



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**Diseño, síntesis y actividad de derivados del bencimidazol contra
*Leishmania mexicana***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Armando Maldonado Rangel



TUTOR: Rafael Castillo Bocanegra
Facultad de Química

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Roberto Martínez
Vocal	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
Vocal	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario.	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio

L-122 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo se expuso en modalidad de cartel en el 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012, celebrado en Cancún, México, del 27 al 31 de Octubre.

Asesor:

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Sustentante:

Armando Maldonado Rangel

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de estar en ella y formar mi carácter profesional y personal.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por su apoyo, confianza pues me extendió la mano desde el principio y sin dudarlo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada 259651 para la realización de esta tesis.

A la Maestra Alicia Hernández Campos por sus valiosos consejos, regaños y experiencia.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por sus enseñanzas como profesor y el apoyo recibido durante la realización del trabajo.

A la Dra. Lilián Yépez, por la determinación de las pruebas antiparasitarias en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS.

Al Dr. Marcos Flores A. en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM por la interpretación de los datos para la obtención de la estructura y red del cristal del compuesto 10.

A los miembros del Jurado por todas sus correcciones y observaciones en este trabajo, que lo hicieron siempre con la idea de mejorarlo.

A mi Familia ABUELA CARMEN!!! , Horacio, Mónica, Cuadros, Nath, y los nuevos integrantes desde hace ya unos años, Marcos, Xareni, Nayla , Alex, Natasha y Shaina, pues todos ellos son mucho más que mi familia son mi INSPIRACION.

A ti Nlteo por estar en la forma correcta y no estar de la forma correcta si se pudo flaca todo se puede siempre y cuando estemos dispuestos a pagar el precio, Gracias por todo tu apoyo.

“Para sostener la creencia de que no existe Dios, el ateísmo tendría que demostrar un conocimiento infinito, que sería lo mismo decir: Tengo el conocimiento infinito para decir que no existe un ser con conocimiento infinito”

Porque la culpable de todo esto eres tú.....Gracias Mamá!!!!

“Tus brazos siempre se abrían cuando quería un abrazo. Tu corazón comprendía cuando necesitaba una amiga. Tus ojos tiernos se endurecían cuando me hacía falta una lección. Tu fuerza y tu amor me guiaron y me dieron alas para volar”

Anónimo

ÍNDICE GENERAL	i
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Leishmaniasis	3
2.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	6
2.3. Tratamientos de la Leishmaniasis	6
2.4. Arginasa	9
2.5. Los bencimidazoles como agentes leishmanicidas	11
2.6. Métodos generales de síntesis de 2-aminobencimidazoles	15
2.7. Síntesis asistida por microondas	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
4.1. Hipótesis	17
4.2. Objetivo General	17
4.3. Objetivos Particulares	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1. Parte Computacional	19
5.1.1 Dinámica Molecular (DM)	19
5.1.2 Estudio de Acoplamiento Molecular	20
5.1.2.1 Preparación de la proteína	20
5.1.2.2 Preparación de los ligandos	20

5.1.2.3 Acoplamiento Molecular	20
5.2. Parte química	21
5.2.1. Síntesis de bromuro de cianógeno	21
5.2.2. Método General de Síntesis	21
5.3. Parte Biológica	23
5.3.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiprotozoaria	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. Parte computacional	24
6.1.1 Dinámica Molecular (DM)	24
6.1.2 Acoplamiento Molecular (Docking)	28
6.1.3. Comparación de modelo con estructura cristalizada	41
6.2. Parte química	43
6.2.1. Síntesis de los intermediarios y productos finales	43
6.2.2. Espectroscopía y espectrometría de los compuestos finales	47
6.2.2.1. Espectrofotometría de Infrarrojo	47
6.2.2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H	47
6.2.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C	47
6.2.2.4. Espectrometría de masas	48
6.2.2.5. Cristalografía de rayos X.	52
6.3. Parte biológica	54
6.3.1. Actividad biológica en los protozoarios <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>	54

7. CONCLUSIONES	57
8. PERSPECTIVAS	58
9. PARTE EXPERIMENTAL	60
9.1. Instrumentación	60
9.2. Sistemas cromatográficos	61
9.3. Procedimientos sintéticos	62
9.3.1. Bromuro de Cianógeno (19)	62
9.3.2. Método general para la síntesis de los 1-alkil-2-amino-1 <i>H</i> -bencimidazoles 5a-c	62
9.3.3. Método general para la síntesis de las iminas intermediarias	68
9.3.4. Reducción de las iminas. Compuestos finales.	73
10. REFERENCIAS	76
11. ESPECTROS	79
Compuesto <i>N</i> -(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol. (8)	79
Compuesto <i>N</i> -(5-Bromo-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol (9)	82
Compuesto <i>N</i> -(5-Cloro-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol (10).	86
Compuesto <i>N</i> -(2-metoxibencil)-2-amino-1-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol (11).	90
Compuesto 2-amino-1-etil- <i>N</i> -(4-metoxibencil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (12).	94
Compuesto <i>N</i> -[4-(dimetilamino)bencil]-2-amino-1-etil-1 <i>H</i> -bencimidazol (13).	98
Compuesto <i>N</i> -(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1 <i>H</i> -bencimidazol (14).	102
Compuesto <i>N</i> -(4-bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (15)	106
Compuesto 2-amino-1-butyl- <i>N</i> -(4-clorobencil)-1 <i>H</i> -bencimidazol (16).	110
Intermediarios	115
APÉNDICE	A

RESUMEN

En la actualidad, las enfermedades parasitarias son un grave problema de salud pública. Los antiparasitarios de mayor uso son los nitroderivados: Metronidazol y la Nitazoxanida contra las protozoosis, y los bencimidazol 2-carbamato, como el Albendazol, Mebendazol y Fenbendazol contra las helmintosis. El uso indiscriminado de los nitroderivados y sus efectos secundarios pueden llevar al abandono del tratamiento, lo que conlleva a la generación de resistencia por los parásitos a este tipo de fármacos. Por otro lado, debido a la pobre solubilidad de los bencimidazol 2-carbamato estos presentan una baja absorción y poca biodisponibilidad, razón por lo cual se requieren de altas dosis y tiempos prolongados para el tratamiento de las infecciones sistémicas.

Los derivados del bencimidazol contienen en su estructura un núcleo que por sus múltiples posibilidades de sustitución se han usado para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. El beneficio principal de este tipo de compuestos ha sido en el tratamiento de las enfermedades parasitarias, aunque también tienen actividad antiviral, antifúngica, antihelmíntica y antibacteriana.

Considerando que los derivados del bencimidazol cuentan con un amplio espectro de actividad antiprotozoaria y que existe la necesidad de contar con nuevos compuestos leishmanicidas, en este proyecto se estudia el acoplamiento molecular, síntesis y actividad antiparasitaria de 9 compuestos derivados del bencimidazol que servirá para concluir con una serie de compuestos derivados de bencimidazol con potencial actividad leishmanicida, con la finalidad de que puedan servir como líderes en la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis.

Para la síntesis de los compuestos anteriores se partió de 1-cloro-2-nitrobenceno, que se sometió a reacciones de sustitución nucleofílica aromática, reducción catalítica, ciclocondensación, formación de imina (por

calentamiento convencional y calentamiento asistido por microondas) y reducción química. Los productos finales purificados se identificaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos y finalmente se evaluaron *in vitro* contra los protozoarios *Leishmania mexicana* y *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos siguen siendo un problema de salud pública universal, sobre todos en zonas que carecen de instalaciones sanitarias adecuadas y buenos hábitos de higiene, como son las regiones en la zona tropical donde se encuentran enfermedades como malaria, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, entre otras, causadas por parásitos protozoos. En ausencia de vacunas eficaces, el control de estas enfermedades humanas depende en gran medida de quimioterapia.

En la actualidad, la leishmaniasis es una enfermedad presente en cuatro continentes y en 88 países. La gravedad de esta enfermedad ha llevado a ser considerada como una prioridad por la OMS en el "Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales".¹

Existen tratamientos que incluyen los fármacos basados en antimonio pentavalente (Sb V) que son el pilar de la quimioterapia contra la leishmaniasis. El antimoniato de meglumina ha sido el principal fármaco en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis por más de 50 años. Sin embargo, son altamente tóxicos y causan efectos secundarios graves, tales como arritmias cardíacas, daños renales, lo que aumenta el fracaso del tratamiento. Además, se tienen reportes de casos clínicos donde se presentan resistencia en varias regiones del mundo.

En la actualidad la quimioterapia antiparasitaria es cara, tiene múltiples efectos adversos y no genera beneficios para las empresas farmacéuticas, por lo que éstas se concentran en mercados más rentables.

Los derivados de bencimidazoles son empleados contra infecciones causadas por helmintos; como Albendazol (ABZ) y Mebendazol (MBZ), Este tipo de fármacos tienen un amplio espectro de acción, donde varios estudios demuestran su actividad contra protozoarios como *G. intestinalis*. Sin embargo, por su alta polaridad y baja

absorción, su uso se limita al tratamiento de infecciones del tracto gastrointestinal. Para el tratamiento de infecciones sistémicas se requieren altas dosis y tratamientos prolongados.

Actualmente existe un incremento en todas las medidas higiénicas, sanitarias y de tratamientos antiparasitarios. A pesar de esto, en las zonas alejadas existen dificultades para implementar estas medidas. Considerando la problemática de la leishmaniasis, los tratamientos existentes, sus desventajas, así como reportes de casos de falla terapéutica, en este estudio se sintetizaron una serie de compuestos derivados de bencimidazol con potencial actividad leishmanicida, con la finalidad de que puedan servir como líderes en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Leishmaniasis

Las zoonosis parasitarias presentan un problema de salud en todo el mundo. Las enfermedades parasitarias tienen una distribución mundial y son causa de una significativa morbilidad, principalmente en regiones tropicales. Tradicionalmente son enfermedades asociadas a un bajo grado de desarrollo, malas condiciones higiénicas, sanitarias y determinadas condiciones ecológicas.

La familia *Trypanosomatidae* comprende un gran grupo de parásitos protozoos, algunos de los cuales causan enfermedades importantes en los seres humanos, tales como el género *Trypanosoma* y *Leishmania*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis es una de las enfermedades más prevalentes con más de 2 millones de nuevos casos cada año, provocando 70.000 muertes anuales y poniendo en peligro 350 millones de personas en 88 países del trópico, subtropical y área mediterránea europea.

Una estimación de la prevalencia mundial de la leishmaniasis es de 12 millones personas afectadas, con una incidencia anual de 1.5-2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 de la leishmaniasis visceral.^{7, 8,10}

Leishmania spp incluye una serie de protozoos flagelados, intracelulares obligados del humano y otros mamíferos, los cuales producen lesiones a nivel cutáneo, mucocutáneo y visceral. *Leishmania spp* es transmitido por un díptero nematócero *Phlebotomus sp* en el viejo mundo y *Lutzomyia sp* en el nuevo mundo.⁴

La forma más frecuente de leishmaniasis en América es la cutánea. Se han reportado casos en México, Centroamérica, Sudamérica, con la excepción de Chile, Uruguay e islas del Caribe. En México, la leishmaniasis se ha identificado al menos en 20 entidades federativas, entre ellas Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí, Morelos, Puebla e Hidalgo.²

Las principales zonas endémicas son: Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz.²

En Tabasco y Veracruz se reportan casos de leishmaniasis cutánea (LC), causada por infección de *L. mexicana*; en Nayarit y Campeche se han identificado *L. mexicana* y/o *L. braziliensis*.

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular protectora; leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel.

La LCL es conocida en México como "úlceras de los chicleros" debido a que fue encontrada en trabajadores que extraían la goma del árbol del chicle, con frecuencia se observaba afectando el pabellón auricular, de curso progresivo y mutilante. Se considera un problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica y porque puede llegar a producir lesiones destructivas e incluso discapacitantes.^{2,3}

Las leishmaniasis se clasifican según los órganos y tejidos dañados, especie que participa y su ubicación geográfica: (i) la leishmaniasis cutánea (LC), es causada por *L. tropica* y *L. major* en los países del Viejo Mundo; y por *L. mexicana* y *L. amazonensis* en Centro y Sur de América; (ii) la leishmaniasis mucocutánea (LCM), causada por el *L. braziliensis* en los países del Nuevo Mundo; (iii) la leishmaniasis visceral (LV) la más peligrosa, a menudo fatal, causada por *L. donovani* y *L. infantum* en personas que viven en los países del Viejo Mundo y *L. chagasi* en América.^{5,6}

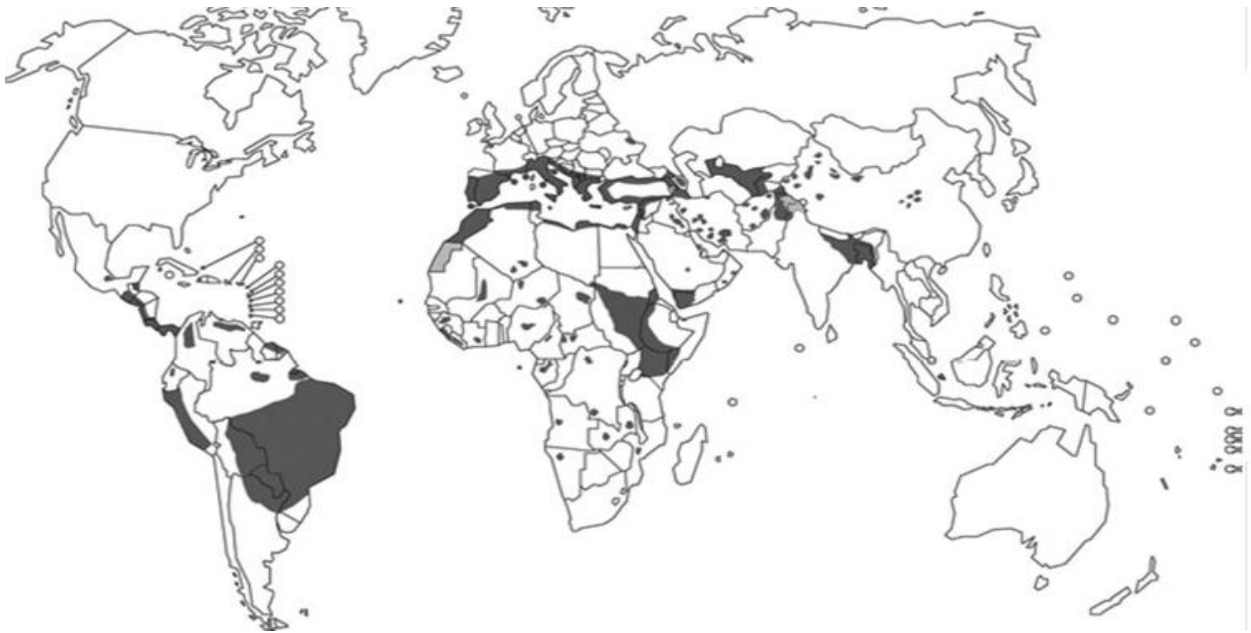


Figura 1. Distribución geográfica de leishmaniasis visceral.⁹

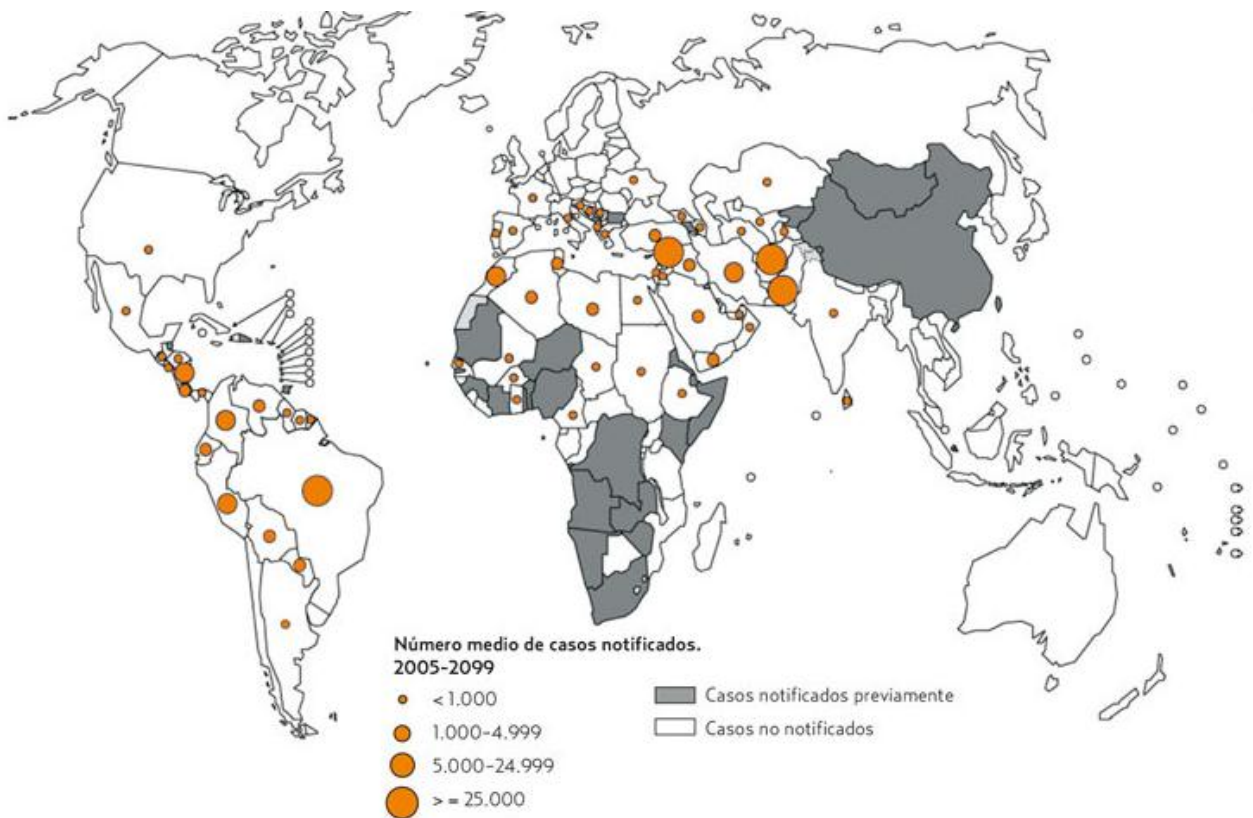


Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea.¹⁰

2.2 Ciclo de vida

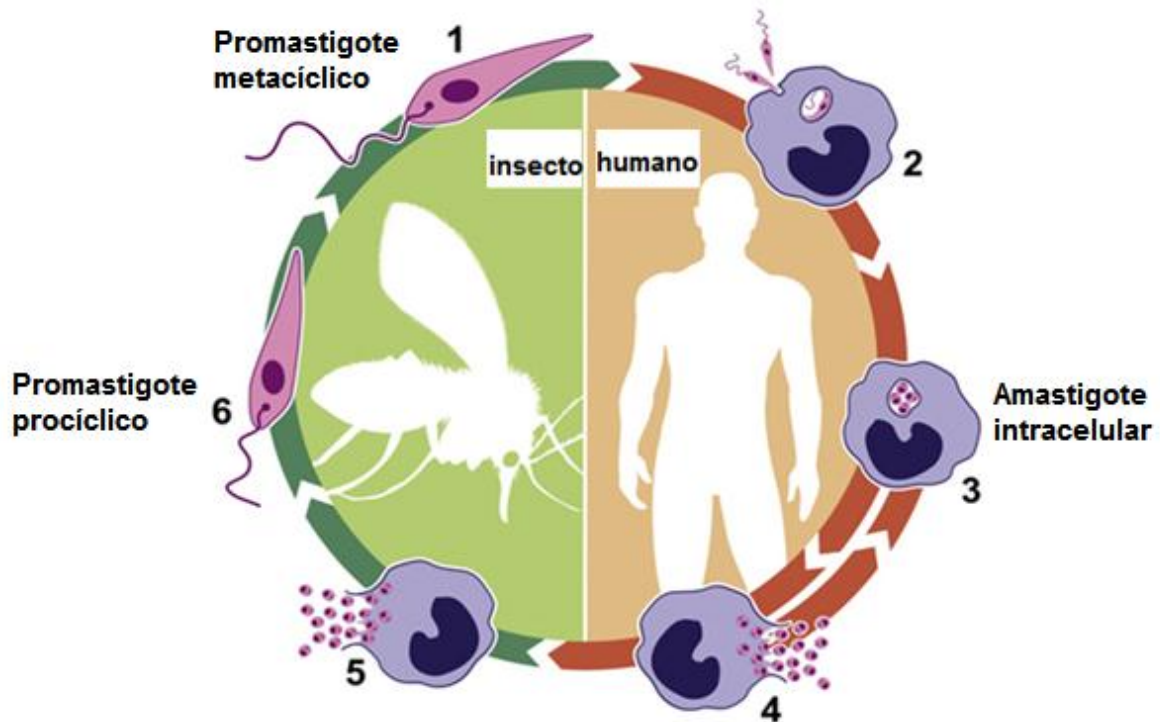


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

La infección es transmitida por la picadura de *Phlebotomus* sp. (1). Cuando la hembra infectada toma la sangre, introduce los promastigotes metacíclicos, los cuales son fagocitados por los macrófagos. (2) Dentro de los macrófagos en los fagolisosomas, los promastigotes se transforman en amastigotes. (3) Se multiplican por fisión binaria, lisan al macrófago y proceden a infectar a otras células fagocíticas. (4) Durante la extracción de sangre el mosquito ingiere macrófagos infectados. (5) En el intestino del insecto los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos proliferativos. (6) Se desarrollan en el intestino grueso o intestino medio y migran a la trompa como promastigotes metacíclicos, continuando el ciclo.³

2.3. Tratamiento de la leishmaniasis

Desde hace más de 50 años no se han mejorado de manera sustancial los fármacos antiparasitarios que existen en el mercado. En la actualidad hay mayor conocimiento

sobre la patología de las enfermedades parasitarias, la relación huésped-parasito, la fisiología y la bioquímica de los parásitos. Con la información obtenida por estos métodos, se pueden emplear las herramientas necesarias para un diseño racional de fármacos, mediante los principios de la química farmacéutica y los métodos computacionales.¹¹

En el tratamiento contra la leishmaniasis se incluyen los fármacos basados en antimonio pentavalente Sb (V) tales como estibogluconato sódico y antimoniato de *N*-metilglucamina (meglumina); considerándose equivalentes en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción. El antimoniato de meglumina ha sido el principal fármaco en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis por más de 50 años.⁹

Sin embargo, estos fármacos son altamente tóxicos, sus efectos colaterales se reflejan en dolor en el sitio de la inyección, diarrea, dolores articulares y trastornos electrocardiográficos que son reversibles, pero pueden causar arritmias graves, paro cardíaco, bradicardia y polineuritis.⁹

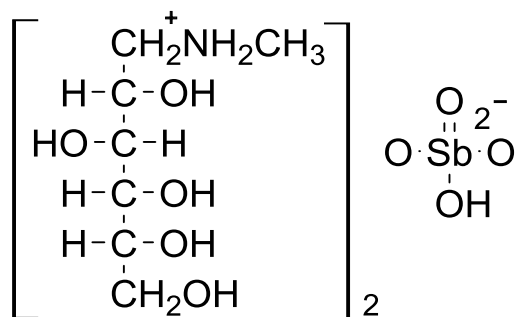
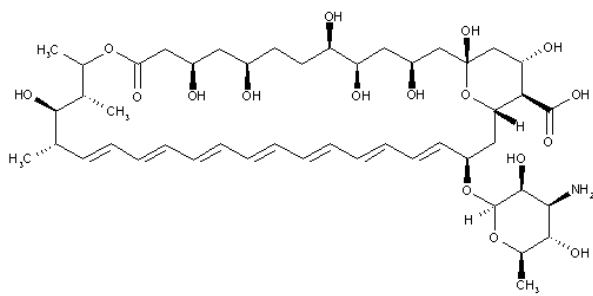
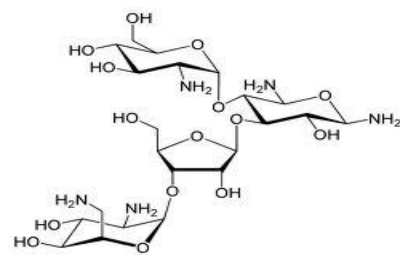


Figura 4. Ejemplo de Antimoniales Pentavalentes. Antimoniato de *N*-metilglucosamina.

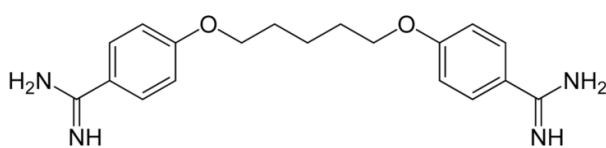
Entre los otros fármacos para su tratamiento se encuentran: pentamidina, la anfotericina B, la paramomicina y la miltefosina. La anfotericina B es el fármaco de elección en la leishmaniasis visceral, sobre todo en regiones con alta resistencia al tratamiento con estibogluconato sódico, como en la India, donde las leishmaniasis son reactivadas. También es el fármaco recomendado en los casos de leishmaniasis de mucosa.¹²



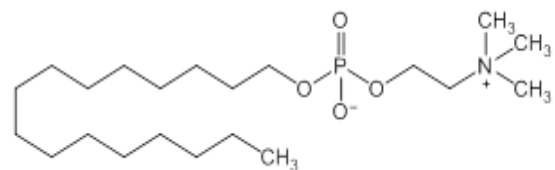
Anfotericina B



Paramomicina



Pentamidina



Miltefosina

Figura 5. Estructura de algunos fármacos leishmanicidas.

Con los fármacos de segunda línea se pueden presentar problemas gastrointestinales, hepatotoxicidad, cefalea, anemia, nefrotoxicidad reversible, fiebre, hipotensión, encefalopatías y erupción cutánea. En el caso de la miltefosina los efectos colaterales más frecuentemente son los gastrointestinales: náuseas, vómitos, anorexia y diarreas.¹²

Si bien los antimoniales son la primera elección del tratamiento, cada vez son más frecuentes los reportes de falla terapéutica, lo cual se traduce en la resistencia del parásito al antimonio. En áreas como la de Bihar, en la India, se reporta que el 60% de los casos tratados de LV presentan resistencia, es así que la OMS promueve iniciativas para encontrar tratamientos alternativos basados en químicos sintéticos o en productos de origen natural.¹²

Dado que los tratamientos disponibles para la leishmaniasis involucran muchos problemas y la alta morbilidad de la enfermedad persiste, el descubrimiento de nuevos agentes leishmanicidas es de suma importancia. Por esta razón se están

buscando nuevas dianas bioquímicas con el fin de desarrollar nuevos fármacos. En las dos últimas décadas enfoques experimentales, tales como la clonación de genes, proteínas, ARN y cristalografía, se han introducido, para validar y definir nuevos blancos para los medicamentos, contra este parásito. Un enfoque de la investigación realizada en nuestro laboratorio fue utilizar la arginasa de *Leishmania* como una diana farmacológica.¹³

2.4. Arginasa

La arginasa es una metaloenzima binuclear que contiene dos iones Mn^{2+} separados a una distancia de 3.3 Å. que están coordinados a aspartato (Asp) e histidina (His), que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina, urea y ATP. El sitio catalítico binuclear manganeso es necesario para la estabilización y la orientación del nucleófilo catalítico, un ion hidróxido. **Figura 6.**¹⁴

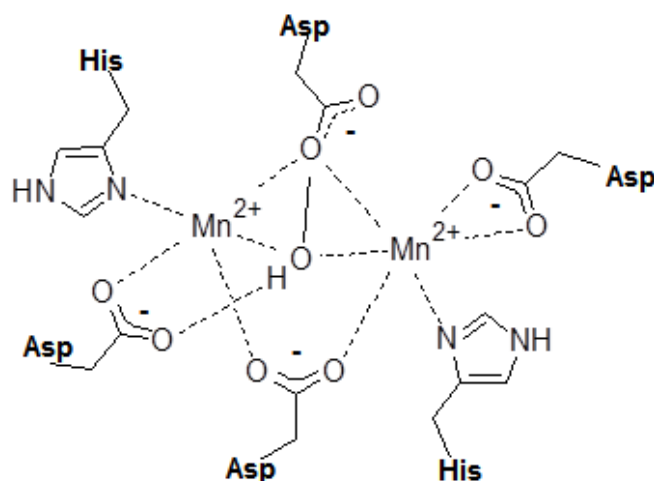


Figura 6. Esquema general del centro binuclear de Arginasa.

La simultánea coordinación de una molécula de agua a ambos iones metálicos en el clúster, facilita la ionización para formar un ion hidróxido el cual ataca al carbono del guanidino, La presencia de los iones Mn^{2+} incrementa la polarizabilidad del ion hidroxilo facilitando su reactividad para ejercer el efecto catalítico,. Una vez formada la L-ornitina se convierte en sustrato de la ornitina-descarboxilasa (ODC), enzima clave de la biosíntesis de poliaminas.¹⁴

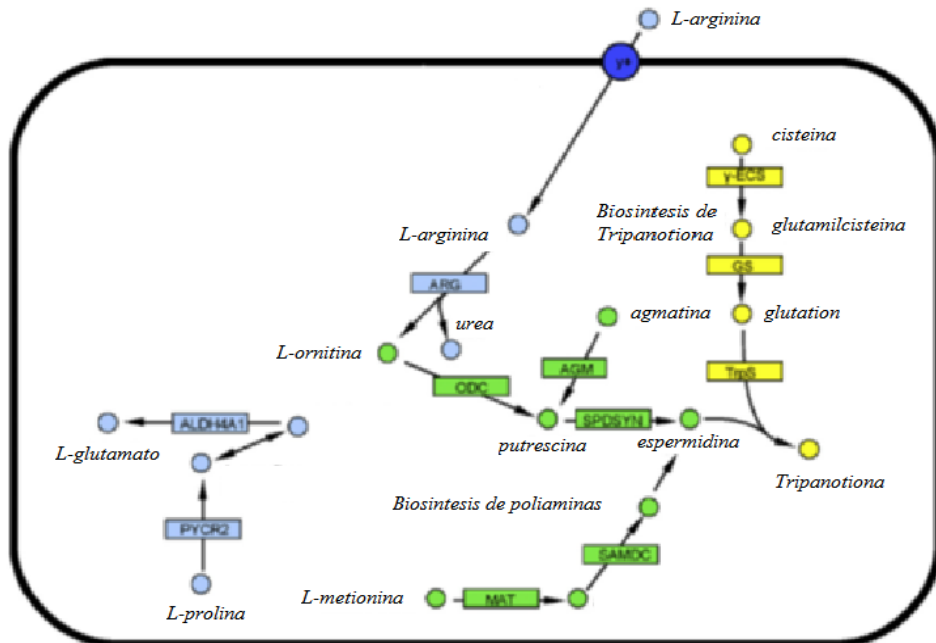


Figura 7. Metabolismo de L-arginina en el parásito *Leishmania* spp.

Esta enzima también está implicada en el proceso de invasión y evasión del sistema inmune del huésped, mediante la reducción de la concentración de L-arginina, aminoácido que activa la nítrico-óxido-sintasa (NOS) del macrófago. Como consecuencia, la generación de óxido nítrico en los macrófagos se reduce y la respuesta inmune del huésped contra el parásito se retrasa.¹

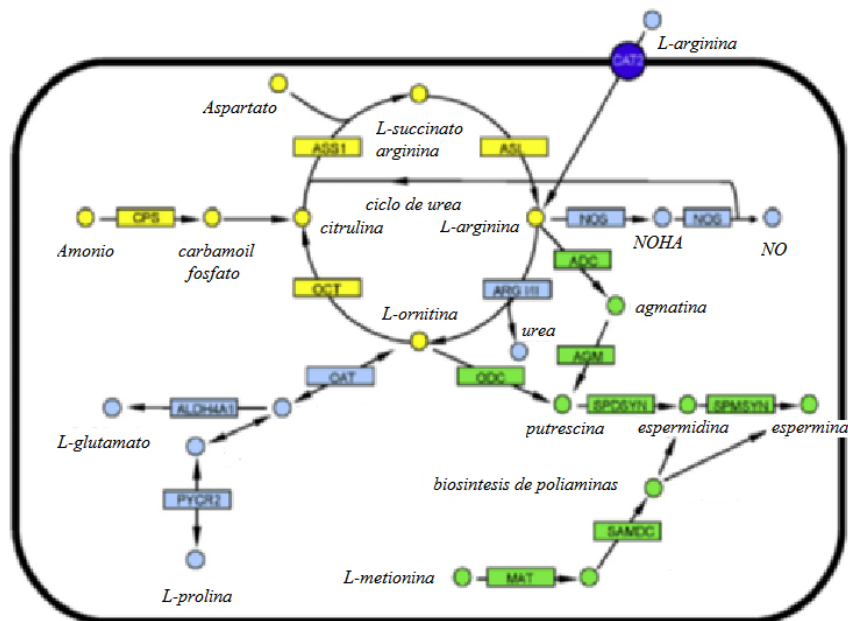


Figura 8. Metabolismo de L-arginina en el humano.

Existen resultados prometedores con arginasa de *L. major* y *L. mexicana*,¹⁶ indicando que una inhibición irreversible de la arginasa del parásito puede interrumpir el progreso de la infección y permitir la curación del huésped. Estos reportes sugieren que la arginasa del parásito desempeña un papel crítico en su proliferación *in vivo*. Esto evidencia la importancia biológica de la arginasa de *Leishmania* y sugiere que podría ser utilizada como una diana del fármaco correspondiente en contra de este parásito.¹⁵

2.5. Los Bencimidazoles como agentes leishmanicidas

Los fármacos antihelmínticos que más se han empleado son los bencimidazoles, como el Albendazol, Mebendazol (**Figura 9**). A pesar de tener un amplio espectro antiparasitario y baja toxicidad, debido a su pobre solubilidad y absorción *in vivo*, comúnmente se emplean para tratar enfermedades gastrointestinales por helmintos. Aunque también se han utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas, se requieren altas dosis y largos tratamientos.

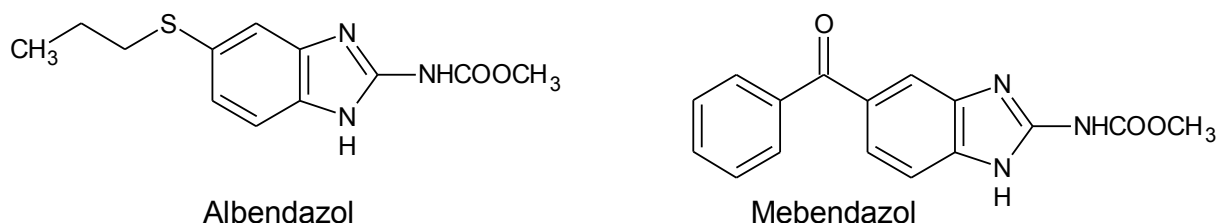
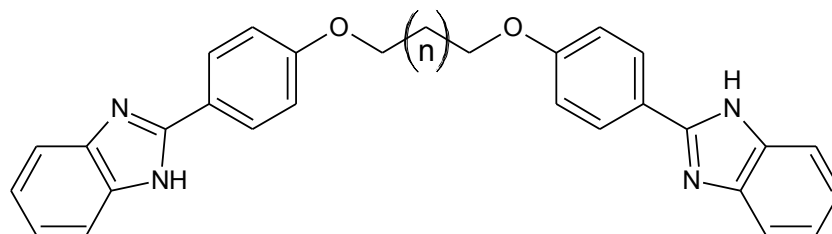


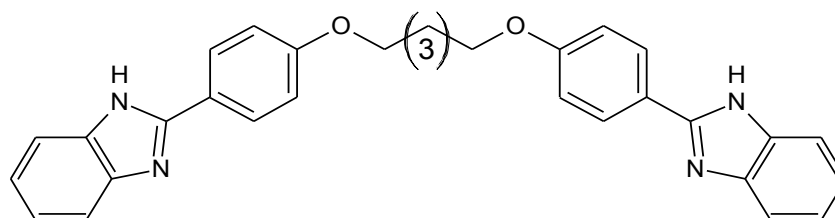
Figura 9. Estructura del Albendazol y Mebendazol.

Recientemente se ha reportado que los bencimidazoles presentan actividad contra el protozooario *Leishmania* (**Tabla 1**), junto con otros estudios realizados en nuestro laboratorio (**Tabla 2**). Estos resultados convierten a los derivados del bencimidazol en compuestos de gran interés para el desarrollo de moléculas activas, con la finalidad de que pueda servir como líder en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.^{16, 17}

Tabla 1. Reportes de CI50 de algunos bencimidazoles contra *Leishmania donovani*¹⁶



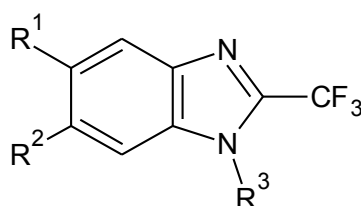
n=	1	2	3	4	5
Comp	7	8	9	10	11



3

Compuesto	<i>Leishmania donovani</i>	
	CI ₅₀ (μ M)	CI ₉₀ (μ M)
7	1.5	3.3
8	4.9	12.9
9	1.4	3.1
10	11.8	53.8
11	13.6	56.2
Pentamidina	2.2	9.8

Tabla 2. Reportes de evaluación biológica de algunos bencimidazoles contra *Leishmania mexicana*¹⁷



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	<i>L. mexicana</i> (CI ₅₀ , μM)
1a	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O ^a	H	H	NE
1b	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O ^a	H	CH ₃	24.00
1c	H	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O ^a	CH ₃	4.10
1d	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O ^a	Cl	H	NE
1e	C ₁₀ H ₇ O ^b	Cl	H	13.78
1f	C ₁₀ H ₇ O ^b	Cl	CH ₃	65.23
1g	Cl	C ₁₀ H ₇ O ^b	CH ₃	50.12
1h	Cl	Cl	H	20.80
1i	Cl	H	CH ₃	NE
ABZ				NE
MTZ				ND
Pentamidina				2.421

^a2,3-diclorofenoxi.

^b1-naftiloxi

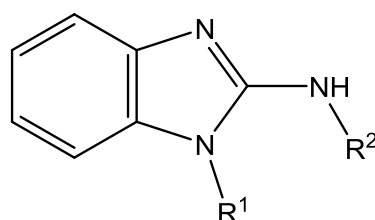
NE: No evaluado

ND: No determinado

Considerando estos datos, en nuestro laboratorio se realizó un estudio de acoplamiento molecular (Docking), donde se buscaron moléculas con el núcleo de bencimidazol en la base de datos de ZINC (<http://zinc.docking.org/>), se seleccionaron aquellas moléculas que exclusivamente se unieran al sitio catalítico de la enzima arginasa, estas moléculas fueron seleccionadas cumpliendo las reglas de Lipinski (*Virtual screening*)²⁴, reglas que debe presentar un fármaco para presentar una buena absorción oral y permeabilidad celular: peso molecular menor o igual a 500 Daltons, 5 ó menos grupos donadores de puentes de hidrógeno, 10 ó menos grupos aceptores de puentes de hidrógeno y un coeficiente de partición

octanol-agua menor ó igual a 5. Si dos ó más de las propiedades se encuentran fuera de estos valores, entonces se considera la posibilidad de que el compuesto presenta una pobre absorción o permeabilidad. Se seleccionaron las moléculas con la mejor energía de unión de acuerdo a los resultados de docking para ser sintetizadas. **Tabla 3.**

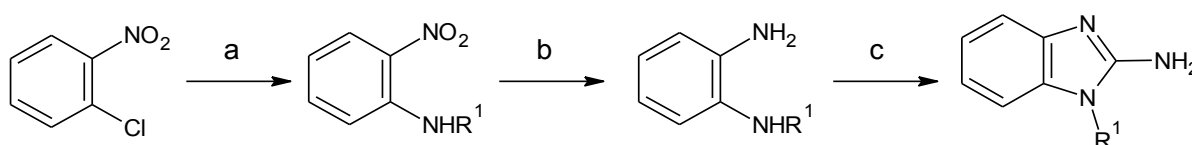
Tabla 3. Moléculas de bencimidazol obtenidas del estudio de *Virtual screening*¹³



Clave Zinc	R ¹	R ²	ΔG (Kcal/mol) <i>L. mexicana</i>
111419	Metilo	5-Bromo-2-hidroxibencilo	-8.3
1798220	Pentilo	2-Hidroxibencilo	-9.1
196189	Propilo	1,3-Benzodioxol-5-ilmetilo	-7.99
2073201	Butilo	Piridin-4-ilmetilo	-7.93
2478054	Isopropilo	4-Bromobencilo	-8.23
285488	Etilo	2-Hidrox-5-metilbencilo	-8.6
285495	Metilo	5-Cloro-2-hidroxibencilo	-8.19
285496	Propilo	5-Cloro-2-hidroxibencilo	-8.96
3643102	Butilo	4-Clorobencilo	-8.11
3643113	Propilo	4-Metoxibencilo	-7.98
513985	Isopentilo	Bencilo	-8.52
513988	Isobutilo	Bencilo	-8.4
525027	Etilo	4-(Dimetilamino)bencilo	-7.29
526385	Metilo	2-Metoxibencilo	-7.96
532233	Metilo	4-Bromobencilo	-7.68
613506	Isopropilo	2-Metoxibencilo	-8.78
804806	Etilo	4-Metoxibencilo	-7.38

2.6. Métodos generales de síntesis de 2-aminobencimidazoles

La síntesis de los bencimidazoles se puede iniciar de compuestos *o*-cloronitrobenzenos, realizando una Sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) para obtener el grupo R^1 . Posteriormente se realiza una reducción del grupo $-NO_2$ por hidrogenación catalítica, obteniéndose la *o*-fenilendiamina correspondiente y su posterior ciclación con bromuro de cianógeno en etanol/agua para la obtención del 2-aminobencimidazol.



(a) Amina sustituida con R^1 , Reactor Parr, 130 °C; (b) H_2 , Pd/C, EtOH; (c) BrCN, EtOH/ H_2O

Esquema 1. Método de síntesis de los 2-aminobencimidazoles

2.7. Síntesis asistida por microondas

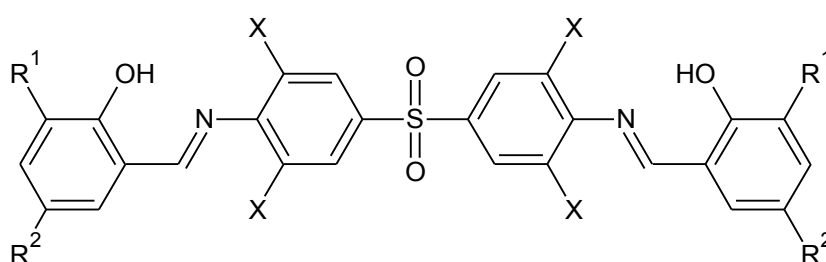
El uso de la irradiación de microondas en síntesis orgánica es cada vez más popular dentro de las áreas farmacéuticas y académicas, ya que es tecnología para disminuir considerablemente el tiempo de una reacción orgánica. Las reacciones químicas mejoradas por irradiación de microondas, especialmente bajo condiciones libres de disolvente, han atraído mucho la atención. Las transformaciones químicas que duran horas o incluso días, ahora se pueden lograr en minutos. La energía de microondas ofrece numerosos beneficios para la realización de una síntesis, tal como el aumento de las velocidades de reacción, rendimientos mejorados, simplicidad en el procesamiento, mayor selectividad, manipulación y purificación.¹⁸

La reacción de aminas con carbonilos para generar iminas, también llamadas bases de Schiff, es una reacción bien conocida debido a su reversibilidad. Cuando una imina se forma a partir de un aldehído y una amina primaria, una molécula de agua es liberada. Por consiguiente, la formación de iminas se facilita cuando el agua se

elimina de la mezcla de reacción. En muchos procedimientos experimentales, la eliminación de agua o reactivos es la técnica empleada.¹⁹

El uso del microondas ya ha sido utilizado eficientemente en la formación de iminas, recientes reportes demuestran la efectividad del uso de esta tecnología,²² **Tabla 4.**

Tabla 4. Comparación de los rendimientos de reacción con calentamiento convencional y calentamiento por microondas²²



Compuesto	X	R ¹	R ²	Rendimiento (% , Tiempo) Calentamiento convencional	Rendimiento (% ,Tiempo) Microondas
2a	H	H	H	75 (10 min)	92 (10 seg)
2b	H	H	Cl	81 (15 min)	91 (20 seg)
2c	H	Br	Br	78 (15 min)	90 (20 seg)
2d	H	I	I	75 (15 min)	93 (20 seg)
2e	Cl	H	H	70 (270min)	78 (240 seg)
2f	Cl	H	Cl	74 (210 min)	79 (200 seg)
2g	Cl	Br	Br	70 (200 min)	80 (210 seg)
2h	Cl	I	I	81 (240 min)	80 (180 seg)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la importancia que tienen las parasitosis en nuestro país, en particular la leishmaniasis y ya que los bencimidazoles son compuestos utilizados en la terapia contra las parasitosis causadas por protozoarios y al mismo tiempo el desarrollo de resistencia de la leishmania a los fármacos de elección, es necesario contar con nuevos agentes leishmanicidas que sean más eficientes y seguros que los ya existentes. Por estas razones se plantea el siguiente problema:

¿Es posible que los compuestos diseñados por acoplamiento molecular, tengan actividad inhibitoria sobre la arginasa y los promastigotes de *Leishmania mexicana*?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

- Los compuestos tendrán actividad inhibitoria en la arginasa y por consiguiente en *Leishmania mexicana*.
- Considerando la naturaleza de *L. mexicana* de protozooario anaeróbico, es factible que los compuestos sintetizados también tengan actividad contra otros protozoarios anaeróbicos como *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

4.2. Objetivos Generales

- Estudiar, por técnicas computacionales, el potencial de derivados del bencimidazol para inhibir la actividad de la arginasa de *Leishmania mexicana*.
- Sintetizar y evaluar *in vitro* las moléculas seleccionadas, con el propósito de que puedan servir como líderes en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

4.3. Objetivos Particulares

- Mediante la técnica de acoplamiento molecular (docking), evaluar la afinidad al sitio catalítico de la arginasa de *Leishmania mexicana* los derivados del bencimidazol.
- Realizar un análisis relación estructura actividad (SAR) de los derivados bencimidazólicos con el fin de conocer las características estructurales para su interacción con la proteína.
- Proponer modificaciones al patrón de sustitución del anillo de bencimidazol que permitan aumentar la afinidad a la arginasa.
- Sintetizar 9 moléculas derivadas del bencimidazol y evaluar su actividad *in vitro*.
- Caracterizar a los productos finales mediante técnicas espectroscópicas (IR, RMN) y espectrométricas (EM).
- Determinar la CI_{50} de los compuestos en cultivos de promastigote *Leishmania mexicana*.
- Evaluar *in vitro* los compuestos sintetizados contra *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

5. METODOLOGÍA

Inicialmente se describe la parte computacional donde se utiliza la técnica de Acoplamiento Molecular (Docking) para analizar el la interacción de los compuestos seleccionados y la arginasa de *Leishmania mexicana*. Para el estudio de dinámica molecular se emplearon los equipos proporcionados por la Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Computación con la cuenta solicitada por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra bajo la asesoría y supervisión del QFB. Rodrigo Aguayo Ortiz.

Posteriormente se describe la parte química, la cual incluye las técnicas de preparación de cada uno de los compuestos intermediarios y finales. Por último, se describe la parte biológica que consiste en las pruebas de actividad antiprotozoaria a las que fueron sometidos los compuestos contra *Leishmania mexicana*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

5.1 Parte computacional

5.1.1 Dinámica Molecular (DM)

Se realizó el estudio de dinámica molecular de la arginasa obtenida a partir de un estudio de homología desarrollado con el modulo *PRIME* de Schrödinger facilitado por el Dr. Alfredo Téllez Valencia de la Universidad Juárez del Estado de Durango, ²⁸ este modelo ya se encontraba previamente reportado en nuestro laboratorio. ²⁷ Sin embargo, se utilizó este modelo debido a que sus parámetros de validación fueron más favorables que el ya reportado (**Apéndice 3**). Esta proteína fue solvatada con moléculas de agua en una caja cubica continua, posteriormente se adicionaron átomos de Na⁺ y Cl⁻ de forma aleatoria para neutralizar la carga del sistema y llevar al mismo a una concentración de 0.15 M. Todas las simulaciones fueron realizadas a 1 bar de presión y 300 K de temperatura.

Una vez preparado el sistema, se realizó una minimización de la energía empleando un campo de fuerza GROMOS96, con una caja puntal en el disolvente. Una vez hecha la minimización se realizó una Dinámica Molecular de 30 ns (30 000 ps) con la finalidad de determinar la estabilidad del sitio de unión.

5.1.2 Estudio de Acoplamiento Molecular

5.1.2.1 Preparación de la Proteína

La proteína se optimizó con la interfaz gráfica *Autodock Tools 1.5.4* corrigiendo las cargas de los Mn (2+), Esta proteína fue sometida a un cálculo de Dinámica Molecular, de la cual se extrajeron 5 clúster representativos (conformaciones) en diferentes tiempos y a todos se les realizó el estudio de acoplamiento molecular (Docking).

De los 5 clústers obtenidos, dos de ellos mostraron una molécula de agua dentro del sitio catalítico de modo que se realizó nuevamente el Docking con estas conformaciones y se comparó con aquellas que no la tenían.

5.1.2.2 Preparación de los ligandos

Las moléculas usadas fueron obtenidas de la base de datos ZINC, por medio de un *Virtual screening* donde se usó como base el 2-aminobencimidazol, buscando que cumplan con ciertas características fisicoquímicas, esta búsqueda se realizó siguiendo la regla de los 5 de Lipinski.

5.1.2.3 Acoplamiento Molecular

Una vez preparada la proteína, se determinó una caja de búsqueda (*GRID*) usando el módulo *Autogrid* de *AutoDock Tools 1.5.4*. La caja se concentró en los iones Mn^{2+} con una dimensión de 90 X 90 X 90 Å. Después se realizó el cálculo de acoplamiento molecular de los 17 ligandos usando *AutoDock 4.2* empleando un algoritmo genético tipo Lamarckiano con un tamaño de población de 150 estructuras con 5×10^6 de evaluaciones y 25 corridas. Finalmente, se realizó el

análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los grupos generados, seleccionando aquel grupo que presentara menor energía y el mayor número de conformaciones ($\Delta G_{\text{unión}}$).

5.2. Parte Química

5.2.1. Síntesis de Bromuro de cianógeno

Para la síntesis de los 9 compuestos primeramente se sintetizó el bromuro de cianógeno (**19**) a partir de cianuro de potasio (**18**) y bromo (**17**), como se muestra en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Preparación del Bromuro de Cianógeno

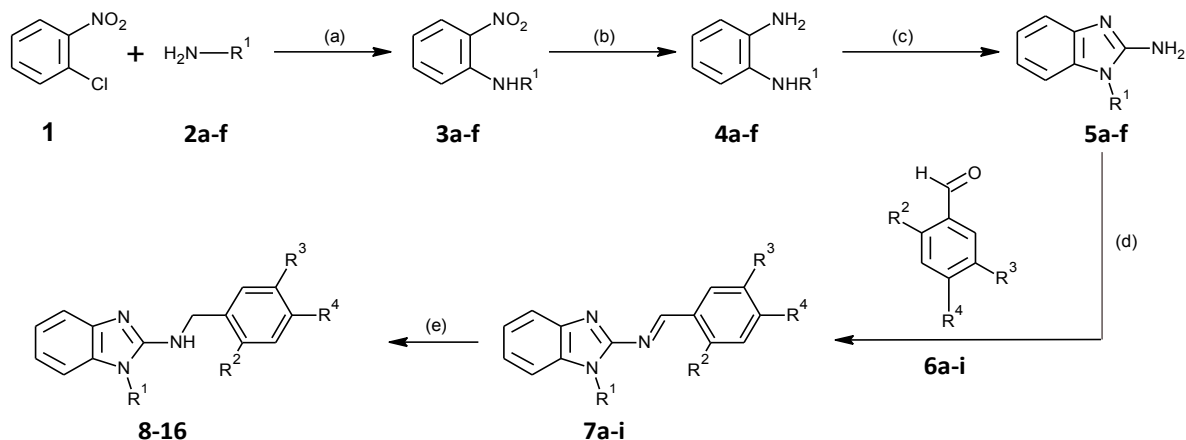
5.2.2. Método General de Síntesis

Posteriormente se siguió la secuencia de reacciones del **Esquema 3**. Para la preparación de las materias primas, los 2 amino-1-alkilbencimidazoles (**3a-f**) de los cuales se obtendrían las 9 moléculas finales.

Se partió del 2-cloronitrobenzeno comercial (**1**) que se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica con el clorhidrato de alquilamina correspondiente con alta presión y temperatura; el producto obtenido, la *N*-alquil-2-nitroanilina (**3a-f**) se sometió a reducción catalítica con hidrógeno y Pd/carbono para dar la *N*-alquil-1,2-diaminobenceno (**4a-f**), que se ciclocondensó con (**19**) lo que generó el derivado 2-amino-*N*-alquil-Bencimidazol (**5a-f**).

Una vez obtenido el bencimidazol, para sintetizar el intermediario imina (**7a-i**), se siguieron dos métodos, usando calentamiento convencional y el asistido por microondas, este último con ortoformiato de metilo como agente secante,

cambiando los tiempos de reacción y la potencia. Finalmente la imina se sometió a una reducción con borohidruro de sodio con el cual se obtuvieron los compuestos finales.

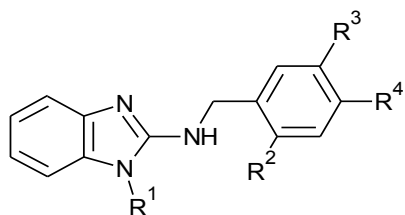


(a) $R_1-NH_2 \cdot HCl$, 125 °C, presión ; (b) H_2 , Pd/C; (c) BrCN, EtOH/ H_2O , 70 °C (d) Tolueno 120 °C o DMF, MW 270 W, 160 °C, ortoformiato de metilo, 15 min ; (e) $NaBH_4$, MeOH 0 °C

2a,3a,4a,5a,7a: $R^1=CH_3$
 2b,3b,4b,5b,7b: $R^1=CH_2CH_3$
 2c,3c,4c,5c,7c: $R^1=CH_2CH_2CH_3$
 2d,3d,4d,5d,7d: $R^1=$ isopropil
 2e,3e,4e,5e,7e: $R^1=CH_2CH_2CH_2CH_3$
 2f,3f,4f,5f,7f: $R^1=$ isobutil

Esquema 3. Ruta sintética a partir del 2-cloronitrobenzoceno para la obtención de los compuestos

Tabla 5. Derivados del bencimidazol sintetizados (8-16)



COMPUESTO	R^1	R^2	R^3	R^4
8	CH ₃	H	H	Br
9	CH ₃	OH	Br	H
10	CH ₃	OH	Cl	H
11	CH ₃	OCH ₃	H	H
12	CH ₂ CH ₃	H	H	OCH ₃

13	CH ₂ CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂
14	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	H	OCH ₃
15	Isopropil	H	H	Br
16	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	H	Cl

5.3. Parte Biológica

5.3.1. Evaluación *in vitro* de la actividad antiprotozoaria

El ensayo para la determinación de la actividad antiprotozoaria se realizó en la unidad de Investigación Médica de enfermedades Infecciosas y Antiparasitarias del IMSS. Centro Médico Siglo XXI, por el grupo de investigación de la Dra. Lilián Yépez Mulia

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se siguió el método descrito por Cedillo Rivera.²⁴ Se incubaron 5x10⁴ trofozoítos/mL de *G. intestinalis* y 6x10³ trofozoítos/mL de *E. histolytica* y *T. vaginalis* con los diferentes compuestos a concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 µg/mL, usando el DMSO libre de compuestos como control negativo. Los tubos se incubaron a 37 °C por 48 h. Posteriormente, los trofozoítos se sembraron en medio fresco por 48 h. Finalmente se determinó el número de trofozoítos por mililitro en una cámara de Neubauer. Los resultados se analizaron por medio de un análisis probit para determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de cada uno de los compuestos, la cual corresponde a la concentración del compuesto que inhibió en 50 % el crecimiento de los trofozoítos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Parte Computacional

6.1.1 Dinámica Molecular (DM)

Esta técnica se empleó para determinar el comportamiento y estabilidad de los iones Mn y aminoácidos del sitio catalítico de la proteína, con la finalidad de validar los resultados del estudio de acoplamiento molecular (**Apéndice 2**).

Se evaluó el comportamiento dinámico de la proteína por medio del cálculo del RMSD (**Gráfico 1**). En el gráfico del RMSD se muestran 5 estructuras (5 Clústerings), que debido a su probabilidad de incidencia son las más representativas a lo largo de la dinámica **Tabla 6**.

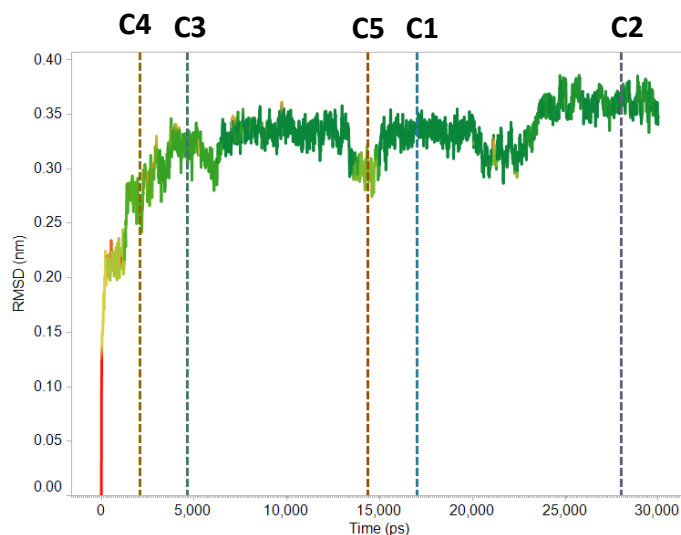


Gráfico 1. RMSD, Dinámica molecular 30 ns.

Tabla 6. Clústerings obtenidos de la DM de 30 ns y el tiempo al que corresponden en la dinámica.

Clúster	No. Estructuras representativas	Tiempo (ps)
1	1752	17030
2	412	28020
3	376	4630
4	167	2070
5	124	14340

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las principales modificaciones estructurales entre cada clúster se deben a los aminoácidos superficiales; sin embargo, dentro de estas modificaciones principalmente se analizaron los aminoácidos del sitio catalítico: *histidina (H90)*, *Aspartato (D113)*, *histidina (H115)*, *Aspartato (D117)*, *Aspartato (D221)* *Aspartato (D223)* y *ácido glutámico (E 266)* y loops vecinos (**Figura 10**).

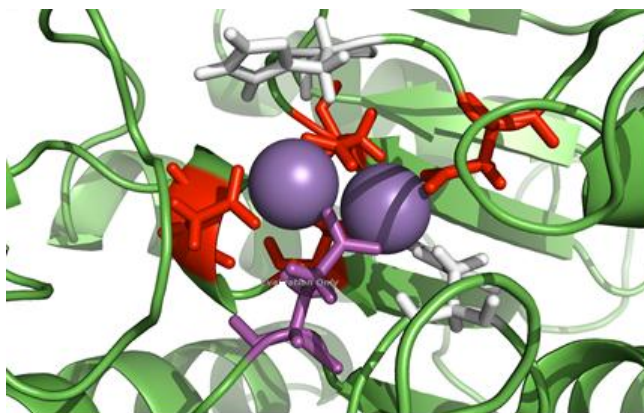


Figura 10. Sitio catalítico con los principales aminoácidos. Histidina (blanco), Aspartato (rojo) y Ácido glutámico (Magenta), iones Mn (Esferas).

El análisis muestra cambios importantes del sitio catalítico, principalmente en la *Histidina H115* (en blanco), el ácido glutámico *E266* (magenta) y los loops vecinos (flechas negras) al sitio catalítico y que son responsables de su apertura y cierre donde se encuentran los iones Mn (**Figura 11**). El análisis conformacional muestra la apertura del sitio al avanzar el tiempo, durante los primeros 5 ns (Clúster 4 y 3) el sitio catalítico se encuentra cerrado, al avanzar el tiempo se abre (Clúster 5 y 1) y se mantiene así hasta que la histidina *H115* cierra de nuevo el sitio al final de la dinámica (Clúster 2).

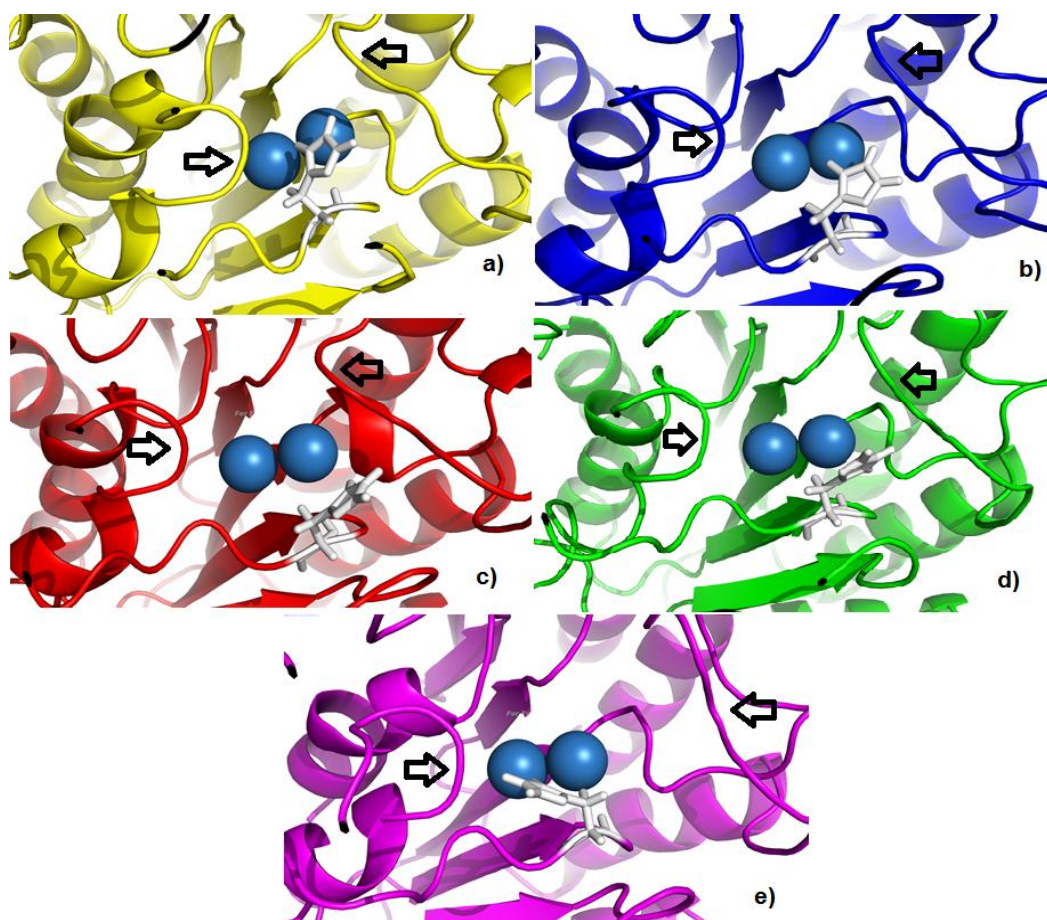


Figura 11. Representación de los 5 Clústerings, en orden cronológico de acuerdo a la DM; Clústering 4 (a), Clúster 3 (b), Clúster 5 (c), Clúster 1 (d), Clúster 2 (e). Iones Mn (Esferas).

Una vez analizados los 5 clústerings, se buscó en cuáles de ellos se encontraba una molécula de agua dentro del sitio catalítico, pues ésta forma el ion OH^- , fundamental para la actividad catalítica de la arginasa. De los 5 clústerings obtenidos, los clúster 1 y 5 mostraban interacciones de los iones Mn con una molécula de agua dentro del sitio catalítico (**Figura 12**). La presencia de la molécula de agua dentro del clúster al parecer se debe principalmente a los cambios conformacionales que adquiere la proteína, cambios en la *histidina H115*, la cual se encuentra frente a los iones Mn; al analizar los clúster 4 y 3, la *histidina H115* se encuentra bloqueando a los iones Mn^{2+} por lo que no permite la difusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del agua al interior. Por otro lado, la histidina en los clúster 5 y 1 no muestra un cambio importante en la conformación de la histidina ni los loops vecinos, en estos dos el sitio catalítico se encuentra expuesto, lo que permite la difusión de la molécula de agua al sitio catalítico y que tenga interacciones con los iones Mn (**Figura 12, a**). En el tiempo final de la DM (clúster 2), nuevamente no se encuentra la molécula de agua dentro del sitio, ya que la *histidina H115* nuevamente bloquea los iones Mn impidiendo la difusión de la molécula de agua (**Figura 12 b**).

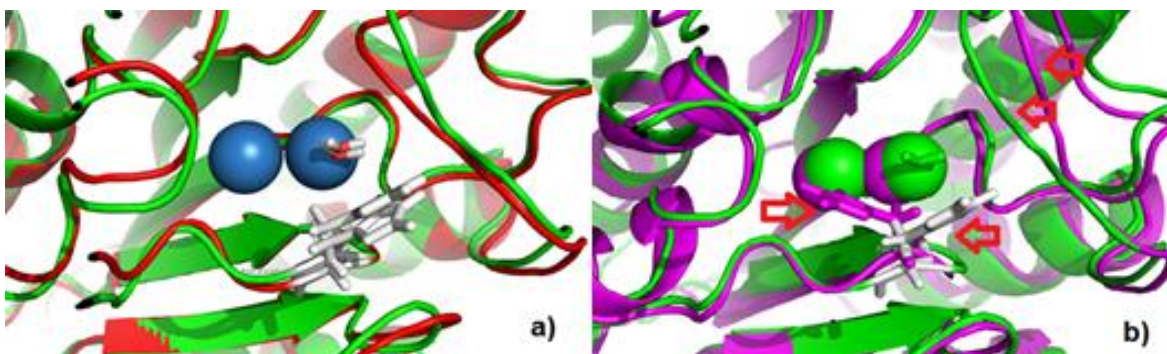


Figura 12. a) Clúster 1 H₂O y Clúster 5 H₂O (verde y rojo respectivamente), histidina en blanco **b)** Clúster 1 con H₂O (verde) histidina (blanco), Clúster 2 ausencia de H₂O (magenta) las flechas rojas indican el cambio conformacional de los loops y la histidina. Iones Mn (Esferas).

Estos datos se encuentran relacionados con los reportados por Nagagarajan et al,²² un estudio realizado en la arginasa I, donde se realizó una DM de 50 ns, sugiere que cuando el sustrato se una lo hará inicialmente al ácido glutámico (presente en el sitio catalítico de nuestra arginasa en Glu266, **Figura 13**), unión fundamental para la organización de los aminoácidos del sitio activo que facilita la difusión del agua y la formación del ion hidróxido. Una vez formado el ion hidróxido, la interacción del sustrato con Glu266 será menor, posicionando el carbono de la fracción de guanidino de la arginina al ataque nucleofílico del ion hidróxido.²¹

Nuestros estudios muestran que la molécula de agua se puede introducir en el sitio catalítico sin necesidad de que el Glu266 tenga un cambio conformacional por la presencia del sustrato, ya que el sitio catalítico sólo necesita que sea expuesto para facilitar la difusión del agua hacia los iones Mn por medio del cambio conformacional de la *H115*.

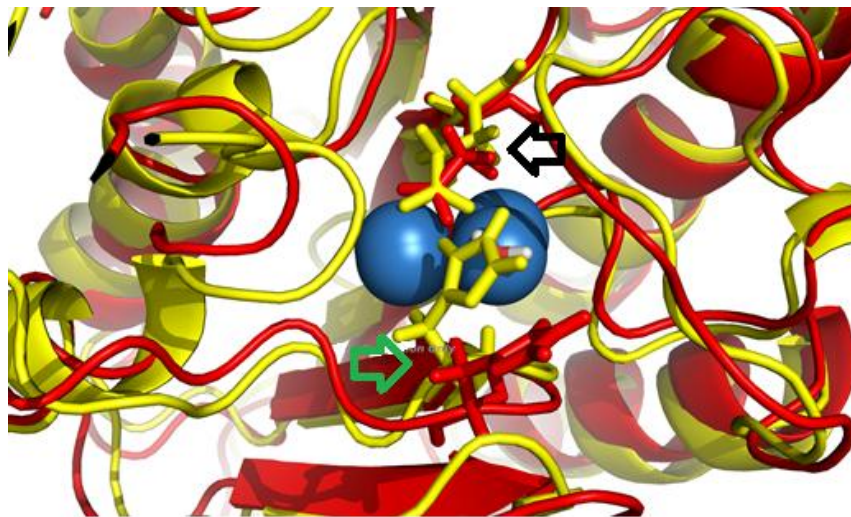


Figura 13. Presencia de ácido glutámico (Glu) (señalado en negro) Histidina (señalado en verde), clúster 4 (amarillo) clúster 5 H₂O (rojo). Iones Mn (Esferas).

6.1.2 Acoplamiento Molecular (Docking)

Esta técnica se empleó con la finalidad de determinar la afinidad y conformación de las moléculas en el sitio de unión, representando la fuerza de unión, con la finalidad de saber cómo y dónde se une el ligando.

La **Tabla 7** muestra los resultados del tamaño del clúster -Clúster size (CS)- y el $\Delta G_{\text{unión}}$ que determinan la afinidad de los ligandos de los 7 estudios de docking realizados en los 5 Clúster extraídos de la DM y dos Clúster que presentaban la molécula de agua en el sitio catalítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4	Clúster 5	Clúster 1 H ₂ O	Clúster 5 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
111419	4 / -6.54	7 / -7.16	10 / -6.62	10 / -6.34	13 / -7.67	10 / -6.34	12 / -6.85
196189	7 / -6.75	11 / -7.45	9 / -7.31	8 / -6.13	7 / -7.18	8 / -6.81	10 / -6.01
285488	16 / -5.78	12 / -6.55	7 / -5.91	18 / -6.48	9 / -7.29	14 / -6.05	6 / -6.49
285495	17 / -6.28	8 / -6.86	8 / -6.83	9 / -6.78	9 / -7.5	12 / -6.28	15 / -6.64
285496	6 / -6.22	8 / -6.86	7 / -7.22	9 / -6.44	7 / -7.06	9 / -6.28	8 / -6.52
513985	12 / -6.71	15 / -6.36	5 / -7.37	10 / -5.52	13 / -6.65	8 / -6.66	9 / -6.28
513988	16 / -6.51	12 / -6.31	7 / -7.18	13 / -6.66	12 / -6.54	11 / -6.5	7 / -5.8
525027	13 / -5.59	7 / -6.11	8 / -6.03	6 / -5.56	12 / -6	9 / -5.61	17 / -5.72
526385	20 / -6.28	21 / -6.6	9 / -6.4	17 / -5.78	11 / -5.8	22 / -6.36	13 / -5.87
532233	11 / -6.57	18 / -7.51	16 / -6.94	14 / -6.34	9 / -6.62	25 / -6.2	16 / -6.01
613506	21 / -6.43	7 / -6.53	9 / -6.27	17 / -5.7	12 / -6.24	10 / -6.49	7 / -6.35
804806	13 / -5.96	13 / -6.52	7 / -6.49	8 / -5.55	10 / -6.44	12 / -6.04	8 / -5.55
1798220	9 / -6.77	11 / -5.86	12 / -7.46	9 / -5.43	7 / -6.86	7 / -6.1	5 / -5.66
2073201	9 / -6.41	8 / -6.48	19 / -7.13	6 / -5.9	9 / -6.43	11 / -6.29	10 / -5.65
2478054	16 / -6.77	9 / -7.42	12 / -7.1	10 / -6.38	9 / -6.88	12 / -6.09	11 / -6.15
3643102	9 / -6.61	5 / -6.84	11 / -7.26	5 / -6.02	12 / -6.65	13 / -6.66	10 / -5.9
3643113	9 / -5.95	9 / -6.49	11 / -6.81	5 / -5.22	9 / -6.97	9 / -6.11	8 / -5.52

Número total de conformaciones por Docking: 25

Clúster size (CS): mayor clúster size mayor afinidad

$\Delta G_{\text{unión}}$: a menor energía, mayor afinidad

Estructuras de Moléculas Clave ZINC Apéndice 5.

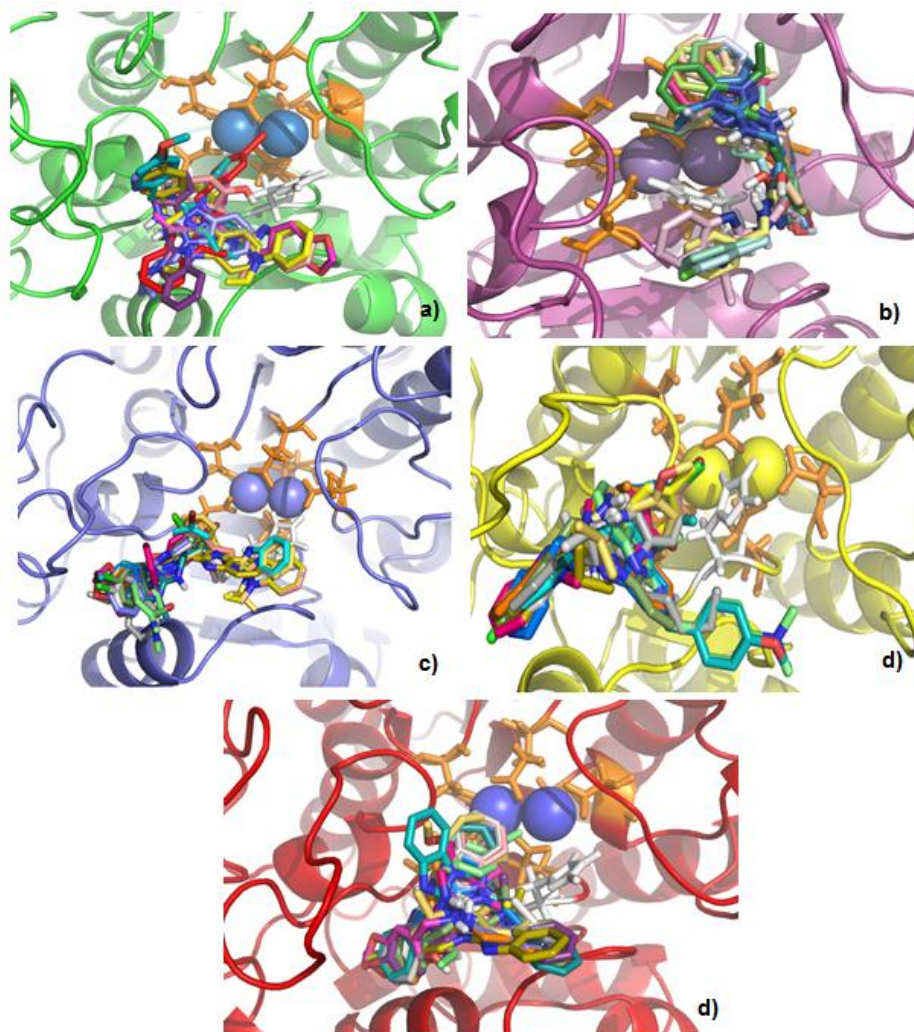


Figura 14. a) Docking Clúster 1 (17030 ps), b) Docking Clúster 2 (28020 ps), c) Docking Clúster 3 (4630 ps), d) Docking Clúster 4 (2070 ps), e) Docking Clúster 5 (14340 ps).

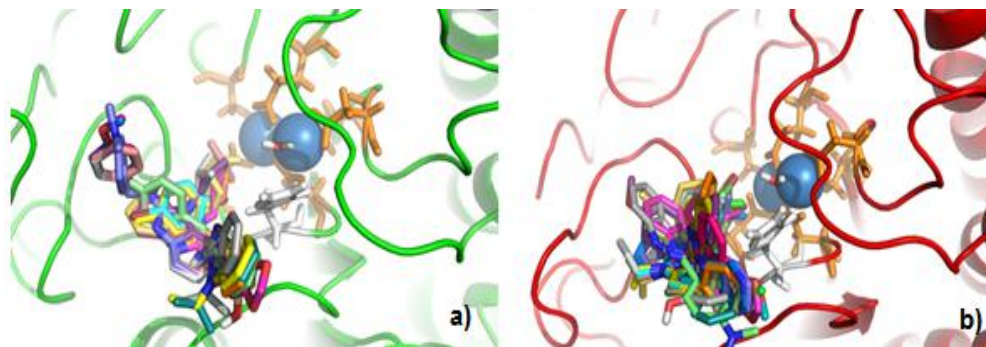


Figura 15. a) Docking Clúster 1 con H₂O, b) Docking Clúster 5 con H₂O.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de todos los acoplamientos realizados muestran que todas las moléculas en todos los clúster se unieron en la cavidad del sitio catalítico en diferentes conformaciones, indicando que la arginina no podría ser usada como sustrato; sin embargo, es de gran importancia elucidar partes importantes de la unión y así poder sugerir cambios estructurales para mejorar la afinidad de los ligandos.

En general los clúster muestran energías de unión desde -6.0 Kcal/mol hasta los -7.6 Kcal/mol; ya que los valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ de cada molécula en cada Docking no tenía un cambio significativo, por lo que determinamos la afinidad basándonos en el tamaño del clúster (clúster size "CS") eligiendo como las moléculas más afines a aquellas que tuvieran mayor CS, debido a su importancia estadística.

En el Docking realizado en el clúster 1 se observa que más de la mitad de las moléculas presentan un CS mayor a 15 (Comparado con los clúster 2, 3, 4 y 5), indicando que las moléculas son más afines a la arginasa en esta conformación y, ya que el clúster 1 presenta la mayor probabilidad de incidencia a lo largo de la dinámica, esto sugiere que éste sería el modo de unión de las moléculas.

Debido a esto, se realizó un análisis que mostrara la influencia de la presencia de la molécula de agua dentro del pocket del sitio catalítico. Se encontró que no hay una diferencia significativa del $\Delta G_{\text{unión}}$ en la mayoría de las moléculas; sin embargo, se observa una alteración en los valores de CS, entre Clúster 1 y Clúster 1H₂O. La disminución del tamaño del CS indica una disminución de la afinidad a la proteína, y las moléculas que aumentaron el CS indican un aumento de la afinidad, por lo tanto las moléculas; 111419, 196189, 285496, 526385, 532233, 2073201 y 3643102 se encuentran dentro de las más afines, pues en presencia de la molécula de agua, el tamaño de los CS se incrementó considerablemente.

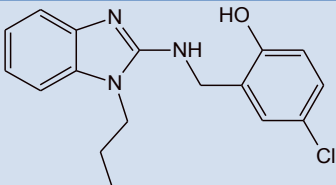
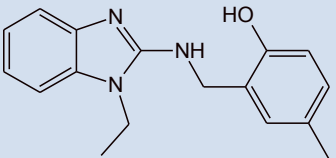
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados nos indican que estas moléculas podrían tener actividad debido a que se unen al sitio catalítico de la conformación proteica que presenta la mayor probabilidad de incidencia de acuerdo a los estudios de Dinámica Molecular.

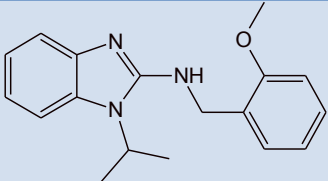
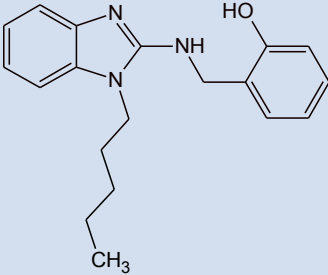
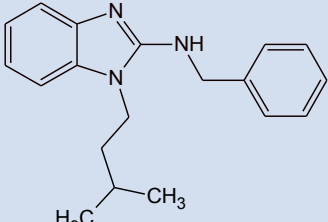
Se realizó el mismo análisis en los Clúster 5 y Clúster 5 H₂O, los resultados muestran que las moléculas: 111419, 196189, 285496, 526385, 532233 y 2073201, tuvieron un incremento en el CS junto con: 196189, 285495, 525027 y 2478054; sin embargo, el clúster 5 mostró la menor probabilidad de incidencia de los estudios de DM, lo que indica que esta conformación será la menos probable.

Una vez determinada la mejor representación de la interacción ligando-proteína Clúster 1 H₂O se realizó un análisis de las interacciones de las cinco moléculas (1798220, 513985, 285488, 285496 y 613506) que fueron sintetizadas previamente en nuestro laboratorio y de las cuales se tienen reportados los resultados de actividad biológica en *Leishmania mexicana*. El análisis fue realizado junto con las moléculas sintetizadas en este trabajo que tuvieran similitudes estructurales para poder predecir su actividad.

Tabla 8. Resultados del acoplamiento molecular y actividad biológica de los 5 compuestos previamente sintetizados

Molécula (Clave zinc)	Molécula	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O	CL ₅₀ (μM)
		Clúster size / ΔG _{unión} (Kcal/mol)	Clúster size / ΔG _{unión} (Kcal/mol)	
285496		6 / -6.22	9 / -6.28	52.91
285488		16 / -5.78	14 / -6.05	61.47

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

613506		21 / -6.43	10 / -6.49	66.95
1798220		9 / -6.77	7 / -6.1	87.82
513985		12 / -6.71	8 / -6.66	108.45

En las moléculas 285496 y 196189 podemos observar que la cadena del grupo propilo es la que se integra en el pocket del sitio catalítico, en presencia y ausencia de agua en el caso de la molécula 196189; sin embargo, en ausencia de agua en la proteína, podemos ver que la cadena alquílica se ubica fuera del pocket **Figura 16 (a)**, indicando que la cadena del grupo propilo es la que determina la afinidad al sitio catalítico. La molécula 285496 ya había sido sintetizada en nuestro grupo de trabajo y los datos de actividad biológica muestran que ésta fue la molécula más activa de las cinco sintetizadas.

Tabla 9. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size/ $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size/ $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
285496	6 / -6.22	9 / -6.28
196189	7 / -6.75	8 / -6.81

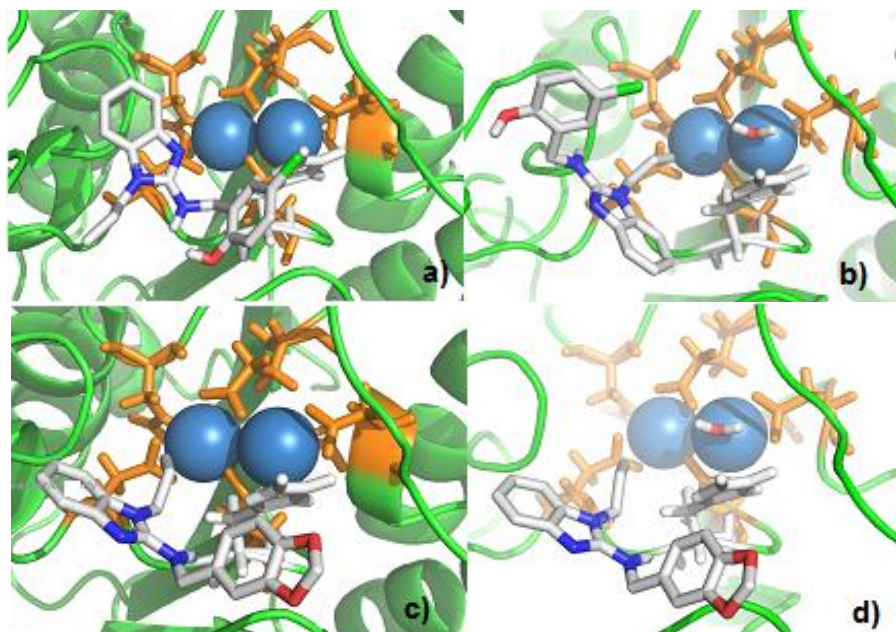


Figura 16. a) Docking Molécula 285496 Clúster 1, b) Docking Molécula 285496 Clúster 1 H₂O, c) Docking Molécula 196189 Clúster 1, d) Docking Molécula 196189 Clúster 1 H₂O.

La molécula 526385 no muestra una diferencia en la conformación al unirse al sitio catalítico entre Clúster 1 H₂O y Clúster 1 **Figura 17 (a y b)**. Comparada con 613506 la orientación en ambas es la misma, con el grupo –OCH₃ dentro del pocket, la única diferencia estructural entre las dos es la cadena alquílica en la posición 1 del bencimidazol, lo que demuestra su importancia pues altera el tamaño del CS considerablemente. Con la cadena del grupo isopropilo disminuye el CS de 613506 en Clúster 1 H₂O en cambio 526385 incrementa su CS en el Clúster 1 H₂O, sugiriendo que tiene más afinidad **Figura 17**. Los resultados de actividad biológica mostraron que 613506 tiene gran potencia en contra de *Leishmania mexicana*, lo que sugiere que 526385 tendría una actividad mayor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
526385	20 / -6.28	22 / -6.36
613506	21 / -6.43	10 / -6.49

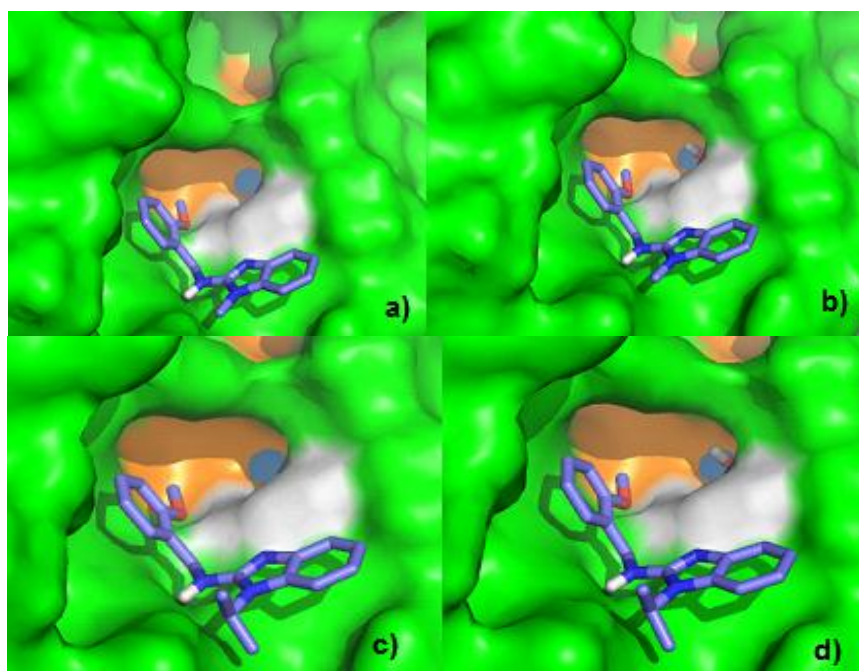


Figura 17. **a)** Docking Molécula 526385 Clúster 1, **b)** Docking Molécula 526385 Clúster 1 H₂O, **c)** Docking Molécula 613506 Clúster 1, **d)** Docking Molécula 613506 Clúster 1 H₂O.

La molécula 285495 se orienta hacia los iones Mn por medio del grupo -OH en el clúster 1 y el clúster 1 H₂O, mientras que el -Cl se orienta en ambos casos hacia fuera del pocket **Figura 18 (a y b)**. La molécula 285488 muestra cómo el grupo -OH se orienta dentro del pocket hacia los iones Mn en el clúster 1 y clúster 1 H₂O **Figura 18 (c y d)**. Sin embargo, existe una disminución en el CS en ambas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

moléculas al comparar el Clúster 1 y el Clúster 1 H₂O **Tabla 11**. La diferencia estructural entre las dos moléculas son la cadena alquílica en la posición 1 del bencimidazol, el grupo CH₃ y el sustituyente Cl en la región del anillo bencénico, por lo tanto, estos dos grupos determinan la orientación y cambios de CS y $\Delta G_{\text{unión}}$ de estas moléculas. Los resultados de actividad biológica mostraron que 285488 presenta actividad en *Leishmania mexicana*.

Tabla 11. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
285495	17 / -6.28	12 / -6.28
285488	16 / -5.78	14 / -6.05

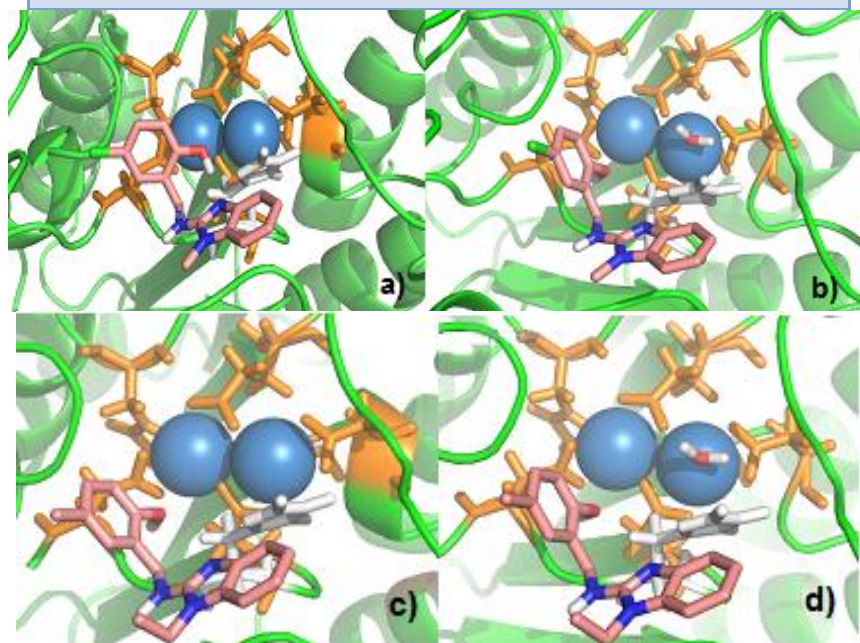


Figura 18. a) Docking Molécula 285495 Clúster 1, b) Docking Molécula 285495 Clúster 1 H₂O, c) Docking Molécula 285488 Clúster 1, d) Docking Molécula 285488 Clúster 1 H₂O,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar 285495, con un grupo metilo en la posición 1, y 285496, con un grupo propilo en la posición 1, podemos observar que la segunda **Figura 19 (c y d)** incrementa su afinidad en el clúster 1 H₂O cuando la cadena de grupo propilo se orienta dentro del pocket del sitio catalítico; en el caso de 285495, la afinidad cae en el clúster 1 H₂O, aquí es el grupo –OH quien se orienta dentro del pocket del sitio catalítico. Los resultados de actividad biológica mostraron que 285496 tiene una potente actividad en *Leishmania mexicana* y de las cinco moléculas reportadas esta es la más activa.

Tabla 12. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
285495	17 / -6.28	12 / -6.28
285496	6 / -6.22	9 / -6.28

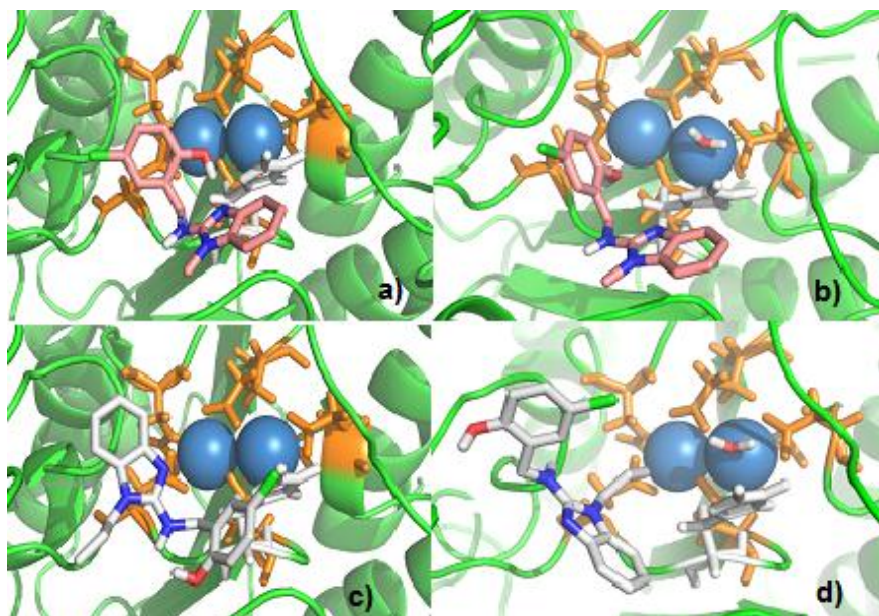


Figura 19. a) Docking Molécula 285495 Clúster 1, b) Docking Molécula 285495 Clúster 1 H₂O, c) Docking Molécula 285496 Clúster 1, d) Docking Molécula 285496 Clúster 1 H₂O,

Las moléculas 513985 y 1798220 son parte de las cinco moléculas previamente sintetizadas que presentaron actividad biológica, sin embargo, fueron las menos activas, la conformación de las dos en el clúster 1 H₂O muestra que la cadena alquílica se orienta dentro del pocket, mientras que en el clúster 1 se orientan hacia afuera.

Tabla 13. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
513985	12 / -6.71	8 / -6.66
1798220	9 / -6.77	7 / -6.1

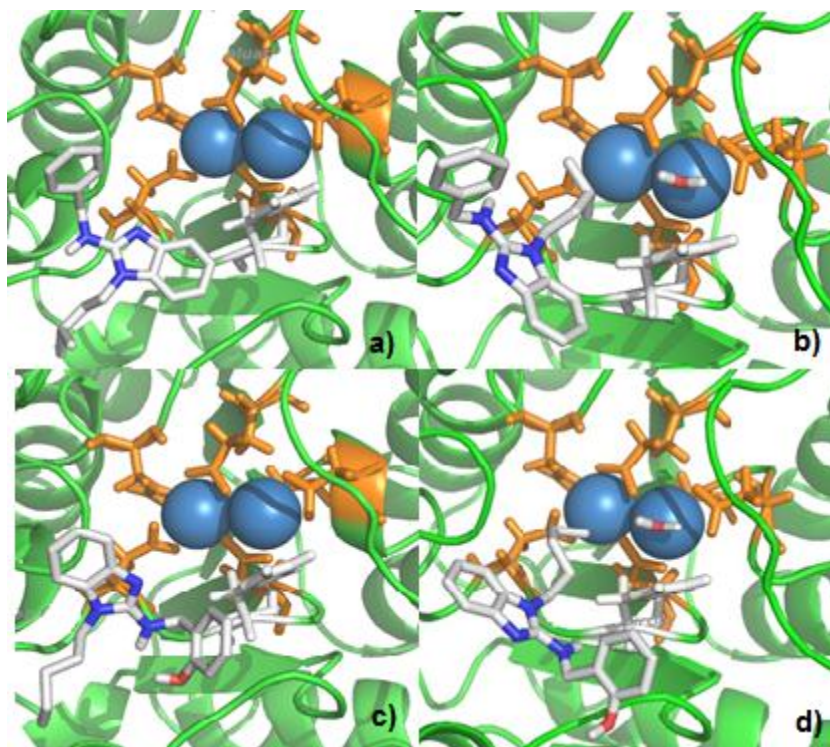


Figura 20. a) Docking Molécula 513985 Clúster 1, b) Docking Molécula 513985 Clúster 1 H₂O, c) Docking Molécula 1798220 Clúster 1, d) Docking Molécula 1798220 Clúster 1 H₂O,

Las interacciones de las moléculas más afines con los iones Mn en el Clúster 1 H₂O y que presentaron actividad biológica 613506, 285496 y 285488 presentaban grupos -OCH₃ y -OH en posición *orto* en la parte bencenoide de la molécula o cadenas alquílicas de propilo en la posición 1 del bencimidazol, introduciéndose estos grupo en el pocket con los iones Mn, lo que indica que estos sustituyentes son importantes para las interacciones ligando-proteína, de modo que estas moléculas pueden servir como líderes para diseñar modificaciones estructurales y obtener nuevos compuestos posiblemente activos.

Por último, se observó que las moléculas que presentan cadenas alquílicas de butilo, isobutilo, pentilo e isopentilo, no mostraban diferencias significativas en el CS ni $\Delta G_{\text{unión}}$ al comparar el clúster 1 y el clúster 1 H₂O. Las moléculas 513985 y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1798220 son moléculas que tienen cadena de isopentilo y pentilo, respectivamente y a pesar de ser moléculas con actividad sobre *Leishmania mexicana*, estas tuvieron baja actividad, lo que puede ser debido a su baja permeabilidad celular, propiedad de moléculas con grandes cadenas alquílicas.

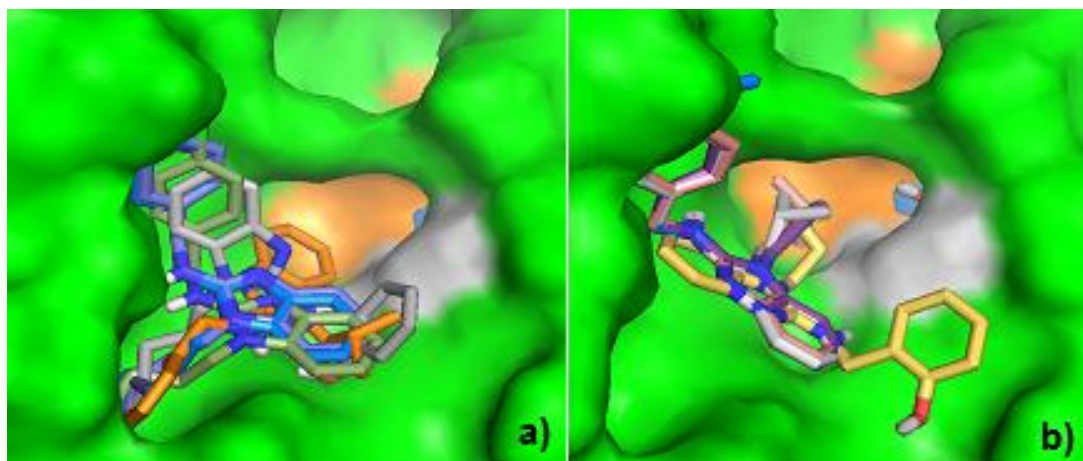


Figura 21. a) Docking Moléculas con cadenas de butilo, isobutilo, pentilo e isopentilo en Clúster 1, **b)** Docking Molécula con cadenas de butilo, isobutilo, pentilo e isopentilo en Clúster 1 H₂O.

Tabla 14. Resultados del acoplamiento molecular

Molécula (Clave zinc)	Clúster 1	Clúster 1 H ₂ O
	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster size / $\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
613506	21 / -6.43	10 / -6.49
285496	6 / -6.22	9 / -6.28
196189	7 / -6.75	8 / -6.81
285495	17 / -6.28	12 / -6.28
285488	16 / -5.78	14 / -6.05
513985	12 / -6.71	8 / -6.66
1798220	9 / -6.77	7 / -6.1

6.1.3. Comparación de Modelo con estructura cristalizada

Una consulta reciente (mayo de 2013) en Protein Data Bank (PDB) mostro un reporte sobre la estructura cristalizada de Arginasa de *Leishmania mexicana*, de modo que se comparó la estructura cristalizada con la estructura de la proteína que en base a nuestros estudios de DM se considera es el mejor modelo proteico, clúster 1 H₂O, encontrando que el modelo tiene una gran similitud estructural a la estructura cristalizada reportada pues se puede observar que se encuentra la mayor parte de las estructuras de alfa hélice y beta plegada (**Figura 22**).

Del mismo modo se comparó la topología del sitio catalítico y no se encontraron diferencias significativas en los aminoácidos, a excepción del ácido glutámico (flecha), cambio conformacional que corresponde al producido por la presencia del ligando con el que la molécula fue cristalizada, como reporta Nagagarajan et al²¹. De este modo podemos observar cómo los estudios de modelado por homología, si bien no son exactos, pueden ayudarnos a elucidar de manera muy cercana la estructura de una proteína cuando no se tiene reportada su estructura cristalina.

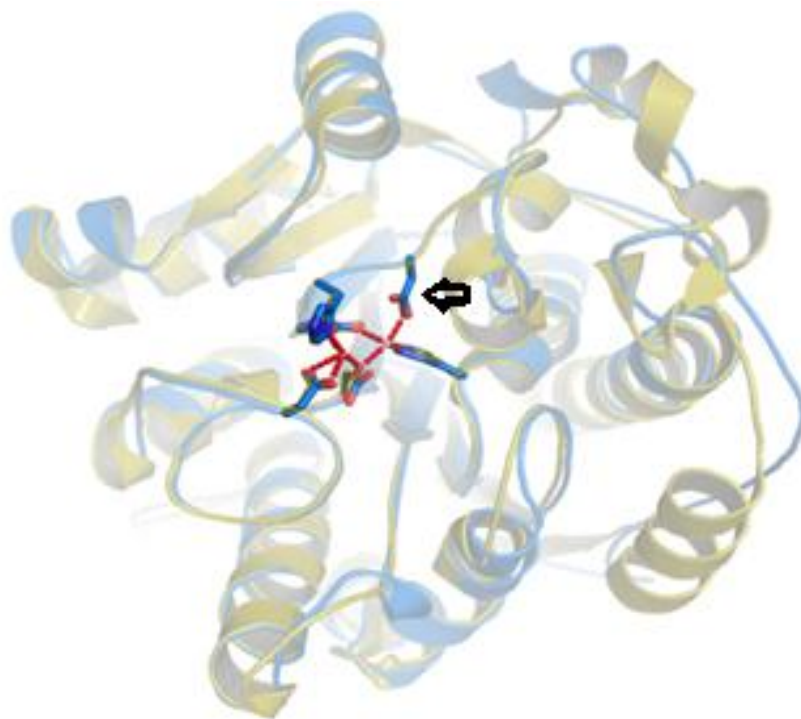


Figura 22. Proteína cristalizada clave 4IU0 (Dorado) Proteína obtenido por estudios de modelado por homología (azul)

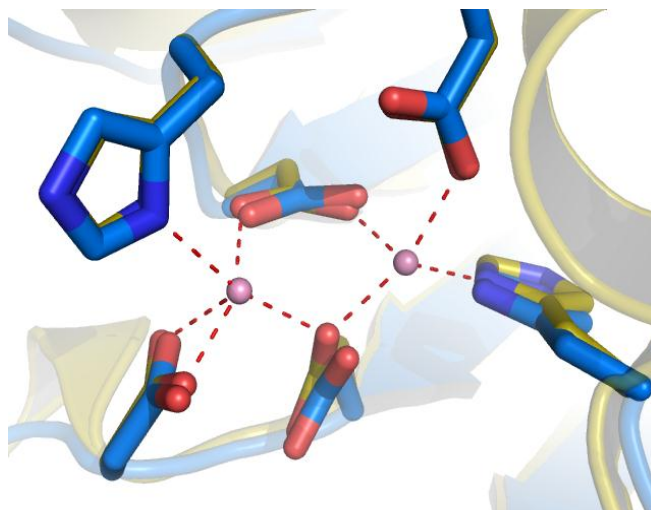


Figura 23. Sitio catalítico de la proteína cristalizada clave 4IU0 (Dorado), Sitio catalítico de proteína obtenido por estudios de modelado por homología.

6.2. Parte química

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos de los compuestos finales, así como de sus intermediarios **3a-f**, **4a-f**, **5a-f**, **7a-f**, **8a-f**, se muestran en la **Tabla 16**. A continuación se presenta una breve discusión de los resultados obtenidos durante el proceso de síntesis, desde la preparación de los intermediarios hasta los productos finales.

6.2.1. Síntesis de los Intermediarios y productos finales

El BrCN se obtuvo con un rendimiento del 49%; la reacción se realizó sin problemas, no así el aislamiento por destilación simple debido a la naturaleza altamente tóxica del compuesto y su bajo punto de fusión; sin embargo, se pudo obtener con alta pureza. Este compuesto es indispensable para la preparación de los 2-aminobencimidazoles.

Los derivados del alquil-2-amino-1*H*-bencimidazol se obtuvieron por una sola ruta, **Esquema 3**. A partir de una misma materia prima: 2-cloronitrobenzeno (**1**), el cual se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica aromática con la alquilamina correspondiente obteniéndose buenos rendimientos, todos superiores al 85%. La reducción del grupo nitro para la obtención de las *o*-fenilendiaminas (**4a-f**) se realizó empleando H₂ y Pd/C como catalizador con periodos de tiempo corto. Los productos obtenidos por hidrogenación catalítica se sometieron inmediatamente a la siguiente reacción de ciclocondensación con BrCN, para evitar su descomposición, dando los derivados del 2-amino-1*H*-bencimidazol (**5a-f**), con diversos rendimientos, en este caso conforme aumentaba la cadena de carbonos, los rendimientos de la ciclocondensación disminuían, obteniendo así el mayor rendimiento con el compuesto 2-amino-*N*-metil-1*H*-bencimidazol (**5a**) (79%) y con el compuesto 2-amino-*N*-isobutil-1*H*-bencimidazol (**5f**) el menor (20%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las reacciones de formación de las iminas se realizaron por calentamiento convencional y calentamiento con microondas, en ambos métodos se obtuvieron las iminas; sin embargo, existen dos aspectos importantes:

- 1) Solamente en las reacciones con microondas se observó todo el consumo de la materia prima, debido al uso del ortoformiato de metilo, que elimina el agua liberada durante la reacción. Este compuesto no podía utilizarse en la reacción con calentamiento convencional donde se usa tolueno debido a que alcanza 120°C para el progreso de la reacción, ya que el ortoformiato de metilo tiene un bajo punto de ebullición, (53°C), éste se evapora inmediatamente, sin embargo en el microondas, este podía eliminar el agua de la reacción ya que se encontraba en un sistema cerrado y más pequeño.
- 2) Si comparamos los tiempos de reacción de ambos métodos podemos ver que el uso de microondas, en la formación de los compuestos de imina, reduce el tiempo considerablemente, reacciones de 2 días a 15 min ó 5 días a 30 min, al mismo tiempo se observó que la materia prima el *N*-alquil-2-aminobencimidazol se agotaba, de modo que la reacción era completa; en cambio, por calentamiento convencional la materia prima nunca se consumió totalmente, de este modo no fue posible determinar el rendimiento de estas reacciones, pues el aislamiento de la imina resultó difícil.

Con base en estos datos podemos ver que el uso de la tecnología de microondas mejoró considerablemente los rendimientos, tratamientos y tiempos de reacción. **Tabla 15.** Además, se observó una relación de las características del aldehído utilizado y su naturaleza electrofílica, ésta se ve alterada de acuerdo a los sustituyentes presentes en el anillo aromático del aldehído, donde un grupo electroattractor mejora su electrofilia y por lo tanto los tiempos de reacción son menores, mientras que un grupo donador de carga, aumenta los tiempos de reacción. Todas las reacciones para la formación de los compuestos finales ocurrieron sin dificultad, sin importar, si provenían de la reacción de microondas o

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

por calentamiento convencional, los rendimientos al igual que su purificación no varían considerablemente entre ellos.

Tabla 15. Tiempo de reacciones realizadas por calentamiento convencional y microondas.

Compuesto	Rendimiento %	Tiempo
7a	ND	2 días
7a*	100	15 min
7b	ND	2 días
7b*	100	15 min
7c	ND	2 días
7d	ND	3 días
7d*	100	15 min
7e	ND	1 semana
7f*	100	30 min
7g	ND	1 semana
7h	ND	2 días
7i	ND	5 días

*. Realizados por calentamiento en Microondas.

N.D: No determinado

Tabla16. Rendimientos y constantes físicas de los productos finales y sus intermediarios sintetizados

Compuesto	Rendimiento %	Pf. (°C).	R _f (Sistema)
3 ^a	93.37	218-221.2	0.44 (II)
4 ^a	100	ND	0.24 (II)
5 ^a	79.79	226.1-227.6	0.4 (IV)
7 ^a	ND	ND	0.72 (VII)
7 ^a *	100	ND	0.72 (VII)
3 ^b	91.31	268-275	0.44 (III)
4 ^b	100	ND	0.26 (II)
5 ^b	40.12	154-155	0.34 (IV)
7 ^b	ND	ND	0.46 (VIII)
7 ^b *	100	ND	0.46 (VIII)
3 ^c	95	268.6-271.2	0.59 (I)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4c	100	ND	0.4 (I)
5c	40	134-135	0.38 (IV)
7c	ND	ND	0.55 (VII)
3d	90	*270-280.3	0.43 (I)
4d	100	ND	0.36 (I)
5d	37.71	198.3-198.9	0.47 (IV)
7d	66.53	ND	0.6 (VII)
7d*	100	ND	0.6 (VII)
3e	87.58	*261.5 – 269.5	0.68 (I)
4e	100	ND	0.38 (I)
5e	24.59	126.8-127.4	0.5 (IV)
7e	ND	ND	0.37 (V)
3f	78.95	268.-274	0.4 (I)
4f	100	ND	0.26 (I)
5f	20.66	155.8-156.8	0.63 (V)
7f*	100	ND	0.69 (VI)
7g	ND	ND	0.75 (V)
7h	ND	ND	0.6 (VI)
7i	ND	ND	0.84 (VI)
8	61.66	189.6-190.9	0.66 (VI)
8**	50.61	189.6-191.1	0.66 (VI)
9	65.60	211.1-211.9	0.65 (VI)
9**	53.32	215.8-216.5	0.65 (VI)
10	75	209 - 209.7	0.53 (VII)
11**	56.71	107-107.8	0.46 (VII)
12	42.74	149-150.2	0.56 (V)
13**	48.4	188.8-191	0.3 (VII)
14	15.31	179-180.7	0.54 (V)
15	43.17	197-197.6	0.46 (VII)
16	77.06	165.2-166.4	0.61 (V)

N.D: No determinado

*. Realizados por calentamiento en Microondas.

** Proviene de Reacción por microondas

Sistemas ccf en Parte Experimental (Tabla 19)

6.2.2. Espectroscopia y espectrometría de los compuestos finales

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales, así como las asignaciones realizadas para cada uno de los compuestos finales, se muestran en la **Tabla 17**. Estos datos permitieron la identificación inequívoca de los **compuestos**.

6.2.2.1. Espectrofotometría de Infrarrojo

Los Espectros de IR de los productos finales mostraron bandas de estiramiento y deformación características de los grupos alquilo ($2975 - 2950$, $1470-1435 \text{ cm}^{-1}$), además, una banda intensa arriba de 3000 cm^{-1} característica de los grupos N-H en todos los compuestos finales, junto con las señales de los grupos OH ($3250 - 3450 \text{ cm}^{-1}$) en los compuestos 9 y 10, las señales de los halógenos se presentaron en los compuestos 8, 9, 10, 15 y 16. ($800 - 600 \text{ cm}^{-1}$) y por último los compuestos 11,12 y 14 mostraron la presencia de los $-\text{OCH}_3$ ($2820 - 2850 \text{ cm}^{-1}$).

6.2.2.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^1H

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos finales fueron concordantes con las estructuras propuestas, mostrando señales para los protones de los **CH₃** y **CH₂** de las cadenas alquílicas unidas al **N** del bencimidazol, así como el **CH₂** bencílico que sirve como conexión entre el **NH** de la posición 2 del bencimidazol y el anillo de benceno proveniente del aldehído. Del mismo modo en todos los espectros se observó la presencia del **NH** señal que desapareció por intercambio con D_2O .

6.2.2.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C

Los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos concordaron con el número de átomos de carbono esperados para las estructuras planteadas.

Sin embargo, en el caso de compuestos **8**, **13**, **14**, **15** y **16** el número de átomos de carbono fue menor, debido a que hay señales traslapadas por los carbonos del

anillo del bencimidazol y/o anillo bencénico, esto se debe a la simetría de las moléculas.

6.2.2.4. Espectrometría de masas.

Todos los intermediarios *N*-alquil-2-aminobencimidazol mostraron el ion molecular correspondiente al compuesto, como pico base en los compuestos **5a**, **5b** y **5e**, mientras que en los compuestos **5c**, **5d** y **5f**, se encuentran como pico base la ruptura de la cadena alquímica.

Todos los compuestos finales mostraron el ion molecular esperado correspondiente a su peso molecular, así como un pico con dos unidades más de masa, en los casos correspondientes (compuestos **8**, **9**, **10**, **15** y **16**) debido a la presencia del halógeno, el producto de fragmentación, de los bencimidazoles 2-amino, formó el correspondiente pico base para los compuestos finales. El Cl muestra la relación de la abundancia isotópica en los dos picos 287 y 289 (75% / 25%), donde 287 muestra una señal más intensa, mientras que en el caso del Br muestra la intensidad de las señales es muy cercana mostrando nuevamente la abundancia isotópica (55% / 45%).

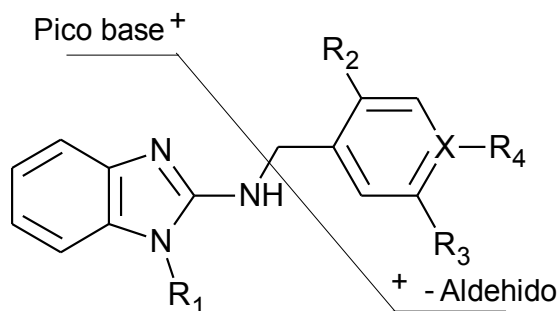
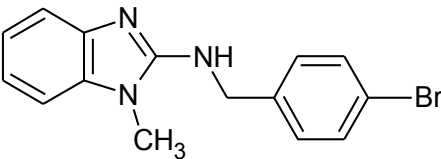
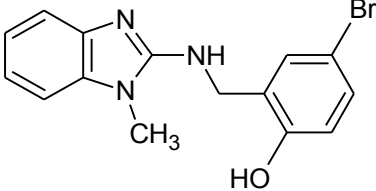


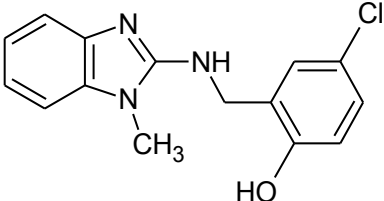
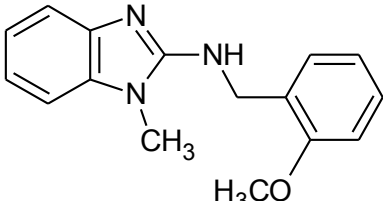
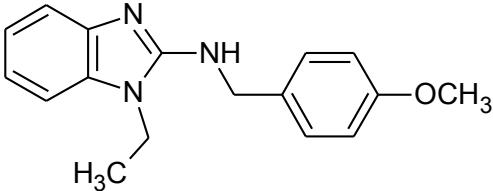
Figura 24. Sitio de ruptura para generar las fragmentaciones más importantes de los compuestos finales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

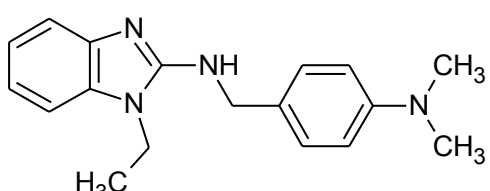
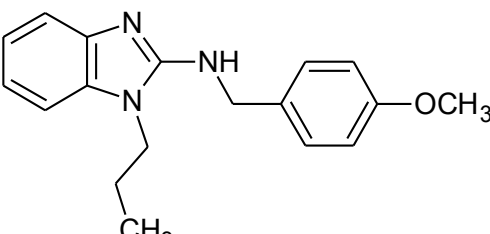
Tabla 17. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales

Compuesto	Señales
<div style="text-align: center;">  <p><i>N</i>-(4-Bromobencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol (8) PM: 316 C₁₅H₁₄BrN₃</p> </div>	<p>Espectro 1. IR (KBr) en cm⁻¹: 3318 (Ar-NH-R), 2934.76 (CH₃), 745.97 (Cl).</p> <p>Espectro 2. EM (IE⁺) m/z (int.%): 318 (M⁺ +2, 15), 317 (M⁺, 75), 315 (80), 146 (100), 169 (45).</p> <p>Espectro 3. RMN ¹H(DMSO-d₆, δ en ppm: 7.50 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), intercambiable con D₂O) 7.15 (td, <i>J</i> = 7.4, 1.7 Hz, 2H), 6.97-6.87 (m, 2H), 4.55 (d, <i>J</i> = 5.6 Hz, 2H), 3.53 (s, 3H).</p> <p>Espectro 4. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm: 155.39, 142.80, 140.35, 135.80, 131.45, 129.89, 120.66, 120.05, 118.81, 115.46, 107.72, 45.51, 28.70.</p>
<div style="text-align: center;">  <p><i>N</i>-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol (9) PM: 332 C₁₅H₁₄BrN₃O</p> </div>	<p>Espectro 5. IR (KBr) en cm⁻¹: 3647 (Ar-NH-R), 3317 (Ar-OH), 2933.93 (CH₃), 744.97 (Br).</p> <p>Espectro 6. EM (IE⁺) m/z (int.%): 333 (M⁺, 14), 334 (M⁺ +2, 5), 331 (15), 147 (100).</p> <p>Espectro 7. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 12.11 (s, 1H) intercambiable con D₂O, 7.59 (s, 1H), intercambiable con D₂O, 7.38 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H), 7.28 – 7.16 (m, 3H), 6.99 (pd, <i>J</i> = 7.4, 1.5 Hz, 2H), 6.76 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 4.42 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz, 2H), 3.52 (s, 3H).</p> <p>Espectro 8. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm: 155.96, 155.49, 140.67, 135.32, 133.04, 131.53, 129.79, 121.27, 119.97, 119.69, 114.92, 110.37, 108.28, 41.95, 28.80.</p>

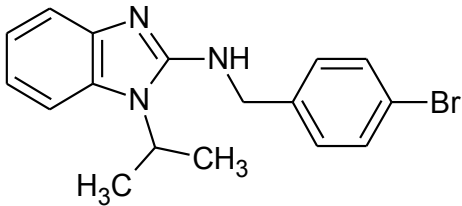
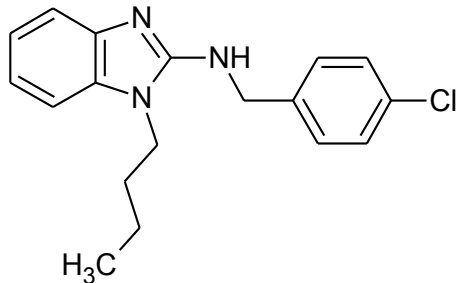
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

 <p><i>N</i>-(5-Cloro-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol (10)</p> <p>PM: 287 C₁₅H₁₄ClN₃O</p>	<p>Espectro 9. IR (KBr) en cm⁻¹: 3431 (Ar-NH-R), 3252.90 (Ar-OH), 2899 (CH₃), 733.44 (Br).</p> <p>Espectro 10. EM (IE⁺) m/z (int. %): 287 (13) 289 (M⁺+2, 5), 147 (100).</p> <p>Espectro 11 RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 7.23-7.15 (m, 4H), 7.09 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 6.96 (pd, <i>J</i> = 7.4, 1.4 Hz, 3H), 6.78 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H) intercambiable con D₂O, 4.41 (s, 2H), 3.50 (s, 3H).</p> <p>Espectro 12. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm): 156.01, 155.93, 140.91, 135.36, 129.86, 129.18, 128.49, 122.19, 121.19, 119.58, 114.95, 108.21, 42.06, 40.83, 28.77.</p>
 <p><i>N</i>-(2-Metoxibencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol (11)</p> <p>PM: 267 C₁₆H₁₇N₃O</p>	<p>Espectro. 13. IR (KBr) en cm⁻¹: 3386.51 (Ar-NH-R), 2935 (OCH₃).</p> <p>Espectro 14. EM (IE⁺) m/z (int.%): 267 (10), 236 (55), 91 (100).</p> <p>Espectro 15. RMN ¹H (CDCl₃, MHz δ en ppm): 7.73 (dd, <i>J</i> = 4.4, 3.4 Hz, 1H), 7.63 (dd, <i>J</i> = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.57 – 7.44 (m, 1H), 7.26 (m, 3H), 7.21 – 7.09 (m, 2H), 4.97 (s, 3H), 4.10 (s, 2H), 4.10 (s, 1H), 3.66 (s, 3H).</p> <p>Espectro 16. RMN ¹³C (DMSO-d₆, MHz δ en ppm): 157.75, 154.61, 142.32, 135.03, 130.07, 129.03, 119.44, 116.43, 110.49, 106.97, 55.44, 43.68, 28.20.</p>
 <p>2-amino-1-Etil-<i>N</i>-(4-metoxibencil)-1<i>H</i>-bencimidazol (12)</p> <p>PM: 281 C₁₇H₁₉N₃O</p>	<p>Espectro 17. IR (KBr) en cm⁻¹: 3454.25 (Ar-NH-R), 2850 (OCH₃), 2967 (CH₃).</p> <p>Espectro 18. EM (IE⁺) m/z (int.%): 281 (25), 121 (100).</p> <p>Espectro 19. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 7.29 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 7.13-7.07 (m, 2H), 6.90 (m, <i>J</i> = 9.0, 1.5 Hz, 4H), 6.34 (s, 1H) intercambiable con D₂O, 4.50 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 4.08-3.94 (m, 2H), 3.69 (s, 3H) δ 1.18 (td, <i>J</i> = 7.1, 2.2 Hz, 3H).</p> <p>Espectro 20. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en</p>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	ppm: 158.57, 154.96, 143.35, 143.10, 134.70, 132.81, 128.91, 120.56, 118.69, 115.42, 114.02, 107.71, 107.62, 55.47, 45.59, 36.63, 14.40.
<div style="text-align: center;">  <p><i>N</i>-[4-(Dimetilamino)encil]-2-amino-1-etil-1<i>H</i>-benzimidazol (13) PM: 294 C₁₈H₂₂N₄</p> </div>	<p>Espectro 21. IR (KBr) en cm⁻¹: 3184.31 (Ar-NH-R), 2899.99 (CH₂), 2938.77 (CH₃).</p> <p>Espectro 22. EM (IE⁺) m/z (int.%): 294 (10), 134 (100).</p> <p>Espectro 23. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 7.24-7.18 (m, 2H), 7.18-7.11 (m, 2H), 7.05 (t, <i>J</i> = 5.9 Hz, 1H) intercambio con D₂O, 6.95-6.85 (m, 2H), 6.68 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H) 4.47 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H), 4.04 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 2.84 (s, 6H), 1.24-1.10 (m, 3H).</p> <p>Espectro 24. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm): 59.54, 154.77, 147.92, 139.45, 133.37, 133.13, 125.26, 123.35, 120.10, 117.55, 112.31, 50.50, 45.55, 41.12, 19.20.</p>
<div style="text-align: center;">  <p><i>N</i>-(4-Metoxibencil)-2-amino-1-propil-1<i>H</i>-benzimidazol (14) PM: 295 C₁₈H₂₁N₃O</p> </div>	<p>Espectro 25. IR (KBr) en cm⁻¹: 3135.63 (Ar-NH-R), 2836 (-OCH₃), 2936.54 (-CH₂), 1463.92 (-CH₂).</p> <p>Espectro 26. EM (IE⁺) m/z (int.%): 295 (23) 253 (10), 121 (100).</p> <p>Espectro 27. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 7.28 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.18-7.02 (m, 3H), 6.95-6.77 (m, 4H), 4.51 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H) intercambio con D₂O, 3.94 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 1.63 (dd, <i>J</i> = 14.6, 7.3 Hz, 2H), 0.86 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H).</p> <p>Espectro 28. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm): 158.56, 155.00, 142.95, 135.23, 132.83, 128.86, 120.50, 118.62, 115.36, 114.00, 107.82, 55.46, 45.58, 42.99, 22.27, 11.43.</p>
	<p>Espectro 29. IR (KBr) en cm⁻¹: 3224 (Ar-NH-R), 2932.83 (CH₃), 736.28 (Br).</p> <p>Espectro 30. EM (IE⁺) m/z (int.%): 346 (M⁺+2, 15), 345 (M⁺+1, 80), 343 (83), 302 (100), 300 (85), 132 (87).</p> <p>Espectro 31. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en</p>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

 <p><i>N</i>-(4-Bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1<i>H</i>-benzimidazol (15) PM: 344 C₁₇H₁₈BrN₃</p>	<p>ppm): 7.54-7.48 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 3H), 7.19 (dt, $J = 7.4, 3.7$ Hz, 2H) intercambio con D₂O, 6.91 (dtd, $J = 23.9, 7.4, 1.2$ Hz, 2H), 4.77-4.62 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.51 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).</p> <p>Espectro 32. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm: 154.29, 143.39, 140.47, 133.46, 131.44, 129.82, 120.41, 120.00, 118.68, 115.91, 110.07, 45.79, 45.66, 20.90.</p>
 <p>2-amino-1-Butil-<i>N</i>-(4-clorobencil)-1<i>H</i>-benzimidazol (16) PM: 313 C₁₈H₂₀ClN₃</p>	<p>Espectro 33. IR (KBr) en cm⁻¹: 3171.64 (Ar-NH-R), 2870.72 (CH₂), 747.91 (Cl).</p> <p>Espectro 34. EM (IE⁺) m/z (int.%): 313 (23), 315 (M⁺+2, 10), 284 (23), 257 (30), 125 (100).</p> <p>Espectro 35. RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm): 7.50-7.26 (m, 4H), 7.28-7.20 (m, 1H) intercambio con D₂O, 7.20-7.08 (m, 2H), 6.98-6.78 (m, 2H), 4.58 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 4.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.71-1.51 (m, 2H), 1.40-1.21 (m, 2H), 0.89 (dd, $J = 8.4, 6.4$ Hz, 3H).</p> <p>Espectro 36. RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm: ¹³C NMR (101DMSO) δ 154.81, 142.85, 140.06, 135.19, 131.55, 129.40, 128.53, 120.56, 118.76, 115.49, 107.89, 45.47, 41.47, 31.11, 19.89, 14.16.</p>

6.2.2.5. Cristalografía de rayos X.

Además de los datos obtenidos por espectroscopia y espectrometría, del compuesto **10** se pudo obtener una imagen cristalográfica que sirvió de apoyo para corroborar la estructura del compuesto, la interpretación de los datos para la obtención de la estructura del compuesto y red del cristal fue determinada por el Dr. Marcos Flores A. en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

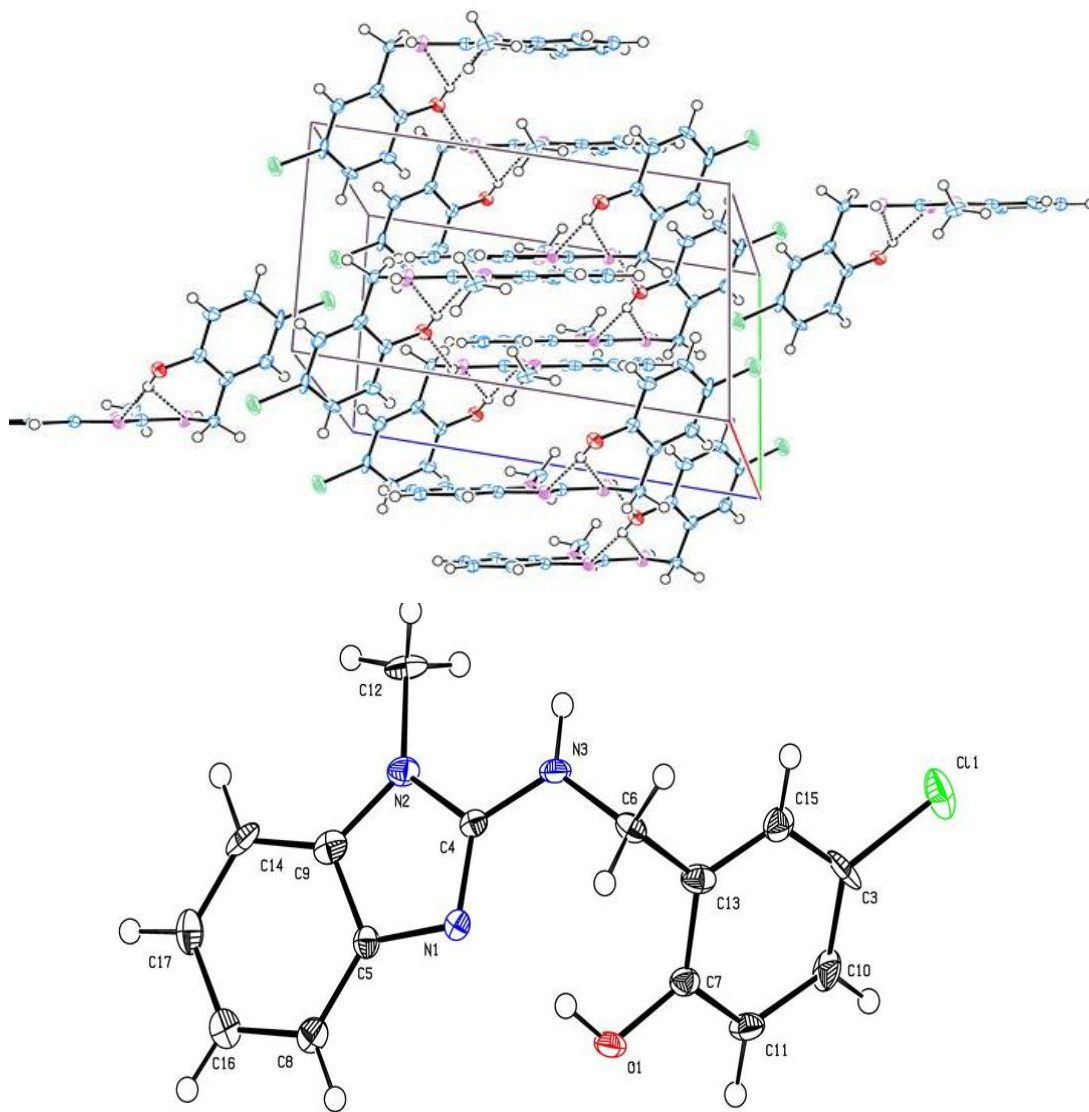


Figura 25. Red cristalina y estructura del Compuesto 10.

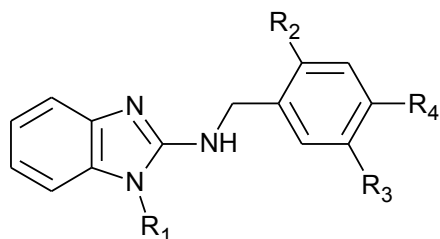
Los datos cristalográficos se encuentran en el **Apéndice 4**.

6.3. Parte biológica

6.3.1. Actividad biológica en los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*

Con la finalidad de incrementar la base de datos de compuestos en nuestro grupo de trabajo para futuros estudios, los compuestos sintetizados fueron sometidos a pruebas de actividad antiprotozoaria en los tres parásitos, los resultados de la actividad de los compuestos **8-16**, junto con sus controles positivos, se muestran en la **Tabla 18 y Gráfico 2**.

Tabla 18. Actividad antiprotozoaria (CI₅₀) de los compuestos finales sintetizados



COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	<i>Giardia intestinalis</i> CI ₅₀ (μM)	<i>Entamoeba histolytica</i> CI ₅₀ (μM)	<i>Trichomonas vaginalis</i> CI ₅₀ (μM)
8	CH ₃	H	H	Br	0.049	0.028	0.039
9	CH ₃	OH	Br	H	0.058	0.094	0.043
10	CH ₃	OH	Cl	H	0.014	0.019	0.059
11	CH ₃	OCH ₃	H	H	0.013	0.026	0.029
12	CH ₂ CH ₃	H	H	OCH ₃	0.033	0.088	0.076
13	CH ₂ CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂	0.061	0.074	0.123
14	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	H	OCH ₃	0.084	0.091	0.077
15	Isopropilo	H	H	Br	0.063	0.034	0.042
16	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	H	Cl	0.058	0.047	0.054
Metronidazol	-	-	-	-	1.228	0.350	0.216
Albendazol	-	-	-	-	0.037	56.60	1.592

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de poder visualizar los resultados de actividad antiprotozoaria obtenidos, se calculó el inverso de CI_{50} (**Gráfico 2**).

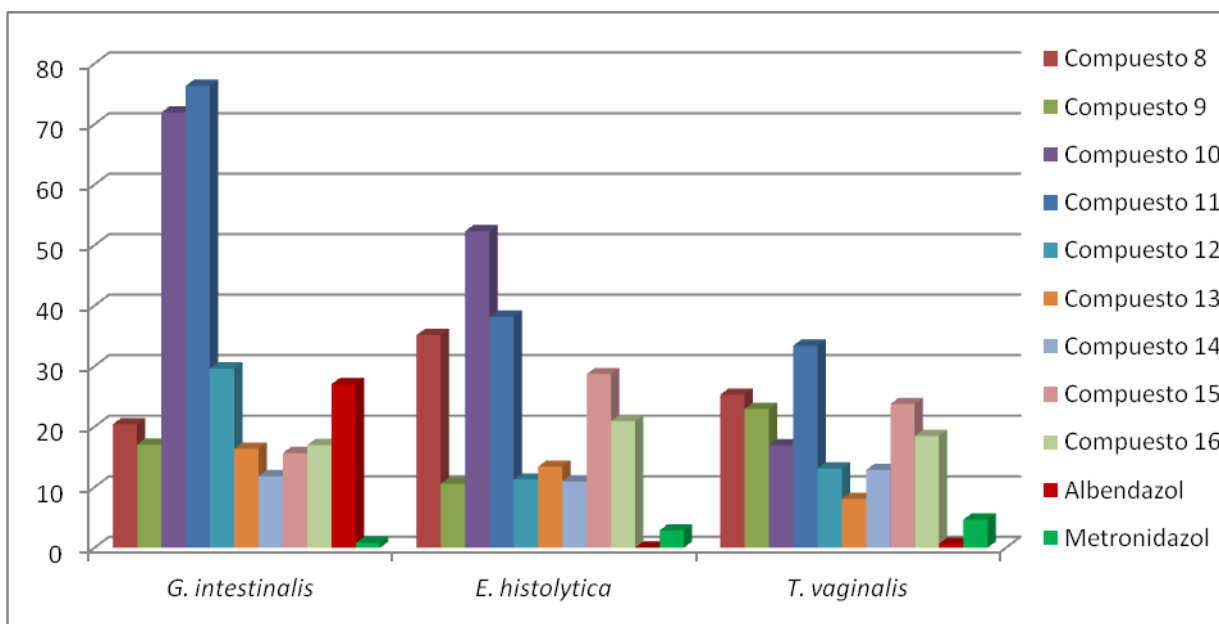


Gráfico 2. Actividad antiprotozoaria ($1/CI_{50}$) de los compuestos finales sintetizados.

Contra *G. intestinalis*, los compuestos más activos fueron el **10** y **11**, los cuales fueron 2.6 veces y 2.8 veces más potentes respectivamente que el Albendazol y comparados con el Metronidazol estos fueron 87.7 y 94.4 veces más potentes, siendo este último el fármaco de elección para este parásito.

Contra *E. histolytica*, los compuestos **10** y **11** fueron 18.4 veces y 13.46 veces más potentes respectivamente que el Metronidazol; comparados entre ellos el compuesto **10** fue 1.36 veces más efectivo, nuevamente todos los compuestos fueron más activos que el metronidazol.

Contra *T. vaginalis* todos los compuestos sintetizados presentaron mayor actividad que el Metronidazol y el Albendazol; sin embargo, los compuestos **8**, **9**, **10**, **11** y **13** resultaron ser los más potentes. En este caso el compuesto **11** resultó 2 veces más activo que el compuesto **10**, destacándose como el compuesto más activo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que todos los compuestos presentan actividad en el orden de nanomolar y entre ellos la mayor actividad se presenta en los compuestos **10** y **11**, los cuales comparten similitudes estructurales como el 1-metilbencimidazol y un grupo formador de puentes de hidrógeno en el anillo aromático bencénico

De acuerdo a estos datos podemos observar que los compuestos más activos en contra de estos parásitos resultan ser los compuestos con presencia de un metilo en la posición R_1 del bencimidazol, pues al comparar los compuestos **8** y **15** podemos notar una disminución en la actividad, por otro lado en algunos casos, al incrementar la cadena alquílica, de nuevo se presenta una disminución de la actividad, lo que se puede observar al comparar el compuesto **12** y **14**.

7. CONCLUSIONES

- La formación de iminas por calentamiento convencional resultó poco efectiva en comparación con el método de calentamiento con microondas, ya que el uso de este último disminuyó el tiempo de reacción, facilitó la purificación y al mismo tiempo llevó a mayores rendimientos.
- Se pudieron sintetizar los 9 compuestos (**8-16**) por las rutas de síntesis propuestas. Estos compuestos resultaron ser moléculas novedosas que se seleccionaron en base en un estudio de Acoplamiento Molecular.
- La dinámica molecular del modelo de arginasa de *L. mexicana* evidenció la presencia de una molécula de agua en el sitio catalítico con una estabilidad a lo largo de 5 ns.
- Los compuestos sintetizados resultaron tener actividad contra los protozoarios anaeróbicos *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, especialmente el compuesto **11**.
- Los compuestos más activos en contra de estos parásitos resultan ser los compuestos con presencia de un metilo en la posición 1 del bencimidazol. De los cuales el **10 y 11** fueron los más activos por encima de ABZ y MTZ contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*.
- Los resultados experimentales de los 5 compuestos reportados siguen una tendencia similar con los resultados teóricos, lo que demuestra el potencial de los estudios computacionales para el diseño de nuevos líderes.
- El estudio computacional-químico-biológico juega una parte importante en Química Farmacéutica para la obtención de nuevos compuestos bioactivos o posibles fármacos contra la leishmaniasis.

8. PERSPECTIVAS

- Una vez que se obtengan los resultados *in vitro* en *L. mexicana* analizar los resultados y relacionarlos con los resultados del estudio computacional.
- Para complementar estos ensayos es indispensable realizar la evaluación enzimática de la Arginasa de *L. mexicana*, con la finalidad de validar el modelo computacional.
- Es recomendable volver a realizar el acoplamiento molecular con la arginasa ya que la base de ZINC aumentó su número de ligandos de 8 millones en 2008 a 21 millones a la fecha, además de que recientemente en Protein Data Bank se reportó la estructura cristalizada de la arginasa, lo anterior con la finalidad de corroborar los resultados de acoplamiento molecular.
- Realizar ensayos *in vitro* contra el amastigote de *L. mexicana*, ya que es en esta fase donde ocurre la reproducción del parásito, la fase invasiva y lo que ocasiona los efectos de la enfermedad.
- Es necesario realizar estudios de Microscopia Electrónica de Barrido y de transmisión a los promastigotes tratados con estos compuestos. De esta forma se pueden estudiar los efectos que ocurren en el parásito a nivel estructural, ayudando a elucidar el posible mecanismo de acción.
- Ya que 5 de los compuestos estudiados por acoplamiento molecular presentaron actividad contra el parásito, es recomendable realizar estudios de proteómica para determinar si la arginasa es la responsable de la inhibición del parásito y/o encontrar otras enzimas que resulten afectadas con mayor fuerza en presencia de los compuestos.
- Los resultados de acoplamiento molecular, dinámica molecular y datos biológicos muestran que en la posición 1 se requieren grupos pequeños, como metilos, etilos o propilos para que el compuesto interaccione mejor con el sitio catalítico del mismo modo la posición 2, 4 y 5 del bencilamino presentan gran influencia en la actividad. Esto sugiere que se pueden hacer diversas

modificaciones en estas regiones con la finalidad de mejorar la afinidad de las moléculas colocando grupos formadores de puentes de hidrógeno o grupos que formen interacciones con los iones Mn^{2+} en el bencilamino, sobre todo en las posiciones 2, 4 y 5.

- Para evitar o retardar el metabolismo de los compuestos bencilimidazólicos, se pretende colocar grupos en la posición 5 y/o 6 del núcleo de bencilimidazol, como el cloro. De esta forma puede aumentar su actividad al tener mayor cantidad del compuesto no metabolizado. Ya que según los resultados computacionales, no hay interacción de esta parte del núcleo de bencilimidazol, por lo que no se afecta directamente la interacción del complejo ligando-enzima.
- Una vez obtenidos los compuestos, someterlos al estudio computacional para verificar que realmente tengan afinidad por la enzima del parásito más que sobre la del humano. Estudiar su estabilidad y energía de unión del complejo ligando-enzima, para que pueda realizarse su síntesis, evaluación biológica y citotoxicidad.

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1. Instrumentación

- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo KATRON ETS-D4 fuzzy.
- El peso de las sustancias se determinó en una balanza granataria OHAUS E4000, o bien, en una balanza analítica Sartorius A210P.
- La concentración de las soluciones se llevaron a cabo en un rotaevaporador marca Büchi modelo R-205 con vacío generado con bomba marca Büchi V-800.
- Las hidrogenaciones catalíticas se llevaron a cabo en un hidrogenador marca Parr modelo 3916EG, a 60 lb/in² y 80 °C, y 250 mL como capacidad máxima, adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney al 10% marca Aldrich.
- La determinación de los puntos de fusión (pf) se realizó en un aparato Büchi modelo B-540 utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- Los espectros de IR en pastilla de bromuro de potasio se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo FT-IR-1600. Las señales se reportan en cm⁻¹.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) se determinaron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 400 MHz, utilizando como disolvente DMSO-*d*₆. Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm). La simbología empleada es la siguiente: s = simple, sa = señal amplia, d = doblete, dd = doble de dobles, m = múltiple.

- Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) se determinaron en un equipo Varian modelo Unity Inova de 400 MHz, utilizando como disolvente DMSO_{d6} . Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).
- Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se determinaron por introducción directa de la muestra (ID), en un aparato marca JEOL modelo JMS-SX102A. La simbología utilizada es: M^+ = ión molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.

9.2. Sistemas cromatográficos

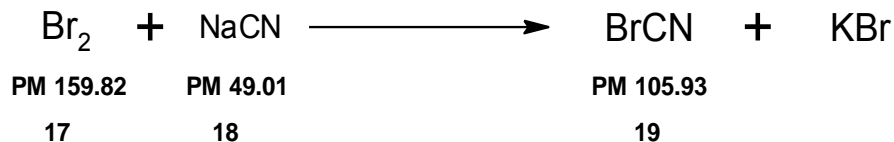
- El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas por gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV). Los sistemas utilizados fueron los siguientes:

Tabla 19. Sistemas cromatográficos.

Sistema	Componentes	Proporción
I	Hexano-Acetato de etilo	95:5
II	Hexano-Acetato de etilo	60:10
III	Hexano-Acetato de etilo	90:10
IV	CHCl_3 -MeOH	80:20
V	CHCl_3 -MeOH	85:15
VI	CHCl_3 -MeOH	95:5
VII	CHCl_3 -MeOH	98:2
VIII	Hexano-Cloroformo-Acetato de etilo	50:35:15

9.3. Procedimientos sintéticos

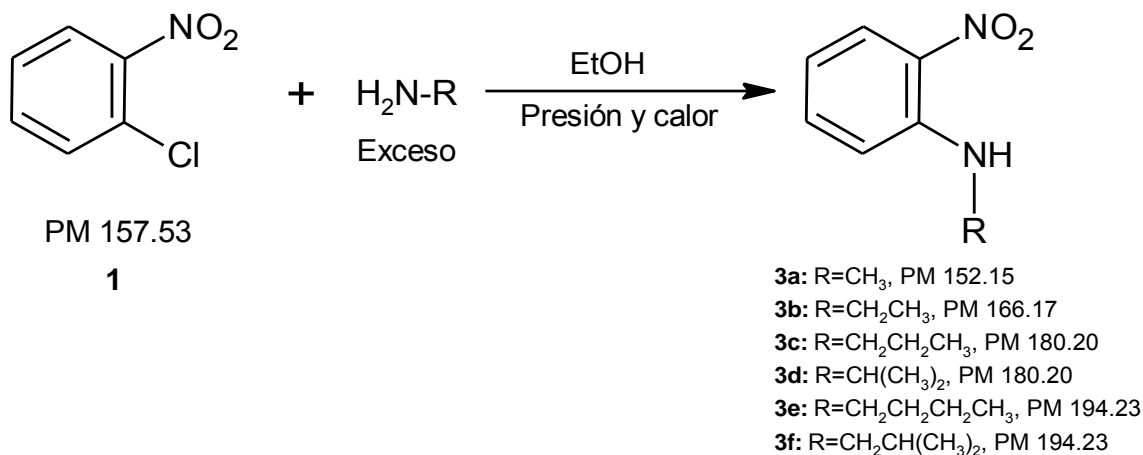
9.3.1. Bromuro de cianógeno (19)



En un matraz de bola de 1000 mL con tres bocas, adaptado con baño de hielo, agitación mecánica, termómetro y un embudo de adición, se colocaron 188.12 g de NaCN (2.88 mol) disueltos en 600 mL de agua. Poco a poco se adicionaron 147 mL (1.94 mol) de Br₂ sin que excediera la temperatura los 30°C, terminada la adición se mantuvo en agitación por 1 hora en baño de hielo. El sólido formado se colecto por filtración al vacío, y posteriormente se colocó en un matraz de 3 bocas de 1000 mL acondicionado con un tapón de hule, agitación mecánica, parrilla, un termómetro y un tubo de destilación conectado a un matraz colector de bola de 2 bocas de 500 mL, sumergido en un baño de hielo, el cual estaba conectado con una columna Vigreux. El producto se destiló a 82°C. Se obtuvieron 152.44 g (49.96%) de cristales blancos, que se almacenaron a 4°C.

9.3.2. Método general para la síntesis de los 2-amino-1-alkil-1H-benzimidazoles 5a-c

(a) Reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática



En un reactor Parr de un litro se mezcló el 2-cloronitrobenceno (**1**) con la amina primaria adecuada en etanol. La mezcla de reacción se calentó con agitación hasta el consumo de **1**, indicado por una ccf. Luego se dejó enfriar y se trató con agua y cloroformo. El producto crudo, un líquido café oscuro, se purificó por filtración de una solución clorofórmica en una columna de alúmina neutra.

9.3.2.1. *N*-Metil-2-nitroanilina (**3a**)

A partir de 20.27 g (0.1270 mol) de **1** y 34.3 g (3 eq) de clorhidrato de metilamina en 150 mL de etanol, a una temperatura 135°C durante 21 horas, se obtuvieron 18.03 g (93.37%p/p) de producto crudo, del cual se obtuvieron por recristalización con etanol unos cristales anaranjados (77.24%) (*Rf* 0.44, Sistema II) y p. eb. 218-221.2°C.

9.3.2.2. *N*-Etil-2-nitroanilina (**3b**)

Partiendo de 20 g (0.1269 mol) de **1** y 31.04 g (3 eq) de clorhidrato de etilamina en 150 mL de etanol, calentados a 135°C durante 18.5 h, llevó 19.25 g (91.31%) de un sólido anaranjado puro, una sola mancha en ccf (*Rf* 0.44, Sistema III) y p. eb. 268-275°C.

9.3.2.3. *N*-Propil-2-nitroanilina (**3c**)

Partiendo de 15 g (0.0952 mol) de **1** y 36.40 g de clorhidrato de propilamina (3 eq) en 150 mL de etanol, calentados a 135°C durante 18 horas, llevó 16.29 g (95%) de un sólido anaranjado puro, una sola mancha en ccf (*Rf* 0.59, Sistema I) y p. eb. 268.6-271.2°C.

9.3.2.4. *N*-Isopropil-2-nitroanilina (**3d**)

Partiendo de 20 g (0.1269 mol) de **1** y 48.51 g de clorhidrato de isopropilamina (4 eq) en 150 mL de etanol, calentados a 135°C durante 18 horas, llevó a 20.58 g (90.02 %) de un sólido anaranjado puro, una sola mancha en ccf (*Rf* 0.43, Sistema

l) y p. eb. 270-280.3°C.

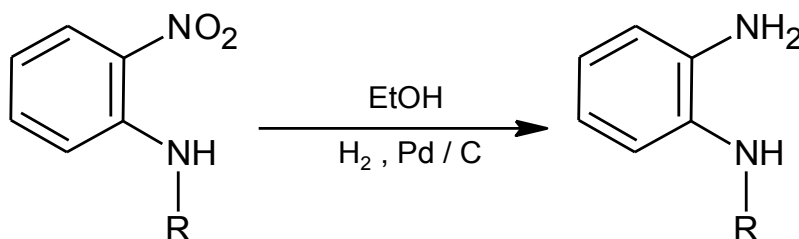
9.3.2.5. *N*-Butil-2-nitroanilina (3e)

Partiendo de 20 g (0.127 mol) de **1** y 37.15 g de clorhidrato de butilamina (4 eq) en 150 mL de etanol, calentados a 120°C durante 18 horas, llevó a 21.58 g (87.58%) de un sólido anaranjado puro, una sola mancha en ccf (*Rf* 0.68, Sistema I) y p. eb. 261.5-269.5°C.

9.3.2.6. *N*-Isobutil-2-nitroanilina (3f)

Partiendo de 20 g (0.127 mol) de **1** y 37.10 g de clorhidrato de butilamina (4 eq) en 150 mL de etanol, calentados a 130°C durante 18 horas, llevó a 19.45 g (78.95%) de un sólido anaranjado puro, una sola mancha en ccf (*Rf* 0.4, Sistema I) y p. eb. 268-274°C.

(b) Reacción de Reducción por Hidrogenación Catalítica.



4a: R=CH₃, PM 122.15

4b: R=CH₂CH₃, PM 136.17

4c: R=CH₂CH₂CH₃, PM 150.20

4d: R=CH(CH₃)₂, PM 150.20

4e: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, PM 164.23

4f: R=CH₂CH(CH₃)₂, PM 164.23

En un frasco de hidrogenación Parr de 500 mL se suspendió la nitro-alquilamina correspondiente en etanol con catalizador Pd/C al 5%. El frasco se acopló al sistema de hidrogenación, se realizó una carga con hidrógeno hasta 30 lb/in² de presión y se succionó con vacío, esta operación se realizó 3 veces. Finalmente, el frasco se llenó con hidrógeno hasta 60 lb/in² y se agitó a temperatura ambiente hasta que no se consumió más hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró usando

celita, el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida. El producto crudo se usó como tal en la reacción siguiente.

9.3.2.7. *N*-Metil-1,2-bencenodiamina (4a)

Partiendo de 18.05 g (0.118 mol) de **3a** y 0.9 g de catalizador Pd/C en 180 mL de etanol se consumieron 500 lb/in² de hidrógeno en 1:15 H. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.24 Sistema II).

9.3.2.8. *N*-Etil-1,2-bencenodiamina (4b)

Partiendo de 5 g (0.030 mol) de **3b** y 0.25 g de catalizador Pd/C en 50 mL de etanol se consumieron 96 lb/in² de hidrógeno en 15 min. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.26 Sistema II).

9.3.2.9. *N*-Propil-1,2-bencenodiamina (4c)

Partiendo de 10 g (0.055 mol) de **3c** y 0.5 g de catalizador Pd/C en 100 mL de etanol se consumieron 250 lb/in² de hidrógeno en 1 h. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.4 Sistema II).

9.3.2.10. *N*-Isopropil-1,2-bencenodiamina (4d)

Partiendo de 18 g (0.099 mol) de **3d** y 0.9 g de catalizador Pd/C en 100 mL de etanol se consumieron 480 lb/in² de hidrógeno en 1 h. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.36 Sistema II).

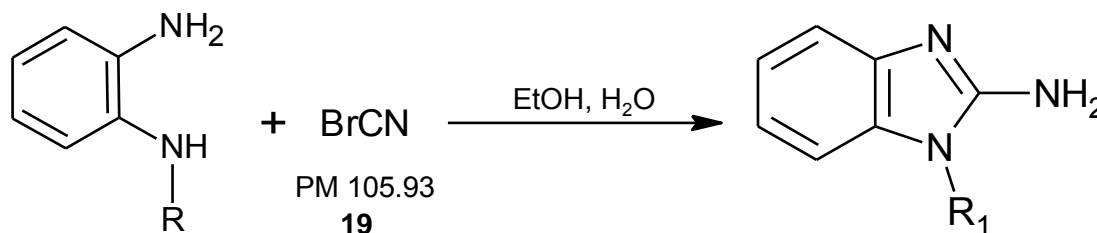
9.3.2.11. *N*-Butil-1,2-bencenodiamina (4e)

Partiendo de 20 g (0.102 mol) de **3e** y 1 g de catalizador Pd/C en 100 mL de etanol se consumieron 189 lb/in² de hidrógeno en 2 h. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.38 Sistema I).

9.3.2.12. *N*-Isobutil-1,2-bencenodiamina (4f)

Partiendo de 19.45 g (0.100 mol) de **3f** y 0.97 g de catalizador Pd/C en 100 mL de etanol se consumieron 270 lb/in² de hidrógeno en 1 h 40 min. Se obtuvo un sólido amorfo, una sola mancha por ccf (*R_f* de 0.26 Sistema I).

(c) Reacción de ciclocondensación



4a: R=CH₃, PM 122.15

4b: R=CH₂CH₃, PM 136.17

4c: R=CH₂CH₂CH₃, PM 150.20

4d: R=CH(CH₃)₂, PM 150.20

4e: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, PM 164.23

4f: R=CH₂CH(CH₃)₂, PM 164.23

5a: R=CH₃, PM 147.15

5b: R=CH₂CH₃, PM 161.17

5c: R=CH₂CH₂CH₃, PM 175.20

5d: R=CH(CH₃)₂, PM 175.20

5e: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, PM 189.23

5f: R=CH₂CH(CH₃)₂, PM 188.23

En un matraz de bola con dos bocas, adaptado con agitador magnético, termómetro y una columna Vigreux, se mezcló la diamina correspondiente en una mezcla de etanol y agua, enseguida se agregó **19**, cuidando que la temperatura no sobrepasara los 70°C. Terminada la adición se dejó en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó carbón activado y se dejó en agitación. La mezcla de reacción se filtró con succión usando celita. Al filtrado se le agregó hidróxido de amonio hasta pH 11. El producto obtenido se sometió a purificación.

9.3.2.13. 2-amino-1-Metil-1*H*-bencimidazol (5a)

Partiendo de 18.03 (0.147 mol) de **4a** en 20 mL de etanol, 80 mL de agua, y 18.64 g (0.176 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recrystalizó de agua para dar 17.33 g (79.79%) de un polvo blanco, (*R_f* 0.4, Sistema IV) con un *mp* de 226.1-227.6°C.

9.3.2.14. 2-amino-1-Etil-1*H*-bencimidazol (5b)

Partiendo de 5 g (0.036 mol) de **4b** en 20 mL de etanol, 80 mL de agua y 9.34 g (0.440 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recristalizó de agua para dar 2.37 g (40.12%) de un polvo blanco, (*Rf* 0.34, Sistema IV) con un *pf* de 154-155°C.

9.3.2.15. 2-amino-1-Propil-1*H*-bencimidazol (5c)

Partiendo de 8.5 (0.056 mol) de **4c** en 30 mL de etanol, 70 mL de agua y 7.19 g (0.678 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recristalizó de agua para dar 3.96 g (40%) de un polvo blanco, (*Rf* 0.38, Sistema IV) con un *pf* de 134-135°C.

9.3.2.16. 2-amino-1-Isopropil-1*H*-bencimidazol (5d)

Partiendo de 15 (0.099 mol) de **4d** en 30 mL de etanol, 70 mL de agua y 12.69 g (0.119 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recristalizó de agua para dar 6.52 g (37.71%) de un polvo blanco, (*Rf* 0.47, Sistema IV) con un *pf* de 198-198.9°C.

9.3.2.17. 2-amino-1-Butil-1*H*-bencimidazol (5e)

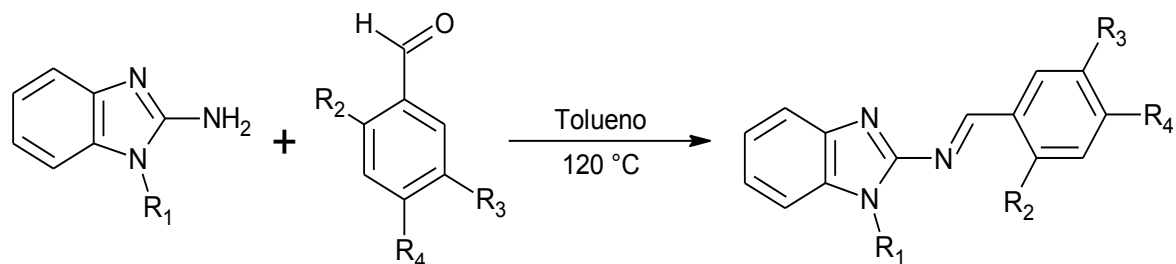
Partiendo de 19.72 (0.120 mol) de **4e** en 30 mL de etanol, 70 mL de agua y 15.25 g (0.143 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recristalizó de agua para dar 5.58 g (24.59%) de un polvo blanco (*Rf* 0.5, Sistema IV) con un *pf* de 126.8-127.4°C.

9.3.2.18. 2-amino-1-Isobutil-1*H*-bencimidazol (5f)

Partiendo de 19.45 (0.118 mol) de **4f** en 20 mL de etanol, 80 mL de agua y 15.05 g (0.142 mol, 1.2 eq) de **19**, se obtuvo un sólido blanco el cual se recristalizó de agua para dar 4.63 g (20.66%) de un polvo blanco, (*Rf* 0.63, Sistema V) con un *pf* de 155.8-156.8°C.

9.3.3. Método general para la síntesis de las iminas intermediarias

(a) Reacciones con calentamiento convencional



5a: R=CH₃, PM 147.15

5b: R=CH₂CH₃, PM 161.17

5c: R=CH₂CH₂CH₃, PM 175.20

5d: R=CH(CH₃)₂, PM 175.20

5e: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, PM 189.23

5f: R=CH₂CH(CH₃)₂, PM 188.23

7a: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 313.02

7b: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Br, R₄=H PM 329.19

7c: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Cl, R₄=H PM 284.74

7d: R₁=CH₃, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=H PM 264.13

7e: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 278.34

7f: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=N(CH₃)₂ PM 292.37

7g: R=CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 292.15

7h: R=CH(CH₃)₂, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 341.23

7i: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Cl PM 310.80

En un matraz de 200 mL acondicionado con una trampa Dean Stark, condensador en posición de reflujo, atmósfera de nitrógeno y agitación magnética se colocó el bencimidazol apropiado en tolueno y se agregó el aldehído adecuado en atmósfera de nitrógeno. Se calentó a 120°C destilando tolueno con agua y rellenando con tolueno anhidro. El crudo de la reacción se concentró a sequedad y se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.1. (*E*)-1-(4-Bromofenil)-*N*-(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metanimina (**7a**)

Partiendo de 3.0 g (0.0204 mol) de **5a** y 2.167g (0.0117 mol, 1.74 eq) de 4-bromobenzaldehído se calentó a 120°C por 2 días. El producto de la reacción (*Rf* 0.72 Sistema VII) se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.2. **(E)-1-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-N-(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)metanimina (7b)**

Partiendo de 0.5 g (0.0034 mol) de **5a** y 0.979 g (0.0049 mol, 1.43 eq) de 5-bromo-2-hidroxibenzaldehído se calentó a 120°C por 2 días. El producto de la reacción (*R_f* 0.46, Sistema VIII) se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.3. **(E)-2-(4-Cloro)-N-(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)metanimina (7c)**

Partiendo de 1 g (0.0068 mol, 1.4 eq) de **5a** y 0.762 g (0.0049 mol) de 5-cloro-2-hidroxibenzaldehído se calentó a 120°C por 2 días. El producto de la reacción (*R_f* 0.55, Sistema VII) se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.4. **(E)-1-(2-Metoxifenil)-N-(1-metil-1H-bencimidazol-2-il)metanimina (7d)**

Partiendo de 1 g (0.068 mol) de **5a** y 1.10 g (0.0081 mol, 1.19 eq) de 2-metoxibenzaldehído se calentó a 120°C por 1 semana. Debido a que no se consumía toda la materia prima se pasó por una columna de gel de sílice usando Cloroformo-Metanol 98:2 como fase móvil, la cual se concentró a sequedad. El análisis por ccf mostró la presencia del bencimidazol, el aldehído y la imina correspondiente (*R_f* 0.37 Sistema V). El producto crudo se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.5. **(E)-N-(1-Etil-1H-bencimidazol-2-il)-1-(4-metoxifenil)metanimina (7e)**

Partiendo de 2 g (0.0124 mol) de **5b** y 1.68 g (0.0123 mol) de 4-metoxibenzaldehído se calentó a 120°C por 1 semana. Debido a que no se consumía toda la materia prima se pasó por una columna de gel de sílice usando Cloroformo-Metanol 98:2 como fase móvil, la cual se concentró a sequedad. El análisis por ccf mostro la presencia de bencimidazol, el aldehído y la imina correspondiente (*R_f* 0.37 Sistema V), el producto se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.6. (E)-1-(4-Metoxifenil)-N-(1-propil-1H-bencimidazol-2-il)metanimina (7g)

Partiendo de 2.5 g (0.0142 mol) de **5c** y 1.93 g (1.2 eq, 0.0142 mol) de 4-metoxibenzaldehído se calentó a 120°C por 1 semana. Debido a que no se consumía toda la materia prima se pasó por una columna de gel de sílice usando Cloroformo-Metanol 98:2 como fase móvil, la cual se concentró a sequedad. El análisis por ccf mostro la presencia de bencimidazol, el aldehído y la imina correspondiente (R_f de 0.75 Sistema V), el producto crudo se sometió directamente a la siguiente reacción.

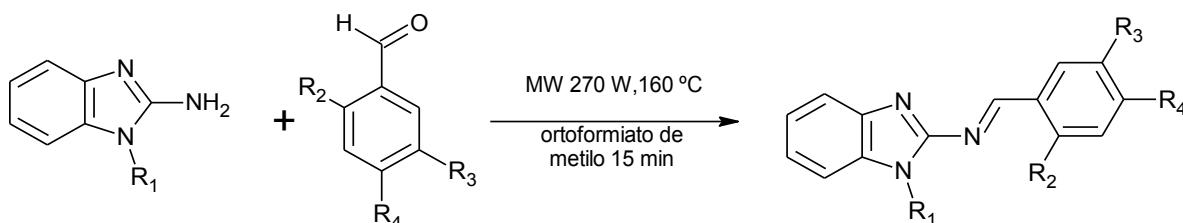
9.3.3.7. (E)-1-(4-Bromofenil)-N-(1-isopropil-1H-bencimidazol-2-il)metanimina (7h)

Partiendo de 2.11 g (0.0120 mol) de **5d** y 2.22 g (0.0120 mol) de 4-bromobenzaldehído se calentó a 120°C por 2 días. Debido a que no se consumía toda la materia prima se concentró a sequedad. El análisis por ccf mostró presencia del bencimidazol, el aldehído y la imina correspondiente (R_f de 0.6 Sistema VI), el crudo de la reacción se sometió directamente a la siguiente reacción.

9.3.3.8. (E)-N-(1-Butil-1H-bencimidazol-2-il)-1-(4-clorofenil)metanimina (7i)

Partiendo de 1.5 g (0.0079 mol) de **5e** y 1.11 g (0.0079 mol) de 4-clorobenzaldehído se calentó a 120°C por 2 días. Destilando. Debido a que no se consumía toda la materia prima se concentró a sequedad. El análisis por ccf mostró presencia del bencimidazol, el aldehído y la imina correspondiente (R_f de 0.84 Sistema VI), el crudo de la reacción se sometió directamente a la siguiente reacción.

(b) Reacciones con calentamiento de microondas



5a: $R=CH_3$, PM 147.15

5b: $R=CH_2CH_3$, PM 161.17

5c: $R=CH_2CH_2CH_3$, PM 175.20

5d: $R=CH(CH_3)_2$, PM 175.20

5e: $R=CH_2CH_2CH_2CH_3$, PM 189.23

5f: $R=CH_2CH(CH_3)_2$, PM 188.23

7a: $R_1=CH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Br$ PM 313.02

7b: $R_1=CH_3$, $R_2=OH$, $R_3=Br$, $R_4=H$ PM 329.19

7c: $R_1=CH_3$, $R_2=OH$, $R_3=Cl$, $R_4=H$ PM 284.74

7d: $R_1=CH_3$, $R_2=OCH_3$, $R_3=H$, $R_4=H$ PM 264.13

7e: $R_1=CH_2CH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$ PM 278.34

7f: $R_1=CH_2CH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=N(CH_3)_2$ PM 292.37

7g: $R=CH_2CH_2CH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$ PM 292.15

7h: $R=CH_2(CH_3)_2$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Br$ PM 341.23

7i: $R=CH_2CH_2CH_2CH_3$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Cl$ PM 310.80

Se colocaron el bencimidazol y el aldehído en un vial adecuado con 15 mL de DMF y 3 ó 4 eq de ortoformiato de metilo. El vial se colocó dentro de un reactor de microondas marca Anton Parr Synthos 3000 con rotor MF100-T4 y se calentó bajo condiciones controladas. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró a presión reducida obteniéndose el producto crudo de la reacción. El análisis por ccf mostró el consumo total de la materia prima bencimidazólica y la presencia del aldehído, la mezcla se sometió directamente a la reacción siguiente de reducción.

9.3.3.9. (*E*)-1-(4-Bromofenil)-*N*-(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)metanimina (**7a**)

Partiendo de 1 g (0.0068 mol) de **5a** y 1.50 g (0.0081 mol, 1.19 eq) de 4-bromobenzaldehído con 3 eq. de ortoformiato de metilo se acondicionó la reacción a una temperatura I.R= 160°C P= 450 Watts, con 3 min de rampa, 15 min de reacción y 15 min de enfriamiento. Se obtuvo un polvo naranja con R_f 0.72, Sistema VII.

9.3.3.10. (*E*)-1-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-*N*-(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il) metanimina (7b)

Partiendo de 1 g (0.0068 mol) de **5a** y 1.245 g (0.0062 mol) de 5-bromo-2-hidroxibenzaldehído con 4 eq de ortoformiato de metilo se acondicionó la reacción a una temperatura I.R= 160°C P= 600 Watts, con 3 min de rampa, 15 min de reacción P= 300 Watts y 15 min de enfriamiento. Se obtuvo un polvo naranja con Rf 0.46, Sistema VIII.

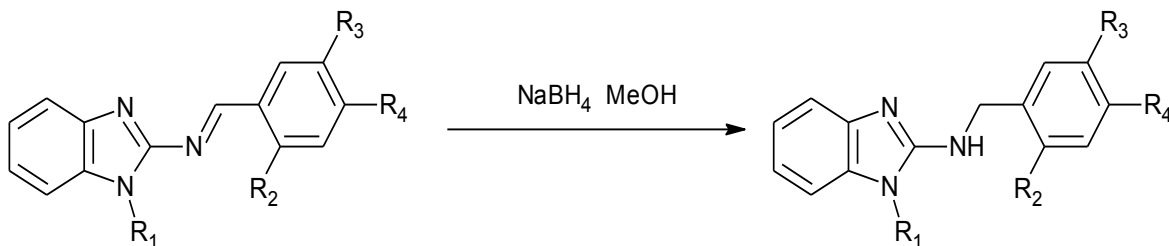
9.3.3.11. (*E*)-1-(2-Metoxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il) metanimina (7d)

Partiendo de 1.5 g (0.0102 mol) de **5a** y 1.66 g (0.0122 mol, 1.196 eq.) de 2-metoxibenzaldehído con 3 eq de ortoformiato de metilo se acondicionó la reacción a una temperatura I.R= 210°C P= 600 Watts, con 3 min de rampa, 30 min de reacción y 15 min de enfriamiento. Se obtuvo un polvo naranja con Rf 0.6, Sistema VII.

9.3.3.12. (*E*)-4-(*N,N*-dimetilanilina)-(1-Etil-1*H*-bencimidazol-2-il)metanimina (7f)

Partiendo de 0.5 g (0.0031 mol) de **5b** y 0.58 g (0.0036 mol, 1.15 eq.) de 4-isopropilaminobenzaldehído con 3 eq de ortoformiato de metilo se acondicionó la reacción a una temperatura I.R= 210°C P= 600 Watts, con 5 min de rampa, 30 min de reacción y 15 min de enfriamiento. Se obtuvo un polvo naranja con Rf 0.69 Sistema VI.

9.3.4. Reducción de las iminas. Compuestos finales.



7a: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 313.02
7b: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Br, R₄=H PM 329.19
7c: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Cl, R₄=H PM 284.74
7d: R₁=CH₃, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=H PM 264.13
7e: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 278.34
7f: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=N(CH₃)₂ PM 292.37
7g: R=CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 292.15
7h: R=CH₂(CH₃)₂, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 341.23
7i: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Cl PM 310.80

8: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 316.02
9: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Br, R₄=H PM 332.19
10: R₁=CH₃, R₂=OH, R₃=Cl, R₄=H PM 287.74
11: R₁=CH₃, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=H PM 267.13
12: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 281.34
13: R₁=CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=N(CH₃)₂ PM 295.37
14: R=CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OCH₃ PM 295.15
15: R=CH₂(CH₃)₂, R₂=H, R₃=H, R₄=Br PM 344.23
16: R=CH₂CH₂CH₂CH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=Cl PM 313.80

En un matraz de bola de 200 mL acondicionado con agitación magnética se colocó la imina en metanol a 0 °C y se agregó el NaBH₄ bajo atmosfera de nitrógeno. Se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que el análisis por ccf mostrara el consumo total de la materia prima. Se concentró a sequedad y el sólido anaranjado amorfo se sometió a purificación.

9.3.4.1. *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol. (8)

Se partió de 2.4 g (0.0077 mol) de **7a** y 0.304 g (0.0080 mol, 2.1 eq.) de NaBH₄. Terminada la reacción en una h se concentró el disolvente y se recrystalizó de metanol. Se obtuvieron 1.48 g (61.66%) de cristales blancos, (*R_f* 0.66, Sistema VI) y un pf de 189.6-190.9°C.

9.3.4.2. *N*-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (9)

Se partió de 0.5 g (0.0015 mol) de **7b** y 0.149 g (0.0039 mol, 5.25 eq.) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 1 h temperatura ambiente, se concentró el disolvente y el producto se recrystalizó de metanol. Se obtuvieron 0.330 g (65.60%) de cristales blancos, (*R_f* 0.65, Sistema VI) y un pf de 211.1-211.9°C.

9.3.4.3. *N*-(5-Cloro-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (10)

Se partió de 1.0 g (0.0039 mol) de **7c** y 0.381 g (0.0101 mol, 5.16 eq) de NaBH₄. Terminada la reacción en una 1 hora a 0°C y 1 h a temperatura ambiente se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron 0.750 g (75%) de cristales blancos, (*R_f* 0.53, Sistema VII) y un *pf* de 209-209.7°C.

9.3.4.4. *N*-(2-metoxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (11)

Se partió de 0.5 g (0.0019 mol) de **7d** y 0.0832 g (0.0022 mol, 2.32 eq) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 2 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en etanol. Se obtuvieron 0.336 g (66.53%) de cristales blancos, (*R_f* 0.46, Sistema VII) y un *pf* de 165.4 -166°C.

9.3.4.5. 2-amino-1-etil-*N*-(4-metoxibencil)-1*H*-bencimidazol (12)

Se partió de 1.30 g (0.0047 mol) de **7e** y 0.284 g (0.0150 mol, 3.21 eq) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 1 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron 0.530 g (42.74%) de cristales blancos, (*R_f* 0.56, Sistema V) y un *pf* de 149-150.2°C.

9.3.4.6 *N*-[4-(dimetilamino)bencil]-2-amino-1-etil-1*H*-bencimidazol (13)

Se partió de 0.5 g (0.00171 mol) de **7f** y 0.111 g (0.0029 mol, 3.43 eq.) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 1 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron 0.242 g (48.4%) de cristales blancos, (*R_f* 0.23, Sistema VII) y un *pf* de 188.8-191°C.

9.3.4.7. *N*-(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1*H*-bencimidazol (14)

Se partió de 1.11 g (0.0038 mol) de **7g** y 0.244 g (0.0064 mol, 3.39 eq) de NaBH₄. Terminada la reacción se dejó en agitación por 1 h a 0°C y 1 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron

0.169 g (15.31%) de cristales blancos, (R_f 0.54, Sistema V) y un pf de 179-180.7°C.

9.3.4.8. *N*-(4-bromobencil) 2-amino-1-(isopropil)-1*H*-bencimidazol (15)

Se partió de 1.3 g (0.0038 mol) de **7h** y 0.4958 g (0.0131 mol, 6.88 eq.) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 1 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron 0.56 g (43.17%) de cristales blancos, (R_f 0.46, Sistema VII) y un pf de 197-197.6°C.

9.3.4.9. 2-amino-1-butil-*N*-(4-clorobencil)-1*H*-bencimidazol (16)

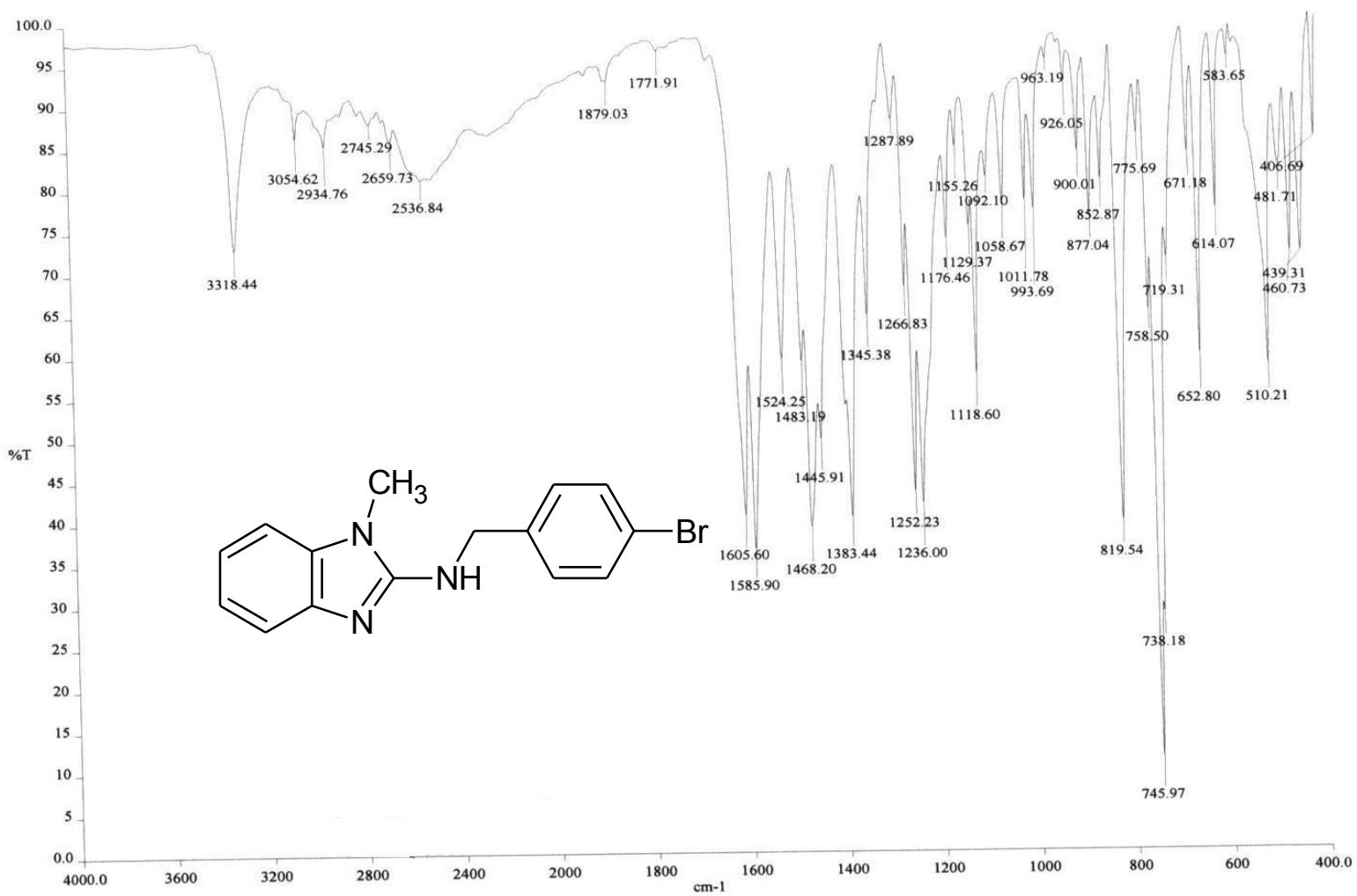
Se partió de 1.26 g (0.0041 mol) de **7i** y 0.261 g (0.0069 mol, 3.4 eq) de NaBH₄. Terminada la reacción en 1 h a 0°C y 1 h a temperatura ambiente, se concentró el disolvente y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron 0.889 g (77.06%) de cristales blancos, (R_f 0.61, Sistema V) y un pf de 165.2-166.4°C.

10. REFERENCIAS

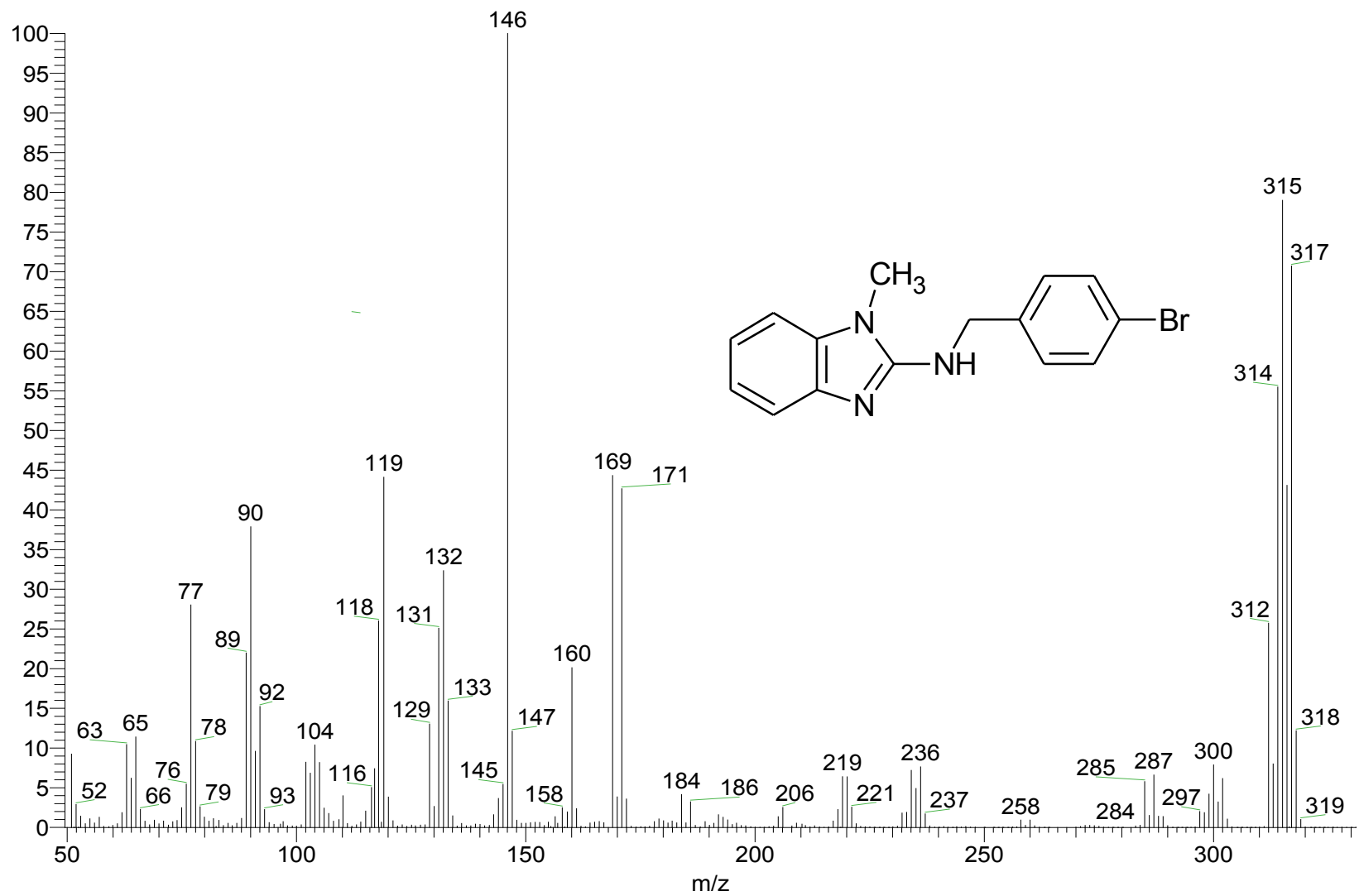
- 1- B.Fouce Rafael, Calvo A. Estefanía, Álvarez V. Raquel, F. Prada Christopher, Pérez P. Yolanda, Reguera Rosa, Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis, *Molecular & Biochemical Parasitology* **2012**; 181; 85–93
- 2- Vargas MF, Torres G, Arenas R, Quintanilla CMR. Leishmaniasis en México. *Med. Cutan Iber. Lat. Am* **2011**; 39 (4); 163-183.
- 3- Cuervo Patricia, B. Domont Gilberto, B. De Jesús José. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of proteomics*, **2010**; 73; 845-867.
- 4- Pérez Molina José Antonio, Díaz Menéndez Marta, Pérez A. Ana, Ferrere Federico, Monje Begona, Norman Francesca y López Vélez Rogelio, *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos Unidad de Medicina Tropical, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España*
- 5- (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). (1-04-2013)
- 6- (<http://apps.who.int/tdr/>). (1-04-2013)
- 7- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2004**; 27: 305–318.
- 8- HW Murray, JD Berman, CR Davies, NG Saravia. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **2005**; 366; 1561–1577.
- 9- F Chappuis, S Sundar, A Hailu, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **2007**; 5: 873–882.
- 10- Control of the leishmaniasis WHO Technical Report Series 949 Report Of a meeting of the WHO Expert Committee On the Control Of Leishmaniasis, Geneva, March **2010**; 22–26

- 11-Becerril Marco Antonio. Parasitología Médica, McGraw-Hill Interamericana, 2^{da} Edición **2008**.
- 12-<http://www.emagister.com/curso-leishmaniasis-cutanea/leishmaniasistratamiento-1-04-2013>
- 13-Mendez-Cuesta Carlos A., Mendez Lucio Oscar, Castillo Rafael, Homology modeling, docking and molecular dynamics of the Leishmania mexicana arginase: A description of the catalytic site useful for drug design. Journal of Molecular Graphics and Modelling **2012**; 38; 50–59
- 14-E. Ash. David *Arginine Metabolism: Enzymology, Nutrition, and Clinical Significance*. *The Journal of Nutrition*, **2004**; 134; 2760-2764
- 15-CM Vendrame, MD Carvalho, FJ Rios, et al. Effect of insulin-like growth factor-I on Leishmania amazonensis promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. Scand J Immunol **2007**; 66: 287–296.
- 16-Mayence Annie, Pietka Aurélie, S. Collins Margaret, T. Cushion Melanie, L. Tekwani Babu, L. Huang Tien, Vanden Eynde Jean Jacques, Novel bisbenzimidazoles with antileishmanial effectiveness. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2008**; 18; 2658–2661
- 17-Hernández Luis Francisco, Hernández Campos Alicia, Castillo Rafael, Navarrete Vázquez Gabriel, Soria Arteché Olivia, Hernández Hernández Manuel, Yépez-Mulia Lilián, Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. European Journal of Medicinal Chemistry, **2010**; 45; 3135-3141
- 18-G Omprakash. Bhusnure, B Sainath. Zangade, Shivaji B. Chavan, Yeshwant B. Synthesis of novel Schiff bases and their antimicrobial screenings Vibhute *J. Chem. Pharm. Res.*, **2010**, 2(6):234-243
- 19- Masoumeh Tabatabaee, Majid M. Heravi, Mahboubeh Sharif and Fatemeh Esfandiyari. Fast and Efficient Method for Imination of *N*-Aminorhodanine

- Using Inorganic Solid Support under Microwave Irradiation and Classical Heating, *E-Journal of Chemistry* **2011**, 8(2), 535-540
- 20- Inesta, V; Gomez-Nieto, L.C. Corraliza, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* **2001**. 193, 7777-7784.
- 21- Nagagarajan Shanthi, Xue Fengtian, and D. MacKerell, Jr. Alexander. Impact of Substrate Protonation and Tautomerization States on Interactions with the Active Site of Arginase I, *Journal of Chemical Information and Modeling.* **2013**; 53(2): 452-460.
- 22-Omprakash G. Bhusnure, Sainath B. Zangade, Shivaji B. Chavan, Yeshwant B. Vibhute, Comparative study of conventional and microwave assisted synthesis of novel Schiff bases and their antimicrobial screenings *J. Chem. Pharm. Res.*, **2010**, 2(6):234-243.
- 23- Aguayo Ortiz Rodrigo, Tesis de Licenciatura. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. **2012**.
- 24-Kichen, D.B.; et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**; 3: 935 – 949.
- 25-Pouplana, R; et al. Química computacional en diseño de fármacos, *Lifescienceslab*; **2009**; 28-31.
- 26-Betancourt Conde María Irene. Tesis de Licenciatura. Clonación, sobreexpresión del gen *Imarg* y construcción del modelo tridimensional de la arginasa de *Leishmania mexicana*” Universidad Juárez del Estado de Durango, **2012**



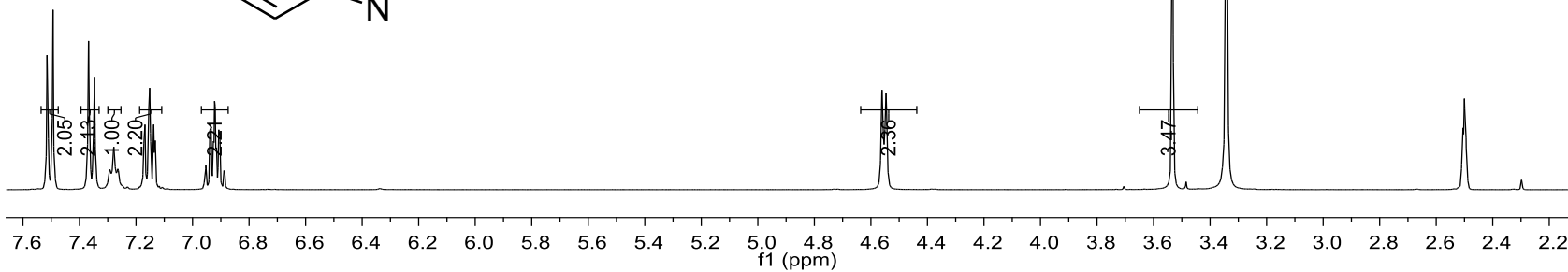
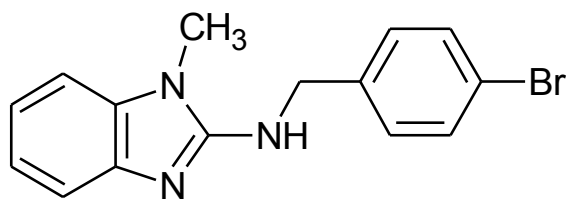
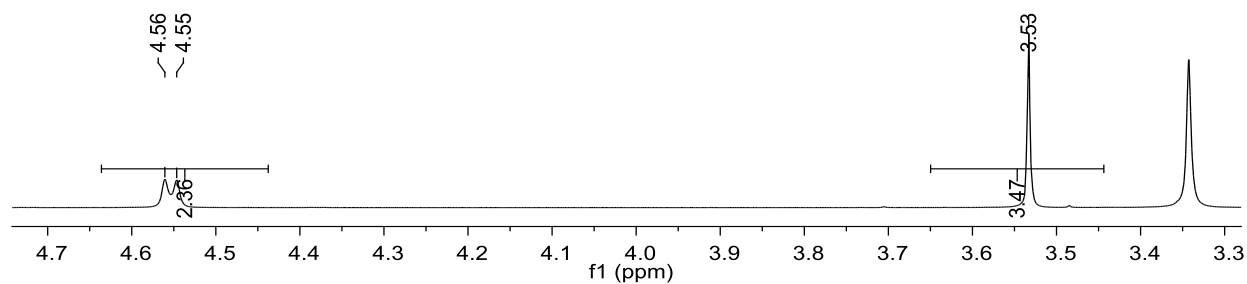
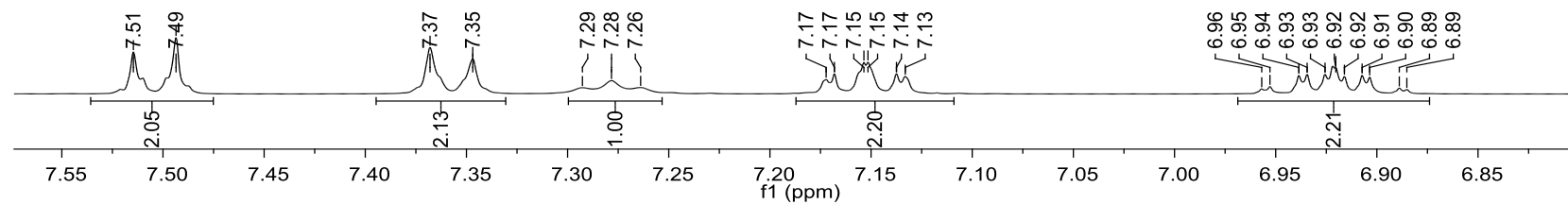
Espectro 1. IR N-(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1H-bencimidazol. (8)



08

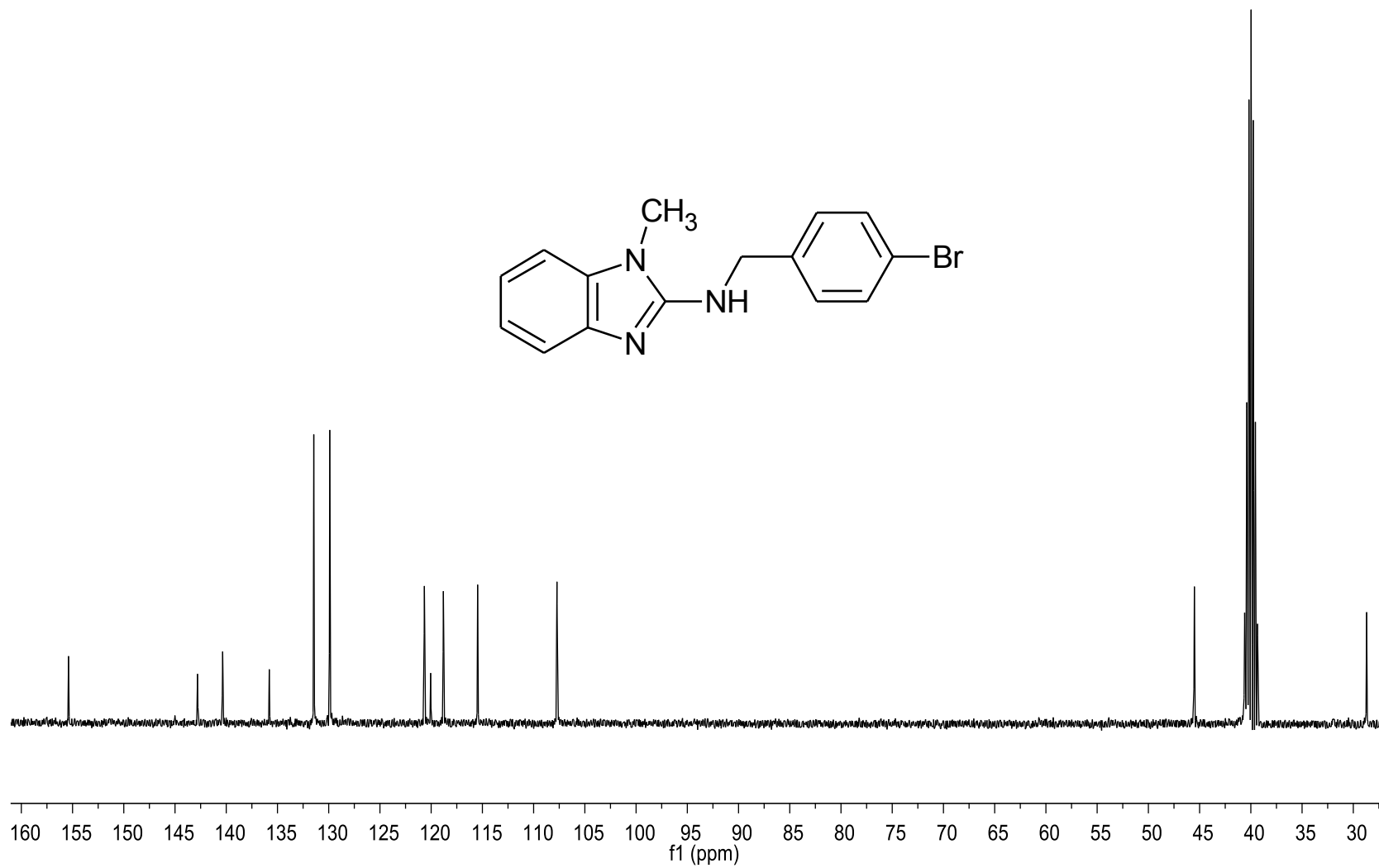
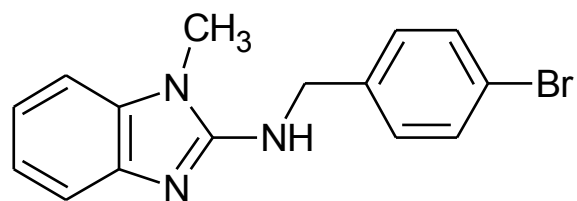
Espectro 2. EM (IE) *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol. (8).

ESPECTROS



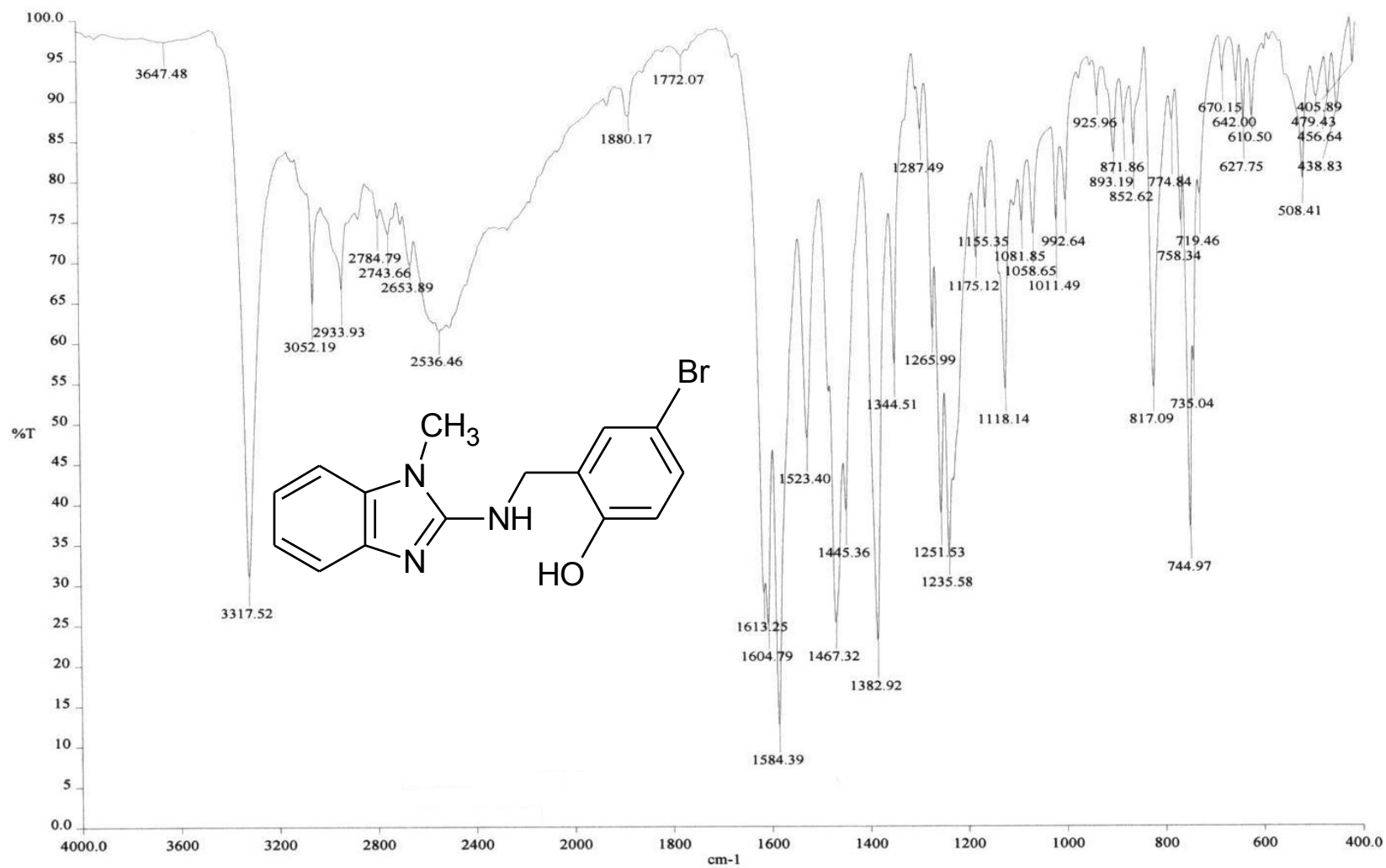
81

Espectro 3. RMN ¹H *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol. (8).

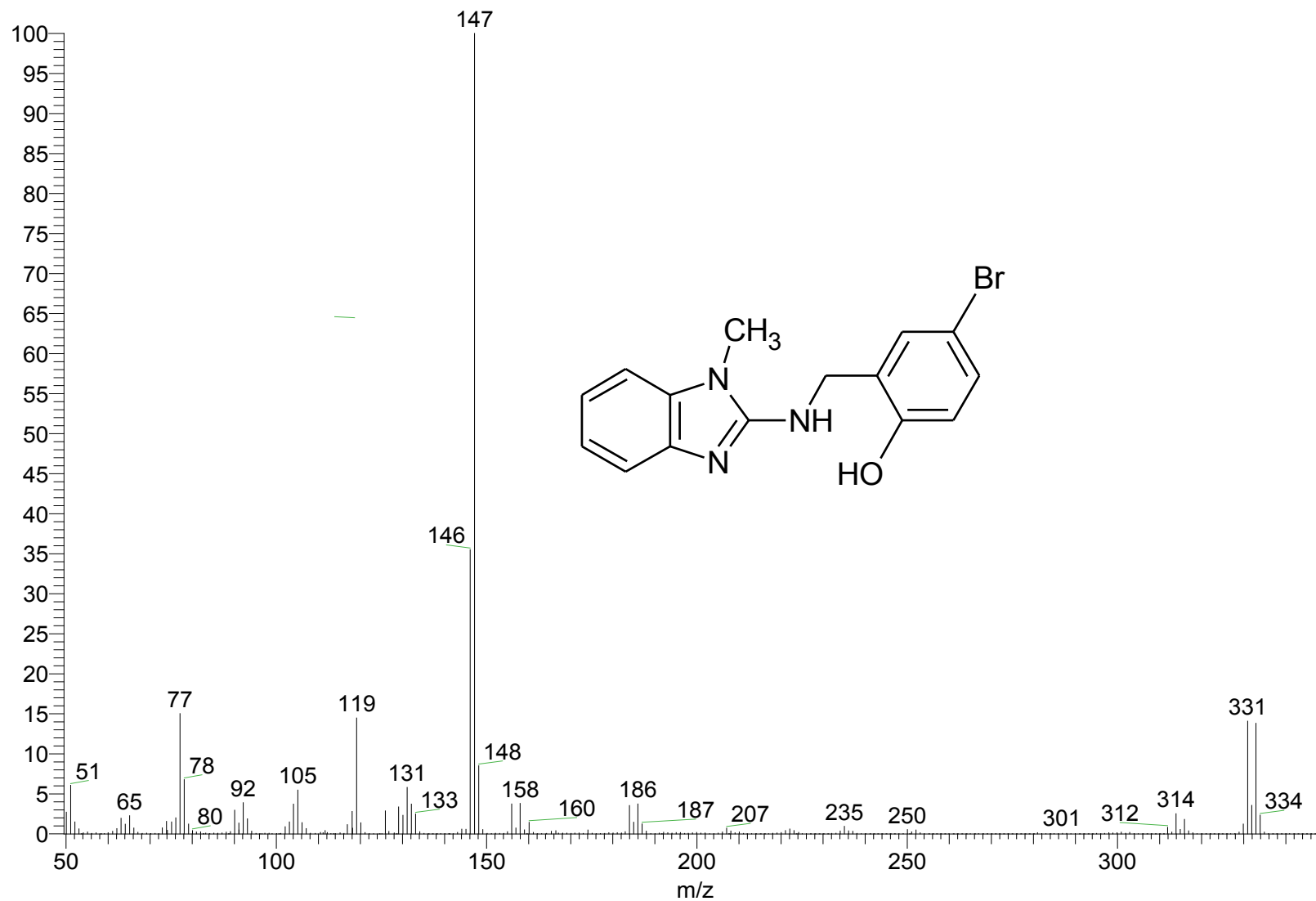


82

Espectro 4. RMN ¹³C *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol. (8).



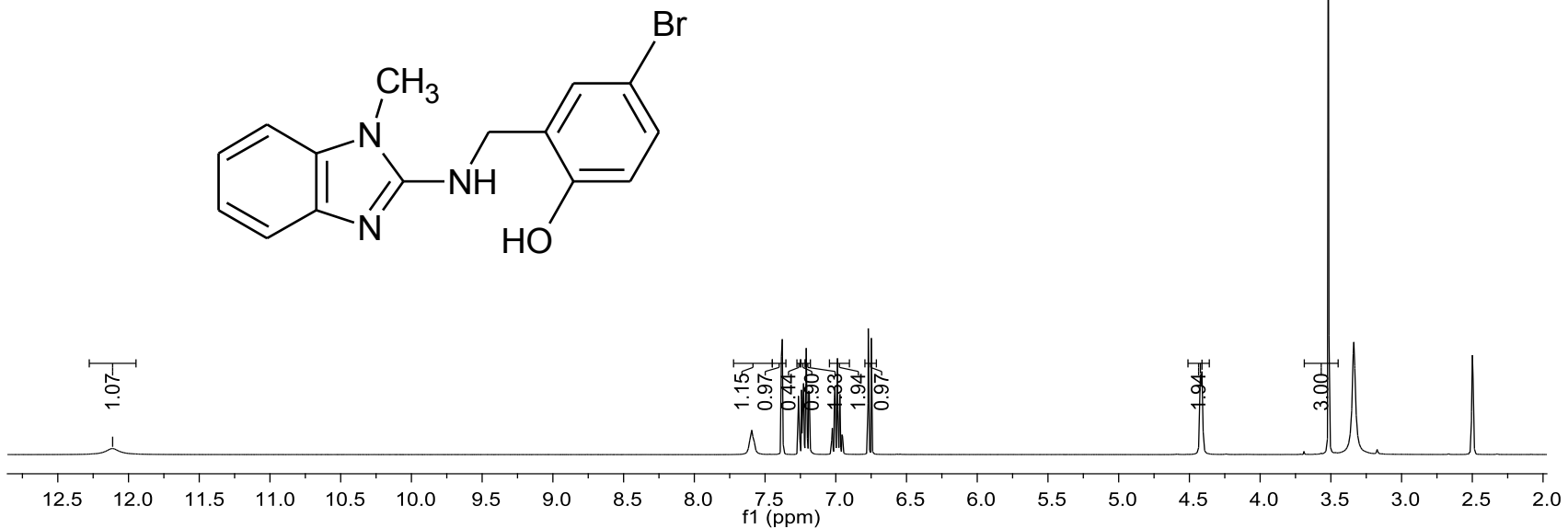
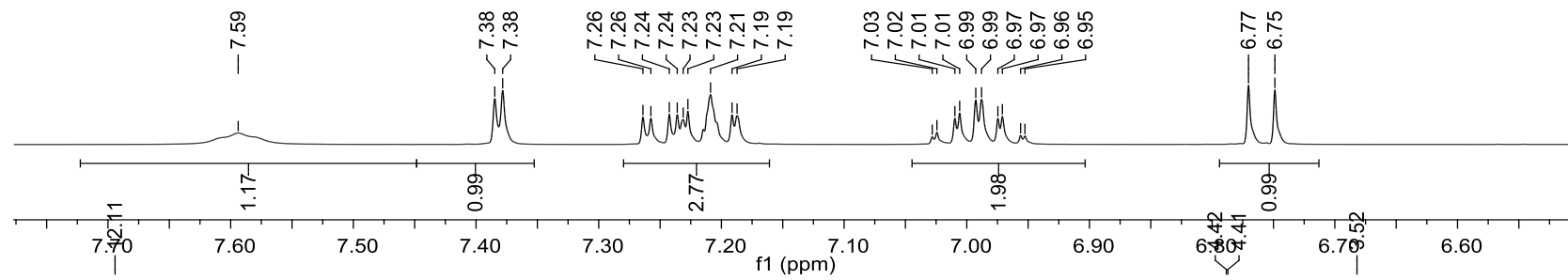
Espectro 5. IR *N*-(5-Bromo-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (9).



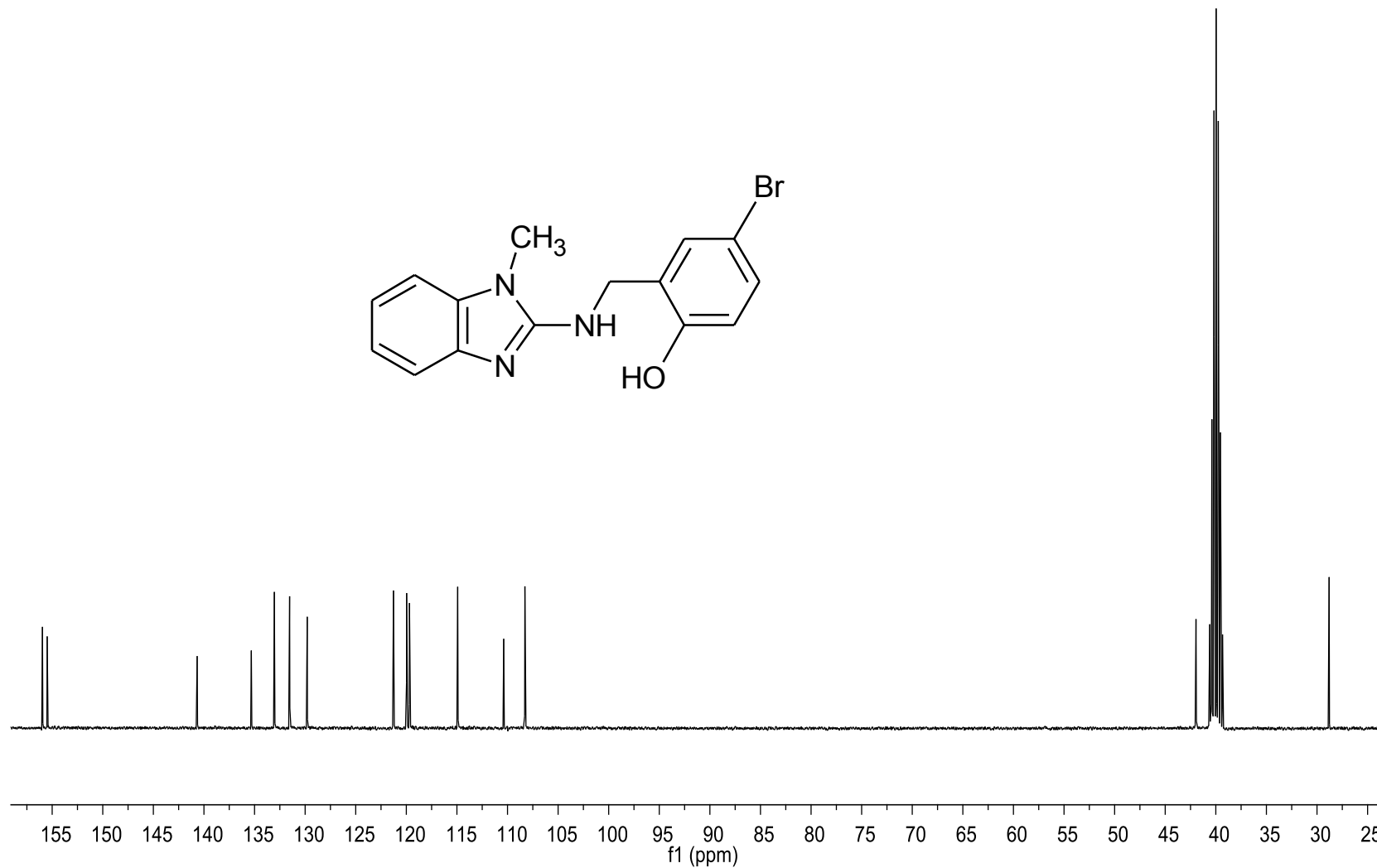
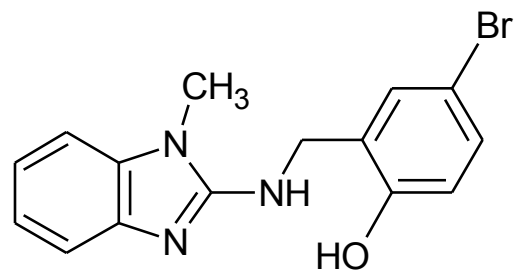
84

Espectro 6. EM (IE) *N*-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (9).

ESPECTROS



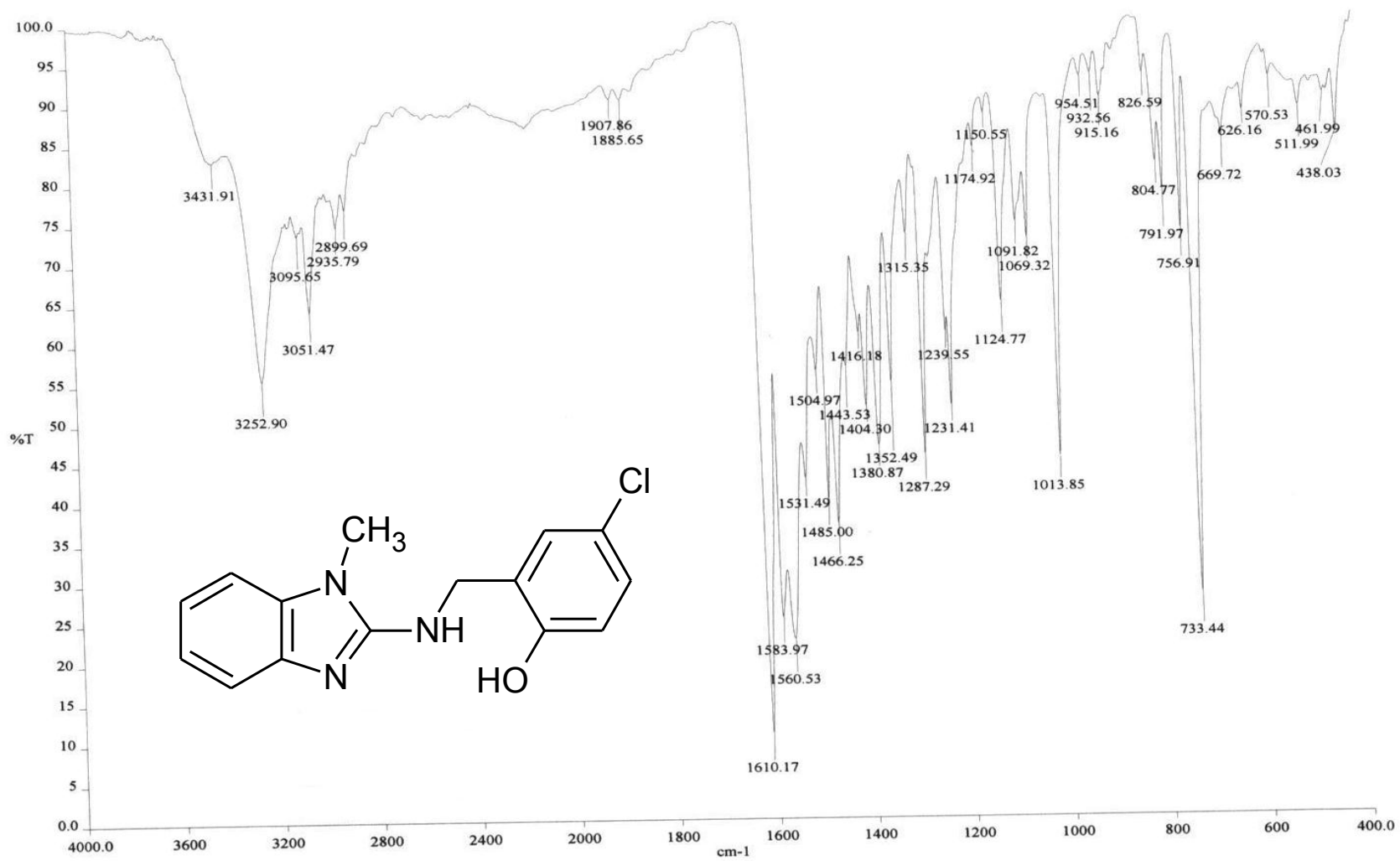
Espectro 7. RMN ¹H *N*-(5-Bromo-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (9).



86

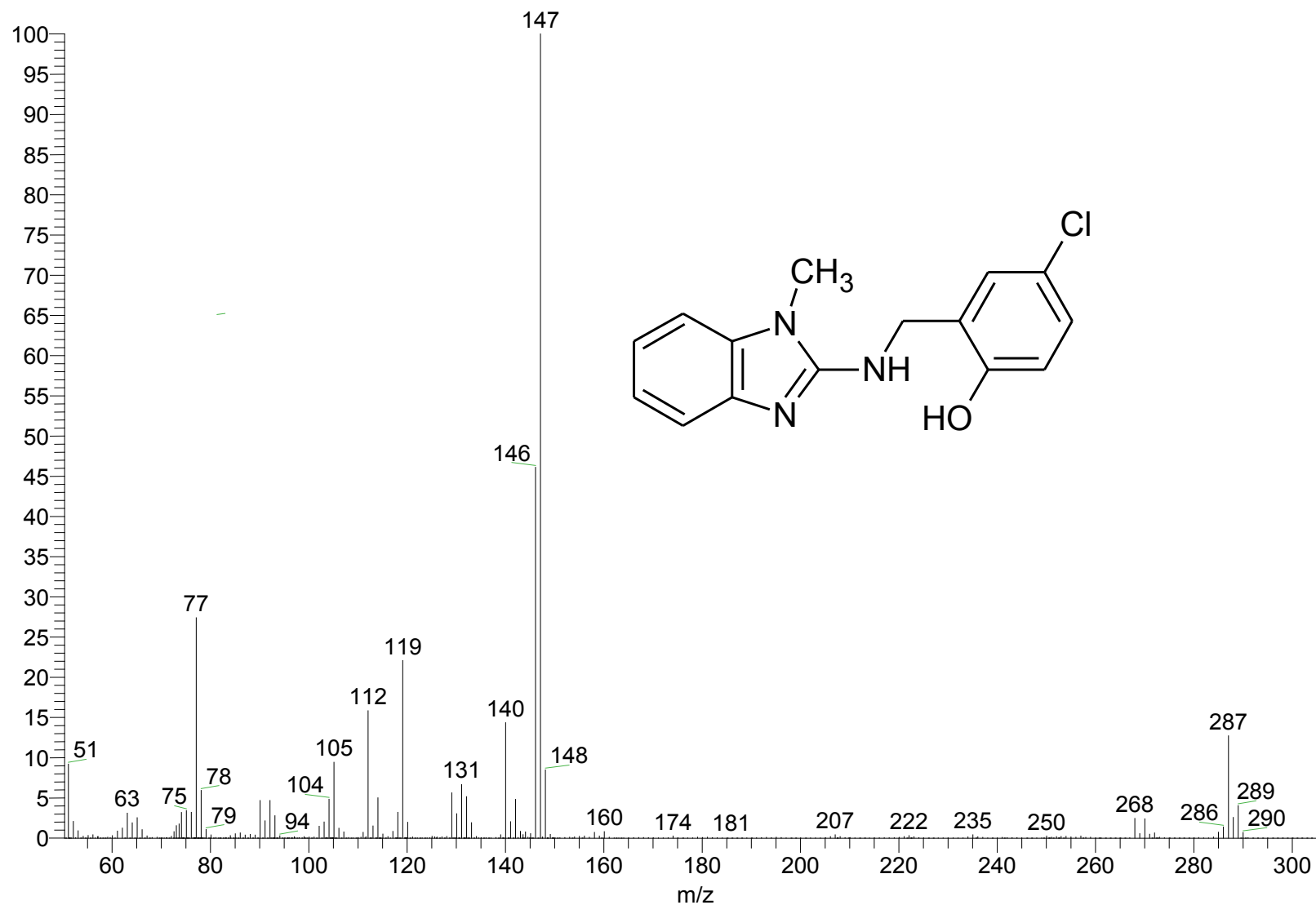
Espectro 8. RMN ¹³C *N*-(5-Bromo-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (9).

ESPECTROS



ESPECTROS

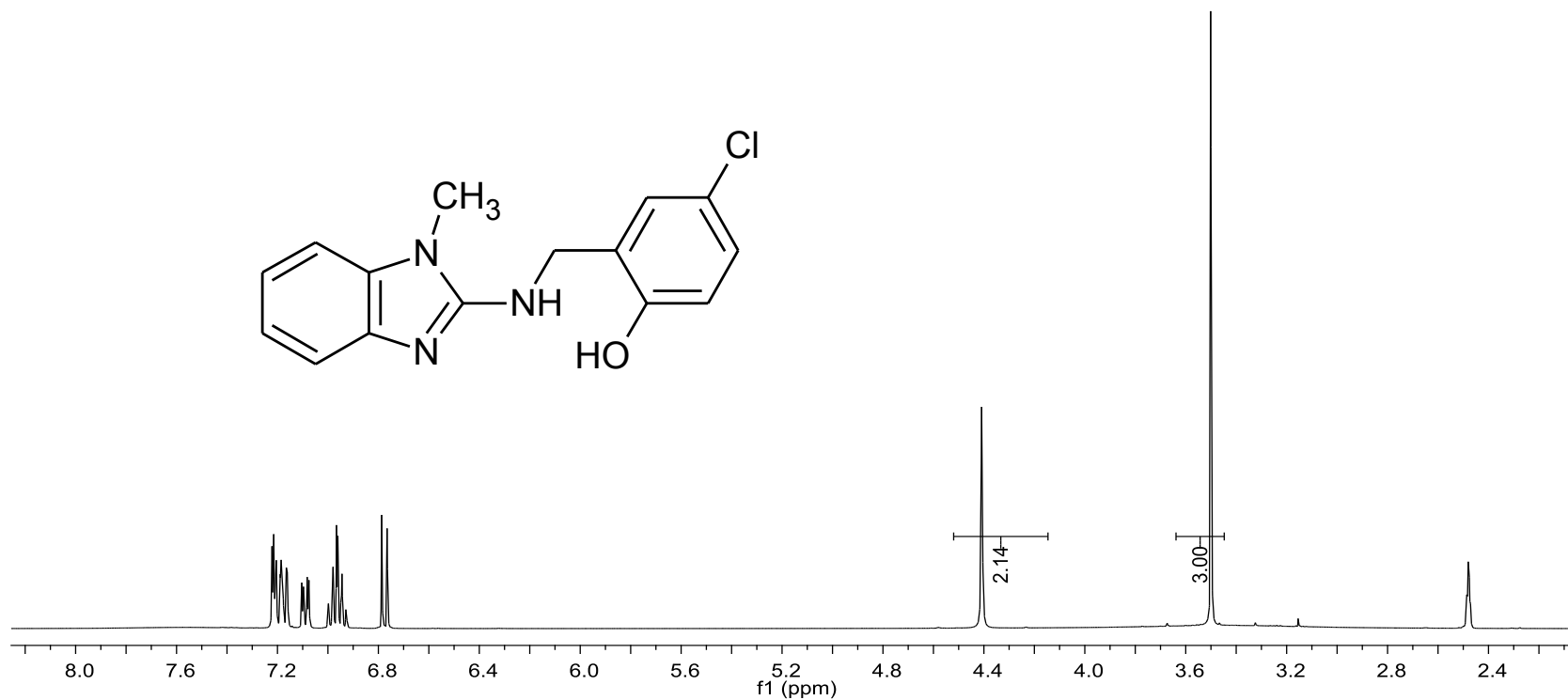
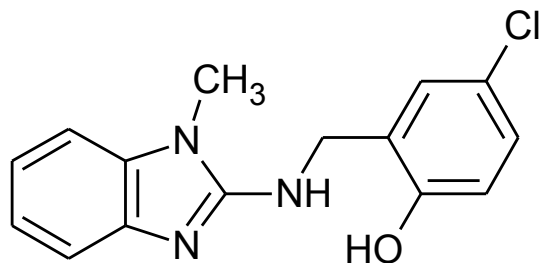
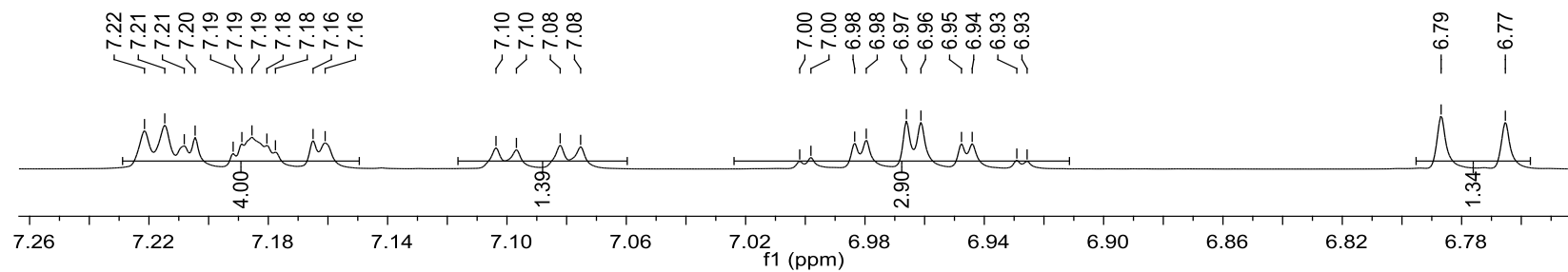
Espectro 9. IR N-(5-Cloro-2-hidroxibencil)-2-amino-1-metil-1H-bencimidazol (10).



8

Espectro 10. EM (IE) *N*-(5-Cloro-2-hidroxiencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (10).

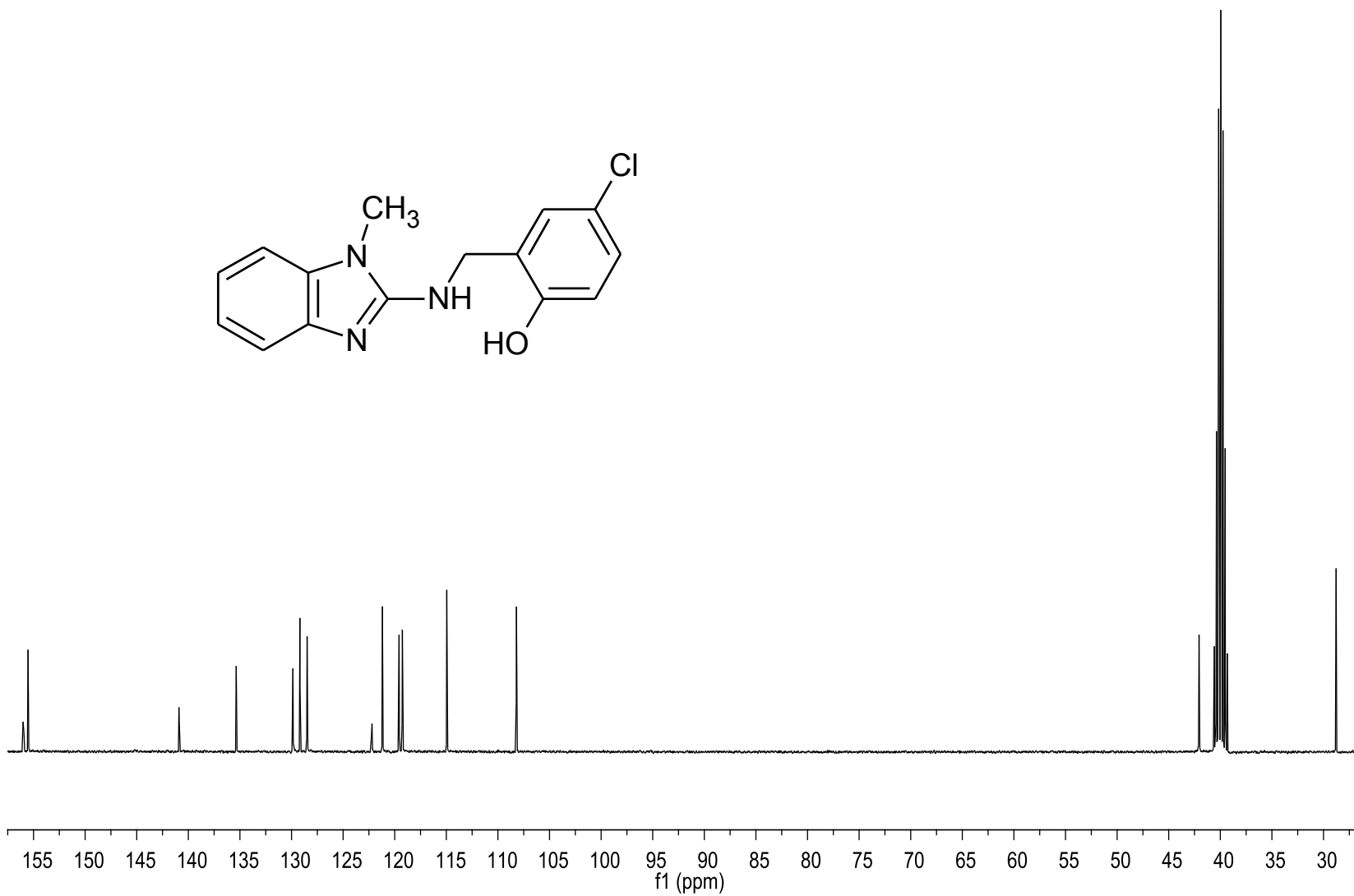
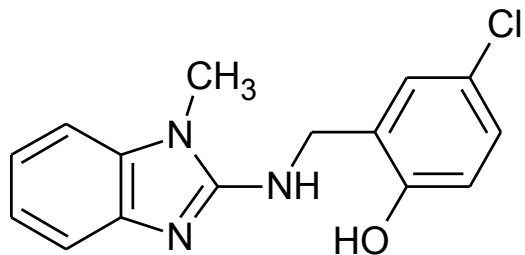
ESPECTROS



68

Espectro 11. RMN ^1H *N*-(5-Cloro-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (10).

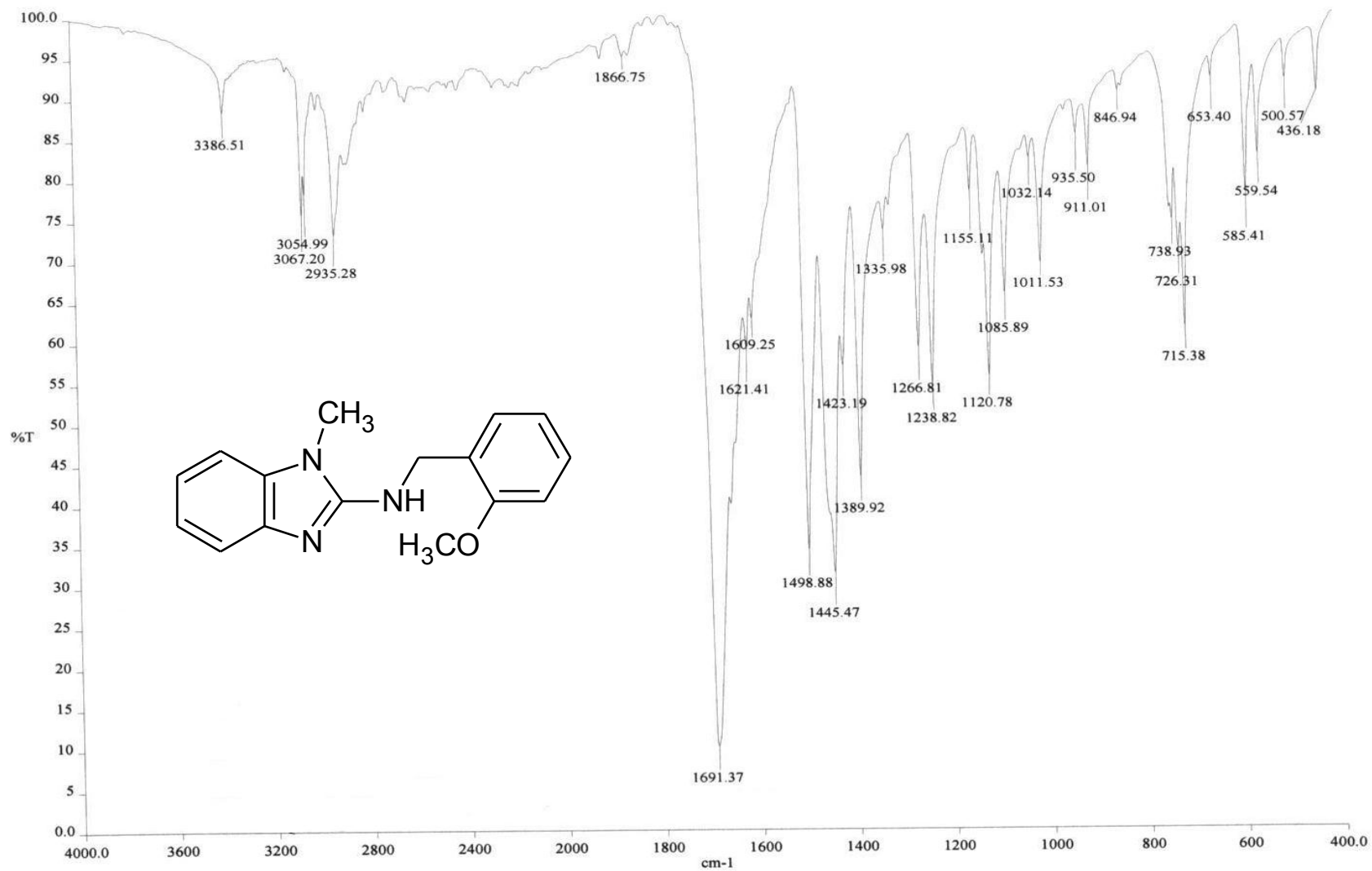
ESPECTROS



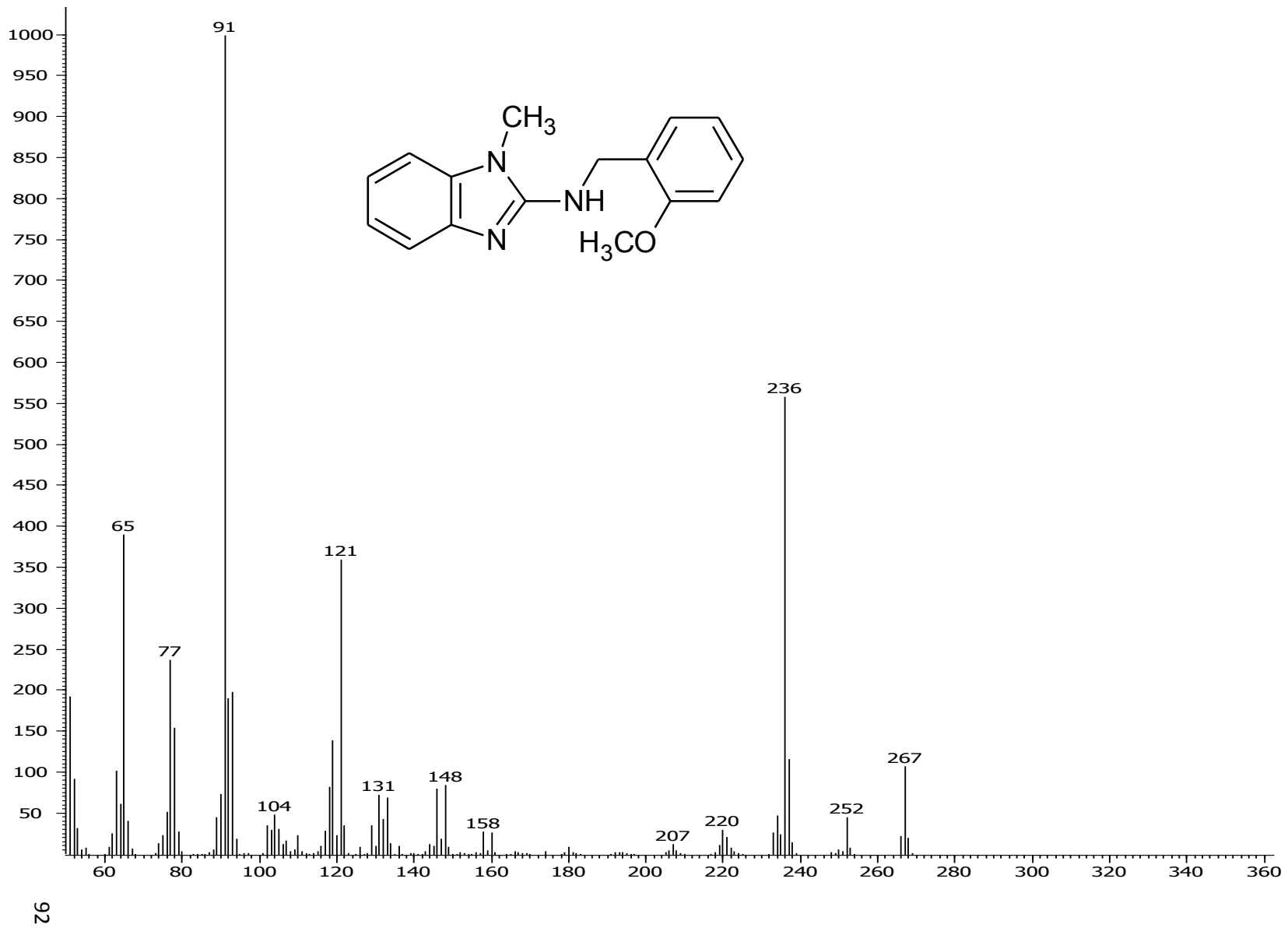
90

Espectro 12. RMN ¹³C *N*-(5-Cloro-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (10).

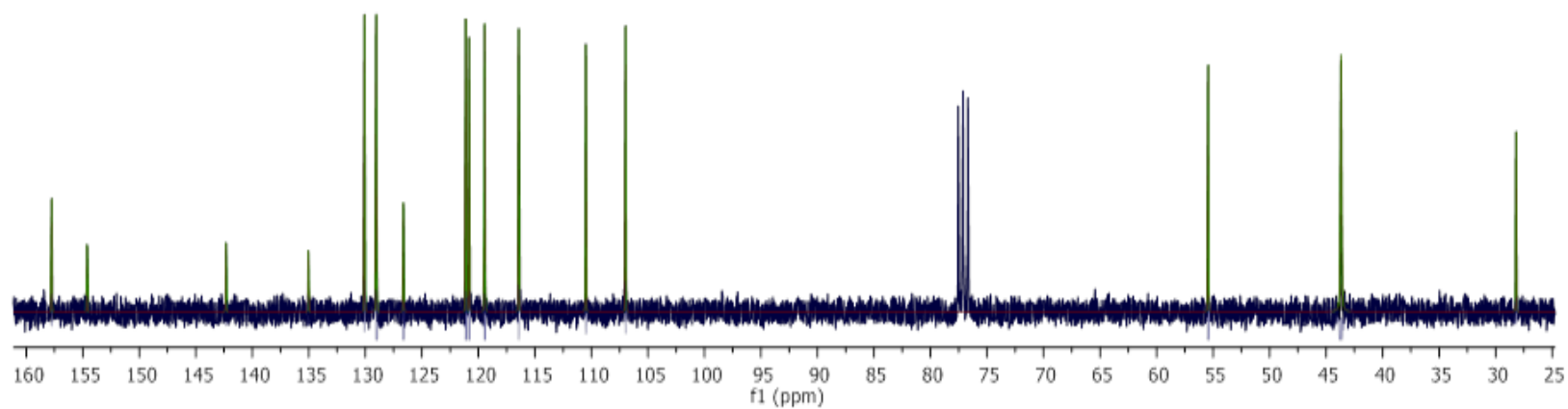
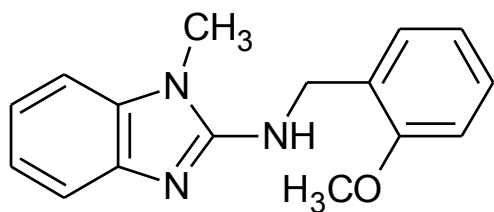
ESPECTROS



Espectro 13. IR *N*-(2-metoxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (11).

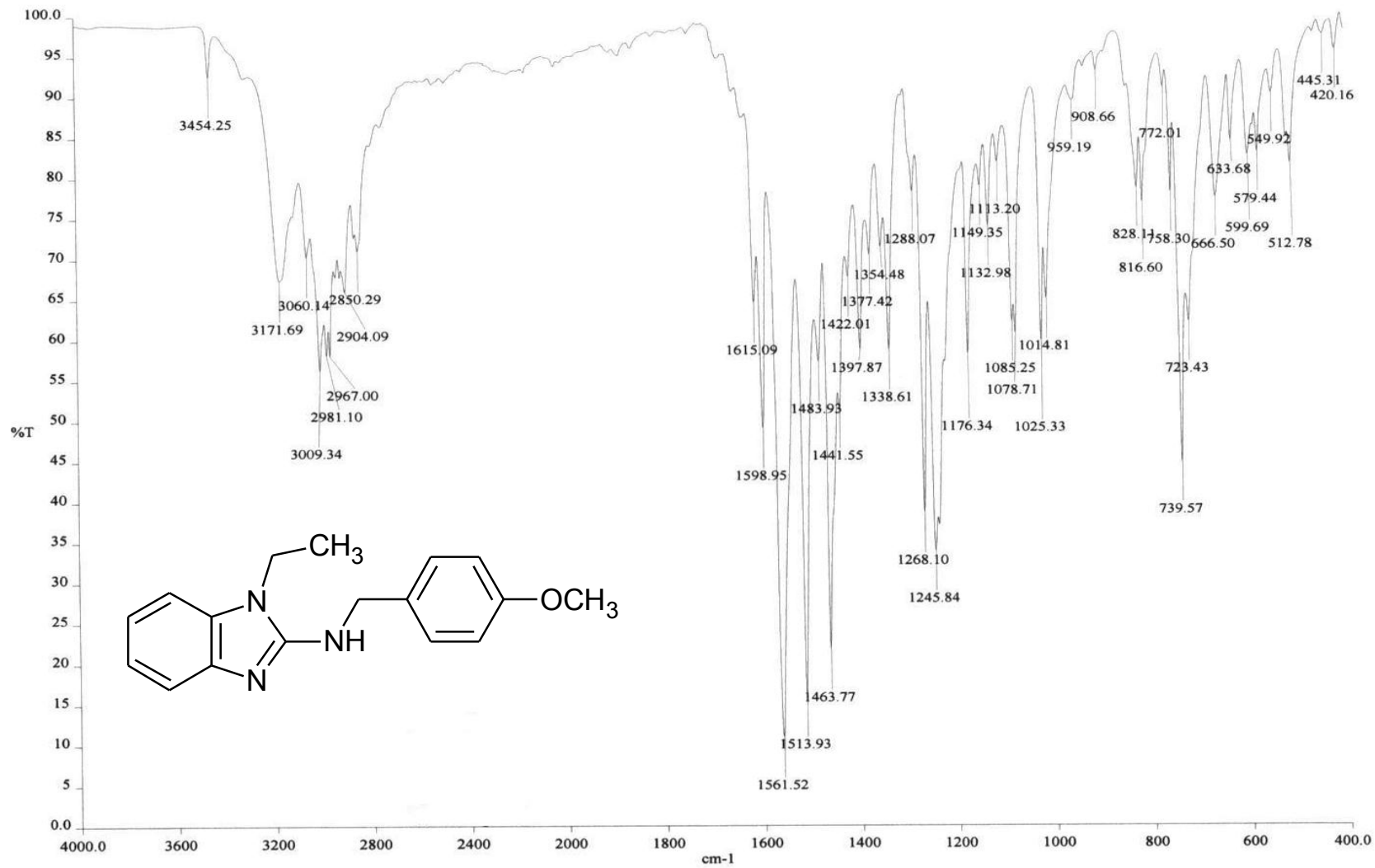


Espectro 14. EM (IE) *N*-(2-metoxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (11).

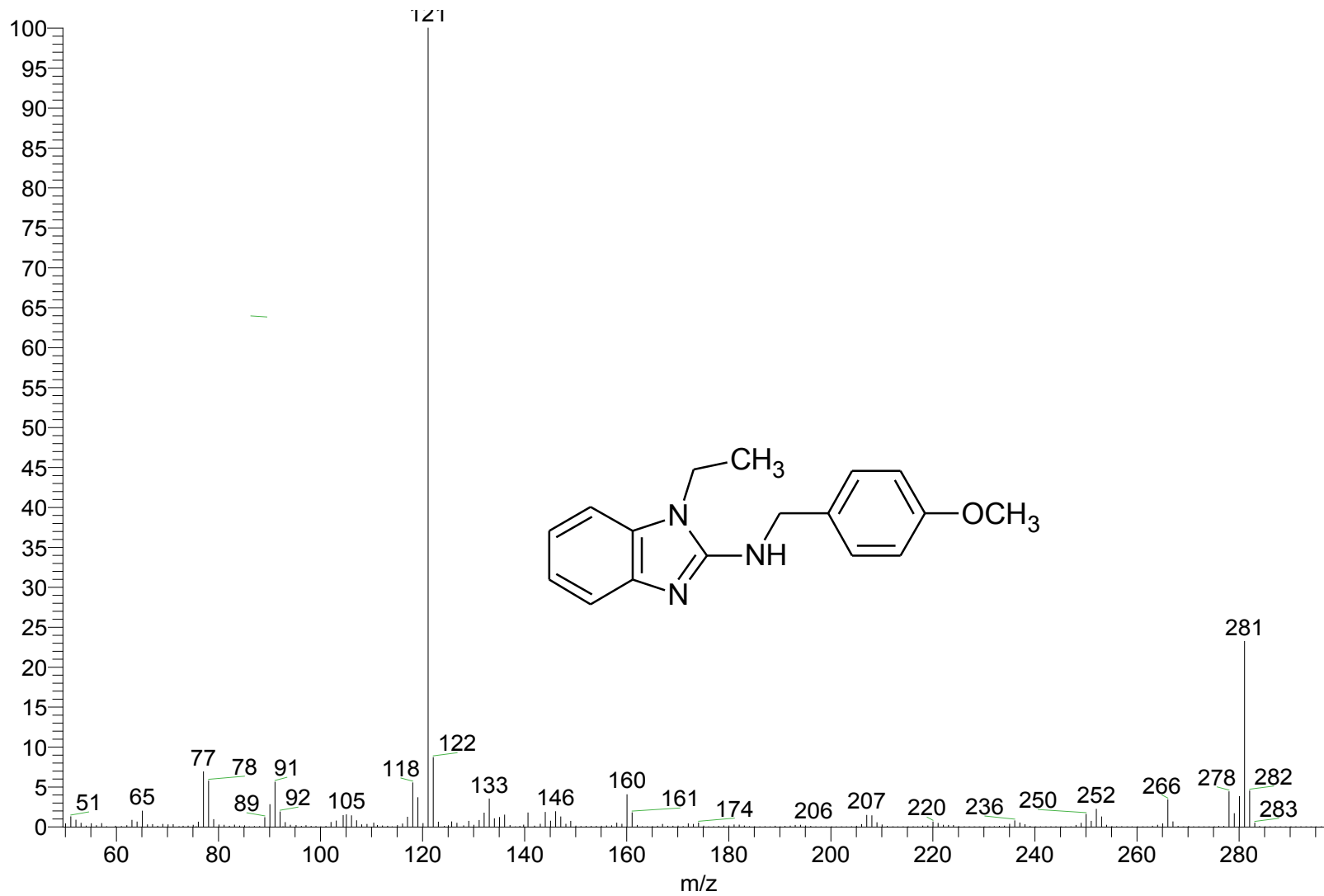


34

Espectro 16. RMN ^{13}C *N*-(2-metoxibencil)-2-amino-1-metil-1*H*-bencimidazol (11).

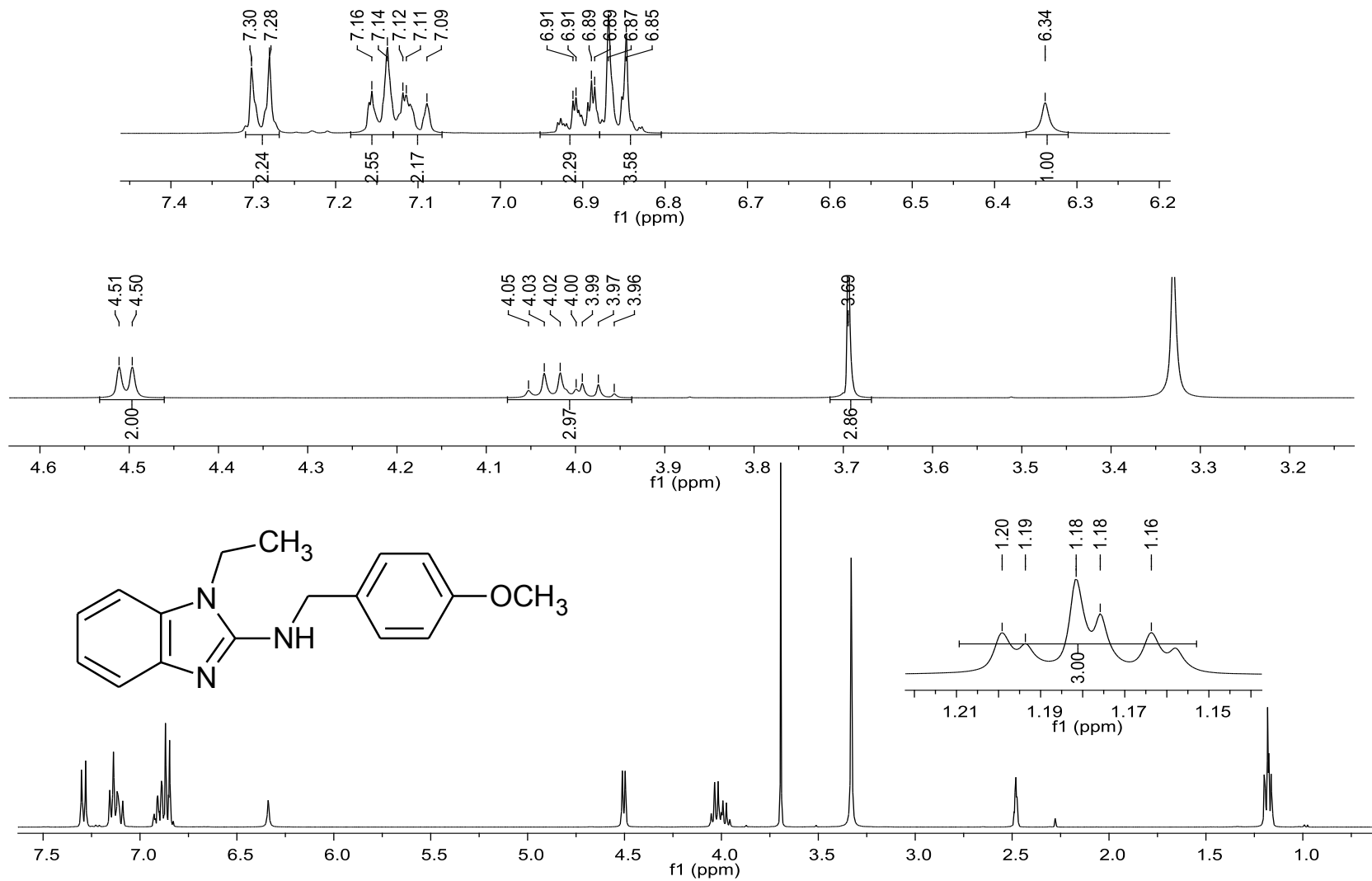


Espectro 17. IR 2-amino-1-etil-N-(4-metoxibenzil)-1H-bencimidazol (12).

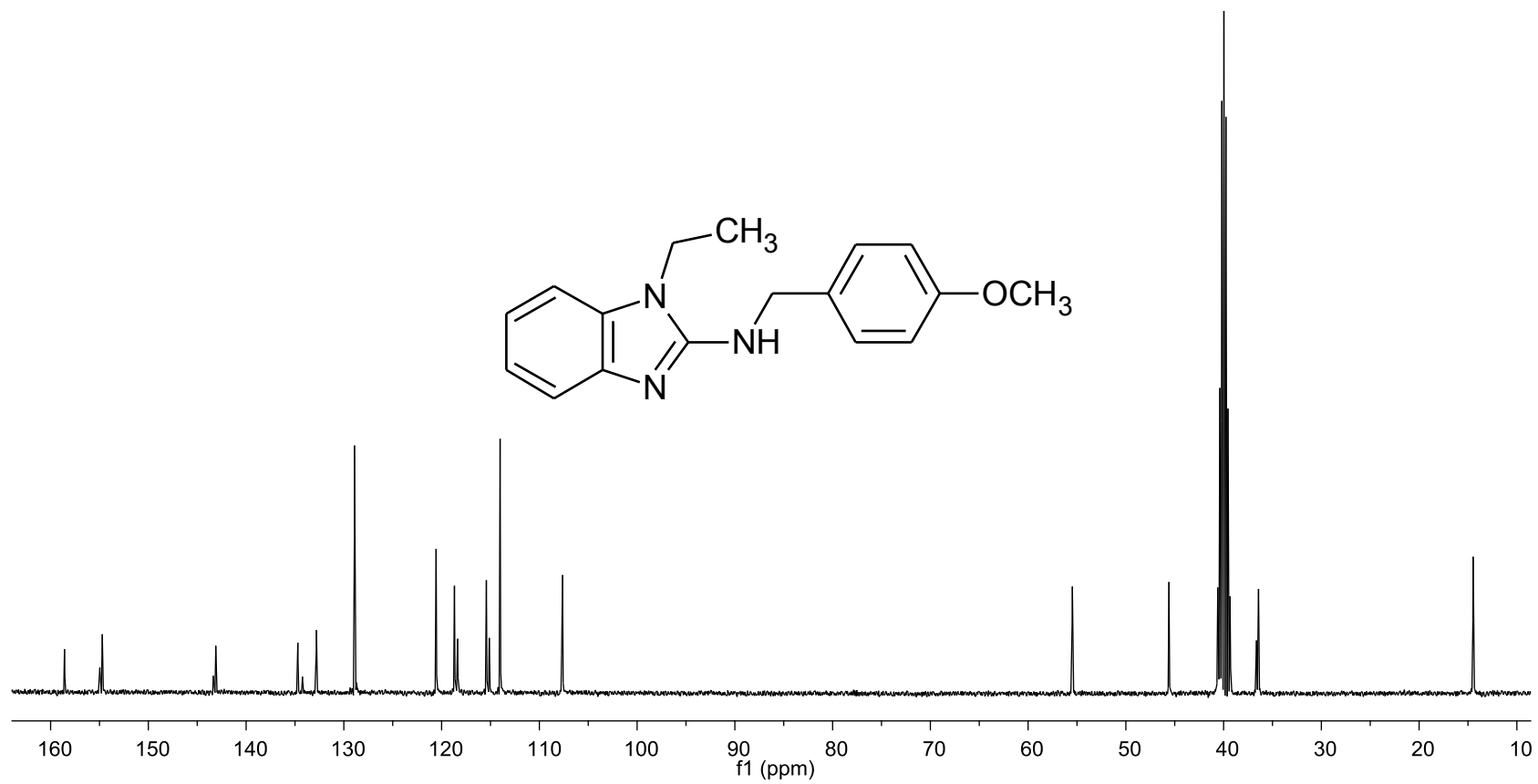


ESPECTROS

Espectro 18. EM (IE) 2-amino-1-etil-N-(4-metoxibencil)-1H-bencimidazol (12).



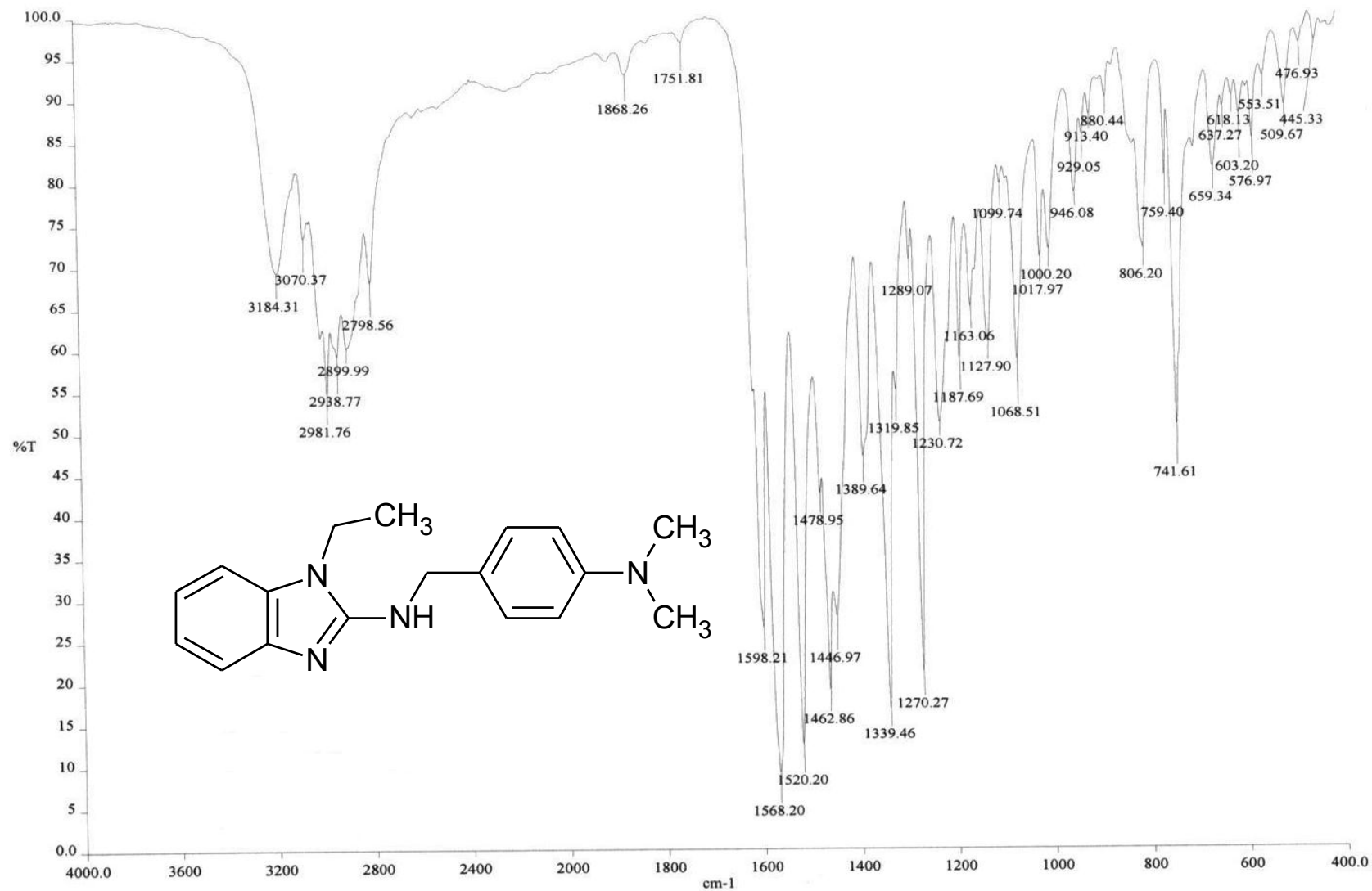
Espectro 19. RMN ¹H 2-amino-1-etil-N-(4-metoxibencil)-1H-bencimidazol (12).



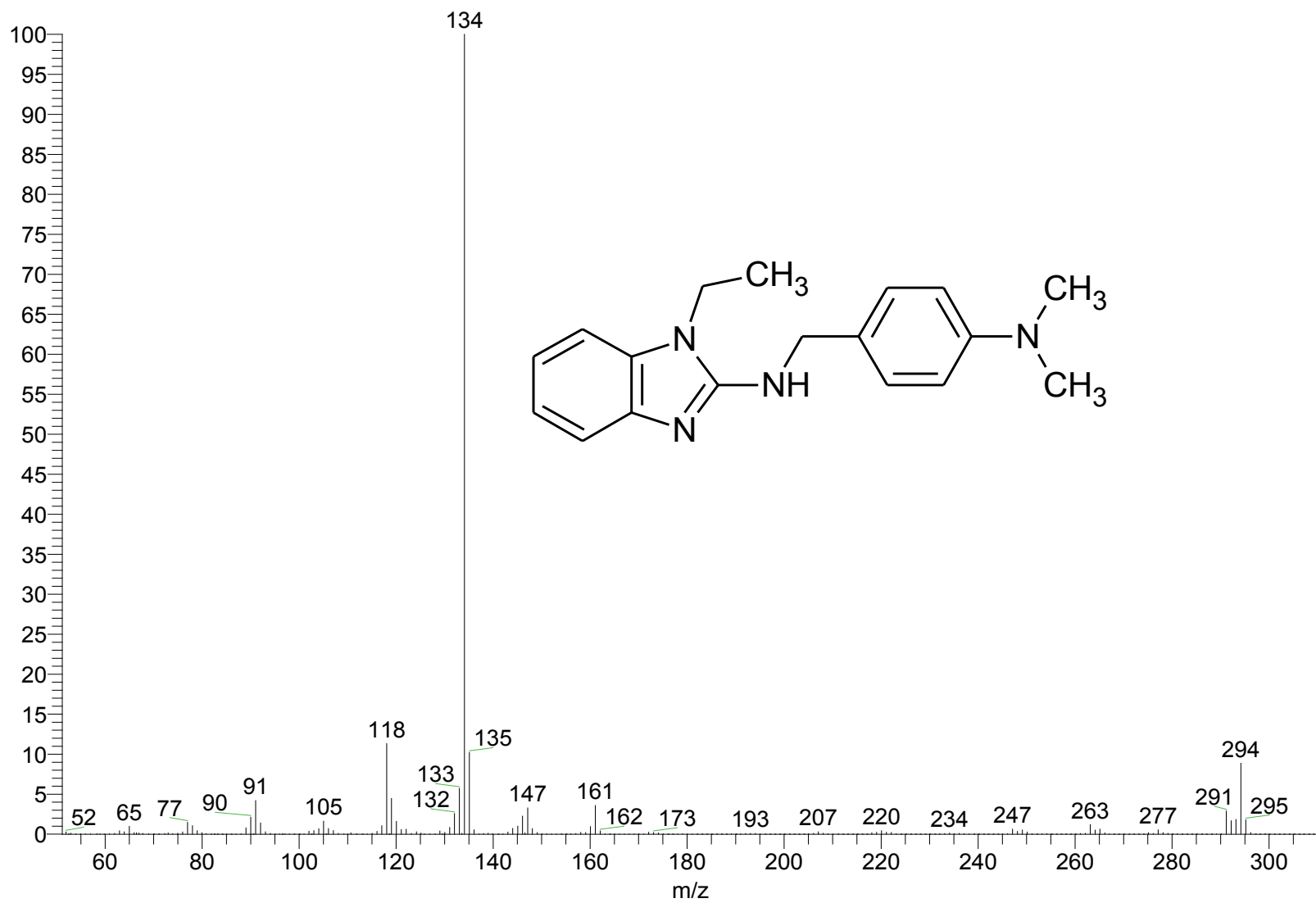
98

Espectro 20. RMN ¹³C-2-amino-1-etil-*N*-(4-metoxibencil)-1*H*-bencimidazol (12).

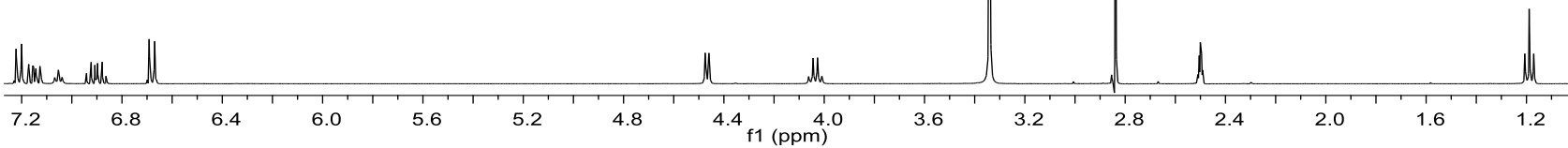
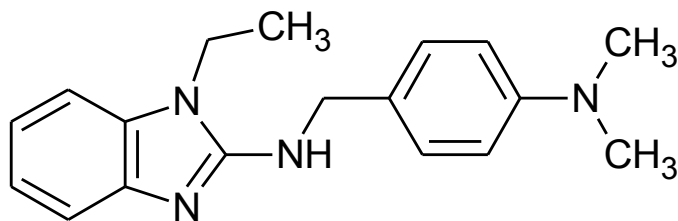
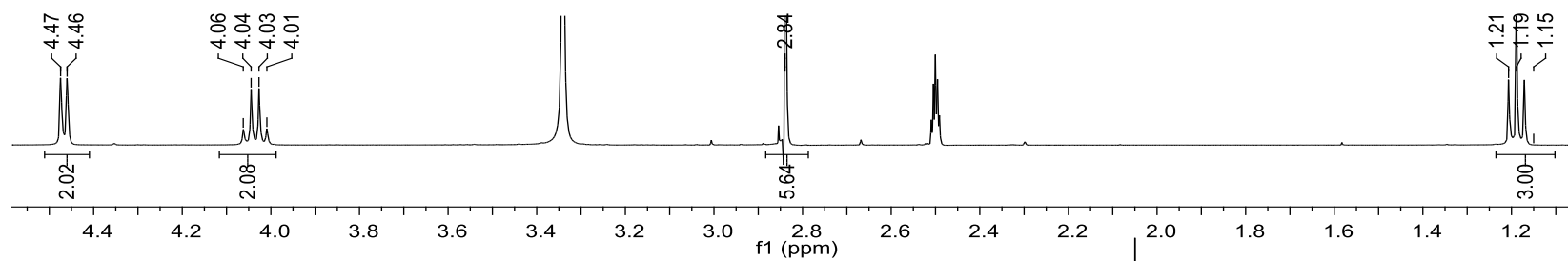
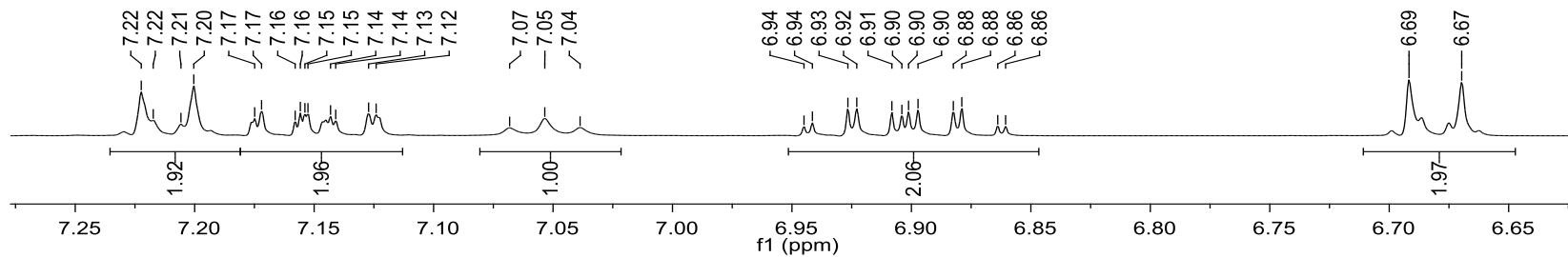
ESPECTROS



Espectro 21. IR N-[4-(dimetilamino)bencil]-2-amino-1-etil-1H-bencimidazol (13).



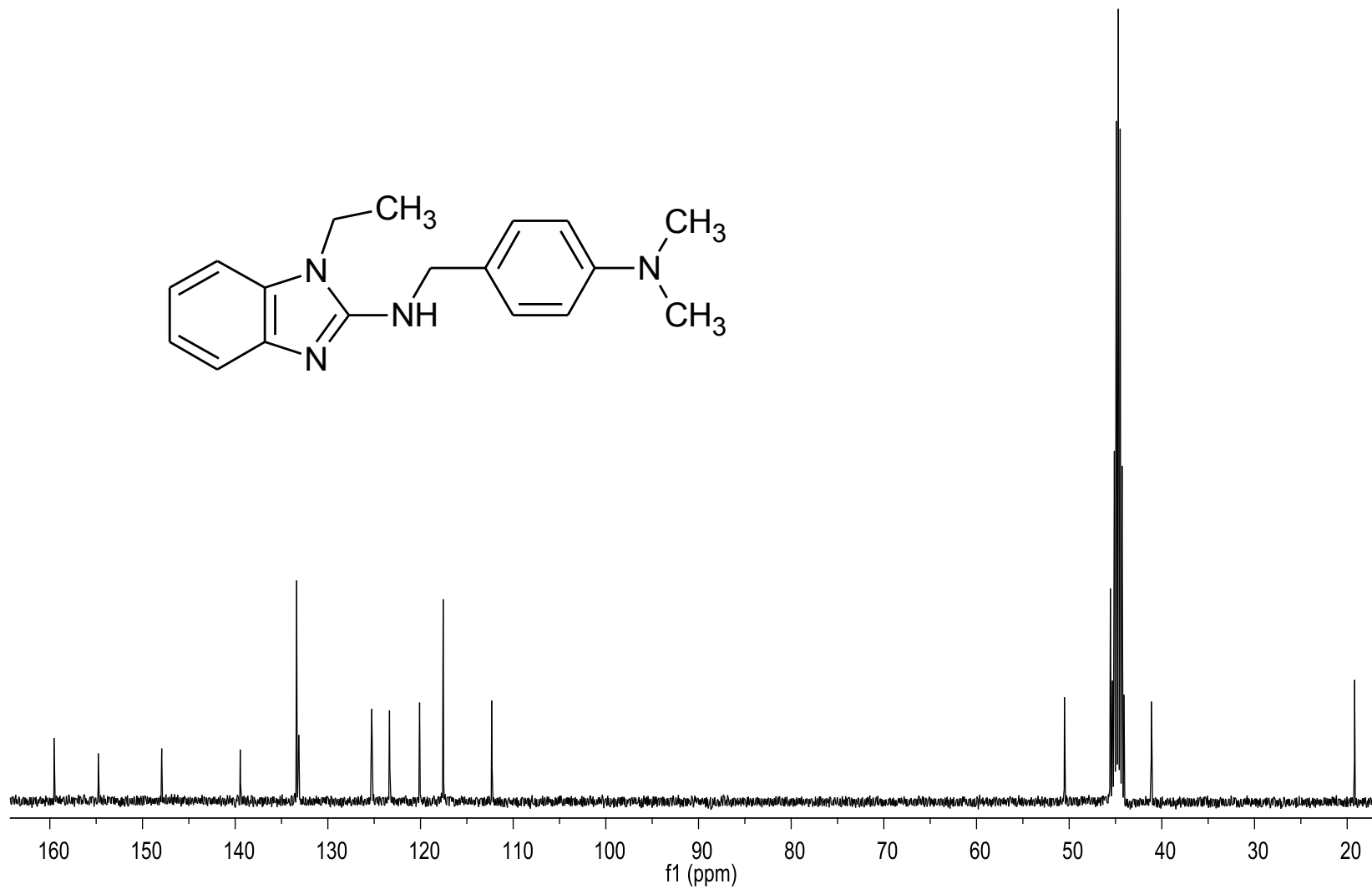
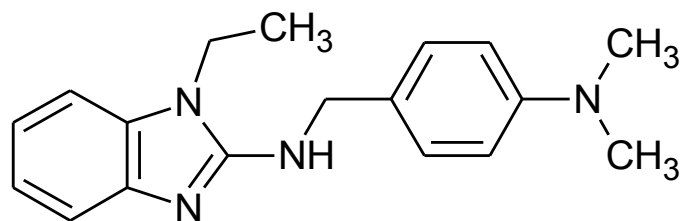
Espectro 22. EM (IE) *N*-[4-(dimetilamino)bencil]-2-amino-1-etil-1*H*-bencimidazol (13).



101

Espectro 23. RMN ^1H *N*-[4-(dimetilamino)encil]-2-amino-1-etil-1*H*-bencimidazol (13).

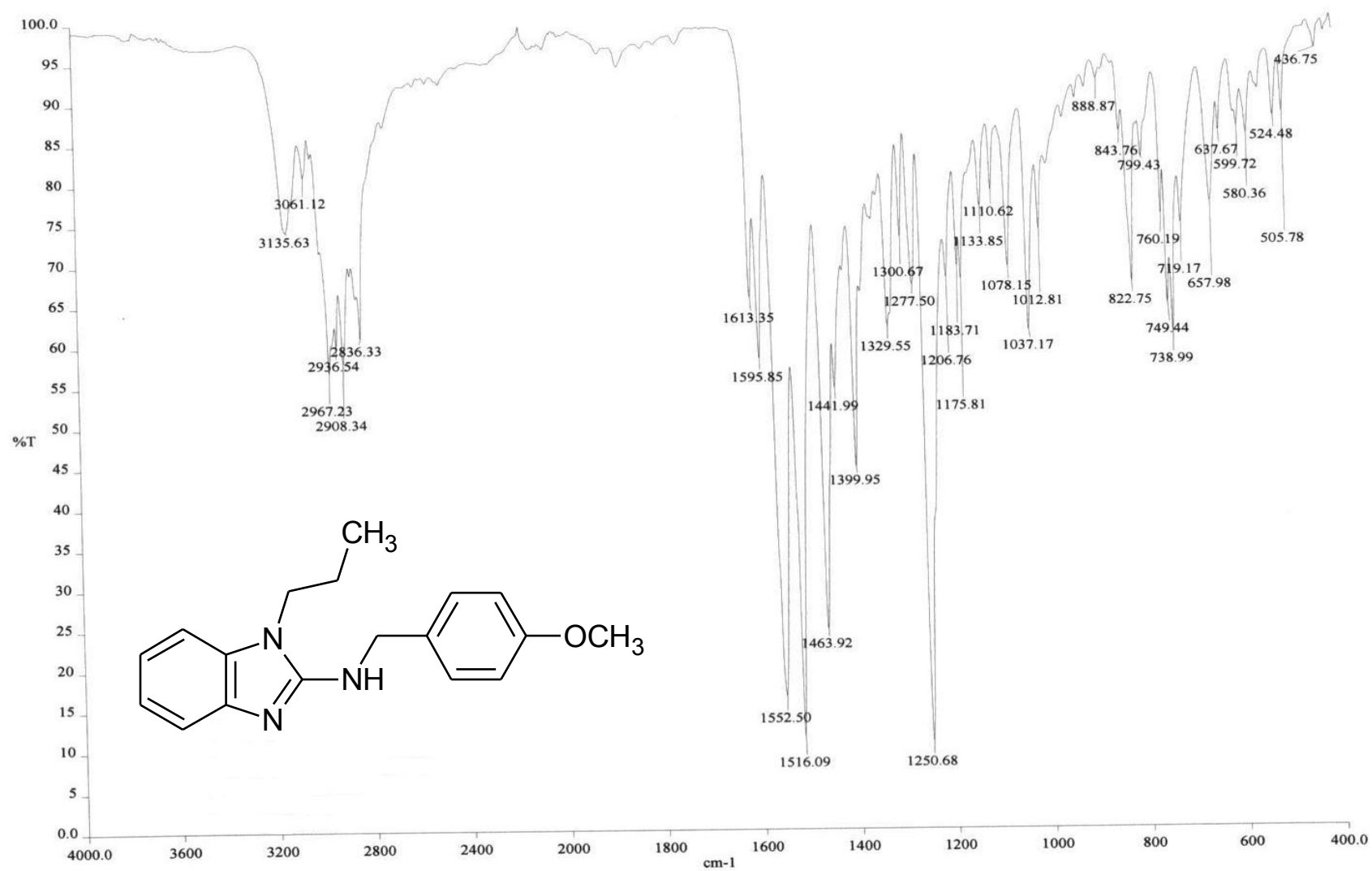
ESPECTROS



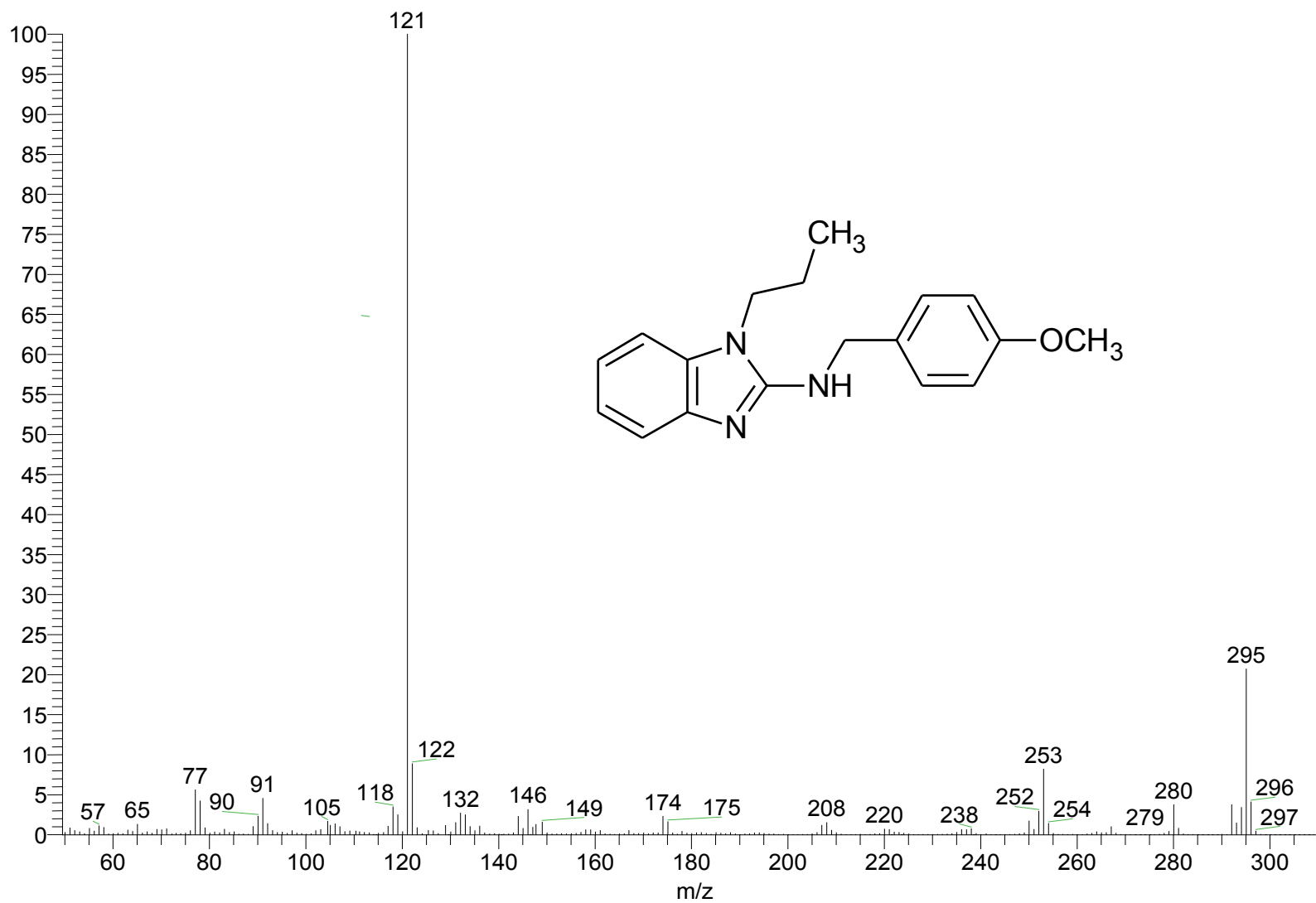
102

Espectro 24. RMN ^{13}C *N*-[4-(dimetilamino)bencil]-2-amino-1-etil-1*H*-bencimidazol (13).

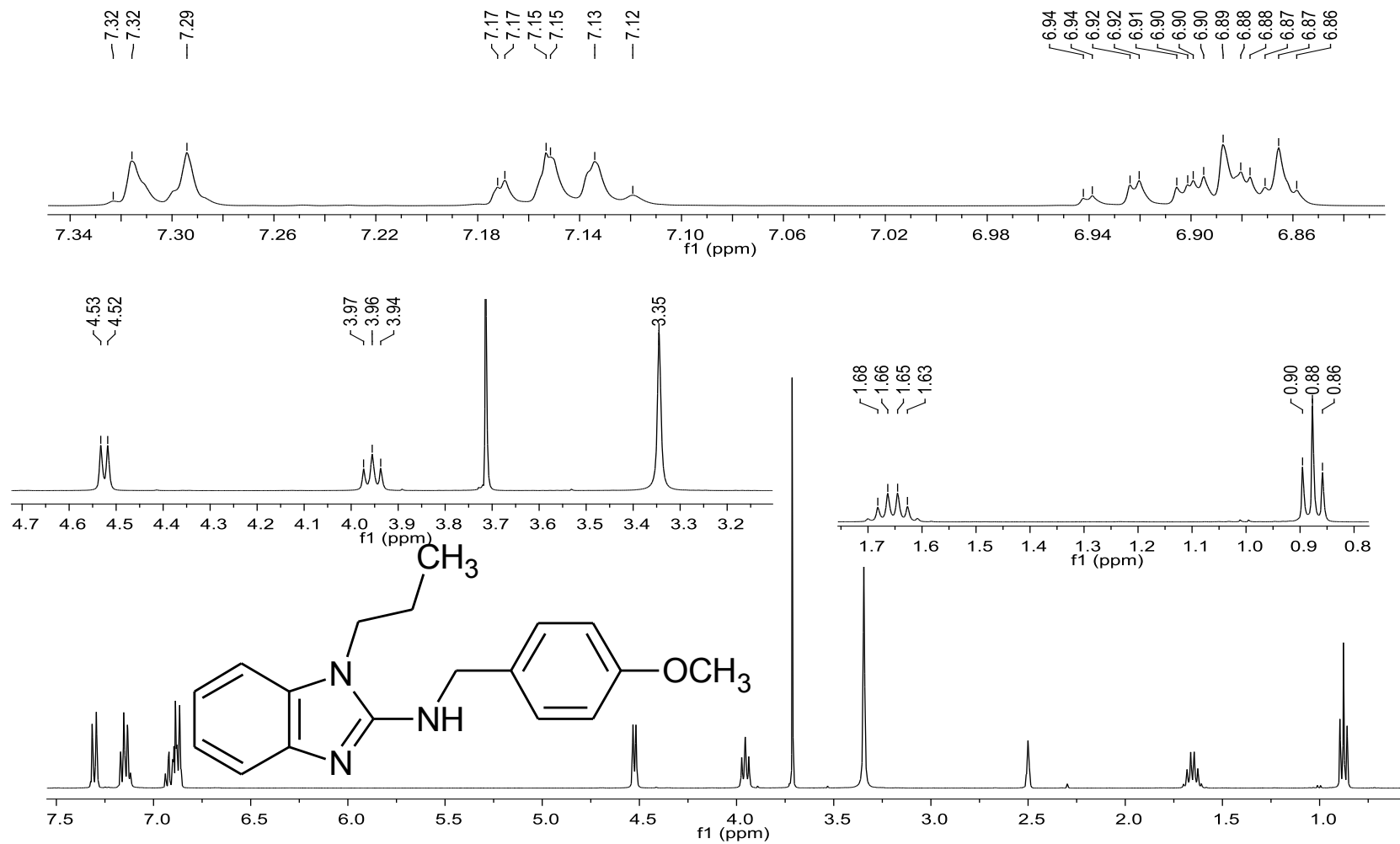
ESPECTROS



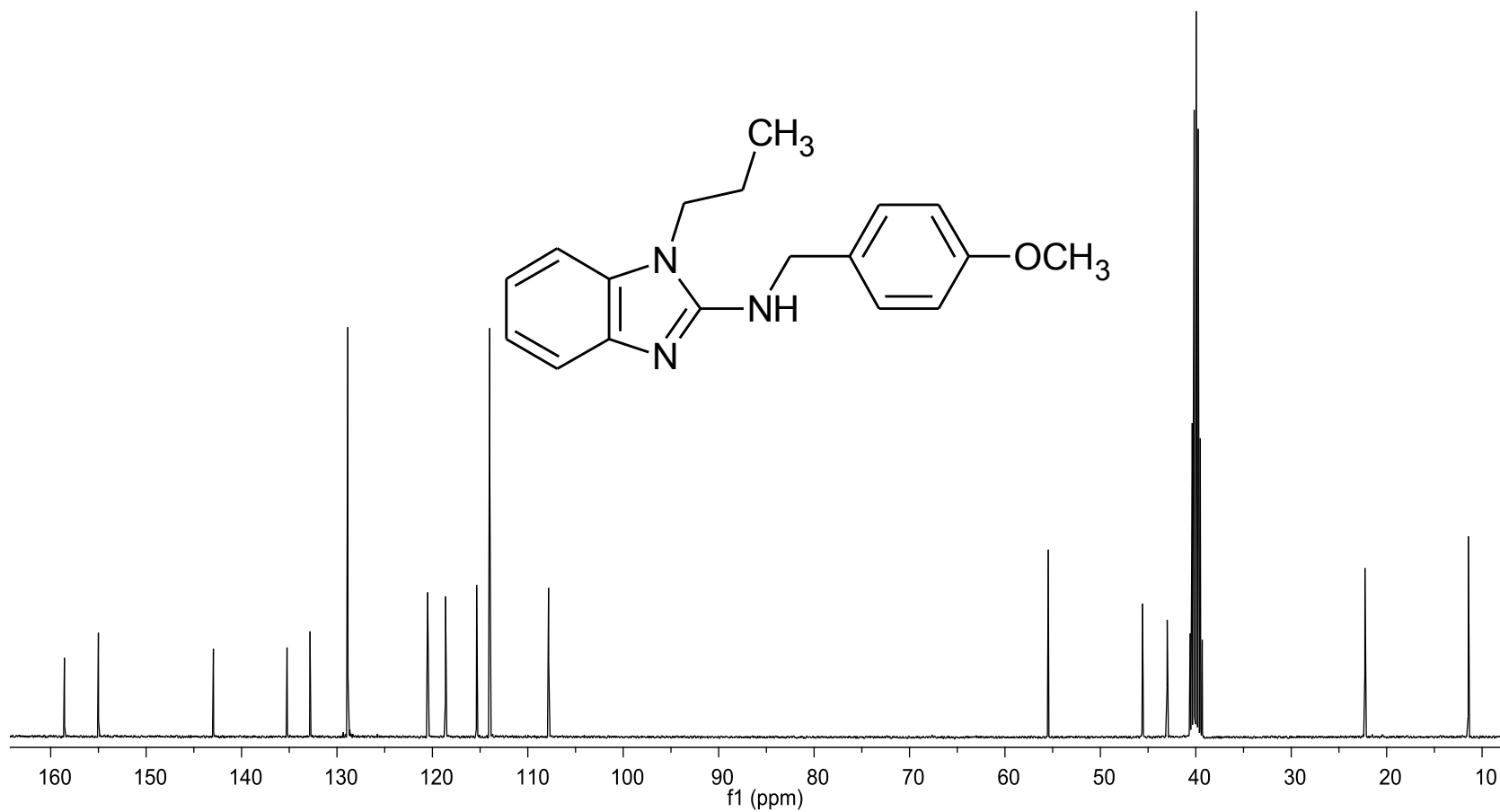
Espectro 25. IR *N*-(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1*H*-bencimidazol (14).



Espectro 26. EM (IE) *N*-(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1*H*-bencimidazol (14).



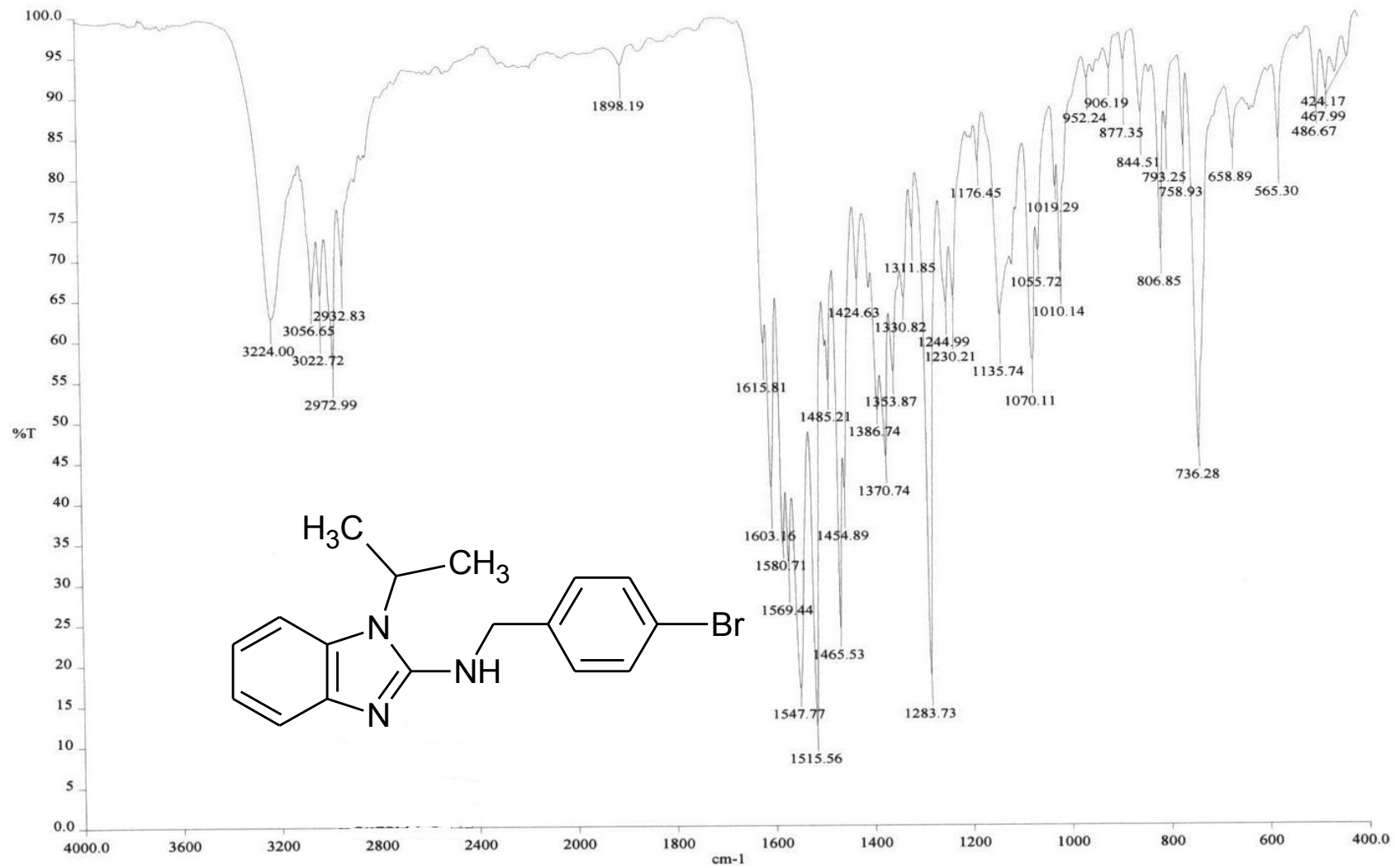
Espectro 27. RMN ¹H *N*-(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1*H*-bencimidazol (14).



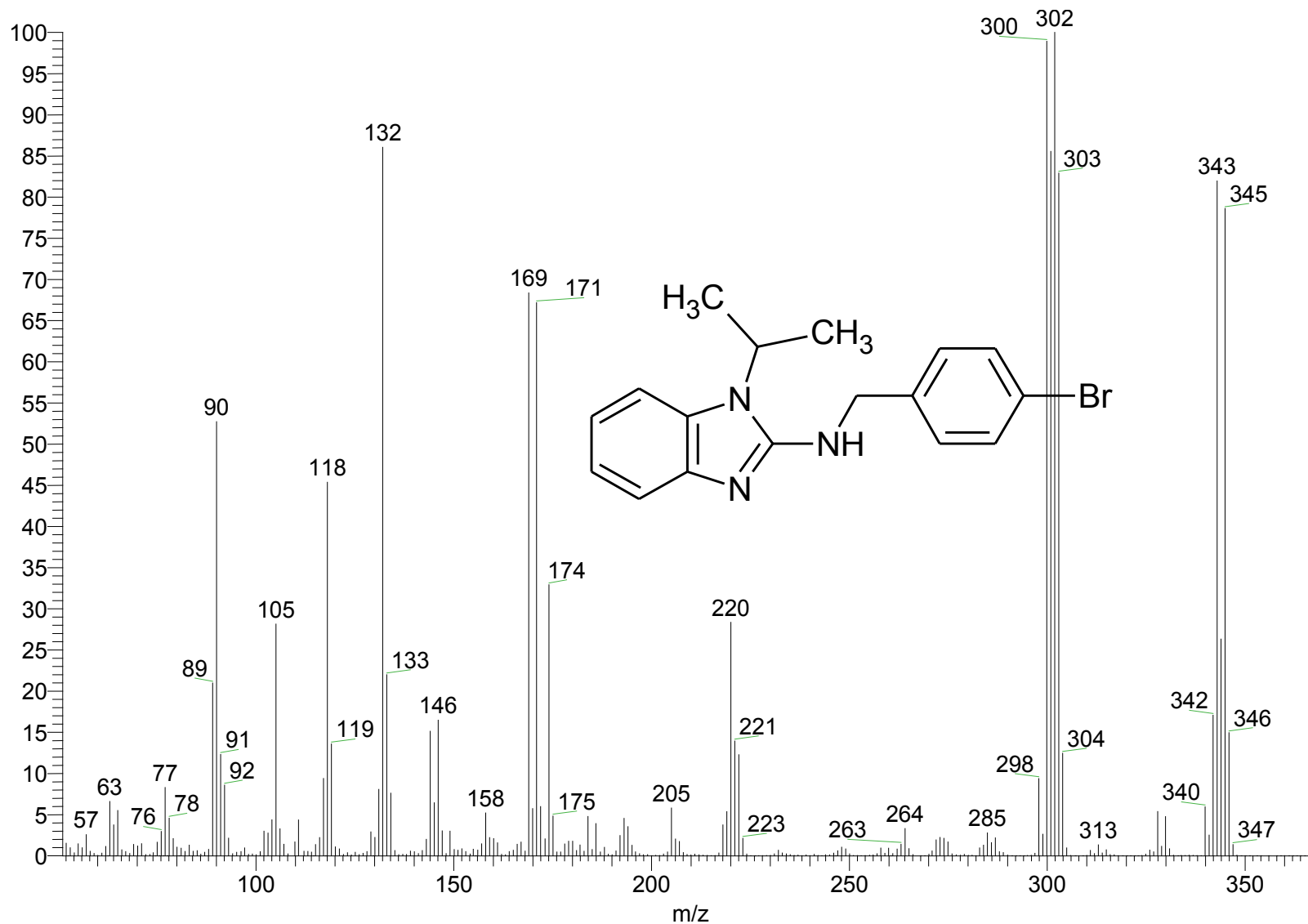
106

Espectro 28. RMN ¹³C *N*-(4-metoxibencil)-2-amino-1-propil-1*H*-bencimidazol (14).

ESPECTROS

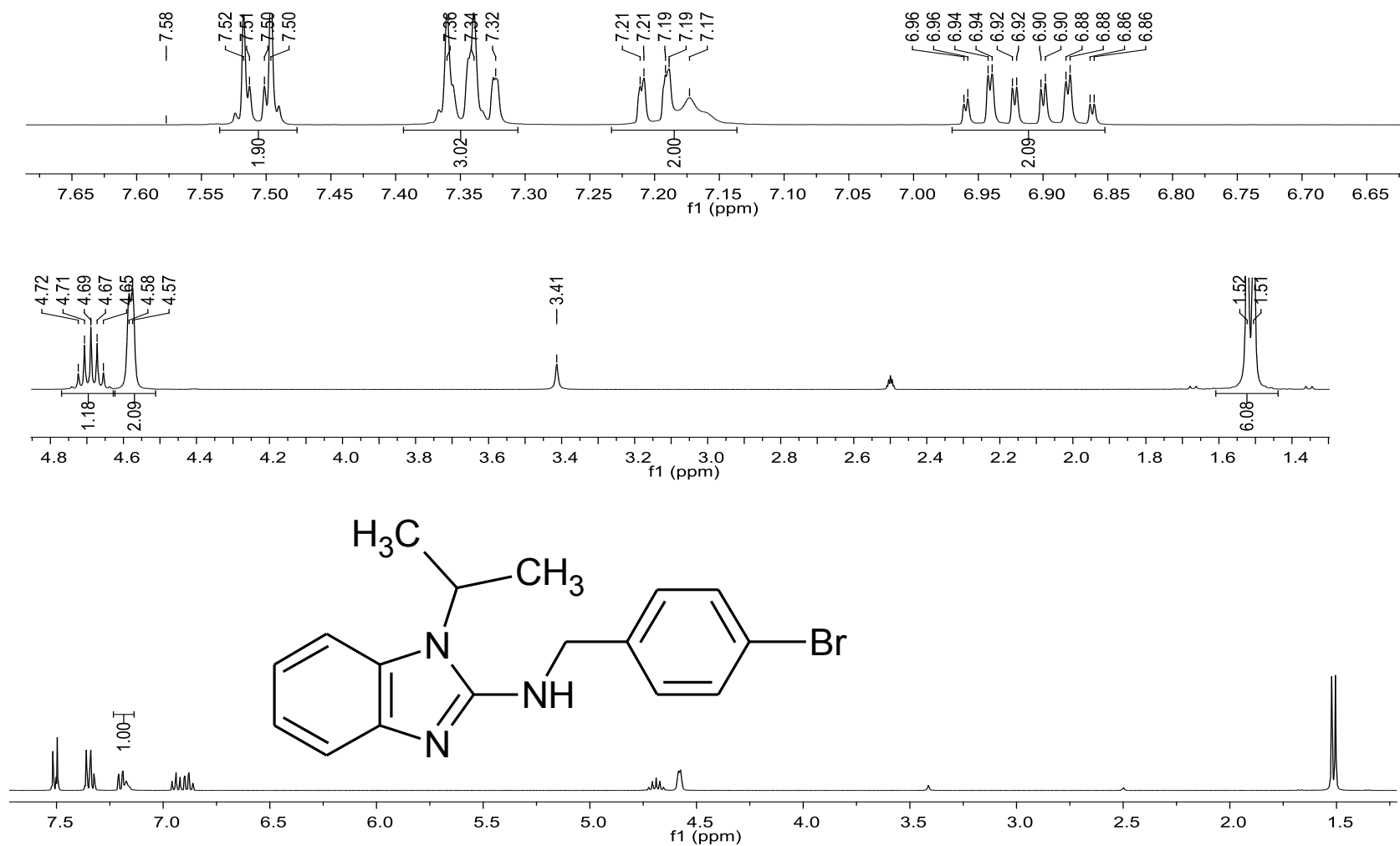


Espectro 29. IR *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1*H*-bencimidazol (15).

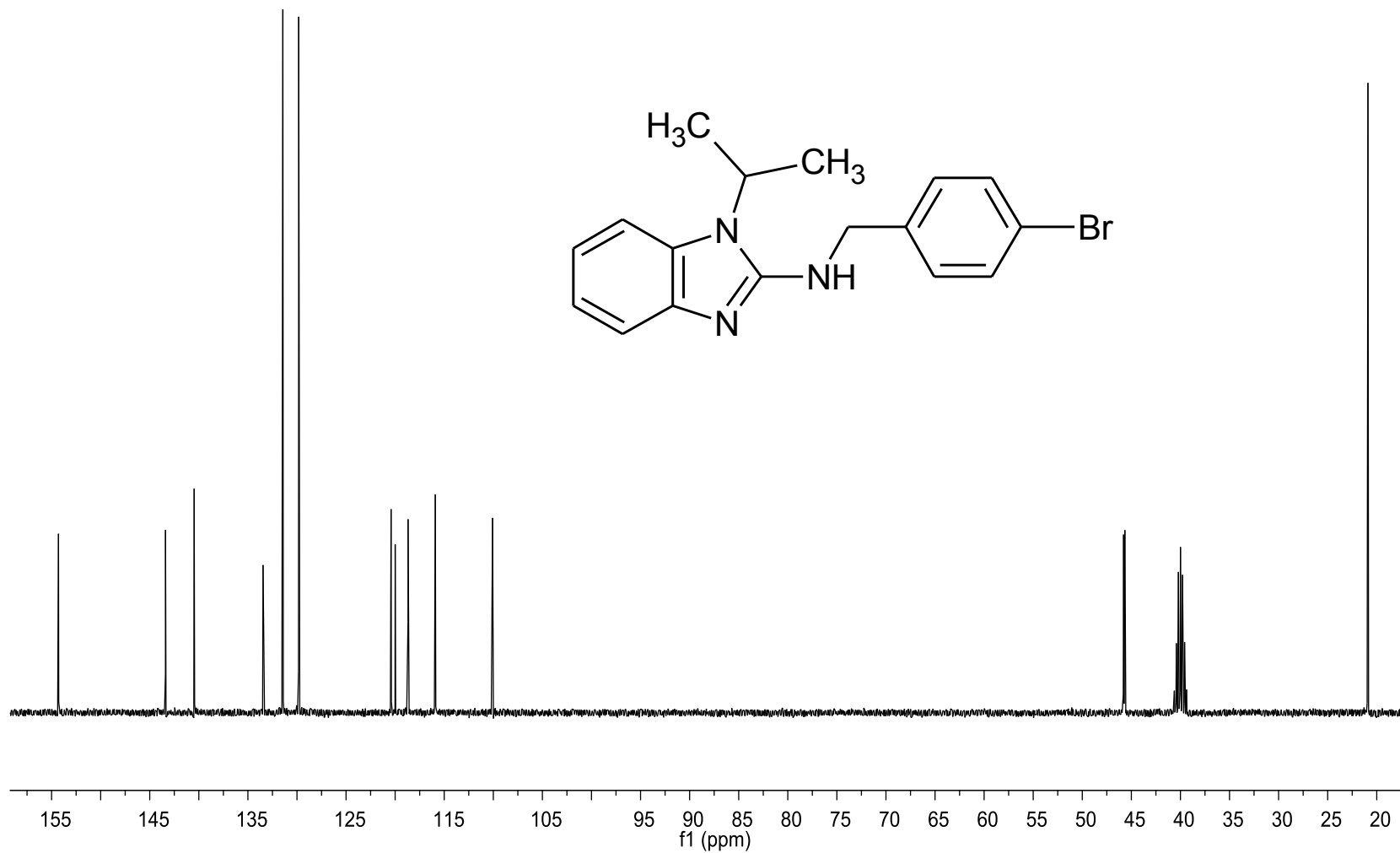


ESPECTROS

Espectro 30. EM (IE) *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1*H*-bencimidazol (15).

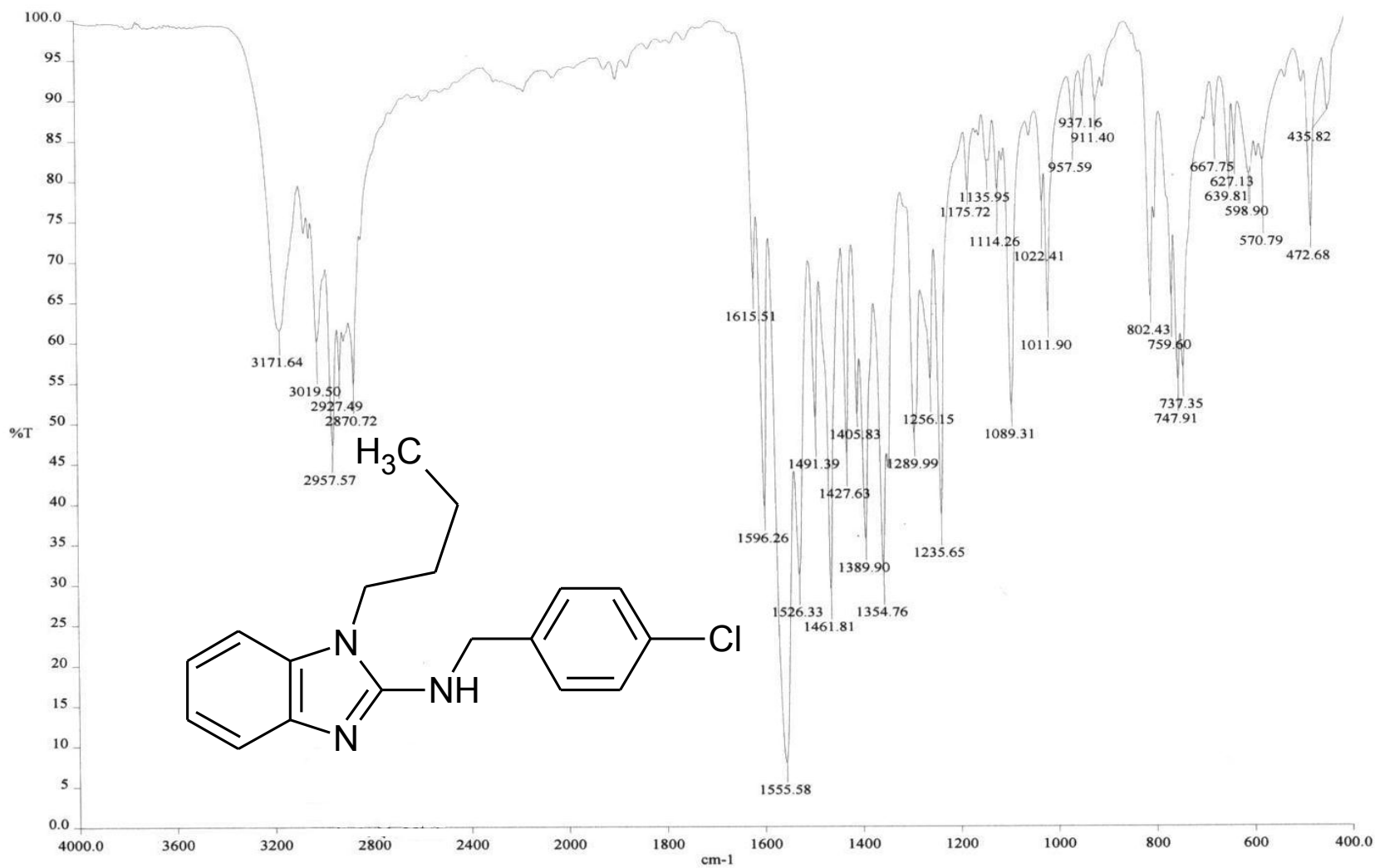


Espectro 31. RMN ^1H *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1*H*-bencimidazol (15).

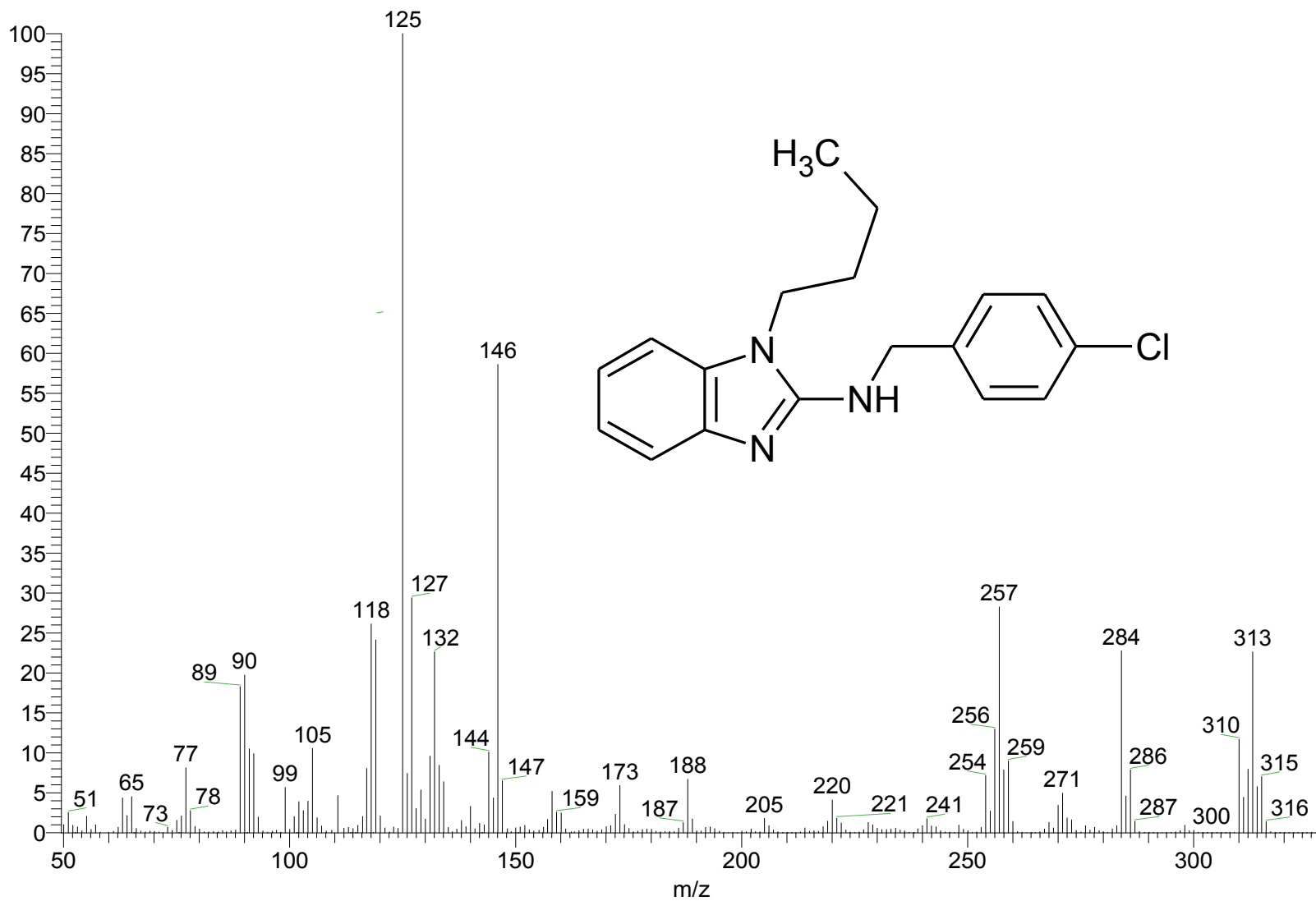


110

Espectro 32. RMN ¹³C *N*-(4-bromobencil)-2-amino-1-(isopropil)-1*H*-bencimidazol (15).



Espectro 33. IR 2-amino-1-butyl-N-(4-clorobencil)-1H-bencimidazol (16).

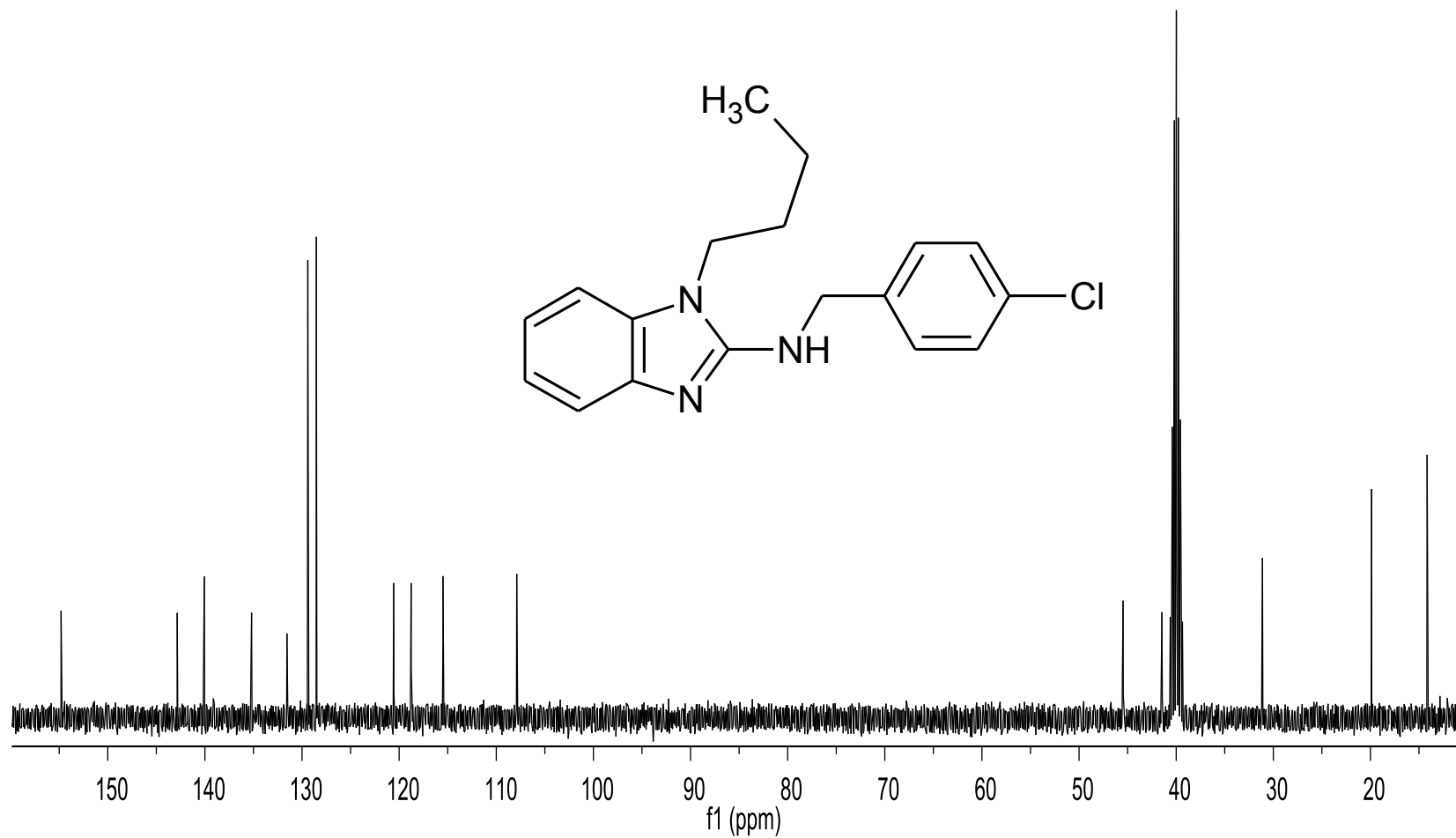


ESPECTROS

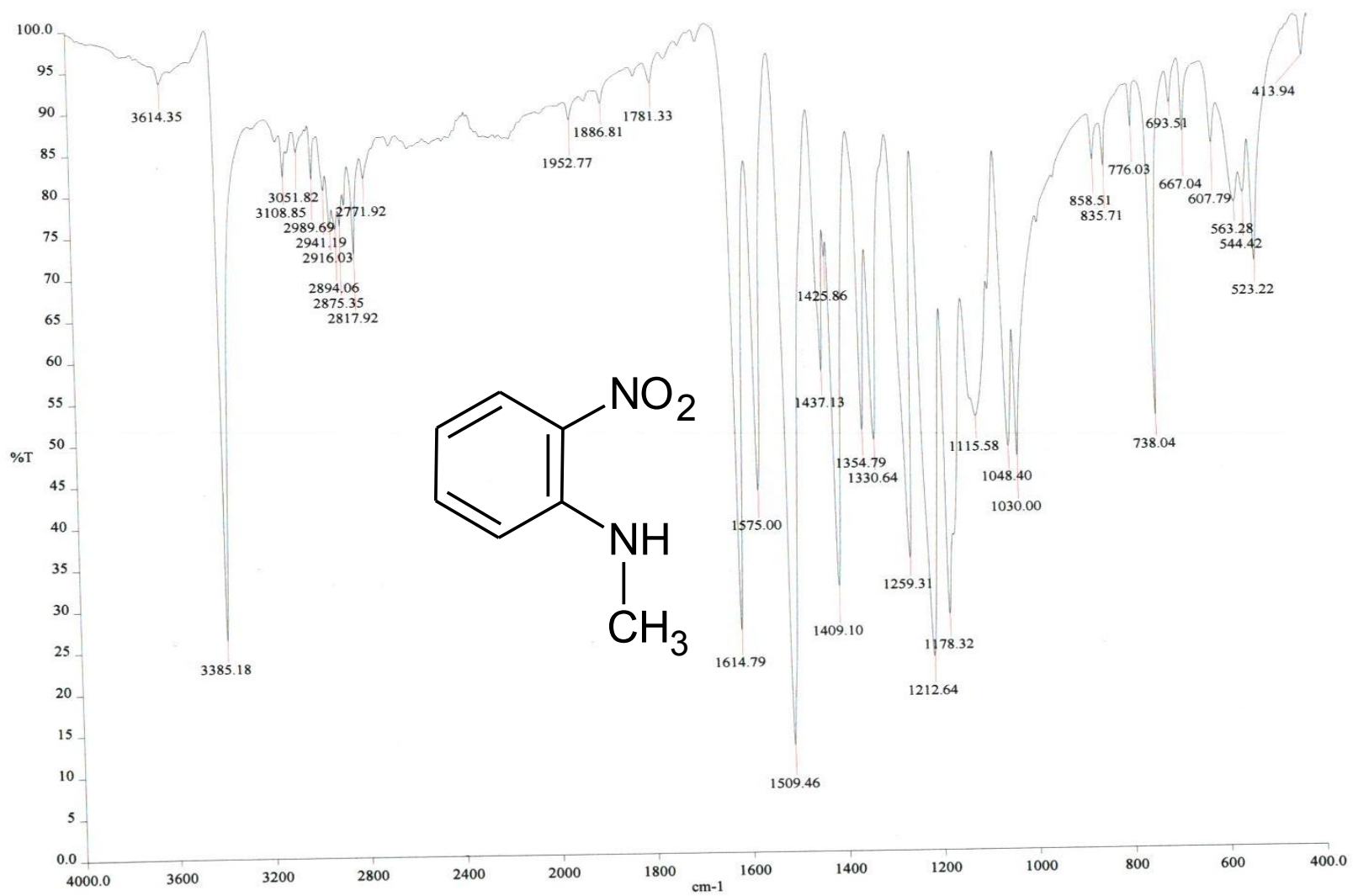
Espectro 34. EM (IE) 2-amino-1-butyl-N-(4-clorobencil)-1H-bencimidazol (16).



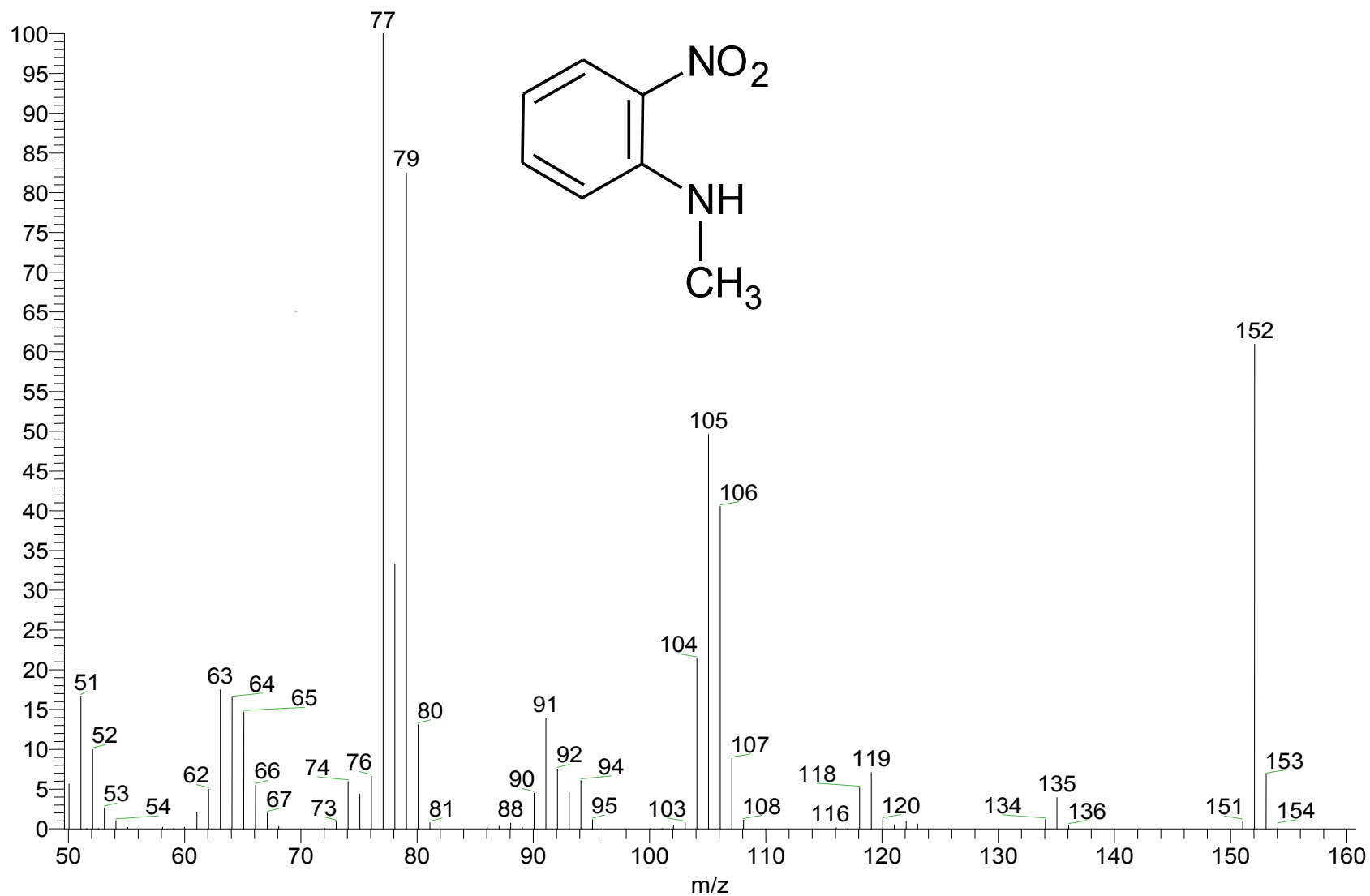
Espectro 35. RMN ¹H 2-amino-1-butyl-N-(4-clorobencil)-1H-bencimidazol (16).



Espectro 36. RMN ¹³C RMN 2-amino-1-butyl-*N*-(4-clorobencil)-1*H*-bencimidazol (16).



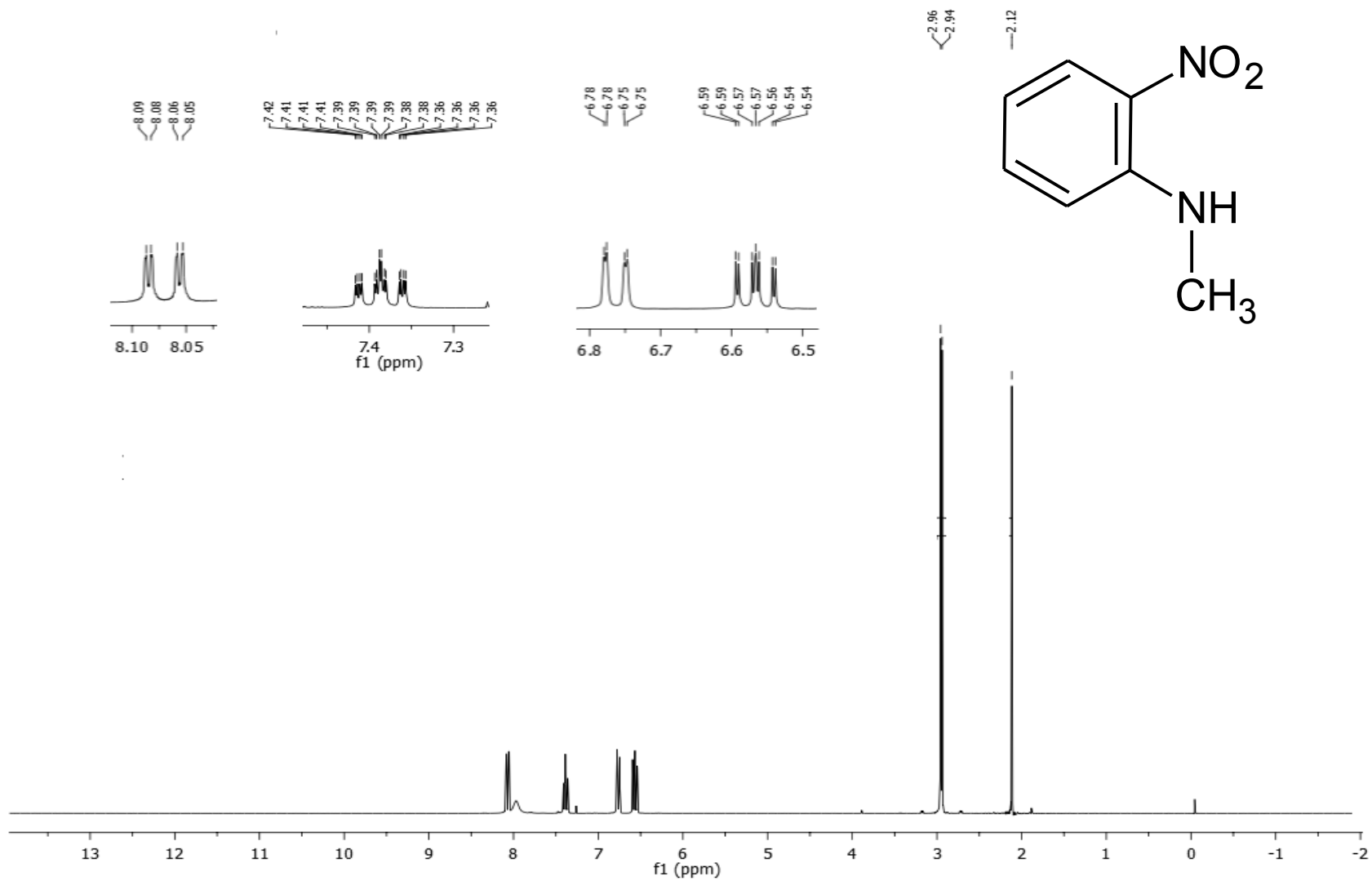
Espectro 37. IR *N*-Metil-2-nitroanilina (3a).



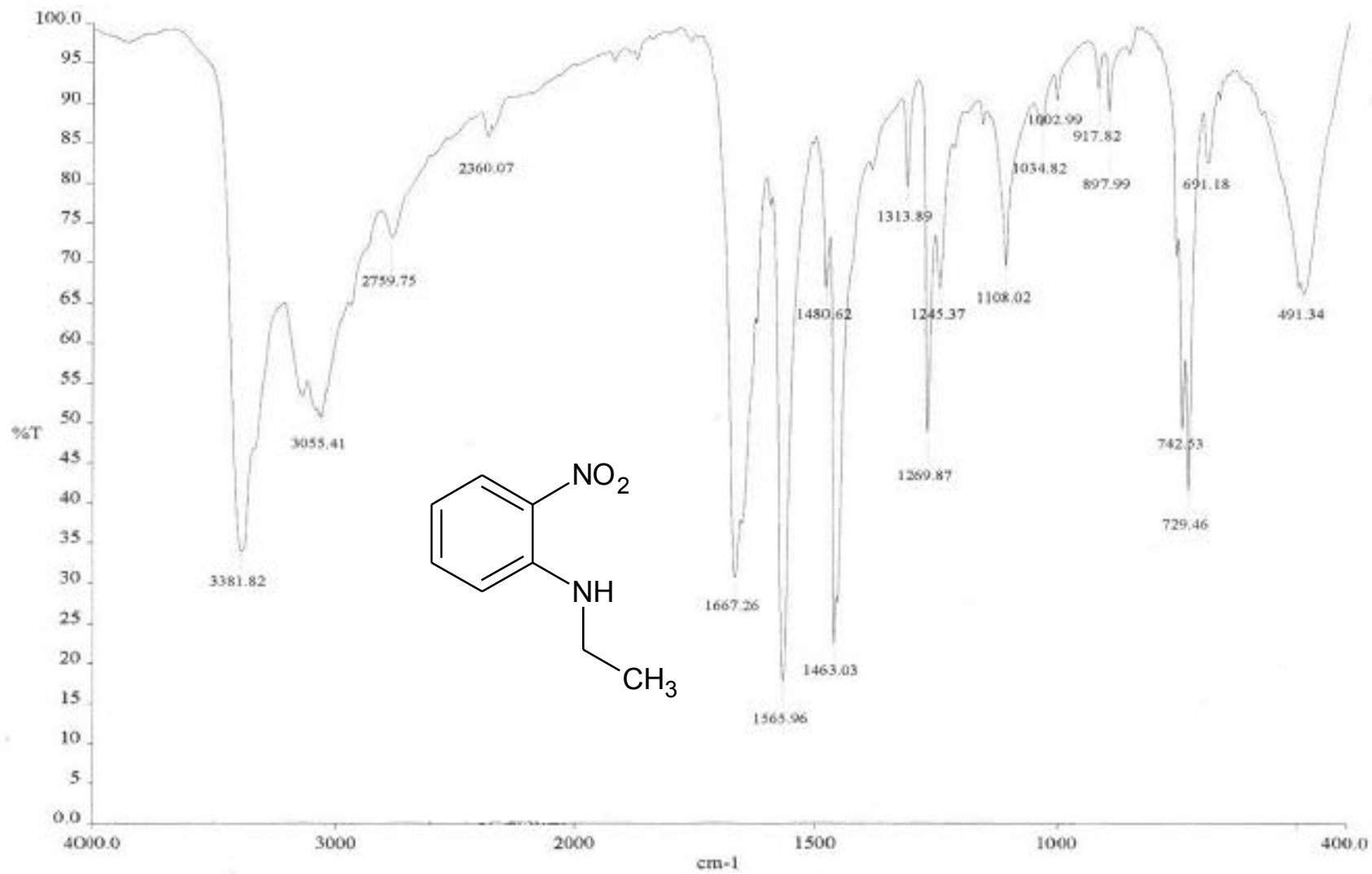
Espectro 38. EM (IE) *N*-Metil-2-nitroanilina (3a).

116

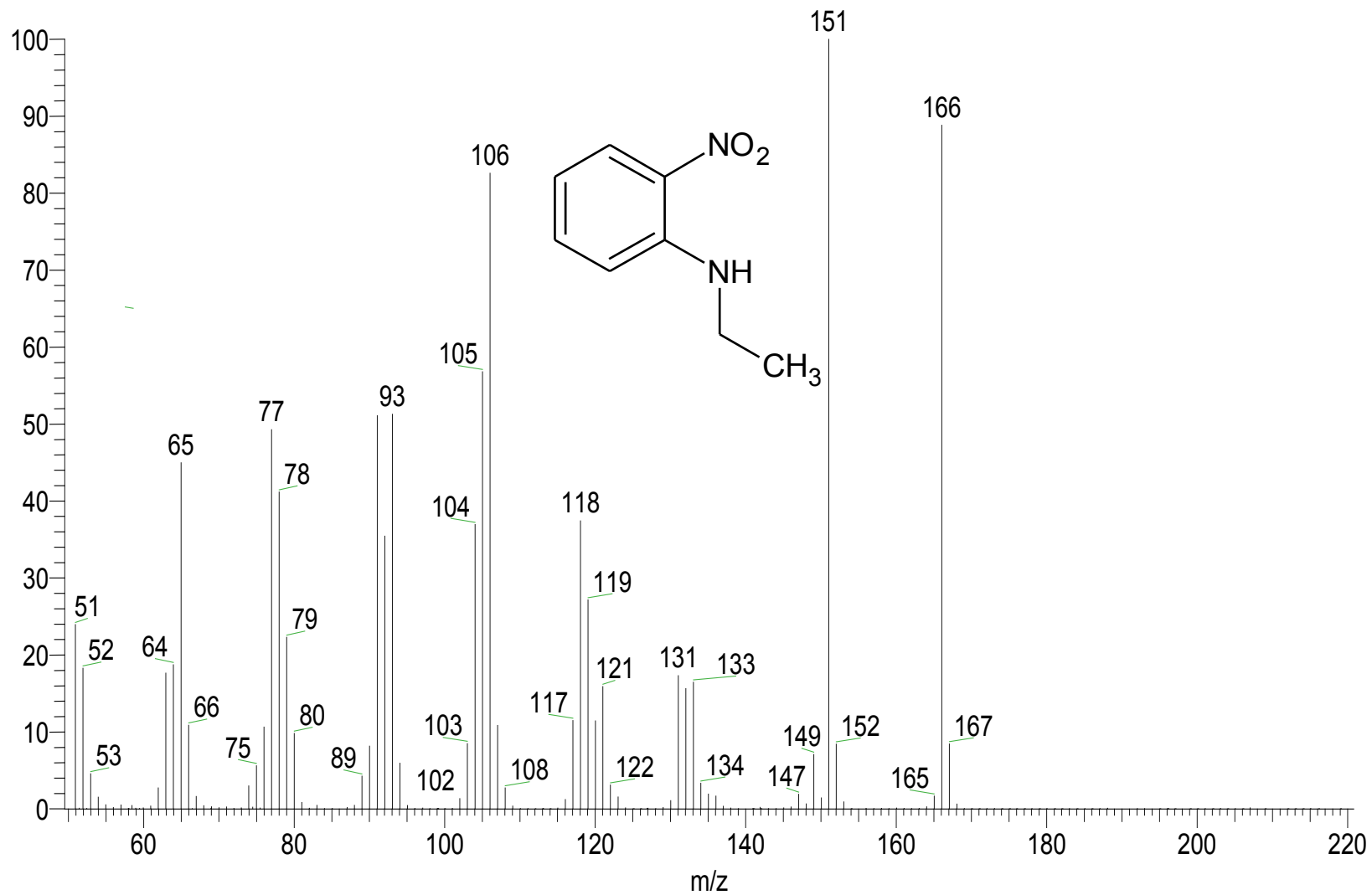
ESPECTROS



Espectro 39. RMN ^1H N- Metil-2-nitroanilina (3a).

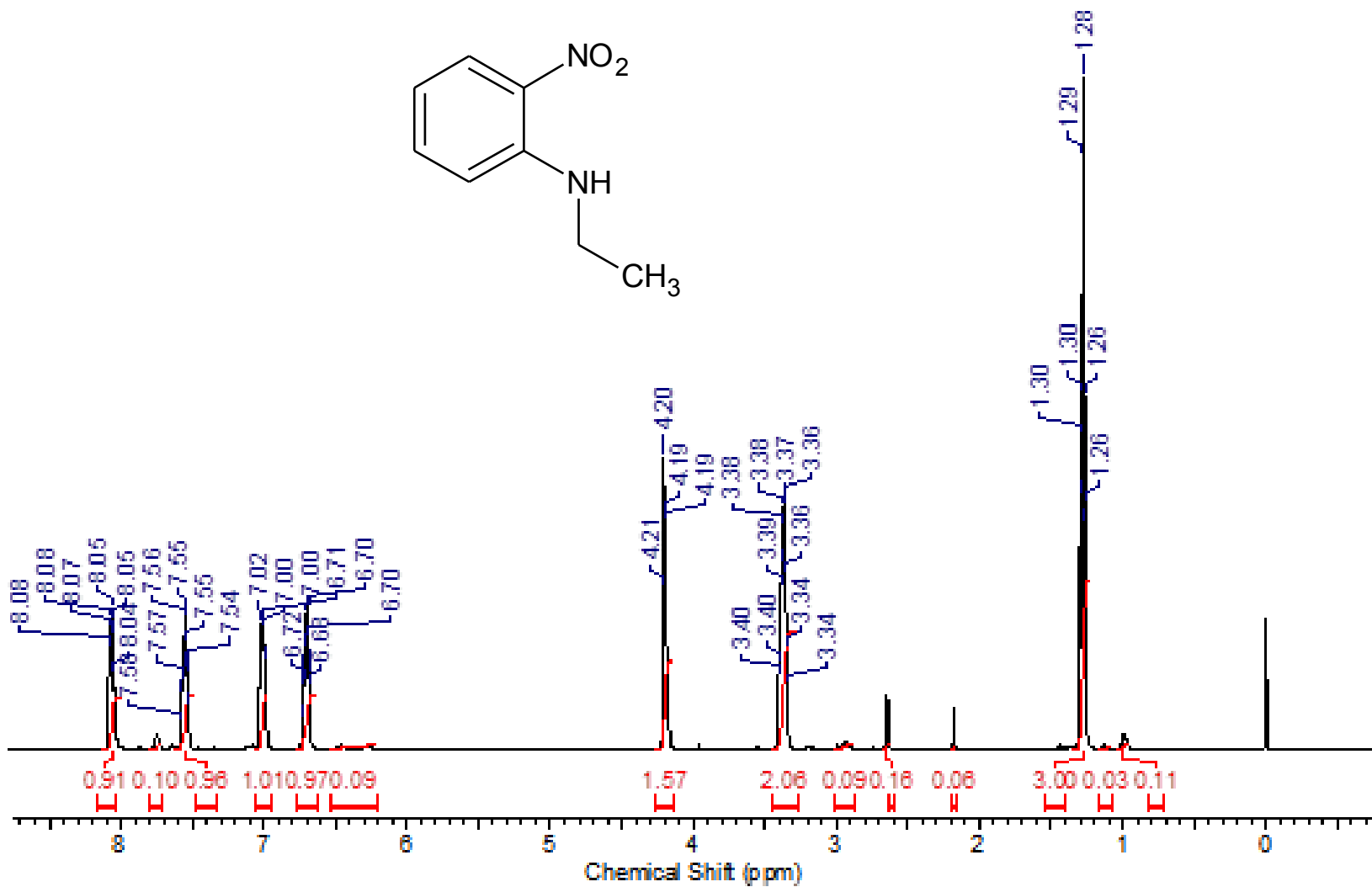


Espectro 40. IR N- Etil-2-nitroanilina (3b).

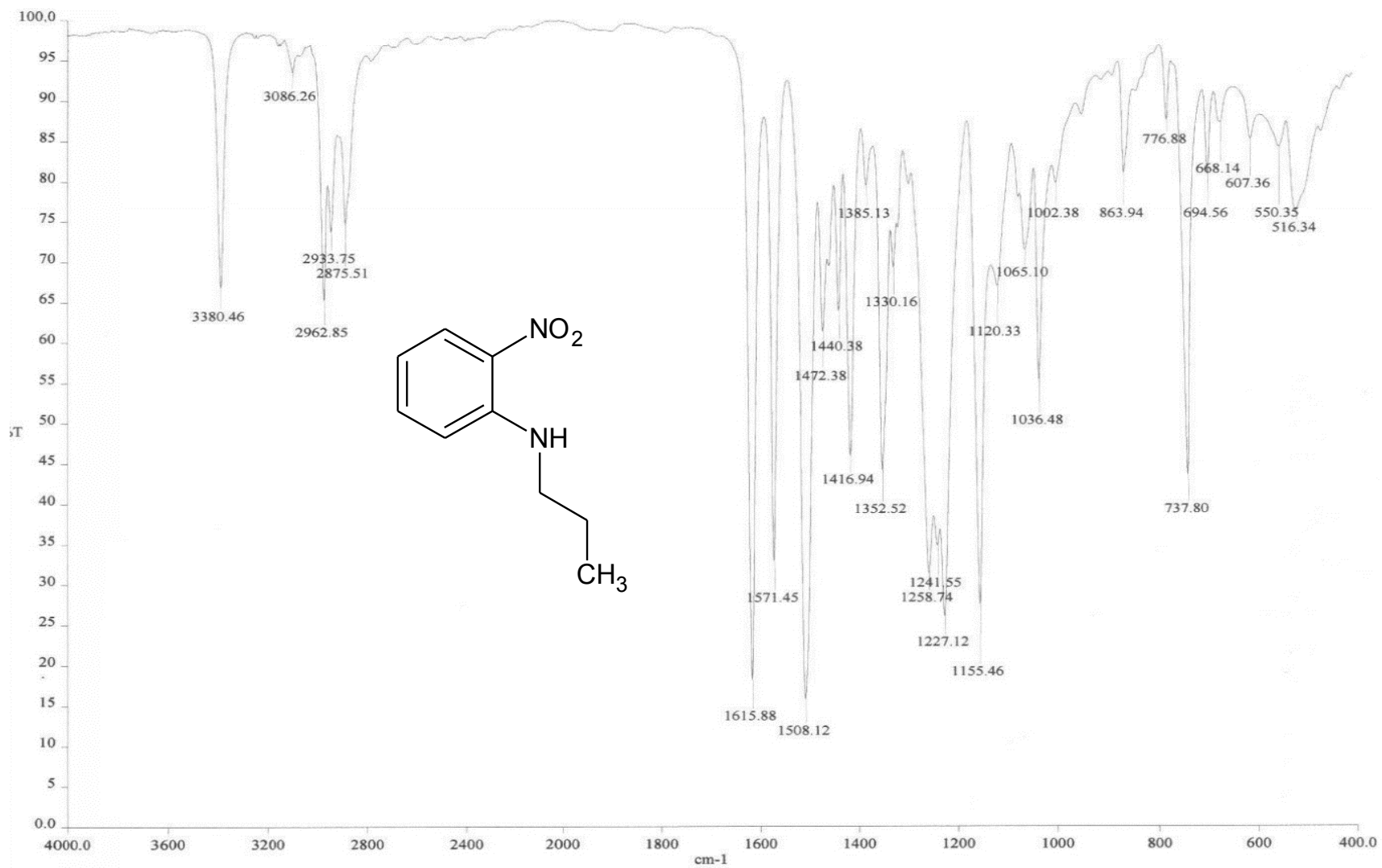


ESPECTROS

Espectro 41. EM (IE) *N*-Etil-2-nitroanilina (3b).

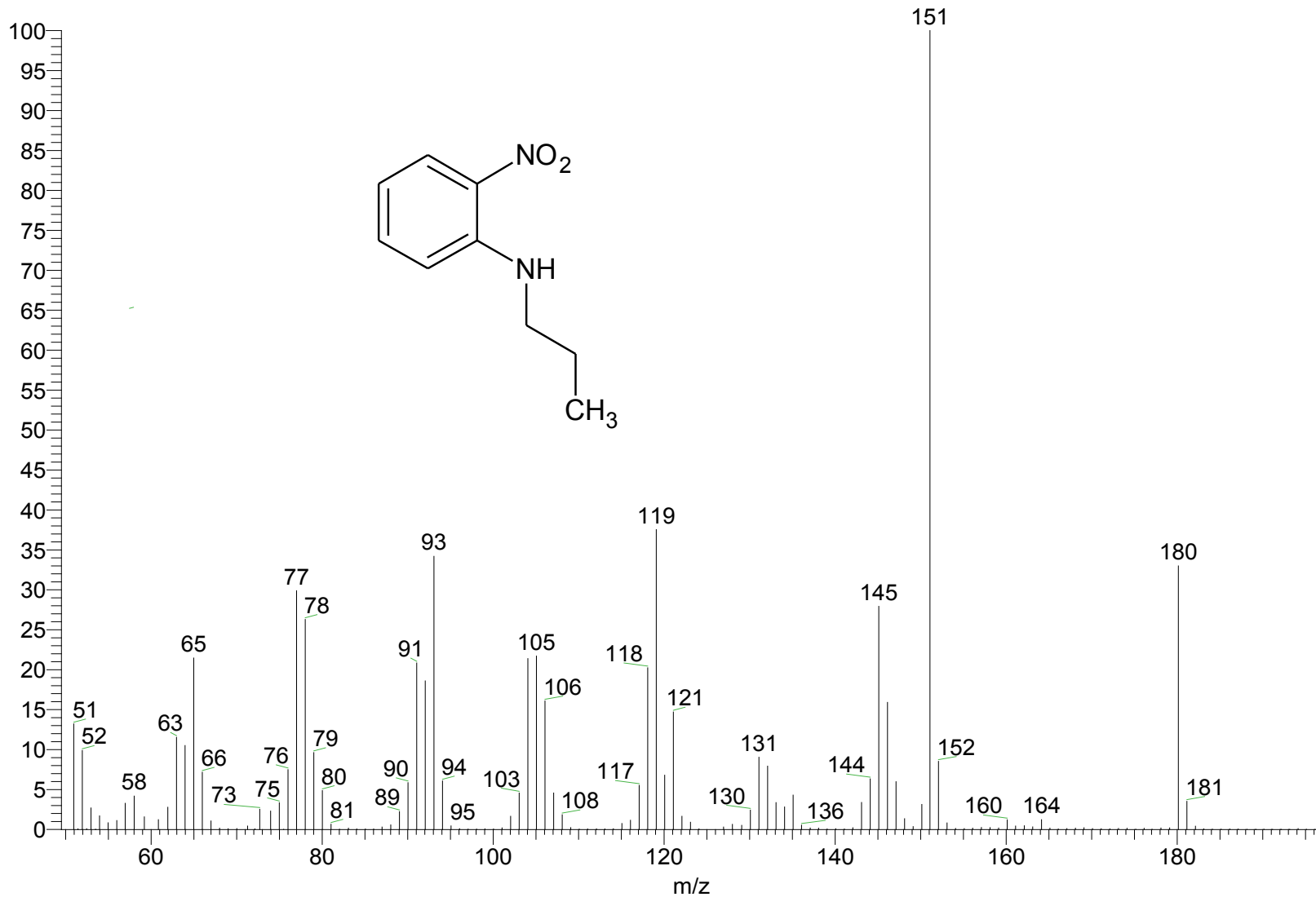


Espectro 42. RMN ¹H *N*-Etil-2-nitroanilina (3b).



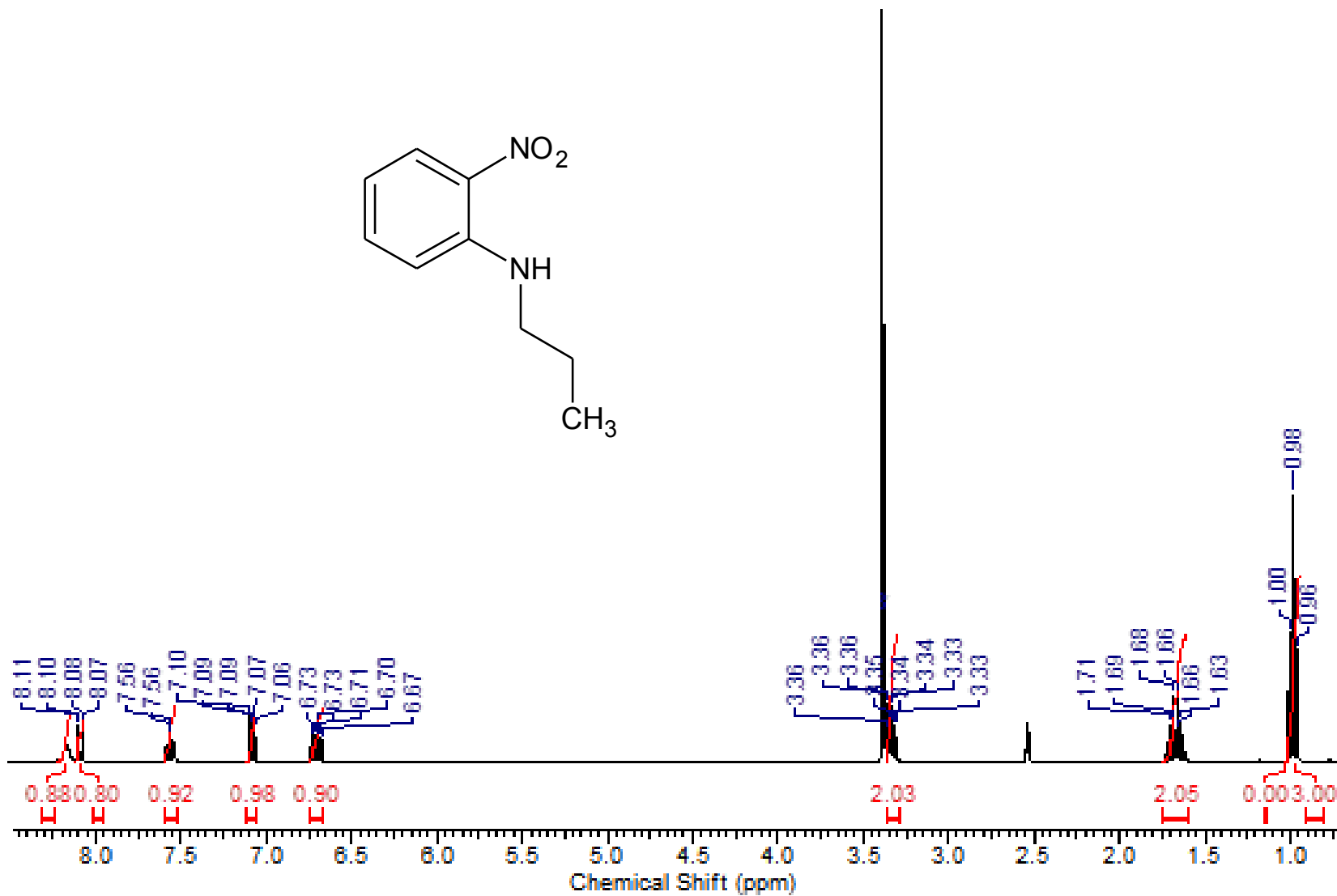
121

Espectro 43. IR *N*-Propil-2-nitroanilina (3c).

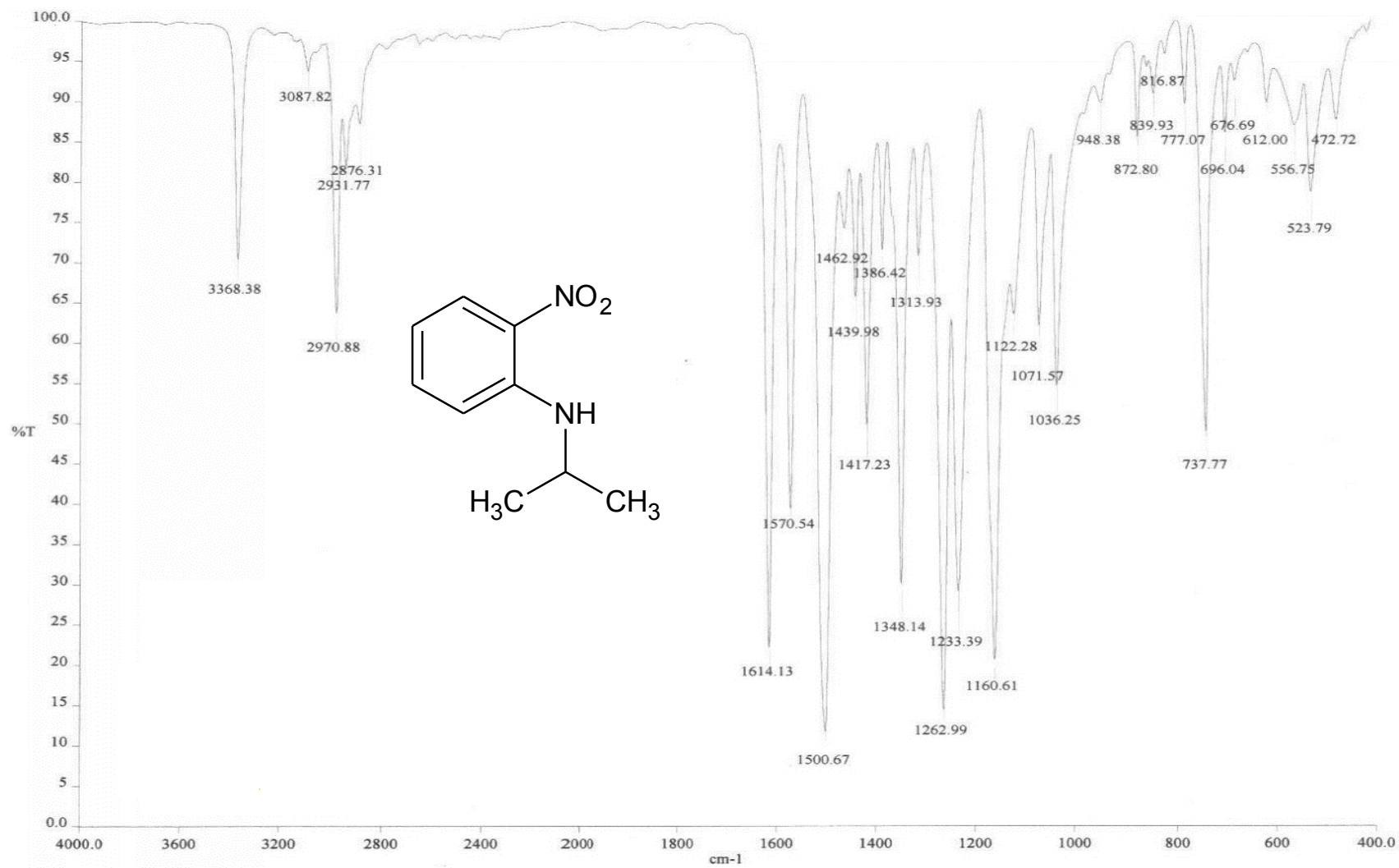


ESPECTROS

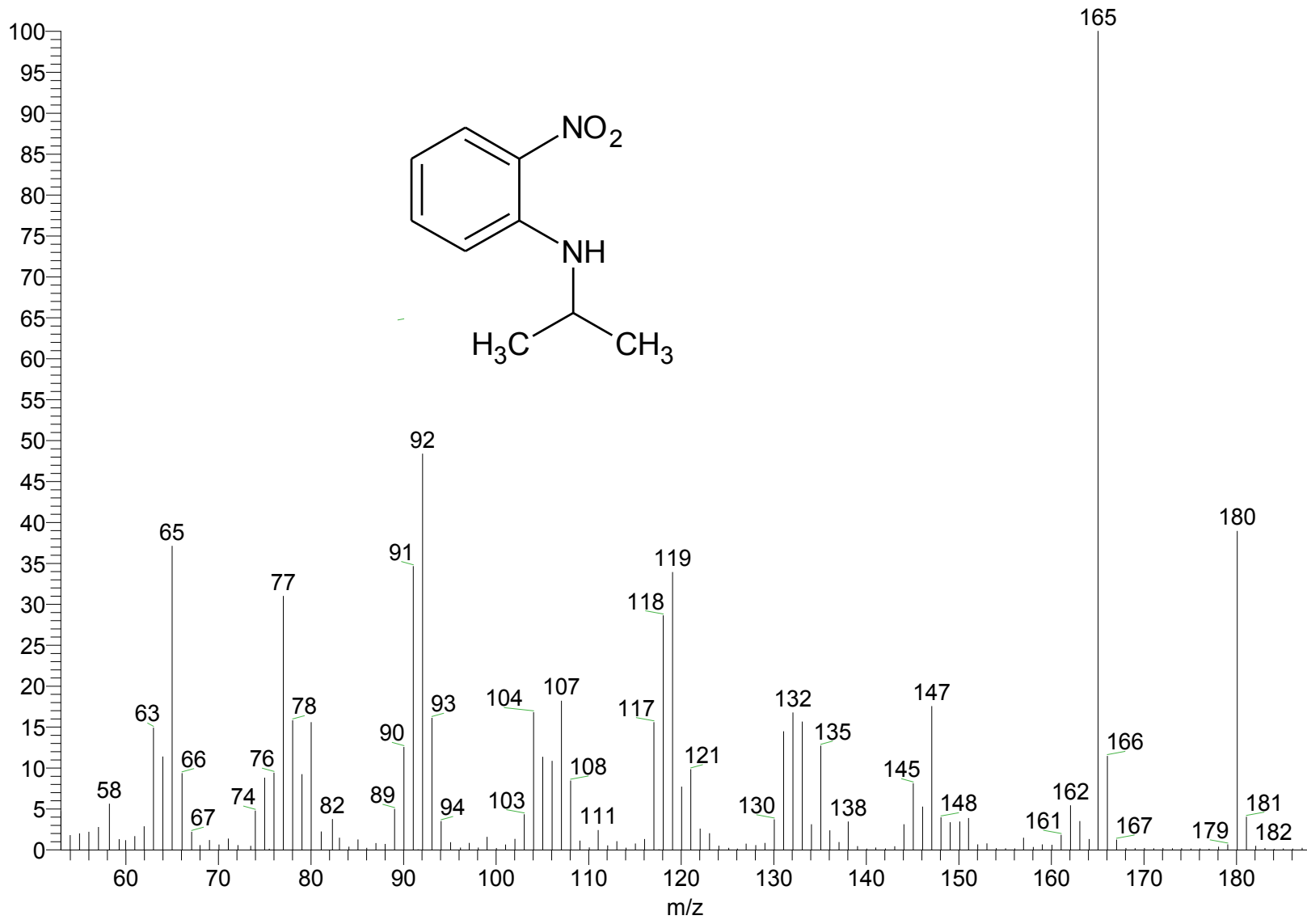
Espectro 44. EM (IE) *N*-Propil-2-nitroanilina (3c).



Espectro 45. RMN ¹H (IE) *N*-Propil-2-nitroanilina (3c).

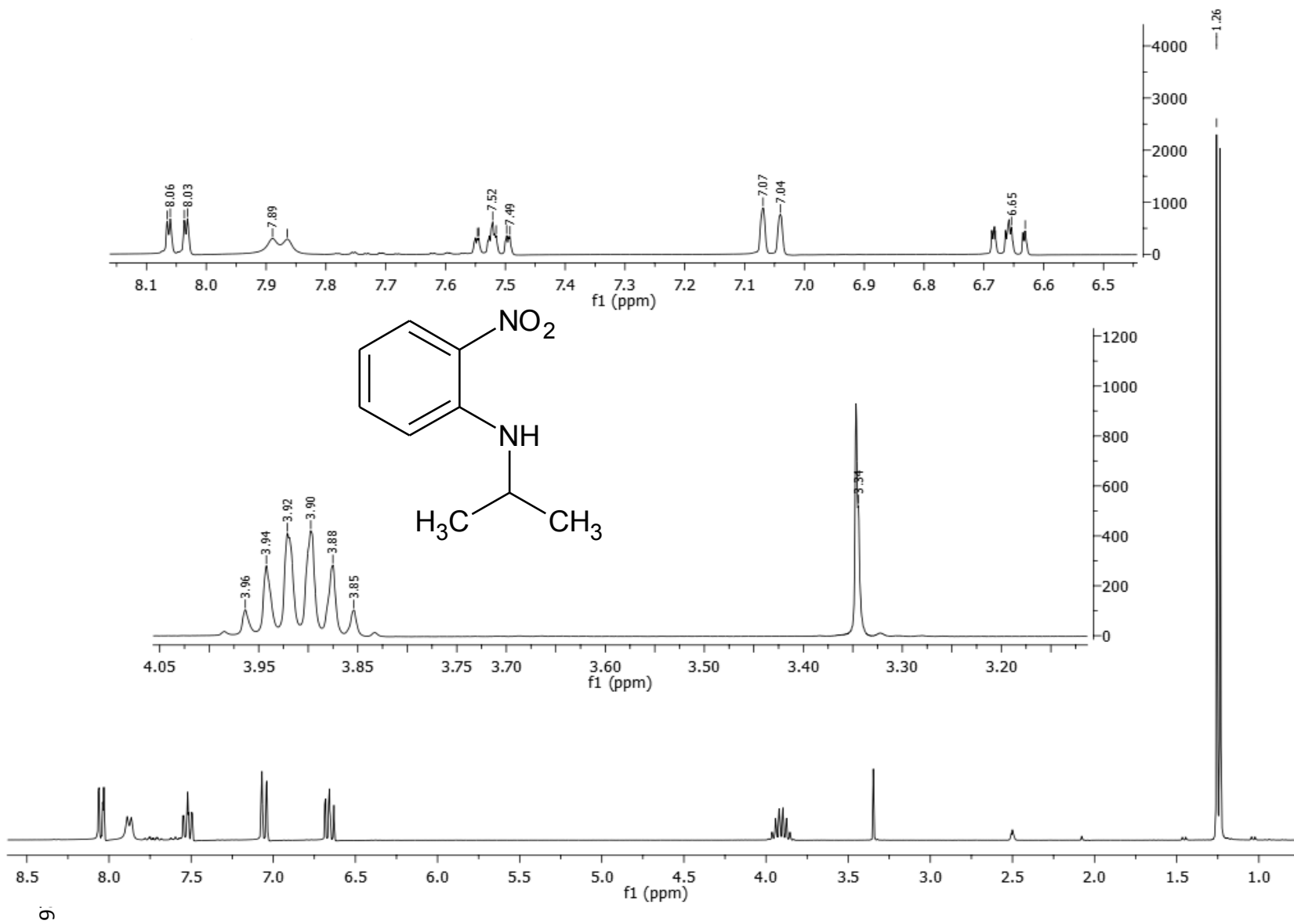


Espectro 46. IR *N*-Isopropil-2-nitroanilina (3d).

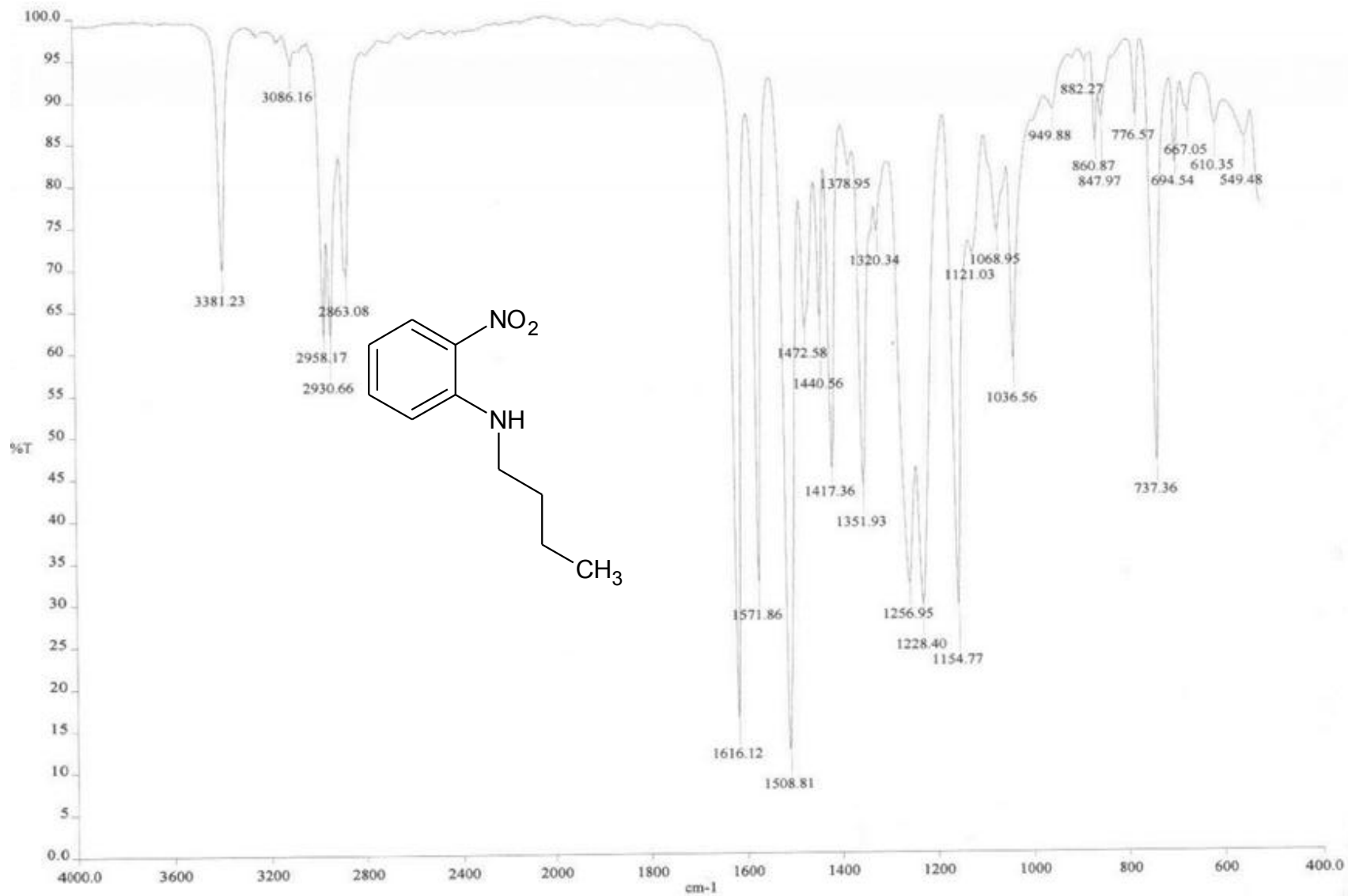


ESPECTROS

Espectro 47. EM (IE) N-Isopropil-2-nitroanilina (3d).

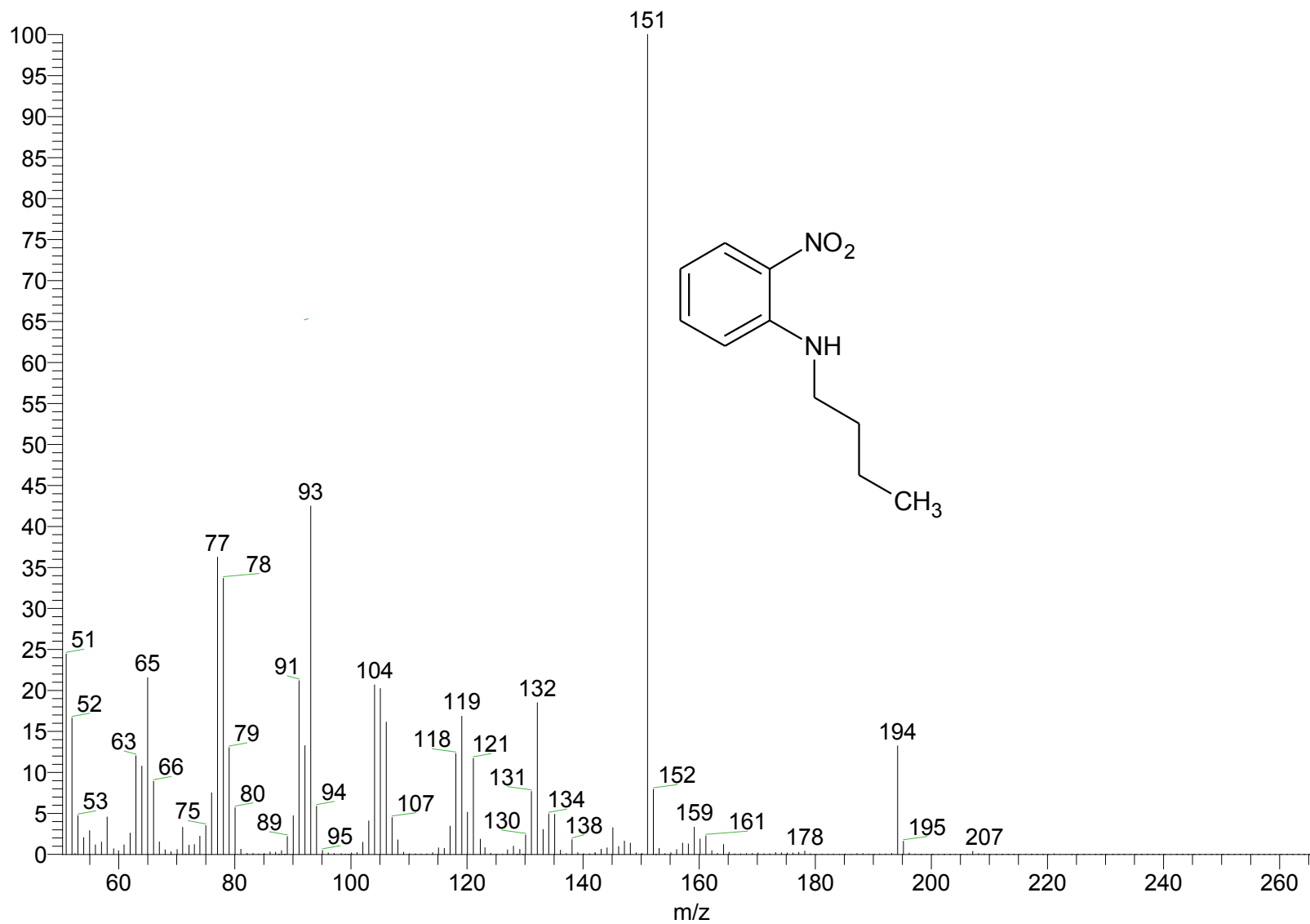


Espectro 48. RMN ^1H N-Isopropil-2-nitroanilina (3d).

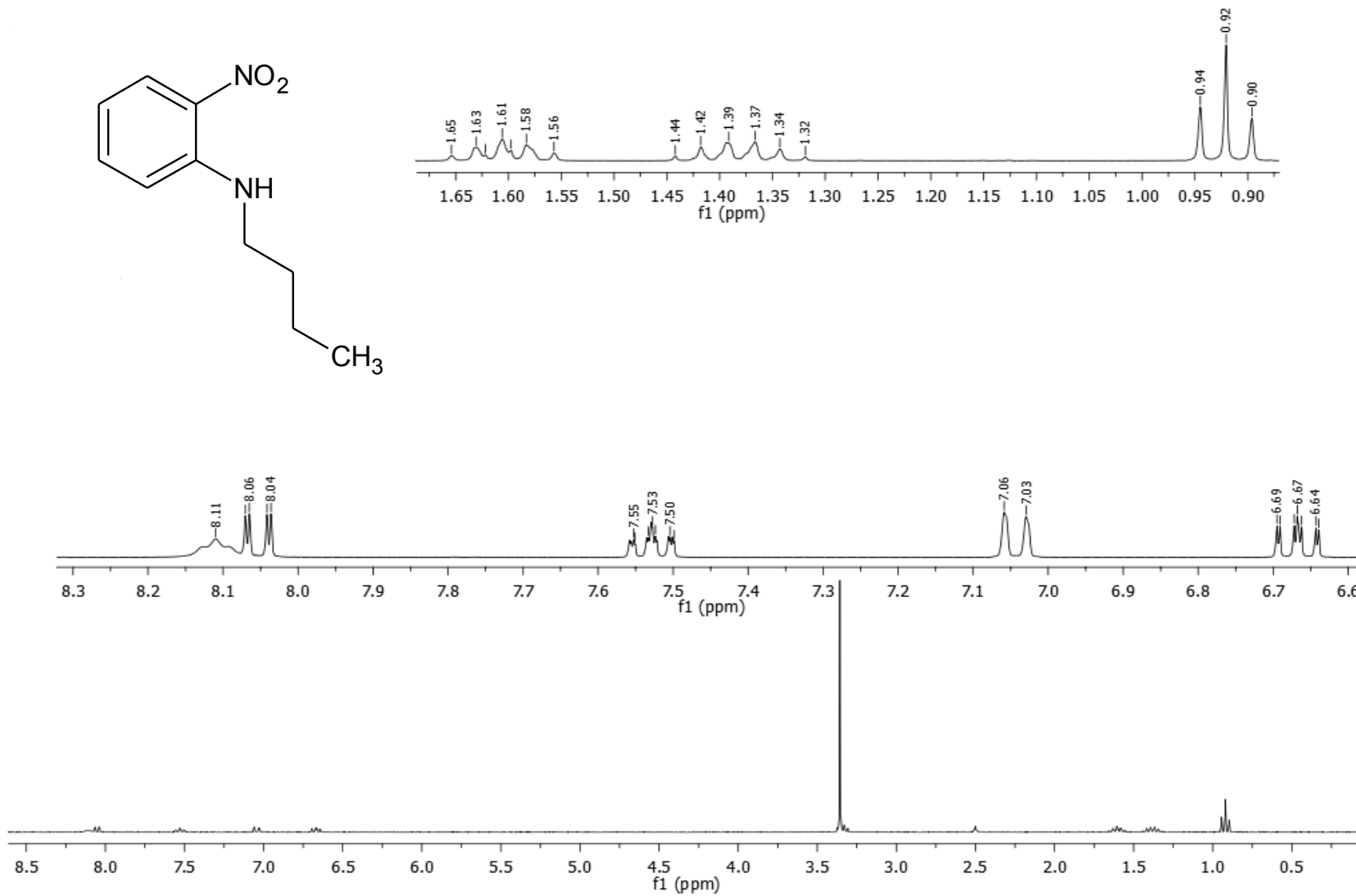


127

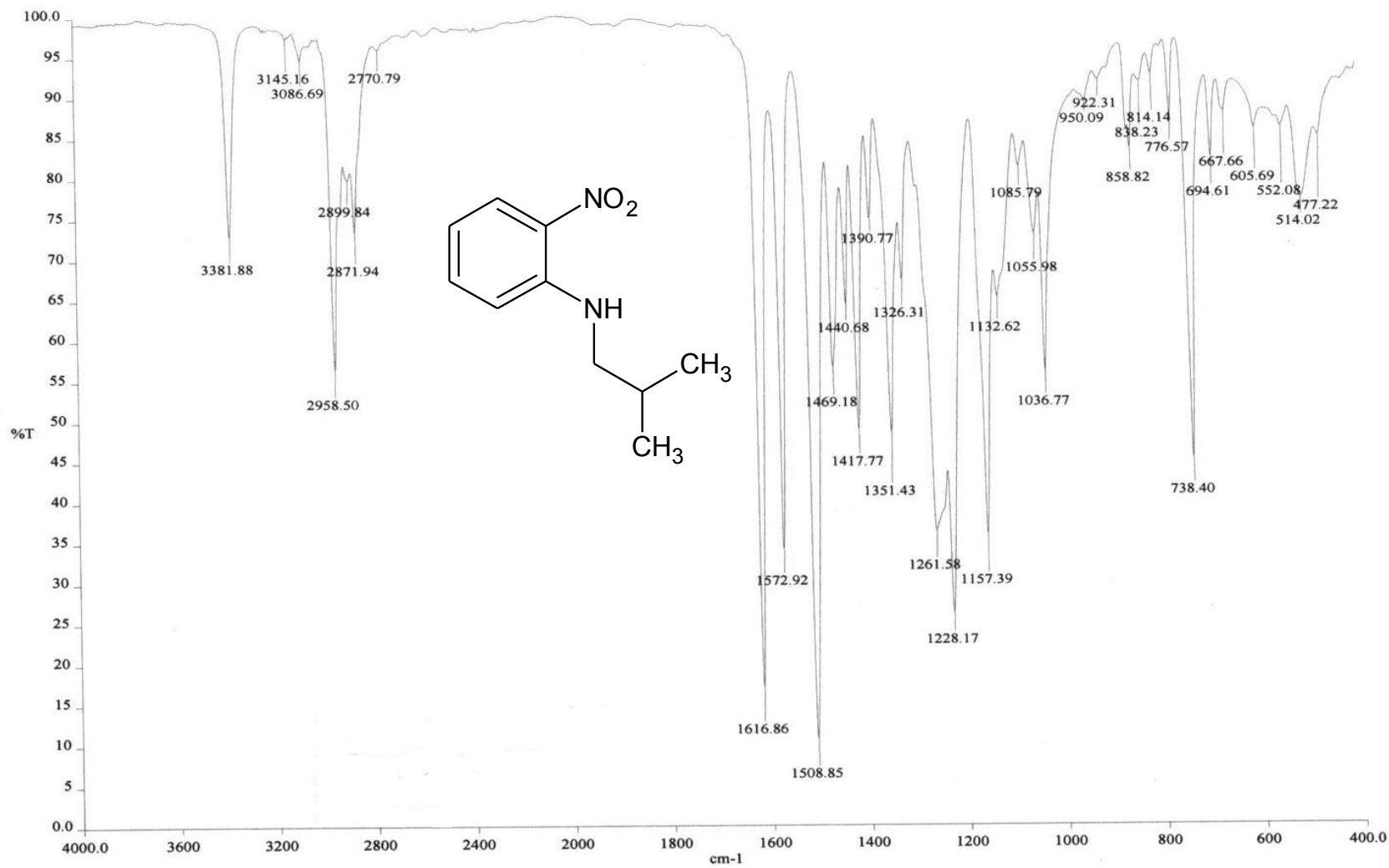
Espectro 49. IR *N*-Butil-2-nitroanilina (3e).



Espectro 50. EM (IE) *N*-Butil-2-nitroanilina (3e).

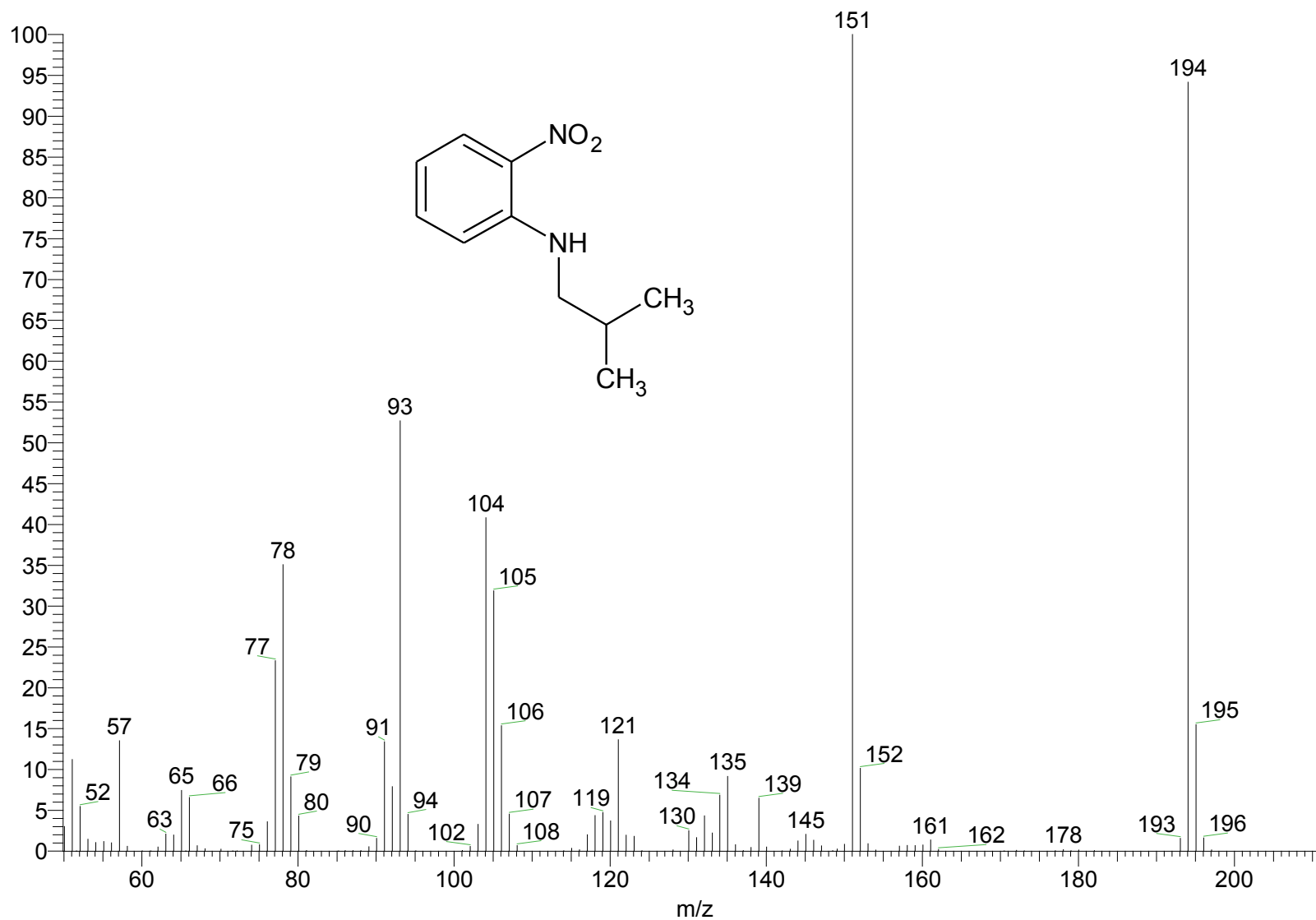


Espectro 51. RMN ^1H *N*-Butil-2-nitroanilina (3e).



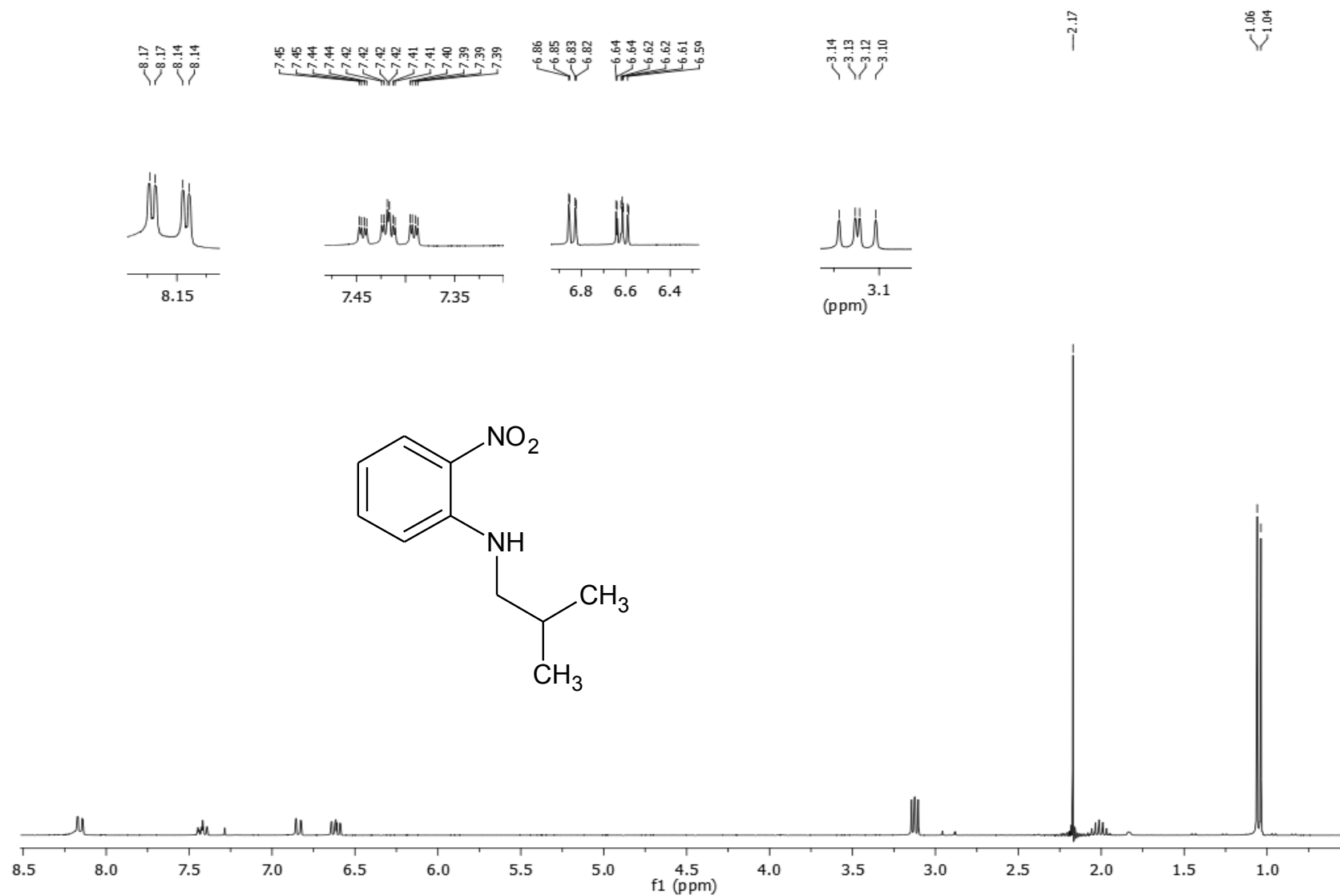
130

Espectro 52. IR *N*-Isobutil-2-nitroanilina (3f).



ESPECTROS

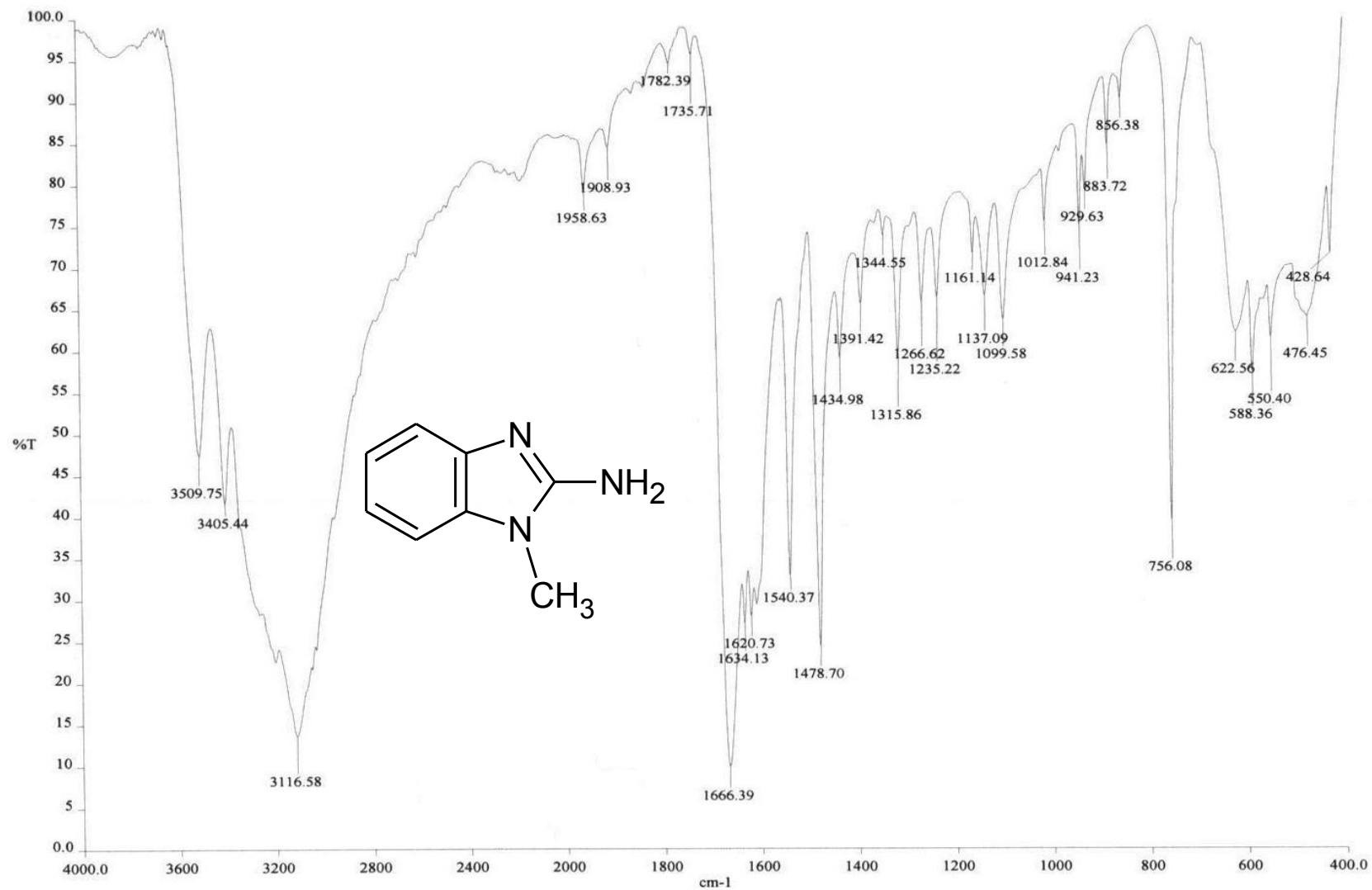
Espectro 53. EM (IE) *N*-Isobutil-2-nitroanilina (3f).



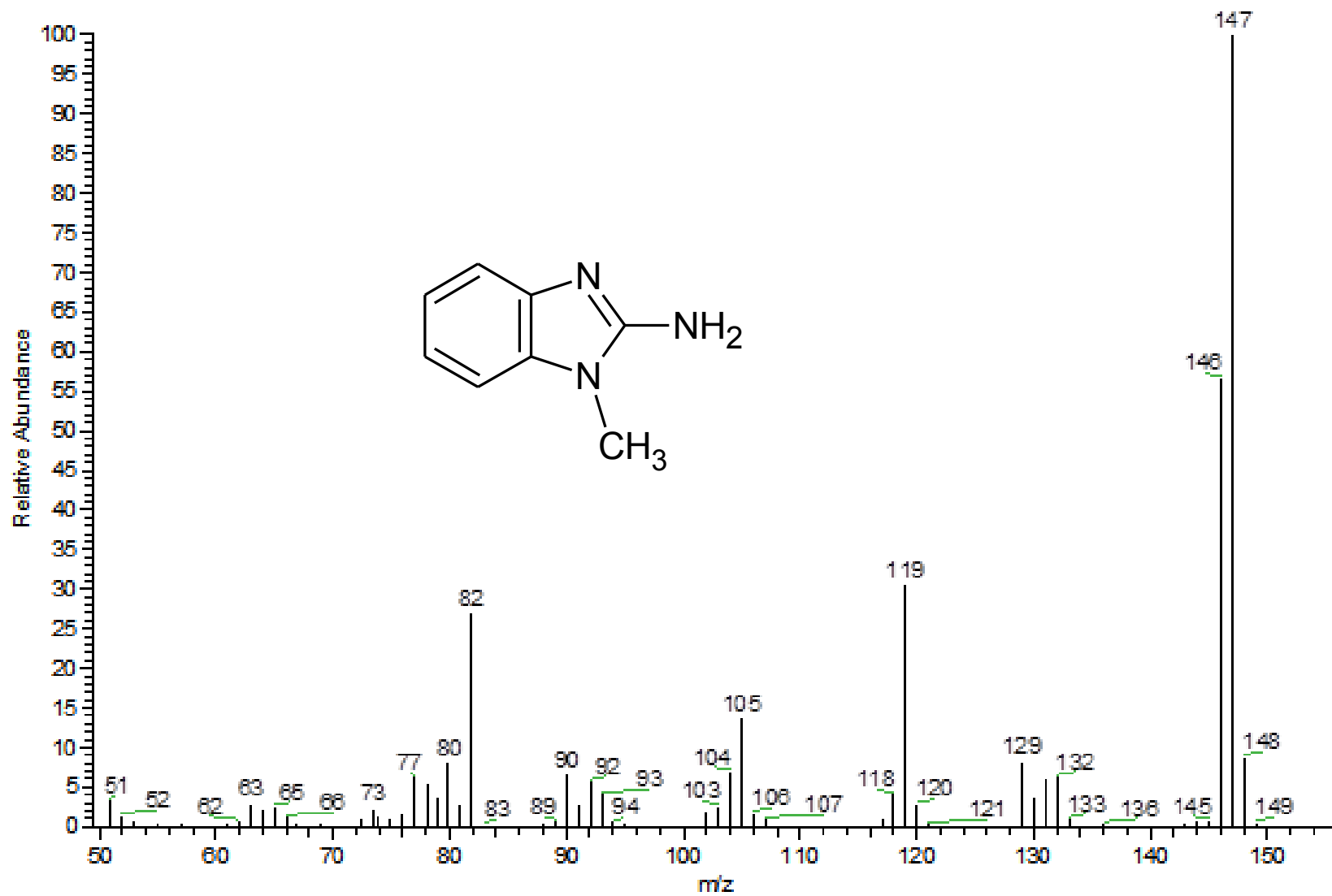
132

Espectro 54. RMN ¹H *N*-Isobutil-2-nitroanilina (3f).

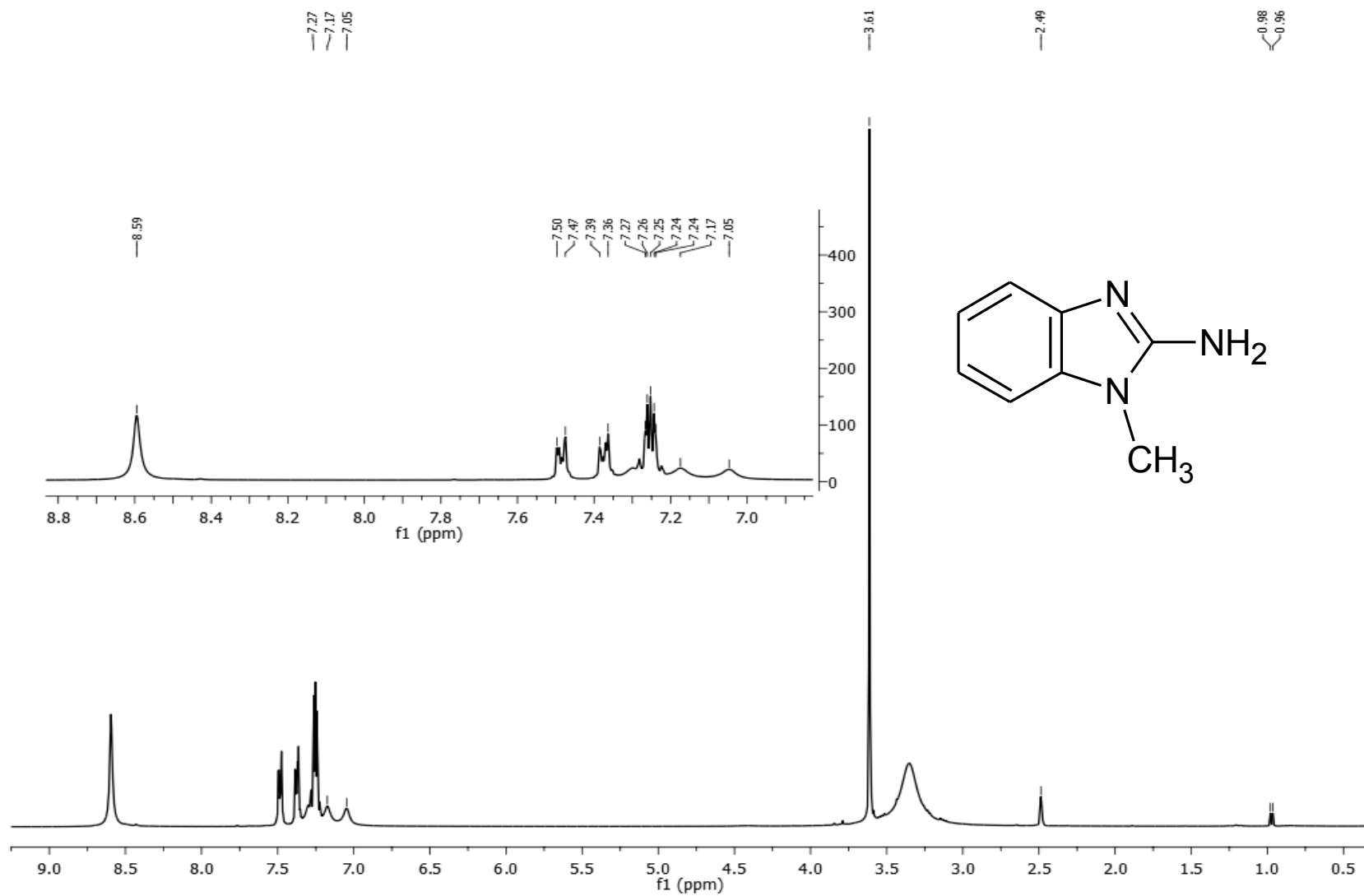
ESPECTROS



Espectro 55. IR 1-Metil-2-amino-1H-bencimidazol (5a)

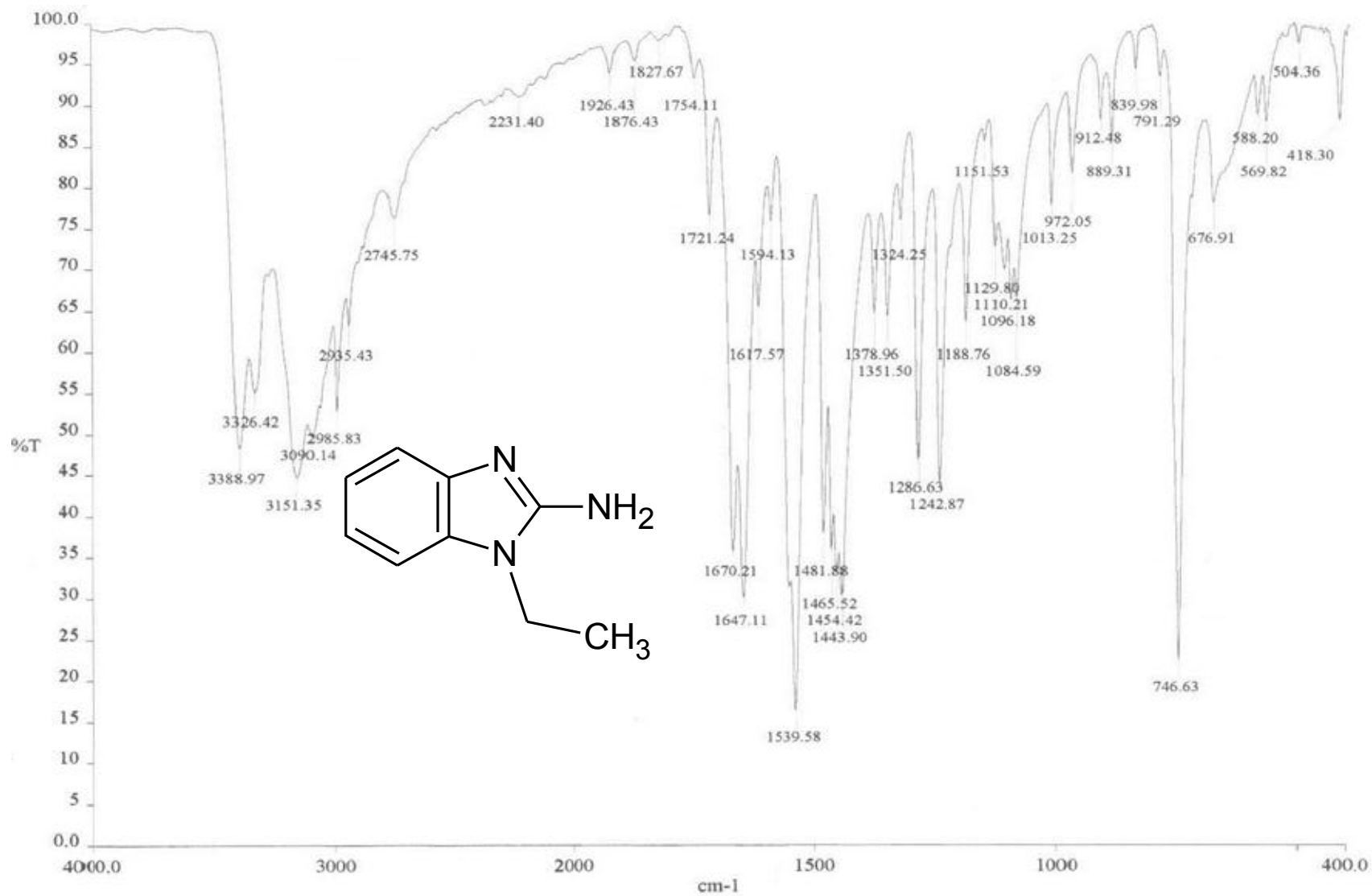


Espectro 56. EM (IE) 1-Metil-2-amino-1H-bencimidazol (5a).

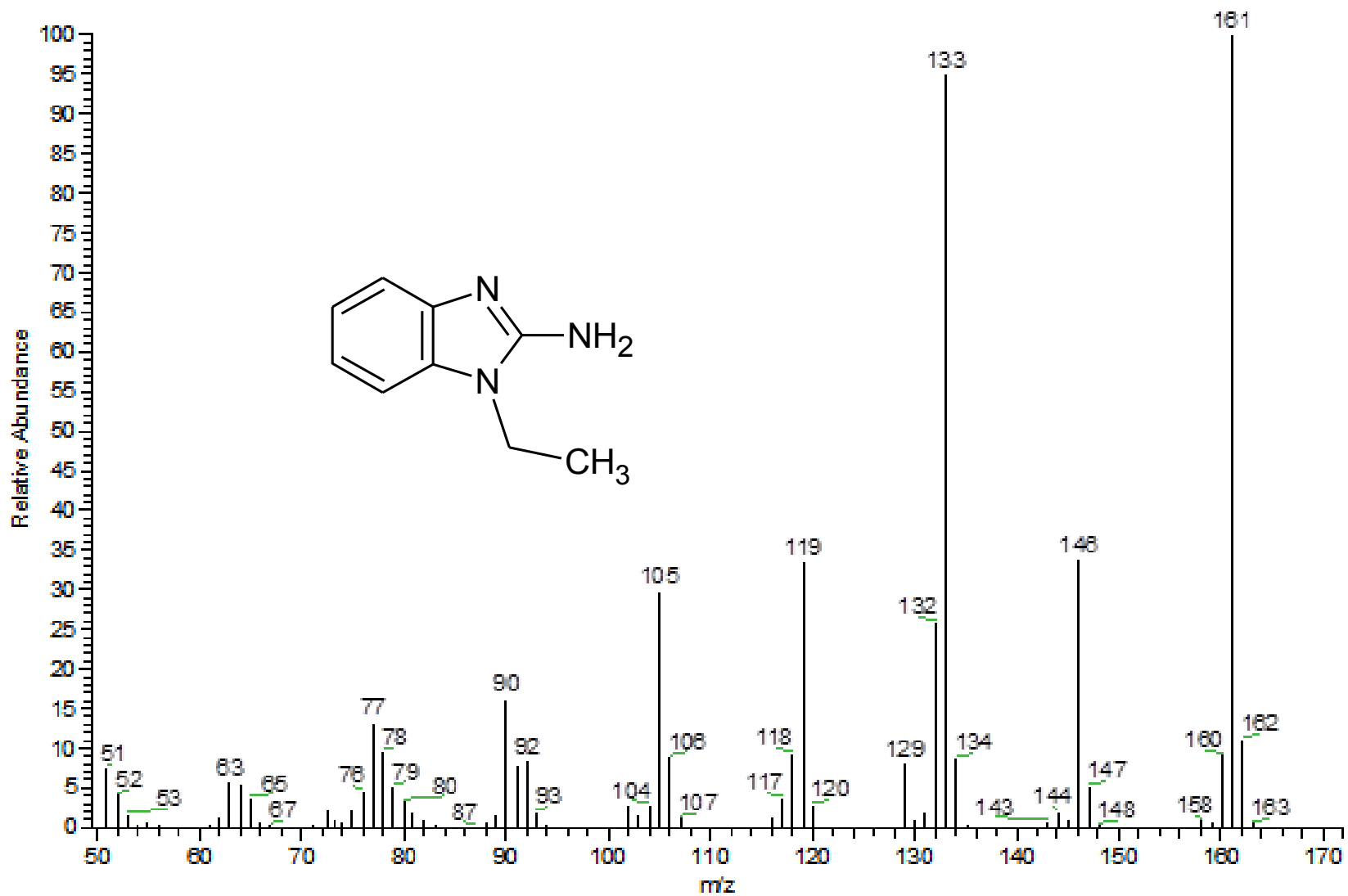


135

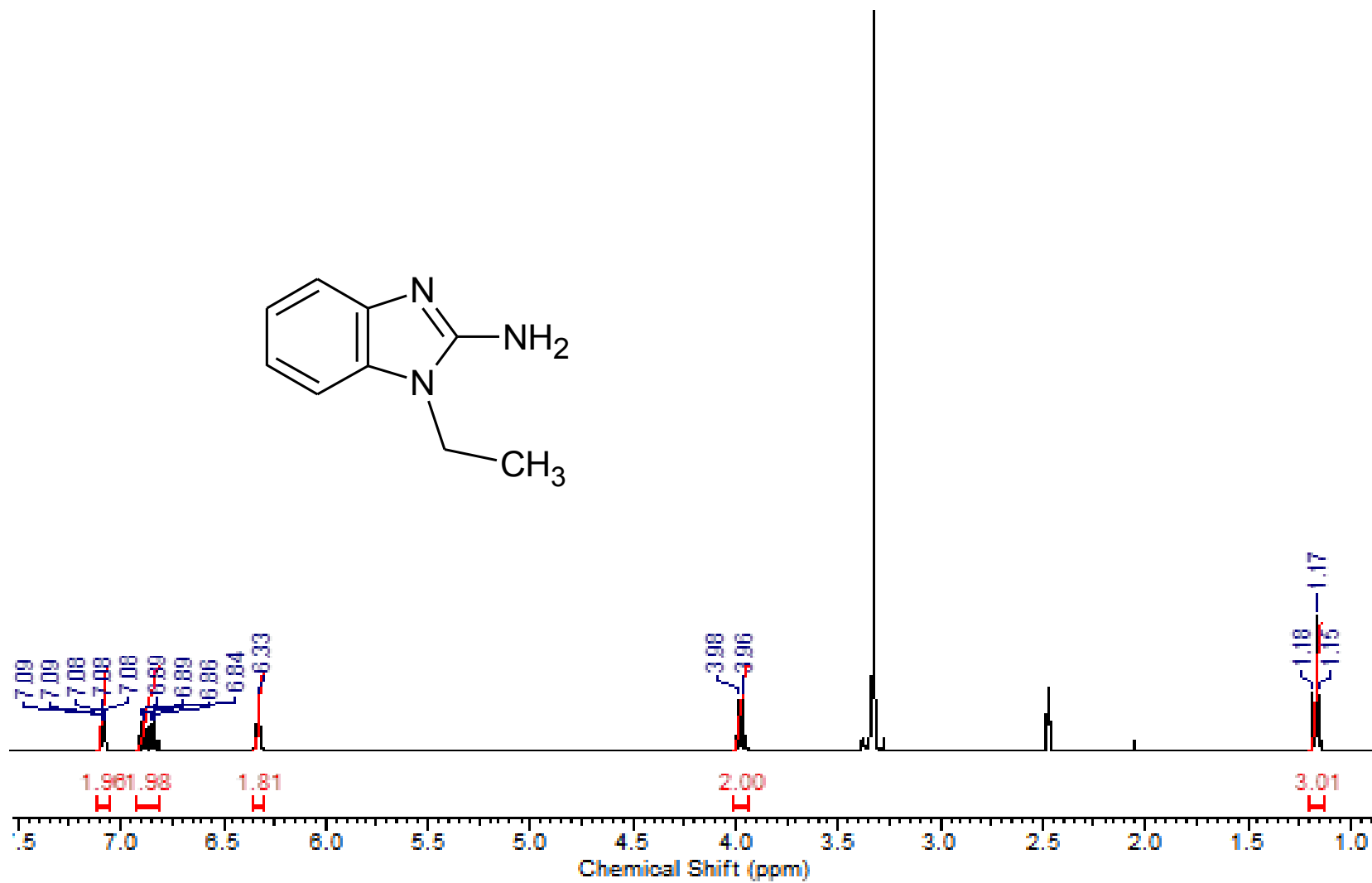
Espectro 57. RMN ¹H 1-Metil-2-amino-1H-bencimidazol (5a).

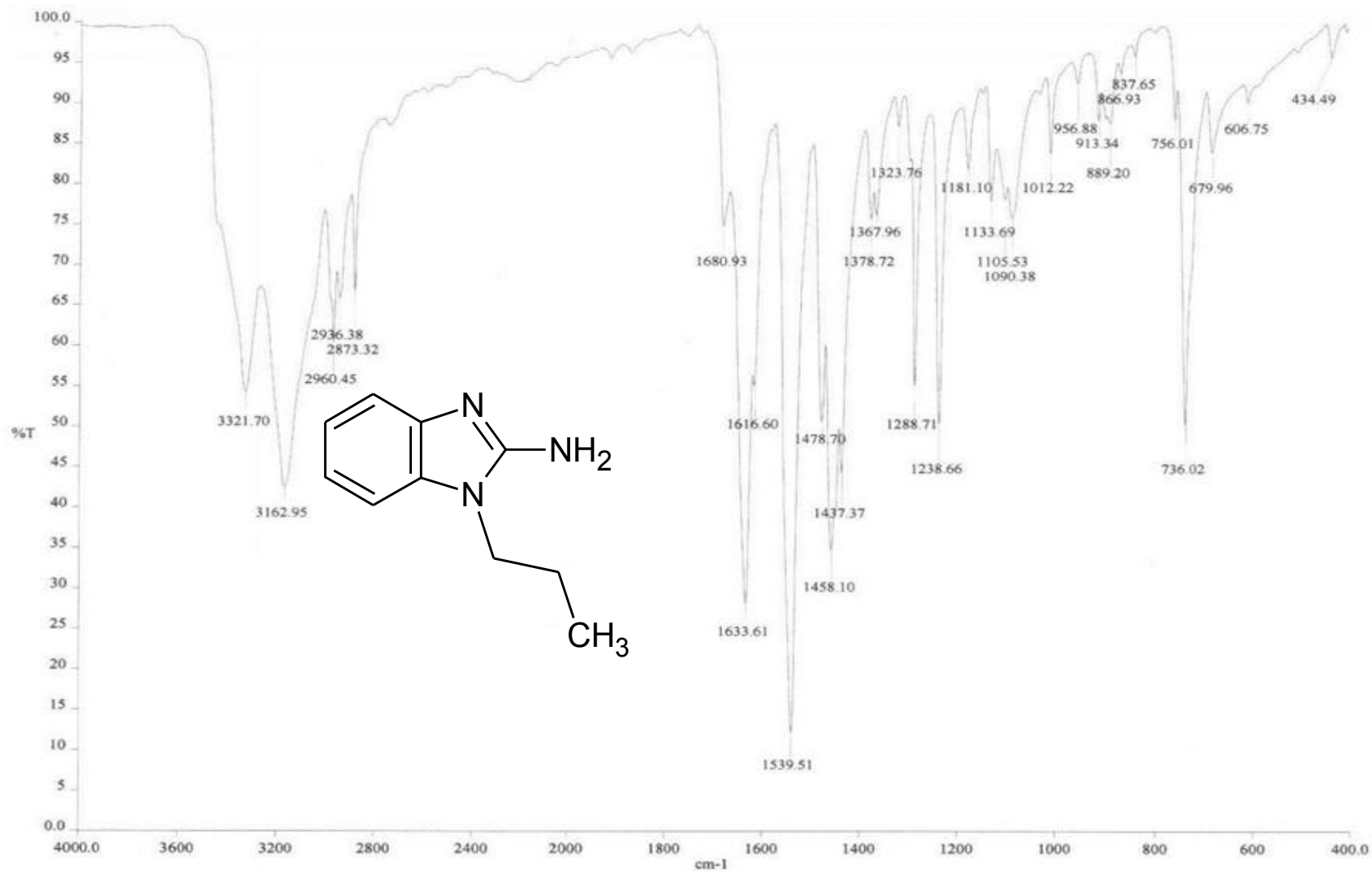


Espectro 58. IR 1-Etil-2-amino-1*H*-bencimidazol (5b).

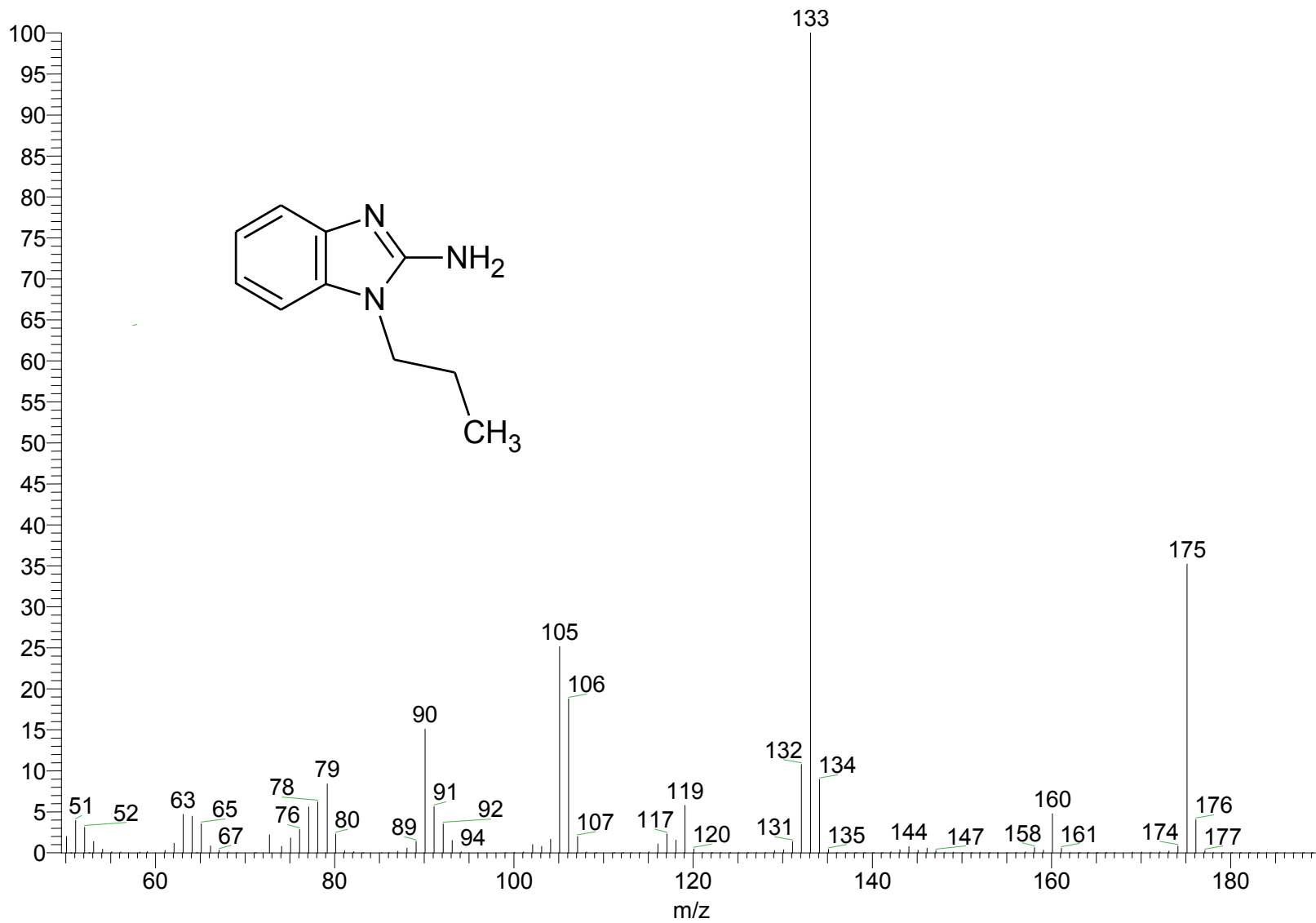


Espectro 59. EM (IE) 1-Etil-2-amino-1H-benzimidazol (5b).

Espectro 60. RMN ¹H 1-Etil-2-amino-1H-benzimidazol (5b).

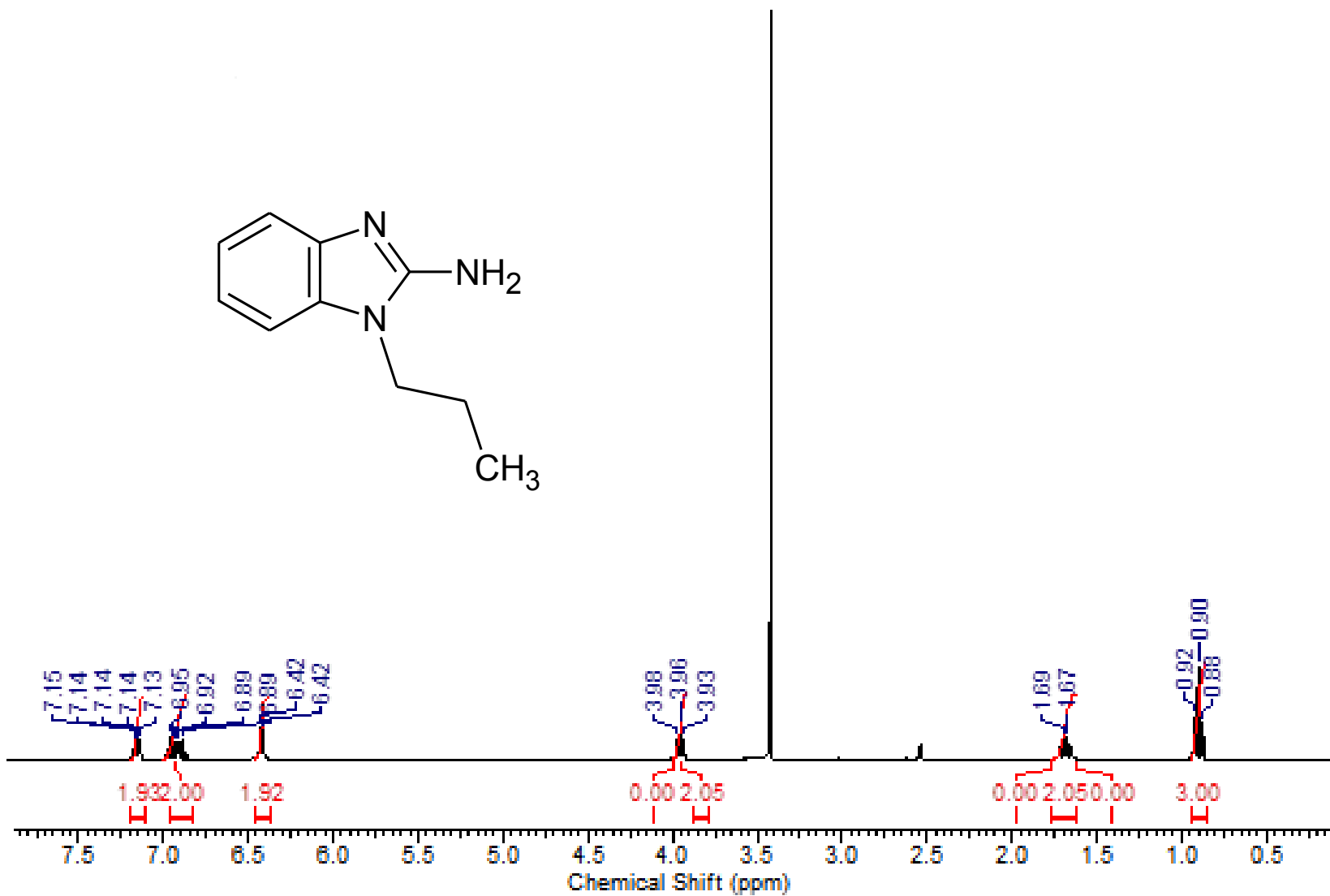


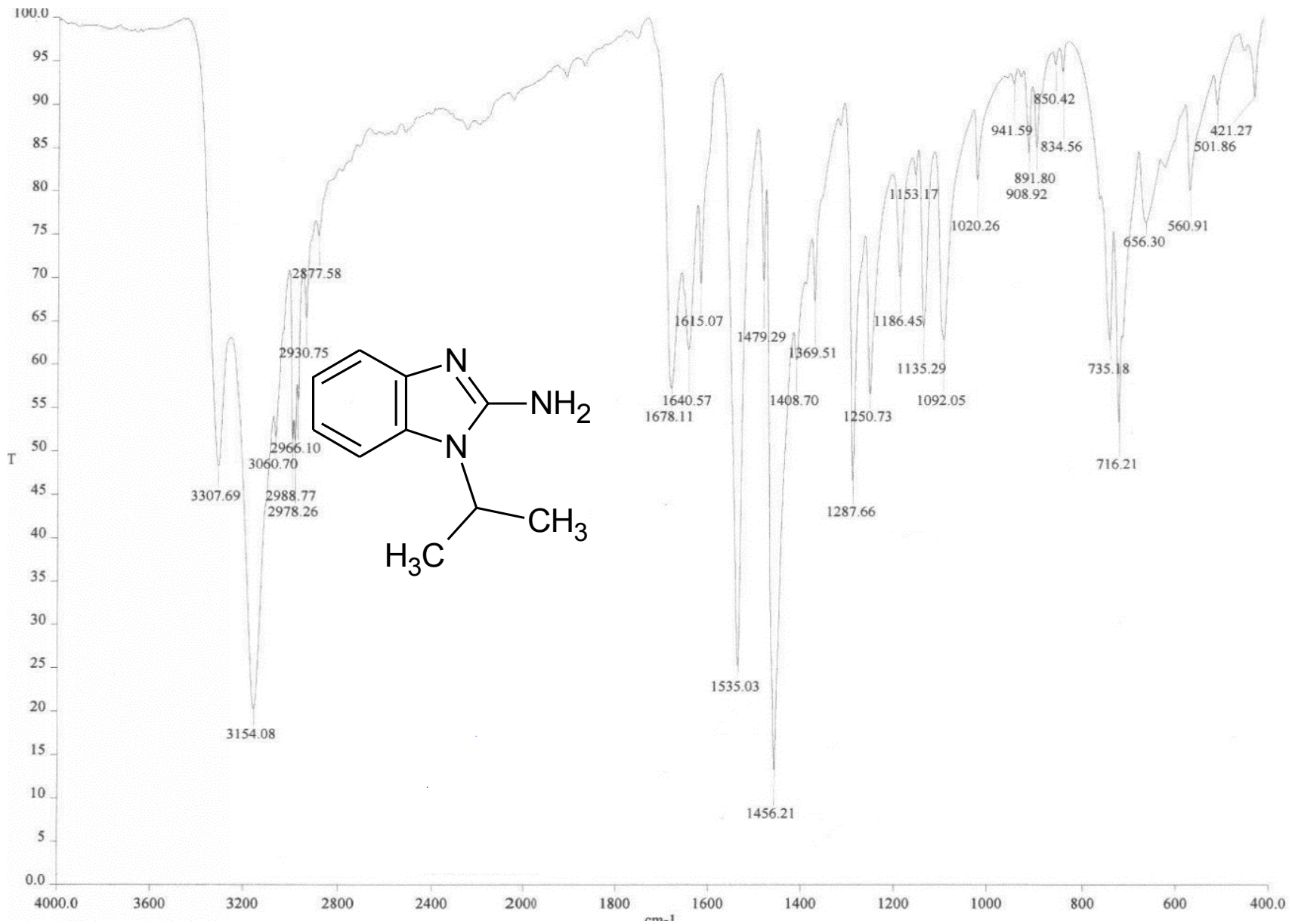
Espectro 61. IR 1-Propil-2-amino-1H-bencimidazol (5c).



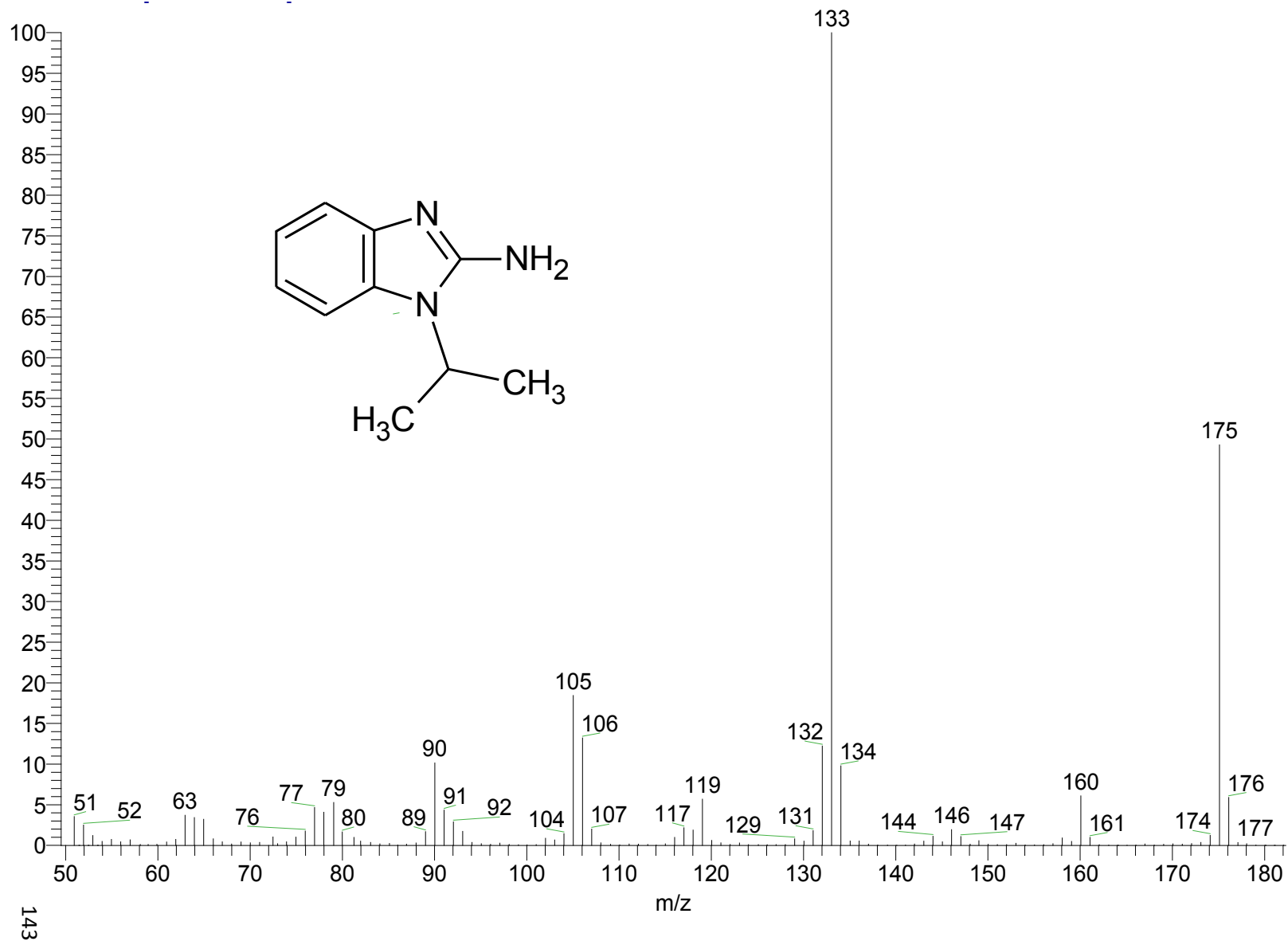
ESPECTROS

Espectro 62. EM (IE) 1-Propil-2-amino-1H-bencimidazol (5c).

Espectro 63. RMN ¹H 1-Propil-2-amino-1H-bencimidazol (5c).

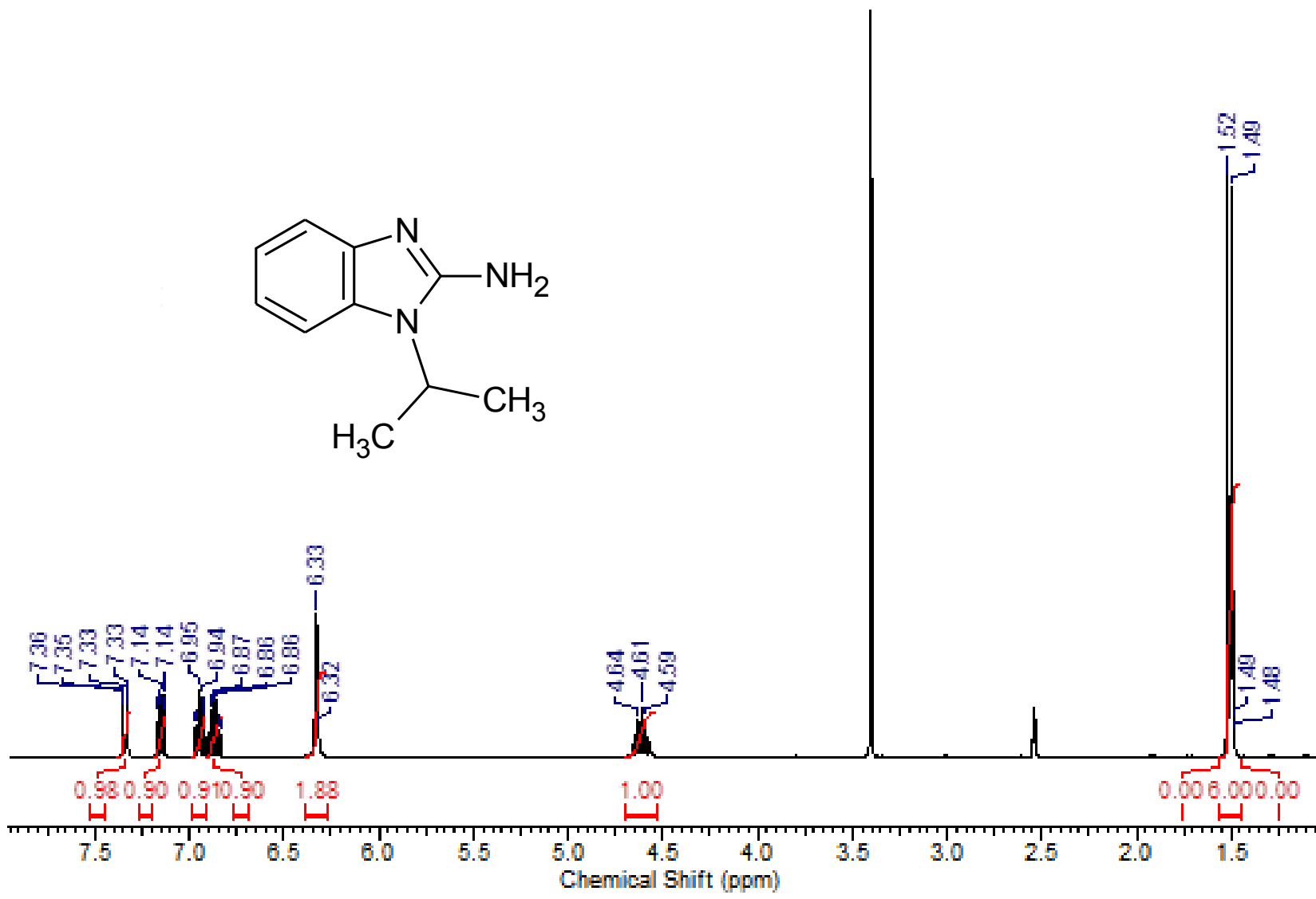


Espectro 64. IR 1-Isopropil-2-amino-1H-bencimidazol (5d)



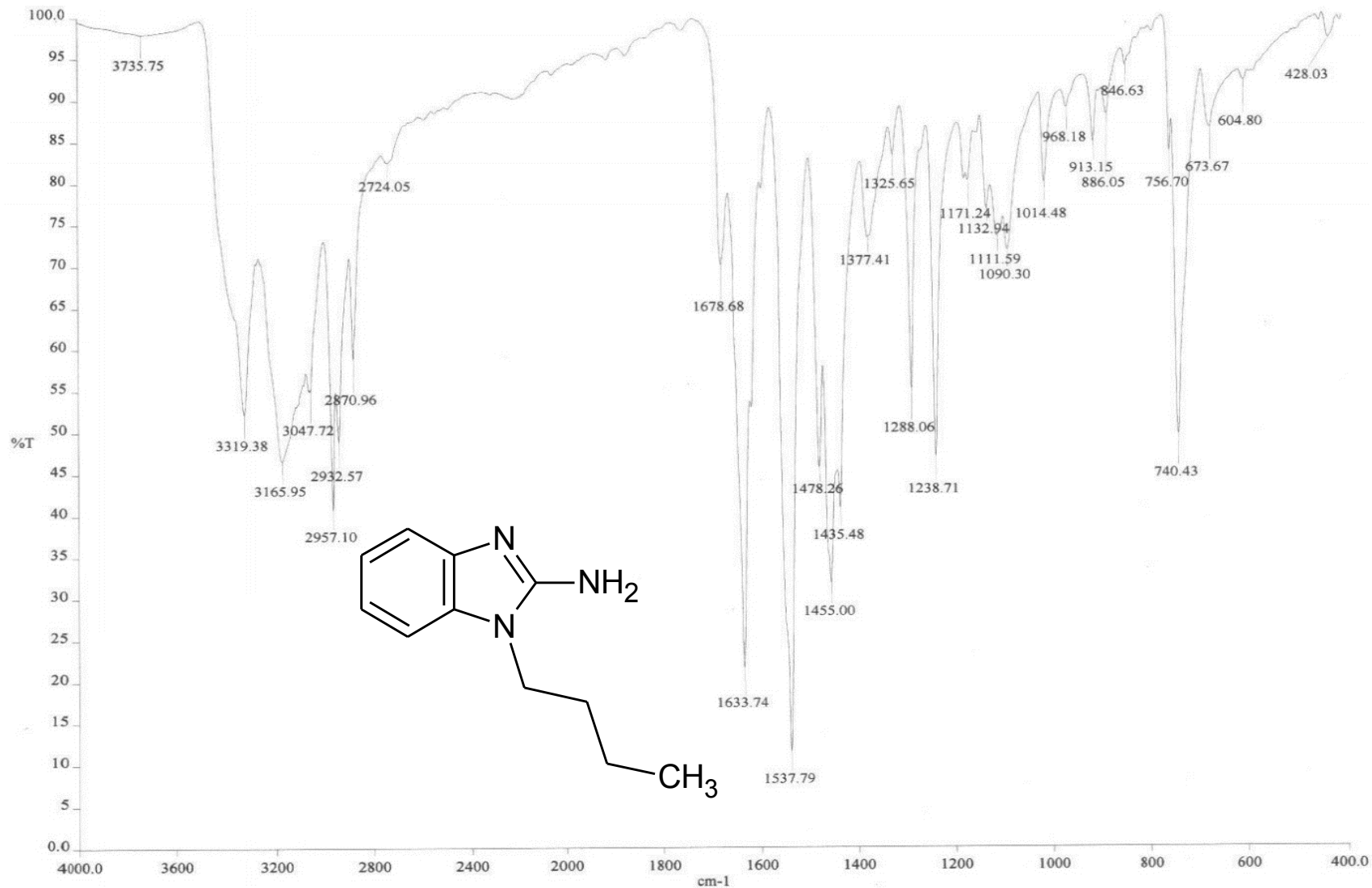
ESPECTROS

Espectro 65. EM (IE) 1-Isopropil-2-amino-1H-bencimidazol (5d).



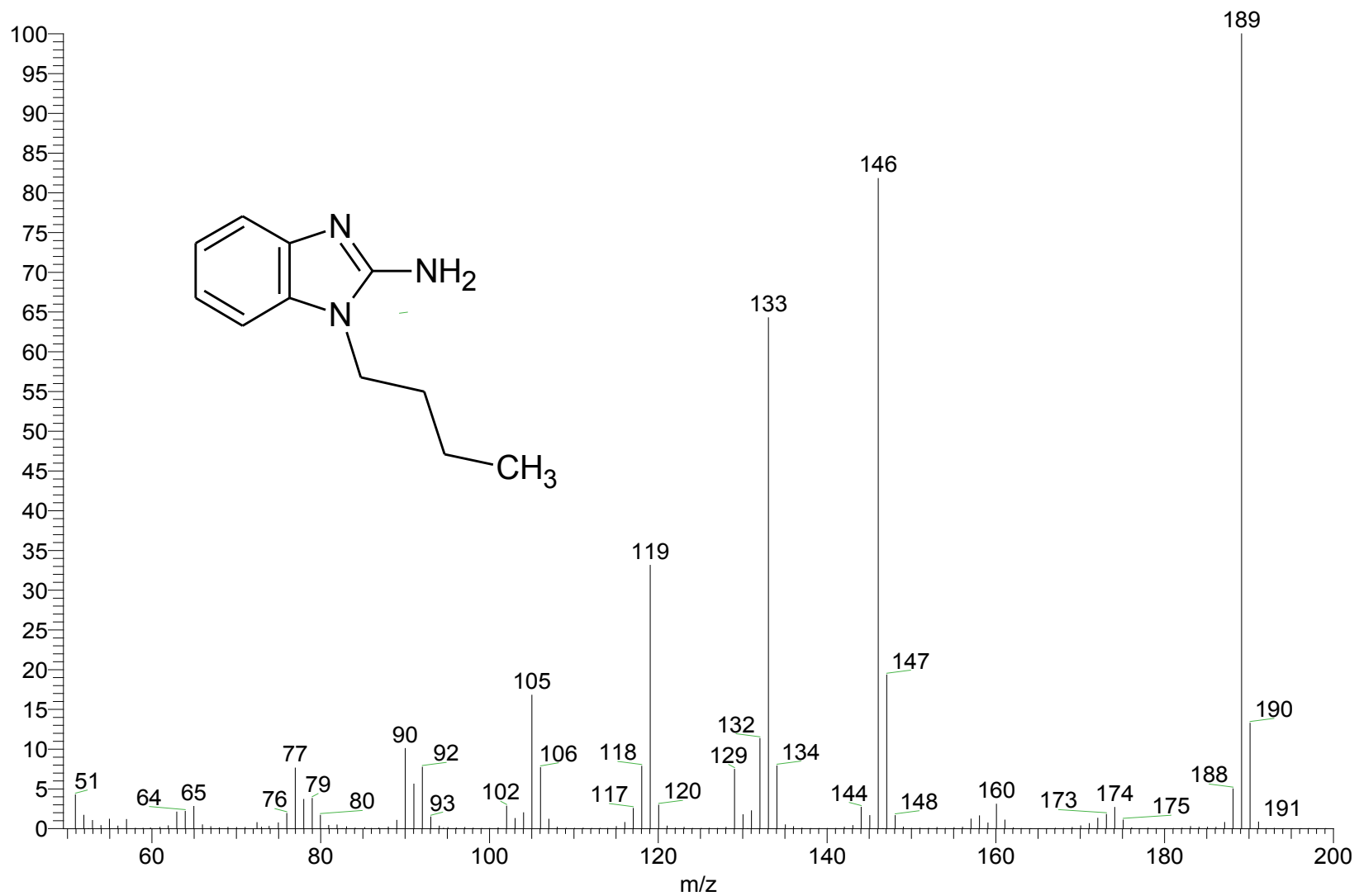
ESPECTROS

Espectro 66. RMN ¹H 1-Isopropil-2-amino-1H-bencimidazol (5d).



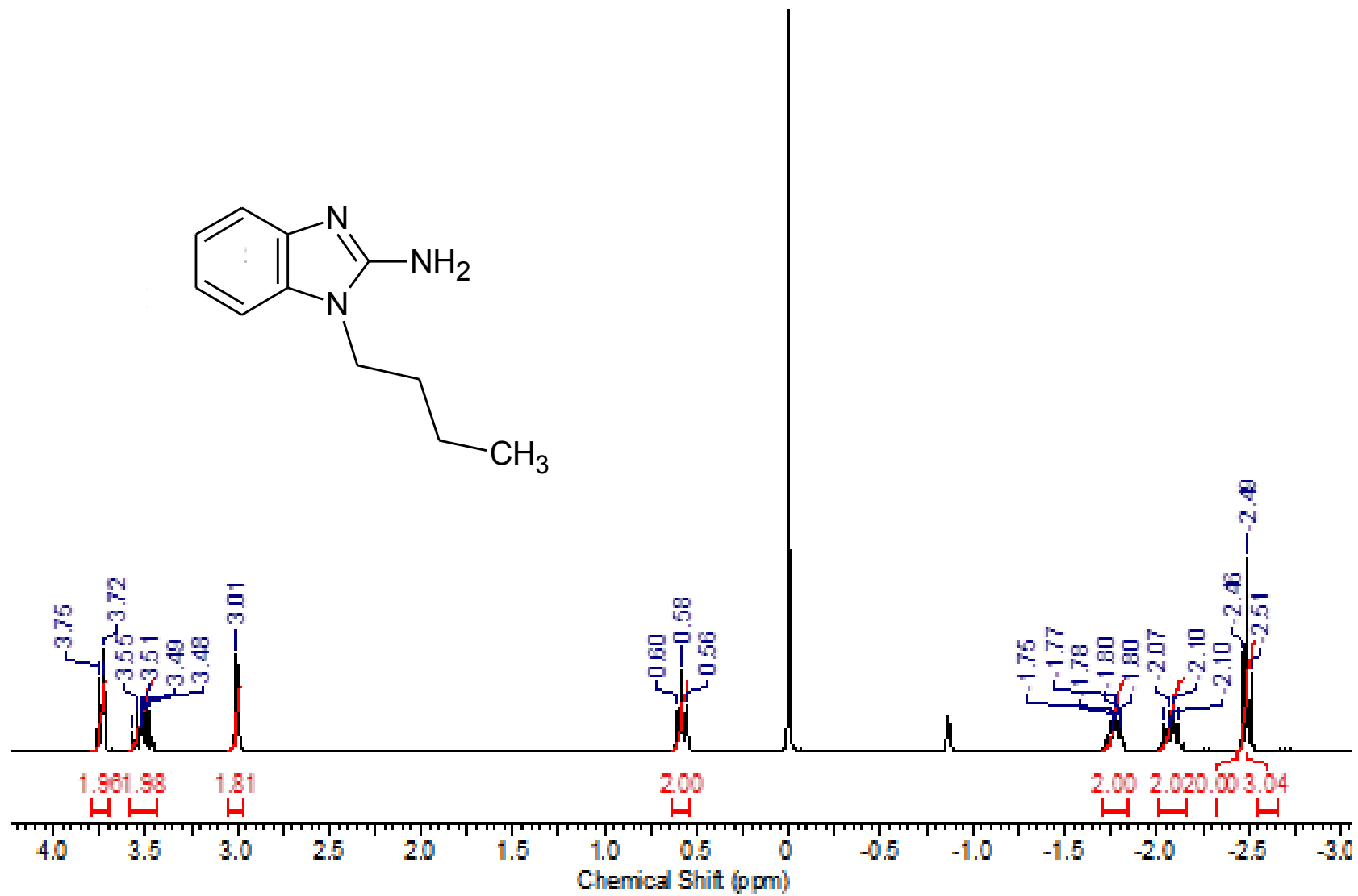
145

Espectro 67. IR 1-Butil-2-amino-1H-bencimidazol (5e).

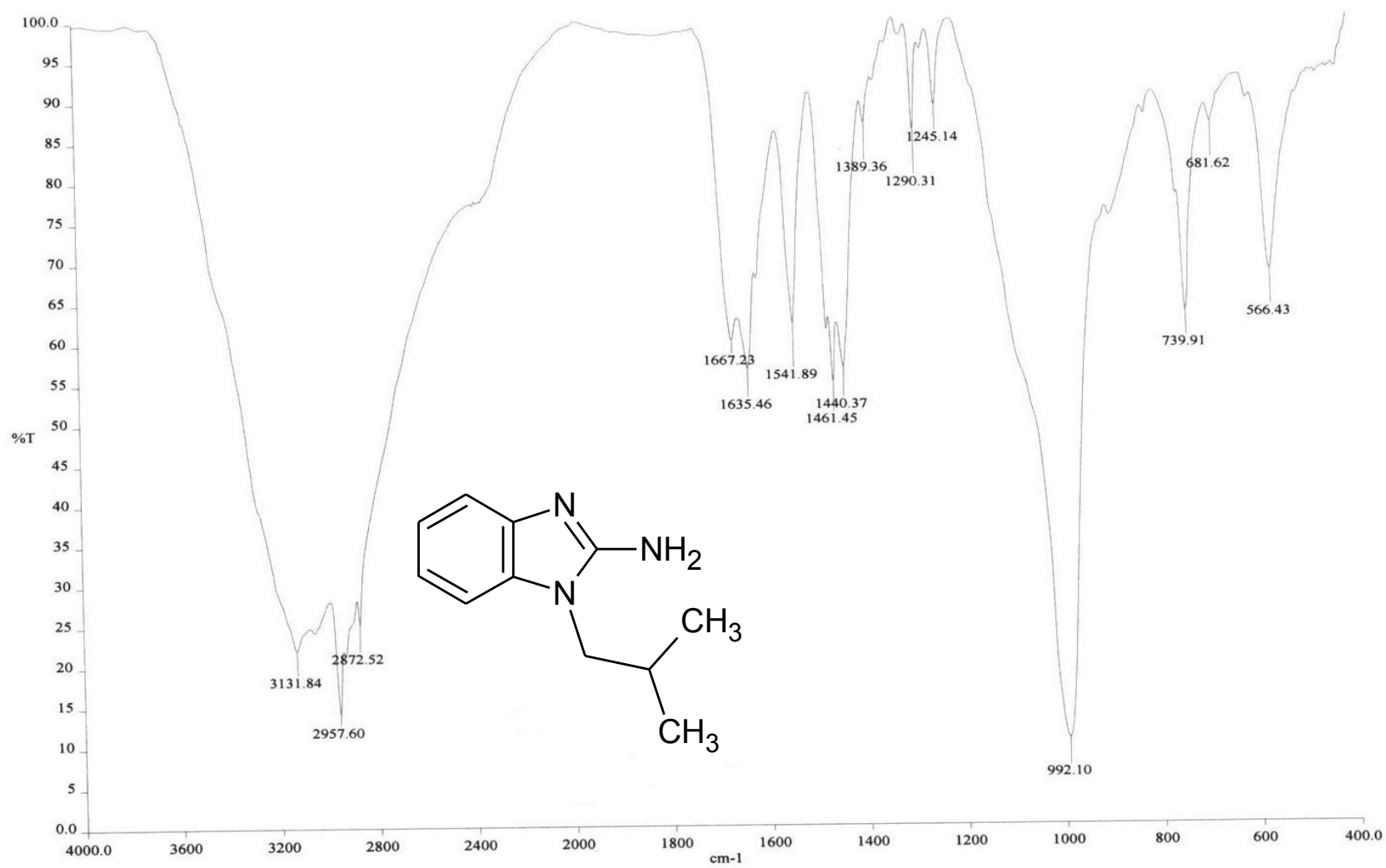


ESPECTROS

Espectro 68. EM (IE) 1-Butil-2-amino-1H-bencimidazol (5e).

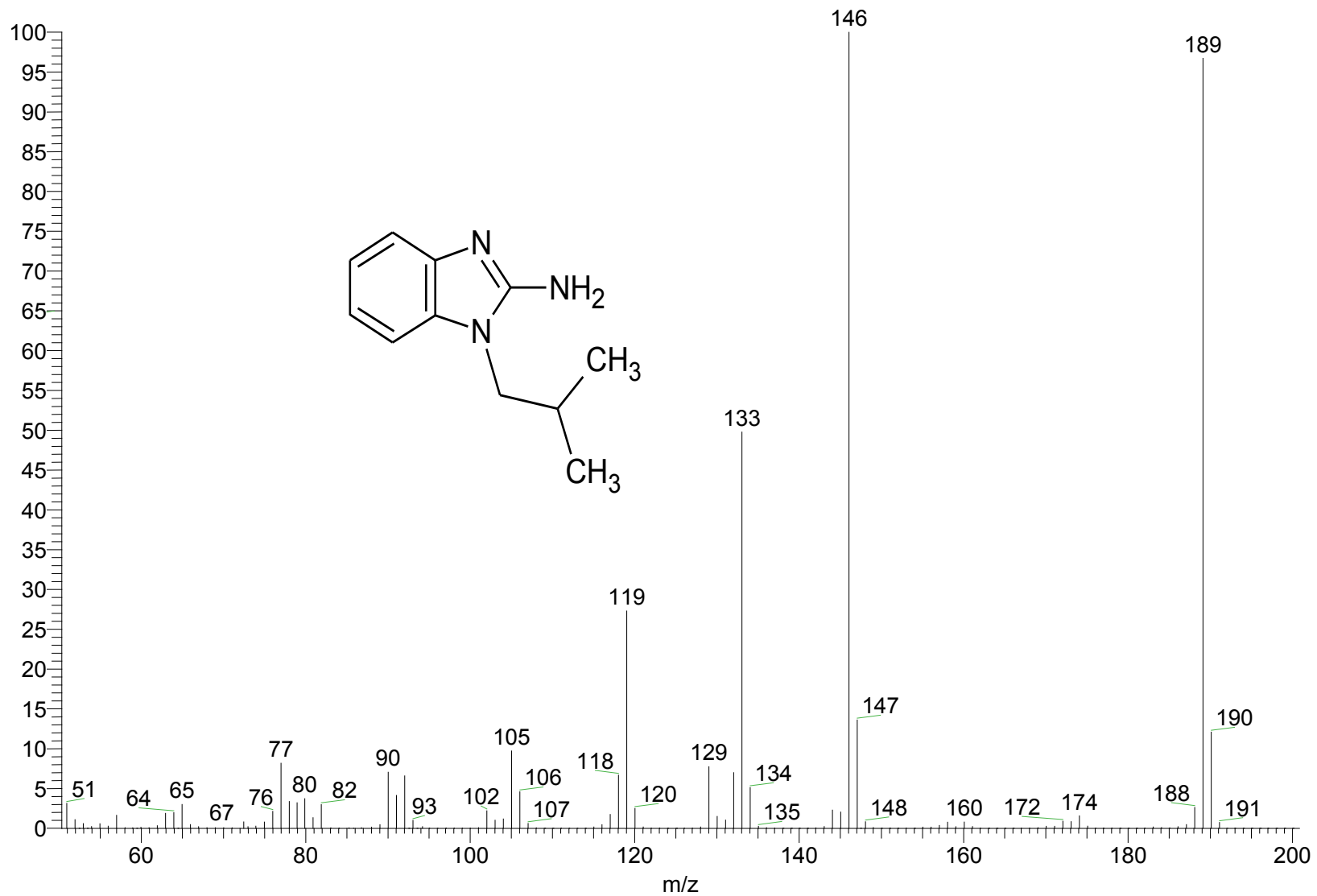


Espectro 69. RMN ¹H 1-Butil-2-amino-1H-bencimidazol (5e).



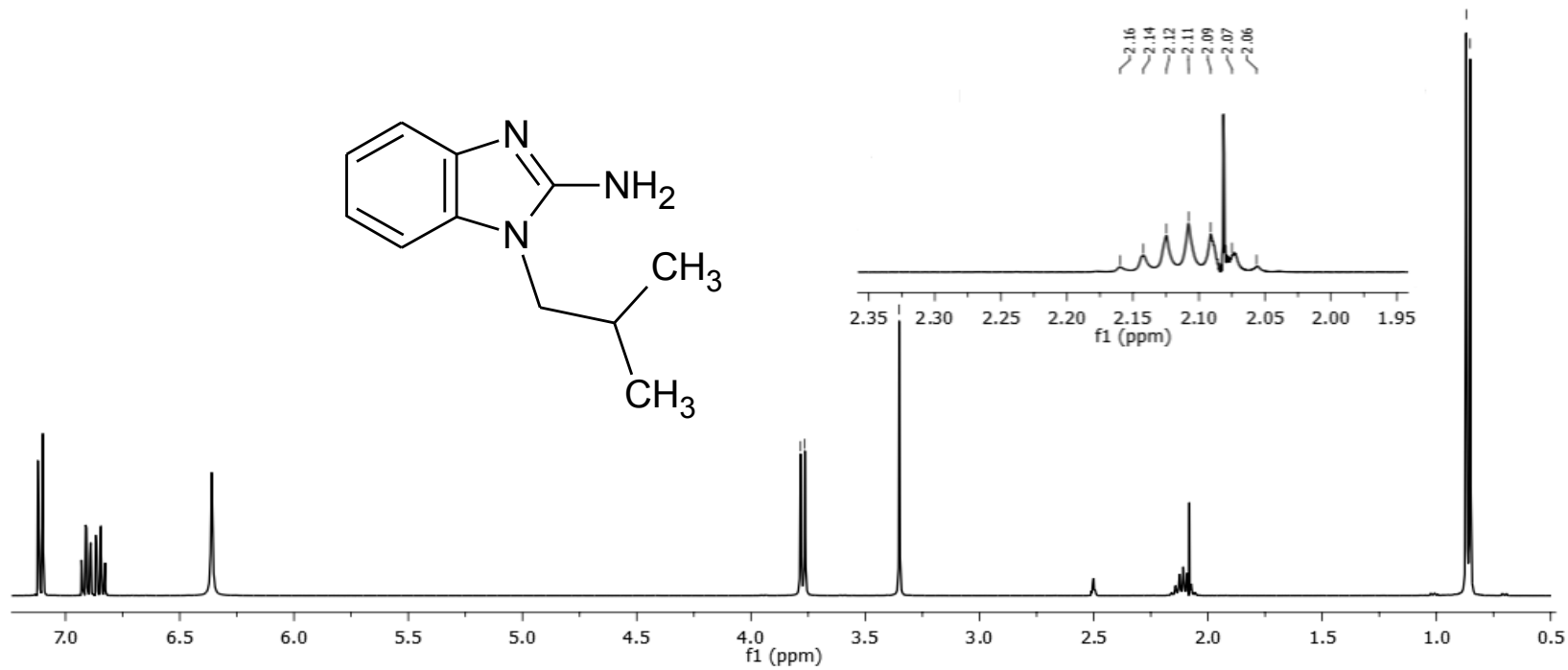
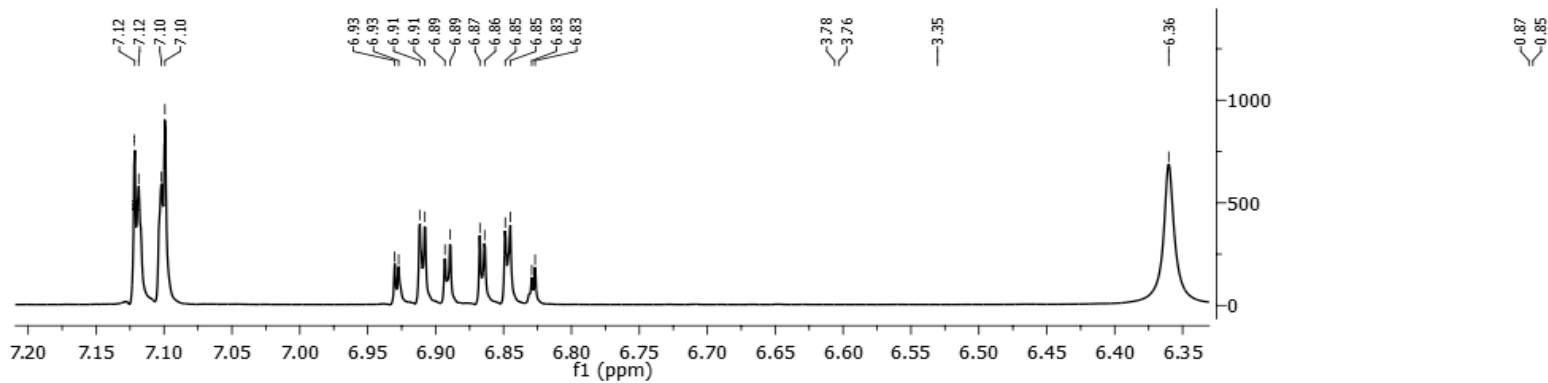
148

Espectro 70. IR 1-Isobutil-2-amino-1H-bencimidazol (5f)



ESPECTROS

Espectro 71. EM (IE) 1-Isobutil-2-amino-1H-bencimidazol (5f)



150

Espectro 72. RMN ¹H 1-Isobutil-2-amino-1H-bencimidazol (5f)

Apéndice 1. Fundamentos teóricos.

Este apartado fue elaborado con el fin de explicar de forma breve y concisa los fundamentos computacionales empleados en este trabajo. En este apartado se abordan los temas relacionados a las técnicas y principios para el acoplamiento molecular, dinámica molecular.

A.1.1 Acoplamiento Molecular (*Docking*)

El acoplamiento molecular (*Docking*) es una técnica computacional que permite predecir la conformación y orientación del ligando en el sitio de unión de la proteína blanco, así como plantear nuevas aproximaciones al diseño del fármaco.²⁵ Esta técnica se emplea cuando la estructura de la diana es conocida, usualmente a partir de estudio de cristalografía de rayos X, por resonancia magnética nuclear (RMN) o bien por técnicas bioinformáticas de predicción estructural. El conocimiento estructural del receptor abre la posibilidad de examinar la inducción de cambios estructurales en el ligando para predecir la orientación más estable dentro del sitio de unión. Esto se realiza mediante una exploración exhaustiva del espacio conformacional del ligando, así como una discriminación entre los diferentes modos de unión que puede adoptar el ligando en la proteína, y finalmente se estima la energía de unión con el receptor. La energía de unión del complejo ligando-receptor, generalmente expresada en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs ($DG_{\text{unión}}$), considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, así como energía de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.²⁵

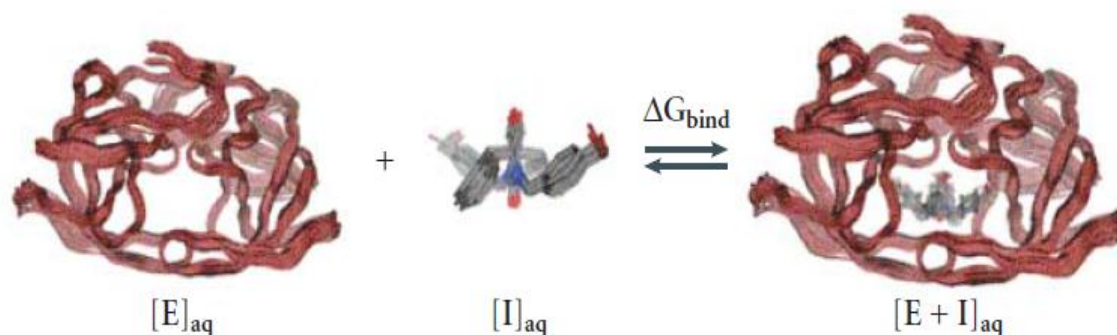


Figura 26. Esquemática del fundamento del acoplamiento molecular, en donde el inhibidor (I) se une a la enzima (E) y forma el complejo inhibidor-enzima (E + I).

Durante el estudio de acoplamiento molecular se formula una serie de valores que contemplan la orientación, conformación y translación del ligando en el receptor, cuyo estado y coordenadas provienen de un algoritmo, al cual se le denomina algoritmo genético.

Existen varias técnicas para la identificación del modo de unión del ligando al receptor, pero de forma general éstas contemplan un espacio delimitado mediante la generación de una malla (GRID) de energía potencial, la cual almacena la información de la contribución energética del potencial electrostático y de van der Waals del receptor en ciertos puntos, la búsqueda del espacio conformacional del ligando mediante la implementación de métodos estocásticos (Monte Carlo) o azarosos (algoritmos genéticos), para la evaluación y posicionamiento (RANK) final a partir del puntaje (score) de las conformaciones finales.²⁴

En el caso del programa *AutoDock®*, la energía de unión se describe en términos aditivos de varios componentes que contribuyen a la energía de formación del complejo ligando-receptor, mostrados en la siguiente ecuación. (Trejo-Soto, P. 2011. Tesis de licenciatura.) Síntesis de tres carboxamidas bencimidazolicas

diseñadas por docking como inhibidores potenciales de la Tirosafosfato isomerasa (TIM) de *Entamoeba Histolytica*. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.)

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

Dónde:

- $\Delta G_{\text{disolvente}}$ es la contribución debida a efectos del disolvente, como interacciones disolvente-ligando, disolvente proteína y disolvente complejo ligando-receptor-
- $\Delta G_{\text{conformación}}$ es la energía debida a cambios conformacionales en la proteína y el ligando.
- $\Delta G_{\text{interacción}}$ es la energía libre asociada a las interacciones ligando-receptor.
- $\Delta G_{\text{rotación}}$ es la pérdida de energía asociada a la pérdida de grados de libertad de rotación interna de la proteína y el ligando.
- ΔG_{tr} es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.
- $\Delta G_{\text{vibración}}$ corresponde a los cambio de energía libre debido a los cambios en los modos vibracionales.

Uno de los aspectos más críticos de esta técnica es la dificultad de explorar de forma completa los cambios conformacionales que puedan ocurrir en el receptor, tanto en las cadenas laterales de los residuos como especialmente en cambios que afecten la disposición del sitio de unión. En los últimos años se han producido avances importantes en la resolución de dichas dificultades, como el uso de funciones de puntuación consenso (*hit consensus*), que consiste en seleccionar los conformeros con base en resultados obtenidos por más de dos *software* diferentes, y la re-evaluación a *posteriori* de las afinidades y conformaciones mediante el empleo de técnicas de dinámica molecular o metadinámica.

A.1.2. Dinámica Molecular.

Los métodos de simulación dinámica son ampliamente utilizados para obtener información acerca de la evolución conformacional, cinética y termodinámica de proteínas, o otras macromoléculas biológicas, durante un determinado periodo de tiempo. Los diferentes procesos dinámicos que pueden ser caracterizados para proteínas, presentan escalas de tiempo que van desde los femtosegundos hasta las horas, para cada uno de los cuales existe un extenso rango de amplitudes y energías obtenidos a partir de la integración de una serie de algoritmos matemáticos a la ecuación de movimiento. El tiempo de movimiento a designar dependerá de la función bioquímica a evaluar. Las reacciones enzimáticas son rápidas y localizadas (10^{-11} – 10^{-7} segundos); el acoplamiento alostérico y el proceso de plegamiento son movimientos muy lentos (10^{-5} – 1 segundos); mientras que la asociación de subunidades ocurre en un mayor número de movimientos (>1 segundo).

Los sistemas macromoleculares son complejos y consisten de un gran número de partículas, por lo que este tipo de simulaciones se llevan a cabo empleando cálculos de mecánica molecular (MM) que permiten describir superficies de energía potencial y propiedades físicas acerca del comportamiento atómico. En estas simulaciones se involucra un cálculo numérico iterativo de las fuerzas instantáneas presentes en el sistema MM y los movimientos correspondientes de dicho sistema. Los modelos de MM representan a los átomos como esferas y a los enlaces como resortes, por lo que al final el sistema macromolecular consiste en un grupo de partículas que presentan movimiento en respuesta a sus interacciones y distancias, de acuerdo a las ecuaciones de movimiento definidas por la mecánica clásica.²³

El proceso de dinámica molecular (DM) considera una serie de factores entre los que se encuentran los siguientes:

- El ambiente simulado: el reproducir las condiciones experimentales permite evaluar el comportamiento real de la proteína en un organismo. La proteína se puede estudiar como una entidad aislada (al vacío) o como un sistema rodeado por moléculas de agua, iones y/o por proteínas vecinas (ambiente cristalino). La simulación de la solvatación de la proteína incluye la posibilidad de establecer un sistema electrostático, implícito (se desprecian las interacciones solvente-proteína para reducir tiempo de cálculo) o explícito (en el que se consideran las interacciones estéricas y electrónicas del disolvente con la macromolécula)
- Longitud de la simulación: se encuentra delimitada por una serie de factores a considerar, entre los cuales se encuentra el costo computacional (tiempo de máquina) para evaluar las interacciones, el número de interacciones necesarias para evaluar cada período de tiempo, los períodos de tiempo para ese proceso y el número de grados de libertad para la propagación.
- Condiciones experimentales: debido a la importancia de replicar las condiciones experimentales, la DM considera factores como presión y temperatura para reproducir las condiciones físicas reales.

A.1.3. Diseño de fármacos asistido por computadora.

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) es un área del diseño racional de fármacos y consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora con la finalidad de descubrir nuevos fármacos en un menor tiempo y costo. El DiFAC tiene como objetivos principales el descubrir nuevos líderes moleculares, optimizar a los líderes ya existentes y seleccionar, de una biblioteca de moléculas, a los candidatos que tienen mayor probabilidad (o menor

probabilidad) de convertirse en fármacos exitosos. Desde luego, las predicciones obtenidas con el DiFAC, como en muchas otras disciplinas científicas, deben someterse a pruebas experimentales.

Los métodos del DiFAC pueden agruparse en dos áreas principales: métodos basados en el ligando, cuando se conoce la estructura de una serie de moléculas con la misma actividad biológica (Relaciones estructura-actividad), y métodos basados en el receptor. Este último método se emplea cuando se conoce la estructura del receptor, determinando la zona con la cual interaccionará el ligando mediante la identificación del sitio activo o alostérico. Los métodos de diseño basado en la estructura del receptor más conocidos son el diseño de *novo*, el cual consiste en construir moléculas directamente en el receptor, y el acoplamiento molecular automatizado (*Docking*). Para estos métodos generalmente se ensayan una serie de bibliotecas moleculares que permiten identificar algunas de las estructuras que pueden ser empleadas como líderes para el diseño de nuevos fármacos, a lo cual se le conoce como screening virtual (*virtual screening*)

APÉNDICE 2. Resultados Dinámica Molecular (DM) 30 ns.

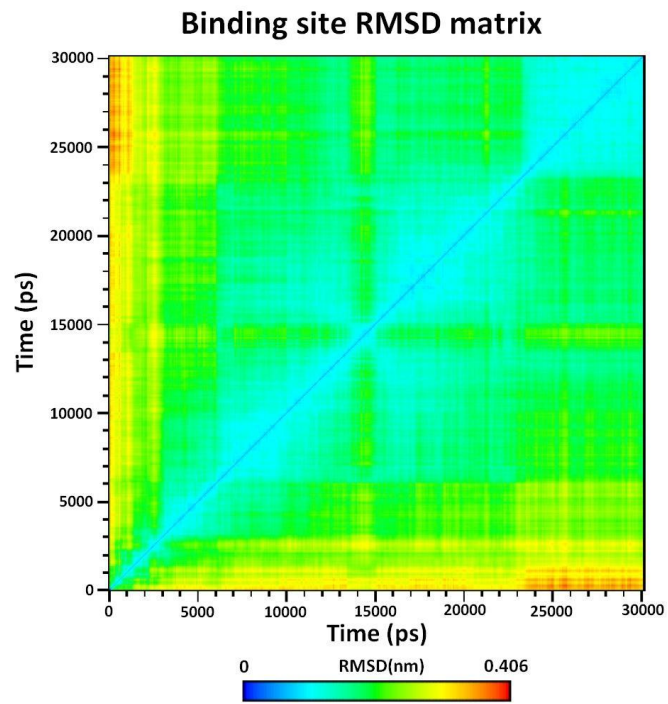


Figura 27.

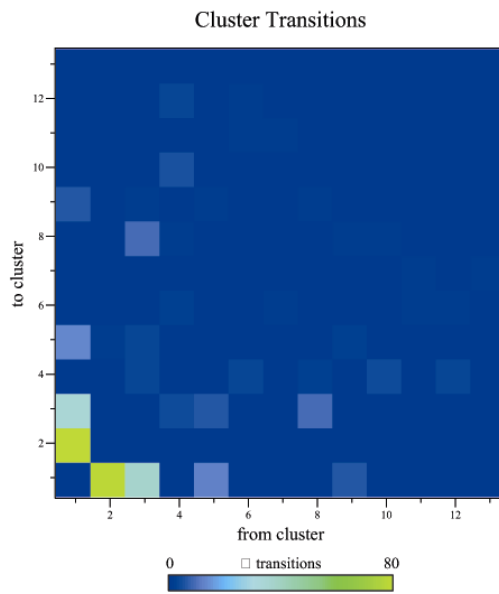
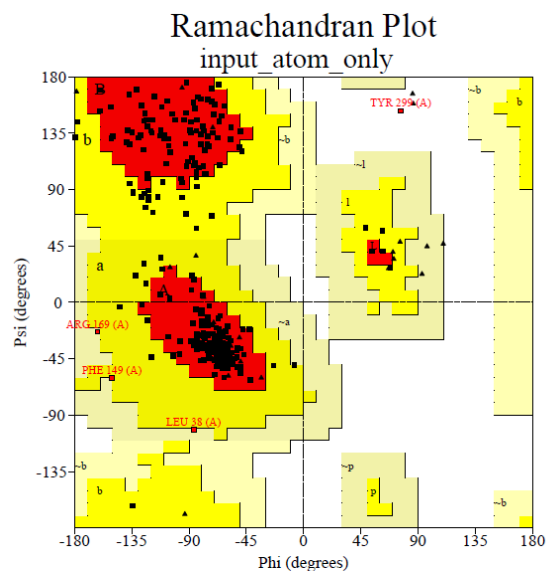


Figura 28.

APÉNDICE 3.

Modelo obtenido por María Irene Betancourt Conde. Tesis de Licenciatura

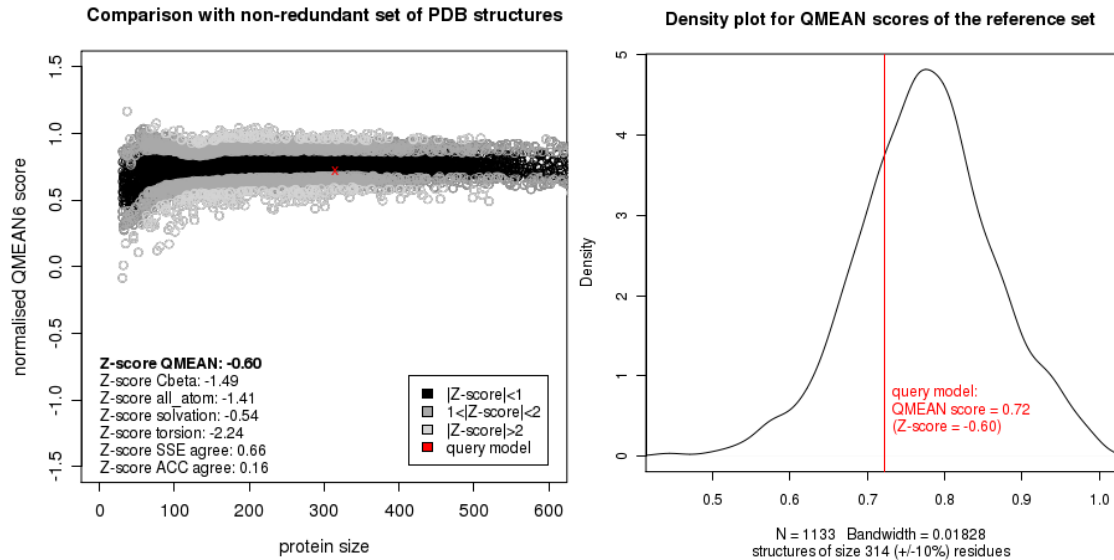


Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	223	83.8%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	39	14.7%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	3	1.1%
Residues in disallowed regions	1	0.4%
	----	-----
Number of non-glycine and non-proline residues	266	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	3	
Number of glycine residues (shown as triangles)	28	
Number of proline residues	17	

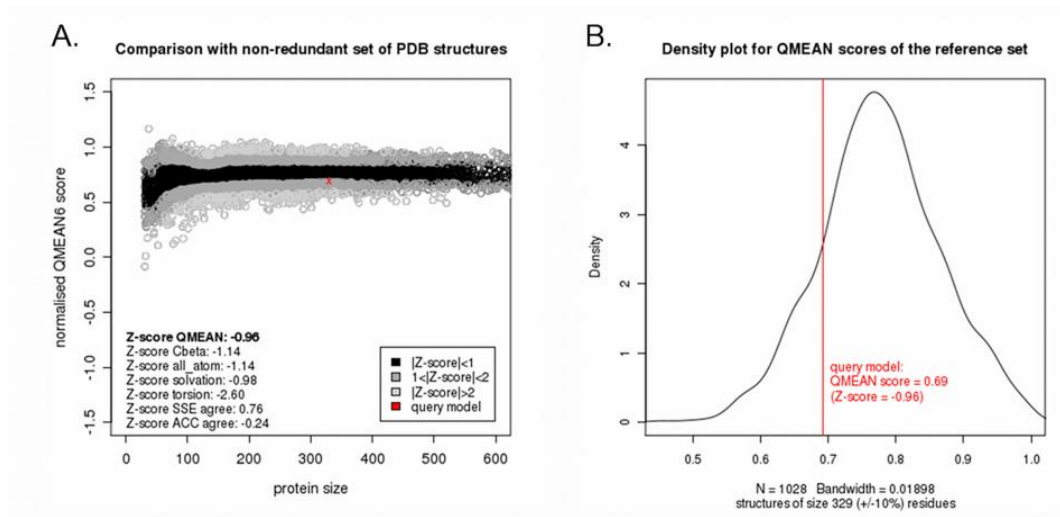
Total number of residues	314	

Gráfica de Ramachandran para el monómero de *L. mexicana*. que muestra las regiones más favorecidas y las desfavorecidas.²⁶



Gráficas de QMEAN para el monómero de arginasa de *L. mexicana*. (a) La gráfica normalizada de QMEAN6 muestra la desviación estándar del monómero. (b) Gráfica de densidad para QMEAN.¹³

Modelo obtenido por Carlos Méndez Cuesta. Tesis Doctoral



Gráficas de QMEAN para el monómero de arginasa de *L. mexicana*. (a) La gráfica normalizada de QMEAN6 muestra la desviación estándar del monómero. (b)

Gráfica de densidad para QMEAN.¹³

Programa	Modelo	Clave PDB	Evaluacion (%)
Modeller	Modeller-1d3v	1d3v	83.7, 15.6, 0.7, 0.0

APÉNDICE 4. Datos cristalográficos Compuesto 10.

Tabla 20. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamientos isotrópico equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

U(eq) se define como un tercio de la traza del ortogonalizado U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
Cl(1)	2307(5)	6879(4)	371(2)	32(1)
O(1)	-293(11)	11752(10)	-2971(6)	21(2)
N(3)	5255(13)	11969(12)	-3298(7)	19(2)
C(16)	2270(18)	14300(13)	-7179(8)	20(2)
C(17)	4245(18)	13682(13)	-7635(9)	22(2)
N(2)	6062(14)	12229(11)	-5119(7)	18(2)
N(1)	2941(13)	13209(11)	-4424(7)	16(2)
C(3)	1490(19)	8304(14)	-600(8)	24(3)
C(4)	4727(15)	12486(12)	-4257(8)	15(2)
C(5)	3106(16)	13457(12)	-5513(8)	15(2)
C(6)	3808(16)	12300(13)	-2358(8)	17(2)
C(7)	414(16)	10659(13)	-2206(8)	17(2)
C(8)	1680(17)	14192(13)	-6131(8)	19(2)
C(9)	5054(16)	12878(12)	-5971(9)	18(2)
C(10)	-358(18)	8135(14)	-961(9)	23(2)
C(11)	-905(16)	9301(13)	-1769(9)	21(2)

C(12)	7937(16)	11200(14)	-5180(10)	23(2)
C(13)	2333(16)	10872(14)	-1878(8)	19(2)
C(14)	5667(16)	12970(13)	-7026(9)	21(2)
C(15)	2847(17)	9709(14)	-1068(8)	20(2)

Tabla 21. Longitud de enlace [Å] y Ángulo [°]

Cl(1)-C(3)	1.725(11)
O(1)-C(7)	1.363(13)
N(3)-C(4)	1.365(13)
N(3)-C(6)	1.476(13)
C(16)-C(8)	1.360(15)
C(16)-C(17)	1.424(16)
C(17)-C(14)	1.374(16)
N(2)-C(4)	1.344(13)
N(2)-C(9)	1.416(14)
N(2)-C(12)	1.447(13)
N(1)-C(4)	1.310(13)
N(1)-C(5)	1.406(13)
C(3)-C(10)	1.366(16)
C(3)-C(15)	1.433(17)
C(5)-C(8)	1.389(15)
C(5)-C(9)	1.397(14)
C(6)-C(13)	1.492(15)
C(7)-C(11)	1.384(15)
C(7)-C(13)	1.393(14)
C(9)-C(14)	1.371(16)
C(10)-C(11)	1.393(15)
C(13)-C(15)	1.385(16)

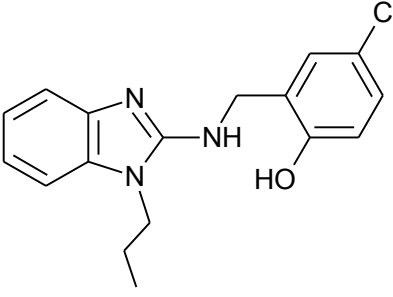
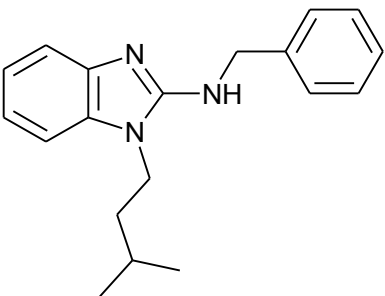
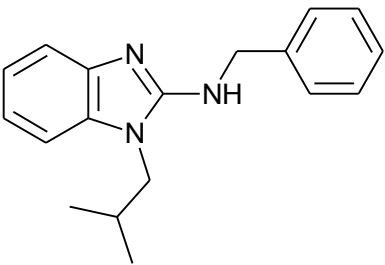
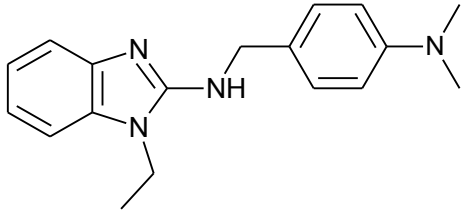
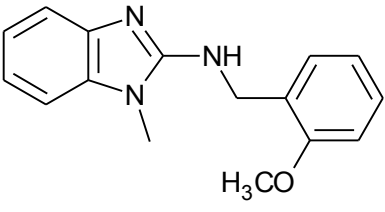
C(4)-N(3)-C(6)	119.7(8)
C(8)-C(16)-C(17)	122.2(10)
C(14)-C(17)-C(16)	120.8(10)
C(4)-N(2)-C(9)	106.3(8)
C(4)-N(2)-C(12)	127.6(9)
C(9)-N(2)-C(12)	125.0(9)
C(4)-N(1)-C(5)	103.9(8)
C(10)-C(3)-C(15)	118.6(10)
C(10)-C(3)-Cl(1)	123.2(10)
C(15)-C(3)-Cl(1)	118.2(8)
N(1)-C(4)-N(2)	115.1(9)
N(1)-C(4)-N(3)	124.8(9)
N(2)-C(4)-N(3)	120.1(9)
C(8)-C(5)-C(9)	120.2(10)
C(8)-C(5)-N(1)	129.4(9)
C(9)-C(5)-N(1)	110.4(9)
N(3)-C(6)-C(13)	112.7(9)
O(1)-C(7)-C(11)	115.5(9)
O(1)-C(7)-C(13)	123.0(10)
C(11)-C(7)-C(13)	121.5(10)
C(16)-C(8)-C(5)	117.0(10)
C(14)-C(9)-C(5)	123.5(10)
C(14)-C(9)-N(2)	132.2(10)
C(5)-C(9)-N(2)	104.3(9)
C(3)-C(10)-C(11)	120.6(10)
C(7)-C(11)-C(10)	120.1(10)
C(15)-C(13)-C(7)	117.7(10)
C(15)-C(13)-C(6)	119.9(9)
C(7)-C(13)-C(6)	122.4(10)

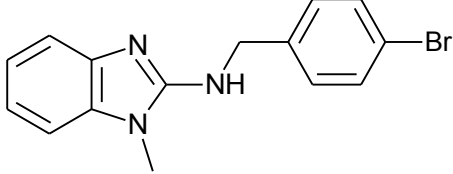
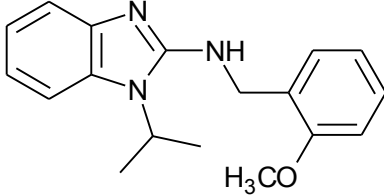
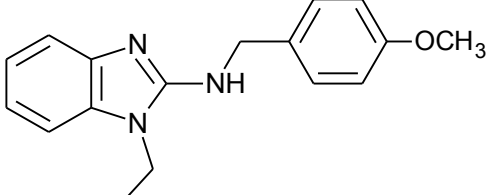
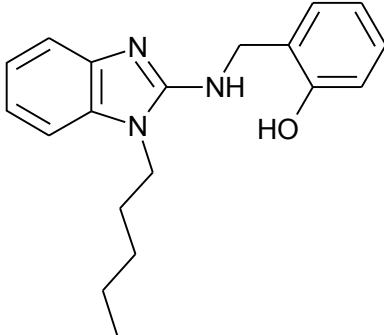
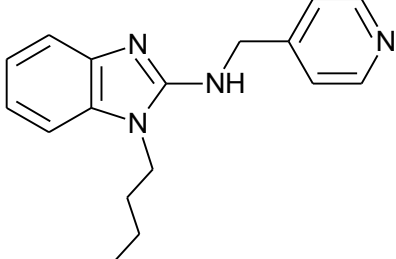
C(9)-C(14)-C(17) 116.2(10)
 C(13)-C(15)-C(3) 121.5(10)

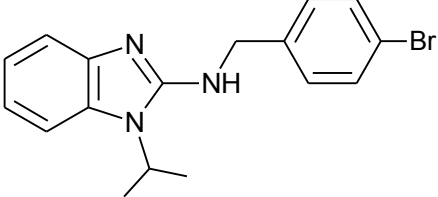
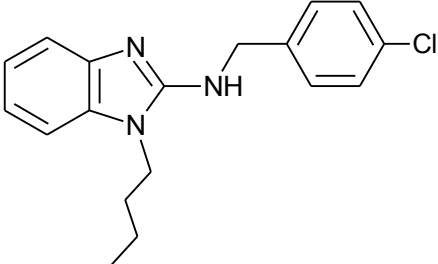
APENDICE 5.

Tabla 22. Estructura de compuestos finales y clave numérica de la base de datos ZINC.

Clave ZINC	Estructura
<p>111419 (Compuesto 9) <i>N</i>-(5-Bromo-2-hidroxi-bencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>196189</p>	
<p>285488</p>	
<p>285495 (Compuesto 10) <i>N</i>-(5-Cloro-2-hidroxi-bencil)- 2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	

<p>285496</p>	
<p>513985</p>	
<p>513988</p>	
<p>525027 (Compuesto 13) <i>N</i>-[4-(Dimetilamino)encil]-2-amino-1-etil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>526385 (Compuesto 11) <i>N</i>-(2-Metoxibencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	

<p>532233 (Compuesto 8) <i>N</i>-(4-Bromobencil)-2-amino-1-metil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>613506</p>	
<p>804806 (Compuesto 12) 1-Etil-<i>N</i>-(4-metoxibencil)-2-amino-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>1798220</p>	
<p>2073201</p>	

<p>2478054 (Compuesto 15) <i>N</i>-(4-Bromobencil)-1-(isopropil)-2-amino-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>3643102 (Compuesto 16) 1-Butil-<i>N</i>-(4-clorobencil)-2-amino-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	
<p>3643113 (Compuesto 14) <i>N</i>-(4-Metoxibencil)-2-amino-1-propil-1<i>H</i>-bencimidazol</p>	