto*-fenilendiamina en presencia de catálisis ácida, HCl 4M. Otros ácidos empleados como catalizadores son: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ácido *para*-toluensulfónico, etc. Si se desea tener otros grupos diferentes de un alquilo o arilo en la posición 2 (Esquema 2.4) se utilizan reactivos tales como ácido trifluoroacético, para dar 2-(trifluorometil)bencimidazoles;<sup>45,46</sup> xantato de etilo para dar 2-mercaptobencimidazoles,<sup>44</sup> los cuales posteriormente pueden alquilarse y dar los 2-(alquiltio)bencimidazoles;<sup>66</sup> ácido láctico para dar 2-(1-hidroxiethyl)bencimidazoles;<sup>53</sup> el ácido glicólico seguido de oxidación produce bencimidazol-2-carbaldehídos, los cuales pueden transformarse a amidas y ésteres por tratamiento con aminas o alcoholes en presencia de MnO<sub>2</sub> y NaCN;<sup>42</sup> sulfato de metoxycarbonil-S-metilisotiurea o dimetoxycarbonil-S-metilisotiurea para dar los (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamatos de metilo;<sup>42</sup> imidatos de alquilo dan 2-alquibencimidazoles;<sup>63</sup> urea o fosgeno para dar bencimidazol-2-onas;<sup>63</sup> bromuro de cianógeno o cianamida para dar bencimidazol-2-aminas.<sup>44</sup> La funcionalización en las posiciones 5 y/o 6 se realiza antes de la ciclación preferentemente. La sustitución en la posición 1 regularmente se hace antes de la formación de la diamina, ya sea por *N*-alquilación de la *orto*-nitroanilina correspondiente o por sustitución nucleofílica aromática del *orto*-halonitrobenzoceno adecuado, ya que al metilar el núcleo del bencimidazol la tautomería protónica lleva a la formación de regioisómeros,<sup>67</sup> Esquema 2.5.



Esquema 2.4. Síntesis de benzimidazoles 2,5 y/o 6 sustituidos.



Esquema 2.5. Síntesis de *orto*-diaminobencenos sustituidos en 4 y/o 5.

## 2.7 Referencias

1. Ximénez G. C. Las parasitosis intestinales en México. Cuadernos FunSalud. *Fundación Mexicana para la Salud*. **2002**, 36: 27-30.
2. Paniagua, G. L.; Monroy, E.; García-González, O.; Alonso, J.; Negrete, E.; Vaca, S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials*. **2007**, 6(1), 17-20.
3. Colley, D. G.; LoVerde, P. T.; Savioli, L. Medical helminthology in the 21st century. *Science*. **2001**, 293(5534), 1437-1438.
4. Watkins, B. M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. *Trends in Parasitology*. **2003**, 19(11), 477-478.
5. Cotruvo, J. A.; Dufour, A.; G. Rees.; Bartram, J.; Carr, R.; Cliver, D. O.; Craun, G. F.; Fayer, R.; Gannon, V. P. J. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. WHO. **2004**.
6. Ali, V.; Nozaki, T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. **2007**, 20(1), 164-187.
7. Boletín de Vigilancia epidemiológica semana 49, **2007**.
8. Escobedo, A. A.; Cimerman, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*. **2007**, 8(12), 1885-902.
9. Bharti, N.; González Garza, M. T.; Cruz-Vega, D. E.; Castro-Garza, J.; Saleem, K.; Naqvi, F.; Mauraya, M.R.; Azam, A. Synthesis, characterization and antiamebic activity of benzimidazole derivatives and their vanadium and molybdenum complexes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12(6), 869-871.
10. Ximénez, C.; Morán, P.; Rojas, L.; Valadez, A.; Gómez, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infection, Genetics and Evolution*. **2009**, 9(6), 1023-1032.
11. Meysick, K.; Garber, G. E. *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **1995**, 8(1), 22-25.

12. Anuario de Morbilidad del Sistema Único de Información Para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. SSA. **2008**.
13. Dupouy-Camet, J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology*. **2000**, 93(3), 191-200.
14. Murrell, K. D.; Pozio, E. Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986–2009. *Emerging Infectious Diseases*. **2011**, 17(12), 2194.
15. Ortega-Pierres, M. G.; Arriaga, C.; Yépez-Mulia, L. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. **2000**, 93(3), 201-225.
16. (a) González A. J. Evaluación de la actividad biológica in vitro de compuestos híbridos del bencimidazol y del nitrotiazol contra la fase sistémica (larva muscular) de *Trichinella spiralis* mediante la técnica del MTT. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. **2000** (b) Nava-Martínez A. Determinación de la actividad antihelmíntica de dos nuevos derivados bencimidazólicos contra la triquinelosis experimental en ratón Tesis de Licenciatura, Universidad del Valle de México. **2007**
17. Toledo, R.; Esteban, J. G.; Fried, B. Current status of food-borne trematode infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **2012**, 31(8), 1705-1718.
18. Hurtrez-Boussès, S.; Meunier, C.; Durand, P.; Renaud, F. Dynamics of host–parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*. **2001**, 3(10), 841-849.
19. Mas-Coma, M. S.; Esteban, J. G.; Bargues, M. D. Epidemiology of human Fasciolosis: a review and proposed new classification. *Bulletin World Health Organization*. **1999**, 77(4), 340-46.
20. Fayer, R. Global change and emerging infectious diseases. *Journal of Parasitology*. **2000**, 86(6), 1174-1181.
21. Robinson, M. W.; Hoey, E. M.; Fairweather, I.; Dalton, J. P.; McGonigle, S.; Trudgett, A. Characterisation of a  $\beta$ -tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*. **2001**, 31(11), 1264-1268.
22. Esteban, J. G.; Flores, A.; Angles, R.; Mas-Coma, S. High endemicity of human Fasciolosis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1999**, 93(2), 151-156.
23. Carrada-Bravo, T.; Martínez, J. R. E. Fasciolosis: revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. **2005**, 52(2), 83-96.
24. Boreham, P. F. L.; Phillips, R. E.; Shepherd, R. W. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1988**, 82(1), 104-106.
25. Upcroft, J. A.; Upcroft, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2001**, 45(6), 1810-1814.
26. Upcroft, J. A.; Dunn, L. A.; Wal, T.; Tabrizi, S.; Delgado-Correa, M. G.; Johnson, P. J.; Upcroft, P. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. *Sexual Health*. **2009**, 6(4), 334-338.
27. Edlind, T. D.; Hang, T. L.; Chakraborty, P. R. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *Journal of Infectious Diseases*. **1990**, 162(6), 1408-1411.
28. Rodríguez-García, R.; Aburto-Bandala, M.; Sánchez-Maldonado, M. I. Eficacia del albendazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. **1996**, 53(4), 173-177.
29. Cabello, R. R.; Guerrero, L. R.; García, M. D. R. M.; Cruz, A. G. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1997**, 91(6), 701-703.
30. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*. **1992**, 37(3), 221-224.
31. Chavez, B.; Cedillo-Rivera, R.; Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **1992**, 39(4), 510-515.
32. Cedillo-Rivera, R.; Chávez, B.; González-Robles.; Tapia, A.; Yépez-Mulia, L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **2002**, 49(3), 201-208.
33. Sharma, S. Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research*. **1994**, 25, 103-172.
34. Holden-Dye, L.; Walker, R. J. Anthelmintic drugs. In: WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. Pasadena (CA): WormBook; 2005. Recuperado el 5 de agosto de 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116072/>
35. Bruschi, F.; Dupouy-Camet, J.; Kociecka, W.; Pozio, E.; Bolas-Fernandez, F. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **2002**, 3(8), 1117-1130.

36. Fairweather, I. Triclabendazole progress report, 2005–2009: an advancement of learning?. *Journal of Helminthology*. **2009**, 83(02), 139-150.
37. Fairweather I.; Boray, J. C. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance And Its Management. *The Veterinary Journal*. **1999**, 158, 81-112.
38. (a) Hobrecker, F. *Chemische Berichte*. **1872**, 5, 920. (b) Landenber, A. *Chemische Berichte*. **1875**, 10, 677. (c) Wundt, E. *Chemische Berichte*. **1878**, 11, 826.
39. Bansal, Y.; Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 6208-6236.
40. Brown, H. D.; Matzuk, A. R.; Ilves, I. R.; Peterson, L. H.; Harris, S. A.; Sarett, L. H.; Cuckler, A. C. Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *Journal of the American Chemical Society*. **1961**, 83(7), 1764-1765.
41. Actor, P.; Anderson, E. L.; DiCuollo, C. J.; Ferlauto, R. J.; Hoover, J. R. E.; Pagano, J. F.; Ravin, L.; Theodorides, V. J. New broad spectrum anthelmintic, methyl 5 (6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate. *Nature*. **1967**, 215, 321.
42. Townsend, L. B.; Wise, D. S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*, **1990**, 6(4), 107-112.
43. Anand, N.; Sharma, S. *Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs*. **1997**, Capítulo 8, 195-238. Netherlands. Ed. Elsevier.
44. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12(16), 2221-2224.
45. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2001**, 11(2), 187-190.
46. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Soria-Arteche, O.; Hernández-Hernández, M.; Yépez-Mulia, L. Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45(7), 3135-3141.
47. López-García, M. L.; Torrado-Durán, S.; Torrado-Durán, J.; Martínez-Fernández, A. R.; Bolás-Fernández, F. Albendazole versus ricobendazole (albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *International Journal for Parasitology*. **1997**, 27(7), 781-785.
48. Ram, S.; Wise, D. S.; Wotring, L. L.; McCall, J. W.; Townsend, L. B. Synthesis and biological activity of certain alkyl 5-(alkoxycarbonyl)-1*H*-benzimidazole-2-carbamates and related derivatives: a new class of potential antineoplastic and antifilarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1992**, 35(3), 539-547.
49. Kumar, S.; Seth, M.; Bhaduri, A. P.; Visen, P. K.; Misra, A.; Gupta, S.; Sen, A. B. Syntheses and anthelmintic activity of alkyl 5(6)-(Substituted carbamoyl) and 5(6)-(Disubstituted carbamoyl)benzimidazole-2-carbamates and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1984**, 27(8), 1083-1089.
50. Luna-González, A. Síntesis y actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia* de 5-clorobenzoxazoles 2-sustituidos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2004**.
51. Rivera-Pérez, J. A. Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 6-clorobenzoxazol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2006**.
52. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, Martínez-Grueiro; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2003**, 11(21), 4615-4622.
53. Valdez-Padilla, D.; Rodríguez-Morales, S.; Hernández-Campos, A.; Hernández-Luis, F.; Yépez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Castillo, R. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, 17(4), 1724-1730.
54. Méndez-Cuesta, C. A. Síntesis alterna de Nitazoxanida y evaluación proteómica de algunos antiprotozoarios contra *G. intestinales*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2007**.
55. Borgers, M.; De, Nollin, S.; De, Brabander, M.; Thienpont, D. Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. *American Journal Veterinary Research*. **1975**, 36(8), 1153-1166.
56. Lacey, E.; Brady, R. L.; Prichard, R. K.; Watson, T. R. Comparison of inhibition of polymerization of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazoles carbamates. *Veterinary*

- Parasitology*. **1987**, *23*, 105-119
57. Aguayo-Ortiz, R. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la  $\beta$ -tubulina de helmintos y protozoarios. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2012**.
  58. Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Medina-Franco, J. L.; Castillo, R., Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to  $\beta$ -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2013**, *41*, 12-19.
  59. Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Romo-Mancillas, A.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel  $\beta$ -tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2013**, *45*, 26-37
  60. Vinaud, M. C.; Ferreira, C. S.; de Souza Lino Junior, R.; Bezerra, J. C. B. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro. *Experimental Parasitology*, **2008**, *120* (3), 221-226.
  61. Fraga, C. M.; Costa, T. L.; Bezerra, J. C. B.; de Souza Lino Junior, R.; Vinaud, M. C. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. *Experimental Parasitology*, **2012**, *130* (2), 146-151.
  62. Programa ACD labs (Advanced Chemistry Development) Software V8.19 for Solaris, **1994–2009**.
  63. Grimmett, M. R. *Imidazole and benzimidazole synthesis*. **1997**, Netherlands. Ed. Elsevier.
  64. Preston, P. N. Synthesis, reactions, and spectroscopic properties of benzimidazoles. *Chemical Reviews*, **1974**, *74*(3), 279-314.
  65. Phillips, M.A. The Methylation of Benzimidazoles. *Journal of the American Chemical Society*. **1931**, 1143-1153.
  66. Pérez-Villanueva, J.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Méndez-Cuesta, C.; Méndez-Lucio, O.; Hernández-Luis F.; Castillo, R. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, *23*(14), 4221-4224.
  67. Trejo-Soto, P. J. Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por *docking* como inhibidores potenciales de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Entamoeba histoytica*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2011**.

---

## Capítulo 3. Objetivos

### 3.1. Objetivos generales

- Desarrollar una metodología eficiente para la preparación del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (compuesto Alfa), que permita el escalamiento desde 1 a 100 g o más, con el propósito de contar con cantidad suficiente para: la identificación inequívoca de su estructura y propiedades físicas; evaluar la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*; determinar el efecto a nivel de estructura sobre *Fasciola hepatica*; elaborar una formulación para su dosificación en animales; y realizar los estudios farmacocinéticos.
- Sintetizar los derivados 1-metilados del TCBZ con el propósito de estudiar la importancia del H en posición 1 del bencimidazol para la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria *in vitro* e *in vivo*.
- Sintetizar análogos del triclabendazol y del compuesto CDRI 87-144 y evaluar su actividad antihelmíntica y antiprotozoaria.

#### 3.1.1. Objetivos particulares

- Determinar las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto Alfa.
- Sintetizar los metabolitos sulfóxido y sulfona del compuesto Alfa para los estudios del efecto del compuesto sobre la estructura de *F. hepatica*.
- Escalar a nivel de 100-250 g la síntesis del compuesto Alfa.
- Estudiar algunas propiedades farmacocinéticas del compuesto Alfa
- Estudiar el potencial antiprotozoario del compuesto Alfa contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*
- Preparar dos derivados 1-metilados de TCBZ por síntesis total y a partir de TCBZ.
- Estudiar el efecto de los derivados 1-metilados de TCBZ sobre los diferentes estadios de *T. spiralis in vivo*.
- Determinar el potencial antiprotozoario de TCBZ y sus derivados 1-metilados contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.
- Sintetizar dos series de análogos de TCBZ por modificaciones en las posiciones 5 y/o 6 con grupos del tipo carboxamidas o amidas cíclicas.
- Determinar la actividad, *in vitro*, de la serie de análogos de TCBZ contra la larva muscular de *T. spiralis* y *T. crassiceps*.
- Determinar la susceptibilidad de *G. intestinalis* a los nuevos compuestos análogos de TCBZ.
- Evaluar algunos parámetros biofarmacéuticos de los compuestos activos como antihelmínticos.

## Capítulo 4. Síntesis y actividad biológica del compuesto Alfa

### 4.1. Introducción

El triclabendazol (TCBZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de la fasciolosis, es efectivo en todas las etapas del ciclo de vida de la *Fasciola hepatica*, también es activo contra *Fasciola giganta*<sup>1,2</sup> y *Fasciola magna*;<sup>3</sup> además contra *Paragonimus spp.*, pero no contra otros cestodos y nematodos.<sup>4</sup>

Estructuralmente, el TCBZ es un derivado bencimidazólico que posee un grupo metiltio en la posición 2 en lugar de un metoxicarbonilamino (carbamato de metilo) y un cloro en posición 5(6) del núcleo de bencimidazol, lo que lo distingue de los bencimidazol-2-il-carbamamatos de metilo como el ABZ y LXBZ.

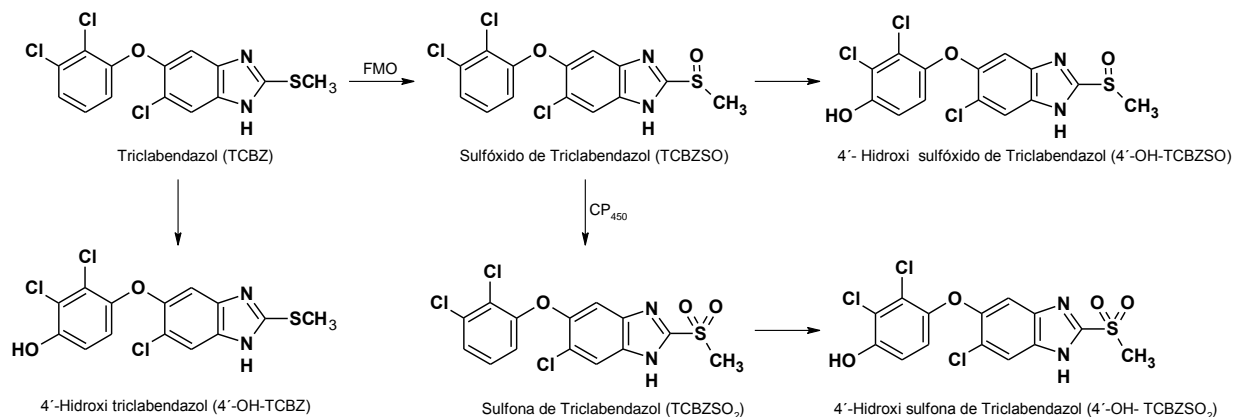
El TCBZ se comercializa por Ciba-Geigy como Fasinex<sup>®</sup> para uso en animales desde principios de 1980, y como Egaten<sup>®</sup> para uso en humanos desde 1998 por Novartis. La OMS considera a las trematodiosis, entre ellas la fasciolosis, como enfermedades tropicales desatendidas (NTD, Neglected Tropical Disease). Esta organización posee un programa en el que provee el fármaco, por petición especial, gratuitamente a los países que lo solicitan.<sup>5</sup> Entre las regiones más afectadas por esta infección está el delta del Nilo en África, Irán, Vietnam y países como Cuba, Perú y Bolivia en América.<sup>6</sup> En México, la fasciolosis también es una zoonosis importante, afectando casi a un tercio de la ganadería; en humanos, la incidencia es menor, pero se perfila en aumento.<sup>7</sup>

Debido a que no existen alternativas para el tratamiento de la fasciolosis y de los reportes sobre la resistencia de *F. hepatica* hacia el TCBZ, en este capítulo se aborda la preparación de un bioisómero del triclabendazol, denominado compuesto Alfa, así como los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* que demuestran su actividad fasciolicida.

### 4.2. Metabolismo del triclabendazol

El TCBZ no se detecta en sangre pero sí sus metabolitos, se oxida rápidamente por la flavinmonooxigenasa (FMO) y por el citocromo P450 (CP450) al sulfóxido (TCBZSO) y la sulfona (TCBZSO<sub>2</sub>). También sufre hidroxilación en la posición 4' convirtiéndose en 4'-OH-TCBZ, 4'-OH-TCBZSO y 4'-OH-TCBZSO<sub>2</sub> (Esquema 4.1) que se excretan por la bilis en forma de cojugados.<sup>8</sup> TCBZ, TCBZSO y TCBZSO<sub>2</sub> se internan en el parásito por vía oral, pero principalmente todos los metabolitos atraviesan el tegumento de la *Fasciola* y se introducen al parásito de acuerdo a su lipofilia.<sup>9a</sup> Hay evidencias de que todos los

metabolitos afectan al parásito pero no de la misma manera.<sup>9b</sup> Además, también se sabe que el TCBZ puede ser metabolizado a TCBSO y TCBZSO<sub>2</sub> dentro de la *F. hepatica*, por lo que el metabolismo dentro del parásito también juega un papel relevante para la actividad.



**Esquema 4.1.** El triclabendazol y sus metabolitos. FMO= Flavinmonooxigenasa, CP450= Citocromo P450.

### 4.3. Mecanismo de acción del triclabendazol

Experimentos de microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET) han demostrado que tanto el TCBZSO como la TCBZSO<sub>2</sub> y TCBZ afectan a la estructura externa e interna de *F. hepatica*, por lo que se cree que el efecto sobre el parásito es la suma del efecto de todos los compuestos. El orden de severidad en daños encontrado es: TCBZSO<sub>2</sub>>TCBZSO>TCBZ.<sup>9</sup> Con estos reportes se descarta la suposición de que la sulfona es la forma inactiva del TCBZ; más aún, estudios de farmacocinética han demostrado que la TCBZSO<sub>2</sub> es el metabolito de mayor tiempo de vida media, hasta 4-5 días vs. 24-30 h del TCBZSO;<sup>7,8</sup> y que causa hasta un 41% de reducción de la carga parasitaria cuando se administra después de 4 semanas post-infección. Las formas hidroxiladas también son capaces de romper el tegumento de *F. hepatica*, por lo que la acción del fármaco podría deberse a un efecto combinado de algunos metabolitos más que al de un simple compuesto.<sup>9</sup>

Debido a que el TCBZ es un bencimidazol, se cree que su diana farmacológica es la  $\beta$ -tubulina del parásito, de acuerdo a algunos estudios de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos de antitubulina y estudios de inhibición de polimerización han demostrado que tanto el TCBZ como sus dos principales metabolitos inhiben la unión de la colchicina, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos. En un homogeneizado de *Fasciola* el orden de efectividad de los compuestos es: TCBZSO>colchicina>TCBZSO<sub>2</sub> >>TCBZ.<sup>10</sup> Se



crea que el TCBZ se une a la  $\beta$ -tubulina por un sitio cercano, pero diferente al que se unen los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, de ahí que éstos no sean tan efectivos contra *F. hepatica* y que el TCBZ no sea activo frente a otros nematodos.<sup>11</sup>

#### 4.4. Resistencia

El uso poco controlado de Fasinex<sup>®</sup> ha propiciado la aparición de cepas resistentes a triclabendazol. Desde 1995 se ha venido reportando cepas resistentes de *F. hepatica* en varias partes del mundo, Australia, Irlanda, Escocia, Gales, España. Algunas veces se confunde la resistencia al fármaco con la falla del tratamiento, debido a que la gravedad de la infección disminuye la conversión del TCBZ a sus metabolitos activos.<sup>11a</sup> Al menos dos posibles mecanismos de resistencia al TCBZ han sido comprobados: modificación del proceso de difusión pasiva en la internalización del TCBZ y TCBSO por eflujo del fármaco y aumento en el metabolismo oxidativo del parásito.<sup>11b</sup>

El uso de los otros fasciolicidas (closantel, oxiclozanida, nitroxinil, clorsulón y albendazol) puede ser una estrategia para evitar que la resistencia se extienda, pero como se sabe el TCBZ es el único efectivo en todas las etapas del ciclo de la *F. hepatica*. Algunos grupos han experimentado con terapias combinadas, con éxito moderado, tratando de afectar al parásito por mecanismos de acción duales; por ejemplo, TCBZ y clorsulón o TCBZ e ivermectina.<sup>11</sup> Otros compuestos han demostrado tener efecto moderado sobre la *F. hepatica*, por ejemplo el derivado nitrotiazólico, nitazoxanida.<sup>12</sup> Otros, como los derivados de productos naturales como el mirazid, se utilizan en Egipto, pero su efecto es controvertido. Otro producto natural, la artemisina, un antimalárico, y sus análogos sintéticos como los 1,2,4-trioxolanos han sido evaluados en pruebas experimentales *in vitro* e *in vivo*. De estos últimos, el compuesto OZ78 es uno de los más potentes, Figura 4.1.<sup>13</sup>

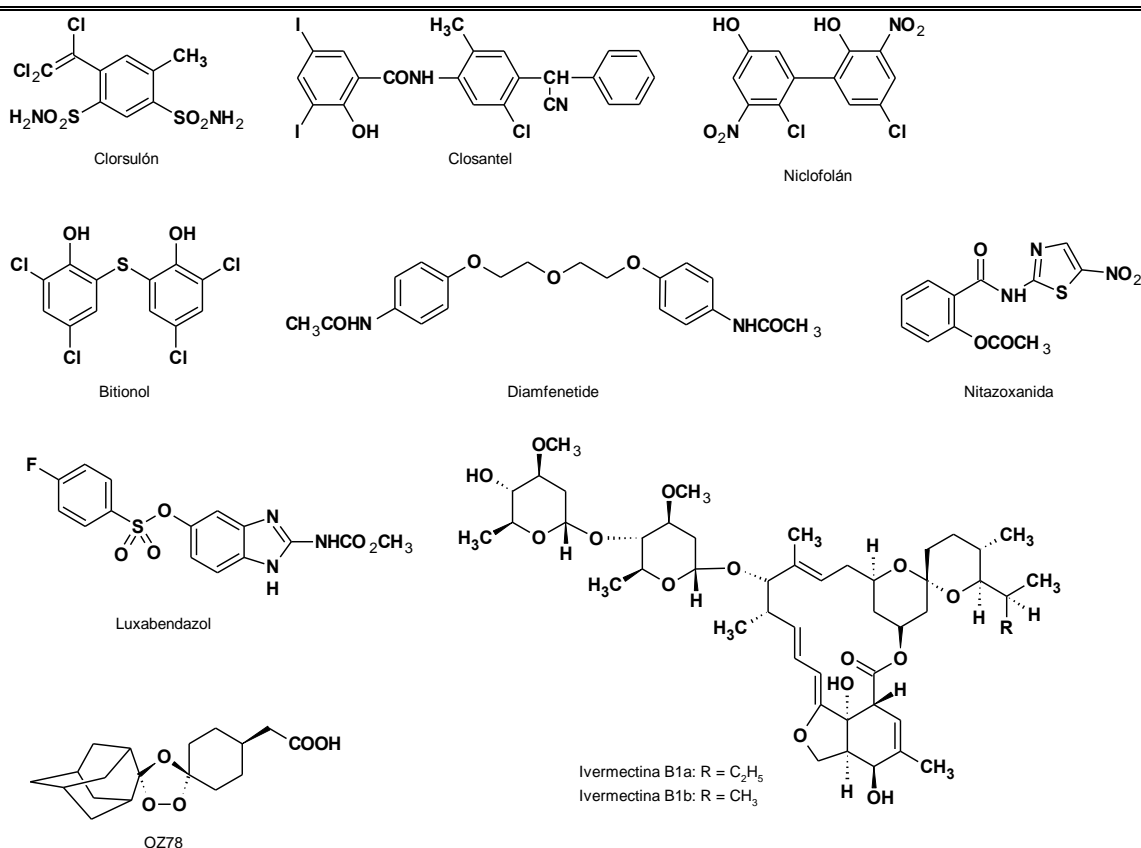
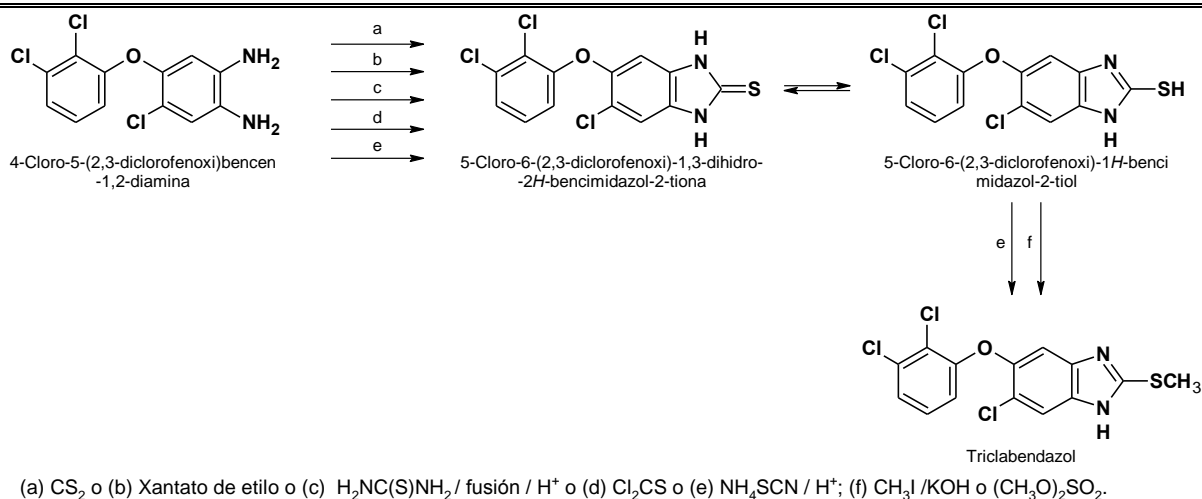


Figura 4.1. Diversidad estructural de compuestos fasciolicidas.

#### 4.5. Síntesis de triclabendazol

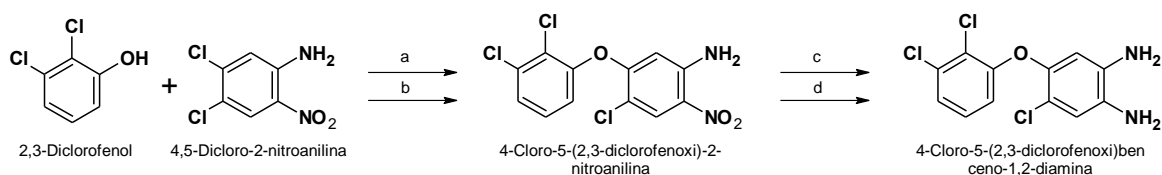
La preparación y actividad fasciolicida del TCBZ se encuentra reportada en la patente Belga 865870 de Ciba Geigy correspondiente a la patente US 4197307 (1978, 1980).<sup>14,15</sup> En ella se reporta la síntesis del TCBZ y sus derivados oxidados, el sulfóxido y la sulfona, primeramente vía la formación del 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-tiol por cinco posibles métodos: por tratamiento de la *o*-fenilendiamina precursora ya sea con disulfuro de carbono, en medio alcalino, xantato de etilo, tiourea por fusión en medio ácido, tiofosgeno en frío o con tiocianato de amonio en medio ácido (Esquema 4.2). Posteriormente, el tiol se hace reaccionar con yoduro de metilo en medio alcalino o con sulfato de dimetilo, para dar el TCBZ.

La 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benceno-1,2-diamina, materia prima para la síntesis, se preparó por reducción química con Fe o Sn en medio ácido o catalítica con  $\text{H}_2$  y Ni-Raney como catalizador; a su vez, el éter nitroanilina se obtuvo por fusión, entre el 2,3-diclorofenol y la 4,5-dicloro-2-nitroanilina con sosa concentrada o en solución con DMF y carbonato (Esquema 4.3).<sup>16</sup>



(a) CS<sub>2</sub> o (b) Xantato de etilo o (c) H<sub>2</sub>NC(S)NH<sub>2</sub> / fusión / H<sup>+</sup> o (d) Cl<sub>2</sub>CS o (e) NH<sub>4</sub>SCN / H<sup>+</sup>; (f) CH<sub>3</sub>I / KOH o (CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>.

Esquema 4.2. Preparación de triclabendazol según Gallay *et al.*<sup>14</sup>



(a) Fusión / NaOH o (b) DMF / K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; (c) Fe / HCl o (d) H<sub>2</sub> / Ni-raney

Esquema 4.3. Preparación de la *o*-fenilendiamina: 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)benzeno-1,2-diamina.<sup>16, 17</sup>

#### 4.6. Bioisosterismo

El bioisosterismo es una herramienta utilizada en la química farmacéutica para el diseño de fármacos, consiste en la modificación racional de un compuesto prototipo (líder) con el fin de obtener otro con las mismas o mejores propiedades biológicas. Esto se logra por modificaciones estructurales al prototipo ya sea mejorando sus propiedades farmacocinéticas, modificando y/o aumentando la afinidad o especificidad por un receptor, variando sus propiedades fisicoquímicas, disminuyendo su toxicidad y cambiando el metabolismo.

Friedman introdujo el término bioisosterismo en 1951 –definió como bioisómeros a todos los átomos o moléculas que se ajustan a la definición de isómeros y que poseen semejantes actividades biológicas, las cuales también pueden ser antagonistas– para describir el fenómeno observado entre sustancias estructuralmente relacionadas que presentan propiedades biológicas similares o antagonistas.

Después, Thornber propuso una ampliación del término definiendo a los bioisómeros como subunidades o grupos o moléculas que poseen propiedades fisicoquímicas y propiedades biológicas semejantes.

Más recientemente Burguer redefinió a los bioisómeros como compuestos o grupos que

poseen formas y volúmenes casi iguales, aproximadamente la misma distribución electrónica y que exhiben similares propiedades físicas.

En moléculas biológicamente activas, el reemplazo de un átomo o grupo de átomos por otro que presente propiedades fisicoquímicas semejantes, se basa en el concepto de isosterismo que introdujo Langmuir desde 1919, definiendo a los isósteros como sustancias que poseen mismo número de átomos y mismo número de electrones de valencia. Después, Grimm's en 1925 propuso la regla del desplazamiento de hidruro que establece que la adición de un hidruro forma un pseudoátomo el cual presenta las mismas propiedades físicas de aquellos átomos que se encuentran en la columna inmediatamente posterior, en la tabla periódica, al átomo inicial. En 1932 Erlenmeyer redefinió el concepto de isósteros como átomos, iones y moléculas en las que las capas periféricas de electrones pueden considerarse idénticas. Su contribución incluye la propuesta de que elementos en la misma columna de la tabla periódica son isósteros entre ellos, y la creación del concepto de anillos electrónicamente equivalentes.<sup>18</sup>

#### 4.6.1. División de Bioisosterismo

Burguer dividió a los bioisósteros como clásicos y no clásicos.

- *Bioisósteros clásicos* son aquellos que se apegan de forma general a las definiciones de isosterismo de Grimm's y Erlenmeyer.
- *Bioisósteros no-clásicos* son aquellos que no se apegan a las definiciones estéricas y electrónicas de lo isósteros clásicos pero que tienen la misma actividad biológica

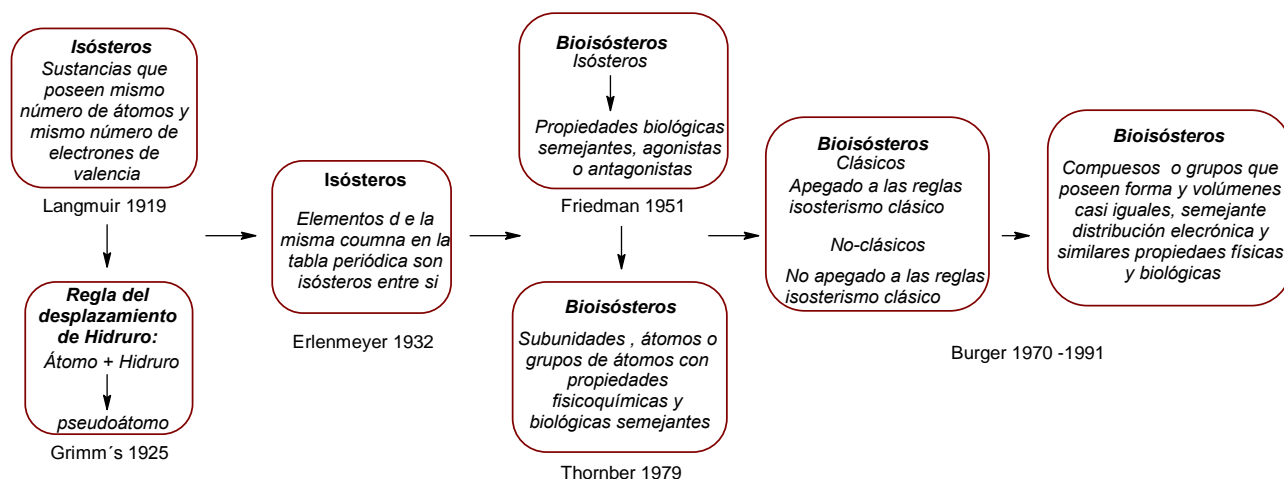


Figura 4.2. Evolución del concepto de bioisosterismo.

Un ejemplo representativo de la aplicación del reemplazo bioisostérico es el desarrollo del pronetalol, un antagonista  $\beta$ -bloqueador, a partir del isoproterenol, un agonista-

antagonista parcial beta, optimizando las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas. Primeramente se sustituyeron los OH fenólicos, en el isoproterenol por átomos de Cl (isosterismo clásico) evitando con ello el metabolismo primario de los catecoles. Además, con el reemplazo se demostró la relevancia de la subunidad catecólica para la actividad adrenérgica. Después se reemplazaron los átomos de Cl vecinos por su equivalente isostérico del tipo no clásico, un fenilo, y con ello surgió el pronetalol, el primer antagonista selectivo para los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Después surgió el propranolol, fármaco de gran importancia para el tratamiento de la hipertensión arterial, Figura 4.3. Sir James Black recibió el Premio Nobel de Medicina en 1988 por este trabajo y por la creación de la cimetidina.

#### 4.7. Diseño del compuesto Alfa

El compuesto Alfa estructuralmente es un bencimidazol sustituido, su diseño obedece el concepto de reemplazo bioisostérico del tipo no-clásico, la sustitución del entorno electrónico de los dos átomos de cloro en el TCBZ por un anillo de benceno produjo un compuesto con semejantes propiedades fisicoquímicas y biológicas.

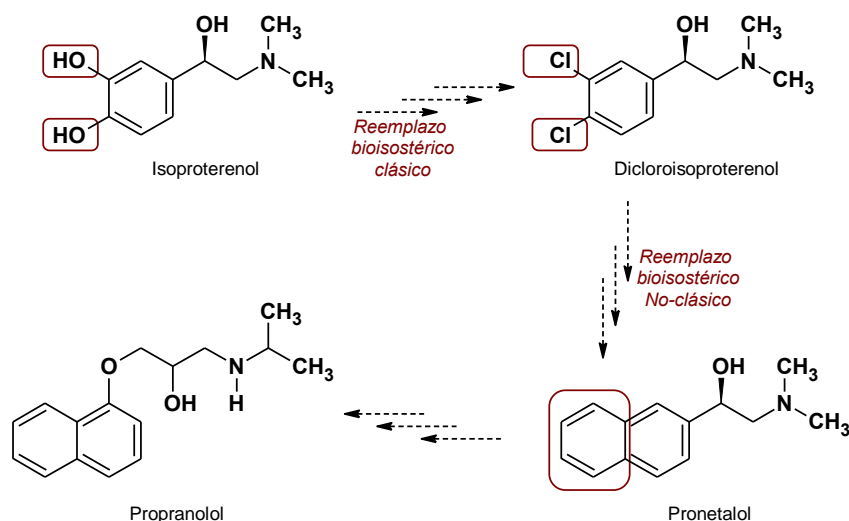


Figura 4.3. Reemplazo bioisostérico clásico y no-clásico en la preparación del Pronetalol.

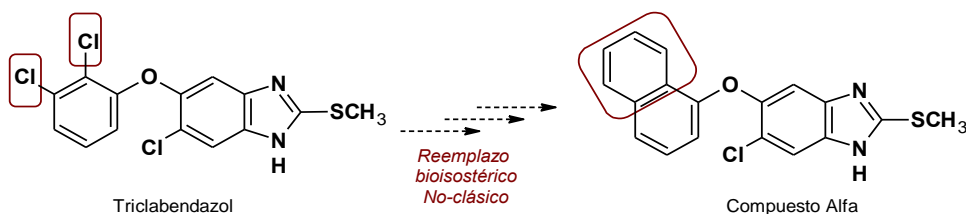


Figura 4.4. Diseño del compuesto Alfa por reemplazo bioisostérico.

## 4.8. Evaluación fasciolicida del compuesto Alfa *in vitro*

Al compuesto Alfa, en un ensayo preliminar, se le determinó la actividad fasciolicida *in vitro* contra metacercarias de *F. hepatica* recién desenquistadas, también se le determinó la actividad a su isómero, el compuesto beta, ambos compuestos fueron activos al 100% a una concentración de 9.09 mg/mL, sólo que el compuesto Alfa además de matar las metacercarias, también las desintegró.<sup>19</sup>

## 4.9. Justificación

Debido a la aparición de cepas resistentes al TCBZ y/o a la falta de tratamientos eficaces, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de compuestos con actividad fasciolicida.

Por esta razón, los grupos de investigación de la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM, del INIFAP y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Parasitología, UNAM, encabezados por el Dr. Rafael Castillo y el Dr. Froylán Ibarra respectivamente, se unieron para buscar opciones para el tratamiento de la Fasciolosis. Así surgió el compuesto Alfa que fue sintetizado de forma preliminar por Estela Vera en su tesis de licenciatura.<sup>19</sup> Sin embargo, dada la necesidad de establecer con precisión su estructura y de tener una metodología de síntesis adecuada que permitiera el escalamiento para producir cantidad suficiente de compuesto para realizar los experimentos de actividad fasciolicida, *in vitro* e *in vivo*, fue necesario hacer un estudio sobre la síntesis del compuesto Alfa y prepararlo a escala mayor de 100 g.

## 4.10. Metodología

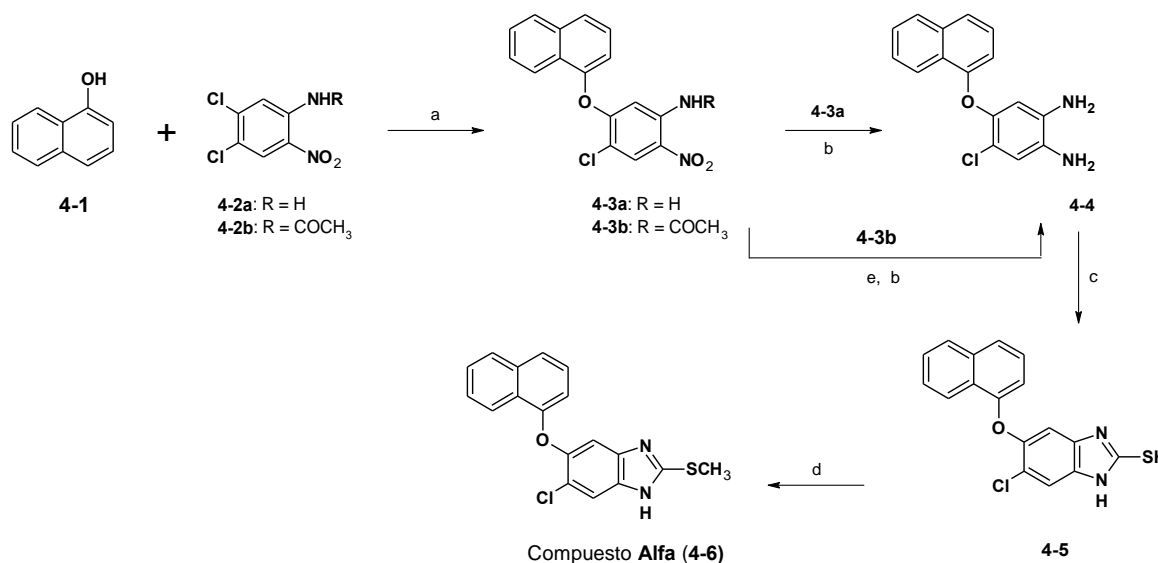
### 4.10.1. Parte Química

#### 4.10.1.1. Síntesis del compuesto Alfa

Para la síntesis del compuesto Alfa se siguió la metodología patentada para el triclabendazol<sup>14,15</sup> con algunas modificaciones, según se muestra en el Esquema 4.4.

Se partió de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) o de *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**4-2b**) las cuales se sometieron a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con el 1-naftol en condiciones básicas;<sup>16</sup> luego, el éter generado se redujo ya sea catalíticamente o por reducción química con SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e inmediatamente se ciclocondensó con el CS<sub>2</sub> en EtOH-KOH dando el correspondiente 2-mercaptobencimidazol.<sup>20</sup> En el caso de partir de la nitroacetanilida **4-2b**, después de la formación del éter **4-3b**, se realizó la hidrólisis de la

amida con KOH-alcohólica; luego se procedió a la reducción del grupo nitro y posterior ciclocondensación. En un último paso se realizó la S-alquilación con CH<sub>3</sub>I en acetona y solución de KOH para dar el compuesto Alfa (4-6).

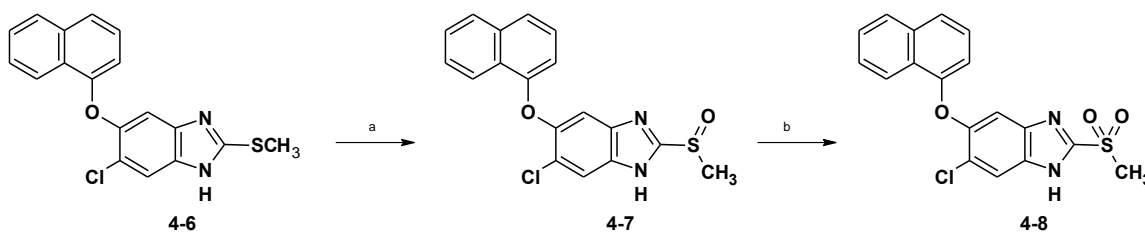


(a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 115 °C; (b) H<sub>2</sub> / Ni-Raney o SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; (c) 1) CS<sub>2</sub>, KOH-EtOH, 2) AcOH; (d) CH<sub>3</sub>I, KOH/acetona; (e) KOH/MeOH.

**Esquema 4.4.** Método de síntesis del compuesto Alfa.

#### 4.10.1.2. S-oxidación del compuesto Alfa

Para las evaluaciones biológicas *in vitro* e *in vivo* del compuesto Alfa fue necesario contar con sus metabolitos, el sulfóxido (AlfaSO) y la sulfona (AlfaSO<sub>2</sub>), por lo que fue necesario prepararlos. Para su síntesis se siguió la metodología que se presenta en el Esquema 4.5. Se usó como agente oxidante ácido *m*-cloroperbenzoico o peryodato de sodio para la obtención del AlfaSO y ácido *m*-cloroperbenzoico para la AlfaSO<sub>2</sub>.<sup>15,21,22</sup>



(a) Ac. mCPB/CHCl<sub>3</sub> o NaIO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN, 0-5 °C; (b) Ac. mCPB/ CH<sub>3</sub>CN, t.a.

**Esquema 4.5.** Metodología para la síntesis de los metabolitos más relevantes del compuesto Alfa.

#### 4.10.2. Parte Biológica

Los estudios de la actividad fasciolicida del compuesto Alfa, *in vitro* e *in vivo*, estuvieron a cargo del Dr. Froylán Ibarra Velarde y su grupo de investigación, primero en el INFAP y después en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se determinó la

actividad fasciolicida *in vitro* a diferentes concentraciones, luego se evaluó la actividad del compuesto Alfa en ovinos sin formular y formulado en suspensión, se determinó la dosis efectiva, el índice de seguridad, el tiempo de permanencia en el ganado para el consumo seguro de la leche y de la carne.

Para las evaluaciones *in vivo* se desarrolló una metodología para preparar la formulación adecuada para la administración en el ganado. Este trabajo fue apoyado por la M. en C. Socorro Alpízar, del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de nuestra Facultad. También se realizó un estudio preliminar sobre la síntesis de profármacos.

En apoyo a los ensayos anteriores se estudió la farmacocinética del compuesto Alfa en ganado; la Dra. Helgi Jung Cook del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, estuvo a cargo de esta actividad.

Además, otros estudios relacionados con el efecto del compuesto Alfa sobre *F. hepatica* a nivel de estructura y ultraestructura *in vitro* e *in vivo* fueron realizados por el Dr. Ian Fairweather y su grupo de investigación en Queen's University, Belfast, United Kingdom. También en el grupo del Dr. Froylán Ibarra en la UNAM se realizaron algunos experimentos de este tipo.

Finalmente, se evaluó el compuesto Alfa como antiprotozoario vs. *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* por la Dra. Lilián Yépez Mulia y su grupo en el Centro Médico, Siglo XXI, IMSS.

## 4.11. Resultados y discusión

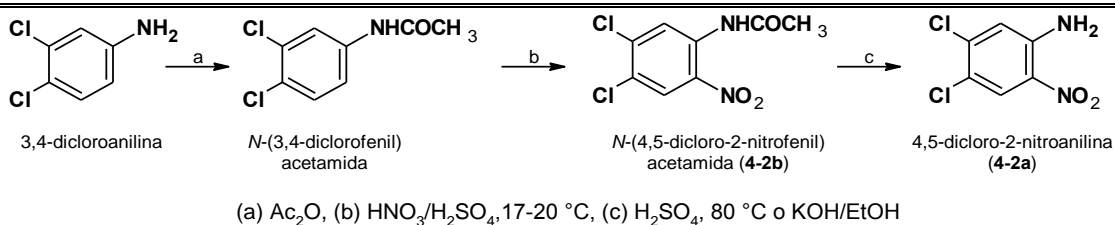
### 4.11.1. Parte química

#### 4.11.1.1. Síntesis del compuesto Alfa

##### 4.11.1.1.1. Sustitución Nucleofílica

Las materias primas 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) o *N*-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (**4-2b**) se prepararon previamente en el laboratorio por métodos ya conocidos<sup>23</sup> a partir de 3,4-dicloroanilina comercial por acetilación, nitración e hidrólisis (Esquema 4.6). La 4,5-dicloro-2-nitroanilina se puede conseguir comercialmente; sin embargo, no es económica (10 g, ~2,000 pesos). Como en este trabajo se necesitaban grandes cantidades del compuesto, se decidió prepararla a partir de la 3,4-dicloroanilina, cuyo costo es de 1 kg por 1,100 pesos.





**Esquema 4.6.** Preparación de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**).

- **Método A. A partir de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4-2a)**

La primera reacción camino a la síntesis del compuesto Alfa fue la sustitución nucleofílica aromática, ésta se estudió de varias formas desde la fusión en medio alcalino (NaOH), hasta el empleo de DMF y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a presión ambiental y en un reactor cerrado, se varió también la base, así como el disolvente y los equivalentes de reactivos, también la temperatura. En la Tabla 4.1 se muestran algunas de las reacciones que se ensayaron.

La reacción 7 fue la mejor de todas; en ella se emplearon K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y DMF como disolvente, no fue necesario agregar agua para disolver el carbonato; tampoco fue necesario poner exceso de 1-naftol. La proporción de materia prima 4,5-dicloro-2-nitroanilina-DMF fue 1:3 p/v; y la temperatura siempre se mantuvo a 115 °C. La purificación se logró por lavados con MeOH. Después de este proceso, el diariléter (**4-3a**) se obtuvo con muy buena calidad, y 71% de rendimiento; una muestra se recristalizó de tolueno para de ésta determinar sus constantes espectroscópicas.

**Tabla 4.1.** Pruebas de  $S_NAr$  en diferentes condiciones para obtener el éter **4-3a** partir de 1 equivalente de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**)

Reacción	1-naftol Equivalentes	Base Equivalentes	Disolvente	Condiciones	Resultado
1	1.5	KOH, 1.5	-----	Fusión y tratamiento con KOH concentrado	Sublimación de materias primas, poca reacción y producto resinoso de mala calidad
2	1.05	KOH, 1.05	isopropanol	A reflujo	Tiempo prolongado > 12 h, reacción incompleta e impura
3	1.2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1.5	DMF/H <sub>2</sub> O	100 °C	6 h reacción, varias manchas en CCF, difícil purificación
4	1.05	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5	DMF	A presión en un reactor Parr, 130 °C	Varios productos secundarios, 4 h de reacción
5	1.05	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5	EtOH	A presión en un reactor Parr, 130 °C	Dos productos principales y otro secundarios
6	1.3	KOH , 1.5	Acetona	A presión en un reactor Parr, 130 °C	35% de avance después de 4 h de reacción
7	1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1.5	DMF	115 °C bajo atm. de N <sub>2</sub>	3.5 h de reacción producto de buena calidad, 97% de rend. crudo, 71% rendimiento después de purificar
8	1	KOH, 1.1	EtOH, DMF	Usando el naftóxido de sodio en EtOH, luego DMF, 100 °C	2 h de reacción Producto de bajo punto de fusión
9	1.05	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1.5	Monoglisma	Reflujo	Tiempo prolongado de reacción, incompleta

El cambio estructural se confirmó en el espectro de IR del producto **4-3a** en el cual se observaron dos bandas a 3464 cm<sup>-1</sup> y 3344 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a la vibración N-H de la amina, y una banda amplia intensa a 1225 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento asimétrico del éter C-O-C. El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró una señal amplia intercambiable con D<sub>2</sub>O a 7.41 ppm que integró para 2H, asignable a los protones del grupo amino, las señales características de los hidrógenos del anillo del naftaleno y dos señales simples a 8.17 ppm y 6.21 ppm correspondientes a los protones bencénicos. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observaron los 16 carbonos esperados. En el espectro de masas se observó el ion *m/z* 314 (100%), que concordó con la masa molecular esperada y el ion con *m/z* 316 y 34% de abundancia comprobó la presencia de un solo átomo de cloro. El espectro de masas de alta resolución confirmó la masa, así como el análisis elemental corroboró la composición.

Esta metodología la reacción se ha repetido muchas veces por la necesidad de contar con producto suficiente para completar la síntesis del compuesto Alfa y tener compuesto para las evaluaciones en animales (ovinos y bovinos). La reacción se realizó en escala

desde 1 g hasta 250 g con resultados reproducibles. Es importante señalar que la calidad del producto obtenido depende mucho de la pureza de las materias primas empleadas y del disolvente.

También se decidió experimentar la fusión<sup>16</sup> (reacción 1), pero los componentes de la reacción sublimaron a la temperatura de trabajo (170-180 °C); por otro lado, la incorporación de la base puede resultar impráctica y peligrosa si se desea escalar la reacción a nivel de 100 g. Además, el producto que se obtuvo fue una resina cuya ccf mostró varias manchas, lo que dificultó el aislamiento y purificación del producto deseado.

Cuando en la reacción se utilizó KOH como base para formar el naftolato de potasio, reacción 8, el tiempo de reacción disminuyó considerablemente, pero el producto que se obtuvo no fue fácil de purificar, lo cual podría optimizarse; sin embargo, desde el punto de vista práctico, se aumenta el número de operaciones, ya que después de la formación de la sal, hubo de evaporarse el etanol, y después de obtenido el crudo no se logró muy buena pureza, por lo que se descartó esta metodología. Además, existe la posibilidad de que residuos de base sin reaccionar provoquen formación de productos secundarios de reacción, desde la formación del fenol, hasta la de posibles dímeros.

Cuando la reacción se realizó en el reactor Parr y se empleó EtOH como disolvente, reacción 5, se obtuvo un producto secundario muy importante, posiblemente se trató del éter EtOAr.

También se observó que la temperatura de reacción es importante para que se lleve a cabo completamente la reacción. Se intentó emplear disolventes de menor punto de ebullición que la DMF para una fácil recuperación de los mismos; pero no se tuvo éxito (reacciones 2 y 9).

Por otro lado, también se observó que en las reacciones en la que usaron disolventes de menor constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) que la DMF (37.8), como isopropanol (17.9), etanol (24.5), acetona (20.7) o monoglima (7.5) no hubo avance significativo de la reacción, prolongando mucho los tiempos de reacción, con el deterioro de la misma.

- *Método B. A partir de N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida (4-2b)*

Basados en los resultados anteriores y debido a que la N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida es el precursor inmediato de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina, se decidió estudiar la reacción de sustitución nucleofílica aromática con este precursor. La reacción

se llevó a cabo a menor temperatura (85-90 °C) y se completó en un lapso de 2.5 horas, casi la mitad del tiempo que la reacción anterior. Se obtuvo así la *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (**4-3b**) con un rendimiento crudo del 91%; la calidad del producto fue superior al reportado por el método A.

La formación de dicho compuesto se confirmó en el espectro de IR, donde se observaron dos bandas a 3344 cm<sup>-1</sup> y a 1720 cm<sup>-1</sup> correspondientes al NH y CO de la acetamida, respectivamente. Además, la espectrometría de masas mostró el pico correspondiente al ion *m/z* 356 (100%) concordante con la masa molecular calculada. El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró una señal simple a 2.478 ppm con integración para 3H correspondiente al metilo de la acetamida, una señal amplia intercambiable con D<sub>2</sub>O a 10.175 ppm que integró para 1H asignable al protón de la amida; además, las señales correspondientes a los protones naftalénicos.

El siguiente paso fue la hidrólisis de la acetamida **4-3b** con potasa etanólica acuosa a una temperatura entre 45-50 °C. Se obtuvo así la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**), con un rendimiento crudo de 98% y 90% de rendimiento de producto puro.

Los dos productos obtenidos por ambos métodos, A y B, coincidieron en *R<sub>f</sub>*, punto de fusión y constantes espectroscópicas.

En la Tabla 4.2 se muestra un comparativo de los dos métodos, con la consideración de que en el método A la 4,5-dicloro-2-nitroanilina se obtiene por hidrólisis alcalina de su acetamida (**4-2b**).

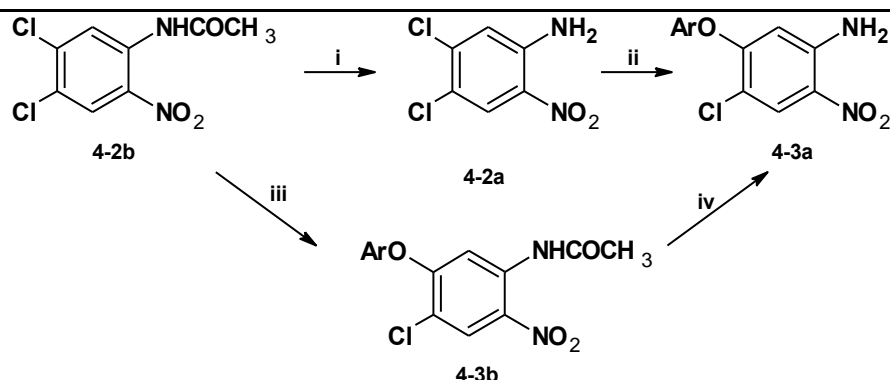
Como puede observarse en la tabla anterior, las condiciones de reacción del método B son más suaves, así como también el rendimiento global es mejor.<sup>24</sup> La limitante de este método es contar con la materia prima acetilada ya que el producto que se tiene en Stock en nuestro laboratorio es la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**). Por lo cual éste metodología también se utilizó algunas veces para el escalamiento de la obtención de la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**).

- *Método C. Asistido por microondas*

Buscando una metodología alternativa para la síntesis del ariléter **4-3a**, que fuese más práctico y que permitiese la recuperación del disolvente; se probó hacer la reacción en otros disolventes, por ejemplo acetonitrilo o acetona cuya constante dieléctrica es de 37.5 y 20.5 debyes respectivamente, también se utilizó KOH como base y se empleó le

calentamiento con microondas. En la Tabla 4.2 se muestran algunas reacciones realizadas en el reactor de microondas Synthos 3000 de Anton Paar.

**Tabla 4.2** .Comparación de las alternativas de síntesis de la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**)



Reacción	Condiciones de reacción	Rendimiento crudo (%)	Rendimiento recristalizado (%)	Rendimiento global (%)
i	KOH, EtOH, H <sub>2</sub> O 60 °C, 25 min.	97.7	90.6	
ii	α-naftol, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF 115 °C, 4 horas	97.0	71.0	Método A (94.77) 64.32
iii	α-naftol, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF 85-90 °C, 2.5 horas	91.1	87.4	
iv	KOH, MeOH, H <sub>2</sub> O 45-50 °C, 30 min.	98.2	90.3	Método B (89.46) 78.92

**Tabla 4.3.** Reacciones de sustitución nucleofílica asistida por microondas para la obtención de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina **4-3a**, a partir de 1 equivalente de **4-2a**

Reacción	Equivalentes de 1-naftol	Base/Equivalentes	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Conversión (%)***
1	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1.5	DMSO	120**	5	80
2	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1.5	DMF	160*	15	97
3	1.1	KOH/2	Acetona/agua (95:5)	150**	12	++++
4	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1.5	MeCN	159*	10	++
5	1.1	KOH/2.0	MeCN/agua (95:5)	151*	13	++++

\*realizadas en el rotor 16MF100; \*\*realizadas en el rotor 64MG5, ambos del reactor Synthos 3000 de Anton Paar. \*\*\*Porcentaje estimado de conversión: 0-25% (+), 25-50% (++) , 50-75% (+++) , >75% (++++).

Como se puede ver en la Tabla 4.3, la conversión más eficiente se logró con acetonitrilo y 5% de agua, ya que en ésta se formó inicialmente la sal potásica del 1-naftol y luego se incorporó a la materia prima **4-2a** para luego someterse al calentamiento.<sup>25</sup> La reacción terminó en 13 min. Esta reacción se pudo escalar a nivel de 10 g en el rotor 16MF100.

Cuando se utilizó DMSO como disolvente y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base, en 5 min se transformó el 80% de la materia prima, aumentó a 93% cuando se calentó 15 min en DMF. Si bien esas reacciones procedieron adecuadamente, el propósito de tener una metodología que

permitiera la fácil recuperación del disolvente, no se cumple con los disolventes empleados.

#### 4.11.1.1.2. Reducción

El siguiente paso en la ruta de síntesis hacia la obtención del compuesto Alfa fue la reducción del grupo nitro de la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**). La patente alemana<sup>17</sup> propone reducción química  $\text{SnCl}_2/\text{AcOH}$ , HCl gas o  $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$  en MeOH o DMF. Nosotros probamos el método catalítico con Ni-Raney en MeOH/AcOEt a 40 °C; y el químico con  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a reflujo de EtOH. Ambos métodos son eficaces, pero la reducción catalítica es cara cuando se requieren hacer grandes cantidades de producto; además, la capacidad de la botella de hidrogenación empleada, es reducida (250 mL). La reducción con  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  es rápida, en 2-3 h termina la reacción; el inconveniente es el aislamiento del producto de las sales de estaño, previo tratamiento de la mezcla de reacción con NaOH concentrada. Este último método fue el que usamos en el escalamiento de la síntesis del compuesto Alfa. Se obtuvo un rendimiento de producto crudo de 99%. Para la comprobación de la estructura se formó el monoclóhidrato de la diamina **4-4** por burbujeo de HCl gas a una solución de una muestra de la diamina en EtOH anhidro.

El IR de la diamina mostró las dos bandas de amina primaria a  $3461\text{ cm}^{-1}$  y  $3345\text{ cm}^{-1}$ . La RMN  $^1\text{H}$  mostró una señal amplia que integró para 4H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$  a 3.4 ppm. El espectro de masas de alta resolución dio un  $\text{M}^+$ , de  $m/z$  284.0716 correspondiente a la masa esperada para la diamina como base libre. El análisis elemental correspondió con la composición del monoclóhidrato.

#### 4.11.1.1.3. Ciclación

Para la obtención del precursor 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-5**), se llevó a cabo la ciclocondensación de la diamina **4-4** mediante la formación *in situ* del xantato de etilo, adicionando disulfuro de carbono y potasa etanólica acuosa, con posterior calentamiento moderado. La reacción procedió de forma rápida, obteniéndose el tiol **4-5** con un rendimiento del 80%. Cabe resaltar que la formación de este compuesto se favoreció al incrementar a 1.5 equivalentes el disulfuro de carbono y la potasa adicionados, manteniendo la proporción materia prima-disolvente entre 1:5 y 1:10; la temperatura ideal para la reacción fue cercana a 65 °C y el pH de 10. La formación de este compuesto se confirmó por la desaparición de las dos bandas a  $3346\text{ cm}^{-1}$  y  $3345\text{ cm}^{-1}$  propios de amina primaria, en su lugar apareció una banda pequeña a  $3388\text{ cm}^{-1}$  y

un conjunto de bandas anchas que convergen a  $3053\text{ cm}^{-1}$ , característico del núcleo de bencimidazol. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , aparecieron todas las señales con la multiplicidad e integración esperadas. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se contaron todos los carbonos, siendo notoria la señal a 169.66 ppm que se asignó al C-2 del bencimidazol. El espectro de masas de alta resolución confirmó la masa molecular del compuesto así como el análisis elemental coincidió con el calculado.

#### 4.11.1.1.4. S-metilación. Obtención de 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (compuesto Alfa, **4-6**)

La metilación del tiol, 5-cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-5**), para la obtención del compuesto Alfa, se realizó utilizando yoduro de metilo como agente alquilante y potasa como base, se utilizó etanol o acetona como disolventes; en ambos casos se obtuvo buena calidad de producto. La reacción terminó prácticamente unos minutos después de la adición del yoduro de metilo. La patente de Gallay *et al.*, para la obtención del triclabendazol<sup>15</sup> propone se realice en etanol/agua con exceso de potasa (2.5 eq) lo que provoca el consumo del yoduro de metilo si no se cuida la velocidad de adición y la temperatura; además, también puede dar lugar a la obtención del compuesto dimetilado ya que éste se produce a temperatura ambiente, y la metodología reportada en la patente mencionada propone que después de 30 min de la adición del reactivo se caliente la mezcla de reacción a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  por una hora y después se deje a temperatura ambiente por 18 h. Estos últimos pasos son innecesarios ya que la reacción termina casi después de terminada la adición del reactivo alquilante.

Cuando se controlan las condiciones y se realiza la reacción con una materia prima de buena calidad el producto que se obtiene es fácil de purificar, de lo contrario habrá que hacer tratamiento con carbón activado. El rendimiento de la reacción fue entre 83-90%, siendo mayor cuando se empleó etanol; sin embargo, la reacción con acetona fue más rápida. La purificación a escala de 150 g fue mejor cuando se realizó por par de disolventes AcOEt/MeOH. De esta forma se obtiene un sólido puro de tamaño de partícula adecuado para la preparación de la suspensión.

Una característica del compuesto Alfa es que presentó diferentes puntos de fusión, en su mayoría se obtuvo como un sólido polimorfo cuyo punto de fusión varió desde  $105\text{ }^\circ\text{C}$  (crudo),  $175\text{-}177\text{ }^\circ\text{C}$  (obtenido de columna),  $181\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$  (purificado por AcOEt/MeOH),  $191\text{-}192\text{ }^\circ\text{C}$  (recristalizado de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ),  $176.2\text{-}177.0\text{ }^\circ\text{C}$ , (recristalizado de MeOH). Un análisis térmico de calorimetría diferencial de barrido del polvo puro y seco, mostró

una temperatura de transición de 167.23-168.53 °C y varios cambios de energía, uno a 183 °C, otro a 195 °C y otros a 214.58, 233.53 y 234.95 °C lo que coincide con algunos de los puntos de fusión encontrados.

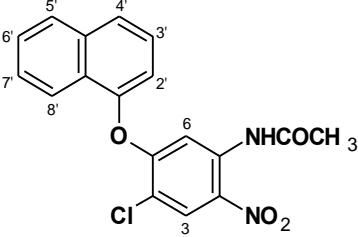
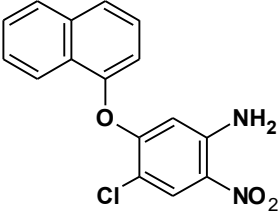
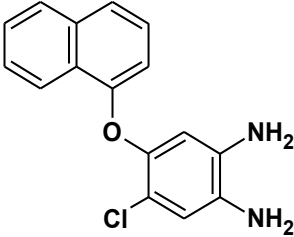
La identidad del compuesto Alfa se comprobó por sus características espectroscópicas particularmente en el espectros de RMN <sup>1</sup>H, en donde la señal a 2.84 ppm que integró para 3H correspondió al -SCH<sub>3</sub>; no se observó señal a 3.6 ppm que podría indicar -N-CH<sub>3</sub>, en cambio sí se observó una señal que intercambió con D<sub>2</sub>O a 6.48 ppm, indicando el NH del bencimidazol. El espectro de RMN <sup>13</sup>C mostró la señal a 13.46 ppm, correspondiendo al -SCH<sub>3</sub>, y los 17 carbonos más. La asignación de las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se apoyó en los experimentos de RMN bidimensionales: COSY y HETCOR. Adicionalmente, el espectro de masas mostró la pérdida de Cl o HCl por los iones de *m/z* 305 y 304; la pérdida del metilo en el ion de *m/z* 290; la presencia de azufre por la pérdida de 32 u y 33 u en los iones de *m/z* 271 y *m/z* 258, finalmente el ion de *m/z* 127, correspondió a la masa del ion del naftaleno y a la pérdida de 213 u. El espectro de masas de alta resolución correspondió con la masa del compuesto Alfa y el análisis elemental con la composición esperada.

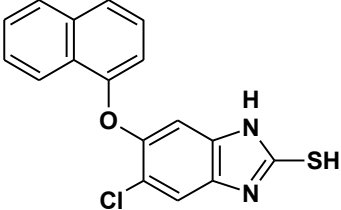
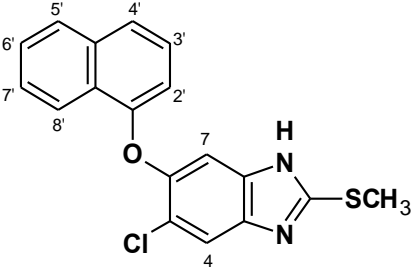
**Tabla 4.4.** Constantes físicas y rendimientos de los compuestos **4-3a–4-6** obtenido por síntesis convencional

Compuesto	Rendimiento crudo %	Rendimiento de cristalización %, método de purificación	Punto de fusión (°C)	R <sub>f</sub> (sistema)
<b>4-3a</b>	97	71, por lavados de MeOH. 98 de tolueno-EtOH	145-146	0.56 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH 99:1)
<b>4-3b</b>	91.1	87.4, AcOEt	178.1-178.7	0.53 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH 99.5:0.5)
<b>4-4a</b>	99.08	-----	195-197, monoclorhidrato EtOH	0.30 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH 98:2+2 gotas de NH <sub>4</sub> )
<b>4-5</b>	77.4	73, AcOEt-EtOH	273-275	0.4 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH 90:10)
<b>Alfa (4-6)</b>	95	89.9, AcOEt- MeOH 83.2, CHCl <sub>3</sub> - MeOH	181-182 sólido amorfo 192-195 cristales	0.39 (CHCl <sub>3</sub> -MeOH 98:2+2 gotas de NH <sub>4</sub> OH)
<b>Rendimiento global producto puro</b>		41.82 (primer paso método A) 51.28 (primer paso método B)		



Tabla 4.5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 4-3a-4-6

 <p><b>4-3b</b> N-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida</p>	<p><b>Espectro 1</b>, IR, pastilla (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3334, 3126–3053, 1720, 1579, 1335, 1267.</p> <p><b>Espectro 2</b>, RMN <math>^1\text{H}</math>, (TMS, <math>\text{CDCl}_3</math>, 300 MHz) <math>\delta</math> ppm: 2.74 (s, 3H, <math>\text{CO-CH}_3</math>); 7.23 (dd, 1H, <math>J_1=7.5</math> Hz, <math>J_2=5.1</math>); 7.46–7.66 (m, 3H, H-2', H-6' y H-7'), 7.80 (d, 1H, <math>J=8.1</math> Hz, H-4); 7.91 (d, 2H, <math>J=8.1</math> Hz, H-5' y H-8'); 8.25 (s, 1H, H-6); 8.44 (s, 1H, H-3); 10.43 (sa, inter. con <math>\text{D}_2\text{O}</math>, NH).</p> <p><b>Espectro 3</b>, RMN <math>^{13}\text{C}</math>, (TMS, <math>\text{CDCl}_3</math>, 75 MHz) <math>\delta</math> ppm: 25.47 (<math>\text{CH}_3\text{CO}</math>), 108.17 (C-2' y C-6), 116.74 (C-4'), 116.74 (C-4), 117.74 (C-4), 121.16 (C-8'), 125.61 (C-8'a), 126.26 (C-7' y C-6'), 126.76 (C-5'), 126.92 (C-3'), 127.96 (C-3), 128.20 (C-1), 135.15 (C-4'a), 135.74 (C-2), 149.65 (C-1'), 160.21 (C-5), 168.85 (C=O).</p> <p><b>Espectro 4</b>, EM, (IE) <math>m/z</math>: 358 (M+2, 34%); 356 (<math>\text{M}^+</math>, 100%); 321, 310 (M-46, 40%); 279 (321-43, 65%); 278 (313-35, 35%); 233 (278-46, 55%); 43 (M-313, 15%).</p>
 <p><b>4-3a</b> 4-Chloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina</p>	<p><b>Espectro 5</b>, IR, pastilla (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3462, 3347, 1628, 1560, 1387, 1320, 1225.</p> <p><b>Espectro 6</b>, RMN <math>^1\text{H}</math>, (TMS, <math>\text{DMSO-}d_6</math>, 300 MHz) <math>\delta</math> ppm: 6.22 (s, 1H, H-6); 7.37 (dd, 1H, <math>J_1=7.5</math> Hz, <math>J_2=1.0</math> Hz, H-2'); 7.44 (sa, 2H, <math>-\text{NH}_2</math>); 7.55-7.64 (m, 3H, H-3, H-6', H-7'); 7.79 (dd, 1H, <math>J_1=8.0</math> Hz, <math>J_2=2.4</math> Hz, H-5'); 7.93 (d, 1H, <math>J=8.4</math> Hz, H-4'); 8.05 (dd, 1H, <math>J_1=7.2</math> Hz, <math>J_2=1.8</math> Hz, H-8'); 8.18 (s, 1H, H-3).</p> <p><b>Espectro 7</b>, RMN <math>^{13}\text{C}</math>, (TMS, <math>\text{DMSO-}d_6</math>, 75 MHz) <math>\delta</math> ppm: 103.59 (C-6), 109.54 (C-4), 117.14 (C-2'), 120.73 (C-5'), 125.69 (C-8'a), 125.79 (C-4'a), 129.99 (C-4'), 126.26 (C-6'), 127.06 (C-3'), 127.12 (C-3), 127.15 (C-7'), 128.26 (C-8'), 134.77 (C-2), 146.91 (C-1), 149.14 (C-1'), 159.04 (C-5).</p> <p><b>Espectro 8</b>, EM, (ID/IE) <math>m/z</math>: 316 (M+2, 34%), 314 (<math>\text{M}^+</math>, 100%), 279 (M-35, 72%), 233 (M-46, 93%).</p> <p>EMAR, (IE) (<math>\text{M}^+</math>) <math>m/z</math>: Calculado para <math>\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3</math>: 314.0458. Encontrado: 314.0458</p> <p>Análisis Elemental. Calculado para <math>\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3</math>: C, 61.06; H, 3.52; N, 8.90. Encontrado: C, 61.18; H, 3.58; N, 8.62.</p>
 <p><b>4-4a</b> 4-Chloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilenediamina</p>	<p>IR, pastilla (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3461, 3345, 1629, 1493, 1227, 766.</p> <p>RMN <math>^1\text{H}</math>, (TMS, <math>\text{DMSO-}d_6</math>, 300 MHz) <math>\delta</math> ppm: 3.80 (sa, 4H, 2 - <math>\text{NH}_2</math>); 6.50 (s, 1H, H-6); 6.89 (dd, 1H, <math>J_1=7.6</math> Hz, <math>J_2=0.9</math> Hz, H-2'); 7.53 (s, 1H, H-3); 7.47 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=7.8</math> Hz, H-3'); 7.50-7.61 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.73 (d, 1H, <math>J=8.4</math> Hz, H-4'); 7.95–8.02 (m, 2H, H-5', H-8').</p> <p>RMN <math>^{13}\text{C}</math>, (TMS, <math>\text{DMSO-}d_6</math>, 75 MHz) <math>\delta</math> ppm: 108.51 (C-6), 112.38 (C-4), 112.90 (C-2'), 119.10 (C-8'a), 121.12 (C-8'), 123.67 (C-3), 123.82 (C-4'), 125.39 (C-4'a), 126.13 (C-3'), 126.52 (C-6'), 126.93 (C-7'), 127.98 (C-5'), 134.59 (C-2), 137.96 (C-1), 150.16 (C-1'), 151.58 (C-5).</p> <p>EM, (ID/IE) <math>m/z</math>: 286 (M+2, 35%); 284 (<math>\text{M}^+</math>, 100%); 248 (M-36); 232 (248-16, 65%).</p> <p>EMAR, (IE) (<math>\text{M}^+</math>) <math>m/z</math>: Calculado para <math>\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}</math>: 284.0716. Encontrado: 284.0716.</p> <p>Análisis Elemental Calculado para <math>\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}</math>: C, 59.83; H, 4.39; N, 8.72. Encontrado: C, 59.80; H, 4.38; N, 8.67.</p>

 <p style="text-align: center;"><b>4-5</b> 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol</p>	<p><b>Espectro 9</b>, IR, pastilla (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3380, 3053, 1460, 1391, 1328, 1229, 1157.</p> <p><b>Espectro 10</b>, RMN <math>^1\text{H}</math>, (TMS, DMSO-<math>d_6</math>, 300 MHz) <math>\delta</math> ppm: 6.75 (dd, 1H, <math>J_1=6.6</math> Hz, <math>J_2=2.0</math> Hz, H-2'); 6.84 (s, 1H, H-7); 7.34 (s, 1H, H-4); 7.40 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-3'); 7.54–7.62 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.68 (d, 1H, <math>J=8.4</math> Hz, H-4'); 7.95–8.00 (m, 1H, H-5'); 8.13–8.17 (m, 1H, H-8'); 12.60 (s, 1H, NH o SH); 12.72 (s, 1H, NH, o SH).</p> <p><b>Espectro 12</b>, RMN <math>^{13}\text{C}</math>, (TMS, DMSO-<math>d_6</math>, 75 MHz) <math>\delta</math> ppm: 102.27 (C-7), 110.60 (C-2'), 110.95 (C-4'), 118.96 (C-5), 121.19 (C-6'), 123.04 (C-4), 124.97 (8'a), 126.01 (C-8'), 126.31 (C-7'), 126.89 (C-5'), 127.82 (C-3'), 129.57 (4'a), 132.04 (C-3a), 134.46 (C-7a), 147.10 (C-1'), 152.66 (C-6), 169.66 (C-2).</p> <p><b>Espectro 13</b>, EM, (ID/IE) <math>m/z</math>: 328 (M+2, 40%); 326 (<math>M^+</math>, 100%); 291 (M-35, 65%); 290 (M-36, 63%); 258 (290-33).</p> <p><b>Espectro 14</b>, EMAR, (IE) (<math>M^+</math>) <math>m/z</math>. Calculado para <math>\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}</math>: 326.0280. Encontrado: 326.0281.</p> <p>Análisis Elemental Calculado para <math>\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}</math>: C, 62.48; H, 3.39; N, 8.57; S, 9.81. Encontrado: C, 62.49; H, 3.29; N, 8.44; S, 9.93.</p>
 <p style="text-align: center;">Compuesto Alfa (<b>4-6</b>) 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol</p>	<p><b>Espectro 15</b>, IR, pastilla (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3402, 2720, 1453, 1316, 1157.</p> <p><b>Espectro 16</b>, RMN <math>^1\text{H}</math>, (TMS, DMSO-<math>d_6</math>, 300 MHz) <math>\delta</math> ppm: 2.84 (s, 3H, -SCH<math>_3</math>); 6.48 (sa, 1H, NH, intercambia con D<math>_2</math>O); 6.77 (d, 1H, <math>J=7.8</math> Hz, H-2'); 7.29 (s, 1H, H-4); 7.40 (dd, 1H, <math>J_1=7.8</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-3'); 7.53–7.66 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.70 (d, 1H, <math>J=8.1</math> Hz, H-4'); 7.89 (s, 1H, H-7); 7.94–8.20 (m, 1H, H-5'); 8.12–8.22 (m, 1H, H-8').</p> <p><b>Espectro 18</b>, RMN <math>^{13}\text{C}</math>, (TMS, DMSO-<math>d_6</math>, 75 MHz) <math>\delta</math> ppm: 13.46 (S-CH<math>_3</math>), 102.95 (C-7), 110.2 (C-2'), 113.116 (C-4), 119.7 (C-8'), 120.83 (C-5), 122.04 (C-4'), 123.8 (C-8'a), 124.12 (C-3'), 124.66 (C-6'), 125.25 (C-7'), 126.21 (C-5'), 128.72 (4'a), 131.34 (C-3a), 133.08 (C-7a), 148.05 (C-1'), 150.75 (C-2), 152.03 (C-6).</p> <p><b>Espectro 21</b>, EM, (IE) <math>m/z</math>: 342 (M+2, 39%); 340 (<math>M^+</math>, 100%); 305 (M-35, 49%); 304 (M-36); 290 (304-15, 40%); 271 (304-33, 20%); 258 (290-32, 15%); 127 (340-213, 20%).</p> <p><b>Espectro 22</b>, EMAR, (IE) (<math>M^+</math>) <math>m/z</math>. Calculado para <math>\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}</math>: 340.0437. Encontrado: 340.0437.</p> <p>Análisis Elemental calculado para <math>\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}</math>: C, 63.43; H, 3.84; N, 8.22; S, 9.41. Encontrado: C, 62.82; H, 3.69; N, 7.97; S, 9.86.</p>

#### 4.11.1.2. Síntesis de los metabolitos del compuesto Alfa (S-Oxidación)

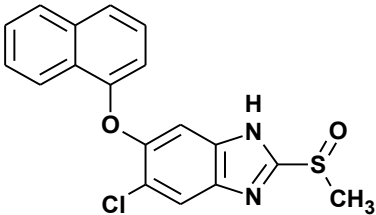
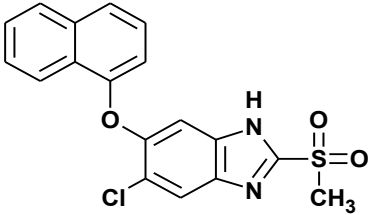
La oxidación del compuesto Alfa se llevó a cabo de dos maneras: utilizando peryodato de sodio o ácido *m*-cloroperbenzoico (AmCPB); el primero es un agente oxidante suave y el segundo un oxidante fuerte.

La reacción con peryodato de sodio no tuvo éxito en condiciones suaves semejantes a las reportadas para la obtención del sulfóxido de albendazol que a 5 °C produce solamente el sulfóxido sin sobreoxidación a la sulfona. Con este resultado se abordó la oxidación por el

método tradicional reportado para la oxidación del triclabendazol, el cual consistió en utilizar AmCPB a bajas temperaturas (0-5 °C) para el sulfóxido (AlfaSO), y a 50 °C para la sulfona (AlfaSO<sub>2</sub>), en cloroformo o un disolvente polar como el acetonitrilo.<sup>26</sup>

La identidad de los compuestos se comprobó por sus espectros de IR, RMN y EM. El espectro de IR fue de gran ayuda, la banda de estiramiento para el enlace S=O apareció como una banda intensa a 1046 cm<sup>-1</sup> y de 1315-1135 cm<sup>-1</sup> para la SO<sub>2</sub>. El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró la señal para el SO-CH<sub>3</sub> a 3.07 ppm y SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> a 3.69 ppm en vez de 2.84 ppm para el -SCH<sub>3</sub> cuando no está oxidado el azufre. También los espectros de masa mostraron la diferencia entre SO y SO<sub>2</sub>.

**Tabla 4.6.** Constantes físicas y espectroscópicas de los metabolitos del compuesto Alfa

 <p>5-Cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol AlfaSO (4-7)</p>	<p>pf: 190.8–191.1 °C R<sub>f</sub>: 0.32, Sistema CHCl<sub>3</sub>-MeOH 97:3+1 gota de NH<sub>4</sub>OH</p> <p>IR (FTIR reflectancia) cm<sup>-1</sup>: 3095-3042 (Ar-H), 2937–2770 (C-H Alif.), 1260 (C-O-C), 1046 (S=O), 970 (C-Cl).</p> <p><b>Espectro 24</b>, RMN <sup>1</sup>H, (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm: 3.08 (s, 3H, SO-CH<sub>3</sub>); 6.74 (d, <i>J</i>= 6.2 Hz, 1H, H-2'); 7.34 (s, 1H, H-4); 7.40 (t, <i>J</i><sub>1</sub>= 8.1 Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 7.8 Hz, 1H, H-3'); 7.55–7.62 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.69 (d, <i>J</i>= 8.2 Hz, 1H, H-4'); 7.96–7.99 (m, 2H, H-5', H-7); 8.19–8.22 (m, 1H, H-8'); 13.74 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, N-H).</p> <p><b>Espectro 26</b>, RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm: 40.49, 121.29, 123.03, 124.97, 126.05, 126.31, 126.92, 127.87, 128.32, 134.52, 152.89, 157.30.</p> <p><b>Espectro 27</b>, EM (ID/IE) <i>m/z</i>: 356 (M<sup>+</sup>, 100%), 358 (M+2, 40%), 341 (M–15, 72%), 306 (M–50, 66%).</p> <p><b>Espectro 28</b>, EMAR: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>ClS: 356.0386; encontrado 356.0308.</p>
 <p>5-Cloro-2-(metilsulfonil)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol AlfaSO<sub>2</sub> (4-8)</p>	<p>Pf: 157.8–158.8 °C R<sub>f</sub>: 0.16, Sistema CHCl<sub>3</sub>-MeOH 97:3+1 gota de NH<sub>4</sub>OH</p> <p>IR (FTIR reflectancia) cm<sup>-1</sup>: 3252 (N-H), 3054-3021 (Ar-H), 2924-2858 (C-H Alif.), 1315 y 1135 (-S=(O)<sub>2</sub>), 1260 (C-O-C), 982 (C-Cl).</p> <p><b>Espectro 30</b>, RMN <sup>1</sup>H, (300 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm: 3.69 (s, 3H, -S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 6.78 (d, <i>J</i>= 7.5 Hz, 1H, H-2'); 7.34 (sa, 1H, H-4); 7.41 (t, <i>J</i><sub>1</sub>= 8.1 Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 7.8 Hz, 1H, H-3'); 7.54–7.61 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.70 (d, <i>J</i>= 8.4 Hz, 1H, H-4'); 7.96–7.99 (m, 1H, H-5'); 8.06 (sa, 1H, H-7); 8.12–8.15 (m, 1H, H-8), 14.2 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, N-H).</p> <p><b>Espectro 31</b>, RMN <sup>13</sup>C, (75 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) δ ppm: 42.40, 121.21, 123.34, 124.00, 126.06, 126.43, 126.96, 127.92, 134.55, 150.70, 152.541.</p> <p><b>Espectro 32</b>, EM (ID/IE) <i>m/z</i>: 372 (M<sup>+</sup>, 100%), 374 (M+2, 40%), 337 (M–35, 48%), 258 (M–114, 59%).</p> <p><b>Espectro 33</b>, EMAR: calculado para C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>ClS: 372.0335, encontrado 372.0342.</p>

4.11.2. Parte Biológica

4.11.2.1. Evaluación *in vitro* del compuesto Alfa

Al compuesto Alfa se le determinó la actividad fasciolicida *in vitro* contra metacercarias de *F. hepatica* recién desenquistadas empleando diferentes concentraciones, además de la ensayada de forma preliminar. La actividad del compuesto Alfa se comparó con la del diamfenetide desacetilado, un fenoxialcano que es altamente efectivo contra las fasciolas inmaduras desde un día a 6 semanas. Las concentraciones que se emplearon fueron de 146.70, 29.34, 9.68, 3.22, y 1.08  $\mu\text{M}$ . La actividad se midió después de 4 días de exposición al compuesto, y se compararon frente a un control sin tratamiento. A partir de 9.68  $\mu\text{M}$  el compuesto fue activo en 77.5% y a 29.34  $\mu\text{M}$  ya fue activo al 100%.<sup>27</sup> Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7.** Actividad biológica *in vitro* del compuesto Alfa (4-6) contra metacercarias de *F. hepatica*<sup>a</sup>

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Eficacia (%)	
	Compuesto Alfa (4-6)	Diamfenetide desacetilado
146.7	100 <sup>b</sup>	nd <sup>d</sup>
34.68 <sup>c</sup>	nd	100
29.34 <sup>c</sup>	100 <sup>b</sup>	nd
9.68	77.5	nd
3.81	nd	100
3.22	0.0	nd
1.08	0.0	100

<sup>a</sup>Experimento llevado a cabo por triplicado. <sup>b</sup>Causó lisis de las metacercarias. <sup>c</sup>Dosis equivalente a 10 mg/mL. <sup>d</sup>nd= No determinado.

4.11.2.2. Evaluación del compuesto Alfa en ovinos

4.11.2.2.1 Administrado en cápsulas de gelatina

En un ensayo preliminar *in vivo* en ovinos, el compuesto Alfa mostró eficacia de 80.6 y 86.9% a dosis de 10 y 15 mg/kg de peso, respectivamente (Tabla 4.8). El ensayo se hizo contra fasciolas adultas de 10 semanas, el compuesto se administró al ganado en cápsulas de gelatina.<sup>27</sup>

4.11.2.2.2. Administrado en suspensión DMSO-agua

En otro estudio *in vivo* en borregos se evaluó la actividad del compuesto Alfa en metacercarias jóvenes (de 4 semanas) y adultas (de 8 semanas) a dosis de 10, 15, 22.2 y 30 mg/kg; la eficacia promedio en ambos estadios fue 82, 87.6, 89.2 y 92.4%, respectivamente (Tabla 4.8). El producto se administró en suspensión acuosa en DMSO al 5% agua. Aquí se demostró que el compuesto es efectivo en todos los estadios de

*Fasciola*. De este estudio se determinó la dosis de 15 mg/kg como sugerida para los siguientes experimentos en ovinos.<sup>28</sup>

**Tabla 4.8.** Eficacia *in vivo* del compuesto Alfa a 4, 8 y 10 semanas de desarrollo de la *F. hepatica*

Dosis mg/kg de peso	% de eficacia			
	Semanas de desarrollo de las fasciolas			
	juveniles de 4 semanas <sup>a</sup>	adultas de 8 semanas <sup>a</sup>	promedio 4-8 semanas	adultas 10 semanas <sup>b</sup>
10	82.2	81.7	82	80.6
15	87.2	88.1	87.6	86.9
22.2	90.8	94.3	89.2	--
30	87.2	90.0	92.4	--
testigo	0	0	0	0

<sup>a</sup>Compuesto administrado en suspensión DMSO 5%-Agua; <sup>b</sup>compuesto administrado en cápsulas de gelatina.

#### 4.11.2.2.3. Evaluación del compuesto Alfa en una formulación en ovinos

En un experimento para evaluar la eficacia del compuesto Alfa formulado en suspensión, se infectaron experimentalmente 60 borregos con metacercarias de *F. hepatica*. Los animales se dividieron en 12 grupos de 5 c/u. Seis grupos se trataron con el compuesto Alfa recién formulado en suspensión, a dosis de 15 mg/kg de peso, desde 3 días hasta 10 semanas post-infección; los otros seis grupos sirvieron como controles sin tratamiento. Cuatro semanas después de cada tratamiento, los animales se sacrificaron para coleccionar los hígados y determinar el % de eficacia del compuesto de acuerdo a la fórmula de Foreyt.<sup>29</sup>

$$\% \text{ de Eficacia} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

donde A es el número de fasciolas en el grupo control  
y B es el número de fasciolas en el grupo tratado

Los resultados se muestran en la Tabla 4.9. Como se puede ver, la dosificación en suspensión fue determinante para el incremento de la actividad fasciolicida. El compuesto fue igualmente efectivo en todas las fases de desarrollo de la *Fasciola*, desde inmaduras (3 días) hasta adultas (10 semanas) a diferencia de algunos fármacos, como clorsulón, nitroxinil o cosantel que solamente son efectivos contra parásitos de seis semanas o más.<sup>30</sup>

**Tabla 4.9.** Eficacia del compuesto Alfa vs. Fasciolas juveniles y adultas en borregos infectados experimentalmente

Grupo (n=5)	Tiempo de desarrollo de la <i>F. hepatica</i> al momento del tratamiento	Eficacia (%) a 15 mg/kg <sup>a</sup>
1	3 días	100
2	Control	0
3	2 semanas	100
4	Control	0
5	4 semanas	100
6	Control	0
7	6 semanas	100
8	Control	0
9	8 semanas	100
10	Control	0
11	10 semanas	100
12	control	0

<sup>a</sup>Previamente formulado con pectina, carboximetilcelulosa de baja y mediana densidad, sacarina, metilparabeno y propilparabeno<sup>31</sup>

#### 4.11.2.3. Evaluación del compuesto Alfa en bovinos

El compuesto Alfa se evaluó en ganado bovino en varios experimentos en la tesis de Doctorado de Yolanda Vera.<sup>32</sup>

##### 4.11.2.3.1. Determinación de la dosis efectiva en bovinos

Se determinó la dosis efectiva en ganado bovino infectado de forma experimental y natural. Para ello se realizaron dos experimentos empleando toretes y novillos. En el primer experimento los animales con 4 y 10 semanas de infección con *F. hepatica* se trataron con suspensión del compuesto Alfa a dosis de 10, 12 y 14 mg/kg de peso. En el segundo experimento, los novillos infectados naturalmente se trataron con las mismas dosis. A los 20 días post-tratamiento se realizó el conteo de huevos y fasciolas.

**Tabla 4.10.** Porcentaje de efectividad del compuesto Alfa a diferentes dosis en ganado bovino

Dosis mg/Kg de peso	% de reducción en animales experimentalmente infectados		% de reducción en animales naturalmente infectados	
	huevos <sup>a</sup>	fasciolas <sup>b</sup>	huevos <sup>a</sup>	fasciolas <sup>b</sup>
10	97.3	94.3	87.5	84.2
12	100	100	99.1	99.6
14	100	100	100	100

<sup>a</sup>Determinado por conteo coproparasitológico. <sup>b</sup>Determinado por conteo directamente en hígado.

De este experimento se concluyó que la dosis efectiva del compuesto Alfa en bovinos con infección inducida o natural es de 12 mg/kg de peso.<sup>33</sup>

##### 4.11.2.3.2. Eficacia del compuesto Alfa contra *F. hepatica* de 4 y 10 semanas de desarrollo en bovinos, comparada con el TCBZ.

En este estudio se evaluó la actividad fasciolicida del compuesto Alfa en novillos infectados experimentalmente en dos ocasiones al día 0 y día 45, con el objetivo de tener

fasciolas en distintas fases de desarrollo. Al día 75 post-infección, los animales se trataron con suspensión del compuesto Alfa a 12 mg/kg de peso, un grupo semejante (infectado de la misma manera) se trató con TCBZ y un tercer grupo sirvió como testigo. El día 45 post-tratamiento del estudio, los animales se sacrificaron para realizar la medida y conteo de los parásitos en los hígados. Los resultados indicaron 100% y 99.4% de reducción de las fasciolas de 4 y 10 semanas de desarrollo respectivamente, para el compuesto Alfa y de 100% para el TCBZ en ambas etapas. No hubo diferencia significativa entre Alfa y TCBZ.<sup>34</sup>

4.11.2.3.3. Eficacia del compuesto Alfa contra *F. hepatica* en diferentes etapas de desarrollo en bovinos

Un experimento más completo se desarrolló infectando los animales con varias cargas de metacercarias de *F. hepatica* con el propósito de tener fasciolas de diversas edades al momento del tratamiento con una suspensión del compuesto Alfa a dosis de 12 mg/kg de peso. En la Tabla 4.11 se muestran los resultados después del conteo de las fasciolas y compararse con los testigos.<sup>35</sup>

**Tabla 4.11.** Eficacia del compuesto Alfa contra *F. hepatica* de 3 días a 12 semanas de desarrollo en bovinos

	% de reducción a dosis 12 mg /kg de peso		
	Tiempo de desarrollo de las fasciolas		
3 días-2 semanas	3-4 semanas	6-8 semanas	10-12 semanas
100	96.4	99.0	100

4.11.2.3.4. Eficacia del compuesto Alfa comparado con otros fasciolicidas en bovinos naturalmente infectados

En este estudio se comparó la eficacia del compuesto Alfa en vacas, infectadas naturalmente, con tres fasciolicidas ya existentes en el mercado: triclabendazol, clorsulón y closantel. La eficacia del compuesto Alfa a los 14 y 21 días del tratamiento fue equiparable a la de los fármacos estudiados, con 98.5% de eficacia, mientras que para TCBZ fue 97.9%, para el closantel 97.7% y para el clorsulón 97.9%; lo que indica una alta eficacia del compuesto Alfa en condiciones de ganado en el campo.<sup>36</sup>

4.11.2.3.5. Determinación de la dosis máxima tolerada (DMT) e índice de seguridad (IS) en bovinos

En este estudio se determinó la dosis máxima tolerada, así como posibles efectos secundarios provocados por el compuesto Alfa. Se trataron cinco grupos de 3 animales c/u con dosis de 12, 36, 60, 120 y 180 mg/kg de peso. A los animales se les determinaron

sus parámetros bioquímicos, hematológicos y fisiológicos en tiempo 0, 4, 8, 16, 128 y hasta 720 h post-tratamiento. Durante el transcurso del experimento todas las valoraciones fueron prácticamente constantes, excepto para el grupo de animales tratados con 180 mg/kg de peso, en el que éstos manifestaron alteraciones en la frecuencia cardíaca y respiratoria, sin producir mayor daño. Se determinó que la DMT para el compuesto Alfa es de 180 m/kg de peso y su índice de seguridad es de 15 veces la dosis efectiva. El índice de seguridad del TCBZ es de 20; sin embargo, produce fotosensibilidad e inflamación de la piel y las ubres, lo que no se observó con el compuesto Alfa. Por los resultados anteriores se postula que el tratamiento con el compuesto Alfa es seguro en bovinos.<sup>37</sup>

Por otro lado, también se evaluó el efecto del compuesto Alfa en vacas de 2, 3, 6 y 9 meses de gestación tratadas con una única dosis de 12 mg/kg de peso. No se observaron abortos en los 24 animales del experimento, ni daño aparente en los becerros recién nacidos, ni en las madres durante el mes que duró el experimento. Con esto se demuestra que el compuesto Alfa no es teratogénico.<sup>38</sup>

#### 4.11.2.3.6. Determinación de la concentración residual del compuesto Alfa en leche en bovinos

Se realizó un estudio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para determinar la concentración del compuesto Alfa en vacas de producción lechera a diferentes tiempos: desde 1 h hasta 1024 h. La máxima concentración detectada del metabolito AlfaSO con la metodología implementada fue de 12 ng/mL. El experimento se corrió hasta las 72 h post-tratamiento, donde ya no se observó el metabolito o metabolitos del Alfa. Este resultado es poco confiable, y no se pudo determinar el tiempo de retiro en leche. Se requiere el desarrollo de una mejor metodología para la determinación.<sup>32</sup>

#### 4.11.2.4. Desarrollo de una mejor formulación en suspensión del compuesto Alfa

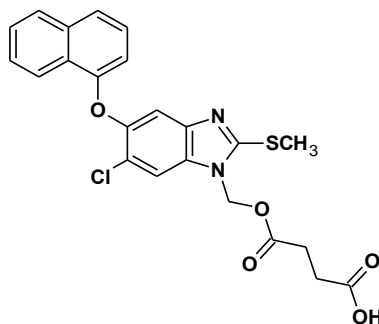
Después de comprobar la eficacia *in vivo* del compuesto Alfa, se realizó un estudio para desarrollar una metodología para preparar una mejor formulación de este compuesto. Este trabajo fue desarrollado por David Tamayo Esquivel en su tesis de Licenciatura<sup>39</sup> y por la M. en C. Socorro Alpízar. En la Tabla 4.12 se muestran los componentes de la formulación que cumplió con las características físicas, organolépticas, de pH y concentración adecuadas; por lo que fue esta suspensión la que se utilizó para las posteriores evaluaciones *in vivo*.



**Tabla 4.12.** Componentes de la Formulación del compuesto Alfa<sup>39</sup>

Componentes	p/100 mL	p/1 L	
Metiparabeno	0.18 g	1.8 g	Características de la formulación: Suspensión color blanco, homogénea, físicamente estable, de viscosidad de 148-182 cps, pH 5.4, de fácil manejo y administración.
Propilparabeno	0.02 g	0.2 g	
Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g	
CMC (baja viscosidad)	0.5 g	5.0g	
CMC (media viscosidad)	0.5 g	5.0 g	
Caolín coloidal	7.5 g	75.0	
Aerosil 200	1.5 g	15.0 g	
Compuesto Alfa	10.0 g	100 g	
H <sub>2</sub> O purificada c.b.p	100 mL	1L	Concentración: 100 mg/mL

Con el propósito de aumentar la solubilidad del compuesto Alfa, se ha incursionado en la síntesis de algunos derivados biorreversibles, estables en medio acuoso y solubles con miras a tener una formulación inyectable para mejor dosificación del compuesto en animales. En este sentido el ácido 4-[[6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metoxi]-4-oxobutanoico fue el compuesto sintetizado que resultó únicamente 2.2 veces más soluble que el compuesto Alfa en medio acuoso, lo cual es insuficiente para una formulación en solución.<sup>40</sup> Estudios en esta área están siendo desarrollado en nuestro laboratorio.



Ácido 4-[[6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol-1-il]metoxi]-4-oxobutanoico

#### 4.11.2.5. Farmacocinética del compuesto Alfa

##### 4.11.2.5.1. Desarrollo de un método analítico para la determinación del compuesto Alfa y sus metabolitos en fluidos biológicos

Debido a la necesidad de evaluar los parámetros farmacocinéticos del compuesto Alfa en animales y de contar con una metodología analítica confiable para la determinación del compuesto y sus metabolitos en fluidos biológicos, se desarrolló un método analítico utilizando la técnica CLAR en plasma y orina. El estudio se desarrolló en borregos

tratados con dosis de 12 mg/kg de peso. Se utilizó detector de UV a 304 nm, una columna C18 y una fase móvil de MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O. (40:40:30 v/v). El método es sensible para llevar a cabo los estudios de farmacocinética.<sup>41</sup>

4.11.2.5.2. Determinación de los parámetros farmacocinéticos del compuesto Alfa en ovino y bovinos

En dos estudios separados y uno dual se evaluó la farmacocinética del compuesto Alfa en ovinos y bovinos.<sup>42</sup> Se estudió la farmacocinética en muestras de sangre de animales tratados con una suspensión del compuesto Alfa a 12 mg/kg de peso por un periodo de 144 h, empleando CLAR. El compuesto Alfa no se detectó en sangre, sino sus metabolitos oxidados AlfaSO y AlfaSO<sub>2</sub>, al igual que sucede con el TCBZ.

También se determinaron las propiedades fisicoquímicas de solubilidad, pKa y el logP del compuesto Alfa experimentalmente.

El compuesto Alfa tiene un pKa de 2.87, lo que lo clasifica como una base débil; un logP 1.44 lo que indica la naturaleza poco polar de la molécula por lo que es muy insoluble a pH fisiológico (>0.02 µg/mL), y más o menos soluble en solución de HCl 0.1 M (10 µg/mL). La unión del AlfaSO a proteínas plasmáticas es de 82-86%, menos que TCB (99%)<sup>8</sup>.

En la Tabla 4.13 se muestran los tiempos de vida media determinados del estudio en ambos animales. En la tabla se puede ver que hay diferencias significativas en el metabolismo entre ovinos y bovinos. Los  $t_{1/2}$  en bovinos son significativamente mayores que en ovinos, lo que justifica la diferencia en la dosis efectiva: 12 mg/kg de peso en ovinos vs. 15 mg/kg de peso en bovinos. La concentración máxima de AlfaSO y AlfaSO<sub>2</sub> también se alcanza más rápido en ovinos que en bovinos, primero se detecta el AlfaSO. Los resultados son ligeramente diferentes entre el compuesto Alfa y el TCBZ; aunque, conservan la misma tendencia. Los tiempos prolongados de vida media del compuesto Alfa, en forma de SO y SO<sub>2</sub>, lo postulan como un buen candidato de fármaco fasciolicida. La pobre solubilidad sugiere la realización de mayores estudios encaminados a mejorar esta propiedad.

**Tabla 4.13.**  $t_{1/2}$  y  $t_{max}$  de los metabolitos de Alfa y TCBZ en ovinos bovinos

Especie	Compuesto	$t_{1/2}$ (h) Tiempo de vida media	$t_{max}$ (h) Tiempo para alcanzar max. conc. en sangre
Ovinos	AlfaSO	19.86 ± 1.18	14.10 ± 6.44
	AlfaSO <sub>2</sub>	19.43 ± 3.33	23.34 ± 7.42
Bovinos	TCBZSO	16.0 ± 1.7	34.1 ± 1.8
	TCBZSO <sub>2</sub>	25.4 ± 1.0	42.0 ± 2.4
	AlfaSO	29.87 ± 8.84	33.43 ± 4.72
	AlfaSO <sub>2</sub>	46.32 ± 15.23	65.14 ± 6.41
	TCBZSO	23.8 ± 8.85	30.00 ± 6.57
	TCBZSO <sub>2</sub>	52.9 ± 8.5	42.00 ± 6.6

4.11.2.6. Estudios sobre el efecto del compuesto Alfa en la estructura y ultraestructura de la *F. hepatica*

4.11.2.6.1. Efecto del compuesto Alfa en el tegumento de fasciolas maduras y juveniles endémicas de México

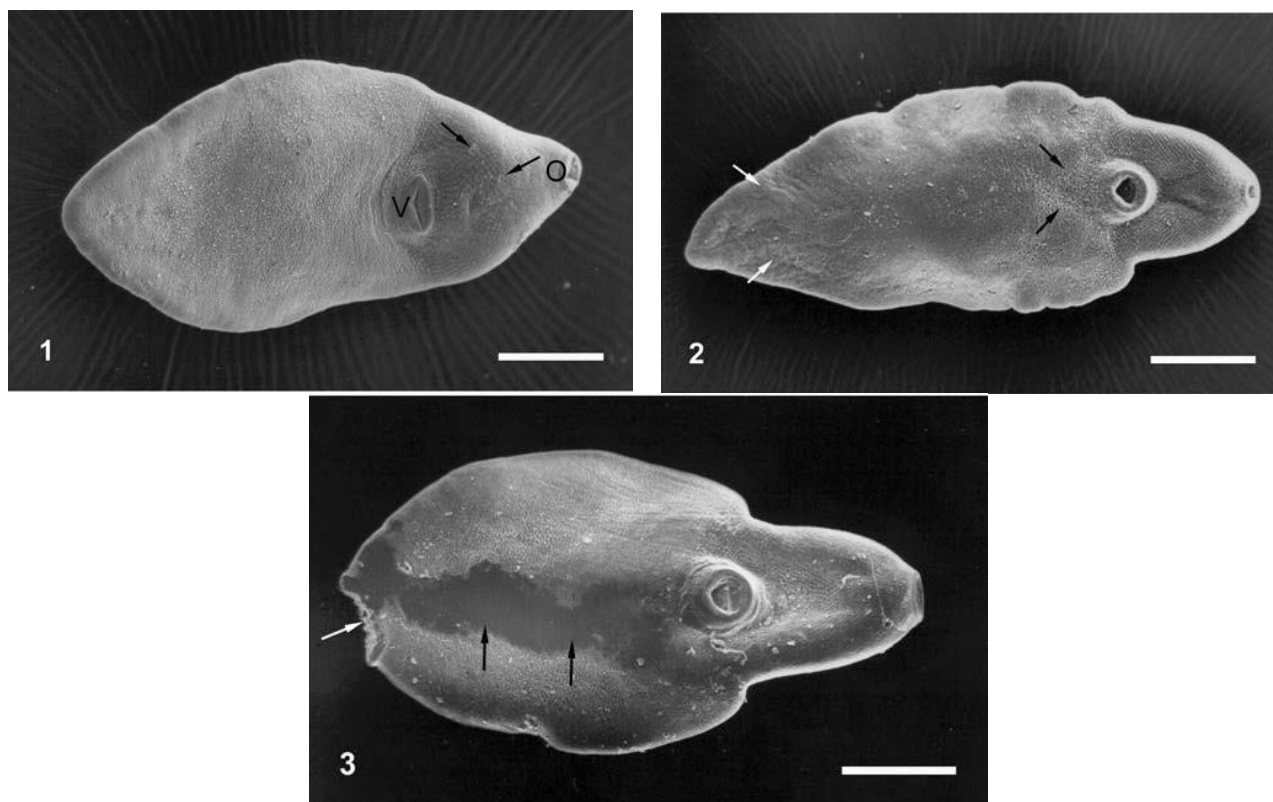
Para la evaluación del efecto del compuesto Alfa sobre fasciolas maduras se realizaron dos experimentos con fasciolas adultas y uno con juveniles. El primero fue un estudio *in vitro* en el que se expusieron fasciolas de 12 semanas de edad, cultivadas en el laboratorio por infección del caracol *Lymnaea cubensis*, al AlfaSO a una concentración de 40 mg/L; después de 6, 12 y 24 h se analizó el daño estructural mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En el segundo estudio 9 borregos se infectaron con metacercarias de *F. hepatica* y a las 12 semanas post-infección se trataron con una suspensión del compuesto Alfa a dosis 10 mg/kg de peso. Las fasciolas adultas se extrajeron de los animales a diferentes tiempos post-tratamiento (6, 12 y 24 h); luego se examinaron al microscopio electrónico para evaluar el daño.

Los resultados de este estudio mostraron daño progresivo en el cuerpo del parásito. A las 6 h post-tratamiento se observaron protuberancias y surcos anormales, a las 12 h las espinas empiezan a caer y el tegumento se rompe mayormente en la parte ventral; a las 24 h hay pérdida importante del tegumento y exposición de la lámina basal.

En un tercer experimento se determinó el daño causado por el compuesto Alfa en fasciolas juveniles de tres semanas. El experimento se realizó de la misma forma que el anterior, la evaluación del daño se realizó por MEB.<sup>46</sup>

A las 6 h se observaron protuberancias y ampollas en la superficie ventral y la región anterior; a las 12 h post-tratamiento se observó desorden estructural y pérdida de las espinas; y a las 24 h, franca pérdida del tegumento con exposición de la lámina basal.

Esto sugiere daño a nivel de microtúbulos y/o actina; ya que el tegumento es rico en tubulina y las espinas en actina. En la Figura 4.5 se muestran micrografías del daño causado por Alfa en las fasciolas juveniles.



**Figura 4.5.** *Fasciola hepatica* a las 6 h (1), 12 h (2) y 24 h (3) tras exposición al compuesto Alfa. La microscopía electrónica de barrido muestra daño al tegumento de la superficie ventral (flechas negras). Es notoria la pérdida del tegumento después de 24 h, así como el disco succionador (O) y el tegumento de la parte posterior (flechas blancas).

#### 4.11.2.6.2. Efecto del compuesto Alfa en el tegumento de fasciolas maduras e inmaduras de cepas Sligo, TCBZ-resistentes y Collumpton, TCBZ susceptibles

Se realizaron tres experimentos, *in vitro*, utilizando MEB, MET y ensayos inmunocitoquímicos de tubulina-Inmunoreactiva (ICQ, tubulina-IR) con cepas resistente a TCBZ y susceptibles a TCBZ.

En el primer experimento, fasciolas adultas de la cepa Sligo, TCBZ-resistentes, se expusieron al metabolito AlfaSO a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se evaluó el daño a las 24 h de incubación.

Los resultados por la técnica MEB coincidieron con los reportados por Rivera *et al.*<sup>46</sup> Se observó daño en la superficie del tegumento en forma de ampollas y protuberancias, gran pérdida de las espinas en la superficie ventral y en el cono oral, así como desprendimiento del tegumento en las márgenes laterales. Figura 4.6.

La MET reveló inflamación en los alrededores de las mitocondrias dentro de las células tegumentales, proliferación de cuerpos celulares T2, pero no complejos de Golgi.

Los estudios ICQ mostraron que la incubación con AlfaSO no causó cambios significativos en la distribución de la tubulina de las células tegumentales, de las cepas resistentes al igual que sucede con ABZSO y TCBZSO.

De estos resultados se concluye que el AlfaSO afecta considerablemente a las fasciolas adultas resistentes al TCBZ, pero no a nivel de la estructura de tubulina.<sup>48</sup>

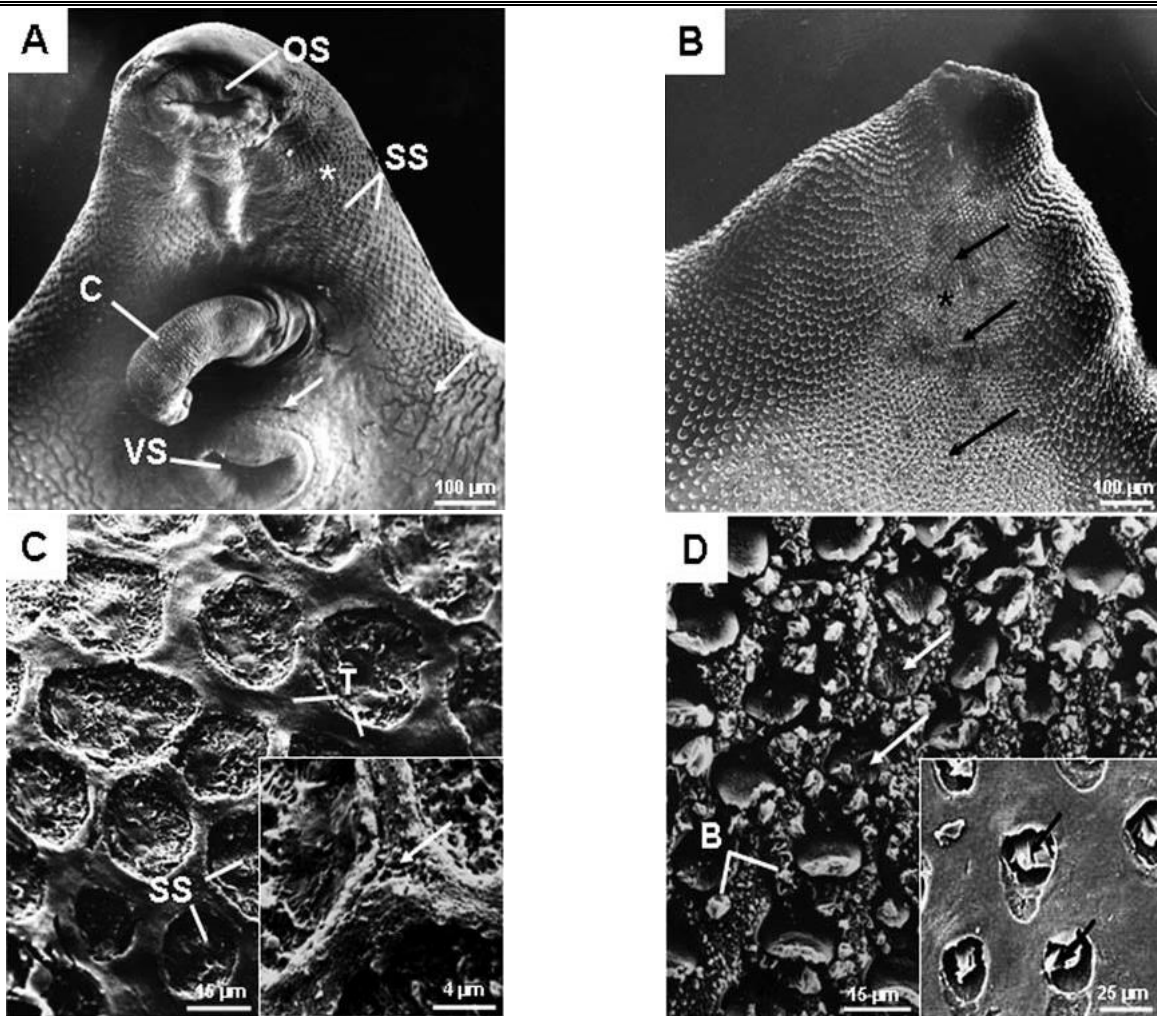
El segundo experimento, a nivel de estructura y subestructura, con fasciolas susceptibles a TCBZ, se realizó por exposición de las *F. hepatica*, de la cepa Collumpton al AlfaSO a 10 µg/mL. Se encontró que este compuesto altera significativamente la organización de la tubulina en la estructura de las capas del sincitio, lo que sugiere que posiblemente la tubulina de *Fasciola* sea un blanco para la acción del compuesto Alfa, de la misma manera que para el TCBZ. Sin embargo, la diferencia estructural entre AlfaSO y TCBZSO podría modificar el sitio de unión de AlfaSO en la tubulina.

Estos resultados indican que posiblemente el compuesto tenga un efecto de acción dual, a nivel de tubulina y otro, posiblemente actina, ya que las espinas están formadas de esta proteína, y sufren daño considerable por efecto del AlfaSO.

En un tercer experimento, fasciolas juveniles de la cepa Sligo, TCBZ-resistentes, se incubaron *in vitro* con 10 µg/mL de AlfaSO. Por técnicas de microscopia electrónica MEB, MET e inmunocitoquímica (ICQ) se estudiaron los cambios en la estructura y subestructura del parásito a 6 y 18 h de incubación. A las 18 h se observaron los cambios más evidentes.

Por MEB se observaron protuberancias y ampollas en el tegumento en la superficie ventral y dorsal, pero en menor grado que con las fasciolas adultas.

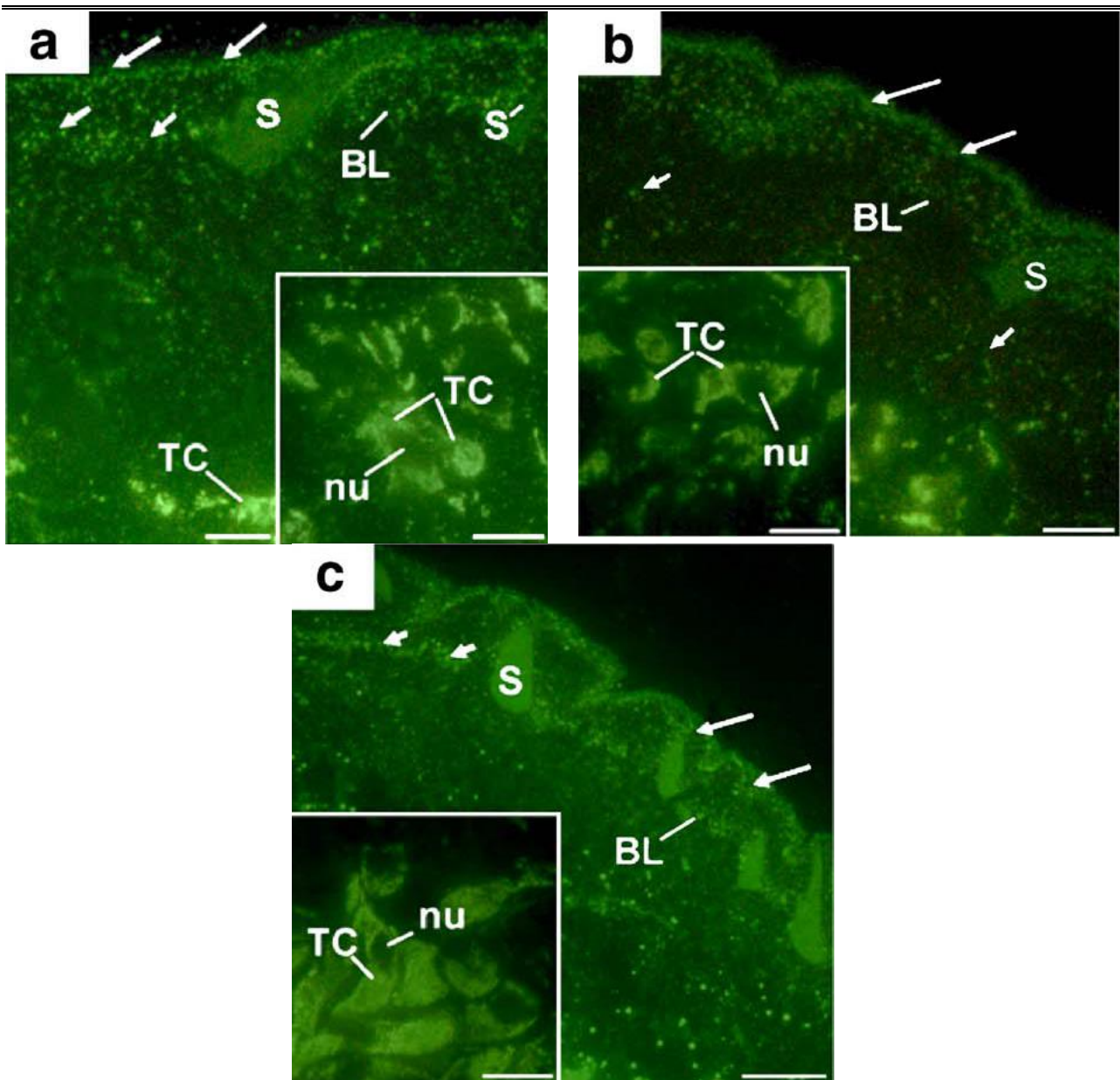
Así mismo, la MET reveló inflamación de las mitocondrias y cuerpos basales, también se observó disminución de cuerpos secretores T1 y T2, diferente a lo observado con fasciolas a las adultas en donde hubo proliferación de cuerpos T2. También fue notoria la ruptura y disminución de las fibras musculares circulares bajo las espinas, lo que causó pérdida de motilidad.<sup>49</sup>



**Figura 4.6.** Microscopía electrónica de barrido de la superficie del tegumento de *Fasciola hepatica* resistentes a TCBZ después de 24 h de la exposición al metabolito AlfaSO. (A) Se observa daño evidente en la superficie del tegumento (flechas), el disco y el succionador ventral (OS y VS) y en las espinas (SS). (B) Imagen de la superficie dorsal de *F. hepatica*. (C y D) Amplificación de la zona dorsal. Es evidente la pérdida de las espinas, importantes para la adhesión y permanencia del parásito en el huésped.

El estudio de ICQ, no reportó daño estructural en la tubulina-IR, en el sincitio tegumento, células citoplasmáticas conectoras ni células tegumentales, por lo que el efecto de AlfaSO no es sobre la estructura de la tubulina, sino que sobre otro blanco, posiblemente la actina. Figura 4.7.

Los resultados de estos experimentos no están en concordancia con lo realizados con cepas de *F. hepatica* endémicas de México, en donde se observó que el daño por el AlfaSO fue mayor sobre las fasciolas juveniles de 3 semanas de edad que sobre las adultas. La diferencia entre los experimentos es que para las fasciolas juveniles, en el estudio mexicano, se realizó *in vivo*; por lo que el entorno fisiológico es diferente para los parásitos. Además no debemos olvidar que el metabolismo del huésped sigue activo y que el sulfóxido se transforma a la sulfona, lo que tal vez concuerde con un mayor daño sobre la fase juvenil.



**Figura 4.7.** Ensayos de inmunotinción de tubulina en células del tegumento de *F. hepatica* sin tratamiento (a), y tras su exposición al metabolito sulfóxido de Alfa a la concentración de 10 mg/mL a las 6 h (b) y 18 h (c). Lámina basal (BL), núcleo celular (nu), célula tegumental (TC), espinas (S). En las células sin tratamiento se observa ligero incremento de la inmunotinción en la zona de la membrana apical (fechas largas) y de la membrana basal (flechas cortas). En el recuadro se observa fuerte inmunoreactividad alrededor del núcleo celular (nu). A las 6 h de exposición de observa una disminución en la intensidad en la zona de la membrana basal y apical, la zona alrededor del núcleo se mantiene sin cambios. Además es notoria la presencia de cuerpos de secreción, los cuales son generados por el parásito para reparar el daño celular. Este incremento puede indicar una respuesta al stress, incrementando el transporte y liberación de los cuerpos de secreción en la célula, observándose la aparición de la línea intensa en la membrana apical, lo que eventualmente lleva al daño en la membrana. A las 18 h de la exposición se observa fuerte intensidad en la zona basal y apical. Hay una disminución significativa de cuerpos de secreción, esto puede deberse a la disminución en la capacidad de la reparación del daño. A pesar de ello, las modificaciones en la distribución de los microtúbulos no son muy evidentes, por lo que la acción del compuesto puede tener un mecanismo alterno de alteración en proteínas estructurales, tales como la actina.<sup>49</sup>

4.11.2.6.3. Efecto en el tegumento de *F. hepatica* adulta y juvenil después del tratamiento con el compuesto Alfa en ovinos irlandeses.

Se corrieron dos experimentos semejantes a los del apartado anterior, con el propósito de estudiar el daño a nivel de estructura sobre *F. hepatica* adultas y juveniles, con la diferencia de que las fasciolas se crecieron *in vivo* en borregos infectados con el trematodo de la cepa Collumpton, TCBZ susceptibles. Cuando las fasciolas alcanzaron 4 ó 12 semanas de desarrollo, los borregos se trataron con una dosis de 15 mg/kg de peso; luego, éstas se extrajeron de los hígados del huésped a las 6, 24 y 72 h post-tratamiento, y se analizaron por MEB y MET.

Los resultados mostraron que el efecto es directamente proporcional al tiempo, los cambios más evidentes se observaron hasta las 72 h, en las dos etapas de desarrollo.

En las fasciolas adultas el daño en el tegumento se observó (MEB) ligeramente a partir de las 24 h; a las 48 h hubo reducción evidente de la movilidad; a las 72 h post-tratamiento se observó daño extenso en el tegumento, se observaron protuberancias y ampollas, pérdida de las espinas, exposición de la lámina basal de la parte posterior y en los casos más severos se observó ruptura de la lámina basal con exposición de la musculatura subyacente. Estos cambios conducen a la eliminación de los parásitos, lo que concuerda con los altos valores de eficacia reportados.<sup>50</sup>

Resultados semejantes se obtuvieron con fasciolas juveniles de 4 semanas en donde el daño observado por MEB fue gradual. A las 48 h se empiezan a observar los cambios en la disrupción del tegumento, siendo muy extensa la ruptura a las 72 h. Se observaron grandes áreas de sincitio tegumental y lámina basal expuesta con presencia de vacuolas autofágicas.

Por MET se observó ruptura progresiva de mitocondrias, pérdida de cuerpos secretorios T1. Las células musculares longitudinales y circulares en algunos casos desaparecieron.

En comparación con el efecto reportado con las fasciolas mexicanas, en este estudio se observa daño más severo sobre la *F. hepatica* de la cepa Collumpton; sin embargo, en las otras el daño fue más rápido (12 h post-tratamiento). Si bien ambas cepas son susceptibles a TCBZ, sus orígenes son diferentes lo que puede modificar la susceptibilidad.<sup>51</sup>



4.11.2.6.4. Estudio sobre los cambios ultraestructurales en el sistema tegumental y células gastrodérmicas de *F. hepatica* adulta después del tratamiento *in vivo* con el compuesto Alfa

Con el propósito de conocer un poco más sobre el modo de acción del compuesto Alfa, y de cómo éste se introduce en el parásito, se realizó un estudio con fasciolas adultas obtenidas de hígados de borregos irlandeses tratados con 15 mg/kg de peso de Alfa, a 24, 48 y 72 h post-tratamiento.

Los resultados de MET mostraron el sincitio tegumental más dañado que el intestino en todas las mediciones, lo que sugiere que la entrada del compuesto no fue vía la cavidad oral, sino a través del tegumento. Éste sufrió daño gradualmente; a las 48 h las espinas empiezan a caerse; generalmente, las espinas permanecen unidas a la lámina basal hasta que el tegumento se pierde. A las 72 h post-tratamiento el daño es severo y se acompaña de pérdida de movilidad lo que ocasiona que las fasciolas no se alimenten por lo que caen en inanición. Esta pérdida de movilidad se vio asociada a la destrucción de las células musculares.

Otro cambio, tiempo dependiente, que se observó fue en las mitocondrias, su deterioro fue progresivo empezando desde las 24 h y fue en aumento hasta las 72 h, por lo que es poco probable que el efecto se deba a desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. También se observó formación de vacuolas indicando ruptura celular. Es posible que otra estructura del citoesqueleto, por ejemplo actina, sea el blanco del compuesto ya que AlfaSO tuvo efecto sobre fasciolas resistentes a TCBZ y no se observó, por estudios inmunocitoquímicos, relación con desestabilización de la tubulina-inmunoreactiva.<sup>52</sup>

4.11.2.5.5. Evaluación de la eficacia del compuesto Alfa *in vivo* vs fasciolas resistentes y susceptibles a TCBZ en ovinos irlandeses.

Se realizó un estudio *in vivo* de la eficacia de Alfa en borregos irlandeses infectados experimentalmente con cepas de fasciolas resistentes (Sligo) o susceptibles (Collumpton) a TCBZ a diferentes etapas de desarrollo: 3 días, 4 y 12 semanas. Este estudio se realizó en ovejas a una dosis de 15 mg/kg de peso en las fases juvenil y adultas de la *F. hepatica*. Paralelamente se realizó un experimento con TCBZ con el propósito de comparar la eficacia de ambos fármacos. Como parámetro de efectividad se midió la excreta de huevos. El compuesto Alfa fue muy efectivo en las cepas adultas susceptibles a TCBZ, mostrando una disminución del 100% en la producción de huevos; mientras que solamente mostró 62.5% de reducción de la carga parasitaria en fasciolas jóvenes susceptibles a TCBZ, cuando éste tuvo una eficacia de 98% en la reducción de fasciolas

adultas. En el caso de la infección con la cepa resistente, no se observó disminución en la producción de huevos. Este resultado se contrapone a lo encontrado el estudio *in vitro* en el que se observó severos cambios, no dependientes de tubulina, en el tegumento de las fasciolas a las 18 h de exposición al compuesto Alfa. Estos resultados sugieren mayores estudios para determinar la efectividad de Alfa *in vivo* contra fasciolas resistentes. Tomado en cuenta que la máxima dosis tolerada es de 180 mg/kg de peso en bovinos, podría analizarse un ajuste de la dosis.<sup>53</sup>

Los resultados de este experimento comprueban que el compuesto Alfa es un potente fasciolicida contra cepas susceptibles a TCBZ, pero no mejor que el TCBZ. Es importante notar que el efecto mayoritario de Alfa es entre las 48 y 72 h post-tratamiento, lo mismo se observa para el TCBZ; ambos compuestos son de acción lenta, como es típico de los bencimidazoles. Debido a que se ha demostrado que la sulfona del triclabendazol, TCBZSO<sub>2</sub>, provoca hasta el 41% de la disminución de la carga parasitaria en ovinos, es importante hacer un estudio sobre el efecto del metabolito AlfaSO<sub>2</sub> sobre *F. hepatica*.

4.11.2.6.5. Efecto en las estructuras del sistema reproductor de *F. hepatica* susceptibles y resistentes a TCBZ después del tratamiento *in vivo* con el compuesto Alfa

- *Estudio sobre la espermatogénesis*

En la *F. hepatica* se sabe que las células testiculares son el tejido más sensible a la acción de los fármacos; los túbulos testiculares sufren mayor daño que otros órganos del sistema reproductivo.

Para evaluar el efecto del compuesto Alfa sobre la espermatogénesis, se realizó un estudio histológico y por microscopía electrónica (MET) a fasciolas susceptibles a TCBZ de 12 semanas de edad, extraídas de los hígados de borregos tratados con 15 mg/kg de peso del compuesto Alfa a diferentes tiempos post-tratamiento (24, 48 y 72 h).

Los resultados indican que la espermatogénesis se ve severamente afectada por el compuesto Alfa. A las 24 h post-tratamiento, ya fueron evidentes cambios en los túbulos testiculares, se observó disrupción de los arreglos celulares *8-cell* o rosetas y este deterioro se volvió más severo con el tiempo. A las 48 h se observaron los túbulos vacíos de células; hubo reducción del número de espermatogonía primaria y secundaria, lo que sugiere efecto del compuesto en la división celular; también se observaron células multinucleares. A las 72 h, no hubo arreglos *8-cell* reconocibles, se observó material

celular disperso, las células encontradas aparecieron con varios núcleos. El centro del arreglo roseta 8-cell (el citóforo) sufrió fragmentación y vacuolización.

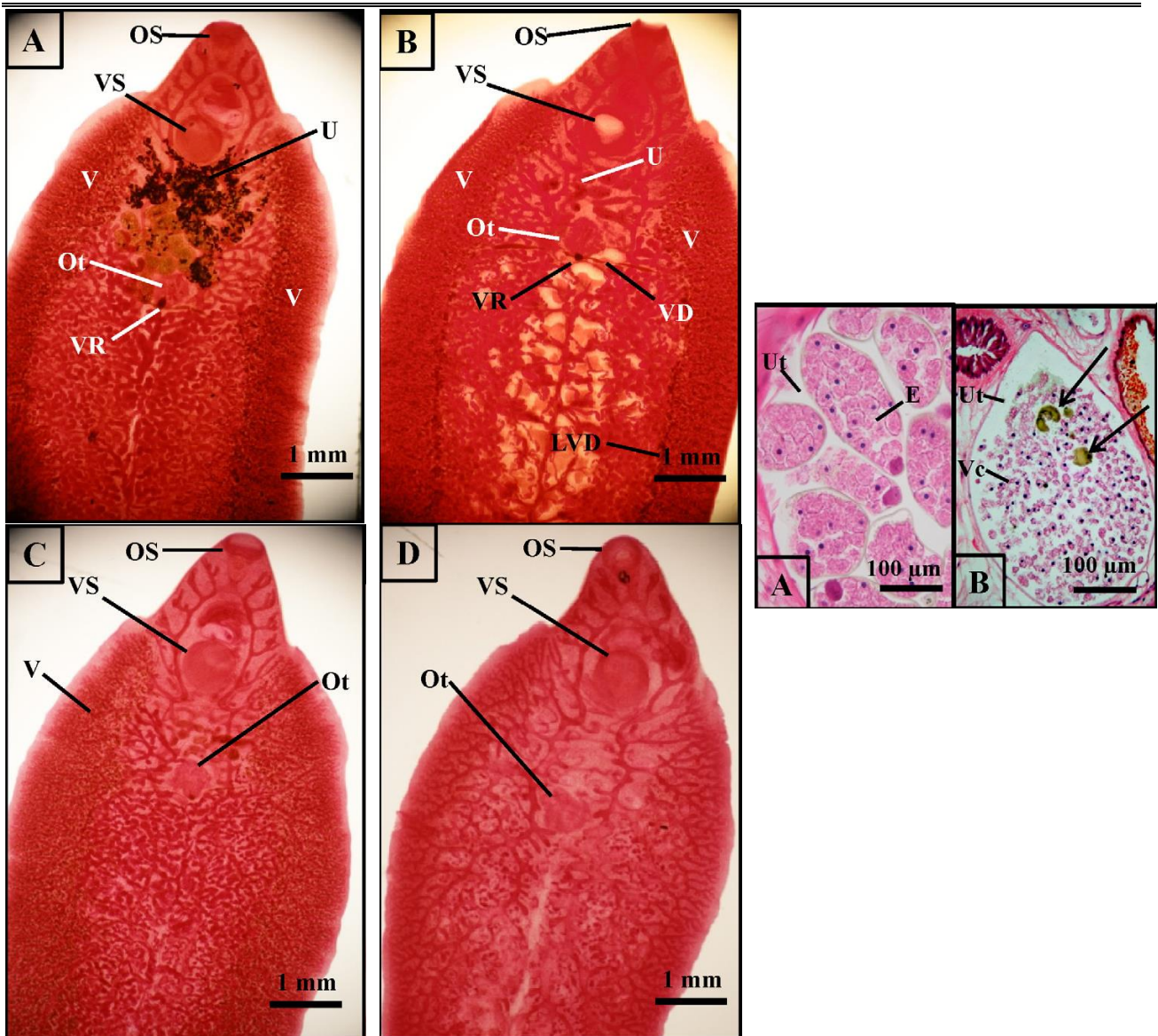
De este estudio se obtienen dos conclusiones importantes de cara a la elucidación del mecanismo de acción del compuesto Alfa. La presencia de células multinucleares, que deriva de la inhibición de la citocinesis o disrupción de los microfilamentos, indica que los procesos meiótico y mitótico continuaron, pero no la división del citoplasma; y la otra, que la inhibición de la división celular y fragmentación de las rosetas es compatible con la disrupción de los microtúbulos. Además se sabe que la región del citóforo tiene como componente actina; y en estudios anteriores se ha demostrado que el compuesto Alfa altera las fibras musculares de las fasciolas, entonces se plantea la hipótesis de que el compuesto Alfa puede tener también como blanco a esta proteína del citoesqueleto.<sup>54</sup>

- *Efecto del compuesto Alfa sobre la ovogénesis*

Para completar los estudios acerca de los cambios a nivel de estructura y de ultraestructura ocasionados por el compuesto Alfa a la *F. hepatica*, se evaluó el efecto sobre los órganos del sistema reproductor femenino de fasciolas de 12 semanas de edad a diferentes tiempos post-tratamiento (24, 48 y 72 h). Los trematodos estudiados se recuperaron de hígados de borregos irlandeses tratados con 15 mg/kg de peso del compuesto Alfa.

El daño se evaluó por medio de comparación histológica con muestras de fasciolas no tratadas y por MET.

La producción de huevos cesó a las 24 h post-tratamiento y precedió a otros cambios importantes en la maquinaria reproductiva. A las 48 h hubo mayor número de células vitelinas maduras que inmaduras; los folículos se observaron vacuolizados y la cubierta protectora de las células desorganizada. En las imágenes vistas al microscopio, la cavidad uterina es poco visible. A las 72 h el daño fue mayor, hubo disrupción de los folículos, el útero ya no se distingue y tampoco las células vitelinas están definidas. A los 3 días se observó disminución en la ovogonia junto con un incremento de eosinófilos y células apoptóticas. La Figura 4.8 muestra las microscopias de las fasciolas observadas por MET.



**Figura 4.8.** (A) *F. hepatica* sin exposición al compuesto Alfa. El útero con huevos (Ut), el disco y zona de succión (OS y VS), glándula de Mehlis (Ot), membrana vitelina (V) y reservorio vitelino. (B) 24 h post-tratamiento. El útero contiene poca cantidad de huevos en su interior, se comienza a presentar daño en las paredes y en la membrana vitelina. (C) 48 h post-tratamiento. El útero no puede ser distinguido con facilidad, la membrana vitelina es menos evidente. (D) 72 h post-tratamiento. A este tiempo de exposición el útero ya no se distingue, las barreras vitelinas ya no se encuentran presentes.

En el recuadro se presenta un útero (Ut) sin exposición al compuesto (A) donde se observa claramente la presencia de huevos (E). (B) A 24 h post-tratamiento ya no se observan huevos en el útero, la membrana vitelina ya no se encuentra presente y comienza a formarse cúmulos de material proteico (flechas).

El efecto sobre la inhibición de la ovogénesis está directamente relacionado con una inhibición en la división celular coincidente con efecto directo sobre los microtúbulos. Estas observaciones son coincidentes con lo observado para el tegumento y los testículos; cabe señalar que de los órganos reproductores estudiados, el daño en los testículos ha sido el más pronunciado.

Estos resultados demuestran que el compuesto Alfa tiene mucho potencial como fasciolicida ya que evita la reproducción y por consiguiente interrumpe el ciclo de vida de la *F. hepatica*.

#### 4.11.2.7. Actividad antiprotozoaria del compuesto Alfa

Al compuesto Alfa también se le determinó su potencial antiprotozoario contra *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, mediante el método de subcultivos.<sup>55</sup>

La Tabla 4.14 muestra las  $CI_{50}$  calculadas por el análisis Probit para los ensayos *in vitro* con tres protozoarios antes mencionados. Se utilizaron como controles positivos, ABZ, MTZ y NTZ.

De los tres protozoarios, el más susceptible al compuesto Alfa fue *E. histolytica*, siendo 2,143 veces más activo que ABZ, 2 veces más que NTZ y 13 veces más que MTZ, contra *G. intestinalis*; el compuesto Alfa sólo superó a MTZ y contra *T. vaginalis* fue mejor que ABZ.

Este estudio demostró que el compuesto Alfa es un potente amebicida con un  $CI_{50}$  de 26.4 nanomolar.

Indirectamente, a pesar de que se trata de organismos diferentes, estos resultados coinciden con la hipótesis de que Alfa tiene cierta preferencia por la proteína del citoesqueleto actina, ya que afecta más a *E. histolytica*, rica en actina, que a *G. intestinalis* rica en tubulina. Sin embargo, esto deberá demostrarse.

**Tabla 4.14.** Susceptibilidad de *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *T. vaginalis* al compuesto Alfa

Compuesto	$CI_{50}$ $\mu$ M <i>G. intestinalis</i>	$CI_{50}$ $\mu$ M <i>E. histolytica</i>	$CI_{50}$ $\mu$ M <i>T. vaginalis</i>
ALFA	0.3095	0.0264	0.4518
ABZ	0.0370	56.600	1.5920
NTZ	0.0130	0.0550	0.1100
MTZ	1.2280	0.3500	0.2160

#### 4.11.2.5.7. Actividad inhibitoria de la enzima Triosafosfato isomerasa (TIM) de *E. histolytica* y *Trypanosoma cruzi*

Como parte de nuestros esfuerzos en el diseño de antiparasitarios, al compuesto Alfa se le determinó la actividad inhibitoria de la enzimas TIM de los protozoarios *E. histolytica* y *Trypanosoma cruzi*.

Se encontró que una concentración de 100  $\mu$ M del compuesto Alfa inhibió la actividad de las enzimas en 66% y 13% respectivamente. Estudios de acoplamiento molecular (*docking*) reportaron valores de  $\Delta G_{\text{unión}}$  de unión favorables con las enzimas TIM, con valores de -10.15 kcal/mol para *E. histolytica* y -6.75 kcal/mol para *T. cruzi*.<sup>55,56</sup> Este dato es importante ya que sugiere que la TIM es un posible blanco para la actividad antiamebiana que presenta este compuesto.

## 4.12. Conclusiones

### 4.12.1. Parte química

- Se sintetizó el compuesto Alfa a escala de 100-150 g con rendimiento global de 51%, lo cual es bueno para un proceso de 5 pasos, sin contar la preparación de la materia prima
- La metodología de la  $S_NAr$  fue mejor utilizando la acetamida, aunque puede significar más pasos de síntesis dependiendo de qué materia prima se disponga.
- El método asistido por microondas para la  $S_NAr$  es rápido y eficiente, emplea disolventes de fácil recuperación y disminuye considerablemente el tiempo de reacción. Esta metodología requiere un estudio sobre el escalamiento ya que las pruebas se hicieron a escala de 0.2 a 10.0 g.
- La reducción con  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$  es el mejor método de reducción del grupo nitro para el proceso a escala mayor de 100 g. La reducción catalítica es lenta, cara y requiere calor.
- La ciclación vía el xantato de etilo no ofrece ningún problema, todo depende de la calidad de la diamina empleada como materia prima.
- La reacción con  $CH_3I$  en acetona es más rápida que en EtOH. Se requiere cuidado de la temperatura para evitar productos de dimetilación.

### 4.12.2. Parte biológica

- El compuesto Alfa fue muy activo contra cepas de *F. hepatica* susceptibles a TCBZ, endémica de nuestro país e irlandesas. Los resultados *in vitro* e *in vivo* lo manifiestan.

- Los estudios sobre la estructura en fasciolas adultas mexicanas, susceptibles a TCBZ, *in vitro* expuestas a AlfaSO mostraron daños en menor tiempo de exposición que las cepas de Cullompton irlandesas, 12-24 h vs. 48-72 h; sin embargo, el daño en el tegumento y espinas se observó más severo en las fasciolas irlandesas.
- El compuesto Alfa mostró efecto *in vitro* sobre *F. hepatica* resistente a TCBZ en sus dos estadios, adulto y juvenil. En cepas mexicanas e irlandesa.
- Los estudios en ganado ovino y bovino permitieron determinar la dosis efectiva entre 15 y 12 mg/kg de peso respectivamente y la máxima dosis tolerada de 180 mg/kg de peso
- La eficacia mostrada con el ganado mexicano a diferentes edades del parásito fue de 86–100% dependiendo de la forma de dosificación. En suspensión, se obtuvo el mayor porcentaje.
- En los estudio *in vivo* en ganado ovino irlandés, se encontró un 100% de eficacia en la reducción de huevos en las excretas, contra cepas susceptibles a TCBZ adultas, pero 62% de disminución de la carga parasitaria cuando se trató a fasciolas de 4 semanas de edad. TCBZ fue 98% efectivo vs. fasciolas adultas de 12 semanas.
- La eficacia del compuesto Alfa en estudios *in vivo* en ovinos irlandeses, infectados con cepas resistentes a TCBZ, fue nula, a pesar de que *in vitro* se observaron severos daños en la estructura y subestructura de las fasciolas adultas y juveniles. Tal vez modificando la dosis podría modificarse este resultado.
- La eficacia del compuesto Alfa fue equiparable a la del TCBZ.
- De los estudios histológicos y de microscopia electrónica MEB y MET, se concluye que el mayor efecto del compuesto Alfa es sobre el tegumento, las espinas y las fibras musculares de fasciolas susceptibles y resistentes a TCBZ; sobre la espermatogénesis y oogénesis en fasciolas susceptibles a TCBZ.
- Los estudios inmunocitoquímicos con tubulina–inmunoreactiva mostraron que el daño observado en las fasciolas resistentes a TCBZ, tratadas con el compuesto Alfa, no tiene relación con la tubulina. Sin embargo, en fasciolas susceptibles a TCBZ el efecto si tiene dependencia con la tubulina.

- De todo lo anterior se puede inferir que el compuesto Alfa puede tener más de un sitio de acción, uno sobre tubulina y otro sobre actina, ambas proteínas del citoesqueleto.
- El compuesto Alfa muestra mayor efecto a largo tiempo 12-24 h y 48-72 h post-tratamiento en ovinos nacionales e irlandeses respectivamente, por encima del tiempo en el que el AlfaSO alcanza su pico más alto en sangre, por lo que un posible efecto causado por la AlfaSO<sub>2</sub> no debe descartarse.
- Se estudió la farmacocinética del compuesto Alfa y sus propiedades fisicoquímicas, los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) en ovinos y bovinos mostraron diferencias entre especies. Se demostró que el compuesto Alfa se metaboliza rápidamente a sus formas oxidadas, AlfaSO y AlfaSO<sub>2</sub>, más rápido en ovinos que en bovinos; semejante a su análogo, el TCBZ.
- Se requieren estudios sobre el efecto del metabolito AlfaSO<sub>2</sub> sobre *F. hepatica in vitro*.
- Se demostró ampliamente que el compuesto Alfa es un bioisómero del triclabendazol y que puede ser empleado como tratamiento contra la fasciolosis en ganado ovino y bovino.
- El diseño de análogos del compuesto Alfa que modifiquen sus propiedades fisicoquímicas, afinidad por los sitios blanco, capacidad de atravesar membranas, farmacocinética y/o metabolismo podría generar moléculas más activas contra todas las edades de la *F. hepatica* y contra cepas resistentes.
- La dosificación del compuesto Alfa en los animales tratados es determinante para la buena eficacia del compuesto Alfa ya que en los experimentos con fasciolas mexicanas, la eficacia se mejoró en un 15% cuando Alfa se administró en una suspensión recién preparada.
- Mayores estudios sobre la forma farmacéutica para la dosificación en los animales están en progreso.
- El compuesto Alfa demostró ser un potente amebicida siendo hasta 2 y 13 veces más activo que los fármacos de elección para el tratamiento de la amoebiosis. Un posible blanco para su actividad podría ser la enzima triosafosfato isomerasa de *E. histolytica*, ya que en un estudio *in vitro* inhibió el 66% de su actividad.



#### 4.13. Referencias

1. Sanyal, P. K.; Gupta, S. C. Efficacy and pharmacokinetics of triclabendazole in buffalo with induced fasciolosis. *Veterinary Parasitology*. **1996**, *63*, 75–82.
2. Santra, P. K.; Prasad, A.; Ghosh, S. Efficacy of triclabendazole against experimental fasciolosis in lambs. *Journal of Veterinary Parasitology*. **1999**, *13*, 111–12.
3. Foreyt, W. J. Efficacy of triclabendazole against experimentally induced *Fascioloides magna* infections in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. **1989**, *50*, 431–432.
4. Calvopiña, M.; Guderian, R. H.; Paredes, W.; Cooper, P. J. Comparison of two single-day regimens of triclabendazole for the treatment of human pulmonary paragonimiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **2003**, *97*, 451–454.
5. WHO Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control, held at WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, October **2006**. pp 39.
6. Fairweather, I. Triclabendazole progress report, 2005–2009: an advancement of learning?. *Journal of helminthology*. **2009**, *83*(02), 139-150.
7. Mas-Coma, S.; Bargues, M. D.; Valero, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal of Parasitology*. **2005**, *35*, 1255–1278.
8. Hennessy, D. R.; Lacey, E.; Steel, J. W.; Prichard, R. K. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **1987**, *10*, 64–72.
9. (a) Mottier, L.; Álvarez, L.; Ceballos, L.; Lanusse, C. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology*. **2006**, *113*(1), 49-57. (b) Halferty, L.; Brennan, G. P.; Trudgett, A.; Hoey, L.; Fairweather, I. Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary parasitology*. **2009**, *159*(2), 126-138.
10. Fetterer, R. H. The effect of albendazole and triclabendazole on colchicine binding in the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **1986**, *9*, 49–54.
11. (a) Fairweather, I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *Journal of Helminthology*. **2005**, *79*, 227–234. (b) Álvarez, L.; Solana, H.; Mottier, L.; Virkel, G.; Fairweather, I.; Lanusse, C. Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*. **2005**, *131*, 501-510.
12. Kabil, S. M.; El Ashry, E.; Ashraf, N. K. An open-label clinical study of nitazoxanide in the treatment of human fascioliasis. *Current therapeutic research*. **2000**, *61*(6), 339-345.
13. Keiser, J.; Morson, G. *Fasciola hepatica*: surface tegumental responses to in vitro and in vivo treatment with the experimental fasciolicide OZ78. *Experimental Parasitology*. **2008**, *119*, 87–93.
14. Gallay, M. J. J.; Kühne, P. M.; Meyer, B. A.; Rechsteiner, B. O.; Schellenbaum, M, M. Benzimidazole derivative effective against liver fluke. Prepn. BE Patent No. 865,870, Abril, 11, **1978**.
15. Gallay, M. J. J.; Kühne, P. M.; Meyer, B. A.; Rechsteiner, B. O.; Schellenbaum, M, M. 2-alkylthio-, 2-alkylsulphonyl- and 2-alkylsulfonyl-6-phenylbenzimidazoles as anthelmintic agents. U. S. patent No. 4,197,307, Abril, 8, **1980**.
16. Agripta S. A. Nitro-anilines halogénées et leur préparation. Patente FR 1499717A. Novembre, 10, **1966**.
17. Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning. Procedimiento para la preparación de 2-carbalcoxi-amino-bencimidazol-5(6)-feniléteres. Patente Alemana 427455 A1 (Clase internacional CO7d), Abril, 3, **1975**.
18. Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current medicinal chemistry*. **2005**, *12*(1), 23-49.
19. Vera, M. E. Síntesis de derivados del bencimidazol con acción fasciolicida potencial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM , **1991**
20. Van Allan, J. A.; Deacon, B. D. 2-Mercaptobenzimidazole. *Organic Syntheses*. **1963**, 56-56.
21. Hudlicky, M. Oxidation in Organic Chemistry, ACS. Monograph 186; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**; pp 252-259.
22. Leonard, N. J.; Johnson, C. R. Periodate oxidation of sulfides to sulfoxides. Scope of the reaction. *The Journal of Organic Chemistry*. **1962**, *27*(1), 282-284.
23. Hernández, C. M. A. Síntesis de bencimidazoles con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. 1990.
24. Aguilar, G. S. Síntesis de 2-(1*H*-bencimidazol-2-iltio)acetamidas sustituidas, diseñadas por Docking como potenciales agentes inactivantes de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi*. Tesis maestría. Facultad de Química, UNAM, **2010**.
25. Ocón, A. A. B.; Hernández, C. A.; Trejo, S. P. J.; Duarte, G. Guzmán, M. Castillo B. R. Síntesis de Diariléteres utilizando irradiación con microondas. 46º Congreso Mexicano de Química, 10-14 de septiembre **2011**.

26. Soria-Arteche, O.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Hurtado-de la Peña, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Medina-Franco, J. L.; Gómez-Flores, K. Studies on the selective S-oxidation of albendazole, fenbendazole, triclabendazole, and other benzimidazole sulfides. *Journal of the Mexican Chemical Society*. **2005**, 49(4), 353-358.
27. Ibarra-Velarde, F.; García-Sánchez, E.; Fernández-Ruvalcaba, M.; Vera-Montenegro, Y.; Castillo, R.; Hernández-Campos A. Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química in vitro e in vivo en ovinos. *Veterinaria México*. **1997**, 28(4), 291-296.
28. Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R. Eficacia fasciolicida del compuesto "Alfa" contra estadios juveniles y adulto en ovinos. *Veterinaria México*. **1997**, 28(4), 287-301.
29. Foreyt, W. J. Efficacy of a fenbendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary parasitology*. **1988**, 26(3), 265-271.
30. Fernández-Rivera, N.; Ibarra-Velarde, F.; Olazarán-Jenkins, S.; Vera-Montenegro, Y.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A. Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in Pelibuey sheep. *Veterinaria México*. **2002**, 33(1), 55-61.
31. Ibarra-Velarde, F.; Montenegro-Cristino, N.; Flores-Crespo, J.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Veterinaria México*. **2000**, 31(1), 47-51
32. Vera, M. Y. R. Evaluación biológica y toxicológica de un fasciolicida experimental en bovinos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, **2005**.
33. Ibarra, F.; Vera, Y.; Quiroz, H.; Cantó, J.; Castillo, R.; Hernández, A.; Ochoa, P. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*. **2004**, 120, 65-74.
34. Vera-Montenegro, Y.; Ibarra-Velarde, F.; Quiroz-Romero, H.; Ríos-Utrera-A.; Castillo, R. Hernández-Campos, A. Eficacia del 6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)benzimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. *Veterinaria México*. **2001**, 32(1), 77-80.
35. Vera-Montenegro, Y.; Ibarra-Velarde, F.; Liéban-Hernández, E.; Quiroz-Romero, H.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Ochoa-Galván, P. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitology Research*. **2004**, 92, 211-214.
36. Vera-Montenegro, Y.; Ibarra-Velarde, F.; Quiroz-Romero, H.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R. Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle. *Parasitology Research*. **2003**, 91(1), 1-4.
37. Vera, Y.; Ibarra, F.; Cantó, G.J.; Soria, O.; Castillo, R.; Hernández, A.; Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. **2006**, 53(3), 145-149.
38. Ayala, A. S. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida Alfa en vacas gestantes. Tesis de Maestría, UNAM, **2003**.
39. Tamayo, E. D. Escalamiento de la síntesis y desarrollo de una formulación para el fasciolicida Alfa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2001.
40. Romo, M. R. A. Síntesis de profármacos del fasciolicida experimental 6-cloro-2-(metiltio)-5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol y su estudio de solubilidad acuosa. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, **2004**.
41. Del Rivero, L. M.; Jung, H.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, αBIOF10, in biological fluids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. **1998**, 712(1-2), 237-241.
42. Vertiz, S. G. Evaluación farmacocinética de α-BIOF-10 en ganado vacuno. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM. 2000.
43. Ramírez, N.; Mayet, L.; Del Rivero, L.; Ibarra-Velarde, F.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Jung-Cook, H. Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthylthio)-1H-benzimidazole, a new fasciolicide agent. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **2008**, 32(2), 154-159.
44. Mohammed-Ali, N.; Bogan, J.; Marriner, S.; Richards, R. Pharmacokinetics of triclabendazole alone or in combination with fenbendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1986**, 10, 64-72
45. Mestorino, N.; Formentini, E. A.; Lucas, M. F.; Fernández, C.; Modamio, P.; Mariño-Hernández, E.; Errecalde, J. P. Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulphoxide. *Veterinary Research Communications*. **2007**, 32, 21-33.
46. Rivera, N.; Ibarra, I.; Zepeda, A.; Fortoul, T.; Hernández, A.; Castillo, R.; Cantó, G. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitology Research*. **2004**, 93, 283-286.

47. Rivera, N.; Ibarra, F.; Zepeda, A.; Fortoul, T.; Cantó, G.; Hernández, A.; Castillo, R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyl)-1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in their natural host. *Parasitology research*. **2005**, 95(6), 379-382.
48. McConville, M.; Brennan, G.P.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Ibarra, F.; Fairweather, I. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology*. **2006**, 133(2), 195-208.
49. McConville, M.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Ibarra, F.; Fairweather, I. Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research*. **2007**, 100(2), 365-377.
50. McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. Ultrastructural changes to the tegumental system and the gastrodermal cells in adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Parasitology*. **2009**, 136(6), 665-680.
51. McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; McCoy, M.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Veterinary Parasitology*. **2008**, 153, 52-64.
52. McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. Ultrastructural changes to the tegumental system and the gastrodermal cells in adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Parasitology*. **2009**, 136(6), 665-680.
53. McConville, M.; Brennan, G. P.; Flanagan, A.; Edgar, H. W. J.; Hanna, R. E. B.; McCoy, M.; Gordon, A. W.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. **2009**, 162(1-2), 75-88.
54. McConville, M.; Hanna, R. E. B.; Brennan, G. P.; McCoy, M.; Edgar, H. W. J.; McConell, S.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Fairweather, I. *Fasciola hepatica*: disruption of spermatogenesis by the fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research*. **2010**, 106(2), 311-323.
55. Cedillo, R.; Chávez, B.; Tapia, A.; Yépez, L.; In vitro effect on Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal, Eukariot Microbiology*. **2002**, 49(3), 201-2013
56. López, V. F. H. Estudios de modelado molecular de benzimidazoles activos contra *Entamoeba histolytica* y diseño de análogos antiamebianos". Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM. **2007**.
57. Romo-Mancillas, A.; Téllez-Valencia, A.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R. The design and inhibitory profile of new benzimidazole derivatives against triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*: A problem of residue motility. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2011**, 30, 90-99.

---

## Capítulo 5. 1-Metiltriclabendazoles

### 5.1. Introducción.

Hasta principios de los años 70's el uso de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo (BZC), como albendazol (ABZ) y mebendazol (MBZ), se había limitado al tratamiento de las helmintosis gastrointestinales principalmente. A la fecha también se ha demostrado la efectividad del ABZ contra parasitosis extraintestinales como cisticercosis y trichinellosis; sin embargo, para que sea efectivo se requieren dosis altas y tratamientos prolongados.<sup>1</sup> Además ABZ es efectivo contra la *Fasciola hepatica* pero únicamente sobre la forma adulta del parásito.<sup>2</sup>

Por otro lado, también se ha demostrado que ABZ es un potente antiprotozoario contra *G. intestinalis*, menos potente, pero activo, contra *T. vaginalis* y en menor grado contra *E. histolytica*.<sup>3</sup>

El triclabendazol (TCBZ) es un bencimidazol estructuralmente diferente a los BZC ya que posee en su estructura un grupo metiltio en posición 2 del núcleo de bencimidazol en lugar del grupo metoxicarbonilamino, característica que le confiere mayor biodisponibilidad. Dentro de los bencimidazoles es el único efectivo contra todas las fases del trematodo *F. hepatica*. TCBZ es poco activo contra nematodos y cestodos susceptibles a BZC y también es poco activo contra otros trematodos.<sup>4</sup>

Hasta ahora no se sabe con certeza la manera en cómo el TCBZ ejerce su acción a nivel estructural, se sabe que uno de sus principales mecanismos de acción es la inhibición de la polimerización de la tubulina y que se une a la  $\beta$ -tubulina por un sitio diferente al que lo hacen los BZC como el albendazol.<sup>5</sup>

Como parte de la investigación hacia la búsqueda de nuevos antiparasitarios, en esta parte del trabajo de tesis se desarrolló la preparación de 2 derivados del triclabendazol 1-metilados y se les determinó su actividad antihelmíntica y antiprotozoaria como mezcla de regioisómeros y por separado.

## 5.2. Espectro antihelmíntico del triclabendazol

En la patente del TCBZ se demostró únicamente la actividad fasciolicida de este compuesto a 30 mg/kg de peso en ovinos; después en estudios posteriores se ajustó a la dosis a 12 mg/kg de peso.<sup>6</sup>

En 1986 Coles reportó la actividad *in vitro* e *in vivo* del triclabendazol frente a diversos nematodos, cestodos y trematodos. Como se puede ver en la Tabla 5.1, TCBZ sólo fue activo *in vivo* contra *F. hepatica*.<sup>4</sup>

**Tabla 5.1.** Actividad del triclabendazol vs. helmintos *in vitro* e *in vivo*

Especie	Concentración efectiva <i>in vitro</i> en µg/mL <sup>a</sup>	% de Efectividad <i>in vivo</i>	Régimen de dosificación
<i>F. hepatica</i>	2.5	90 100	una dosis oral 40 mg/kg 100 ppm en la dieta por 7 días
<i>S. mansoni</i>	50	n.a <sup>b</sup>	500 ppm en la dieta por 7 días
<i>H. diminuta</i>	0.5	n.a n.a	una dosis oral 200 mg/kg 200 ppm en la dieta por 5 días
<i>T. crassiceps</i>	50	n.a	500 ppm en la dieta por 14 días
<i>C. elegans</i>	> 40	n.a	-----
<i>N. dubius</i>	----	n.a	500 ppm en la dieta por 7 días

<sup>a</sup>Concentración que produjo inmovilización total en 24 h.

<sup>b</sup>No fue activo a la dosis experimentada

Estudios *in vivo* en humanos han demostrado que TCBZ es efectivo contra la *Fasciola* de pulmón, *Paragonimus mexicanus*, a dosis de 10 mg/kg<sup>7</sup> más de 10% mejor que praziquantel y con menos efectos secundarios. También se ha comprobado la eficacia del TCBZ contra el trematodo *Gyrodactylus sp.* que infecta a los peces de agua dulce como las truchas, *in vitro* e *in vivo* a 4 y 25 mg/L respectivamente.<sup>8</sup> Su espectro de acción es limitado, pero va en aumento el descubrimiento de nuevos parásitos susceptibles a este compuesto.

## 5.3. Importancia de la *Trichinella spiralis*

Se sabe que la trichinellosis es una zoonosis que implica un gran problema de salud en el mundo, y más aún con el movimiento de grandes poblaciones. El agente causal es el helminto *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*), que como se mencionó en el Capítulo 2, cursa con dos fases en su ciclo de vida: la fase entérica (gastrointestinal) y la fase sistémica (la larva muscular que invade el sistema músculo-esquelético). Para su tratamiento, desde hace mucho tiempo se emplean ABZ y MBZ. El más usado es ABZ, pero con la desventaja de su pobre solubilidad acuosa, y por consiguiente pobre biodisponibilidad; se absorbe solo un 5% de la dosis, lo que lo hace poco efectivo cuando el parásito ya se encuentra en el músculo.<sup>9</sup>

*T. spiralis* además de ser el agente de una parasitosis importante, posee un ciclo de vida muy interesante, que permite utilizarse como modelo experimental para la evaluación antihelmíntica *in vivo* de nuevos compuestos a nivel sistémico y enteral.

#### 5.4. 1-Metilbencimidazoles como antiparasitarios

Está demostrado que el principal mecanismo de acción de los BZC es la inhibición de la polimerización de la tubulina y como consecuencia de ello, otros eventos bioquímicos se ven afectados; como por ejemplo, la captación de la glucosa, la actividad de la fumarato reductasa o la actividad neuromuscular.<sup>10</sup> También es importante mencionar que la formación de los complejos entre los BZC y la tubulina así como su estabilidad, dependen de la naturaleza de los grupos que sustituyen al núcleo de bencimidazol-2-carbamato de metilo. Por décadas se ha postulado que la presencia del H en la posición 1 del bencimidazol es esencial para la actividad antihelmíntica.<sup>11</sup> Algunas excepciones son los BZC sustituidos como el benomilo, un profármaco que libera el carbendazim *in vivo*.<sup>12</sup>

Nuestro grupo de investigación ha reportado la síntesis y actividad antihelmíntica de derivados 1-metilados y *N*-metilados de ABZ contra *T. spiralis* y *T. crassiceps*. Se encontró que contra estos parásitos, susceptibles a ABZ, la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* disminuye drásticamente cuando se sustituye la posición 1 del bencimidazol y moderadamente cuando se sustituye el nitrógeno del carbamato; así por ejemplo, cuando se trataron ratones infectados con *T. spiralis* a 75 mg/kg con ABZ el porcentaje de reducción de las LM (larvas musculares) fue de 85.3%; este valor bajó a 1.8% cuando se trató del 1-metilABZ.<sup>13</sup>

**Tabla 5.2.** Actividad antihelmíntica de albendazol y sus derivados metilados

Compuesto	% reducción de la carga parasitaria de <i>T. spiralis</i> , <i>in vivo</i> a 75 mg/Kg <sup>13</sup>		% reducción de la carga parasitaria de <i>T. crassiceps in vitro</i> (cepa ORF) <sup>14</sup>	
	LM	Fase adulta	a 0.28 $\mu$ M	a 1.7 $\mu$ M
ABZ	85	55.9	80	99
ABZSO	---	---	46	88
<i>N</i> -metilABZ	37	44.9	0	0
1-MetilABZ	1.8	0	0	0
(isómero 1,6)				
1-MetilABZ	10.7	19.4	0	0
(isómero 1,5)				

En estos trabajos también se reportó la actividad *in vitro* contra el protozoario *G. intestinalis*, susceptible a ABZ, encontrándose que la actividad disminuyó hasta 10 veces en los derivados metilados.<sup>13</sup> Lo anterior también puede afirmarse para la actividad giardicida 1*H*-

bencimidazol-2-il-carbamatos de metilo con sustituyentes metilo en posición 1 del bencimidazol y sustituyentes pequeños como Cl en posiciones 5 y/o 6, ya que en un estudio *in vitro* la  $Cl_{50}$  fue hasta 10 veces más alta que la obtenida para los 1*H*-bencimidazol-2-il-carbamatos de metilo análogos sin metilar.<sup>15</sup>

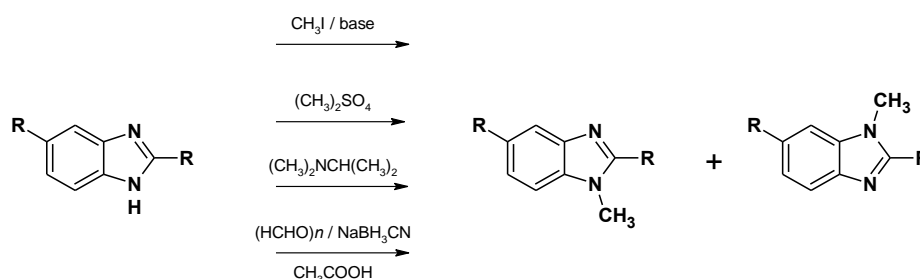
Por otro lado, cuando la sustitución en posición 2 del bencimidazol es diferente del grupo metoxicarbonilamino y en su lugar se tienen SH, SCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, H, COOR, o CONHR; la presencia de un metilo en posición 1 del bencimidazol no disminuye la actividad giardicida, sino que en algunos casos la incrementa. También se reportó que este tipo de compuestos no inhibe la polimerización de la tubulina, como lo hace el ABZ, por lo que se presupone que actúan por un mecanismo diferente.<sup>16</sup>

### 5.5. Preparación de 1-metilbencimidazoles

Hay varias estrategias que se pueden seguir para la preparación de 1-metilbencimidazoles; todo depende la sustitución en el núcleo de bencimidazol. En general, se puede decir que se pueden obtener por alquilación del propio bencimidazol o a partir de las *N*-metil-2-nitroanilinas adecuadamente sustituidas.

#### 5.5.1. A partir de bencimidazoles

Los *N*-metilbencimidazoles se pueden obtener por metilación directa del bencimidazol con un agente alquilante como CH<sub>3</sub>I en medio básico (a) con (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) o utilizando acetales dimetilados de DMF en condiciones anhidras (c).<sup>18</sup> Otra manera de metilar al bencimidazol es mediante aminación reductiva, utilizando paraformaldehído y cianoborohidruro de sodio en ácido acético, Esquema 5.1 (d).<sup>19</sup>



**Esquema 5.1.** Obtención de 1-metilbencimidazoles a partir de bencimidazol.

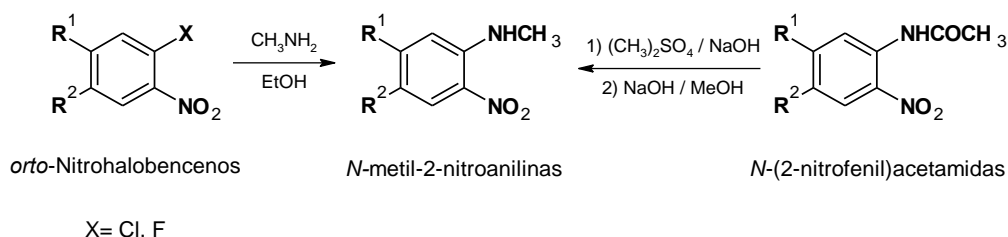
Cuando el bencimidazol que se requiere está sustituido asimétricamente se obtiene la mezcla de isómeros y es necesario separarlos, lo cual puede ser un proceso difícil.

5.5.2. A partir de *N*-metil-2-nitroanilinas

Las *N*-metil-2-nitroanilinas adecuadamente sustituidas dan los bencimidazoles sustituidos en 1 por reducción y posterior ciclación con el electrófilo adecuado; la clave de esta metodología es la preparación de las *N*-metil-2-nitroanilinas correspondientes, para ello existen varias alternativas.

La primera es la sustitución directa de un halógeno *orto* al grupo nitro por el grupo N-CH<sub>3</sub>, mediante una reacción de S<sub>N</sub>Ar, las condiciones de la reacción pueden variar dependiendo del tipo de sustituyentes sobre el anillo aromático y del halógeno a sustituir.<sup>20</sup>

Otra forma de preparar estos importantes precursores es a partir de la *N*-metilación de *N*-(2-nitrofenil)acetamidas adecuadamente sustituidas y posterior hidrólisis de la acetamida.<sup>21,22</sup>

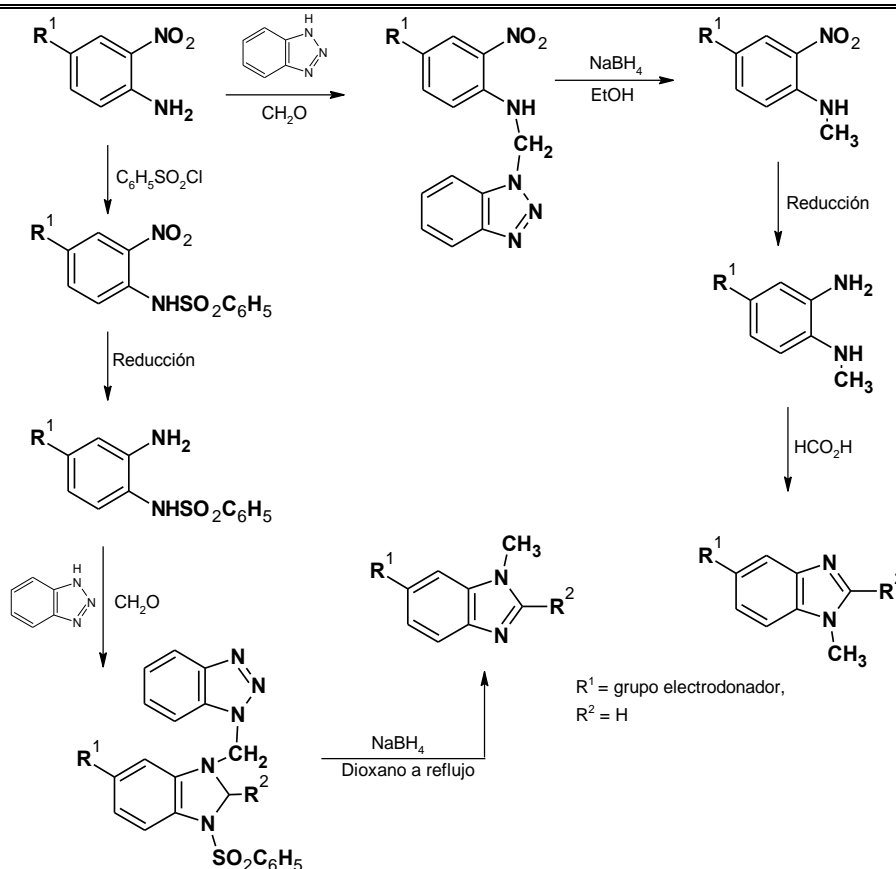


**Esquema 5.2.** Preparación de de *N*-metil-2-nitroanilinas.

Un método novedoso reportado por Katritzki para la síntesis de 1-metilbencimidazoles, a partir de *N*-metil-2-nitroanilinas es vía la reacción con formaldehído y benzotriazol con posterior reducción con NaBH<sub>4</sub>. Se requiere que la nitroanilina tenga un grupo electrodonador en posición 4. La posterior ciclación con el electrófilo adecuado dará el bencimidazol con un patrón de sustitución 1,5.

Si se requiere el bencimidazol 1,6-disustituido, lo que se plantea es primeramente proteger a la amina vía una sulfonamida. El tratamiento de esta nitrosulfonamida con formaldehído y benzotriazol, y posterior tratamiento con NaBH<sub>4</sub> dará el bencimidazol 1,6 disustituido.<sup>23</sup>





Esquema 5.3. 1-Metilbencimidazoles vía reacción con formaldehído y benzotriazol.

## 5.6. Justificación

Las parasitosis intra y extraintestinales siguen siendo un problema de salud tanto a nivel humano como veterinario. El mal uso de los antihelmínticos disponibles para el tratamiento de estas parasitosis ha ocasionado la aparición de cepas resistentes de los parásitos a éstos fármacos; por lo que es necesario seguir investigando el diseño, la síntesis y evaluación de nuevos y mejores agentes antihelmínticos y antiprotozoarios.

El ABZ, un bencimidazol-2-carbamato de metilo, a pesar de tener un espectro antiparasitario amplio, tiene la desventaja de su pobre solubilidad acuosa, lo que limita su absorción, por consiguiente, su actividad contra parásitos extraintestinales o sistémicos; por ejemplo *T. spiralis*.

Por otro lado, el TCBZ es un antihelmíntico con un estrecho espectro de actividad antiparasitaria indicado en el tratamiento de la fasciolosis, parasitosis extraintestinal. Si bien es más soluble en disolventes orgánicos que los carbamatos bencimidazólicos, también es poco soluble en medios acuosos. Al igual que ABZ, el TCBZ se convierte rápidamente al

sulfóxido, su metabolito activo, modificando sus propiedades fisicoquímicas, esto puede ser una de las razones del por qué sea efectivo, entre otros factores, contra el trematodo *Paragonimus sp.*, o fasciola del pulmón.

Con el propósito de contar con información acerca de la importancia del hidrógeno en la posición 1 en la molécula del TCBZ para la actividad biológica; conocer cómo la sustitución de éste por metilo modifica su acción antihelmíntica y de estudiar más sobre el espectro de actividad antiparasitaria del mismo, se decidió sintetizar al TCBZ y sus derivados 1-metilados para evaluar su potencial antihelmíntico sobre *T. spiralis* en sus dos estadios, adulto y larva muscular; y también sobre los protozoarios, *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

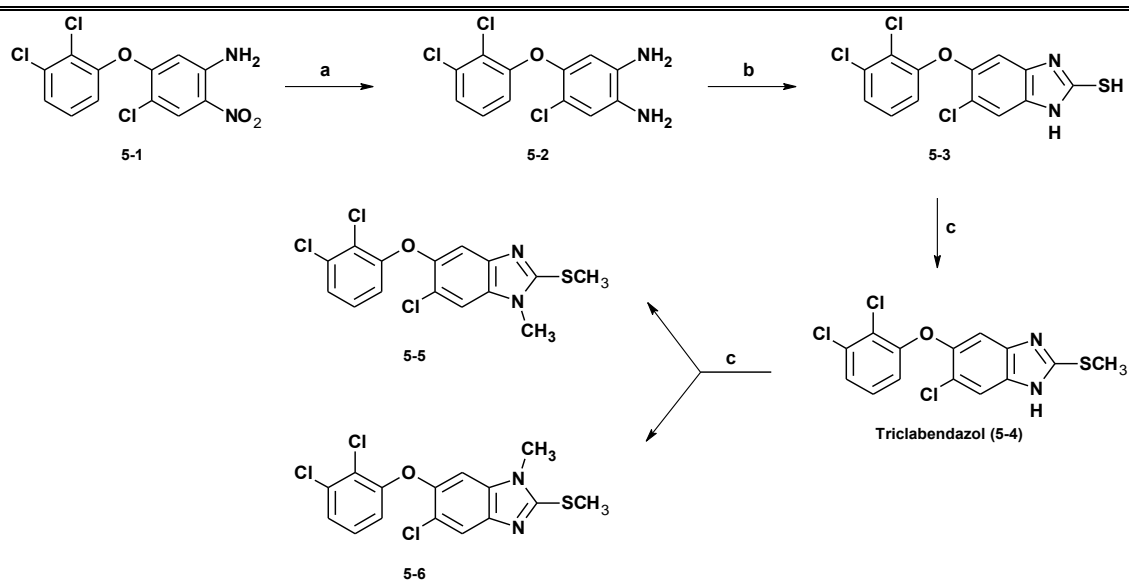
## 5.7. Metodología

### 5.7.1. Parte química

Los compuestos 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-5**) y 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-6**) se sintetizaron por dos métodos: uno, a partir del TCBZ,<sup>24</sup> obteniéndolos como mezcla de isómeros; y el otro, partiendo de las *N*-metil-2-nitroanilinas correspondientes, lo que llevó a los compuestos **5-5** y **5-6** por separado.

#### 5.7.1.1. Síntesis de los 1-metiltriclabendazoles **5-5** y **5-6** a partir de Triclabendazol

Primero se sintetizó el TCBZ por la metodología reportada en la patente Belga, con algunas modificaciones según el Esquema 5.4. El compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5-1**), preparado en nuestro laboratorio, se redujo con H<sub>2</sub> y Ni-Raney o con SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. La diamina **5-2** se ciclocondensó con CS<sub>2</sub> en KOH/EtOH para dar el 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**5-3**). El tratamiento de **5-3** con un equivalente de CH<sub>3</sub>I en KOH/EtOH o acetona dio el TCBZ (**5-4**). A partir del TCBZ se sintetizaron sus derivados 1-metilados **5-5** y **5-6** o también por tratamiento del tiol **5-3** con dos equivalentes de yoduro metilo.

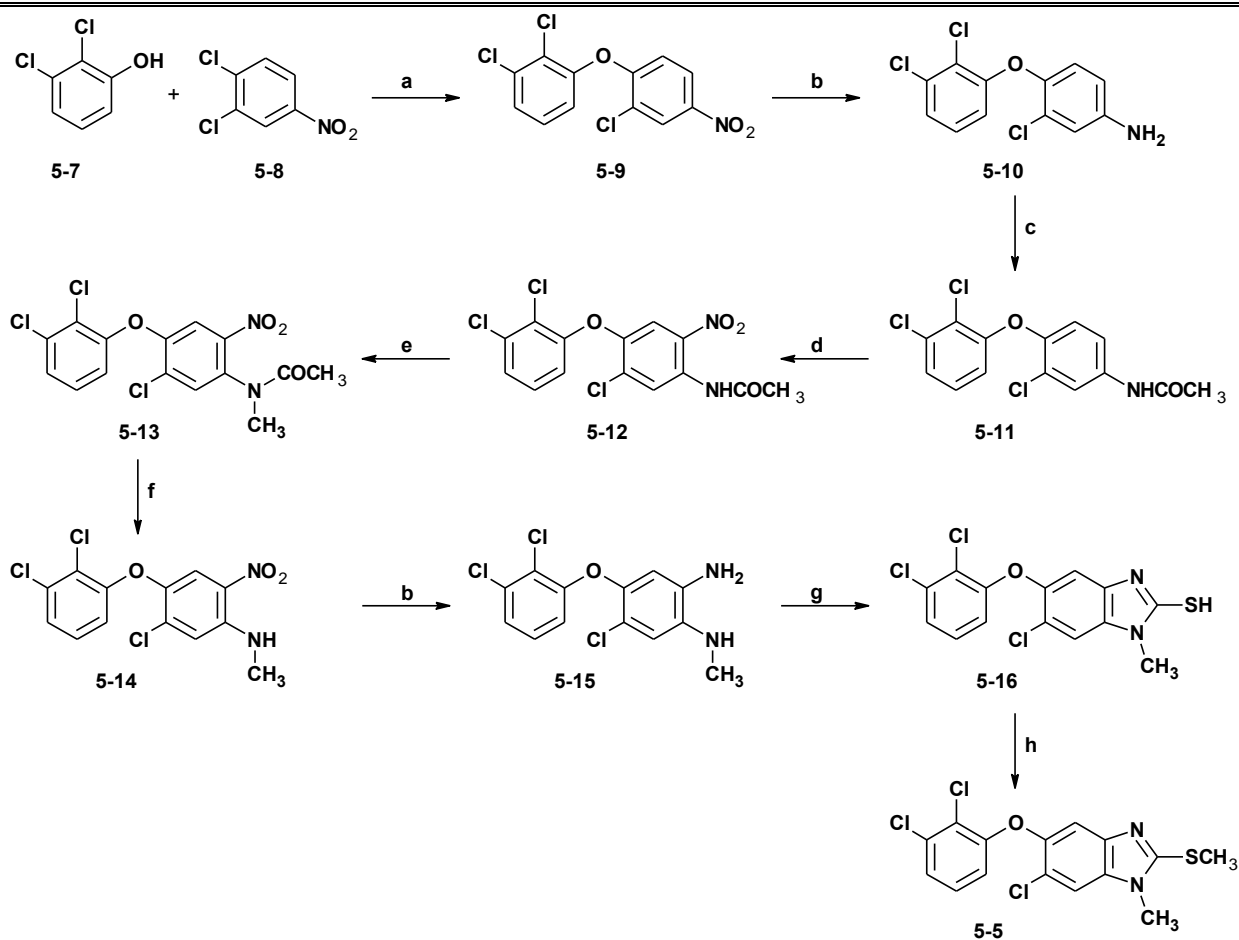


(a) H<sub>2</sub>, Ni-Raney o SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; (b) CS<sub>2</sub> / KOH; (c) CH<sub>3</sub>I / KOH, acetona, t.a.

**Esquema 5.4.** Síntesis de los compuestos **5-5** y **5-6** a partir de triclabendazol.

#### 5.7.1.2. Síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**5-5**)

Se partió del 3,4-dicloronitrobenceno **5-8** el cual por S<sub>N</sub>Ar con 3,4-diclorofenoxy se convirtió en el éter **5-9**; éste se redujo a la amina química o catalíticamente; se acetiló y se nitró con mezcla sulfonítrica dando la 2-nitroacetanilida **5-12**. La metilación con (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posterior hidrólisis de la acetamida produjo la 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-N-metil-2-nitro-anilina (**5-14**). La reducción del grupo nitro, y posterior ciclación con CS<sub>2</sub> en potasa etanólica, condujo al 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1H-benzimidazol-2-tiol (**5-16**), el cual por tratamiento con CH<sub>3</sub>I en medio básico llevó al isómero buscado **5-5** (Esquema 5.5).

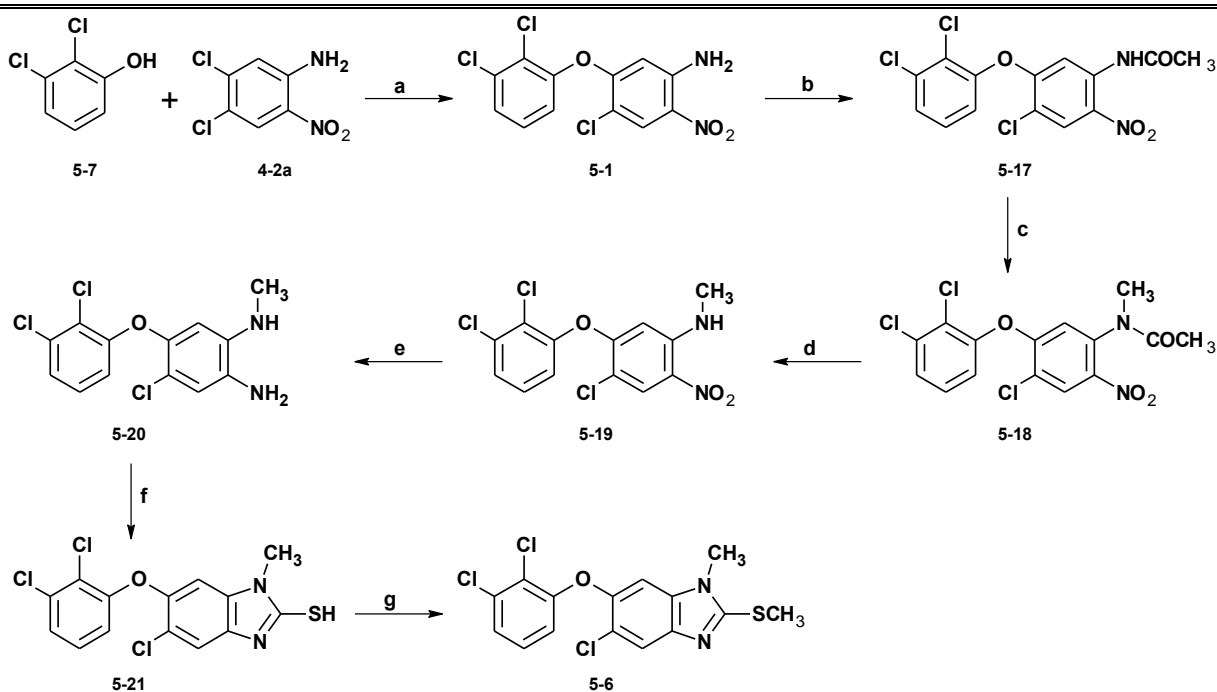


(a)  $K_2CO_3$ , DMF; (b)  $H_2$ , Ni-Raney or  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ; (c)  $Ac_2O$ ; (d)  $HNO_3/H_2SO_4$ ; (e)  $KOH/(CH_3)_2SO_4$ ; (f)  $H_2SO_4$ ; (g)  $CS_2/KOH$ , EtOH; (h)  $CH_3I/KOH$ .

**Esquema 5.5.** Ruta sintética para la preparación de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol (**5-5**).

### 5.7.1.3. Síntesis de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol (**5-6**)

Para la síntesis del isómero **5-6** se partió de 4,5-dicloro-2-nitroanilina y 2,3-diclorofenol que por  $S_NAr$  dio la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5-1**), intermediario común para la síntesis de TCBZ. Posterior acetilación y *N*-metilación de **5-1** con  $(CH_3)_2SO_4$  en medio básico permitió obtener la *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida **5-18**. La hidrólisis de **5-18**, generó la *N*-metil-2-nitroanilina **5-19**. El tratamiento de **5-19** con la metodología descrita para la síntesis del isómero **5-5** produjo el compuesto **5-6** (Esquema 5.6).



(a)  $K_2CO_3$ , DMF; (b)  $Ac_2O$ ; (c)  $KOH/(CH_3)_2SO_4$ ; (d)  $H_2SO_4$ ; (e)  $H_2$ , Ni-Raney o  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ; (f)  $CS_2/KOH$ , EtOH; (g)  $CH_3I/KOH$ .

**Esquema 5.6.** Ruta sintética para la preparación de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol (**5-6**).

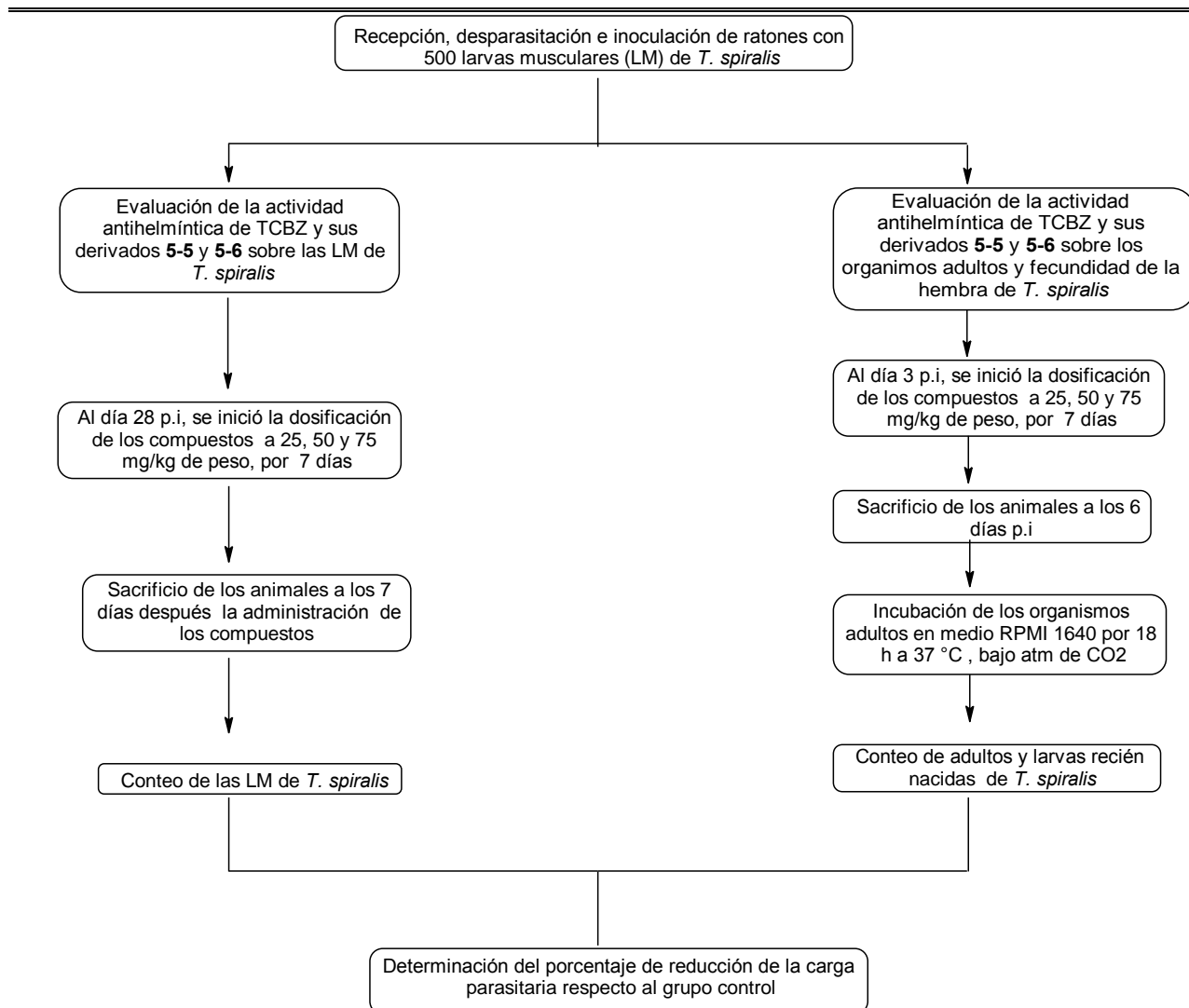
### 5.8.1. Parte biológica

#### 5.8.1.1. Actividad antihelmíntica

La actividad antihelmíntica *in vivo* del TCBZ (**5-4**) y sus derivados 1-metilados (**5-5** y **5-6**) se evaluó sobre *T. spiralis*; se usaron ratones BALB/c experimentalmente infectados con larvas musculares de *T. spiralis*. El efecto de los compuestos se determinó como % de reducción de la carga parasitaria causada por los compuestos sobre organismos adultos, sobre la fertilidad de la hembra y también sobre la fase muscular del parásito a tres dosis: 25, 50 y 75 mg/kg de peso. Los compuestos se administraron en suspensión.<sup>25</sup>

En todos los estudios se evaluaron tres dosis: 25, 50 y 75 mg/kg de peso, según se reporta en la literatura. El diagrama de flujo mostrado en la Figura 5.1 resume la metodología seguida para estas evaluaciones.

Los resultados se compararon frente a un control sin tratamiento y como fármacos de referencia se tuvieron al ABZ y NTZ solamente a la dosis de 50 mg/kg de peso. Los estudios se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en la parte experimental.



**Figura 5.1.** Diagrama de flujo seguido para la evaluación antihelmíntica vs. *T. spiralis*.

#### 5.8.1.2. Actividad antiprotozoaria

Se determinó la susceptibilidad *in vitro* de los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* a los compuestos TCBZ (5-4), 5-5 y 5-6, por tratamiento de los trofozoítos de los parásitos con concentraciones crecientes del compuesto a evaluar. Los controles positivos fueron ABZ, MTZ y NTZ. El experimento se realizó por triplicado siguiendo el método de subcultivo.<sup>26</sup>

Ambos experimentos se realizaron en el Hospital de Pediatría del IMSS Centro Médico, Siglo XXI por la Dra. Yépez y su grupo.

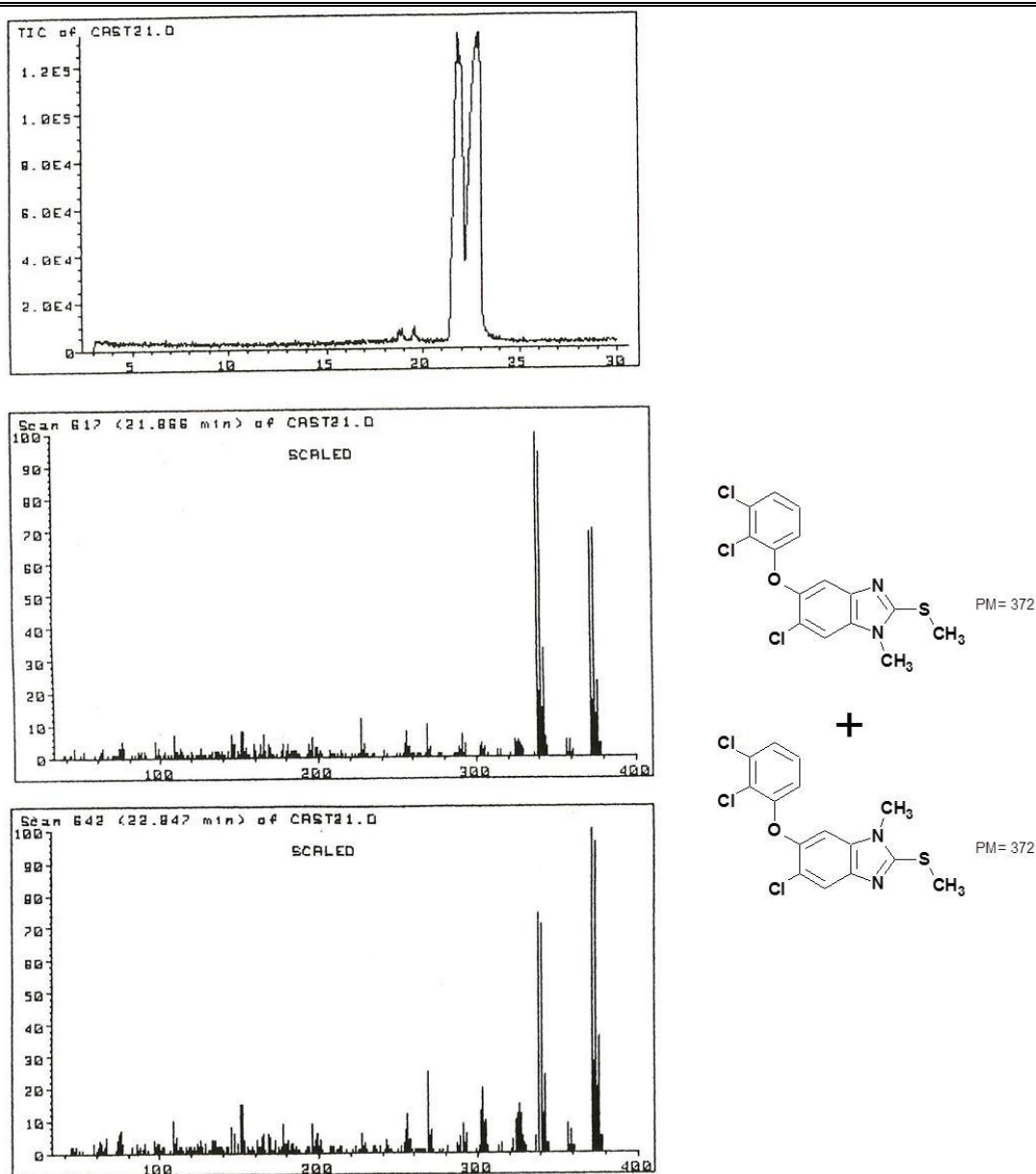
## 5.9. Resultados y Discusión

### 5.9.1. Parte química

#### 5.9.1.1. Síntesis de los derivados **5-5** y **5-6** a partir de triclabendazol

El triclabendazol se preparó de acuerdo al Esquema 5.4 a partir del éter 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5-1**) con buenos rendimientos; su *pf* y propiedades espectroscópicas coincidieron con lo reportado en la literatura.<sup>6,24</sup> Cuando el TCBZ se metiló con CH<sub>3</sub>I en medio alcalino se obtuvo una mezcla de compuestos en proporción 1:1 (Figura 5.2), correspondiente a la metilación de cada uno de los dos tautómeros del triclabendazol (Esquema 5.4). El producto, como mezcla, fundió con un rango de temperatura muy cerrado 162-165 °C lo que reflejó la semejanza de las dos estructuras. La mezcla como tal se sometió a análisis espectroscópicos y espectrométricos. El espectro de IR mostró las bandas características del sistema bencimidazólico entre 1576 cm<sup>-1</sup> y 1421 cm<sup>-1</sup>; también se observaron las bandas de estiramiento asimétrico para el éter aromático, C-O-C, a 1250 cm<sup>-1</sup> y para el tioéter, C-S-C, a 1146 cm<sup>-1</sup>. La RMN <sup>1</sup>H mostró dos señales a 2.74 ppm y 2.76 ppm correspondientes a los CH<sub>3</sub>-S para cada isómero, también dos señales a 3.65 ppm y 3.70 ppm asignadas a los CH<sub>3</sub>-N. En la parte aromática se observaron las cuatro señales sencillas para los carbonos 4 y 7 de los anillos de bencimidazol. Las señales para el diclorofenoxi no se diferenciaron, excepto los hidrógenos H-6' cuya señales aparecieron sobrepuestas pero diferenciadas. En la cromatografía de gases aparecieron dos picos muy juntos de igual intensidad, uno con *Rt*<sub>1</sub> de 21.866 min y *Rt*<sub>2</sub> 22.847 min. Los dos espectros de masas presentaron el mismo patrón de fragmentación únicamente se diferenciaron en la intensidad relativa de los iones. Para el isómero de menor *Rt* el M<sup>+</sup> fue de *m/z* 372 (68% de abundancia), y para el de mayor *Rt* el ion M<sup>+</sup> fue el pico base del espectro; en ambos casos se observaron los iones M+2 y M+4 corroborando la presencia de Cl y S (Figura 5.2).

Los isómeros se separaron por recristalización fraccionada de acetona, con poca eficiencia. Se aisló primeramente el compuesto de *R<sub>f</sub>* 0.35 con *pf* 183-184 °C y luego el de 0.51 con *pf* 137.6-139.7 °C, que correspondieron a los regioisómeros **5-6** y **5-5** respectivamente, de acuerdo a los puntos de fusión reportados en la literatura.<sup>24</sup>



**Figura 5.2.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) de la mezcla de compuestos 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-5**) y 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-6**).

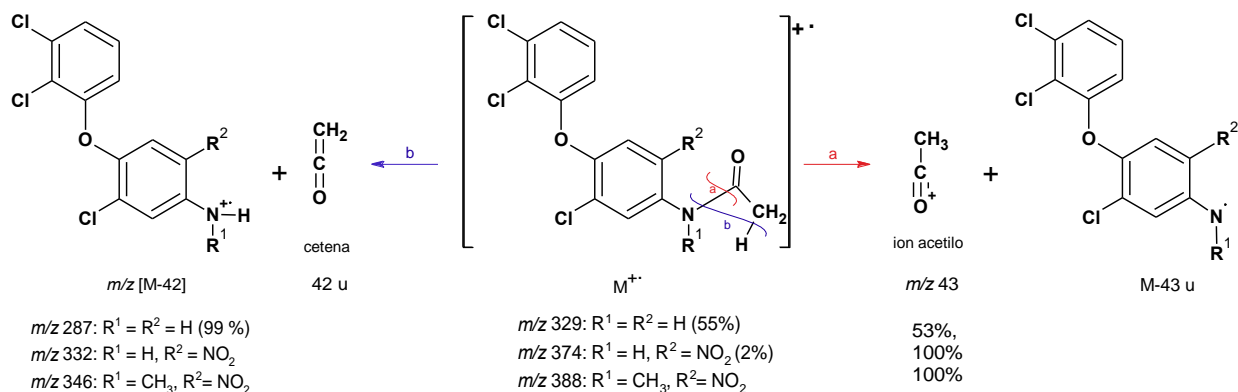
#### 5.9.1.2. Síntesis de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-5**)

La síntesis del isómero **5-5** partió del 3,4-dicloronitrobenceno (**5-8**), Esquema 5.5, que por sustitución nucleofílica con el 2,3-diclorofenol dio el éter **5-9** con rendimiento relativamente bajo (56% rendimiento crudo) debido a que el volumen de DMF fue más del necesario. El IR mostró las bandas características para el grupo nitro a  $1516\text{ cm}^{-1}$  y  $1344\text{ cm}^{-1}$ ; además de la correspondiente al C-O-C a  $1282\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de resonancia de  $^1\text{H}$  se observaron los 6 hidrógenos aromáticos con la multiplicidad esperada. En el espectro de masas se observó claramente al presencia de los tres cloros en la molécula por la abundancia de los iones  $m/z$ :



317 ( $M^+$ , 88%); 319 ( $M+2$ , 87%), y 321 ( $M+4$ , 30%). La reducción del grupo nitro se llevó a cabo utilizando  $H_2$  y Ni-Raney como catalizador para evitar hidrogenólisis. La amina obtenida se acetiló, rápidamente, con anhídrido acético y  $H_2SO_4$  como catalizador obteniéndose la acetanilida **5-11** con rendimiento cuantitativo. El IR mostró la presencia de la amida por las bandas a  $3300\text{ cm}^{-1}$  y  $1668\text{ cm}^{-1}$  de los estiramientos NH y C=O, respectivamente. En el espectro de RMN  $^1H$  la señal simple a 2.19 ppm que integró para 3H corroboró la presencia de la acetamida. En la espectrometría de masas el ion con  $m/z$  329 (59% de abundancia) correspondió a la masa esperada. Además los iones de  $m/z$  287 y 43 demostraron la presencia de la acetamida por la eliminación de ceteno ( $M-42$ , 99%) y la formación del catión acetilo ( $M-286$ , 50%), Esquema 5.7. Protegida la amina, vía acetilación, se procedió a introducir el otro nitrógeno mediante una reacción de nitración, la cual se llevó a cabo utilizando nitrato de acetilo (anhídrido acético +  $HNO_3$  conc.). La reacción produjo una mezcla de dos compuestos en proporción 80:20; el producto mayoritario correspondió al producto de nitración en la posición *orto* menos impedida. El rendimiento crudo de esta reacción fue de 83.98%. El producto se recrystalizó de metanol dando un solo producto con rendimiento de 60.4%. Este producto también se obtuvo a partir de la anilina **5-10** cuando ésta se acetiló y nitró al mismo tiempo. El cambio estructural se comprobó por las bandas de estiramiento asimétrico y simétrico de grupo nitro a  $1576\text{ cm}^{-1}$  y  $1306\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR. En la RMN  $^1H$ , se observaron los dos singuletes a 7.61 ppm y 8.90 ppm correspondientes a H-6 y H-3 respectivamente, lo que indicó la sustitución *para* al cloro y *orto* a la acetamida. En el espectro de masas el ion molecular fue muy pequeño ( $m/z$  374, 2%), pero el ion de  $m/z$  43 ( $M-331$ ) correspondió al pico base del espectro. El siguiente paso fue la *N*-metilación de la acetamida utilizando  $(CH_3)_2SO_4$  y KOH en solución al 50%. El disolvente empleado en esta reacción fue benceno por lo que la agitación de la mezcla de reacción fue determinante, además del cuidadoso control de la temperatura ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ) para evitar la hidrólisis de la acetamida y por consiguiente polialquilación. El espectro de IR mostró la presencia del grupo nitro por las bandas a  $1534\text{ cm}^{-1}$  y  $1344\text{ cm}^{-1}$ , así como de la permanencia del acetilo por la banda a  $1680\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento simétrico del C=O. En el espectro de RMN  $^1H$  se observó duplicidad de las señales de los metilos tanto del  $CH_3CO$  a 1.78 ppm y 2.15 ppm; como del  $CH_3N$  a 3.12 ppm y 3.31 ppm; los cuatro singuletes integraron para 6H en total. Este fenómeno se debió a la rotación restringida de los metilos provocado por el grupo  $NO_2$  vecino. En el espectro de masas no se observó el  $M^+$ ; el ion de mayor masa fue el fragmento

de  $m/z$  302 (M-43, 2%) y el pico base del espectro fue el ion acetilo,  $m/z$  43 (M-345) lo que corroboró la estructura de la *N*-metilacetamida **5-13**.



**Esquema 5.7.** Propuesta de formación de los iones  $m/z$  [M-42] y 43 en la fragmentación de las acetanilidas **5-11-5-13**.

Después se procedió a la hidrólisis de la *N*-metilacetamida **5-13**, utilizando  $H_2SO_4$  conc. y calor. La poca solubilidad acuosa de la diamina **5-14** ayudó a su aislamiento del medio ácido de reacción, sin problemas. El siguiente paso fue la reducción catalítica del grupo nitro utilizando Ni-Raney como catalizador. Es importante señalar que cuando se usó Pd/C al 5%, una ccf de la mezcla de reacción permitió observar otro producto en aproximadamente 10-15 % como impureza; posiblemente el producto de hidrogenólisis. La diamina **5-15**, sin posterior tratamiento, se sometió a la reacción de ciclación. La síntesis del tiol se realizó utilizando  $CS_2$  en KOH y etanol para generar el xantato de potasio *in situ*. La reacción fue muy eficiente (91%), el producto crudo se recristalizó de EtOH-DMF dada la insolubilidad característica de los tioles; aunque, debido al metilo en el nitrógeno bencimidazólico fue un poco más fácil de trabajar que cuando no está metilado este nitrógeno. La pequeña banda a  $2750\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR, demostró la presencia del SH, así como la señal amplia a 7.71 ppm, que desapareció con  $D_2O$ , en el espectro de RMN  $^1H$ , asignada al SH o al NH en la forma de tiona. El último paso fue la alquilación del azufre la cual se llevó a cabo utilizando como agente alquilante el  $CH_3I$  en medio alcalino. Esta reacción, debido a que el nitrógeno del bencimidazol también está metilado, no ofreció ningún problema y se realizó a temperatura ambiente. El rendimiento crudo de fue 78% y recristalizado de metanol 73.29 %. La *S*-metilación se demostró claramente en la espectroscopia: en el IR apareció la banda amplia a  $1146\text{ cm}^{-1}$  del tioéter C-S-C; en el espectro de RMN  $^1H$  se observó el singulete a 2.70 ppm que integró para 3H, característico de  $CH_3$  unido a azufre, también apareció el singulete a 3.69 ppm, que integró para 3H asignado al  $CH_3N$ ; Las señales aromáticas aparecieron con

los acoplamientos esperados; siendo representativos del núcleo de bencimidazol los dos singuletes asignados a los hidrógenos H-4 y H-7 a 7.44 ppm y 7.87 ppm, respectivamente. No hubo señal que intercambiase con D<sub>2</sub>O. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se contaron 15 señales concordantes con el número de carbonos del compuesto **5-5**; dos carbonos alifáticos (14.15 ppm y 30.21 ppm), 12 aromáticos y uno a 154.78 ppm asignado al C-2 del núcleo de bencimidazol. En el espectro de masas el ion de *m/z* 372 correspondió al M<sup>+</sup> con 94% de abundancia relativa, el cual estuvo acompañado de los respectivos M+2 (374, 100%) y M+4 (376, 32%) concordante con la contribución isotópica de los tres cloros y el azufre de la estructura de **5-5**; el fragmento de *m/z* 339 (M-33, 84%) apuntó la presencia de azufre.

#### 5.9.1.3. Síntesis de 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-6**)

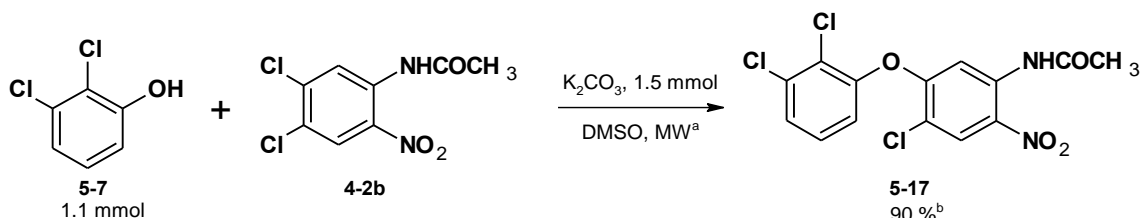
Para la síntesis de derivado **5-6** se partió de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina **4-2a**, (Esquema 5.6) la cual se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica con el 2,3-diclorofenol (**5-7**) en DMF y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para dar el éter **5-1** con buen rendimiento; el producto se logró recrystalizar exitosamente de una mezcla de tolueno-etanol. La formación del éter se comprobó porque en el espectro de IR apareció la banda a 1241 cm<sup>-1</sup> para el alargamiento C-O-C del éter; además de las bandas a 3465 cm<sup>-1</sup> y 3344 cm<sup>-1</sup> para la amina primaria, así como las correspondientes al grupo NO<sub>2</sub> a 1559 cm<sup>-1</sup> y 1423 cm<sup>-1</sup>. La RMN <sup>1</sup>H demostró la formación del éter por la presencia de los tres conjuntos de señales siguientes: dd a 7.42 ppm, t a 7.29 ppm y dd a 7.09 ppm correspondientes a los 3 hidrógenos del grupo diclorofenoxi; y por la señal amplia a 6.13 ppm que intercambió con D<sub>2</sub>O e integró para 2H correspondiente al NH<sub>2</sub> de la parte de la cloronitroanilina. En el espectro de masas el ion molecular de *m/z* 332 correspondió con la masa esperada; además, la presencia de los iones M+2 y M+4 corroboraron la presencia de tres cloros en la molécula.

El éter **5-1** también se preparó por fusión entre los precursores **4-2a** y **5-7** con KOH a 180 °C, la desventaja de este método es que la agitación es muy difícil, y a esta temperatura la 4,5-dicloro-2-nitroanilina sublima, lo que dificulta la reacción.

Actualmente, debido a la necesidad de contar con este tipo de precursores, esta reacción se ha realizado por calentamiento asistido por microondas con muy buenos resultados, 90% de conversión, en 15 min. En esta metodología se utilizó la materia prima acetilada **4-2b** (Esquema 5.8) dando el producto **5-18**, lo cual ofrece una ventaja para la posterior reacción

de metilación. La desventaja es el uso de DMSO como disolvente. Se requiere optimizar esta metodología.

Obtenido el éter **5-1**, el siguiente paso fue la acetilación de la amina la cual se llevó a cabo en solución de acetato de etilo; cuando la mezcla se enfrió, el producto (compuesto **5-17**) precipitó en forma cristalina. El acetilo se manifestó en el IR por las bandas a  $3322\text{ cm}^{-1}$  y  $1708\text{ cm}^{-1}$ . En la RMN<sup>1</sup>H, el CH<sub>3</sub>CO apareció como una señal simple que integró par 3H a 2.15 ppm y en el espectro de RMN <sup>13</sup>C la señal a 169.97 ppm se asignó al carbono del C=O. El ion de *m/z* 374 correspondió con la masa esperada.



<sup>a</sup> Condiciones de calentamiento en el horno Synthos 3000, Anton Paar: rotor 64MG5, 1) 2.5 min., 200 W, 120 °C; 2) 15 min. 85 W, 120 °C. <sup>b</sup> Determinado por CG-Masas

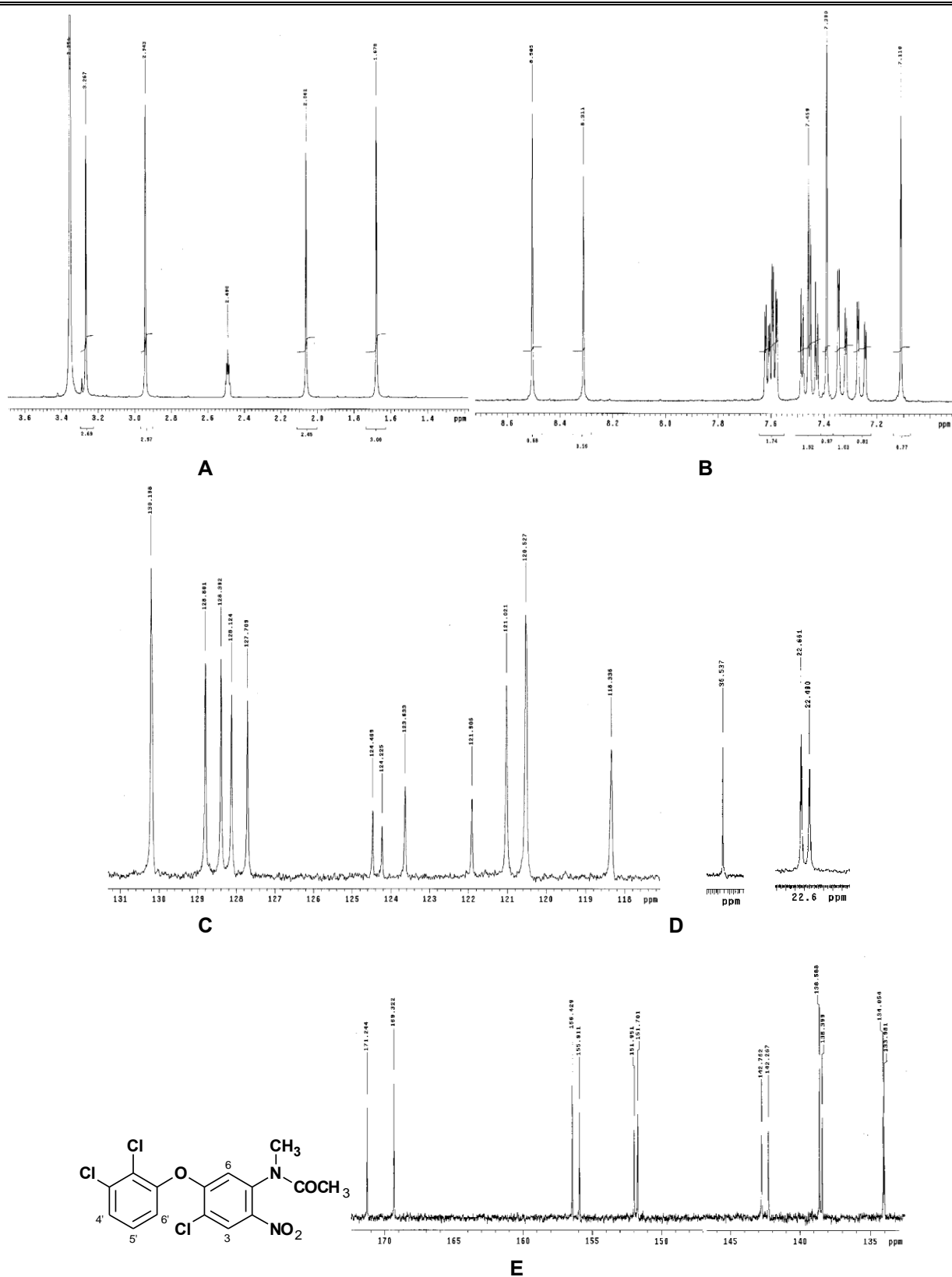
**Esquema 5.8.** Reacción de S<sub>N</sub>Ar para obtención del compuesto **5-17**.

Después, la amina acetilada se metiló con sulfato de dimetilo en KOH. Nuevamente el espectro de RMN<sup>1</sup>H y también el de <sup>13</sup>C, presentaron duplicidad de señales debido a los conformeros generados por el impedimento que produce el grupo nitro para la libre rotación del acetilo. En la Figura 5.3A se pueden observar dos señales para los hidrógenos del metilo del CH<sub>3</sub>CO a 1.67 ppm y a 2.06 ppm y dos para el CH<sub>3</sub>N a 2.943 ppm y 3.267 ppm. En general todas las señales se presentaron por duplicado; son particularmente notorios los singuletes a 7.11 ppm y 7.39 ppm y a 8.31 ppm y 8.50 ppm (Figura 5.3 B) asignados a los hidrógenos H-6 y H-3 de la *N*-metilnitroacetamida **5-18**. En el espectro de RMN de <sup>13</sup>C se observaron 27 señales en lugar de 15. La segunda señal para el CH<sub>3</sub>N no fue evidente pero dada la cercanía que tiene con la señales de DMSO, es posible que se encuentre sumada con la señal a 39.392 ppm; la señal para el C=O también se observó duplicada 169.32 ppm y 171.24 ppm, Figura 5.3 (C, D y E).

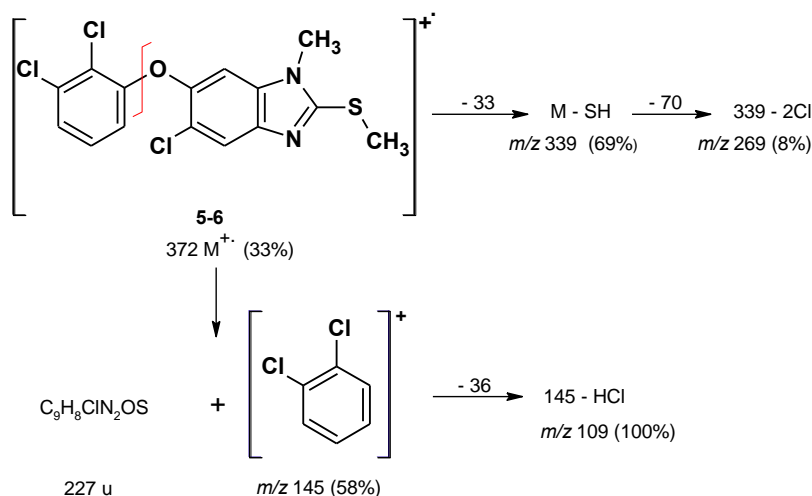
La hidrólisis del acetilo se llevó a cabo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la *N*-metilnitroanilina **5-19** se obtuvo con excelente rendimiento. El espectro de IR mostró la banda del NH de la amina a  $3364\text{ cm}^{-1}$ . En este caso no se observó duplicidad de las señales en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, lo que reforzó la hipótesis de que el impedimento en el giro del acetilo es lo que provocó este

efecto. El ion con  $m/z$  346 (100%) correspondió con la masa esperada. La reducción catalítica de la nitro-*N*-metilamina **5-19** se realizó utilizando Pd/C al 5%, la reacción no fue muy limpia ya que en la ccf se observó aproximadamente un 15% de impurezas, por lo que, se decidió emplear Ni-Raney al 30% como catalizador. El producto crudo de la reacción se sometió a la reacción con disulfuro de carbono para la formación del 2-mercaptobencimidazol **5-22**. La formación del tiol se evidenció por la banda a  $2750\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , la señal a 10.60 ppm que integró para 1H, intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$  y se asignó al protón del SH o del NH cuando está en forma de tiona. En EM el ion molecular correspondió con el ion de  $m/z$  358.

El compuesto **5-6** se obtuvo sin problemas por la metilación del tiol en presencia de potasa y  $\text{CH}_3\text{I}$ . Los hidrógenos del  $\text{CH}_3\text{S}$  aparecieron a 2.72 ppm como un singulete que integró para 3H en el espectro de resonancia de  $^1\text{H}$  y el  $\text{CH}_3$  unido a N apareció a 3.63 ppm. Los tres hidrógenos aromáticos del sustituyente diclorofenoxi aparecieron a 6.62, 7.24 y 7.36 ppm como dobletes de dobletes. Las dos señales simples a 7.57 y 7.77 ppm correspondieron a los hidrógenos H-7 y H-4 del anillo de bencimidazol. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostró las 15 señales para los carbonos del sistema. Las señales a 14.14 ppm y 30.14 ppm correspondieron a los carbonos de los metilos  $\text{CH}_3\text{S}$  y  $\text{CH}_3\text{N}$  respectivamente; la señal a 155.34 ppm fue característica de C-2 del anillo de bencimidazol. La espectrometría de masas mostró el ion molecular a 372 unidades de  $m/z$ , los correspondientes M+2 y M+4 estuvieron en concordancia con la presencia de los isótopos de cloro y azufre. El fragmento 339 (M-33) demostró la presencia de azufre. En el Esquema 5.9 se muestra la formación de los principales iones encontrados en el espectro de masas del compuesto **5-6**.



**Figura 5.3.** Duplicidad de señales en RMN del compuesto **5-18**. **A y B)** Espectro de  $^1\text{H}$ , regiones de 1-3.5 y 7-8.6 ppm. **C, D y E)** Espectro de  $^{13}\text{C}$ , regiones 118-131 ppm, 20-40 ppm y 135-175 ppm.

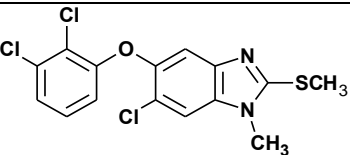
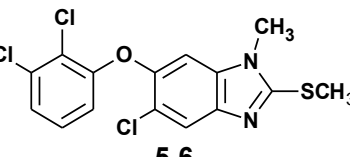
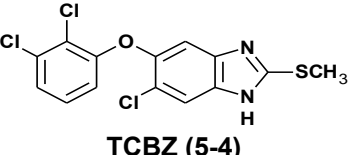


**Esquema 5.9.** Fragmentos más importantes en el espectro de masas para el compuesto **5-6**. El mismo tipo de iones pero con diferente abundancia relativa se obtuvieron para el compuesto **5-5**.

En las Tablas 5.3 y 5.4 se muestran las constantes físicas y espectroscópicas de los isómeros **5-5** y **5-6** y del TCBZ en donde se puede observar que todas sus constantes son casi idénticas, excepto en la abundancia en los espectros de masas. Sin embargo cuando se tuvo la mezcla de los isómeros a partir de triclabendazol, los espectros de masas fueron más parecidos. En cuanto a sus constantes físicas tales como  $R_f$ ,  $R_t$  y  $p_f$  si se observó una clara diferencia entre los dos isómeros, Tabla 5.6.

Las Tablas 5.6–5.9 resumen las constantes físicas y espectroscópicas de los intermediarios en la síntesis de **5-5** y **5-6**.

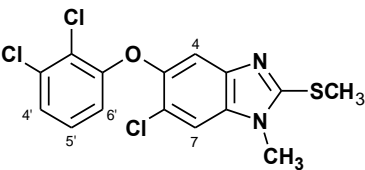
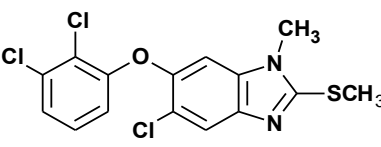
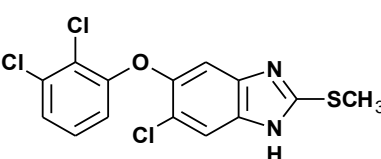
Tabla 5.3. Constantes físicas y rendimientos de los compuestos 5-5, 5-6 y TCBZ

Estructura	Fórmula PM	Rendimiento (%)		pf (°C)	Disolvente de cristalización	R <sub>f</sub> (Sistema)	C logP <sup>a</sup>
		crudo	recristalizado				
 <p><b>5-5</b></p>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS 373.6846	78	73.29	183–184 181-182 (ref. 24)	EtOH/H <sub>2</sub> O	0.3571 CHCl <sub>3</sub> /MeOH, 98:2	6.44 ± 0.89
 <p><b>5-6</b></p>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS 373.6846	80	72	137.6–139.7 132-134 (ref. 24)	EtOH/H <sub>2</sub> O	0.5178 CHCl <sub>3</sub> /MeOH, 98:2	6.44 ± 0.89
Mezcla <b>5-5+5-6</b>	—	84	--	162-165	Producto crudo Acetona/agua	0.3571 0.5178 CHCl <sub>3</sub> /MeOH, 98:2	—
 <p><b>TCBZ (5-4)</b></p>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS 359.6580	89.74	64.74	173-174 175-176 (ref 6) 176-178 °C, (ref. 24)	Tolueno/C activado	0.6071 CHCl <sub>3</sub> /MeOH, 98:2	6.34 ± 81 5.7 experimental

<sup>a</sup> Calculado con el programa ACDIabs



**Tabla 5.4.** Características espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **5-5**, **5-6** y TCBZ (**5-4**)

Compuesto	Constantes
 <p>6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (<b>5-5</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3052 (C-H Ar.), 2932 (C-H Alif.), 1627, 1574, 1448, 1423 (C=C, N=C-S), 1251 (C-O-C); 1146 (C-S-C), 909 (C-Cl).</p> <p>RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 2.70 (s, 3H, <math>\text{CH}_3\text{S}</math>); 3.69 (s, 3H, <math>\text{CH}_3\text{N}</math>); 6.60 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=1.2</math> Hz, H-6'); 7.24 (dd, 1H, <math>J_1=8.10</math> Hz, <math>J_2=8.40</math> Hz, H-5'); 7.35 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-4'); 7.44 (s, 1H, H-4); 7.87 (s, 1H, H-7).</p> <p>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (75.3 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 14.15 (<math>\text{CH}_3\text{S}</math>), 30.21 (<math>\text{CH}_3\text{N}</math>), 110.74 (C-4), 111.16 (C-7), 114.88 (C-6'), 118.81 (C-6), 120.80 (C-2'), 124.22 (C-4'), 128.70 (C-5), 132.80 (C-7a), 135.60 (C-3'), 142.23 (C-3a), 144.67 (C-5), 154.79 (C-2), 155.56 (C-1').</p> <p>EM (CG, IE, <math>R_t</math> 21.457 min) <math>m/z</math>: 376 (M+4, 32%); 374 (M+2, 100%); 372 (<math>M^+</math>, 94%); 343 (23%), 341 (77%), 339 (M-33, 84%); 269 ([M-33]-70, 32%); 151 (36%), 152 (38%), 145 (M-227, 19%); 109 ([M-227]-36, 28%).</p>
 <p>5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (<b>5-6</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3082 (C-H Ar.) 2932 (C-H Alif.), 1620, 1577, 1466, 1427 (C=C, N=C-S), 1256 (C-O-C), 1168 (C-S-C), 906 (C-Cl).</p> <p>RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 2.72 (s, 3H, <math>\text{CH}_3\text{S}</math>); 3.63 (s, 3H, <math>\text{CH}_3\text{N}</math>); 6.62 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=1.50</math> Hz, H-6'); 7.24 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-5'); 7.35 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-4); 7.57 (s, 1H, H-7); 7.77 (s, 1H, H-4).</p> <p>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (75.3 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 14.14 (<math>\text{CH}_3\text{S}</math>), 30.14 (<math>\text{CH}_3\text{N}</math>), 103.72 (C-7), 114.875 (C-6'), 118.45 (C-4), 118.85 (C-5), 120.70 (C-2'), 124.17 (C-4'), 128.66 (C-5'), 132.81 (C-7a), 136.43 (C-3'), 140.74 (C-3a), 144.55 (C-1'), 154.75 (C-6), 155.34 (C-2).</p> <p>EM (CG, IE, <math>R_t</math> 21.137 min) <math>m/z</math>: 376 (M+4, 14 %); 374 (M+2, 43 %); 372 (<math>M^+</math>, 33%); 339 (M-33, 69 %); 341 (58 %), 343 (20 %); 145 (M-227, 56%); 147(39 %), 149 (15 %); 109 ([M-227]-36, 100 %).</p>
 <p>6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (TCBZ, <b>5-4</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3044 (NH, C-H Ar.) 2932 (C-H Alif.), 1626, 1574, 1450 (C=C, N=C-S), 1258 (C-O-C), 1110 (C-S-C), 909 (C-Cl).</p> <p>RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 2.68 (s, 3H, <math>\text{CH}_3\text{S}</math>); 6.64 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-6'); 7.32 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-5'); 7.35 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-4); 7.68 (s, 1H, H-7); 7.77 (s, 1H, H-4).</p> <p>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (75.3 MHz, <math>\text{DMSO}_{-d6}</math>) <math>\delta</math> en ppm: 13.781 (<math>\text{CH}_3\text{S}</math>), 115.11 (C-4), 118.51 (C-6'), 120.88 (C-7), 124.26 (C-6), 125.30 (C-2'), 128.19 (C-4'), 128.70 (C-5'), 128.89 ((C-3a,C-7a), 132.82(C-3') 144.56 (C-5), 154.23 (C-2) 154.709 (C-1').</p> <p>EM IE, <math>m/z</math>: 362 (M+4, 28.56 %); 374 (M+2, 83.20 %); 358 (<math>M^+</math>, 79%).</p>

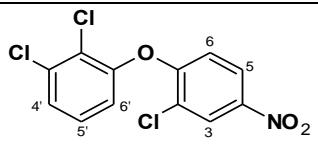
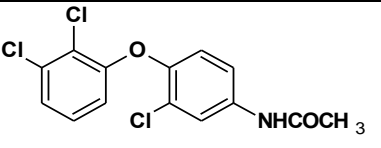
**Tabla 5.5.** Rendimiento y constantes físicas de los intermediarios 5-9 a 5-16

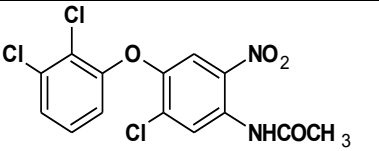
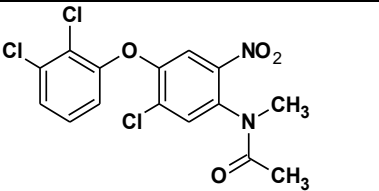
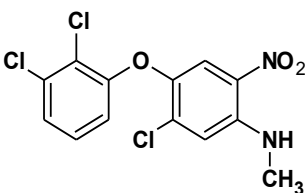
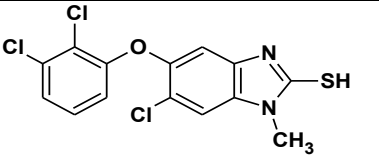
Compuesto	crudo	Rendimiento (%)	pf °C	R <sub>f</sub> (sistema)
		recristalizado		
5-9	56	44.54 Tolueno	117.5-118.0	0.50 (I)
5-10	95.21	74.44 Ciclohexano	----	0.26 (I)
5-11	97.63	79.08 1) EtOH/H <sub>2</sub> O, 2) Tolueno	129-130	0.30 (VI)
5-12	83.98	50.66 AcOEt	169-170	0.34 (I)
5-13	75.74	39.53 Tolueno/MeOH	130-131	0.13 (I)
5-14	89.96	70.33 Benceno/EtOH	148-149	0.46 (I)
5-15	91.4	----	----	0.35 (I)
5-16	91.07	73.21 EtOH-DMF/C activado	295-296	0.42 (VI)

**Tabla 5.6.** Rendimiento y constantes físicas de los intermediarios 5-17 a 5-22

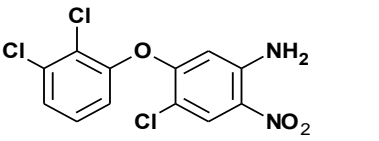
Compuesto	crudo	Rendimiento (%)	pf °C	R <sub>f</sub> (sistema)
		recristalizado de		
5-1	97.48	80.71 Tolueno/EtOH	144-145	0.55 (III)
5-17	84.58	68.50 EtOH	158-159	0.63 (III)
5-18	89.19	83.83 EtOH	179-180	0.21 (III)
5-19	91.55	86.31 EtOH	184-185	0.66 (III)
5-20	100	----	----	0.28 (I)
5-21	93.39	70.31 EtOH/C activado	260.2-261.7	0.57 (VI)

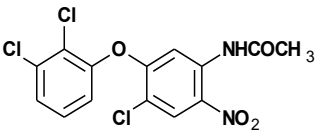
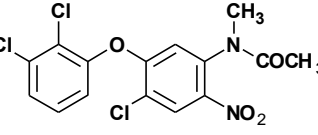
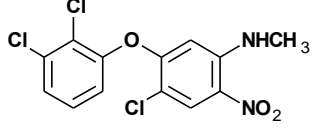
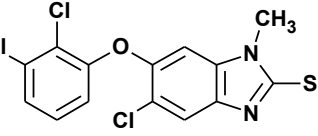
**Tabla 5.7.** Características espectroscópicas y espectrométricas de los intermediarios de la síntesis de 5-5

Compuesto	Constantes
 <p>2-Cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (5-9)</p>	<p>IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3000-3100 (C-H Ar.), 1570-1448 (C=C); 1516, 1344 (-NO<sub>2</sub>), 1282 (C-O-C Ar.), 926 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm: 6.97 (d, 1H, <i>J</i>= 9 Hz, H-6'), 7.18–7.40 (m, 2H, H-4 y H-5); 7.50 (dd, 1H, <i>J</i><sub>1</sub>= 9 Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 3 Hz, H-6); 8.10 (dd, 1H, <i>J</i><sub>1</sub>= 9Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 3H, H-5'); 8.31 (d, 1H, <i>J</i>= 3H, H-3').</p> <p>EM (CG, IE, Rt 14.226 min.) <i>m/z</i>: 321 (M+4, 30%); 319 (M+2, 87%); 317 (M<sup>+</sup>, 88%); 238 ([M+2]-81, 70%); 236 (M-81, 100%); 172 ([M-81]-63, 43%).</p>
 <p><i>N</i>-[3-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (5-11)</p>	<p>IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3300 (NH), 3114–3184 (C-H Ar.), 2900 (C-H Alif), 1668 (C=O), 1590, 1448 (C=C), 1254 (C-OC), 928 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm: 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 6.48 (dd, 1H, <i>J</i><sub>1</sub>= 9 Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 3 Hz, H-6'); 6.73 (d, 1H, <i>J</i>= 9 Hz, H-5); 6.80–7.29 (m, 3H, H-4', H-5', H-6); 7.57 (d, 1H, <i>J</i>= 3 Hz, H-2); 7.80 (sa, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O NHCO).</p> <p>EM (CG, IE, Rt 17.712 min.) <i>m/z</i>: 333 (M+4, 13%); 331 (M+2, 53%); 329 (M<sup>+</sup>, 55%); 291 ([M+4]-42, 30 %); 289 ([M+2]-42, 94 %); 287 (M-42, 99%); 142 (M-187, 96%); 43 (M-286, 53 %).</p>

 <p><i>N</i>-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (<b>5-12</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3340 (NH), 3130, 3072 (C-H), 1680 (C=O), 1576, 1306 (-NO<sub>2</sub>), 1500, 1448 (C=C), 1254 (C-O-C); 998 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 6.78 (dd, 1H, <math>J_1=9</math> Hz, <math>J_2=3</math> Hz, H-6'); 7.33 (m, 2H, H-5' y H-4'); 7.61 (s, 1H, H-6); 8.90 (s, 1H, H-3); 12.80 (sa, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH).</p> <p>EM (CG, IE, Rt 17.519) <math>m/z</math>: 376 (M+2, 2%); 374 (M<sup>+</sup>, 2%); 43 (M-331, 100%).</p>
 <p><i>N</i>-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-<i>N</i>-metilacetamida (<b>5-13</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3032 (C-H Ar.), 2934 (C-H Alif.), 1680 (C=O), 1534, 1344 (NO<sub>2</sub>), 1568, 1486, 1450 (C=C), 972 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 1.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 3.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 6.82–7.41 (m, 3H, H-4', H-5' y H-6'), 7.30 (s, 1H, H-6); 7.430 (s, 1H, H-3).</p> <p>EM (CG, IE, Rt 17.432 min.) <math>m/z</math>: 345 (M-43, 2%); 43 (M-345, 100%).</p>
 <p>5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-<i>N</i>-metil-2-nitroanilina (<b>5-14</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3390 (NH), 3078 (C-H Ar.), 2918 (C-H Alif.); 1566 y 1398 (NO<sub>2</sub>), 1626, 1500, 1448 (C=C); 1256 y 1222 (C-O-C, C-N-C); 996 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 3.00 (d, 3H, <math>J=6</math> Hz, CH<sub>3</sub>N, simplificó con D<sub>2</sub>O); 6.65 (dd, 1H, <math>J_1=9.0</math> Hz, <math>J_2=3</math> Hz, H-6'); 6.90 (m, 3H, H-6, H-5' y H-4'); 7.80 (s, 1H, H-3); 7.92 (s, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH).</p> <p>EM (CG, IE, Rt 16.992 min) <math>m/z</math>: 350 (M+4, 36%); 348 (M+2, 97%); 346 (M<sup>+</sup>, 100%); 300 (M-46, 21%); 258 (M-88%, 56%); 201 (M-145, 48%); 173 (201-28, 32%), 155 (M-191, 62%); 145 (M-201, 76%); 139 (155-16, 93%), 109 (139-30, 96%).</p>
 <p>6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-tiol (<b>5-16</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3440 (NH de la forma de tiona), 3121, 3068 (C-H Ar.), 2934 (C-H Alif.), 2750 (SH), 1624, 1572, 1490, 1428 (C=C, C=N-S), 996 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 6.65 (dd, 1H, <math>J_1=9</math> Hz, <math>J_2=3</math> Hz, H-6'); 6.89 (s, 1H, H-4); 7.02–7.30 (m, 2H, H-4' y H-5'); 7.37 (s, 1H, H-7), 7.71 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, SH).</p>

**Tabla 5.8.** Constantes espectroscópicas espectrométricas de los intermediarios de la síntesis de 5-6

compuesto	Constantes
 <p>4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (<b>5-1</b>).</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3465 y 3344 (-NH<sub>2</sub>), 3174–3039 (C-H Ar.), 1632, 1469, 1446 (C=C), 1559, 1423 (-NO<sub>2</sub>), 1241 (C-O-C), 911 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 5.93 (s, 1H, H-6), 6.13 (sa, 2H, Inter. con de D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 7.09 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-6'); 7.29 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-5'), 7.42 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-4'); 8.26 (s, 1H, H-3).</p> <p>EM (CG, IE) <math>m/z</math>: 336 (M+4, 30 %); 334 (M+2, 93 %), 332 (M<sup>+</sup>, 94 %); 262 (M-70, 100 %); 251 (M-81, 50 %).</p>

 <p><i>N</i>-[4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (<b>5-17</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3322 (NH), 3109–3071 (C-H Ar.), 1708 (C=O), 1610, 1583, 1488 (C=C), 1570, 1367 (-NO<sub>2</sub>), 1267 (C-O-C), 991 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 7.374 (dd, 1H, <math>J_1=8.0</math> Hz, <math>J_2=1.6</math> Hz, H-6'), 7.57 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=8.0</math> Hz, H-5'); 7.62 (dd, 1H, <math>J_1=8.0</math> Hz, <math>J_2=1.2</math> Hz, H-4); 8.16 (s, 1H, H-3), 10.24 (s, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH).</p> <p>RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Acetona-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 25.08 (CH<sub>3</sub>CO), 109.45 (C-6), 117.62 (C-4), 121.95 (C-6'), 125.90 (C-2'), 128.725 (C-4'), 128.88 (C-3), 130.05 (C-5'), 133.37 (C-1), 134.94 (C-2), 136.39 (C-3'), 152.18 (C-1'), 158.27 (C-5), 169.97 (C=O).</p> <p>EM (ID, IE) <math>m/z</math>: 378 (M+4, 4 %); 376 (M+2, 10%); 374 (M<sup>+</sup>, 12%); 332 (M-42, 52 %); 328 (M-46, 90 %); 326 (M-48, 64 %); 291 (326 [M-48]-35, 58%); 256 (M-118, 100%).</p>
 <p><i>N</i>-[4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-<i>N</i>-metilacetamida (<b>5-18</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3103–3028 (C-H Ar.), 2936 (C-H Alif.), 1672 (C=O), 1600, 1521, 1448 (C=C), 1565 y 1337 (-NO<sub>2</sub>), 1247 (C-O-C), 915 (C-C).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: Espectros con duplicidad de señales 1.678 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 2.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 7.11 (s, 1H, H-6); 7.25 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-6'); 7.33 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-6'); 7.39 (s, 1H, H-6); 7.45 (dd, 1H, <math>J_1=8.4</math>, <math>J_2=8.1</math>, H-5'); 7.45 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=8.1</math> Hz, H-5'); 7.59 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.2</math> Hz, H-4'); 7.60 (dd, 1H, <math>J_1=8.1</math> Hz, <math>J_2=1.5</math> Hz, H-4'); 8.31 (s, 1H, H-3); 8.50 (s, 1H, H-3).</p> <p>RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: Espectros con duplicidad de señales. 22.49 (CH<sub>3</sub>CO); 22.66 (CH<sub>3</sub>CO); 36.53 (CH<sub>3</sub>N), 118.33 (C-2'), 120.52 (C-6'), 121.02 (C-4'), 121.90 (C-2'), 123.63 (C-2'), 124.22 (C-4), 124.46 (C-4), 127.70 (C-6), 128.12 (C-6), 128.39 (C-3), 128.80 (C-3), 130.19 (C-5'), 133.98 (C-3'), 134.05 (C-3'), 138.39 (C-1), 138.58 (C-1), 142.26 (C-2), 142.76 (C-2), 151.70 (C-1'), 151.95 (C-1'), 155.91 (C-5), 156.42 (C-5), 169.32 (C=O), 171.24 (C=O).</p> <p>EM (ID, IE, con descomposición) <math>m/z</math>: 358 (M-30, 4 %); 342 ([M-30]-16, o M-46 96 %); 340 (M-48, 96 %); 305 (340-35, 54 %); 270 (M-118, 305-35, 100%).</p>
 <p>4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-<i>N</i>-metil-2-nitroanilina (<b>5-19</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3364 (NH), 3076 (C-H Ar.), 2954 (C-H Alif.), 1626, 1508 (C=C), 1566, 1444 (-NO<sub>2</sub>), 1234 (C-O-C, C-N-C), 908 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 2.83 (d, 3H, <math>J=6</math> Hz, simplifica con D<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>NH); 6.12 (s, 1H, H-6), 7.09 (dd, 1H, <math>J_1=9</math> Hz, <math>J_2=3</math> Hz, H-6'); 7.18–7.50 (m, 2H, H-5' y H-4'); 8.15 (s, 1H, H-3); 8.20 (sa, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH).</p> <p>EM (CG, IE, <i>Rt</i> 17.299) <math>m/z</math>: 350 (M+4, 31 %); 348 (M+2, 93 %); 346 (M<sup>+</sup>, 100 %); 276 (M-70, 28%); 258 (M-88, 32 %); 183 (M-163, 43%).</p>
 <p>5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-tiol (<b>5-21</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3066 (C-H Ar.), 2940 (C-H Alif.), 2750 (SH), 1578, 1480, 1440, 1334 (C=C, N=C-S), 1272 (C-O-C), 912 (C-Cl).</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>) <math>\delta</math> en ppm: 3.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N); 6.50 (dd, 1H, <math>J_1=9</math> Hz, <math>J_2=3</math> Hz, H-6'); 6.910–7.130 (m, 2H, H-4' y H-5'); 10.60 (sa, 1H, Inter. con D<sub>2</sub>O, SH o NH de la forma de tiona).</p> <p>EM (CG, IE) <math>m/z</math>: 362 (M+4, 30 %); 360 (M+2, 82 %); 358 (M<sup>+</sup>, 67%), 340 (M-18, 100 %).</p>

5.9.2. Parte biológica

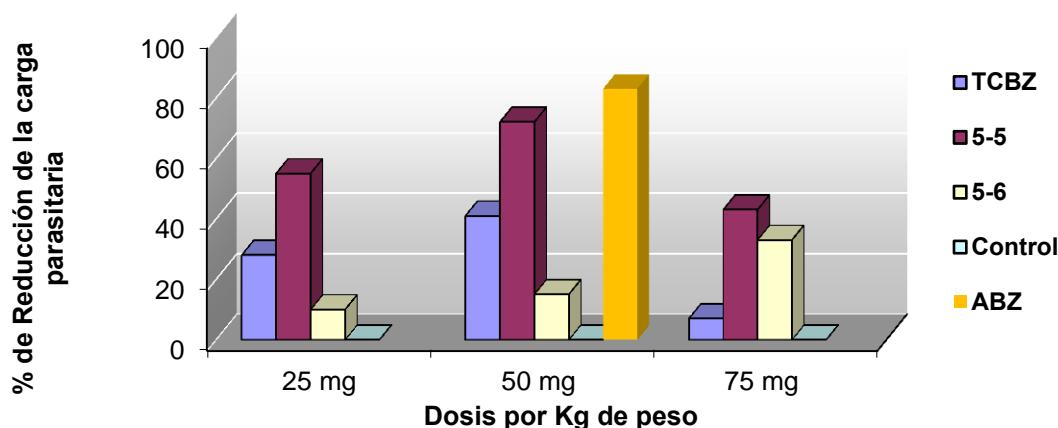
Los compuestos TCBZ (5-4), 5-5 y 5-6 se sometieron a evaluación antihelmíntica contra el helminto *Trichinella spiralis* *in vitro* e *in vivo*. En estos ensayos también se evaluó la actividad antihelmíntica de la mezcla de los isómeros 5-5 y 5-6; además la actividad antiprotozoaria *in vitro* frente a *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

5.9.2.1. Evaluación antihelmíntica vs *Trichinella spiralis*

En las Tablas 5.9–5.11 y Figuras 5.1–5.3 se muestran los resultados de la evaluación antihelmíntica *in vivo* en ratones. Se midió la disminución de la carga parasitaria en la fase adulta de *T. spiralis*, el efecto sobre la fertilidad y sobre las larvas musculares (LM). Los estudios se realizaron utilizando tres dosis: 25, 50 y 75 mg/kg de peso.

**Tabla 5.9.** Efecto de TCBZ y sus derivados 1-metilados 5-5 y 5-6 sobre el organismo en fase adulta de la *T. spiralis*

Compuesto	Porcentaje (%) de reducción de la fase adulta		
	25 mg/Kg de peso	50 mg/Kg de peso	75 mg/Kg de peso
Dosis			
TCBZ (5-4)	28	41	7
5-5	55	72	43
5-6	10	15	33
5-5+5-6	31	55	—
Control	0	0	0
ABZ	—	83	—
NTZ	—	71	—



**Gráfica 5.1.** Efecto de TCBZ y sus derivados 1-metilados 5-5 y 5-6 sobre la fase adulta de *T. spiralis*.

Los resultados sobre la fase adulta de *T. spiralis* mostraron (Tabla 5.9 y Gráfica 5.1) mostraron que el compuesto 5-5, isómero que tiene el metilo en la posición 1 y el diclorofenoxi en la posición 5 del anillo bencimidazólico, fue el que causó mayor efecto sobre el organismo adulto de la *T. spiralis* (fase entérica). El segundo lugar fue para el

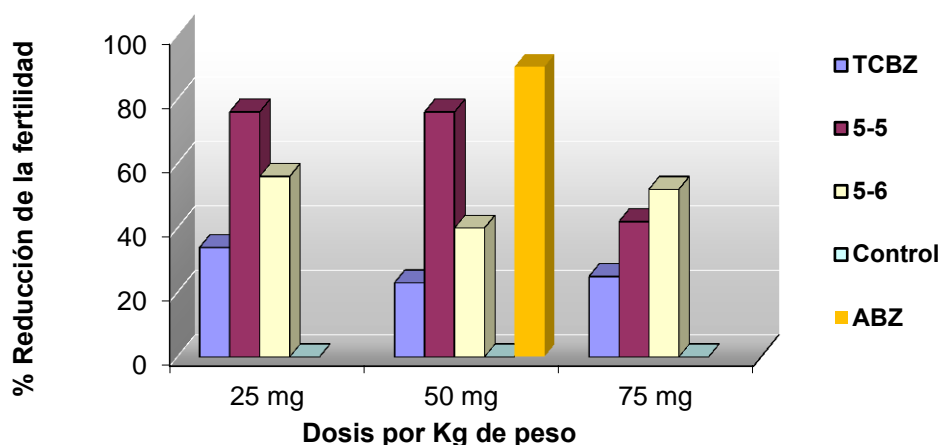
TCBZ y por último el isómero **5-6**. Cuando se evaluó la mezcla de los dos isómeros, el porcentaje de reducción tuvo un valor intermedio entre los valores individuales.

Los resultados de la evaluación sobre el efecto que tienen estos compuestos sobre la fertilidad de las hembras de *T. spiralis* se muestran en la Tabla 5.10 y la Gráfica 5.2.

**Tabla 5.10.** Efecto del TCBZ, y sus derivados 1-metilados **5-5** y **5-6** sobre la fertilidad el de las hembras de *T. spiralis*

Compuesto	Porcentaje (%) de reducción de la fertilidad		
Dosis	25 mg/Kg de peso	50 mg/Kg de peso	75 mg/Kg de peso
TCBZ (5-4)	34	23	25
<b>5-5</b>	76	76	42
<b>5-6</b>	56	40	52
Control	0	0	0
ABZ		90	
NTZ		90	

Nuevamente se puede observar que los derivados 1-metilados **5-5** y **5-6** tuvieron mayor efecto sobre la fertilidad de las hembras de *T. spiralis* que el TCBZ. El compuesto **5-5** mostró el mayor efecto, 76% de reducción, comparado con 90% de reducción mostrado por ABZ. En general no se observó cambio en el porcentaje de reducción al aumentar la dosis; aunque, a la dosis más alta el efecto disminuyó, tal vez esté involucrado algún problema de solubilidad.



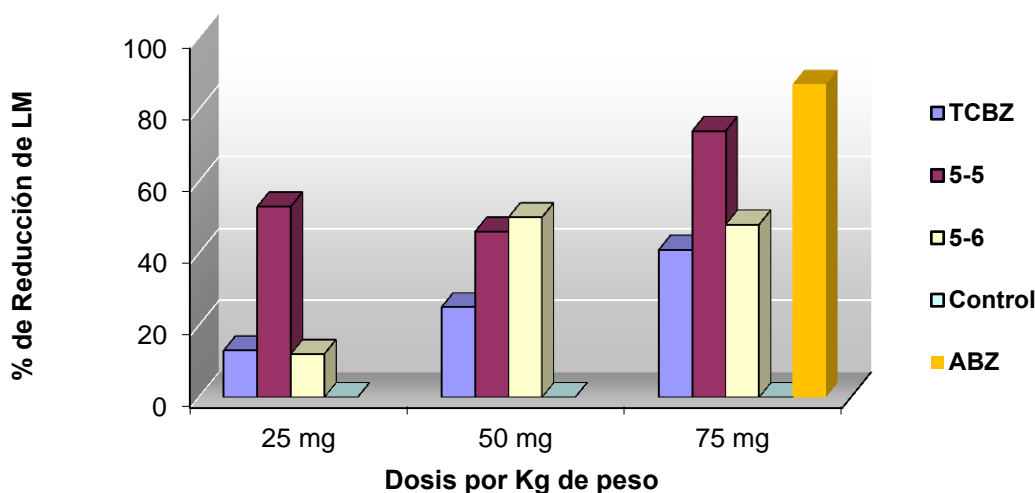
**Gráfica 5.2.** Efecto, expresado en %, del TCBZ y sus derivados 1-metilados **5-5** y **5-6** sobre la fertilidad el de las hembras de *T. spiralis*.

Cuando se midió el efecto de estos compuestos sobre la larva muscular de *T. spiralis*, nuevamente el compuesto **5-5** fue el que tuvo mayor efecto. Además se logró ver en general que al aumentar la dosis el efecto sobre la LM también aumentó, esto se podría correlacionar con una mayor absorción. En la Tabla 5.11 y la Gráfica 5.3 se muestra el efecto sobre las LM de *T. spiralis*.

**Tabla 5.11.** Efecto del TCBZ, y sus derivados 1-metilados **5-5** y **5-6** sobre la larva muscular (LM) de *T. spiralis*

Compuesto	Porcentaje (%) de reducción de las larva muscular (LM) de <i>T spiralis</i>		
	25 mg/Kg de peso	50 mg/Kg de peso	75 mg/Kg de peso
Dosis			
TCBZ	13	25	41
5-5	53	46	74
5-6	12	50	48
Control	0	0	0
ABZ			87
NTZ			60

Al comparar estos resultados con los datos que se tienen reportados de este tipo de ensayos realizados para ABZ y NTZ, se pudo ver que el compuesto **5-5** tuvo porcentajes de reducción muy semejantes a los del ABZ, y en algunos casos superiores a los reportados para la NTZ. Lo que hace muy interesante el continuar con otros estudios, con el propósito de ampliar su espectro antihelmíntico.



**Gráfica 5.3.** Porcentaje de reducción de larvas musculares de *T. spiralis* por efecto de los compuestos TCBZ, **5-5** y **5-6**.

#### 5.9.2.12. Evaluación antiprotozoaria vs. *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*

La evaluación antiprotozoaria se realizó utilizando el método de subcultivos reportado por Cedillo *et al.*<sup>26</sup> Los resultados se muestran en las Tabla 5.12 y Gráfica 5.4.

**Tabla 5.12.** Susceptibilidad *in vitro* contra los protozoarios *G intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*

Compuesto	Cl <sub>50</sub> μM <i>G</i> <i>intestinalis</i>	1/ Cl <sub>50</sub>	Cl <sub>50</sub> μM <i>E.</i> <i>histolytica</i>	1/ Cl <sub>50</sub>	Cl <sub>50</sub> μM <i>T. vaginalis</i>	1/ Cl <sub>50</sub>
<b>TCBZ (5-4)</b>	0.0236	42.37	0.4059	2.46	0.6172	1.62
<b>5-5</b>	1.1453	0.87	1.3861	0.72	0.9098	1.10
<b>5-6</b>	0.1926	5.19	0.2783	3.59	0.2033	4.92
<b>ABZ</b>	0.037	27.03	56.6	0.02	1.592	0.63
<b>NTZ</b>	0.0130	76.92	0.0550	18.18	0.110	9.09
<b>MTZ</b>	1.2280	0.81	0.350	2.86	0.2160	4.63

En los tres ensayos el TCBZ (**5-4**) fue más activo que ABZ, 1.56 veces, 139 veces y 2.57 veces más activo contra *G intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, respectivamente; pero menos que NTZ. Únicamente contra *G intestinalis*, TCBZ fue 52 veces más activo que MTZ. Por su parte, los derivados 1-metilados fueron mejores amebicidas y tricomonocidas que ABZ. El compuesto **5-6** fue 203.37 veces más activo que ABZ contra *E. histolytica* y semejante a MTZ contra *T. vaginalis*. En el caso *G. intestinalis* ninguno de los derivados, **5-5** y **5-6** fue más activo que ABZ y NTZ; el compuesto **5-6** fue seis veces más activo que MTZ frente a este protozoario.

Contra *G. intestinalis*, el TCBZ fue ocho veces más activo que el compuesto **5-6** y éste seis veces más potente que el isómero **5-5**.

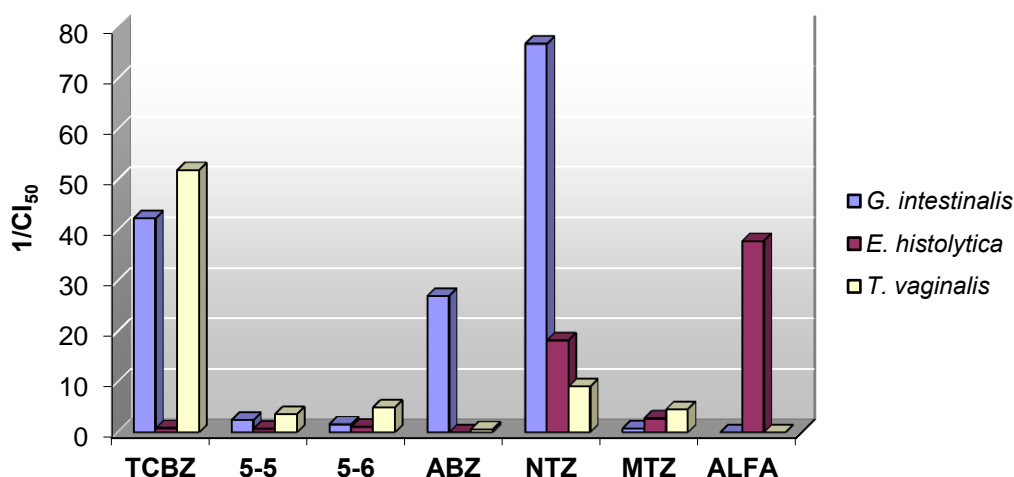
En cuanto a la *E. histolytica* y *T. vaginalis* el orden de actividad de los compuestos fue el mismo: **5-6** >TCBZ >**5-5**.

El isómero **5-6** fue más activo que el **5-5** frente a los tres parásitos. La diferencia en los valores de Cl<sub>50</sub> entre los isómeros fue notoria, **5-6** fue entre 4 y 6 veces más potente que **5-5**; este hecho pone de manifiesto que la distribución de los sustituyentes en el anillo de bencimidazol juega un papel importante en la respuesta biológica.

Al comparar los valores de Cl<sub>50</sub> del TCBZ y sus derivados 1-metilados con los obtenidos para el compuesto Alfa se observó que TCBZ mostró mejores propiedades giardicidas y tricomonocidas; y que el compuesto Alfa fue el mejor amebicida de los compuestos evaluados, inclusive mejor que la NTZ.

La Gráfica 5.4 muestra el efecto *in vitro* de los compuestos TCBZ, **5-5** y **5-6** sobre los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica*, y *T. vaginalis*. La Cl<sub>50</sub> se convirtió en su inverso 1/Cl<sub>50</sub>. Se anexaron los valores del compuesto Alfa.





**Gráfica 5.4.** Actividad antiprotozoaria expresado como  $1/CI_{50}$  de los compuestos, TCBZ, **5-5** y **5-6** sobre *G. intestinalis*, *E. histolytica*, y *T. vaginalis*.

### 5.10. Conclusiones

- La síntesis de triclabendazol y sus derivados 1-metilados se realizó sin problemas siguiendo la metodología propuesta a partir de triclabendazol o de *N*-metil-2-nitroacetanilidas adecuadamente sustituidas con rendimientos globales de 21.23% para el regioisómero **5-5** (nueve pasos de síntesis) y 50.29% (siete pasos de síntesis) para el **5-6**.
- El primer paso de síntesis en cualquiera de los métodos es una reacción de  $S_NAr$ , la cual es lenta y requiere DMF como disolvente. Una alternativa es el uso de las MW, pero no están establecidas las condiciones con disolventes de menor p.eb., por lo que esta reacción requiere mayores estudios.
- Se determinó que el H en posición 1 del bencimidazol, en la estructura de TCBZ, no es necesario para la actividad antihelmíntica.
- Triclabendazol y sus derivados 1-metilados tuvieron buena actividad contra *T. spiralis* tanto en la fase adulta como larva muscular; el isómero **5-5**, aquél con el grupo diclorofenoxi en posición 5 y metilo en 1, fue el más activo de los tres compuestos evaluados; tuvo porcentajes de reducción muy semejantes a los del ABZ, y en algunos casos superiores a los reportados para la NTZ, lo que lo postula como molécula interesante para continuar con otros estudios, con el propósito de ampliar su espectro antihelmíntico.
- El metilo en posición 1 del bencimidazol, también influyó en la actividad antiprotozoaria, el derivado **5-6**, con el grupo diclorofenoxi en posición 6 y metilo en 1, fue más activo contra los tres parásitos, *in vitro*, que su isómero de posición **5-5**.

Aun así, TCBZ fue más activo que sus derivados metilados contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

- TCBZ mostró ser mejor giardicida y tricomonicida que el compuesto Alfa; pero éste último mostró ser más activo que TCBZ sobre *E. histolytica*.
- El TCBZ (**5-4**), fármaco empleado como fasciolicida de uso humano y veterinario resultó ser un buen antiprotozoario, lo que lo califica como antiprotozoario de amplio espectro. Por otro lado el compuesto **5-6** también es un buen candidato para ser estudiado como antiprotozoario ya que fue tan activo como MTZ. La particularidad de poseer un metilo en posición 1, evitará algunos problemas que pudiera tener el TCBZ, por ejemplo, absorción o unión a proteínas. Lo que le da características importantes para ser un buen candidato a mayores estudios.
- Se amplió el espectro de actividad antiparasitaria del TCBZ anexándose un helminto y tres protozoarios a la lista.
- Se requieren estudios de solubilidad, permeabilidad, y otras propiedades farmacocinéticas y de metabolismo que eluciden cómo el CH<sub>3</sub>, en el compuesto **5-5** y **5-6**, aumenta la actividad antihelmíntica y antiprotozoaria. Además de la búsqueda del mecanismo de acción de estos compuestos.

### 5.11. Referencias

1. Sotelo, J.; Jung, H. Pharmacokinetic optimization of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics*. **1998**, 34(6), 503-515.
2. Fairweather, I.; Boray, J. C. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and Its Management. *The Veterinary Journal*. **1999**, 158, 81-112.
3. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, **1992**, 37(3), 221-224
4. Coles, G. C. Anthelmintic activity of triclabendazole. *Journal of Helminthology*. **1986**, 60, 210-212.
5. Robinson, M. W.; Trudgett, A.; Hoey, E. M.; Fairweather, I. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*:  $\beta$ -tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole. *Parasitology*, **2002**, 124(3), 325-338.
6. Gallay, M. J.; Kühne, P. M.; Meyer, B. A.; Rechsteiner, B. O.; Schellenbaum, M. M. 2-alkylthio-, 2-alkylsulphonyl and 2-alkylsulfonyl-6-phenylbenzimidazoles as anthelmintic agents. U. S. patent No. 4, 197,307, Abril, 8, **1980**.
7. Calvopiña, M.; Guderian, R. H.; Paredes, W.; Chico, M.; Coope, F. J. Treatment of human pulmonary paragonimiasis with triclabendazole: clinical tolerance and drug efficacy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1998**, 92(5), 566-569.
8. Tojo, J.; Santamarina, M. T.; Ubeira, F. M.; Estevez, J.; Sanmartin, M. L. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. **1992**, 12, 185-189.
9. Pozio, E.; Gomez-Morales, M. A.; Dupouy-Camet, J. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert Review Anti-Infective Therapy*. **2004**, 1, 471-82.
10. Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. **1990**, 6(4), 112-115.
11. Abuzar, S.; Sharma, S. Synthesis of Substituted Benzimidazoles as Potential Anthelmintics. *Archiv der Pharmazie*. **1982**, 315(10), 866-871.
12. Katiyar, S. K.; Gordon, V. R.; McLaughlin, G. L., Edlind, T. D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1994**, 38(9), 2086-2090.

13. Pérez, V. J. Síntesis y actividad antihelmíntica de derivados *N*-metilados del albendazol. Tesis Maestría. Facultad de Química, UNAM, **2007**.
14. Palomares-Alonso, F.; Jung-Cook, H.; Pérez-Villanueva, J.; Piliado, J. C.; Rodríguez-Morales, S.; Palencia-Hernández, G.; López-Balbiaux, N.; Hernández-Campos, A. Castillo, R.; Hernández-Luis, F. Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, 44(4), 1794-1800.
15. Hernández, M. A. Síntesis y Actividad Antiparasitaria de Derivados del (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, **2006**.
16. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12(16), 2221-2222
17. Katritzki, A. R.; Rachwal, S. New Routes to Selectively Methylate benzimidazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1994**, 31, 775.
18. Middleton, R. W.; Monney, H; Parrick, J. *N*-methylation of heterocycles with dimethylformamide dimethyl acetal. *Synthesis* **1984**, 9, 740-743
19. Katsuri, T. R.; Jois, H. R.; Mathew, L. A novel Transformation of 3-alkoxyisoquinolines to 3-Chloroisoquinolines an Unusual Decyanation of 1,3-Dialkoxy-4-cyano-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines Under Vilsmeier-Haack Conditions. *Synthesis*. **1984**, 9, 743-746.
20. Belstein Organische Chemie. Band XII, pp 730 (Blanskma, R21, 276).
21. Brehme, R. Phasentransfer-katalysierte *N*-Alkylierung von *N*-Acylanilinen im wässrig-organischen Zweiphasen-System. *Synthesis* **1976**, 2, 113-114.
22. Mendoza, R. L. Síntesis de *N*-metil-2-nitroanilinas, Materias primas para la preparación de 1-metilbencimidazoles antiparasitarios. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. **2001**
23. Katritzki, A. R., Rachwal. S.; Ollmann, R. New routes to selectively methylated benzimidazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1994**, 4, 775-779.
24. Iddon, B.; Kutschy, P., Robinson, A. G., Suschitzky, H., Kramerb, W., Neugebauer, F. A. 2*H*-Benzimidazoles (Isobenzimidazoles). Part 7. A New Route to Triclabendazole [5-Chloro-6- (2,3-dichlorophenoxy)-2-methylthio-1*H*-benzimidazole] and Congeneric Benzimidazoles. *Journal of Chemical Society. Perkin Transactions I*. **1992**, 3129-3134.
25. Basilio E. P. Evaluación de la actividad biológica de compuestos derivados del triclabendazol empleando a *Trichinella spiralis* como modelo experimental. Tesis Licenciatura. UNAM, **1999**.
26. Cedillo, R.; Chávez, B.; Tapia, A.; Yépez, L.; In vitro effect on Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinales*, *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal Eukariot Microbiology*. **2002**, 49(3), 201-2013.
27. ACDLabs DB versión 6.0.

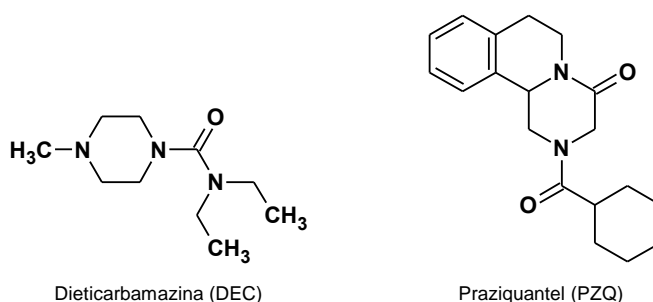
## 6. Análogos del Triclabendazol

### 6.1. Introducción

A diferencia de las infecciones intestinales causadas por los nematodos intestinales como *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenalis* (uncinarias), *Trichuris trichura* (tricocéfalo) y *Ascaris lumbricoides* (lombriz intestinal); así como las causadas por los cestodos *Taenia saginata* (tenias o solitarias), que pueden ser tratadas con albendazol y mebendazol (nematodos), praziquantel y niclosamida (cestodos), las parasitosis extraintestinales causadas por los nematodos *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Loa loa* (oncocercosis, filariosis linfática y filariosis loa loa), *Trichinella spiralis* (trichinellosis) y el cestodo *Taenia solium* (cisticercosis) requieren de fármacos con mayor biodisponibilidad para su tratamiento.

Estas parasitosis tienen en común el estar catalogadas por la OMS<sup>1</sup> dentro de las enfermedades desatendidas y/o relacionadas con la pobreza y afectan grandes poblaciones en el mundo. Las filariosis son transmitidas por vectores (moscas o mosquitos) mientras que la trichinellosis y cisticercosis por los alimentos; todas tienen ciclos de vida complejos que involucran varias fases o estadios y son capaces de invadir órganos como el cerebro, lo músculos, la vejiga, los ojos y los vasos linfáticos.

Los fármacos empleados para su tratamiento son escasos, entre ellos están: dietilcarbamazina (DEC), ABZ, PZQ e ivermectina (IV) con la característica de que éstos no son efectivos en todos los estadios de vida de los parásitos.



**Figura 6.1.** Algunos fármacos empleados contra helmintosis extraintestinales.

En la terapia de la filariosis linfática se utilizan mezclas de DEC+ABZ y DEC+IV con éxito moderado; sin embargo, los efectos secundarios pueden ser fatales cuando las microfilarias (fases juveniles del parásito) están alojadas en vasos sanguíneos, vasos linfáticos, causando encefalopatía, daño renal y hasta la muerte.<sup>2</sup> Los fármacos son poco efectivos contra las fases adultas.

En el caso de la trichinellosis, ABZ es efectivo contra la fase adulta del parásito (fase entérica) pero en menor grado contra las larvas musculares.

De la cisticercosis, el principal problema es cuando el parásito se aloja en el cerebro ocasionando problemas neurológicos importantes tales como convulsiones vértigo, etc. A pesar de su pobre solubilidad, ABZ penetra la barrera hematoencefálica y puede actuar contra los cisticercos alojados en el cerebro; obviamente, los tratamientos son prolongados y se requiere de altas dosis (800 mg por día en dos tomas hasta por 30 días).<sup>3</sup>

Algunos BZC, ya existentes en el mercado, por ejemplo flubendazol o compuestos experimentales, han demostrado tener actividad contra parásitos extraintestinales *in vitro* o *in vivo* administrados vía subcutánea, pero no oralmente.<sup>4,5</sup> Esto no es de sorprender ya que los BZC se diseñaron para ser pobremente absorbidos y ser efectivos contra parásitos intestinales.

Con el propósito de modificar las características de solubilidad de los bencimidazoles se han sintetizado compuestos con grupos diferentes del metoxicarbonilamino en la posición 2, pero en general la actividad se ve disminuida; la excepción es el TCBZ que con un grupo metiltio, en la posición 2 del núcleo de bencimidazol, es capaz de llegar al hígado y al pulmón y actuar contra los trematodos que se alojan en esos órganos, pero con menor espectro de actividad contra otros parásitos.

Por otro lado, dentro de las parasitosis extraintestinales están las protozoosis causadas por *E. histolytica* (absceso hepático) y *T. vaginalis*, para las que ABZ y MBZ son poco efectivos, pero sí algunos otros bencimidazoles no carbamatos de metilo con grupos trifluorometilo (-CF<sub>3</sub>) o metilsulfanilo (-SCH<sub>3</sub>) en posición 2 del bencimidazol.<sup>6,7</sup>

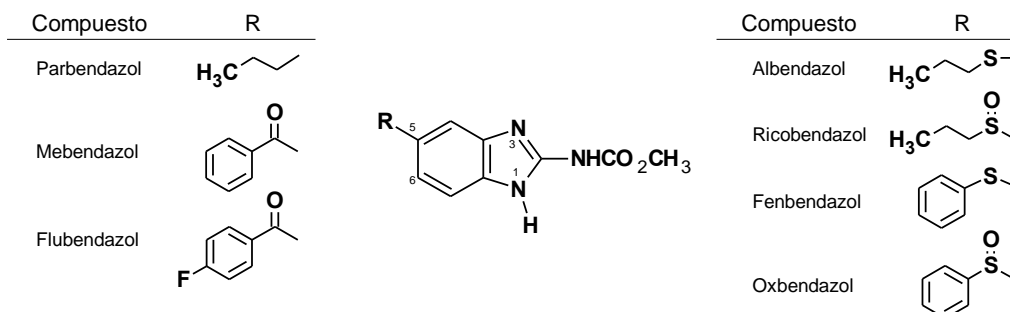
En la búsqueda de antiparasitarios de amplio espectro, en esta parte de la tesis se abordó la síntesis de dos series de ocho compuestos bencimidazólicos cada una, que mantienen el grupo SCH<sub>3</sub> en la posición 2 pero que en la posición 5(6) tienen un grupo aminocarbonilo o un grupo amino. Estos compuestos se evaluaron contra *T. spiralis*, *Taenia crassiceps* y también contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Del grupo de la carboxamidas, se eligieron cuatro compuestos para el estudio de sus propiedades biofarmacéuticas tales como pKa, solubilidad y coeficiente de permeabilidad en células Caco-2.

## 6.2. Modificación en la posición 5(6) del bencimidazol

La presencia de diferentes grupos en la posición 5(6) de los bencimidazoles 2-sustituidos es un factor importante para determinar el perfil biológico de los compuestos de esta clase. Los sustituyentes en esta posición no solamente evitan el metabolismo al 5-hidroxibencimidazol, con menos actividad, sino que dirigen la respuesta biológica frente a parásitos entéricos o tisulares; con base en ello se han sintetizado y probado gran cantidad de compuestos.

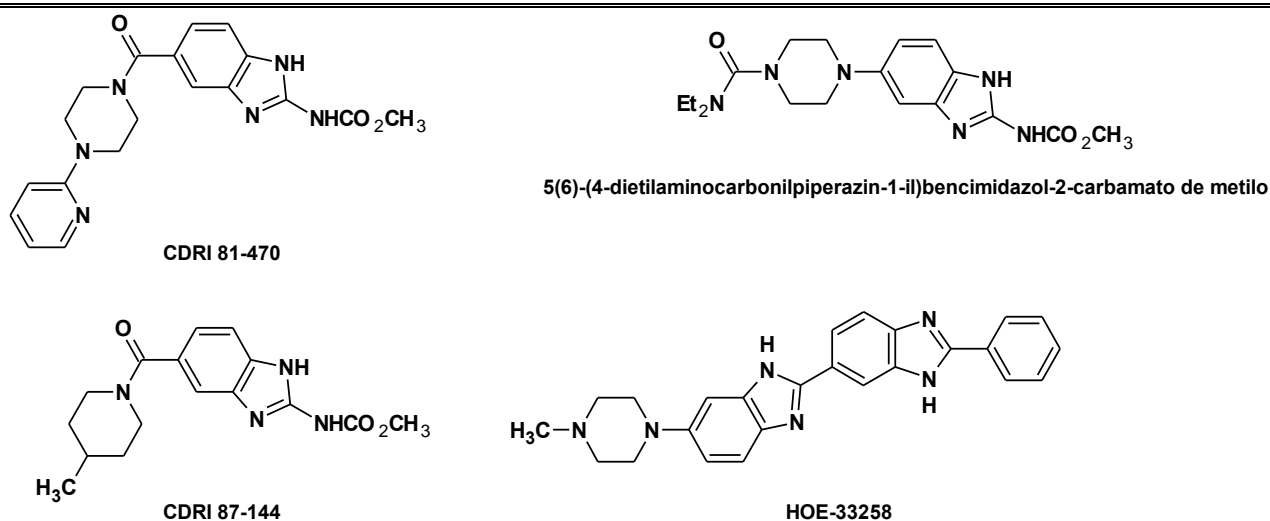
La mayoría de los bencimidazoles sintetizados pertenecen al grupo de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, ya que se ha establecido, en función de su mecanismo de acción como inhibidores de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina, que el grupo alcóxicarbonilamino en posición 2 del bencimidazol es esencial para la actividad antihelmíntica.

Los grupos funcionales que se han colocado en esta posición son de diferentes tipos, tales como: alquilo, arilo, etenilo, alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, arilcarbonilo. También se han sintetizado cetonas bisbencimidazólicas. De estas modificaciones surgieron parbendazol,<sup>8</sup> mebendazol<sup>9,10</sup> y flubendazol; los dos últimos, antihelmínticos potentes contra parásitos intestinales y tisulares.



**Figura 6.2.** Modificaciones en la posición 5(6) del bencimidazol.

Otros grupos que se han ensayado son los alcóxicarbonilos (ésteres). Cuando se sustituyó el alcóxicarbonilo por aminocarbonilo se obtuvo un gran número de carboxamidas activas de amplio espectro, dependiendo de la naturaleza de la parte amínica de la amida, p.ej. piperazinas; algunas de éstas activas contra macro y microfilarias en animales como el compuesto CDRI 81-470.<sup>11</sup>



**Figura 6.3.** Benzimidazoles con grupos piperazino o piperidino activos como micro y macrofilaricidas.

Otro compuesto destacado de esa serie es el CDRI 87-144 con amplio espectro de actividad antihelmíntica *in vivo*; es efectivo al 100% contra los modelos de parásitos intestinales y tisulares: *Ancylostoma ceylanicum* (25 mg/kg), *Nippostrongylus brasiliensis* (100 mg/kg), *Syphacia obvelata* (50 mg/kg), *Hymenolepis nana* (250 mg/kg X 3) y *Cysticercus fasciolaris* (50 mg/kg X 10). El compuesto CDRI 87-144 resultó ser tan potente como el MBZ.<sup>12,13</sup>

Una importante modificación que produjo compuestos de amplio espectro y alto grado de actividad es la colocación de grupos alquiltio y ariltio en la posición 5(6) y sus sulfóxidos. De esta serie surgieron albendazol,<sup>14</sup> ricobendazol, fenbendazol y oxfendazol. Los dos primeros, de gran uso en parasitosis intra y extraintestinales. El reemplazo del azufre por oxígeno disminuyó la actividad.

Otro tipo de sustituyentes ensayados en la posición 5(6) son aminas secundarias como piperazinas sustituidas;<sup>15</sup> por ejemplo, el compuesto HOE-33258, muy activo como filaricida, pero tóxico.<sup>16</sup>

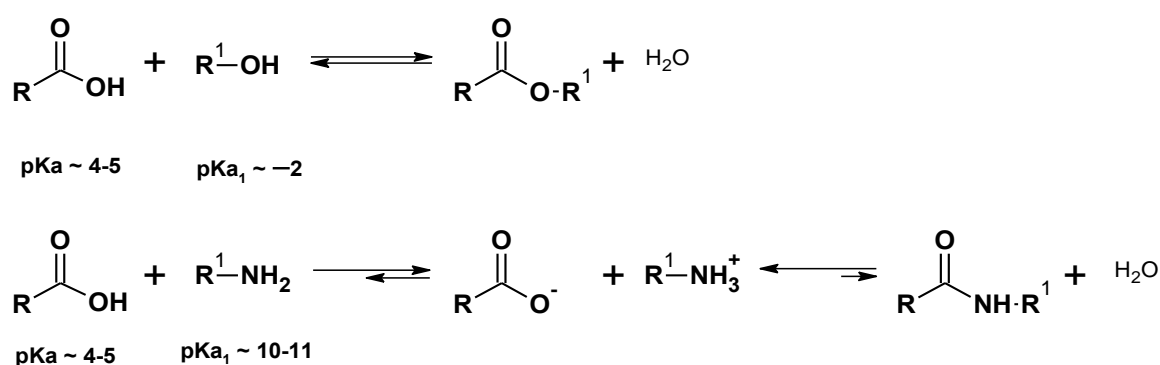
### 6.3. Síntesis de amidas benzimidazólicas

#### 6.3.1. Generalidades sobre la síntesis de amidas

El grupo funcional amida (R-CO-NRR) es común encontrarlo ya sea en grandes moléculas como las proteínas, o en productos naturales o sintéticos de cualquier grado de complejidad. En la Química Farmacéutica, más del 25% de los fármacos poseen por lo menos un grupo carboxamido en su estructura. Esto no es de sorprender dado que las amidas son grupos funcionales estables, neutros y con la particularidad de que pueden

ser donadores y/o aceptores de puentes de hidrógenos, lo que les permite tener interacciones con los componentes de los sistemas biológicos.

A diferencia de la esterificación, la formación de amidas no es un procesos de equilibrio, sino que, dada la naturaleza básica de las aminas, lo primero que ocurre es la reacción ácido-base, formado la sal de amonio correspondiente por lo que es difícil formar el enlace amida a partir de la sal y en caso de ser posible, se requieren condiciones de reacción extremas, lo que repercute en la estabilidad de otros grupos funcionales presentes en las moléculas. De aquí que es necesario modificar la estructura del ácido carboxílico, activándolo para que permita el fácil ataque de la amina para generar una amida.



**Esquema 6.1.** Formación de ésteres *versus* formación de amidas.

Bajo este principio, los químicos sintéticos han estudiado y propuesto una gran cantidad de métodos para llevar a cabo esta activación. Algunos de estos métodos se enlistan en la Tabla 6.1.

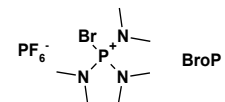
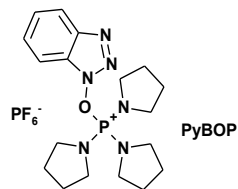


**Tabla 6.1.** Métodos de activación de ácidos carboxílicos para la síntesis de amidas

Método	Reactivos	Mecanismo propuesto	Ref
Formación de cloruros de ácido	<p>Reactivo formador de cloruros de acilo: cloruro de tionilo (<math>\text{SOCl}_2</math>), cloruro de oxalilo (<math>\text{COCl}_2</math>), <math>\text{POCl}_3</math>, <math>\text{PCl}_5</math></p> <p>Base: trietilamina (TEA), diisopropiletilamina (DIPEA), piridina</p>	<p>Mecanismo de reacción con <math>\text{SOCl}_2</math></p> <p>intermediario cloruro de acilo</p>	17
Acoplamiento con 1,1'-carbonildiimidazol	<p>Agente acoplante:</p> <p>Base: imidazol, TEA</p>	<p>Mecanismo de reacción con CDI</p> <p>intermediario imidazólido</p>	18
Acoplamiento con carbodiimidas	<p>Agentes acoplantes:</p> <p>Base: TEA, DIPEA, 4-dimetilaminopiridina, (DMAP)</p>	<p>Mecanismo de reacción con DIC</p> <p>intermediario O-acilisourea</p>	19

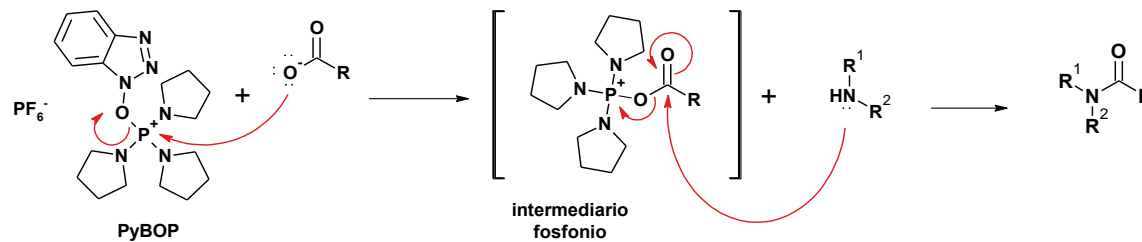
Acoplamiento con sales de fósforo

Agentes acoplantes:



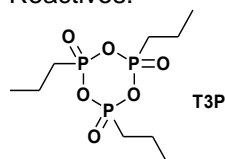
Base: 4-metilmorfolina (NMM), DIPEA

Mecanismo de reacción utilizando PyBOP

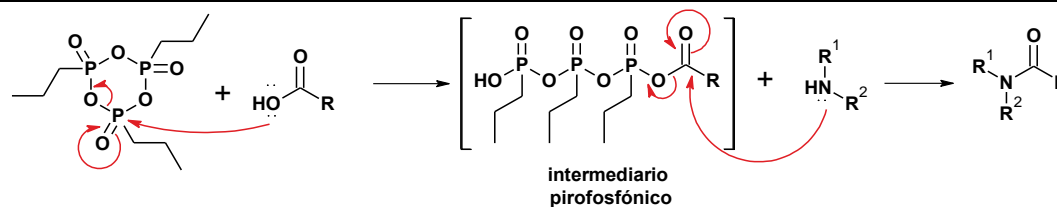


Acoplamiento con anhídridos fosfónicos

Reactivos:



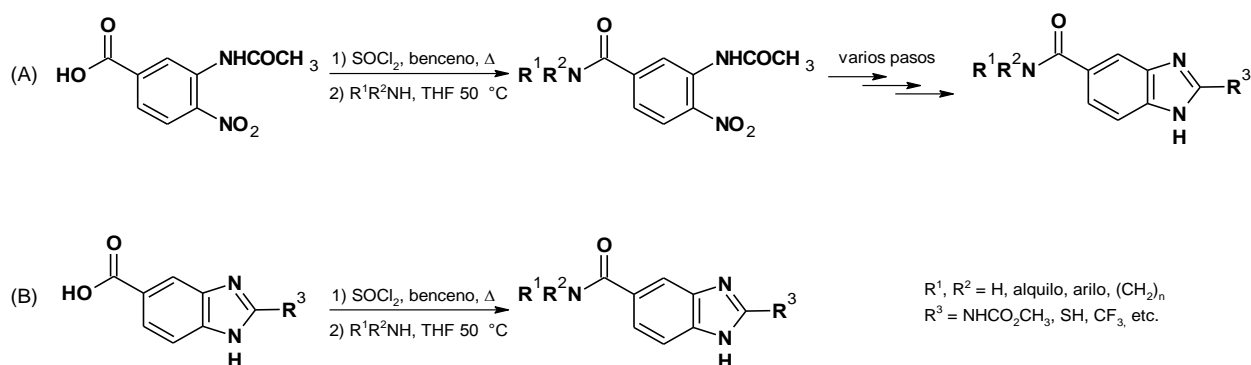
Base: piridina, DIPEA, NMP



## 6.3.2. Amidas bencimidazólicas

La síntesis de bencimidazoles con grupos aminocarbonilos en algunas posiciones, particularmente 4 ó 5(6), ha sido reportada ampliamente.

Las dos estrategias empleadas para la síntesis de las carboxamidas bencimidazólicas son: preparar las amidas antes de la ciclación al bencimidazol<sup>22</sup> o después de la obtención del núcleo bencimidazólico.



**Esquema 6.2.** Estrategias para la preparación de amidas bencimidazólicas. (A) Formación de la amida antes de ciclar. (B) Formación de la amida después de ciclar.

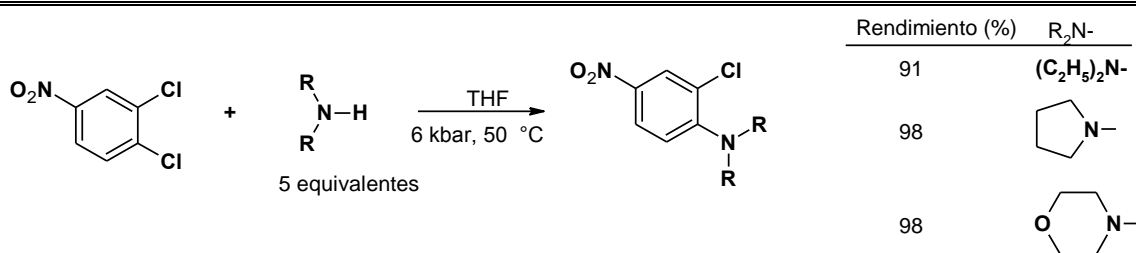
En general los dos métodos coinciden en activar al ácido carboxílico vía el cloruro del ácido, utilizando  $SOCl_2$  en benceno a reflujo. En un segundo paso, después de eliminar el exceso de  $SOCl_2$ , se adiciona la amina (2 eq) o en presencia de trietilamina y se deja reaccionar entre 25-50 °C en  $CHCl_3$  o THF.<sup>23,24</sup>

Otro reactivo utilizado para la activación del ácido carboxílico es el 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) en DMF a 40 °C y subsecuente acoplamiento con la amina correspondiente a 50 °C.<sup>25</sup>

## 6.4. Síntesis de aminas bencimidazólicas

## 6.4.1. Sustitución nucleofílica aromática de halobencenos

La sustitución nucleofílica de haluros aromáticos es un proceso difícil a presión normal, sólo se limita a los ejemplos cuando el halógeno es flúor y tiene buenos grupos electroattractores en posiciones *orto* o *para*. En general las reacciones de  $S_NAr$  se aceleran a altas presiones (p.ej. 6.0-12.0 kbar); aún así, los tiempos son prolongados 20-50 h, en THF y con 5 equivalentes del nucleófilo. Cuando éste es una amina, su volumen y tamaño están en relación con la reactividad; las aminas primarias son las más reactivas, le siguen las secundarias cíclicas, luego las secundarias alifáticas y por último las aminas terciarias.<sup>26</sup>

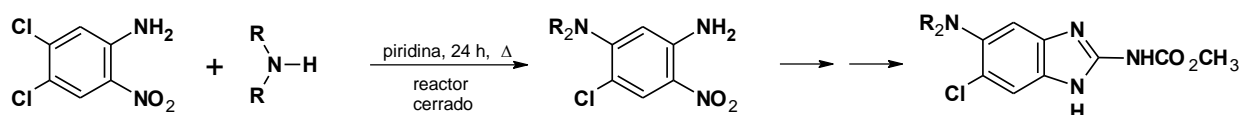


**Esquema 6.3.** S<sub>N</sub>Ar de aminas secundarias sobre 3,4-dicloronitrobenzoceno.

Recientemente, las condiciones de reacción se han optimizado al aumentar la temperatura de la reacción utilizando disolventes de alto punto de ebullición y a presión normal, o bajo presión y mediante el uso de calentamiento por microondas.

#### 6.4.2. Aminobencimidazoles

En el esfuerzo de contar con diversidad de grupos en las posiciones 5(6) del benzimidazol, se han introducido grupos amino, desde -NH<sub>2</sub>, -NHR o -NRR o su derivados acilados. La forma común de introducir estos grupos es desde las etapas iniciales de la síntesis, por medio de reacciones de S<sub>N</sub>Ar sobre 5-cloro-2-nitroanilinas en un reactor de acero o a reflujo en piridina por 24 h. Los pasos siguientes de síntesis corresponden a la reducción del grupo nitro y posterior ciclación al benzimidazol requerido. Esquema 6.4.<sup>27</sup>



**Esquema 6.4.** Preparación de aminas benzimidazólicas en 5(6).

### 6.5. Justificación

Las opciones de tratamiento para las parasitosis extraintestinales son limitadas. Dentro del grupo de los benzimidazoles, sólo ABZ es el fármaco de elección, con actividad moderada contra parásitos tisulares. Además, hay reportes de cepas de parásitos resistentes a este compuesto.

Modificar la posición 5(6) del núcleo del benzimidazol, mediante sustitución por grupos del tipo amida o aminas cíclicas, es una estrategia interesante a explorar en busca de información sobre los requerimientos estructurales para la actividad antiparasitaria. En esta parte del trabajo de tesis se decidió sintetizar y evaluar la actividad antiparasitaria de 16 análogos de triclabendazol con sustituyentes en 5(6) de tipo aminocarbonilo y amino que confieran a las moléculas cierto perfil contra parásitos tisulares.

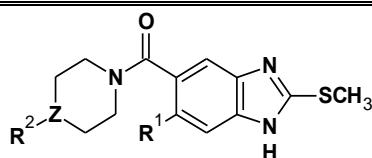
La evaluación de los compuestos contra los helmintos *T. spiralis*, *T. cracisseps* y los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* proporcionará mayor información para enriquecer las bases de datos de nuestro grupo de investigación.

### 6.6. Diseño de los análogos de triclabendazol

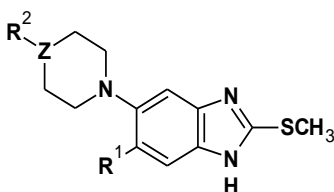
Los compuestos de las Tabla 6-2 y 6-3 se diseñaron de acuerdo a lo siguientes fundamentos:

- El grupo metoxicarbonilamino, en los BZC es indispensable para la actividad antihelmíntica en parásitos gastrointestinales.
- Un grupo de tipo piperazino sustituido, en la posición 5(6) del bencimidazol, unido por un grupo C=O o directamente, evita el metabolismo y perfilan a estas moléculas como antihelmínticos de amplio espectro en parásitos extraintestinales.
- Hay poca información relacionada con el efecto de grupos alquiltio en la posición 2 del bencimidazol en la actividad antihelmíntica; pero se sabe que estos grupos confieren a las moléculas mayor grado de liposolubilidad, por ejemplo el TCBZ.
- Los compuestos CDRI 87-144 y HOE-33258, son potentes micro y macrofilaricidas, pero con problemas de absorción o toxicidad. Ambos compuestos tienen en su estructura un heterociclo de seis miembros nitrogenado piperidina y piperazina

Con base en la información anterior, los compuestos diseñados poseen las siguientes características: se conservó el núcleo de bencimidazol con el SCH<sub>3</sub> en la posición 2; se sustituyeron las posiciones 5(6) por grupos aminocarbonilo o aminas; se dejó hidrógeno en 6(5) o se colocó un cloro. La primera serie comprende amidas de piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina y 4-metilpiperazina y la segunda son aminas bencimidazólicas de tipo de piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina y 4-metilpiperazina.


**Tabla 6.2.** Análogos de triclabendazol con sustitución en 5(6) de tipo carboxamida

Compuesto No.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Z
6-1	H	H	CH
6-2	Cl	H	CH
6-3	H	CH <sub>3</sub>	CH
6-4	Cl	CH <sub>3</sub>	CH
6-5a	H	H	N
6-5b	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO	N
6-6	Cl	H	N
6-7	H	CH <sub>3</sub>	N
6-8	Cl	CH <sub>3</sub>	N


**Tabla 6.3.** Análogos de triclabendazol con sustitución en 5(6) de tipo amina

Compuesto No.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Z
6-9	H	H	CH
6-10	Cl	H	CH
6-11	H	CH <sub>3</sub>	CH
6-12	Cl	CH <sub>3</sub>	CH
6-13a	H	H	N
6-13b	H	CH <sub>3</sub> CO	N
6-14a	Cl	H	N
6-14b	Cl	CH <sub>3</sub> CO	N
6-15	H	CH <sub>3</sub>	N
6-16	Cl	CH <sub>3</sub>	N

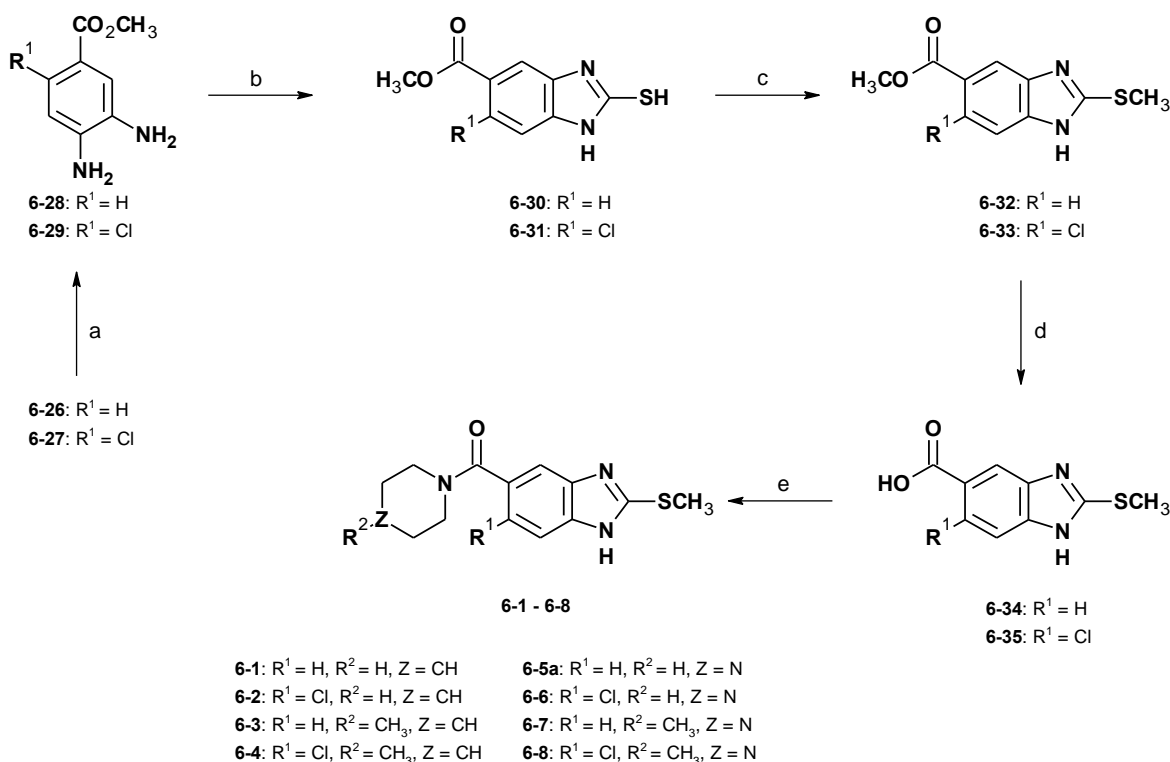
## 6.7. Metodología

### 6.7.1. Parte química

#### 6.7.1.1. Síntesis de las carboxamidas 6-1–6-8

Las carboxamidas **6-1–6-8** se sintetizaron a partir de los ácidos 2-(metiltio)-5(6) bencimidazol carboxílicos **6-34** (para las carboxamidas **6-1**, **6-3**, **6-5a**, **6-5b** y **6-7**) y **6-35** (para las carboxamidas **6-2**, **6-4**, **6-6** y **6-8**) utilizando CDI como agente acoplante. Los ácidos se prepararon siguiendo el Esquema 6.6 a partir de los ésteres: 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo, **6-26** y 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo, **6-27**. La hidrogenación catalítica de los ésteres dio las *o*-fenilendiaminas **6-28** y **6-29**; éstas, sin posterior tratamiento, se sometieron a la reacción de ciclación utilizando xantato de etilo a

60 °C para dar los 2-mercaptobencimidazoles **6-30** and **6-31**.<sup>28</sup> La S-metilación se realizó por tratamiento con CH<sub>3</sub>I en solución de KOH-EtOH en frío. Se obtuvieron los ésteres **6-32** y **6-33**, los cuales se sometieron a hidrólisis alcalina a 80 °C y posterior tratamiento con solución de HCl dil., para dar los ácidos 2-(metiltio)bencimidazol-5(6)-carboxílico **6-34** y el 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5(6)carboxílico **6-35**. Cada ácido se trató, por separado, con 1,1'-carbonildiimidazol en condiciones anhidras, usando como disolvente CHCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN o DMF, seguido por la adición de las aminas piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina o 1-metilpiperzina.

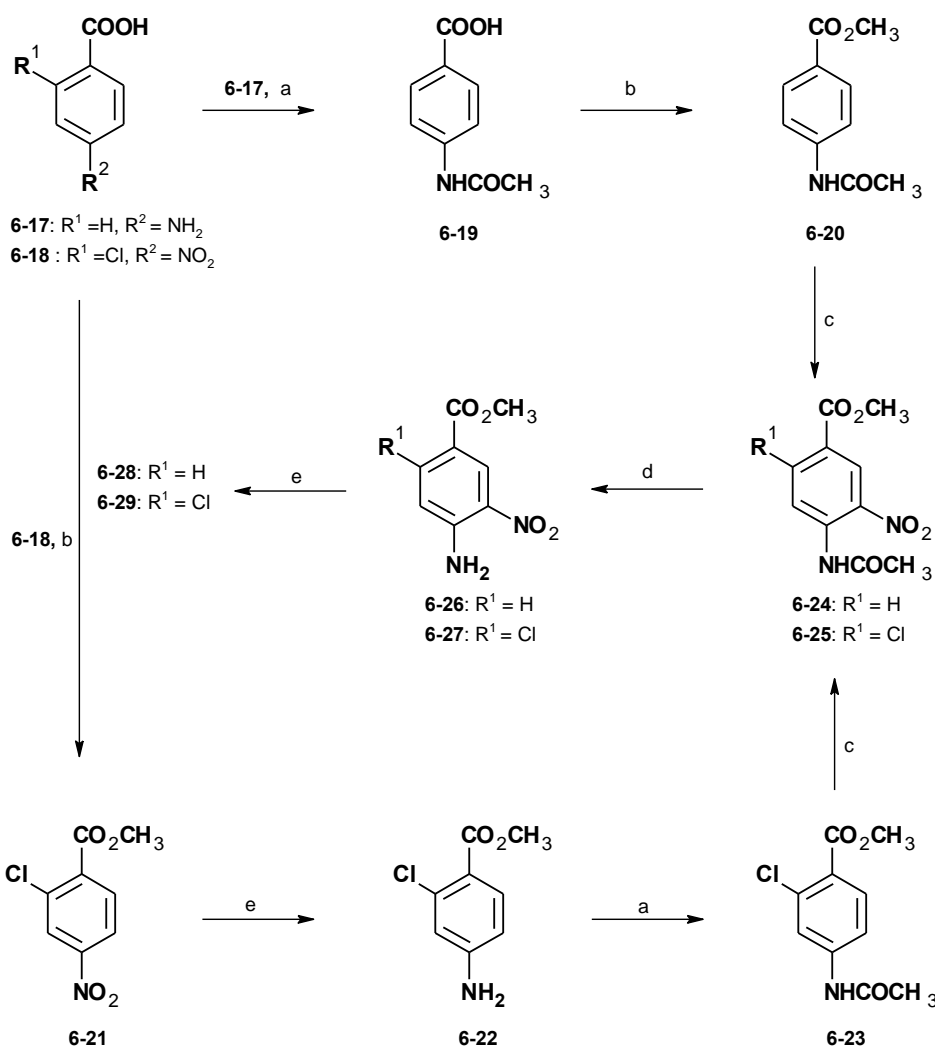


(a) H<sub>2</sub>, Pd/C al 5% o Níquel - Raney, CH<sub>3</sub>OH; (b) CS<sub>2</sub>, KOH, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, H<sub>2</sub>O; (c) CH<sub>3</sub>I, KOH, H<sub>2</sub>O; (d) 1) NaOH, H<sub>2</sub>O, 80 °C; 2) H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>; (e) 1) 1,1'-carbonildiimidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2) piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina, 1-metilpiperazina.

### Esquema 6.5. Síntesis de las carboxamidas **6-1–6-8**.

Los ésteres precursores **6-26** y **6-27** se sintetizaron a partir de los correspondientes ácidos 4-aminobenzoico (**6-17**) o 2-cloro-4-nitrobenzoico (**6-18**) comerciales, de acuerdo a procedimientos ya conocidos mostrados en el Esquema 6.6. Para la obtención de **6-26**, el compuesto **6-17** se acetiló con anhídrido acético; luego se esterificó por tratamiento con sulfato de dimetilo en medio alcalino dando el 4-acetamidobenzoato de metilo (**6-20**). El tratamiento de éste con mezcla sulfonítrica dio el compuesto **6-24**. La hidrólisis con NaOH/MeOH dio el éster 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo **6-26**. Para la síntesis del precursor **6-27**, el ácido **6-18** se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico dando el éster **6-21**; éste se sometió a reducción catalítica utilizando Ni-Raney como catalizador.

Posteriormente, la amina **6-22** se acetiló y nitró con  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  dando el nitrocompuesto **6-25**. Por último, la hidrólisis de la acetamida **6-25** con  $\text{NaOH}/\text{MeOH}$  dio el éster precursor 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo **6-27**.



(a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ; (b)  $\text{DMF}, \text{NaHCO}_3, \text{H}_2\text{O}, (\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ; (c)  $\text{HNO}_3, \text{H}_2\text{SO}_4$ ; (d)  $\text{NaOH}, \text{CH}_3\text{OH}$ ; (e)  $\text{H}_2$ , Níquel - Raney,  $\text{CH}_3\text{OH}$

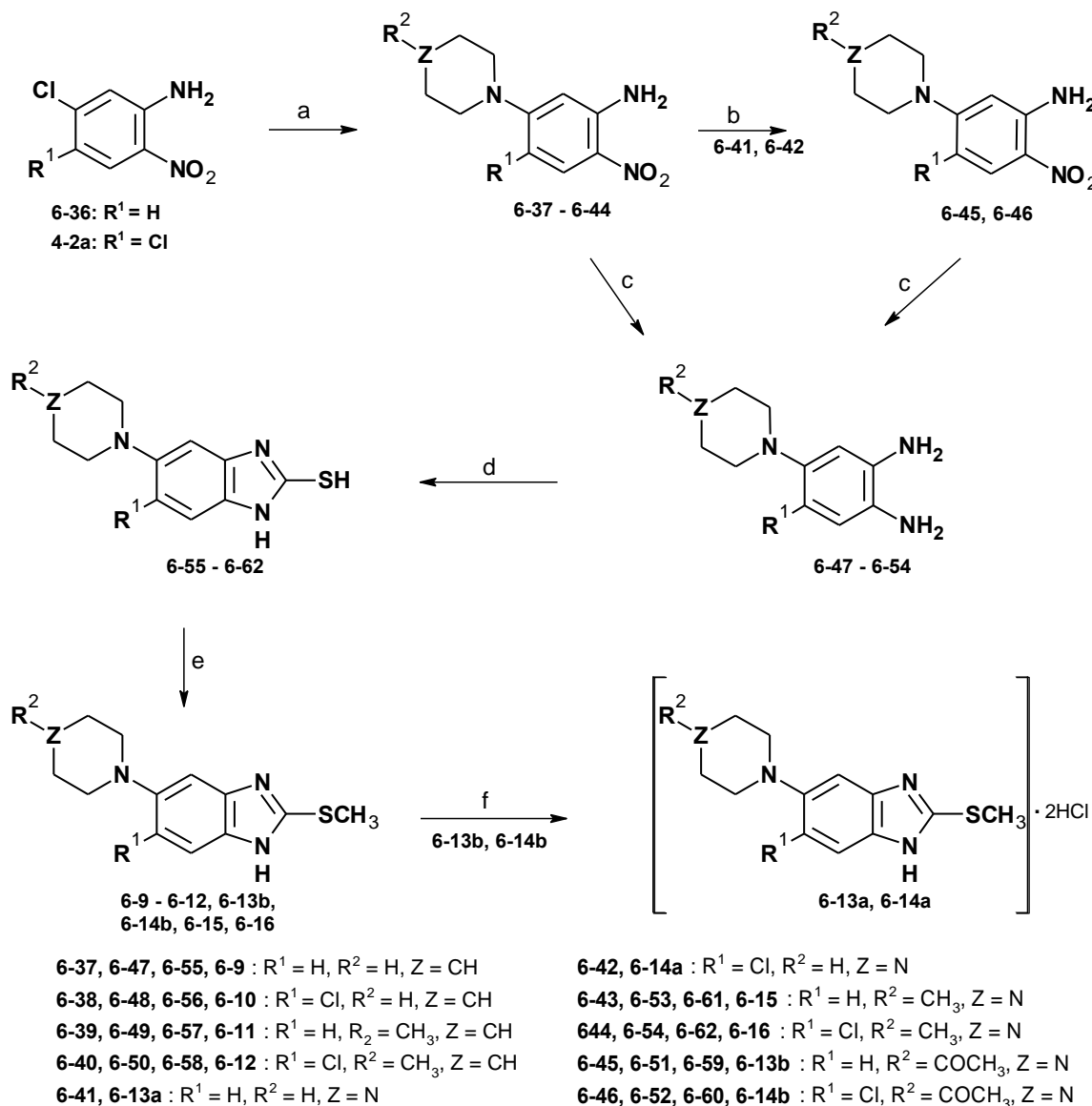
**Esquema 6.6.** Preparación de los precursores 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**6-26**) y 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6-27**).

#### 6.7.1.2. Síntesis de las aminas **6-9–6-12**, **6-13a**, **6-14a**, **6-15** y **6-16**

Las aminas **6-9–6-12**, **6-13a**, **6-14a**, **6-15** y **6-16** se sintetizaron a partir las nitroanilinas 5-cloro-2-nitroanila (**6-36**) y 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) según se muestra en el Esquema 6.7. Primeramente, las materias primas se trataron en caliente y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  con 4 eq de piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina o 1-metilpiperazina. Para dar las nitroanilinas **6-37–6-44**. Los compuestos **6-41** y **6-42** se acetilaron con  $\text{Ac}_2\text{O}$ /piridina en  $\text{DMF}$  o  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$  y calor, dando los compuestos **6-45** y **6-46**. Los nitrocompuestos se redujeron con  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}/\text{C}$  al 5% o  $\text{Ni-Raney}$  o con 5 equivalentes de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Las



diaminas, sin aislar, se convirtieron en los tioles **6-55–6-62** por reacción con CS<sub>2</sub>/KOH/EtOH. Por último, el tratamiento con CH<sub>3</sub>I/KOH/EtOH, generó a los metilobencimidazoles **6-9–6-12**, **6-13b**, **6-14b**, **6-15** y **6-16**. Las acetamidas **6-13b** y **6-14b** se liberaron del acetilo por hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador en EtOH/H<sub>2</sub>O a 50 °C, dando las aminas **6-13a** y **6-14a** que se trataron con HCl gas para aislarlas como clorhidratos.



(a) Piperidina, 4-metilpiperidina, piperazina o 1-metilpiperazina, 120-140 °C; (b) Ac<sub>2</sub>O/Piridina, 65 °C ; (c) H<sub>2</sub>, Pd/C o Ni-Raney o SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; (d) CS<sub>2</sub>/KOH/EtOH; (e) CH<sub>3</sub>I/KOH; (f) 1) EtOH/H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cat, 50 °C, 2) HCl gas

**Esquema 6.7.** Ruta de síntesis para las aminas **6-9–6-12**, **6-13a**, **6-14a**, **6-15** y **6-16**.

### 6.7.2. Parte biológica

#### 6.7.2.1. Evaluación antihelmíntica

Las carboxamidas **6-1–6-8** se evaluaron *in vitro* contra la larva muscular de *T. spiralis*. La viabilidad de los parásitos se determinó por el método colorimétrico del MTT descrito por Townson.<sup>29</sup> Se emplearon cinco concentraciones en un rango entre 0.000377  $\mu\text{M}$ –3.77  $\mu\text{M}$ . Estos estudios se realizaron en el IMSS, Centro Médico, Siglo XXI por la Dra. Yépez Mulia y su grupo.

Los compuestos **6-1–6-4** también se evaluaron *in vitro* contra la cepa ORF de *T. crassiceps* a dos concentraciones (0.28  $\mu\text{M}$  y 1.70  $\mu\text{M}$ ). Estos ensayos se realizaron en el Instituto Nacional de Neurología, por el grupo de la Dra. Jung Cook.<sup>30</sup>

#### 6.7.2.2. Evaluación antiprotozoaria

Adicionalmente, las carboxamidas y las aminas se evaluaron *in vitro* contra los trofozoítos de los protozoarios *G. intestinalis* y *E. histolytica* por el método de subcultivos. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado a concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Estos experimentos se realizaron por el grupo de la Dra. Yépez Mulia en el IMSS, Centro Médico, Siglo XXI.

#### 6.7.2.3. Evaluación biofarmacéutica.

A las carboxamidas **6-1–6-4** se les determinaron sus propiedades farmacocinéticas como log P, solubilidad, pKa y permeabilidad aparente en células Caco-2. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de biofarmacia de la Dra. Jung Cook y en el IMSS, Centro Médico, Siglo por la Dra. Yépez Mulia y su grupo.<sup>31</sup>

## 6.8. Resultados y Discusión

### 6.8.1. Amidas **6-1–6-8**

#### 6.8.1.1. Resultados y Discusión de la Parte Química

##### 6.8.1.1.1. Preparación de los ácidos 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-34**) y 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-35**)

Para preparar los ácidos **6-34** y **6-35** fue necesario prepara primeramente su precursores 4-acetamidobenzoato de metilo (**6-20**) para **6-34** y 4-(acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (**6-23**) para el ácido **6-35**, siguiendo la ruta sintética del Esquema 6.6.

Para la síntesis del ácido 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-34**) se partió del ácido 4-aminobenzoico **6-17**, el cual primeramente se trató con anhídrido acético para proteger la amina; luego se esterificó con sulfato de dimetilo en medio alcalino dando el éster 4-acetamidobenzoato de metilo (**6-20**) con excelente rendimiento.

Por otro lado, para la síntesis del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-35**) hubo que preparar al éster 4-(acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo (**6-23**) para lo cual se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**6-21**) el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio alcalino y DMF como disolvente. Luego, **6-21** se redujo catalíticamente usando Ni-Raney como catalizador para evitar hidrogenólisis, ya que cuando se utilizó Pd/C se obtuvo el producto 4-aminobenzoato de metilo. El compuesto **6-22** inmediatamente se acetilo para dar el compuesto **6-23**.

Habiendo preparado los compuestos **6-20** y **6-23**, éstos se sometieron a las mismas reacciones según los Esquemas 6.5 y 6.6 para culminar con los ácidos **6-34** y **6-35** materias primas de las carboxamidas **6-1–6-8**.

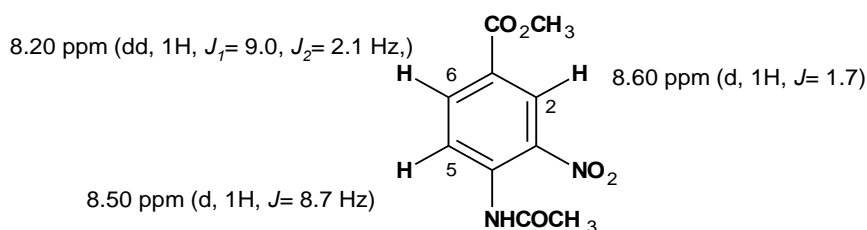
El propósito de esterificar fue evitar problemas de solubilidad con moléculas tipo zwitterion en las reacciones posteriores. La formación del éster, vía una reacción tipo  $S_N2$ , en este caso es una reacción muy rápida y práctica *versus* el clásico método de esterificación de Fischer.<sup>32</sup>

En el espectro de IR del éster **6-20**, únicamente se observó una banda amplia a  $1685\text{ cm}^{-1}$  para los dos tipos de C=O; sin embargo, para el éster **6-23** sí se observaron claramente los dos tipos de C=O a  $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1637\text{ cm}^{-1}$  para el éster y la amida, respectivamente. Las señales a 2.10 ppm y 3.83 ppm (para **6-20**); 2.07 ppm y 3.08 ppm (para **6-23**) en los correspondientes espectros de RMN  $^1\text{H}$ , mostraron los dos tipos de metilo; la primera señal para el  $\text{CH}_3\text{CONH}$  de la acetamida y la segunda para el  $\text{CH}_3\text{OCO}$ - del éster. En el espectro de masas los fragmentos de  $m/z$  120 ( $[\text{M}-42]-31$ ) para **6-20** y  $m/z$  154 para el compuesto **6-23** fueron el pico base del espectro y correspondieron a la pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$  (42 u) característico de las acetamidas, más la pérdida de  $\text{OCH}_3$  (31 u) evidenciando la presencia de la amida y el éster metílico en ambos compuestos.

6.8.1.1.2. Preparación de los intermediarios 4-acetamido-3-nitrobenzoato de metilo (**6-24**) y 4-acetamido-2-cloro-3-nitrobenzoato de metilo (**6-25**)

Los compuestos **6-20** y **6-23** se nitraron sin problemas utilizando mezcla sulfonítrica en frío (0-10 °C). Lo espectros de IR mostraron las dos bandas características del grupo nitro

a  $1509\text{ cm}^{-1}$  y  $1342\text{ cm}^{-1}$  para **6-24**;  $1567\text{ cm}^{-1}$  y  $1336\text{ cm}^{-1}$  para **6-25**. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **6-24**, la multiplicidad de las señales correspondió con el patrón de trisustitución en el anillo aromático, como se muestra en la Figura 6.4; y en el caso del compuesto **6-25**, se observaron dos señales simples. En la espectrometría de masas, el ion molecular de ambos espectros correspondió con las estructuras esperadas. En ambos casos el fragmento más abundante correspondió al ion (M-42) y en segundo lugar en abundancia fue el fragmento ([M-42]-31) correspondiente a los iones de  $m/z$  196 y 230, para **6-24** y **6-25** respectivamente. Esto corroboró la presencia tanto del éster como de la acetamida.



**Figura 6.4.** Patrón de multiplicidad en RMN  $^1\text{H}$  para un compuesto 1,3,4 trisustituido. Ejemplo: 4-acetamido-3-nitrobenzoato de metilo.

#### 6.8.1.1.3. Preparación de los intermediarios 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (**6-26**) y 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6-27**)

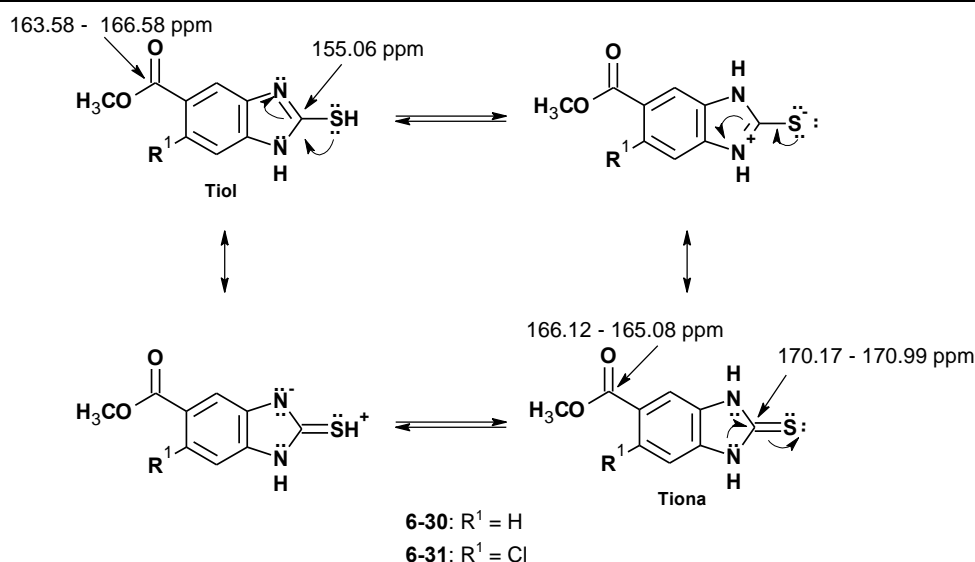
El siguiente paso hacia la síntesis de los ácidos fue la hidrólisis de la acetamida la cual se llevó a cabo con un equivalente de NaOH en metanol. La hidrólisis selectiva de la amida con respecto al éster se debió al efecto electroatractor del grupo nitro en posición *orto* y al del carbonilo del éster en *para* con respecto a la amida; además, estos mismo grupos estabilizan por resonancia al par de electrones que se libera por el ataque del hidroxilo al carbonilo de la amida. La temperatura  $\leq 22\text{ }^\circ\text{C}$  fue un factor determinante para el éxito de la reacción. El cambio estructural se comprobó por la aparición de las dos bandas entre  $3452\text{ cm}^{-1}$  y  $3341\text{ cm}^{-1}$  de amina primaria, así como la permanencia del C=O del éster por las bandas a  $1701\text{ cm}^{-1}$  (para **6-26**) y  $1712\text{ cm}^{-1}$  (para **6-27**) en los espectro de IR; también por la señal amplia a 7.56 ppm (para **6-26**) y 7.98 ppm (para **6-27**) que integró para 2H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$ , en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; y por la ausencia del fragmento M-42 en el espectro de masas, en este caso los iones de  $m/z$  165 y 199 correspondieron al fragmento (M-31, 100%); con lo que se demostró la permanencia del éster metílico en la estructura de **6-26** y **6-27** respectivamente.

6.8.1.1.4. Preparación de las *o*-fenilendiaminas 3,4-diaminobenzoato de metilo (**6-28**) y 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**6-29**)

La reducción del grupo nitro se realizó catalíticamente; utilizando Pd/C para la reducción de **6-26** y Ni-Raney para la de **6-27**. Después de eliminar el catalizador, el producto, tal cual, se sometió a la siguiente reacción. Una pequeña muestra se recristalizó de EtOH para determinar sus constantes físicas y espectroscópicas. En el espectro de resonancia de  $^1\text{H}$  se observaron dos señales que integraron para 2H cada una e intercambiaron con  $\text{D}_2\text{O}$ , correspondientes a los  $2\text{NH}_2$  a 4.65 ppm y 5.27 ppm para **6-28**, a 4.79 ppm y 5.49 ppm para la diamina **6-29**. El  $\text{M}^+$ , en ambos espectros de masas, fue el pico más abundante.

6.8.1.1.5. Reacción de ciclación. Preparación de los compuestos 2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6-30**) y 6-cloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6-31**)

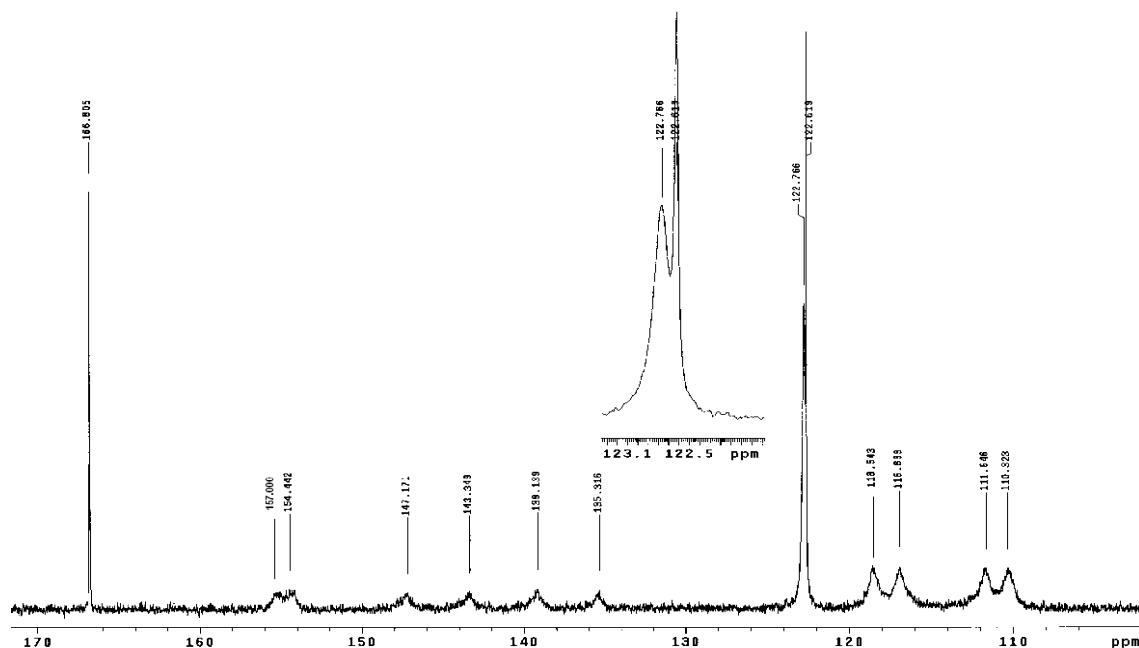
La reacción de ciclación de las diaminas **6-28** y **6-29** al núcleo de bencimidazol se llevó a cabo por adición del xantato de etilo preparado en frío previamente y luego calentamiento posterior para provocar la ciclación. El xantato de etilo se preparó previamente a la reacción para evitar que el medio básico provocara la hidrólisis del éster ya que la reacción de ciclación requiere calentamiento a 60-70 °C; sin embargo, este proceso se puede evitar siempre y cuando toda la mezcla de materia prima y reactivos se realice a temperatura ambiente y se deje reaccionar por espacio de 15 min antes de iniciar el calentamiento. Con esto se evitó la manipulación del xantato de etilo; reflejándose en el aumento del rendimiento de la reacción. Los productos **6-30** y **6-31** fueron sólidos poco solubles en los disolventes comunes por lo que fue un tanto difícil su recristalización. La presencia de una señal en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a 12.83 ppm y a 12.91 ppm, para **6-30** y **6-31** respectivamente, que integró para 2H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$  sugirió el predominio de la tiona en el par de tautómeros posibles, esto se confirmó por la señal a 170.17 ppm (**6-30**) y 170.98 ppm (**6-31**) en el espectro de  $^{13}\text{C}$  correspondiendo al C-2 del anillo de bencimidazol, concordante con una unión C=S (tiona), ya que de ser el tiol (C-SH) el valor teórico del desplazamiento sería aproximadamente  $155 \pm 9.3$  ppm, muy cercano al desplazamiento del C=O del éster (Esquema 6.8). El ion molecular del espectro de masas fue el pico base y en segundo término el fragmento M-31 producido por la ruptura del éster metílico.



**Esquema 6.8.** Equilibrio tiol-tiona de los compuesto **6-30** y **6-31**, se indican los desplazamientos de RMN <sup>13</sup>C para los carbonos del éster y el C-2.

6.8.1.1.6. Preparación de los compuestos 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6-32**) y 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6-33**)

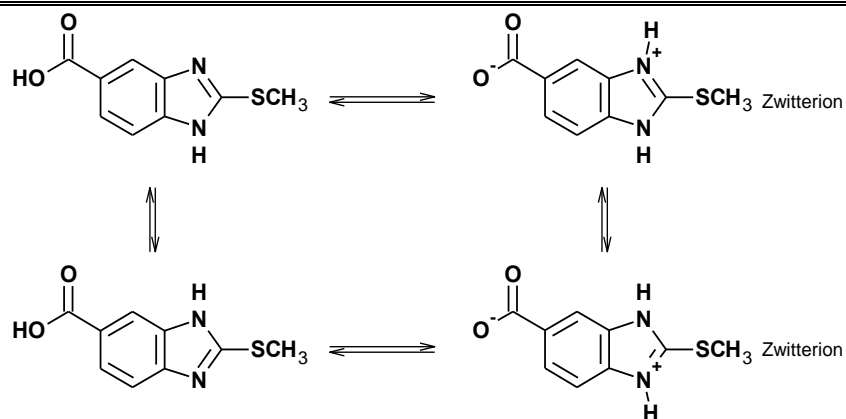
El siguiente paso fue la metilación del tiol o tiona vía una S<sub>N</sub>2 con CH<sub>3</sub>I y KOH; el disolvente que se empleó fue acetona, sin embargo en EtOH esta reacción también procedió con buen rendimiento. Es importante resaltar que se controlaron los equivalentes de base y reactivo, ya que si se tiene exceso puede ocurrir la dimetilación, si no se cuida la temperatura. La comprobación de que el producto de la reacción fue una S-metilación y no una N-metilación o dimetilación fue por los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuesto **6-32** y **6-33**, en donde se observaron solamente dos señales que integraron para 3H, una a 2.70 ppm (**6-32**) ó 2.69 ppm (**6-33**) para el SCH<sub>3</sub> y otra a 3.83 ppm (**6-32** y **6-33**) para el OCH<sub>3</sub> respectivamente; además la señal para el NH apareció a 12.89 ppm ó 12.98 ppm e intercambió con D<sub>2</sub>O. Igualmente, en el espectro de RMN <sup>13</sup>C sólo se observaron dos señales a alta frecuencia para los dos tipos de metilo a 13.75 ppm y 51.98 ppm, para **6-32**; y a 13.72 ppm y 52.30 ppm, para el compuesto **6-33**. En el espectro de <sup>13</sup>C del compuesto **6-32** fue notoria la duplicidad de las señales para los carbonos aromáticos posiblemente debido a que se observa al par de tautómeros, intrínsecos del sistema de bencimidazol, Figura 6.5: El desplazamiento químico del C-2 (=C-S-CH<sub>3</sub>) en el compuesto **6-32** fue de 157.10 ppm muy por abajo del valor de 170.17 del de su precursor (HN-C=S). En el espectro de masas el M<sup>+</sup> correspondió al pico más abundante, y los demás fragmentos corroboraron al éster metílico:(M-31) y ([M-31]-28) para los dos ésteres **6-32** y **6-33**.



**Figura 6.5.** Duplicidad de las señales por los carbonos aromáticos en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **6-32**.

6.8.1.1.7. Preparación de los compuestos ácido 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-34**) y 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-35**)

Los ácidos 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-34**) y 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-35**) se prepararon por hidrólisis alcalina de los ésteres **6-32** y **6-33**, utilizando tres equivalentes de sosa. La reacción en este caso se hizo en medio acuoso a 75-80 °C; también fue posible utilizar EtOH. El trabajo de la reacción para protonar el carboxilato es muy importante, ya que si no se llega al pH adecuado (pH~ 3-4) disminuye el rendimiento. La presencia del ácido carboxílico se observó en el espectro de IR por las señales entre 3125-2600  $\text{cm}^{-1}$  y 1685  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al grupo carboxilo. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , para el ácido **6-34**, se mostraron perturbados ya que por ejemplo en el de  $^1\text{H}$ , las señales se resolvieron mostrando su multiplicidad, hasta después del intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ . En el caso del espectro de  $^{13}\text{C}$ , todas las señales del núcleo de bencimidazol aparecieron dobles. Lo que podría significar que la molécula estuviese como Zwitterion o que el equilibrio entre los dos tautómeros sea lo suficientemente lento para ser observado en los espectros de RMN.<sup>33</sup>



Esquema 6.9. Equilibrios ácido base y tautomérico para el ácido 6-34.

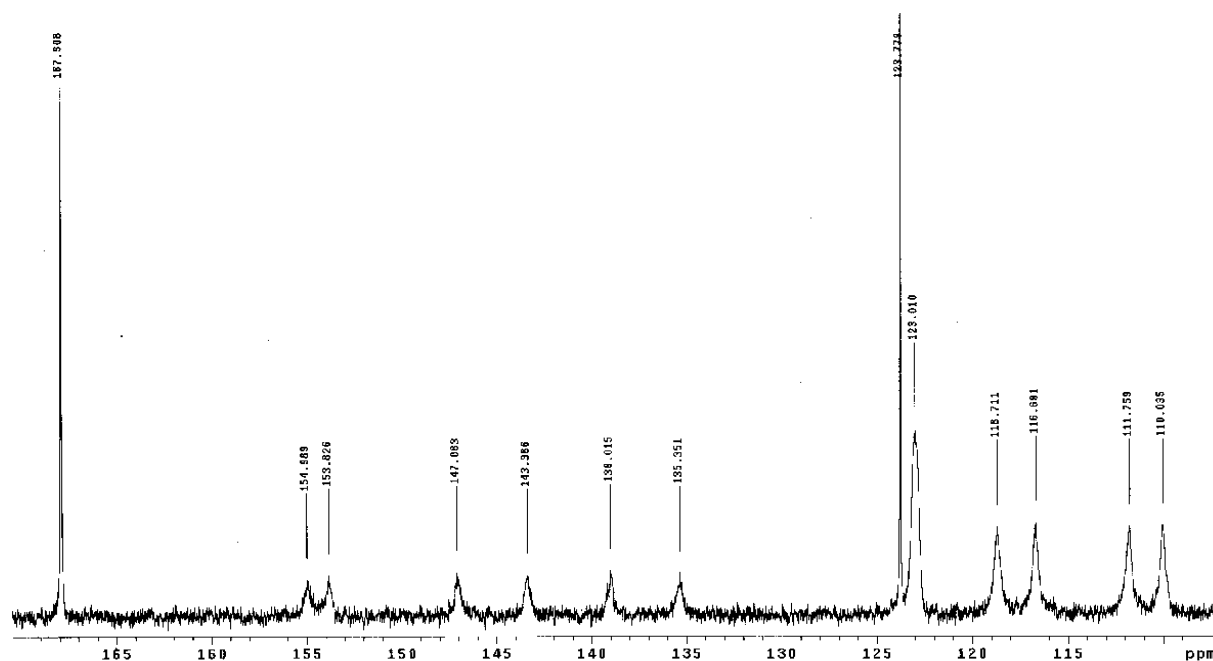


Figura 6.6. Duplicidad de las señales por los carbonos aromáticos en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 6-34.

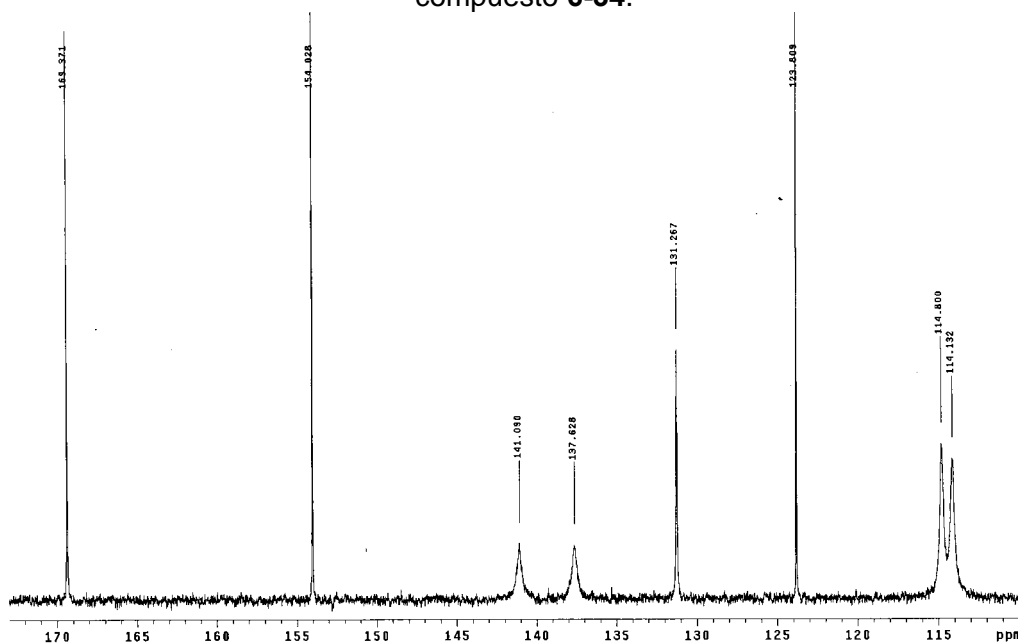


Figura 6.7. Señales simples de la parte aromática del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 6-35.



6.8.1.1.8. Preparación de las carboxamidas **6-1–6-8**

A partir de los ácidos **6-34** y **6-35** previamente activados y las aminas correspondientes se obtuvieron las amidas **6-1–6-8**. Se decidió activar a los ácidos mediante la formación de los derivados imidazólidos, resultantes de hacer reaccionar al ácido carboxílico con 1,1'-carbonildiimidazol. El grupo saliente que se genera con esta reacción es un compuesto aromático muy estable por lo que la reacción de formación de la amida es rápida y de fácil manejo. La formación del imidazólido, a diferencia de la del cloruro de ácido, es un procedimiento sencillo cuya única limitante es la condición anhidra del disolvente empleado, y la eliminación del imidazol que se genera como producto secundario de la reacción; aunque, esto no ofreció grandes problemas. A pesar de la pobre solubilidad de los ácidos **6-34** y **6-35** en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{CH}_3\text{CN}$ , a medida que fue formando el intermediario, éste se disolvió en el medio de la reacción, además, la reacción procedió entre 28-30 °C. Cuando se empleó  $\text{CH}_3\text{CN}$  el tiempo de reacción fue menor ya que el ácido se disolvió también. La segunda parte de la reacción fue la formación de las amidas. En general el tiempo de esta segunda reacción varió de 1.5-15 h, la reacción fue más rápida cuando se utilizó acetonitrilo ya que se pudo calentar a 55 °C. Los rendimientos fueron de regulares a muy buenos, 35-88%, el menor rendimiento fue para la formación de **6-5a**, la amida de piperazina, cuyo NH extra le provee muy alta solubilidad en agua, por lo que el rendimiento bajó en el proceso del aislamiento y purificación. La muestra pura para espectroscopia se logró por purificación por cromatografía en columna.

Es importante mencionar que también se prepararon algunas amidas por el método del cloruro de ácido; sin embargo, las condiciones ácidas de la formación de éste intermediario hacen que la reacción sea muy lenta, por la baja solubilidad de la sal generada en el medio de la reacción.

Los puntos de fusión de las amidas **6-1–6-8** fueron relativamente bajos de 72.1 °C a 189 °C. El compuesto de más alto punto de fusión fue **6-7**, la amida de *N*-metilpiperazina, y la de más bajo pf fue su análogo clorado (**6-8**) que fundió con descomposición a 69.7-72.1 °C. El mismo comportamiento se observó con **6-3** y **6-4**, las amidas de la 4-metilpiperidina, en las que el pf más alto correspondió a **6-3** (183-184 °C) y el más bajo pf (124.1-1245.5 °C) a **6-4** (el compuesto clorado). Al parecer el cloro en posición 6 del anillo bencimidazólico, vecino al grupo carboxamido promueve un acomodo menos simétrico en la red cristalina, lo que disminuye el punto de fusión considerablemente, Figura 6.8.

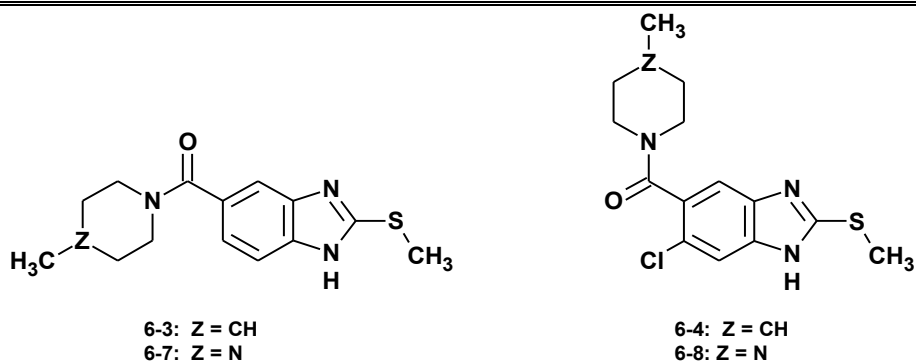
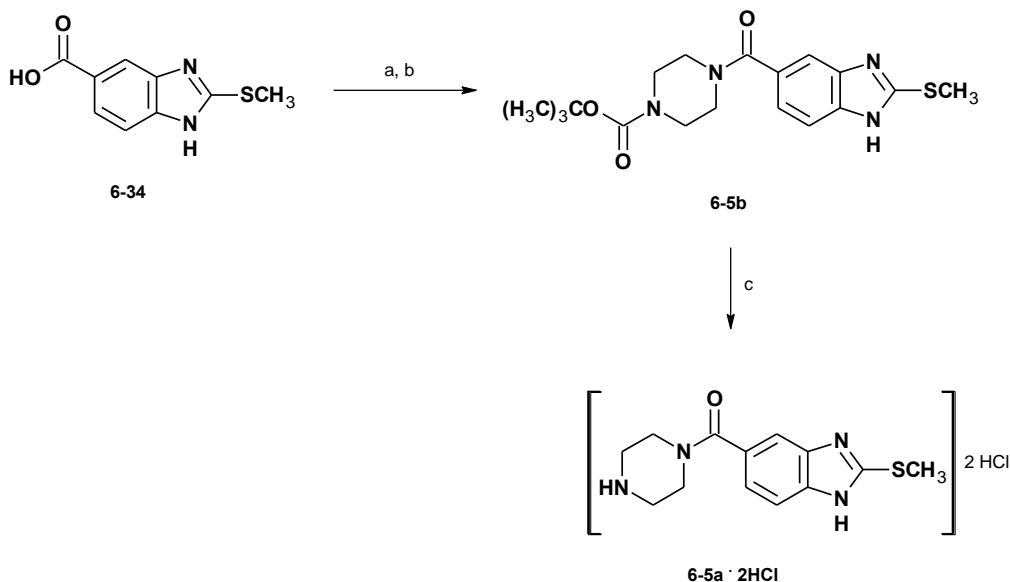


Figura 6.8. Amidas voluminosas

6.8.1.1.9. Método alternativo para la síntesis del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-5a**)

Debido a los inconvenientes que presentó la preparación del compuesto **6-5a**, se decidió utilizar a la piperazina protegida como el 1-piperazincarboxilato de *tert*-butilo en la reacción de formación de la amida; en este caso se obtuvo el compuesto **6-5b** (Esquema 6.10). Los problemas de solubilidad se resolvieron de ésta manera. La hidrólisis posterior del *tert*-Boc para liberar al NH de la piperazina se logró por tratamiento con solución de HCl 1M en AcOH 3M, dando como producto final a la amida **6-5a** en forma de diclorhidrato.



(a) 1,1'-carbonildiimidazol,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; (b) 1-Piperazincarboxilato de *tert*-butilo; (c) HCl 1M en AcOH

 Esquema 6.10. Método alternativo para la preparación de la amida **6-5a**.

6.8.1.1.10. Elucidación estructural de los carboxamidas **6-1–6-8**

En la Tabla 6.4 se resumen algunas de las características espectroscópicas y espectrométricas más importantes de las nuevas carboxamidas **6-1–6-8**; se anexa

también al compuesto **6-5b**, intermediario en la síntesis de la carboxamida **6-5a**. A continuación se discute la información que proporcionó la espectroscopia de estos compuestos y que llevó a la confirmación de las estructuras propuestas.

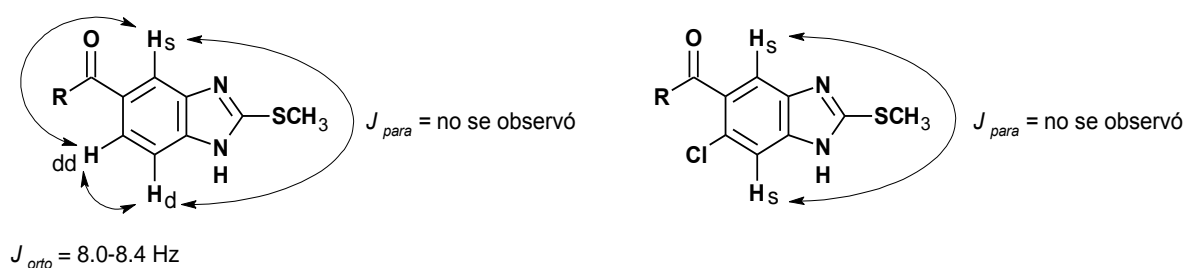
#### 6.8.1.1.11. Espectroscopia de IR

Todos los compuestos presentaron en sus espectros de IR (ver Apéndice 1. Espectros) las bandas características del esqueleto del núcleo bencimidazólico entre  $1570\text{ cm}^{-1}$ ,  $1480\text{ cm}^{-1}$  y  $1340\text{ cm}^{-1}$ ; la banda de alargamiento NH, de la posición 1 del anillo de bencimidazol, apareció entre  $3435\text{ cm}^{-1}$  y  $3100\text{ cm}^{-1}$  conjuntamente con los NH de la posición 4' de los compuestos **6-5a** y **6-6**. El alargamiento C=O de amida terciaria se observó a menor frecuencia que en sus correspondientes ácidos precursores, en un rango muy cerrado a  $1601\text{ cm}^{-1}$  y  $1627\text{ cm}^{-1}$ ; el compuesto **6-5b** mostró otra banda de C=O a  $1692\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a el carboxilato de *terc*-butilo. El sustituyente en posición 2 del anillo bencimidazólico se comprobó por la banda a  $1272\text{-}1299\text{ cm}^{-1}$  que coincidió con lo esperado para el alargamiento C-S ( $\text{CH}_3\text{-S}$ ). Las amidas **6-7** y **6-8**, adicionalmente, mostraron otra banda para el enlace C-N ( $\text{CH}_3\text{-N}$ ) en esta misma región.

#### 6.8.1.1.12. RMN $^1\text{H}$

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las carboxamidas **6-1–6-8** se observó que los desplazamientos químicos de los protones en estos compuestos fueron constantes; así los hidrógenos del  $\text{CH}_3\text{-S}$  se presentaron como señales simples entre 2.66 y 3.00 ppm. El más desplazado correspondió al compuesto **6-5a·2HCl**. La señal para el NH bencimidazólico apareció entre 9.73 ppm y 12.80 ppm, excepto para los compuestos **6-3**, **6-6** y **6-8** en donde el NH apareció entre 3.41-4.59 ppm; la señal integró para 1H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$ . El NH de la posición 4' de los compuestos **6-5a** y **6-6** se observó a 3.39 ppm y 4.59 ppm respectivamente. El diclorhidrato del compuesto **6-5a (6-5a·2HCl)** se comprobó por la señal amplia a 6.77 ppm que integró para 2H y desapareció con  $\text{D}_2\text{O}$ ; además, la señal a 9.73 ppm también integró para 2H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$  correspondiente a los NH de las posiciones 1 y 4'. Los compuestos **6-3** y **6-4** mostraron el  $\text{CH}_3$  en 4' como un doblete a 0.87 ppm y 0.98 ppm, y como señales simples a 2.17 ppm y 2.16 ppm para los compuestos **6-7** y **6-8**. La sustitución en el sistema del bencimidazol coincidió con la multiplicidad esperada, aunque la  $J_{meta}$  sólo se observó en el dd correspondiente al H-6(5) para los compuestos sustituidos en 5(6) y la  $J_{para}$  no se observó, inclusive en los compuestos sustituidos en 5 y 6 por lo que la multiplicidad de los H-4 y H-7 se reportó como singulete en lugar de doblete, Figura 6.19. Las señales

correspondientes a los hidrógenos de las porciones de piperidina y piperazina se mostraron como señales amplias o múltiples entre 0.92-4.70 ppm (9H o 10H) para los hidrógenos 2', 3', 4', 5' y 6' de la piperidina y entre 2.18-3.88 ppm para los hidrógenos de 2', 3', 5' y 6' (8H) de la piperazina. Cabe señalar que las integrales no coincidieron exactamente en todos los casos, ya que algunos espectros presentaron duplicidad de señales, o en su defecto señales muy amplias que tuvieron mejor resolución después del intercambio con D<sub>2</sub>O. El caso más importante fue el de la carboxamida 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



**Figura 6.9.** Sistemas de acoplamiento encontrados en los espectros de RMN <sup>1</sup>H para los compuestos **6-1–6-8**.

#### 6.8.1.1.13. RMN <sup>13</sup>C

En general todos los espectros de los nuevos compuestos coincidieron en los desplazamientos químicos de los carbonos relevantes. Así por ejemplo, el C del CH<sub>3</sub>-S apareció entre 13.77 ppm y 13.78 ppm, excepto en el compuesto **6-4** en donde el desplazamiento químico fue mucho más bajo debido a que el disolvente empleado en este caso fue Acetona-*d*<sub>6</sub> y no DMSO-*d*<sub>6</sub> como en los demás compuestos. El desplazamiento del carbono C-2 se observó entre 144.74 ppm y 154.56 ppm, y el del C=O de la amida entre 156.20 ppm y 169.71 ppm, en los dos casos el menor valor correspondió al compuesto **6-4**. En algunos casos no se pudieron registrar con precisión los desplazamientos de todos los carbonos, ya que algunas señales se observaron con muy baja intensidad e inclusive se presentaron como señales muy anchas, siendo a veces un poco difícil hacer la asignación. En otros casos, el espectro presentó duplicidad de señales siendo el ejemplo más claro el de la carboxamida **6-4**.

#### 6.8.1.1.14. Análisis espectroscópico de RMN de la carboxamida 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**)

Cuando se obtuvieron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C para el compuesto **6-4**, éstos mostraron casi el doble de las señales esperadas, siendo muy notorio que en la parte aromática en el espectro de <sup>1</sup>H, se observaron cuatro señales en vez de las dos que

se esperaban; además, las integrales no coincidieron exactamente con el número de hidrógenos de la molécula.

Por otro lado, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  fue más complicado, se observaron 22 carbonos y no 15 como se esperaba. En un principio se consideró que era una mezcla; sin embargo, el espectro de masas de alta resolución correspondió con la masa exacta del compuesto **6-4**: EMAR calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$ : 323.0859; encontrado: 323.0859. Además, los resultados del análisis elemental también fueron concordantes con los calculados.

La asignación de las señales tanto del espectro de hidrógeno y de carbono se realizó con ayuda del experimento bidimensional HETCOR (HETeronuclear CORrelation). En la Figura 6.10 se muestra la parte aromática del espectro HETCOR. Se puede observar en el espectro de  $^{13}\text{C}$  que las dos señales anchas y de baja intensidad a 102.32 ppm y 104.51 ppm correlacionaron con las cuatro señales simples 7.34 ppm, 7.43 ppm, 7.52 ppm y 7.54 ppm por lo que se corroboró la asignación de éstas a los hidrógenos y carbonos de las posiciones 4 y 7 del núcleo de bencimidazol.

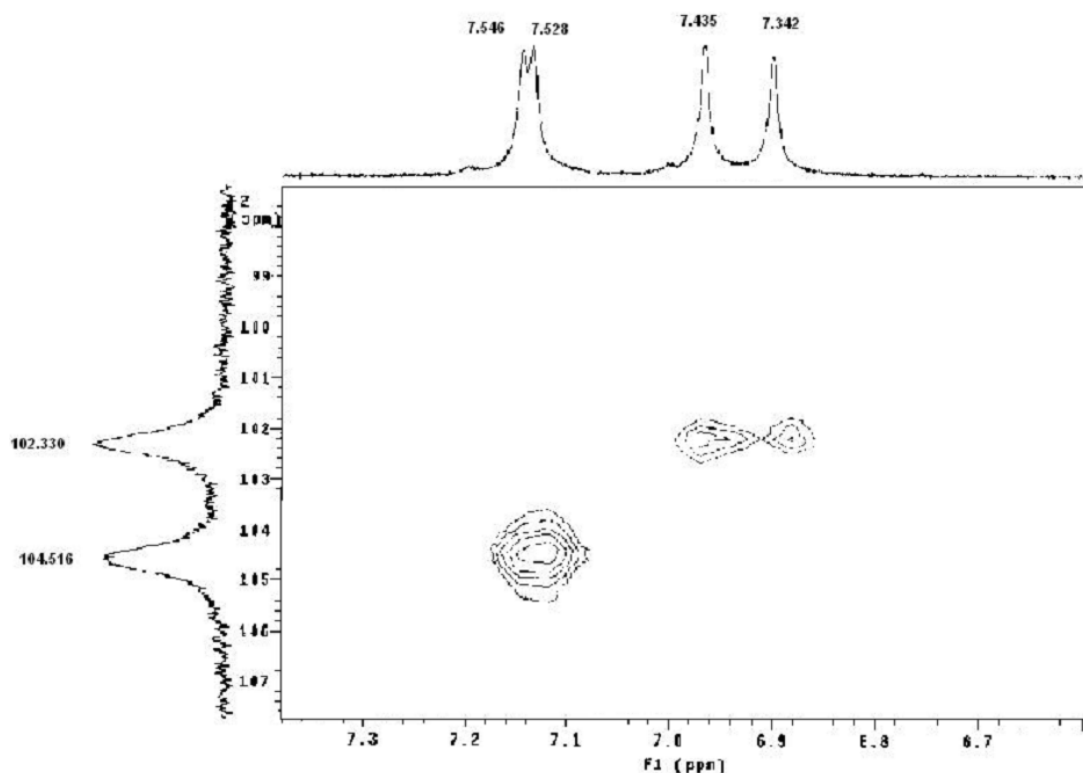


Figura 6.10. Parte aromática del espectro HETCOR del compuesto **6-4**.

Este hecho puede deberse presumiblemente a que en las condiciones en las que se obtuvieron los espectros de resonancia (Acetona- $d_6$  y temperatura ambiente) fue posible observar un par de isómeros ya sea tautómeros o de confómeros de rotación restringida, entre los cuales la interconversión es lo suficientemente lenta para poder diferenciarse en

el experimento de RMN. Sin embargo, la diferencia energética entre ellos no es lo suficientemente grande como para poder separarse físicamente. Cuando se realizó el intercambio con D<sub>2</sub>O, en el espectro de RMN <sup>1</sup>H, las cuatro señales permanecieron sin cambio lo que descartó que el hecho experimental observado se deba a la tautomería.

Por otro lado, cuando se prepararon los derivados 1-metilados del compuesto **6-4**,<sup>34a,b</sup> el espectro de RMN <sup>1</sup>H también apareció duplicado, cuando el espectro se determinó a 22.4 °C, observándose claramente las cuatro señales aromáticas, ver Figura 6.11. Este experimento descartó la hipótesis de que el fenómeno observado en el compuesto **6-4**, se deba al efecto de la tautomería.

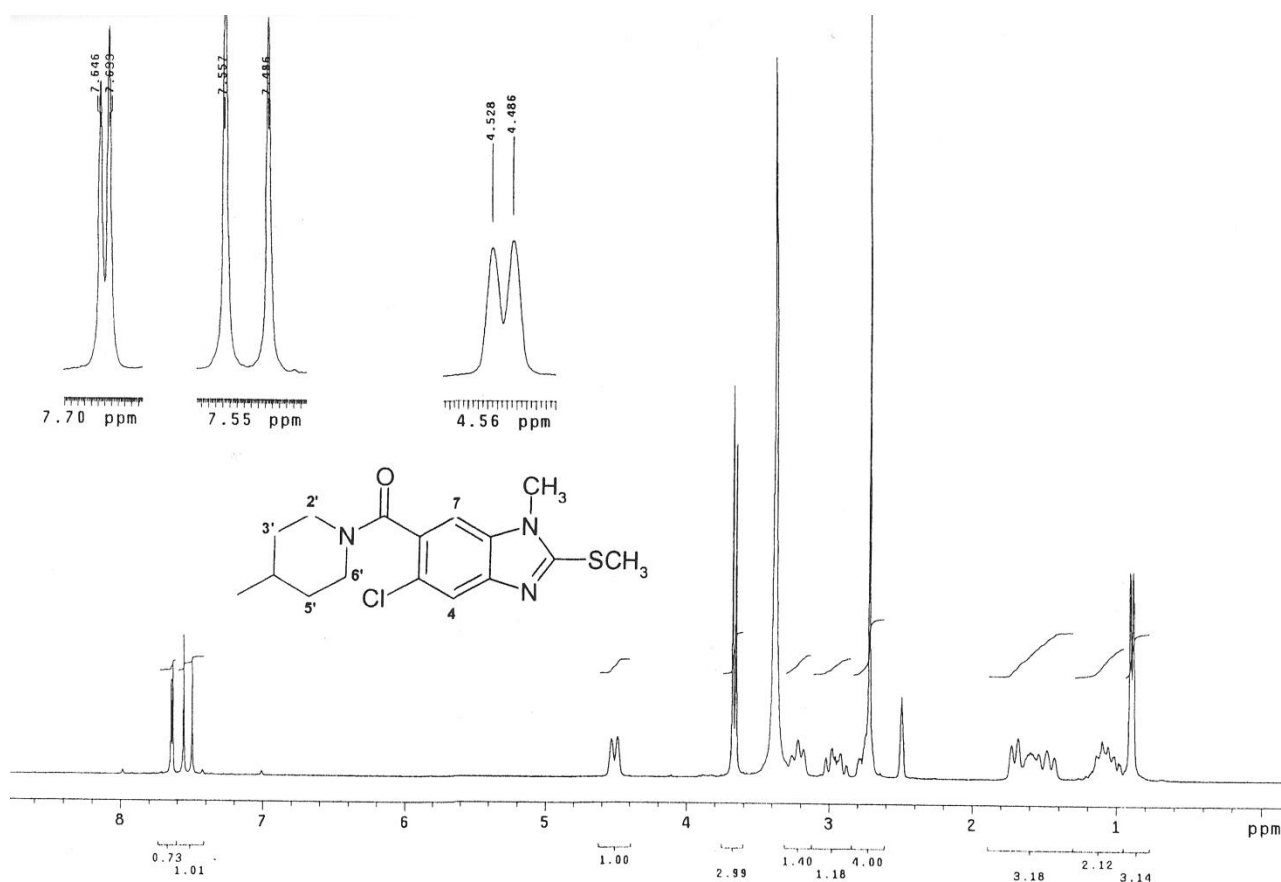
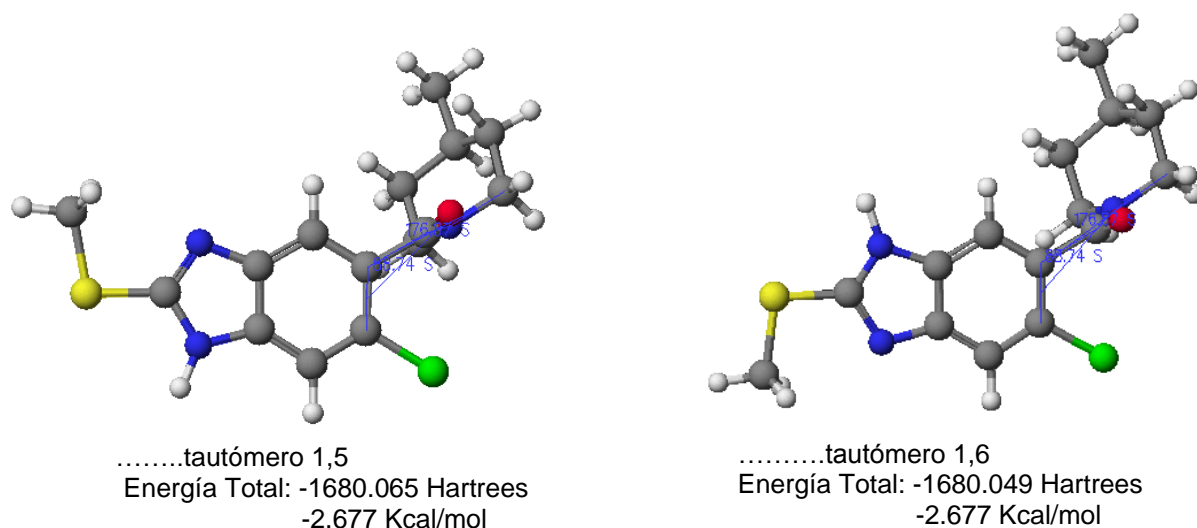


Figura 6.11. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del derivado 1 metilado del compuesto **6-4**.

Adicionalmente, utilizando métodos computacionales se modelaron los tautómeros de la amida **6-4** y se realizó el cálculo de sus energías. En la Figura 6.12 se presentan a los dos tautómeros del conformero más estable que se obtuvo del estudio conformacional realizado por el método MM3.



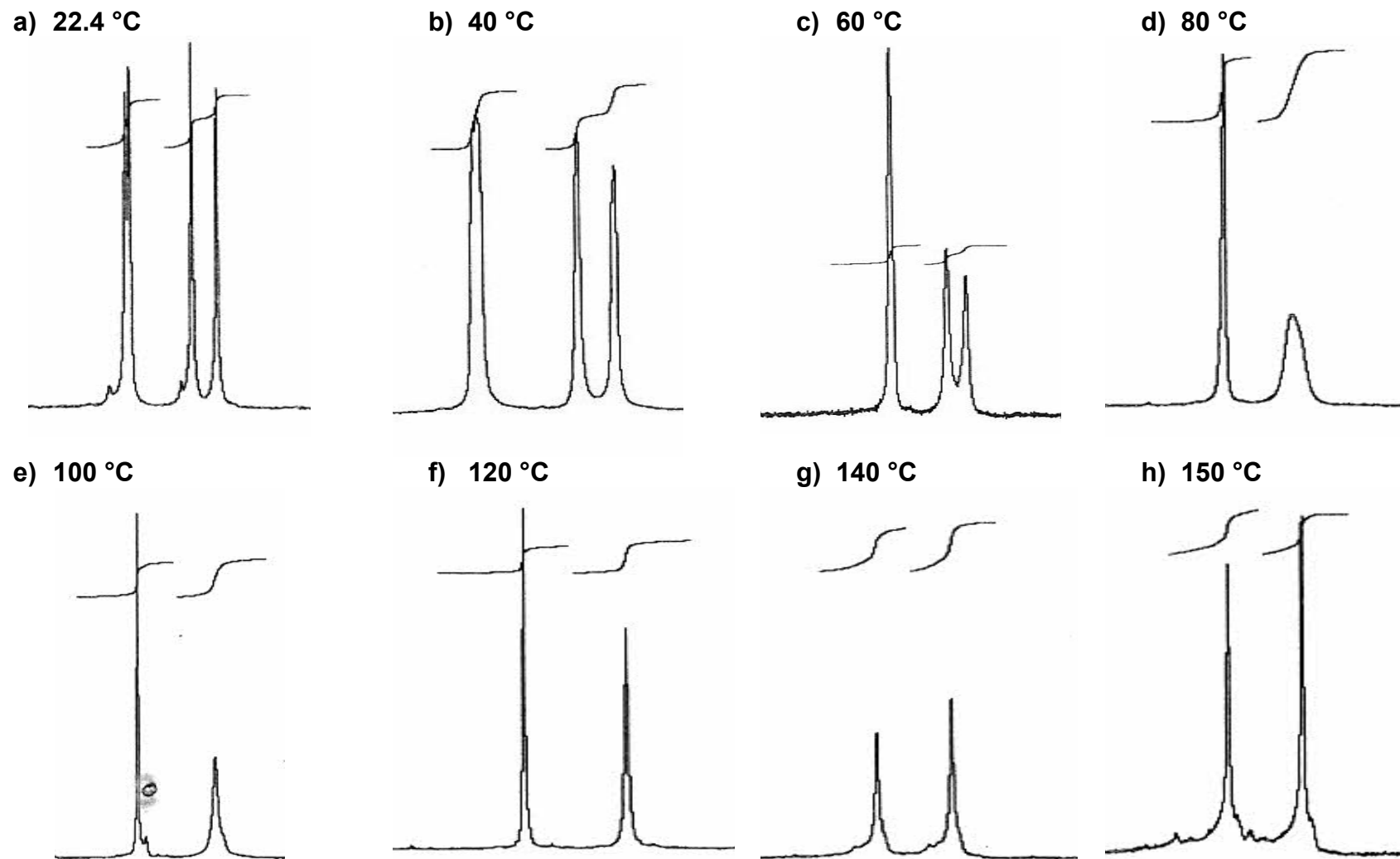
**Figura 6.12.** Tautómeros del compuesto **6-4** y sus energías calculadas por el método de DFT-B88-LYP Scf (DFT).

Al comparar la energía de ambas estructuras se observó que no hay diferencias energéticas significativas entre los isómeros. Por lo que entonces el fenómeno de la duplicidad de las señales puede deberse a la coexistencia de posibles rotámeros originados por el grupo carbonilo de la amida y a la conformación que adopta el anillo de metilpiperidina.

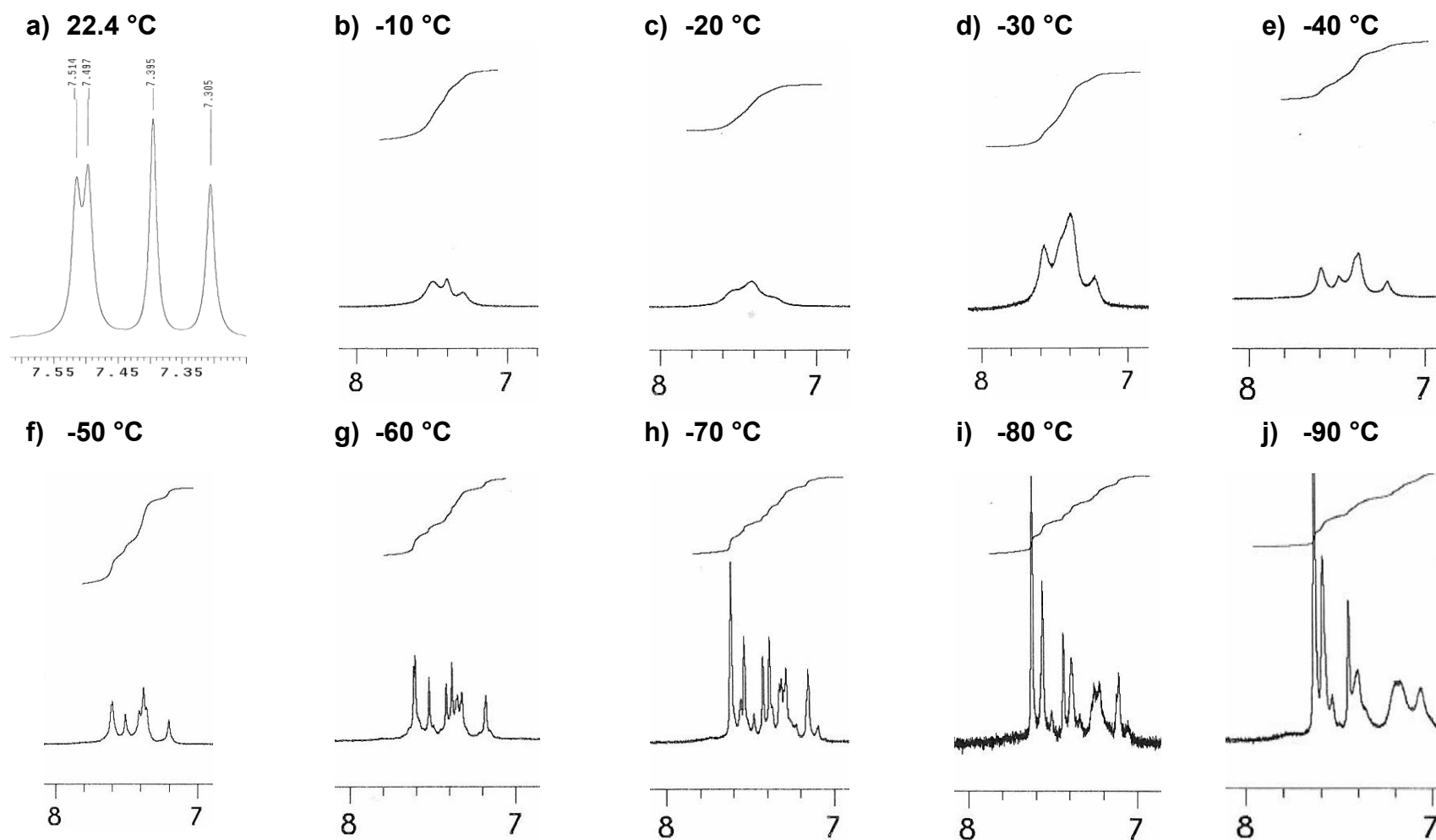
Con el propósito de comprobar que se trataba de una mezcla de conformeros, se realizaron dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de temperatura variable: uno de 22.4 °C a 150 °C, utilizando  $\text{DMSO-}d_6$  como disolvente; y otro, de 22.4°C a -90°C, utilizando  $\text{Acetona-}d_6$ . En el primer experimento, las cuatro señales entre 7.3-7.6 ppm empezaron a coalescer a 60 °C, Figura 6.13 (c); a esta temperatura las dos señales a 7.528 ppm y 7.546 ppm se juntaron en una sola señal; lo mismo sucedió con las señales simples a 7.34 ppm y 7.43 ppm que empezaron a juntarse a 80 °C, Figura 6.13 (d). A 120 °C se observó que las cuatro señales aromáticas coalescieron, observándose únicamente dos; también se observó coalescencia de las señales en la parte alifática Figura 6.13 (h) simplificándose notablemente el espectro. La coalescencia de señales también se observó en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a 22.4 °C se observaron 22 señales, las cuales disminuyeron a 15 a 80 °C. Este hecho experimental concuerda con el resultado del cálculo de las energías arriba descrito en donde las energías calculadas para los dos tautómeros de la conformación de menor energía para el compuesto **6-4**, resultaron de igual valor. De lo anterior se deduce que el fenómeno se debe a la presencia simultánea de isómeros conformacionales y/o de rotación restringida únicamente.

En el experimento de RMN  $^1\text{H}$  a bajas temperaturas se observó el efecto contrario (Figura 6.14). A medida que la temperatura disminuyó, el número de señales aumentó; a  $-50^\circ\text{C}$  se observó el desdoblamiento de las señales aromáticas, también la señal del NH a 12 ppm se dividió. Este efecto fue muy notorio en el espectro corrido a  $-70^\circ\text{C}$  donde se pudieron observar por lo menos 16 señales aromáticas y tres entre 12.533-12.644 ppm (Figura 6.15) lo que reflejó la presencia simultánea de múltiples posibles conformeros y tautómeros.

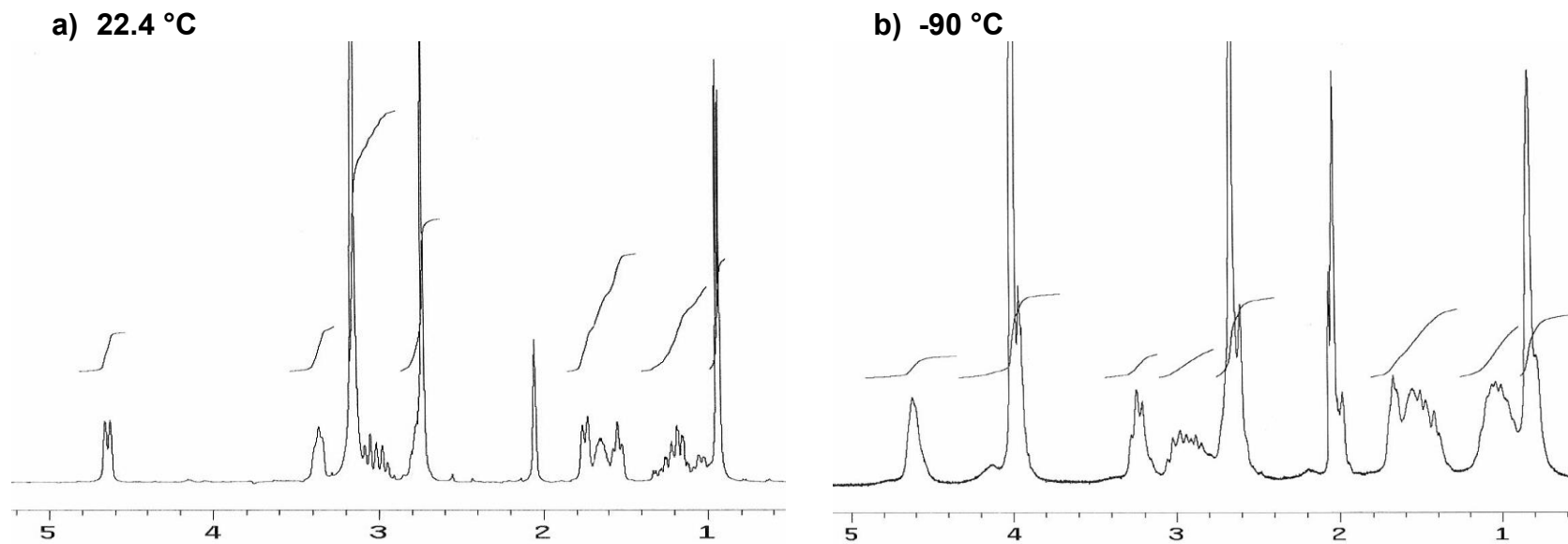




**Figura 6.13.** Parte aromática del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **6-4** a) 22.4 °C, b) 40 °C, c) 60 °C, d) 80 °C, e) 100 °C, f) 120 °C, g) 140 °C, h) 150 °C señales en 7.3 y 7.6 ppm. Espectro adquirido con DMSO- $d_6$ .

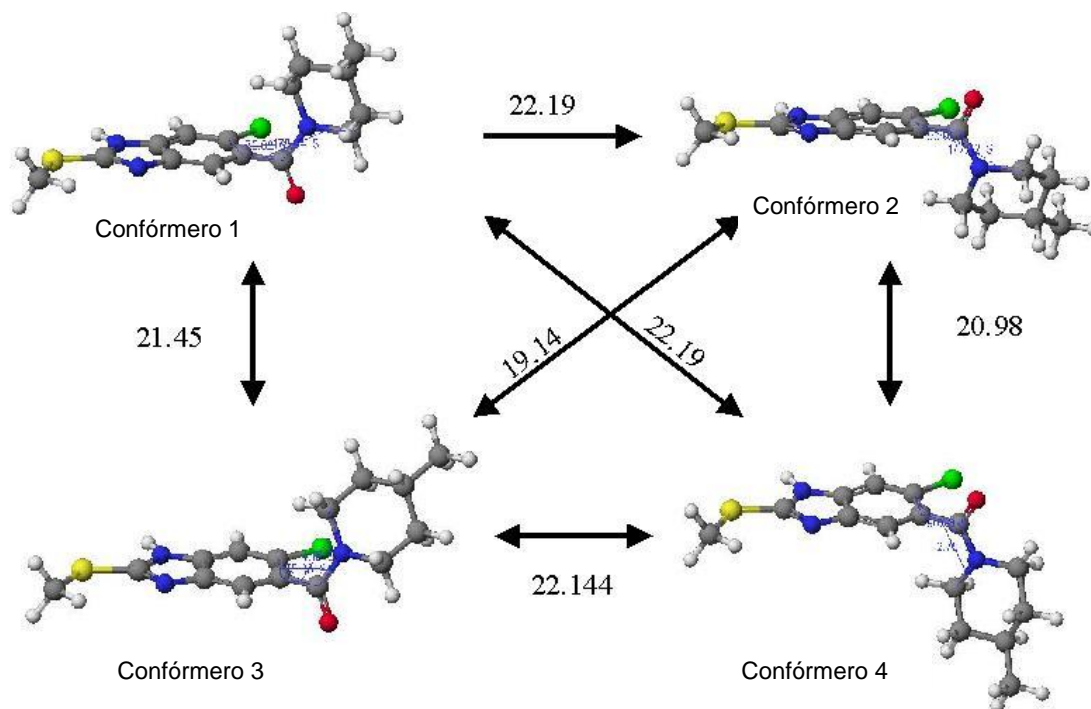


**Figura 6.14.** Parte aromática del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **6-4** a) 22.4 °C, b) -10 °C, c) -20 °C, d) -30 °C, e) -40 °C, f) -50 °C, g) -60 °C, h) -70 °C, i) -80 °C, j) -90 °C. Espectro adquirido en Acetona- $d_6$



**Figura 6.15.** Parte alifática del espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **6-4** a) 22.4 °C, b) -90 °C. Espectro adquirido en Acetona-*d*<sub>6</sub>.

Continuando con el estudio computacional, se encontraron cuatro principales confórmeros energéticamente diferentes uno del otro. En la Figura 6.16 se muestran los posibles confórmeros y las barreras energéticas que hay que superar para su interconversión.

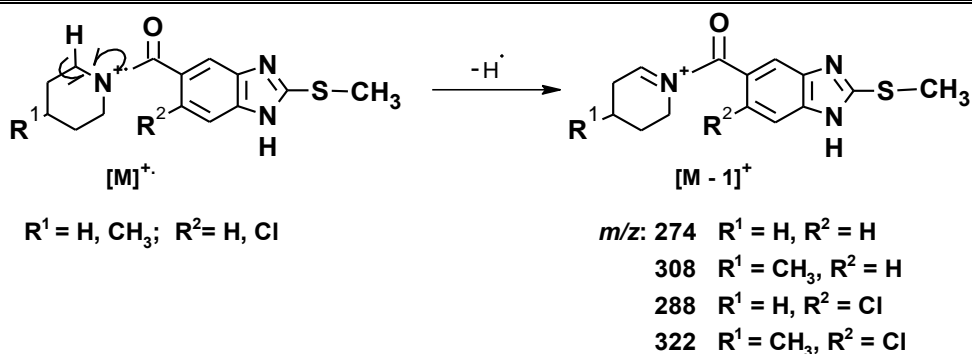


**Figura 6.16.** Diagrama de equilibrio interconversión entre los 4 posibles rotámeros, los valores sobre las flechas indican la energía en Kcal/mol relacionada en cada paso, obtenidas del mapa del potencial electrostático calculado por el método MM3.

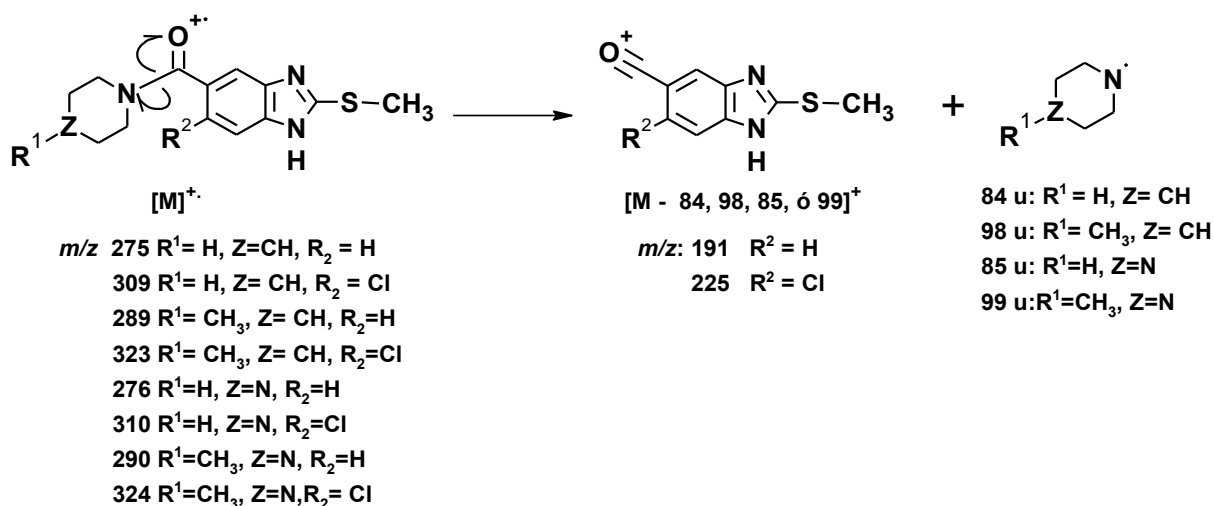
Experimentalmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  se observaron ocho señales en lugar de las dos esperadas, este fenómeno puede deberse que a la temperatura de adquisición del espectro pudo detectarse la presencia de los cuatro principales confórmeros, lo que es consistente con los obtenidos en el estudio teórico.

#### 6.8.1.1.15. Espectrometría de masas

En los espectros de masas para todas las amidas, **6-1-6-8** se observó el ion molecular en diferentes proporciones, pero en ningún caso el ion molecular correspondió al pico base del espectro. Para las amidas **6-1-6-4**, las derivadas de piperidina, fue muy importante el fragmento M-1 por la pérdida de un hidrógeno alfa al nitrógeno (Esquema 6.11), la abundancia de este pico fue de 69 a 100 %.

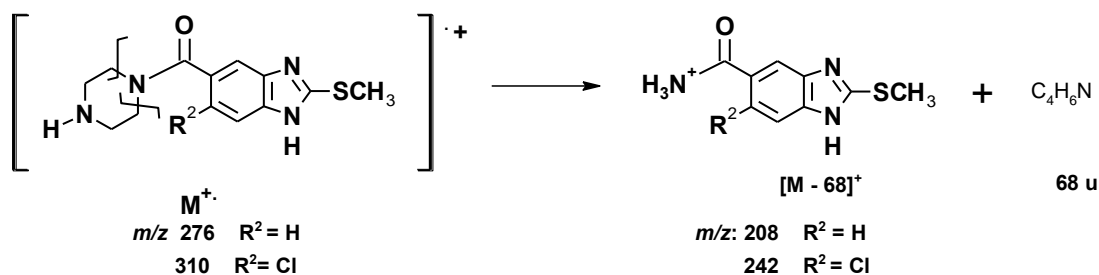

 Esquema 6.11.  $[M-1]^+$  de las amidas 6-1–6-4.

En general, en todas las amidas la formación del ion acilio fue uno de los fragmentos más importantes, en la mayoría de los casos, el pico base del espectro. Los iones de  $m/z$  191 y 225 correspondieron al ion acilio para los compuestos con H en la posición 6 o con Cl respectivamente, excepto para las amidas 6-2, 6-5a y 6-8 en la que la abundancia relativa del ion acilio fue de 95, 93 y 67% (Esquema 6.12).



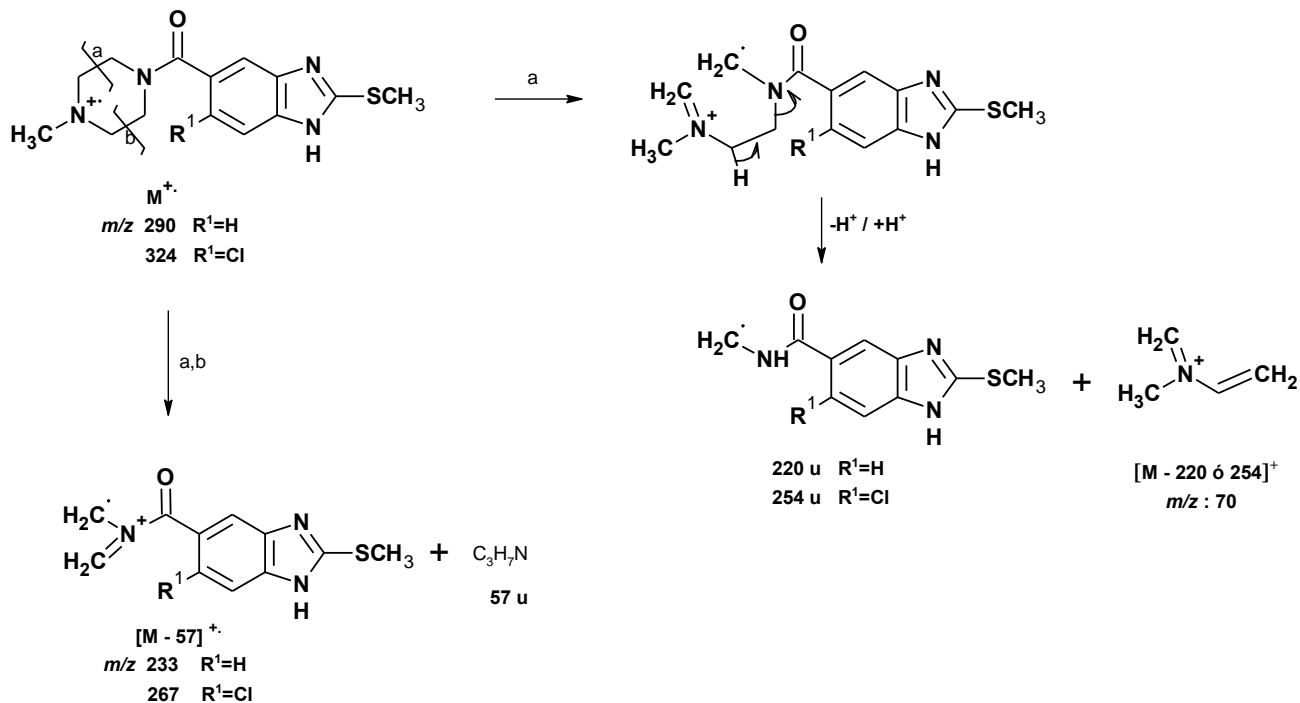
Esquema 6.12. Formación del ion acilio para las carboxamidas 6-1–6-8.

Adicionalmente, las amidas 6-5a y 6-6, las derivadas de piperazina, mostraron una pérdida de 68 unidades de masa originando los iones de  $m/z$  208 y 242 con 100 y 96% de abundancia, respectivamente (Esquema 6.13).



Esquema 6.13. Propuesta de fragmentación en el EM para las amidas 6-5a y 6-6.

Por otro lado las amidas **6-7** y **6-8**, derivadas de 1-metilpiperazina mostraron los iones  $[M-57]$  de  $m/z$  233 y 267 (91 y 20 % de abundancia) resultado de la ruptura simétrica del núcleo de piperazina; y el ion de  $m/z$  70 (84 y 100% de abundancia) por la pérdida de 220 o 254 unidades de masa, ver Esquema 6.14.



Esquema 6.14. Propuesta de fragmentación en el EM para las amidas **6-7-6-8**.

**Tabla 6.4.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las carboxamidas finales

Comp. No.	IR $\text{cm}^{-1}$ (KBr)				RMN $^1\text{H}$ $\delta$ ppm (DMSO- $d_6$ )				RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ ppm			EM m/z (IE)
	NH	C=O	CH <sub>3</sub> -S, CH <sub>3</sub> -N	CH <sub>3</sub> -S	NH	Otro	CH <sub>3</sub> -S	C-2	C=O	Otro		
<b>6-1</b>	3386	1602	1290 ---	2.66	12.75		13.78	152.89 153.200	169.612			275 (M <sup>+</sup> , 53%), 274 (M-1, 80%), 191 (M-84, 100%).
<b>6-2</b>	3435	1610	1290 ---	2.68	12.80		13.75	154.41	165.93			309 (M <sup>+</sup> , 89%), 308 (M-1, 100%), 274 (M-35, 40%), 225 (M-84, 95%).
<b>6-3</b>	3426	1602	1272 ---	2.66	3.80	0.87 CH <sub>3</sub> en 4'	13.77	152.96	169.56	21.61 CH <sub>3</sub> en 4'		289 (M <sup>+</sup> , 58%), 288 (M-1, 93%), 191 (M-98, 100%).
<b>6-4</b>	3422	1611	1284 ---	2.78 <sup>a</sup>	12.00	0.98 CH <sub>3</sub> en 4'	4.068 <sup>a</sup>	144.740	156.20 156.30	11.77, 11.88 CH <sub>3</sub> en 4'		323 (M <sup>+</sup> , 29%), 322 (M-1, 69%), 288 (M-35, 18%), 225 (M-98, 100%).
<b>6-5a</b>	3397	1606	1284 ---	2.68	12.76 3.39		13.825	153.146	169.71			276 (M <sup>+</sup> , 20%), 208 (M-68, 100%), 191 (M-85, 93%).
<b>6-5a•2HCl</b>				3.00	9.73, 2NH 4.59, 2NH	6.17 2HCl						-----
<b>6-6</b>	3389	1607	1291 ---	2.68	4.59, 2NH		13.77	154.56	166.14			310 (M <sup>+</sup> , 20%), 242 (M-68, 96%), 225 (M-85, 100%)
<b>6-7</b>	3100	1601	1292, 1273	2.68	12.70	2.17 CH <sub>3</sub> N	13.77	153.13	169.66	45.63 CH <sub>3</sub> N		290 (M <sup>+</sup> , 93%), 233 (M-57, 91%), 191 (M-99, 100%). 70 (M-220, 84%)
<b>6-8</b>	3385	1611	1299, 1260	2.68	3.41	2.16 CH <sub>3</sub> N	13.75	154.54	166.12	45.62 CH <sub>3</sub> N		324 M <sup>+</sup> , 35%), 267 (M-57, 20%), 225 (M-99, 67%) 70 (M-254, 100%).
<b>6-5b</b>	3343	1627, 1692	1274 --	2.71 <sup>b</sup>	10.30	1.48, 9H	14.40 <sup>b</sup>	154.55	171.64	154.34 C=O <i>terc</i> - Boc		376 (M <sup>+</sup> , 11%), 208 (M-168, 64%), 191 (M-185, 100%).

<sup>a</sup>Acetona- $d_6$ , <sup>b</sup>CDCl<sub>3</sub>

6.8.1.2. Resultados y Discusión de la Parte Biológica, Amidas **6-1–6-8**

Los compuestos **6-1–6-8** se sometieron a evaluación antihelmíntica contra las larvas musculares de *T. spiralis* y contra la cepa ORF de *Taenia crassiceps*. También se evaluó la actividad antiprotozoaria *in vitro* frente a *Giardia intestinalis*. Los resultados se muestran en las Tabla 6.5 y 6.6.

6.8.1.2.1. Efecto antihelmíntico de las amidas **6-1–6-8** sobre LM de *T. spiralis* y sobre *T. crassiceps in vitro*

Los compuestos se sometieron a evaluación antihelmíntica *in vitro* contra las larvas musculares de *T. spiralis*. Se determinó el porcentaje de reducción de la viabilidad de las larvas musculares a cinco concentraciones, Tabla 6.5.

**Tabla 6.5.** Actividad de los compuestos **6-1–6-8** contra la larva muscular de *T. spiralis*

Compuesto No.	% de reducción de la viabilidad de larvas musculares de <i>T. spiralis</i> (concentraciones $\mu\text{M}$ )				
	3.777	0.377	0.0377	0.00377	0.000377
<b>6-1</b>	61	39	28	24	10
<b>6-2</b>	48	29	19	15	12
<b>6-3</b>	27	20	5	0	0
<b>6-4</b>	35	25	23	18	9
<b>6-5a</b>	45	35	30	17	0
<b>6-6</b>	40	35	28	21	0
<b>6-7</b>	27	21	19	17	0
<b>6-8</b>	30	6	2	0	0
<b>ABZ</b>	46	35	27	25	18

En general se puede observar que estos compuestos presentaron una buena actividad antihelmíntica. Los compuestos **6-1**, **6-2** y **6-5a** fueron tan activos o mejores que el albendazol, siendo la carboxamida **6-1** la más potente de la serie. Cabe señalar que cuando se evaluaron sus correspondientes derivados 1-metilados la actividad vs *T. spiralis* se perdió casi por completo, ver Tabla 6.7.<sup>34</sup>

Las carboxamidas **6-1–6-4** y **6-7** se evaluaron *in vitro* contra *T. crassiceps* de la cepa ORF, a dos concentraciones: 0.20  $\mu\text{M}$  y 1.7  $\mu\text{M}$ . Los resultados fueron contundentes: ninguna carboxamida presentó actividad, el valor determinado fue de 0% de muertes de los cisticercos, comparado con el sulfóxido de ABZ que tuvo un 88% de mortalidad a la concentración de 1.7  $\mu\text{M}$ . La carboxamida, análoga de **6-1** pero de tipo carbamato de metilo, redujo 62% de los quistes, lo que indica la importancia del grupo alcoxicarbonilamino en la posición 2 del bencimidazol. También estos resultados indicaron que el ABZ sólo fue activo como sulfóxido.



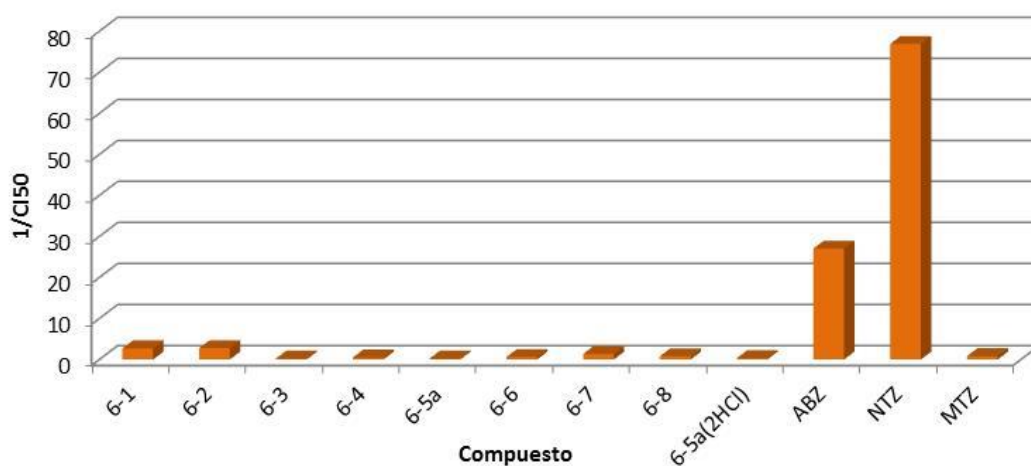
6.8.1.2.2. Efecto antiprotozoario de las amidas **6-1–6-8** sobre *G. intestinalis*

En general las carboxamidas **6-1–6-8** presentaron actividad modesta contra los trofozoítos de *G. intestinalis*. Únicamente los compuesto **6-1**, **6-2** y **6-7** mostraron mejor actividad que el MTZ y por consiguiente todos fueron menos potentes que el ABZ y la NTZ. Los resultados se muestran en la Tabla 6.6 y Gráfico 6.1.

Al comparar los valores de  $CI_{50}$  de alguno derivados 1-metilados de las carboxamidas **6-1–6-4**, se encontró que la potencia aumentó considerablemente. Lo que queda de manifiesto que para este tipo de compuestos, con sustituyentes voluminosos en 5(6), el grupo 1-CH<sub>3</sub> aumenta la actividad giardicida, ver Tabla 6.7.

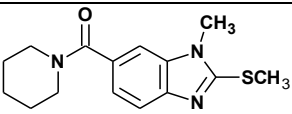
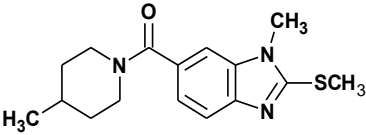
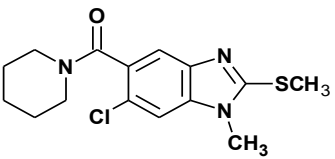
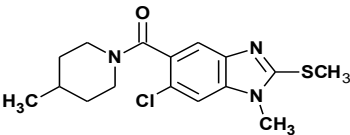
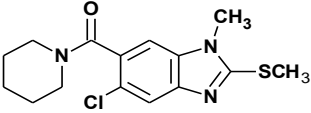
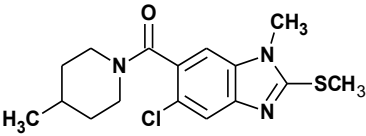
**Tabla 6.6.** Susceptibilidad *in vitro* de *G. intestinalis* a los compuestos **6-1–6-8**

Compuesto	$CI_{50}$ $\mu$ M	$-\log CI_{50}$ ( $pCI_{50}$ )
<b>6-1</b>	0.368	6.434
<b>6-2</b>	0.359	6.444
<b>6-3</b>	3.918	5.406
<b>6-4</b>	2.09	5.679
<b>6-5a</b>	4.157	5.381
<b>6-6</b>	1.634	5.786
<b>6-7</b>	0.740	6.130
<b>6-8</b>	1.283	5.891
<b>6-5a(2HCl)</b>	3.289	5.482
<b>ABZ</b>	0.037	7.4317
<b>NTZ</b>	0.0130	7.8860
<b>MTZ</b>	1.2280	5.9108



**Gráfica 6.1.** Actividad giardicida de las carboxamidas **6-1–6-8**.

**Tabla 6.7.** Actividad antiparasitaria de algunas carboxamidas 1-metilbencimidazólicas

Compuesto	CI <sub>50</sub> $\mu$ M contra <i>G intestinalis</i>	% de Reducción de la viabilidad de las larvas musculares de <i>T. spiralis</i> a 3.77 $\mu$ M
	0.256	10.0
	0.053	10.0
	7.013	9.7.0
	1.428	6.0
	0.122	NR
	0.099	NR

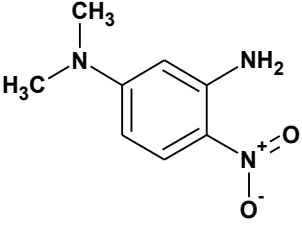
#### 6.8.1.2.3 Determinación de algunas propiedades biofarmacéuticas

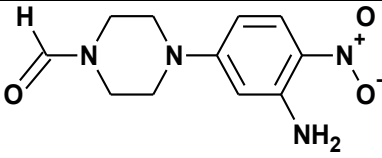
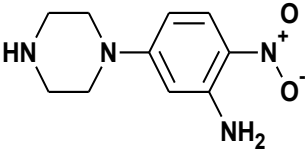
Debido a que las carboxamidas **6-1–6-4** resultaron con buena actividad contra las larvas musculares de *T. spiralis*, se les determinó la solubilidad, pKa, logP. El compuesto **6-1** presentó una mejor solubilidad en medio ácido que el ABZ. Los cuatro compuestos fueron altamente permeables, por lo que un sistema de flujo en la célula podría estar facilitando su transporte, siendo el compuesto **6-4** el que presentó la mayor permeabilidad, esto está relacionado con la presencia de un metilo y un átomo de cloro en su estructura lo que aumenta su lipofilia (logP = 1.97). A pesar de su buena solubilidad y permeabilidad, el compuesto **6-1** es rápidamente metabolizado a su sulfóxido, por lo que su tiempo de vida media y de residencia es muy corto, lo que lleva a su rápida eliminación.<sup>31</sup>



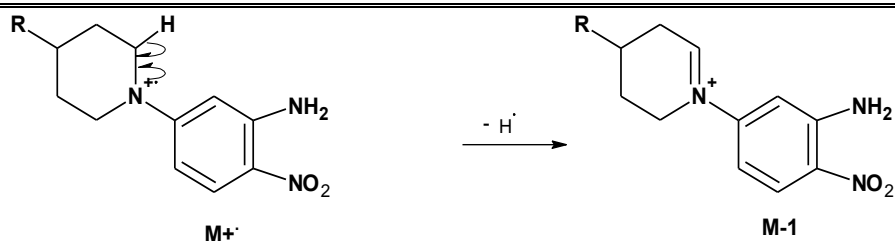
NH<sub>2</sub>, también las dos señales a 1554 cm<sup>-1</sup> y 1399 cm<sup>-1</sup> confirmaron la presencia del grupo nitro. Los 6 hidrógenos de la dimetilamina aparecieron en el espectro de RMN <sup>1</sup>H como un singulete a 3.04 ppm que integró para 6H. La trisustitución en el anillo aromático lo mostró el sistema ABX en el espectro de RMN <sup>1</sup>H. Además, el espectro de masas mostró el ion molecular de *m/z* 181 correspondiente a una estructura con número impar de nitrógenos. La presencia del grupo nitro se evidenció por los iones M-30 y M-46; la pérdida de 15 unidades de masa correspondió a la pérdida de CH<sub>3</sub>. El segundo producto de la reacción fue el producto de formilación del nitrógeno de la piperazina. El espectro de RMN <sup>1</sup>H, mostró los multipletes complejos a 3.29-3.39 ppm y 3.46-3.49 ppm, cada uno integrando para 4H correspondientes a los hidrógenos de la piperazina. Se observó también un singulete a 8.07 ppm que no intercambiaba con D<sub>2</sub>O. Esta última señal correlacionó en el espectro HETCOR con una señal a 157.10 ppm que se asignó a un carbonilo de aldehído o formilo. El ion molecular de *m/z* 250 confirmó la presencia de un número par de nitrógenos; y la pérdida de 29 unidades, comprobó la pérdida del formilo. El último producto y el de menor *R<sub>f</sub>* fue la 2-nitro-5-(piperazin-1-il)anilina (**6-41**), la cual mostró en el IR las bandas a 3449 cm<sup>-1</sup>, 3312 cm<sup>-1</sup> y 3271 cm<sup>-1</sup> características de los dos tipos de amina NH<sub>2</sub> y NH; además en el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observaron los protones de la piperazina, así como dos tipos de hidrógenos intercambiables con D<sub>2</sub>O en las señales amplias 3.70-4.70 ppm y 7.29 ppm que integraron para uno y dos protones, respectivamente. En el espectro de masas el ion molecular de *m/z* 222 correspondió al peso molecular del compuesto esperado; el pico base del espectro 180 (M-42) fue ocasionado por la pérdida de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N del anillo de piperazina.

**Tabla 6.8.** Constantes espectroscópicas de los productos de la reacción de obtención de **6-41** en DMF

 <p><i>N,N'</i>-Dimetil-4-nitro-1,3-benzenodiamina</p>	<p>IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3468 y 3355 (-NH<sub>2</sub>), 2923 (C-H), 1619 (C=C), 1554 y 1399 (-NO<sub>2</sub>), 1251 (C-N)</p> <p>RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 3.05 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>N); 5.88 (d, 1H, <i>J</i>= 2.7 Hz, H-2); 6.18 (dd, 1H, <i>J</i><sub>1</sub>= 9.6 Hz, <i>J</i><sub>2</sub>= 2.7 Hz, H-6); 5.70-6.38 (as, 2H, Inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 8.01 (d, 1H, <i>J</i>= 9.9 Hz, H-5).</p> <p>EM (IE, ID) <i>m/z</i>: 181 (M<sup>+</sup>, 100%); 180 (M-1, 77%); 166 (M-15, 25%); 151 (M-30, 90%); 135 (M-46, 88%); 120 (135-15).</p>
---	--

 <p>4-(3-Amino-4-nitrofenil)piperazino-1-carbaldehído</p>	<p>RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm: 3.30–3.39 (m, 4H, H-3 y H-5); 3.46–3.49 (m, 4H, H-2 y H-6); 6.23 (d, 1H, <math>J= 2.7</math> Hz, H-2'); 6.40 (dd, 1H, <math>J_1= 9.6</math> Hz, <math>J_2= 2.7</math> Hz, H-6'); 7.28 (sa, 2H, Inter. con <math>\text{D}_2\text{O}</math>, <math>-\text{NH}_2</math>); 7.82 (d, 1H, <math>J= 9.6</math> Hz, H-5'); 8.08 (s, 1H, H-CO-).</p> <p>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (75.3 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math> ppm: 40.04 (C-2), 41.80 (C-6), 43.10 (C-3 y C-5), 93.83 (C-2'), 101.61 (C-6'), 119.03 (C-4'), 123.24 (C-5'), 144.06 (C-3'), 150.69 (C-1'), 157.104 (C=O).</p> <p>EM (IE, ID) <math>m/z</math>: 250 (M+, 100%); 221 (M–29, 70%); 192 (M–58), 179 (221–42, 36%).</p>
 <p>2-Nitro-5-piperazin-1-ilanilina (<b>6-41</b>)</p>	<p>IR (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math>: 3449, 3312, 3271 (<math>-\text{NH}_2</math>, NH), 3121 (C-H Ar.), 2944–2844 (C-H Alif.), 1623 (C=C), 1567, 1373 (<math>-\text{NO}_2</math>), 1230 (C-N).</p> <p>RMN <math>^1\text{H}</math> (300 MHz, <math>\text{DMSO-}d_6</math>) <math>\delta</math>: 2.95 (dd, 4H, <math>J_1= 5.1</math> Hz, <math>J_2= 4.8</math> Hz, H-3' y H-5'); 3.36 (dd, 4H, <math>J_1= 5.2</math> Hz, <math>J_2= 4.8</math> Hz, H-2' y H-6'); 3.70–4.70 (sa, 1H, Inter. <math>\text{D}_2\text{O}</math>, NH); 6.23 (d, 1H, <math>J= 2.7</math> Hz, H-6); 6.38 (dd, 1H, <math>J_1= 9.6</math> Hz, <math>J_2= 3.0</math> Hz, H-4); 7.29 (s, 2H, Inter. <math>\text{D}_2\text{O}</math>, <math>\text{NH}_2</math>); 7.81 (d, 1H, <math>J= 9.6</math> Hz, H-3).</p> <p>EM (IE, ID) <math>m/z</math>: 222 (M+, 95%); 180 (M–42, <math>\text{C}_2\text{H}_4\text{N}</math>, 100%); 134 (180–46, <math>\text{NO}_2</math>, 59%).</p>

Debido a lo anterior se decidió realizar la reacción por fusión de los dos sólidos materias primas (125-129 °C y 109-112 °C son los puntos de fusión de 5-cloro-2-nitroanilina y piperazina respectivamente). Se utilizó un exceso de piperazina (4 equivalentes). La reacción se completó en 10 minutos y se obtuvo la amina **6-41** con un buen rendimiento y grado de pureza. El mismo procedimiento fue efectivo para la nitroanilina **6-42**. En general todas las aminas **6-37–6-44** se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos. Todas las aminas se caracterizaron por presentar en el IR las dos bandas de amina primaria entre  $3460\text{ cm}^{-1}$  y  $3330\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , aparecieron las señales para los anillos de piperidina y piperazina entre 1.00 y 3.30 ppm, también la señal que intercambiaba con  $\text{D}_2\text{O}$  e integró para 2H apareció en todos los casos entre 6.00 y 7.50 ppm. En el espectro de masas de las aminas **6-37–6-40**, es decir, las que tienen un núcleo de piperidina o 4-metilpiperidina presentaron el ion M–1 como el más abundante o muy cercano al 100%. Debido a la pérdida de un hidrógeno de la posición alfa al nitrógeno del heterociclo.



**Esquema 6.16.** Ion  $[M-1]^+$  más abundante en el espectro de masas de las aminas 6-37–6-40.

Cabe mencionar que actualmente hemos incursionado en la síntesis asistida por microondas y algunos ejemplos exitosos son la preparación de las aminas cloradas de esta serie. En la Tabla 6.9 se resumen las condiciones y rendimientos de los ejemplos probados y se comparan con el método convencional. Como se puede ver fue notable la disminución en el tiempo de reacción, la eficiencia con menor cantidad de reactivo y la mejora en el rendimiento de las reacciones con microondas.

**Tabla 6.9.** Reacciones de  $S_NAr$  realizadas por el método convencional y por microondas

Compuesto	Tipo de síntesis	Equivalentes de amina	Temperatura (°C)	Disolvente	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
	Convencional	4	140	--	120	37
	Microondas <sup>a</sup>	2.5	150	--	5	82
	Convencional	4	120	--	120	85
	Microondas	2.5	150	--	5	90
	Convencional	3.5	125	nd	10	71
	Microondas	nd	nd	nd	nd	nd
	Convencional	4	nd	--	nd	nd
	Microondas	2.5	150	--	10	90
	Convencional	4	nd	--	nd	nd
	Microondas	2.5	140	MeCN	30	71
	Convencional	4	120	--	180	77
	Microondas	2.5	150	--	10	93

<sup>a</sup>Reacciones realizadas en un horno Synthos 3000 de Anton Paar, utilizando el rotor 64MG5.

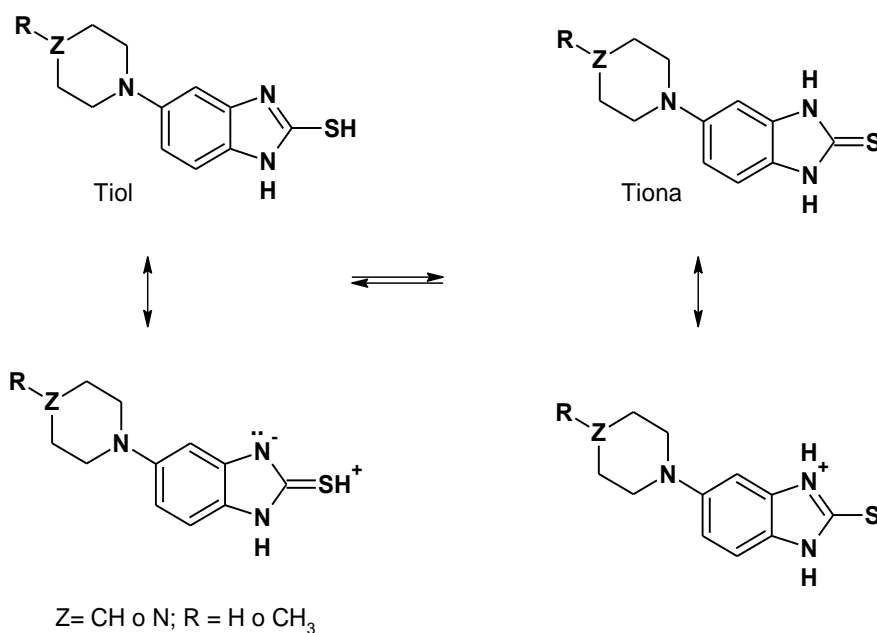
6.8.2.1.2. Preparación de los compuestos **6-47–6-54**. Reacción de reducción

Seguendo con la ruta sintética planteada en el Esquema 6.7. Para las reacciones posteriores fue necesario proteger a las aminas **6-41** y **6-42** mediante acetilación; el problema en esta reacción fue la presencia del  $\text{NH}_2$  de la anilina que se acetiló cuando se utilizó anhídrido acético en exceso por lo que la reacción se llevó a cabo utilizando piridina, DMF y  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$  como disolventes y un equivalente de anhídrido acético. La siguiente reacción en la propuesta metodológica fue la reducción del grupo nitro; las aminas **6-47–6-54** se obtuvieron por hidrogenación catalítica utilizando Pd/C como catalizador y  $\text{SnCl}_2/\text{HCl}$  o Ni-Raney en el caso de los compuestos clorados, debido a que se observó hidrogenólisis cuando se utilizó Pd/C.

6.8.2.1.3. Preparación de los compuestos **6-55–6-62**. Reacción de ciclación

Las diaminas **6-47–6-54** recién preparadas, sin posterior tratamiento, se sometieron a la ciclación con  $\text{CS}_2$  para dar los tioles correspondientes **6-55–6-62**. La solubilidad fue el principal obstáculo a vencer en el proceso de purificación por lo que en algunos casos el producto se purificó por recristalización de EtOH-DMF o por lavados con tolueno/EtOH a 70-80 °C. En los compuestos **6-55–6-62**, el tautómero que predomina en el equilibrio al parecer es la tiona debido a que en el IR la banda de SH es muy tenue o no aparece; sin embargo a 1170-1200  $\text{cm}^{-1}$  se observó una banda intensa. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observó casi en todos los casos una señal amplia que integró para 2H entre 10.50 ppm y 12.50 ppm que desapareció con  $\text{D}_2\text{O}$ . También la señal a 168 ppm en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (en los casos en que se determinó el espectro) coincidió con lo calculado para un carbonilo de tiona ( $\text{C}=\text{S}$ ). Aún cuando también se tuvo un  $\text{C}=\text{O}$  de acetilo en la molécula (compuestos **6-59** y **6-60**) el desplazamiento del C-2 se conservó en este valor ya que los carbonilos aparecieron a 167.33 ppm y 168.44 ppm para **6-59** y **6-60**, respectivamente. En ningún caso se observó una señal a 157 ppm correspondiente a un C-SH de tiol. Algunos reportes en la literatura<sup>35,36</sup> han demostrado que la forma predominante en el equilibrio tiona/tiol depende del disolvente utilizado en la determinación de las constantes espectroscópicas; así por ejemplo en disolventes polares tales como, metanol o  $\text{DMSO-}d_6$  se observó abundancia de la tiona y en ciclohexano predomina la forma de tiol. En nuestro caso, el disolvente que se empleó para la determinación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fue  $\text{DMSO-}d_6$  dada la poca solubilidad de los compuestos en otros disolventes, concordando así con lo reportado en la literatura.

La superficie de potencial electrostático señala que la mayor densidad electrónica reside sobre el átomo de azufre en la forma de tiona, Figura 6.18 (color rojo), en cambio en la forma de tiol la densidad electrónica se dispersa entre el nitrógeno y el anillo bencénico.



Esquema 6.17. Equilibrio tautomérico tiol-tiona de los compuestos 6-55 y 6-59.

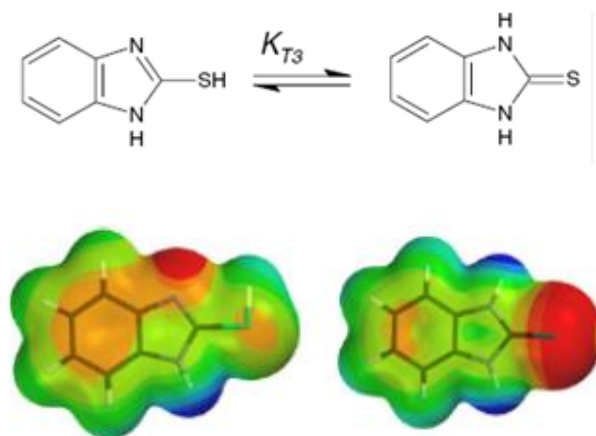


Figura 6.18. Superficie de la densidad del potencial electrostático para los tautómeros tiol-tiona, calculado por el método teoría de funcionales de la densidad (DFT, B3LYP/6-31 G\*)

Tabla 6-10. Características espectroscópicas de las tionas 6-55 – 6-61

Compuesto	IR cm <sup>-1</sup>		RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	
	NH	C=S	ppm	C=S (C-2)	C=O
6-55	3398	1174	12.25 d (2H)	167.07	-
6-56	3114	1184	12.50 sa (2H)	-	-
6-57	3110	1200	11.80 sa (2H)	-	-
6-58	3108	1184	12.52 sa (2H)	-	-
6-59	3112	1173	12.36 sa (2H)	168.26	167.33
6-60	3116	1184	12.51 d (2H)	168.45	168.88
6-61	3431	1181	12.27 sa (2H)	-	-
6-61	3400	1184	12.51 sa(2H)	168.71	-



---

**6.8.2.1.4. Preparación de las aminas 6-9-6-12, 6-13a, 6-14a, 6-15 y 6-16. Reacción de metilación**

Por último, la metilación se logró utilizando  $\text{CH}_3\text{I}$  en presencia de  $\text{KOH}$  y  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  como disolvente. La reacción fue cuantitativa y muy limpia ya que las condiciones de temperatura ( $0\text{-}10\text{ }^\circ\text{C}$ ) y los equivalentes de reactivos (1.2 eq), que se emplearon, llevó a la formación del producto de *S*-metilación **6-9-6-16** con buenos rendimientos. En general, los puntos de fusión oscilaron entre  $92.9\text{ }^\circ\text{C}$  y  $260\text{ }^\circ\text{C}$ . Los puntos de fusión más altos fueron para los productos obtenidos en forma de clorhidratos **6-13a** y **6-14a**. La recristalización de los productos no ofreció mayor problema, dada la buena solubilidad de los compuestos en los disolventes comunes.

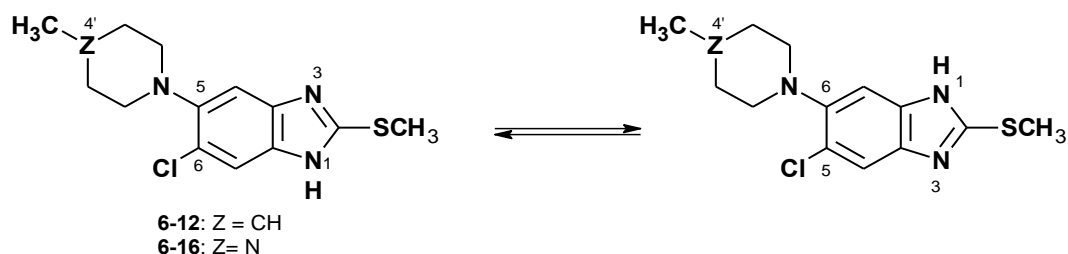
En el IR la banda intensa entre  $1212\text{ cm}^{-1}$  y  $1424\text{ cm}^{-1}$  se asignó a la vibración de  $\text{CH}_3\text{-S}$ ; sin embargo, ésta también es posible asignarse a la de  $\text{C-N}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , los hidrógenos del  $\text{CH}_3\text{-S}$  se presentaron como señales simples entre 2.63 ppm y 2.97 ppm y la señal para el NH bencimidazólico apareció entre 9.42 ppm y 12.55 ppm, integró para 1H e intercambió con  $\text{D}_2\text{O}$ . En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  el  $\text{CH}_3\text{-S}$  apareció entre 13.02 ppm y 19.82 ppm siendo este último valor para el  $\text{CH}_3\text{-S}$  de la amina **6-12**. No en todos los casos se pudieron registrar con precisión los desplazamientos de todos los carbonos, siendo a veces un poco difícil hacer la asignación.

En algunos casos, como en las aminas **6-12** y **6-16**, se observaron cuatro señales aromáticas en vez de dos en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . También se observó doble señal para el  $\text{CH}_3$  de la posición 4'; además, las integrales no coincidieron con las esperadas. También en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  aparecieron 20 señales y no 14 como sería el máximo de señales esperadas para el compuesto **6-12**, Figura 6.19. Este hecho puede deberse presumiblemente a que en las condiciones en las que se obtuvieron los espectros de resonancia ( $\text{DMSO-}d_6$  y temperatura ambiente) fue posible observar a los dos tautómeros. Cabe mencionar que los dos compuesto que presentaron este fenómeno son aquellos en que las posiciones 5 y 6 del anillo bencimidazólico están sustituidas y también hay sustitución en el anillo de piperidina (**6-12**) y piperazina en (**6-16**) lo que provocó que la barrera energética entre uno y otro tautómero sea lo suficientemente pequeña para interconvertirse uno en otro, pero lo suficientemente grande para que se puedan observar de manera independiente en el espectro de resonancia. Cuando se realizó el intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$  el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la amina **6-12** se simplificó notablemente observándose únicamente dos señales simples a 7.13 y 7.45 ppm que

integraron para 1H cada una, ver Figura 6.20. Estas señales se asignaron a los hidrógenos de las posiciones 4 y 7 del bencimidazol (compuesto **6-12**); sin embargo, los dos dobletes a 0.945 y 1.024 para el CH<sub>3</sub> en 4' permanecieron sin cambio. Lo que sugiere que aunado a la tautomería también se estén observando un par de isómeros conformacionales para este compuesto. El hecho de la simplificación del espectro puede deberse a que al intercambiarse el H por D el equilibrio fue más lento y solamente se observó uno de los dos tautómeros. Cuando se adquirieron los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, Figura 6.19 (i) y 6.20 (j), para el derivado 1-metilado del compuesto **6-12** no se observó ninguna duplicidad de señales en la región aromática ni tampoco par el CH<sub>3</sub> en 4' por lo que se comprobó que el fenómeno observado para el compuesto **6-12** se debió principalmente a la tautomería protónica del anillo bencimidazólico.

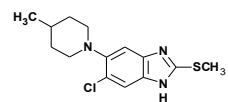
El compuesto **6-16** también presentó el mismo fenómeno, se observaron más señales de las esperadas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H. En este caso el CH<sub>3</sub> sobre el N en 4' no mostró doble señal debido a que no hay hidrógenos en el átomo vecino. A diferencia del compuesto **6-12** no se observó ninguna simplificación de las señales al intercambio con D<sub>2</sub>O en el compuesto **6-16**. También en el espectro de RMN <sup>13</sup>C aparecieron más carbonos de los esperados. Para el compuesto **6-16** el derivado 1-metilado no se preparó por lo que no se puede concluir más al respecto.



6-Cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-12**)  
 6-Cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-16**)

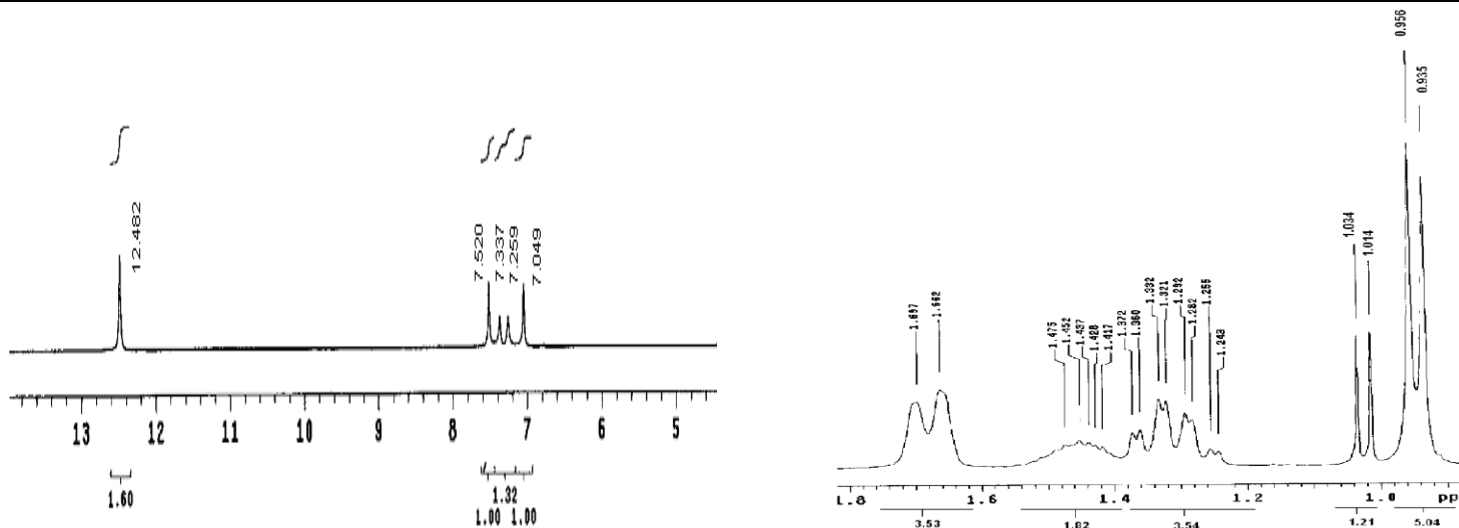
5-Cloro-6-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol(**6-12**)  
 5-Cloro-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazo (**6-16**)

**Esquema 6.18.** Equilibrio tautomérico de los compuesto **6-12** y **6-16**.



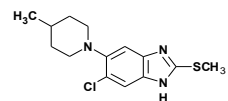
Compuesto **6-12**

RMN  $^1\text{H}$  (a) región aromática (b) región entre 0-1.8 ppm



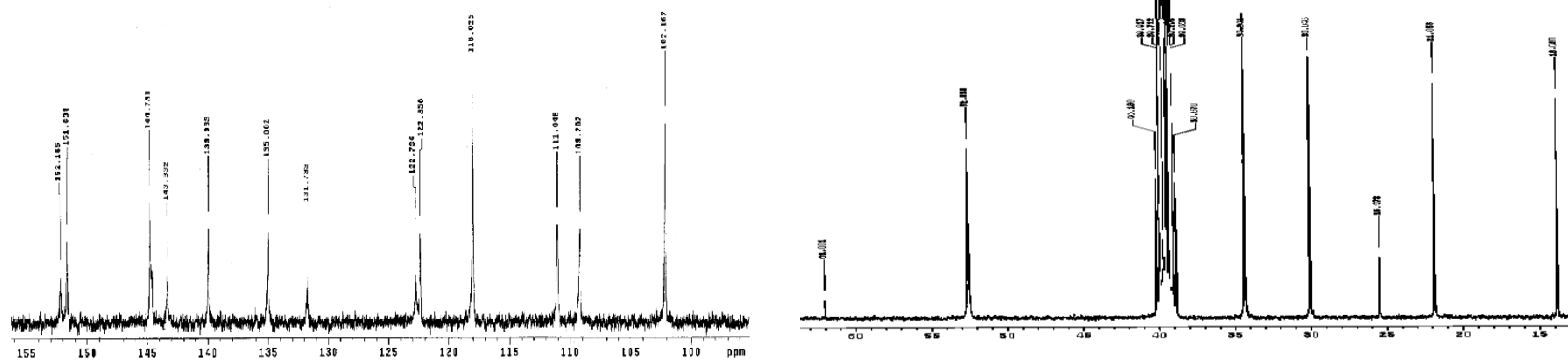
a

b



Compuesto **6-12**

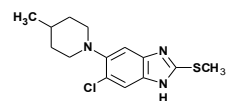
RMN  $^{13}\text{C}$  (c) región aromática, (d) región alifática



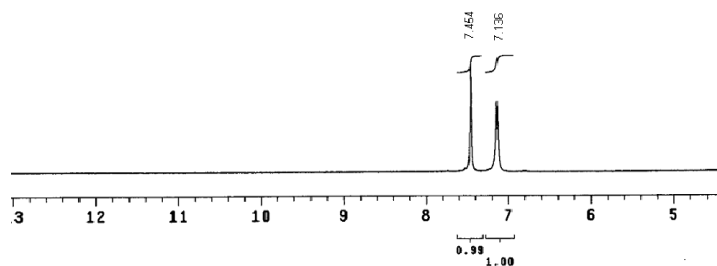
c

d

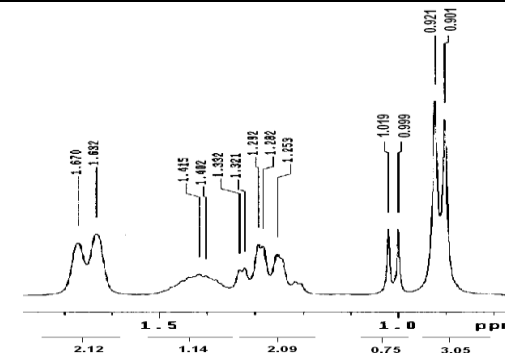
Figura 6.19. Resonancia Magnética de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **6-12** y su derivado 1-metilado.



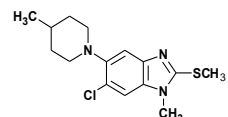
Compuesto **6-12**  
RMN  $^1\text{H}$  Intercambio  
con  $\text{D}_2\text{O}$  (e) región  
aromática, (d) región  
0-2.3 ppm



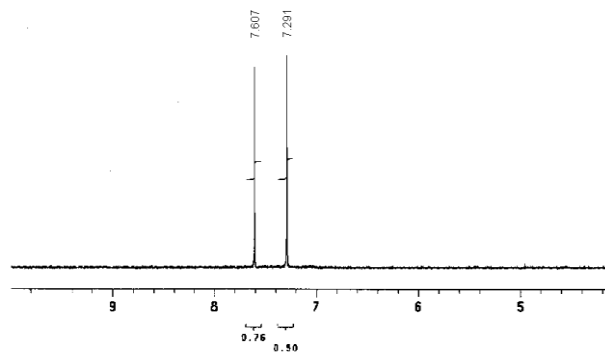
e



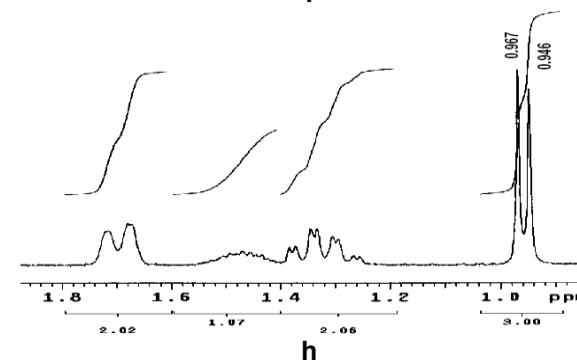
f



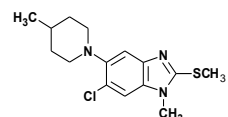
Derivado 1-metilado  
del compuesto **6-12**  
RMN  $^1\text{H}$  (g) región  
aromática, (h) región  
entre 0-1.8 ppm



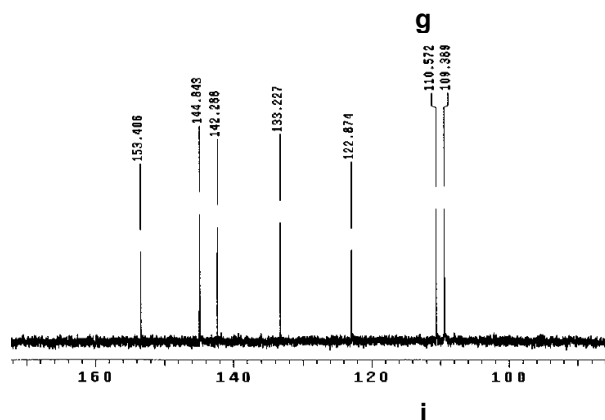
g



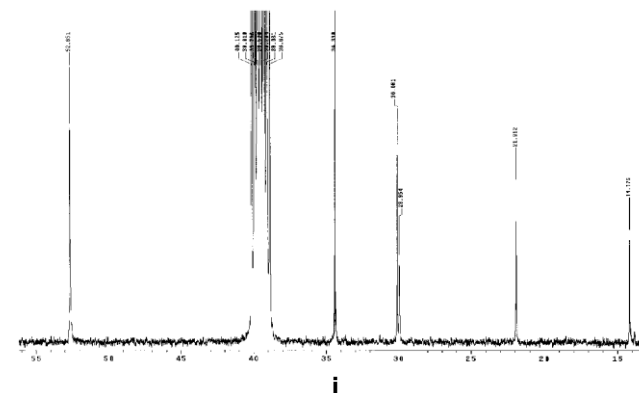
h



Derivado 1-metilado  
del compuesto **6-12**  
RMN  $^{13}\text{C}$  (i) región  
aromática, (j) región  
alifática



i



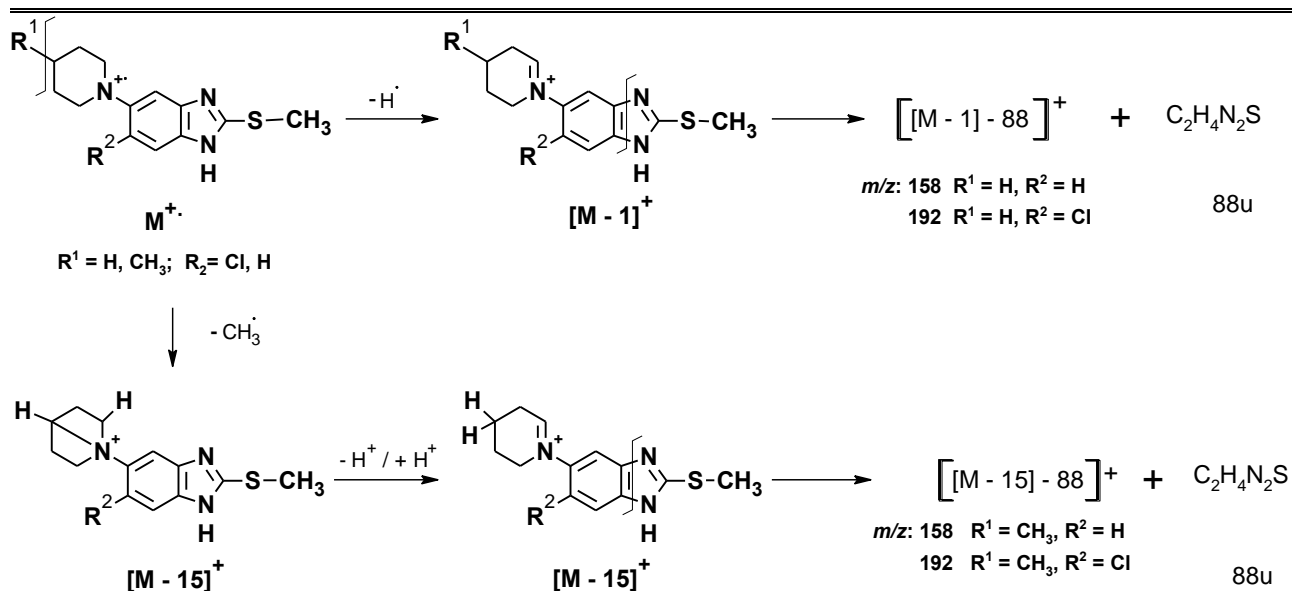
j

Figura 6.20. Resonancia Magnética de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **6-12** y su derivado 1-metilado con intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ .

**Tabla 6.11.** Señales espectroscópicas características de las aminas **6-9–6-12**, **6-13a**, **6-14a-b**, **6-15** y **6-16**

No.	IR $\text{cm}^{-1}$		RMN $^1\text{H}$ $\delta$ : ppm		RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ : ppm	EM $m/z$
	NH, C-H	S-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> -S	NH	CH <sub>3</sub> -S	
<b>6-9</b>	3390 - 3042	1214	2.70	11.39	14.41	247 (M <sup>+</sup> , 100%); 246 (M-1, 76%); 158 ([M-] -88, 52%)
<b>6-10</b>	3424 - 3042	1386	2.64	12.48	13.82	281 (M <sup>+</sup> , 76%); 280 (M-1, 100%); 192 ([M-1] -88, 30%)
<b>6-11</b>	3150 - 3043	1412	2.70	11.34	14.43	261 (M <sup>+</sup> , 100%); 260 (M-1, 78%); 158 ([M-15] - 88, 90%)
<b>6-12</b>	3080 - 3040	1387	2.64	12.48	19.82	295 (M <sup>+</sup> , 100%), 294 (M-1, 84%); 192 ([M-15] - 88, 18%)
<b>6-13b</b>	--	--	--	--	--	--
<b>6-14b</b>	3185 - 3007	1276	2.65	12.55	13.02	324 (M <sup>+</sup> , 81%), 252 (M-72, 100%); 192 ([M-43] -1] - 88, 20%).
<b>6-15</b>	3154 - 3000	1409	2.64	12.23	13.94	262 (M <sup>+</sup> , 46%); 158 ([M-15-1] - 88, 66%); 71 (M-191, 100%); 70 (M- 192, 83 %).
<b>6-16</b>	338 - 3100	1311	2.65	12.53	13.80	296 (M <sup>+</sup> , 36%); 192 ([M-15-1] - 88, 66%); 71 (M - 225, 100%); 70 (M - 226, 56 %).
<b>6-13a</b>	3412	X	2.97	9.67	15.66	249 (M+1, 100%) método FAB+ 248 (M <sup>+</sup> , 25%); 206 (M-42, 8%); 192 (M-56, 8%).
<b>6-14a</b>	3524 - 3454	1411	2.50	9.42	14.57	282 (M <sup>+</sup> , 36%); 240 (M-42, 100%); 192 ([M-1] - 88, 13%)

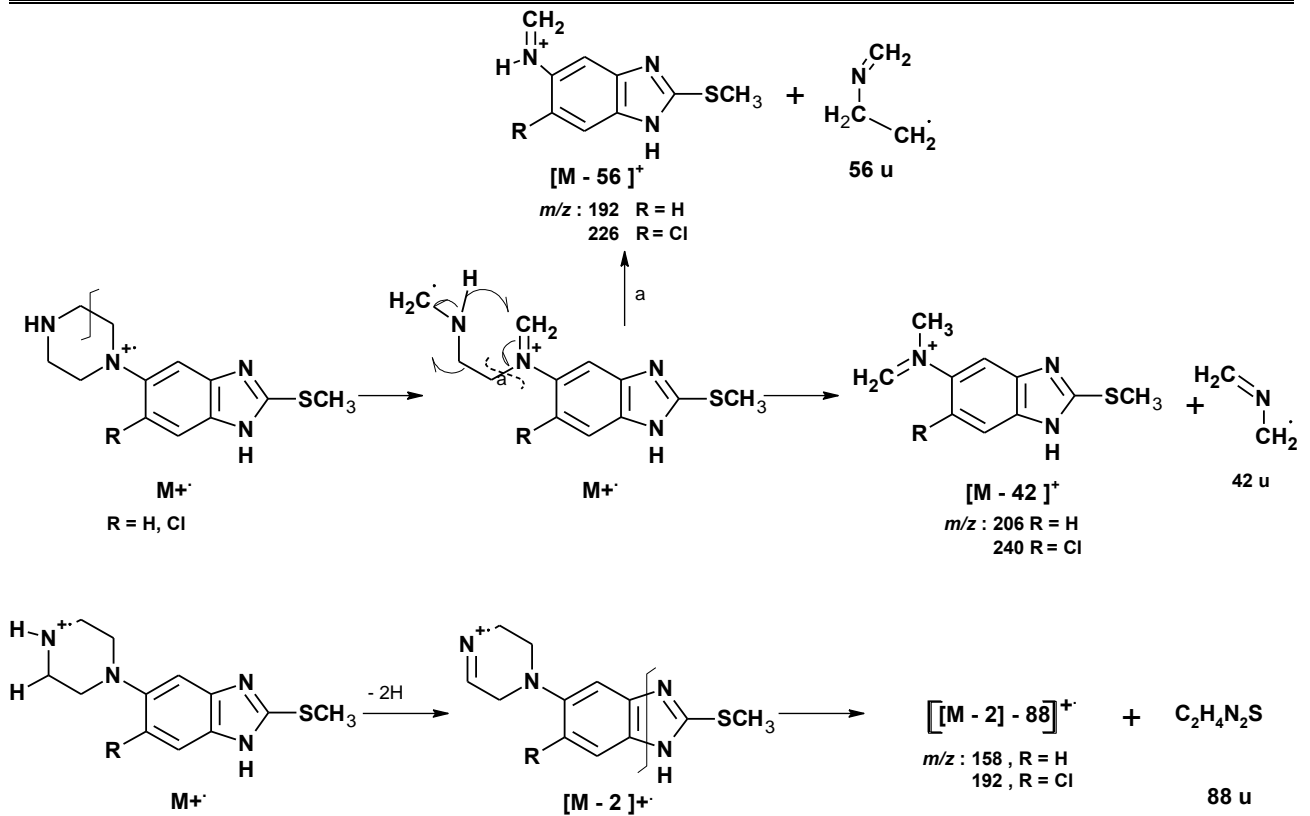
En los espectros de masas en todos los casos se observó el ion molecular; para las aminas **6-9–6-12**, las derivadas de piperidina, éste fue también el pico base del espectro, excepto para la amina **6-10** en que el M<sup>+</sup>· tuvo una abundancia relativa de 76%. También en esta familia fue muy importante el fragmento M-1 producido por la pérdida de un radical hidrógeno del carbono alfa al nitrógeno del núcleo de piperidina; la abundancia de este pico fue de 76 a 100 %. Característicos también para el grupo de aminas **6-9–6-12** fueron los iones de  $m/z$  158 y 192 producidos a partir del [M-1], para **6-9** y **6-10**, cuando se perdió el fragmento de masa 88 correspondiente a la ruptura del anillo de imidazol, como se muestra en el Esquema 6.19. En los compuestos **6-11** y **6-12** los iones de  $m/z$  158 y 192 se formaron a partir del ion [M-15] cuando se perdió el fragmento de masa 88.



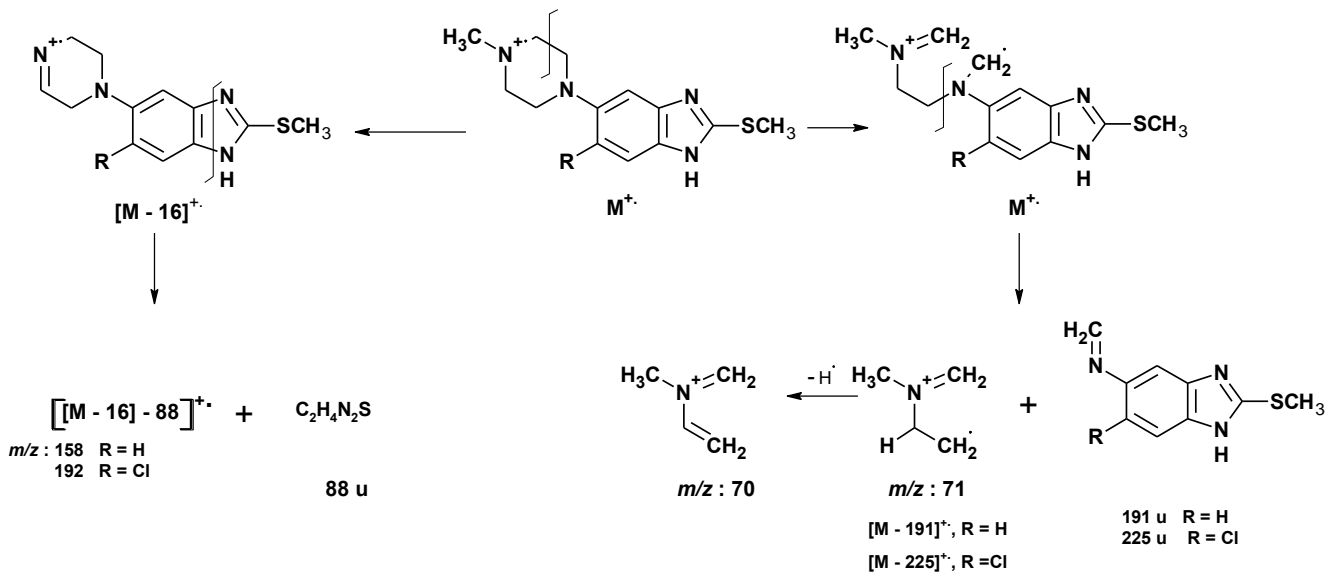
**Esquema 6.19.** Propuesta de fragmentación en el espectro de masas para las aminas **6-9-6-12**.

En el caso de las aminas derivadas de piperazina la estabilidad del ion molecular no fue tan buena como en los compuestos anteriores ya que la abundancia del  $M^+$  fue de 36 a 46%. Para la amina **6-13a** se empleó la técnica de FAB+ para adquirir el espectro, por consiguiente se obtuvo el  $M+1$  con 100% de abundancia; no obstante, el  $M^+$  se logró observar con 25% de abundancia. La ruptura del ion molecular con pérdida de 42 unidades de masa arrojó los iones de  $m/z$  206 y 204 según sea el bencimidazol con o sin Cl (Esquema 6.20). Cuando la pérdida fue de 56 unidades, aparecieron los iones de  $m/z$  192 y 226.<sup>37</sup> Importante a notar es que también se obtuvieron los iones de  $m/z$  158 y 192 por la ruptura del anillo de imidazol, como se muestra en el Esquema 6.20.

Para las aminas **6-15** y **6-16** el pico base del espectro fue el fragmento de  $m/z$  71 producido por la ruptura del anillo de piperazina, como se muestra en el Esquema 6.21. También la ruptura del anillo de imidazol arrojó los iones  $m/z$  158 y 192 para **6-15** y **6-16** respectivamente; éstos producidos por la pérdida del fragmento de masa 88 a partir del ion  $[M-16]$  como se muestra en el esquema.

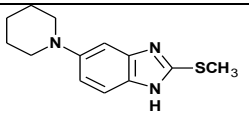
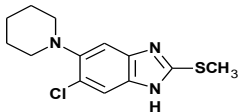
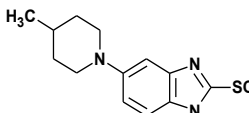
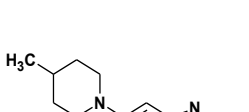
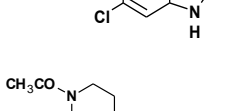
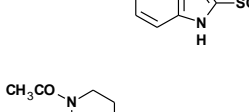
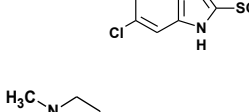


Esquema 6.20. Propuesta de fragmentación en el espectro de masas para las aminas 6-13a-6-14a.



Esquema 6.21. Propuesta de fragmentación en el espectro de masas para las aminas 6-15-6-16.

**Tabla 6.12.** Resumen de las propiedades físicas de las aminas

No.	Estructura	Fórmula	PM	Rendimiento (%)	pf (°C)	Disolvente de cristalización	C log P
6-9		C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> S	247.359	92.35 crudo	92.9 - 94.1	Isopropanol/ Agua	3.24 ± 0.78
				74.80 recristalizado			
6-10		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> S	281.8042	95.57 crudo	183.6 - 184	Isopropanol/ Agua	4.34 ± 0.79
				81.23 recristalizado			
6-11		C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> S	261.3857	96 crudo	103.4 – 105.5	MeOH/Agua	3.73 ± 0.78
				76.8 recristalizado			
6-12		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> S	295.8308	95 crudo	164.4 – 166.0	EtOH/Agua	4.83 ± 0.88
				76.76 recristalizado			
6-13b		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> OS	290.3839	90.7 crudo	258.9 – 261.36	HCl gas	1.19 ± 0.86
				73.77 clorhidrato			
6-14b		C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	324.8289	52 crudo	212.4 – 212.9	AcOEt/EtOH	2.29 ± 0.87
				23 recristalizado			
6-15		C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> S	262.3738	92 crudo	136.6 – 138.4	MeOH/Agua	2.06 ± 0.82
				71.76 recristalizado			



<b>6-16</b>		$C_{13}H_{17}ClN_4S$	296.8188	94.27 crudo	182.0 – 183.3	MeOH/Agua	$3.16 \pm 0.83$
				73.53 recristalizado			
<b>6-13<sup>a</sup></b>		$C_{12}H_{17}ClN_4S$	284.8081	36.8	310 315 desc.	HCl gas	$1.37 \pm 0.87$
<b>6-14a</b>		$C_{12}H_{16}Cl_2N_4S$	319.2532	76.74	235.0 – 237.0	HCl gas	$2.47 \pm 0.88$

6.8.2.2. Resultados y discusión parte biológica, Aminas **6-9–6-12**, **6-15**, **6-16** y **6-13a**

Los compuestos **6-9–6-12**, **6-15**, **6-16** y **6-13a** se sometieron a evaluación antiprotozoaria *in vitro* contra *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* utilizando el método de subcultivos. Los resultados se encuentran en la Tabla 6.13.

**Tabla 6.13.** Susceptibilidad *in vitro* contra los protozoarios *G intestinalis* y *E. histolytica*

Compuesto	CI <sub>50</sub> μM	CI <sub>50</sub> μM
	<i>G. intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>
<b>6-9</b>	1.4189	0.1075*
<b>6-10</b>	8.5023*	0.1561*
<b>6-11</b>	6.5037	0.6656*
<b>6-12</b>	0.1352	0.2095*
<b>6-15</b>	0.8880	0.5526*
<b>6-16</b>	1.9001	0.2880*
<b>6-13a</b>	0.1993	0.3905
<b>6-14a</b>	Nd	Nd
<b>ABZ</b>	0.037	56.6
<b>NTZ</b>	0.013	0.055
<b>MTZ</b>	1.228	0.35

\*NOTA: LOS ENSAYOS SE REALIZARON DOS VECES POR TRIPLICADO Y A LAS CONCENTRACIONES DE 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 Y 0.5 μg/ml

\* El promedio no es válido ya que los valores que se sumaron difieren significativamente.

Los resultados que se obtuvieron de este ensayo, mostraron claramente la tendencia de que en general los compuestos fueron más activos contra *E. histolytica*. No se pudo hacer una correlación cualitativa con la estructura y la actividad ni tampoco con el valor calculado de logP; únicamente se pudo observar que la amina **6-12**, el compuesto de mayor logP, fue el compuesto más interesante ya que tuvo buena actividad con los dos parásitos ensayados.

## 6.9. Conclusiones

- El método de preparación de las carboxamidas **6-1–6-8** a partir de los ácidos 5(6)-bencimidazolcarboxílicos ofrece la posibilidad de sintetizar series de compuestos a partir de un mismo precursor. La desventaja podría estribar en tener algunos problemas de solubilidad que limiten la eficiencia de las siguientes reacciones.
- El CDI como agente acoplante es una buena alternativa para la síntesis de amidas bencimidazólicas.
- A pesar de la pobre solubilidad de los ácidos, las reacciones de activación se lograron hacer en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- Las carboxamida **6-5a**, aquella derivada de piperazina, solamente se pudo obtener utilizando a la piperazina protegida como su derivado *terc*-Boc.
- Todos los compuestos se identificaron por los métodos espectroscópicos y espectrométricos, encontrándose patrones comunes en toda la serie.

- Las carboxamidas **6-1** y **6-2**, derivadas de la piperidina, resultaron tan potentes como el ABZ contra las larvas musculares de *T. spiralis in vitro*, pero no contra *T. crassiceps*. Las amidas derivadas de piperazina fueron las menos activas.
- La actividad giardicida de estos compuestos fue moderada. Los compuestos **6-1** y **6-2** fueron los más activos contra *G. intestinalis*, pero no superaron al ABZ.
- Los compuestos **6-1–6-4** fueron más solubles que ABZ y altamente permeables por lo que se absorben rápidamente.
- La síntesis de las aminas **6-9–6-16** procedió favorablemente según la metodología planteada. El primer paso de la síntesis, la  $S_NAr$ , se realizó sin emplear disolvente. Esta metodología se puede mejorar empleando menos equivalentes de amina y calentamiento con microondas
- Las aminas derivadas de piperazina se obtuvieron como clorhidratos.
- La evaluación antiprotozoaria de las aminas sugiere que tienen un mejor perfil como amebicidas que como giardicidas

## 6.10. Referencias

1. Hotez, P. J. The Neglected Tropical Diseases and the Neglected Infections of Poverty: Overview of their Common Features, Global Disease Burden and Distribution, New Control Tools, and Prospects for Disease Elimination. In *The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases: Opportunities for Integrated Intervention Strategies: Workshop Summary*. National Academies Press. **2011**, pp.221-225. [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=13087](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=13087). (consultado el 10 de noviembre de **2013**).
2. Drugs for Neglected Diseases <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/helminth-infections/current-treatments.html>. (accesado 10 de noviembre **2013**).
3. CDC Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. <http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/es/hcp/index.html#tx>. (accesado 10 de noviembre **2013**).
4. Domínguez-Vázquez, A.; Taylor, H. R.; Ruvalcaba-Macias, A. M.; Murphy, R. P.; Greene, B. M.; Rivas-Alcalá, A. R.; Beltrán-Hernández, F. Comparison of flubendazole and diethylcarbamazine in treatment of onchocerciasis. *Lancet*. **1983**, 321(8317), 139-143.
5. Abuzar, S.; Sharma, S.; Fatma, N.; Gupta, S.; Murthy, P. K.; Katiyar J. C.; Chatterjee, R. K., Sen, A. B. Studies in potential filaricides. Synthesis of 2,2'-disubstituted 5,5'-dibenzimidazolyl ketones and related compounds as potential anthelmintics. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1986**, 29(7), 1296-1299.
6. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J. A.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M. Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2003**, 11(21), 4615-4622.
7. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12(16), 2221-2224.
8. Actor, P.; Anderson, E. L.; Dicuollo, A. C.; Ferlauto, R. J.; Hoover, E.; Pagano, J. F.; Ravin, L. R.; Scheidy, S. F.; R. J. Stedman, R. J. Theodorides, V. J. New broad spectrum anthelmintic, methyl 5 (6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate. *Nature*. **1967**, 215, 321-322.
9. Van Gelder, J. L. H.; *et al.* Benzimidazole carbamates. US Patent. 3,657,267, Apr. 18, **1972**.
10. Maki, J.; Yanagisawa, T. Anthelmintic effects of bithionol, paromomycin sulphate, flubendazole and mebendazole on mature and immature *Hymenolepis nana* in mice. *Journal of Helminthology*. **1985**, 59, 211-216.
11. Katiyar, J. C.; Gupta, S.; Visen, P. K. S.; Murthy, P. K.; Misra, A.; Kumar, S.; Sarin, J. P. S. Methyl 5-[4-(2-pyridinyl)-1-piperazinylcarbonyl]-1*H*-benzimidazol-2-ylcarbamate: Efficacy against developing

- and adult helminths by topical application. *Indian Journal of Experimental Biology*. **1988**, 26, 715-719.
12. Naim, S. S.; Singh, S. K.; Sharma, S.; Gupta, S.; Khan, A. M.; Jain, M.; Katiyar, J. Studies in antiparasitic agents. Synthesis of 5-substituted 2-alkyl aril-carbonylaminobenzimidazoles as orally effective anthelmintics. *Indian Journal of Chemistry Including Medicinal Chemistry*. **1990**, 29(5), 464-470.
  13. Gupta, S.; Khan, A. M.; Jain, M. K.; Katiyar, J. C.; Naim, S. S.; Singh, S. K.; Sharma, S. Anthelmintic profile of methyl 5(6)-(4-methylpiperidin-1-yl) carbonylbenzimidazole-2-carbamate in experimental helminthiasis. *Indian Journal of Experimental Biology*. **1990**, 28(5), 475-479.
  14. Coulaud, J. P., Rossignol, J. F. (1984). Albendazole: a new single dose anthelmintic. Study in 1455 patients. *Acta Tropica*. **1984**, 41(1), 87
  15. Dubey, R.; Abuzar, S.; Sharma, S.; Chatterjee, R. K.; Katiyar, J. C. Synthesis and anthelmintic activity of 5(6)-(benzimidazol-2-ylcarbonyl) and (4-substituted piperazin-1-yl)benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1985**, 28(11), 1748-1750.
  16. Perry, P.; Wolff, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. **1974**, 251, 156-158.
  17. a) Pizey, J. S. *Synthetic Reagents*. Ed. Wiley: New York, **1974**; vol. 1, 321-357; b) Pearson, A. J., Roush, W. R. *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups*. Ed.; Wiley: New York, **1999**, 370-373.
  18. a) Paul, R.; Anderson, W. *Journal of the American Chemical Society*. **1960**, 82, 4596-4600; b) Dale, D. J.; Draper, J.; Dunn, P. J.; Hughes, M. L.; Hussain, F.; Levett, P. C.; Ward, G. B.; Wood, A. S. *Organic Process Research and Development*. **2002**, 6, 767-772.
  19. a) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *Journal of the American Chemical Society*. 1955, 77, 1067-1068; b) Sheehan, J.; Cruickshank, P. A. *Journal of Organic Chemistry*. **1961**, 26, 2525-2528; c) Schuessler, H.; Zahn, H. *Chemische Berichte*. **1962**, 95, 1076-1080.
  20. a) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Letters*. **1990**, 31, 205-208; b) Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P.; Castro, B. *Tetrahedron Letters*. **1991**, 32, 1967-1970.
  21. Dunetz, J. R.; Xiang, Y.; Baldwin, A.; Ringling, J. *Organic Letters*. **2011**, 13(19), 5048-5051.
  22. Kumar, S.; Seth, M.; Bhaduri, A. P.; Visen, P.K.; Misra, A.; Gupta, S.; Fatima, N.; Katiyar, J. C.; Chatterjee, R. K.; Sen, A. B. Syntheses and Anthelmintic Activity of Alkyl 5(6)-(Substituted-carbamoyl)- and 5(6)-(Disubstituted-carbamoyl)benzimidazole-2-carbamates and Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1984**, 27(8), 1083-1089.
  23. Göker, H.; Tebrizli, E. Synthesis of 1,2-disubstituted benzimidazole-5(6)-carboxamides and evaluation of their antimicrobial activity. *Il Farmaco*. **1996**, 51(1) 53-58.
  24. Ayhan-Kilcigil, G.; Tunçbilek, M.; Altanlar, N.; Göker, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole carboxylates and carboxamides. *Il Farmaco*. **1992**, 54, 562-565.
  25. López-Rodríguez, M.; Benham, B.; Viso, A.; Morcillo, A.; Murcia, M.; Orensanz, L.; Alfaro, M. J.; Martín, M. I. Benzimidazole derivatives. Part 1: Synthesis and structure-activity relationships of new benzimidazole-4-carboxamides and carboxylates as potent and selective 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **1999**, 7(11), 2271-2281.
  26. Ibata, T.; Isogami, Y.; Toyoda, J. Aromatic nucleophilic substitution of halobenzenes with amines under high pressure. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **1991**, 64(1), 42-49.
  27. Dubey, R.; Abuzar, S.; Sharma, S.; Chatterjee, R. K.; Katiyar, J. C. Synthesis and anthelmintic activity of 5 (6)-[(benzimidazol-2-yl) carboxamido]-and (4-substituted piperazin-1-yl) benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1985**, 28(11), 1748-1750.
  28. Pérez-Villanueva, J.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Méndez-Cuesta, C.; Méndez-Lucio, O.; Hernández-Luis, F.; Castillo, R. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfonyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, 23(14), 4221-4224
  29. Townson, S.; Shay, K.E.; Dobinson, A. R., Connelly, C.; Comley, J. C. W.; Zea-Flores, G. *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus*: studies on the viability and drug responses of cryopreserved adult worms *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1989**, 83(5) 664-669.
  30. Palomares-Alonso, F.; Jung-Cook, H.; Pérez-Villanueva, J.; Piliado, J. C., Rodríguez-Morales, S., Palencia-Hernández, G.; López-Balbiaux, N., Hernández-Campos, A., Castillo, R.; Hernández-Luis, F. Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, 44(4), 1794-1800.
  31. Rivera, J. C.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Campos, A., Moreno-Esparza, R.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Fuentes-Noriega, I.; Jung-Cook, H. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives *International Journal of Pharmaceutics*. **2007**, 343, 159-165.
  32. Alvarenga, E. S.; Mann, J. Synthesis of Benzyl 4-hydroxy-5-iodo-2,3-dimethoxy-6-methylbenzoate - The Aromatic Unit of Calicheamicin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **1999**, 10(2), 107-111.

33. Koparir, M.; Çetin, A.; Cansiz, A. 5-Furan-2yl-[1,3,4]oxadiazole-2-thiol, 5-Furan-2yl-4H-[1,2,4]triazole-3-thiol and Their Thiol-Thione Tautomerism. *Molecules*. **2005**, 10, 475-480.
34. (a) López, B. N., Síntesis y actividad antiparasitaria de Nuevo derivados del bencimidazol 1-metilados. Tesis Licenciatura. UNAM, **2003**. (b) Sandoval, R.E. Síntesis de carboxamidas 1-metilbencimidazolicas con potencial actividad antiparasitaria. Tesis Licenciatura. UNAM, **2003**.
35. Moran, D.; Sukcharoenphon K, Puchta, R.; Schaefer, H. F. III; Schleyer, P. V.; Hoff, C. D.; 2-Pyridinethiol/2-pyridinethione tautomeric equilibrium. A comparative experimental and computational study. *Journal of Organic Chemistry*. **2002**; 25, 9061-9069.
36. López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A.; Rodríguez-Morales, S.; Yépez, L.M Cedillo, R.; Castillo, R. Molecular modeling of some 1*H*-benzimidazole derivatives with biological activity against *Entamoeba histolytica*: a comparative molecular field analysis study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2007**; 15(2), 1117-1126.
37. Porter, Q.N. Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds (The chemistry of heterocyclic compounds). **1985**, Ed. John Wiley & Sons, 2a Edición, New York, USA.

---

## Capítulo 7. Conclusiones generales

- Se desarrolló y optimizó una metodología escalable y reproducible que permitió sintetizar el compuesto Alfa en cantidades desde 1 g hasta 100 g. La eficiencia global del método fue de 51.28 % en un proceso de cinco pasos.
- El compuesto Alfa obtenido tuvo las características físicas de calidad y pureza adecuadas para su evaluación biológica en animales.
- El compuesto Alfa fue activo al 100% a 15 mg/kg de peso en borregos y 12 mg/kg de peso en bovinos, contra fasciolas juveniles y adultas.
- La dosis máxima tolerada del compuesto alfa es de 15 veces la concentración efectiva. No se encontró que fuera teratogénico.
- Estudios de microscopia de barrido y de transmisión demostraron el efecto del compuesto Alfa sobre *F. hepatica* a nivel de ultraestructura, dañando a las espinas y el tegumento y fibras musculares. También se observó el daño en la espermatogénesis y ovogénesis de los parásitos, con lo que se cree que actúa a nivel de  $\beta$ -tubulina, de manera semejante al TCBZ, pero también actúa a nivel de otra proteína estructural como la actina.
- El compuesto Alfa fue activo, *in vitro*, contra fasciolas resistentes a TCBZ. Esto no se logró observar *in vivo*.
- Los ensayos biológicos *in vivo* dependen de la estabilidad de la suspensión y efectiva dosificación por lo que se requieren más estudios a cerca de una forma farmacéutica de fácil manejo.
- Se comprobó que el compuesto Alfa es un bioisómero de TCBZ ya que en casi todos los ensayos se tuvieron resultados semejantes, con algunas variaciones que lo hacen perfilarse como un buen antiparasitario.
- El compuesto Alfa fue activo a  $CI_{50}$  de 26.4 nM vs *E. histolytica*.
- Se sintetizaron los derivados 1-metilados del TCBZ a partir de materias primas accesibles.
- Los regioisómeros se evaluaron contra las fases entérica y tisular de *T. spiralis in vivo*, resultando uno de ellos (compuesto **5-5**) tan activo como ABZ. Lo que demuestra que el H en posición 1 del bencimidazol no es esencial para la actividad antihelmíntica contra *T. spiralis*.
- El TCBZ resultó ser un potente giardicida y tricomonocida, mejor que ABZ y metronidazol.

- Se sintetizaron 16 análogos de TCBZ modificando la posición 5(6) con grupos de tipo amidas y aminas heterocíclicas.
- Las amidas (compuestos **6-1–6-8**) resultaron ser mejores como antihelmínticos contra la larva muscular de *T. spiralis* que como antiprotozoarios.
- El grupo de aminas bencimidazólicas, compuestos **6-9–6-16**, sólo se evaluó *in vitro* contra *G. intestinales* y *E. histolytica*, mostrando actividad moderada contra éstos parásitos.
- De los dos grupos de análogos del triclabendazol, las amidas fueron más activas como antiprotozoarios.
- Con la sustitución de tipo aminocarbonilo en 5(6) se mejoraron las propiedades de solubilidad, punto de fusión y absorción de los bencimidazoles que les precede en el diseño. Hacen falta mayores estudios sobre su espectro de actividad biológica.

## Capítulo 8. Procedimientos experimentales

Para mayor claridad, esta sección se divide en dos partes. La primera, la química, describe todo lo realizado en el laboratorio L-122 de la Facultad de Química, lo cual está relacionado con la parte sintética. En la segunda parte, la biológica, se describe la metodología que se siguió en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS para la determinación de la actividad antiparasitaria de los compuestos sintetizados, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia y la Bióloga Amparo Tapia. Los experimentos relacionados con la evaluación y efecto del compuesto Alfa sobre *Fasciola hepatica*, *in vitro* e *in vivo*, fueron realizados por los grupos de trabajo de los Doctores Froylán Ibarra Velarde, Yolanda Vera Montenegro, (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM) e Ian Fairweather (Universidad de Queens en Belfast, Irlanda del Norte), que se describen en la sección 4.11.2 del Capítulo 4.

### 7.1. Parte química

#### 7.1.1 Instrumentación

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato marca Büchi modelo B-530 y no están corregidos. La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador marca Büchi CR 114, con baño de agua modelo B-480 y condensador vertical tipo trampa de hielo seco. Para condensar los vapores, el condensador se llenó con una mezcla de etilenglicol-agua (70:30) y se enfrió por la inmersión de un elemento refrigerante en espiral marca Lauda Brinkman IC 30. Para disminuir la presión del sistema hasta 1 mmHg se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC610 con regulador de vacío integrado CVC2. Las hidrogenaciones catalíticas se realizaron empleando un hidrogenador marca Parr modelo 3916EG con 60 lb/pulg<sup>2</sup> y 250 cc como máxima capacidad, utilizando hidrógeno de tanque de la casa INFRA y como catalizador Pd/C al 5 ó 10%, o bien catalizador de Ni-Raney en suspensión acuosa. Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla con calentamiento y agitación marca IKA, modelo IKAMAG RET, básica con sensor y control de temperatura, modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.

Las reacciones de calentamiento por microondas se realizaron en un reactor de síntesis asistido por microondas Synthos 3000, de la marca Anton Paar, utilizando en rotor 64MG5 para reacciones a microescala (hasta 200 mg) o en el rotor 16MF100 para reacciones con mayor cantidad y/o mayor temperatura.



Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1605, en pastilla de bromuro de potasio (KBr), las bandas de absorción se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) se determinaron en un espectrómetro marca Varian modelo EM390 de 90 MHz y el Unity Inova VRX-300 y 400 MHz. Como referencia interna se utilizó el tetrametilsilano (TMS) y como disolvente sulfóxido de dimetilo hexadeuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ), deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), acetona hexadeuterada [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ], ácido trifluoroacético ( $\text{CF}_3\text{COOD}$ ) y agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) para el intercambio de hidrógeno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm). Los símbolos de las señales son: s= señal simple, sa= señal simple y amplia, d= señal doble, dd= señal doble de dobles, t= señal triple y m= señal múltiple. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se dan en Hertz (Hz). Los espectros de masas (EM) se determinaron en un espectrómetro marca JEOL Modelo JMS-SX102A acoplado a un cromatógrafo marca Hewlett Packard Mod. 5988A Serie II. La técnica empleada fue por introducción directa o de impacto electrónico (IE), por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), por ionización química (IQ) o por bombardeo rápido ( $\text{FAB}^+$ ). La simbología empleada es:  $m/z$ = masa carga,  $\text{M}^+$ = ion molecular,  $\text{M}+2$ ,  $\text{M}+4$ = picos de isotopía, %= porcentaje de abundancia relativa, PB= pico base. El análisis elemental (*Anal.*) se determinó en un aparato FISOONS EA11108 CHNSO. Los compuestos conocidos se identificaron por sus constantes físicas y no se caracterizaron espectroscópicamente.

#### 7.1.2. Programa computacional empleado para comprobar nombre y estructura de los compuestos orgánicos sintetizados

El nombre sistemático (IUPAC) de los compuestos involucrados en esta tesis se comprobó con el programa computacional ACDLabs versión 4.5. De igual forma, en caso de duda se recurrió a este programa para la elucidación estructural de los compuestos sintetizados, al comparar los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de éstos con los del programa. También se consultó la versión 8 del programa ACDLabs para conocer la predicción de los valores de pKa, como apoyo para las reacciones ácido-base.

Para la determinación de los tautómeros y confórmeros del compuesto **6-4** se empleó el campo de fuerza MM3, mientras que para el cálculo de sus energías se empleó el método DFT-B88-LYP Scf; ambas determinaciones fueron realizadas con el programa Gaussian 03.

### 7.1.3. Cromatografía

El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se determinaron por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de vidrio de recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de la casa Merck. La visualización de los compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta marca UVP, Inc., modelo UVGL-225 mineralight y por exposición a vapores de yodo. Para la elusión de las placas se emplearon los siguientes sistemas:

Sistema	Composición	Proporción
I	Hexano-CHCl <sub>3</sub> -AcOEt	50:35:15
II	Cloroformo-Metanol*	90:10
III	Cloroformo-Metanol	95:5
IV	Cloroformo-Metanol*	99.5: 0.5
V	Cloroformo-Metanol*	99:1
VI	Cloroformo-Metanol*	98:2
VII	Cloroformo-Metanol*	80:20
VIII	Cloroformo-Metanol**	90:10
IX	Cloroformo-Metanol**	95:5
X	Hexano-AcOEt	60:40
XI	Hexano-AcOEt	85:15
XII	Éter de petróleo-CHCl <sub>3</sub>	99:1
XIII	CHCl <sub>3</sub> /acetona	65:35

\*8 ml de la mezcla+2 gotas de hidróxido de amonio. \*\*8 mL de la mezcla+1 gota de ácido acético.

## 7.2. Procedimientos para la obtención de los productos finales

### 7.2.1. Procedimiento general de formación de amidas

A una solución de 1,1'-carbonildiimidazol (1.2–1.5 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>CN (1:20 p/v) a 10 °C se le adicionó, en condiciones anhidras, una suspensión del correspondiente ácido carboxílico **6-34** ó **6-35** en el mismo disolvente. Después de la adición se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 30–50 °C por 1-3.5 h. Durante este tiempo el ácido materia prima se consumió totalmente observándose la evolución de un gas. El consumo total del ácido y la formación del imidazólido intermedio se determinó tratando una pequeña muestra con metanol en caliente, después, en una ccf ya no se apreció al ácido, sino el éster metílico correspondiente. Cuando la reacción terminó ésta se enfrió a 5–10 °C y se trató con 1.2–

2.5 eq de la amina adecuada disuelta en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; después, la mezcla de reacción se calentó a 30–55 °C hasta desaparición total del imidazólido por un periodo de 1.5–15 h. Para determinar el consumo total del imidazólido, una alícuota se trató con metanol y se consideró como reacción completa cuando no se observaba la formación del éster, sólo la amida correspondiente. El disolvente se eliminó al vacío, el sólido resultante se disolvió en AcOEt, se lavó con solución diluida al 5% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , después con agua salada y agua. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a sequedad en el rotaevaporador. El residuo resultante correspondió a las carboxamidas **6-1–6-8**, las cuales se purificaron por recristalización o por cromatografía en columna.

#### 7.2.1.1. 2-(Metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-1**)

Disolvente de reacción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Rendimiento 85%. Cristales blancos de EtOH– $\text{H}_2\text{O}$ , pf 99–100. 7 °C.  $R_f$  0.37, sistema XIII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3386 (NH), 3140–3310 (C-H Ar.), 2856–2779 (C-H Alif.), 1602 (C=O), 1488 (C=N), 1444–1340 (C=C), 1290 (S- $\text{CH}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.46 (sa, 4H, 2H, H-3' y/o H-5' y 2H, H-4'), 1.56 (sa, 2H, H-3' y/o H-5'), 2.66 (s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ), 3.41 (sa, 4H, 2H, H-2' y H-6'), 7.10 (dd, 1H,  $J_1= 8.09$  Hz,  $J_2= 1.49$  Hz, H-6), 7.40 (s, 1H, H-4), 7.43 (d, 1H,  $J= 8.09$  Hz, H-7), 12.75 (sa, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 13.78 (S- $\text{CH}_3$ ), 24.14, (C-4'), 25.68 (C-3' y C-5'), 42.05 (C-2' o C-6'), 48.20, (C-2' o C-6'), 109.13 y 110.05 (C-7), 115.68 y 116.77 (C-4), 120.21 y 120.70 (C-6), 129.46 (C-5), 135.11 y 136.19 (C-3a), 143.08 y 144.35 (C-7a), 152.89 y 153.20 (C-2), 169.61 (C=O). EM (EI, ID)  $m/z$ : 275 ( $\text{M}^+$ , 53%), 274 (M–1, 80%), 191 (M–84, 100%). EMAR: calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ON}_3\text{S}$ : 275.1092; encontrado: 275.1092

#### 7.2.1.2. 6-Cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-2**)

Disolvente de reacción  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Rendimiento 88%. Cristales blancos de EtOH– $\text{H}_2\text{O}$ , pf 110–112 °C.  $R_f$  0.44, sistema XIII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3435 (NH), 3091–3038 (C-H Ar.), 2939–2721 (C-H Alif.), 1610 (C=O), 1482, 1438, 1413 (C=N, C=C), 1290 (S- $\text{CH}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 1.36–1.43 (m, 2H, 2H, H-3' y/o H-5'), 1.5–1.55 (sa, 4H, 2H, H-3' y/o 5' y 2H, H-4'), 2.68 (s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ), 3.06 (t, 2H,  $J= 5.9$  Hz, 2H, H-2' y/o 6), 3.53–3.67 (m, 3H, 2H, H-2' y/o H-6'), 7.33 (s, 1H, H-7), 7.54 (s, 1H, H-4), 12.80 (sa, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 13.75 (S- $\text{CH}_3$ ), 23.99 (C-4'), 25.23 (C-3' o C-5'), 25.78 (C-5' o C-3'), 41.83 (C-6' o C-2'), 47.25 (C-2' o C-6'), 109.18 (C-7), 115.53 (C-4), 122.00 (C-5), 129.31 (C-6), 134.74 (C-3a), 142.54 (C-7a) 154.41 (C-2), 165.93 (C=O). EM (ID, EI)  $m/z$ : 311 (M+2, 41%), 309 ( $\text{M}^+$ , 89%), 308 (M–1, 100%), 274 (M–35), 225 (M–84, 95%). EMAR: calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClON}_3\text{S}$ : 309.0726; encontrado: 309.0726.

## 7.2.1.3. 5-[(4-Metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-3)

Disolvente de reacción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Rendimiento 86%. Cristales blancos de EtOH, pf 181–183 °C.  $R_f$  0.37, sistema XIII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3426 (NH), 3092–3048 (C-H Ar.), 2928–2986 (C-H Alif.), 1602 (C=O), 1484, 1444 (C=N, C=C), 1272 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.88 (d, 3H,  $J$ = 6.334 Hz, -CH<sub>3</sub> en 4'), 0.92–1.10 (m, 2H, H-3' y/o H-5'), 1.52–1.65 (m, 3H, 2H, H-3' y/o H-5' y H-4'), 2.66 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 2.68–3.02 (sa, 3H, H-2' y H-6' ), 4.22–4.50 (m, 1H, H-2' o H-6'), 3.80 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH), 7.11 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.1 Hz,  $J_2$ = 1.5 Hz, H-6), 7.40 (s, 1H, H-4), 7.44 (d, 1H,  $J$ = 8.1 Hz, H-7). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.77 (S-CH<sub>3</sub>), 21.62 (CH<sub>3</sub> en 4'), 30.53 (C-4'), 33.87 (C-3' y C-5'), 42.01 (C-2'), 47.56 (C-6'), 110.80 (C-7), 116.46 (C-4), 120.48 (C-6), 129.45 (C-5), 136.80 (C-3a), 143.00 (C-7a), 152.97 (C-2), 169.57 (C=O). EM (EI, CG)  $m/z$ : 289 (M<sup>+</sup>, 58%); 288 (M–1, 93%); 191 (M–98, 100%); 163 ([M–98]–28, 16%). EMAR: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>ON<sub>3</sub>S: 289.1248; encontrado: 289.1249.

## 7.2.1.4. 6-Cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-4)

Disolvente de reacción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Rendimiento 88%. Cristales blancos de EtOH, pf 124.1–125.5 °C.  $R_f$  0.49, sistema XIII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3422 (NH), 3098 (C-H Ar.), 2926–2863 (C-H Alif.), 1611 (C=O), 1446, 1412, 1306 (C=N, C=C), 1284 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.98 (d, 3H,  $J$ = 6.3 Hz, -CH<sub>3</sub> en 4'); 1.02–1.34 (m, 3H, H-3' o H-5'); 1.52–1.83 (m, 3H, H-3' o H-5' y H-4'); 2.74–3.46 (m, 3H, H-2' y H-6'); 2.78 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 4.70 (m, 1H, H-2' o H-6'); 7.34, 7.43 (s, 1H, H-7); 7.52, 7.54 (s, 1H, H-4); 12.00 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.06 (S-CH<sub>3</sub>), 11.77, 11.88 (-CH<sub>3</sub> en C-4'), 20.69, 20.74 (C-4'), 23.71 (C-3' y C-5'), 24.07, 24.46 (C-3' o C-5'), 31.51 (C-2' y C-6'), 36.58, 37.20 (C-6' o C-2'), 102.32 (C-7), 104.51 (C-4), 112.25, 112.32 (C-5), 119.56, 119.65 (C-6), 128.57, 130.78 (C-7a o C-3a), 144.74 (C-2), 156.20 (C=O), 156.30 (C=O). EM (EI, ID)  $m/z$ : 325(M+2, 10%), 323 (M<sup>+</sup>, 29%), 322 (M–1, 69%), 288 (M–35, 18%), 225 (M–98, 100%), 197 ([M–98]–28, 20%). EMAR: calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>OS: 323.0859; encontrado: 323.0859.

## 7.2.1.5. 2-(Metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (6-5a)

Disolvente de reacción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Rendimiento 35%. Polvo blanco que oscureció con la luz, purificado por cromatografía en columna fracción: Hexano/Acetato de etilo 75:25, pf 103.0–106.5 °C.  $R_f$  0.5, sistema VII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3397 (NH), 3117 (C-H Ar.), 2927–2986 (C-H Alif.), 1606 (C=O), 1429 (C=N, C=C), 1278 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ :

2.68 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.39 (sa, 5H, H-3', H-5' y H-4', inter. con D<sub>2</sub>O); 3.56 (sa, 4H, 2H en 2' y 2H en 6'); 7.18 (dd, 1H,  $J_1 = 8.25$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, H-6); 7.45 (d, 1H,  $J = 8.25$ , H-7); 7.48 (1H, H-4); 12.76 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH en 1). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.82, 14.146 (S-CH<sub>3</sub>), 43.80 (C-6' o C-2'), 45.70 (C-3' o C-5'), 48.16 (C-3' o C-5'), 51.07 (C-2' o C-6'), 112.82 (C-7), 113.89 (C-4), 120.77 (C-6), 128.90, 129.10 (C-5), 137.10 (C-7a o C-3a), 140.50 (C-3a o C-7a), 153.14 (C-2), 169.71 (C=O). EM (ID, EI) *m/z*: 276 (M<sup>+</sup>, 20 %), 275 (M-1, 6%), 208 (M-68, 100%), 191 (M-85, 93%). EMAR: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OS: 276.1044, encontrado 276.1045.

**7.2.1.6. 4-[[2-(Metiltio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de terc-butilo (6-5b)**

Disolvente de reacción CH<sub>3</sub>CN. El producto crudo se obtuvo por precipitación en agua. Rendimiento 51%. Cristales blancos de EtOH-H<sub>2</sub>O, pf 188.9-189.9 °C. *R<sub>f</sub>* 0.5714 (sistema CHCl<sub>3</sub>-MeOH 80:20+1 gota NH<sub>4</sub>OH). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3343 (NH), 3151 (C-H Ar.), 2976-2865 (C-H Alif.), 1692 (C=O, Boc), 1627 (C=O Amida), 1418 (C=C, C=N), 1274, 1253, 1240 y 1226 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-, S-CH<sub>3</sub>), 1167 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.48 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 2.71 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 3.34-3.88 (m, 8H, H-2', H-3', H-5', H-2' y H-6'), 7.17 (dd, 1H,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, H-6), 7.35 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 7.46 (s, 1H, H-4), 10.30 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.40 (S-CH<sub>3</sub>), 28.34 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 41.40 (C-2' o C-6'), 42.56 (C-6' o C-2'), 43.49 (C-3' o C-5'), 47.85 (C-5' o C-3'), 80.47 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 112.98 (C-7), 113.98 (C-4), 121.12 (C-6), 128.31 (C-5), 138.79 (C-3a), 140.76 (C-7a), 154.35 (N-CO-O), 154.56 (C-2), 171.64 (N-CO). EM (IE, ID) *m/z*: 376 (M<sup>+</sup>, 11%), 319 (M-57, 6%), 275 ([M-57]-44, 3%), 220 (276-56, 10%), 219 ([M-57]-56, 9%), 208 (M-168, 64%), 191 (M-185, 100%), 164 ([M-168]-44, 21%), 163 ([M-185]-28, 17%).

**7.2.1.7. 6-Cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (6-6)**

Disolvente de reacción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento 65%. Cristales blancos de agua, pf 136.6-138.6 °C. *R<sub>f</sub>* 0.23, sistema VII. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3389 (NH), 3275 (C-H Ar.), 2924-2802 (C-H Alif.), 1607 (C=O), 1447, 1409 (C=N, C=C), 1291 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.53-2.65 (m, 2H, H en 3' o 5'), 2.68 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 2.73 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz H-2' o H-6'), 3.02 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz H-2' o H-6'), 3.50-3.62 (m, 2H, H-3' o H-5'), 4.59 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, 2NH, H-4' y H-1), 7.34 (s, 1H, H-7), 7.54 (s, 1H, H-4). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.77 (S-CH<sub>3</sub>), 42.39 (C-6' o 2'), 45.32 (C-3' o 5'), 45.72 (C-3' o 5'), 47.70 (C-2' o 6'), 112.21 (C-7), 114.30 (C-4), 121.94 (C-5), 128.95 (C-6), 138.34 (C-3a), 140.66 (C-7a), 154.56 (C-2), 166.14 (C=O). EM (EI, ID) *m/z*: 312 (M+2, 6%), 310 (M<sup>+</sup>, 20 %), 309 (M-1,

6%), 242 (M-68, 96%), 225 (M-85, 100%), 198 ([M-68]-44, 23%), 197 ([M-85]-28, 15%), 85 (M-225, 50%). EMAR: calculado para C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>OS: 310.0655; encontrado: 310.0655.

#### 7.2.1.8. 5-[(4-Metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-7)

Disolvente de reacción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento 75%. Cristales blancos de MeOH, pf 188.7–189.3 °C. *R<sub>f</sub>* 0.64 Sistema VII. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3100 (NH), 3089–3048 (C-H Ar.), 2939–2840 (C-H Alif.), 1601 (C=O), 1547, 1483, 1442 (C=N, C=C), 1292 (N-CH<sub>3</sub>), 1273 (N-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.17 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.29 (sa, 4H, H-3' y H-5'), 2.68 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 3.30–3.59 (m, 4H, H-2' y H-6'), 7.12 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8.4 Hz, *J*<sub>2</sub>= 0.8 Hz, H-6), 7.42 (s, 1H, H-4), 7.44 (d, 1H, *J*= 8.0 Hz, H-7), 12.70 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.77 (CH<sub>3</sub>-S), 41.73 (C-3' o C-5'), 45.63 (CH<sub>3</sub>-N), 47.27 (C-3' o C-5'), 54.58 (C-2' y C-6'), 112.93 (C-7 y C-4), 120.71 (C-6), 128.84 (C-5), 139.78 (C-3a y C-7a), 153.13 (C-2), 169.664 (C=O). EM (ID, EI) *m/z*: 290 (M<sup>+</sup>, 93%), 233 (M-57, 91%), 220 (M-70, 24%), 191 (M-99, 100%), 163 ([M-99]-28, 68%), 99 (M-191, 77%), 83 (78%), 70 (M-220, 84%), 56 (75%). EMAR: calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OS: 290.1201; encontrado: 290.1201.

#### 7.2.1.9. 6-Cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-8)

Disolvente de reacción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento 78%. Cristales blancos de MeOH, pf 69.7–72.1 °C. *R<sub>f</sub>* 0.68 Sistema VII. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3385 (NH), 3151 (C-H Ar.), 2931–2811 (C-H Alif.), 1611 (C=O), 1505, 1449, 1412 (C=N, C=C), 1299 (S-CH<sub>3</sub>), 1260 (N-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.16 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.185–2.23 (m, 2H, H-3' o H-5'), 2.35 (t, 2H, *J*= 5.1 Hz, H-3' o H-5'), 2.68 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 3.09 (t, 2H, *J*= 4.8 Hz, H-6' o H-2'), 3.41 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH), 3.63 (t, 2H, *J*= 4.8, H-6' o H-2'), 7.34 (s, 1H, H-7), 7.54 (s, 1H, H-4). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.758 (S-CH<sub>3</sub>), 41.050 (C-2' o C-6'), 45.621 (N-CH<sub>3</sub>), 46.263 (C-6' o C-2'), 54.16 (C-3' o C-5'), 54.54 (C-5' o C-3'), 112.61 (C-7), 114.53 (C-4), 121.97 (C-5), 128.80 (C-6), 137.50 (C-3a), 142.00 (C-7a), 154.54 (C-2), 166.12 (C=O). EM (ID, EI) *m/z*: 326 (M+2, 12%), 324 (M<sup>+</sup>, 35 %), 267 (M-57, 20%), 225 (M-99, 67%), 197 ([M-99]-28, 13%), 99 (M-225, 63%), 70 (M-254, 100%). EMAR: calculado para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>OS: 324.0811; encontrado: 324.0812.

#### 7.2.2. Procedimiento general de formación de sulfóxidos y sulfonas

Sulfóxidos: Se preparó una solución del compuesto Alfa (4-6), TCBZ, 5-5 ó 5-6 en CHCl<sub>3</sub> (1:40 p/v) a una temperatura de 35-40 °C. A la solución fría a 0 °C se le adicionó lentamente un equivalente de Ac.*m*-cloroperbenzoico disuelto en CHCl<sub>3</sub>, a una

temperatura entre 0-10 °C. Terminada la reacción, la mezcla se vertió sobre una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 6% en agua y extrajo con CHCl<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> varias veces. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y se eliminó el disolvente en el rotaevaporador hasta sequedad, sin calentamiento. El residuo se redisolvió en una mezcla de benceno/EtOH 1:1 (v/v) en exceso, luego se concentró a mínimo volumen a presión reducida, sin calentar. Precipitó un sólido blanco cual se colectó por filtración al vacío, lavó con EtOH y dejó secar.

Sulfonas: Se preparó una solución del compuesto Alfa (**4-6**), TCBZ, **5-5** o **5-6** en CHCl<sub>3</sub> (1:40 p/p) a una temperatura de 35-40 °C. A la solución, a temperatura ambiente, se le agregaron 2.5-3 eq de Ac.*m*-cloroperbenzoico disuelto en CHCl<sub>3</sub>. Terminada la reacción, la mezcla se vertió sobre una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 6% en agua y extrajo con CHCl<sub>3</sub> varias veces. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y se eliminó el disolvente en el rotaevaporador hasta sequedad. El sólido se recristalizó de CHCl<sub>3</sub>/éter de petróleo.

### 7.2.3. Procedimiento general de S-alquilación con yoduro de metilo

A una solución del 2-mercaptobencimidazol, adecuadamente sustituido, en acetona o etanol se le agregó KOH al 50% (1.1 eq) y posteriormente a una temperatura entre 0-5°C (compuestos **4-6**, **6-1-6-8**, **6-9-6-16**) o bien a temperatura ambiente (compuestos **5-5** y **5-6**) se adicionó lentamente CH<sub>3</sub>I (1.1 eq) diluido al 50% en el mismo disolvente de la reacción. La solución se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por un periodo de 0.5–3 h. Una vez consumida la materia prima la solución se neutralizó con HCl al 20%. Los sólidos obtenidos se colectaron por filtración y se secaron al aire. El producto crudo se purificó por recristalización. Nota: el pH de la reacción debe estar entre 8–9.

#### 7.2.3.1. 5-Cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-6**). Compuesto Alfa

Siguiendo el procedimiento general de S-alquilación se partió de 100 g (0.3060 mol) de 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-tiol (**4-5**) y se obtuvieron 86.22 g (89.9%) del compuesto Alfa; recristalizado de AcOEt/MeOH, como un polvo blanco, 181–182 °C, pf 192–195 °C (recristalizado de CHCl<sub>3</sub>-MeOH). R<sub>f</sub> 0.39, sistema VI. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3402, 2720, 1453, 1316, 1157. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.84 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 6.48 (sa, 1H, NH, inter. con D<sub>2</sub>O); 6.77 (d, 1H, J= 7.8 Hz, H-2'); 7.29 (s, 1H, H-4); 7.40 (dd, 1H, J<sub>1</sub>= 7.8 Hz, J<sub>2</sub>= 8.1 Hz, H-3'); 7.53–7.66 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.70 (d, 1H, J= 8.1 Hz, H-4'); 7.89 (s, 1H, H-7); 7.94–8.20 (m, 1H, H-5'); 8.12-8.22 (m, 1H, H-8'). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-

$\delta$ : 13.46 (S-CH<sub>3</sub>), 102.95 (C-7), 110.2 (C-2'), 113.116 (C-4), 119.7 (C-8'), 120.83 (C-5), 122.04 (C-4'), 123.8 (C-8'a), 124.12 (C-3'), 124.66 (C-6'), 125.25 (C-7'), 126.21 (C-5'), 128.72 (4'a), 131.34 (C-3a), 133.08 (C-7a), 148.05 (C-1'), 150.75 (C-2), 152.03 (C-6). EM (ID/IE)  $m/z$ : 342 (M+2, 39%); 340 (M<sup>+</sup>, 100%); 305 (M-35, 49%); 304 (M-36); 290 (304-15, 40%); 271 (304-33, 20%); 258 (290-32, 15%); 127 (340-213, 20%). EMAR: calculado para C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS (M<sup>+</sup>)  $m/z$ : 340.0437. Encontrado: 340.0437. Análisis Elemental: calculado para C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS: C, 63.43; H, 3.84; N, 8.22; S, 9.41. Encontrado: C, 62.82; H, 3.69; N, 7.97; S, 9.86.

#### 7.2.3.2. 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (5-5)

A partir de 19.5 g (0.0542 mol) de 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-tiol (**5-16**), se obtuvieron 15.8 g (78.0%) de un sólido beige.  $R_f$  0.36 Sistema VI. Se recristalizó de EtOH/agua con carbón activado dando 14.8 g (93.67 %) de cristales blancos con pf 183–184 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3052 (C-H Ar.), 2932 (C-H Alif.), 1627, 1574, 1448, 1423 (C=C, N=C-S), 1251 (C-O-C); 1146 (C-S-C), 909 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.70 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.69 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6.60 (dd, 1H,  $J_1=8.4$  Hz,  $J_2=1.2$  Hz, H-6'); 7.24 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=8.4$  Hz, H-5'); 7.36 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-4'); 7.44 (s, 1H, H-4); 7.87 (s, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.15 (S-CH<sub>3</sub>), 30.22 (N-CH<sub>3</sub>), 110.74 (C-4), 11.16 (C-7), 114.89 (C-6'), 118.81 (C-6), 120.80 (C-2'), 124.22 (C-4'), 128.71 (C-5), 132.81 (C-7a), 135.61 (C-3'), 142.23 (C-3a), 144.67 (C-5), 154.79 (C-2), 155.56 (C-1'). EM (CG, IE,  $R_t$  21.457 min)  $m/z$ : 376 (M+4, 32%); 374 (M+2, 100%); 372 (M<sup>+</sup>, 94%); 343 (23%), 341 (77%), 339 (M-33, 84%); 269 ([M-33]-70, 32%); 151 (36%), 152 (38%), 109 (28%).

#### 7.2.3.3. 5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (5-6)

A partir de 6.6 g (0.01835 mol) del 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-bencimidazol-2-tiol (**5-21**), 1.53 g (0.0275 mol, 1.5 eq) de KOH y 1.25 mL (0.0201 mol, 1.2 eq) de CH<sub>3</sub>I, se obtuvieron 5.5 g (80%) de un sólido blanco que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  0.52 Sistema VI, se recristalizó de EtOH-agua con carbón activado dando cristales blancos, pf 131–132 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3082 (C-H Ar.), 2932 (C-H Alif.), 1620, 1577, 1466, 1427 (C=C, N=C-S), 1256 (C-O-C), 1168 (C-S-C), 906 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.72 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.63 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6.62 (dd, 1H,  $J_1=8.4$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-6'); 7.25 (dd, 1H,  $J_1=8.4$  Hz,  $J_2=8.1$  Hz, H-5'); 7.36 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-4); 7.57 (s, 1H, H-7); 7.78 (s, 1H, H-4). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.15 (S-CH<sub>3</sub>), 30.14 (N-CH<sub>3</sub>), 103.72 (C-7), 114.87 (C-6'), 118.46 (C-4), 118.86 (C-5), 120.70 (C-2'), 124.17 (C-4'),



128.66 (C-5'), 132.81 (C-7a), 136.43 (C-3'), 140.74 (C-3a), 144.55 (C-1'), 154.75 (C-6), 155.35 (C-2). EM (CG, IE,  $R_t$  21.137 min)  $m/z$ : 376 (M+4, 14%); 374 (M+2, 43%); 372 (M<sup>+</sup>, 33%); 339 (M-33, 69%); 341 (58%), 343 (20%); 145 (M-227, 56%); 147(39%), 149 (15%); 109 (M-263, 100%).

#### 7.2.3.4. 2-(Metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-32)

De 40 g (0.1920 mol) de 2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-30) se obtuvieron 40.7 g (87.56%) de un sólido beige que en ccf presentó una mancha,  $R_f$  0.31 Sistema III, corrida dos veces.  $R_f$  0.5, sistema IX. El producto se recristalizó de tolueno con carbón activado dando cristales blancos con pf 117–118 °C. Recristalizado de EtOH, pf 147.3–148.2 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3267 (NH), 3030 (C-H Ar.), 2946–2625 (C-H Alif.), 1716 (C=O), 1693 (C=N, C=C), 1431(C=N-S), 1297 (S-CH<sub>3</sub>), 1235 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.703 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.833 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 7.494 (sa, 1H, resolvió con D<sub>2</sub>O a d,  $J$ = 8.6Hz, H-7); 7.754 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.54 Hz,  $J_2$ = 1.79 Hz, H-6); 8.008 (sa, 1H, H-4); 12.897 (sa, 1H, inter con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.758 (S-CH<sub>3</sub>); 51.983 (O-CH<sub>3</sub>); 110.323, 111.646 (C-7); 116.899, 118.543 (C-4); 122.619, 135.316 (C-5); 122.619, 122.766 (C-6); 135.316, 139.139 (7a); 143.349, 147.171 (3a); 154.442, 157.100 (C-2); 166.805 (C=O). EM (ID, IE)  $m/z$ : 222 (M<sup>+</sup>, 100%); 191 (M-31, 47%); 189 (M-33, 32%); 163 ([M-31]-28, 16%). EMAR: calculado para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S: 222.0462, encontrado 222.0463.

#### 7.2.3.5. 6-Cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-33)

A partir de 18.21 g (0.0750 mol) de 6-cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-31) se obtuvieron 17.75 g (92.20 %) de un producto crudo con una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.38, sistema IX. Una muestra de 3.7 g se recristalizó de tolueno–EtOH con carbón activado y EtOH–agua con carbón activado dando 2.76 g (74.59%) de cristales blancos muy finos, pf 139.3–141.2 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3301 (NH, CH, Ar.), 2949–2750 (C-H Alif.), 1710 (C=O), 1624 (C=N, C=C), 1449 (C=N-S), 1292 (S-CH<sub>3</sub>), 1257 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.70 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 7.58 (s, 1H, H-7 o H-4), 7.86 (s, 1H, H-7), 12.98 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.73 (S-CH<sub>3</sub>), 52.31 (O-CH<sub>3</sub>), 108.90, 109.99 (C-5), 114.50, 116.30 (C-6), 122.40 (C-7), 124.96 (C-4), 132.20 (C-3a), 134.00 (C-7a), 156.17 (C-2), 165.88 (C=O). EM (EI, CG)  $m/z$ : 258 (M+2, 36 %); 256 (M<sup>+</sup>, 100%); 225 (M-31,70%); 223 (M-33, 48%); 197 ([M-31]-28, 18%). EMAR: calculado para C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>SCl: 256.0073; encontrado: 256.0073.

## 7.2.3.6. 2-(Metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-9)

Se partió de 10.0 g (0.0428 mol) del 5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-55**) obteniendo 9.78 g (92.43% rend. crudo) de un sólido café que en ccf presentó un sola mancha,  $R_f$  0.19, sistema III (más una gota de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Recristalizado de isopropanol-agua con carbón activado dio 7.92 g (81% de rend. recristalizado) de un sólido en forma de hojuelas blancas nacaradas, pf 92.9–94.1 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3130 (NH), 3042 (C-H Ar.) 2938–2812 (C-H Alif.), 1628 (C=C, C=N), 1482, 1410 (N=C-S), 1214 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.50–1.56 (m, 2H, H-4'); 1.66–1.72 (m, 4H, H-3' y H-5'); 2.70 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.06 (dd, 4H,  $J_1=5.6$  Hz,  $J_2=5.2$  Hz, H-2' y H-6'); 6.88 (dd, 1H,  $J_1=8.88$ ,  $J_2=2.4$  Hz, H-6); 6.96 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz, H-4); 7.31 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz, H-7); 11.40 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.42 (S-CH<sub>3</sub>), 25.02 (C-4'), 26.94 (C-3' y C-5'), 52.20 (C-2' y C-6'), 99.44 (C-4), 100.41 (C-6), 100.69 (C-7), 115.08 (C-7a), 118.07 (C-3a), 149.90 (C-5), 150.47 (C-2). EM (IE-CG)  $m/z$ : 249 (M+2, 5%); 247 (M<sup>+</sup>, 100%); 246 (M-1, 76%); 232 (M-15, 23%); 158 ([M-1]-88, 52%).

## 7.2.3.7. 6-Cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-10)

Se partió de 10 g (0.0373 mol) del 6-cloro-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-56**) obteniendo 10.05 g (95.57% rend. crudo) de un sólido que en ccf presentó un sola mancha,  $R_f$  0.46 Sistema III (más 1 gota de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ),  $R_f$  de 0.67 (Sistema Hexano-AcOEt 70:30+1 gota de AcOH). El sólido se recristalizó de isopropanol-agua (rendimiento 90%) dando hojuelas blancas nacaradas, pf 183.6–184.0 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3424 (NH), 3107–3042 (C-H Ar.), 2994–2722 (C-H Alif.), 1624 (C=C, C=N), 1455 (N=C-S), 1386 (S-CH<sub>3</sub>), 990 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.51 (q, 2H,  $J=4.8$  Hz, H-4'); 1.65 (q, 4H,  $J=5.2$  Hz, H-3' y H-5'), 2.65 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 2.85 (dd, 4H,  $J_1=4.8$  Hz,  $J_2=5.2$  Hz, H-2' y H-6'), 7.13 (s, 1H, H-4); 7.46 (s, 1H, H-7); 12.49 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.82 (S-CH<sub>3</sub>), 23.70 (C-4'); 25.96 (C-3' y C-5'), 53.26 (C-2' y C-6'), 104.46 (C-4'), 116.13 (C-7), 122.51 (C-6), 137.42 (C-7a), 142.46 (C-3a), 144.98 (C-5), 151.86 (C-2). EM (IE-CG)  $m/z$ : 283 (M+2, 29%), 281 (M<sup>+</sup>, 76%), 280 (M-1, 100%), 192 ([M-1]-88, 30%).

## 7.2.3.8. 5-(4-Metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-11)

Se partió de 5 g (0.0202 mol) de 5-(4-metilpiperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-57**) obteniendo 5.0 g (94.69%) de un sólido que en ccf presentó un sola mancha  $R_f$  0.24 Sistema III+1 gota de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). El sólido se recristalizó de metanol-agua dando 4.6 g

(92% rend. cristalización) de cristales blancos nacarados con  $p_f$  103.4–105.5 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3150–3043 (NH, C-H Ar.), 2994–2799 (C-H Alif.), 1630 (C=C, C=N), 1482 (N=C-S), 1412 (S-CH<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.96 (d, 3H,  $J$ = 6.4 Hz, H-3' y/o H-5'); 1.41–1.15 (m, 1H, H-4'); 1.72 (dd, 2H,  $J_1$ = 12.8 Hz,  $J_2$ = 2.0 Hz, H-5' y/o H-3'), 2.62 (td, 2H  $J_1$ = 12 Hz,  $J_2$ = 2.44 Hz, H-2' y/o H-6'); 2.70 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.54 (da, 2H,  $J_1$ = 12 Hz,  $J_2$ = 2.4 Hz, H-6' y/o H-2'); 6.88 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.8 Hz,  $J_2$ = 2.4 Hz, H-6); 6.96 (d, 1H,  $J$ = 2.6 Hz, H-4); 7.31 (d, 1H,  $J$ = 8.8 Hz, H-7); 11.35 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.43 (S-CH<sub>3</sub>), 22.20 (CH<sub>3</sub>-CH), 31.47 (C-4'), 35.25 (C-3' y C-5'), 52.49 (C-2' y C-6'); 101.96 (C-4), 114.99 (C-6 y C-7), 115.00 (C-7a), 149.52 (C-3a y C-5), 150.44 (C-2). EM (IE, CG)  $m/z$ : 263 (M+2, 55); 261 (M<sup>+</sup>, 100%); 260 (M-1, 68%); 246 (M-15, 26%); 190 (M-71, 34%); 158 ([M-15]-88, 90%); 90 (M-171, 45%); 55 (M-206, 47%).

#### 7.2.3.9. 6-Cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-12)

Se partió de 5 g (0.0177 mol) del 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-58**) obteniendo 5.0 g (95.6%) de un sólido que en ccf presentó un sola mancha,  $R_f$  de 0.27 Sistema III. Recristalizado de EtOH-H<sub>2</sub>O dando 4.2 g (80.30% rend. puro) de cristales blancos,  $p_f$  164.4–166.0 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3080–3040 (NH, C-H Ar.), 2923–2719 (C-H Alif.), 1626, 1453 (C=C, C=N), 1423 (N=C-S), 1387 (S-CH<sub>3</sub>), 1183 (C-N), 985 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, Señales dobles por lo que las integrales no coinciden con lo esperado)  $\delta$ : 0.94 (d, 5H,  $J$ = 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>-CH); 1.02 (d, 1H,  $J$ = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH); 1.27 (dd, 2H,  $J_1$ = 11.1 Hz,  $J_2$ = 3.3 Hz, H-3' y/o H-5'); 1.35 (dd, 2H,  $J_1$ = 12.0 Hz,  $J_2$ = 3.6 Hz, H-3' y/o H-5'); 1.42–1.47 (m, 2H, H-4'); 1.68 (d, 4H,  $J$ = 10.5 Hz, H-5' y/o H-3'); 2.57 (t, 3.57H,  $J$ = 10.8 Hz, H-2' y/o H-6'); 2.65 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.61 (da, 3.46H,  $J$ = 10 Hz, H-6' y/o H-2'); 7.05 (s, 1H, H-4); 7.26 (s, 0.66H, H-4); 7.37 (s, 0.66H, H-7); 7.52 (s, 1H, H-7); 12.48 (s, 1.6H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, espectro después del intercambio con D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 0.91 (d, 3H,  $J$ = 6.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH); 1.01 (d, 0.75H,  $J$ = 6 Hz, CH<sub>3</sub>-CH); 1.27 (qd, 2H,  $J_1$ = 12.0 Hz,  $J_2$ = 3.0 Hz, H-3' y/o H-5'), 1.31–1.50 (m, 1H, H-4'); 1.65 (d, 2H,  $J$ = 11.4 Hz, H-5' y/o H-3'); 2.53 (t, 2H,  $J$ = 10.8 Hz, H-2' y/o H-6'); 2.62 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.12 (d, 2H,  $J_1$ =11.1 Hz, H-6' y/o H-2'); 7.14 (s, 1H, H-4); 7.45 (s, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, espectro con duplicidad de señales debido a la tautomería)  $\delta$ : 19.83 (S-CH<sub>3</sub>), 21.85 (CH<sub>3</sub>-CH), 25.47 (CH<sub>3</sub>-CH), 30.04 (C-4'), 34.34 (C-5' y C-3'), 52.53 (C-2' y/o C-6'), 62.00 (C-2' y/o C-6'), 102.16 (C-4 o C-7), 109.20 (C-4 o C-7), 111.04 (C-7 o C-4), 118.02 (C-7 o C-4), 122.36 (C-6 o C-5), 122.74 (C-6 o C-5), 131.73 (C-7a o C-3a), 135.00 (C-7a o C-3a), 139.93 (C-3a o C-7a), 143.33 (C-3a o C-7a), 144.78 (C-5 o C-6), 151.64 (C-2), 152.18 (C-

2). EM (IE, CG)  $m/z$ : 297 (M+2, 38%); 295 (M<sup>+</sup>, 100%), 294 (M-1, 84%); 226 (M-69, 17%); 192 ([M-15]-88, 18%).

7.2.3.10. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-13b)

De 6.41 g (0.023 mol) de 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-59) se obtuvieron 6.1 g (90.7%) de un sólido resinoso que en ccf mostró una mancha principal,  $R_f$  0.20 Sistema II. Datos espectroscópicos no disponibles. El producto se hidrolizó y aisló en forma de clorhidrato (73.77%).

7.2.3.11. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-14b)

A partir de 2.4 g (0.0077 mol) del 6-(4-acetilpiperazin-1-il)-5-cloro-1H-bencimidazol-2-tiol (6-60) se obtuvieron 1.3 g (52%) de un producto que en ccf presentó una mancha principal. El producto se recristalizó de AcOEt-EtOH dando 0.575 g (44.23% rend. recristalización) de cristales blancos finos, pf 212.4–212.9 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3185–3007 (NH), 2908–2831 (C-H Alif.), 1618 (N=C-S), 1276 (S-CH<sub>3</sub>), 996 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 2.65 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 2.86 (dd, 2H,  $J_1=4.4$  Hz,  $J_2=4.4$  Hz, H-2' y/o H-6'); 2.92 (dd, 2H,  $J_1=4.4$  Hz,  $J_2=4.4$  Hz, H-6' y/o H-2'); 3.58 (dd, 4H,  $J_1=9.2$  Hz,  $J_2=5.2$  Hz, H-3' y H-5'); 7.13 (sa, 1H, H-4); 7.52 (sa, 1H, H-7); 12.56 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.82 (S-CH<sub>3</sub>), 41.21 (C-5'), 46.09 (C-3'), 51.68 (C-6' o C-2'), 52.13 (C-2' o C-6'), 102.68 (C-4), 109.38 (C-7), 118.20 (C-6), 122.30 (C-3a), 140.32 (C-7a), 143.38 (C-5), 152.360 (C-2), 168.33 (C=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 326 (M+2, 30.5%); 324 (M<sup>+</sup>, 81%), 281 (M-43, 15.5%); 252 (M-72, 100%); 239 (M-85, 37%).

7.2.3.12. 5-(4-Metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-15)

A partir de 5.1 g (0.0205 mol) de 5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-61) se obtuvieron 5.0 g (92.79%) de un sólido que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  de 0.179 Sistema VII. El sólido se recristalizó de metanol-agua dando 3.9 g (78%) de cristales blancos nacarados, pf 136.6–138.4 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3154–3000 (NH, C-H Ar.), 2938–2963 (C-H Alif.), 1628, 1489 (C=C, C=N), 1446 (N=C-S), 1409 (S-CH<sub>3</sub>), 1229 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 2.44 (dd, 4H,  $J_1=4.8$  Hz,  $J_2=4.8$  Hz, H-3' y H-5'); 2.64 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 3.04 (dd, 4H,  $J_1=4.4$  Hz,  $J_2=5.2$  Hz, H-2' y H-6'); 6.81 (dd, 1H,  $J_1=9.2$  Hz,  $J_2=2.4$  Hz, H-6); 6.86 (sa, 1H, H-4); 7.27 (d, 1H,  $J=7.2$  Hz, H-7); 12.23 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.94 (S-CH<sub>3</sub>), 45.76 (CH<sub>3</sub>-N), 49.96 (C-3' y C-5'), 54.86 (C-2' y C-6'), 97.04 (C-4), 97.37 (C-6), 112.61 (C-7), 116.00 (C-7a), 136.43 (C-3a), 147.20 (C-5), 149.33 (C-2). EM (IE, CG)  $m/z$ : 264 (M+2, 3%); 262 (M<sup>+</sup>,

46%); 247 (M-15, 14%, CH<sub>3</sub>); 218 (M-44, 12%); 192 (M-70, 34%); 158 ([M-15]-88, 66%); 71 (M-191, 100%); 70 (M-192, 83%).

#### 7.2.3.13. 6-Cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-16)

A partir de 5.0 g (0.0178 mol) de 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-62**) se obtuvieron 4.94 g (94.27%) de un sólido que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  0.25 Sistema VII. El sólido se recrystalizó de metanol-agua dando 3.9 g (78.94% rend. cristalización) cristales blancos nacarados, pf 182.0–183.3 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3380 (NH), 3100 (C-H Ar.), 2619 (C-H Alif.), 1607 (C=C), 1453, 1430 (N=C-S), 1311 (S-CH<sub>3</sub>, C-N), 1002 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 2.47–2.48 (m, 4H, H-3' y H-5'); 2.65 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 2.92 (sa, 4H, H-2' y H-6'); 7.16 (s, 1H, H-4); 7.35 (s, ~2H, simplifica con D<sub>2</sub>O, H-4 y H-7); 7.48 (s, 1H, H-7); 12.53 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, después del intercambio con D<sub>2</sub>O) δ: 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 2.40–2.48 (sa, 4H, H-3' y H-5'); 2.62 (s, 1H, S-CH<sub>3</sub>); 2.89 (sa, 4H, H-2' y H-6'); 7.16 (s, 1H, H-4); 7.33 (s, 1H, H-4 o H-7), 7.33 s, (1H, H-7 o H-4); 7.47 (s, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.80 (S-CH<sub>3</sub>), 45.77 (CH<sub>3</sub>-N), 51.65 (C-3' y C-5'), 54.96 (C-2' y C-6'), 102.00 (C-4 o C-7), 103.13 (C-7 o C-4), 117.37 (C-7), 122.27 (C-5), 125.30 (C-4), 128.30 (C-5), 128.88 (C-7a), 136.32 (C-3a), 137.32 (C-7a), 139.43 (C-3a), 143.81 (C-5 o C-6), 152.06 (C-2). EM (IE, CG) *m/z*: 298 (M+2, 13%); 296 (M<sup>+</sup>, 36%); 281 (M-15, 6%); 261 (M-35, 14%); 226 (M-70, 16%); 225 (M-71, 15%); 192 (M-104, 36%); 71 (M-225, 100%); 70 (M-226, 58%); 56 (M-240, 23%)..

#### 7.2.4. Procedimiento general de obtención de clorhidratos

El compuesto protegido como carboxilato de *terc*-butilo (**6-5b**) se suspendió en (1:10 p/v) solución de HCl 1M en AcOH 3M, la mezcla se agitó 3 h a temperatura ambiente. El sólido que precipitó se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se separó por filtración al vacío. Los compuestos protegidos como acetamidas (**6-13a**, **6-14a**) se suspendieron en una mezcla de EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1 v/v); a la mezcla se le adicionaron unas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se calentó a 50 °C por una hora. Pasado este tiempo la reacción se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub>, el EtOH se retiró a presión reducida; al volumen resultante se le adicionó salmuera y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica colectada se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se retiró a presión reducida. El sólido resultante se redisolvió en MeOH o EtOH anhidro y se burbujeó con HCl gas hasta la formación de un precipitado. El sólido formado se colectó por filtración, dejándose secar bajo una campana de vacío.

#### 7.2.4.1. Diclorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-5a**)

De 1.00 g (0.0026 mol) de 4-[[2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *tert*-butilo (**6-5b**) se obtuvieron 0.623 g de un sólido blanco esponjoso que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.1228, Sistema VII+1 gota  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pf 230.5–248.6 °C. El clorhidrato se recrystalizó de isopropanol dando cristales blancos (72%), pf 243.1–246.9 °C. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 3.00 (s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ), 3.24 (sa, 4H, H-3' y H-5'), 3.82 (sa, 4H, H-2' y H-6'), 6.18 (sa, 2H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , 2 HCl), 7.54 (dd, 1H,  $J_1=8.4$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-6), 7.77 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz, H-7), 7.82 (s, 1H, H-4), 9.73 (sa, 2H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , 2NH, H-4' y H-1).

#### 7.2.4.2. Clorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-bencimidazol (**6-13a**)

De 1.5 g (0.0052 mol) del clorhidrato de 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-13b**) se obtuvieron 0.844 g (36.8%) de un sólido que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.44 Sistema VII, pf 310–315 °C con descomposición. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3412 ( $-\text{NH}_2^+$ ), 2989–2485 (C-H Alif.), 1633 (C=C), 1482 (C=N), 1454 (N=C-S). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.97 (s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ); 3.21–3.29 (sa, 4H, H-2', y H-6'); 3.44–3.48 (m, 4H, H-3' y H-5'); 5.93 (sa, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH); 7.15 (d, 1H,  $J=2.1$  Hz, H-4); 7.26 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=2.4$  Hz, H-6); 7.59 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz, H-7). 9.67 (s, 2H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $-\text{NH}_2^+$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 15.16 (S- $\text{CH}_3$ ), 42.48 (C-3' y C-5'), 46.36 (C-2' y C-6'), 98.90 (C-4), 113.41 (C-6), 116.17 (C-7), 126.50 (C-7a), 133.29 (C-3a), 148.35 (C-5), 150.91 (C-2). EM (FAB $^+$ , ID)  $m/z$ : 249 (M+1).

#### 7.2.4.3. Clorhidrato de 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-bencimidazol (**6-14a**)

De 0.5 g (0.0052 mol) de la acetamida 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-14b**) se obtuvieron 0.30 g (81.0%) de producto, una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.16 Sistema VII, pf 235–237 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3524–3454 ( $-\text{NH}_2^+$ ,  $-\text{NH}^+$ ), 2917–2484 (C-H Alif.), 1613 (C=C), 1457 (N=C-S), 909 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.50 (s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ); 3.17–3.25 (m, 8H, H-3', H-5', H-2' y H-6'); 4.80 (sa, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , HCl); 7.32 (s, 1H, H-4); 7.69 (s, 1H, H-7); 9.42 (sa, 2H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 14.57 (S- $\text{CH}_3$ ), 43.13 (C-3' y C-5'), 48.47 (C-2' y C-6'), 105.09 (C-4), 114.73 (C-7), 124.33 (C-6), 132.23 (C-7a), 134.64 (C-3a), 144.45 (C-5), 153.10 (C-2). EM (IE, ID)  $m/z$ : 284 (M+2, 15%); 282 (M $^+$ , 36%); 240 (M-42, 100%), 192 ([M-1]-88, 13%).

## 7.2.5. Procedimiento de obtención de 2-mercaptobencimidazoles

A una solución del 1,2-diaminobenceno (*o*-fenilendiamina) adecuadamente sustituido en mezcla de EtOH–H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) se adicionó KOH (1.5 eq) y CS<sub>2</sub> (1.5 eq), a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno por un tiempo de 2–3 h y a una temperatura de 65–70 °C. Agotada la materia prima, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua con hielo; posteriormente se aciduló con solución de AcOH al 20% hasta un pH= 5. El sólido obtenido se colectó por filtración al vacío. Los productos obtenidos se purificaron por recristalización.

7.2.5.1. 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-5**)5-Cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-tiol (**4-5**)

A partir de 50 g (0.1756 mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (**4-4**) se obtuvieron después de recristalizar dos veces de AcOEt–EtOH con carbón activado 41.82 g (73%) de un polvo blanco, pf 273–275 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3380, 3053, 1460, 1391, 1328, 1229, 1157. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.75 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 6.6 Hz, *J*<sub>2</sub>= 2.0 Hz, H-2'); 6.84 (s, 1H, H-7); 7.34 (s, 1H, H-4); 7.40 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub>= 8.1 Hz, H-3'); 7.54–7.62 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.68 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-4'); 7.95–8.00 (m, 1H, H-5'); 8.13-8.17 (m, 1H, H-8'); 12.60 (s, 1H, NH o SH); 12.72 (s, 1H, NH, o SH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 102.27 (C-7), 110.60 (C-2'), 110.95 (C-4'), 118.96 (C-5), 121.19 (C-6'), 123.04 (C-4), 124.97 (8'a), 126.01 (C-8'), 126.31 (C-7'), 126.89 (C-5'), 127.82 (C-3'), 129.57 (4'a), 132.04 (C-3a), 134.46 (C-7a), 147.10 (C-1'), 152.66 (C-6), 169.66 (C-2). EM (ID/IE) *m/z*: 328 (M+2, 40%); 326 (M<sup>+</sup>, 100%); 291 (M–35, 65%); 290 (M–36, 63%); 258 (290–33). EMAR: calculado para C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS (M<sup>+</sup>) *m/z*: 326.0280. Encontrado: 326.0281. Análisis Elemental: calculado para: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS: C, 62.48; H, 3.39; N, 8.57; S, 9.81. Encontrado: C, 62.49; H, 3.29; N, 8.44; S, 9.93.

7.2.5.2. 6-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol (**5-16**)

De 10.0 g (0.0314 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (**5-15**) se obtuvieron 10.2 g (91.07%). El producto se recristalizó dos veces de EtOH–DMF con carbón activado. Se obtuvieron 8.2 g (80.39%) de un sólido amorfo beige claro que en ccf presentó una sola mancha con *R<sub>f</sub>* de 0.43 Sistema VI, pf de 295–296 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3440 (NH de la forma de tiona), 3121, 3068 (C-H Ar.), 2934 (C-H Alif.), 2750 (SH), 1624, 1572, 1490, 1428 (C=C, C=N-S), 996 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.62 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6.65 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub>= 3.0 Hz, H-6'); 6.89 (s, 1H, H-4); 7.02–7.30 (m, 2H, H-4' y H-5'); 7.37 (s, 1H, H-7), 7.71 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, SH).

7.2.5.3. 5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-mercapto-1-metil-1H-bencimidazol (5-21)

5-Cloro-6-(2,3-diclorofenox)-1-metil-1H-bencimidazol-2-tiol (5-21)

A partir de 10.2 g (0.0320 mol) de la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1,2-fenilendiamina (**5-20**), se aislaron 10.2 g (93.39%). El producto en cromatografía presentó una mancha principal,  $R_f$  0.57 Sistema VI, y una mancha café en el origen. El producto se purificó mediante dos recristalizaciones en EtOH con carbón activado. Se obtuvieron 7.68 g (75.2%) de un sólido amorfo beige claro que en ccf presentó una sola mancha, pf 260.2–261.7 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3066 (C-H Ar.), 2940 (C-H Alif.), 2750 (-SH), 1578, 1480, 1440, 1334 (C=C, N=C-S), 1272 (C-O-C), 912 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.60 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6.50 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=3.0$  Hz, H-6'); 6.91–7.13 (m, 2H, H-4' y H-5'); 10.60 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, SH o NH de la forma de tiona). EM (CG/IE.)  $m/z$ : 362 (M+4, 30%); 360 (M+2, 82%); 358 (M<sup>+</sup>, 67%), 340 (M-18, 100 %).

7.2.5.4. 2-Mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-30)

De 37.22 g (0.224 mol) de 3,4-diaminobenzoato de metilo (**6-28**) se obtuvieron 40.8 g (87.51%) de un sólido beige oscuro; de las aguas madres se recuperaron 3.9 g (8.36%). El producto crudo se recristalizó de MeOH/DMF (95:5 v/v) y carbón activado para dar 26.82 g (60%) de un polvo blanco que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  0.61 Sistema VIII, pf de 306–308 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3310 (NH), 3303, 3056 (C-H Ar.), 2948, 2980 (C-H Alif.), 1692 (C=O) 1478 (N-C=S, C=C), 1230 (C-O-C), 1174 (C=S). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.82 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 7.20 (dd, 1H,  $J_1=8.39$  Hz,  $J_2=0.59$  Hz, H-7); 7.63 (dd, 1H,  $J_1=1.49$  Hz,  $J_2=0.59$  Hz, H-4); 7.74 (dd, 1H,  $J_1=8.39$  Hz,  $J_2=1.79$  Hz, H-6); 12.84 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, 2 NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 52.12 (O-CH<sub>3</sub>), 109.27 (C-7), 110.06 (C-4), 123.50 (C-5), 124.13 (C-6), 132.24 (C-3a), 135.93 (C-7a), 166.12 (C=O), 170.17 (C-2). EM (IE, ID)  $m/z$ : 208 (M<sup>+</sup>, 100%); 177 (M-31, 67%); 149 ([M-31]-28, 21%). EMAR: Calculado para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S: 208.0306, encontrado 208.0306.

7.2.5.5. 6-Cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (6-31)

A partir de 23.9 g (0.1191 mol) de 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**6-29**) se obtuvieron 28.39 g (98.15%) de un sólido blanco que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  0.33, Sistema IX. 2 g de producto crudo se recristalizaron de EtOH-DMF (9:1 v/v), obteniéndose 1.3 g (65%) de cristales blancos con pf 280.6–280.9 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3313 (NH), 2949 (C-H Alif.), 1708 (C=O), 1625 1448, 1411 (N-C=S, C=C), 1293 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.82 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 7.21 (s, 1H, H-4), 7.52 (s, 1H, H-7), 12.91 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, 2 NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 52.44 (O-CH<sub>3</sub>), 111.06 (C-



7 o C-4), 111.55 (C-4 o C-7), 122.68 (C-5), 126.56 (C-3a), 131.08 (C-6), 135.40 (C-7a), 165.08 (C=O), 170.99 (C-2). EM (IE, ID)  $m/z$ : 244 (M+2, 38 %); 242 (M<sup>+</sup>, 100 %); 211 (M-31, 82%); 183 ([M-31] -28, 21%). EMAR: calculado para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>ClS: 241.9916; encontrado 241.9917.

**7.2.5.6. 5-(Piperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-55)**  
**5-(Piperidin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (6-55)**

A partir de 8.35 g de 4-(piperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-47**) se obtuvieron 10.2 g (83.6%) de un sólido café claro, que en ccf mostró una mancha principal,  $R_f$  0.31 Sistema III. El producto crudo se purificó por recristalización con EtOH-DMF obteniendo 7.8 g (76.47%) de un sólido blanco rosado, pf 253.3–255.3 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3398–3132 (NH), 2940 y 2808 (C-H Alif.), 1632 (C=C, C=N), 1500 y 1464 (N-C=S), 1174 (C=S). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.02 (d, 2H,  $J$ = 6.4 Hz, H-4'); 1.46–1.52 (m, 2H, H-3' y/o H-5'); 1.59–1.64 (m, 4H, H-5' y/o H-3', H-2' y/o H-6'); 3.02 (dd, 2H,  $J_1$ = 5.2 Hz,  $J_2$ = 5.2 Hz, H-6' y/o H-2'); 6.31 (d, 1H,  $J$ = 1.6 Hz, H-4); 6.78 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.6 Hz,  $J_2$ = 2.0 Hz, H-6); 6.96 (d, 1H,  $J$ = 8.8 Hz, H-7); 12.25 (d, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, 2NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 23.77 (C-4'), 25.49 (C-3' y C-5'), 51.18 (C-2' y C-6'), 97.31 (C-4), 109.66 (C-7), 112.97 (C-6), 125.66 (C-3a), 133.12 (C-7a), 148.67 (C-5), 167.07 (C-2). EM (ID, IE)  $m/z$ : 235 (M+2, 36 %), 233 (M<sup>+</sup>, 85%), 232 (M-1, 100%).

**7.2.5.7. 6-Cloro-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-56)**  
**5-Cloro-6-(piperidin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (6-56)**

De 30 g (0.1329 mol) de la 4-cloro-5-(piperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-48**) se obtuvieron 36 g (96.1%) de un sólido rojizo que en ccf mostró una mancha principal,  $R_f$  0.54 Sistema III. El producto se purificó mediante un lavado con EtOH-tolueno (60:40) a reflujo y bajo N<sub>2</sub> dando 32.7 g (87.31%) de un sólido rosado, pf de 270–270.5 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3114–3060 (NH), 2932 y 2806 (C-H Alif.), 2583 (SH débil), 1610 y 1510 (C=C, C=N), 1478 (N=C-S, N-C=S), 1184 (C=S). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.60 (sa, 6H, H-3',4' y 5'); 2.01 (sa, 4H, H-2' y 6'), 6.85 (s, 1H, H-7), 7.15 (s, 1H, H-4), 12.50 (sa, 2H, NH, inter. con D<sub>2</sub>O). EM (EI)  $m/z$ : 269 (M+2, 32 %), 267 (M<sup>+</sup>, 100%), 266 (M-1, 80%).

**7.2.5.8. 5-(4-Metilpiperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-57)**  
**5-(4-metilpiperidin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona**

De 5.36 g (0.0261 mol) de la 4-(4-metilpiperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-49**) cruda, se obtuvieron 6.14 g (90%) de un sólido café claro que en ccf mostró una mancha principal,  $R_f$  0.54 Sistema III. El producto se purificó por recristalización de etanol con carbón activado. Se obtuvieron 5.1 g (74.67%) de un sólido beige, pf de 248.3–249.2 °C. IR (KBr)

cm<sup>-1</sup>: 3110–3052 (NH), 2924 y 288 (C-H Alif.), 2594 (SH débil), 1636 y 1614 (C=C, C=N), 1480 (N=C-S, N-C=S), 1200 (C=S). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.95 (d, 3H, *J*= 5Hz, CH<sub>3</sub>); 1.05–1.90 (m, 5H, H-3',4' y 5'), 2.60 (dd, 2H, *J*<sub>1</sub>= 12 Hz, *J*<sub>2</sub>= 4 Hz, H-2' y 6'), 3.32 (d, 2H, *J*= 12 Hz, H-6' y H-2'); 6.62 (d, 1H, *J*= 3 Hz, H-4); 6.68 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 9 Hz, *J*<sub>2</sub>= 3 Hz, H-6); 6.98 (d, 1H, *J*= 9 Hz, H-7); 11.80 (sa, 2H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH). EM (EI, CG) *m/z*: 249 (M+2, 4 %), 247 (M<sup>+</sup>, 83%), 246 (M-1, 100%).

**7.2.5.9. 6-Cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-58)**  
**5-Cloro-6-(4-metilpiperidin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (6-58)**

De 10 g (0.0417 mol) de la 4-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-50**) se obtuvieron 10.3 g (86.15%) de un sólido café claro que en ccf mostró una mancha principal, *R<sub>f</sub>* 0.55 Sistema III. El producto se purificó mediante un lavado caliente de tolueno-etanol. Se obtuvieron 7.85 g (76.3%) de un sólido beige, pf 280–283.5 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3108–3060 (NH, C-H Ar.), 2948–2802 (C-H Alif.), 2527 (SH débil), 1619 y 1514 (C=C, C=N), 1484 (N=C-S, N-C=S), 1184 (C=S). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.93 (d, 3H, *J*= 5 Hz, CH<sub>3</sub>); 1.13–1.83 (m, 5H, H-3',4' y 5'); 2.32–2.72 (m, 2H, H-2' y 6'); 2.93–3.27 (m, 2H, H-6' y H-2'); 3.30 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, SH); 6.83 (s, 1H, H-4); 7.13 (s, 1H, H-7); 12.52 (sa, 1H; inter. con D<sub>2</sub>O, NH). EM (EI, CG) *m/z*: 282 (M+2, 36 %), 281 (M<sup>+</sup>, 100 %), 280 (M-1, 70 %), 211 (M-70, 40%).

**7.2.5.10. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (6-59)**  
**5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (6-59)**

De 8.8 g (0.0378 mol) 4-(4-acetilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-51**) se obtuvieron 7.8 g (74.71%) de un sólido beige que en ccf mostró una mancha principal, *R<sub>f</sub>* de 0.32 Sistema II. El producto se purificó mediante un lavado caliente de tolueno-EtOH. Se obtuvieron 7.85 g (76.3%) de un sólido beige, pf 310.1–311.4 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3112 (NH), 3028 (C-H Ar.), 2911–2981 (C-H Alif.), 2510 (-SH, débil), 1603 (C=N, C=C), 1464 (C-N=S), 1173 (C=S, C-N). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.04 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 2.99–3.08 (m, 4H, H-2' y H-6'); 3.55–3.06 (m, 4H, H-3' y H-5'); 6.66 (d, 1H, *J*= 2.1 Hz, H-4); 6.83 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub>= 2.4 Hz, H-6); 7.02 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, H-7), 12.36 (s, 2H, inter. D<sub>2</sub>O, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 21.24 (CO-CH<sub>3</sub>), 40.85 (C-5'), 45.62 (C-3'), 49.85 (H-2' o H-6'), 50.16 (H-6' o H-2'), 97.49 (C-4), 109.79 (C-7), 126.25 (C-7a), 133.14 (C-3a), 147.62 (C-5), 167.33 (C=O), 168.26 (C-2).

7.2.5.11. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-60**)

5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (**6-60**)

De 2.68 g (0.01 mol) 4-(4-acetilpiperazin-1-il)-5-clorobenceno-1,2-diamina (**6-52**) se obtuvieron 2.5 g (80.64%) de un sólido beige que en ccf mostró una mancha principal. Una muestra se purificó por cromatografía en columna utilizando AcOEt–Acetona (70:30) como eluyente. Se obtuvo un sólido beige, pf 281.8–283.3 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3116 (NH), 3041 (C-H Ar.), 2909–2813 (C-H, Alif.), 1626 (N-C=O), 1610 (C=N, C=C), 1470 (N=C-S), 1304 (C-N), 1184(C=S), 997 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.02 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 2.83 (t, 2H,  $J= 4.8$  Hz, H-2' y/o H-6'); 2.90 (t, 2H,  $J= 4.5$  Hz, H-6' y/o H-2'); 3.56 (t, 4H,  $J= 3.9$  Hz, H-3' y H-5'); 6.85 (s, 1H, H-4); 7.16 (s, 1H, H-7). 12.51 (d, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, 2 NH o NH, SH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 21.31 (CO-CH<sub>3</sub>), 41.17 (C-5'), 46.04 (C-3'), 51.45 (C-2' o C-6'), 51.78 (C-6' o C-2'), 102.21 (C-4), 110.68 (C-7), 122.78 (C-6), 128.74 (C-7a), 131.96 (C-3a), 144.19 (C-5), 168.44 (C=O), 168.88 (C-2). EM (IE, ID)  $m/z$ : 311 (M+2, 35%); 310 (M<sup>+</sup>, 100%); 278 (M–32, 8%); 267 (M–43, 18%); 238 (M–72, 68%); 225 (M–85, 28%); 211 (225–14).

7.2.5.12. 5-(4-Metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-61**)

5-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (**6-61**)

De 0.0423 mol del clorhidrato de 4-(4-metilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-53**) se obtuvieron 6.1 g (58 %) de un sólido café claro que en ccf mostró una mancha principal,  $R_f$  0.57 Sistema III. El producto se purificó por recristalización de EtOH con carbón activado. Se obtuvieron 5.1 g (83.6%) de un sólido beige con pf 298.6–299.2 °C con descomposición. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3431 (NH), 3094 (C-H Ar.), 2961–2686 (C-H Alif.), 2525 (S-H débil), 1630–1504 (C=C, C=N), 1458 (N=C-S, N-C=S), 1221 y 1181 (C-N, C=S). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 2.43 (dd, 4H,  $J_1= 4.8$ Hz,  $J_2= 5.2$  Hz, H-3' y H-5'); 3.03 (dd, 4H,  $J_1= 4.8$  Hz,  $J_2= 4.8$  Hz, H-2' y H-6'); 6.60 (d, 1H,  $J=2.0$  Hz, H-4); 6.78 (dd, 1H,  $J_1= 8.8$  Hz,  $J_2= 2.4$  Hz, H-6); 6.97 (d, 1H,  $J= 8.8$  Hz, H-7); 12.27 (sa, 2H, Inter. con D<sub>2</sub>O, 2NH, o NH y SH). EM (EI, CG)  $m/z$ : 250 (M+2, 4 %), 248 (M<sup>+</sup>, 100%), 246 (M–1, 20%), 71 (M–177, 38%).

7.2.5.13. 5-Cloro-6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-tiol (**6-62**)

5-Cloro-6-(4-metilpiperazin-1-il)-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (**6-62**)

De 8.9 g (0.0370 mol) de 4-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (**6-54**) se obtuvieron 8.6 g (82.21%) de un sólido café claro que en ccf mostró una mancha principal con  $R_f$  0.57 Sistema III. El producto se purificó por recristalización de EtOH con carbón activado. Se obtuvieron 6.1 g (70.96%) de un sólido beige, pf 303.2–304.9 °C. IR (KBr)

cm<sup>-1</sup>: 3400 (NH), 3120 (C-H Ar.), 2946–2816 (C-H Alif.), 2650 (-SH débil) 1656 (C=N, C=C), 1468 (N=C-S), 1184 (C=S, C-N), 1002 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 2.42–2.48 (m, 4H, H-3' y H-5'); 2.87–2.92 (m, 4H, H-2' y H-6'); 6.84 (s, 1H, H-4); 7.13 (s, 1H, H-7); 12.51 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH, SH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 45.72 (N-CH<sub>3</sub>), 51.36 (C-3' y C-5'), 54.83 (C-2' y C-6'), 101.77 (C-4), 110.65 (C-7), 122.65 (C-6), 128.42 (C-7a), 131.93 (C-3a), 144.56 (C-5), 168.71 (C-2).

#### 7.2.6. Procedimiento de obtención de 1,2-diaminobencenos (*o*-fenilendiaminas)

Reducción catalítica (Método A): una mezcla del derivado de nitroanilina adecuadamente sustituido, 10% en peso de catalizador de Pd/C al 5% (para compuestos no clorados) o 30% en peso de Ni-Raney (para compuestos clorados) en EtOH, MeOH, AcOEt-MeOH (1:1 v/v) THF, o THF–EtOH se agitaron con cargas constantes de 60 lb de hidrógeno hasta que el consumo de hidrógeno cesó. El catalizador se retiró por filtración sobre celita y el filtrado se concentró a presión reducida dando la diamina correspondiente, la cual se utilizó de inmediato en la siguiente reacción, sin purificación.

Reducción química (Método B): una mezcla de la nitroanilina, SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (6 eq) y EtOH se agitaron bajo atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 70 °C por un periodo de 3 h. Consumida la materia prima la solución se llevó a pH= 9 con solución de NaOH al 50%. El disolvente se retiró a presión reducida, el residuo se lavó con AcOEt varias veces; la fase orgánica se lavó con agua salada, luego se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se eliminó con rotaevaporador.

##### 7.2.6.1. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (**4-4**)

Método B. A partir de 100 g (0.3177 mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**), se obtuvieron 89.6 g (99.05%) de producto crudo como un aceite espeso, el cual inmediatamente se sometió a la siguiente reacción. Una muestra analítica disuelta en EtOH anhidro se convirtió en el monoclórhidrato por tratamiento con HCl gas; se recristalizó de EtOH dando cristales amarillos con pf 195–197 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3461, 3345, 1629, 1493, 1227, 766. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 3.80 (sa, 4H, 2 -NH<sub>2</sub>); 6.50 (s, 1H, H-6); 6.89 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub>= 0.9 Hz, H-2'); 7.53 (s, 1H, H-3); 7.47 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub>= 7.8 Hz, H-3'); 7.50–7.61 (m, 2H, H-6', H-7'); 7.73 (d, 1H, *J*= 8.4 Hz, H-4'); 7.95–8.02 (m, 2H, H-5', H-8'). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 108.51 (C-6), 112.38 (C-4), 112.90 (C-2'), 119.10 (C-8'a), 121.12 (C-8'), 123.67 (C-3), 123.82 (C-4'), 125.39 (C-4'a), 126.13 (C-3'), 126.52 (C-6'), 126.93 (C-7'), 127.98 (C-5'), 134.59 (C-2), 137.96 (C-1),

150.16 (C-1'), 151.58 (C-5). EM (ID/IE)  $m/z$ : 286 (M+2, 35%); 284 (M<sup>+</sup>, 100%); 248 (M-36); 232 (248-16, 65%). EMAR: Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup>)  $m/z$ : 284.0716. Encontrado: 284.0716. Análisis Elemental: calculado para: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O HCl: C, 59.83; H, 4.39; N, 8.72. Encontrado: C, 59.80; H, 4.38; N, 8.67.

#### 7.2.6.2. 5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-N-metilbenceno-1,2-diamina (5-15)

Método A. Utilizando Ni-Raney como catalizador, EtOH-AcOEt como disolvente y calentamiento entre 35-40 °C; a partir de 12 g (0.03452 mol) de 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-N-metil-2-nitroanilina (5-14), se obtuvo un residuo color café oscuro que pesó 10.0 g (91.4%) y en ccf presentó una mancha principal,  $R_f$  0.35 Sistema I y una secundaria en proporción aproximada del 10%. El producto crudo, sin tratamiento posterior, se sometió a la siguiente reacción.

#### 7.2.6.3. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-N-metilbenceno-1,2-diamina (5-20)

Método A. Utilizando Ni-Raney como catalizador, EtOH-AcOEt como disolvente y calentamiento entre 35-40 °C; a partir de 10.5 g (0.0302 mol) de 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-N-metil-2-nitroanilina (5-19) se obtuvo un residuo color café oscuro que pesó 10 g (104%) y en ccf presentó una mancha principal. El producto crudo, sin tratamiento posterior, se sometió a la siguiente reacción.

#### 7.2.6.4. 3,4-Diaminobenzoato de metilo (6-28)

Método A. De 44 g (0.2243 mol) de 4-amino-3-nitrobenzoato de metilo (6-26), utilizando Pd/C al 5% como catalizador y AcOEt-MeOH como disolvente se obtuvo un sólido blanco que presentó una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.40 Sistema III. Una muestra de 2 g se recristalizó de agua dando cristales blancos muy finos,  $mp$  107.4-108.5 °C que se tornaron grisáceos rápidamente. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3435 y 3363 (-NH<sub>2</sub>), 3195 (C-H Ar.), 2941 (CH Alif.), 1692 (C=O), 1628, 1588, 1453 (C=C), 1295 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.69 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 4.65 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 5.28 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 6.48 (d, 1H,  $J$ = 8.1 Hz, H-5); 7.07 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.1 Hz,  $J_2$ = 2.10 Hz, H-6); 7.14 (d, 1H,  $J$ = 1.8 Hz, H-2). EM (IE, ID)  $m/z$ : 166 (M<sup>+</sup>, 100 %); 135 (M-31, 89%); 107 ([M-31]-28, 34%).

#### 7.2.6.5. 4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (6-29)

Método A. De 10.5 g (0.0455 mol) de 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6-27), utilizando Ni-Raney como catalizador y AcOEt-MeOH como disolvente, se obtuvieron 8.9 g (98%) de un sólido gris, una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.23 Sistema III. Una muestra de 2

g se recristalizó de etanol-agua dando 1.34 g (67%) de un sólido blanco brillante que se tornó de color gris al contacto con el aire,  $pf$  101.9–102.1 °C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3404, 3325 (-NH<sub>2</sub>), 3245-3000 (CH Ar.), 2952 (CH Alif.), 1716 (C=O), 1640, 1572, 1515, 1437 (C=C), 1208, 1118 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 3.70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 4.79 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 5.50 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 6.54 (s, 1H, H-3); 7.11 (s, 1H, H-6). EM (CG, IE)  $m/z$ : 202 (M+2, 33%); 200 (M<sup>+</sup>, 100%); 169 (M-31); 141 ([M-31] -28, 27%). EMAR: calculado para C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Cl: 200.0352, encontrado: 200.0352. Anal. Calc. para C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 47.89, H 4.52, N 13.96; encontrado: C 47.86, H 4.80, N 13.92.

#### 7.2.6.6. 4-(Piperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-47)

Método A. Por reducción catalítica con Pd/C al 10% y MeOH como disolvente; de 10 g (0.0452 mol) de 2-nitro-5-(piperidin-1-il)anilina (6-37) se obtuvieron 8.35 g (96.59%) de un líquido viscoso, el cual oscureció rápidamente; por ccf mostró una mancha con  $R_f$  0.55 Sistema I.

#### 7.2.6.7. 4-Cloro-5-(piperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-48)

Método B. A partir de 36 g (0.1407 mol) de 4-cloro-2-nitro-5-(piperidin-1-il)anilina (6-38) se obtuvieron 30 g (95%) de un líquido viscoso color café, que en ccf mostró un sola mancha con  $R_f$  de 0.35 Sistema V.

#### 7.2.6.8. 4-(4-Metilpiperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-49)

Método A. Utilizando Pd/C al 10% y EtOH como disolvente; de 6.5 g (0.0276 mol) de 5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-nitroanilina (6-39) se aislaron 5.36 g (94.6%) de un líquido viscoso con  $R_f$  0.48 Sistema II, el cual oscureció rápidamente.

#### 7.2.6.9. 4-Cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-50)

Método B. De 12 g (0.0446 mol) de 4-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-nitroanilina (6-40) se obtuvieron 9.5 g (88.85%) de un líquido viscoso color café que en ccf mostró un sola mancha con  $R_f$  de 0.45 Sistema II.

#### 7.2.6.10. 4-(4-Acetilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-51)

Método A. Empleando Ni-Raney como catalizador y THF como disolvente; de 10 g (0.0378 mol) de 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-45) se obtuvieron 8.79 g (99.25%) de un líquido viscoso que presentó un sola mancha con  $R_f$  de 0.19 Sistema II.

7.2.6.11. 4-(4-Acetilpiperazin-1-il)-5-clorobenceno-1,2-diamina (6-52)

Método A. Empleando Ni-Raney y THF-EtOH (60:40) como disolvente; de 3 g (0.0100 mol) de 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-4-cloro-2-nitroanilina (6-46) se obtuvieron 2.68 g (99.62%) de la diamina, la cual presentó una sola mancha con  $R_f$  de 0.30 Sistema III.

7.2.6.12. 4-(4-Metilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-53)

Método A. Empleando Pd/C al 5% y EtOH como disolvente; de 10 g (0.0423 mol) de 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-43) se aislaron 8.72 g en forma de clorhidrato cuando la diamina 6-53 se trató con HCl conc. (9:1 v/v) en forma de un sólido viscoso que oscureció rápidamente. El producto presentó una sola mancha con  $R_f$  0.25 Sistema II. El producto crudo tal cual se sometió a la siguiente reacción.

7.2.6.13. 4-Cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)benceno-1,2-diamina (6-54)

Método A. Empleando Ni-Raney y EtOH como disolvente; de 10 g (0.0370 mol) de 4-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-44) se obtuvieron 10.5 g de la diamina 6-54 en forma de líquido viscoso que oscureció rápidamente. Este producto presentó una sola mancha con  $R_f$  0.25 Sistema II. El producto crudo tal cual se sometió a la siguiente reacción.

### 7.3. Síntesis de precursores

7.3.1. Procedimiento general para la preparación de ésteres con sulfato de metilo

A una mezcla de DMF y agua (7:3 v/v) se adicionó el derivado ácido benzoico adecuadamente sustituido y  $\text{NaHCO}_3$  (2 eq); la suspensión se calentó a 50–60 °C, con agitación suave, por 20 min. Posteriormente, a la mezcla de reacción se adicionó lentamente  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  (1.5 eq.) y dejó en agitación a la misma temperatura por 2 h. Una vez consumida la materia prima, la mezcla se vertió en agua con hielo precipitando un sólido, éste se agitó por algunos minutos y después de colectó por filtración. Los productos se purificaron por recristalización.

7.3.1.1. 4-Acetamidobenzoato de metilo (6-20)

A partir de 100 g (0.5581 mol) de ácido 4-acetamidobenzoico (6-19) se obtuvieron 97.7 g (90.60%) de un sólido blanco, el cual mostró una sola mancha por ccf con  $R_f$  de 0.45 (Sistema IV). El producto se recristalizó de MeOH obteniéndose 83.88 g (77.79%) de agujas blancas con pf 128.0–129.3 °C. [Lit. 128.3–128.7 °C]. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3360 (NH),

2951 (CH Alif.), 1686 (C=O), 1597, 1524, 1443 (C=C, NHCO), 1252 (C-N), 1175 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$ : 2.11 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 7.72–7.77 (m, 2H, H-3, H-5), 7.90–7.95 (m, 2H, H-2, H-6), 9.44 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NHCOOCH<sub>3</sub>). EM (IE, ID)  $m/z$ : 193 (M<sup>+</sup>, 54%); 151 (M–42, 9%); 120 ([M–42]–31, 73, 100%); 43 (M–150).

### 7.3.1.2. 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (6-21)

De 42 g (0.2083 mol) de ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (6-18) se obtuvieron 43.7 g (97.31%) de un polvo blanco que en ccf presentó una sola mancha. El producto crudo se recristalizó de EtOH dando 37.14 g (85%) de cristales amarillos brillantes con pf 76–77 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3099 (C-H Ar.), 2965 (C-H Alif.), 1720 (C=O), 1528, 1356 (-NO<sub>2</sub>), 1297 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.99 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 7.98 (dd, 1H,  $J_1= 8.7$  Hz,  $J_2= 0.3$  Hz, H-6); 8.17 (dd, 1H,  $J_1= 8.7$  Hz,  $J_2= 2.1$  Hz, H-5); 8.32 (d, 1H,  $J_1= 2.1$  Hz, H-3). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 53.18 (O-CH<sub>3</sub>); 122.42 (C-5); 125.44 (C-3); 131.97 (C-6); 132.47 (C-2); 135.83 (C-1); 149.31 (C-4); 164.46 (C=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 217 (M+2, 35%); 215 (M<sup>+</sup>, 85%); 184 (M–31, 100%); 138 ([184–46], 65%).

### 7.3.2. Procedimiento general de obtención de anilinas

Una mezcla del derivado de nitrado adecuadamente sustituido y 30% en peso de Ni-Raney, en MeOH o EtOH se agitaron con cargas constantes de 60 lb de hidrógeno hasta consumirse la materia prima. El catalizador se retiró por filtración sobre celita y el filtrado se concentró a presión reducida dando la amina correspondiente.

#### 7.3.2.1. 3-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)anilina (5-10)

De 12 g (0.0377 mol) de 2-cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter se obtuvieron 10.35 g (95.21%) de un sólido blanco el cual se recristalizó de ciclohexano dando 8.5 g (78.19%) cristales blancos, una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.26 Sistema I. Datos espectroscópicos no disponibles.

#### 7.3.2.2. 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (6-22)

De 26 g de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (6-21) se obtuvieron después de recristalización con agua 20.3 g (91%) de cristales blancos, una sola mancha por ccf con  $R_f$  de 0.55 Sistema III, pf 107–107.5 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3427, 3337, (-NH<sub>2</sub>), 3222 (C-H Ar.), 2952 (C-H Alif.), 1703 (C=O), 1634–1431 (C=C), 1264, 1248 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O); 6.17 (as, 2H, Inter. con D<sub>2</sub>O, NH<sub>2</sub>); 6.49 (dd, 1H,  $J_1$



=8.7 Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, H-5); 6.62 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz, H-3); 7.62 (d, 1H,  $J = 8.7$ , H-6). RMN  $^{13}\text{C}$  (75.3 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: 51.42 (CH<sub>3</sub>O), 111.57 (C-5), 113.86 (C-1), 114.54 (C-3), 133.59 (C-6), 134.74 (C-2), 153.50 (C-4), 164.77 (C=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 187 (M+2, 17%); 185 (M+, 45%), 154 (M-31, 100%); 126 ([M-31]-28, 10%).

### 7.3.3. Procedimiento general de acetilación

El derivado de anilina, recién preparado, adecuadamente sustituido se adicionó lentamente y sin sobrepasar los 70 °C sobre anhídrido acético (1:6 p/v) con una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 30 min. La mezcla se reaccionó se vertió en agua con hielo, el precipitado formado se colectó por filtración y se lavó en múltiples ocasiones con agua hasta un pH neutro y se dejó secar.

#### 7.3.3.1. *N*-[3-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (**5-11**)

Partiendo de 10 g (0.0347 mol) de la 3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)anilina (**5-10**) se obtuvieron 11.20 g (97.63%) de un sólido blanco con  $R_f$  de 0.30 Sistema VI, el cual se recristalizó de tolueno dando 9.30 g (81%) de cristales blancos con pf 129–130 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3300 (NH), 3114-3184 (C-H Ar.), 2900 (C-H Alif.), 1668 (C=O), 1590, 1448 (C=C), 1254 (C-O-C), 928 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.19 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 6.48 (dd, 1H,  $J_1 = 9.0$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz, H-6'); 6.73 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz, H-5); 6.80–7.29 (m, 3H, H-4', H-5', H-6); 7.57 (d, 1H,  $J = 3.0$  Hz, H-2); 7.80 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). EM (CG-IE,  $R_t$  17.712 min.)  $m/z$ : 333 (M+4, 13%); 331 (M+2, 53%); 329 (M<sup>+</sup>, 55%); 291 ([M+4]-42, 30 %); 289 ([M+2]-42, 94%); 287 (M-42, 99%); 142 (M-187, 96%); 43 (M-286, 53%).

#### 7.3.3.2. *N*-[4-Cloro-5(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (**5-17**)

De 10 g (0.0299 mol.) de la 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (**5-1**) se obtuvieron 9.50 g (84.58 %) de un sólido amarillo que en ccf presentó una mancha con  $R_f$  0.63, Sistema III. El producto se recristalizó de EtOH absoluto, se obtuvieron 7.7 g (81%) de cristales amarillo con pf 158–159 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3322 (NH), 3109–3071 (C-H Ar.), 1708 (C=O), 1610, 1583, 1488 (C=C), 1570, 1367 (-NO<sub>2</sub>), 1267 (C-O-C), 991 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$ : 2.16 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 7.37 (dd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, H-6'), 7.57 (dd, 1H,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, H-5'); 7.63 (dd, 1H,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, H-4); 8.17 (s, 1H, H-3), 10.24 (s, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$ : 25.08 (-CH<sub>3</sub>), 109.45 (C-6), 117.62 (C-4), 121.96 (C-6'), 125.91 (C-2'), 128.72 (C-4'), 128.88 (C-3), 130.05 (C-5'), 133.37 (C-1), 134.94 (C-2), 136.39 (C-3'), 152.18 (C-1'), 158.27 (C-5), 169.97 (C=O). EM (ID, IE)  $m/z$ : 378 (M+4, 4 %); 376 (M+2, 10%); 374 (M<sup>+</sup>,

12%); 332 (M-42, 52 %); 328 (M-46, 90 %); 326 (M-48, 64 %); 291 (326-35, 58%); 256 (M-118, 100%).

#### 7.3.3.3. 4-(Acetilamino)-2-cloro-benzoato de metilo (6-23)

Utilizando AcOH como disolvente, de 44.76 g (0.2412mol) de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (6-22) se obtuvieron 53.26 g (97%) de un sólido blanco puro,  $R_f$  0.38 Sistema III. Una muestra se recrystalizó de tolueno dando 80% de rendimiento y cristales blancos con pf 113–114 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3295 (NH), 3260-3089 (C-H Ar.), 2951(C-H Alif.), 1730 (O-C=O), 1677(NHC=O), 1526, 1431 (C=C), 1249 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.07 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 3.81 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 7.53 (dd, 1H,  $J_1= 8.7$  Hz,  $J_2= 2.1$  Hz, H-5); 7.82 (d, 1H,  $J= 8.4$  Hz, H-6); 7.89 (d, 1H,  $J= 2.1$  Hz, H-3); 10.38 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 24.15 (CO-CH<sub>3</sub>), 52.18 (O-CH<sub>3</sub>), 116.83 (C-5); 119.96 (C-3), 122.92 (C-1), 132.43 (C-6), 133.14 (C-2), 143.33 (C-4), 164.70 (O-C=O), 169.23 (NHC=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 229 (M+2, 12%); 227 (M<sup>+</sup>, 43%), 196 (M-31, 21%), 185 (M-42, 75%), 154 ([M-42]-31, 100%).

#### 7.3.3.4. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-45)

Se empleó como disolvente una mezcla de DMF–Piridina (1:1 v/v) en proporción 1:10 p/v y sólo un equivalente de anhídrido acético, sin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De 11.4 g (0.0512 mol) de 2-nitro-5-(piperazin-1-il)anilina (6-41) se obtuvieron 11.5 g (84.84%) de un producto que en ccf presentó un sola mancha con  $R_f$  de 0.46 Sistema VIII. 2.0 g del producto crudo se recrystalizaron de una mezcla de EtOH–DMF (80:20 v/v) obteniendo 1.0 g (50%) de cristales amarillos con pf 214–215 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3455, 3296 (-NH<sub>2</sub>), 2990–2835 (C-H Alif.), 1637 (N-C=O), 1617 (C=C), 1567, 1377 (-NO<sub>2</sub>), 1243 (C-N). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.02 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 3.30–3.40 (m, 4H, H-2', y H-6'); 3.53–3.58 (m, 4H, H-3' y H-5'); 6.18 (d, 1H,  $J= 2.4$  Hz, H-6); 6.37 (dd, 1H,  $J_1= 9.9$  Hz,  $J_2= 2.7$  Hz, H-4); 7.29 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 7.81 (d, 1H,  $J= 9.9$  Hz, H-3). EM (IE, ID)  $m/z$ : 264 (M<sup>+</sup>, 95%); 221 (M-43, 30%); 192 (M-72, 100%); 179 (M-85, 50%); 56(38%); 43 (15%).

#### 7.3.3.5. 5-(4-Acetilpiperazin-1-il)-4-cloro-2-nitroanilina (6-46)

10g (0.0390 mol) de 4-cloro-2-nitro-5-(piperazin-1-il)anilina (6-42) se disolvieron en 600 mL de CH<sub>3</sub>CN–EtOH (3:1 v/v) a 50 °C. La solución fría se trató con un equivalente de anhídrido acético disuelto en piridina (2:1 v/v). Se obtuvieron 9.4 g (80.34%) de un sólido color naranja que en ccf mostró una mancha con  $R_f$  0.53 Sistema VI. 2 g del producto crudo se recrystalizaron de EtOH–DMF dando 1.5 g (75%) de agujas amarillas con pf

241.0–242.6 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3445, 3315 (-NH<sub>2</sub>), 2986–2835 (C-H Alif.), 1639 (N-C=O), 1619 (C=C), 1557, 1376 (-NO<sub>2</sub>), 1240 (C-N). 990 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.08 (t,  $J_1= 5.1$  Hz,  $J_2= 5.1$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-); 3.14 (t,  $J_1= 5.4$  Hz,  $J_2= 4.8$  , 2H, -CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-); 3.64 (t,  $J_1= 5.1$  Hz,  $J_2= 4.8$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-NCO-CH<sub>2</sub>-); 3.79 (t,  $J_1= 5.1$  Hz,  $J_2= 4.8$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-NCO-CH<sub>2</sub>-); 6.20 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.24 (s, 1H, H-6); 8.16 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 21.31 (CO-CH<sub>3</sub>), 40.68 (C-5'), 45.53 (C-3'), 50.11 (C-2' o C-6'), 50.50 (C-6' o C-2'), 107.84 (C-6), 113.78 (C-4), 125.29 (C-3), 126.90 (C-2), 146.60 (C-1), 154.63 (C-5), 168.57 (C=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 300 (M+2, 34%); 298 (M<sup>+</sup>, 100%); 281 (M-17, 10%), 255 (M-43, 40%); 252 (M-46, 20 %); 226 (M-72, 93%); 213 (M-85, 43%); 43. EMAR ESI  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 321.0730, experimental 321.0738.

#### 7.3.4. Procedimiento general de nitración utilizando mezcla sulfonítrica o anhídrido acético

La acetamida adecuadamente sustituida se disolvió en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado o anhídrido acético, sin que la temperatura excediera los 5°C. Una vez disuelta en su totalidad y a una temperatura entre 0–5°C se adicionó gota a gota y sin exceder la temperatura de trabajo HNO<sub>3</sub> frío (1.2 eq). Terminada la adición (aprox. 1 hora) la reacción se dejó en agitación por una hora más, consumida la materia prima la reacción se vertió en hielo picado. El sólido formado se colectó por filtración, éste se lavó repetidamente con agua hasta pH neutro, para finalmente dejarse secar.

##### 7.3.4.1. *N*-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (**5-12**)

Se utilizó anhídrido acético como disolvente. De 15 g (0.0454 mol) *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (**5-11**) se obtuvieron 14.32 g (83.98%) de un sólido amarillo que en ccf presentó dos manchas, la principal con  $R_f$  de 0.34 y una de  $R_f$  0.11, Sistema I. El sólido se recrystalizó de AcOEt dando 10.3 g (60.40%) de cristales con  $p_f$  de 169–170 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3340 (NH), 3130,3072 (C-H), 1680 (C=O), 1576, 1306 (-NO<sub>2</sub>), 1500, 1448 (C=C), 1254 (C-O-C); 998 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.31 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 6.78 (dd, 1H,  $J_1= 9.0$  Hz,  $J_2= 3.0$  Hz, H-6'); 7.33 (m, 2H, H-5' y H-4'); 7.61 (s, 1H, H-6); 8.90 (s, 1H, H-3); 12.8 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). EM (CG, IE,  $R_t$  17.519 min.)  $m/z$ : 376 (M+2, 2%); 374 (M<sup>+</sup>, 2%); 43 (M-331, 100%).

##### 7.3.4.2. 4-Acetamido-3-nitrobenzoato de metilo (**6-24**)

Siguiendo procedimiento general utilizando mezcla sulfonítrica, a partir de 20 g (0.1035 mol) de 4-acetamidobenzoato de metilo (**6-20**) se obtuvieron 22.2 g (90.05%) de un sólido

amarillo, el cual mostró una mancha principal con  $R_f$  de 0.54 Sistema I. El producto crudo se recrystalizó de MeOH dando un 16.2 g (73.0 %) de unos cristales amarillos en forma de agujas con pf de 128.8–129.6 °C. [Lit 129.4–130.0 °C]. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3352 (NH), 3314 (CH Ar.), 2961 (CH, Alif.), 1731 (O-C=O), 1719 (NHC=O), 1619, 1581, 1441 (C=C), 1509 y 13342 ( $\text{NO}_2$ ). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$ : 2.25 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ); 3.90 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 8.20 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=2.1$  Hz, H-6); 8.50 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz, H-5); 8.60 (d, 1H,  $J=1.87$  Hz, H-2); 10.22 (sa, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). EM (IE, ID)  $m/z$ : 238 ( $\text{M}^+$ , 26%); 207 ( $\text{M}-31$ , 10%), 196 ( $\text{M}-42$ , 100%), 165( $[\text{M}-42]-31$ , 93%); 43 ( $\text{M}-195$ , 28%).

#### 7.3.4.3. 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6-25)

Siguiendo procedimiento general utilizando mezcla sulfonítrica, de 30 g (0.1317 mol) de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (6-23) se obtuvieron 34.5 g (96%) de producto crudo que resultó ser una mancha principal por ccf,  $R_f$  0.72 Sistema III. El producto crudo se recrystalizó de metanol dando 25.31 g (70.5%) de cristales amarillos con pf 140–141 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3344 (NH), 1732 (O-C=O), 1716 (NHC=O), 1612, 1429 (C=C), 1567, 1336 ( $-\text{NO}_2$ ), 1231 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 2.13 (s, 3H,  $\text{CO}-\text{CH}_3$ ); 3.86 (s, 3H,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ); 8.02 (s, 1H, H-3); 8.41 (s, 1H, H-6); 10.54 (s, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 23.86 ( $\text{CO}-\text{CH}_3$ ), 52.86 ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ), 124.25 (C-1), 125.52 (C-3), 128.51 (C-6), 135.14 (C-4), 137.58 (C-5), 138.75 (C-2), 163.08 (O-C=O), 169.11 (HNC=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 274 ( $\text{M}+2$ , 5%); 272 ( $\text{M}^+$ , 15%), 241 ( $\text{M}-31$ , 10%), 230 ( $\text{M}-42$ , 100%), 199 ( $[\text{M}-42]-31$ , 85%).

#### 7.3.5. Procedimiento general de hidrólisis ácida de acetamidas utilizando $\text{H}_2\text{SO}_4$

El derivado acetamida correspondiente se disolvió en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (en la mínima cantidad necesaria) y se calentó a 75°C por 60 min. Cuando la ccf indicó el consumo de la materia prima, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo, el precipitado formado se aisló por filtración, se lavó en repetidas ocasiones con agua fría hasta pH neutro y se dejó secar.

##### 7.3.5.1. 5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (5-14)

Partiendo de 39 g (0.1001 mol) de la *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (5-13) se obtuvieron 31.3 g (89.96%) de un sólido color naranja, el cual se recrystalizó de benceno–etanol (25:75) dando 27.2 g (78.18%) de cristales brillantes de color naranja, una sola mancha por ccf,  $R_f$  0.46 Sistema I y un pf 148–149 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3390 (NH), 3078 (C-H Ar.), 2918 (C-H Alif.); 1566 y 1398 ( $-\text{NO}_2$ ), 1626, 1500, 1448

(C=C); 1256 y 1222 (C-O-C, C-N-C); 996 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.00 (d, 3H,  $J=6.0$  Hz, N- $\text{CH}_3$ , simplificó con  $\text{D}_2\text{O}$ ); 6.65 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=3.0$  Hz, H-6'); 6.90 (m, 3H, H-6, H-5' y H-4'); 7.80 (s, 1H, H-3); 7.92 (s, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). EM (CG, IE,  $R_t$  16.992 min.)  $m/z$ : 350 (M+4, 36%); 348 (M+2, 97%); 346 ( $\text{M}^+$ , 100%); 300 (M-46, 21%); 258 (M-88, 56%); 201 (M-145, 48%); 173 (201-28, 32%), 145 (M-201, 76%); 139 (155-16, 93%), 109 (139-30, 96%).

#### 7.3.5.2. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-N-metil-2-nitroanilina (5-19)

A partir de 15 g (0.0384) de *N*-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (5-18) se obtuvieron 12.25 g (91.55%) de un sólido que en ccf presentó una sola mancha con  $R_f$  0.66 Sistema I. El producto se recrystalizó de EtOH dando cristales finos de color anaranjado con pf 184–185 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3364 (NH), 3076 (C-H Ar.), 2954 (C-H Alif.), 1626, 1508 (C=C), 1566, 1444 ( $-\text{NO}_2$ ), 1234 (C-O-C, C-N-C), 908 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.83 (d, 3H,  $J=6.0$  Hz, simplifica con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH- $\text{CH}_3$ ); 6.12 (s, 1H, H-6), 7.09 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=3.0$  Hz, H-6'); 7.18–7.50 (m, 2H, H-5' y H-4'); 8.15 (s, 1H, H-3); 8.20 (sa, 1H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ , NH). EM (CG, IE,  $R_t$  17.299 min.)  $m/z$ : 350 (M+4, 31 %); 348 (M+2, 93 %); 346 ( $\text{M}^+$ , 100 %); 276 (M-70, 28%); 258 (M-88, 32 %); 183 (M-163, 43%).

#### 7.3.6. Procedimiento general de hidrólisis alcalina de acetamidas

A una suspensión que contenía al derivado acetamido correspondiente y MeOH (1:10 p/v) se adicionó a temperatura ambiente NaOH (1.5 eq) disuelta en agua. Después la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por una hora. El sólido que precipitó se colectó por filtración, se lavó con agua hasta pH neutro y se dejó secar.

#### 7.3.7. 4-Amino-3-nitrobenzoato de metilo (6-26)

De 25 g (0.1050 mol) de 4-acetamido-3-nitrobenzoato de metilo (6-24) se obtuvieron 19.14 g (93%) de producto crudo, el cual se recrystalizó de MeOH dando 18.5 g (96%) de cristales amarillos en forma de agujas, pf de 200.3–201.7 °C [Lit 197.0–202.0 °C],  $R_f$  0.42 Sistema VII. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3474 y 3341 ( $-\text{NH}_2$ ), 3189 (C-H Ar.), 2962 (CH Alif.), 1701 (C=O), 1632, 1565, 1438 (C=C), 1520 y 1356 ( $-\text{NO}_2$ ), 1133 (C-O-C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$ : 3.85 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ); 7.13 (dd, 1H,  $J_1=8.7$  Hz,  $J_2=0.3$  Hz, H-5); 7.56 (sa, 2H, inter. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $-\text{NH}_2$ ); 7.91 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=2.1$  Hz, H-6); 8.68 (d, 1H,  $J=2.1$  Hz, H-2). EM (IE, CG)  $m/z$ : 196 ( $\text{M}^+$ , 90%); 165 (M-31, 100%); 119 ([M-31]-46, 38%).

### 7.3.8. 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6-27)

Partiendo de 36.1 g (0.1324 mol) de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6-25**) se obtuvieron 29.5 g de producto crudo, el cual se purificó por recristalización de MeOH para dar 28.5 g (93.32%) de cristales amarillos con pf 222.3–223.0 °C y  $R_f$  de 0.64 Sistema III. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3452, 3345 (-NH<sub>2</sub>), 3120 (C-H Ar.), 2952 (C-H Alif.), 1712 (C=O), 1625, 1429 (C=C), 1549, 1326 (-NO<sub>2</sub>), 1286, 1248 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.78 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 7.11 (s, 1H, H-3), 7.99 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>), 8.54 (s, 1H, H-6). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 52.20 (O-CH<sub>3</sub>), 114.25 (C-1), 120.22 (C-3), 128.53 (C-5), 131.01 (C-6), 139.06 (C-2), 147.97 (C-4), 163.22 (C=O). EM (IE, CG)  $m/z$ : 232 (M+2, 22%); 230 (M<sup>+</sup>, 60%), 199 (M-31, 100%), 153 ([M-31] -46, 30%). EMAR: calculado para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl: 230.60, encontrado 230.00. Anal. Calc. para C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 41.67, H 3.06, N 12.15; encontrado: C 41.58, H 3.11, N 12.04.

### 7.3.9. Procedimiento general de hidrólisis alcalina de ésteres

A una suspensión del éster correspondiente y agua se adicionó NaOH (3 eq) disuelta en agua, la solución formada se calentó a 75–80°C por 30 min. Pasado este tiempo la reacción se enfrió a ~10°C y se aciduló con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% hasta un pH 3–4. El sólido formado se aisló por filtración, se lavó con agua y se dejó secar.

#### 7.3.9.1. Ácido 2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (6-34)

A partir de 25.7 g (0.1156 mol) de 2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**6-32**) se obtuvieron 22.69 g (93.85%) de un producto que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.11 Sistema IX. Una muestra de 5 g de producto crudo se recristalizó de EtOH-H<sub>2</sub>O y carbón activado dando 3.5 g (70%) de cristales blancos con pf 139–140.5 °C IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3475 (NH), 3125–2600 (OH, C-H Ar., C-H Alif.), 1685 (C=O), 1619, 1482 (C=N, C=C), 1297(C=N-S), 1226 (C-O-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.70 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 7.50 (sa, 1H, resolvió con D<sub>2</sub>O a d,  $J$ = 8.4 Hz, H-7); 7.75 (d, 1H, resolvió con D<sub>2</sub>O a dd,  $J_1$ = 8.7 Hz,  $J_2$ = 1.5 Hz, H-6); 7.980 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH); 8.034 (sa, 1H, H-4); 12.850 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, OH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.77 (S-CH<sub>3</sub>); 110.03, 111.76 (C-7); 116.69, 118.71 (C-4); 123.01, 123.78 (C-5); 123.01, 123.78 (C-6); 135.35, 139.01 (3a), 143.39, 147.08 (7a); 153.83, 154.99 (C-2), 167.90 (C=O). EM (IE, ID)  $m/z$ : 208 (M<sup>+</sup>, 100%), 207 (M-1, 37%); 193 (M-15, 8%); 175 (M-33, 75%); 163 (M-45, 13%). EMAR: calculado para C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S: 208.0306, encontrado 208.0306.

### 7.3.9.2. Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-35)

De 19.7 g (0.0767 mol) del éster 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (6-33) se obtuvieron 18.5 g (99.4%) de producto crudo, los cuales se recrystalizaron de EtOH con carbón activado dando 14.2 g (76.75 %) de un sólido blanco cristalino muy fino. De las aguas madres se recuperaron 2.0 g (10.7%). El producto presentó una sola mancha en ccf,  $R_f$  0.24 VII+1 gota de AcOH, pf 242.0–242.8 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3500–3000 (NH, OH), 1686 (C=O), 1624, 1559, 1412 (C=N, C=N-S, C=C), 1397, 1386. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 2.67 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>); 4.66 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH, OH); 7.39 (s, 1H, H-7); 7.63 (s, 1H, H-4). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 13.76 (S-CH<sub>3</sub>), 114.12 (C-7), 114.76 (C-4), 123.78 (3a), 131.27 (C-5), 137.63 (C-7a), 141.09 (C-6), 154.01 (C-2), 169.41 (C=O). EM (EI, CG)  $m/z$ : 244 (M+2, 40%); 242 (M<sup>+</sup>, 100%), 209 (M–33, 78%) EMAR: calculado para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>ClS: 241.9916; encontrado: 256.17.

### 7.3.10. Procedimiento general de N-metilación de acetamidas

Una mezcla de la acetamida correspondiente y (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 eq) en benceno anhidro se calentó con agitación vigorosa a 35°C. A esta temperatura se adicionó por goteo lento una solución de NaOH al 50% (1 eq), evitando que la temperatura no sobrepasará los 35°C. Terminada la reacción ésta se vertió en agua fría, la fase orgánica se separó y lavó con agua, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se retiró a presión reducida.

#### 7.3.10.1 N-[5-Cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-N-metilacetamida (5-13)

A partir de 10 g (0.0266 mol) de N-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (5-12) se obtuvieron 7.85 g (75.74%) de un sólido amarillo-naranja que en ccf presentó una sola mancha,  $R_f$  0.13 Sistema I. El producto crudo se recrystalizó de tolueno–MeOH dando 5.41 g (52.20%) de cristales color naranja, pf 130–131 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3032 (C-H Ar.), 2934 (C-H Alif.) 1680 (C=O), 1534, 1344 (-NO<sub>2</sub>), 1568, 1486, 1450 (C=C), 972 (C-Cl). RMN  $^1\text{H}$  (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.78 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 2.15 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 3.12 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 3.31 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6.82–7.41 (m, 3H, H-4', H-5' y H-6'), 7.30 (s, 1H, H-6); 7.43 (s, 1H, H-3). EM (CG, IE,  $R_t$  17.432 min.)  $m/z$ : 345 (M–43, 2%); 43 (M–345, 100%).

#### 7.3.10.2. N-[4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]-N-metilacetamida (5-18)

De 10 g (0.0266 mol) de N-[4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (5-17) se obtuvieron 9.25 (89.19%) g de un sólido amarillo que en ccf mostró una sola mancha de  $R_f$  0.21 Sistema III el cual se recrystalizó de EtOH dando 8.70 g (94%) de cristales

amarillo-naranja con  $pf$  179–180 °C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3103–3028 (C-H Ar.), 2936 (C-H Alif.), 1672 (C=O), 1600, 1521, 1448 (C=C), 1565 y 1337 (-NO<sub>2</sub>), 1247 (C-O-C), 915 (C-C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, Duplicidad de señales)  $\delta$ : 1.68 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 2.06 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 2.94 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 3.27 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 7.11 (s, 1H, H-6); 7.26 (dd, 1H,  $J_1=8.4$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-6'); 7.33 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-6'); 7.39 (s, 1H, H-6); 7.45 (dd, 1H,  $J_1=8.4$ ,  $J_2=8.1$ , H-5'); 7.46 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=8.1$  Hz, H-5'); 7.59 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=1.2$  Hz, H-4'); 7.61 (dd, 1H,  $J_1=8.1$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-4'); 8.31 (s, 1H, H-3); 8.50 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, Duplicidad de señales)  $\delta$ : 22.49 (CO-CH<sub>3</sub>); 22.66 (CO-CH<sub>3</sub>); 36.54 (N-CH<sub>3</sub>), 118.34 (C-2'), 120.53 (C-6'), 121.02 (C-4'), 121.91 (C-2'), 123.63 (C-2'), 124.22 (C-4), 124.47 (C-4), 127.71 (C-6), 128.12 (C-6), 128.39 (C-3), 128.80 (C-3), 130.20 (C-5'), 133.98 (C-3'), 134.05 (C-3'), 138.40 (C-1), 138.59 (C-1), 142.27 (C-2), 142.76 (C-2), 151.70 (C-1'), 151.95 (C-1'), 155.91 (C-5), 156.43 (C-5), 169.32 (C=O), 171.24 (C=O). EM (ID, IE, con descomposición)  $m/z$ : 358 (M-30, 4 %); 342 ([M-30]-16, o M-46 96 %); 340 (M-48, 96 %); 305 (340-35, 54 %); 270 (M-118, 305-35, 100%).

#### 7.4. Método general para las reacciones de sustitución nucleofílica aromática

##### 7.4.1. Utilizando fenoles como nucleófilo

Calentamiento convencional: una suspensión de DMF que contenía al sustrato 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) o 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (**5-8**), el fenol correspondiente (1.1 eq) y carbonato de potasio (1.5 eq), se calentó a 115 °C por 3-3.5 hrs. Terminada la reacción se enfrió a temperatura ambiente, el disolvente se retiró por presión reducida y el sólido se lavó por lavados de DMF, metanol o agua. Los sólidos se aislaron por filtración y por ccf mostraron ser un solo producto, por lo que se utilizaron para las reacciones posteriores. Muestras analíticas de los productos aislados se purificaron por recristalización.

Calentamiento por microondas: una suspensión de DMF o acetonitrilo que contenía al sustrato 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) o 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (**5-8**), el fenol correspondiente (1.1 eq) y carbonato de potasio (1.5 eq), se calentó a 140-150°C y 300 W de potencia por 10-15 min. Terminada la reacción se enfrió a temperatura ambiente, el disolvente se retiró por presión reducida. Los sólidos se aislaron por filtración y por ccf mostraron ser un solo producto, por lo que se utilizaron para las reacciones posteriores. Muestras analíticas de los productos aislados se purificaron por recristalización.



**7.4.1.1. 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (4-3a)**

Por calentamiento convencional, de 100 g (0.4831 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**), se obtuvieron 108.0 g (71%) de un producto prácticamente puro, el cual presentó una mancha principal por ccf con  $R_f$  de 0.56 Sistema II. Una muestra analítica se recrystalizó de tolueno–EtOH dando 98% de cristales amarillo-naranja con pf 145–146 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3462, 3347, 1628, 1560, 1387, 1320, 1225. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 6.22 (s, 1H, H-6); 7.37 (dd, 1H,  $J_1=7.5$  Hz,  $J_2=1.0$  Hz, H-2'); 7.44 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>); 7.55–7.64 (m, 3H, H-3, H-6', H-7'); 7.79 (dd, 1H,  $J_1=8.0$  Hz,  $J_2=2.4$  Hz, H-5'); 7.93 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz, H-4'); 8.05 (dd, 1H,  $J_1=7.2$  Hz,  $J_2=1.8$  Hz, H-8'); 8.18 (s, 1H, H-3). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 103.59 (C-6), 109.54 (C-4), 117.14 (C-2'), 120.73 (C-5'), 125.69 (C-8'a), 125.79 (C-4'a), 129.99 (C-4'), 126.26 (C-6'), 127.06 (C-3'), 127.12 (C-3), 127.15 (C-7'), 128.26 (C-8'), 134.77 (C-2), 146.91 (C-1), 149.14 (C-1'), 159.04 (C-5). EM (ID/IE)  $m/z$ : 316 (M+2, 34%), 314 (M<sup>+</sup>, 100%), 279 (M–35, 72%), 233 (M–46, 93%). EMAR: Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3$  (M<sup>+</sup>)  $m/z$ : 314.0458. Encontrado: 314.0458. Análisis Elemental: calculado para:  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3$ : C, 61.06; H, 3.52; N, 8.90. Encontrado: C, 61.18; H, 3.58; N, 8.62. El producto obtenido por calentamiento con microondas presentó constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas semejantes.

**7.4.1.2. N-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (4-3b)**

Por calentamiento convencional, a partir de 15.20 g (0.061 mol) de N-(4,5-dicloro-2-nitrofenil)acetamida, en DMF se calentaron a 80–90 °C por 2.5 h. El producto se lavó con agua y recrystalizó de MeOH. Se obtuvieron 19.02 g (87.4%) de cristales amarillos,  $R_f$  0.58, sistema VI, pf 176.2–177.0 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3334, 3126–3053, 1720, 1579, 1335, 1267. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.74 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>); 7.23 (dd, 1H,  $J_1=7.5$  Hz,  $J_2=5.1$ ); 7.46–7.56 (m, 3H, H-2', H-6' y H-7'), 7.80 (d, 1H,  $J=8.1$  Hz, H-4); 7.91 (d, 2H,  $J=8.1$  Hz, H-5' y H-8'); 8.25 (s, 1H, H-6); 8.44 (s, 1H, H-3); 10.43 (sa, inter. con D<sub>2</sub>O, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 25.47 (-CH<sub>3</sub>), 108.17 (C-2' y C-6), 116.74 (C-4'), 116.74 (C-4), 117.74 (C-4), 121.16 (C-8'), 125.61 (C-8'a), 126.26 (C-7' y C-6'), 126.76 (C-5'), 126.92 (C-3'), 127.96 (C-3), 128.20 (C-1), 135.15 (C-4'a), 135.74 (C-2), 149.65 (C-1'), 160.21 (C-5), 168.85 (C=O). EM (ID/IE)  $m/z$ : 358 (M+2, 34%); 356 (M<sup>+</sup>, 100%); 321, 310 (M–46, 40%); 279 (321–43, 65%); 278 (313–35, 35%); 233 (278–46, 55%); 43 (M–313, 15%).

### 7.4.1.3. 2-Cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (5-9)

A partir de 20 g (0.1042 mol) de 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (**5-8**), se obtuvieron 18.56 g (55.99%) de un producto que en ccf presentó una sola mancha con  $R_f$  de 0.50 Sistema I. El producto se recrystalizó de tolueno dando 14.80 g (44.59%) de cristales amarillo naranja con pf 117.5–118.0 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3000–3100 (C-H Ar.), 1570–1448 (C=C); 1516, 1344 (-NO<sub>2</sub>), 1282 (C-O-C), 926 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> / CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.97 (d, 1H,  $J$ = 9.0 Hz, H-6'); 7.18–7.40 (m, 2H, H-4 y H-5); 7.50 (dd, 1H,  $J_1$ = 9.0 Hz,  $J_2$ = 3.0 Hz, H-6); 8.10 (dd, 1H,  $J_1$ = 9.0 Hz,  $J_2$ = 3Hz, H-5'); 8.31 (d, 1H,  $J$ = 3.0 Hz, H-3'). EM (CG, IE,  $R_t$  14.226 min.)  $m/z$ : 321 (M+4, 30%); 319 (M+2, 87%); 317 (M<sup>+</sup>, 88%); 238 ([M+2]–81, 70%); 236 (M–81, 100%); 172 ([M–81]–63, 43%).

### 7.4.1.4. 4-Cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitroanilina (5-1)

De 10 g (0.04830 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) se obtuvieron 15.7 g (97.48%) de un sólido que en ccf presentó una mancha principal con  $R_f$  de 0.55 Sistema III. El producto crudo se recrystalizó de tolueno–etanol dando 13 g (82.8 %) de un sólido amarillo naranja, pf 144–145 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3465 y 3344 (-NH<sub>2</sub>), 3174–3039 (C-H Ar.), 1632, 1469, 1446 (C=C), 1559, 1423 (-NO<sub>2</sub>), 1241 (C-O-C), 911 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 5.93 (s, 1H, H-6), 6.13 (sa, 2H, inter. con de D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 7.09 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.1 Hz,  $J_2$ = 1.5 Hz, H-6'); 7.29 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.4 Hz,  $J_2$ = 8.1 Hz, H-5'), 7.42 (dd, 1H,  $J_1$ = 8.1Hz,  $J_2$ = 1.5 Hz, H-4'); 8.26 (s, 1H, H-3). EM (CG, IE)  $m/z$ : 336 (M+4, 30 %); 334 (M+2, 93 %), 332 (M<sup>+</sup>, 94 %); 262 (M–70, 100 %); 251 (M–81, 50 %).

### 7.4.2. Utilizando aminas como nucleófilo

Calentamiento convencional: una mezcla de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) o 5-cloro-2-nitroanilina (**6-36**) y 3–4 eq de la amina correspondiente se calentaron a 120–140 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante por un tiempo de 2–5 h. Terminada la reacción se adicionó agua con hielo, se agitó hasta la formación de un sólido el cual fue colectado por filtración. La ccf indicó que un solo producto en todos los casos. Una parte de los productos obtenidos fue recrystalizada para su caracterización.

Calentamiento por microondas: una mezcla de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) y 2.5 eq de la amina se calentaron a 140–150 °C en el horno de microondas Synthos 3000 utilizando una potencia de irradiación de 600 W por 5–30 min, en el rotor 64MG5. Terminada la reacción las mezclas de reacción se vertieron en agua helada y los sólidos obtenidos se colectaron por filtración.

7.4.2.1. 2-Nitro-5-piperidin-1-ilanilina (**6-37**)

Se realizó por el método de calentamiento convencional. De 15 g (0.0869 mol) de 5-cloro-2-nitroanilina (**6-36**) y 4 eq de piperidina se obtuvieron 19.0 g (98.0%) de un sólido color naranja oscuro, que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.63 Sistema III. El producto se recristalizó de metanol dando 16.6 g (87.36%) de agujas anaranjadas, pf 105.5–105.8°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3462 y 3338 (-NH<sub>2</sub>), 2936–2854 (C-H Alif.), 1618 (C=C), 1558 y 1320 (-NO<sub>2</sub>), 1240 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.62 (sa, 6H, H-3', 4' y 5'); 3.30 (sa, 4H, H-2' y 6'); 5.58 (d, 1H,  $J$ = 3.0 Hz H-6); 6.10 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 6.18 (dd, 1H,  $J_1$ = 9.0 Hz,  $J_2$ = 3.0 Hz, H-4); 7.86 (d, 1H,  $J$ = 9.0 Hz, H-3). EM (EI, CG)  $m/z$ : 221 (M<sup>+</sup>, 91%); 220 (M-1, 100%); 191 (M-30, 27%); 175 (M-46, 14%).

7.4.2.2. 4-Cloro-2-nitro-5-piperidin-1-ilanilina (**6-38**)

Método de calentamiento convencional. De 30 g (0.1449 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) y 4 eq de piperidina se obtuvieron 36.1 g (97.42 %) de un sólido color naranja oscuro que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.37 Sistema I. Una pequeña porción se recristalizó de metanol dando 38% de agujas anaranjadas, pf 101–101.5 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3472 y 34242 (-NH<sub>2</sub>), 2926–2802 (C-H Alif.), 1630 y 1560 (C=C), 1560 y 1376 (-NO<sub>2</sub>), 1224 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.57–1.77 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 3.06–3.09 (m, 4H, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>); 6.12 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.18 (s, 1H, H-6); 8.11 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 24.15, 25.91, 52.23, 106.78, 116.67, 128.17, 145.17, 146.98, 157.01. EMAR ESI  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 278.0672, experimental 278.0679.

Método de calentamiento con microondas. 2.5 eq. de piperidina, 5 min de reacción. Rendimiento 82%. Constantes espectroscópicas y espectrométricas semejantes al producto obtenido por el método convencional

7.4.2.3. 5-(4-Metilpiperidin-1-il)-2-nitroanilina (**6-39**)

Método de calentamiento convencional. De 5 g (0.0289 mol) de 5-cloro-2-nitroanilina (**6-36**) y 4 eq de 4-metilpiperidina se obtuvieron 6.6 g (96.9%) de un sólido color naranja oscuro que en ccf mostró una sola mancha,  $R_f$  0.37 Sistema I. El producto se recristalizó de metanol dando 6.0 g (90.9%) de cristales en forma de agujas de color naranja con pf de 98.8–99.2 °C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3460 y 3334 (-NH<sub>2</sub>), 2912 (C-H Alif.), 1616 (C=C), 1558 y 1332 (-NO<sub>2</sub>), 1224 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.94 (d, 3H,  $J$ = 5.0 Hz, CH<sub>3</sub>-CH), 1.00–1.87 (m, 5H, H-3, 4' y 5'); 2.81 (dd, 2H,  $J_1$ = 12.0 Hz,  $J_2$ = 4.0 Hz, H-2' y H-6') 3.80 (dd, 2H,  $J_1$ = 12.0 Hz,  $J_2$ = 4.0 Hz, H-6' y H2'), 5.86 (d, 1H,  $J$ = 3.0 Hz, H-6); 6.10 (sa, 2H,

inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 6.22 (dd, 1H,  $J_1=9.0$  Hz,  $J_2=3.0$  Hz, H-4); 7.90 (d, 1H,  $J=9.0$  Hz, H-3). EM (EI, CG)  $m/z$ : 235 (M<sup>+</sup>, 61 %), 234 (M-1, 70%), 41 (M-194, 100%).

#### 7.4.2.4. 4-Cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-nitroanilina (6-40)

Método de calentamiento convencional. De 24.1 g (0.1164 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4-2a) y 4 eq de 4-metilpiperidina se obtuvieron 31.1 g (95.9%) de un sólido amarillo que en ccf mostró una sola mancha con  $R_f$  de 0.42 Sistema I. Recristalizado de metanol dio 6.20 g (20%) de agujas amarillas con pf de 111–112 °C. Por adición de agua se recuperaron 20.5 g (65.91%) de cristales amarillos de igual  $R_f$  y pf. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3470 y 3346 (-NH<sub>2</sub>), 2948-2806 (C-H Alif.), 1622 y 1460 (C=C), 1558 y 1380 (-NO<sub>2</sub>), 1216 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.99 (d,  $J=6.3$  Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1.33–1.75 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-); 2.61–2.69 y 3.51–3.55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>); 6.15 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.20 (s, 1H, H-6); 8.09 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 21.91, 30.67, 34.14, 51.51, 106.81, 116.58, 128.12, 145.20, 156.79. EMAR ESI  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 292.0829, experimental 292.0837.

Método de calentamiento con microondas. 2.5 eq de 4-metilpiperidina, 5 min. Rendimiento 90%. Constantes espectroscópicas y espectrométricas semejantes al producto obtenido por el método convencional

#### 7.4.2.5. 2-Nitro-5-(piperazin-1-il)anilina (6-41)

Método de calentamiento convencional. De 20 g (0.1150 mol) de 5-cloro-2-nitroanilina (6-36) se obtuvieron 20.58 g (80.52%) de un sólido color naranja. El producto crudo se recristalizó con una mezcla de EtOH-H<sub>2</sub>O (60:40) dando 11.4 g, de las aguas madres se recuperaron 4.3 g por lo que en total se obtuvieron 15.7g (61.43%) de cristales amarillo naranja con pf 232–235 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3449, 3312, 3271 (-NH<sub>2</sub>, NH), 3121 (C-H Ar.), 2944–2844 (C-H Alif.), 1623 (C=C), 1567, 1373 (-NO<sub>2</sub>), 1230 (C-N). RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.95 (dd, 4H,  $J_1=5.1$  Hz,  $J_2=4.8$  Hz, H-3' y H-5'); 3.36 (dd, 4H,  $J_1=5.2$  Hz,  $J_2=4.8$  Hz, H-2' y H-6'); 3.70–4.70 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH); 6.23 (d, 1H,  $J=2.7$  Hz, H-6); 6.38 (dd, 1H,  $J_1=9.6$  Hz,  $J_2=3.0$  Hz, H-4); 7.29 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 7.81 (d, 1H,  $J=9.6$  Hz, H-3). EM (IE, ID)  $m/z$ : 222 (M<sup>+</sup>, 95%); 180 (M-42, 100%); 134 (180-46, 59%).

## 7.4.2.6. 4-Cloro-2-nitro-5-(piperazin-1-il)anilina (6-42)

Método de calentamiento convencional. De 20.7 g (0.01 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) y 3.5 eq de piperazina, 10 min de reacción se obtuvieron 35.0 g (136%) de un sólido naranja. El producto crudo se recristalizó con una mezcla de EtOH–H<sub>2</sub>O (60:40) obteniendo 18.3 g (71.37%) de cristales amarillo naranja con pf 197–198 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3289 (ba, NH), 2990-2480 (C-H Alif.), 1638 (C=C, C=N), 1564, 1365 (-NO<sub>2</sub>), 1295 (C-N), 990 (C-Cl). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.80–2.82 (m, 4H, H-3' y H-5'); 2.93–2.94 (m, 4H, H-2' y H-6'); 3.30 (sa, 1H, inter. con D<sub>2</sub>O, NH); 6.52 (s, 1H, H-6); 7.49 (s, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 7.89 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 45.41 (C-3' y C-5'), 51.73 (C-2' y C-6'), 107.32 (C-6), 113.93 (C-4), 124.94 (C-2), 126.83 (C-3), 146.70 (C-1), 155.54 (C-5). EM (FAB<sup>+</sup>, ID) *m/z*: 257 (M+1, 55%).

## 7.4.2.7. 5-(4-Metilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-43)

Método de calentamiento convencional. De 15 g (0.0869 mol) de 5-cloro-2-nitroanilina (**6-36**) y 4 eq de 1-metilpiperazina se obtuvieron 14.6 g (71.09%) de un sólido amarillo que en ccf mostró una sola mancha con *R<sub>f</sub>* de 0.37 Sistema II. Recristalizado de MeOH–H<sub>2</sub>O dio 13 g (89%) de agujas amarillas con pf 151-152 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3440-3270 (-NH<sub>2</sub>), 3151 (C-H Ar.), 2942-2813 (C-H Alif.), 1618 (C=C), 1567, 1319 (-NO<sub>2</sub>), 1245 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (90 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.30 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 2.48 (t, 4H, H-3' y H-5'); 3.29 (t, 4H, H-2' y H-6') 5.89 (d, 1H, *J*= 3.0 Hz, H-6); 6.19 (sa, 2H, inter. con D<sub>2</sub>O, -NH<sub>2</sub>); 6.24 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub>= 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub>= 3.0 Hz, H-4); 7.95 (d, 1H, *J*= 9.0 Hz, H-3). EM (EI, CG) *m/z*: 237 (M+1, 22 %); 236 (M<sup>+</sup>, 100%); 235 (M–1, 20%); 165 (M–71, 29%); 71 (M–165, 43%); 70 (M–166, 40%); 43 (M–193, 40%); 42 (194, 18%).

## 7.4.2.8. 4-Cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-nitroanilina (6-44)

Método de calentamiento convencional. De 10 g (0.0483 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (**4-2a**) se obtuvieron 12.0 g (91.81%) de un sólido amarillo que en ccf mostró una sola mancha con *R<sub>f</sub>* de 0.32 Sistema II. Recristalizado de EtOH–H<sub>2</sub>O dio 10 g (83%) de agujas amarillas con pf de 199.1–200.0 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3431–3274 (-NH<sub>2</sub>), 3141 (C-H Ar.), 2977-2741 (C-H Alif.), 1626, 1610, 1473 (C=C), 1559, 1370 (-NO<sub>2</sub>), 1255 (C-N). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.59 (t, *J*<sub>1</sub>= 4.8 Hz, *J*<sub>2</sub>= 4.5 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>-); 3.17 (t, *J*<sub>1</sub>= 4.2 Hz, *J*<sub>2</sub>= 4.2 Hz, 4H, -CH<sub>2</sub>NMeCH<sub>2</sub>-); 6.16 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.22 (s, 1H, H-6); 8.12 (s, 1H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 46.17, 50.70, 54.90, 107.06, 116.35, 126.92, 128.31, 145.07, 155.85. EM (IE, CG) *m/z*: 272 (M+2, 32%,); 270 (M+, 100%); 235

(M-35, 72%); 199 (M-71, 32%); 71 (M-199, 43%); 70 (M-200, 42%), 43 (M-227, 43%). EMAR ESI  $m/z$ :  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{11}H_{16}N_4O_2^+$ : 271.0962, experimental 271.0970.

Método de calentamiento por microondas. 2.5 eq de 4-metipiperina, 10 min de reacción. Rendimiento 93%. Constantes espectroscópicas y espectrométricas semejantes al producto obtenido por el método convencional

## 7.5. Parte biológica

### 7.5.1. Prueba de susceptibilidad *in vitro* para protozoarios

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivo, previamente estandarizado. De forma breve, el procedimiento es el siguiente. Se incubaron  $4 \times 10^6$  trofozoítos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes del compuesto a evaluar (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500  $\mu\text{g/mL}$ ), utilizando como compuestos de referencia albendazol, nitazoxanida y metronidazol; para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármaco empleando DMSO.

Se inocularon 50  $\mu\text{L}$  de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos y se incubaron por 48 h más. El número final de trofozoítos se determinó en un hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit se calculó la Concentración Inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), que correspondió a la concentración que inhibió el crecimiento del 50 % de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron dos veces por triplicado.

### 7.5.2. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*

Para este ensayo se empleó el método de cuantificación de NADH, el cual es un método indirecto que determina la actividad residual de la enzima después de la exposición a un determinado compuesto. Se incubó la triosafosfato isomerasa a una concentración de 5 mg/mL en 1 mL de **Medio 1**, el cual ya contenía al compuesto a evaluar, por dos horas a 36 °C. Para el control negativo se empleó la TIM en medio libre de inhibidores. Después de la incubación se tomó una muestra de 1 mL de la solución anterior y se adicionó a 1 mL del medio de reacción para ensayo de actividad, **Medio 2<sup>b</sup>**. En la celda de reacción a 340 nm en un espectrofotómetro marca Hewlett-Packard equipado con termostato a 25 °C se siguió la desaparición de NADH. Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con el control.

<sup>a</sup>Medio 1. Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, compuesto, pH= 7.4.

<sup>b</sup>Medio 2. Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, gliceraldehído-3-fosfato 1mM, 0.9 unidades de  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa, pH= 7.5.

### 7.5.3. Ensayo general para la determinación de la actividad in vitro en *Trichinella spiralis*

Para los ensayos,  $1 \times 10^3$  larvas musculares de *T. spiralis* (obtenidas por el método de Dennis *et al.*) se incubaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, en la presencia de concentraciones crecientes (3.77, 0.377, 0.0377, 0.00377 y 0.000377  $\mu$ M) de los compuestos a evaluar (**5-5**, **5-6**, **6-1–6-8** y albendazol como control positivo). Los parásitos se incubaron a 37°C con 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub> por 3 días, cambiando el medio y el compuesto evaluado cada día. ABZ se incluyó como control positivo y DMSO como control negativo. Después del tiempo de incubación la viabilidad de los parásitos se determinó por un método colorimétrico usando MTT, previamente reportado por Towson *et al.* (1988) con algunas modificaciones. El porcentaje de viabilidad fue referido con el control negativo.

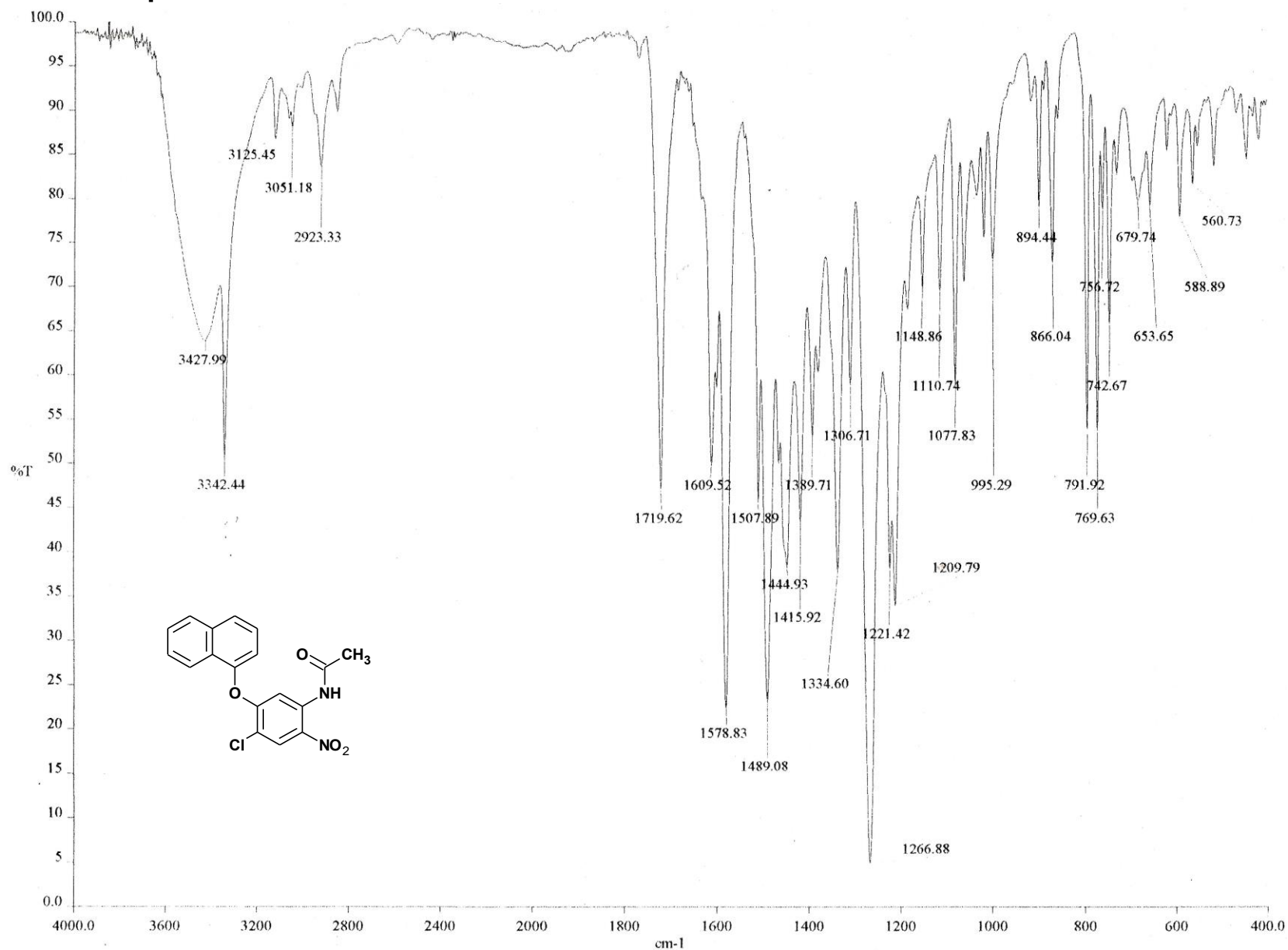
### 7.5.4. Ensayo general para la determinación de la actividad in vitro en *Taenia crassiceps*

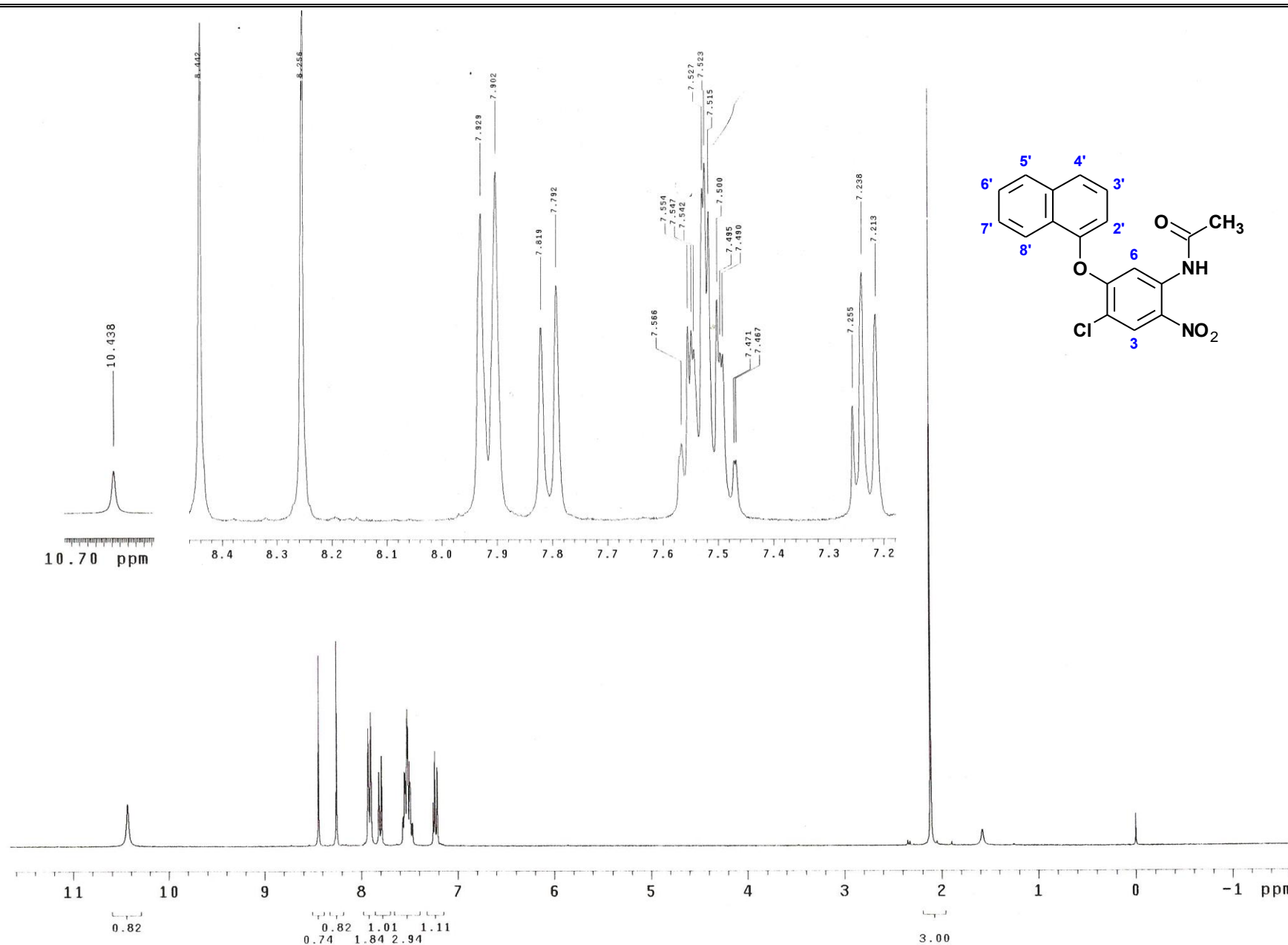
Los cisticercos se obtuvieron de ratones BALB/c de dos meses de edad infectados experimentalmente. Después de tres meses, los ratones se sacrificaron y los cisticercos se removieron de la cavidad peritoneal. Los parásitos se lavaron con solución salina 0.9% estéril y solo los cisticercos con la superficie de la vejiga intacta fueron usados para los ensayos. Las soluciones stock de cada compuesto se prepararon en DMSO y se diluyeron con el medio de cultivo hasta obtener concentraciones de 0.28 y 1.7  $\mu$ M. Un medio que contenía 0.25% de DMSO se utilizó como control. Cada ensayo conteniendo 25 cisticercos en 5 mL de medio, éstos se incubaron por 11 días a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Los parásitos se observaron cada día por 11 días y la mortalidad de los parásitos fue registrada. El criterio de mortalidad consideró la pérdida de la vesícula, parálisis de la membrana y el colapso del parásito. La mortalidad se confirmó en el día 11 del ensayo por la prueba de exclusión de Azul Tripano. Cada experimento se realizó por triplicado.

## **Apéndice 1. Espectros**

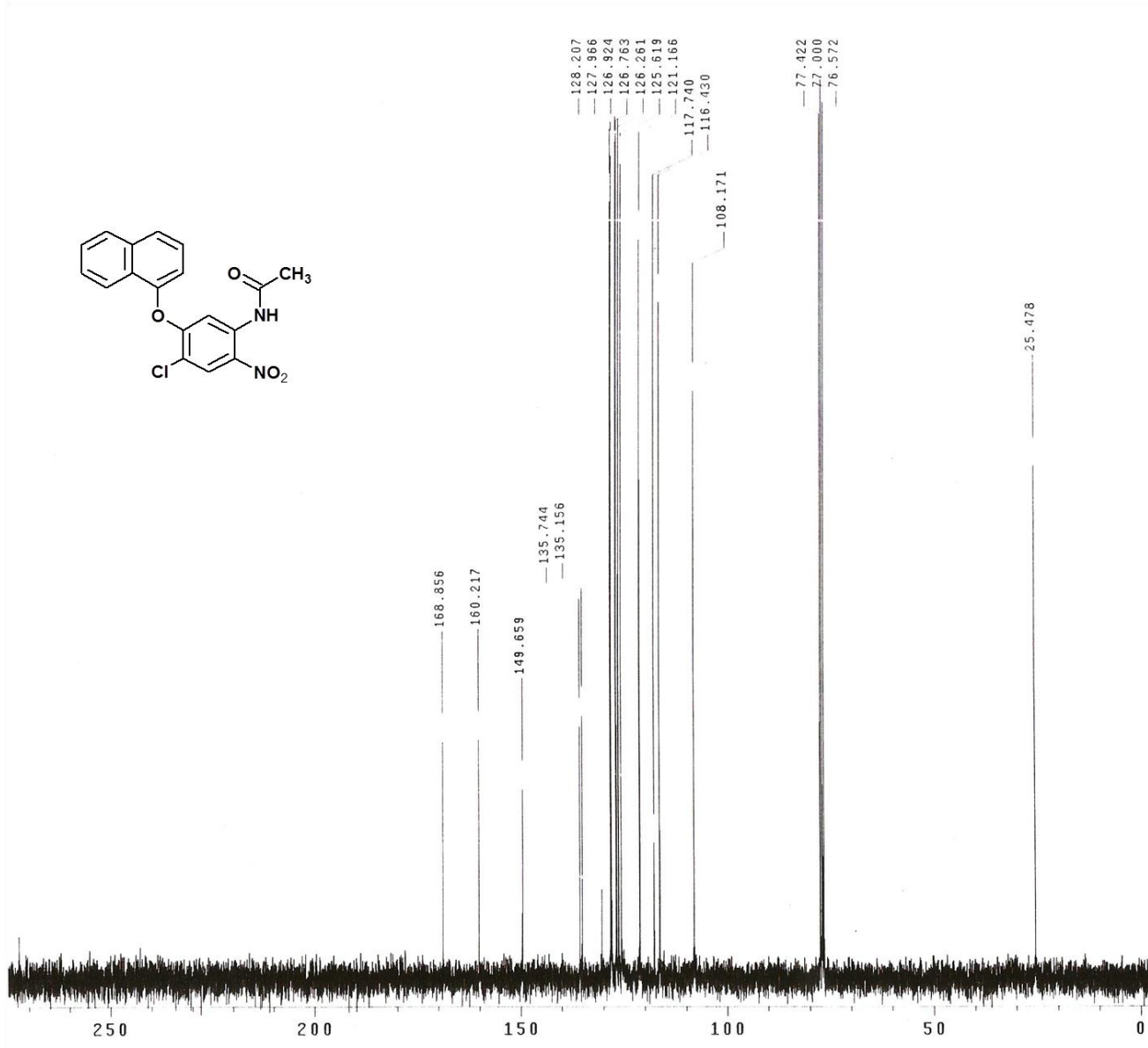


## Apéndice 1. Espectros

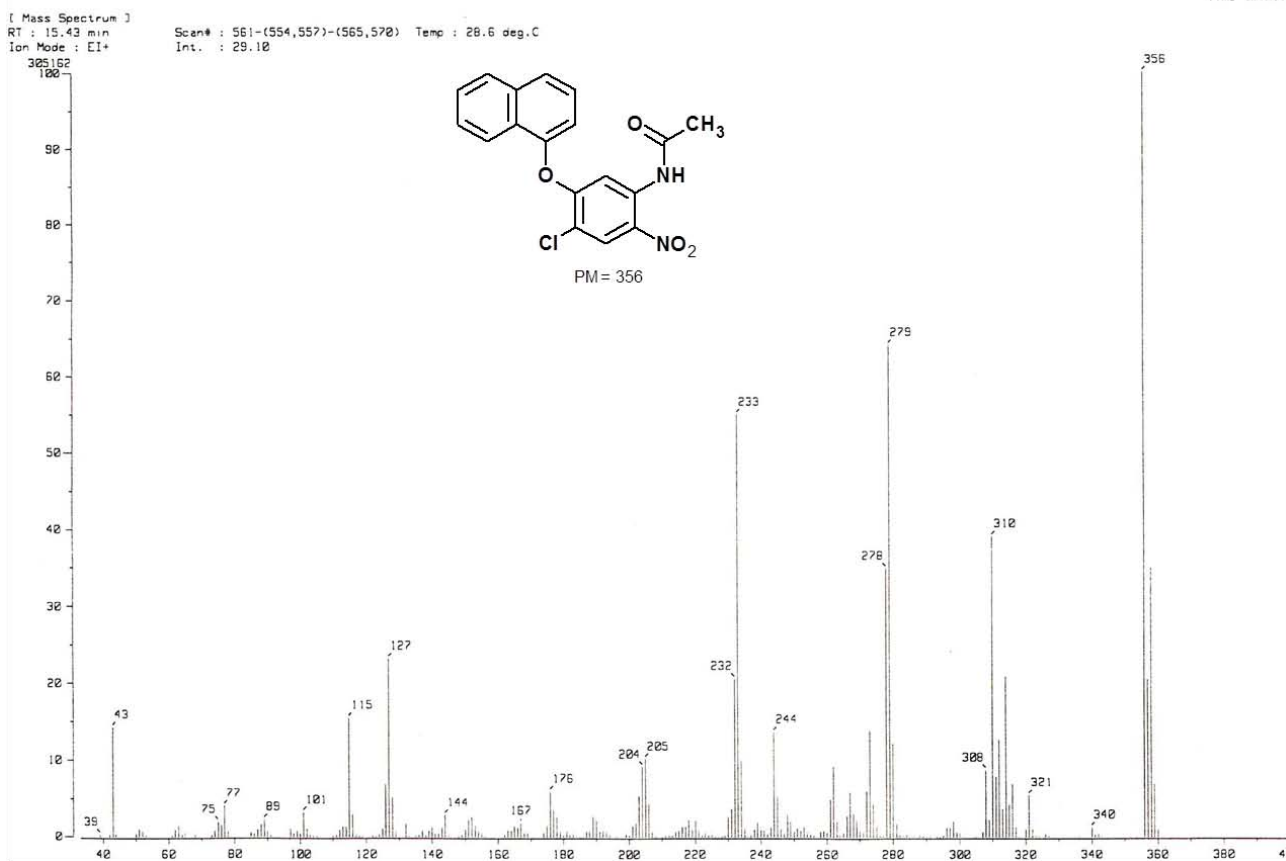
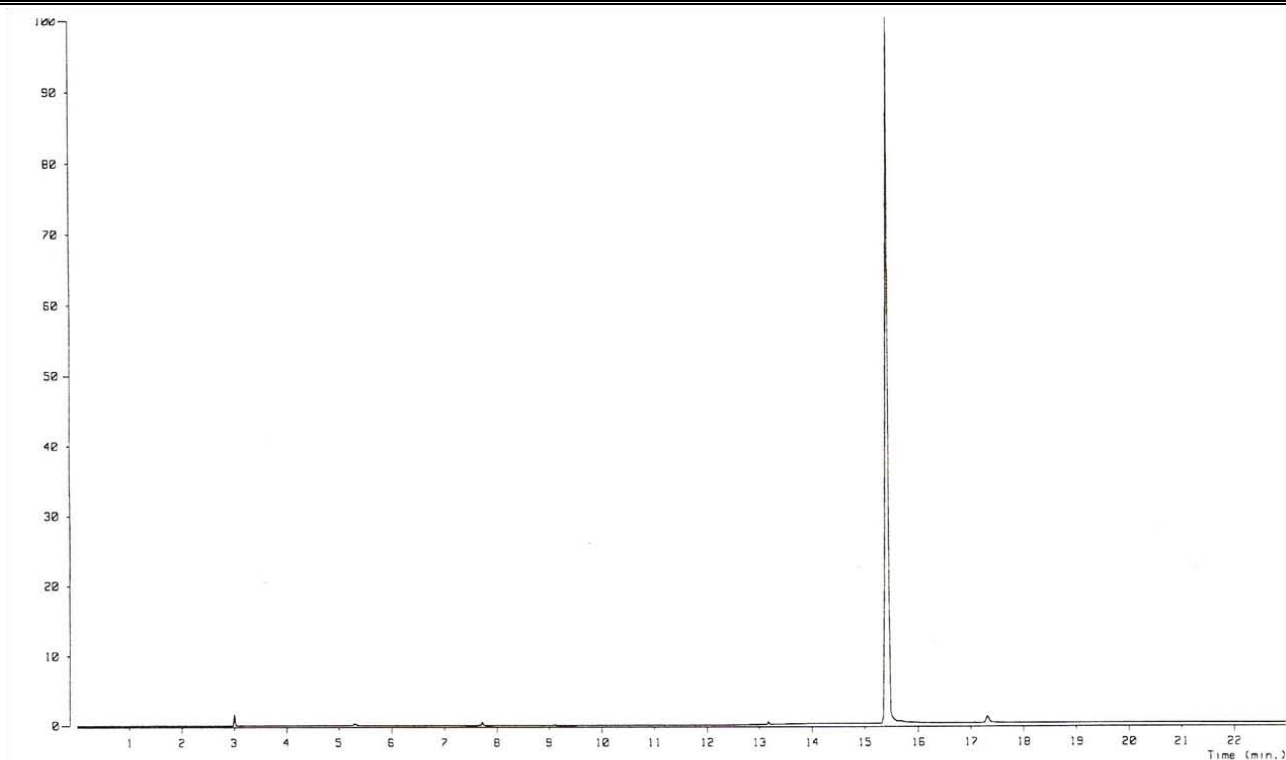
Espectro 1. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (4-3b).



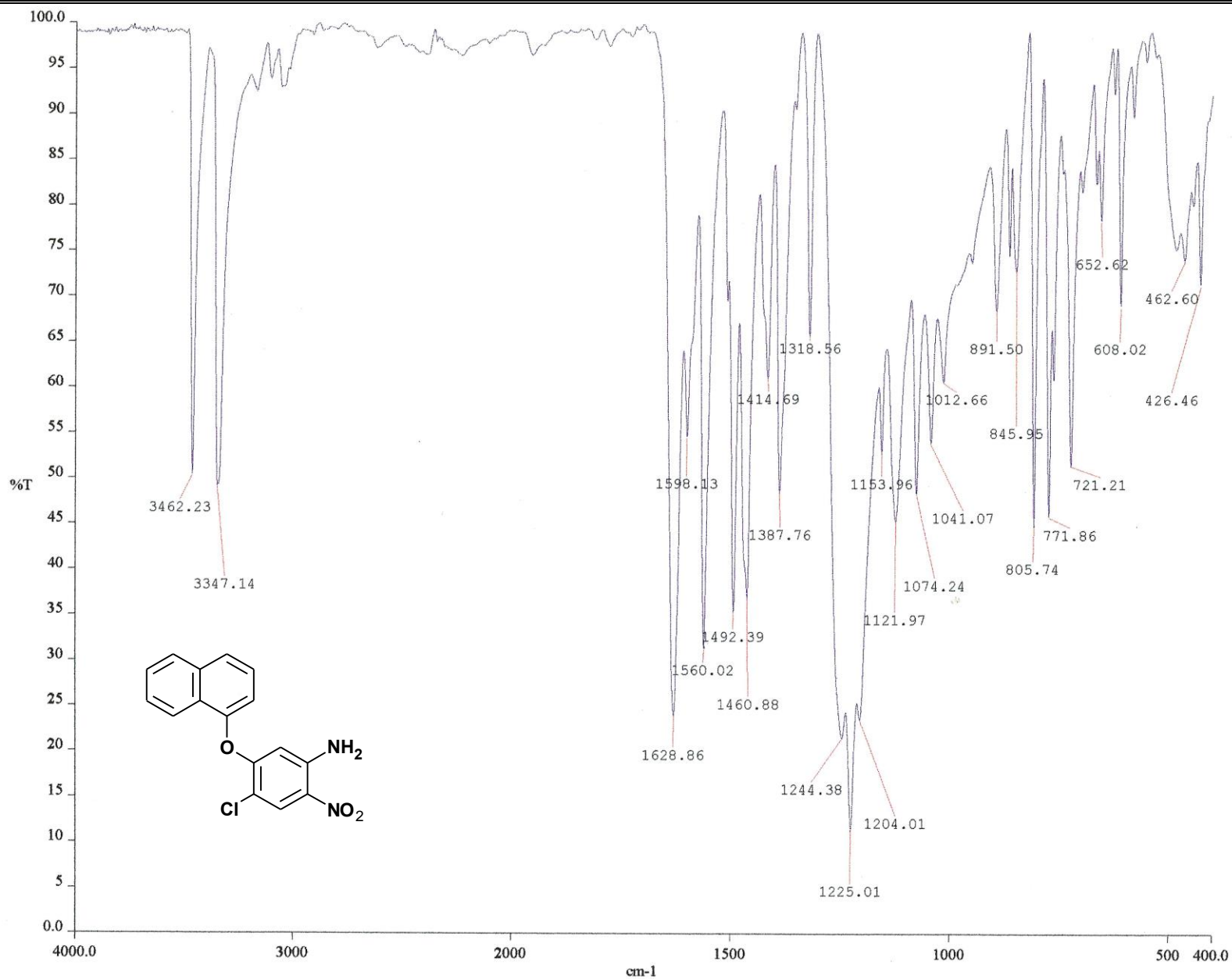
**Espectro 2.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (4-3b).



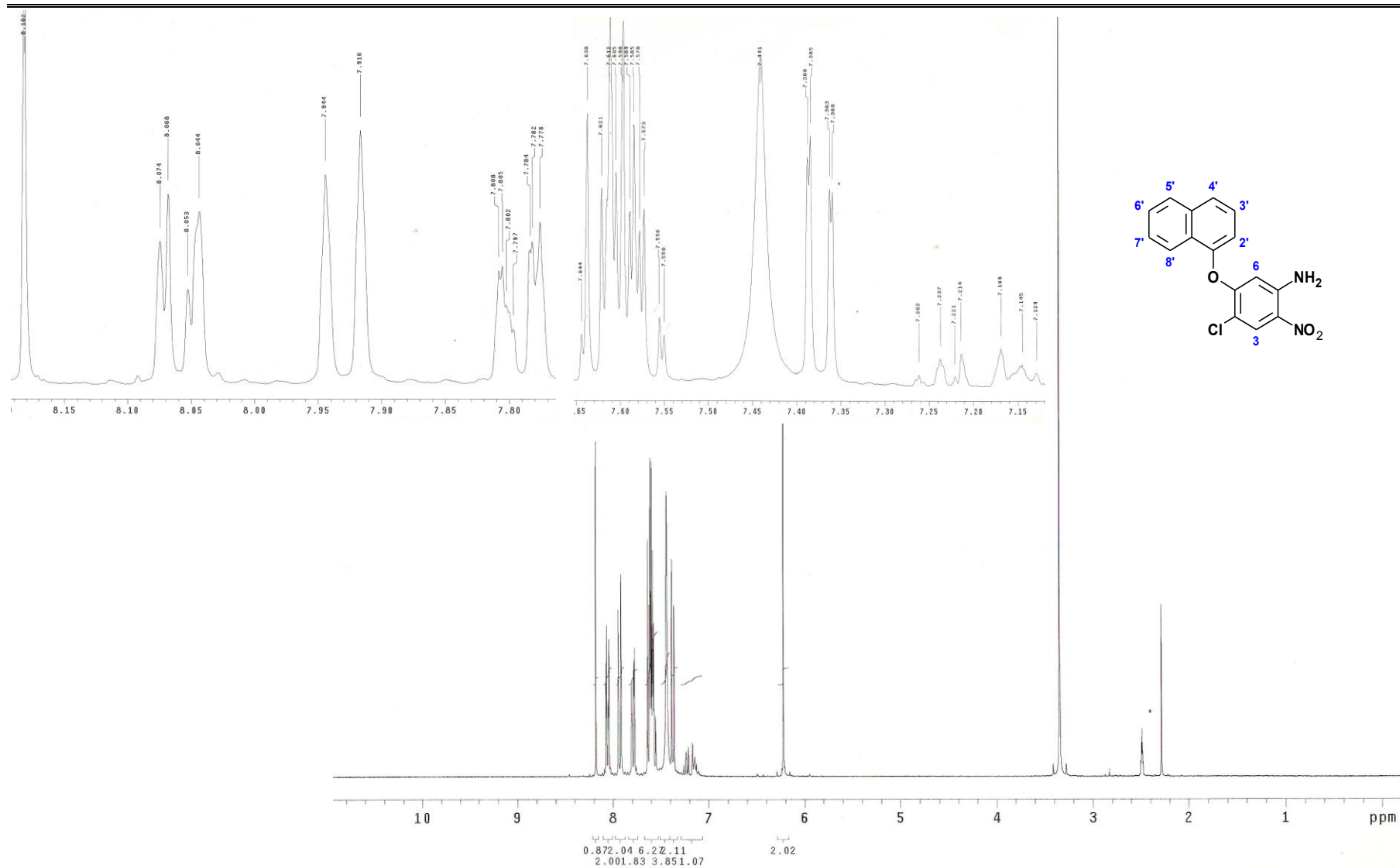
**Espectro 3.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (**4-3b**).



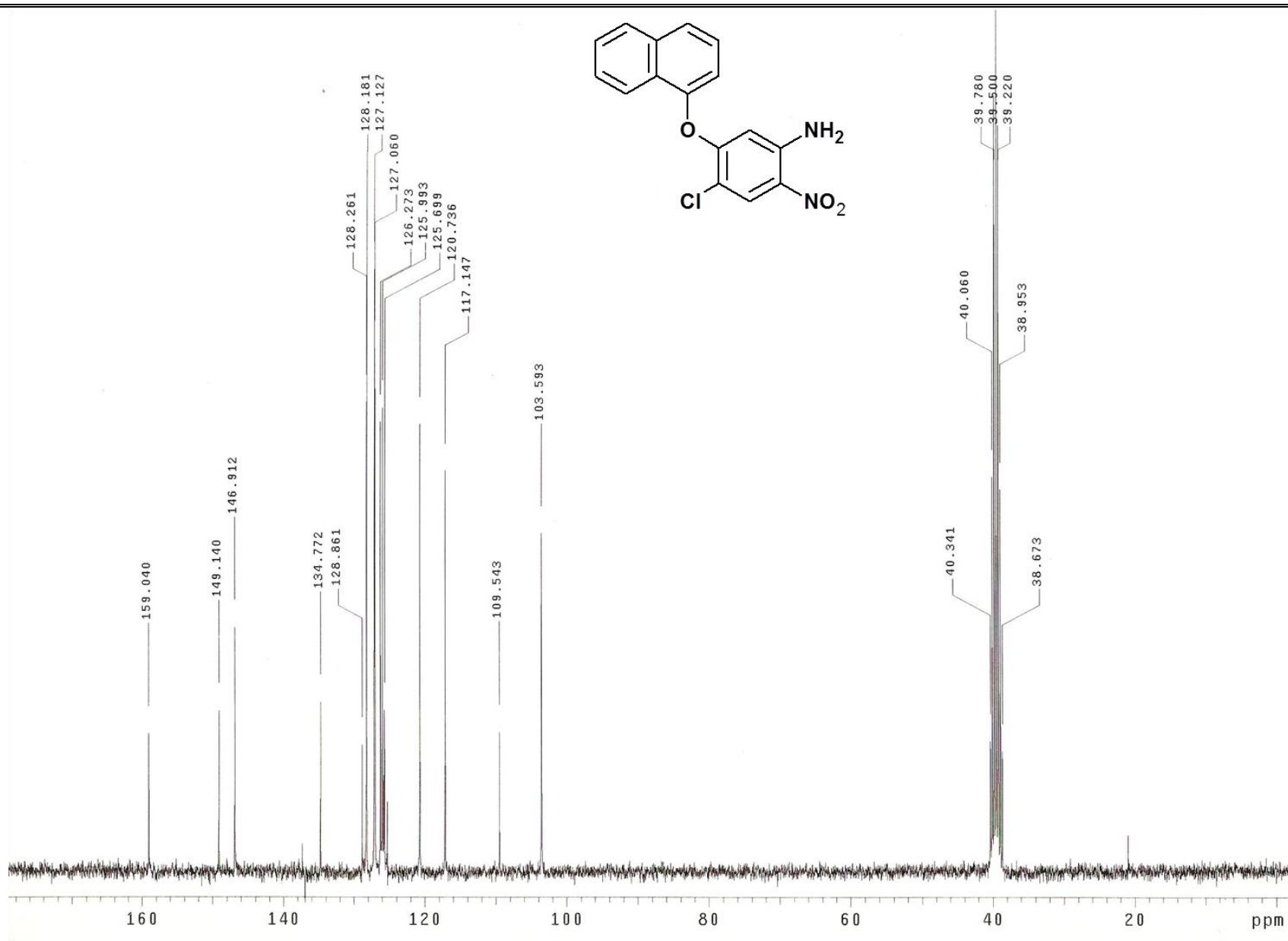
**Espectro 4.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto *N*-[4-cloro-5-(naftiloxi)-2-nitrofenil]acetamida (**4-b**).



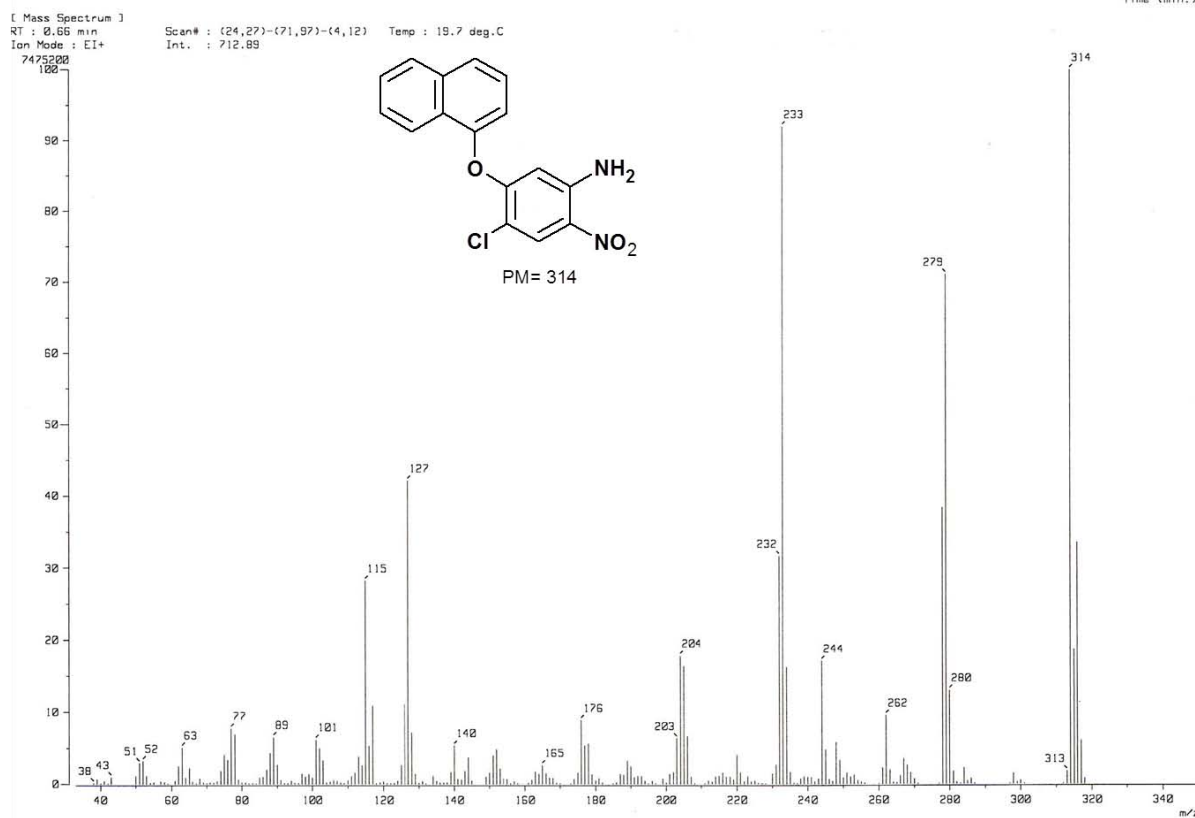
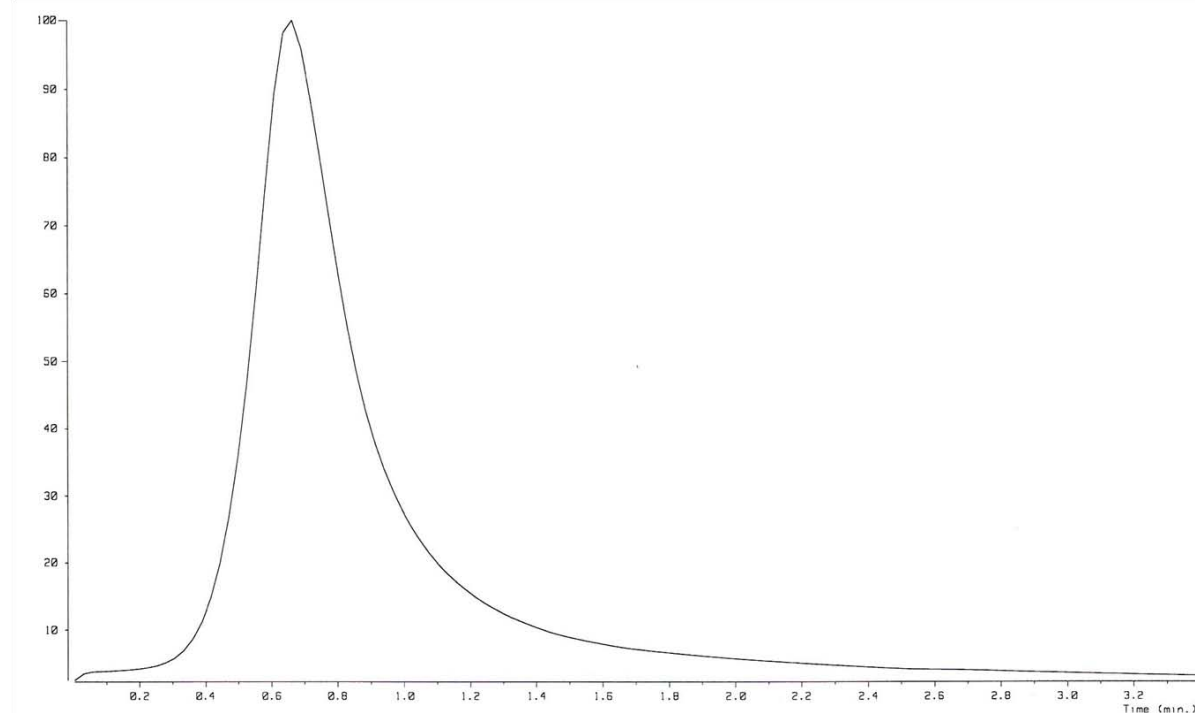
**Espectro 5.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**).



**Espectro 6.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**).

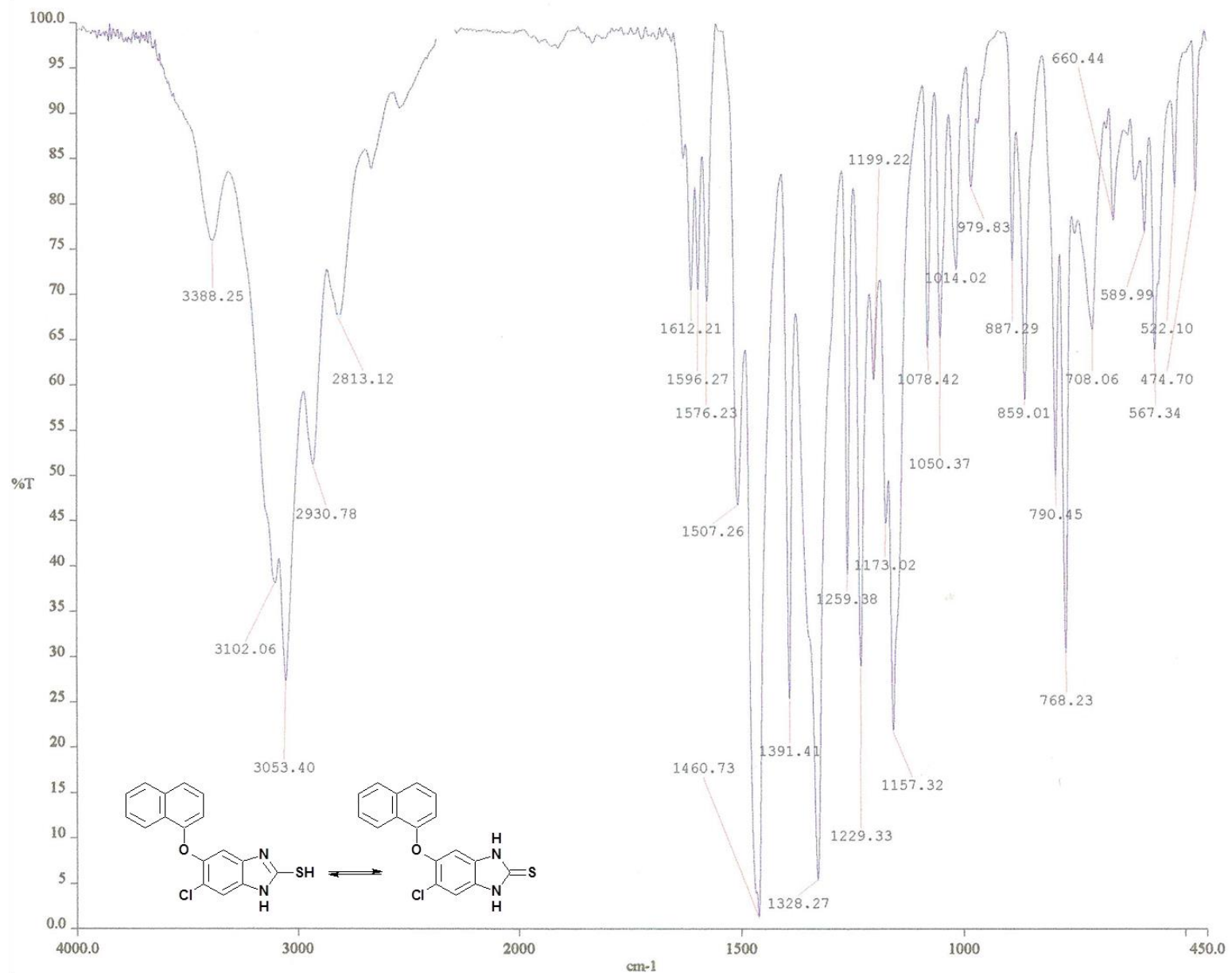


Espectro 7. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (4-3a).

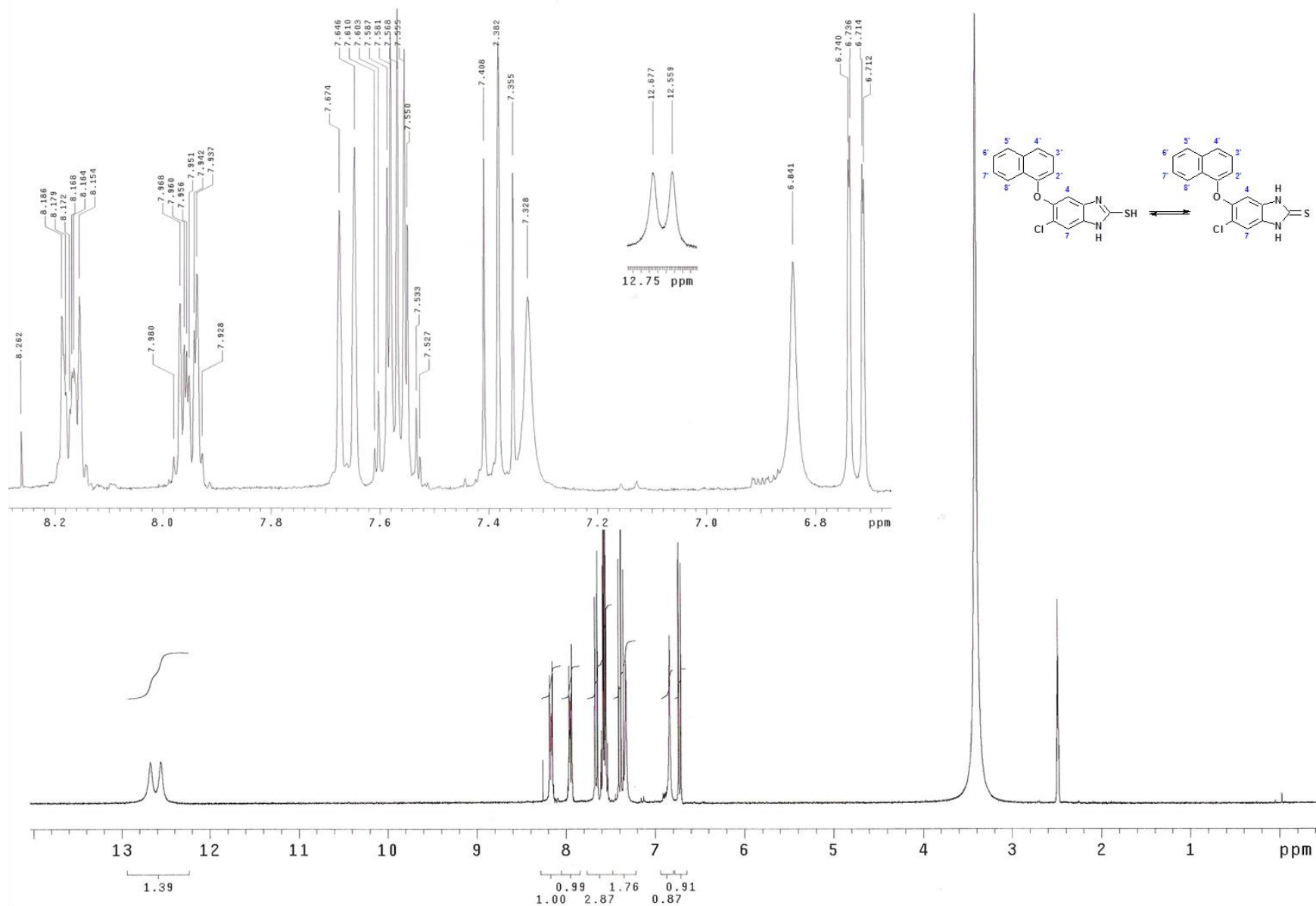


**Espectro 8.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (**4-3a**).

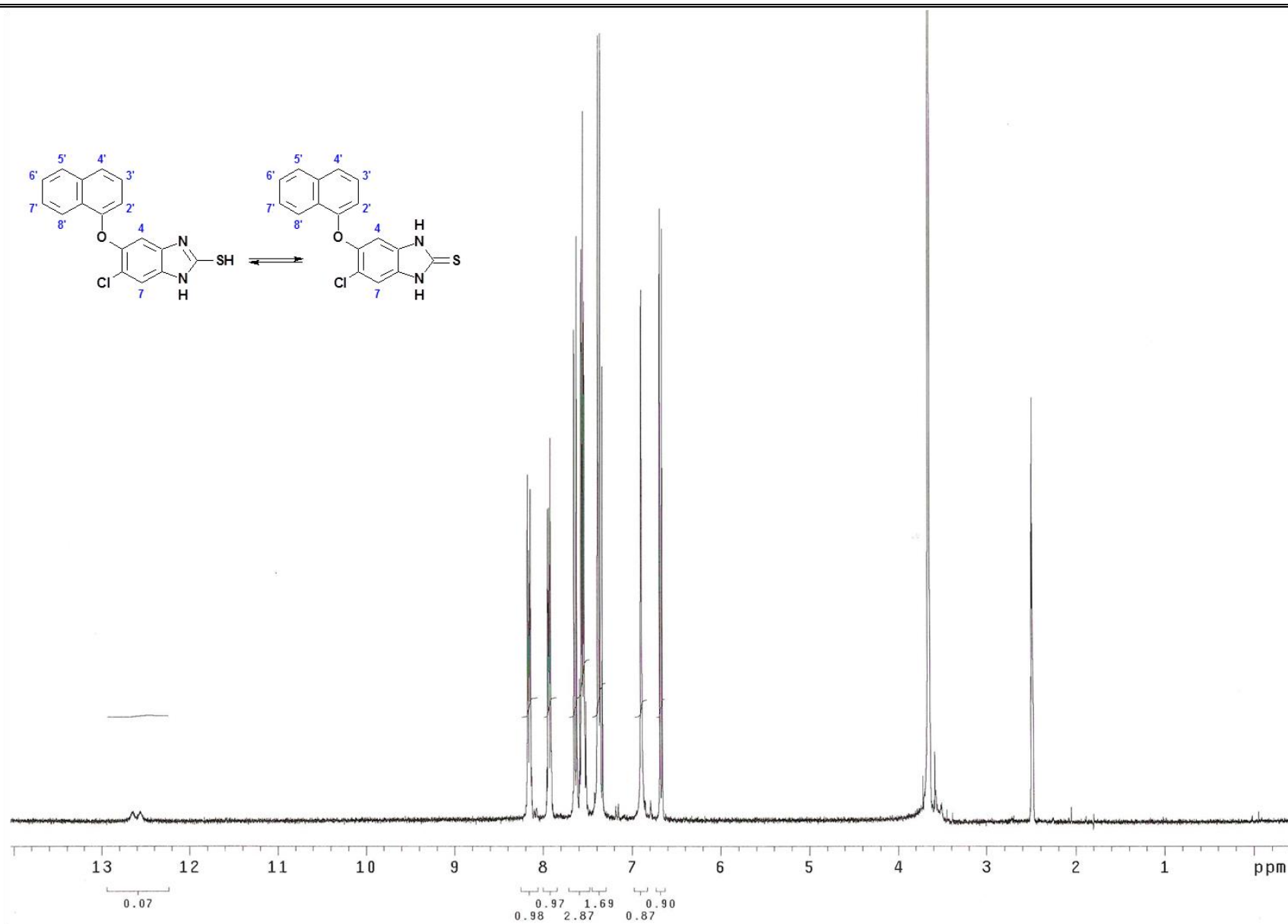




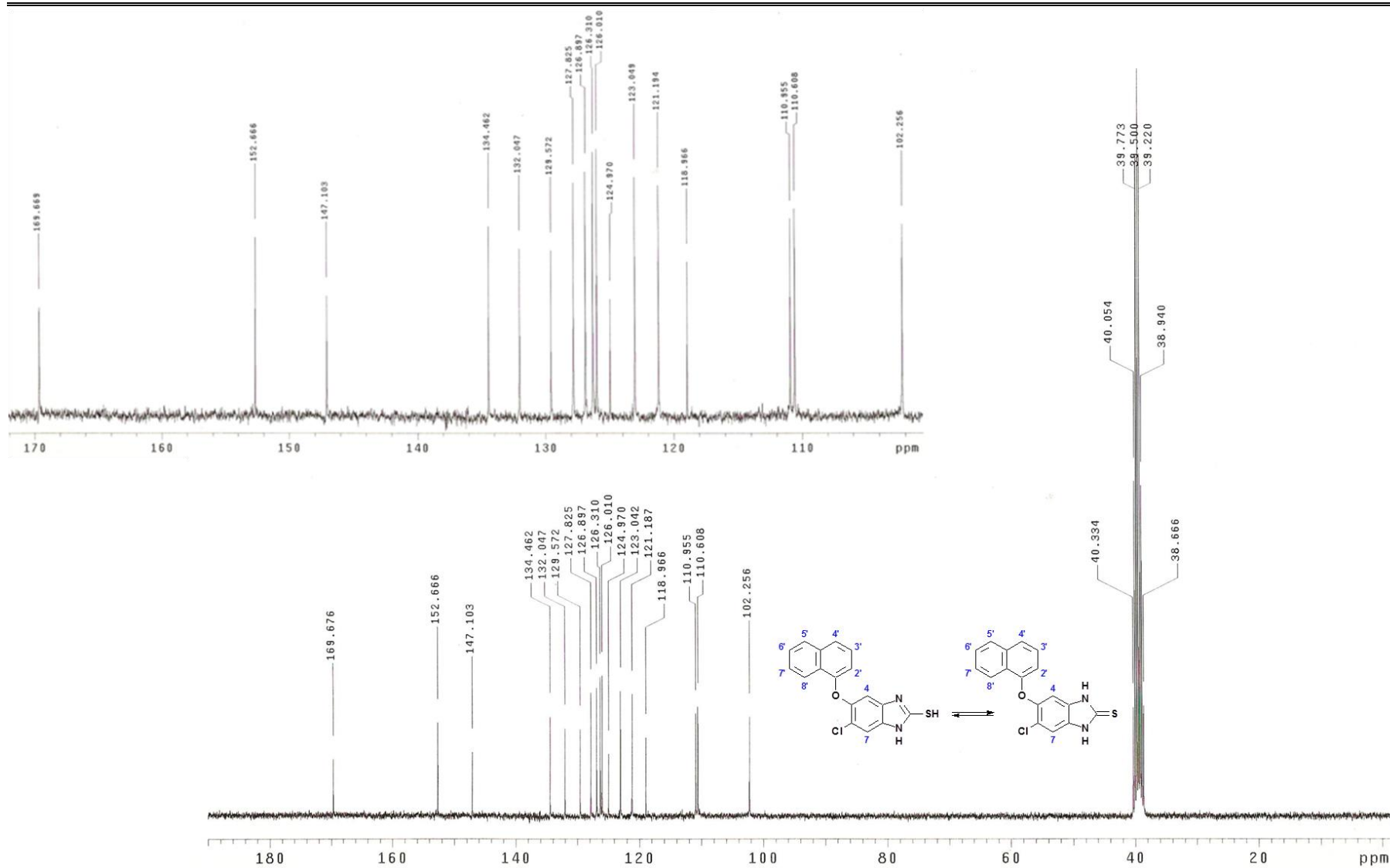
**Espectro 9.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-tiol (4-5).



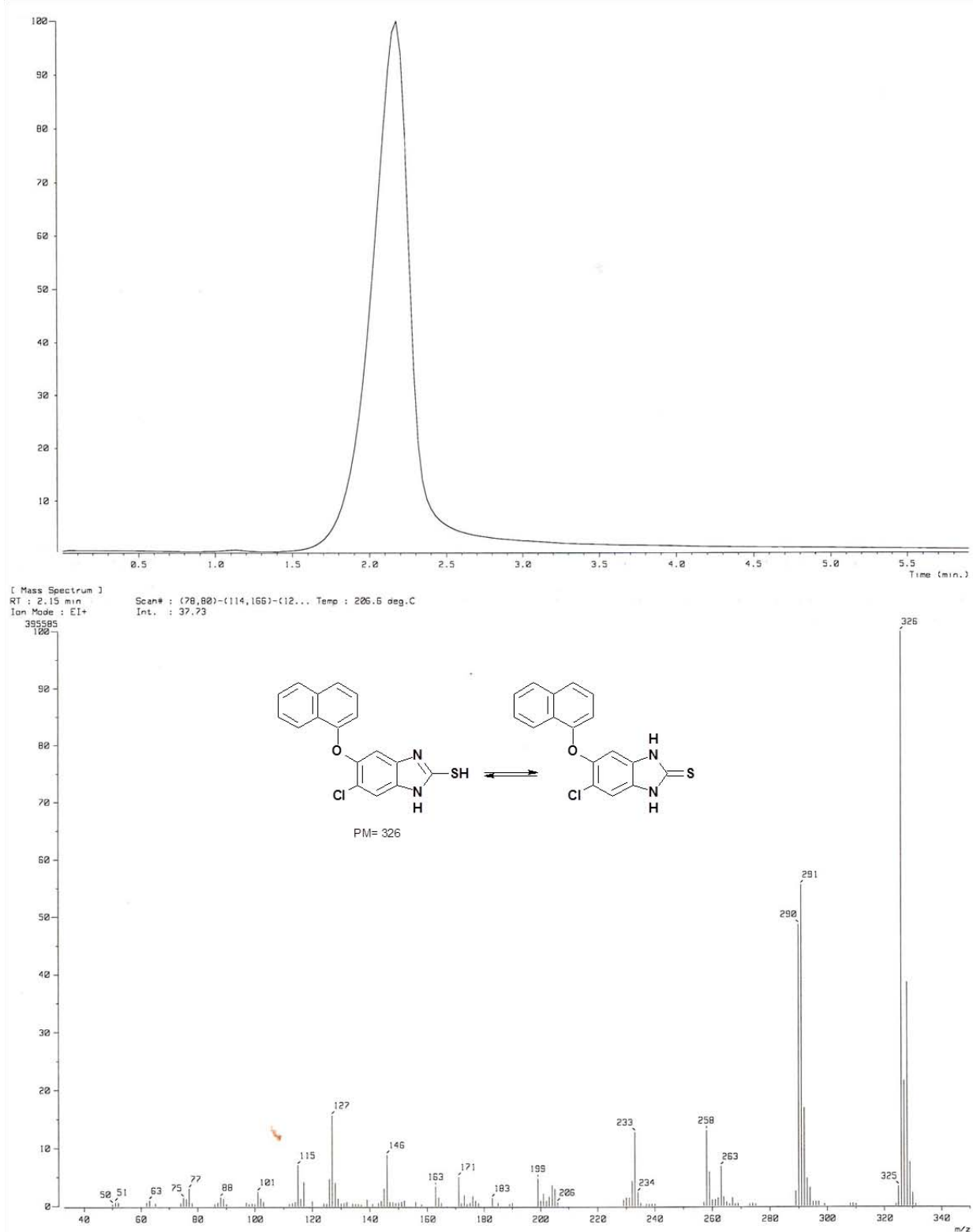
**Espectro 10.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-tiol (**4-5**).



**Espectro 11.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-tiol (**4-5**).



Espectro 12. RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-tiol (4-5).



**Espectro 13.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol-2-tiol (4-5).

[ Theoretical Ion Distribution ] Page: 1

Molecular Formula : C17 H11 Cl N2 O S

(m/z 326.0281, MW 326.8061, U.S. 14.0)

Base Peak : 326.0281, Averaged MW : 326.8052 (a), 326.8086 (w)

m/z	INT.	
326.0281	100.0000	*****
327.0311	20.6351	*****
328.0255	38.6289	*****
329.0282	7.6440	****
330.0245	2.2487	*
331.0257	0.3455	
332.0266	0.0398	
333.0278	0.0036	
334.0293	0.0003	

[ Elemental Composition ]

Page: 1

Data : OT2968\_RCB-TIOL\_004

Date : 03-Apr-101 21:52

Sample: Default parameters for B scan high-resolution

Note : Current control, internal scan

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 1.67 min

Scan#: 17

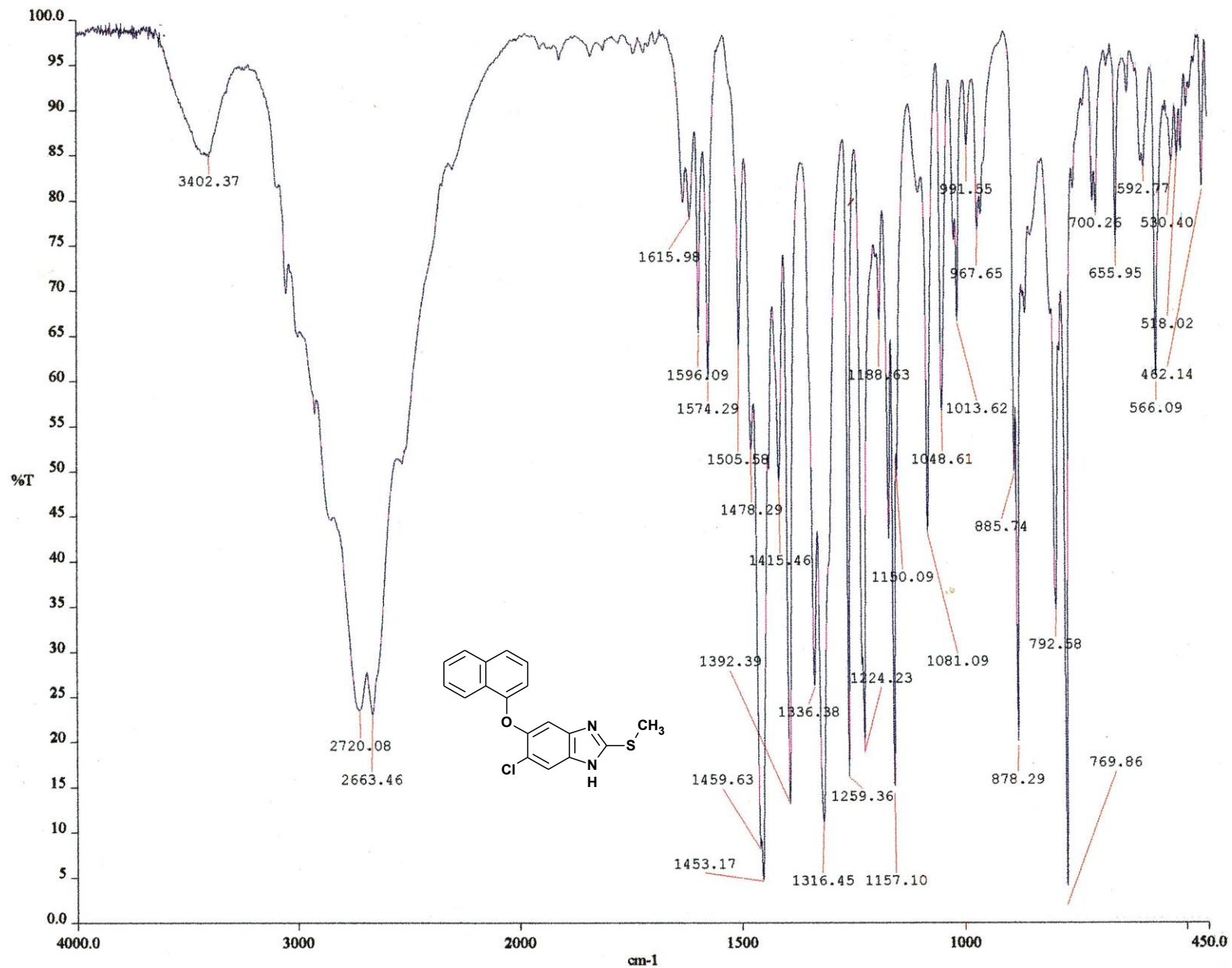
Elements : C 20/1, H 20/1, O 5/1, N 5/1, Cl 5/1, S 5/1

Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000

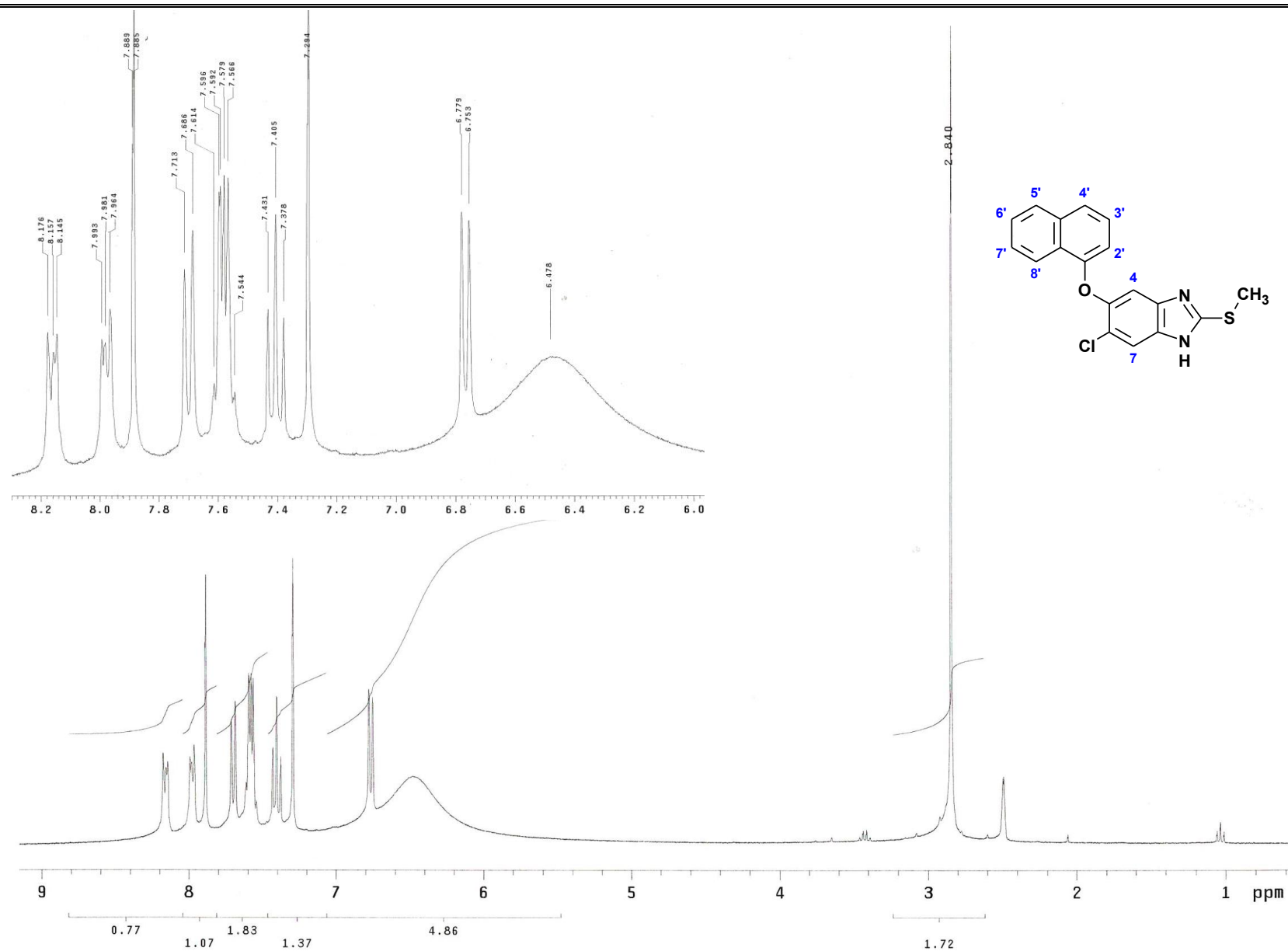
Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S. Composition
326.0281	100.0	+8.4 / +2.7	9.5 C 14 H 13 O 4 N Cl S
		+0.1 / +0.0	14.0 C 17 H 11 O N 2 Cl S ←
		+12.5 / +4.1	10.0 C 12 H 11 O 3 N 4 Cl S
		-13.8 / -4.5	5.5 C 8 H 13 O 5 N 5 Cl S
		+6.9 / +2.2	5.0 C 11 H 16 O 3 N 2 Cl 2 S
		+11.0 / +3.6	5.5 C 9 H 14 O 2 N 5 Cl 2 S
		+5.4 / +1.7	0.5 C 8 H 19 O 2 N 3 Cl 3 S
		-2.0 / -0.6	5.5 C 11 H 17 O 4 N Cl S 2
		-10.2 / -3.3	10.0 C 14 H 15 O N 2 Cl S 2
		+2.1 / +0.7	6.0 C 9 H 15 O 3 N 4 Cl S 2
		-3.5 / -1.1	1.0 C 8 H 20 O 3 N 2 Cl 2 S 2
		+0.6 / +0.2	1.5 C 6 H 18 O 2 N 5 Cl 2 S 2
		-8.2 / -2.7	2.0 C 6 H 19 O 3 N 4 Cl S 3

**Espectro 14.** EMAR (ID/IE, m/z) del compuesto 5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-tiol (4-5).

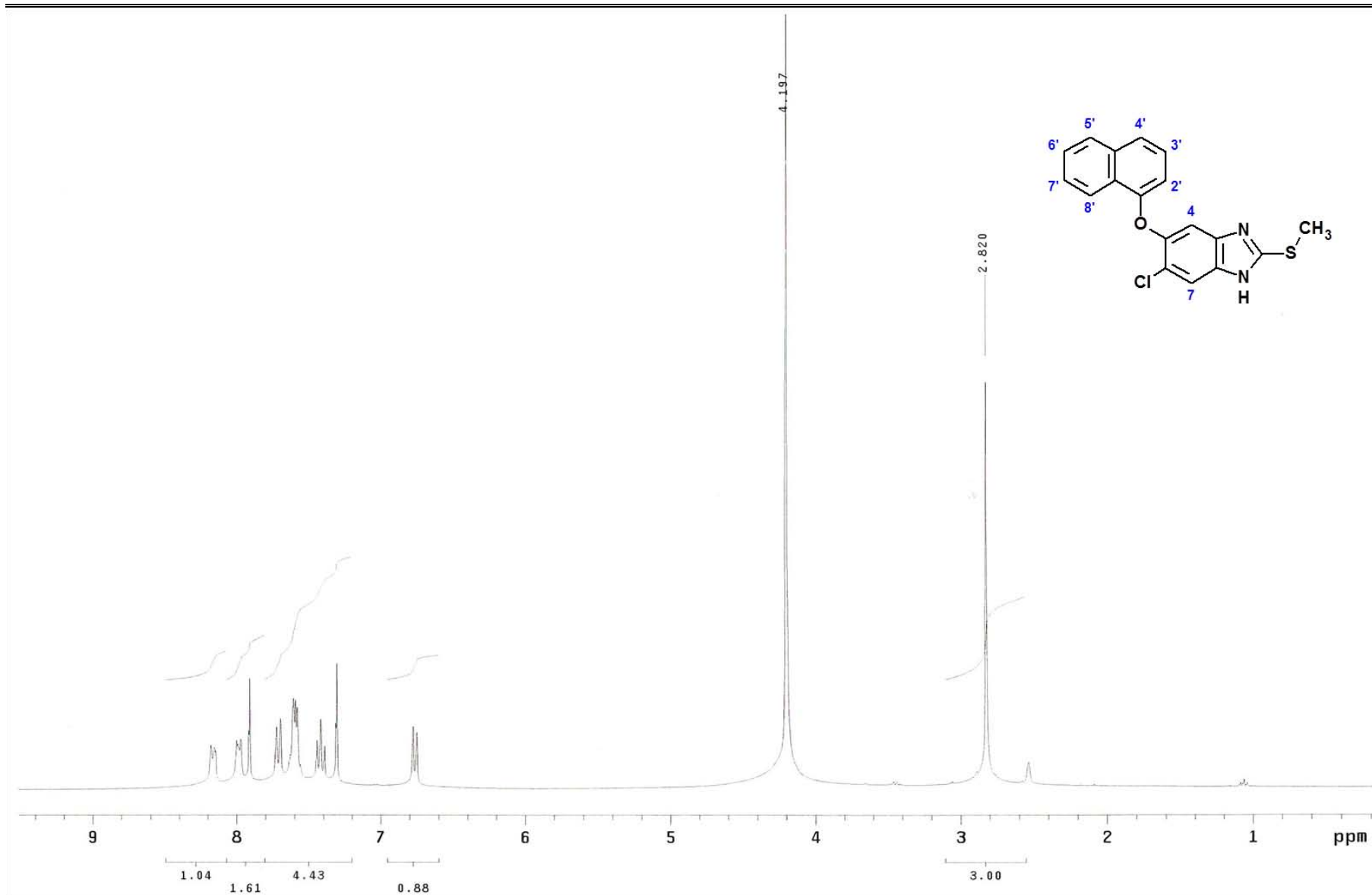


Espectro 15. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol, ALFA (4-6).

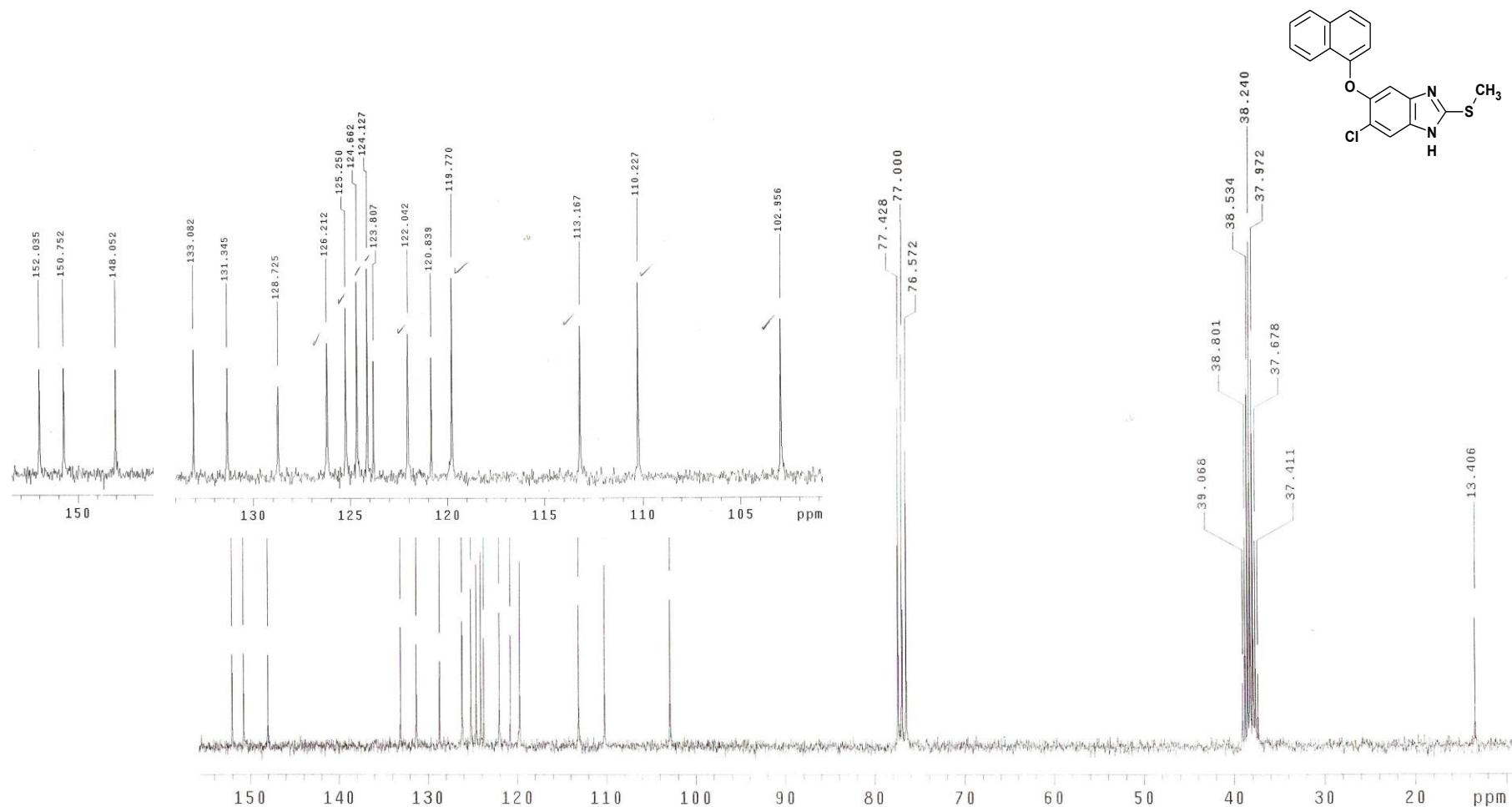


**Espectro 16.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol, ALFA (4-6).

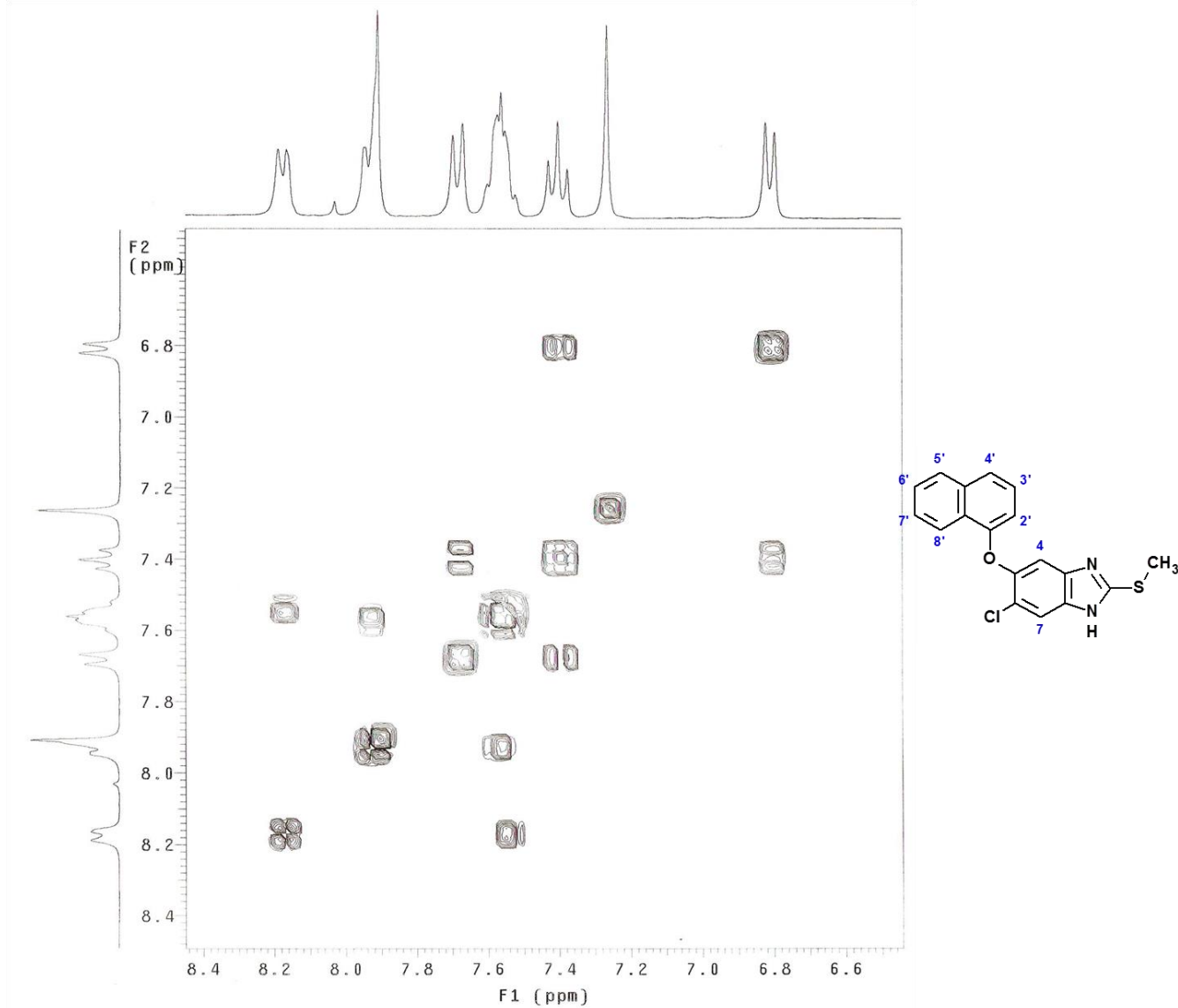




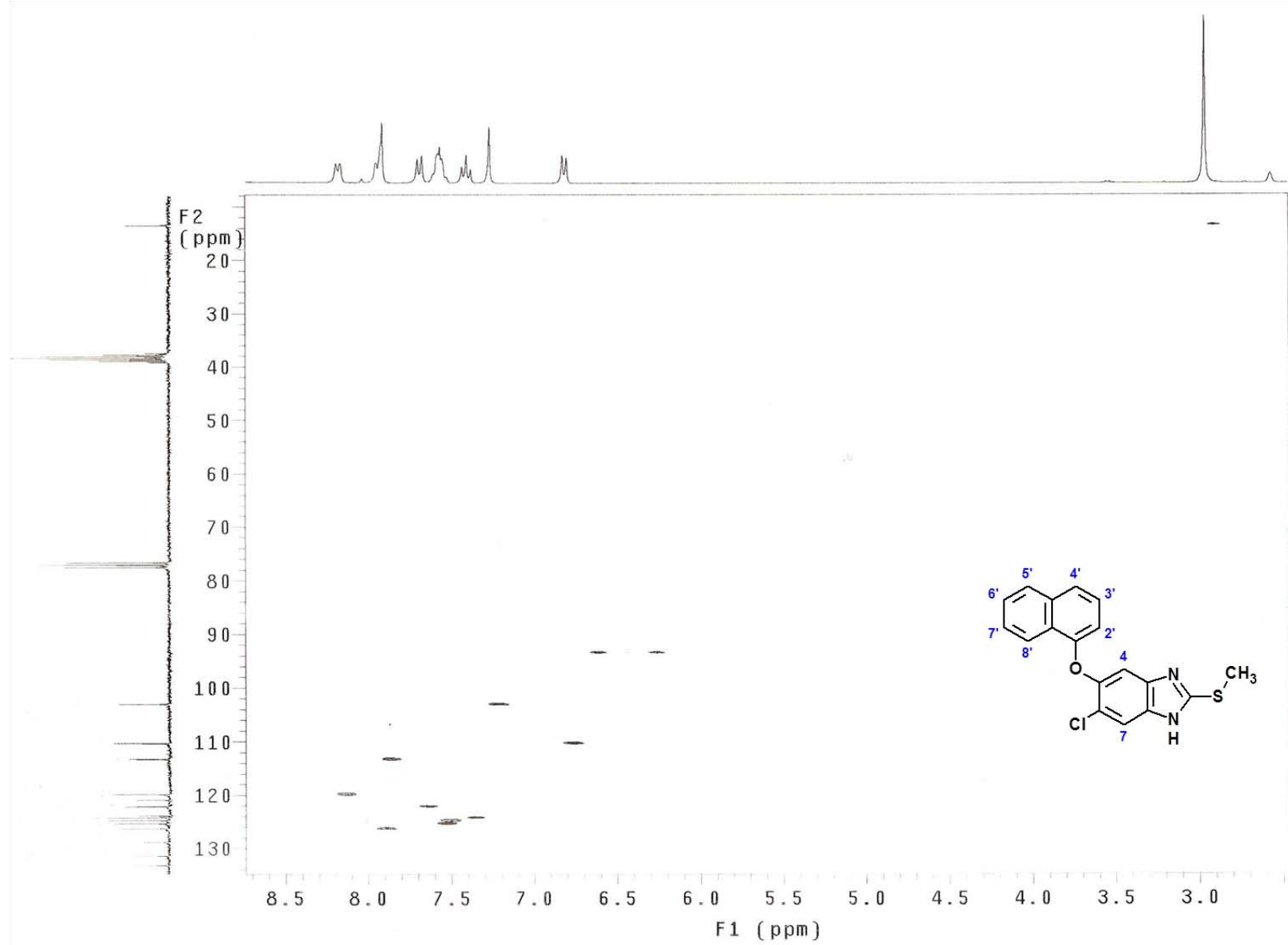
**Espectro 17.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol, ALFA (4-6).



**Espectro 18.** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 101 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol, ALFA (4-6).

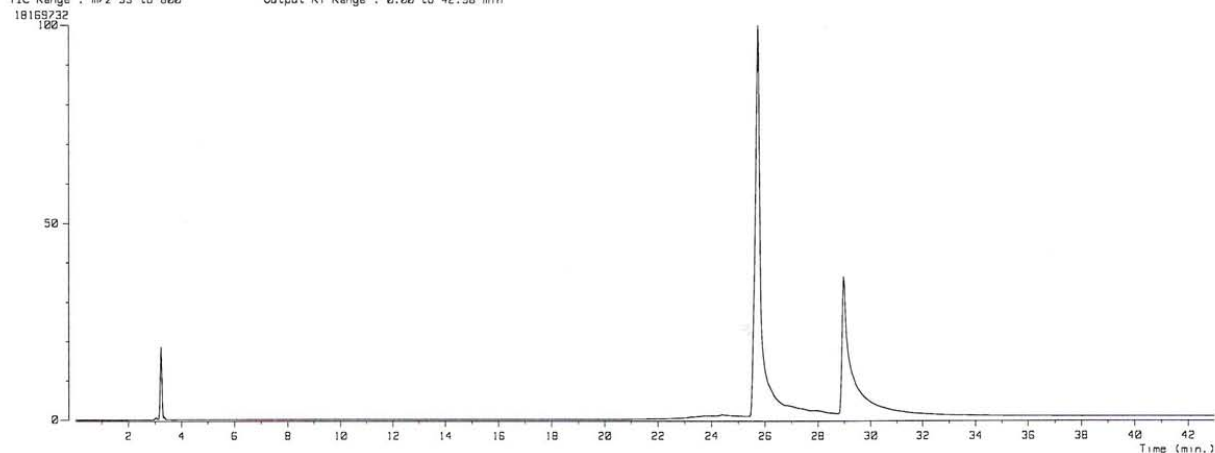


**Espectro 19.** Experimento COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol, ALFA (4-6).

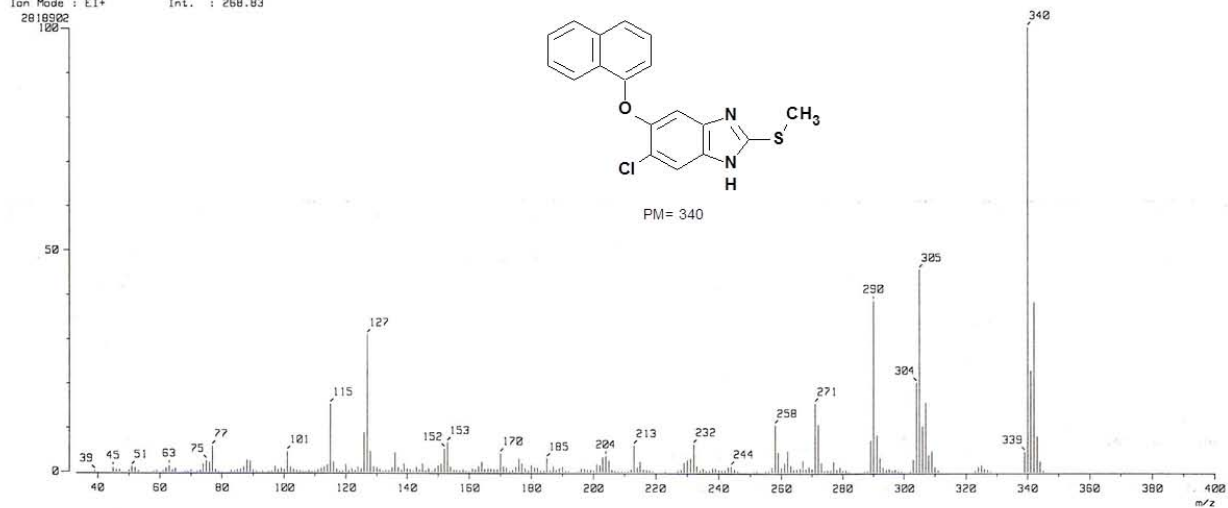


**Espectro 20.** Experimento HETCOR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol, ALFA (4-6).

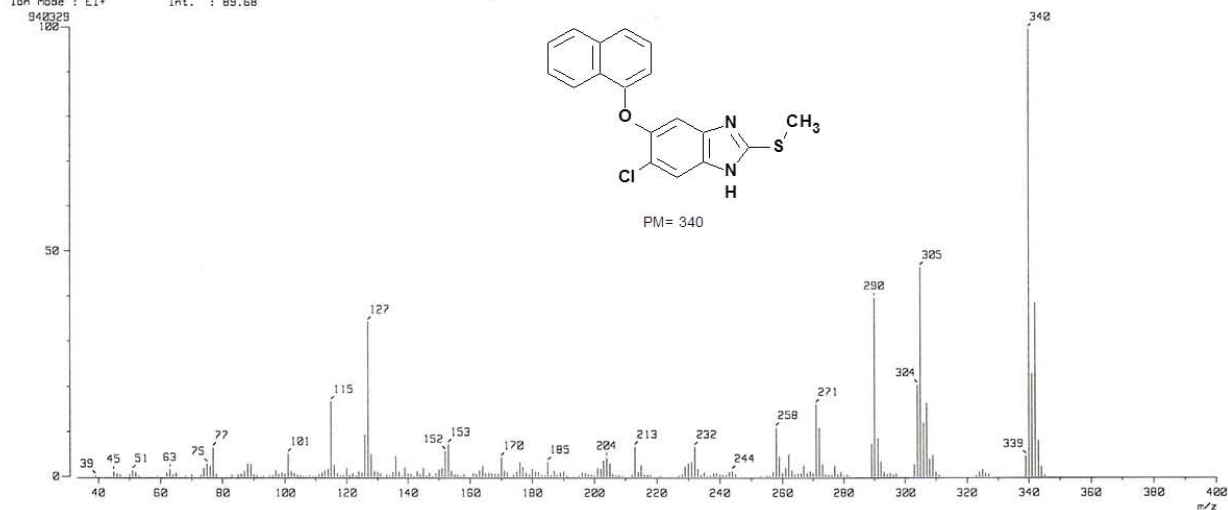
[ TIC ]  
 Data : OT2474\_D12-alfa\_001 Date : 26-Jul-99 07:24  
 Sample:  
 Note : USRI, Fac. de Química, UNFM.  
 Inlet : GC Ion Mode : EI+  
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]  
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 42.98 min



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 25.73 min Scan# : (935,937) Temp : 6.4 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 268.83



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 29.38 min Scan# : (1053,1055)-(1023,104... Temp : 37.3 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 89.68



**Espectro 21.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol, ALFA (4-6).

[ Theoretical Ion Distribution ]

Page: 1

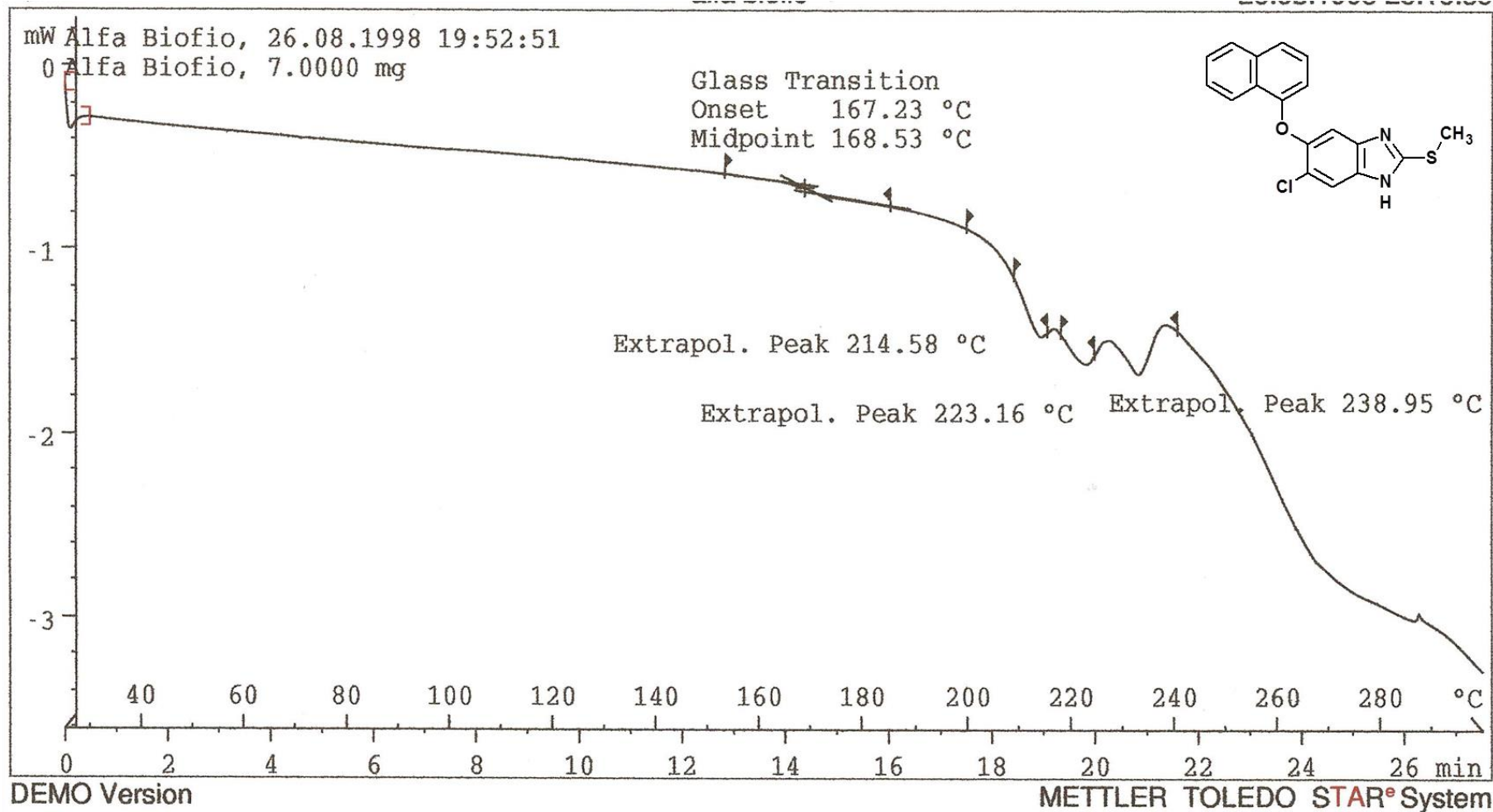
Molecular Formula : C18 H13 Cl N2 O S

(m/z 340.0437, MW 340.8330, U.S. 14.0)

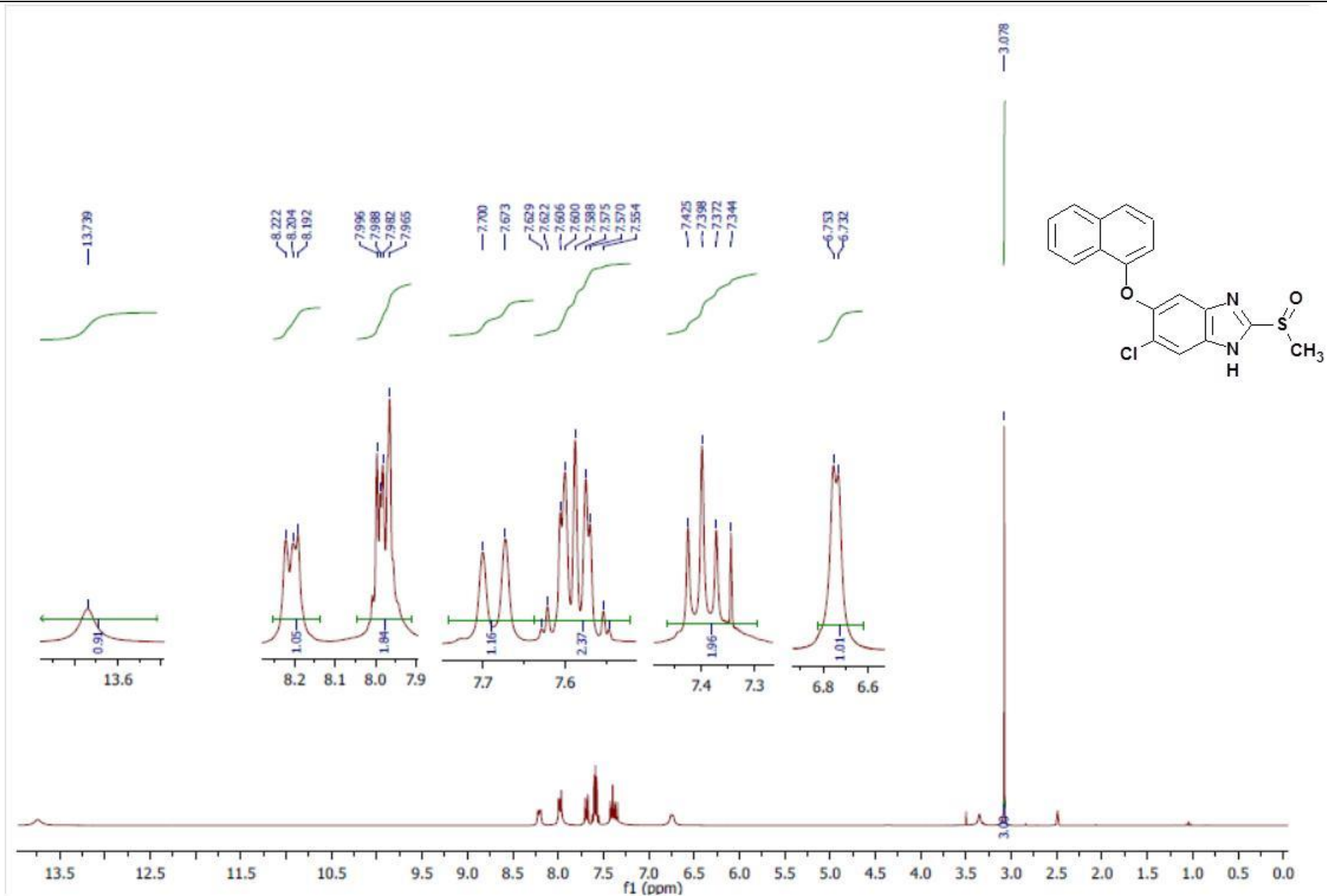
Base Peak : 340.0437, Averaged MW : 340.8322(a), 340.8355(w)

m/z	INT.	
340.0437	100.0000	*****
341.0467	21.7773	*****
342.0412	38.8649	*****
343.0439	8.0853	*****
344.0405	2.3361	*
345.0415	0.3712	
346.0425	0.0438	
347.0437	0.0041	
348.0453	0.0003	

**Espectro 22.** EMAR (ID/IE, *m/z*) del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol, ALFA (4-6).

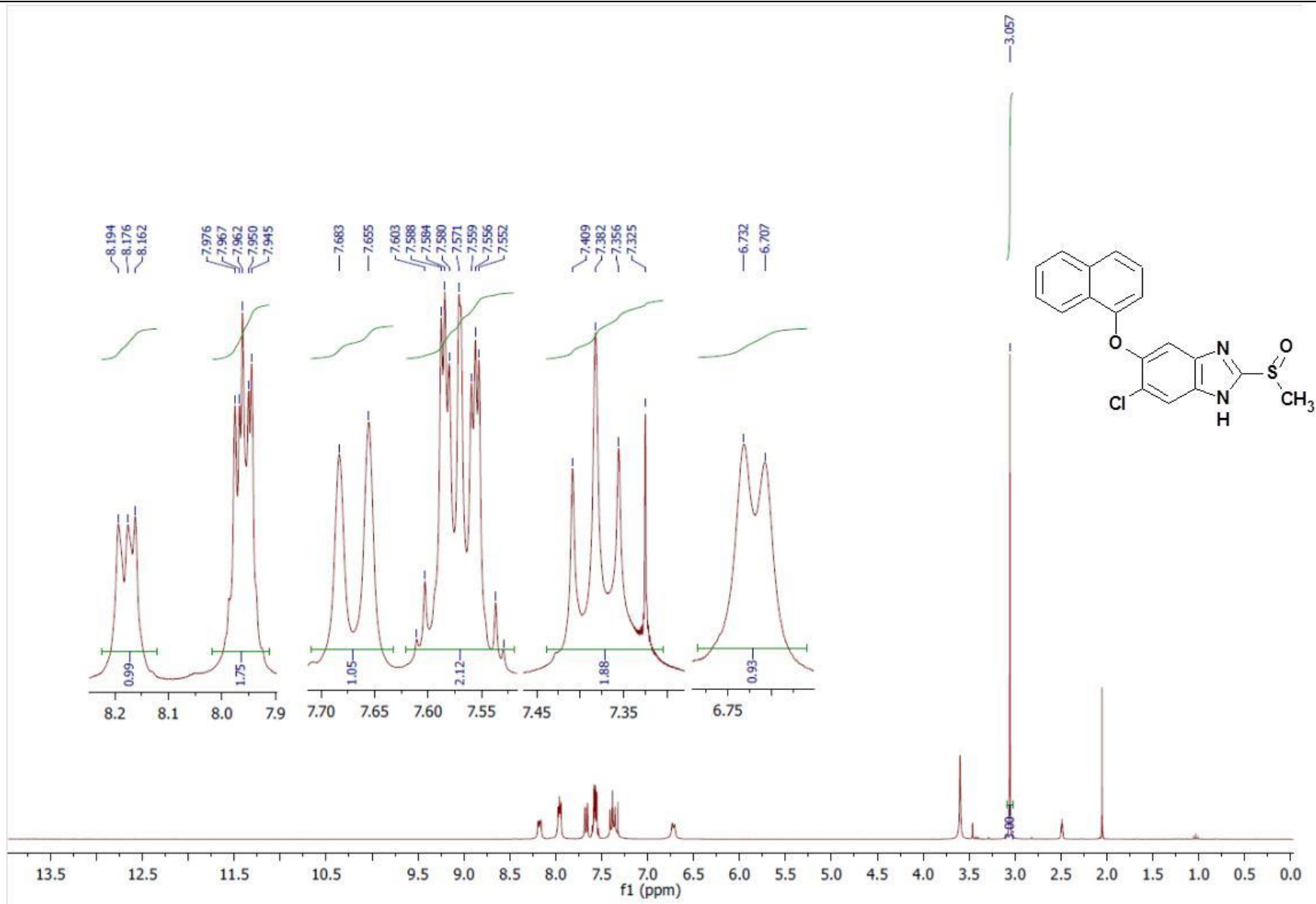


**Espectro 23.** Calorimetría diferencial de barrido del compuesto 5-cloro-2-(metiltio)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol, ALFA (4-6).

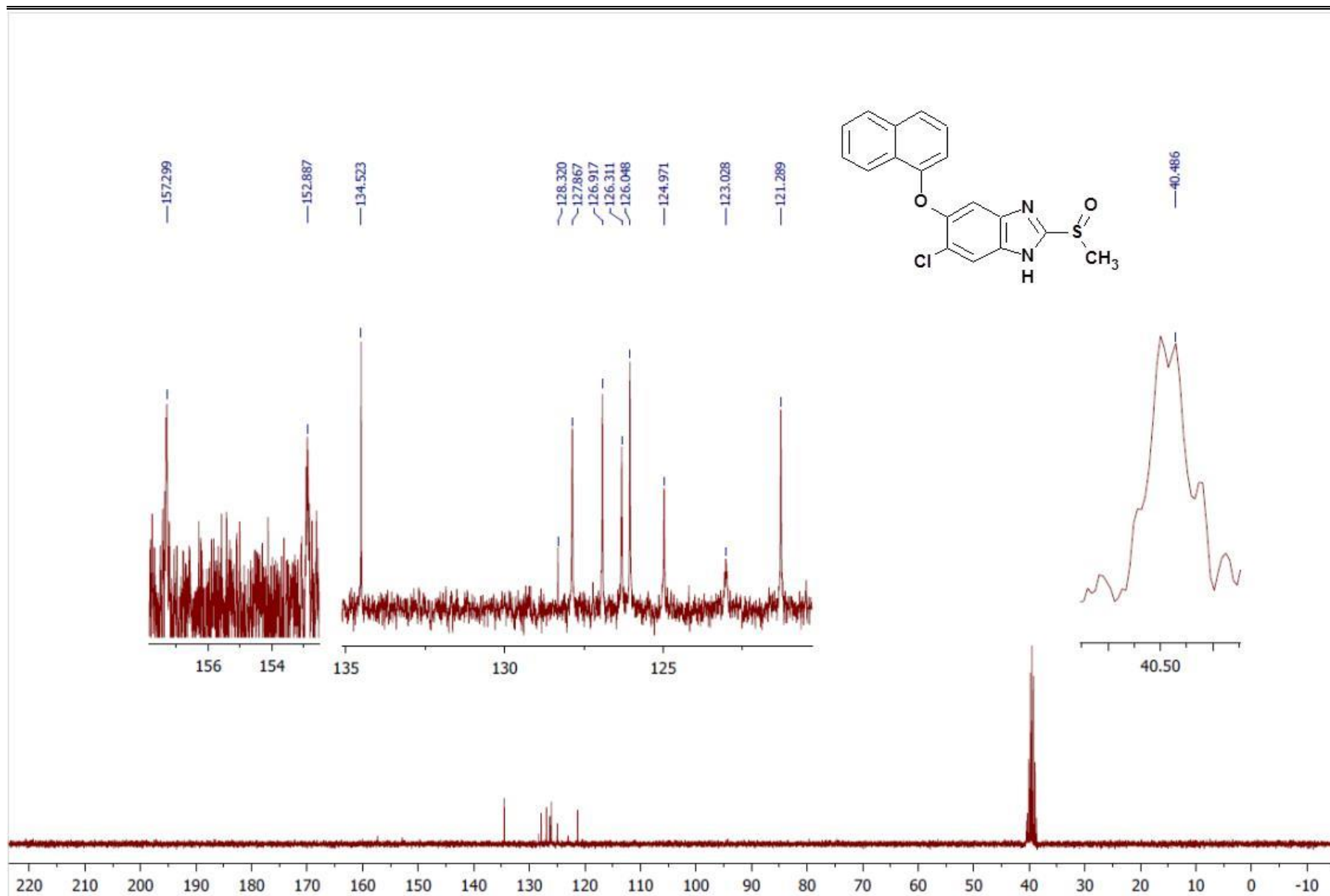


**Espectro 24.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (**4-7**).

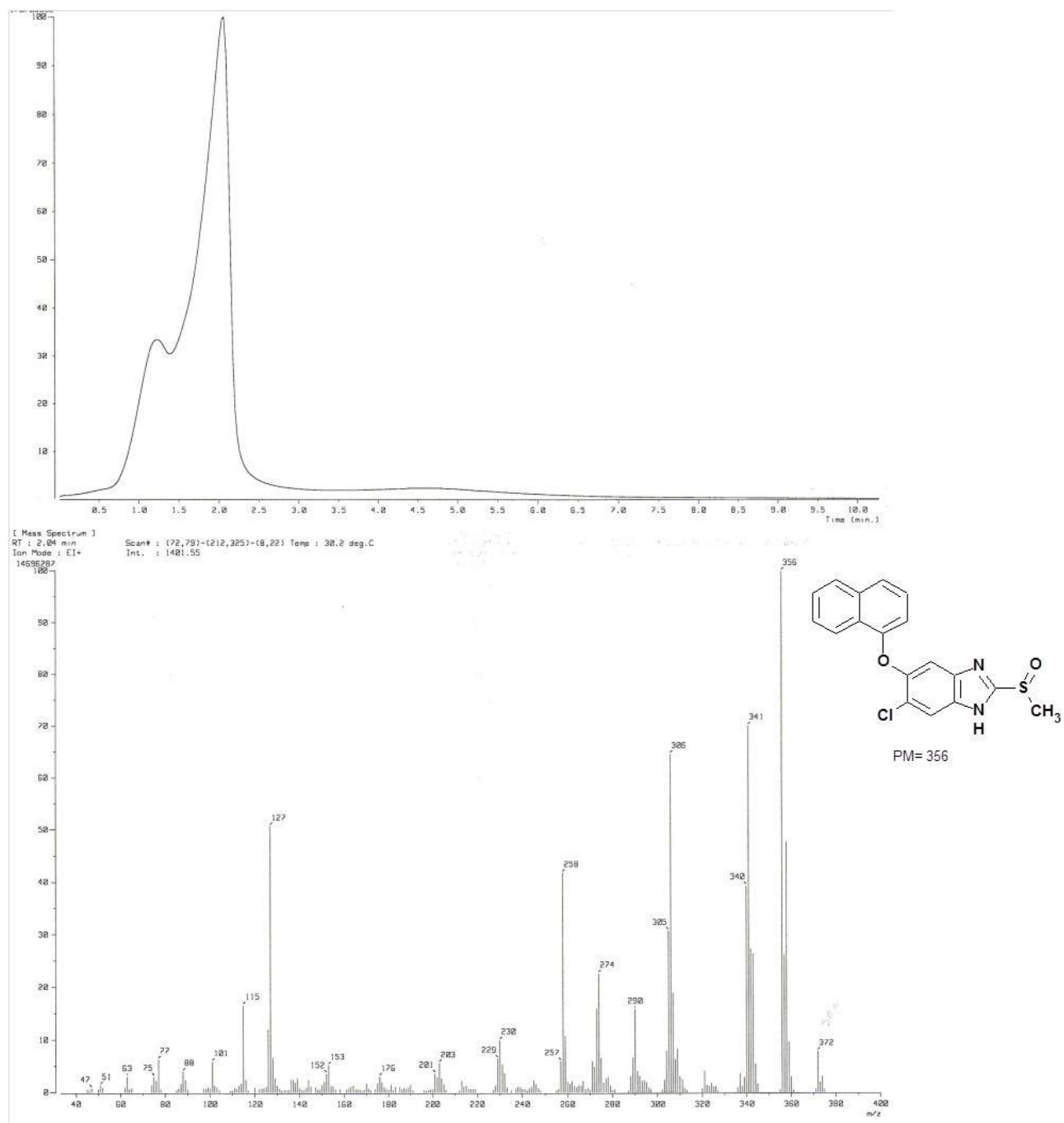




**Espectro 25.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-7**).



**Espectro 26.** RMN  $^{13}\text{C}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (**4-7**).

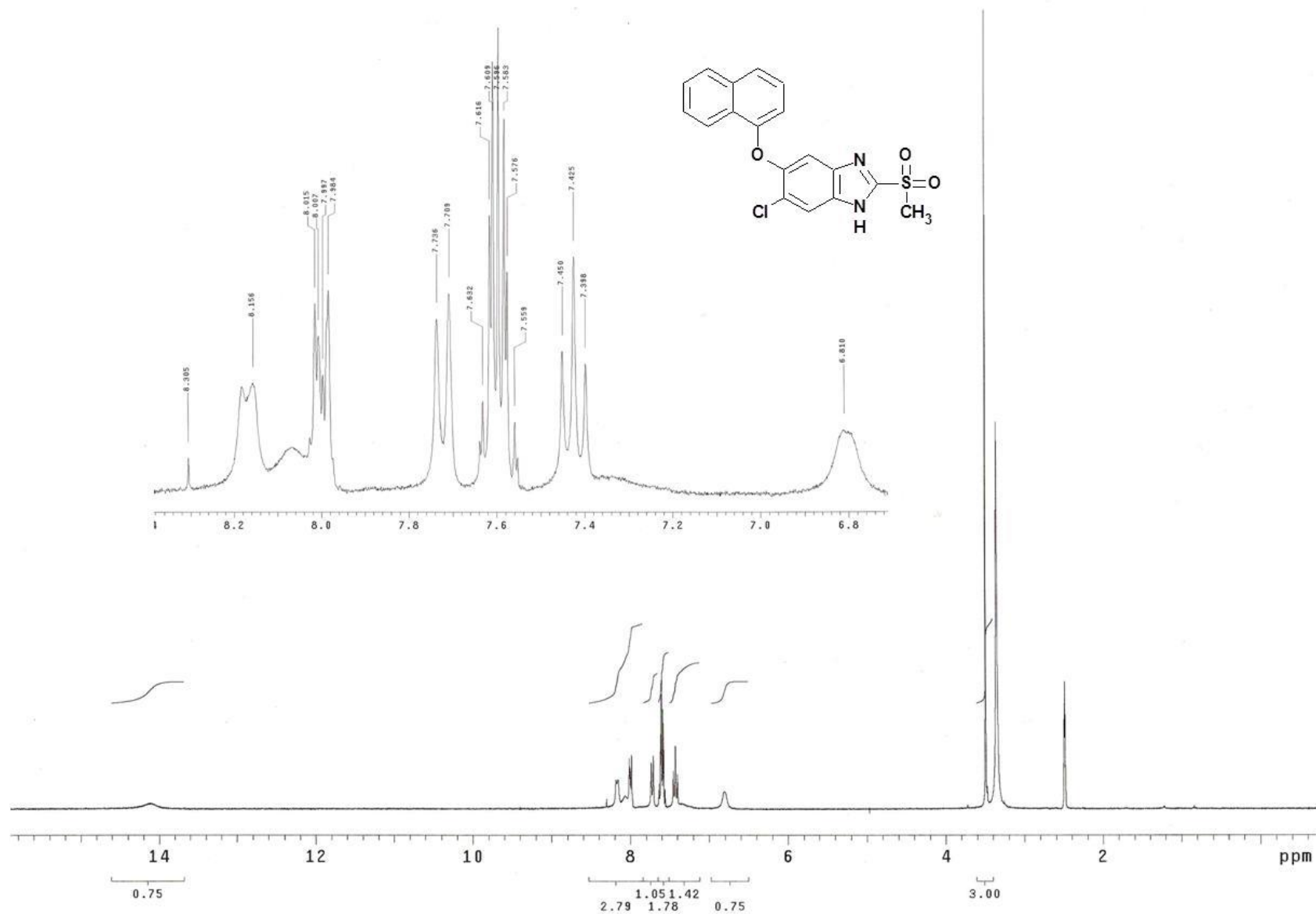


**Espectro 27.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (**4-7**).

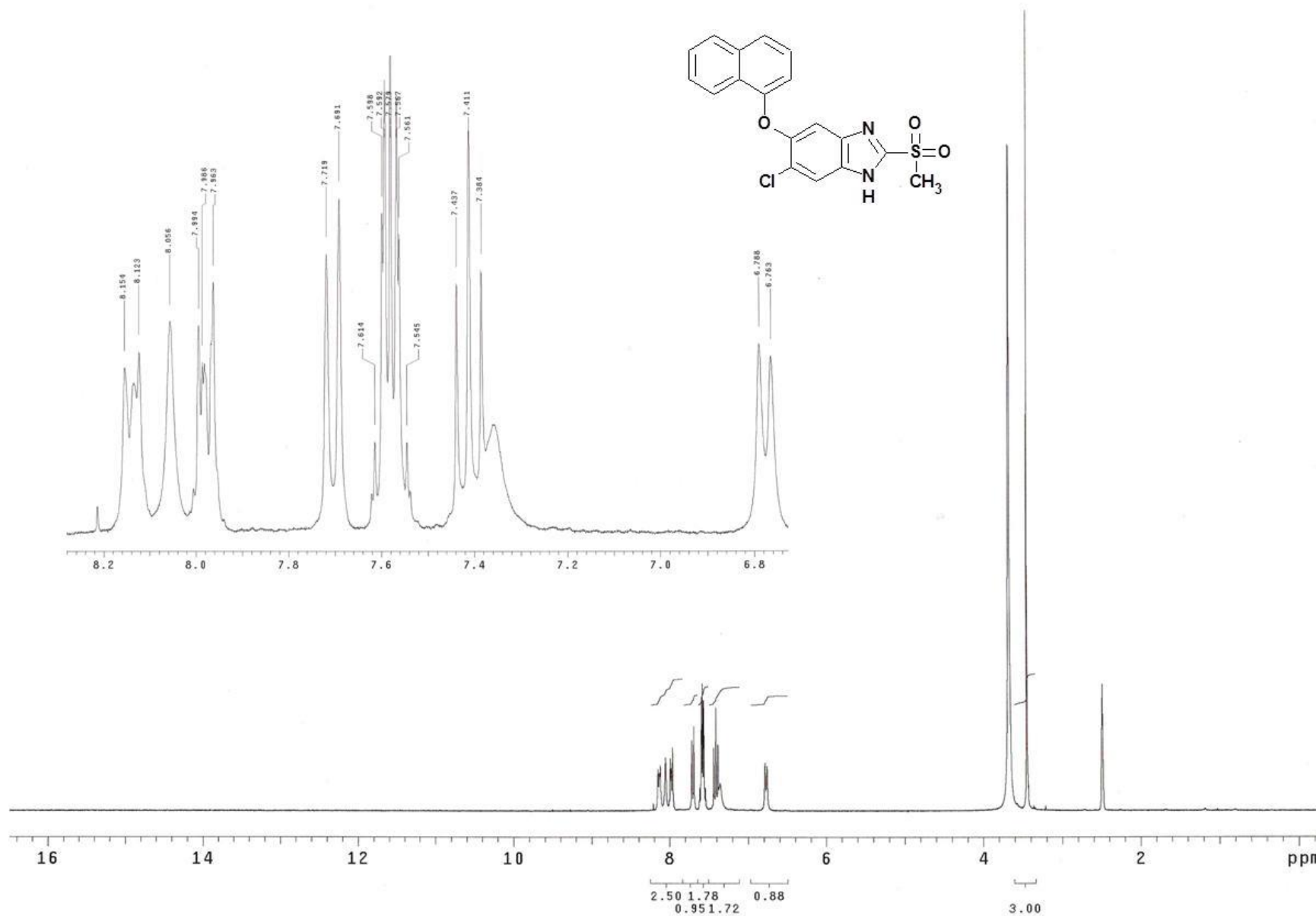
[ Elemental Composition ]  
 Data : OT2264\_SOalfa\_001 Date : 07-Jun-99 01:37  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.40 min Scan#: 9  
 Elements : C 30/1, H 30/1, O 5/1, N 2/1, Cl 5/1, S 5/1  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
356.0380	100.0	+5.7 / +2.0	9.5	C 15 H 15 O 5 N Cl S
		-1.8 / -0.6	14.0	C 18 H 13 O 2 N 2 Cl S
		+4.4 / +1.6	5.0	C 12 H 18 O 4 N 2 Cl 2 S
		-8.3 / -3.0	4.5	C 14 H 21 O N Cl 3 S
		-3.7 / -1.3	5.5	C 12 H 19 O 5 N Cl S 2
		-11.2 / -4.0	10.0	C 15 H 17 O 2 N 2 Cl S 2
		-5.1 / -1.8	1.0	C 9 H 22 O 4 N 2 Cl 2 S 2
		-13.2 / -4.7	1.5	C 9 H 23 O 5 N Cl S 3
		+9.5 / +3.4	1.5	C 10 H 24 O 2 N Cl 2 S 3

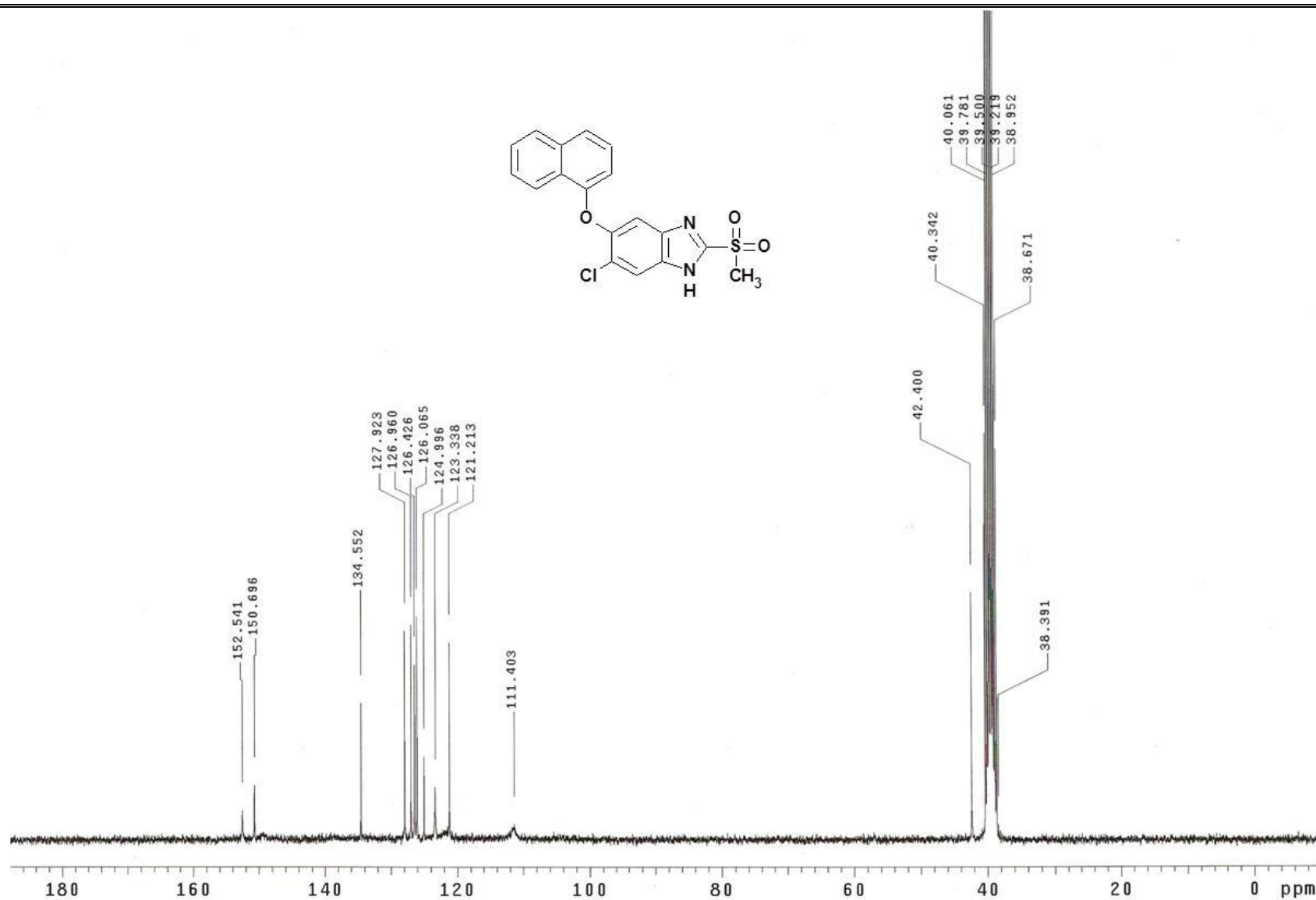
**Espectro 28.** EMAR del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfinil)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (4-7).



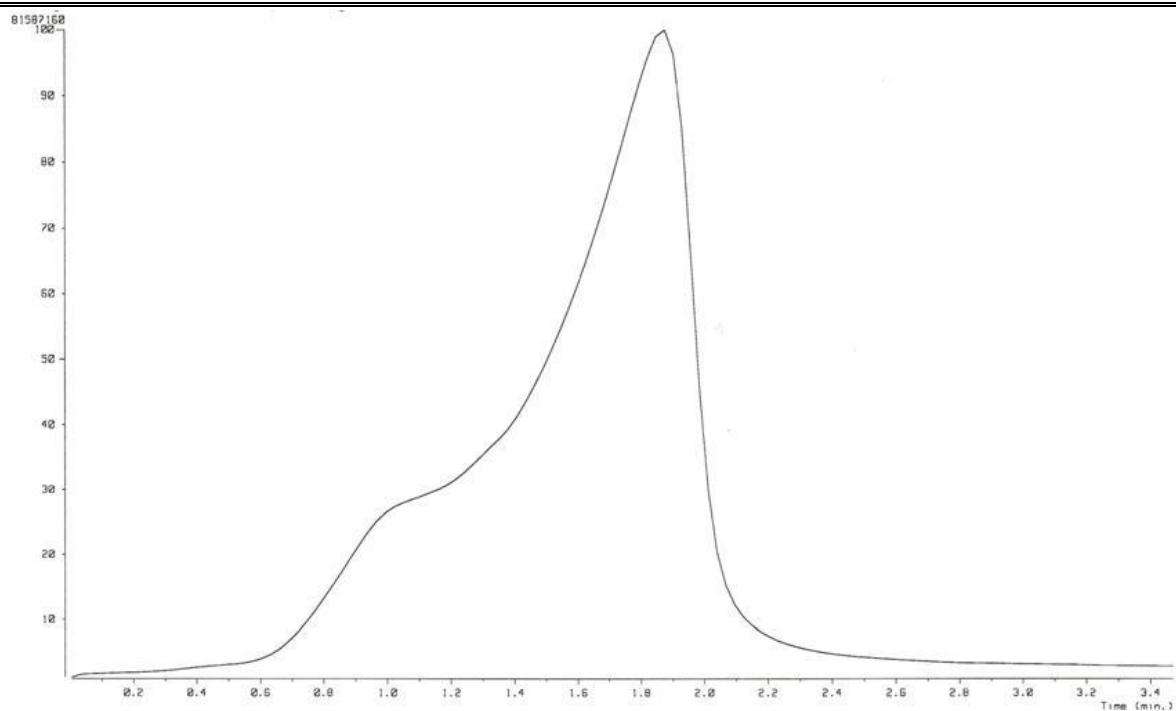
**Espectro 29.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfonyl)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (**4-8**).



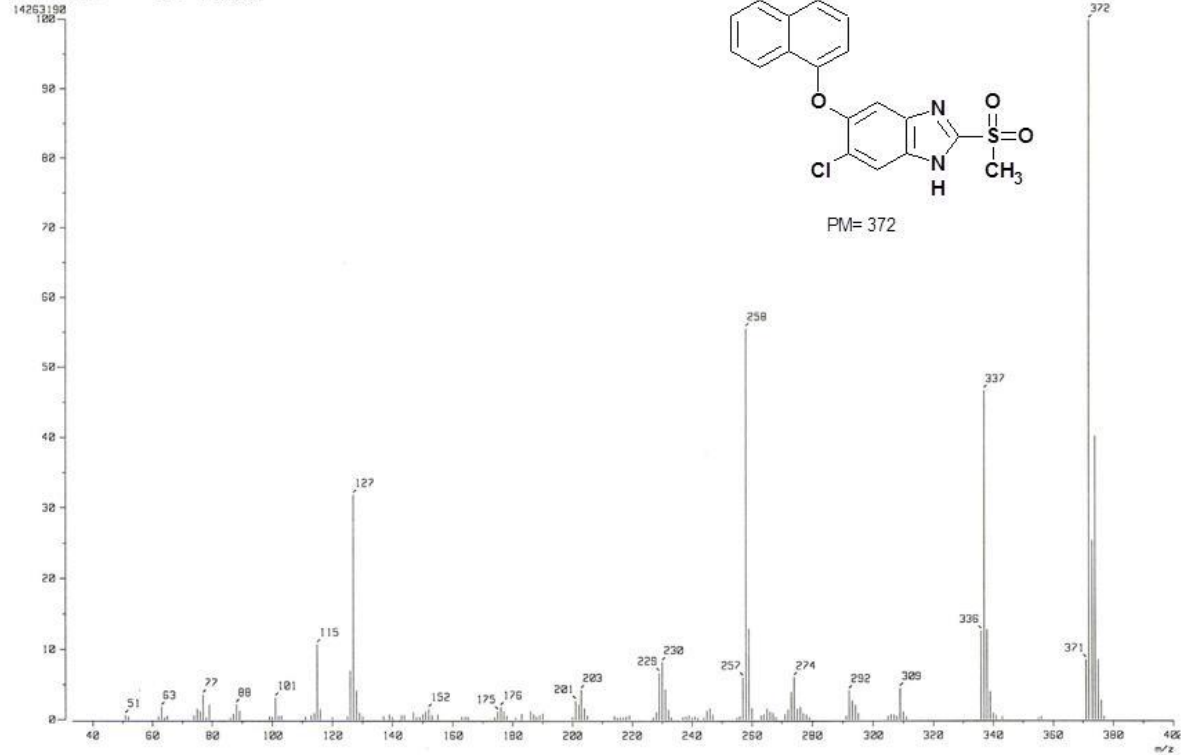
**Espectro 30.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfonil)-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (**4-8**).



**Espectro 31.** RMN  $^{13}\text{C}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfonil)-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (**4-8**).



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.85 min Scan# : (57,78)  
 Ion Mode : EI+ Int. : 1360.25  
 Temp : 5.4 deg.C



**Espectro 32.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfonil)-6-(1-naftil-1-oxi)-1H-benzimidazol (4-8).



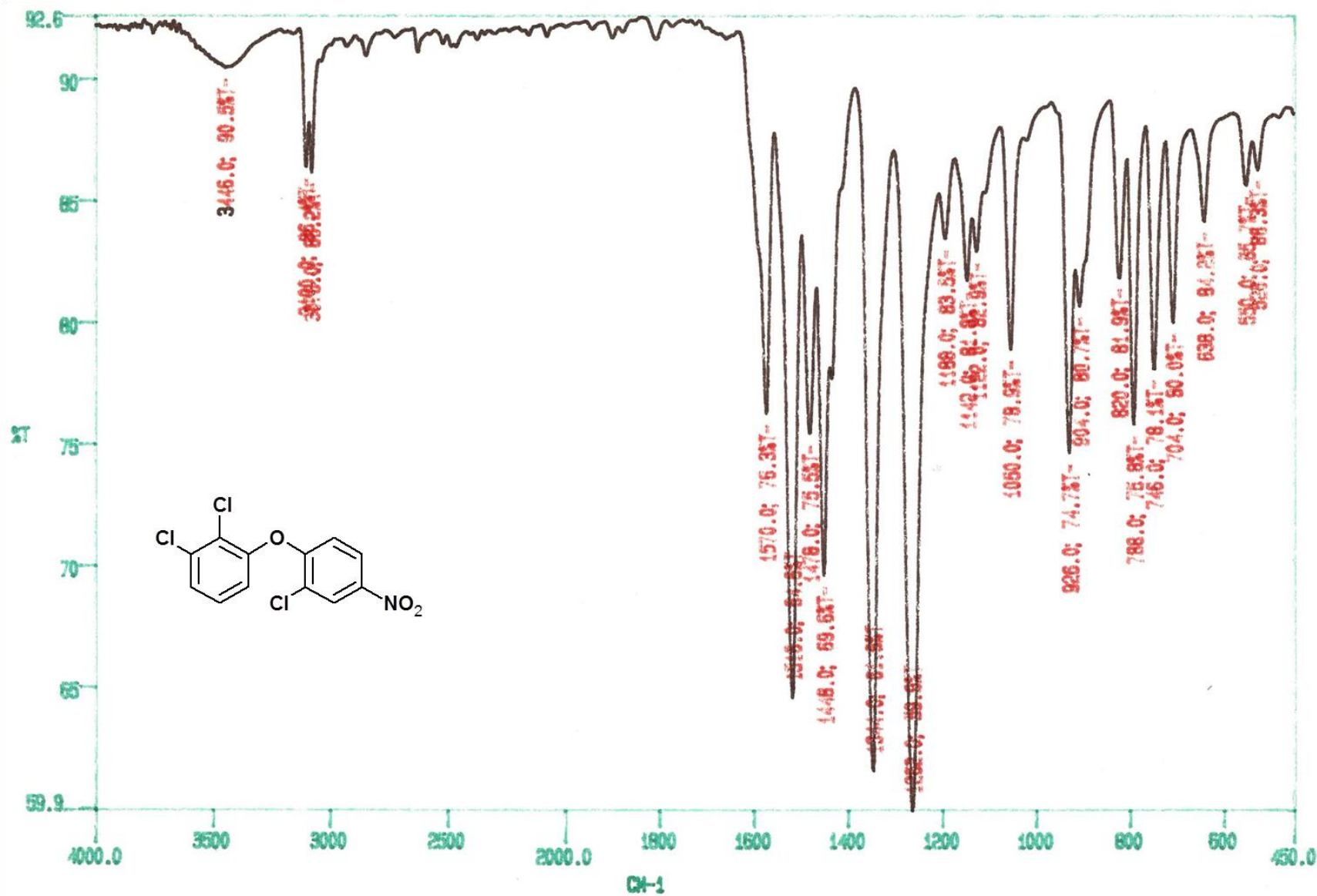
```

[ Elemental Composition ]
Data : OT2262 SO2alfa_001          Date : 07-Jun-99 02:02
Sample: Default parameters for B scan high-resolution
Note : Current control, internal scan
Inlet : Direct                      Ion Mode : EI+
RT : 0.40 min                       Scan#: 9
Elements : C 30/1, H 30/1, O 5/1, N 2/1, Cl 5/1, S 5/1
Mass Tolerance      : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000
Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

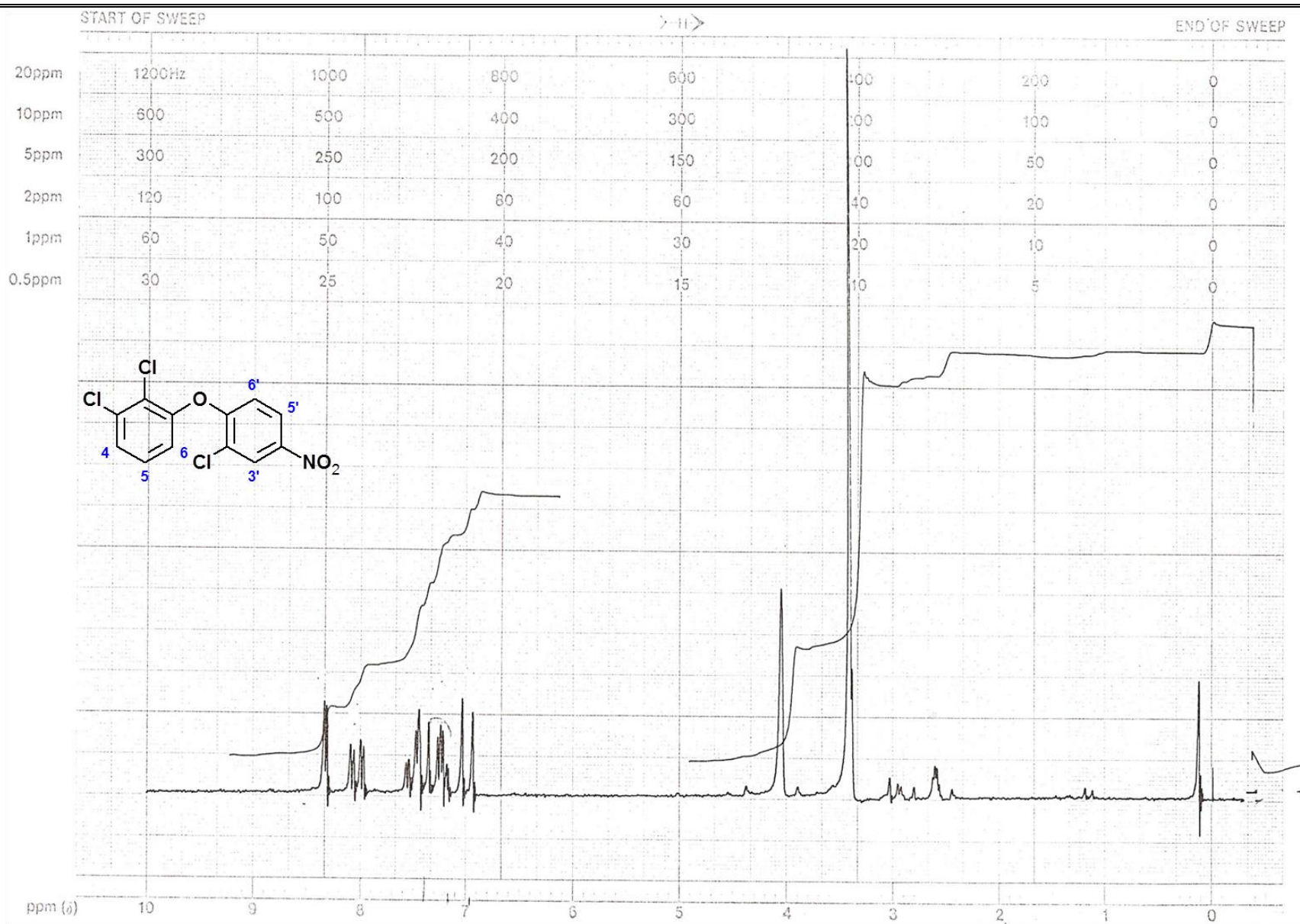
Observed m/z Int%  Err[ppm / mmu]  U.S. Composition
 372.0342  100.0   +1.9 / +0.7   14.0 C 18 H 13 O 3 N 2 Cl S
                +7.8 / +2.9    5.0 C 12 H 18 O 5 N 2 Cl 2 S
                -4.3 / -1.6    4.5 C 14 H 21 O 2 N Cl 3 S
                -5.7 / -2.1    0.0 C 11 H 24 O N 2 Cl 4 S
                -7.2 / -2.7   10.0 C 15 H 17 O 3 N 2 Cl S 2
                -1.3 / -0.5    1.0 C 9 H 22 O 5 N 2 Cl 2 S 2
                -13.4 / -5.0   0.5 C 11 H 25 O 2 N Cl 3 S 2
                +6.7 / +2.5   10.5 C 16 H 19 O N Cl S 3
                +12.6 / +4.7    1.5 C 10 H 24 O 3 N Cl 2 S 3
                -2.3 / -0.9    6.5 C 13 H 23 O N Cl S 4
                -11.4 / -4.2    2.5 C 10 H 27 O N Cl S 5

```

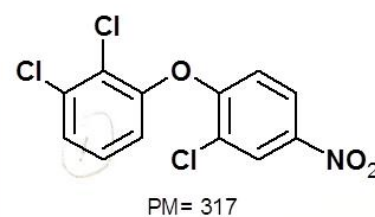
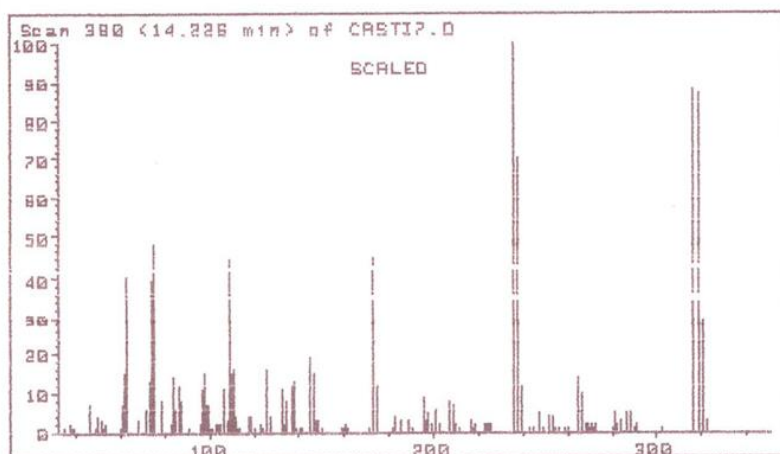
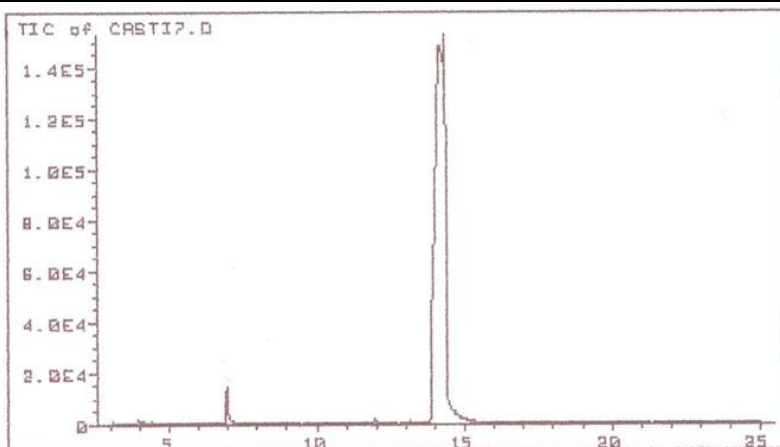
**Espectro 33.** EMAR del compuesto 5-cloro-2-(metilsulfonil)-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (4-8).



Espectro 34. IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (5-9).



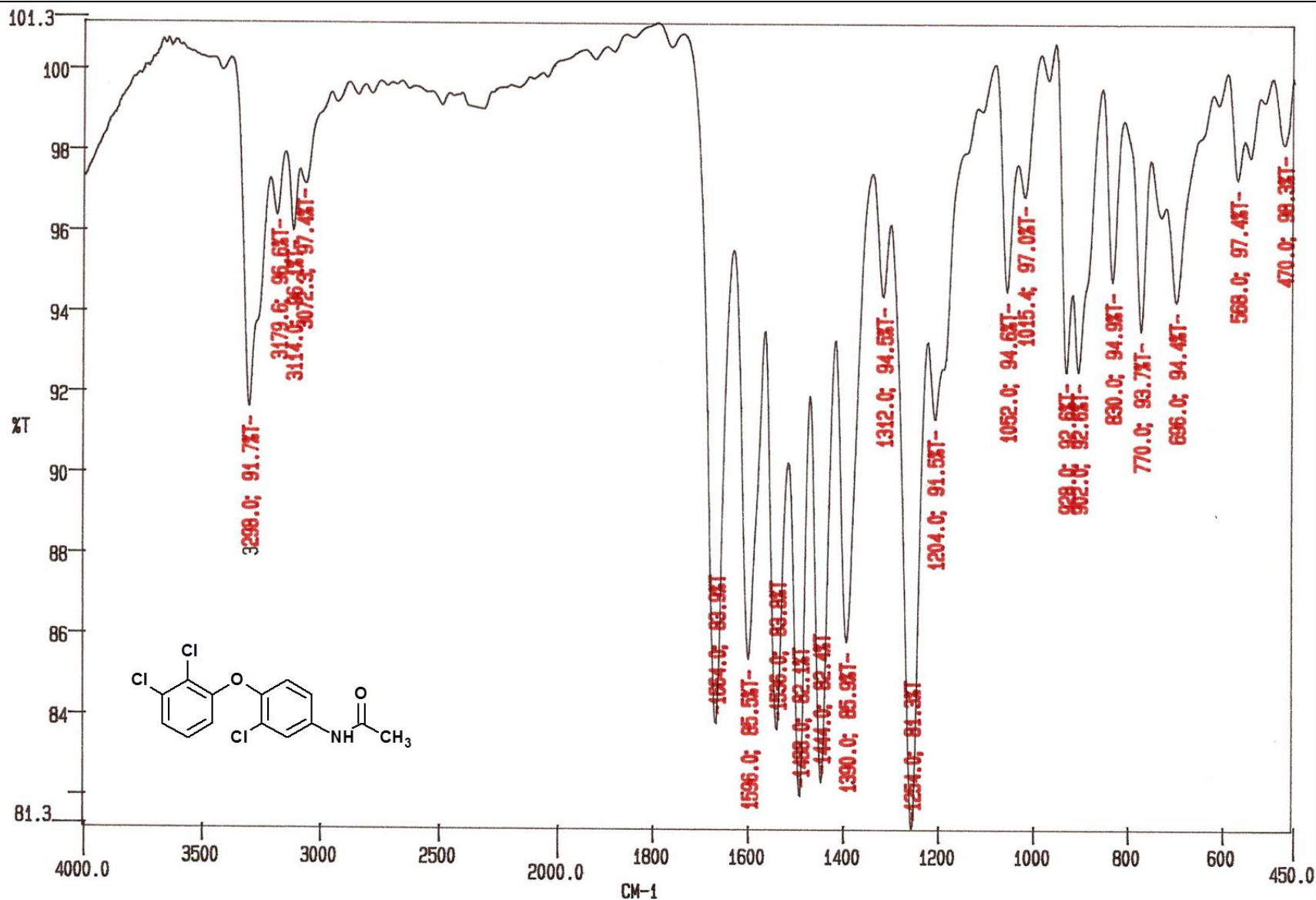
**Espectro 35.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 90 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (**5-9**).



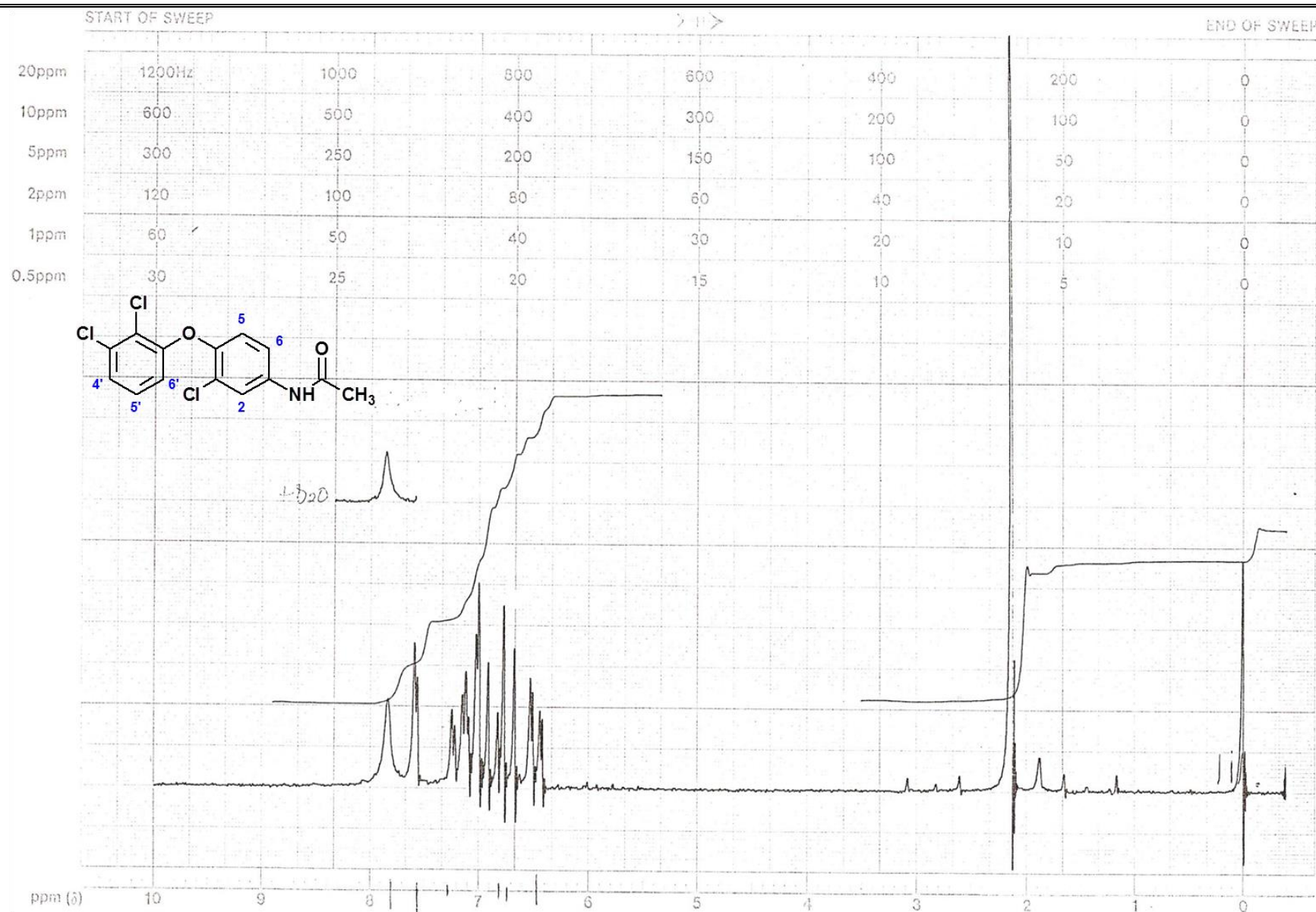
Scan 380 (14.226 min) of CASTI7.D  
AHC-49

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
35.00	1	103.20	2	159.25	1	242.45	1
36.90	2	103.95	2	159.50	1	242.70	1
38.00	1	104.30	2	160.50	2	244.45	1
38.90	1	106.70	11	161.40	1	246.70	5
45.80	7	107.80	3	170.65	1	248.70	1
48.95	1	108.70	43	172.65	43	251.55	4
49.95	4	109.70	15	174.65	12	253.55	4
50.95	3	110.70	16	181.50	1	254.45	1
51.80	1	111.70	4	182.50	4	255.70	1
52.95	2	112.70	1	184.65	3	258.70	1

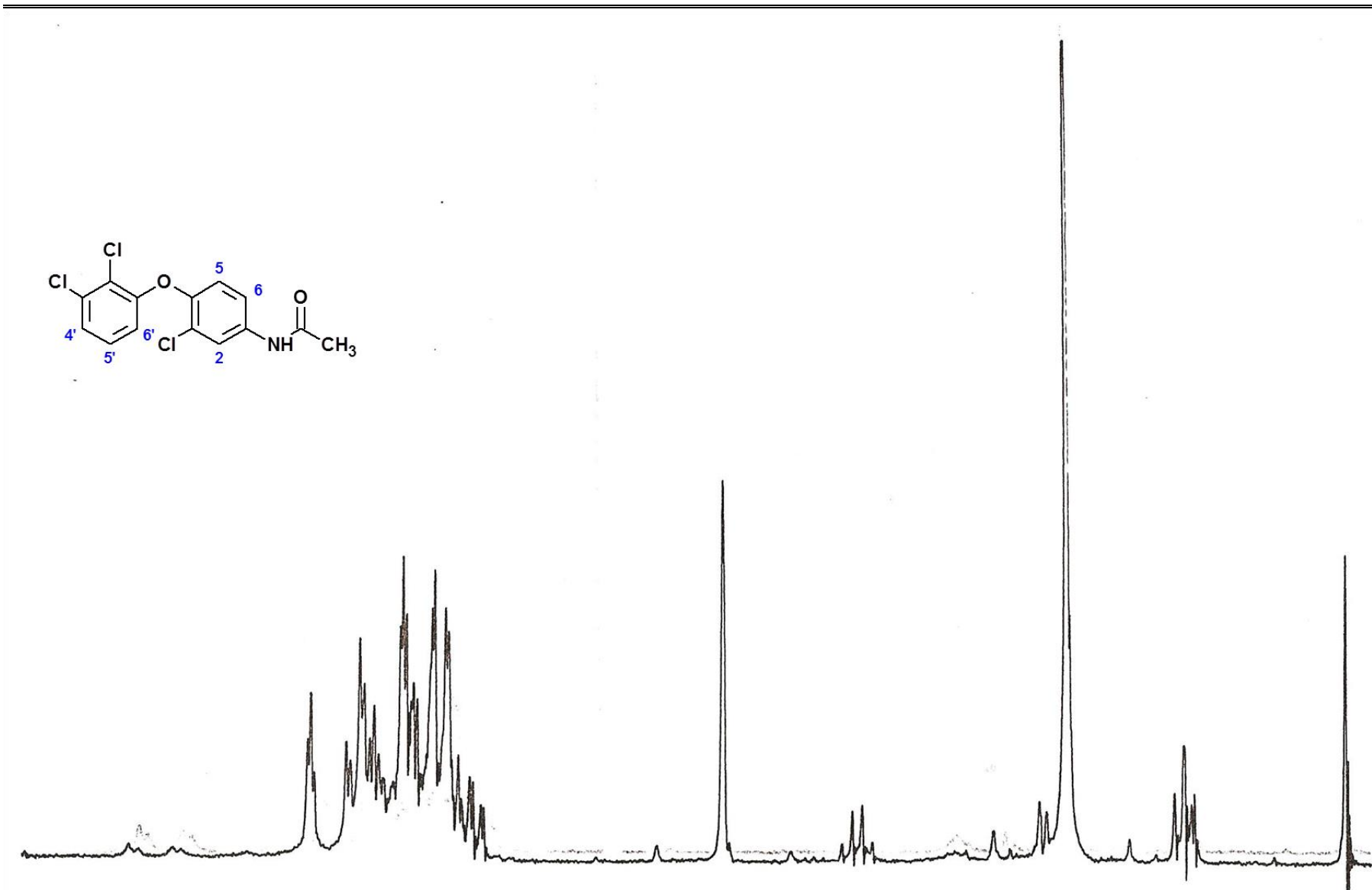
**Espectro 36.** EM (CG/IE, *m/z*) del compuesto 2-cloro-4-nitrofenil-2,3-diclorofenil éter (5-9).



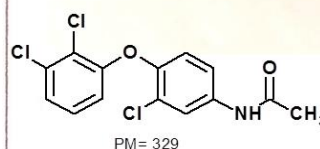
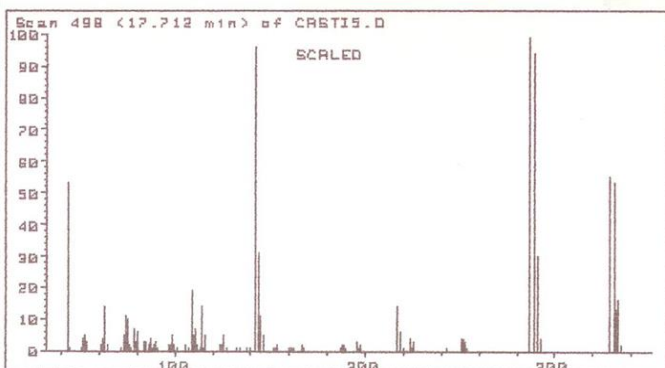
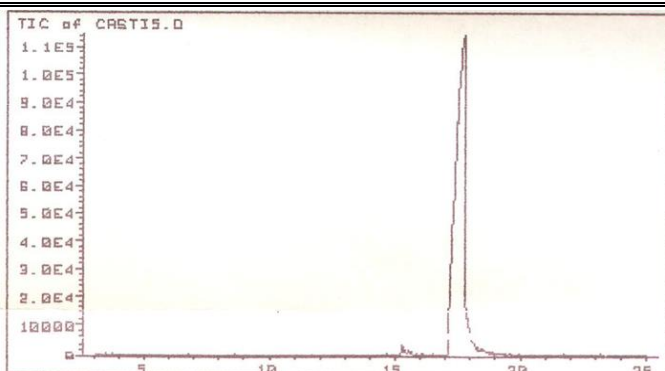
**Espectro 37.** IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (5-11).



**Espectro 38.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{CDCl}_3$ , 90 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (**5-11**).



**Espectro 39.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (5-11).



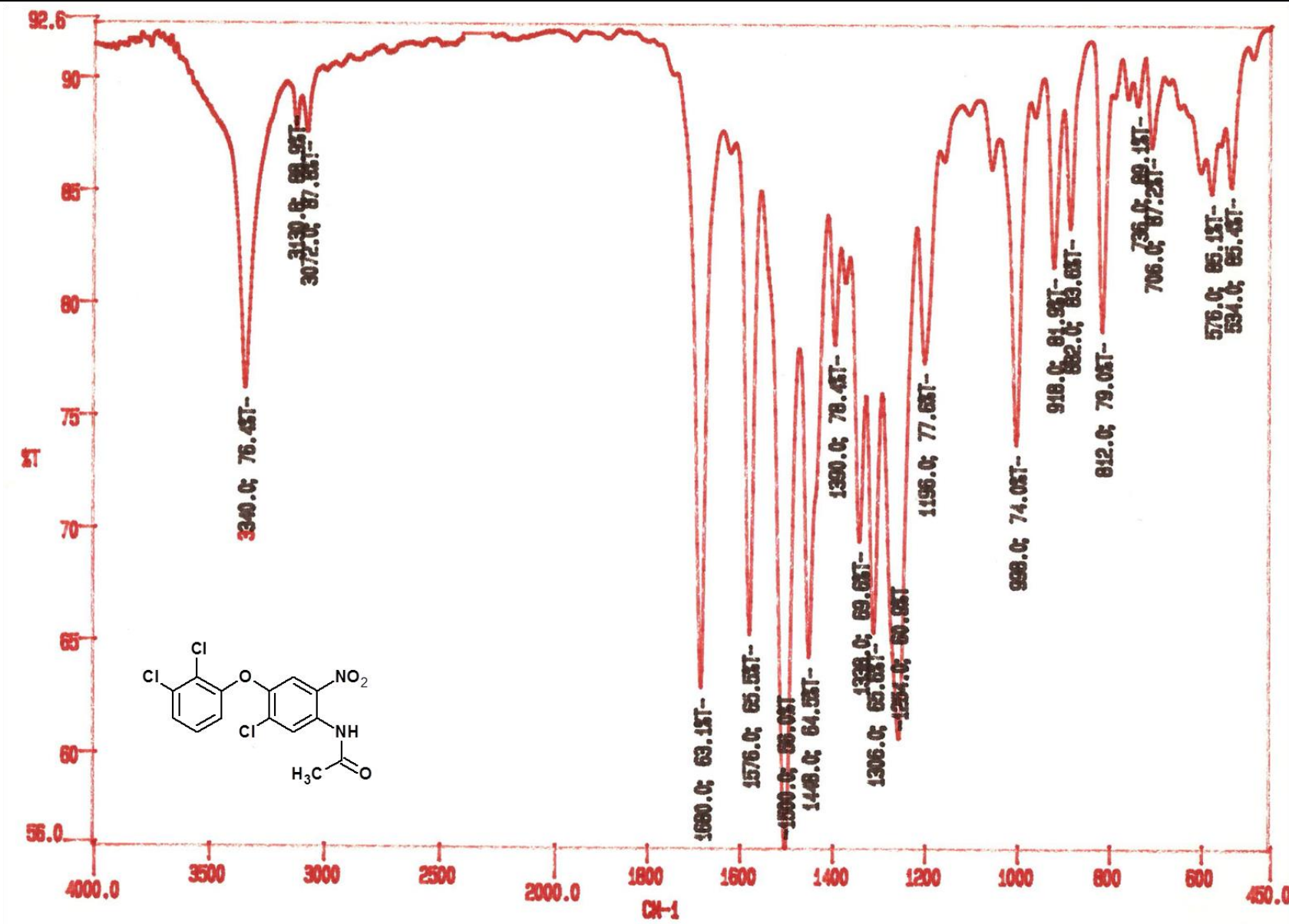
Scan 498 (17.712 min) of CASTIS.D

AHC 51A

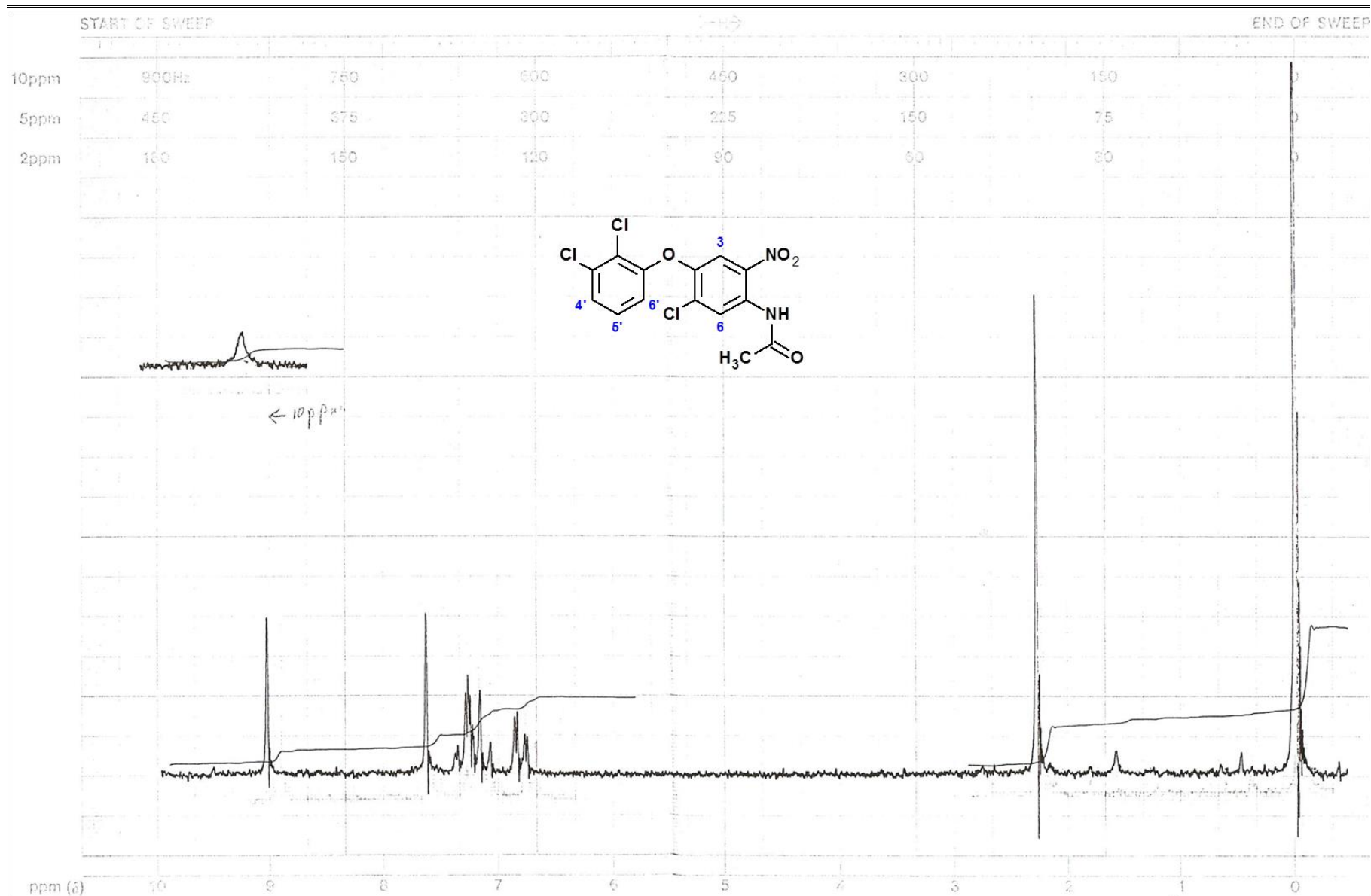
m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
43.00	53	88.80	2	134.65	1	195.65	3
43.90	1	89.95	3	138.00	1	196.40	1
50.05	1	90.80	1	140.00	1	197.65	2
50.95	4	96.95	2	141.90	96	216.75	14
51.95	5	97.95	2	143.75	31	218.50	6
52.95	3	98.80	5	144.65	11	219.65	1
61.05	2	99.70	2	146.75	5	223.80	4
61.95	4	100.80	1	151.65	1	224.70	1
62.95	14	105.80	2	152.75	1	225.70	3
64.05	2	106.95	1	153.15	1	242.70	1
71.80	1	108.80	19	153.90	2	250.70	4
72.95	5	109.95	5	159.75	1	251.80	4
73.95	11	110.80	7	160.25	1	252.70	3
74.95	10	111.80	2	161.15	1	253.55	1
75.95	2	112.95	1	162.50	1	286.70	99
76.95	1	113.80	14	162.75	1	288.70	94
77.95	7	114.80	1	166.90	2	290.55	30
79.05	3	115.80	5	167.65	1	292.55	4
79.95	6	123.80	2	186.75	1	328.75	55
83.95	3	124.80	2	187.15	1	330.65	53
84.80	3	125.80	5	187.75	2	331.75	13
85.95	2	127.70	1	188.65	2	332.65	16
86.80	4	132.70	1	189.75	1	334.75	2
87.95	1						

**Espectro 40.** EM (CG/IE, *m/z*) del compuesto *N*-[3-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)fenil]acetamida (5-11).

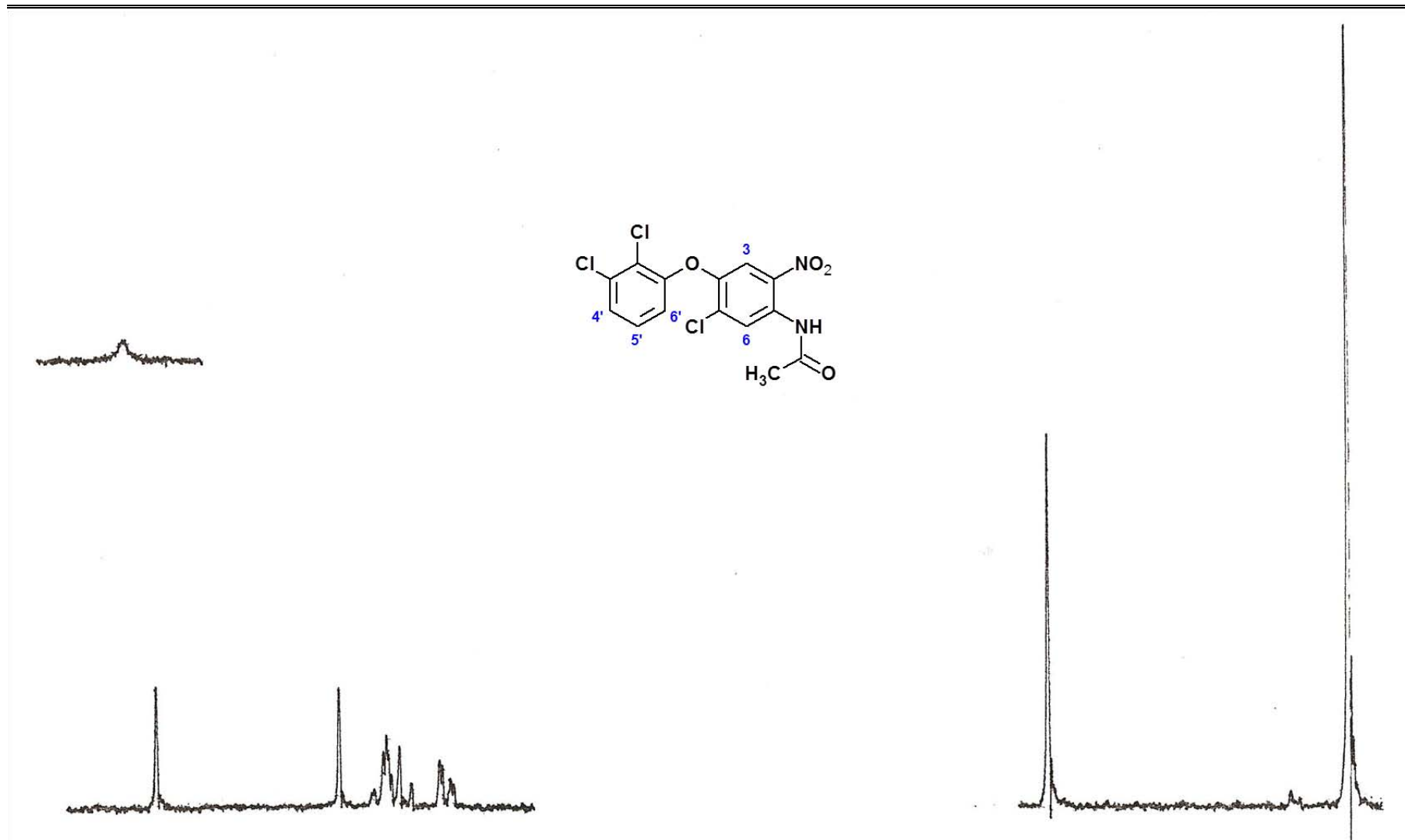




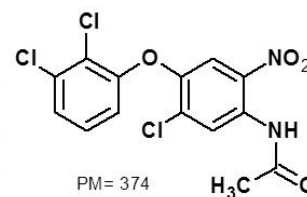
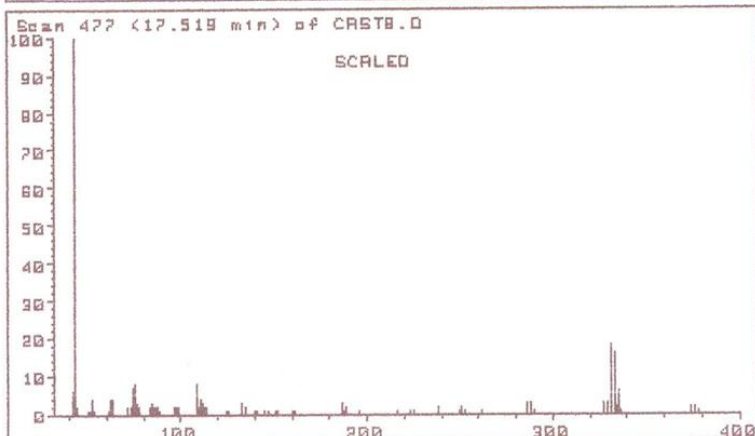
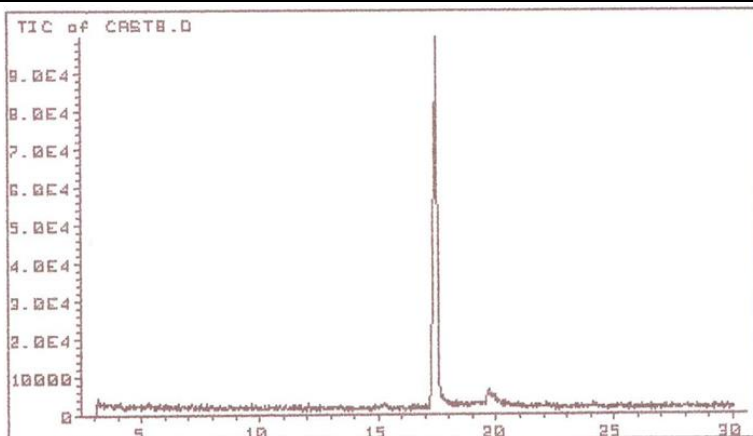
Espectro 41. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-12).



**Espectro 42.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-2-nitrofenil]acetamida (5-12).



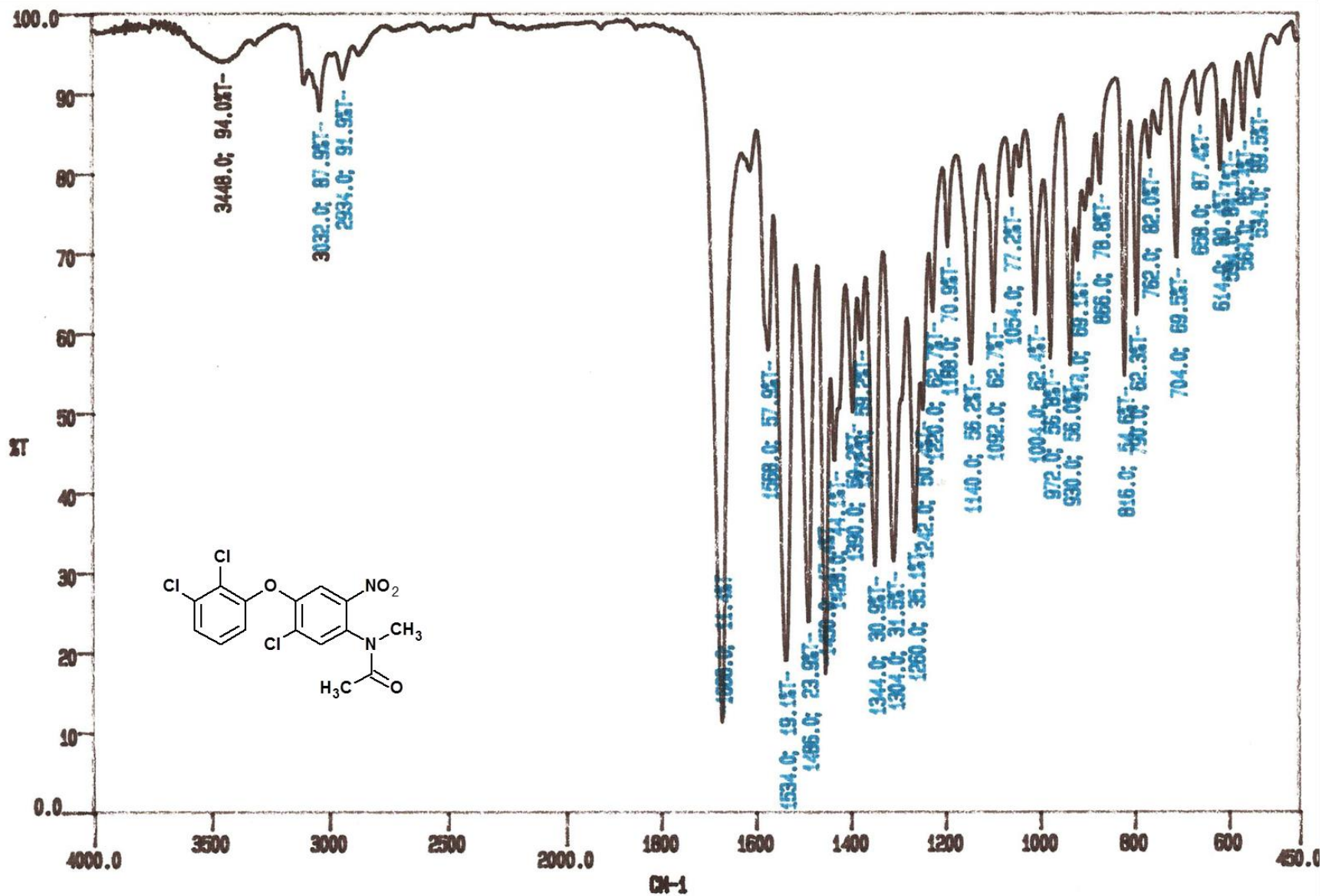
**Espectro 43.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-12).



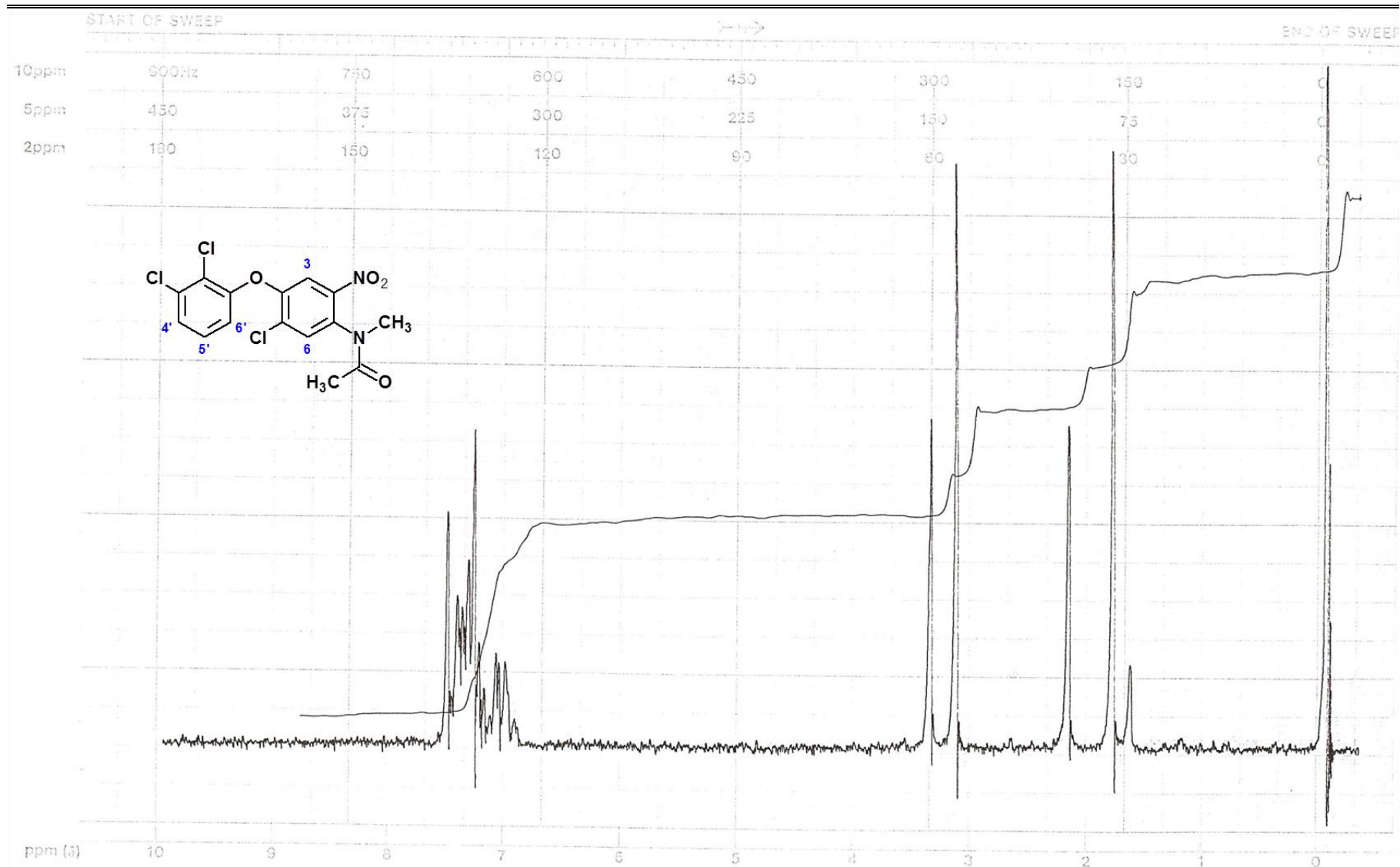
Scan 477 (17.519 min) of CAST8.D  
CLAVE MTRA "52-A"

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
41.90	6	84.80	3	139.90	1	250.95	2
42.90	100	85.95	2	140.90	1	252.95	1
43.90	2	86.95	2	144.90	1	261.95	1
50.00	1	87.95	2	146.90	1	285.90	3
50.90	1	88.95	1	150.90	1	287.90	3
51.90	4	96.95	2	152.00	1	289.90	1
53.00	1	98.05	2	159.95	1	327.95	3
60.90	1	98.95	2	161.80	1	329.95	3
61.90	4	108.95	8	186.95	3	331.95	18
62.90	4	109.90	2	187.95	1	333.05	2
71.80	2	111.00	4	188.95	2	333.95	16
72.95	2	112.00	3	195.80	1	334.80	2
73.95	7	113.00	2	215.90	1	335.95	6
74.95	8	114.00	2	222.90	1	336.80	1
75.95	3	125.00	1	225.00	1	373.90	2
76.80	1	126.00	1	237.90	2	375.90	2
77.95	2	132.90	3	249.80	1	378.00	1
83.95	2	134.75	2				

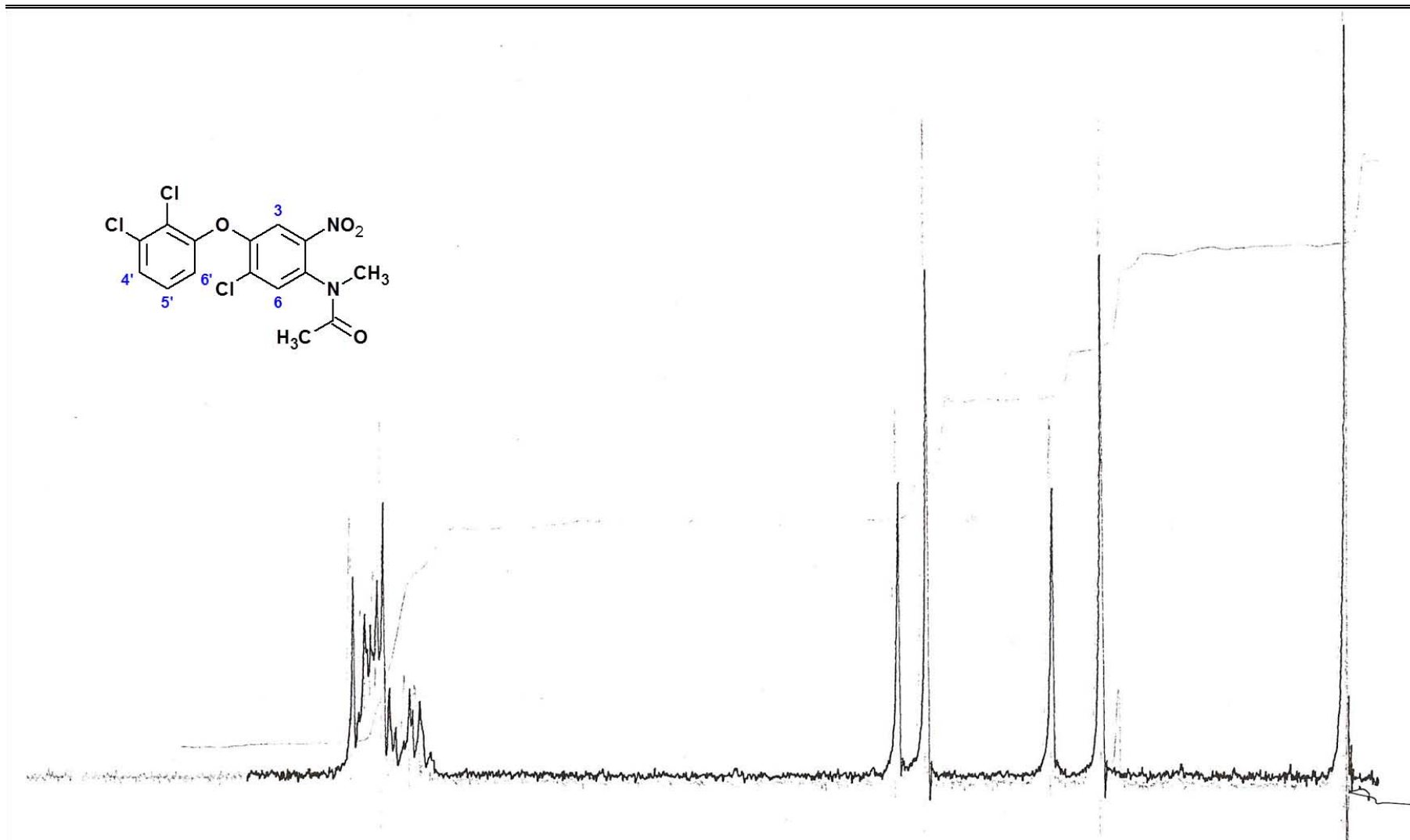
**Espectro 44 . EM (CG/IE, m/z) del compuesto N-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-12).**



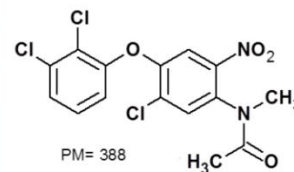
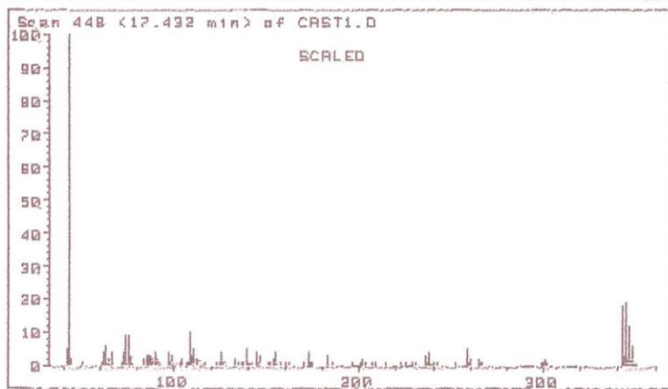
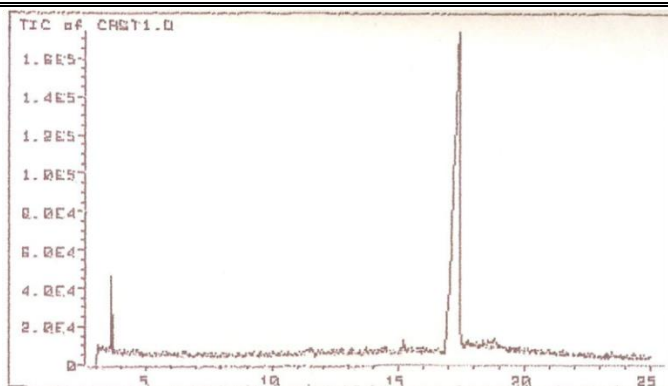
Espectro 45. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (5-13).



**Espectro 46.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{CDCl}_3$ , 90 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (**5-13**).



**Espectro 47.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (5-13).



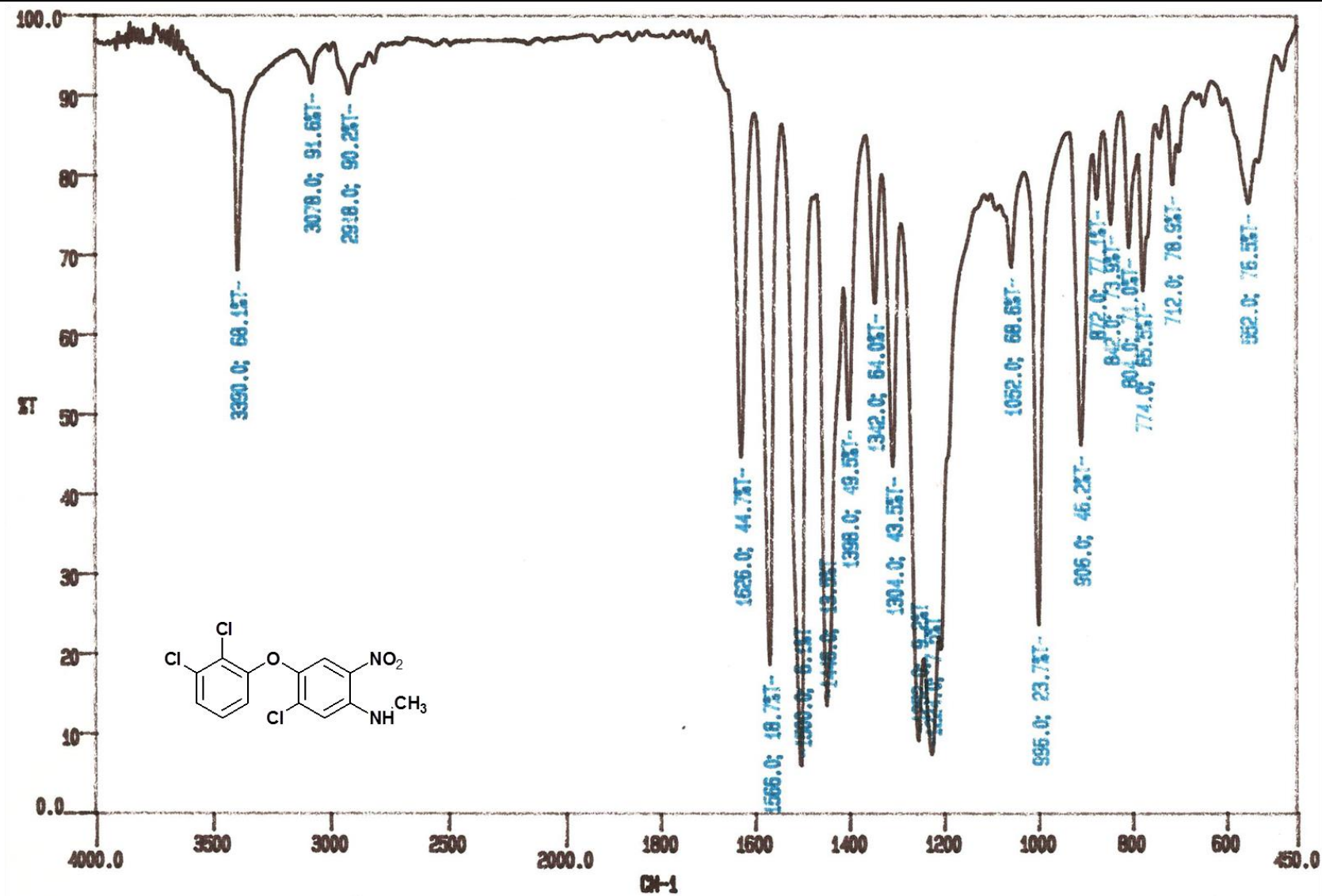
Scan 448 (17.432 min) of CAST1.D

CLAVE 1

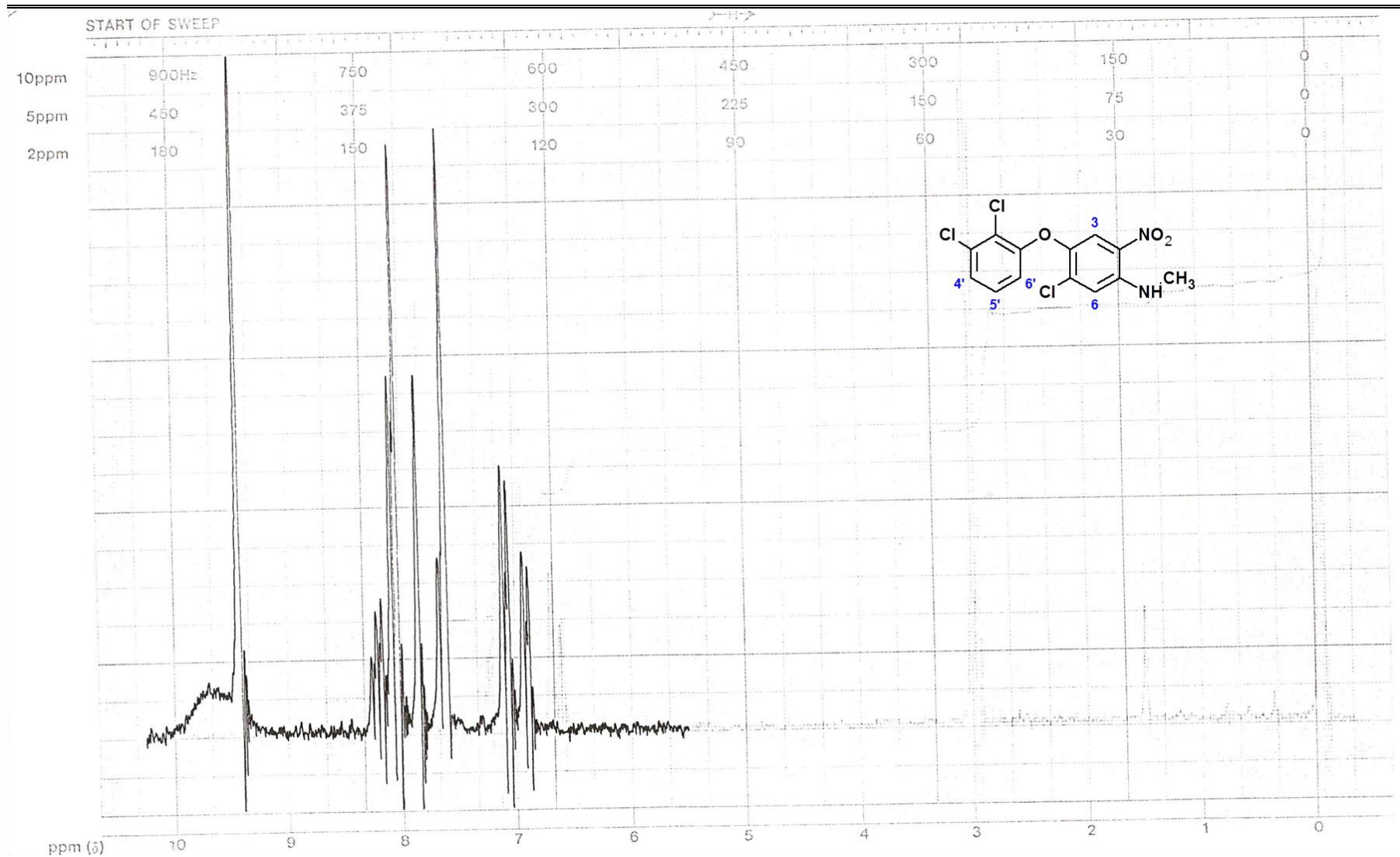
m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
42.00	5	99.80	1	144.90	4	235.90	3
42.90	100	100.80	1	145.90	1	236.90	1
44.00	2	102.95	1	146.90	3	237.90	4
49.90	1	103.95	2	151.00	1	238.90	1
61.00	1	106.95	1	152.00	1	239.90	1
61.90	4	107.80	1	153.95	2	241.95	1
62.90	6	108.80	10	154.95	4	251.95	1
64.00	1	109.90	3	156.95	1	257.95	5
64.90	2	110.90	5	159.95	1	259.05	1
65.95	4	112.00	2	161.95	1	259.95	2
71.80	1	112.90	2	169.80	1	264.95	2
72.95	4	113.90	1	172.95	4	265.80	1
73.95	9	115.00	1	173.95	1	266.95	1
74.95	9	117.00	1	174.95	1	298.90	1
75.95	3	122.90	1	182.95	3	299.90	1
76.95	1	124.90	1	184.95	1	300.90	2
83.80	2	126.00	4	195.95	1	301.90	1
84.95	3	126.90	1	201.00	1	341.95	18
85.95	3	127.90	1	202.00	2	342.80	3
86.95	3	132.90	2	203.00	1	343.95	19
87.95	2	134.90	1	206.90	1	344.80	2
89.95	4	137.00	1	208.90	1	345.80	12
90.95	2	137.90	1	214.00	1	346.95	2
91.95	1	138.90	5	222.75	1	347.80	6

**Espectro 48.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto *N*-[5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (**5-13**).

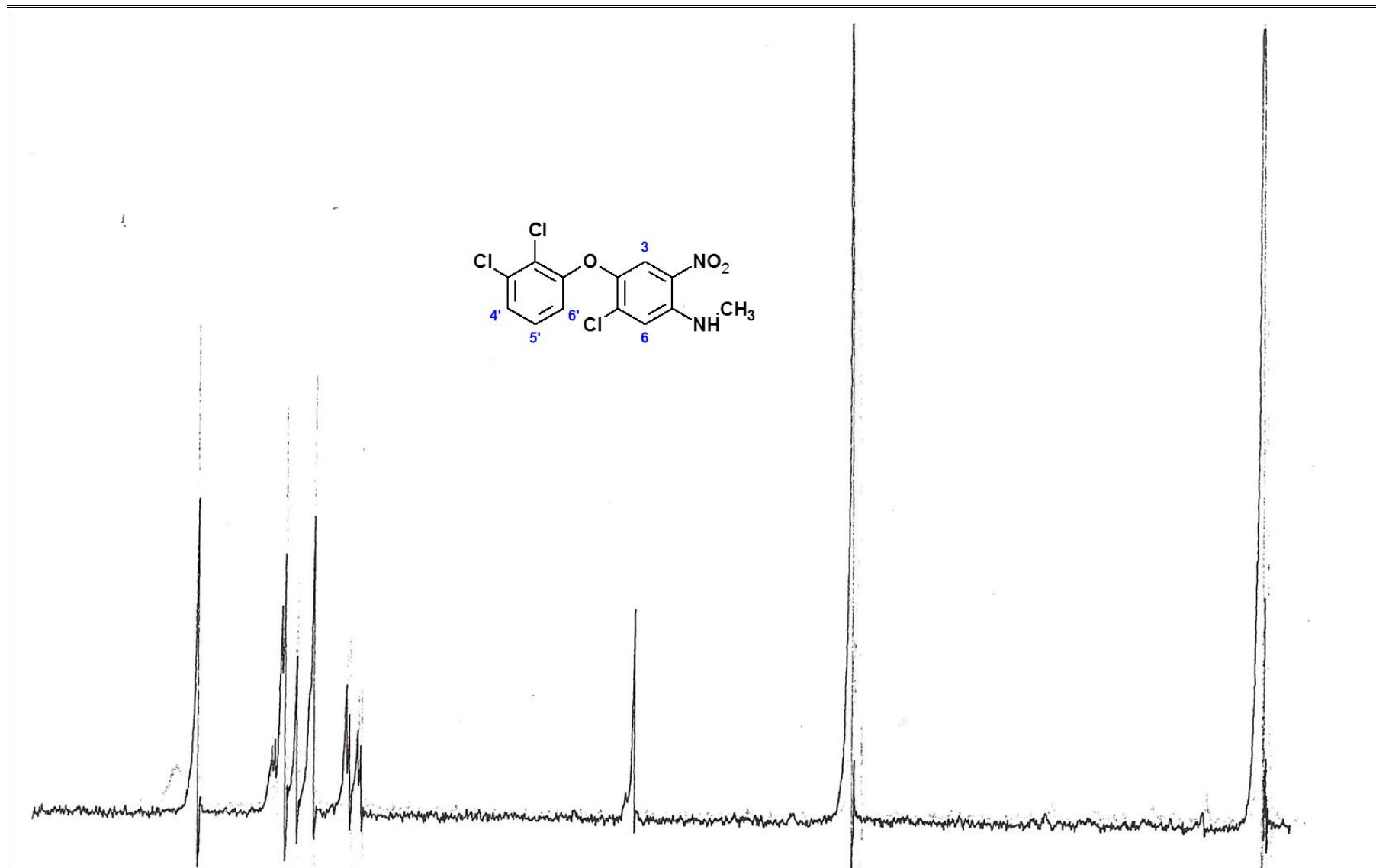




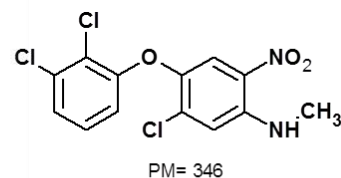
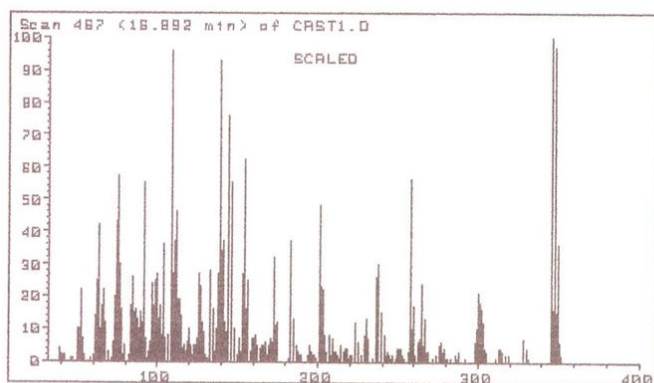
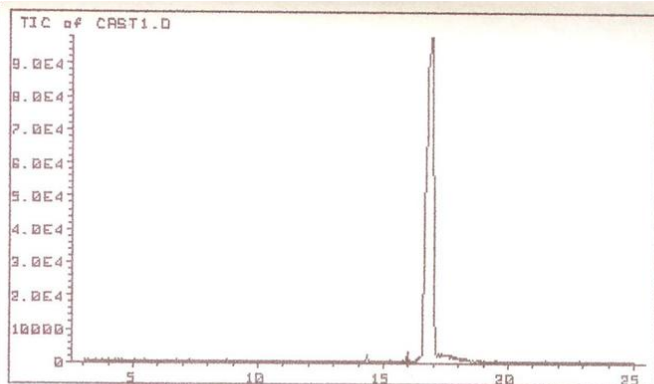
Espectro 49. IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-2-nitroanilina (5-14).



**Espectro 50.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (**5-14**).



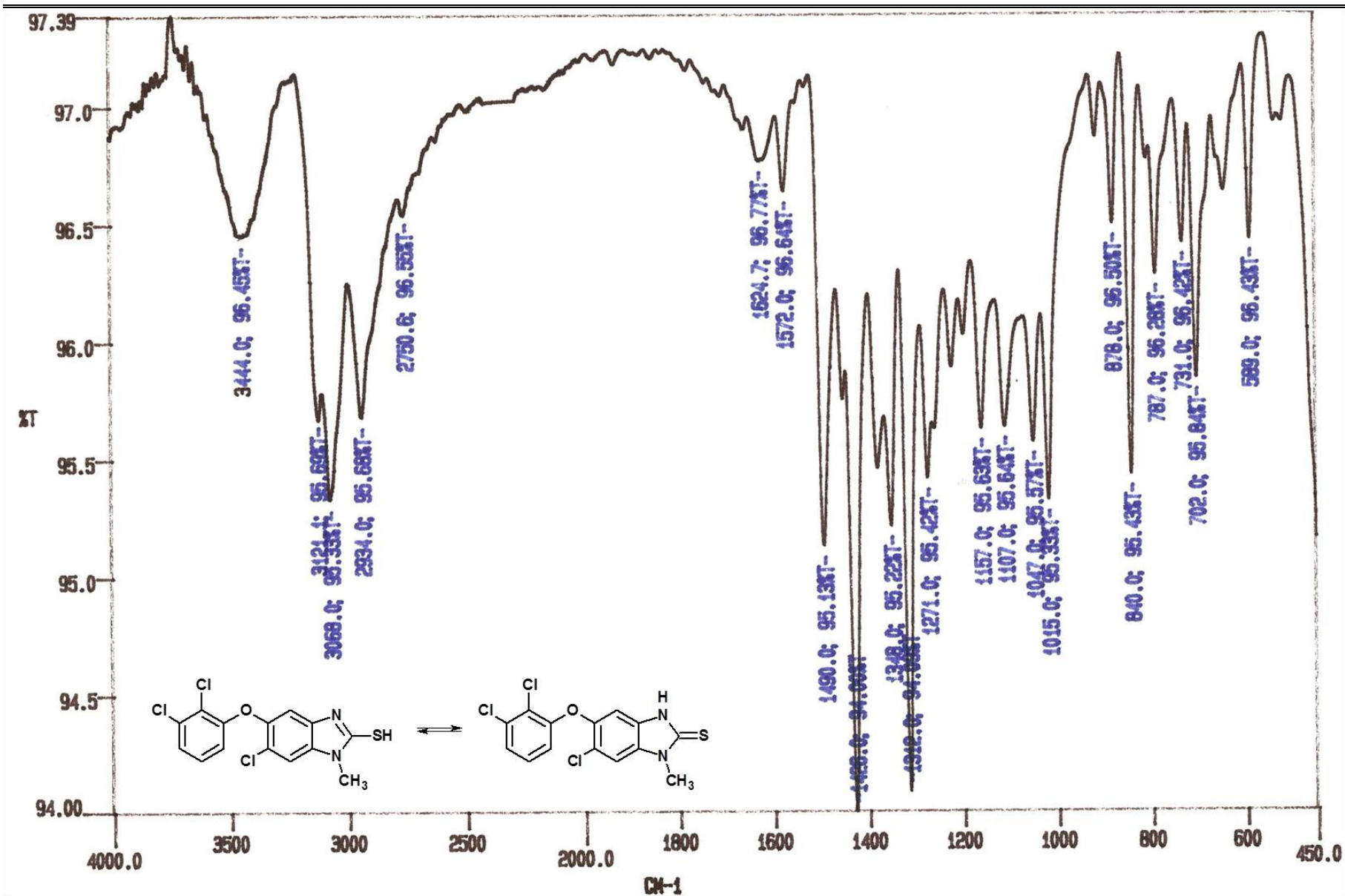
**Espectro 51.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-2-nitroanilina (5-14).



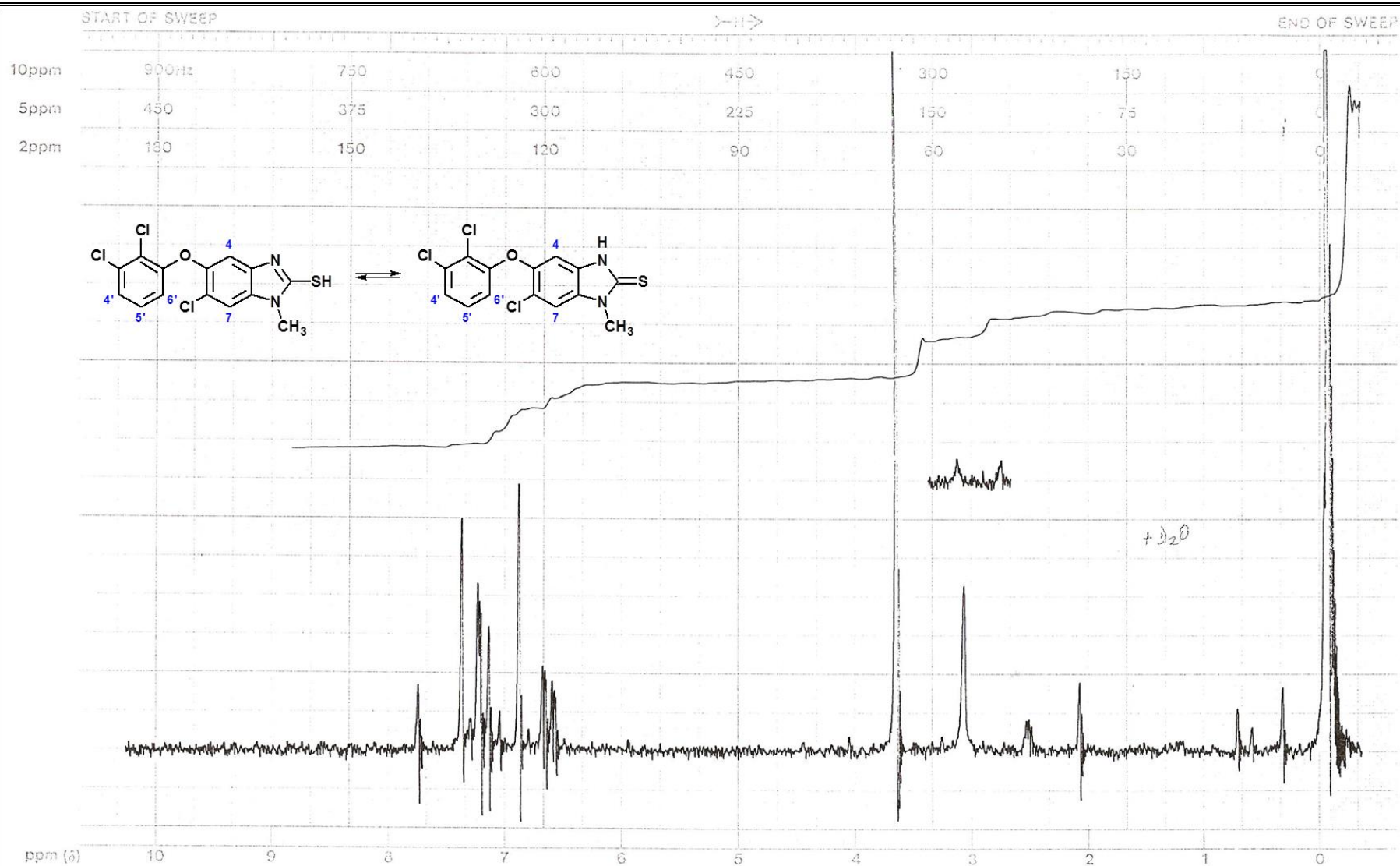
Scan 467 (16.892 min) of CAST1.D  
MTRA. NO. 1 P.M.=331

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
220.50	2	245.25	1	271.70	1	303.80	4
220.75	2	246.65	2	273.80	2	304.70	3
221.00	2	248.75	1	275.80	5	311.70	1
222.90	12	249.90	4	276.80	6	312.80	4
224.75	6	250.90	4	277.70	3	313.70	1
226.75	2	251.90	4	278.95	4	314.70	4
228.90	8	252.50	2	279.95	1	315.70	3
229.90	13	252.90	2	280.30	1	316.95	2
230.75	7	253.40	1	280.70	1	317.80	2
231.75	7	256.75	3	280.95	1	318.90	2
233.90	1	257.90	56	282.70	1	328.75	7
234.25	1	258.90	10	285.70	2	330.00	2
235.90	26	259.75	17	286.80	1	330.75	4
236.75	10	260.75	2	287.80	3	331.75	1
237.75	30	262.75	6	291.70	1	345.75	100
239.90	15	263.90	7	297.80	6	346.75	16
241.75	8	264.90	24	298.70	10	347.75	97
242.65	2	265.75	5	299.80	21	348.75	15
242.90	2	266.90	13	300.80	18	349.75	36
243.90	3	267.75	3	301.80	16	350.90	6
244.50	2	268.75	3	302.70	12	351.75	2
244.90	1	271.45	1				

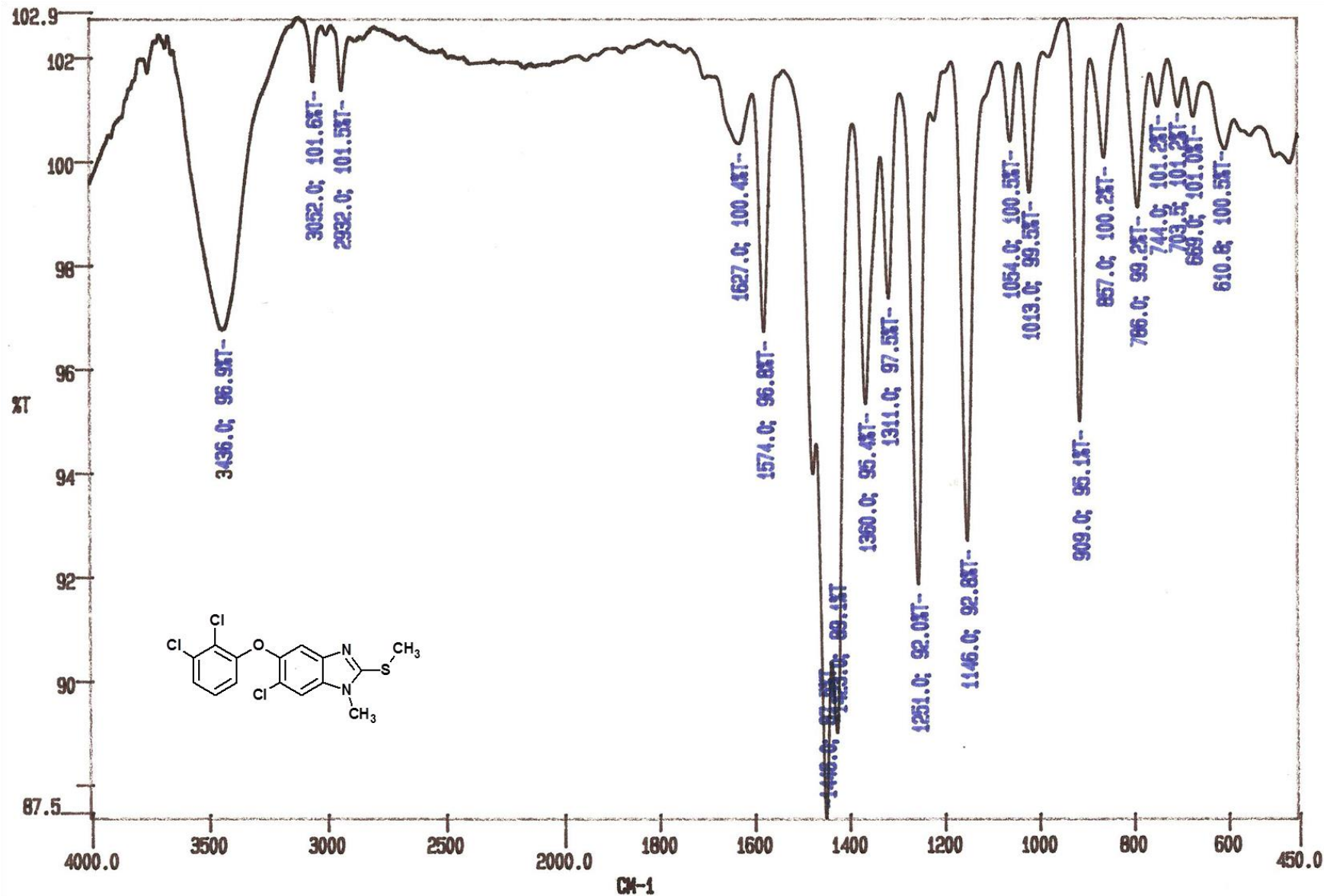
**Espectro 52.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-4-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (**5-14**).



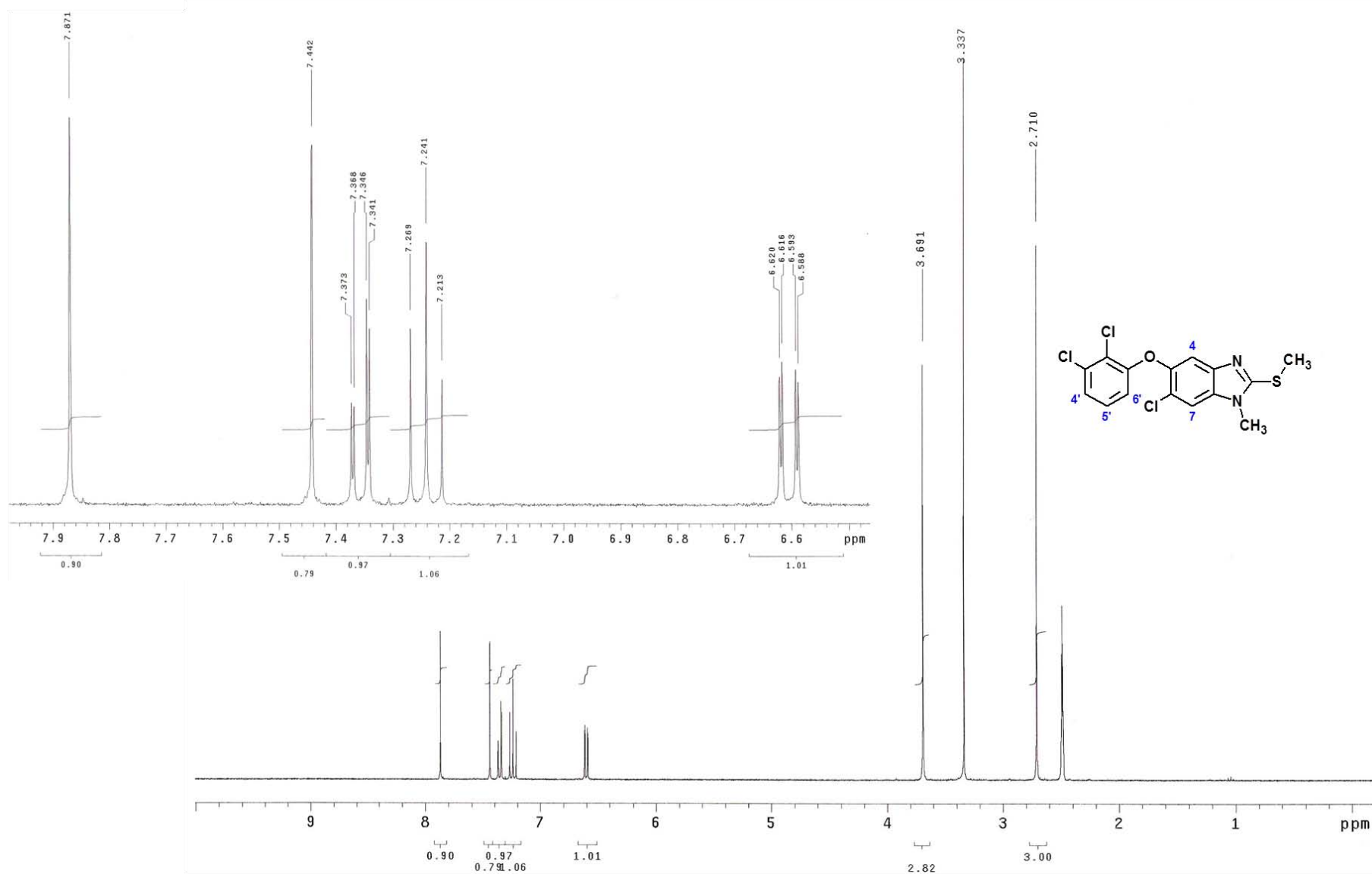
Espectro 53. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1H-benzimidazol-2-tiol (**5-16**).



**Espectro 54.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO}-d_6 / \text{CDCl}_3$ , 90 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**5-16**).

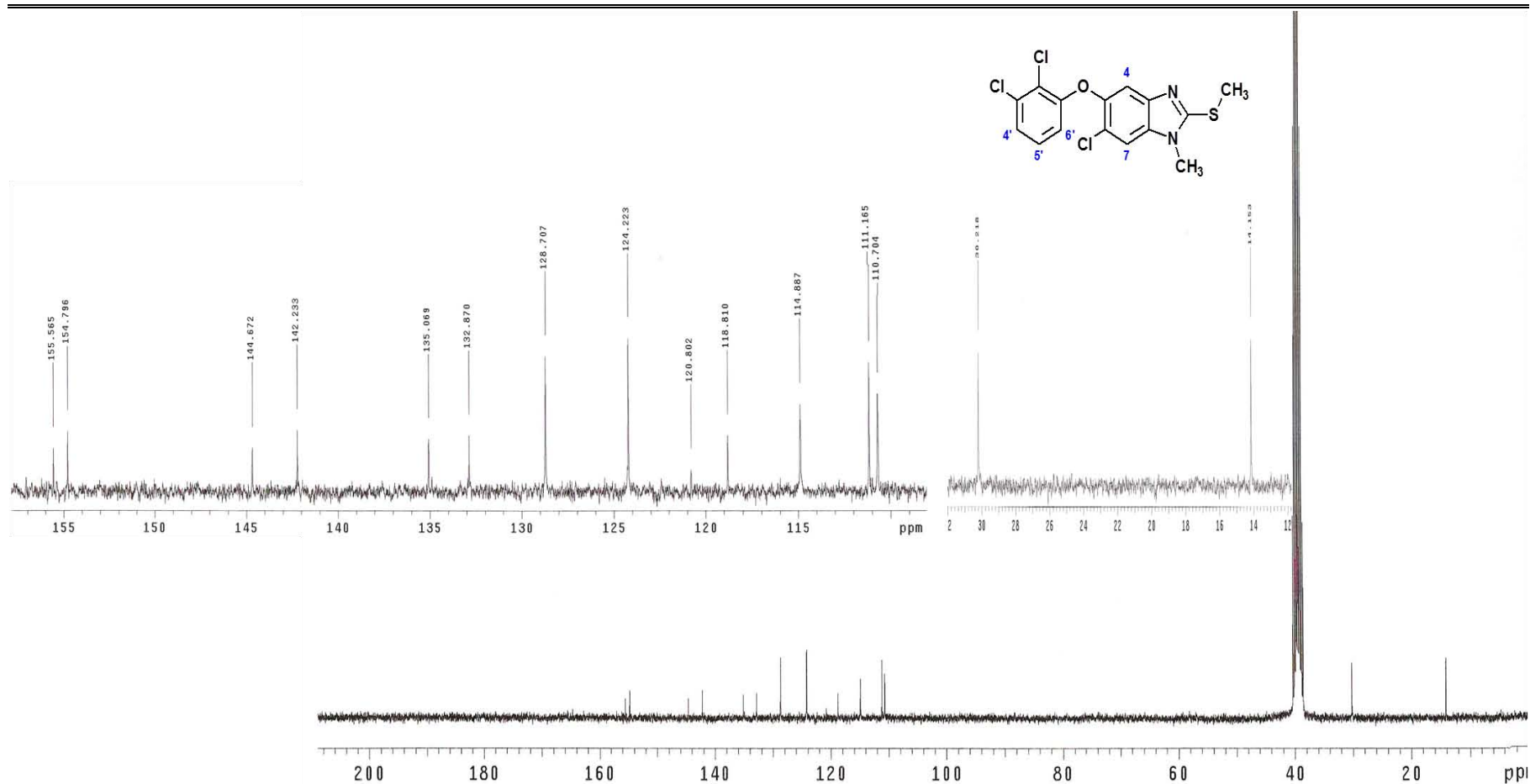


Espectro 55. IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (5-5).

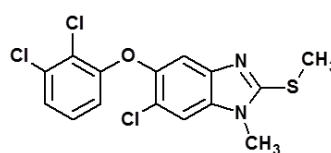
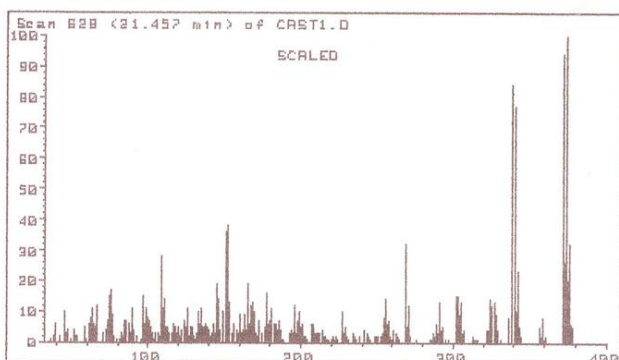
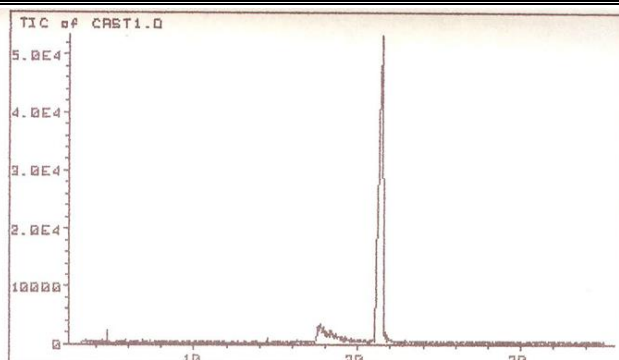


**Espectro 56.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (**5-5**).





**Espectro 57.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metilitio)-1H-benzimidazol (**5-5**).



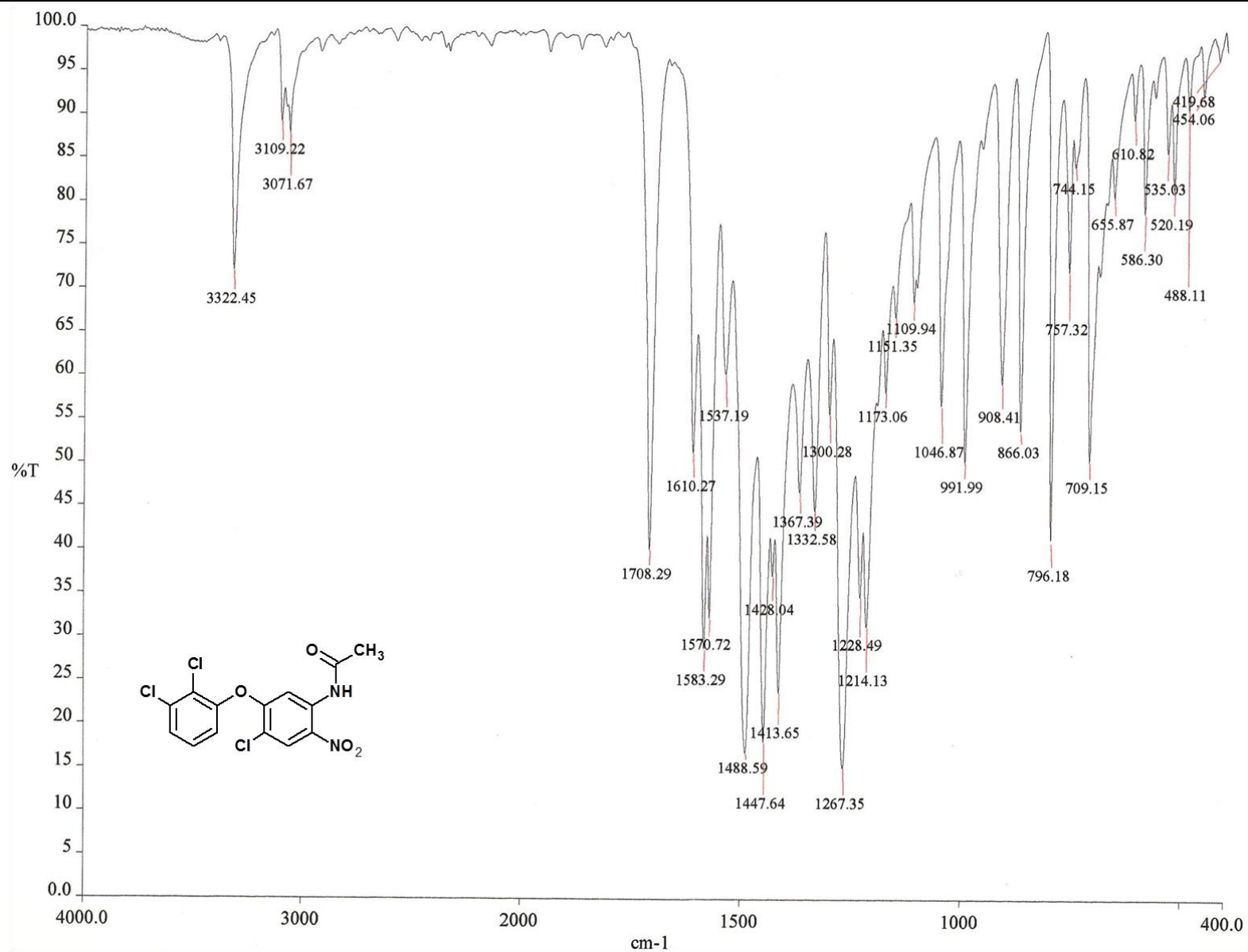
PM= 372

Scan 628 (21.457 min) of CAST1.D

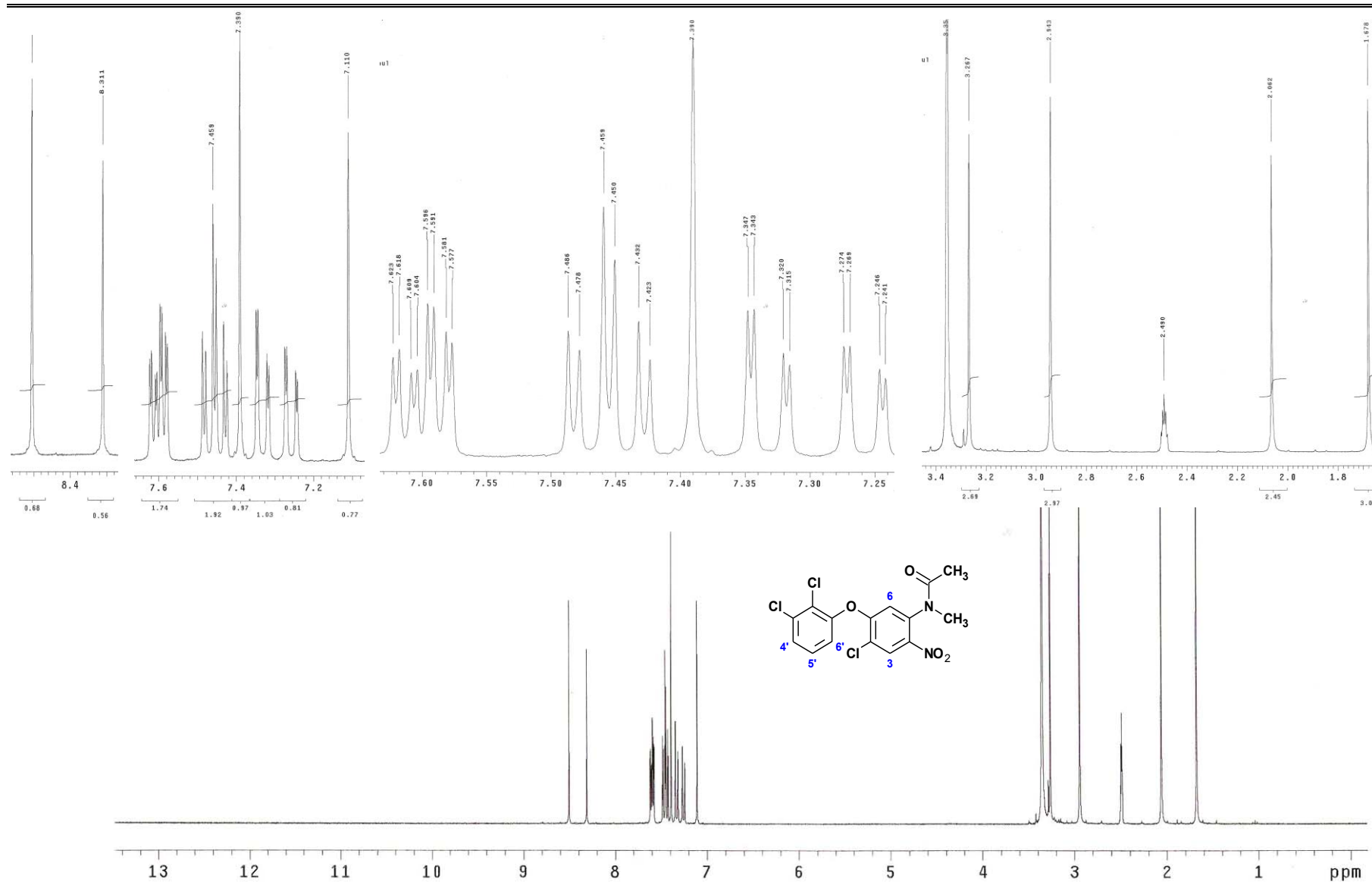
CLAVE 45

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
216.70	1	244.90	2	276.05	1	325.90	12
216.95	1	245.50	1	285.30	1	327.00	13
217.30	1	248.50	1	285.55	1	328.00	9
217.80	1	248.90	2	287.05	3	328.90	5
220.40	1	249.65	2	288.20	2	329.90	4
220.75	2	250.00	2	288.95	6	331.00	1
222.15	1	250.25	2	289.95	3	337.00	8
223.00	2	252.90	2	290.95	13	338.90	84
223.65	1	254.00	3	292.05	4	340.90	77
223.90	1	254.90	8	292.95	5	341.90	10
224.25	1	255.15	8	294.70	1	342.90	23
224.65	1	255.90	14	296.95	1	343.90	5
226.90	10	257.00	6	301.95	15	345.00	2
227.90	3	258.00	7	302.95	15	356.90	5
228.90	5	259.00	2	303.95	9	358.00	2
229.90	2	259.90	1	304.95	13	358.90	8
231.15	1	261.00	4	305.95	3	359.90	1
231.75	1	263.00	3	306.95	4	360.90	2
234.00	3	263.90	2	312.95	2	371.95	94
234.65	2	264.65	1	314.05	1	372.95	26
235.75	2	265.00	1	315.70	1	373.95	100
236.40	1	268.90	32	316.80	1	374.95	20
237.90	2	269.80	5	321.90	4	375.95	32
241.00	4	270.95	12	323.90	4	376.95	6
241.90	4	272.05	2	324.90	14	377.95	5
243.65	3						

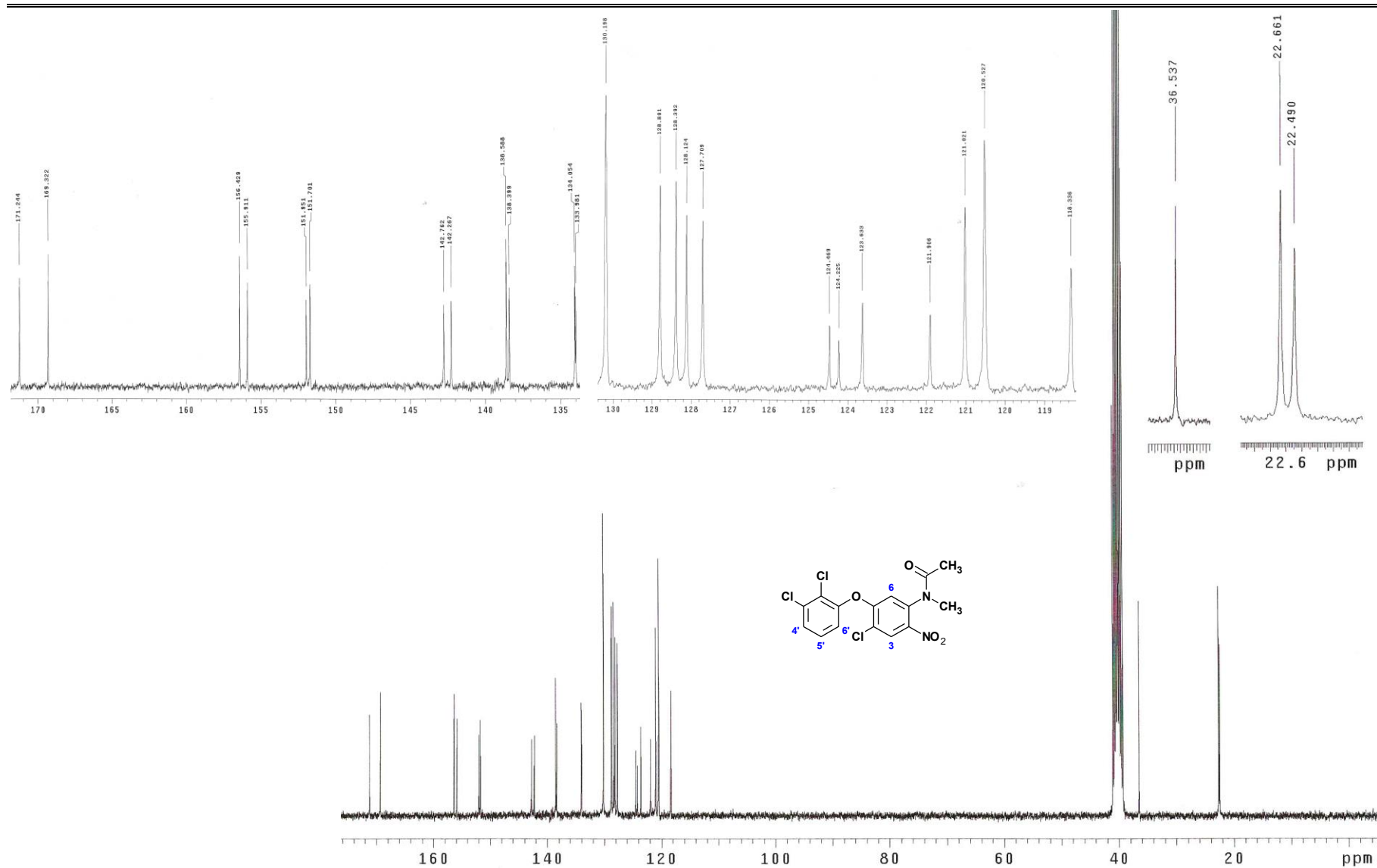
**Espectro 58.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metilthio)-1H-benzimidazol (**5-5**).



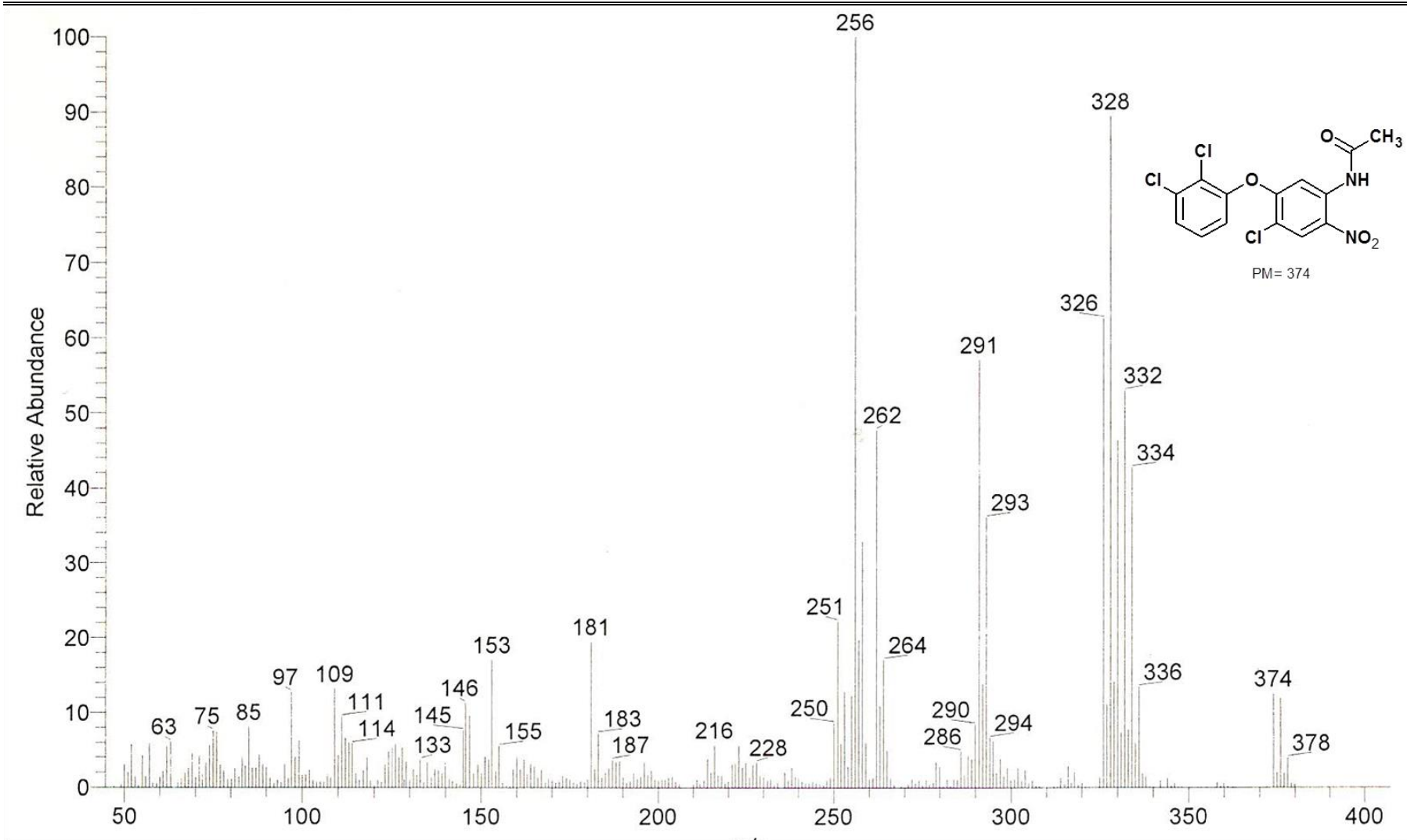
**Espectro 59.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-17).



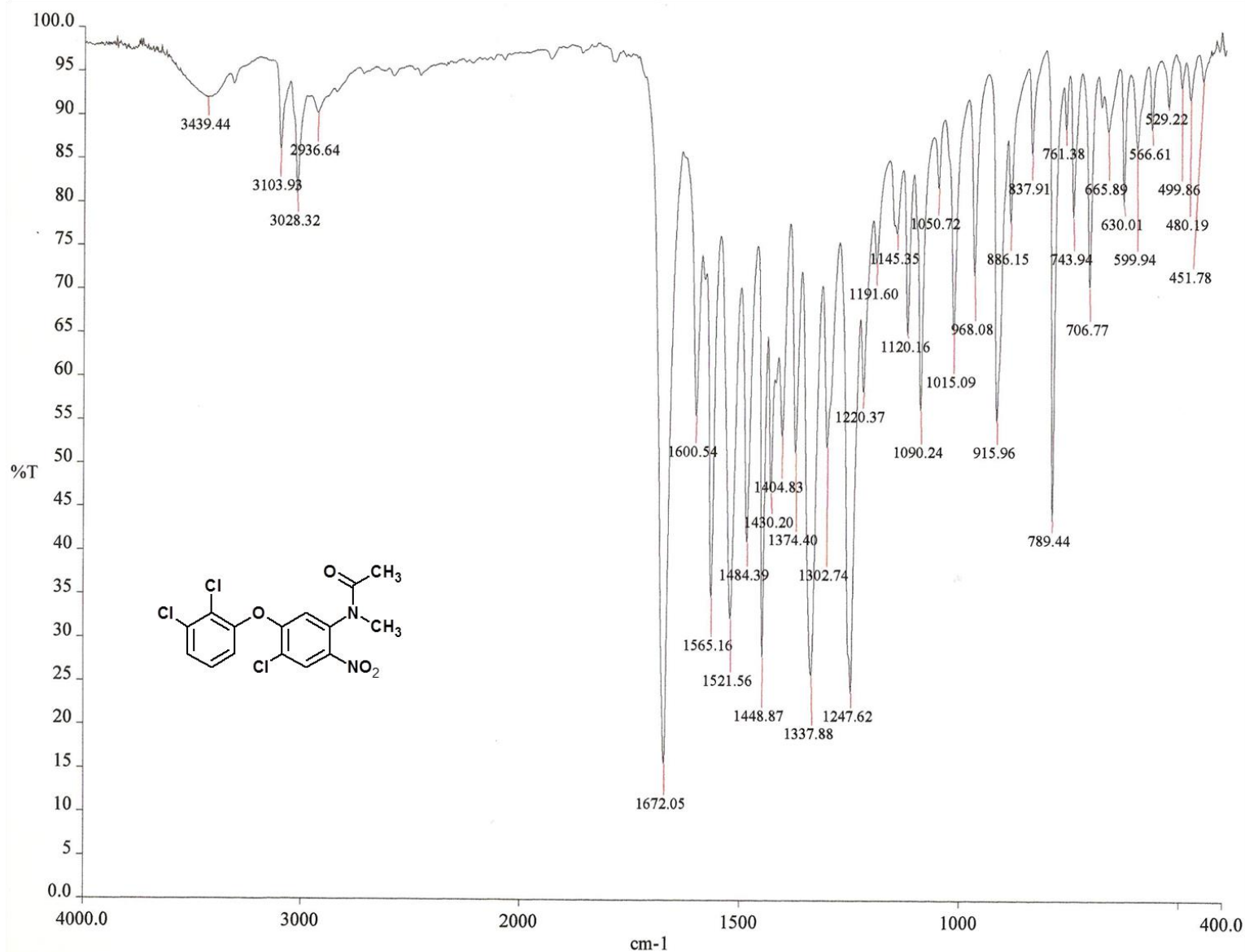
**Espectro 60.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, acetona- $d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-17).



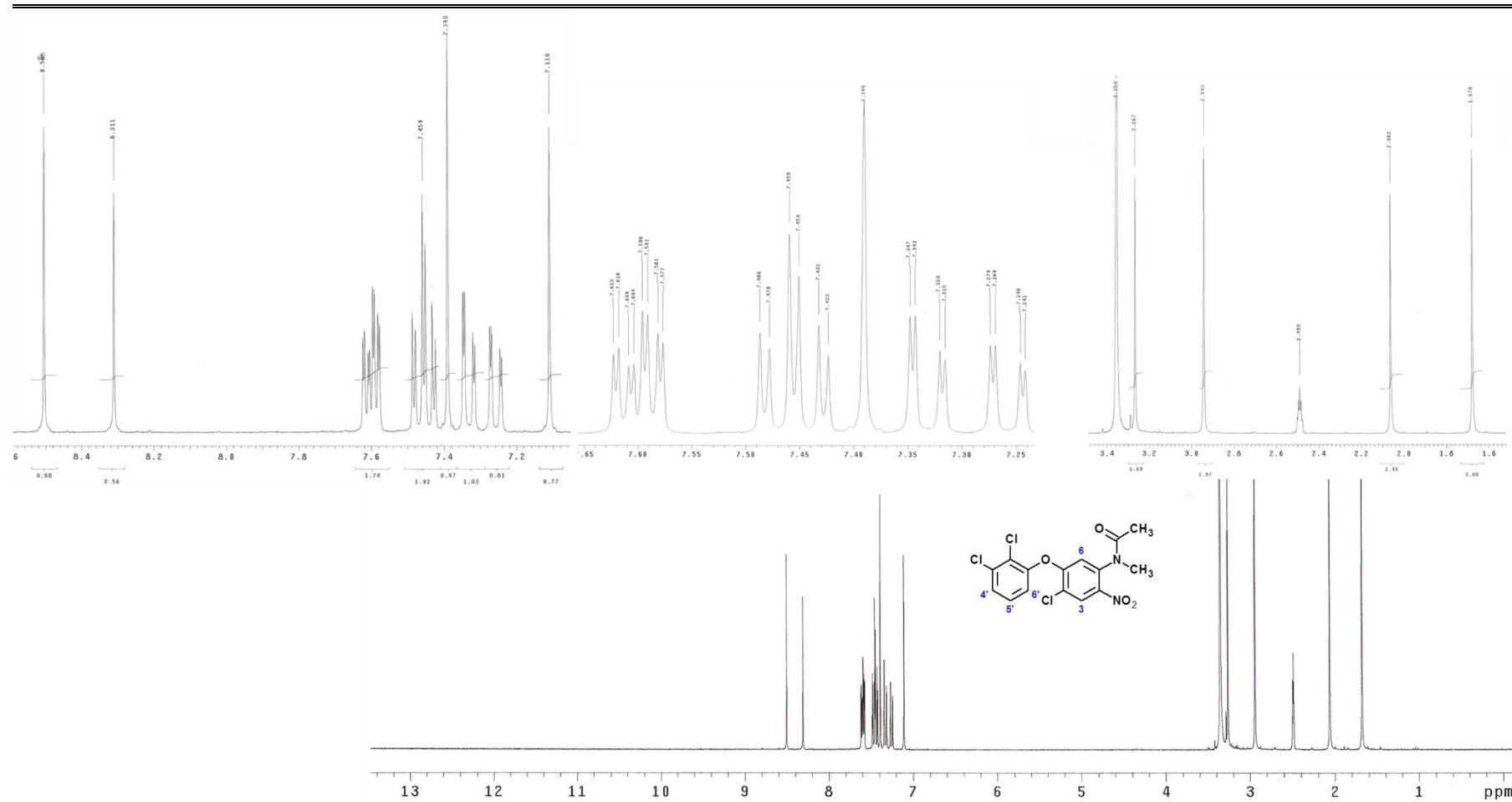
**Espectro 61.** RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 100 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-17).



**Espectro 62.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]acetamida (5-17).

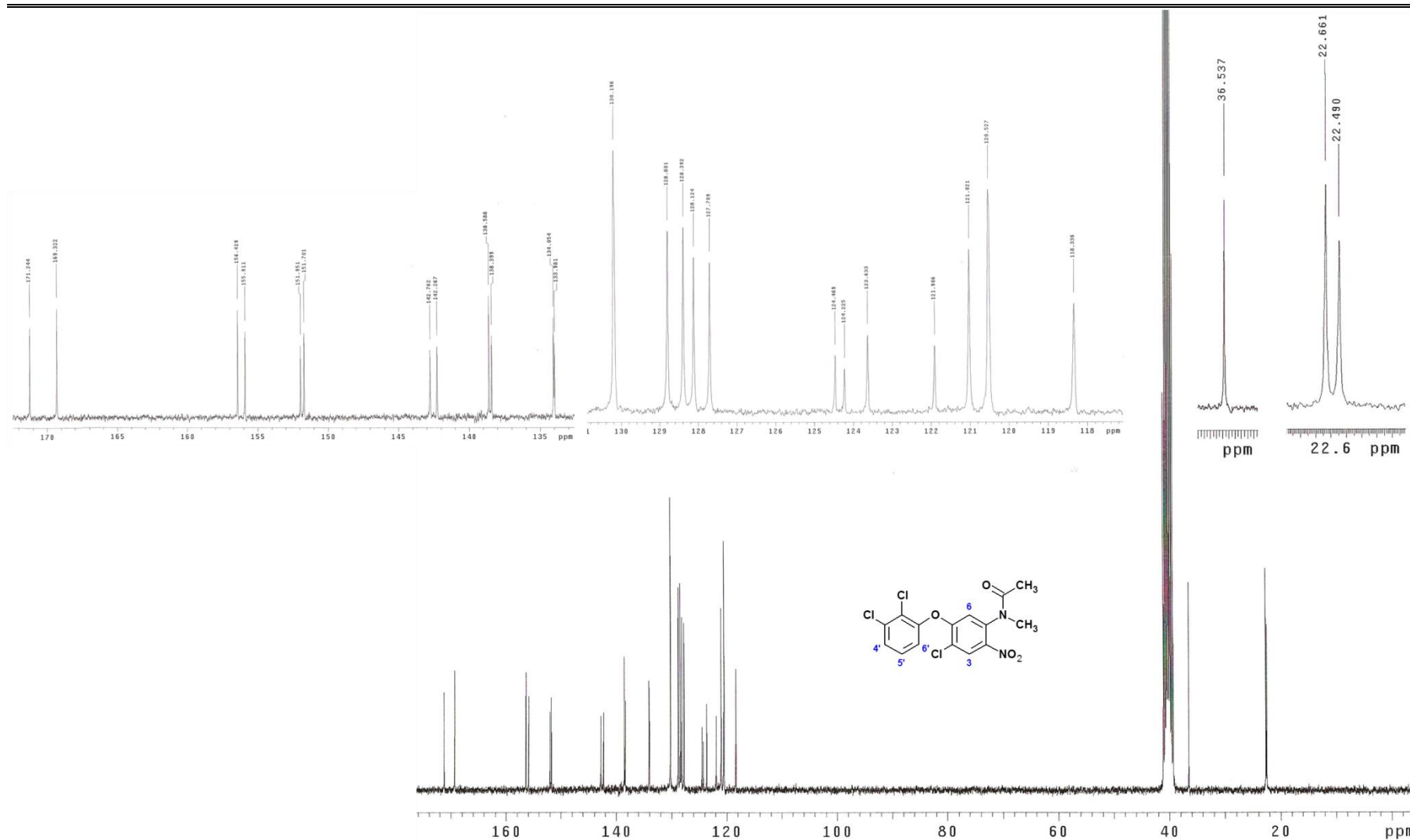


**Espectro 63.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (5-18).

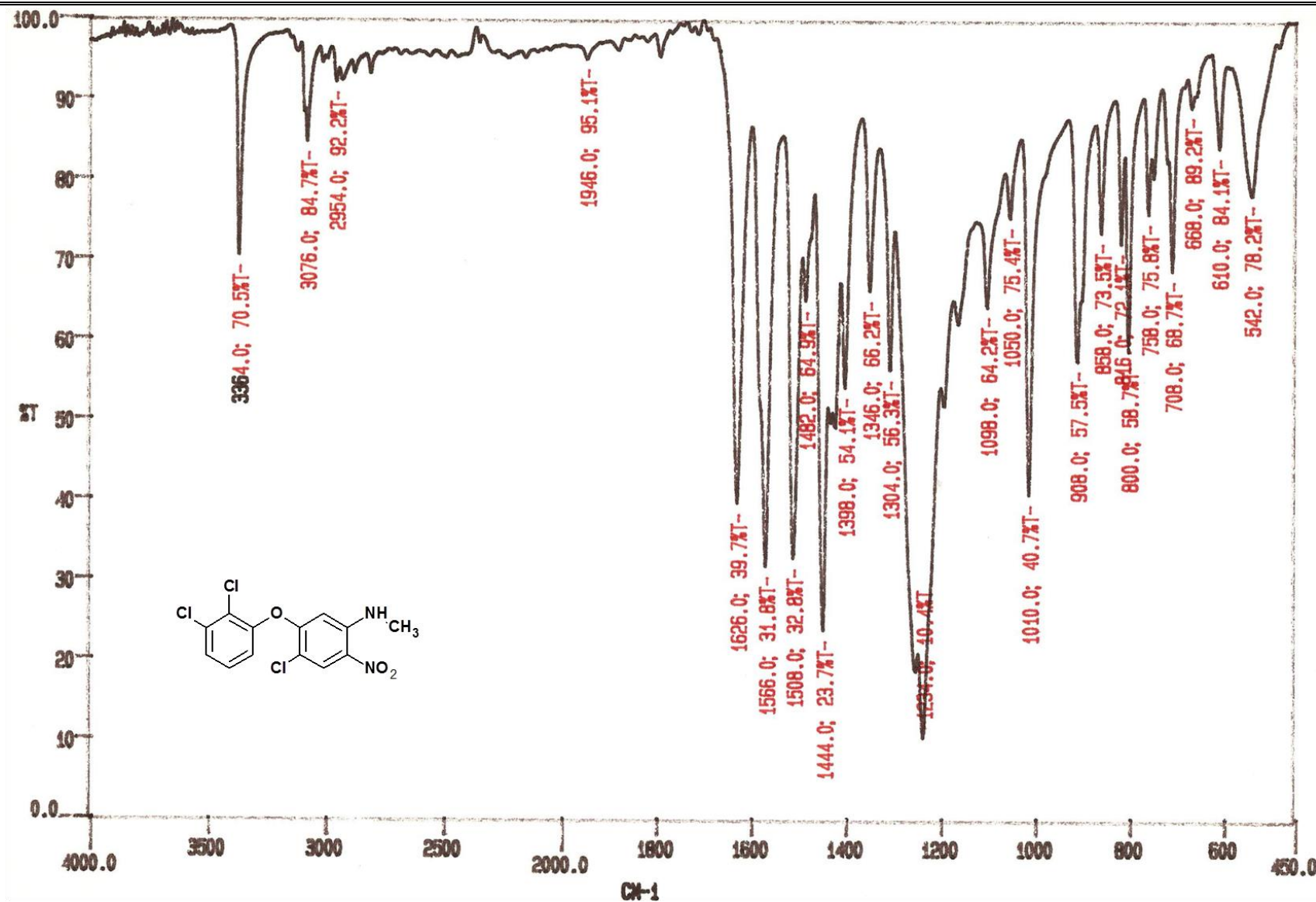


**Espectro 64.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (**5-18**).

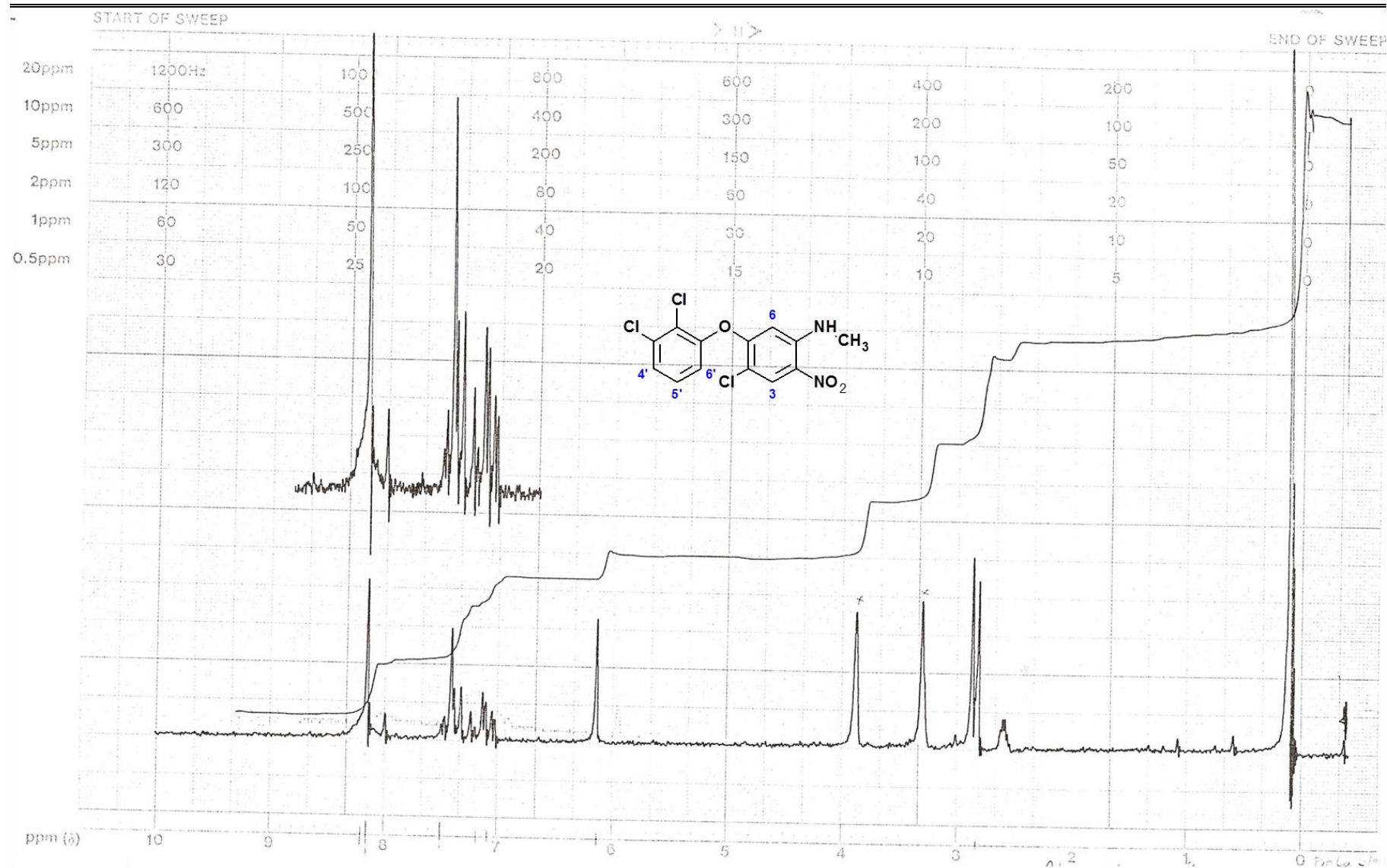




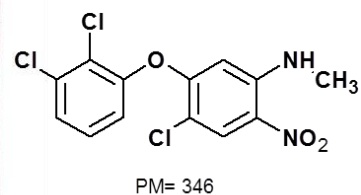
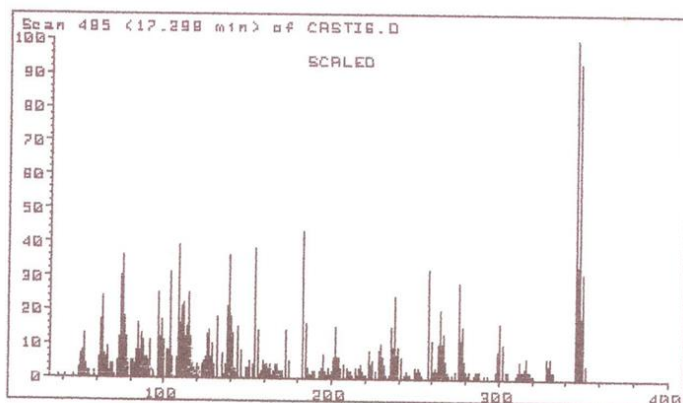
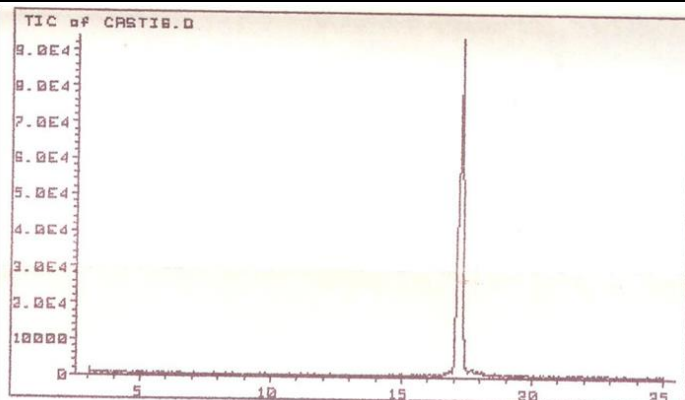
**Espectro 65.** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[4-cloro-5(2,3-diclorofenoxy)-2-nitrofenil]-*N*-metilacetamida (**5-18**).



Espectro 66. IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-N-metil-2-nitroanilina (5-19).



**Espectro 67.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub> / CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-*N*-metil-2-nitroanilina (5-19).

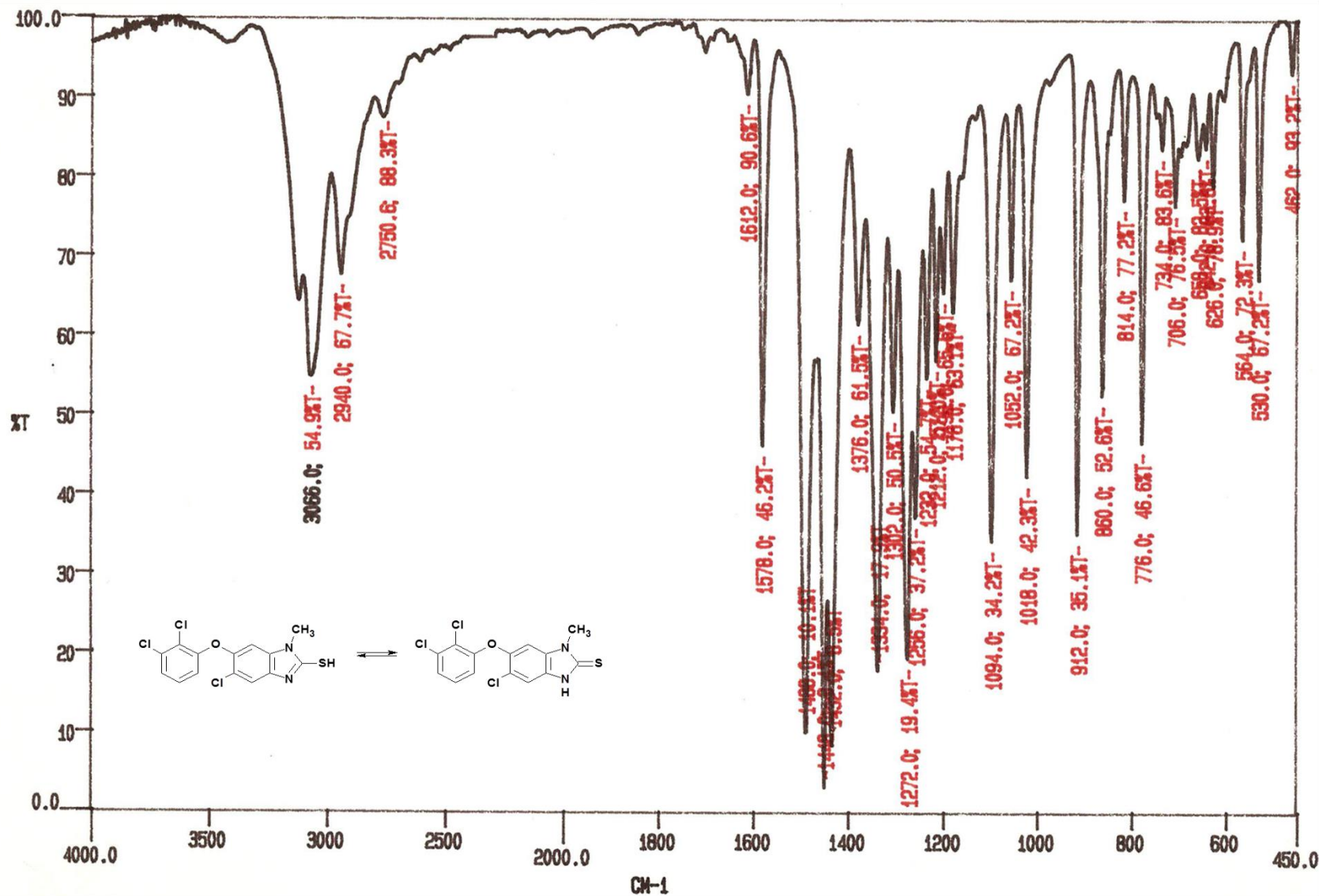


Scan 485 (17.298 min) of CAST16.D

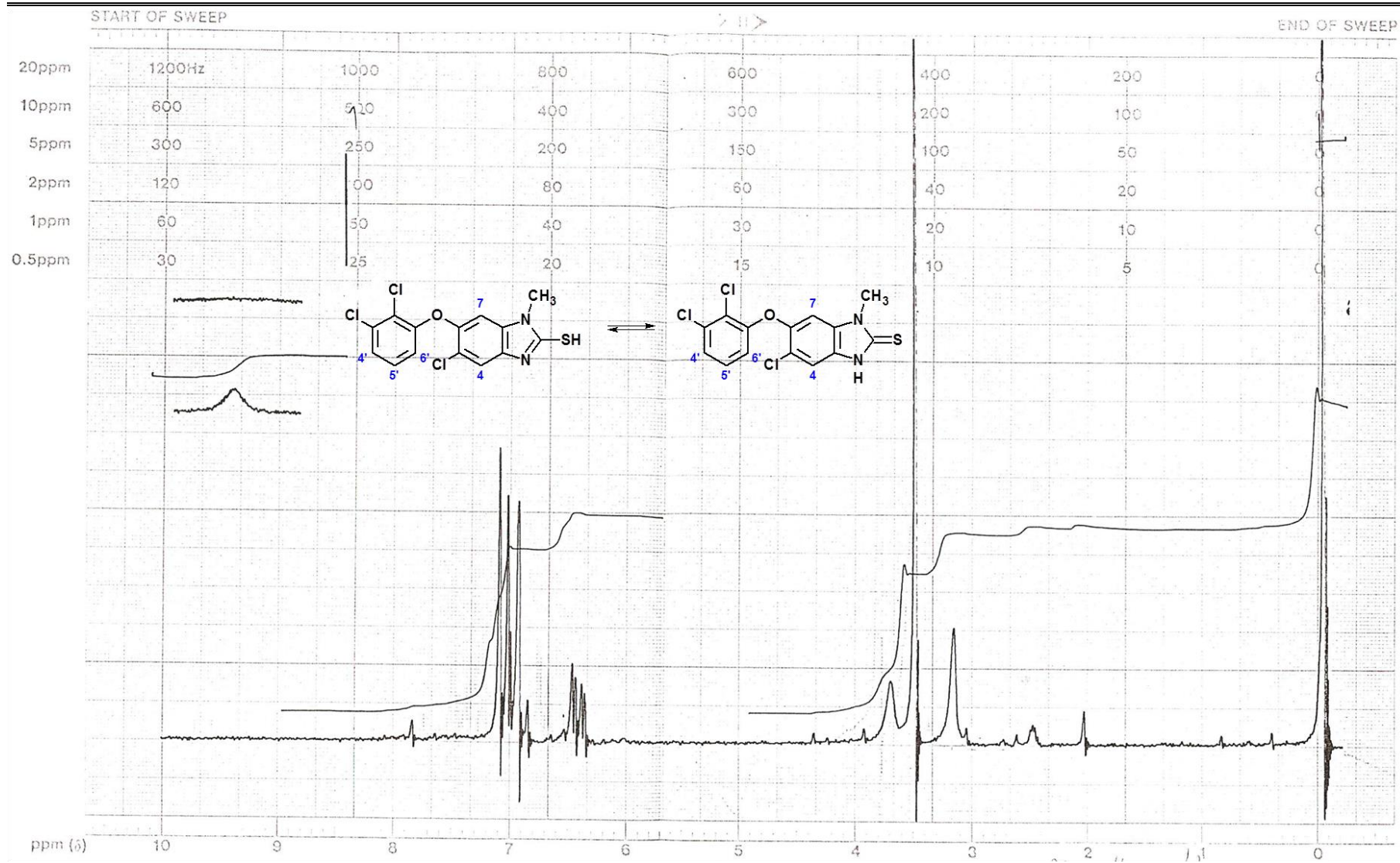
AHC-62

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
228.80	10	257.80	32	281.55	2	313.40	1
229.70	10	259.80	11	284.55	1	313.75	2
230.55	6	260.70	2	285.55	2	314.15	2
231.55	4	261.70	3	286.70	2	314.90	3
232.70	1	262.30	2	287.30	1	315.75	3
234.20	1	263.70	10	287.55	2	316.65	6
235.70	15	264.55	20	290.80	1	317.75	2
236.80	9	265.80	10	292.80	1	318.65	2
237.55	24	266.70	13	297.70	2	319.75	1
238.55	7	267.55	5	298.70	8	320.75	1
239.70	9	268.80	2	299.70	8	328.65	6
241.80	6	269.45	1	300.55	16	329.65	4
242.95	1	271.30	1	301.70	8	330.65	6
243.80	1	271.55	1	302.55	10	331.75	2
244.80	2	273.70	2	304.55	2	332.75	2
245.70	1	275.80	28	304.80	2	345.65	100
246.80	1	276.55	11	310.20	1	346.90	33
249.80	3	277.70	15	310.45	1	347.65	93
250.55	2	278.70	5	310.80	2	348.90	18
251.55	3	279.55	2	311.70	2	349.65	31
252.70	2	280.80	1	312.75	5	351.75	4
253.70	1						

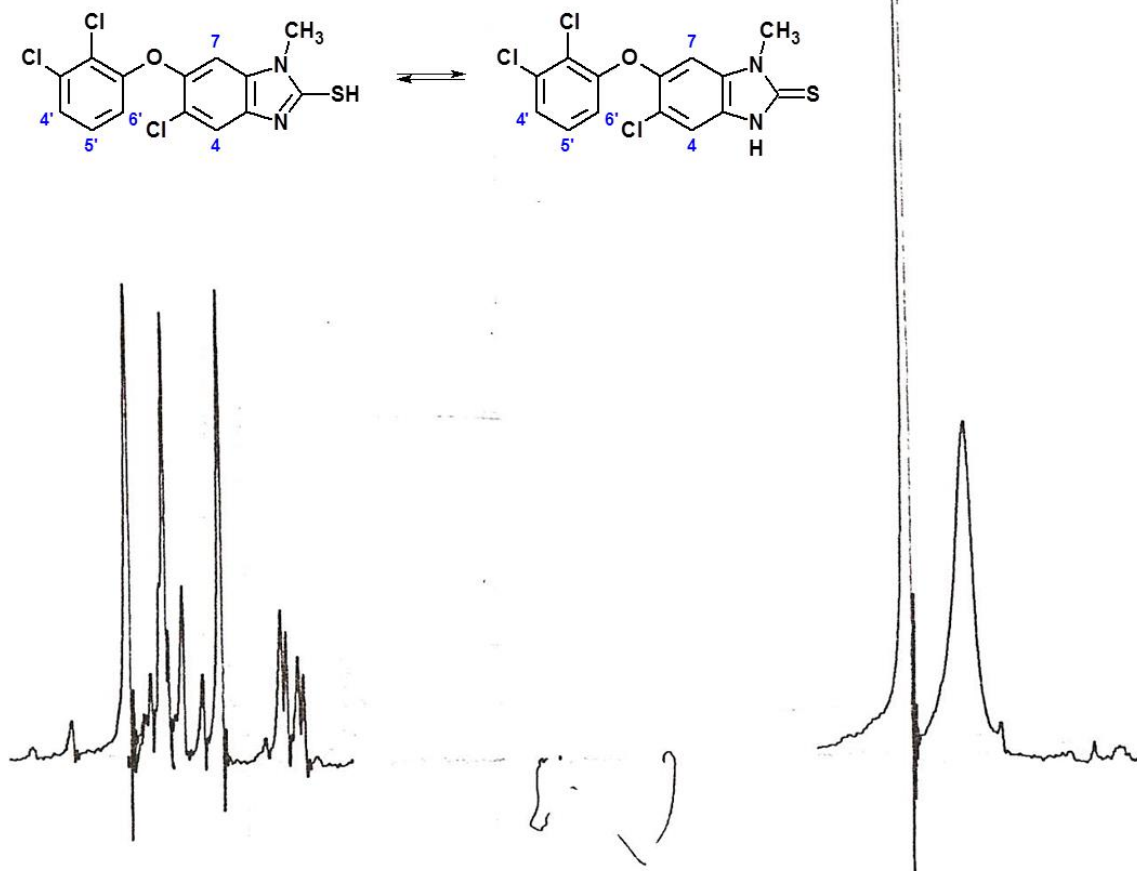
**Espectro 68.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 4-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-*N*-metil-2-nitroanilina (**5-19**).



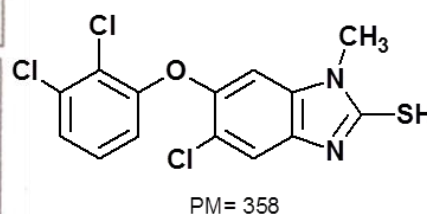
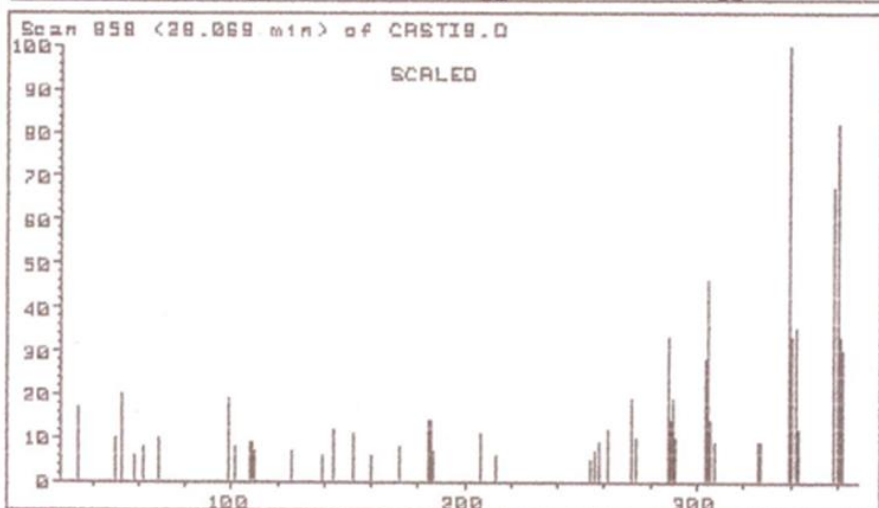
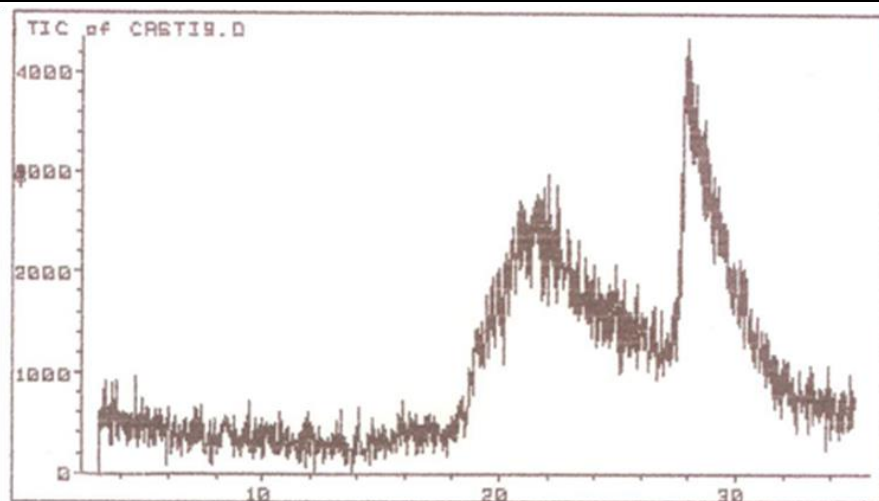
**Espectro 69.** IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (5-21).



**Espectro 70.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub> / CDCl<sub>3</sub>, 90 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (**5-21**).



**Espectro 71.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol (5-21).



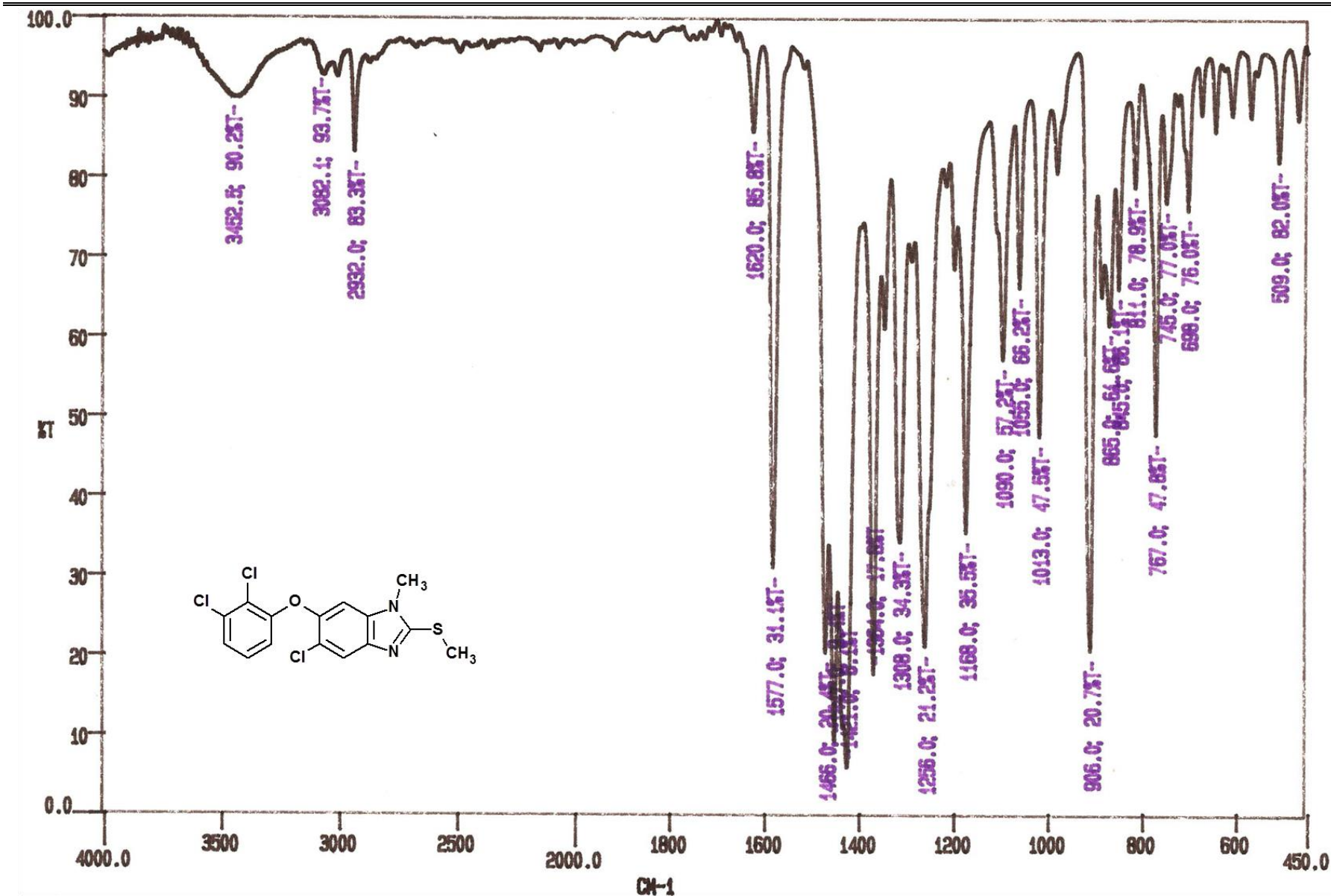
Scan 858 (28.069 min) of CASTI9.D

AHC-64

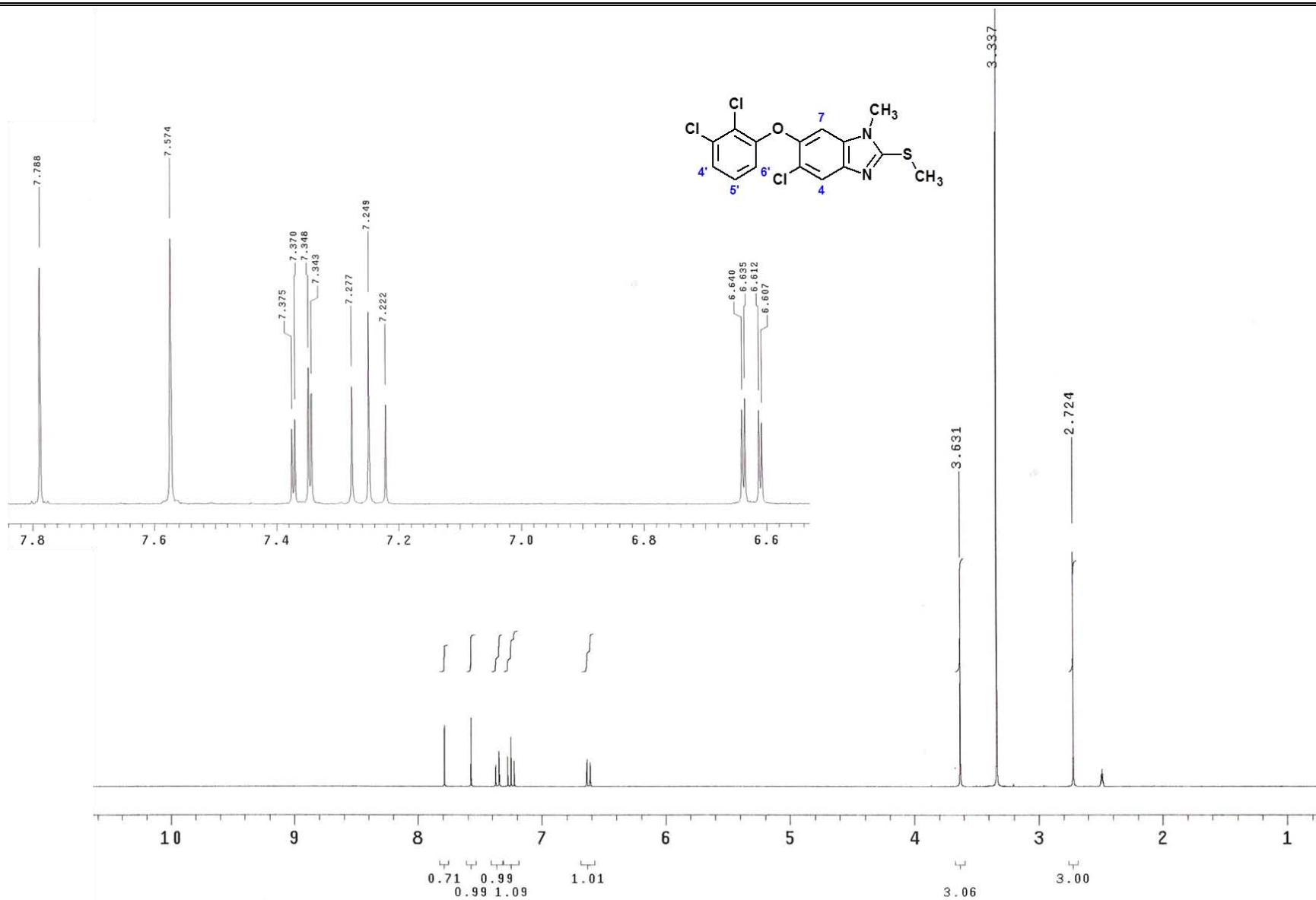
m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
33.90	17	125.95	7	257.20	9	307.45	9
49.55	8	139.15	6	261.70	12	326.15	9
50.30	10	144.00	12	271.80	19	326.50	8
52.45	20	152.40	11	272.05	18	327.00	9
58.30	6	159.65	6	273.20	10	339.90	100
62.20	8	171.65	8	287.80	33	340.75	33
69.05	10	184.50	14	289.05	14	341.90	35
98.80	19	185.00	14	289.80	19	342.90	12
101.30	8	186.65	7	290.55	10	357.90	67
108.55	9	207.00	11	304.05	28	359.75	82
108.80	9	213.50	6	304.95	46	360.65	33
109.05	9	254.20	5	305.80	14	361.75	30
109.55	7	255.95	7	306.05	11		

**Espectro 72.** EM (CG/IE, *m/z*) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-1*H*-benzimidazol-2-tiol (**5-21**).

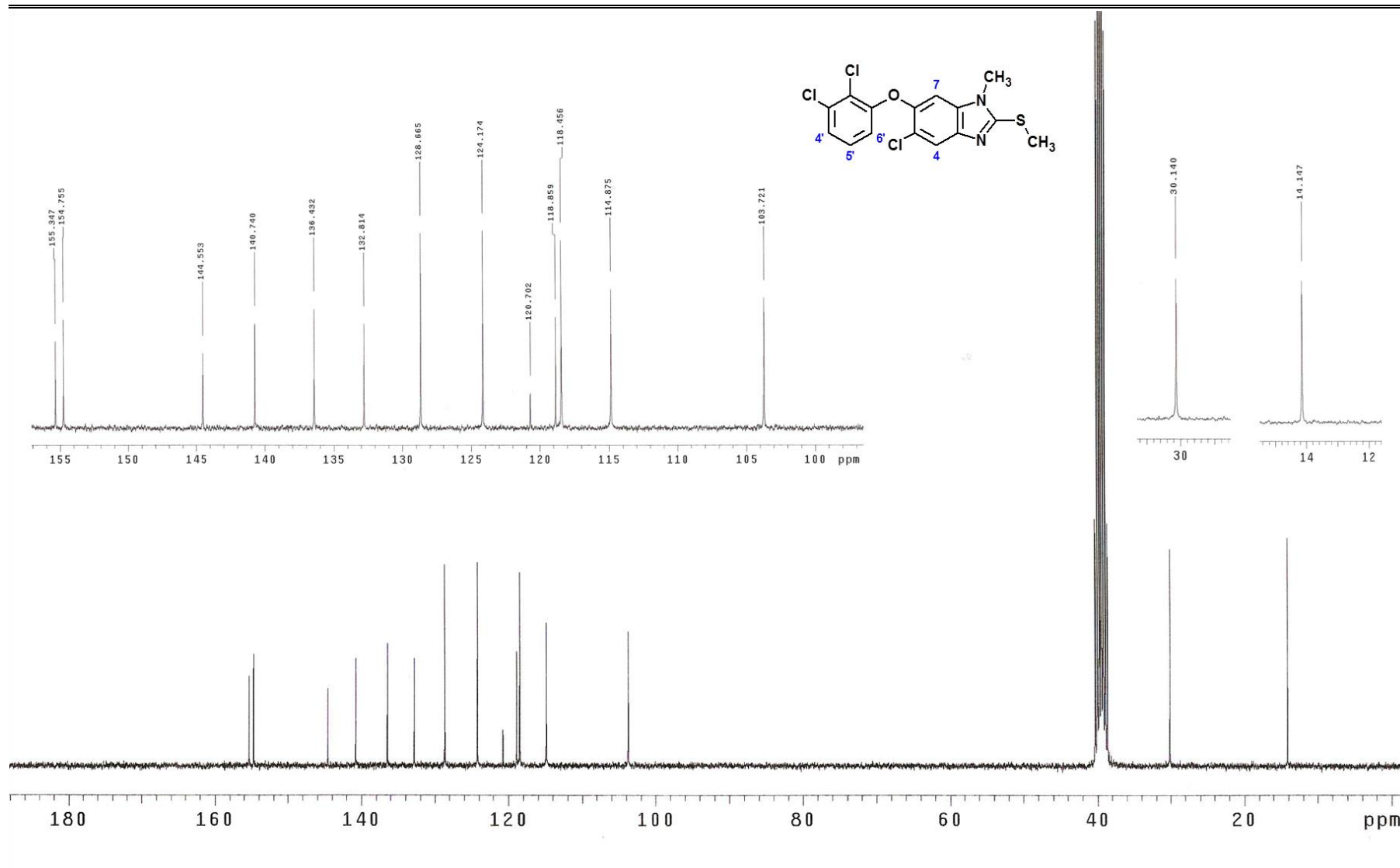




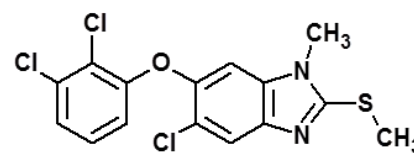
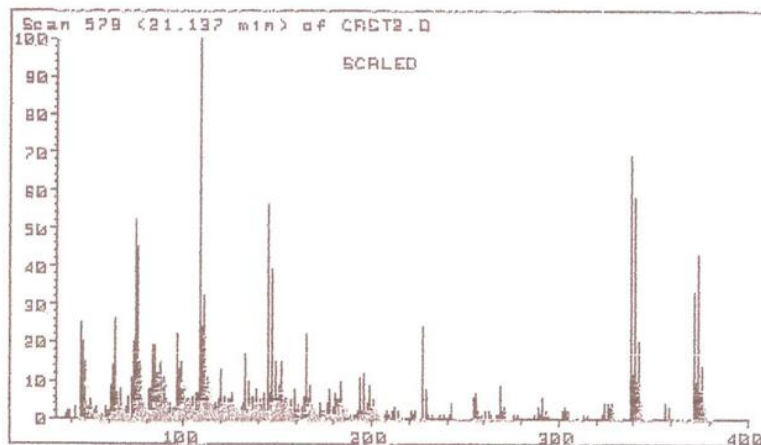
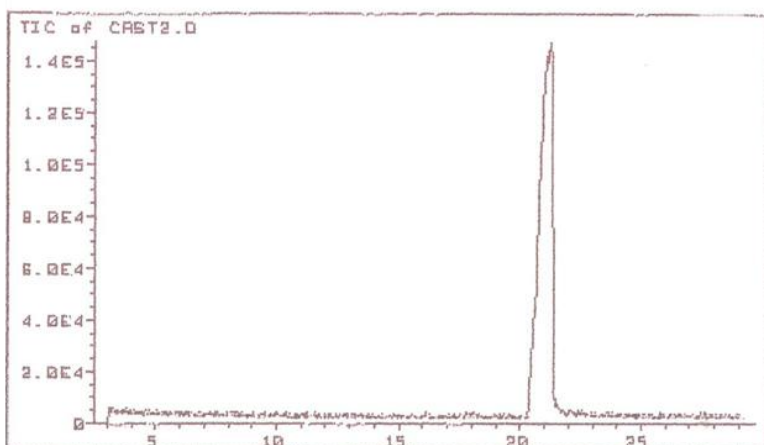
**Espectro 73.** IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (5-6).



**Espectro 74.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**5-6**).



**Espectro 75.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**5-6**).



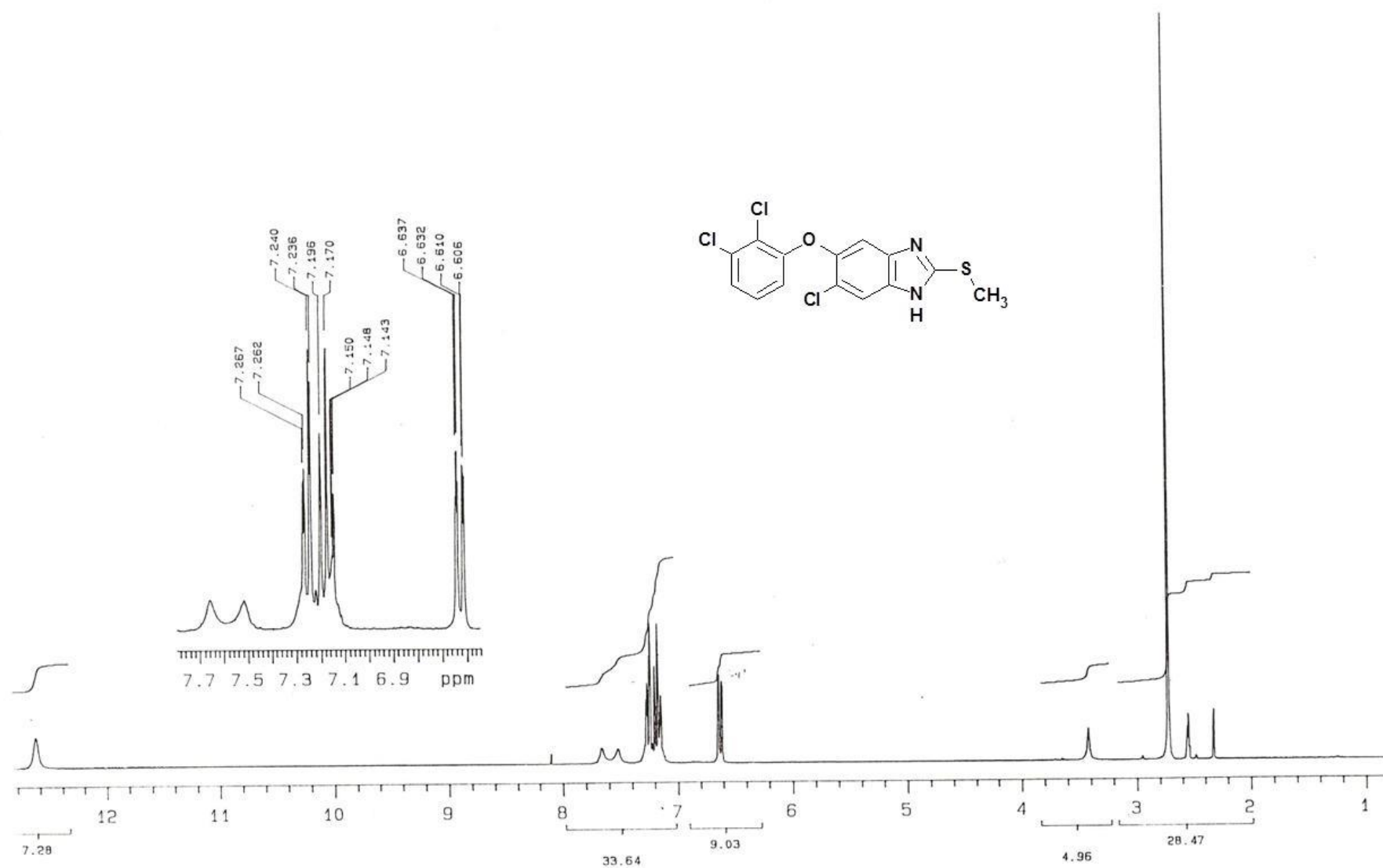
PM= 372

Scan 579 (21.137 min) of CAST2.D

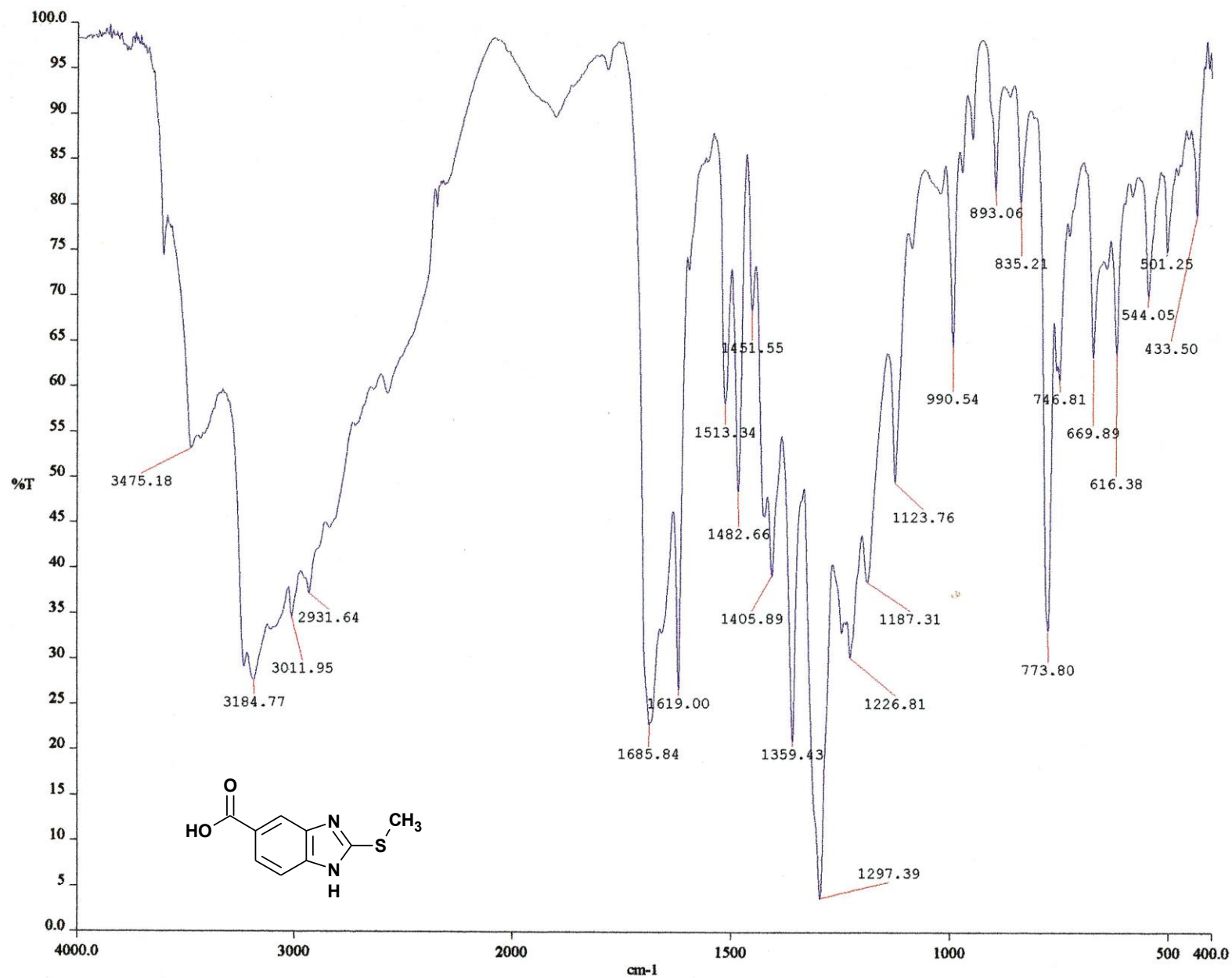
CLAVE 2

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
203.00	1	241.95	4	277.95	1	327.95	3
206.90	1	255.05	6	287.00	1	328.95	4
208.00	2	255.95	7	288.90	3	338.95	69
208.90	1	256.80	2	289.90	1	339.80	12
210.90	2	257.05	2	290.15	1	340.95	58
212.00	3	257.55	1	291.00	6	341.95	10
214.15	2	257.95	1	292.00	1	342.95	20
221.00	2	258.20	1	292.90	2	343.95	4
222.00	1	258.80	1	294.00	1	356.80	4
222.90	2	260.80	2	302.00	2	358.80	3
226.90	24	262.95	2	303.00	3	371.90	33
227.75	3	264.05	1	303.90	2	372.90	10
228.90	8	267.05	1	304.90	2	373.90	43
229.90	1	268.05	1	312.90	1	374.90	8
231.90	1	268.95	9	315.00	1	375.90	14
236.00	1	269.95	2	322.90	1	376.90	3
238.75	1	270.95	3	324.90	4	377.75	1
241.05	1	275.95	1	326.90	4		

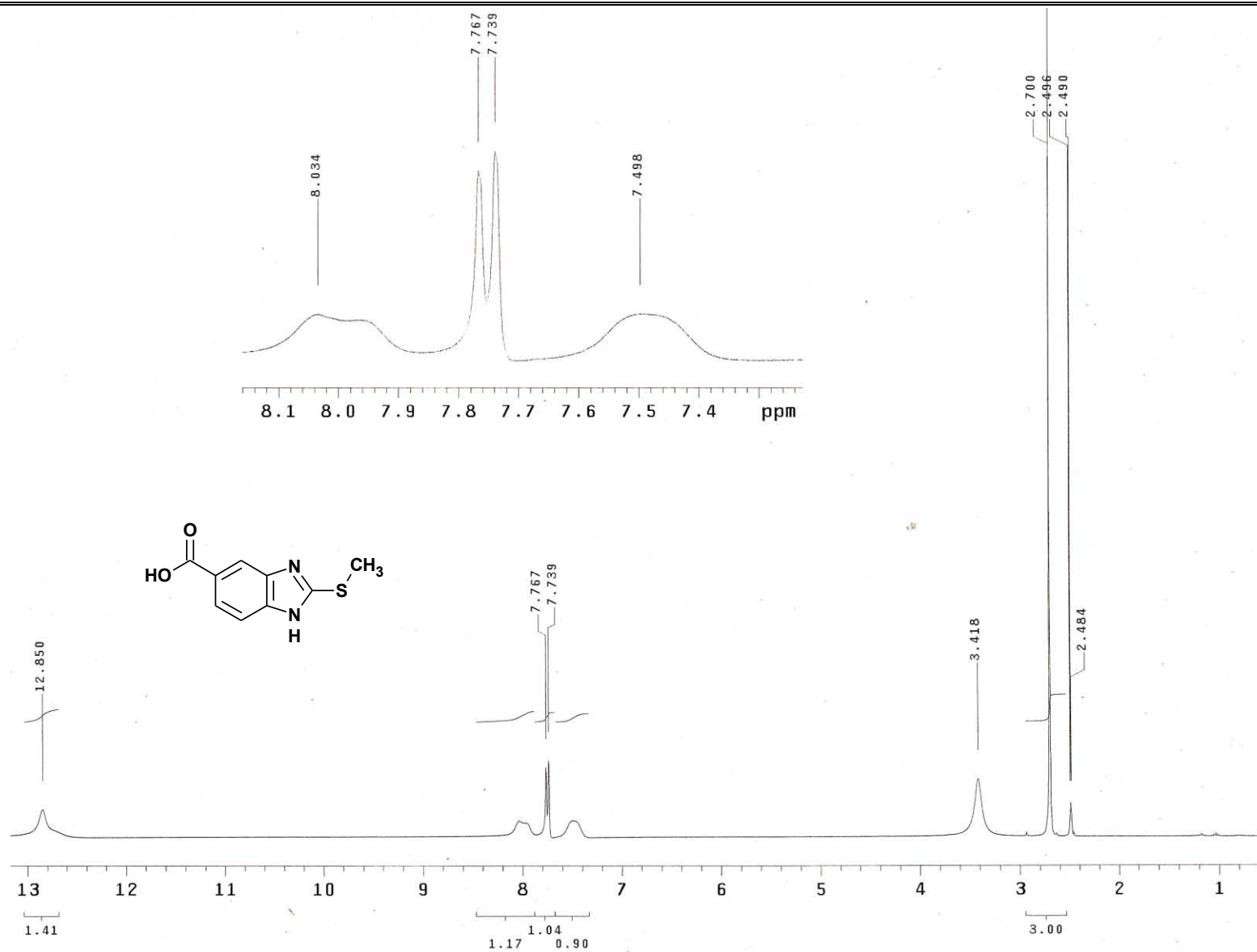
**Espectro 76.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxy)-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol (5-6).



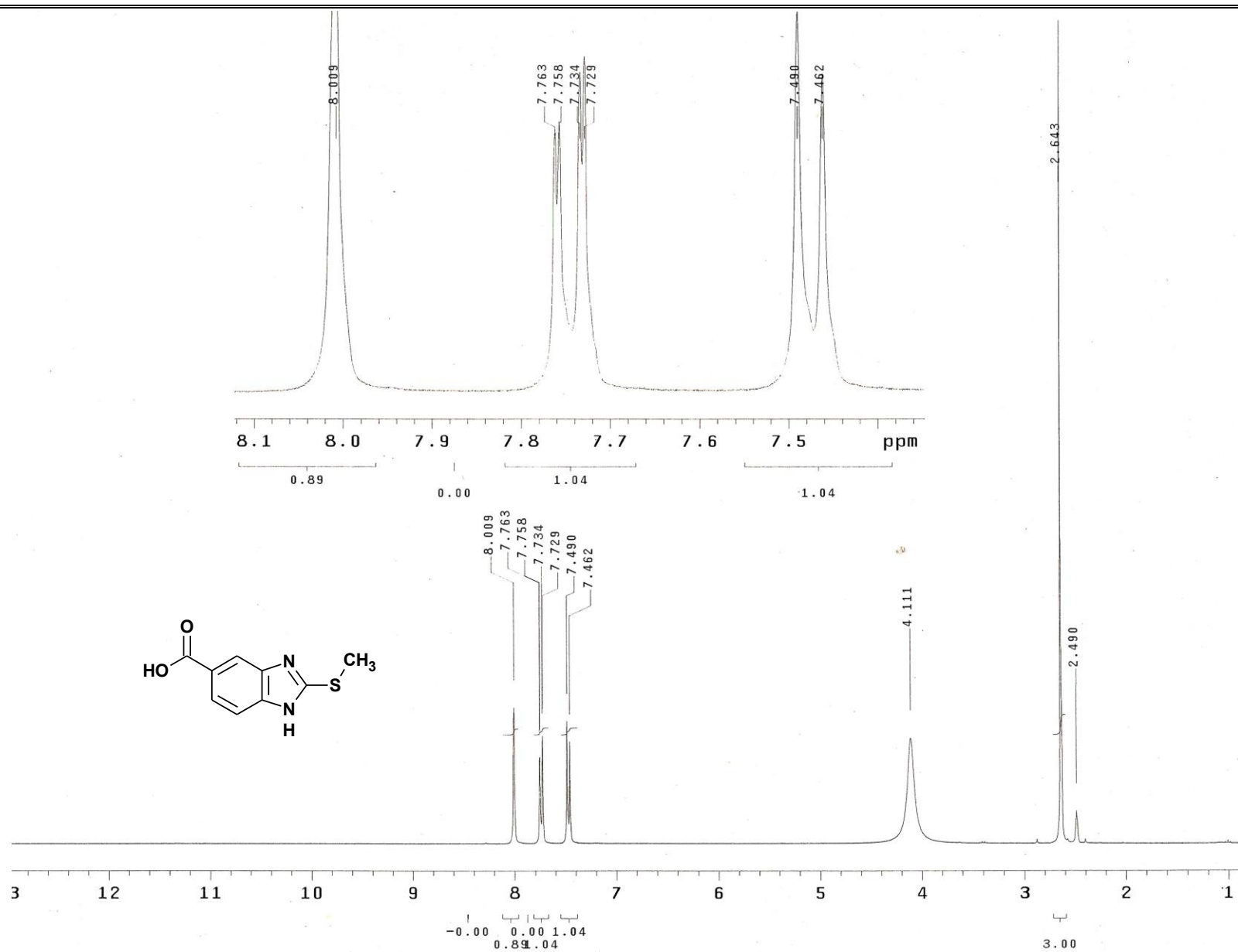
**Espectro 77.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol, Triclabendazol.



**Espectro 78.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto ácido 2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-34).

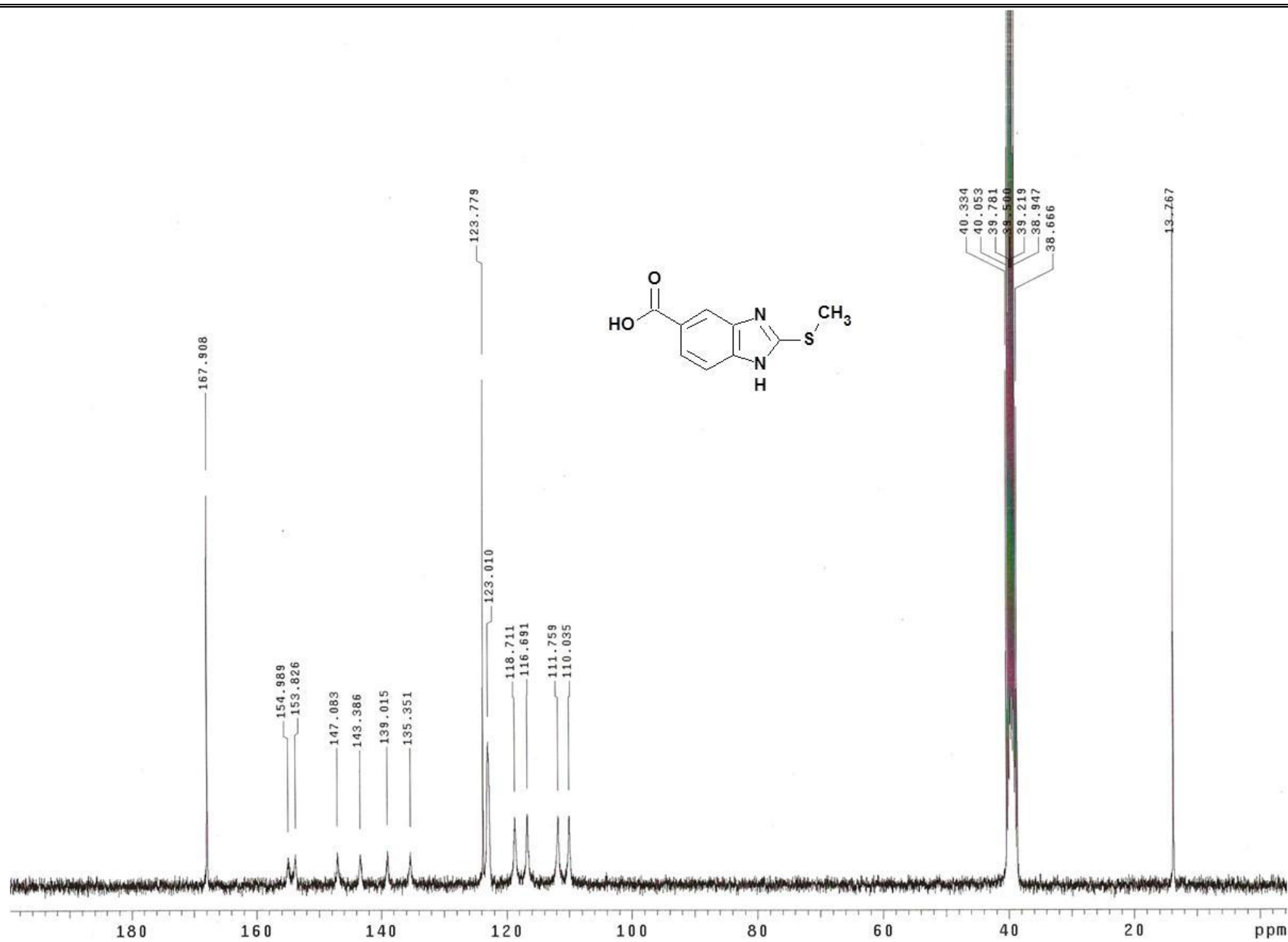


**Espectro 79.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto ácido 2-(metilthio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-34).

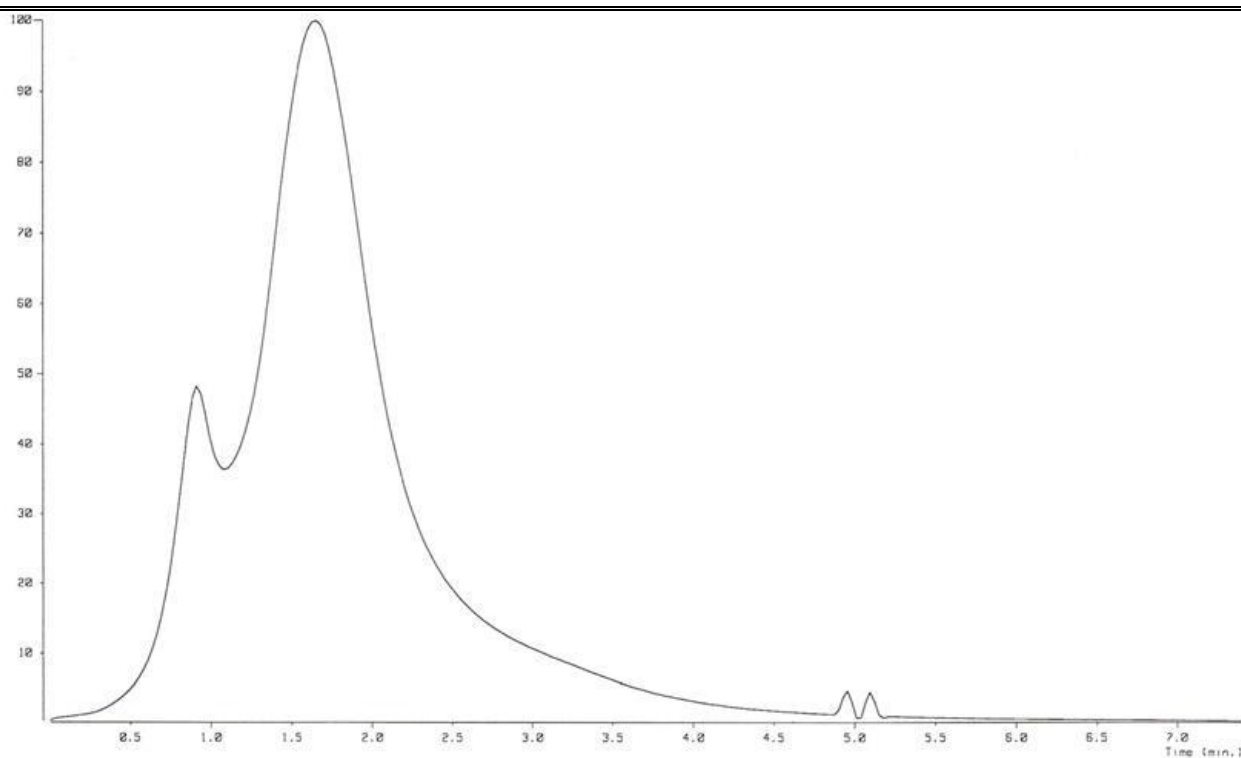


**Espectro 80.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto ácido 2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (**6-34**).

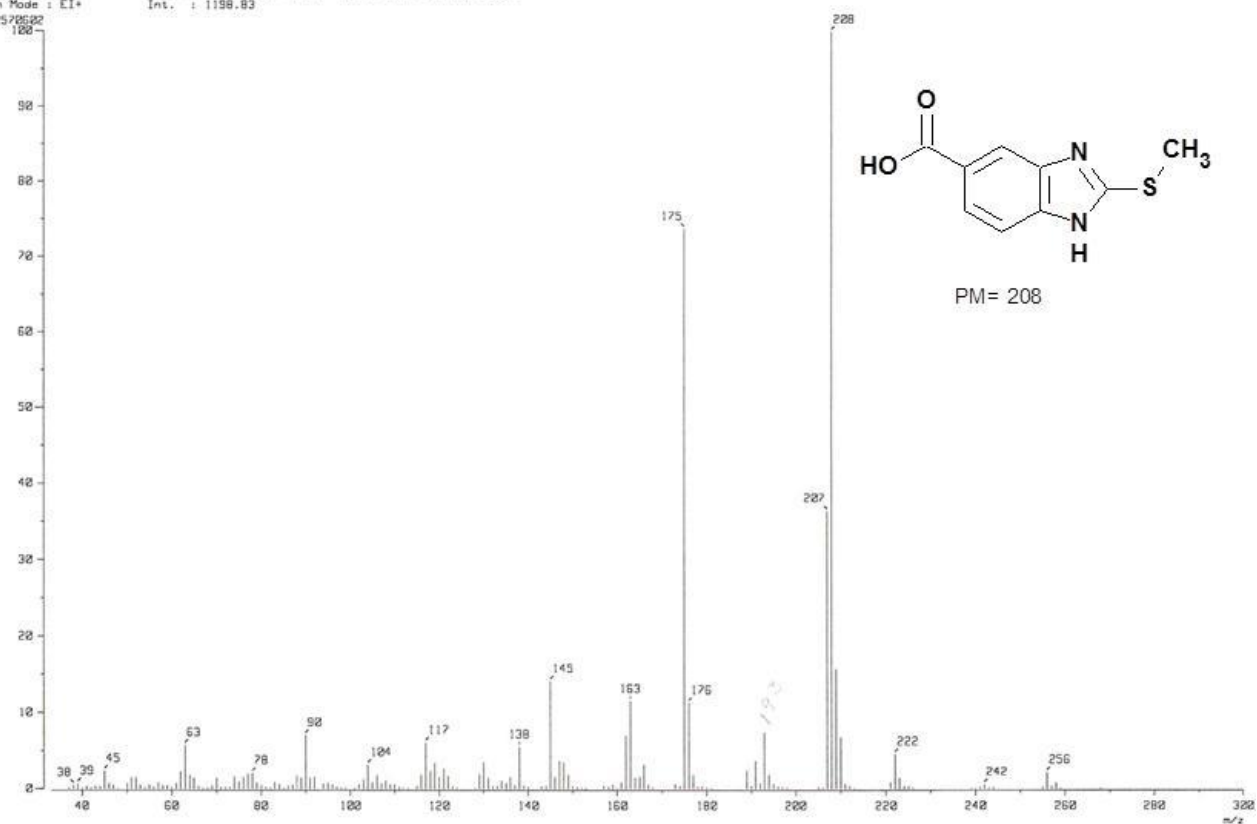




Espectro 81. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto ácido 2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-34).



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.65 min  
 Ion Mode : EI+  
 125786.22  
 Scan# : (58,64)-(147,248)-(1,24) Temp : 150.2 deg.C  
 Int. : 1198.83



**Espectro 82.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto ácido 2-(metilthio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (6-34).

[ Elemental Composition ]

Data : OT5689\_acido-1\_001 Date : 21-Nov-102 15:54  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 1.35 min Scan#: 14  
 Elements : C 15/1, H 25/1, O 2/1, N 2/1, S 5/1  
 Mass Tolerance : 10mmu  
 Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

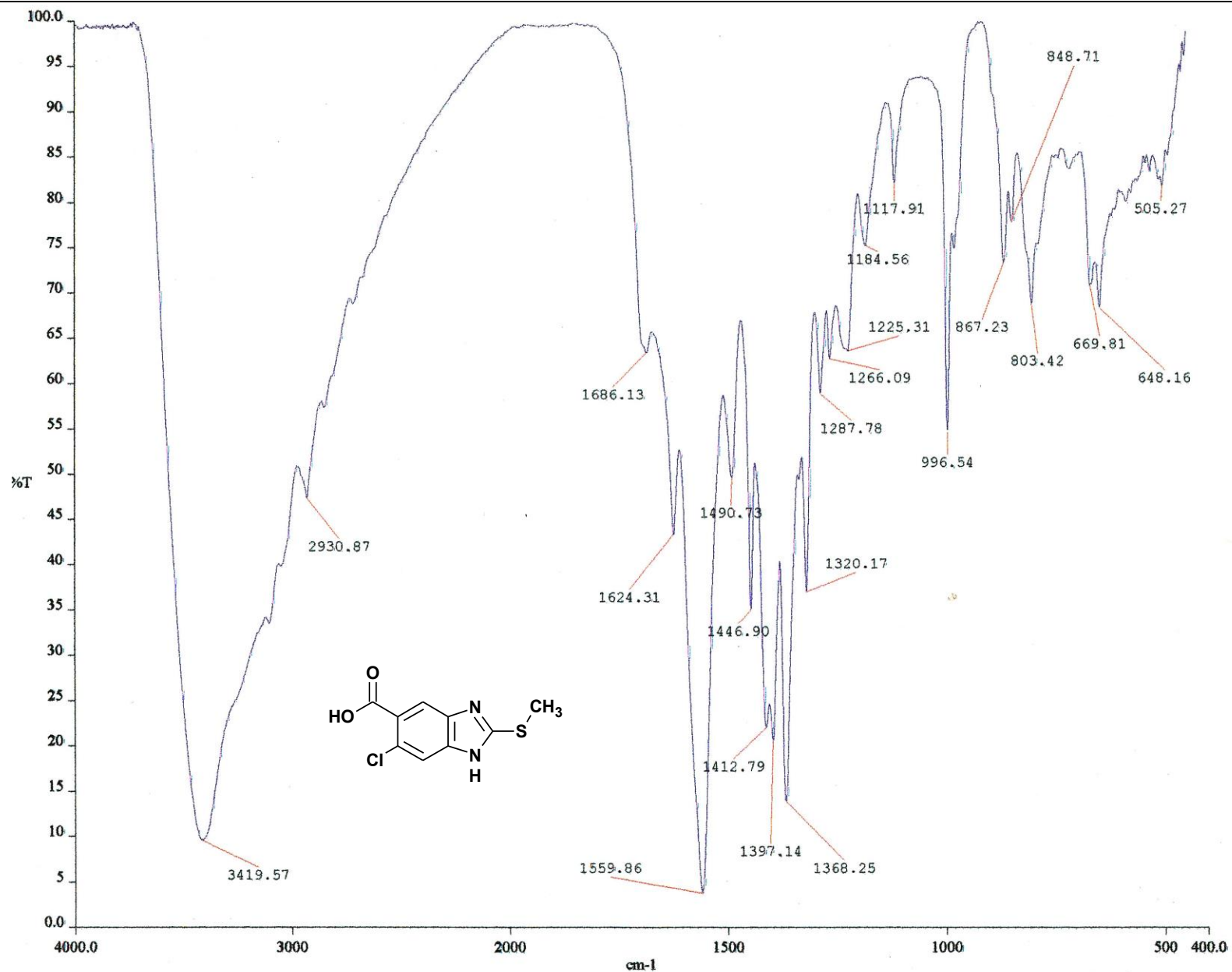
Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
208.0287	100.0	-9.2 / -1.9	8.0	C 9 H 8 O 2 N 2 S
		-25.4 / -5.3	4.0	C 6 H 12 O 2 N 2 S 2
		-41.6 / -8.7	0.0	C 3 H 16 O 2 N 2 S 3

[ Theoretical Ion Distribution ]

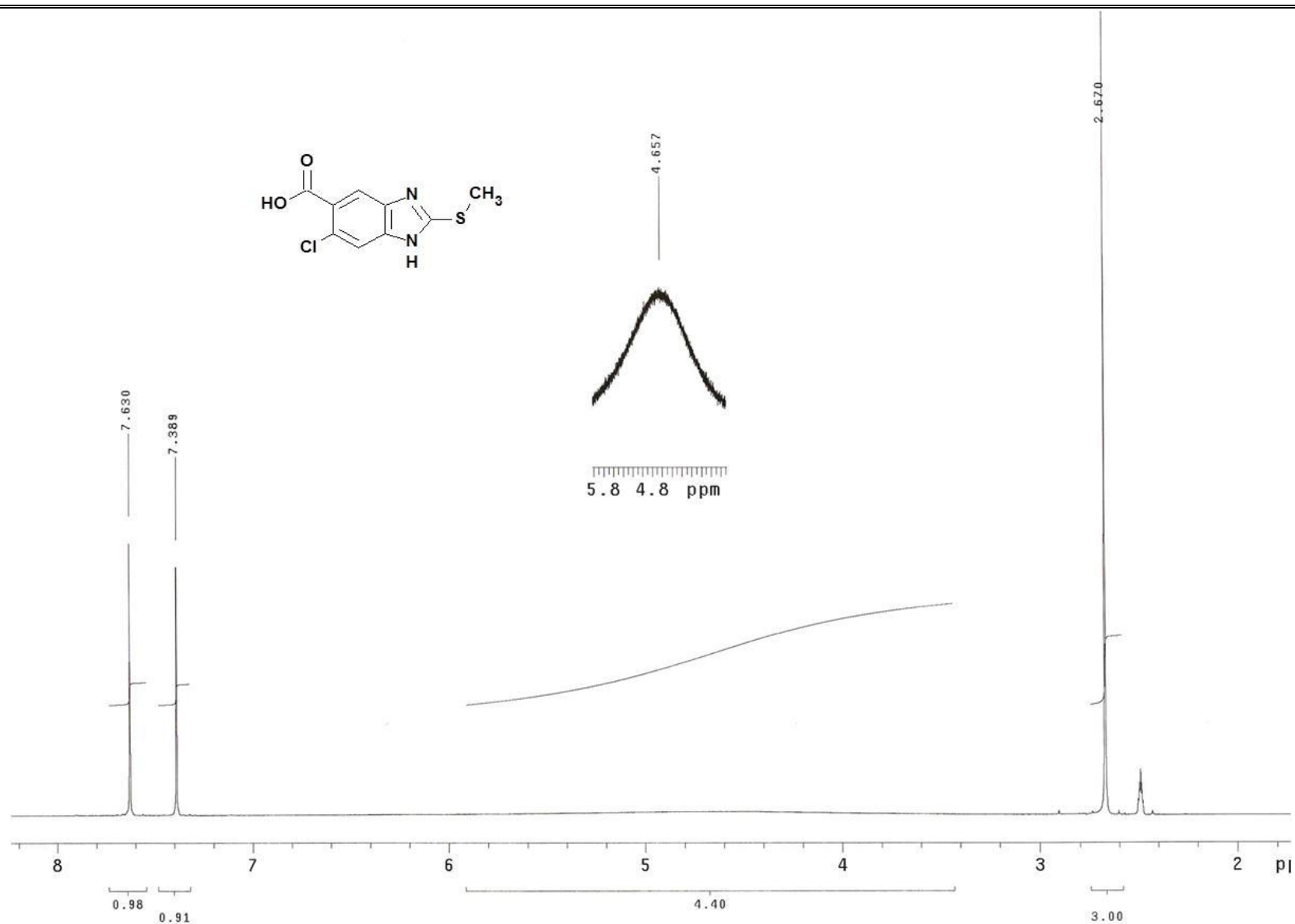
Molecular Formula : C9 H8 O2 N2 S  
 (m/z 208.0306, MW 208.2407, U.S. 8.0)  
 Base Peak : 208.0306, Averaged MW : 208.2396(a), 208.2410(w)

m/z	INT.	
208.0306	100.0000	*****
209.0334	11.7303	*****
210.0282	5.4594	***
211.0305	0.5519	
212.0302	0.0661	
213.0318	0.0051	
214.0332	0.0003	

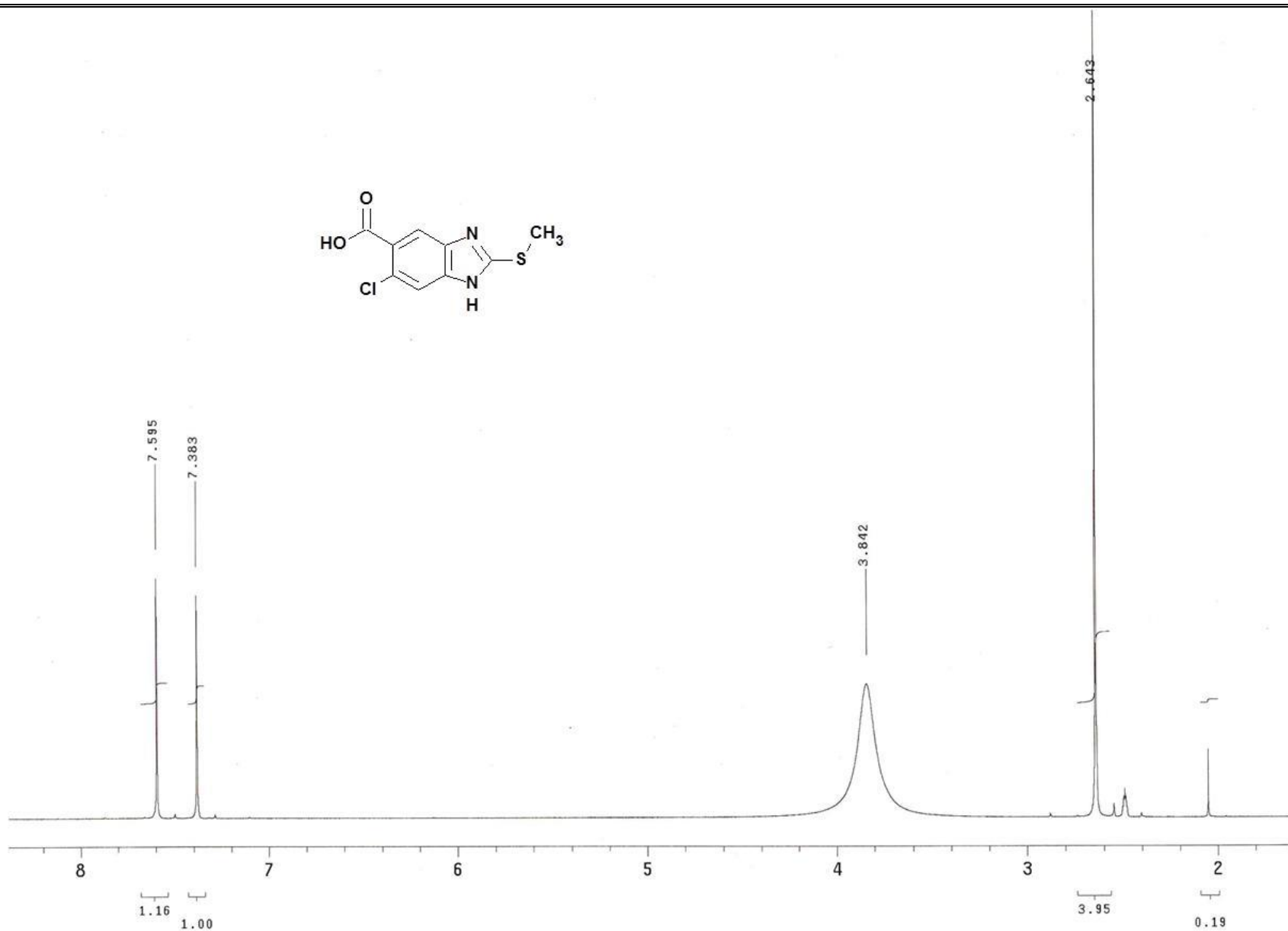
**Espectro 83.** EMAR del compuesto ácido 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-34**).



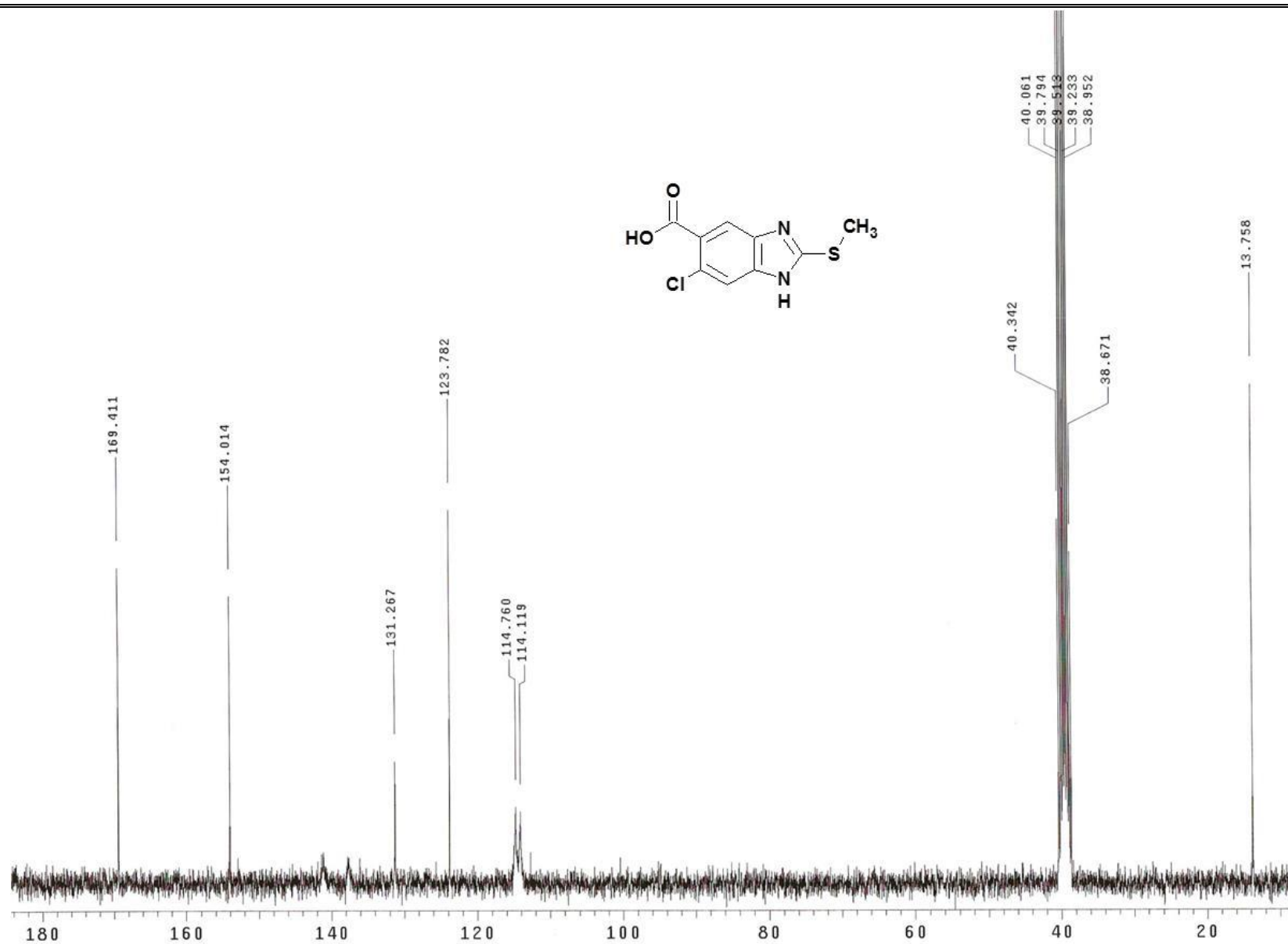
**Espectro 84.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**6-35**).



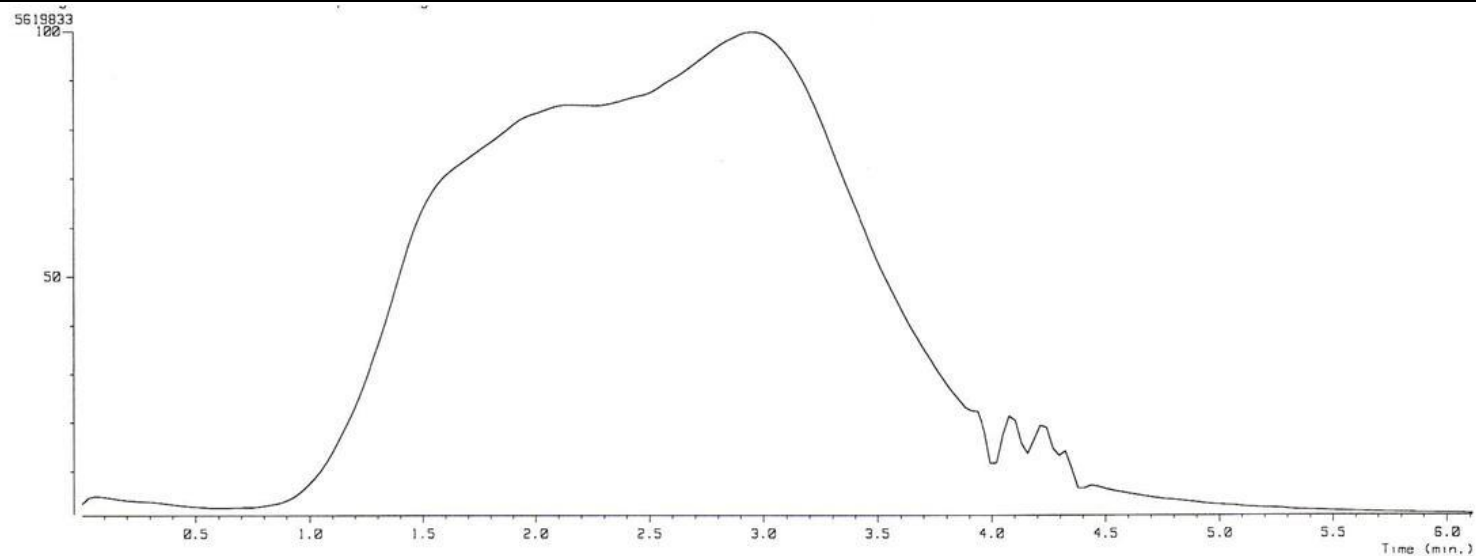
**Espectro 85.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-35).



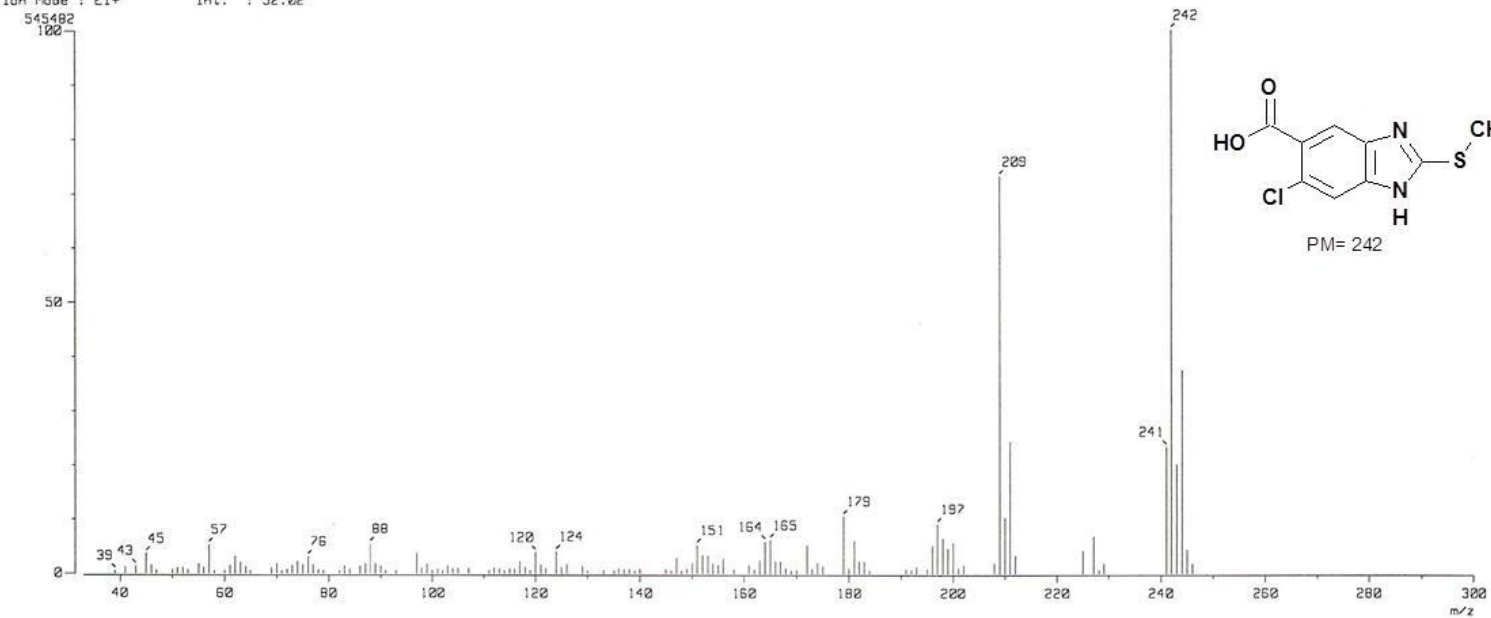
**Espectro 86.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (6-35).



**Espectro 87.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metilito)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (6-35).



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.43 min Scan# : 53 Temp : 83.2 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 52.02



**Espectro 88.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (6-35).



```

[ Elemental Composition ]
Data : OT5690 acido-2_001          Date : 21-Nov-102 16:07
Sample: Default parameters for B scan high-resolution
Note : Current control, internal scan
Inlet : Direct                      Ion Mode : EI+
RT : 1.15 min                       Scan#: 12
Elements : C 15/1, H 25/1, O 2/1, N 2/1, Cl 1/1, S 5/1
Mass Tolerance : 10mmu
Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

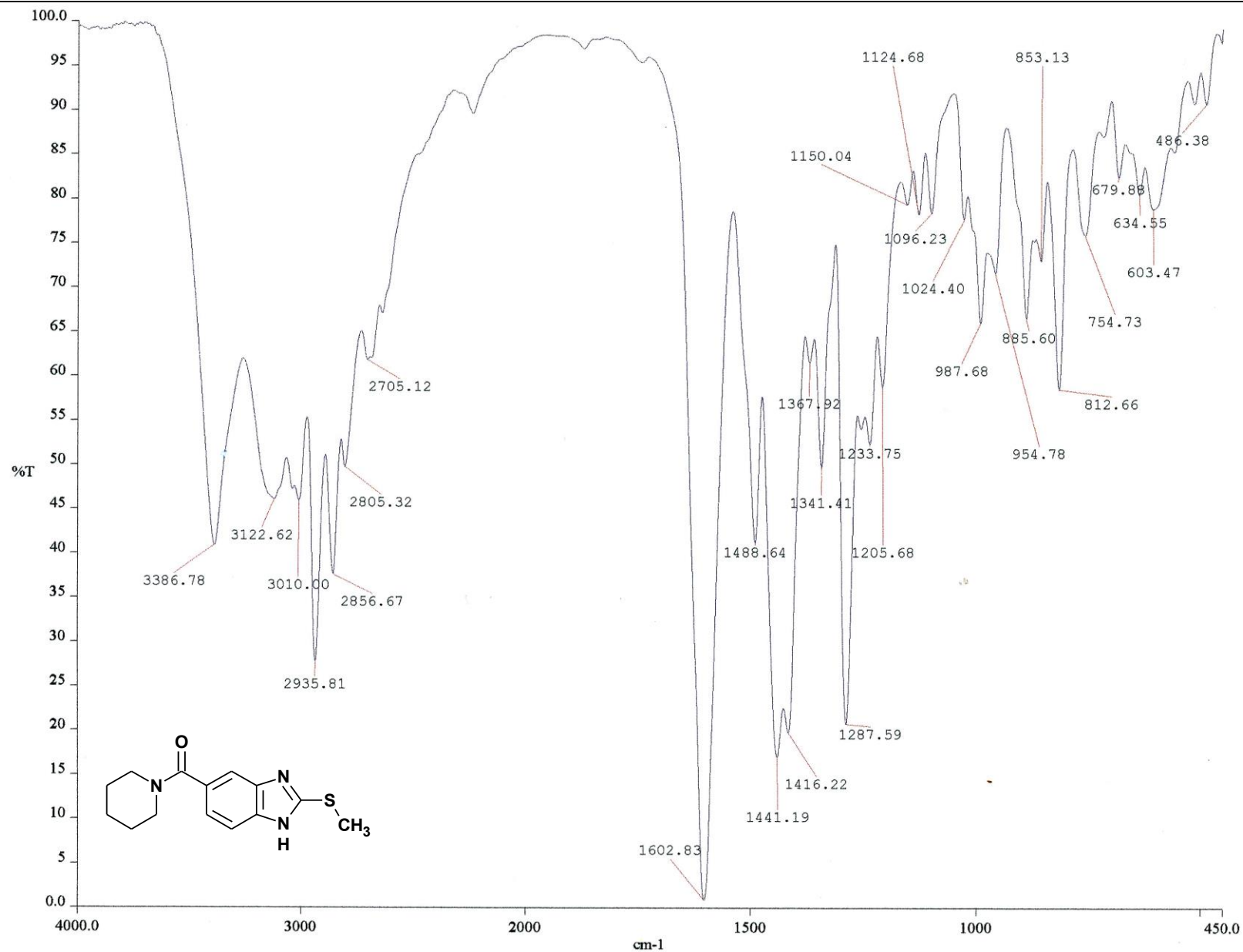
Observed m/z  Int%  Err[ppm / mmu]  U.S.  Composition
  241.9934    100.0    +7.1 / +1.7     8.0  C 9 H 7 O 2 N 2 Cl S
                -6.8 / -1.7     4.0  C 6 H 11 O 2 N 2 Cl S 2
                -20.8 / -5.0    0.0  C 3 H 15 O 2 N 2 Cl S 3

[ Theoretical Ion Distribution ]
Molecular Formula : C9 H7 O2 N2 Cl S
                    (m/z 241.9917, MW 242.6858, U.S. 8.0)
Base Peak : 241.9917, Averaged MW : 242.6843 (a), 242.6886 (w)

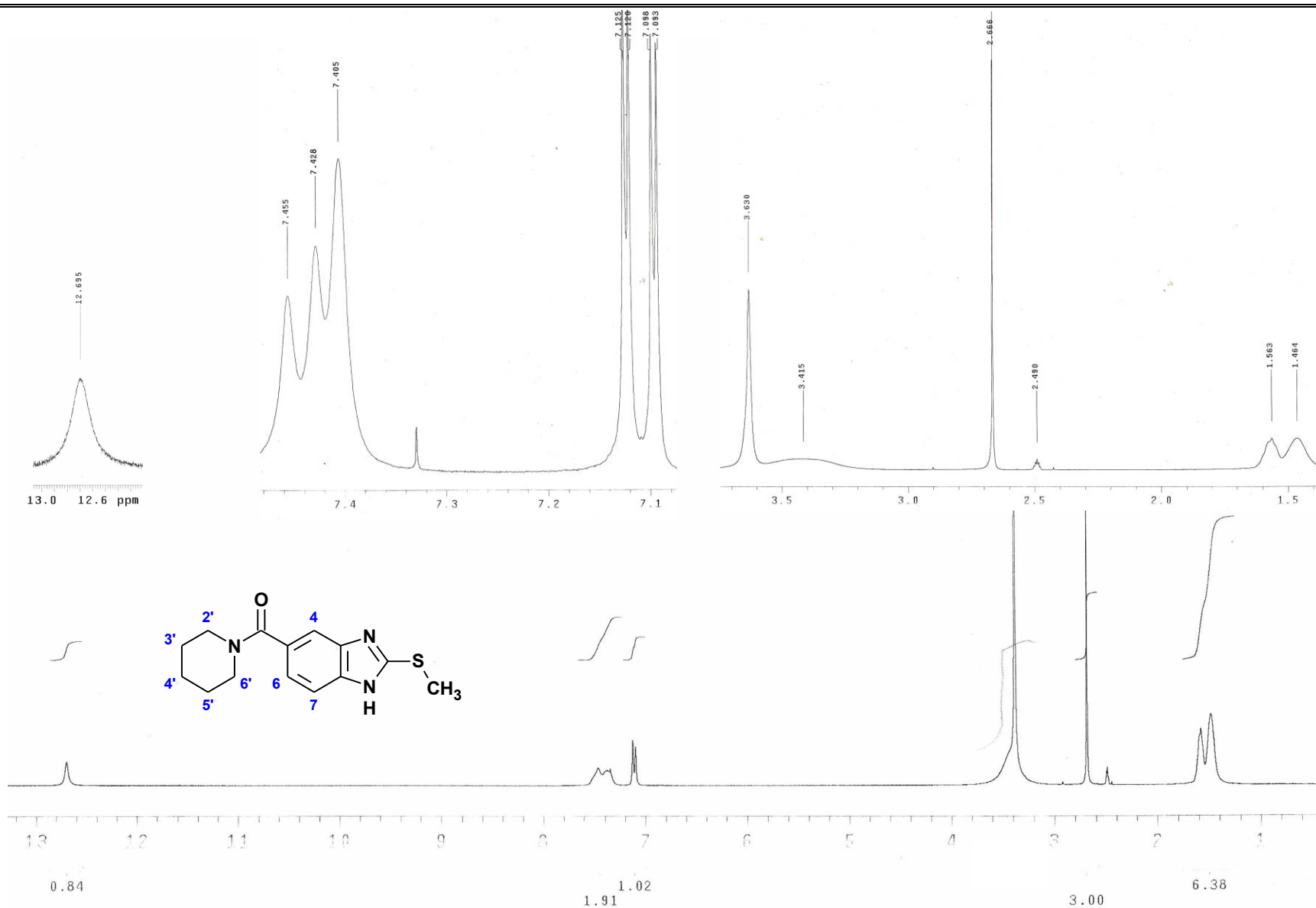
    m/z      INT.
241.9917 100.0000 *****
242.9944  11.7153 *****
243.9888  37.4360 *****
244.9915   4.2975 **
245.9864   1.8113 *
246.9886   0.1813
247.9883   0.0215
248.9900   0.0016
249.9913   0.0001

```

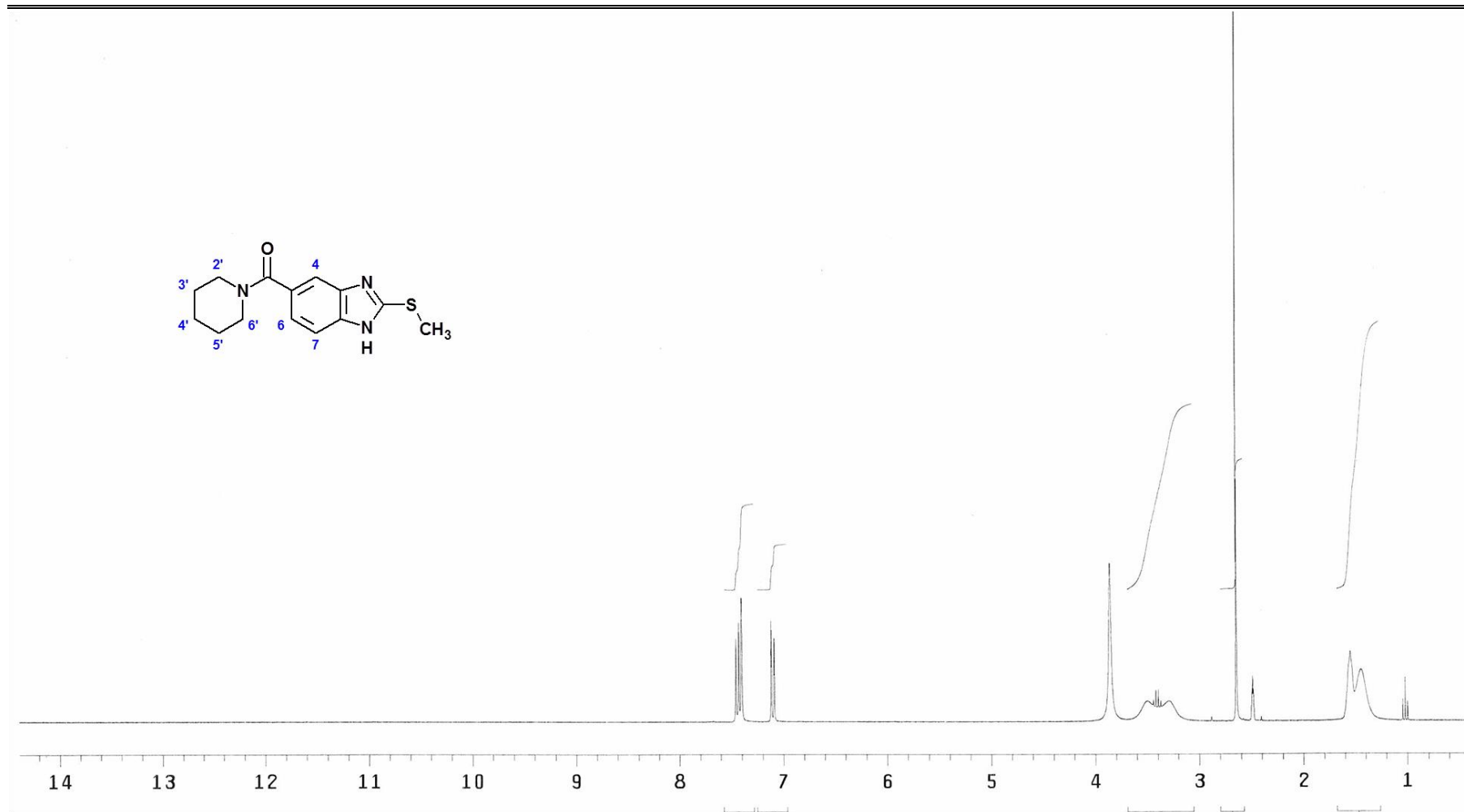
**Espectro 89.** EMAR del compuesto ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (6-35).



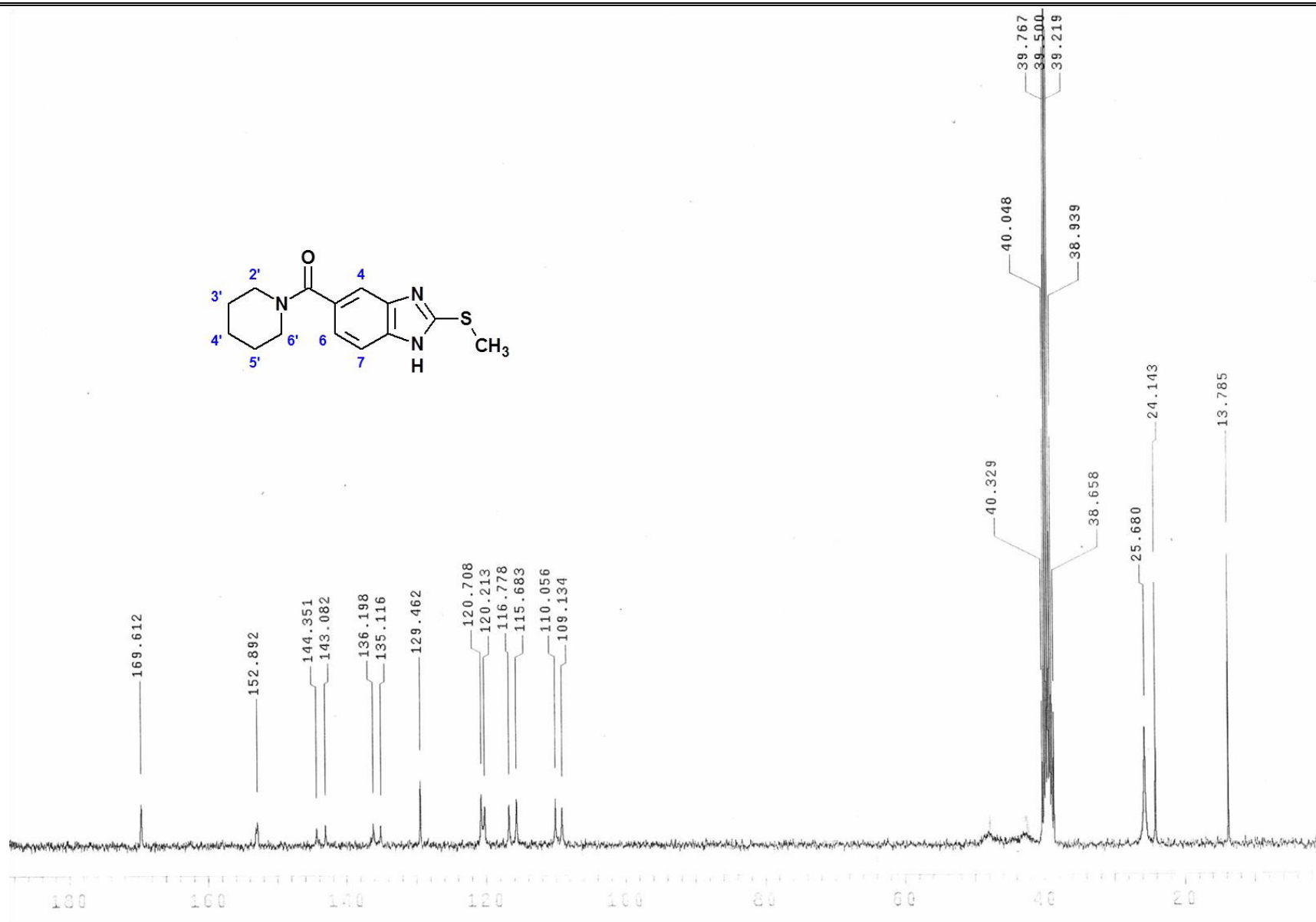
**Espectro 90.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (6-1).



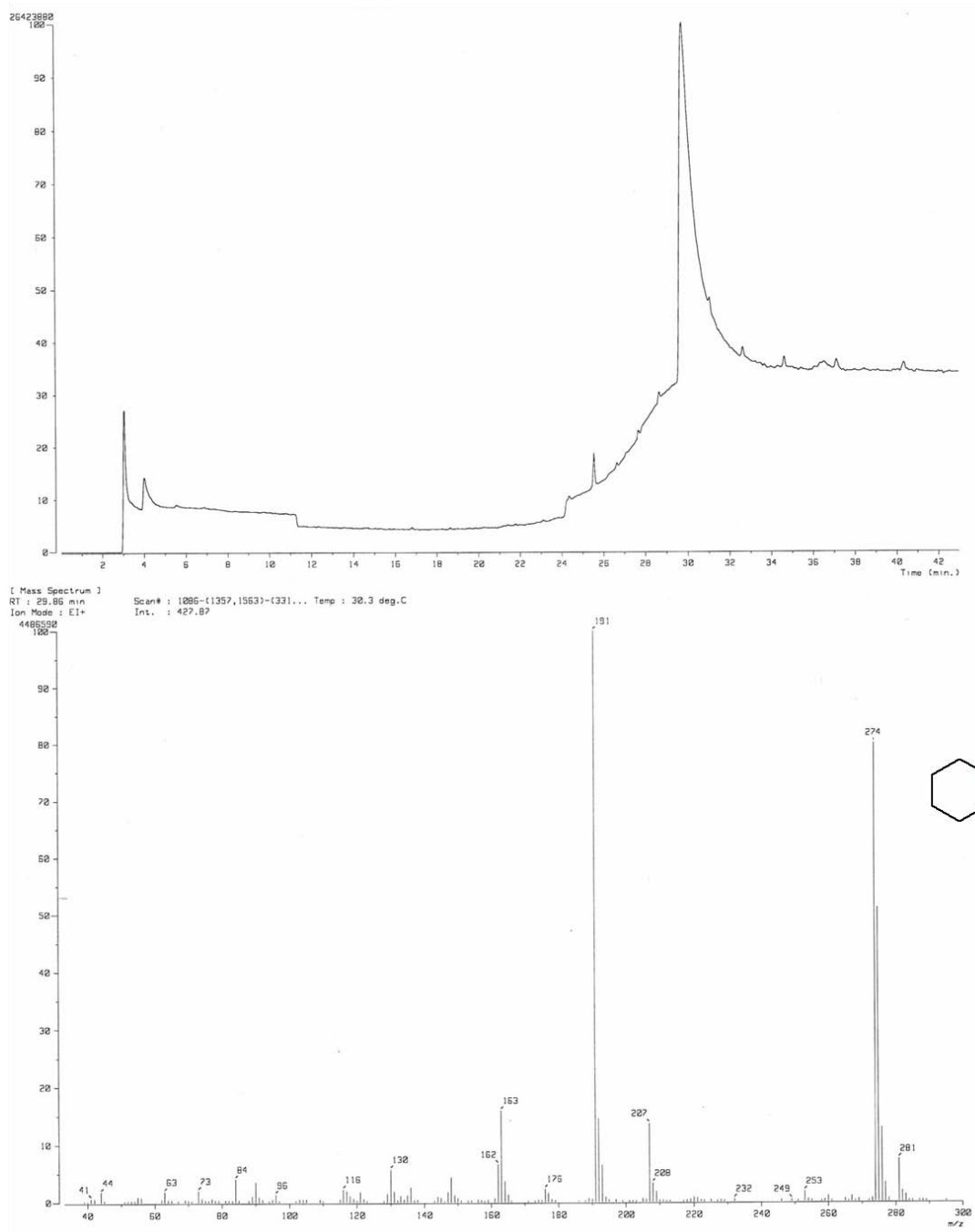
**Espectro 91.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonyl)-1*H*-bencimidazol (**6-1**).



**Espectro 92.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonyl)-1H-bencimidazol (**6-1**).



**Espectro 93.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonyl)-1H-bencimidazol (**6-1**).



**Espectro 94.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-1**).

[ Elemental Composition ]  
 Date : 08-Mar-99 14:56  
 Data : OT2035\_CARBI\_002  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.81 min Scan#: 17  
 Elements : C 20/0, H 50/0, O 10/0, N 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 200  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
275.1100	29.3	-11.1 / -3.1	3.5	C 12 H 19 O 7
		+3.5 / +1.0	-0.5	C 7 H 19 O 9 N 2
		-6.3 / -1.7	4.0	C 10 H 17 O 6 N 3
		-16.0 / -4.4	8.5	C 13 H 15 O 3 N 4
		+8.4 / +2.3	0.0	C 5 H 17 O 8 N 5
		-2.0 / -0.6	8.5	C 16 H 19 O 2 S
		+12.6 / +3.5	4.5	C 11 H 19 O 4 N 2 S
		+2.8 / +0.8	9.0	C 14 H 17 O N 3 S ←
		+17.5 / +4.8	5.0	C 9 H 17 O 3 N 5 S
		-14.3 / -3.9	4.5	C 13 H 23 O 2 S 2
		+0.3 / +0.1	0.5	C 8 H 23 O 4 N 2 S 2
		-9.4 / -2.6	5.0	C 11 H 21 O N 3 S 2
		+5.2 / +1.4	1.0	C 6 H 21 O 3 N 5 S 2
		274.1023	47.3	-10.7 / -2.9
+4.0 / +1.1	0.0			C 7 H 18 O 9 N 2
-5.8 / -1.6	4.5			C 10 H 16 O 6 N 3
-15.6 / -4.3	9.0			C 13 H 14 O 3 N 4
+8.9 / +2.4	0.5			C 5 H 16 O 8 N 5
-1.6 / -0.4	9.0			C 16 H 18 O 2 S
+13.1 / +3.6	5.0			C 11 H 18 O 4 N 2 S
+3.3 / +0.9	9.5			C 14 H 16 O N 3 S ←
-18.1 / -5.0	0.5			C 7 H 20 O 6 N 3 S
+18.0 / +4.9	5.5			C 9 H 16 O 3 N 5 S
-13.9 / -3.8	5.0			C 13 H 22 O 2 S 2
+0.8 / +0.2	1.0			C 8 H 22 O 4 N 2 S 2
-9.0 / -2.5	5.5			C 11 H 20 O N 3 S 2
+5.7 / +1.6	1.5			C 6 H 20 O 3 N 5 S 2

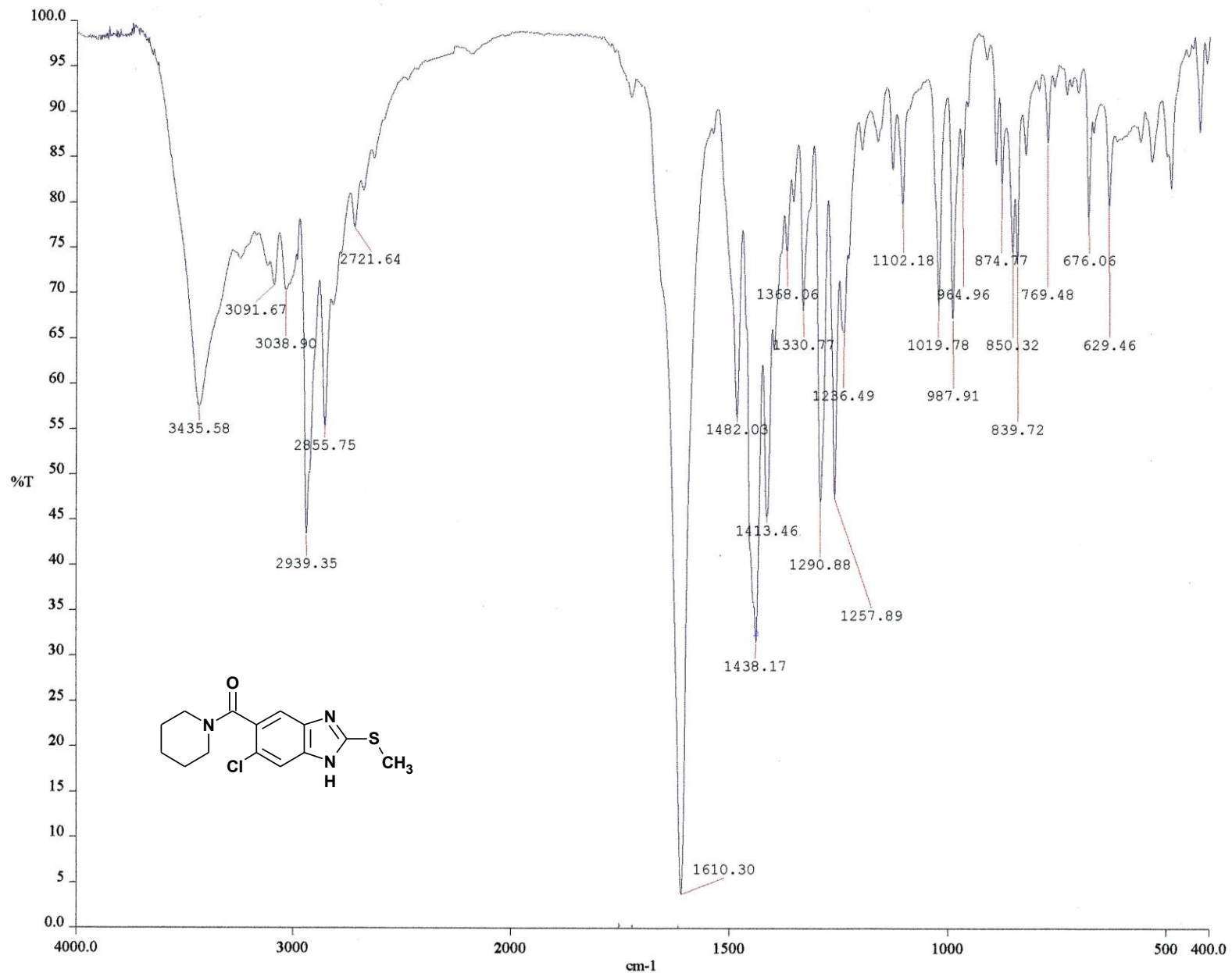
[ Theoretical Ion Distribution ]  
 Molecular Formula : C14 H17 O N3 S

Page: 1

(m/z 275.1092, MW 275.3745, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 275.1092, Averaged MW : 275.3740(a), 275.3752(w)

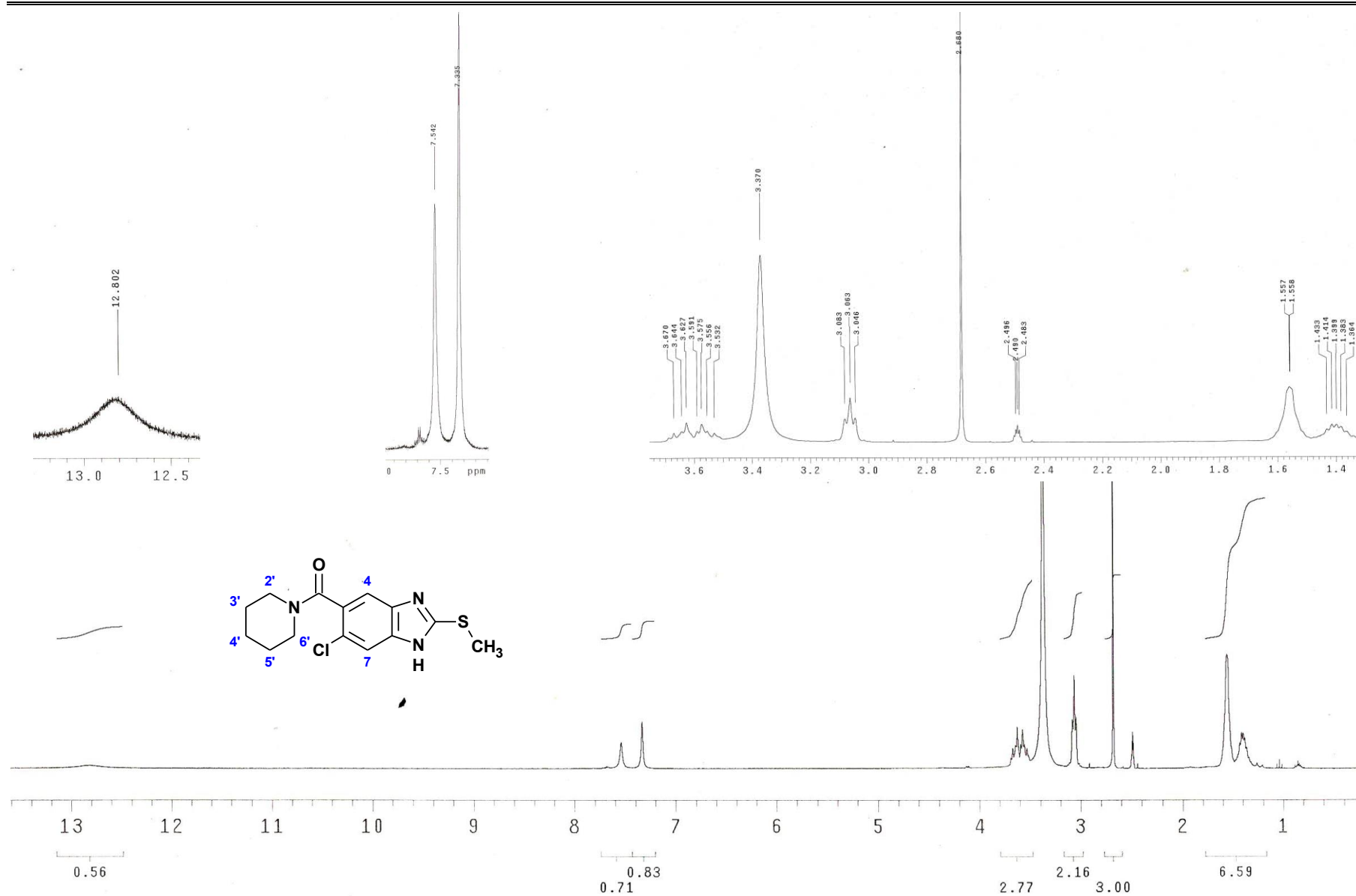
m/z	INT.	
275.1092	100.0000	*****
276.1121	17.7558	*****
277.1077	6.1157	****
278.1092	0.8649	*
279.1099	0.0956	
280.1110	0.0083	
281.1125	0.0006	

**Espectro 95.** EMAR del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (6-1).

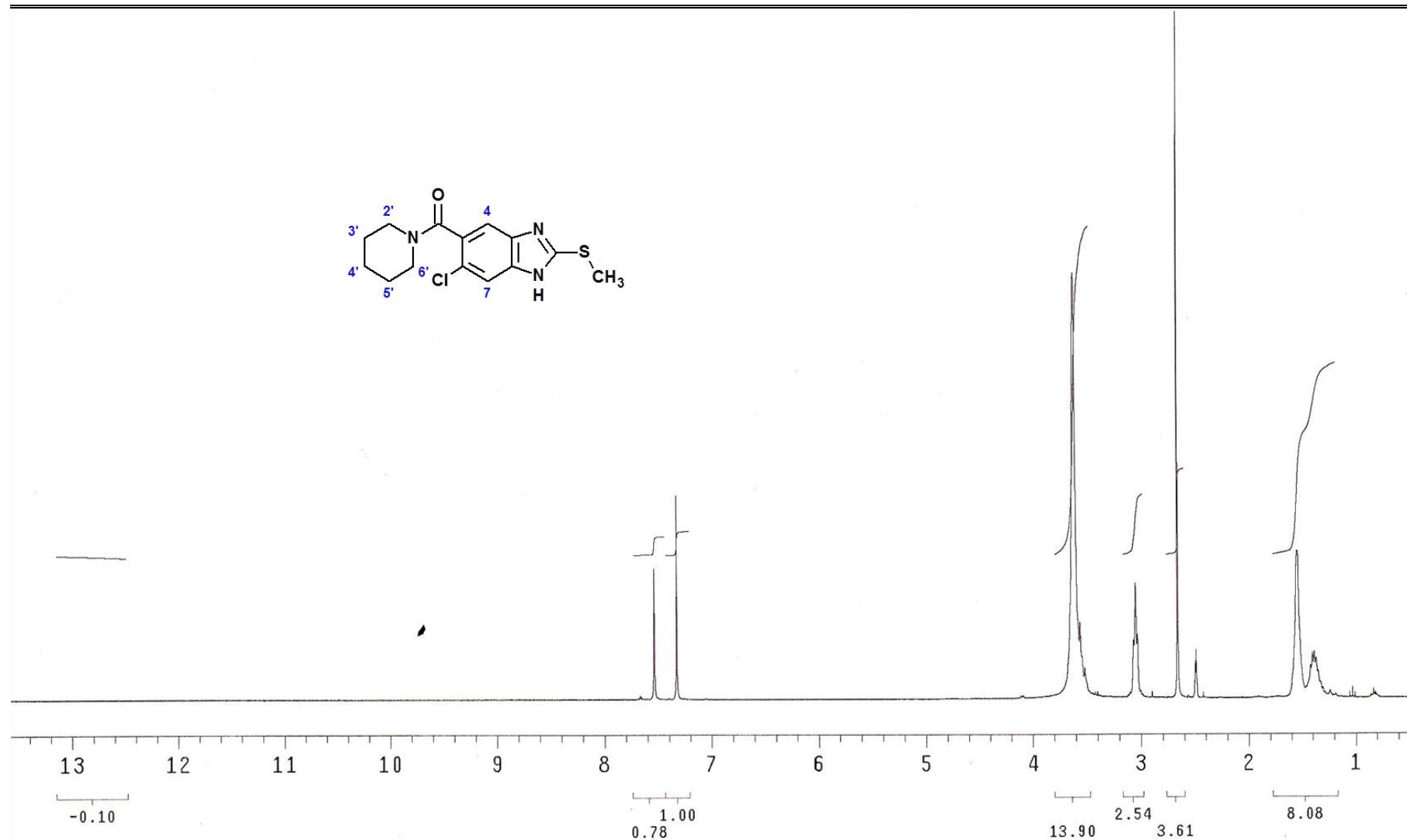


Espectro 96. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-2-(metiltilio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-2**).

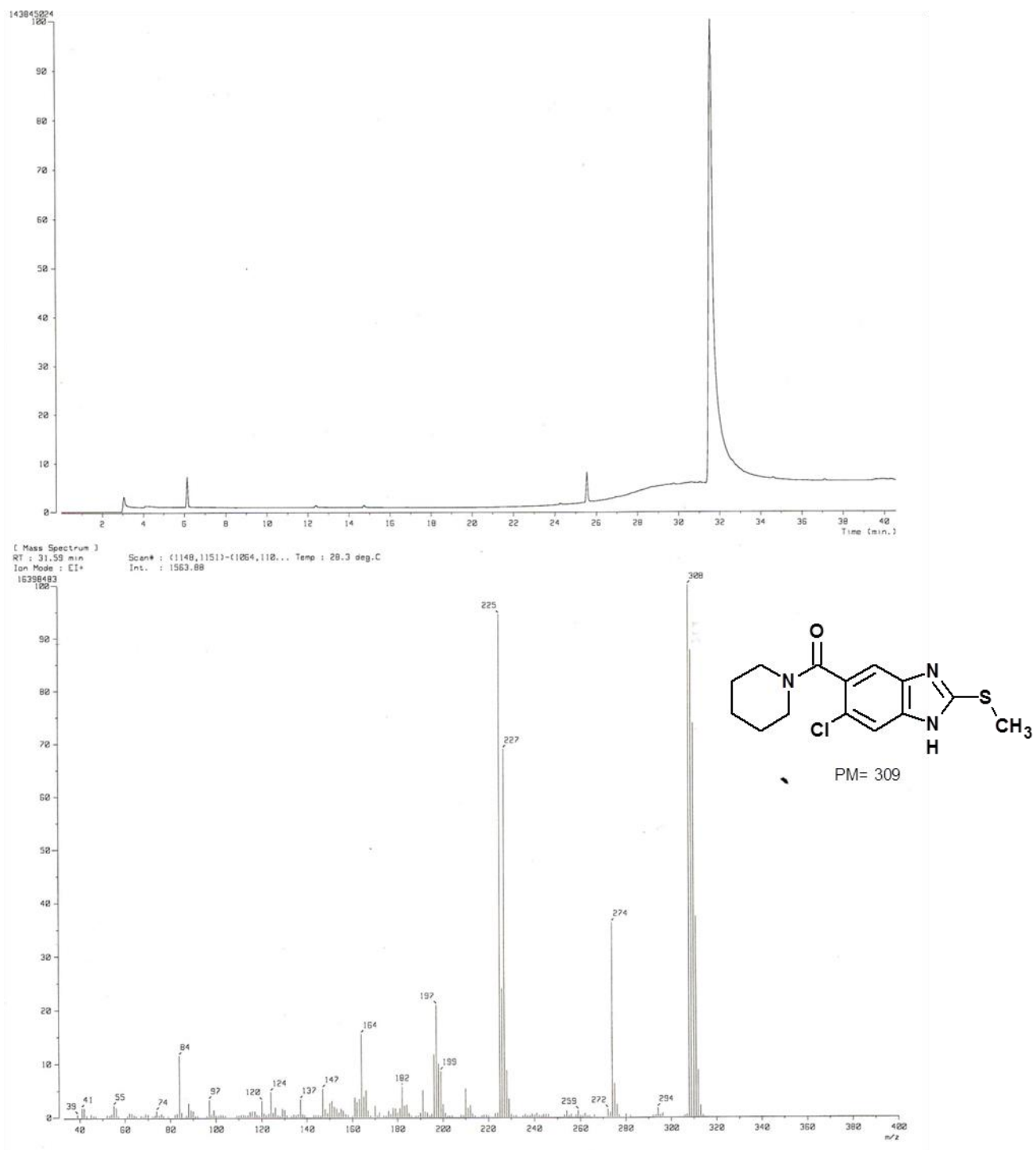




**Espectro 97.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-2**).



**Espectro 98.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-2**).



**Espectro 99.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-2-(metilitio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-2**).

[ Elemental Composition ]  
 Data : PRUEBA\_CARB2\_R5000\_001 Date : 14-Mar-99 18:44  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.96 min Scan#: 20  
 Elements : C 20/0, H 50/0, O 10/0, N 5/0, Cl 5/1, S 5/1  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

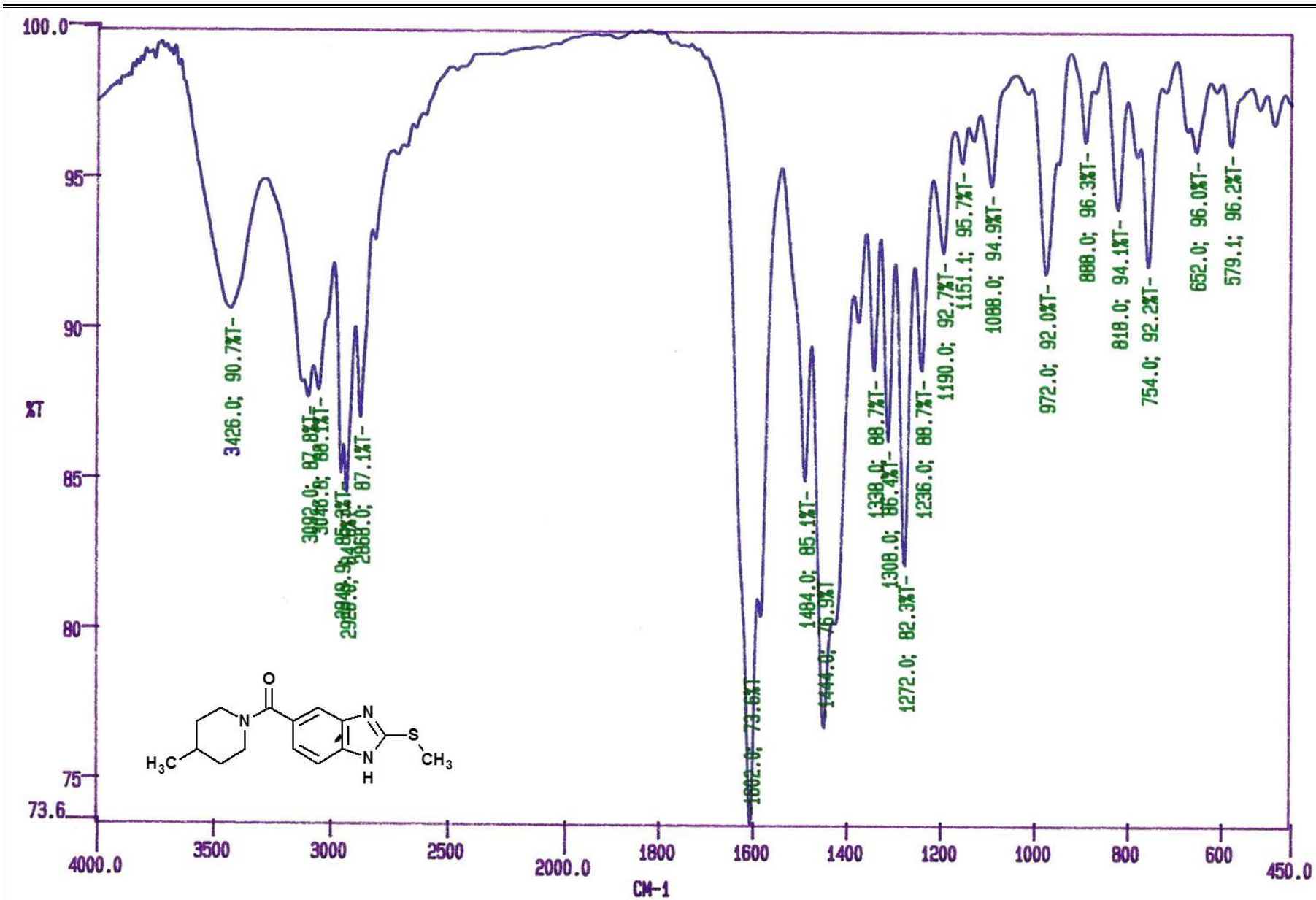
Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
308.0617	74.8	-6.8 / -2.1	9.0	C 16 H 17 O 2 Cl S
		+14.9 / +4.6	0.5	C 8 H 19 O 7 N Cl S
		+6.2 / +1.9	5.0	C 11 H 17 O 4 N 2 Cl S
		-2.5 / -0.8	9.5	C 14 H 15 O N 3 Cl S
		+10.6 / +3.3	5.5	C 9 H 15 O 3 N 5 Cl S
		+0.3 / +0.1	0.0	C 10 H 22 O 4 Cl 2 S
		-8.4 / -2.6	4.5	C 13 H 20 O N Cl 2 S
		+4.6 / +1.4	0.5	C 8 H 20 O 3 N 3 Cl 2 S
		-4.1 / -1.2	5.0	C 11 H 18 N 4 Cl 2 S
		-10.0 / -3.1	0.0	C 10 H 23 N 2 Cl 3 S
		-4.7 / -1.5	1.0	C 8 H 21 O 4 N 2 Cl S 2
		-13.4 / -4.1	5.5	C 11 H 19 O N 3 Cl S 2
		-0.4 / -0.1	1.5	C 6 H 19 O 3 N 5 Cl S 2
		-15.0 / -4.6	1.0	C 8 H 22 N 4 Cl 2 S 2
		+12.1 / +3.7	1.5	C 9 H 23 O 2 N Cl S 3
309.0700	46.4	-5.2 / -1.6	8.5	C 16 H 18 O 2 Cl S
		+7.8 / +2.4	4.5	C 11 H 18 O 4 N 2 Cl S
		-0.8 / -0.3	9.0	C 14 H 16 O N 3 Cl S
		+12.2 / +3.8	5.0	C 9 H 16 O 3 N 5 Cl S
		+1.9 / +0.6	-0.5	C 10 H 23 O 4 Cl 2 S
		-6.7 / -2.1	4.0	C 13 H 21 O N Cl 2 S
		+6.3 / +1.9	0.0	C 8 H 21 O 3 N 3 Cl 2 S
		-2.4 / -0.7	4.5	C 11 H 19 N 4 Cl 2 S
		-8.3 / -2.6	-0.5	C 10 H 24 N 2 Cl 3 S
		-16.1 / -5.0	4.5	C 13 H 22 O 2 Cl S 2
		-3.1 / -0.9	0.5	C 8 H 22 O 4 N 2 Cl S 2
		-11.7 / -3.6	5.0	C 11 H 20 O N 3 Cl S 2
		+1.3 / +0.4	1.0	C 6 H 20 O 3 N 5 Cl S 2
		-13.3 / -4.1	0.5	C 8 H 23 N 4 Cl 2 S 2
		+13.7 / +4.2	1.0	C 9 H 24 O 2 N Cl S 3

[ Theoretical Ion Distribution ]  
 Molecular Formula : C14 H16 O N3 Cl S  
 (m/z 309.0703, MW 309.8195, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 309.0703, Averaged MW : 309.8187 (a), 309.8222 (w)

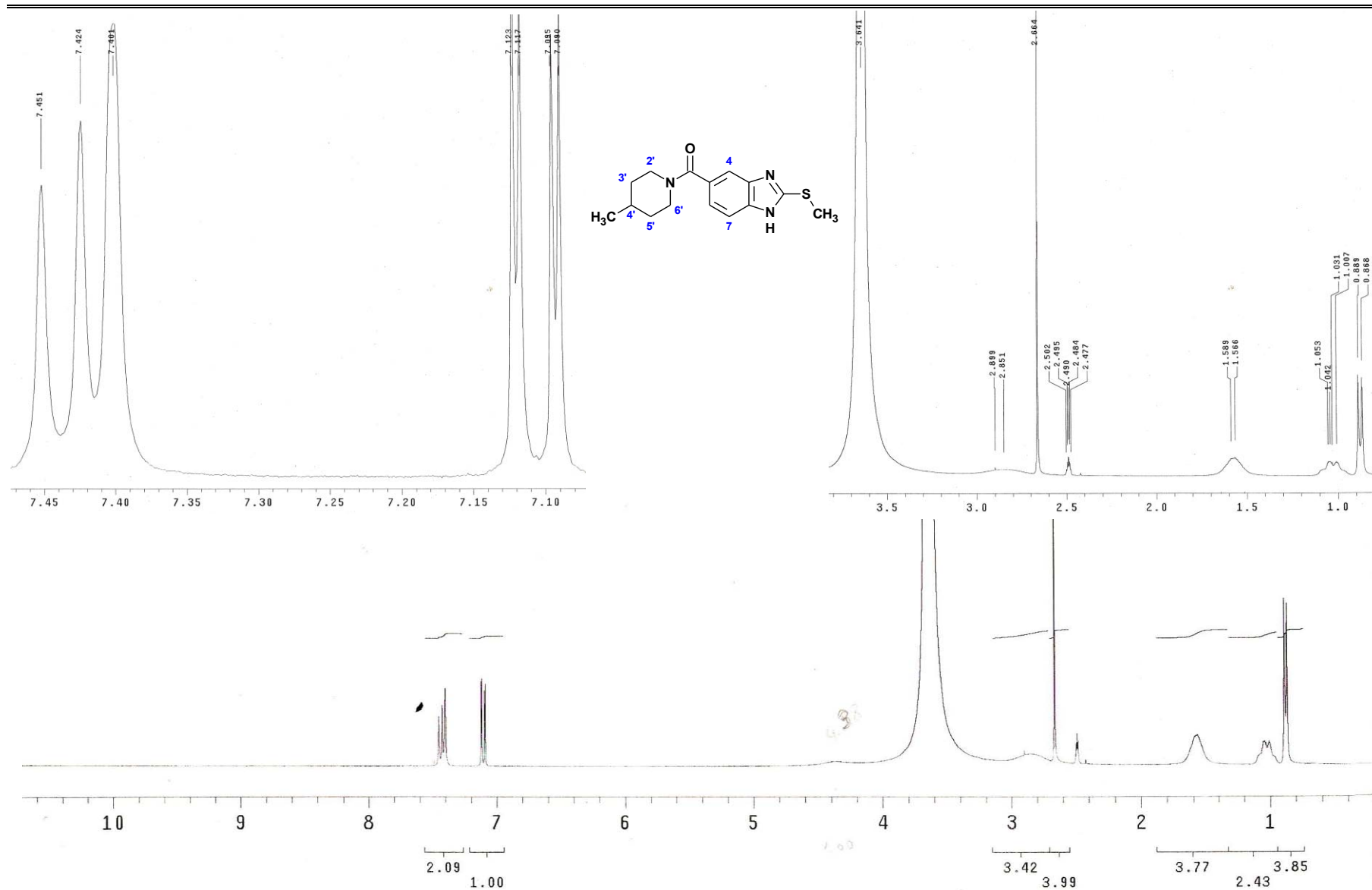
Page: 1

m/z	INT.	
309.0703	100.0000	*****
310.0731	17.7408	*****
311.0675	38.0914	*****
312.0702	6.5372	****
313.0660	2.0503	*
314.0674	0.2846	
315.0680	0.0311	
316.0691	0.0027	
317.0707	0.0002	

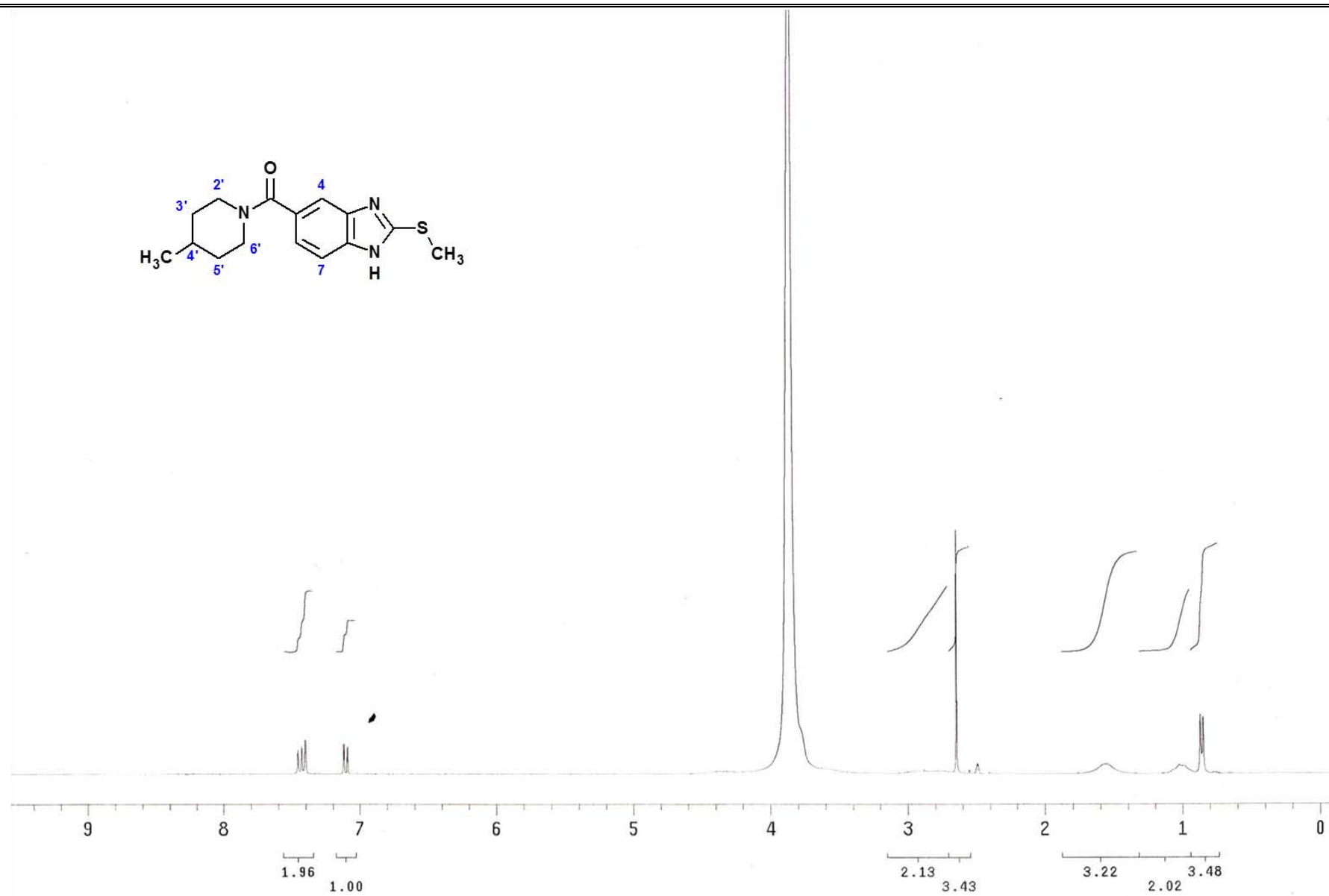
**Espectro 100. EMAR del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (6-2).**



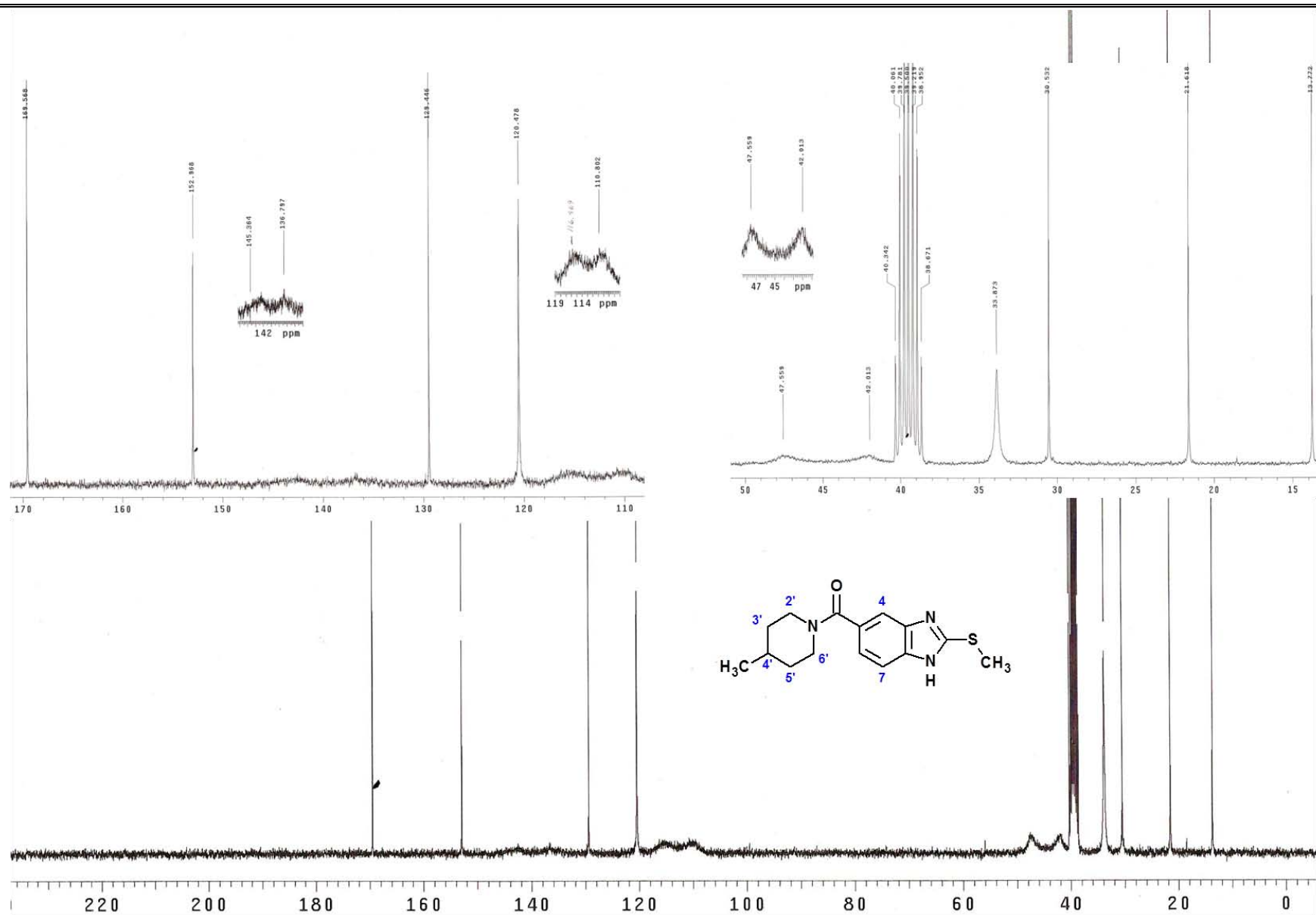
**Espectro 101.** IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol (6-3).



**Espectro 102.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-3**).

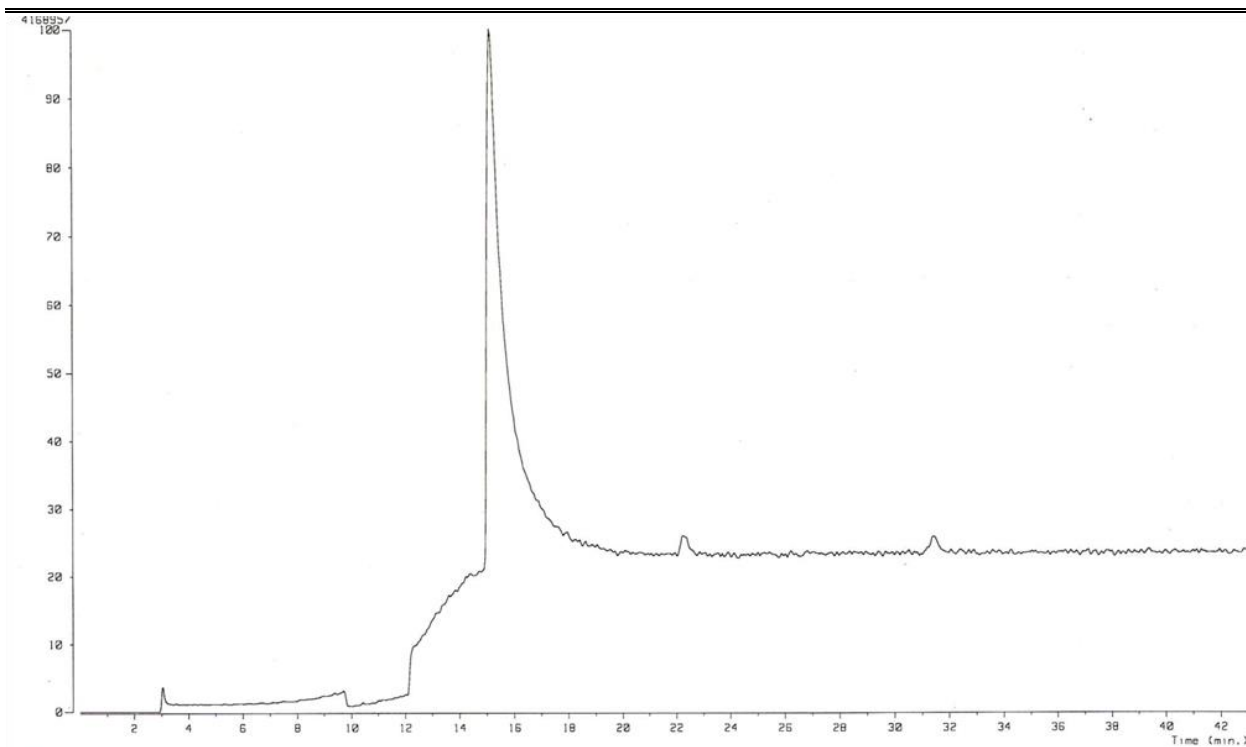


**Espectro 103.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (6-3).

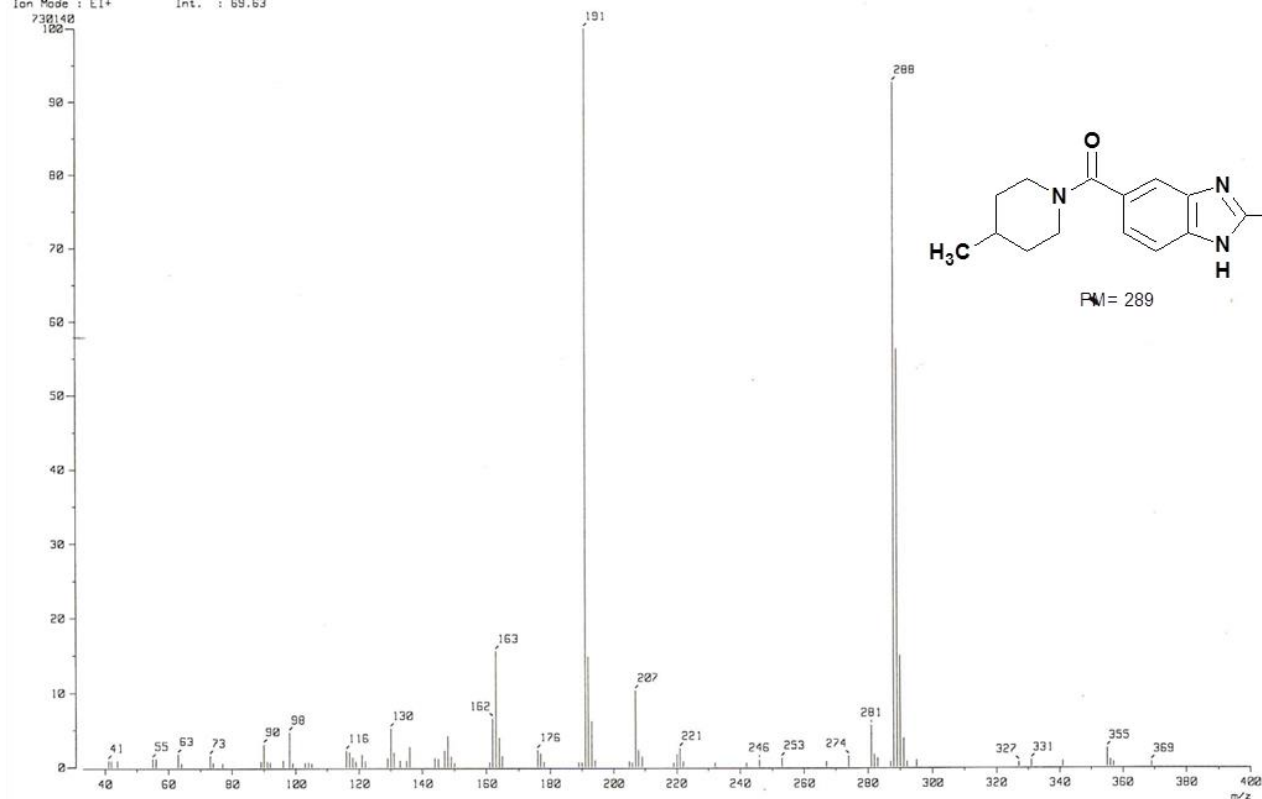


**Espectro 104.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-3**).





[ Mass Spectrum ]  
 RT : 15.22 min Scan# : (551,557)-(224,487)-(... Temp : 30.5 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 69.63



**Espectro 105.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-3**).

Data : OT2037 CARB3\_R5000\_001 Date : 14-Mar-99 16:58  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Reserv. Ion Mode : EI+  
 RT : 1.21 min Scan#: 25  
 Elements : C 20/0, H 50/0, O 10/0, N 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
290.2347	0.3	+5.3 / +1.5	0.5	C 15 H 32 O 4 N
		-3.9 / -1.1	5.0	C 18 H 30 O N 2
		+10.0 / +2.9	1.0	C 13 H 30 O 3 N 4
		+0.7 / +0.2	5.5	C 16 H 28 N 5
		-15.5 / -4.5	1.0	C 15 H 34 O N 2 S
		-10.9 / -3.2	1.5	C 13 H 32 N 5 S
289.1246	50.2	-14.2 / -4.1	3.5	C 13 H 21 O 7
		-0.2 / -0.1	-0.5	C 8 H 21 O 9 N 2
		-9.5 / -2.8	4.0	C 11 H 19 O 6 N 3
		+4.4 / +1.3	0.0	C 6 H 19 O 8 N 5
		-5.5 / -1.6	8.5	C 17 H 21 O 2 S
		+8.4 / +2.4	4.5	C 12 H 21 O 4 N 2 S
		-0.9 / -0.3	9.0	C 15 H 19 O N 3 S
		+13.0 / +3.8	5.0	C 10 H 19 O 3 N 5 S
		-17.2 / -5.0	4.5	C 14 H 25 O 2 S 2
		-3.3 / -0.9	0.5	C 9 H 25 O 4 N 2 S 2
		-12.5 / -3.6	5.0	C 12 H 23 O N 3 S 2
		+1.4 / +0.4	1.0	C 7 H 23 O 3 N 5 S 2
		+14.7 / +4.2	1.0	C 10 H 27 O 2 N S 3
		288.1165	84.2	-15.1 / -4.4
-1.2 / -0.3	0.0			C 8 H 20 O 9 N 2
-10.5 / -3.0	4.5			C 11 H 18 O 6 N 3
+3.5 / +1.0	0.5			C 6 H 18 O 8 N 5
-6.4 / -1.9	9.0			C 17 H 20 O 2 S
+16.8 / +4.8	0.5			C 9 H 22 O 7 N S
+7.5 / +2.2	5.0			C 12 H 20 O 4 N 2 S
-1.8 / -0.5	9.5			C 15 H 18 O N 3 S
+12.2 / +3.5	5.5			C 10 H 18 O 3 N 5 S
-4.2 / -1.2	1.0			C 9 H 24 O 4 N 2 S 2
-13.5 / -3.9	5.5			C 12 H 22 O N 3 S 2
+0.5 / +0.1	1.5			C 7 H 22 O 3 N 5 S 2
+13.8 / +4.0	1.5			C 10 H 26 O 2 N S 3

[ Theoretical Ion Distribution ]

Page: 1

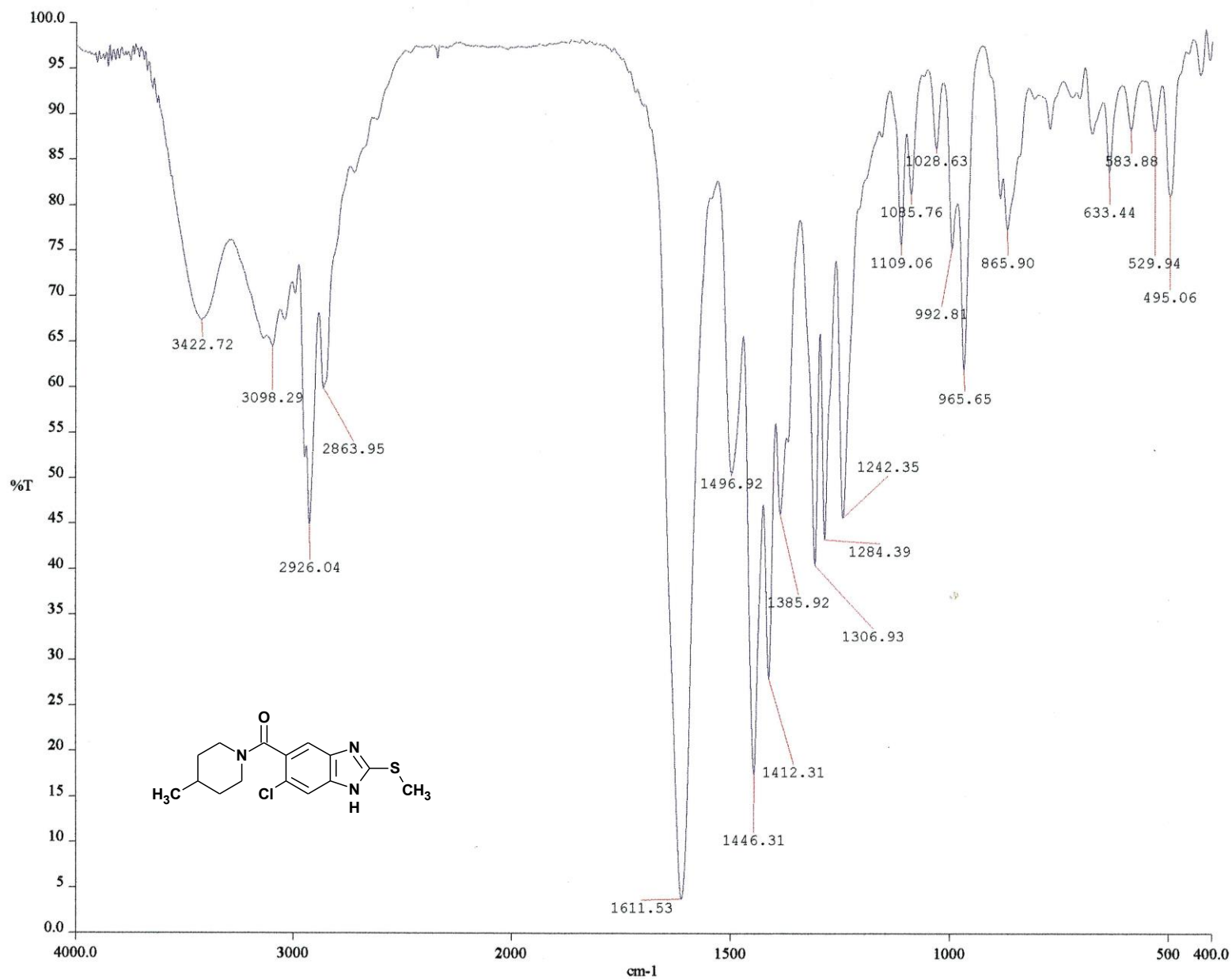
Molecular Formula : C15 H19 N3 O S

(m/z 289.1249, MW 289.4014, U.S. 9.0)

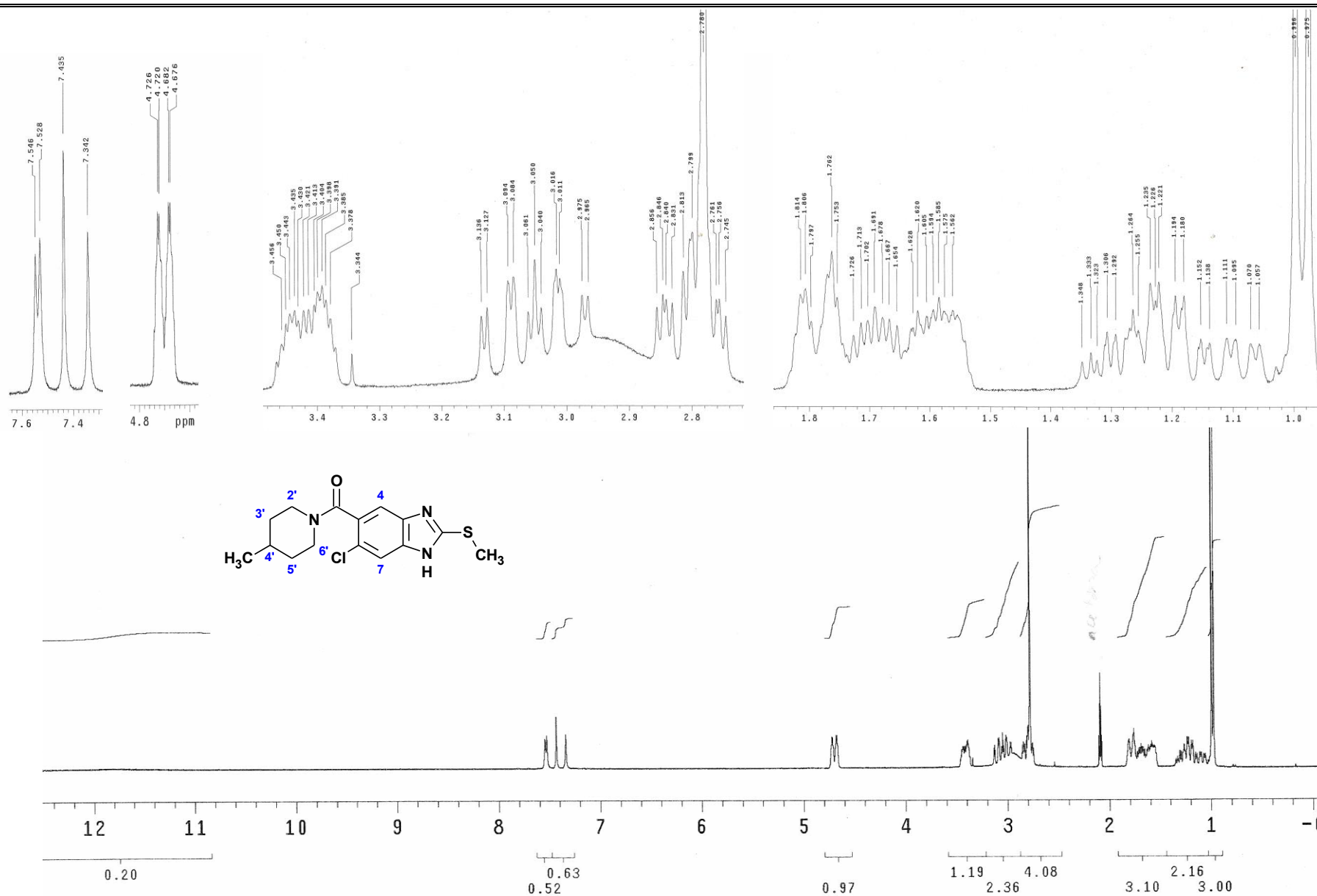
Base Peak : 289.1249, Averaged MW : 289.4010 (a), 289.4022 (w)

m/z	INT.	
289.1249	100.0000	*****
290.1278	18.8980	*****
291.1236	6.3188	****
292.1250	0.9348	*
293.1258	0.1055	
294.1269	0.0094	
295.1284	0.0006	

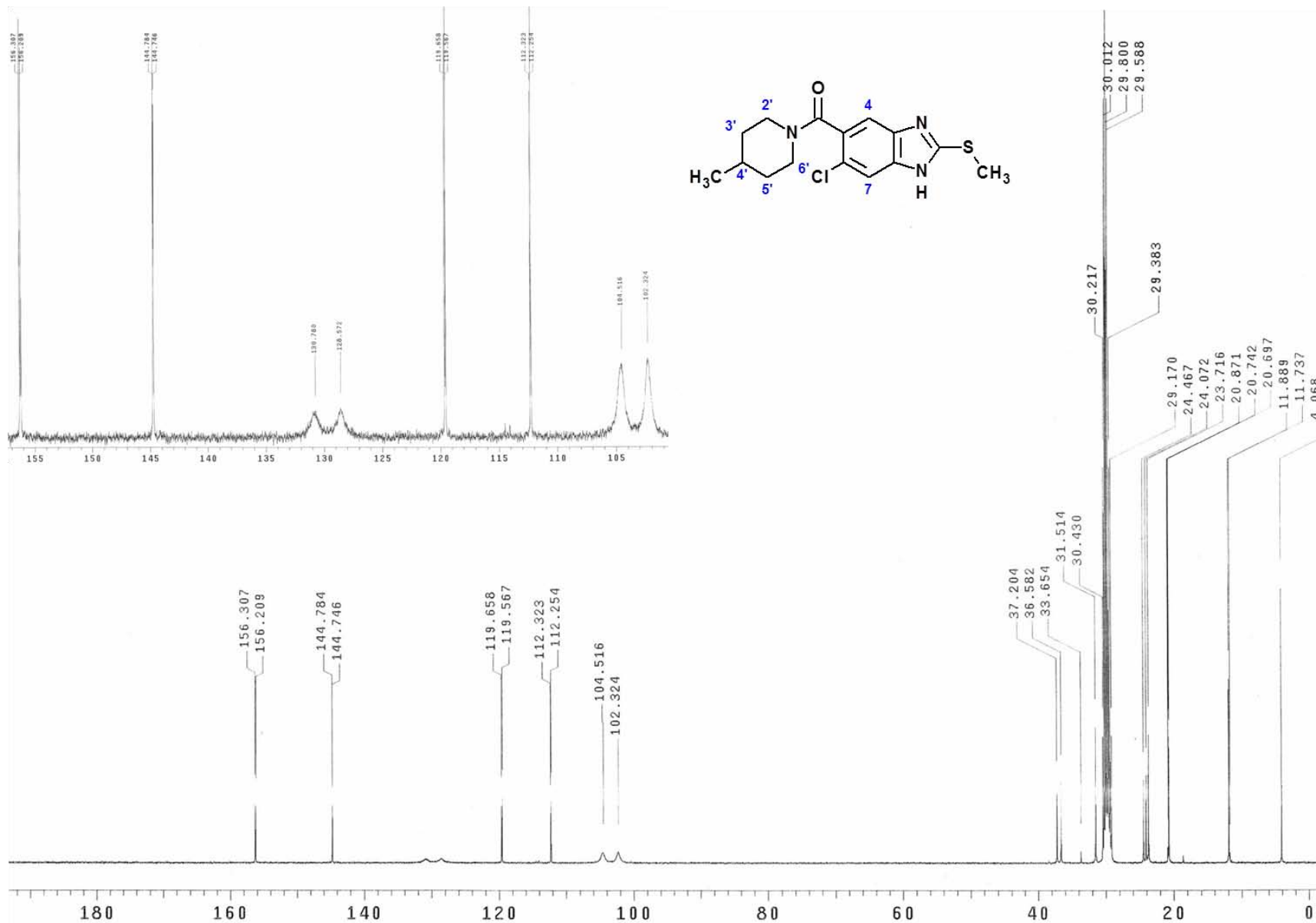
**Espectro 106.** EMAR del compuesto 5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-3**).



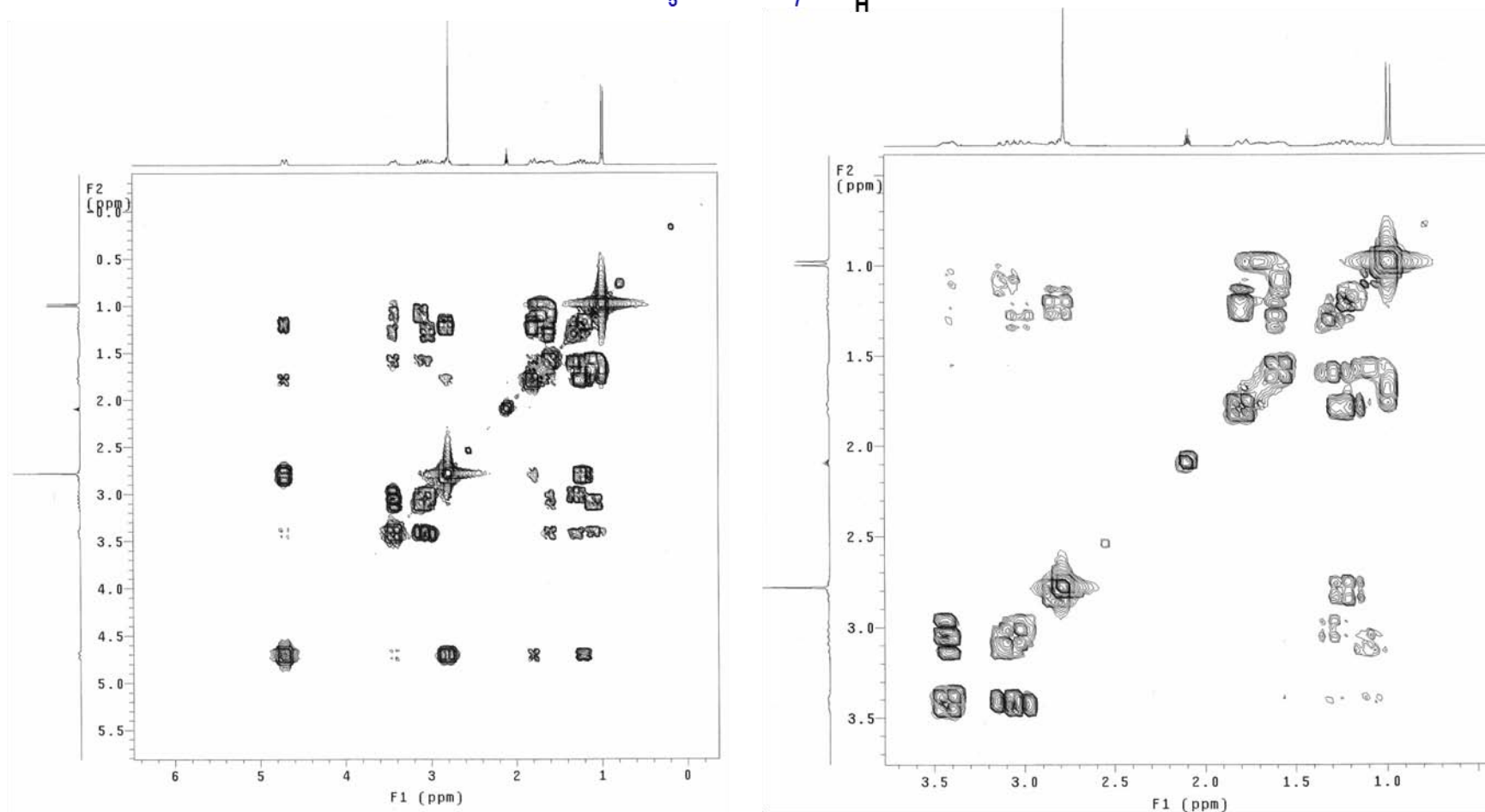
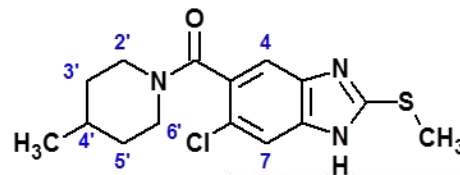
**Espectro 107.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



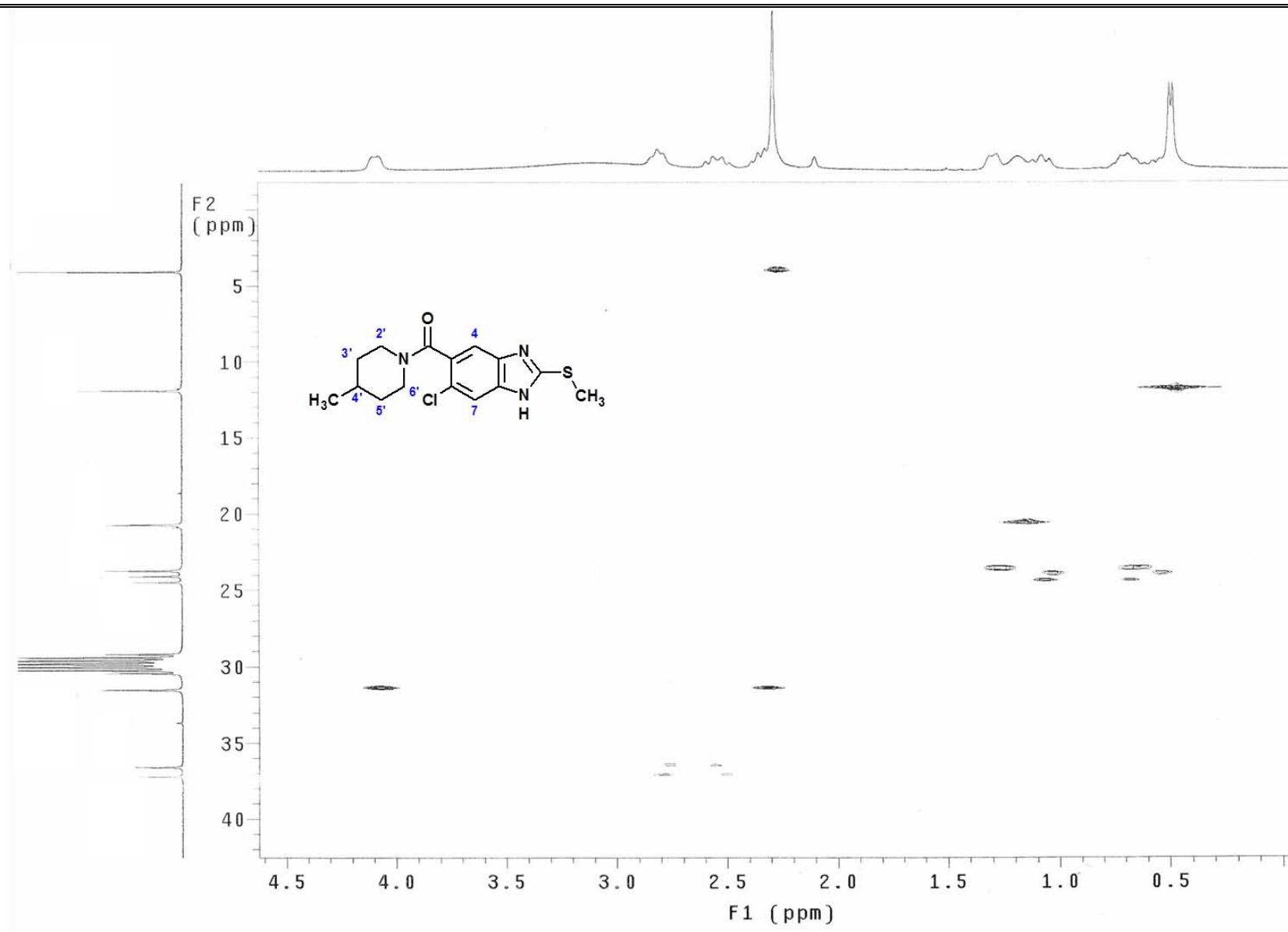
**Espectro 108.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, acetona- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metilto)-1H-bencimidazol (**6-4**).



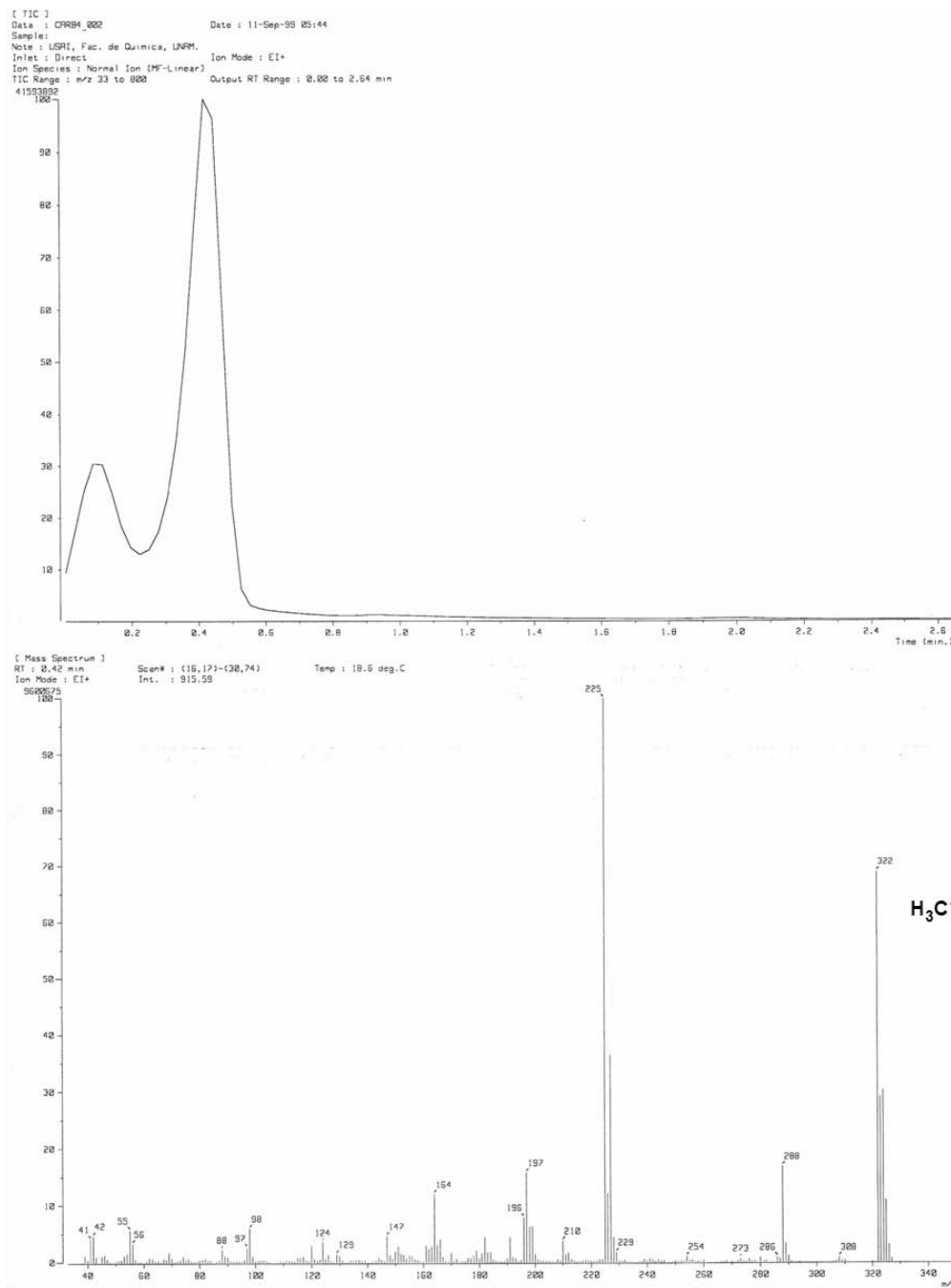
**Espectro 109.** RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



**Espectro 110.** Experimento COSY del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



**Espectro 111.** Experimento HETCOR del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



**Espectro 112.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-4**).



[ Elemental Composition ]

Data : OT2038\_CARBA\_R5000\_001 Date : 14-Mar-99 17:52  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.76 min Scan#: 16  
 Elements : C 20/0, H 50/0, O 10/0, N 5/0, Cl 5/1, S 5/1  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
323.0851	47.7	-6.7 / -2.2	8.5	C 17 H 20 O 2 Cl S
		+14.0 / +4.5	0.0	C 9 H 22 O 7 N Cl S
		+5.7 / +1.9	4.5	C 12 H 20 O 4 N 2 Cl S
		-2.6 / -0.8	9.0	C 15 H 18 O N 3 Cl S
		+9.9 / +3.2	5.0	C 10 H 18 O 3 N 5 Cl S
		+0.1 / +0.0	-0.5	C 11 H 25 O 4 Cl 2 S
		-8.2 / -2.7	4.0	C 14 H 23 O N Cl 2 S
		+4.2 / +1.4	0.0	C 9 H 23 O 3 N 3 Cl 2 S
		-4.1 / -1.3	4.5	C 12 H 21 N 4 Cl 2 S
		-9.7 / -3.1	-0.5	C 11 H 26 N 2 Cl 3 S
		-4.7 / -1.5	0.5	C 9 H 24 O 4 N 2 Cl S 2
		-13.0 / -4.2	5.0	C 12 H 22 O N 3 Cl S 2
		-0.6 / -0.2	1.0	C 7 H 22 O 3 N 5 Cl S 2
		-14.5 / -4.7	0.5	C 9 H 25 N 4 Cl 2 S 2
+11.3 / +3.7	1.0	C 10 H 26 O 2 N Cl S 3		
322.0784	81.6	-3.3 / -1.1	9.0	C 17 H 19 O 2 Cl S
		+9.2 / +3.0	5.0	C 12 H 19 O 4 N 2 Cl S
		+0.9 / +0.3	9.5	C 15 H 17 O N 3 Cl S
		+13.4 / +4.3	5.5	C 10 H 17 O 3 N 5 Cl S
		+3.5 / +1.1	0.0	C 11 H 24 O 4 Cl 2 S
		-4.8 / -1.5	4.5	C 14 H 22 O N Cl 2 S
		+7.7 / +2.5	0.5	C 9 H 22 O 3 N 3 Cl 2 S
		-0.6 / -0.2	5.0	C 12 H 20 N 4 Cl 2 S
		-6.3 / -2.0	0.0	C 11 H 25 N 2 Cl 3 S
		-13.8 / -4.4	5.0	C 14 H 23 O 2 Cl S 2
		-1.3 / -0.4	1.0	C 9 H 23 O 4 N 2 Cl S 2
		-9.6 / -3.1	5.5	C 12 H 21 O N 3 Cl S 2
		+2.9 / +0.9	1.5	C 7 H 21 O 3 N 5 Cl S 2
		-15.3 / -4.9	0.5	C 11 H 26 O N Cl 2 S 2
-11.1 / -3.6	1.0	C 9 H 24 N 4 Cl 2 S 2		
+14.8 / +4.8	1.5	C 10 H 25 O 2 N Cl S 3		

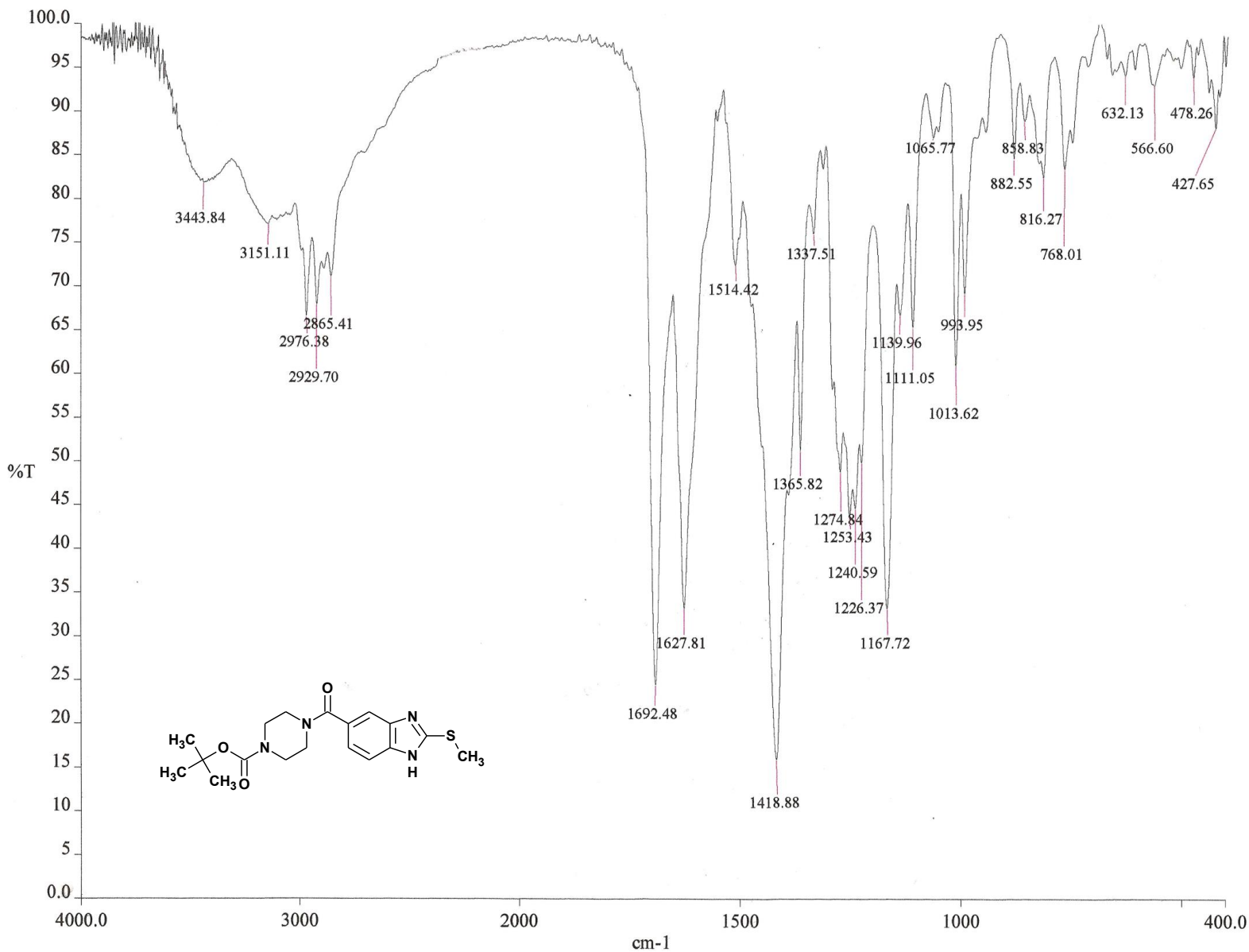
[ Theoretical Ion Distribution ]

Page: 1

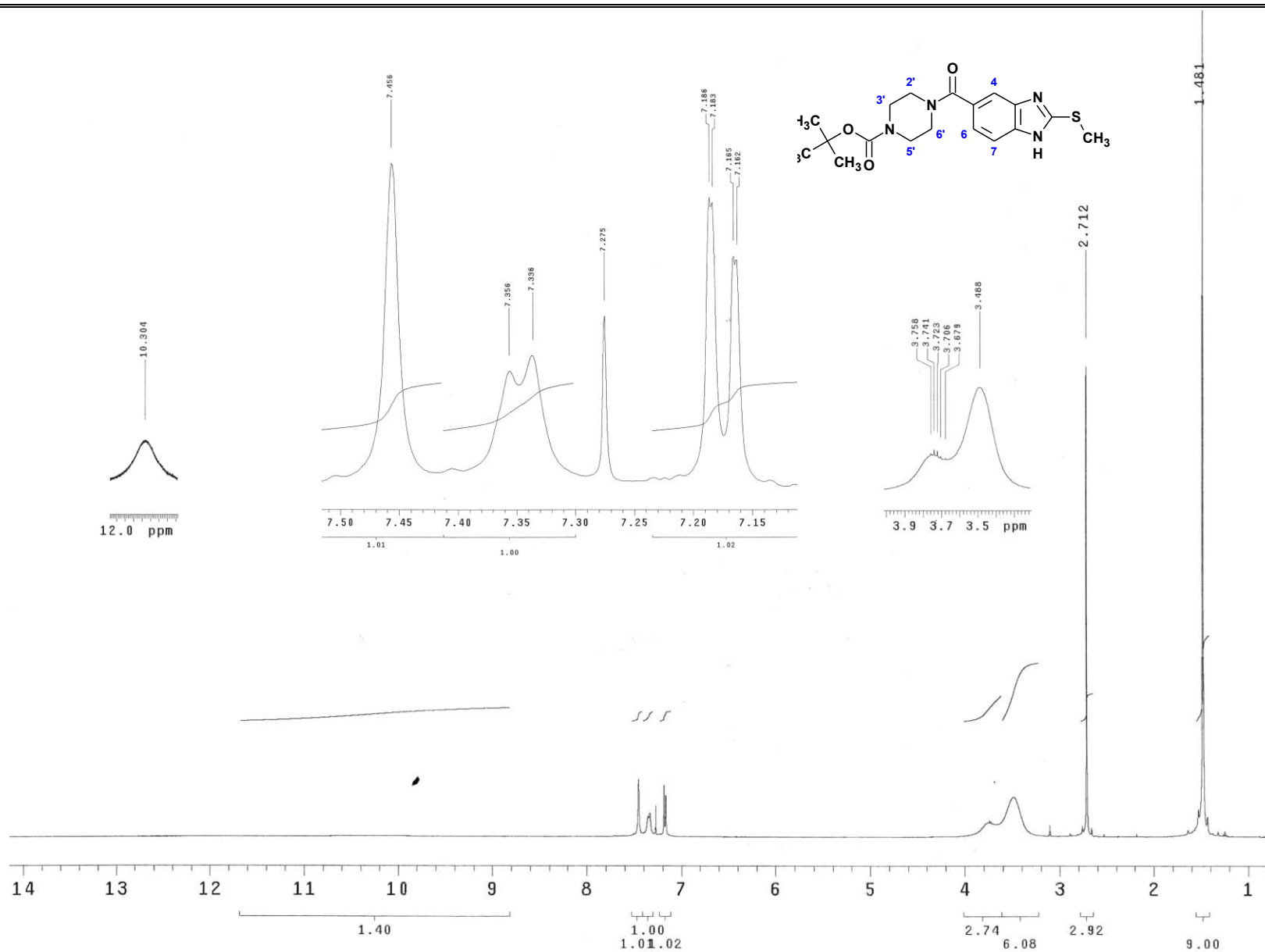
Molecular Formula : C15 H18 O N3 Cl S  
 (m/z 323.0859, MW 323.8464, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 323.0859, Averaged MW : 323.8457(a), 323.8491(w)

m/z	INT.	
323.0859	100.0000	*****
324.0888	18.8830	*****
325.0832	38.2944	*****
326.0859	6.9723	****
327.0819	2.1251	*
328.0832	0.3080	
329.0840	0.0343	
330.0850	0.0030	
331.0866	0.0002	

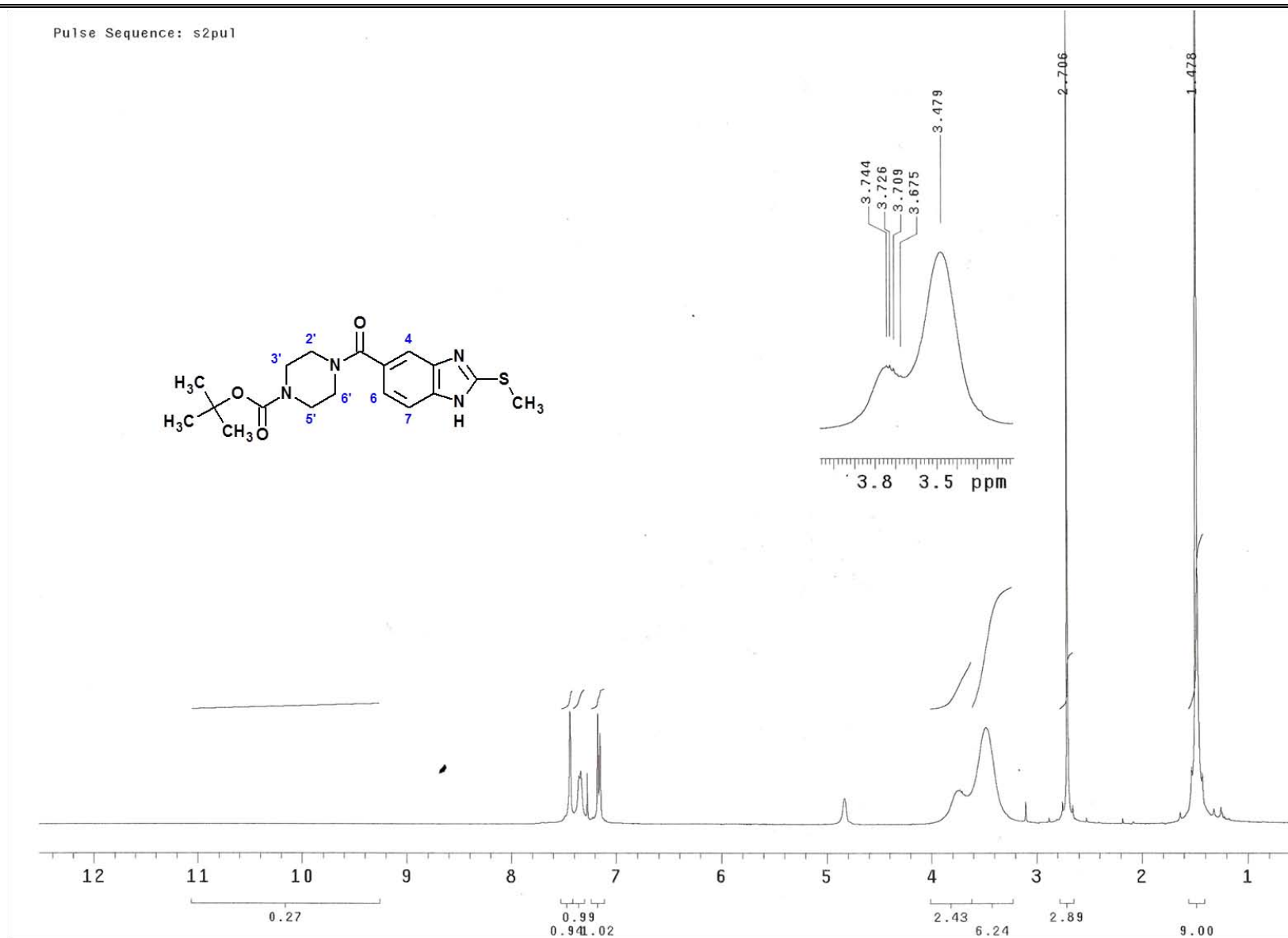
**Espectro 113.** EMAR del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperidin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-4).



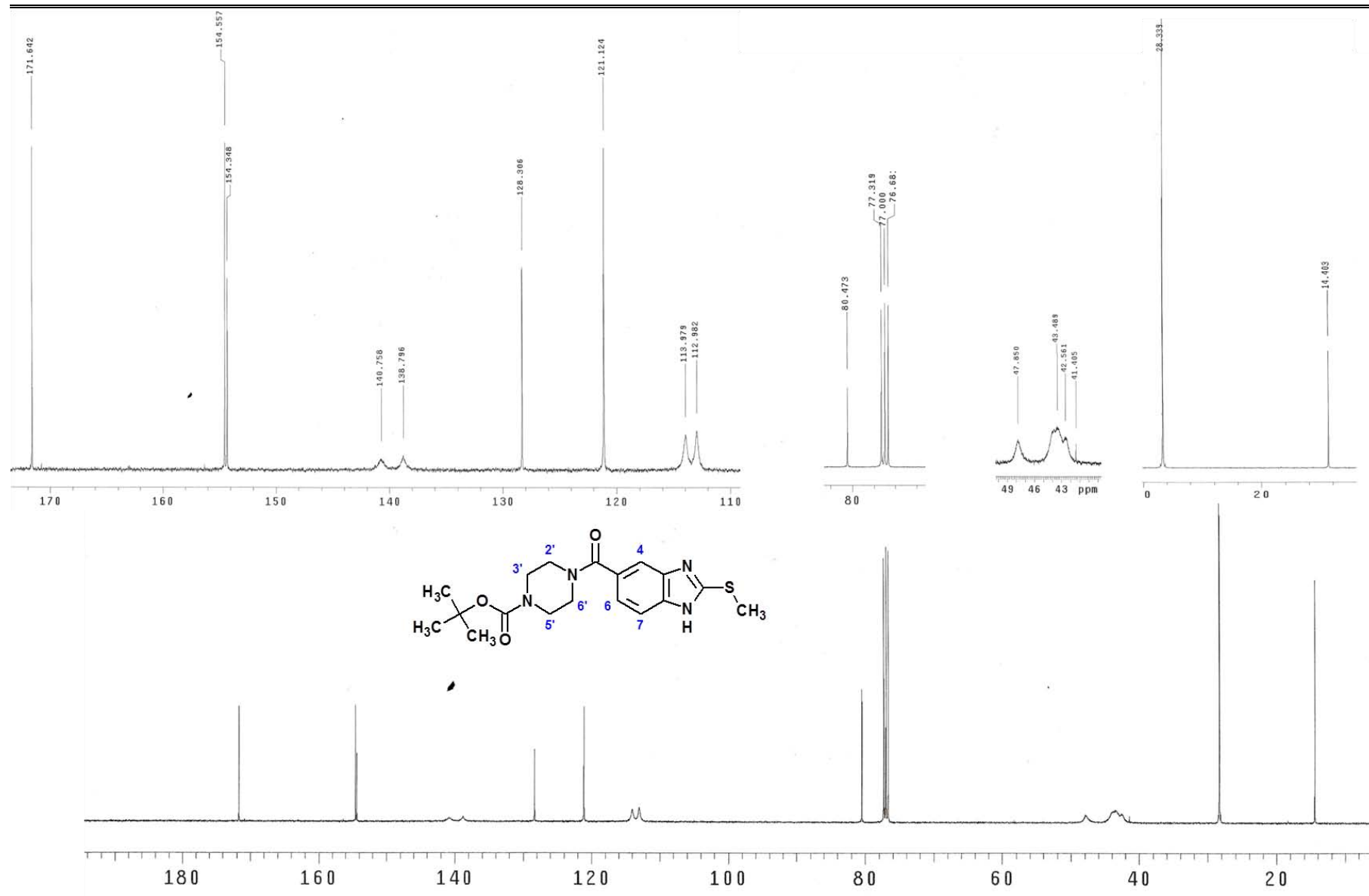
**Espectro 114.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 4-[[2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo (6-5b).



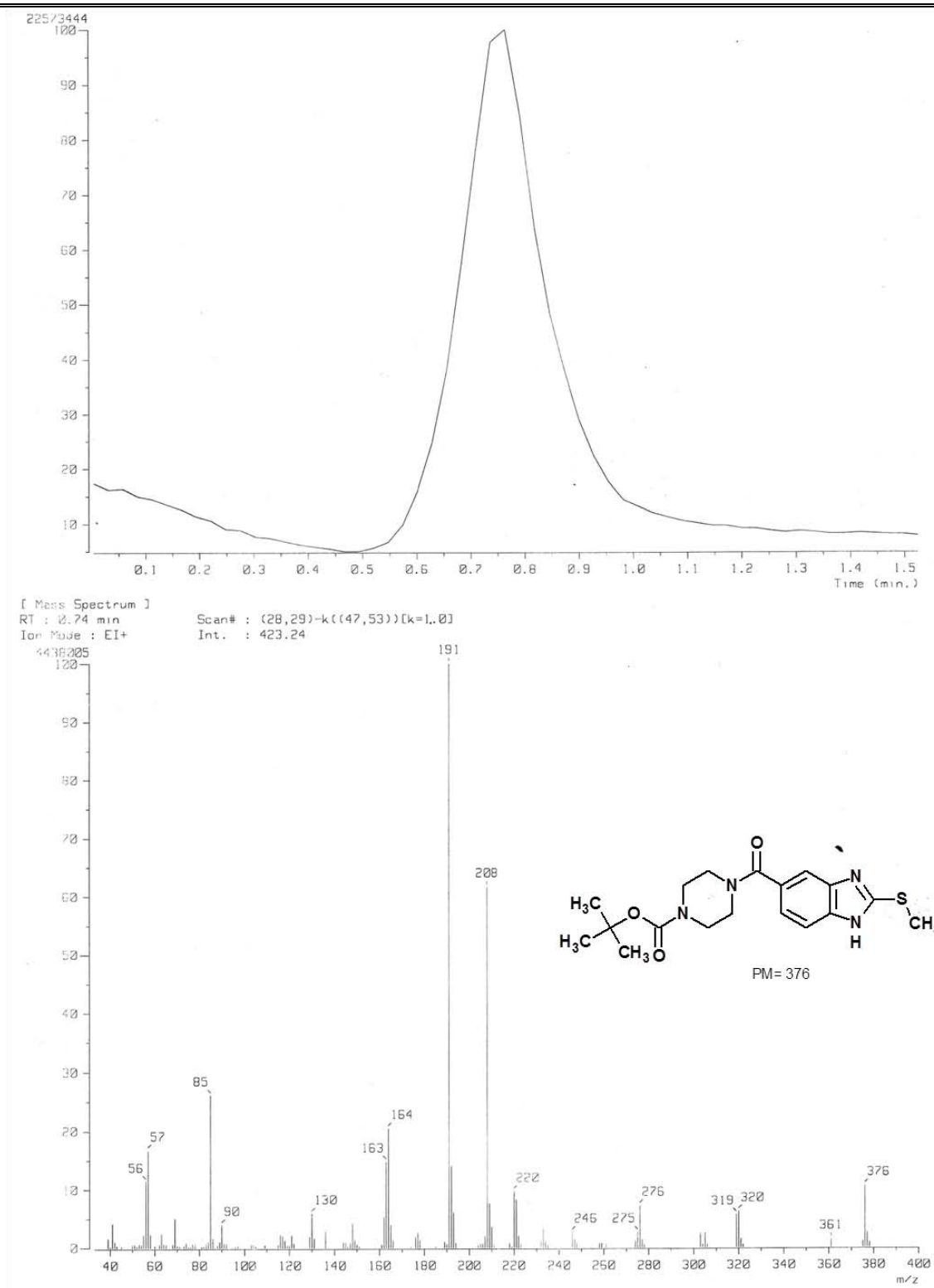
**Espectro 115.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 4-[[2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo (**6-5b**).



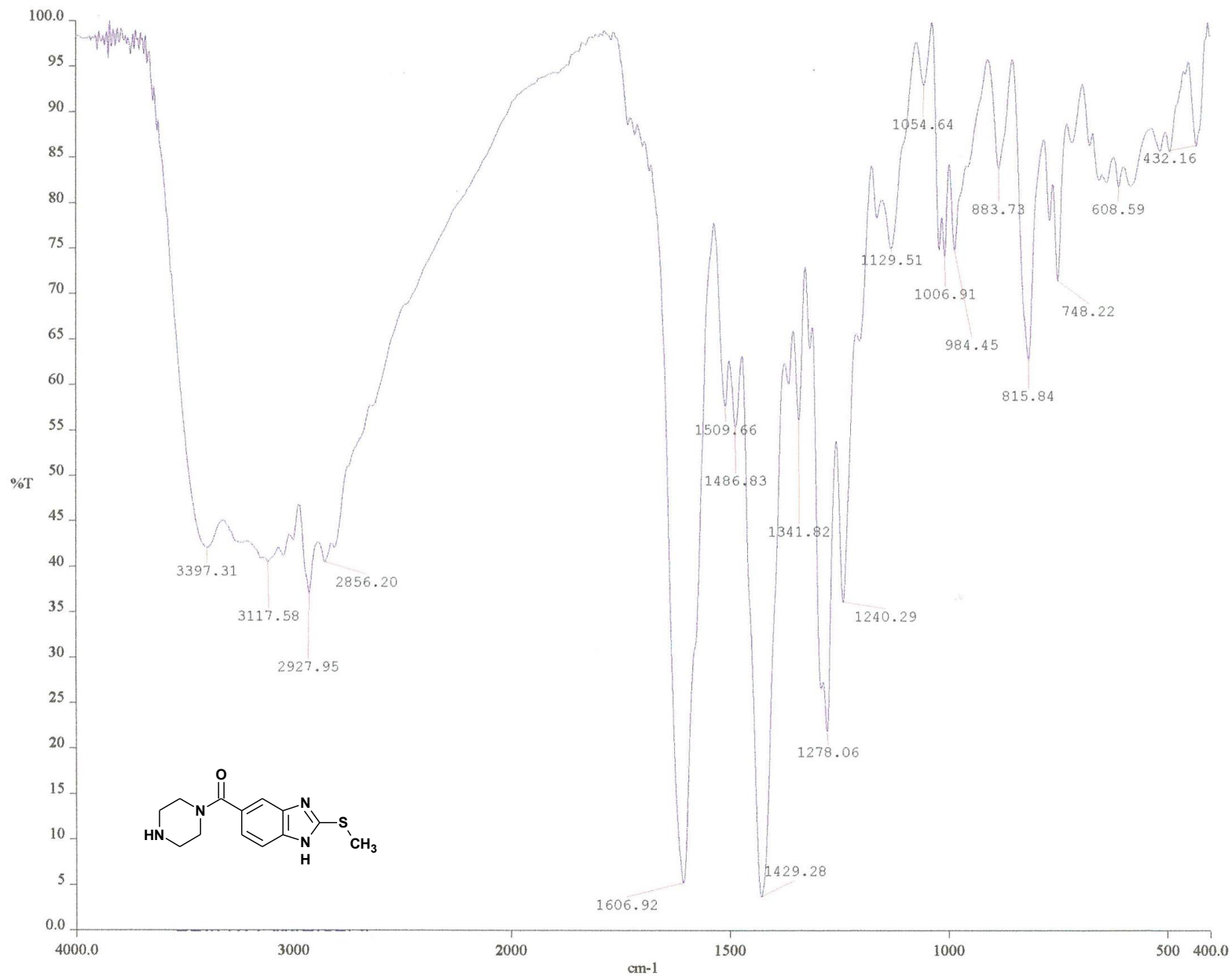
**Espectro 116.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 4-[[2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo (6-5b).



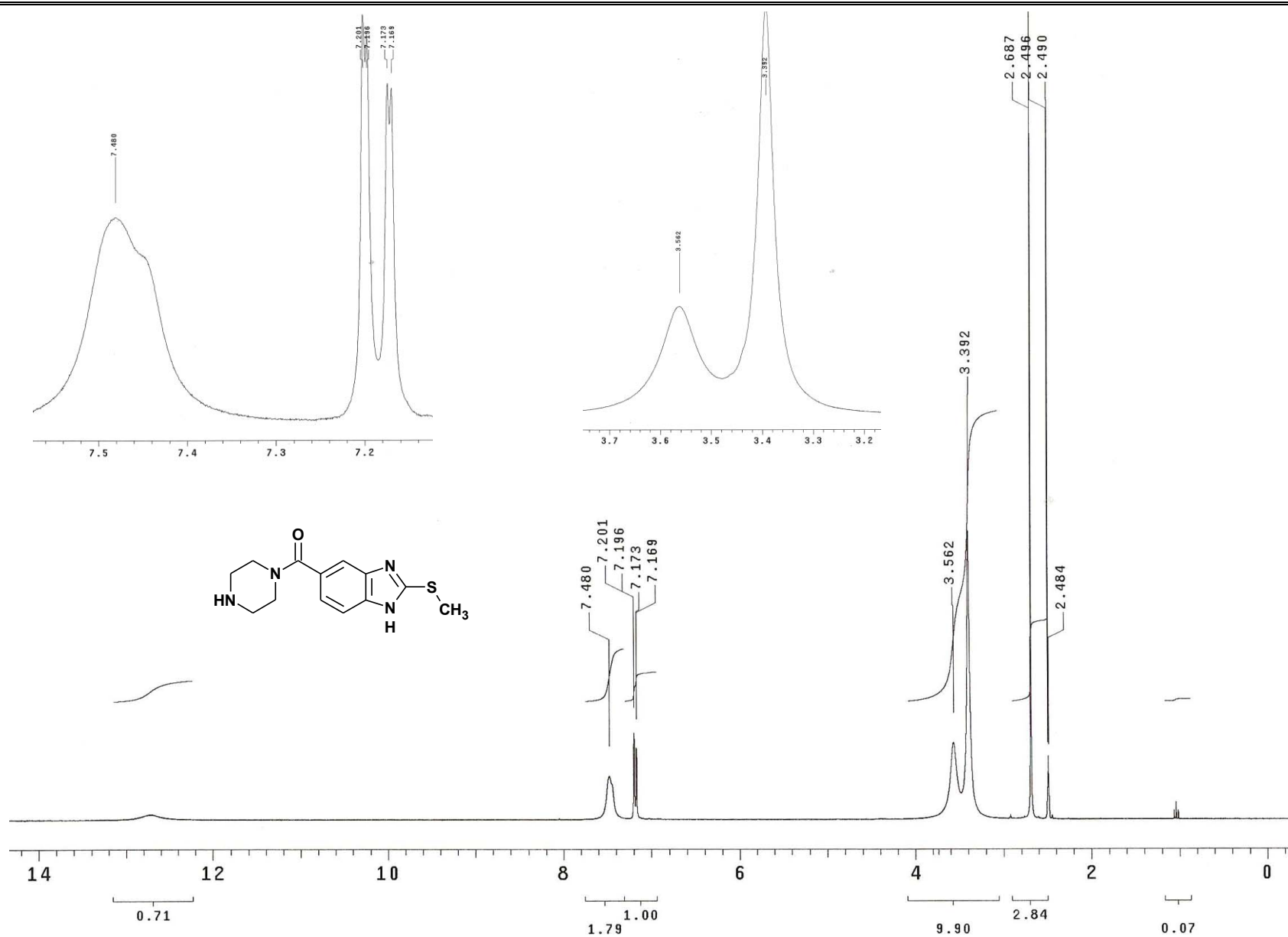
**Espectro 117.** RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 4-[[2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo (**6-5b**).



**Espectro 118.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 4-[[2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-il]carbonil]piperazino-1-carboxilato de *terc*-butilo (6-5b).



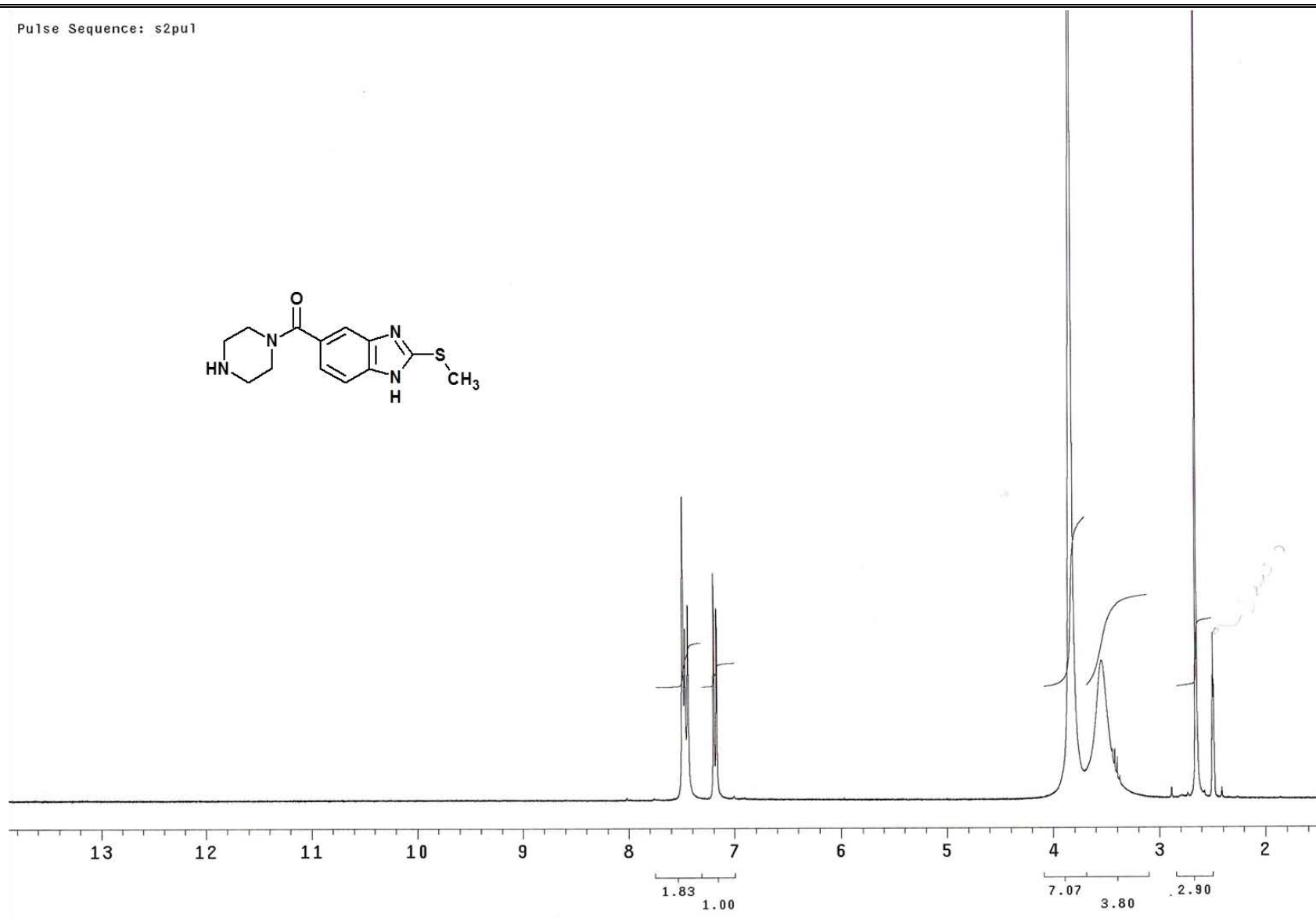
**Espectro 119.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-5a**).



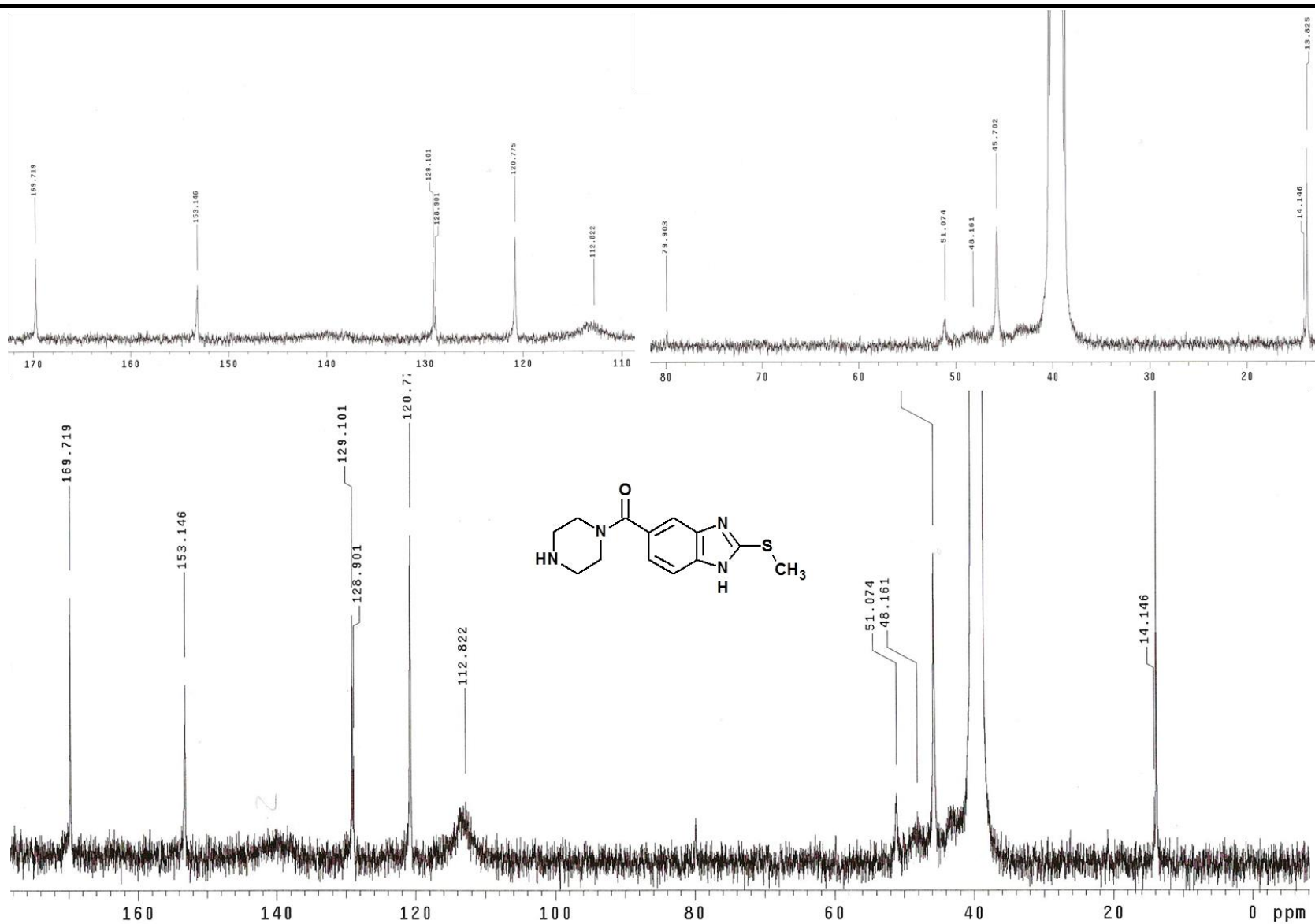
**Espectro 120.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonyl)-1H-benzimidazol (**6-5a**).



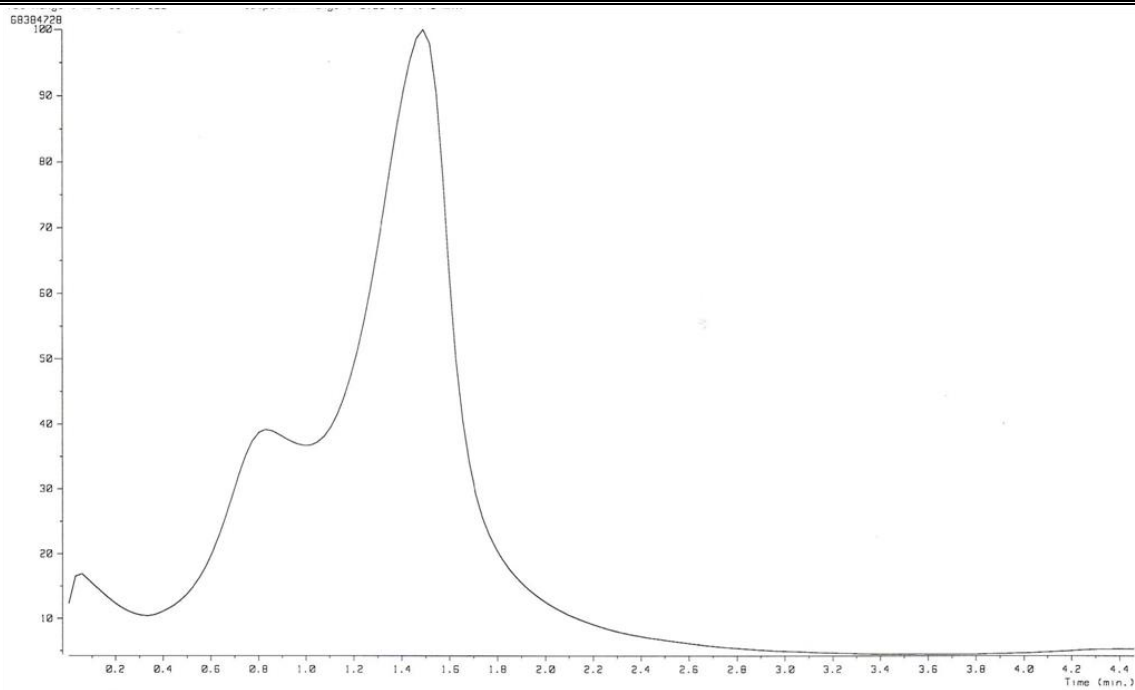
Pulse Sequence: s2pu1



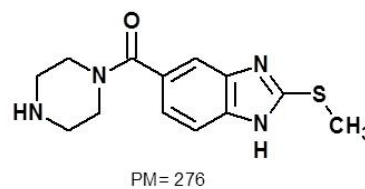
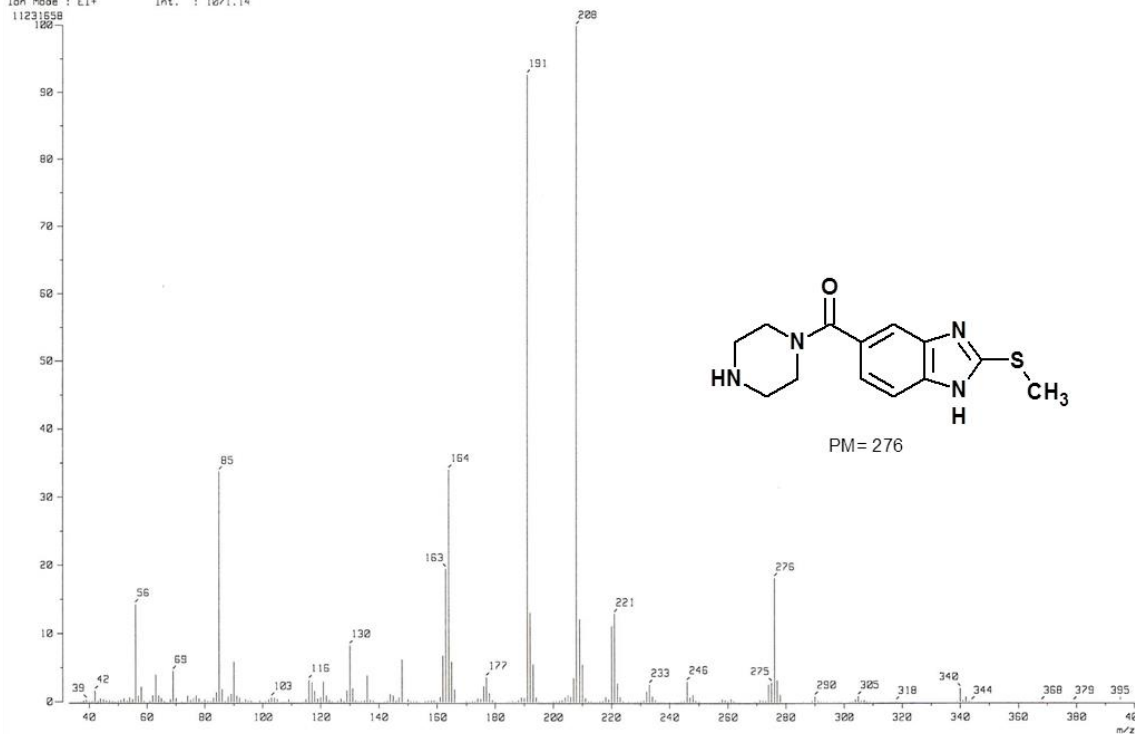
**Espectro 121.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-5a**).



**Espectro 122.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metilito)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-5a**).



[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.46 min  
 Ion Mode : EI+  
 Scan# : (52,57)-(2,35)-(89,137) Temp : 27.8 deg.C  
 Int. : 1071.14



**Espectro 123.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 2-(metilto)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-5a**).

[ Elemental Composition ]

Data : OT1967\_CARB5\_002 Date : 03-Mar-99 05:20  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.50 min Scan#: 11  
 Elements : C 20/0, H 20/0, O 10/0, N 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

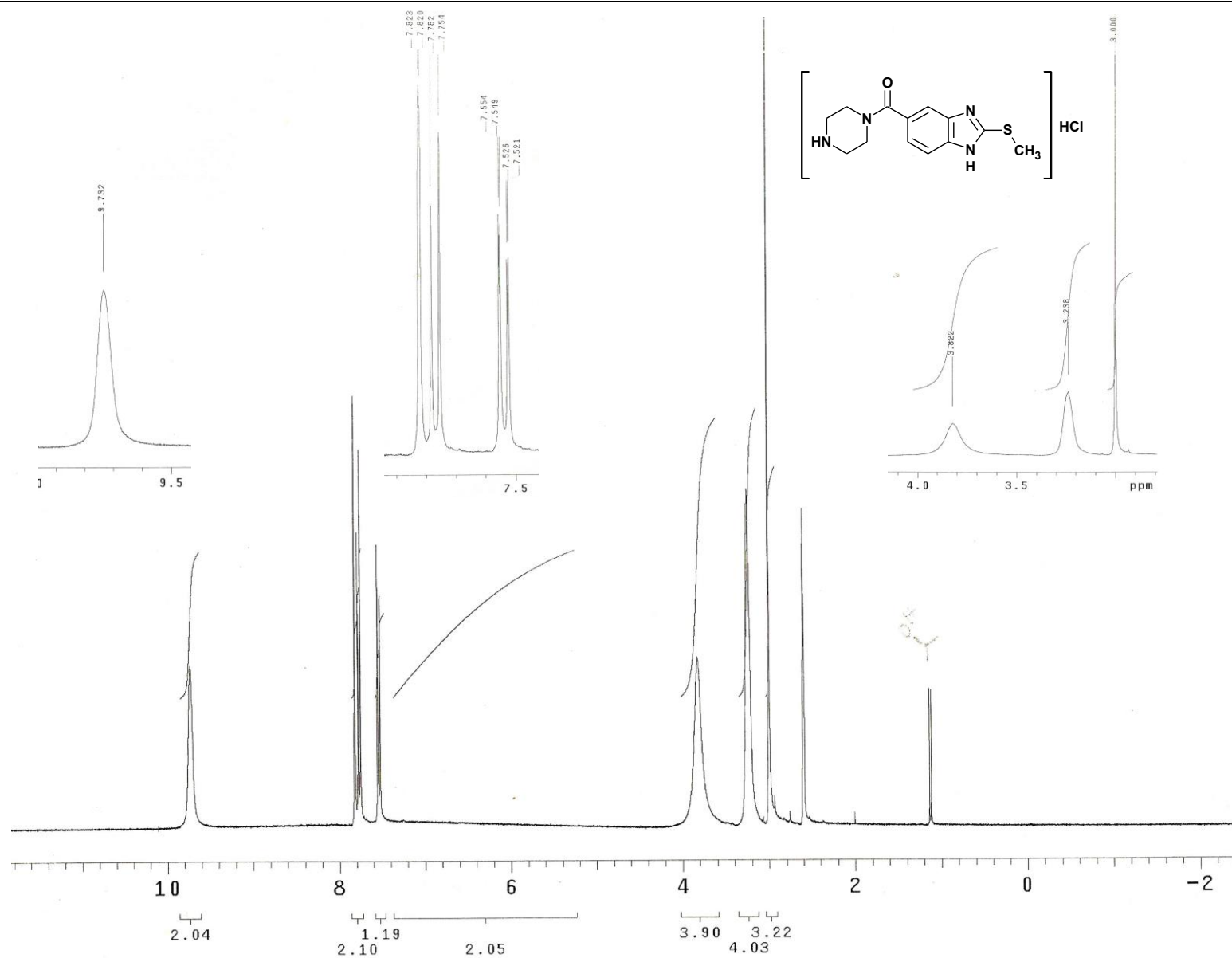
Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
276.1044	17.4	+16.8 / +4.6	8.0	C 15 H 16 O 5
		-14.2 / -3.9	3.5	C 11 H 18 O 7 N 3
		+0.3 / +0.1	-0.5	C 6 H 18 O 9 N 3
		-9.4 / -2.6	4.0	C 9 H 16 O 6 N 4
		+4.5 / +1.3	4.0	C 12 H 20 O 5 S
		-5.2 / -1.4	8.5	C 15 H 18 O 2 N S
		+9.4 / +2.6	4.5	C 10 H 18 O 4 N 3 S
		-0.3 / -0.1	9.0	C 13 H 16 O N 4 S
		+13.6 / +3.8	9.0	C 16 H 20 S 2
		-12.5 / -3.5	5.0	C 10 H 20 O N 4 S 2

[ Theoretical Ion Distribution ]

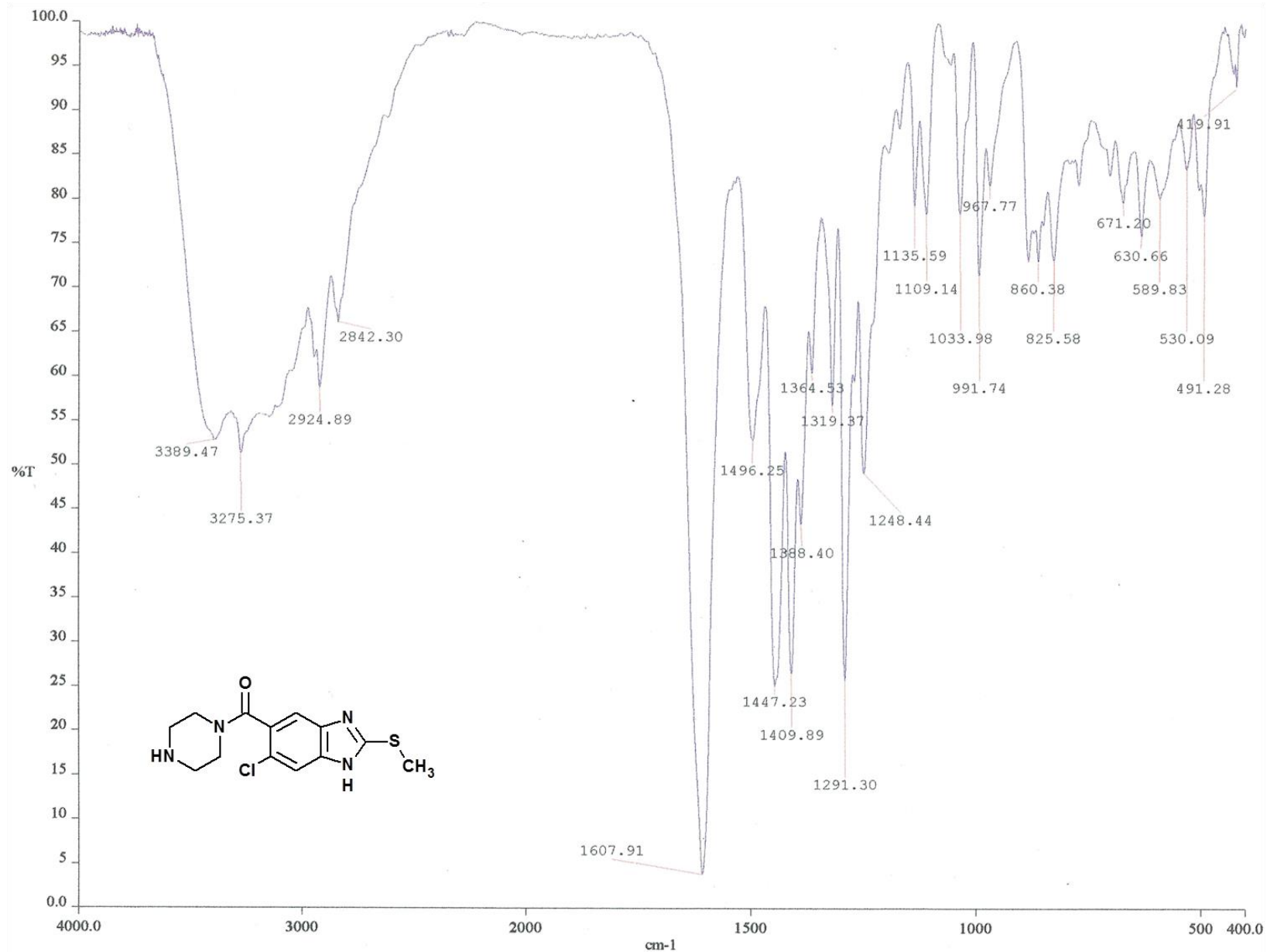
Molecular Formula : C13 H16 N4 O S  
 (m/z 276.1045, MW 276.3622, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 276.1045, Averaged MW : 276.3617(a), 276.3629(w)

m/z	INT.	
276.1045	100.0000	*****
277.1072	16.9959	*****
278.1027	5.9892	***
279.1042	0.8198	
280.1047	0.0895	
281.1058	0.0076	
282.1073	0.0005	

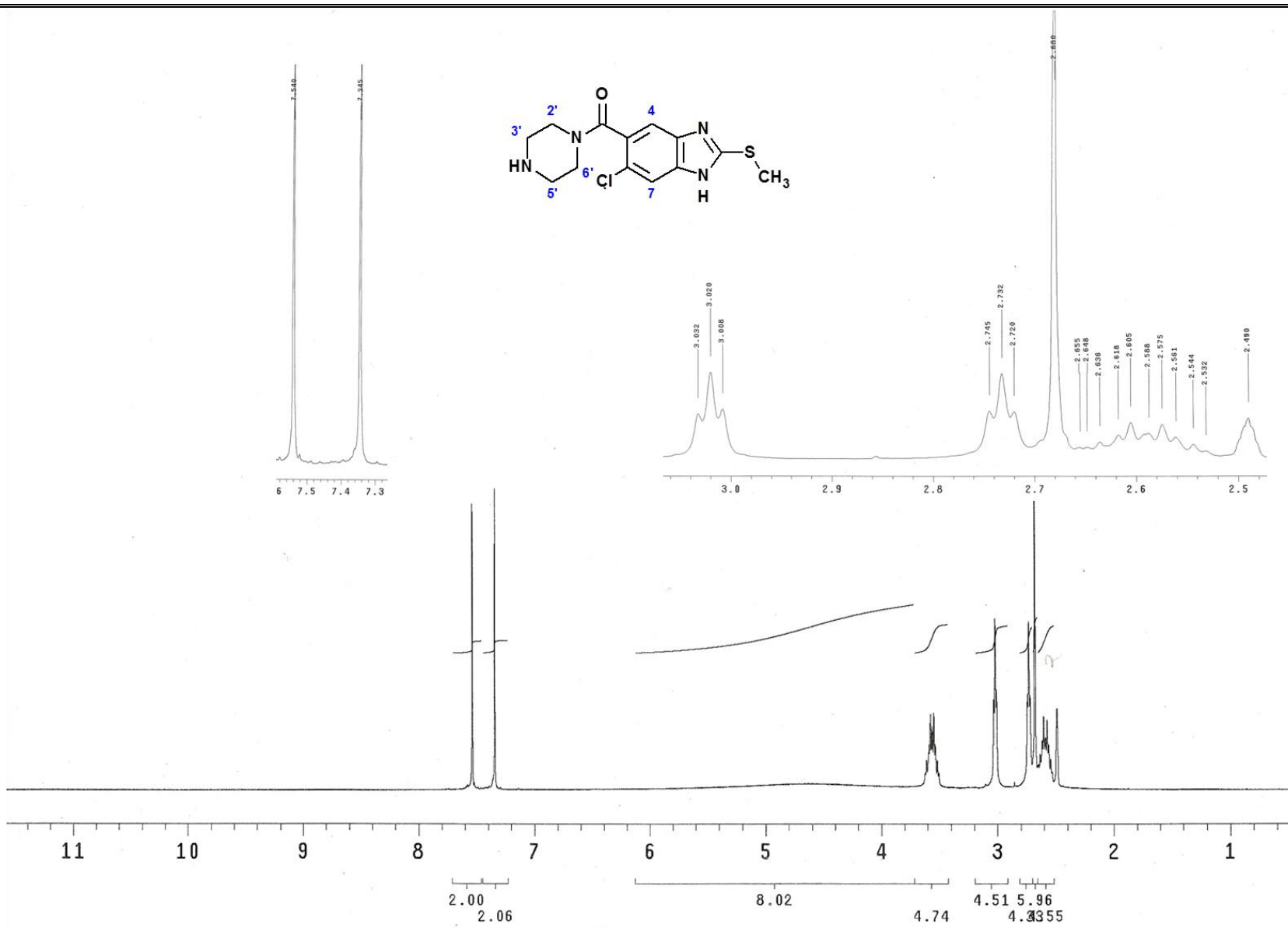
**Espectro 124.** EMAR del compuesto 2-(metilitio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (6-5a).



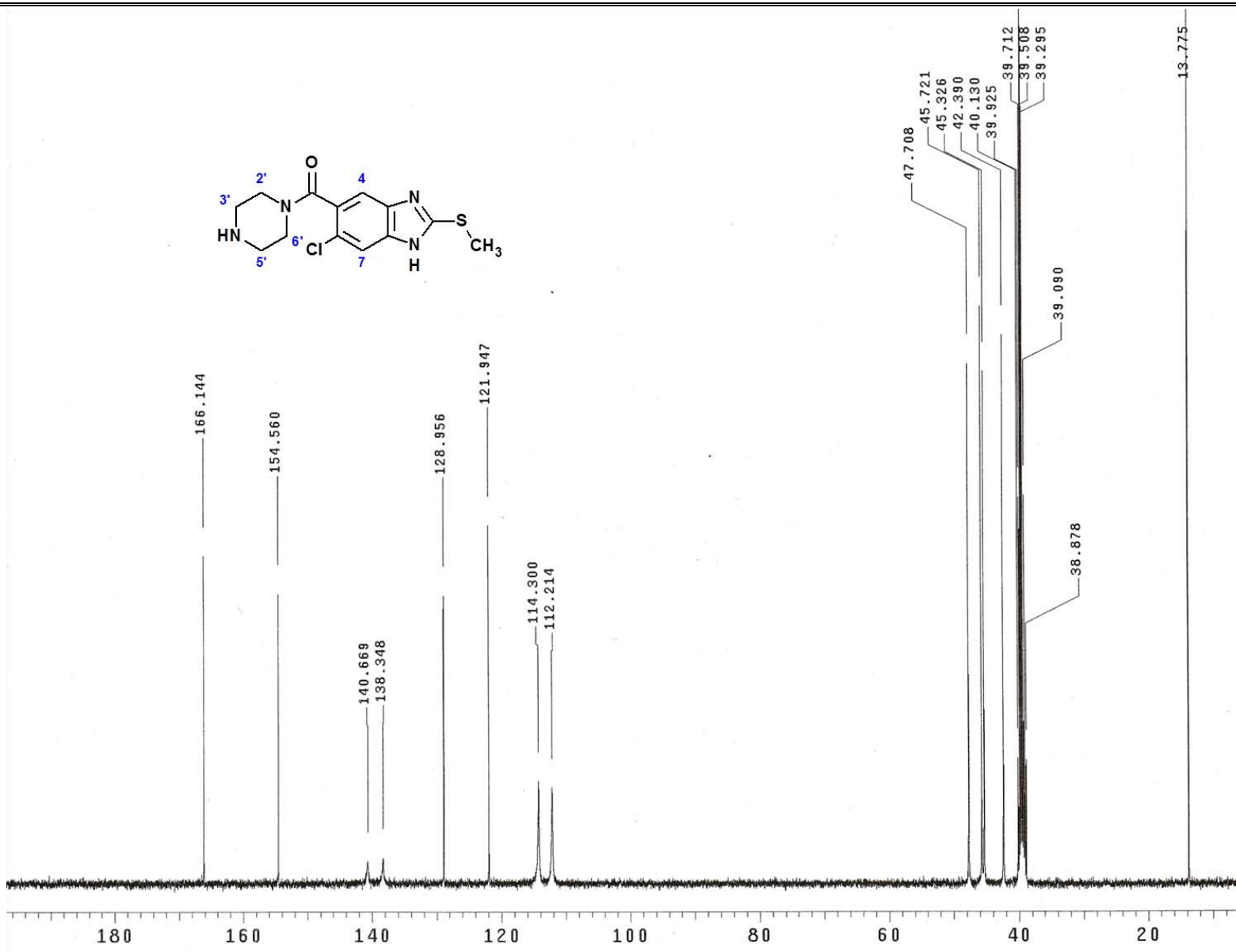
**Espectro 125.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto diclorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-5a**).



**Espectro 126.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-6**).

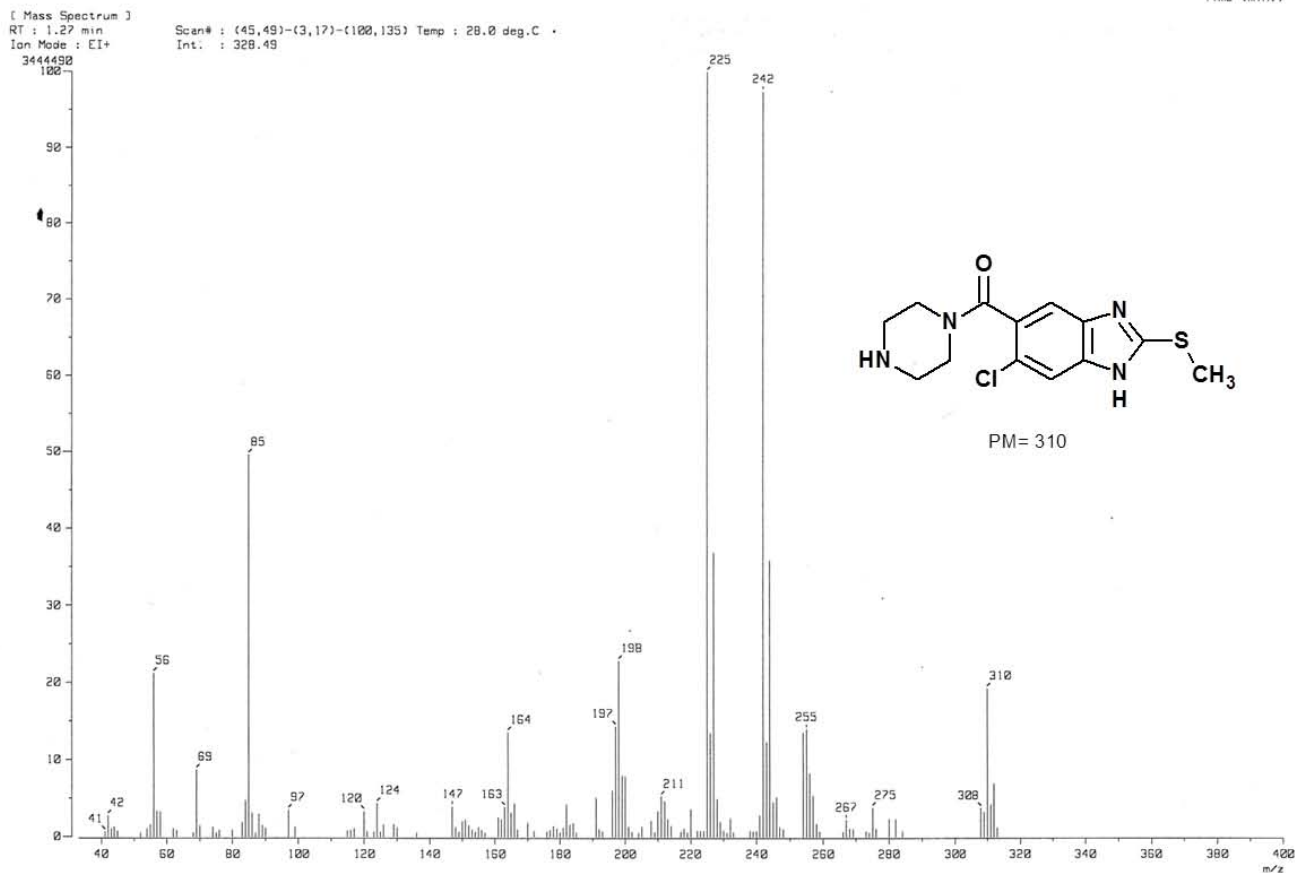
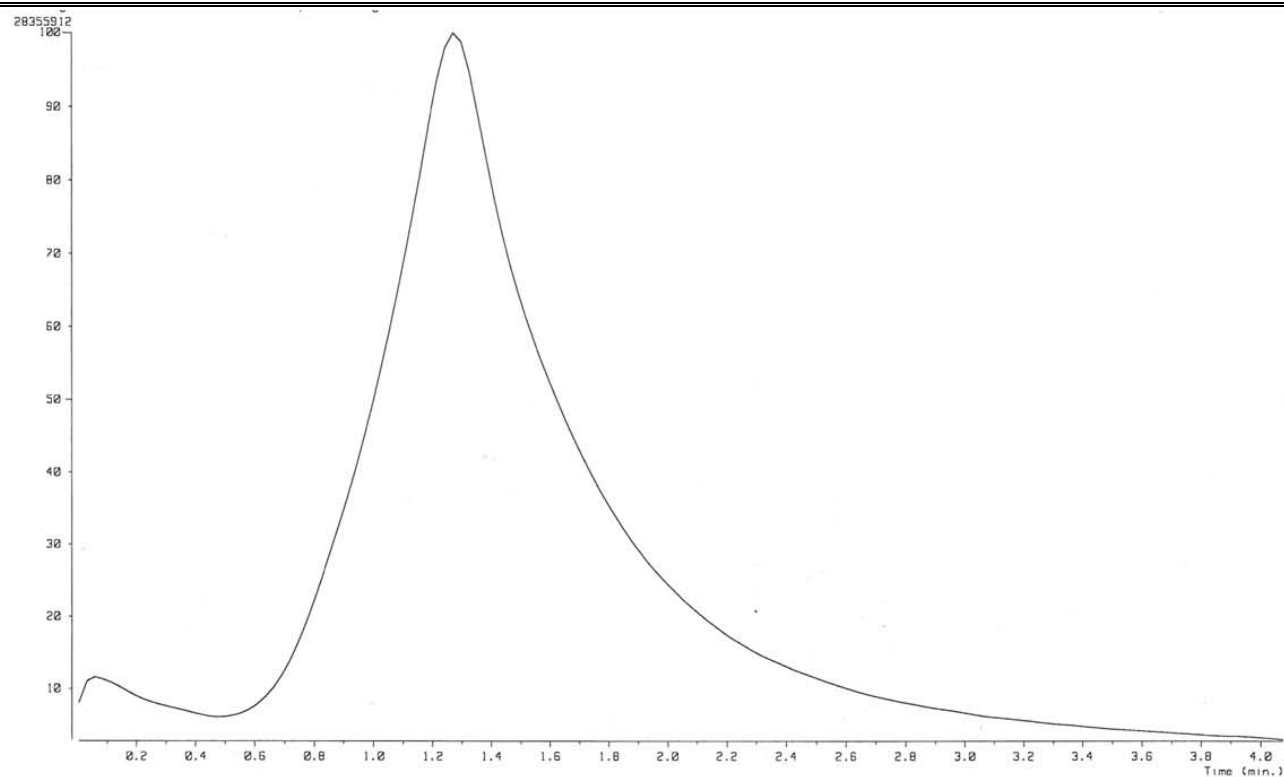


**Espectro 127.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metilitio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-6**).



Espectro 128. RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 101 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-6**).





**Espectro 129.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1*H*-bencimidazol (**6-6**).

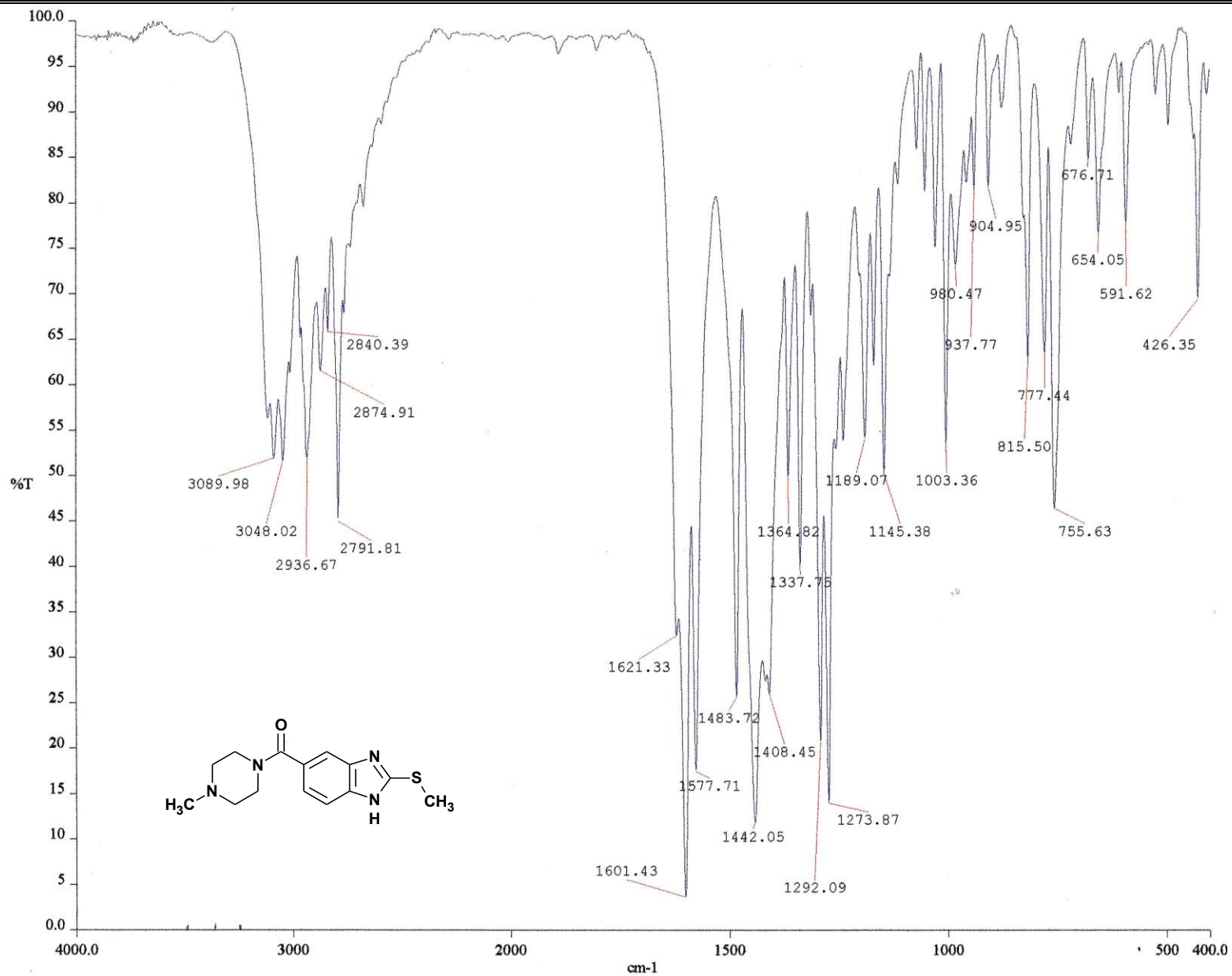
[ Elemental Composition ] P  
 Data : OT1966 CARB6\_003 Date : 03-Mar-99 05:51  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 1.06 min Scan#: 22  
 Elements : C 20/0, H 20/0, O 10/0, N 5/0, Cl 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
310.0650	17.4	-12.6 / -3.9	8.0	C 14 H 14 O 8
		+0.4 / +0.1	4.0	C 9 H 14 O 10 N 2
		-8.2 / -2.6	8.5	C 12 H 12 O 7 N 3
		+4.7 / +1.5	4.5	C 7 H 12 O 9 N 5
		+13.5 / +4.2	8.0	C 15 H 15 O 5 Cl
		-14.1 / -4.4	3.5	C 11 H 17 O 7 N Cl
		-1.2 / -0.4	-0.5	C 6 H 17 O 9 N 3 Cl
		-9.8 / -3.0	4.0	C 9 H 15 O 6 N 4 Cl
		+11.9 / +3.7	3.5	C 12 H 18 O 4 N Cl 2
		+3.2 / +1.0	8.0	C 15 H 16 O N 2 Cl 2
		+7.6 / +2.3	8.5	C 13 H 14 N 5 Cl 2
		-11.4 / -3.5	-0.5	C 6 H 18 O 5 N 5 Cl 2
		+1.7 / +0.5	3.5	C 12 H 19 N 3 Cl 3
		+14.6 / +4.5	-0.5	C 7 H 19 O 2 N 5 Cl 3
		+8.5 / +2.6	9.0	C 13 H 14 O 5 N 2 S
		-10.5 / -3.2	0.0	C 6 H 18 O 10 N 2 S
		+12.8 / +4.0	9.5	C 11 H 12 O 4 N 5 S
		-6.1 / -1.9	0.5	C 4 H 16 O 9 N 5 S
		+2.6 / +0.8	4.0	C 12 H 19 O 5 Cl S
		-6.1 / -1.9	8.5	C 15 H 17 O 2 N Cl S
		+15.5 / +4.8	0.0	C 7 H 19 O 7 N 2 Cl S
		+6.9 / +2.1	4.5	C 10 H 17 O 4 N 3 Cl S
		-1.7 / -0.5	9.0	C 13 H 15 O N 4 Cl S ←
		-7.6 / -2.4	4.0	C 12 H 20 O N 2 Cl 2 S
		+5.3 / +1.7	0.0	C 7 H 20 O 3 N 4 Cl 2 S
		-3.3 / -1.0	4.5	C 10 H 18 N 5 Cl 2 S
		-15.4 / -4.8	9.0	C 15 H 18 O 3 S 2
		+6.2 / +1.9	0.5	C 7 H 20 O 8 N S 2
		-2.4 / -0.7	5.0	C 10 H 18 O 5 N 2 S 2
		-11.0 / -3.4	9.5	C 13 H 16 O 2 N 3 S 2
		+10.6 / +3.3	1.0	C 5 H 18 O 7 N 4 S 2
		+1.9 / +0.6	5.5	C 8 H 16 O 4 N 5 S 2
		+10.6 / +3.3	9.0	C 16 H 19 Cl S 2
		-12.6 / -3.9	5.0	C 10 H 19 O N 4 Cl S 2
		+14.3 / +4.4	5.5	C 11 H 20 O 3 N S 3
		+5.7 / +1.8	10.0	C 14 H 18 N 2 S 3
		-8.9 / -2.8	1.5	C 5 H 20 O 4 N 5 S 3

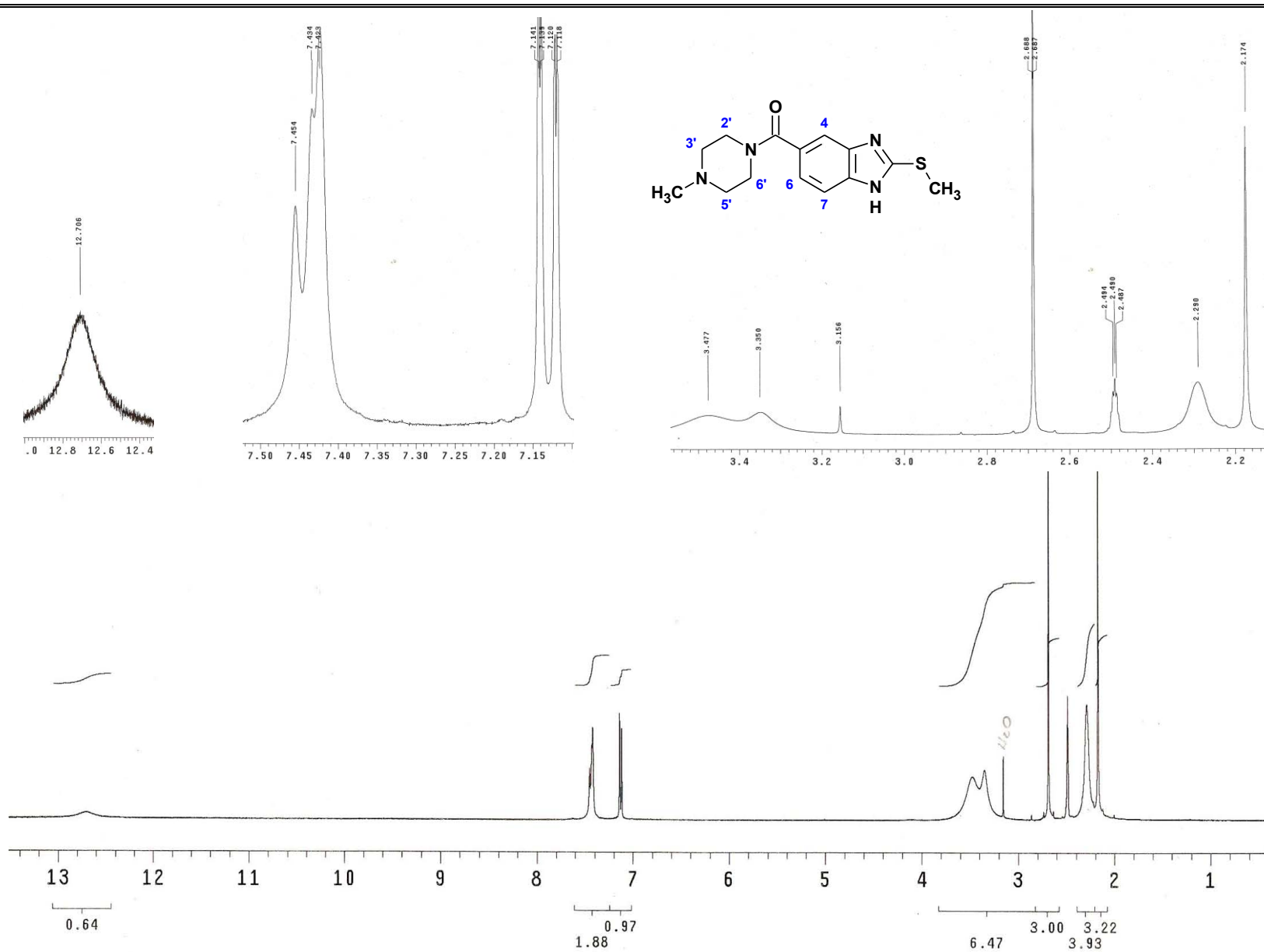
[ Theoretical Ion Distribution ] Page: 1  
 Molecular Formula : C13 H15 Cl N4 O S  
 (m/z 310.0655, MW 310.8073, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 310.0655, Averaged MW : 310.8064 (a), 310.8099 (w)

m/z	INT.	
310.0655	100.0000	*****
311.0682	16.9809	*****
312.0627	37.9650	*****
313.0652	6.2491	****
314.0610	2.0038	*
315.0624	0.2695	
316.0629	0.0291	
317.0639	0.0025	
318.0654	0.0002	

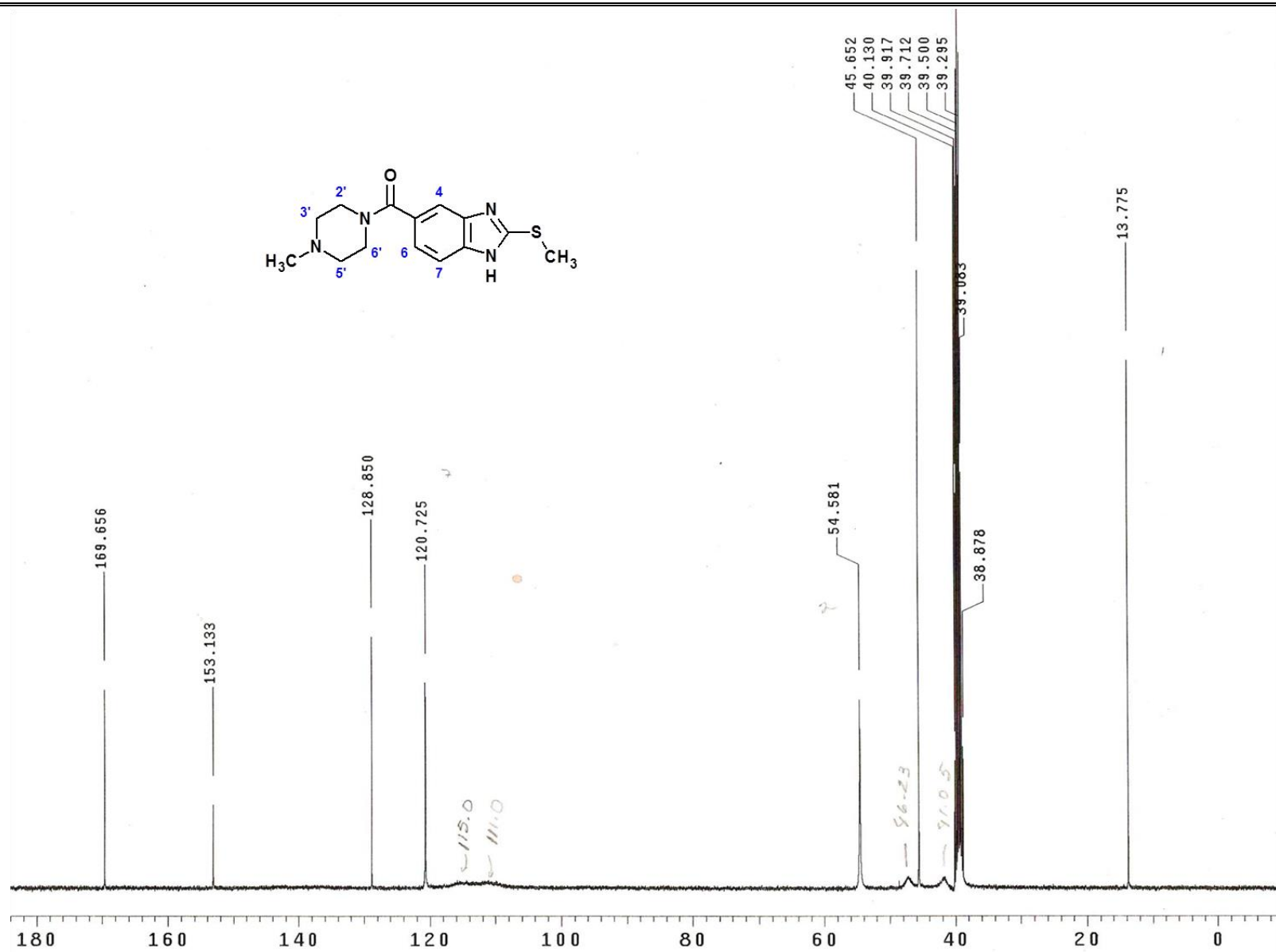
**Espectro 130.** EMAR del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-ilcarbonil)-1H-bencimidazol (**6-6**).



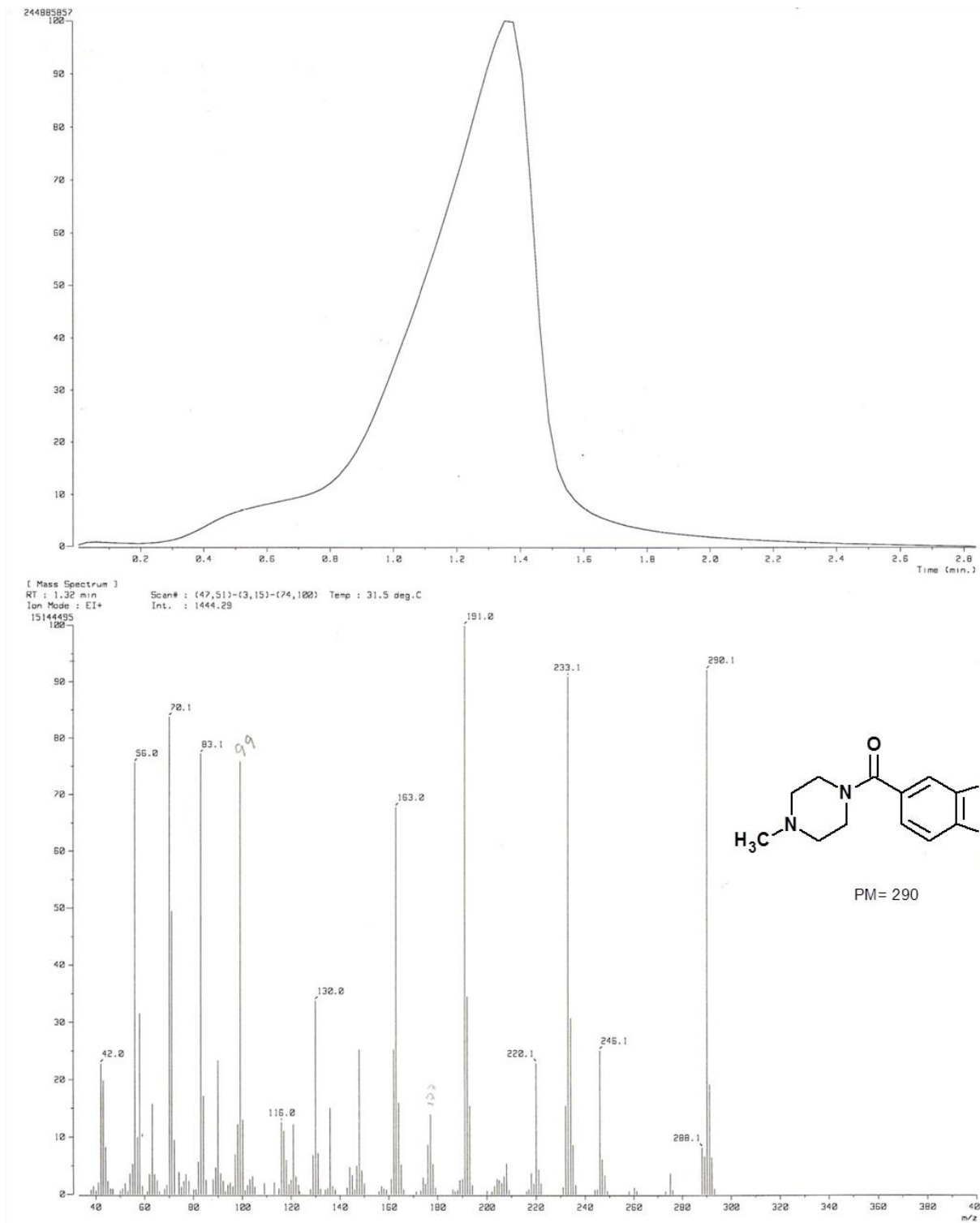
**Espectro 131.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-7).



**Espectro 132.** RMN  $^1H$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-7**).



**Espectro 133.** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 101 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol (**6-7**).



**Espectro 134.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-7**).

[ Elemental Composition ]

Data : OT1971\_CARB7\_003 Date : 03-Mar-99 06:09  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 1.31 min Scan#: 27  
 Elements : C 20/0, H 20/0, O 10/0, N 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
290.1208	24.4	-10.9 / -3.2	3.5	C 12 H 20 O 7 N
		+3.0 / +0.9	-0.5	C 7 H 20 O 9 N 3
		-6.3 / -1.8	4.0	C 10 H 18 O 6 N 4
		-15.5 / -4.5	8.5	C 13 H 16 O 3 N 5
		-2.3 / -0.7	8.5	C 16 H 20 O 2 N S
		+11.6 / +3.4	4.5	C 11 H 20 O 4 N 3 S
		+2.4 / +0.7	9.0	C 14 H 18 O N 4 S

[ Theoretical Ion Distribution ]

Page: 1

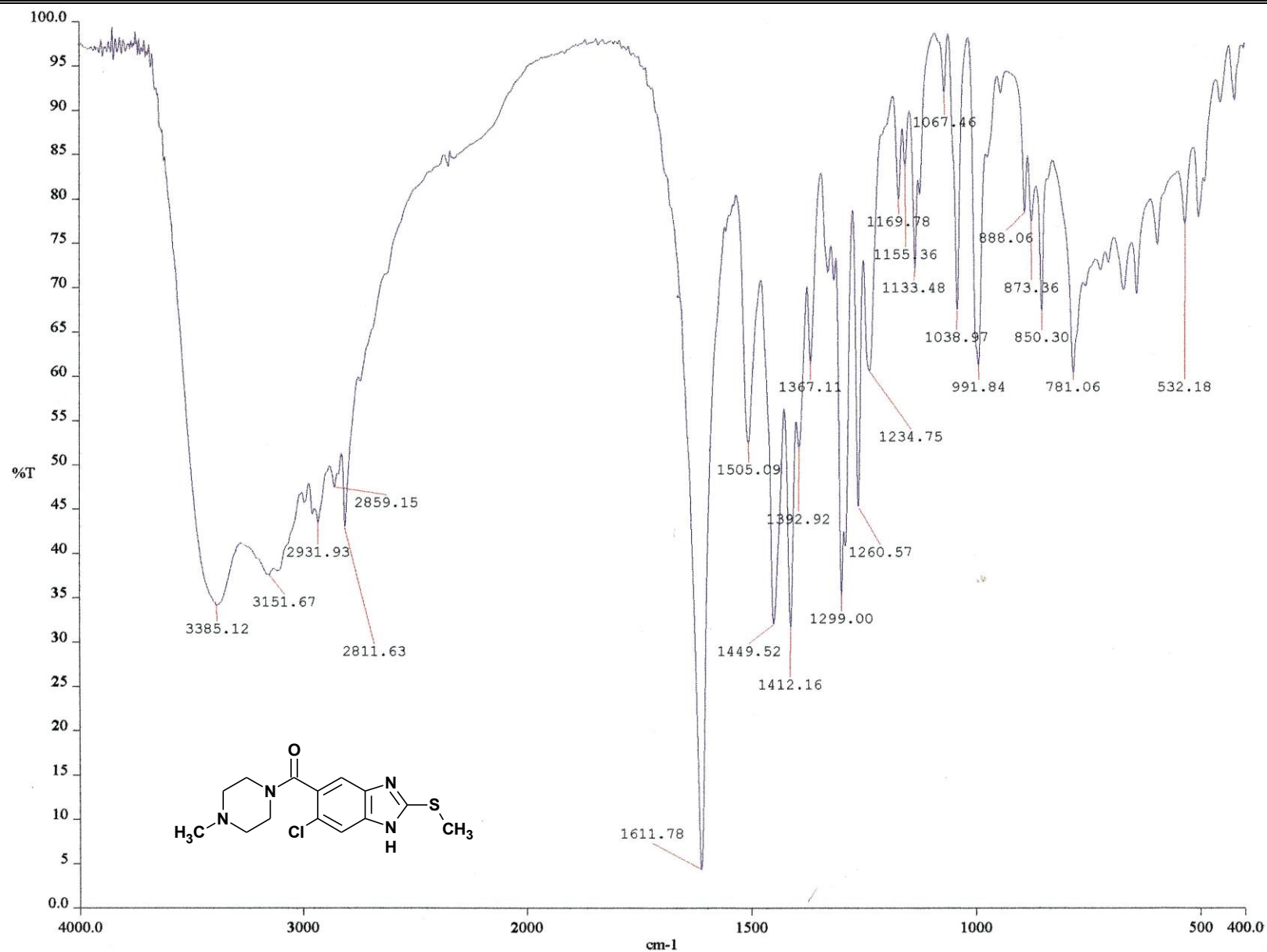
Molecular Formula : C14 H18 N4 O S

(m/z 290.1201, MW 290.3891, U.S. 9.0)

Base Peak : 290.1201, Averaged MW : 290.3887(a), 290.3899(w)

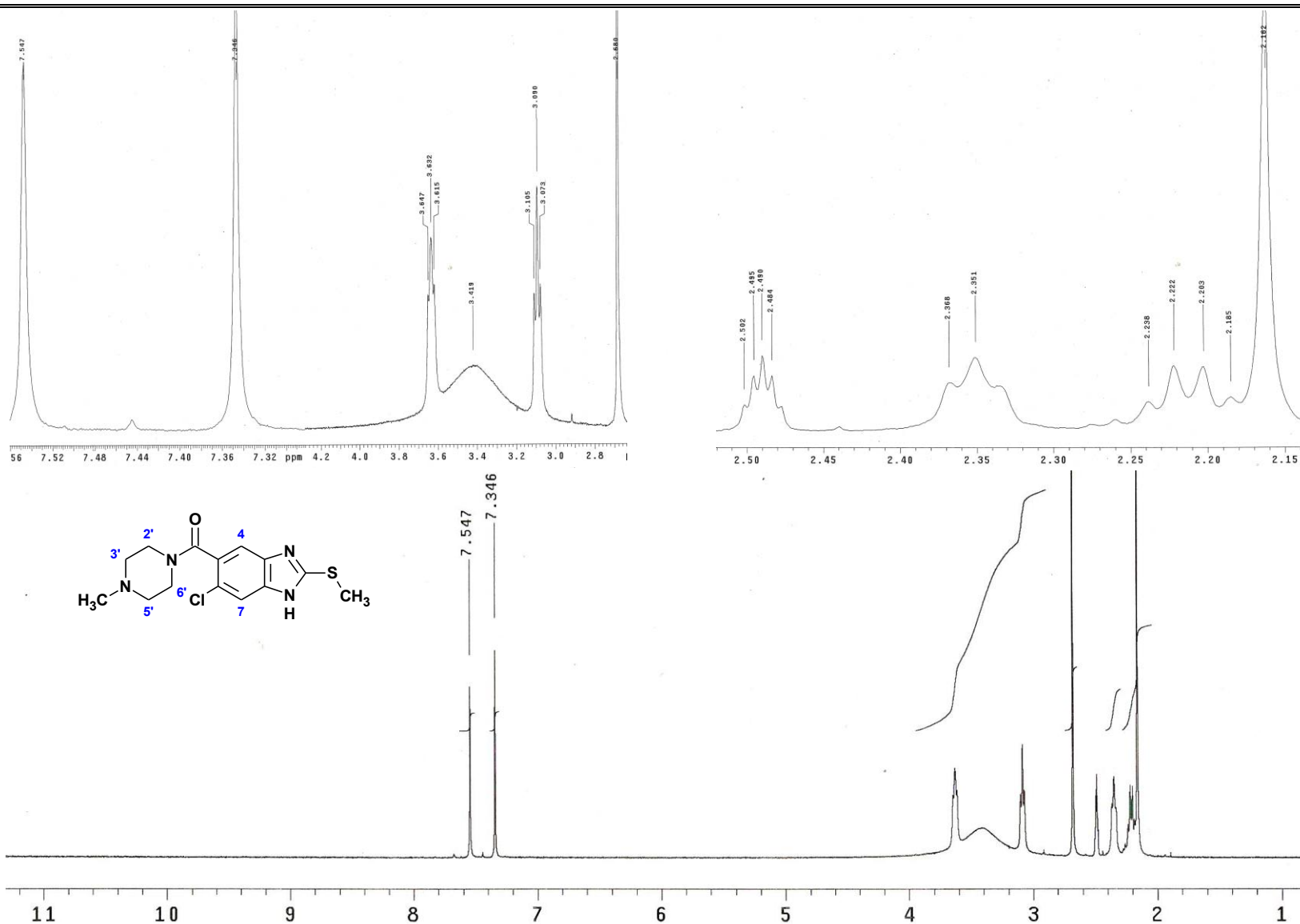
m/z	INT.	
290.1201	100.0000	*****
291.1228	18.1381	*****
292.1186	6.1836	****
293.1200	0.8883	*
294.1207	0.0989	
295.1217	0.0086	
296.1232	0.0006	

**Espectro 135.** EMAR del compuesto 5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-7**).

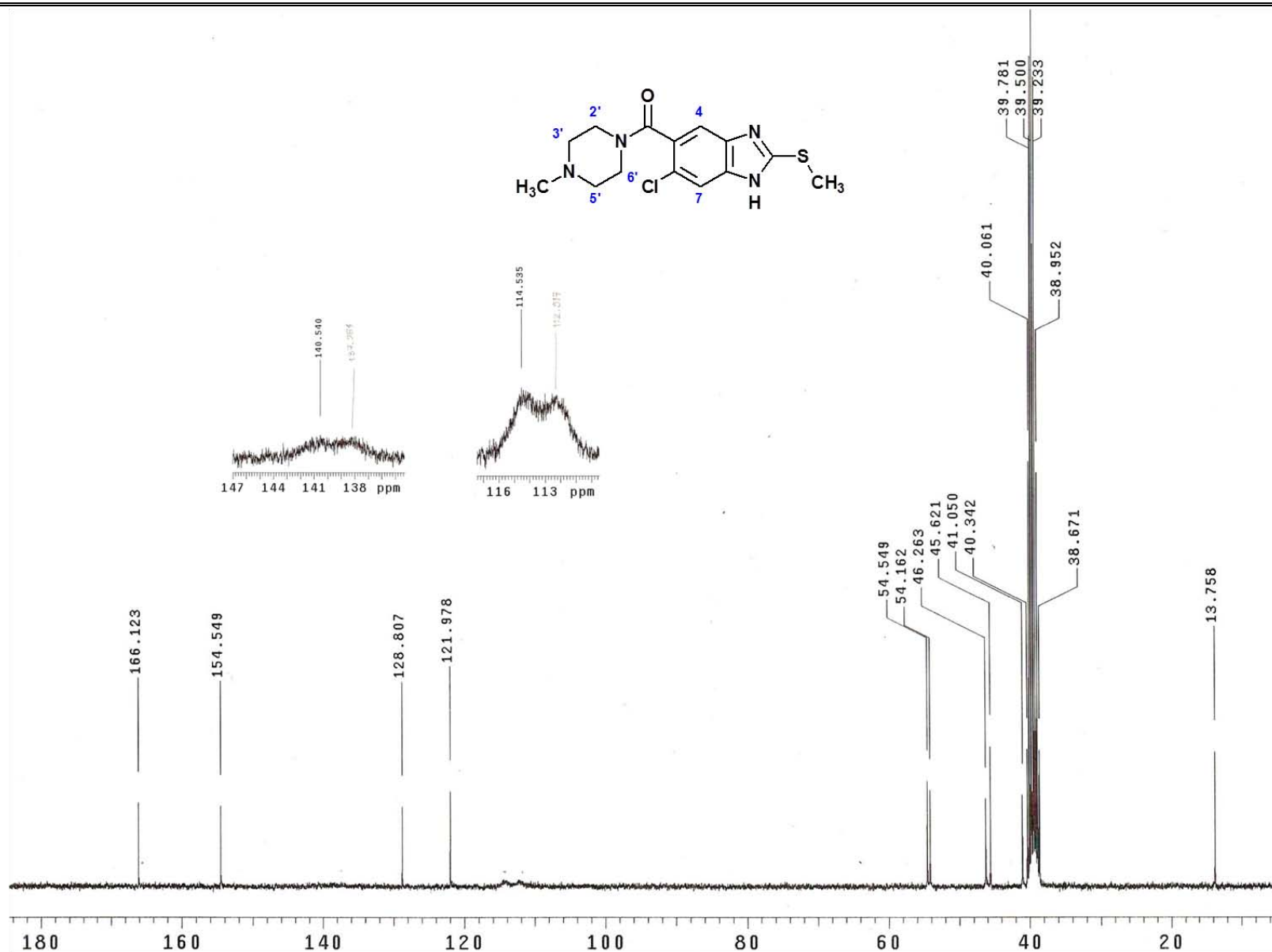


**Espectro 136.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol (**6-8**).

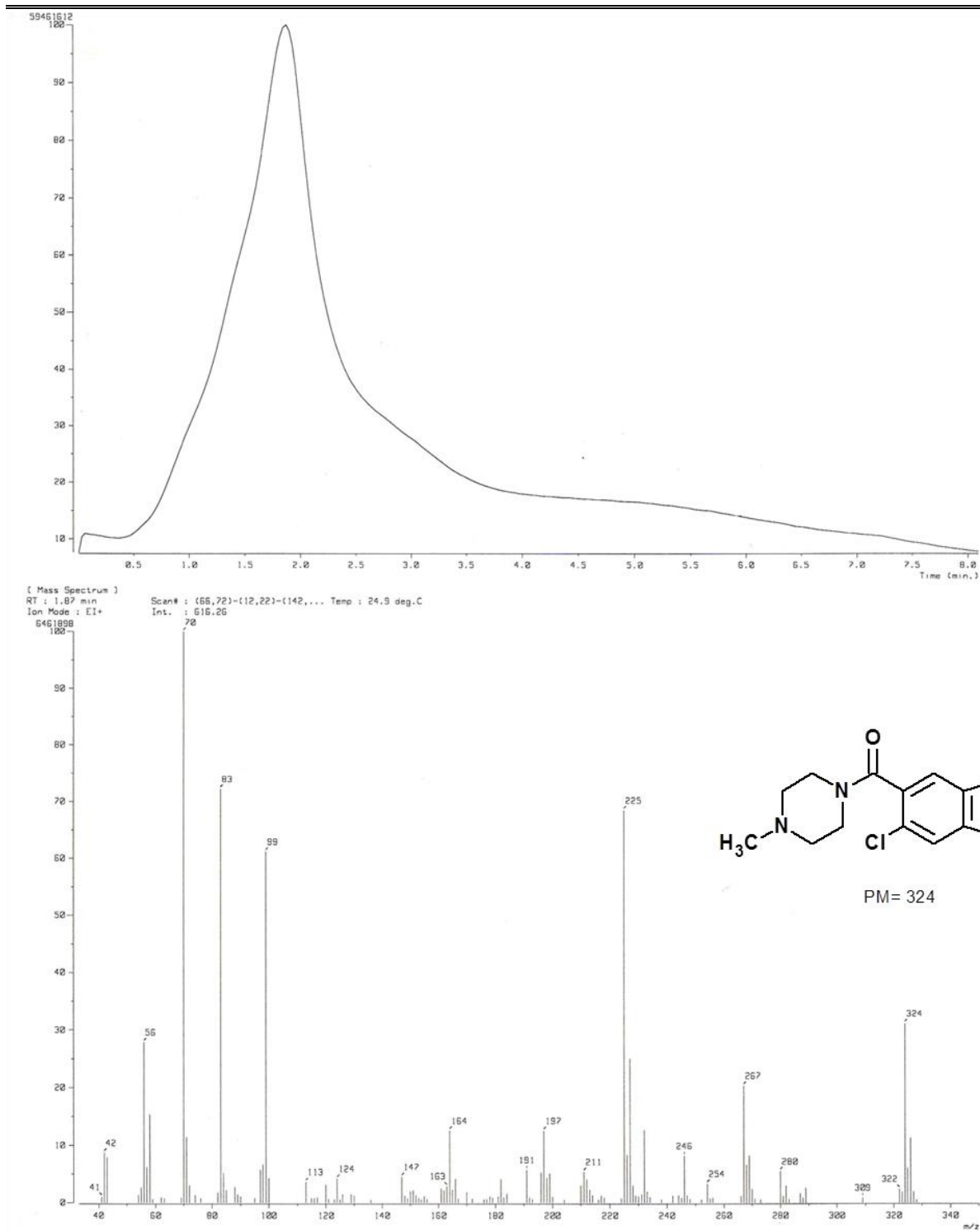




**Espectro 137.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (**6-8**).



**Espectro 138.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-8**).



**Espectro 139.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-8**).

[ Elemental Composition ]  
 Data : OT1972\_CARB8\_001 Date : 03-Mar-99 06:24  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 1.06 min Scan#: 22  
 Elements : C 20/0, H 20/0, O 10/0, N 5/0, Cl 5/0, S 5/0  
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
324.0797	15.8	-14.8 / -4.8	8.0	C 15 H 16 O 8
		-2.4 / -0.8	4.0	C 10 H 16 O 10 N 2
		-10.7 / -3.5	8.5	C 13 H 14 O 7 N 3
		+1.7 / +0.6	4.5	C 8 H 14 O 9 N 5
		+10.1 / +3.3	8.0	C 16 H 17 O 5 Cl
		+14.2 / +4.6	8.5	C 14 H 15 O 4 N 3 Cl
		-3.9 / -1.3	-0.5	C 7 H 19 O 9 N 3 Cl
		-12.2 / -4.0	4.0	C 10 H 17 O 6 N 4 Cl
		+8.6 / +2.8	3.5	C 13 H 20 O 4 N Cl 2
		+0.3 / +0.1	8.0	C 16 H 18 O N 2 Cl 2
		+12.7 / +4.1	4.0	C 11 H 18 O 3 N 4 Cl 2
		+4.4 / +1.4	8.5	C 14 H 16 N 5 Cl 2
		-13.7 / -4.4	-0.5	C 7 H 20 O 5 N 5 Cl 2
		+13.6 / +4.4	4.5	C 11 H 18 O 8 N S
		+5.3 / +1.7	9.0	C 14 H 16 O 5 N 2 S
		-12.8 / -4.2	0.0	C 7 H 20 O 10 N 2 S
		+9.4 / +3.1	9.5	C 12 H 14 O 4 N 5 S
		-8.7 / -2.8	0.5	C 5 H 18 O 9 N 5 S
		-8.6 / -2.8	8.5	C 16 H 19 O 2 N Cl S
		+3.8 / +1.2	4.5	C 11 H 19 O 4 N 3 Cl S
		-4.5 / -1.4	9.0	C 14 H 17 O N 4 Cl S
		-6.0 / -1.9	4.5	C 11 H 20 N 5 Cl 2 S
		-5.1 / -1.7	5.0	C 11 H 20 O 5 N 2 S 2
		-13.4 / -4.3	9.5	C 14 H 18 O 2 N 3 S 2
		+7.3 / +2.4	1.0	C 6 H 20 O 7 N 4 S 2
		-1.0 / -0.3	5.5	C 9 H 18 O 4 N 5 S 2
		+2.6 / +0.8	10.0	C 15 H 20 N 2 S 3
		+15.0 / +4.9	6.0	C 10 H 20 O 2 N 4 S 3

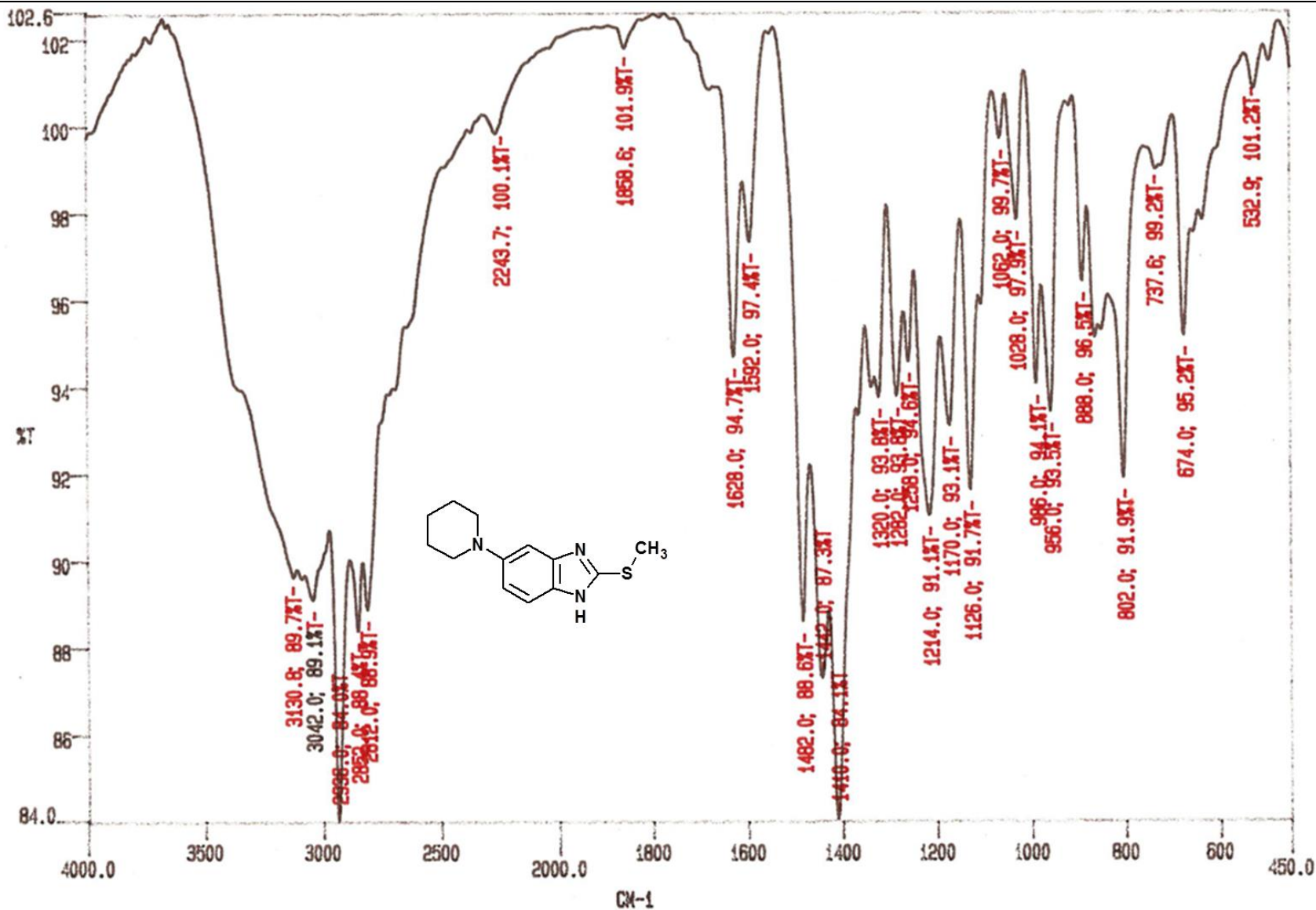
[ Theoretical Ion Distribution ]

Page: 1

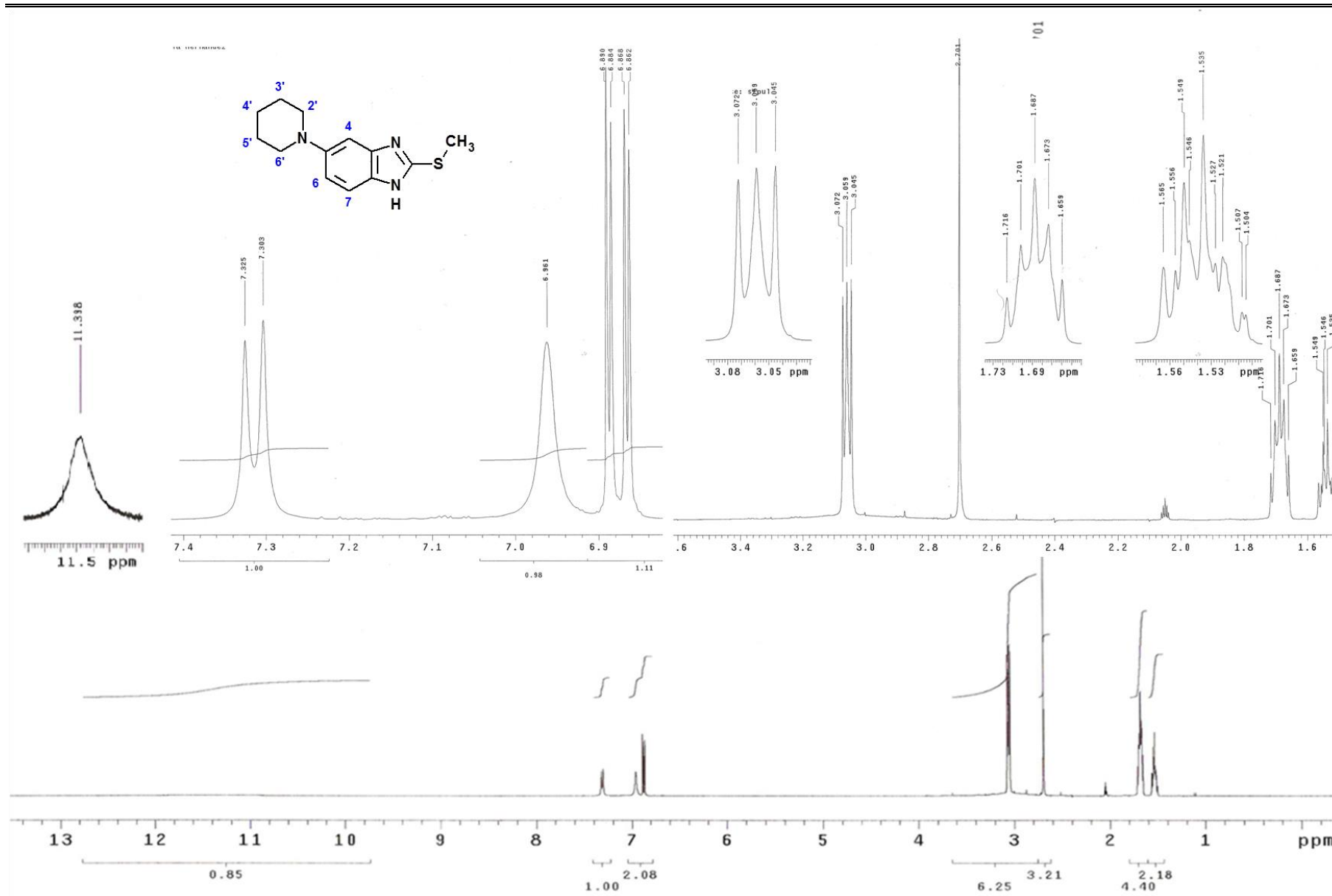
Molecular Formula : C14 H17 O N4 Cl S  
 (m/z 324.0812, MW 324.8342, U.S. 9.0)  
 Base Peak : 324.0812, Averaged MW : 324.8334(a), 324.8368(w)

m/z	INT.	
324.0812	100.0000	*****
325.0839	18.1231	*****
326.0784	38.1593	*****
327.0809	6.6828	****
328.0769	2.0753	*
329.0782	0.2924	
330.0788	0.0322	
331.0798	0.0028	
332.0813	0.0002	

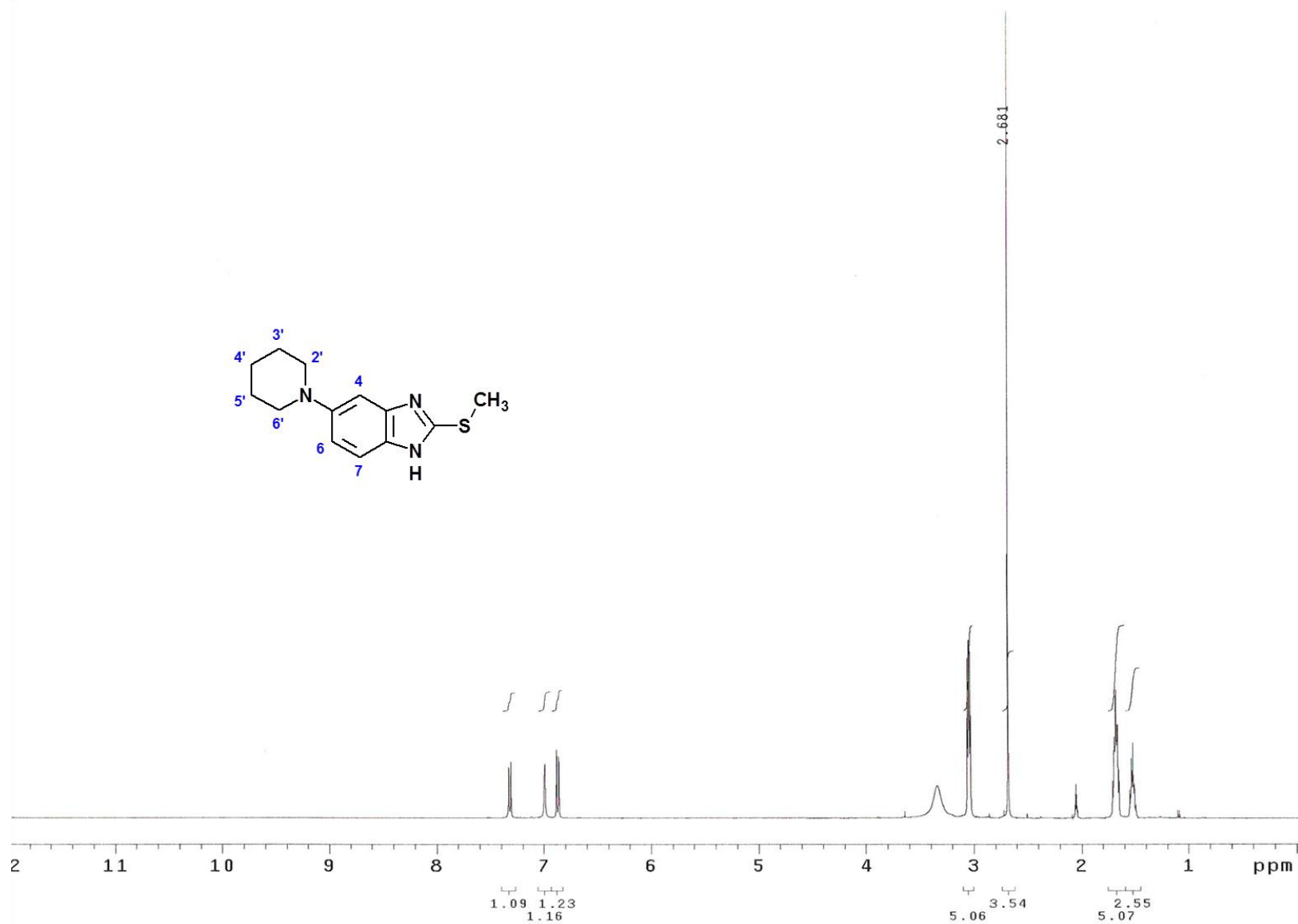
**Espectro 140.** EMAR del compuesto 6-cloro-5-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (6-8).



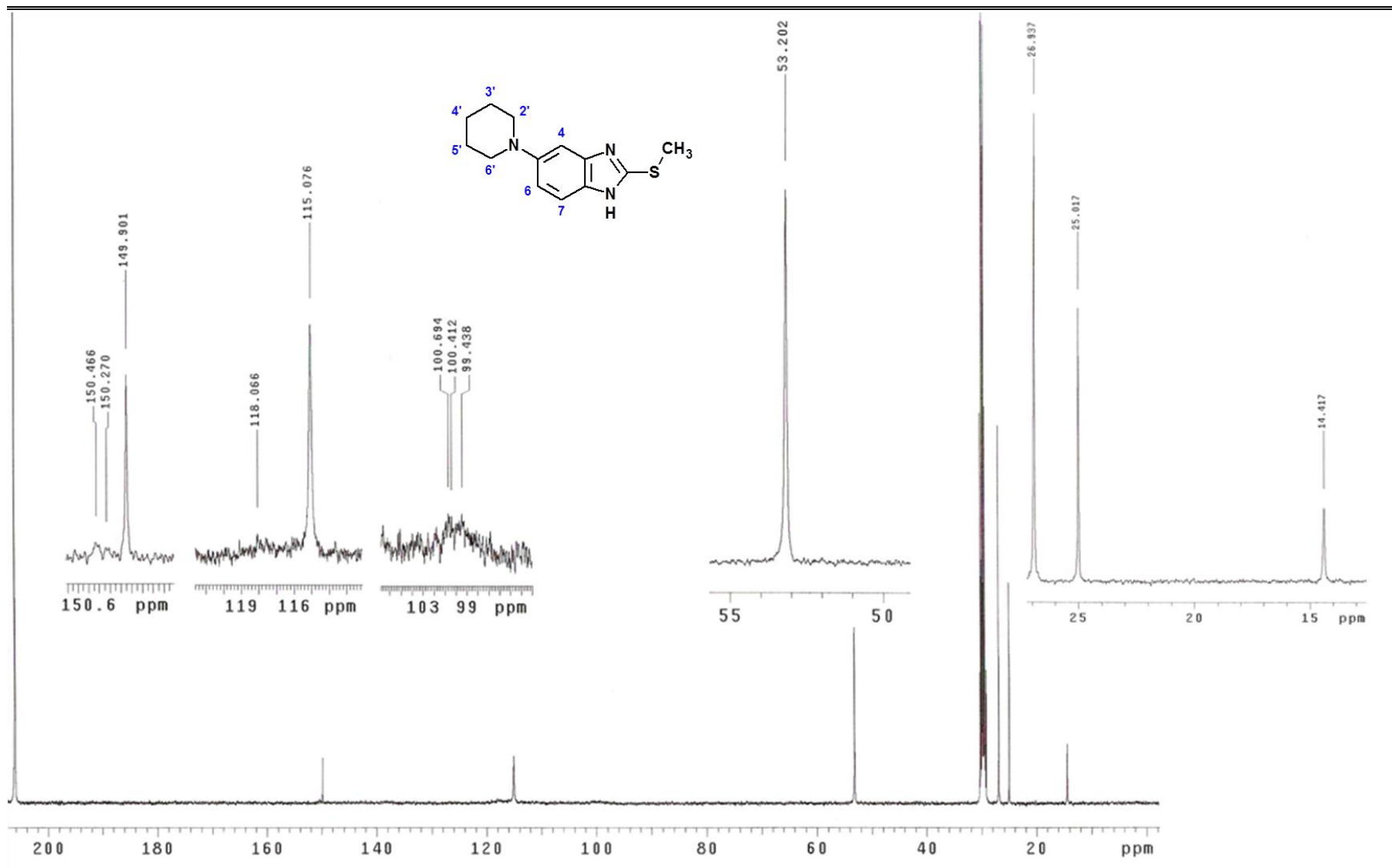
Espectro 141. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-(metilito)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-9).



**Espectro 142.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, acetona- $d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-9).



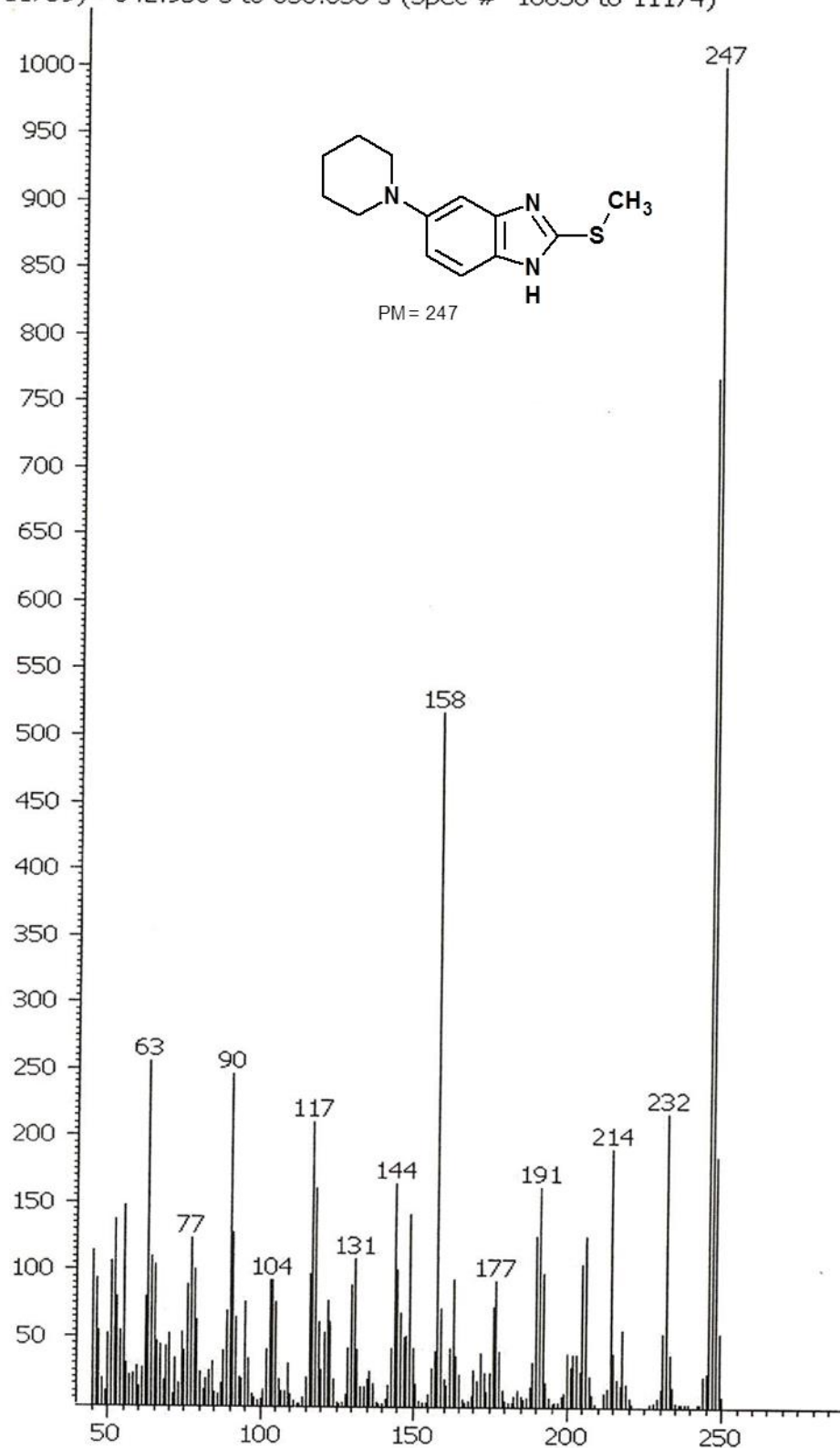
**Espectro 143.** RMN  $^1\text{H}$  (int. con  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-9**).



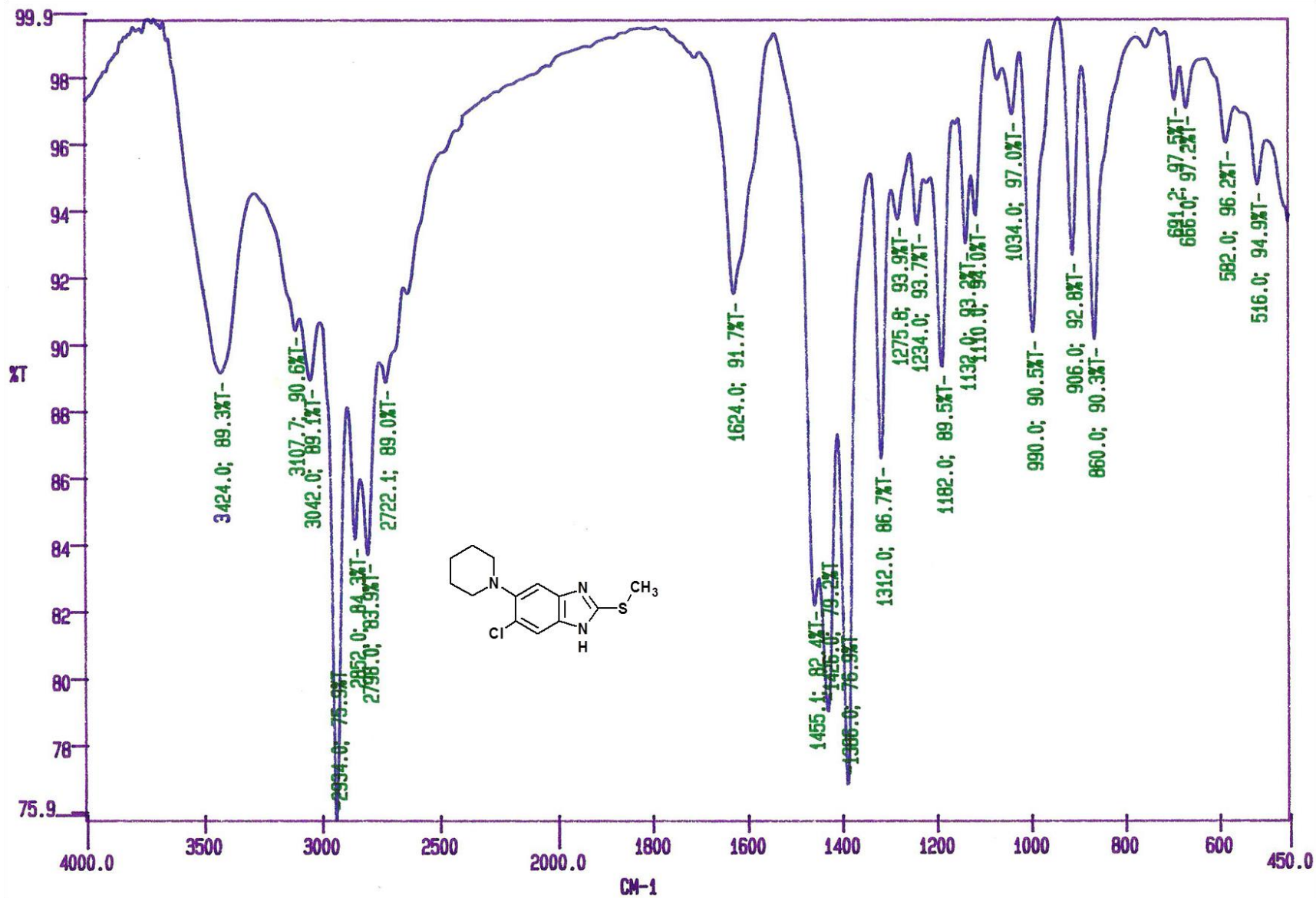
**Espectro 144.** RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (**6-9**).



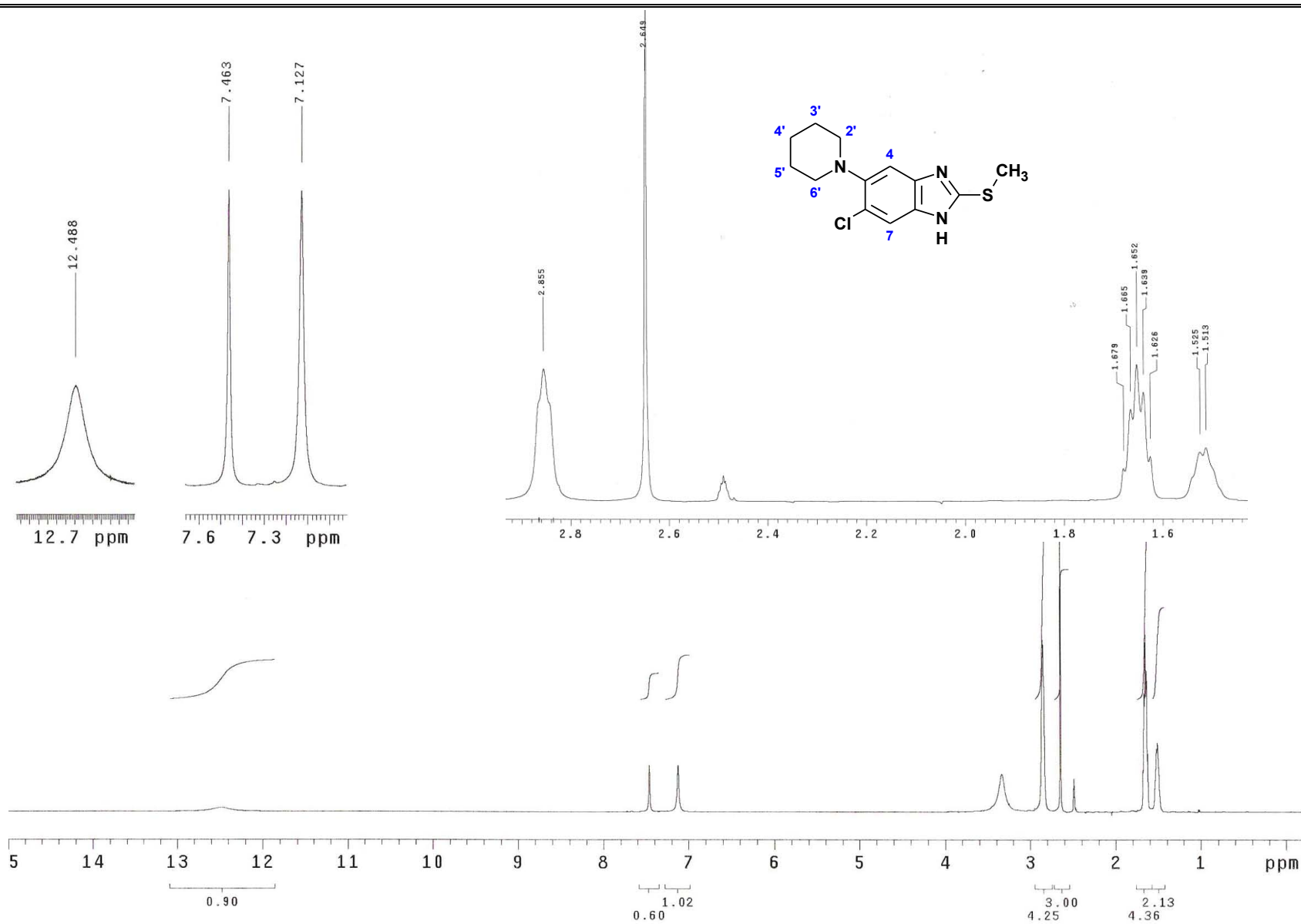
Caliper - sample "AMINA-1:1", 688.106 s to 688.106 s (Spec # 11759 to 11759) - 642.956 s to 658.856 s (Spec # 10856 to 11174)



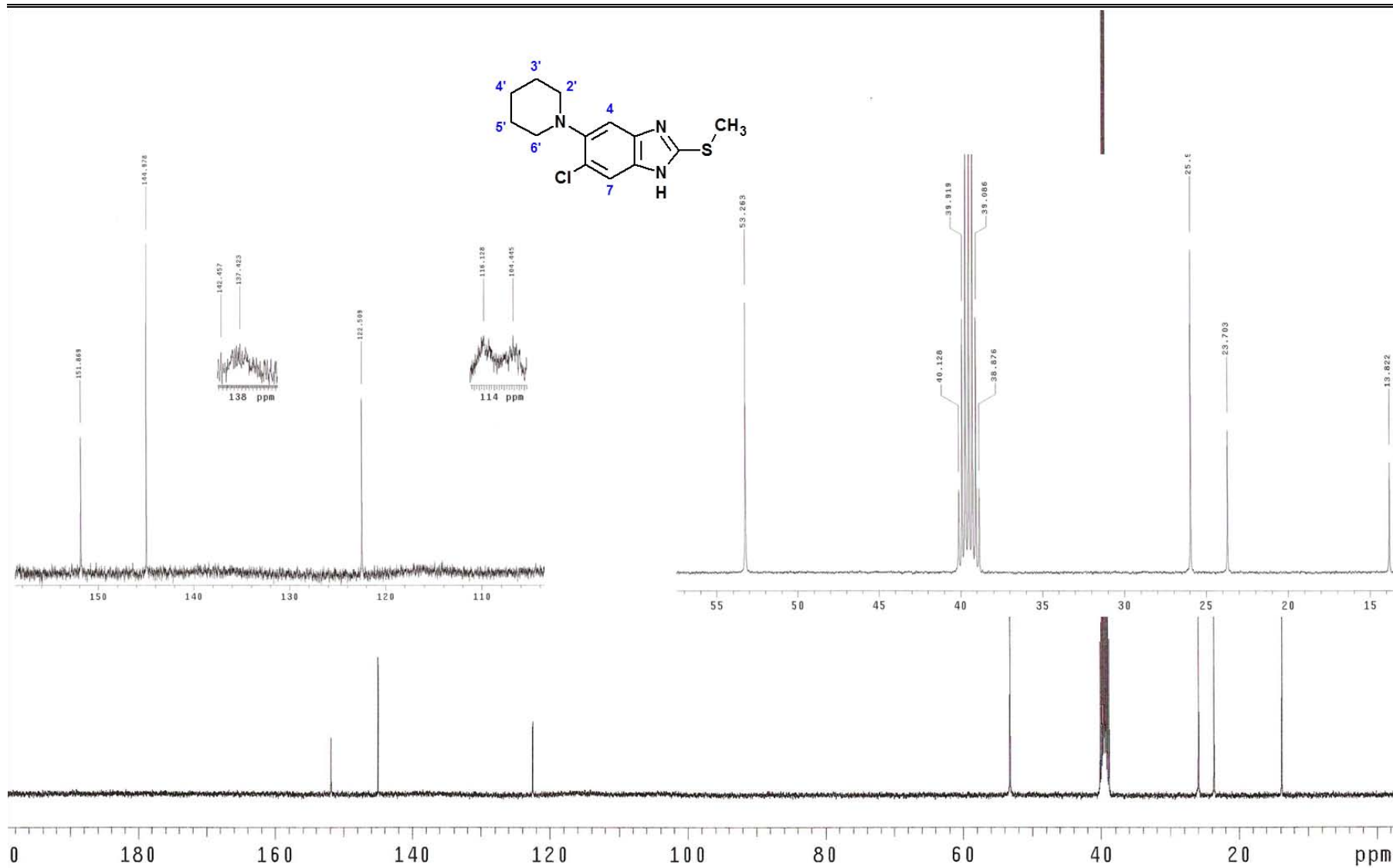
**Espectro 145.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1*H*-bencimidazol (6-9).



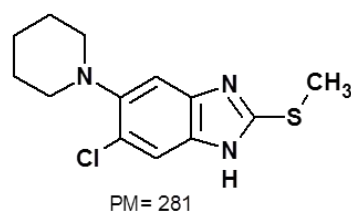
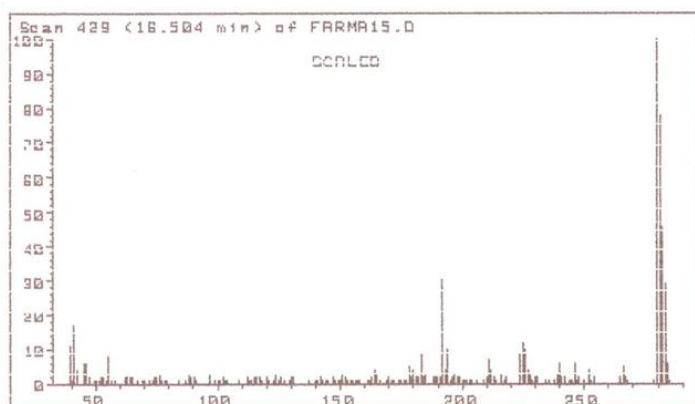
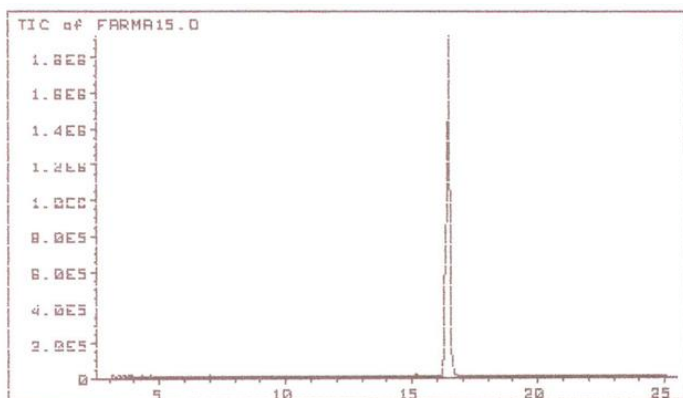
Espectro 146. IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-10).



**Espectro 147.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-10**).



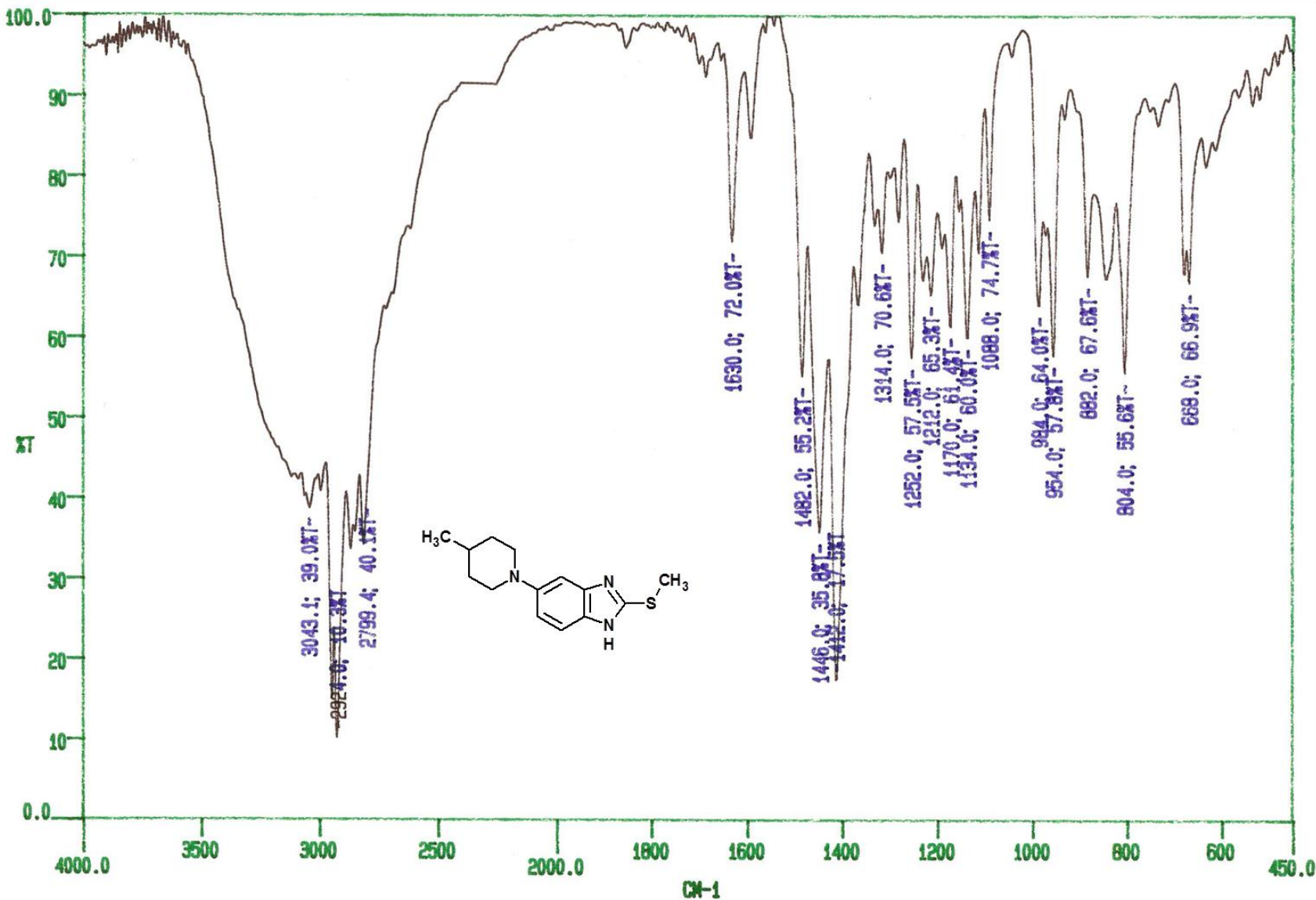
**Espectro 148.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-bencimidazol (6-10).



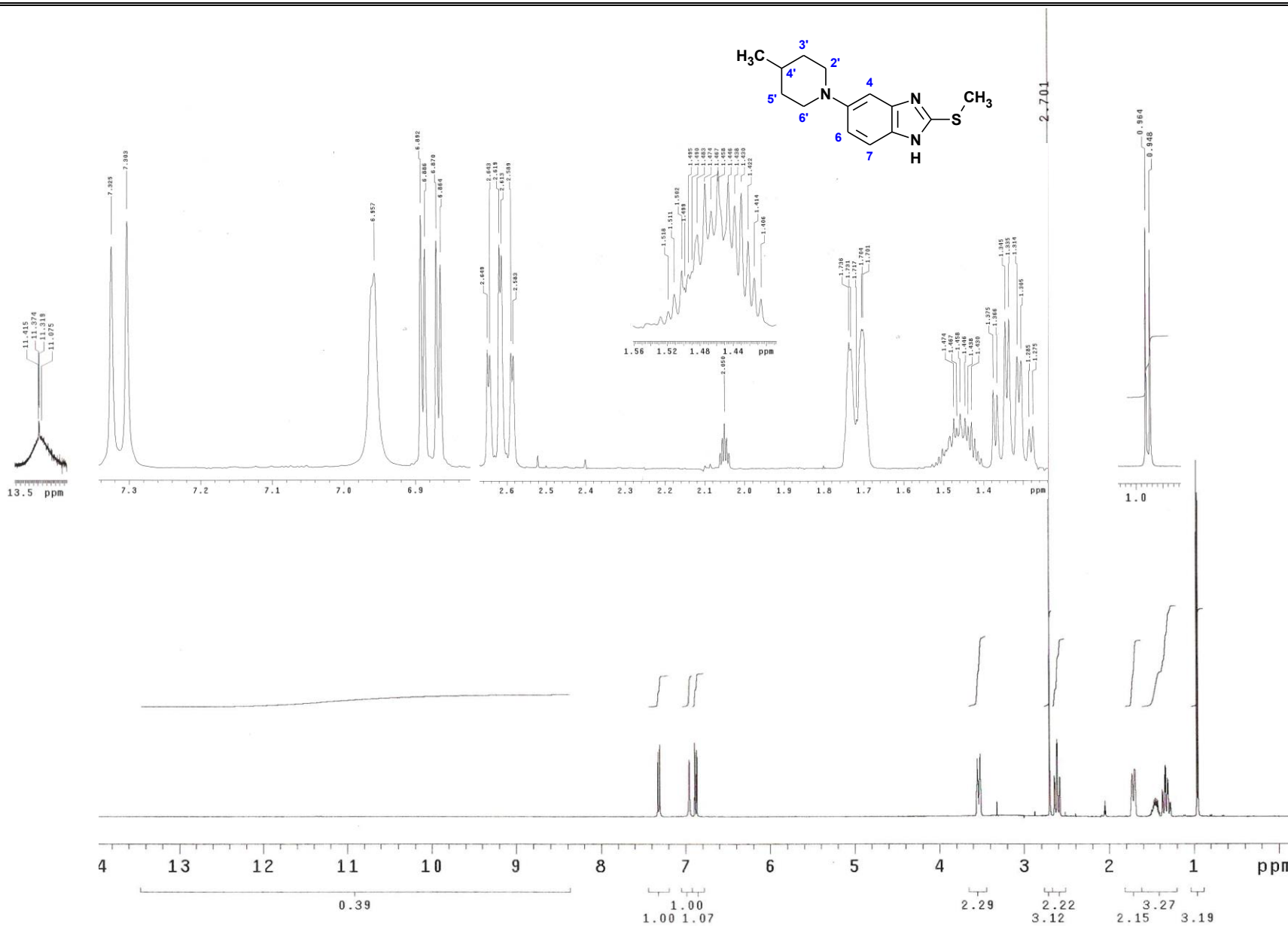
Scan 429 (16.504 min) of FARMA15.D  
CLAVE MTRA.: P-3

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
74.05	2	142.05	2	189.90	2	244.00	1
74.95	2	143.05	1	191.00	2	244.90	1
76.05	3	144.05	1	191.90	30	246.00	6
77.05	1	145.05	1	193.00	4	247.00	1
78.05	1	147.05	2	193.90	10	248.00	2
79.05	1	148.05	1	194.90	1	249.90	1
84.05	1	149.05	1	195.90	2	251.90	4
87.05	1	150.05	1	196.90	3	253.00	1
88.05	3	150.95	3	197.90	2	253.90	2
89.05	2	152.05	2	198.90	2	264.90	2
90.05	2	152.95	1	200.00	1	265.90	5
90.95	1	154.05	1	200.90	1	266.90	2
96.95	3	154.95	1	201.90	1	267.90	1
98.95	1	155.95	1	202.90	1	277.90	1
100.05	1	156.95	1	203.90	1	279.90	100

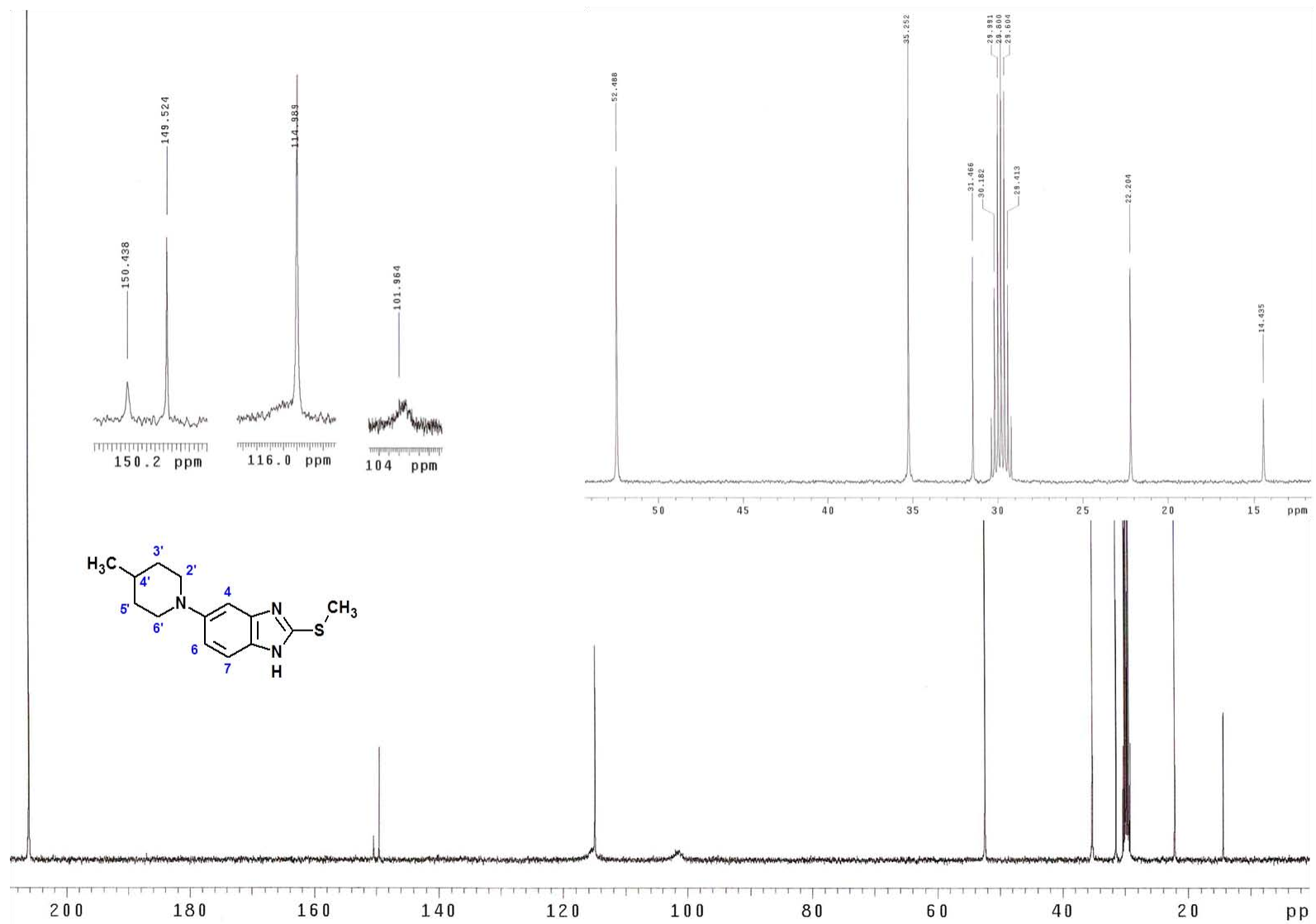
**Espectro 149.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperidin-1-il)-1H-benzimidazol (**6-10**).



**Espectro 150.** IR (pastilla KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-11**).



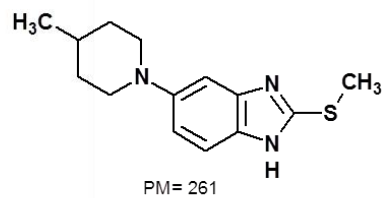
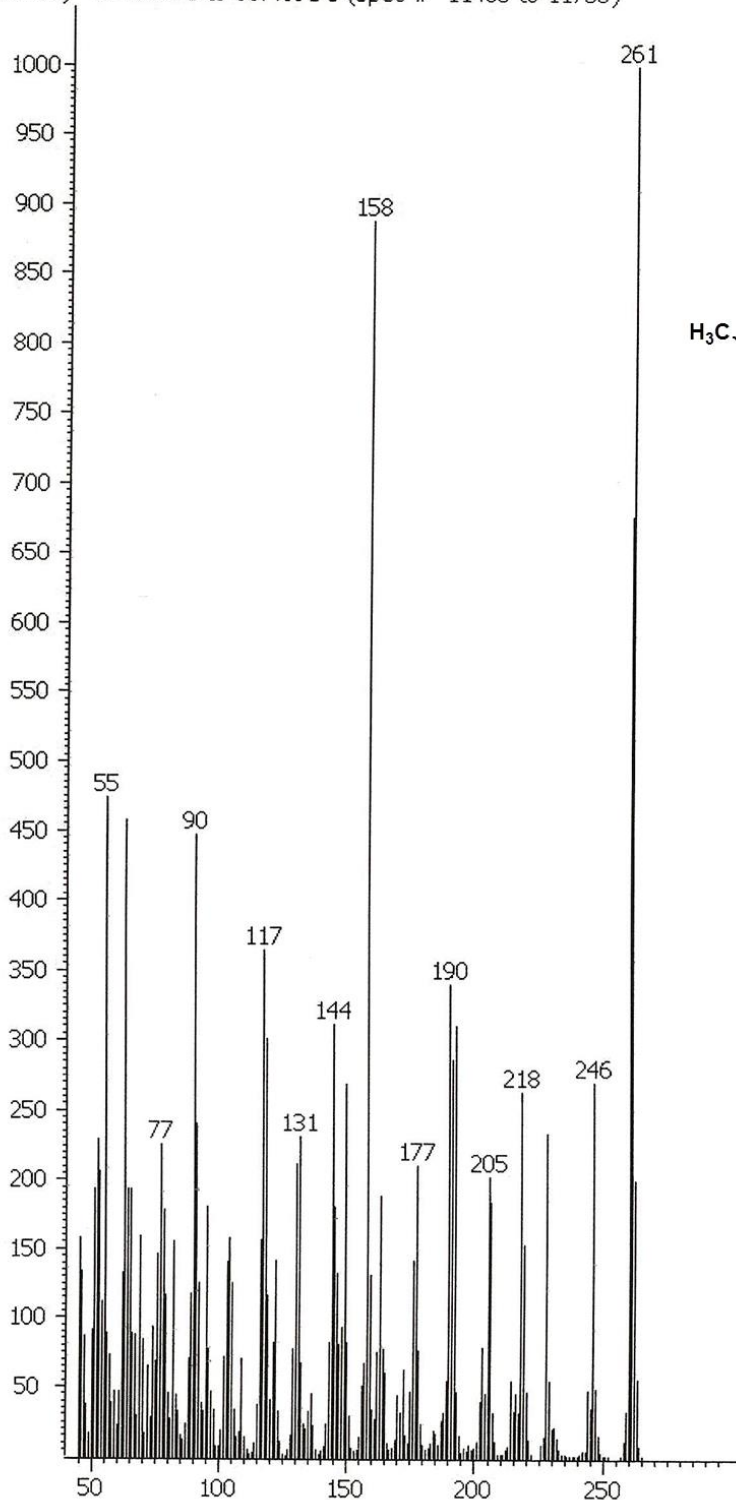
**Espectro 151.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (**6-11**).



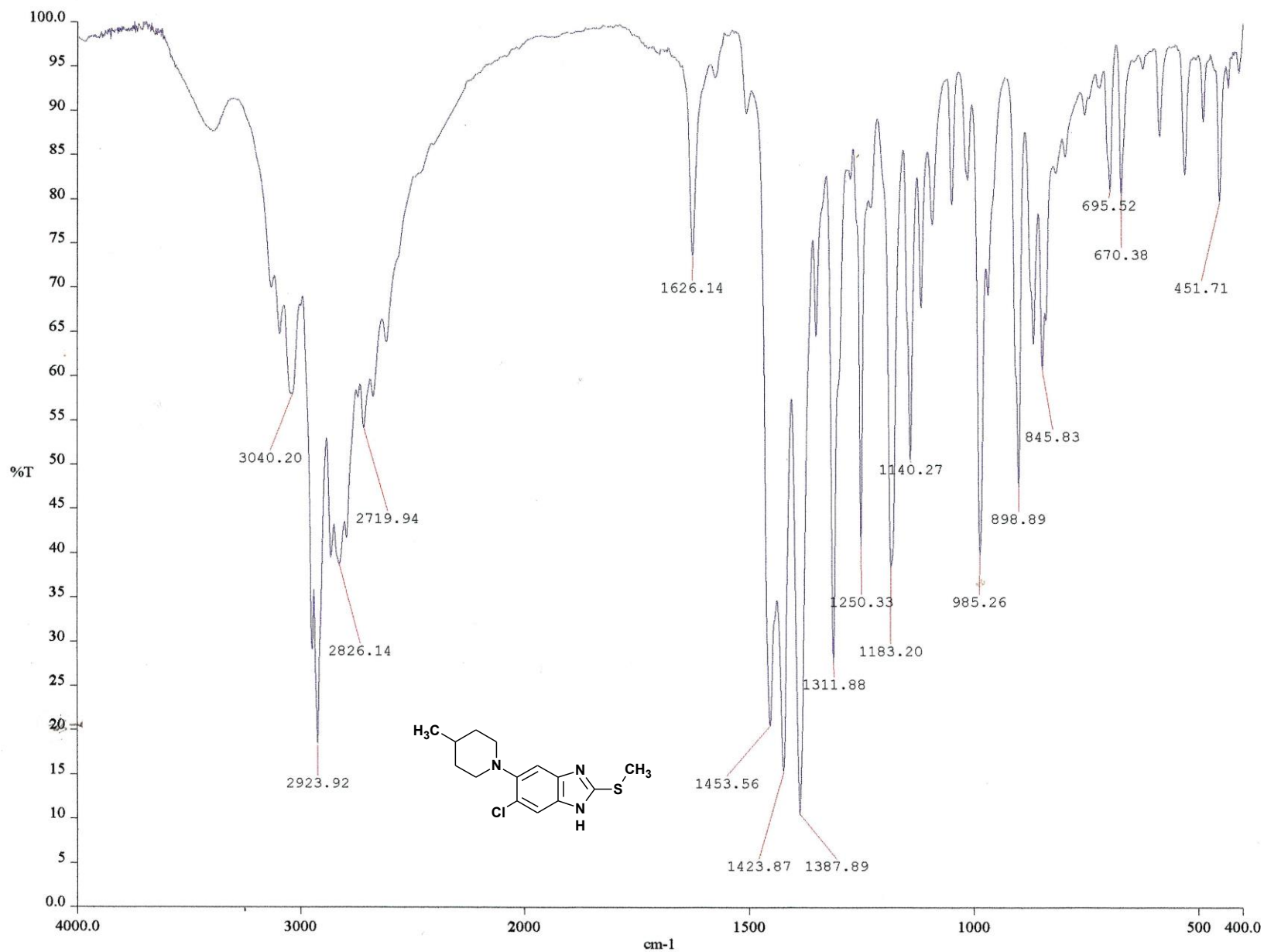
**Espectro 152.** RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-11).



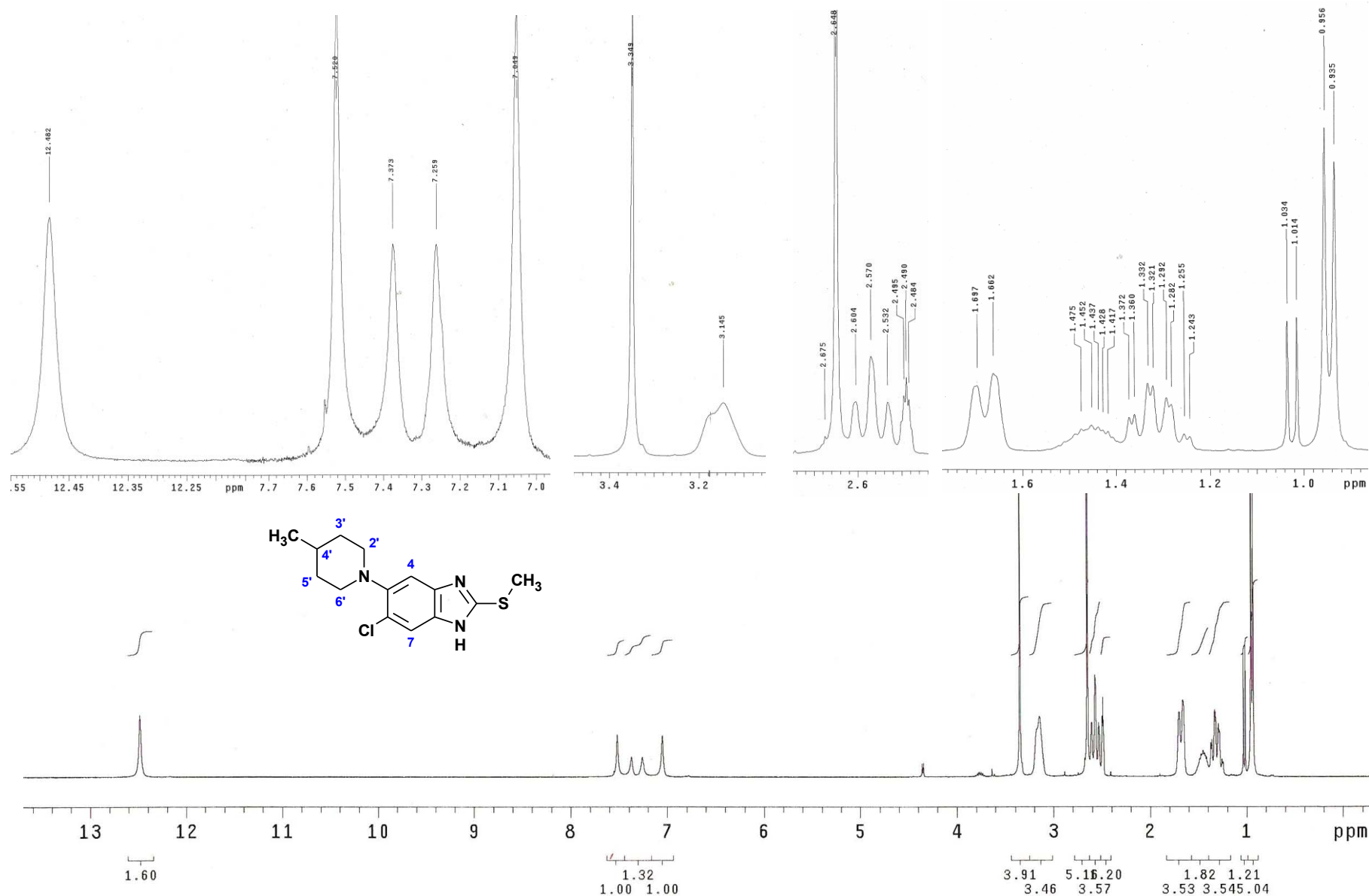
Caliper - sample "AMINA-3:1", 707.041 s to 707.041 s (Spec # 12138 to 12138) - 674.291 s to 687.891 s (Spec # 11483 to 11755)



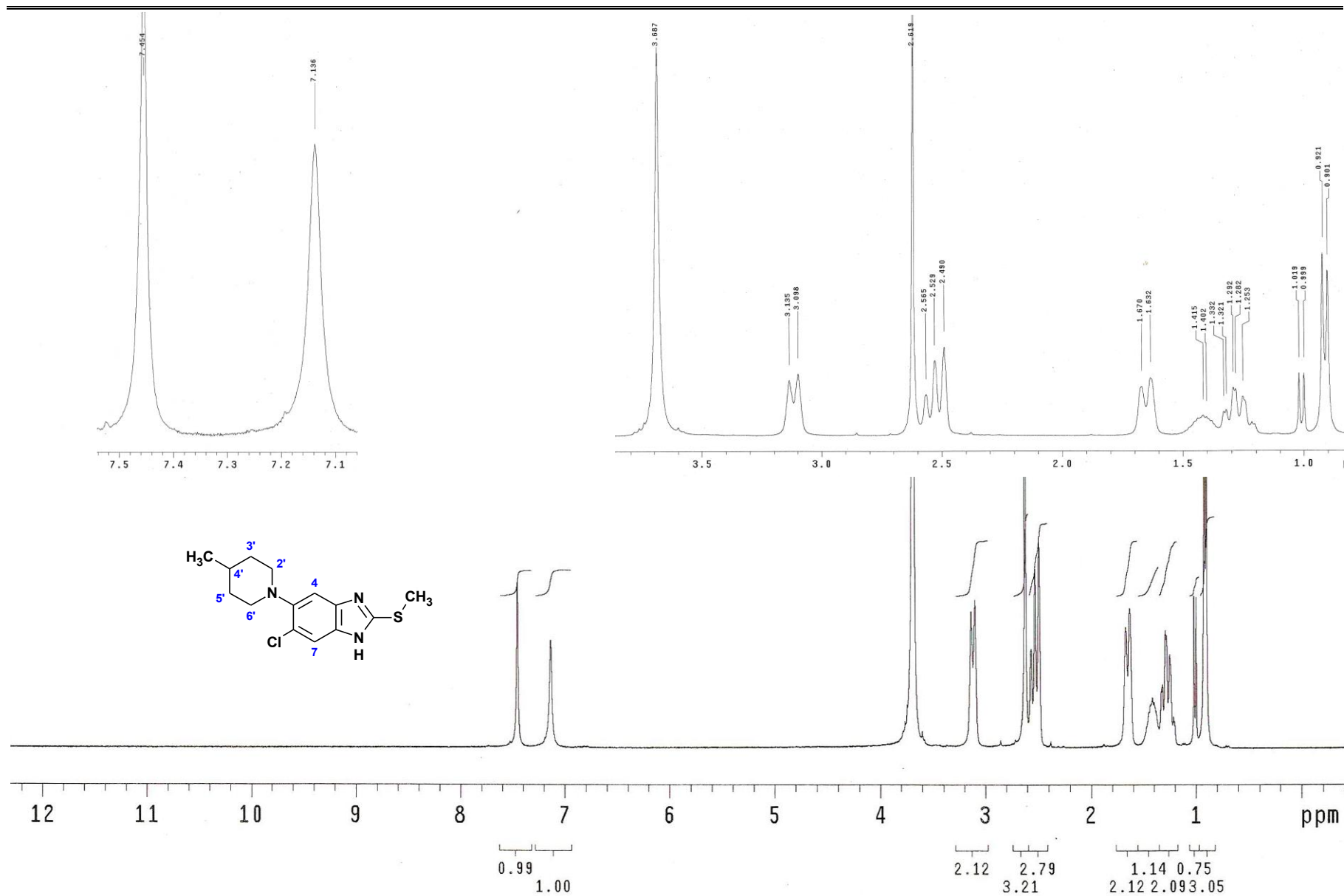
**Espectro 153.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-11**).



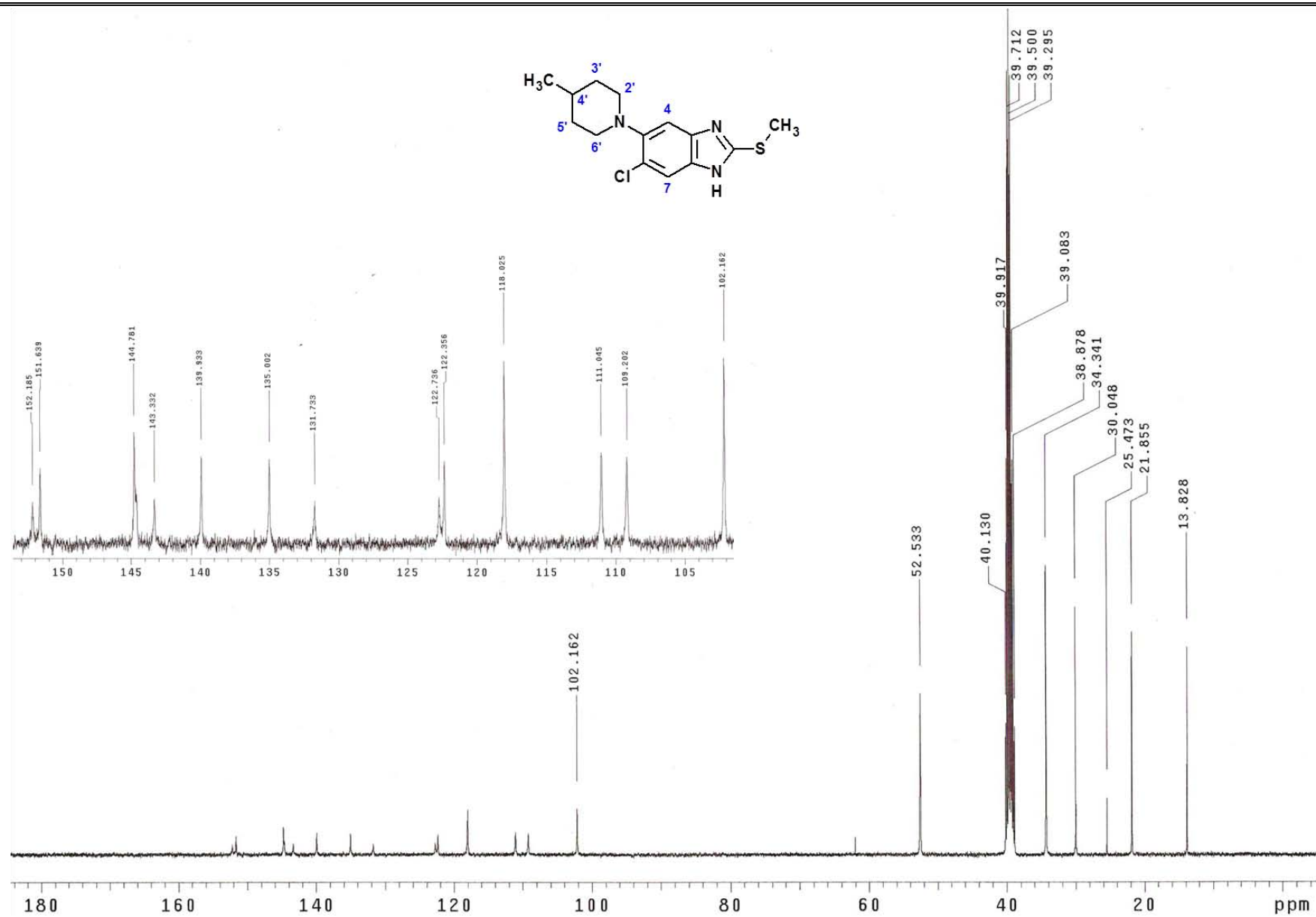
**Espectro 154.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-12**).



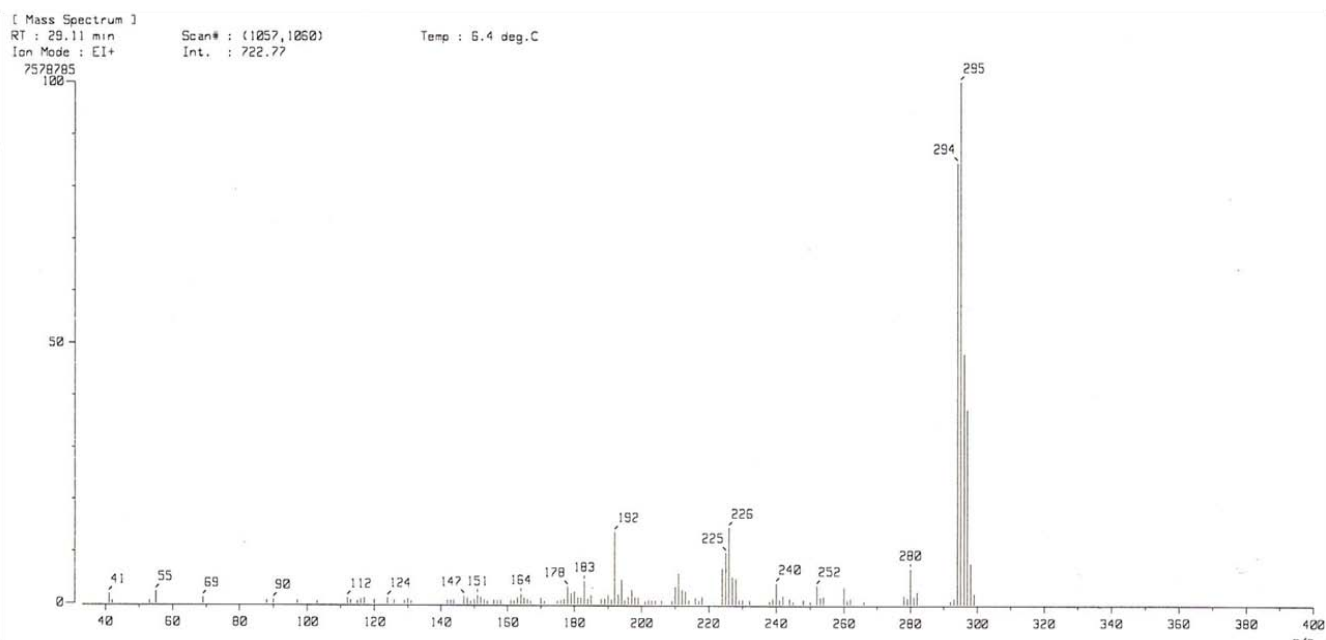
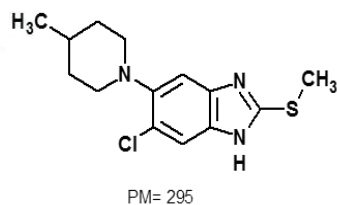
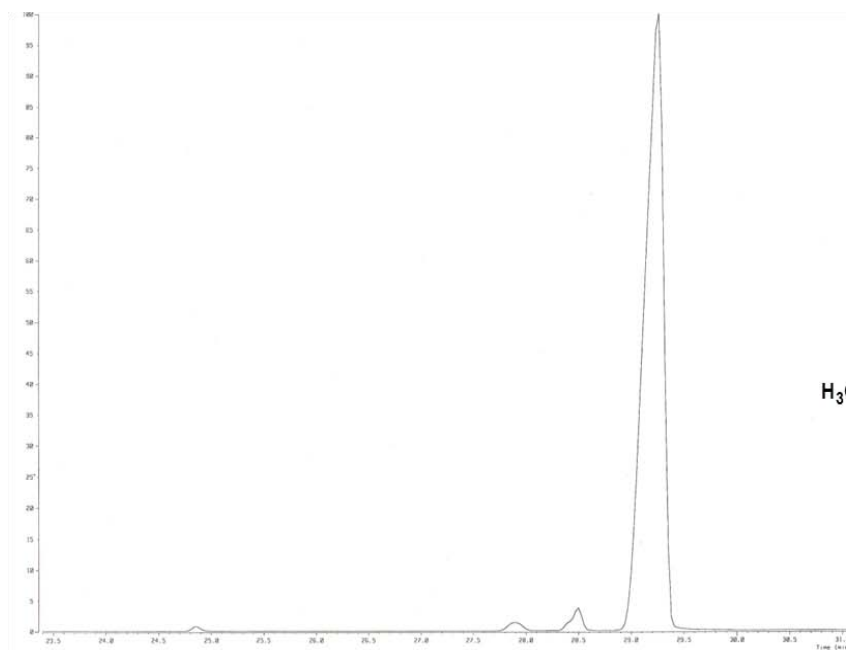
**Espectro 155.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS, DMSO- $d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-12**).



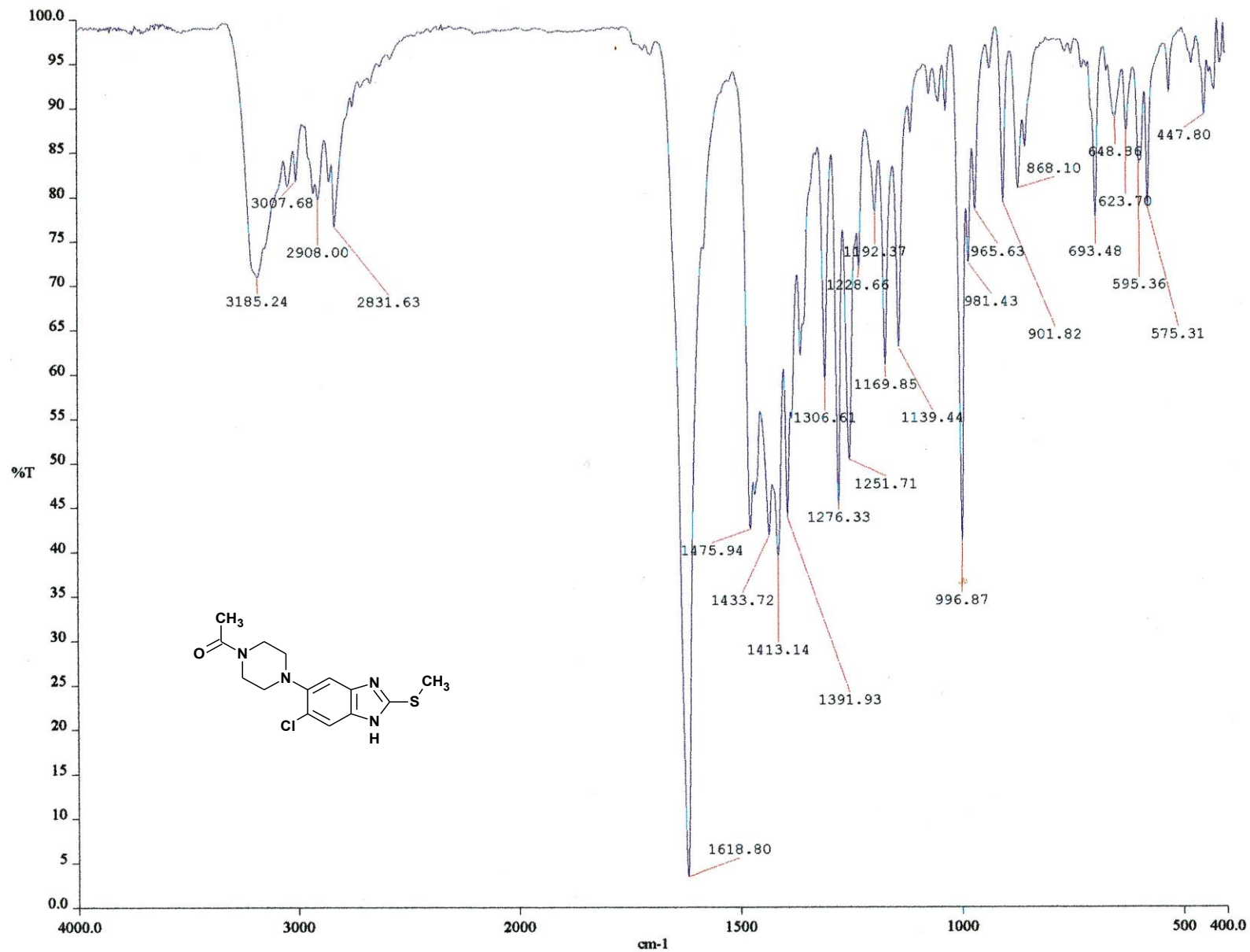
**Espectro 156.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-12**).



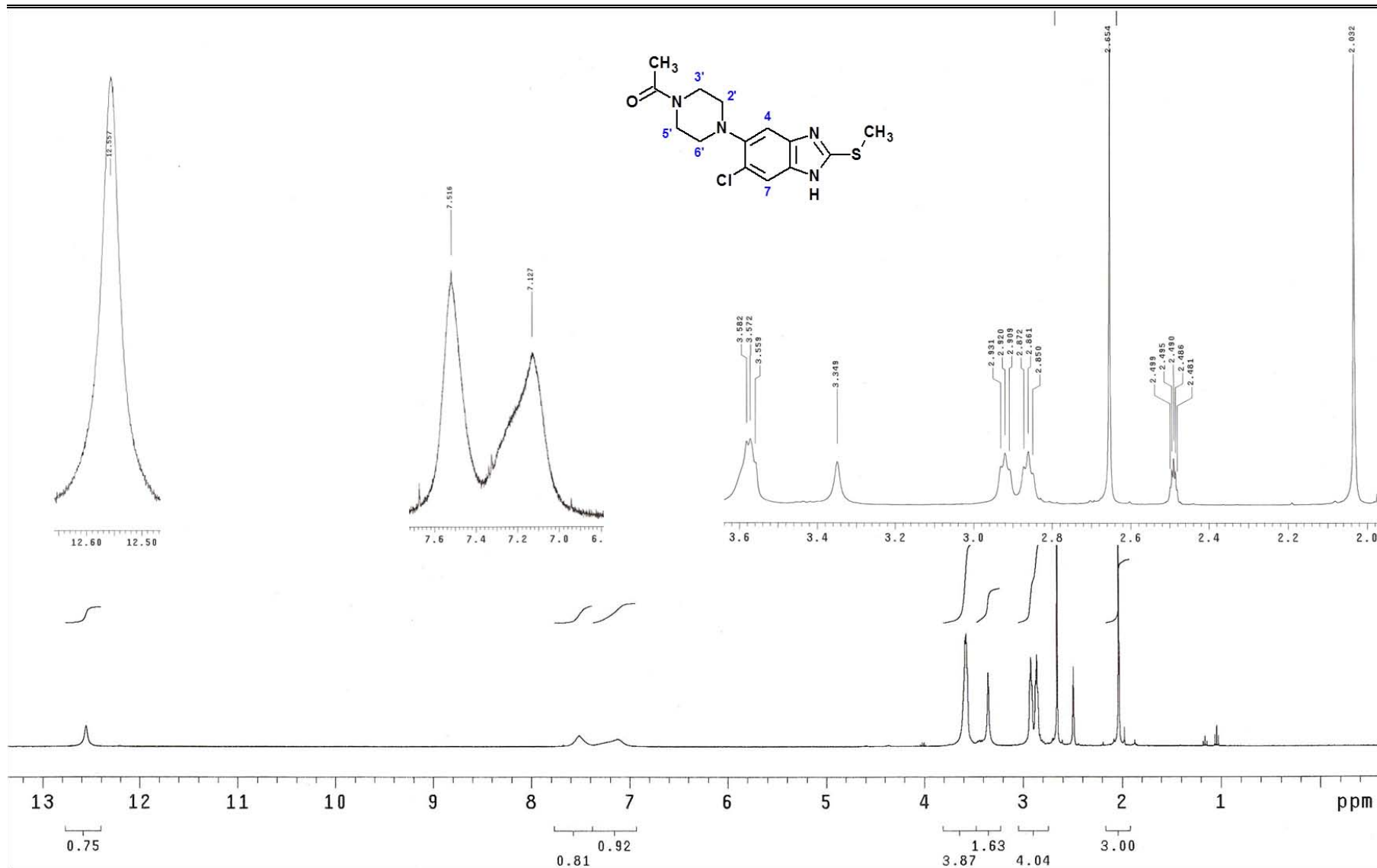
**Espectro 157.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-12**).



**Espectro 158.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperidin-1-il)-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol (**6-12**).

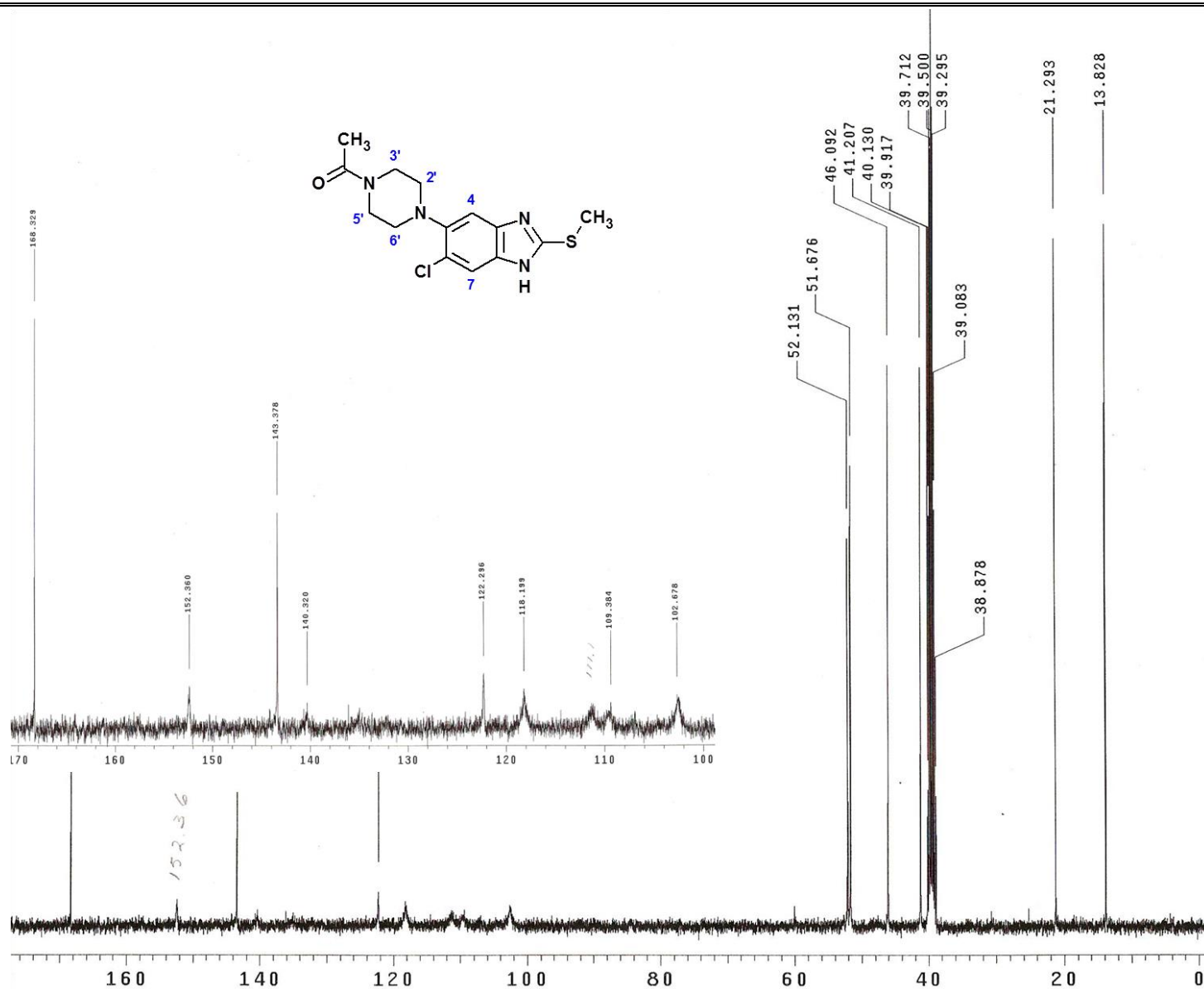


Espectro 159. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-14b**).

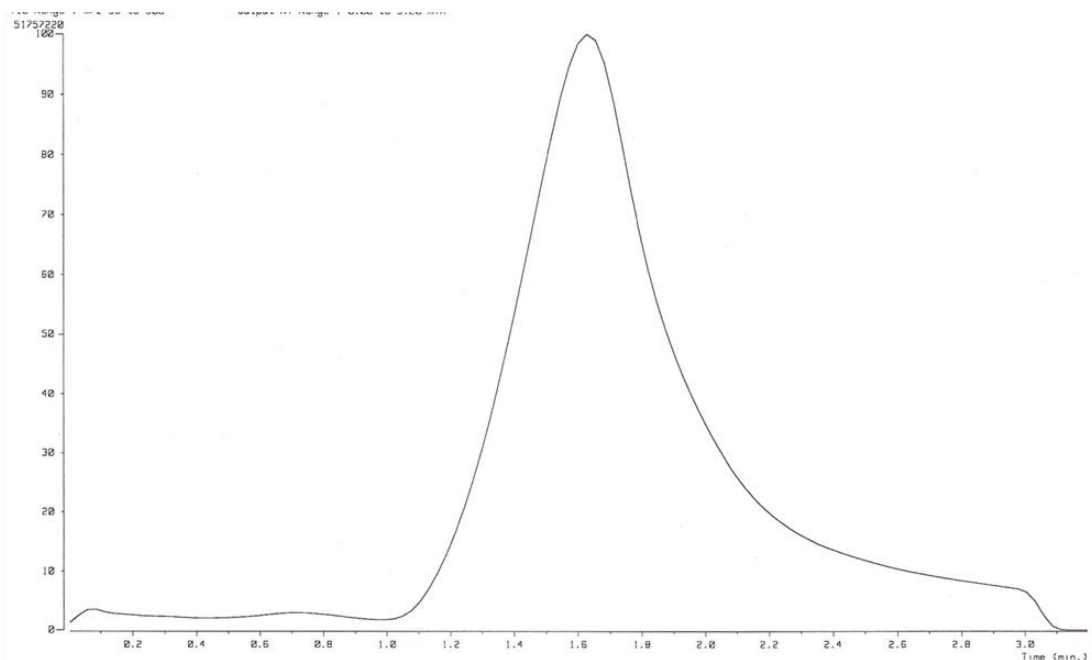


**Espectro 160.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-14b**).

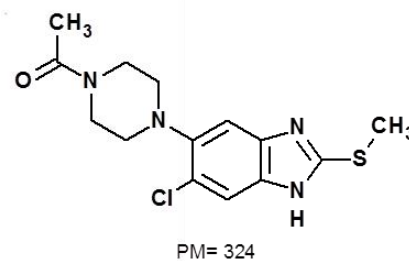
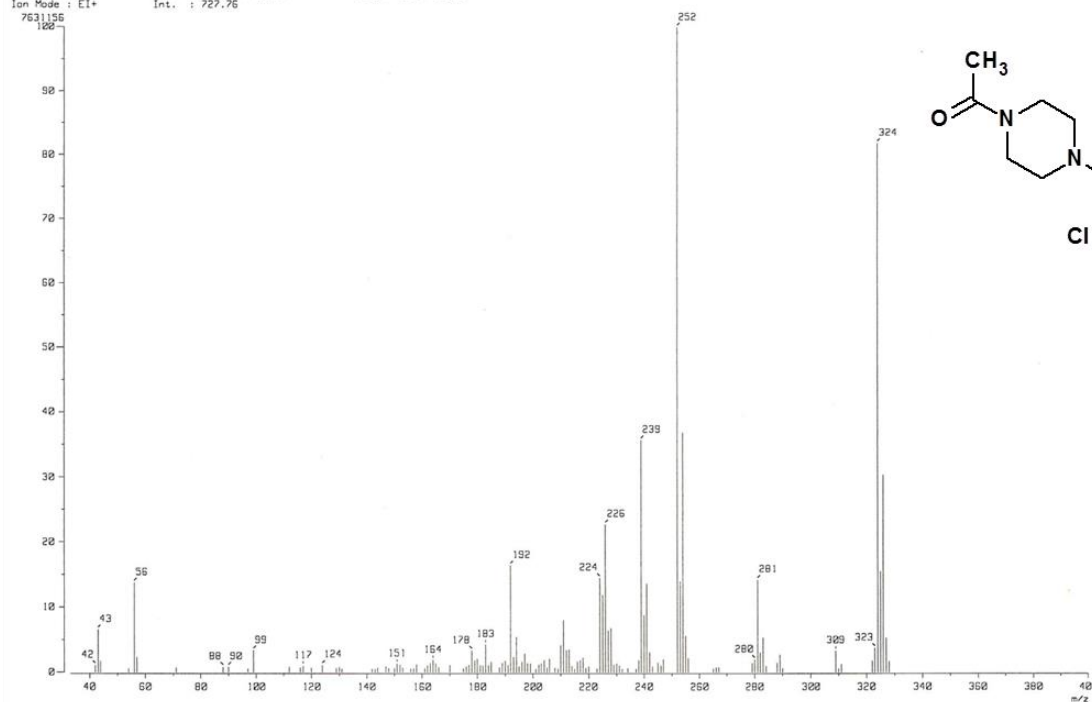




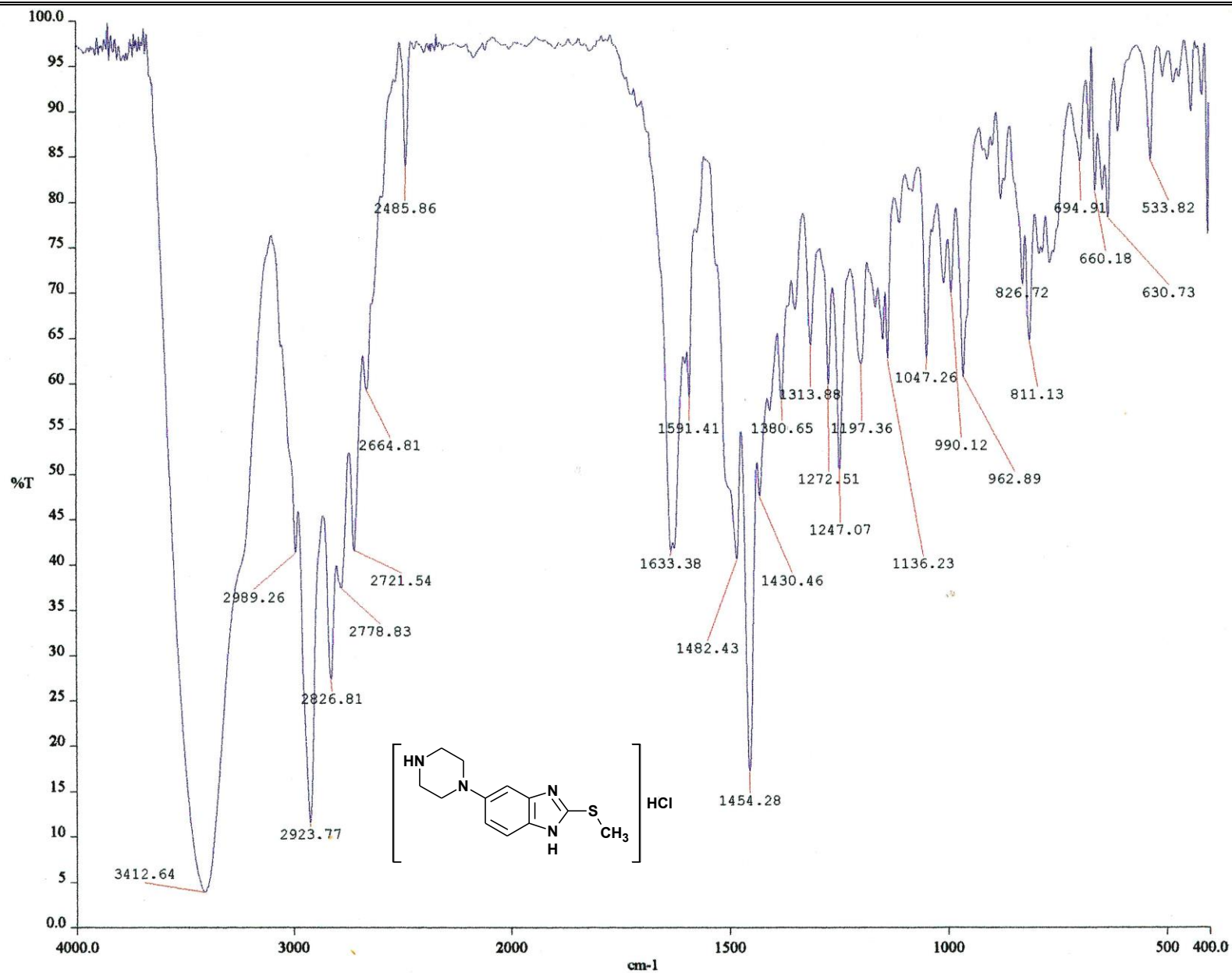
**Espectro 161.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-14b**).



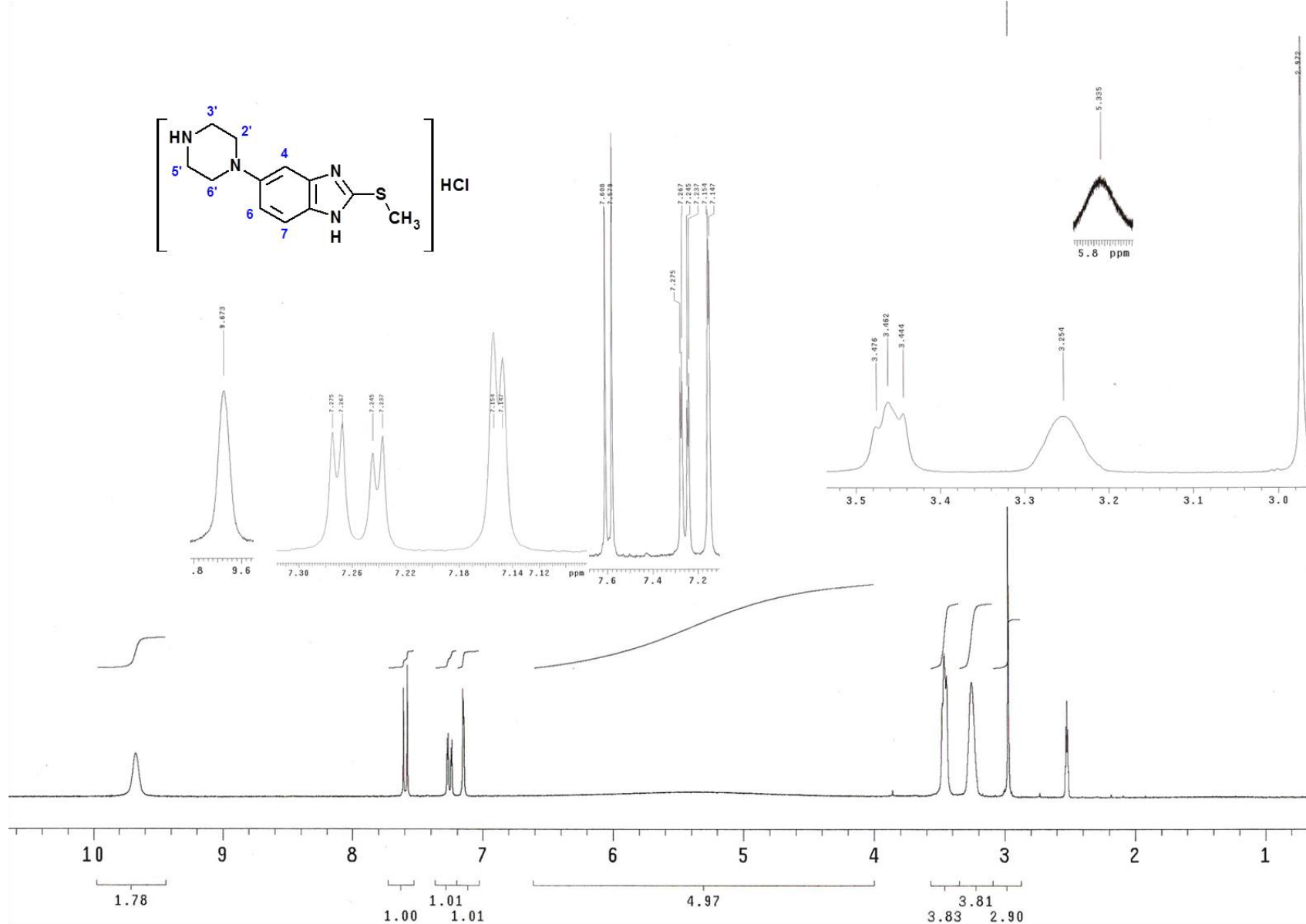
[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.60 min Scan# : (58,61)-(8,31) Temp : 149.4 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 727.76  
 7631155  
 100



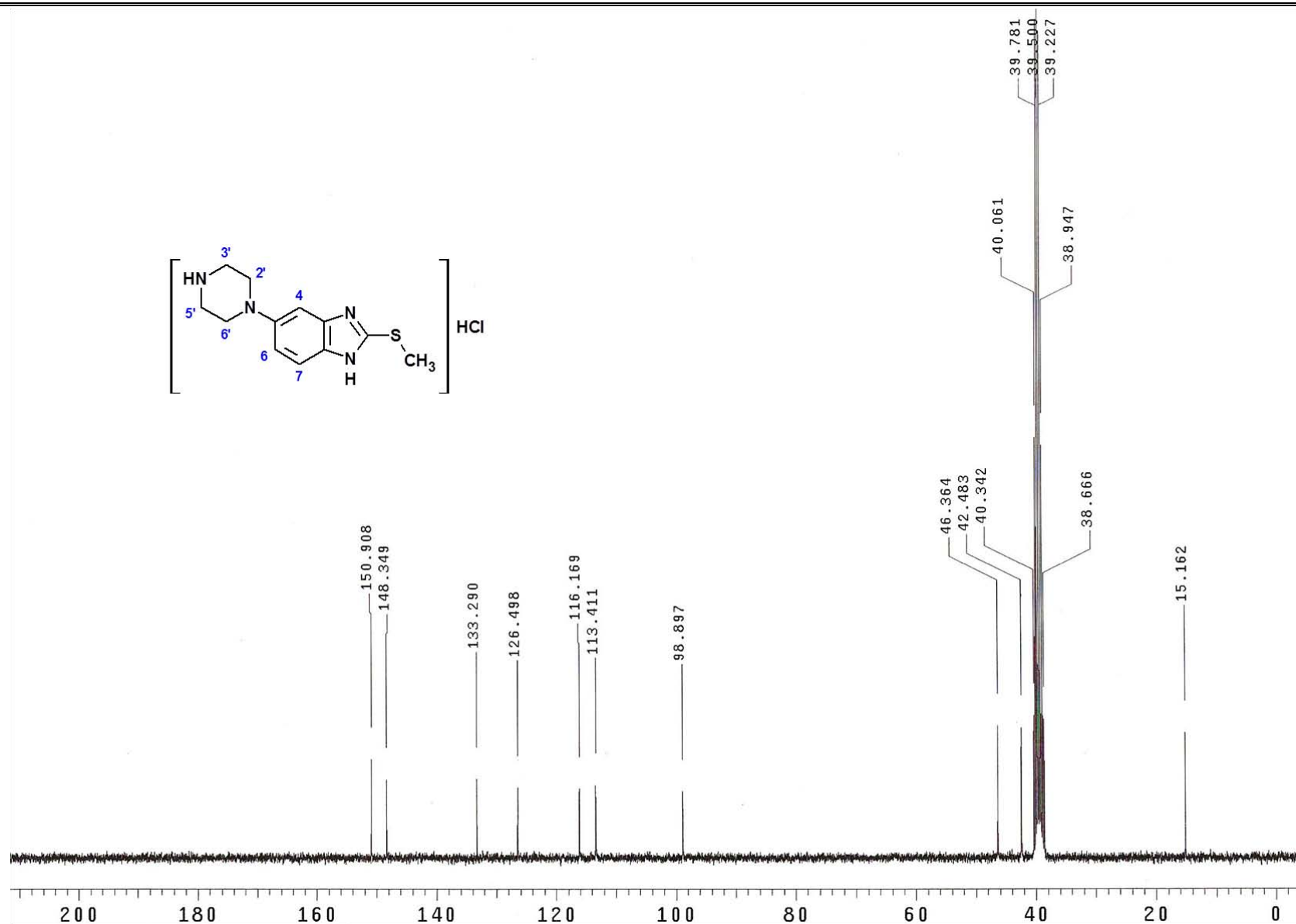
**Espectro 162.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-(4-acetilpiperazin-1-il)-6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol (**6-14b**).



Espectro 163. IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto clorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-bencimidazol (**6-13a**).

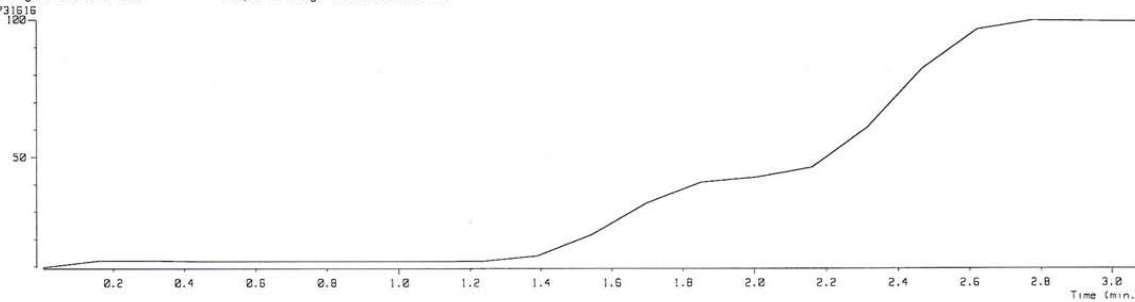


**Espectro 164.** RMN  $^1\text{H}$  (TMS,  $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto clorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-benzimidazol (**6-13a**).

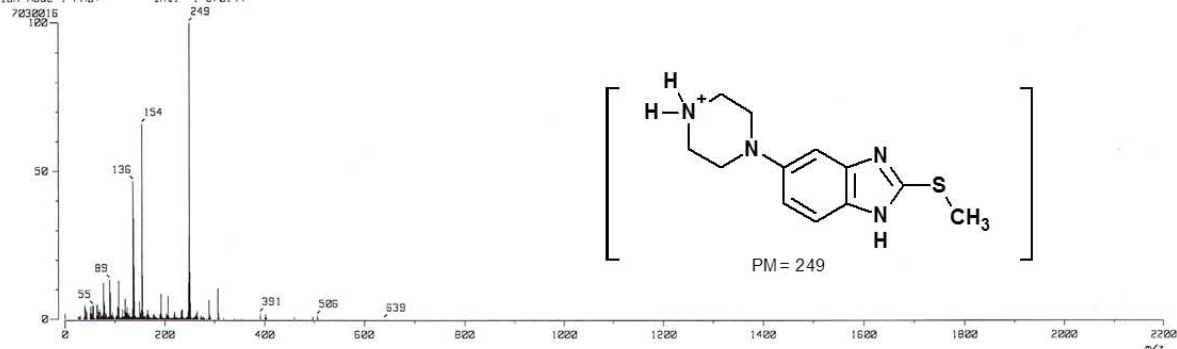


**Espectro 165.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto clorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-benzimidazol (**6-13a**).

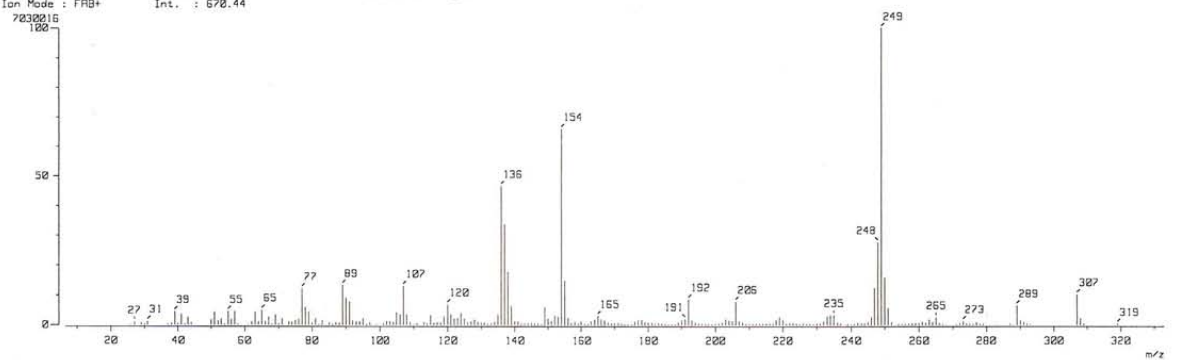
[ TIC ]  
 Date : 072251\_PiezHCl\_001 Date : 29-May-99 12:48  
 Sample: MATRIZ: Alcohol 3-nitro benzilico  
 Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigacion (USRI), F.O. UNFM  
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
 Ion Species : Normal Ion [M<sup>+</sup>-Linear]  
 TIC Range : m/z 0 to 2200 Output RT Range : 0.00 to 3.00 min  
 438731616



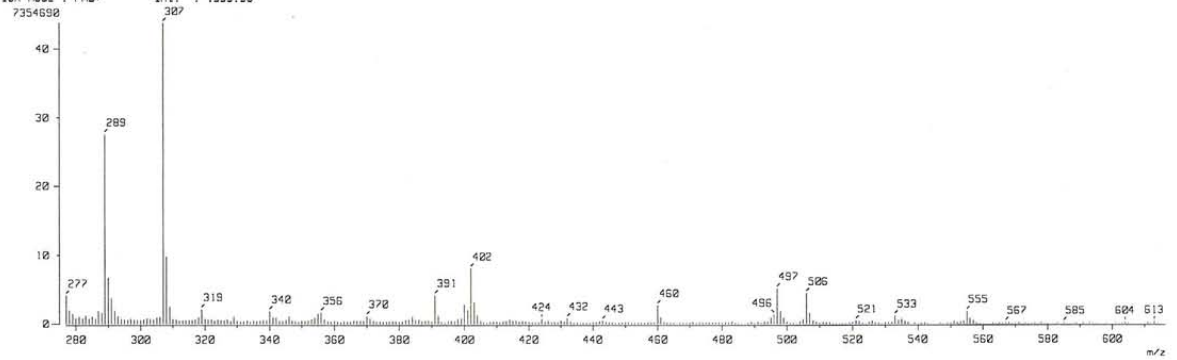
[ Mass Spectrum ]  
 RT : 0.62 min Scan# : (4,7)  
 Ion Mode : FAB+ Int. : 670.44  
 Temp : 6.4 deg.C



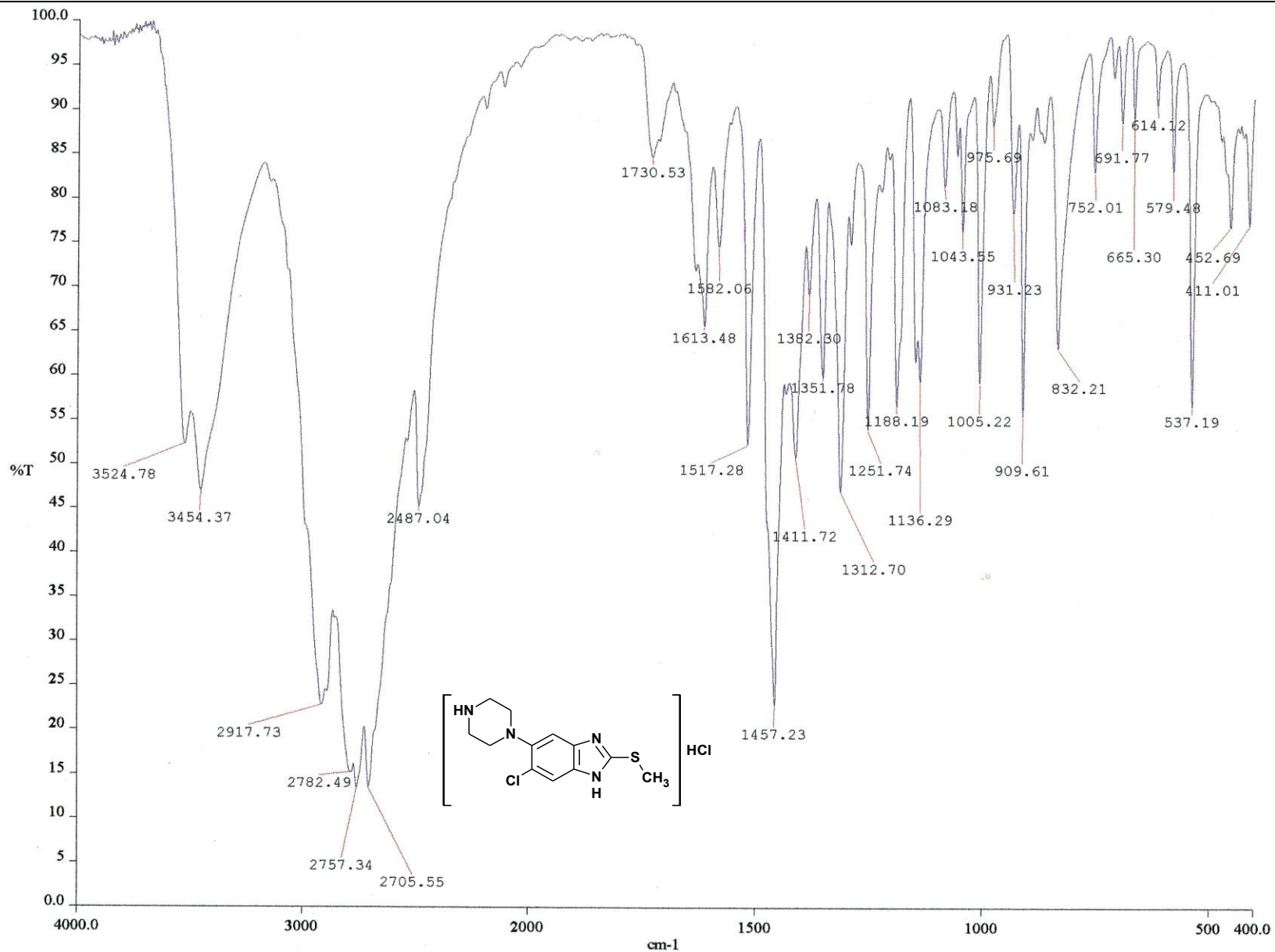
[ Mass Spectrum ]  
 RT : 0.62 min Scan# : (4,7)  
 Ion Mode : FAB+ Int. : 670.44  
 Temp : 6.4 deg.C



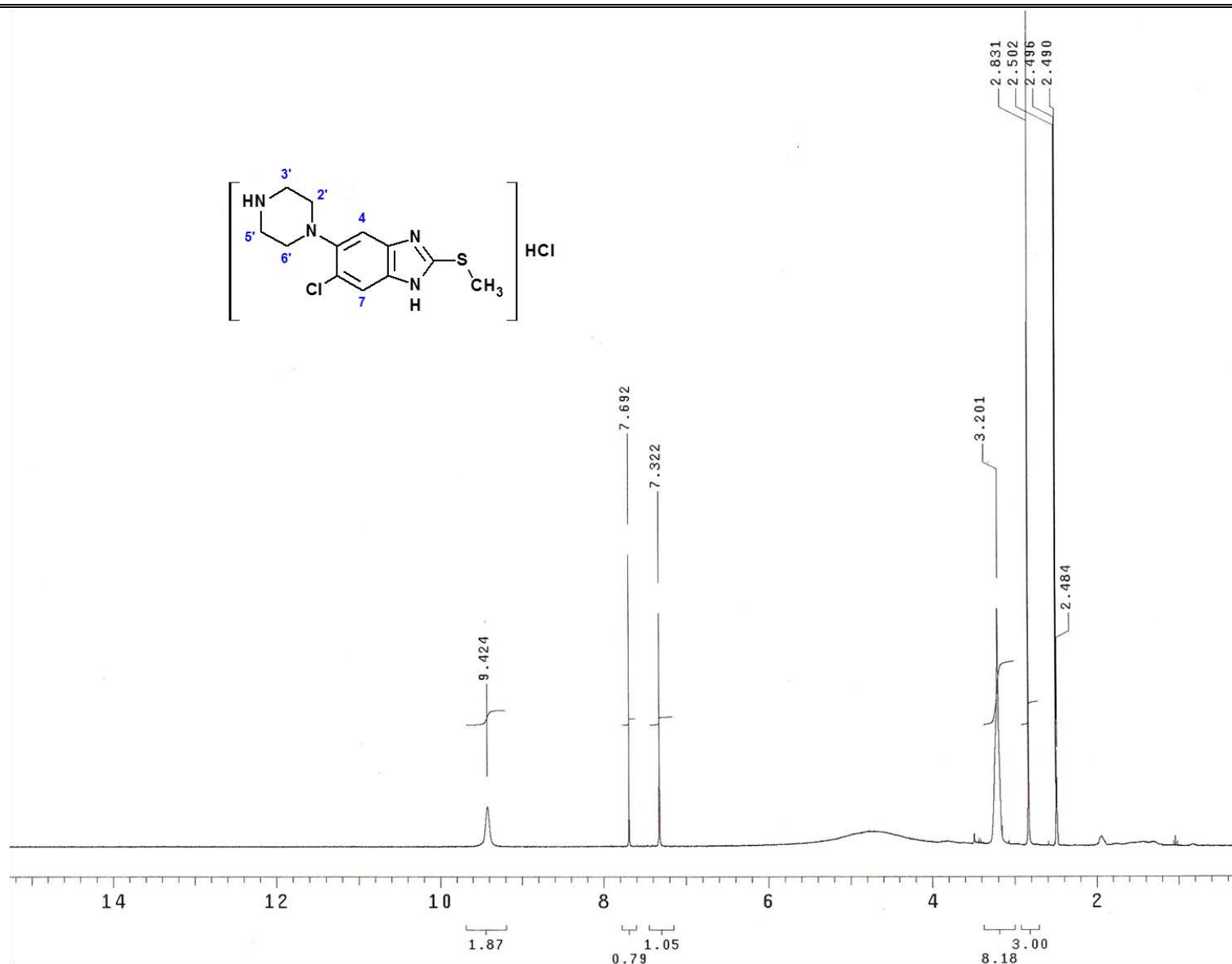
[ Mass Spectrum ]  
 RT : 2.78 min Scan# : (18,20)  
 Ion Mode : FAB+ Int. : 1599.98  
 Temp : 6.4 deg.C



**Espectro 166.** EM (ID/FAB<sup>+</sup>, m/z) del compuesto clorhidrato de 2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1H-benzimidazol (**6-13a**).

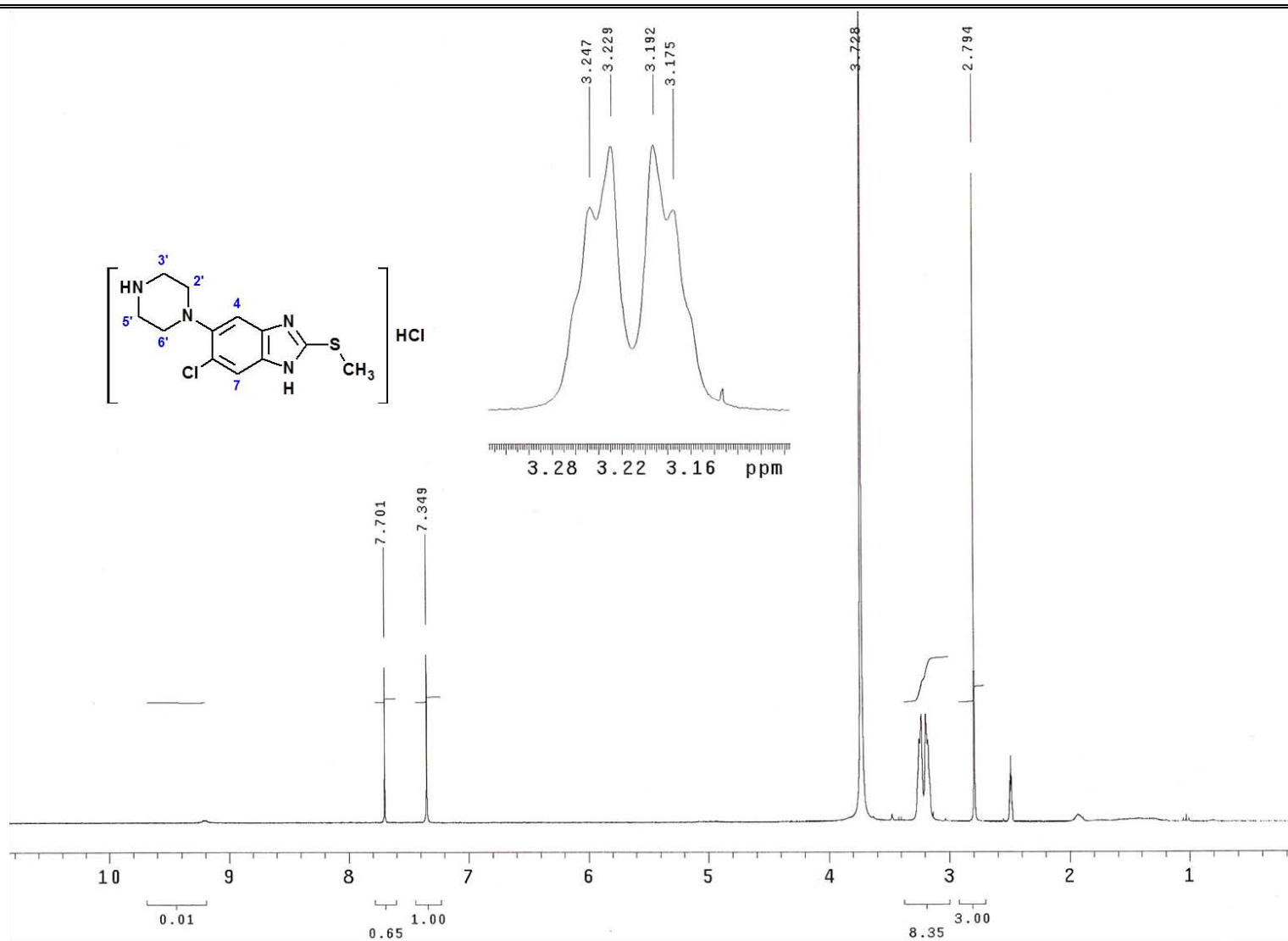


**Espectro 167.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto clorhidrato de 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-14a**).

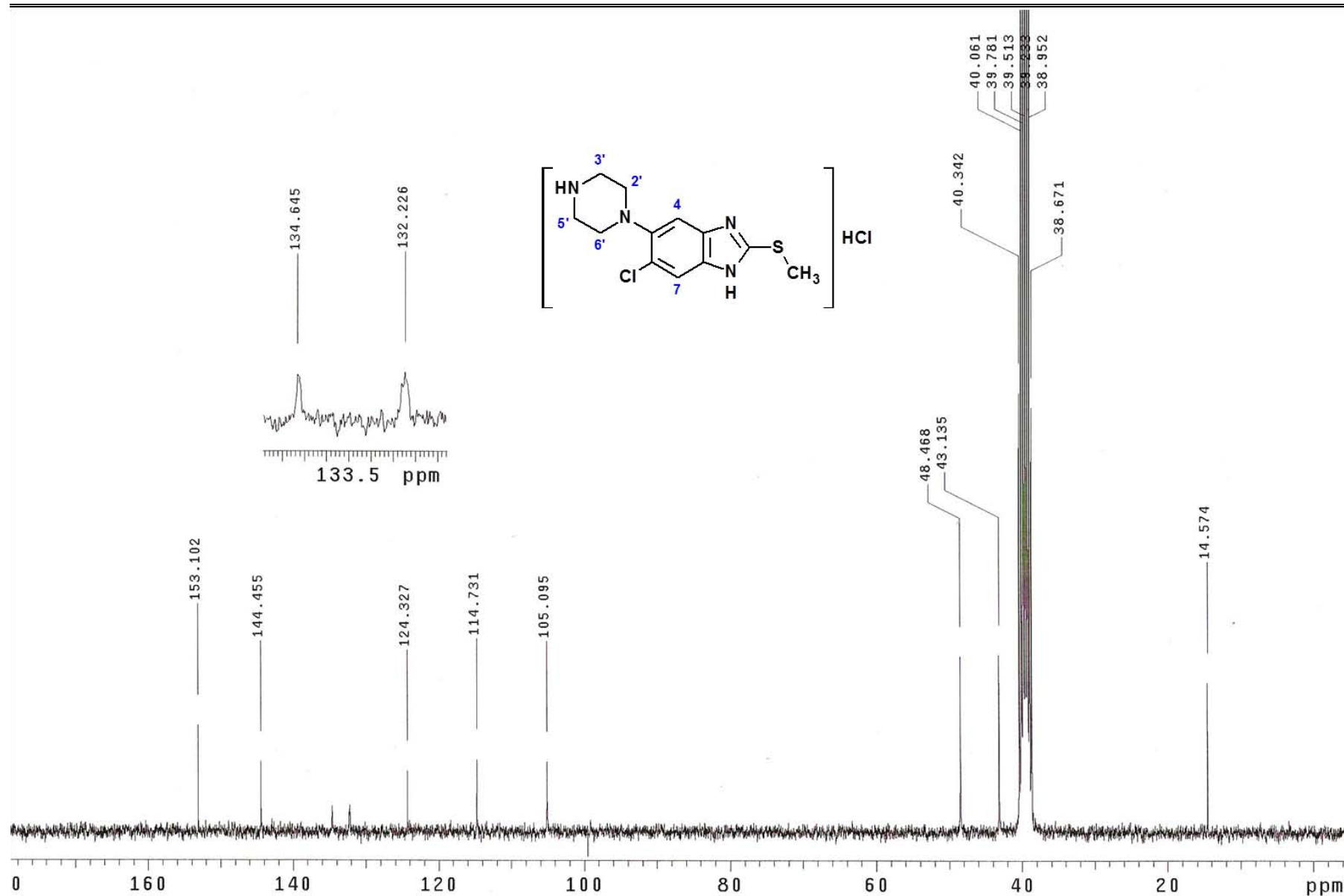


**Espectro 168.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-14b**).

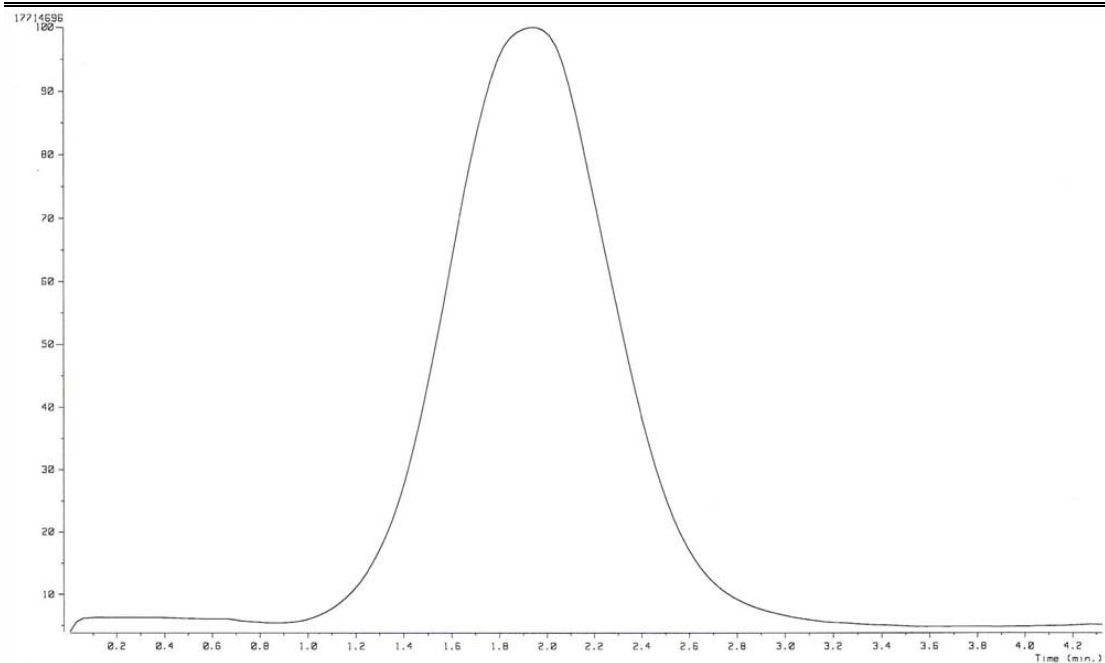




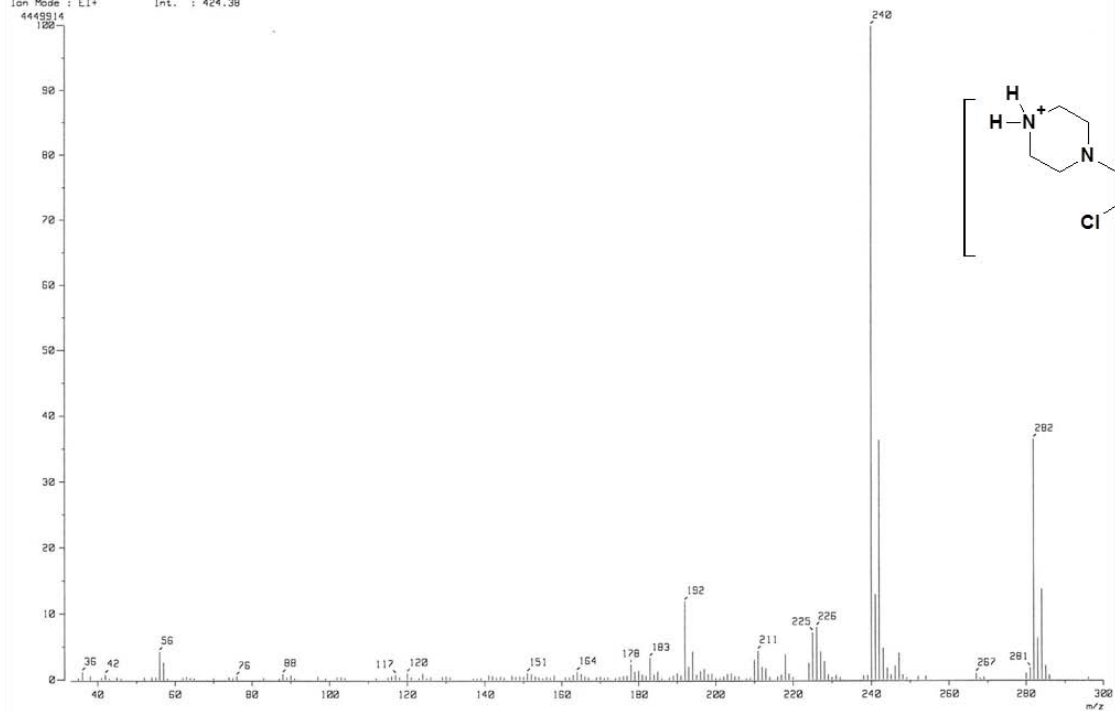
**Espectro 169.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto clorhidrato de 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-14a**).



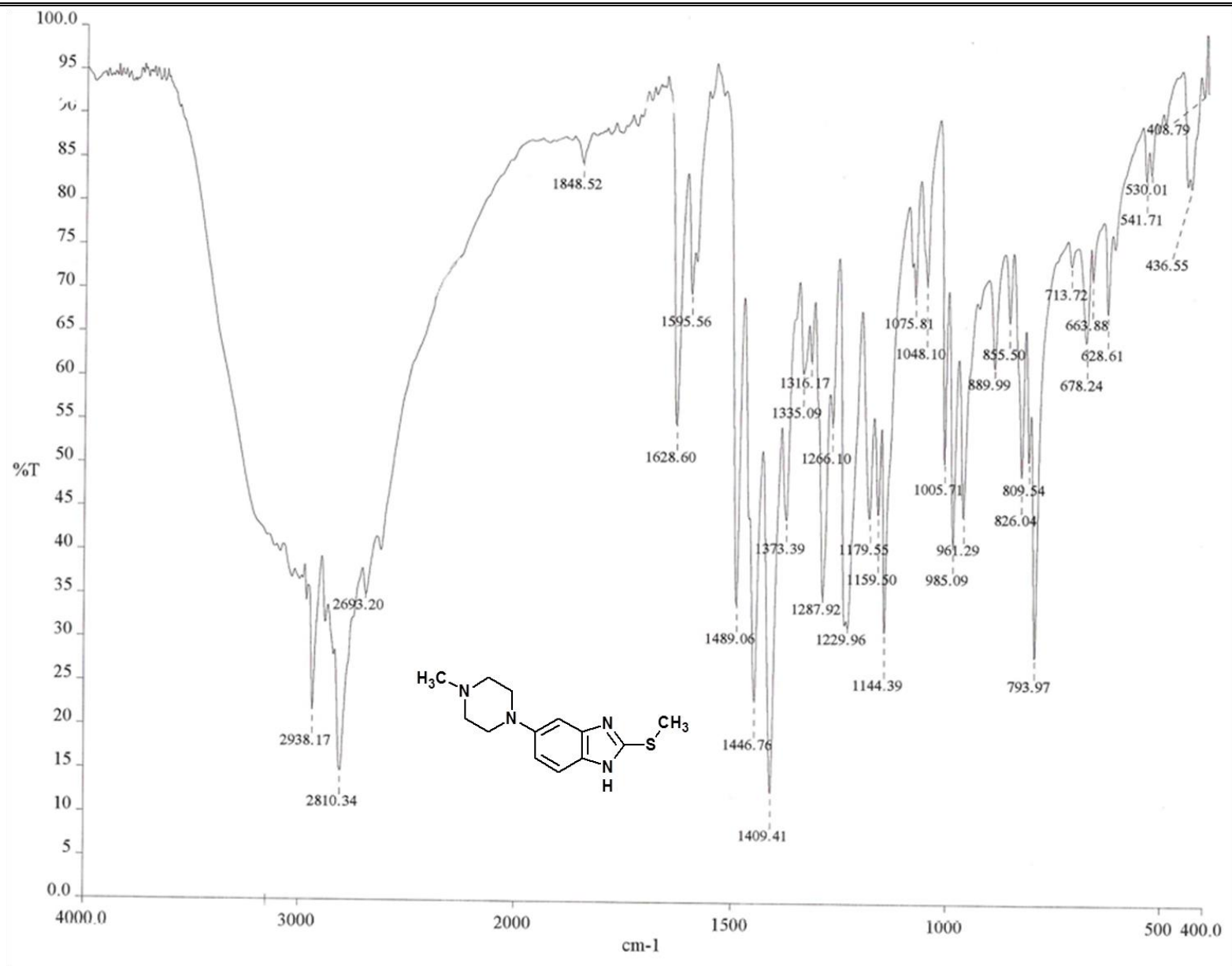
**Espectro 170.** RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto clorhidrato de 6-cloro-2-(metilitio)-5-(piperazin-1-il)-1H-bencimidazol (**6-14a**).



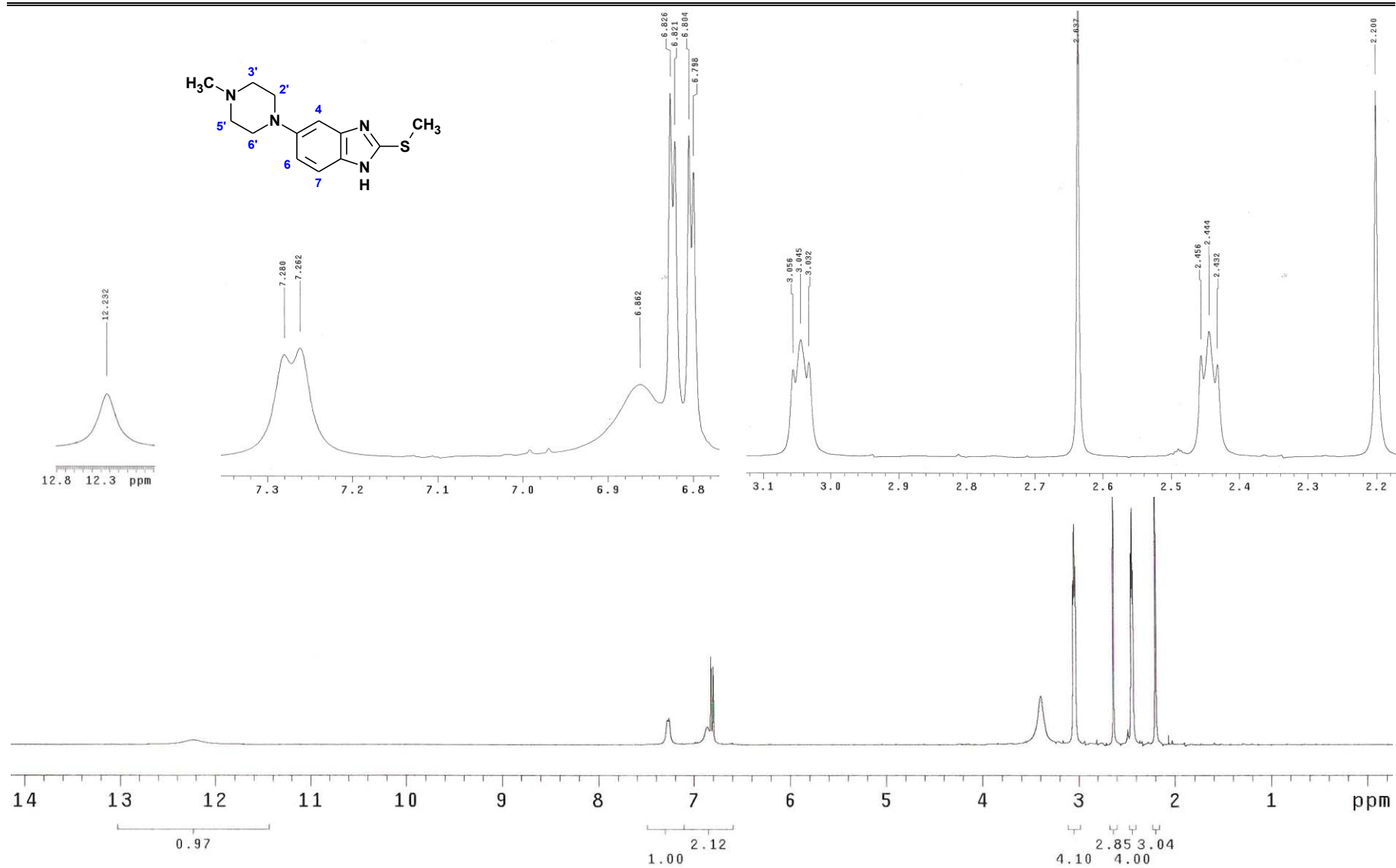
[ Mass Spectrum ]  
 RT : 1.93 min Scan# : (68,74)-(11,33)-(120,... Temp : 26.4 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 424.38



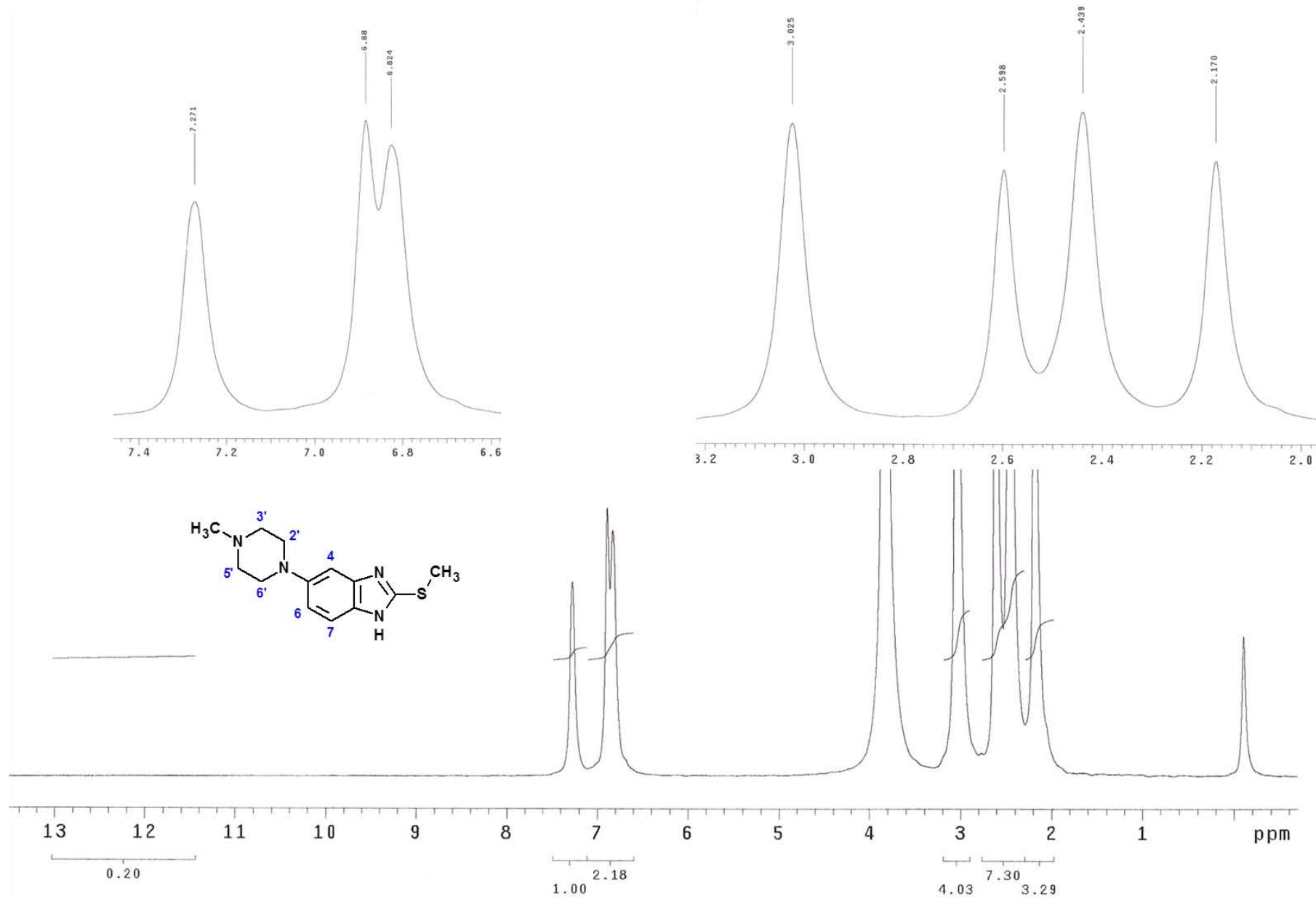
**Espectro 171.** EM (ID/IE,  $m/z$ ) del compuesto clorhidrato de 6-cloro-2-(metiltio)-5-(piperazin-1-il)-1*H*-bencimidazol (**6-14a**).



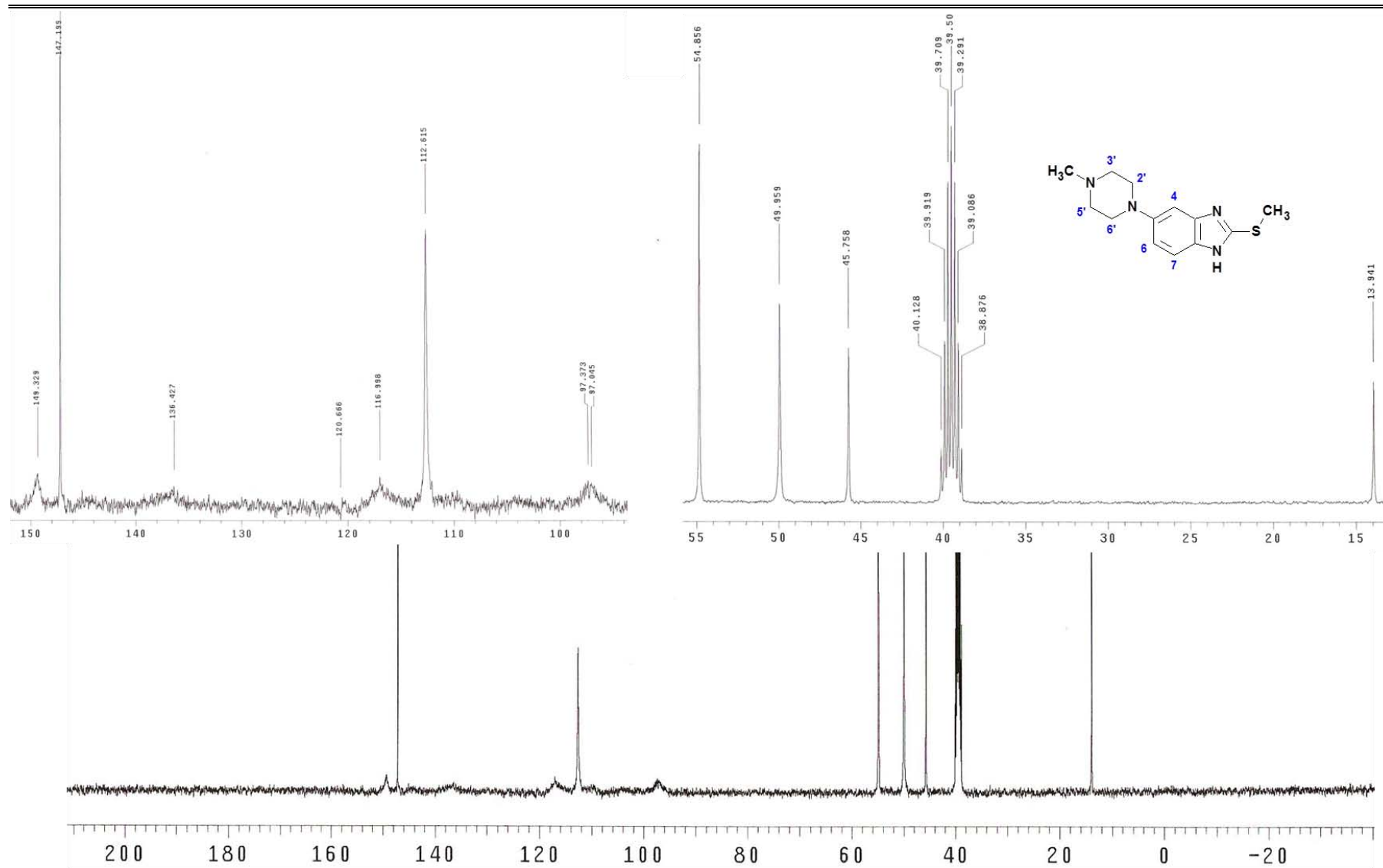
**Espectro 172.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-15**).



**Espectro 173.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-15**).

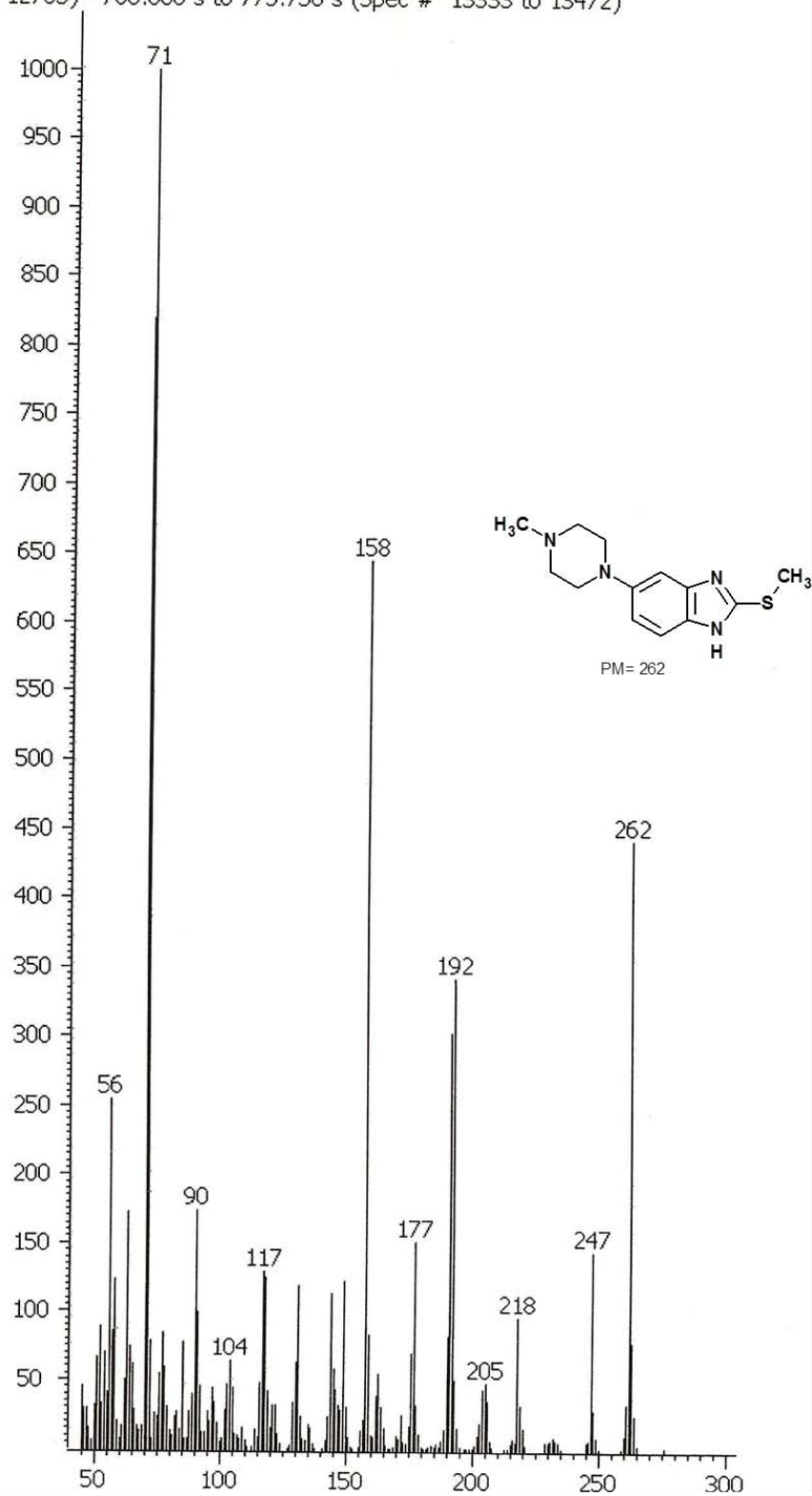


**Espectro 174.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-15**).



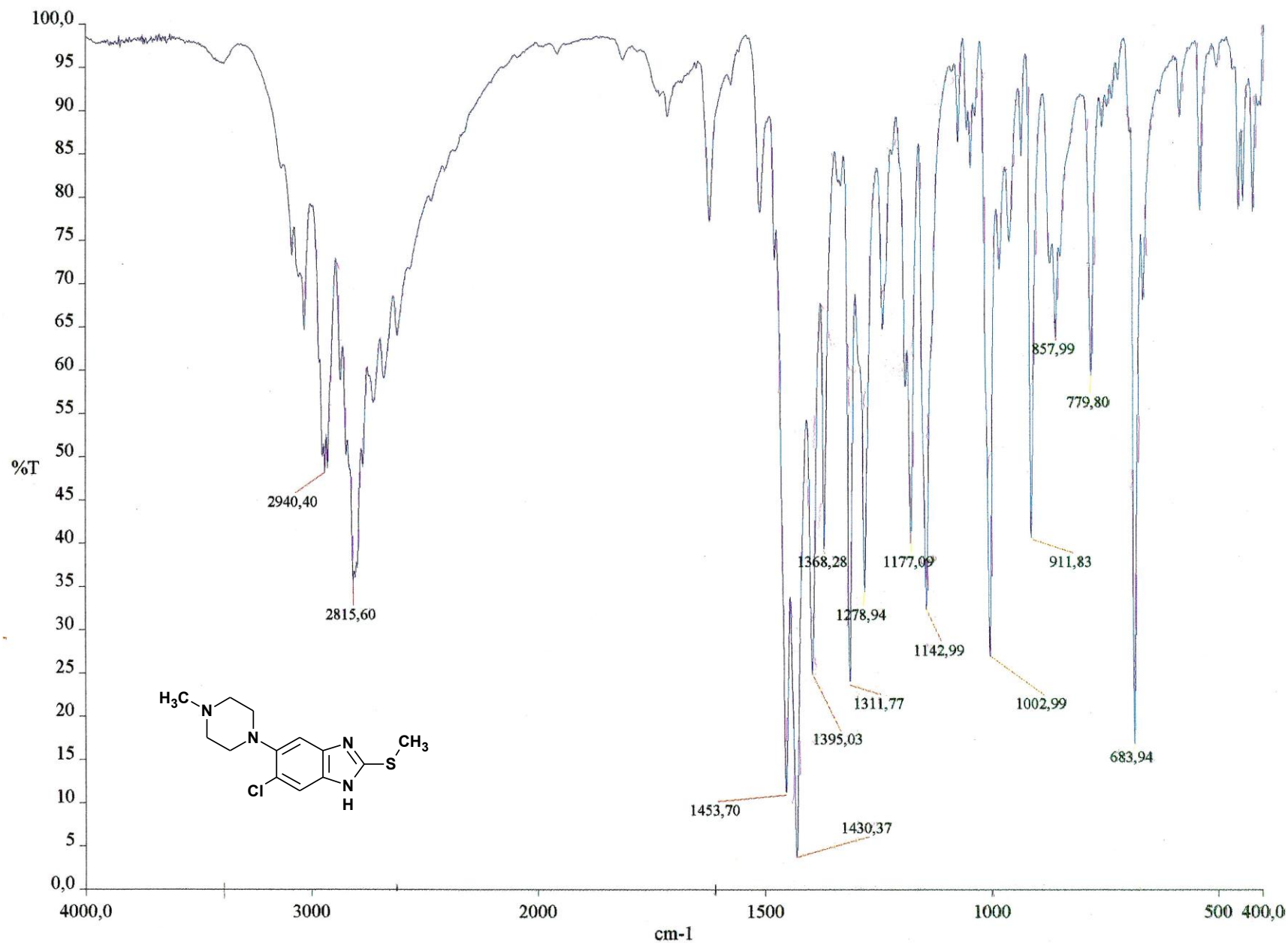
**Espectro 175.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 101 MHz,  $\delta$  en ppm) del compuesto 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-15).

Caliper - sample "AMINA-7:1", 738.406 s to 738.406 s (Spec # 12765 to 12765) - 766.806 s to 773.756 s (Spec # 13333 to 13472)

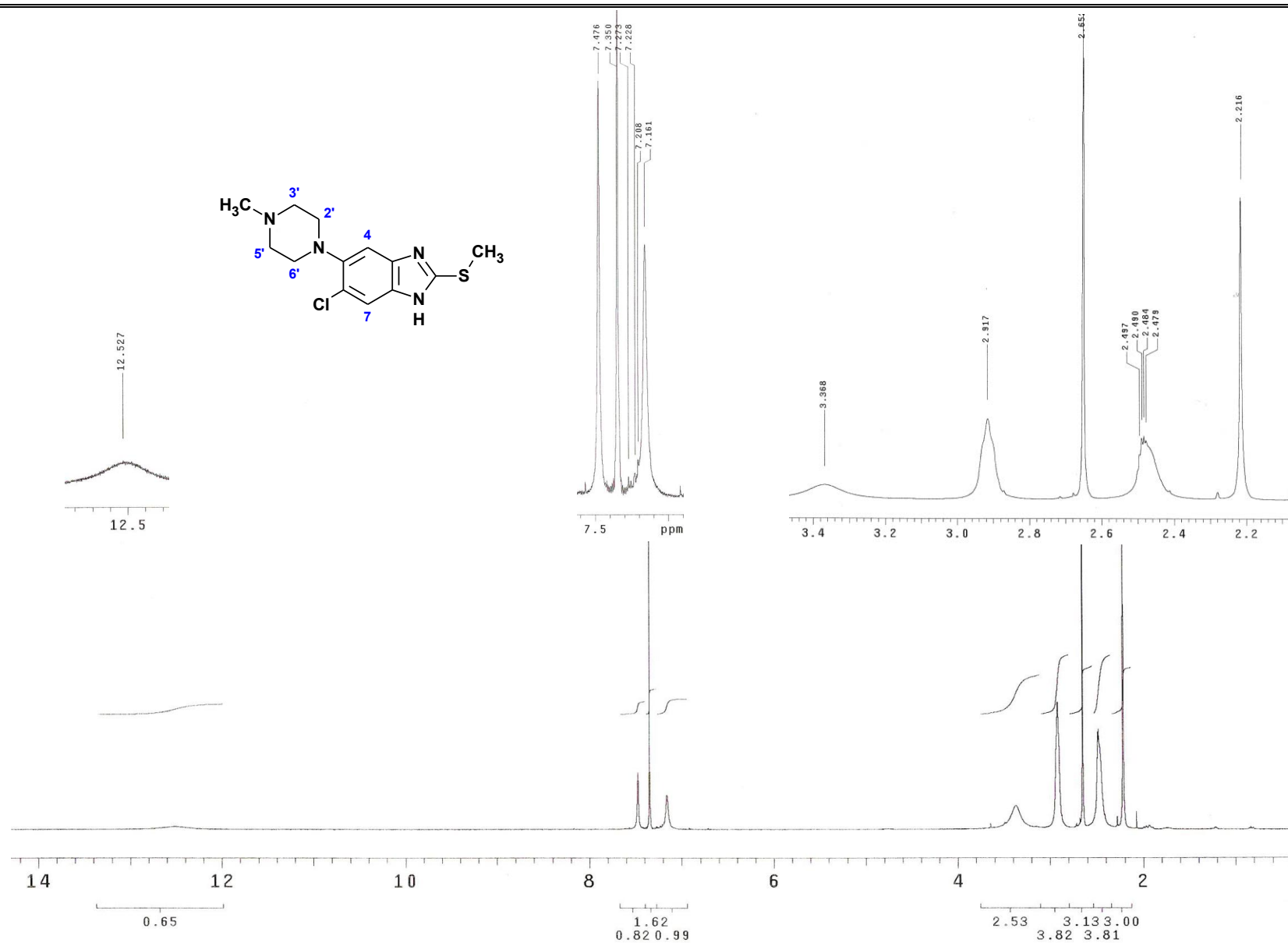


**Espectro 176.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-15**).

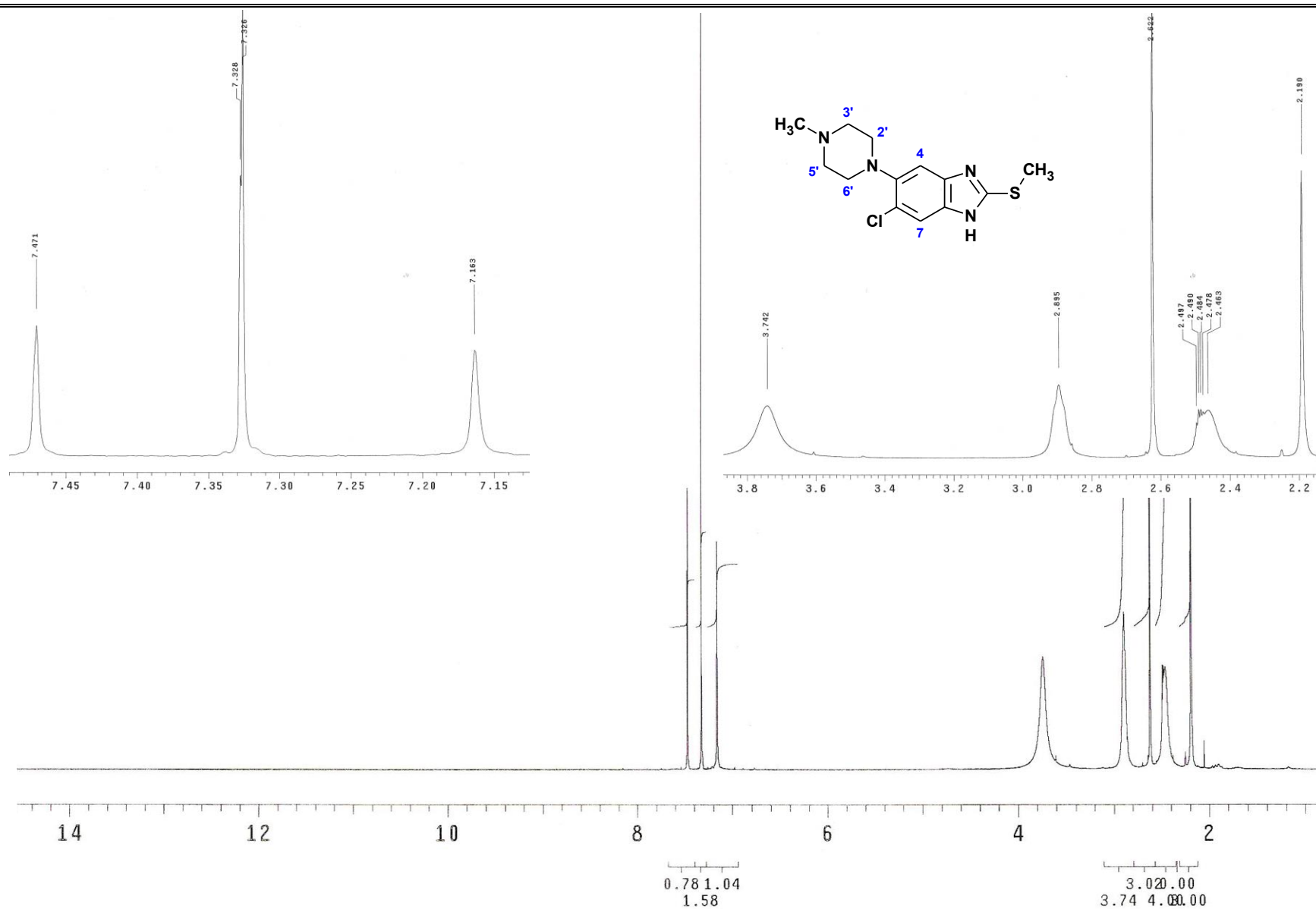




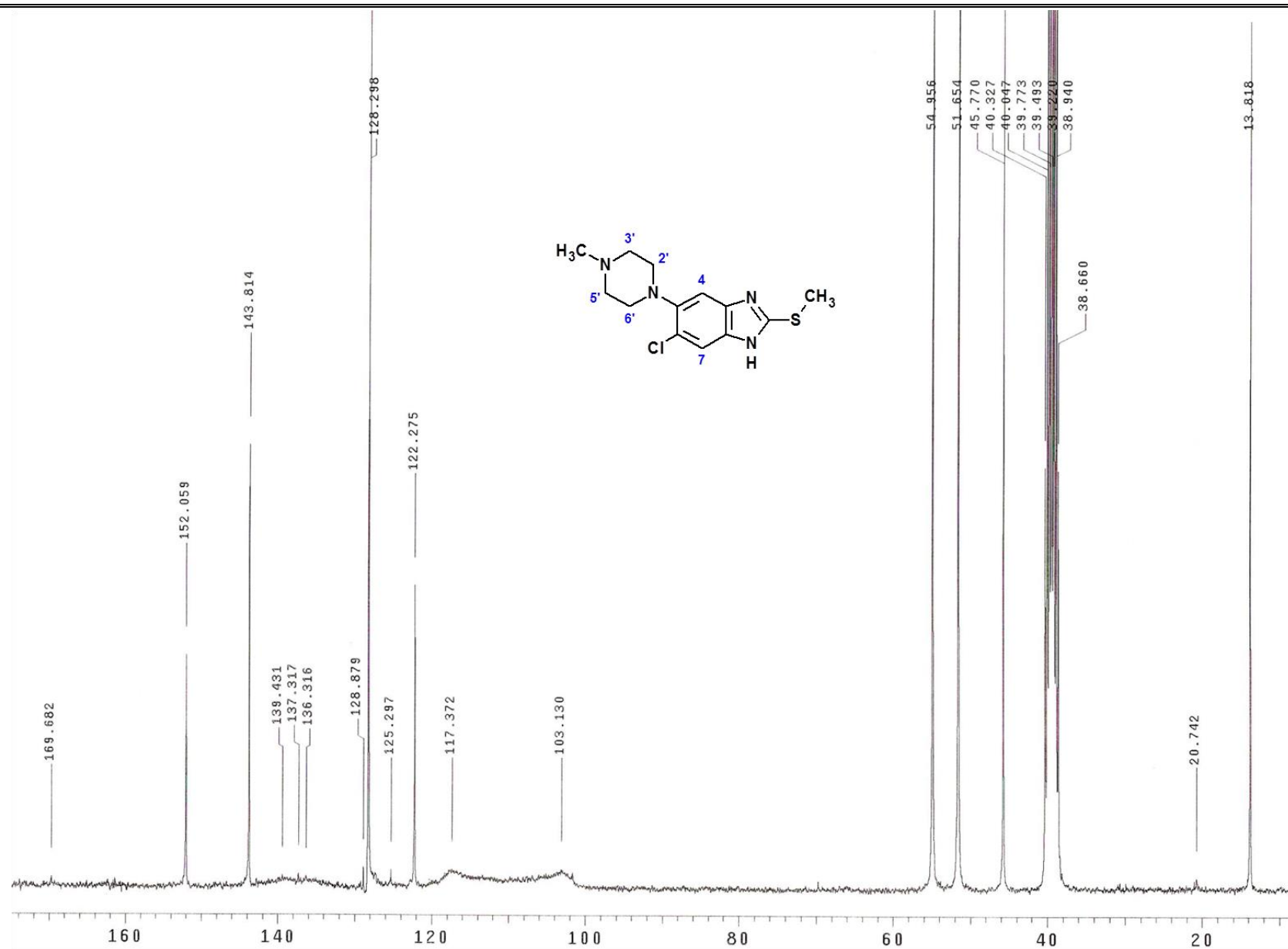
**Espectro 177.** IR (pastilla KBr, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-16**).



**Espectro 178.** RMN <sup>1</sup>H (TMS, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-16**).

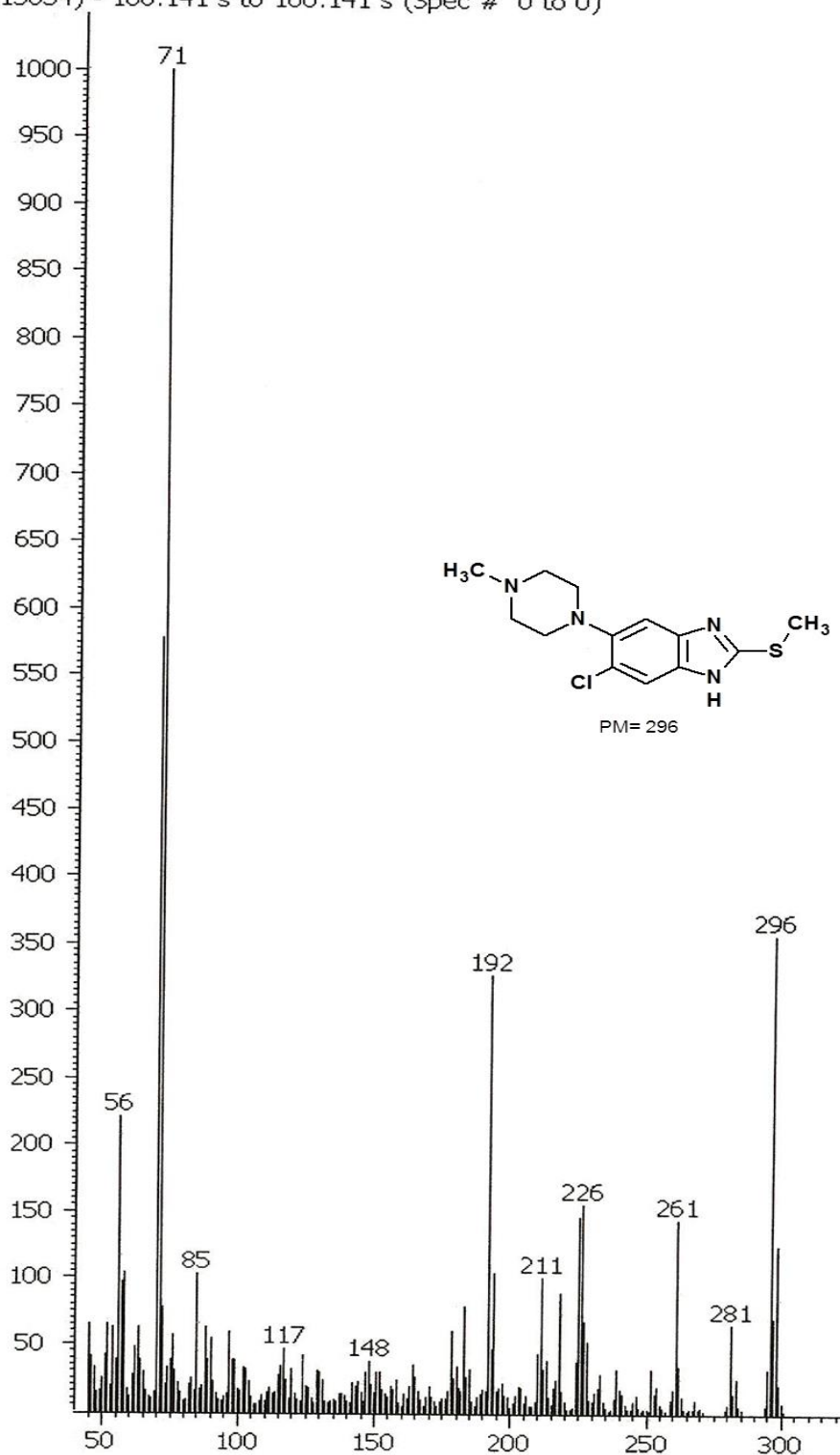


**Espectro 179.** RMN <sup>1</sup>H (int. con D<sub>2</sub>O, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (6-16).



**Espectro 180.** RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-16**).

Caliper - sample "AMINA-8:1", 751.841 s to 751.841 s (Spec # 13034  
13034) - 100.141 s to 100.141 s (Spec # 0 to 0)



**Espectro 181.** EM (CG/IE,  $m/z$ ) del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol (**6-16**).

**A**

Data : OT2823 AMINA8 R5000 002 Date : 31-Jan-99 21:20  
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution  
 Note : Current control, internal scan  
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
 RT : 0.44 min Scan#: 4  
 Elements : C 20/1, H 30/1, N 5/1, Cl 5/1, S 5/1  
 Mass Tolerance : 10ppm, 20mmu if m/z < 2000, 50mmu if m/z > 5000  
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 10.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
296.0847	100.0	-47.6 / -14.1	7.5	C 14 H 19 N 3 Cl S
		-5.2 / -1.5	8.0	C 13 H 17 N 4 Cl S ✓
		+37.3 / +11.0	8.5	C 12 H 15 N 5 Cl S
		-53.8 / -15.9	2.5	C 13 H 24 N Cl 2 S
		-11.3 / -3.4	3.0	C 12 H 22 N 2 Cl 2 S
		+31.1 / +9.2	3.5	C 11 H 20 N 3 Cl 2 S
		-59.0 / -17.5	3.5	C 11 H 23 N 3 Cl S 2
		-16.6 / -4.9	4.0	C 10 H 21 N 4 Cl S 2
		+25.9 / +7.7	4.5	C 9 H 19 N 5 Cl S 2
		+19.7 / +5.8	-0.5	C 8 H 24 N 3 Cl 2 S 2
		+62.2 / +18.4	0.0	C 7 H 22 N 4 Cl 2 S 2
		-27.9 / -8.3	0.0	C 7 H 25 N 4 Cl S 3
		+14.5 / +4.3	0.5	C 6 H 23 N 5 Cl S 3

[ Theoretical Ion Distribution ]

Molecular Formula : C13 H17 N4 Cl S

(m/z 296.0862, MW 296.8238, U.S. 8.0)

Base Peak : 296.0862, Averaged MW : 296.8231(a), 296.8267(w)

m/z	INT.	
296.0862	100.0000	*****
297.0889	16.9728	*****
298.0834	37.7631	*****
299.0859	6.2121	****
300.0815	1.9276	*
301.0828	0.2569	
302.0833	0.0252	
303.0840	0.0019	
304.0855	0.0001	

**EAGER 200 - SUMMARY**

**B**

COMPANY NAME : USAI  
 OPERATOR ID : UNK  
 METHOD IN USE : CHNS

GROUP 1 SAMPLE NAME	NITROGEN (%)	CARBON (%)	HYDROGEN (%)	SULPHUR (%)
AMINA8	16.30581	57.28876	6.226872	8.713733
AMINA8	16.7825	57.22739	6.296463	8.988618
GROUP 1				
	AVERAGE	STD. DEV.	% REL. S. D.	VARIANCE
NITROGEN (%)	16.54416	.3370474	2.03726	.113601
CARBON (%)	57.25808	4.575516E-02	.0799104	2.093534E-03
HYDROGEN (%)	6.261667	4.926103E-02	.7867078	2.426649E-03
SULPHUR (%)	8.851175	.194389	2.196194	3.778708E-02

**Espectro 182.** (A) EMAR del compuesto y (B) resultados de análisis elemental del compuesto 6-cloro-5-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol (**6-16**).

## **Apéndice 2. Publicaciones**

## Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole\*\*

Alicia HERNÁNDEZ-CAMPOS,<sup>a</sup> Froylán IBARRA-VELARDE,<sup>b</sup> Yolanda VERA-MONTENEGRO,<sup>b</sup> Norma RIVERA-FERNÁNDEZ,<sup>b</sup> and Rafael CASTILLO\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CU; México D.F. 04510, México; and <sup>b</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, CU; México D.F. 04510, México.

Received October 15, 2001; accepted February 5, 2002

**The synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole (6) is described. Compound 6 showed 100% activity *in vitro* at 146.70 and 29.34  $\mu\text{M}$  concentrations. It also completely removed 3-d and 10-week-old *Fasciola hepatica* in sheep at a dose of 15 mg/kg.**

**Key words** fasciolicidal activity; bioisostere; benzimidazole synthesis; *Fasciola hepatica*

Fasciolosis, caused by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*, is a very serious parasitic disease, which is responsible for heavy economic losses in sheep and cattle production in many countries of the world.<sup>1)</sup>

Besides domestic animals, other animal species and man may be infected as well.<sup>2)</sup> There are effective strategies for the control of fasciolosis which are largely based on drug (fasciolicide) use on the definitive host.<sup>3)</sup> So far the only effective drug against immature and adult flukes alike is triclabendazole (TCBZ, Fig. 1), a potent fasciolicide with a better bioavailability than that of the benzimidazole carbamates, such as albendazole. It differs structurally from the latter in having a 2-methylthio group instead of a 2-methylcarbamate group in the benzimidazole ring.<sup>4)</sup>

TCBZ appears to be highly specific for flukes, possessing 97–100% activity against all stages of *Fasciola* spp. The usual oral dose of TCBZ for the elimination of immature and adult forms of *F. hepatica* is 5–10 mg/kg for sheep and goats, and 12 mg/kg for cattle.<sup>5)</sup>

For safety and efficacy, TCBZ is the drug of choice for the treatment of human fasciolosis.<sup>6–10)</sup> Unlike nematocides, no new fasciolicides have been marketed recently and apparently no compounds are yet under development.<sup>1)</sup> Considering that fasciolosis is also a health problem in Mexico, a research project was undertaken in our laboratory with the purpose of developing new compounds with potential fasciolicidal activity.<sup>11,12)</sup>

For the design of one of the new compounds described in this paper, we use as a model pronethalol, an adrenergic blocker which was formed by replacing the 3,4-dichlorophenyl group in dichloroisoproterenol (DCI, Fig. 1) by the 2-naphthyl group.<sup>13)</sup> DCI is also an adrenergic blocker with some agonist activity thus establishing the fact that pronethalol is a bioisostere of DCI.

In this paper we report the synthesis and preliminary fasciolicidal activity, *in vitro* and *in vivo*, against *F. hepatica*, of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole (6), a TCBZ analog. In this compound, the 1-naphthyl group replaces the 3,4-dichlorophenyl group in TCBZ, a moiety change, which is analogous to that done with pronethalol-DCI.

### Chemistry

The synthetic sequence in the preparation of 6 is shown in

Chart 1. In the first step, 4,5-dichloro-2-nitroaniline (1) was subjected to a nucleophilic substitution reaction with 1-naphthol (2) under known conditions,<sup>14)</sup> and the ether obtained (3) was reduced with  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .<sup>15)</sup> The corresponding *o*-phenylenediamine (4) formed was immediately cyclocondensed with  $\text{CS}_2$  in an EtOH–KOH solution to give the 2-mercaptobenzimidazole (5).<sup>16)</sup> In the last step, 5 was monoalkylated with  $\text{CH}_3\text{I}$  in acetone and KOH solution<sup>17)</sup> to afford the title compound (6).

The synthesized compounds were purified by recrystallization and their physical constants were determined. The structure of all new compounds was established by spectroscopic and spectrometric data.

### Pharmacology

Compound 6 was evaluated *in vitro* against newly excysted *F. hepatica* metacercariae at 146.70, 29.34, 9.68, 3.22, and 1.08  $\mu\text{M}$  concentrations.<sup>18,19)</sup> In this experiment we used the deacetylated (amine) metabolite of diamphenetide (DAMD), as a reference standard. Diamphenetide is a phenoxyalkane compound which is highly effective against early immature flukes from 1 d up to 6 weeks, at concentrations of 1.08–3.81  $\mu\text{M}$ .<sup>19)</sup> The activity was assessed by comparing the survival of flukes with the untreated control after a 4-d period of exposure to 6; the results of these studies are shown in Table 1.

For the *in vivo* evaluation two experiments were carried out. In the former, 27 crossbred sheep were infected each with 150 metacercariae; ten weeks after infection the sheep were randomly divided in three groups of 9 animals each.

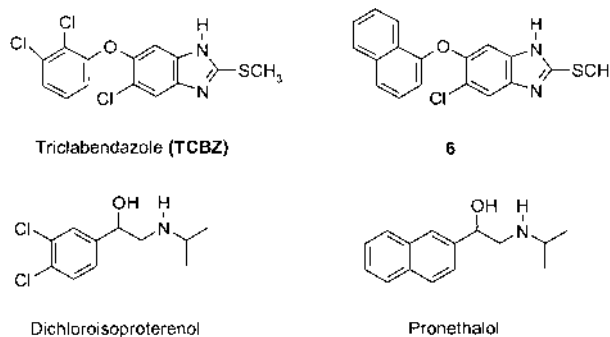


Fig. 1. Isosteric Substitution in TCBZ and Dichloroisoproterenol (DCI) That Led to 6 and Pronethalol, Respectively

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: rafaelc@servidor.unam.mx

\*\* Taken in part from the PhD thesis of Alicia Hernández-Campos.



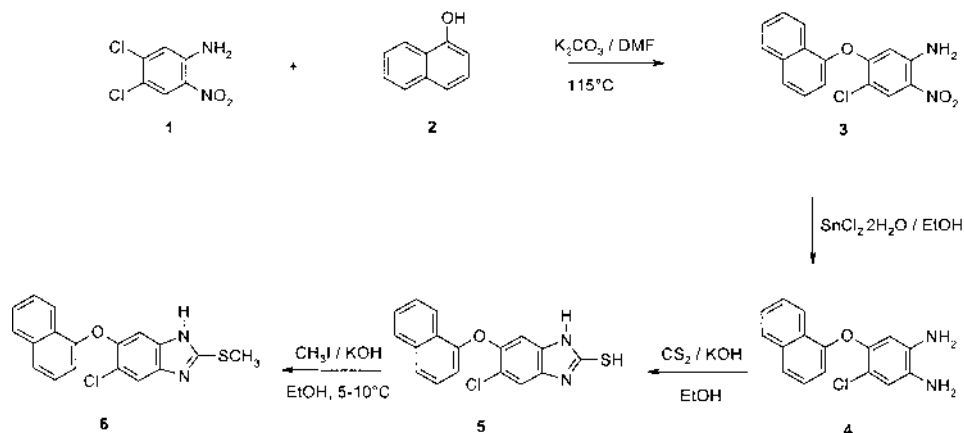


Chart 1. Synthesis of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole (**6**)

Groups 1 and 2 were treated orally with a dose of 10 and 15 mg/kg of compound **6**, respectively, in gelatin capsules. Group 3 was the untreated control. Two weeks after treatment, all sheep were killed; the flukes were collected from the liver and counted. Efficacy was determined as a percentage of fluke reduction by the treatment in comparison with the control (Table 2).<sup>12</sup>

In a second experiment, sixty 10 to 12 month-old cross-bred sheep were orally infected, each with 150 metacercariae of *F. hepatica*. The animals were divided into 12 groups of 5 each. Groups 1, 3, 5, 7, 9, and 11 with 3-d, 2-week, 4-week, 6-week, 8-week and 10-week-old flukes, respectively, were orally treated with 15 mg of **6** in a freshly prepared suspension,<sup>20,21</sup> while groups 2, 4, 6, 8, 10, and 12 remained as untreated controls. Four weeks after treatment, the animals were killed in order to collect and count the flukes in the liver. Efficacy (Table 3) was assessed as a percentage of fluke reduction in the treated groups in comparison with the control according to the formula of Forey.<sup>22</sup>

$$\% \text{ efficacy} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Where *A* is the mean number of flukes in the control group; *B* is the mean number of flukes in the treated group.

## Results and Discussion

The synthesis of compound **3** implies a nucleophilic substitution which can be carried out either by melting **1** and **2** in the presence of KOH,<sup>23</sup> or by heating the mixture at 115 °C in a polar solvent (*N,N*-dimethylformamide (DMF)), and a base ( $K_2CO_3$ ).<sup>14</sup> We used the second method; which gave higher yield % of the desired product, however, it was severely decreased by recrystallization. Washing the crude product with cold solvent gave a product of high quality and a good yield %. Compound **4** was obtained in good yield %, but the crude amine had to be stabilized with acid to avoid a fast decomposition. Although it was possible to isolate **4**, we preferred to use it immediately in the next reaction. The preparation of 2-mercaptobenzimidazoles is also a known process;<sup>16,17</sup> it was adapted here to obtain **5**. Although this compound had a poor solubility in most organic solvents, it was possible to purify it by recrystallization from AcOEt–EtOH. The reaction to obtain **6** was very fast. In this final

Table 1. Biological Activity *in Vitro* of **6** against *F. hepatica* Metacercariae<sup>a)</sup>

Concentration ( $\mu M$ )	(% Efficacy)	
	Compound <b>6</b>	Diamphenetide deacetylated
146.7	100 <sup>b)</sup>	nd
34.68 <sup>c)</sup>	nd	100
29.34 <sup>c)</sup>	100 <sup>b)</sup>	nd
9.68	77.5	nd
3.81	nd	100 <sup>d)</sup>
3.22	0.0	nd
1.08	0.0	100 <sup>d)</sup>

a) Experiment was carried out in triplicate. b) Caused lysis of the metacercariae. c) Dose equivalent to 10  $\mu g/ml$ . d) Ref. 19. nd=not determined.

Table 2. Efficacy of **6** against 10 Week-Old *F. hepatica* in Experimentally Infected Sheep at Two Dose Levels

Group (n=9)	Dose (mg/kg/bw) <sup>a)</sup> per os	Efficacy (%)
1	10	80.6
2	15	86.9
3	Non treated control	0.0

a) Body weight.

Table 3. Efficacy of **6** against *F. hepatica* of Different Ages in Experimentally Infected Sheep

Group (n=5)	Age of <i>F. hepatica</i> at the moment of treatment	Efficacy (%) at 15 mg/kg <sup>a)</sup>
1	3 d	100
2	Control	0
3	2 weeks	100
4	Control	0
5	4 weeks	100
6	Control	0
7	6 weeks	100
8	Control	0
9	8 weeks	100
10	Control	0
11	10 weeks	100
12	Control	0

a) Previously formulated.<sup>21</sup>

step, the amount of reagent and the temperature were carefully controlled; otherwise dimethylation products were formed.

The *in vitro* assay (Table 1) showed that compound **6** killed early immature flukes (1–4 d) at concentrations of 29.34–9.68  $\mu\text{M}$  (77.5%). These results motivated us to carry out *in vivo* tests.

The preliminary *in vivo* assay (Table 2) showed that compound **6** had an efficacy of 86.90% at a dose of 15 mg/kg against 10-week-old flukes. However, compound **6** was not formulated in our assay; this fact might as well have reduced significantly the efficacy.

The third trial showed that compound **6** given in an oral suspension was 100% effective (Table 3) against all stages of *F. hepatica* (3 d–12 weeks) at a dose of 15 mg/kg.

## Conclusions

The substitution of the 1-naphthyl group for the 2,3-dichlorophenyl group in TCBZ gives a bioisostere of this potent fasciolicide. The *in vitro* assay showed that compound **6** is very active and capable of disrupting the metacercariae. Compound **6** showed good activity when it was administered in a suspension. At a dose of 15 mg/kg it was 100% effective against 3-d and 10-week-old flukes. The results so far obtained are promising, since most fasciolicidal agents such as rafoxanide, nitroxylin, closantel or clorsulon act only against 6-week-old flukes or older; or at the immature stage, as diamphenetide.<sup>1)</sup> Further studies are in progress in order to get a better formulation and to optimize the dose. The determination of the efficacy of **6** in cattle is in progress as well.

## Experimental

Melting points were determined on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on 0.2 mm pre-coated silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (E. Merck). IR spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR-1600 spectrometer as KBr disks. <sup>1</sup>H-NMR spectra were measured with a Varian EM-390 (300 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given in ppm relative to Me<sub>4</sub>Si ( $\delta=0$ ) in DMSO-*d*<sub>6</sub>. *J* values are given in Hz. The following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet; br, broad. MS were recorded on a JEOL JMS-SX102A spectrometer by electron impact (EI) low and high resolution (HR). Elemental analyses were carried out on a FISON EA11108 CHNSO analyzer. Starting material **1** was synthesized in our laboratory from the commercially available 3,4-dichloroaniline via acetylation, nitration and hydrolysis of the nitroacetanilide.

**4-Chloro-5-(1-naphthoxy)-2-nitroaniline (3)** A suspension of **1** (100 g, 0.483 mol), **2** (70.33 g, 0.487 mol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 g, 0.724 mol), and DMF (360 ml) was stirred at 115 °C for 3.5 h. Then the mixture was cooled at room temperature and filtered by suction. The residue was washed with hot DMF (300 ml) and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was washed with cold methanol (300 ml) twice, and the orange solid was airdried to give 108.0 g (71%) of essentially pure **3**. An analytical sample was recrystallized from toluene–ethanol affording 98% of yellow crystals. mp 145–146 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3462, 3347, 1628, 1560, 1387, 1320, 1225. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.22 (1H, s, H-6), 7.37 (1H, dd, *J*<sub>1</sub>=7.5 Hz, *J*<sub>2</sub>=1.0 Hz, H-2'), 7.44 (2H, br, NH<sub>2</sub>), 7.55–7.64 (3H, m, H-3, H-6', H-7'), 7.79 (1H, dd, *J*<sub>1</sub>=8.0 Hz, *J*<sub>2</sub>=2.4 Hz, H-5'), 7.93 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4'), 8.05 (1H, dd, *J*<sub>1</sub>=7.2 Hz, *J*<sub>2</sub>=1.8 Hz, H-8'), 8.18 (1H, s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 103.59 (C-6), 109.54 (C-4), 117.14 (C-2'), 120.73 (C-5'), 125.69 (C-8'a), 125.79 (C-4'a), 129.99 (C-4'), 126.26 (C-6'), 127.06 (C-3'), 127.12 (C-3), 127.15 (C-7'), 128.26 (C-8'), 134.77 (C-2), 146.91 (C-1), 149.14 (C-1'), 159.04 (C-5). MS EI *m/z* 314 (M<sup>+</sup>), 279, 233. HR-MS (EI) Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>) *m/z*: 314.0458. Found: 314.0458. Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 61.06; H, 3.52; N, 8.90. Found: C, 61.18; H, 3.58; N, 8.62.

**4-Chloro-5-(1-naphthoxy)-1,2-phenylenediamine (4)** A mixture of **3** (100 g, 0.317 mol), SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (430 g, 1.9 mol), and EtOH (640 ml) was stirred at 70 °C for 3 h in a nitrogen atmosphere. After cooling, the mixture

was basified (pH=9) with a 50% NaOH solution. The solvent was removed carefully *in vacuo*, and the solid residue was extracted with AcOEt (200 ml×3). The combined organic extracts were washed with brine, dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give 89.6 g (99.08%) of **4** as an oil, which was immediately cyclocondensed in the next step. An analytical sample, which was dissolved in anhydrous ethanol, was converted into the monohydrochloride by treatment with HCl gas; the solid formed was separated *in vacuo*, washed with ethanol and recrystallized from ethanol to give yellow crystals. mp 195–197 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3461, 3345, 1629, 1493, 1227, 766. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.80 (4H, br, 2NH<sub>2</sub>), 6.50 (1H, s, H-6), 6.89 (1H, dd, *J*<sub>1</sub>=7.6, *J*<sub>2</sub>=0.9, H-2'), 7.53 (1H, s, H-3), 7.47 (1H, t, *J*<sub>1</sub>=8.1, *J*<sub>2</sub>=7.8 Hz, H-3'), 7.50–7.61 (2H, m, H-6', H-7'), 7.73 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4'), 7.95–8.02 (2H, m, H-5', H-8'). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 108.51 (C-6), 112.38 (C-4), 112.90 (C-2'), 119.10 (C-8'a), 121.12 (C-8'), 123.67 (C-3), 123.82 (C-4'), 125.39 (C-4'a), 126.13 (C-3'), 126.52 (C-6'), 126.93 (C-7'), 127.98 (C-5'), 134.59 (C-2), 137.96 (C-1), 150.16 (C-1'), 151.58 (C-5). MS (EI) *m/z*: 284 (M<sup>+</sup>), 232. HR-MS (EI) Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O (M<sup>+</sup>) *m/z*: 284.0716. Found: 284.0716. Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O·HCl: C, 59.83; H, 4.39; N, 8.72. Found: C, 59.80; H, 4.38; N, 8.67.

**5-Chloro-2-mercapto-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole (5)** A solution of **4** (50 g, 0.175 mol) in 250 ml of EtOH:H<sub>2</sub>O (80:20), KOH (14.77 g, 0.263 mol), and CS<sub>2</sub> (15.84 ml, 20.05 g) was stirred at 70 °C for 3 h under a N<sub>2</sub> atmosphere. During this time a yellow precipitate was formed. The cold mixture was poured into 600 ml of H<sub>2</sub>O and treated with 20% AcOH solution to a pH 5–6. The precipitate was separated by suction filtration, washed with water and dried in an oven at 90 °C. The crude product was purified by recrystallization from AcOEt–EtOH and activated carbon twice to give 41.82 g (73%) of **5** as a white powder. mp 273–275 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3380, 3053, 1460, 1391, 1328, 1229, 1157. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.75 (1H, dd, *J*<sub>1</sub>=6.6, *J*<sub>2</sub>=2.0, H-2'), 6.84 (1H, s, H-7), 7.34 (1H, s, H-4), 7.40 (1H, t, *J*<sub>1</sub>=8.1 Hz, *J*<sub>2</sub>=8.1 Hz, H-3'), 7.54–7.62 (2H, m, H-6', H-7'), 7.68 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-4'), 7.95–8.00 (1H, m, H-5'), 8.13–8.17 (1H, m, H-8'), 12.60 (1H, s, NH or SH), 12.72 (1H, s, NH or SH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 102.27 (C-7), 110.60 (C-2'), 110.95 (C-4'), 118.96 (C-5), 121.19 (C-6'), 123.04 (C-4), 124.97 (C-8'a), 126.01 (C-8'), 126.31 (C-7'), 126.89 (C-5'), 127.82 (C-3'), 129.57 (C-4'a), 132.04 (C-3a), 134.46 (C-7a), 147.10 (C-1'), 152.66 (C-6), 169.66 (C-2). MS (EI) *m/z* 326 (M<sup>+</sup>), 291, 290. HR-MS (EI) Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS (M<sup>+</sup>) *m/z*: 326.0280. Found: 326.0281. Anal. Calcd for: C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS: C, 62.48; H, 3.39; N, 8.57; S, 9.81. Found: C, 62.49; H, 3.29; N, 8.44; S, 9.93.

**5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole (6)** A suspension of 100 g (0.3059 mol) of **5** in acetone (300 ml) was treated with a solution of KOH (18.8 g, 0.336 mol) in water (50 ml), at room temperature, under a N<sub>2</sub> atmosphere. The dark solution formed was cooled to 0–5 °C and treated slowly (1 h) with a solution of CH<sub>3</sub>I (43.41 g, 0.3059 mol) in acetone (43 ml). The mixture was stirred at 10 °C for 30 min, neutralized with 20% HCl solution, and the solvent was eliminated *in vacuo*. The solid residue was taken up with 400 ml of AcOEt, washed with brine, dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated up to 200 ml. To the concentrated solution was added an equal volume of methanol and it was stirred in a cold bath. The resulting precipitate was collected, washed with methanol and dried. The crude product was recrystallized from CHCl<sub>3</sub>–MeOH to give 86.22 g (82.70%) of **6** as white powder. mp 192–195 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3402, 2720, 1453, 1316, 1157. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.84 (3H, s, S–CH<sub>3</sub>), 6.48 (1H, br, NH), 6.77 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-2'), 7.29 (1H, s, H-4), 7.40 (1H, t, *J*<sub>1</sub>=7.8 Hz, *J*<sub>2</sub>=8.1 Hz, H-3'), 7.53–7.66 (2H, m, H-6', H-7'), 7.70 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-4'), 7.89 (1H, s, H-7), 7.94–8.20 (1H, m, H-5'), 8.12–8.22 (1H, m, H-8'). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.46 (S–CH<sub>3</sub>), 102.95 (C-7), 110.20 (C-2'), 113.16 (C-4), 119.70 (C-8'), 120.83 (C-5), 122.04 (C-4'), 123.80 (C-8'a), 124.12 (C-3'), 124.66 (C-6'), 125.25 (C-7'), 126.21 (C-5'), 128.72 (C-4'a), 131.34 (C-3a), 133.08 (C-7a), 148.05 (C-1'), 150.75 (C-2), 152.03 (C-6). MS (EI) *m/z* 340 (M<sup>+</sup>), 305, 290. HR-MS (EI) Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS (M<sup>+</sup>) *m/z*: 340.0437. Found: 340.0437. Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS: C, 63.43; H, 3.84; N, 8.22; S, 9.41. Found: C, 62.82; H, 3.69; N, 7.97; S, 9.86.

**Acknowledgements** We thank CONACYT for the financial support of project 34942B. We also thank DGAPA for the financial help of projects IN227998 and IN204998. We are grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán and Marisela Gutiérrez, from the School of Chemistry, UNAM, for the determination of all spectra, and Socorro Alpizar, from the Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, for the formulations. We are very grateful to Dr. Eugene Bratoeff for critical review of the manuscript.

## References and Notes

- 1) Fairweather I., Boray J. C., *Vet. J.*, **158**, 81—112 (1999).
- 2) Chen M. G., Mott K. E., *Trop. Dis. Bull.*, **1990**, R1—R37 (1990).
- 3) Boray J. C. "Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis," ed. by Boray J. C., MSD AGVET Rahway, New Jersey, 1997, pp. 83—89.
- 4) Thorpe P. J., *Drugs Future*, **9**, 593—594 (1984).
- 5) Boray J. C., Crowfoot P. D., Strong M. B., Allison J. R., Schellenbaum M., Von Orelli M., Sarisin G., *Vet. Rec.*, **113**, 315—317 (1983).
- 6) Wolf K., Eckert J., Schneider G., Lutz H., *Vet. Parasitol.*, **13**, 145—150 (1983).
- 7) Craig T. M., Huey R. L., *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1644—1645 (1984).
- 8) Arjona R., Riancho J. A., Aguado J. M., Salesa R., Gonzalez-Macias J., *Medicine* (Baltimore), **74**, 13—23 (1995).
- 9) Apt W., Aguilera X., Vega F., Miranda C., Zulantay I., Perez C., Gabor M., Apt P., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**, 532—535 (1995).
- 10) el-Karakasy H., Hassanein B., Okasha S., Behairy B., Gadallah I., *J. Trop. Pediatr.*, **45**, 135—138 (1999).
- 11) Ibarra-Velarde F., García-Sánchez E., Fernández-Ruvalcaba M., Vera-Montenegro Y., Castillo R., Hernández-Campos A., *Vet. Méx.* **28**, 291—296 (1997).
- 12) Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., Hernández-Campos A., Castillo R., *R. Vet. Méx.* **28**, 297—301 (1997).
- 13) Black J. W., Stephenson J. S. *Lancet*, **ii**, 311—314 (1962).
- 14) Averkin E. A., Beard C. C., Dvorak C. A., Edwards J. A., Fried J. H., Kilian J. G., Schiltz R. A., Kistner T. P., Drudge J. H., Lyons E. T., Sharp M. L., Corwin R. M. J., *J. Med. Chem.*, **18**, 1164—1166 (1975).
- 15) Manjarrez N., Luna H. M., Pérez H. I., Soria O., *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **30**, 52—54 (1986).
- 16) Van Allan J. A., Deacon B. D., "Organic Syntheses Collective Volume," Vol. IV, ed. by Rabjohn N., John Wiley and Sons, N.Y., 1976, pp. 569—570.
- 17) Ciba-Geigy A. G., Belg. Pat. 865870 (1978) [*Chem. Abstr.*, **90**, 137817 z (1979)].
- 18) Ibarra O. F., Jenkins D. C., *Z. Parasitenk.*, **70**, 655—671 (1984).
- 19) Sánchez E. B., Ibarra V. F., *Tec. Pec. Méx.*, **25**, 397—403 (1988).
- 20) Ibarra-Velarde F., Montenegro-Cristino N., Flores-Crespo J., Hernández-Campos A., Castillo R., *Vet. Méx.*, **31**, 47—51 (2000).
- 21) The freshly prepared suspension contained: compound **6** (10 g), pectin (1.5 g), low viscosity carboxymethylcellulose (0.5 g), medium viscosity carboxymethylcellulose (0.5 g), USP saccharine (0.2 g), methylparaben (0.5 g), propylparaben (0.03 g), and water to make 100 ml.
- 22) Forey W. S., *Vet. Parasitol.*, **26**, 265—271 (1988).
- 23) Frick W. E., Weiss A. G., Wenger T., Traber W., U.S. Pat. 3506767 (1968) [*Chem. Abstr.*, **69**, 37061w (1968)].
- 24) Bennett J. L., Köhler P., *Exp. Parasitol.*, **63**, 49—57 (1987).

## Studies on the selective S-oxidation of albendazole, fenbendazole, triclabendazole, and other benzimidazole sulfides

Olivia Soria-Arteche,<sup>1\*</sup> Rafael Castillo,<sup>2</sup> Alicia Hernández-Campos,<sup>2</sup> Marcela Hurtado-de la Peña,<sup>1</sup> Gabriel Navarrete-Vázquez,<sup>2,3</sup> José Luis Medina-Franco,<sup>2</sup> Kathia Gómez-Flores.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento Sistemas Biológicos, DCBS. UAM-Xochimilco, México, D.F 04960, México. Email: soriao@correo.xoc.uam.mx

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CU, México D.F. 04510, México

<sup>3</sup>Facultad de Farmacia, UAEM, Cuernavaca, Morelos 62210, México

**Abstract.** The selective S-oxidation of albendazole, fenbendazole, and other benzimidazole sulfides with sodium periodate in acid medium, afforded the corresponding sulfoxides or sulfones. In contrast, triclabendazole and other 2-methylthiobenzimidazole derivatives could not be S-oxidized under the same smooth conditions with this reagent, but with MCPBA, a stronger oxidizing agent.

**Key words:** Albendazole, fenbendazole, triclabendazole, metabolites, S-oxidation.

**Resumen.** La oxidación selectiva de albendazol, fenbendazol, y otros sulfuros benzimidazólicos con peryodato de sodio en medio ácido da los correspondientes sulfoxidos y sulfonas. En contraste, triclabendazol y otros derivados de 2-metilthiobenzimidazoles no pueden ser oxidados bajo las mismas condiciones suaves con este reactivo, pero sí con un agente oxidante fuerte como MCPBA.

**Palabras clave:** Albendazol, fenbendazol, triclabendazol, metabolitos, S-oxidación.

### Introduction

A large group of wide spectrum, high efficiency anthelmintics, such as the benzimidazole 2-carbamates (BZC), is marketed worldwide for the control of helminthiasis. It has been reported that BZC with a sulfide group are the most active against intestinal nematodes in humans, as well as in animals [1-3]. Included among these anthelmintics are albendazole **1**, fenbendazole **2** and triclabendazole **3** (Figure 1).

Benzimidazole sulfides **1**, **2**, and **3** undergo first pass bio-transformation in the organism where the sulphur atom is oxidized to produce the active antiparasitic sulfoxides **4** [1,4,5], **6** [6-7], and **8** [8,9], respectively. Further oxidation produces the inactive sulfones **5**, **7** or **9**.

Metabolites **4,5** and **7** are commercially available but not easily affordable. Not so for **6**, which is easily available at a relatively low price. Although there are reports in the pertinent literature for the synthesis of **4**, **5** [1,10,11 12]; **6**, **7** [2]; and **8**, **9** [13], in addition to the general methods of S-oxidation [13], these are not easy to carry out, or fail, due to insolubility problems in **1-3**, which often leads to mixtures of sulfoxides and

sulfones that are difficult to separate. The need of these metabolites in helminthiasis chemotherapy research [2,3,5] makes the development of new preparation methods highly desirable, in particular, those that employ common reagents, mild reaction conditions and convenient working procedures.

In this paper we present an efficient, high yield method for the selective S-oxidation of **1**, **2** and **3** to obtain **4-8**, as well as the selective S-oxidation of other benzimidazole sulfides **10**, **12** and **17** to obtain **11**, **13** and **18**, respectively (cf. Figures 2 and 3). In these studies, sodium periodate in acid medium was used as the oxidizing agent. This reagent does not over-oxidize **1** under low temperature conditions [15-17]. In addition, aqueous mixtures of acetic acid-acetonitrile were used as solvent, which allowed carrying out the reactions at different temperature conditions for better control, thus avoiding over oxidation.

### Results and Discussion

The results of the oxidation reactions of **1-3**, **10**, **12** and **17** are shown in Table 1.

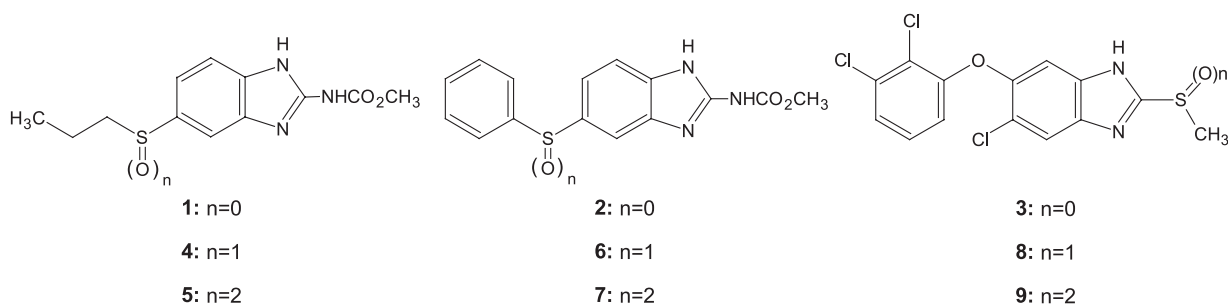


Fig. 1. Structure of albendazole **1**, fenbendazole **2**, triclabendazole **3**, and their metabolites.

**Table 1.** Oxidation reactions, conditions and results

Compound Equivalents	NaIO <sub>4</sub>	Solvent (°C)	Temperature	Yield (%)	Product
<b>1</b>	1.00	CH <sub>3</sub> COOH/H <sub>2</sub> O	0-5	<b>4</b>	97
<b>1</b>	2.50	CH <sub>3</sub> COOH/H <sub>2</sub> O	25	<b>5</b>	90
<b>2</b>	1.10	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	15	<b>6</b>	95
<b>2</b>	2.80	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	60	<b>7</b>	67
<b>3</b>	1.00	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	60	<b>8</b>	0
<b>10</b>	1.09	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	0-5	<b>11</b>	90
<b>12</b>	1.00	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	60	<b>13</b>	0
<b>17</b>	1,00	CH <sub>3</sub> COOH/CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	0-5	<b>18</b>	80

Oxidation of **1** with sodium periodate in acetic acid to obtain albendazole sulfoxide **4** was studied under several temperature conditions. At -10°C it was necessary to add acetonitrile as co-solvent to avoid precipitation of **1** and to complete its oxidation; however, the reaction was incomplete. On the other hand, at 25°C, a mixture of **1**, **4** and **5** was produced. The best results were obtained when the reaction was carried out in acetic acid-water at 0-5°C, in this case, **4** was obtained as the only product in 97% yield. Its <sup>1</sup>H NMR spectrum showed a multiplet at 2.72-2.86 ppm, characteristic of the diastereotopic α-methylene hydrogens next to the chiral sulfoxide. The mass spectrum showed a peak at *m/z* 281, which is in agreement with the molecular ion of **4**. The purity of **4** was confirmed by HPLC. Only one peak with a 6.75 min retention time was observed.

When **1** was oxidized with excess of sodium periodate at 25°C for longer periods of time, sulfone **5** was the only product obtained in a 90% yield. The <sup>1</sup>H NMR spectrum now showed a triplet at 3.21 ppm for the nondiastereotopic α-methylene hydrogens next to the sulfone group. The mass spectrum showed the molecular ion peak of **5** at *m/z* 297. The purity was confirmed by HPLC, a single peak with a 5.21 min retention time was observed.

Encouraged by these results, we decided to test the periodate oxidation method with compounds **2**, **3** and other benzimidazole sulfides, **10** and **12**, which are currently being studied as experimental new antiparasitic agents (Figure 2).

Oxidation of **2** at 15°C gave sulfoxide **6** in a 95% yield. Its structure was confirmed by mass spectrometry. When the

temperature and the equivalents were increased (60°C, 2.8 eq.), sulfone **7** was obtained as the only product in a 67% yield.

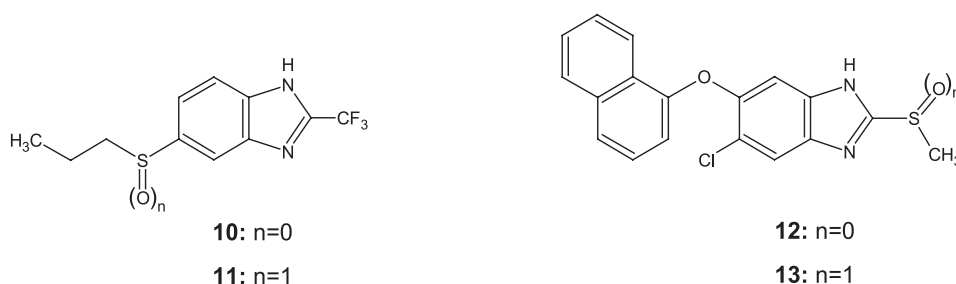
In order to increase the solubility of **3** and prevent its precipitation, the oxidation reaction with sodium periodate was undertaken with acetonitrile as co-solvent; however, although a solution was attained, no change in **3** was observed, even at 20°C. In this case, we had to use *m*-chloroperbenzoic acid (MCPBA), a stronger oxidizing agent, and obtained **8** at 0-5°C [18].

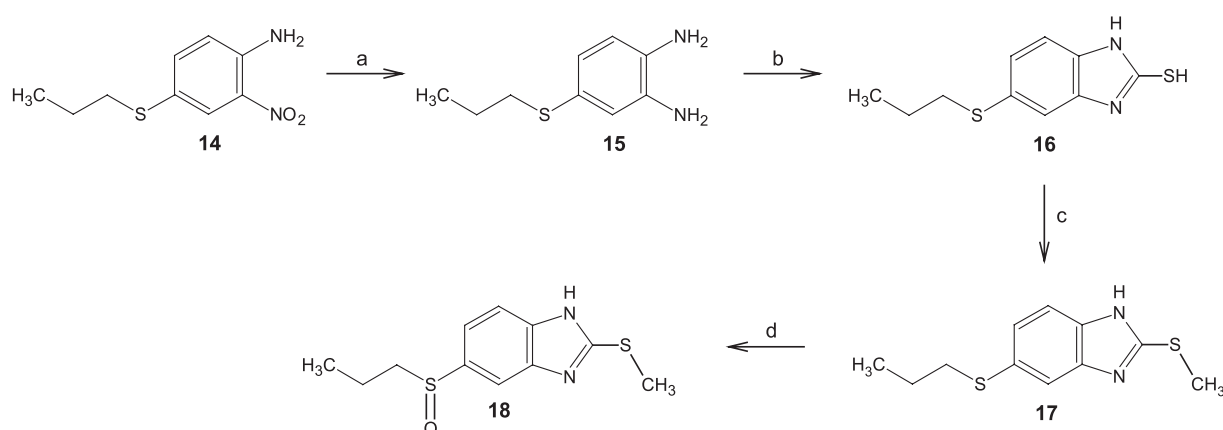
In the case of compound **10**, the oxidation with sodium periodate in acetic acid-acetonitrile proceeded smoothly at 0-5°C to afford sulfoxide **11** in a 90% yield.

The oxidation of **12** to the sulfoxide **13** also failed with sodium periodate, but it was easily achieved with MCPBA. The lower reactivity of sulfides such as **3** and **12** can be attributed to a reduced electron density on sulfur because of the inductive effect of the imidazole ring nitrogen atoms. This contention is supported by the regiospecific and high yielding oxidation of the bis-sulfide **17** (Scheme 1 [19, 20]; see **Experimental** section for details of synthesis) to the monosulfoxide **18**, and by electron density calculations (Fig. 3).

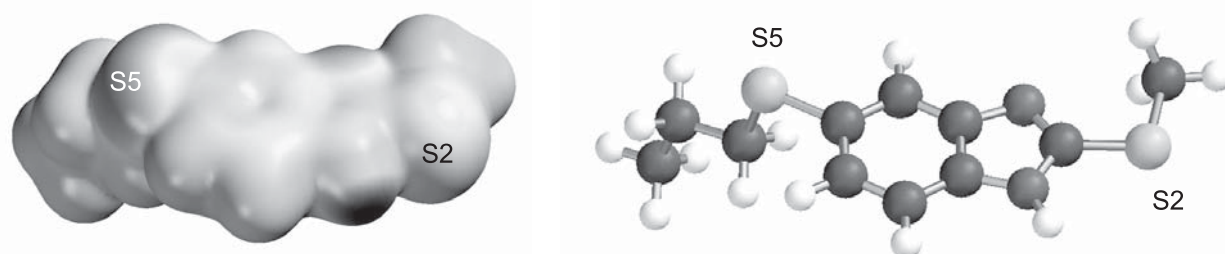
## Conclusions

A practical, mild and efficient method for the *S*-oxidation of albendazole **1**, fenbendazole **2**, and benzimidazole sulfide **10** was developed. The method consists in treating a cold solu-

**Fig. 2.** Benzimidazole sulfides used as experimental antiparasitic agents and their sulfoxides.



**Scheme 1.** Reagents: (a)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EtOH; (b)  $\text{CS}_2$ , KOH, EtOH; (c)  $\text{CH}_3\text{I}$ , KOH,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ; (d)  $\text{NaIO}_4$ .



**Fig. 3.** Molecular surface of **17** showing the potential energy calculated at RHF/6-31G(*d,p*) level. Darker zones represent either more positive or more negative regions. The sulphur atom of the propylthio group (S5, charge -0.366) corresponds to a darker zone than the sulphur atom of the methylthio group (S2, charge -0.211).

tion of these compounds with sodium periodate to generate the corresponding sulfoxides. The related sulfones were obtained at higher temperatures. In the case of 2-(methylthio)benzimidazoles, such as triclabendazole **3**, the S-oxidation was achieved with MCPBA, a stronger oxidizing agent.

## Experimental

Melting points were determined on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on 0.2 mm precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (E. Merck). Infra-red spectra were recorded in a Perkin-Elmer FT-IR-1600 spectrometer on KBr pellets, the absorption bands are given  $\text{cm}^{-1}$ . MS were recorded on a JEOL JMS-SX102A spectrometer by electron impact (EI) of low and high resolution (HR-MS), and FAB<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR spectra were measured with a Varian model EM-390 (300 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given in ppm relative to  $\text{Me}_4\text{Si}$  ( $\delta=0$ ) used as internal standard. The solvent employed was  $\text{DMSO}-d_6$ , except for **11** and **17** that was  $\text{CDCl}_3$ . *J* values are given in Hz. The following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet;

sext, sextuplet; m, multiplet; bs, broad signal. HPLC analyses were performed in a Perkin Elmer serie 200LC, UV 785A detector: column C-8, mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_3\text{COOH}$  (40:40:19.4:0.6). Starting materials **1**, **2**, and **3** were obtained commercially, where as **10**, **12**, and **14** were synthesized in our laboratories.

**General method for the synthesis of propylsulfinyl derivatives (4, 6, 11 and 18) and propylsulfonyl derivatives (5, 7).** Into a stirred solution of **1**, **2**, **10**, or **17** in AcOH or AcOH/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1) was slowly added, dropwise, a solution of  $\text{NaIO}_4$  in a mixture of  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ . The mixture was stirred, then, the solvent removed *in vacuo* without heating. The progress of the reaction was monitored by TLC. The residue was suspended in brine and neutralized with a saturated solution of potassium carbonate, the resulting suspension was filtered, and the residue washed with water and air dried.

**Methyl 5-[(propylsulfinyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (4).** Following the general procedure, **1** (0.5 g, 1.89 mmol) in 6.5 mL AcOH and  $\text{NaIO}_4$  (0.403 g, 1.89 mmol) in 14 mL of  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$  (5:2) were stirred at 0–5°C for 2 h and gave **4**

(0.514 g, 97%) as a white powder. Mp 218-220°C. TLC (Toluene-THF-AcOH, 5:1:1). IR  $\nu_{\max}$  3169 (NH), 1730 (C=O), and 1028 (SO). MS EI ( $m/z$ ): 281 ( $M^+$ ), HR-MS (EI) Calcd for  $C_{12}H_{15}N_3O_3S$  ( $M^+$ )  $m/z$ : 281.0834, found: 281.0820.  $^1H$ -NMR: 0.95 (3H, t,  $J=7.20$ ,  $CH_3CH_2CH_2SO$ ), 1.42-1.66 (2H, m,  $CH_2CH_2SO$ ), 2.72-2.86 (2H, m,  $CH_2SO$ ), 3.79 (3H, s,  $CH_3O$ ), 7.33 (1H, dd,  $J=8.0$ ,  $J=1.4$ , H-6), 7.57 (1H, d,  $J=8.0$ , H-7), 7.72 (1H, d,  $J=1.4$ , H-4), and 11.90 (H, bs, NH, int.  $D_2O$ ). HPLC:  $rt=6.75$  min.

**Methyl [5-(propylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (5).** Following the general procedure, **1** (1.0 g, 3.76 mmol) in 15 mL of AcOH and  $NaIO_4$  (2.015 g, 9.42 mmol, 2.5 eq.) in 25 mL of  $H_2O/AcOH$  (4:1) were stirred at 25°C for 22 h and gave **11** (1.01 g, 90%) as a white powder. Mp: 226-227°C. TLC (Toluene-THF-AcOH, 5:1:1). IR  $\nu_{\max}$  3352 (NH), 1731 (C=O), 1276 and 1131 ( $SO_2$ ). MS (EI) ( $m/z$ ): 297 ( $M^+$ ). HR-MS (EI) calcd for  $C_{12}H_{15}N_3O_4S$  ( $M^+$ ) 297.0783. Found: 297.0792.  $^1H$ -NMR: 0.89 (3H, t,  $J=7.5$ ,  $CH_3CH_2CH_2SO_2$ ), 1.55 (2H, sext,  $J=7.5$ ,  $CH_2CH_2SO_2$ ), 3.22 (2H, t,  $J=7.5$ ,  $CH_2SO_2$ ), 3.80 (3H, s,  $CH_3O$ ), 7.58 (1H, dd,  $J=8.2$ ;  $J=1.5$ , H-6); 7.62 (1H, d,  $J=8.2$ , H-7), 7.91 (1H, s, H-4); and 12.06 (bs, NH, int.  $D_2O$ ). HPLC:  $rt=5.21$  min.

**Methyl [5-(phenylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (6).** Following the general procedure, **2** (0.5 g, 1.67 mmol) in 13 mL of AcOH/ $CH_3CN$  and  $NaIO_4$  (0.393 g, 1.84 mmol) in 6 mL of  $H_2O/AcOH$  (5:2) were stirred at 15°C for 2 h and gave **6** (0.527 g, 95%) as a pale pink solid, after recrystallization from  $CHCl_3$ . Mp 253.9°C. TLC (Toluene-THF-AcOH, 5:1:1). IR  $\nu_{\max}$  3388 (NH), 1721 (C=O), 1047 (SO). MS (EI) ( $m/z$ ): 315 ( $M^+$ ). HR-MS (EI) calcd for  $C_{20}H_{13}N_3O_3S$  ( $M^+$ )  $m/z$ : 315.0678. Found: 315.0677.  $^1H$ -NMR: 3.76 (3H, s,  $CH_3O$ ), 7.36 (1H, dd,  $J=8.4$ ;  $J=1.35$ , H-6), 7.4-7.55 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.66 (1H, d,  $J=8.4$ , H-7), 7.73 (1H, d,  $J=1.35$ , H-4), and 11.86 (s, NH, int.  $D_2O$ ).

**Methyl [5-(phenylsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (7).** Following the general procedure, **2** (0.16 g, 0.54 mmol) in 15 mL of AcOH/ $CH_3CN$  and  $NaIO_4$  (0.285 g, 1.34 mmol) in 4.5 mL of  $H_2O/AcOH$  (4:1) were stirred at 60°C for 24 h and gave **7** (0.113 g, 67%) as a pale pink solid. Mp: 319.8-321.1°C. TLC (Toluene-THF-AcOH, 5:1:1). IR  $\nu_{\max}$  3342 (NH), 1731 (C=O), 1268, and 1047 ( $SO_2$ ). MS (FAB) ( $m/z$ ): 332 ( $M+1$ ), HR-MS calcd for  $C_{15}H_{14}N_3O_4S$  ( $M^+$ )  $m/z$ : 331.0627, found: 332.0726.  $^1H$ -NMR: 3.74 (3H, s,  $CH_3O$ ), 7.36 (1H, dd,  $J=8.4$ ,  $J=1.8$ , H-6), 7.48-7.53 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.49 (1H, dd,  $J=8.4$ ,  $J=0.6$ , H-7), 7.73 (1H, d,  $J=1.8$ , H-4), and 11.81 (s, NH, int.  $D_2O$ ).

**5-(Propylsulfonyl)-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (11).** Following the general procedure, **10** (0.40 g, 1.54 mmol) in 8 mL of AcOH/ $CH_3CN$  and  $NaIO_4$  (0.328 g, 1.69 mmol, 1.09 eq.) in 16 mL of  $H_2O/AcOH$  (5:2) were stirred at 60°C for 2 h and gave **11** (0.381 g, 90%) as a white powder, after recrystallization from cyclohexane-toluene. Mp: 123.2-125.2°C. TLC (EtOAc-Hexane, 5:1). IR  $\nu_{\max}$  3425 (NH), 1015

(SO). MS ( $m/z$ ): 276 ( $M^+$ ), HR-MS (EI) calcd for  $C_{11}H_{11}F_3N_2OS$  ( $M^+$ )  $m/z$  276.0544, found: 276.0546.  $^1H$ -NMR: 1.06 (3H, t,  $J=7.34$ ,  $CH_3CH_2CH_2SO$ ), 1.60-1.90 (2H, m,  $CH_2CH_2SO$ ), 2.83-3.0 (2H, m,  $CH_2SO$ ), 7.48 (1H, d,  $J=7.9$ , H-6), 7.89 (1H, d,  $J=7.9$ , H-7), 8.25 (1H, s, H-4), and 10.58 (1H, bs, NH int.  $D_2O$ ).

**2-(Methylthio)-5-(propylsulfonyl)-1H-benzimidazole (18).** Following the general procedure, **17** (0.105 g, 0.44 mmol) in 10 mL of AcOH/ $CH_3CN$  and  $NaIO_4$  (0.094 g, 0.44 mmol) in 2 mL of  $H_2O/AcOH$  were stirred for 2 h and gave **18** (0.900 g, 80%) as a white powder, after recrystallization from AcOEt-Et<sub>2</sub>O. Mp: 100.1-100.5°C. TLC ( $CHCl_3-CH_3OH$ , 95.5:0.5). IR  $\nu_{\max}$  3392 (NH) and 1083 (S=O). MS (EI)  $m/z$  254 ( $M^+$ ). HR-MS (EI) calcd for  $C_{11}H_{14}N_2OS_2$  ( $M^+$ )  $m/z$  254.0548. Found: 254.0560.  $^1H$ -NMR: 0.99 (3H, t,  $J=7.34$ ,  $CH_3CH_2CH_2SO$ ), 1.47-1.79 (2H, m,  $CH_2CH_2SO$ ), 2.75 (3H, s,  $CH_3S$ ), 2.68-2.87 (2H, m,  $CH_2SO$ ), 7.38 (1H, dd,  $J=8.4$ ,  $J=1.5$ , H-6), 7.58 (1H, dd,  $J=8.4$ ,  $J=0.6$ , H-7), and 7.69 (1H, dd,  $J=1.5$ ,  $J=0.6$ , H-4), and 13.2 (bs, NH, int.  $D_2O$ ).

**5-Chloro-6-(2,3-dichlorophenoxy)-2-(methylsulfonyl)-1H-benzimidazole (8).** To a stirred solution of **3** (0.50 g, 1.37 mmol) in 50 mL of  $CHCl_3$  was slowly added, dropwise, a solution of MCPBA (0.338g, 1.37 mmol) in 4 mL of  $CHCl_3$  at 0-5°C. The progress of the reaction was monitored by TLC ( $CHCl_3-MeOH$ , 95.5:0.5). At the end of the reaction the solvent was removed *in vacuo* without heating, the residue was suspended in brine and neutralized with a saturated solution of potassium carbonate. The mixture was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3x20 mL). The combined organic extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo* to give **8** (0.389 g, 75%) of a white soapy powder. Mp: 176-178°C. IR  $\nu_{\max}$ : 3168 (NH), 1050 (SO). MS (EI) ( $m/z$ ): 376 ( $M^+$ ). HR-MS (EI) Calcd for  $C_{14}H_9Cl_3N_2O_2S$  ( $M^+$ )  $m/z$  375.9450. Found: 375.9422.  $^1H$ -NMR: 3.083 (3H, s,  $CH_3SO$ ), 6.75 (1H, d,  $J=8.4$ , H-6'), 7.28 (1H, t,  $J=8.0$ ,  $J=8.4$ , H-5'), 7.40 (1H, dd,  $J=8.0$ ,  $J=0.8$ , H-4'), 7.47 (1H, s, H-7), 7.93 (1H, s, H-4), and 13.82 (bs, NH, int.  $D_2O$ ).

**5-Chloro-2-(methylsulfonyl)-5-(1-naphthyl)-1H-benzimidazole (13).** Into a stirred solution of **12** (0.50 g, 1.476 mmol) in 20 mL of  $CHCl_3$  was slowly added, dropwise, a solution of MCPBA (0.394 g, 1.37 mmol) in 15 mL of  $CHCl_3$  at 0-5°C. The progress of the reaction was monitored by TLC ( $CHCl_3-MeOH$ , 97:3). When the reaction was completed, it was treated with a solution of  $NaHCO_3$  until pH 7. Afterwards, the mixture was extracted with  $CHCl_3$  (30 X 3 mL). The combined organic extracts were dried with anhydrous sodium sulphate, filtered and evaporated *in vacuo* to give **13** as a white soapy powder. The solid was recrystallized from ethanol-benzene 1:1 to give 0.381 g (72.43%) of a white powder. Mp 189-190°C. IR  $\nu_{\max}$  3422 (NH), 1048 (SO). MS (EI) ( $m/z$ ): 356 ( $M^+$ ). HR-MS (EI) Calcd for  $C_{18}H_{13}ClN_2O_2S$  ( $M^+$ )  $m/z$  356.0386 Found: 356.0380  $^1H$ -NMR: 3.079 (3H, s,  $CH_3SO$ ), 6.702 (1H, d,  $J=7.5$ , H-2'), 7.376 (1H, s, H-4), 7.403 (1H, t,

$J=8.1$ , H-3'), 7.558-7.628 (2H, m, H-6', H-7'), 7.692 (1H, d,  $J=8.4$ , H-4'), 7.972 (1H, s, H-7), 7.990-8.003 (1H, m, H-5'), 8.180-8.214 (1H, m, H-8'), and 14.121 (bs, NH, int. D<sub>2</sub>O).

**4-(Propylthio)-*o*-phenylenediamine (15).** A stirred mixture of **14** (0.5 g, 2.35 mmol), SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (3.18 g, 14.13 mmol) and 5 mL of absolute ethanol was heated at 80°C under N<sub>2</sub> for 2 h. The progress of the reaction was monitored by TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 95.5:0.5), and once finished, it was allowed to reach room temperature, then, it was neutralized with a 50% NaOH solution and filtered. The residue of tin salts was dried under vacuum and extracted with AcOEt (3x10 mL). The combined organic extracts were washed with brine, and dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After evaporation of the solvent under vacuum, a brown viscous liquid was obtained. The crude product was immediately used in the next reaction without any purification.

**5-(Propylthio)-1*H*-benzimidazole-2-thiol (16).** A stirred mixture of **15** (0.429 g, 1.912 mmol), EtOH (6 mL), KOH (0.233 g, 3.53 mmol) in water (1 mL) and CS<sub>2</sub> (0.2 mL, 3.532 mmol) was heated at 50°C under N<sub>2</sub> for 3 h. Then, the reaction was left 12 h at room temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 95.5:0.5). The yellow precipitate formed was poured into water and treated with 20% AcOH solution to pH 6. The solid was separated by suction filtration, washed with water and air dried to obtain **16** (0.391 g, 74%) of a slightly yellow powder. Mp: 216.1-217.8°C. IR  $\nu_{\max}$  3439 (NH). MS ( $m/z$ ): 224 (M<sup>+</sup>). HR-MS (EI) Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (M<sup>+</sup>)  $m/z$  224.0442, found: 375.9422. <sup>1</sup>H-NMR: 0.99 (3H, t,  $J=7.28$ , CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.60 (2H, sext,  $J=7.28$ , CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.84 (2H, t,  $J=7.28$ , CH<sub>2</sub>S), 7.14 (1H, s, H-7), 7.15 (1H, s, H-6), 7.25 (1H, m, H-4), and 9.55 (bs, NH, int. D<sub>2</sub>O).

**2-(Methylthio)-5-(propylthio)-1*H*-benzimidazole (17).** Into a stirred, dark solution, of **16** (1.2 g, 5.33 mmol) in 4.5 mL of acetone and KOH (0.351 g, 6.27 mmol) in 0.5 mL of water, was slowly added, under N<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>I (0.4 mL, 5.33 mmol) at 0°C. Then, the mixture was stirred for 30 min at 10°C. The progress of the reaction was monitored by TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 95.5:0.5) and once finished it was neutralized with a 20% HCl solution and concentrated under vacuum. The residue was taken up with AcOEt, the extract washed with brine, dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and half concentrated under vacuum. Addition of MeOH allowed the formation of **14** (1.22 g, 96%) of a white powder. Mp: 142.7-142.9°C. IR  $\nu_{\max}$  3426 (NH). MS (EI)  $m/z$ : 238 (M<sup>+</sup>). HR-MS (EI) Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>)  $m/z$  238.0598, found: 238.0582. <sup>1</sup>H-NMR: 0.97 (3H, t,  $J=7.5$ , CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.61 (2H, sext.,  $J=7.5$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>S), 2.85 (2H, t,  $J=7.5$ , CH<sub>2</sub>SO), 7.24 (1H, dd,  $J=8.4$ ,  $J=1.5$ , H-6), 7.42 (1H, d,  $J=8.4$ , H-7), 7.55 (1H, d,  $J=1.2$ , H-4), and 10.21 (bs, NH, int. D<sub>2</sub>O).

## Computational methodology

Complete optimization of the geometry of compound **17** was done with the program Spartan'02 [21] at level RHF/6-31G(*d,p*). The electrostatic potential map was calculated from the optimized geometry.

## Acknowledgements

We are grateful to the Departamento Sistemas Biológicos from the UAM-X for the financial support for this work and to DGAPA, UNAM, for financing project IN 202101. We are also grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán and Marisela Gutiérrez, from the Facultad de Química, UNAM, for the determination of all the spectra.

## References

- Gyurik, R. J.; Chow, A. W.; Zaber, B.; Brunner, E. L.; Miller, J. A.; Villani, A. J.; Petka, L. A.; Parish, R. C. *Drug Metabolism Disposition*. **1981**, *9*, 503-508.
- Averkin, E. A.; Beard, C. C.; Dvorak, C. A.; Edwards, J. A.; Fried, J. H.; Kilian, J. G.; Schiltz, R. A. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1164-1166.
- Lecaillon, J. B.; Godbillon, J.; Campestrini, J.; Naquira, C.; Miranda, L.; Pacheco, R.; Mull, R.; Poltera, A. A. *J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *45*, 601-604.
- Alvarez, L. I.; Sánchez, S. F.; Lanusse, C. E. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **1999**, *22*, 77-86.
- Virkel, G.; Lifschitz, A.; Soraci, A.; Sansinanea, A.; Lanusse, C. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 381-393.
- Murray, M.; Hudson, A. M.; Yassa, V. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 60-66.
- Szprengier-Juszkiewicz, T.; Semeniuk, S.; Wlodarczyk, B. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. **2002**, *46*, 119-125.
- Sanyal, P. K. *Indian J. Pharmacol.* **1994**, *26*, 200-203.
- Takeba, K.; Fujinuma, K.; Sakamoto, M.; Miyazaki, T.; Oka, H.; Itoh, Y.; Nakazawa, H. *J. Chromatog. A*. **2000**, *882*, 99-107.
- De Laurentis, N.; Milillo, M. A.; Bruno, S. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1996**, *6*, 51-53.
- Xie, J.H.; Hu, Y.Z. *Xhejiang Daxue Xuebao Yixueban*. **31**, 45 (2002); *Chem. Abstr.* **138**, 73201(2002).
- Brandon, D. L.; Binder, R. G.; Bates, A. H.; Montangue, W. C. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1588-1594.
- Iddon, B.; Kutschy, P.; Robinson, A.G.; Suschitzky, H.; Kramer, W.; Neugebauer, F.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. **1992**, 3129-3134.
- Hudlicky, M. *Oxidation in Organic Chemistry*. ACS Monograph 186. American Chemical Society. Washington D.C. **1990**, 252.
- Leonard, N. J.; Johnson, C. R. *J. Org. Chem.* **1961**, *27*, 282-284.
- Hiskey, R. G.; Harpold, M. A. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3191-3194.
- Evans, B.J.; Doi, T.; Musker, W. K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2580-2586.
- Hay, M. P.; Wilson, W. R.; Denny, W.; Denny, W. A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 645-657.



19. Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 649-652.
20. Navarrete-Vázquez, G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M.; Castillo, R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 4615-4622.
21. Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kedziora, G. S.; Rassolov, V. A.; Maurice, D. R.; Nair, N.; Shao, Y.; Besley, N. A.; Maslen, P. E.; Dombroski, J. P.; Daschel, H.; Zhang, W.; Korambath, P. P.; Baker, J.; Byrd, E. F. C.; Van Vooris, T.; Oumi, M.; Hirata, S.; Hsu, C.-P.; Ishikawa, N.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.; Gill, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. J. *Comput. Chem.* **2000**, 21, 1532-1548.



ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 712 (1998) 237–241

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY B

## High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, $\alpha$ BIOF10, in biological fluids

Lauro Misael del Rivero, Helgi Jung\*, Rafael Castillo, Alicia Hernández-Campos

*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., Mexico*

Received 29 September 1997; received in revised form 9 March 1998; accepted 17 March 1998

### Abstract

This paper describes a high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet absorbance detection at 304 nm for the determination of 6-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-methylthio benzimidazole ( $\alpha$ BIOF10) — a new fasciolicide agent — and its sulphoxide (SO $\alpha$ BIOF10), in plasma and urine. It requires 2 ml of biological fluid, an extraction using Sep-Pak cartridges, and methanol for drug elution. Analysis is performed on a  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m) column, using methanol–acetonitrile–water (40:30:30, v/v) as the mobile phase. Results showed that the assay is sensitive: 7.2 ng/ml for  $\alpha$ BIOF10 and SO $\alpha$ BIOF10 in plasma and 3.6 ng/ml for both compounds in urine. The response was linear between 0.195 and 12.5  $\mu$ g/ml. Maximum intra-day coefficient of variation was 5.3%. Recovery obtained was 97.8% for both  $\alpha$ BIOF10 and SO $\alpha$ BIOF10. In urine, recovery was 99.6% and 93.1% for  $\alpha$ BIOF10 and SO $\alpha$ BIOF10 respectively. The method was used to perform a preliminary pharmacokinetic study in two sheep and was found to be satisfactory. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** 6-Chloro-5-(1-naphthoxy)-2-methylthio benzimidazole ( $\alpha$ BIOF10)

### 1. Introduction

Searching for new fasciolicide agents, a new benzimidazole derivative, 6-chloro-5-(1-naphthoxy)-2-methylthio benzimidazole ( $\alpha$ BIOF10), was recently synthesized by our group at the National University of Mexico. This compound has shown a potent fasciolicide activity in vitro and in vivo in sheep [1].

In order to determine the pharmacokinetic parameters of  $\alpha$ BIOF10, a sensitive and specific method of assay was needed in order to measure the drug levels in plasma and urine. This paper describes a rapid, specific, reliable, and sensitive analytical method

based on reversed-phase liquid chromatography for the quantitation of  $\alpha$ BIOF10 and its metabolite in plasma and urine of sheep. The method was validated according to procedures and acceptance criteria based on USP XXIII guidelines [2] and recommendations of Shah et al. [3], Bresolle et al. [4] and Braggio et al. [5].

### 2. Experimental

#### 2.1. Materials and reagents

$\alpha$ BIOF10 and  $\alpha$ BIOF10 sulphoxide (SO $\alpha$ BIOF10) were synthesised at the Department of Pharmacy, National University of Mexico

\*Corresponding author.

# Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental

Froylán Ibarra Velarde\*  
Natividad Montenegro Cristino\*  
Jaime Flores Crespo\*  
Alicia Hernández Campos\*\*  
Rafael Castillo Bocanegra\*\*

## Abstract

The aim of the present study was to select from four vehicles the most suitable one to formulate an experimental fasciolicide called Alfa. Twenty five fluke-free crossbred sheep were used. On day zero, all animals were infected orally with 200 metacercariae of *F. hepatica* administered in a gelatin capsule. Only 15 sheep were reinfected each with another 200 metacercariae on week six. Sheep were divided ten weeks after the infection in five groups of five animals each, providing that from the 15 reinfected animals 10 were included in Groups 1 and 2, and the remaining five ones were left in the control one. Groups 1 to 4 were treated with an oral dose of 15 mg/kg of body weight of the experimental compound, formulated with vehicles 1, 2, 3 and 4, respectively, and Group 5 remained as the non-treated control one. All sheep were sacrificed two weeks after the treatment, and all flukes in the liver were quantified. Efficacy was determined as the percentage of fluke reduction. Results showed an efficacy against adult flukes of 100%, 100%, 92.4% and 77.0%, for Groups 1, 2, 3 and 4, respectively, and against juvenile flukes of 100% and 100% for Groups 1 and 2, respectively. It is concluded that compound Alfa formulated in vehicles number 1 and 2 exerted a 100% efficacy against four week-old and 10 week-old flukes in sheep.

**Key words:** *FASCIOLA HEPATICA*, EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY, SHEEP.

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue seleccionar entre cuatro vehículos, el idóneo para formular un fasciolicida experimental denominado Alfa. Se utilizaron 25 ovinos criollos, libres de infección por *F. hepatica*, los cuales en el día 0, fueron infectados por vía oral con 200 metacercarias del parásito por borrego, administradas en cápsula de gelatina. En la semana 6, sólo 15 ovinos fueron re infectados con otras 200 metacercarias por animal. Diez semanas después de la primera infección, los borregos fueron divididos en cinco grupos de cinco animales cada uno, previendo que de los 15 ovinos re infectados, 10 quedaran insertos en los grupos 1 y 2, y los 5 restantes quedaran dentro del grupo testigo. Así, los grupos 1 a 4 fueron dosificados por vía oral, con 15 mg/kg del compuesto experimental, formulado con los vehículos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, y el grupo 5 fungió como testigo, sin tratamiento. A las dos semanas postratamiento, se sacrificaron los ovinos y se cuantificaron las fasciolas en hígado. La eficacia se determinó con base en el porcentaje de reducción de fasciolas. Los resultados indicaron una eficacia contra fasciolas adultas de 100%, 100%, 92.4% y 77.0%, para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, y contra fasciolas juveniles de 100% y 100%, para los grupos 1 y 2, respectivamente. Se concluye que el compuesto Alfa formulado con los vehículos 1 y 2, mostró una eficacia del 100% contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad en ovinos, respectivamente.

**Palabras clave:** *FASCIOLA HEPATICA*, QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL, OVINOS.

Recibido el 10 de agosto de 1999 y aceptado el 29 de noviembre de 1999.

\* Proyecto Fasciolosis, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de la Secretaría de Ganadería, Agricultura y Desarrollo Rural, km 11.5, Carretera Cuernavaca-Cuarzila, Morelos, 62500, México.

\*\* Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

# Eficacia del 6-cloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México

Yolanda Vera Montenegro\*  
Froylán Ibarra Velarde\*  
Héctor Quiroz Romero\*  
Ángel Ríos Utrera\*\*  
Rafael Castillo Bocanegra\*\*\*  
Alicia Hernández Campos\*\*\*\*

---

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the fascioliscide efficacy of 6-chloro-2-metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol called compound "alfa" against 4 and 10 week-old flukes in cattle. Fifteen *Fasciola hepatica* fluke-free steers were divided into 3 groups of 5 animals each. Each animal was orally infected with 300 metacercariae given 150 on day 0 and 150 on day 45. All animals were sampled for faeces to determine the presence of *Fasciola*-eggs by means of coprological analysis. On day 75, Groups 1 and 2 were treated with compound alfa and triclabendazol at a dose of 12 mg/kg per os, respectively. Group 3 remained as the non-treated control. Forty-five days after treatment, all animals were sacrificed; the liver was isolated to count the flukes. Efficacy was assessed on the number of flukes present in the treated groups in relation to the control one. Results indicated an efficacy of 99.4% for compound alfa, and of 100% for triclabendazol, respectively. It is concluded that compound alfa exerted a high efficacy against 4 and 10 week-old flukes.

**Key words:** EFFICACY, EXPERIMENTAL FASCIOLISCIDE, CATTLE

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia fasciolicida del 6-cloro-2- metiltio-5-(1-naftiloxi) bencimidazol denominado compuesto "alfa" contra fasciolas de cuatro y 10 semanas de edad en bovinos. Se utilizaron 15 novillos libres de infección por *F. Hepatica* que se infectaron por vía oral con 300 metacercarias, administradas 150 en el día 0 y 150 en el día 45, respectivamente. A todos los bovinos se les tomaron muestras de heces con el propósito de corroborar la presencia del parásito mediante análisis coprológicos. El día 75, los grupos 1 y 2 fueron tratados con los compuestos alfa y triclabendazol a dosis única de 12 mg/kg, vía oral. El grupo 3 quedó como testigo sin tratamiento. A los 45 días postratamiento todos los bovinos fueron sacrificados para separar el hígado y cuantificar los vermes presentes. La eficacia se midió con base en el número de fasciolas presentes en los grupos tratados respecto del testigo. Los resultados indicaron una eficacia de 99.4% para el compuesto alfa y de 100% para el triclabendazol. Se concluye que el compuesto alfa mostró alta eficacia contra fasciolas de cuatro y diez semanas de edad.

**Palabras clave:** EFICACIA, FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL, BOVINOS.

---

Recibido el 29 de junio de 2000 y aceptado el 31 de octubre de 2000.

\* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

\*\* Campo Experimental Pecuario "Las Margaritas" del estado de Puebla, México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

\*\*\* Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

# Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-bencimidazol contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos Pelibuey

## Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in Pelibuey sheep

Norma Rivera Fernández\*\*  
Froylán Ibarra Velarde\*\*  
Sara Olazarán Jenkins\*\*\*  
Yolanda Vera Montenegro\*\*  
Rafael Castillo Bocanegra†  
Alicia Hernández Campos‡

### Abstract

The aim of the present study was to evaluate the fasciolicide activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-*ih*-benzimidazole called compound alpha against three day, two-, four-, six-, eight- and ten week-old flukes in experimentally infected sheep. Sixty Pelibuey free-fluke sheep were infected each with 150 metacercariae of *F. hepatica* *per os*. Animals were divided into 12 groups of 5 animals each. All animals were detected positive to *F. hepatica* antibodies by the ELISA test at three week postinfection. Groups 1, 3, 5, 7, 9 and 11 were orally treated with 15 mg/kg of compound alpha on days 2, 4, 6, 8 and 10 weeks postinfection, respectively. Groups 2, 4, 6, 8, 10 and 12 remained as non-treated controls. All sheep were euthanized in order to collect and count the flukes in the liver four weeks after the treatment. Efficacy was assessed as the percentage of fluke reduction in the treated groups in comparison to the control ones. Results showed that compound alpha removed 100% of the flukes in all treated groups. Mean number of flukes in non-treated groups was of 189. Maximum- and minimum number of flukes collected per animal was of 59 and 15, respectively. It is concluded that compound alpha administered *per os* at 15 mg/kg, exerted highly promising efficacy against different evolutive stages of *F. hepatica* in sheep.

**Key words:** FASCIOLAREPATICA, PELIBUEY SHEEP, TREMATODA, COMPOUND ALPHA, EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY.

### Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-bencimidazol denominado compuesto "alfa" contra fasciolas de tres días, dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas de edad, en ovinos infectados experimentalmente. Se utilizaron 60 ovinos de raza Pelibuey, libres de infección por *F. hepatica*. En el día cero todos los animales fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias del parásito por borrego. Los animales fueron divididos en 12 grupos de cinco animales cada uno. Los grupos 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se trataron con el compuesto alfa en suspensión a una dosis oral de 15 mg/kg a los tres días, dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas posinfección, respectivamente. Los grupos 2, 4, 6, 8, 10 y 12 fueron testigos sin tratamiento. A las cuatro semanas postratamiento,

Recibido el 8 de junio de 2001 y aceptado el 12 de septiembre de 2001.

\* El presente estudio fue tema de tesis de maestría del primer autor.

\*\* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\*\* Campo Experimental Pecuario del Estado de Puebla (CIPEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Hueytamalco, Puebla, México.

† Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde  
H. Quiroz Romero · A. Hernández Campos · R. Castillo

## Field trial on the efficacy of an experimental fasciolicide compared with some commercial compounds in naturally infected cattle

Received: 2 April 2003 / Accepted: 10 April 2003 / Published online: 3 July 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole was evaluated with three commercial fasciolicides in terms of the percentage of egg reduction in cattle. Fifty Swiss cows were selected for inclusion in the trial based on finding eggs of *Fasciola hepatica* in their feces. On day 0, they were blocked in five groups (G) of ten animals each according to fecal egg counts. G1 received compound alpha at 12 mg/kg p.o.; G2 triclabendazole at 12 mg/kg p.o.; G3.closantel at 3.5 mg/kg s.c.; G4 clorsulon at 2.0 mg/kg s.c. G5 animals served as untreated controls. Fecal analysis was performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90. Efficacy was measured on days 14 and 21. In addition, the extension and intensity effects were determined on day 60. The percentage efficacy for groups 1–4 was 98.1, 98.7, 98.2 and 97.9 on day 14 and 98.5, 97.9, 97.7 and 97.9 on day 21, respectively. No statistical differences were observed between treated groups.

### Introduction

The 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, called compound alpha (Hernández et al. 2002), has been previously tested as a fasciolicide in sheep (Ibarra et al. 1997a, 1997b, 2000; Rivera et al. 2002), showing promising results. However, the population of sheep in Mexico is far smaller than that of cattle. All fasciolicides available on the Mexican market

are imported, or they are prepared with foreign materials, a situation which makes the products expensive and economically inaccessible to the common cattle producer. Therefore, local efforts have been made to develop a safe, effective and non-expensive fasciolicide. The aim of the present work was to determine the efficacy of compound alpha along with three other commercial fascioliscides, measured by the percentage of egg-reduction in naturally infected cattle.

### Materials and methods

#### Location of the study

This work was carried out at the farm called “Copalar” located in an endemic zone of fasciolosis with a warm humid climate at Monte Gordo, State of Veracruz, Mexico.

#### Experimental animals

Fifty 1- to 6-year-old Swiss cows naturally infected with *Fasciola hepatica* were used.

#### Anthelmintics

Compounds alpha (experimental compound), triclabendazol (TCB) (Ciba-Geigy), clorsulon (Merck) and closantel (Cyanamid), were used according to the manufacturer’s instructions.

#### Study procedure

Prior to the start the experiment, animals were sampled for feces on day 8 to select those with the highest number of eggs using the sedimentation test. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1988).

On day 0, animals were blocked into five groups of ten animals each, according to fecal egg counts. Treatments were given once. They were sequentially allocated to animals in each block as follows: group (G)1, treated with compound alpha at 12 mg/kg p.o.; G2 TCB at 12 mg/kg p.o.; G3 closantel at 3.5 mg/kg s.c.; G4 clorsulon at 2.0 mg/kg s.c., while G5 served as non-treated controls. Individual fecal analyses were performed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90.

Taken in part from the PhD thesis of Yolanda Vera Montenegro

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde (✉) · H. Quiroz Romero  
Departamento de Parasitología,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
UNAM, CP. 04510 Mexico City, Mexico  
E-mail: ibarraf@servidor.unam.mx  
Fax: + 52-55-56225971

A. Hernández Campos · R. Castillo  
Facultad de Química, UNAM,  
CP. 04510 Mexico City, Mexico

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde  
E. Liébano Hernández · H. Quiroz Romero  
R. Castillo Bocanegra · A. Hernández Campos  
P. Ochoa Galván

## Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves

Received: 20 July 2003 / Accepted: 8 September 2003 / Published online: 3 December 2003  
© Springer-Verlag is a part of Springer Science + Business Media 2003

**Abstract** The efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio)-1*H*-benzimidazole, called “alpha”, was tested against *Fasciola hepatica*. Fluke-free calves ( $n=32$ ) were divided into 8 groups and infected with 150 metacercariae per animal. All animals subsequently received a second infection with another 150 metacercariae, given at different time intervals aimed to produce flukes of differing ages within the experimental animals. When the flukes reached the required age in the animals, four groups were treated with a single oral dose of 12 mg/kg of compound alpha and the remaining ones served as non-treated controls. Two weeks after treatment the animals of all groups were sacrificed and the livers were removed to determine the numbers of parasites present in the treated and untreated controls. In the treated groups the fluke reduction for the 3 day/2 week group was 100%, for the 3 week/4 week group it was 96.4%, for the 6 week/8 week group it was 99.2% and for the 10 week/12 week group it was 100%.

(1-naphthylthio)-1*H*-benzimidazole (known as “alpha”) has been developed (Hernández et al. 2002) and has shown high efficacy when tested on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* (Ibarra et al. 1996, 1997a, b, 2000; Vera et al. 2001; Rivera et al. 2002). The pharmacokinetics of the drug have also been investigated in sheep (Del Rivero 1998) and cattle (Vertiz 2000). The aim of the present study was to evaluate the efficacy of alpha as a fasciolicide against immature and mature *F. hepatica* in experimentally infected calves.

### Introduction

In view of the economic importance of bovine fasciolosis in Mexico, a new fasciolicide, 5-chloro-2-methylthio-6-

### Materials and methods

#### Animals

Thirty-two crossbred calves, 1–2 years old, were used. They were born and located at the National Center for Parasitology in Jiutepec state of Morelos (central part of Mexico), which is recognized as a free-fluke area. The calves were fed on green alfalfa and some commercial pelleted food for cattle, and water was supplied ad libitum.

#### Experimental procedure

Prior to the experiment, fecal and serum samples from the calves were analyzed by the sedimentation test (MAFF 1988) and indirectly by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ibarra et al. 1998) to ensure that they really were free of flukes. On day zero each calf was infected with 150 metacercariae of *F. hepatica* and, afterwards, a second stepped infection of another 150 metacercariae was given per calf, adjusting exact timings to produce flukes of different ages. When the flukes reached the required age for treatment in the animals, four groups of 8 animals each were formed, from which 4 animals were treated and the other 4 served as untreated controls. Group G1 had flukes 3 days and 2 weeks old, G2 had flukes 3 and 4 weeks old, G3 had flukes 6 and 8 weeks old, and G4 had flukes 10 and 12 weeks old.

#### Treatment

Compound alpha, formulated as a 10% suspension, was administered by mouth at a dose rate of 12 mg/kg when the flukes had reached the ages for the previously defined groups.

Taken in part from the PhD thesis of Yolanda Vera Montenegro

Y. Vera Montenegro · F. Ibarra Velarde (✉) · H. Quiroz Romero  
Depto. de Parasitología, FMVZ-UNAM, Cd. Universitaria 04510,  
Mexico City, Mexico  
E-mail: ibarraf@servidor.unam.mx  
Fax: +52-55-56225971

E. Liébano Hernández  
CENID-Pavet, INIFAP, Km 12.5, Cuernavaca-Cuautla,  
Edo. de Morelos, Mexico

R. Castillo Bocanegra · A. Hernández Campos  
Depto. de Farmacia, Facultad de Química, UNAM,  
Cd. Universitaria 04510, Mexico City, Mexico

P. Ochoa Galván  
Depto. de Estadística, FMVZ-UNAM, Cd. Universitaria 04510,  
Mexico City, Mexico

## Determination of the Maximum Tolerated Dose and the Safety Index of an Experimental Fasciolicide in Cattle

Y. VERA<sup>1,5</sup>, F. IBARRA<sup>1</sup>, G. J. CANTO<sup>2</sup>, O. SORIA<sup>3</sup>, R. CASTILLO<sup>4</sup> and A. HERNÁNDEZ<sup>4</sup>

Addresses of authors: <sup>1</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Med.Vet. y Zoot., UNAM, Cd. Universitaria, 04510, México, D.F.; <sup>2</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal, INIFAP, Querétaro, Querétaro, México; <sup>3</sup>Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.; <sup>4</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Cd. Universitaria, 04510, México, D.F., Mexico; <sup>5</sup>Corresponding author: Fax: + 52 55 56 22 58 99; E-mail: vemonty@yahoo.com

With 3 tables

Received for publication August 11, 2005

### Summary

The aim of the present study was to determine the maximum tolerated dose (MTD) and the safety index (SI) of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)1*H*-benzimidazole, called compound alpha, in cattle. In addition, to search for possible adverse effects after treatment, the measurement of some biochemical, haematological and physiological parameters were also analysed. Eighteen crossbred heifers were divided into six groups of three animals each. Groups 1–5 received a single oral dose of 12, 36, 60, 120 and 180 mg/kg of body weight (bw) of compound alpha. Group 6 served as an untreated control. To determine the biochemical, haematological and enzymatic parameters, sera and blood samples were individually taken at 0, 4, 8, 16, 32, 128, and 720 h after treatment. Physiological parameters such as rectal temperature, heart rate (HR), respiration rate (RR) and ruminal motility were measured at the time intervals mentioned above. Estimation of the MTD and SI was obtained by using the formula reported by the Food and Drug Administration (FDA), the results showing an MTD of 180 mg/kg/bw and an SI of 15 times the recommended clinical dose. Some statistical differences were observed in a few of the biochemical, haematological and enzymatic parameters, the adverse effects being not highly representative. Alterations on HR and RR were statistically different ( $P < 0.05$ ) only in heifers treated with 180 mg.

### Introduction

Fasciolosis, the most important hepatic parasitic disease of ruminants, is caused by the liver fluke *Fasciola hepatica*, which is still the cause of considerable losses in sheep and cattle production all over the world.

In the early 1980s a new fasciolicide, named triclabendazole, was launched showing a wide spectrum of activity against immature and mature *F. hepatica*; however, since then no new fasciolicide has been launched. Therefore, efforts aimed to produce new drugs with fasciolicide activity should be encouraged.

The development of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)1*H*-benzimidazole called compound alpha (Hernández et al., 2002), has been the motive of different therapeutic

evaluations in cattle (Ibarra et al., 2004; Vera et al., 2001, 2003, 2004; Vertiz, 2000). However, studies of drug tolerance in animals has not yet been performed.

The aim of the present study was not only to determine the maximum tolerated dose (MTD) and the safety index (SI) of compound alpha in cattle, but also to look for possible adverse effects after treatment by means of the measurement of some biochemical, haematological and physiological parameters in the experimental animals.

### Materials and Methods

#### Animals and experimental procedures

Eighteen crossbred heifers weighing between 200 and 300 kg were purchased from a private farm at the beginning of the experiment.

The animals were bred in a zero-grazing system, their nematode and fluke status being checked through repeated coprological examinations [Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAAF), 1988].

On day 0, the animals were divided into six groups of three animals each. Groups 1–5 received a single oral dose of 12(1x), 36(3x), 60(5x), 120(10x) and 180(15x) mg/kg of compound alpha formulated as a 10% suspension. Group 6 served as an untreated control.

#### Estimation of the MTD and SI

These parameters were obtained by using the formula reported in the Target animal safety guidelines for new animal drugs (1989), in which:

$$\frac{\text{MTD}}{\text{clinical dose}} = \text{SI}.$$

#### Biochemical and enzymatic parameters

The evaluated analites were: glucose, total protein, albumin, globulins, total bilirubin, creatinine, urea nitrogen, uric acid, total cholesterol and phosphorus.

The enzymatic activities were aspartate-aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (DHL) and alkaline phosphatase (AF). All parameters



# Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to *in vitro* treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha

M. McCONVILLE<sup>1</sup>, G. P. BRENNAN<sup>1</sup>, M. McCOY<sup>2</sup>, R. CASTILLO<sup>3</sup>,  
A. HERNANDEZ-CAMPOS<sup>3</sup>, F. IBARRA<sup>3</sup> and I. FAIRWEATHER<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, Queens University Belfast

<sup>2</sup>Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland (DARDNI), Belfast

<sup>3</sup>Facultades de Química y Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City

(Received 26 January 2006; revised 13 February 2006; accepted 13 February 2006; first published online 2 May 2006)

## SUMMARY

Mature *Fasciola hepatica* of the triclabendazole-resistant Sligo isolate were incubated *in vitro* with 10 µg/ml of the sulphoxide metabolite of compound alpha [5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-*H*-benzimidazole]; the metabolite will be referred to as alpha.SO. Changes resulting from drug treatment were examined by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and tubulin immunocytochemistry (ICC). SEM revealed that disruption to the tegumental surface mainly took the form of swelling and blebbing. Extensive spine loss occurred on the ventral surface of the oral cone, and sloughing of the tegument was observed along the lateral margins of the fluke. Examination of sections from the anterior mid-body region at the TEM level revealed that treatment with alpha.SO led to swelling of the basal infolds and mitochondria within the tegumental syncytium; also, accumulations of secretory bodies beneath the apical plasma membrane. The tegumental cell bodies contained swollen mitochondria and cisternae of granular endoplasmic reticulum, but few Golgi complexes were observed. An increase in T2 secretory bodies was observed, whilst in the T1 tegumental cells, the T1 secretory bodies had decreased in number. Immunocytochemical (ICC) studies showed that incubation with alpha.SO, ABZ.SO and TCBZ.SO did not cause significant changes to the distribution of tubulin within the tegumental syncytium of the Sligo isolate. In contrast, alpha.SO, ABZ.SO and TCBZ.SO caused severe disruption to tubulin organization within the syncytial layer of the TCBZ-susceptible Cullompton isolate. The EM results confirm that compound alpha is a fasciolicide capable of disrupting the tegument of mature TCBZ-resistant *F. hepatica*; however, this was not accompanied by any change in tubulin immunoreactivity.

Key words: *Fasciola hepatica*, triclabendazole resistance, alpha.SO, immunocytochemistry, tegument, tubulin.

## INTRODUCTION

Fascioliasis is a major parasitic disease of livestock in temperate regions of the world. There has been a marked increase and spread of the disease in recent years, largely as a result of climate change. In the UK, for example, infection levels of more than 30% in cattle and more than 20% in sheep exist in some areas (Wolstenholme *et al.* 2004). Fascioliasis is also emerging as a major zoonosis and is considered to be a serious human health problem in some countries (reviewed by Mas-Coma *et al.* 2005).

Triclabendazole (TCBZ) remains the current drug of choice to treat liver fluke infections, because of its particularly high activity against juvenile flukes

(Boray *et al.* 1983; Smeal and Hall, 1983; Turner *et al.* 1984). However, resistance to the drug was first identified in the mid-1990s (in Australia: Overend and Bowen, 1995) and appears to be widespread in Europe for which the data is most comprehensive (reviewed by Fairweather, 2005). The combination of increased disease prevalence and spread of TCBZ resistance is of considerable concern to the livestock industry, because no other fasciolicides on the market have comparable activity against the damaging immature stages of fluke.

Several proposals to overcome resistance have been attempted; they include use of alternative fasciolicides, use of synergistic combinations of drugs and the development of new drugs. Several existing fasciolicides – closantel, oxyclozanide, nitroxylnil, clorsulon and albendazole – have been shown to be active against TCBZ-resistant flukes (Coles *et al.* 2000; Moll *et al.* 2000; Coles and Stafford, 2001). However, their activity is limited to the adult fluke, not the juvenile stages. Recently, a derivative of

\* Corresponding author: Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, School of Biological Sciences, Queens University of Belfast, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast BT97BL, Northern Ireland. Tel: +44(0)2890 972298. Fax: +44(0)2890 975877. E-mail: i.fairweather@qub.ac.uk

# Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha

M. McConville · G. P. Brennan · M. McCoy ·  
R. Castillo · A. Hernandez-Campos · F. Ibarra ·  
I. Fairweather

Received: 8 June 2006 / Accepted: 26 June 2006 / Published online: 3 October 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Juvenile triclabendazole-resistant liver flukes, *Fasciola hepatica*, were incubated in vitro with 10 µg/ml of the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide, compound alpha [5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole], for 6 and 18 h. Following treatment, the specimens were examined using scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and tubulin immunocytochemistry. The scanning electron microscope results revealed a posterior-directed disruption comprised predominantly of swelling and blebbing of the tegument; these changes were more severe and extensive after the longer 18-h incubation. Along with swelling of the tegument and blebbing, the transmission electron microscope results also revealed swelling of the mitochondria and basal infolds. A decrease in the number of both T1 and T2 secretory bodies was observed in the syncytium and cytoplasmic connections after the 18-h treatment. The circular muscle bundles were also disrupted, in that the organisation of the muscle fibres was irregular and the total number of muscle fibres was reduced. The immu-

nocytochemical studies revealed no significant disruption to the distribution of tubulin immunoreactivity within the tegumental syncytium, the cytoplasmic connections or the associated tegumental cells. The results indicate that alpha. SO is capable of disrupting the tegument of 4-week-old triclabendazole-resistant liver flukes, though the morphological changes were not associated with any significant differences in tubulin immunostaining.

## Introduction

The benzimidazole derivative, triclabendazole (TCBZ), remains the drug of choice for the treatment of fasciolosis infections. TCBZ is the only drug available that is effective against both adult and juvenile stages of the fluke (Boray et al. 1983). This is of consequence, as it is the juvenile stage which is responsible for extensive haemorrhaging and fibrosis of the liver as the flukes migrate throughout the liver parenchyma (Behm and Sangster 1999). Of growing concern is the occurrence of TCBZ-resistant isolates of *Fasciola hepatica*, first reported by Overend and Bowen (1995) in Australia. Since then, studies in a number of countries throughout Europe have confirmed cases of TCBZ resistance (Anon 1995; Lane 1998; Moll et al. 2000; Thomas et al. 2000; Gaasenbeek et al. 2001; Rojo-Vázquez 2004). In the UK and Ireland, the incidence of disease has dramatically increased over recent years (Mitchell 2002, 2003). This rise in the occurrence of fasciolosis highlights a growing need to successfully control infections; in particular, those caused by TCBZ-resistant isolates of *F. hepatica*.

There is an increasing urgency for an alternative, effective fasciolicide to control TCBZ-resistant *F. hepatica*

M. McConville · G. P. Brennan · I. Fairweather (✉)  
Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group,  
School of Biological Sciences,  
Queens University of Belfast, Medical Biology Centre,  
97 Lisburn Road,  
BT97BL Belfast, Northern Ireland, UK  
e-mail: i.fairweather@qub.ac.uk

M. McCoy  
Veterinary Sciences Division,  
Department of Agriculture and Rural Development for  
Northern Ireland (DARDNI),  
Belfast, Northern Ireland, UK

R. Castillo · A. Hernandez-Campos · F. Ibarra  
Facultades de Química y Medicina Veterinaria,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
Mexico City, Mexico

## Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1*H*-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives

Julio C. Rivera<sup>a,c</sup>, Lilián Yépez-Mulia<sup>b</sup>, Alicia Hernández-Campos<sup>a</sup>,  
Rafael Moreno-Esparza<sup>a</sup>, Rafael Castillo<sup>a</sup>, Gabriel Navarrete-Vázquez<sup>a,c</sup>,  
Inés Fuentes-Noriega<sup>a</sup>, Helgi Jung-Cook<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Unidad de Investigación Médica en Enfermedades infecciosas Parasitarias, Hospital de Pediatría,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. 06720, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Campus Universitario Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 062210, Mexico

Received 22 December 2006; received in revised form 16 March 2007; accepted 10 May 2007

Available online 16 May 2007

### Abstract

Benzimidazole 2-carbamates, such as albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ), used for the treatment of helminthic infections, have low aqueous solubility and poor bioavailability, both of which lead to high interindividual variability when used for human systemic helminthiasis; therefore, it is necessary to search for new anthelmintics with better biopharmaceutical properties. In the present study the solubility,  $pK_a$ ,  $\log P$  and apparent permeability in the Caco-2 cells system of four novel anthelmintic (1*H*-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives (compounds 1–4) with a 2-methylthio group were evaluated. Also the pharmacokinetic parameters of compound 1 which in previous studies showed activity similar to ABZ against *T. spiralis*, was evaluated in BALB/c mice, as a representative molecule of the series. The novel anthelmintics, showed better solubility than ABZ in aqueous acid pH and in organic solvents. The  $\log P$ ,  $P_{app}$  and Caco-2 data indicate that the 4 derivatives are highly permeable drugs, but it is possible that an efflux system could be involved in the transport of these compounds. Plasma levels of compound 1 and its sulfoxide (compound 5) were high after the first 5 min. This fact strongly suggests that compound 1 is rapidly metabolized in the small intestine. On the other hand, the sulfone metabolite (compound 6) levels were lower than those of compound 5. The half life and mean residence time (MRT) of compound 1 and its main metabolites indicate that their elimination is very rapid.

More studies in mammalian species are necessary in order to understand the pharmacokinetic behavior of these novel compounds.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Permeability; Pharmacokinetics; Benzimidazole; Biopharmaceutics; Caco-2; Solubility

### 1. Introduction

Intestinal helminthiasis is still a major health problem mainly in developing countries. The economic importance of helminthic infections has long been recognized in the field of animal husbandry. For this reason the most important advances in the chemotherapy of helminthiasis have probably come from the animal health area (Horton, 1990). Although the development of vaccines in the long term could be an ideal strategy for the control of these parasitic infections, at the present time and in the near future, the control of helminthiasis relies on the use of

anthelmintics. Helminth parasites that have an intra and extra intestinal phase are able to infect humans as well as animals. The treatment for intestinal helminthiasis is usually carried out with benzimidazole 2-carbamate drugs (BZC), which have a wide spectrum of activity such as albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ); however, the treatment of systemic parasitosis with these types of drugs requires high doses and long treatments because of their poor solubility in body fluids; this decreases their absorption and bioavailability (Cook, 1990). In clinical trials, these drugs have shown a high interindividual variability (Sharma, 1994). Although ABZ is currently used as the drug of first choice for the treatment of neurocysticercosis, it is far from being the ideal drug because of the mentioned absorption problems (Jung et al., 1998). In addition, there are other experimental anthelmintics with a benzimidazole nucleus, among

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56225282; fax: +52 55 56225329.  
E-mail address: [helgijung@yahoo.com.mx](mailto:helgijung@yahoo.com.mx) (H. Jung-Cook).

## Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, a new fasciolicide agent

N. RAMÍREZ\*

L. MAYET†

L. DEL RIVERO†

F. IBARRA-VELARDE‡

R. CASTILLO†

A. HERNÁNDEZ-CAMPOS† &

H. JUNG-COOK†

\**Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica;*

†*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México, DF, México;*

‡*Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, DF, México*

Ramírez, N., Mayet, L., Del Rivero, L., Ibarra-Velarde, F., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Jung-Cook, H. Pharmacokinetic behavior in sheep and cattle of 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole, a new fasciolicide agent. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 32, 154–159.

The physicochemical properties,  $pK_a$ ,  $\log P$  and solubility of compound alpha, (5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole), a new fasciolicide agent, were characterized using conventional methods. Also, its pharmacokinetics was evaluated in sheep and cattle. In both species an oral dose of 12 mg/kg was administered. Blood samples were collected during 144 h and analyzed by using an HPLC assay. Results showed that compound alpha is a weak base with a  $pK_a$  value of 2.87 and  $\log P$  of 1.44. The solubility was very low in aqueous solvents. Pharmacokinetic studies showed that in both species compound alpha could not be detected at any sampling time. The mean half-life ( $t_{1/2}$ ) values of alpha sulphoxide in sheep and cattle were 19.86 and 29.87 h, while the half-life values of alpha sulphone were 19.43 and 46.32 h respectively.  $C_{max}$  values of alpha sulphoxide did not differ between species while alpha sulphone values were higher in cattle. Plasma protein binding of alpha sulphoxide was between 82% and 86%. These results, combined with the previous efficacy studies, suggest that compound alpha could be a promising fasciolicide agent.

(Paper received 31 January 2008; accepted for publication 31 July 2008)

*Helgi Jung-Cook, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México, DF 04510, México. E-mail: helgi@servidor.unam.mx*

### INTRODUCTION

Fasciolosis is an important helminth infection caused by the trematode *Fasciola hepatica*, a parasite that infests the biliary ducts of many different species (ruminants, horses, humans). This fluke species occurs throughout the world and is a cause of serious economic loss in the animal husbandry industry.

A number of drugs have been used in control fasciolosis in animals. Drugs differ in their safety and mode of action. Fasciolicides fall into five main chemical groups: salicylanilides, halogenated phenols, sulfonamides, phenoxyalkanes and benzimidazoles (Fairweather & Boray, 1999). Salicylanilides and halogenated phenols can be regarded as close analogues and include: clioxanide, oxyclosanide, niclosamide, rafoxanide, closantel, nitroxylnil, bithionol, hexachlorophene, and niclofolan. With the exception of niclosamide the above-mentioned compounds are usually marketed as flukicides for sheep and cattle, being highly effective against adult and to a lesser extent, immature flukes. Clorsulon, a compound belonging to the sulphonamides family, is also recommended for the control of adult flukes and frequently used in combination with ivermectin. Benzimidazoles have broad-spectrum of activity against a number of nematode, cestode, and trematode parasites (Lacey,

1990). Common benzimidazoles, such as cambendazole, fenbendazole, mebendazole, and oxfendazole, have little or no activity against *Fasciola hepatica*. Albendazole has been recommended, although its activity is restricted to mature flukes and requires elevated dose rates. Triclabendazole (TCBZ) was introduced in the early 1980s for the treatment of *Fasciola hepatica* infections in livestock. Because of its high activity against adult and juvenile stages of this parasite, it has been established as the principal anti-fluke drug on the market.

Considering that no fasciolicides have been marketed recently, a new benzimidazole derivative, 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole (known as 'alpha'), was synthesized at the Universidad Nacional Autónoma de México (Hernández-Campos *et al.*, 2002). *In vivo*, compound alpha was tested as fasciolicide in sheep and cattle, showing high effectiveness (Rivera *et al.*, 2002). When compound alpha was compared with TCBZ at 12 mg/kg p.o., closantel at 3.5 mg/kg s.c. and clorsulon at 2 mg/kg s.c., in naturally infected cattle, no statistical differences in the efficacy between groups were found (Vera *et al.*, 2003). An additional study showed that the effective dose of compound alpha in naturally and infected cattle was 12 mg/kg (Ibarra *et al.*, 2004). Its safety has also been evaluated (Vera *et al.*, 2006), showing a maximum tolerated dose of

## Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with the experimental fasciolicide, compound alpha

M. McConville<sup>a</sup>, G.P. Brennan<sup>a</sup>, A. Flanagan<sup>a</sup>, H.W.J. Edgar<sup>b</sup>,  
M. McCoy<sup>b</sup>, R. Castillo<sup>c</sup>, A. Hernández-Campos<sup>c</sup>, I. Fairweather<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, Queens University Belfast, United Kingdom

<sup>b</sup> Veterinary Sciences Division, Agri-Food Biosciences Institute (AFBI), Belfast, United Kingdom

<sup>c</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, DF 04510, Mexico

Received 15 October 2007; received in revised form 17 December 2007; accepted 15 January 2008

---

### Abstract

Eight indoor-reared, crossbred sheep with no pre-exposure to *Fasciola hepatica* were infected, by oral gavage, with 200 metacercarial cysts of the triclabendazole-susceptible, Cullompton isolate of *F. hepatica*. Anthelmintic dosing occurred at 4 weeks post-infection using 15 mg/kg compound alpha. Two treated sheep per time period were euthanized at 24 h, 48 h and 72 h post-treatment with compound alpha. The two sheep from the control group were euthanized alongside the 24 h alpha-treated sheep. Juvenile flukes were recovered from each of the sheep's liver and processed for examination by electron microscopy. The surface morphology of the flukes' tegument was assessed using scanning electron microscopy (SEM). The ultrastructure of the tegumental syncytium and underlying tegumental cells and connections and somatic musculature were investigated using transmission electron microscopy (TEM).

Both the SEM and TEM results revealed a level of disruption that increased with time, culminating at 72 h with extensive tegumental loss and substantial degeneration of the cell bodies. The effects of compound alpha on the surface morphology were not particularly apparent until 48 h post-treatment, when disruption included swelling and blebbing of the tegument. At 72 h post-treatment, SEM revealed loss of the entire syncytial layer over large areas of the flukes. In the areas where the syncytium was lost and the basal lamina exposed, lesions of varying sizes had developed, revealing underlying tissues. Though minor forms of disruption to the ultrastructure of the syncytium were observed using TEM 24 h post-treatment, it was at 48 h post-treatment that substantial stress responses occurred. They included the presence of autophagic vacuoles and 'open' bodies at the apex of the syncytium and swelling of the basal infolds. The mitochondria within the syncytium and tegumental cells became progressively more disrupted over the three time periods and, by 72 h post-treatment, they were frequently distorted and swollen in appearance, and contained severely swollen cristae. By 72 h, the number of secretory bodies, particularly T1 bodies, had become significantly depleted in their respective cell bodies, cytoplasmic processes and in the tegumental syncytium. Both the circular and longitudinal muscle bundles were severely disrupted 72 h post-treatment. They frequently contained a reduced number of muscle fibres and, in more severe instances, there was an absence of fibres altogether.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*; Compound alpha; Experimental fasciolicide; Electron microscopy

---

\* Corresponding author. Tel.: +44 28 9097 2298; fax: +44 28 9097 5877.

E-mail address: [i.fairweather@qub.ac.uk](mailto:i.fairweather@qub.ac.uk) (I. Fairweather).

# Paramphistomicidal efficacy of an experimental compound in sheep

P. M. Reyes · V. F. Ibarra · M. Y. Vera · A. G. Cantó ·  
A. Hernández · C. A. Hernández · R. Castillo ·  
M. A. Villa

Received: 14 November 2007 / Accepted: 16 November 2007 / Published online: 10 January 2008  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** The aim of the present study was to determine the paramphistomicidal efficacy of methyl [5-chloro-6-(1-naphthylthio)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamate (alpha-carbamate) in experimentally infected sheep. Sixteen crossbred rams were infected each with 600 metacercariae of *Calicophoron calicophorum*. Forty five days after infection, they were divided into four groups of four animals each. Groups 1 to 3 received compound alpha-carbamate at a dose of 12, 18, and 24 mg/kg b/w, respectively; group 4 serving as the nontreated control. Ten days after treatment, all animals were killed to obtain the rumen and collect, measure, and quantify the trematodes present. Efficacy was assessed as the percentage of trematode reduction of the treated groups relative to the nontreated control. The obtained efficacy indicated

a percentage reduction of 86.7%, 97.5%, and 100% for groups 1, 2, and 3, respectively. This experimental compound showed high efficacy against 45-day-old *C. calicophorum* in experimentally infected sheep.

## Introduction

Paramphistomosis is a gastrointestinal parasitic disease of ruminants caused by *Paramphistomum* spp, which inhabits the rumen, reticle, abomasum, and small intestine (Eduardo 1982). It is characterized by hemorrhagic and catarrhal enteritis producing nonquantifiable economical losses (Rolfe et al. 1991).

In Mexico, this disease is more frequently seen in cattle (Horak 1971; Quiroz et al. 1973) with higher prevalence in Cebu livestock, particularly from the south-east region of the country (Arizmendi 1981; De la O 1983; Quiroz 1990; Rangel-Ruiz et al. 2003). Treatment of this disease has been carried out with different fasciolicidal compounds, all showing weak efficacy against immature stages of the trematode.

Considering the fasciolicidal efficacy previously shown by the compound 5-chloro-2-(methylthio)-6-(1-naphthylthio)-1*H*-benzimidazole, known as compound alpha (Hernández et al. 2002), in sheep and cattle, (Ibarra et al. 1997, 2000, 2004; Vera et al. 2001, 2003, 2004; Rivera et al. 2002, 2004, 2005), it was deemed relevant to modify its chemical structure and synthesize alpha-carbamate aimed at testing

---

P. M. Reyes · V. F. Ibarra (✉) · M. Y. Vera · M. A. Villa  
Departamento de Parasitología,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM,  
DF 04510 México, México  
e-mail: ibarraf@servidor.unam.mx

A. G. Cantó  
Facultad de Ciencias Naturales,  
Universidad Autónoma de Querétaro,  
Querétaro, México

A. Hernández · C. A. Hernández · R. Castillo  
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM,  
México, México

# Ultrastructural changes to the tegumental system and the gastrodermal cells in adult *Fasciola hepatica* following *in vivo* treatment with the experimental fasciolicide, compound alpha

M. McCONVILLE<sup>1</sup>, G. P. BRENNAN<sup>1</sup>, A. FLANAGAN<sup>1</sup>, H. W. J. EDGAR<sup>2</sup>, R. CASTILLO<sup>3</sup>, A. HERNÁNDEZ-CAMPOS<sup>3</sup> and I. FAIRWEATHER<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, Queens University Belfast

<sup>2</sup>Veterinary Sciences Division, Agri-Food Biosciences Institute (AFBI), Stormont, Belfast

<sup>3</sup>Facultades de Química y Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City

(Received 7 November 2008; revised 8 January 2009; accepted 8 January 2009)

## SUMMARY

Sheep infected with the triclabendazole-susceptible, Cullompton isolate of *Fasciola hepatica* were dosed with 15 mg/kg of compound alpha at 12 weeks post-infection. Adult flukes were recovered from the bile ducts at 24, 48 and 72 h post-treatment (p.t.). Ultrastructural changes to the flukes were assessed using transmission electron microscopy (TEM), with a view to gathering information on the mechanism(s) of action for compound alpha and on the possible route of its entry into *F. hepatica*. The tegumental syncytium was more severely affected than the gut at all time-points p.t. with compound alpha, suggesting a predominantly trans-tegumental route of uptake. Disruption to the tegumental system became increasingly severe over time. A stress response was observed at 24 h p.t. and took the form of blebbing and increases in the production and transport of secretory bodies. By 72 h p.t., extensive tegumental loss and degeneration of the tegumental cell bodies had occurred. Degeneration of subtegumental tissues and internal flooding were also observed. Changes in the gastrodermal cells were slow to develop: reduced secretory activity was evident at 72 h p.t.. There was progressive disruption to the somatic muscle layers, with disorganization of the muscle blocks and loss of muscle fibres.

Key words: *Fasciola hepatica*, liver fluke, compound alpha, transmission electron microscopy.

## INTRODUCTION

The liver fluke, *Fasciola hepatica*, is a parasitic trematode that infects ruminants and humans in temperate regions of the world. The benzimidazole anthelmintic, triclabendazole (TCBZ) is currently the treatment of choice for the control of fascioliasis in livestock. However, an over-reliance on this fasciolicide has led to the development of TCBZ-resistant *F. hepatica* infections. An experimental fasciolicide has been developed by The National Autonomous University of Mexico as a possible alternative to TCBZ for the treatment of fascioliasis. Compound alpha [5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole] is a derivative of TCBZ (Hernández-Campos *et al.* 2002) and the preliminary trial data gathered against a Mexican

field isolate showed that compound alpha is highly efficacious against *F. hepatica*, with a spectrum of activity similar to that of TCBZ. Several studies in sheep and cattle have shown that compound alpha is capable of killing flukes from 3 days old up to adult flukes at least 12 weeks old (Ibarra *et al.* 1997*a, b*, 1999, 2000; Rivera *et al.* 2002).

A trial carried out in our laboratory has confirmed the activity of compound alpha against an adult TCBZ-susceptible fluke infection, although not against a TCBZ-resistant isolate (McConville *et al.* 2009). Fluke material from that trial has been processed for electron microscopical and histological analysis. It was collected at 3 time-points post-treatment (p.t.): 24, 48, 72 h. The present paper is concerned with fine-structural changes to the tegument, somatic musculature and gut of *F. hepatica*. The tegument plays major roles in fluke biology and acts as a protective barrier between the fluke and its environment (Hanna, 1980; Fairweather *et al.* 1999). Maintenance of the tegument, especially the apical plasma membrane, is essential for the survival of the fluke in the face of stressful situations, such as drug action. Previous ultrastructural studies have shown

\* Corresponding author: Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, Northern Ireland. Tel: +44 28 9097 2298. Fax: +44 28 9097 5877. E-mail: i.fairweather@qub.ac.uk

Short communication

## Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives

Francisca Palomares-Alonso<sup>a,c</sup>, Helgi Jung-Cook<sup>a,c</sup>, Jaime Pérez-Villanueva<sup>c</sup>,  
Juan Carlos Piliado<sup>a</sup>, Sergio Rodríguez-Morales<sup>c</sup>, Guadalupe Palencia-Hernández<sup>b</sup>,  
Nayeli López-Balbiaux<sup>c</sup>, Alicia Hernández-Campos<sup>c</sup>, Rafael Castillo<sup>c</sup>,  
Francisco Hernández-Luis<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México DF 14269, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México DF 14269, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

Received 14 November 2007; received in revised form 18 April 2008; accepted 5 May 2008

Available online 15 May 2008

### Abstract

Despite albendazole being the drug of choice in neurocysticercosis treatment, its low solubility limits its bioavailability; therefore, more research is required in order to find new molecules with cestocidal activity and adequate aqueous solubility. A set of 13 benzimidazole derivatives were synthesized and their *in vitro* activities were evaluated against *Taenia crassiceps* cysts, using albendazole sulfoxide as reference molecule, showing that two of them exhibited good activity. Molecular modelling revealed that the cysticidal efficacy depends on the presence on the molecule of an H in the 1-position, a planar carbamate group at 2-position, and if the substituent in 5-position is voluminous, it should be orthogonal to the benzimidazole ring.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Benzimidazole analogues; Cysticidal activity; Molecular modelling

### 1. Introduction

Cysticercosis, the infection caused by the larval stage of the tapeworm *Taenia solium*, is the most common parasitic disease of the nervous system in humans and the single most common cause of acquired epileptic seizures in the developing world, specially Latin America, India, Africa, and China [1,2]. The treatment of neurocysticercosis has evolved from surgical therapy in the past to anticysticercal chemotherapy. Praziquantel and albendazole (ABZ) are the drugs commonly used for the treatment of this disease [3,4], and both undergo extensive metabolism by cytochrome P450 [5,6]. Up-to-date ABZ is the

drug of choice for neurocysticercosis treatment, however, its bioavailability is limited by its low solubility in the gastrointestinal tract; therefore, a high inter-individual variability in plasma levels and in efficacy has been found [7]. Considering that the search for new alternatives is still necessary, we synthesized 13 benzimidazole derivatives and their activities against *Taenia crassiceps* cysts were evaluated using albendazole sulfoxide **1**, which is the active metabolite of ABZ [8], as reference molecule. Also to understand the requirements for activity a molecular modelling study was performed.

### 2. Chemistry

Compound **1** was obtained by the treatment of ABZ with 3-chloroperbenzoic acid. Compound **2** was prepared by the methylation of ABZ with methyl iodide in methanol in the presence of potassium hydroxide. For the synthesis of compound **3**, the

\* Corresponding author. Tel.: +55 56063822.

E-mail addresses: [ingpalomares@yahoo.com.mx](mailto:ingpalomares@yahoo.com.mx) (F. Palomares-Alonso), [franher@servidor.unam.mx](mailto:franher@servidor.unam.mx) (F. Hernández-Luis).





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*

M. McConville<sup>a</sup>, G.P. Brennan<sup>a</sup>, A. Flanagan<sup>a</sup>, H.W.J. Edgar<sup>b</sup>, R.E.B. Hanna<sup>b</sup>, M. McCoy<sup>b</sup>, A.W. Gordon<sup>c</sup>, R. Castillo<sup>d</sup>, A. Hernández-Campos<sup>d</sup>, I. Fairweather<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast, United Kingdom

<sup>b</sup> Veterinary Sciences Division, Agri-Food Biosciences Institute (AFBI), Stormont, Belfast, United Kingdom

<sup>c</sup> Biometrics Division, Agri-Food Biosciences Institute (AFBI), Newforge Lane, Belfast, United Kingdom

<sup>d</sup> Facultad de Química y Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 September 2008

Received in revised form 28 January 2009

Accepted 4 February 2009

## Keywords:

*Fasciola hepatica*

Liver fluke

Compound alpha

Experimental fasciolicide

Efficacy

Triclabendazole resistance

## ABSTRACT

Seventy indoor-reared sheep were divided into 10 groups to test the efficacy of the experimental fasciolicide, compound alpha (15 mg/kg) against triclabendazole (TCBZ)-resistant and TCBZ-susceptible *F. hepatica* infections. Activity against the Sligo TCBZ-resistant isolate was tested at three time points post-infection (p.i.): 3 days, 4 weeks and 12 weeks (Groups 1–3, respectively). A parallel trial was carried out using TCBZ (10 mg/kg) (Groups 5–7): this provided a direct comparison between the efficacies of the two drugs. Group 4 served as an untreated Sligo control. Groups 8 and 9 were setup to test the efficacy of TCBZ and compound alpha against 12-week-old and 4-week-old TCBZ-susceptible, Cullompton infections, respectively. Group 10 served as an untreated Cullompton control. Sheep were sacrificed at 16 weeks p.i. and efficacies were determined. All remaining flukes were collected and measured, before being processed for whole-mount staining to assess the condition of their reproductive structures (testis, vitellaria, ovary and uterus).

A second study was carried out to test the activity of compound alpha (15 mg/kg) against mature 12-week-old TCBZ-susceptible *F. hepatica* infections in sheep. Eighteen sheep were divided into two groups, A and B. Group A was treated and Group B served as an untreated control group. Efficacy was determined by reduction in faecal egg counts.

The results showed that, whilst compound alpha was very active against adult TCBZ-susceptible flukes, producing a 100% reduction in faecal egg counts, it only caused a 62.5% reduction in fluke burden against juvenile flukes. Moreover, compound alpha was not effective against any stage of infection with TCBZ-resistant *F. hepatica* in sheep. Data from the trial also revealed biological differences between the two isolates. Thus, Sligo flukes were smaller in size and produced fewer eggs than the Cullompton flukes and their cysts were less infective to sheep. However, they reached the bile ducts more quickly and their eggs appeared in the faeces >2 weeks earlier.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Parasite Proteomics and Therapeutics Research Group, School of Biological Sciences, Queen's University of Belfast, Medical Biology Centre, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, United Kingdom. Tel.: +44 28 9097 2298; fax: +44 28 9097 5877.

E-mail address: [i.fairweather@qub.ac.uk](mailto:i.fairweather@qub.ac.uk) (I. Fairweather).

### 1. Introduction

Animal fascioliasis is primarily treated using the benzimidazole derivative triclabendazole (TCBZ), due to its ability to target both juvenile and mature *Fasciola hepatica* infections. Used since 1983, the success of TCBZ has been compromised by recent reports of TCBZ resistance (Anon, 1995, 1998; Overend and Bowen,

# Surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha

M. McConville · G. P. Brennan · A. Flanagan ·  
R. E. B. Hanna · H. W. J. Edgar · R. Castillo ·  
A. Hernández-Campos · I. Fairweather

Received: 2 April 2009 / Accepted: 20 April 2009 / Published online: 21 May 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Sheep infected with the triclabendazole-susceptible Cullompton isolate of *Fasciola hepatica* were dosed with 15 mg/kg of compound alpha at 12 weeks postinfection. Adult flukes were recovered from the bile ducts at 24, 48, and 72 h post-treatment (p.t.). Changes to the surface morphology of the flukes were assessed using scanning electron microscopy (SEM). Flukes were still active at 24 h p.t. and displayed limited areas of disruption, which were restricted to the oral cone region. At 48 h p.t., a reduced level of motility was observed in ~50% of the flukes recovered. Swelling of the tegument was more widespread and was accompanied by blebbing and partial loss of the tegumental covering of the spines. By 72 h p.t., the reduction in motility was greater, and approximately one quarter of the flukes recovered were inactive. In the majority of the flukes examined, the midbody region was marked by a discolor-

ation of the flukes' tissues. This was seen to be due to the loss of the tegumental syncytium. Sloughing extended into the tail region in some specimens and, in the more badly-affected specimens, the basal lamina was breached to expose the underlying musculature. Elsewhere on the body, the tegument that remained was relatively normal, although areas of swelling and blebbing were present. Overall, the results provided information on the time-scale of changes to the surface morphology of the fluke that underpin the efficacy of compound alpha.

## Introduction

Fascioliasis remains an important disease of livestock, the incidence of which has increased in recent years. This increase has been attributed to climatic changes and to greater stock movements (Fairweather 2005). Fascioliasis is also emerging as a significant zoonotic infection of humans (Mas-Coma et al. 2005). The control of the disease has relied heavily on the use of one drug, triclabendazole (TCBZ), because of its ability to target all stages of infection in the mammalian host (Boray et al. 1983). However, the extensive use (and over-use) of the drug has led to the development of TCBZ-resistant populations of fluke: in Australia and several European countries (for references, see Fairweather 2005, 2009). The emergence of resistance has prompted the search for new compounds or for better use of existing drugs, perhaps as combination therapies (Meaney et al. 2006, 2007). Alternative drugs tested include nitazoxanide (Favennec et al. 2003), Mirazid (Haridy et al. 2003; Abo-Madyan et al. 2004), artemisinin derivatives (Keiser et al. 2006a, b, 2007; O'Neill et al. 2009), and the TCBZ derivative, compound alpha. Compound alpha has shown promise, with a range of

---

M. McConville · G. P. Brennan · A. Flanagan · I. Fairweather (✉)  
Parasite Therapeutics Research Group School of Biological Sciences,  
The Queen's University of Belfast Medical Biology Centre,  
97 Lisburn Road,  
Belfast BT9 7BL, UK  
e-mail: i.fairweather@qub.ac.uk

R. E. B. Hanna · H. W. J. Edgar  
Veterinary Sciences Division,  
Agri-Food Biosciences Institute (AFBI),  
Stormont,  
Belfast, UK

R. Castillo · A. Hernández-Campos  
Facultads de Química y Medicina Veterinaria,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
Mexico City, Mexico

# *Fasciola hepatica*: disruption of spermatogenesis by the fasciolicide compound alpha

Maeve McConville · Robert E. B. Hanna · Gerard P. Brennan · Maurice McCoy · Hillary W. J. Edgar · Shirley McConnell · Rafael Castillo · Alicia Hernández-Campos · Ian Fairweather

Received: 11 September 2009 / Accepted: 30 September 2009 / Published online: 18 November 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Sheep infected with the triclabendazole-susceptible Cullompton isolate of *Fasciola hepatica* were dosed with 15 mg/kg of compound alpha at 12 weeks post-infection. Adult flukes were recovered from the bile ducts at 24, 48, and 72 h post-treatment (p.t.). Changes to the spermatogenic cells in the testis were examined by histology and transmission electron microscopy. Disruption to the testes became increasingly severe over time. The testis tubules shrank in size, became vacuolated, and contained fewer cells. Identification of cell types became difficult, and apoptotic eosinophilic bodies were the predominant feature at 72 h p.t. Changes to the spermatogonia were evident at 24 h p.t., the cells containing swollen and electron-lucent mitochondria. The proportion of tertiary spermatogonia increased at 48 h p.t., and they showed signs of autophagy. Multinucleate spermatogonia were a feature of drug treatment at this time point, and they contained autophagic vacuoles. By 72 h p.t., it was difficult to identify primary and secondary spermatogonia, and there were no

recognisable clusters of tertiary spermatogonia. Most spermatogonial cells were multinucleate and in the process of breaking down. With regard to the primary spermatocytes, fragmentation of the cytophore was observed at 24 h p.t. Intact rosettes were rare after 48 h treatment; collections of cells were seen, but were not organised into clusters. By 72 h p.t., no spermatocyte cells could be recognised. The results indicate that spermatogenesis was severely affected by compound alpha.

## Introduction

Fascioliasis predominantly is a disease of livestock, but there is a growing awareness that it is an important zoonotic infection in man (Mas-Coma et al. 2005). There has been a sharp increase in the incidence of the disease in recent years; this increase has been attributed to climate change (Kenyon et al. 2009; Mas-Coma et al. 2009). To date, control has relied heavily on the use of drugs and triclabendazole (TCBZ) in particular, because of its high activity against all stages of fluke in the final host (Boray et al. 1983; McConville et al. 2009a). However, reports of reduced drug activity (possibly indicative of drug resistance), along with genuine cases of TCBZ resistance, have risen in recent years (for references, see Fairweather 2009). This is a worrying scenario and highlights the need for alternative drugs.

Compound alpha is a novel flukicide that has been shown to have a high level of activity against all stages of *Fasciola hepatica*, from as young as 3 days old (Ibarra et al. 1997a, b, 2004; Rivera et al. 2002; Vera Montenegro et al. 2003, 2004; McConville et al. 2009a). This is a spectrum of activity similar to that of TCBZ itself. A number of morphological studies have been carried out to gain information on the timescale of drug action, the route of drug entry into the fluke,

---

M. McConville · G. P. Brennan · I. Fairweather (✉)  
Parasite Therapeutics Research Group,  
School of Biological Sciences, The Queen's University of Belfast,  
Medical Biology Centre,  
97 Lisburn Road,  
BT9 7BL Belfast, UK  
e-mail: i.fairweather@qub.ac.uk

R. E. B. Hanna · M. McCoy · H. W. J. Edgar · S. McConnell  
Veterinary Sciences Division,  
Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI),  
Stormont,  
Belfast BT4 3SD, UK

R. Castillo · A. Hernández-Campos  
Facultad de Química, Departamento de Farmacia,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
DF 04510 Mexico, Mexico



## *Fasciola hepatica*: Histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes after treatment *in vivo* with TCBZ and the related benzimidazole derivative, Compound Alpha

R.E.B. Hanna<sup>a,\*</sup>, H.W.J. Edgar<sup>a</sup>, S. McConnell<sup>a</sup>, E. Toner<sup>b</sup>, M. McConville<sup>b</sup>, G.P. Brennan<sup>b</sup>, C. Devine<sup>b</sup>, A. Flanagan<sup>b</sup>, L. Halferty<sup>b</sup>, M. Meaney<sup>b</sup>, L. Shaw<sup>b</sup>, D. Moffett<sup>a</sup>, M. McCoy<sup>a</sup>, I. Fairweather<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Veterinary Sciences Division, Agri-Food and Biosciences Institute, Stormont, Dundonald, Belfast, Northern Ireland BT4 3SD, United Kingdom

<sup>b</sup> School of Biological Sciences, Queen's University, Belfast BT71NN, United Kingdom

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 September 2009

Received in revised form 17 November 2009

Accepted 20 November 2009

#### Keywords:

*Fasciola hepatica*

*In vivo* histology

Reproductive structures

Triclabendazole

Compound Alpha

TCBZ resistance

### ABSTRACT

Twenty-four shed-reared lambs were each infected orally with 250 metacercariae of *Fasciola hepatica*, using either the triclabendazole (TCBZ)-sensitive Cullmpton isolate or the TCBZ-resistant Sligo isolate. Twelve weeks after infection the lambs were treated with TCBZ (10 mg/kg) or with the experimental fasciolicide, Compound Alpha (Cpd  $\alpha$ ), a benzimidazole derivative of TCBZ (15 mg/kg). The lambs were euthanised 48, 72 and 96 h after TCBZ treatment, or 24, 48 and 72 h after Cpd  $\alpha$  treatment, and flukes were collected from the liver and/or gall bladder of each animal. Untreated animals harbouring 12-week infections were euthanised 24 h after administration of anthelmintic to the treatment groups, and the untreated flukes provided control material. A semi-quantitative assessment of the degree of histological change induced by the two drugs after different times of exposure was achieved by scoring the intensity of three well-defined lesions that developed in the testes and uteri of a representative sample of flukes from each lamb. In general, it was found that in those tissues where active meiosis and/or mitosis occurred (testis, ovary, and vitelline follicles), there was progressive loss of cell content due to apparent failure of cell division to keep pace with expulsion of the mature or effete products. Further, actively dividing cell types tended to become individualised, rounded and condensed, characteristic of apoptotic cell death. Protein synthetic activity was apparently inhibited in the Mehlis' secretory cells. In the uterus, where successful formation of shelled eggs represents the culmination of a complex sequence of cytokinetic, cytological and synthetic activity involving the vitelline follicles, the ovary and the Mehlis' gland, histological evidence indicating failure of ovigenesis was evident from 24 h post-treatment onwards. The development of these lesions may be related to the known anti-tubulin activity of the benzimidazole class of anthelmintics, to the induction of apoptosis in cells where mitosis or meiosis has aborted due to failure of spindle formation, and to drug-induced inhibition of protein synthesis. The semi-quantitative findings indicated that Cpd  $\alpha$  is slightly less efficacious than TCBZ itself in causing histological damage to the reproductive structures of TCBZ-sensitive flukes, and that, like TCBZ, it caused no histological damage in flukes of the TCBZ-resistant isolate. This study illustrates the potential utility of histological techniques for conveniently screening representative

\* Corresponding author. Tel.: +44 2890525615; fax: +44 2890525767.

E-mail address: [bob.hanna@afbini.gov.uk](mailto:bob.hanna@afbini.gov.uk) (R.E.B. Hanna).



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/JMGM](http://www.elsevier.com/locate/JMGM)

## The design and inhibitory profile of new benzimidazole derivatives against triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*: A problem of residue motility<sup>☆</sup>

Antonio Romo-Mancillas<sup>a</sup>, Alfredo Téllez-Valencia<sup>b</sup>, Lilián Yépez-Mulia<sup>c</sup>, Francisco Hernández-Luis<sup>a</sup>, Alicia Hernández-Campos<sup>a</sup>, Rafael Castillo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones en Alimentos y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango 34000, Mexico

<sup>c</sup> Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS, México DF, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 February 2011

Received in revised form 18 June 2011

Accepted 21 June 2011

Available online 29 June 2011

#### Keywords:

Docking

Triosephosphate isomerase

Benzimidazole

Homodimeric interface

### ABSTRACT

To develop a new set of compounds with inhibitory activity against the triosephosphate isomerase of *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), a group of benzimidazole derivatives was studied using four different docking procedures. These docking procedures differ in the number and type of mobile residues considered in the analysis. As a result of this methodology, a clustered analysis of plausible candidate structures was produced. A different set of previously synthesized compounds was used to validate this analysis. The validation showed that the best results correspond to the docking procedure in which the residues near the hydrophobic pocket of the protein's interface were considered mobile. A binding site for the best candidates was identified. Residues Tyr103, Glu105 and Lys113, among others, are important for the binding of this kind of compound. Residue Tyr103 is different in the human TIM, thus establishing a key feature for the future design of selective inhibitors.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

According to the World Health Organization [1], American trypanosomiasis or Chagas disease affects approximately 28 million people in the American continent, particularly in Latin-American countries. Endemic to this continent, Chagas disease is caused by infection of the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. Mild symptoms are common to all infections in the early stages of the disease. However, if left untreated this infection can cause severe organ dysfunction and death in 20–30% of affected individuals several years after infection. Thus, life expectancy for these individuals is diminished by almost 15 years. This disease is considered incurable, without effective treatment, and is classified as “neglected” for economic reasons. Still, some research groups have focused on studying the parasite's metabolic pathways to identify possible drug targets [2]. Among the plethora of biological targets, there has been considerable attention given to block the parasite's only energy supply: the glycolytic pathway [3,4].

Among other enzymes in this metabolic pathway, triosephosphate isomerase (TIM) has been identified as an important enzyme

that acts at a crucial step [3]. This homodimeric enzyme catalyzes the interconversion of dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) to glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) [5]. TIM is present in both human (HsTIM) and *T. cruzi* (TcTIM) cells, and it contains a highly conserved catalytic site. These facts make difficult to design drugs that are focused on this site. Therefore, to inhibit this enzyme a putative “allosteric” control site, which is extremely hydrophobic and is located at the homodimeric interface, has been proposed [6,7]. The conforming residues vary from species to species. For example, this hydrophobic site in TcTIM is formed by aromatic residues, whereas aliphatic and aromatic residues in HsTIM [8]. Several efforts have been made to find a selective inhibitor to TcTIM, among these brevifolin derivatives extracted from natural products [9], heterocyclic systems like phenazine dioxides, thiadiazines and thiazoles among others found by high-throughput screening [10], and a group of amphiphilic benzothiazole derivatives [8,11,12] that have been extensively studied *in silico* [13–16]. It could be extracted from these works that the interface of TcTIM has affinity for molecules that are mostly aromatic heterocyclic systems.

Our research group has synthesized a large number of benzimidazole derivatives with antiparasitic activity [17–19]. Some of these compounds present activity, ranging from poor to mild, as TcTIM inhibitors (see below). Since these benzimidazole derivatives act as inhibitors, broadening the spectra of scaffolds that could bind to this enzyme, a subsequent task would be to identify the

<sup>☆</sup> Taken in part from the PhD thesis of Antonio Romo-Mancillas.

\* Corresponding author. Tel.: +52 5556225287; fax: +52 5556225329.

E-mail address: [rafaelc@servidor.unam.mx](mailto:rafaelc@servidor.unam.mx) (R. Castillo).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Impact of compound alpha treatment *in vivo* on egg production by the liver fluke, *Fasciola hepatica*

M. McConville<sup>a</sup>, R.E.B. Hanna<sup>b</sup>, G.P. Brennan<sup>a</sup>, H.W.J. Edgar<sup>b</sup>, S. McConnell<sup>b</sup>, M. McCoy<sup>b</sup>, R. Castillo<sup>c</sup>, A. Hernández-Campos<sup>c</sup>, I. Fairweather<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Parasite Therapeutics Research Group, School of Biological Sciences, Medical Biology Centre, The Queen's University of Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, Northern Ireland, United Kingdom

<sup>b</sup> Veterinary Sciences Division, Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI), Stormont, Belfast BT4 3SD, United Kingdom

<sup>c</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, DF04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 October 2011

Received in revised form

12 December 2011

Accepted 20 December 2011

#### Keywords:

*Fasciola hepatica*

Liver fluke

Compound alpha

*In vivo* sheep trial

Whole mount preparations

Histology

Transmission electron microscopy

Uterus

Mehlis' gland

Ovary

Vitellaria

### ABSTRACT

Sheep infected with the triclabendazole-susceptible Cullompton isolate of *Fasciola hepatica* were treated with compound alpha at a dosage of 15 mg/kg at 12 weeks post-infection. Adult flukes were recovered from the bile ducts at 24 h, 48 h and 72 h post-treatment (pt). They were processed for whole mount analysis, histology and transmission electron microscopy of the female reproductive system: specifically, the uterus, Mehlis' gland, ovary and vitellaria. As judged by the appearance of the uterus, normal egg production ceased within 24 h of treatment; this phenomenon preceded significant changes to the other reproductive organs.

Over the 3-day pt period, there was a progressive decline in the number of oogonia in the ovary, together with an increase in the number of eosinophilic and apoptotic oocytes and vacuolation and shrinkage of the ovarian tubules. There was a shift in the cell population within the vitelline follicles at 48 h pt, with relatively greater numbers of mature vitelline cells and fewer immature cells. The follicles were vacuolated and the shell globule clusters in the mature cells were disorganised. Greater disruption was seen at 72 h pt, with a reduction in the size of the follicles and rupture of cells, releasing their content into the lumen of the follicles. These histological observations were confirmed and extended at the TEM level. Thus, examination of electron micrographs showed that disruption of the shell globule clusters was evident at 48 h pt, which coincided with the start of the breakdown of the mature cells and of the nurse cell network. These degenerative changes were more conspicuous at 72 h pt. In the Mehlis' gland, shrinkage and vacuolation of the cells and their cytoplasmic extensions became progressively greater from 48 h to 72 h pt, and secretory activity declined. The changes in the reproductive organs and inhibition of egg production are put in context of the overall time-course of drug action.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fasciolosis remains a major cause of ill-health and production losses in ruminant livestock and, increasingly, is being recognised as a significant pathogen of man (Mas-Coma et al., 2009a,b). It has been predicted that the incidence of fasciolosis will continue to rise in the future, continuing the trend seen in recent years; this trend has

\* Corresponding author at: School of Biological Sciences, Medical Biology Centre, The Queen's University of Belfast, 97, Lisburn Road, Belfast, Northern Ireland, BT9 7BL, United Kingdom. Tel.: +44 28 90972298; fax: +44 28 90975877.

E-mail address: [i.fairweather@qub.ac.uk](mailto:i.fairweather@qub.ac.uk) (I. Fairweather).