



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y actividad de derivados del 1*H*-Bencimidazol en la arginina
desiminasa de *Giardia intestinalis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Gustavo Adolfo Martínez Córdoba

TUTOR: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Dr. Francisco Yuste López
Vocal	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
Vocal	Dr. Fernando Calzada Bermejo
Vocal	Dr. Héctor García Ortega
Secretario	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Lugar donde se desarrolló el tema

Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Laboratorio L-122, UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma México por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por permitirme trabajar en su grupo de investigación, compartirme sus conocimientos día a día en el trabajo experimental y sus valiosas observaciones para el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. María Alicia Hernández Campos por el apoyo brindado en mi quehacer en el laboratorio y sus consejos oportunos en el trabajo escrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca número 288916, gracias al cual pude llevar a término mi anhelada maestría.

Al CONACyT por apoyo al proyecto No. 168718.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del impreso y sus observaciones que me ayudaron a dar mejor presentación al trabajo.

A todos mis compañeros por su amistad y por darse el tiempo de revisar conmigo conceptos que yo desconocía, todo ello en la pizarra de nuestro laboratorio con marcador en mano.

A las personas que contribuyeron directa o indirectamente al desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a México por haberme acogido por más de dos años, darme nuevas amistades, y haberme hecho vivir experiencias de vida que siempre recordaré.

¡Viva México!

Dedicada

A mis padres, Gustavo y Amparo.

Porque ustedes son mi motor y saben exactamente cuánto me ha costado cumplir el sueño hasta aquí.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1. Giardiosis	3
2.2. <i>Giardia intestinalis</i>	4
2.2.1. Ciclo de vida.....	4
2.2.2. Características del trofozoíto y el quiste	5
2.2.3. Fuentes de energía de <i>Giardia intestinalis</i>	5
2.3. Bencimidazoles como agentes antiparasitarios	9
2.4. Diseño de fármacos asistido por computadora	9
2.5. Antecedentes del proyecto	10
CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3.1. HIPÓTESIS	13
3.2. OBJETIVO GENERAL	13
3.2.1 Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	15
4.1. Planificación de la ruta de síntesis	15
4.2. Análisis retrosintético	15
4.3. Evaluación antiprotozoaria	20
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1. Síntesis, identificación y caracterización de intermediarios y productos finales	21
5.1.1 Obtención de 1-Metil-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -bencimidazol-2-tiona (Int 3).....	21
5.1.2 Obtención del clorhidrato de 2-[(1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)sulfanil]etil carbamimidotioato (ADI 1).....	23
5.1.3 Obtención de <i>N</i> '-hidroxi-3-[(1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)sulfanil] propanimidamida (ADI 2).....	26
5.1.4 Obtención de 2-{2-[(1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carbotioamida (ADI 3) y 2-{2-[(1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carboxamida (ADI 4)	29
5.1.5 Obtención de 1-{2-[(1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}guanidina (ADI 5).....	31
5.1.6 Asignación de desplazamientos químicos para ¹³ C y para ¹ H.....	34
5.1.7 RMN ¹³ C de los compuestos finales.....	36
5.1.8 RMN ¹ H de los compuestos finales.....	37
5.1.9 Espectrometría de masas y análisis elemental	37

5.2. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos finales	40
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	43
6.1. PERSPECTIVAS.....	44
CAPÍTULO 7. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	45
7.1. Instrumentación.....	45
7.2. Cromatografía	46
7.2.1 Sistemas cromatográficos	46
7.3. Síntesis.....	47
7.3.1 Síntesis de N-metil-2-nitroanilina (Int 1)	47
7.3.2 Síntesis de 1-metil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (Int 3).....	48
7.3.3 Síntesis 2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etanol (Int 4)	49
7.3.4 Síntesis de 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 5).....	49
7.3.5 Síntesis del clorhidrato de carbamimidotioato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)etilo (ADI 1*)	50
7.3.6 Síntesis de 3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanonitrilo	50
(Int 6* o ADI6*)	50
7.3.7 Síntesis de N'-hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanimidamida (ADI 2*).....	51
7.3.8 Síntesis de 2-[(2,2-dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 7)	51
7.3.9 Síntesis de [(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]acetaldehído (Int 8).....	52
7.3.10 Síntesis de 2-{2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carbotioamida (ADI 3)	52
.....	52
7.3.11 Síntesis de 2-{2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carboxamida (ADI 4)	53
7.3.12 Síntesis de (2-bromoetil)carbamato de terc-butilo	53
7.3.13 Síntesis de {2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}carbamato de terc-butilo (Int 9)	54
7.3.14 Síntesis de 2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (Int 10)	54
7.3.15 Síntesis de 1-{2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}guanidina (ADI 5)	55
7.4. Evaluación de la susceptibilidad de los trofozoitos de <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> y <i>T. vaginalis</i>	55
ANEXOS	60

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades parasitarias con mayor incidencia a nivel mundial se encuentran aquellas producidas por los protozoarios como *Giardia intestinalis*, la cual es causante de infecciones intestinales que afectan principalmente a la población infantil retardando su crecimiento y desarrollo intelectual. Este problema existe en varios países latinoamericanos, en los cuales la giardiosis se encuentra entre las principales infecciones intestinales.

El tratamiento común para esta problemática es el uso de la quimioterapia, la cual no siempre resulta útil pues existen cepas que se han vuelto resistentes a los fármacos disponibles actualmente.

Basado en lo anterior, el desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios es una necesidad urgente principalmente por parte de los países que sufren de parasitosis.

Dentro de los métodos usados para el diseño de fármacos, actualmente es de primordial importancia el uso de metodologías computacionales. Una aplicación de estas herramientas es el diseño de antiparasitarios, por ejemplo giardicidas, basados en el diseño racional de inhibidores de alguna ruta metabólica propia del parásito.

Los componentes de la ruta metabólica del aminoácido arginina en *Giardia intestinalis* muestran ser una diana para el diseño de giardicidas dado que esta ruta metabólica es fuente importante de energía para el parásito. La arginina desiminasa de *G. intestinalis* (**GiADI**) es una de las tres enzimas involucradas en el metabolismo de la arginina y cuenta con la ventaja que ésta se encuentra en *Giardia*, pero no en humanos.

Estudios de proteómica realizados en giardias tratadas con compuestos bencimidazólicos, obtenidos en nuestro grupo de investigación, muestran que la expresión de la **GiADI** se ve afectada por algunos compuestos lo que parece indicar que éstos inhiben su función. Por ello, en nuestro grupo se desarrolló un trabajo de investigación teórico basado en la inhibición de la enzima **GiADI** para el diseño de fármacos giardicidas. En dicho trabajo se utilizó la herramienta computacional de modelado por homología para la obtención de la estructura tridimensional de **GiADI** y se evaluó la capacidad de que **GiADI** fuera un blanco. Por medio de la técnica de

acoplamiento molecular o *docking*, en este estudio se diseñaron nuevos inhibidores teóricos con buena afinidad por la enzima **GiADI**.

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de algunas moléculas diseñadas por estudios de acoplamiento molecular con el fin de que sean evaluadas frente a **GiADI** en ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Giardiosis

La giardiosis es una infección intestinal causada por el protozoario *Giardia intestinalis* (conocido también como *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*) y es la responsable de la mayor causa de diarrea transmitida por agua o alimentos a nivel mundial.¹

La giardiosis ejerce un impacto significativo en la salud pública alrededor del mundo por su alta prevalencia y causa de muerte por la infección, siendo los más afectados los niños.

Las afecciones por giardiosis en países desarrollados son menores, reportándose entre 0.4 y 7.6% de infecciones en dichos países y entre 8 y 30% en países en vías de desarrollo.²

Cabe resaltar que la prevalencia es mucho mayor para la población infantil, por ejemplo, en Colombia el 12% de la población sufre de la afección pero el 28% de los niños entre 1 y 4 años la padecen.³

En México en el 2010, de acuerdo con estadísticas del CENEVASE (Centro Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades) se detectaron un total de 20678 casos nuevos de enfermedad por *Giardia lamblia*, siendo el grupo más afectado el de los lactantes y preescolares de 1 a 4 años de edad; los estados con la más alta incidencia fueron Sinaloa, Yucatán y Baja California Sur⁴.

Los agentes más efectivos para el tratamiento de giardiosis son dosis únicas de tinidazol u ornidazol, 5 a 7 días de quinacrina, 5 a 7 días de metronidazol y 3 días de Nitazoxanida. El tinidazol y ornidazol no están aprobados para su uso en los Estados Unidos, la producción de quinacrina ha sido descontinuada y ésta tiene efectos colaterales adversos especialmente en niños, el uso de nitazoxanida se acompaña frecuentemente por molestias gastrointestinales. Así que en Estados Unidos el tratamiento de elección es metronidazol.⁵ Tomando esto último como referencia existen reportes de complicaciones y efectos adversos en el uso de las pocas sustancias que se tienen para combatir la giardiosis; además de que ya existe resistencia de algunas cepas a fármacos como metronidazol y albendazol, viéndose la necesidad de crear nuevas alternativas para este tratamiento.

2.2. *Giardia intestinalis*

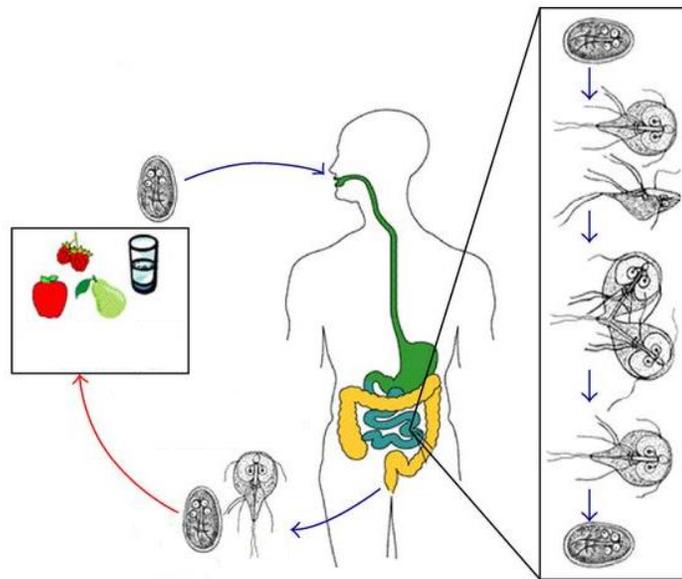
La *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) es un microorganismo eucariota considerado entre los más primitivos, se clasifica dentro del reino *Protozoa*, subreino *Archezoa*, subfilo *Eopharyngia*, clase *Trepomonadea*, subclase *Diplozoa* y orden *Giardiida*.

Es un microorganismo anaerobio que no posee mitocondria o algún componente de fosforilación oxidativa, además carece de nucléolo y peroxisomas.

2.2.1. Ciclo de vida

La *G. intestinalis* es un protozooario encontrado en dos estadios: trofozoíto y quiste.

Esquema 2.1. El trofozoíto habita en el epitelio de los dos tercios superiores del intestino delgado. Ahí absorbe nutrientes y se reproduce por fisión binaria cada cinco horas.⁶ Algunos trofozoítos se despegan de la pared intestinal y continúan hacia el intestino grueso, trayecto en el cual se transforman en quistes y se excretan por las heces.



Esquema 2.1. Ciclo de vida de *G. intestinalis*.

2.2.2. Características del trofozoíto y el quiste

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene una longitud de 12-15 μm , unicelular y dinucleado, presenta flagelos en su parte lateral, los cuales le proporcionan movimiento. Su principal característica es el disco de adhesión que le sirve para fijarse al hospedero y obtener los nutrientes (**Figura 2.1**).

El quiste es el responsable de la transmisión de la giardiosis pues es resistente a las condiciones externas por días o semanas, tiene un diámetro aproximado de 7-10 μm . Su pared se constituye de un exterior filamentosos y una porción membranosa interna que lo protegen.⁷

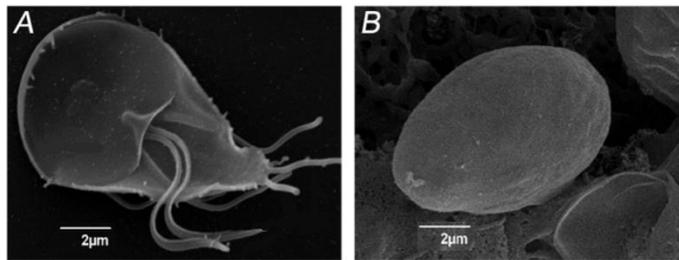


Figura 2.1. Estadios de Giardia Intestinalis. (A) trofozoíto, (B) quiste.

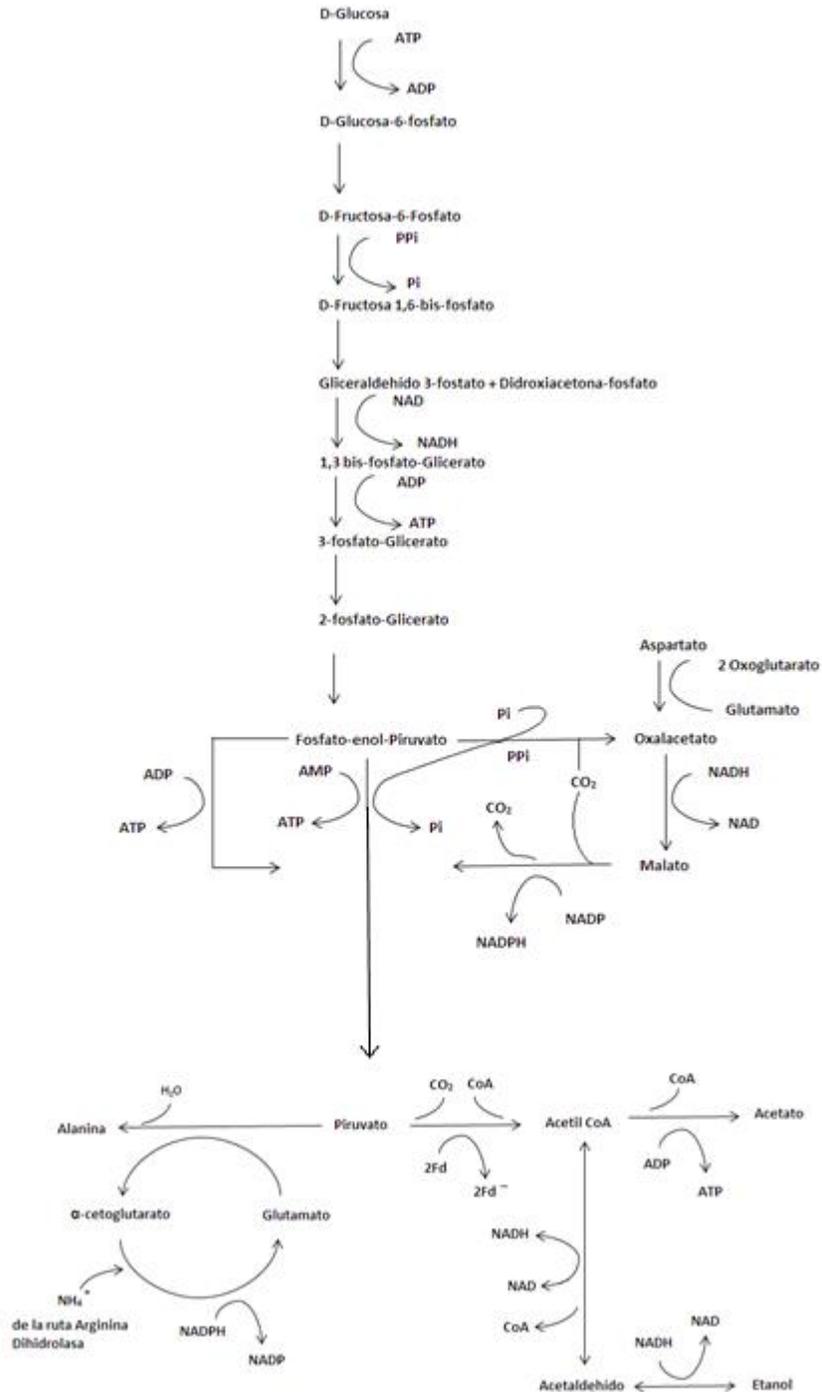
2.2.3. Fuentes de energía de Giardia intestinalis

La mayoría de los organismos eucariotas dependen principalmente del metabolismo aeróbico para su producción de energía. Sin embargo, algunos eucariotas como *G. intestinalis* se caracterizan por la falta de mitocondria y fosforilación oxidativa mediada por citocromo. Para la obtención de energía, *G. Intestinalis* se basa en el metabolismo fermentativo. A pesar de que ha sido comúnmente aceptado que la glucosa es la única fuente de energía para *G. intestinalis*, hay evidencia que esto no es verdadero; puesto que el catabolismo de glucosa (**Esquema 2.2**) no puede justificar todos los productos finales, otras fuentes de carbono deben ser utilizadas también, como son aminoácidos y proteínas.

Se estima que en su hábitat natural *G. intestinalis* obtiene 3 a 4 veces más energía a partir de la arginina que por medio de la glucosa.⁸ **Esquema 2.3.**

El metabolismo del trofozoíto es afectado por pequeños cambios en la concentración de oxígeno. Bajo condiciones totalmente anaeróbicas la alanina es el producto mayoritario del metabolismo, con pequeñas cantidades de oxígeno $< 0.25 \mu\text{M}$ ya se promueve la producción de etanol y la de alanina se inhibe. Con un mayor incremento de oxígeno, la producción de alanina y etanol se inhiben; a concentraciones mayores a $46 \mu\text{M}$, la producción de alanina se inhibe completamente siendo acetato y CO_2 los productos del metabolismo. Estas concentraciones son importantes pues están relacionadas con las concentraciones de oxígeno que se encuentran en el intestino que van de 0 a $60 \mu\text{M}$.

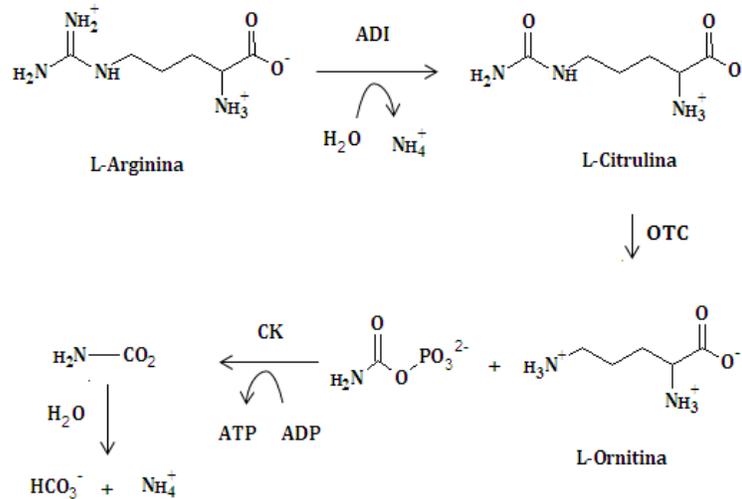
El metabolismo de la glucosa y la generación de energía a partir de ésta se resumen en el **Esquema 2.2**. Todas las reacciones se producen en el citosol pues *G. intestinalis* no posee compartimientos metabólicos para ello.



Esquema 2.2. Metabolismo de la glucosa en *G. intestinalis*.

Como ya se mencionó, el metabolismo de los aminoácidos es reconocido como un componente importante del metabolismo energético de *Giardia intestinalis*. En la vía de la arginina deshidrolasa (ADH) (Esquema 2.3) la arginina es convertida

primeramente a citrulina, esta a su vez se convierte en ornitina y carbamoil fosfato, este último se convierte finalmente en amoniaco con la generación de ATP a partir de ADP por fosforilación. La ornitina es subsecuentemente intercambiada por arginina extracelular por un mecanismo de transporte. En la vía metabólica de la **ADH** participan tres enzimas que son la arginina desiminasa (**GiADI**), ornitina carbamoiltransferasa (**OTC**) y la carbamato cinasa (**CK**).



Esquema 2.3. Ruta metabólica de la arginina deshidrolasa.

La arginina desiminasa de *G. intestinalis* (**GiADI**) cataliza la conversión de arginina a citrulina con liberación de amoniaco, es una enzima de 580 aminoácidos y tiene aproximadamente 145 aminoácidos más en su extensión C-terminal. El alineamiento de secuencias con otras enzimas **ADI** reportadas muestra que el sitio catalítico se encuentra altamente conservado, los aminoácidos del sitio catalítico se identifican como Cys424, His280, Asp175, Glu226 y Asp282.

La importancia que tiene **GiADI** en la supervivencia de *G. intestinalis* es muy alta ya que cuando se usan nucleótidos antisentido para el silenciamiento del gen de **GiADI** los trofozoítos no se desarrollan.

Otra función importante de **GiADI** es la evasión del sistema inmune debido a que cuando el trofozoíto llega al intestino las células epiteliales del hospedero liberan arginina en una respuesta normal a la infección, siendo esta metabolizada por *Giardia* evitándose la generación de óxido nítrico y que el sistema inmune finalmente no responda.⁹

2.3. Bencimidazoles como agentes antiparasitarios

En las décadas de los 80s y 90s se realizaron estudios referentes a la actividad antiprotozoaria del albendazol y mebendazol, siendo éstos los primeros reportes sobre la actividad giardicida y tricomonicida para derivados de bencimidazol que hasta la fecha son utilizados como antihelmínticos. Esto llevó a la síntesis de nuevos derivados de bencimidazol y a evaluarlos como antiprotozoarios.

Entre los primeros trabajos se encuentra la síntesis y evaluación de derivados de bencimidazol con sustituyentes en posición 2 del anillo con hidrógeno, metilo, amino, mercapto, metiltio y carbamato de metilo, además, con sustituciones que incluyen cloro e hidrógeno en las posiciones 5 y 6.¹⁰

Los compuestos mostraron buena actividad giardicida y amebicida, en la mayoría de casos fueron más activos que el fármaco de referencia, metronidazol.

Con el fin de conocer más acerca de los requerimientos estructurales para ejercer actividad antiprotozoaria se prepararon derivados 1-metilados, observándose que su actividad giardicida era superior a la de los análogos con hidrógeno en posición 1 en la mayoría de los casos.¹¹

La información que se posee de estos estudios comprende una base de datos importante para estudio de relaciones estructura-actividad.

2.4. Diseño de fármacos asistido por computadora

Los métodos computacionales son herramientas muy valiosas para el diseño de nuevas moléculas. Dentro de ellos, los métodos basados en la estructura son una parte integral del desarrollo de fármacos. Para el uso de esta metodología se requiere de la estructura 3D de un blanco que enlace a su ligando natural o a un fármaco; esto se determina ya sea por cristalografía de rayos X o por RMN para identificar el sitio activo.¹² Una vez que se conoce la estructura del blanco se realiza la búsqueda de posibles compuestos activos mediante un estudio de cribado virtual o “*virtual screening*” en una biblioteca de compuestos pública (por ejemplo la base de datos de ZINC¹³) o privada. Para realizar el “*virtual screening*” se emplea la técnica de acoplamiento molecular o *docking*.

En el caso de desconocerse la estructura 3D de la proteína que contiene el blanco se puede hacer uso del modelado por homología¹⁴, el cual es una herramienta computacional utilizada para predecir modelos de estructuras tridimensionales de proteínas y que proporciona información sobre la estructura y la función de éstas.

2.5. Antecedentes del proyecto

La **GiADI** es una enzima que en estudios de proteómica de *G. intestinalis* tratada con compuestos bencimidazólicos se ve afectada en su expresión, y debido a su importancia en los procesos energéticos y de evasión del sistema inmune se considera un blanco importante para el diseño de compuestos giardicidas. Dentro de los trabajos realizados en la Facultad de Química, en el Departamento de Farmacia de la UNAM, y el Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) se ha venido investigando a la **GiADI** como un blanco útil para el diseño de fármacos.

Inicialmente, Mendez-Cuesta reporta en su tesis de maestría,¹⁵ el estudio de la proteómica de trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con el compuesto CMC20 (compuesto sintetizado en nuestro grupo de investigación) y fármacos de referencia. El compuesto híbrido CMC20 resultó ser uno de los más activos contra *G. intestinalis*. Ante la exposición a este compuesto el trofozoíto pierde su morfología característica, pierde flagelos, se afecta la membrana y el disco de adhesión sufre un daño importante. En el análisis electroforético de las proteínas de *G. intestinalis* se pudo identificar la modificación de la expresión de algunas proteínas a causa de CMC20 como se ve en la **Tabla 2.1** en la cual sólo se citan algunos ejemplos.

Tabla 2.1. Enzimas que se observan alteradas en su expresión en trofozoítos de *G. intestinalis* expuestas a CMC20

Proteína	Expresión	Función
β-Tubulina	Disminuye	Estructura del citoesqueleto
Enolasa	Disminuye	Enzima del metabolismo de la glucosa. Cataliza a conversión de glicerol 2-fosfato a fosfoenolpiruvato

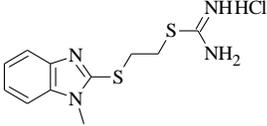
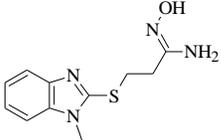
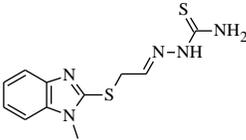
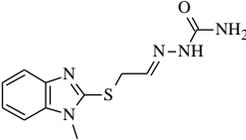
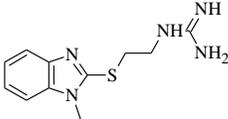
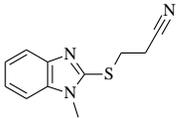
Arginina desiminasa	Disminuye	Enzima de la ruta de la ADH . Cataliza la conversión de arginina a citrulina
α-Giardina	Disminuye	Proteína estructural asociada a membrana y pared del quiste

Además se reporta que la disminución de la expresión de **GiADI** se lleva a cabo por efecto del compuesto sobre la enzima y no en el proceso de biosíntesis de la misma, pues en estudios de RT-PCR el compuesto no interfiere con la expresión de la enzima a nivel traduccional, por lo que su acción es a nivel postraduccional.

Con esta información se procedió a la obtención de la estructura tridimensional de la **GiADI**, ya que su estructura cristalina no se encuentra reportada en alguna base de datos. Un modelo 3D de GiADI obtenido por modelado por homología se reporta en la tesis de maestría de Pedro Josué Trejo Soto.¹⁶ En este estudio también se diseñaron inhibidores que poseen una interacción parecida con la **GiADI** como lo hace su sustrato natural, la arginina, ya que ésta interactúa directamente con los aminoácidos del sitio activo transformándola en el grupo urea presente en la citrulina. Con esto en mente se decidió tomar el grupo guanidino del sustrato natural, el cual es reconocido por la enzima, y unirlo al núcleo de bencimidazol, el cual *per se* ha demostrado que tiene actividad antiparasitaria. Posteriormente, se diseñó una serie de moléculas, análogas al híbrido mencionado, para evaluar su afinidad con base en la modificación del grupo guanidino del sustrato arginina por isómeros de este grupo.

Utilizando como base la estructura de la **GiADI** derivada de los estudios previos de homología molecular, se calcularon las energías de unión derivadas del docking de los compuestos planificados a ser sintetizados en el presente trabajo. Los valores de energía se muestran en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Energías de unión derivadas de docking de los compuestos diseñados como inhibidores de ADI de *Giardia intestinalis*

Clave	R	Autodock Energía (kcal* mol^{-1}) / Poblaciones
ADI 1		-5.90/7
ADI 2		-6.36/5
ADI 3		-5.82/5
ADI 4		-6.86/5
ADI 5		-7.72/11
ADI 6		-6.13/11

CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones intestinales siguen siendo un problema de salud a nivel mundial, una de estas parasitosis es la provocada por el protozooario *G. intestinalis*.

La enzima **GiADI** muestra ser un blanco potencial para el diseño de fármacos contra *Giardia intestinalis* y a partir de estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se han venido realizando estudios teóricos relacionados con la enzima, entre ellos, el diseño de moléculas afines por el sitio catalítico de ADI, que puedan actuar como inhibidores de la misma y, en consecuencia, como giardiacidas. Por ello se decidió realizar la síntesis de compuestos diseñados previamente por métodos computacionales con el fin de poder evaluarlos *in vitro* contra el parásito y con la enzima.

3.1. HIPÓTESIS

Los compuestos bencimidazólicos diseñados por docking como inhibidores de la enzima **GiADI** (obtenida por modelado por homología) serán activos contra el parásito *G. intestinalis* por contar en su estructura con elementos análogos presentes en el sustrato natural de **GiADI**.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar la actividad giardicida de seis nuevos derivados de bencimidazol 1,2-disustituídos diseñados por docking como inhibidores de la enzima arginina desiminasa (**GiADI**).

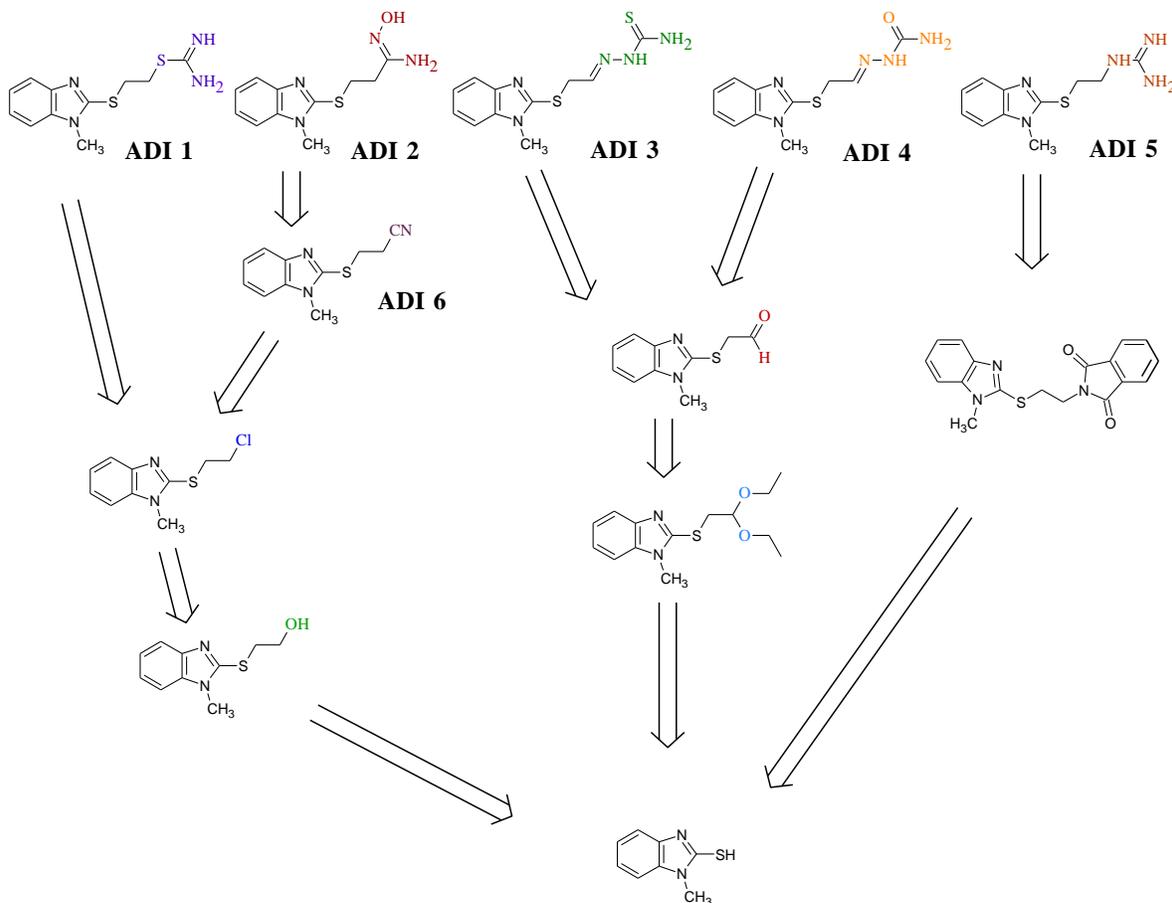
3.2.1 Objetivos específicos

- Proponer una ruta de síntesis viable para la preparación de los compuestos diseñados **ADI 1–ADI 6**.
- Sintetizar los compuestos anteriores en cantidades suficientes para su identificación y evaluación contra *G. intestinalis* y **GiADI**.

- Enviar a evaluación *in vitro* los compuestos **ADI 1-ADI 6** contra de otros protozoarios (*T. vaginalis* y *E. histolytica*).

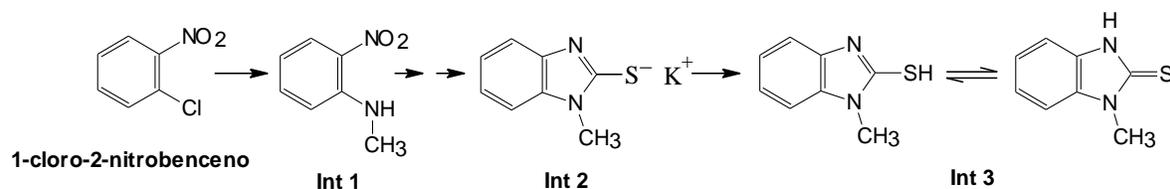
El análisis retrosintético para la preparación de los compuestos **ADI 1-ADI 6** se representa en el **Esquema 4.2**. La primera observación fue que los grupos sustituyentes en la cadena de la posición 2 del anillo bencimidazólico eran muy polares y heteroatómicos lo que podría traer problemas como reacciones secundarias indeseables si se intentaba primero sintetizar estos fragmentos para unirlos posteriormente al bencimidazol, motivo por el cual se consideró que en todos los compuestos el fragmento polar sería sintetizado en el último paso, a partir de los precursores adecuados por reacciones de sustitución nucleofílica o por reacciones sobre el C=O de un aldehído con los reactivos apropiados. Posteriormente se analizó la posibilidad de encontrar un fragmento común a todas las moléculas que fuese estable, y en lo posible, con una sola posición reactiva. Del análisis retrosintético se observó que el fragmento más estable, común a todos los compuestos y que evite el mayor número de reacciones colaterales sería el 1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol.

Para la síntesis de 1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol se contaba ya con la materia prima 1-cloro-2-nitrobenceno por lo que se planeó la síntesis usando como referencia lo ya reportado por nuestro grupo de investigación¹⁷ y en la literatura.¹⁸ El análisis retrosintético se representa en el **Esquema 4.2**.



Esquema 4.2. Análisis retrosintético para las moléculas propuestas.

La síntesis del precursor común, el **Int 3**, se realizó a partir de 1-cloro-2-nitrobenzenceno a través de los pasos indicados en el **Esquema 4.3**. El 1-cloro-2-nitrobenzenceno por reacción de sustitución con metilamina generó *N*-metil-2-nitroanilina (**Int 1**) la cual a continuación se redujo catalíticamente e hizo reaccionar con etil xantato de potasio produciendo la ciclocondensación dando como producto el **Int 3** que es reactivo común a todos los compuestos finales **ADI 1-ADI6**.



Esquema 4.3. Ruta de síntesis de 1-metil-1*H*-bencimidazol-2-tiol.

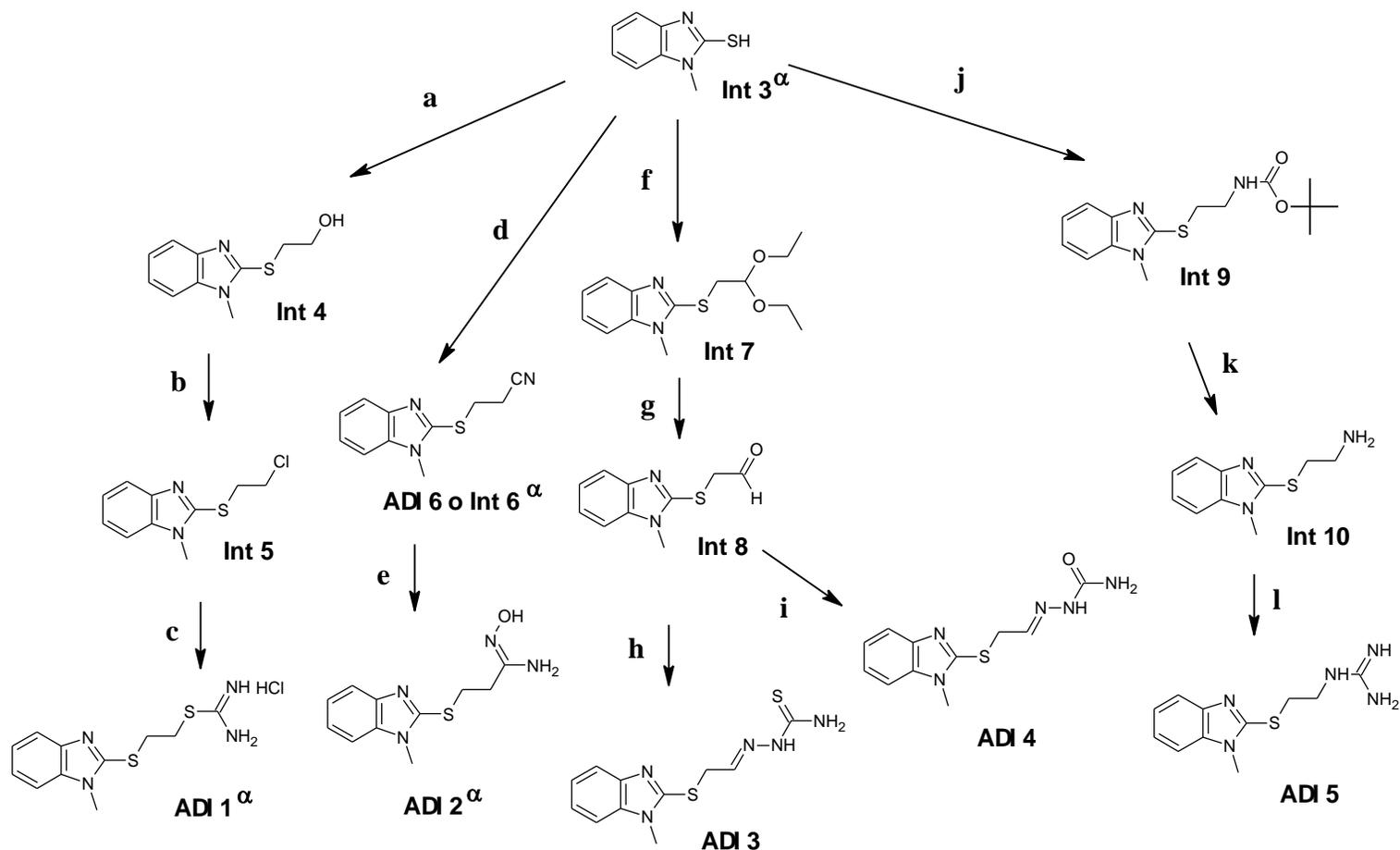
La ruta que se siguió para la síntesis de los compuestos **ADI 1-ADI 6** está indicada en el **Esquema 4.4**, y se describe brevemente a continuación.

Para la obtención del compuesto final **ADI 1**, el compuesto **Int 3** se hizo reaccionar con bromoetanol produciéndose el alcohol **Int 4**. A partir de este compuesto, la cloración con cloruro de tionilo llevó al cloruro de alquilo **Int 5** que al reaccionar con tiourea dió el compuesto final **ADI 1**.

El producto de la reacción del **Int 3** con acrilonitrilo dio el **Int 6 (ADI 6)**, sustancia que al reaccionar con hidroxilamina produjo **ADI 2**.

A partir del intermediario **Int 3** por reacción con el dietil acetal del bromoacetaldehído se obtuvo el **Int 7**, el cual al desprotegerse con ácido acuoso dio el aldehído (**Int 8**), precursor de **ADI 3** y **ADI 4**. Finalmente, la reacción del aldehído con tiosemicarbazida y semicarbazida produjo **ADI 3** y **ADI 4** respectivamente.

La reacción del intermediario **Int 3** con (2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo llevó al **Int 9**, el cual se desprotegió con ácido acuoso para dar la amina **Int 10**, finalmente, por reacción de ésta con 1*H*-pirazol-1-carboxamidina generó el producto **ADI 5**.



^α Vease la sección resultados y discusión para una explicación de las estructuras finales asignadas a estos compuestos.

Esquema 4.4. Síntesis de compuestos ADI 1-6: (a) KOH, BrCH₂CH₂OH, agua, 0 °C → T. amb. toda la noche; (b) SOCl₂, CHCl₃, 0 °C → reflujo, 3 h; (c) tiourea, DMF, 110 °C, 3 h; (d) Acrilonitrilo, agua, 0 °C → T. amb. toda la noche; (e) NH₂OH.HCl, Na₂CO₃, etanol, T. amb. → reflujo, 4 h; (f) KOH, dietil acetal del bromoacetaldehído, DMSO-agua, T.amb., 1 semana; (g) HCl 2.5N_(ac), dioxano, 0 °C → T. amb. Toda la noche; (h) tiosemicarbazida, CF₃COOH, etanol, 3 h; (i) Semicarbazida, CF₃COOH, NaHCO₃, etanol, 4 h; (j) KOH, (2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo, DMF, 0 °C → T. amb., 3 h; (k) HCl_(ac) 2.5N, 0 °C → T. amb. Toda la noche; (l) 1H-Pirazol-1-carboxamida, MeCN, 60 °C, 24h.

4.3. Evaluación antiprotozoaria

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiprotozoaria (*in vitro*) de los compuestos sintetizados contra *G. intestinalis*. Adicionalmente, ya que también se cuenta con el ensayo, también se evaluaron los compuestos contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

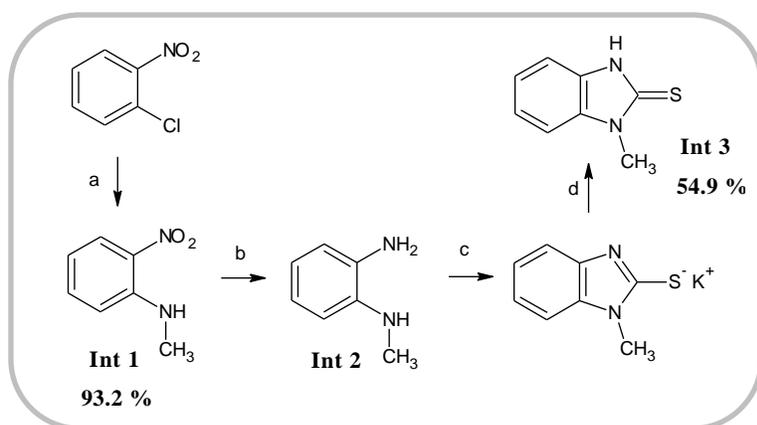
Para estos ensayos se siguió el método de subcultivos descrito por Cedillo-Rivera *et al.*¹⁹ y Chávez *et al.*²⁰ El procedimiento general aplicado a cada parásito varió solamente en el número de trofozoítos incubados correspondiendo a 6×10^3 para *E. histolytica* y 5×10^4 para *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

Los resultados se analizaron por medio de un análisis probit para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), de cada compuesto, correspondiente a la concentración que mata el 50% de los trofozoítos.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis, identificación y caracterización de intermediarios y productos finales

En esta sección se presentan y analizan los resultados de la síntesis seguida para la obtención de los compuestos diseñados como posibles inhibidores de la ADI de *Giardia intestinalis*.

5.1.1 Obtención de 1-Metil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (**Int 3**)

(a) $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$, K_2CO_3 , EtOH, 150 °C, 5 h; (b) H_2 , Pd/C, EtOH; (c) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCSSK}$, EtOH; (d) AcOH, EtOH/ H_2O , pH 7.

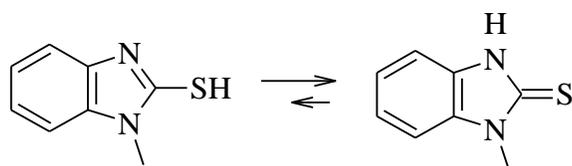
Esquema 5.1. Síntesis del intermediario 3 (**Int 3**).

Para la síntesis del **Int 3** (**Esquema 5.1**) se partió del 1-cloro-2-nitrobenzeno, el cual se hizo reaccionar con el clorhidrato de metilamina mediante una reacción de sustitución nucleofílica aromática; la reacción se llevó a cabo en un reactor a presión a 150 °C, en etanol y en medio básico, la base utilizada fue carbonato de sodio obteniéndose de esta manera el **Int 1**. La reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ se basó en los procedimientos ya conocidos de nuestro grupo de investigación.²¹

El siguiente paso fue la reducción del grupo nitro de la *N*-metil-2-nitroanilina (**Int 1**) con H_2 utilizando como catalizador Pd/C en etanol. La reacción se consideró cuantitativa y se dio por terminada cuando no se consumió más hidrógeno.

El paso final fue la formación del núcleo bencimidazólico, para lo cual la *N*-metilbenceno-1,2-diamina (**Int 2**) se hizo reaccionar a reflujo con xantato etílico de potasio recién generado, la posterior acidificación con ácido acético glacial produjo el compuesto deseado (**Int 3**). El procedimiento utilizado toma como referencia el reportado en la literatura.¹⁸ Los datos espectroscópicos, de *pf* y *R_f* coincidieron con los ya reportados y con una muestra pura de referencia.

Durante el análisis retrosintético y la síntesis experimental se consideró que el anillo de bencimidazol se encontraba en forma del tautómero tiol. Un análisis detallado de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y comparación con datos en la literatura^{22,23} demostraron que la forma tautomérica predominante en la que se encuentra el **Int 3** es 1-metil-1,3-dihidro-2*H*-bencimidazol-2-tiona, **Figura 5.1**.

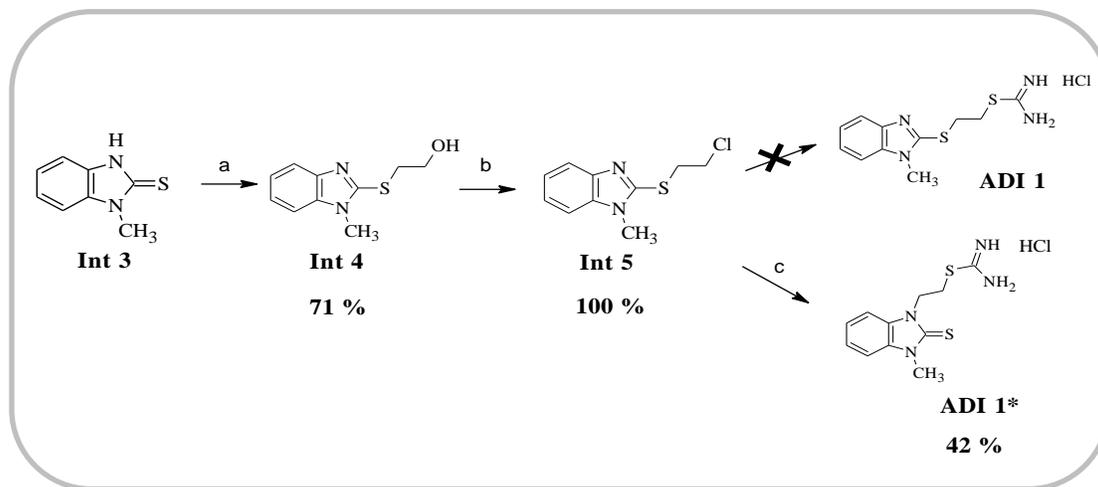


Int 3

Figura 5.1. Tautómeros del **Int 3**.

De cálculos teóricos²⁴ se conoce que este desplazamiento del equilibrio a la tiona se debe a que ésta es de 3 a 8 kcal/mol más estable que el tautómero tiol (en el vacío). De la misma manera se conoce por datos cristalográficos que la tiona: 1,3-dihidro-2*H*-bencimidazol-2-tiona predomina en el equilibrio²⁵ y que los electrones π están deslocalizados y un carácter aromático existe en el anillo de imidazol por lo cual se espera el mismo comportamiento en **Int 3**; la estructura cristalina del 1-metil-1*H*-bencimidazol-2(3*H*)-tione se encuentra reportada en la literatura como una estructura plana,²⁶ lo cual es uno de los requisitos para la aromaticidad.

5.1.2 Obtención del clorhidrato de 2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil carbamimidatoato (**ADI 1**)



(a) KOH, BrCH₂CH₂OH, Agua, 0 °C → T. amb. toda la noche; (b) SOCl₂, CHCl₃, 0 °C → reflujo, 3 h; (c) tiourea, DMF, 110 °C, 3 h.

Esquema 5.2. Síntesis del compuesto **ADI 1**.

La preparación de **ADI 1** (**Esquema 5.2**) se inició con la incorporación del hidroxietilo en la posición 2 del bencimidazol; la reacción del **Int 3** con 2-bromoetanol se realizó en agua²⁷ aprovechando el excelente comportamiento nucleofílico del átomo de azufre en los disolventes próticos y el hecho de que 2-bromoetanol es soluble en agua. Así, para incrementar la fuerza del nucleófilo, se utilizó hidróxido de potasio para formar el anión que es soluble en agua. El ataque nucleofílico del azufre desplazando el ion Br⁻ del 2-bromoetanol dió el alcohol (**Int 4**) con rendimiento de 71%.

El siguiente paso fue la reacción de cloración de 2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etanol (**Int 4**) con cloruro de tionilo; inicialmente esta reacción se probó sin disolvente²⁸ y después en cloroformo. En el primer caso se formó una pasta difícil de tratar, el producto se separó de la mezcla por cromatografía en columna usando como eluyente cloroformo. Una prueba de recristalización en etanol de la sustancia aislada de la cromatografía llevó a un producto blanco y puro el cual no tuvo el mismo R_f que la referencia obtenida previa a la recristalización; lo que dio indicios de que existió una reacción química en el proceso de recristalización. Los espectros de RMN de ¹H y

^{13}C mostraron la presencia de dos carbonos alifáticos ubicados en la posición dos del bencimidazol. La marcada solubilidad acuosa del producto sugirió que se trataba de un compuesto iónico producto de una posible reacción intramolecular, una ciclación entre el nitrógeno en la posición 3 del anillo bencimidazólico y el carbono base del cloro, generando un producto tricíclico (**Int 11**) con la estructura de la **Figura 5.2**. Para comprobar nuestra hipótesis se realizó una prueba tratando la sustancia obtenida con solución concentrada de hidróxido de sodio presenciándose la formación de un precipitado blanco que se extrajo con acetato de etilo y que mostró dos manchas en ccf, una de ellas con el mismo R_f que el alcohol **Int 4**, corroborando que en la recristalización hubo reacción de ciclación. En el espectro RMN ^1H del compuesto de la **Figura 5.2** se observan dos tripletes a 4.41 y 4.79 ppm mientras que para el producto previo a la recristalización se observan a 3.67 y 3.91 ppm.

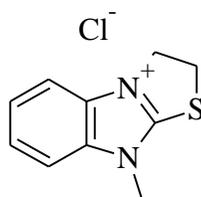


Figura 5.2. Producto de ciclación cloruro de 9-metil-3,9-dihidro-2*H*-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]-bencimidazol-4-onio. (**Int 11**)

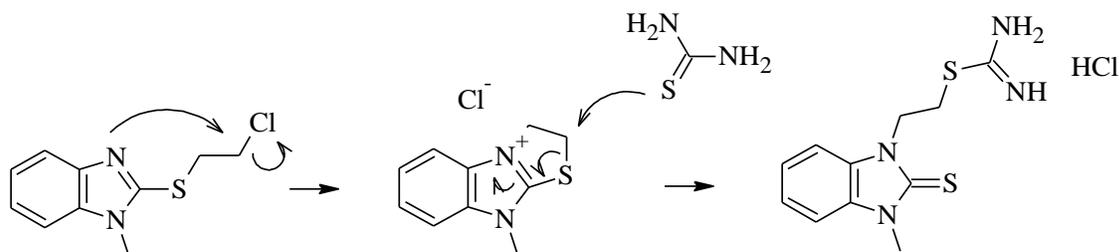
Cuando la reacción se realizó utilizando cloroformo como disolvente, se empleó menos cantidad de cloruro de tionilo, haciendo que la reacción procediera en fase homogénea. De esta manera se eligió la reacción en cloroformo²⁹ como la mejor opción para la obtención del **Int 5** pues además la temperatura de ebullición es más baja que la del cloruro de tionilo puro evitándose de esta manera el riesgo latente de que exista una reacción no deseada. El producto obtenido por este procedimiento no se recristalizó para evitar la posible ciclación. La comprobación de que se obtuvo el compuesto 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol (**Int 5**) la ofreció el espectro de masas por su masa molecular y la isotopía del cloro.

La reacción final entre el 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol (**Int 5**) y tiourea se probó inicialmente en *n*-butanol conforme a lo reportado en la literatura para reacciones similares.³⁰ Por ccf analítica se observó la presencia de tres

compuestos en cantidades semejantes; uno de ellos correspondiente en R_f con el del compuesto ciclado de la **Figura 5.2**. Finalmente la reacción se realizó en DMF que al ser un disolvente polar aprótico incrementaría el carácter nucleófilico del azufre de la tiourea. Al llevar a cabo la reacción en este disolvente en la ccf analítica se observó la formación del mismo número de compuestos pero uno en mayor proporción. El compuesto mayoritario se aisló por medio de columna cromatográfica y se identificó en primera instancia como el compuesto final deseado **ADI 1**.

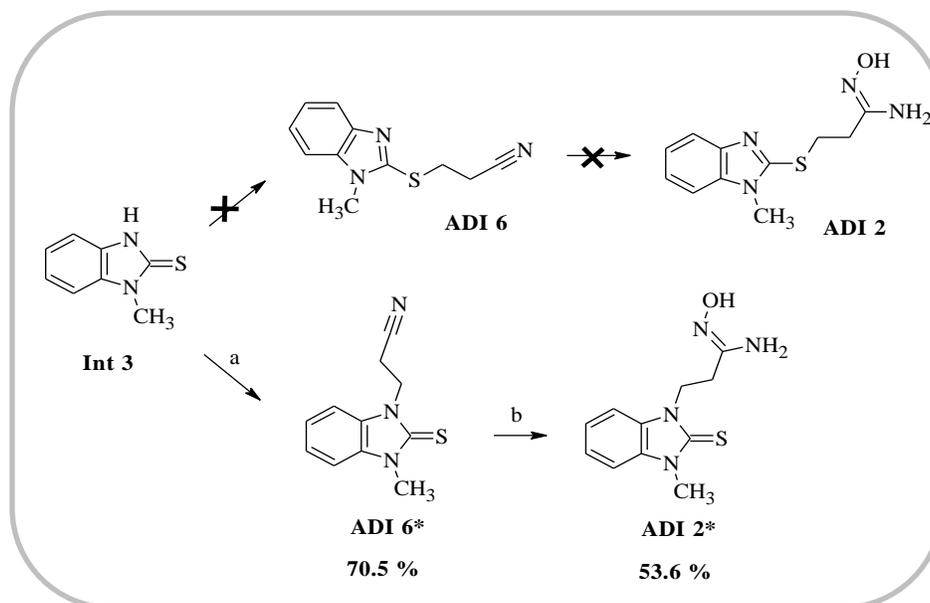
En el espectro de RMN ^1H se observaron los hidrógenos y señales con la multiplicidad esperada. El espectro de masas correspondió con la masa del compuesto. El análisis minucioso del espectro de RMN ^{13}C mostró el desplazamiento para el C-2 del bencimidazol a campo más bajo (169.27 ppm) que lo esperado para un enlace C-S simple correspondiente a una S-alkilación (150.56 ppm) como lo muestra su precursor el 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol (**Int 5**), por lo que se sospechó que la estructura del compuesto obtenido posee una tiona en C-2 y por consiguiente, el nitrógeno en la posición 3 se encuentra sustituido. Ver **espectros 7 y 10**. Por otro lado, en el espectro de IR (**Espectro 13**) se observa la señal para el N-(C=S)-N a 1343 cm^{-1} , concordante con el estiramiento C=S. La estructura del compuesto obtenido correspondió, por tanto, al clorhidrato de carbamimidotioato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)etilo (**ADI 1***).

Una explicación para este hecho es que de nuevo por una reacción intramolecular se formó el **Int 11** y éste sufrió el ataque nucleofílico de la tiourea en el carbono vecino al azufre, dando por consiguiente el isómero **ADI 1***, como se muestra en el **Esquema 5.3**.



Esquema 5.3. Propuesta del mecanismo de reacción para la formación de **ADI 1***.

5.1.3 Obtención de *N'*-hidroxi-3-[(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)sulfanil]propanimidamida (**ADI 2**)



(a) Acrilonitrilo, Agua, 0 °C → T. amb. toda la noche; (b) NH₂OH.HCl, Na₂CO₃, etanol, T. amb. →reflujo, 4 h

Esquema 5.4. Síntesis del compuesto ADI 2.

Para la obtención del compuesto **ADI 2** (**Esquema 5.4**) fue necesario preparar el nitrilo intermediario (**Int 6**). Inicialmente se probó la reacción del 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol (**Int 5**) con 1.4 eq de cianuro de sodio³¹ en DMF a 100 °C. La ccf de esta reacción mostró dos compuestos en la misma proporción por lo cual se consideró emplear una vía alterna de síntesis utilizando acrilonitrilo y el **Int 3** en una reacción de adición conjugada tipo Michael. Una ventaja que esta reacción presentó es que el acrilonitrilo es soluble en agua por lo que el medio ideal para la reacción sería ésta. Al realizar esta última reacción se obtuvo un producto insoluble en agua que en ccf mostró ser un solo compuesto. El producto se obtuvo con un rendimiento de 70.5%.

El siguiente paso fue la adición de hidroxilamina al nitrilo recién preparado empleando clorhidrato de hidroxilamina en etanol.³² Se obtuvo una sustancia mayoritaria en ccf, el producto se recrystalizó de etanol obteniéndose un rendimiento del 42 %. Los resultados de la elucidación de la estructura del compuesto obtenido no

correspondieron con los del compuesto esperado **ADI 2**, sino a su isómero **ADI 2***; nuevamente, la señal a 168.66 ppm en el espectro de RMN ^{13}C sugirió que la estructura del compuesto tiene una tiona en el carbono 2 del bencimidazol. El análisis minucioso de los espectros de RMN ^{13}C y el de IR del nitrilo intermediario demostró que la cianoetilación había sido sobre el nitrógeno de la posición 3 del bencimidazol, por el desplazamiento a 169.17 ppm del C-2 y por la banda a 1340cm^{-1} corroborando la unión C=S de la tiona. Esto fue un resultado inesperado pues se preveía que el mejor nucleófilo sería el azufre, dadas las condiciones básicas de la reacción.

En una investigación bibliográfica más profunda sobre el fenómeno de adición nucleofílica sobre sistemas α,β -insaturados como el acrilonitrilo, se encontró que en medio básico la *N*-sustitución supera a la *S*-sustitución; mientras que las alquilaciones $\text{S}_{\text{N}}2$ dan invariablemente productos *S*-alquilados. Una justificación química más precisa de este fenómeno es por medio de la llamada escala oxibase y su poder predictivo en aniones ambidentados.³³ En términos cualitativos se puede decir que en reacciones con reactivos electrofílicos polares el ataque se produce por el átomo más electronegativo (Nitrógeno) que tiene la mayor densidad electrónica y en las reacciones que proceden a través de un solo estado de transición el enlace es formado con el átomo más polarizable (Azufre).³⁴

De lo anterior se concluye que la estructura correcta del compuesto, obtenido por adición nucleofílica del **Int 3** al acrilonitrilo en medio básico, corresponde al compuesto 3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanonitrilo (**Int 6***); y por consiguiente su derivado, producto de la reacción con hidroxilamina, al *N'*-hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (**ADI 2***).

La confirmación inequívoca de que la estructura corresponde al producto *N*-sustituido, son las correlaciones observadas en espectro NOESY (**Figura 5.3**) del compuesto **ADI 2***. En donde la señal simple a 3.70 ppm, que integra para 3H, asignada al CH_3 en posición 1, correlaciona con el multiplete en 7.42 ppm que corresponde al hidrógeno en C-7; y el triplete que integra para 2H, a 4.44 ppm, asignado a los dos hidrógenos del C-1', correlacionan con el multiplete a 7.55 ppm correspondiente al hidrógeno en C-4.

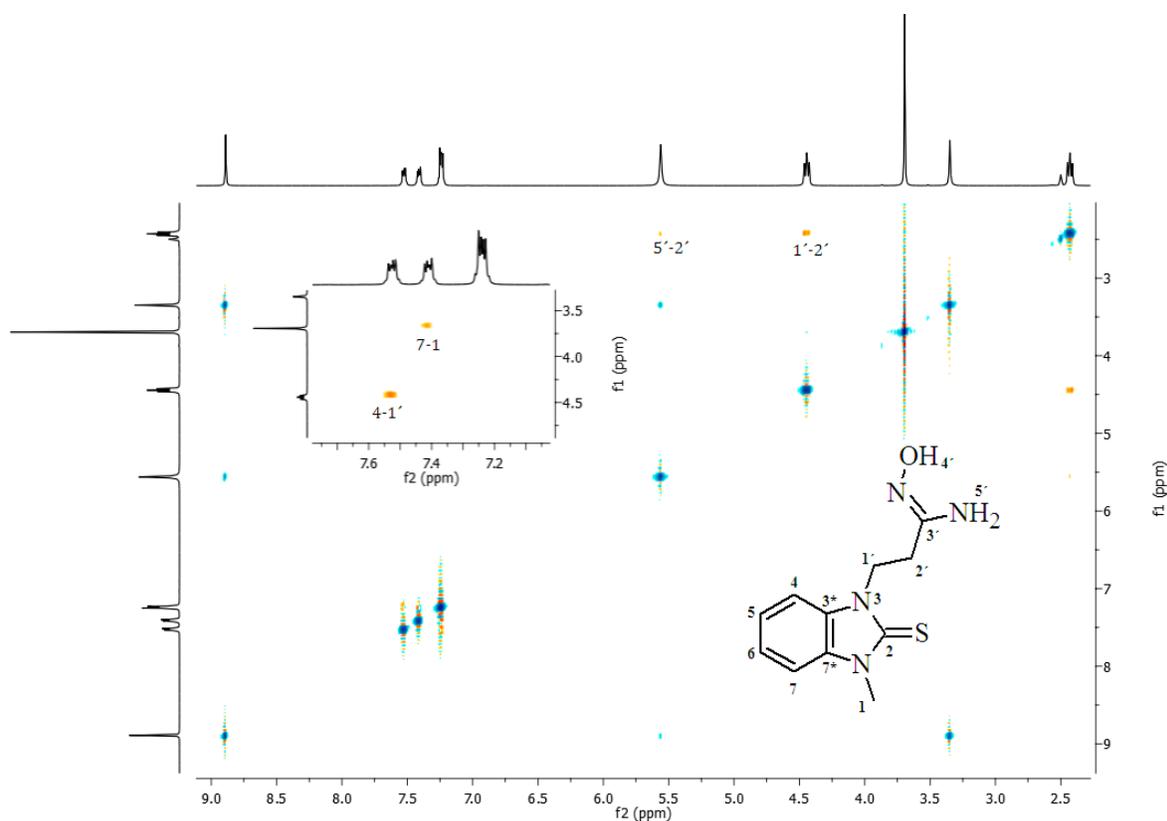


Figura 5.3. Espectro NOESY del compuesto *N*'-hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (**ADI 2***)

Por otro lado, de la literatura se conoce que el tautómero más común en las amidoximas es la forma amino-oxima y que los desplazamientos químicos a los que se encuentran las señales del grupo amino (5.57 ppm, integración para 2H) e hidroxilo (8.9 ppm, integración para 1H) son característicos de la forma amino-oxima.³⁵ Por lo que se concluye que ésta es la forma del tautómero (**Figura 5.4.**) en el que se encuentra el producto obtenido **ADI 2***.

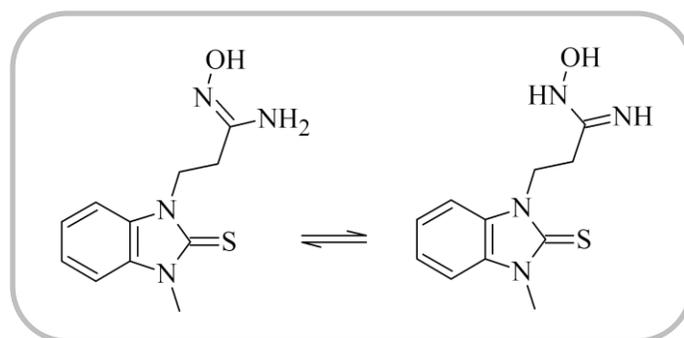
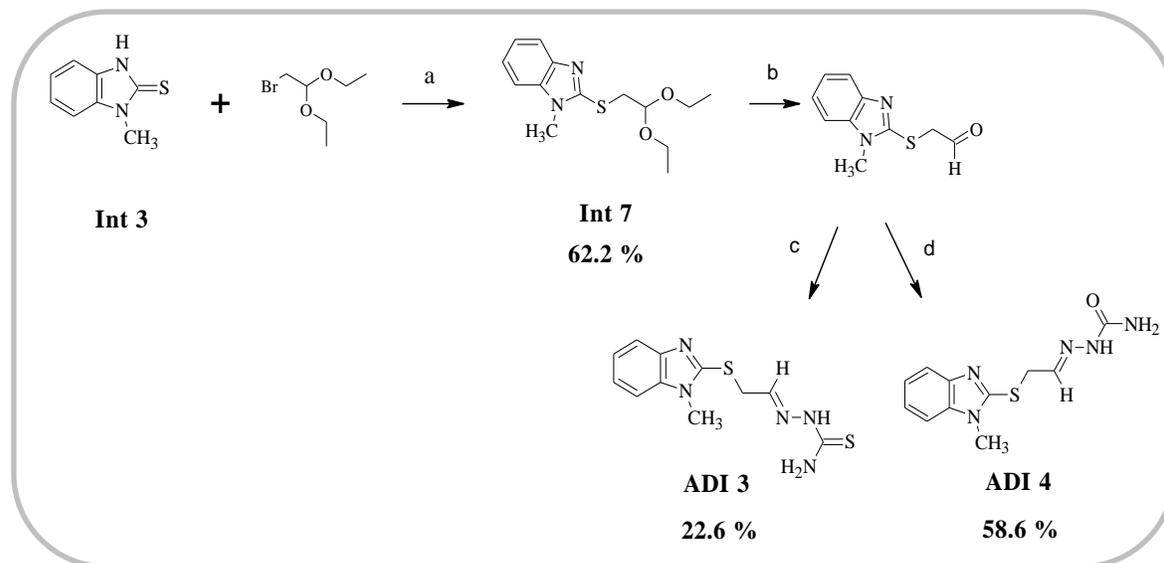


Figura 5.4. Tautomerismo amino oxima - imino hidroxilamina.

5.1.4 Obtención de 2-{2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carbotioamida (**ADI 3**) y 2-{2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carboxamida (**ADI 4**)



(a) KOH, Agua-DMSO, T. amb. 1 semana; (b) HCl 2.5N_(ac), dioxano, 0 °C → T. amb., toda la noche; (c) tiosemicarbazida, CF₃COOH, etanol, 3 h, (d) Semicarbazida, CF₃COOH, NaHCO₃, etanol, 4 h.

Esquema 5.5. Síntesis del compuesto **ADI 3** y **ADI 4**.

Las síntesis de los compuestos **ADI 3** y **ADI 4** (**Esquema 5.5**) tienen en común dos de tres pasos, ya que son análogos; uno, es una tiosemicarbazona y el otro, una semicarbazona. Los dos pasos de coincidencia son lo que llevan a la obtención del **Int 8**, un aldehído, el cual será transformado a los correspondientes compuestos **ADI 3** y **ADI 4**. En la literatura³⁶ se encontró que la reacción de formación del aldehído, **Int 8**, se puede llevar a cabo a partir de la reacción entre el **Int 3** y el dietil acetal del bromoacetaldehído en DMSO a 50°C como temperatura máxima. Sin embargo, cuando se reprodujeron esta condiciones, la reacción no se completó, incluso añadiendo más equivalentes de bromoacetaldehido dietil acetal. El **Int 7** se obtuvo en 62.2% de rendimiento después de una semana de reacción. Esta reacción se considera que transcurre lentamente por el impedimento estérico en el dietil acetal del bromoacetaldehído. La hidrólisis del acetal se realizó sin problemas produciendo el aldehído, **Int 8**. Este compuesto presentó dos señales características en RMN ¹H a 9.71

ppm (triplete, 1H) correspondiente al hidrógeno del grupo aldehído y a 4.14 ppm (doblete, 2H) asignado a los hidrógenos adyacentes al aldehído.

Finalmente, la metodología usada para sintetizar las moléculas deseadas **ADI 3** y **ADI 4** fue tratar el aldehído, por separado, con tiosemicarbazida y semicarbazida en etanol a temperatura ambiente utilizando como catalizador ácido trifluoroacético³⁷ con rendimientos de 22.6 y 58.6%, respectivamente. El análisis de los espectros de RMN ¹H y ¹³C de los compuestos **ADI 3** y **ADI 4** mostró que los compuestos que se formaron corresponden al producto de *S*-sustitución, coincidente con un mecanismo tipo *S_N2*, ya que el desplazamiento químico del C-2 en el espectro de carbono fue de 150.20 y 150.51 ppm para **ADI 3** y **ADI 4**, respectivamente. Además se observó un solo isómero de los posibles, *E* o *Z*, pues no existen señales que se puedan asignar a la presencia de un isómero adicional. Para saber cuál de los dos isómeros se obtuvo se realizó un análisis de ¹³C de protones desacoplados fuera de resonancia de **ADI 4** por medio del cual se pudo determinar que la constante de acoplamiento carbono-hidrógeno del azometino es de 168.6 Hz lo cual corresponde a la conformación *E* ya que en aldíminas la constante para el isómero *E* es de aproximadamente 162 Hz; mientras que para isómero *Z* es aproximadamente 177 Hz.³⁷ Así mismo se conoce que el intervalo para semicarbazonas de configuración *E* es de 164 a 168 Hz.³⁸ (**Figura 5.5**)

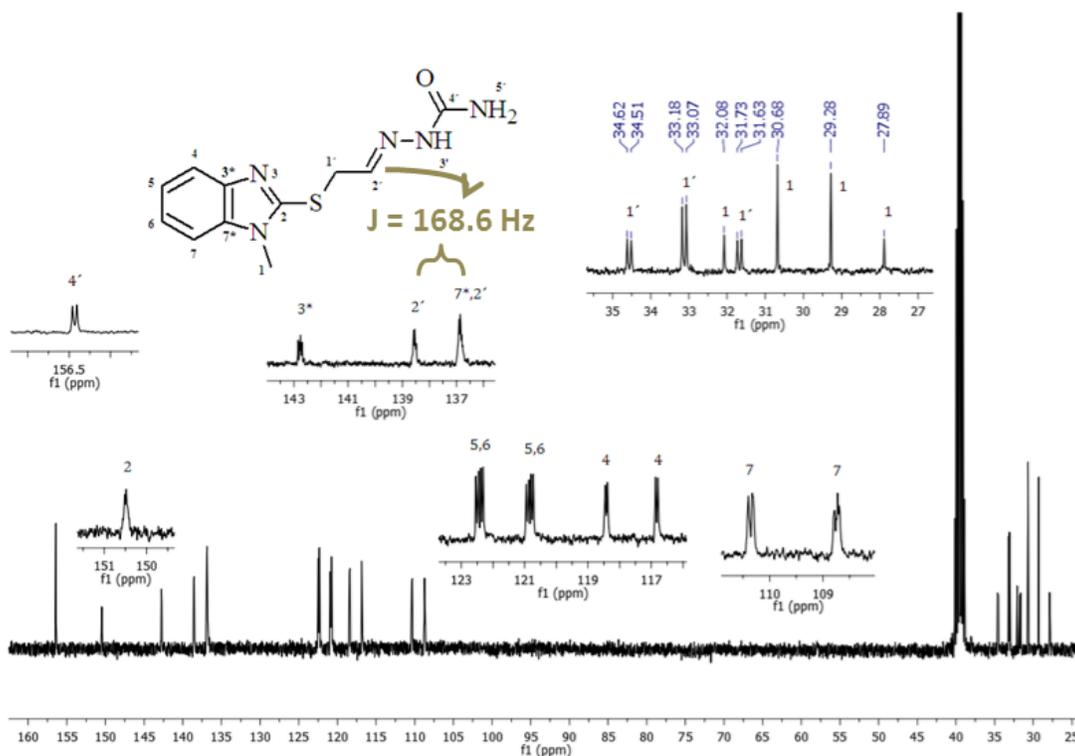
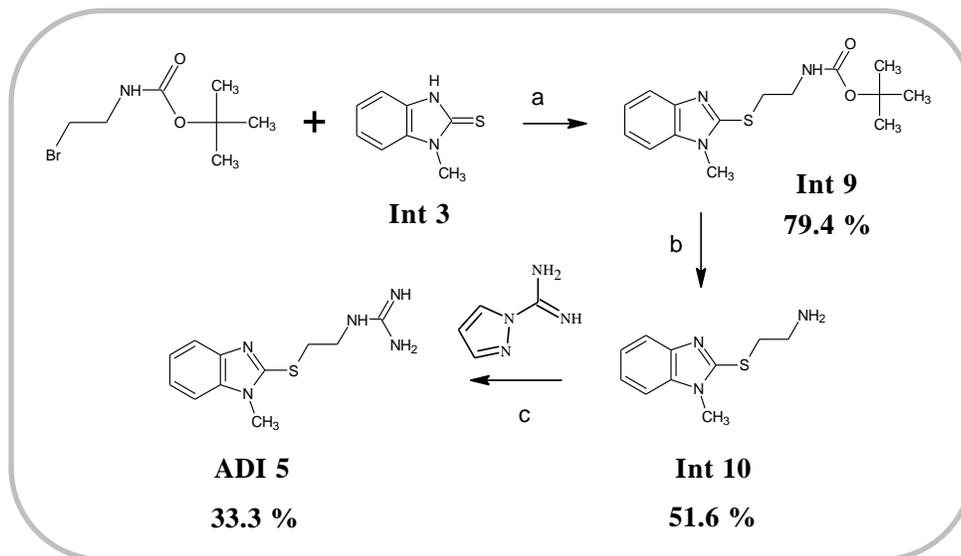


Figura 5.5. RMN de protones desacoplados fuera de resonancia de ADI 4.

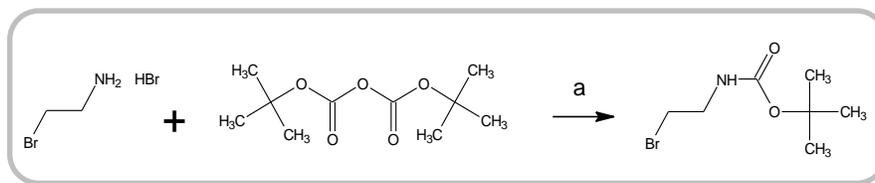
5.1.5 Obtención de 1-[2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil]guanidina (ADI 5)



(a) KOH, DMF-agua, 0 °C → Tamb 3 h; (b) HCl (ac) 2.5N, 0°C → Tamb toda la noche. (c) 1H-Pirazol-1-carboxamida, MeCN, 60°C, 24 h.

Esquema 5.6. Síntesis del compuesto ADI 5.

El compuesto **ADI 5** se sintetizó en tres pasos, **Esquema 5.6**. Se partió de la reacción de sustitución nucleofílica entre el **Int 3** y la 2-bromoetilamina previamente protegida en forma de éster carbámico³⁹, (2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo (**Esquema 5.7**).



(a) Trietilamina, CH₂Cl₂, 0°C → Tamb, 1.5 h

Esquema 5.7. Protección del grupo amina con dicarbonato de di-*terc*-butilo.

Para el paso de sustitución nucleofílica se eligió DMF como medio de reacción por la ventaja de que la reacción se llevaría en fase homogénea y que el nucleófilo sería más fuerte en este disolvente; para ayudar un poco a la solubilidad del hidróxido de potasio éste se disolvió primero en agua y se añadió a la DMF; la reacción se realizó a temperatura ambiente por 3 horas. El producto precipitó en agua y se extrajo con cloroformo para su purificación; sin embargo, el control por ccf del extracto clorofórmico indicó la presencia de **Int 3** que no reaccionó, incluso dejando más tiempo la reacción o incrementando la cantidad de (2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo por lo que se decidió hacer lavados con solución acuosa de NaOH, saturada, a la solución clorofórmica. De esta manera se pudo obtener el **Int 9** puro. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C del **Int 9**, demostraron la presencia del compuesto, siendo características las señales correspondientes a los metilos del grupo *t*-Boc. **Espectros 32 y 33.**

El siguiente paso fue la desprotección del *t*-Boc por medio de HCl 2.5N en dioxano, la 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (**Int 10**) se obtuvo en forma de clorhidrato. Para obtener la base libre, el clorhidrato se trató con solución de NaOH 3N. El extracto clorofórmico de esta solución dió el **Int 10** como un líquido oleoso del cual se separó el compuesto de interés por cromatografía en columna. El espectro de masas de este compuesto coincidió con la masa esperada para el **Int 10**. Para poder estabilizar y purificar de una manera óptima el compuesto que se enviaría al análisis

de RMN fué necesario preparar el clorhidrato con HCl 4M en dioxano para finalmente recristalizarlo en isopropanol-etanol.

El **Int 10** también se intentó obtener por reducción del [(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)sulfanil]acetonitrilo con borohidruro de sodio utilizando como catalizador CoCl_2 ; ⁴⁰ Este procedimiento dio dos productos minoritarios luego de 2 h a temperatura ambiente en THF, análisis por ccf posteriores no indicaron avance de la reacción por lo que se descartó esta metodología. Otra forma en que se intentó preparar el **Int 10** fue por reacción directa en agua, entre la 2-bromoetilamina y el **Int 3** utilizando como base hidróxido de potasio para formar el anión correspondiente. El resultado de esta reacción no fue satisfactorio pues en ccf se observó la formación de cuatro compuestos en aproximadamente la misma proporción además de las materias de partida, por lo que se eliminó este método de síntesis ya que todas las manchas en placa también revelaron con ninhidrina indicando que los productos formados posiblemente se traten de aminas producto de polialquilaciones. Por lo que se decidió trabajar con el reactivo 2-bromoetilamina protegida con Boc como se mencionó arriba.

Finalmente para la obtención del compuesto **ADI 5** se realizó la reacción entre la amina (**Int 10**) y el 1*H*-pirazol-1-carboxamidina en acetonitrilo a 60 °C por 24 h, lo cual dio el resultado esperado obteniéndose la guanidina **ADI 5** como base libre. La reacción a través de este método fue exitosa debido a que al reaccionar la amina con el grupo carboxamidina se libera pirazol como grupo saliente, el cual es una sustancia aromática muy estable, lo que evita tener que usar condiciones drásticas de reacción obteniéndose así el compuesto final. La estructura del compuesto **ADI 5** se caracterizó por RMN de ¹H, ¹³C y espectrometría de masas de alta resolución. La *S*-sustitución fue evidente en el espectro de RMN ¹³C, ya que el C-2 se presentó a 151.98 ppm.

Otros métodos que se intentaron para introducir el grupo guanidino a la molécula para obtener a **ADI 5** fueron haciendo reaccionar a la amina **Int 10** con hemisulfato de *O*-metilisourea a temperatura ambiente lo cual no dio ningún resultado; un segundo intento fue la reacción de Rathke⁴¹ en la cual se usó hemisulfato de *S*-metilisotiourea en agua-etanol durante 5 h, lo que dio como resultado la pérdida del grupo aminoetilo

sobre el azufre. Esto se comprobó porque el espectro de RMN ^1H coincidió con el de la referencia 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-bencimidazol.⁴²

5.1.6 Asignación de desplazamientos químicos para ^{13}C y para ^1H

Las asignaciones dadas a continuación se sustentan en los análisis HSQC, HMBC y NOESY determinados a las sustancias **ADI 1*** - **ADI 6*** lo cual junto con la comparación con los espectros predichos por el programa MestReNova Versión 6.0.2-5475, permitieron la correcta asignación de las señales.

Las siguientes tablas muestran los desplazamientos químicos encontrados experimentalmente en las moléculas sintetizadas, el código de numeración en la sustitución en 2 y 3 es secuencial como se indica en los ejemplos de las **Figura 5.6** y **Figura 5.7** respectivamente.

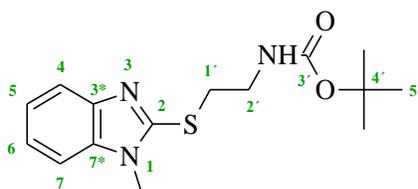


Figura 5.6. Ejemplo de numeración para Tabla 5.1 y 5.2.

Tabla 5.1. Desplazamientos químicos en ppm de ^{13}C para intermediarios y productos finales

Clave	2	3*	4	5	6	7	7*	CH ₃	1'	2'	3'	4'	5'
Int 4	151.81	142.77	117.37	121.38	121.38	109.33	136.77	29.83	34.30	60.05			
Int 5	150.56	143.33	118.32	122.00	122.08	108.61	136.85	30.06	34.32	43.01			
Int 7			118.26			108.53		31.04	35.54	101.19	62.65	15.33	
Int 8								30.15	40.84	195.49			
ADI 3	150.20	142.74	117.67	121.62	121.79	109.62	136.85	30.04	33.03	141.52	178.04		
ADI 4	150.51	142.78	117.64	121.58	121.73	109.58	136.85	30.01	33.13	137.73	156.44		
Int 9	151.33	142.68	117.39	121.49	121.46	109.43	136.68	29.91	31.65	39.72	155.60	77.79	28.21
Int 10	150.21	150.21	114.84	124.11	124.30	111.36	134.60	31.35	29.62	38.03			
ADI 5	151.98	142.82	117.71	122.12	122.23	110.07	137.09	30.47	30.38	40.77	157.94		

Para la numeración de las señales de ^1H se siguió el mismo lineamiento que para las señales de carbono excluyéndose las señales de hidrógenos ácidos.

Tabla 5.2. Desplazamientos químicos en ppm de ^1H para los intermediarios y productos finales

Clave	4	5	6	7	CH ₃	1'	2'	3'	4'
Int 4	7.50-7.60	7.10-7.25		7.40-7.50	3.67	3.42	3.73		
Int 5	7.60-7.70	7.10-7.30			3.65	3.69	3.91		
Int 7	7.50-7.70	7.10-7.30			3.69		4.82		1.22
ADI 3	7.40-7.70	7.10-7.30		7.40-7.70	3.70	4.13	7.40-7.70		
ADI 4	7.50-7.60	7.10-7.30		7.40-7.50	3.69	4.10	7.35		
Int 9	7.30-7.60	7.00-7.30			3.67	3.20-3.50	3.20-3.50	1.36	
Int 10	7.75-7.85	7.35-7.50		7.65-7.75	3.85	3.79	3.23		
ADI 5	7.55-7.65	7.10-7.30		7.45-7.55	3.69	3.35-3.60	3.35-3.60		

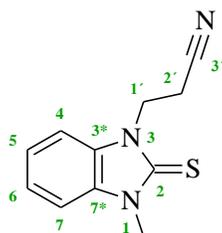


Figura 5.7. Ejemplo de numeración para Tabla 5.3 y 5.4.

Tabla 5.3 Desplazamientos químicos en ppm de ^{13}C para intermediarios y productos finales

Clave	2	3*	4	5	6	7	7*	CH ₃	1'	2'	3'
Int 3	168.52	133.15	109.57	122.20	122.87	109.49	130.68	30.04			
ADI 1*	169.27	131.99	109.72	123.01	123.09	109.72	131.20	31.10	42.53	28.51	169.04
Int 6*	169.17	132.44	110.27	123.43	123.56	110.16	131.62	31.48	40.29	16.33	118.92
ADI 2*	168.56	131.96	109.64	122.68	122.73	109.43	131.39	30.89	41.69	29.21	149.85

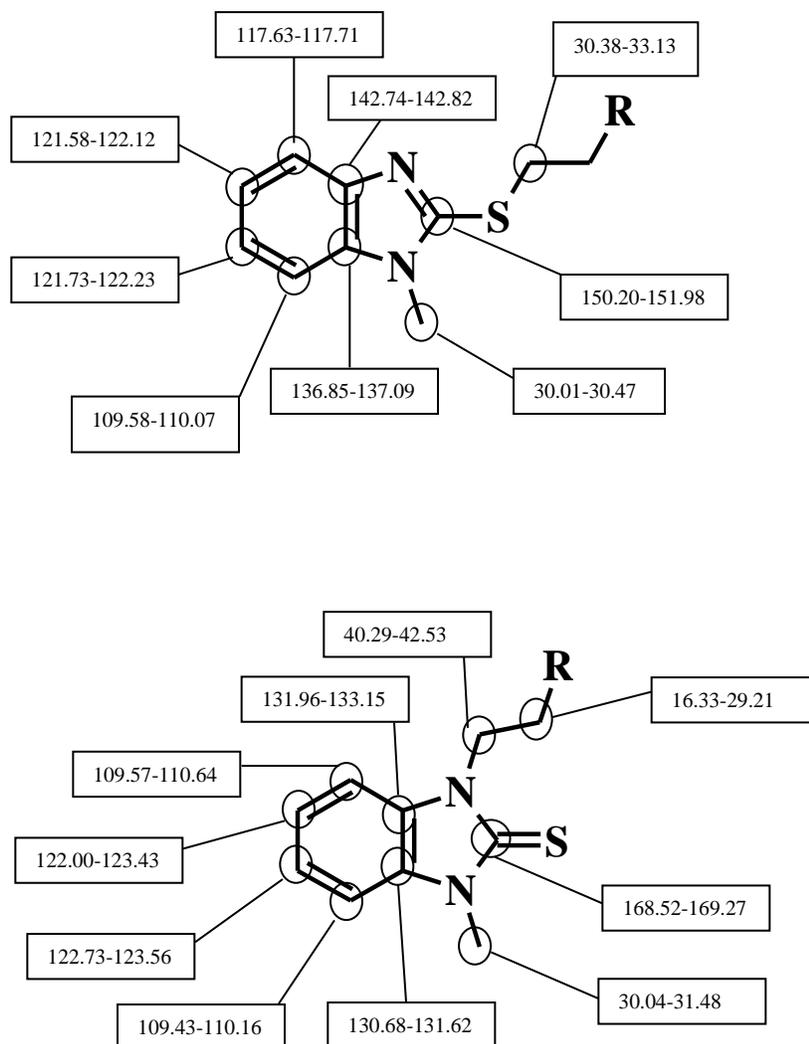
Para la numeración de las señales de ^1H se siguió el mismo lineamiento que para las señales de carbono excluyéndose las señales de hidrógenos ácidos.

Tabla 5.4 Desplazamientos químicos en ppm de ^1H para los intermediarios y productos finales

Clave	4	5	6	7	CH ₃	1'	2'
Int 3	7.30-7.40	7.10-7.25			3.64		
ADI 1*	7.50-7.55	7.20-7.35		7.45-7.50	3.72	4.60	3.70
Int 6*	7.60-7.70	7.20-7.35		7.40-7.50	3.71	4.58	3.08
ADI 2*	7.50-7.60	7.20-7.30		7.35-7.45	3.70	4.44	2.43

5.1.7 RMN ^{13}C de los compuestos finales

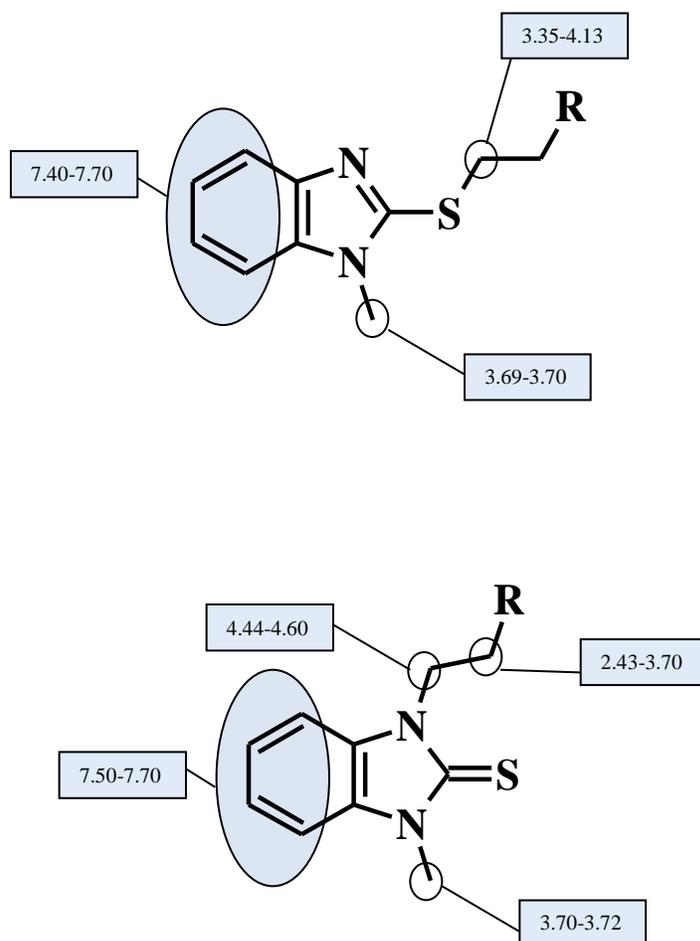
En los espectros se observan características comunes debido a sus semejanzas estructurales. Los desplazamientos químicos para las señales correspondientes a RMN ^{13}C comunes a todos los compuestos finales se resumen en el **Esquema 5.8**.



Esquema 5.8. Relación entre la estructura general de los compuestos finales y las señales de RMN ^{13}C observadas. (Valores dados en ppm)

5.1.8 RMN ^1H de los compuestos finales

En el **Esquema 5.9** se muestra un resumen de los desplazamientos químicos de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y su relación con la estructura general de las moléculas finales.



Esquema 5.9. Relación entre la estructura general de los compuestos finales y las señales de RMN ^1H observadas. (Valores dados en ppm)

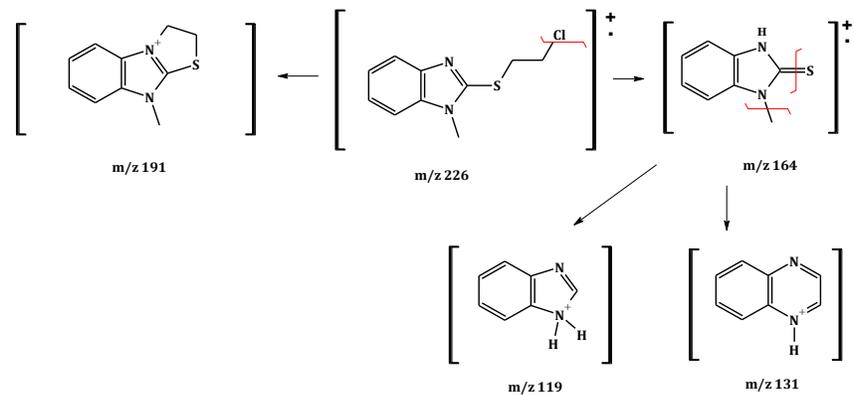
5.1.9 Espectrometría de masas y análisis elemental

Los espectros de masas se determinaron por los métodos GC-MS con ionización por impacto electrónico, UPLC-TOF con ionización por electrospray.

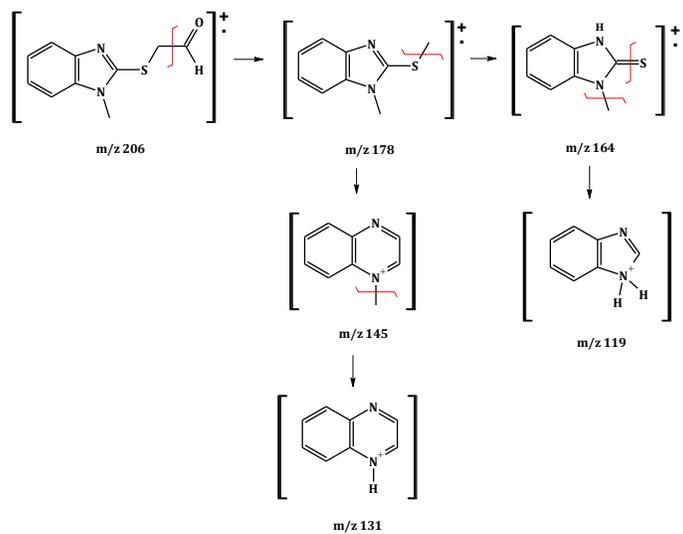
De los espectros realizados se pudo evidenciar que existe un patrón de fragmentación similar para todos los compuestos medidos generándose en la mayoría de los casos los cationes radicales de m/z 164, 145, 131, 119.

La propuesta de las fragmentaciones (**Esquema 5.10**) se hace en base a las propuestas descritas en la literatura para los bencimidazoles⁴³ y por análisis de los espectros observados.

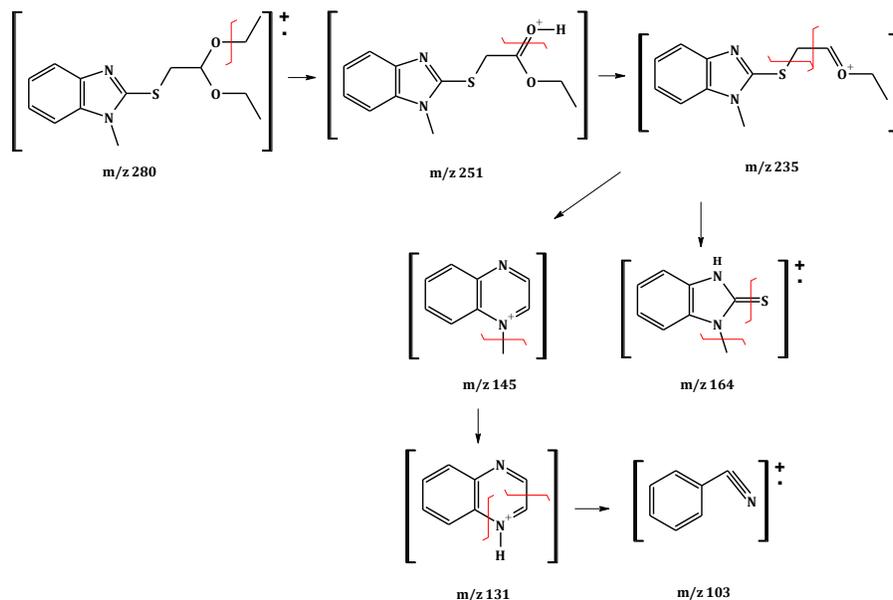
A



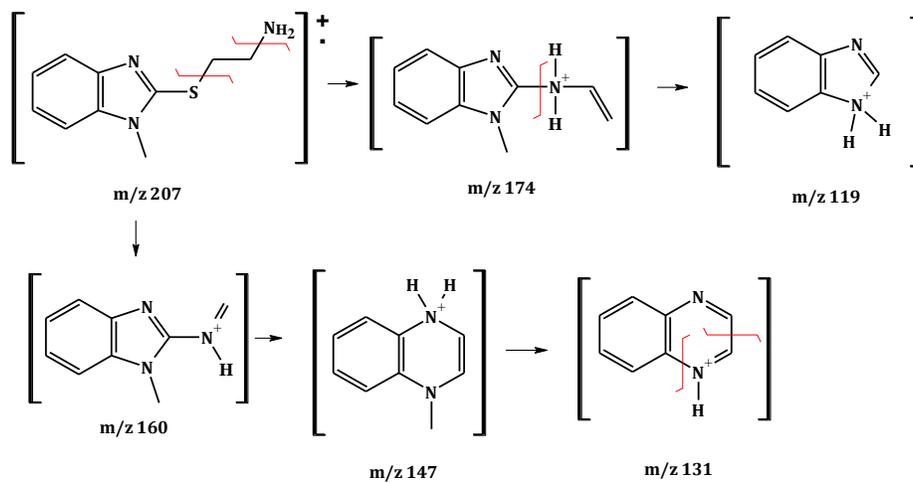
B



C



D



Esquema 5.10. Fragmentaciones propuestas de algunos compuestos sintetizados.

Para los compuestos finales se determinó la composición elemental usando espectrometría de masas de alta resolución. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Composición elemental determinada por espectrometría de masas de alta resolución

Clave	Composición esperada	Masa monoisotópica calculada	Masa encontrada	Porcentaje de error
ADI 1*	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ S ₂	267.0738	267.0839	0.00378
Int 6*	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ S	218.0752	218.0760	0.00036
ADI 2*	C ₁₁ H ₁₄ N ₄ OS	251.0967	251.0962	-0.00019
ADI 3	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ S ₂	302.0510	302.0518	0.00026
ADI 4	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ OS	286.0739	286.0737	-0.00006

5.2. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos finales

Los compuestos **ADI 1*** - **ADI 6*** se sometieron a ensayos *in vitro* contra *G. intestinalis*. Adicionalmente, ya que en el laboratorio de evaluaciones biológicas se cuenta con otros protozoarios, también se evaluaron contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*; los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Actividad antiprotozoaria de los compuestos sintetizados

Compuesto	CI ₅₀	CI ₅₀	CI ₅₀
	<i>G. intestinalis</i> (nM) ^b	<i>E. histolytica</i> (nM) ^b	<i>T. vaginalis</i> (nM) ^b
ADI 1*	85.8 ± 4.7	109.0 ± 16.3	191.5 ± 30.4
ADI 2*	151.8 ± 5.7	50.0 ± 8.5	155.8 ± 14.1
ADI 3	69.8 ± 2.5	77.0 ± 7.6	121.7 ± 10.1
ADI 4	58.9 ± 2.7	43.7 ± 8.1	91.1 ± 8.1
ADI 5	44.1 ± 8.5	58.2 ± 2.8	64.2 ± 5.7
ADI 6 ^a	39.1 ± 3.3	30.0 ± 9.8	82.8 ± 0.0
Metronidazol	1226.9 ± 175.3 ^c	379.8 ± 146.1 ^c	236.0 ± 16.0 ^c
Albendazol	37.7 ± 3.7 ^c	56533.4 ± 18844.5 ^c	1590.5 ± 11.3 ^c

^a La estructura de ADI 6* corresponde al Int 6*

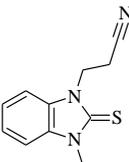
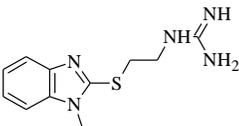
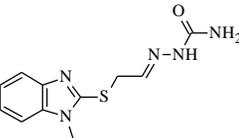
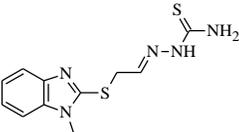
^b Los datos fueron promediados y se reporta su desviación estándar.

^c Datos tomados de bibliografía⁴⁴ expresados con un intervalo de 95% de límite de confianza.

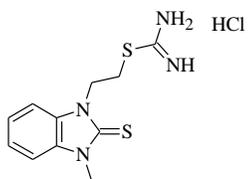
Todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol (fármaco de elección) contra los tres parásitos. En general, los compuestos fueron más activos contra *G.*

intestinalis. Cabe mencionar que los valores de las actividades de los compuestos sintetizados muestran la misma tendencia para los tres protozoarios. En el caso particular de *G. intestinalis*, podemos decir que conforme el fragmento etilo de la molécula pierde semejanza con la molécula híbrida con el fragmento guanidina (**ADI 5**) disminuye la actividad, lo que nos demuestra que este fragmento es primordial para la actividad de los compuestos. (**Tabla 5.7**), siendo la única excepción la molécula con el fragmento nitrilo (**ADI 6***) pudiendo esto deberse a que este compuesto ejerza su efecto por otro mecanismo o que el -CN, también sea un buen sustrato de la enzima arginina desiminasa. También se observa que la posición del sustituyente en posición 2 ó 3 no inhibe la actividad, aunque los productos 2-sustituidos (**ADI 3 – ADI 5**) fueron más activos que sus análogos 3-sustituidos (**ADI 1 y ADI2**).

Tabla 5.7. Relación entre la estructura molecular y la actividad biológica

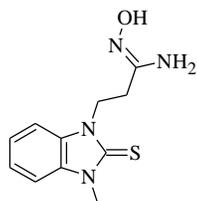
	Estructura	Actividad contra Giardia (nM)
ADI 6*		39.1
ADI 5		44.1
ADI 4		58.9
ADI 3		69.8

ADI 1*



85.8

ADI 2*



151.8

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Los compuestos **ADI 3**, **ADI 4** y **ADI 5** diseñados por *docking* como inhibidores de **GiADI** fueron activos contra el protozooario *G. intestinalis* (en un rango de CI_{50} de 44.1 a 69.8 nM) por lo que se acepta la hipótesis. Por otro lado sus isómeros 1,3-disustituidos (**ADI 1***, **ADI 2*** y **ADI 6***) también fueron activos (en un rango de CI_{50} de 39.1 a 151.8 nM).
- Se sintetizó y evaluó la actividad de tres derivados del bencimidazol 1,2-disustituidos diseñados por *docking* como inhibidores de la enzima arginina desiminasa de *G. intestinalis* (**GiADI**).
- Se sintetizó y evaluó la actividad de tres derivados del bencimidazol 1,3-disustituidos productos que se obtuvieron inesperadamente en el intento de obtener sus correspondientes isómeros 1,2-disustituidos diseñados por *docking*.
- La ruta sintética utilizada ofrece la posibilidad de sintetizar series de compuestos a partir de un mismo precursor por medio de reacciones sencillas de reproducir y con rendimientos aceptables.
- La presencia de grupos hidrofílicos como semicarbazida, tiosemicarbazida y guanidina proporciona a los compuestos finales una alta solubilidad en agua.
- Todos los compuestos se identificaron por los métodos espectroscópicos y espectrométricos encontrándose patrones comunes en las dos series y lográndose identificar las configuraciones de los isómeros que se obtuvieron en los compuestos **ADI 3** y **ADI 4**.
- La obtención de compuestos 1,3-disustituidos fue inesperada, lo que demostró que el nitrógeno en la posición 3 es más reactivo en condiciones básicas que el azufre, pues produce un solo producto en la adición tipo Michael; sin embargo, en las reacciones tipo S_N2 el azufre sigue siendo el mejor nucleófilo.
- La mayoría de los compuestos finales resultaron más potentes que el fármaco de elección, metronidazol, en los tres parásitos evaluados *G. intestinalis*, *T. vaginalis* y *E. histolytica*.
- Se evidenció que existe una relación entre la estructura del sustituyente en la posición 2 y 3 del anillo de bencimidazol, con la actividad contra *Giardia*

intestinalis; siendo el orden de actividad descendiente **ADI 6***, **ADI 5**, **ADI 4**, **ADI 3**, **ADI 1*** y **ADI 2*** respectivamente.

- El hecho de que los tres isómeros inesperados resultaron ser activos demuestra que no es esencial para su eficacia el hecho que el sustituyente este en posición 2 o 3 del anillo ya que éste sigue conservando su planaridad como lo demuestra la literatura.
- La síntesis de compuestos funcionalizados en la posición 2 y 3 del anillo bencimidazolico está abierta a mayor investigación pues como probaron los estudios computacionales e *in vitro*, las sustancias obtenidas tienen buena actividad.

6.1. PERSPECTIVAS

- Sintetizar derivados sustituidos en las posiciones 5 ó 6 por cloro para evitar su metabolismo en el huésped.
- Sintetizar derivados sustituidos en las posiciones 5 ó 6 por éster ya que esto incrementaría su afinidad por el sitio de unión conduciendo a compuestos más activos.
- Evaluar los compuestos sintetizados, en este trabajo, en la enzima **ADI** de *G. intestinalis* obtenida por técnica de biología molecular.
- Desarrollar una metodología de síntesis para los compuestos 2-sustituidos **ADI 1**, **ADI 2** y **ADI 6**.
- Investigar a los derivados sustituidos en la posición 3 del anillo de bencimidazol como compuestos antiparasitarios.

CAPÍTULO 7. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación se describe la instrumentación, reactivos y disolventes, así como los procedimientos de síntesis para la obtención de los intermediarios y productos finales sintetizados.

7.1. Instrumentación

El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria Scientech SL 600 y en una balanza analítica Sartorius A210P.

Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi R-215 con condensador vertical de dedo frío y baño. Para disminuir la presión del sistema (hasta 1 mmHg) se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2. Alternativamente se utilizó un rotaevaporador Büchi CR-205 con condensador vertical de dedo frío y baño.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Büchi B-540 utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono trece (RMN ^1H y RMN ^{13}C) se obtuvieron en un espectrómetro Varian modelo Unity Inova 300 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me_4Si , $\delta = 0$) en CDCl_3 o DMSO-d_6 y los valores de J en Hz. La simbología empleada es: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, c = señal cuádruple, m = señal múltiple, sa = señal ancha, dd = señal doble de dobles.

Los espectros de masas se determinaron en cromatógrafo de gases acoplado a masas marca Thermo-Electron, modelo Trace GC Ultra con columna capilar fase DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón) de 30 metros de longitud y 0.25 mm de espesor de película 0.1 micrometros. Se utilizó, para la determinación de espectros de masas de alta

resolución, un equipo UPLC-Tof marca Waters, modelo Xevo TQ (con fuente de ionización por electrospray).

La hidrogenación catalítica se realizó en un aparato de hidrogenación Parr, Modelo 3916 EG a 60 lb/in² y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Pd sobre carbono (al 5%) de la casa Aldrich.

7.2. Cromatografía

El progreso de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se determinó por cromatografía en placa fina (ccf) empleando cromatoplasmas de la casa Merck recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV), por exposición a vapores de yodo o ninhidrina.

Para la separación cromatográfica, por la técnica de cromatografía en columna, se utilizó una columna de vidrio empacada con gel de sílice 60 (Merck, tamaño de partícula 0.04-0.063 mm y malla 230-400 mesh).

7.2.1 Sistemas cromatográficos

Para el desarrollo experimental del trabajo se usaron los siguientes sistemas cromatográficos tabulados en **Tabla 7.1**.

Tabla 7.1 Sistemas cromatográficos utilizados

Sistema	Componentes	Proporción
I	Hexano-acetato de etilo	4:1
II	Hexano-Cloroformo-Acetato de etilo	50:35:15
III	Cloroformo-metanol	98:2
IV	Cloroformo-metanol	80:20
V	Cloroformo-metanol	90:10
VI	Cloroformo-metanol	70:30

7.3. Síntesis

7.3.1 Síntesis de *N*-metil-2-nitroanilina (**Int 1**)

En un reactor Parr se mezclaron 40 g (253 mmol, 1 eq) de 1-cloro-2-nitrobenceno, 51.42 g (761 mmol, 3 eq) de clorhidrato de metilamina y 105.24 g (761 mmol, 3 eq) de carbonato de potasio en 400 mL de etanol. La reacción se calentó a 150 °C durante 5 horas. El avance de la reacción se verificó por ccf en el sistema I y luego en el sistema II. Las sales inorgánicas se separaron por filtración al vacío, y lavaron repetidas veces con etanol. El disolvente se destiló a vacío hasta llevar a sequedad. El sólido resultante se purificó por filtración sobre alúmina neutra, para lo cual el producto de reacción se redisolvió en acetona y se mezcló con alúmina; la mezcla se llevó a sequeda por destilación al vacío. La mezcla alúmina-compuesto se colocó sobre el punto de aplicación en la columna y se eluyó de la columna repetidas veces con cloroformo. La fase orgánica se concentró en rotavapor. Se obtuvieron 36 g, dando un rendimiento de 93.2% de un sólido color naranja, identificado como *N*-metil-2-nitroanilina, con pf 35-38 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.02 (d, 3H, CH₃, J = 5.1 Hz), 6.64 (ddd, 1H, H-4, J =

8.3, 6.9, 1.2 Hz), 6.83 (dd, 1H, H-6, J = 8.7, 1.0 Hz), 7.45 (dddd, 1H, H-5, J = 8.6, 6.9, 1.6, 0.6 Hz), 8.03 (sa, 1H, -NHCH_3), 8.15 (dd, 1H, H-3, J = 8.6, 1.6 Hz), (**Espectro 1**).

7.3.2 Síntesis de 1-metil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (**Int 3**)

La síntesis se llevó a cabo en dos pasos:

Síntesis de etil xantato de potasio.- 8.75 g de KOH (156 mmol, 1.1 eq) se disolvieron en 20 mL de etanol; a la solución fría a 0°C se añadieron lentamente 9.5 mL (157 mmol, 1.1 eq) de disulfuro de carbono. Después de la adición se formó un precipitado amarillo el cual se mantuvo en refrigeración para usarse en el siguiente paso.

Síntesis de *N*-metilbenceno-1,2-diamina.- En el reactor de hidrogenación se cargaron 21 g (138 mmol, 1 eq) de *N*-metil-2-nitroanilina y 200 mL de etanol; a la mezcla se le añadieron 2 g de Pd/C, bajo atmósfera de nitrógeno; después de purgar el sistema con lavados de 30 lb de H₂, se inició la reacción hasta que el consumo de hidrógeno cesó. La reacción concluyó en 1.5 h. Después de que el reactor alcanzó temperatura ambiente, el catalizador se separó por filtración sobre una cama de celita y el filtrado se concentró a vacío hasta un volumen aproximado de 50 mL; luego, el líquido oscuro residual se mezcló con el xantato, preparado previamente, y se calentó a reflujo por 3 horas bajo atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se verificó por ccf en el sistema III. Para obtener la ccf, una alícuota de la mezcla de reacción se suspendió en agua, se acidificó con ácido acético y extrajo con acetato de etilo.

Una vez concluida la reacción se añadieron 8 g de carbón activado y se continuó el reflujo 10 minutos más. La mezcla caliente se filtró sobre una cama de celita y al filtrado se añadieron 600 mL de agua caliente (60-70 °C); esta solución se trató con ácido acético glacial hasta llevar a pH 7. En este punto se observó abundante formación de un precipitado blanco que correspondió al producto deseado. El sólido se separó por filtración al vacío, se lavó con agua y secó al aire. Se obtuvieron 18.5 g de sustancia final pura que no requirió posterior purificación. De las aguas madres se recuperaron 7 g de producto, el cual se recrystalizó de etanol. El rendimiento total fue de 54.9% de un sólido blanco de $R_f = 0.47$ y pf 191.1-192.0 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.64 (s, 3H, CH₃), 7.1-7.4 (m, 4H_{arom}), 12.72 (sa, 1H, -NH), (**Espectro 2**);

RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ : 30.04 (CH_3), 109.49 (C-7), 109.57 (C-4), 122.20 (C-5), 122.87 (C-6), 130.68 (C-7*), 133.15 (C-3*), 168.52 (C-2), (**Espectro 3**).

7.3.3 Síntesis 2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etanol (**Int 4**)

A una solución de 10 g (61 mmol, 1 eq) del **Int 3** y 3.57 g (64 mmol, 1eq) de KOH en 30 mL de H_2O a 0 °C se le gotearon 4.3 mL (61 mmol, 1 eq) de 2-bromoetanol. La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente formándose un precipitado blanco el cual se suspendió en 250 mL de agua. El sólido se separó de la mezcla por filtración al vacío y se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro. Se obtuvieron 9 g (71%). El producto se recristalizó de agua dando un producto puro con un $R_f = 0.24$ en el sistema III y pf 102.4-103.4 °C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.42 (t, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J = 6.5\text{Hz}$), 3.67 (s, 3H, CH_3), 3.73 (t, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J = 6.5\text{ Hz}$), 5.15 (sa, 1H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 7.1-7.6 (m, 4H_{arom}), (**Espectro 4**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO) δ : 29.83 (CH_3), 34.30 (C-1'), 60.05 (C-2'), 109.33 (C-7), 117.37 (C-4), 121.38 (C-5 y C-6), 136.77 (C-7*), 142.77 (C-3*), 151.81 (C-2), (**Espectro 5**).

7.3.4 Síntesis de 2-[(2-cloroetil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (**Int 5**)

A una solución fría (0 °C) de cloruro de tionilo (14 mL, 193 mmol, 4.9 eq) en 80 mL de cloroformo se añadieron 8.18 g (39 mmol, 1 eq) del alcohol **Int 4** disueltos en 80 mL de cloroformo. La adición se realizó lentamente durante 15 min. Al finalizar la adición, la mezcla se calentó a reflujo por 3 horas. Después de este tiempo, la ccf de la mezcla de reacción mostró consumo de la materia prima y una mancha principal con $R_f = 0.6$. La reacción se trabajó por destilación del disolvente a presión reducida hasta obtener una pasta la cual se lavó tres veces con benceno, destilando el disolvente cada vez. El sólido resultante de color amarillo mostró una sola mancha y no se sometió a un proceso de purificación adicional. El producto tuvo un pf de 127.5-129.3 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.65 (s, 3H, CH_3), 3.69 (t, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $J = 7\text{ Hz}$), 3.91 (t, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $J = 7\text{ Hz}$), 7.1-7.7 (m, 4H_{arom}), (**Espectro 6**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) δ : 30.06 (CH_3), 34.32 (C-1'), 43.01 (C-2'), 108.61 (C-7), 118.32 (C-4), 122.00 (C-5),

122.08 (C-6), 136.85 (C-7*), 143.33 (C-3*), 150.56 (C-2), (**Espectro 7**); EMIE (m/z, [M]⁺): 226, (**Espectro 8**).

7.3.5 Síntesis del clorhidrato de carbamimidatoato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)etilo (**ADI 1***)

A 3.7g (16.3 mmol, 1.4 eq) del compuesto **Int 5** en 37 mL de DMF a temperatura ambiente se añadieron 0.89 g (11.7 mmol, 1 eq) de tiourea. La mezcla de reacción se calentó entre 100-110 °C durante 3 horas. Terminada la reacción, la DMF se destiló a presión reducida, la pasta obtenida se solubilizó en 20 mL de cloroformo y la solución se mantuvo en refrigeración por tres días, tiempo en el cual se observó la formación de un precipitado el cual se lavó con isopropanol caliente. El residuo sólido después de separarse pesó 1.5 g (42 %). El producto se purificó por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y eluyente cloroformo-etanol (80:20). Se obtuvo un sólido de color amarillo que presentó un $R_f = 0.34$ en el sistema IV, p_f 176.8-178.1 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.70 (t, 2H, BzSCH₂CH₂S-, J = 6.5Hz), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.60 (t, 2H, BzSCH₂CH₂S-, J = 6.5Hz), 7.25-7.57 (m, 4H_{arom}), 9.34 (sa, 4H, C(NH)NH₂.HCl), (**Espectro 9**); ¹³C RMN (75.5 MHz, DMSO-d₆) δ : 28.51 (C-2'), 31.10 (CH₃), 42.53 (C-1'), 109.72 (C-4 y C-7), 123.01 (C-5), 123.09 (C-6), 131.20 (C-7*), 131.99 (C-3*), 169.04 (C-3'), 169.27 (C-2), (**Espectro 10**); EMAR (Q-Tof, m/z [M+1]⁺): calculado: 267.0738, encontrado: 267.0839.

7.3.6 Síntesis de 3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanonitrilo (**Int 6*** o **ADI6***)

A 1.64 g (10 mmol, 1 eq) de **Int 3** en 20 mL de agua conteniendo 0.6 g de KOH a 0 °C, se añadió 0.7mL (10 mmol, 1 eq) de acrilonitrilo. Una vez terminada la adición se retiró el baño de hielo y se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche. El sólido formado se separó por filtración al vacío; las aguas madres que contenían todavía el tiol **Int 3**, se concentraron a un tercio de su volumen y se les adicionó 1 mL (15 mmol) de acrilonitrilo; obteniéndose nuevamente un sólido coincidente en R_f con el sólido inicial. Al reunir las dos filtrados se obtuvo 1.53 g (70.5%) de un sólido de color

blanco el cual se recristalizó en etanol. El producto obtenido presentó un $R_f = 0.51$ en el sistema III. pf 171.5-172.0 °C, RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.08 (t, 2H, BzSCH $_2$ CH $_2$ CN), 4.58 (t, 2H, BzSCH $_2$ CH $_2$ CN), 7.2-7.7(m, 4H $_{arom}$), (**Espectro 14**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.33 (C-2'), 31.48 (CH $_3$), 40.29 (C-1'), 110.16 (C-7), 110.27 (C-4), 118.92 (C-3'), 123.43 (C-5), 123.56 (C-6), 131.62 (C-7*), 132.44 (C-3*), 169.17 (C-2), (**Espectro 15**); EMAR (Q-Tof, m/z [M+1] $^+$): calculado 218.0752, encontrado: 218.0760.

7.3.7 Síntesis de *N'*-hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanimidamida (**ADI 2***)

A una mezcla de 3 g (13.8 mmol, 1 eq) del **Int 6** y 2.88 g (41 mmol, 2.9 eq) de clorhidrato de hidroxilamina disueltos en 100 mL de etanol se añadió lentamente una solución de 2.19 g (20.6 mmol, 2.9 eq) de Na $_2$ CO $_3$ en 30 mL de agua. La mezcla se calentó a reflujo por 2 horas, tiempo en el cual se adicionó 1 equivalente más de hidroxilamina (1 g de clorhidrato de hidroxilamina neutralizado con carbonato), y se continuó el calentamiento por dos horas más. Terminada la reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 14 mL de agua. El producto se aisló por extracción con CH $_2$ Cl $_2$ (30 mL, x4), la fase orgánica se concentró en el rotaevaporador y el sólido obtenido se recristalizó en etanol obteniéndose 1.85g (53.6%) de un sólido verde claro que tiene un $R_f = 0.39$ en el sistema V. pf 167.6-168.1 °C, RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.43 (m, 2H, SCH $_2$ CH $_2$ C(NOH)NH $_2$), 3.7 (s, 3H, CH $_3$), 4.44 (m, 2H, SCH $_2$ CH $_2$ C(NOH)NH $_2$), 5.57 (sa, 2H, SCH $_2$ CH $_2$ C(NOH)NH $_2$), 7.2-7.58 (m, 4H $_{arom}$), 8.9 (sa, 1H, SCH $_2$ CH $_2$ C(NOH)NH $_2$), (**Espectro 17**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ : 29.21 (C-2'), 30.89 (CH $_3$), 41.69 (C-1'), 109.43 (C-7), 109.64 (C-4), 122.68 (C-5), 122.73 (C-6), 131.39 (C-7*), 131.96 (C-3*), 149.85 (C-3'), 168.56 (C-2), (**Espectro 18**); EMAR (Q-Tof, m/z [M+1] $^+$): calculado: 251.0967, encontrado: 251.0962.

7.3.8 Síntesis de 2-[(2,2-dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (**Int 7**)

A 5 g (30.4 mmol, 1 eq) del **Int 3** disueltos en 120 mL de DMSO se añadió una solución de 1.7 g (30.3 mmol, 1 eq) de KOH en 30 mL de agua. A la mezcla resultante se adicionó 4.8 mL (31.9 mmol, 1 eq) del dietil acetal del bromoacetaldehído y se dejó reaccionar a temperatura ambiente una semana. El producto se separó de la mezcla por extracción con acetato de etilo, la fase orgánica se trató con NaSO₄ anhidro y concentró al vacío hasta obtener un aceite de color amarillo. Para purificar la sustancia se destiló el compuesto en un aparato Kugelrohr tomándose la fracción que hierve a 253 °C (0.15 mmHg) obteniéndose 5.31 g (62.2%) de **Int 7** como un aceite amarillo que presenta un R_f = 0.63 en el sistema III. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.22 (t, 6H, CH₃CH₂O-, J = 7Hz), 3.5-3.82 (m, 9H), 4.82 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 7.1-7.8 (m, 4H_{arom}), (**Espectro 21**); EMIE (m/z, [M]⁺): 280, (**Espectro 22**).

7.3.9 Síntesis de [(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]acetaldehído (**Int 8**)

A una solución de 2 g (7 mmol) del **Int 7** en 22 mL de dioxano a 0 °C se añadió lentamente 22 mL de HCl 2.5 N y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se enfrió a 0 °C, se neutralizó con solución de bicarbonato de sodio, se extrajo con cloroformo (30mL, x3). La fase orgánica se lavó con salmuera, se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a sequedad utilizándose el producto directamente en la siguiente reacción. El producto aceitoso de color amarillo presentó un R_f = 0.31 en el sistema III. EMIE (m/z, [M]⁺): 206, (**Espectro 23**).

7.3.10 Síntesis de 2-{2-[(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazino-carbotioamida (**ADI 3**)

Asumiendo que el rendimiento en la formación de **Int 8** fue cuantitativo, a 1.47 g (1 eq) de este aldehído en 25 mL de etanol, se añadió 0.76 g (1.2 mmol) de tiosemicarbazida y 40 mg de ácido trifluoroacético a 25 °C. La reacción trascurrió en 3 horas. El control de la reacción se llevó a cabo en el sistema VI presentando la sustancia un R_f = 0.69. Una vez terminada la reacción se filtró el sólido y se recristalizó en etanol obteniéndose 0.45 g (22.6%) del compuesto final de color blanco hueso. pf

136.2-137.1, RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.7 (s, 3H, CH_3), 4.13 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 7.1-7.65 (6H), 8.13 (sa, 1H), (**Espectro 24**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO) δ : 30.04 (CH_3), 33.03 (C-1'), 109.62 (C-7), 117.67 (C-4), 121.62 (C-5), 121.79 (C-6), 136.85 (C-7*), 141.52 (C-2'), 142.74 (C-3*), 150.20 (C-2), 178.04 (C-3'), (**Espectro 25**); EMAR (Q-Tof, m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$): calculado: 302.0510, encontrado: 302.0518.

7.3.11 Síntesis de 2-{2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (**ADI 4**)

Para la obtención de este compuesto se sintetizó el **Int 8** a partir de 2 g (7.1 mmol, 1 eq) de **Int 7** utilizando el procedimiento anterior. Al producto de la reacción se le añadieron 25 mL de etanol, 0.95 g (8.5 mmol, 1.2 eq) de clorhidrato de semicarbazida y 0.72 g (8.5 mmol, 1.2 eq) de bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó por una hora y se añadieron 25 mg de ácido trifluoroacético manteniendo la agitación por 3 horas más a temperatura ambiente. El producto formado se separó por filtración, se lavó con agua y se recristalizó en etanol dando 1.1 g (58.6%) del compuesto final que presentó un $R_f = 0.62$ en el sistema VI. pf 176.4-177.0 °C RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 3.69 (s, 3H, CH_3), 4.10 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 6.23 (sa, 2H), 7.1-7.25 (m, 2H_{arom}), 7.35 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.45-7.6 (m, 2H_{arom}), 10.07 (s, 1H), (**Espectro 27**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO) δ : 30.01 (CH_3), 33.13 (C-1'), 109.58 (C-7), 117.64 (C-4), 121.58 (C-5), 121.73 (C-6), 136.85 (C-7*), 137.73 (C-2'), 142.78 (C-3*), 150.51 (C-2), 156.44 (C-3'), (**Espectro 28**); EMAR (Q-Tof, m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$): calculado: 286.0739, encontrado: 286.0737.

7.3.12 Síntesis de (2-bromoetil)carbamato de *terc*-butilo

En 60 mL de diclorometano a 0 °C, se colocaron 6.46 g (31.5 mmol) de bromhidrato de 2-bromoetilamina y 4.4 mL (31.5 mmol) de trietilamina y se adicionaron lentamente 15 mL de solución de 6.89 g (31.5 mmol) de dicarbonato de di-*terc*-butilo en diclorometano. Se dejó agitando a temperatura ambiente por 1.5 horas. Se añadió acetato de etilo y se hizo lavados con solución al 5% de ácido cítrico, agua y salmuera;

se trató con sulfato de sodio, se concentró y se obtuvo un aceite transparente 6.86 g (97%). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.48 (s, 9H, CH_3), 3.38-3.62 (m, 4H, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 5.21 (sa, 1H, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$).

7.3.13 Síntesis de 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etil}carbamato de terc-butilo (**Int 9**)

A una solución de 4 g del **Int 3** (24.4 mmol, 1 eq) en 25 mL de DMF y se añadieron 1.37 g (24.4 mmol, 1 eq) de KOH enfriándose el sistema a 0 °C con baño de hielo; luego se añadieron 6.35 g (28.3 mmol, 1.1 eq) del carbamato de (2-bromoetil) terc-butilo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Para aislar el compuesto y purificarlo se hizo una extracción con cloroformo por triplicado, las fracciones orgánicas se unieron y se lavaron con solución acuosa saturada de hidróxido de sodio. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio y se concentró dando 5.95 g (79.4%) del compuesto deseado que presenta un $R_f = 0.74$ en el sistema V. pf 98.4-101.6, RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 1.36 (s, 9H, CH_3), 3.26-3.42 (m, 4H, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.67 (s, 3H, CH_3), 7-7.65 (m, 4H_{arom}), (**Espectro 32**); RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO) δ : 28.21 (C-5'), 29.91 (CH_3), 31.65 (C-1'), 39.72 (C-2'), 77.79 (C-4'), 109.43 (C-7), 117.39 (C-4), 121.46 (C-6), 121.49 (C-5), 136.68 (C-7*), 142.68 (C-3*), 151.33 (C-2), 155.60 (C-3'), (**Espectro 33**).

7.3.14 Síntesis de 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (**Int 10**)

A 8.86 g del **Int 9** (28.8 mmol, 1 eq), disueltos en 55 mL de dioxano a 0 °C, se añadieron 95 mL de una solución 2.5 N de HCl (ac) (237.5 mmol, 8.2 eq); terminada la adición la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente toda la noche; luego, ésta se enfrió nuevamente a 0 °C y se ajustó el pH a 12 con hidróxido de sodio (2 N), se extrajo con cloroformo, se trató con sulfato de sodio y se concentró obteniéndose un aceite amarillo. El producto se purificó por columna cromatográfica usando como fase estacionaria gel de sílice y eluyente cloroformo-etanol (80:20). Se obtuvieron 3.08 g (51.6%) de un aceite de color amarillo que presentó un $R_f = 0.27$ en el sistema IV y que reveló con ninhidrina. EMIE (m/z, $[\text{M}]^+$) (base libre): 207, (**Espectro 34**); RMN ^1H

(300 MHz, DMSO) (clorhidrato) δ : 3.23 (m, 2H, SCH₂CH₂NH₃⁺), 3.79 (t, 2H, SCH₂CH₂NH₃⁺), 3.85 (s, 3H, CH₃), 7.36-7.84 (m, 4H_{arom}), 8.51 (sa, 3H, SCH₂CH₂NH₃⁺), (**Espectro 35**); RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO) (clorhidrato) δ : 29.62 (C-1'), 31.35 (CH₃), 38.03 (C-2'), 111.36 (C-7), 114.84 (C-4), 124.11 (C-5), 124.30 (C-6), 134.60 (C-7*), 150.21 (C-2, C-3*), (**Espectro 37**).

7.3.15 Síntesis de 1-{2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etil}guanidina (**ADI 5**)

En 17 mL de acetonitrilo anhidro se mezclaron 2 g de **Int 10** (9.6 mmol, 1 eq), 2.81 g de clorhidrato de 1H-Pirazol-1-carboxamida (19.2 mmol, 2 eq) y 2.7 mL de trietilamina (19.2 mmol, 2 eq); la solución se calentó a 60 °C durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Al terminar la reacción, el sólido formado se filtró y se lavó con acetonitrilo. El sólido obtenido se lavó con etanol caliente. Al filtrado etanólico se le añadió carbón activado y se hizo hervir por cinco minutos, se filtró y se concentró en el rotavapor. El residuo obtenido se cromatógrafió en una columna de gel de sílice empleando como fase móvil cloroformo:metanol 80:20, obteniendo el producto **ADI 5**. Se requirió de un paso más de purificación por medio de una recristalización en etanol anhidro obteniéndose 0.8 g (33.3%) del compuesto deseado el cual posee un R_f de 0.28 en el sistema IV. RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ : 3.3-3.65 (m, 4H, SCH₂CH₂NH-), 3.64 (CH₃), 7.1-7.65 (m, 4H_{arom}), (**Espectro 39**); RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO) δ : 30.38 (C-1'), 30.47 (CH₃), 40.77 (C-2'), 110.07 (C-7), 117.71 (C-4), 122.12 (C-5), 122.23 (C-6), 137.09 (C-7*), 142.82 (C-3*), 151.98 (C-2), 157.94 (C-3'), (**Espectro 40**).

7.4. Evaluación de la susceptibilidad de los trofozoitos de *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

Se incubaron trofozoítos 5×10⁴ de *G. intestinalis*, 6×10³ *E. histolytica* y 5×10⁴ *T. vaginalis* por 48 horas a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes del compuesto correspondiente (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL), utilizando como compuestos de referencia albendazol y metronidazol, para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármaco empleando DMSO.

Se inocularon 50 μ L de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos y se incubaron por 48 horas 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 (CI₅₀), que correspondió a la concentración que inhibió el crecimiento del 50 % de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron dos veces por triplicado.

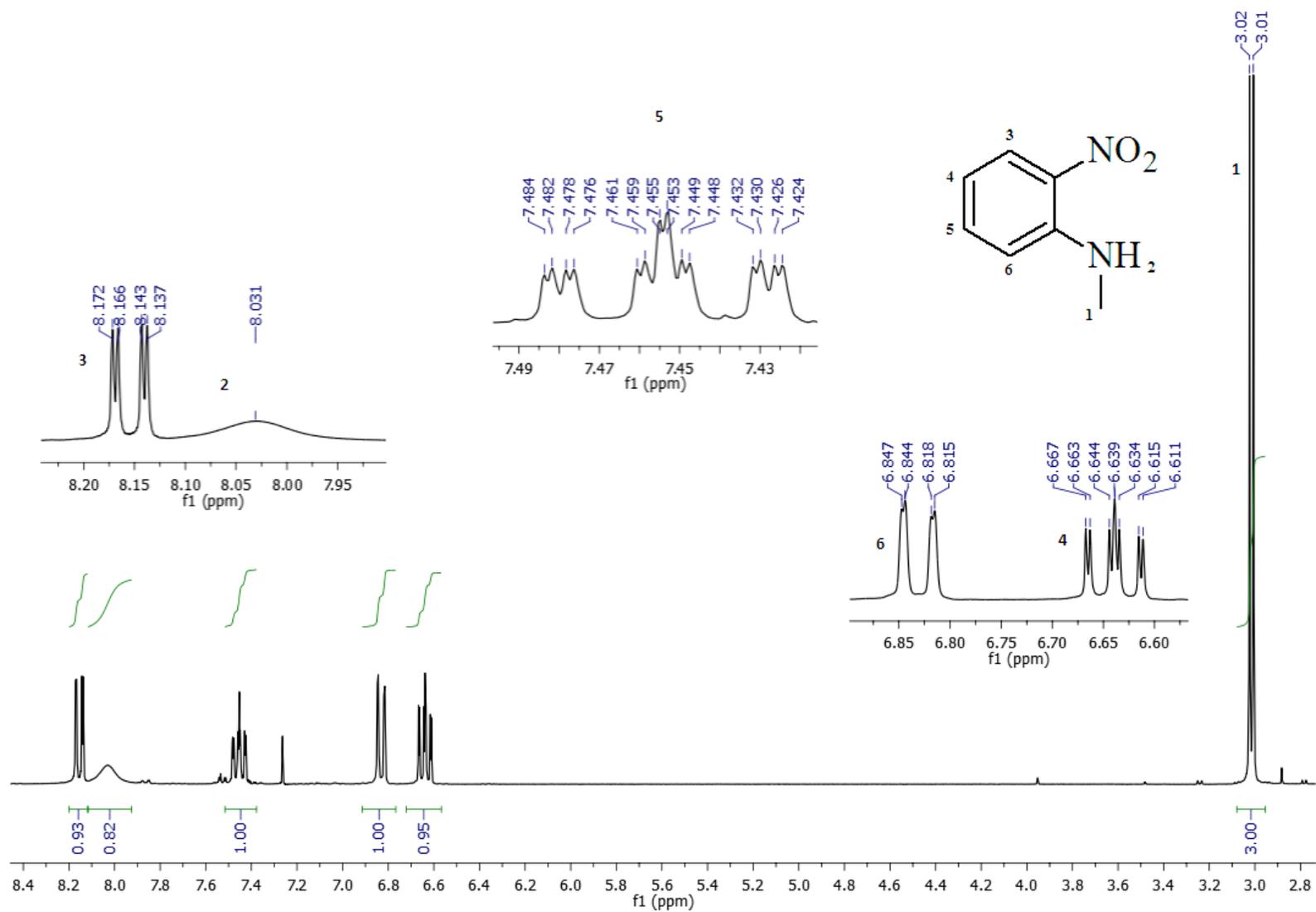
BIBLIOGRAFÍA

1. Huang, D. B. & White, A. C. An updated review on Cryptosporidium and Giardia. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **35**, 291–314, viii (2006).
2. Feng, Y. & Xiao, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 110–40 (2011).
3. Giraldo-Gómez, J. M., Lora, F., Henao, L. H., Mejía, S. & Gómez-Marín, J. E. Prevalencia de giardiasis y parásitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. *Rev. Salud Pública* **7(3)**, 327–338 (2005).
4. Ordoñez, E. *et al.* Prevención, diagnóstico y tratamiento farmacológico de la giardiasis en niños y adolescentes de 1 a 18 años en el primer y segundo nivel de atención. *Guía práctica Clin. Cons. Salubr. Gen.*
5. Gardner, T. B. & Hill, D. R. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 114–128 (2001).
6. Guidelines for prevention and control for local public health agencies. (2001).
7. Luján, H. D., Mowatt, M. R. & Nash, T. E. Mechanisms of Giardia lamblia differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 294–304 (1997).
8. Schofield, P. J., Edwards, M. R., Matthews, J. & Wilson, J. R. The pathway of arginine catabolism in Giardia intestinalis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 29–36 (1992).
9. Rópolo, A. S. & Touz, M. C. A lesson in survival, by Giardia lamblia. *ScientificWorldJournal.* **10**, 2019–31 (2010).
10. Valdez, J. *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2221–4 (2002).
11. Sánchez Díaz, M. TESIS DE MAESTRÍA: Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. *UNAM* (1999).
12. Mandal, S., Moudgil, M. & Mandal, S. K. Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 90–100 (2009).
13. Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 177–182 (2006).
14. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today* **14**, 676–83 (2009).
15. Méndez, C. A. TESIS DE MAESTRÍA: Síntesis alterna de nitazoxanida y evaluación proteómica de algunos antiprotozoarios contra G. intestinalis. *UNAM* (2007).
16. Trejo, P. J. TESIS DE MAESTRÍA: Estudio de modelado por homología para determinar la estructura de la enzima arginina deiminasa de Giardia intestinalis y diseño de inhibidores. *UNAM* (2013).

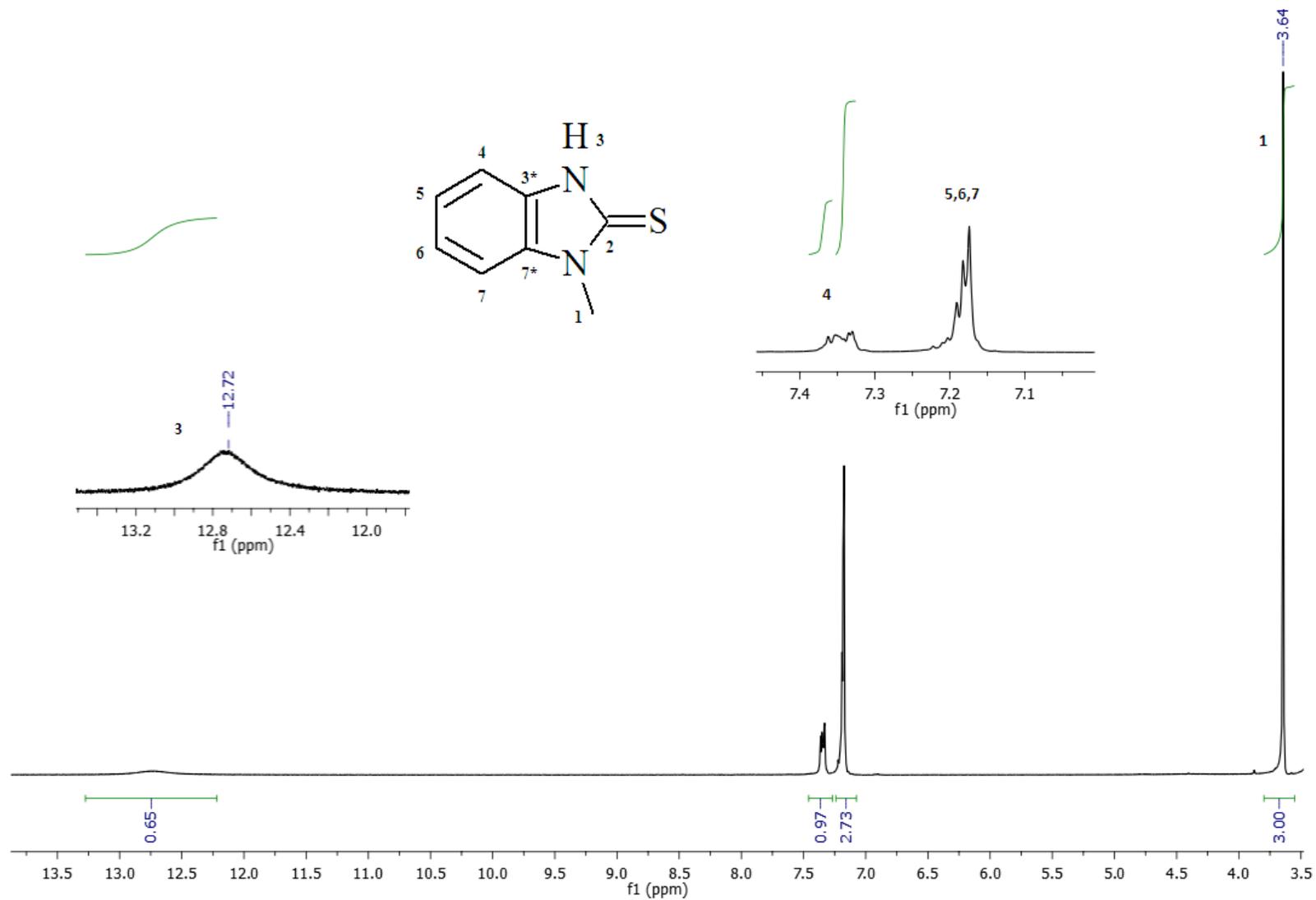
17. Trejo, P. J. TESIS DE LICENCIATURA: Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la Triosafosfato Isomerasa (TIM) de Entamoeba. *UNAM* (2011).
18. Deacon, B. D. & VanAllan, J. A. 2-Mercaptobenzimidazole. *Org. Synth.* **30**, 56 (1950).
19. Cedillo-Rivera & Muñoz, O. In vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **37**, 221–224 (1992).
20. Chavez, R., Espinosa-Cantellano & Al., E. Effects of albendazole on Entamoeba histolytica and Giardia lamblia trophozoites. *Arch. Med. Res.* **23**, 63–67 (1992).
21. Maldonado, A. TESIS DE MAESTRÍA: Diseño, síntesis y actividad de derivados del bencimidazol contra Leishmania mexicana. *UNAM* (2014).
22. Braun, S. *et al.* Design of benzimidazole- and benzoxazole-2-thione derivatives as inhibitors of bacterial hyaluronan lyase. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4419–29 (2011).
23. Balestrero, R. S. & Russell, J. G. ¹³C NMR: Iminothiol-thioamide tautomerism of 2-mercaptobenzazoles and 1-methyl-2-mercaptoimidazole. **24**, 651–655 (1986).
24. Araya, C. G., Vargas, V. & Morales, R. G. E. $1\pi \rightarrow 1\pi^*$ Ultraviolet absorption bands and electronic charge transfers in singlet excited states of sulfur aromatic heterocycles. *Spectrosc. Lett.* **38**, 605–616 (2005).
25. Form, G. R., Raper, E. S. & Downie, T. C. The crystal and molecular structure of 2-mercaptobenzimidazole. *Acta Crystallogr. Sect. B* **32**, 345–348 (1976).
26. Khan, H., Badshah, A., Shaheen, F., Gieck, C. & Qureshi, R. A. 1-Methyl-1H-benzimidazole-2(3H)-thione. *Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online* **64**, o1141 (2008).
27. Ibrahim, E. S., Omar, A. M. & Khalil, M. A. Novel potential anticancer agents derived from benzimidazole. *J. Pharm. Sci.* **69**, 1348–50 (1980).
28. Alcalde, E., Pérez-García, L., Dinarés, I. & Frigola, J. Heterocyclic Betaines. XXII. Azinium(azolium) 4-nitrobenzimidazolate inner salts and their derivatives with several interannular spacers. Synthesis, characterization and antitrichomonal activity. *Chem. Pharm. Bull.* **43(3)**, (1995).
29. Shirley, A. & Gilman, H. Some derivatives of phenothiazine. *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 888–893 (1944).
30. Kandalintseva, N. V., Prosenko, A. E., Dyubchenko, O. I. & Stoyanov, E. S. Synthesis of S -alkylisothiuronium halides by reaction of thiourea with M - (4-hydroxyaryl) alkyl halides. *Russ. J. Org. Chem.* **37**, 1249–1252 (2001).
31. Adams, R. & Thal, A. Benzyl cyanide. *Org. Synth.* **1**, 107 (1941).
32. Cherkofsky, S. Hydroxyguanidine O-carbamates. *US Pat.3867447* (1975).
33. Halasa, A. F. & Smith, G. E. P. Michael and Mannich reactions with benzothiazole-2-thiol. *J. Org. Chem.* **36**, 636–641 (1971).

34. Abramov, N. D. & Trzhtsinskaya, B. V. Structure and properties of imidazole-2-thiones (review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **24**, 1309–1321 (1988).
35. Bell, C. L., Nambury, C. N. V. & Bauer, L. The structure of amidoximes. *J. Org. Chem.* **29**, 2873–2877 (1964).
36. Baldwin, J. Piperidine and morpholine renin inhibitors. *Pat. WO2007/117560A2* (2007).
37. Mikhaleva, A. I., Ivanov, A. V., Vasil, A. M., Ushakov, I. A. & Yang, G. Directed Synthesis of semicarbazones, thiosemicarbazones, and guanylylhydrazones of 1-vinyl-pyrrole-2-carbaldehydes. *Chem. Heterocycl. Compd.* **44**, 1384–1390 (2008).
38. Bjorgo, B. J., Boyd, D. R., Watson, C. G. & Jennings, W. B. E-Z-Isomerism in aldimines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1081–1084 (1974).
39. Miyamoto, K., Yasuda, Y. & Yoshioka, K. Hyaluronic acid derivative and drug containing the same. *Pat. EP1710257A1* (2006).
40. Osby, J. O., Heinzman, S. W. & Ganem, B. Studies on the mechanism of transition-metal-assisted sodium borohydride and lithium aluminum hydride reductions. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 67–72 (1986).
41. Raffel, D. M. *et al.* Radiolabeled phenethylguanidines: novel imaging agents for cardiac sympathetic neurons and adrenergic tumors. *J. Med. Chem.* **50**, 2078–88 (2007).
42. Lee, T. R. & Kim, K. A facile one pot synthesis of 1-alkylbenzimidazoline-2-thiones. *J. Heterocycl. Chem.* **26**, 747–751 (1989).
43. Lawesson, S. O., Schroll, G., Bowie, J. H. & Cooks, R. G. Electron impact studies—XXII: Mass spectra of substituted benzimidazoles. *Tetrahedron* **24**, 1875–1888 (1968).
44. Cedillo-Rivera, R., Chávez, B., González-Robles, A., Tapia, A. & Yépez-Mulia, L. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 201–208 (2002).

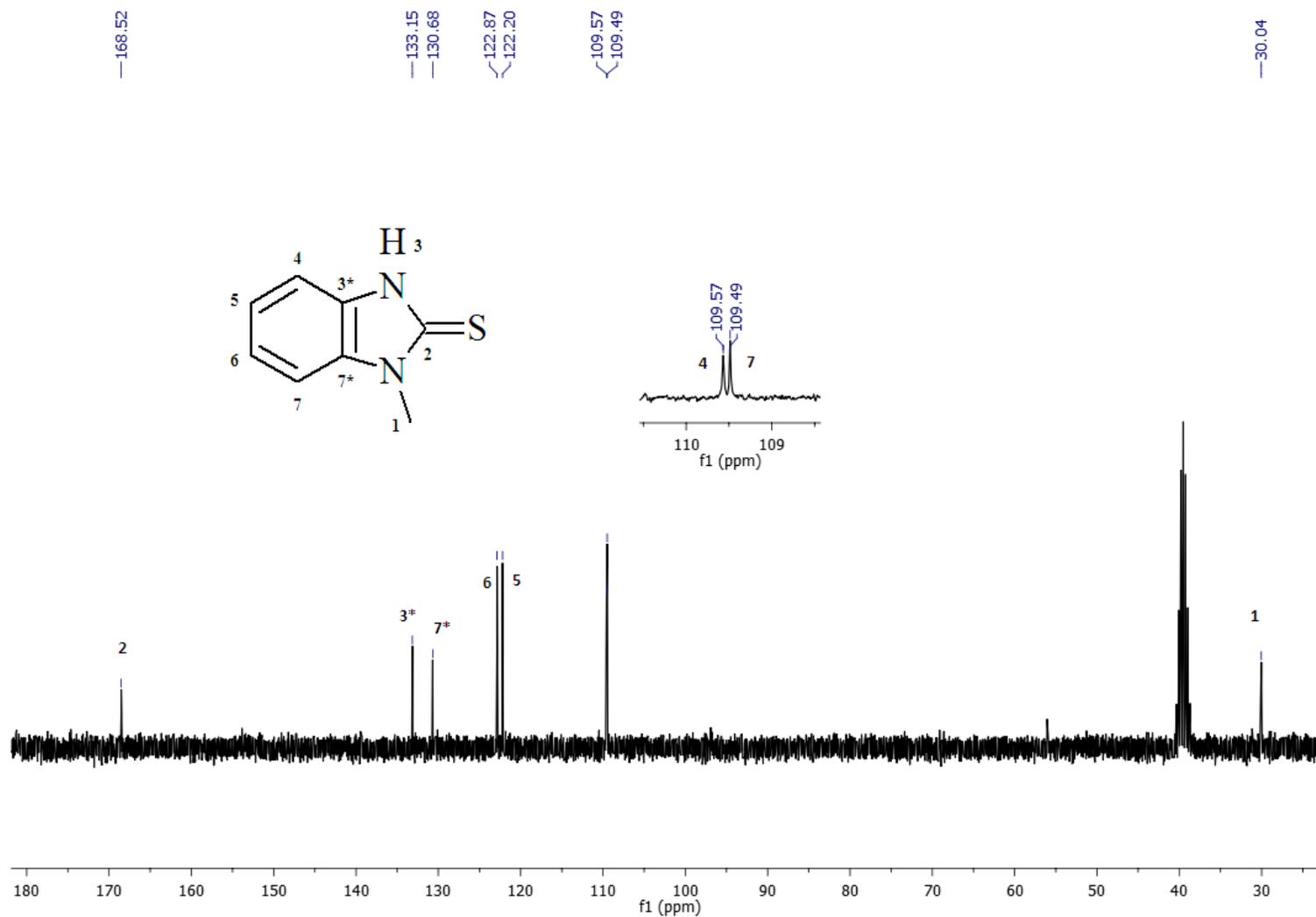
ANEXOS



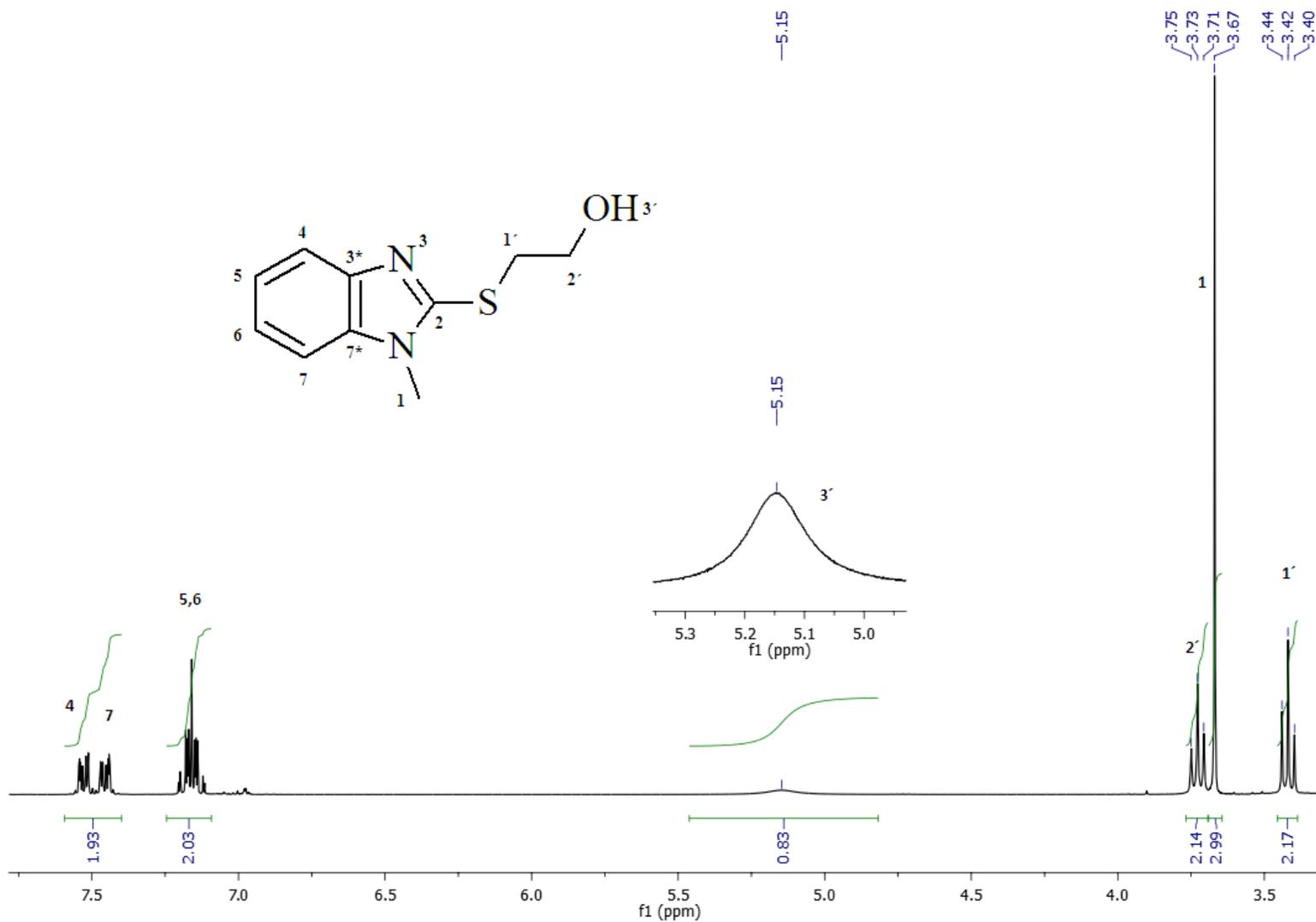
Espectro 1. RMN ^1H (300MHz) de *N*-Metil-2-nitroanilina (Int 1).



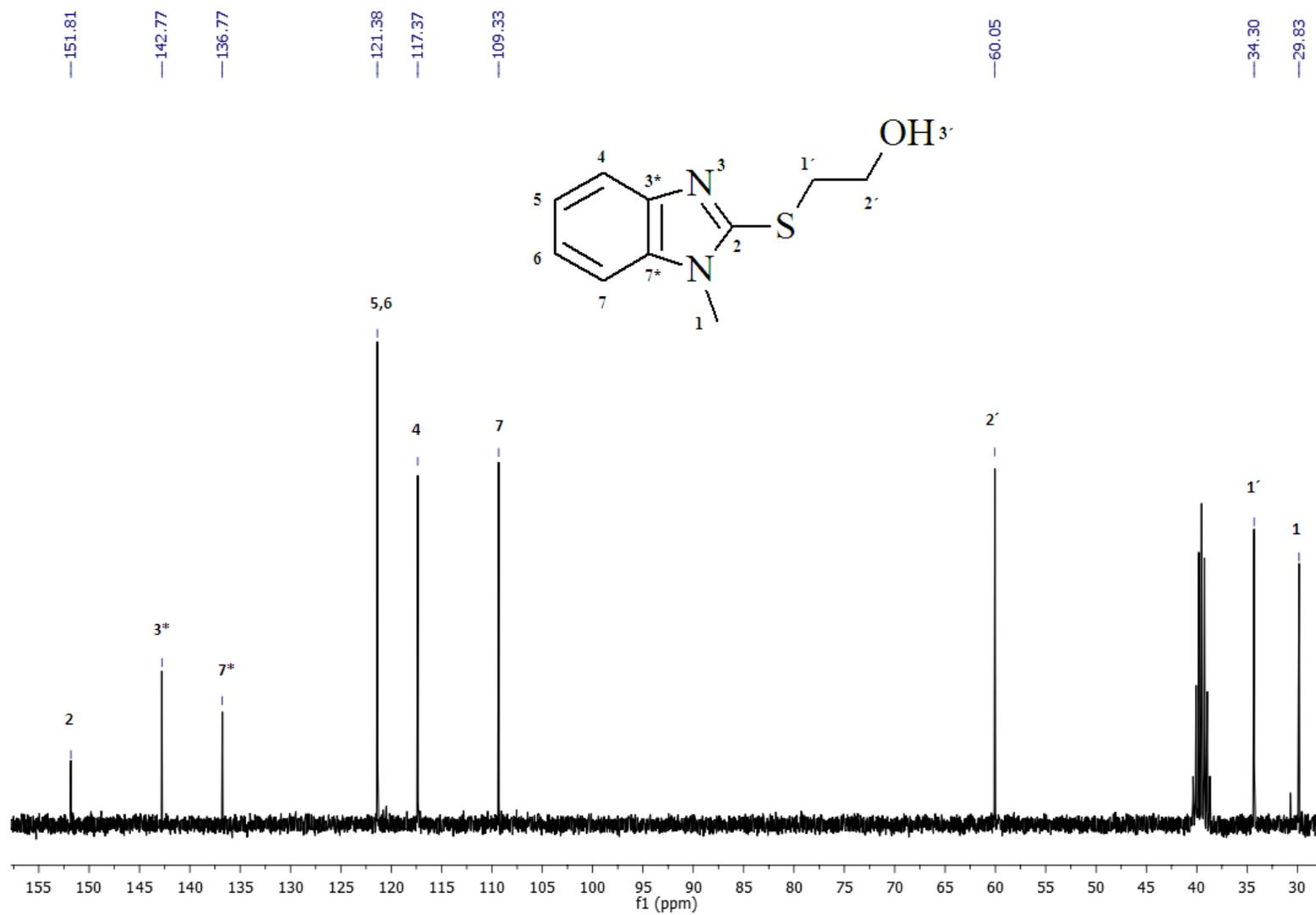
Espectro 2. RMN ^1H (300MHz) de 1-Metil-1,3-dihidro-2H-bencimidazol-2-tiona (Int 3).



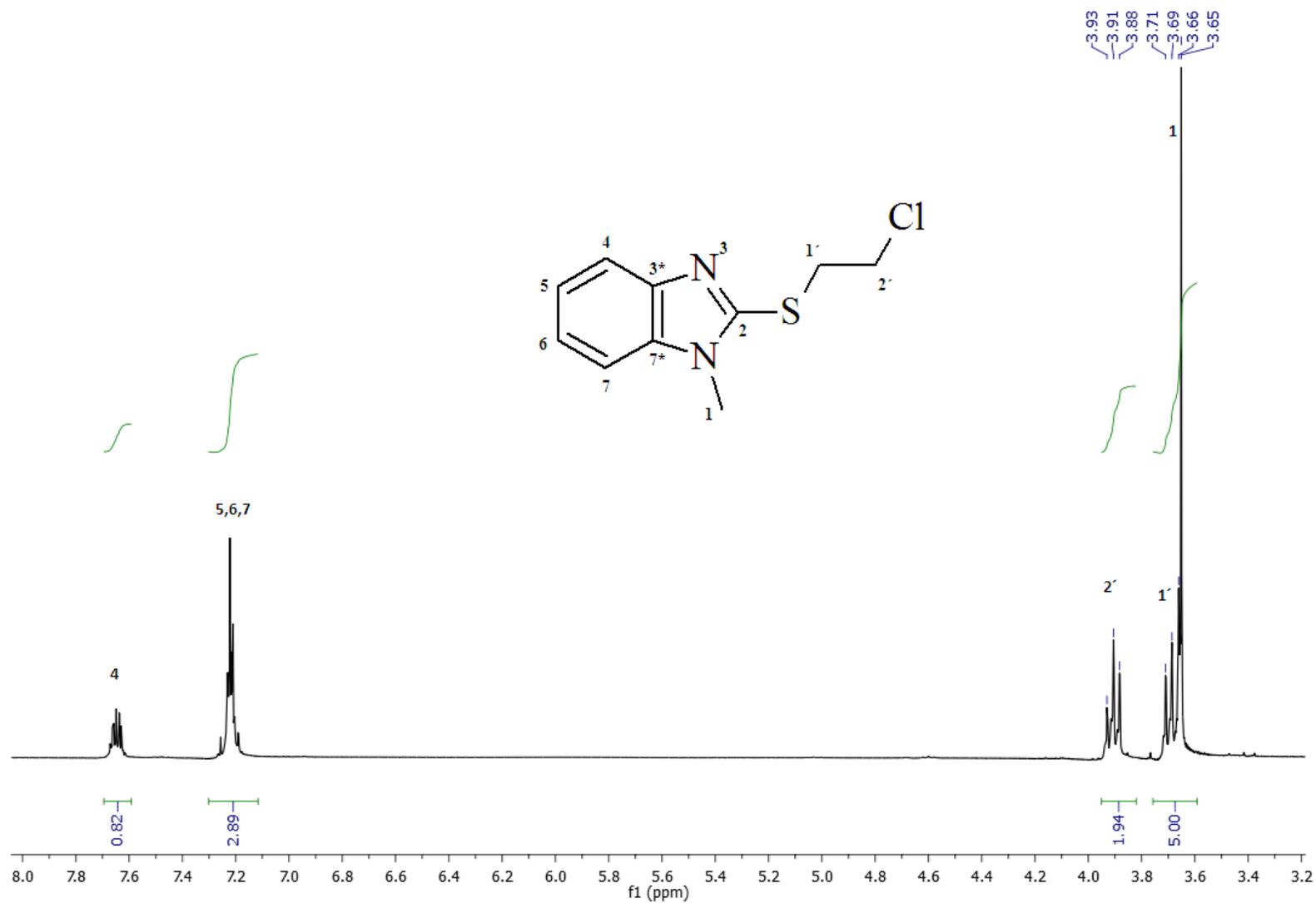
Espectro 3. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 1-Metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-tiona (Int 3).



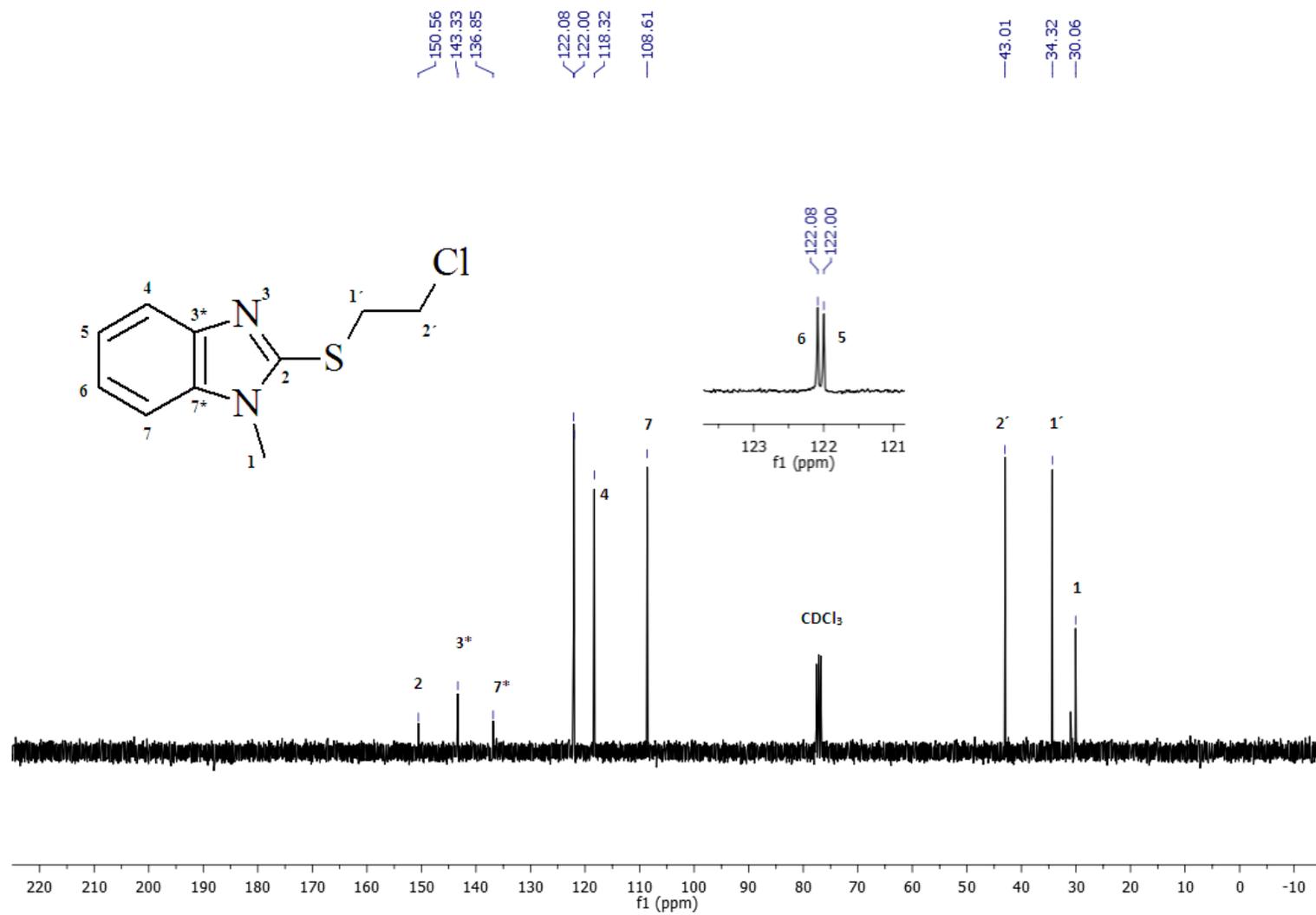
Espectro 4. RMN ^1H (300MHz) de 2-[(1-Metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanol (Int 4).



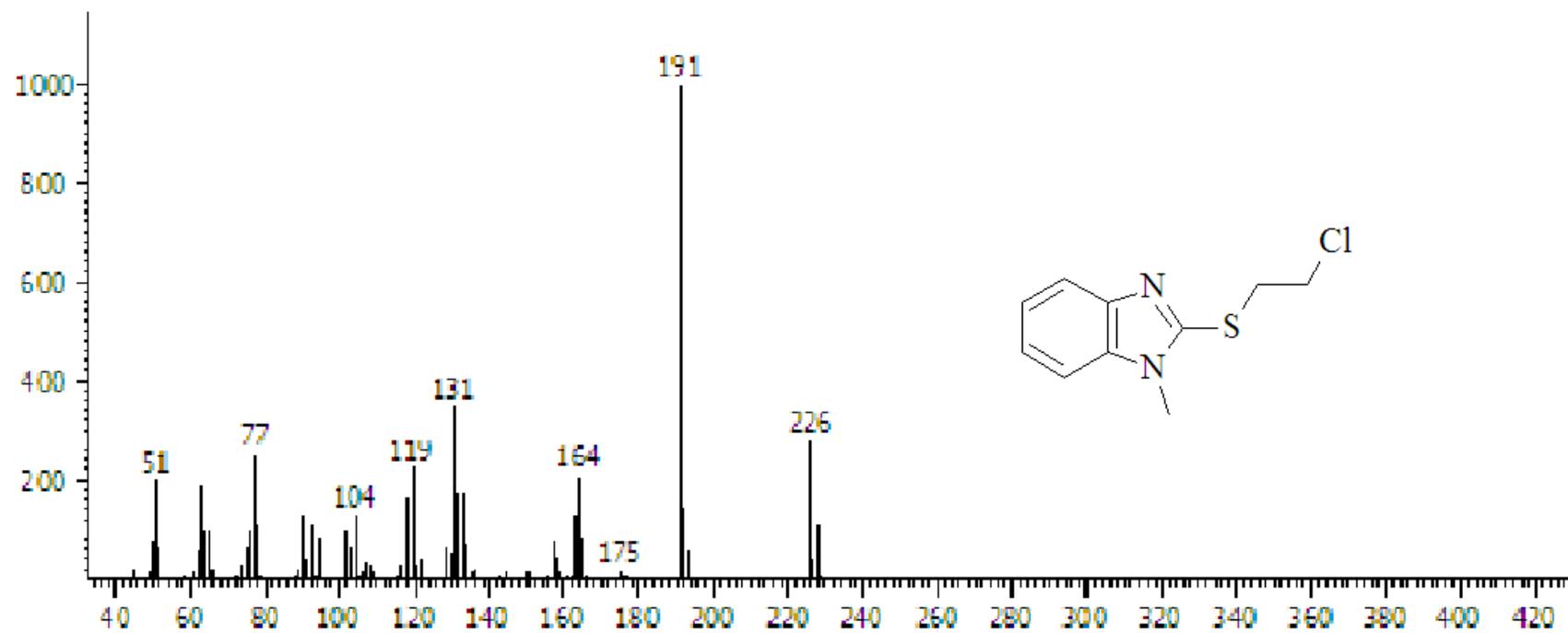
Espectro 5. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 2-[(1-Metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanol (Int 4).



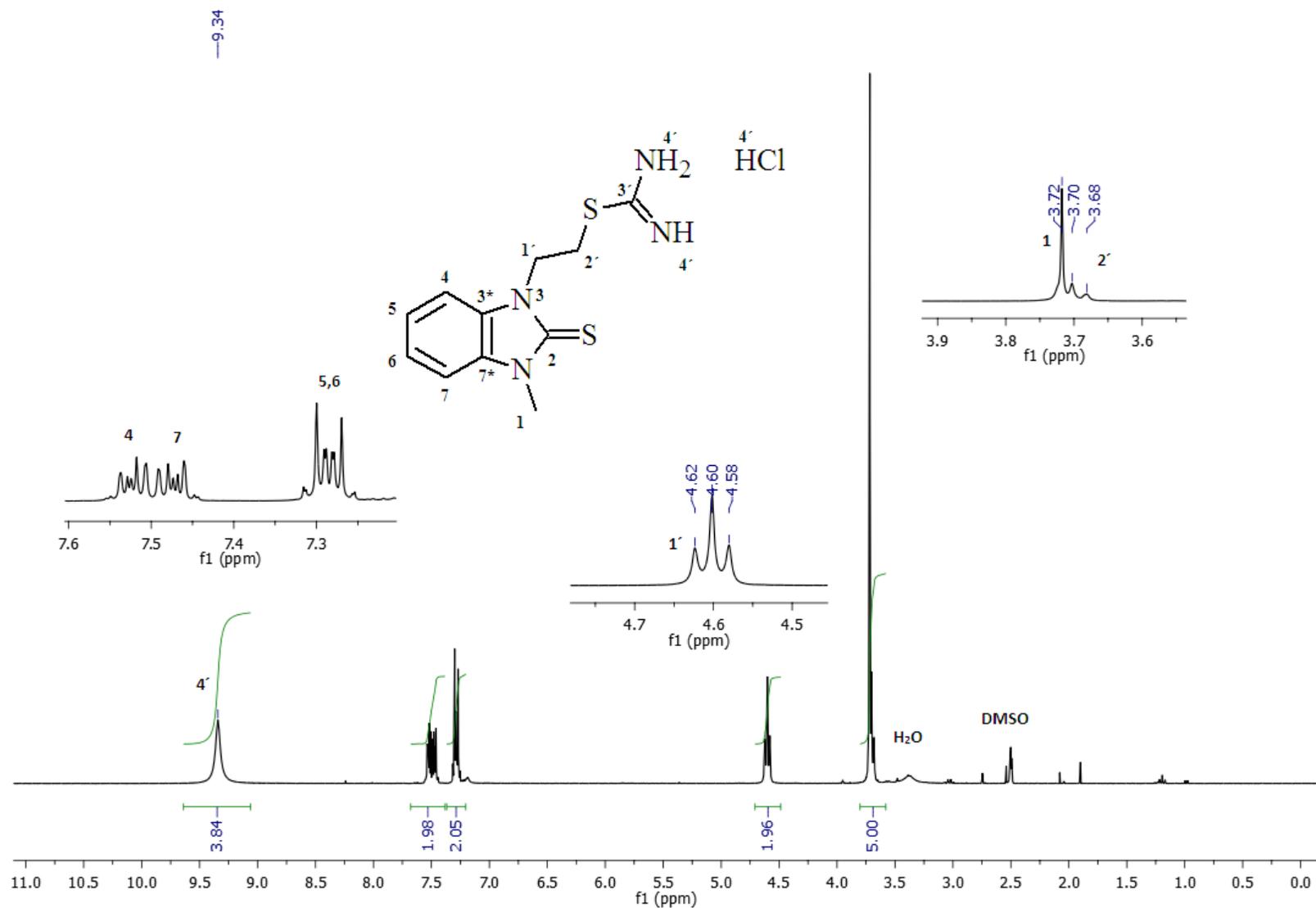
Espectro 6. RMN ^1H (300MHz) de 2-[(2-Cloroetil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 5).



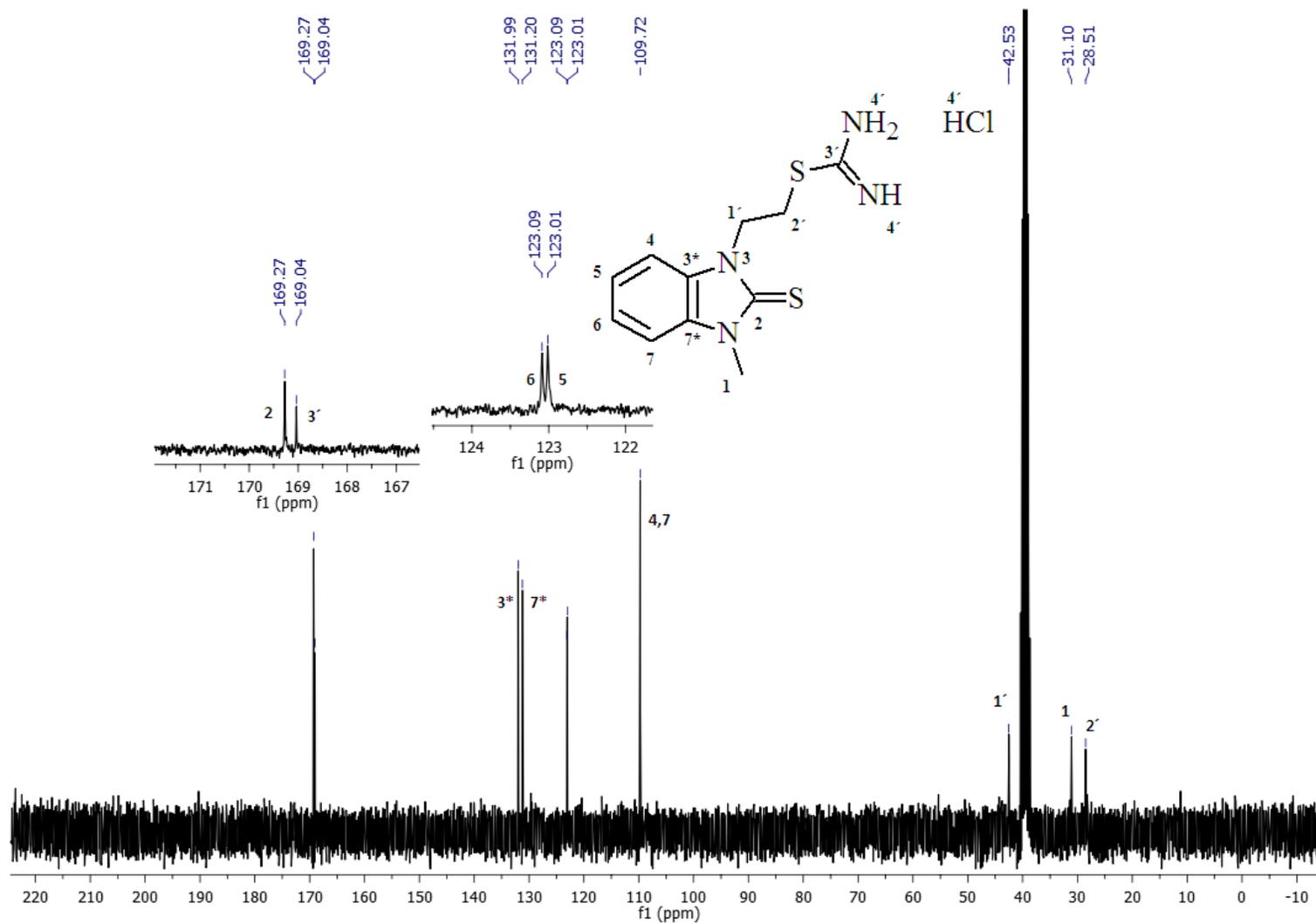
Espectro 7. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 2-[(2-Cloroetil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 5).



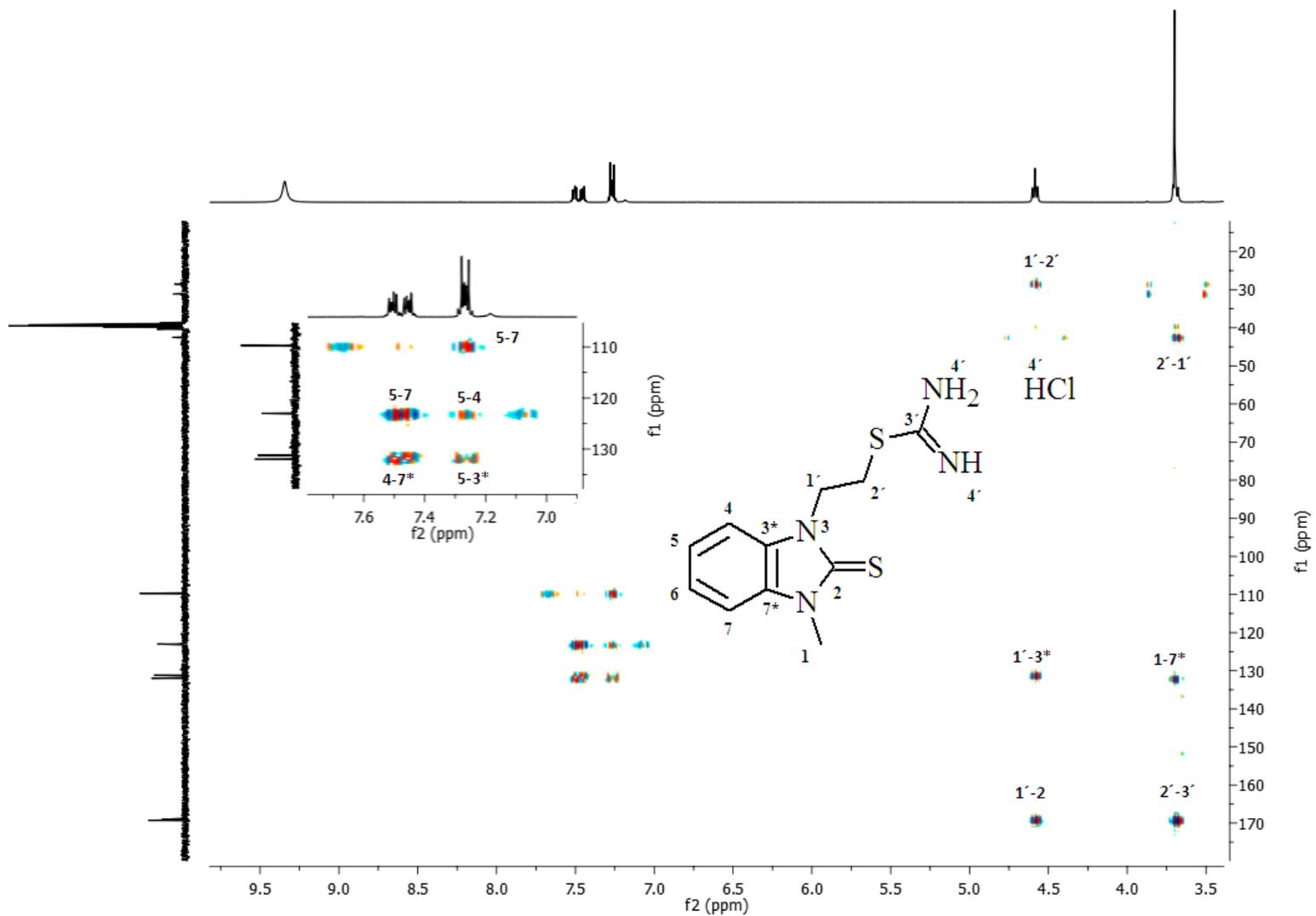
Espectro 8. CG-MS-IE de 2-[(2-Cloroetil)sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol (Int 5).



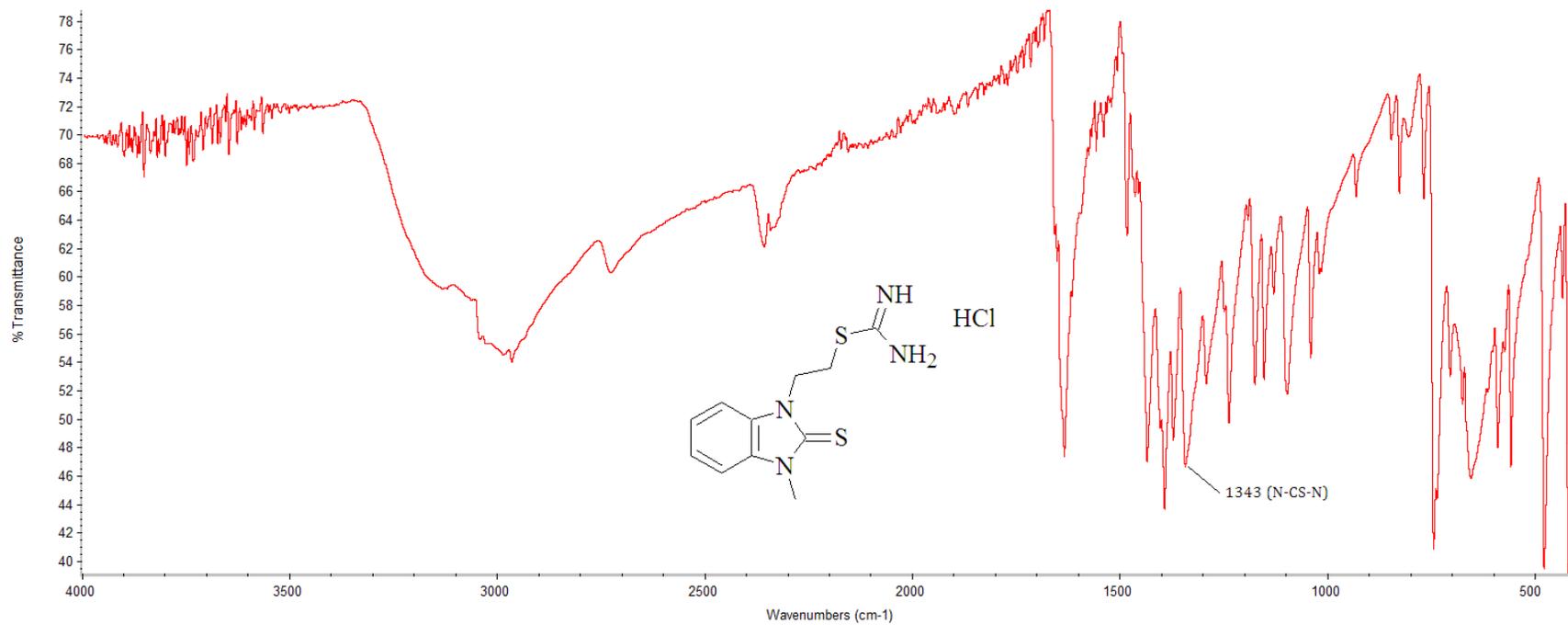
Espectro 9. RMN ^1H (300MHz) del Clorhidrato de carbamimidatoato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-benzimidazol-1-il)etilo (ADI 1*).



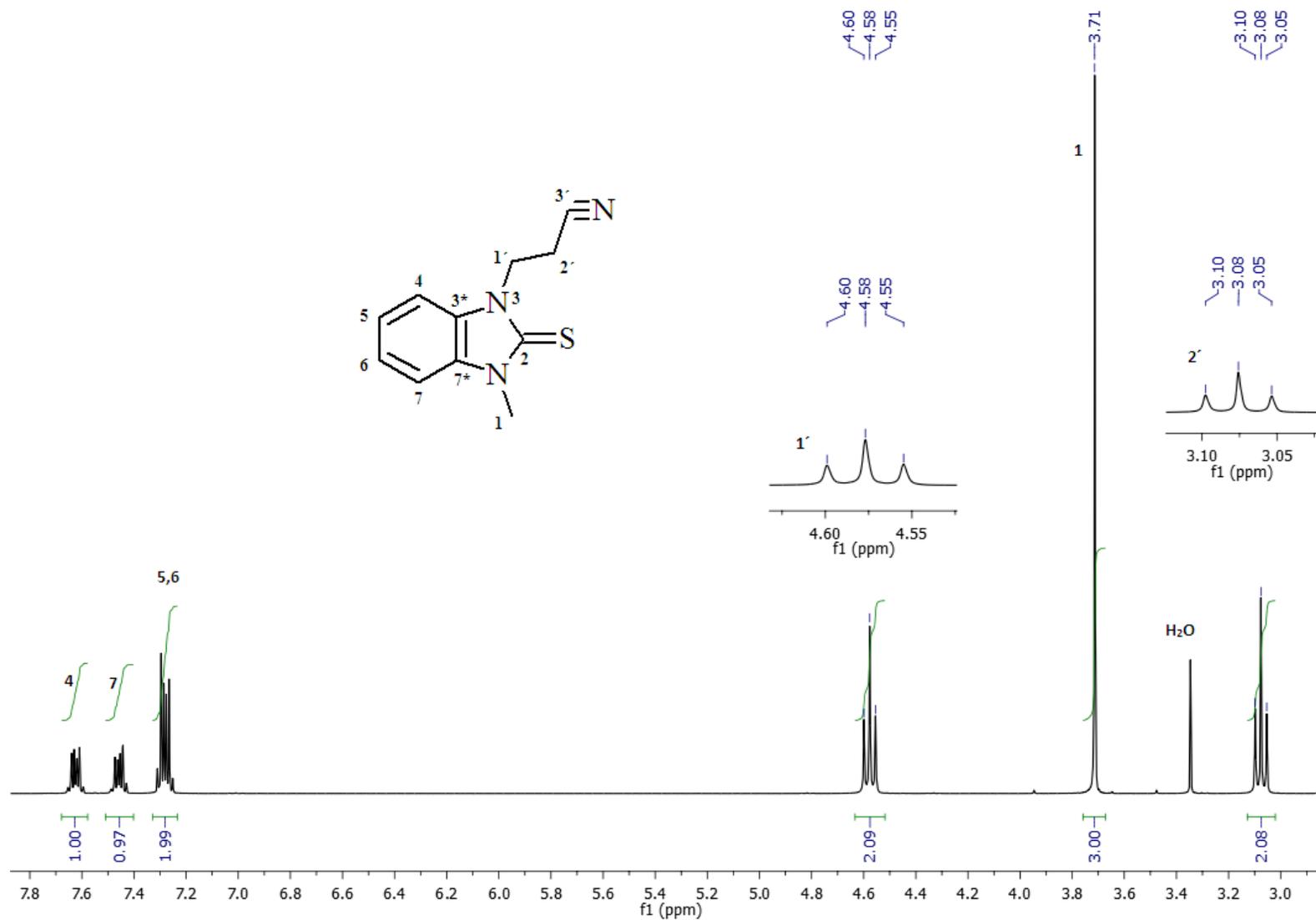
Espectro 10. RMN ^{13}C (75.5MHz) del Clorhidrato de carbamimidatoato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-benzimidazol-1-il)etilo (ADI 1*).



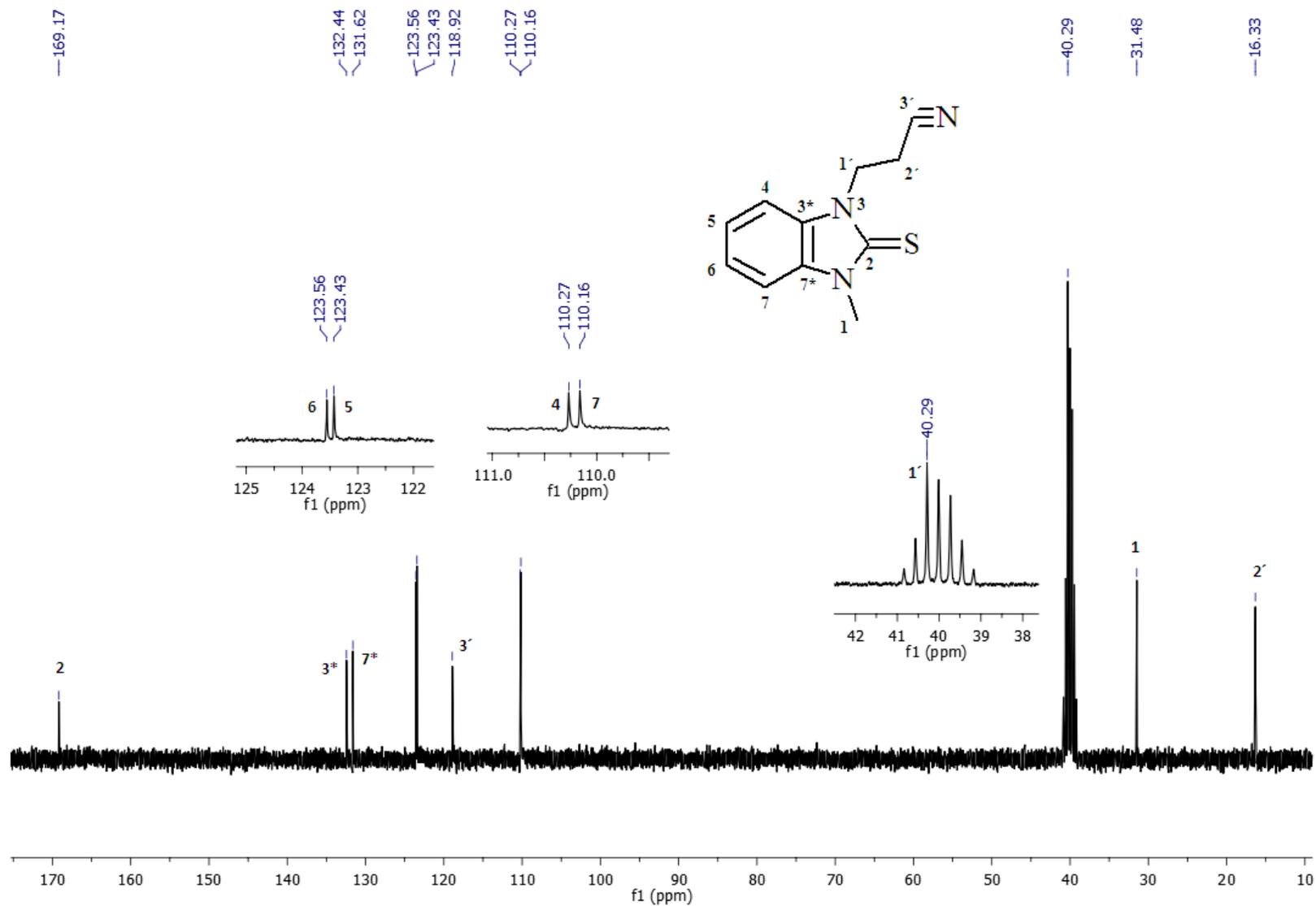
Espectro 12. RMN-HMBC del Clorhidrato de carbamimidotioato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)etilo (ADI 1*).



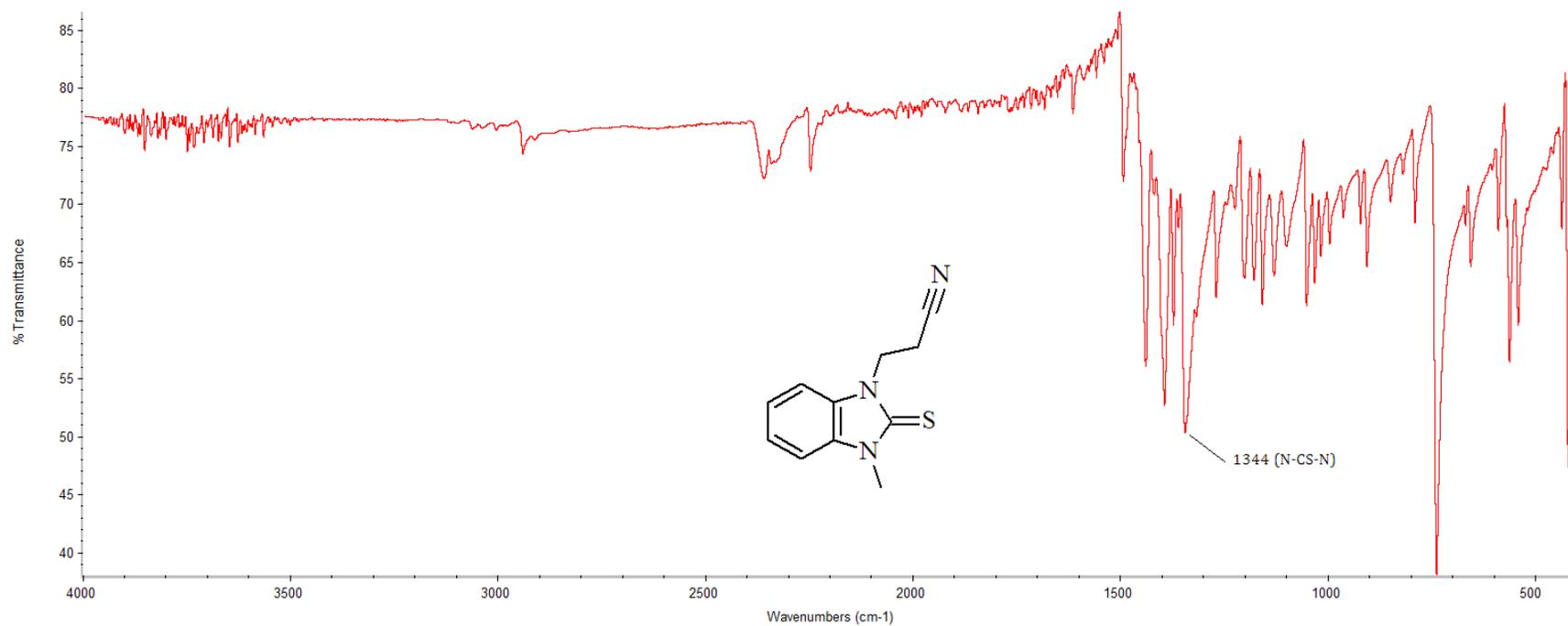
Espectro 13. FT-IR del Clorhidrato de carbamimidatoato de 2-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)etilo (ADI 1*).



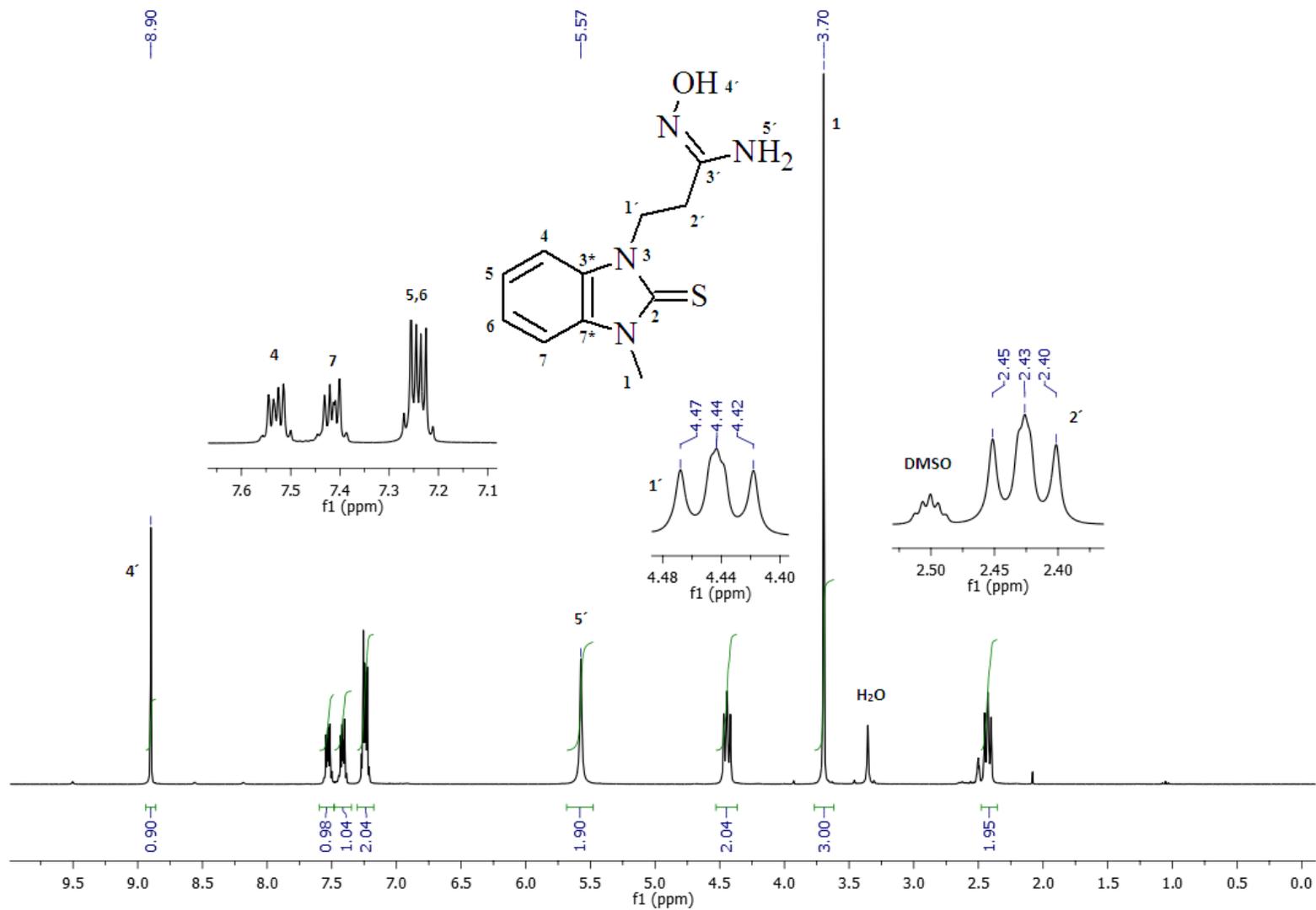
Espectro 14. RMN ^1H (300MHz) de 3-(3-Metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanonitrilo (Int 6* o ADI 6*).



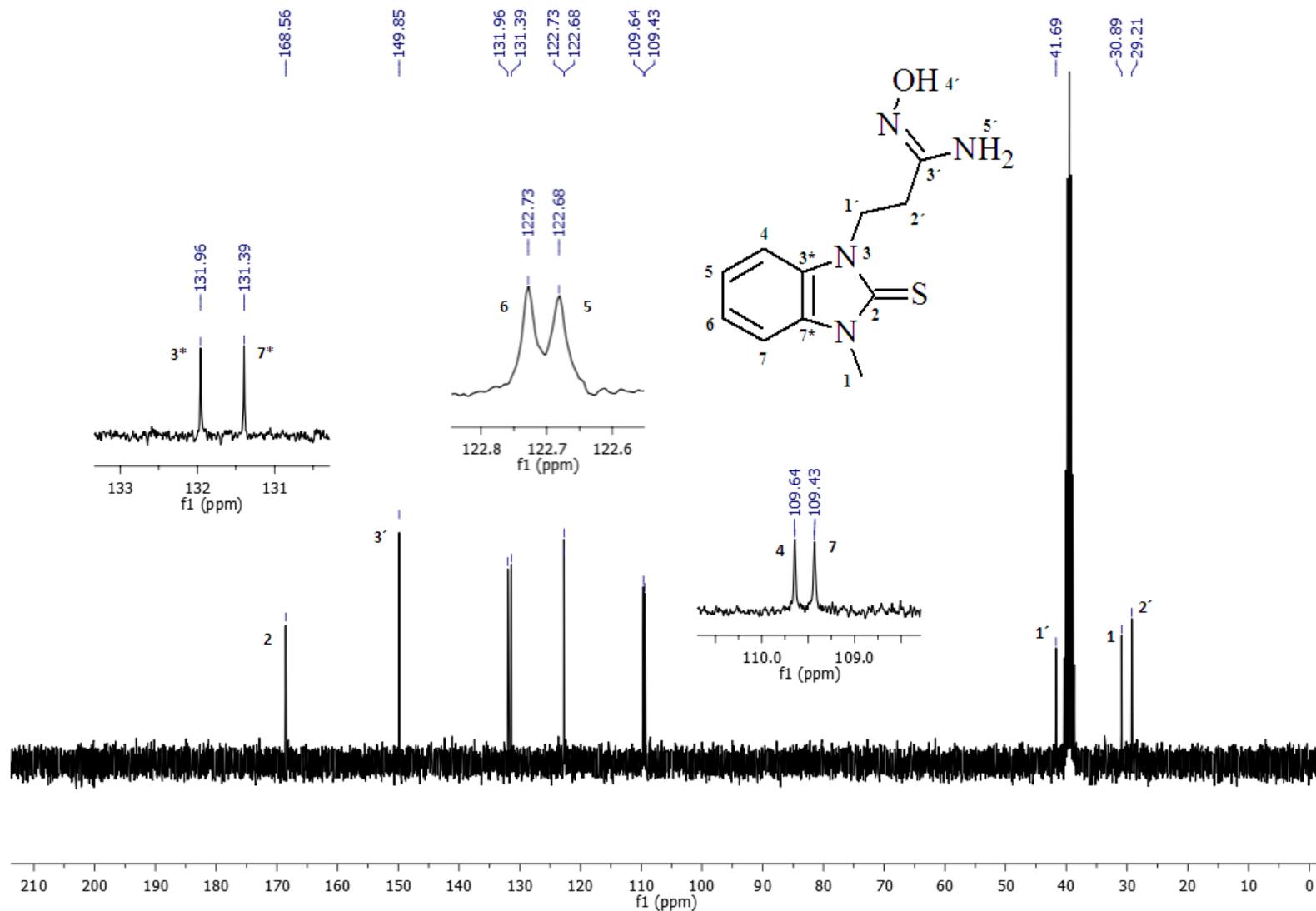
Espectro 15. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 3-(3-Metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanonitrilo (Int 6* o ADI 6*).



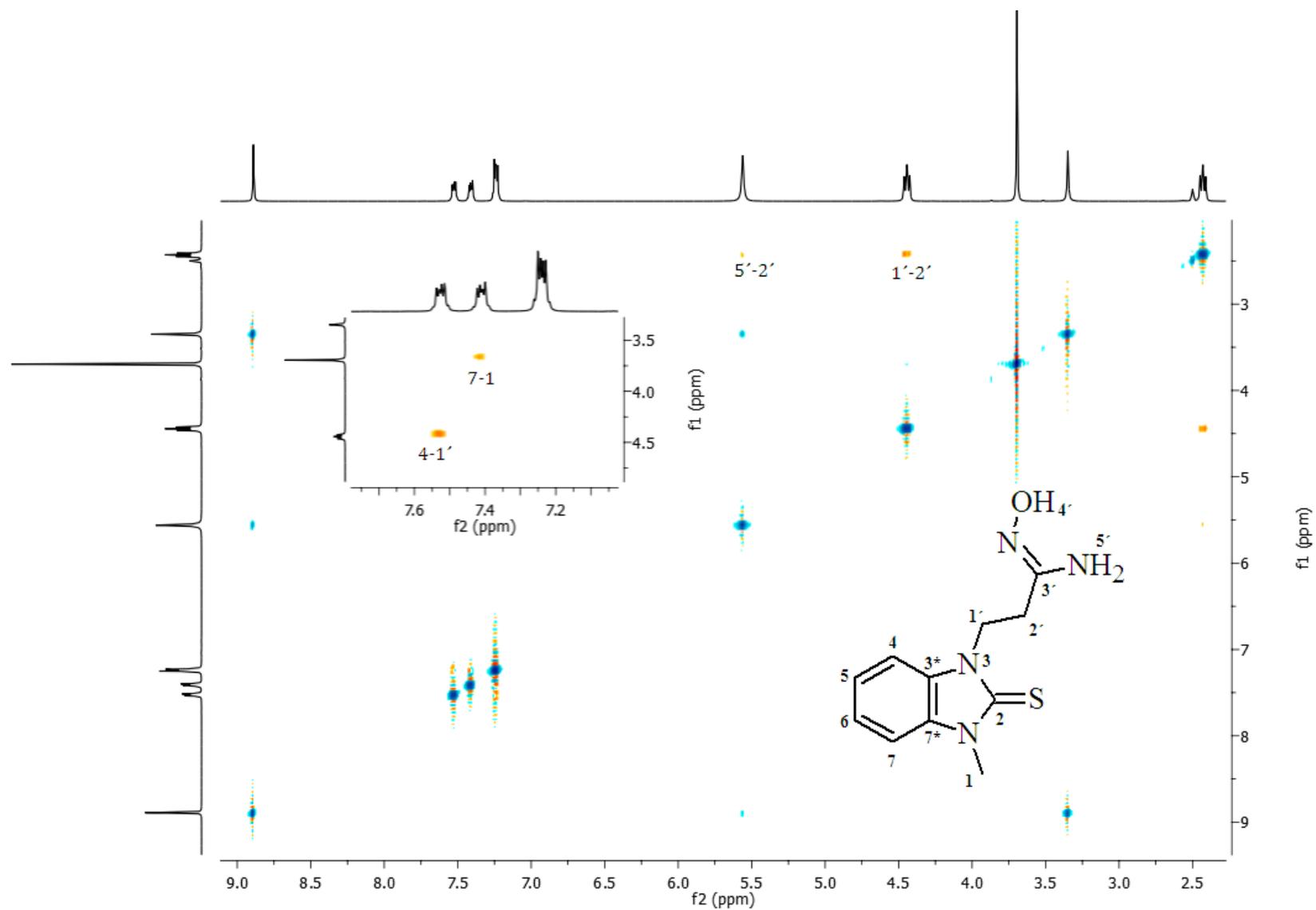
Espectro 16. FT-IR de 3-(3-Metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-1-il)propanonitrilo (Int 6* o ADI 6*).



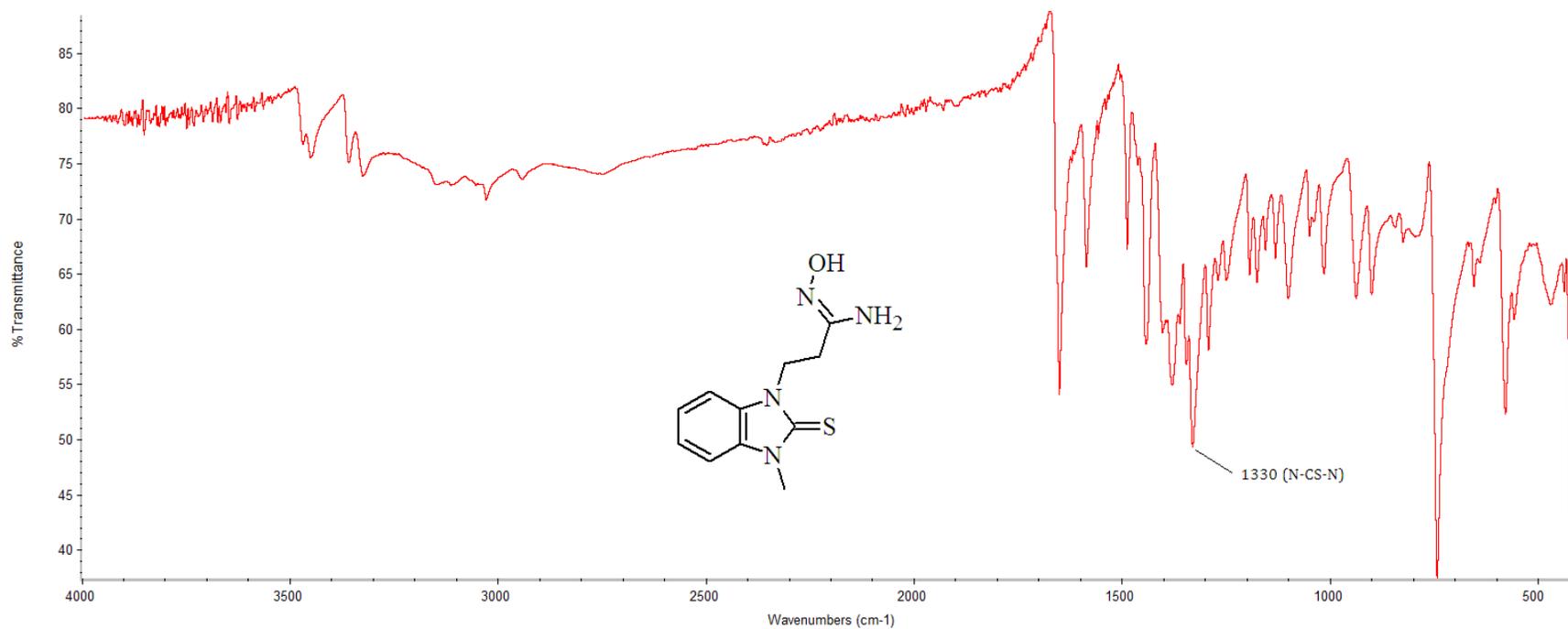
Espectro 17. RMN ^1H (300MHz) de *N'*-Hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (ADI 2*).



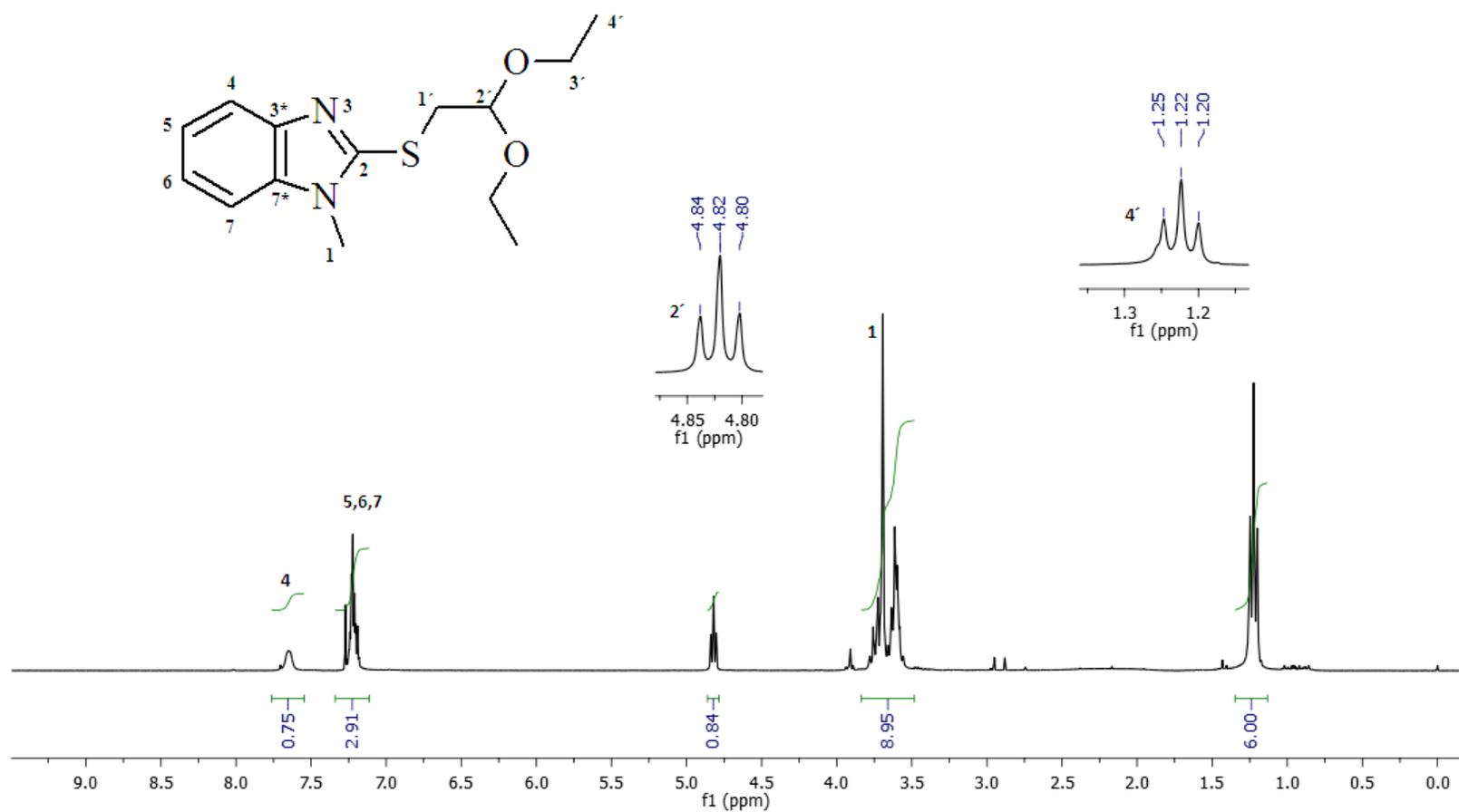
Espectro 18. RMN ^{13}C (75.5MHz) de *N'*-Hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (ADI 2*).



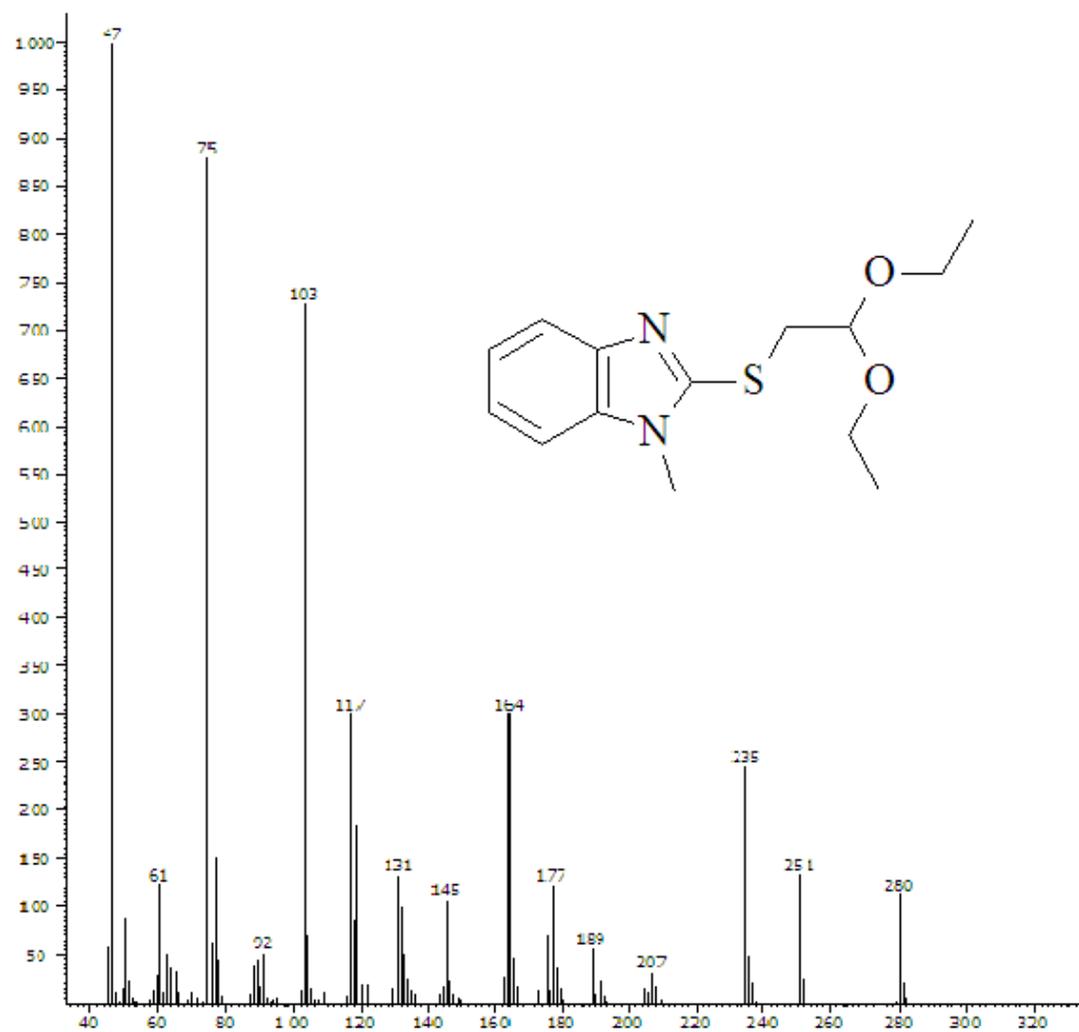
Espectro 19. RMN-NOESY de *N'*-Hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (ADI 2*).



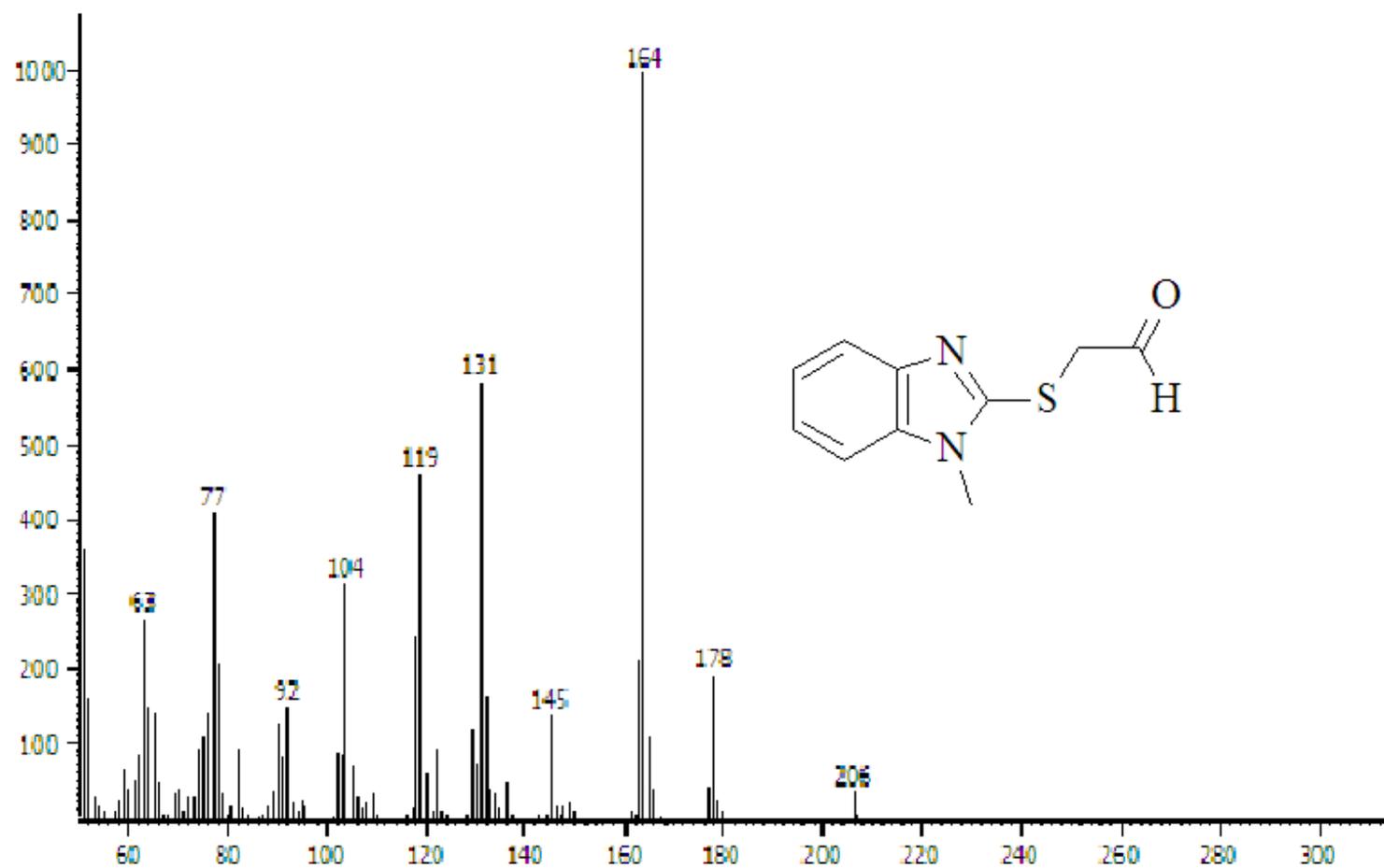
Espectro 20. FT-IR de *N'*-Hidroxi-3-(3-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-1-il)propanimidamida (ADI 2*).



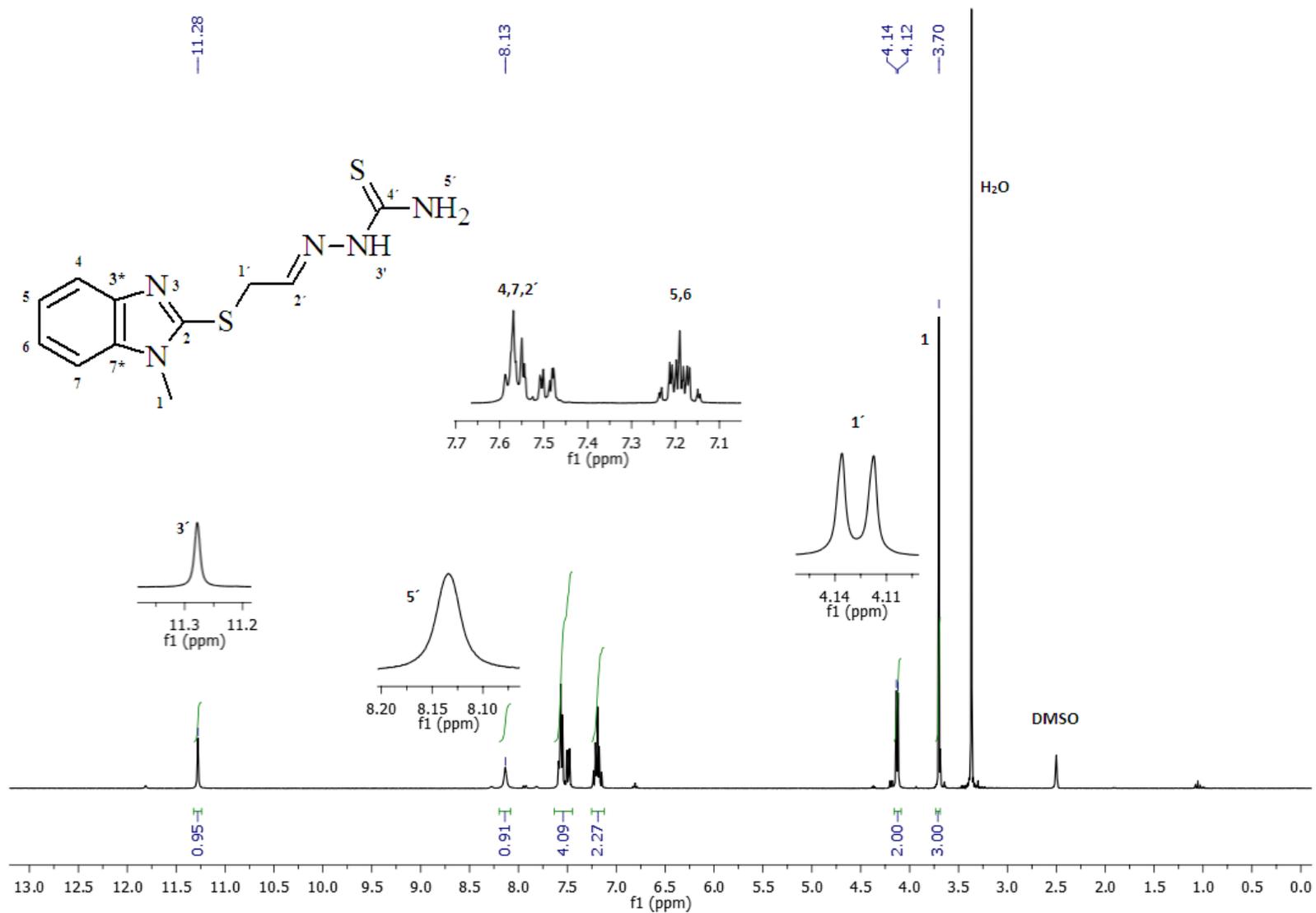
Espectro 21. RMN ¹H (300MHz) de 2-[(2,2-Diethoxyetil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 7).



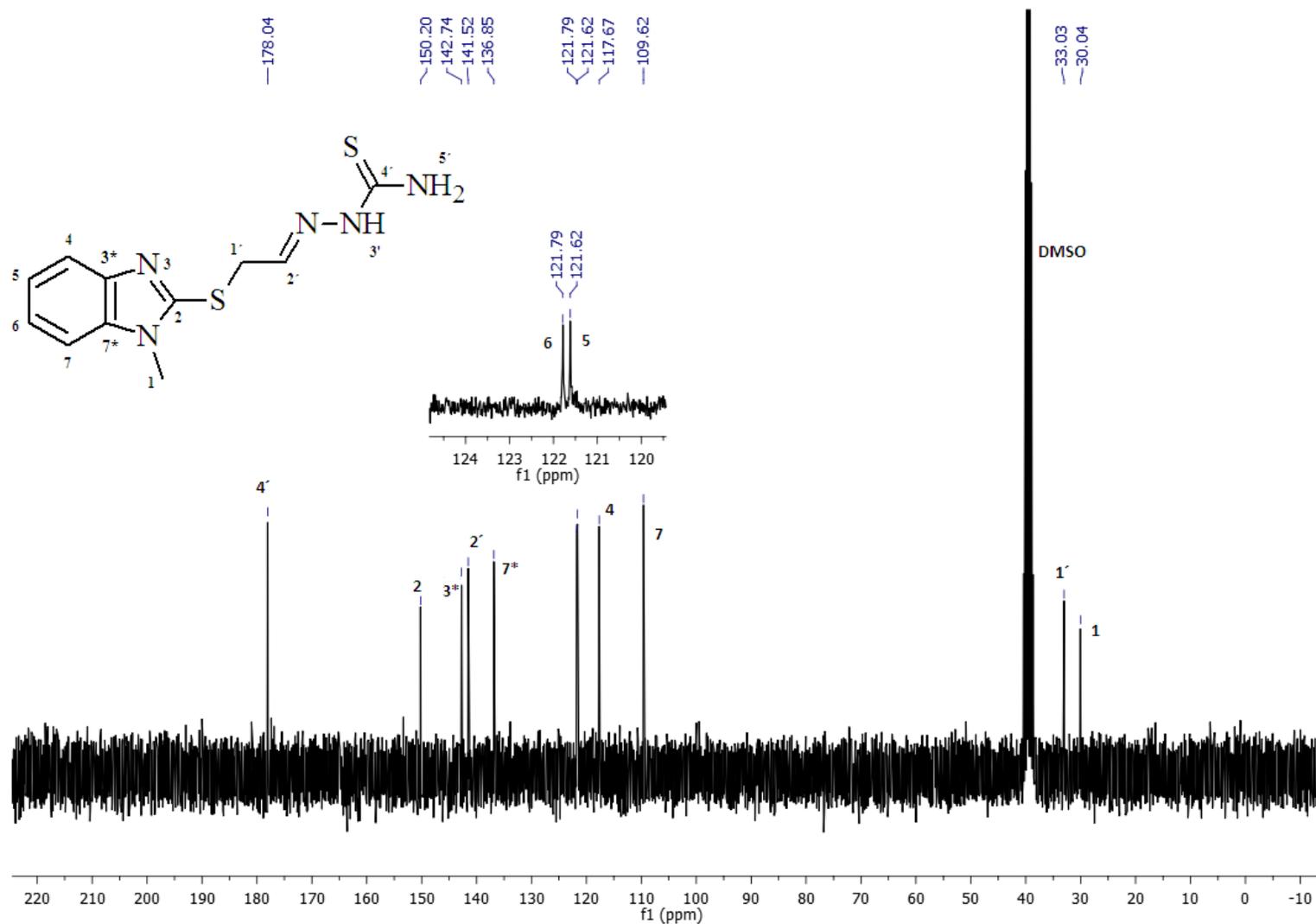
Espectro 22. GC-MS-IE de 2-[(2,2-Dietoxietil)sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol (Int 7).



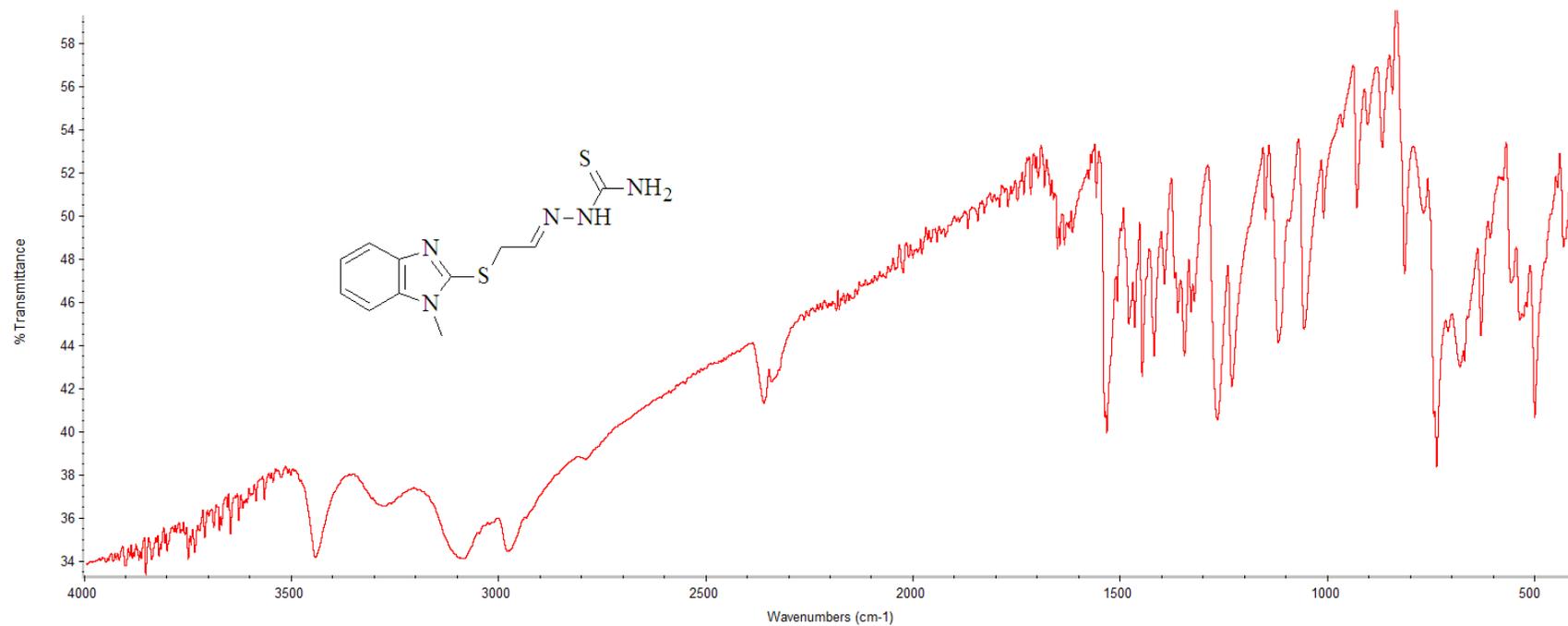
Espectro 23. GC-MS-IE de [(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]acetaldehído (Int 8).



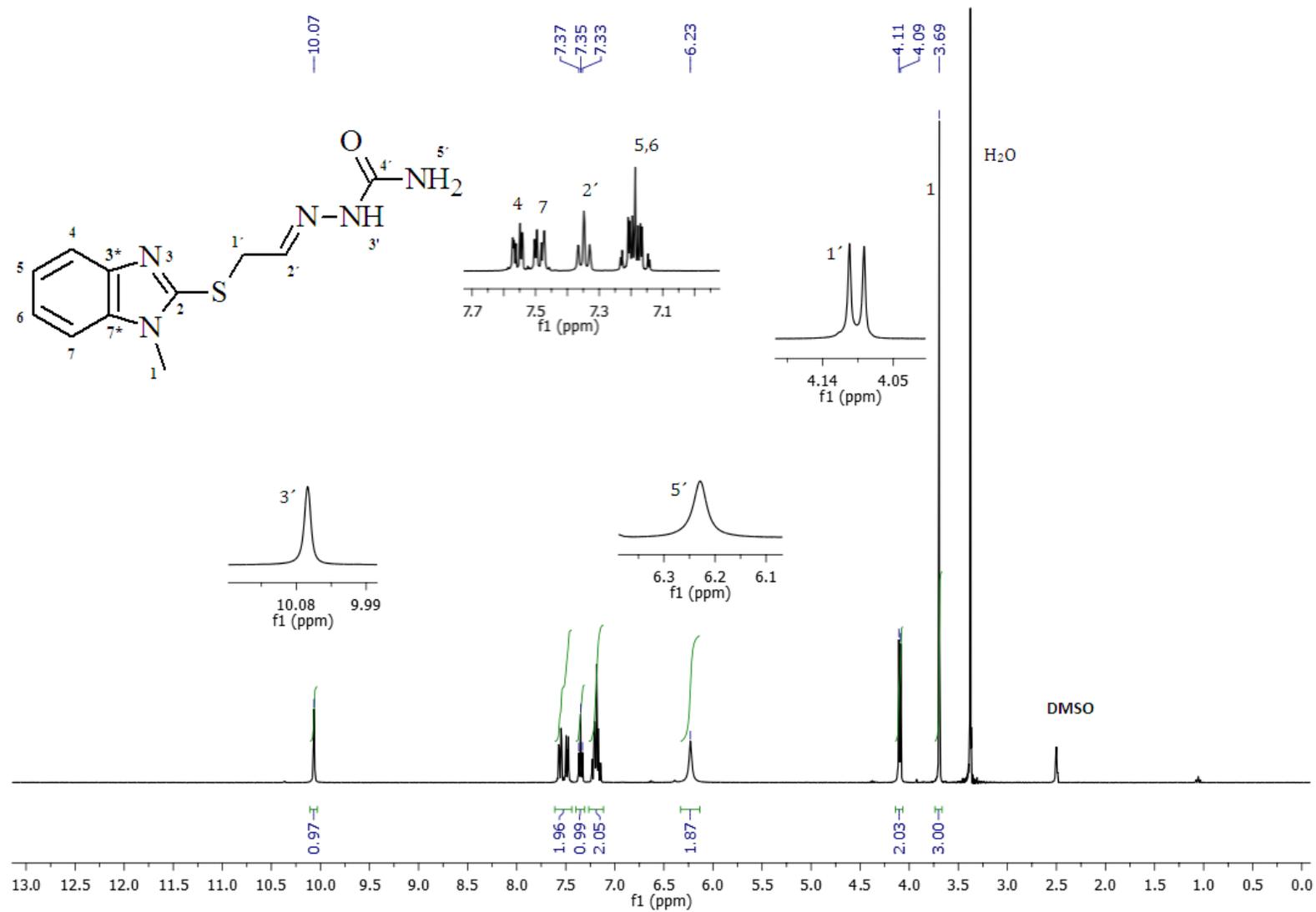
Espectro 24. RMN ^1H (300MHz) de 2-[2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden]hidrazinocarbotioamida (ADI 3).



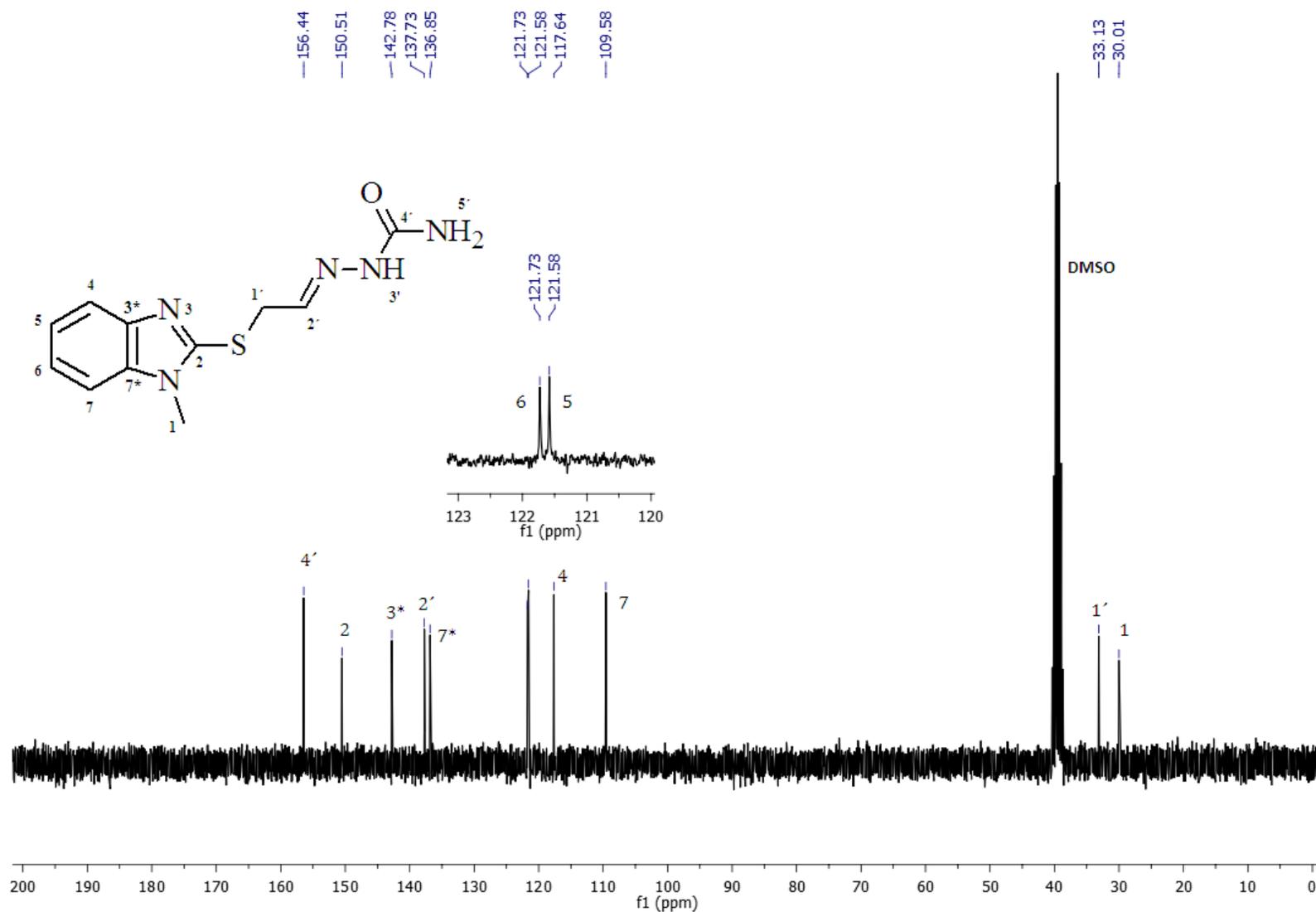
Espectro 25. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarbotioamida (ADI 3).



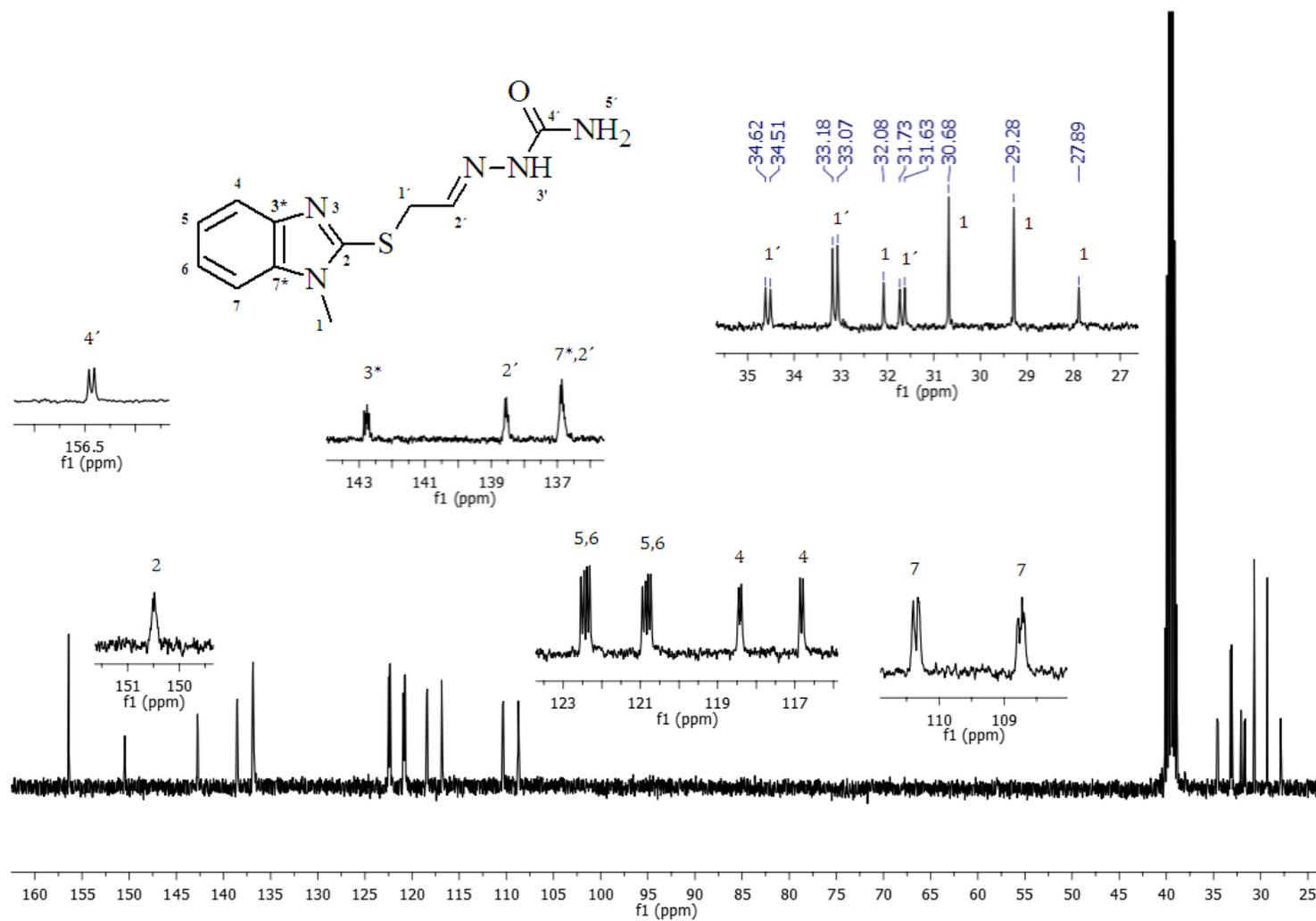
Espectro 26. FT-IR de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarbotioamida (ADI 3).



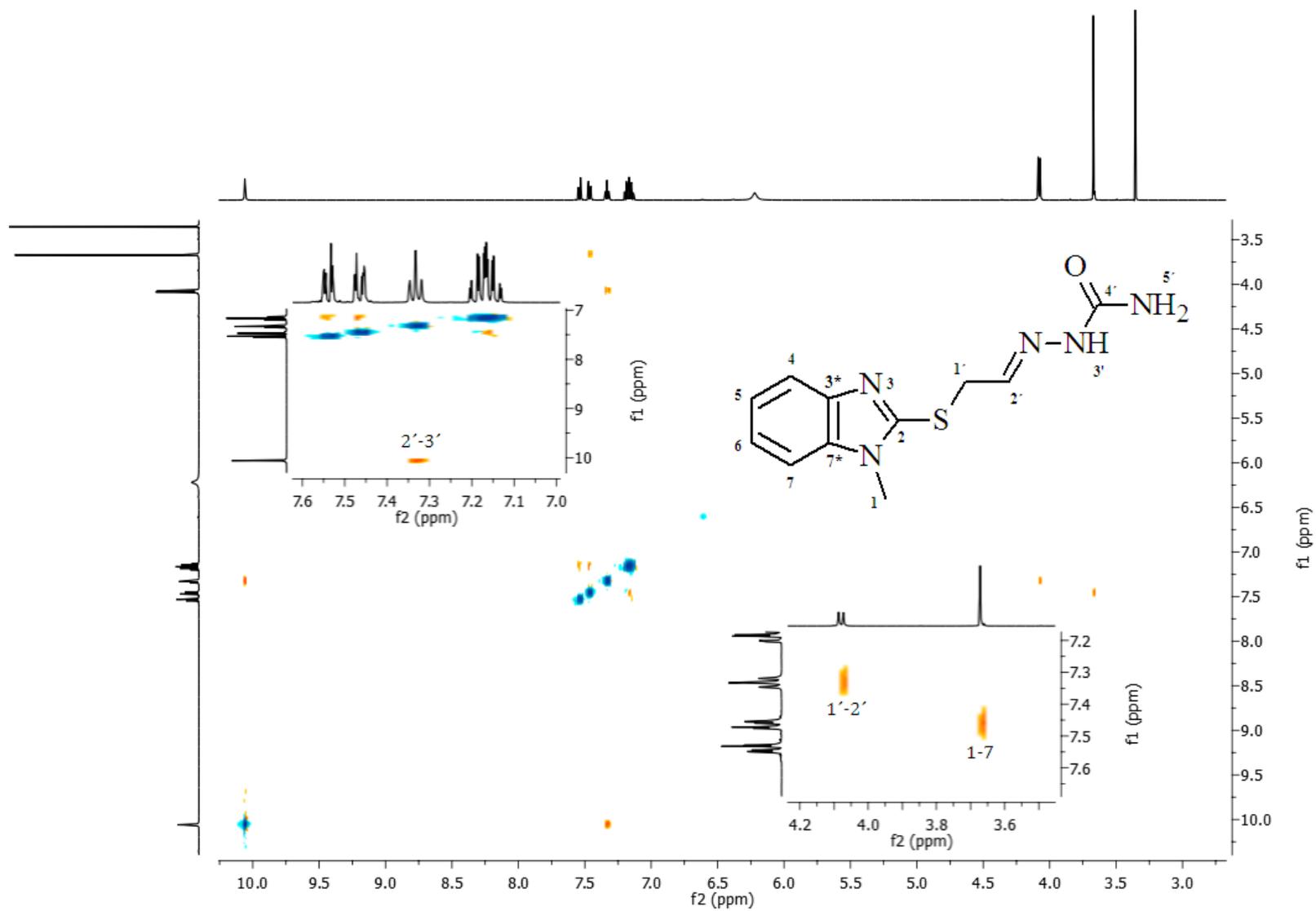
Espectro 27. RMN ^1H (300MHz) de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (ADI 4).



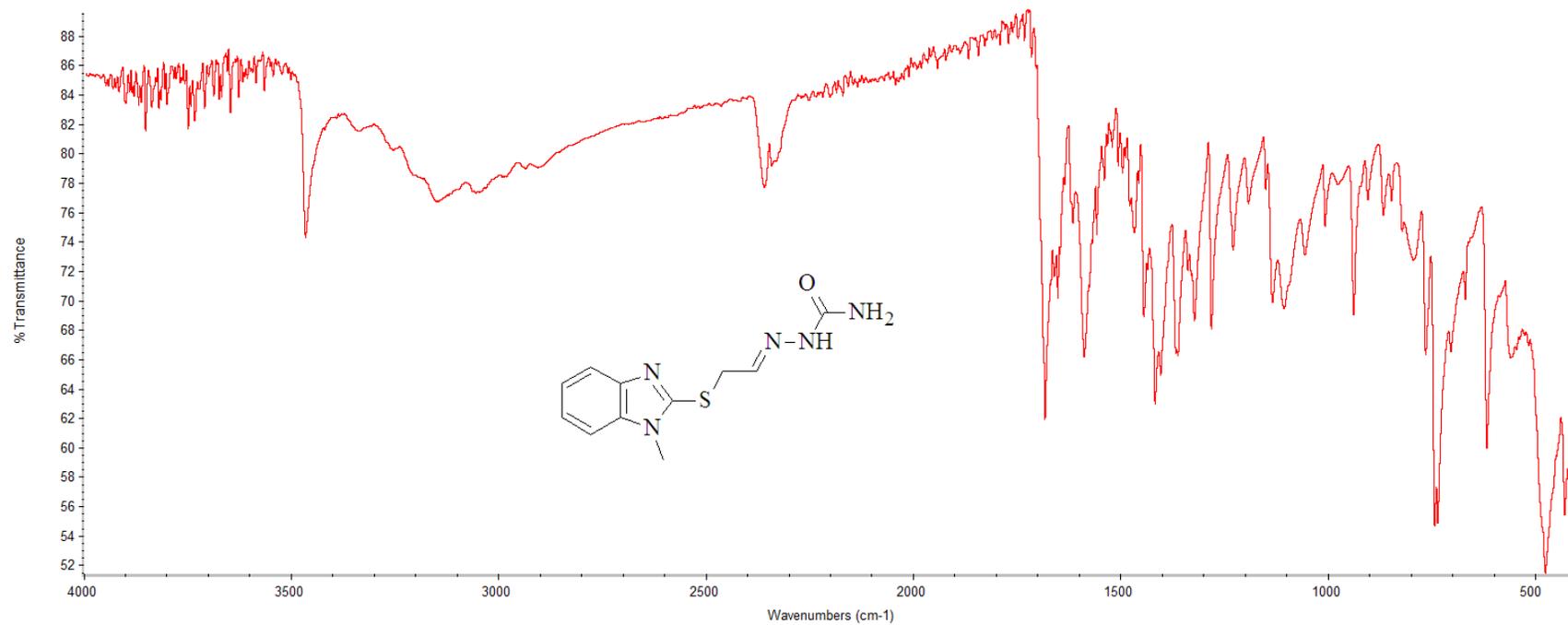
Espectro 28. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 2-[2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (ADI 4).



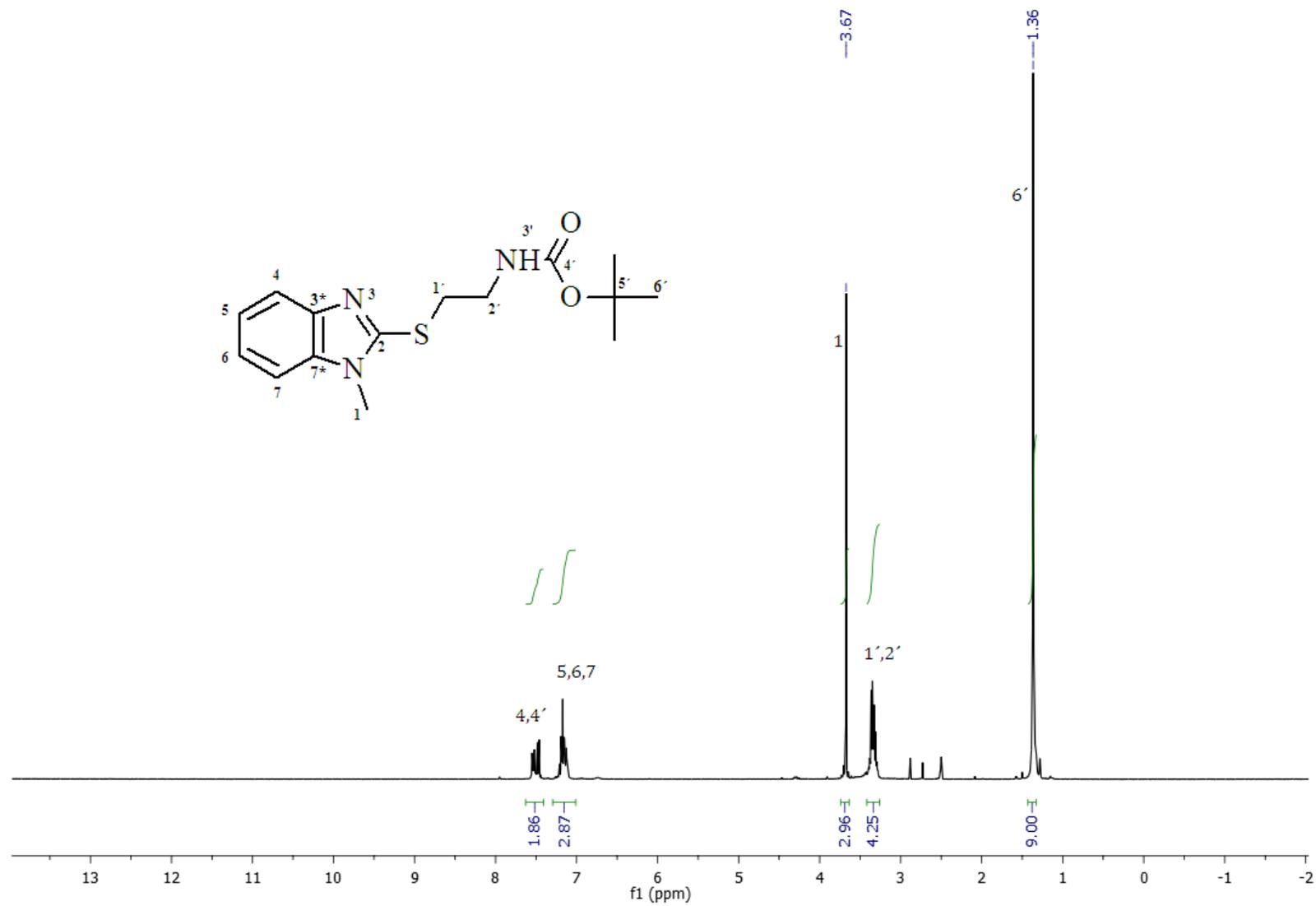
Espectro 29. RMN ^{13}C (Protones desacoplados fuera de resonancia) de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (ADI 4).



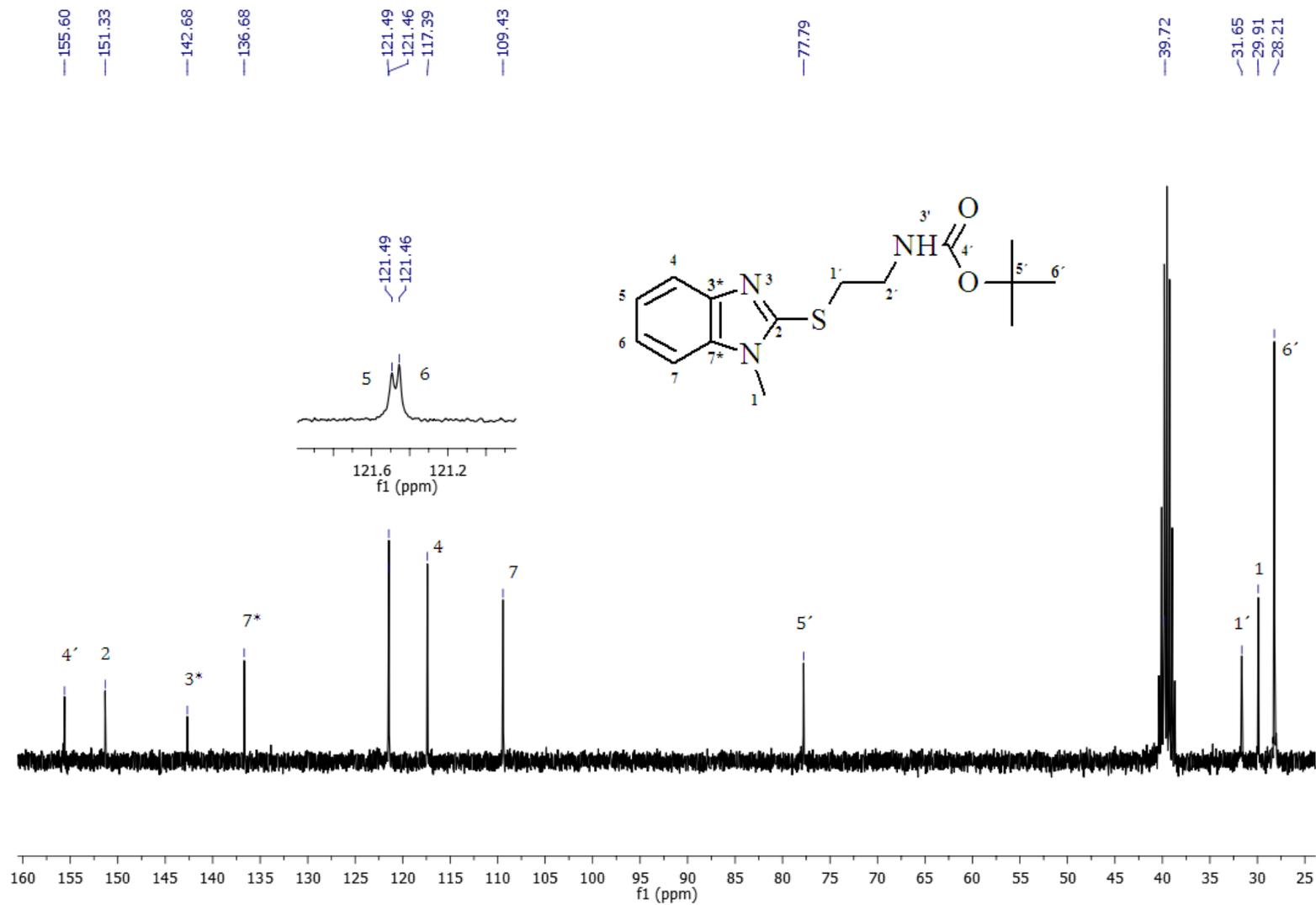
Espectro 30. RMN-NOESY de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (ADI 4).



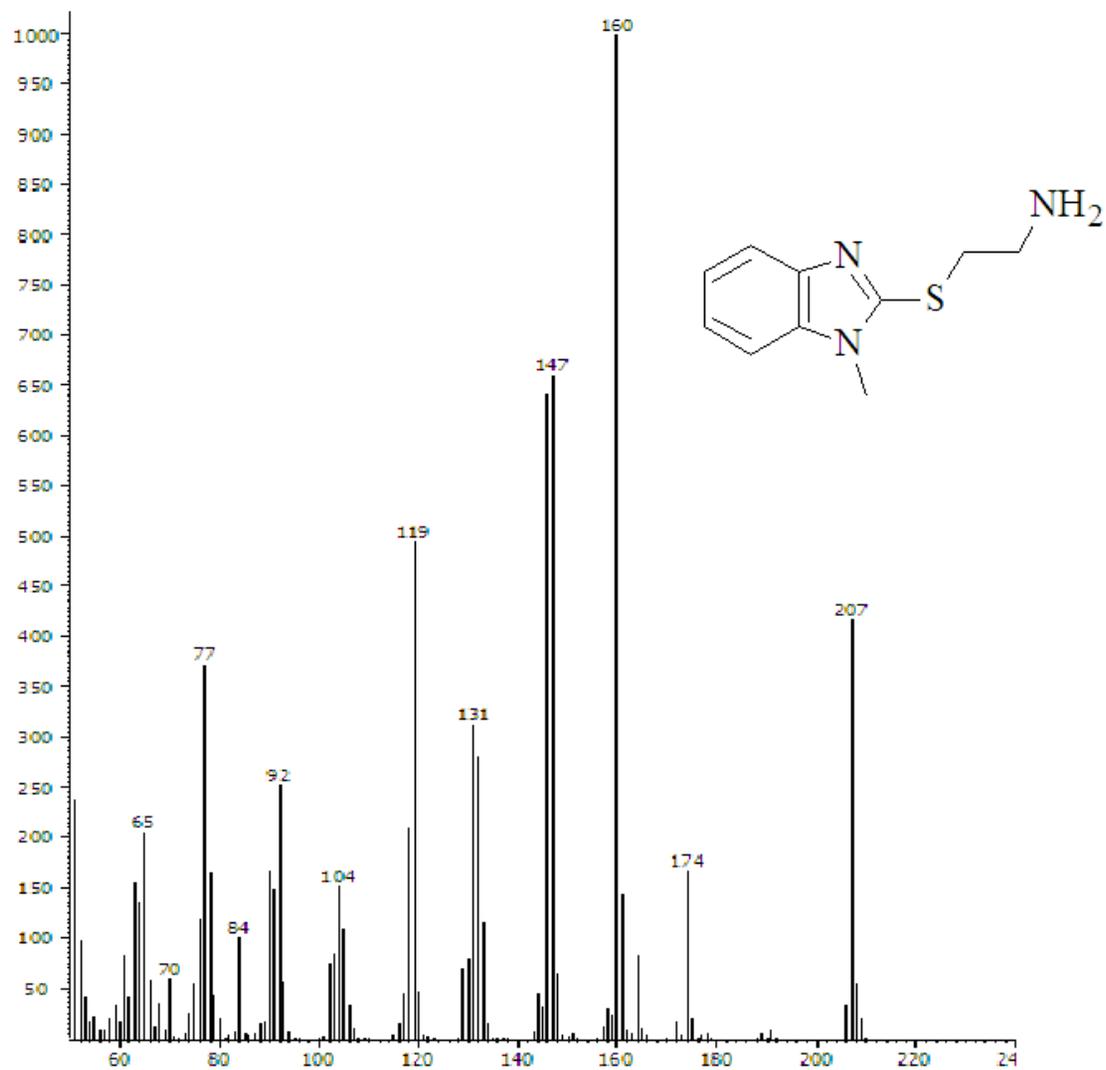
Espectro 31. FT-IR de 2-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etiliden}hidrazinocarboxamida (ADI 4).



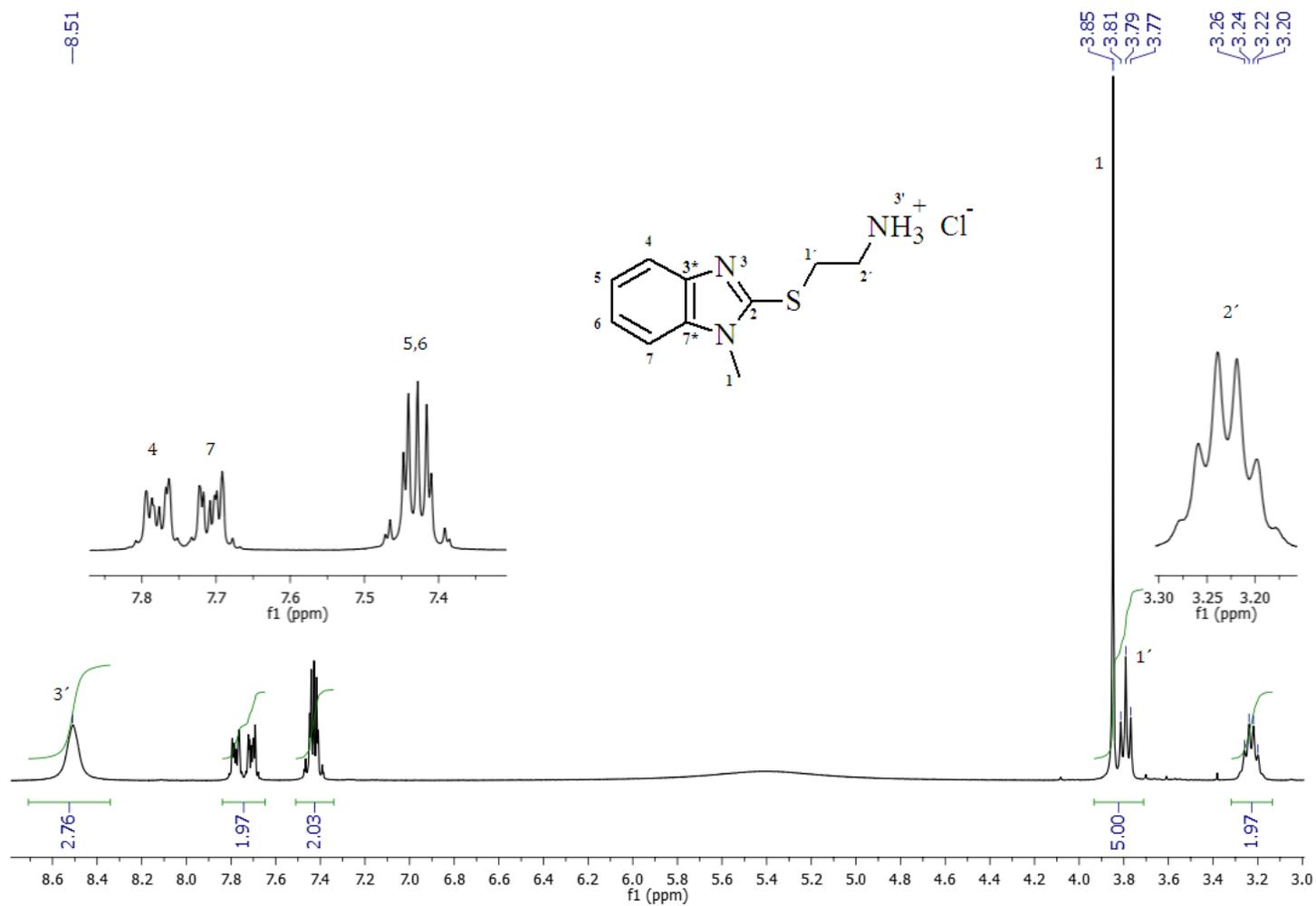
Espectro 32. RMN ¹H (300MHz) de {2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}carbamato de *tert*-butilo (Int 9).



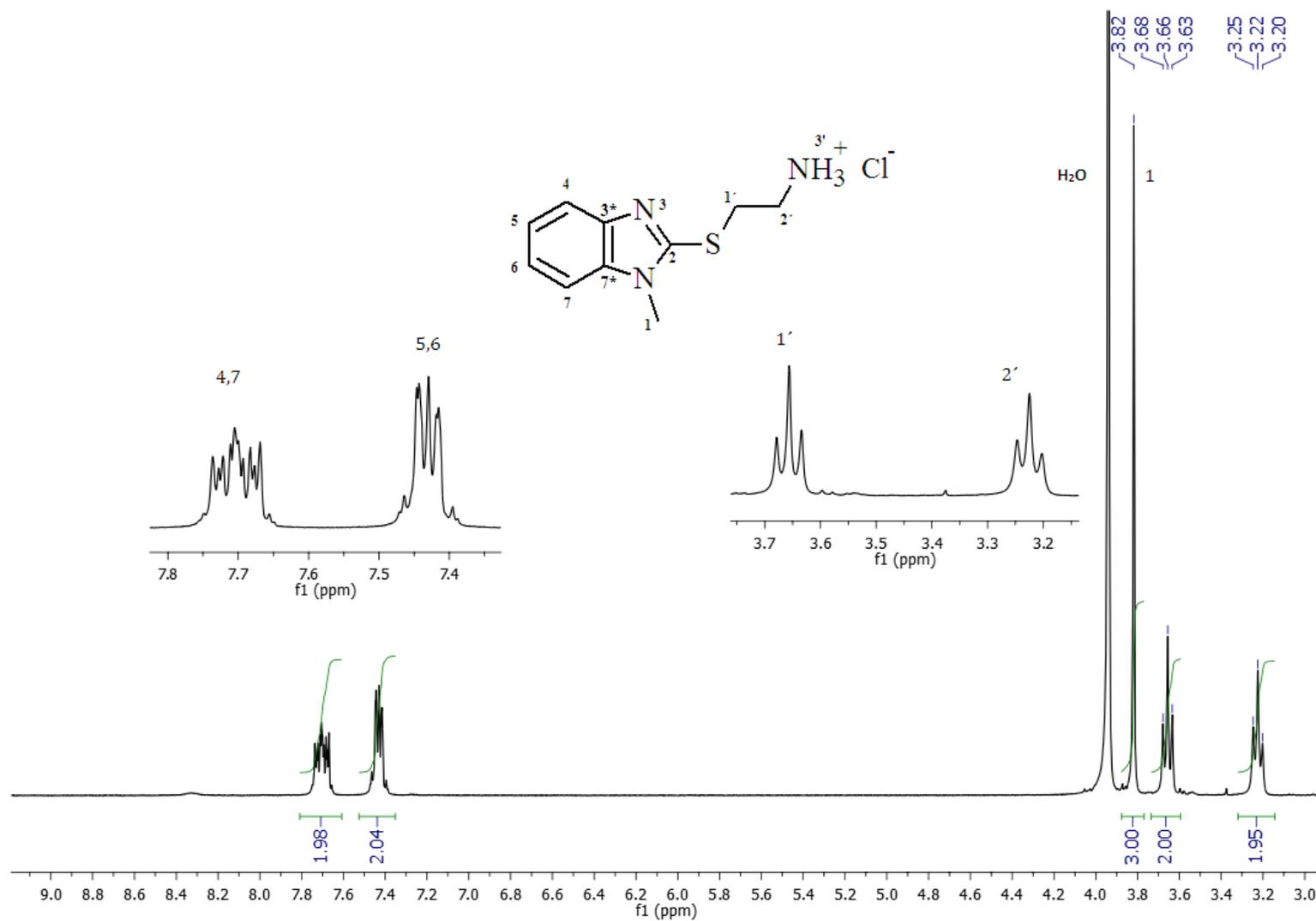
Espectro 33. RMN ^{13}C (75.5MHz) de {2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}carbamato de *tert*-butilo (Int 9).



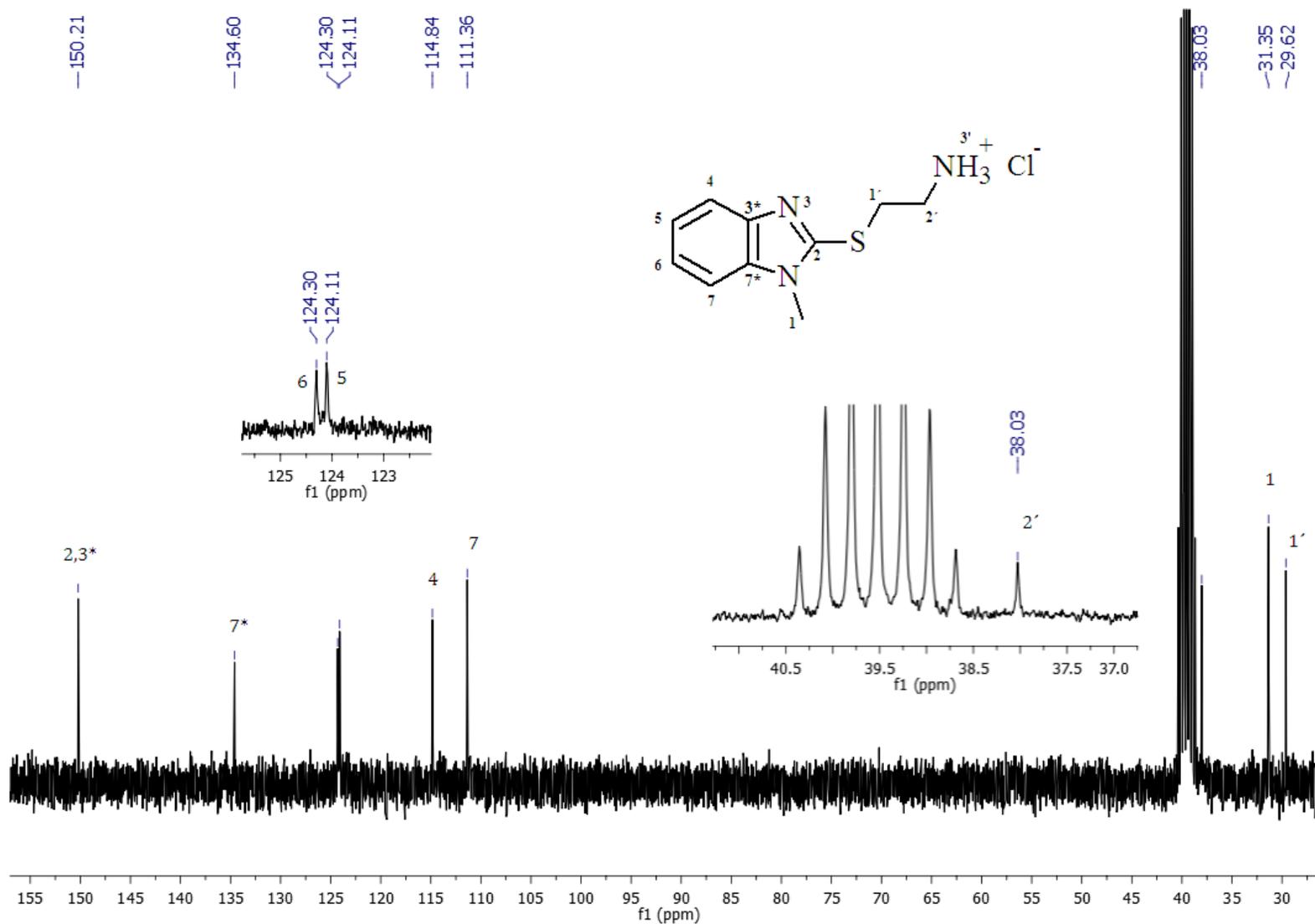
Espectro 34. GC-MS-IE de 2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (Int 10).



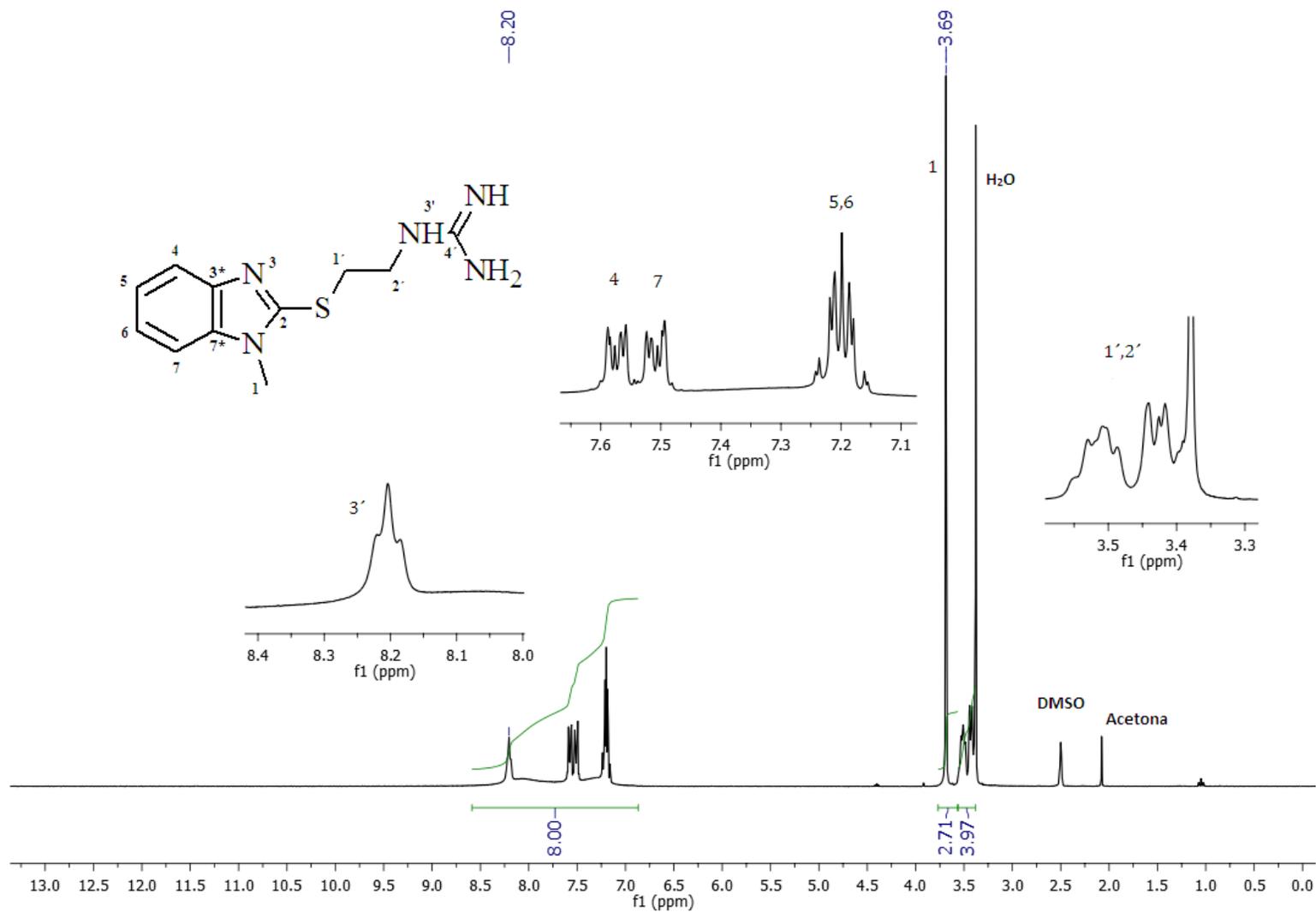
Espectro 35. RMN ¹H (300MHz) del Clorhidrato de 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (Int 10).



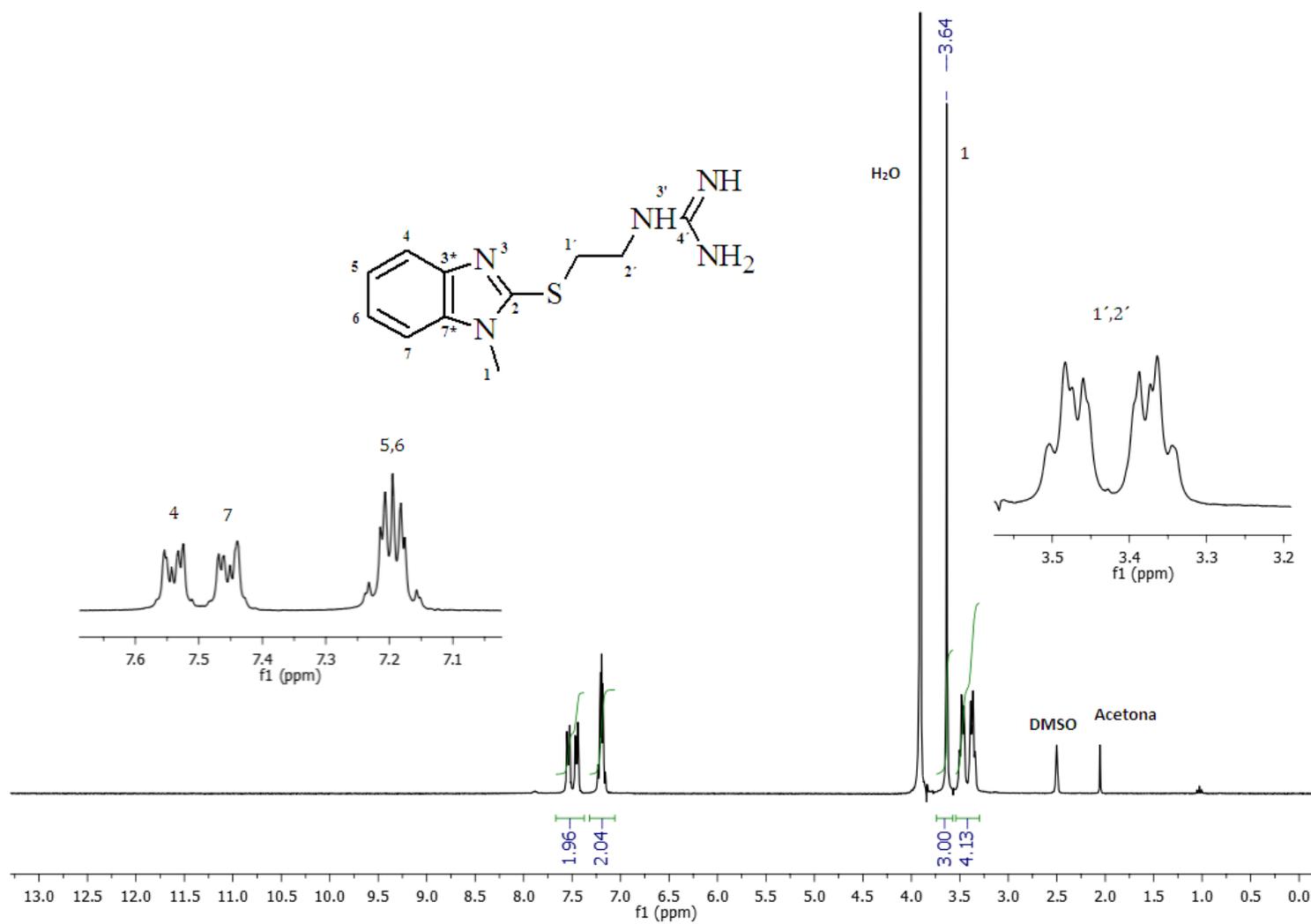
Espectro 36. RMN ^1H (300MHz) del Clorhidrato de 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (intercambio con D_2O) (Int 10).



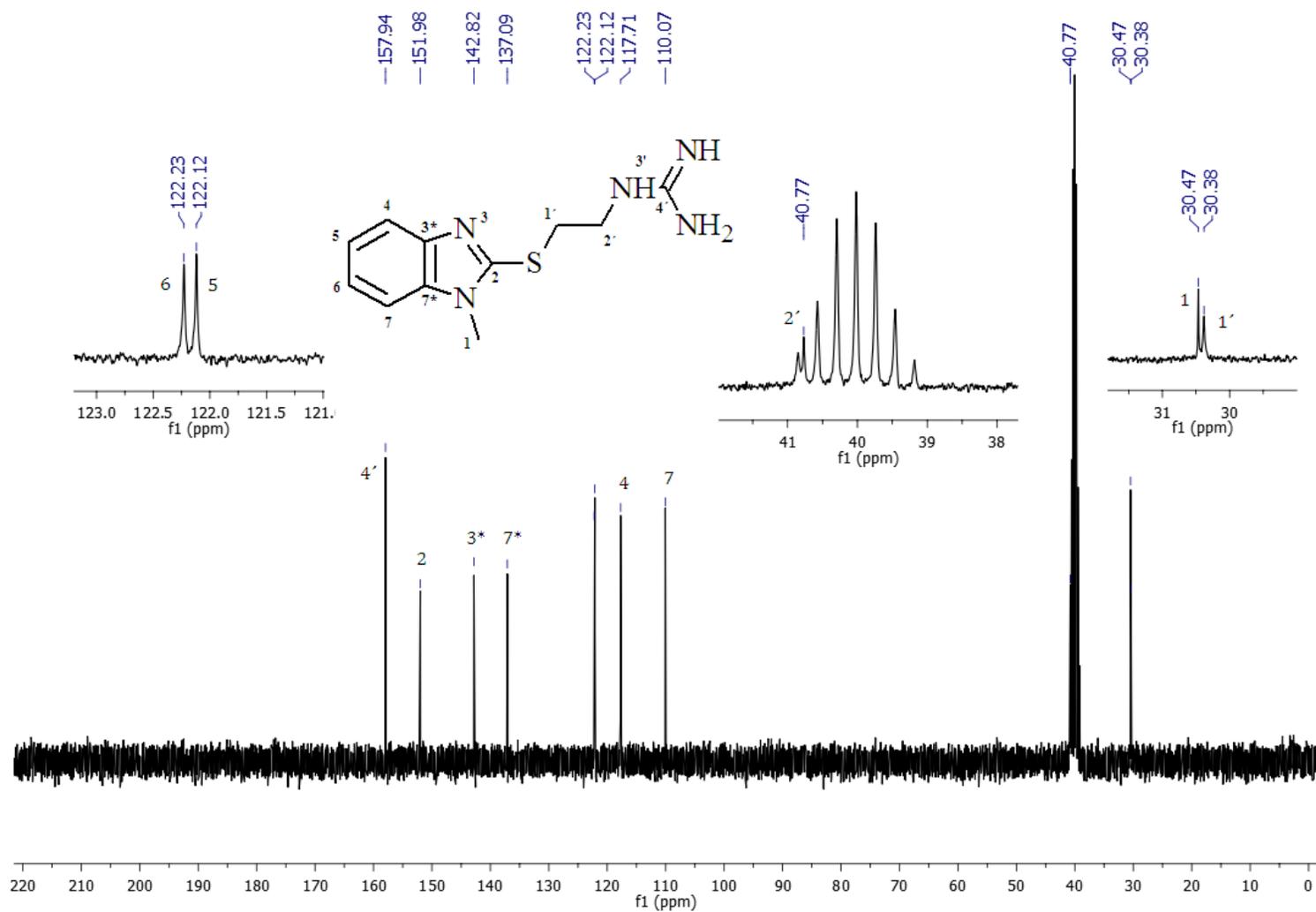
Espectro 37. RMN ^{13}C (75.5MHz) del Clorhidrato de 2-[(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)sulfanil]etanamina (Int 10).



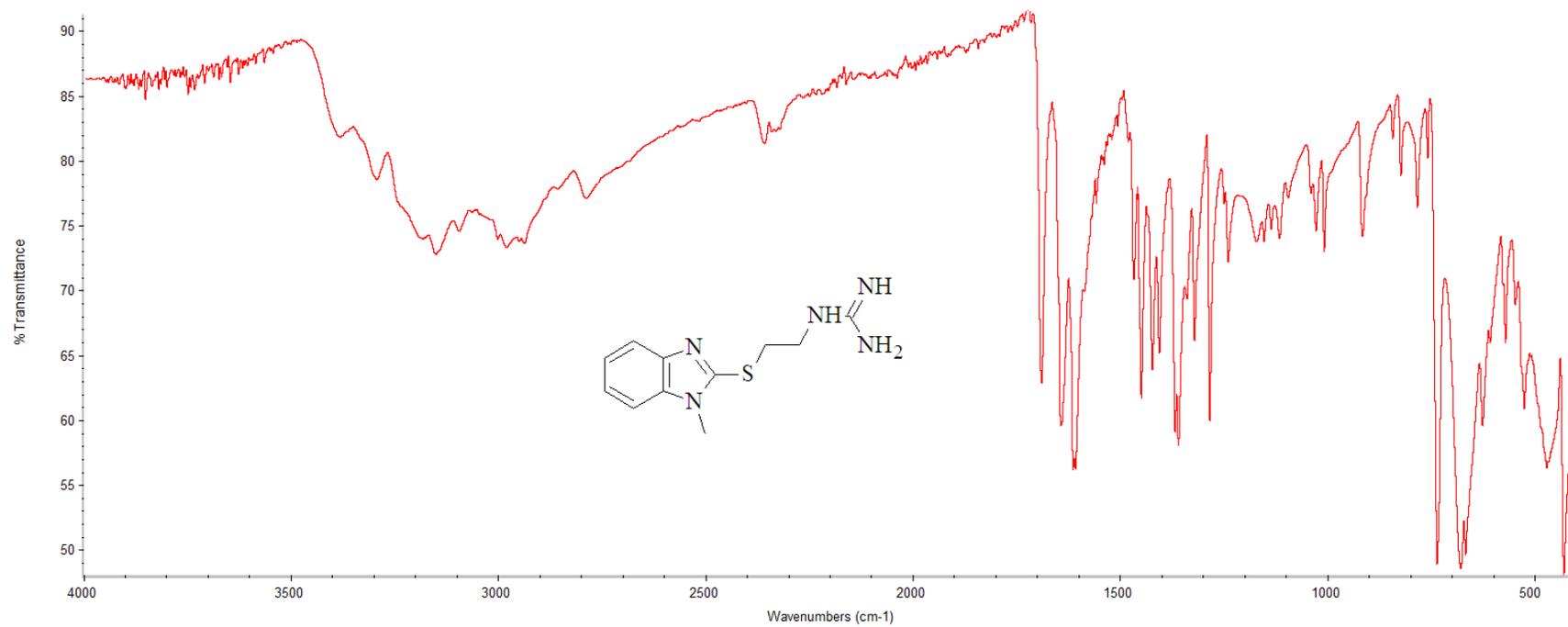
Espectro 38. RMN ^1H (300MHz) de 1-[2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil]guanidina (ADI 5).



Espectro 39. RMN ^1H (300MHz) de 1-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}guanidina (intercambio con D_2O) (ADI 5).



Espectro 40. RMN ^{13}C (75.5MHz) de 1-[2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil]guanidina (ADI 5).



Espectro 41. FT-IR de 1-{2-[(1-Metil-1H-bencimidazol-2-il)sulfanil]etil}guanidina (ADI 5).