



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Síntesis y evaluación de la actividad antiprotozoaria
de nuevas carboxamidas 1*H*-bencimidazólicas,
derivadas del 6-cloro-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-
carboxamida”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ LUIS ZAVALA SALGADO



MÉXICO, CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DESIGNADO

PRESIDENTE: María Alicia Hernández Campos.

VOCAL: Martha Yolanda González Quezada.

SECRETARIO: Francisco Hernández Luis.

1er SUPLENTE: Nayeli López Balbiaux.

2do SUPLENTE: José Luis Medina Franco.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 122. Conjunto E. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Miguel Velázquez López.

SUSTENTANTE:

José Luis Zavala Salgado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme en sus aulas; por la excelencia en formación de profesionales y ciudadanos que impulsen el desarrollo científico, tecnológico, económico y social de México.

A la Facultad de Química por adentrarme en el maravilloso mundo de la ciencia y darme las bases sobre las que construiré mi futuro profesional.

De manera muy especial a la Dra. María Alicia Hernández Campos, por participar ampliamente en mi desarrollo académico; clases, estancias, servicio social y tesis. Por sus consejos, confianza y tiempo compartido. Además, por su apoyo personal en la culminación de mis estudios de licenciatura, así como en la orientación para dirigir mi camino hacia el éxito. Con mucho respeto, cariño y admiración; mil gracias.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por adoptarme como un integrante más de la familia del 122, por sus sabios consejos y agradables experiencias. Doc, es un orgullo anunciar que pertenezco a este laboratorio.

Al Dr. José Miguel Velázquez, que adoptó el papel de compañero y mentor, por asesorarme en el trabajo experimental y escrito de este trabajo. Sin olvidar su apoyo moral para no desanimarme y dramatizar tras cada reacción fallida, por compartir sus experiencias académicas las cuales me permitieron tomar mejores decisiones.

A la Dra. Lillian Yépez y a su grupo de investigación; Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, por las pruebas de actividad antiprotozoaria de los compuestos presentados en este trabajo.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI); M. en C. Rosa Isela del Villar, Dra. Minerva Monroy, Q. Marisela Gutiérrez, por la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear e infrarrojo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de los proyectos 80093 y 168718.

A Nayeli Balbiaux, por su amistad y tutela desde etapas muy tempranas en la facultad. Por tomarte el tiempo de conocerme y aconsejarme como lo haría una amiga-maestra; considerando mi manera de ser. Naye, con mucho cariño, gracias.

A todos mis profesores con los que tomé cursos durante mi paso por la facultad, principalmente aquellos que más allá de enseñarme química, compartieron su experiencia de vida e impulsaron mi vocación profesional, así como el apoyo en diversos ámbitos personales y académicos; Francisco Hernández Luis, Socorro Alpizar y Ma. Josefa Bernad. Del CCH, Roberto Peña.

A los apreciables miembros del jurado por sus valiosas recomendaciones para enriquecer este trabajo escrito.

A mis compañeros del laboratorio 122; Rodrigo Arroyo, Miguel Flores, José Miguel, Paulina Flores, Rodrigo Aguayo, Carlos Carvente, Elkin, Lucy, Abigail, Adriana, Anuar, Sol, por compartir tantas alegrías y frustraciones. De manera especial a Jorge Victoria, por convertirse en mi amigo durante mi estancia en el laboratorio; sintetizar se vuelve más sencillo cuando existe alguien que sabe cómo te sientes. Además, a Pedro Trejo por su amable disposición de resolver mis dudas x-press.

A Marisol Ramírez Yautentzi por compartir conmigo esta etapa de nuestras vidas. Por tu alegría, paciencia, apoyo, cariño y dejarme aprender de ti; saber que confiar más y vivir espontáneamente frente a los ojos de una persona, es posible.

A mis amigos de toda la vida y los que la Facultad me regaló, con ellos aprendí que la amistad va más allá de la diversión y que se extiende hombro a hombro para luchar juntos; Marisol, Pablo, Teo, Fitz, Abraham, Jaquie, Dani Varela, Robert, Rox, Omar Bringas, George, Sandy, Abi, Cris, Vidals, Rubí Mireles, Ale Puerto, Silvia, Emi, Fer Duque, Aram, Adair, Felipe, Isra, Gio, Toño Hdz, Marcos L, Jonh Juárez, a todos los que coincidimos en el camino y de alguna manera “hicimos **química**”. En particular a Ramiro Rangel Tovar; mejor amigo gracias por hacer que esta amistad siga creciendo desde ya hace muchos años, por tu atención, apoyo y por hacer de muchos días una aventura.

DEDICATORIAS

*Principalmente, a mis padres Carmen Salgado y José Luis Zavala, por educarme con los principios y valores morales que hoy, forjan mi personalidad y carácter. Por su tiempo, amor y comprensión. Como siempre lo hemos dicho, "la escuela es la **mejor herencia**" y lo tendré presente eternamente; por cada peldaño que avanzo de la escalera hacia el éxito, expreso su sabiduría para enfrentar la adversidad, buscando en cada fracaso la oportunidad de crecer y valorar más la vida. Gracias por hacerme uno más de sus logros, los amo.*

En especial, a mi tía Josefina, por estar presente desde mis primeros años de vida y apoyarme como a un hijo hasta el día de hoy. Te quiero mucho.

En memoria de mi abuela Francisca, por haber dado todo para que sus nietos siempre tuvieran lo mejor.

RESUMEN

Las parasitosis permanecen como un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en los países con servicios sanitarios deficientes. En un esfuerzo por el desarrollo de nuevas moléculas que ayuden a combatir algunos de los parásitos de mayor prevalencia, este trabajo presenta la síntesis y evaluación *in vitro* de cinco nuevas carboxamidas del tipo 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ 01-05). Los resultados evidenciaron potente actividad biológica del orden nanomolar contra *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, superando a los fármacos de referencia albendazol, metronidazol y nitazoxanida. Particularmente JOULZ-01 y JOULZ-04 se presentaron como líderes de la serie, destacando para el primer compuesto un valor de CI_{50} contra *G. intestinalis* de 4 nM. En adición se identificó que los requerimientos estructurales fundamentales para favorecer la actividad son el hidrógeno en la posición 1 del bencimidazol (NH), amidas primarias y secundarias, así como sustituyentes de mayor tamaño en la posición 5.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
[M+H] ⁺	Aducto del ion molecular más un hidrógeno
≈	Aproximadamente
°C	Grados Celsius
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Å	Ångström (1x10 ⁻¹⁰ cm)
ABZ	Albendazol
ABZSO	Sulfóxido de albendazol
ABZSO ₂	Sulfona de albendazol
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alif.	Alifático
Ar	Aromático
c	Señal cuádruple
CCF	Cromatografía de capa fina
CDI	1,1-Carbonildiimidazol
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
cm	Centímetro
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i> / Correlación homonuclear a un enlace de distancia
CYP	Citocromo P450
Cys	Cisteína
d	Señal doble
DART	<i>Direct analysis in real time</i> /Análisis directo en tiempo real
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
dd	Señal doble de dobles
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ⁶	Dimetilsulfóxido deuterado en las 6 posiciones

EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
eq.	Equivalentes
Et	Etilo
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
F.E	Fase estacionaria
F.M	Fase móvil
FMNO	Flavín monooxigenasa
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramo
GDP	Guanosín difosfato
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico/Glutamato
GN*	Gas noble electrónicamente excitado
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i> / Correlación heteronuclear a múltiples enlaces de distancia
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> / Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear simple quantum coherence</i> / Correlación heteronuclear a un enlace de distancia
Hz	Hertz/Hercio
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
kJ	KiloJoule
M	Molar

m	Señal múltiple
m/z	Relación masa/carga
M ⁺	Ion molecular
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz/Megahercio
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercurio
MS	<i>Mass spectroscopy/</i> Espectrometría de masas
MTZ	Metronidazol
NA	No aplica
ND	No determinado
Ni- Raney	Níquel Raney
nM	Nanomolar
NMM	4-Metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect</i> <i>spectroscopy/</i> Correlación por efecto nuclear Overhauser
NTX	Nitazoxanida
P.eb	Punto de ebullición
P.f	Punto de fusión
pCl ₅₀	Logaritmo negativo de la concentración inhibitoria 50
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio
Phe	Fenilalanina
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
PPI's	<i>Proton pump</i> <i>inhibitors/</i> Inhibidores de la bomba de protones

ppm	Partes por millón
QSAR	<i>Quantitative structure</i> <i>activity relationship/</i> Relación cuantitativa estructura actividad
R	Radical
Rend.	Rendimiento
Rf.	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
SAR	<i>Structure activity</i> <i>relationship/</i> Relación estructura actividad
Sist.	Sistema
S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
SOSA	<i>Selective optimization of</i> <i>side activities/</i> Optimización selectiva de efectos adversos
T	Temperatura
t	Señal triple
T.a	Temperatura ambiente
T3P	Anhídridopropilfosfónico
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
w/w	Peso/Peso
δ	Desplazamiento químico
μ	1x10 ⁻⁶
μg	Microgramos
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro

TABLA DE CONTENIDO GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Epidemiología.....	2
2.2. Giardiasis, amebiasis y tricomoniasis. Agentes etiológicos, características de la enfermedad y tratamiento.....	4
2.2.1. Amebiasis.....	4
2.2.2. Giardiasis.....	7
2.2.3. Tricomoniasis.....	8
2.2.4. Tratamiento Farmacológico.....	10
2.3. Marco histórico del bencimidazol.....	11
2.4. Características estructurales deseables para la actividad antiparasitaria.....	14
2.5. Carboxamidas como antiparasitarios.....	17
2.6. Farmacocinética.....	18
2.7. Farmacodinamia.....	19
2.8. Síntesis de bencimidazoles.....	21
2.9. Síntesis de amidas.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. Objetivo General.....	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1. Parte química.....	27
6.2. Parte biológica.....	28
6.2.1. Protozoarios.....	28
6.2.2. Ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i>	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1. Parte química.....	30
7.1.1. Síntesis y purificación.....	30
7.1.2. Caracterización espectroscópica y espectrométrica.....	35
7.1.2.1. Espectroscopía de FT-IR.....	37
7.1.2.2. Espectroscopía de RMN.....	38
7.1.2.2.1. JOULZ-01.....	38
7.1.2.2.2. JOULZ-02.....	40
7.1.2.2.3. JOULZ-03.....	44
7.1.2.2.4. JOULZ-04.....	47
7.1.2.2.5. JOULZ-05.....	49
7.1.2.3. Espectrometría de masas de baja y alta resolución.....	53
7.2. Parte biológica.....	56
8. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD (SAR).....	59
9. CONCLUSIONES.....	63

10.	APÉNDICE A. PARTE EXPERIMENTAL	64
10.1.	Instrumentación	64
10.2.	Procedimiento experimental	65
10.2.1.	6-Cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)	65
10.2.2.	Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (10)	66
10.2.3.	Cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbonilo (11)	67
10.2.4.	6-Cloro-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01)	68
10.2.5.	6-Cloro- <i>N</i> -metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-02)	70
10.2.6.	6-Cloro- <i>N,N</i> -dimetil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-03)	71
10.2.7.	6-Cloro- <i>N</i> -etil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-04)	72
10.2.8.	6-Cloro- <i>N,N</i> -dietil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-05)	73
11.	APÉNDICE B. ESPECTROS	74
12.	REFERENCIAS	100

TABLA DE CONTENIDO DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS POR CAPÍTULO

Tablas

<i>Tabla 2.1. Número de casos por año de las parasitosis producidas por helmintos y protozoarios en México en el año 2013-2015</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 2.2. Estudio SAR para la actividad antiparasitaria en bencimidazoles</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2.3. Métodos de síntesis de amidas, previa activación del ácido carboxílico</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 5.1. Serie de carboxamidas planteada</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 7.1. Purificación, propiedades fisicoquímicas y rendimiento de los intermediarios 9-11</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 7.2. Condiciones de reacción, purificación, propiedades fisicoquímicas y rendimiento de las carboxamidas JOULZ</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 7.3. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la serie JOULZ</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 7.4. Resumen de las señales de RMN de ¹H</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 7.5. Resumen de las señales de RMN de ¹³C</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 7.6. Espectrometría de masas de baja y alta resolución para las carboxamidas sintetizadas</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 7.7. Resultados de la actividad antiprotozoaria de la serie de carboxamidas JOULZ</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 8.1. Comparación de la serie de carboxamidas JOULZ con compuestos previamente sintetizados en nuestro laboratorio</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 8.2. Carboxamidas bencimidazólicas pertenecientes a la Serie A y fármacos de referencia ordenados de mayor a menor actividad giardicida</i>	<i>61</i>

Figuras

<i>Figura 2.1. Número de casos por año de las parasitosis producidas por helmintos y protozoarios en México en el año 2013-2015. Clave: Ver Tabla 1</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2.2. Microscopía con tinción (A) y electrónica (B) de Entamoeba histolytica como trofozoito</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2.3. Ciclo de vida de E. histolytica</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2.4. Morfología y ciclo de vida de G. intestinalis</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2.5. Morfología de Trichomonas vaginalis</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2.6. Quimioterapia contra protozoarios</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2.7. Vitamina B12. Enmarcado en rojo se muestra la estructura del bencimidazol</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2.8. Estructura química de derivados del bencimidazol como antiparasitarios</i>	<i>12</i>

Figura 2.9. Bencimidazol como estructura privilegiada.	13
Figura 2.10. Algunos PPI's con actividad antiprotozoaria.	14
Figura 2.11. Sistema conjugado cis y trans que presenta el grupo amida.	17
Figura 2.12. Carboxamidas sintetizadas por nuestro grupo de investigación.	18
Figura 2.13. Ruta metabólica del albendazol.	19
Figura 2.14. Estructura y formación de microtúbulos.	20
Figura 2.15. Diferentes conformaciones del mebendazol dentro del sitio de unión de la β-tubulina.	21
Figura 2.16. Primeras formas de síntesis de los bencimidazoles.	21
Figura 2.17. Tautomerismo del bencimidazol.	22
Figura 2.18. Funcionalización del bencimidazol en la posición 2 con grupos amino y mercapto. ...	22
Figura 7.1. Diagrama de distribución de especies teórico para el ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico.	32
Figura 7.2. Mecanismo de reacción de la activación de ácido carboxílico con DMF como catalizador.	32
Figura 7.3. Tipos de Interacciones de un ácido carboxílico con alúmina.	35
Figura 7.4. Espectro COSY para el compuesto JOULZ-01.	39
Figura 7.5. Espectro HMBC para el compuesto JOULZ-01.	40
Figura 7.6. Espectro HSQC del compuesto JOULZ-02.	41
Figura 7.7. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-02.	42
Figura 7.8. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-02.	42
Figura 7.9. Espectro NOESY del compuesto JOULZ-02.	43
Figura 7.10. Espectro HSQC del compuesto JOULZ-03.	44
Figura 7.11. Espectro NOESY del compuesto JOULZ-03.	45
Figura 7.12. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-03.	46
Figura 7.13. Espectro COSY (A) y NOESY (B) de JOULZ-04.	47
Figura 7.14. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto JOULZ-04 donde se observa la tautomería intrínseca del bencimidazol.	48
Figura 7.15. Espectro COSY (A) y HSQC (B) del compuesto JOULZ-05.	49
Figura 7.17. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-05.	51
Figura 7.16. Espectro NOESY y estructura tridimensional del tautómero de mínima energía (-44.1 kJ/mol) del compuesto JOULZ-05.	50
Figura 7.18. Espectro DART-MS del compuesto JOULZ-05.	55
Figura 7.19. Actividad antiprotozoaria de los compuestos JOULZ 01-05.	56
Figura 7.20. Actividad biológica contra <i>G. lamblia</i> de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.	57
Figura 7.21. Actividad biológica contra <i>E. histolytica</i> de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.	58
Figura 7.22. Actividad biológica contra <i>T. vaginalis</i> de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.	58
Figura 10.1. Sistema para la síntesis de los cloruros de acilo.	68
Figura 10.2. Sistema para la síntesis de las carboxamidas.	69
Esquemas	
Esquema 6.1. Ruta sintética para la obtención del intermediario 8.	27
Esquema 6.2. Síntesis de compuestos finales JOULZ 01-05 a partir del intermediario 8.	28
Esquema 7.1. Esquema de reacciones para formar la especie $[M+H]^+$	54

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias producidas por helmintos y protozoarios son uno de los principales problemas de salud en el mundo, siendo los países en desarrollo los que poseen los índices más altos de morbilidad y mortalidad. La amebiasis, ascariasis y giardiasis son las parasitosis más frecuentes a nivel mundial.

Actualmente se dispone de un amplio número de fármacos para el tratamiento de las infecciones por protozoarios y helmintos. Sin embargo, algunos de ellos como los nitroheterociclos se han comercializado por más de cuarenta años. Además, factores como uso indiscriminado, efectos secundarios y principalmente el abandono del tratamiento han provocado que cepas resistentes a dichos agentes quimioterapéuticos aparezcan con mayor frecuencia. De ahí es que surge la necesidad de desarrollar nuevos principios activos para combatir las enfermedades antes expuestas.

Los derivados del bencimidazol constituyen uno de los grupos de fármacos frecuentemente utilizados en las infecciones causadas por helmintos, no obstante se ha demostrado su eficacia como antiprotozoarios. Entre los más empleados destacan: albendazol, mebendazol y tiabendazol. Todos con amplio espectro de acción antiparasitaria, baja toxicidad, pobre absorción intestinal y baja solubilidad acuosa. Funcionan exitosamente para infestaciones en el tracto gastrointestinal; no así en las de tipo sistémico, que requieren altas dosis por largos periodos.

Nuestro equipo de investigación ha desarrollado diversos compuestos antiparasitarios derivados del bencimidazol. En particular las carboxamidas 1*H*-bencimidazólicas, han demostrado poseer una importante actividad antiprotozoaria en ensayos *in vitro*. Este trabajo contempla la síntesis de cinco nuevas carboxamidas alifáticas derivadas del ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, su caracterización espectroscópica, espectrométrica, determinación de algunas de sus propiedades fisicoquímicas (P.f y Rf.). Los resultados demostraron potente actividad *in vitro* del orden nanomolar, contra los parásitos *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología

Las parasitosis siguen siendo un problema de salud pública en México y también a nivel mundial. Prevalen donde las condiciones socioeconómicas son bajas y los servicios sanitarios deficientes, por ejemplo en países en vías de desarrollo, los cuales poseen los índices de morbilidad y mortalidad más altos. [1] Diversos son los agentes etiológicos que pueden infestar el intestino, los más frecuentes son los protozoarios: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; además de los helmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuristrichiura*, *Hymenolepis nana* y *Taenia* (en sus especies, *saginata* y *solium*). Cuya manifestación clínica más frecuente de estos parásitos es la diarrea. [2] Los grupos de alto riesgo son los niños, pacientes inmunodeprimidos y viajeros a zonas endémicas. El ser humano es el principal reservorio pero existen otros posibles hospedadores como los animales domésticos y de granja, aunque las zoonosis raramente se presentan.

En lo que respecta a la amebiasis, 500 millones de personas aproximadamente en todo el mundo están infectadas por *E. histolytica*, pero únicamente entre 34 y 50 millones de los infectados presentan sintomatología; de éstos, mueren alrededor de 100,000. Los países que tienen las estadísticas más altas de morbilidad son India, México, África y zonas de Oriente Medio, Sudamérica y Centroamérica; con una prevalencia de la enfermedad cercana al 50%. Por otro lado, en la giardiasis se estima una incidencia del 2-7% en países desarrollados y 20-30% en países en vías de desarrollo. [3]

En México las infecciones intestinales por protozoarios y las poliparasitosis tienen mayores casos de morbilidad y mortalidad reportados que las helmintiasis. Tabla 2.1. [4-6] En los estados con mayor pobreza y desnutrición, como Oaxaca, la población infantil es la que se ve más afectada. [1]

Además de las enfermedades intestinales, algunos protozoarios pueden ocasionar enfermedades de transmisión sexual (ETS). Vale la pena mencionar el caso de *Trichomonas vaginalis*, que es capaz de infestar el tracto urogenital. La tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual no vírica y curable que más

prevalece en el mundo. Este parásito puede sobrevivir en fómites, sin embargo solo se transmite por contacto sexual, y se estima una prevalencia del 2.3% en adultos jóvenes. Es igual de frecuente en ambos sexos, aunque los casos sintomáticos se producen generalmente en mujeres. Tiene mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, personas mayores de 25 años, de raza negra e individuos con varias parejas sexuales. [3]

Tabla 2.1. Número de casos por año de las parasitosis producidas por helmintos y protozoarios en México en el año 2013-2015 [4-6]

Clave	Helmintiasis			Protozoosis			
	A	B	C	D	E	F	G
Año	Otros Helmintos	Ascariasis	Total helmintos	Amebiasis	Giardiasis	Tricomoniiasis	Total protozoos
2013	257905	62398	320303	337014	15422	99115	451551
2014	226385	54092	280477	294539	12486	77115	384140
2015	186167	47633	233800	251416	11418	61128	323962

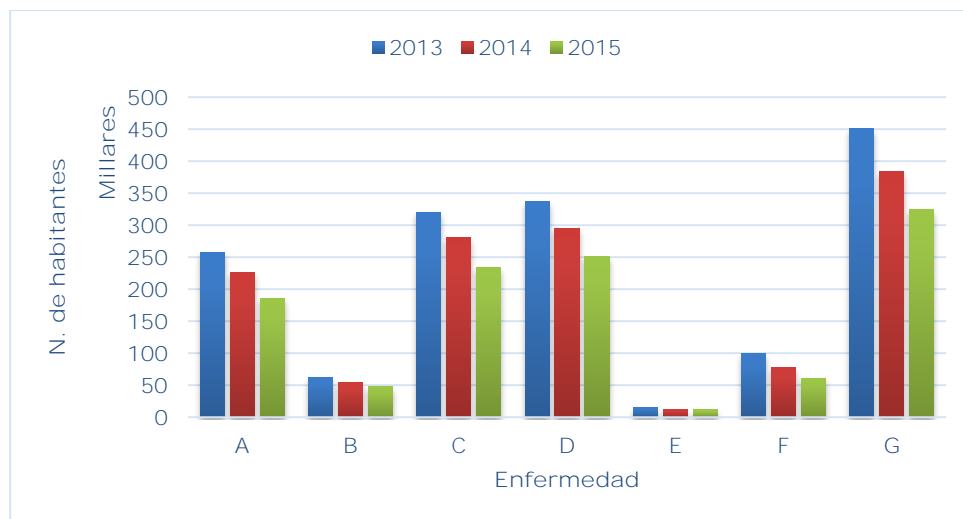


Figura 2.1. Número de casos por año de las parasitosis producidas por helmintos y protozoarios en México en el año 2013-2015. Clave: Ver Tabla 1.

No obstante que de toda población infectada por protozoarios presente una tendencia a la baja en la morbilidad [Figura 2.1], es necesario continuar con el desarrollo de nuevos fármacos que sean más seguros, eficaces y que contraataquen las cepas resistentes.

2.2. Giardiasis, amebiasis y tricomoniasis. Agentes etiológicos, características de la enfermedad y tratamiento

Los tres parásitos descritos a continuación presentan características similares en cuanto a su ciclo de vida, prevalencia y tratamiento quimioterapéutico. Cada uno de éstos cuenta con diferentes factores de virulencia o características morfológicas particulares que pueden explotarse como diana farmacológica en el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, se ha optado por utilizar como tratamiento de elección los nitroimidazoles que tienen como mecanismo de acción inhibir la replicación del ADN [7].

Cabe destacar que tanto *E. histolytica* como *G. lamblia* presentan dentro de su ciclo de vida una forma quística (invasiva) y otra de trofozoíto (infectiva). Donde la fase infectiva existe solo si se lleva a cabo la exquistación. Para que se establezca la enfermedad por cualquiera de los parásitos predichos es necesario ingerir una dosis infectiva; para el caso de *G. lamblia* es 10-15 quistes y para *E. histolytica* < 100 microorganismos. Este último presenta importante resistencia al cloro por lo que el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* lo ha considerado como un patógeno de categoría B de biodefensa, como posible arma biológica. De lo anterior se puede inferir que inhibir la maduración del parásito para evitar la infección, probablemente puede convertirse en una estrategia alternativa para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos.

Para llegar al diagnóstico etiológico se emplean distintos métodos: los mecanismos directos (micro/macroscópico), los estudios serológicos, las pruebas endoscópicas con toma de biopsias y las pruebas de imagen (tomografía computadorizada, ecografía). [3]

A continuación se describen a detalle las características más importantes de estas enfermedades, así como su tratamiento.

2.2.1. Amebiasis

Se define como amebiasis aquella enfermedad parasitaria producida en los seres humanos por amebas de la especie *Entamoeba histolytica*. Hasta el momento solo se ha reconocido a *E. histolytica* como la única ameba intestinal con poder patógeno y causante de la amebiasis. Este protozoario tiene dos formas vitales,

como quiste (principal forma invasiva y de resistencia) o como trofozoíto (forma infectiva y móvil).

Los trofozoítos tienen un tamaño habitual entre 15 y 20 μm , suelen habitar el colon por ser un ambiente anaeróbico donde obtienen su energía por fermentación. [Figura 2.2]. Presentan una serie de moléculas con importantes funciones que pueden convertirse en diana para el desarrollo de nuevos fármacos cuyo mecanismo de acción se base en la inhibición de alguno de los mecanismos de patogenicidad: a) la lectina galactosa *N*-acetilgalactosamina (Gal-GalNAc), implicada en la adhesión a las células del hospedador; b) las proteínas formadoras de poro o amebaporos, cuya misión es producir la lisis bacteriana o de las células eucariotas; c) cisteín-proteasas, las cuales son las encargadas de romper las proteínas de la matriz extracelular, facilitando la invasión de la mucosa colónica; d) proteínas del citoesqueleto, cuya misión es otorgar movilidad al parásito.

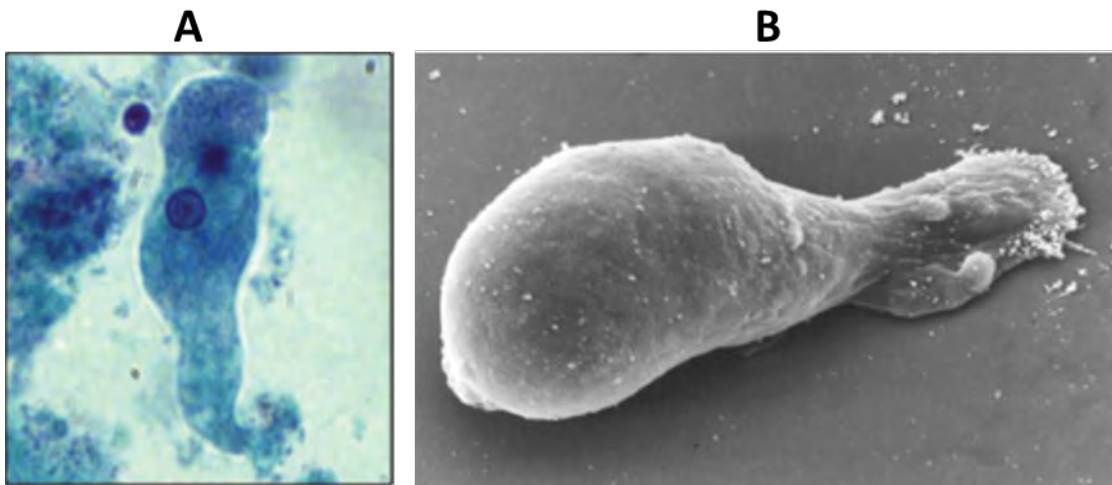


Figura 2.2. Microscopía con tinción (A) y electrónica (B) de *Entamoeba histolytica* como trofozoíto.

En lo que respecta a los quistes (segunda forma vital e invasiva), morfológicamente son esféricos y con un tamaño que oscila entre los 12 y 15 μm . Mediante esta forma los protozoos se defienden de los mecanismos externos de agresión puesto que sobreviven a la cloración, al pH ácido del estómago y a ambientes húmedos con bajas temperaturas; sin embargo, son destruidos por el calor (más de 50 °C) o la congelación. Por lo que al ser eliminados por las heces pueden llegar a sobrevivir durante semanas en un ambiente desfavorable,

pudiendo contaminar el agua y los alimentos. Si éstos son consumidos por humanos, los quistes van a llegar al intestino delgado donde va a tener lugar la exquistación de los mismos y, por ende, el desarrollo de los trofozoítos, los cuales serán potencialmente invasivos. Éstos pueden volver a enquistarse en el intestino grueso sin producir lesión a nivel de la mucosa y así eliminarse por las heces en forma de quistes, resultando como un proceso autolimitado y asintomático. No obstante, también pueden adherirse a las células epiteliales del colon iniciando así su invasión, lo que conlleva una amebiasis intestinal. Tras la invasión, los trofozoítos pueden diseminarse al hígado y desde allí a otros tejidos como la pleura, el pericardio o el pulmón, produciendo la amebiasis extraintestinal [Figura 2.3].

[3]

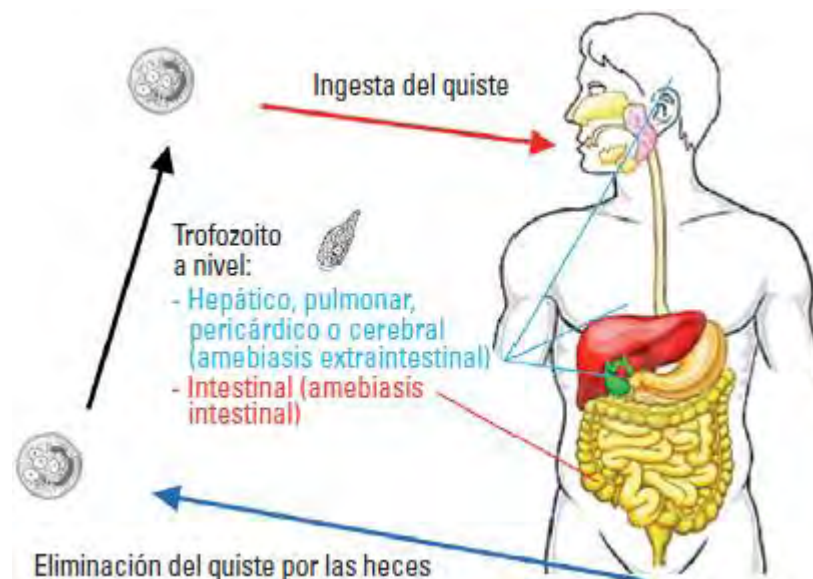


Figura 2.3. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Clínicamente las variaciones de la amebiasis presentan distintos síntomas. Para el caso de la amebiasis intestinal la presencia de una diarrea invasiva (*diarrea amebiana*) es la forma más frecuente y se caracteriza porque no se visualiza moco ni sangre microscópica en las heces. En un leve porcentaje de casos los pacientes presentan fiebre (8-38%), siendo más frecuente la pérdida de peso (hasta el 50%) y el tenesmo rectal; o bien, se puede presentar colitis amebiana, que consiste en dolor abdominal intenso y diarrea con moco o sangre macroscópica en las heces en un paciente infectado. Por otro lado, la amebiasis extraintestinal frecuentemente se manifiesta como un absceso hepático que al romperse causa complicaciones

como la amebiasis pericárdica; ésta tiene como consecuencias falla cardíaca o taponamiento cardíaco. [3]

2.2.2. Giardiasis

Se denomina giardiasis a la infección producida por protozoarios del género *Giardia*. El principal agente implicado es *Giardia lamblia*, también conocida como *G. duodenalis* o *G. intestinalis*. Ésta causa diarrea esporádica o epidémica, se transmite a través de agua o alimentos contaminados, brotes en guarderías y por diseminación de individuos infectados que migran de un país a otro. Además, en los últimos 30 años la giardiasis también ha sido considerada como enfermedad de transmisión sexual, esto como resultado del contacto sexual anal/oral. [8]

G. lamblia tiene dos formas biológicas: trofozoíto y quiste. El trofozoíto tiene forma de pera invertida, mide entre 10-20 μm de longitud y entre 5-15 μm de diámetro transversal. [Figura 2.4 A]. El quiste es la forma invasiva y puede sobrevivir en ambientes húmedos durante tiempo prolongado. Presenta una forma ovoide y es más pequeño que el trofozoíto, con una pared doble y cuatro núcleos.

Su ciclo biológico comienza con la ingesta de los quistes, en el duodeno se produce la exquistación mediada por el pH ácido del estómago, enzimas pancreáticas y una cisteín-proteasa del parásito. La replicación de los trofozoítos ocurre en el duodeno y el yeyuno, los cuales se fijan a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante el disco de adherencia. A lo largo del íleon se realiza la enquistación, favorecida por el medio alcalino que proporciona la secreción biliar. Finalmente, los quistes salen al medio ambiente a través de las heces pudiendo transmitirse a un nuevo hospedero [Figura 2.4 B].

Dentro de las manifestaciones clínicas, después del periodo de incubación que habitualmente dura entre 7 a 14 días, la gravedad es variable dependiendo de una serie de factores como la virulencia de la cepa, la carga parasitaria y la respuesta inmune del hospedador. En general la mitad de los individuos infectados eliminan los quistes sin presentar síntomas. Pero de los pacientes sintomáticos se distinguen dos formas clínicas: Giardiasis aguda-Aparición repentina de diarrea acuosa y explosiva acompañada de febrícula; además existe intolerancia a la lactosa que a veces persiste tras la desaparición de los parásitos. Giardiasis

crónica-Los episodios diarreicos suelen ser intermitentes, con heces pastosas y amarillentas que se acompañan de meteorismo y flatulencia; los pacientes presentan astenia y malestar que a veces se acompañan de cefalea, así como de epigastralgia (dolor en la boca del estómago) que se exagera con las comidas. Generalmente existe pérdida de peso; malabsorción de vitamina A, ácido fólico y vitamina B12. En un 20-40% de los casos existe intolerancia a la lactosa. [3]

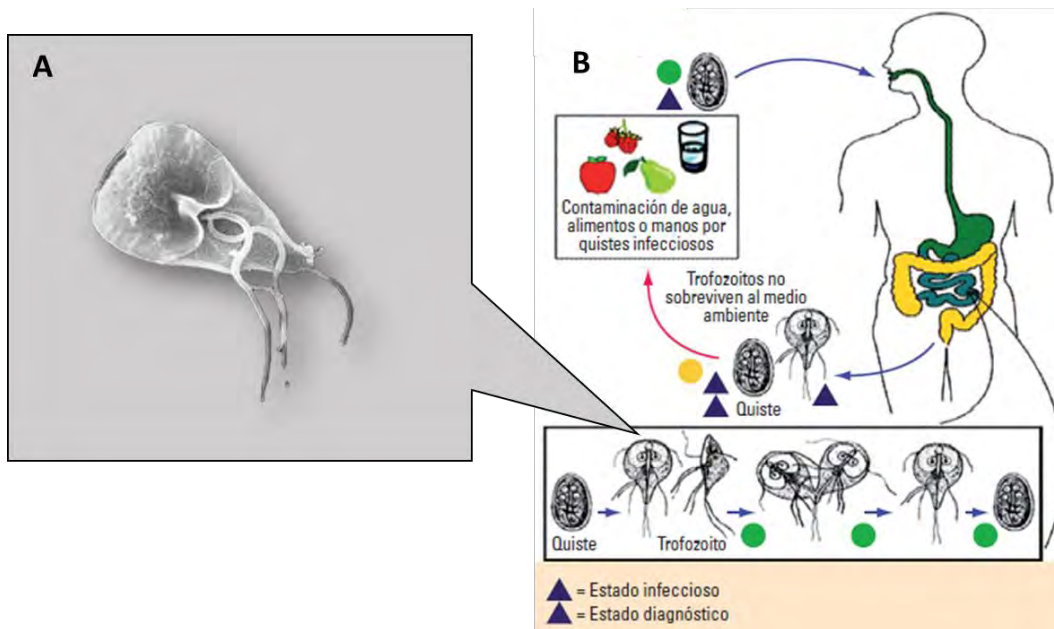


Figura 2.4. Morfología y ciclo de vida de *G. intestinalis*.

2.2.3. Tricomoniasis

Es la infección producida por el protozoo *Trichomonas vaginalis*, protozoo microaerófilico que parasita la vía urogenital. Solamente se han observado la forma de trofozoito, la cual presenta forma y tamaño muy variable. En las preparaciones en fresco [Figura 2.5 D] suele aparecer con aspecto piriforme, con una dimensión promedio de $10 \times 7 \mu\text{m}$. Poseen cuatro flagelos anteriores libres y un quinto que emerge de una membrana ondulante que les confiere su característica movilidad. No presenta forma quística, aunque en condiciones desfavorables puede redondearse e internalizar sus flagelos. Se ha visto que en cultivos axénicos tiende a tener forma uniforme [Figura 2.5 A y B] mientras que de muestras tomadas del epitelio vaginal tiende a tener forma ameboide. [Figura 2.5 C] [9]

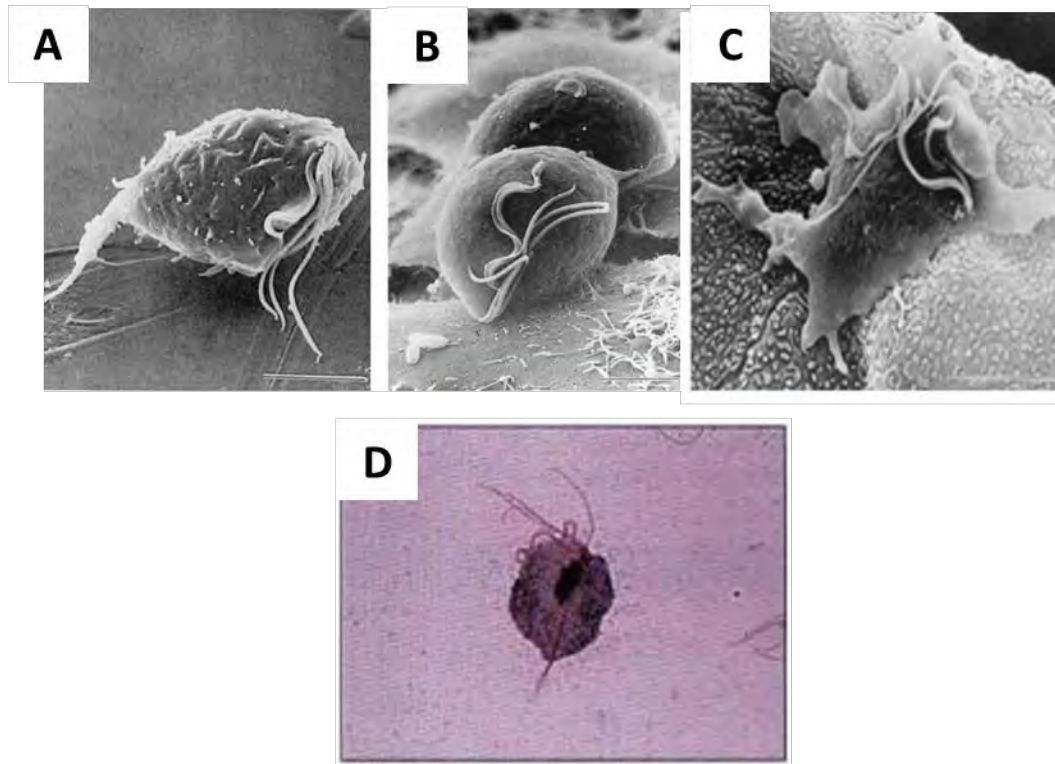


Figura 2.5. Morfología de *Trichomonas vaginalis*.
[9, 10]

El ciclo biológico es simple, ya que solo parasita a la especie humana, presentando un tropismo altamente específico por el epitelio escamoso del aparato genitourinario. Infecta principalmente la vagina, la uretra y las glándulas parauretrales. Otros sitios menos comunes incluyen cérvix, vejiga, glándulas de Bartolino y próstata.

Las manifestaciones clínicas comprenden un periodo de incubación entre 4 y 28 días. En mujeres, la tricomoniasis va desde un estado de portador asintomático, lo que ocurre en un 50% de casos, hasta una enfermedad inflamatoria grave. La infección asintomática puede persistir durante periodos de no más de tres meses. La vulvovaginitis es la principal manifestación y se caracteriza por un aumento del flujo vaginal de aspecto amarillo-verdoso y maloliente, junto con prurito y escozor vulvar. Esto se debe a la alteración de la microbiota de la vagina de tal forma que disminuye la cantidad de *Lactobacillus vaginalis*, además, *T. vaginalis* consume arginina para la obtención de energía, produciendo como desecho de su metabolismo putrescina, responsable de la elevación del pH y el olor fétido que presenta el flujo vaginal. En el varón es a menudo asintomática, pero se ha

asociado a uretritis no gonocócica, epididimitis, infertilidad y prostatitis; ésta última cuando es crónica puede desarrollar cáncer. [3]

2.2.4. Tratamiento Farmacológico

El objetivo de la quimioterapia antiprotozoaria es eliminar tanto los trofozoítos como las formas quísticas. Existen dos tipos de tratamientos: luminales (eficaces frente a los parásitos presentes en la luz intestinal) y tisulares (encargados de erradicar los patógenos que se encuentran en el interior de los tejidos). Los luminales se pueden dividir en aquellos que actúan de manera directa frente al protozoario (diloxanida e iodoquinol) y los que ejercen su efecto de forma indirecta (paramomicina y tetraciclinas). En cuanto a los fármacos tisulares, encontramos los nitroimidazoles, familia en la que destaca metronidazol, el cual es la base del tratamiento. Otras alternativas con vida media más larga y mejor tolerados por el paciente son el tinidazol, secnidazol y ornidazol. El uso de la nitazoxanida generalmente se reserva como tratamiento para cepas resistentes al metronidazol. [3, 11]

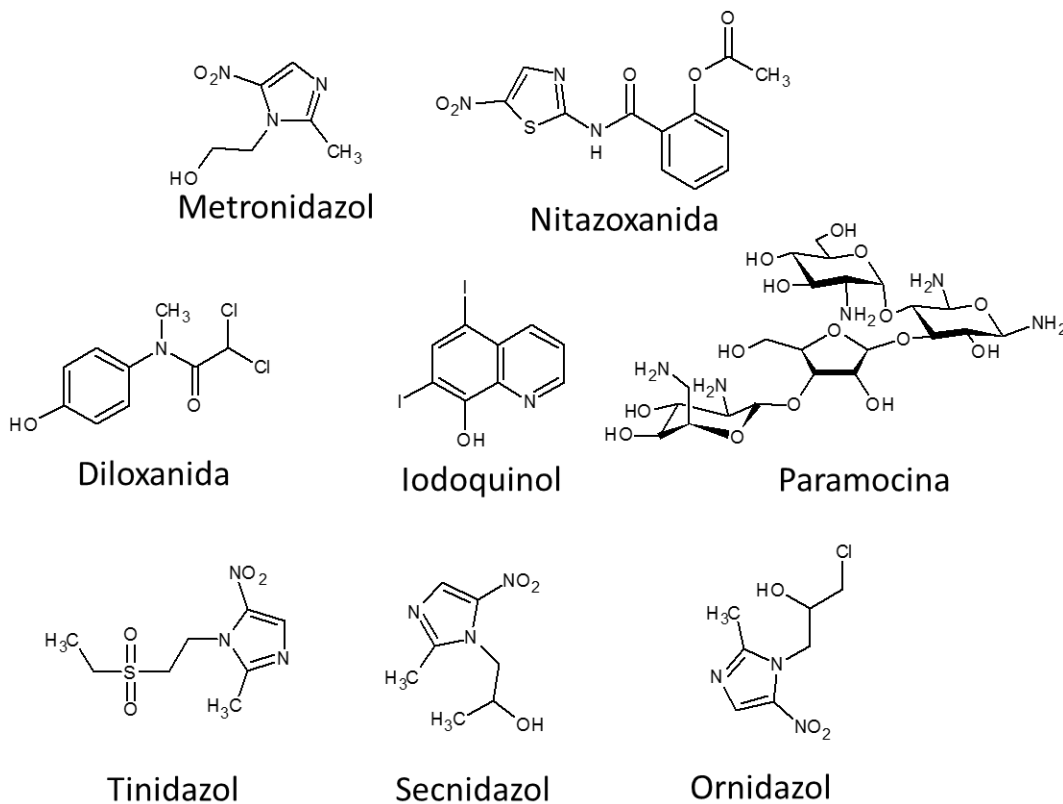
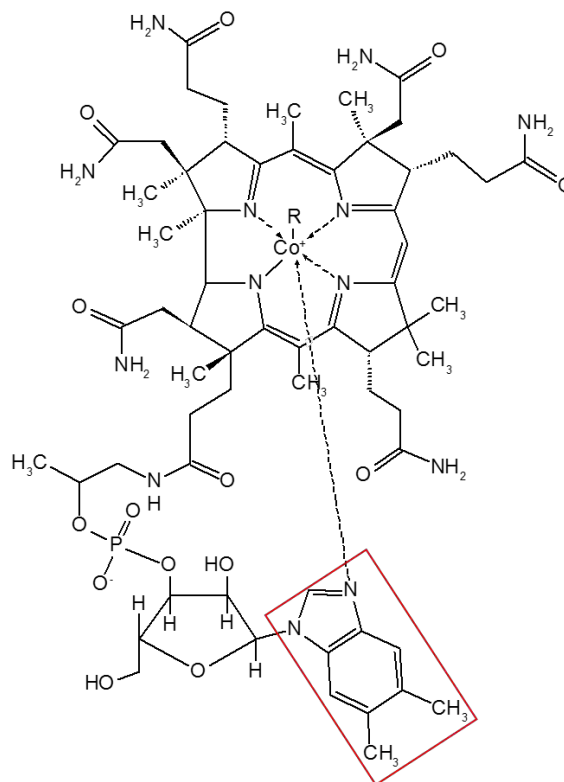


Figura 2.6. Quimioterapia contra protozoarios.

2.3. Marco histórico del bencimidazol

En los años **50's** se descubrió que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil) bencimidazol formaba parte de la vitamina B12 [Figura 2.7], desde entonces muchos investigadores alrededor del mundo han centrado su atención en el desarrollo de derivados del bencimidazol con diferente actividad biológica. El primer bencimidazol desarrollado y aprobado para uso humano fue el tiabendazol, en 1962. Después numerosos antihelmínticos de uso veterinario fueron apareciendo y se han comercializado, entre éstos se incluyen parbendazol, fenbendazol, oxfendazol y cambendazol. Años más tarde, apareció el primer carbamato del bencimidazol para uso humano; el mebendazol [Figura 2.8]. [12]



R= 5-desoxiadenosil, Me, OH, CN

Figura 2.7. Vitamina B12. Enmarcado en rojo se muestra la estructura del bencimidazol.

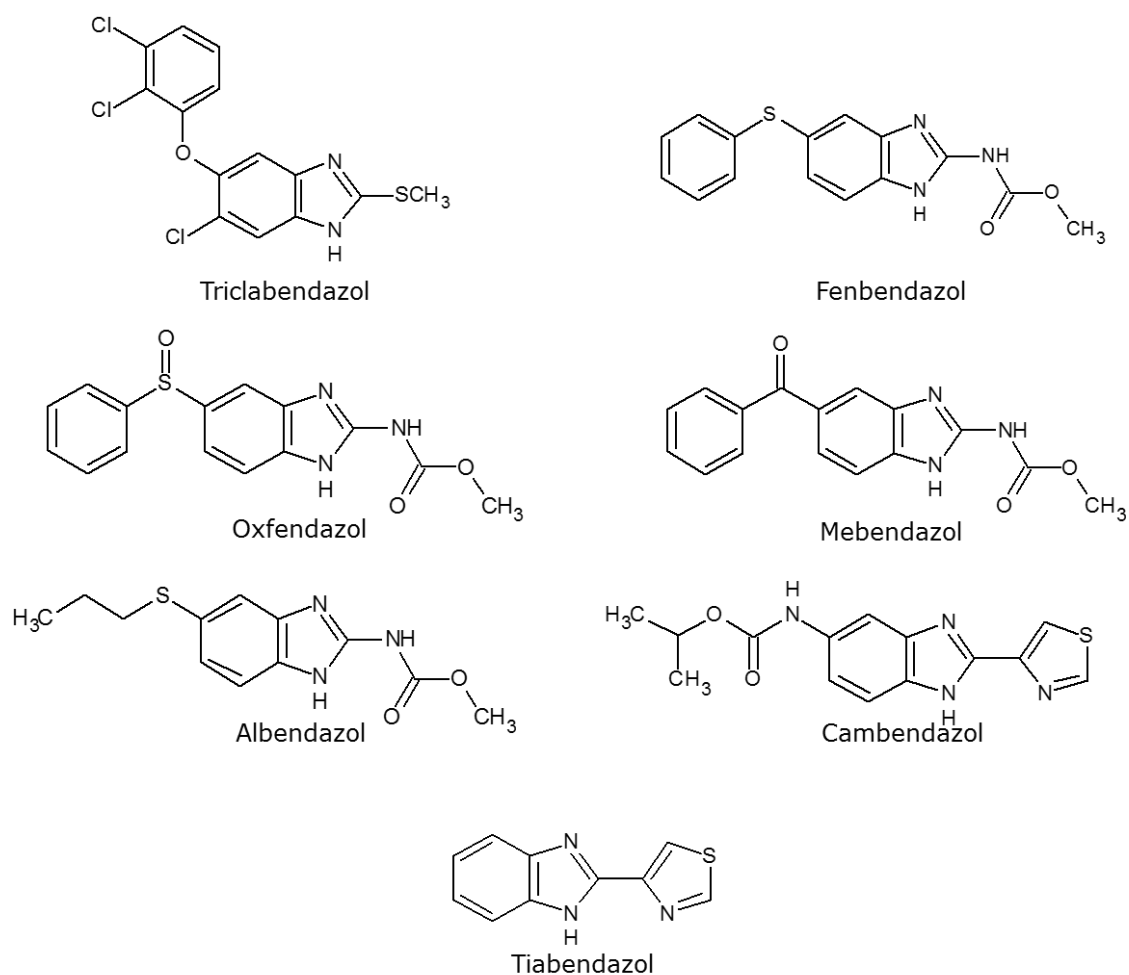


Figura 2.8. Estructura química de derivados del bencimidazol como antiparasitarios.

Este sistema heterocíclico de dos anillos fusionados (benceno-imidazol) se considera una estructura versátil, ya que variando los sustituyentes en las posiciones 1, 2, 5 y 6 se ha visto que poseen diferente actividad biológica como: antiviral, anticancerígeno, antihelmíntico, antituberculoso, antimicrobiano, anticonvulsivante, analgésico, antiinflamatorio, antidiabético, antiprotozoario, entre otras áreas de explotación clínica [Figura 2.9]. Entre los mecanismos por los que ejercen su acción destacan: el estrés oxidativo, la interacción enzimática e inhibición de receptores celulares. Algunos de los fármacos derivados del bencimidazol clínicamente aprobados son: albendazol, mebendazol y triclabendazol como antihelmínticos (**después de los años 80's se demostró que éstos poseen también actividad antiprotozoaria**); omeprazol y pantoprazol como inhibidores de la bomba de protones; astemizol como antihistamínico; enviroxima como antiviral; candesartán y telmisartán como antihipertensivos. [12, 13]

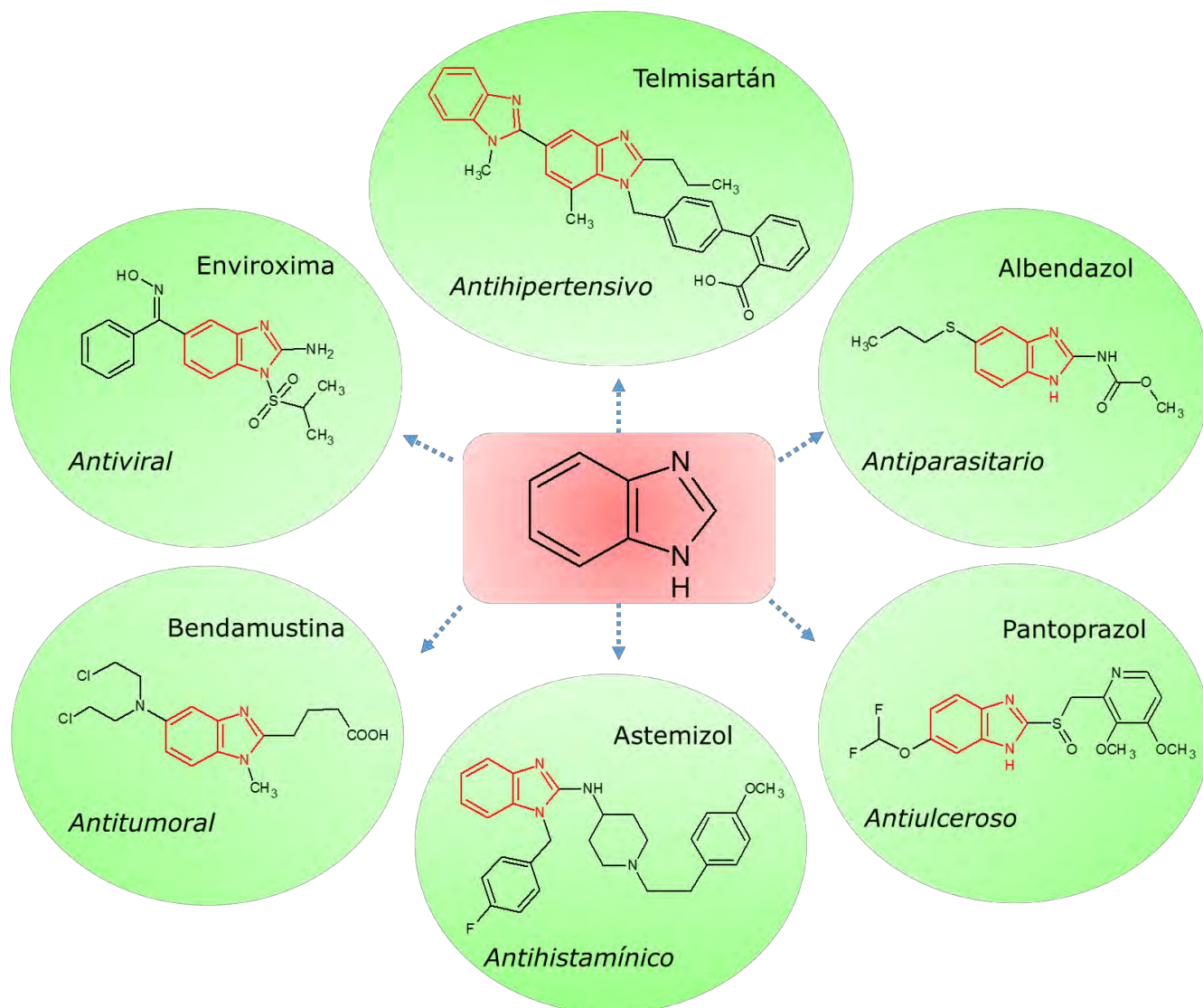
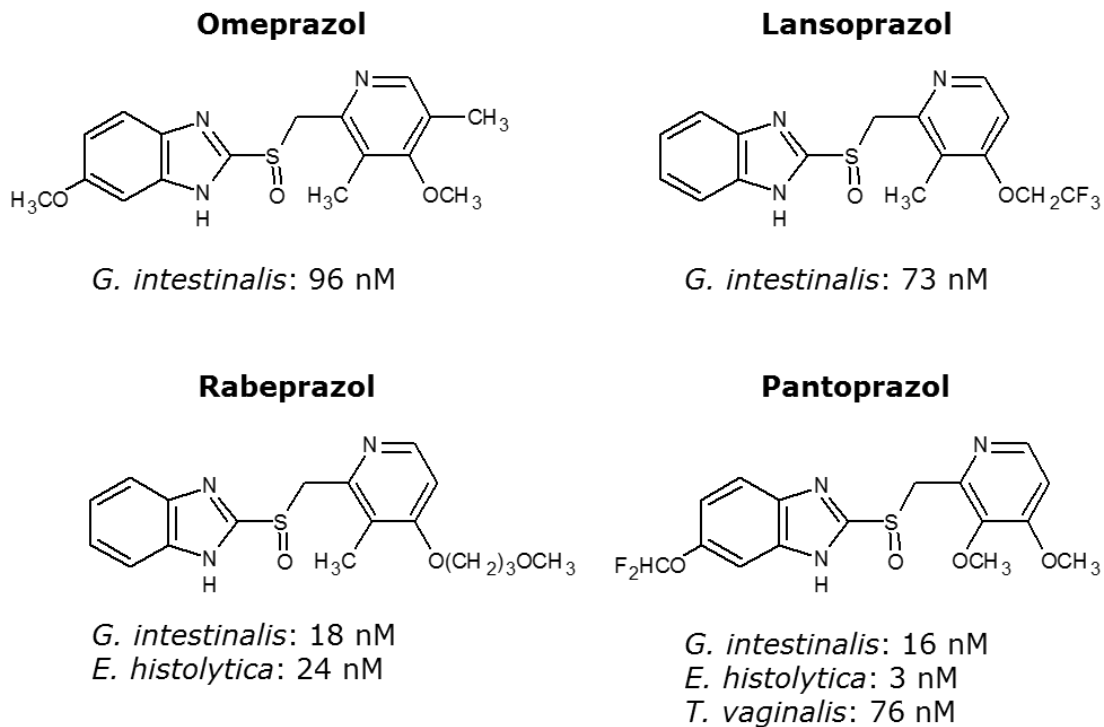


Figura 2.9. *Bencimidazol* como estructura privilegiada.

Esta peculiaridad de compartir similitud estructural y presentar diferente actividad biológica, abre las puertas al reposicionamiento de moléculas activas derivadas del bencimidazol. Utilizando estrategias sofisticadas como la optimización selectiva de los efectos colaterales (SOSA approach) [14], o simplemente el principio de similitud (estructura similar-actividad similar) se puede obtener nuevas entidades químicas que mejoren las existentes. Por ejemplo, en el caso de los inhibidores de la bomba de protones (PPI's) como el omeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol, se ha evidenciado mediante estudios de modelado molecular y estudios *in vitro* que presentan buena actividad antiprotozoaria contra los parásitos *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. lamblia* [Figura

2.10]. Resaltando el rabeprazol y el pantoprazol como los más activos con CI_{50} del orden nanomolar, siendo aún mejores que el metronidazol, fármaco de elección para estas parasitosis. [15] Lo anterior, sugiere que pueden ser candidatos para reposicionarse con una nueva actividad. Dicha estrategia actualmente se volvió frecuente por las compañías farmacéuticas para acortar el periodo en que un fármaco comience a comercializarse como nueva alternativa de tratamiento clínico. Además provee información útil como punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos activos. [16]



MTZ: *G. intestinalis* (1226 nM), *E. histolytica* (350 nM), *T. vaginalis* (236 nM).

Figura 2.10. Algunos PPI's con actividad antiprotozoaria.

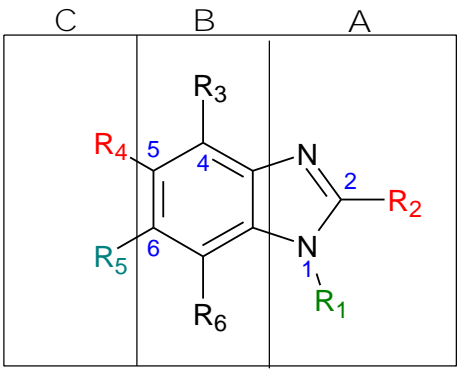
2.4. Características estructurales deseables para la actividad antiparasitaria

El desarrollo de nuevos prototipos e identificación de la relación que existe entre el tipo de sustituyentes que posee un compuesto con la actividad biológica, facilita la comprensión de cuáles son los grupos fundamentales para ejercer la actividad antiparasitaria. Además, permite predecir e indagar en posibles cambios estructurales que modifiquen la respuesta biológica con la finalidad de hacer un diseño racional de fármacos basándose en la estructura. [17] En nuestro equipo

de trabajo motivados por los resultados publicados anteriormente, donde se demuestra que los derivados del bencimidazol poseen actividad antihelmíntica y además antiprotozoaria, se han sintetizado y evaluado una gran cantidad de derivados del bencimidazol. Como resultado de estos trabajos se ha podido establecer una relación estructura actividad (SAR) que ha permitido conocer los requerimientos estructurales fundamentales para ejercer actividad antiparasitaria. Esto aunado al uso de herramientas informáticas, ha permitido identificar las características que poseen los posibles sitios de unión. Dichos hallazgos se resumen en la *Tabla 2.2*.

A diferencia del SAR, que contempla una relación estructura-actividad cualitativa. Existen otras herramientas que permiten el diseño de fármacos basadas en el ligando de manera cuantitativa; una de ellas es el QSAR, (*Quantitative structure activity relationship*) donde la relación se establece por medio de descriptores moleculares (propiedades fisicoquímicas, características estructurales, etc.) y permite identificar el tipo de sustituyentes que favorecen la interacción del compuesto en su sitio receptor. [18] En el caso del QSAR-3D, la técnica CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) permite el diseño aun cuando no se conoce el sitio de unión o el mecanismo de acción. López Vallejo publicó resultados de la actividad contra *E. histolytica* de algunos derivados del 1*H*-bencimidazol, donde los resultados del CoMFA sugieren que la actividad amebicida se ve favorecida por grupos estéricamente voluminosos en la posición 5 y por grupos con pobre densidad electrónica en la posición 2. [19]

Tabla 2.2. Estudio SAR para la actividad antiparasitaria en bencimidazoles
[12, 20-25]

			
Región	Cambios estructurales	Relevancia estructural	
A	R1	H, CH ₃	La presencia de H es esencial para la actividad antihelmíntica. No así para la actividad antiprotozoaria.
	R2	(1) CO ₂ Et (2) CONH ₂ (3) CONHMe (4) CON(Me) ₂ (5) NHCO ₂ R' (6) S(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂ (7) S(CH ₂) ₂ (N-morfolinil) (8) S(CH ₂) ₂ (p-nitrofenil) (9) 2-(1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil	(1-4) Los compuestos con sustituyente éster mostraron mayor actividad antiprotozoaria que los derivados de amida. (5) Cuando existe la presencia de carbamatos, el metilcarbamato es el que presenta mayor actividad antihelmíntica. En adición, si se sustituye el hidrógeno del nitrógeno del carbamato por un grupo alquilo, la actividad disminuye. (6-9) Los grupos alquiltio en la posición dos propician compuestos con potencia antiprotozoaria alta.
B	R3 R6	Inserción de un nitrógeno en el anillo bencénico.	Disminuye la actividad. Posiblemente las interacciones de Vander Waals en el sitio receptor (π - π) favorezcan actividad. Y la presencia del nitrógeno las disminuye.
C	R4	(a) H, Cl, OCH ₂ CH ₃ , COOCH ₃ , alquilo, cicloalquilo, heteroarilo. (b) -XR' ; X= O, S, SO, SO ₂ , OSO, CO, CONH, NHCO, (CH ₂) _n R'=alquilo, cicloalquilo, heteroarilo.	(a) El incremento en el tamaño del sustituyente es favorable para la actividad contra <i>E. histolytica</i> . (b) Se tiene óptima actividad cuando X=O, CO, S, SO (aceptores de enlace de H). R4 y R5 son espaciadores farmacóforos esenciales que determinan la selectividad por el sitio de unión.
	R5	(A) H, Cl, OCH ₂ CH ₃ , COOCH ₃ , alquilo, cicloalquilo, heteroarilo.	(A) Grupos voluminosos favorecen actividad contra <i>T. vaginalis</i> y <i>G. intestinalis</i> .

2.5. Carboxamidas como antiparasitarios

Las amidas al igual que los ésteres, abundan en todos los organismos vivos; las proteínas, los ácidos nucleicos y muchos productos farmacéuticos poseen el grupo funcional amida. La razón de su abundancia es gracias a su estabilidad en medios acuosos (necesarios en organismos vivos), debido a que son menos susceptibles a reacciones de sustitución nucleofílica en el grupo acilo. Presentan baja basicidad en comparación con las aminas debido a que existe un sistema conjugado con el átomo de oxígeno del carbonilo, donde la densidad electrónica se encuentra deslocalizada [Figura 2.11]; se puede considerar que existe un doble enlace C=N (conformación plana) que limita el libre giro y que puede adoptar conformación cis o trans, hecho que se considera relevante a la hora de interactuar con su receptor. [26]

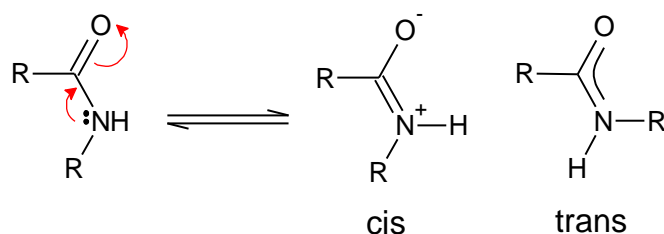


Figura 2.11. Sistema conjugado cis y trans que presenta el grupo amida.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado más de 100 carboxamidas bencimidazólicas con actividad antiparasitaria. Estos derivados poseen en la posición 5 ó 6 cloro, hidrógeno y/o amidas con sustituyentes alifáticos, aromáticos y heterocíclicos; además, en la posición 1 con metilo o hidrógeno y la posición 2 está ocupada por carbamato de metilo, tiol, metiltio, trifluorometilo, metilo, hidrógeno. La potencia en su actividad como antiparasitarios va del orden de nM a μ M.

Las diferentes carboxamidas se pueden agrupar según el tipo de amina que se utiliza para formar la amida en 3 grupos: Grupo A, contiene carboxamidas bencimidazólicas derivadas de aminas alifáticas; Grupo B, derivadas de aminas aromáticas y Grupo C, de aminas heterocíclicas [Figura 2.12]. Es importante resaltar que el Grupo A destaca por su actividad giardicida y tricomonocida. En

contraste con el Grupo B y C que presentan mayor actividad amebicida. [20-22, 24, 25]

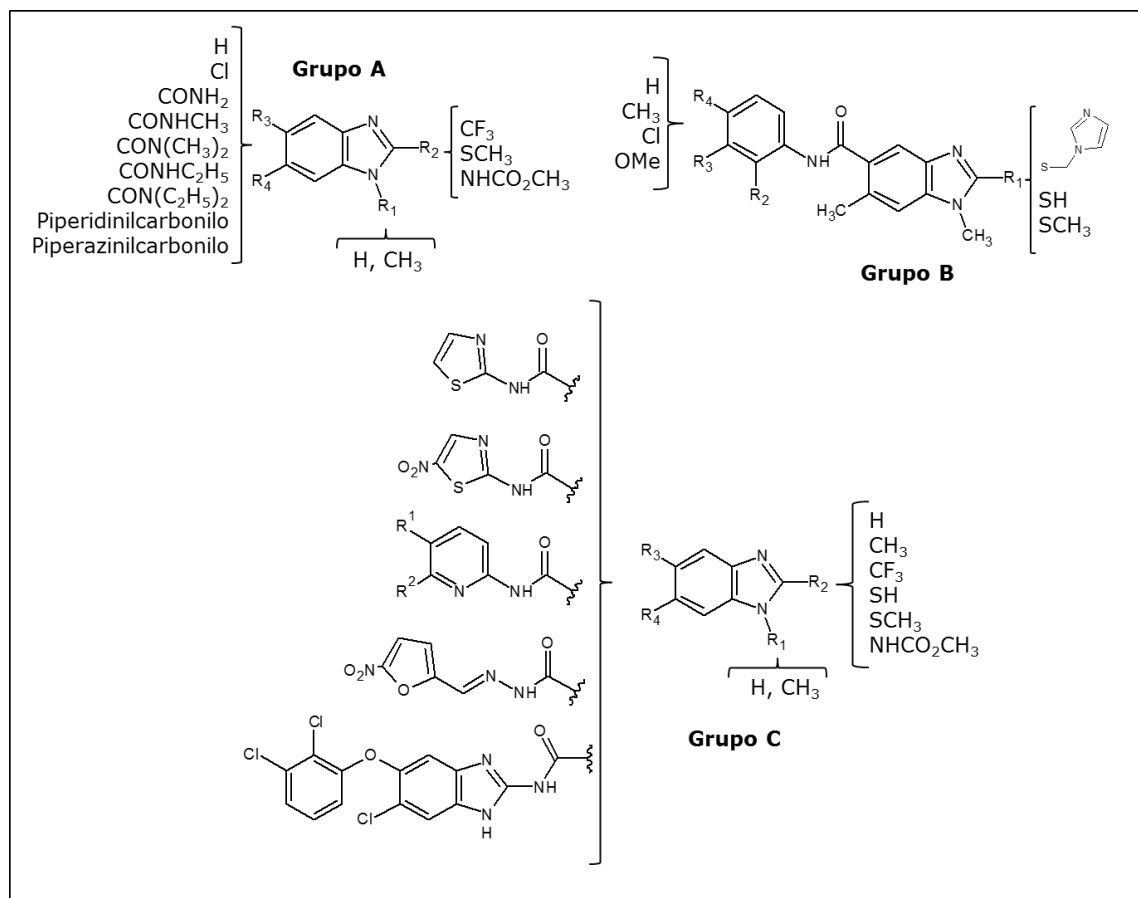


Figura 2.12. Carboxamidas sintetizadas por nuestro grupo de investigación. [20]

2.6. Farmacocinética

Los bencimidazoles antiparasitarios presentan vida media corta (predominan metabolitos) y baja solubilidad acuosa, las diferencias en éstas características determinan el grado de absorción y por ende su eficacia terapéutica. Dentro del tipo de reacciones en el metabolismo de fase I, el citocromo P450 (CYP) y la flavín monooxigenasa (FMNO) son las principales enzimas que participan en las reacciones de oxidación de estos fármacos. [27]

Específicamente para el caso del albendazol una vez que sufre la primera oxidación para formar el sulfóxido, metabolito que posee la actividad equivalente a la de su predecesor, se forma un centro quiral en el átomo de azufre dando como resultado dos enantiómeros (+) ABZSO y (-) ABZSO. [Figura 2.13] La forma dextrógira (+) ABZSO es la que posee mayor actividad contra los nematodos *T.*

spiralis, *H. contortus*, *Ascaris spp.*, mientras que la forma levógira (-) ABZSO resulta ser el principal sustrato para la producción del metabolito inactivo: la sulfona (ABZSO₂). Es posible que la selectividad de los enantiómeros se deba al tipo de transporte y la afinidad por las proteínas citosólicas. [28, 29]

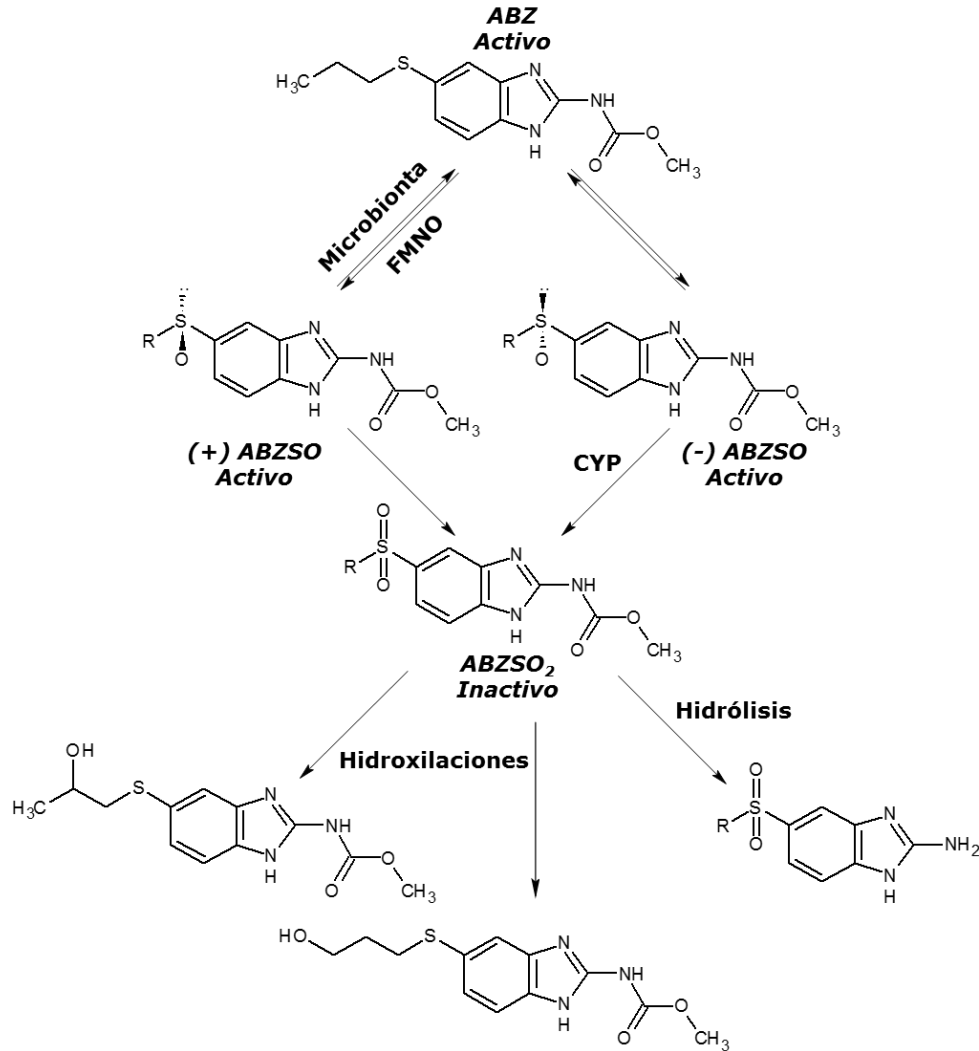


Figura 2.13. Ruta metabólica del albendazol. [27, 28]

2.7. Farmacodinamia

La farmacodinamia comprende principalmente la interacción de un fármaco con su sitio de acción, es decir, su mecanismo de acción. En el caso de la actividad antiparasitaria de los derivados del bencimidazol, inicialmente se propuso la inhibición de la captura de glucosa como posible mecanismo de acción. Después Borgers demostró que la inhibición de la polimerización de la tubulina era la acción que provocaba la muerte del parásito [30].

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas constituidas por protofilamentos compuestos por dos subunidades monoméricas de α -tubulina y β -tubulina que se encuentran en un sistema dinámico de ensamblaje y desensamblaje. Además interactúan con GTP/GDP e iones Mg^{2+} [Figura 2.14]. Están asociados a las funciones de soporte (citoesqueleto), división celular (huso mitótico) y motilidad celular (cilios y flagelos), funciones de vital importancia que si se ven perturbadas propician la muerte celular. Diversos estudios han demostrado que la inhibición **de la polimerización se da por la unión selectiva al monómero de β -tubulina** del parásito, sin embargo, no es específico ya que se ha demostrado que sí existe un ligero efecto sobre la isoforma de mamíferos. [31-33]

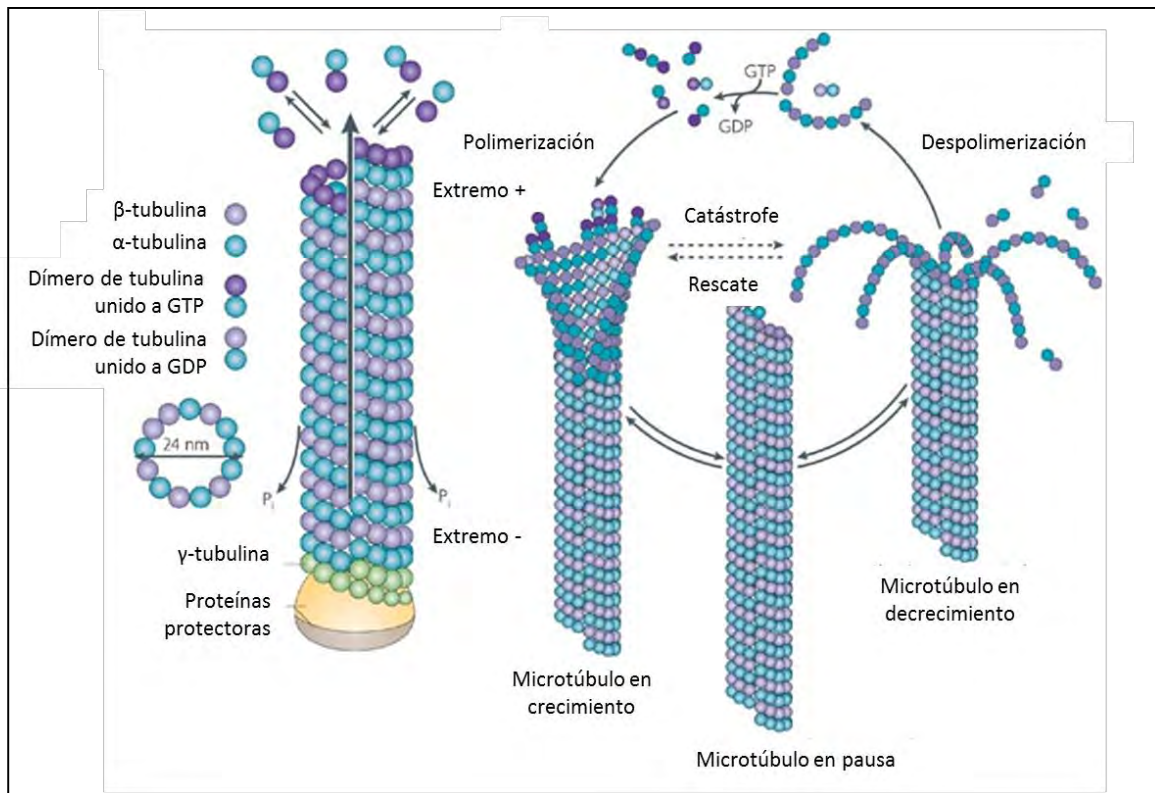


Figura 2.14. Estructura y formación de microtúbulos.

Desafortunadamente no se ha reportado las estructuras cristalográficas de la β -tubulina, lo que ha dificultado identificar el sitio de unión de los bencimidazoles. A pesar de ello, estudios de modelado por homología han permitido que mediante estudios de acoplamiento molecular (*docking*), se identifiquen posibles sitios de unión. Los resultados han evidenciado que la unión de los derivados del bencimidazol-2-carbamato de metilo con los residuos de aminoácidos Thr165,

Glu198, Cys239 y Gln134, son estabilizados mediante enlaces de hidrógeno [Figura 2.15]. También resalta la importancia de tener átomos aceptores de enlace de hidrógeno en la posición 5 para aumentar la actividad (por ejemplo sulfona o sulfóxidos; metabolitos del albendazol). [34]

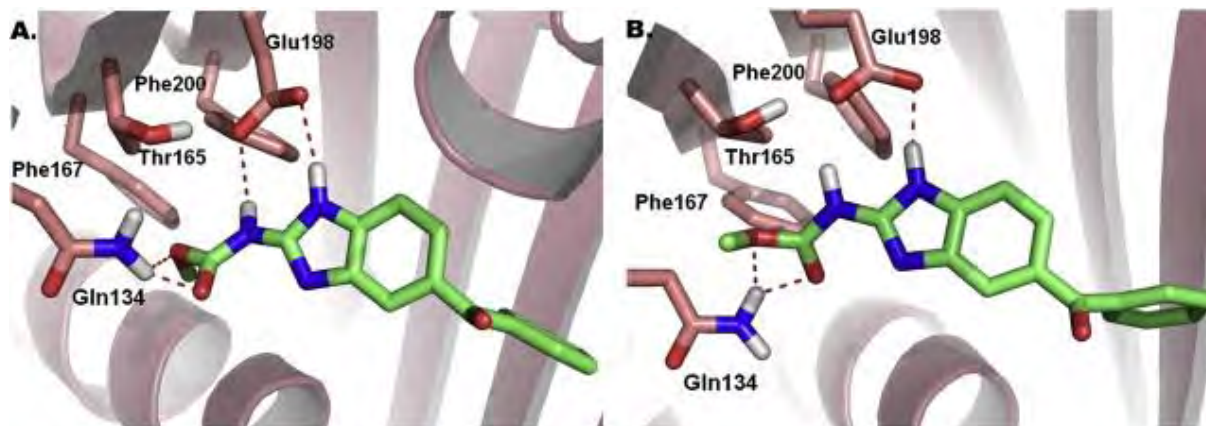


Figura 2.15. Diferentes conformaciones del mebendazol dentro del sitio de unión de la β -tubulina. [34]

2.8. Síntesis de bencimidazoles

El primer método de síntesis de bencimidazoles fue reportado en 1872 por Hoesbrecker; para formar el (2,5 ó 2,6-dimetilbencimidazol) a partir de la reducción del 4-metil-2-nitroacetanilida [Figura 2.16 A]. Años más tarde Ladenburg obtuvo el mismo compuesto a partir de 3,4-diaminotolueno en presencia de ácido acético [Figura 2.16 B]. [12]

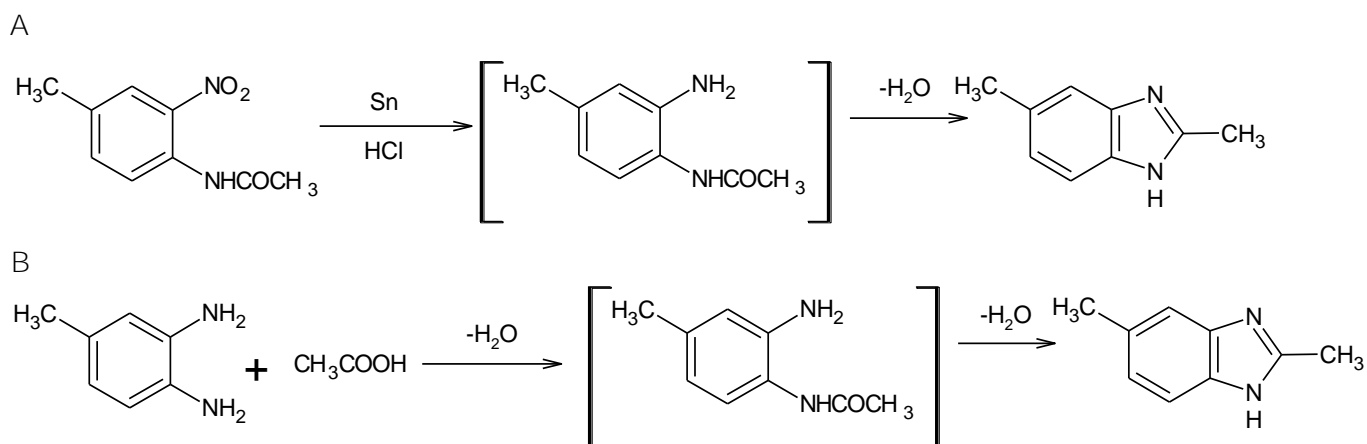


Figura 2.16. Primeras formas de síntesis de los bencimidazoles.

El método más popular para la síntesis de bencimidazoles es a partir de las *orto*-fenilendiaminas, reportado por Fischer en 1905 y fue modificado por Phillips

en 1928. Consiste en la ciclocondensación entre una *o*-fenilendiamina con un ácido carboxílico, en presencia de ácido clorhídrico, usualmente 4 N a temperatura de reflujo. Es importante mencionar, que el hidrógeno en la posición 1 presenta tautomerismo [Figura 2.17], lo que da lugar a la obtención de tautómeros al momento de formar derivados del mismo. [12, 35]

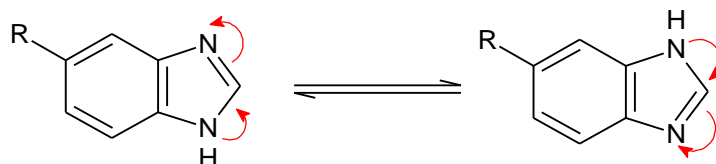


Figura 2.17. Tautomerismo del bencimidazol.

Para funcionalizar en la posición 2 con grupos NH_2 o SH se emplean reactivos electrofílicos como BrCN o bien xantato generado *in situ* a partir de CS_2 y un alcohol. [Figura 2.18] [24, 36]

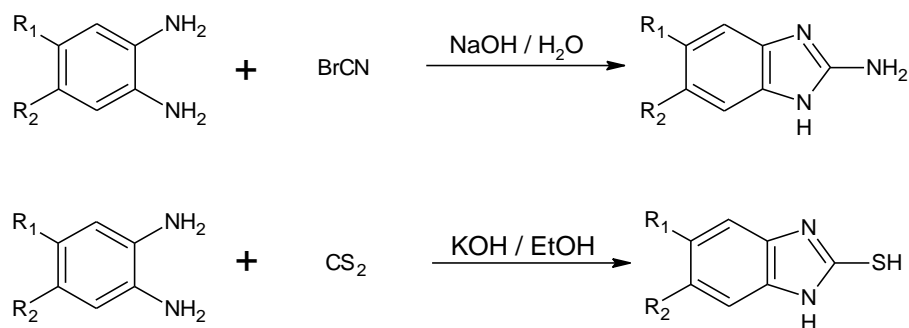


Figura 2.18. Funcionalización del bencimidazol en la posición 2 con grupos amino y mercapto.

2.9. Síntesis de amidas

La formación de amidas a partir de únicamente un ácido carboxílico y una amina, es una reacción que no procede con facilidad. Termodinámicamente, la reacción ácido-base entre estas especies es lo que requiere menor energía, y por ende ocurre antes que una condensación para formar la amida. No obstante la condensación directa puede lograrse bajo condiciones de reacción drásticas (160-180 °C), si la naturaleza de los reactivos lo permite.

Para solucionar la problemática anterior, se recurre comúnmente a activar el ácido carboxílico (generar un mejor grupo saliente) y después mediante un ataque nucleofílico por parte de una amina lograr la sustitución. Con esto se logra aumentar el rendimiento, facilitar la purificación y en algunos casos cuando se generan estereocentros; mejorar la selectividad. [37]

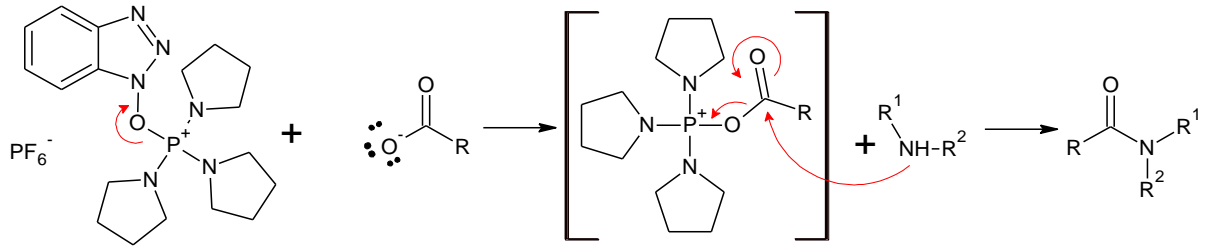
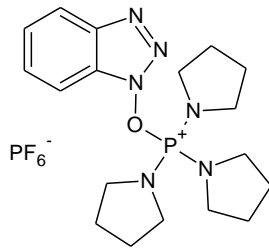
Tabla 2.3. Métodos de síntesis de amidas, previa activación del ácido carboxílico

Frecuentemente se activa como: halogenuros de acilo, acilazidas, acilimidazoles, anhídridos o ésteres. [38]

Método	Reactivos	Mecanismo propuesto
Formación de cloruros de acilo	<p><u>Reactivos formadores de cloruros de acilo:</u> cloruro de tionilo (SOCl_2), cloruro de oxalilo (COCl_2), POCl_3, PCl_5. <u>Bases:</u> Et_3N, DIPEA, piridina.</p>	<p>Mecanismo de reacción con SOCl_2</p>
Acoplamiento con 1,1-carbonildiimidazol (CDI)	<p><u>Agente acoplante:</u> CDI</p> <p><u>Base:</u> Et_3N</p>	
Acoplamiento con carbodiimidas	<p><u>Agentes acoplantes:</u> -DCC -DIC -EDC <u>Base:</u> Et_3N, DIPEA, DMAP.</p>	<p>Mecanismo de reacción con DIC</p>

Acoplamiento con sales de fósforo

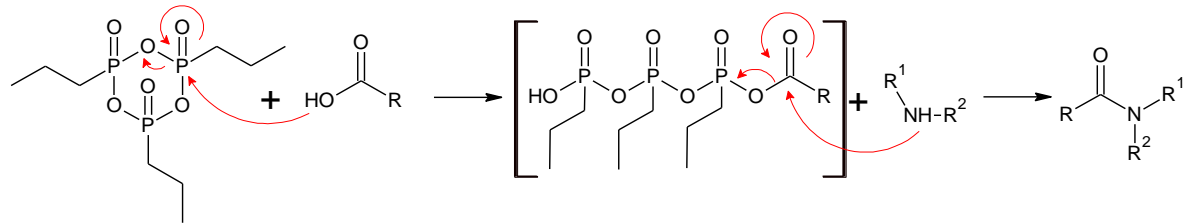
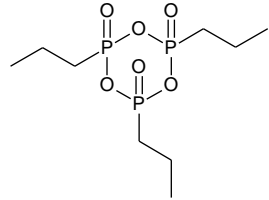
Agente acoplante:
PyBOP



Base: NMM, DIPEA

Acoplamiento con anhídridos fosfónicos

Agente acoplante:
-T3P



Base: piridina, DIPEA, NMP.

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que las enfermedades producidas por helmintos y protozoarios prevalecen como un problema de salud pública en México y el resto del mundo, además, algunas son consideradas como enfermedades desatendidas, es necesario el desarrollo y optimización de principios activos que tengan actividad biológica contra los parásitos de mayor prevalencia (*E. histolytica*, *G. intestinalis*, *T. vaginalis*, *A. lumbricoides*, *F. hepática*, *T. cruzi*), incluyendo las cepas resistentes que han surgido. Puesto que se ha demostrado la eficacia de los derivados del bencimidazol como antiparasitarios, esto conduce al desarrollo de nuevos compuestos más potentes y selectivos; que solucionen los problemas de farmacocinética, resistencia y efectos adversos que poseen los fármacos comercializados actualmente. Este trabajo se enfoca en la síntesis, caracterización y evaluación antiprotozoaria de cinco carboxamidas derivadas del 1*H*-bencimidazol contra los parásitos *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*; como un ejemplo del diseño racional de compuestos activos basándose en su relación estructura-actividad.

4. HIPÓTESIS

Apoyándose en la información generada por nuestro equipo de investigación sobre los derivados del bencimidazol como antiparasitarios, tomando en cuenta que el sustituyente carboxamida del tipo alifática pequeña en la posición 5 ó 6 del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol y que grupos voluminosos en la posición 5 ó 6, como el Cl; han demostrado favorecer la actividad giardicida y tricomonicida. Se espera que los compuestos JOULZ-01 → JOULZ-05 de la *Tabla 5.1* presentarán actividad antiprotozoaria *in vitro*, particularmente contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad antiprotozoaria de un grupo de cinco carboxamidas alifáticas derivadas del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol.

5.2. Objetivos particulares

A) Establecer la metodología adecuada para obtener la serie de carboxamidas planteada. Con pureza y rendimiento aceptables.

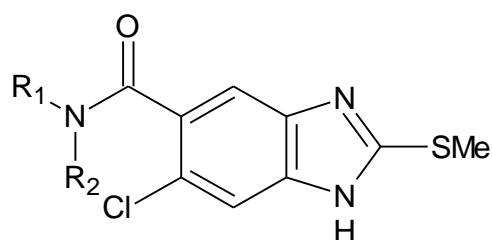


Tabla 5.1. Serie de carboxamidas planteada

Compuesto	R ₁	R ₂
JOULZ-01	H	H
JOULZ-02	H	CH ₃
JOULZ-03	CH ₃	CH ₃
JOULZ-04	H	CH ₃ CH ₂
JOULZ-05	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂

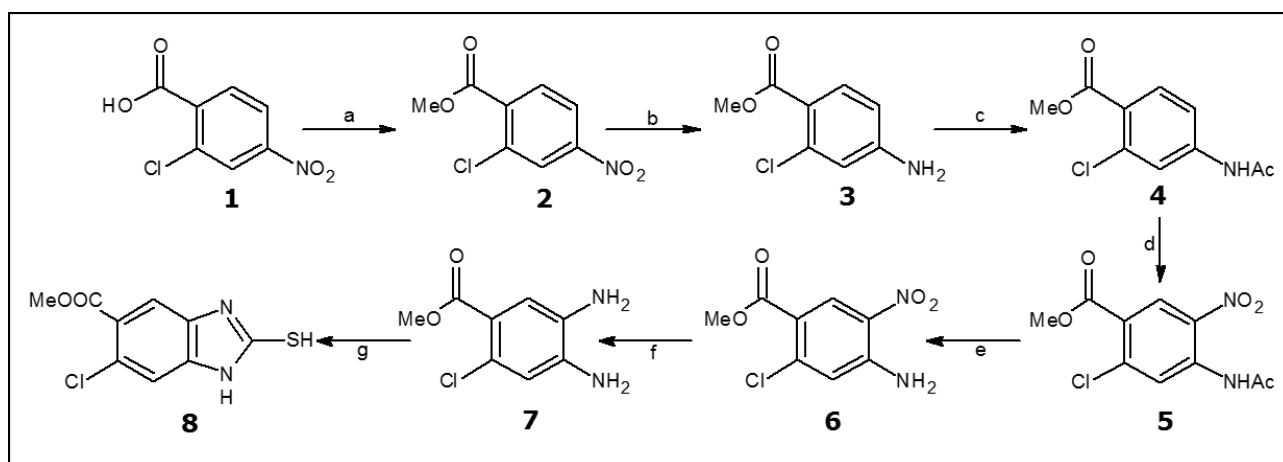
- B) Caracterizar las carboxamidas mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- C) Obtener algunas de sus propiedades fisicoquímicas como punto de fusión (P.f) y factor de retención (Rf.) en cromatografía de capa fina.
- D) Evaluar la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* por el método de subcultivos. Determinar la CI₅₀.
- E) A partir de los resultados obtenidos establecer una relación estructura-actividad que enriquezca al banco de datos de las moléculas de nuestro grupo de investigación.

6. METODOLOGÍA

Este apartado, en su primer parte comprende la secuencia de pasos para la obtención de la serie de carboxamidas planteada (JOULZ-01 → JOULZ-05). La segunda parte describe la metodología que se llevó a cabo para realizar la evaluación biológica *in vitro*.

6.1. Parte química

Los compuestos JOULZ 01-05 se sintetizaron vía formación del cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo (11). El *Esquema 6.1* muestra la síntesis a partir del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (1); es necesario indicar que los intermediarios 1-8 ya han sido sintetizados con anterioridad [21], por lo que en este trabajo solo describe la metodología para sintetizar los precursores 9-11 [*Esquema 6.2*] y las carboxamidas JOULZ 01-05.



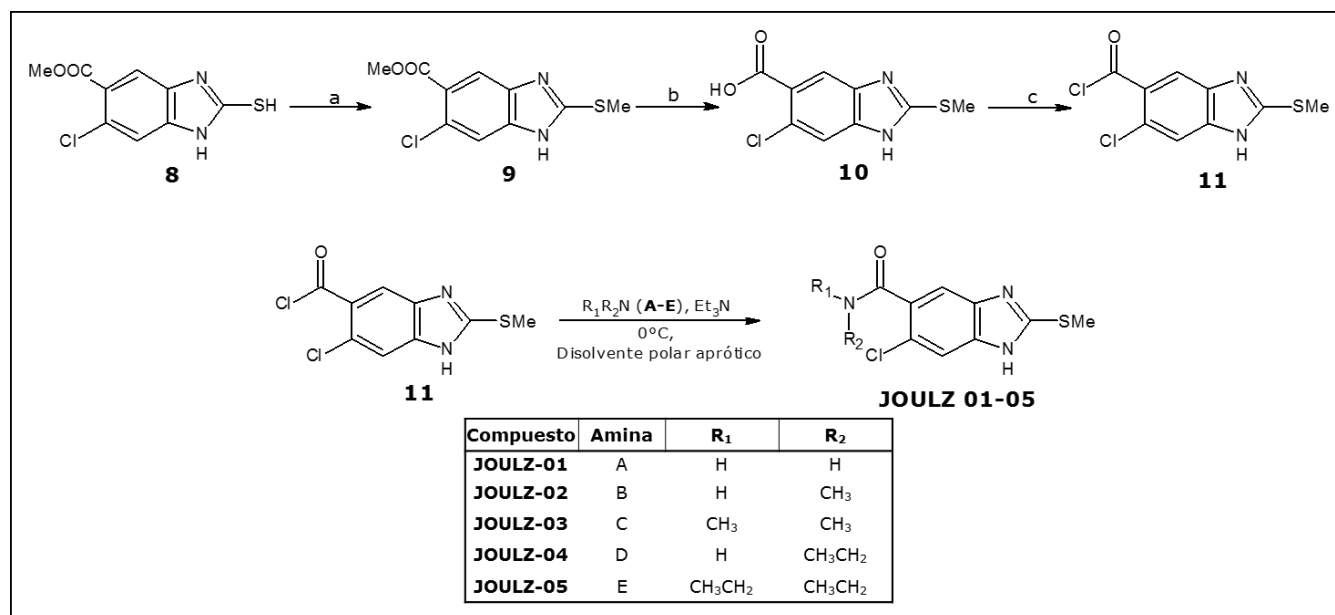
Esquema 6.1. Ruta sintética para la obtención del intermediario 8.

Reactivos y condiciones de reacción: (a) $(\text{Me})_2\text{SO}_4$, NaHCO_3 , DMF, 60 °C; (b) H_2 , Ni-Raney, MeOH, T.a; (c) Ac_2O , AcOH, T.a; (d) HNO_3 , H_2SO_4 , 0-5 °C; (e) MeOH, H_2SO_4 , 65 °C; (f) H_2 , Ni-Raney, MeOH, AcOEt, T.a; (g) CS_2 , KOH, EtOH, 50 °C.

La metilación del grupo tiol del compuesto 6-cloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8) procedió adicionando con exactitud un equivalente de yoduro de metilo para evitar metilación del nitrógeno en la posición 1 del bencimidazol, un disolvente aprótico como la acetona en presencia de KOH y temperatura de 0 °C, como resultado se aisló el compuesto 9. Enseguida se llevó a cabo la hidrólisis del éster utilizando KOH, en metanol a 65 °C, para dar origen al ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (10). El ácido

carboxílico 10 se trató con exceso de cloruro de tionilo, utilizando DMF como catalizador con el fin de generar el cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo (11), más reactivo para la formación de amida.

Las carboxamidas JOULZ 01-05 se formaron suspendiendo el compuesto 11 en un disolvente polar aprótico (THF, CH₂Cl₂ o MeCN), adicionando trietilamina como base y la correspondiente amina (A-E), bajo condiciones anhidras y manteniendo la temperatura a 0 °C. Debido a que las aminas A-D que participaron en estas reacciones son gases; éstas se produjeron a partir de la reacción entre su sal; el cloruro de alquilamonio correspondiente y NaOH. Una vez generada la amina (gas), ésta se burbujeó en el seno de la reacción para obtener los compuestos finales [Esquema 6.2].



Esquema 6.2. Síntesis de compuestos finales JOULZ 01-05 a partir del intermediario 8. Reactivos y condiciones de reacción: (a) CH₃I, KOH, Acetona, 0 °C; (b) KOH, MeOH, 65 °C; (c) SOCl₂, DMF, T.a.

6.2. Parte biológica

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 GT-15. El medio de cultivo TYI-S-33 (suplementado

con 10% de suero de bovino) se utilizó para incubar a *E. histolytica* y *T. vaginalis*, mientras que *G. intestinalis* se cultivó en el mismo medio (TYI-S-33) pero enriquecido con suero de ternera al 10%. Las cepas se mantuvieron en condiciones axénicas y se utilizaron en su fase logarítmica de crecimiento. [39]

6.2.2. Ensayo de susceptibilidad *in vitro*

El método de subcultivos se realizó como se ha descrito con anterioridad [13, 20]. Se preparó una solución stock de cada carboxamida a concentración de 10 mg/mL utilizando DMSO como cosolvente. A partir de esta disolución se realizaron diluciones para llegar a una concentración final de 0.005, 0.010, 0.050, **0.100 y 0.500 µg/mL utilizando el medio de cultivo correspondiente** para cada protozoario. Se empleó albendazol, metronidazol y nitazoxanida como compuestos de referencia. Para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de fármacos, en vez de éstos se adicionó DMSO. A cada tubo con una concentración específica de compuesto a evaluar se inocularon 6×10^3 trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, en el caso de *G. intestinalis* se inocularon 5×10^4 trofozoítos. Los tubos se incubaron durante 48 h a 37 °C. Al cabo de este periodo se tomaron **50 µL de cada tubo, se adicionaron a 950 µL de medio fresco y se incubó a las mismas condiciones.**

Se contó el número de protozoarios utilizando una cámara de Neubauer (hemocitómetro) y se determinó el porcentaje de inhibición de trofozoítos comparado con los tubos control. Se calculó el valor de la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) utilizando un análisis estadístico Probit. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos tres veces.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

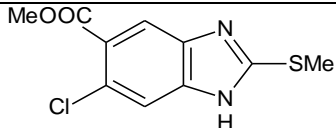
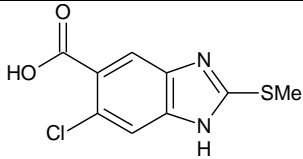
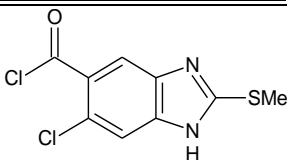
Esta sección se divide en parte química y parte biológica para conceptualizar de manera concreta los resultados y poderlos analizar con facilidad. En la sección química se abordan los resultados de la parte sintética y la caracterización de los compuestos mediante espectroscopía de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , RMN en dos dimensiones (COSY, NOESY, HMBC, HSQC), además espectrometría de masas (EM) de baja y alta resolución. Por otro lado, la sección biológica contiene los resultados y el análisis de actividad antiprotozoaria, donde se pone en manifiesto la sensibilidad de los parásitos a las nuevas carboxamidas (JOULZ 01-05). Cabe destacar que con base en este análisis se estableció una relación estructura-actividad (SAR), la cual se discute en la *Sección 8*.

7.1. Parte química

7.1.1. Síntesis y purificación

Los resultados obtenidos de la síntesis química se resumen en las *Tablas 7.1* y *7.2*.

Tabla 7.1. Purificación, propiedades fisicoquímicas y rendimiento de los intermediarios 9-11

COMPUESTO	Aislamiento	Rend. (%)	Rf.	P.f [°C]
 <u>6-Cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (9)</u>	Precipitación.	90	0.65 Sist.I	(140.0-141.0)
 <u>Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico (10)</u>	1) Precipitación fraccionada. 2) Recristalización en etanol.	85	0.13 Sist.III	(221.1-221.9)
 <u>Cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carbonilo (11)</u>	Eliminación del exceso de SOCl_2 por destilación de arrastre con tolueno. Lavados con Hexano.	97	0.78 Sist.II	ND

Como ya se mencionó, la síntesis de las carboxamidas comenzó a partir del compuesto 8, el cual se *S*-metiló utilizando yoduro de metilo como agente alquilante para obtener al compuesto 9. La reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) procedió sin complicación y el producto se aisló sin dificultad (90% rendimiento, ver *Tabla 7.1*). El uso de un disolvente aprótico favoreció la reacción, como es típico en las sustituciones nucleofílicas bimoleculares [40].

La hidrólisis del éster (9) para generar el ácido carboxílico (10) se llevó a cabo en condiciones básicas de manera irreversible, con buen rendimiento. Cabe destacar que para aislar el producto por precipitación, el pH se ajustó entre 3 y 4 para que la molécula neutra [*Figura 7.1. (10a)*] estuviese en mayor proporción (pH 3.4, 33.67% de máxima abundancia), es decir, debido a que se tiene una molécula anfótera hay que evitar que la molécula quede cargada [*Figura 7.1. (10b-10e)*] y permanezca en disolución acuosa. Como resultado de lo anterior, el equilibrio ácido-base es muy dinámico y dificultó la extracción en un solo paso, por lo que el producto se aisló mediante precipitación fraccionada; aprovechando que al disminuir la concentración del compuesto 10a [*Figura 7.1*] al retirarlo por filtración, el equilibrio se desplaza hacia la formación del compuesto neutro y se puede continuar extrayendo en etapas sucesivas.

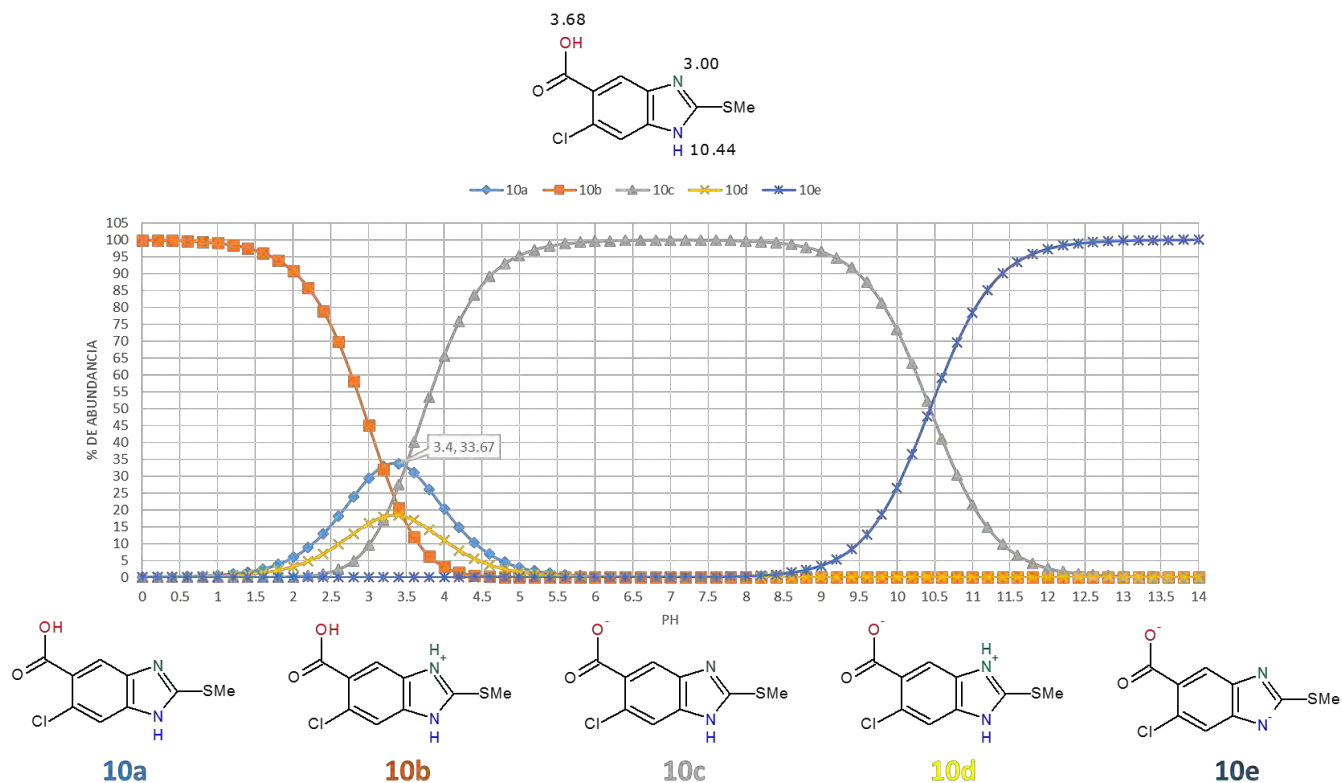


Figura 7.1. Diagrama de distribución de especies teórico para el ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxílico. Obtenido con el software MarvinSketch versión 16.2.29. En la parte superior se observa el compuesto 10 con el valor de sus tres pKa.

La reacción de activación del ácido carboxílico (10) se realizó *in situ* previo a la condensación con las aminas para evitar su descomposición. Se utilizó exceso de cloruro de tionilo para generar el cloruro de acilo (11) en presencia de DMF como catalizador, ya que acelera la velocidad de la reacción mediante la formación de un intermediario más reactivo [Figura 7.2.] y por la participación como disolvente, favoreciendo la interacción a nivel molecular [37].

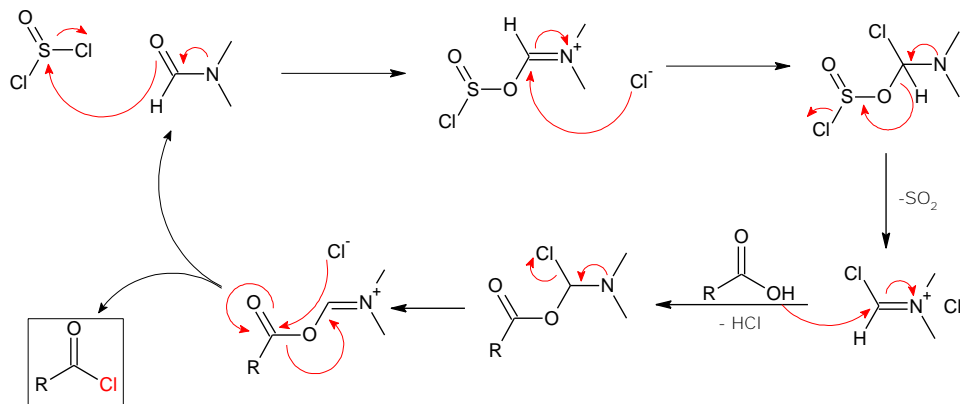
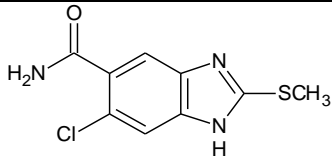
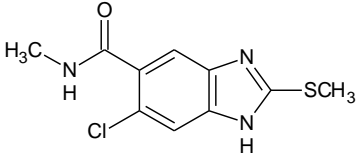
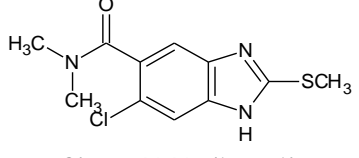
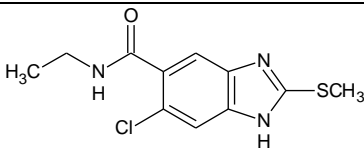
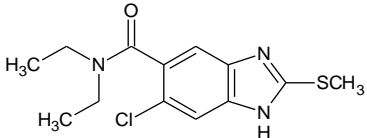


Figura 7.2. Mecanismo de reacción de la activación de ácido carboxílico con DMF como catalizador.

Finalmente se obtuvieron buenos rendimientos (97%) ya que, como se sabe retirar el exceso de cloruro de tionilo y mantener condiciones anhidras son variables críticas para aislar el cloruro de acilo como un sólido manejable, relativamente estable al aire cuando no se encuentra en disolución. Además, si no se elimina completamente el cloruro de tionilo, éste al ser una especie muy reactiva, provoca la formación de subproductos al momento de realizar la sustitución nucleofílica al acilo, los cuales, no se aislaron ni caracterizaron, pero se pudieron observar en CCF y que probablemente dificultaron la purificación de la serie de compuestos JOULZ.

Tabla 7.2. Condiciones de reacción, purificación, propiedades fisicoquímicas y rendimiento de las carboxamidas JOULZ

COMPUESTO	DISOLVENTE DE REACCIÓN	PURIFICACIÓN	P.f (°C) /Rf. (Sist.II)	Rend. parcial/global
 <u>6-Cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> (JOULZ-01)	MeCN	Cromatografía en columna. F.E: alúmina neutra. F.M: EtOH:MeOH (1:1).	(238.8-240.4) /0.15	21% / 16%
 <u>6-Cloro-N-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> (JOULZ-02)	CH ₂ Cl ₂	1) Tratamiento con carbón activado. 2) Recristalización en agua.	(128.8-130.0) /0.44	32% / 28%
 <u>6-Cloro-N,N-dimetil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> (JOULZ-03)	MeCN	Cromatografía en columna. F.E: alúmina neutra. F.M: CHCl ₃ :MeOH (6:4).	(88.5-90.1) /0.55	68% / 51%
 <u>6-Cloro-N-etil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> (JOULZ-04)	THF	1) Cromatografía en columna. F.E: alúmina neutra. F.M: CHCl ₃ :MeOH (4:1). 2) Recristalización en agua.	(194.4-195.8) /0.52	16% / 12%

 <p><u>6-Cloro-N,N-diethyl-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> (JOULZ-05)</p>	THF	Cromatografía en columna. F.E: alúmina neutra. F.M: CHCl ₃ : MeOH (4: 1).	(138.7-139.3) /0.49	25% / 19%
---	-----	--	---------------------	-----------

Las reacciones de acoplamiento del cloruro de acilo (11) con la amina correspondiente (A-E) para generar las carboxamidas (JOULZ 01-05) fueron de pobres a moderados. Éstas se llevaron a cabo en tres diferentes disolventes polares apróticos, no se logró identificar alguna diferencia significativa atribuible al disolvente utilizado; sin embargo, se observó que el acetonitrilo, seguido del diclorometano tuvieron los mejores rendimientos. A pesar de esto, como ya se mencionó, una de las variables críticas para obtener mejores resultados radica en pureza del cloruro de acilo (11) y en segundo lugar el método de purificación de la amida.

El método de elección para la purificación de las carboxamidas fue la cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria alúmina neutra, con varias fases móviles de distinta composición y proporción, de acuerdo a cada carboxamida. No sin antes haber realizado la extracción de las sales de alquilamonio correspondientes.

Se puede apreciar en la *Tabla 7.2* que el compuesto JOULZ-03 tuvo el mayor rendimiento (65%). Para los demás compuestos, los bajos rendimientos de la reacción de sustitución sugieren que la hidrólisis del cloruro de ácido merma la obtención de carboxamidas. Además, como el tipo de interacciones entre el grupo ácido carboxílico del compuesto 10 con la alúmina [*Figura 7.3*], son similares a las que se establecen con la amida (enlace de hidrógeno y enlace de coordinación), una parte del compuesto deseado también se queda atrapada en la columna; por lo que la polaridad de la fase móvil juega un papel importante para evitarlo.

Como perspectivas, para realizar un escalamiento se recomienda evitar estrictamente el contacto de 11 con la humedad cuando éste ya se encuentra en la mezcla de reacción. Por ejemplo montar sistemas cerrados; más estrictos aunque más riesgosos por el hecho de que los reactivos son gases y se manejan

altas presiones. Esperando así, que la cantidad de producto de hidrólisis (10) será poca y evitaría el uso de la cromatografía en columna como técnica de purificación. Por ejemplo; JOULZ-02 se purificó por tratamiento con carbón activado y posterior recristalización obteniéndose rendimiento moderado (32%); sin embargo no supera el rendimiento de JOULZ-03, esto puede explicarse porque todo método de purificación tiene consecuencias negativas en el rendimiento; siendo así, el uso de dos técnicas consecutivas (tratamiento con carbón activado y recristalización) lo que provocó menor rendimiento.

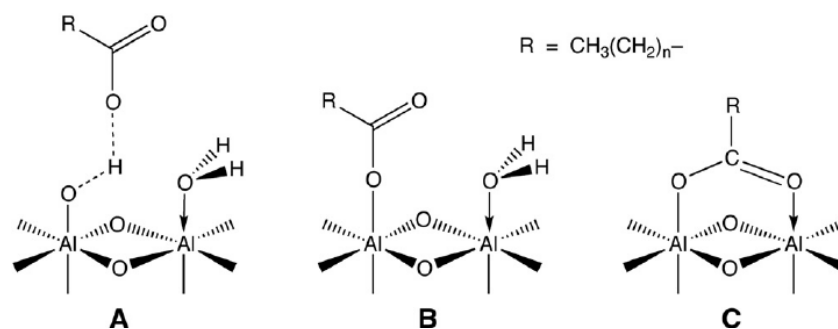


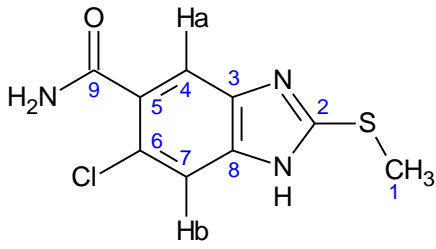
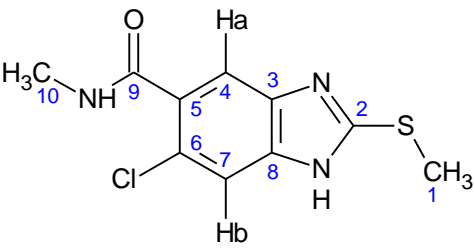
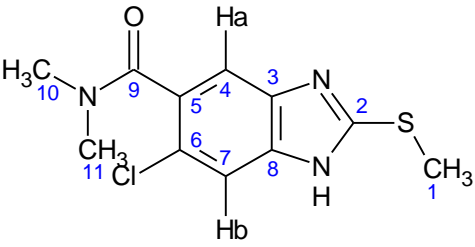
Figura 7.3. Tipos de Interacciones de un ácido carboxílico con alúmina.

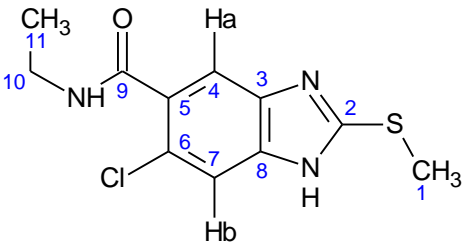
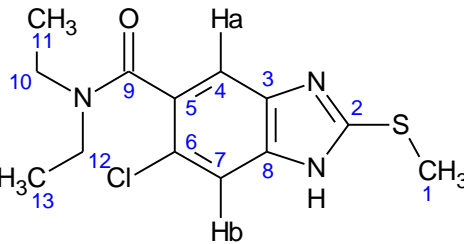
(A) Tipo enlace de hidrógeno. (B) Enlace covalente tipo éster. (C) Enlace de coordinación bidentado.[41]

7.1.2. Caracterización espectroscópica y espectrométrica

La caracterización espectroscópica se realizó vía espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) por el método de reflectancia ATR y mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) y adicionalmente se recurrió a experimentos en dos dimensiones (2D) para realizar una asignación más adecuada de las señales. La caracterización de los compuestos se completó con espectrometría de masas de baja y alta resolución, mediante la técnica de ionización por Análisis Directo en Tiempo Real (DART). La *Tabla 7.3* resume la caracterización espectroscópica y espectrométrica de la serie de carboxamidas JOULZ 01-05.

Tabla 7.3. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la serie JOULZ

COMPUESTO	CARACTERIZACIÓN
 <p style="text-align: center;">JOULZ-01 <u>6-Cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> Masa monoisotópica calculada: 241.01549</p>	<p>Espectro 1. FT-IR [cm^{-1}]: 3490 y 3368 (CON-H); 3091 y 3050 (C-H. Ar.); 2940 (C-H. Alif.); 1644 (C=O); 1585 y 1468 (C=C, C=N).</p> <p>Espectro 2. EM/DART [m/z]: 242 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).</p> <p>Espectro 3. RMN ^1H (400 MHz), <i>dms</i>o-d^6, [ppm]: 2.70 (s, 3H, SCH₃); 7.47 (s, 1H, CONH₂- D₂O); 7.49 (s, 1H, Ha-Ar); 7.51 (s, 1H, Hb-Ar); 7.78 (s, 1H, CONH₂- D₂O); 12.83 (s, 1H, NH-benzimidazol-D₂O).</p> <p>Espectro 4. RMN ^{13}C (100 MHz), <i>dms</i>o-d^6 [ppm]: 13.8 (C-1); 122.9 (C-5); 130.1 (C-6); 154.4 (C-2); 168.7 (C-9).</p> <p>Espectro 5. EMAR/DART [m/z] para $[\text{C}_9\text{H}_8\text{ClN}_3\text{OS}+\text{H}]^+$ (Error ppm): 242.01566 (0.70).</p>
 <p style="text-align: center;">JOULZ-02 <u>6-Cloro-N-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> Masa monoisotópica calculada: 255.02331</p>	<p>Espectro 6. FT-IR [cm^{-1}]: 3241 (CON-H); 3096 y 3046 (C-H. Ar.); 2931 y 2854 (C-H. Alif.); 1623 (C=O); 1559, 1498 y 1449 (C=C, C=N).</p> <p>Espectro 7. EM/DART [m/z]: 256 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).</p> <p>Espectro 8. RMN ^1H (400 MHz), <i>dms</i>o-d^6, [ppm]: 2.70 (s, 3H, SCH₃); 2.76 (d. $J=4.6$ Hz, 3H, NCH₃); 7.44 (s, 1H, Ha-Ar); 7.52 (s, 1H, Hb-Ar); 8.25 (c. $J=4.6$ Hz, 1H, CONH-D₂O); 12.79 (s, 1H, NH-benzimidazol-D₂O).</p> <p>Espectro 9. RMN ^{13}C (100 MHz), <i>dms</i>o-d^6, [ppm]: 13.8 (C-1); 26.2 (C-10); 113.1 (C-4); 114.6 (C-7); 123.0 (C-5); 130.3 (C-6); 141.9 (C-3); 154.5 (C-2); 167.3 (C-9).</p> <p>Espectro 10. EMAR/DART [m/z] para $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{OS}+\text{H}]^+$ (Error ppm): 256.03086 (1.09).</p>
 <p style="text-align: center;">JOULZ-03 <u>6-Cloro-N,N-dimetil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u> Masa monoisotópica calculada: 269.03896</p>	<p>Espectro 11 FT-IR [cm^{-1}]: 3096 y 3038 (C-H. Ar.); 2929 y 2852 (C-H. Alif.); 1611 (C=O); 1510 y 1446 (C=C, C=N).</p> <p>Espectro 12 EM/DART [m/z]: 270 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).</p> <p>Espectro 13. RMN ^1H (400 MHz), <i>dms</i>o-d^6, [ppm]: 2.70 (s, 3H, SCH₃); 2.75 (s, 3H, NCH₃); 3.01 (s, 3H, NCH₃); 7.36 (s, 1H, Ha-Ar); 7.54 (s, 1H, Hb-Ar); 12.69 (s, 1H, NH-benzimidazol-D₂O).</p> <p>Espectro 14. RMN ^{13}C (100 MHz), <i>dms</i>o-d^6, [ppm]: 13.8 (C-1); 34.1 y 37.7 (C-10,11); 112.2 (C-4); 114.3 (C-7); 122.1 (C-5); 129.5 (C-6); 154.4 (C-2); 167.6 (C-9).</p> <p>Espectro 15. EMAR/DART [m/z] para $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{OS}+\text{H}]^+$ (Error ppm): 270.04657 (0.81).</p>

 <p style="text-align: center;">JOULZ-04</p> <p style="text-align: center;"><u>6-Cloro-N-etil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u></p> <p style="text-align: center;">Masa monoisotópica calculada: 269.03896</p>	<p>Espectro 16. FT-IR [cm⁻¹]: 3223 (CON-H); 3073 y 3042 (C-H. Ar.); 2967, 2929 y 2851 (C-H. Alif.); 1624 (C=O); 1487 y 1559 (C=C, C=N).</p> <p>Espectro 17. EM/DART [m/z]: 270 ([M+H]⁺, 100%).</p> <p>Espectro 18. RMN ¹H (400 MHz), <i>dmsO-d⁶</i>, [ppm]: 1.12 (t. <i>J</i>= 7.2 Hz, 3H, CH₃-CH₂N); 2.70 (s, 3H, SCH₃); 3.27 (m, 2H, NCH₂-CH₃); 7.42 (s, 1H, Ha-Ar); 7.52 (s, 1H, Hb-Ar); 8.30 (t. <i>J</i>=5.2 Hz, 1H, CONH-D₂O); 12.82 (s, 1H, NH-benzimidazol-D₂O).</p> <p>Espectro 19. RMN ¹³C (100 MHz), <i>dmsO-d⁶</i>, [ppm]: 13.7 (C-1); 14.6 (C-11); 34.0 (C-10); 110.1 (C-4); 116.8 (C-7); 122.9 (C-5); 130.4 (C-6); 154.9 (C-2); 166.5 (C-9).</p> <p>Espectro 20. EMAR/DART [m/z] para [C₁₁H₁₂ClN₃OS+H]⁺ (Error ppm): 270.04621 (2.12).</p>
 <p style="text-align: center;">JOULZ-05</p> <p style="text-align: center;"><u>6-Cloro-N,N-dietil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</u></p> <p style="text-align: center;">Masa monoisotópica calculada: 297.07026</p>	<p>Espectro 21. FT-IR [cm⁻¹]: 3086 y 3032 (C-H. Ar.); 2960, 2928 y 2849 (C-H. Alif.); 1794, 1730 y 1690 (Sobretonos Ar.); 1586 (C=O); 1577 y 1482 (C=C, C=N).</p> <p>Espectro 22. EM/DART [m/z]: 298 ([M+H]⁺, 100%).</p> <p>Espectro 23. RMN ¹H (400 MHz), <i>dmsO-d⁶</i>, [ppm]: 0.97 (t. <i>J</i>= 7.1 Hz, 3H, CH₃CH₂N); 1.16 (t. <i>J</i>= 7.1 Hz, 3H, CH₃CH₂N); 2.70 (s, 3H, SCH₃); 3.01 (m, 1H, NCH_{2a}CH₃); 3.11 (m, 1H, NCH_{2a}CH₃); 3.30 (m, 1H, NCH_{2b}CH₃); 3.64 (m, 1H, NCH_{2b}CH₃); 7.36 (s, 1H, Ha-Ar); 7.55 (s, 1H, Hb-Ar); 12.85 (s, 1H, NH-benzimidazol-D₂O).</p> <p>Espectro 24. RMN ¹³C (100 MHz), <i>dmsO-d⁶</i>, [ppm]: 12.6 (C-11); 13.8 (Integra 2C; C-1 y C-13); 38.4 y 42.3 (C-10, C-12); 112.0 (C-4); 114.3 (C-7); 122.0 (C-5); 129.7 (C-6); 138.0 (C-8); 140.1 (C-3); 154.4 (C-2); 167.0 (C-9).</p> <p>Espectro 25. EMAR/DART [m/z] para [C₁₃H₁₆ClN₃OS+H]⁺ (Error ppm): 298.07863 (1.82).</p>
<p>NOTA: la numeración de los carbonos se asignó de manera arbitraria y no corresponde con la de la nomenclatura.</p>	<p>NOTA: la connotación "-D₂O" indica que la señal desaparece por intercambio con agua deuterada.</p>

7.1.2.1. Espectroscopía de FT-IR

En lo que respecta a la caracterización por infrarrojo [Tabla 7.3] destaca la confirmación del grupo amida debido a la presencia de la banda de estiramiento del grupo carbonilo (C=O) alrededor de 1600 cm⁻¹ en todos los espectros; junto con: para el caso de la amida primaria (JOULZ-01) dos bandas de estiramiento N-H alrededor de 3200 cm⁻¹ y solo una banda para las amidas secundarias (JOULZ-02 y JOULZ-04), no así para las amidas terciarias (JOULZ-03 y JOULZ-05) donde desaparece la banda de torsión por ausencia del hidrógeno de la amida. En adición, las dos bandas de estiramiento C-H en ≈ 3090 y 3050 cm⁻¹, junto con la presencia

de al menos dos bandas entre $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ confirma el sistema aromático del bencimidazol presente en las carboxamidas ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$). Por último, las bandas entre $2900-2800\text{ cm}^{-1}$ son características de la vibración por estiramiento C-H de los carbonos alifáticos sustituyentes de las amidas o del metilto.

7.1.2.2. Espectroscopía de RMN

En la caracterización con RMN se recurrió en gran medida a los experimentos en dos dimensiones (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) para asignar el desplazamiento químico de los hidrógenos y carbonos presentes en las moléculas JOULZ 01-05 [Tabla 7.3]. Enseguida se presentan los hallazgos que permitieron inferir de manera inequívoca el desplazamiento químico de las señales. Cabe destacar que el hidrógeno del NH del bencimidazol fue difícil de detectar debido al intercambio que sufre constantemente para dar origen al tautómero, observándose como una señal ancha y de poca intensidad en los espectros de ^1H . En los espectros de ^{13}C , algunos de los carbonos aromáticos aparecen en el espectro de carbono unidimensional; los que no, se detectaron de manera indirecta (por su acoplamiento con ^1H) en los estudios bidimensionales. Los carbonos aromáticos cabeza de puente del bencimidazol solo se pudieron identificar indirectamente en las amidas JOULZ 02 y 05.

7.1.2.2.1. JOULZ-01

Este compuesto posee dos hidrógenos unidos al nitrógeno del grupo amida que se diferenciaron magnéticamente, por tanto mostraron desplazamiento químico diferente en el espectro de RMN ^1H . Este fenómeno se observó debido a la resonancia que presenta el grupo amida [Figura 2.11], generando un doble enlace rígido imposible de rotar y genera un ambiente químico diferente (anisotrópico) para cada hidrógeno. Lo anterior se evidenció cuando uno de los hidrógenos presentó un desplazamiento de 7.78 ppm y otro con desplazamiento similar a los H-Ar, dando como resultado que las señales se traslaparan generando una señal múltiple entre 7.47 y 7.49 con integración de 3H [Espectro 3], dificultando distinguir qué desplazamiento correspondía a cada cual. El espectro de intercambio con D_2O [Espectro 3.1] permitió observar claramente los H-Ar. En el espectro

COSY [Figura 7.4] se identificó la correlación entre los hidrógenos de 7.78 y 7.47 ppm que corresponden a los hidrógenos de la amida.

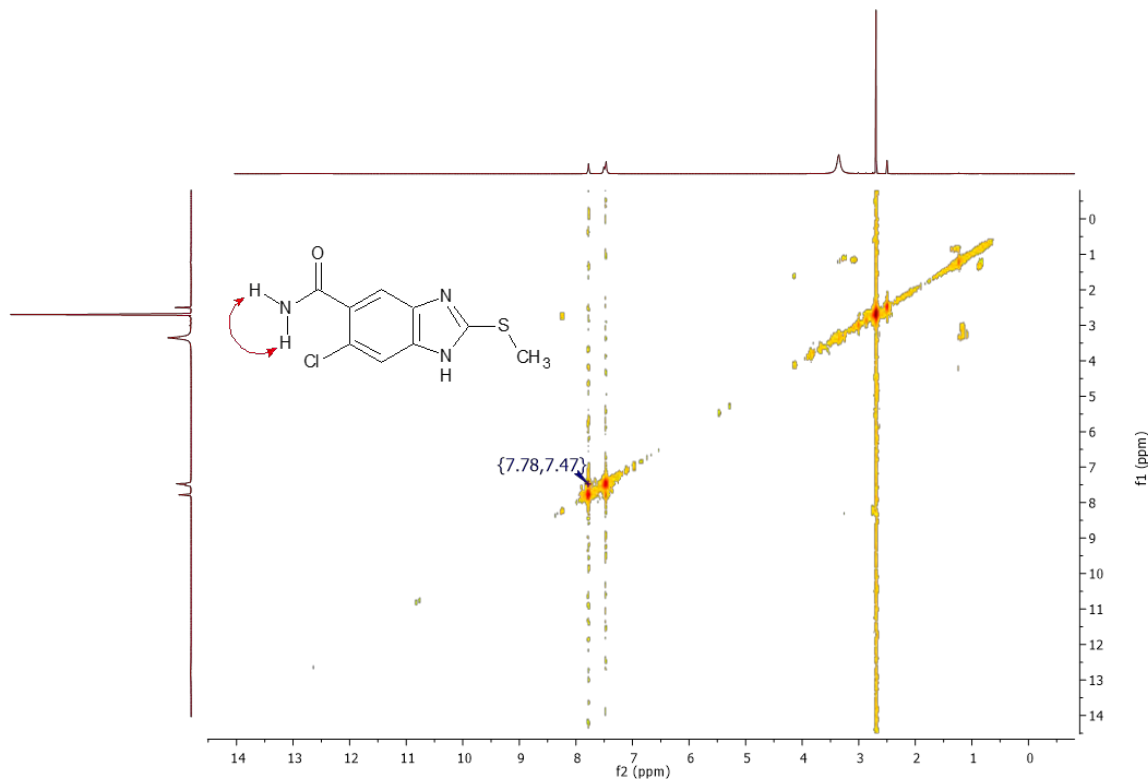


Figura 7.4. Espectro COSY para el compuesto JOULZ-01.

Una vez resuelto esto, restaba conocer qué desplazamiento correspondía al hidrógeno aromático de la posición 4 y 7 del benzimidazol. Esto se resolvió con el espectro de HMBC que evidencia acoplamiento heteronuclear a 2 y 3 enlaces de distancia. Se observó correlación entre el carbono con desplazamiento de 168.7 ppm y el hidrógeno de 7.49 ppm; conociendo que los carbonos de un grupo carbonilo se detectan alrededor de 160-220 ppm, se infirió que ese hidrógeno era el de la posición 4 del benzimidazol [Figura 7.5]. En adición en el espectro se observa cómo los hidrógenos de la amida también correlacionan con el carbonilo.

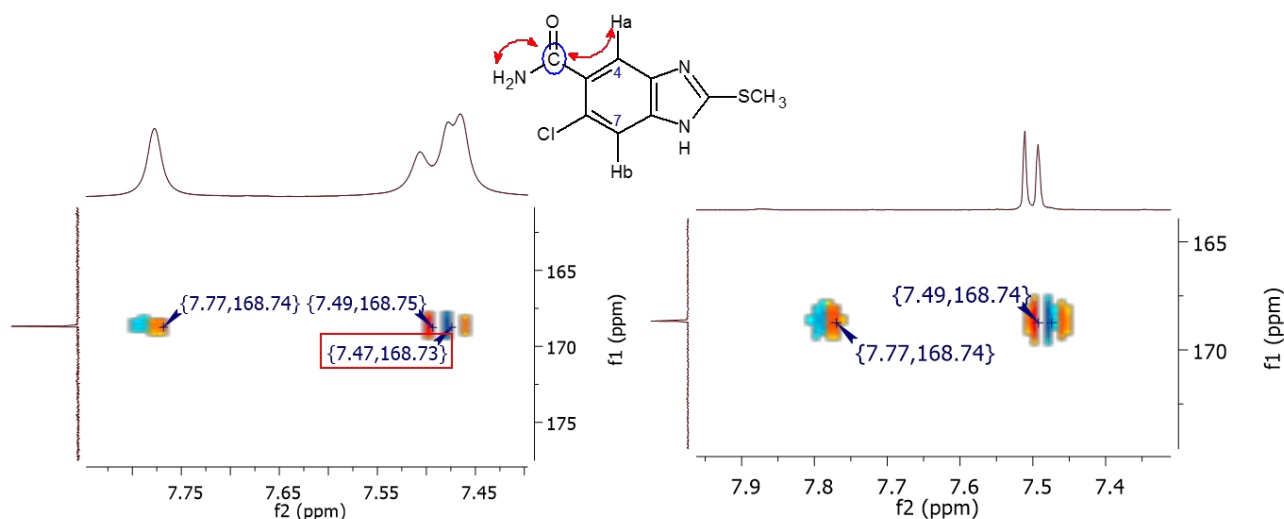


Figura 7.5. Espectro HMBC para el compuesto JOULZ-01. En el recuadro rojo se observa la correlación entre el hidrógeno de la posición 4 y el carbonilo. Del lado derecho se muestra la correlación de ^{13}C con el espectro de D_2O donde se puede apreciar más claramente la correlación con el hidrógeno de la posición 4 (7.49) con el carbonilo (168.7).

7.1.2.2.2. JOULZ-02

En el espectro de RMN ^1H esta carboxamida destaca el acoplamiento entre el hidrógeno de la amida y el metilo, dando como resultado una señal cuádruple en 8.25 ppm que integra para 1H del NHCH_3 ; una señal doble en 2.76 ppm que integra para 3H del NHCH_3 , ambos con una $J = 4.6$ Hz [Espectro 8].

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C [Espectro 9] se observaron dos señales que por su desplazamiento corresponden a carbonos saturados, en este caso a los metilos presentes en la molécula ($-\text{SCH}_3$ y $-\text{NHCH}_3$). Para determinar correctamente a qué carbono corresponden éstas señales se recurrió al espectro HSQC, el cual da información acerca de la correlación heteronuclear a 1 enlace de distancia; es decir el acoplamiento de los hidrógenos con el carbono al cual están unidos. Como se puede observar en la *Figura 7.6* el carbono a 13.8 ppm correlaciona con la señal simple que integra para 3H en 2.70 ppm, concluyendo que se trata del metilo unido al azufre ($-\text{SCH}_3$). Consecuentemente el carbono a 26.2 ppm correlaciona con la señal doble que se encuentra en 2.76 ppm, por lo que se trata del metilo que sustituye a la amida ($-\text{NHCH}_3$).

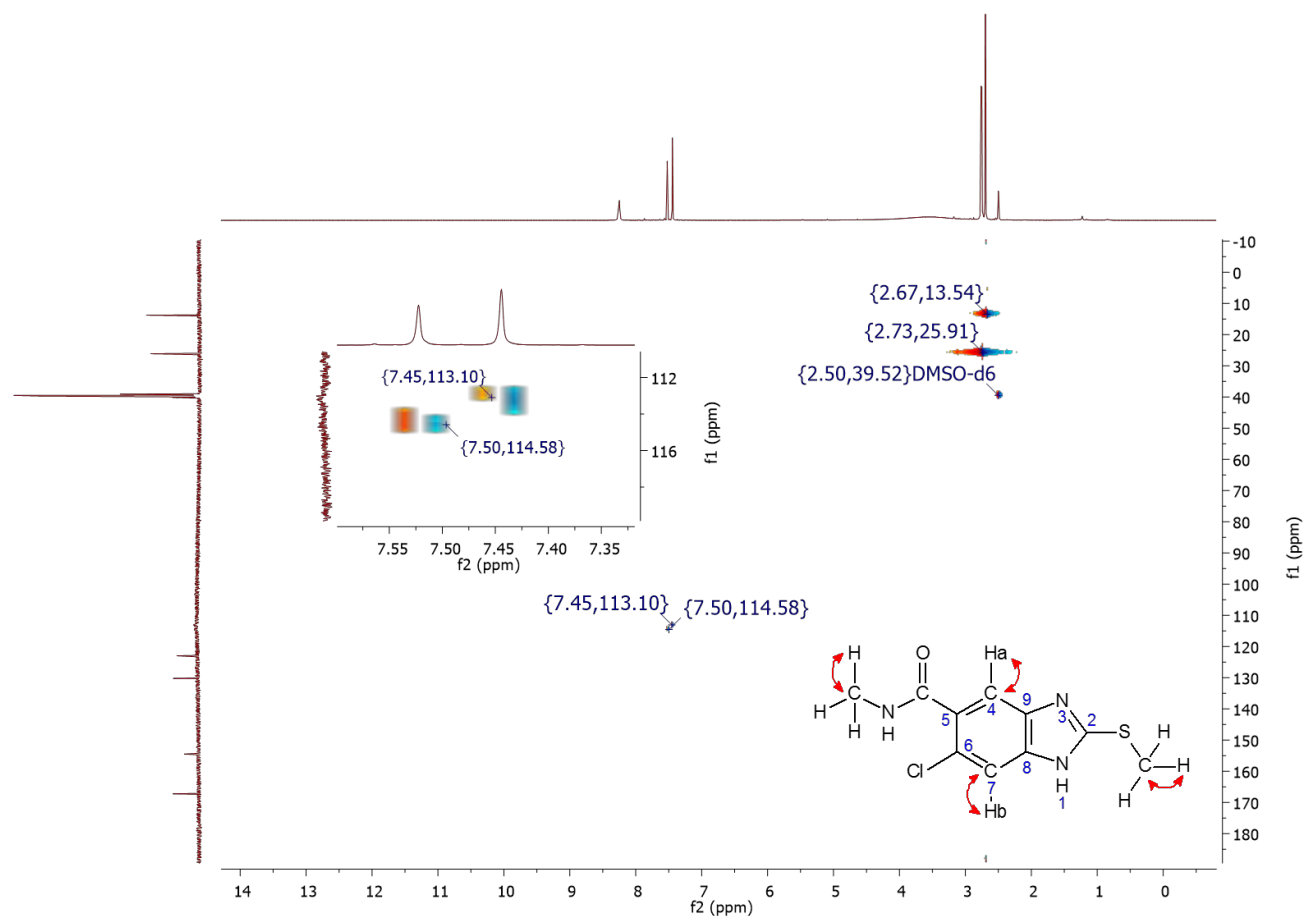


Figura 7.6. Espectro HSQC del compuesto JOULZ-02.

También en este mismo espectro bidimensional [Figura 7.6] se nota la interacción de cada protón aromático (Hx-Ar) con su carbono. De modo que, de manera indirecta permitió detectar dos carbonos cuyas señales (113.1 y 114.6 ppm) no se observaron en el espectro unidimensional. Para diferenciar la posición 4 ó 7 de estos átomos, se recurrió al espectro HMBC [Figura 7.7] donde de manera similar a la carboxamida anterior; sabiendo qué protón (Ha= 7.44 ppm) correlaciona con el carbono de 167.3 ppm (C=O) se infirió la posición de cada carbono. Resultando que la señal en 113.1 ppm corresponde a C-4 y la señal de 114.6 a C-7. En este compuesto en especial, con el espectro HMBC se identificó un carbono más de forma indirecta, se trata del carbono en 141.9 ppm el cual corresponde al carbono cabeza de puente denotado en la Figura 7.7 con el número 9.

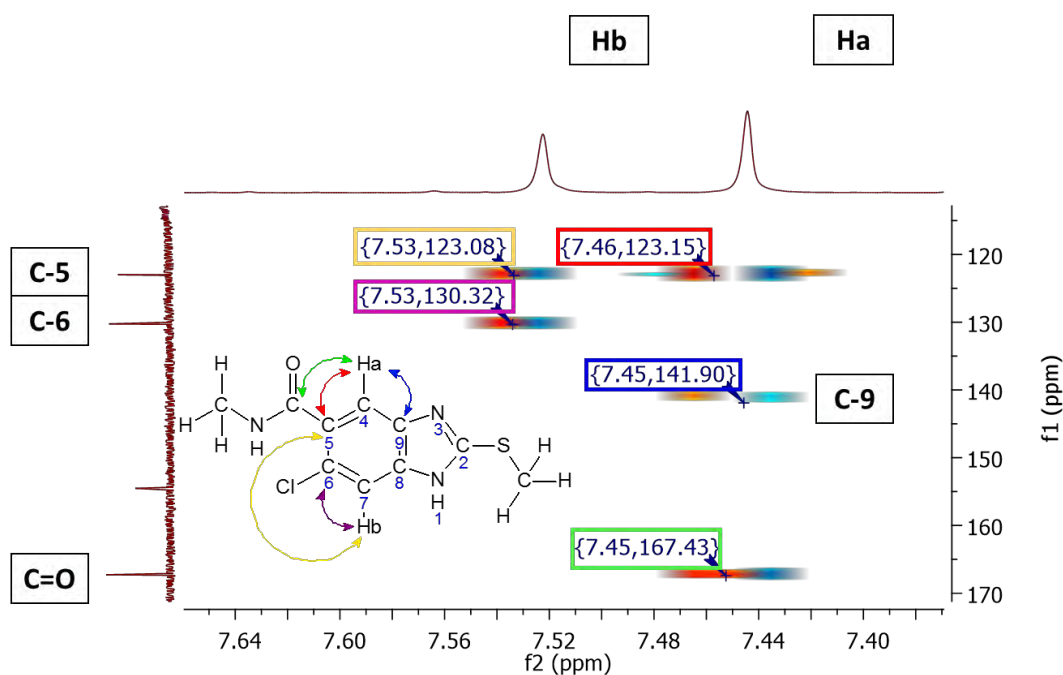


Figura 7.7. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-02. Se observa las interacciones de los Hx-Ar con los carbonos a 2 y 3 enlaces de distancia.

Otra interacción importante en el espectro HMBC del compuesto JOULZ-02, fue la correlación de la señal simple en 2.70 ppm correspondiente a los hidrógenos del metilitio con la señal del espectro de ^{13}C en 154.5 ppm. Por lo que se puede afirmar que se trata del carbono de la posición 2 del bencimidazol. Además de esto, se observó la interacción del metilo de amida con el carbonilo [Figura 7.8].

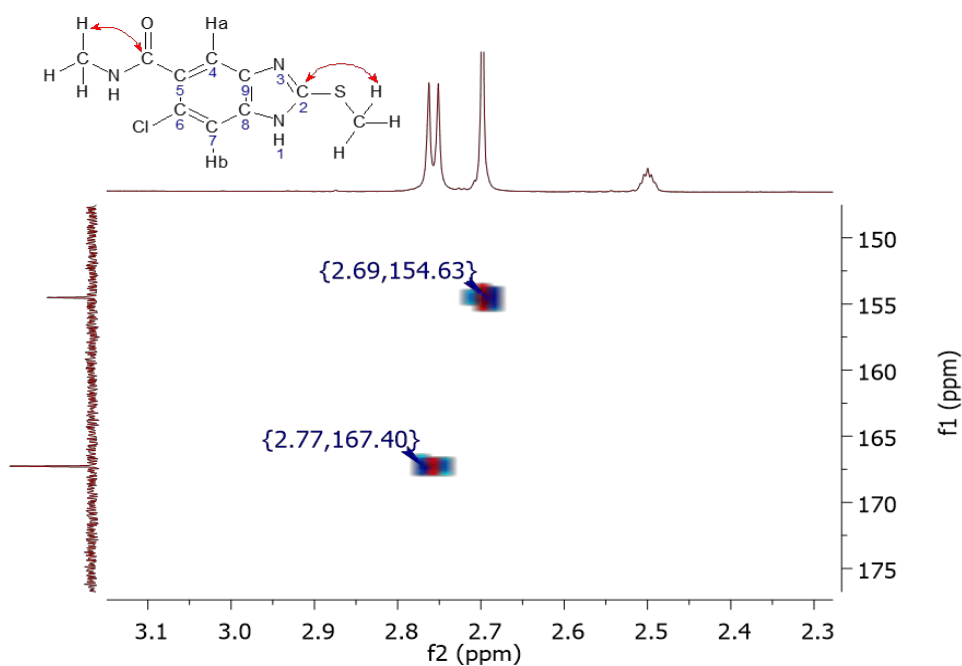


Figura 7.8. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-02.

Por último, para este compuesto se detectó un ejemplo del efecto Overhauser (NOESY), el cual muestra correlaciones homonucleares a través del acoplamiento dipolar; es decir de dos núcleos por su cercanía. Las señales correspondientes a los hidrógenos de Ha-Ar (7.44 ppm) y el NH de la amida (8.25 ppm) mostraron interacción como se muestra en la *Figura 7.9*, lo anterior se fundamenta en que los conformeros que adopta la molécula acercan los núcleos y pueden manifestar acoplamiento dipolar (el conformero $R_1NH^+ = CO \cdot R_2$ al no tener libre giro favorece la interacción). Otra interacción similar ocurre entre los hidrógenos del metilo de la amida (2.76 ppm) y el NH de la misma.

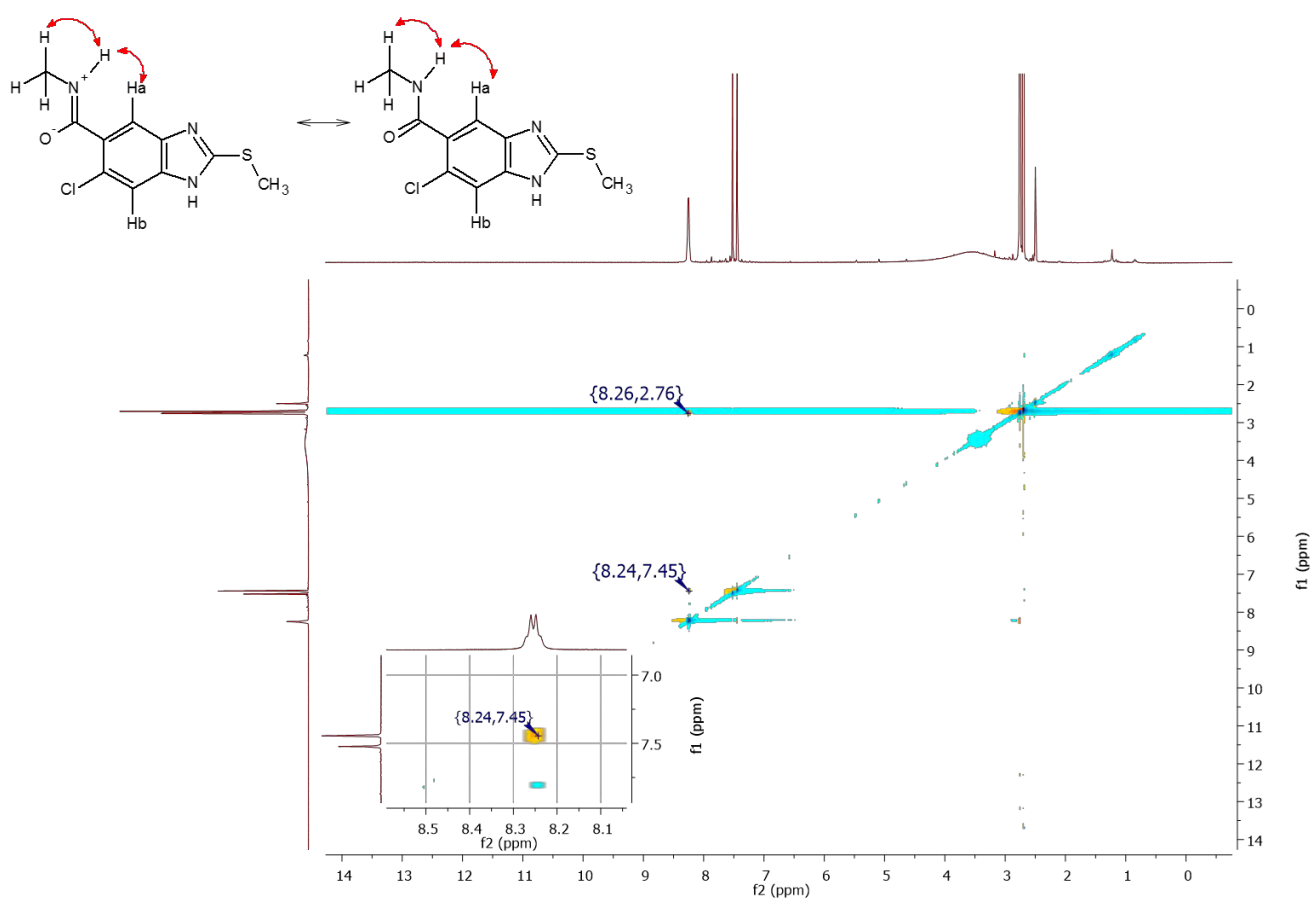


Figura 7.9. Espectro NOESY del compuesto JOULZ-02.

7.1.2.2.3. JOULZ-03

En este compuesto también se observó el efecto anisotrópico generado por la resonancia del grupo amida, provocando que cada uno de sus metilos se diferenciara magnéticamente y se observaran dos señales simples que integraron para 3H en 2.75 y 3.01 ppm [Espectro 13]. Por otro lado, se confirmó que las señales en el espectro de ^{13}C [Espectro 14] en 34.1 y 37.7 ppm corresponden a los carbonos alifáticos de la amida, por la correlación con sus hidrógenos (2.75 y 3.01 ppm) en el HSQC. En adición, en este último espectro se observó el acoplamiento de los Hx-Ar con su carbono y al igual que en $-\text{SCH}_3$. [Figura 7.10].

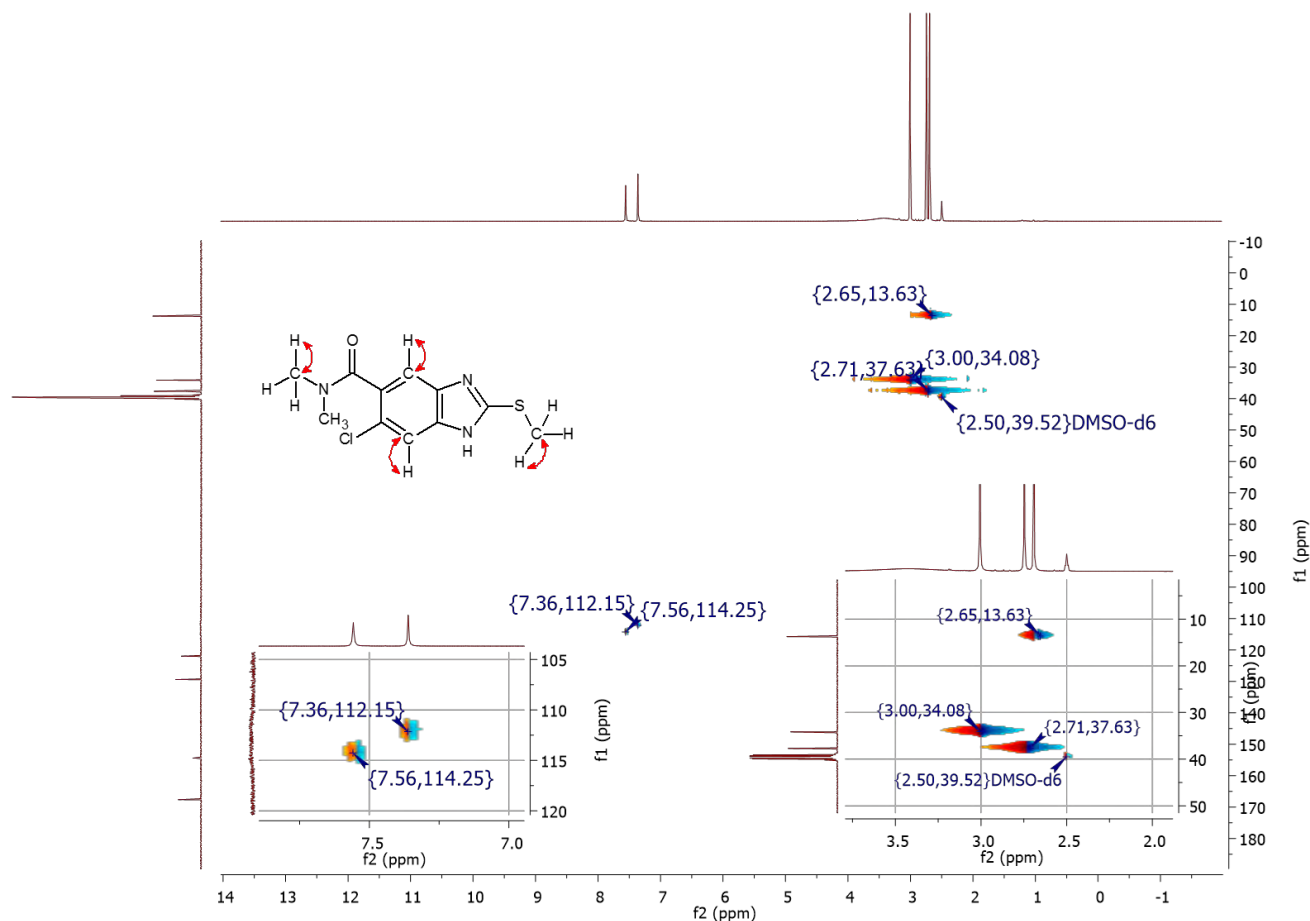


Figura 7.10. Espectro HSQC del compuesto JOULZ-03.

También, se observó el acoplamiento dipolar (NOESY) de los hidrógenos del metilo en 2.75 ppm con Ha-Ar, de manera similar a como ocurrió en JOULZ-02 la conformación limitada de giro favorece este acoplamiento en el espacio. El efecto Overhauser también se observó con los hidrógenos alifáticos de la amida y Ha-Ar [Figura 7.11].

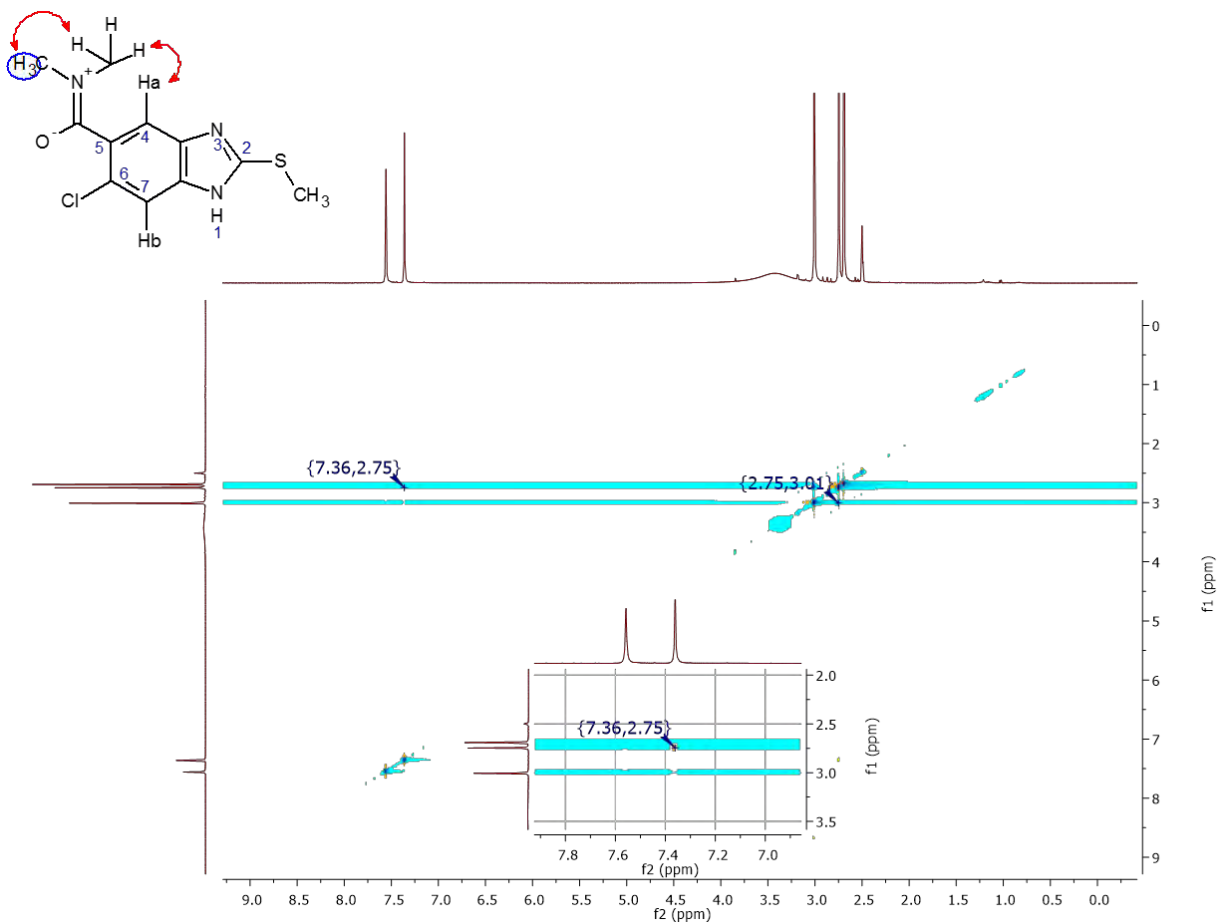


Figura 7.11. Espectro NOESY del compuesto JOULZ-03.

Del espectro heteronuclear HMBC de JOULZ-03 es importante hacer notar que Ha-Ar solo se observó el acoplamiento con el carbono que está a dos enlaces de distancia (C-5, 122.1 ppm), no así con C-6 (129.5 ppm) que se encuentra a tres enlaces. En contraste, Hb sí se acopló con ambos. Este comportamiento se logró observar en casi todos los espectros HMBC, aunque se esperase un comportamiento similar para ambos Hx-Ar. La dificultad para detectar el acoplamiento de Ha-Ar con C-6 pudiese recaer en: este tipo de experimentos detecta el acoplamiento indirecto o escalar de los espines nucleares y además, éste se transfiere a través de los enlaces [42]; para el caso de Hb, el cloro al ser un sustituyente que activa o dona densidad electrónica al anillo aromático, pudiese facilitar la transferencia del campo magnético y por ende la magnetización hacia el núcleo de C-5 [Figura 7.12]. Al contrario, para donde se encuentra Ha, el carbonilo abstrae densidad electrónica y no promueve la transferencia de magnetización.

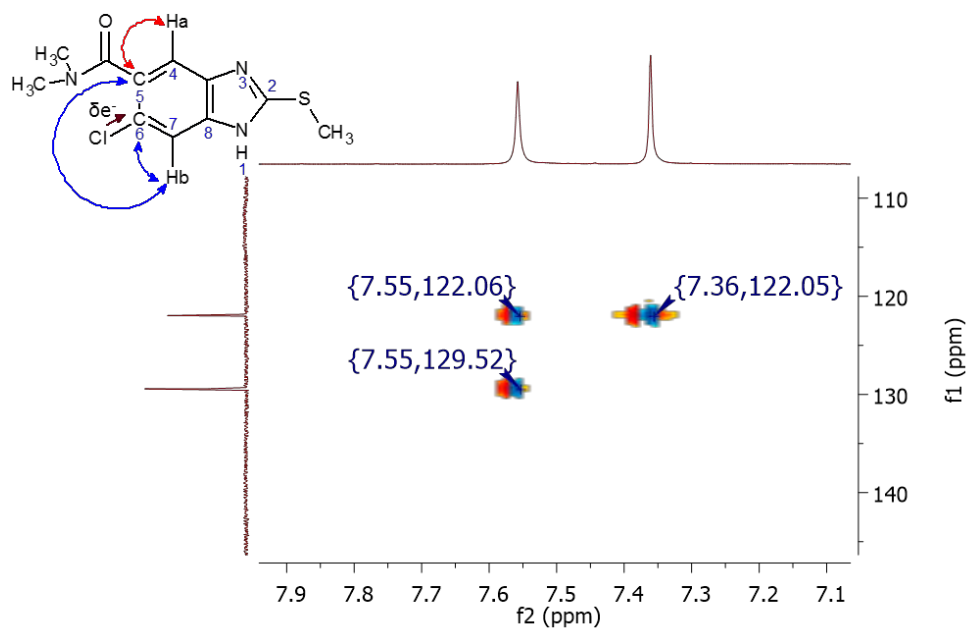


Figura 7.12. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-03. Se observa cómo la donación de densidad electrónica del cloro al anillo de benceno facilita la transferencia de la magnetización para que se observe el acoplamiento heteronuclear a 3 enlaces de distancia.

7.1.2.2.4. JOULZ-04

La carboxamida JOULZ-04 es un homólogo del compuesto JOULZ-02, por lo tanto se observaron fenómenos similares en RMN. Para el caso de los espectros de ^1H [Espectro 18], se observó una señal triple en 8.30 ppm ($J= 5.2$ Hz) que integró para 1H, correspondiente al NH de la amida. Esta multiplicidad es el resultado del acoplamiento con el metileno ($\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_3$) que sustituye al nitrógeno de la amida. Dicho acoplamiento se confirma en el espectro COSY [Figura 7.13 (A)]. El metileno antes mencionado presentó una señal múltiple en 3.27 ppm (Integración= 2H) como resultado del acoplamiento con el metilo vecino y el NH del grupo amida (confirmación con espectro de COSY). También, como se apreció en los compuestos anteriores, esta carboxamida presentó acoplamiento directo (NOESY) entre el hidrógeno de la amida con CH_3 (1.12) y Ha-Ar (7.42) [Figura 7.13 (B)].

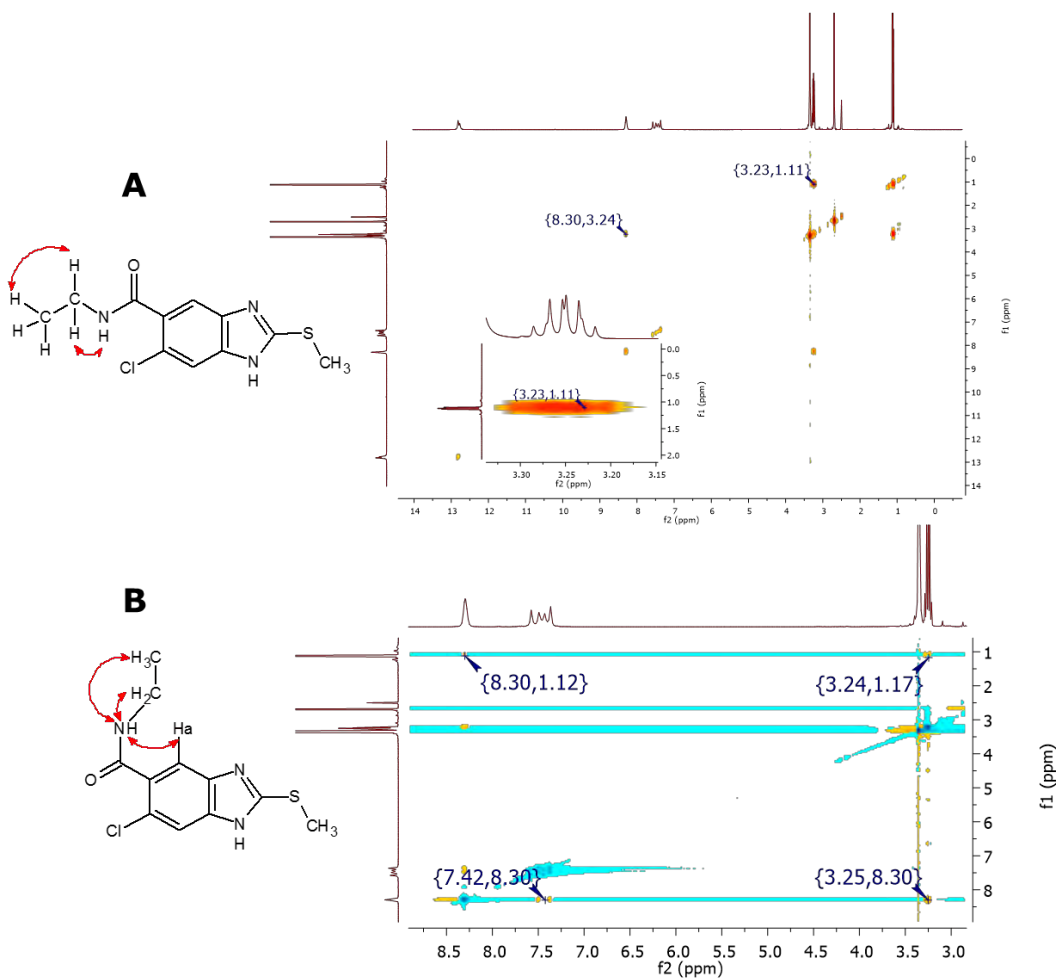


Figura 7.13. Espectro COSY (A) y NOESY (B) de JOULZ-04.

En este compuesto se detectó un fenómeno particular de los tautómeros del bencimidazol. En primera instancia, las señales de los hidrógenos aromáticos (Hx-Ar) aparecieron en el espectro como una señal doble dobleteada en 7.47 ppm que integró para 2H, aun cuando se esperaban dos señales simples. Además el hidrógeno del bencimidazol (NH) en 12.82 ppm se presentó como una señal doble. Al adicionar D₂O desapareció la señal del NH y se definieron bien las señales simples correspondientes a los Hx-Ar [Figura 7.14 (A, B)]. En conclusión, la multiplicidad que se aprecia en los Hx-Ar se debe fundamentalmente a que los hidrógenos aromáticos de cada tautómero tienen diferente desplazamiento químico, y cuando se adiciona D₂O evita que los tautómeros se diferencien magnéticamente, pudiéndose observar señales simples aunque con un ligero cambio en su desplazamiento. Por otro lado, en los espectros de ¹³C algunos carbonos aparecen como señales anchas o dobles [Figura 7.14 (C)]; este comportamiento ya había sido estudiado antes en nuestro equipo de trabajo y se debe por la tautomería intrínseca del bencimidazol [43].

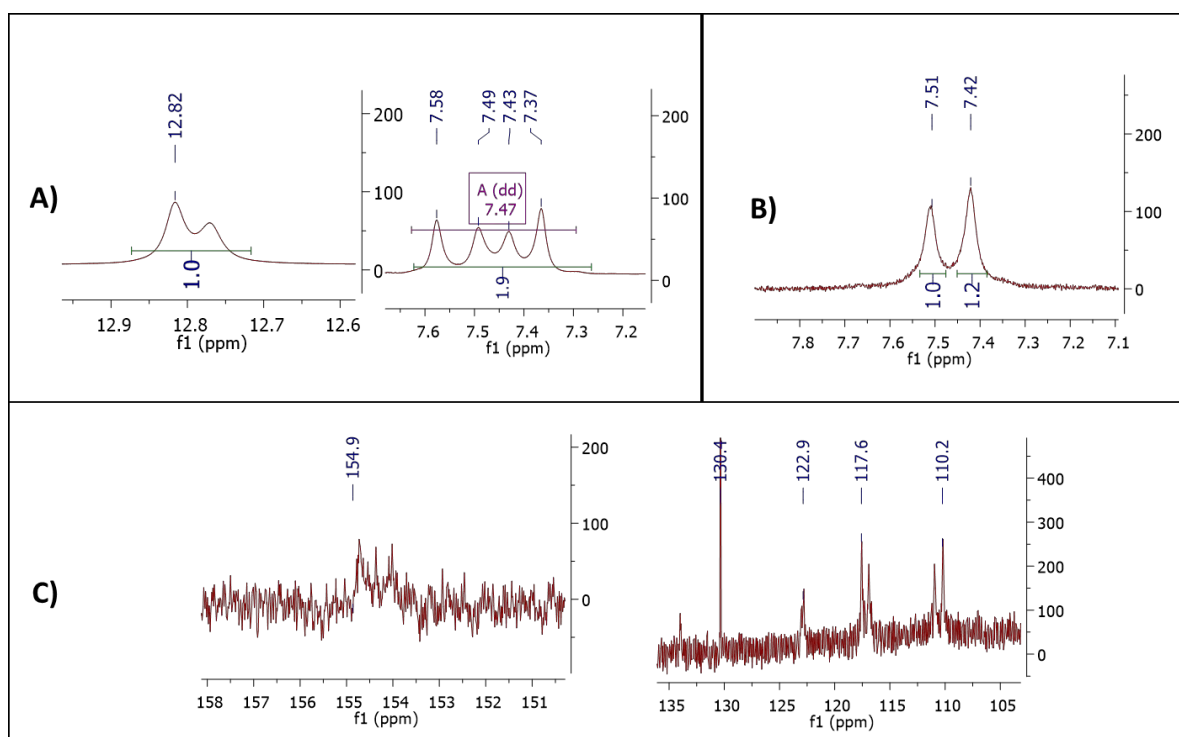


Figura 7.14. Espectros de RMN ¹H y ¹³C del compuesto JOULZ-04 donde se observa la tautomería intrínseca del bencimidazol. A) Espectro ¹H donde se observa señales múltiples. B) Espectro ¹H+D₂O, el intercambio evita la diferenciación magnética de los tautómeros y se observan señales simples. C) Espectro de ¹³C, se observan las señales anchas o dobles para los carbonos del anillo de benceno.

7.1.2.2.5. JOULZ-05

Este compuesto presentó el efecto generado por la resonancia del grupo amida, donde además cada uno de los hidrógenos de los metilenos fueron diastereotópicos, lo anterior resultó en 4 señales múltiples que integraron cada una para 1H en 3.01, 3.11, 3.30 y 3.64 ppm. Por otro lado, los hidrógenos de los grupos metilo se diferenciaron magnéticamente debido al efecto resonante del grupo amida, por lo que generaron 2 señales triples que integraron para 3H en 0.97 y 1.16 ppm. En el espectro COSY [Figura 7.15 (A)], se puede confirmar el porqué de la multiplicidad que se presentó, ya que cada hidrógeno de un metileno (3.30 ppm), al ser diastereotópico, se acopló con el hidrógeno del mismo carbono al que está unido (3.64 ppm) y también a los hidrógenos del grupo metilo vecino (1.16 ppm), generando así el multiplete. Por lo tanto el espectro COSY junto con el HSQC [Figura 7.15 (B)] confirmaron cuáles eran los hidrógenos que estaban unidos al mismo carbono; siendo el par con desplazamiento en 3.01 y 3.11 ppm los que están unidos al carbono en 42.3 ppm (grupo metilo próximo: ^{13}C : 13.8 - ^1H : 0.97 ppm) y los hidrógenos en 3.30 y 3.64 ppm al carbono con desplazamiento en 38.4 ppm (grupo metilo próximo ^{13}C : 12.6 ppm - ^1H : 1.16 ppm).

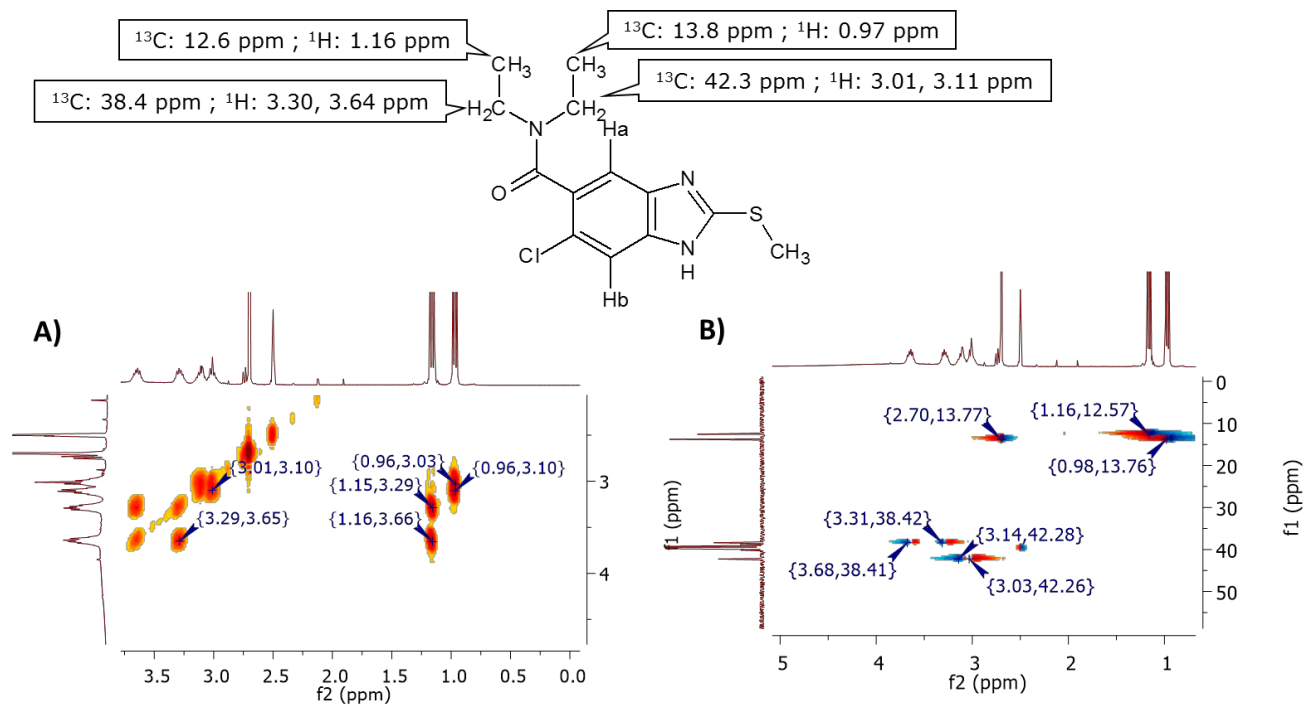


Figura 7.15. Espectro COSY (A) y HSQC (B) del compuesto JOULZ-05.

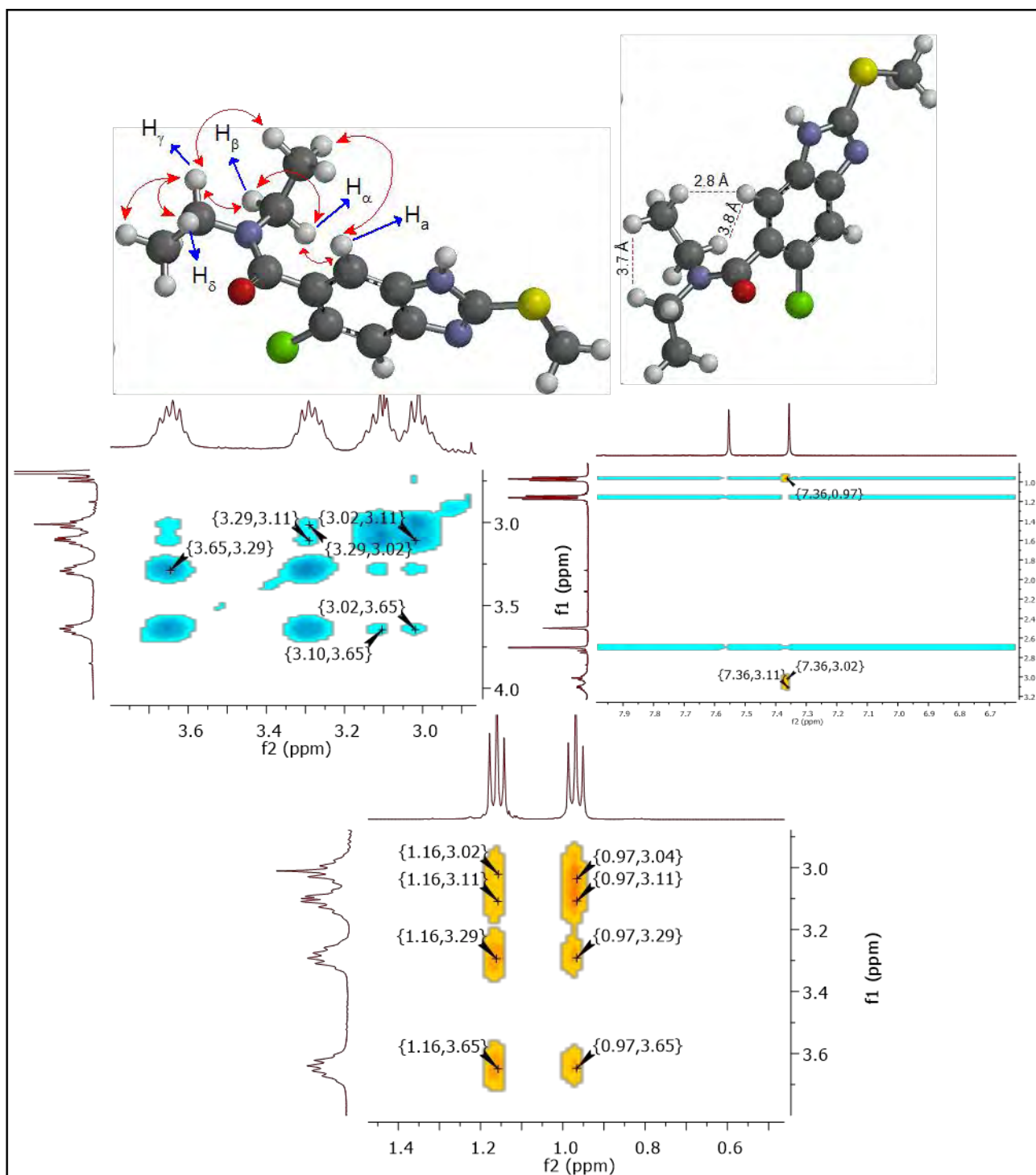


Figura 7.16. Espectro NOESY y estructura tridimensional del tautómero de mínima energía (-44.1 kJ/mol) del compuesto JOULZ-05. Se presenta la distancia en Ångström entre H_α - H_{AR} y el CH_3 - H_{AR} (El efecto Overhauser se observa en núcleos con cercanía alrededor de 5 Å [44]) [Software Spartan 10]

Otro dato que resulta interesante destacar es el hecho de que en el espectro NOESY prevalece el acoplamiento del par de hidrógenos diasterotópicos (H_{α} - H_{β}) [Figura 7.16] con δ en 3.01 y 3.11 ppm con H_{α} -Ar (7.36 ppm) y con los hidrógenos del grupo metilo vecino (0.97 ppm). En adición, todos los hidrógenos diasterotópicos tuvieron acoplamiento entre sí, con los hidrógenos del metilo próximo y con el otro sustituyente alifático de la amida (Ver interacciones en la Figura 7.16).

Por último, señalar que en el espectro HMBC de JOULZ-05 [Figura 7.17] se lograron identificar todos los carbonos cuaternarios; con valores de 122.0 (C-5), 129.7 (C-6), 138.0 (C-8) y 140.1 ppm (C-9), siendo esta molécula, la única donde de forma directa o indirecta se observaron todos los carbonos que la conforman, por lo que aunado a la asignación de señales de 1H se convirtió en la caracterización por RMN más completa.

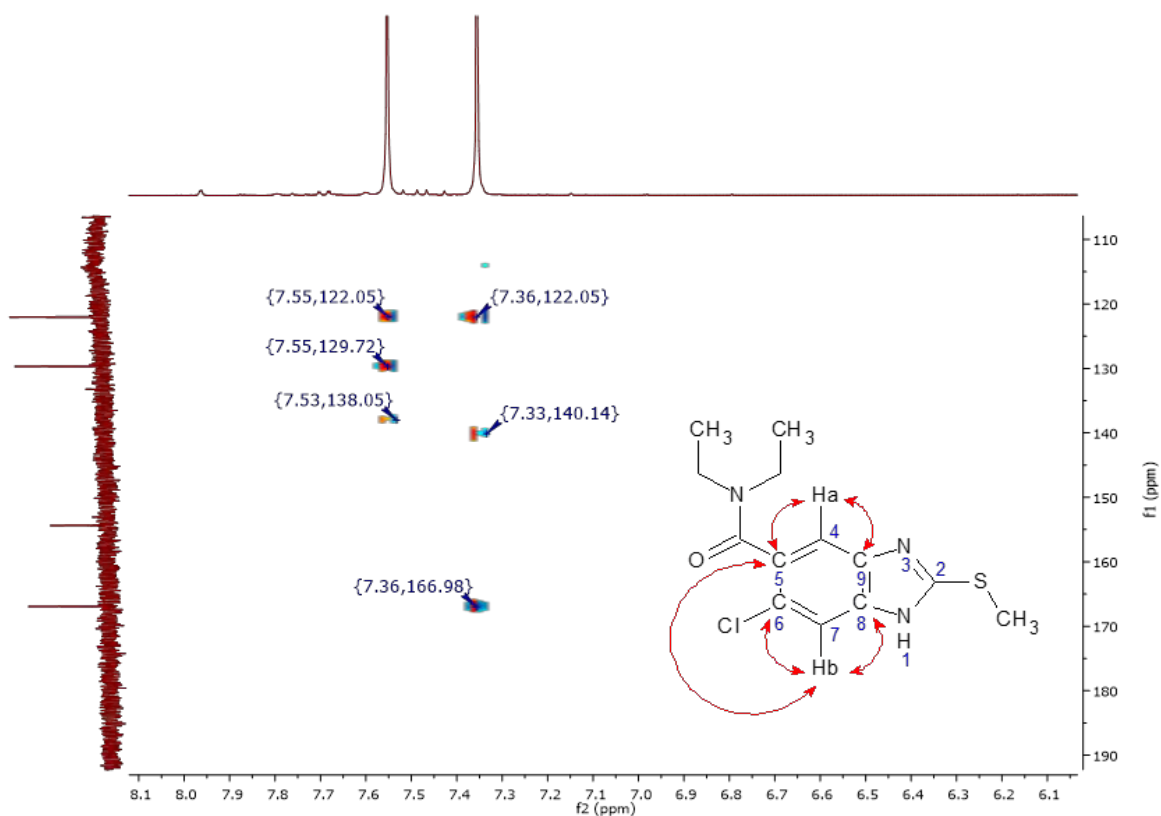
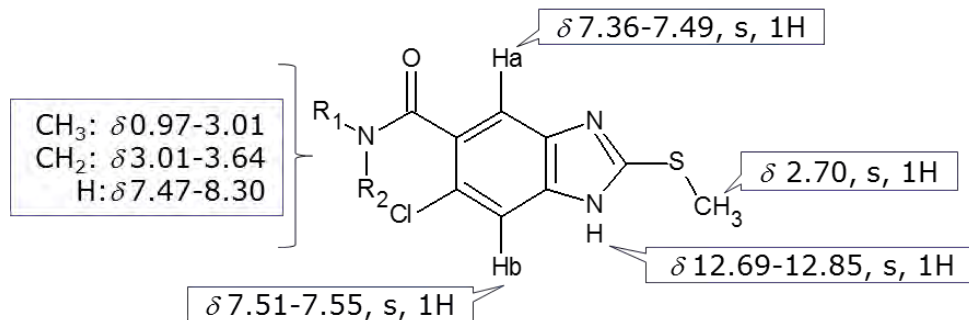


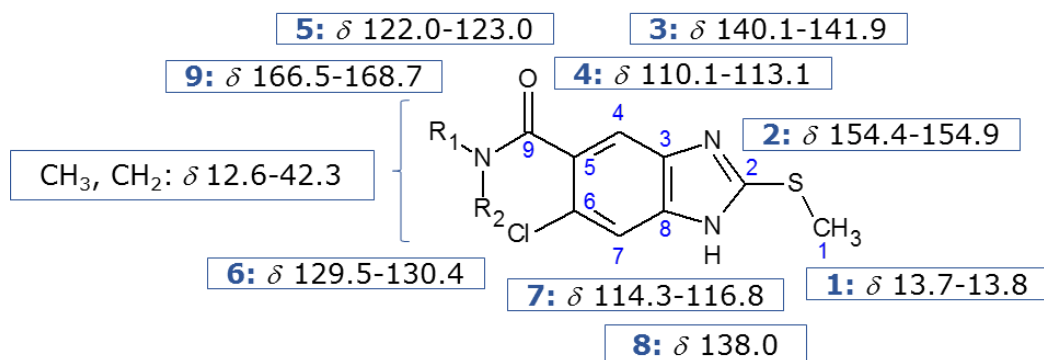
Figura 7.17. Espectro HMBC del compuesto JOULZ-05.

Tabla 7.4. Resumen de las señales de RMN de ^1H 

Compuesto	R ₁	R ₂	Desplazamiento químico (δ) ppm. Multiplicidad. Integral					
			SCH ₃	Ha	Hb	R ₁	R ₂	NH-Bencimidazol
JOULZ-01	H	H	2.70. s. 3H	7.49. s. 1H	7.51. s. 1H	7.47. s. 1H	7.78. s. 1H	12.83. s. 1H
JOULZ-02	H	CH ₃	2.70. s. 3H	7.44. s. 1H	7.52. s. 1H	8.25. c. 1H	2.76. d. 3H	12.79. s. 1H
JOULZ-03	CH ₃	CH ₃	2.70. s. 3H	7.36. s. 1H	7.54. s. 1H	2.75. s. 3H	3.01. s. 3H	12.69. s. 1H
JOULZ-04	H	CH ₃ CH ₂	2.70. s. 3H	7.42. s. 1H	7.52. s. 1H	8.30. t. 1H	1.12. t. 3H 3.27. m. 2H	12.82. s. 1H
JOULZ-05	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	2.70. s. 3H	7.36. s. 1H	7.55. s. 1H	0.97. t. 3H 3.01. m. 1H 3.11. m. 1H	1.16. t. 3H 3.30. m. 1H 3.64. m. 1H	12.85. s. 1H

Tabla 7.5. Resumen de las señales de RMN de ^{13}C

Compuesto	R ₁	R ₂	Desplazamiento químico (δ , ppm)										R ₁	R ₂
			C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9			
JOULZ-01	H	H	13.8	154.4	-	-	122.9	130.1	-	-	168.7	-	-	
JOULZ-02	H	CH ₃	13.8	154.5	141.9	113.1	123.0	130.3	114.6	-	167.3	-	26.2	
JOULZ-03	CH ₃	CH ₃	13.8	154.4	-	112.2	122.1	129.5	114.3	-	167.6	37.7	34.1	
JOULZ-04	H	CH ₃ CH ₂	13.7	154.9	-	110.1	122.9	130.4	116.8	-	166.5	-	14.6 (CH ₃) 34.0 (CH ₂)	
JOULZ-05	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂	13.8	154.4	140.1	112.0	122.0	129.7	114.3	138.0	166.9	13.8 (CH ₃) 42.3 (CH ₂)	12.6 (CH ₃) 38.4 (CH ₂)	



En resumen, para el caso de los espectros de ^1H [Tabla 7.4] las señales de los hidrógenos alifáticos se observaron a campo alto entre 0.97-3.64 ppm; prevaleciendo para el SCH_3 un desplazamiento químico (δ) alrededor de 2.70 ppm, los CH_3 entre 0.97-3.01 ppm y los CH_2 entre 3.01-3.64 ppm. Los hidrógenos pertenecientes al carbono que se enlazaba directamente con el nitrógeno del grupo amida ($-\text{N}-\underline{\text{CH}}_\#$), tuvieron δ a campo más bajo (2.76-3.64 ppm) que los que tenían vecinos un grupo alquilo ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_3$; 0.97-1.16 ppm) debido a la desprotección que ejerce el nitrógeno sobre los núcleos de hidrógeno. Por otro lado, los Hx-Ar tuvieron desplazamiento alrededor de 7.36-7.55 ppm, siendo la señal del Hb-Ar la que siempre se observó a campo más bajo, esto debido a la desprotección de Hb-Ar por el átomo de cloro. La señal de los hidrógenos del grupo amida se observó alrededor de 7.47-8.30 ppm; en el caso de alquilamidas (JOULZ-02 y JOULZ-04) ésta ($\text{NH}-\text{R}$) presentó multiplicidad por el acoplamiento con los hidrógenos del grupo alifático próximo. Por último la señal del NH del bencimidazol se identificó siempre a campo bajo, alrededor de 12.69-12.85 ppm, esto debido a que el par de electrones libre del nitrógeno forma parte del sistema aromático y no ejerce protección por efecto inductivo.

En lo que corresponde a los espectros de ^{13}C los carbonos 1-9 [Tabla 7.5] presentaron δ similar entre todos los compuestos finales. Las señales de los sustituyentes alifáticos de la amida y el SCH_3 se mostraron a campo alto, alrededor de 12.6-42.3 ppm; los carbonos unidos directamente al nitrógeno de la amida tuvieron desplazamiento a frecuencias más altas por efecto de desprotección como ocurre en ^1H . Los carbonos sp^2 del bencimidazol tuvieron δ entre 110.1-154.9 ppm, siendo C-2 la señal a campo más bajo por estar desprotegido en medio de los dos nitrógenos. Por último, la señal del carbonilo se logró observar sin dificultad alrededor de 166.5-168.7 ppm.

7.1.2.3. Espectrometría de masas de baja y alta resolución

La masa molecular de las carboxamidas obtenidas fue determinada por espectrometría de masas. La técnica utilizada fue DART (*Direct analysis in real time*). Como se trata de una técnica de ionización más suave que la ionización electrónica no se observó fragmentación. En ésta se utiliza átomos de un gas noble

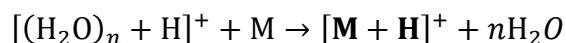
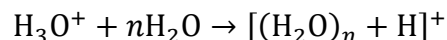
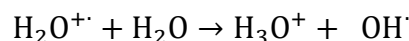
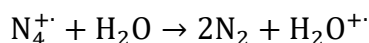
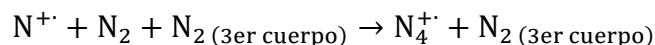
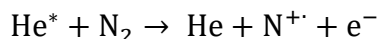
electrónicamente excitado (GN^*) para ionizar las moléculas. En todos los casos el pico base con abundancia relativa del 100% correspondió al ion molecular más un hidrógeno ($[\text{M}+\text{H}]^+$). El hecho de que el (M^+) forme un aducto con un hidrógeno " $[\text{M}+\text{H}]^+$ " se debe al tipo de ionización utilizada, ya que como la muestra tiene contacto con la atmósfera del ambiente ($\text{N}_2(\text{g})$, $\text{O}_2(\text{g})$, $\text{H}_2\text{O}(\text{g})$, etc.) y por una serie de reacciones [Esquema 7.1] es que se forman este tipo de aductos. Por la misma razón, se observó la formación de dímeros y trímeros.

Tabla 7.6. Espectrometría de masas de baja y alta resolución para las carboxamidas sintetizadas

Compuesto	Composición esperada	Masa monoisotópica calculada	EM/DART: m/z (%)	Masa monoisotópica calculada para $[\text{M}+\text{H}]^+$	EMAR/DART para $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Error, ppm)
JOULZ-01	$\text{C}_9\text{H}_8\text{ClN}_3\text{OS}$	241.00766	242 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)	242.01549	242.01566 (0.70)
JOULZ-02	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{OS}$	255.02331	256 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)	256.03114	256.03086 (1.09)
JOULZ-03	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{OS}$	269.03896	270 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)	270.04679	270.04657 (0.81)
JOULZ-04	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{OS}$	269.03896	270 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)	270.04679	270.04621 (2.12)
JOULZ-05	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$	297.07026	298 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100)	298.07809	298.07863 (1.82)

Esquema 7.1. Esquema de reacciones para formar la especie $[\text{M}+\text{H}]^+$
[45]

Como el agua no puede ser ionizada directamente por la interacción con GN^* , el proceso se lleva a cabo con los siguientes pasos:



Por ejemplo en el espectro de masas de baja resolución JOULZ-05 [Figura 7.18] que se esperaba una masa de 297; el pico base tiene un valor de 298 m/z debido a la formación del aducto con H. Ahora bien, si a este valor se suma la masa de otra molécula JOULZ-05 resulta un valor de 595 m/z, cuyo pico se puede

identificar en el espectro. El dímero descrito, es común en DART-MS, por lo que se confirma la masa molecular del compuesto sintetizado. En adición no se observaron picos que sugieran la presencia del ácido carboxílico (10); se puede afirmar que el compuesto cuenta con pureza aceptable.

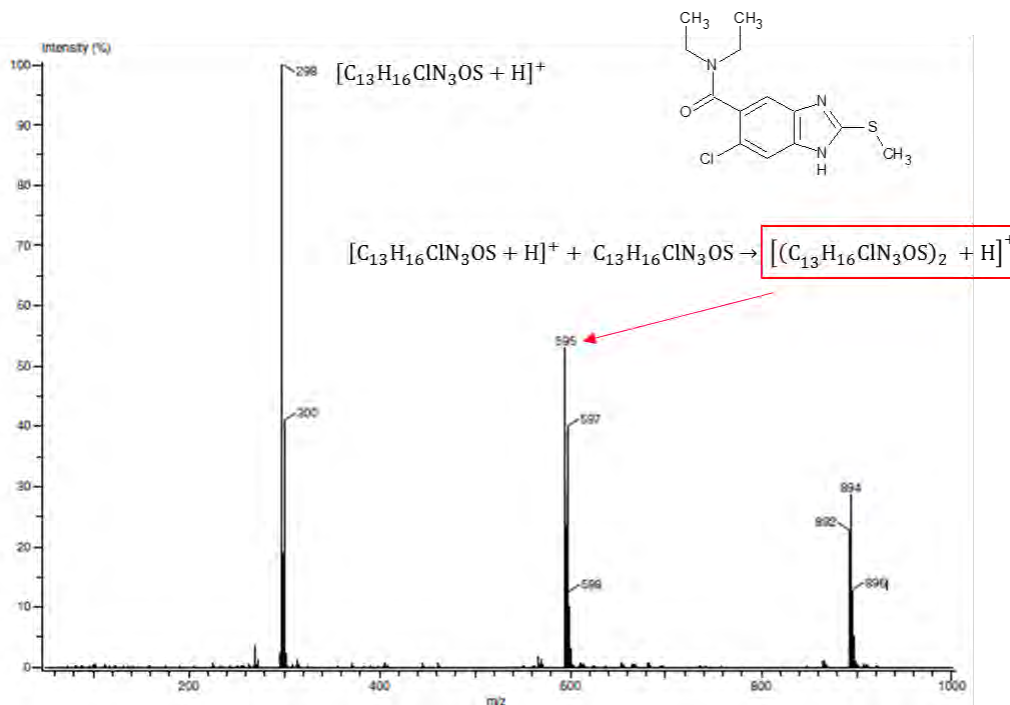


Figura 7.18. Espectro DART-MS del compuesto JOULZ-05.

Para obtener la composición elemental de las carboxamidas se utilizó DART-MS de alta resolución; los resultados se muestran en la *Tabla 7.6*. Todos los compuestos muestran una masa para el ion molecular muy cercana a la masa monoisotópica calculada para el $[M+H]^+$, con valor de error dentro del intervalo aceptable.

7.2. Parte biológica

La serie de carboxamidas JOULZ se sometió a evaluación antiprotozoaria contra *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. Los resultados de la CI_{50} se muestran en la *Tabla 7.7*, los valores se compararon contra los de los fármacos de referencia ABZ, MTZ y NTX.

Tabla 7.7. Resultados de la actividad antiprotozoaria de la serie de carboxamidas JOULZ

	Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}), [μ M]		
	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>
JOULZ-01	0.004 \pm 0.000	0.097 \pm 0.003	0.031 \pm 0.003
JOULZ-02	0.061 \pm 0.003	0.123 \pm 0.008	0.092 \pm 0.019
JOULZ-03	0.093 \pm 0.000	0.159 \pm 0.005	0.130 \pm 0.021
JOULZ-04	0.037 \pm 0.005	0.044 \pm 0.005	0.063 \pm 0.010
JOULZ-05	0.065 \pm 0.007	0.082 \pm 0.007	0.111 \pm 0.009
ABZ	0.037	56.600	1.592
MTZ	1.228	0.350	0.216
NTX	0.013	0.055	0.110

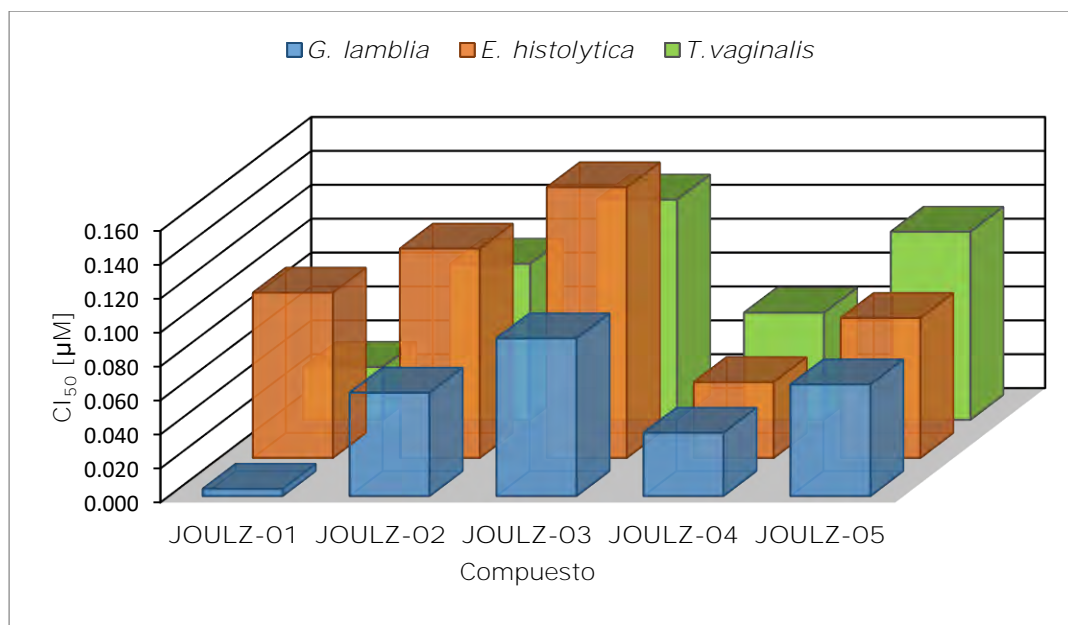


Figura 7.19. Actividad antiprotozoaria de los compuestos JOULZ 01-05.

Se identificó que todos los compuestos presentaron buena actividad contra los tres parásitos, ya que en su mayoría tuvieron valores de CI_{50} **menores a 1 μ M**. Esta serie de carboxamidas (JOULZ 01-05) tuvo mayor eficiencia como giardicida; siendo JOULZ-01 el compuesto más potente que además destacó por su acción

tricomonida [Tabla 7.7 y Figura 7.19]. Este compuesto puede considerarse el líder por poseer un valor de CI_{50} menor contra dos de los tres parásitos, sin dejar de lado a JOULZ-04 que le sigue en eficiencia.

Realizando una comparación contra los fármacos de elección para tratar las parasitosis por protozoarios (ABZ, MTZ y NTX), se determinó que todas las carboxamidas fueron más eficaces para combatir a *G. lamblia* que el metronidazol. JOULZ-04 igualó en potencia al albendazol y JOULZ-01 superó a los tres compuestos de referencia [Figura 7.20].

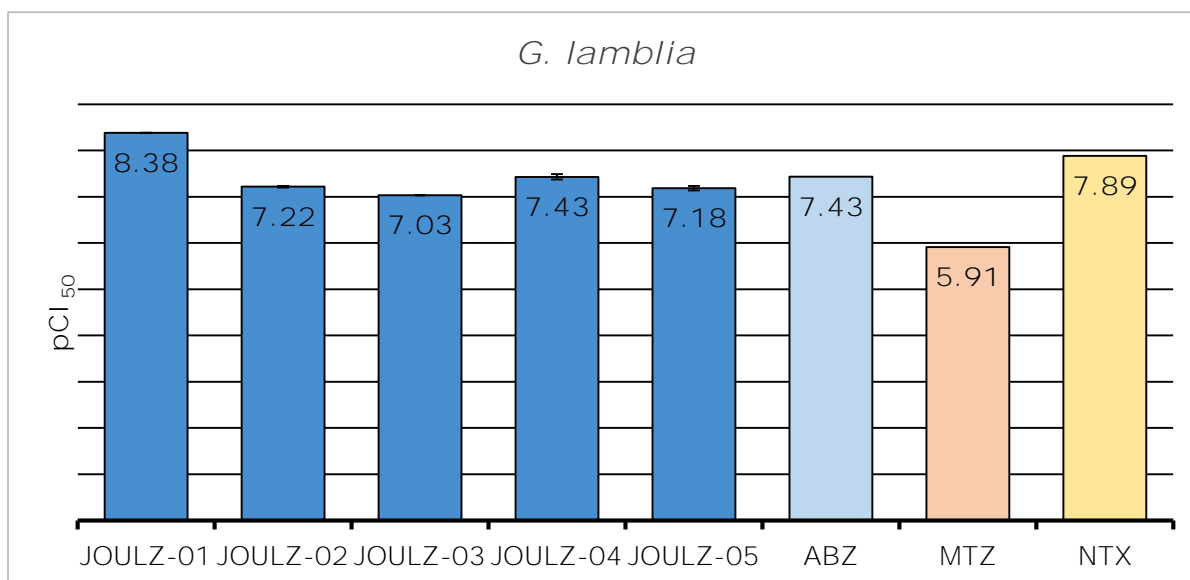


Figura 7.20. Actividad biológica contra *G. lamblia* de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.

Por otro lado, para *E. histolytica* estos nuevos derivados del bencimidazol mejoraron la potencia del albendazol y metronidazol, no así para la nitazoxanida que solo se vio superada por JOULZ-04 [Figura 7.21]. De manera similar, la actividad tricomonida de toda la serie fue mayor al ABZ y MTZ; en contraste, JOULZ-01 y JOULZ-04 rebasaron la eficacia de la NTX y JOULZ-05 solo la igualó [Figura 7.22].

De lo anterior se puede confirmar que JOULZ-01 y JOULZ-04 trascienden para posicionarse como nuevos antiprotozoarios. Cabe destacar que los compuestos JOULZ 01-05 siguieron la tendencia que se había venido observando en nuestro grupo de investigación; donde las carboxamidas bencimidazólicas derivadas de aminas alifáticas tuvieron mayor potencia contra *G. lamblia* y *T.*

vaginalis [20-22, 24, 25]. En el caso de la actividad amebicida, el sustituyente en la posición 5 del bencimidazol debe ser de mayor tamaño, hecho que se logra más fácilmente insertando un anillo aromático o un heterociclo, así como alargando la cadena alifática, tal es el caso de JOULZ-04 que presentó la menor CI_{50} contra *E. histolytica*.

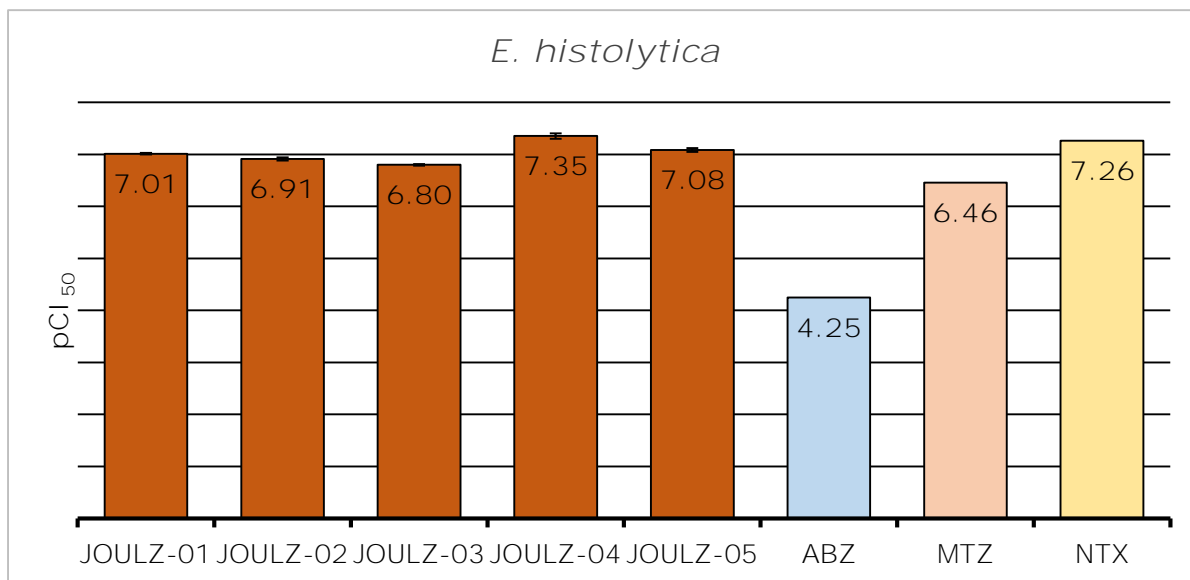


Figura 7.21. Actividad biológica contra *E. histolytica* de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.

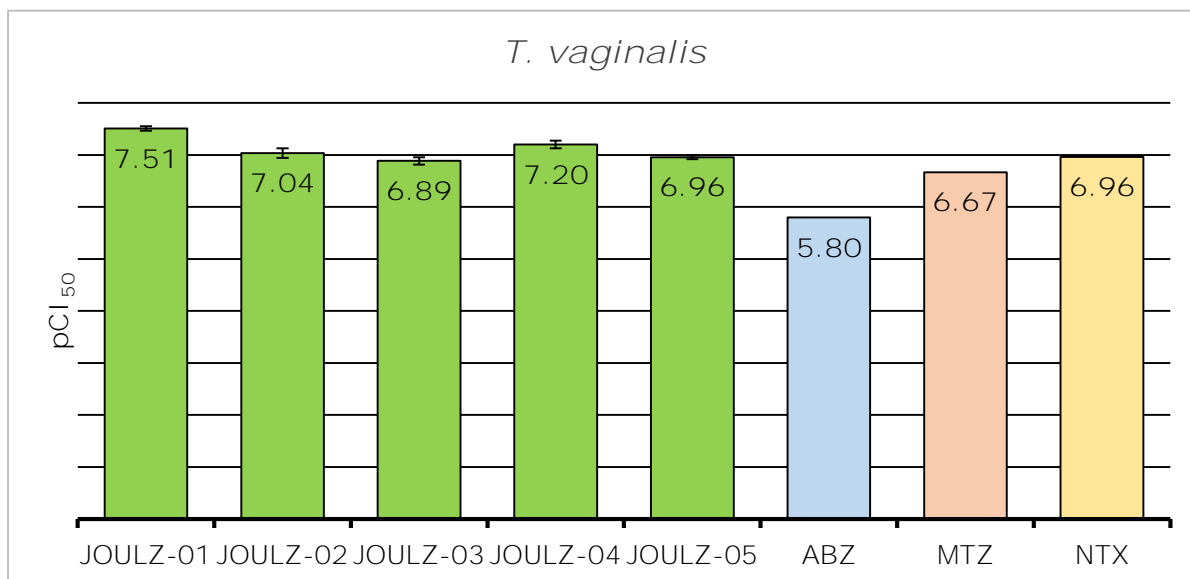
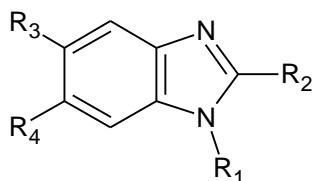


Figura 7.22. Actividad biológica contra *T. vaginalis* de los compuestos JOULZ comparada con ABZ, MTZ y NTX.

8. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD (SAR)

A continuación se presenta un análisis de la relación estructura actividad para algunas carboxamidas del Grupo A (Ver *Figura 2.12*), las cuales se han venido evaluando por nuestro equipo de investigación e incluye los nuevos compuestos que aporta este trabajo. De esta manera se enriquece la base de datos para impulsar el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antiprotozoaria, además de apoyar a establecer requerimientos estructurales para aumentar la potencia.

Tabla 8.1. Comparación de la serie de carboxamidas JOULZ con compuestos previamente sintetizados en nuestro laboratorio
[24, 46, 47]



Clave	R1	R2	R3	R4	pCl ₅₀		
					<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>
JOULZ-01	H	SCH ₃	-CONH ₂	Cl	8.38	7.01	7.51
JOULZ-02	H	SCH ₃	-CONHCH ₃	Cl	7.22	6.91	7.04
JOULZ-03	H	SCH ₃	-CON(CH ₃) ₂	Cl	7.03	6.80	6.89
JOULZ-04	H	SCH ₃	-CONHCH ₂ CH ₃	Cl	7.43	7.35	7.20
JOULZ-05	H	SCH ₃	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	Cl	7.18	7.08	6.96
C1	CH ₃	SCH ₃	-CONH ₂	Cl	6.54	6.75	6.32
C2	CH ₃	SCH ₃	-CONHCH ₃	Cl	6.72	6.69	6.21
C3	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONH ₂	6.39	6.41	6.26
C4	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONHCH ₃	6.19	6.80	6.16
C5	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CON(CH ₃) ₂	5.69	6.11	6.25
C6	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONHCH ₂ CH ₃	6.50	6.66	6.49
C7	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	6.16	6.32	6.05

C8	CH ₃	SCH ₃	Cl	Piperidinilcarbonil	6.91	ND	7.34
C9	CH ₃	SCH ₃	Cl	4-metilpiperidincarbonil	7.00	ND	6.95
ABZ	H	-NHCO ₂ CH ₃	-SC ₃ H ₇	H	7.43	4.25	5.80
MTZ	NA				5.91	6.46	6.67
NTX	NA				7.89	7.26	6.96

Código de colores: Rojo= Mayor potencia; Azul: Menor potencia.

Como se puede apreciar en la *Tabla 8.1* se presentan los valores de pCI₅₀ de JOULZ 01-05 para los tres microorganismos, junto con el de nueve compuestos más (C1-C9) y los fármacos de referencia (ABZ, MTZ y NTX). En lo que corresponde a C1-C7 se diferencian de JOULZ 01-05 por estar metilados en la posición 1 del bencimidazol (R1) y por la posición del sustituyente amida (R3 ó R4). Asimismo C8 y C9 están metilados en R1, sin embargo en R4 poseen un grupo amida derivado de una amina alifática-cíclica. Todos ellos poseen el sustituyente cloro (Cl) en R3 ó R4 el cual evita la desactivación metabólica cuando se administra en *in vivo* (Ejemplo: Animales y humanos), no obstante esta particularidad no influye para este análisis ya que los ensayos biológicos se realizaron *in vitro*.

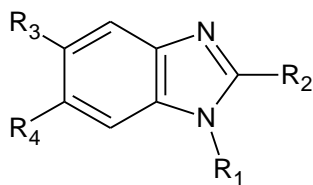
De estos 17 compuestos bioactivos, alguna de las cinco carboxamidas de la serie JOULZ (marcados con rojo en la *Tabla 8.1*) resultó ser la más activa para los tres protozoarios; JOULZ-01 contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis* y JOULZ-04 para *E. histolytica*. Dando lugar a que el hidrógeno en R1 favorece la actividad antiprotozoaria, porque como se ha visto anteriormente en estudios acoplamiento molecular con los carbamatos bencimidazólicos [*Figura 2.15*], el NH del bencimidazol forma un enlace de hidrógeno con los aminoácidos del sitio de unión a la β -tubulina, lo que permite que adopte una conformación más estable en la proteína y pueda inhibir la polimerización de los microtúbulos. Sin embargo, estos compuestos no son carbamatos, por lo que el mecanismo podría ser diferente.

En adición, los resultados sugieren que la posición del sustituyente amida en R3 ó R4 no influye significativamente en la potencia. Ya que si comparamos C1 y C3 (regioisómeros) la actividad antiprotozoaria de C1 (grupo amida R3) fue ligeramente mayor que C3. En contraste, se identificó que las amidas primarias y

secundarias elevan el efecto inhibitorio. Por ejemplo JOULZ 01,04 y 05 tuvieron valores de pCl_{50} mayores que sus análogos JOULZ 03 y 05; tendencia que se repite en las carboxamidas metiladas, donde C5 y C7 son amidas terciarias y poseen la menor eficiencia giardicida y amebicida (C5), o bien tricomonocida (C7), no solo de sus análogos si no de todas las carboxamidas presentadas en la *Tabla 8.1*. Lo anterior nuevamente da indicios de que un grupo donador de enlace de hidrógeno en la posición R3 ó R4 favorece la actividad antiprotozoaria.

Por último, una relevancia estructural más, resultó ser que los compuestos con sustituyentes de mayor tamaño en R3 ó R4 (cadena saturada más larga del grupo amida) poseen una mayor eficacia como amebicidas; JOULZ-04, JOULZ-05 y C6.

Tabla 8.2. Carboxamidas bencimidazólicas pertenecientes a la Serie A y fármacos de referencia ordenados de mayor a menor actividad giardicida [24, 46, 47]



Clave	R1	R2	R3	R4	pCl_{50} <i>G. lamblia</i>
JOULZ-01	H	SCH ₃	-CONH ₂	Cl	8.38
NTX	-	NA			7.89
C21	CH ₃	SCH ₃	-CONHCH ₃	H	7.74
ABZ	H	-NHCO ₂ CH ₃	-SC ₃ H ₇	H	7.43
JOULZ-04	H	SCH ₃	-CONHCH ₂ CH ₃	Cl	7.43
C15	CH ₃	-NHCO ₂ CH ₃	-CONH ₂	H	7.25
JOULZ-02	H	SCH ₃	-CONHCH ₃	Cl	7.22
JOULZ-05	H	SCH ₃	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	Cl	7.18
C14	CH ₃	SCH ₃	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	H	7.17
C20	CH ₃	SCH ₃	-CONH ₂	H	7.15
C22	H	SCH ₃	-CON(CH ₃) ₂	H	7.14
C23	H	SCH ₃	-CONHCH ₂ CH ₃	H	7.07
JOULZ-03	H	SCH ₃	-CON(CH ₃) ₂	Cl	7.03
C9	CH ₃	SCH ₃	Cl	4- metilpiperidincarbonil	7.00

C12	CH ₃	SCH ₃	-CON(CH ₃) ₂	H	6.97
C8	CH ₃	SCH ₃	Cl	Piperidinilcarbonil	6.91
C2	CH ₃	SCH ₃	-CONHCH ₃	Cl	6.72
C11	CH ₃	SCH ₃	-CONHCH ₃	H	6.65
C13	CH ₃	SCH ₃	-CONHCH ₂ CH ₃	H	6.62
C10	CH ₃	SCH ₃	-CONH ₂	H	6.60
C16	CH ₃	-NHCO ₂ CH ₃	-CONHCH ₃	H	6.59
C1	CH ₃	SCH ₃	-CONH ₂	Cl	6.54
C6	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONHCH ₂ CH ₃	6.50
C24	H	SCH ₃	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	H	6.46
C25	H	SCH ₃	H	Piperidinilcarbonil	6.44
C3	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONH ₂	6.39
C19	CH ₃	-NHCO ₂ CH ₃	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	H	6.22
C4	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CONHCH ₃	6.19
C7	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CON(CH ₂ CH ₃) ₂	6.16
C17	CH ₃	-NHCO ₂ CH ₃	-CON(CH ₃) ₂	H	6.07
MTZ	NA				5.91
C18	CH ₃	-NHCO ₂ CH ₃	-CONHCH ₂ CH ₃	H	5.90
C5	CH ₃	SCH ₃	Cl	-CON(CH ₃) ₂	5.69

En la *Tabla 8.2* se presentan 30 carboxamidas del Grupo A con su valor de pCl₅₀ para la actividad giardicida. Nuevamente las encabeza el compuesto JOULZ-01, con potencia todavía mayor que la nitazoxanida. Las demás moléculas de la serie JOULZ se encuentran entre los 10 primeros lugares de eficiencia inhibitoria, entre los cuales también se encuentra el albendazol, que igualó con JOULZ-04. El metronidazol se colocó en los últimos de potencia.

Al igual que en la *Tabla 8.1*, se observó una tendencia similar en cuanto a los requerimientos estructurales (Por orden de prioridad: NH en R1, amidas primarias y secundarias en R3 ó R4, tuvieron mayor eficacia). En suma, el sustituyente metiltio (SCH₃) en R2 eleva más la actividad antiprotozoaria que el carbamato de metilo.

9. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados, se logró la síntesis de cinco nuevas carboxamidas del tipo 6-cloro-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ 01-05) con rendimientos de pobres a moderados. El método de síntesis fue la activación del ácido carboxílico 10 *in situ*, utilizando cloruro de tionilo en presencia de DMF como catalizador y posterior acoplamiento de 11 con la amina correspondiente (A-E). La purificación más eficiente fue la cromatografía en columna (FE: Alúmina neutra).

Los compuestos finales se caracterizaron por sus constantes físicas y espectroscópicas. Los experimentos de RMN-2D (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) permitieron la asignación inequívoca de las señales para todos los hidrógenos y/o carbonos en los espectros.

En general, la serie JOULZ presentó buena actividad antiprotozoaria contra los parásitos *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. JOULZ-01 y JOULZ-04 se posicionaron como los compuestos líderes de la serie, por su eficacia para inhibir el desarrollo protozoario todavía mejor que los fármacos de referencia ABZ, MTZ y NTX. Cabe destacar que de todas las de carboxamidas evaluadas hasta el momento por nuestro equipo de investigación de la Serie A (derivadas de aminas alifáticas), JOULZ-01, la amida primaria, es la molécula con mejor perfil giardicida con una CI_{50} de 4 nM; lo que confirma la hipótesis planteada.

Por último, se identificó como requerimientos estructurales deseables para la actividad antiprotozoaria, que el hidrógeno en la posición 1 del bencimidazol (NH) y las amidas pequeñas (primaria y secundarias) favorecen la actividad giardicida y tricomonocida; que el hidrógeno en la posición 1 (NH) junto con el aumento de tamaño y/o volumen de la amida (terciarias) incrementan la actividad amebicida.

10. APÉNDICE A. Parte experimental

En este apartado se describe la síntesis de los intermediarios y los compuestos finales.

10.1. Instrumentación

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- La destilación a presión reducida se realizó por medio de un rotaevaporador Büchi CR-114 con condensador vertical de dedo frío y baño B-480. Se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2. Alternativamente, se utilizó un rotaevaporador Büchi CR-205 con condensador vertical de dedo frío y baño B-490. Para disminuir la presión del Sistema (hasta 10 mmHg), se utilizó una bomba de vacío marca Büchi V-500 con regulador de vacío V-800.
- Los puntos de fusión (P.f) se determinaron en un aparato Büchi B-450 utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C) se obtuvieron en un espectrómetro Varian 400-MR (400 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al DMSO- d^6 y los valores de J en Hz. La simbología empleada es: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, c = señal cuádruple, m = señal múltiple, dd = señal doble de dobles. La asignación del desplazamiento químico de las señales se realizó apoyándose de experimentos en dos dimensiones (COSY, HSQC, HMBC, NOESY).
- Los espectros de masas se realizaron por análisis directo en tiempo real (DART). La simbología utilizada es m/z (masa/carga) y $[\text{M}+\text{H}]^+$ (aducto de ion molecular con hidrógeno).

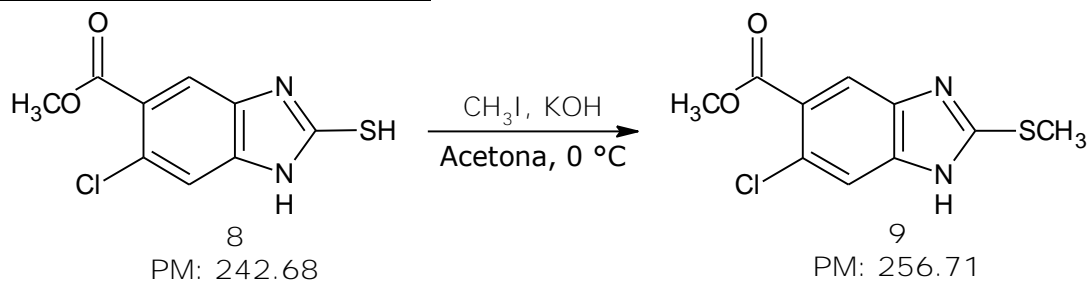
- Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se realizaron mediante la técnica reflectancia de ATR. Se utilizó un equipo FTIR/FIR Spectrum 400.
- El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta o exposición a vapores de yodo. Los sistemas de elución utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo-Metanol	4:1
II	Acetona-Cloroformo	7:3+2 gotas de NH ₄ OH
III	Tolueno-THF-AcOH	30:3:1

10.2. Procedimiento experimental

10.2.1. 6-Cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)

Reacción de S-metilación

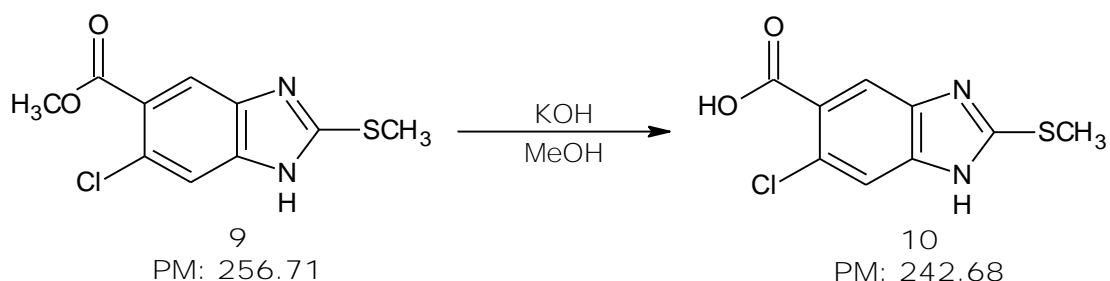


En un matraz de bola de dos bocas de 250 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, embudo de adición y atmósfera de nitrógeno, se suspendieron 8.01 g (0.033 mol) de 6-cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8) en 50 mL de acetona. La suspensión se enfrió hasta una temperatura de 0 °C (baño hielo/sal/etanol), para luego adicionar 2.04 g de KOH (0.036 mol, 1.1 eq.) disueltos en 5 mL de agua. Al terminar la adición, se observó una disolución total, así como coloración café oscuro de la mezcla. Manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C se agregó lentamente 2.08 mL de CH₃I (0.033 mol, 1.0 eq.) disueltos en 5 mL de acetona. Al finalizar, la mezcla adoptó apariencia

traslúcida y la reacción se mantuvo por 3 h entre 0-5 °C. La CCF indicó ausencia de materia prima. Se extrajo el producto vertiendo la mezcla de reacción en 100 mL de agua helada y ajustando el pH a 5 con HCl al 10%, obteniéndose un sólido color beige (90%), el cual se recuperó por filtración al vacío y se lavó con abundante agua fría (Rf. 0.65, sistema I).

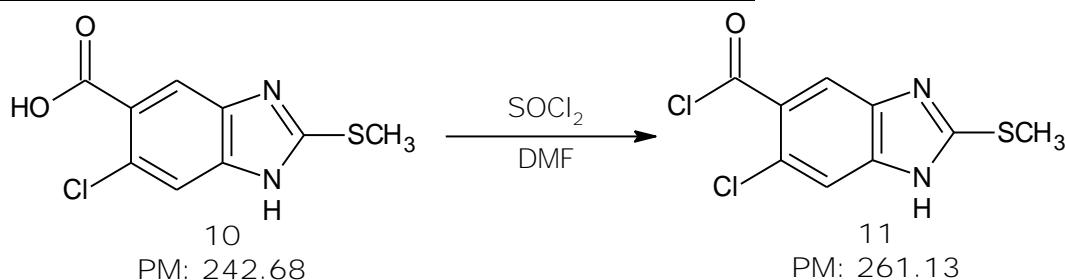
10.2.2. Ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10)

Reacción de hidrólisis



En un matraz de bola de 500 mL, adaptado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, el producto obtenido de la S-metilación; 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9) se suspendió en 200 mL de metanol. Se adicionaron 4.08 g de NaOH (0.102 mol, 3 eq.) disueltos en 5 mL de agua. La disolución se sometió a una temperatura de 65 °C por 6 h. La CCF indicó ausencia del éster, por lo que la mezcla se vertió en 250 mL de agua helada y se ajustó el pH a 4 con HCl 10%, precipitó un sólido color blanco grisáceo que se filtró al vacío. Este último tratamiento se realizó 2 veces más hasta que la solución adoptó un color amarillo y no se obtuvo más producto después de ajustar el pH a 4. Al final se obtuvieron 6.81 g del producto de hidrólisis (85%). El sólido se trató 3 veces con carbón activado a 65 °C por 30 min (5% de carbón por peso de producto y metanol como disolvente), retirando el carbón activado vía filtración con cama de celita. El filtrado se concentró a sequedad, y el sólido obtenido se recrystalizó en etanol. Se obtuvieron 6.47 g (95% recrystalización) de unos cristales beige, los cuales presentaron una sola mancha en CCF (Rf. 0.13, sistema III).

10.2.3. Cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonilo (11)

Reacción de activación del ácido carboxílico

En un matraz de bola de tres bocas de 100 mL, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo, embudo de adición y trampa básica [Figura 10.1], se agregaron 0.820 g (3.38×10^{-3} mol) de ácido 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (10). Se suspendieron con 4 mL de cloruro de tionilo (0.055 mol, 16 eq.) y se adicionaron 0.5 mL de DMF (6.44×10^{-3} mol, 1.5 eq) como catalizador y para ayudar a la disolución de la materia prima. Se dejó en agitación y temperatura ambiente por 72 h. Después de ese tiempo se elevó la temperatura a 50 °C y permaneció así por 2 h. Se realizó CCF (Nota 1) y reveló ausencia de materia prima (Rf. éster: 0.78, sistema II). El remanente de cloruro de tionilo se eliminó destilándolo al vacío por arrastre con 2x20 mL de tolueno y enseguida con 20 mL acetonitrilo anhidro. Se obtuvo un sólido amarillo, el cual fue lavado con 10 mL de hexano anhidro frío y se filtró. El sólido seco aislado pesó 0.855 g (3.27 mmol, 97%) al cual se le realizó CCF y reveló ausencia de materia prima. Se conservó bajo atmósfera de nitrógeno e inmediatamente se sometió a la siguiente reacción.

NOTA 1: Las placas de CCF se realizaron derivatizando el cloruro de acilo al éster de la siguiente manera: la mezcla de reacción contenida en un tubo de ensayo se le adicionó MeOH grado HPLC y se calentó para facilitar la formación del éster. Después éste se recuperó por extracción con AcOEt en condiciones alcalinas (adición NaHCO_3 5%).

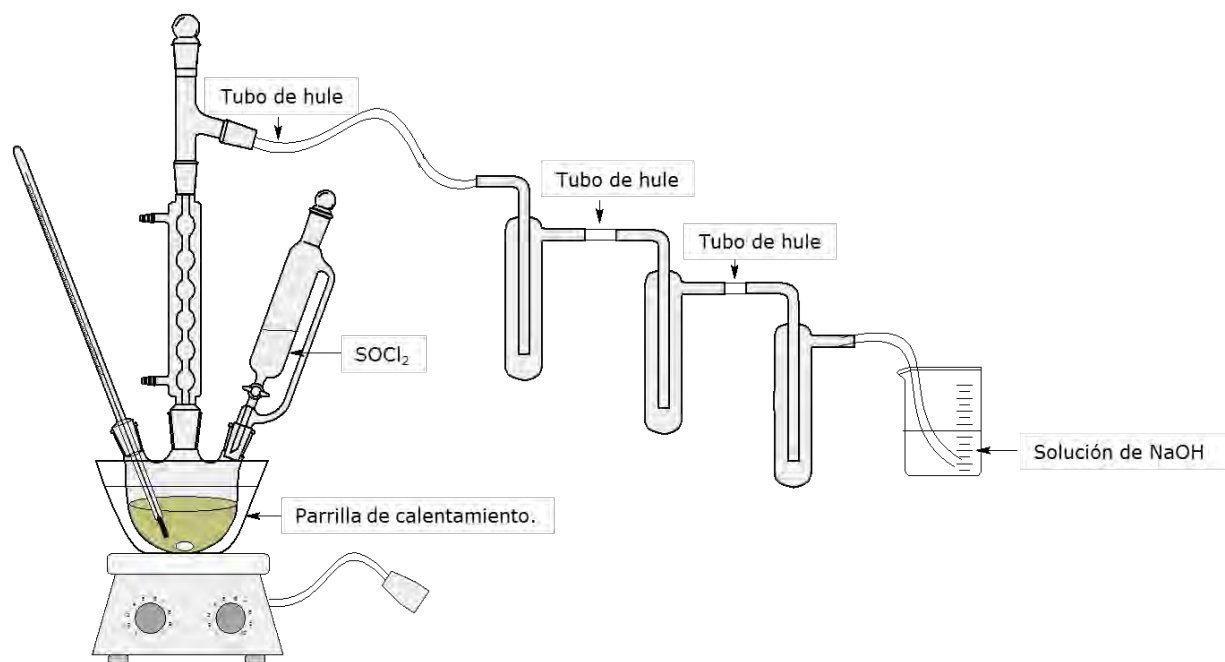
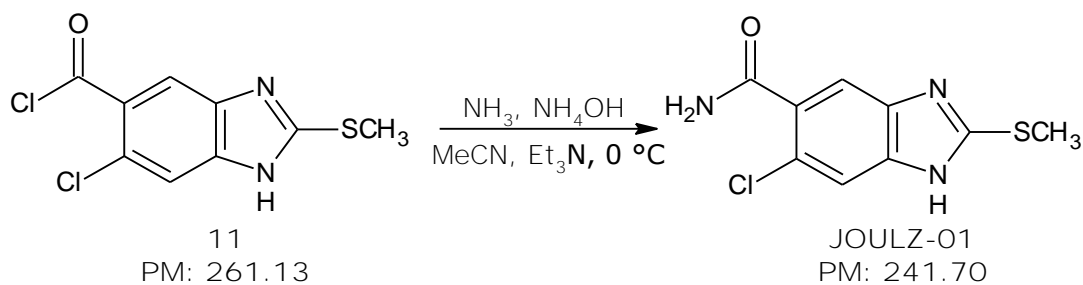


Figura 10.1. Sistema para la síntesis de los cloruros de acilo.

10.2.4. 6-Cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01) Reacción de sustitución nucleofílica al cloruro de acilo



Se suspendieron 0.855 g (3.27×10^{-3} mol) de cloruro de 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carbonilo (11) en 20 mL de acetonitrilo anhidro, en un matraz bola de 100 mL de tres bocas, adaptado con agitación magnética, trampa de humedad, termómetro, atmósfera de nitrógeno y conectado a un matraz generador [Figura 10.2]. Una vez montado el sistema se disminuyó la temperatura del matraz de reacción a 0 °C con ayuda de un baño de hielo/sal/etanol y se adicionaron 1.8 mL de trietilamina (0.013 mol, 4 eq.). Se purgó el sistema haciendo pasar N₂ desde el matraz generador.

En el matraz generador se colocaron 2.7 g de cloruro de amonio (0.044 mol, 13 eq.), a los cuales se les adicionó lentamente, con agitación constante y a 50 °C una solución de NaOH preparada con 2.33 g (0.044 mol, 13 eq.) en 5 mL de agua,

lo anterior para generar amoníaco (P.eb: $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$). Una vez terminado el burbujeo se desinstaló el matraz generador y se adicionaron 2 mL (0.014 mol, 4 eq.) de hidróxido de amonio (Sol. Acuosa al 29%) a la mezcla de reacción, siempre manteniendo la temperatura a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se dejó reaccionar 1 h y posteriormente permaneció con agitación constante a temperatura ambiente por 24 h. Al transcurrir ese tiempo precipitó un sólido cristalino. Se tomó una alícuota del medio de reacción y se realizó CCF, la cual reveló la marca correspondiente a la amida y la presencia de ácido carboxílico proveniente de la hidrólisis del cloruro de acilo. Se filtró al vacío para retirar el sólido blanco-cristalino (cloruro de trietilamonio). El líquido filtrado se concentró a sequedad y se obtuvo una resina color café claro que enseguida se disolvió en 10 mL de una mezcla etanol-metanol (1:1). Se preparó una columna cromatográfica con alúmina neutra la cual se eluyó con 100 mL de dicha mezcla. La fracción recolectada se concentró hasta sequedad y se obtuvo una resina amarilla que reveló una sola mancha en CCF. Se lavó con agua/hielo y precipitó un sólido blanco que pesó 0.171 g (21%; Rf. 0.15, sistema II).

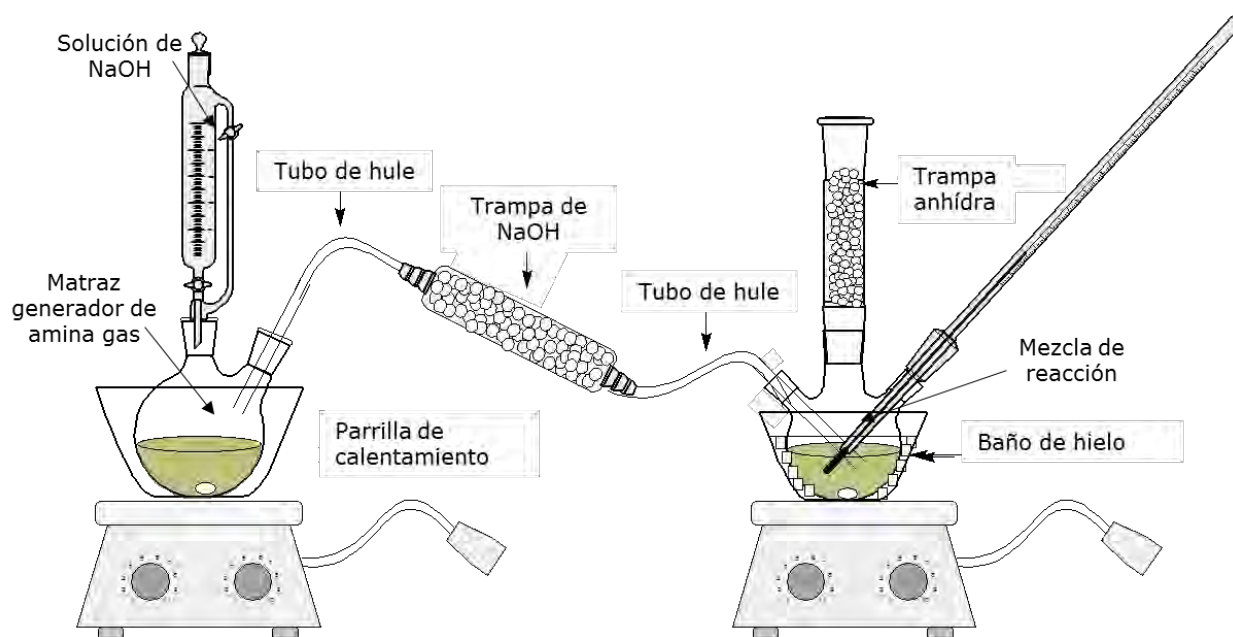
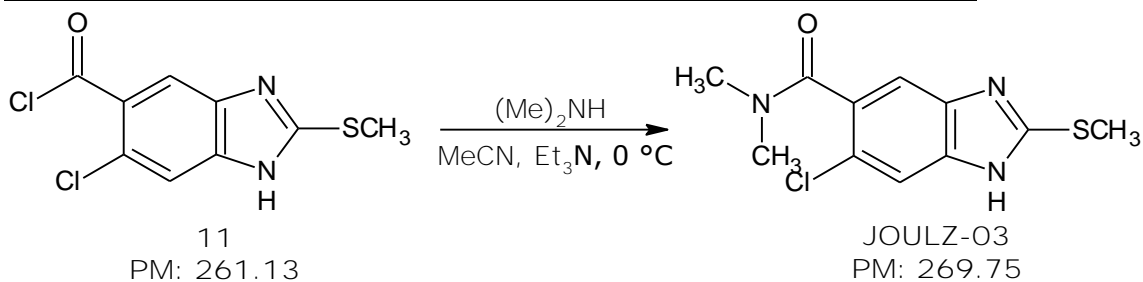
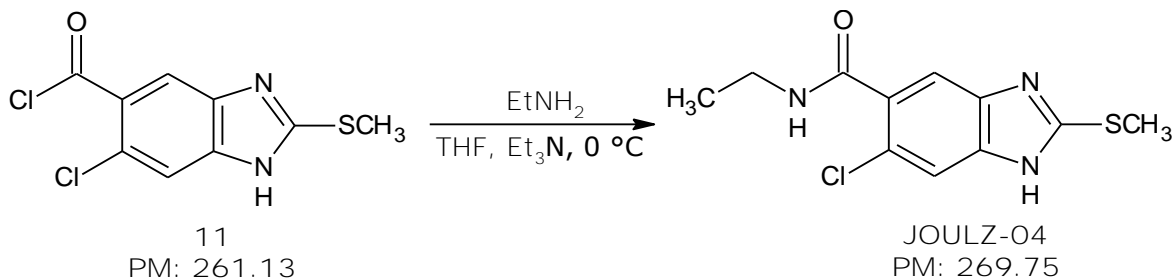


Figura 10.2. Sistema para la síntesis de las carboxamidas.

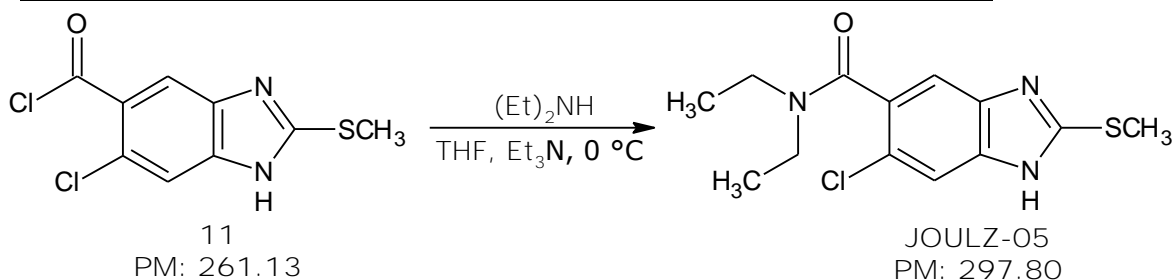
10.2.6. 6-Cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-03)Reacción de sustitución nucleofílica al cloruro de acilo

Se suspendieron 0.470 g (1.80×10^{-3} mol) del compuesto 11 en 20 mL de acetonitrilo anhidro en un matraz bola de 100 mL de tres bocas, adaptado como se describe en el procedimiento 10.2.4. Una vez montado el sistema se disminuyó la temperatura del matraz de reacción a 0 °C con ayuda de un baño de hielo/sal/etanol y se adicionó 1 mL de trietilamina (7.22×10^{-3} mol, 4 eq.). Se purgó el sistema haciendo pasar N_2 desde el matraz generador.

En el matraz generador se colocaron 3.24 g de cloruro de dimetilamonio (0.040 mol, 21 eq.), a los cuales se les adicionó rápidamente 2.0 g de granallas de NaOH (0.040 mol, 25 eq.). Esta mezcla de sólidos se mantuvo con agitación vigorosa, constante y manteniendo una temperatura de 50 °C para generar dimetilamina (P.eb: 7 °C). Con ayuda de una llave de paso que conectaba ambos matraces y con un globo conectado en la superficie del matraz generador como contenedor, se realizó un burbujeo suave durante 30 min en el seno de la reacción. Se dejó reaccionar 1 h y posteriormente permaneció con agitación constante a temperatura ambiente por 120 h. Al paso de ese periodo se realizó CCF, ésta reveló además del producto deseado, ausencia de materia prima y presencia del ácido carboxílico 10. Se concentró a sequedad y se obtuvo una resina color amarillo (Peso del crudo: 1.05 g). Dicho sólido se lavó con acetona y filtró para retirar las sales (cloruro de trietilamonio). Enseguida se llevó a una columna cromatográfica de alúmina neutra y se eluyó con 200 mL de una mezcla cloroformo-metanol (6:4). Se eliminó el disolvente de la fracción recolectada. La resina obtenida (0.353 g) se lavó con agua/hielo y precipitó un sólido blanco que pesó 0.330 g (68%; Rf. 0.55, sistema II).

10.2.7. 6-Cloro-*N*-etil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-04)Reacción de sustitución nucleofílica al cloruro de acilo

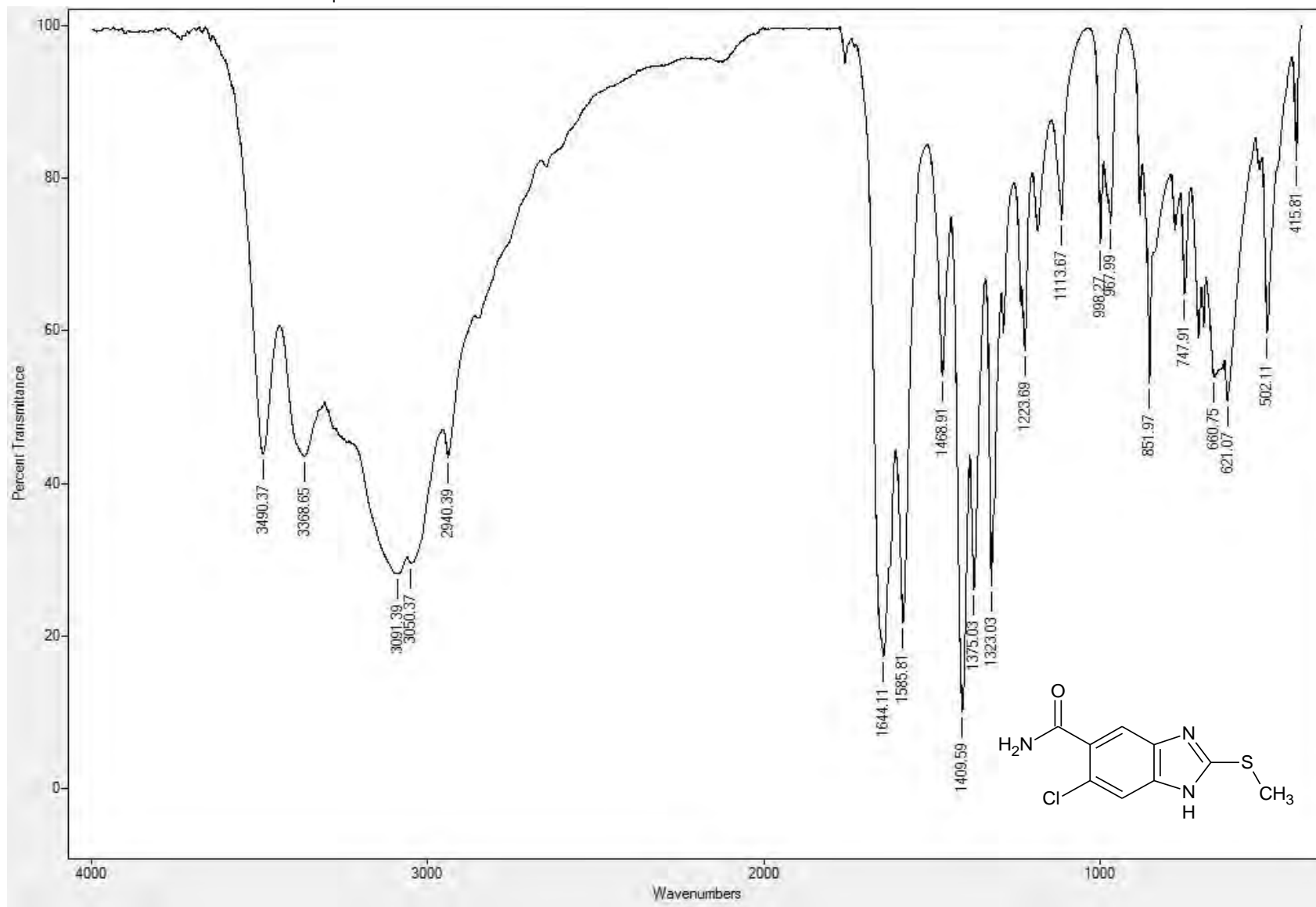
En un matraz de bola de tres bocas de 100 mL adaptado con agitación magnética, termómetro, trampa de humedad, baño de hielo/sal/etanol, atmósfera de nitrógeno y conectado a un tanque que contenía la etilamina (P.eb= 17 °C), se suspendieron 0.82 g (3.14×10^{-3} mol) de 11 en 20 mL de THF. Con el tanque de etilamina previamente pesado y manteniendo la temperatura menor a 0 °C se realizó un burbujeo suave al seno de la reacción durante 10 min y por diferencia de peso se supo que se agregaron 3.39 g (0.075 mol, 24 eq). Enseguida se adicionaron 1.5 mL de trietilamina (9.42×10^{-3} mol, 3 eq.), la mezcla de reacción se tornó traslúcida y apareció un precipitado blanco (cloruro de la trietilamonio), se dejó que alcanzara temperatura ambiente y permaneció en agitación 12 h. Una vez transcurrido ese tiempo se realizó CCF, ésta reveló la transformación de la materia prima al compuesto de interés, junto con el subproducto de hidrólisis 10. La mezcla de reacción se filtró al vacío y se concentró hasta sequedad obteniéndose una resina color naranja. Ésta se eluyó sobre una columna de alúmina neutra con 100 mL de una mezcla CHCl_3 -MeOH (4: 1), la fracción obtenida reveló en CCF una sola marca correspondiente al compuesto deseado. Enseguida, se recristalizó con 25 mL de agua y unas gotas de EtOH (cbp. lograr solubilizarlo). Se obtuvo un sólido blanco que pesó 0.137 g (16 %; Rf. 0.52, sistema II).

10.2.8. 6-Cloro-*N,N*-dietil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-05)Reacción de sustitución nucleofílica al cloruro de acilo

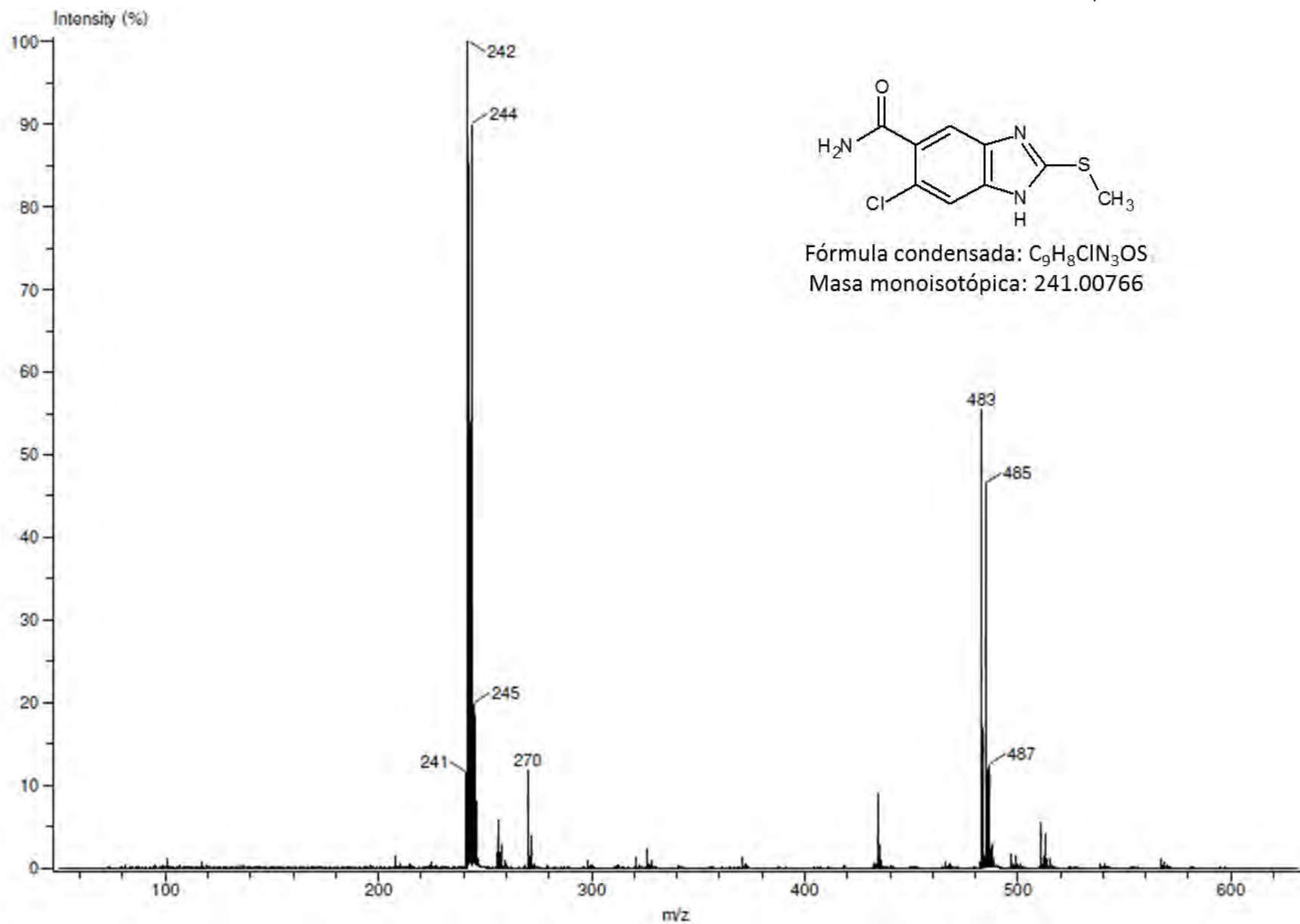
En un matraz de bola de tres bocas de 100 mL, adaptado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición, atmósfera de nitrógeno y baño de hielo/sal/etanol, se suspendieron 0.82 g (3.14×10^{-3} mol) de 11 en 20 mL de THF. Se procedió a disolver 0.5 mL de dietilamina (3.14×10^{-3} mol, 1 eq.) en 5 mL de THF y se adicionaron lentamente, manteniendo el medio de reacción a una temperatura entre 0-15 °C. Al terminar se agregaron 1.5 mL de trietilamina (9.42×10^{-3} mol, 3 eq.). La reacción permaneció 12 h en agitación a temperatura ambiente y al realizar la CCF reveló la obtención de JOULZ-05, sin embargo persistió el ácido carboxílico 10.

Enseguida se eliminó el disolvente, obteniéndose una resina amarilla que se llevó a una columna cromatográfica de alúmina neutra y se eluyó con 100 mL de una mezcla CHCl_3 -MeOH (4:1). Se evaporó el disolvente y se formó nuevamente una resina, de la cual precipito un sólido al agregar 20 mL de agua helada. Al final se obtuvieron 0.235 g (25 %) de un sólido blanco (Rf. 0.49, sistema II).

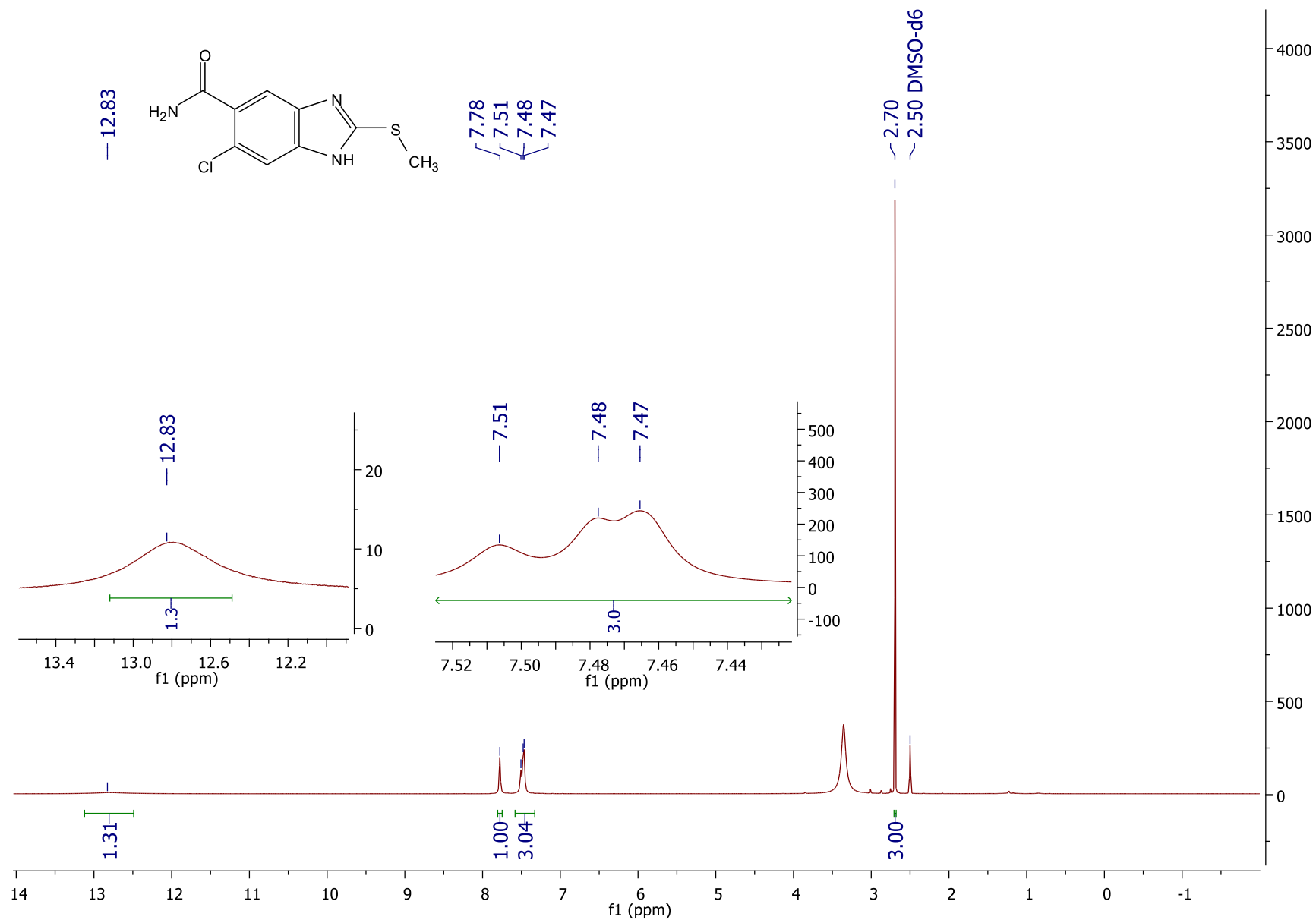
11. APÉNDICE B. Espectros

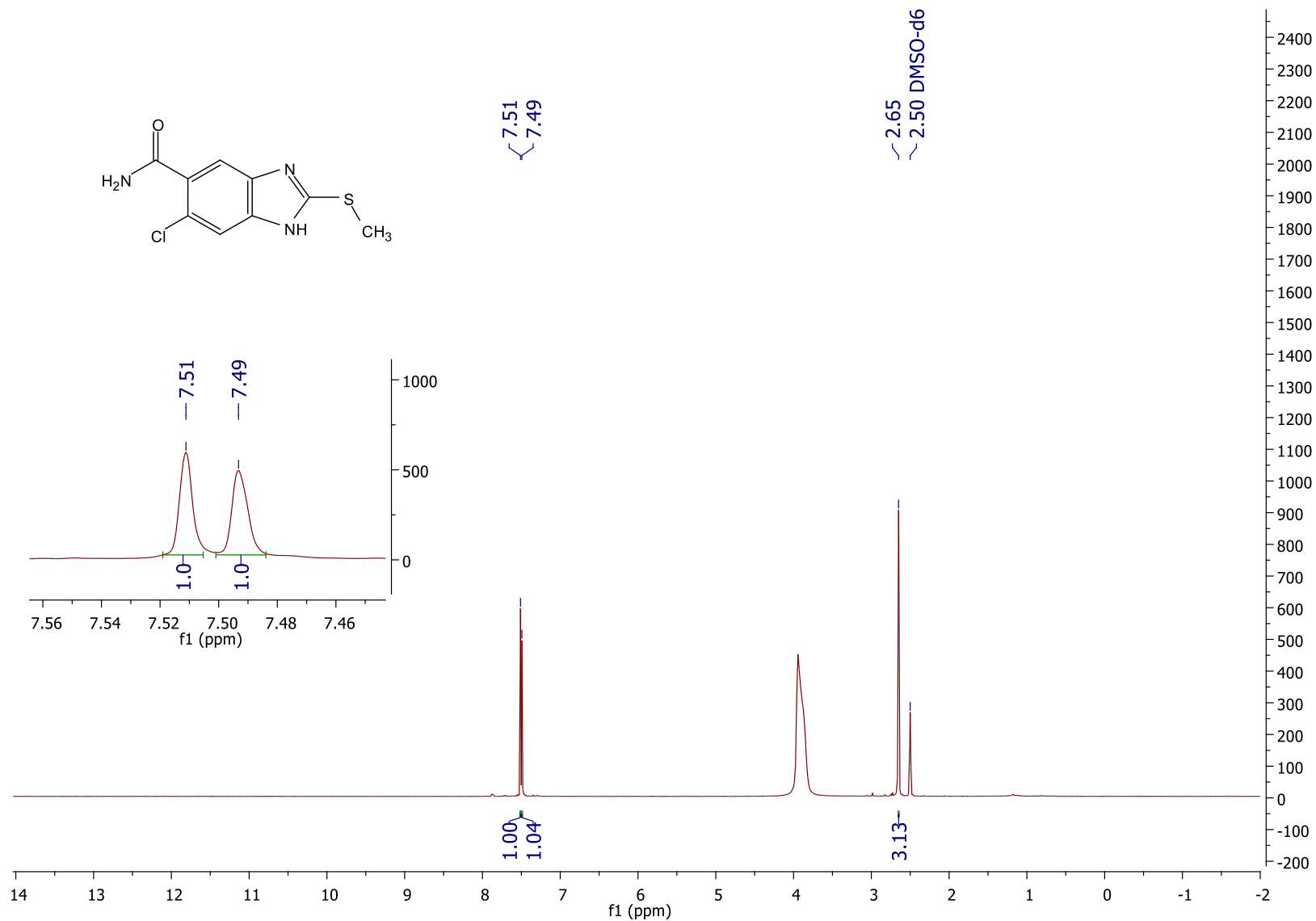


Espectro 1. FTIR (ATR) del 6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

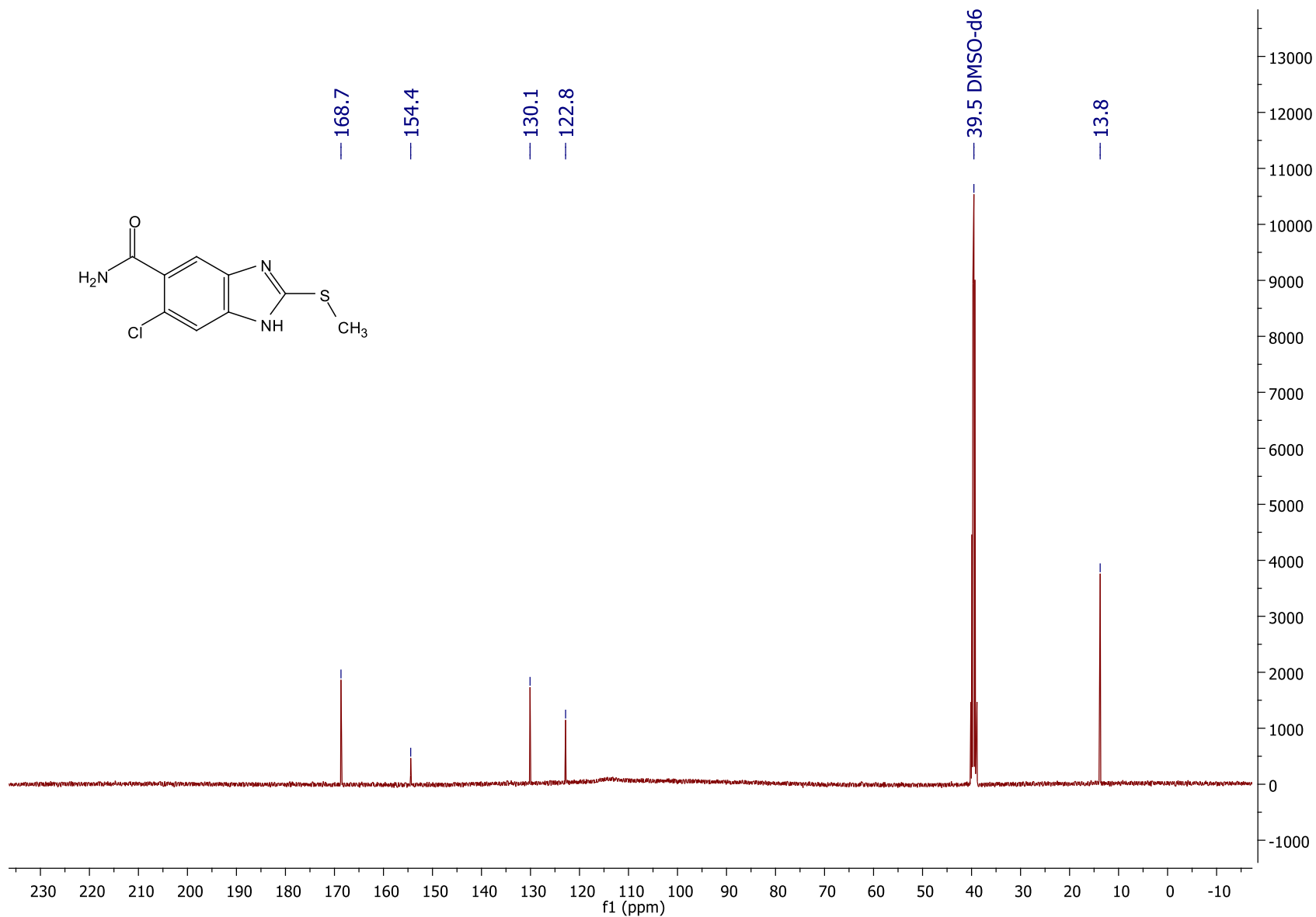


Espectro 2. EM-DART del 6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

Espectro 3. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d⁶) del 6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

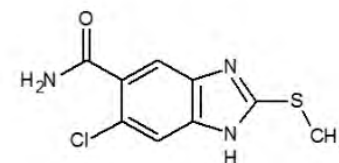
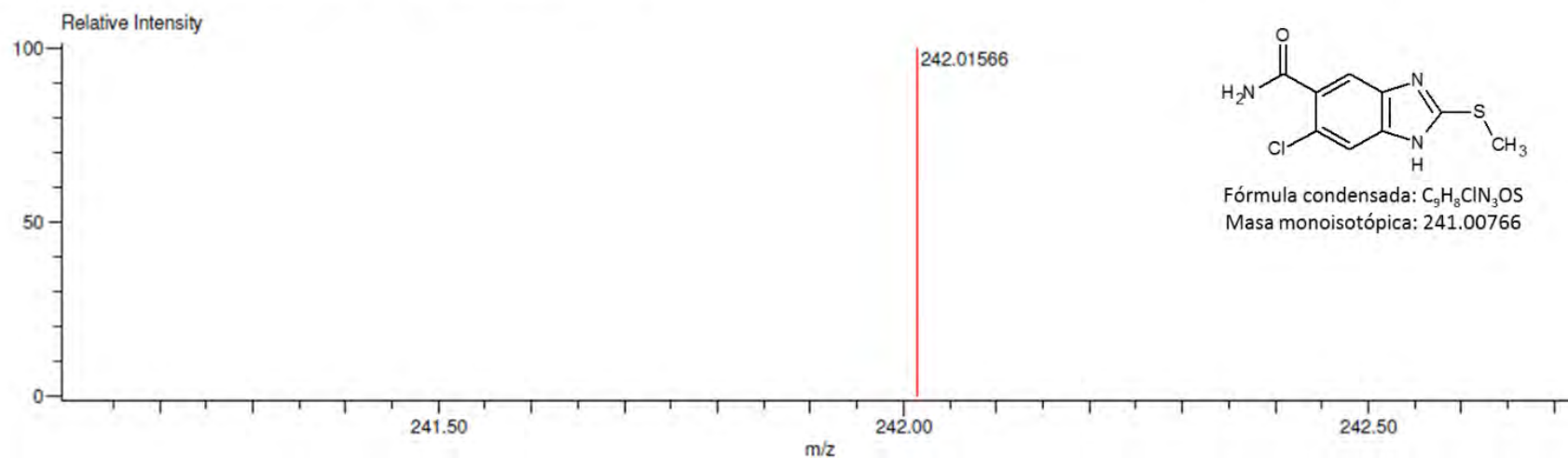


Espectro 3.1. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 + D_2O) del 6-cloro-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

Espectro 4. RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de 6-cloro-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 3, ¹⁶O:0 .. 1, ³²S:0 .. 1

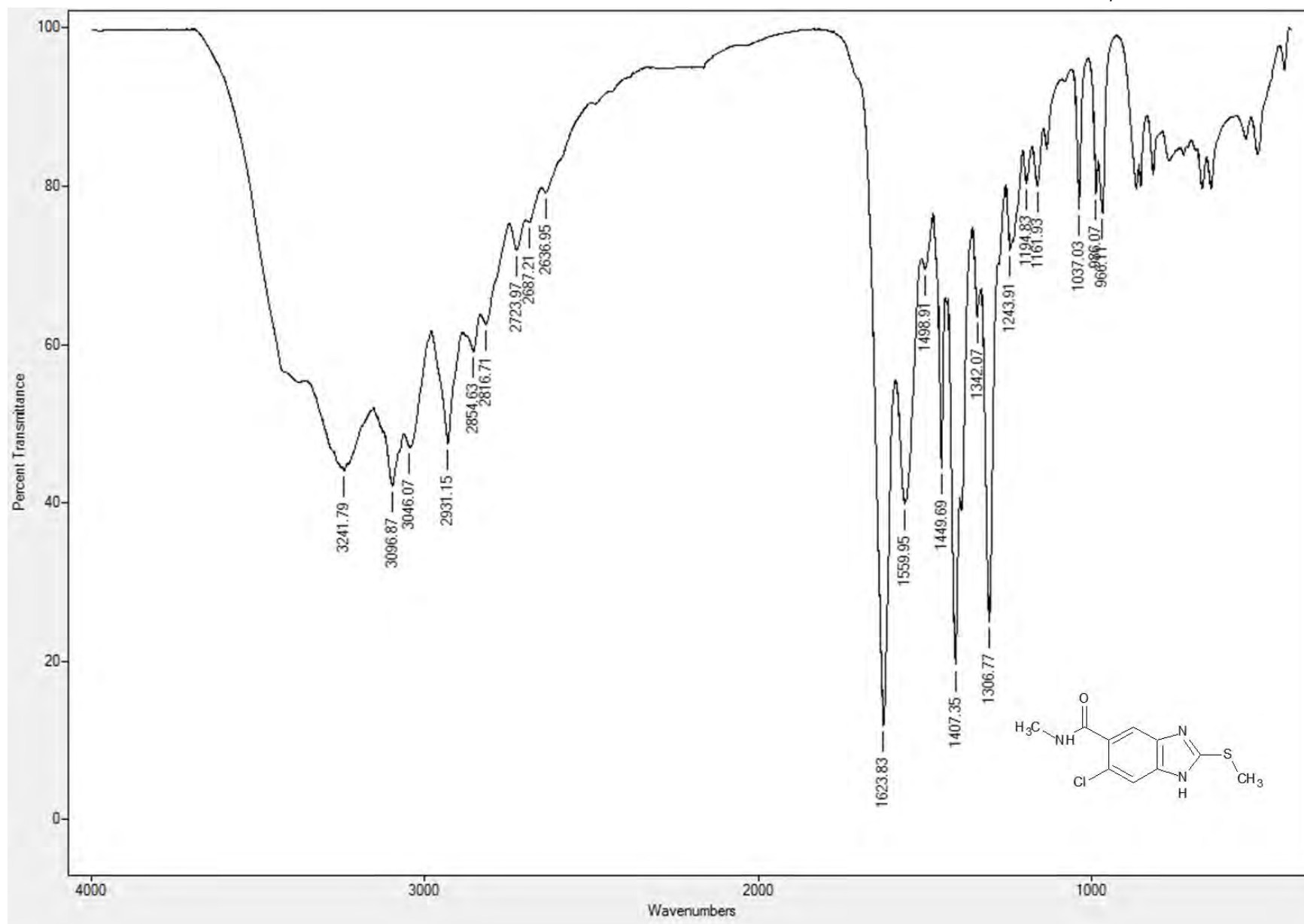
Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:Both)



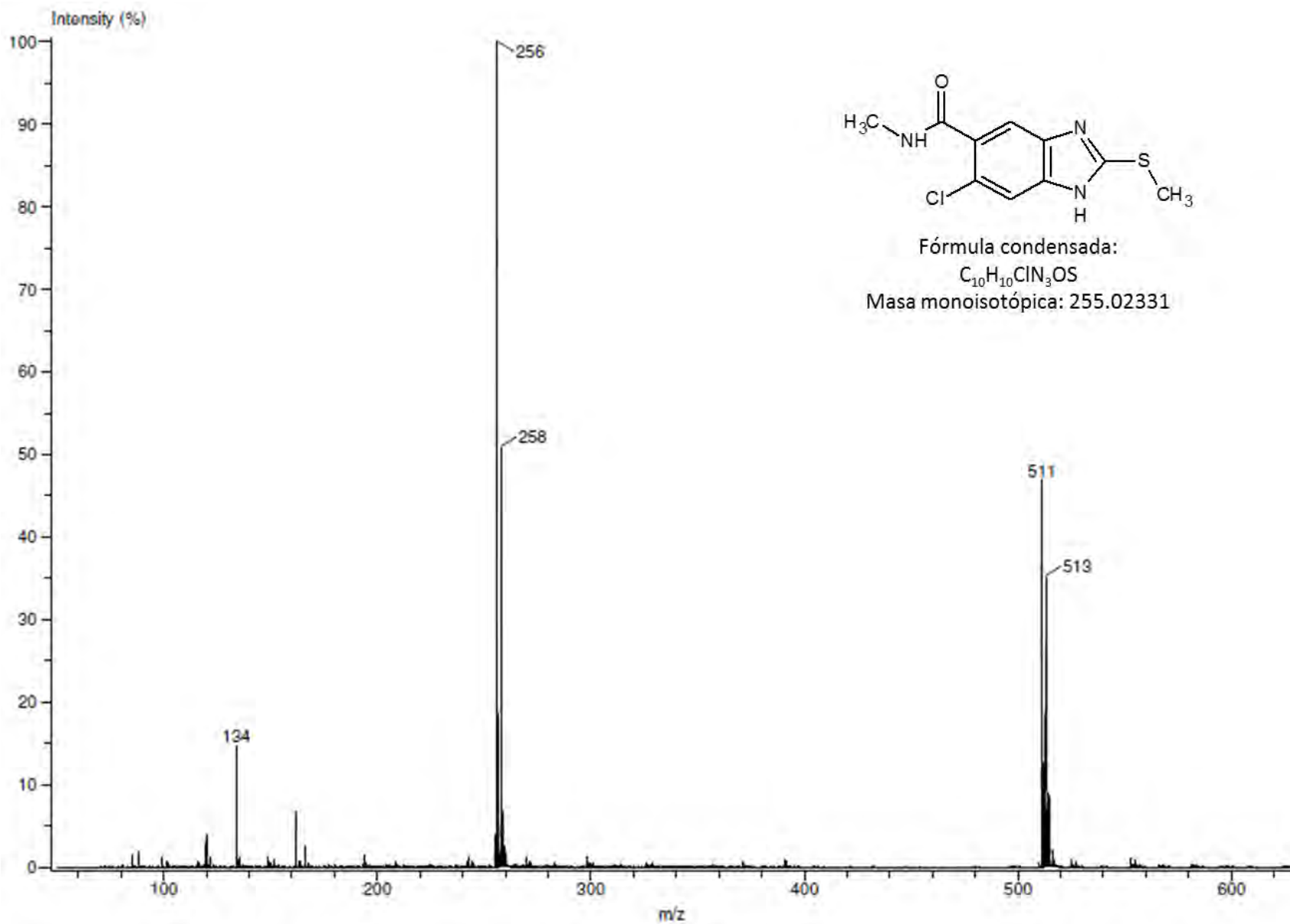
Fórmula condensada: C₉H₈ClN₃OS
 Masa monoisotópica: 241.00766

Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
242.01566	1627300.25	242.01549	0.17	0.70	¹² C ₉ ¹ H ₈ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₁ ³² S ₁	7.5

Espectro 5. EMAR (DART) del 6-cloro-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (JOULZ-01).

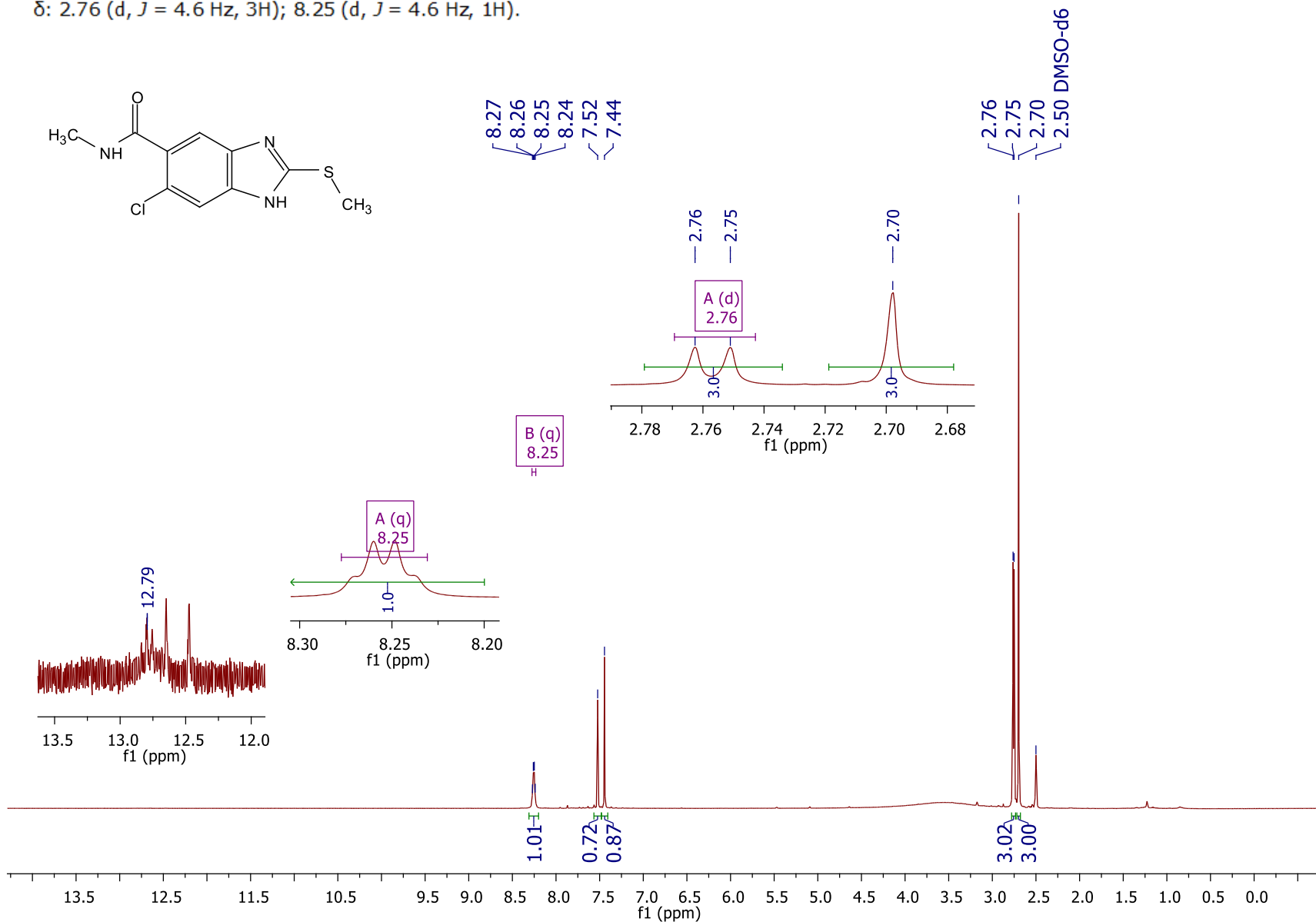


Espectro 6. FTIR (ATR) del 6-cloro-N-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-02).

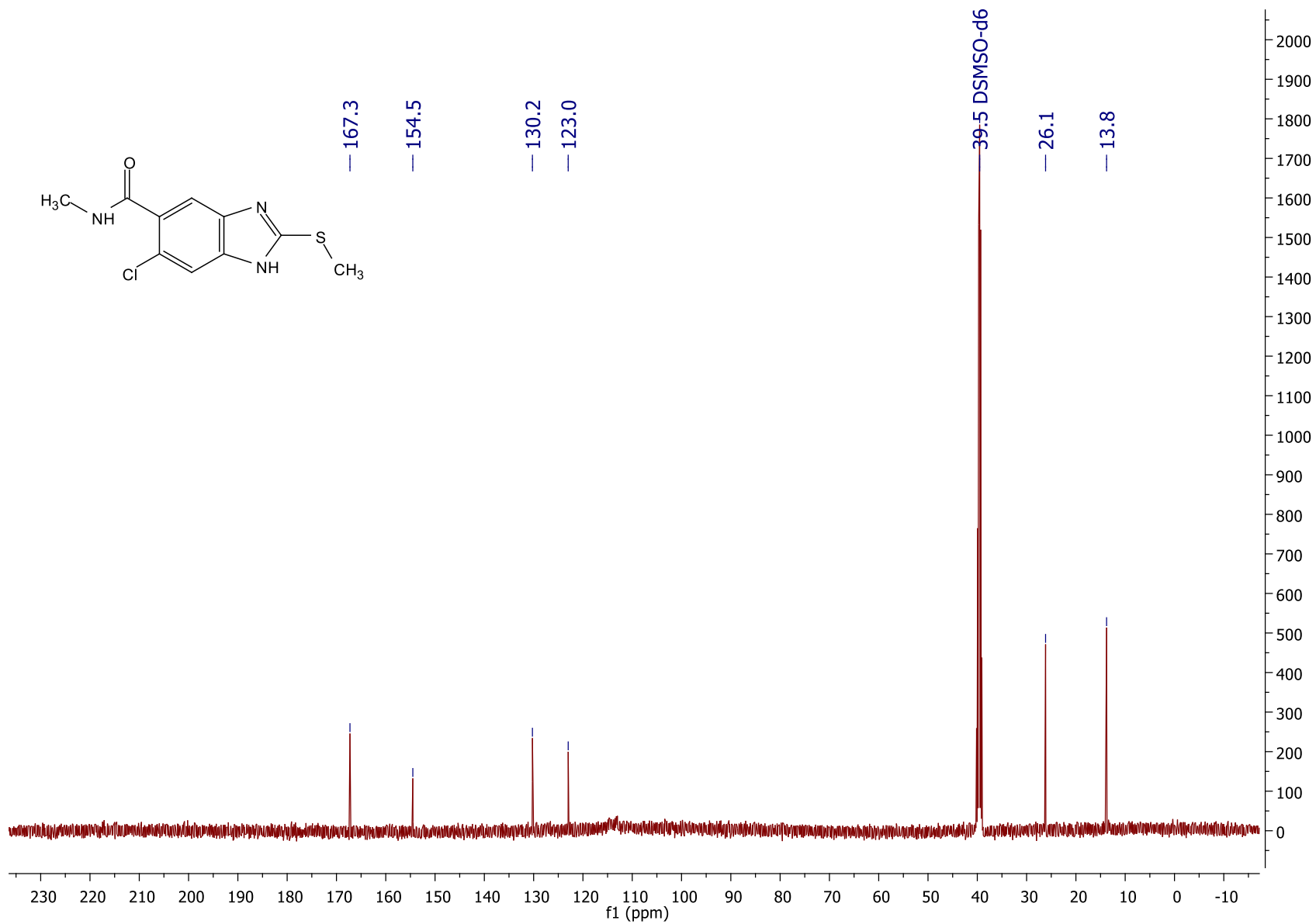


Espectro 7. EM-DART del 6-cloro-N-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-02).

δ : 2.76 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H); 8.25 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H).



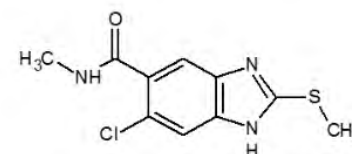
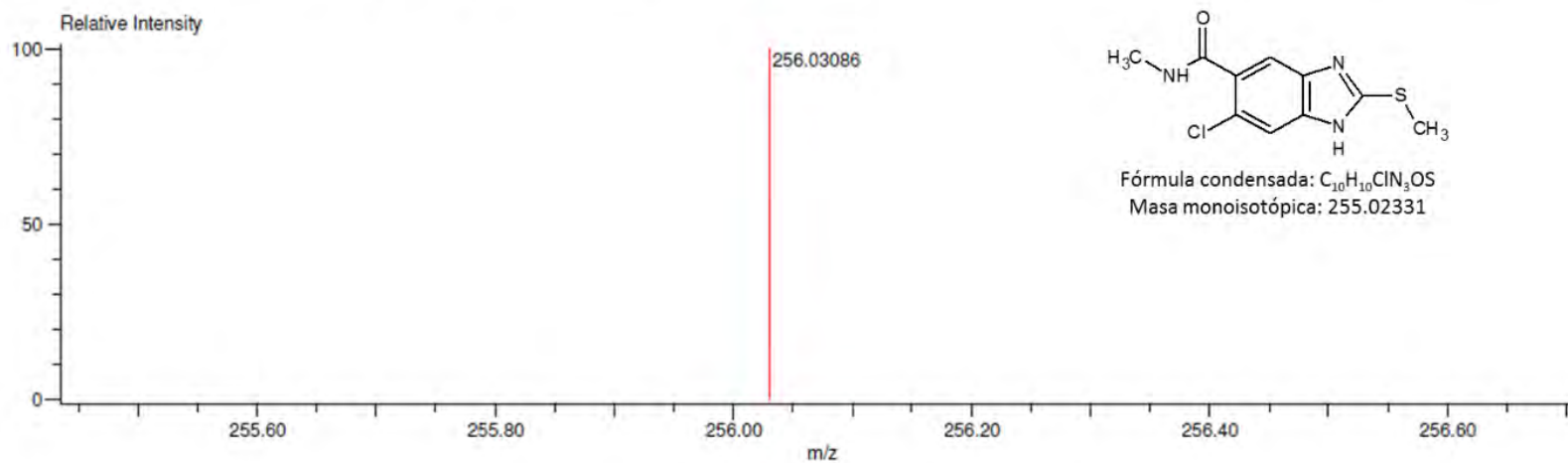
Espectro 8. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) del 6-cloro-*N*-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-02).



Espectro 9. RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d⁶) del 6-cloro-*N*-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-02).

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 3, ¹⁶O:0 .. 1, ³²S:0 .. 1

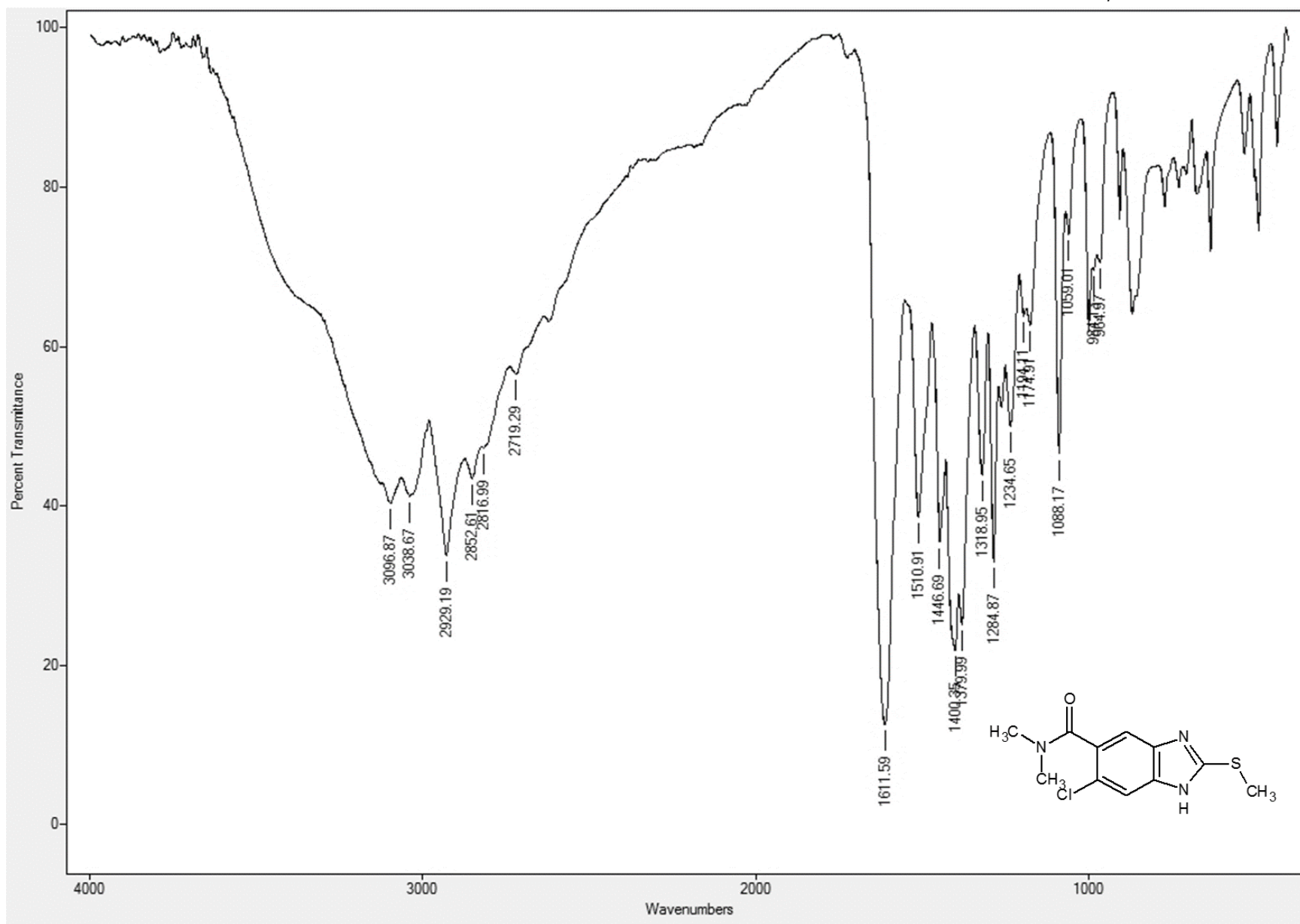
Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:Both)



Fórmula condensada: C₁₀H₁₀ClN₃OS
 Masa monoisotópica: 255.02331

Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
256.03086	1339263.92	256.03114	-0.28	-1.09	¹² C ₁₀ ¹ H ₁₁ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₁ ³² S ₁	7.5

Espectro 10. EMAR-(DART) del 6-cloro-*N*-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-02).

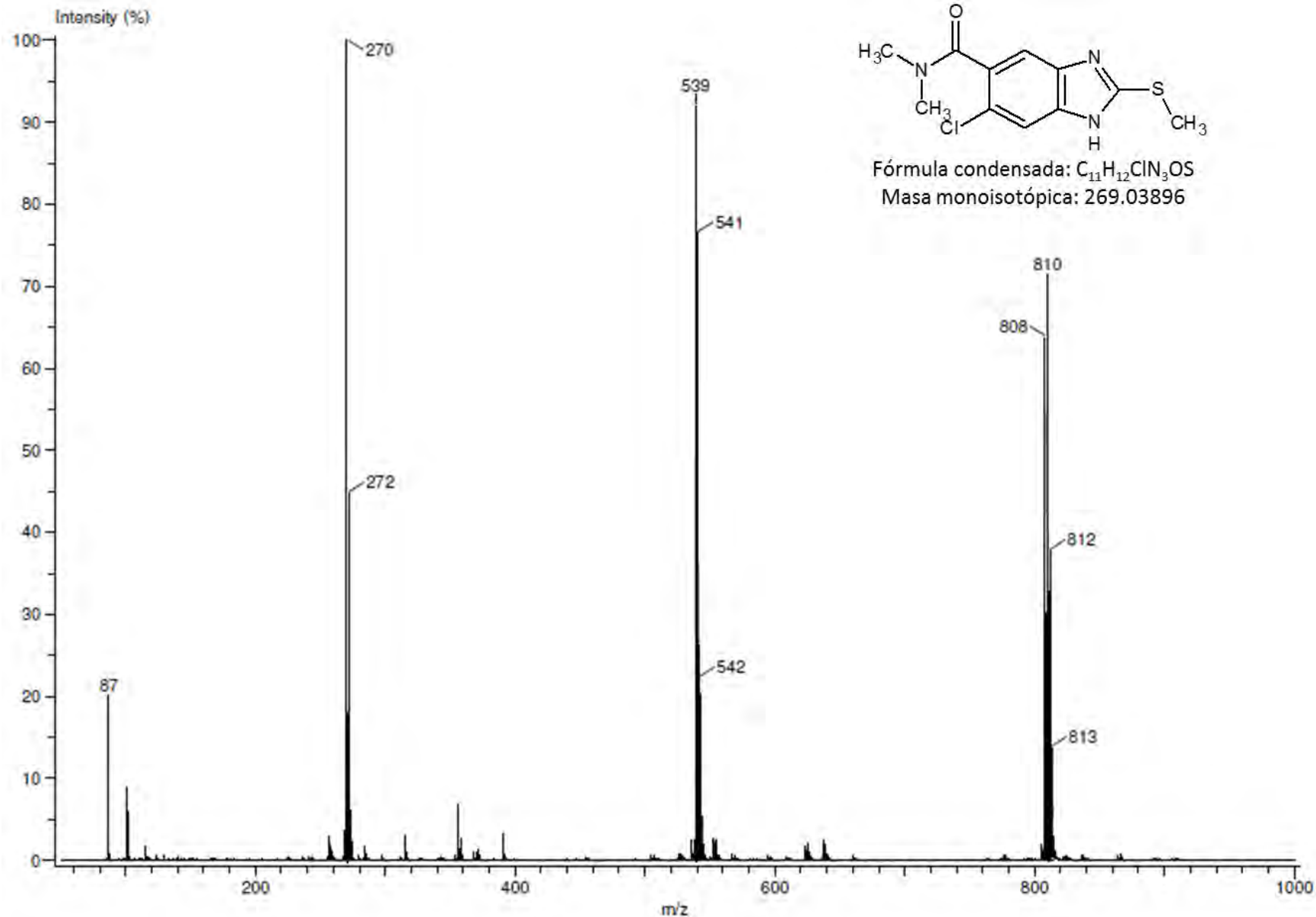


Espectro 11. FTIR (ATR) del 6-cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-03).

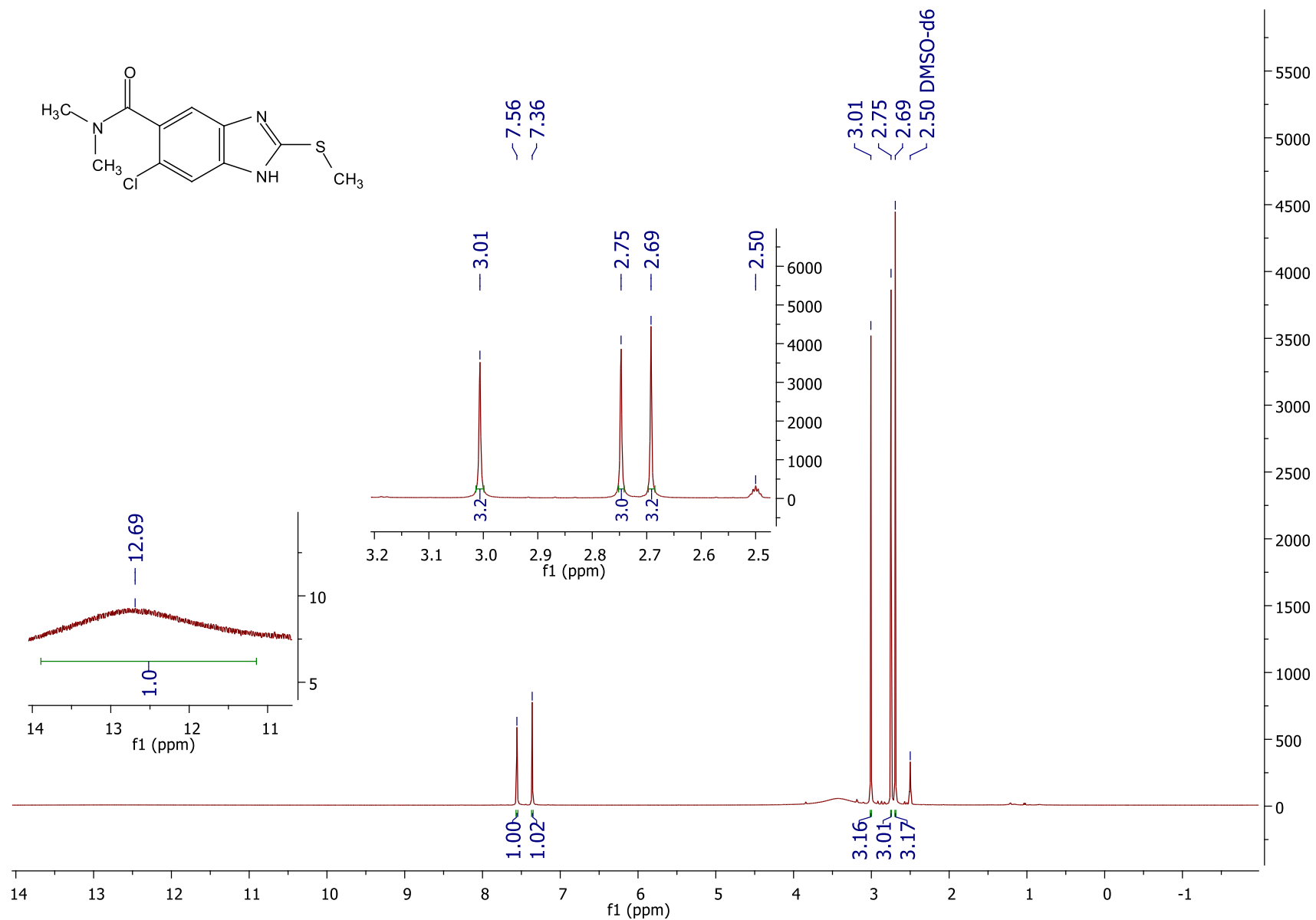
11. APÉNDICE B. Espectros



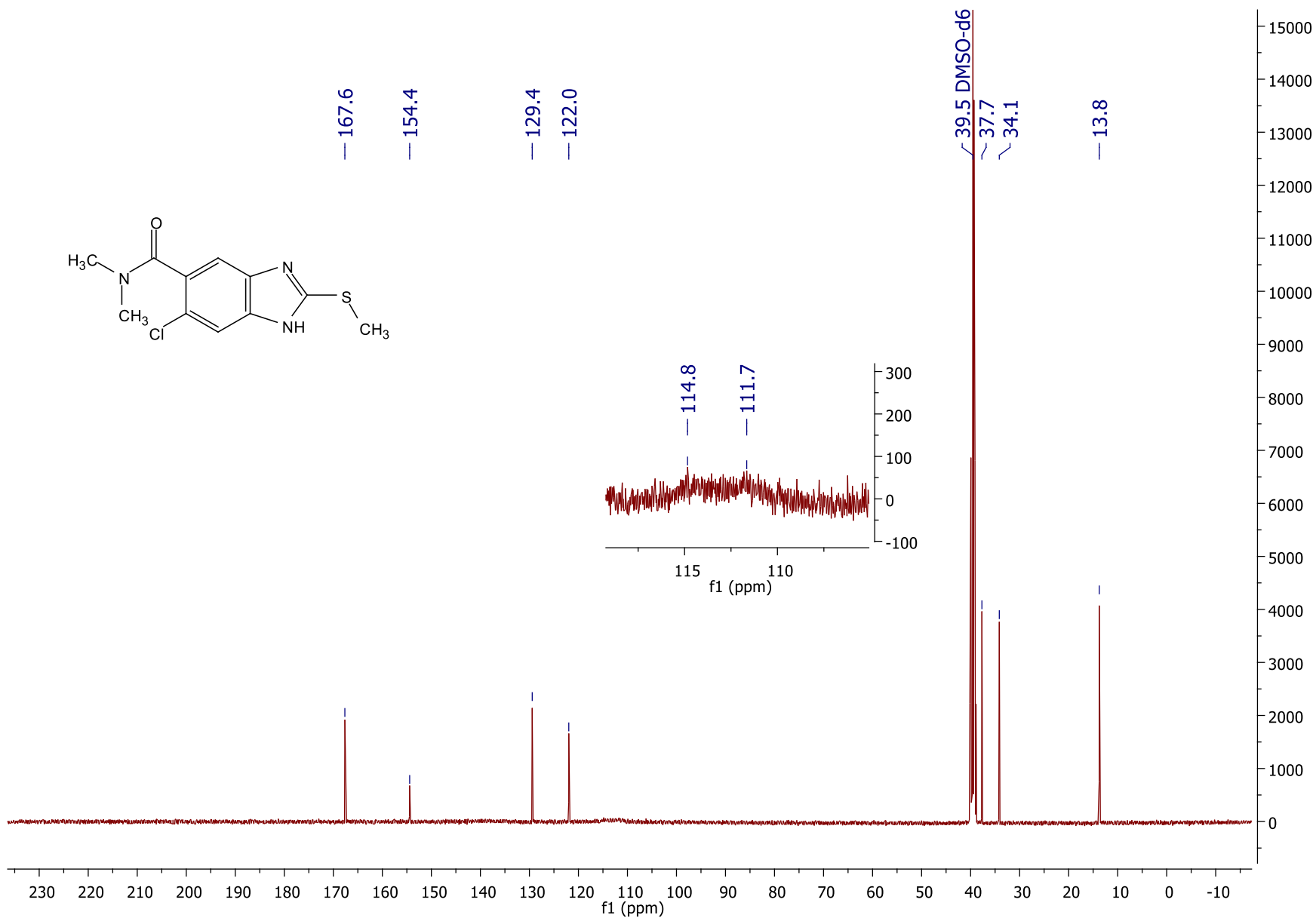
Fórmula condensada: C₁₁H₁₂ClN₃OS
Masa monoisotópica: 269.03896



Espectro 12. EM-DART del 6-cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-03).



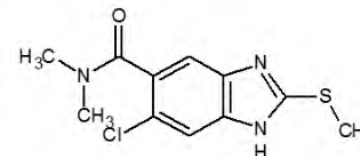
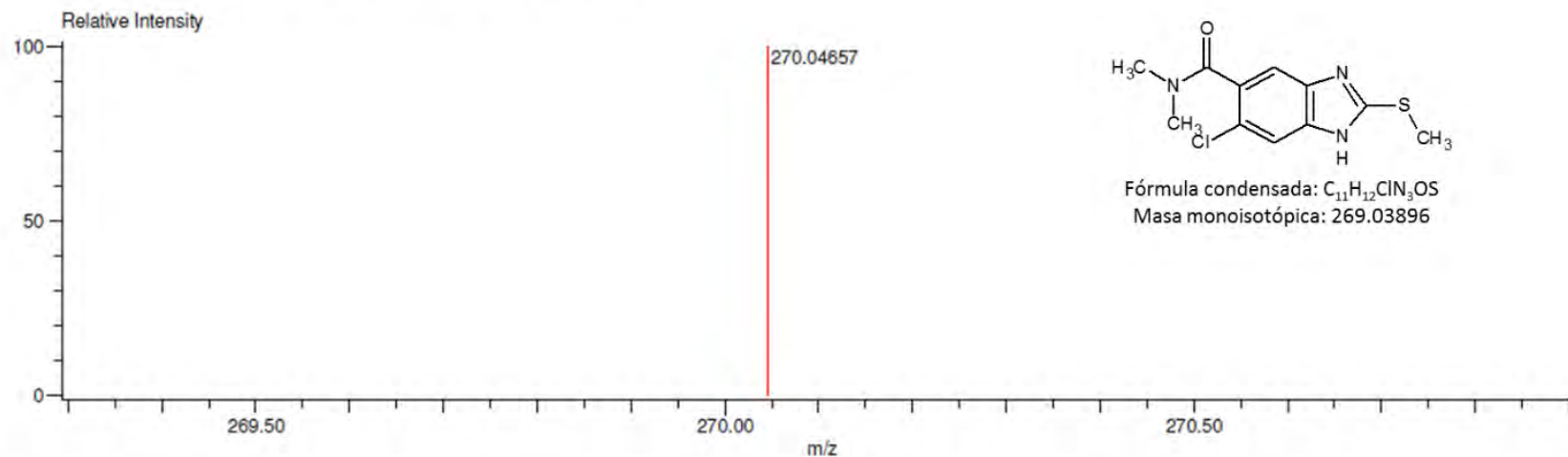
Espectro 13. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) del 6-cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-03).



Espectro 14. RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del 6-cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-03).

Charge number:1
 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 3, ¹⁶O:0 .. 1, ³²S:0 .. 1

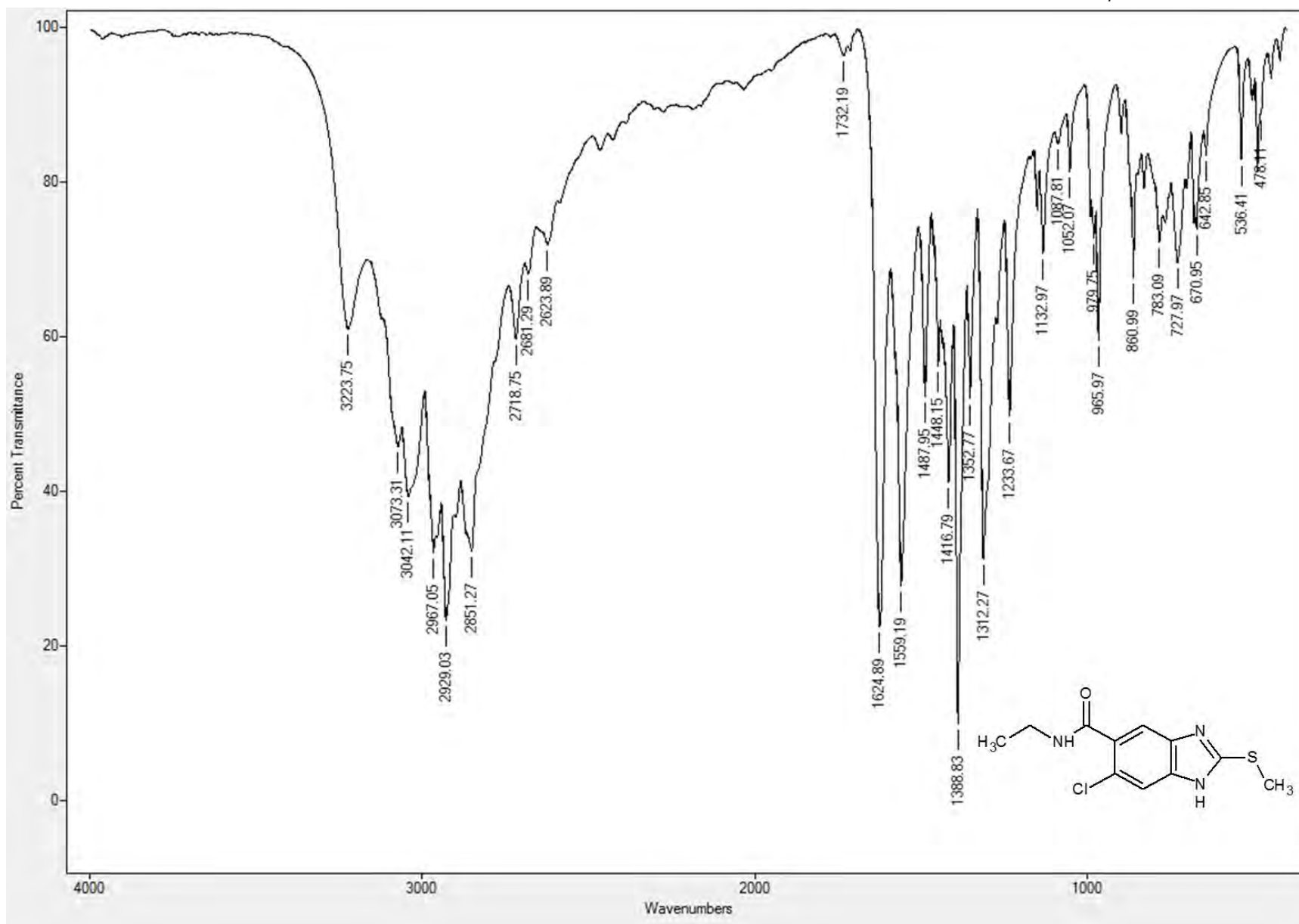
Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:Both)



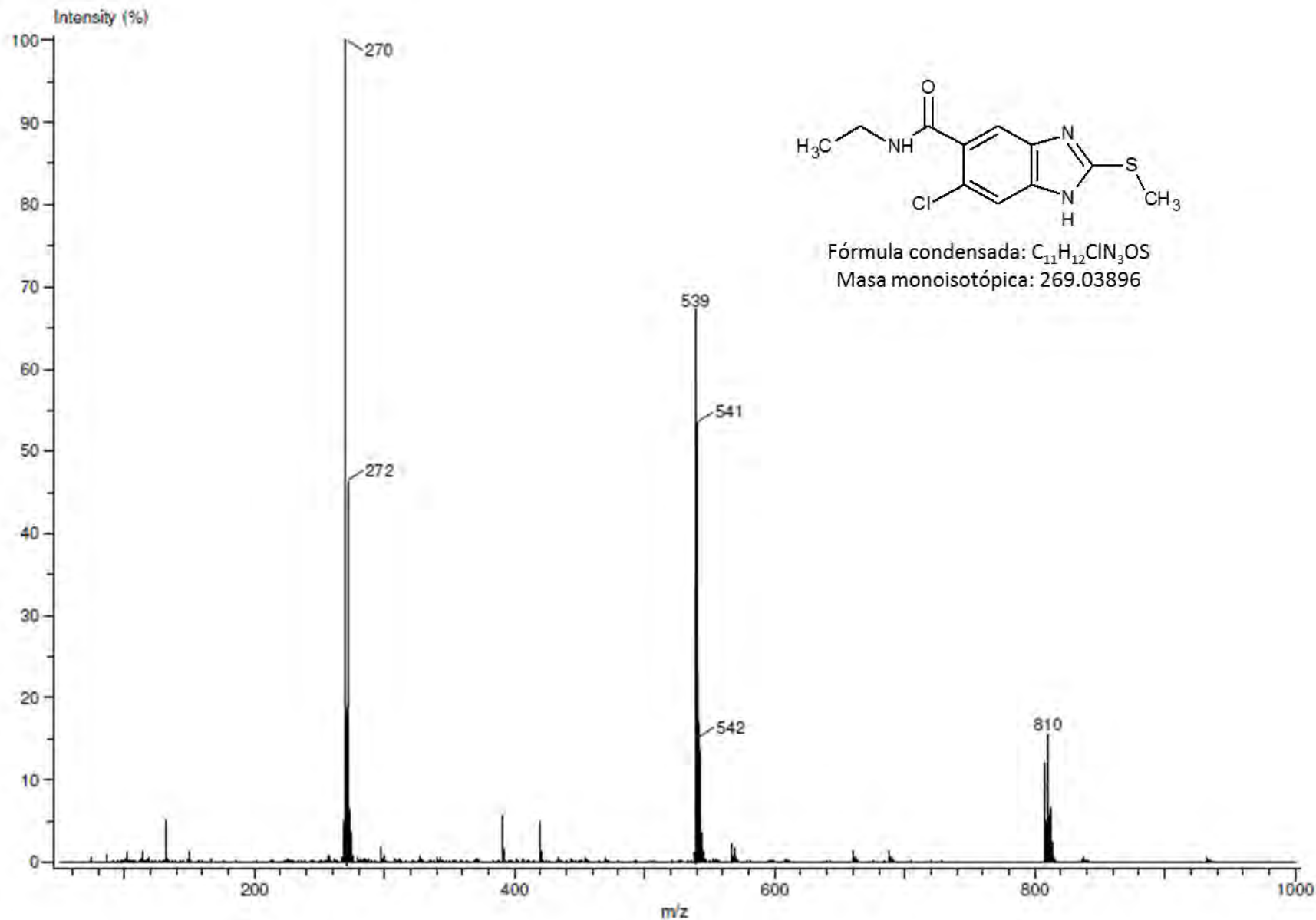
Fórmula condensada: C₁₁H₁₂ClN₃OS
 Masa monoisotópica: 269.03896

Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
270.04657	2572687.50	270.04679	-0.22	-0.81	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₃ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₁ ³² S ₁	7.5

Espectro 15. EMAR-(DART) del 6-cloro-*N,N*-dimetil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-03).

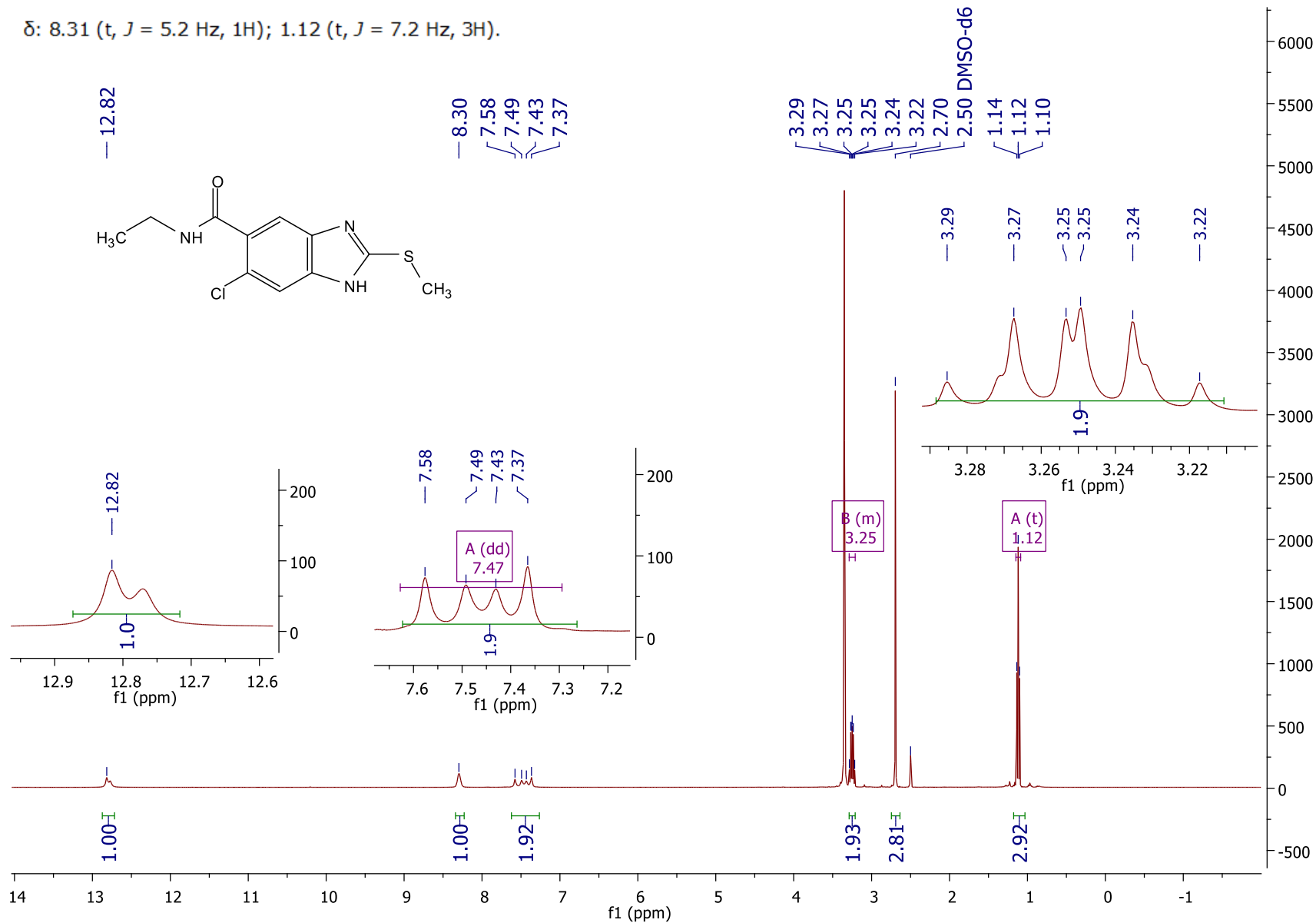


Espectro 16. FTIR (ATR) del 6-cloro-N-etil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-04).

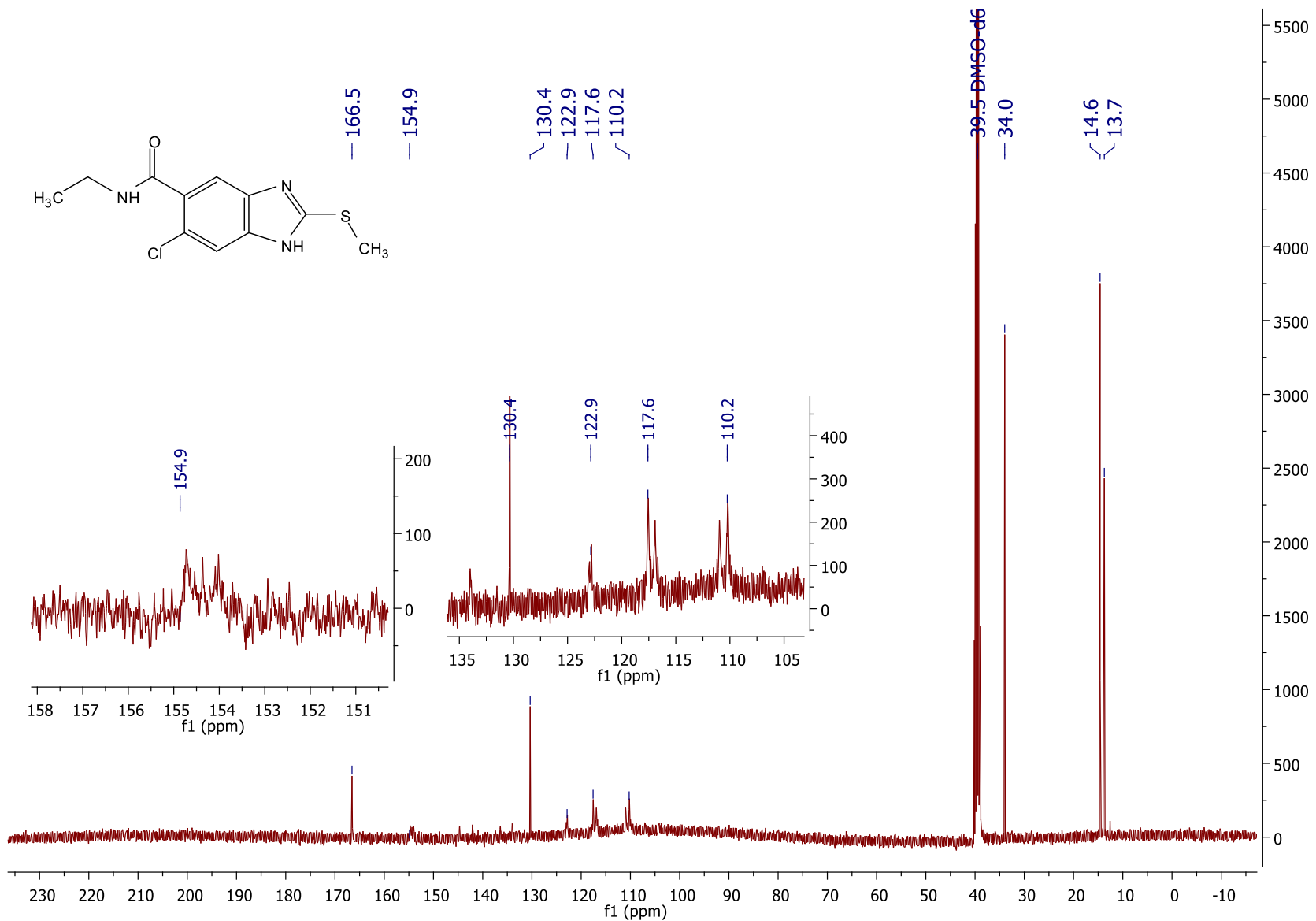


Espectro 17. EM-DART del 6-cloro-N-etil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-04).

δ : 8.31 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H); 1.12 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).



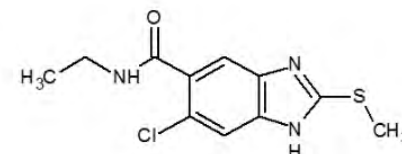
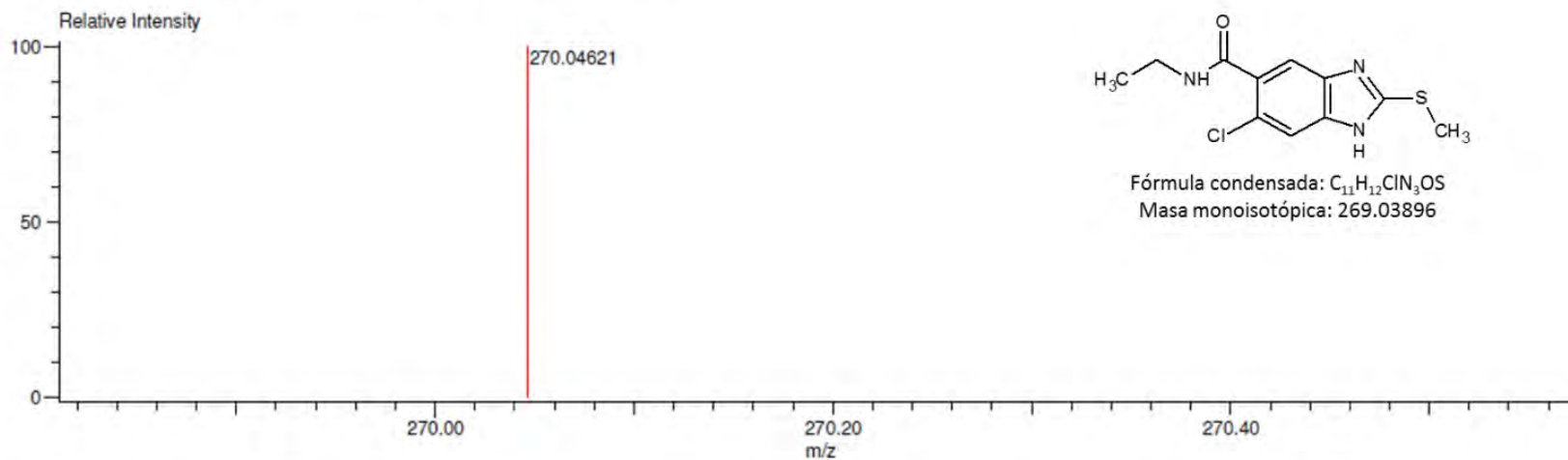
Espectro 18. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) del 6-cloro-*N*-etil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-04).



Espectro 19. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) del 6-cloro-N-etil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-04).

Charge number:1
 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 3, ¹⁶O:0 .. 1, ³²S:0 .. 1

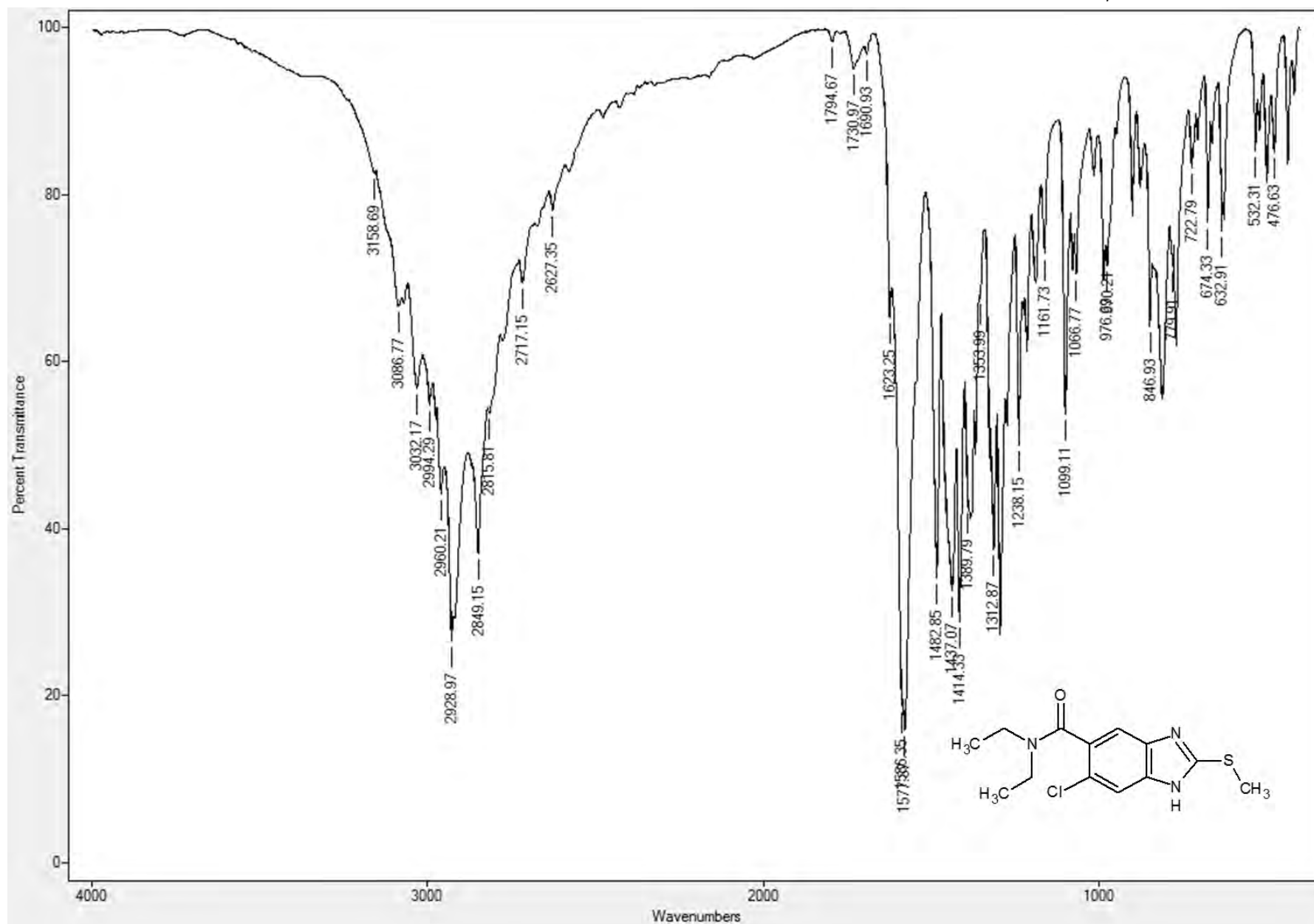
Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:Both)



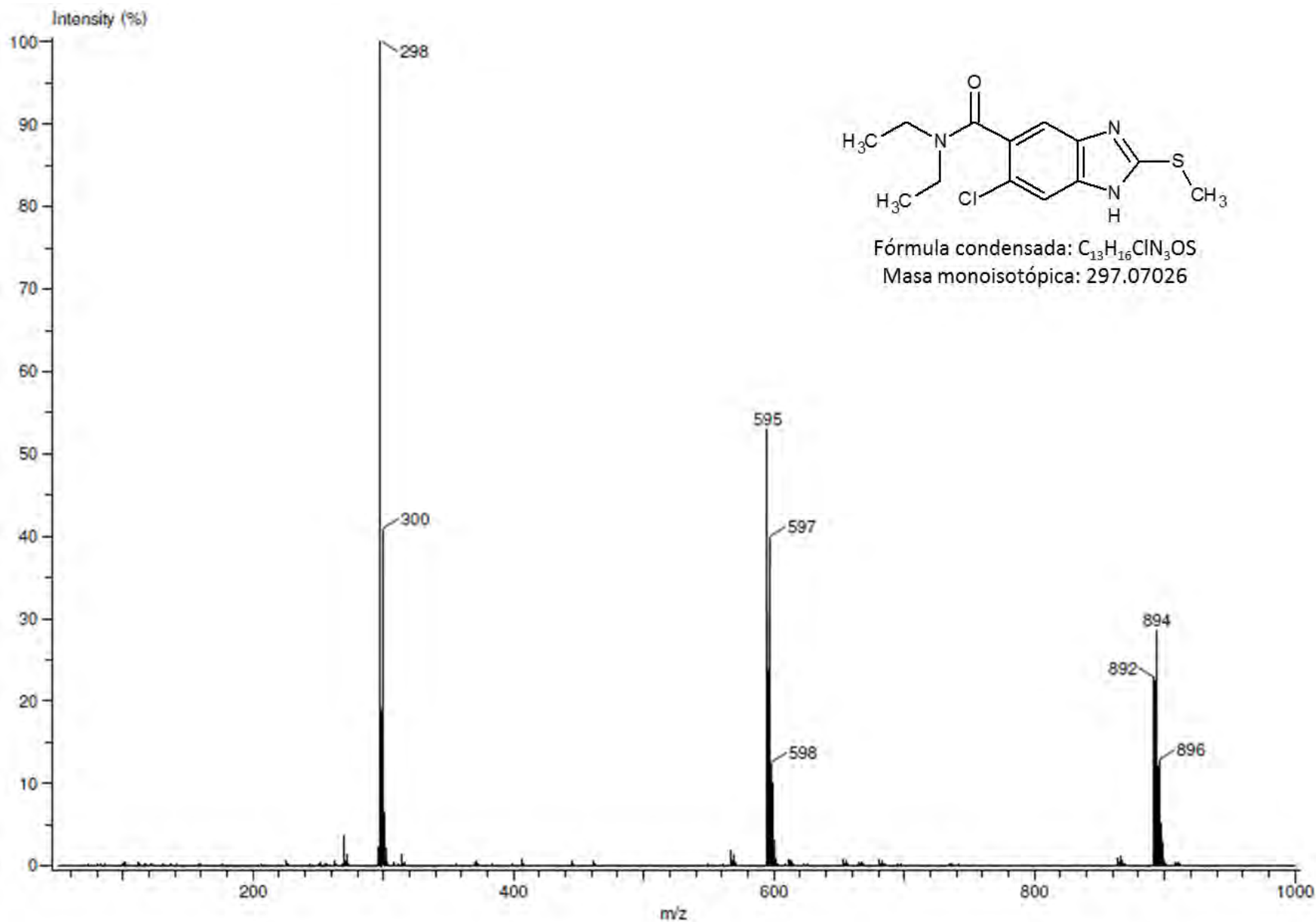
Fórmula condensada: C₁₁H₁₂ClN₃OS
 Masa monoisotópica: 269.03896

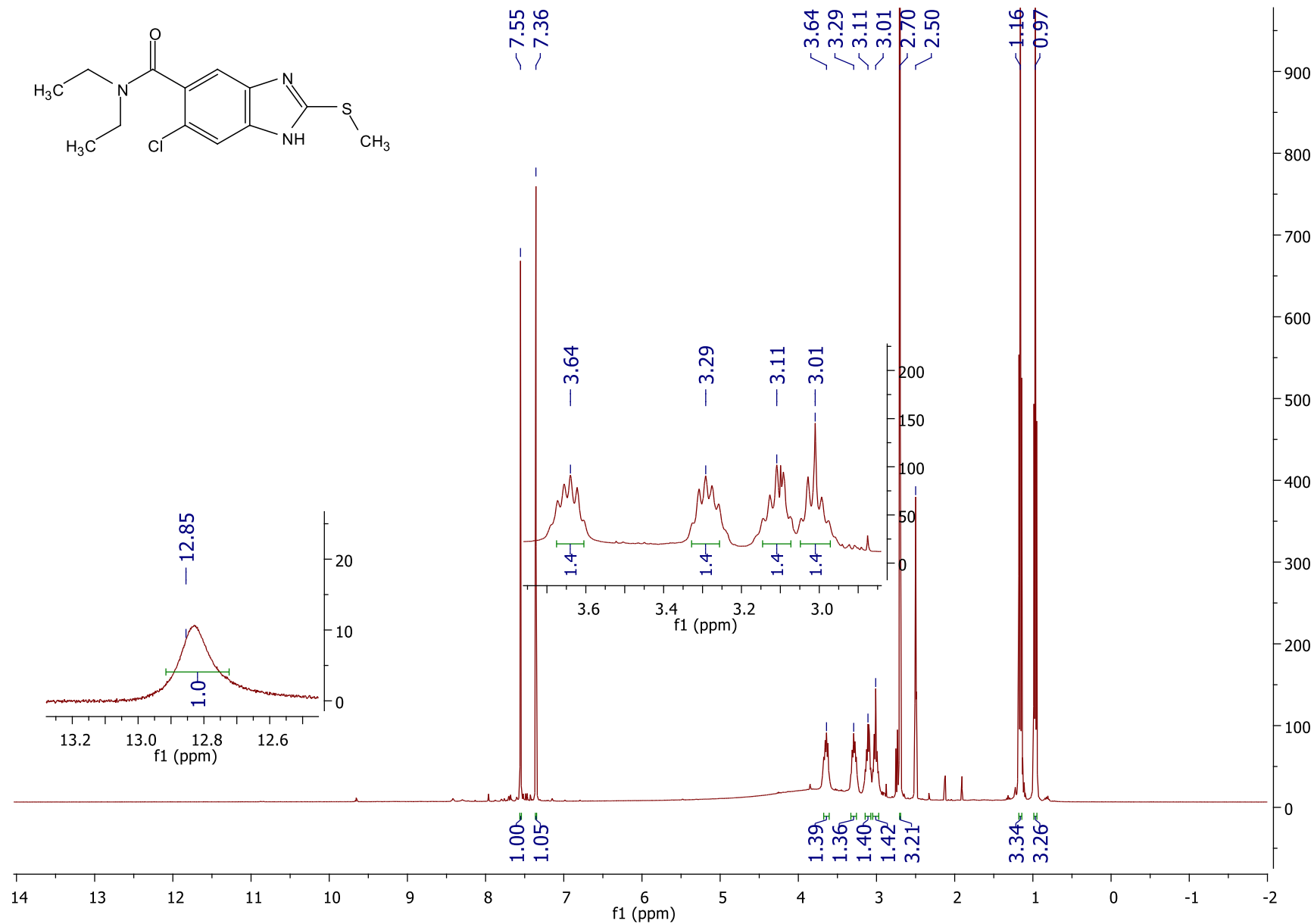
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
270.04621	1005969.92	270.04679	-0.57	-2.12	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₃ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₁ ³² S ₁	7.5

Espectro 20. EMAR-(DART) del 6-cloro-*N*-etil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-04).

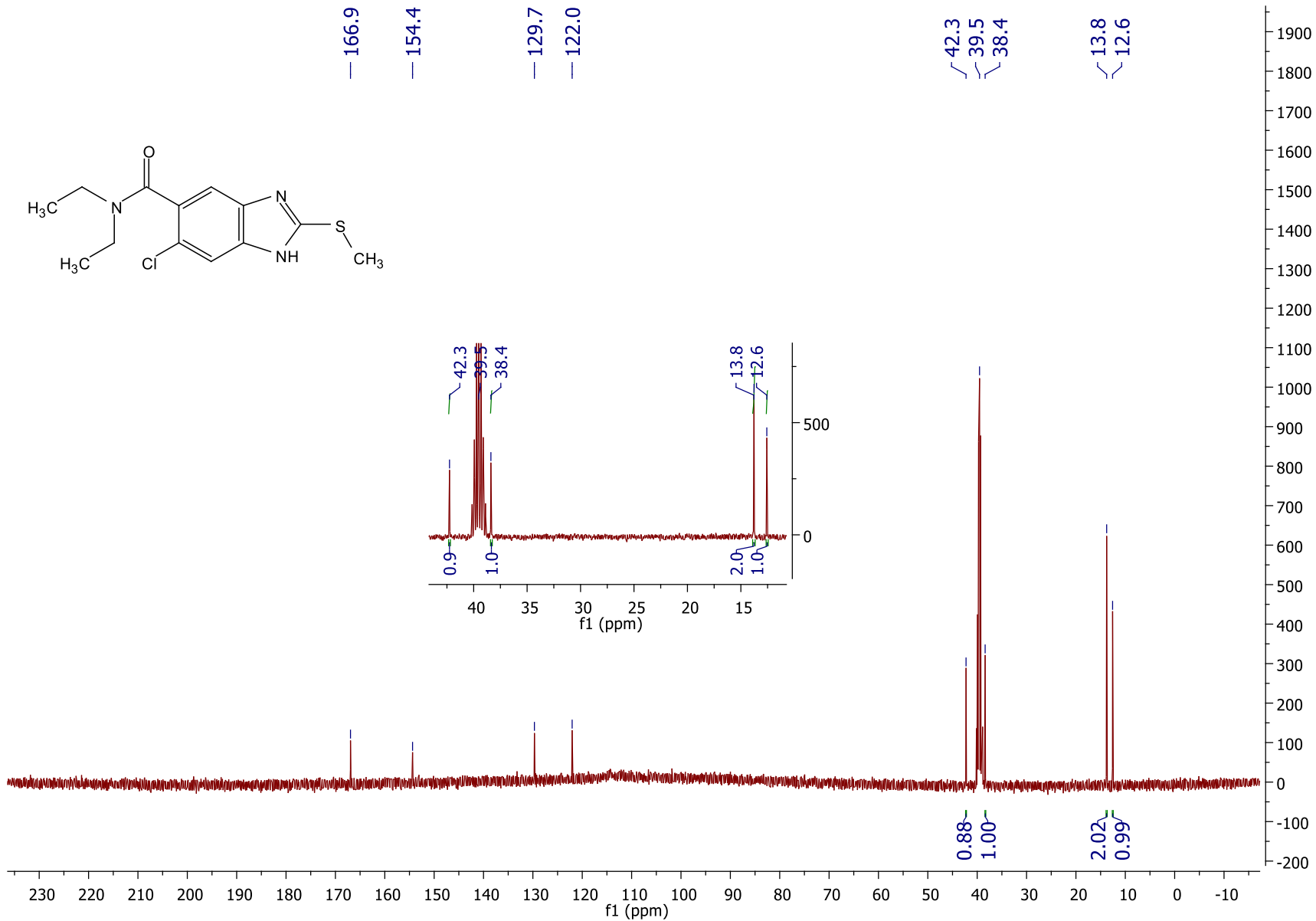


Espectro 21. FTIR (ATR) del 6-cloro-*N,N*-dietil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOUZ-05).

Espectro 22. EM-DART del 6-cloro-*N,N*-dietil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-05).



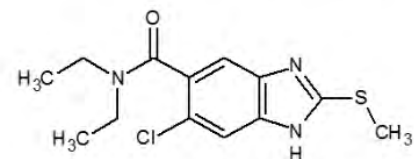
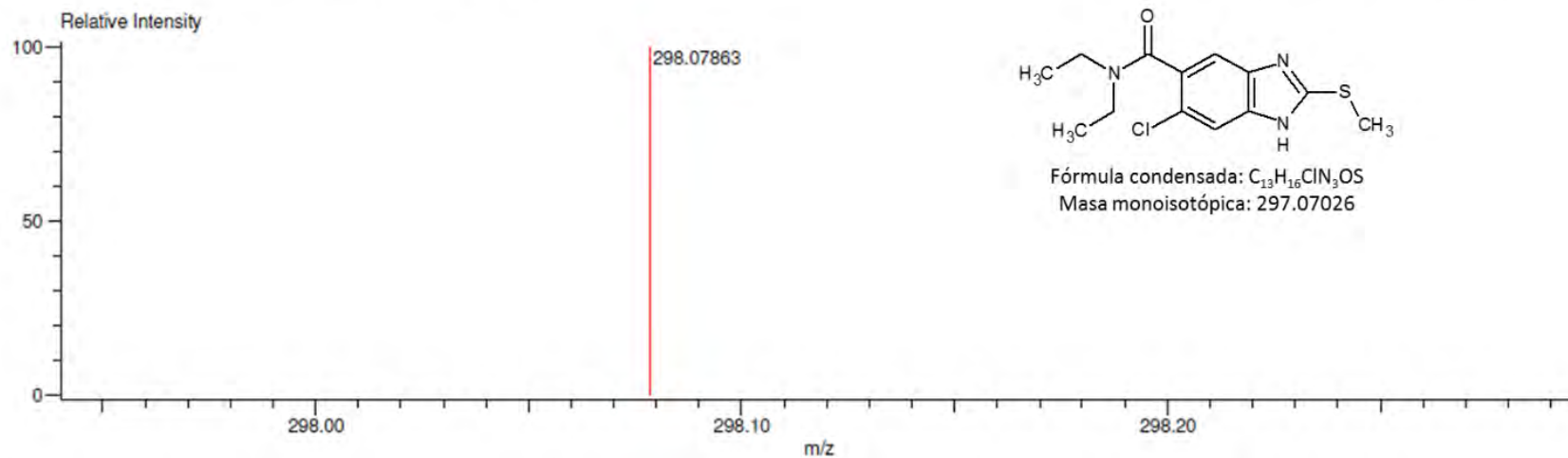
Espectro 23. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) del 6-cloro-*N,N*-diel-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-05).



Espectro 24. RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶) del 6-cloro-*N,N*-dietil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-05).

Charge number:1
 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 3, ¹⁶O:0 .. 1, ³²S:0 .. 1

Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:Both)



Fórmula condensada: C₁₃H₁₆ClN₃OS
 Masa monoisotópica: 297.07026

Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
298.07863	1058514.96	298.07809	0.54	1.82	¹² C ₁₃ ¹ H ₁₇ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₁ ³² S ₁	7.5

Espectro 25. EMAR-(DART) del 6-cloro-*N,N*-dietil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida. (JOULZ-05).

12. REFERENCIAS

1. Quihui-Cota, L., et al., *Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation to nutritional status in Mexican schoolchildren*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004. 98(11): p. 653-9.
2. *Epidemiología de las parasitosis intestinales. Boletín epidemiológico. Semana 20*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud, 2003. 20: p. 1-3.
3. Cordero Bernabé, R., et al., *Amebiasis, giardiasis y tricomoniasis*. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 2014. 11(54): p. 3181-3193.
4. *Boletín Epidemiológico. Semana 52*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud., 2015. 32(52): p. 18-26.
5. *Boletín Epidemiológico. Semana 39*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud., 2015. 32(39): p. 18-26.
6. *Boletín Epidemiológico. Semana 53*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud., 2014. 31(53): p. 18-22, 26.
7. DrugBank. Metronidazole [cited 2016 11/02]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00916#pharmacology>.
8. Escobedo, A.A., et al., *Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread?* *Acta Trop*, 2014. 132: p. 106-11.
9. Dino Petrin, K.D., Gary Garber., *Clinical and Microbiological Aspects of Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews.*, 1998. 11(2): p. 300-317.
10. *Cervix-cytology inflamation / parasites Trichomonas vaginalis*. [cited 2016 11/02]; Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixcytologytrichomonasvaginalis.html>.
11. Williams, T.L.L.D.A., *Foye's. Principles of medicinal chemistry*. Vol. 7th edition. 2013, China.: Wolters Kluwer. 1131-11138.
12. Yadav, G. and S. Ganguly, *Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review*. *Eur J Med Chem*, 2015. 97: p. 419-43.
13. Cedillo Rivera, R.M., O., *In-vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents*. *J Med Micro.*, 1992. 37(3): p. 221-224.
14. Wermuth, C.G., *Selective optimization of side activities: the SOSA approach*. *Drug Discovery Today*, 2006. 11(3-4): p. 160-164.
15. Perez-Villanueva, J., et al., *Antiprotozoal activity of proton-pump inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. 21(24): p. 7351-4.
16. Ashburn, T.T., K., *Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004. 3: p. 673-683.

17. Nogrady, T.F.W., *Medicinal Chemistry. A molecular and Biochemical Approach*. 3th edition, ed. O.U. Press. 2005, New York. 118-121.
18. Tropsha, *Recent trends in quantitative structure-activity relationships*. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 2003. 1: p. 49-77.
19. Lopez-Vallejo, F., et al., *Molecular modeling of some 1H-benzimidazole derivatives with biological activity against Entamoeba histolytica: a comparative molecular field analysis study*. Bioorg Med Chem, 2007. 15(2): p. 1117-26.
20. Carrillo., P.F., *Síntesis y actividad antiprotozoaria de derivados del 6-cloro-2-[2-1H-imidazol-1-il)etil]sulfanil}-1-metil-1H-bencimidazol-5-carboxamida.*, in *Facultad de Química*. 2015, UNAM: CU, México.
21. Velázquez López, J.M., *Síntesis y actividad tripanocida de nuevos derivados del bencimidazol.*, in *Facultad de Química*. 2016, UNAM: CU, México.
22. Ortiz., R.A., *Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios.*, in *Facultad de Química*. 2012, UNAM: CU, México.
23. Perez-Villanueva, J., 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): p. 4221-4.
24. Arroyo Trejo, R., *Síntesis y actividad antiparasitaria de derivados de 6-cloro-2-metiltio-1H-bencimidazol-5-carboxamida.*, in *Facultad de Química*. 2014, UNAM: CU, México.
25. Valdez-Padilla, D., et al., *Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives*. Bioorg Med Chem, 2009. 17(4): p. 1724-30.
26. Mc Murry, J., *Química Orgánica*. 8a ed, ed. C. Learning. 2012, México. 842-845.
27. Gottschall, D.W., *The Metabolism of Benzimidazole Anthelmintics*. Parasitology today., 1990. 6(4): p. 115-124.
28. Capece, B.P., G.L. Virkel, and C.E. Lanusse, *Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: pharmacological implications*. Vet J, 2009. 181(3): p. 241-50.
29. Cvilink, V., et al., *Phase I biotransformation of albendazole in lancet fluke (Dicrocoelium dendriticum)*. Res Vet Sci, 2009. 86(1): p. 49-55.
30. Borger, M.D.N., S.; De Brabander, M.; Thienpont, D., *Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells*. American Journal Veterinary Research, 1975. 36(08): p. 1153-66.
31. Aguayo-Ortiz, R., et al., *Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel beta-tubulin binding site model*. J Mol Graph Model, 2013. 45: p. 26-37.
32. Katiyar, S.K., *Antiprotozoal Activities of Benzimidazoles and Correlations with β -Tubulin Sequence*. Antimicrobial agents and chemotherapy., 1994. 38(8): p. 2086-2090.

33. Lacey, E.W., T. R., *Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates* Veterinary Parasitology, 1987. 23: p. 105-119.
34. Aguayo-Ortiz, R., et al., *Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to beta-tubulin of Trichinella spiralis: insights from computational and experimental data.* J Mol Graph Model, 2013. 41: p. 12-9.
35. Salahuddin, M. Shaharyar, and A. Mazumder, *Benzimidazoles: A biologically active compounds.* Arabian Journal of Chemistry, 2012: p. 2-17.
36. Maske, P.D., J., *Synthesis and antiprotozoal activity of nitro and halogeno substituted some novel mercaptobenzimidazole derivatives.* Der Pharma Chemica, 2012. 4(3): p. 1283-1287.
37. Montalbetti, C.A.G.N. and V. Falque, *Amide bond formation and peptide coupling.* Tetrahedron, 2005. 61(46): p. 10827-10852.
38. Campos., A.H., *Síntesis y actividad biológica de análogos del triclabendazol.*, in *Facultad de Química.* 2014, UNAM: CU, México.
39. Clark, C.G. and L.S. Diamond, *Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance.* Clinical Microbiology Reviews, 2002. 15(3): p. 329-341.
40. Mc Murry, J., *Química Orgánica.* 8a ed, ed. C. Learning. 2012, México. 375-385.
41. *Interaction with alumina.* [cited 2016 6/Mar]; Available from: https://www.researchgate.net/figure/51561880_fig3_Fig-4-Interactions-of-a-carboxylic-acid-with-an-alumina-surface-via-A-hydrogen.
42. *HMBC.* Columbia University. [cited 2016 11/03]; Available from: <http://www.columbia.edu/cu/chemistry/groups/nmr/HMBC.html>.
43. Pérez Villanueva, J., *Relaciones estructura-actividad, diseño, síntesis y actividad antiprotozoaria de derivados del bencimidazol.*, in *Facultad de Química.* 2013, UNAM: CU, Méx.
44. M. Lesk, A., *Introduction to protein science. Chap. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in structural biology.* 2nd ed, ed. O.U. Press. 2010, New Yrk.
45. Gross, J.H., *Direct analysis in real time-a critical review on DART-MS.* Anal Bioanal Chem, 2014. 406(1): p. 63-80.
46. López Balbiaux, N., *Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazólicos 1-metilados.*, in *Facultad de Química.* 2003, UNAM: México.
47. López Balbiaux, N., *Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de nuevas carboxamidas bencimidazólicas 1-metiladas.*, in *Facultad de Química.* 2005, UNAM: México.