



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE DERIVADOS DEL 6-
CLORO-2- $\{[2-(1H\text{-IMIDAZOL-1-IL)ETIL}]SULFANIL\}$ -1-METIL-1H-
BENCIMIDAZOL-5-CARBOXAMIDA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. PAULINA FLORES CARRILLO

TUTOR

Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO D.F. NOVIEMBRE 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE DERIVADOS DEL 6-CLORO-2-
{[2-(1H-IMIDAZOL-1-IL)ETIL]SULFANIL}-1-METIL-1H-BENCIMIDAZOL-5-
CARBOXAMIDA”**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

**PRESENTA
QFB. PAULINA FLORES CARRILLO**



México, D. F. 2015

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Francisco Yuste López
Vocal	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Vocal	Dr. Fernando Calzada Bermejo
Secretario	Dr. Marcos Hernández Rodríguez

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Este trabajo se realizó en la Facultad de Química, Departamento de Farmacia, laboratorio 122, del conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. Las evaluaciones antiparasitarias se realizaron en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional IMSS, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

- “Síntesis y actividad antiprotozoaria de carboxamidas bencimidazólicas” 48° Congreso Mexicano de Química, 31 agosto-3 septiembre del 2013, Guanajuato Guanajuato.
- “Relaciones estructura-actividad de carboxamidas bencimidazólicas: Identificación de compuestos antiprotozoarios selectivos” 49° Congreso Mexicano de Química, 17-21 septiembre del 2014, Mérida, Yucatán.
- “Diseño y síntesis de derivados del bencimidazol y su evaluación sobre la enzima arginina de iminasa (adi) de *Giardia intestinalis*”. QUIMIUNAM, 22-24 abril del 2015, México, Distrito Federal.
- “Synthesis, antiprotozoal activity and structure-activity relationships of novel 1-methyl-2-(methylthio)-1*H*-bencimidazole-5-carboxamide derivatives: Identification of new selectivity compounds”. American Chemical Society National Meeting & Exposition. 250th Celebration. August 16-20, 2015, Boston, M.A.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme los recursos y la gran oportunidad de formarme como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario 292914). También agradezco al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia a congresos y la impresión de tesis.

Agradezco al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por todas sus enseñanzas a nivel académico y personal, por compartir conmigo momentos gratos, por su cariño y confianza. Así mismo agradezco a la Dra. Alicia Hernández Campos por todo su apoyo, confianza y amistad. Los quiero mucho a ambos.

Al M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz por su apoyo en la parte computacional del trabajo, y especialmente por su amistad y la motivación brindada para seguir siempre adelante.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia y su equipo de investigación por la evaluación in vitro de los compuestos sintetizados en este trabajo y por darme la oportunidad de aprender un poco más sobre los protozoarios.

A Pedro Trejo, José Miguel Velázquez, Miguel Flores, Eli Fernández, Antonio Romo, Carlos Méndez, Jaime Pérez, Oscar Méndez, Rodrigo Pérez, Rodrigo Arroyo, Berenice Ocón, Valeria Rosales, Nayeli González, Lucía Cano, Anuar Flores, Carlos Carvente, Sebastian Huerta, Cecilia Arenas, Frida Herrera, Abigail Cruz, Gustavo Martínez, Elkin Sanabria, Jeferson Mateus y Adriana Luque por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia divertida.

A Edher Rosales, Hermann Mejía, Víctor García, Laura Mendoza, Eduardo García, Pelayo del Villar y Milton Medeiros por su valiosa amistad, cariño, apoyo y tiempo compartido.

A Félix Matadamas, Marie Sarabia, Alejandra Vázquez, Artemisa Luevano, Irene Betancourt y al Dr. Alfredo Téllez por todo lo aprendido y compartido en Durango.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones al presente trabajo de tesis.

*Dedicada con todo amor, cariño y agradecimiento infinitos
A Aurora, José, Maricela y Pablo*

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Enfermedades parasitarias	3
2.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i> Schaudinn	3
2.1.2. <i>Giardia intestinalis</i> Kunstler.....	5
2.1.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> Doné.....	6
2.2. Tratamiento para las protozoosis.....	8
2.3. Bencimidazoles como agentes antiprotozoarios	8
2.3.1. Carboxamidas bencimidazólicas: una nueva generación de compuestos antiprotozoarios.....	9
2.4. Diseño de fármacos	11
2.4.1. Modificación molecular como estrategia en el diseño de fármacos	12
2.4.2. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)	13
2.4.3. Análisis del panorama de actividad (<i>activity landscape</i>) como herramienta computacional para el diseño de fármacos.....	14
2.5. Consideraciones para el diseño.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Rutas de síntesis planteadas para la obtención de la carboxamidas bencimidazólicas (LFC) ...	20
a) Síntesis de las 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamidas (LFC1a-4a)	20

b) Síntesis de la serie 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b-4b).....	21
c) Síntesis de las 6-cloro-2-[[2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5 carboxamidas (LFC1-4)	22
6.2. Evaluación antiprotozoaria de las carboxamidas bencimidazólicas	23
6.2.1. Protozoarios.....	23
6.2.3. Ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i>	24
6.3. Análisis del panorama de actividad (<i>activity landscape</i>) giardicida, amebicida y tricomonocida de derivados del bencimidazol.....	25
6.3.1. Base de datos	25
6.3.2. Análisis del panorama de actividad (<i>activity landscape</i>)	26
6.3.3. Mapa DAD	27
6.3.4. Mapa TAD-2D.....	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1. Obtención de la serie de carboxamidas bencimidazólicas (LFC).....	28
7.1.1. Síntesis de los intermediarios 2-10 y 12-13	28
7.1.2. Síntesis del intermediario 1-(2-cloroetil)-1 <i>H</i> -imidazol (11)	35
7.1.3. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1a-4a	36
7.1.4. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1b-4b	39
7.1.5. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1-4	47
7.2. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos finales	56
7.3. Análisis del panorama de actividad (<i>activity landscape</i>) giardicida, amebicida y tricomonocida de derivados del bencimidazol.....	60
7.3.1. Mapa DAD	60
7.3.2. Mapa 2D-TAD	63
8. HALLAZGOS IMPORTANTES.....	66
9. CONCLUSIONES	67

10. PERSPECTIVAS	68
11. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	69
11.1. Instrumentación	69
11.2. Sistemas cromatográficos.....	69
11.3. Técnicas para la preparación de intermediarios	70
11.3.1. Síntesis de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).....	70
11.3.2. Síntesis de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).....	71
11.3.3. Síntesis de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)	71
11.3.4. Síntesis de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).....	72
11.3.5. Síntesis de 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)	73
11.3.6. Síntesis de 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7).....	74
11.3.7. Síntesis de 5-amino-2-cloro-4-(metilamino) benzoato de metilo (8).....	75
11.3.8. Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol carboxilato de metilo (9).....	75
11.3.9. Síntesis de ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10)	76
11.3.10. Síntesis de 1-(2-cloroetil)-1 <i>H</i> -imidazol (11).....	77
11.3.11. Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12)	77
11.3.12. Síntesis de ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (13).....	78
11.4. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1a-4a.....	79
11.4.1. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a).....	79
11.4.2. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a)	80
11.4.3. Síntesis de 6-cloro-1-metil- <i>N</i> -(2-metilfenil)-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC3a).....	80
11.4.4. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a)	81

11.5. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1b-4b.....	82
11.5.1. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b).....	82
11.5.2. Síntesis de 6-cloro-1-metil- <i>N</i> -fenil-2-metiltio-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b).....	83
11.5.3. Síntesis de 6-cloro-1-metil- <i>N</i> -(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b).....	84
11.5.4. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC4b).....	84
11.6. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1-4.....	85
11.6.1. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-[[2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC1).....	85
11.6.2. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -fenil-2-[[2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC2).....	86
11.6.3. Síntesis de 6-cloro-2-[[2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil- <i>N</i> -(2-metilfenil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC3).....	87
11.6.4. Síntesis de 6-cloro- <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)-2-[[2-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (LFC4).....	88
12. REFERENCIAS	89
APÉNDICE A.....	95
APÉNDICE B.....	99

RESUMEN

Los compuestos derivados del bencimidazol tienen un amplio uso en la terapéutica debido a sus propiedades como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antiprotozoarios, antihelmínticos, antiulcerosos, entre otras.

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado y evaluado la actividad antiparasitaria de un gran número de moléculas derivadas del bencimidazol y en fechas recientes se han estudiado las relaciones estructura actividad de estos compuestos empleando herramientas computacionales. Estas nuevas metodologías permiten el diseño racional de nuevos derivados, así como la generación de información respecto a las características estructurales que éstos deben poseer para ser compuestos activos.

En este trabajo se describe la síntesis de una serie carboxamidas bencimidazólicas tomando en cuenta para su diseño la información recabada sobre los estudios de relación estructura actividad previamente realizados en el grupo. De manera complementaria se realizó un análisis del panorama de actividad, empleando herramientas quimioinformáticas. Esta tesis se presenta en tres partes.

La primera parte describe la obtención de una serie de doce carboxamidas bencimidazólicas así como su caracterización estructural mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

La segunda parte aborda los resultados de los ensayos *in vitro* contra los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* a los cuales se sometieron los compuestos de la serie.

La tercera parte del trabajo se enfoca en el estudio quimioinformático que se realizó empleando una base de compuestos derivados del bencimidazol previamente sintetizados en el grupo de investigación y una serie de carboxamidas bencimidazolicas que resultó de gran interés debido a su alta potencia como antiprotozoarios. Se generaron mapas DAD y 2D-TAD en los cuales se localizaron compuestos antiprotozoarios selectivos y de amplio espectro, lo cual es información importante para considerar en el diseño de nuevos compuestos.

A manera de perspectiva del trabajo se propuso una serie de compuestos derivados del bencimidazol para su posterior síntesis y evaluación antiprotozoaria.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios y helmintos son en la actualidad uno de los principales problemas médico-sociales en el mundo entero, afectando principalmente a los países en desarrollo, donde los servicios sanitarios básicos, la educación y cultura higiénica son insuficientes, favoreciendo su permanencia en estas regiones. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada con al menos un tipo de parásito. Entre las enfermedades parasitarias con mayor incidencia se encuentran aquellas que poseen como agentes etiológicos a los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. A pesar de que la tasa de mortalidad de las enfermedades parasitarias es baja, la morbilidad es alta, deteriorando la calidad de vida de quienes las padecen.

Actualmente se han implementado diversas estrategias para el control de estas enfermedades; sin embargo, la quimioterapia es una herramienta fundamental para el tratamiento de estos padecimientos. El metronidazol, 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol, es el fármaco de elección para el tratamiento de la amebiasis, giardiasis y tricomoniasis desde hace ya más de 40 años, pero su uso se encuentra limitado debido a los efectos secundarios indeseables que genera y la aparición de cepas resistentes, por lo que resulta imperativo el contar con nuevos agentes antiprotozoarios.

Dentro de nuestro grupo de investigación se han diseñado y sintetizado diversos compuestos derivados del bencimidazol con actividad antiprotozoaria, con lo que se ha conseguido integrar una amplia biblioteca de compuestos, la cual ha sido objeto de diferentes estudios de relación estructura-actividad. Estos estudios han permitido deslumbrar algunos de los requerimientos estructurales que los derivados del bencimidazol deben poseer para ejercer una buena actividad contra estos protozoarios.

En este trabajo se presentan la síntesis y evaluación como antiprotozoarios de derivados del bencimidazol, cuyo diseño se sustenta en estudios previos realizados dentro del grupo de investigación, con el objetivo de encontrar nuevos compuestos antiprotozoarios y enriquecer la biblioteca de compuestos. De manera adicional se presenta un estudio de relación estructura-actividad de una serie de doce carboxamidas bencimidazólicas previamente sintetizada y evaluada *in vitro* contra los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* la cual se comparó, utilizando metodologías quimioinformáticas, con una base de 91 compuestos derivados del bencimidazol y adicionalmente con una serie de compuestos híbridos nitazoxanida-*N*-metilbencimidazoles.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades parasitarias

Las infecciones parasitarias continúan siendo un problema de salud mundial que afecta principalmente a los países en desarrollo donde los servicios básicos sanitarios son insuficientes. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 3 mil millones de habitantes en el mundo están infectados con al menos un parásito [1]. Entre las enfermedades parasitarias con mayor prevalencia se encuentran las causadas por protozoarios y helmintos; estos padecimientos pueden adquirirse mediante el consumo de agua o alimentos contaminados, a través de vectores o por contacto sexual [2].

Entre las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios, con mayor frecuencia, se encuentran la giardiosis, la amebiosis y la tricomoniosis, causadas por *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, respectivamente. De estas protozoosis la giardiosis y la amebiosis son causantes de diarreas y diversos problemas gastrointestinales, la prevalencia de la giardiosis es del 10 por ciento en países desarrollados y va del 20 al 30 por ciento en la población que habita en países en desarrollo [3]. En el caso de la amebiosis, se estima anualmente 500 millones de personas infectadas y 100,000 defunciones causadas por este protozoario [4]. La población infantil es el sector más afectado por ambas enfermedades causando un deterioro en su desarrollo físico e intelectual. La tricomoniosis es una enfermedad de transmisión sexual que afecta principalmente a mujeres, causando inflamación en el tracto genitourinario y se reportan 170 millones de casos anuales [5].

2.1.1. *Entamoeba histolytica* Schaudinn

Entamoeba histolytica es un protozoario de la orden Amoebida y familia Entamoebidae. Presenta dos formas o fases en su desarrollo: la fase de quiste donde el parásito permanece latente o infectante, y la fase de trofozoíto que corresponde a la fase invasiva. Los quistes son de forma redonda u oval, miden entre 10-15 μm de diámetro con una pared retráctil que posee quitina. En su interior contienen cuatro núcleos, glucógeno y cuerpos cromatóides. Los trofozoitos son móviles, miden de 10-50 μm de diámetro, son altamente pleomórficos y se reproducen por fisión binaria [6]. La transmisión de *E. histolytica* puede darse al ingerir agua o alimentos contaminados con quistes del protozoario. Una vez que se ingiere el quiste maduro, éste desciende en el tubo digestivo hasta el intestino, donde previo al contacto con jugos digestivos se inicia el proceso de desenquistamiento, en el cual la pared de resistencia se reblandece. Los núcleos se duplican a ocho y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las cuales crecen a trofozoitos maduros y se multiplican por fisión binaria. El establecimiento o colonización de los trofozoitos se da en el intestino grueso. De estos sitios, nuevamente el parásito es arrastrado con el tránsito intestinal, se desarrolla el

enquistamiento y es expulsado con las heces en forma de quiste con lo cual se cierra el ciclo biológico cuando el quiste se ingiere por otra persona [7-8] (Figura 1).

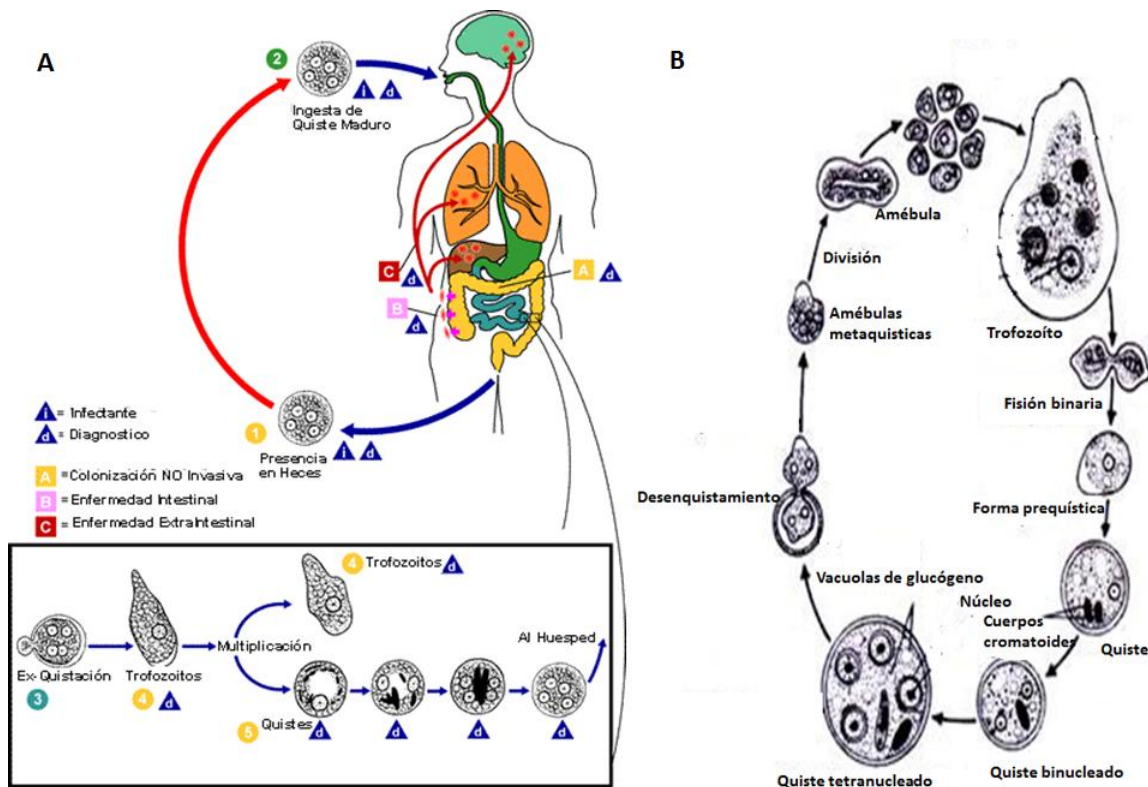


Figura 1. (A) Ciclo biológico de *E. histolytica*, (B) Estadios morfológicos de *E. histolytica* [9].

2.1.1.2. Sintomatología y diagnóstico

La amebiosis comprende una amplia gama de síntomas entre los cuales se encuentran el síndrome disentérico, caracterizado por la presencia de heces mucoides con pequeños volúmenes de sangre; la colitis amebiana, que se caracteriza por ulceraciones de la mucosa del colon con abscesos; el amoeboma, que consiste en la formación de una masa fibrótica en la pared intestinal; y la enfermedad invasiva, dando lugar a abscesos amebianos en el cerebro, los pulmones o en el hígado [10].

El diagnóstico resulta difícil ya que *E. histolytica* es morfológicamente idéntica a otras especies no patógenas como *E. dispar* y *E. moshkovskii*, por lo que la microscopía generalmente se considera insuficiente para la diferenciación de estas especies. Por lo tanto, un diagnóstico definitivo puede realizarse mediante pruebas basadas en antígenos y biología molecular [11].

2.1.2. *Giardia intestinalis* Kunstler

Giardia intestinalis es un protozoo flagelado patógeno perteneciente a la orden Diplomonadida y familia Hexamitidae; presenta dos núcleos adyacentes en el mismo plano transversal, seis u ocho flagelos, axonemas pareados y simetría bilateral. *G. intestinalis* presenta dos formas morfológicas en su ciclo biológico: quiste o forma infectante y trofozoíto (**Figura 2**). El quiste tiene forma ovoide y mide de 8 a 12 μm en su diámetro mayor y 8 μm como promedio en el menor. En este estadio el protozoo se encuentra circundado por una pared quística hialina que le confiere resistencia al medio ambiente. Estos quistes son transmitidos al ser humano por ingesta de agua o comida contaminada, así como por la ruta oral-fecal. Después de la exposición al medio ácido del estómago, cada quiste ingerido libera dos trofozoítos en el intestino delgado mediante un proceso conocido como exquistamiento. Los trofozoítos liberados invaden el epitelio intestinal y se multiplican por división binaria en el lumen del intestino delgado, causando diarrea y malabsorción. Finalmente, cuando los trofozoítos llegan al colon se transforman en quistes para ser liberados en las heces, permitiendo que se complete el ciclo de transmisión al infectar a un nuevo hospedero [12-13].

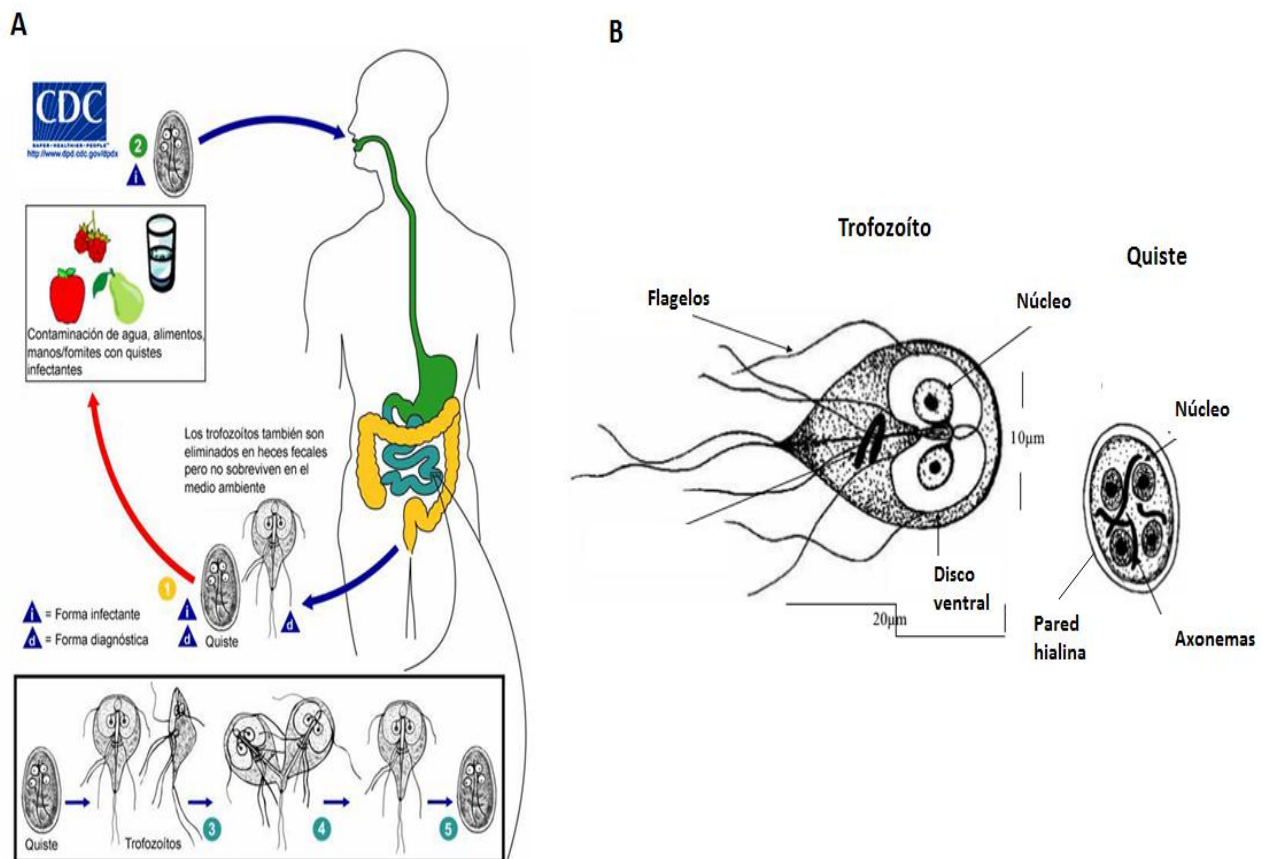


Figura 2. (A) Ciclo biológico de *G. intestinalis* (A) Morfología del quiste y el trofozoíto de *G. intestinalis* [14].

2.1.2.1. Sintomatología y diagnóstico

Los síntomas de la giardiosis pueden ser variables, pero se presentan principalmente como diarrea aguda o crónica asociada con dolor abdominal, náuseas, mala absorción y pérdida de peso. En niños puede causar desnutrición, que puede conducir a un retraso del crecimiento y desarrollo de habilidades cognitivas. Ha habido unos pocos informes que sugieren que la giardiosis puede ser un factor de riesgo para la deficiencia de zinc en los niños en edad escolar [12,15]. El diagnóstico se basa generalmente en la detección microscópica de quistes o trofozoítos de *G. intestinalis* en una muestra de heces. Las heces se pueden examinar, ya sea directamente mediante frotis frescos conservados en formol o en alcohol polivinílico y teñidos con yodo o hematoxilina. Varios ensayos de detección de antígeno están disponibles incluyendo las EIA, ELISA y pruebas de anticuerpos fluorescentes directos [16].

2.1.3. *Trichomonas vaginalis* Doné

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado perteneciente a la orden Tricomonanida y a la familia Trichomonadidae. El trofozoíto es la forma usual e infectante del parásito. No se han descrito formas quísticas; sin embargo, en situaciones desfavorables puede interiorizar sus flagelos y adoptar una configuración de pseudoquiste. *T. vaginalis* mide de 7 a 23 μm ; puede presentar diferentes aspectos: en cultivos *in vitro* se puede observar como ovoide o piriforme; por el contrario, tras la adherencia a las células del epitelio genital tiende a adoptar una morfología ameboide (**Figura 3**). El ser humano es el único hospedero de *T. vaginalis* y su transmisión, por lo general, es por contacto sexual, aunque se ha demostrado que también es posible mediante el uso de fomites y ropa interior, porque el parásito puede sobrevivir en la orina durante tres horas y en el semen durante seis horas. El transporte del parásito entre las mucosas en el acto sexual se hace mediante las secreciones de quienes participan en él, como el flujo vaginal, el líquido preseminal y el semen. Una vez que el parásito invade la mucosa genital, tiene preferencia por localizarse, en el caso de la mujer, en las glándulas de Bartholino y parauretrales y en sus secreciones, además de la vagina y el cérvix. En el hombre coloniza principalmente el surco balano-prepucial, las glándulas prepuciales, la uretra prostática y las vesículas seminales. Una vez que el trofozoíto se encuentra en la mucosa, se reproduce mediante fisión binaria longitudinal con un período de incubación que oscila entre 4 y 28 días, y crece con la presencia de sales de hierro, como las que se encuentran en la sangre menstrual, y de la glucosa, presente en el epitelio vaginal durante la edad fértil; además, como ya se dijo, lo favorece el pH alcalino que genera tras colonizar el epitelio sano [17-18].

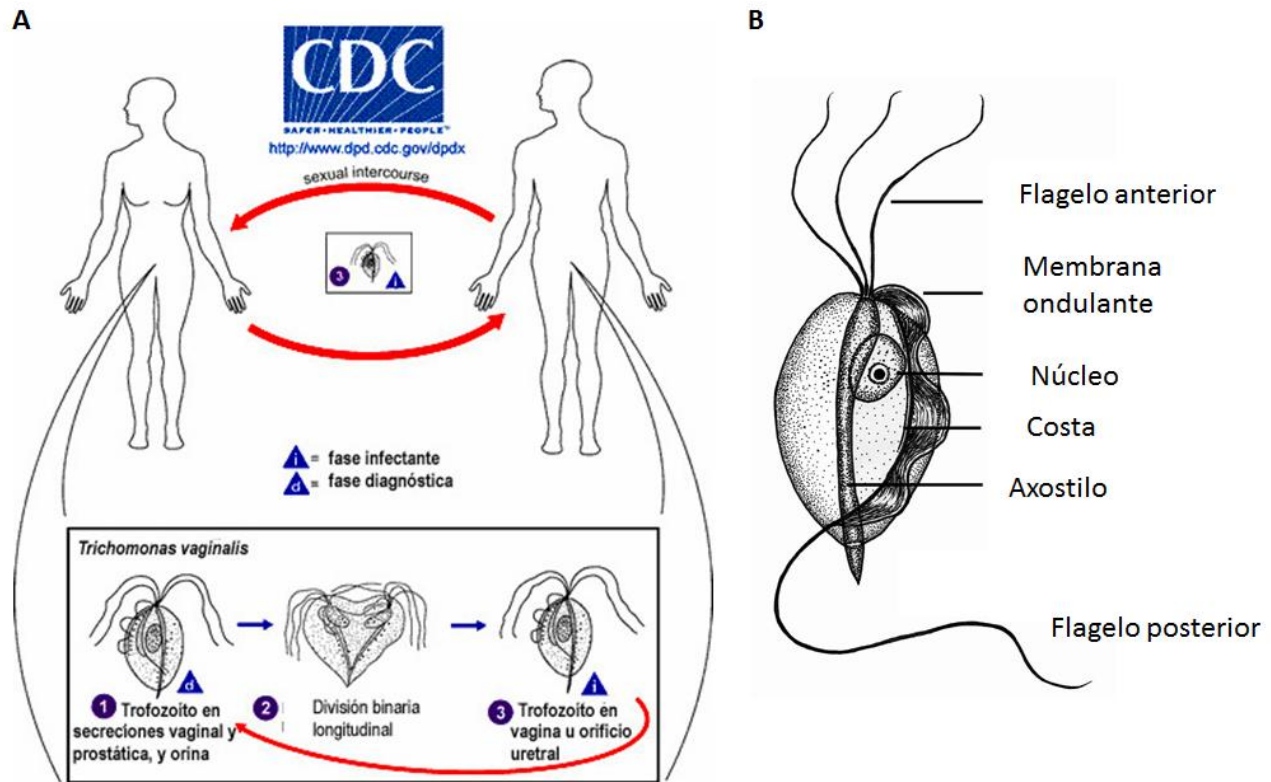


Figura 3. (A) Ciclo biológico de *T. vaginalis*. (B) Trofozoíto de *T. vaginalis* [19].

2.1.3.1. Sintomatología y diagnóstico

Las mujeres son más propensas que los hombres a presentar sintomatología por la infección con este protozoario. En las infecciones por *T. vaginalis* se puede observar leucorrea abundante, espumosa, fétida y de color amarillo verdoso. Las mujeres infectadas refieren prurito, dispareunia y disuria, que se acentúan durante la menstruación. Durante la infección el pH vaginal puede aumentar hasta 5,0. La tricomoniasis está asociada a adenitis inguinal, piosalpingitis, endometritis, uretritis, vaginitis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (EPI) e infertilidad tubárica. En las mujeres embarazadas, predispone a entrar en trabajo de parto pretérmino y a bajo peso al nacer. Durante el parto, las mujeres infectadas pueden transmitir el parásito verticalmente al recién nacido, produciéndole una infección genitourinaria o una neumonía neonatal. Los varones tienden a sufrir una infección asintomática y actúan como reservorios de *T. vaginalis* [20].

Lo que respecta al diagnóstico, en el caso de la mujer, la muestra de elección para la búsqueda del parásito es el fluido vaginal, mientras que en el hombre lo es el semen, por su mayor sensibilidad. El método más apropiado, debido a su sensibilidad (98%) y especificidad (100%), es el cultivo en los caldos de Roiron

y de Diamond. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) ha dado resultados satisfactorios en secreción vaginal y orina, con altas sensibilidad y especificidad, pero es un método con grandes limitaciones debido a su alto costo [21].

2.2. Tratamiento para las protozoosis

Las instituciones gubernamentales de cada país han establecido estrategias dirigidas a la mejora de los servicios sanitarios básicos, así como la implementación de campañas de salud para disminuir el número de casos y ofrecer un diagnóstico oportuno. A pesar de estos esfuerzos, la quimioterapia es la principal herramienta para combatir las enfermedades parasitarias.

El metronidazol (**MTZ**) es el fármaco de elección para el tratamiento de las protozoosis; sin embargo, presenta efectos adversos como cefalea, náuseas, vértigo, diarrea, sabor metálico e inclusive se tienen reportes de actividad carcinogénica de esta sustancia, lo que ocasiona, en muchos de los casos, que el paciente interrumpa el tratamiento. Esto último ha propiciado la aparición de cepas resistentes a este fármaco, por lo cual se ha empleado a la nitazoxanida (**NTZ**) como nueva alternativa para el tratamiento contra la amebiosis, la giardiosis y la tricomoniosis (**Figura 4**). Aunque actualmente se cuenta con esta opción de tratamiento, no sabemos con certeza la respuesta a éste en el futuro, por lo que es necesario contar con nuevos fármacos [22-24].

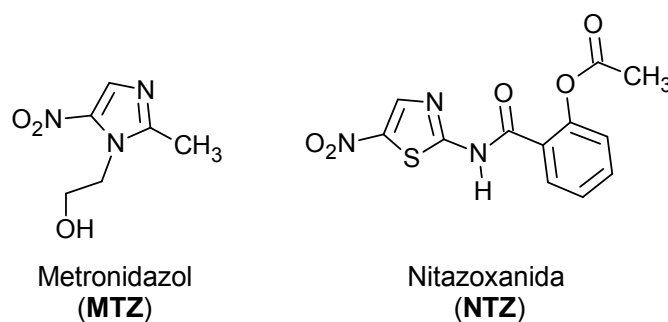


Figura 4. Principales fármacos antiprotozoarios.

2.3. Bencimidazoles como agentes antiprotozoarios

El núcleo del bencimidazol se considera una molécula privilegiada ya que se encuentra presente en compuestos con diversas actividades biológicas, dando origen a un gran número de productos con propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antiparasitarias. El albendazol (**ABZ**) y mebendazol (**MBZ**) son los principales agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por helmintos (**Figura 5**). Estos dos compuestos pertenecen al grupo de los bencimidazol 2-carbamato (**BzC**)

cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición de polimerización de la tubulina ocasionando con ello la pérdida de las funciones celulares, la disminución de los niveles energéticos y la inmovilización y posterior muerte del parásito [25-26].

Aunque se conocía muy bien la actividad antihelmíntica del **ABZ** y el **MBZ**, fue hasta finales de los años ochenta cuando se evaluó la actividad giardicida y tricomonocida de estos **BzC**. Motivados por los resultados encontrados se sintetizaron y evaluaron nuevos derivados del bencimidazol como agentes antiprotozoarios [27-29].

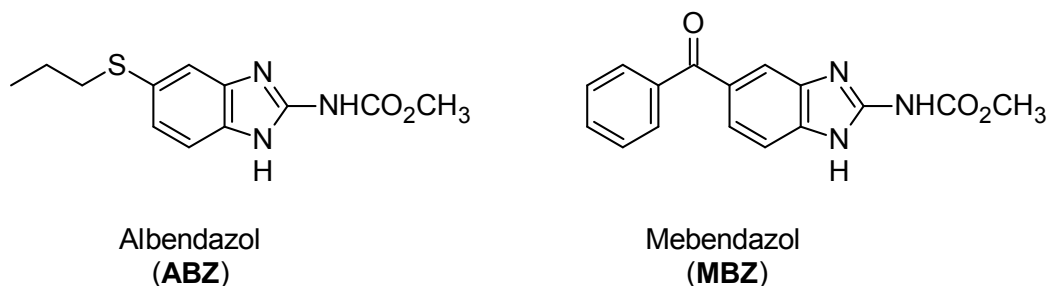


Figura 5. Bencimidazoles utilizados para el tratamiento de la helmintiasis.

Dentro de nuestro grupo de investigación se han sintetizado más de 400 derivados del bencimidazol con el propósito en encontrar los requerimientos básicos para optimizar su actividad antiprotozoaria.

2.3.1. Carboxamidas bencimidazólicas: una nueva generación de compuestos antiprotozoarios

Las carboxamidas bencimidazólicas son un grupo de compuestos con actividad antiprotozoaria de gran interés debido a la basta información respecto a las relaciones estructura-actividad que ha generado a través del tiempo. En nuestro grupo de investigación se han sintetizado más de 100 carboxamidas bencimidazólicas con sustituyentes alifáticos, fenilos y algunos heterociclos, cuyos rangos de actividad antiprotozoaria van de muy buenos a pobres (**Figura 6**).

En el grupo A se encuentran las carboxamidas bencimidazólicas del tipo alifático, presentan en la posición 1 del núcleo del bencimidazol un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, en la posición 2 poseen sustituyentes como metiltio, trifluoro metilo y carbamato de metilo; además, en las posiciones 5 y 6 presentan átomos de cloro e hidrógeno. La actividades giardicida y tricomonocida de los compuestos del grupo A fueron de buenas a pobres (0.0181-7.079 μM , mediana 0.865 μM) (0.0288-8.13 μM , mediana 1.388 μM) [30-37].

El grupo B es el más numeroso y contiene a las carboxamidas bencimidazólicas que presentan como sustituyentes a distintos heterociclos. La posición 1 del núcleo del bencimidazol está sustituida por un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, en la posición 2 presentan sustituyentes como hidrógeno, metilo, metiltio,

trifluoro metilo, y carbamato de metilo; además poseen átomos de cloro e hidrógeno en las posiciones 5 y 6. Estos compuestos mostraron actividades giardicidas que van de muy buenas a regulares (0.005-1.096 μM , mediana 0.177 μM). Por otra parte se encontró buena actividad amebicida en la mayoría de los casos (0.001-0.151 μM , mediana 0.033 μM) y actividades tricomonicidas que van de buenas a pobres (0.001-8.128 μM , mediana 0.515 μM) [38-49].

El grupo C es el menos numeroso y en él se encuentran las carboxamidas con sustituyentes del tipo fenilo. La posición 1 del núcleo del bencimidazol se encuentra sustituida por un átomo de hidrógeno y en la posición 2 por un grupo metililo; las posiciones 5 y 6 están sustituidas por un átomo de cloro. Se encontraron valores de actividad giardicida que van de buenos a regulares, (0.072-1.122 μM , mediana 0.464 μM) mientras que los valores de actividad amebicida de los compuestos de este grupo fueron buenos en la mayoría de los casos (0.0269-0.1205 μM , mediana 0.050 μM). Por otra parte se encontró un amplio rango de actividad tricomonicida que va de muy buenos a regulares (0.005-1.096 μM , mediana 0.177 μM) [50-51]. El grupo C contiene solo nueve compuestos, por lo que es necesario sintetizar y evaluar nuevas carboxamidas bencimidazólicas con las características estructurales correspondientes a este grupo, con el objetivo de generar más información.

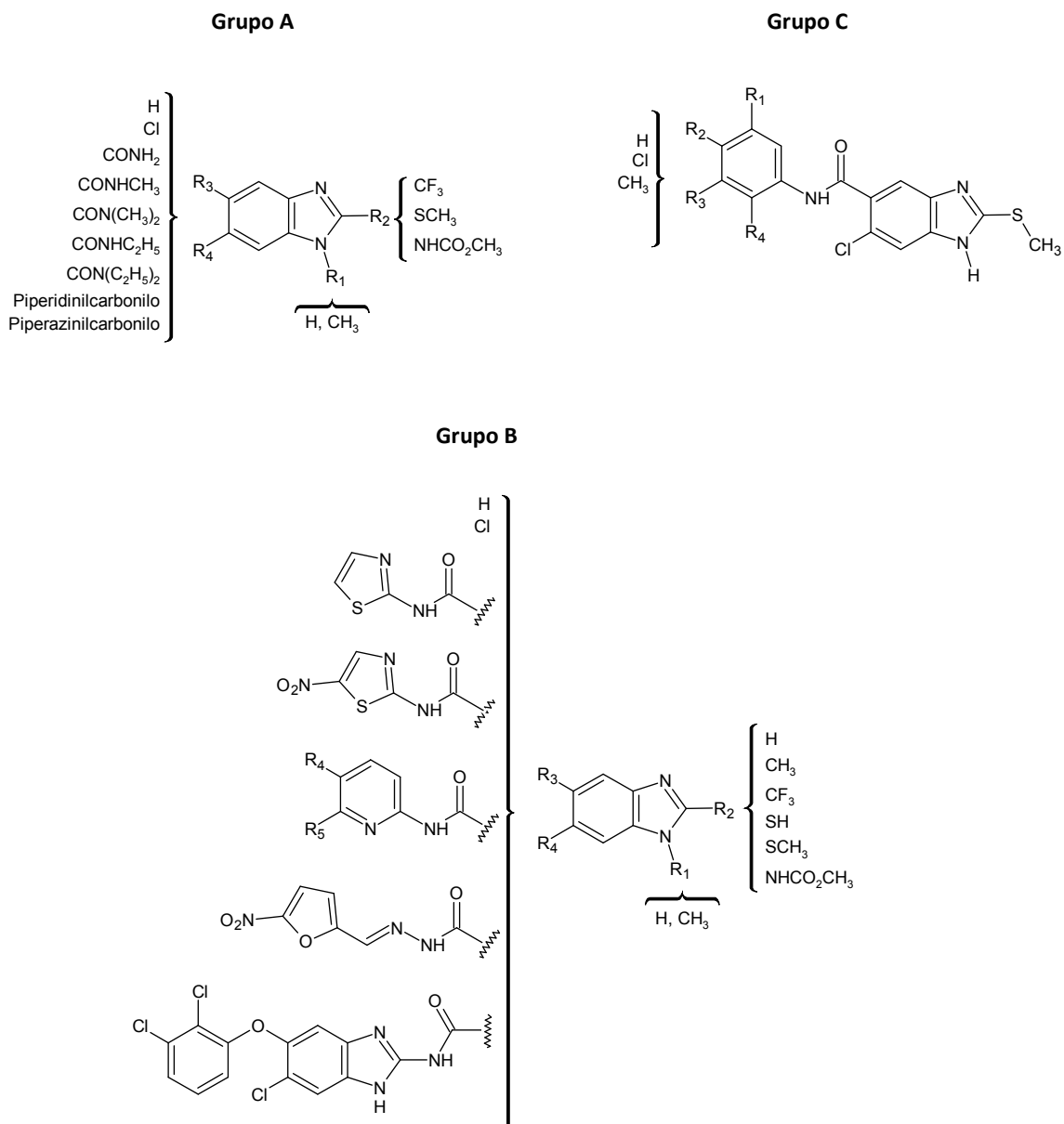


Figura 6. Carboxamidas bencimidazólicas sintetizadas en el laboratorio L-122.

2.4. Diseño de fármacos

El desarrollo de fármacos cada vez más seguros, adecuados, específicos y efectivos en el tratamiento de enfermedades es un largo proceso que comienza con la identificación del objetivo biológico, es decir, conocer los aspectos bioquímicos y fisiopatológicos involucrados con un padecimiento; y con esto elegir blancos terapéuticos a los que el diseño de algún fármaco sea dirigido. Luego es necesario encontrar al denominado "compuesto líder", es decir, compuesto prototipo que tiene la actividad biológica o farmacológica deseada (inhibición enzimática/bloqueo receptor) pero que puede presentar también ciertas

características contraproducentes: alta toxicidad, insolubilidad, inestabilidad, difícil proceso de obtención, etc. El compuesto líder puede optimizarse a través de modificaciones en la estructura química que eliminen esas características indeseables, lo que permite la obtención del "compuesto candidato" que es aquel seleccionado para ser sometido a las pruebas preclínicas [52]. (Figura 7).



Figura 7. Etapas necesarias para la obtención del compuesto candidato.

Para las etapas de descubrimiento del líder y su optimización es necesaria una interrelación constante con los biólogos que realizan los ensayos de actividad biológica. Ellos son los que determinan la actividad biológica de los compuestos para hallar el compuesto líder. Esta es la etapa que puede durar entre 12 y 15 años. Las pruebas *in vivo* se clasifican en distintas fases, las fases preclínicas, pruebas en animales donde principalmente se estudia la toxicidad, las pruebas clínicas I pequeño grupo de voluntarios sanos, especialmente para determinar efectos secundarios, dosis, farmacocinética (ADME: absorción, distribución, metabolismo, eliminación), II, pequeño grupo de pacientes, obviamente para determinar la efectividad, III, donde se trata un mayor número de pacientes donde se satisfacen los requerimientos de eficacia y seguridad de los organismos reguladores. Incluso hay una fase IV de control que se realiza cuando el fármaco ya está en el mercado [53].

2.4.1. Modificación molecular como estrategia en el diseño de fármacos

Este método se conoce como variación estructural y es prácticamente indispensable en el diseño y desarrollo de un nuevo fármaco. Pueden considerarse tres tipos de estrategias a la hora de manipular la estructura de un cabeza de serie, consistentes en:

- Simplificación del modelo. Esta estrategia consiste en diseñar compuestos que contengan aisladamente los fragmentos responsables de la actividad biológica estudiada. Es necesario aclarar que las partes responsables de la actividad no tienen necesariamente que encontrarse unidas entre sí sino que pueden estar separadas por una serie de átomos que no forman parte decisiva en la interacción con el receptor. En estos estudios se necesita de un verdadero conocimiento de la estructura tridimensional y del comportamiento conformacional del compuesto [54-55].

- Asociación molecular. Consiste en la unión de dos estructuras con una determinada actividad con la esperanza de potenciarla. Tradicionalmente se ha distinguido entre adición molecular definida como la asociación de moléculas diferentes por interacciones débiles, replicación molecular o unión covalente de unidades idénticas e hibridación molecular en la que se asocian covalentemente dos o más unidades distintas [54-55].
- Replicación moduladora. Consiste en la sustitución de determinados grupos de la estructura modelo. Es la metodología más frecuente. Comprende isomerización, homología, alquilación, ramificación, desalquilación, saturación, insaturación, cambio en la posición de la insaturación, desplazamiento de una función, introducción, sustitución o eliminación de heteroátomos, introducción de sistemas cíclicos, contracción o expansión de ciclos, etc. [54-55].

2.4.2. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)

El diseño de fármacos asistido por computadora consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura [56]. Los objetivos principales del DiFAC son tres: descubrir moléculas activas, optimizar moléculas activas ya conocidas y seleccionar, de un grupo dado de estructuras, a los candidatos que tengan mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos [57]. Los procedimientos computacionales utilizados deben estar integrados con pruebas experimentales, usualmente por medio de varios ciclos de optimización. Si bien es cierto que el procesamiento de datos puede ser, en general, rápido, la elección de métodos y el análisis e interpretación de datos son laboriosos. Al igual que las pruebas experimentales, las metodologías computacionales deben validarse para encontrar los parámetros óptimos que den resultados confiables [57-58].

El DiFAC puede enfocarse en distintas líneas de investigación haciendo uso de diversos conceptos y metodologías como se muestra en la **Figura 8**. Todo ello depende de los objetivos específicos de cada proyecto en particular.

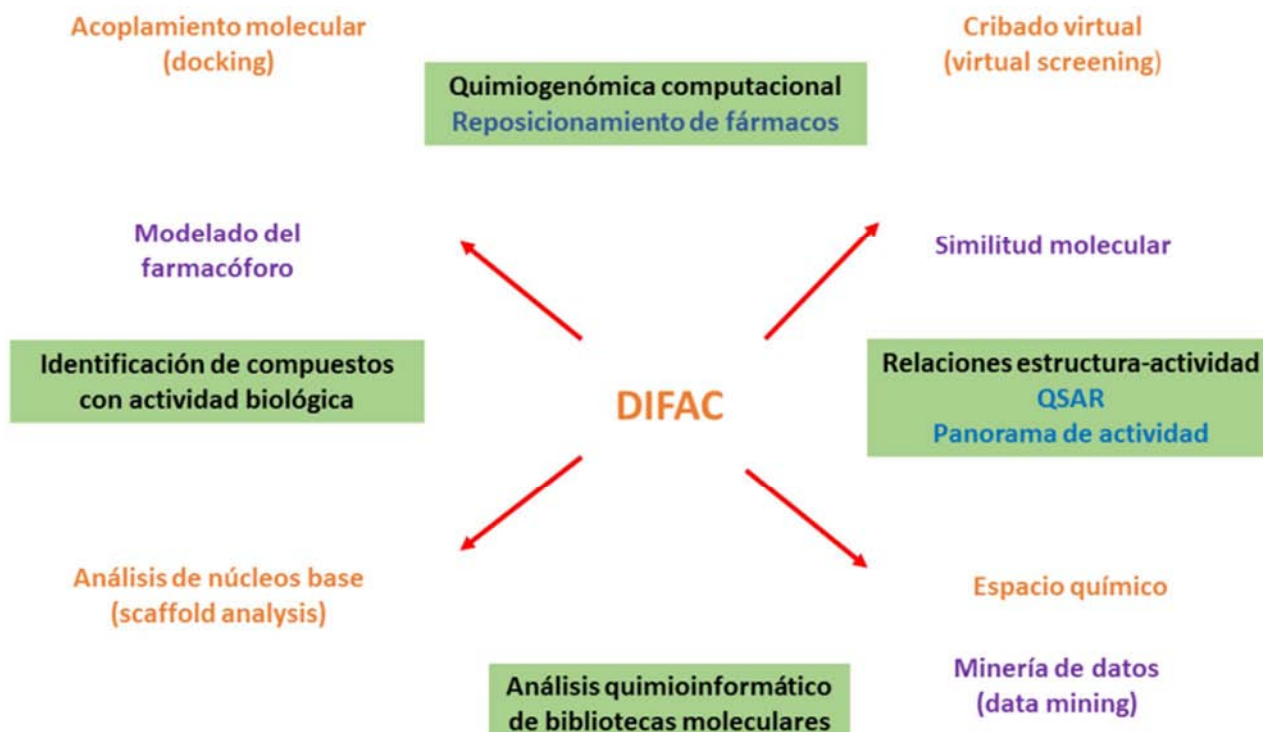


Figura 8. Principales aplicaciones del DIFAC.

2.4.3. Análisis del panorama de actividad (*activity landscape*) como herramienta computacional para el diseño de fármacos

El estudio de las relaciones estructura-actividad (SAR, *Structure Activity Relationships*) es una de las principales herramientas para el diseño de fármacos utilizadas en la actualidad. Desde hace tiempo, los métodos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) son los más empleados para el análisis de quimiotecas; sin embargo, estas técnicas requieren de un número reducido de datos para obtener modelos robustos. Por este motivo, el modelado del panorama de actividad resulta una herramienta útil y novedosa que permite analizar el SAR de las quimiotecas compuestas por cientos de moléculas [59].

El panorama de actividad (*activity landscape*) se define como una superficie que representa el espacio químico de una serie de compuestos en relación con su actividad biológica. En éste, los compuestos con mayor similitud estructural se localizan en regiones cercanas del espacio, mientras que los compuestos diferentes se encuentran en regiones más alejadas. (Figura 9). El SAR continuo se representa por pequeñas colinas, lo que indica que pequeños cambios estructurales producen pequeños cambios en la actividad biológica. Por el contrario, el SAR discontinuo presenta un panorama más accidentado debido a que las

pequeñas modificaciones estructurales generan grandes cambios en la actividad biológica. Sin embargo, el comportamiento de las bases de datos suele presentar una combinación de ambos panoramas de actividad, a lo que se le denomina un SAR heterogéneo [59-61].

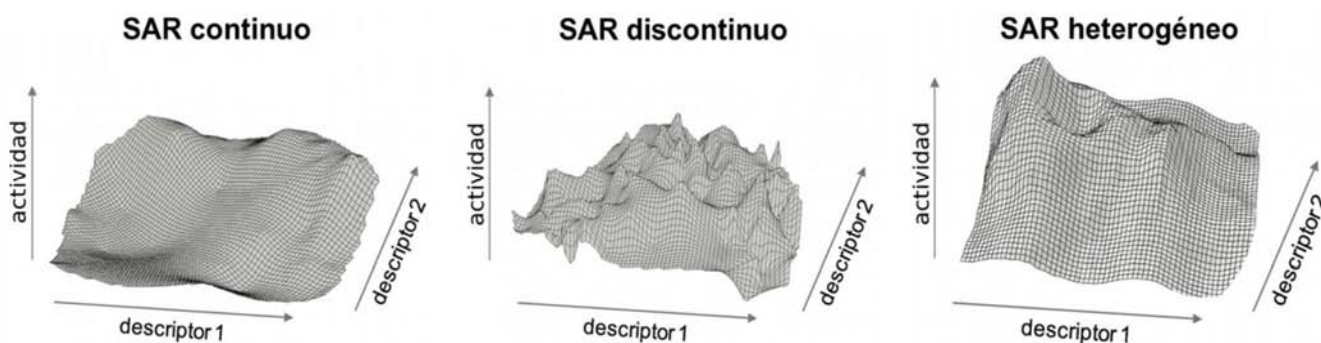


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes tipos de SARs [58-61].

Para la caracterización del panorama de actividad se emplean herramientas de visualización como los mapas de similitud estructura-actividad (SAS, *Structure-Activity Similarity*), los cuales se construyen graficando, por cada par de compuestos, la similitud en estructura en el eje X contra la similitud en actividad en el eje Y [62]. En estos mapas se pueden distinguir cuatro regiones (I-IV) (**Figura 10**). Los puntos que caen sobre la región I corresponden a pares de moléculas con alta similitud en actividad y baja similitud estructural y por lo tanto pueden ser asociados con cambios del núcleo base o cambios grandes en cadenas laterales. Los puntos en la región II se refieren a moléculas con alta similitud estructural y en actividad, y pueden ser asociados con un comportamiento continuo en las relaciones estructura-actividad. La región III corresponde a pares de moléculas con baja similitud estructural y en actividad; esta región se considera poco informativa. La región IV contiene pares de moléculas con alta similitud estructural y baja similitud en actividad y se asocian con relaciones estructura actividad discontinuas y la presencia de activity cliffs [63-65].

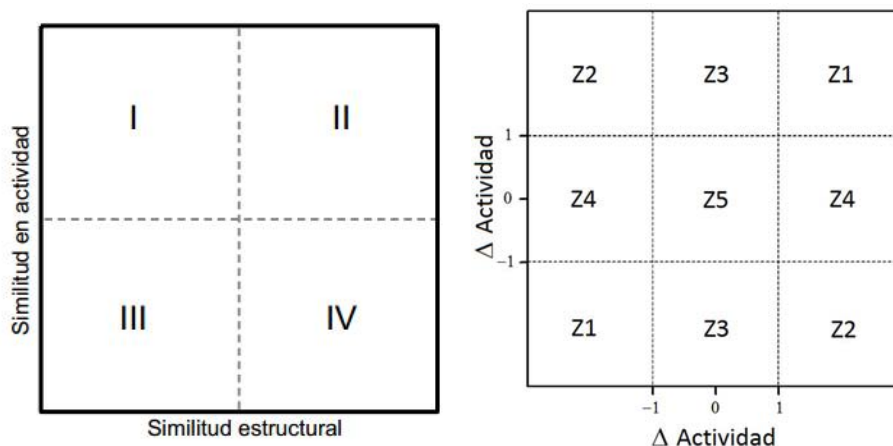


Figura 10. Formas esquemáticas de un mapa SAS dividido en cuatro regiones y un mapa DAD.

Además del mapa SAS se han desarrollado mapas de diferencia de actividad dual (DAD) y triple (TAD) que permiten evaluar las comparaciones pareadas con la actividad contra dos y tres blancos, respectivamente [66-67]. Con estas representaciones se han realizado varios estudios en los que se evalúa de manera sistemática a los diferentes tipos de SARs, y en los cuales se han empleado los siguientes conceptos:

- *Activity cliff*: Par de moléculas que presentan una alta similitud estructural pero difieren en la potencia de la actividad biológica (SAR discontinuo) [68].
- *Activity cliff generators*. Estructura química con alta probabilidad de generar *activity cliffs* con moléculas probadas en el mismo ensayo biológico [69].
- *R-cliff*: Son *activity cliffs* dentro de una serie de derivados moleculares cuya diferencia estructural se encuentra en los sustituyentes [70].
- *Scaffold hop*: Par de moléculas con diferente estructura base (*scaffold*) que presentan la misma actividad biológica [70].
- *Side-chain hop*. Par de derivados moleculares que difieren en la estructura de uno de los sustituyentes y presentan la misma actividad biológica [67].
- *Selectivity switch*. Par de compuestos con modificaciones estructurales pequeñas que invierten drásticamente el patrón de selectividad para dos blancos [71].

En nuestro grupo de investigación se han empleado estas herramientas quimioinformáticas para estudiar el SAR de diferentes bases de datos [67, 68,72]. Dentro de los trabajos realizados por el Dr. Jaime Pérez Villanueva se encuentran los estudios realizados con 32 y 55 moléculas publicadas de la base de

datos de derivados del bencimidazol. Los resultados de estos estudios permitieron encontrar relaciones entre la actividad tricomonocida y giardicida para varios derivados del bencimidazol, así como también se identificaron algunas de las características estructurales más importantes para que los compuestos sean potentes contra ambos protozoarios [72]. La información generada es una base importante para realizar nuevos estudios con la biblioteca de compuestos completa.

2.5. Consideraciones para el diseño

Recientemente el Dr. Pérez-Villanueva reportó el diseño, síntesis y actividad antiprotozoaria de nuevos derivados del bencimidazol [71]. El diseño de estos compuestos es el resultado de diversos estudios SAR, QSAR e información obtenida de modelos CoMFA y CoMSIA. Las conclusiones de los estudios de relación estructura-actividad se resumen en la **Figura 11**.

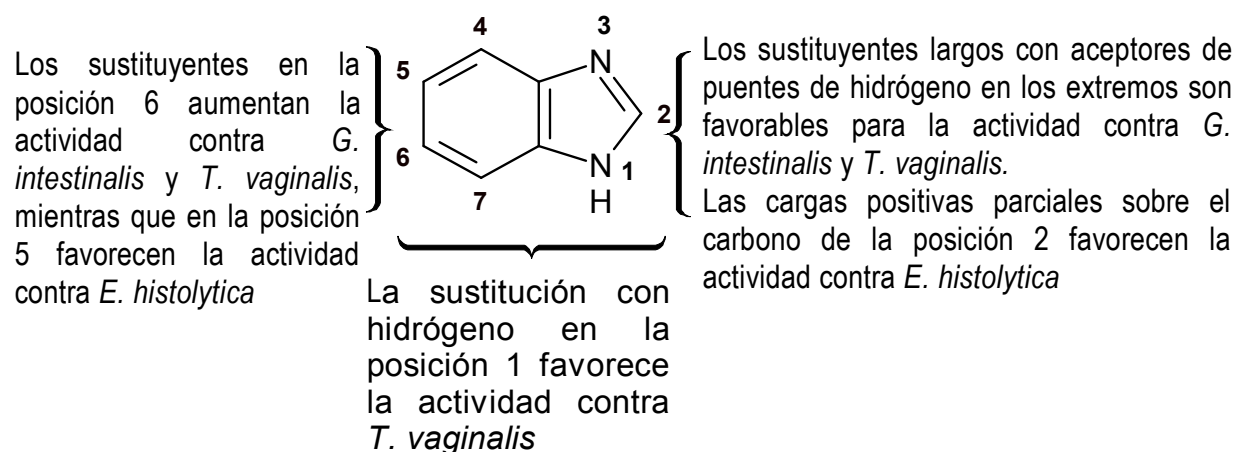


Figura 11. Relaciones estructura actividad para bencimidazoles con actividad contra los protozoarios *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

De los resultados obtenidos, el Dr. Pérez-Villanueva propuso la síntesis de derivados del bencimidazol cuyo diseño se basó tomando en cuenta dos compuestos muy activos y combina un anillo aromático en la posición 2 con un aceptor de puente de hidrógeno (**Figura 12**).

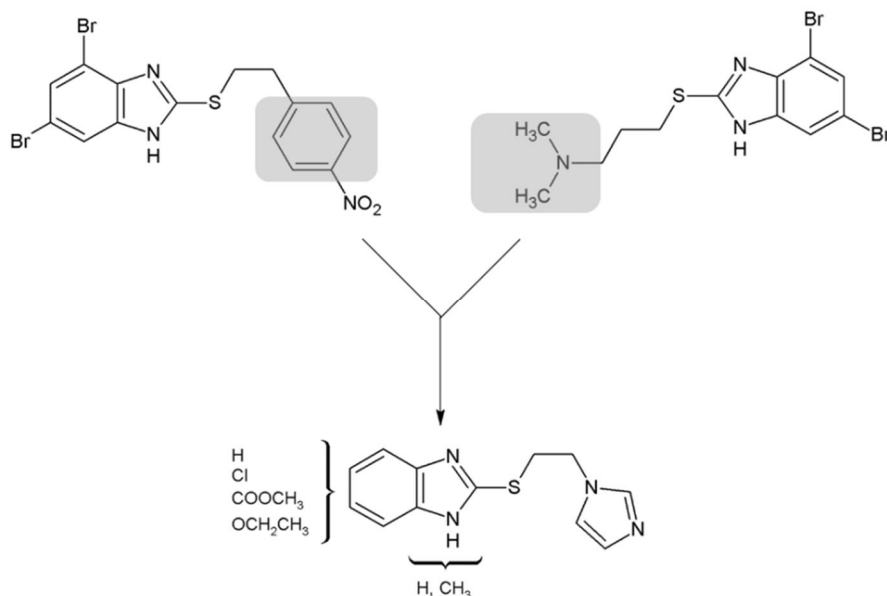


Figura 12. Consideraciones para el diseño de los compuestos sintetizados por el Dr. Pérez-Villanueva.

En presente trabajo de tesis se propuso enriquecer la base de derivados del bencimidazol, en específico el grupo C de las carboxamidas bencimidazólicas. Como se mencionó en apartados anteriores, este grupo es el que cuenta con menor número de compuestos, por lo que se requiere obtener más información para optimizar las estructuras líderes. El grupo C de las carboxamidas bencimidazólicas posee pocas variaciones en los sustituyentes de la posición 2 del núcleo del bencimidazol, por lo que se planteó sintetizar una serie de carboxamidas bencimidazólicas que presenten sustituyentes mercapto, metiltio y etil-sulfanil-imidazol en la posición 2 (**Figura 13**).

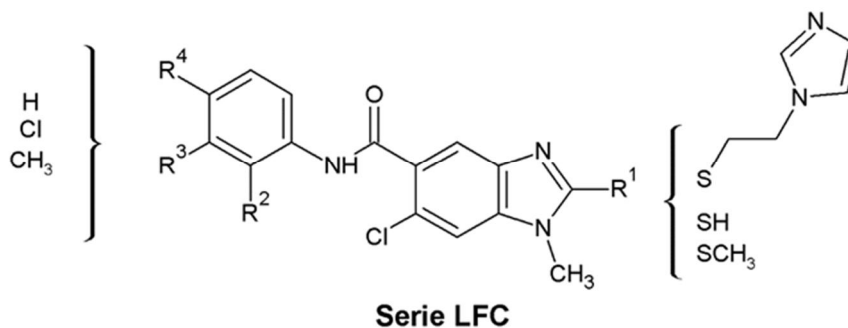


Figura 13. Serie de carboxamidas bencimidazólicas diseñadas para su síntesis.

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta la problemática actual de las enfermedades parasitarias producidas por protozoarios, aunado a que la principal estrategia para el tratamiento de estos padecimientos es la quimioterapia, es necesario contribuir con el diseño y síntesis de nuevas moléculas bioactivas. En este trabajo se emplean principios de química farmacéutica como la asociación molecular y herramientas computacionales para el diseño racional de derivados del bencimidazol con acción antiprotozoaria.

4. HIPÓTESIS

Con la información generada en el grupo de investigación y tomando en cuenta los estudios de relación-actividad de derivados del bencimidazol, se sintetizarán compuestos con actividad antiprotozoaria. Haciendo uso de herramientas computacionales será posible establecer requerimientos estructurales necesarios para optimizar los compuestos antiprotozoarios derivados del bencimidazol sintetizados en este trabajo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar una serie de carboxamidas bencimidazólicas con actividad antiprotozoaria diseñadas a partir del análisis de los estudios de relación estructura-actividad realizados previamente en el grupo de investigación.

5.2. Objetivos particulares

- Establecer una ruta de síntesis adecuada para obtener la serie de carboxamidas bencimidazólicas planteada.
- Caracterizar las moléculas sintetizadas empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar la actividad *in vitro* mediante el método de subcultivos sobre *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*
- Analizar las relaciones estructura-actividad de la quimioteca del Laboratorio 122 aplicando técnicas de quimioinformática
- A partir de los resultados obtenidos, proponer una nueva serie de compuestos a manera de perspectiva de este trabajo.

6. METODOLOGÍA

Para una mejor comprensión de las actividades llevadas a cabo en este trabajo, esta parte se dividió en tres secciones. En la primera, la parte química, se describe la metodología sintética realizada para la obtención de la serie de doce carboxamidas bencimidazólicas (**LFC**). En la segunda, la parte biológica, se presenta la descripción de los ensayos de actividad biológica a la que se sometieron las doce carboxamidas anteriores. Finalmente en la tercera parte se describe el análisis de las relaciones estructura-actividad de los derivados del bencimidazol sintetizados por el grupo de investigación, dicho estudio se realizó empleando herramientas computacionales.

6.1. Rutas de síntesis planteadas para la obtención de la carboxamidas bencimidazólicas (**LFC**)

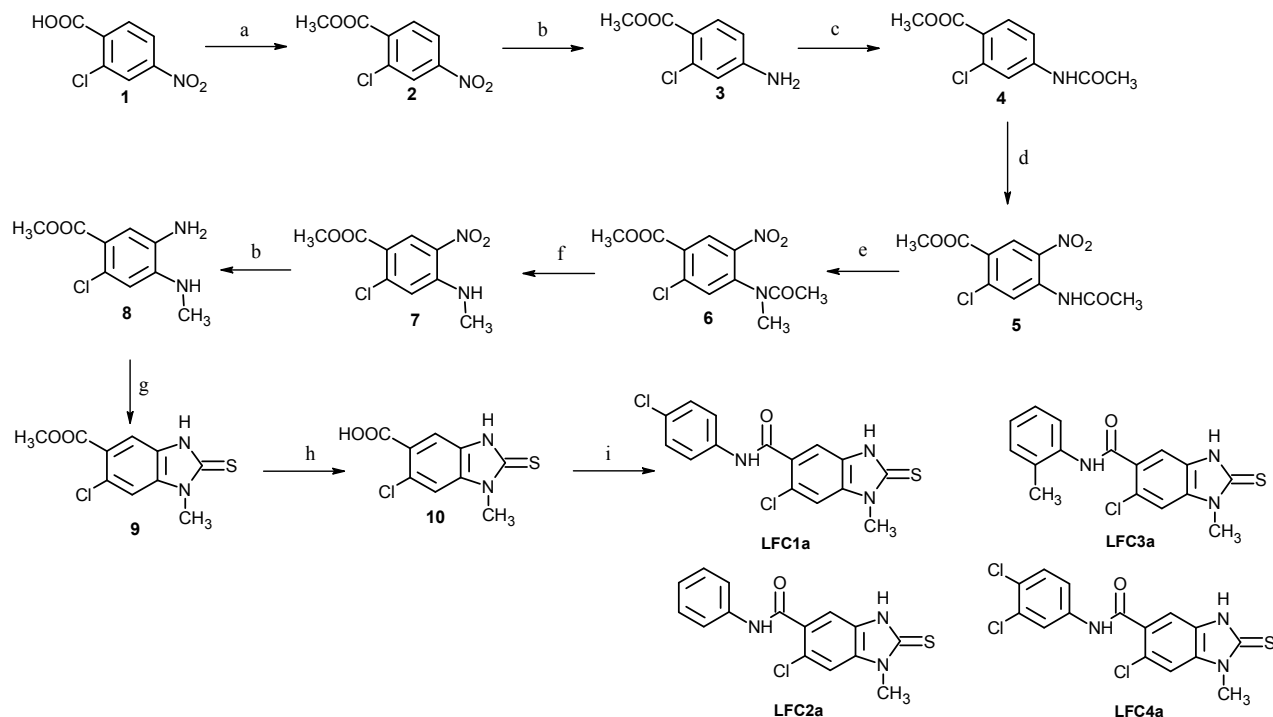
El desarrollo experimental para la síntesis de las carboxamidas bencimidazólicas se dividió en tres secciones.

a) Síntesis de las 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamidas (**LFC1a-4a**)

Para la obtención de las carboxamidas **LFC1a-4a** se siguió la ruta sintética que se muestra en el **Esquema 1**. Se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**), disponible comercialmente, el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**). La reducción catalítica con H₂/Ni-Raney de (**2**) llevó a la obtención del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**). Este compuesto se trató inmediatamente con anhídrido acético para obtener al compuesto 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**).

Posteriormente se realizó la nitración de (**4**) con mezcla sulfonítrica a 5 °C y se obtuvo el 4-(acetilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). La *N*-metilación con sulfato de dimetilo en medio básico de (**5**) resultó en la obtención de 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**), que por reacción de hidrólisis en medio ácido con H₂SO₄/MeOH llevó al 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (**7**). Una vez obtenido (**7**) se llevó a cabo la reducción del grupo nitro con H₂/Ni-Raney y se obtuvo el 5-amino-2-cloro-4-(metilamino)-benzoato de metilo (**8**) el cual se trató de inmediato con disulfuro de carbono (CS₂) para formar 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**) al cual se le realizó una hidrólisis básica con NaOH y calentamiento con lo que se obtuvo el ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**). Posteriormente, este ácido carboxílico se activó utilizando el agente acoplante anhídrido propil fosfónico (T3P®) para la formación de las amidas correspondientes usando trietilamina como base y la anilina correspondiente.

Esquema 1. Secuencia de síntesis para la obtención de la serie de derivados del bencimidazol 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**LFC1a-4a**)

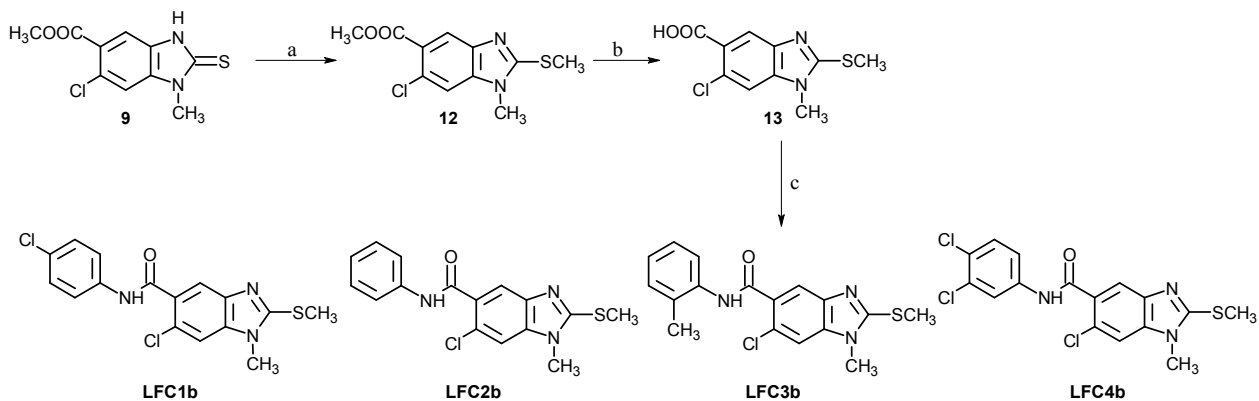


Reactivos y condiciones: (a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaHCO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$; (b) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (c) Ac_2O ; (d) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, 0-5 °C; (e) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaOH, diglima; (f) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$; (g) CS_2 , EtOH, H_2O , KOH, 60 °C; (h) KOH, MeOH; (i) T3P (Anhídrido propil fosfónico), AcOEt, T.A., Ar-NH₂

b) Síntesis de la serie 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b-4b**)**

Para la síntesis de esta serie de carboxamidas se siguió la ruta planteada en el **Esquema 2**. Se partió del compuesto **9** sintetizado previamente, el cual se trató con yoduro de metilo en condiciones alcalinas para obtener el 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**12**), este intermediario se trató con hidróxido de potasio hidrolizando su grupo éster lo que resultó en el compuesto ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**13**). El compuesto obtenido se trató con cloruro de tionilo en exceso, obteniendo de esta manera, y sin aislamiento, el cloruro de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carbonilo. El posterior tratamiento del cloruro de ácido, en el mismo matraz de reacción, con la anilina correspondiente permitió obtener a los compuestos de la serie **LFC1b-4b**.

Esquema 2. Secuencia de síntesis para la obtención de la serie de derivados del bencimidazol 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**LFC1b-4b**)



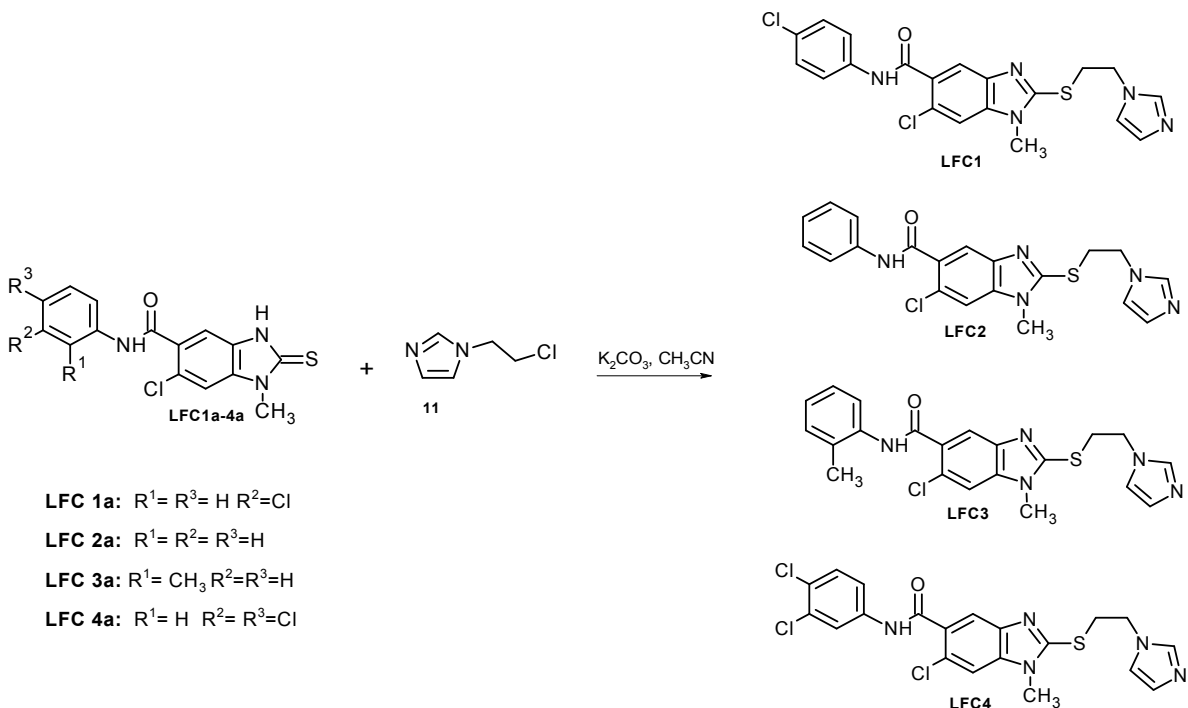
Reactivos y condiciones: (a) CH_3I , KOH , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$; (b) KOH , MeOH ; (c) 1) SOCl_2 , CH_3CN , 2) NEt_3 , Ar-NH_2

c) Síntesis de las 6-cloro-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamidas (**LFC1-4**)

Para la obtención de las carboxamidas **LFC1-4** se siguió la ruta sintética que se muestra en el

Esquema 3

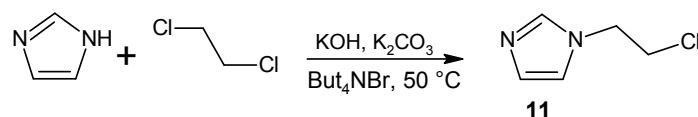
Esquema 3. Secuencia de síntesis para la obtención de la serie de derivados del bencimidazol 6-cloro-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**LFC1-4**)



Se utilizaron como precursores sintéticos a los compuestos de la serie **LFC1a-4a**, los cuales se hicieron reaccionar con 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**) mediante una reacción de sustitución nucleofílica para dar los compuestos deseados.

Por otra parte se sintetizó el intermediario 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**) empleando una reacción de sustitución nucleofílica entre el imidazol con 1,2-dicloroetano en medio básico utilizando bromuro de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fases (**Esquema 4**).

Esquema 4. Síntesis del 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**)



6.2. Evaluación antiprotozoaria de las carboxamidas bencimidazólicas

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos, previamente estandarizado.

6.2.1. Protozoarios

Las cepas de los microorganismos utilizados en los ensayos fueron *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS, *Giardia intestinalis* cepa IMSS: 0989 y *Trichomonas vaginalis* cepa GT15. *E. histolytica* y *T. vaginalis* se mantuvieron en el medio de cultivo TYI-S-33, suplementado con 10% de suero bovino y el protozooario *G. intestinalis* fue cultivado en el medio TYI-S-33 modificado, complementado con suero de ternera al 10% (**Tabla 1**). Las cepas fueron mantenidas en condiciones axénicas y para realizar los ensayos se emplearon en la fase logarítmica de crecimiento.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* [73]

Medio de cultivo TYI-S-33* para <i>E. histolytica</i> y <i>T. vaginalis</i>	Medio de cultivo TYI-S-33** modificado para <i>G. intestinalis</i>
1.0 g Fosfato de potasio dibásico	1.0 g Fosfato de potasio dibásico
0.6 g Fosfato de potasio monobásico	0.6 g Fosfato de potasio monobásico
2.0 g Cloruro de sodio	2.0 g Cloruro de sodio
20.0 g Peptona de caseína	20.0 g Peptona de caseína
10.0 g Extracto de levadura	10.0 g Extracto de levadura
10.0 g Glucosa	10.0 g Glucosa
1.0 g L-Cisteína	2.0 g L-Cisteína
0.2 g Ácido ascórbico	0.2 g Ácido ascórbico
1.0 ml de Citrato férrico de amonio (28.2 mg/mL)	1.0 ml de Citrato férrico de amonio (28.2 mg/mL)

*Cantidades calculadas para un volumen final de 880 mL. pH= 6.8 (utilizar NaOH 1N).

**Cantidades calculadas para un volumen final de 880 mL. pH= 7.0-7.1 (Utilizar NaOH 1N).

6.2.3. Ensayo de susceptibilidad *in vitro*

Las pruebas *in vitro* contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se llevaron a cabo utilizando un método descrito previamente [74]. Se preparó un stock de cada compuesto a concentración de 10 mg/mL utilizando DMSO y a partir de éstos se realizaron diluciones a concentraciones 0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL utilizando el medio de cultivo correspondiente para cada protozoario. Se utilizaron como compuestos de referencia **ABZ**, **MTZ** y **NTZ**, para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármaco empleando DMSO. A cada tubo de concentración distinta del compuesto a probar se inocularon 6×10^3 trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, para el caso de *G. intestinalis* se inocularon 5×10^4 trofozoítos. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Pasado este tiempo se tomaron 50 µL de cada tubo, se agregaron a tubos con 950 µL de medio fresco y se incubaron nuevamente a las mismas condiciones.

Finalmente los protozoarios se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de trofozoítos comparado con los tubos control. El porcentaje de inhibición calculado se transformó en unidades probit, las cuales se graficaron contra las concentraciones en unidades logarítmicas; la mejor línea recta se determinó por análisis de regresión lineal y se calcularon los valores concentración inhibitoria 50% (CI₅₀). Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos tres veces

6.3. Análisis del panorama de actividad (*activity landscape*) giardicida, amebicida y tricomonocida de derivados del bencimidazol

Se realizó un análisis del panorama de la actividad antiprotozoaria de una serie de carboxamidas bencimidazólicas recientemente sintetizadas, cuyos valores de actividad antiprotozoaria resultaron muy buenos en la mayoría de los casos, una base de 91 compuestos derivados del bencimidazol y una serie de híbridos nitazoxanida-*N*-metilbencimidazoles. Este estudio se enfocó en la identificación de compuestos selectivos.

6.3.1. Base de datos

Para este análisis quimioinformático se comparó una serie de 12 carboxamidas bencimidazólicas con actividades contra los tres protozoarios (**Figura 14 y Tabla 2**) con una base de 91 compuestos derivados del bencimidazol con actividades contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis* y de manera adicional con una serie de 13 híbridos nitazoxanida-*N*-metilbencimidazoles con actividad contra los tres protozoarios de interés. Todos los compuestos se evaluaron bajo las mismas condiciones en el laboratorio de parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, perteneciente al Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez-Mulia. Los valores de actividad en pCl₅₀ (-log Cl₅₀), la estructura química y la referencia bibliográfica de los compuestos se reportan en el **Apéndice A**.

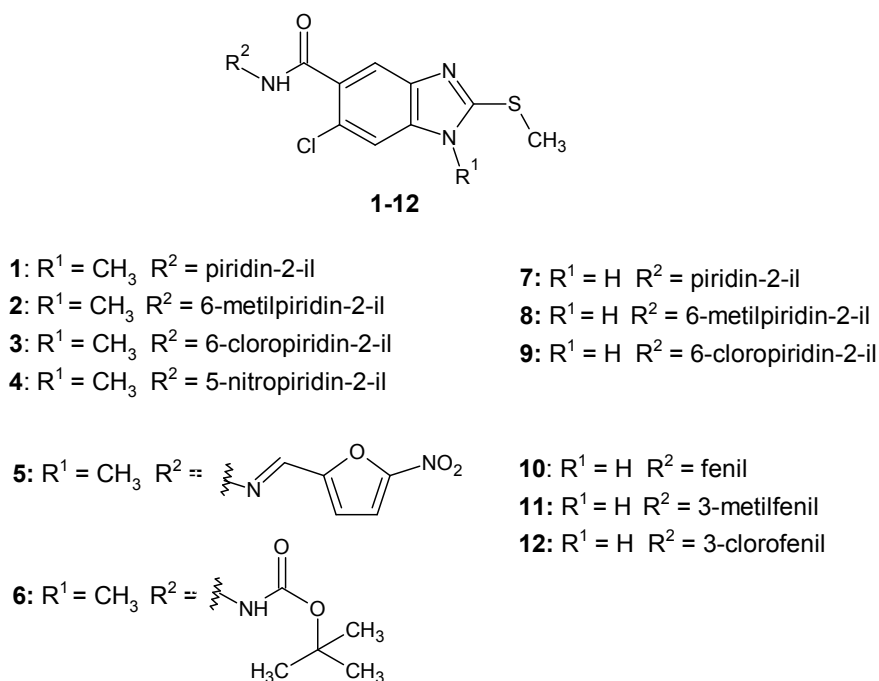


Figura 14. Serie de carboxamidas bencimidazólicas utilizadas en el estudio SAR.

Tabla 2. Actividad antiprotozoaria de las carboxamidas bencimidazólicas utilizadas en el estudio SAR

Compuesto	<i>G. intestinalis</i> CI ₅₀ (μM)	<i>T. vaginalis</i> CI ₅₀ (μM)	<i>E. histolytica</i> CI ₅₀ (μM)
1	0.3455 ± 0.0170	0.0120 ± 0.0050	0.0345 ± 0.0021
2	0.0158 ± 0.0020	0.0288 ± 0.0041	0.0418 ± 0.0061
3	0.0122 ± 0.0058	0.3676 ± 0.0019	0.0408 ± 0.0039
4	0.0079 ± 0.0037	0.0410 ± 0.0019	0.0092 ± 0.0019
5	0.0566 ± 0.0012	0.0283 ± 0.0019	0.0485 ± 0.0038
6	0.0292 ± 0.0018	0.0132 ± 0.0018	0.0266 ± 0.0018
7	0.0770 ± 0.0019	0.0676 ± 0.0019	0.0440 ± 0.0012
8	0.1353 ± 0.0026	0.1114 ± 0.0019	0.0813 ± 0.0011
9	0.4545 ± 0.0018	0.1278 ± 0.0022	0.0369 ± 0.0022
10	0.0725 ± 0.0019	0.1199 ± 0.0028	0.0520 ± 0.0033
11	0.2501 ± 0.0013	0.5153 ± 0.0034	0.1205 ± 0.0024
12	1.1100 ± 0.0014	0.1620 ± 0.0018	0.0510 ± 0.0014
ABZ	0.0370 ± 0.0030	1.5905 ± 0.0113	56.5334 ± 18.8445
MTZ	1.2260 ± 0.1250	0.2360 ± 0.0160	0.3798 ± 0.1461

6.3.2. Análisis del panorama de actividad (*activity landscape*)

Se evaluó el panorama de actividad antiprotozoaria de la serie de 12 carboxamidas bencimidazólicas comparándola con la base de 104 compuestos del bencimidazol, para ello se generó un mapa DAD graficando la diferencia de actividad contra *G. intestinalis* contra la diferencia de actividad contra *T. vaginalis*. Por otra parte se generó un mapa TAD comparando la serie de 12 carboxamidas bencimidazólicas con la serie de híbridos nitazoxanida-*N*-metilbencimidazoles graficando las diferencias de actividad contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Todos los mapas se construyeron con el programa Tableau Public v8.1[75].

6.3.2.1. Similitud estructural

Para cada molécula se calcularon las siguientes representaciones moleculares implementadas en el programa en Molecular Operating Environment (MOE), (Montreal, Canadá) [76]: Molecular Access System (MACCS) keys (166-bits); pharmacophore atom triangle (piDAPH3); y typed graph distance (TGD). Para estas representaciones se utilizó la conformación de mínima energía calculada con el campo de fuerza MMFF implementado en el módulo LigPrep 2.8 [77] del programa Maestro 9.6 de Schrödinger [78].

Se empleó el coeficiente de Tanimoto para calcular la similitud entre los compuestos [79-80].

6.3.3. Mapa DAD

El mapa se construyó al graficar las diferencias pareadas de actividad en pCl_{50} de *G. intestinalis* contra *T. vaginalis* (6670 pares). La diferencia de actividad (ΔpCl_{50}) se calculó como la diferencia de actividad que existe entre cada par de moléculas, como se muestra en la siguiente expresión:

$$\Delta pCl_{50}(P)_{ij} = pCl_{50}(P)_i - pCl_{50}(P)_j$$

Donde $pCl_{50}(P)_i$ y $pCl_{50}(P)_j$ son las actividades de la i -ésima y j -ésima molécula contra uno de los parásitos (P). Los mapas se dividieron en cinco regiones (Z1-Z5) utilizando como límite una unidad logarítmica ($-1 \leq \Delta pCl_{50} \leq 1$) en ambos ejes del mapa. Cabe señalar que ΔpCl_{50} puede tener valores positivos o negativos que proporcionan información sobre la direccionalidad de la SAR. Los mapas DAD son capaces de diferenciar pares de moléculas donde el cambio estructural aumenta la actividad para un parásito pero disminuye la actividad para el otro.

6.3.4. Mapa TAD-2D

Este mapa se construyó graficando la diferencia de actividad de *G. intestinalis* en el eje Y, la diferencia de actividad de *T. vaginalis* en el eje X y se empleó un código de colores para representar la diferencia de actividad de *E. histolytica* obteniendo un total de 2211 puntos graficados.

Posteriormente se removieron del mapa los puntos que representaron pares de compuestos con menos de una unidad logarítmica en la diferencia de actividad de *E. histolytica* con el objetivo de identificar solamente a los pares de compuestos más relevantes (498 pares). Finalmente se refinó aún más el mapa retirando los pares de compuestos que tuvieran más de dos cambios en los sustituyentes del núcleo del bencimidazol, resultando en 74 pares graficados en el mapa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

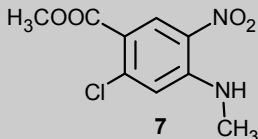
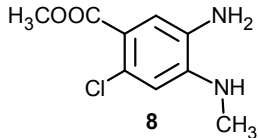
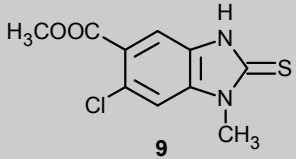
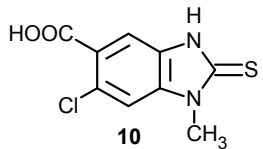
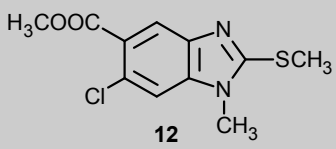
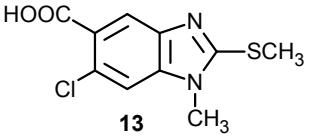
7.1. Obtención de la serie de carboxamidas bencimidazólicas (LFC)

7.1.1. Síntesis de los intermediarios 2-10 y 12-13

Los intermediarios se obtuvieron como sólidos puros con puntos de fusión definidos. En su mayoría se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En la **Tabla 3** se muestran los rendimientos y constantes físicas de los intermediarios.

Tabla 3. Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios 2-10 y 12

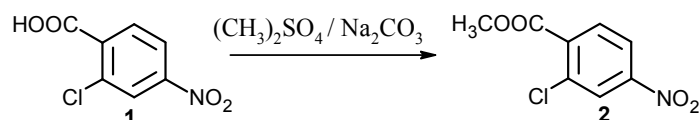
Compuesto	Rendimiento (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Punto de fusión (°C)	R _f (Sistema)
2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo <chem>COC(=O)c1cc(Cl)cc([N+](=O)[O-])c1</chem> 2	99	Metanol	76.0-76.5	0.63 (I)
4-amino-2-clorobenzoato de metilo <chem>COC(=O)c1cc(N)cc(Cl)c1</chem> 3	95	Metanol/Agua	108.5-109.5	0.50 (I)
4-(acetilamino)-2-clorobenzoato de metilo <chem>COC(=O)c1cc(NC(=O)C)cc(Cl)c1</chem> 4	92	Tolueno	114.8-115.4	0.38 (I)
4-(acetilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo <chem>COC(=O)c1cc(NC(=O)C)cc(Cl)c1[N+](=O)[O-]</chem> 5	83	Metanol	141.9-142.7	0.72 (I)
4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo <chem>COC(=O)c1cc(NC(=O)C)cc(Cl)c1[N+](=O)[O-]</chem> 6	89	Etanol	107.3-108.1	0.64 (I)

Compuesto	Rendimiento	Disolvente para recristalización	Punto de fusión	R _f (Sistema)
<p>2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo</p>  <p>7</p>	92	MeOH	191.1-192.5	0.73 (I)
<p>5-amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo</p>  <p>8</p>	78	Nd*	Nd*	0.48 (I)
<p>6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo</p>  <p>9</p>	64	MeOH/DMF	237.6-238.9	0.53 (III)
<p>Ácido-6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico</p>  <p>10</p>	86	MeOH/DMF	308.5-309.1	0.20 (III)
<p>6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo</p>  <p>12</p>	88	EtOH	115.8-117.1	0.71(III)
<p>Ácido-6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico</p>  <p>13</p>	94	MeOH	301.3-303.2	0.38(III)

Sistema (I) Cloroformo/Metanol 95:5; Sistema (III) Cloroformo/Metanol 85:15. Nd* No determinado

Los intermediarios **2-10** y **12-13** se obtuvieron con rendimientos aceptables. La secuencia sintética comenzó con la esterificación del ácido 2-cloro-nitrobenzoico, mediante una reacción de sustitución nucleofílica utilizando sulfato de dimetilo como agente alquilante, en medio básico y utilizando acetona como disolvente como se muestra en el **Esquema 5**. La reacción se llevó a cabo con conversión total de la materia prima con rendimientos altos.

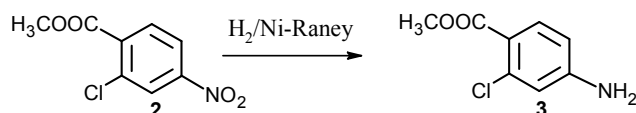
Esquema 5. Esterificación del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico



La identificación estructural del éster **2** se realizó por espectroscopia, y en el espectro de IR (**Espectro 1**) se observó la pérdida de la banda ancha de -OH del grupo carboxilo, y en su lugar se identificó la banda del estiramiento del enlace de -OCH₃ de éster a 1293cm⁻¹. En el espectro de RMN ¹H (**Espectro 2**) se identificó el metilo del éster por la presencia de una señal simple que integró para 3H a 3.94 ppm. Para el espectro de RMN ¹³C (**Espectro 3**) se observó una señal a 53.65 ppm correspondiente al metilo del éster. Por medio de espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto con *m/z* de 215 (25 %), así como el fragmento de *m/z* 184 el cual correspondió a la pérdida de 32 u.m.a. correspondiente al metoxilo del grupo éster que originó el pico base del espectro (**Espectro 4**).

La reducción catalítica del grupo nitro del compuesto **2** generó el 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**) (**Esquema 6**). Esta reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, se decidió utilizar Ni/Raney como catalizador, ya que por experiencias previas en nuestro laboratorio, el uso de Pd/Carbono como catalizador promueve la eliminación de halógenos en la molécula, como el del cloro presente en la posición 2.

Esquema 6. Obtención de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**)

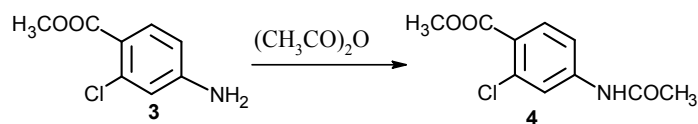


En el espectro de IR (**Espectro 5**) se observaron dos picos en 3426 y 3336 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones de los enlaces de hidrógeno del -NH₂ presente en la molécula. El espectro de RMN ¹H (**Espectro 6**) del compuesto **3** mostró una señal amplia que integró para 2H correspondiente al grupo -NH₂ en 6.14 ppm; además se comprobó con intercambio los hidrógenos ácidos por deuterio eliminando las

señales antes vistas. Con espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto con m/z de 185 (55%), acompañada del ion de m/z 187 (18%) correspondiente a la contribución isotópica del cloro; también se observó el fragmento de m/z de 154 correspondiente a la pérdida del $-OCH_3$ (**Espectro 8**).

El siguiente paso fue la acetilación del compuesto **3** con anhídrido acético para dar el 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**), con la finalidad de proteger el grupo amino antes de realizar la nitración (**Esquema 7**).

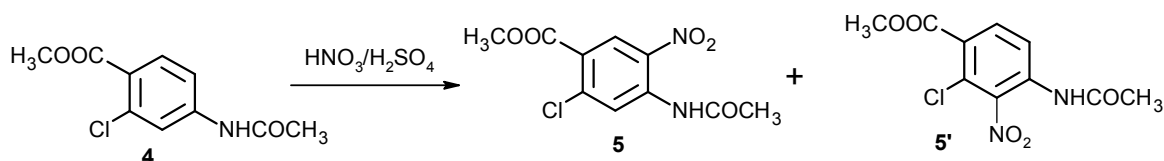
Esquema 7. Obtención de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**)



En el espectro de IR (**Espectro 9**) se observaron las bandas características del carbonilo de amida en 1587 cm^{-1} y de éster a 1722 cm^{-1} . En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 10**) se observó una señal simple en 2.08 ppm que integró para 3H correspondientes al metilo del acetilo y una señal característica del N-H de la acetanilida en 10.390 ppm que integró para un hidrogeno, esta señal desapareció cuando se hizo intercambio con D_2O . En el caso del espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 11**) se observó una señal a 24.65 ppm correspondiente al metilo del acetamido. El espectro de masas confirmó la masa molecular del compuesto al observarse el ion de m/z de 227 (22 %); los iones de m/z 185 y 154, mostraron la pérdida del acetilo y el $-OCH_3$, respectivamente siendo éste último el pico base del espectro (**Espectro 12**).

Posteriormente, el compuesto **4** se nitró con mezcla sulfonítrica para obtener el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**) (**Esquema 8**). La formación del ion nitronio se realizó *in situ* por la adición del ácido nítrico a la solución fría de **4** en H_2SO_4 , la reacción se llevó a cabo entre 0 y $5\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura con la finalidad de disminuir la formación del isómero nitrado en la posición 3, el cual se eliminó con lavados de MeOH frío al producto crudo de la reacción.

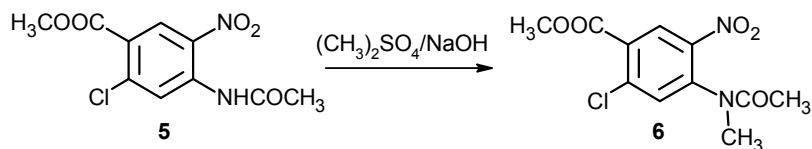
Esquema 8. Obtención de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**)



En el espectro de IR (**Espectro 13**) se observaron las bandas características a los estiramientos asimétricos y simétricos del grupo nitro en 1567 y 1335 cm^{-1} , respectivamente. El espectro de RMN ^1H (**Espectro 14**) mostró sólo dos señales simples pertenecientes a los hidrógenos aromáticos H-3 y H-6 a 8.08 y 8.46 ppm respectivamente. Por otro lado, la espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto al observarse los iones de m/z de 272 (12 %), 274 (6 %) y el ion de m/z 226 correspondió a la pérdida de 46 u, correspondiente al grupo NO_2 (**Espectro 16**). Los iones más abundantes, 230 y 199, se debieron a la pérdida del grupo acetilo y posteriormente a la pérdida del grupo metoxilo.

La metilación de **5** para la obtención del compuesto 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) se logró mediante el empleo de sulfato de dimetilo en medio básico utilizando diglima como disolvente (**Esquema 9**). El rango de temperatura óptimo para la reacción fue de 10-15 $^\circ\text{C}$ ya que a mayores temperaturas se observó la generación de productos secundarios debido a la hidrólisis del éster y del acetamido. La adición de la solución de NaOH fue muy lenta para tener mayor control de la temperatura.

Esquema 9. Obtención de 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**)

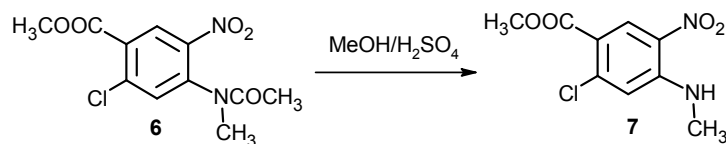


En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 18**) se observaron señales duplicadas debido a la presencia de dos rotámeros de la molécula debido a que la energía de interconversión entre ambos es alta. La señal en 3.91 ppm no se duplica, aunque integra para 6 hidrógenos, correspondientes a los metilos del éster de cada isómero, debido a que el efecto del grupo nitro no afecta el desplazamiento de los mismos. En este sentido, los metilos restantes si poseen diferencias magnéticas debido a la rotación del grupo acetilo y a su cercanía con el grupo nitro por lo que su desplazamiento se ve afectado, de tal forma, que se obtienen 4 señales diferentes a frecuencias bajas que integran para 3H. Cabe mencionar que el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 19**) también presentó duplicidad de señales. En el espectro de masas (**Espectro 20**) se observa el fragmento de m/z 244 (100 %) correspondiente a la pérdida del acetilo

La hidrólisis del grupo acetilo del compuesto **6** se realizó en medio ácido en presencia de metanol (**Esquema 10**), ésta fue la metodología con mayores rendimientos debido a que al realizarla en medio básico

utilizando NaOH se observó la hidrólisis de éster, inclusive a baja temperatura. De esta manera se obtuvo al compuesto 4-(metilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (7).

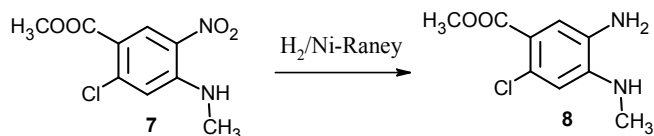
Esquema 10. Obtención de 4-(metilamino)-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (7)



En el espectro de IR (**Espectro 21**) se observó la banda característica de enlace N-H en 3389 cm⁻¹, así como la banda correspondiente al carbonilo del éster en 1732 cm⁻¹. En el espectro de RMN ¹H (**Espectro 22**) se observó una señal cuádruple correspondiente al hidrógeno enlazado al nitrógeno en 8.59 ppm, que se acopla con los hidrógenos del grupo metilo, confirmando la hidrólisis del grupo acetilo; también se observó una señal en 3.81 ppm que integra para 3H correspondiente al metilo del éster. En el espectro de RMN ¹³C (**Espectro 23**) se apreció una sola señal a frecuencias altas, correspondiente al carbonilo del éster, con lo que se corroboró que se conservó dicho grupo funcional. El espectro de masas (**Espectro 24**) confirmó la estructura de la molécula con una *m/z* 244 correspondiente al peso de la molécula así como el fragmento con *m/z* 213 debido a la pérdida del éster.

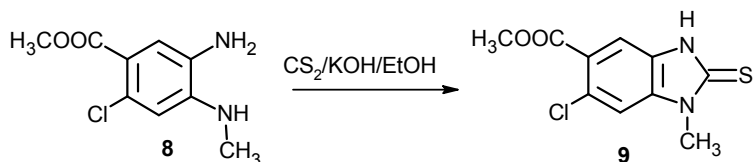
Posteriormente, el grupo nitro se redujo catalíticamente con hidrógeno y con Ni-Raney para obtener **8**, el cual debido a su poca estabilidad se llevó inmediatamente a la reacción posterior (**Esquema 11**).

Esquema 11. Obtención de 5-amino-2-cloro-4-(metilamino)benzoato de metilo (8)



Posteriormente la *o*-fenilendiamina **8** se sometió a la reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio básico obteniendo el 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**) (**Esquema 12**). Primeramente se formó el xantato de etilo *in situ* adicionando disulfuro de carbono a temperatura ambiente a la solución etanólica básica de la diamina. Posterior a la adición de los reactivos la reacción se mantuvo una temperatura de reacción por debajo de 65 °C y pH 9 con la finalidad de evitar la hidrólisis del éster.

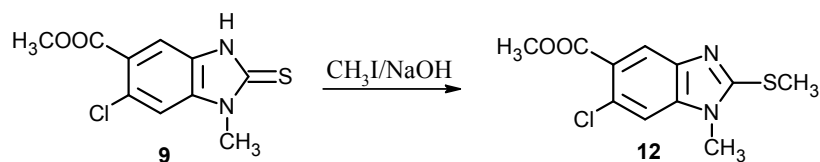
Esquema 12. Obtención de 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**)



En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 26**) se apreció la señal en 13.15 ppm correspondiente al hidrógeno enlazado al nitrógeno del bencimidazol ya que el equilibrio se encuentra desplazado a la forma de tiocarbonilo y no de tior. Para confirmar la ciclocondensación se recurrió al espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 27**) donde se observaron dos señales a frecuencias altas, 165.5 ppm y 171.7, correspondientes al carbono del carbonilo y al enlace C=S, respectivamente. En el espectro de masas (**Espectro 28**) se observó el pico base, correspondiente al ion molecular con m/z 256; además de la contribución isotópica del cloro. Aunado a lo anterior, el pico de m/z 225 correspondió al fragmento que había sufrido la pérdida del grupo metoxilo del éster

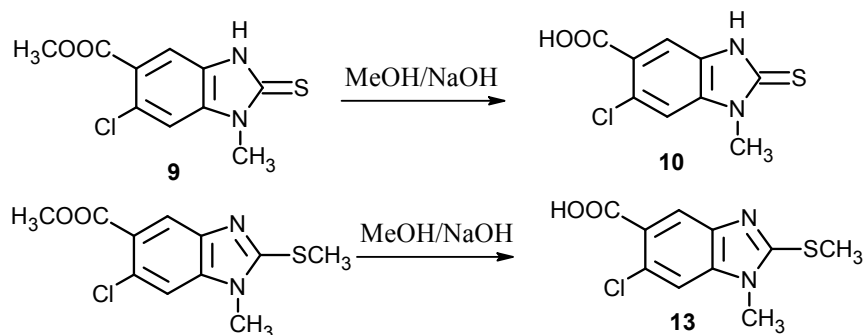
El compuesto **9** se sometió a una reacción de *S*-metilación con yoduro de metilo en acetona para obtener al compuesto 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol carboxilato de metilo (**12**) (**Esquema 13**).

Esquema 13. Obtención de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol carboxilato de metilo (**12**)



El espectro de RMN ^1H (**Espectro 30**) se observaron señales simples en 2.76, 3.71 y 3.88, que integran para 3H correspondientes a los metilos de la molécula. El espectro de masas (**Espectro 32**) mostró el ion molecular con m/z de 270. Para el espectro de RMN ^{13}C se observó la aparición de una señal a 14.59 ppm que corresponde al metilo enlazado al azufre.

Posteriormente se realizó la hidrólisis del grupo éster de los compuestos **9** y **12** bajo condiciones alcalinas en metanol y a temperatura de reflujo para obtener los compuestos ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**10**) y ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**13**) respectivamente (**Esquema 14**). Para el compuesto **10** el espectro de IR (**Espectro 29**) se muestra la banda ancha característica del ácido carboxílico alrededor de 3000 cm^{-1}

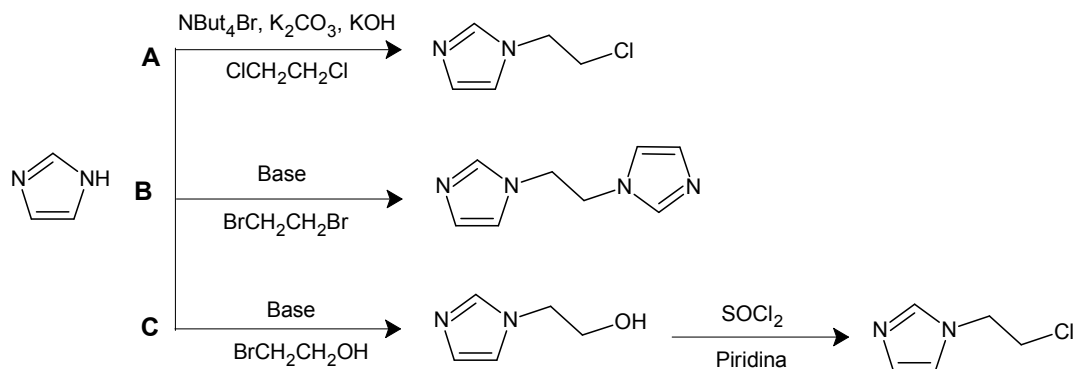
Esquema 14. Obtención de los ácidos carboxílicos **10** y **13**

Para el espectro de RMN ^1H (**Espectro 30**) muestra una señal simple a 3.62 ppm que corresponde al metilo enlazado al nitrógeno y a 13.04 ppm se observa una señal amplia que integra para 2H que corresponden al del ácido carboxílico y al hidrógeno del equilibrio tiol-tiocarbonilo. En el caso del compuesto **13** el espectro de RMN ^1H (**Espectro 38**) manifestó la presencia de una señal en 13.03 ppm perteneciente al hidrógeno del ácido carboxílico; también se observó la presencia de solo dos señales simples que integraron para tres hidrógenos correspondientes a los metilos enlazados al nitrógeno y al azufre.

7.1.2. Síntesis del intermediario 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**)

Para obtener el intermediario 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**), se realizó una reacción de sustitución nucleofílica entre el imidazol y 1,2-dicloroetano en medio básico como se muestra en el **Esquema 15**. La reacción se llevó a cabo en un sistema de dos fases, por lo que fue necesario utilizar un catalizador de transferencia de fases, en este caso el bromuro de tetrabutilamonio. Esta sal de amonio tiene un grupo polar y cadenas laterales hidrocarbonadas, las cuales permiten que a pesar de la carga del nitrógeno pueda ser soluble en la fase orgánica y con esto que una concentración de iones hidroxilo pueda atravesar a la fase orgánica y llevarse a cabo las reacciones ácido-base y sustitución nucleofílica. A pesar del gran avance que este catalizador representa tiene ciertas limitaciones debido a la presencia de agua en la reacción debido al KOH, tanto por sus características higroscópicas como por la formada en la reacción, esto puede causar reacciones hidrolíticas indeseadas o la transformación de la sal de amonio por eliminación de Hoffman, es por eso que se agrega también a la reacción el K_2CO_3 , reactivo que ayudara a retener el agua y evitar estos subproductos.

El intermediario 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**) puede sintetizarse mediante distintas metodologías como se muestra en el **Esquema 15**.

Esquema 15. Posibles rutas sintéticas para la obtención de 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (**11**)

La ruta sintética **A** fue utilizada en este trabajo, ya que como se observa en el **Esquema 5** la ruta **B** favorece la formación del 1,1'-etano-1,2-diilbis(1*H*-imidazol) y la ruta **C** involucra dos pasos lo que afecta el rendimiento. Con la ruta sintética **A** se obtuvo el intermediario de interés; sin embargo, se generaron dos productos más: el 1,1'-etano-1,2-diilbis(1*H*-imidazol) y el producto de eliminación 1-vinil-1*H*-imidazol. Para eliminar estos productos secundarios se implementó una metodología de purificación de varios pasos. El producto crudo de reacción se agitó en hexano para retirar el producto de eliminación; posteriormente se realizaron lavados con agua para extraer la materia prima (imidazol). Finalmente se llevó a cabo una destilación de bulbo a bulbo mediante un sistema de destilación Kugelrohr. Cabe mencionar que la metodología de purificación continua estudiándose con el objetivo de estandarizar el método y establecer condiciones.

7.1.3. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1a-4a

Para obtener las carboxamidas **LFC1a**, **LFC2a**, **LFC3a** y **LFC4a** se siguió la ruta sintética planteada en el **Esquema 1**. Primeramente se activó el ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**12**) haciéndolo reaccionar con el agente acoplante anhídrido propil fosfónico T3P® (**Figura 15**) en acetonitrilo utilizando trietilamina como base y las anilinas correspondientes. Para llevar a cabo esta reacción se probaron diferentes condiciones las cuales se muestran en la **Tabla 4**.

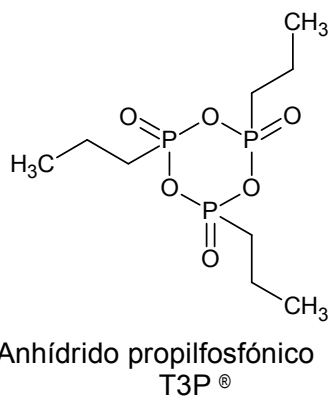


Figura 15. Estructura química del agente acoplante T3P®.

Tabla 4. Condiciones de reacción probadas para la obtención de las carboxamidas LFC1a-4a

Disolvente	Base	Rendimiento promedio
CH ₂ Cl ₂	Trietilamina	10 %
DMF	Trietilamina	9 %
THF	Trietilamina	9. %
Acetonitrilo	Trietilamina	27 %
Acetonitrilo/DMF	Trietilamina	5 %
CH ₂ Cl ₂	<i>N</i> -metilmorfolina	9 %
DMF	<i>N</i> -metilmorfolina	5 %
THF	<i>N</i> -metilmorfolina	5 %
Acetonitrilo	<i>N</i> -metilmorfolina	25 %
Acetonitrilo/DMF	<i>N</i> -metilmorfolina	6 %

Las condiciones óptimas que resultaron en mejores rendimientos para llevar a cabo la formación de las amidas fueron utilizando acetonitrilo como disolvente y trietilamina como base. El factor fundamental para llevar a cabo esta reacción fue la solubilidad de las materias primas y productos en este disolvente.

En la **Tabla 5** se muestran los rendimientos y constantes físicas de las amidas de la serie **LFC1a-4a**.

Tabla 5. Rendimientos y constantes físicas de las amidas de la serie LFC1a-4a

Compuesto	Rendimiento (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Punto de fusión (°C)	R _f (Sistema)*
LFC1a	44.6	Tolueno	294.8-295.4	0.64 (II)
LFC2a	38.5	Tolueno	331.3-332.4	0.62 (II)
LFC3a	34.7	Tolueno	291.3-292.7	0.65 (II)
LFC4a	28.7	Tolueno	301.6-302.8	0.68 (II)

Sistema (II) Cloroformo/Metanol 90:10

En general los rendimientos de estas reacciones no fueron altos, debido a que se tiene una competencia de nucleófilos, entre la anilina y el azufre perteneciente al bencimidazol. Debido a lo anterior se probó proteger el grupo mercapto del ácido bencimidazólico con carbobenciloxi y cloruro de benzoilo como se muestra en la **Figura 16**.

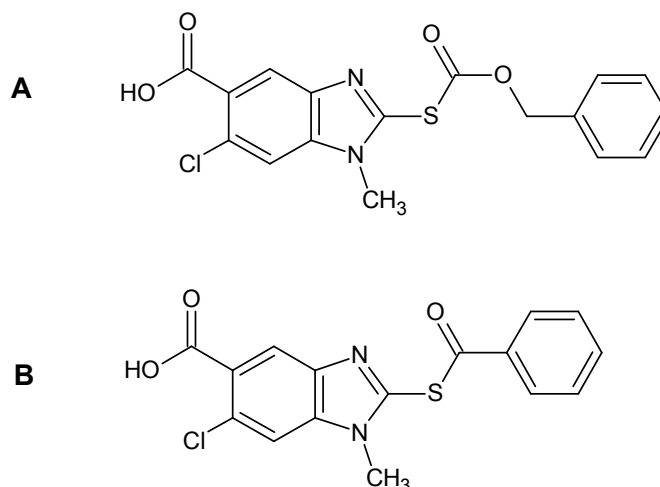


Figura 16. (A) Grupo mercapto del bencimidazol protegido con CBZ. (B) Grupo mercapto del bencimidazol protegido con cloruro de benzoilo.

Esta estrategia no tuvo resultados favorables, ya que la reacción de protección del grupo mercapto no se llevó a cabo completamente observándose un porcentaje de conversión del 40-50 %. A pesar de esto se intentó la desprotección para observar el comportamiento de la reacción, esto se hizo con NaOH en acetonitrilo a temperatura de reflujo por 12 horas observándose un 40 % aproximado de conversión. A estas

condiciones la amida bencimidazólica formada sería poco estable por lo que esta estrategia de protección del grupo mercapto fue desechada y se procedió a utilizar el mercaptobencimidazol sin proteger para la formación de las amidas correspondientes.

7.1.4. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1b-4b

La preparación de las carboxamidas finales **LFC1b**, **LFC2b**, **LFC3b** y **LFC4b** se llevó a cabo siguiendo la ruta sintética mostrada en el **Esquema 2**. Primeramente se activó el ácido carboxílico **13**, formando el cloruro del ácido correspondiente a temperatura de 40 °C, para ello se utilizó un exceso de cloruro de tionilo el cual se utilizó también como disolvente. Una vez formado el cloruro de ácido éste se hizo reaccionar por separado con cada una de las cuatro diferentes aminas (4-cloroanilina, anilina, 2-metilánilina y 3,4-dicloroanilina), mediante una reacción de sustitución nucleofílica en carbono sp^2 .

Para cada reacción se utilizó acetonitrilo como disolvente, trietilamina como base y a temperatura ambiente. En la **Tabla 6** se muestran los rendimientos y constantes físicas para cada una de las amidas sintetizadas.

Tabla 6. Rendimientos y constantes físicas de las serie de amidas **LFC1b-4b**

Compuesto	Rendimiento (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Punto de fusión (°C)	Rf (Sistema)*
LFC1b	72.8	Metanol	217.5-218.3	0.85 (II)
LFC2b	70.3	Acetona	212.3-213.8	0.83 (II)
LFC3b	72.6	Metanol	224.7-225.3	0.86 (II)
LFC4b	60.4	Metanol	260.3-261.1	0.88 (II)

Sistema (II) Cloroformo/Metanol 90:10

7.1.4.1. Caracterización mediante RMN 1H de los compuestos de las series **LFC1a-4a** y **LFC1b-4b**

Todos los compuestos de esta serie presentaron señales comunes en RMN 1H debido a que poseen la misma estructura base (**Figura 17**). De manera general todos los compuestos muestran una señal simple alrededor de 3.6 ppm que integra para tres hidrógenos que corresponde al metilo unido al nitrógeno del bencimidazol y en caso de los compuestos de la serie **LFC1b-4b** se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos alrededor de 2.7 ppm, esta señal corresponde al grupo metiltio que se encuentra en la posición 2 del núcleo del bencimidazol. A campo alto se observan dos señales simples que integran para un hidrógeno cada uno, los cuales corresponden a los hidrógenos de las posiciones 4 y 7 del núcleo del

bencimidazol. Las señales correspondientes a los hidrógenos de la amida y el enlazado al nitrógeno del bencimidazol, para el caso de los compuestos de la serie **LFC1a-4a**, se encuentran alrededor de 10 ppm y 13 ppm respectivamente, ambas señales integran para un hidrógeno.

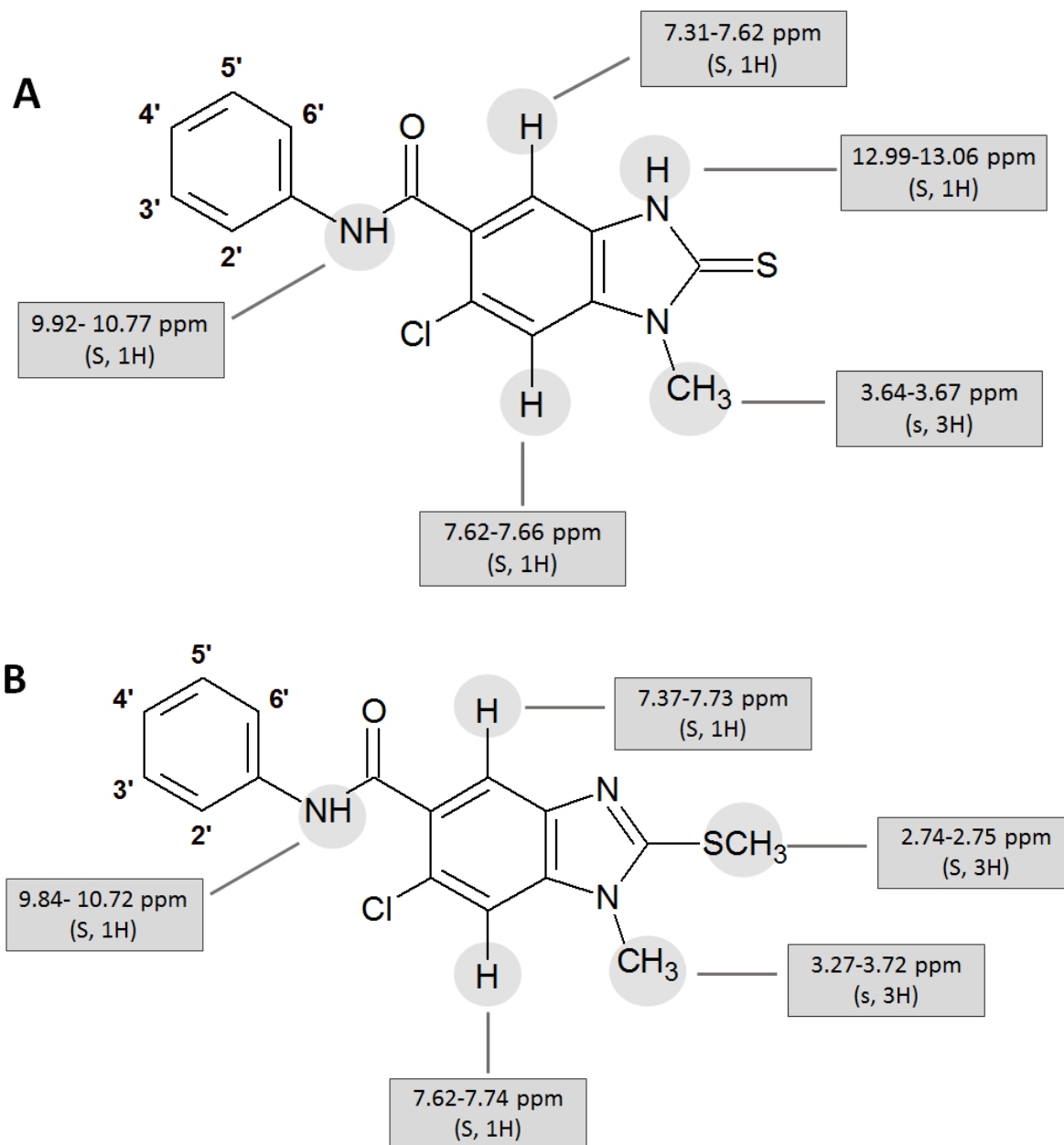
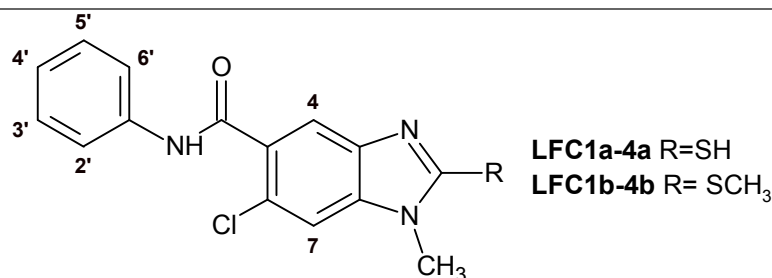


Figura 17. Relación entre las estructuras generales de las carboxamidas finales y sus señales en RMN ¹H observadas. (A) Serie **LFC1a-4a**. (B) Serie **LFC1b-4b**.

Los compuestos de ambas series presentan el mismo tipo de sustituyente fenilo. En la **Tabla 7** se muestran los desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de los hidrógenos 2'-6' correspondientes al sustituyente fenilo de los compuestos de la series **LFC1a-4a** y **LFC1b-4b**.

Tabla 7. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de los hidrógenos 2'-6' de los compuestos de la serie LFC1a-4a y LFC1b-4b



Compuesto	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'
LFC1a	7.72 ppm	7.39 ppm	-----	7.39ppm	7.72 ppm
	J= 8.9 Hz	J= 8.9 Hz	-----	J= 8.9Hz	J= 8.9 Hz
	Señal doble	Señal doble	-----	Señal doble	Señal doble
LFC2a	7.70 ppm	7.33 ppm	7.09 ppm	7.33 ppm	7.70 ppm
	J= 7.9 Hz	J= 7.9 Hz	J= 7.4 Hz	J= 7.9 Hz	J= 7.9 Hz
	Señal doble	Señal triple	Señal triple	Señal triple	Señal doble
LFC3a	-----	7.26 ppm	7.15 ppm	7.21 ppm	7.46 ppm
	-----	J= 7.3 Hz	J= 7.1 Hz	Señal compleja	J= 7.6 Hz
	-----	Señal doble	Señal triple	-----	Señal doble
LFC4a	8.09 ppm	-----	-----	7.66 ppm	7.66 ppm
	J= 2.2 Hz	-----	-----	J= 8.8 Hz	J ₁ = 8.8 Hz
	Señal doble	-----	-----	Señal doble	Señal doble
LFC1b	7.41 ppm	7.78 ppm	-----	7.78 ppm	7.41 ppm
	J= 8.8 Hz	J= 8.8 Hz	-----	J= 8.8 Hz	J= 8.8 Hz
	Señal doble	Señal doble	-----	Señal doble	Señal doble
LFC2b	7.73 ppm	7.35 ppm	7.10 ppm	7.35 ppm	7.73 ppm
	J= 7.9 Hz	J= 7.7 Hz	J= 7.2 Hz	J= 7.7 Hz	J= 7.9 Hz
	Señal doble	Señal triple	Señal triple	Señal triple	Señal doble
LFC3b	-----	7.26 ppm	7.15 ppm	7.22 ppm	7.46 ppm
	-----	J= 7.5 Hz	J= 7.2 Hz	Señal compleja	J= 7.6 Hz
	-----	Señal doble	Señal triple	-----	Señal doble
LFC4b	8.14 ppm	-----	-----	7.66 ppm	7.66 ppm
	J= 2.2 Hz	-----	-----	J= 8.8 Hz	J ₁ = 8.8 J ₂ = 2.2 Hz
	Señal doble	-----	-----	Señal doble	Doble de dobles

7.1.4.2. Caracterización mediante RMN ¹³C de los compuestos de las series LFC1a-4a y LFC1b-4b

Los compuestos de ambas series poseen señales comunes en los espectros de RMN ¹³C. En la serie de compuestos **LFC1a-4a** se observa una señal a campo bajo (170-171 ppm) que corresponde al carbono 2 del anillo del bencimidazol, esta señal concuerda con una unión C=S (tiocarbonilo) ya que de ser

el tiol (C-SH) el desplazamiento químico sería de 154-155 ppm muy cercano al desplazamiento químico del C-10 correspondiente a la unión C=O de la amida (**Figura 18**). Con lo observado se confirma que el tautómero tiocarbonílico es predominante.

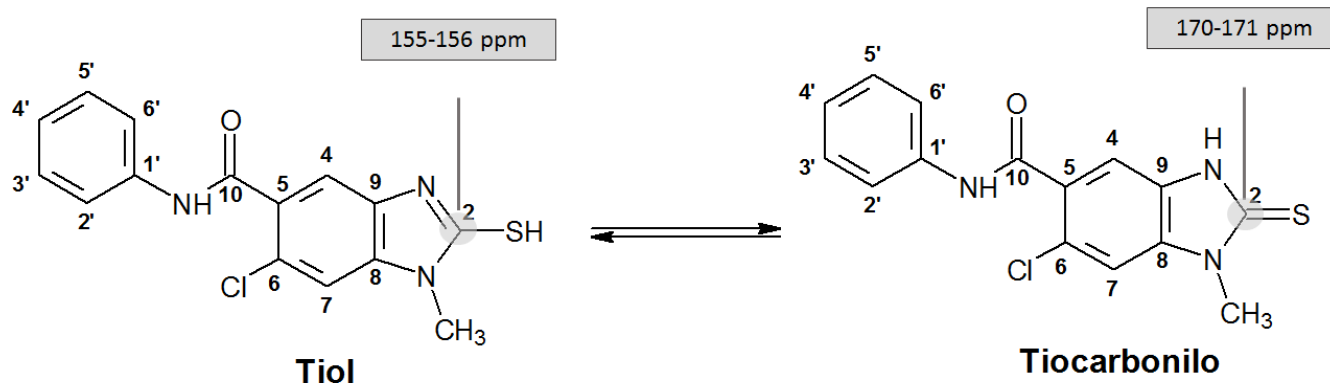


Figura 18. Equilibrio tior-tiocarbonilo y diferencias en el desplazamiento químico del C-2 del núcleo del bencimidazol.

Las señales restantes (C-4 a C-10) del núcleo del bencimidazol se observaron a campo bajo para ambas series con valores de desplazamientos químicos similares, también se observó la señal a campo alto (30 ppm) correspondiente al metilo unido al nitrógeno del bencimidazol y en el caso de los compuestos de la serie **LFC1b-4b** se observa la señal a campo alto (14 ppm) del metilo correspondiente al grupo metililo (**Figura 19**).

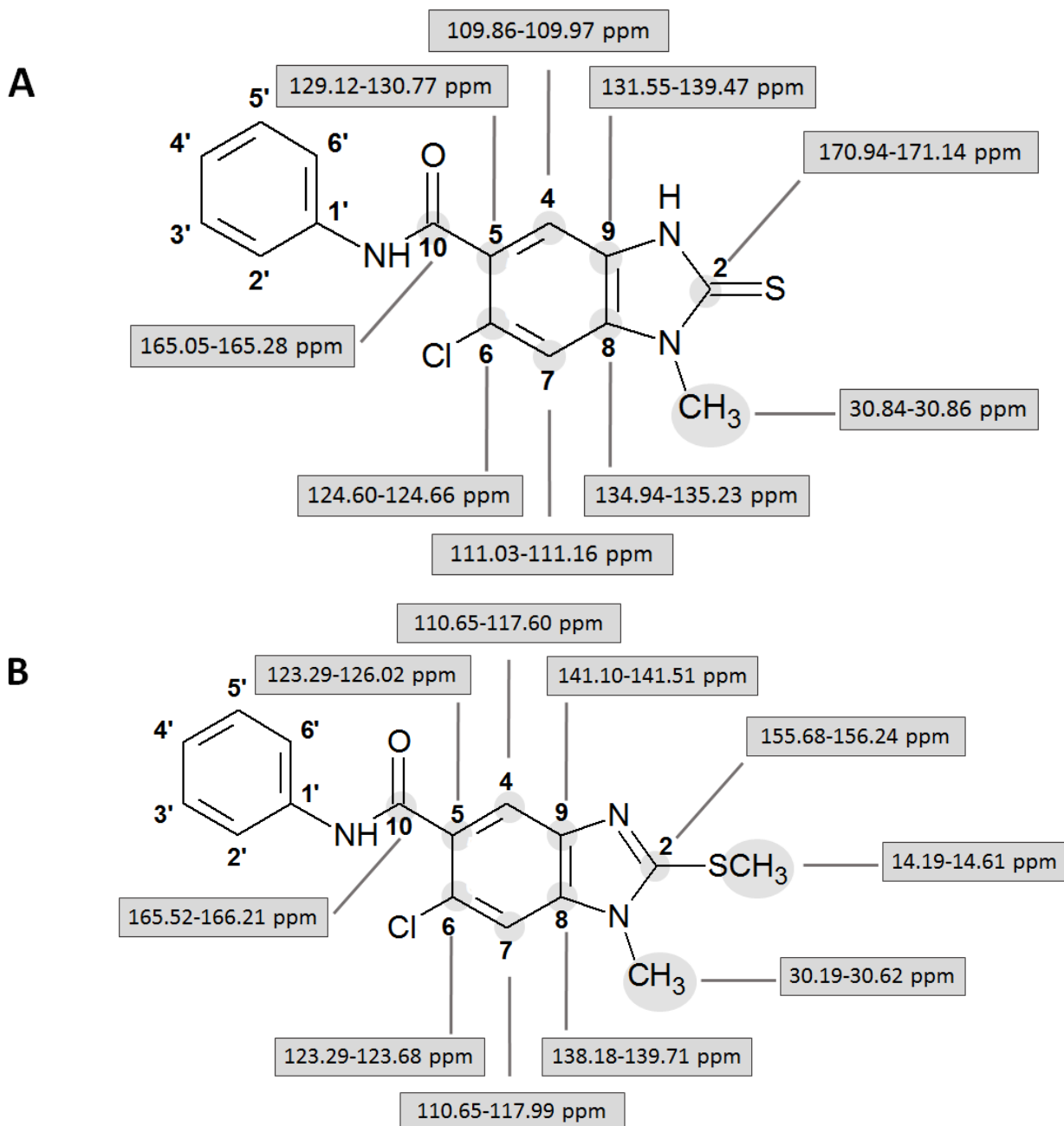
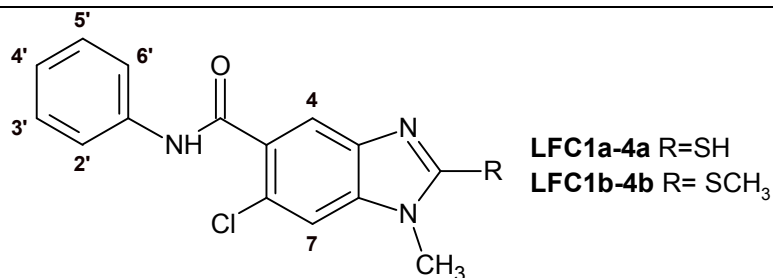


Figura 19. Relación entre las estructuras de las carboxamidas finales y las señales de RMN ^{13}C . (A) Serie LFC1a-4a (B) Serie LFC1b-4b.

En la serie **LFC1b-4b** se observa que la señal correspondiente al C-2 se encuentra presente entre 155.68-156.24 ppm lo que corrobora la presencia mayoritaria del tautómero tiocarbonílico en la serie de carboxamidas **LFC1a-4a**.

Las señales de los carbonos correspondientes al sustituyente fenilo de las carboxamidas de ambas series se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Desplazamientos químicos de los carbonos C-1' a C-2' de las series de carboxamidas **LFC1a-4a** y **LFC1b-4b**



Compuesto	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
LFC1a	131.22 ppm	129.12 ppm	121.59 ppm	127.87 ppm	121.59 ppm	129.12 ppm
LFC2a	131.55 ppm	129.19 ppm	120.05 ppm	124.21 ppm	120.05 ppm	129.19 ppm
LFC3a	131.61 ppm	133.43 ppm	130.81 ppm	126.39 ppm	126.39 ppm	126.44 ppm
LFC4a	131.41 ppm	121.22 ppm	129.75 ppm	125.70 ppm	120.01 ppm	131.19 ppm
LFC1b	129.92 ppm	121.11 ppm	128.66 ppm	127.21 ppm	128.66 ppm	121.11 ppm
LFC2b	130.44 ppm	123.77 ppm	128.86 ppm	123.77 ppm	128.86 ppm	123.77 ppm
LFC3b	133.22 ppm	136.31 ppm	130.55 ppm	126.02 ppm	130.55 ppm	126.16 ppm
LFC4b	131.45 ppm	121.10 ppm	131.15 ppm	129.87 ppm	131.15 ppm	120.01 ppm

La asignación de señales de RMN ¹H y RMN ¹³C se realizó con ayuda de los experimentos de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (2D RMN): Nuclear Overhauser Effect Espectroscopy (NOESY) y Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC).

El experimento NOESY permite encontrar las conectividades entre núcleos que tienen acoplamiento dipolar, es decir aquellos que están vecinos espacialmente. Mediante 2D-NOESY se observa la relación espacial entre C-SH o C-NH y N-CH₃ (A), N-CH₃ y H-7 (B), -NH- y H-2' (C) y finalmente -NH- y H-4 (D) (**Figura 20**). Estas correlaciones permitieron asignar los desplazamientos químicos de los hidrógenos H-4 y H-7 del núcleo del bencimidazol así como también los desplazamientos químicos de H-2' y H-6'. Esta

información no puede obtenerse fácilmente mediante un análisis simple de RMN ^1H por eso la importancia de este experimento 2D.

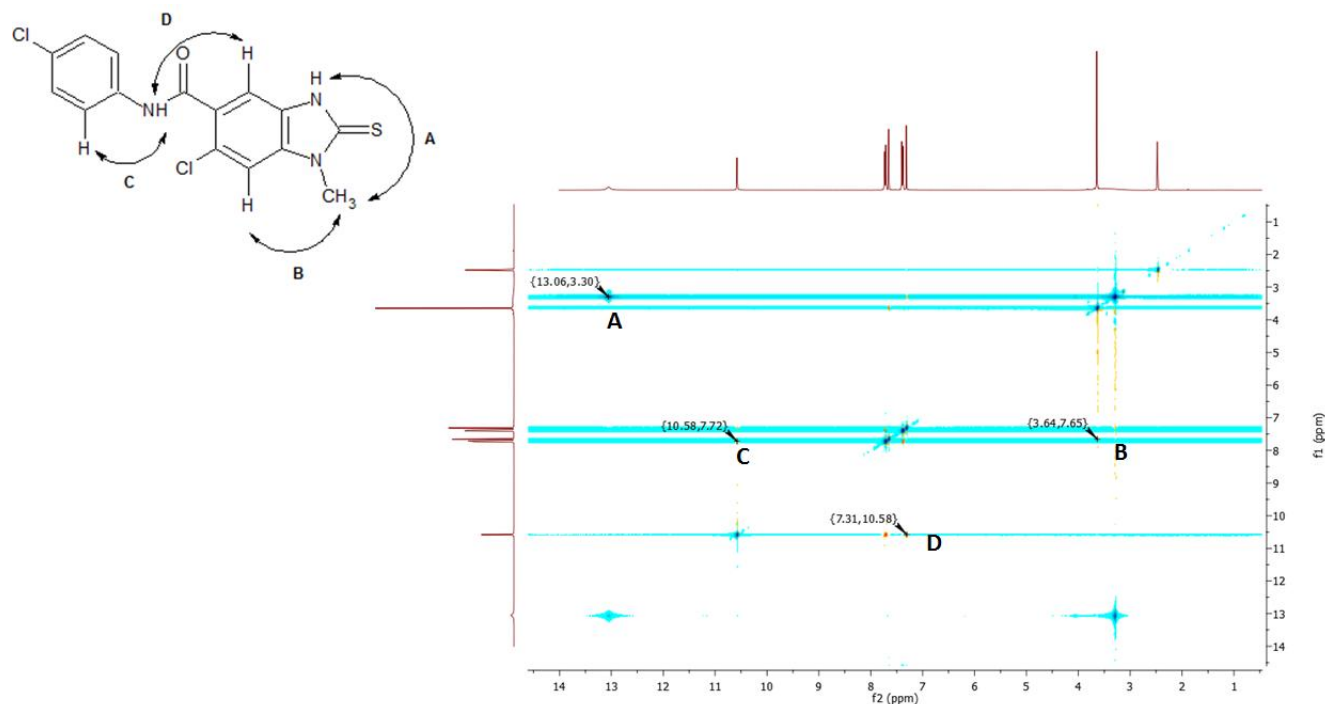


Figura 20. Experimento NOESY en dos dimensiones (2D-NOESY) del compuesto **LFC1a**.

Con los valores de los desplazamientos químicos de H-4, H-7, H-2' y H-6' se asignaron los desplazamientos químicos de los carbonos a los cuales se encuentran enlazados estos hidrógenos. Esto se realizó mediante la interpretación del espectro del experimento en dos dimensiones HSQC (2D-HSQC) el cual permite correlacionar protones y carbonos unidos directamente a través de un enlace. En la **Figura 21** se muestran los valores de los desplazamientos químicos de los hidrógenos pertenecientes al núcleo del bencimidazol y al sustituyente fenilo con sus respectivos valores del desplazamiento químico de los carbonos correspondientes.

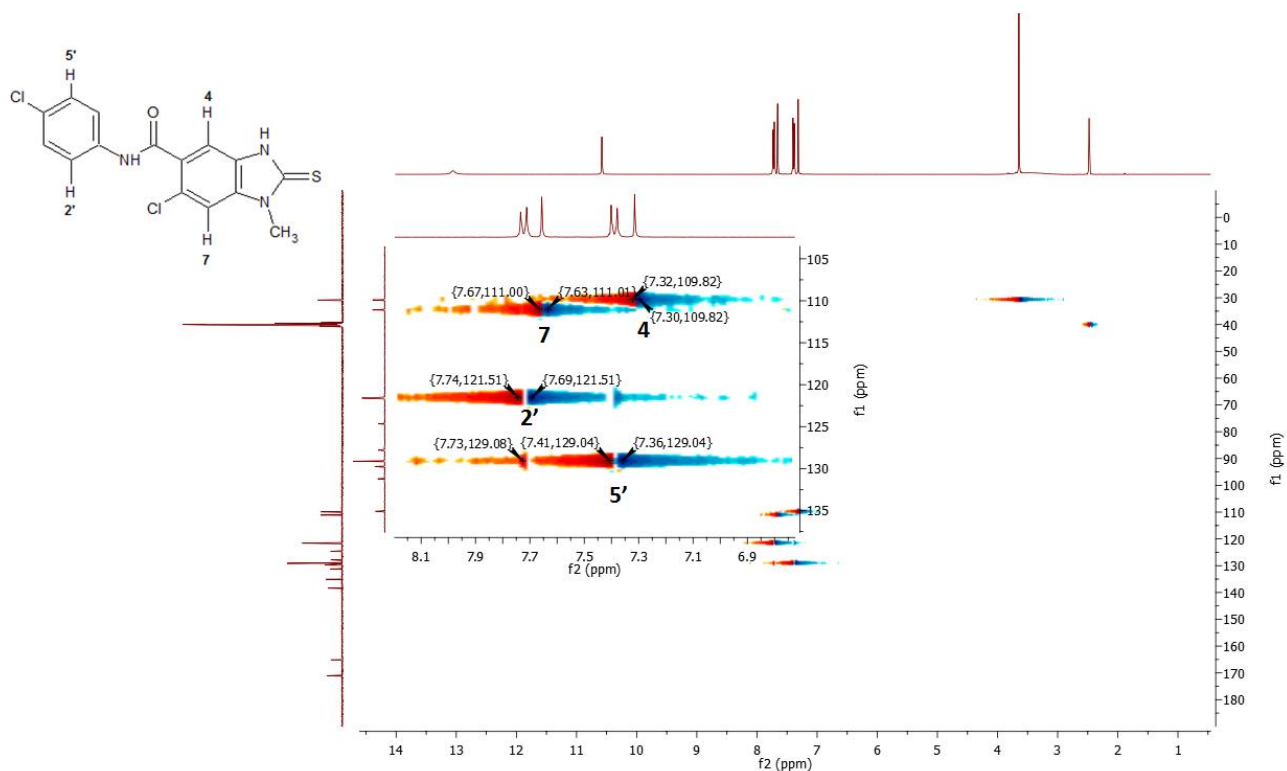


Figura 21. Espectro del experimento en dos dimensiones HSQC (2D-HSQC) del compuesto LFC1a.

7.1.4.3. Espectrometría de masas de los compuestos de las series de carboxamidas LFC1a-4a y LFC1b-4b

El peso molecular de ambas series de carboxamidas sintetizadas se determinó usando espectroscopia de masas. Las moléculas se analizaron utilizando un equipo de Ionización por Electrospray acoplado a un equipo de cromatografía de líquidos (LC/MS-ESI). De manera general los compuestos muestran una abundancia relativa baja y poca fragmentación debido al método de ionización utilizado.

En la mayoría de los casos el ion molecular corresponde al pico base y se observó el fragmento correspondiente al ion acilio (**Figura 22**), aunque su abundancia relativa es muy baja (menor al 5 %).

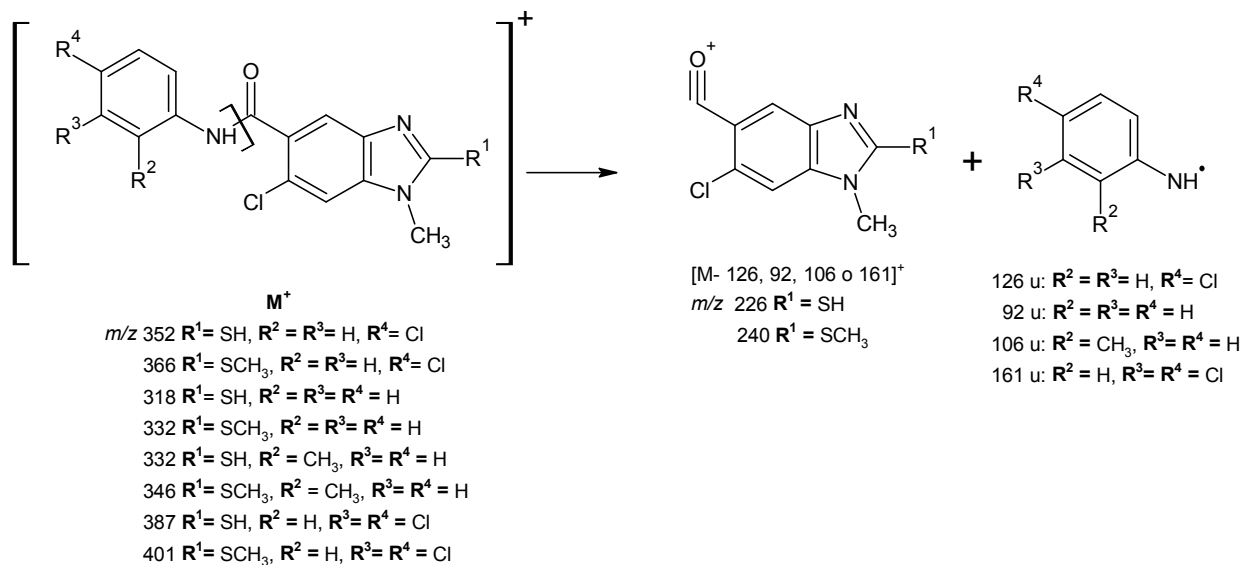


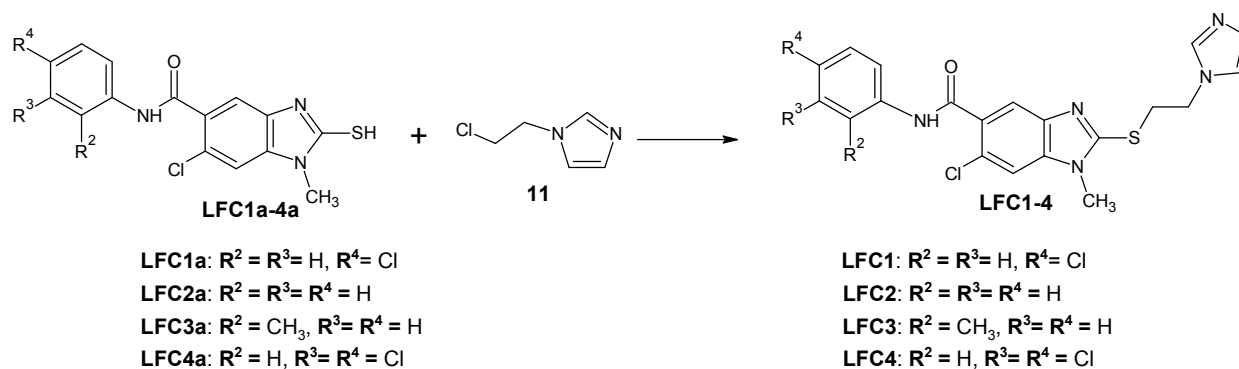
Figura 22. Principales fragmentos observados en la espectrometría de masas.

Se observaron los patrones de distribución isotópica característica para la mayoría de las carboxamidas debido a que todos los compuestos contienen al menos un átomo de cloro en sus estructuras.

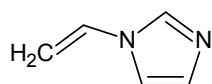
7.1.5. Síntesis de las carboxamidas de la serie LFC1-4

Para la obtención de los compuestos de la serie LFC1-4 se utilizaron como precursores sintéticos a los compuestos de la serie LFC1a-4a haciéndolos reaccionar mediante una reacción de sustitución nucleofílica sobre el carbono sp^3 del compuesto 1-(2-cloroetil)-1H-imidazol (**11**) como se muestra en el Esquema 16.

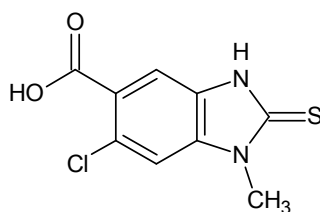
Esquema 16. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1-4



La reacción procedió en medio alcalino utilizando K_2CO_3 y acetonitrilo como disolvente. Se optó por una base no nucleofílica debido a que los sustratos utilizados son propensos a reaccionar con una base de estas características. En primera instancia se utilizó KOH para realizar la reacción y se observaron muy bajos rendimientos y la abundante formación de productos secundarios que corresponden a la hidrólisis de las amidas y al producto de eliminación del compuesto **11**. Ambos compuestos se muestran en la **Figura 23**.



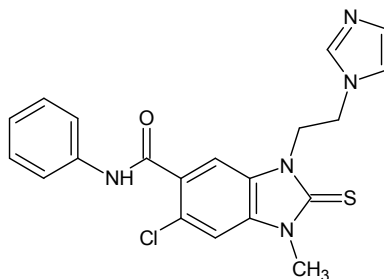
1-vinil-1*H*-imidazol



Ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico

Figura 23. Principales compuestos secundarios observados en la reacción de S_N2 en medio alcalino con KOH.

El disolvente y la temperatura son otros aspectos importantes que se consideraron para realizar la reacción. El mantener la mezcla de reacción como una solución homogénea favorece el rendimiento, por esta razón se realizó en acetonitrilo, un disolvente polar aprótico que además favorece las reacciones tipo S_N2 . La temperatura se mantuvo en el rango de 40-50 °C, a menores temperaturas la transformación no se llevó a cabo y si la temperatura excede este rango el compuesto **11** es inestable convirtiéndose en una resina la cual no reaccionó de la manera esperada. Adicionalmente se ha observado que a temperaturas altas la sustitución se lleva a cabo en el nitrógeno de la posición 3 en el bencimidazol, ya que como se ha mencionado anteriormente, existe un equilibrio tautomérico tiol-tiocarbonilo lo que favorece la nucleofilia del nitrógeno y por tanto la formación del 6-cloro-3-[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]-1-metil-*N*-fenil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**Figura 24**).



6-cloro-3-[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]-*N*-fenil-1-metil-2-tioxi-2,3-dihidro-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida

Figura 24. Producto secundario derivado del benzimidazol sustituido en la posición 3.

Para favorecer el rendimiento de las reacciones se agregó NaI a la mezcla de reacción con la finalidad de realizar un intercambio de halógenos y formar el compuesto 1-(2-yodoetil)-1*H*-imidazol el cual es más reactivo que el compuesto **11** al contener un átomo de yodo que es mejor grupo saliente. Esta reacción de intercambio de halógenos se conoce como reacción de Finkelstein (**Figura 25**).

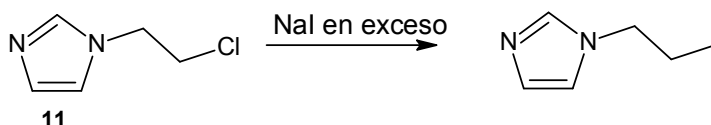


Figura 25. Aplicación de la reacción de Finkelstein

Bajo las condiciones establecidas se sintetizaron los cuatro compuestos de la serie **LFC1-4**, se obtuvieron como sólidos de color blanco con rendimientos que van de regulares a bajos. En la **Tabla 9** se muestran los rendimientos y propiedades físicas de todas las moléculas de la serie.

Tabla 9. Rendimientos y constantes físicas de las serie de amidas **LFC1-4**

Compuesto	Rendimiento (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Punto de fusión (°C)	<i>R_f</i> (Sistema)*
LFC1	38.2	Isopropanol/Agua	141.3-142.9	0.43 (III)
LFC2	36.4	Etanol/Agua	121.1-122.3	0.40 (III)
LFC3	28.9	Isopropanol/Agua	98.9-100.8	0.43 (III)
LFC4	23.6	CHCl ₃ /Isopropanol	116.8-117.5	0.45 (III)

Sistema (III) Cloroformo/Metanol 85:15

7.1.5.1. RMN ^1H de la serie de compuestos LFC1-4

En los espectros de RMN ^1H se muestran características comunes para todos los compuestos debido a que presentan la misma estructura base. En la **Figura 26** se muestra un resumen esquemático de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y su relación con la estructura de los compuestos de la serie.

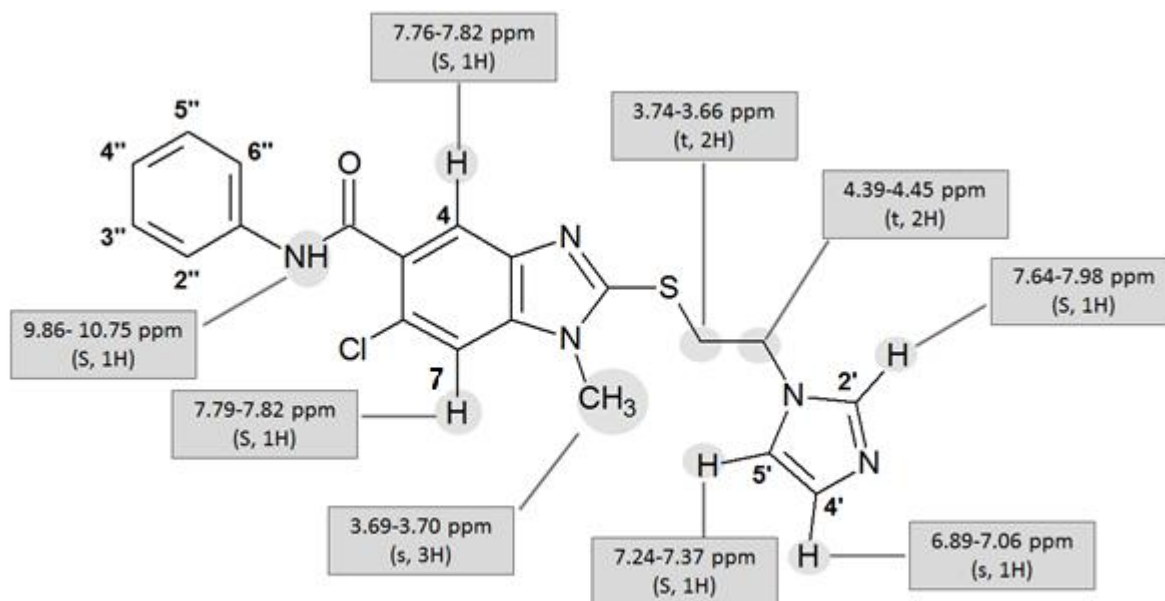


Figura 26. Relación entre la estructura base de la serie de carboxamidas **LFC1-4** y sus señales en RMN ^1H .

De manera general, en los espectros de todas las moléculas se observan dos señales triples a campo alto que corresponden a los metilenos que unen al 2-mercaptobenzimidazol con el imidazol. La primera señal triple se encuentra en el rango de 3.66-3.74 ppm y corresponde al metileno enlazado al átomo de azufre del benzimidazol. La segunda señal triple se observó entre 4.39-4.45 ppm, esta señal pertenece al metileno enlazado al nitrógeno del imidazol. La diferencia entre los desplazamientos químicos de ambas señales triples se debe a los valores de electronegatividad de los heteroátomos a los que se encuentran enlazados. El nitrógeno es más electronegativo que el azufre, por lo tanto el metileno unido al nitrógeno está más desprotegido electrónicamente y la señal correspondiente se ubica desplazada a campo bajo. Se observaron también las señales características correspondientes al núcleo del benzimidazol. La señal que pertenece al metilo unido al nitrógeno aparece alrededor de 3.7 ppm y a campo bajo se encuentran las señales simples

que corresponden a los H-4 y H-7, en algunos casos las señales tienen desplazamientos químicos muy cercanos y en los espectros se muestran como una señal simple que integra para dos hidrógenos. Respecto al anillo de imidazol se observan tres señales simples ensanchadas correspondientes a los hidrógenos H-2', H-4' y H-5'. La asignación de los desplazamientos químicos se realizó usando experimentos de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones: 2D-NOESY y COSY (Figuras 27 y 28).

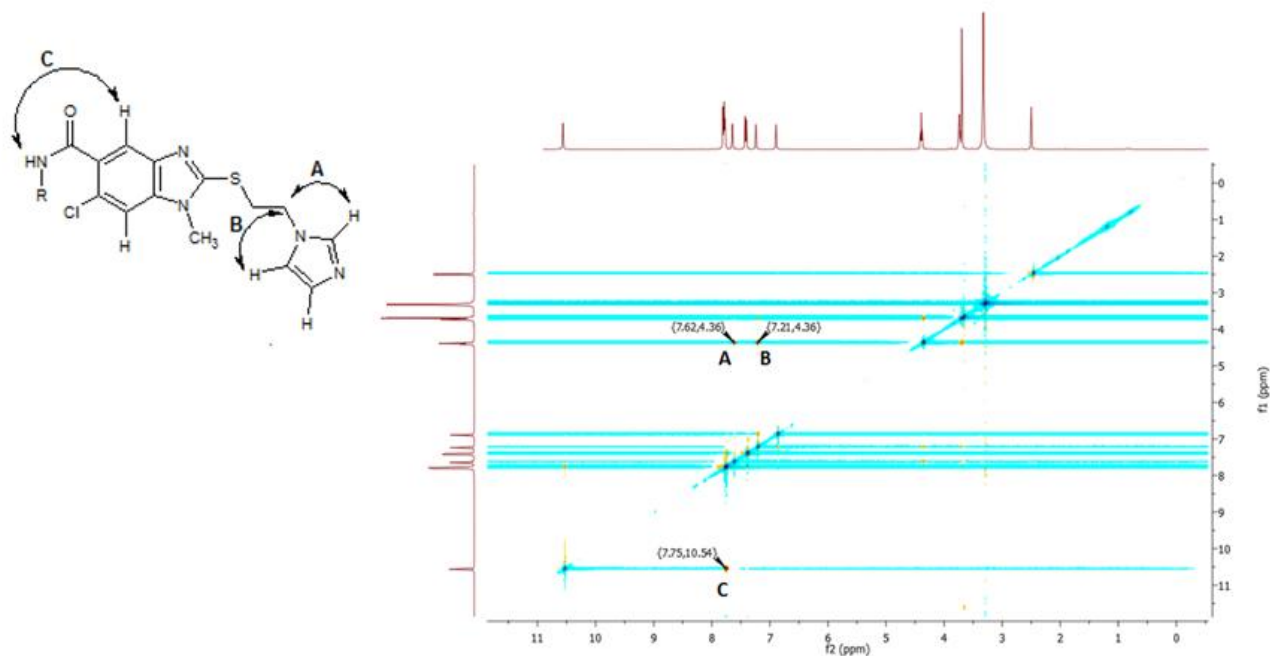


Figura 27. Espectro 2D-NOESY del compuesto LFC1.

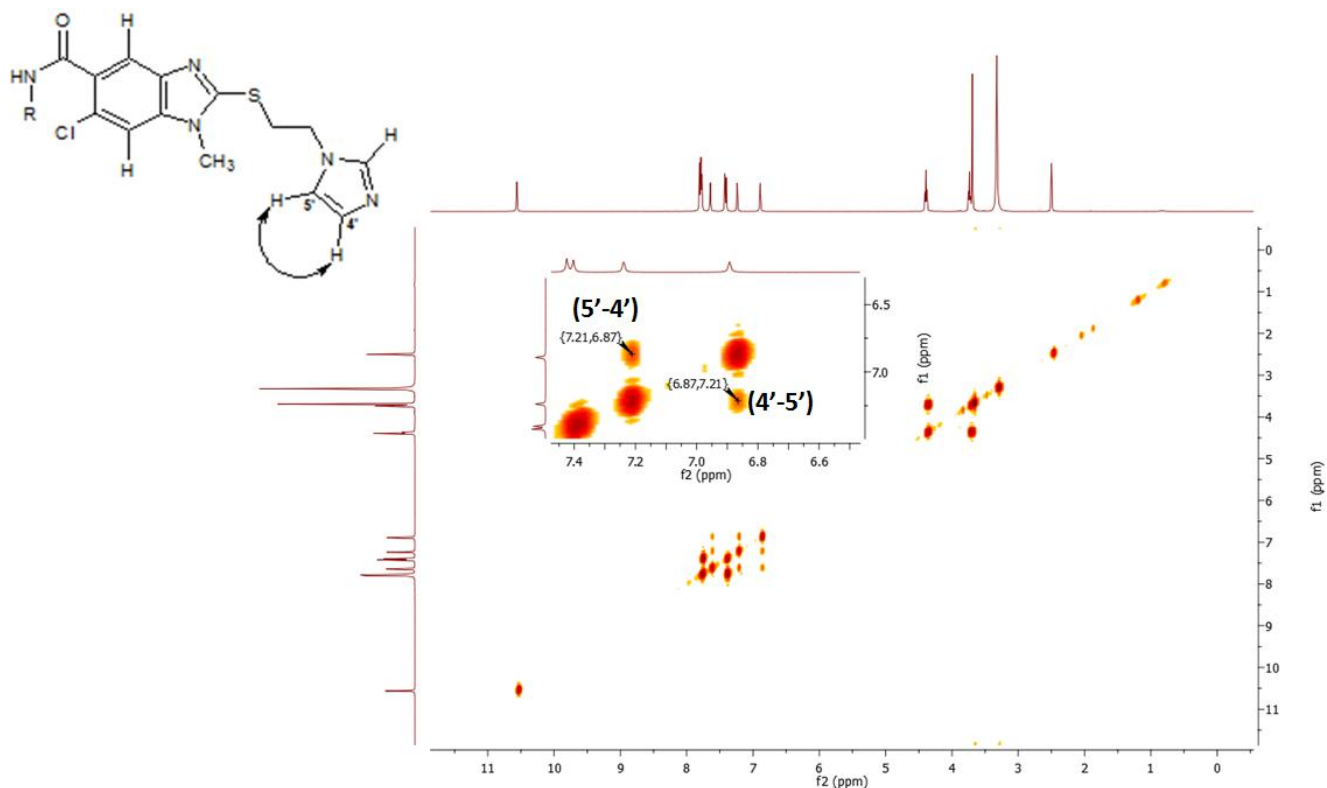
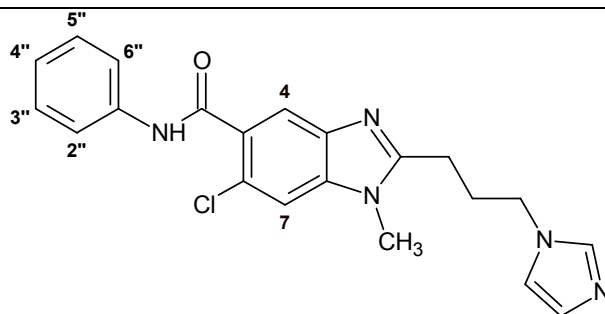


Figura 28. Espectro 2D-COSY del compuesto LFC1.

En el espectro 2D-NOESY (**Figura 27**) se observó la interacción espacial entre H-2', H-5' y los hidrógenos del metileno enlazado directamente al nitrógeno del anillo de imidazol. Con esta información se determinó el desplazamiento químico de H-5' el cual se encuentra en el rango de 7.24-7.37 ppm, mientras que la señal de H-2' se encuentra desplazada a campo bajo debido a la influencia de los nitrógenos del imidazol, asignando su desplazamiento químico en el rango de 7.64-7.98 ppm. El hidrógeno H-4 del núcleo del bencimidazol presentó una interacción con el -NH- del grupo amida, de esta manera se asignó su desplazamiento químico alrededor de 7.75 ppm.

En el espectro 2D-COSY (**Figura 28**) se observan las interacciones entre hidrógenos a tres enlaces de distancia. La información en este espectro se utilizó principalmente para designar el desplazamiento químico del H-4' del anillo del imidazol. En el espectro 2D-COSY se observó la interacción del H-5', cuyo desplazamiento químico se asignó utilizando el espectro 2D-NOESY, con el hidrógeno H-4'. Esto permitió identificar a H-4' en el intervalo de 6.89-7.06 ppm. En la **Tabla 10** se muestran los desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de los hidrógenos pertenecientes al sustituyente fenilo de las carboxamidas finales.

Tabla 10. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de los hidrógenos H-2''-H-6'' de la serie LFC



Compuesto	H-2''	H-3''	H-4''	H-5''	H-6''
LFC1	7.78 ppm	7.41 ppm		7.41 ppm	7.78 ppm
	J= 8.9 Hz	J= 8.9 Hz	-----	J= 8.9 Hz	J= 8.9 Hz
	Señal doble	Señal doble	-	Señal doble	Señal doble
LFC2	7.76 ppm	7.35 ppm	7.10 ppm	7.35 ppm	7.76 ppm
	J= 7.9 Hz	J= 7.9 Hz	J= 7.4 Hz	J= 7.9 Hz	J= 7.9 Hz
	Señal doble	Señal triple	Señal triple	Señal triple	Señal doble
LFC3	-----	7.26 ppm	7.17 ppm	7.23 ppm	7.45 ppm
		J= 7.3 Hz	J= 7.1 Hz	Señal compleja	J= 7.6 Hz
		Señal doble	Señal triple		Señal doble
LFC4	8.14 ppm	-----	-----	7.62 ppm	7.66 ppm
	J= 2.2 Hz			J= 8.8 Hz	J ₁ = 8.8 Hz, J ₂ = 2.1 Hz
	Señal doble			Señal doble	Doble de dobles

7.1.5.2. RMN ¹³C de los compuestos de la serie LFC1-4

Los espectros de RMN ¹³C presentan señales comunes para todos los compuestos de la serie (Figura 29). A campo alto se observó la señal correspondiente al carbono alifático unido al azufre dentro del rango de 32.59-33.93 ppm, el carbono enlazado al nitrógeno del imidazol se observó en el rango de 45.07-47.28 ppm mientras que el carbono del metilo unido al nitrógeno del benzimidazol se encuentra en el rango de 30.26-31.86 ppm.

Respecto al anillo de imidazol, se observaron tres señales a campo bajo que corresponden a los carbonos C-2', C-4' y C-5' cuyos desplazamientos químicos se encuentran a 119.32-125.10 ppm 128.51-132.02 ppm 137.42-138.56 ppm respectivamente. De manera adicional se observa la señal característica correspondiente al carbono sp² del carbonilo del grupo amida en un rango de 165.52-166.21 ppm.

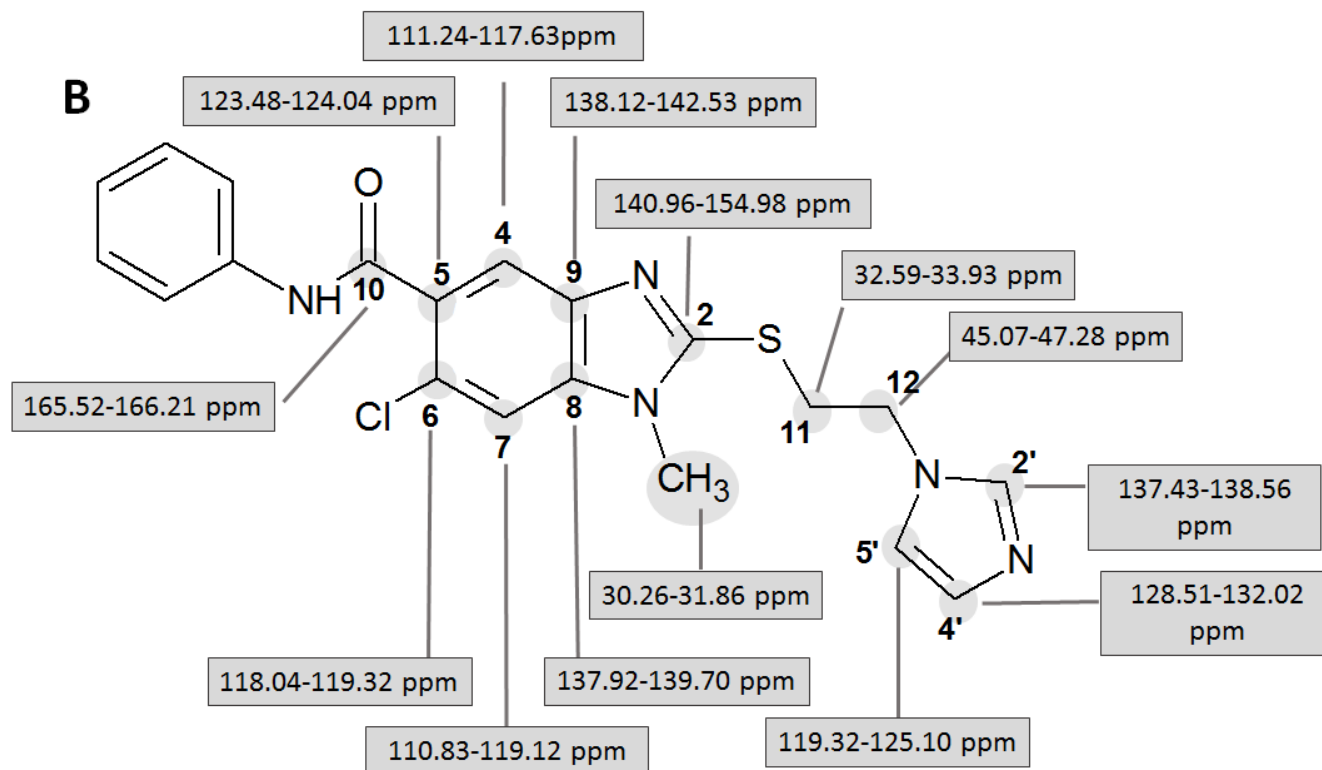
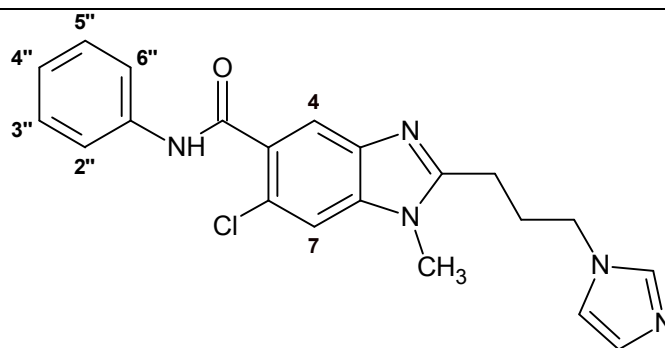


Figura 29. Relación entre la estructura base de la serie de carboxamidas de la serie LFC1-4 y sus señales en RMN ^{13}C .

De manera general los carbonos situados en el núcleo del bencimidazol son los que presentaron mayores variaciones en el desplazamiento químico. El carbono C-2 se encuentra más desplazado a campo bajo debido al efecto que ejercen sobre él los átomos de nitrógeno y azufre a los que se encuentra enlazado, la señal se encuentra dentro del rango 140.96-154.98 ppm. Las siguientes señales en aparecer son las pertenecientes a los carbonos C-8 y C-9 ubicándose entre 137.39-139.70 ppm y 138.12-142.53 ppm respectivamente. Las señales de los carbonos C-5 y C-6 no aparecieron en todos los espectros de las moléculas de la serie y en algunos casos se muestran como señales poco abundantes y poco diferenciadas de la señal de ruido del espectro. Estas señales se observan dentro del rango 118.04-119.32 ppm para el C-6 y entre 123.48-124.04 ppm para C-5. La diferencia entre desplazamientos se debe al efecto de desapantallamiento ejercido por el grupo electroatractor al que se encuentra unido el C-5.

Finalmente las señales de los carbonos C-4 y C-7 se ubican en el rango de 111.21-117.63 ppm y 110.83-119.12 ppm respectivamente. Los valores de desplazamiento químico de los carbonos situados en el sustituyente fenilo de las carboxamidas se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de los carbonos C-1''-C-6'' de los compuestos de la serie LFC1-4



Compuesto	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
LFC1	130.05 ppm	121.07 ppm	128.58 ppm	127.15 ppm	128.58 ppm	121.07 ppm
LFC2	130.91 ppm	118.04 ppm	129.11 ppm	124.04 ppm	129.11 ppm	118.04 ppm
LFC3	131.89 ppm	134.61 ppm	131.89 ppm	127.4 ppm	127.56 ppm	127.49 ppm
LFC4	131.45 ppm	123.96 ppm	130.07 ppm	130.07 ppm	131.15 ppm	120.07 ppm

7.1.5.3. Espectrometría de masas de los compuestos de la serie LFC1-4

El peso molecular de las carboxamidas sintetizadas se determinó usando espectrometría de masas. Las moléculas se analizaron utilizando un equipo de ionización por Electrospray acoplado a un equipo de cromatografía de líquidos (MS-ESI/LC). Para todos los compuestos se observó el ión molecular correspondiente y un patrón de fragmentación similar.

Los fragmentos más importantes corresponden al ion acilio con masa 319 u.m.a y los cationes radical etilimidazol e imidazol con masas 95 y 68 u.m.a, respectivamente (**Figura 30**).

El pico base corresponde al catión radical 6-cloro-2-(etenilsulfanil)-1-metil-*N*-fenil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida de masa variable para cada compuesto excepto para el compuesto **LFC4** donde el pico base corresponde al ion molecular.

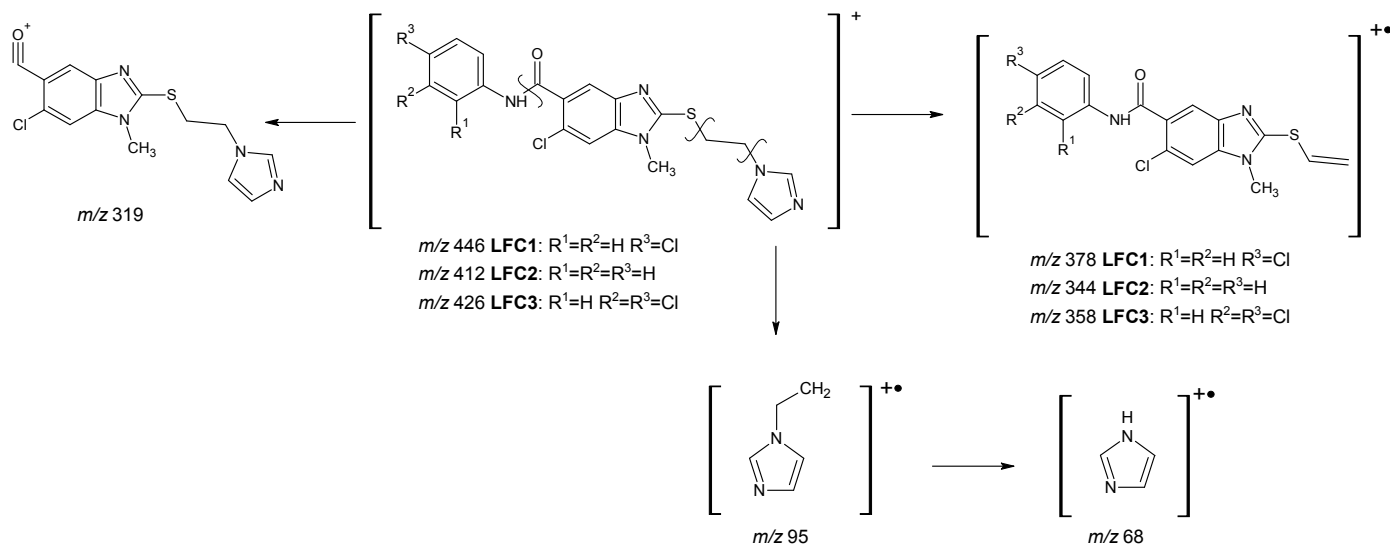


Figura 30. Fragmentos representativos para los compuestos de la serie LFC1-4.

7.2. Evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos finales

Los compuestos de las tres series de carboxamidas sintetizadas se sometieron a ensayos *in vitro* contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*; los resultados de actividad antiprotozoaria se muestran en la **Tabla 12**. Los datos se analizaron empleando ANOVA de una vía, posteriormente se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey utilizando $P < 0.05$.

Adicionalmente se graficaron los valores del inverso de la concentración inhibitoria cincuenta ($1/CI_{50}$) para observar de manera más sencilla las diferencias de actividad entre los compuestos y los fármacos usados como referencia (**Gráfico 1**).

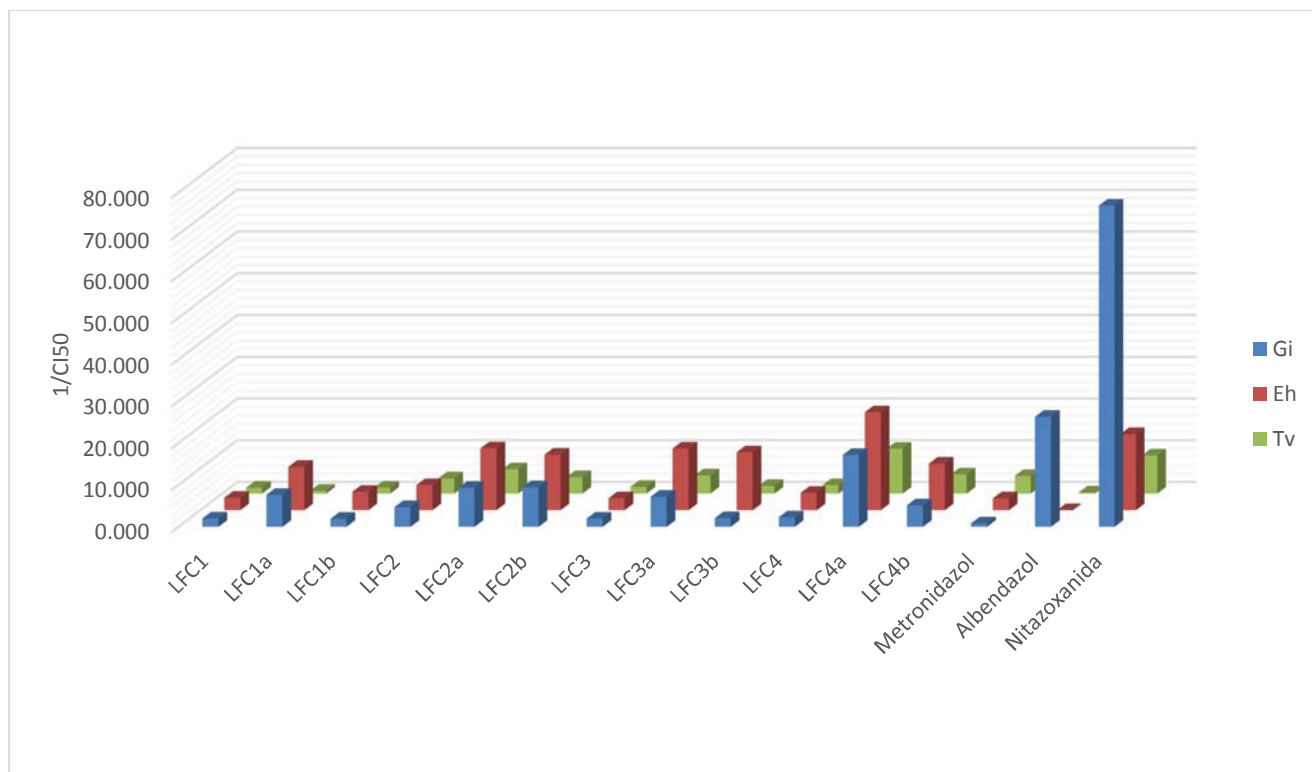
Tabla 12. Actividad antiprotozoaria in vitro de los compuestos finales y fármacos de referencia

Compuesto	<i>G. intestinalis</i> CI ₅₀ (µM)	<i>E. histolytica</i> CI ₅₀ (µM)	<i>T. vaginalis</i> CI ₅₀ (µM)
LFC1	0.5000 ± 0.0063(**)	0.3371 ± 0.0143(*)	0.7070 ± 0.0014(*)
LFC1a	0.1324 ± 0.0100(**)	0.0970 ± 0.0081(*) (**)	0.1460 ± 0.0020(*)
LFC1b	0.5204 ± 0.0212(**)	0.2284 ± 0.0097(*) (**)	0.6944 ± 0.0039(*)
LFC2	0.2123 ± 0.0189(**)	0.1660 ± 0.0017(*) (**)	0.2752 ± 0.0360(*)
LFC2a	0.1070 ± 0.0089(**)	0.0680 ± 0.0157(*) (**)	0.1710 ± 0.0023(*) (**)
LFC2b	0.1051 ± 0.0086(**)	0.0750 ± 0.0170(*) (**)	0.2530 ± 0.0085(*)
LFC3	0.5020 ± 0.0298(**)	0.3481 ± 0.0381(*)	0.6199 ± 0.0499(*)
LFC3a	0.1390 ± 0.0086(**)	0.0680 ± 0.0107(*) (**)	0.2290 ± 0.0042(*)
LFC3b	0.4814 ± 0.0225(**)	0.0720 ± 0.0163(*) (**)	0.5460 ± 0.0164(*)
LFC4	0.4350 ± 0.0117(**)	0.2390 ± 0.0352(*) (**)	0.4870 ± 0.0206(*)
LFC4a	0.0580 ± 0.0018(**)	0.0430 ± 0.0018(*) (**)	0.0930 ± 0.0037(*) (**)
LFC4b	0.1925 ± 0.0074(**)	0.0913 ± 0.0088(*) (**)	0.2170 ± 0.0106(*)
ABZ*	0.0370 ± 0.0030	56.5334 ± 18.8445	1.5905 ± 0.0113
MTZ**	1.2260 ± 0.1250	0.3798 ± 0.1461	0.2360 ± 0.0160
NTZ***	0.0128 ± 0.0952	0.0550 ± 0.0896	0.1098 ± 0.0896

(*) Compuesto superior en potencia al ABZ (P<0.05)

(**) Compuesto superior en potencia al MTZ (P<0.05)

(***) Compuesto superior en potencia a NTZ (P<0.05)



Gráfica 1. 1/CI50 de los compuestos finales y los fármacos de referencia

En los ensayos contra *G. intestinalis* todos los compuestos resultaron más potentes que el **MTZ**, ya que presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al compararlos con éste fármaco de referencia sin embargo no superaron en potencia al **ABZ** y a **NTZ**; siendo el compuesto **LFC4a** el que posee mejor actividad giardicida.

Contra *E. histolytica*, casi todos los compuestos sintetizados mostraron mayor actividad que el **MTZ** excepto los compuestos **LFC1** y **LFC3** cuya potencia es equivalente a la de este fármaco de referencia ($P > 0.05$) y por consiguiente mucho más activos que el **ABZ**, el cual no está clasificado como amebicida. Ninguno de los compuestos presentó mayor actividad amebicida respecto a **NTZ**. El compuesto **LFC4a** tiene la mayor actividad contra este protozoario.

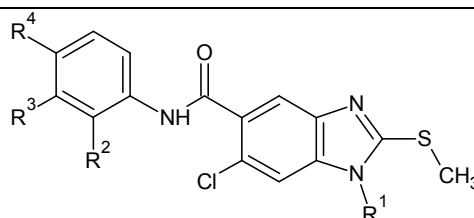
Respecto a los ensayos contra *T. vaginalis* todos los compuestos evaluados presentaron mayor actividad que el albendazol y solo los compuestos **LFC2a** y **LFC4a** mostraron actividad superior a **MTZ** y **NTZ** respectivamente. ($P < 0.05$)

De manera inicial se planteó la optimización de las carboxamidas bencimidazólicas del grupo B mediante el uso de la hibridación molecular tomando como base al compuesto S2J13, el cual presenta una

potente actividad antiprotozoaria. Sin embargo se observó que el reemplazo del sustituyente metililo por etilimidazol en la posición 2 del núcleo del bencimidazol trajo como consecuencia la disminución en la actividad.

Por otra parte es importante notar que el reemplazo del sustituyente metililo por el grupo mercapto aumentó la actividad, siendo el compuesto **LFC4a** el más activo contra los tres protozoarios. Dentro de la base de compuestos del L-122 se encuentran reportadas la síntesis y actividad de una serie de moléculas análogas a los de la serie **LFC1b-4b** (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad antiprotozoaria de las carboxamidas de la serie **LFC1b-4b** y sus compuestos análogos



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	<i>G.intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>
					Cl ₅₀ (μM)	Cl ₅₀ (μM)	Cl ₅₀ (μM)
LGI-1	H	H	H	Cl	0.7079	0.0309	0.1513
LFC1b	CH ₃	H	H	Cl	0.519	0.227	0.693
JMCV01	H	H	H	H	0.0725	0.0520	0.1199
LFC2b	CH ₃	H	H	H	0.105	0.075	0.253
JMCV03	H	H	CH ₃	H	0.2501	0.1205	0.5153
LFC3b	CH ₃	CH ₃	H	H	0.480	0.072	0.546
LGI-3	H	H	Cl	Cl	0.3162	0.0269	0.1148
LFC4b	CH ₃	H	Cl	Cl	0.194	0.090	0.217

La principal diferencia estructural entre los compuestos radica en el sustituyente de la posición 1 del núcleo del bencimidazol. Para todos los casos el reemplazo del átomo de hidrógeno por el grupo metilo disminuye la actividad contra *T. vaginalis*, mientras que para los protozoarios restantes no se observa una correlación clara del efecto causado por el reemplazo en esta posición del núcleo base (**Figura 31**).

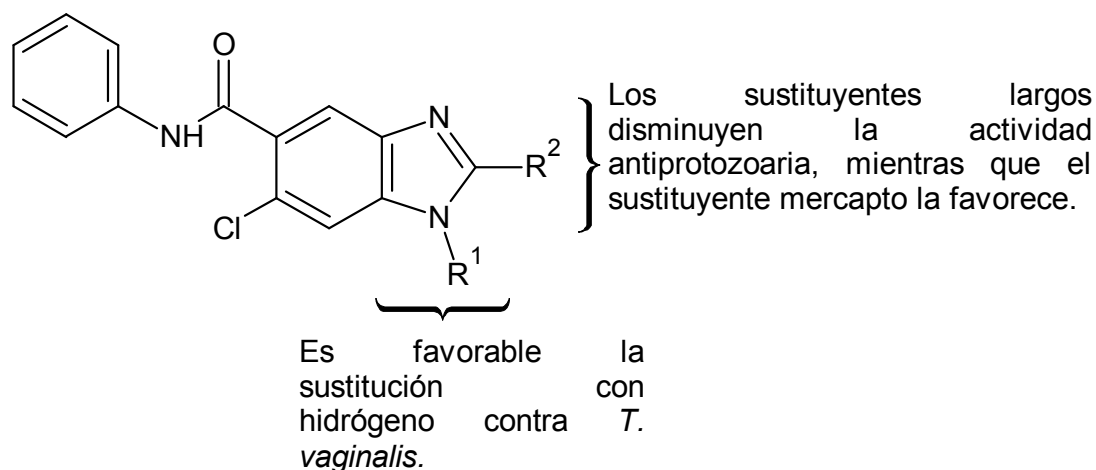


Figura 31. Resumen de las relaciones estructura actividad de las carboxamidas de la serie LFC.

7.3. Análisis del panorama de actividad (*activity landscape*) giardicida, amebicida y tricomonocida de derivados del bencimidazol

7.3.1. Mapa DAD

En esta sección se compararon la actividad tricomonocida y la actividad giardicida de 116 moléculas incluidas las doce carboxamidas bencimidazólicas y la base de 104 compuestos derivados del bencimidazol. Se calcularon los valores de pCl_{50} de cada compuesto para ambas actividades. Posteriormente se obtuvieron las diferencias de actividad por pares de compuestos obteniendo un total de 6670 pares; sin embargo, solo se seleccionaron los pares de compuestos que presentaban uno o dos cambios en los sustituyentes del núcleo del bencimidazol (1700 pares).

En la **Figura 32** se muestra el mapa DAD construido con la diferencia de actividad de los pares de compuestos contra los protozoarios *G. intestinalis* – *T. vaginalis* (1700 pares). En esta figura también se presentan las estructuras químicas y la actividad biológica destacando los sustituyentes estructurales y la dirección en la selectividad de los pares de compuestos identificados en regiones Z1 y Z2. En la **Tabla 14** que se encuentra debajo de la figura se observan los pares de compuestos identificados en ambas regiones, la diferencia de actividad para ambos protozoarios y los valores de similitud basados en los finger prints para cada par de compuestos.

Se identificaron un total de seis pares de compuestos en el mapa DAD, cuatro pares se encuentran en las región Z1 y dos pares en Z2. Los pares **2/11**, **4/11**, **6/12** y **6/DB_42** se identificaron en la región Z1 del mapa DAD, esto indica que los pares de compuestos identificados tienen una alta similitud estructural (sólo dos variaciones en los sustituyentes del núcleo del bencimidazol) pero poseen una alta diferencia en actividad biológica contra ambos parásitos en una sola dirección, es decir, aumenta o disminuye la actividad para ambos protozoarios en conjunto (llamados “*Dual activity cliffs*”). Estos pares de compuestos demuestran que las sustituciones en las posiciones 1 y 5 son de gran importancia para generar estos cambios en la actividad biológica. Por ejemplo, el cambio en la sustitución del átomo de hidrógeno por metilo en la posición 1 en los primeros tres pares, aumenta la actividad para los dos protozoarios; mientras que la sustitución de 2-metiltio a 2-carboxamida y el grupo aromático en la posición 5 por el cloro disminuye la actividad para ambos parásitos.

Por otro lado, se identificaron pares **1/3** y **1/DB_26** en la región de Z2 de los mapas DAD, lo que indica que estos pares de compuestos tienen un efecto contrario en la actividad frente a ambos parásitos, es decir, si aumenta la actividad para un protozoario disminuye para el otro (llamados “*activity switches*”). Es importante destacar que el compuesto **1** está presente en los dos pares, y en el caso del par **1/3** la única diferencia en el sustituyente es el átomo de cloro en la posición 6 por lo que podemos observar que la piridina no sustituida aumenta la actividad contra *T. vaginalis*. Del mismo modo, se incrementa la actividad contra *T. vaginalis* con la sustitución de trifluorometilo y 1-naftiloxi en **DB_26** por metiltio y grupo piridin-2-ilaminocarbonil en las posiciones 2 y 5, respectivamente. Estos pares de compuestos son ejemplos de “*Selectivity switches*” ya que **3** y **DB_26** son selectivos para *G. intestinalis* mientras que **1** es selectivo para *T. vaginalis*

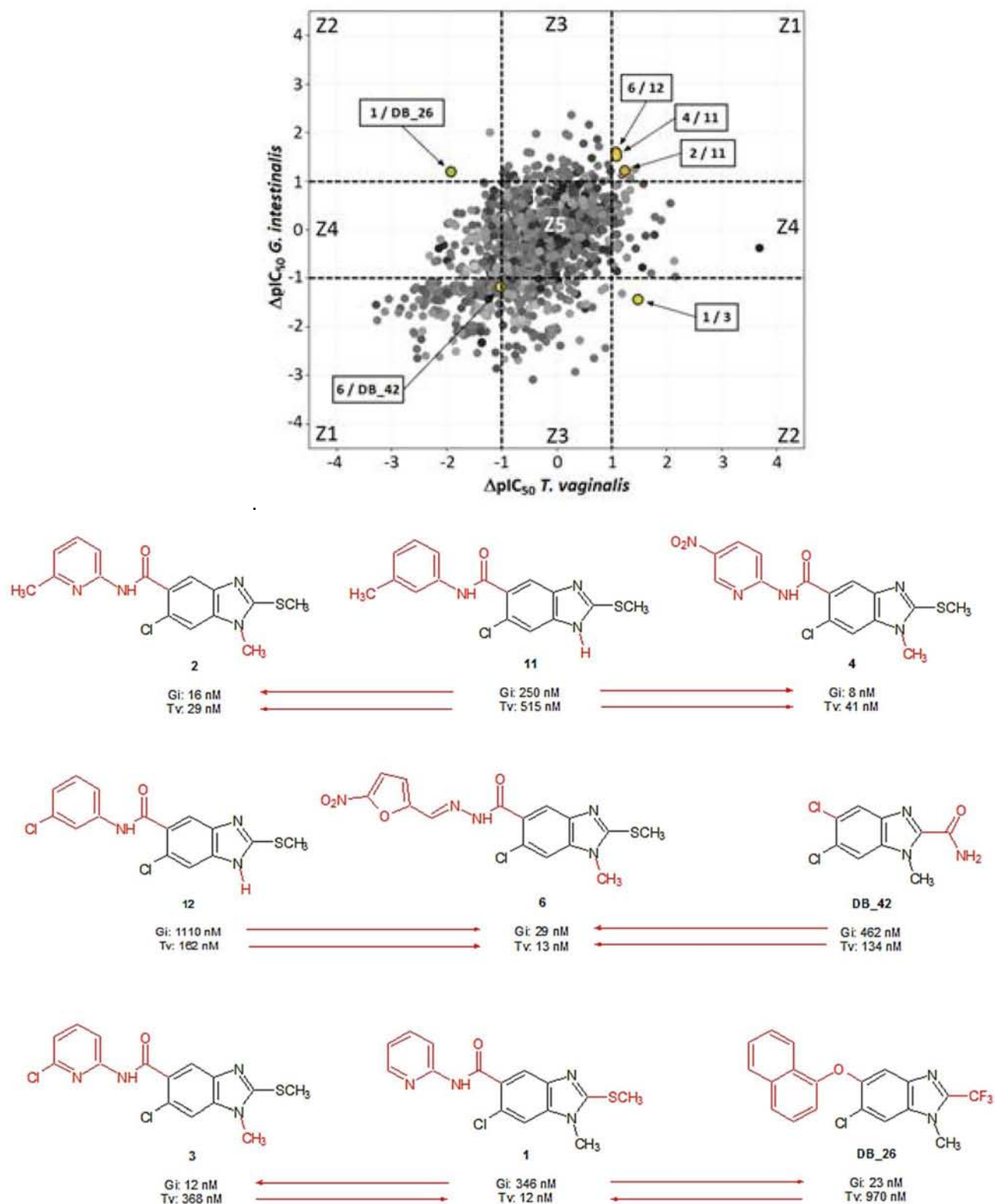


Figura 32. Mapa de la diferencia dual de la actividad para una y dos sustituciones (1700 pares). Los switches se identifican en la zona Z2 del mapa DAD. Los cambios estructurales en cada par están en color rojo

Tabla 14. Diferencia de actividad, la similitud promedio y los fingerprint utilizados

Region	Par	ΔpCl_{50} Gi	ΔpCl_{50} Tv	Similitud promedio	MACCS	piDAPH3	TGD
Z1	2 / 11	1.20	1.25	0.762	0.837	0.729	0.720
	4 / 11	1.50	1.10	0.693	0.672	0.690	0.716
	6 / 12	1.58	1.09	0.759	0.816	0.717	0.744
	6 / DB_42	1.19	1.01	0.686	0.720	0.644	0.695
Z2	1 / 3	1.45	1.49	0.700	0.642	0.635	0.822
	1 / DB_26	1.18	1.92	0.621	0.607	0.447	0.809

7.3.2. Mapa 2D-TAD

Para la construcción del mapa 2D-TAD se recopilaron las actividades contra *E. histolytica* de algunos de los compuestos mencionados anteriormente, ya que no toda la base de compuestos posee datos de actividad para este protozoo. Obteniendo un total de 67 compuestos con actividades reportadas. Esto se realizó con el fin de estudiar la relación estructura-actividad para los tres parásitos. Es importante destacar que este es el primer trabajo en donde las tres actividades se estudian utilizando métodos de quimioinformática.

La **Figura 33** muestra el mapa en dos dimensiones de la triple diferencia de actividad (2D-TAD) que contiene a los pares de compuestos con actividad contra los tres protozoos, considerando sólo aquellos pares con más de una unidad logarítmica de diferencia de actividad contra *E. histolytica* (498 pares). Esta figura también muestra el mapa 2D-TAD con uno y dos cambios en los sustituyentes en el núcleo del bencimidazol (74 pares), destacando los pares identificados en regiones TZ1, TZ3 y TZ4 y mostrando sus estructuras químicas, actividad biológica, cambio estructural y la dirección en la selectividad. En la **Tabla 15** debajo contiene la diferencia de actividad y valores de similitud estructural para cada par basados en los fingerprints utilizados.

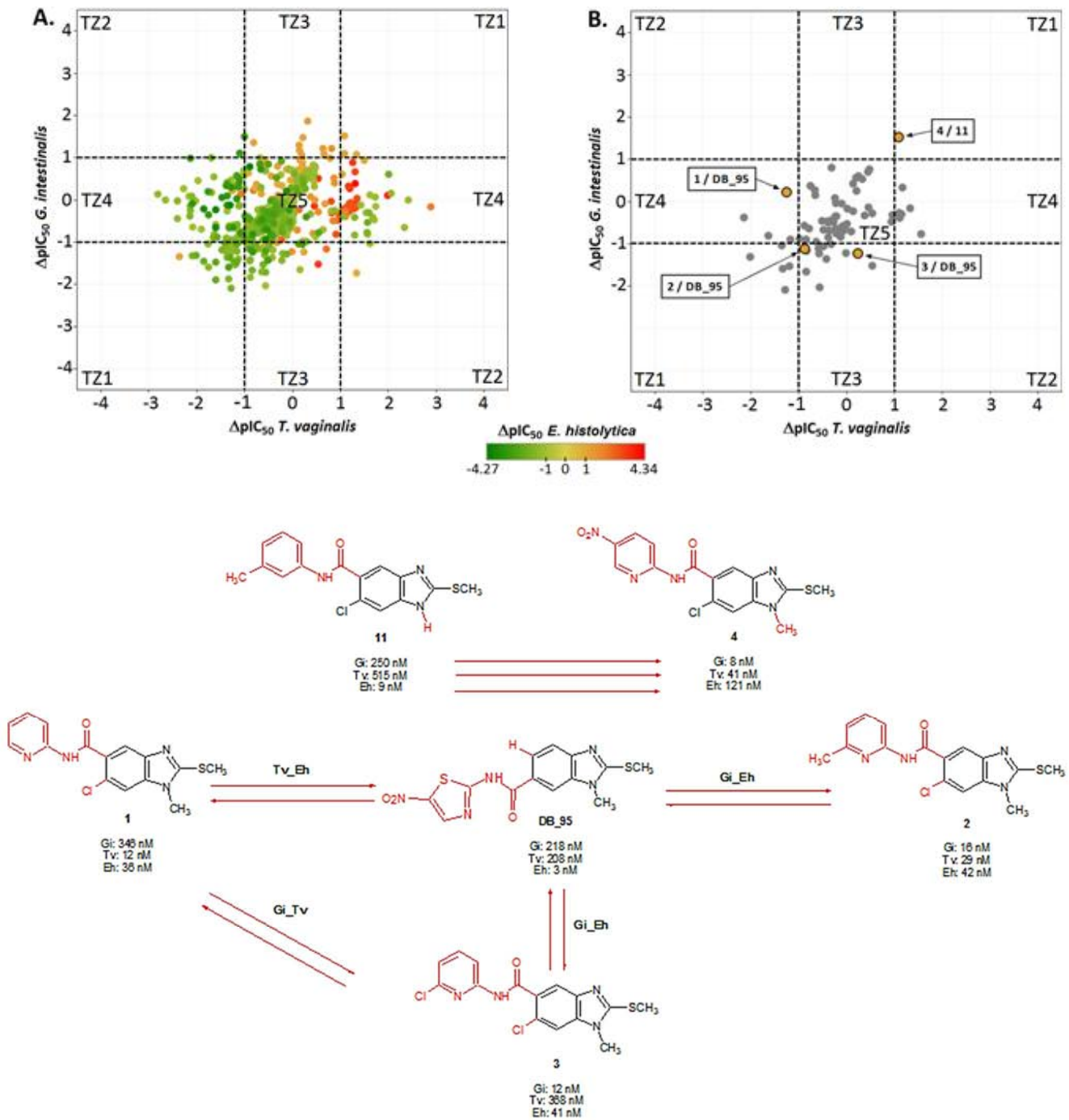


Figura 33. (A) Mapa en dos dimensiones de la triple diferencia de actividad para los compuestos con más de una unidad logarítmica en la diferencia de actividad contra *E. histolytica* (498 pares). El “pan activity cliff” y los “activity switches” están identificados en (B) el mapa 2D-TAD para una y dos sustituciones en el núcleo del bencimidazol (74 pares). Los cambios estructurales para cada par se encuentran en rojo.

Tabla 15. Diferencia de actividad y la similitud estructural promedio basada en los fingerprints utilizados para cada par

Región	Par	ΔpIC_{50} Gi	ΔpIC_{50} Tv	ΔpIC_{50} Eh	Similitud Promedio	MACCS	piDAPH3	TGD
TZ1	4/11	1.50	1.10	1.12	0.693	0.672	0.690	0.716
TZ3	2/DB_95	1.14	0.86	1.14	0.708	0.661	0.588	0.874
	3/DB_95	1.25	0.25	1.13	0.618	0.589	0.440	0.824
TZ4	1/DB_95	0.20	1.24	1.06	0.712	0.651	0.622	0.862

El par identificado en la región de TZ1 (**4/11**) corresponde a un “*Pan Activity Cliff*” en el que la sustitución del átomo de hidrógeno por un grupo metilo en la posición 1 y la sustitución de 3-clorofenil por 4-nitropiridina de la carboxamida en la posición 5 aumenta sustancialmente la actividad contra los tres protozoarios.

En las regiones TZ3 y TZ4 se identificaron como “*Activity switches*” a los pares **1/3**, **1/DB_95**, **2/DB_95** y **3/DB_95**. Vale la pena señalar que el compuesto **DB_95** tiene actividad importante contra *E. histolytica* y se identifica en los tres casos. La doble sustitución del hidrógeno por grupo voluminoso en la posición 5 y un grupo voluminoso por cloro en la posición 6 del núcleo de bencimidazol en el compuesto **1** aumenta la actividad para la *T. vaginalis*. Del mismo modo, la actividad se incrementa en contra de *G. intestinalis* con el mismo patrón de sustitución en los compuestos **2** y **3**.

Estos “*Selectivity switches*” sugieren que el compuesto **DB_95** es selectivo para *E. histolytica*, y confirman que **3** es selectivo para *G. intestinalis* mientras que **1** es selectivo para *T. vaginalis* (observado previamente en el mapa DAD). Este análisis nos permitió confirmar que los compuestos 1-metil-2-(metiltio)-bencimidazoles con sustituyentes voluminosos en la posición 6 mejoran la actividad contra *E. histolytica*, mientras que el patrón de sustitución 1,5 es favorable para los protozoarios restantes. Es importante destacar que un grupo aromático sin sustituir muestra mejor actividad contra *T. vaginalis*, mientras que se prefieren sustituyentes nitroaromáticos para la actividad amebicida y giardicida.

8. HALLAZGOS IMPORTANTES

En este trabajo se estudiaron las relaciones estructura-actividad de los grupos B y C de carboxamidas bencimidazólicas. Como se mencionó anteriormente en el grupo B se encuentran las carboxamidas que poseen como sustituyentes distintos heterociclos mientras que el grupo C contiene a las carboxamidas con sustituyentes de tipo fenilo. Las características estructurales que las moléculas pertenecientes a cada grupo deben poseer para ser compuestos activos frente a los tres protozoarios de interés, son diferentes para cada grupo y se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Relaciones estructura actividad para los grupos de carboxamidas B y C

Carboxamidas del grupo B	
El cloro como sustituyente favorece la actividad contra <i>G. intestinalis</i>	← R ² = Cl, R ³ = H
El heterociclo no sustituido favorece la actividad contra <i>T. vaginalis</i>	← R ² = H, R ³ = H
La presencia de un grupo nitro favorece la actividad contra los tres protozoarios	← R ² =H, R ³ = NO ₂

Disminuye la actividad contra los tres protozoarios ← H, CH₃

↓

Favorece la actividad contra los tres protozoarios

Carboxamidas del grupo C	
	Disminuye la actividad contra los tres protozoarios SH → Favorece la actividad contra los tres protozoarios
Favorece la actividad contra <i>T. vaginalis</i> ← H, CH ₃	Favorece la actividad contra <i>G. intestinalis</i> y <i>E. histolytica</i>

Al plantear alguna serie de carboxamidas bencimidazólicas para su síntesis y evaluación como antiprotozoarios es importante tomar en consideración el grupo al cual pertenecen las moléculas y así decidir la naturaleza de los sustituyentes en el núcleo del bencimidazol.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizó una serie de doce carboxamidas bencimidazólicas en cantidad y pureza suficientes para su caracterización. Los compuestos se obtuvieron mediante una ruta sintética optimizada para lograr los mejores rendimientos.

Se evaluó la actividad antiprotozoaria de la serie de compuestos mediante ensayos *in vitro* contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Todos los compuestos mostraron mayor actividad giardicida respecto a **MTZ** pero no superaron a **ABZ** y **NTZ**. Como amebicidas casi todos los compuestos resultaron más potentes que el **MTZ** a excepción de **LFC1** y **LFC3**. Con respecto a *T. vaginalis* solo los compuestos **LFC2a** y **LFC4a** mostraron mayor actividad respecto al **MTZ**.

El compuesto **LFC4a** resultó un potente tricomonocida ya que es más activo que los tres fármacos de referencia

Los compuestos diseñados empleando la estrategia de hibridación molecular no resultaron más activos que los compuestos de partida. Esta información nos permitirá conocer las características estructurales más importantes para obtener carboxamidas bencimidazólicas con actividad antiprotozoaria.

Los mapas DAD y 2D-TAD permitieron estudiar las relaciones estructura actividad para los tres protozoarios utilizando algunos compuestos de la quimioteca del Laboratorio 122. Mediante el uso de estas herramientas quimioinformáticas se detectaron “activity cliffs”, “dual activity cliffs”, “selectivity cliffs” y “pan activity cliffs”. Además se observó la importancia de los heterociclos como sustituyentes de las carboxamidas y la importancia del patrón de sustitución 1,5 y 1,6 en las carboxamidas bencimidazólicas. Con la información generada es posible identificar características importantes para obtener compuestos potentes selectivos para algún parásito o de amplio espectro.

Con los resultados de este trabajo será posible diseñar carboxamidas bencimidazólicas con actividad antiprotozoaria y aumentar la quimioteca de compuestos del grupo de investigación.

10. PERSPECTIVAS

A partir de la información generada al estudiar las relaciones estructura actividad de las carboxamidas bencimidazólicas con actividad antiprotozoaria, es posible diseñar una serie de compuestos que cumpla con las características estructurales necesarias para ser potentes antiprotozoarios. Las moléculas propuestas se muestran en la **Figura 34**.

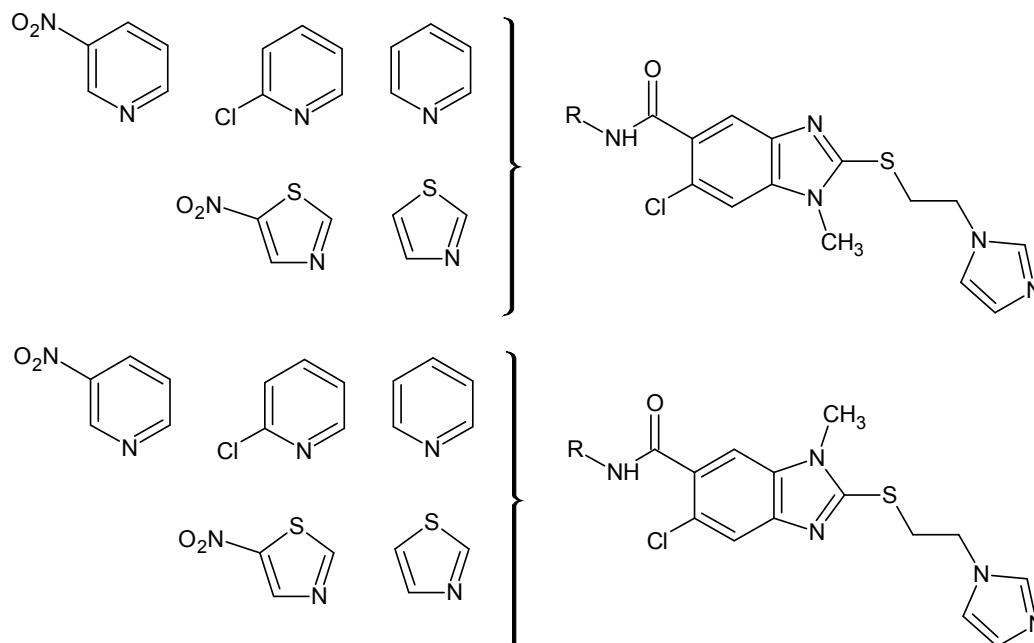


Figura 34. Serie de carboxamidas propuesta para su síntesis y evaluación

Los compuestos de esta serie brindarán información sobre la importancia del tipo de sustituyente en la posición 2 del núcleo del bencimidazol en este tipo de carboxamidas con sustituyentes heterocíclicos.

11. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

11.1. Instrumentación

El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria SCIENTECH SL600, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P. Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo RCT básica con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy. La hidrogenación catalítica se realizó en un hidrogenador marca Parr Modelo 3926EG con 60 lb/in² y 80 °C como capacidad máxima, adaptado con un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney marca Aldrich. La determinación de los puntos de fusión (p.f) se realizó en un aparato Büchi modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos. La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi Modelo R-215 con condensador vertical de dedo frío y baño B-491. El condensador se llenó con líquido refrigerante de automóvil y se enfrió con un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30. 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. La determinación de los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Para ello se empleó un espectrómetro Varian Modelo Utility Inova de 300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y sulfóxido de dimetilo hexadeuterado (DMSO-d₆) como disolvente. Los espectros de masas (EM) se determinaron en un equipo de espectroscopia de masas acoplado a cromatografía de líquidos. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400.

Reactivos y disolventes: las materias primas iniciales se adquirieron de la casa Sigma-Aldrich y se utilizaron como tales sin ninguna purificación. De la misma casa se adquirió el catalizador Ni-Raney suspendido en agua alcalina. Los disolventes empleados en las reacciones fueron del grado RA y QP.

11.2. Sistemas cromatográficos

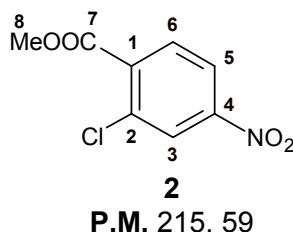
El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se observaron por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV). Los sistemas utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo-Metanol	95:5
II	Cloroformo-Metanol	90:10
III	Cloroformo-Metanol	80:10
IV	Acetato de etilo-Metanol	80:20

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

11.3. Técnicas para la preparación de intermediarios

11.3.1. Síntesis de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)

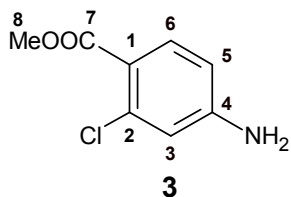


En un matraz redondo de una boca esmerilada 24/40 de 500 mL, adaptado a un embudo de adición, se disolvieron 50 g (0.2480 mol) de ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (**1**) en 200 mL de acetona. A continuación se adicionaron 26.29 g (1 eq. 0.2480 mol) de carbonato de sodio suspendidos en 40 mL de agua, en este punto la mezcla se mantuvo en agitación vigorosa durante 10 minutos. Una vez pasado este tiempo, se verificó que el pH estuviera en 7, por lo que se procedió a la adición, mediante goteo continuo, de 47.1 mL (2 eq. 0.496 mol) de sulfato de dimetilo. Terminada la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 horas 30 minutos, la ccf reveló la ausencia del ácido materia prima **1**. El disolvente se retiró de la mezcla de reacción con el rotaevaporador, se agregó agua con hielo al matraz de reacción obteniendo un sólido amarillo claro, éste se separó por filtración al vacío y se lavó repetidamente con agua fría dando 5.32 g (99.50%) de producto crudo. Una muestra 0.73 g se recristalizó de MeOH dando 0.71 g de cristales blancos (97%) con R_f 0.63 (Sistema I) y un p.f. de 76-76.5 °C. (Soluble en acetato de etilo)

Espectro 1. IR cm^{-1} : 3100 y 3039 (C-H aromático), 2967 (-CH₃), 1718 (C=O), 1523 (-NO₂), 1293 (C-O-C). **Espectro 2. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.94 (s, 3H, CH₃ éster), 8.06 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-3); 8.30 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, H-5), 8.40 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-6). **Espectro 3. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:**

53.6 (C-8), 122.8 (C-5), 125.9 (C-3), 132.4 (C-6), 132.9 (C-2), 136.2 (C-1), 149.7 (C-4), 164.9 (C-7). **Espectro 4. EM (IE/ID) m/z :** 215 (M^+ , 22%), 217 ($M+2$, 7%), 184 ($M-31$, 100%).

11.3.2. Síntesis de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3)

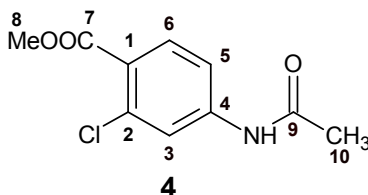


P.M. 185.60

En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.1159 mol) de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**) en 250 mL de MeOH, en seguida se adicionaron 7.5 g (30% en peso) de catalizador Ni/Raney, previamente lavado con agua y posteriormente con MeOH. La botella de hidrogenación se colocó en el hidrogenador, se purgó por triplicado con hidrógeno; la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, con la adición de hidrógeno. Después de 3 horas 30 minutos el consumo de hidrógeno cesó y la CCF demostró la ausencia de la materia prima **2**. La mezcla de reacción se filtró en una cama de celita, posteriormente se retiró el disolvente en un rotaevaporador. Se obtuvieron 20.44 g (95.02%) de un sólido café claro con R_f 0.5 (Sistema I) y p.f. de 108.5-109.5 °C. (Soluble en acetona).

Espectro 5. IR cm^{-1} : 3426 y 3336 (Ar-NH₂); 3221 (C-H aromático); 2951 (-CH₃); 1702 (C=O de éster); 1264 (C-O-C, de éster). **Espectro 6. RMN ¹H:** (TMS, CDCl₃) ppm: 3.714 (s, 3H, -CH₃ de éster); 6.171 (sa, 2H, int. con D₂O, NH₂); 6.496 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 1H, H-5); 6.617 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, H-3); 7.626 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-6). **Espectro 7. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 51.79 (C-8); 112.01 (C-5); 114.4 (C-3); 115.01 (C-1); 133.95 (C-6); 133.15 (C-2); 153.86 (C-4); 165.21 (C-7). **Espectro 8, EM: IE/ID m/z :** 185 (M^+ , 55%); ($M+2$, 18%); 154 ($M-31$, 100%).

11.3.3. Síntesis de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)



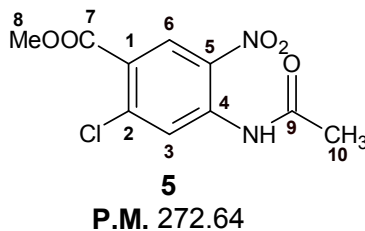
P.M. 227.64

En un vaso de precipitados de 250 mL provisto de termómetro, agitador de vidrio y baño de hielo, se colocaron 20 g (0.1077 mol) de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**) y 30 mL de ácido acético. Lentamente

se adicionaron 10.2 mL (1 eq. 0.1077 mol) de anhídrido acético evitando que la temperatura rebasara los 40 °C, terminada la adición la mezcla de reacción se dejó en agitación vigorosa por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la ccf mostró una conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se agitó vigorosamente con un agitador de vidrio. El sólido blanco formado se separó por filtración al vacío y se lavó repetidamente con agua fría. Se obtuvieron 22.64 g (92.34%) de producto con un *R_f* 0.38 (Sistema I) y p.f. de 114.8-115.4 °C. (Soluble en acetato de etilo).

Espectro 9. IR cm^{-1} : 3260 (N-H), 3186 y 3106 (C-H aromático), 2992 Y 2948 (-CH₃), 1722, 1674 (C=O), 1250 (C-O-C). **Espectro 10. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.08 (s, 3H, CH₃ amida), 3.81 (s, 3H, CH₃ éster), 7.57 (dd, *J* = 8.6, 2 Hz, 1H, H-3), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-5), 7.93 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H-6), 10.39 (s, 1H, N-H). **Espectro 11. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 24.6 (C-10), 52.6 (C-8), 117.2 (C-5), 120.4 (C-3), 123.3 (C-1), 132.9 (C-6), 133.6 (C-2), 143.8 (C-4), 165.1 (C-7), 169.7 (C-9). **Espectro 12. EM (IE/ID) *m/z*:** 227 (M⁺, 22%), 229 (M⁺+2, 7%) 185 (M-42, 60%), 154 (M-73, 100%).

11.3.4. Síntesis de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)

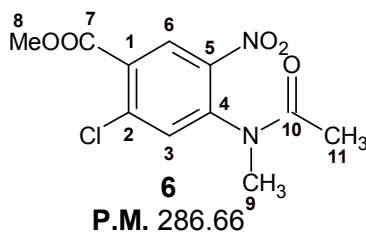


En un vaso de precipitados de 1 L provisto de termómetro, embudo de adición y baño de hielo, se disolvieron 20 g (0.0890 mol) de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4) en 40 mL de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo una agitación vigorosa hasta obtener una solución homogénea y controlando la temperatura por debajo de 10 °C. Se aseguró que la temperatura estuviese entre 0-5 °C para posteriormente adicionar, gota a gota, 6.36 mL (1.2 eq. 0.1068 mol) de ácido nítrico, manteniendo la reacción en el rango de temperatura indicado (0-5 °C). Al término de la adición, 2 horas 30 minutos, la reveló conversión total de la materia prima y la formación de dos productos en proporción 60:40 aproximadamente. La mezcla de reacción se vertió en 2 L de agua con hielo y se agitó vigorosamente. El sólido se separó por succión, se lavó repetidamente con agua fría y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 22.51 g (92.77%) de un sólido amarillo claro. El producto crudo se recristalizó de AcOEt obteniendo 18.54 g (82.4%) de cristales amarillos con *R_f* 0.72 (Sistema I) y p.f 138.9-139.7 °C. (Soluble en etanol).

Espectro 13. IR cm^{-1} : 3341 (-N-H), 3124 Y 3091 (C-H DE Ar), 2953 (-CH₃), 1731 Y 1715 (-C=O), 1611 (-NO₂), 1567 (Ar-NO₂), 1230 (CO-O-CH₃). **Espectro 14. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.14 (s, 3H,

CH₃ amida), 3.88 (s, 3H, CH₃ éster), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.43 (s, 1H, H-6), 10.54 (s, 1H, N-H)
Espectro 15. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 24.3 (C- 10), 53.3 (C-8), 124.6 (C-3), 125.9 (C-1), 129 (C-6),
 135.6 (C-5), 138.1 (C-2), 139.2 (C-4), 163.5 (C-7), 169.6 (C-9). **Espectro 16. EM (IE/ID) m/z:** 272 (M+, 8%),
 230 (M-42, 97%) 199 (M-73, 100%).

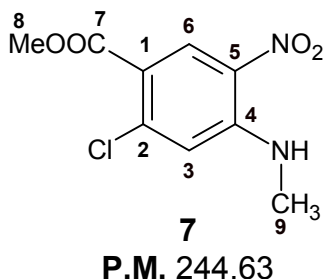
11.3.5. Síntesis de 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)



Se colocaron 30 g (0.110 mol) del 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo en un matraz redondo de 3 bocas adaptado con baño de hielo, termómetro, embudo de adición, agitación magnética y atmosfera de nitrógeno. Se fueron adicionando gota a gota 42 mL (0.440 mol) de (CH₃)₂SO₄ con agitación constante. Posteriormente se goteó muy lentamente una solución concentrada de NaOH (17.6 g en 18 mL de agua.) manteniendo la temperatura entre 10-15°C. Se dejó reaccionar por 50 min y se realizó ccf con lo que se comprobó la ausencia de materia prima. La mezcla de reacción se agregó a 100 g de hielo con lo que se formó un sólido amarillo muy claro el cual se filtró al vacío, se lavó con abundante agua y se hizo una extracción sólido-líquido con metanol frio logrando obtener el producto puro con 84.5% de rendimiento. El punto de fusión fue de 107.8-108.4 °C y con R_f 0.63 (sistema I). Del sólido se tomó una pequeña fracción y se recristalizó de MeOH.(Soluble en acetona).

Espectro 17. IR cm⁻¹: 3051 y 3027 (C-H aromático), 2965 (-CH₃), 1739 (C-O-C=O), 1664 (N-C=O), 1608 (-NO₂), 1341 (COO-CH₃). **Espectro 18. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.14 (s, 3H, CH₃ amida), 3.88 (s, 3H, N-CH₃), 3.91 (s, 6H, CH₃ éster), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.43 (s, 1H, H-6), 10.54 (s, 1H, N-H). **Espectro 19. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 22.4 (C-11), 36.4 (C-9), 53.7 (C-8), 126.9 (C-3), 130.27 (C-1), 132.6 (C-6), 135.4 (C-2), 135.9 (C-5), 148 (C-4), 164.1 (C-7), 171.2 (C-10). **Espectro 20. EM (IE/ID) m/z:** 195 (M-61, 76%) 244 (M-42, 100%).

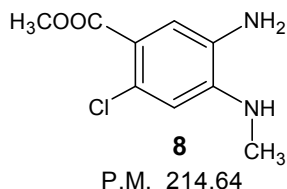
11.3.6. Síntesis de 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7)



En un matraz redondo de una boca de 500 mL, provisto de un condensador, se suspendieron 15 g (0.0550 mol) de 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) en 180 mL de MeOH a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron, gota a gota, 20 mL de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación constante durante 8 horas. Pasado este tiempo la ccf mostró la conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, dando lugar a la formación de un precipitado naranja que posteriormente se separó por filtración al vacío, se lavó con 50 mL de MeOH y posteriormente con agua, se dejó secar al aire dando 11.23 g (88.54%) de un sólido amarillo-naranja. El producto crudo se recrystalizó de MeOH, obteniendo 9.25 g (82.4%) de cristales de color naranja con *Rf* 0.73 (sistema I) y un p.f 191.4-192.5 °C. (Soluble en etanol).

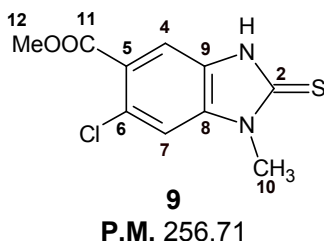
Espectro 21. IR cm^{-1} : 3389 (-N-H), 3114 (C-H aromático), 2921 (-CH₃), 1732 (-C=O), 1619 (-NO₂), 1568 (Ar-NO₂), 1215 (CO-O-CH₃). **Espectro 22. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.99 (d, *J* = 5 Hz, 3H, N-CH₃), 3.81 (s, 3H, CH₃ éster), 7.07 (s, 1H, H-3), 8.62 (s, 1H, H-6), 8.58 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, N-H). **Espectro 23. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.6 (C-9), 52.6 (C-8), 114.1 (C-3), 116.5 (C-1), 129.7 (C-6), 131.5 (C-5), 140.9 (C-2), 147.6 (C-4), 163.7 (C-7). **Espectro 24. EM (IE/ID) *m/z*:** 195 (M-79, 50%) 240 (M-4, 100%), 244 (M+, 53%) 246 (M+2, 18%).

11.3.7. Síntesis de 5-amino-2-cloro-4-(metilamino) benzoato de metilo (8)



En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.1021 mol) de 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7) en 250 mL de MeOH y enseguida se adicionaron 7.5 g (30% en peso) de Ni/Raney, previamente lavado con agua y MeOH. Una vez terminada la adición del catalizador, la botella de hidrogenación se colocó en el hidrogenador; el sistema se purgó tres veces con H₂. Durante 3 horas 30 minutos se llevó a cabo la adición de hidrógeno, a temperatura ambiente; después de este tiempo el consumo de hidrógeno cesó y se decidió terminar la reacción. La ccf demostró la conversión total de la materia prima (7), la mezcla de reacción se filtró en una cama de celita, para retirar el catalizador y posteriormente se concentró el disolvente en un rotaevaporador. Se obtuvieron 20.11 g (92.47%) de un sólido café claro con un *Rf* 0.48 (Sistema I). El producto sin tratamiento posterior se utilizó en la siguiente reacción. (Soluble en metanol).

11.3.8. Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol carboxilato de metilo (9)

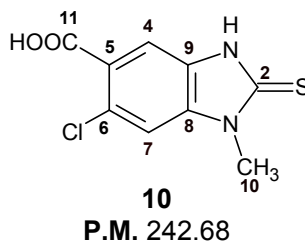


En matraz redondo de tres bocas de 500 mL, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmosfera de nitrógeno, se mezclaron 20 g (0.0932 mol) de 5-amino-2-cloro-4-(metilamino) benzoato de metilo (8) en 250 mL de EtOH a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 14 g de KOH (2.5 eq. 0.2329 mol) disueltos en 50 mL de agua. Después de 10 minutos de agitación, se adicionaron lentamente 12 mL (2 eq. 0.1864 mol) de disulfuro de carbono. Una vez terminada la adición, la mezcla de reacción se calentó a una temperatura de 65 °C durante 3 horas. La ccf reveló conversión total de la materia prima. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo, se puso en agitación y luego se adicionó lentamente ácido acético glacial al 20% hasta un pH 5. El sólido formado se separó al vacío, se lavó con agua helada en repetidas ocasiones y se secó al aire.

Se obtuvieron 18.92 g (78.20%) de un sólido café claro que en ccf mostró una sola mancha con R_f 0.53 (Sistema I). Una muestra de 1.52 g se recrystalizó en EtOH/DMF obteniendo 1.21 g (80%) de un sólido blanco con un p.f. de 254.1-255 °C. (Soluble en DMF).

Espectro 25. IR cm^{-1} : 3242 (S-H), 3072 Y 3023 (C-H-aromático), 2949 (-CH₃), 1701 (C=O), 1628 (C=N), 1242 (CO-O-CH₃). **Espectro 26. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.63 (s, 3H, N-CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃ éster), 7.54 (s, 1H, H-7), 7.62 (s, 1H, H-4), 13.10 (s, 1H, S-H). **Espectro 27. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.7 (C-10), 52.9 (C-12), 112 (C-7), 123.6 (C-4), 123.9 (C-6), 127 (C-5), 129.7 (C-8), 136.5 (C-9), 165.5 (C-11), 171.7 (C-2). **Espectro 28. EM (IE/ID) m/z :** 225 (M-31, 64%), 256 (M+, 100%), 258 (M+2, 39%).

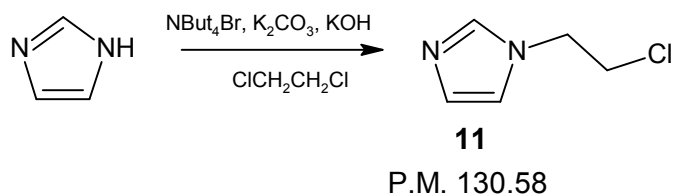
11.3.9. Síntesis de ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10)



En matraz redondo de dos bocas de 100 mL acondicionado con un condensador, se mezclaron con agitación 5 g (0.0194 mol) de 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol carboxilato de metilo (9) en 25 mL de MeOH. Posteriormente se adicionaron 2.1 g (2 eq. 0.0388 mol) de KOH disueltos en 5 mL de agua. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas. La ccf reveló conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se ajustó el pH a 4 con ácido acético al 20%. El sólido se separó al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar al ambiente, dando 2.80 g (59.28%) de un sólido blanco, el cual se recrystalizó de MeOH obteniendo 2.68 g (96%) de cristales blancos con R_f 0.35 (Sistema III) y p.f. de 325.3-326.8 °C. (Soluble en DMSO).

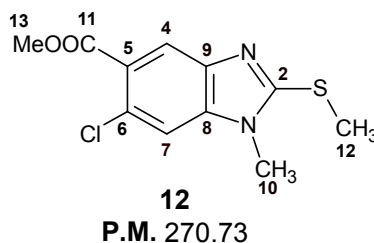
Espectro 29. IR cm^{-1} : 3343 (HO-); >3000 (C-H aromático); 2700 (-CH₃); 1691 (C=O); 1627 (C=N); 1137 (C=S). **Espectro 30. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.62 (s, 3H, N-CH₃); 7.57 (s, 2H, H-4, H-7), 13.04 (s, 2H, COOH, SH). **Espectro 31. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.55 (C-10), 111.94 (C-7), 112.09 (C-4), 125.03 (C-6), 127.02 (C-5), 129.75 (C-8), 136.24 (C-9), 166.77 (C-11), 171.45 (C-2). **Espectro 32. EM (ES/LC) m/z :** 244 (M+2, 30 %); 242 (M, 100 %)

11.3.10. Síntesis de 1-(2-cloroetil)-1*H*-imidazol (11)



En un matraz redondo de 100 mL, adaptado con un condensador, se colocó una mezcla de 5.0 g (0.0736 mol) de imidazol, 0.5017 g (0.0016 mol) de Bu₄NBr, 21.2 g (0.1534 mol) de K₂CO₃, 27.5 g (0.4901 mol) de KOH y 100 mL (1.2631 mol) de 1,2-dicloroetano. La mezcla de reacción se calentó a 50 °C por 4 horas con agitación vigorosa. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se filtró por gravedad y se lavó con diclorometano. El filtrado se lavó con salmuera tres veces, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo un líquido amarillo pálido con *Rf* 0.39 (Sistema IV)

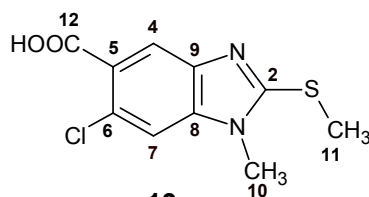
11.3.11. Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12)



En un matraz redondo de una boca de 100 mL acondicionado con embudo de adición y baño de agua helada (5 °C) se disolvieron 10 g (0.0389 mol) de 6-cloro-1-metil-2-tio-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9) en 50 mL de acetona. A la solución se le adicionaron 2.42 g de KOH (1.1 eq. 0.0428 mol) disueltos en 10 mL de agua y posteriormente se agregaron, gota a gota, 2.5 mL (1 eq. 0.0389 mol) de yoduro de metilo. Terminada la adición de los reactivos, la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas, después de este tiempo la ccf reveló la conversión total de la materia. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se ajustó el pH con ácido acético hasta un valor de 7; posteriormente se filtró al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire dando un sólido blanco. El producto crudo se recrystalizó de EtOH dando 2.18 g (84%) de cristales blancos con un *Rf* 0.39 (Sistema II) y un p.f. de 113.3-114.3 °C. (Soluble en DMF).

Espectro 33. IR cm^{-1} : 3080 y 3006 (C-H-aromático), 2948 y 2930 (-CH₃), 1720 (C=O), 1616 (C=N), 1265 (CO-O-CH₃). **Espectro 34.** RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2.76 (s, 3H, S-CH₃), 3.71 (s, 3H, N-CH₃), 3.88 (s, 3H, CH₃ éster), 7.78 (s, 1H, H-7), 7.98 (s, 1H, H-4). **Espectro 35.** RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 14.5 (C-11), 30.7 (C-10), 52.8 (C-13), 112 (C-7), 120.3 (C-4), 123.1 (C-6), 125.5 (C-5), 139.9 (C-8), 141.4 (C-9), 157 (C-2), 166.4 (C-12). **Espectro 36.** EM (IE/ID) m/z : 237 (M-33, 49%), 239 (M-31, 51%), 270 (M+, 100%), 272 (M+2, 38%).

11.3.12. Síntesis de ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (13)



13
P.M. 256.71

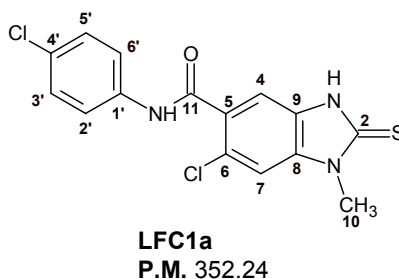
En matraz redondo de dos bocas de 100 mL, acondicionado con una columna Vigreux y termómetro, se mezclaron con agitación 5 g (0.0184 mol) de 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (**12**) en 25 mL de MeOH. Posteriormente se adicionaron 2.1 g (2 eq. 0.0369 mol) de KOH disueltos en 5 mL de agua. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas. La ccf reveló conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se ajustó el pH a 4 con ácido acético al 20%. El sólido se separó al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar al ambiente, dando 2.80 g (59.28%) de un sólido blanco, el cual se recrystalizó de EtOH obteniendo 2.68 g (96%) de cristales blancos con R_f 0.20 (Sistema I) y p.f. de 252-253 °C. (Soluble en DMSO).

Espectro 37. IR cm^{-1} : 3450 (HO-); >3000 (C-H aromático); 2933 y 256 (-CH₃); 1699 (C=O); 1613 (C=N); 1255 (C-S-CH₃). **Espectro 38.** RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2.74 (s, 3H, S-CH₃), 3.68 (s, 3H, N-CH₃), 7.74 (s, 1H, H-7), 7.94 (s, 1H, H-6), 13.03 (s, 1H, COOH). **Espectro 39.** RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 14.6 (C-11), 30.6 (C-10), 111.9 (C-7), 120.2 (C-4), 124.4 (C-6), 125.6 (H-5), 139.6 (C-8), 141.4 (C-9), 156.7 (C-2), 167.5 (C-12). **Espectro 40.** EM (IE/ID) m/z : 223 (M-33, 68%), 256 (M+, 100%), 258 (M+2, 39%).

11.4. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1a-4a

En un matraz redondo de 50 mL, adaptado con baño de hielo y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 0.6 g (0.0025 mol) de ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol carboxílico (**10**) suspendidos en 20 mL de acetonitrilo anhidro; a la suspensión se agregaron 0.7 mL (2 eq. 0.005 mol) de trietilamina previamente destilada y 1.5 equivalentes de la anilina adecuadamente sustituida. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante y cuando alcanzó los 0 °C se añadieron lentamente 2.8 mL (2 eq. 0.005 mol) de T3P®. La reacción se trabajó de acuerdo a sus propiedades.

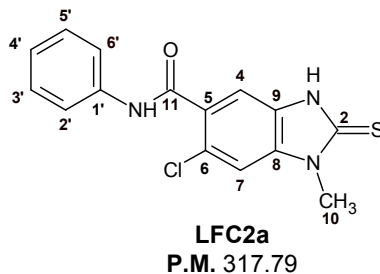
11.4.1. Síntesis de 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a)



Se siguió el método general de síntesis utilizando 0.478 g (1.5 eq 0.00375 mol) de 4-cloroanilina. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el disolvente de la mezcla de reacción con el rotaevaporador y se agregó agua/hielo. Se obtuvo un precipitado blanco que se filtró al vacío y se dejó secar. El producto se purificó por tratamiento con 20% (w/w) de carbón activado en MeOH a reflujo durante media hora. Posteriormente, el producto se recristalizó con tolueno dando 0.393 g (38.2 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.64 (Sistema II) y punto de fusión de 294.8-295.4 °C. (Soluble en acetato de etilo)

Espectro 41. IR cm^{-1} : 3278 (NH- de amida); 3107 (C-H aromático); 2940 (-CH₃); 1657 (C=O de amida); 1591 (HN- CO); 1302 (Ar-N-R); 1134 (C=S de tiona). **Espectro 42. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.64 (s, 3H, -NCH₃); 7.31 (s, 1H, H-7); 7.39 (d, 2H, H-3', H-5', *J*= 8.9 Hz); 7.66 (s, 1H, H-4); 7.72 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.9 Hz); 10.58 (s, 1H, -NH-); 13.05 (sa, 1H, -NH-). **Espectro 43. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.86 (C-10); 109.90 (C-4); 111.09 (C-7); 121.59 (C-3', C-5'); 124.65 (C-6); 127.81 (C-4'); 129.12 (C-2', C-6'); 129.77 (C-5); 131.22 (C-1'); 135.09 (C-8); 138.37 (C-9); 165.13 (C-11); 171.05 (C-2). **Espectro 44. EM (ES/LC) *m/z*:** 354 (M+2, 10 %); 352 (M, 100 %); 226 (M-126, 18 %)

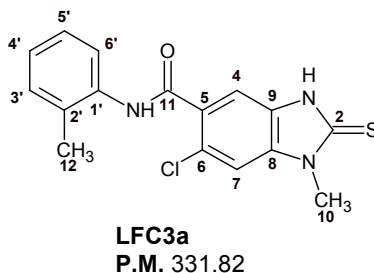
11.4.2. Síntesis de 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a)



Se siguió el método general de síntesis utilizando 0.34 mL (1.5 eq 0.00375 mol) de anilina previamente destilada. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el disolvente de la mezcla de reacción con el rotaevaporador, el residuo se disolvió en 30 mL de diclorometano y se extrajo con salmuera (3 x 50 mL). La fase orgánica se concentró al 50 % del volumen inicial y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil una mezcla CHCl₃/MeOH (90:10). Se obtuvieron 0.306 g (38.5 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.62 (sistema II) y punto de fusión 331.3-332.4 °C. (Soluble en acetona).

Espectro 45. IR cm⁻¹: 3242 (NH- de amida); 3114 (C-H aromático); 2941 (-CH₃); 1652 (C=O de amida); 1596 (HN- CO); 1302 (Ar-N-R); 1136 (C=S). **Espectro 46. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.65 (s, 1H, -NCH₃-); 7.09 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz); 7.30 (s, 1H, H-7); 7.33 (t, 2H, H-3',H-5', *J*=7.9 Hz); 7.65 (s, 1H, H-4); 7.70 (d, 2H, H-2', H-6', *J*= 7.9 Hz); 10.44 (s, 1H, -NH-); 12.99 (sa, 1H, -NH). **Espectro 47. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.86 (C-10); 109.86 (C-4); 111.05 (C-7); 120.05 (C-3', C-5'); 124.21 (C-4'); 124.65 (C-6); 129.19 (C-2', C-6'); 129.78 (C-5); 131.55 (C-1'); 135.00 (C-8); 139.43 (C-9); 165.05 (C-11); 171.00 (C-2). **Espectro 48. EM (ES/LC) *m/z*:** 320 (M+2, 22 %); 318 (M, 100 %); 226 (M-92, 15 %).

11.4.3. Síntesis de 6-cloro-1-metil-*N*-(2-metilfenil)-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3a)

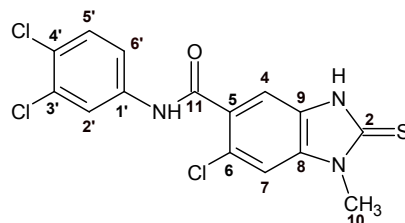


Se siguió el método general de síntesis utilizando 0.40 mL (1.5 eq 0.00375 mol) de 2-metil-anilina previamente destilada. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el disolvente de la mezcla de reacción con el rotaevaporador, el residuo

se disolvió en 30 mL de diclorometano y se lavó con salmuera (3 x 50 mL). La fase orgánica se concentró al 50 % del volumen inicial y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil una mezcla CHCl₃/MeOH (95:5). Se obtuvieron 0.288 g (34.7 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.65 (sistema II) y punto de fusión 291.3-292.7 °C. (Soluble en acetato de etilo).

Espectro 49. IR cm⁻¹: 3357 (NH- de amida); 3141 (C-H aromático); 2991 y 2936 (-CH₃); 1662 (C=O de amida); 1584 (HN- CO); 1307 (Ar-N-R); 1100 (C=S de tiona). **Espectro 50. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.29 (s, 3H, ArCH₃); 3.67 (s, 3H, -NCH₃); 7.15 (t, 1H, H-4', *J* = 7.1); 7.21 (sc, 1H, H-5'); 7.26 (d, 1H, H-3', *J* = 7.3 Hz); 7.36 (s, 1H, H-7), 7.45 (d, 1H, H-6', *J* = 7.6 Hz); 7.66 (s, 1H, H-4); 9.92 (s, 1H, -NH-); 13.02 (sa, 1H, -NH). **Espectro 51. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 18.46 (C-12); 30.84 (C-10); 109.90 (C-4); 111.03 (C-7); 124.60 (C-6); 126.39 (C-4 C-5''); 126.44 (C-6''); 129.82 (C-5); 130.81 (C-3'); 131.61 (C-1'); 133.43 (C-2'); 134.94 (C-8) 136.30 (C-9); 165.28 (C-11); 170.94 (C-2). **Espectro 52. EM (ES/LC) *m/z*:** 334 (M+2 40 %); 332 (M, 100 %); 226 (M-106, 13 %).

11.4.4. Síntesis de 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a)



LFC4a
P.M. 386.68

Se siguió el método general de síntesis utilizando 0.608 g (1.5 eq 0.00375 mol) de 3,4-dicloroanilina. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el disolvente de la mezcla de reacción con el rotaevaporador y se agregó agua/hielo. Se obtuvo un precipitado café que se filtró al vacío y se dejó secar; la purificación del sólido se llevó a cabo mediante una columna de óxido de aluminio y posteriormente recristalización con tolueno. Se obtuvieron 0.277 g (28.7 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.68 y punto de fusión 301.6-302.8 °C. (Soluble en acetona).

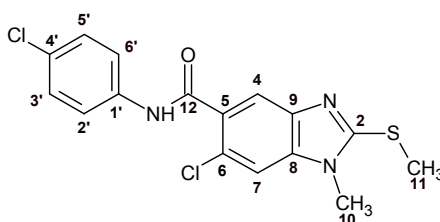
Espectro 53. IR cm⁻¹: 3168 (NH- de amida); 3100 (C-H Aromático); 2940 (-CH₃); 1661 (C=O de amida); 1531 (HN- CO); 1311 (Ar-N-R); 1097 (C=S). **Espectro 54 RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 3.67 (s, 3H, -NCH₃); 7.62 (s, 2H, H-4, H-7); 7.66 (dd, 1H, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, H-5'); 7.77 (s, 1H, H-7); 8.09 (sd, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-2'); 10.77 (s, 1H, -NH-); 13.06 (sa 1H, -N-H). **Espectro 55 RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.87 (C-10); 109.97 (C-4); 111.16 (C-7); 120.10 (C-5'); 121.22 (C-2'); 124.66 (C-6); 125.7 (C-4'); 129.75 (C-

3'); 130.77 (C-5), 131.19 (C-6'); 131.41 (C-1'); 135.26 (C-8); 139.47 (C-9); 165.38 (C-12); 171.14 (C-2)..
Espectro 56. EM (ES/LC) m/z : 388 (M+2); 386 (M, 2 %); 226 (M-161, 20%).

11.5. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1b-4b

En un matraz redondo de una boca de 50 mL, acondicionado con una columna Vigreux, se colocó 1g (0.0039 mol) del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**13**) y 1.71 mL (6 eq. 0.0234 mol) de SOCl₂. La reacción se agitó y calentó a 40 °C durante 3 horas. Una muestra analítica de la mezcla de reacción se derivatizó al éster del bencimidazol (**12**) por tratamiento con MeOH anhidro, con el propósito de observar la formación completa del cloruro de ácido. Una vez terminada la formación del cloruro de ácido, el exceso de SOCl₂ se retiró mediante destilación azeotrópica con 20 mL de benceno. El residuo seco, se lavó con hexano frío (20 mL x 5), precipitando un sólido que se separó al vacío, y se utilizó de manera inmediata para evitar su hidrólisis debida a la humedad del ambiente. El cloruro del ácido se colocó en un matraz de una boca de 50 mL, se suspendió en 20 mL de CH₃CN anhidro y a la suspensión se agregaron 1.64 mL (3 eq. 0.0117 mol) de Et₃N y 1 equivalente de la anilina adecuadamente sustituida. La reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Cada reacción se trabajó de acuerdo a sus propiedades.

11.5.1. Síntesis de 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b)



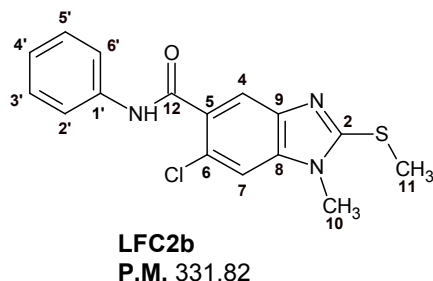
LFC1b
P.M. 366.26

Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente de cloruro de ácido y 0.484 g (0.0038 mol) de 4-cloroanilina, la reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 6 horas. Pasado este tiempo se destiló el disolvente con el rotaevaporador, el sólido resultante se vertió en hielo, se filtró al vacío y se dejó secar. El producto se purificó mediante recristalización con MeOH obteniendo 1.08 g (78.2 %) de cristales blancos con *Rf* 0.86 (Sistema II) y punto de fusión 217.5-218.3 °C. (Soluble en acetato de etilo).

Espectro 57. IR cm^{-1} : 3272 (NH- de amida); 3173 (C-H aromático); 2945 (-CH₃); 1665 (C=O de amida); 1595 (HN- CO); 1312 (Ar-N-R); 1257 (C-S-CH₃). **Espectro 58. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.74

(s, 3H, -SCH₃); 3.71 (s, 3H, -NCH₃); 7.41 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 8.8 Hz); 7.73 (s, 1H, H-4); 7.77 (s, 1H, H-7); 7.78 (d, 2H, H-3', H-5', *J* = 8.9 Hz); 10.55 (s, 1H, -NH-). **Espectro 59. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 14.19 (C-11); 30.19 (C-10); 110.65 (C-4, C-7); 121.11 (C-2', C-6'); 123.29 (C-5, C-6); 127.21 (C-4'); 128.66 (C-3', C-5'); 129.92 (C-1'); 138.18 (C-8); 141-10 (C-9); 155.70 (C-2); 165.56 (C-2). **Espectro 60. EM (ES/LC) *m/z*:** 370 (M+2, 10 %); 368 (M, 100 %); 240 (M-126, 9 %).

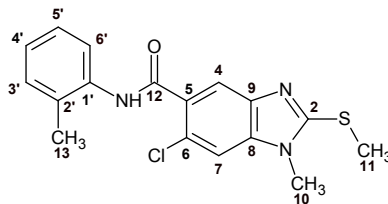
11.5.2. Síntesis de 6-cloro-1-metil-*N*-fenil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b)



Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente de cloruro de ácido y 0.35 mL (0.0038 mol) de anilina previamente destilada, la reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 8 horas. Pasado este tiempo se retiró el disolvente con el rotaevaporador, el sólido resultante se vertió en hielo, se filtró al vacío y se dejó secar. El producto se purificó por tratamiento con 20% (w/w) de carbón activado en MeOH a reflujo durante media hora. Posteriormente se recristalizó con acetona obteniendo 0.886 g (70.3 %) de cristales blancos con *R_f* 0.83 (Sistema II) y punto de fusión 212.3-213.8 °C. (Soluble en acetona).

Espectro 61. IR cm⁻¹: 3243 (NH- de amida); 3189 (C-H aromático); 2945 (-CH₃); 1666 (C=O de amida); 1596 (HN- CO); 1311 (Ar-N-R); 1258 (C-S-CH₃). **Espectro 62. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.74 (s, 3H, -SCH₃); 3.71 (s, 1H, -NCH₃-); 7.10 (t, 1H, H-4', *J* = 7.2 Hz); 7.35 (t, 2H, H-3', H-5', *J* = 7.7 Hz); 7.73 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 7.9 Hz); 7.76 (s, 2H, H-4, H-7); 10.40 (s, 1H, -NH-). **Espectro 63. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 14.35 (C-11); 30.33 (C-10); 110.73 (C-7); 117.53 (C-4); 123.77 (C-2', C-4', C-6'); 128.86 (C-3', C-5'); 130.44 (C-1'); 139.41 (C-8); 141.29 (C-9); 155.73 (C-2); 165.62 (C-12). **Espectro 64. EM (ES/LC) *m/z*:** 334 (M+2); 332 (M, 100 %); 240 (M-92, 10 %).

11.5.3. Síntesis de 6-cloro-1-metil-*N*-(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b)

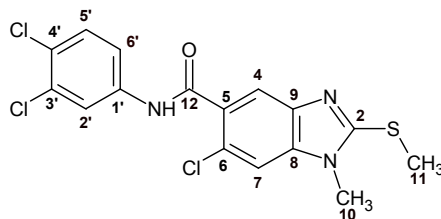


LFC3b
P.M. 345.85

Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente de cloruro de ácido y 0.41 mL (0.0038 mol) de 2-metilanilina previamente destilada, la reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 8 horas. Pasado este tiempo se destiló el disolvente con el rotaevaporador, el sólido resultante se vertió en hielo, se filtró al vacío y se dejó secar. El producto se purificó mediante tratamiento con 20% (w/w) de carbón activado en MeOH a reflujo durante media hora, obteniendo 0.954 g (72.6 %) de cristales blancos con *R_f* 0.86 (Sistema II) y punto de fusión 224.7-225.3 °C. (Soluble en acetona).

Espectro 65. IR cm^{-1} : 3200 (NH- de amida); 3024 (C-H aromático); 2978 y 2928 (-CH₃); 1638 (C=O de amida); 1524 (HN- CO); 1305 (Ar-N-R); 1277 (C-S-CH₃). **Espectro 66.** 2.31 (s, 3H, ArCH₃); 2.75 (s, 3H, -SCH₃); 3.271 (s, 3H, -NCH₃); 7.15 (t, 1H, H-4', *J* = 7.2 Hz); 7.22 (sc, 1H, H-5'); 7.26 (d, 1H, H-3', *J* = 7.5 Hz); 7.46 (d, 1H, H-6', *J* = 7.6 Hz); 7.76 (s, 2H, H-4, H-7); 9.84 (s, 1H, -NH-). **Espectro 67. RMN ^{13}C (TMS, DMSO-*d*6) ppm:** 14.38 (C-11); 18.22 (C-13); 30.36 (C-10); 110.78 (C-7); 117.60 (C-4); 123.52 (C-6); 126.02 (C-5, C-4'); 126.12 (C-6'); 130.55 (C-5'); 133.22 (C-1'); 136.31 (C-2'); 138.20 (C-8) 141.32 (C-9); 155.68 (C-2); 165.79 (C-11). **Espectro 68. EM (ES/LC) *m/z*:** 348 (M+2, 38%) 346 (M, 100 %); 240 (M-106, 10 %).

11.5.4. Síntesis de 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4b)



LFC4b
P.M. 400.71

Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente de cloruro de ácido y 0.615 g (0.0038 mol) de 3,4-dicloroanilina, la reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 10 horas. Pasado este tiempo se destiló el disolvente con el rotaevaporador, el sólido resultante se vertió en hielo, se filtró al vacío y se dejó secar. El producto se purificó mediante una columna de óxido de aluminio y

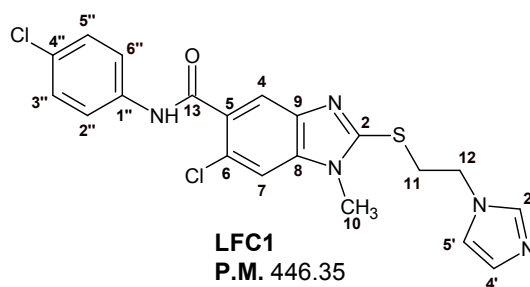
posterior recristalización con MeOH, obteniendo 0.916 g (70.6 %) de un sólido blanco con Rf 0.88 (Sistema II) y punto de fusión 260.3-261.1 °C. (Soluble en acetona).

Espectro 69. IR cm^{-1} : 3218 (NH- de amida); 3155 (C-H aromático); 2938 (-CH₃); 1666 (C=O de amida); 1525 (HN- CO); 1306 (Ar-N-R); 1253 (C-S-CH₃). **Espectro 70. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.75 (s, 3H, -SCH₃); 3.72 (s, 3H, -NCH₃); 7.62 (d, 1H, J= 8.8 Hz, H-5'); 7.67 (dd, 1H, J₁= 8.8 Hz, J₂= 2.2 Hz, H-6'); 7.77 (s, 1H, H-7); 7.80 (s, 1H, H-4); 8.14 (sd, 1H, J= 2.2 Hz, H-2'); 10.72 (s, 1H, -NH-). **Espectro 71. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 14.61 (C-11); 30.62 (C-10); 111.16 (C-4); 117.99 (C-7); 120.01 (C-6'); 121.10 (C-2'); 123.68 (C-6); 125.50 (C-5); 129.87 (C-4'); 131.15 (C-3',C-5'); 131.45 (C-1'); 139.71 (C-8); 141.51 (C-9); 156.24 (C-2); 166.21 (C-12). **Espectro 72. EM (ES/LC) m/z:** 402 (M+2, 92 %); 400 (M, 100%); 240 (M-161, 10%.)

11.6. Método general de síntesis para la obtención de los compuestos de la serie LFC1-4

En un matraz redondo de 50 mL, adaptado con una columna Vigreux, se colocaron 0.6 g de la amida correspondiente (**LFC1a-4a**) suspendidos en 20 mL de acetonitrilo; posteriormente, a la suspensión se agregó 1 equivalente de carbonato de potasio disuelto en la mínima cantidad de agua. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 3 mL de 1-(2-cloroetil)-1H-imidazol (**11**). Cada reacción se trabajó de acuerdo a sus propiedades.

11.6.1. Síntesis de 6-cloro-N-(4-clorofenil)-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (**LFC1**)

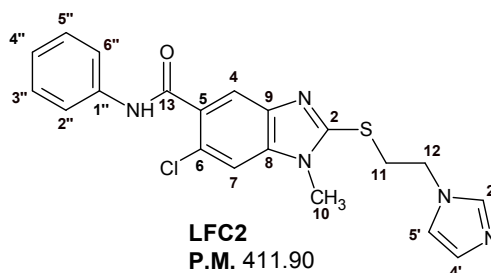


Se siguió el método general de síntesis utilizando como materia prima 0.6 g (0.002 mol) de **LFC1a**. La reacción se mantuvo a 50 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente 10 horas más. Pasado este tiempo la ccf reveló la ausencia de materia prima **LFC1a**. Se destiló el disolvente con el rotaevaporador y se agregó agua helada al líquido denso resultante. La mezcla se mantuvo en agitación constante a 10 °C hasta la formación de un sólido amarillo, el cual se filtró al vacío y se dejó secar. El producto obtenido se purificó

mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil acetato de etilo. Posteriormente se recristalizó de isopropanol/agua. Se obtuvieron 0.341 g de un sólido blanco con *Rf* 0.43 (Sistema III) y punto de fusión 141.3-142.9 °C. (Soluble en cloroformo).

Espectro 73. IR cm^{-1} : 3245 (NH- de amida); 3185 (C-H aromático); 2940-2800 (alifáticos); 1674 (C=O de amida); 1594 (HN- CO); 1309 (Ar-N-R). **Espectro 74. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm:** 3.69 (s, 3H, NCH₃); 3.74 (t, 2H, -SCH₂-, *J*= 6.4 Hz); 4.39 (t, 2H, -NCH₂-, *J*= 6.4 Hz); 6.89 (s, 1H, H-4'); 7.24 (s, 1H, H-5'); 7.41 (d, 2H, H-3'', H-5'', *J*= 8.9); 7.64 (s, 1H, H-2''); 7.78 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*= 8.9); 7.78 (s, 1H, H-4); 7.81 (s, 1H, H-7); 10.61 (s, 1H, -NH-). **Espectro 75. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm:** 30.26 (C-10); 32.59 (C-11); 45.07 (C-12); 110.83 (C-4); 117.63 (C-7); 119.32 (C-6, C-5'); 121.07 (C-2'', C-6''); 123.48 (C-5); 127.15 (C-4''); 128.51 (C-4') 128.58 (C-3'', C-5''); 130.05 (C-1''); 137.43 (C-2'); 138.12 (C-9); 140.96 (C-2); 165.68 (C-13). **Espectro 76. EM (ES/LC) *m/z*:** 450 (M+4, 9 %); 448 (M+2, 36 %); 446 (M, 48 %); 382 (M-64, 19 %); 380 (M-66, 78 %); 378 (M-68, 100 %); 321 (M-125, 18 %); 319 (M-127, 49 %); 127 (M-319, 11 %); 95 (M-351, 20 %); 69 (M-377, 5 %)

11.6.2. Síntesis de 6-cloro-*N*-fenil-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2)

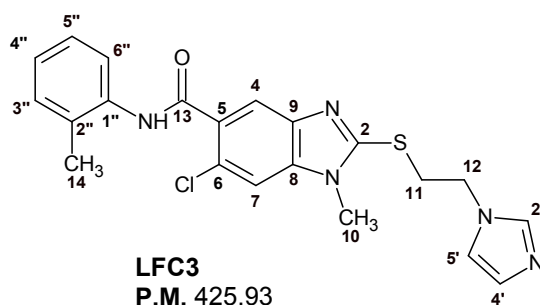


Se siguió el método general de síntesis utilizando como materia prima 0.6 g (0.002 mol) de **LFC2a**. La reacción se mantuvo a 50 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente 12 horas más. Pasado este tiempo la ccf reveló ausencia de materia prima **LFC2a**. Se destiló el disolvente con el rotaevaporador obteniendo un líquido denso color café oscuro. El producto se purificó por tratamiento con 20% (w/w) de carbón activado en isopropanol a reflujo durante media hora. Posteriormente el producto se recristalizó de isopropanol/agua dando 0.298 g (36.4 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.40 (Sistema III) y punto de fusión 121.1-122.3 °C. (Soluble en acetato de etilo).

Espectro 77. IR cm^{-1} : 3242 (NH- de amida); 3191 (C-H aromático); 2930-2800 (alifáticos); 1670 (C=O de amida); 1600 (HN- CO); 1312 (Ar-N-R). **Espectro 78. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm:** 3.70 (s, 3H,

NCH₃); 3.74 (t, 2H, -SCH₂-, *J*= 6.2 Hz); 4.39 (t, 2H, -NCH₂-, *J*= 6.2 Hz); 7.02 (s, 1H, H-4'); 7.10 (t, 1H, H-4'' *J*=7.3 Hz); 7.35 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*= 7.8 Hz); 7.76 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*= 7.2 Hz); 7.76 (s, 1H, H-4); 7.80 (s, 1H, H-7); 7.88 (s, 1H, H-2'); 10.41 (s, 1H, -NH-). **Espectro 79. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 30.74 (C-10); 32.93 (C-11); 46.00 (C-12); 111.24 (C-7); 118.04 (C-6,C-4,C-6''); 120.04 (C-5'); 124.04 (C-5,C-4''); 129.11 (C-4' C-5''); 130.91 (C-1''); 138.31 (C-2'); 139.65 (C-8); 141.44 (C-9); 154.00 (C-2); 165.82 (C-13). **Espectro 80. EM (ES/LC) *m/z*:** 414 (M+2, 10 %); 412 (M, 30 %); 346 (M-66, 40 %); 344 (M-68, 100 %); 321 (M-91, 20 %); 319 (M-93, 50 %) 127 (M-285, 14 %) 95 (M-317, 20 %) 69 (M-343, 9 %).

11.6.3. Síntesis de 6-cloro-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-*N*-(2-metilfenil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3)

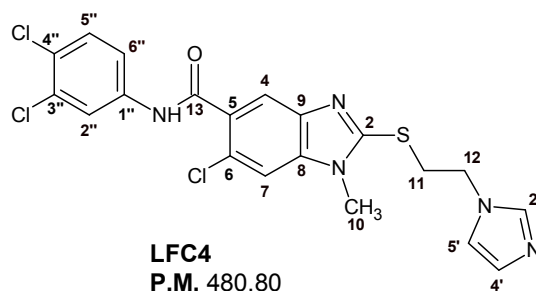


Se siguió el método general de síntesis utilizando como materia prima 0.6 g (0.002 mol) de **LFC3a**. La reacción se mantuvo a 50 °C durante 4 horas y a temperatura ambiente 15 horas más. Pasado este tiempo la ccf reveló ausencia de materia prima **LFC3a**. Se destiló el disolvente con el rotaevaporador, el producto obtenido se lavó con éter dietílico y posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil acetato de etilo. El sólido se recrystalizó de isopropanol/agua obteniendo 0.246 g (28.9 %) de un sólido blanco con *Rf* 0.43 (Sistema III) y punto de fusión 98.9-100.8 °C. (Soluble en acetato de etilo).

Espectro 81. IR cm⁻¹: 3241 (NH- de amida); 3177 (C-H aromático); 2981-2800 (alifáticos); 1668 (C=O de amida); 1586 (HN- CO); 1311 (Ar-N-R). **Espectro 82. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 2.31 (s, 3H, Ar-CH₃); 3.69 (s, 3H, -NCH₃); 3.76 (t, 2H, -SCH₂-, *J*= 6.2 Hz); 4.45 (t, 2H, -NCH₂-, *J*= 6.2 Hz); 7.06 (s, 1H, H-4'); 7.17 (t, 1H, H-4'' *J*=7.3 Hz); 7.23 (m, 1H H-5'', *J*= 7.8 Hz); 7.26 (s, 1H, H-3''); 7.37 (s, 1H, H-5'); 7.45 (s, 1H, H-6''); 7.79 (s, 2H, H-4, H-7); 7.98 (s, 1H, H-2'); 9.86 (s, 1H, -NH-). **Espectro 83. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm:** 19.55 (C-14); 31.86 (C-10); 33.93 (C-11); 47.28 (C-12); 112.35 (C-7); 119.12 (C-4); 125.10 (C-5'); 127.40 (C-4''); 127.49 (C-6''); 127.56 (C-5''); 131.89 (C-1'', C-3''); 134.61 (C-2'') 132.02 (C-4'); 137.60 (C-2');

139.35 (C-8); 142.53 (C-9); 154.98 (C-2); 167.06 (C-13). **Espectro 84. EM (ES/LC) m/z :** 428 (M+2, 18 %); 426 (M, 54 %); 360 (M-66, 38 %); 358 (M-68, 100%); 321 (M-105, 30 %); 319 (M-107, 80 %); 127 (M-299, 20 %); 95 (M-331, 22 %); 69 (M-357, 25 %).

11.6.4. Síntesis de 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4)



Se siguió el método general de síntesis utilizando como materia prima 0.6 g (0.002 mol) de **LFC4a**. La reacción se mantuvo a 50 °C durante 4 horas y a temperatura ambiente 12 horas más. La ccf mostró la presencia de materia prima **LFC4a** por lo que se decidió mantener la reacción en agitación y a 50 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo se destiló el disolvente con el rotaevaporador, se agregó agua helada al producto obtenido y se mantuvo en agitación hasta la formación de un precipitado café. El producto se filtró y se dejó secar al vacío, posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil acetato de etilo obteniendo 0.226 g (23.6 %) de un sólido blanco con *R_f* 0.45 (Sistema III) y punto de fusión 116.8-117.5 °C. (Soluble en cloroformo)

Espectro 85. IR cm^{-1} : 3577 (NH- de amida); 3200 (C-H aromático); 2900-2800 (alifáticos); 1676 (C=O de amida); 1585 (HN- CO); 1304 (Ar-N-R). **Espectro 86. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm:** 3.70 (s, 3H, -NCH₃); 3.74 (t, 2H, -SCH₂-, $J = 6.4$ Hz); 4.40 (t, 2H, -NCH₂- $J = 6.4$ Hz); 6.91 (s, 1H, H-4'); 7.25 (s, 1H, H-5'); 7.62 (d, 1H, H-5'' $J = 8.8$ Hz); 7.66 (dd, 1H, H-6'', $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz); 7.67 (s, 1H, H-2'); 7.82 (s, 2H, H-4, H-7); 8.14 (sd, 1H, H-2'' $J = 2.2$ Hz); 10.75 (s, 1H, -NH-). **Espectro 87. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm:** 30.77 (C-10); 33.07 (C-11); 45.57 (C-12); 111.42 (C-7); 118.23 (C-4); 120.07 (C-6''); 121.17 (C-5'); 123.96 (C-2''); 129.01 (C-4'); 130.07 (C-4''); 131.15 (C-2, C-5''); 131.45 (C-1''); 138.56 (C-2'); 139.70 (C-8); 141.43 (C-9); 154.36 (C-2); 165.15 (C-13). **Espectro 88. EM (ES/LC) m/z :** 484 (M+4, 30 %); 482 (M+2, 92 %); 480 (M, 100%)

12. REFERENCIAS

- [1] Report, T.W.H. Reducing risk, promoting healthy life. Geneva. World Health Organization. **2002**.
- [2] Escobedo, A.A.; Almirall, P.; Robertson, L.J.; Franco, R.M.; Hanevik, K.; Mørch, K.; Cimerman, S. Treatment of intestinal protozoan infections in children. *Arch. Dis. Child.* **2009**, 94: 478–482.
- [3] Jansen, A.; Stark, K.; Kunkel, J.; Schreier, E.; Ignatius, R.; Liesenfeld, O.; Werber, D.; Göbel, U.B.; Zeitz, M.; Schneider, T. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* **2008**, 8:143-149.
- [4] Jackson, T.F.H.G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.* **1998**, 28:181–186.
- [5] Hernández-Álvarez, H.; Sariago-Ramos, I.; Sarracent-Pérez, J. Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. *Rev. Cuba. Obs. Ginecol.* **2009**, 35(4):108–17.
- [6] Raza, A.; Iqbal, Z.; Muhammad, G.; Khan, M.A.; Hanif, K. Amoebiasis as a major risk to human health: a review. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 3(3):13-24.
- [7] Stanley S.L. Amoebiasis. *Lancet.* **2003**, 361:1025–1034.
- [8] Chatterjee, A.; Ghosh, S.K.; Jang, K.; Bullitt, E.; Moore, L.; Robbins, P.W.; Samuelson, J. Evidence for a "wattle and daub" model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathog.* **2009** 5: e1000498
- [9] <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>. (11-07-**2015**).
- [10] Pritt, B.S.; Clark, C.G. Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* **2008**, 83:1154–1160.
- [11] CDC. Laboratory diagnosis of amebiasis: *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. CDC. Atlanta, GA. **2010**
- [12] Thompson, R.C.A.; Lymbery, A.J.; Meloni, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. *Protozo. Abs.* **1990**, 14, 1–28.
- [13] Ankarklev, J.; Jerlström-Hultqvist, J.; Ringqvist, E.; Troell, K.; Svärd, S.G. Review. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8:413-422.
- [14] <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>. (18 -07 -**2015**).
- [15] Busatti, H.G.; Santos, J.F.; Gomes, M.A. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we? *Biologics.* **2009**, 3:273–287.
- [16] Demirci, M.; Delibas, N.; Altuntas, I.; Oktem, F.; Yönden, Z. Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. *J. Health Popul. Nutr.* **2003**, 21:72–75.
- [17] Bourg, R. Studies on the morphology of *Trichomonas vaginalis* Donne. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* **1957**, 22 (6-7):346–60.

- [18] Costamagna, S.R.; Prado-Figueroa, Ma. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitol. día.* **2001**, 25(3-4):100–108.
- [19] <http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>. (15-07-2015).
- [20] Cadena, V. D.; Miranda, N.; Calderón, N. Tricomoniasis urogenital. *Rev. Papeña. Med. Fam.* **2006**, 3(4):84–9.
- [21] Mason, P.R.; Gregson, S.; Gwanzura, L.; Cappuccinelli, P.; Rapelli, P.; Fiori, P.L. Enzyme immunoassay for urogenital trichomoniasis as a marker of unsafe sexual behaviour. *Epidemiol. Infect.* **2001**, 126(1):103–9.
- [22] Howland, R.; Mycek, M.; Harvey, R.; Champe, P; Mycek, M. *Pharmacology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 4th Edition. 2006. 417-420.
- [23] Boreham, P.F.; Phillips, R.E.; Shepherd, R.W. A comparison of the in-vitro activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1985**, 16: 589-595.
- [24] Gardner, T.B. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14(1): 114-128.
- [25] Brunton, L. Goodman, S.L.; Gilman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Editorial Médico Panamericana, México, **1996**; (2), 1049-1060.
- [26] Morgan, U. M.; Reynolds, J. A.; Thomson, C. A.; Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia spp.* In vitro, *Antimicro Agents and Chemo Ther.* **1993**, 37: 328.
- [27] Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **1992**, 37(3): 221-224.
- [28] Sears, S.D.; O'hare, J. In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to 50 antimicrobial agents, *Antimicrob Agents Chemother.* **1988**, 32:144-146.
- [29] Chavez, B.; Espinosa-Cantellano, M.; Cedillo-Rivera, R.; Ramirez, A.; Martinez-Palomo, A. Effects of albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch. Med. Res.* **1992**, 23:63-67
- [30] López-Balbiaux, N. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de nuevas carboxamidas benzimidazólicas 1-metiladas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2005**.
- [31] Vargas-Benítez, P. Síntesis de derivados del 5-aminocarbonil-1H-benzimidazol con potencial actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, **2002**.
- [32] Reza-Ramírez, B. E. Síntesis de 5 carboxamidas derivadas del ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-il carboxílico con posible actividad giardicida. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2005**.

- [33] Hernández-Campos, A. Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2014**.
- [34] Islas-Fonseca, Y. Síntesis alterna de dos 1-metil-6-carboxamidas bencimidazólicas con potencial actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2003**.
- [35] Sandoval-Rivera, E. Síntesis de carboxamidas 1-metilbencimidazolicas con potencial actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2003**.
- [36] López-Balbiaux, N. Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazólicos 1-metilados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2003**.
- [37] Arroyo-Trejo, L. R. Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados de 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, DF. **2014**.
- [38] Soria-Arteche, O.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Trejo-Soto, P. J.; Hernández-Luis, F.; Gres-Molina, J.; Maldonado, L. A.; Castillo, R. Synthesis and antiprotozoal activity of nitazoxanide-*N*-methylbenzimidazole hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23: 6838-6841.
- [39] Méndez-Cuesta, C. A. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-cloro-2-(metiltio)-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2005**.
- [40] Aguilar-González, S. Síntesis de derivados bencimidazólicos con posible actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2007**.
- [41] Arroyo-Sánchez, V. M. Síntesis de nitrocarboxamidas aromáticas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2005**.
- [42] Vargas-Benítez, P. Síntesis y actividad giardicida de carboxamidas bencimidazólicas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2006**.
- [43] Gres-Molina, J. E. Síntesis de nuevos derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol con posible actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2007**.
- [44] Flores-Carrillo, P.; García-Peñaloza, P. Síntesis de carboxamidas bencimidazólicas y su evaluación sobre la enzima triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2013**.
- [45] Vargas-Osorio, Z. Síntesis de una carboxamida bencimidazólica diseñada por *docking* como posible agente inactivante de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2009**.

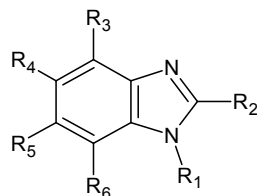
- [46] Reyes-García, D. Síntesis de dos carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como posibles inhibidores de la triosafosfato isomerasa de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2010**.
- [47] Trejo-Soto, P. J. Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la triosafosfato isomerasa (TIM) de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2011**.
- [48] Velázquez-Martínez, I. Reporte de las actividades biológicas de los compuestos IVM. Agosto de **2008**.
- [49] Melchor-Doncel de la Torre, S. P. Síntesis de derivados de carbendazim y nicotinamida como compuestos de acción antiparasitaria. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, DF. **2011**.
- [50] Velázquez-López, J. M. Síntesis de nuevas carboxamidas bencimidazólicas y estudio de la actividad inhibitoria de la enzima Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM. México, DF. *En proceso*.
- [51] González-Iglesias, L. G. Síntesis y actividad antiparasitaria de 5-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxamidas-*N*-sustituidas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. **2012**.
- [52] Silverman, R.B. The organic chemistry of drug design and drug action. Second Edition, Elsevier 2004. 7-17.
- [53] Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery, *Science*. **2004**, 303: 1813-1818.
- [54] Avendaño-Lopez, M.C. Introducción a la Química Farmacéutica 2ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, 2001.
- [55] Korolkovas, A. Essentials of Molecular Pharmacology: Background for Drug Design. Wiley-Interscience. 1970. 41-83
- [56] Hopfinger, A. J. Computer-assisted drug design. *J. Med. Chem.* **1985**, 28(9):1133-1139.
- [57] Ooms, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7(2):141-158.
- [58] Balbes, L.M., Mascarella, S.W.; Boyd, D.B. A perspective of modern methods in computer-aided drug design. En *Reviews in Computational Chemistry*, Lipkowitz, K. y Boyd, D., Eds. VCH Publishers, Nueva York, **1994**, vol. 5, p. 337-379.
- [59] Wassermann, A.M.; Wawer, M.; Bajorath, J. Activity landscape representations for structure-activity relationship analysis. *J. Med. Chem.* **2010**, 53: 8209-8223.
- [60] Bajorath, J.; Peltason, L.; Wawer, M.; Guha, R.; Lajiness, M.S.; Van Drie, J.H. Navigating structure-activity landscapes. *Drug. Disc. Today*. **2009**, 14: 698-705.

- [61] Méndez Lucio, O. Estudio computacional sobre la inhibición de la cruzaina por purino-carbonitrilos y análisis quimioinformático de bases de datos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México, DF. **2012**.
- [62] Shanmugasundaram, V.; Maggiora, G.M. Characterizing property and activity landscapes using an information-theoretic approach. *222nd American Chemical Society National Meeting*, **2001**.
- [63] Guha, R.; Van Drie, J.H. Structure-activity landscape index: indentifying and quantifying activity cliffs. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, 48: 646-658.
- [64] Medina-Franco, J.L.; Martinez-Mayorga, K.; Bender, A.; Marin, R.M.; Giulianotti, M.A.; Pinilla, C.; Houghten, R.A. Characterization of activity landscapes using 2D and 3D similarity methods: consensus activity cliffs. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49: 477-491.
- [65] Pérez-Villanueva, J.; Santos, R.; Hernández-Campos, A.; Giulianotti, M.A.; Castillo, R.; Medina-Franco, J.L. Structure-activity relationships of benzimidazole derivatives as antiparasitic agents: Dual activity-difference (DAD) maps. *Med. Chem. Commun.* **2011**, 2: 44-49.
- [66] Medina-Franco, J.L.; Yongye, A.B.; Pérez-Villanueva, J.; Houghten, R.A.; Martínez-Mayorga, K. Multitarget structure-activity relationships characterized by activity-difference maps and consensus similarity measure. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51: 2427-2439.
- [67] Maggiora, G.M. On outliers and activity cliffs – Why QSAR often disappoints. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, 46: 1535.
- [68] Méndez-Lucio, O.; Pérez-Villanueva, J.; Castillo, R.; Medina-Franco, J.L. Identifying activity cliff generators of PPAR ligands using SAS maps. *Mol. Inf.* **2012**, 31(11-12): 837-846.
- [69] Agrafiotis, D.K.; Wiener, J.J.; Skalkin, A.; Kolpak, J. Single R group polymorphisms (SRPs) and R-cliffs: an intuitive framework for analyzing and visualizing activity cliffs in a single analog series. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51(5): 1122-1131.
- [70] Böhm, H.-J.; Flohr, A.; Stahl, M. Scaffold hopping. *Drug. Disc. Today. Technol.* **2004**, 1(3): 217-224.
- [71] Medina-Franco, J.L. Scanning structure-activity relationships with SAS and related maps: from consensus activity cliffs to selectivity switches. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52(10): 2485-2493.
- [72] Pérez-Villanueva, J.; Hernández-Campos, A.; Yépez-Mulia, L.; Méndez-Cuesta, C.; Méndez-Lucio, O.; Hernández-Luis, F.; Castillo, R. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23: 4221-4224.
- [73] Clark, C.G.; Diamond, L.S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, 15(3): 329-341.

- [74] Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **1992**, *37*: 221–224.
- [75] Tableau Software Inc. *Tableau Public*, versión 8.1. Seattle, USA (**2014**).
- [76] Chemical Computing Group Inc. *Molecular Operating Environment (MOE)*, versión 10. Montreal, Canadá (**2011**).
- [77] Schrödinger Inc. *Lig Prep*, versión 2.7. New York, USA (**2013**).
- [78] Schrödinger Inc. *Maestro*, versión 9.6. New York, USA (**2013**).
- [79] Jaccard, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et des jura. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. Med.* **1901**, *37*: 547-579.
- [80] Bender, A.; Glen, R.C. Molecular similarity: a key technique in molecular informatics. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*(22): 3204.

APÉNDICE A. Base de datos de derivados del bencimidazol

Tabla A1. Estructura química de los bencimidazoles empleados durante el estudio y sus actividades biológicas contra *Giardia intestinalis* (Gi), *Trichomonas vaginalis* (Tv) y *Entamoeba histolytica* (Eh).



#	Sustitución en el bencimidazol						pCl ₅₀			Ref
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Gi	Tv	Eh	
DB_1	H	CF ₃	H	H	H	H	6.97	5.50	7.16	[a]
DB_2	CH ₃	CF ₃	H	CF ₃	H	H	5.94	5.39	-	[a]
DB_3	CH ₃	CF ₃	H	H	CF ₃	H	5.05	5.27	-	[a]
DB_4	CH ₃	CF ₃	H	Propiltio	H	H	4.98	6.70	-	[b]
DB_5	CH ₃	CF ₃	H	H	Propiltio	H	5.85	5.59	-	[b]
DB_6	CH ₃	CF ₃	H	Bencil	H	H	5.96	4.53	-	[b]
DB_7	CH ₃	CF ₃	H	H	Bencil	H	5.89	4.97	-	[b]
DB_8	H	CF ₃	H	Cl	H	H	5.89	6.35	7.66	[a]
DB_9	H	CF ₃	H	F	H	H	6.31	5.50	-	[a]
DB_10	H	CF ₃	H	CF ₃	H	H	6.17	6.63	-	[a]
DB_11	H	CF ₃	H	CN	H	H	5.75	5.64	-	[a]
DB_12	H	CF ₃	H	Propiltio	H	H	5.82	6.46	-	[b]
DB_13	H	CF ₃	H	Bencil	H	H	5.64	4.55	-	[b]
DB_14	H	CF ₃	H	Br	H	H	6.19	5.80	5.88	[c]
DB_15	H	CF ₃	Br	H	Br	H	6.60	6.72	7.30	[c]
DB_16	H	CF ₃	Br	Br	Br	H	6.85	6.57	4.86	[c]
DB_17	H	CF ₃	H	Br	Br	H	6.92	6.66	6.36	[c]
DB_18	H	CF ₃	Br	Br	Br	Br	7.25	8.70	6.52	[c]
DB_19	H	CF ₃	H	NO ₂	NO ₂	H	6.62	6.24	5.81	[c]
DB_20	H	C ₂ F ₅	H	Cl	Cl	H	6.25	6.52	6.68	[c]
DB_21	H	C ₂ F ₅	Br	Br	Br	Br	7.64	5.00	6.64	[c]
DB_22	H	CF ₃	H	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O	H	H	7.27	6.27	7.74	[d]
DB_23	CH ₃	CF ₃	H	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O	H	H	7.52	7.80	8.05	[d]
DB_24	CH ₃	CF ₃	H	H	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O	H	7.20	6.96	7.72	[d]
DB_25	H	CF ₃	H	C ₁₀ H ₇ O	Cl	H	8.30	7.07	7.72	[d]
DB_26	CH ₃	CF ₃	H	C ₁₀ H ₇ O	Cl	H	7.64	6.01	7.42	[d]
DB_27	CH ₃	CF ₃	H	Cl	C ₁₀ H ₇ O	H	7.92	6.35	7.77	[d]

Tabla A1. (Continuación)

#	Sustitución en el bencimidazol						pCl ₅₀			Ref
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Gi	Tv	Eh	
DB_28	H	CF ₃	H	Cl	Cl	H	7.11	6.63	7.96	[d]
DB_29	CH ₃	CF ₃	H	Cl	H	H	7.38	6.62	7.34	[d]
DB_30	CH ₃	CONH ₂	H	H	Cl	H	7.12	6.96	-	[e]
DB_31	CH ₃	CONHCH ₃	H	H	Cl	H	7.15	6.98	-	[e]
DB_32	CH ₃	CON(CH ₃) ₂	H	H	Cl	H	7.40	6.62	-	[e]
DB_33	CH ₃	COOCH ₂ CH ₃	H	H	Cl	H	7.32	7.72	-	[e]
DB_34	CH ₃	CH(OH)CH ₃	H	H	Cl	H	7.15	6.96	-	[e]
DB_35	CH ₃	COCH ₃	H	H	Cl	H	7.17	6.64	-	[e]
DB_36	CH ₃	CONH ₂	H	Cl	H	H	6.63	6.73	-	[e]
DB_37	CH ₃	CONHCH ₃	H	Cl	H	H	6.45	6.45	-	[e]
DB_38	CH ₃	CON(CH ₃) ₂	H	Cl	H	H	6.61	6.68	-	[e]
DB_39	CH ₃	COOCH ₂ CH ₃	H	Cl	H	H	7.40	7.57	-	[e]
DB_40	CH ₃	CH(OH)CH ₃	H	Cl	H	H	7.42	7.02	-	[e]
DB_41	CH ₃	COCH ₃	H	Cl	H	H	7.30	6.88	-	[e]
DB_42	CH ₃	CONH ₂	H	Cl	Cl	H	6.34	6.87	-	[e]
DB_42	CH ₃	CONHCH ₃	H	Cl	Cl	H	6.82	6.65	-	[e]
DB_44	CH ₃	CON(CH ₃) ₂	H	Cl	Cl	H	7.13	7.12	-	[e]
DB_45	CH ₃	COOCH ₂ CH ₃	H	Cl	Cl	H	7.56	7.53	-	[e]
DB_46	CH ₃	CH(OH)CH ₃	H	Cl	Cl	H	7.69	7.39	-	[e]
DB_47	CH ₃	COCH ₃	H	Cl	Cl	H	7.46	7.20	-	[e]
DB_48	CH ₃	CONH ₂	H	H	H	H	7.03	6.78	-	[e]
DB_49	CH ₃	CONHCH ₃	H	H	H	H	7.22	6.98	-	[e]
DB_50	CH ₃	CON(CH ₃) ₂	H	H	H	H	6.29	6.37	-	[e]
DB_51	CH ₃	COOCH ₂ CH ₃	H	H	H	H	7.16	7.07	-	[e]
DB_52	CH ₃	CH(OH)CH ₃	H	H	H	H	7.17	6.78	-	[e]
DB_53	CH ₃	COCH ₃	H	H	H	H	7.06	6.68	-	[e]
DB_54	H	SCH ₂ CH ₂ OH	Cl	H	Cl	H	7.42	6.16	-	[f]
DB_55	H	SCH ₂ CH ₂ OH	Br	H	Br	H	6.98	6.83	-	[f]
DB_56	H	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Cl	H	Cl	H	7.68	7.14	-	[f]
DB_57	H	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Br	H	Br	H	7.54	6.51	-	[f]
DB_58	H	SCH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Cl	H	Cl	H	7.72	7.39	-	[f]
DB_59	H	SCH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Br	H	Br	H	7.46	7.53	-	[f]
DB_60	H	SCH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Cl	H	Cl	H	7.14	7.07	-	[f]
DB_61	H	SCH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Br	H	Br	H	7.69	7.99	-	[f]
DB_62	H	SCH ₂ CH ₂ -(N-piperidil)	Cl	H	Cl	H	7.26	7.14	-	[f]

DB_63	H	SCH ₂ CH ₂ -(N-piperidil)	Br	H	Br	H	6.90	7.69	-	[f]
-------	---	---	----	---	----	---	------	------	---	-----

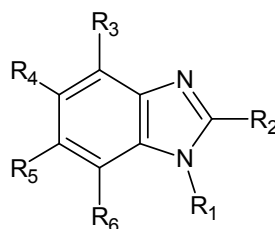
Tabla A1. (Continuación)

#	Sustitución en el bencimidazol						pCl ₅₀			Ref
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Gi	Tv	Eh	
DB_64	H	SCH ₂ CH ₂ -(N-morpholinil)	Cl	H	Cl	H	7.41	7.29	-	[f]
DB_65	H	SCH ₂ CH ₂ -(N-morpholinil)	Br	H	Br	H	7.23	7.23	-	[f]
DB_66	H	SCH ₂ CH ₂ -(p-nitrophenil)	Cl	H	Cl	H	7.09	7.96	-	[f]
DB_67	H	SCH ₂ CH ₂ -(p-nitrophenil)	Br	H	Br	H	7.43	8.48	-	[f]
DB_68	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	H	H	H	6.93	6.75	6.83	[g]
DB_69	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	H	H	7.09	6.77	7.13	[g]
DB_70	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	Cl	H	7.12	6.85	7.23	[g]
DB_71	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	H	H	H	7.06	6.83	7.11	[g]
DB_72	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	H	Cl	H	7.19	6.89	7.17	[g]
DB_73	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	H	H	7.18	6.87	7.18	[g]
DB_74	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	Cl	H	7.16	7.02	7.19	[g]
DB_75	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	COOCH ₃	H	H	7.11	6.96	7.21	[g]
DB_76	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	COOCH ₃	Cl	H	7.26	7.14	7.24	[g]
DB_77	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	H	COOCH ₃	H	7.24	6.93	7.28	[g]
DB_78	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	COOCH ₃	H	7.25	7.06	7.37	[g]
DB_79	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	COOCH ₃	H	H	7.21	7.11	7.37	[g]
DB_80	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	COOCH ₃	Cl	H	7.35	7.03	7.29	[g]
DB_81	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	OCH ₂ CH ₃	H	H	7.25	7.14	7.37	[g]
DB_82	H	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	OCH ₂ CH ₃	Cl	H	7.33	7.00	7.21	[g]
DB_83	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	H	OCH ₂ CH ₃	H	7.34	7.14	7.39	[g]
DB_84	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	Cl	OCH ₂ CH ₃	H	7.45	7.16	7.34	[g]
DB_85	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	OCH ₂ CH ₃	H	H	8.08	7.12	7.53	[g]
DB_86	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ -(1 <i>H</i> -imidazolil)	H	OCH ₂ CH ₃	Cl	H	7.68	7.01	7.83	[g]
DB_87	H	SOCH ₂ -(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)	H	OCH ₃	H	H	7.02	6.92	6.31	[h]
DB_88	H	SOCH ₂ -[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]	H	H	H	H	7.14	6.91	6.46	[h]
DB_89	H	SOCH ₂ -[4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridin-2-il]	H	H	H	H	7.74	6.98	7.63	[h]
DB_90	H	SOCH ₂ -(3,4-dimetoxipiridin-2-il)	H	OCHF ₂	H	H	7.80	7.12	8.59	[h]
DB_91	H	NHCOOCH ₃	H	Propiltio	H	H	7.43	5.80	4.25	[h]

Referencias:

- a) Navarrete-Vázquez G, Rojano-Vilchis MDM, Yépez-Mulia L, et al.: Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole bioisosteres. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 41(1): 135-141.
- b) Navarrete-Vázquez G, Yépez L, Hernández-Campos A, et al.: Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11(21): 4615-4622.
- c) Andrzejewska M, Yépez-Mulia L, Cedillo-Rivera R, et al.: Synthesis, antiprotozoal and anticancer activity of substituted 2-trifluoromethyl- and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37(12): 973-978.
- d) Hernández-Luis F, Hernández-Campos A, Castillo R, et al.: Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(7): 3135-3141.
- e) Valdez-Padilla D, Rodríguez-Morales S, Hernández-Campos A, et al.: Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17(4): 1724-1730.
- f) Andrzejewska M, Yépez-Mulia L, Tapia A, et al.: Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 21(2-3): 323-329.
- g) Pérez-Villanueva J, Hernández-Campos A, Yépez-Mulia L, et al.: Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23(14): 4221-4224.
- h) Pérez-Villanueva J, Romo-Mancillas A, Hernández-Campos A, et al.: Antiprotozoal activity of proton-pump inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21(24): 7351-7354.

Tabla A1.1. Estructura y actividad antiprotozoaria de los híbridos Nitazoxanida-N-metilbencimidazoles utilizados en el estudio de quimioinformática



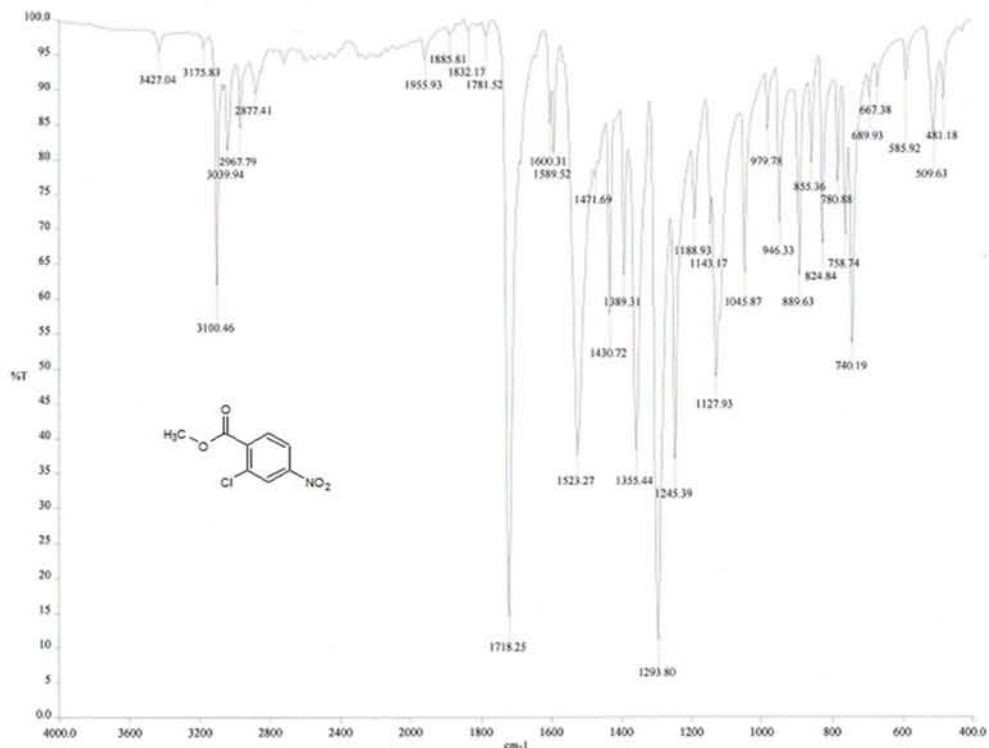
#	Sustitución en el bencimidazol						pCl ₅₀		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Gi	Tv	Eh
DB_92	CH ₃	H	H	H	5NTC	H	6.60	6.47	7.16
DB_93	CH ₃	CH ₃	H	H	5NTC	H	7.57	7.09	8.22
DB_94	CH ₃	CF ₃	H	H	5NTC	H	6.72	6.45	7.49
DB_95	CH ₃	SCH ₃	H	H	5NTC	H	6.66	6.68	8.52
DB_96	CH ₃	NHCO ₂ CH ₃	H	H	5NTC	H	7.35	7.15	7.48
DB_97	CH ₃	H	H	Cl	5NTC	H	7.03	6.90	7.43
DB_98	CH ₃	CH ₃	H	Cl	5NTC	H	7.15	7.07	7.60
DB_99	CH ₃	CF ₃	H	Cl	5NTC	H	7.66	7.64	7.96
DB_100	CH ₃	NHCO ₂ CH ₃	H	Cl	5NTC	H	7.39	7.26	7.68
DB_101	CH ₃	H	H	5NTC	Cl	H	7.42	6.95	7.57
DB_102	CH ₃	CH ₃	H	5NTC	Cl	H	7.57	7.15	7.64
DB_103	CH ₃	CF ₃	H	5NTC	Cl	H	7.68	7.39	8.22
DB_104	CH ₃	NHCO ₂ CH ₃	H	5NTC	Cl	H	6.94	6.90	7.22

Nota: N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carboxamida (5NTC)

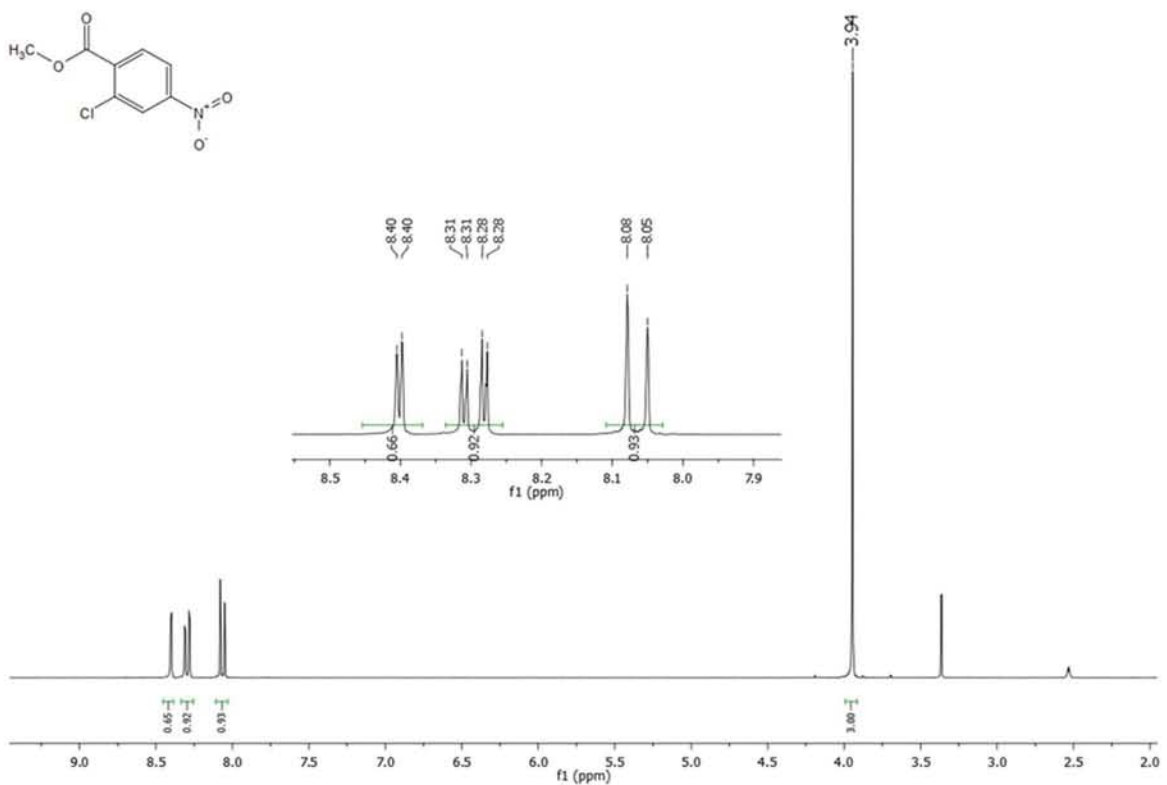
APÉNDICE B

APÉNDICE B

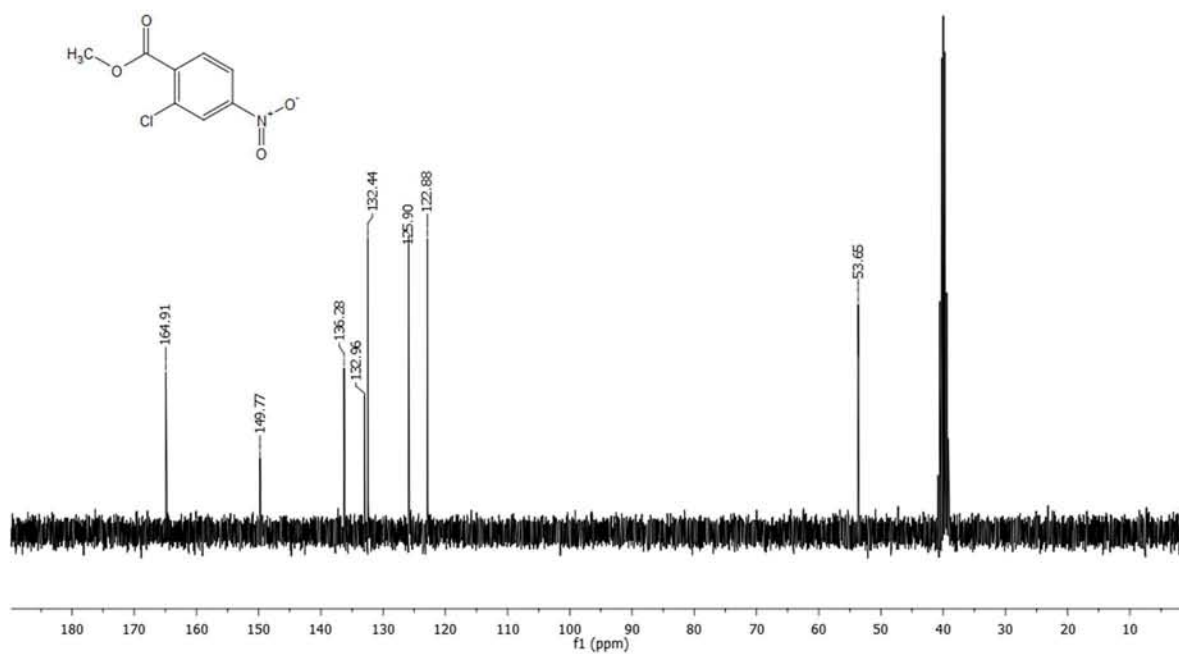
ESPECTROS



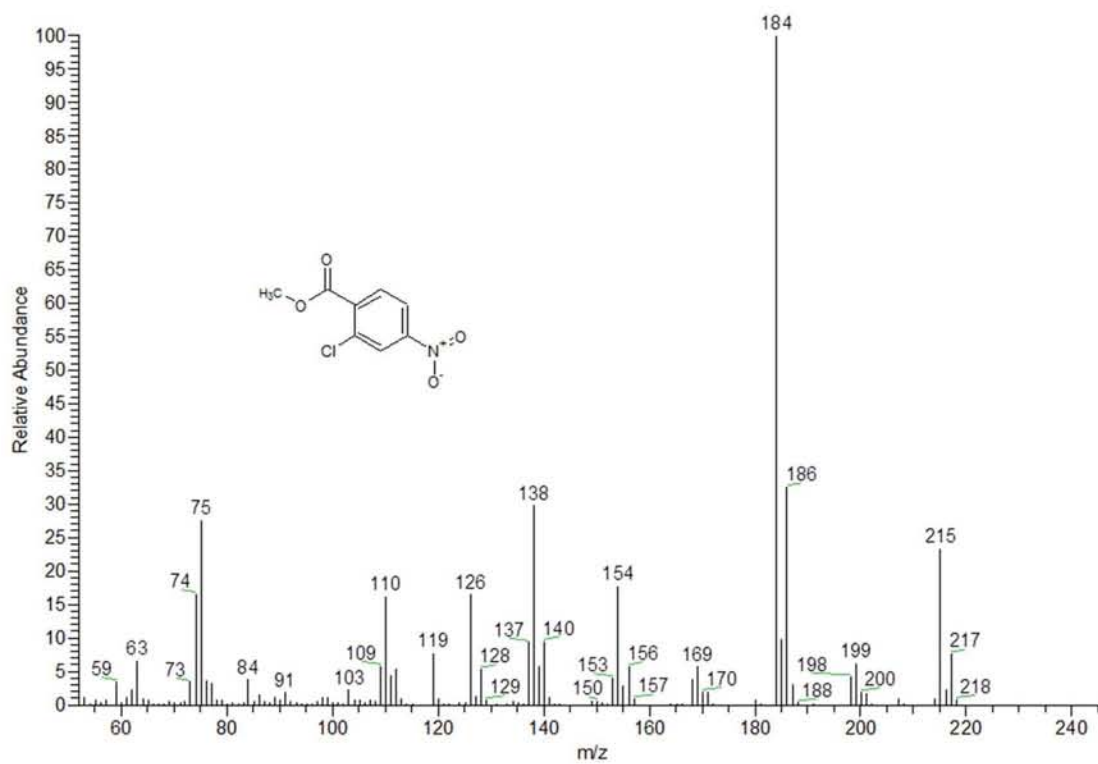
Espectro 1. IR cm⁻¹: 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



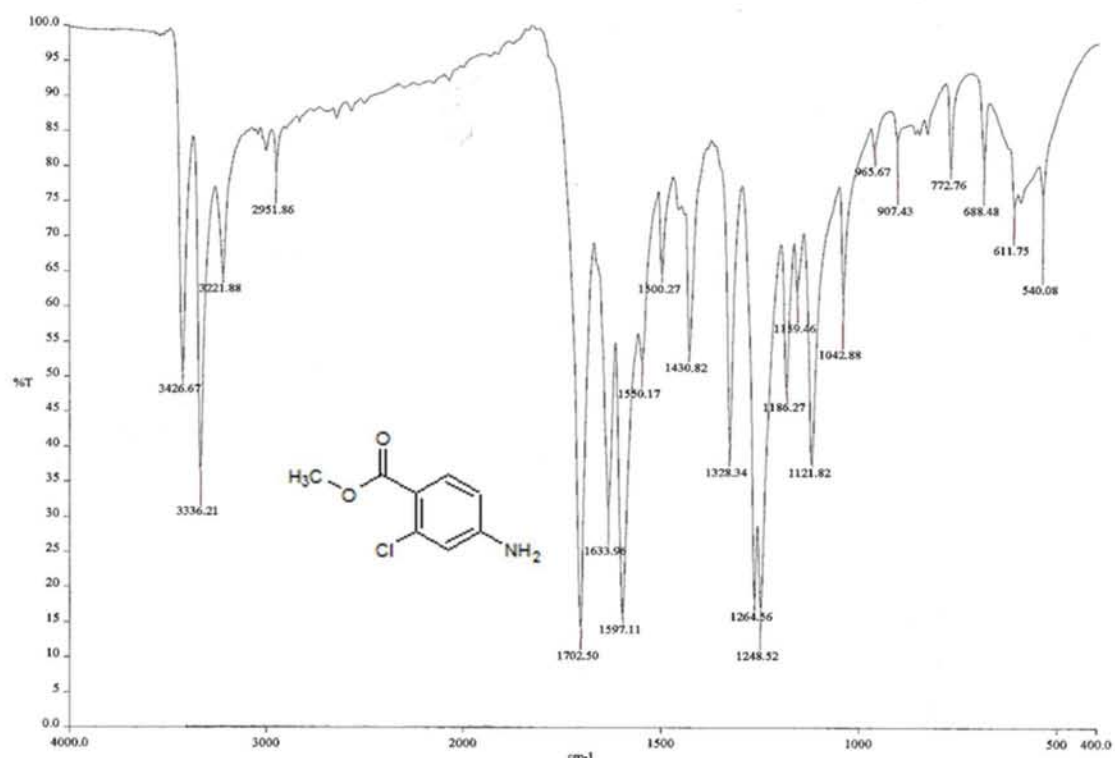
Espectro 2. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



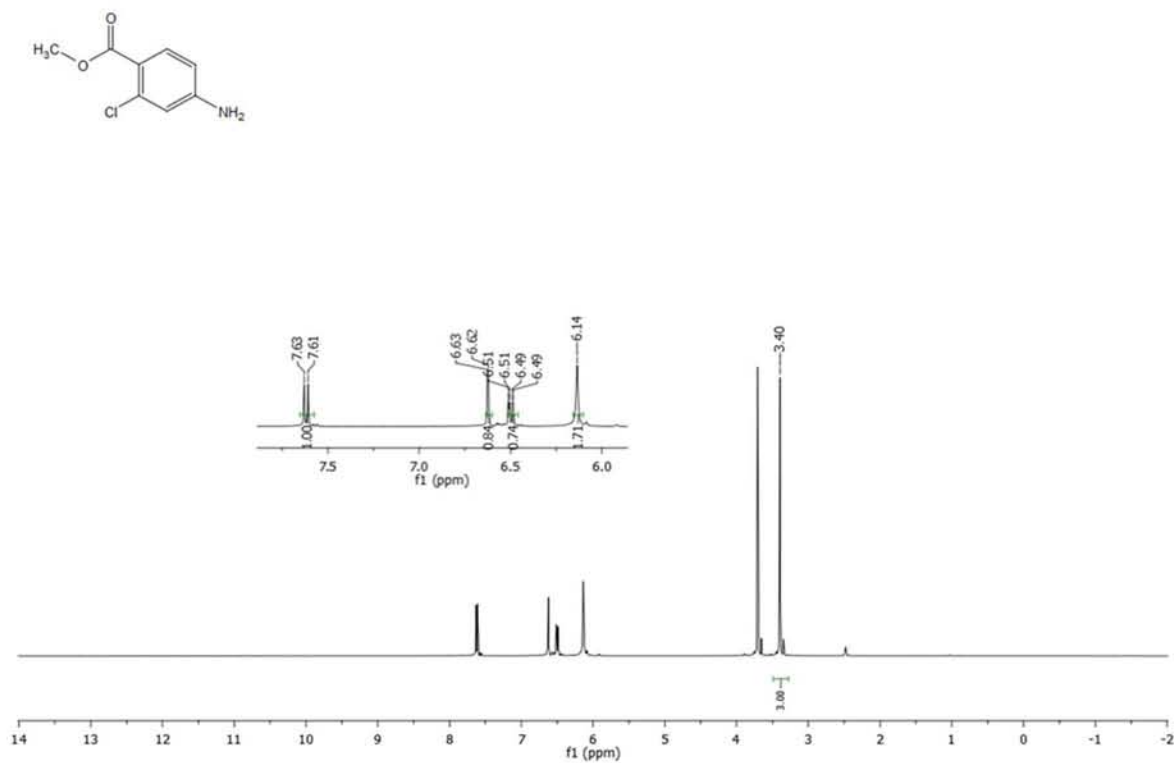
Espectro 3. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



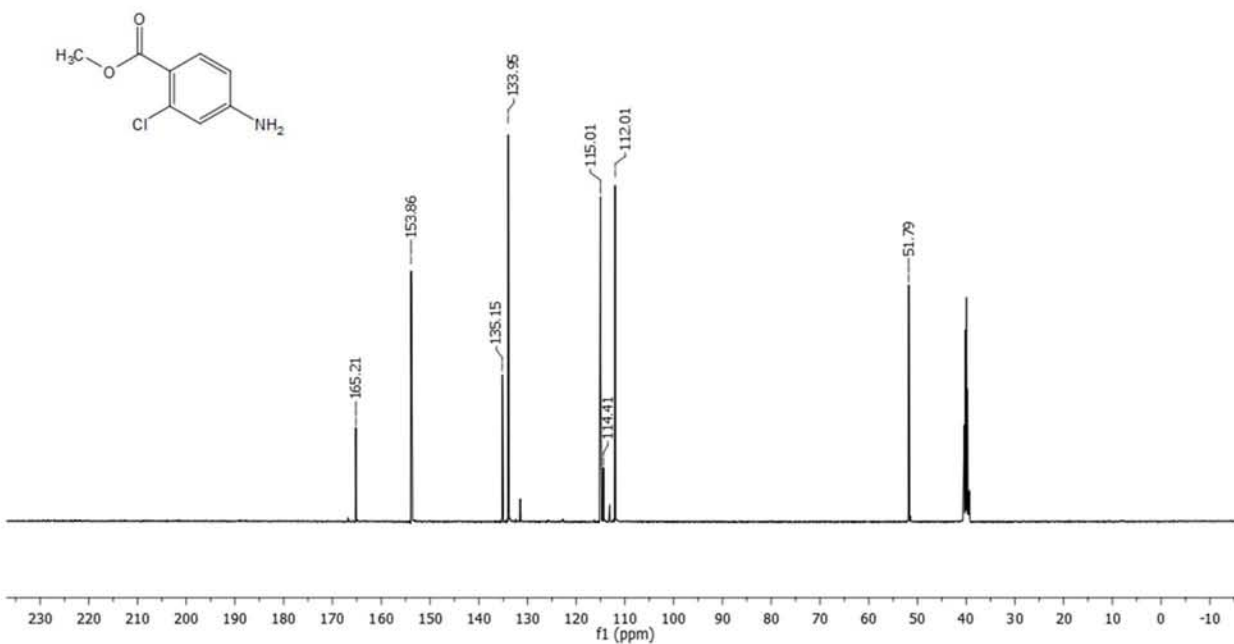
Espectro 4. EM (IE/CG) m/z: 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



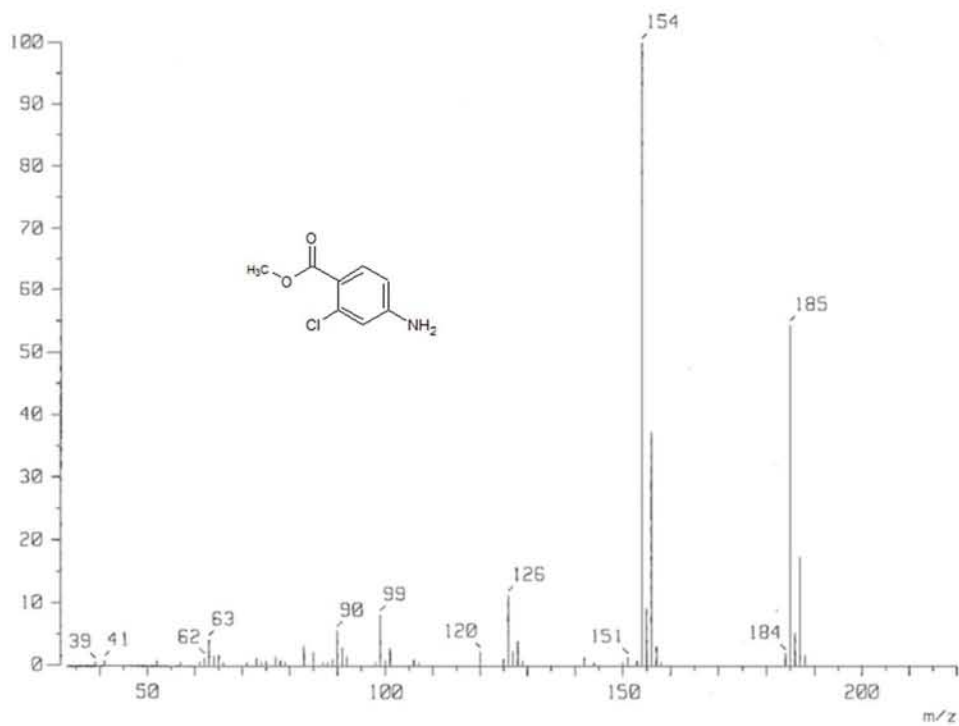
Espectro 5. IR cm^{-1} : 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



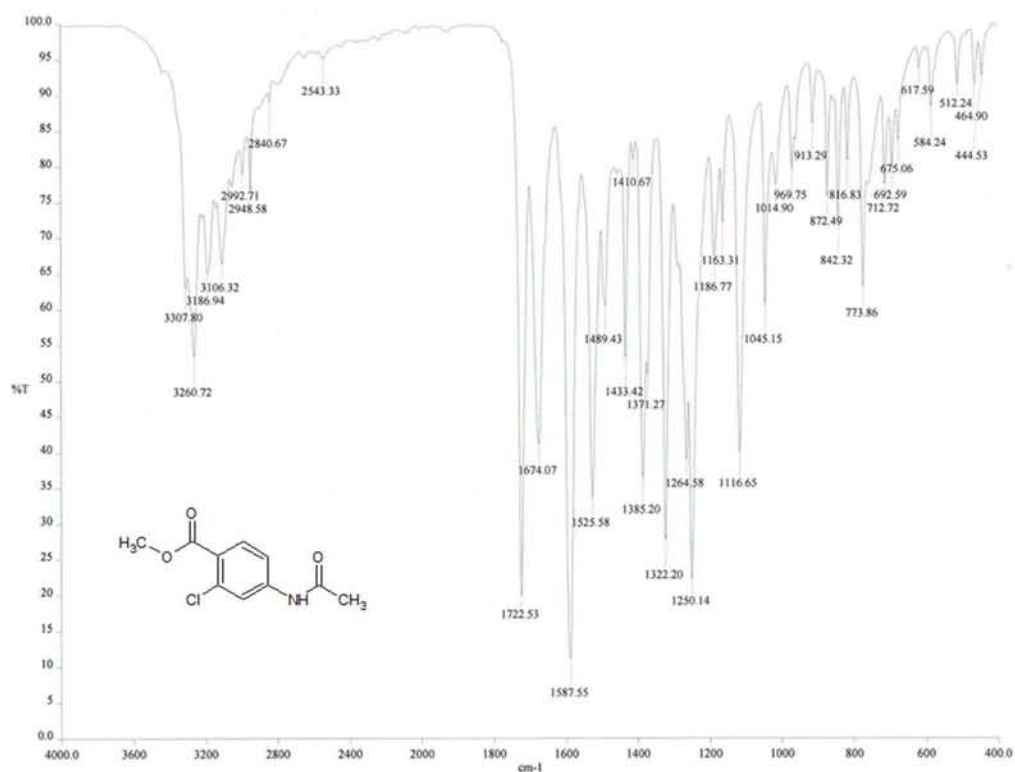
Espectro 6. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



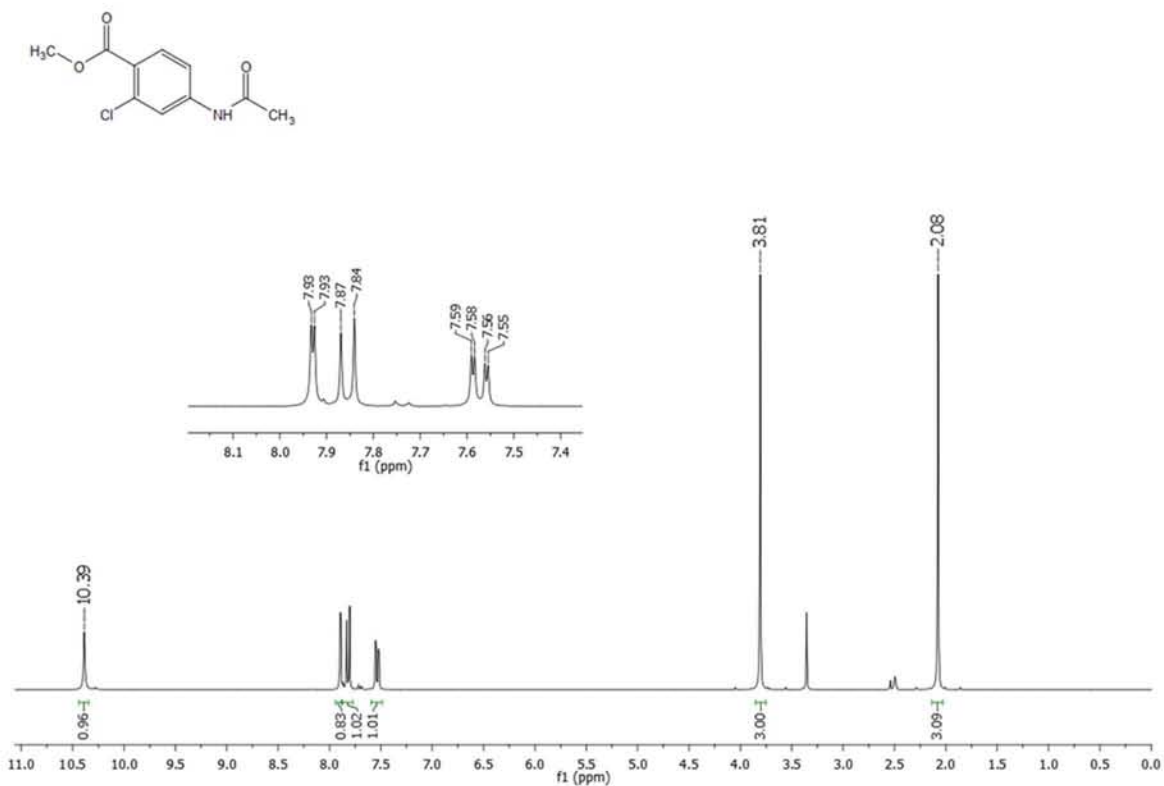
Espectro 7. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d6) ppm: 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



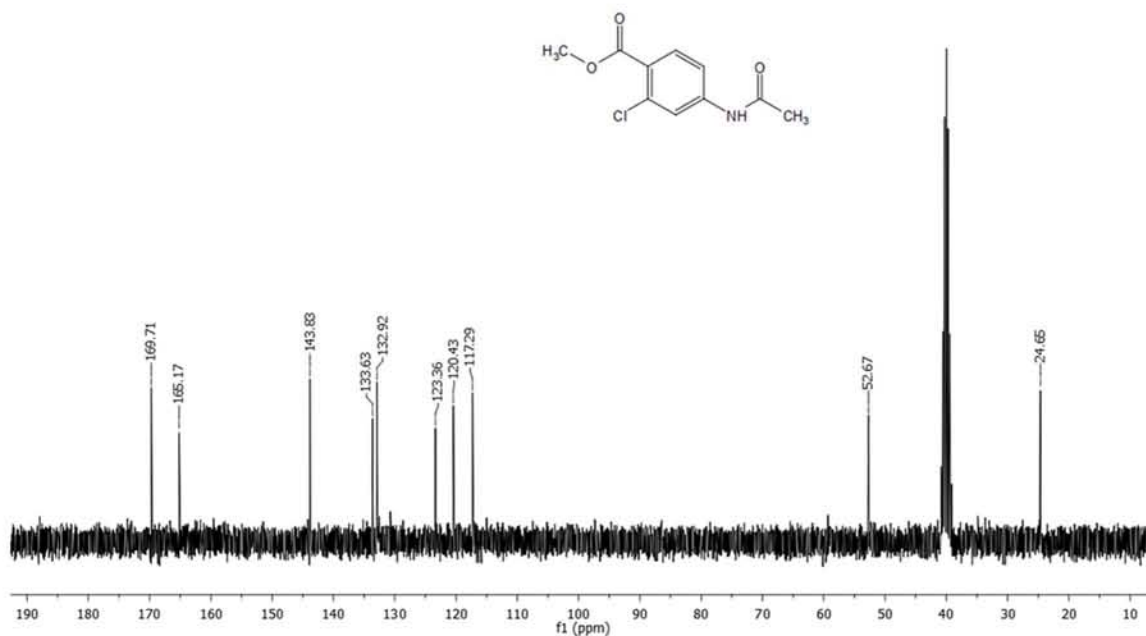
Espectro 8. EM (IE/CG) m/z: 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



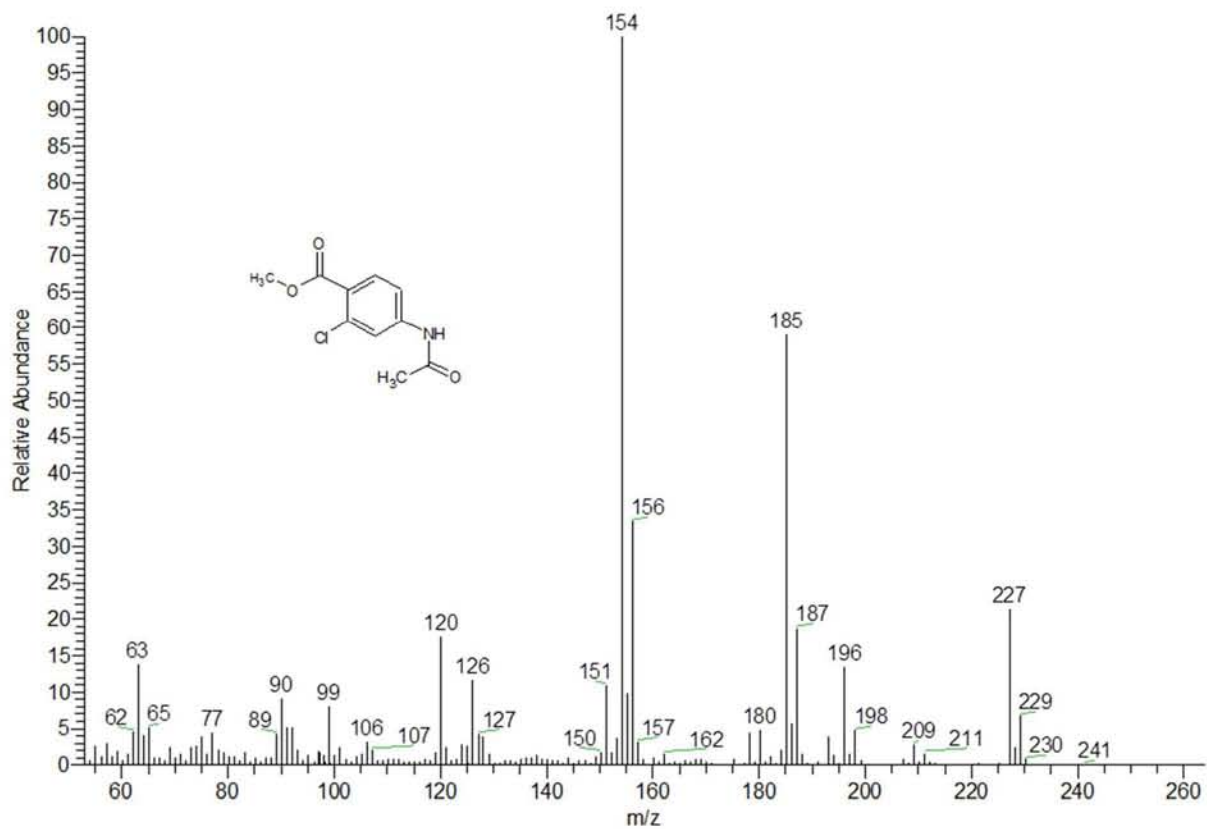
Espectro 9. IR cm⁻¹ : 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



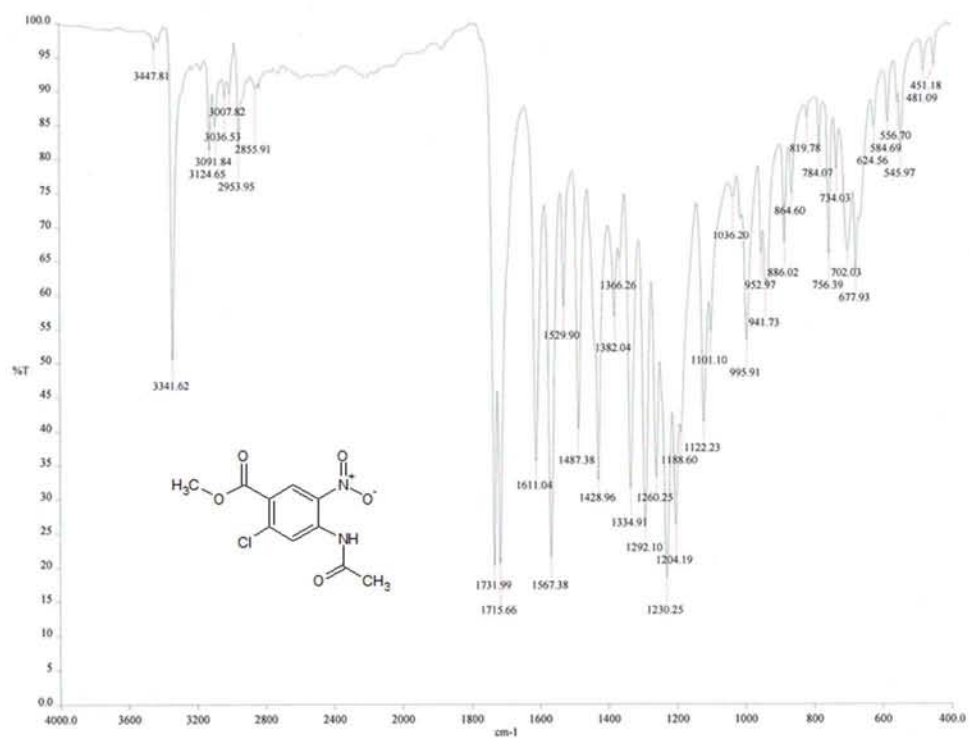
Espectro 10. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



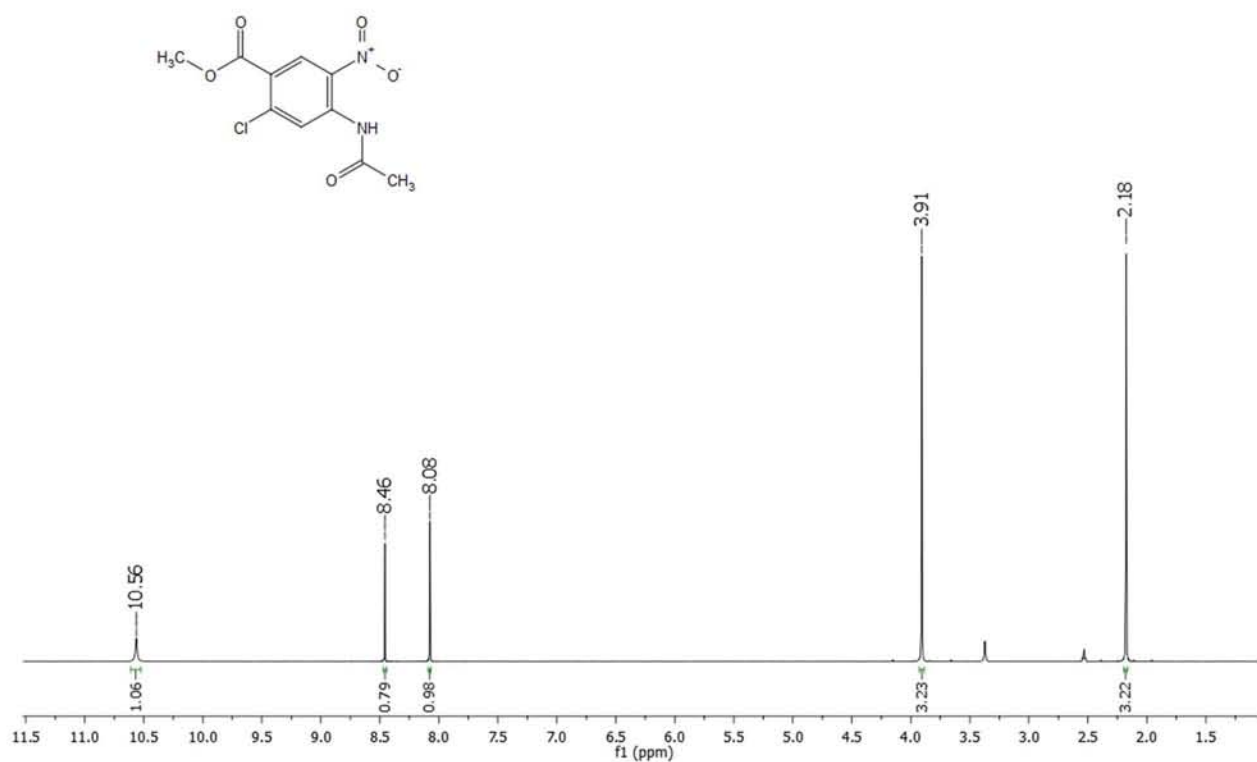
Espectro 11. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



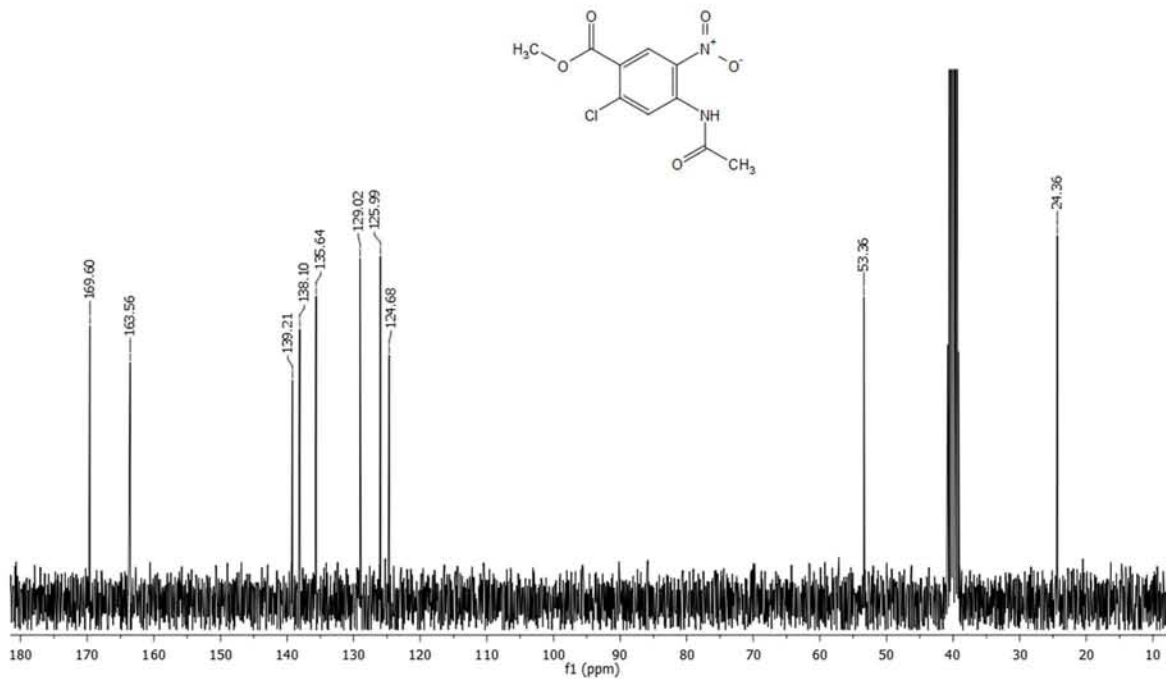
Espectro 12. EM (IE/CG) m/z: 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



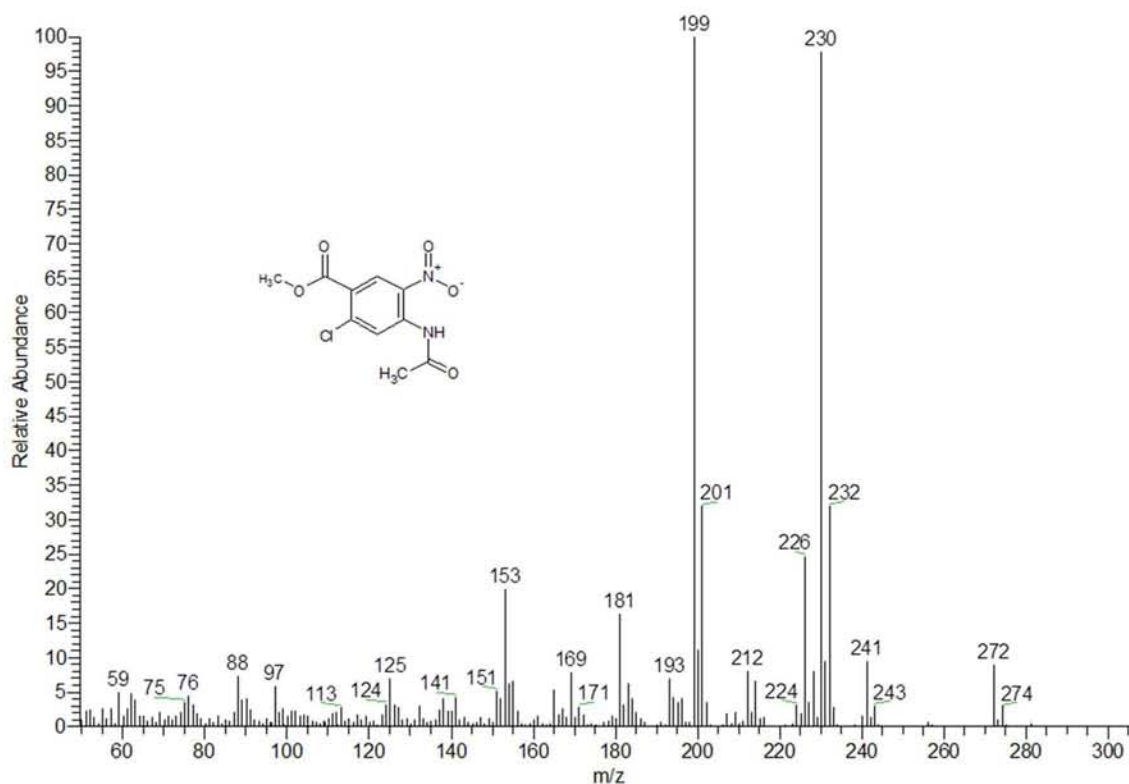
Espectro 13. IR cm⁻¹ 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



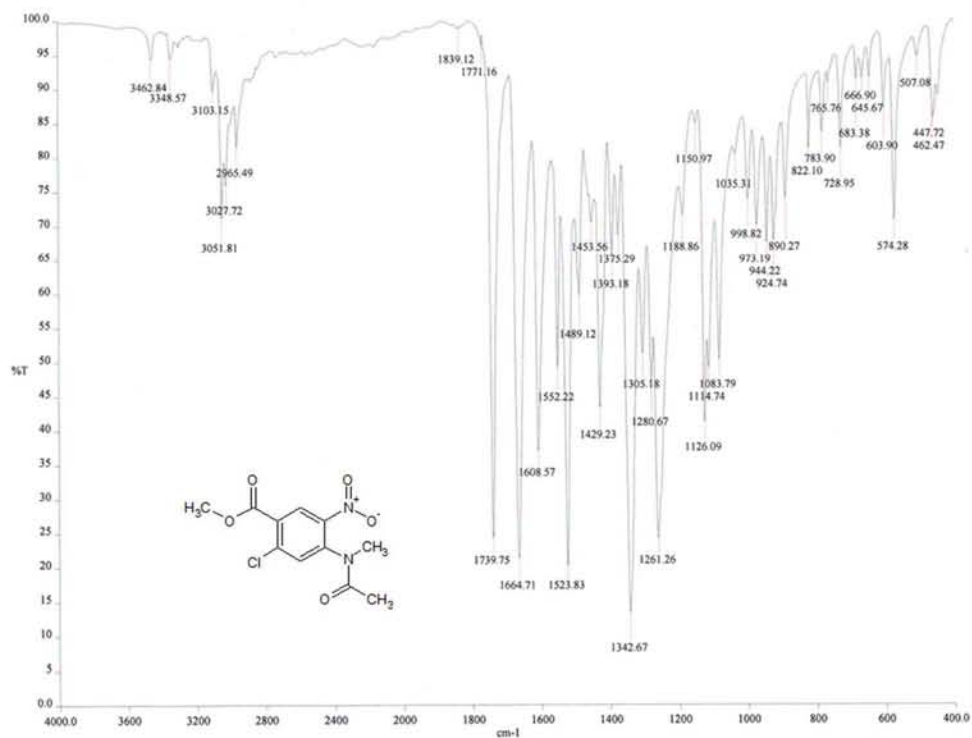
Espectro 14. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



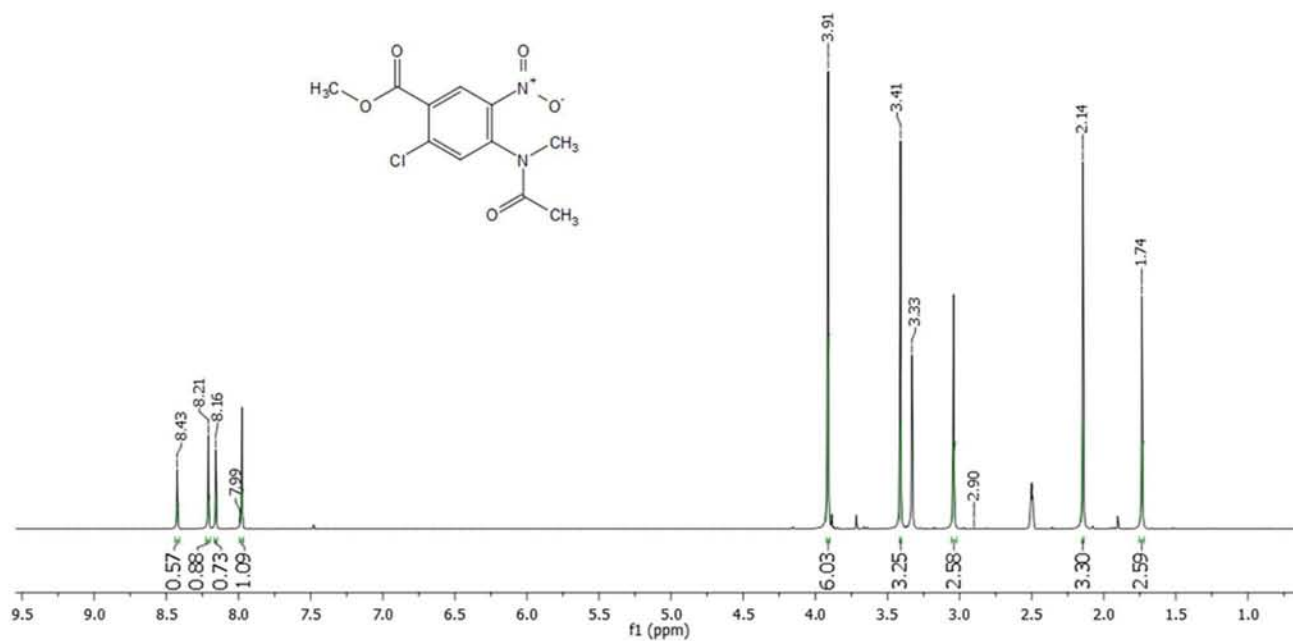
Espectro 15. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



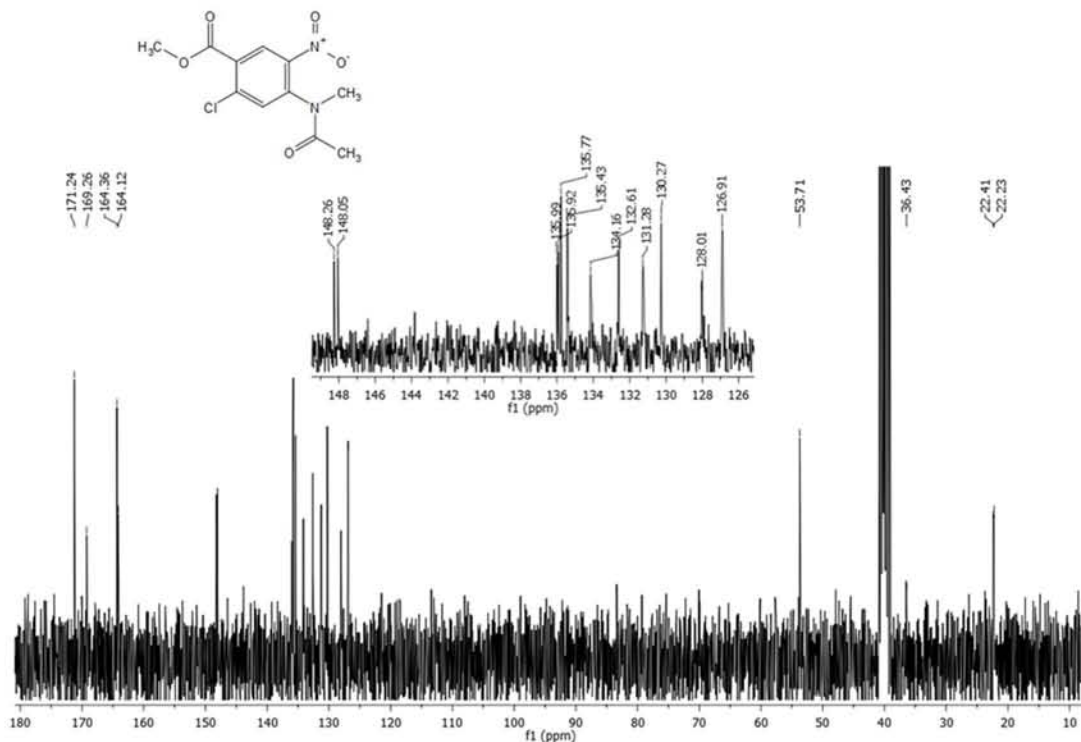
Espectro 16. EM (IE/CG) m/z: 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



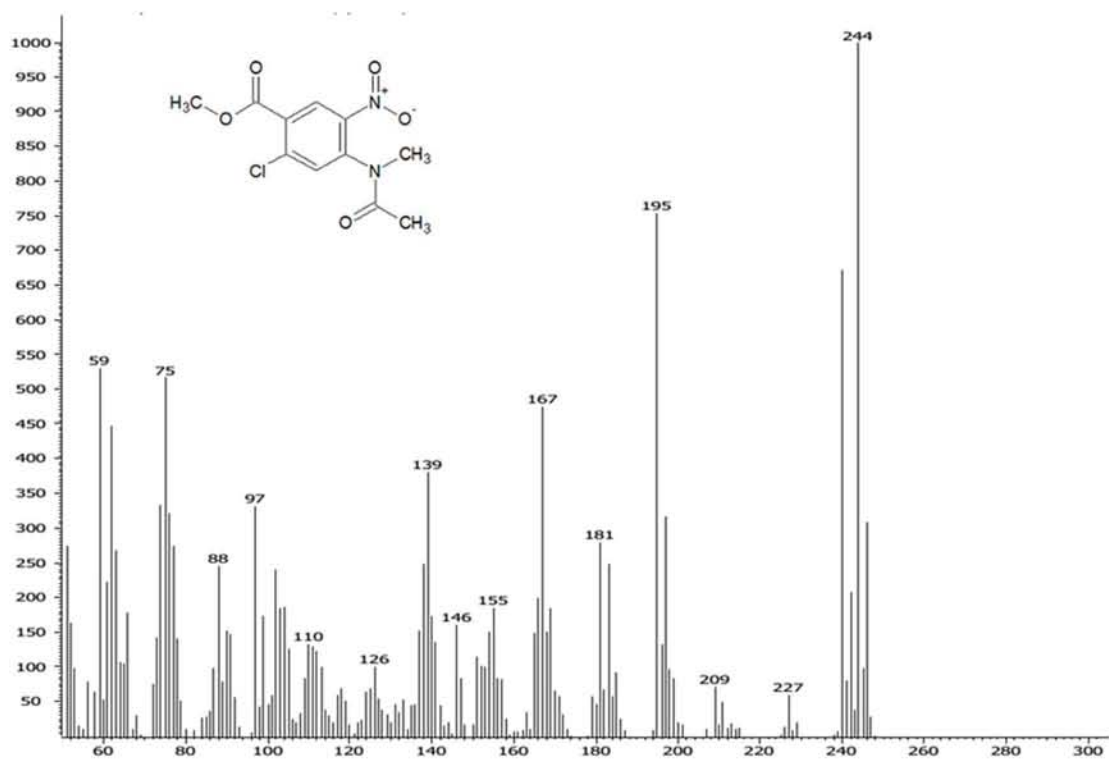
Espectro 17. IR cm⁻¹ : 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



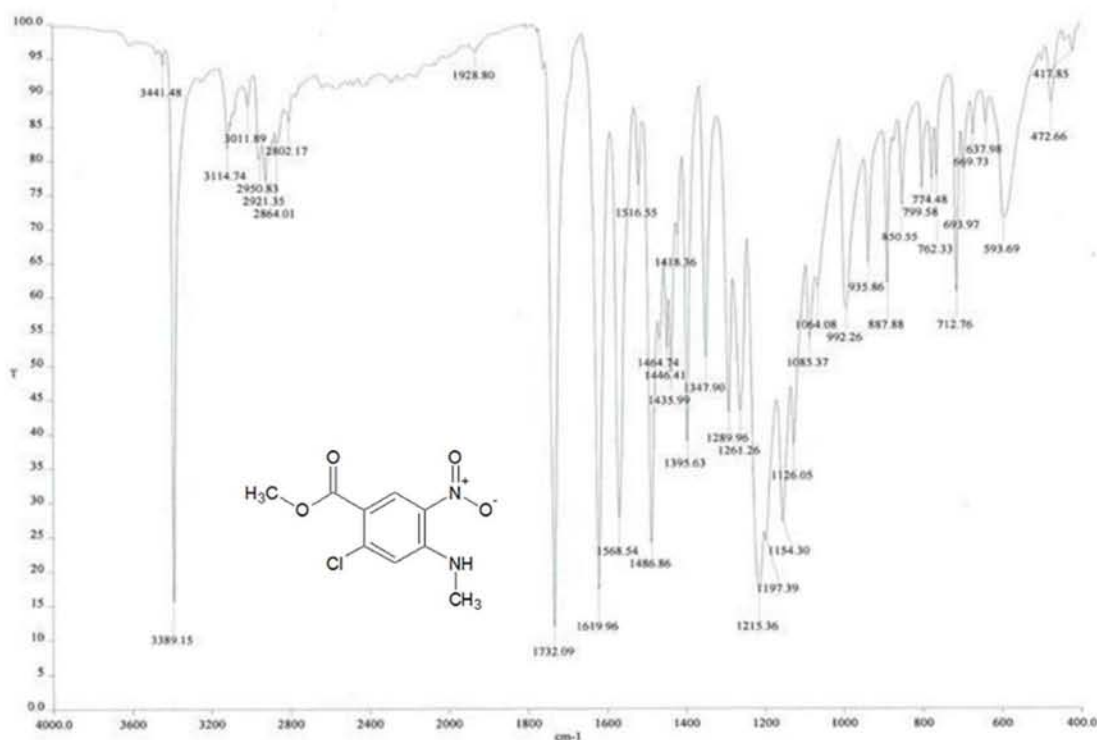
Espectro 18. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



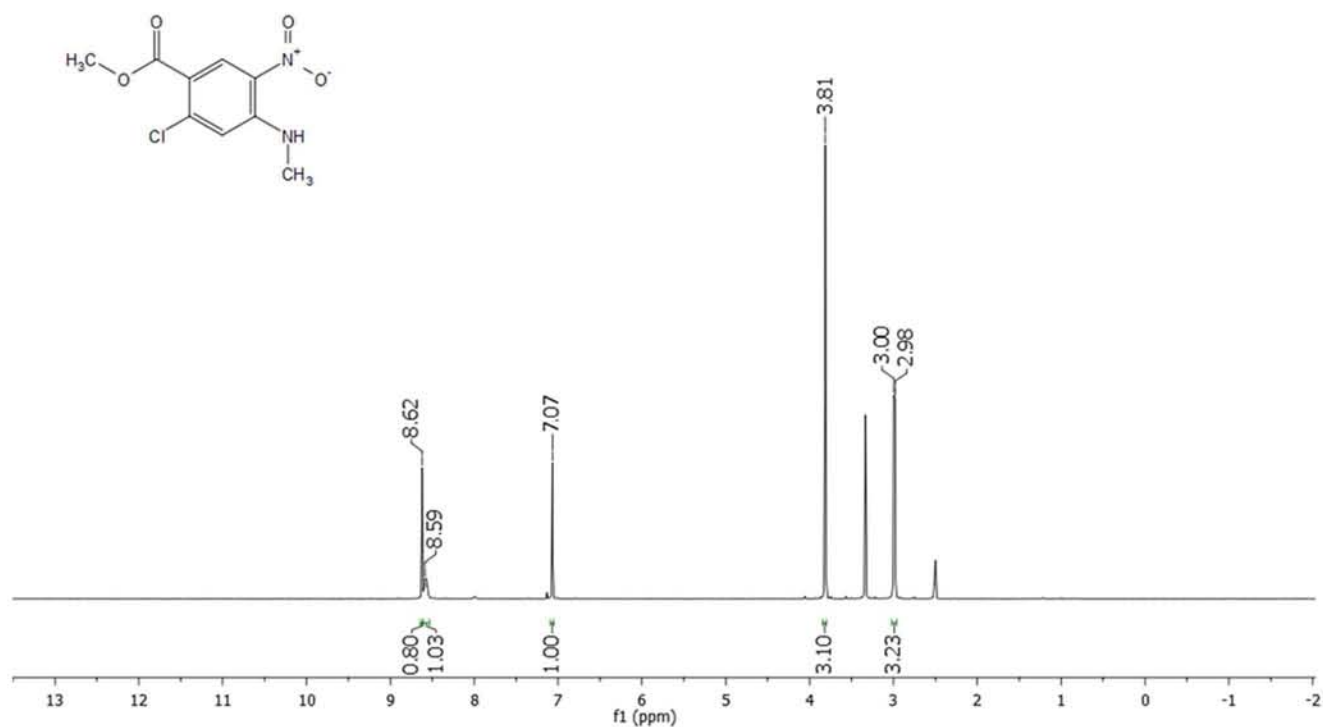
Espectro 19. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



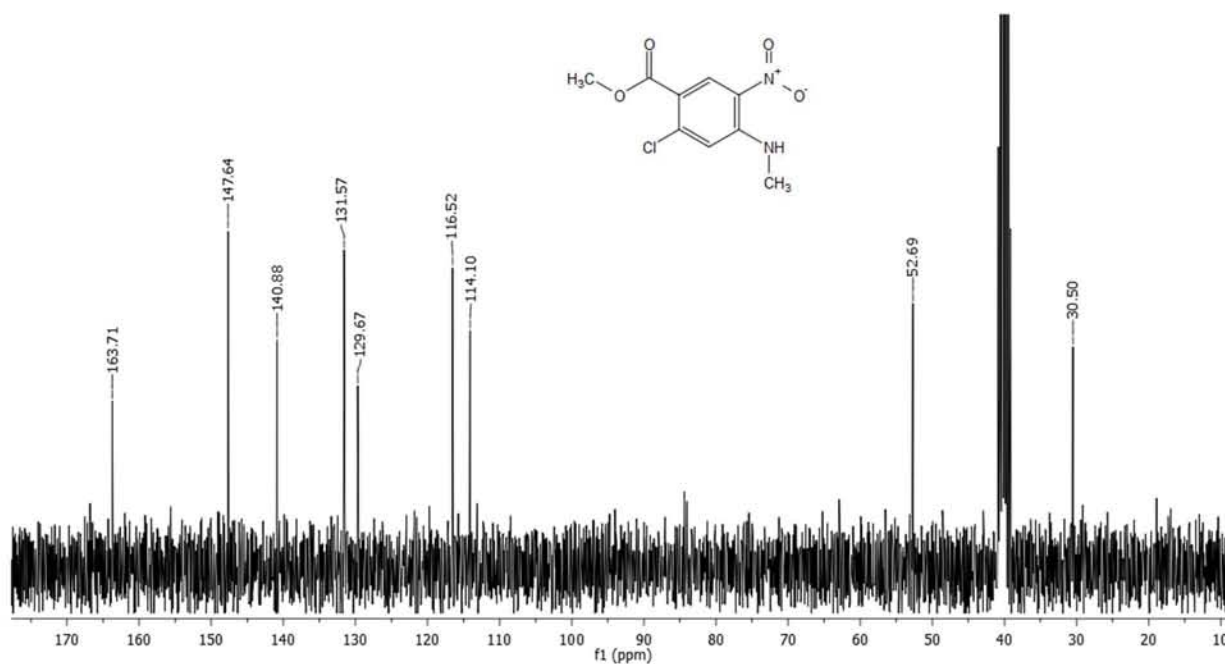
Espectro 20. EM (IE/CG) m/z : 4-[acetil(metil)amino]-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



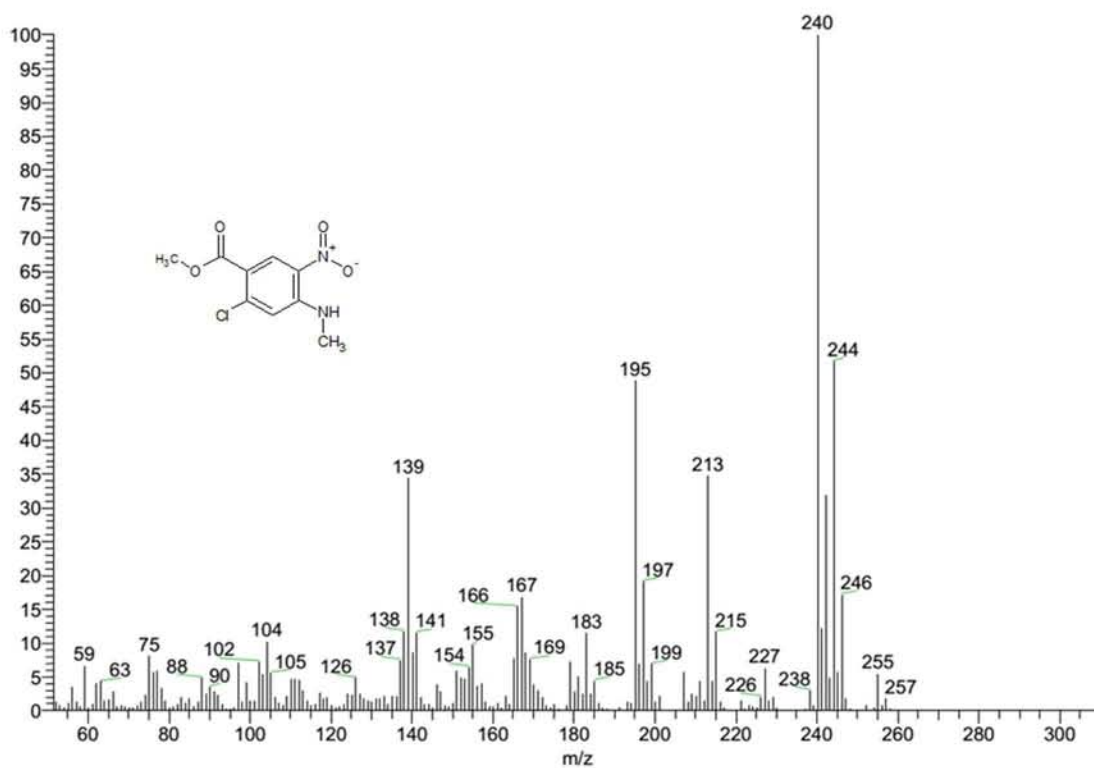
Espectro 21. IR cm^{-1} : 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7).



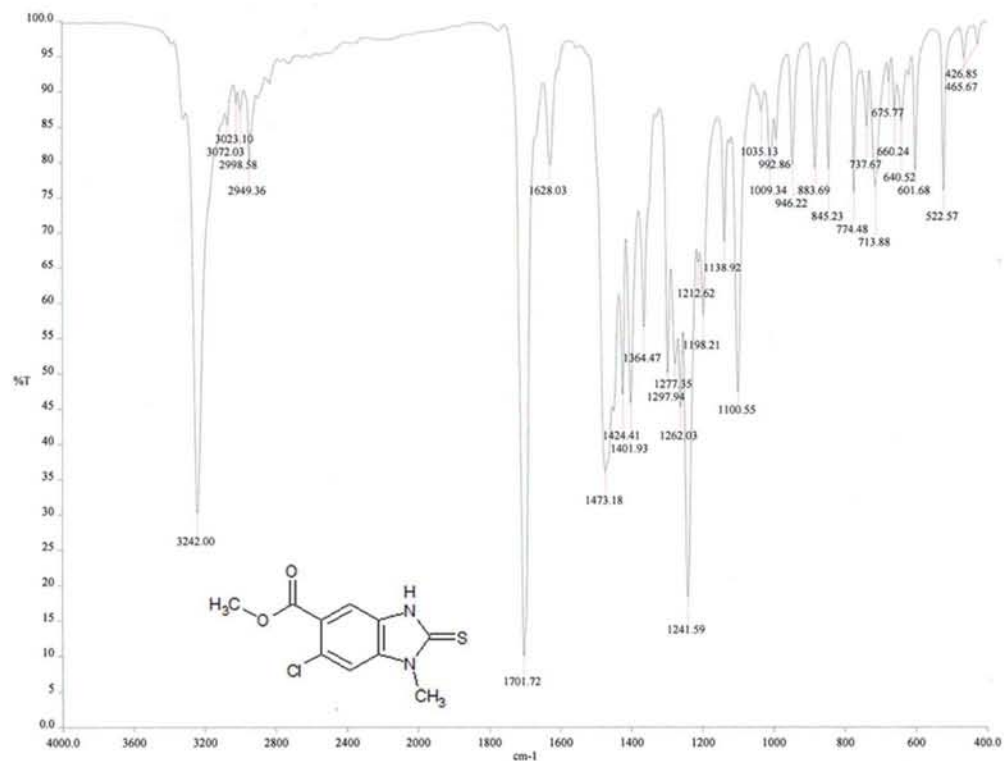
Espectro 22. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7).



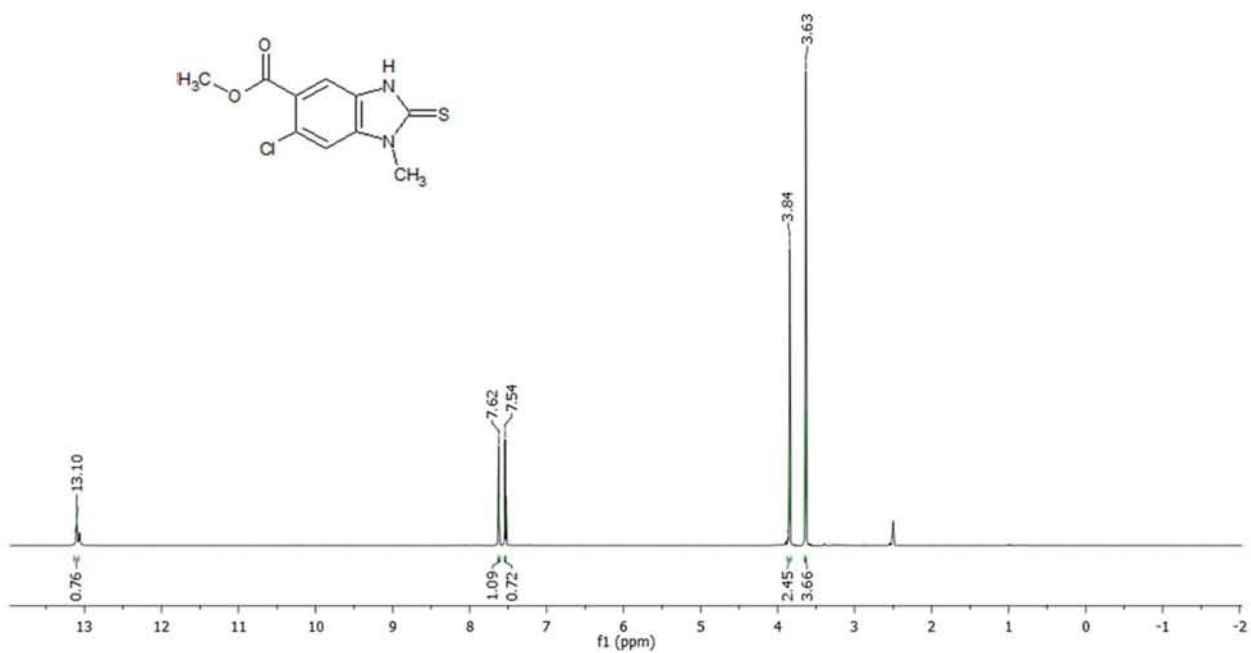
Espectro 23. RMN ^{13}C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7).



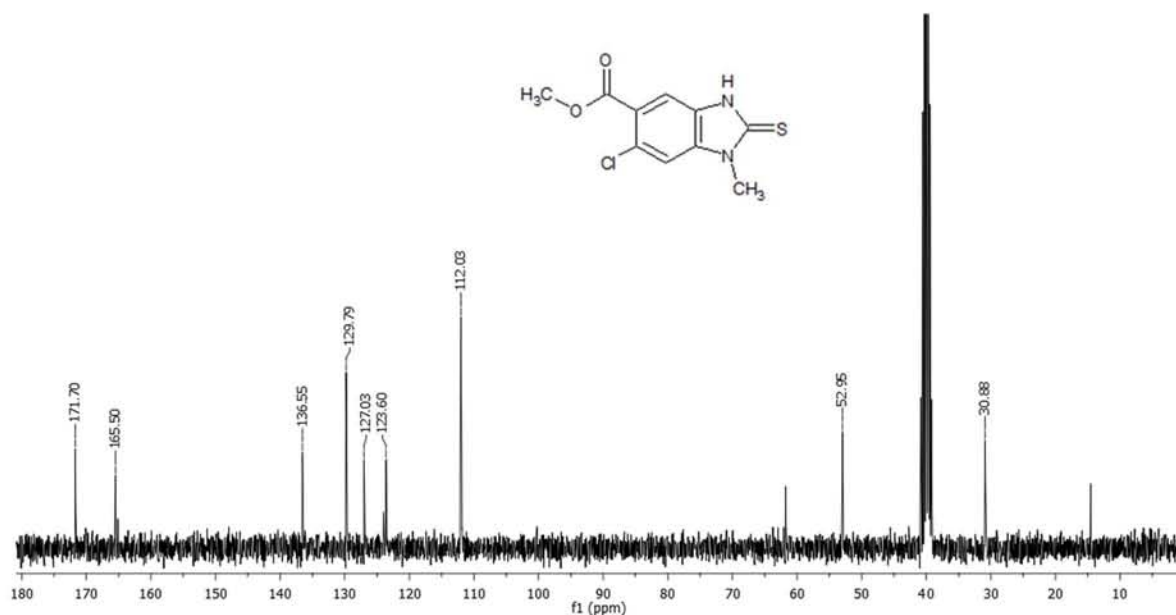
Espectro 24. EM (IE/CG) m/z: 2-cloro-4-(metilamino)-5-nitrobenzoato de metilo (7).



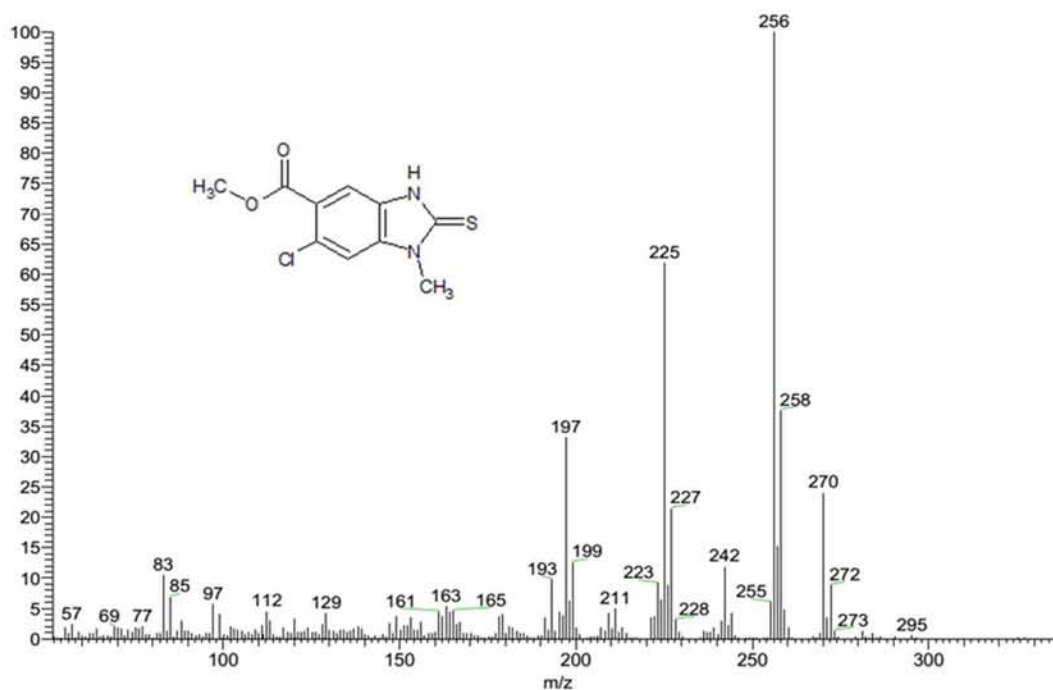
Espectro 25. IR cm⁻¹ : 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol carboxilato de metilo (9).



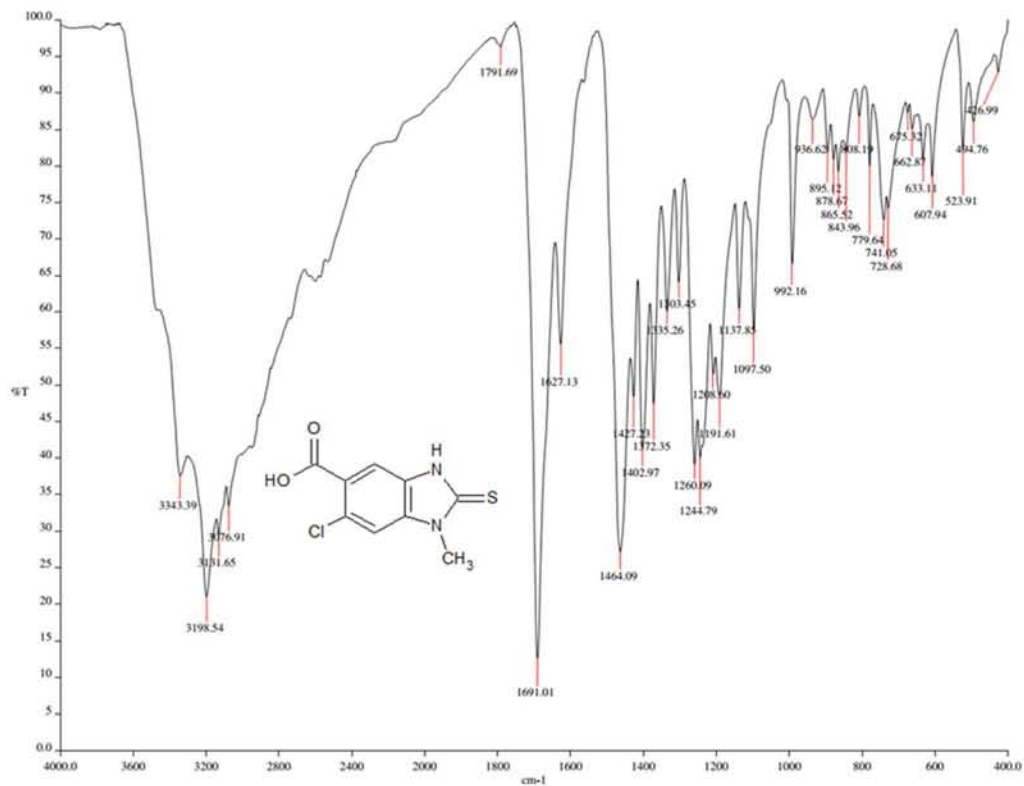
Espectro 26. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol carboxilato de metilo (9).



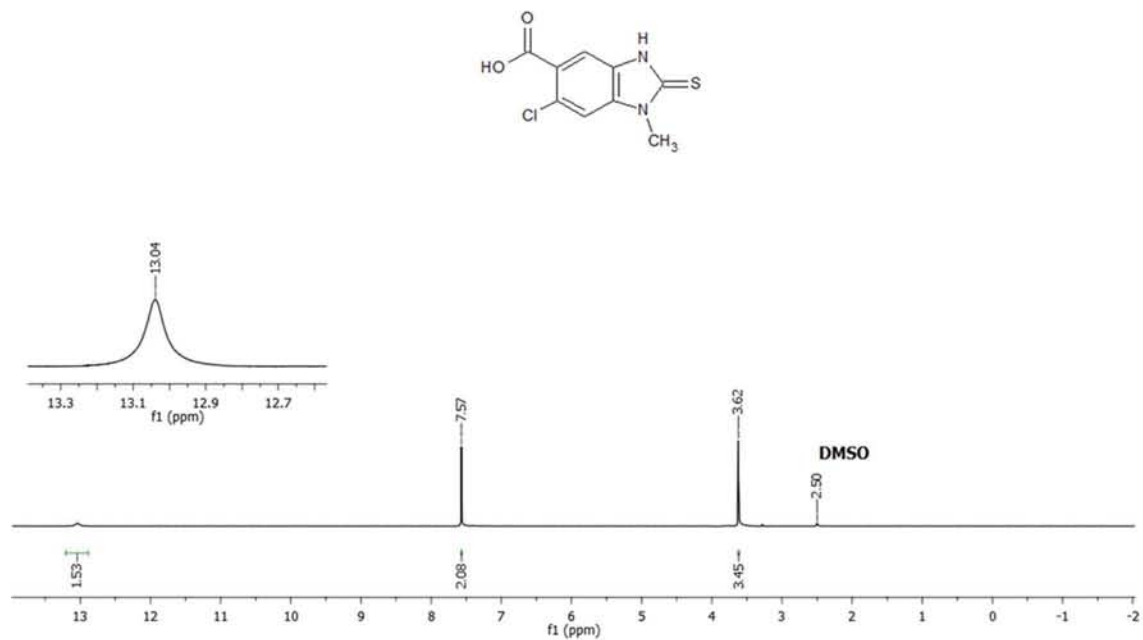
Espectro 27. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol carboxilato de metilo (9).



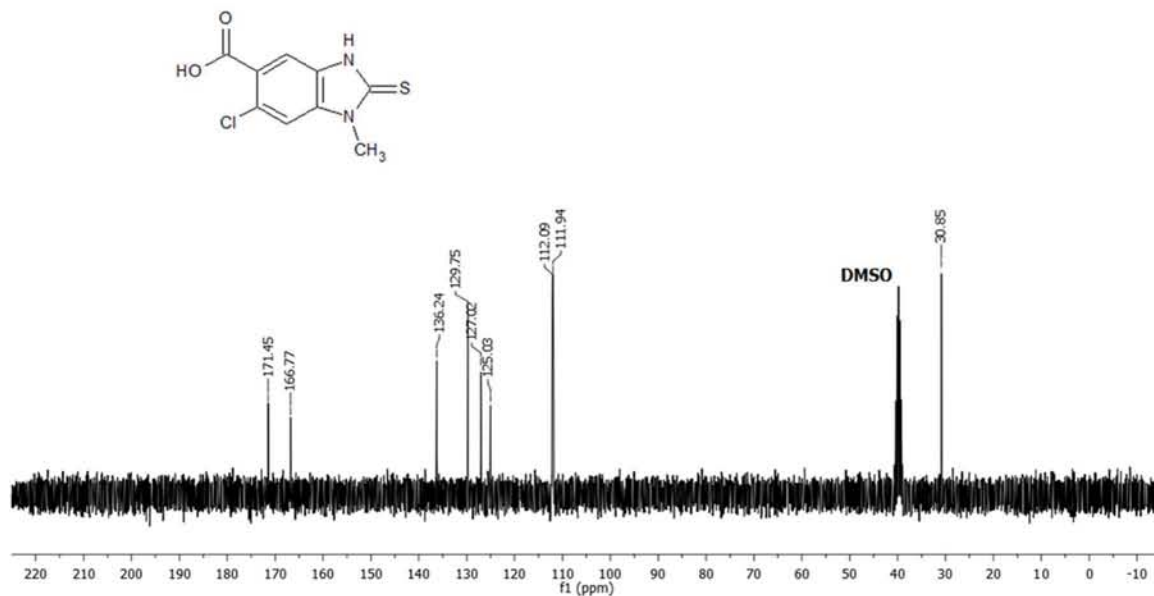
Espectro 28. EM (IE/CG) m/z : 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol carboxilato de metilo (9).



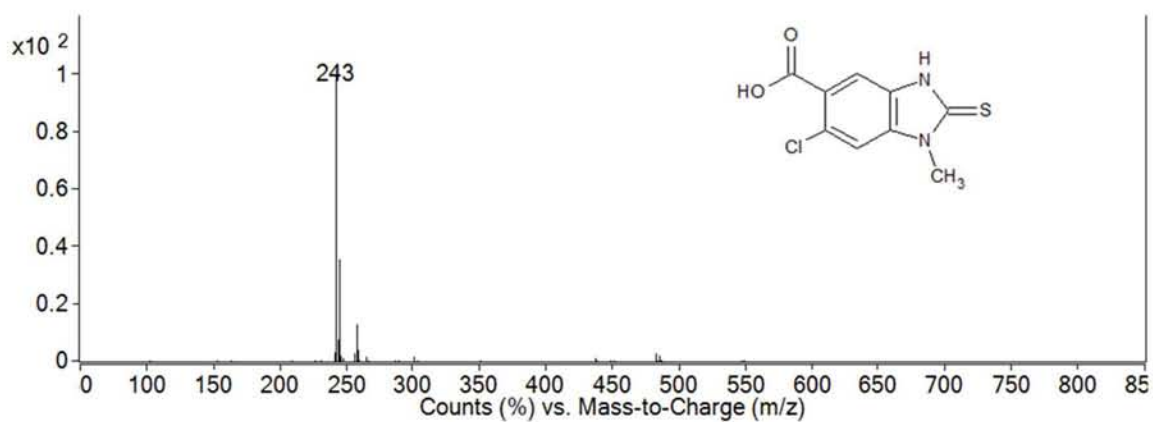
Espectro 29. IR cm^{-1} : ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10).



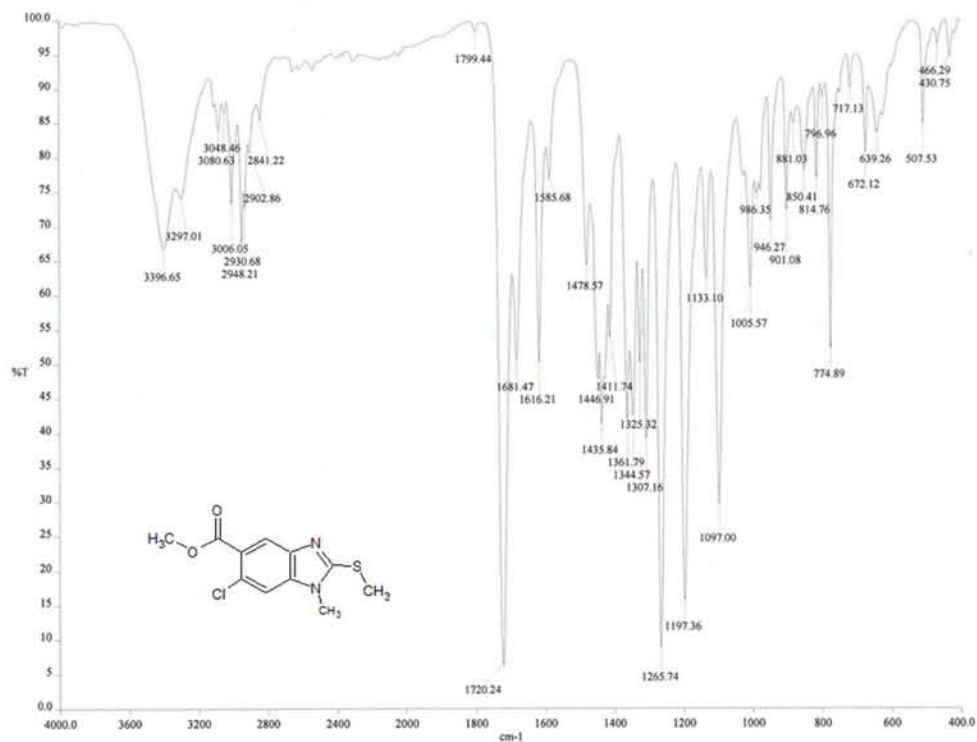
Espectro 30. RMN ^1H (TMS, DMSO-d₆) ppm: ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10).



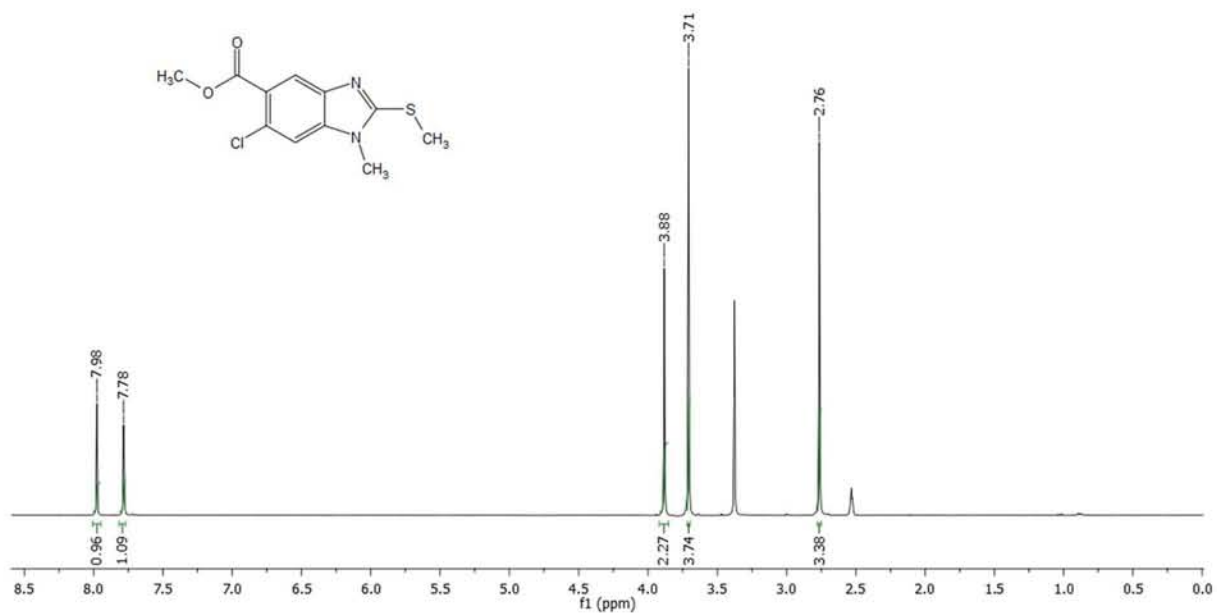
Espectro 31. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10).



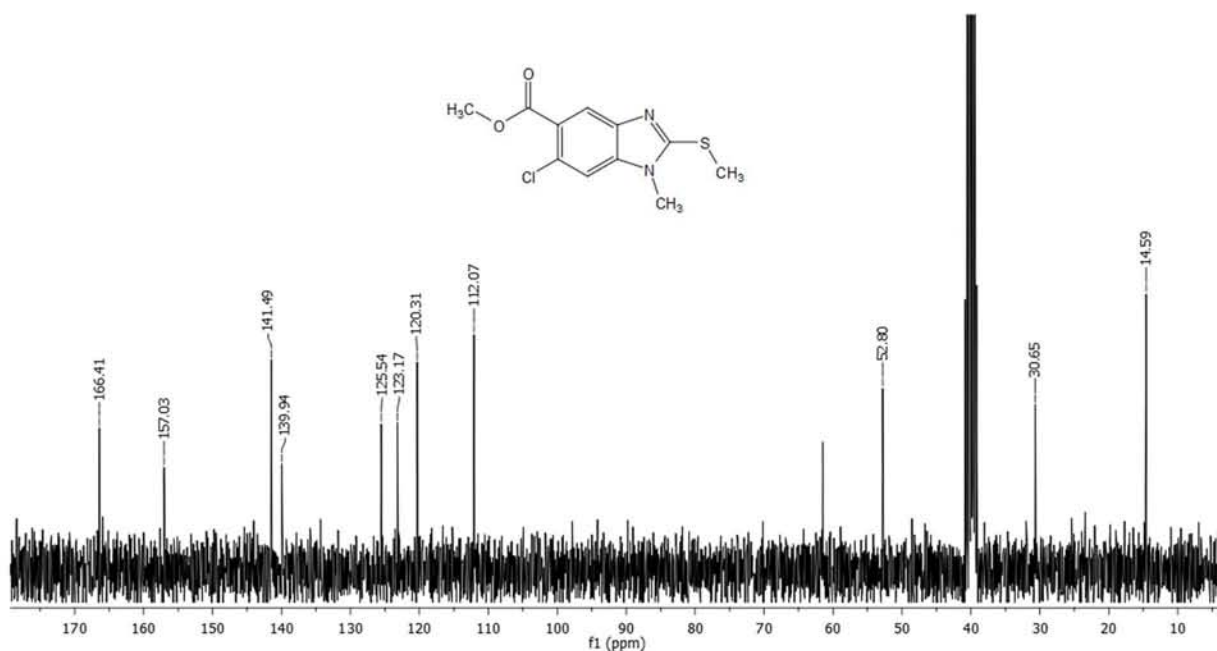
Espectro 32. EM (ESI/CL) m/z: ácido 6-cloro-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10).



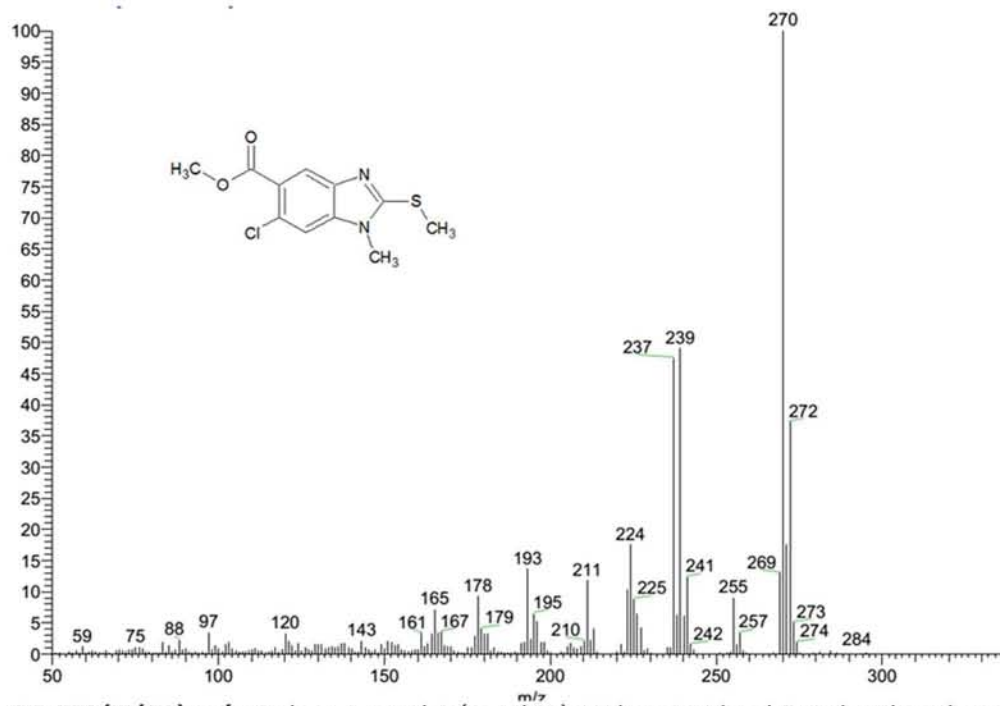
Espectro 33. IR cm⁻¹ : 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12).



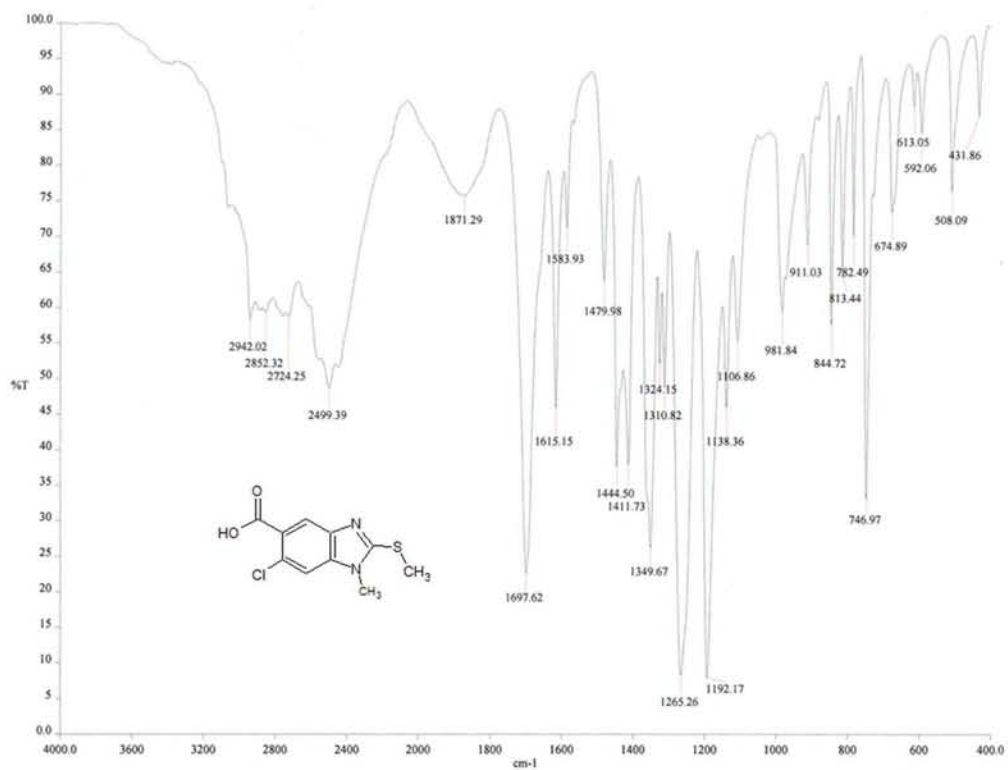
Espectro 34. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12).



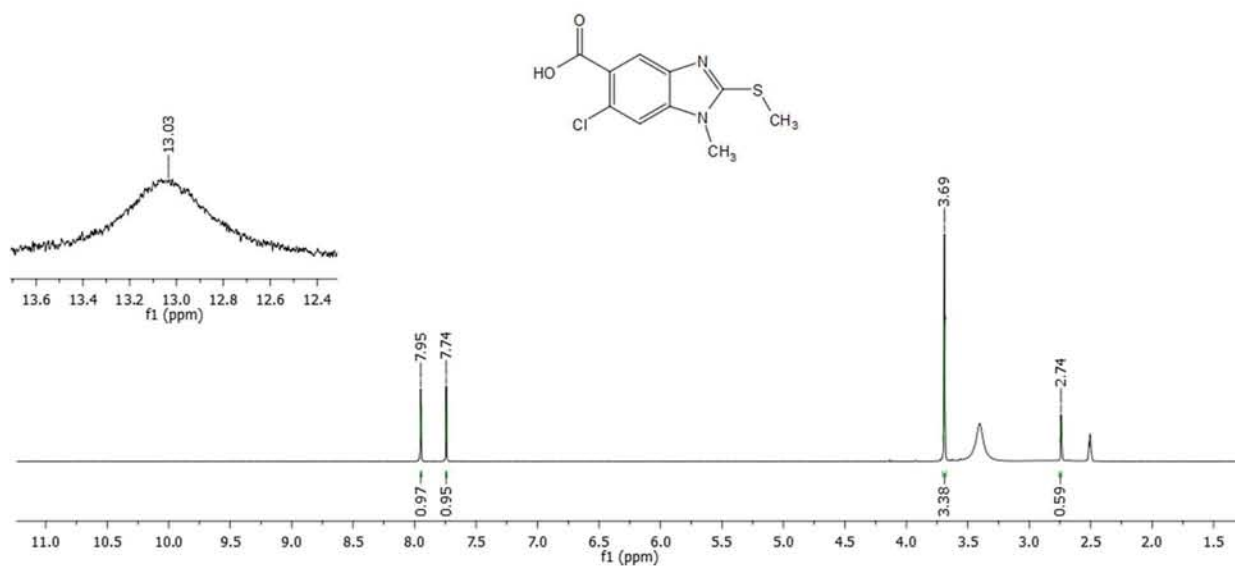
Espectro 35. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12).



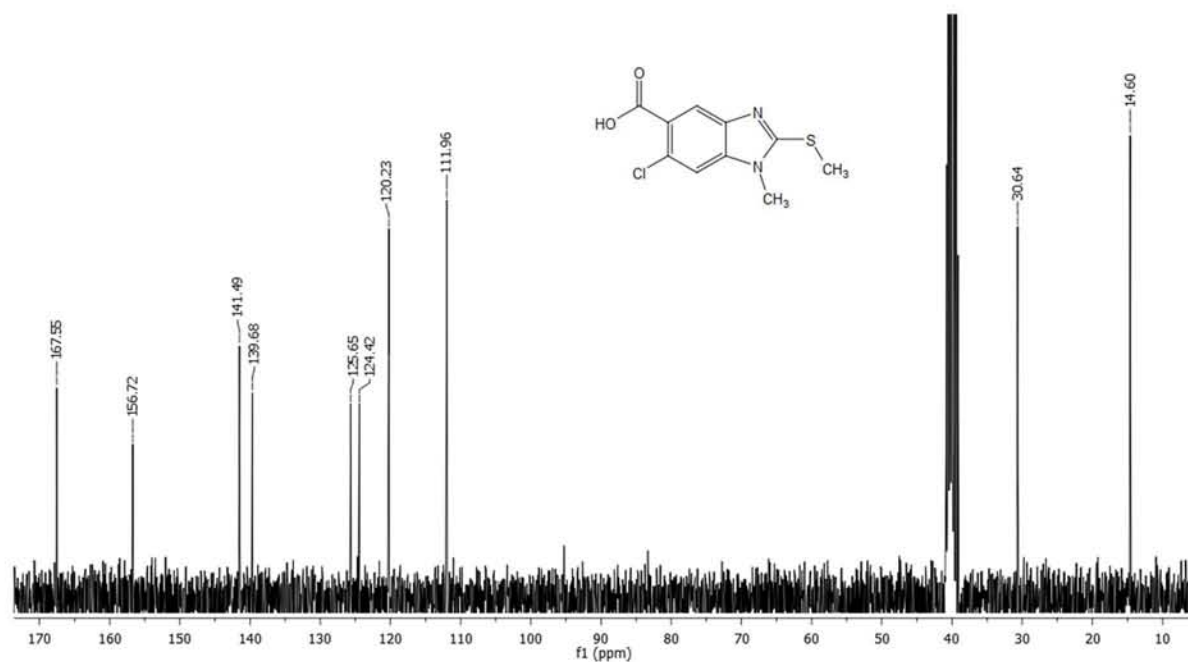
Espectro 36. EM (IE/CG) m/z : 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (12).



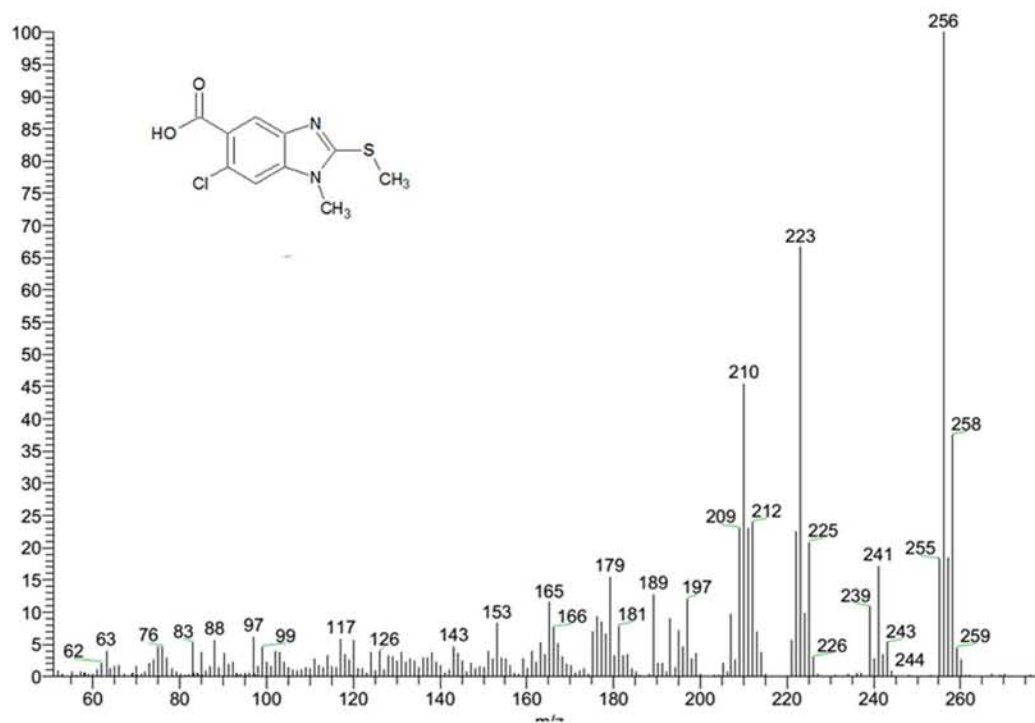
Espectro 37. IR cm^{-1} : ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (13).



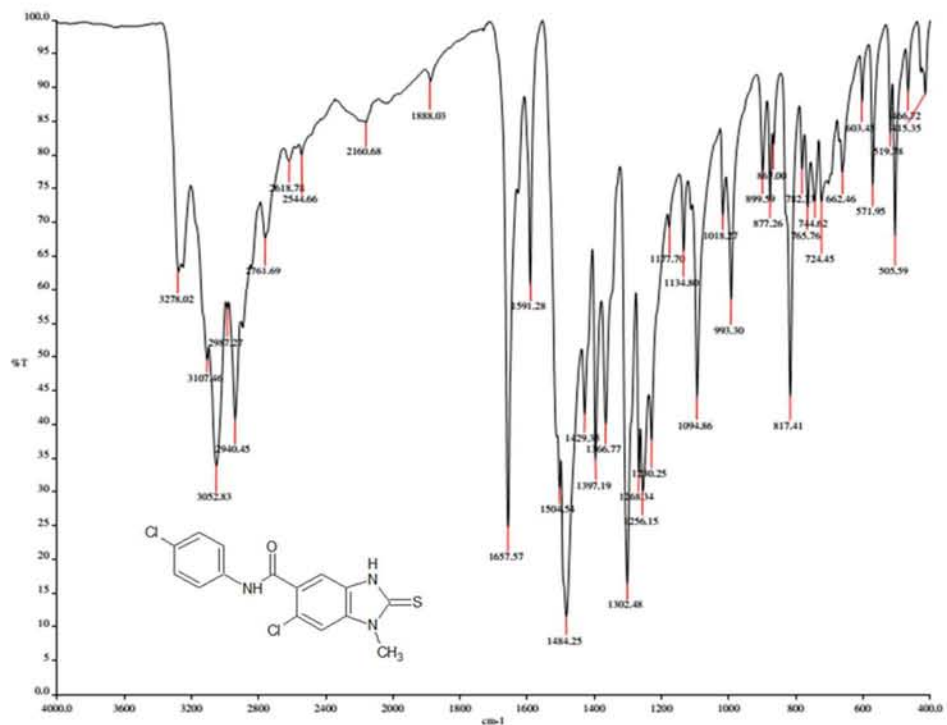
Espectro 38. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1H-bencimidazol-5-carboxílico (13).



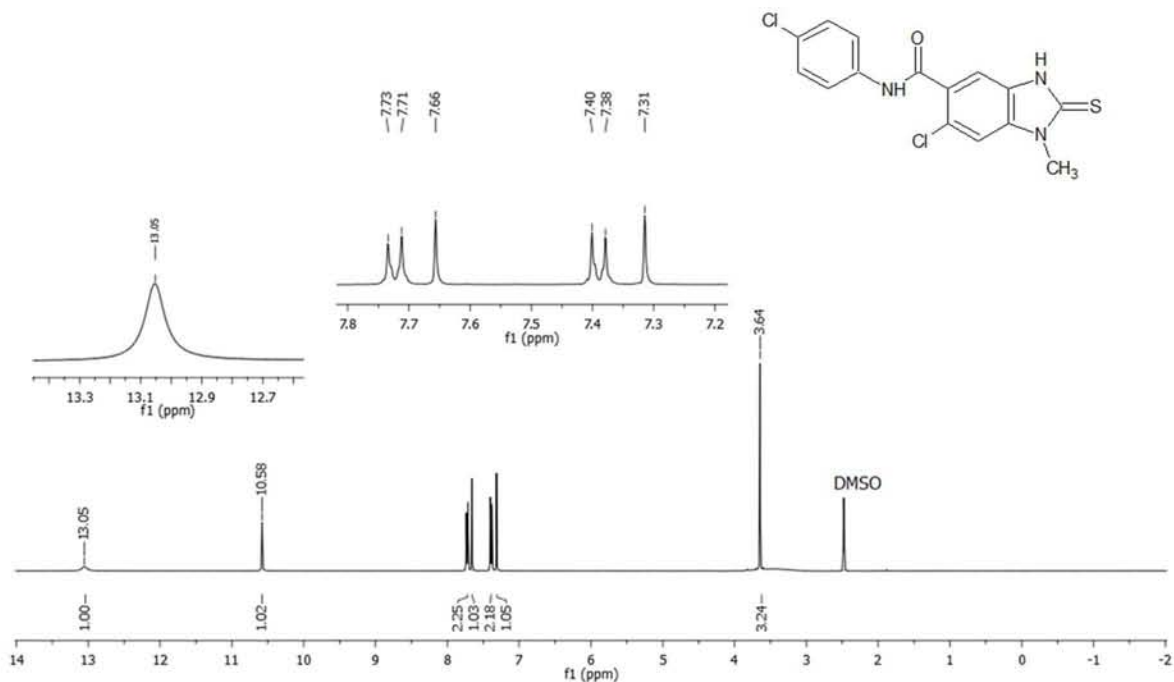
Espectro 39. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (13).



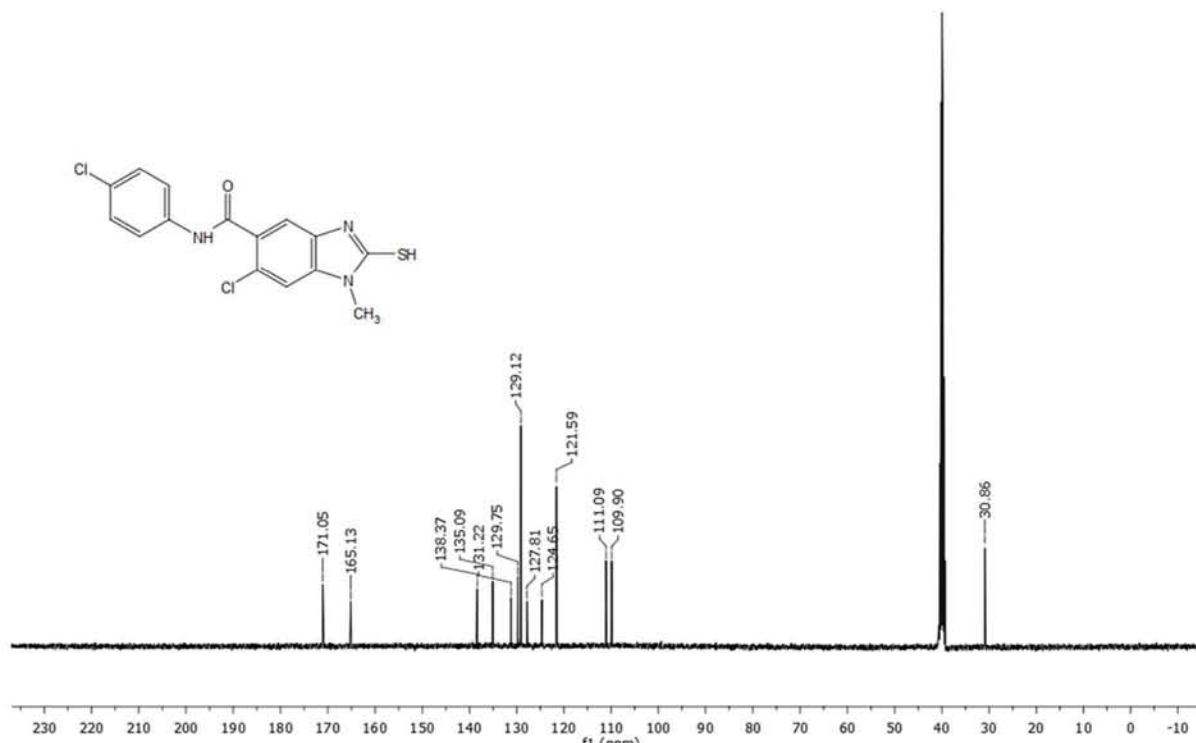
Espectro 40. EM (IE/CG) m/z : ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (13).



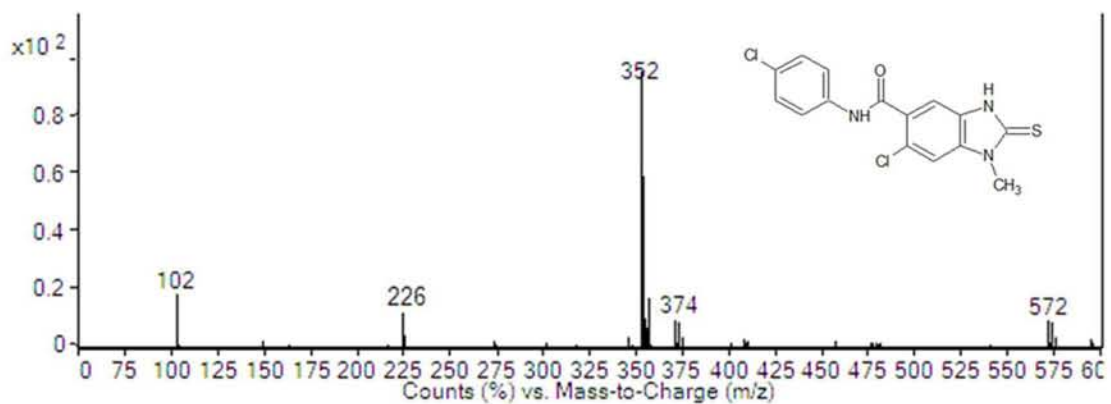
Espectro 41. IR cm^{-1} : 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a).



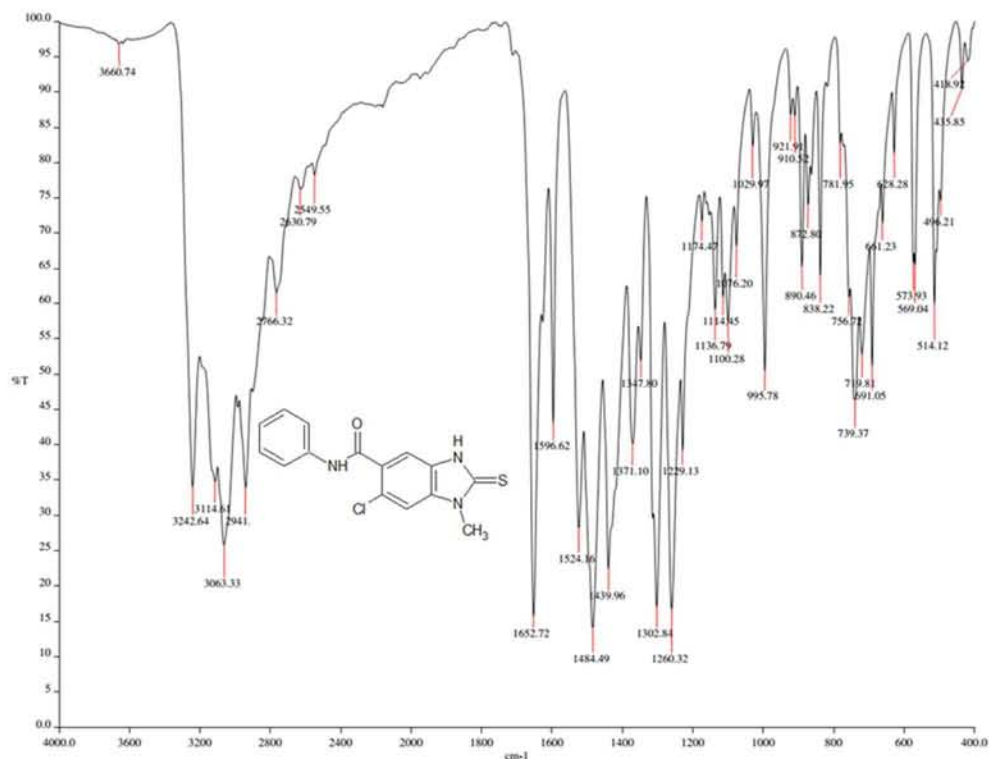
Espectro 42. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a).



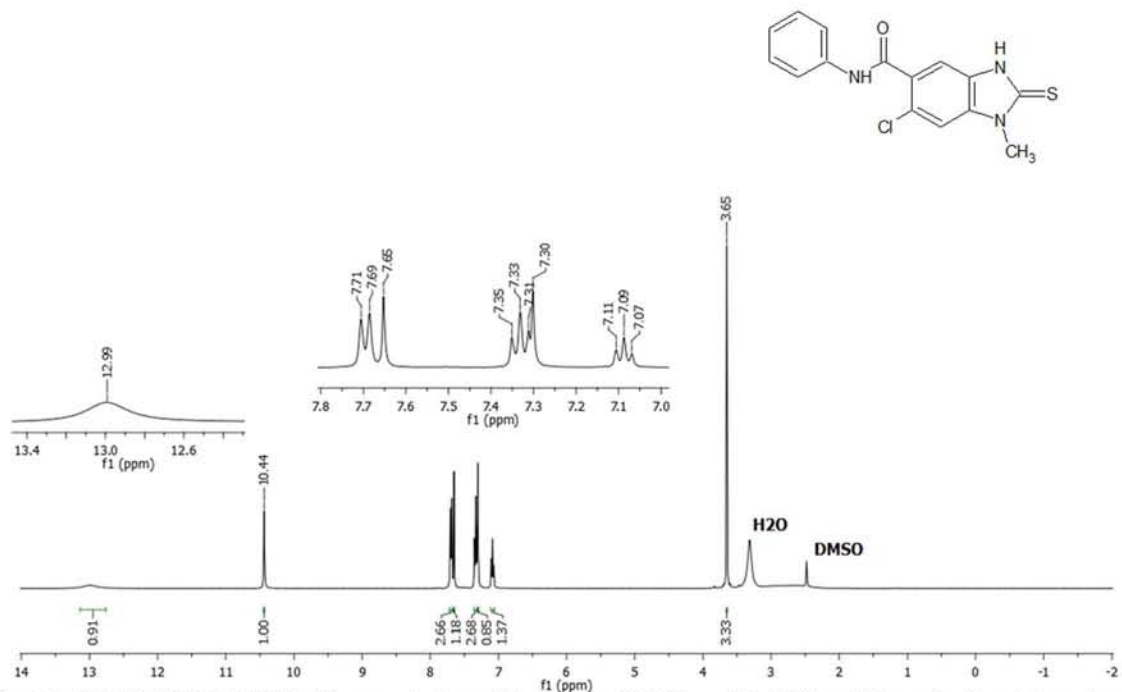
Espectro 43. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a).



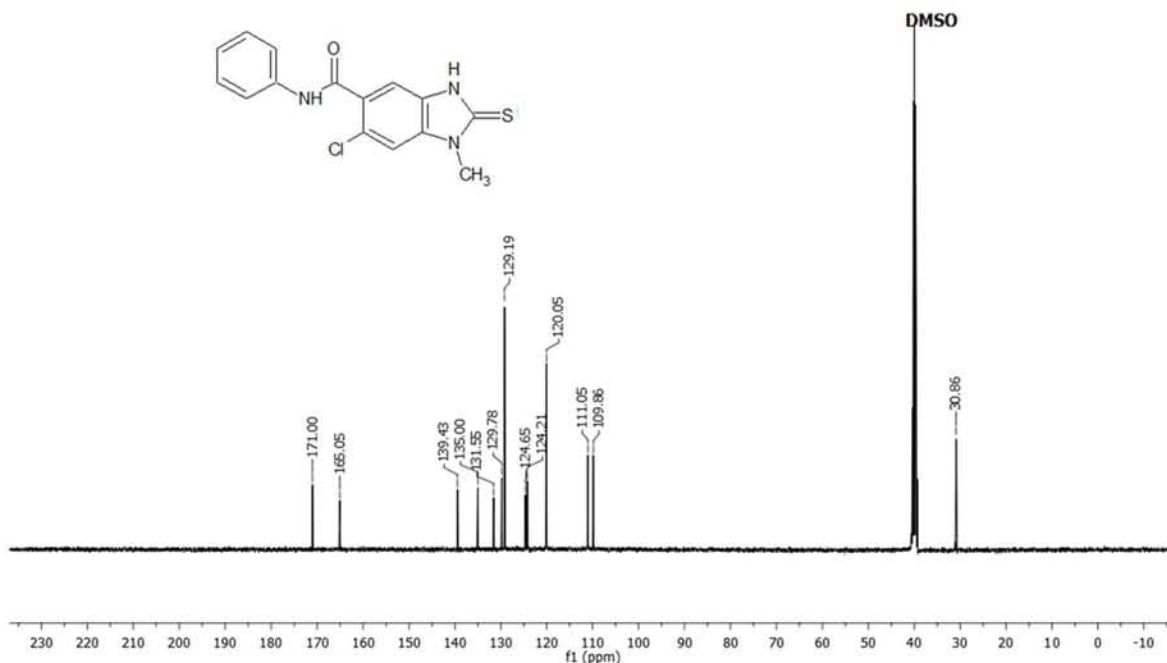
Espectro 44. EM (ESI/CL) *m/z*: : 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1a).



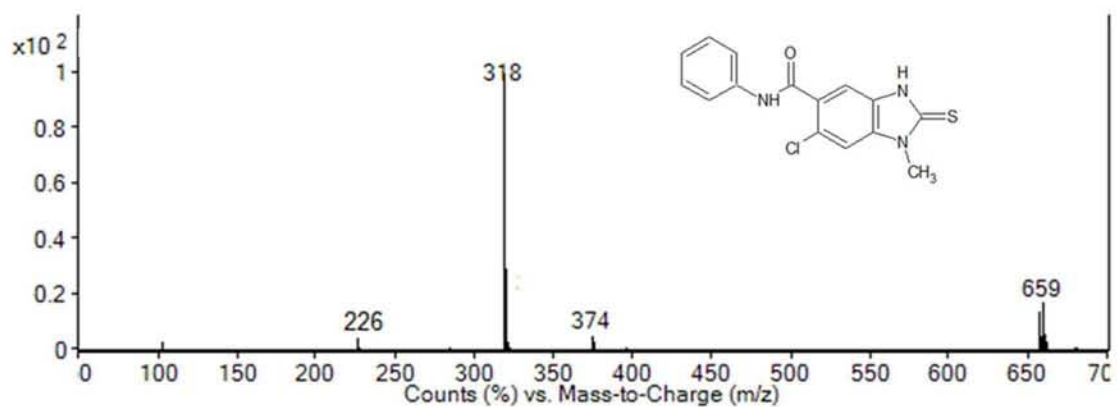
Espectro 45. IR cm⁻¹ : 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a).



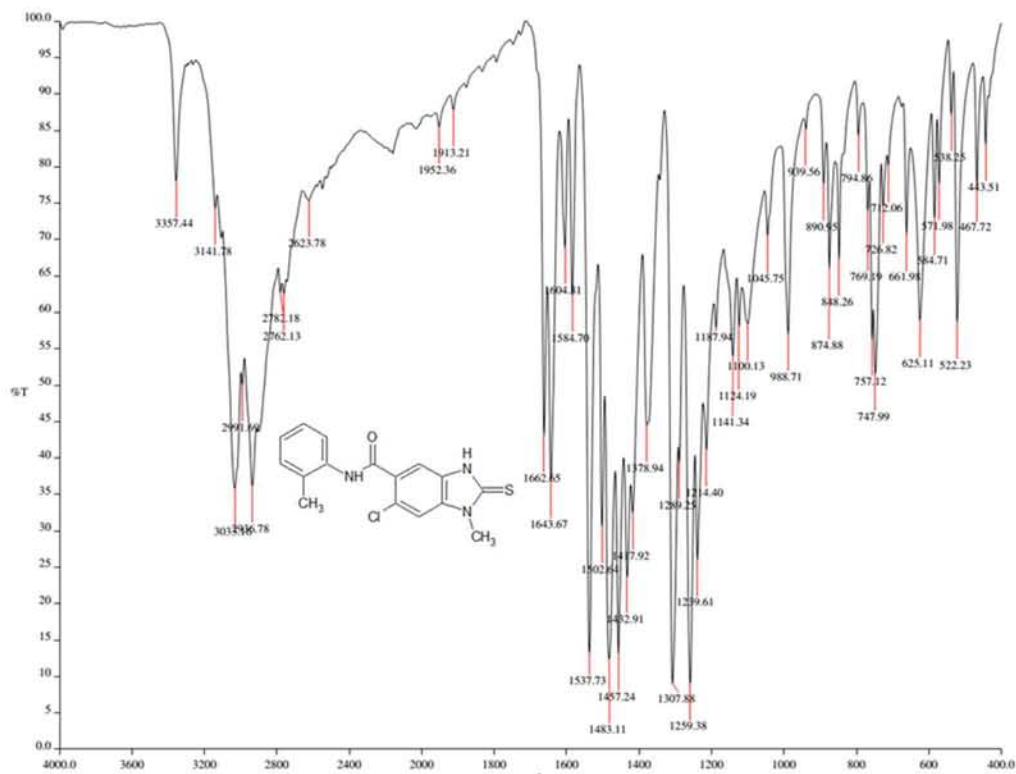
Espectro 46. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a).



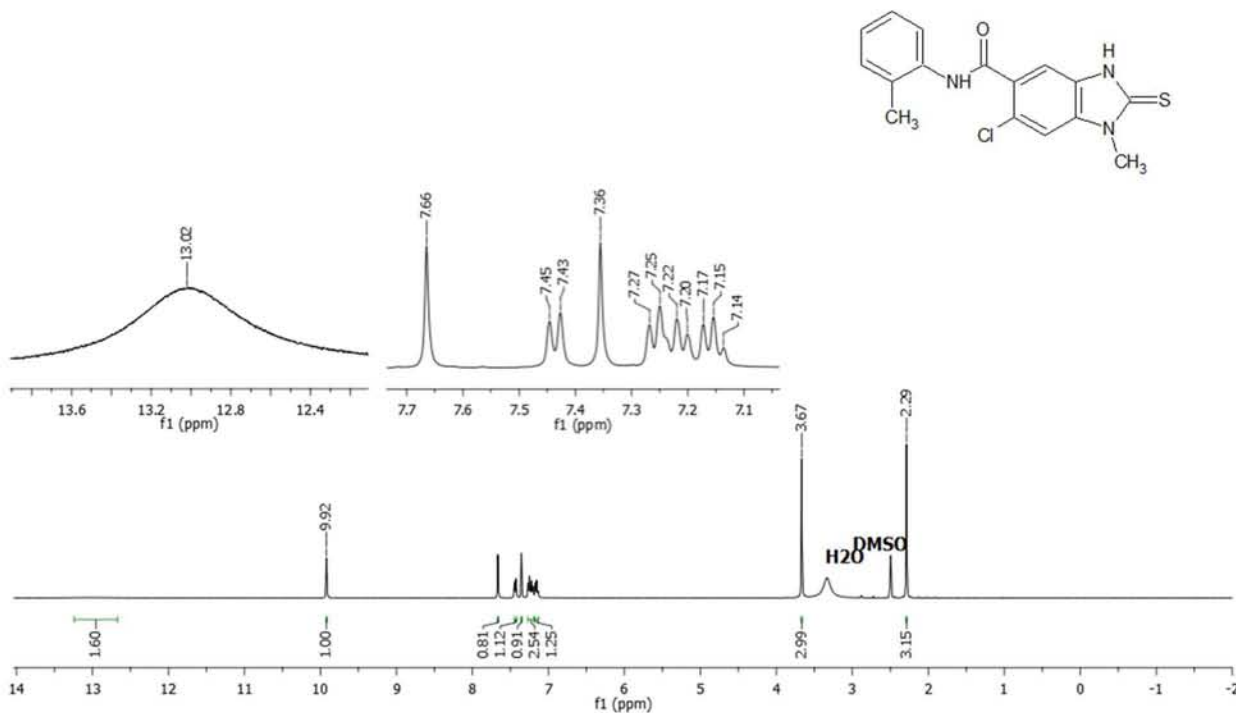
Espectro 47. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a).



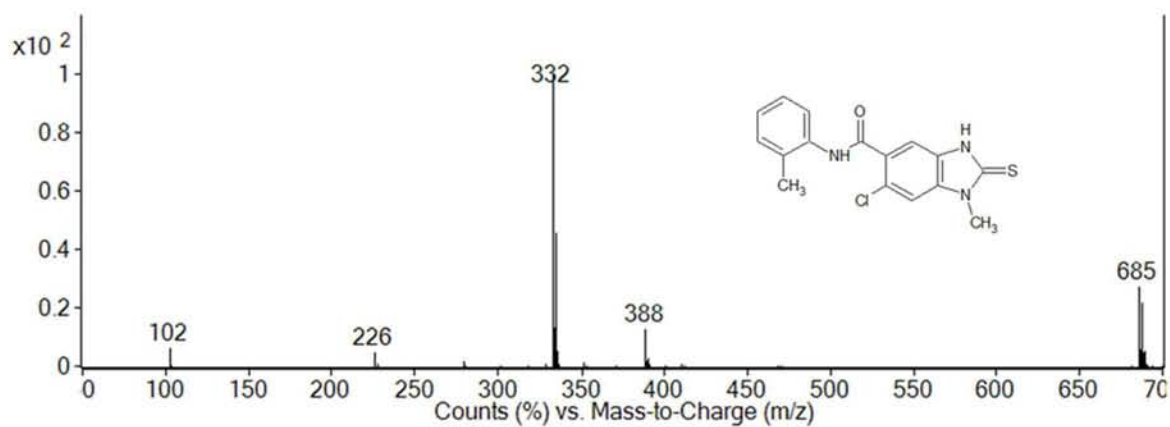
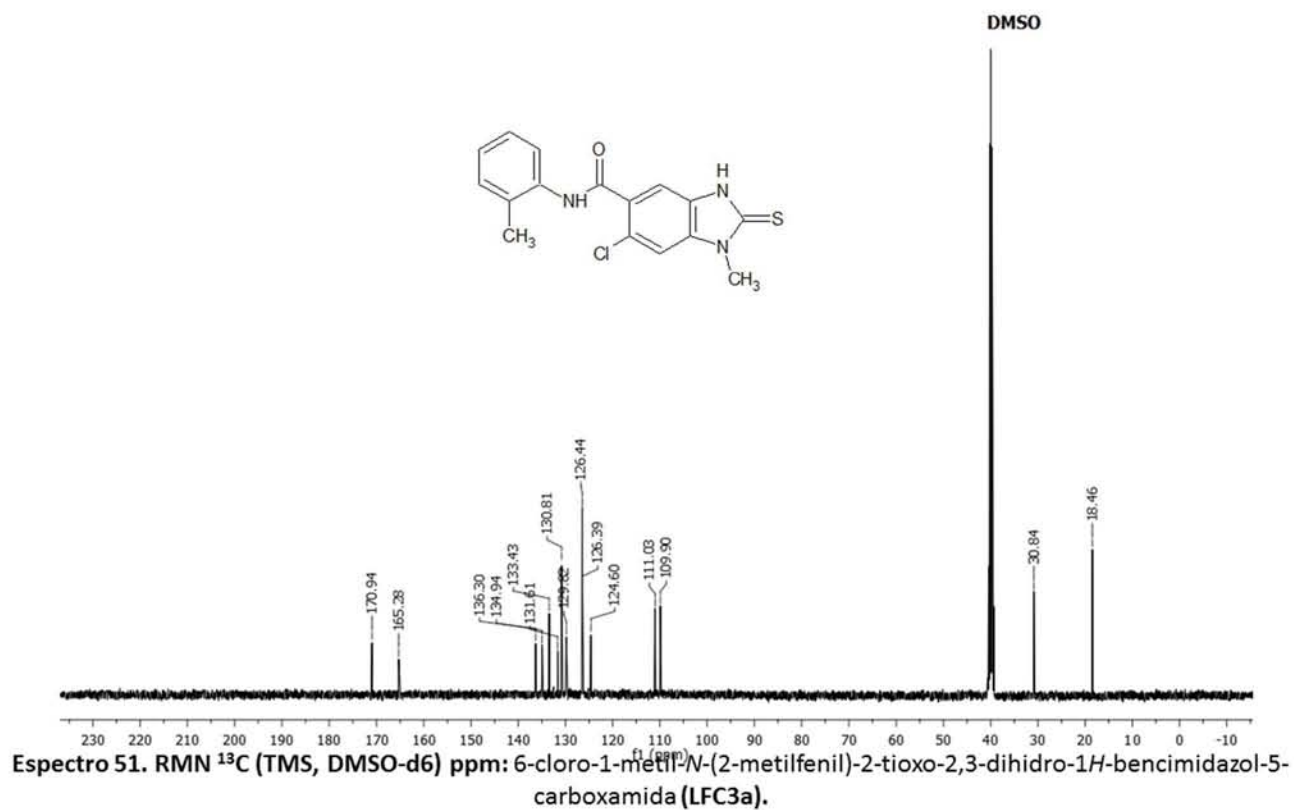
Espectro 48. EM (ESI/CL) *m/z*: 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2a).

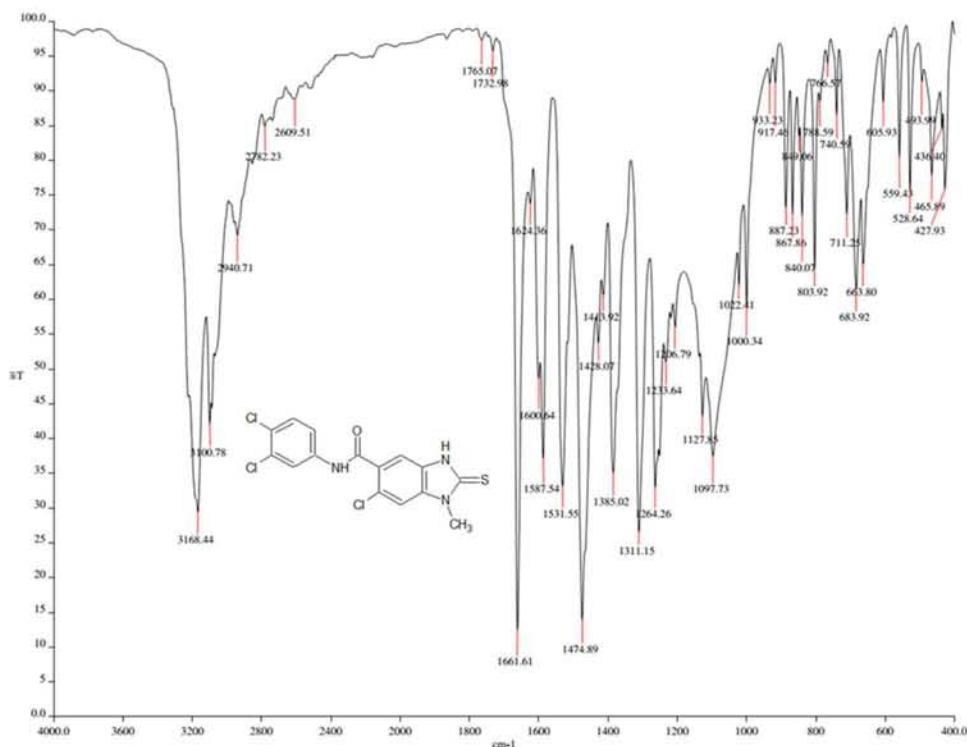


Espectro 49. IR cm^{-1} : 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3a).

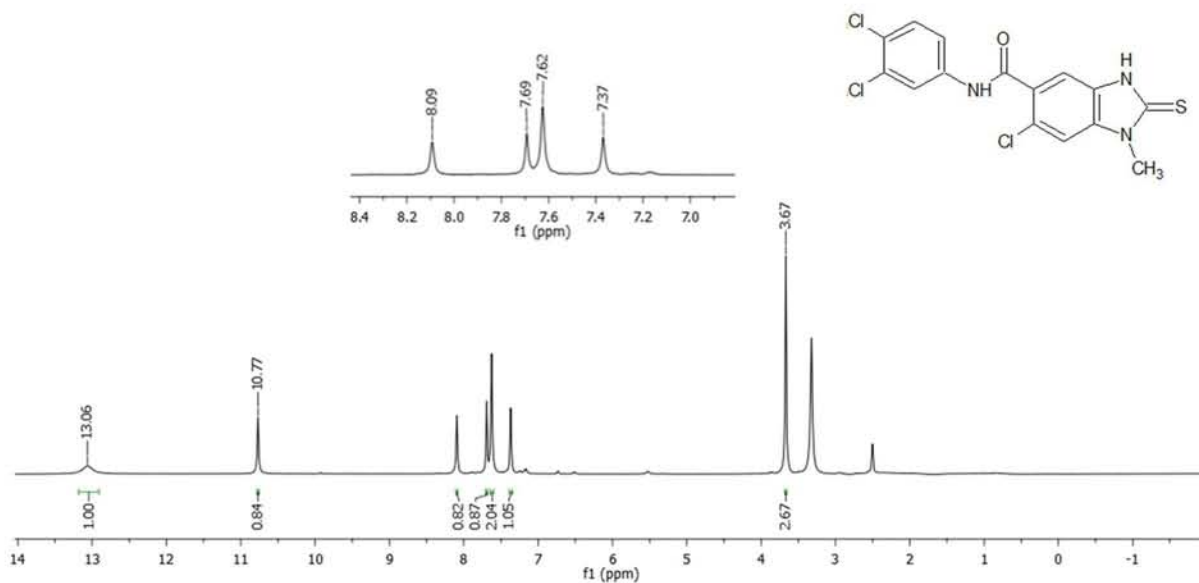


Espectro 50. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-tioxo-2,3-dihidro-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3a).

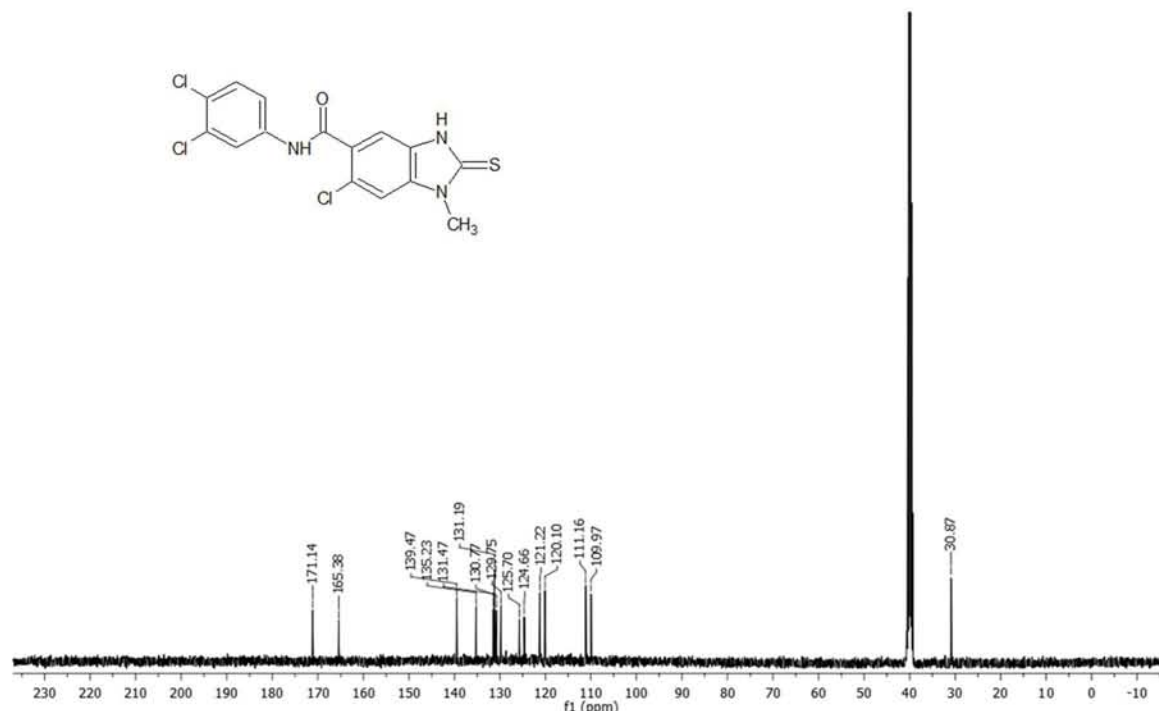




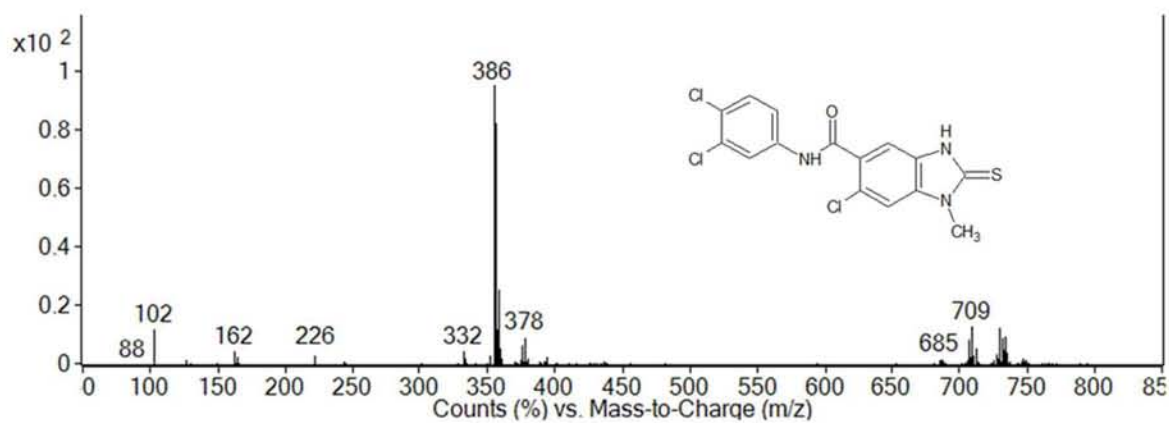
Espectro 53. IR cm^{-1} : 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a).



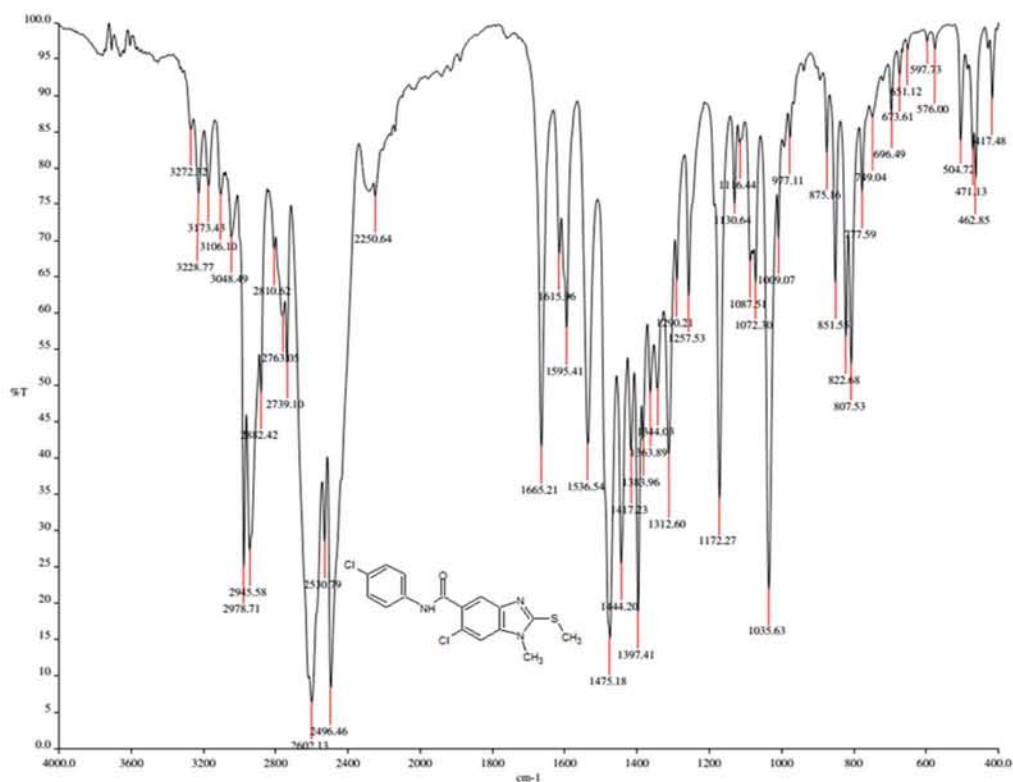
Espectro 54. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a).



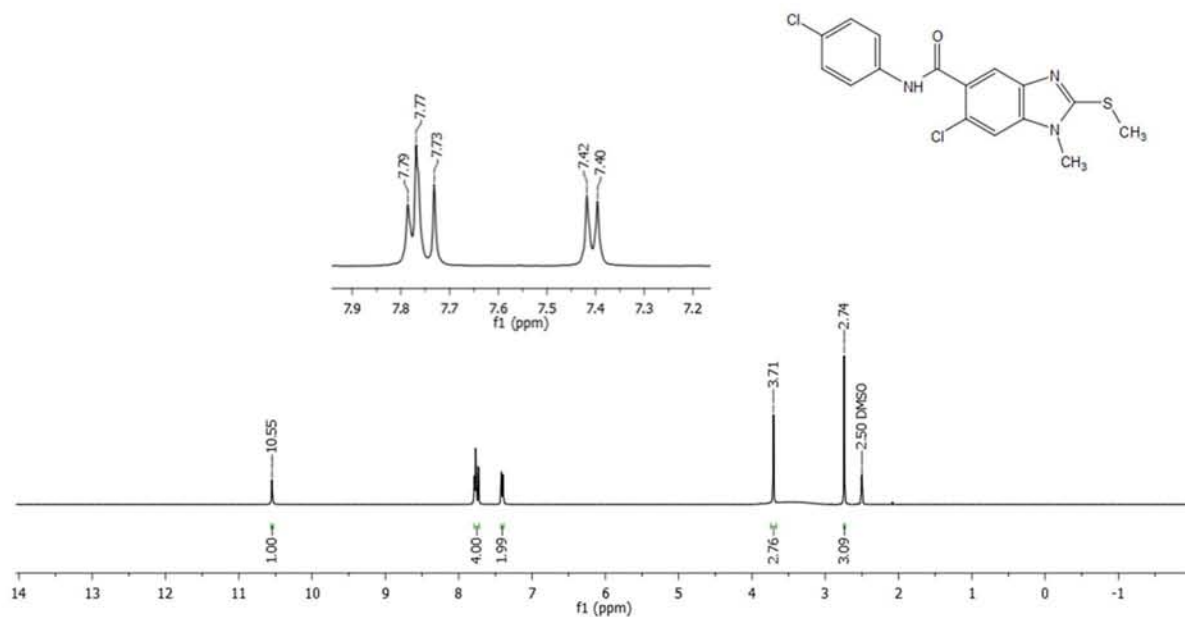
Espectro 55. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a).



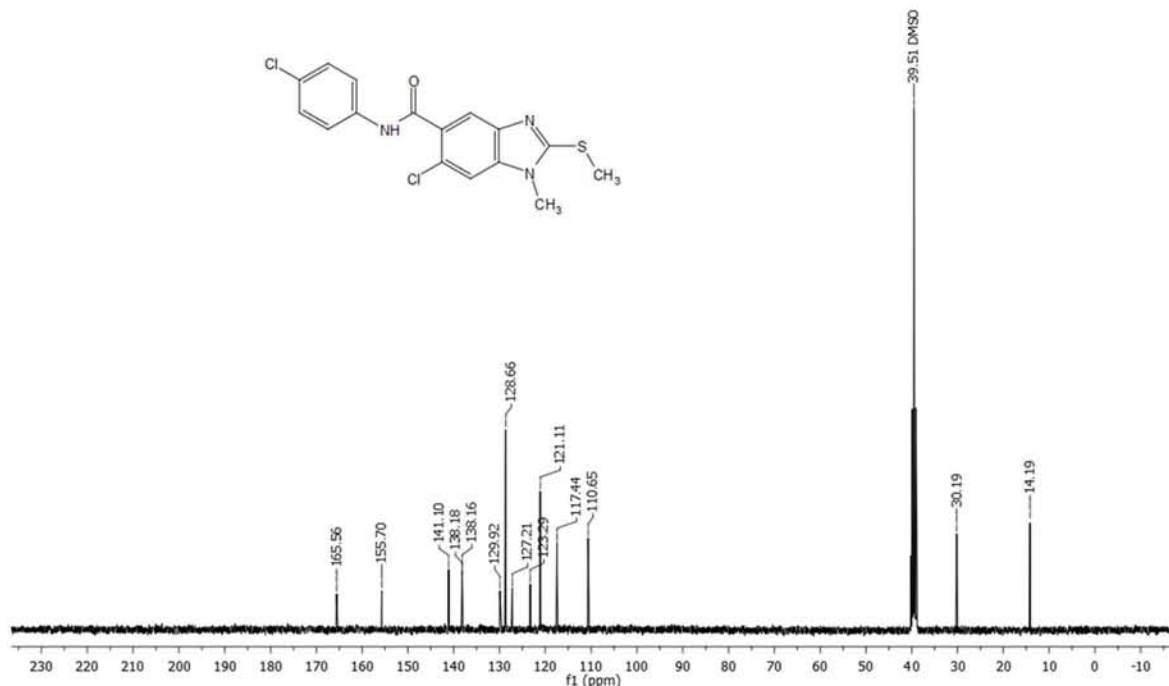
Espectro 56. EM (ESI/CL) *m/z*: : 6-cloro-*N*-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-tioxo-2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4a).



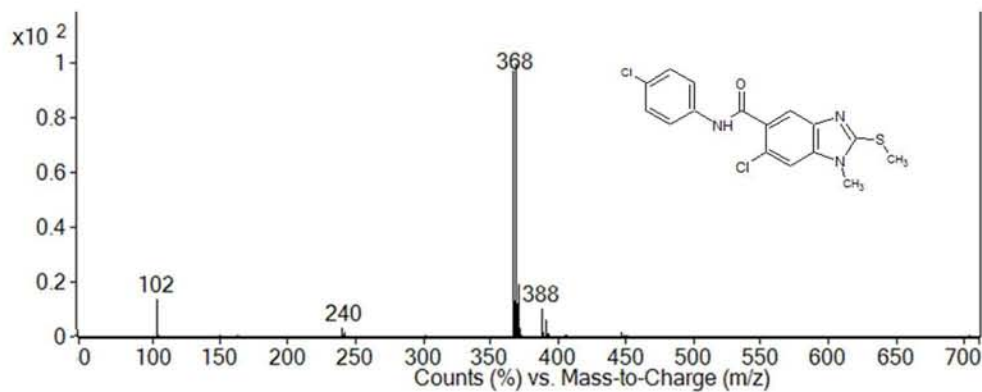
Espectro 57. IR cm^{-1} : 6-cloro-N-(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b).



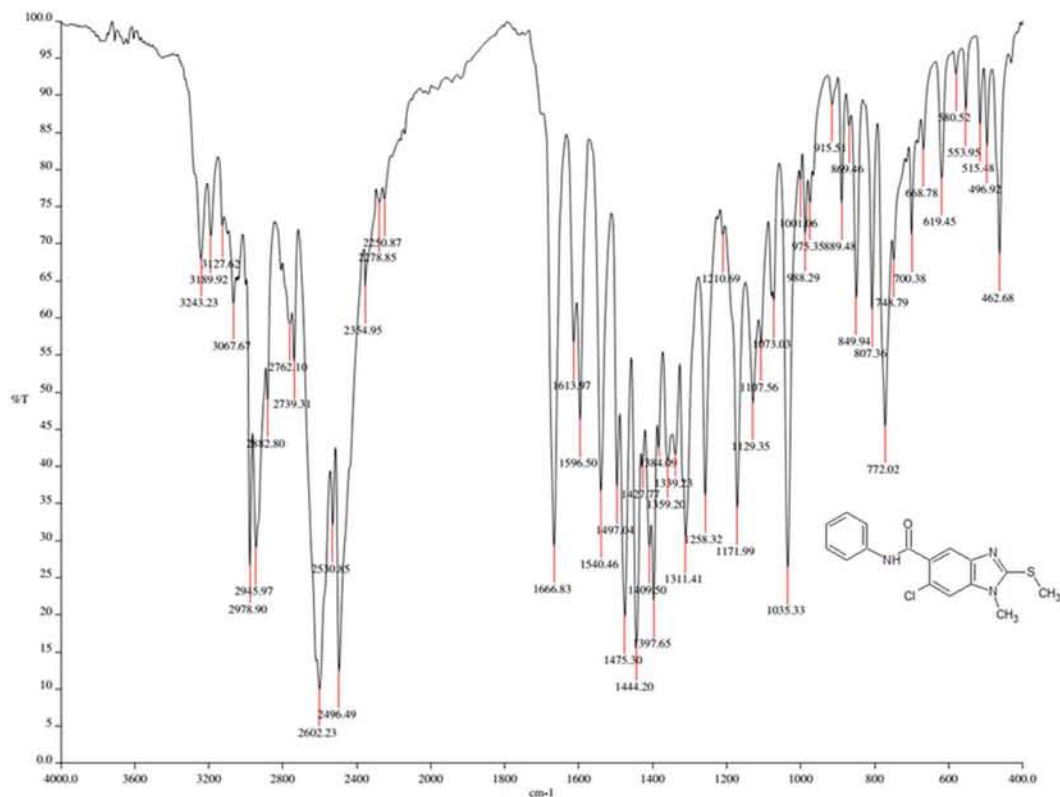
Espectro 58. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6) ppm: 6-cloro-N-(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b).



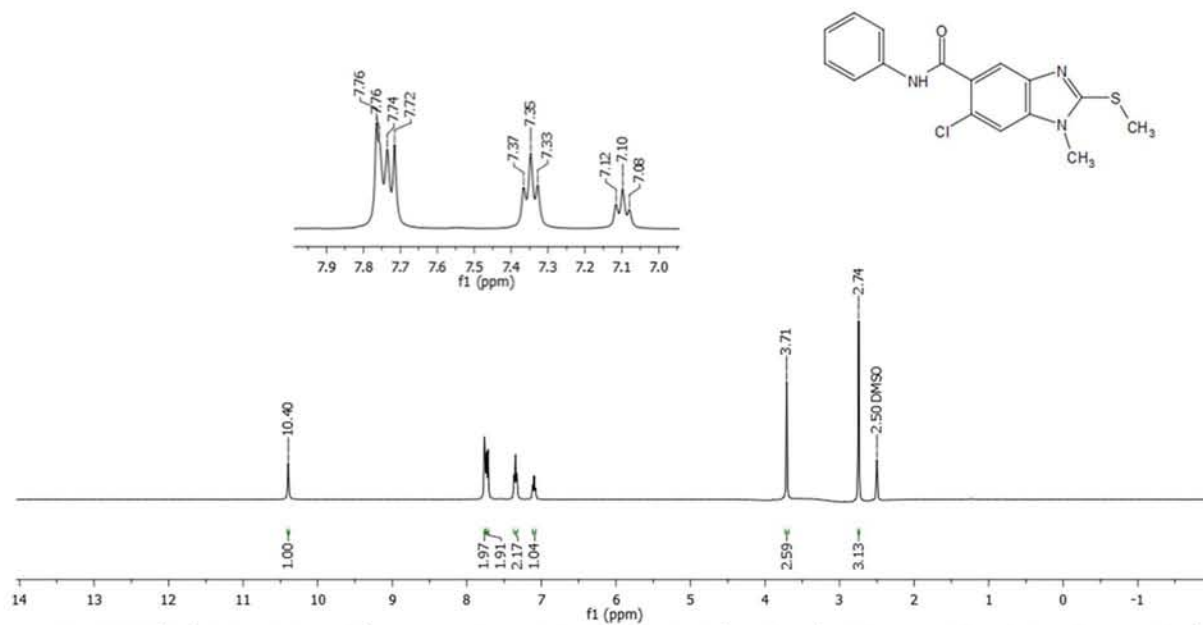
Espectro 59. RMN ^{13}C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b).



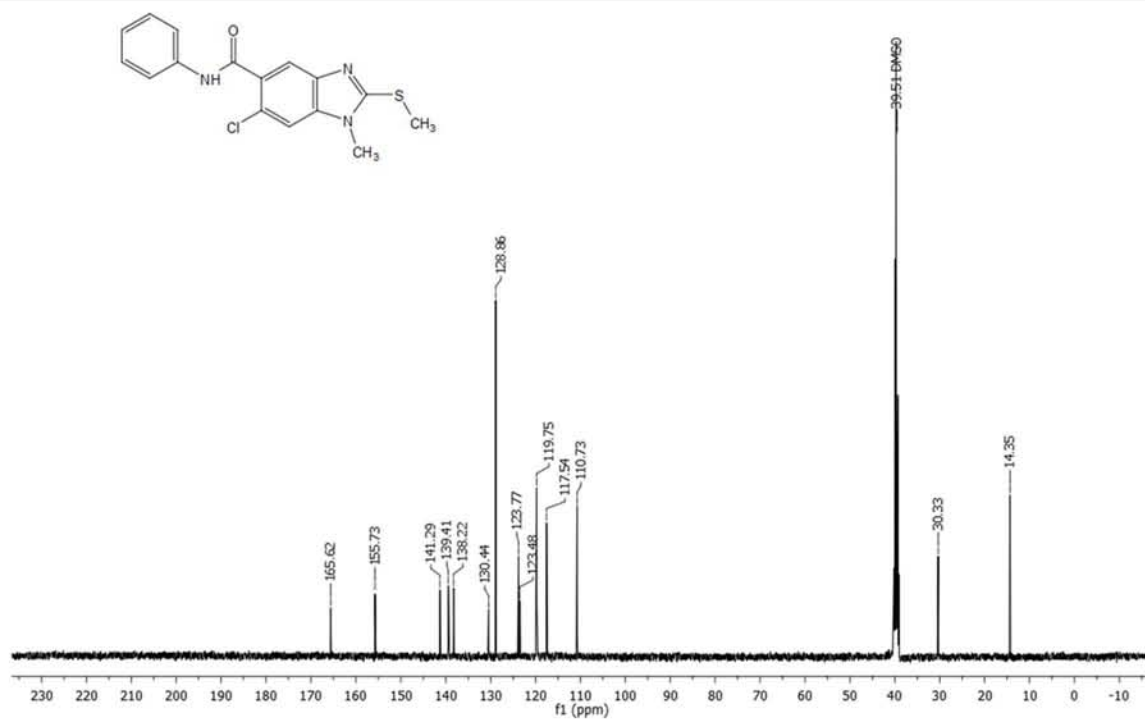
Espectro 60. EM (ESI/CL) *m/z*: 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1b).



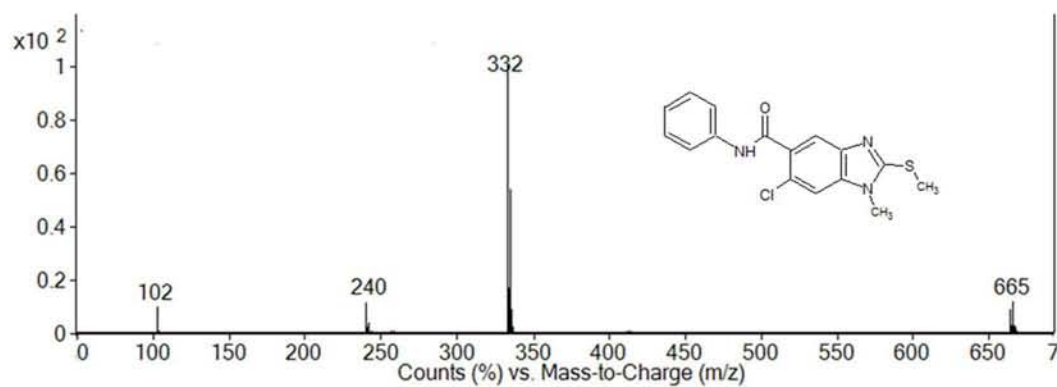
Espectro 61. IR cm⁻¹: 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b).



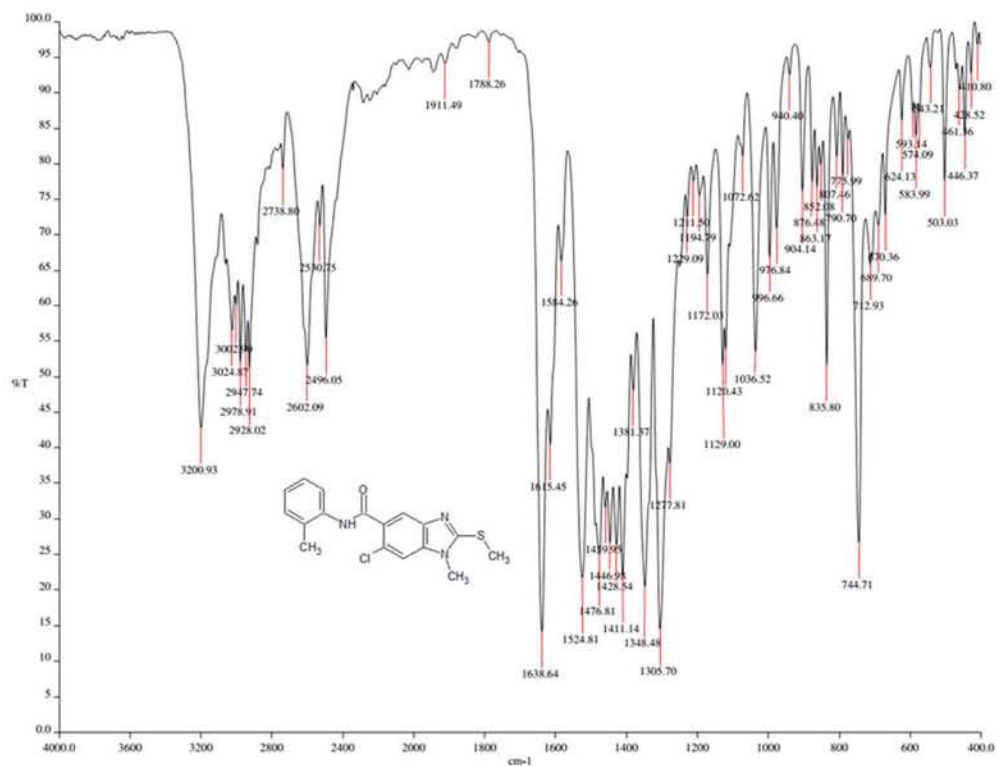
Espectro 62. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-*N*-fenil-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b).



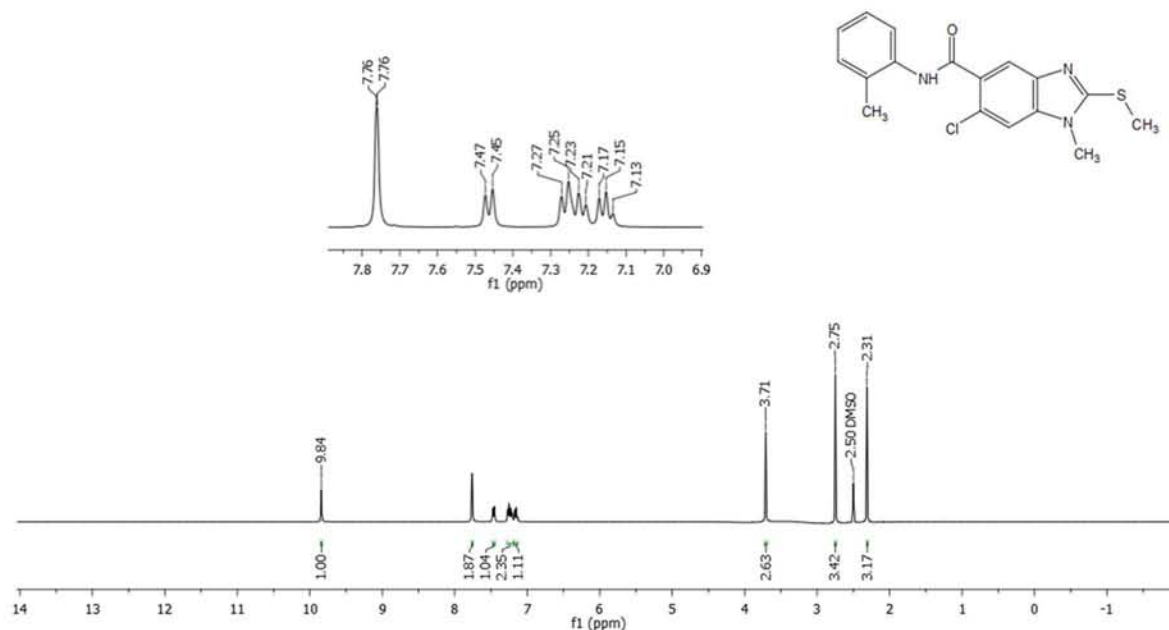
Espectro 63. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-N-fenil-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b).



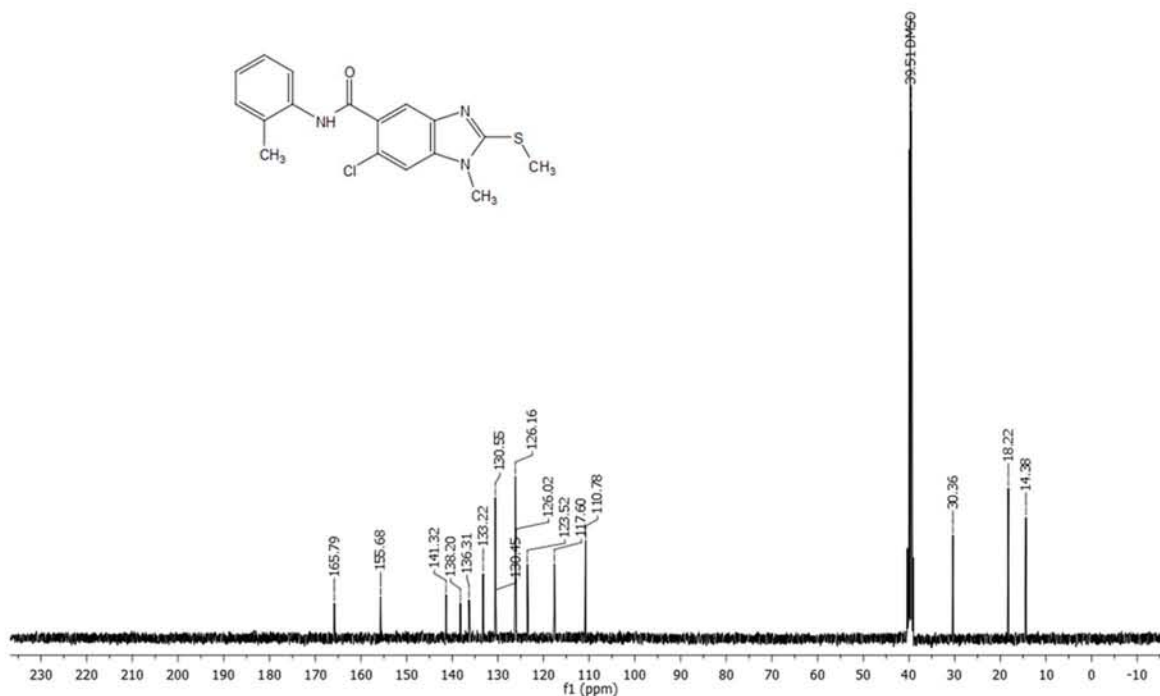
Espectro 64. EM (ESI/CL) m/z : 6-cloro-N-fenil-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2b).



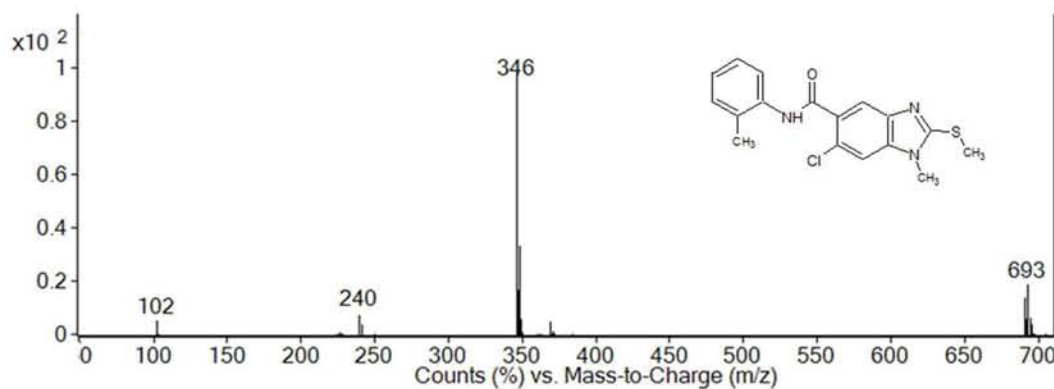
Espectro 65. IR cm^{-1} : 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b) .



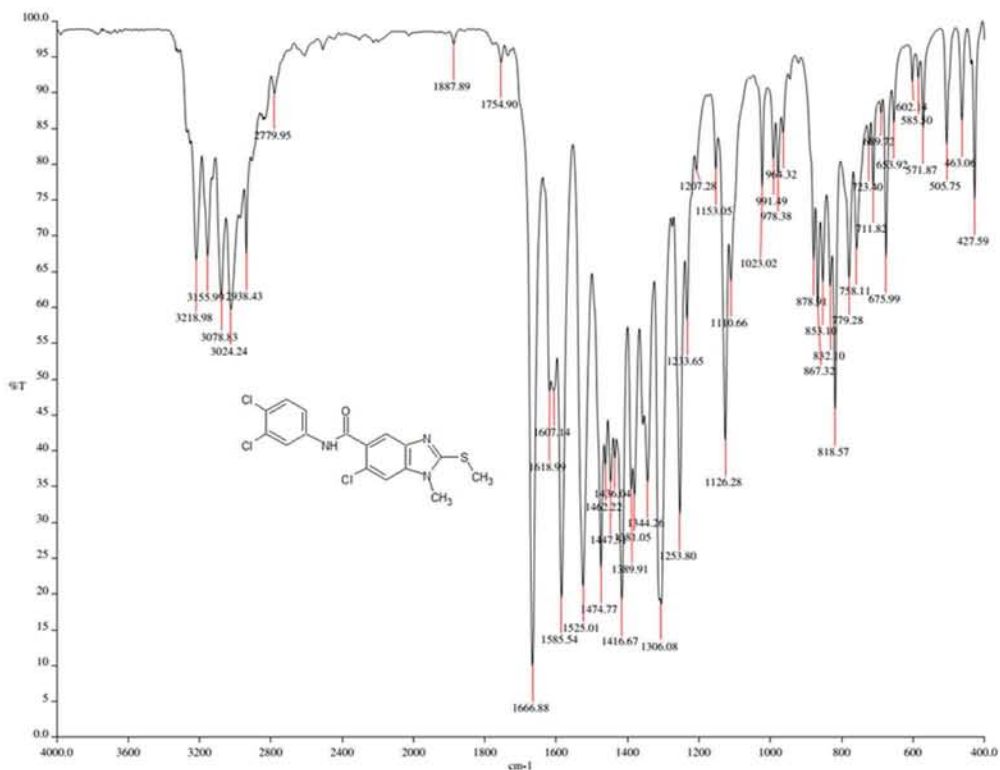
Espectro 66. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b).



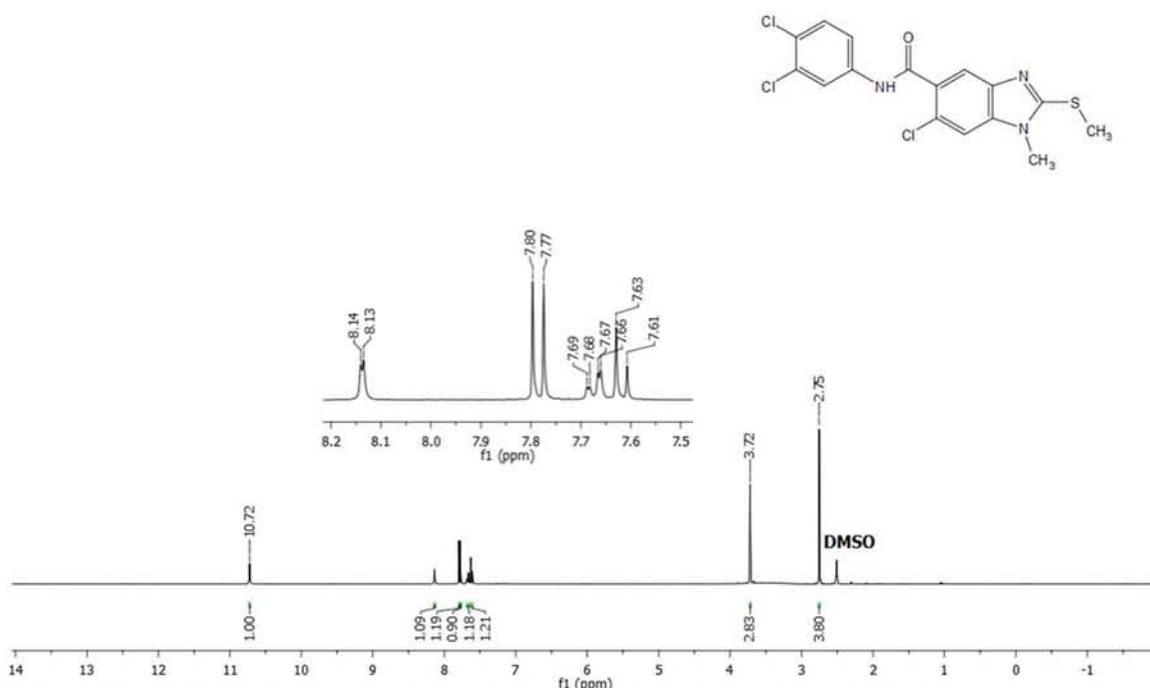
Espectro 67. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b).



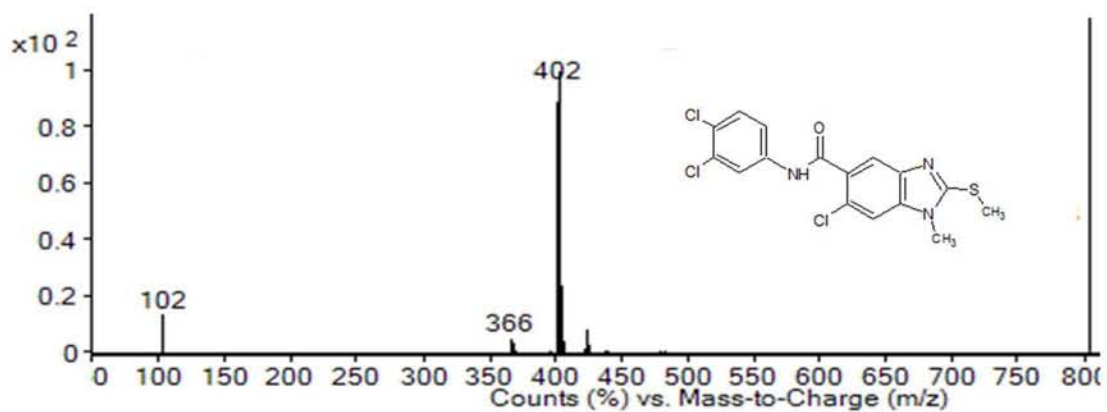
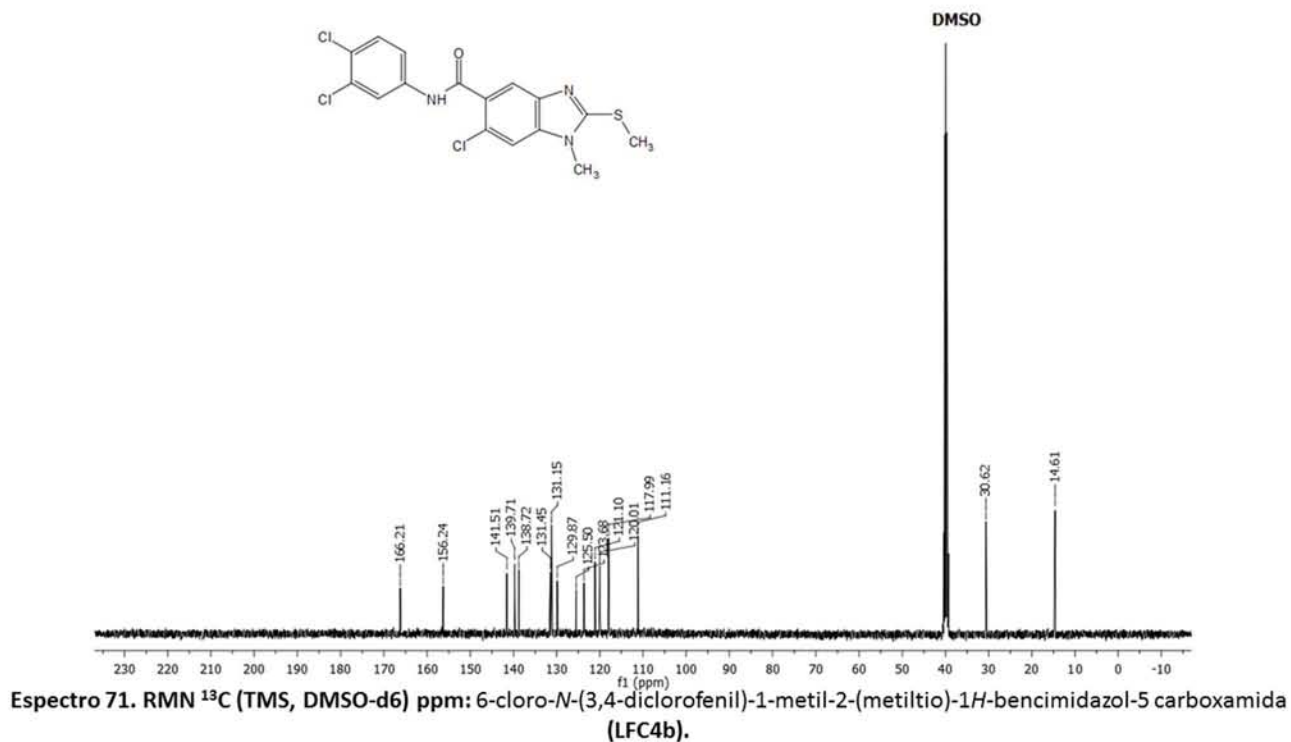
Espectro 68. EM (ESI/CL) m/z: 6-cloro-1-metil-N-(2-metilfenil)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3b).

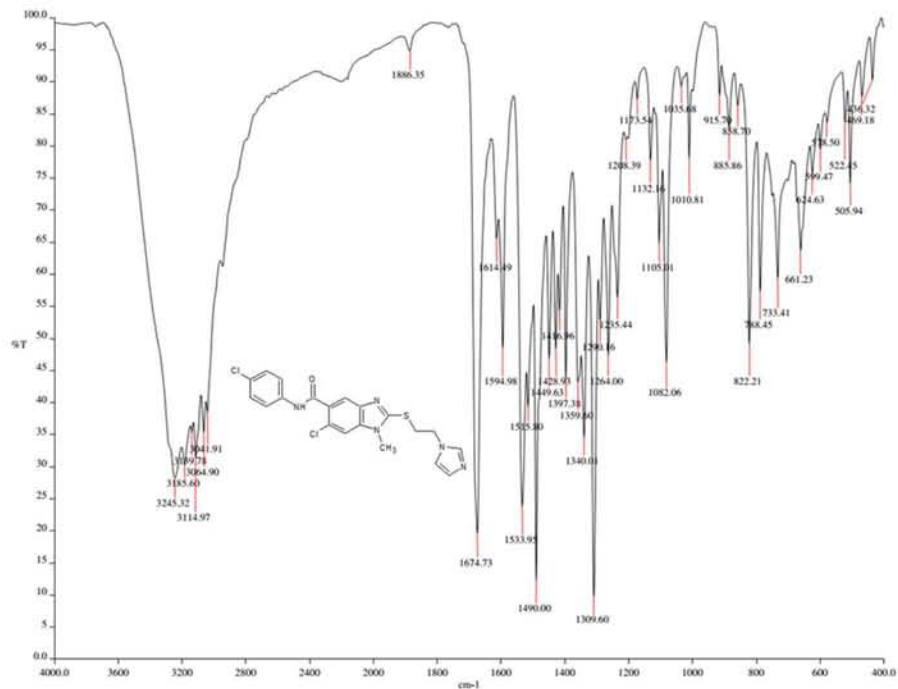


Espectro 69. IR cm^{-1} : 6-cloro-N-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5 carboxamida (LFC4b).

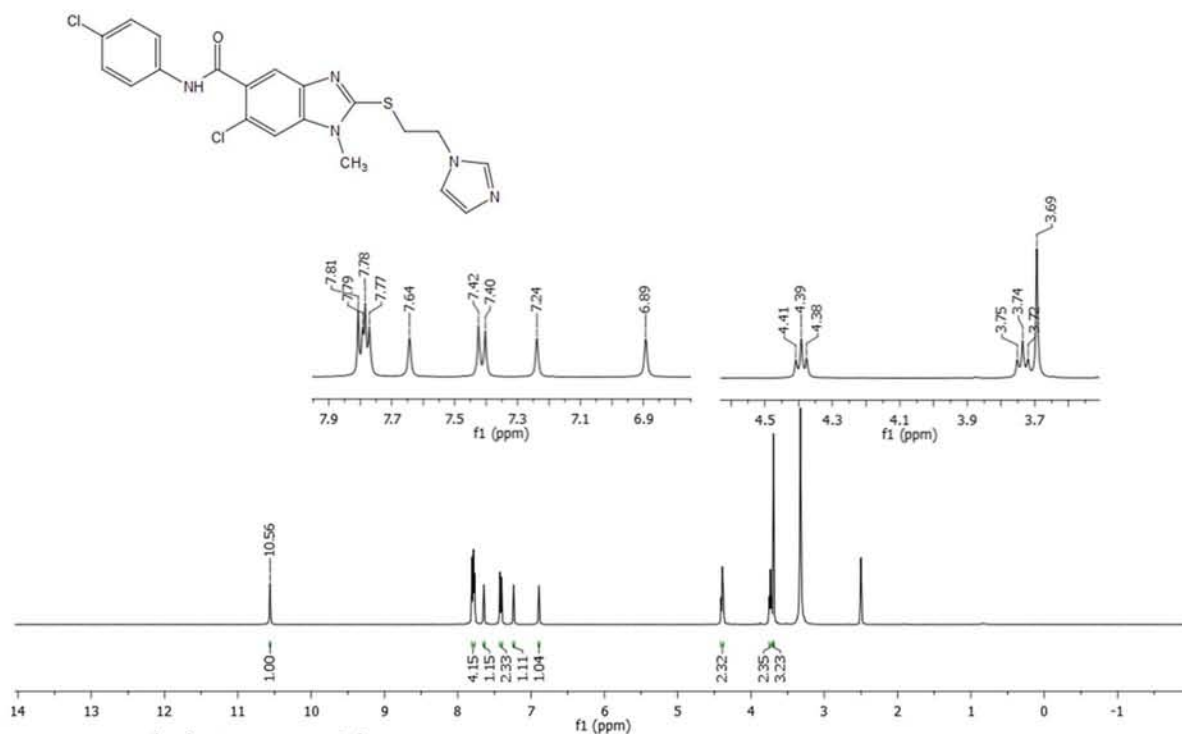


Espectro 70. RMN ^1H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-N-(3,4-diclorofenil)-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5 carboxamida (LFC4b).

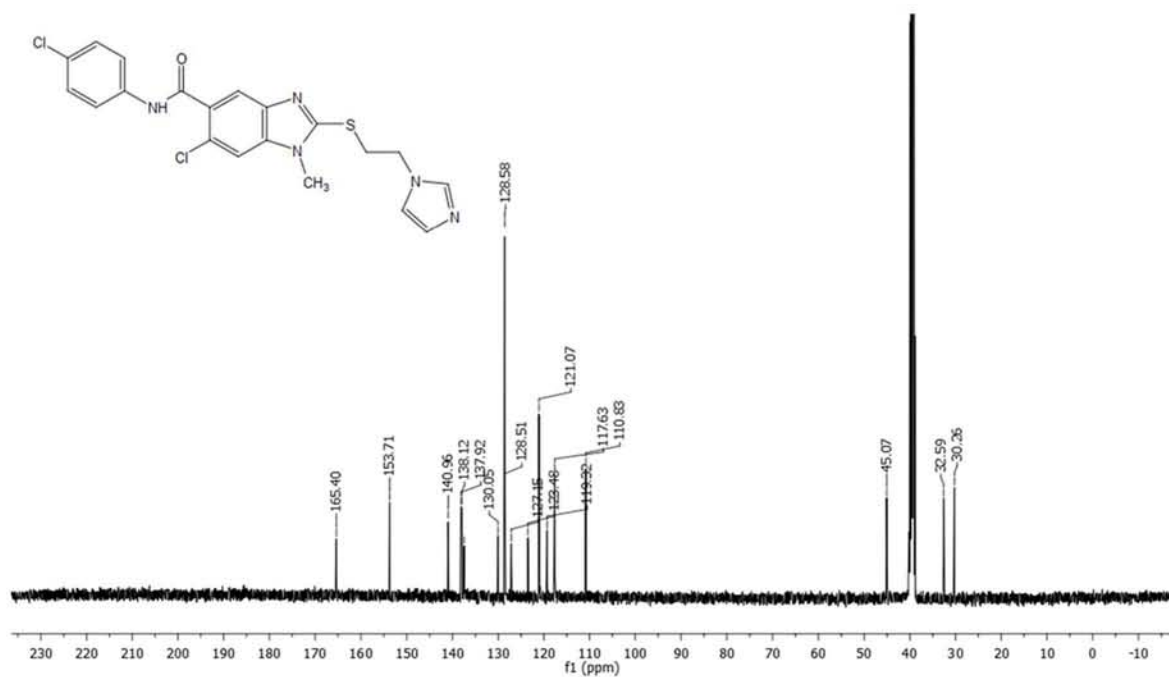




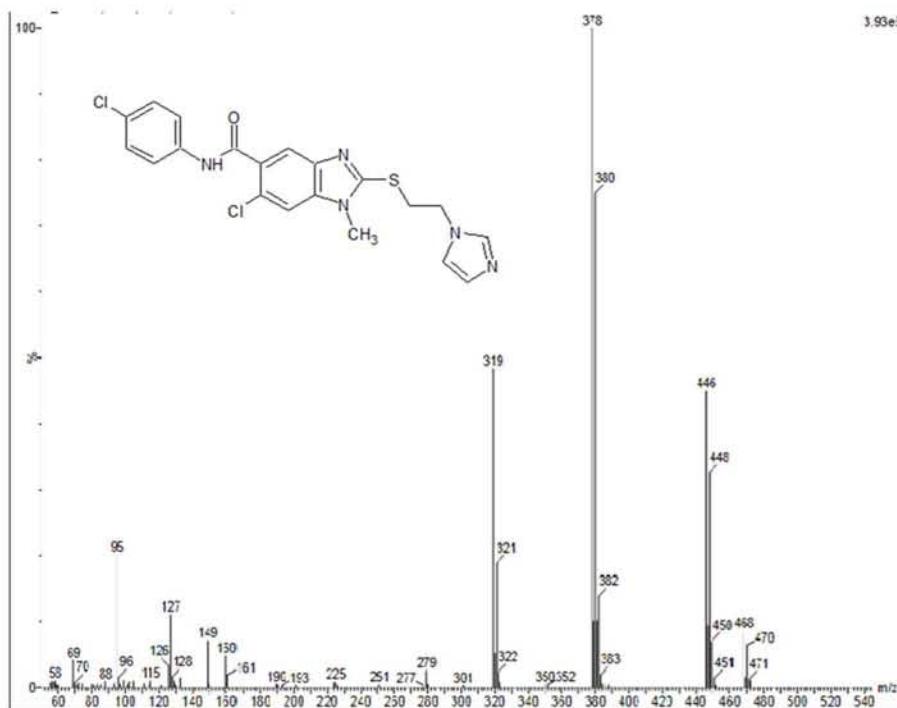
Espectro 73. IR cm^{-1} : 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1).



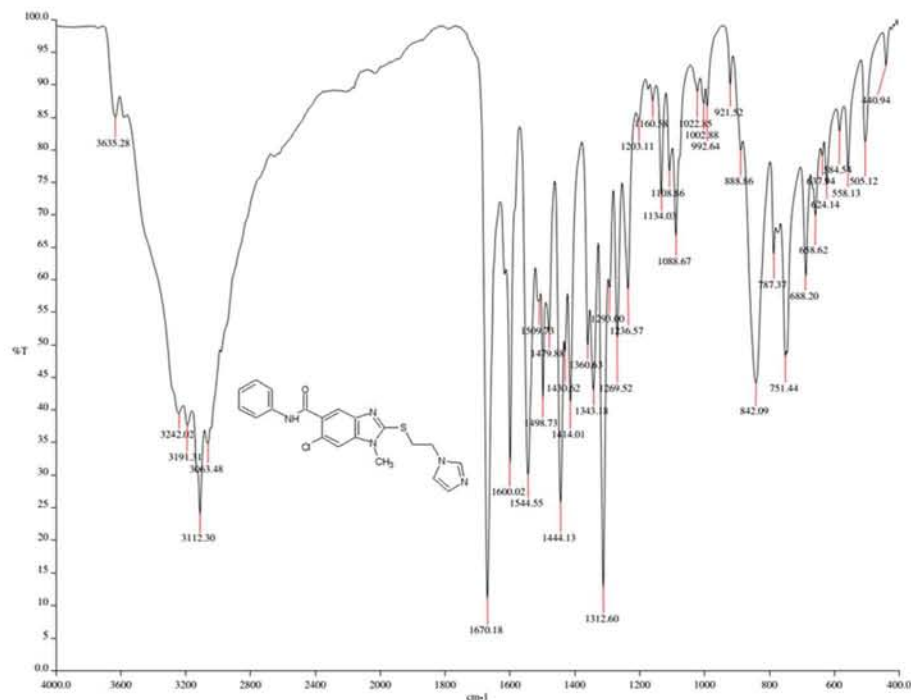
Espectro 74. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-*N*-(4-clorofenil)-2-[[2-(1*H*-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1).



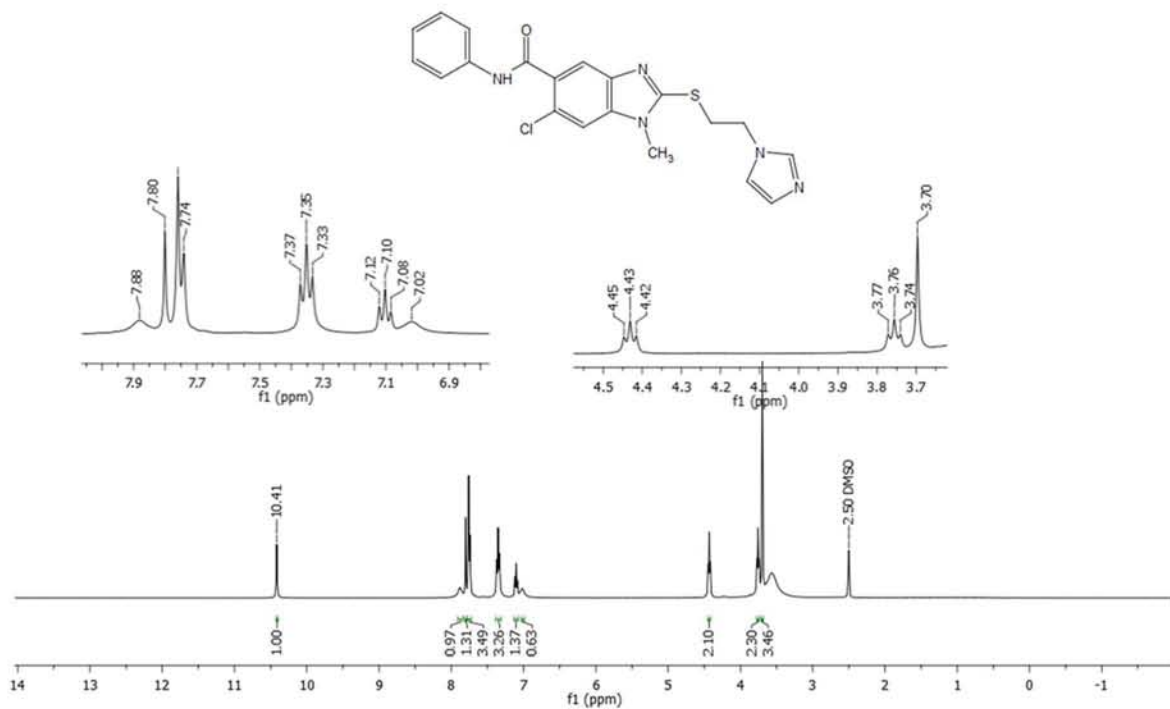
Espectro 75. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-N-(4-clorofenil)-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1).



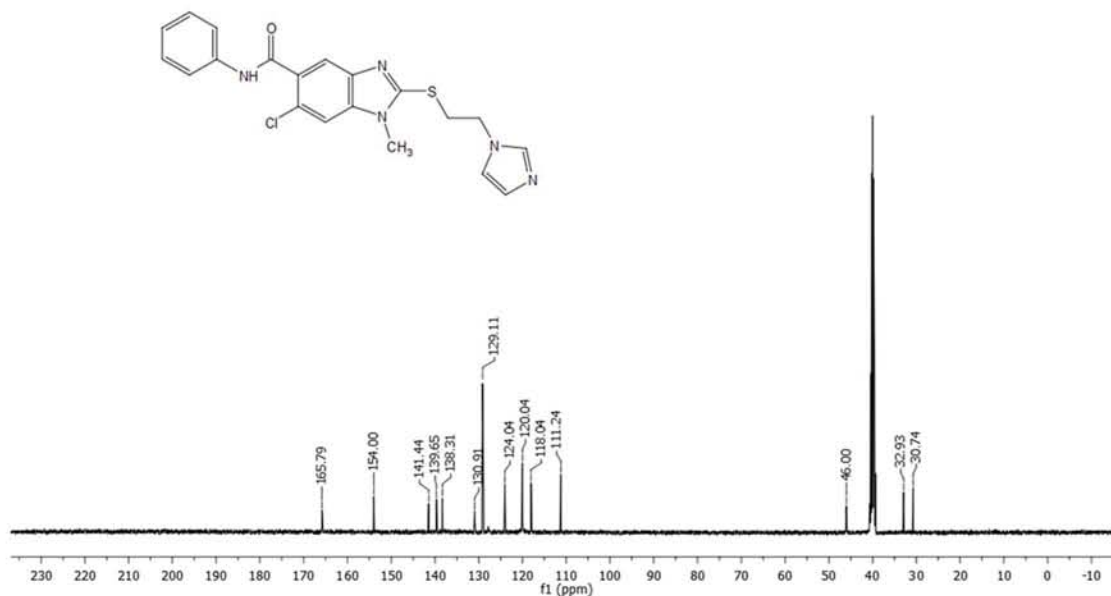
Espectro 76. EM (ESI/CL) m/z: 6-cloro-N-(4-clorofenil)-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC1).



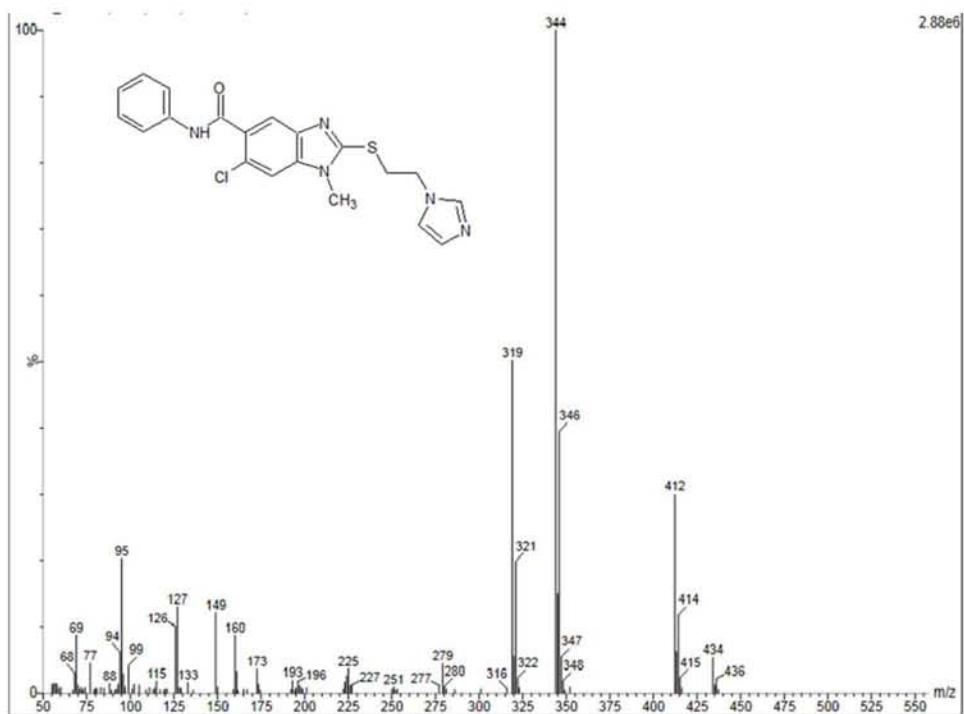
Espectro 77. IR cm^{-1} : 6-cloro-N-fenil-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2).



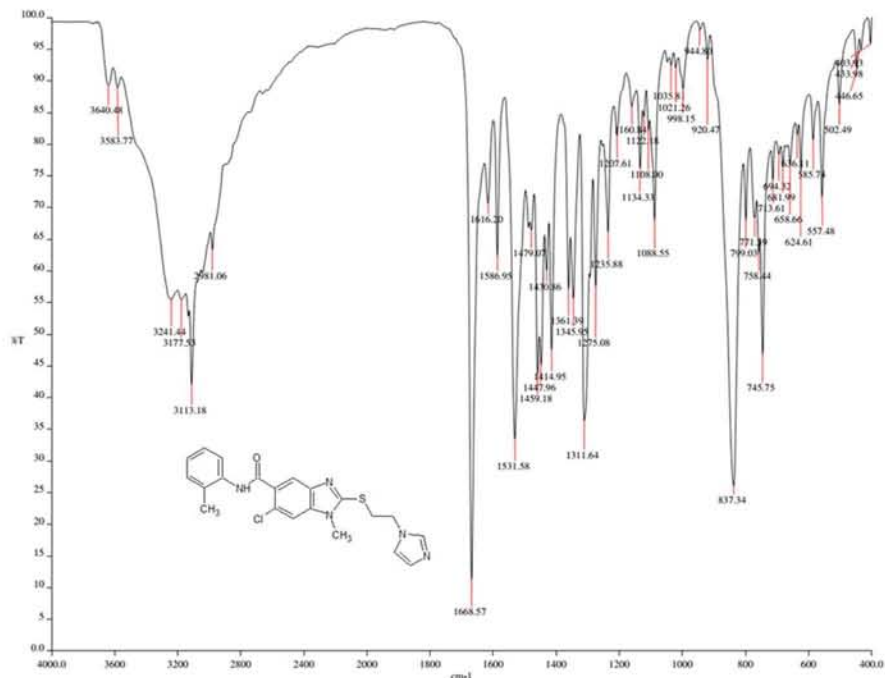
Espectro 78. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-N-fenil-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC2).



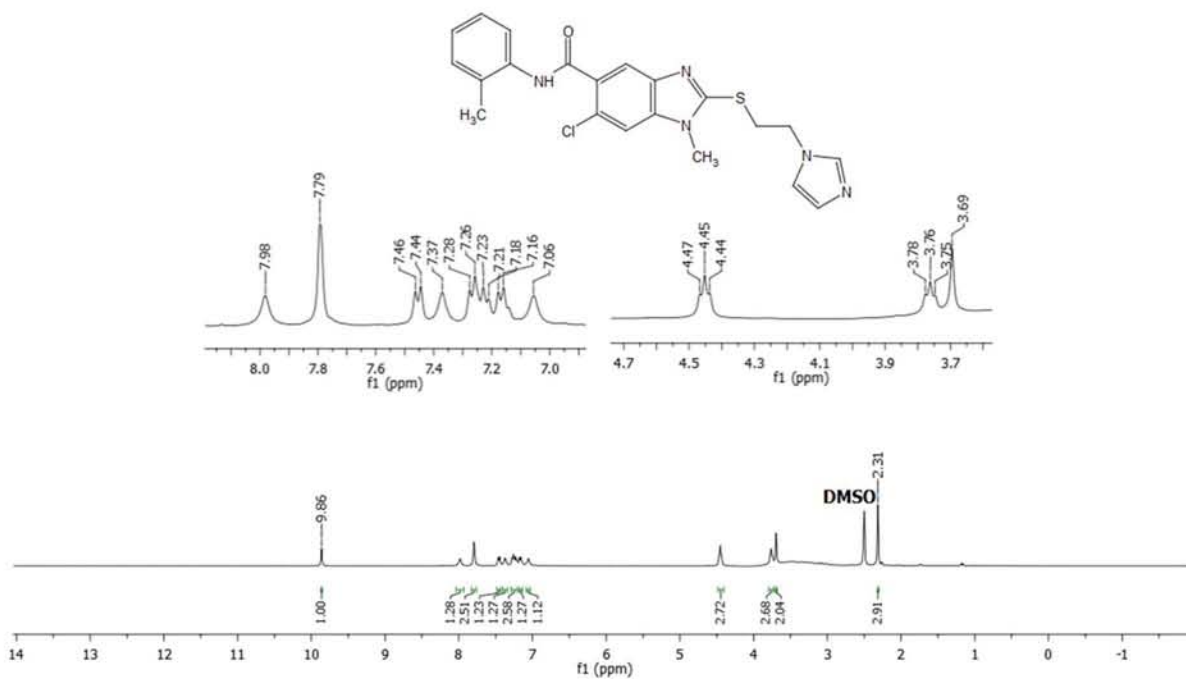
Espectro 79. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-N-fenil-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida (LFC2).



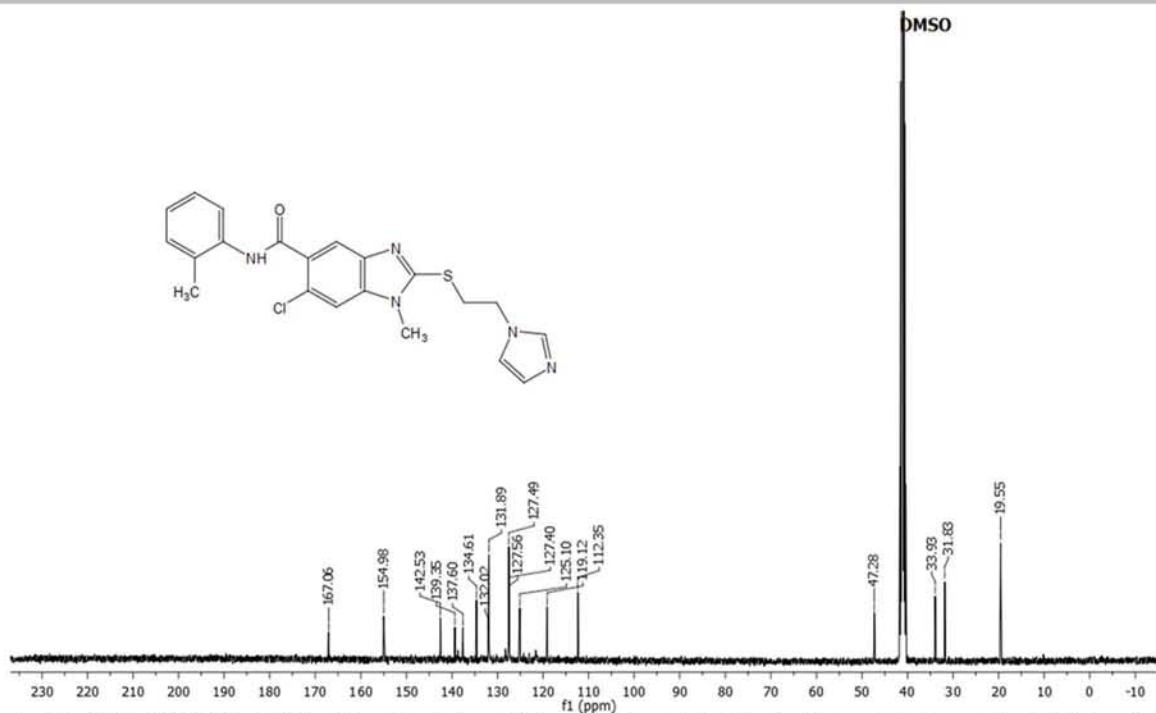
Espectro 80. EM (ESI/CL) m/z : 6-cloro-N-fenil-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida (LFC2).



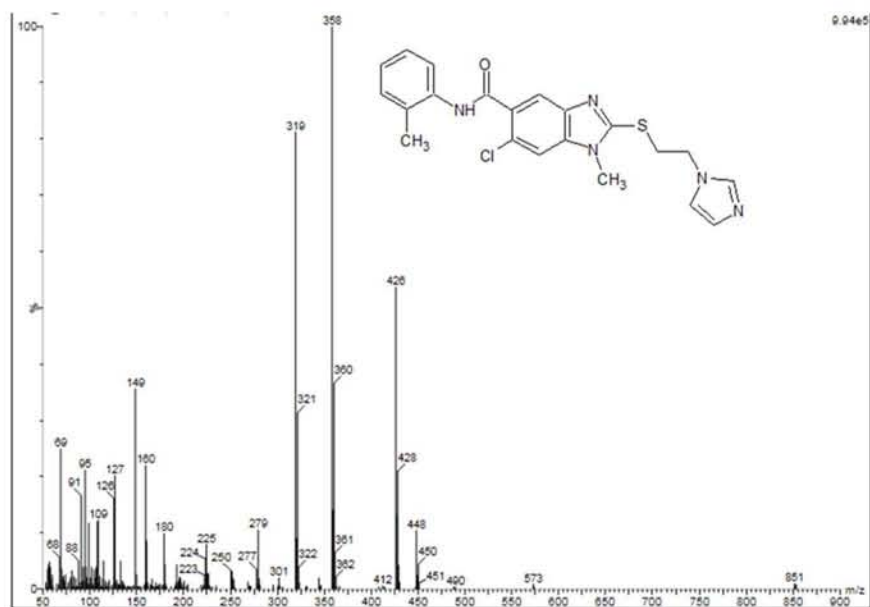
Espectro 81. IR cm⁻¹: 6-cloro-2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)etil]sulfanil]-1-metil-N-(2-metilfenil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3).



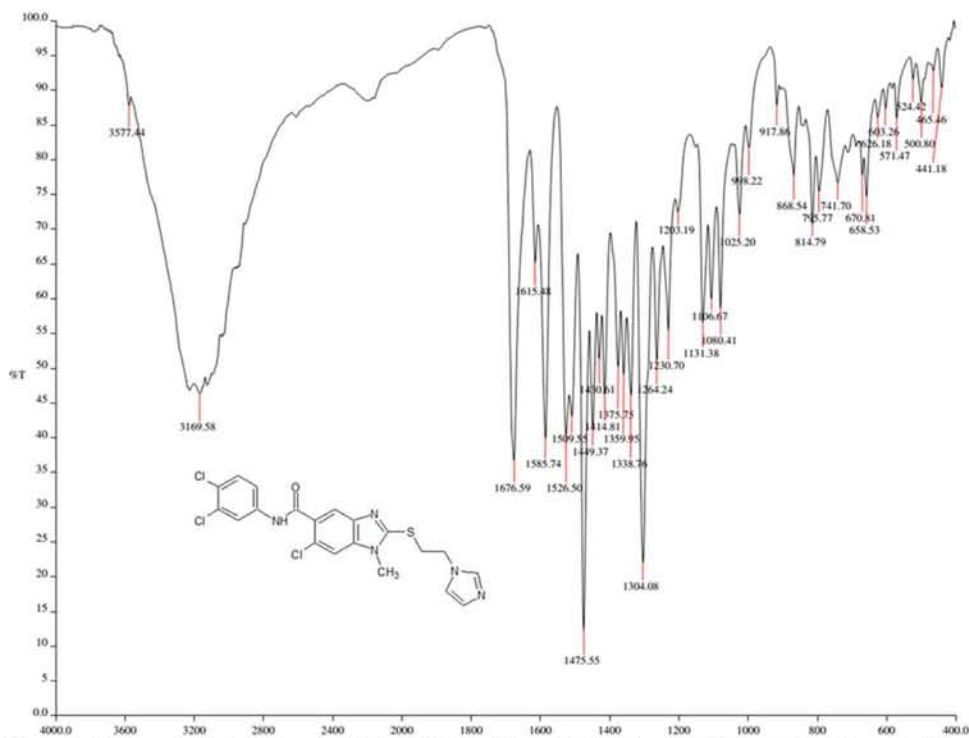
Espectro 82. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)etil]sulfanil]-1-metil-N-(2-metilfenil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3).



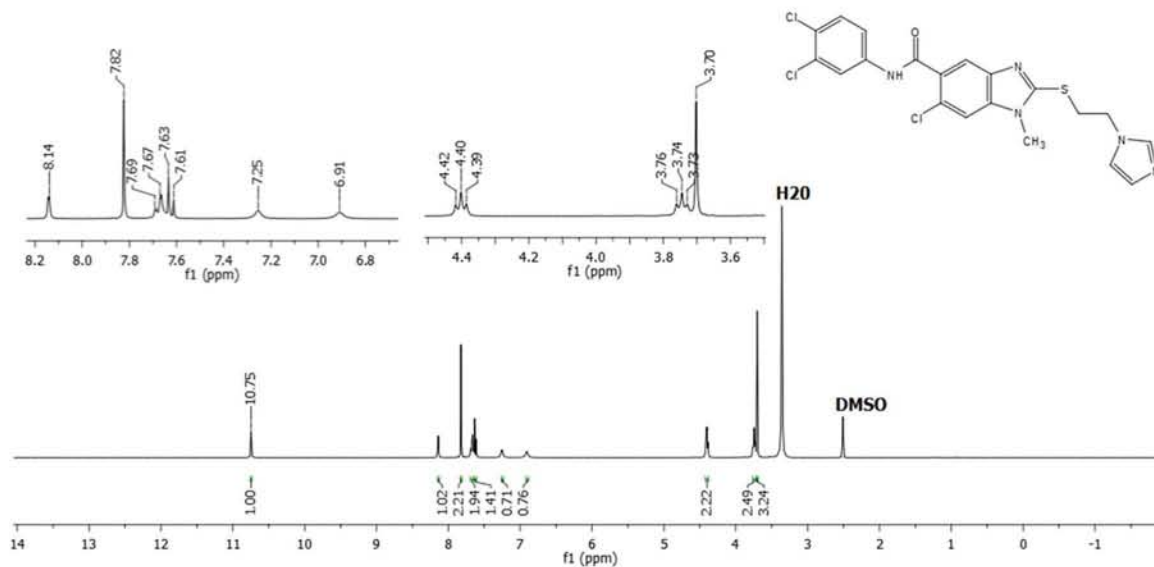
Espectro 83. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6) ppm: 6-cloro-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-N-(2-metilfenil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3).



Espectro 84. EM (ESI/CL) m/z : 6-cloro-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-N-(2-metilfenil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC3).



Espectro 85. IR cm⁻¹: 6-cloro-N-(3,4-diclorofenil)-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4).



Espectro 86. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-N-(3,4-diclorofenil)-2-[[2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil]-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida (LFC4).

