



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

**ACOPLAMIENTO MOLECULAR, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL CONTRA PIRUVATO CINASA Y ARGINASA
DE *LEISHMANIA SPP***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. CARLOS ALBERTO MÉNDEZ CUESTA

TUTOR
DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. ENRIQUE RAMÓN ÁNGELES ANGUIANO
FES-CUATITLÁN, UNAM
DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



MÉXICO, D.F. ABRIL, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
VOCAL	DR. BENJAMÍN ORTIZ MENDOZA
VOCAL	DR. ENRIQUE RAMÓN ÁNGELES ANGUIANO
VOCAL	DR. JUAN GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ
SECRETARIO	DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 122, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

TUTOR

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

SUSTENTANTE

M en C Carlos Alberto Méndez Cuesta

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el conocimiento y el pensamiento crítico científico que me ha brindado desde mis estudios de licenciatura y que concluye con mis estudios de doctorado. Gracias por todo.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por haberme permitido realizar esta tesis bajo su tutoría, por sus conocimientos, consejos y su gran apoyo durante la realización de este proyecto.

Al CONACYT por la beca 170430 otorgada durante la realización de mis estudios de doctorado.

A la M en C Alicia Hernández Campos por sus consejos y apoyo durante la elaboración del proyecto, así como haberme permitido entrar al laboratorio.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por sus consejos y crítica a este proyecto de doctorado.

A mi Comité Tutorial, Dra. Lilián Yépez Mulia y Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano por sus consejos, correcciones y críticas durante la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. Benjamín Ortiz Mendoza, Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Francisco Hernández Luis por sus recomendaciones en la revisión del trabajo escrito.

A la B. Amparo Tapia y la QBP Rocío Nieto por la realización de la parte biológica de la evaluación de los compuestos en *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*; así como los estudios de citotoxicidad de este proyecto.

Al Dr. Manuel Hernández por la realización de la parte biológica de la evaluación de los compuestos en *Leishmania mexicana*.

Al personal de la USAI por la realización de los espectros de IR, RMN¹H y EM.

Al M. en C. Oscar Méndez Lucio y al QFB Rodrigo Aguayo Ortiz por su importante colaboración en la realización de los estudios de Acoplamiento Molecular y de Dinámica Molecular.

Al Instituto Carso de la Salud por la Beca de Excelencia S0921968 otorgada durante la realización de este proyecto.

A ti, mi amada SUKI por compartir esta etapa de mi vida que hoy termina y porque seguirás en la que etapa que comienza.

Este trabajo se publicó en el siguiente artículo:

Carlos A. Méndez-Cuesta, Oscar Méndez-Lucio, Rafael Castillo. "Homology modeling docking and molecular dynamics of *Leishmania mexicana* arginase: A description of the catalytic site useful for drug design." *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2012, 3:50-59.

Además, los resultados se presentaron en los siguientes congresos:

244th National Meeting and Exposition, American Chemical Society, Philadelphia, Pennsylvania. "Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of novel 1,2-disubstituted-1*H*-benzimidazole derivatives". Autores: Carlos Méndez-Cuesta, Alicia Hernández-Campos, Lilian Yépez-Mulia, Rafael Castillo. Año 2012.

Conferencia-Curso: "Acoplamiento molecular, síntesis y evaluación biológica de derivados de benzimidazol contra *Leishmania spp*", en la Escuela de Química, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Año: 2012.

7ª. Reunión de la Asociación Mexicana de Química Orgánica, Cuernavaca, Morelos, México; con el Poster: "Síntesis y evaluación biológica de derivados N-alkyl-2-aminobenzimidazoles contra protozoarios". Autores: Carlos Alberto Méndez Cuesta, Alicia Hernández Campos, Lilian Yépez Mulia, Amparo Tapia, Rafael Castillo. Año: 2011.

VIII European Workshop in Drug Design, Siena, Italia. Presentación del poster "Synthesis and antiprotozoal activity of 2-(amine)-N-alkyl-1*H*-benzimidazole derivatives". Autores: Carlos Alberto Méndez Cuesta, Rafael Castillo. Año: 2011.

46° Congreso de Química de la Sociedad Química de México, Juriquilla, Querétaro, México. Poster: "Síntesis y evaluación biológica de derivados N-alkyl-2-aminobenzimidazoles contra protozoos parásitos". Autores: **Carlos Alberto Méndez Cuesta**, Alicia Hernández Campos, Lilián Yépez Mulia, Amparo Tapia, Rafael Castillo. 2011.

Conferencia: "Acoplamiento molecular, síntesis y evaluación biológica de derivados de benzimidazol contra *Leishmania spp*." En la actividad académica QuimiUNAM 2011, Posgrado en Ciencias Químicas, DF, México.

239th National Meeting and Exposition, American Chemical Society, San Francisco, California. "Docking study of benzimidazole derivatives and pyruvate kinase of *Leishmania spp*". Autores:

Carlos Méndez-Cuesta, Alicia Hernández-Campos, Francisco Hernández-Luis, Rafael Castillo. Año 2010.

44° Congreso de Química de la Sociedad Química de México, Puebla, Puebla, México. Poster: "Modelado por homología de la enzima Arginasa de *Leishmania spp*" y "Acoplamiento molecular de derivados bencimidazólicos contra la Piruvato cinasa de *Leishmania spp*". Autores: Carlos Alberto Méndez Cuesta, Alicia Hernández Campos, Rafael Castillo. 2009

ABSTRACT

In this thesis presents a computer-assisted homology study conducted to build the three-dimensional structure based on the known sequence of amino acids of arginase enzyme. Furthermore, several molecular coupling benzimidazole derivatives in the homologous enzyme arginase and crystallized pyruvate kinase enzyme of *Leishmania mexicana* and human was performed, obtaining selectivity by parasite enzymes. The derivatives that higher binding energy exhibited were synthesized, being those with the structure 2-amino-1*H*-benzimidazol substituted in position 1 with short and long chains as well as substitutions on the 2-amino group with benzyl substituted. In total 10 compounds (**6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **41**, **46**, **48**, **53**) were synthesized, 5 for arginase and 5 for pyruvate kinase. The synthesized compounds were characterized by their spectroscopic and spectrometric data. The antiparasitic activity *in vitro* showed that compounds **6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **41** and **48** were more active than Albendazole, Metronidazole and Nitazoxanide against *Giardia intestinalis*. Against *Trichomonas vaginalis* all of the compounds were more active than the ABZ, but only compounds **11**, **16**, **21**, **36**, **41** and **53** were more active than the MTZ, while the compounds **11**, **16**, **21**, **41** and **53** were more active than NTZ. For activity against *Entamoeba histolytica* was found that compounds **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **41**, **46**, **48** and **53** were more active than MTZ but none was more active than ABZ and NTZ. All the compounds were evaluated against *Leishmania mexicana* promastigotes, where it was observed that compounds **6**, **11**, **41**, **46** and **48** had moderate activity but no more active than amphotericin (ANF) and pentamidine, the drugs of choice. Finally, the results of the cytotoxicity for the compounds synthesized showed that all the tested compounds displayed lower cytotoxicity compared to the ANF, particularly compounds **11**, **41** and **46**. The compound **46** has the best activity and reduced cytotoxicity. These compounds can be used to build a database of activity against Leishmania, for a rational design of new computer derivatives of benzimidazoles

RESUMEN

En esta tesis se describe un estudio de modelado por homología asistida por computadora con la cual se logró obtener la estructura tridimensional basada en la secuencia conocida de aminoácidos de la enzima arginasa. Además, se realizó un acoplamiento molecular de varios derivados de benzimidazol en la enzima homóloga de arginasa y la cristalizada de piruvato cinasa de *Leishmania mexicana* y de humano, obteniendo selectividad por las enzimas del parásito. Los derivados que exhibieron una mayor energía de enlace se sintetizaron, siendo los que tenían la estructura base de los 2-amino-1*H*-benzimidazol sustituido en la posición 1 con cadenas cortas y largas, así como sustituciones en el grupo 2-amino con bencilo sustituido. En total fueron 10 compuestos (**6, 11, 16, 21, 26, 36, 41, 46, 48, 53**) los sintetizados, 5 para arginasa y 5 para piruvato cinasa. Los compuestos sintetizados se caracterizaron por sus datos espectrocópicos y espectrométrico. La actividad antiportozoaria *in vitro* mostró que los compuestos **6, 11, 16, 21, 26, 36, 41** y **48** fueron más activos que Albendazol, Metronidazol y Nitazoxanida contra *Giardia intestinalis*. Contra *Trichomonas vaginalis* todos los compuestos fueron más activos que el ABZ, pero solo los compuestos **11, 16, 21, 36, 41,** y **53** fueron más activos que el MTZ, mientras que los compuestos **11, 16, 21, 41** y **53** fueron más activos que NTZ. Para la actividad contra *Entamoeba histolytica* se encontró que los compuestos **11, 16, 21, 26, 36, 41, 46, 48** y **53** fueron más activos que MTZ pero ninguno resultó ser más activo que ABZ y NTZ. A todos los compuestos se les evaluó su actividad contra promastigotes de *Leishmania mexicana*, donde se observó que los compuestos **6, 11, 41, 46** y **48** presentaron actividades moderadas pero no más activos que los fármacos de elección Anfotericina (ANF) y pentamidina. Por último, se muestran los resultados del estudio de citotoxicidad de los compuestos sintetizados, en donde se observó que todos los compuestos presentaron una menor citotoxicidad respecto a la ANF, en especial los compuestos **11, 41** y **46**. El compuesto **46** tiene la mejor actividad y la menor citotoxicidad. Estos compuestos se pueden utilizar para construir una base de datos de actividad contra *Leishmania spp*, para realizar un diseño racional por computadora de nuevos derivados de los benzimidazoles.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Lista de Abreviaturas	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Leishmaniosis	5
2.2. Leishmaniosis en México	7
2.3. Ciclo de vida de Leishmania spp	7
2.4. Diagnóstico	8
2.5. Control	9
2.6. Tratamiento	10
2.7. Bencimidazoles como Leishmanicidas	12
2.8. Diseño de nuevos fármacos Leishmanicidas	16
2.9. Enzimas (Arginasa y Piruvato Cinasa)	18
2.10. Modelado por Homología y Acoplamiento Molecular	20
2.11. Síntesis de derivados del 2-Amino-1 <i>H</i> -Bencimidazol	23
2.11.1. A partir de <i>o</i> -fenilendiaminas	23
2.11.2. A partir de Nitrobenzenos <i>o</i> -sustituidos	24
2.11.3. A partir de Tioureas	25
2.11.4. Por alquilación de derivados de 2-Aminobencimidazol	26
2.11.5. Por acilación de derivados de 2-Aminobencimidazol	26
2.11.6. Por aroilación de derivados de 2-Aminobencimidazol	27
2.11.7. Por reacción de derivados de 2-Aminobencimidazol con compuestos carbonílicos	27
3. Planteamiento del Problema	28
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo General	28
5.2. Objetivos Específicos	28
6. Desarrollo Experimental	30
6.1. Parte Computacional	30
6.1.1. Modelado por Homología	30
6.1.2. Estudios de Acoplamiento Molecular	31
6.1.2.1. Preparación de Proteínas	31
6.1.2.2. Preparación de los ligandos	31

6.1.2.3. Acoplamiento molecular	32
6.1.3. Dinámica Molecular	32
6.2. Parte Química	32
6.2.1. Análisis retrosintético	33
6.2.2. Síntesis 1 de los 1,2-disustituidos 2-aminobencimidazoles, vía Sustitución Nucleofílica Aromática	33
6.2.3. Síntesis 2 de los 1,2-disustituidos 2-aminobencimidazoles, vía ciclocondensación con isotiocianato	33
6.2.4. Síntesis 3 de los 1,2-disustituidos 2-aminobencimidazoles, vía sustitución con cloruro de alquilo	35
6.3. Parte Biológica	35
6.3.1. Actividad contra los protozoarios <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
6.3.2. Cultivo de células Vero	36
6.3.3. Citotoxicidad	36
6.3.4. Cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	36
6.3.5. Ensayo de susceptibilidad <i>in vitro</i> con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	36
7. Resultados y Discusión	38
7.1. Parte Computacional	38
7.1.1. Modelado por Homología	38
7.1.2. Dinámica molecular de la arginasa de <i>L. mexicana</i>	46
7.1.3. Acoplamiento molecular con la enzima PC de <i>L. mexicana</i> y <i>H. sapiens</i>	47
7.1.4. Acoplamiento molecular con la enzima AN de <i>L. mexicana</i> y <i>H. sapiens</i>	57
7.1.5. Dinámica molecular del complejo arginasa-compuesto 36	64
7.2. Parte Química	68
7.3. Parte Biológica	96
7.3.1. Actividad contra los protozoarios <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i>	96
7.3.2. Actividad sobre los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	99
8. Conclusiones	106
9. Perspectivas	108
10. Bibliografía	110
Apéndice A. Parte Experimental	122
Apéndice B. Espectros	139

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Albendazol	ABZ
AmBisome	AmB
Anfotericina B.	ANF
Antimoniales pentavalentes	Sb
Arginasa	AN
Borohidruro de sodio	NaBH ₄
Bromuro de cianógeno	BrCN
Centro de Investigación y Estudios Avanzados	CINVESTAV
Concentración Citotóxica Media	CC ₅₀
Concentración Inhibitoria Media	CI ₅₀
Diciclohexilcarbodiimida	DCC
Dicloro-difenil-tricloroetano	DDT
Diseño de Fármacos Asistido por Computadora	DiFAC
Electroforesis de Enzimas Multilocus	MLEE
Equivalente	eq
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	ENCB
Fosfoenolpiruvato	PEP
Índice de Selectividad	IS
Instituto Mexicano del Seguro Social	IMSS
Intradermorreacción	IDR
Isotiocianato de alquilo	SCN-R
Leishmaniosis Cutánea	LC
Leishmaniosis Cutánea Difusa	LCD
Leishmaniosis Cutánea Localizada	LCL
Leishmaniosis Dérmica Post-Kala-azar	LDPK
Leishmaniosis Mucocutánea	LMC
Leishmaniosis Visceral	LV
Mebendazol	MBZ
Metronidazol	MTZ
Miltefosina	MLF
No aplica	n.a.
No determinado	n.d.
Organización Mundial de la Salud	OMS

Óxido Nítrico	NO
Óxido Nítrico Sintetasa	ONS
Paromomicina	PMM
Piruvato cinasa	PC
Protein Data Bank	PDB
Punto de ebullición	peb
Punto de fusión	pf
Reacción en Cadena de la Polimerasa	RCP
Sustitución Nucleofílica Aromática	SNAr
Vía Intravenosa	v.i.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios y helmintos continúan siendo un grave problema de salud pública en países en vías de desarrollo, entre ellos México. Estas enfermedades ocupan uno de los primeros lugares de morbilidad en el ámbito mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de la mitad de la población mundial está infectada con algún tipo de parásito. Entre ellos, se tienen enfermedades como la giardiasis, amebiasis y trichomoniasis que afectan a una parte importante de la población mundial. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de casos de infección, así como los graves problemas que generan, se cuentan con alternativas de tratamiento. El fármaco de elección es el metronidazol, un nitroimidazol que ha estado en el mercado por más de 40 años. La nitazoxanida es un fármaco nitroheterocíclico de creación relativamente reciente que se ha usado con éxito en el tratamiento de la giardiasis y otras parasitosis.

Sin embargo, existen enfermedades que no cuentan con opciones de tratamientos seguros, eficaces y al alcance de la población. Una de estas enfermedades es la Leishmaniasis, cuyo agente etiológico es el parásito *Leishmania spp*, en sus diversas variedades causa leishmaniasis cutánea, mucosa y la más grave de todas, la visceral. Se reportan cerca de 12 millones de casos en todo el mundo, con un aumento de 2 millones por año. Esta enfermedad causa una gran cantidad de muertes en países tropicales y subtropicales, lo que llega a ser un gran problema en países en vías de desarrollo. Dependiendo del tipo de leishmaniasis, puede causar lesiones en la piel, las mucosas, inflamación de órganos como corazón, hígado y finalmente la muerte. Los pocos fármacos disponibles como son los antimoniales, macrólidos y derivados de la pentamidina, son insuficientes para tratar esta enfermedad. Además de que llevan más de 50 años en el mercado, provocando resistencia por parte del parásito, así como severos efectos secundarios. En este aspecto, grupos de investigación de la Facultad de Química-UNAM, Departamento de Farmacia; del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS; del CINVESTAV-Zacatenco y de la Universidad de Durango; han unido esfuerzos en este amplio proyecto de investigación, cuyo propósito es el acoplamiento molecular, diseño, síntesis y determinación de la actividad leishmanicida de derivados del bencimidazol.

El propósito de este proyecto está encaminado a determinar los requerimientos estructurales que deben tener los derivados del bencimidazol para presentar actividad leishmanicida, para ser evaluados *in silico* contra proteínas del metabolismo, sintetizarlos y evaluarlos *in vitro* contra el parásito. Estos compuestos servirán para construir una base de datos estructura-actividad antileishmania significativa, con el propósito de aplicarlos para un diseño racional y computarizado de nuevos derivados del bencimidazol. En esta tesis se realizó un acoplamiento molecular de

varios derivados del bencimidazol sobre las enzimas arginasa y piruvato cinasa de *Leishmania mexicana*. Se sintetizaron los derivados que presentaban mayor energía unión, los cuáles presentaban la estructura base del 2-amino-1*H*-bencimidazol sustituido en la posición 1 con cadenas cortas y largas; así como sustituciones en el 2-amino con grupos bencilo sustituidos. Posteriormente, los compuestos sintetizados fueron evaluados *in vitro* contra diversos protozoarios, como son *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* para determinar su actividad antiprotozoaria, además de probar su actividad contra los promastigotes de *Leishmania mexicana*. Finalmente se realizó un estudio de citotoxicidad de los compuestos sintetizados para determinar su seguridad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Leishmaniosis

Desde un punto de vista global, las enfermedades parasitarias muestran una tendencia de aumento en la salud humana y su bienestar.¹ Los parásitos protozoarios son los responsables de la mayoría de las enfermedades más comunes y devastadoras que afectan a los humanos y animales domésticos, disminuyendo la calidad de vida de una tercera parte de la población mundial.²

La leishmaniosis y la tripanosomiasis continúan siendo una causa de sufrimiento de millones de personas en zonas tropicales y subtropicales del mundo. En los últimos 30 años, estos padecimientos han crecido considerablemente y permanecen como uno de los más grandes problemas en la salud y prosperidad económica de la humanidad.^{1,3,4}

A partir del año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una serie de lineamientos para combatir el hambre y las enfermedades en el mundo, destacando el combate a enfermedades que afectan a los países en vías de desarrollo y que han recibido poco apoyo financiero. Estos padecimientos fueron nombradas como las 13 enfermedades tropicales olvidadas, entre las que destacan la leishmaniosis, así como la ascariosis, infecciones por gusanos de gancho, trichuriasis, filariosis linfática, oncocercosis, dracunculiosis, esquistosomiosis, enfermedad de Chagas, tripanosomiosis humana Africana, úlcera de Buruli, lepra y tracoma.⁵

Entre estas enfermedades, la leishmaniosis es la que más muertes provoca tras la malaria, por lo que es una de las enfermedades olvidadas que se han convertido en una prioridad para la OMS.⁶ El estimado global de esta enfermedad es impreciso debido en parte a la pasiva detección de datos usado para calcular la prevalencia en algunas ciudades endémicas. La cifra global es de 12 millones de casos confirmados, así como 350 millones de personas en 98 países en riesgo de contraer leishmaniosis, con una incidencia por año de 0.2 a 0.4 millones de casos para leishmaniosis visceral y 0.7 a 1.2 millones para leishmaniosis cutánea, en regiones como India, sur de Asia, África Central, Latinoamérica y el Caribe (**Figura 1**).^{5,7-9}

La leishmaniosis es una enfermedad compleja, ya que es el nombre colectivo para un número de enfermedades causadas por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*.^{11,12} Este género abarca hasta 20 especies distintas (incluyen *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*). Son transmitidos a humanos por más de 30 especies diferentes del mosquito de arena hembra de la subfamilia *Phlebotominae*; presentando diferentes manifestaciones clínicas.^{10,13,14}

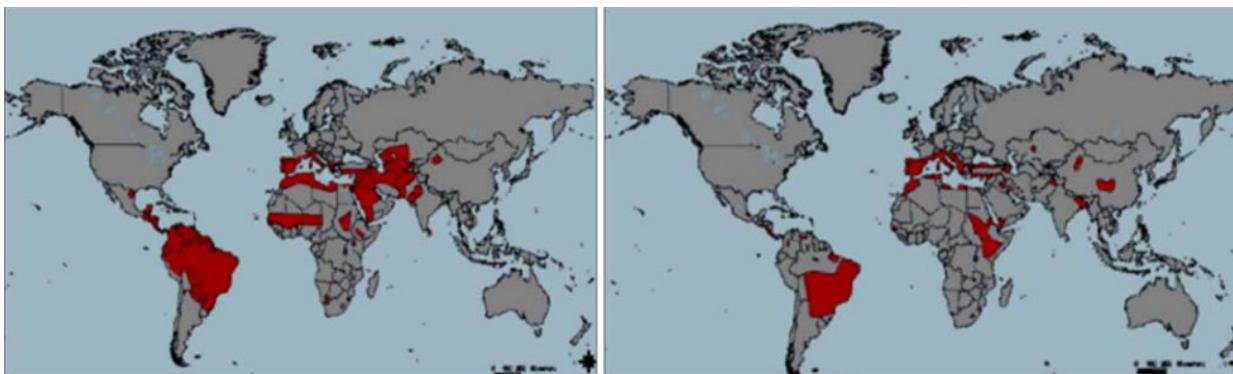


Figura 1. Distribución de la Leishmaniosis Cutánea (LC) (izquierda) y Leishmaniosis Visceral (LV) (derecha) en el Nuevo y Viejo Mundo. Las áreas afectadas están marcadas en rojo de acuerdo a la OMS.¹⁰

La forma más mortal es la leishmaniosis visceral (LV), presente tanto en el viejo mundo como en el nuevo mundo. Se caracteriza por espasmos irregulares y fiebre, pérdida sustancial de peso, puntos negros, hinchazón del bazo, del hígado y anemia.^{8,12} Otro gran número de diferentes especies de *Leishmania* causa leishmaniosis cutánea (LC), la cual es la más común de las afecciones de este tipo. Se caracteriza porque los pacientes presentan una o varias úlceras severas o nódulos en la piel. Las úlceras raramente se curan espontáneamente, aunque lentamente, en pacientes inmunocomprometidos; pero causan cicatrices desfigurantes.^{6,8,12}

En la leishmaniosis mucocutánea (LMC), los pacientes sufren de ulceraciones progresivas destructivas de las mucosas, extendiéndose de las nariz y la boca a la faringe y laringe. Estas lesiones no se curan por sí solas y usualmente se ven meses o años después de un primer episodio de LC, cuando los macrófagos de la mucosa naso-orofaríngea se infectan.^{8,12} Una variante de la LV, la leishmaniosis dérmica post-kala-azar (LDPK), produce en los pacientes la aparición de una urticaria macular, maculo-papular o nodular y es una complicación de la LV que no es tratada a tiempo. Estos casos son altamente infecciosos debido a que estas lesiones nodulares contienen una cantidad importante de parásitos, considerados reservorios durante ciclos epidémicos (**Figura 2**).^{6,12}

Este problema no solo es exclusivo de países tropicales, ya que el número de casos de LV en el litoral mediterráneo, especialmente en España, también está aumentando hasta convertirse en un problema sanitario. También, la leishmaniosis es frecuente como co-infección en pacientes con VIH (prevalencia de un 7 a 17%).^{3,6}



Figura 2. Signos clínicos de leishmaniosis. (a) Un paciente de Perú con LC. (b) Un paciente de Bolivia con LMC. (c) Un paciente de Uganda con LV. (d) Un paciente de la India con LDPK.

2.2. Leishmaniosis en México

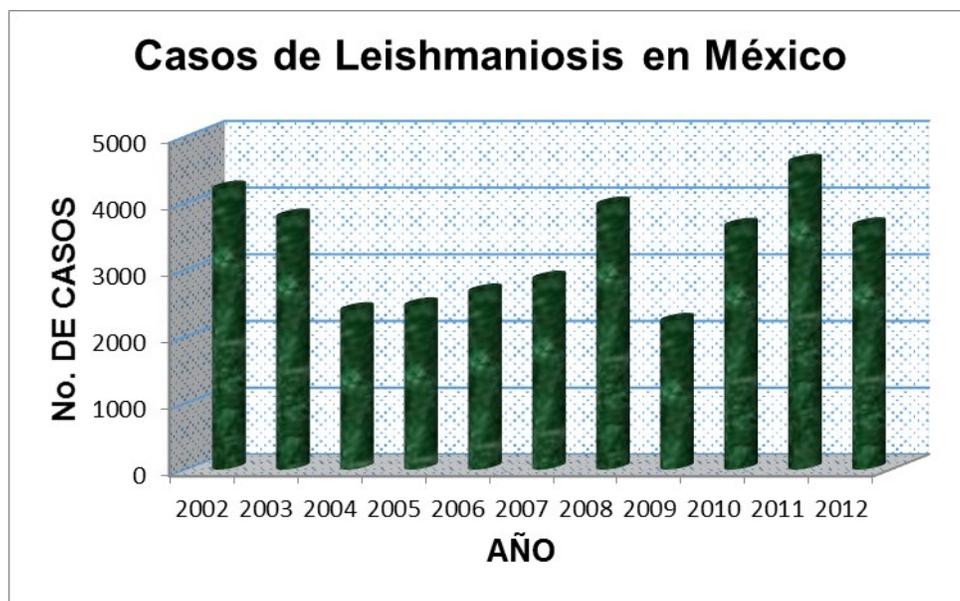
En México se conoce su existencia desde la época prehispánica, así como su presencia en las diversas formas clínicas en Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán donde se informó de leishmaniosis cutánea localizada (LCL); en Tabasco, Michoacán, Coahuila y Tamaulipas de leishmaniosis cutánea difusa (LCD), que fue descrita por primera vez en 1965; en Tabasco y Chiapas leishmaniosis mucocutánea (LMC) y en los estados de Guerrero y Morelos de leishmaniosis visceral (LV) (**Gráfica 1**).¹¹

Se estima que hay al menos 200 nuevos casos cada año en la región, con un pequeño número de casos en los estados de Coahuila y Nuevo León, los cuales tienen un clima desértico y en la frontera con los Estados Unidos. La única especie reportada en México es la *L. mexicana mexicana*, y es notorio que pacientes mexicanos con LC raramente se curen espontáneamente.¹⁵

2.3. Ciclo de Vida de *Leishmania spp*

El género de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados.⁴ El ciclo de vida de *Leishmania* tiene dos formas distintas: una forma llamada promastigote flagelar, encontrada en el intestino de artrópodo vector y una forma de amastigote, la cual se desarrolla intracelularmente en el huésped

mamífero. Solo la hembra del *Phlebotomus* transmite la enfermedad, por inoculación del promastigote en la piel. El parásito se interna en las células dendríticas y en los macrófagos de la dermis, entonces se transforman en amastigotes por pérdida de su flagelo. Se multiplican y sobreviven en los fagolisosomas a través de una compleja interacción parásito-huésped. El parásito se disemina a través del sistema vascular y linfático e infecta a otros monocitos y macrófagos, resultando en la infiltración de la médula ósea, hepatoesplenomegalia y en ocasiones alargamiento de los nódulos linfáticos (linfadenopatía). Posteriormente, cuando el mosquito toma la sangre del paciente infectado, también toma los macrófagos infectados. Los amastigotes se dirigen al intestino y se convierten en promastigotes, donde se multiplican y comienzan nuevamente el ciclo.^{10,12,17} El ciclo de vida completo se muestra en la **Figura 3**.



Gráfica 1. Casos reportados de Leishmaniosis en México hasta 2012.¹⁶

2.4. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la LC se desarrollaron diversos métodos, pero la detección del parásito por impronta, estudio histopatológico de las biopsias, aislamiento y cultivo para su posterior identificación, es lo que corrobora el diagnóstico. Desde luego que las pruebas inmunológicas como ELISA y la intradermorreacción (IDR) de Montenegro son importantes para establecer el diagnóstico.¹⁸ La IDR se aplica con un criterio epidemiológico desde 1941. El grado de endemidad de una zona está relacionado con la susceptibilidad y resistencia de sus habitantes y se mide al emplear los índices, parasitario y alérgico.¹¹

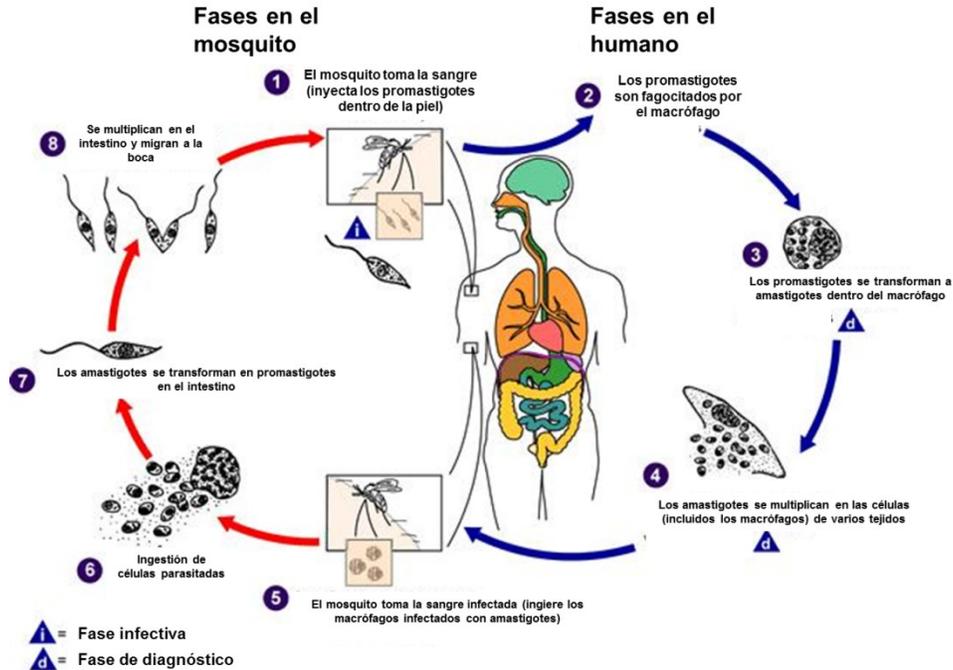


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.^{10,12,17}

Como la presentación clínica de LV es poco específica, pruebas confirmatorias son requeridas para decidir que pacientes deben ser tratados. Dentro del grupo de pruebas de tipo no-leishmania está el conteo de células sanguíneas, donde una reducción en el número de células blancas, rojas y plaquetas (pancitopenia) es característico en la LV.¹² Para la detección directa del parásito se recurre a la visualización del amastigote por examinación en el microscopio de un aspirado de nódulos linfáticos, médula ósea o bazo. Las pruebas con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y la detección con anticuerpos monoclonales específicos para *Leishmania* spp, es altamente efectiva, dando su identificación inequívocamente. La movilidad electroforética de enzimas (electroforesis de enzimas multilocus, MLEE) es otra herramienta que caracteriza al parásito, revelando polimorfismos, lo que clasifica las diferentes especies de *Leishmania*.¹⁹

A pesar de tener estas herramientas útiles para la detección de esta enfermedad, estas últimas son de muy alta incidencia. Además de que estas técnicas están restringidas a hospitales principales y grandes centros de investigación, a pesar de lo simples que son estas técnicas.¹²

2.5. Control

Las estrategias actuales para el control de la LV incluye el control del vector y de los reservorios, el uso de materiales impregnados con insecticidas y la detección de casos y su tratamiento.; las vacunas anti-leishmania aún están siendo desarrolladas.¹²

Para el control del reservorio, los perros son la principal fuente de *L. infantum* de LV zoonótica. El tratamiento de perros infectados no es una estrategia de control muy efectiva, ya que los perros clínicamente curados pueden recapturar la infectividad semanas después del tratamiento. Además de que el tratamiento puede generar resistencia por parte del parásito. Para el control del vector, el mosquito de la arena es susceptible a los insecticidas (Dicloro-difenil-tricloroetano, DDT) utilizados contra el mosquito anófeles, el vector de la malaria. Desafortunadamente, la enfermedad reaparece rápidamente cuando el insecticida se disipa y se discontinúa. Lo que también provoca resistencia del mosquito *Phlebotomus*, transmisor de esta enfermedad.¹²

2.6. Tratamiento

Ante la ausencia de vacunas efectivas y de un adecuado control del mosquito vector, la quimioterapia sigue siendo la mejor opción de tratamiento de esta enfermedad, aunque su eficacia es limitada por la creciente resistencia a los fármacos de primera línea.^{9,20}

La primera línea de tratamiento recomendada para LV incluye: (a) antimoniales pentavalentes (Sb) como son antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostam), excepto en algunas regiones de India, donde hay áreas significativas de resistencia al fármaco. (b) El antibiótico poliénico Anfotericina B (ANF). (c) La formulación liposomal AmBisome (AmB). (d) El aminoglicósido paromomicina (PMM). (e) El fármaco oral Miltefosina (MLF).^{4,5,9,21}

En el caso de los pacientes con leishmaniosis tratados con los antimoniales pentavalentes presentan varias desventajas. Necesitan ser administrados vía intravenosa (i.v.), requieren de 3 a 4 semanas de hospitalización, lo cual incrementa su costo, además de presentar severos efectos adversos como mialgias, pancreatitis, arritmias cardíacas y hepatitis.²² Aún más importante, la eficacia del tratamiento en ciertas regiones ha disminuido, debido al incremento en el número de cepas resistentes,^{4,5,9} ya que este tipo de fármacos se viene utilizando constantemente desde hace más de 70 años.⁶ Su mecanismo exacto aún es desconocido, se sabe que se reduce de su forma pentavalente a trivalente para ejercer su acción. Inhibe la biosíntesis de macromoléculas en amastigotes, posiblemente interfiriendo con la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos.²³

La ANF es una eficiente alternativa, pero también requiere de administración i.v., lo cual es costoso y también presenta severos efectos adversos.⁶ Su mecanismo de acción se basa en unirse a esteroides como el ergosterol y el esterol, predominante en este parásito, promoviendo la formación de poros en las membranas, produciendo la pérdida de iones y finalmente la muerte. Sin embargo también es afín al colesterol de los mamíferos, de ahí su toxicidad.²² Sin embargo, esta toxicidad se puede reducir considerablemente con la aparición de formulaciones lipídicas de ANF, como el

AmB, Amphotec y Abelcet, pero su elevado costo lo hace inaccesible en la mayoría de zonas endémicas de esta enfermedad.^{6,21}

La PMM (Aminosidina) es un antibiótico aminoglicósido producido por *Streptomyces spp.* Su uso está indicado contra LV y LC, ya sea solo o en combinación con antimoniales y con MLF.²² Su mecanismo de acción se basa en la alteración de la síntesis de proteínas, interferencia con la actividad mitocondrial, inhibición de la captura de precursores de macromoléculas y pérdida de permeabilidad de la membrana.²⁴ Aunque aún no hay casos reportados de resistencia, en estudios *in vitro* se han logrado obtener cepas resistentes, por lo que es de suma importancia definir mejor su mecanismo de acción y resistencia por parte del parásito.²⁵

La pentamidina se utiliza como segunda línea de tratamiento de la leishmaniasis desde hace más de 40 años. Sin embargo su uso no es muy amplio dada su toxicidad, ya que produce hipoglucemia, diabetes, nefrotoxicidad, taquicardia y dolor en el sitio de la aplicación. Su mecanismo de acción se basa en su acumulación selectiva en las células del parásito, provocando inhibición en el transporte de arginina, putrescina y espermidina; desintegración de ADN y colapso en el potencial de la membrana mitocondrial. También se han reportado casos de resistencia y dificultades en el tratamiento de pacientes inmunosuprimidos.^{10,25}

El fármaco más prometedor que se ha desarrollado en años recientes es la MLF, un alquilfosfolípido (hexadecilfosfolina). La MLF fue desarrollada primero como un fármaco anticancerígeno; sin embargo, su eficacia en el tratamiento de la LV murina fue reportada tempranamente.^{4,5} Aunque los efectos de la MLF en el metabolismo del fosfatidilinositol y en la alquil-acil-coenzima A aciltransferasa en *Leishmania* han sido reportados, el mecanismo exacto de su actividad aún es desconocido.⁴ Su uso ya es permitido en India para tratamiento principal de la LV, aunque sigue en fase 3 de investigación. Su mayor limitante es su teratogenicidad y su uso está prohibido en mujeres embarazadas.²⁴

Hay diversos fármacos potenciales en varios estados de desarrollo. Tal es el caso de la 8-aminoquinolina (sitamaquina) que se encuentra en Fase 1/Fase 2, probado por GSK en el tratamiento de la LV. Derivados de la imidazoquinolina (Imiquimod) también se encuentran en esta fase y actúan vía activación de macrófagos.^{6,24}

Dado que una gran parte de la población de regiones endémicas está infectada con diversos parásitos y tienen múltiples enfermedades tropicales olvidadas simultáneamente, se ha liberado un paquete de fármacos de rápido impacto para su beneficio. Este paquete incluye la combinación de cuatro de seis fármacos: albendazol o mebendazol, prazicuantel, ivermectina o dietilcarbamacina y azitromicina.⁵

Recientemente, la OMS recomendó el uso de una dosis simple de AmB o combinaciones de fármacos antileishmania, con el fin de reducir la duración y la toxicidad del tratamiento, prolongando la vida terapéutica de los fármacos existentes y retrasar la presencia de resistencia.⁹

Aunque recientes investigaciones clínicas han revelado la eficacia y seguridad de estos tratamientos combinados anti-leishmania, se tiene evidencia que claramente demuestra la adquisición de resistencia a diferentes combinaciones de fármacos en promastigotes de *L. donovani*, utilizando un proceso de adaptación por pasos para incrementar las concentraciones del fármaco. Así como también se han obtenido amastigotes intracelulares de *L. donovani* que son resistentes a diferentes combinaciones de fármacos a partir de promastigotes que también son resistentes a esta combinación de fármacos, tales como MLF/PMM, AmB/PMM y Sb/PMM.⁹

Recientemente, en algunas regiones de México, los pacientes responden pobremente a los tratamientos con los antimoniales pentavalentes, debido a una exposición constante del fármaco o a una inadecuada dosis por razones económicas.¹⁵

En los últimos años, se ha recurrido al uso de inmunoterapias, como son el uso IFN- γ recombinante humana (rIFN- γ), el cual está disponible y que activan a los macrófagos, restableciéndolos con una óptima capacidad leishmanicida. De igual forma se han creado tratamientos de combinación de inmunoterapia con el uso de antimoniales pentavalentes, siendo efectivos en pacientes con LV severa, pero no totalmente eficientes con cepas resistentes a los antimoniales.^{15,24}

A pesar de contar con todas estas alternativas de tratamiento, muchos de ellos se administran con reservas, dada su alta toxicidad, resistencia por parte de los parásitos, costo, eficiencia, largos periodos de tratamiento, etc. Además, el desarrollo de estos fármacos tiene un alto costo y los recursos para la búsqueda de nuevos leishmanicidas son considerablemente más restringidos, en comparación con aquellos que afectan directamente a países más desarrollados. A pesar de estas limitantes, se han logrado obtener nuevas alternativas de tratamiento en estos últimos años. Sin embargo, en comparación con anticancerígenos o antifúngicos, su cantidad es mínima. Es por estas razones que se requieren aplicar nuevas metodologías o aplicar las ya existentes en el desarrollo de fármacos leishmanicidas, para obtener un mayor número de alternativas, seguras, eficientes y de un costo accesible para la mayoría de las personas afectas con esta enfermedad.

2.7. Bencimidazoles como Leishmanicidas

Las investigaciones actuales que permiten el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos están basadas en diversas pruebas: (a) fármacos utilizados en otras patologías, (b) sustancias

neumonía en pacientes con VIH. Sin embargo, dentro de sus limitaciones está su pobre biodisponibilidad y algunos efectos adversos. Es por eso que se han hechos intentos por mejorar este tipo de fármacos, consistiendo en enmascarar las funciones amidinas por la incorporación dentro de los sistemas cíclicos conjugados, particularmente, dentro del núcleo del bencimidazol, obteniéndose un bisbencimidazol (**Figura 5**), el cual demostró tener una actividad exclusiva contra *L. donovani*, incluso mayor que pentamidina, con un valor de Cl_{50} de 1.4 μM (**Tabla 1**).³⁹⁻⁴¹

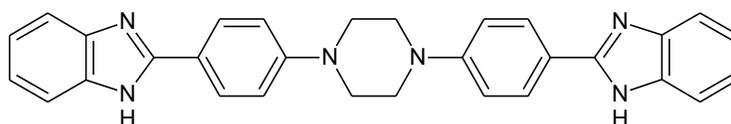
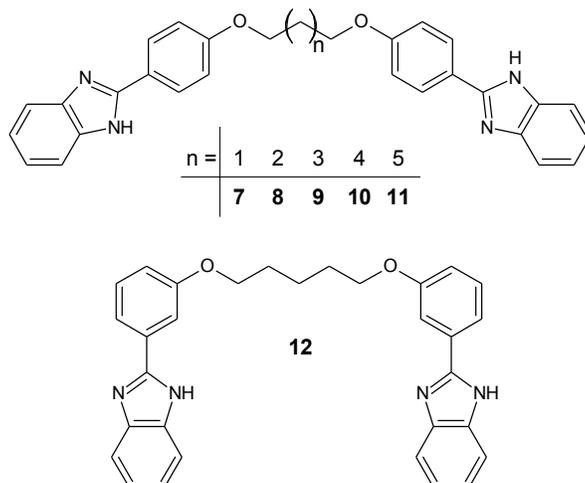


Figura 5. Estructura del bisbencimidazol leishmanicida.³⁹

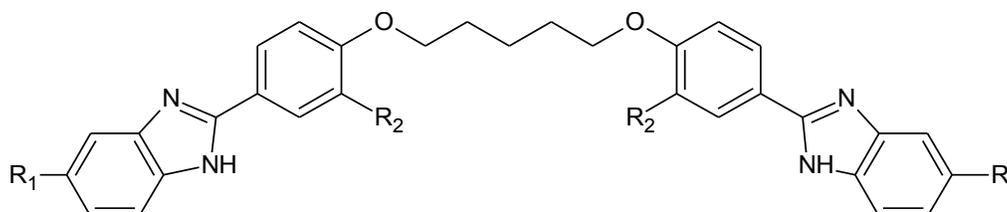
Tabla 1. Actividad farmacológica para los compuestos 7-12 y pentamidina (3).³⁹



Compuesto	<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	<i>Leishmania donovani</i>		Células VERO
	Cl_{50} (μM)	Cl_{50} (μM)	Cl_{50} (μM)	Cl_{90} (μM)	Cl_{50} (μM)
7	10.2	>60	1.5	3.3	27.2
8	169.4	>60	4.9	12.9	>100
9	54.1	>60	1.4	3.1	28.7
10	>100	>60	11.8	53.8	27.9
11	>100	>60	13.6	56.2	46.1
12	5.2	0.85	10.3	45.1	12.3
3	0.5	0.05	2.2	9.8	>100

También se han sintetizado otros compuestos híbridos entre bencimidazoles y pentamidina que presentan sustituciones en las posiciones 5 y 6 del anillo del bencimidazol, así como sustituyentes en el grupo 2-fenilo, que han dado buenas actividades contra *L. mexicana*; algunos con mejor actividad que la pentamidina (**Tabla 2 y 3**).⁴²

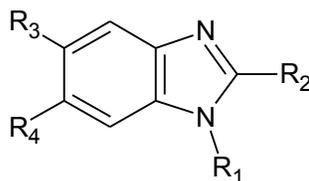
Tabla 2. Datos de actividad antiprotozoaria de derivados híbridos bencimidazol-pentamidina.⁴²



Clave	R ₁	R ₂	<i>L. mexicana</i> CI ₅₀ (μM)
1	H	H	1.065
2	OCH ₃	H	0.712
3	CH ₃	H	0.368
4	CF ₃	H	>50
5	NO ₂	H	>50
6	H	OCH ₃	>50
7	OCH ₃	OCH ₃	>50
8	CH ₃	OCH ₃	>50
9	CF ₃	OCH ₃	>50
Pentamidina			2.2

Como puede observarse, los resultados obtenidos son muy prometedores desde que algunos compuestos muestran actividad similar o superior a la pentamidina. Esto demuestra que la introducción del anillo de bencimidazol resulta en un mejoramiento de la actividad antiprotozoaria, además de una optimización en el mejoramiento de sus propiedades farmacocinéticas.

Tabla 3. Algunos derivados de bencimidazoles como agentes leishmanicidas.⁴³



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	<i>L. mexicana</i> CI ₅₀ (μM)
RSD-7	CH ₃	SH	Cl	H	NE > 80.00
JVG-9	H	SH	Cl	H	24.00
G2	H	CF ₃	Cl	Cl	4.10
GNV14	CH ₃	CF ₃	DCF	H	NE > 80.00
GNV21	CH ₃	CF ₃	H	DCF	13.78
RCB20	H	CF ₃	NAF	Cl	65.23
BZHNOS-2	CH ₃	CH ₃	H	Nitrotia	50.12
PVBM-71	CH ₃	CH ₃	Nitrotia	H	20.80
ABZ					NE > 80.00
Pentamidina					2.421

NAF: 1-naftoxi; DCR: 2,3-diclorofenoxi; Nitrotia: [5-nitro-1,3-tiazol-2-il)amino]carbonilo

NE: No encontrado

2.8. Diseño de nuevos fármacos Leishmanicidas

La Química Farmacéutica es una ciencia aplicada al campo del desarrollo de nuevos fármacos que se ha involucrado gracias a los recientes avances en tecnología, principalmente en las áreas de biología molecular, estructural y química computacional. Consecuentemente, el desarrollo racional de fármacos es una realidad que ofrece nuevas perspectivas para el descubrimiento de nuevos fármacos y/o mejorar los ya existentes.¹⁰

El éxito de la utilización para el descubrimiento de nuevos fármacos y el desarrollo de todos los datos involucrados en el conocimiento del genoma y la postgenómica, requiere de la interacción de algunas disciplinas importantes, entre ellas bioinformática, bioquímica, parasitología celular y molecular, química orgánica e inorgánica, cristalografía de proteínas y biología estructural, farmacología, toxicología, así como competencia en el campo de la prueba de fármacos y experiencia en la clínica humana.¹

La investigación ayuda en la identificación y validación de nuevos blancos es uno de las partes más específicas del proceso de descubrimiento de fármacos, aunque estudios comparativos en *Leishmania* y *Trypanosoma* han sido unidos por el deseo de encontrar un fármaco antitripanosomátida de amplio espectro. La biología celular de la *Leishmania* y de las células de mamíferos difieren considerablemente y esta distinción se extiende a nivel bioquímico. Esto muestra una prometedora perspectiva de que algunas de las proteínas de los parásitos deben ser lo suficientemente diferentes para ser considerados blancos farmacéuticos. Con esto, encontrar nuevos antileishmania debe ser considerablemente más fácil de descubrir que nuevos fármacos

anticancerígenos.²⁴ Una lista de blancos validados para encontrar nuevos fármacos contra *Leishmania* se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Blancos farmacéuticos validados y potenciales antileishmania.²⁴

Enzima/Ruta Metabólica	Evidencia	Estado de explotación
Metabolismo de Tripanotiona	Validación de la tripanotiona reductasa como blanco terapéutico sugerido por experimentos genéticos. Glutationilperimidina sintetasa y tripanotiona sintetasa como potenciales blancos, aún por ser validados en su totalidad.	Reportes de algunos inhibidores de la tripanotiona reductasa, ninguno mostró ser efectivo <i>in vivo</i> a través de la inhibición enzimática.
Cisteinpeptidasa	La enzima CPB validada por manipulación genética y pruebas químicas.	Inhibidores efectivo <i>in vivo</i> . Uno se encuentra en fase clínica contra la enfermedad de Chagas.
Biosíntesis de esteroides	Inhibidores de enzimas en la biosíntesis del esteroide (14 α -dimetilasa) que tiene actividad antileishmania <i>in vitro</i> .	En fase clínica de desarrollo, pero el parásito puede tomar los esteroides del huésped para sobrevivir al ataque del fármaco.
Glicólisis	La glicólisis es considerada esencial, algunas enzimas contenidas en los glicosomas.	Enzimas caracterizadas y algunos inhibidores encontrados.
Protein cinasas	Cinasas dependientes de ciclinas esenciales para el parásito.	Inhibidores encontrados, activos contra amastigotes en macrófagos.
Microtúbulos	Tubulina validada como blanco terapéutico.	Agentes específicos requeridos contra el parásito.

Existe evidencia de que los bencimidazoles son inhibidores de enzimas tipo cinasa, como la enzima punto de control cinasa (chk2). Esta enzima es responsable de que células sanas se vean afectadas por la radiación y entren en fase de apoptosis. Este tipo de compuestos impiden la actividad de la enzima, permitiendo a las células sanas resistir la apoptosis y por lo tanto se utilizan como agente protectores de células sanas durante la radiación (**Figura 6**).⁴⁴ De ahí el supuesto de que este tipo de estructuras pueden ser potenciales inhibidores de enzimas cinasas en *Leishmania spp.*

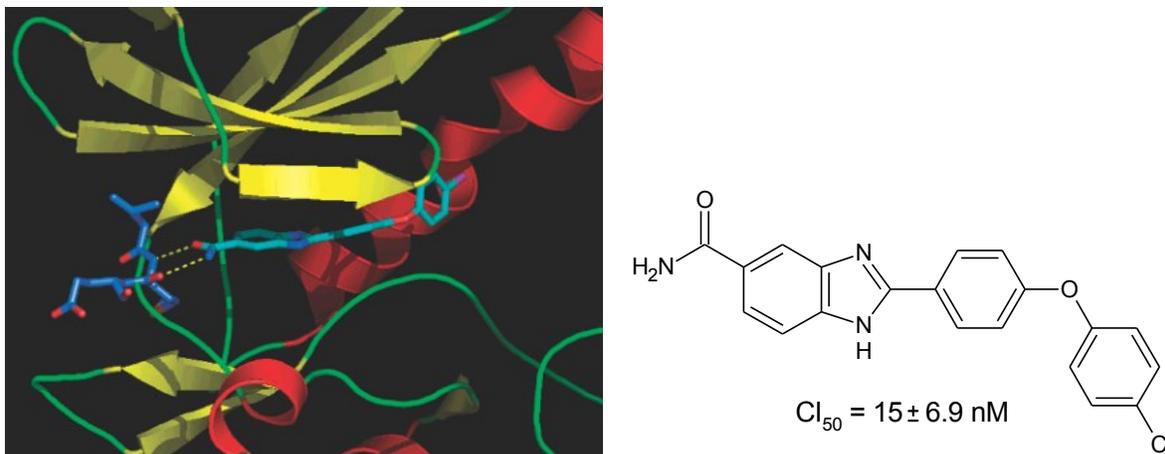


Figura 6. Modelo del compuesto **2h** acoplado en el sitio de unión del ATP de la chk2. Los valores de IC_{50} están expresados en $nM \pm SEM$, de un promedio de seis réplicas.⁴⁴

Se tiene registro de un incremento en el número de pruebas con proteínas cinasas de parásitos protozoarios para evaluarlos como blancos de fármacos (CDKs, CK1, GSK-3, MAPKs, etc.). Algunas se han obtenido como proteínas recombinantes para probar una pequeña selección de compuestos que pueden inhibirlos. Varios de estos compuestos han tenido éxito en la inhibición de la proliferación de los protozoarios, lo que muestra una clara tendencia a usar este tipo de enzimas para desarrollar nuevos fármacos contra la Leishmaniosis.⁴⁵

2.9. Enzimas (Arginasa y Piruvato Cinasa)

La arginasa (L-arginina amidinohidrolasa E.C. 3.5.3.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea. Es una metaloenzima con un centro binuclear de manganeso, responsable de la activación de moléculas de agua utilizadas para atacar el sustrato L-arginina. Estos dos manganesos, Mn^{2+}_A y Mn^{2+}_B son esenciales para la actividad enzimática.⁴⁶ El metabolismo de este aminoácido es crucial en el mecanismo para la regulación de respuesta inmune.⁴⁷

Los organismos patógenos intracelulares que infectan macrófagos, como la *Leishmania*, tienen la habilidad de modular la producción de óxido nítrico (NO) del huésped para mantener la infección. Se propuso que la arginasa puede regular la actividad de la óxido nítrico sintetasa (iNOS), a través de la disminución de la cantidad de L-arginina, manteniendo bajos los niveles de NO citotóxico para el parásito (**Figura 7**).⁴⁸

Basado en su taxonomía e interés fisiológico, la caracterización molecular del gen que codifica la arginasa es de interés para el estudio de su uso como agente terapéutico. Comparando las

secuencias de aminoácidos de la arginasa de *Leishmania* y la arginasa de humano, se observó que tienen un alto grado de similitud, principalmente en el centro catalítico y sus alrededores. Estos aminoácidos son conservados en todas las arginasas que se han comparado hasta la fecha. A pesar de que tiene regiones altamente conservadas, había diferencias significativas entre ambos. Una diferencia en el sitio catalítico, es que en *L. amazonensis* se encuentra un residuo de Thr246, mientras que en la posición equivalente en la arginasa de hígado de humano presenta una Gly235. Otra de estas diferencias son los aminoácidos His228 y Met239 en humano y *L. amazonensis* respectivamente. Estos dos residuos se sitúan cerca del sitio catalítico, formando una estructura espacial diferencial como una especie de canal.⁴⁶

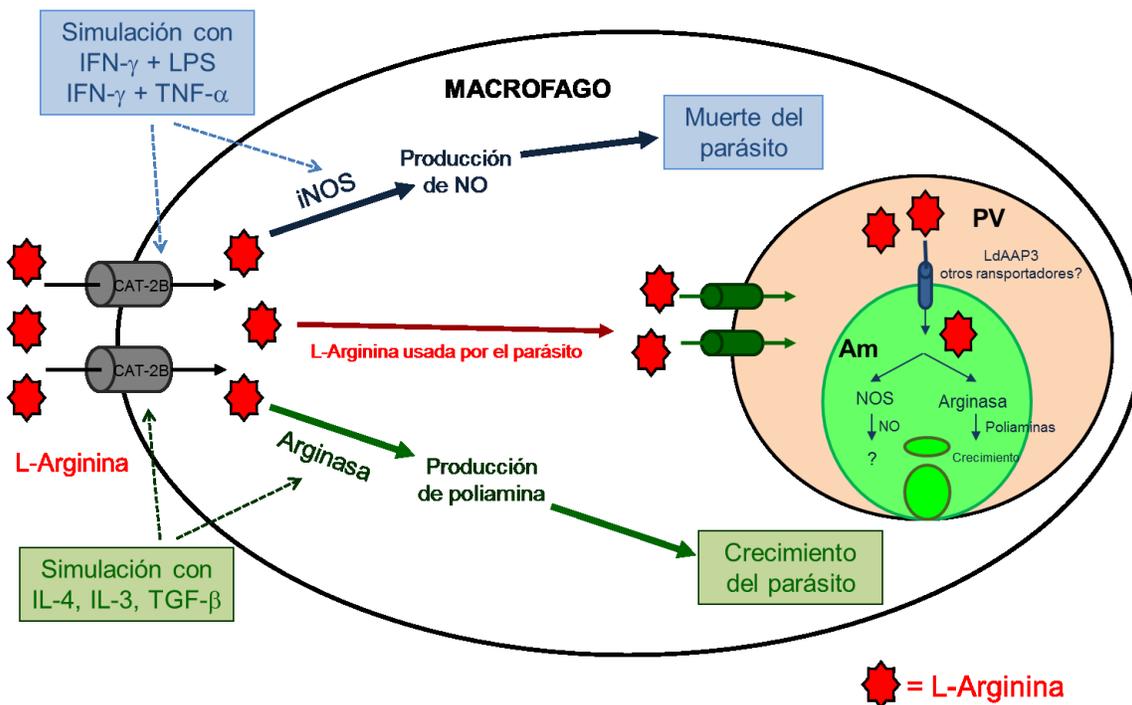


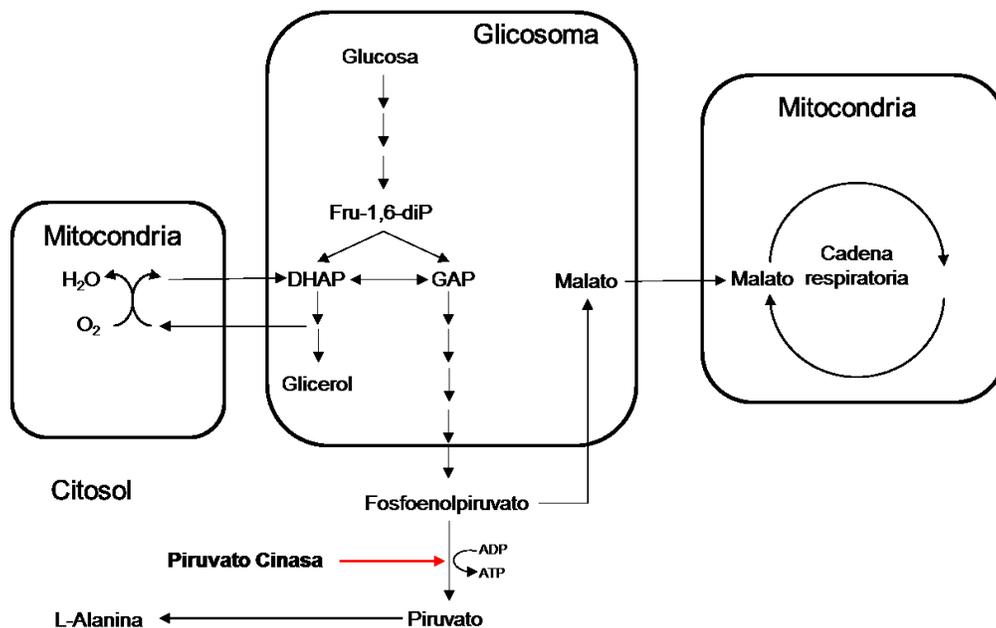
Figura 7. Metabolismo de *Leishmania* spp.⁸

La comparación de estos modelos puede ser explorada para la búsqueda de diferencias significativas espaciales en el sitio catalítico o alostérico, para obtener inhibidores específicos de la arginasa de *Leishmania*.

L. mexicana pertenece al grupo de los protozoarios tripanosomátides que, cuando viven en sus huéspedes mamíferos, dependen totalmente de la glicólisis para la producción catabólica de ATP. Una de las enzimas clave en esta ruta y que ha despertado el interés farmacéutico es la piruvato cinasa (PC) (ATP-piruvato 2-O-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40).⁴⁹ Esta enzima cataliza la esencial transfosforilación irreversible de fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP a piruvato y ATP. El producto es un

componente esencial a un número importante de otras rutas metabólicas, lo que coloca a esta enzima en una inserción metabólica primaria (**Esquema 1 y Figura 8**).⁵⁰

Esta ruta es particularmente interesante, especialmente por la existencia de inhibidores con alta afinidad, no competitivos o irreversibles. Además esta enzima tiene diferencias significativas con la enzima análoga en mamíferos. Una comparación del sitio catalítico de *Leishmania* es que se compone de los residuos de aminoácidos Phe212, Asp264, Thr84, Ser53, Asn51, Asp83, Lys238, Arg49 y Thr296; mientras que la PC de eritrocito de humano se compone de los residuos R116, Thr371, Gly338, Asp339 y E315. Por lo que se tiene una diferencia significativa tanto en el número de aminoácidos como en la cantidad de estos que participan en la conversión de PEP a piruvato.^{49,51}



Esquema 1. Ruta glicolítica general de los protozoarios *Trypanosomatides*, entre ellos *Leishmania spp.* Modificado de^{52,53}

Teniendo en cuenta la importancia que tienen estas enzimas, tanto en la ruta metabólica del parásito, como en las diferencias estructurales, se puede utilizar esta información para la búsqueda de nuevos compuestos contra *L. mexicana*.

2.10. Modelado por Homología y Acoplamiento Molecular

Actualmente, la industria farmacéutica y grupos de investigación de universidades han incorporado metodologías computacionales para el descubrimiento y optimización de fármacos. Desde hace

cuatro décadas se puede generar la información estructural, disminuir los costos y el tiempo para crear u optimizar un fármaco, usando el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC), a partir de evaluar una gran cantidad de compuestos con sus actividades biológicas comunes. De esta manera, el DiFAC se define como el uso de diversos métodos computacionales para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura. Estos métodos pueden agruparse en dos área principales: métodos basados en el ligando y métodos basados en el receptor.^{55,56}

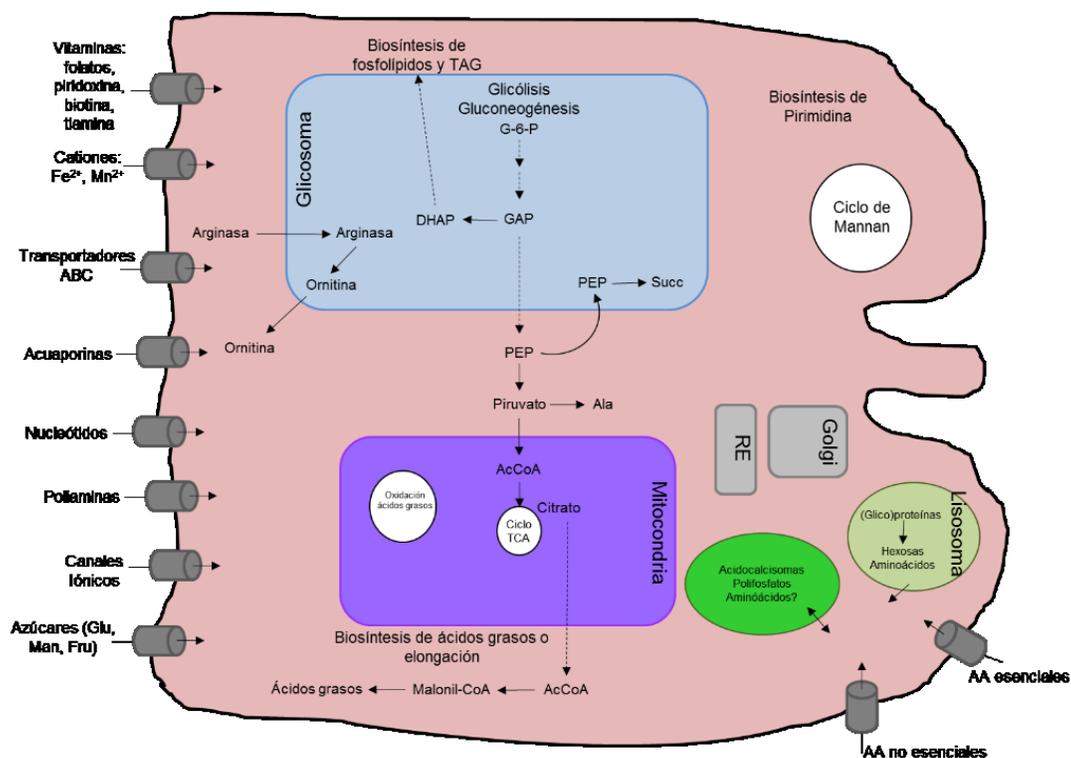


Figura 8. Rutas metabólicas conocidas presentes en el amastigote de *Leishmania*. Modificado de

54

El método basado en el receptor permite evaluar una gran cantidad de moléculas organizadas en bibliotecas virtuales de ligandos, en una gran cantidad de estructuras de proteínas, para obtener compuestos prometedores para su posterior síntesis y/o evaluación biológica. Con el aumento desarrollo de las computadoras y los programas destinados a ellos, se puede realizar este procedimiento de una forma sencilla, rápida y de bajo costo El segundo es cuando se desconoce la estructura del receptor o del blanco pero se conoce la estructura y actividad biológica en común de una serie de moléculas.⁵⁵

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 de fármacos (**Figura 10**).⁵⁸ Esta técnica se emplea cuando la estructura de la diana es conocida. El conocimiento estructural del receptor permite examinar la inducción de cambios estructurales en el ligando para predecir su orientación más estable, así como discriminar entre los diferentes modos de unión que pueda adoptar el ligando y finalmente estimar la energía de unión con el receptor. La energía de unión del complejo ligando-receptor, generalmente se expresa como energía libre de Gibbs ($\Delta G_{\text{unión}}$), considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno así como de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.⁵⁹

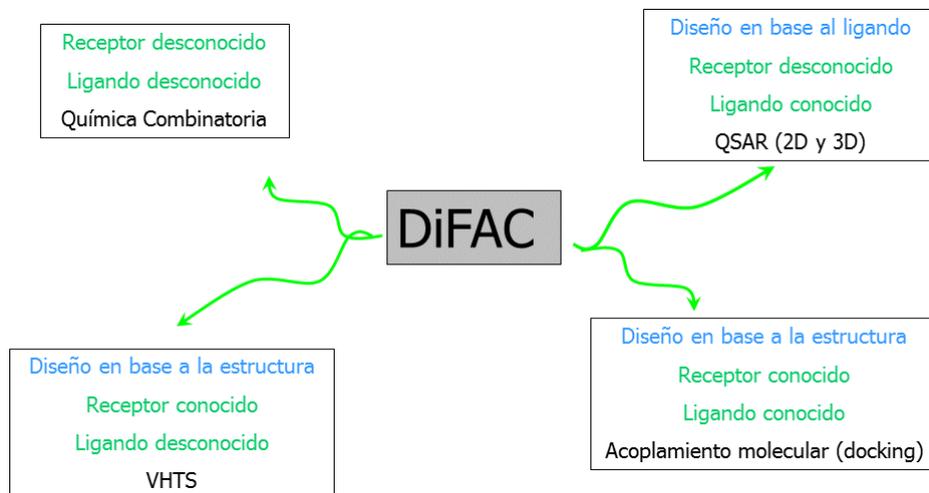


Figura 9. Estrategias para el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC).⁵⁷

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 aquellos 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*) y la re-evaluación *a posteriori* de las afinidades y conformaciones mediante el empleo de técnicas de dinámica molecular o metadinámica.⁵⁹

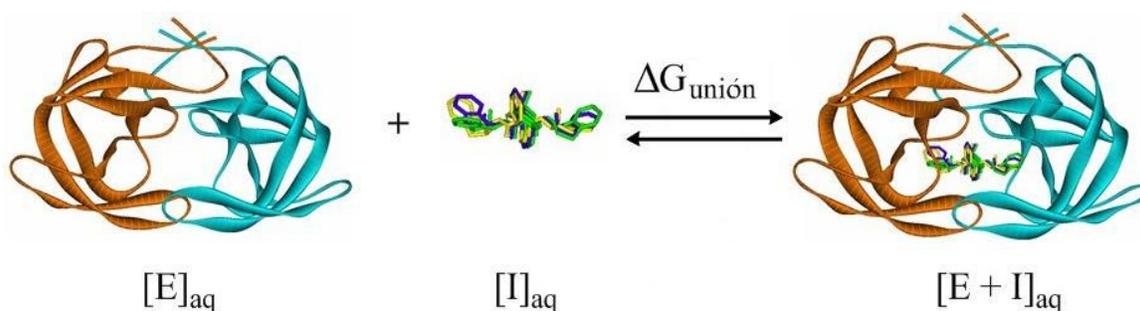


Figura 10. Esquematización del fundamento del acoplamiento molecular, en donde el inhibidor (I) se une a la enzima (E) y forma el complejo inhibidor-enzima (E + I).⁵⁸

Este método es muy utilizado cuando se tiene la proteína cristalizada, pero cuando no se dispone de esta proteína, se recurre al modelado de proteínas por homología. Esta técnica se basa en la suposición razonable de que dos proteínas homólogas compartirán estructuras muy similares puesto que un plegado proteico está evolutivamente más conservado que su secuencia. Una alta similitud secuencial permite asegurar la existencia de una relación evolutiva entre dos organismos, por lo que secuencias prácticamente similares generalmente se plegaran de forma idéntica. La técnica garantiza la confiabilidad del modelo al fundamentar su búsqueda en la similitud de cobertura y en el porcentaje de identidad (%ID). Actualmente existen varios servidores y programas que permiten generar modelos por homología a partir del seguimiento de una serie de pasos ordenados (**Figura 11**).^{60,61}

Los métodos de simulación dinámica son ampliamente utilizados para obtener información acerca de la evolución conformacional, cinética y termodinámica de proteínas, u otras macromoléculas biológicas, a través de 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. El tiempo de movimiento a designar dependerá de la función bioquímica a evaluar. Las reacciones enzimáticas son rápidas y localizadas (10^{-11} – 10^{-7} segundo); el acoplamiento alostérico y el proceso de plegamiento son movimientos lentos (10^{-5} – 1 segundo); mientras que la asociación de subunidades ocurre en un mayor número de movimientos (>1 segundo).⁶² Este método permite conocer tanto la estabilidad de la proteína homóloga, así como la interacción y estabilidad del complejo ligando-receptor a lo largo de un determinado período de tiempo.

2.11. Síntesis de derivados del 2-Amino-1H-bencimidazol

Los derivados del 2-amino-1H-bencimidazol son de los heterociclos con nitrógeno más conocidos y que han sido reconocidos como un importante bloque para la síntesis de una amplia variedad de bencimidazoles sustituidos en la academia, farmacia e industria. La polifuncionalidad de este núcleo lo ha hecho un material importante en la síntesis orgánica. La síntesis de los derivados del 2-amino-1H-bencimidazol se puede llevar a cabo de diversas formas, dependiendo de la materia prima.

2.11.1. A partir de o-fenilendiaminas

El método más versátil y económico involucra el tratamiento de una o-fenilendiamina con diferentes agentes condensantes. En este procedimiento la o-fenilendiamina adecuadamente sustituida se hace reaccionar con bromuro de cianógeno dando el producto con altos rendimientos.⁶⁴ La mezcla de reacción ácida se basifica con solución de hidróxido de sodio o de hidróxido de amonio para

precipitar el producto. Puede reemplazarse el bromuro de cianógeno con cloruro de cianógeno, *N,N*-difencilcarbodiimida o dicloro *p*-clorofenilcarbonimidol y con dicloro electrófilos, dan 2-aminobencimidazoles con buenos rendimientos (Figura 12).^{65,66}

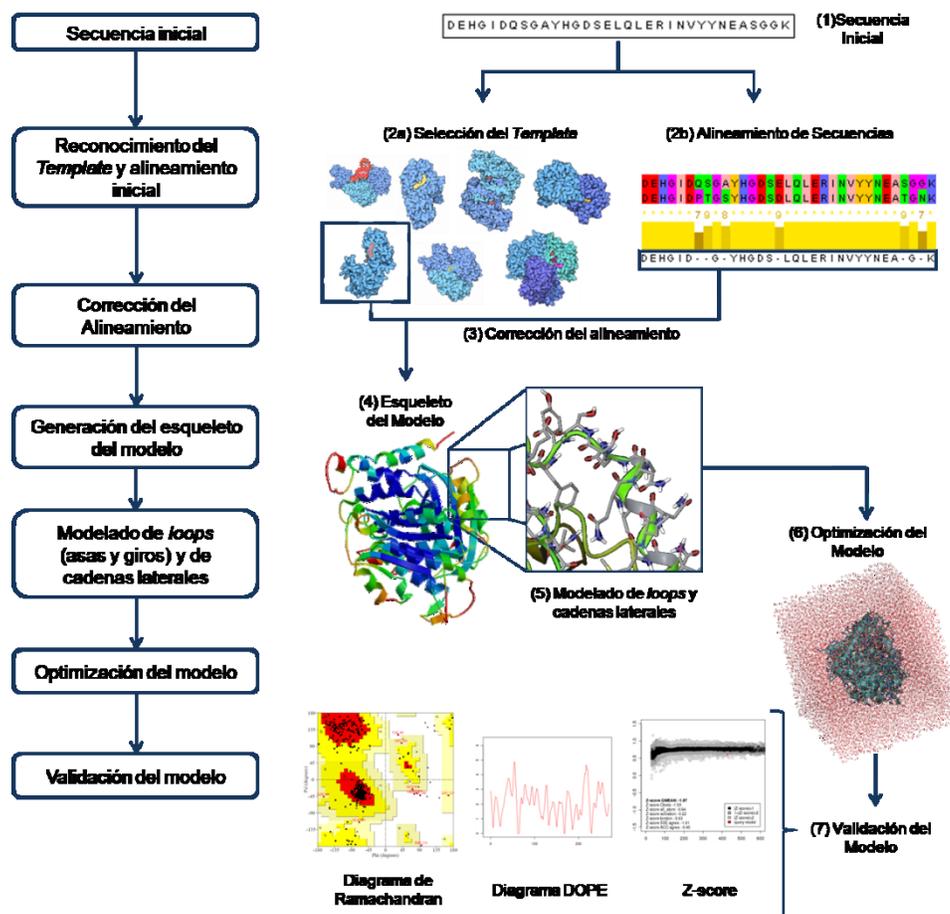


Figura 11. Procedimiento general para el Modelado por Homología.⁶³

2.11.2. A partir de Nitrobenzenos *o*-sustituídos

La hidrogenación de *o*-cianaminonitrobenzenos obtenidos por tratamiento de *o*-cloronitrobenzenos con cianamida de sodio, en catálisis de Ni-Raney, da el derivado de 2-amino-1*H*-bencimidazol. Un método alternativo consiste en calentar a reflujo *N*-(2,5-dinitrofenil)cianamida o *N*-(2,4-dinitrofenil)cianamida con hierro en ácido acético para dar el 2-amino-5-nitrobencimidazol (Figura 13).^{67,68}

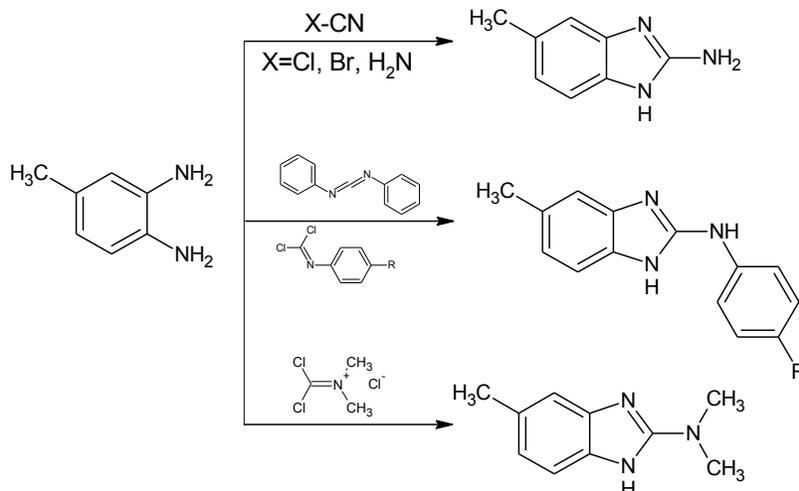


Figura 12. Síntesis de derivados de 2-Amino-1*H*-bencimidazol a partir de *o*-fenilendiaminas.

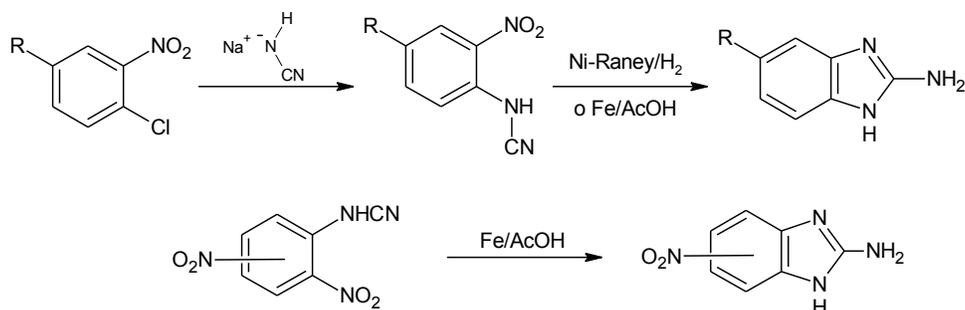


Figura 13. Síntesis de derivados de 2-Amino-1*H*-bencimidazol a partir de *o*-nitrobenzenos.

2.11.3. A partir de Tioureas

Los derivados del 2-amino-1*H*-bencimidazol se pueden preparar por oxidación de las correspondientes *N*-(*o*-aminofenil)tioureas con óxido de mercurio II en etanol absoluto. Las tioureas y su posterior ciclación se pueden obtener en un solo paso, mediante la reacción de *o*-fenilendiaminas con isotiocianato, en presencia de dicitlohexilcarbodiimida (DCC) en diclorometano. En ocasiones se utilizan polímeros acarreadores como el polietilenglicol monometil éter (MeO-PEG-OH) para aumentar los rendimientos (**Figura 14**).^{64,69}

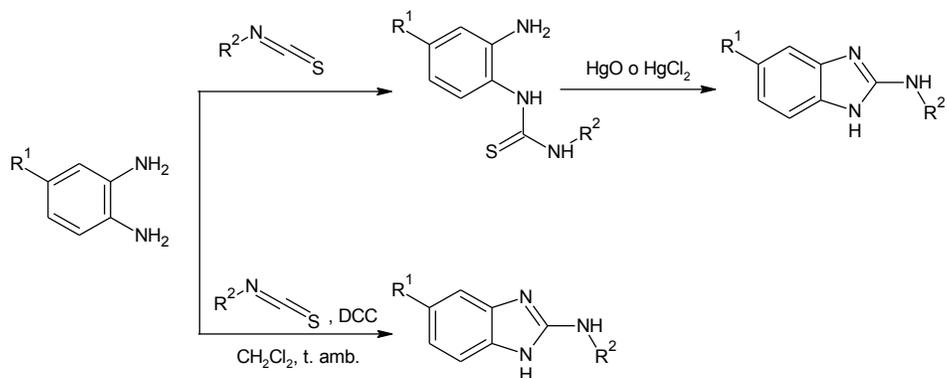


Figura 14. Síntesis de derivados de 2-Amino-1*H*-bencimidazol a partir de Tioureas.

2.11.4. Por alquilación de derivados de 2-Aminobencimidazol

Los 2-aminobencimidazoles también pueden sufrir reacciones de sustitución, las cuales se pueden llevar a cabo por alquilación, acilación o arilación de estos compuestos. La alquilación del 2-aminobencimidazol con haluros de alquilo dan los derivados 1-sustituido-2-aminobencimidazoles con moderados rendimientos. Sin embargo, se puede mejorar el rendimiento si se utiliza el yoduro de alquilo en presencia de hidróxido de potasio (**Figura 15**).⁶⁴

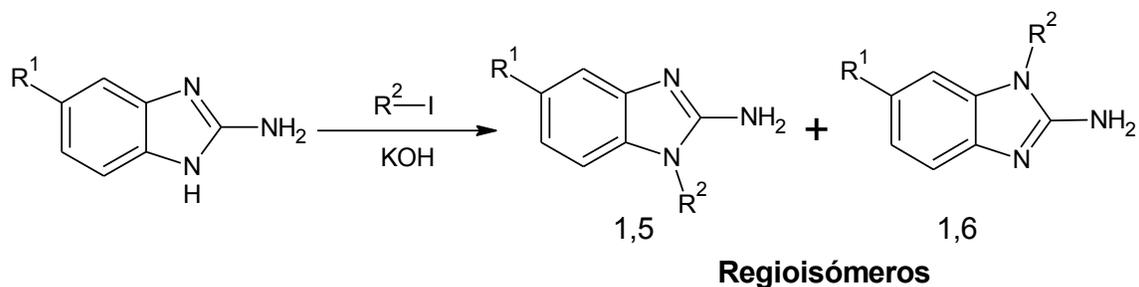


Figura 15. Síntesis de 1-alquil-2-aminobencimidazoles.

2.11.5. Por acilación de derivados de 2-Aminobencimidazol

La acilación de los 2-aminobencimidazoles con una gran variedad de cloruros de acilo genera bencimidazoles 2-carbamatos de alquilo con buenos rendimientos. Los carbamatos de alquilo también se pueden preparar con carbonatos de alquilo en presencia de una base o con carbonato de etileno en presencia de alcohol y una base (**Figura 16**).⁶⁴

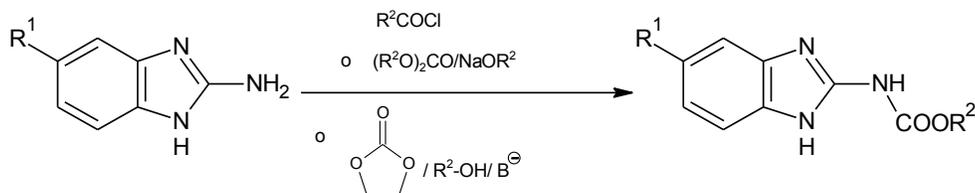


Figura 16. Síntesis de derivados de 1*H*-bencimidazol 2-carbamato de alquilo.

2.11.6. Por aroilación de derivados de 2-Aminobencimidazol

La aroilación de 2 aminobencimidazoles genera bencimidazoles mono y disustituidos, los cuales tienen un amplio espectro de actividad. La reacción de los 2-aminobencimidazoles con cloruros de ácido aromáticos genera el correspondiente 2-aroilaminobencimidazol, el cual se puede acilar para dar el correspondiente bencimidazol 1,2-disustituido (**Figura 17**).⁶⁴

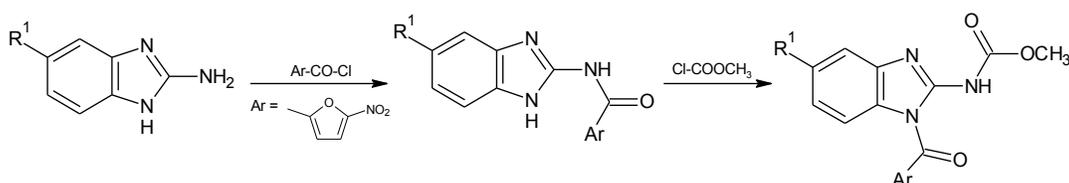


Figura 17. Arilación de 2-aminobencimidazoles.

2.11.7. Por reacción de derivados de 2-Aminobencimidazol con compuestos carbonílicos

Los derivados del 2-amino-1*H*-bencimidazol pueden reaccionar con algunos aldehídos o cetonas para formar las correspondientes bases de Schiff. Para este procedimiento se puede utilizar un agente desecante para eliminar el agua que se forme o utilizar un disolvente de alto punto de ebullición. La imina recién formada puede reducirse para obtener el bencimidazol 2-amino sustituido (**Figura 18**).⁷⁰

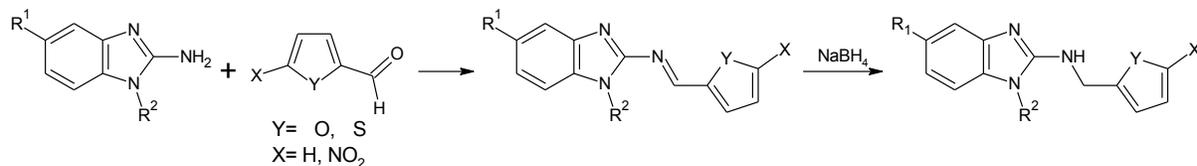


Figura 18. Reacción de los derivados de 2-Amino-1*H*-bencimidazol con compuestos carbonílicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es posible que algunos derivados del bencimidazol se unan selectivamente al sitio de unión de la piruvato cinasa (PC) y arginasa (AN) de *Leishmania*, y que éstos inhiban su actividad catalítica?

4. HIPÓTESIS

Las enzimas arginasa y la piruvato cinasa tendrán afinidad por los derivados de bencimidazol, pudiendo ser blancos potenciales para el diseño de compuestos antiprotozoarios.

Si los compuestos bencimidazólicos se unen selectivamente *in silico* a las enzimas piruvato cinasa y arginasa, entonces estos compuestos inhibirán el crecimiento de *Leishmania* en experimentos *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Estudiar, por técnicas computacionales, el potencial de derivados del bencimidazol para inhibir la actividad de las enzimas clave en el metabolismo de la glucosa en el parásito protozoario *Leishmania*.

Evaluar *in vitro* los compuestos seleccionados con mayor actividad predicha por el método computacional, con el propósito de encontrar moléculas que puedan servir como líderes en el diseño de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniosis.

Determinar el posible mecanismo de acción de los compuestos más activos.

5.2. Objetivos Específicos

Generar un modelo tridimensional de la arginasa y la piruvato cinasa a través de simulación por computadora.

Buscar, mediante la técnica de acoplamiento molecular (docking), derivados del bencimidazol que se unan al sitio catalítico de las enzimas arginasa y piruvato cinasa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS, OBJETIVOS

Seleccionar las moléculas con mayor afinidad y sintetizarlas.

Evaluar *in vitro* la inhibición enzimática de las enzimas arginasa y piruvato cinasa causada por los compuestos seleccionados de los estudios anteriores.

Determinar la CI_{50} de los inhibidores de ambas enzimas en cultivos de *Leishmania*.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Parte Computacional

6.1.1 Modelado por Homología

A la fecha, no se tienen reportes de la estructura tridimensional de la arginasa (AN) de *Leishmania mexicana*. Sin embargo, estudios previos de modelado por homología dieron como resultado la determinación de la estructura de la arginasa de *L. amazonensis*, la cual puede ser usada como una guía para la generación tridimensional de la arginasa de *L. mexicana*.⁴⁶

La secuencia de aminoácidos de arginasa de *L. mexicana* (Gen Bank: AAR06176.1) se obtuvo de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).⁷¹ La búsqueda para las secuencias homólogas a esta secuencia de aminoácidos se realizó en base de datos con estructuras cristalizadas reportadas en esta base de datos y utilizando diversos métodos de búsqueda en línea: GenSilico (<https://genesilico.pl/meta2>), PDB/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Bioinfobank (<http://meta.bioinfo.pl>).⁷²⁻⁷⁴ El alineamiento de secuencias se realizó con el servidor del programa Clustal-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).⁷⁵ Los modelos 3D se construyeron con tres diferentes programas: Bioinfobank (<http://meta.bioinfo.pl>), 3D-Jigsaw (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>) y MODELLER 9v1.⁷⁴⁻⁷⁹ Los modelos resultantes obtenidos fueron evaluados usando PROCHECK para valorar la calidad de la estereoquímica de la estructura de la proteína.⁸⁰ Además de utilizar los programas WHATCHECK y PROMOTIF, los cuáles identifican, clasifica y analiza un gran número de cambios en la estructura secundaria.^{81,82} Todos estos métodos de valoración fueron empleados del servidor de SWISS-MODEL.⁸³

Todos los modelos generados fueron sometidos a una minimización de energía utilizando el programa Sybyl8.0 para remover los contactos erróneos derivados del modelado por homología. Todos los cálculos fueron llevados a cabo en un campo de fuerza Amber 4, asignando las cargas de Gastaiger-Hückel a 300 K de temperatura, con una constante dieléctrica de 4 y un máximo de 100 000 evaluaciones.⁸⁴

Para el caso de la piruvato cinasa (PC) de *L. mexicana*, la proteína cristalizada se encontraba reportada en la base de datos del Protein Data Base (PDB) con la ID: 1pkl.⁴⁹ Un monotetrámero de 498 aminoácidos de longitud en cada monómero con un centro de magnesio en el sitio catalítico. Para su preparación, se le retiraron todas las moléculas de agua, así como los iones de sulfato, potasio y calcio presentes. Se realizó una minimización a la proteína utilizando los mismos parámetros que para la arginasa anteriormente mencionada.

También se prepararon las proteínas AN (PDB ID: 2aeb)⁸⁵ y PC (PDB ID: 3bjt)⁸⁶ de *Homo sapiens*, retirando todas las moléculas de agua, cationes y ligandos, utilizando el programa Sybyl8.0, en un campo de fuerza Amber 4, asignando las cargas de Gasteiger-Hückel a 300 K de temperatura, con una constante dieléctrica de 4 y un máximo de 100 000 evaluaciones.⁸⁴

6.1.2. Estudios de Acoplamiento Molecular

6.1.2.1. Preparación de las Proteínas

Se realizó un screening virtual sobre las enzimas PC y AN de *L. mexicana* y de *H. sapiens* utilizando el programa AutoDock4.2, empleando su interfaz gráfica AutoDock MGLTools 1.5.4, en el cual se solicitó se agregaran los hidrógenos polares y se hiciera la corrección las cargas de los aminoácidos.⁸⁷ Las cajas se centraron en el centro de la proteína con una dimensión de 126 Å con un espacio entre cada punto de interacción de 0.375 Å, con la finalidad de primero realizar un acoplamiento en ciego, para detectar aquellos ligandos que se unan al sitio catalítico. Se calcularon los mapas para cada uno de los siguientes tipos de átomos: H, HD, C, A, N, NA, F, P, S, SA, Cl, Br y I. También se calcularon los mapas electrostáticos y de desolvatación. Las moléculas que se unían selectivamente al sitio catalítico de las enzimas fueron re-acopladas con una caja de un tamaño de 60 Å centradas en el sitio catalítico de las enzimas. La proteína se usó como una estructura rígida.

6.1.2.2. Preparación de los ligandos

Los ligandos se obtuvieron de la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org/>), una base de datos que contiene más de 21 millones de moléculas.⁸⁸ Se seleccionaron aquellos ligandos que presentaban como núcleo base el anillo de bencimidazol y que cumplieran con las reglas de Lipinski, con la finalidad de tener buena biodisponibilidad. Un total de 1386 moléculas fueron obtenidas de esta base de datos, además se complementaron con un set de 53 derivados de bencimidazol con actividad antiprotozoaria previamente reportada por nuestro laboratorio.^{33-35,89-91} Las estructuras se descargaron directamente de ZINC en formato pdb. Las estructuras de los otros 53 derivados se construyeron con el programa Sybyl8.0 y se optimizaron con el campo de fuerza de Amber 4. Con el programa MGLTools 1.5.4 se solicitó se agregaran los hidrógenos polares y se detectaron automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables, a excepción del enlace amida, el cual se consideró rígido en todas las estructuras.

6.1.2.3. Acoplamiento molecular

Los cálculos de acoplamiento molecular fueron realizados utilizando un algoritmo genético tipo Lamarckiano (LGA) para la búsqueda conformacional del ligando, con un tamaño de población de 150 estructuras con 25×10^6 evaluaciones, 25 corridas con una población inicial de 150 individuos, con un máximo de 270 000 generaciones, un rango de mutación de 0.02 y un rango cruzado de 0.8. Finalmente, se realizó un análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los grupos generados, seleccionando aquel grupo que presentara las conformaciones energéticamente más favorables (menor ΔG).

6.1.3. Dinámica Molecular

Las dinámicas moleculares se realizaron con y sin ligandos utilizando el programa GROMACS 4.0.5. Las estructuras iniciales de estas simulaciones fueron el resultado del complejo ligando-enzima con la menor energía de unión. Los parámetros de los ligandos fueron calculados con el servidor de PRODRG⁹² con el campo de fuerza de GROMOS, mientras que los valores de C6=5.751 y C12=4.517 fueron empleados para establecer el Mn^{2+} para la arginasa. El complejo se solvató con agua en un cubo periódico que incluye la enzima y 1 nm^3 de agua. Aparte de los iones metálicos (Mn^{2+} o Mg^{2+}), fueron agregados aleatoriamente iones de Na^+ y Cl^- para neutralizar las cargas del sistema. Todas simulaciones se llevaron a cabo a 1 bar de presión y a 300 K de temperatura.

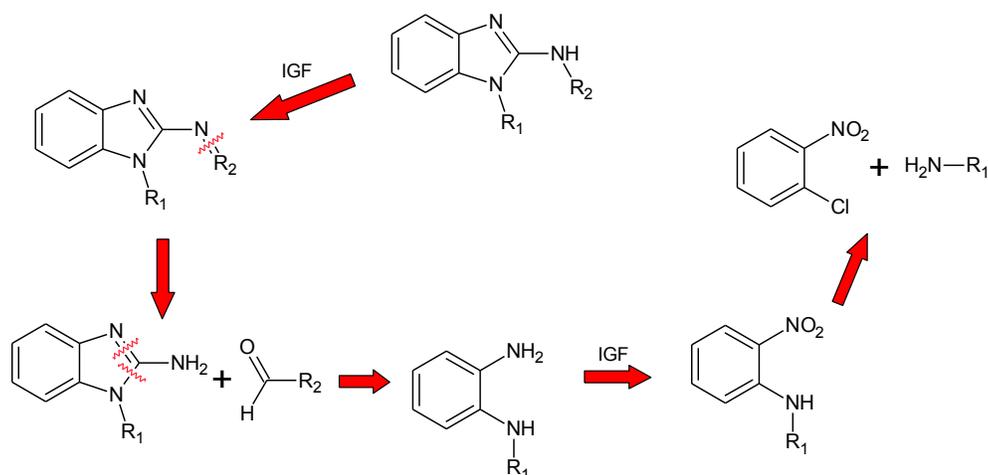
Primero se realizó una energía de minimización utilizando el campo de fuerza de GROMOS96 43a1, con un modelo de punto simple de carga de agua y un tiempo por pasos de 0.002 ps. Las fuerzas electrostáticas se calcularon con la implementación PME del método sumatorio de Ewald, y las interacciones de Lennard-Jones se calcularon con un radio de corte de 0.9 nm. Después de la energía de minimización, el sistema se equilibró por 20 ps de dinámica molecular con posición restringida en la enzima, para que las moléculas de solvente se relajen. Finalmente, se realizó una dinámica molecular de 3 ns para valorar la estabilidad del modelo de arginasa y los complejos enzima-ligando.

6.2. Parte Química

En esta parte se presenta el estudio realizado para la síntesis de los derivados del bencimidazol 2-aminosustituídos **6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **38**, **43**, **48** y **53**.

6.2.1. Análisis retrosintético

La primera estrategia seguida se basó en el análisis retrosintético que se muestra en el **Esquema 2**. Se planteó obtener los aminobenzimidazoles 1,2-disustituídos (**6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **38**, **43**, **48** y **53**) al someter el 2-iminobenzimidazol a una reducción con NaBH_4 . El 2-iminobenzimidazol se visualizó que se podría obtener a partir de la condensación bajo condiciones anhidras entre el correspondiente benzaldehído sustituido y el precursor 1-sustituído-2-aminobenzimidazol, que a su vez sería el producto de una ciclocondensación de la *o*-fenilendiamina con bromuro de cianógeno. La *o*-fenilendiamina se podría obtener por reducción del grupo nitro de la nitroanilina *N*-sustituída, la cual se puede obtener por Sustitución Nucleofílica Aromática entre el cloronitrobeneno y la amina sustituida correspondiente.



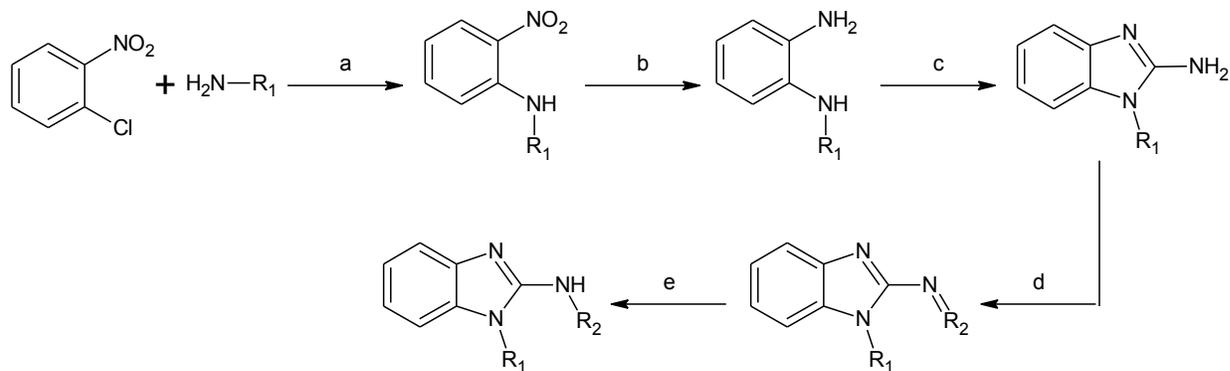
Esquema 2. Esquema retrosintético general.

6.2.2. Síntesis 1 de los 2-aminobenzimidazoles 1,2-disustituídos, vía Sustitución Nucleofílica Aromática

Se realizó un estudio para la preparación de estos 2-aminobenzimidazoles 1,2-disustituídos a partir del cloronitrobeneno comercial, sometiéndolo a una reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática con la amina sustituida correspondiente, dando como producto la nitroanilina sustituida. Posteriormente fue sometida a una reducción catalítica con $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ dando las *o*-fenilendiaminas *N*-sustituídas precursoras. El estudio continuó con la ciclocondensación de Leonard⁶⁵ con bromuro de cianógeno que llevó a la obtención del 2-aminobenzimidazol 1-sustituído. Una vez obtenido este compuesto se sometió a una reacción de condensación⁷⁰ con el aldehído sustituido correspondiente obteniéndose la imina sustituida. Finalmente este producto se sometió a reducción con NaBH_4 para obtener el producto final 2-aminobenzimidazol 1,2-disustituído (**Esquema 3**).

6.2.3. Síntesis 2 de los 2-aminobencimidazoles 1,2-disustituídos, vía ciclocondensación con isotiocianato

Otro estudio que se realizó para obtener los 2-aminobencimidazoles, fue a partir de la *N*-sustituída-*o*-fenilendiamina que se ciclocondensó con el isotiocianato sustituido correspondiente en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC).⁶⁹ Esto da origen al 2-aminobencimidazol 1,2-disustituído correspondiente (**Esquema 4**).



6: R₁ = 2(1-Piperidinil)etilo, R₂ = 2,5-Dimetoxibencilo

11: R₁ = Bencilo, R₂ = 3,4-Dimetoxibencilo

16: R₁ = 1-Butilo, R₂ = 2-Hidroxi-5-metilbencilo

21: R₁ = Etilo, R₂ = 3,4,5-Trimetoxibencilo

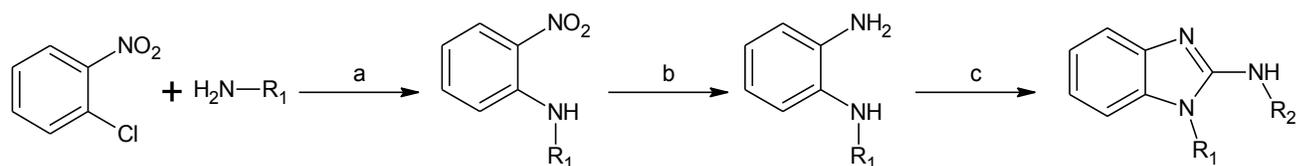
36: R₁ = Pentilo, R₂ = 2-Hidroxibencilo

41: R₁ = Propilo, R₂ = 5-Cloro-2-hidroxibencilo

46: R₁ = Isopropilo, R₂ = 2-Metoxibencilo

48: R₁ = Etilo, R₂ = 2-Hidroxi-5-metilbencilo

Esquema 3. (a) Reactor Parr, 120 °C ó 90°C en sistema abierto; (b) H₂, Pd/C; (c) BrCN, H₂O, 70 °C; (d) Aldehído sustituido, Tolueno, 110 °C; (e) NaBH₄, MeOH, 0 °C.

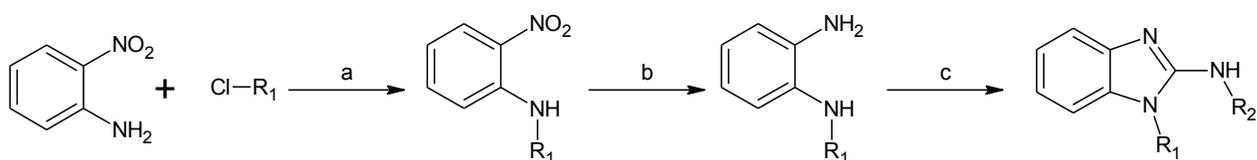


53: R₁ = Isopentilo, R₂ = Bencilo

Esquema 4. (a) Reactor Parr, 120 °C; (b) H₂, Pd/C; (c) R₂-NCS, DCC, THF, 70 °C.

6.2.4. Síntesis 3 de los 2-aminobenzimidazoles 1,2-disustituídos, vía sustitución con cloruro de alquilo

Un método alternativo para la preparación de estos derivados benzimidazólicos es a partir de la nitroanilina comercial, la cual se sometió a una reacción de sustitución nucleofílica con el cloruro de alquilo correspondiente, lo cual da origen a la nitroanilina *N*-sustituída. Posteriormente es sometida a una reducción catalítica con H₂/Pd-C dando las *o*-fenilendiaminas *N*-sustituídas precursoras. El producto se ciclocondensó con el isotiocianato sustituido correspondiente en presencia de dicitohexilcarbodiimida (DCC).⁶⁹ Esta reacción da directamente el 2-aminobenzimidazol correspondiente (**Esquema 5**).



26: R₁ = 2,5-Dimetilbencilo, R₂ = Etilo

Esquema 5. (a) DMF, NaHCO₃, 110 °C; (b) H₂, Pd/C; (c) R₂-NCS, DCC, THF, 70 °C.

6.3. Parte Biológica

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

La actividad antiprotozoaria *in vitro* de los compuestos sintetizados se evaluó contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis* en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), a cargo de la Dra. Lilian Yépez Mulia. Para estos ensayos se siguió el método de subcultivos descrito por Cedillo Rivera.⁹³ Se incubó 5x10⁶ trofozoítos del parásito a evaluar con los diferentes compuestos a concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 µg/mL. El albendazol, metronidazol y nitazoxanida se usaron como controles positivos y el DMSO libre de fármacos como control negativo. Los tubos se incubaron a 37 °C por 48 h. Posteriormente los trofozoítos tratados se sembraron en medio fresco y se incubaron a 37 °C por 48 h más. 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. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.3.2. Cultivo de células VERO

Células Vero (células epiteliales renales de mono *Cercopithecus aethiops*, donados por el laboratorio de Virología de la ENCB del IPN), la línea celular se mantuvo en un medio de cultivo DMEM suplementado con 10% Suero Bovino Fetal y 10 % antibiótico-antimicótico.

6.3.3. Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad se utilizó la metodología propuesta por Denizot⁹⁴ con células VERO con algunas modificaciones. A partir de una caja de cultivo T-25 con un 100% de confluencia celular se realizarán pases seriados usando tripsina 0.25%. Se sembrarán 1.5×10^3 células por pozo en placas de 96 pozos y se incubarán a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h para que se adhirieran. Para evaluar los derivados de bencimidazol las concentraciones de 15, 10, 5, 1 µg/mL; se incubarán por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al concluir el tiempo, se agregará el reactivo de MTT a una concentración de 1 mg/mL a cada pozo, volviendo a incubar durante 2-4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para disolver los cristales formados y facilitar el rompimiento de las membranas de las células, se adicionará SDS 10%-HCl 0.01N y se incubarán toda la noche a temperatura ambiente, la microplaca se leyó mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm. Cada ensayo se realizará por triplicado, se incluirá un control con DMSO. Se calculará el porcentaje de viabilidad y la concentración citotóxica media (CC₅₀).

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Densidad óptica Células tratadas}}{\text{Densidad óptica Células control}} \times 100$$

6.3.4. Cultivo de promastigotes de *L. mexicana*

Se utilizaron amastigotes de *L. mexicana* (cepa MNYC/BZ/62/M379), que fueron aislados de un ratón BALB/c infectado con el parásito por la Dra. Luvia Enid Sánchez Torres, ENCB-IPN. Los promastigotes de *L. mexicana*, cepa MHOM/MX92/UAY68 fueron aislados de un paciente mexicano con leishmaniosis cutánea. Los parásitos se mantuvieron en cultivo en la fase log entre 25 °C - 26 °C en medio RPMI suplementado con 10% SFB, 100 U µg/mL penicilina – 100 mg/mL estreptomicina.

6.3.5. Ensayo de susceptibilidad *in vitro* con promastigotes de *L. mexicana*

La actividad leishmanicida se realizó frente a promastigotes de *L. mexicana* de la cepa MNYC/BZ/62/M379 en su fase estacionaria. En cajas de 96 pozos se colocaron 2×10^4

parásitos/mL y se cultivaron en medio RPMI suplementado, conteniendo 0.1, 0.5, 1.5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos a evaluar por 12, 24 y 48 h a 25 °C. Como control negativo se incluyeron parásitos en presencia de la concentración máxima de DMSO (0.1%), empleado para disolver los compuestos; además de incluir anfotericina B como control positivo. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado cada uno. Los parásitos se fijaron en 0.14 M de NaCl que contenía 3.7% de formaldehído. A las 48 h se calculó el porcentaje de viabilidad de los parásitos a las diferentes concentraciones y se determinó la CI_{50} .^{91,95}

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. PARTE COMPUTACIONAL

7.1.1. Modelado por homología

Se encontraron varias estructuras tridimensionales con secuencias homólogas a la arginasa de *L. mexicana* con los tres métodos de búsqueda (GenSilico, PDB/BLAST y Bioinfobank), los cuáles se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Comparación entre los diversos métodos de búsqueda utilizando el programa GenSilico

Métodos de búsqueda	Proteína (PDB ID)	Puntaje	Identidad
PDB/Blast	1d3v	1e-128	40%
	2aeb	1e-128	43%
	1pq3	1e-122	38%
	2cev	1e-113	37%
Blastp	2aeb	2e-62	44%
	1d3v	3e-59	41%
	1pq3	7e-55	39%
	2cev	2e-53	38%
	2ef5	1e-41	38%
Hhsearch	2aeb	100	41%
	1pq3	100	38%
	2cev	100	37%
pcons5	2aeb	7.3565	43%
	1pq3	7.2131	38%
	1d3v	7.1987	40%
	2aeb	7.1471	41%
	1pq3	7.1009	38%

	2cev	6.8098	37%
	2cev	6.7062	37%
jmbrank	2aeb		41%
	1d3v		41%
	1pq3		38%
	2cev		37%
consens3d	1pq3	184.19	38%
	2aeb	184.19	41%
	1pq3	183.67	38%
	1d3v	183.14	40%
	2aeb	182.95	43%
	2cev	181.10	37%
	2cev	180.14	37%

Dentro de éstas, interesantemente, se encontró que dos estructuras tridimensionales con un alto porcentaje de similitud estaban presentes en todos los métodos de búsqueda (mayor al 40% de similitud), lo cual es lo suficientemente adecuado para construir un modelo confiable. Estas dos estructuras tridimensionales son de la enzima arginasa de *H. sapiens* (PDB ID: 2aeb⁸⁵) y de *Rattus norvegicus* (PDB ID: 1d3v⁹⁶), las cuáles comparten una similitud con la arginasa de *L. mexicana* del 44% y el 41%, respectivamente.

Las secuencias de las enzimas de *H. sapiens* (PDB ID: 1wva⁸⁵, 2pho⁹⁷, 2aeb⁸⁵ y 1pq3⁹⁸) y de *R. norvegicus* (PDB ID: 1d3v⁹⁶) se obtuvieron de la base de datos del NCBI y se alinearon utilizando el programa Clustal W (**Figura 19**). A nivel de la estructura primaria, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la arginasa de *L. mexicana* y de humano (hígado y macrófago) muestra un alto grado de similitud, especialmente en el sitio catalítico, lo cual puede verse en la **Figura 19**. La precisión del alineamiento es el paso más crucial para asegurar la calidad del modelo homólogo, el alineamiento de secuencias múltiples es la aproximación preferida para este propósito. Sin embargo se pueden apreciar algunas diferencias: mientras que la enzima de humano tiene una Gly235 no cargada, la de *L. mexicana* tiene un grupo polar Thr246 no cargado. Esta diferencia puede ser útil para el diseño de inhibidores selectivos contra esta enzima.

Con esta información se construyeron diferentes modelos 3D de la arginasa de *L. mexicana* utilizando como molde cada una de las cinco diferentes estructuras reportadas para la arginasa de humano y de rata. Para este fin se utilizaron los programas Bioinfobank, MODELLER 9v1 y Jigsaw para generar un total de 10 modelos. Cada modelo se minimizó usando el programa Sybyl8.0 con las condiciones previamente descritas en la metodología. La estereoquímica de cada modelo se evaluó utilizando las gráficas de Ramachandran generadas con el programa PROCHECK (**Tabla 6** y **Gráfica 2**). Los mejores resultados y por lo tanto el mejor modelo se obtuvo con el programa MODELLER 9v1 utilizando como molde la arginasa de hígado de rata (1d3v). La gráfica de Ramachandran para este modelo indicó que el 83.7% de los residuos se encontraban en las zonas más favorecidas, 15.6% en regiones permitidas, 0.7% en las regiones permitidas generosamente y 0.0% en regiones desfavorecidas (**Tabla 6**). Basados en las gráficas de Ramachandran, la estructura del modelo generado tiene una confiabilidad del 99.3%. Es importante mencionar que el modelo obtenido con el programa Bioinfobank y utilizando como molde la arginasa de humano (1d3v), tuvo una confiabilidad del 99.6%; sin embargo, la estructura generada para esta enzima tuvo 78.3% de los residuos localizado en las zonas más favorecidas, el cual es un valor más bajo que el obtenido para la arginasa de hígado de rata. Aunque la información de la estructura de la arginasa de humano está disponible en el PDB, su sitio activo y su mecanismo de acción no están del todo estudiados.

Además, a partir de que se encontró que los puntajes estaban dentro de los valores aceptados para el modelo de arginasa de hígado de rata, el programa PROCHECK mostró un valor de Z-score de -0.57 obtenido de la gráfica de Ramachandran, donde un valor de Z-score mayor a -2.0 está asociado comúnmente con un modelo de alta calidad. El valor de QMEAN⁹⁹ fue de -0.96, un valor que se encuentra entre una y dos desviaciones estándar, lo cual es aceptable para una proteína de este tamaño (**Figura 20**). Este puntaje o score está compuesto por una combinación lineal de 6 términos, donde contribuyen la pseudo-energía de estos términos obtenidos respecto a los puntajes dados por las estructuras experimentales de alta resolución de tamaño similar resueltos por cristalografía de rayos X. La distribución de los residuos, tanto dentro como fuera de la proteína es normal, con un valor de RMS Z-score de 1.097 para la relación de aminoácidos dentro/fuera. El Z-score dado por el programa WHATIF fue de -7.9 para el modelo obtenido a partir de la arginasa de hígado de rata; mientras que el modelo obtenido a partir de la arginasa de humano fue de -6.85. Este valor se obtiene mediante la valoración de la estructura 3D de una proteína a través de una serie de mediciones de estructuras cristalizadas por rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Para ser aceptable este valor debe ser menor a -6. Comparado con otros modelos, Modeller-1d3v es el más aceptable de todos (**Figura 21**). La confiabilidad de este modelo lo hace apto para realizar un acoplamiento molecular de una gran base de datos de ligandos para encontrar inhibidores específicos.

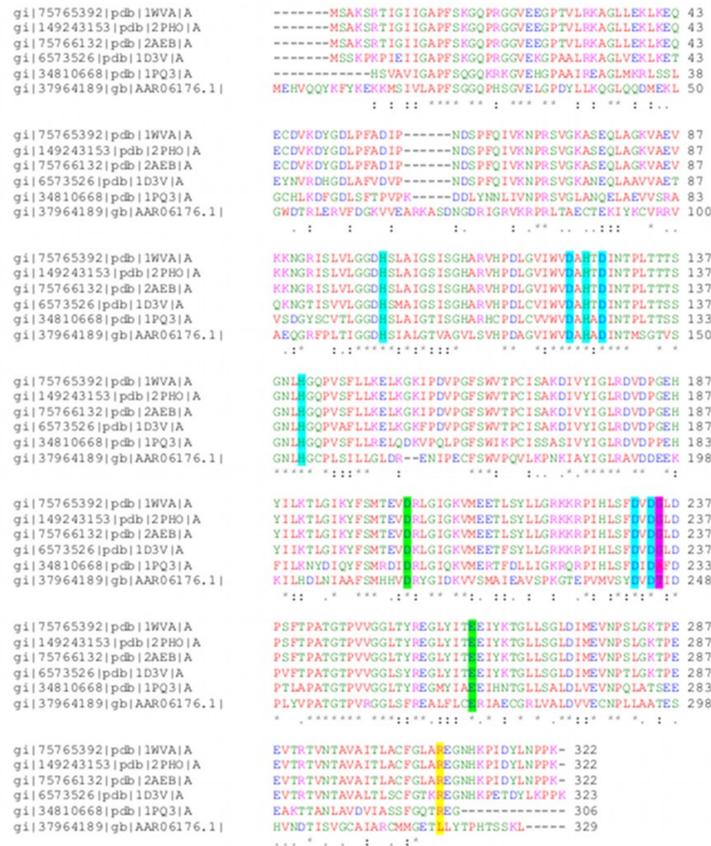
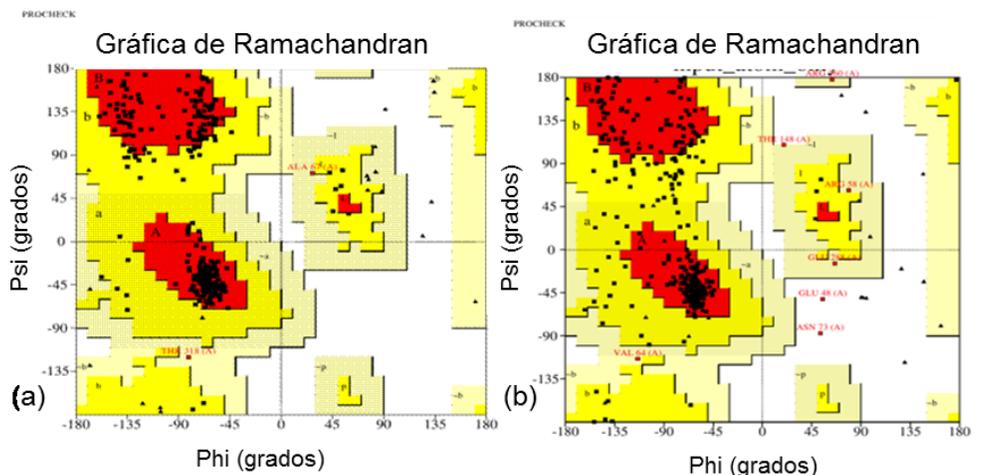


Figura 19. Alineamiento de secuencias múltiples usando el programa ClustaW 2.0.10. La alineación entre las proteínas 1d3v (arginasa de hígado de rata); 1wva, 2pho, 2aeb y 1pq3 (arginasa de humano) con la secuencia de aminoácidos de arginasa de *L. mexicana* (AAR06176.1). Los residuos marcados en azul forman parte del sitio catalítico; en magenta se muestra el residuo que difiere en el sitio catalítico de *L. mexicana* respecto a las otras especies. Los aminoácidos marcados con verde estabilizan el trímero, en amarillo está el aminoácido que estabiliza intra e intermonómero del trímero.

Tabla 6. Evaluación de los modelos obtenidos por los programas 3D-Jigsaw, Bioinfobank y MODELLER. Se utilizaron las referencias de las estructuras cristalizadas de arginasa de *Rattus norvegicus* (1d3v) y arginasa de *Homo sapiens* (1wva, 2pho, 2aeb and 1pq3)

Programa	Modelo	Molde	Evaluación
3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-1d3v	1d3v	76.0%, 21.7%, 1.9%, 0.4%
3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-2aeb	2aeb	71.2%, 25.4%, 2.7%, 0.8%

3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-2pho	2pho	71.4%, 26.3%, 0.4%, 1.9%
Bioinfobank	Bioinfobank-1d3v	1d3v	78.8%, 20.0%, 0.8%, 0.4%
Bioinfobank	Bioinfobank-1pq3	1pq3	78.3%, 21.3%, 0.0%, 0.4%
Bioinfobank	Bioinfobank-2aeb	2aeb	76.3%, 23.3%, 0.4%, 0.0%
Modeller	Modeller-1d3v	1d3v	83.7%, 15.6%, 0.7%, 0.0%
Modeller	Modeller-1pq3	1pq3	77.3%, 20.2%, 1.4%, 1.1%
Modeller	Modeller-1wva	1wva	77.3%, 21.6%, 0.7%, 0.4%
Modeller	Modeller-2aeb	2aeb	73.8%, 23.8%, 1.8%, 0.7%



Gráfica 2. Gráficas de Ramachandran. (a) Modelo Modeller-1d3v. (b) Modelo Bioinfobank 2aeb.

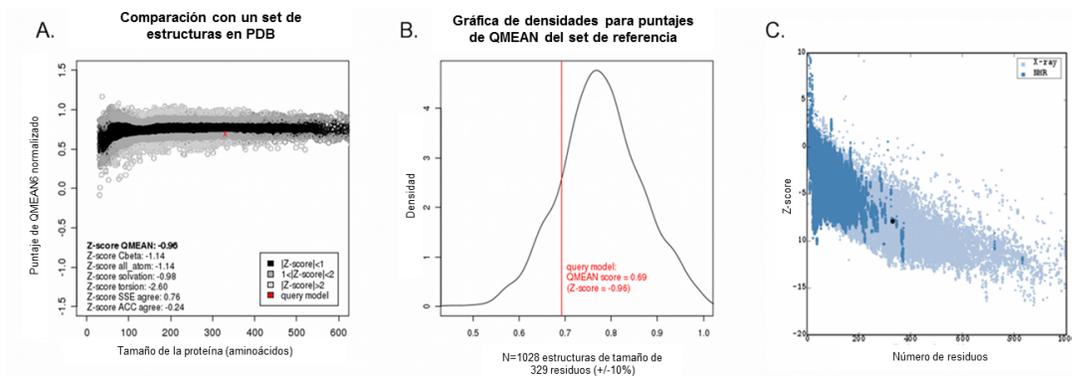


Figura 20. Gráficas de QMEAN para el monómero de arginasa de *L. mexicana*. (a) La gráfica normalizada de QMEAN6 muestra la desviación estándar del monómero. (b) Gráfica de densidad para QMEAN. (c) Gráfica de Z-score obtenida por WHATIF.

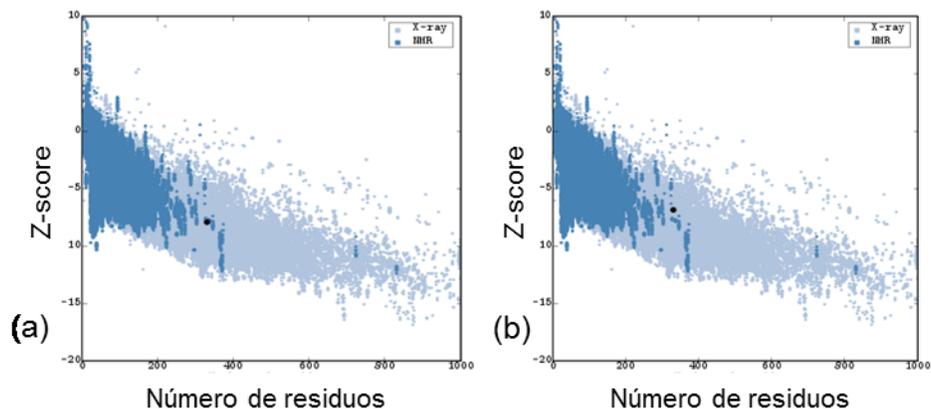


Figura 21. Gráficas de Z-score dados por el programa WHATIF. (a) Modelo Modeller-1d3v, Z-score: -7.9. (b) Modelo Bioinfobank-2aeb, Z-score: -6.85

Los aminoácidos que coordinan a los 2 Mn^{2+} y a la arginina en el sitio activo están localizados en la misma región tanto en el modelo de arginasa de *L. mexicana* como en la arginasa de hígado de rata. En la **Figura 22** se muestra que los residuos His139, Asp 243 y Asp245 coordinan con uno de los Mn^{2+} ; mientras que los residuos His114, Asp137 y Asp141 coordinan al otro Mn^{2+} ; los residuos His154 y Glu288 están involucrados directamente en la unión de la arginina.¹⁰⁰ Estos aminoácidos están conservados en todas las arginasas que se han comparado hasta la fecha,¹⁰¹ pero la variación en la composición de aminoácidos que muestra la arginasa de *L. mexicana* es más cercana a la arginasa de hígado de humano. La estructura del monómero de la arginasa de ambos organismos y los detalles mostrados en el sitio activo revelan que son altamente conservados. Sin embargo, algunas diferencias se pueden apreciar entre dos residuos no conservados equivalentes, His228 y Met239 en la arginasa de humano y *L. mexicana* respectivamente, formando una estructura “espacio-canal” (**Figura 22C**). Estas diferencias en regiones vecinas al sitio activo no son conservadas y se pueden explorar en el diseño específico de inhibidores de arginasa de *L. mexicana*.

Usando los datos de la estructura cristalina establecidos para la enzima de rata¹⁰⁰ y basados en el modelo obtenido para el monómero de arginasa de *L. mexicana*, se realizó una simulación de la estructura 3D del trímero de arginasa. Este es el primer modelo reportado para un trímero de arginasa de *L. mexicana* y puede ser muy útil para entender el modo de unión y para el diseño de nuevos inhibidores alostéricos, especialmente, aquellos que se unan a la interface entre los monómeros (**Figura 23**).

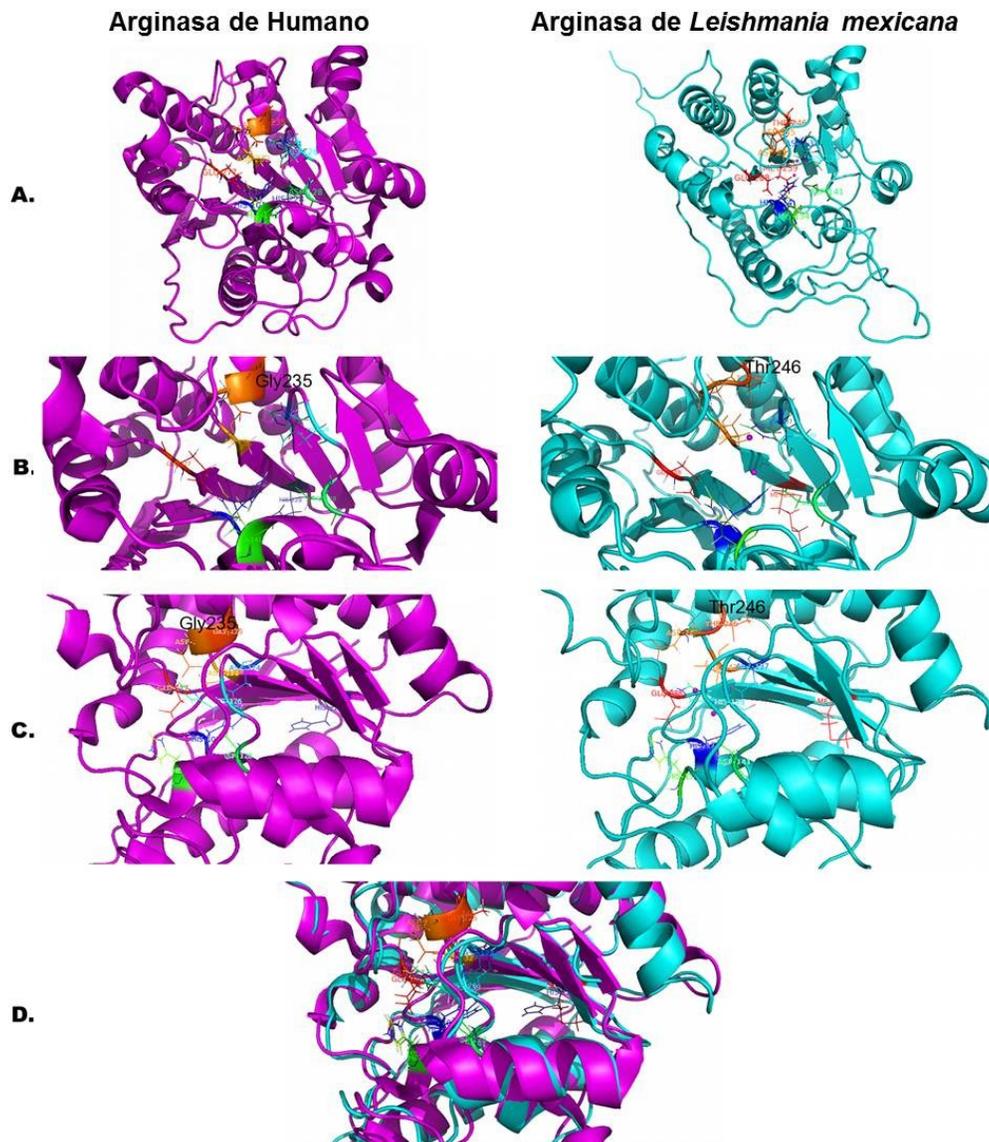


Figura 22. Modelos 3D de la arginasa de *Leishmania mexicana* (verde) y de hígado de humano (violeta). (a) El modelo completo del monómero de ambas enzimas humano y *L. mexicana*. Los aminoácidos que participan en el sitio activo están indicados en color. (b) Detalles del Mn²⁺ binuclear y de los aminoácidos que interactúan directamente con el sustrato en el sitio activo en ambas enzimas. (c) Diferencias en la estructura “espacio-canal” causado por la presencia del residuo Met239 (amarillo) en *L. mexicana* en lugar del residuo His228 (amarillo) observado en humanos. (d) Sobreposición de las estructuras “espacio-canal” de *L. mexicana* y humano mostrando las diferencias espaciales. En color azul la arginasa de *L. mexicana*, en magenta la arginasa de humano.

El modelo del trímero se minimizó bajo las mismas condiciones previamente descritas en la parte de metodología de la parte computacional. El modelo del trímero se evaluó utilizando los mismos

criterios que aquellos utilizados para los monómeros. En la evaluación con el programa PROCHECK, utilizando las gráficas de Ramachandran, observamos que el 83.3% de los residuos se localizaron en las zonas más favorecidas y que un 18.9% en regiones permitidas. En términos generales la estructura tiene una confiabilidad del 99.2%. El programa mostró que el valor global del factor G es de -0.47, obtenido de las gráficas de Ramachandran; el modelo debe tener un valor mayor a -0.5 por lo que el modelo tiene un buen puntaje de aceptación. El puntaje de QMEAN fue de -4.04, un valor bajo que indica que el modelo está por arriba de las dos desviaciones estándar. Sin embargo, esto puede deberse al tamaño de la proteína, ya que es mayor a los 900 aminoácidos, lo que la hace más difícil de medir con precisión, puesto que el valor más preciso de QMEAN es hasta los 600 aminoácidos; por arriba de éste la gráfica se dispersa en la medición de las desviaciones estándar. (Figura 24). Dados los puntajes favorable de los contactos atómicos entre los monómeros para el modelo del trímero de arginasa de *L. mexicana* en comparación con el modelo del monómero sugiere la existencia de una estructura trimérica *in vivo* para la arginasa de *L. mexicana*. En la arginasa de hígado de rata, el residuo Arg308 forma un puente salino intramonómeros con la Glu262 y un puente salino intermonómero con el residuo Asp204 de la subunidad adyacente.¹⁰² Ambos residuos Glu262 y Asp204 son conservados en las arginasa de rata, humano, ratón y varias especies de ranas del género *Xenopus*. Estas observaciones sugieren un papel similar en la estabilización de los estados oligoméricos del trímero. En la enzima arginasa de *L. mexicana*, los residuos Glu262 y Asp204 son conservados en la posición 253 y 215 respectivamente, pero el residuo Arg308 está ausente. Sin embargo, en algunas arginasas de bacterias hay arginasas hexaméricas (dímero de trímeros) y los últimos tres residuos no están conservados. Por esta razón, Arg308 no es esencial para la estabilización del trímero en estos organismos o para una actividad óptima.¹⁰¹

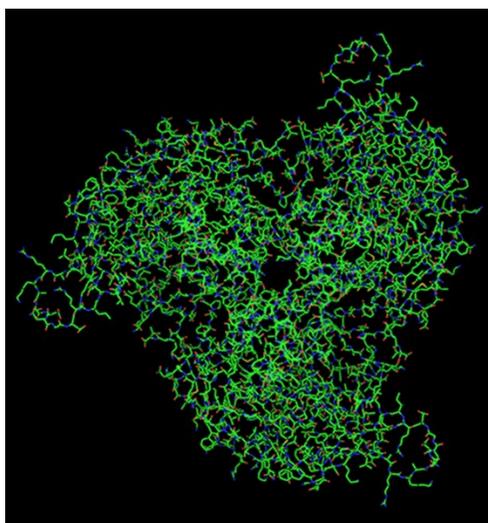


Figura 23. Modelo del trímero de arginasa de *L. mexicana*.

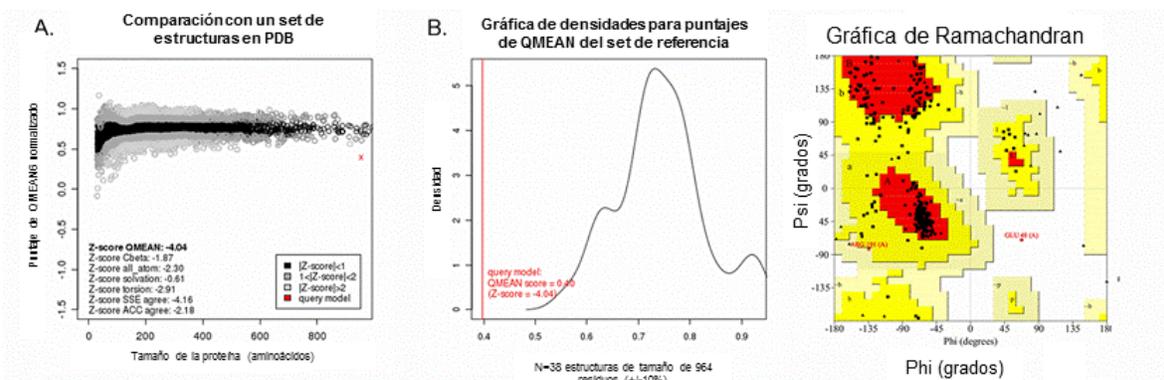


Figura 24. Gráficas de QMEAN para el trímero de arginasa de *L. mexicana*. (a) La gráfica normalizada de QMEAN6 muestra la desviación estándar del trímero. (b) Gráfica de densidades para QMEAN. (c) Gráfica de Ramachandran para el trímero que muestra las regiones más favorecidas y las desfavorecidas.

7.1.2. Dinámica molecular de la arginasa de *L. mexicana*

Los cálculos de dinámica molecular se utilizaron para valorar la estabilidad del modelo de arginasa de *L. mexicana* obtenido por homología. El estudio se centró en el sitio catalítico, especialmente en los residuos de aminoácidos que coordinan los Mn^{2+} y en la interacción entre el metal y la enzima. En general, el RMSD de los átomos de $C\alpha$ se vio incrementado desde el inicio hasta los 1100 ps, indicando que se había alcanzado el equilibrio (**Figura 25**). En la **Figura 25B**, se observa la tendencia del RMSD del manganeso, observándose que el metal se estabiliza en el sitio catalítico después de los 780 ps. Esta estabilización es causada por la relajación del sitio catalítico, en la cual los dos manganesos se separaron uno del otro a una distancia máxima de 1.3 nm, para permitir la interacción de cada uno de los manganesos con los residuos ácidos que los coordinan. Durante estos cálculos, es claro que la distancia promedio entre los manganesos y los residuos ácidos es de 0.21 nm. Además, la distancia promedio entre los átomos de manganeso es de 1.3 nm.

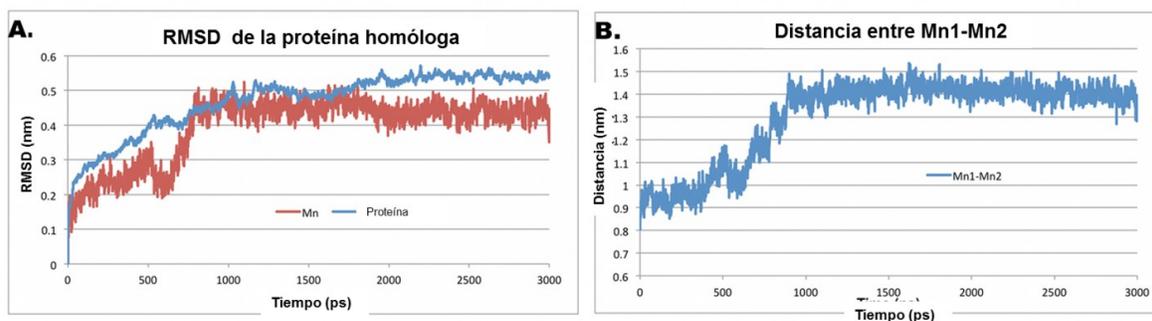


Figura 25. (A) RMSD del monómero de la arginasa de *L. mexicana* y el RMSD de la interacción proteína- Mn^{2+} . (B) Distancia entre ambos manganesos a través de toda la dinámica molecular.

Los residuos responsables de la coordinación de los metales son Asp141, Asp194, Glu196 y Glu197 para el Mn^{2+} -1, mientras que Asp137, Asp243 y Glu288 coordinan al metal Mn^{2+} -2, como se representa en la **Figura 26**.

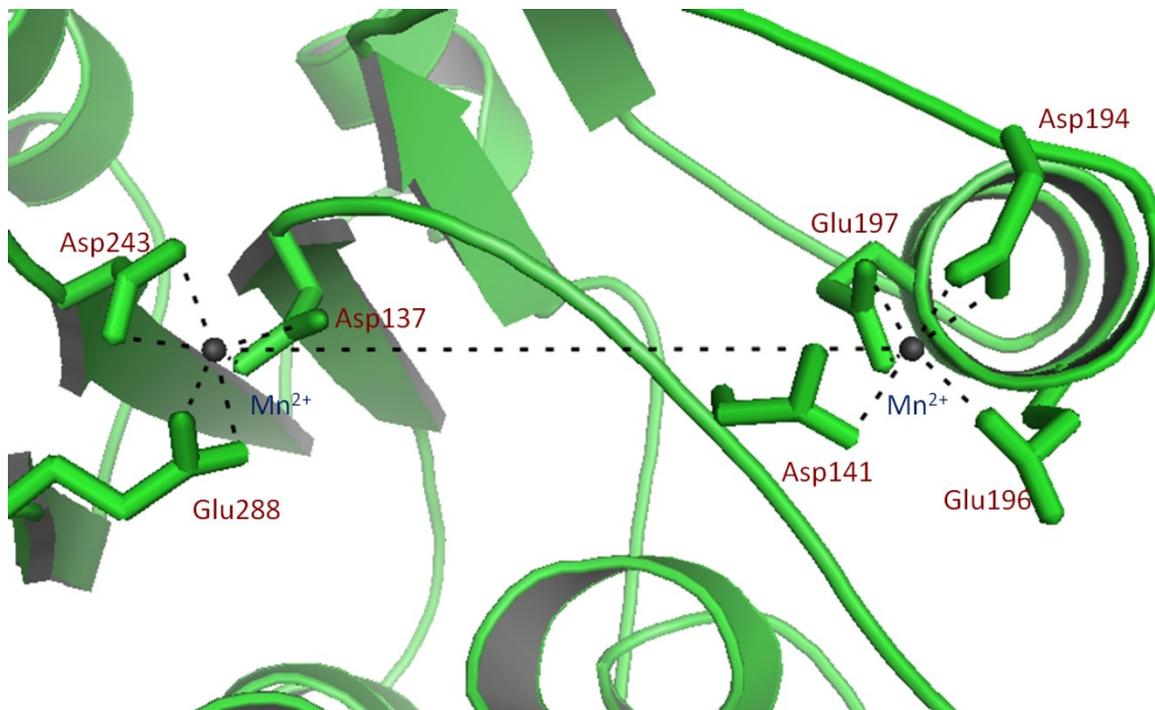


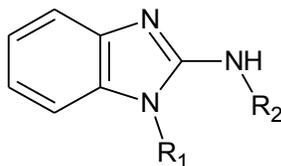
Figura 26. Interacción entre los Mn^{2+} y los residuos de aminoácidos. La imagen indica el tipo de aminoácidos (Glu y Asp) que estabilizan el Mn y la distancia entre los dos manganesos (un promedio de 1.3 nm).

7.1.3. Acoplamiento molecular con la enzima PC de *L. mexicana* y *H. sapiens*

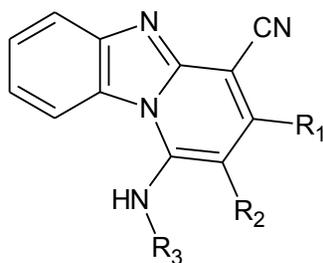
Para poder identificar aquellas moléculas que podrían unirse al sitio catalítico de la enzima piruvato de *L. mexicana* y *H. sapiens*, se llevó a cabo una evaluación virtual utilizando cálculos de acoplamiento molecular. Como se describió en la sección experimental, se permitió la flexibilidad de los ligandos en todos sus enlaces rotables, mientras que la proteína se mantuvo rígida. Se utilizaron las dos enzimas de piruvato cinasa para identificar a aquellos compuestos que se unían selectivamente al sitio catalítico de la PC del parásito. Los resultados del acoplamiento molecular “en ciego” mostraron que 22 compuestos de la base de datos mostraban preferencia por unirse al sitio catalítico tanto de la enzima del parásito como a la de humano. Posteriormente se realizó un segundo acoplamiento, esta vez limitando la caja en el sitio catalítico como se describió en la metodología. Se observó que de estos 22 compuestos, 10 mejoraban su energía de unión, disminuyendo su valor de ΔG sobre la enzima PC de *L. mexicana* respecto al valor anterior y

siendo más afines que a la PC de humano. Las estructuras de estos 10 compuestos y sus valores se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Valores de ΔG de los ligandos obtenidos por screening en la enzima PC de *L. mexicana* y humano



Compuesto	Clave ZINC	R ₁	R ₂	ΔG (kcal/mol) <i>L. mexicana</i>	ΔG (kcal/mol) <i>H. sapiens</i>
6	02387272	2-(1-Piperidinil)etilo	2,5-Dimetoxibencilo	-8.42	-4.15
11	00854869	Bencilo	3,4-Dimetoxibencilo	-7.06	-4.76
16	05737381	1-Butilo	2-Hidroxi-5-metilbencilo	-6.65	-4.72
21	00240921	Etilo	3,4,5-Trimetoxibencilo	-6.78	-4.49
26	01399420	2,5-Dimetilbencilo	Etilo	-5.92	-4.77
31	05739441	<i>N,N</i> -Dietilaminometilo	1-Naftilmetilo	-5.55	-5.08



Compuesto	Clave ZINC	R ₁	R ₂	R ₃	ΔG (kcal/mol) <i>L. mexicana</i>	ΔG (kcal/mol) <i>H. sapiens</i>
114	04170451	Metilo	1-Propilo	2-(Morfolin-4-il)etilo	-7.13	-4.93
115	02371750	Metilo	1-Pentilo	3-(Morfolin-4-il)propilo	-7.04	-4.10
116	00637957	1-Propilo	1-Propilo	2-(Azepan-1-il)etilo	-6.49	-5.68
117	04115353	Metilo	1-Pentilo	3-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)propilo	-6.04	-4.66

Los residuos de aminoácidos que forman el sitio catalítico de esta enzima varía completamente entre la PC de *L. mexicana* y de humano. La enzima PC de *L. mexicana* se compone por los residuos Asp264, Lys238, Thr296, Asn51, Ser53, Asp83 y Thr84 juegan un papel importante en la unión con el Fosfoenolpiruvato (PEP).⁴⁹ La enzima PC de humano se compone de los residuos Arg116, Asp56, Lys313, Glu315, Ala337 y Arg336 para el sitio catalítico.⁵⁰ Como se puede observar, el compuesto con menor energía de unión (mayor afinidad) tiene un valor de -8.42

kcal/mol para la enzima de *L. mexicana*, el cual presenta mejor afinidad que el que se presenta para la PC de humano (-4.15 kcal/mol). Cabe destacar que solo se presentaron dos estructuras bases con el núcleo de bencimidazol, un 2-aminobencimidazol y otra una estructura tricíclica compleja de tipo pirido[1,2-*a*]bencimidazol. La estructura del compuesto más activo es derivada del 2-aminobencimidazol, lo cual lo hace una estructura más factible de sintetizar que el triciclobencimidazol. Otra característica importante de este tipo de moléculas es que no presentan sustituciones en el anillo de bencimidazol en las posiciones 5 y 6, lo que en otras moléculas reportadas como antiprotozoarios es importante para la actividad, así como les permite evitar su eliminación por el metabolismo del huésped;^{32-35,89} sin embargo, este tipo de compuestos pueden ser de utilidad en el diseño de nuevas estructuras.

Para explicar la forma en que se lleva a cabo la interacción ligando-proteínas, el complejo se estudió utilizando los programas Pymol¹⁰³ y Maestro.¹⁰⁴ Los resultados se muestran en la **Figura 27**. Se pudo observar que existen diversas interacciones importantes entre la proteína y el ligando. Una de estas interacciones ocurre entre el metal Mg²⁺ y el grupo metoxi formando un enlace de coordinación muy estable. Esto ocurre para casi todos los ligandos del tipo 2-aminobencimidazol. Para los ligandos bencimidazoles triciclos la interacción es menor entre el metal y el ligando, observándose que si ocurre, es entre el magnesio y el nitrógeno del bencimidazol. Otra interacción importante ocurre entre el residuo Asp145 que se encuentra cargado negativamente, lo que le permite formar puentes de hidrógeno con el catión de la piperidina del compuesto **6**, con el hidroxilo del compuesto **16** y con el catión NH del morfolino en el compuesto **114**. Si bien no hay una interacción importante con los residuos que participan en la estabilización del ion Mg²⁺ o con aquellos que realizan la conversión de PEP a piruvato, la interacción enzima-ligando sigue siendo muy importante. Por un lado se puede observar que hay una interacción entre el ión metálico y el ligando, lo que puede impedir la interacción con el sustrato directamente, ya que este metal es de gran importancia para llevar a cabo la catálisis. Por otro lado, el ligando interacciona con residuos que se encuentran más adentro del sitio catalítico, lo que impide la entrada de cualquier sustancia a esta zona de la enzima y por lo tanto puede inhibir su actividad.

Se realizó un estudio de dinámica molecular para estudiar la estabilidad del complejo ligando-enzima, así como identificar la posible conformación bioactiva del ligando. Para esto se utilizó el ligando con menor energía de unión, en este caso el del compuesto **6**, utilizando los resultados del acoplamiento molecular como punto inicial. Así mismo, también se realizó la dinámica molecular con el complejo enzima-compuesto **6** con la enzima de humano para observar las diferencias de unión. La dinámica se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología durante un tiempo de 3 ns, tiempo suficiente para observar la estabilidad de este complejo. Los resultados se muestran en la **Figura 28**.

Como se puede observar, el compuesto **6** se mantiene en el sitio activo de la PC durante todo el tiempo de la dinámica. La **Figura 28a** muestra que el ligando alcanza el equilibrio después de los 730 ps, con un RMSD final de 0.41 nm. Como ya se mencionó, el ligando se estabiliza principalmente por puentes de hidrógeno y por enlace con el ion Mg^{2+} , lo cual se ve reflejado en la **Figura 28b** y **28c**. Durante el tiempo de simulación se observa una formación constante de puentes de hidrógeno entre el compuesto **6** y la proteína, observándose que en promedio se forman 2 puentes de hidrógeno. También se observa que la interacción entre el Mg^{2+} y el ligando se mantiene hasta los 850 ps, después hay un aumento en la distancia entre ellos, lo que hace que se pierda la interacción entre estos dos.

Sin embargo, las imágenes en las **Figuras 29** y **30** muestran que durante toda la dinámica no se pierde la interacción entre el grupo NH de la piperidina con el residuo Asp145. También se observa que antes de los 1000 ps la interacción con el Mg^{2+} se pierde; pero se forman otras interacciones entre el NH del 2-amino con el Asp264, el cual se forma intermitentemente. Se observan otras interacciones, como la que ocurre entre el residuo Tyr142 con el anillo de bencimidazol, siendo esta interacción de tipo π - π entre los dos anillos aromáticos de estos grupos; sin embargo, esto se observa solo en el rango entre 1500 y los 2100 ps.

Un dato interesante es que las posiciones 5 y 6 del núcleo de bencimidazol no interactúan con ningún residuo de aminoácido de la proteína, por lo que algún cambio en estas posiciones no afecta la estabilidad del complejo ligando-enzima.

También se realizó la dinámica del compuesto **6** para observar la estabilidad del complejo ligando-enzima PC de humano y compararlas con la de *L. mexicana* (**Figura 31** y **32**). Como se puede observar, el compuesto inicialmente no muestra ninguna interacción con la enzima, pero poco a poco forman enlaces entre los metoxilos y los residuos Ser362 y Asp178, así como entre el N-3 del bencimidazol y el residuo Gln329. También se observa que el ligando se aleja poco a poco del sitio catalítico, dado por la pérdida de estas interacciones, solo conservándose la existente entre el Gln329 y el N-3 del bencimidazol. Así como se observa que la distancia entre el ligando y el Mg^{2+} aumenta, lo que sugiere que el complejo es poco estable y si se dejara por más tiempo la dinámica, el ligando se separaría completamente de la enzima. De esta forma podemos decir que la interacción del complejo ligando-enzima de la PC de humano es menos estable que la de *L. mexicana*. Por lo tanto es mucho más estable y selectivo este compuesto contra la enzima del parásito.

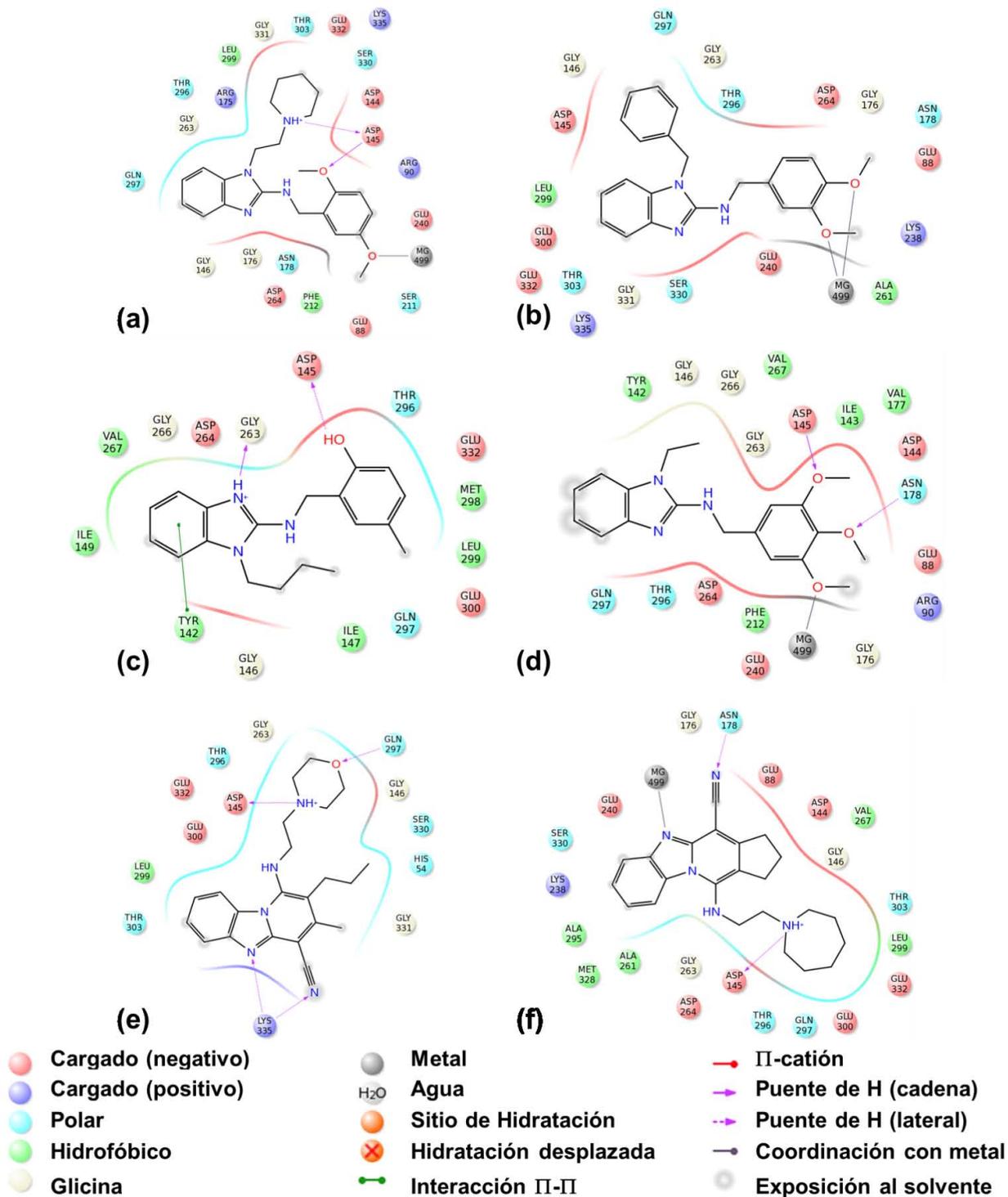


Figura 27. Interacción de los residuos de aminoácidos de la proteína PC de *L. mexicana* con los diferentes ligandos. (a) Compuesto 6. (b) Compuesto 11. (c) Compuesto 16. (d) Compuesto 21. (e) Compuesto 114. (f) Compuesto 116.

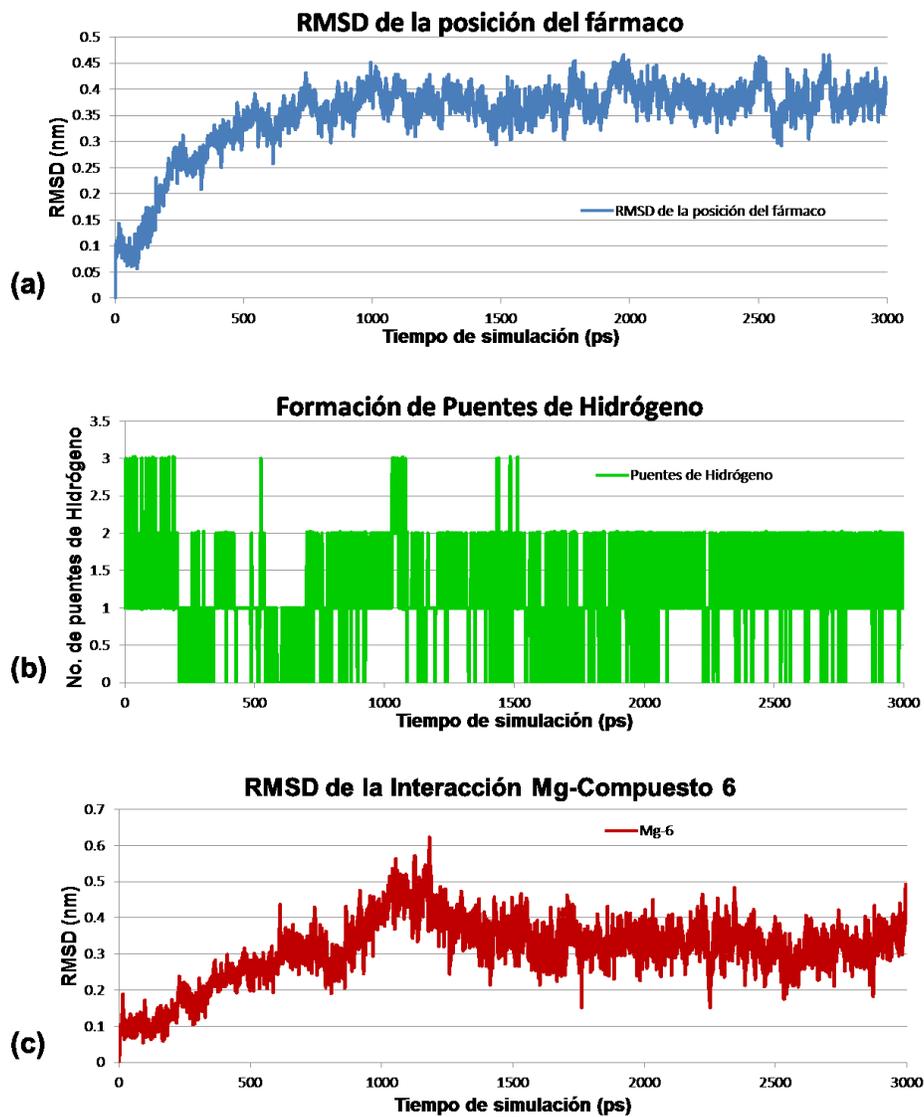


Figura 28. Gráficas de interacción proteína-compuesto 6. (a) RMSD de la posición del compuesto 6. (b) Formación de puentes de hidrógeno entre la proteína y el ligando 6. (c) RMSD de la interacción entre el Mg^{2+} y el compuesto 6.

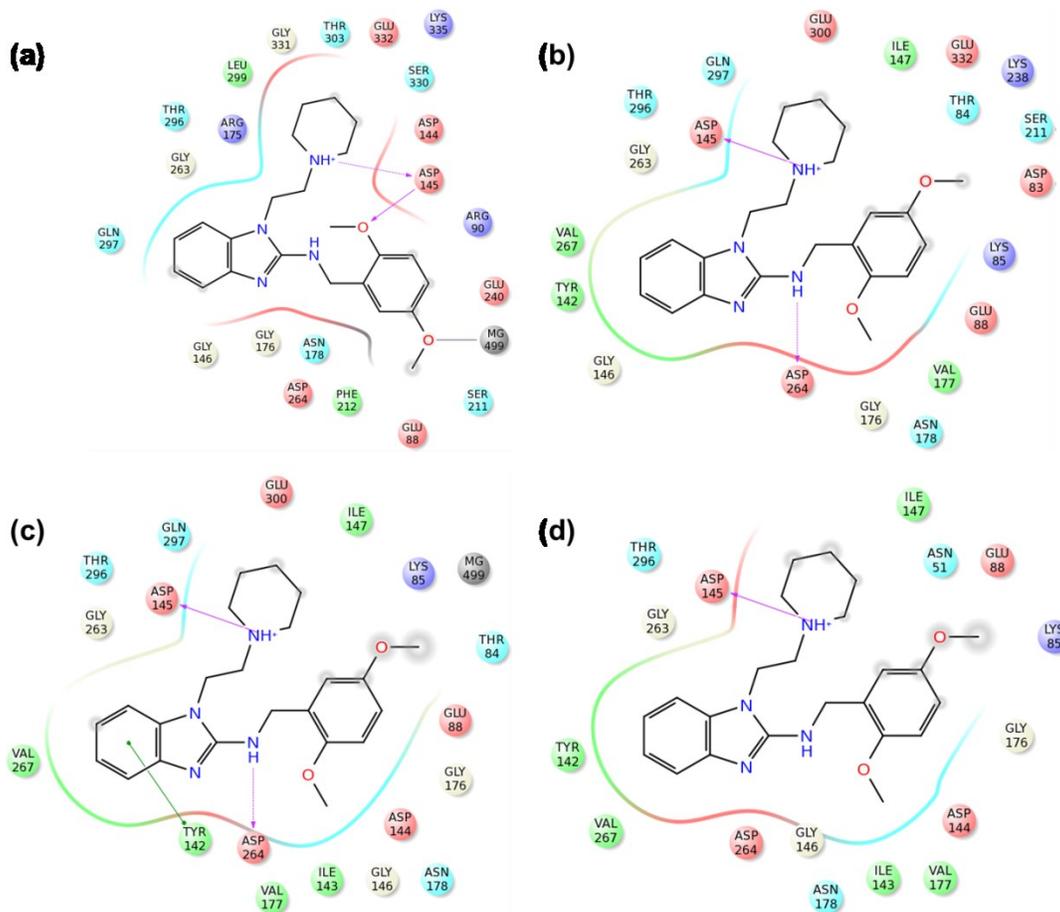


Figura 29. Posición del compuesto **6** dentro de la proteína PC de *L. mexicana* durante la dinámica molecular. (a) 1ps, la interacción es como la que se muestra en la **Figura 27a**. (b) 1000 ps, se mantiene la interacción del grupo NH del piperidinio con el residuo Asp145, además de la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo NH y el residuo Asp264. (c) 2000 ps, se mantiene la interacción del grupo NH del piperidinio con el residuo Asp145 al igual que la interacción del grupo NH con el residuo Asp246. (d) 3000 ps, la interacción del piperidinio con el Asp145 se mantuvo a lo largo de toda la simulación. Imágenes realizadas con Maestro.

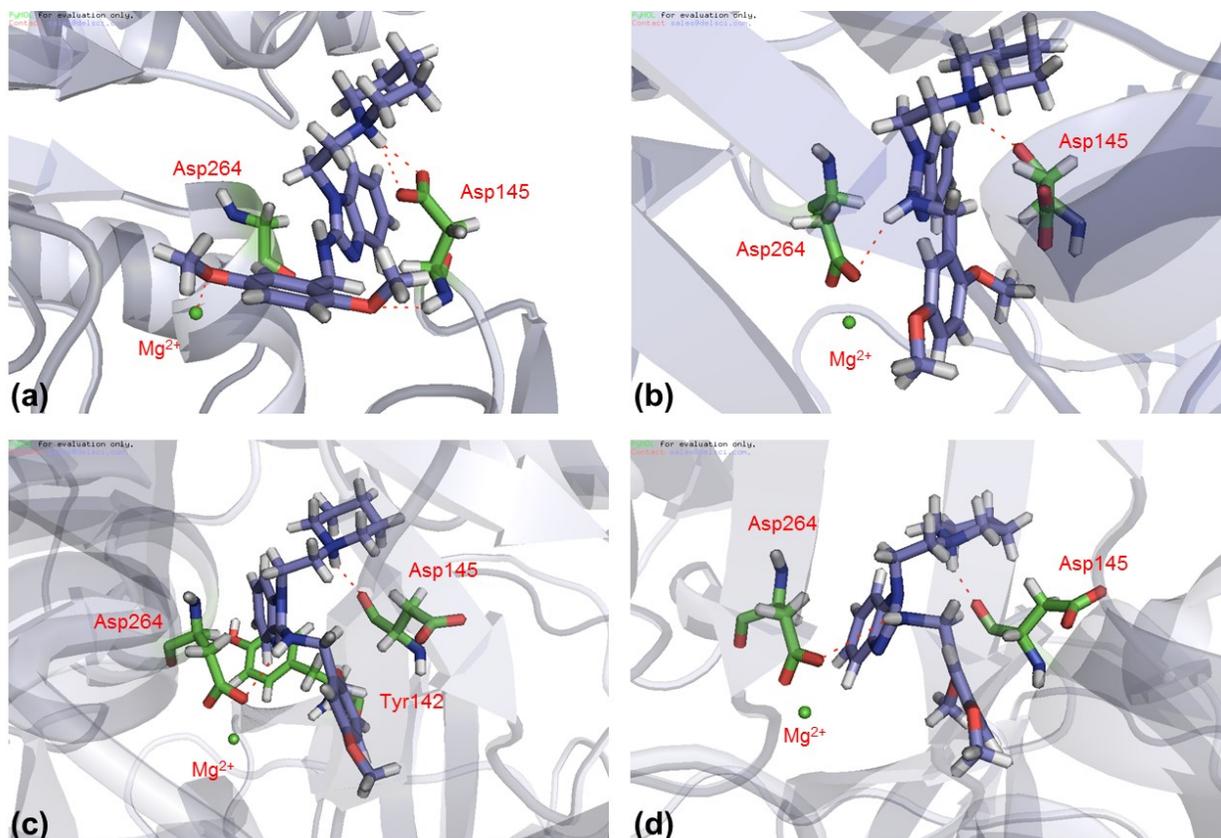


Figura 30. Posición del compuesto **6** dentro de la proteína PC de *L. mexicana* durante la dinámica molecular. (a) 1ps, la interacción es como la que se muestra en la **Figura 27a**. (b) 1000 ps, se mantiene la interacción del grupo NH del piperidinio con el residuo Asp145, además de la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo NH y el residuo Asp264. (c) 2000 ps, se mantiene la interacción del grupo NH del piperidinio con el residuo Asp145 al igual que la interacción del grupo NH con el residuo Asp246. Se observa la presencia del residuo Tyr142 que forma la interacción π - π con el anillo del benzimidazol. (d) 3000 ps, la interacción del piperidinio con el Asp145 se mantuvo a lo largo de toda la simulación. Imágenes realizadas con Pymol.

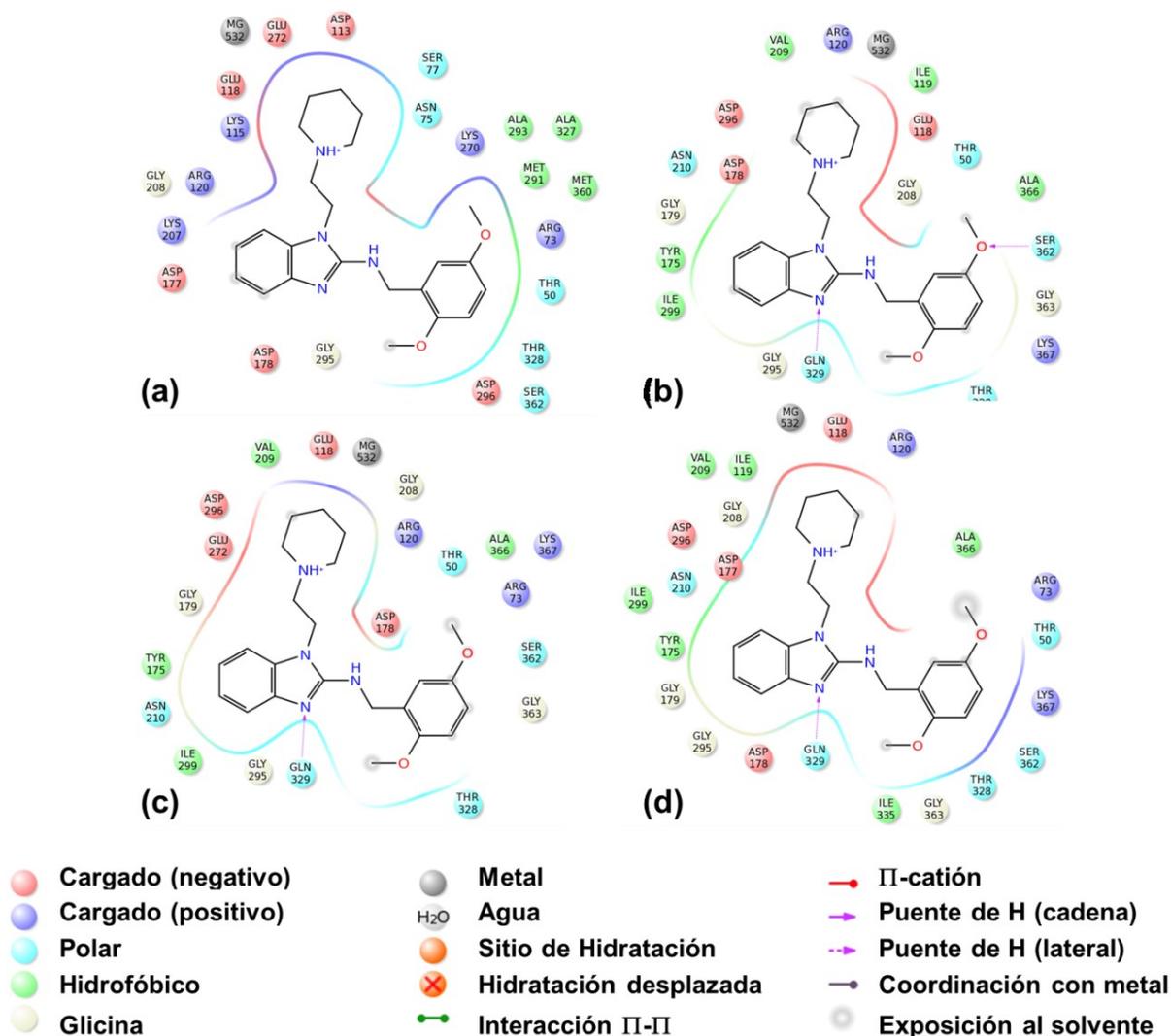


Figura 31. Posición del compuesto **6** dentro de la PC de humano durante la dinámica molecular. (a) 1ps, no hay interacción de ningún tipo. (b) 1000 ps, se forma un puente de hidrógeno entre el residuo Gln329 y el N-3 del bencimidazol, al igual que hay una interacción entre el residuo Ser362 y el oxígeno del metoxilo. (c) 2000 ps, se mantiene la interacción del grupo N-3 del bencimidazol con el residuo Gln329, pero se pierde la interacción con el residuo Ser362. (d) 3000 ps, la interacción con el Gln329 fue la única interacción que se mantuvo después de los 1000 ps. Imágenes realizadas con Maestro.

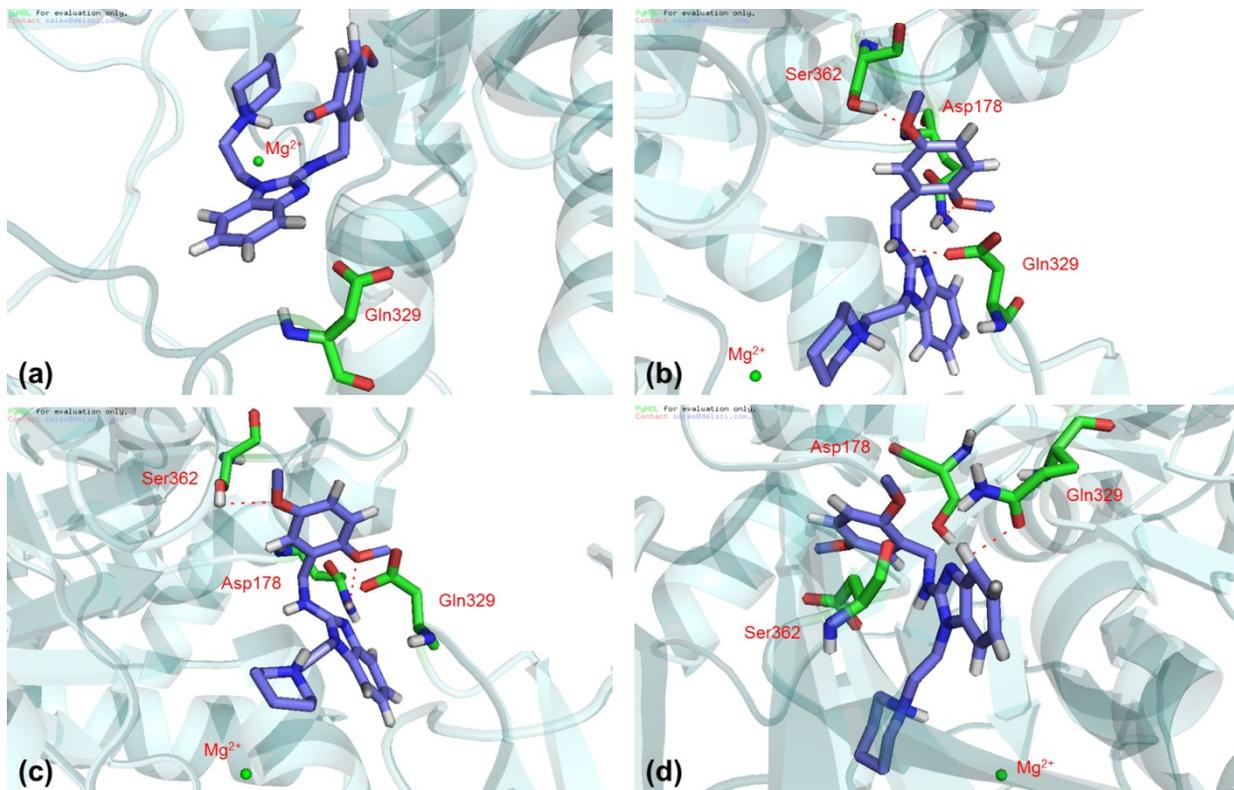


Figura 32. Posición del compuesto **6** dentro de la PC de humano durante la dinámica molecular. (a) 1ps, no hay interacción de ningún tipo. (b) 1000 ps, se forma un puente de hidrógeno entre el residuo Gln239 y el NH del amino, al igual que hay una interacción entre el residuo Ser362 y Asp178 con los oxígenos de los metoxilos. (c) 2000 ps, se mantiene la interacción de los residuos Ser362 y Asp178 con los oxígenos de los metoxilos. (d) 3000 ps, la interacción con el Gln329 es la única interacción que se observa. Imágenes realizadas con Pymol.

Para complementar este estudio, la energía de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) después de la dinámica molecular se describió en términos de la siguiente ecuación:¹⁰⁵

$$\Delta G_{\text{unión}} = \alpha [(V_{\text{LJ}})_{\text{enlace}} - (V_{\text{LJ}})_{\text{libre}}] + \beta [(V_{\text{CL}})_{\text{enlace}} - (V_{\text{CL}})_{\text{libre}}] + \gamma$$

Donde $(V_{\text{LJ}})_{\text{enlace}}$ es el promedio de la energía Lennard-Jones para la interacción proteína-ligando; $(V_{\text{LJ}})_{\text{libre}}$ es el promedio de energías de Lennard-Jones para la interacción ligando-agua; $(V_{\text{CL}})_{\text{enlace}}$ es el promedio de la energía electrostática para la interacción ligando-proteína; $(V_{\text{CL}})_{\text{libre}}$ es el promedio de la energía electrostática para la interacción ligando-agua; α , β y γ son coeficientes de interacción de energía lineal (LIE). Para fármacos pequeños $\alpha = 0.18$, $\beta = 0.50$ y $\gamma = 0.00$.

Con esto la energía de unión del complejo ligando-compuesto **6** para la enzima de humano es de -5.18 kcal/mol y la de *L. mexicana* fue de -7.23 kcal/mol. Si bien la energía de unión de la enzima de

humano aumentó y la del parásito disminuyó, las diferencias de energía entre ambos son grandes, por lo que aun así se tiene una gran selectividad por la enzima del parásito sobre la de humano. Además, las interacciones presentadas entre el ligando y la enzima de *L. mexicana* son mayores y más importantes respecto a las del humano.

Con estos datos, podemos asegurar que la interacción de la enzima-compuesto **6** es muy estable y que no se observa una disociación de este complejo en el lapso de los 3 ns. Esto nos da mucha información acerca de los requerimientos estructurales para el diseño de nuevos inhibidores de esta enzima. Así mismo, también encontramos que si se colocaran sustituyentes en las posiciones 5 y/o 6 del núcleo de bencimidazol no afectarían en su acoplamiento con la enzima, de esta manera poder evitar el metabolismo de primer paso del huésped.

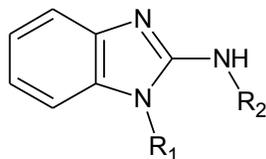
7.1.4. Acoplamiento molecular con la enzima AN de *L. mexicana* y *H. sapiens*

Una vez que se comprobó que la estructura obtenida para arginasa de *L. mexicana* a partir de la estructura de arginasa de hígado de rata cumplía con los requisitos para ser un buen modelo, se llevó a cabo un screening virtual utilizando cálculos de acoplamiento molecular. Este estudio se realizó para poder identificar aquellas moléculas que podrían unirse al sitio catalítico de la enzima arginasa de *L. mexicana* y *H. sapiens*. Al igual que en el estudio anterior se utilizó la base de datos de ZINC, se permitió la flexibilidad de los ligandos en todos sus enlaces rotables, mientras que la proteína se mantuvo rígida. Se utilizaron las dos enzimas de arginasa para identificar a aquellos compuestos que se unían selectivamente al sitio catalítico de la AN del parásito. Primero se realizó el acoplamiento molecular con el modelo de la arginasa sin los iones metálico, ya que en un principio el programa AutoDock4.2 y GROMACS 4.0.5 no contaban con los parámetros para colocar un metal como el manganeso y realizar el acoplamiento y la dinámica molecular respectivamente. Después de realizar varios cálculos, se logró obtener los parámetros para este metal y obtener la enzima con los dos iones del manganeso. Razón por la cual se presentan dos resultados de acoplamiento molecular, uno sin iones y otro con los iones de manganeso.

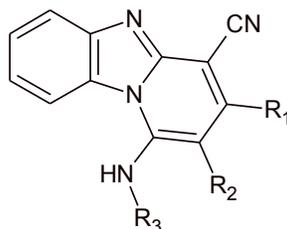
Los resultados del acoplamiento molecular “en ciego” sin el Mn^{2+} mostraron que más de 100 compuestos de la base de datos mostraban preferencia por unirse al sitio catalítico de la enzima. Estos compuestos se unían exclusivamente a la enzima AN de *L. mexicana*, pero ninguno de ellos se unía a la AN de humano. Estos datos indican que se pudieron obtener compuestos selectivos contra la enzima del parásito y por lo tanto tener una expectativa de que los compuestos no serán tóxicos al humano. Posteriormente se realizó un segundo acoplamiento, esta vez limitando la caja en el sitio catalítico como se describió en la metodología, para clasificar y seleccionar aquellos que tuvieran una mejor energía de unión. Basados en esta clasificación solo 18 compuestos mejoraba

su energía de unión siendo menor a -7.0 kcal/mol. Las estructuras de estos 18 compuestos y sus valores se presentan en la **Tabla 8**.

TABLA 8. ΔG de unión al sitio catalítico de la Arginasa de *Leishmania mexicana*.



Compuesto	Clave ZINC	R ₁	R ₂	ΔG (kcal/mol) <i>L. mexicana</i>
36	1798220	Pentilo	2-Hidroxibencilo	-9.10
41	285496	Propilo	5-Cloro-2-hidroxibencilo	-8.96
46	613506	Isopropilo	2-Metoxibencilo	-8.78
48	285488	Etilo	2-Hidroxi-5-metilbencilo	-8.60
53	513985	Isopentilo	Bencilo	-8.52
58	513988	Isobutilo	Bencilo	-8.40
63	111419	Metilo	5-Bromo-2-hidroxibencilo	-8.30
68	2478054	Isopropilo	4-Bromobencilo	-8.23
73	285495	Metilo	5-Cloro-2-hidroxibencilo	-8.19
78	3643102	Butilo	4-Clorobencilo	-8.11
83	196189	Propilo	1,3-Benzodioxol-5-ilmetilo	-7.99
88	3643113	Propilo	4-Metoxibencilo	-7.98
93	526385	Metilo	2-Metoxibencilo	-7.96
98	2073201	Butilo	Piridin-4-ilmetilo	-7.93
103	532233	Metilo	4-Bromobencilo	-7.68
108	804806	Etilo	4-Metoxibencilo	-7.38
113	525027	Etilo	4-(Dimetilamino)bencilo	-7.29



Compuesto	Clave ZINC	R ₁	R ₂	R ₃	ΔG (kcal/mol) <i>L. mexicana</i>
118	4312478	Metilo	Etilo	3-(morfolin-4-il)propilo	-8.2

Como se puede observar, las estructuras corresponden a derivados de 1,2-disustituidos 2-aminobencimidazoles sin sustituyentes en las posiciones 5 y 6; al igual que un triciclo con núcleo de bencimidazol. Estas estructuras son del mismo tipo que las encontradas con el acoplamiento molecular sobre la PC. Aunque no tienen exactamente los mismos sustituyentes ninguna de las estructuras de la PC con las encontradas para la AN, ya que las que las interacciones ligando-enzima son específicas, dado que las dos enzimas son diferentes en los aminoácidos que componen su sitio catalítico. Estas interacciones pueden ser observadas en la **Figura 33**. Se pueden encontrar sustituyentes que puedan unirse a ambas enzimas propiciado que se diversifique su actividad, disminuya la resistencia por parte del parásito y se tengan más opciones de tratamiento. Esto demuestra, una vez más, la versatilidad de los bencimidazoles ya que presentan actividad biológica contra varios parásitos.

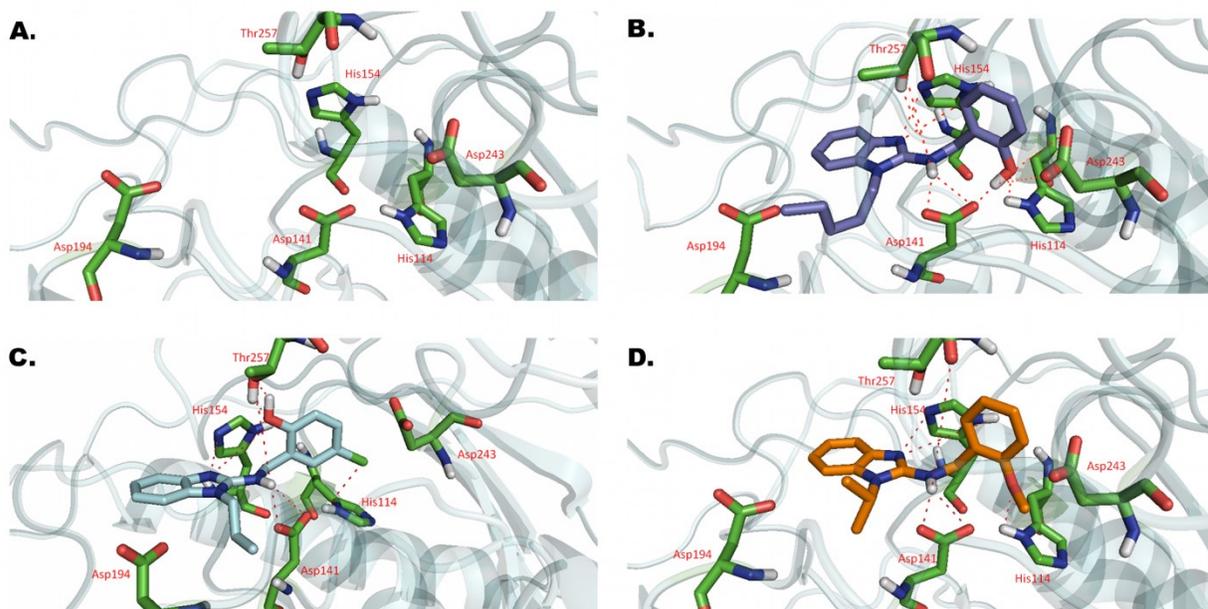


Figura 33. Interacciones ligando-proteína. (A) Los diversos ligando interactúan con la proteína a través de los residuos His114, Asp141, His154, Thr257 y Asp243. (B) El compuesto **36** interactuando con la proteína. (C) El compuesto **41** interactuando con la proteína. (D) El compuesto **46** interactuando con la proteína.

Como se observa en la **Figura 33**, todas las moléculas exhiben el mismo modo de unión: Curiosamente, las interacciones más importantes se pueden encontrar entre estas moléculas y los residuos His114, Asp141 e His154, los cuáles participan directamente en el mecanismo de catálisis de esta enzima. En la Figura 33B el compuesto **36** interactúa con la proteína de la siguiente manera: el grupo hidroxilo forma un puente de hidrógeno con el residuo His114 y Asp141; el N2 del

núcleo del bencimidazol forma un puente de hidrógeno con el residuo His154; el N1 y el N del 2-amino interactúa con el residuo Asp141. Con el compuesto **41** (Figura 33C) el cloro interactúa con el residuo His114; el grupo hidroxilo forma un puente de hidrógeno con el residuo Thr257; el N2 del núcleo del bencimidazol forma un puente de hidrógeno con el residuo His154; el N1 y el N del 2-amino interactúan con el residuo Asp141. En el caso del compuesto **46**, el grupo hidroxilo forma un puente de hidrógeno con el residuo His114 y Asp141; el N2 del núcleo de bencimidazol forma un puente de hidrógeno con el residuo His154; el N1 y el N del 2-amino interactúa con el residuo Asp141 (Figura 33D).

En síntesis, el complejo ligando enzima se estabiliza principalmente por puentes de hidrógeno, especialmente en aquellos que forman los sustituyentes del grupo R₂ con His114 y Thr257; uno entre el N del 2-amino y el Asp141; y algunos presentados entre el N del núcleo del bencimidazol y el residuo His154. Además, una interacción π - π se forma entre la His139 y el grupo bencilo del ligando. De esta forma, los sustituyentes del grupo bencilo actúan como anclas hacia la enzima mientras que el bencimidazol ayuda a mantener la molécula en la cavidad de unión; el grupo R₁ ayuda a posicionar al ligando en el sitio catalítico.

Cabe mencionar que ninguna de estas moléculas se reportó su actividad biológica *in vitro* contra *L. mexicana* o contra la arginasa de *L. mexicana*. El screening virtual muestra que los 1-alkil-N-bencil-1H-bencimidazol-2-aminas son posibles inhibidores de la arginasa de *L. mexicana*. Aun cuando se sabe bien que las energías de unión calculadas no siempre reflejan la respuesta biológica, las interacciones específicas ligando-enzima podrían ser usadas como una guía para el diseño de nuevas moléculas contra la leishmaniosis.

En el segundo estudio de acoplamiento molecular se colocaron los dos manganesos presentes en el sitio catalítico en el modelo de la enzima arginasa de *L. mexicana*. En esta ocasión se utilizaron los mismos ligandos que fueron específicos para la enzima del parásito. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Comparación de las energías de unión de los ligandos con la enzima AN de *L. mexicana* sin y con Mn²⁺

Compuesto	Código ZINC	ΔG (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
		<i>L. mexicana</i> Sin Mn ²⁺	<i>L. mexicana</i> Con Mn ²⁺
36	1798220	-9.10	-5.03
41	285496	-8.96	-4.98
46	613506	-8.78	-4.88

48	285488	-8.60	-4.80
53	513985	-8.52	-4.01
58	513988	-8.40	-3.76
63	111419	-8.30	-4.49
68	2478054	-8.23	-4.31
73	285495	-8.19	-4.69
78	3643102	-8.11	-3.92
83	196189	-7.99	-4.63
88	3643113	-7.98	-4.09
93	526385	-7.96	-4.50
98	2073201	-7.93	-4.08
103	532233	-7.68	-4.21
108	613506	-7.38	-4.87
113	525027	-7.29	-3.80
118	4312478	-8.20	-4.87

Como se observa en la **Tabla 9**, a pesar de que las energías de unión disminuyen respecto al acoplamiento sin manganeso, siguen siendo relativamente aceptables, ya que ni siquiera se unen a la enzima de humano. Casi todas las energías disminuyen entre 3 y 4 unidades de ΔG , pero los primeros 3 compuestos siguen teniendo las más altas energías de unión de toda la serie de compuestos. De hecho, las actividades entre el compuesto **36** y **41** fueron muy cercanas. También otros compuestos como el **93** presentaban una alta energía de unión, respecto a su valor anterior. Para el caso de la única estructura tricíclica, su valor disminuyó mucho (-4.87), pero aun así presentaba una baja energía de unión, muy similar a la de los compuestos **46** y **48**. Esto puede deberse a que las interacciones con los aminoácidos del sitio catalítico varían debido a la presencia de los iones Mn^{2+} , ya sean cambiando la intensidad de estas interacciones o formándose otras interacciones. Esas nuevas interacciones se muestran en la **Figura 34** y **35**.

El compuesto **36** forma un puente de hidrógeno entre el grupo OH y los residuos Arg191, His139 y Ala138. El compuesto **41** forma una interacción de puentes de hidrógeno entre el grupo OH y NH del 2-amino con el residuo Thr257; una interacción de tipo π - π del anillo del bencimidazol con los residuos His139 y la His154; un puente de hidrógeno entre el N2 del bencimidazol y la His154; además de una interacción Π -catión con el residuo Arg191. El compuesto **63** interacciona con la enzima formando puentes de hidrógeno entre el grupo OH del bencilo y los residuos Asp245 y Arg191; el N2 del bencimidazol forma un puente de hidrógeno con el residuo Arg191; una interacción tipo π - π del anillo del bencimidazol con el residuo His139. El compuesto **93** forma puentes de hidrógeno del grupo NH con el residuo Thr257, entre el N2 del bencimidazol con el

residuo Gln26 y entre la His139 con el O del metoxilo; además, de la formación de interacciones π - π del anillo del bencimidazol con los residuos His139 y la His154. Finalmente, el compuesto **118** forma puentes de hidrógeno entre el NH del piperidinio con los residuos Asp194 y Asp141; también entre el residuo Arg191 con el N2 del bencimidazol y el N del nitrilo; así como interacciones π - π del anillo del bencimidazol con la His139.

En general, los ligandos interaccionan formando puentes de hidrógeno con los residuos Arg191, Thr257, Asp245, His154, Asp194 y Asp141. También se forman interacciones π - π del anillo del bencimidazol con los residuos His139 y la His154; así como una interacción π -catión entre el bencilo y el residuo Arg191. Estas nuevas interacciones son un poco diferentes respecto al acoplamiento molecular sin los iones manganesos. Los aminoácidos que son comunes en sus interacciones entre estos dos acoplamientos son los residuos Thr257, His154, Asp141 y Asp194. Esto se debe a que en presencia de los iones manganeso el sitio catalítico varía, ya que estos iones ocupan espacio en esta zona haciendo que el ligando no entre aún más; o porque estos iones interactúan con más aminoácidos que afectan la interacción con el ligando. La presencia de estos iones también puede generar la formación de otros enlaces, que pueden ser iguales o de mayor intensidad a los presentados; lo que permite realizar modificaciones a estos ligandos para mejorar la energía de unión, crear enlaces con los iones Mn^{2+} como en el caso de la piruvato y por lo tanto tener fármacos más selectivos y potentes. Aun así, los ligandos obtenidos siguen siendo selectivos a la enzima de *L. mexicana* sobre la de humano. Estos compuestos se seleccionaron para ser sintetizados y evaluado *in vitro*.

Dado que la presencia de los iones Mn^{2+} afectan el sitio catalítico y la forma en que interaccionan los ligandos, es importante verificar que los iones siempre estén presentes para tener un mejor modelo 3D de una enzima obtenida por homología; así como la forma más cercana en que ocurren las interacciones ligando-enzima. En este caso sí hay una variación entre el acoplamiento molecular sin y con los iones de manganeso, si bien no en cuanto a selectividad, si respecto a la energía de unión y la forma de interacción entre el ligando-proteína. Los ligandos obtenidos sin los iones, siguen siendo selectivos contra la enzima del parásito, pero varían un poco las interacciones y los residuos de aminoácidos con los que interaccionan; pero siguen siendo interacciones fuertes e importantes dentro del sitio catalítico.

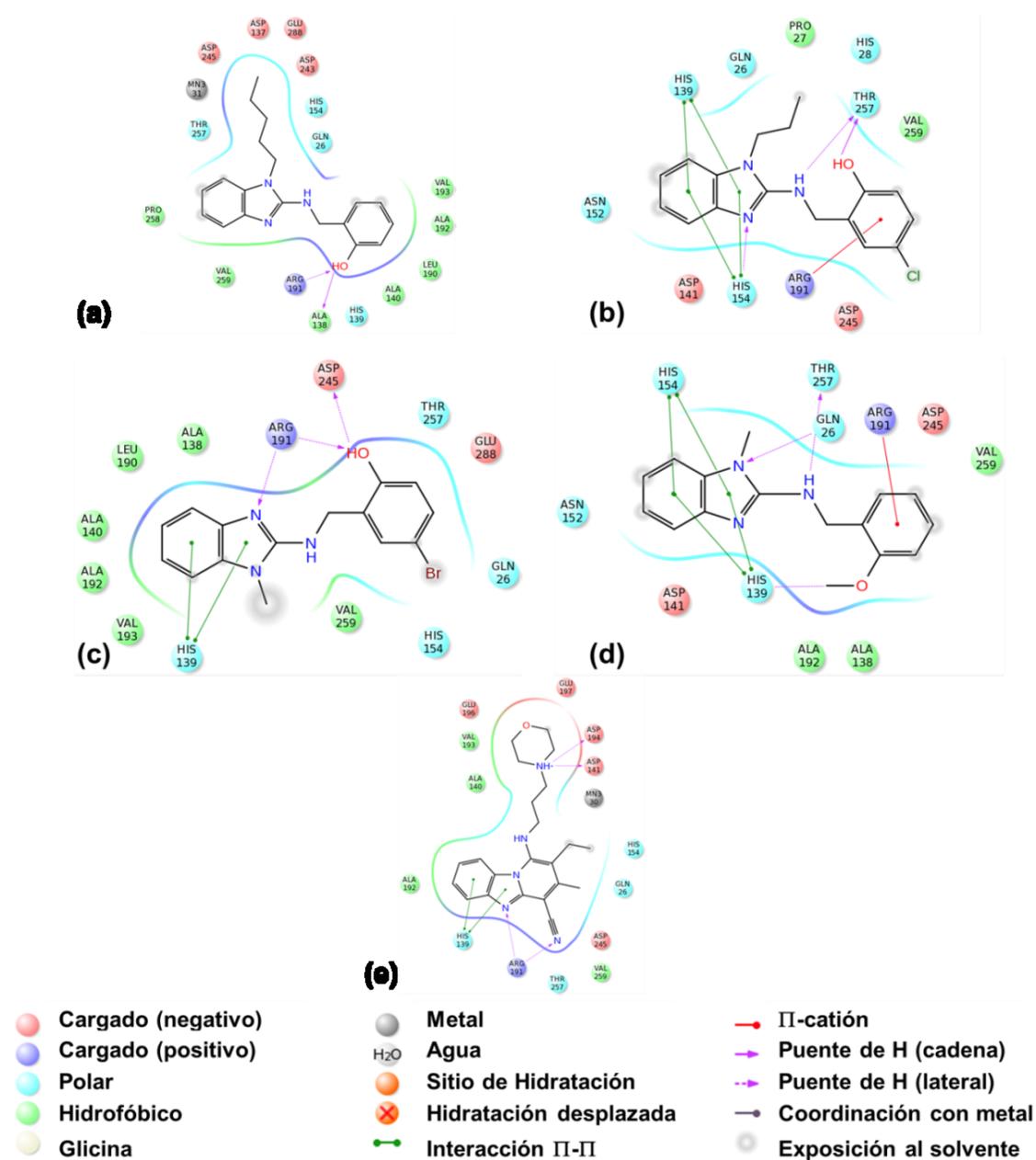


Figura 34. Acoplamiento molecular con el modelo de la arginasa de *L. mexicana* con los iones de Mn^{2+} . (a) Compuesto **36**. (b) Compuesto **41**. (c) Compuesto **63**. (d) Compuesto **93**. (e) Compuesto **118**. Imágenes realizadas con Maestro.

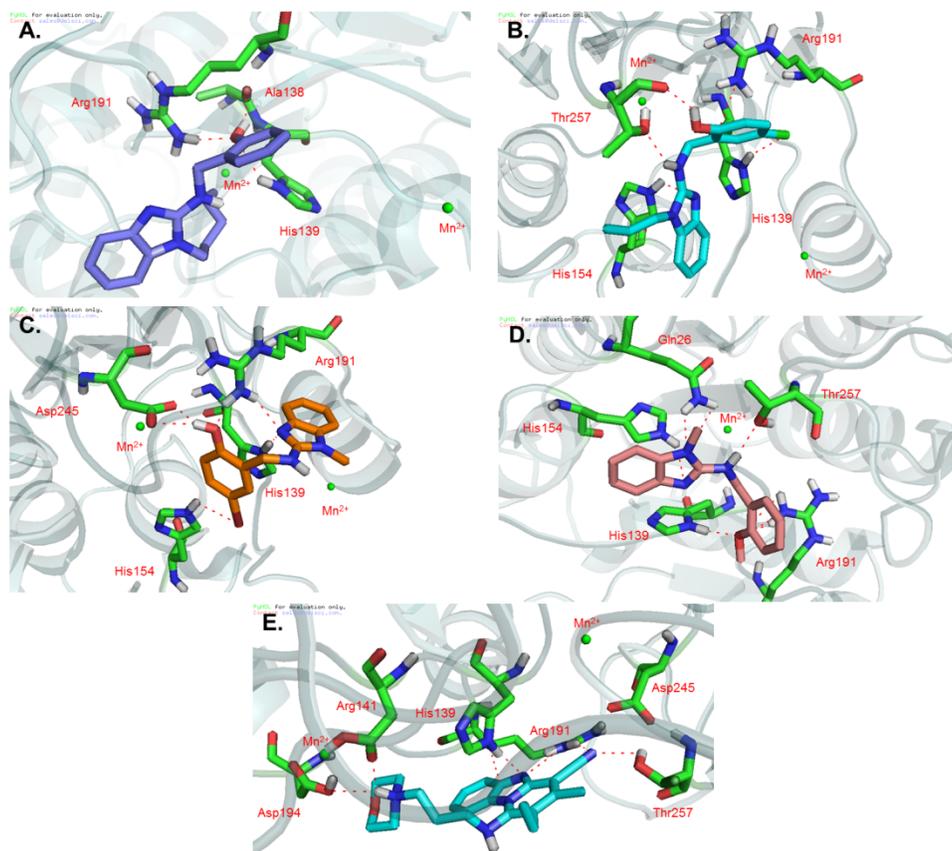


Figura 35. Interacciones ligando-proteína arginasa de *L. mexicana*. (A) El compuesto **36** interactuando con la proteína. (B) El compuesto **41** interactuando con la proteína. (C) El compuesto **63** interactuando con la proteína. (D) El compuesto **93** interactuando con la proteína. (E) El compuesto **118** interactuando con la proteína. Imágenes realizadas con Pymol.

7.1.5. Dinámica molecular del complejo arginasa-compuesto 36

Como en el estudio anterior de dinámica molecular, este procedimiento nos permitió analizar el complejo ligando-enzima e identificar las posibles conformaciones bioactivas de esta molécula. Para este propósito, se utilizó la conformación del compuesto **36**, obtenido después del estudio de acoplamiento molecular con el modelo de arginasa de *L. mexicana*, como punto de inicio. El RMSD del compuesto **36**, mostrado en la **Figura 36**, muestra que el ligando alcanzó el equilibrio después de los 570 ps, el cuál es mucho más rápido que la proteína sola. Como se mencionó anteriormente, el ligando se estabiliza principalmente por puentes de hidrógeno, los cuáles se analizaron a lo largo de toda la dinámica. La **Figura 36B** muestra las distancias entre el H del grupo 2-amino y el oxígeno del Asp141 y el Thr257. Es interesante la formación de un puente de hidrógeno entre el ligando y el residuo Asp141, el cual es estable al inicio de la simulación (primeros 95 ps), pero después, la amina gira para formar un nuevo puente de hidrógeno con el

residuo Thr257 a los 750 ps. Este resultado sugiere que estos dos residuos del sitio catalítico puede estabilizar la interacción entre el NH y la proteína; sin embargo, una simulación más grande es necesaria para soportar esta idea.

Una situación similar se puede observar cuando se analiza la interacción entre el grupo OH del compuesto **36** y el Asp141 (**Figura 36C**). En este caso, un puente de hidrógeno se forma entre estos dos grupos al inicio del cálculo (60 ps). Sin embargo, conforme la simulación avanza (alrededor de los 760 ps), el ligando se introduce aún más al sitio catalítico y el grupo OH forma un nuevo puente de hidrógeno con el residuo Asp243, el cual forma parte importante del sitio catalítico. La interacción HO-Asp243 muestra que el grupo bencilo se mueve hacia adentro del sitio catalítico y que el OH interactúa con varios residuos del sitio catalítico (**Figura 37**). Está por demás mencionar que el ligando permanece dentro del sitio catalítico y los enlaces de hidrógeno permanecen constantes a lo largo del tiempo de simulación. Por otro lado, se observó que la conformación del ligando no muestra cambios importantes. Todos estos resultados proveen información relevante de la interacción dinámica del complejo ligando-enzima.

Por último se realizó un estudio de dinámica molecular del complejo ligando-enzima entre el compuesto **36** y la AN con los dos iones de Mn^{2+} , el resultado se puede observar en la **Figura 38**. A lo largo del tiempo de la dinámica se observa que si bien hay una interacción con el grupo OH del bencilo, la interacción se pierde después de los 1000 ps. Además, hay una interacción entre el residuo Arg191 y el anillo del bencimidazol de tipo catión- π que solo dura hasta los 2000 ps, después no se vuelve a observar. Parece ser que los iones de manganeso si influyen en la estabilidad del complejo ligando-enzima, de manera que la interacción inicial se pierde después de los 3 ns al punto de que parece ser que el ligando casi se sale del sitio catalítico. Sin embargo se mantiene en la entrada de este. Por lo que si bien la estabilidad no es buena, si es lo suficientemente estable para que no entre el sustrato a la enzima y se realice la inhibición. Es por esto que es necesario contar con todos los iones para realizar un buen estudio de acoplamiento molecular y encontrar los mejores inhibidores de estas enzimas.

A pesar de todo, los compuestos pueden presentar una buena actividad inhibitoria, ya sea con la enzima o el promastigote de *L. mexicana*. Además de que servirán como referencia para encontrar otros compuestos que sean líderes para la obtención de nuevos fármacos leishmanicidas.

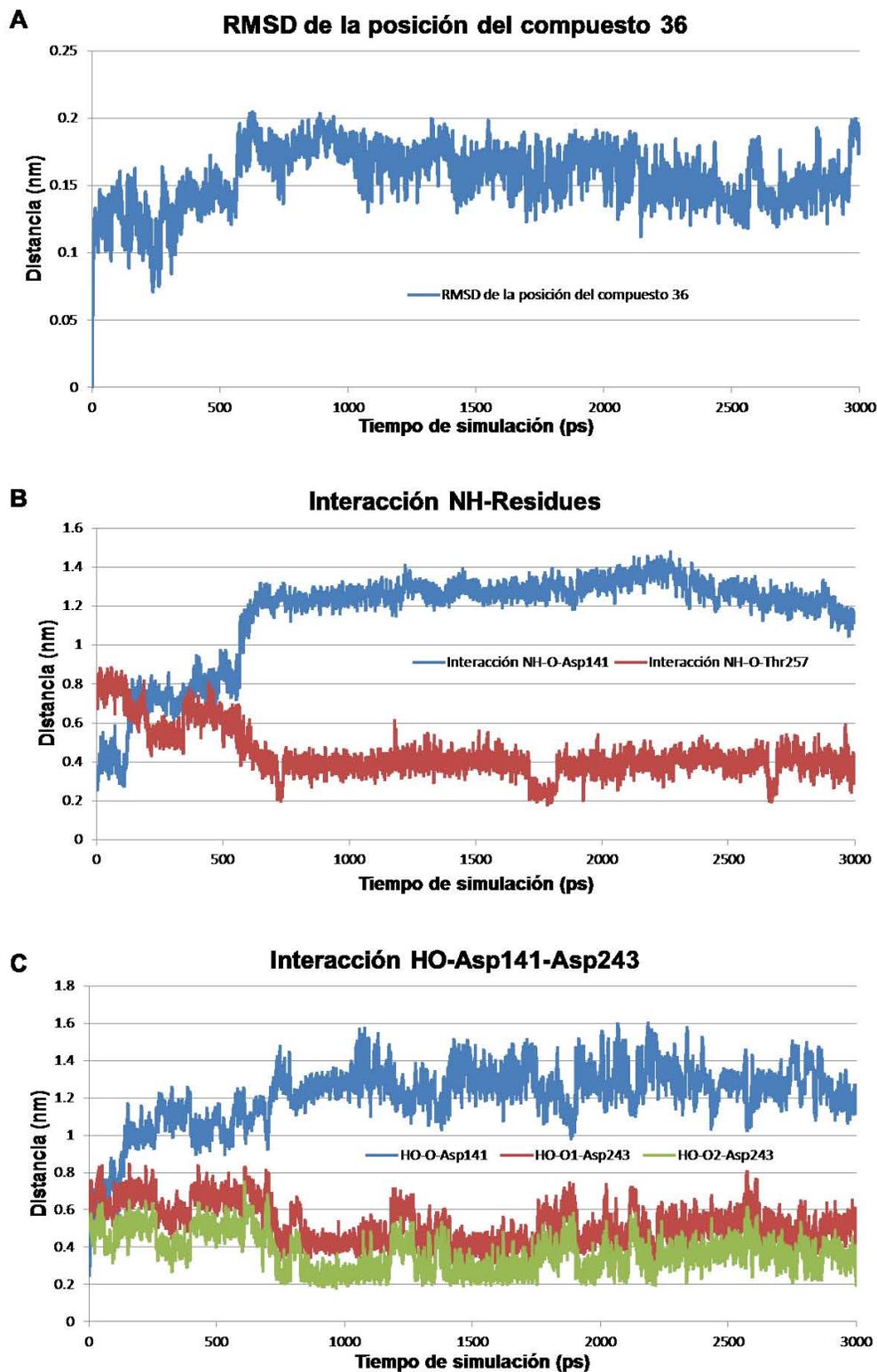


Figura 36. (A) RMSD de la posición del ligando. (B) Interacción del grupo 2-amino con los residuos Asp141 y Thr257. (C) Interacción del grupo OH con los residuos Asp141 y Asp243.

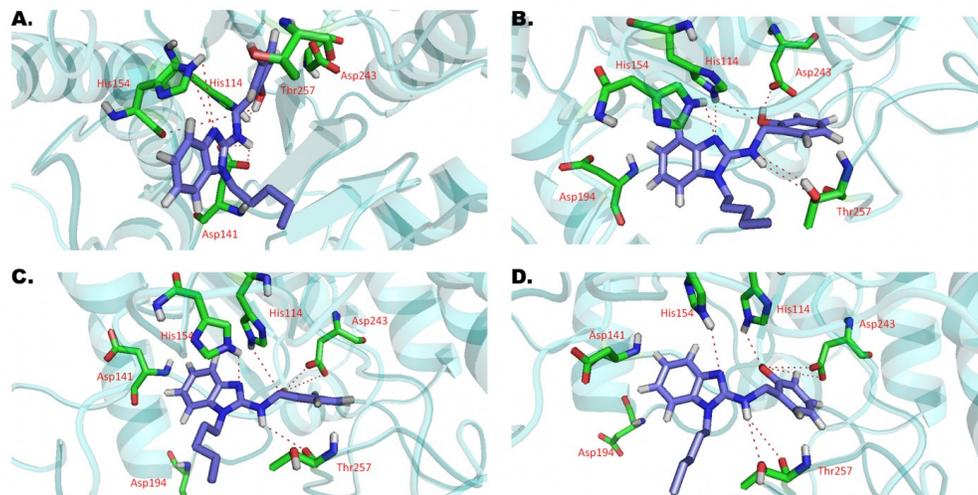


Figura 37. Posición del compuesto **36** dentro de la proteína arginasa de *L. mexicana* durante la dinámica molecular. (A) 1ps; la interacción es como se muestra en la Figura **34A**. (B) 1000 ps; la interacción inicial cambia, el grupo OH interactúa con el residuo ASP243 en vez del residuo His114; el Grupo NH ahora cambia la interacción con Thr257; la interacción del N2 del núcleo del bencimidazol es más fuerte que a los 1 ps. (C) 2000 ps; todas las interacciones en B se conservan y son más fuertes. (D) 3000 ps; la interacción final es similar a B y C.

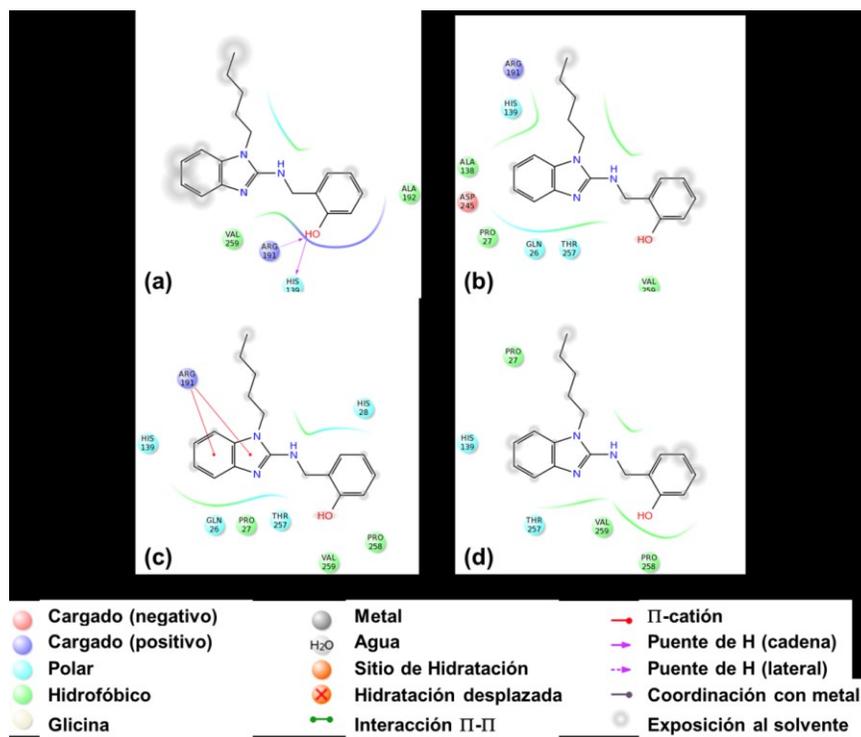


Figura 38. Dinámica molecular con el modelo de la arginasa de *L. mexicana* con los iones de Mn^{2+} y el compuesto **36**. (a) 1 ps, forma puentes de hidrógeno entre el OH y los residuos His139 y Arg191. (b) 1000 ps, no hay interacción. (c) 2000 ps, interacción catión- π entre el residuo Arg191 y el anillo de bencimidazol. (d) 3000 ps, no hay interacción. Imágenes realizadas con Maestro.

7.2. PARTE QUÍMICA

En la **Tabla 10** se presentan los resultados de rendimientos y constantes físicas de los intermediarios y los productos finales sintetizados en este trabajo, todos derivados del 2-aminobencimidazol. En la **Tabla 11** se resume las constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H y espectrometría de masas, así como las asignaciones realizadas para cada compuesto.

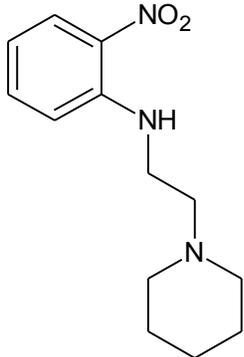
Tabla 10. Constantes físicas y rendimientos obtenidos de los derivados e intermediarios de los 1,2-disustituidos 2-aminobencimidazoles sintetizados (**6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **38**, **43**, **48** y **53**)

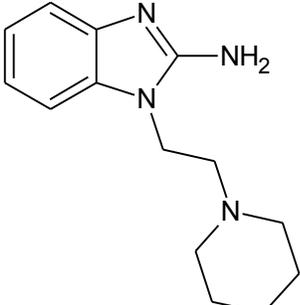
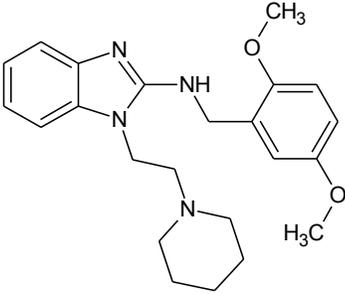
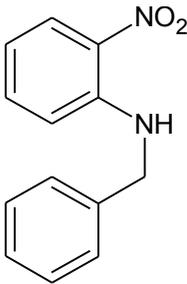
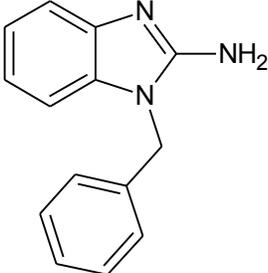
Compuesto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Cristalización	Rf (sistema)
2	33.55	64.5-66	Hexano	0.09 (I)
3	99.92	n.d.	n.a.	0.16 (II)
4	10.9	176.6-177.8	Tolueno	0.25 (III)
5	n.d.	n.d.	n.a.	0.51(II)
6	92.5	178.3-179.4	n.a.	0.25 (IV)
7	64.84	73.1-73.8	n.a.	0.38 (I)
8	n.d.	n.d.	n.a.	0.05 (I)
9	51.33	196.3-197.8	Agua-Etanol	0.44 (IV)
10	79.76	145.8-147.3	Éter de petróleo	0.42 (V)
11	66.08	146.5-147.2	Etanol	0.14 (V)
12	80.67	268.6-271.2 (eb)	n.a.	0.39 (VI)
13	n.d.	n.d.	n.a.	0.49 (VI)
14	24.50	126.8-127.4	Agua	0.38 (II)
15	56.79	101.9-102.9	Éter de petróleo	0.45 (V)
16	19	181.9-182.9	Éter de petróleo	0.34 (V)
17	98.04	268-275 (eb)	n.a.	0.28 (I)
18	98.17	n.d.	n.a.	0.30 (II)
19	60.45	156.7-158.1	Agua	0.22 (II)
20	90.02	105.5-106	Éter de petróleo	0.65 (IV)
21	73.49	125.2-126.3	Éter de petróleo	0.39 (V)
23	81.42	107.7-109	n.a.	0.32 (IV)
24	98.19	n.d.	n.a.	0.17 (VI)
26	24.19	166.2-167.4	Tolueno	0.22 (IV)
32	77.33	246.4-262.8	n.a.	0.36 (VI)
33	n.d.	n.d.	n.a.	0.15 (VI)

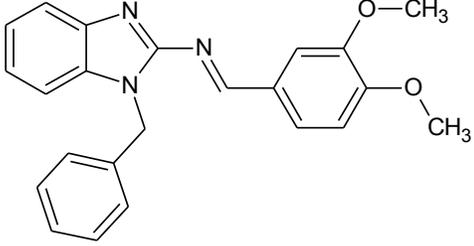
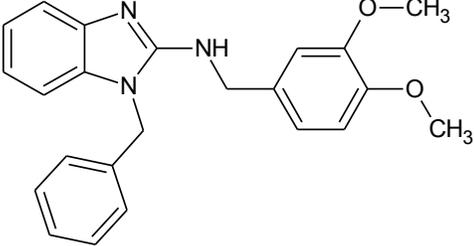
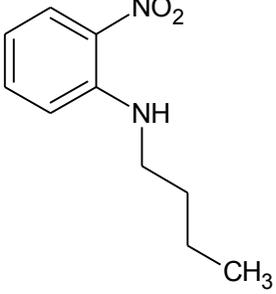
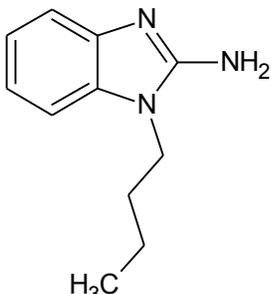
34	64.87	139.5–140.5	Agua-Etanol	0.41 (III)
35	40.07	69.8–71.8	Éter de petróleo	0.49 (V)
36	80.70	169.1–170.3	Tolueno	0.31 (V)
37	74.26	268.6–271.2	n.a.	0.5 (VI)
38	n.d.	n.d.	n.a.	0.40 (VI)
39	37.71	134.6–135.1	Agua	0.42 (II)
40	25.70	166.9–167.5	Éter de petróleo	0.39 (V)
41	23.60	187.9–188.3	Tolueno	0.43 (V)
42	83.53	271.8–280.3 (eb)	n.a.	0.43 (VI)
43	n.d.	n.d.	n.a.	0.36 (VI)
44	15.81	198.3–198.9	Agua	0.58 (II)
45	n.d.	n.d.	n.a.	0.49 (V)
46	48.47	187.7–188.9	Tolueno	0.17 (V)
47	89.71	174.5–175.2	Éter de petróleo	0.37 (V)
48	66	198.6–199.8	Tolueno	0.31 (V)
49	92.86	255.4–270.7	n.a.	0.37 (VI)
50	n.d.	n.d.	n.a.	0.16 (VI)
53	13.32	147–149	n.a.	0.32 (IV)

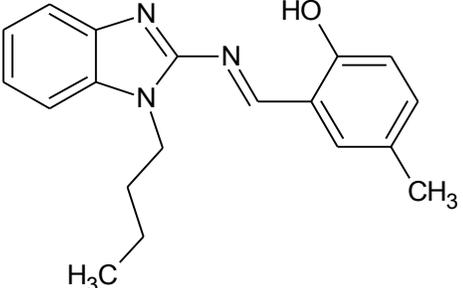
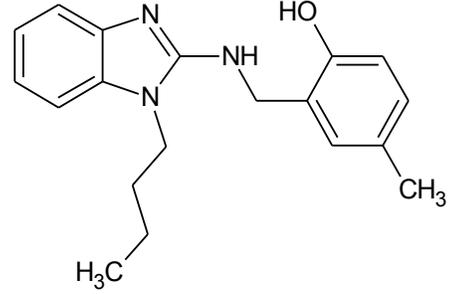
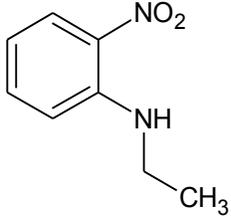
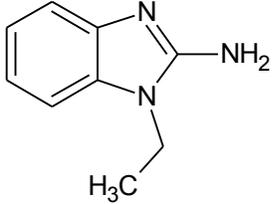
(peb) Punto de ebullición; (n.d.) No determinado; (n.a.) No aplica. Los sistemas cromatográficos se desglosan en el **Apéndice A**.

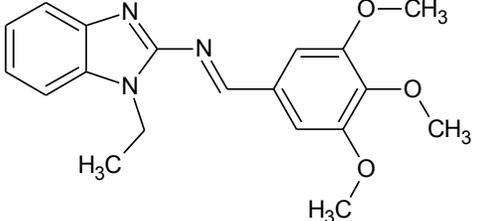
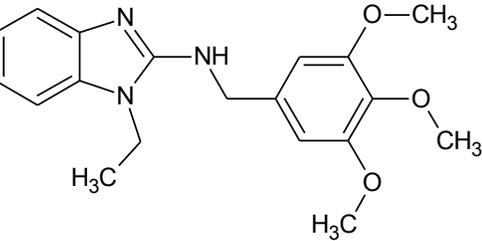
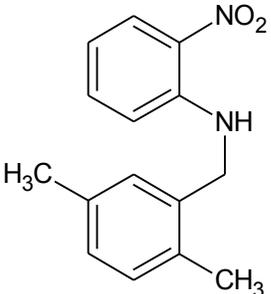
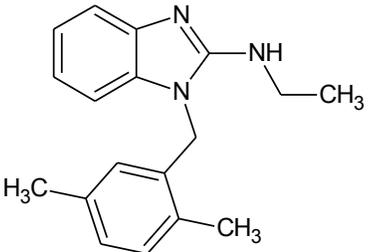
TABLA 11. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados.

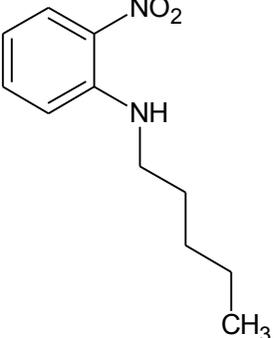
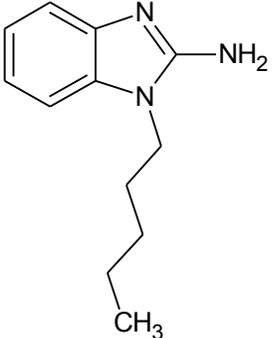
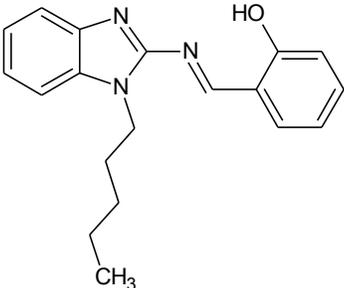
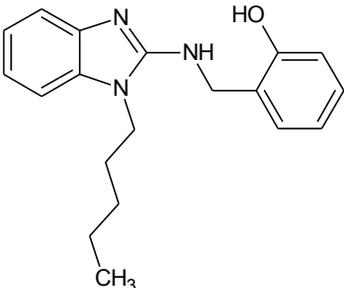
COMPUESTO	ESPECTROS
2-Nitro- <i>N</i> -[2-(piperidin-1-il)etil]anilina (2) 	Espectro 1, IR (cm ⁻¹): 3318.30, 1613.81, 1561.43 (-NH-); 3086.14 (aromático); 2936.19, 2850.43, 2787.95, 2760.24 (-CH ₂ -); 1504.80, 1343.61 (Ar-NO ₂); 1450.03 (Ciclohexano). Espectro 2, RMN ¹H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 1.52 (m, 6 H, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -, Piperidin), 2.42 (m, 4 H, -CH ₂ -CH ₂ -, Piperidin), 2.61 (t, <i>J</i> =6.21 Hz, 2 H, -CH ₂ -), 6.71 (m, 1 H, 5), 7.05 (dd, <i>J</i> =8.77, 1.34 Hz, 1 H, 6), 7.57 (m, 1 H, 4), 8.09 (dd, <i>J</i> =8.65, 1.61 Hz, 1 H, 3), 8.48 (m, 1 H, -NH-). Espectro 3, EM: IE/ID <i>m/z</i> : 249 (M ⁺ , 0.5%); 98 (M-152, 100%).
1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-amina (4)	Espectro 4, IR (cm ⁻¹): 3195.84, 1645.97, 1544.29 (-NH-); 3051.95 (aromático); 2932.88, 2853.43, 2820.67, 2805.19 (-CH ₂ -); 1451.05 (Ciclohexano). Espectro 5, RMN ¹H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 1.51 (m, 6 H, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -, Piperidin),

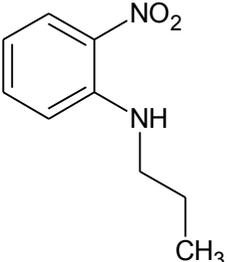
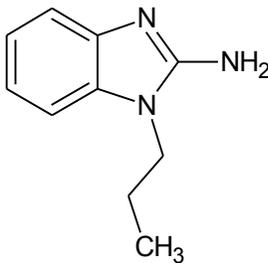
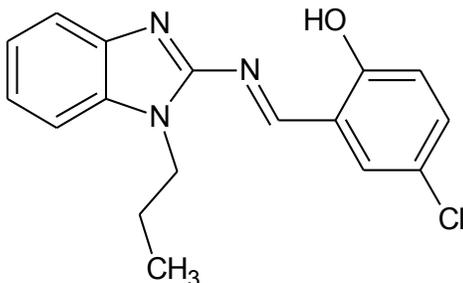
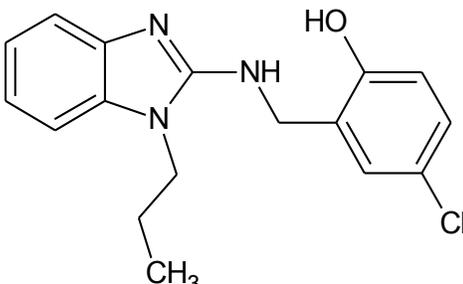
	<p>2.46 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-, Piperidin), 2.54 (m, 2 H, -CH₂-), 4.07 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-), 6.51 (s, 2 H, -NH₂), 6.92 (m, 2 H, 4,7), 7.15 (m, 2 H, 5, 6).</p> <p>Espectro 6, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 244 (M⁺, 4%); 157 (M-87, 8%); 133 (M-111, 10%); 98 (M-146, 100%).</p>
<p>1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-<i>N</i>-(5-etil-2-metoxibencil)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (6)</p> 	<p>Espectro 7, IR (cm⁻¹): 3195.84, 1645.97, 1544.29 (-NH-); 3051.95 (aromático); 2932.88, 2853.43, 2820.67, 2805.19 (-CH₂-); 1451.05 (Ciclohexano).</p> <p>Espectro 8, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.51 (m, 6 H, -CH₂-CH₂-CH₂-, Piperidin), 2.46 (m, 4 H, -CH₂-CH₂-, Piperidin), 2.54 (m, 2 H, -CH₂-), 4.07 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-), 6.51 (s, 2 H, -NH₂), 6.92 (m, 2 H, 4,7), 7.15 (m, 2 H, 5, 6).</p> <p>Espectro 9, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 244 (M⁺, 4%); 157 (M-87, 8%); 133 (M-111, 10%); 98 (M-146, 100%).</p>
<p><i>N</i>-Bencil-2-nitroanilina (7)</p> 	<p>Espectro 10, IR (cm⁻¹): 3396.85, 1618.45, 1572.62 (-NH-); 3052.86 (aromático); 2927.23 (-CH₂-); 1512.95, 1348.56 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 11, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 4.62 (d, <i>J</i>=6.23 Hz, 2 H, -CH₂-), 6.67 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, NH-), 6.90 (dd, <i>J</i>=8.77, 1.26 Hz, 1 H, H-4), 7.37 (m, 6 H, H-3, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 8.07 (m, 1 H, H-5), 8.65 (m, 1 H, H-6).</p> <p>Espectro 12, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 228 (M⁺, 9%); 180 (M-48, 15%); 105 (M-123, 71%); 91 (M-137, 100%).</p>
<p>1-Bencil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (9)</p> 	<p>Espectro 13, IR (cm⁻¹): 3451.84, 1652.12, 1545.67 (-NH-); 3030.66 (aromático); 2750.76 (-CH₂-).</p> <p>Espectro 14, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 5.25 (s, 2 H, -CH₂-), 6.56 (d, <i>J</i>=0.41 Hz, 2 H, -NH₂), 6.82 (dt, <i>J</i>=7.52, 0.50 Hz, 1 H, H-5), 6.92 (m, 1 H, H-6), 7.03 (d, <i>J</i>=0.55 Hz, 1 H, H-7), 7.23 (m, 6 H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6').</p> <p>Espectro 15, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 223 (M⁺, 57%); 91 (M-132, 100%).</p>
<p>1-Bencil-<i>N</i>-[(<i>E</i>)-(3,4-dimetoxifenil)metildieno]-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (10)</p>	<p>Espectro 16, IR (cm⁻¹): 3431.15, 1576.73 (-C=N-); 3014.54 (aromático); 2843.81 (-CH₂-); 1268.21 (Ar-N-R); 1139.85 (Ar-O-R)</p> <p>Espectro 17, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 3.90 (s, 6 H, los dos -OCH₃), 5.68 (s, 2 H, -CH₂-), 7.31 (m, 8 H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-5'', H-6''), 7.60 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.75 (m, 2 H, H-4, H-7), 9.47 (s, 1 H, =CH-).</p>

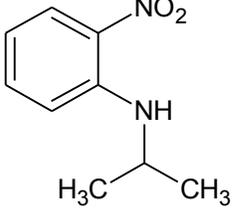
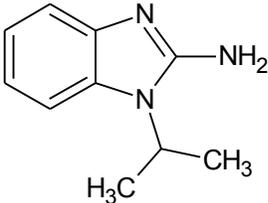
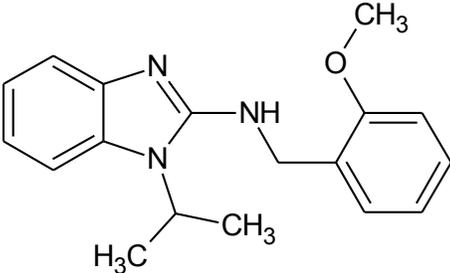
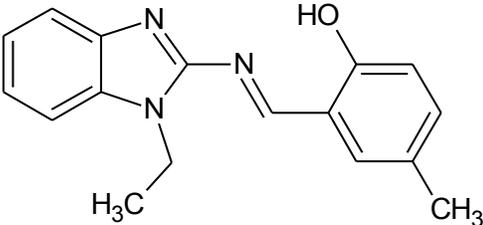
	<p>Espectro 18, EM: IE/ID m/z: 371 (M+, 46%); 370 (M-1, 100%); 91 (M-132, 22%).</p>
<p>1-Bencil-<i>N</i>-(3,4-dimetoxibencil)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (11)</p> 	<p>Espectro 19, IR (cm⁻¹): 3358.61, 1600.20, 1562.71, 1516.62 (Ar-NH-); 3029.90 (aromático); 2937.34 (-CH₂-); 1265.32 (Ar-N-R); 1138.27 (Ar-O-R)</p> <p>Espectro 20, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 3.70 (s, 3 H, -OCH₃), 3.74 (s, 3 H, -OCH₃), 4.58 (d, <i>J</i>=5.94 Hz, 2 H, -NH₂-CH₂-), 5.35 (s, 2 H, Bencimidazol-CH₂-), 6.87 (d, <i>J</i>=1.32 Hz, 1 H, H-2''), 6.89 (d, <i>J</i>=1.14 Hz, 2 H, H-5'', H-6''), 6.98 (m, 2 H, H-4, H-5), 7.10 (m, 1 H, H-6), 7.21 (m, 3 H, H-7, H-2', H-3'), 7.34 (m, 4 H, H-4', H-5', H-6', -NH-).</p> <p>Espectro 21, EM: IE/ID m/z: 373 (M+, 49%); 282 (M-91, 58%); 151 (M-222, 100%).</p>
<p><i>N</i>-Butil-2-nitroanilina (12)</p> 	<p>Espectro 22, IR (cm⁻¹): 3381.23, 1616.12, 1571.86 (-NH-); 3086.16 (aromático); 2958.17, 2930.66, 2863.08 (-CH₂-); 1508.81, 1351.93 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 23, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.91 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 3 H, -CH₃), 1.38 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 1.59 (dd, <i>J</i>=6.76, 0.09 Hz, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.33 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.67 (br. t, <i>J</i>=1.00, 1.00 Hz, 1 H, -NH-), 7.04 (d, <i>J</i>=8.79 Hz, 1 H, H-6), 7.53 (m, 1 H, H-4), 8.05 (m, 1 H, H-3), 8.12 (m, 1 H, H-5).</p> <p>Espectro 24, EM: IE/ID m/z: 194 (M+, 13%); 151 (M-43, 100%); 93 (M-101, 43%).</p>
<p>1-Butil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (14)</p> 	<p>Espectro 25, IR (cm⁻¹): 3319.38, 1633.74, 1537.79 (-NH-); 3165.95 (aromático); 2957.10, 2932.57, 2870.96 (-CH₂-).</p> <p>Espectro 26, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.88 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 3 H, -CH₃), 1.29 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 1.60 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.95 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.38 (s, 2 H, -NH₂), 6.90 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.11 (dd, <i>J</i>=7.31, 1.67 Hz, 2 H, H-4, H-7).</p> <p>Espectro 27, EM: IE/ID m/z: 189 (M+, 100%); 146 (M-43, 80%); 133 (M-56, 65%).</p>
<p>2-<i>{(E)-[(1-Butil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)imino]metil}</i>-4-metilfenol (15)</p>	<p>Espectro 28, IR (cm⁻¹): 1574.98 (-C=N-); 3060.97 (aromático); 2958.49, 2932.65, 2873.96 (-CH₂-); 1281.68 (Ar-N-R); 1045.43, (R-OH); 1232.34, 1211.98 (Ar-OH); 1445.17 (-CH₃)</p> <p>Espectro 29, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.88 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 3 H, -CH₃, 4'), 1.28 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 1.75 (m, 2 H, -CH₂-, 2'),</p>

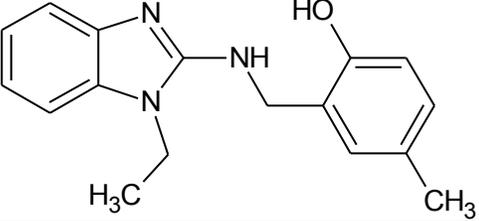
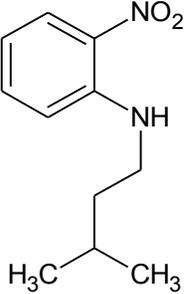
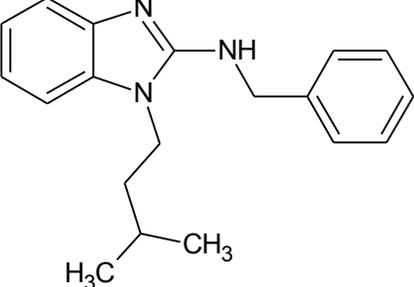
	<p>2.29 (s, 3 H, -CH₃), 4.35 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.94 (d, <i>J</i>=8.39 Hz, 1 H, H-3''), 7.23 (m, 2 H, H-4, H-7), 7.32 (ddt, <i>J</i>=8.41, 2.53, 0.55, 0.55 Hz, 1 H, H-4''), 7.60 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.75 (s, 1 H, H-6''), 9.66 (s, 1 H, -OH).</p> <p>Espectro 30, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 307 (M⁺, 28%); 290 (M-17, 100%); 234 (M-73, 26%).</p>
<p>2-[[1-(1-Butil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)amino]metil]-4-metilfenol (16)</p> 	<p>Espectro 31, IR (cm⁻¹): 3314.52, (Ar-OH), 1606.54, 1574.66, (Ar-NH-); 2958.32, 2929.38, 2870.59 (-CH₂-); 1239.49 (Ar-NH-R); 2520.27 (R-OH--HO-R), 1457.21 (-CH₃).</p> <p>Espectro 32, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.92 (s, 3 H, -CH₃, 4'), 1.34 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 1.63 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 2.21 (s, 3 H, -CH₃), 4.00 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-, 1'), 4.41 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -NH-CH₂-), 6.70 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, H-3''), 6.99 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6, H-7), 7.24 (m, 2 H, H-4'', H-6''), 7.60 (m, 1 H, -NH-), 11.65 (s, 1 H, -OH).</p> <p>Espectro 33, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 309 (M⁺, 25%); 189 (M-20, 100%); 146 (M-163, 76%); 133 (M-176, 80%).</p>
<p><i>N</i>-Etil-2-nitroanilina (17)</p> 	<p>Espectro 34, IR (cm⁻¹): 3381.82, 1667.26, 1565.96 (-NH-); 3055.41 (aromático); 2759.75 (-CH₂-); 1463.03 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 35, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.28 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 3 H, -CH₃), 3.38 (m, 2 H, -CH₂-), 4.20 (m, 1 H, -NH-), 6.71 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, H-6), 7.00 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, H-5), 7.55 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, H-3), 8.07 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, H-4).</p> <p>Espectro 36, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 166 (M⁺, 89%); 151 (M-15, 100%); 106 (M-60, 83%).</p>
<p>1-Etil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (19)</p> 	<p>Espectro 37, IR (cm⁻¹): 3388.97, 1647.11, 1539.58 (-NH-); 3151.35 (aromático); 2985.83, 2935.43 (-CH₂-); 1351.50 (-CH₃).</p> <p>Espectro 38, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.17 (t, <i>J</i>=7.14 Hz, 3 H, -CH₃), 3.97 (d, <i>J</i>=7.14 Hz, 2 H, -CH₂-), 6.33 (s, 2 H, -NH₂), 6.86 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.08 (m, 2 H, H-4, H-7).</p> <p>Espectro 39, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 161 (M⁺, 100%); 146 (M-15, 26%); 133 (M-28, 65%).</p>
<p>1-Etil-<i>N</i>-[(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxifenil)metildieno]-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (20)</p>	<p>Espectro 40, IR (cm⁻¹): 1575.70 (-C=N-); 3016.74 (aromático); 2937.46 (-CH₂-); 1228.52 (Ar-N-R); 1125.57 (Ar-O-R); 1327.21 (-CH₃).</p> <p>Espectro 41, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.36 (t, <i>J</i>=7.16 Hz, 3 H, -CH₃, alquilo), 3.78 (s, 3 H, -CH₃, metoxi), 3.89 (s, 6 H, -CH₃, 2 de metoxi), 4.46 (m, 2 H, -CH₂-), 7.22 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.49 (s, 2 H, H-2', H-6'), 7.59 (m, 2 H, H-4, H-7), 9.41 (s, 1 H, =CH-).</p>

	<p>Espectro 42, EM: IE/ID m/z: 339 (M+, 57%); 338 (M-1, 100%); 118 (M-21, 48%).</p>
<p>1-Etil-<i>N</i>-(3,4,5-trimetoxibencil)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (21)</p> 	<p>Espectro 43, IR (cm⁻¹): 3159.58, 1551.26 (-C-NH-); 3018.33 (aromático); 2936.44 (-CH₂-); 1238.60 (Ar-NH-R); 1129.94 (Ar-O-R); 1340.87 (-CH₃).</p> <p>Espectro 44, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.30 (t, $J=7.07$ Hz, 3 H, -CH₃), 3.69 (s, 3 H, -CH₃, metoxi), 3.82 (s, 6 H, -CH₃, 2 de metoxi), 4.15 (dd, $J=7.11, 0.11$ Hz, 2 H, -CH₂-), 4.60 (d, $J=1.00$ Hz, 2 H, -NH-CH₂-), 6.80 (s, 2 H, H-2', H-6'), 6.99 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.24 (m, 2 H, H-4, H-7), 7.28 (m, 1 H, -NH-).</p> <p>Espectro 45, EM: IE/ID m/z: 341 (M+, 24%); 326 (M-15, 19%); 181 (M-160, 100%).</p>
<p><i>N</i>-(2,5-Dimetilbencil)-2-nitroanilina (23)</p> 	<p>Espectro 46, IR (cm⁻¹): 3401.06, 1611.47, 1568.60 (-NH-); 3091.79 (aromático); 2921.35 (-CH₂-); 1502.20, (Ar-NO₂); 1346.65, 1329.51 (-CH₃).</p> <p>Espectro 47, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 2.23 (s, 3 H, -CH₃), 2.31 (s, 3 H, -CH₃), 4.55 (d, $J=5.86$ Hz, 2 H, -CH₂-), 6.72 (m, 1 H), 6.92 (dd, $J=8.76, 1.32$ Hz, 1 H, H-3), 7.06 (m, 3 H, H-3', H-4', H-6'), 7.51 (m, 1 H, H-4), 8.12 (dd, $J=8.61, 1.61$ Hz, 1 H, H-6), 8.44 (m, 1 H, H-5).</p> <p>Espectro 48, EM: IE/ID m/z: 256 (M+, 22%); 119 (M-137, 100%); 118 (M-138, 38%).</p>
<p>1-(2,5-dimetilbencil)-<i>N</i>-etil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (26)</p> 	<p>Espectro 49, IR (cm⁻¹): 3253.48, 1557.59 (R-NH-R); 3072.48 (aromático); 2967.91 (-CH₂-); 1323.68 (-CH₃).</p> <p>Espectro 50, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.17 (m, 3 H, -CH₃), 1.65 (m, 2 H, -NH-CH₂-), 2.06 (m, 3 H, -CH₃), 2.30 (s, 3 H, -CH₃), 5.14 (s, 2 H, -CH₂-), 5.57 (dd, $J=8.02, 0.49$ Hz, 1 H, H-6'), 6.19 (t, $J=1.22, 0.49$ Hz, 1 H, -NH-), 6.84 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6, H-7), 7.19 (m, 2 H, H-3', H-4').</p> <p>Espectro 51, EM: IE/ID m/z: 279 (M+, 52%); 160 (M-119, 32%); 119 (M-160, 100%).</p>
<p>2-Nitro-<i>N</i>-pentilaniлина (32)</p>	<p>Espectro 52, IR (cm⁻¹): 3381.34, 1616.75, 1572.03 (-NH-); 3086.28 (aromático); 2956.23, 2929.30, 2859.21 (-CH₂-); 1509.20, 1351.30 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 53, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.89 (t, $J=1.00$ Hz, 3 H, -CH₃), 1.34 (m, 4 H, -CH₂-, 2', 4'), 1.63 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 3.35 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.69 (m, 1 H, H-3), 7.05 (m, 1 H, H-4), 7.55 (m, 1 H, H-6), 8.08 (m, 1 H, H-</p>

	<p>5), 8.14 (m, 1 H, -NH-). Espectro 54, EM: IE/ID m/z: 208 (M+, 15%); 151 (M-57, 100%); 93 (M-115, 38%).</p>
<p>1-Pentil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (34)</p> 	<p>Espectro 55, IR (cm⁻¹): 3338.72, 1639.86, 1539.06 (-NH-); 3152.59 (aromático); 2954.79, 2929.39, 2860.07 (-CH₂-); 1383.99 (-CH₃). Espectro 56, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.86 (m, 3 H, -CH₃), 1.30 (m, 4 H, -CH₂-, 2', 4'), 1.65 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 3.98 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.39 (s, 2 H, -NH₂), 6.92 (ddd, $J=9.85, 7.32, 1.52$ Hz, 2 H, H-5, H-6), 7.13 (m, 2 H, H-4, H-7). Espectro 57, EM: IE/ID m/z: 203 (M+, 100%); 146 (M-57, 83%); 133 (M-70, 72%); 119 (M-84, 32%).</p>
<p>2-<i>{(E)-[(1-Pentil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)imino]metil}fenol</i> (35)</p> 	<p>Espectro 58, IR (cm⁻¹): 1573.49 (-C=N-); 3063.68 (aromático); 2953.23, 2926.81, 2862.02 (-CH₂-); 1280.80 (Ar-N-R); 1149.69, (R-OH); 1280.80, 1195.03 (Ar-OH); 1472.70 (-CH₃). Espectro 59, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.83 (t, $J=7.02$ Hz, 3 H, , -CH₃), 1.31 (m, 4 H, -CH₂-, 2', 4'), 1.82 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 4.39 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 7.06 (m, 2 H, H-3'', H-6''), 7.27 (m, 2 H, H-4'', H-5''), 7.54 (m, 1 H, H-4), 7.63 (m, 2 H, H-5, H-7), 8.00 (m, 1 H, H-6), 9.76 (s, 1 H, -OH). Espectro 60, EM: IE/ID m/z: 307 (M+, 44%); 290 (M-17, 100%); 220 (M-87, 57%); 132 (M-175, 60%); 118 (M-189, 62%).</p>
<p>2-<i>{[(1-Pentil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)amino]metil}fenol</i> (36)</p> 	<p>Espectro 61, IR (cm⁻¹): 3372.84, (Ar-OH), 3061.37 (aromático); 1606.66, 1585.70, (Ar-NH-); 2955.22, 2929.31, 2857.73 (-CH₂-); 1223.02 (Ar-NH-R); 2474.25 (R-OH---HO-R), 1462.31 (-CH₃). Espectro 62, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.86 (m, 3 H, -CH₃), 1.29 (m, 4 H, -CH₂-, 2', 4'), 1.65 (m, 2 H, -CH₂-, 3'), 2.33 (s, 1 H, -NH-), 4.00 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 4.47 (s, 2 H, -NH-CH₂-), 6.81 (m, 2 H, H-4'', H-5''), 7.00 (m, 2 H, H-3'', H-6''), 7.21 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6, H-7), 7.70 (s, 1 H, -OH). Espectro 63, EM: IE/ID m/z: 309 (M+, 7%); 203 (M-106, 68%); 146 (M-163, 75%); 133 (M-176, 100%).</p>

<p>2-Nitro-<i>N</i>-propilanilina (37)</p> 	<p>Espectro 64, IR (cm⁻¹): 3380.46, 1615.88, 1571.45 (-NH-); 3086.26 (aromático); 2962.85 (-CH₂-); 1408.12 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 65, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.98 (t, <i>J</i>=7.40 Hz, 3 H, -CH₃), 1.67 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.34 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.70 (m, 1 H, H-5), 7.08 (m, 1 H, H-3, H-3), 7.56 (d, <i>J</i>=0.81 Hz, 1 H, H-4), 8.09 (m, 1 H, H-6), 8.17 (m, 1 H, -NH-).</p> <p>Espectro 66, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 180 (M⁺, 33%); 151 (M-29, 100%); 119 (M-61, 38%).</p>
<p>1-Propil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (39)</p> 	<p>Espectro 67, IR (cm⁻¹): 3321.70, 1633.61, 1539.51 (-NH-); 3162.95 (aromático); 2960.45, 2936.38, 2873.32 (-CH₂-); 1458.10 (-CH₃).</p> <p>Espectro 68, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.90 (t, <i>J</i>=7.38 Hz, 3 H, -CH₃), 1.68 (dd, <i>J</i>=7.40, 0.40 Hz, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.95 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.42 (s, 2 H, -NH₂), 6.92 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.15 (m, 2 H, H-4, H-7).</p> <p>Espectro 69, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 175 (M⁺, 100%); 146 (M-29, 75%); 133 (M-42, 67%); 119 (M-61, 36%).</p>
<p>4-Cloro-2-<i>{(E)-[(1-propil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)imino]metil}fenol</i> (40)</p> 	<p>Espectro 70, IR (cm⁻¹): 1564.20 (-C=N-); 3039.04 (aromático); 2971.69, 2935.13, 2877.15 (-CH₂-); 1269.91 (Ar-N-R); 1165.15, (R-OH); 1269.91, 1190.79 (Ar-OH); 1473.54 (-CH₃); 743.15 (R-Cl)</p> <p>Espectro 71, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.87 (m, 3 H, -CH₃), 1.82 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.38 (s, 1 H, =CH-), 4.37 (t, <i>J</i>=1.00 Hz, 2 H, -CH₂-, 1'), 7.08 (d, <i>J</i>=8.87 Hz, 1 H, H-6''), 7.26 (m, 2 H, H-3'', H-4''), 7.53 (m, 1 H, H-4), 7.64 (m, 2 H, H-5, H-6), 8.05 (d, <i>J</i>=2.75 Hz, 1 H, H-7), 9.72 (s, 1 H, -OH).</p> <p>Espectro 72, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 313 (M⁺, 44%); 315 (M+2, 15%); 298 (M-15, 36%); 296 (M-17, 100%); 256 (M-57, 12%); 254 (M-34, 34%); 132 (M-181, 52%); 118 (M-195, 47%).</p>
<p>4-Cloro-2-<i>{[(1-propil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)amino]metil}fenol</i> (41)</p> 	<p>Espectro 73, IR (cm⁻¹): 3304.58, (Ar-OH), 3026.07 (aromático); 1605.49, 1579.62, (Ar-NH-); 2972.75, 2938.33, 2880.86 (-CH₂-); 1248.77 (Ar-NH-R); 2499.28 (R-OH---HO-R), 1455.62 (-CH₃); 743.42 (R-Cl).</p> <p>Espectro 74, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.92 (t, <i>J</i>=7.36 Hz, 3 H, -CH₃), 1.69 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 3.35 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, -NH-), 3.99 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 4.47 (d, <i>J</i>=0.07 Hz, 2 H, -NH-CH₂-), 6.84 (d, <i>J</i>=8.61 Hz, 1 H, H-6''), 7.01 (m, 2 H, H-7, H-3''), 7.16 (dd, <i>J</i>=8.57, 2.75 Hz, 1 H, H-4''), 7.25 (m, 3 H, H-4, H-5, H-6), 7.71 (s, 1 H, -OH).</p> <p>Espectro 75, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 315 (M⁺, 5%); 317 (M+2, 2%); 175 (M-140, 34%); 146 (M-169, 38%); 133 (M-182, 100%); 77 (M-238, 85%); 51 (M-264, 82%).</p>

<p>2-Nitro-<i>N</i>-(propan-2-il)anilina (42)</p> 	<p>Espectro 76, IR (cm⁻¹): 3368.38, 1614.13, 1570.54 (-NH-); 3087.82 (aromático); 2970.88, 2931.77 (-CH-); 1417.23 (Ar-NO₂); 1500.67 (-CH₃).</p> <p>Espectro 77, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.27 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 6 H, -CH₃), 3.94 (m, 1, -CH-), 6.69 (m, 1 H, H-4), 7.08 (m, 1 H, H-6), 7.55 (m, 1 H, H-5), 7.91 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 1 H, -NH-), 8.07 (m, 1 H, H-3).</p> <p>Espectro 78, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 180 (M⁺, 39%); 165 (M-15, 100%); 92 (M-88, 48%).</p>
<p>1-(Propan-2-il)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (44)</p> 	<p>Espectro 79, IR (cm⁻¹): 3307.69, 1678.11, 1535.03, 1456.21, 1287.66 (-NH₂); 3154.08 (aromático); 2988.77, 2930.75 (-CH-).</p> <p>Espectro 80, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.50 (d, <i>J</i>=1.00 Hz, 6 H, -CH₃), 4.62 (m, 1 H, -CH-), 6.33 (s, 2 H, -NH₂), 6.87 (m, 1 H, H-5), 6.95 (m, 1 H, H-6), 7.15 (m, 1 H, H-7), 7.34 (m, 1 H, H-4).</p> <p>Espectro 81, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 175 (M⁺, 62%); 133 (M-42, 100%).</p>
<p><i>N</i>-(2-Metoxibencil)-1-(propan-2-il)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (46)</p> 	<p>Espectro 82, IR (cm⁻¹): 3248.40, 1598.09, 1569.84 (-C-NH-); 3068.84 (aromático); 2975.57 (-CH-); 1244.65 (Ar-NH-R); 1118.08, 1281.16 (Ar-O-CH₃); 1334.05 (-CH₃).</p> <p>Espectro 83, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.56 (d, <i>J</i>=6.81 Hz, 6 H, -CH₃), 3.87 (s, 3 H, -OCH₃), 4.58 (d, <i>J</i>=5.72 Hz, 2 H, -NH-CH₂-), 4.76 (m, 1 H, -CH-), 6.93 (m, 4 H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.02 (d, <i>J</i>=8.39 Hz, 1 H, -NH-), 7.16 (m, 1 H, H-5), 7.24 (d, <i>J</i>=7.33 Hz, 2 H, H-4, H-7), 7.37 (m, 1 H, H-6).</p> <p>Espectro 84, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 295 (M⁺, 12%); 264 (M-31, 35%); 121 (M-174, 44%); 91 (M-204, 100%).</p>
<p>2-{{(<i>E</i>)-[(1-Etil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)imino]metil}-4-metilfenol (47)</p> 	<p>Espectro 85, IR (cm⁻¹): 1573.76 (-C=N-); 3052.62 (aromático); 2979.86, 2960.08 (-CH₂-); 1278.10 (Ar-N-R); 1156.88, (R-OH); 1242.09, (Ar-OH); 1480.71, 740.93 (-CH₃).</p> <p>Espectro 86, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.39 (t, <i>J</i>=7.20 Hz, 3 H, -CH₃), 2.32 (s, 3 H, Ar-CH₃), 4.41 (m, 2 H, -CH₂-), 6.96 (d, <i>J</i>=8.39 Hz, 1 H, H-6'), 7.26 (m, 2 H, H-3', H-4'), 7.34 (m, 1 H, H-4), 7.63 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.79 (dd, <i>J</i>=2.88, 0.09 Hz, 1 H, H-7), 9.70 (s, 1 H, -OH), 11.48 (s, 1 H, =CH-).</p> <p>Espectro 87, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 279 (M⁺, 22%); 262 (M-17, 81%); 118 (M-161, 100%).</p>
<p>2-[[1-(1-Etil-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il)amino]metil]-4-metilfenol (48)</p>	<p>Espectro 88, IR (cm⁻¹): 3292.73, (Ar-OH), 3027.64 (aromático); 1606.78, 1578.64, (Ar-NH-); 2978.88, 2918.88 (-CH₂-); 1251.85 (Ar-NH-R); 2542.81 (R-OH---HO-R), 1462.10, 743.95 (-CH₃).</p> <p>Espectro 89, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 1.23 (t, <i>J</i>=7.11 Hz, 3 H, -CH₃), 2.21 (s, 3</p>

	<p>H, Ar-CH₃), 3.40 (s, 1 H, -NH-), 4.05 (m, 2 H, -CH₂-), 4.41 (s, 2 H, -NH-CH₂-), 6.71 (d, <i>J</i>=8.10 Hz, 1 H, H-6), 6.99 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6, H-7), 7.24 (m, 2 H, H-3', H-4'), 7.64 (s, 1 H, -OH).</p> <p>Espectro 90, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 281 (M⁺, 30%); 161 (M-120, 100%); 133 (M-148, 96%).</p>
<p><i>N</i>-(3-Metilbutil)-2-nitroanilina (49)</p> 	<p>Espectro 91, IR (cm⁻¹): 3381.44, 1616.75, 1572.03 (-NH-); 3086.28 (aromático); 2956.23, 2926.78, 2869.79 (-CH₂-); 1509.37, 1352.75 (Ar-NO₂).</p> <p>Espectro 92, RMN ¹H (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.95 (m, 6 H, -CH₃), 1.54 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 1.69 (m, 1 H, -CH-), 3.37 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 6.69 (m, 1 H, H-4), 7.05 (dd, <i>J</i>=8.77, 1.37 Hz, 1 H, H-3), 7.56 (m, 1 H, H-5), 8.08 (m, 1 H, H-6), 8.12 (m, 1 H, -NH-).</p> <p>Espectro 93, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 208 (M⁺, 17%); 151 (M-57, 100%).</p>
<p><i>N</i>-bencil-1-(3-metilbutil)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-amina (53)</p> 	<p>Espectro 94, IR (cm⁻¹): 3292.73, (Ar-OH), 3027.64 (aromático); 1606.78, 1578.64, (Ar-NH-); 2978.88, 2918.88 (-CH₂-); 1251.85 (Ar-NH-R); 2542.81 (R-OH---HO-R), 1462.10, 743.95 (-CH₃).</p> <p>Espectro 95, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ ppm: 0.92 (d, <i>J</i>=6.46 Hz, 6 H, -CH₃), 1.50 (m, 2 H, -CH₂-, 2'), 1.59 (m, 1 H, -CH-), 4.00 (m, 2 H, -CH₂-, 1'), 4.59 (d, <i>J</i>=5.97 Hz, 2 H, -NH-CH₂-), 6.89 (m, 2 H, H-3'', H-5''), 7.12 (m, 2 H, H-2'', H-6''), 7.19 (m, 1 H, H-4''), 7.22 (s, 1 H, -NH-), 7.30 (m, 2 H, H-5, H-6), 7.36 (m, 2 H, H-4, H-7).</p> <p>Espectro 96, EM: IE/CG <i>m/z</i>: 293 (M⁺, 58%); 290 (M-3, 54%); 250 (M-43, 100%).</p>

La mayoría de los derivados del 2-aminobenzimidazol se obtuvieron con buenos rendimientos, sobre todo los compuestos **6**, **11**, **21**, **36** y **48** que se obtuvieron con rendimientos mayores al 60%, el resto de los productos finales se obtuvo con rendimientos menores al 50%. Para la obtención de los compuestos **6**, **11**, **16**, **21**, **36**, **41**, **46** y **48** se utilizó la ruta sintética 1 de la sección de metodología experimental, página 35. Partiendo del 2-cloronitrobenzoceno comercial (**1**), el cual se sometió a una reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática a presión con la amina sustituida correspondiente, colocando este último en exceso (3-7 equivalentes) para que actúe como nucleófilo, como base y como disolvente, ya que las aminas en su mayoría eran líquidas.¹⁰⁶ Esta reacción tardó aproximadamente 6-7 h dando altos rendimientos. Para el caso del compuesto **2**, dado que la materia prima 2-(piperidin-1-il)etanamina es muy cara y escasa, se realizó la SNA en un sistema abierto con 1 eq de la amina y 1 eq de trietilamina como base, calentando a reflujo y tardando 72 h para obtener el compuesto final con un bajo rendimiento (34%). La mayoría de los productos de sustitución fueron líquidos, por lo que se les determinó su punto de ebullición y su

purificación se realizó a través de la destilación bulbo a bulbo. Para el caso del compuesto **7** también se realizó en un sistema abierto con 7 eq de la bencilamina y un tiempo de 5 días, obteniéndose el compuesto con un rendimiento aceptable (65%). El cambio estructural se determinó fácilmente a través del IR, donde se observó la presencia del grupo amina entre las regiones 1640 – 1560. La RMN ^1H mostró la presencia del alquilamino por un triplete a 4.2 ppm, el cual variaba dependiendo del tipo de amina utilizada. La espectrometría de masas confirmó el peso molecular del producto de sustitución por la pérdida de la señal M+2 característica del cloro.

La hidrogenación catalítica del grupo nitro empleando Pd/C como catalizador a temperatura ambiente, dio origen a la diamina correspondiente; ésta se procesó rápidamente para evitar su oxidación, por lo que rápidamente se sometió a la siguiente reacción. El 1-sustituido 2-aminobencimidazol se obtuvo a través de la ciclocondensación de Leonard⁶⁵ entre la *o*-fenilendiamina y el bromuro de cianógeno en medio acuoso, cuidando que durante la adición del cianógeno la temperatura no excediera los 70 °C. Una vez terminada la reacción, se realizó una purificación con C activado en este medio de reacción para obtener un producto más puro y blanco. Neutralizando posteriormente con 1 eq NaOH o con hidróxido de amonio para mantener un medio neutro o básico y permitir la precipitación del producto. Se obtuvo el producto con bajos rendimientos (del 10 al 60%), posiblemente a la alta solubilidad del 2-aminobencimidazol en agua que no permitió recuperar todo el producto, así como al proceso de purificación que quitaba una gran cantidad de producto sucio. El espectro de IR mostró una banda entre 3400 y 3500 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento simétrico del grupo Ar-NH₂; así como en las regiones 1650, 1540 y 1460 cm^{-1} , correspondientes a la torsión en el plano y al estiramiento del grupo NH₂. En el espectro de RMN ^1H un singulete a 6.33 ppm que integró para 2 hidrógenos corresponde con el grupo NH₂, que desaparece con el intercambio con D₂O. La espectrometría de masas también confirmó el peso molecular de cada uno de los compuestos.

Para la formación de la imina a partir de la condensación entre el 2-aminobencimidazol y el aldehído correspondiente se siguió la metodología descrita por Da Settimo.⁷⁰ Se colocó el 2-aminobencimidazol con el aldehído en tolueno a una temperatura de 110 °C entre 24 y 72 h, dependiendo del tipo de sustratos. Para todos los casos se destiló constantemente tolueno, aproximadamente a la mitad y colocando tolueno fresco anhidro. Esto se realizó con la finalidad de eliminar el agua formada como producto de la reacción, tanto para favorecer la formación de la imina como evitar la hidrólisis de la misma. Todas las iminas se pudieron aislar, a excepción de los intermediarios **5** y **45** que se obtuvieron en forma líquida y se sometieron inmediatamente a la siguiente reacción. El espectro de IR presentó bandas en la región de 1120 y 1570 cm^{-1} , que corresponde con la presencia de iminas, así como la ausencia de bandas en 1650 y 1545 cm^{-1} , correspondientes al grupo NH₂. La RMN ^1H indicó la ausencia de un grupo NH en la región de los 6.5 ppm, correspondiente al grupo NH₂ del 2-aminobencimidazol; además de no haber ningún

cambio en el intercambio con D₂O. La espectrometría de masas comprobó la masa molecular de cada uno de los compuestos.

Continuando con la técnica de Da Settimo⁷⁰ la reducción de la imina se llevó a cabo utilizando NaBH₄ como agente reductor en metanol a 0 °C durante 1 h, posteriormente se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y reaccionara por lo menos otras 3 h. De esta manera se logró obtener el producto final de cada derivado con buenos rendimientos (entre el 60 y el 90%); a excepción de los compuestos **16** y **41** que se obtuvieron con rendimientos bajos (menor al 25%) y el compuesto **46** con un rendimiento menor al 50%. La formación del producto se pudo observar en el espectro de IR por la presencia de bandas entre 1660 y 1650 cm⁻¹, así como en 1560 cm⁻¹, correspondientes a la torsión del grupo NH. En el espectro de RMN ¹H una triplete puede observarse a 7.27 ppm que integra para 1 H, correspondiente al grupo NH que desaparece en el intercambio con D₂O; así como la presencia de un doblete a 4.62 ppm que corresponde al grupo CH₂ del bencilo. En los espectros de masas de cada compuesto se observó el ion molecular correspondiente al peso molecular esperado para cada compuesto final.

Para el caso del compuesto **53** se sintetizó utilizando la ruta sintética 2 del procedimiento experimental, ya que la formación de la imina era muy tardada (mayor a 5 días), además de que la materia prima, el 2-aminobencimidazol, no reaccionaba en su totalidad. La obtención de la *o*-fenilediamina sustituida se obtuvo igual que en la ruta sintética 1. La formación del 2-aminobencimidazol se obtuvo utilizando la técnica de Wu,^{69,107} ciclocondensando la *o*-fenilediamina con el isotiocianato de bencilo en THF en presencia de DCC, calentando a 70 °C por 24 h. Se logró obtener el producto impuro, el cual se recristalizó de tolueno y después de hizo pasar a través de una columna de gel de sílice. Los espectro de IR, RMN ¹H y EM demostraron la presencia del producto dadas las señales descritas anteriormente.

El compuesto **26** se obtuvo mediante la ruta sintética 3, debido a que no se contaba con la amina sustituida correspondiente para realizar la SNA. Se hizo reaccionar la 2-nitroanilina y el 2-(clorometil)-1,4-dimetilbenzeno en DMF y bicarbonato de sodio como base a 110 °C; dando el producto **23** con buen rendimiento. Las bandas presentes en IR a 3350 y 1580 cm⁻¹ mostraban la presencia del grupo NH. Así como el espectro de RMN ¹H mostraba un triplete a 4.5 ppm que integraba para un H que desaparece con el intercambio con D₂O. Mientras que el EM mostró el ion con una relación m/z de 279 y una abundancia relativa del 23% que correspondió al peso molecular esperado.

Para establecer la metodología empleada para la obtención de todos los compuestos se realizaron varios estudios hasta que se obtuvo la mejor ruta sintética. Primeramente lo que se requería era obtener las nitroanilinas sustituidas, un procedimiento largo y complicado de establecer. Se

realizaron varios ensayos para optimizar esta técnica, los más importantes se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Ensayos de síntesis de la Sustitución Nucleofílica Aromática para la obtención del compuesto **7**.

Reactivo(s)	Condiciones	Tiempo	Producto	Rendimiento (%)
3 equivalentes de bencilamina, K_2CO_3 , dimetiléter de etilenglicol (glima).	85 °C	3 h	Resina	n.d.
1 equivalente de bencilamina, DBU.	70 °C	1 h	Resina	n.d.
2 equivalentes de bencilamina.	Temperatura ambiente	62 h	Sólido sucio	n.d.
5 equivalentes de bencilamina, trietilamina.	90 °C	5 días	Puro	18.22
7 equivalentes de bencilamina. Adición espaciada.	90 °C	6 días	Puro	22.37
7 equivalentes de bencilamina.	90 °C	3 días	Puro	64.84

Para realizar la sustitución nucleofílica aromática se siguieron varias metodologías.¹⁰⁸⁻¹¹¹ El estudio se realizó sobre la obtención del compuesto **7**. En el primer ensayo se utilizaron 3 equivalentes de bencilamina disueltos en glima, utilizando como base carbonato de potasio a 85 °C. Después de 3 h se realizó una cromatografía en capa fina (ccf) donde se observó que no había presencia de materia prima, solo impurezas. La mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el carbonato, el filtrado se concentró a sequedad, lo cual dio origen a una resina café. Esta resina se intentó purificar a través de lavados con agua ácida (HCl al 1%) y una extracción con diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. Nuevamente se obtuvo una resina naranja, la cual mostraba impurezas, por lo que se dejó enfriar para favorecer la cristalización y purificar el producto, pero no ocurrió nada de esto. Otra técnica empleada fue hacer reaccionar el 2-cloronitrobenceno con la bencilamina en presencia de DBU como base,¹¹² la cual se fue adicionando un exceso durante el transcurso de la reacción para que esta avanzara. Una vez que se consumió toda la materia prima la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad dando una resina café con varios productos, la cual se intentó recrystalizar con hexano y éter de petróleo, pero en ningún caso se formaron cristales ni se purificó el producto.

Otra metodología consistió en hacer reaccionar el 2-cloronitrobenceno con solo 2 equivalentes de bencilamina, la cual se destiló para tenerla pura y esto no afectara la reacción. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48 h y después se calentó a 40 °C por 12 h. Una ccf reveló que aún había materia prima, por lo que la mezcla de reacción se trató para eliminarla. Se concentró a sequedad dando una resina café, la cual se redisolvió en acetato de etilo y se realizaron extracciones con HCl al 1%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se

concentró a sequedad, dando un líquido anaranjado oscuro, el cual se intentó purificar con una destilación de bulbo a bulbo, pero no fue suficiente para eliminar las impurezas.

Un ensayo más se realizó al colocar el 2-cloronitrobenzono con 1 equivalente de bencilamina y 1.05 eq de trietilamina. Después de 2 días de reacción a 40 °C, aún tenía mucha materia prima, por lo que se adicionaron 3 eq más de bencilamina y se calentó a 90 °C por 2 días más. Posteriormente para que toda la materia prima se consumiera, se adicionó 1 eq más de bencilamina y continuando el calentamiento a 90 °C. La reacción consumió la materia prima en su totalidad. Por lo que la mezcla de reacción se resuspendió en hexano y se dejó enfriar, formándose cristales anaranjados. Estos se filtraron al vacío y se le hicieron lavados con HCl al 1% y recristalizando de hexano. Finalmente se obtuvieron cristales anaranjados puros con un bajo rendimiento (18.22%). Una variante de este proceso fue colocar un exceso de bencilamina (7 eq) sin disolvente y ninguna otra base a 90 °C. El exceso de esta amina actuaría como disolvente por ser líquida y actuar también como base. El exceso se adicionó lentamente conforme pasaba el tiempo de reacción, completándose en 6 días. Se utilizó el procedimiento anterior para purificar el compuesto, lográndose obtener la anilina sustituida en un rendimiento mayor que el obtenido en el proceso anterior (22.37%).

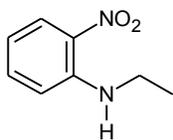
Finalmente se optimizó el proceso colocando los 7 eq bencilamina desde el principio y calentando a 90 °C. El proceso tardó 3 días en completarse. Después de la purificación, el rendimiento aumentó hasta un 64.84%, lo que dejó las bases para definir este método como el mejor para obtener el resto de las anilinas sustituidas intermediarios.

Conforme el estudio anterior se realizaba, al mismo tiempo se estudió otra forma de obtener el compuesto **19**, los ensayos se resumen en la **Tabla 13**.

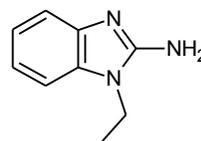
Tabla 13. Ensayos de síntesis del compuesto **19**

Reacción	Reactivos	Condiciones	Tiempo	Producto
SNAr	(a) 2.4 equivalentes de etilamina, metanol.	70 °C	3 días	Reacción incompleta
SNAr	(a) 3 equivalente de etilamina, metanol.	130 °C, en un reactor a presión	2 días	Sólido con impurezas
Reducción	(b) Ni-Raney, H ₂ , metanol	Hidrogenador	3 hr	Resina
Ciclocondensación	(c) BrCN, H ₂ O	80 °C	2 hr	Sólido con bajo rendimiento

Para la obtención del intermediario **19** se realizaron varios estudios para lograr la mejor ruta sintética. Primeramente se estudió la síntesis del compuesto **17** por SNAr entre el 2-cloronitrobenzoceno y la etilamina en exceso, a presión normal y en un reactor Parr.



17

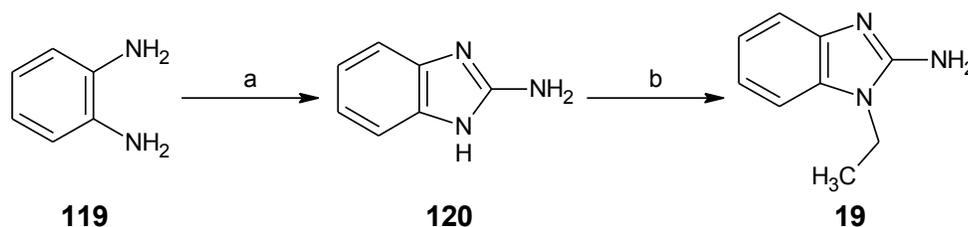


19

El 2-cloronitrobenzoceno se trató con etilamina (2.4 eq) en metanol y posteriormente se calentó a 70 °C durante 3 días. La mezcla todavía tenía materia prima y aunque se trató de purificar, no se logró del todo. Una variación que se le hizo a esta reacción fue tratar el 2-cloronitrobenzoceno con 3 eq de etilamina en metanol y someterlo a presión en un reactor Parr a 130 °C por 2 días. Si bien se logró obtener el producto, éste también presentaba impurezas que fueron difíciles de eliminar. Razón por la cual se sometió inmediatamente a la siguiente reacción, la cual consistió en la reducción con H₂ utilizando Ni-Raney como catalizador, lo cual dio como producto una resina oscura, la supuesta *o*-fenilendiamina. Este producto se ciclocondensó con el bromuro de cianógeno en agua a una temperatura máxima de 80 °C. Después del proceso de purificación se logró obtener un producto color crema que en la ccf reveló que estaba puro, pero su rendimiento fue menor al 10%.

Dado lo ineficaz que resultó la técnica anterior, se realizó otro ensayo, donde se partió de la *o*-fenilendiamina y se ciclocondensó en presencia de bromuro de cianógeno en agua a temperatura ambiente para obtener el producto **120** 1*H*-benzimidazol-2-amino, el cual se trató con yoduro de etilo (Tabla 14).

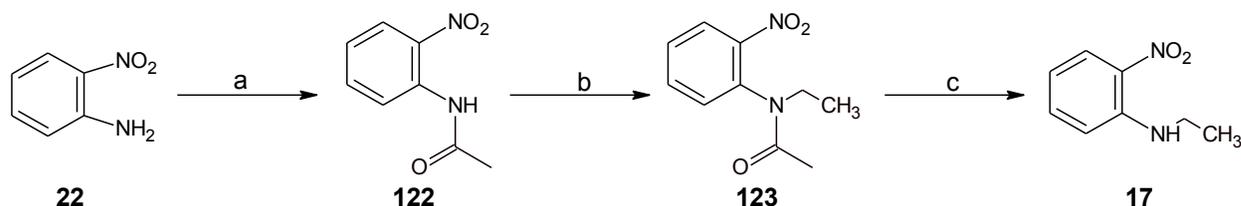
Tabla 14. Ensayo de síntesis para obtener el compuesto **19**



Compuesto	Condiciones	Purificación	Producto	Rendimiento
120	(a) BrCN, H ₂ O, t amb.	Recristalización en metanol.	Puro	30.55%
120	(a) BrCN, H ₂ O, t amb.	Recristalización en agua.	Puro	20.56%
19	(b) Acetona, KOH, CH ₃ CH ₂ I, t amb.	Recristalización en agua.	Puro	16.62%
19	(b) Etanol, Na ₂ CO ₃ , CH ₃ CH ₂ I, 70 °C.	Columna empacada con gel de sílice.	Impuro	12.34%

El compuesto **120** se logró obtener en su totalidad, pero durante su proceso de recristalización, si bien se lograba obtener el producto puro ya sea en metanol o en agua, los rendimientos fueron por debajo de 35%. Dicho producto **120** tenía que ser protegido de la luz, puesto que se oxidaba en presencia de ésta, lo cual afectaba su calidad en la siguiente reacción. El compuesto **120** se hizo reaccionar con yoduro de etilo en acetona en presencia de potasa a temperatura ambiente.¹¹³ La reacción procedió lentamente, adicionando un exceso del yoduro de etilo hasta los 7 eq después de 3 días, logrando que la materia prima se consumiera en su totalidad. El producto se recristalizó de agua obteniéndose puro pero con un rendimiento muy bajo, del 16.62%. Una variante a esta técnica, se realizó utilizando metanol como disolvente y carbonato de sodio como base, para evitar la reacción entre la potasa con el yoduro. La reacción procedió lentamente y se tuvo que adicionar un exceso del yoduro hasta en 6 eq, además de calentar a 70 °C para que la reacción terminara después de 3 días. Como el producto presentaba muchas más impurezas que el procedimiento anterior, se intentó purificar haciéndola pasar a través de una columna empacada con gel de sílice utilizando cloroformo como fase móvil. Finalmente se logró obtener el producto pero aún tenía varias impurezas y con un rendimiento muy bajo, del 12.34%.

Tabla 15. Ensayo de síntesis para obtener el producto **17**



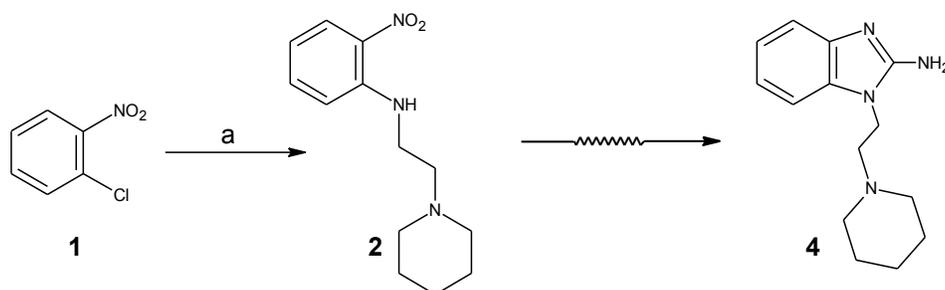
Compuesto	Condiciones	Recristalización	Producto	Rendimiento
122	(a) Anhídrido acético, H ₂ SO ₄ , calor.	Etanol	Puro	62%
123	(b) Acetona, CH ₃ CH ₂ I, NaOH.	Acetato de etilo	Sucio con producto de hidrólisis de	74.51%
17	(c) Metanol, NaOH, H ₂ O, calor.	Etanol	Reacción incompleta	66.78%

Un último ensayo que se realizó fue el hacer reaccionar la 2-nitroanilina con anhídrido acético con 0.1 mL de ácido sulfúrico y calentamiento de 40 °C, obteniéndose el producto de acetilación **122** con buena pureza y rendimiento (**Tabla 15**). El compuesto **122** se sometió a una sustitución nucleofílica en presencia de yoduro de etilo y sosa como base. A pesar de que la reacción procedió rápidamente, se formaba el producto de hidrólisis del compuesto **122**, por lo que se adicionaba lentamente la base. Sin embargo, aún se formaba el producto de hidrólisis y de sustitución. El producto crudo de reacción se trató de purificar por cristalización de acetato de etilo sin conseguirlo

del todo. El producto **122** con alto grado de pureza se sometió así a la siguiente reacción. La mezcla anterior se sometió a hidrólisis básica con sosa calentando la reacción a reflujo. Se dejó reaccionar por 3 h y la reacción no terminaba, por lo que se decidió detenerla y tratar de purificar el producto por recristalización en etanol. No se logró obtener el producto puro, razón por la cual se dejó esta reacción. Al mismo tiempo se trabajó sobre la S_NAr entre el 2-cloronitrobenzono y la etanamina en exceso a presión, la cual dio buenos rendimientos, pureza y en un tiempo menor, por lo que se decidió trabajar sobre esta ruta sintética.

Para el caso del compuesto **6**, dado que la 2-(piperidin-1-il)etanamina tenía un alto costo (5 mL = \$ 1100), era importante conocer la mejor ruta para sintetizar este compuesto con el mínimo de pérdidas, razón por la cual no se podía colocar en exceso. Para eso se partió del esquema de síntesis en resumida en la **Tabla 16**. Se colocó el 2-cloronitrobenzono junto con 1 eq de amina y la trietilamina, dado que estos dos últimos eran líquidos, todo se disolvió y se calentó a 140 °C por 3 días. Esto dio como resultado un producto anaranjado oscuro, que después del proceso de purificación con hexano se obtuvo el producto puro pero con un rendimiento bajo del 29.02%. Una variante en esta reacción fue colocando el cloronitrobenzono y 1 eq de amina disuelta en metanol, utilizando como base el carbonato de potasio, sometiendo todo a presión en un reactor Parr a 120 °C por 16 h. La materia prima se consumió en su totalidad. Para el proceso de purificación se eliminó el carbonato por filtración y el metanol por destilación a presión reducida. El producto, un líquido oscuro viscoso, se intentó recristalizar de hexano sin éxito. También se intentó purificar por extracción sin tampoco lograrlo. Una alternativa más fue hacer pasar el producto a través de una columna empacada con gel sílice utilizando como fase móvil Hexano:AcOEt (95:5) para que eluyera primero el producto menos polar. Después se cambió el sistema por Hexano solo, favoreciendo que saliera el producto menos polar. De esta forma se logró obtener en la fase hexánica el producto de la S_NAr con un rendimiento del 39.04%. Dado que este procedimiento fue más extenso que la reacción anterior y viendo que el rendimiento fue similar, se utilizó la primera técnica para obtener el producto.

Tabla 16. Ensayo de síntesis para obtener el producto **4**



Compuesto	Condiciones	Purificación	Producto	Rendimiento
2	(a) 2-(Piperidinil-1-il)etanamina, trietilamina, 140 °C	Recristalización en hexano	Puro	29.02%
2	(a) 2-(Piperidinil-1-il)etanamina, metanol, K ₂ CO ₃ , 120 °C a presión.	Columna empacada con gel de sílice	Puro	39.04%

Para obtener los intermediarios iminas también se exploraron diversas rutas sintéticas, las cuáles se resumen en la **Tabla 17**. Los ensayos se realizaron para obtener el compuesto **10**. En la primera reacción se disolvió la materia prima, en este caso el 1-bencil-1*H*-bencimidazol-2-amina, junto con el 3,4-dimetoxibenzaldehído. Se adicionó ácido acético hasta que el pH se ajustara a un valor entre 4 y 5, ya que es el pH óptimo para la formación de una imina; además de adicionar mallas moleculares secas para eliminar el agua que se formara durante la reacción y esta no fuera reversible. En un principio la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, pero después de observar que la reacción no avanzaba se decidió calentar hasta los 70 °C con la subsecuente adición de benzaldehído (0.5 eq más). Después de 2 días de reacción aún había presencia de materia prima (aproximadamente 10%), por lo que se terminó la reacción, eliminó todo el disolvente y se intentó someter a la siguiente reacción de reducción, pero el producto aún seguía contaminado con la materia prima.

En otro ensayo, se utilizaron los mismos reactivos que la reacción anterior, pero esta vez se fijó el pH a 4.5 desde el principio y posteriormente se adicionaron las materias primas. Solo se adicionó 1 eq del benzaldehído y se calentó gradualmente, de la temperatura ambiente hasta los 70 °C, monitoreando la reacción durante el transcurso del tiempo. Sin embargo, también se observó que la reacción fue incompleta y no se pudo purificar a través de la recristalización en metanol.

Un último intento se realizó utilizando acetonitrilo anhidro con el pH ajustado a 4.5 con ácido acético, colocando la materia prima con 1 eq del benzaldehído y calentando desde el inicio a 80 °C. Después de 3 días aún se tenía 1-bencil-1*H*-bencimidazol-2-amina en el medio de reacción, por lo que esta metodología también fue rechazada.

La metodología final empleada fue utilizando la técnica de Da Settimo,⁷⁰ en la que se disuelve el 2-aminobencimidazol y el benzaldehído correspondiente en tolueno y se calienta a reflujo durante 24 h. Al final de este tiempo se observó la ausencia de materia prima, pudiendo obtenerse el producto final después de recristalizar de etanol en forma de cristales amarillos claros con un rendimiento regular del 49%.

Esta última ruta sintética fue muy útil para tener el resto de los compuestos de la serie, sin embargo, para obtener el compuesto **53** no fue del todo útil. Los ensayos se resumen en la **Tabla**

18. Los primeros ensayos se realizaron siguiendo la metodología anterior, sólo disolviendo la materia prima, compuesto **51** con el benzaldehído en tolueno y calentando a reflujo. Después de 2 días de reacción aún había presencia de materia prima, por lo que la mezcla de reacción se intentó recuperar el producto a través de una recristalización con éter de petróleo pero no se logró obtener ningún sólido. En otro ensayo se realizó el mismo procedimiento, solo que esta vez se destilaba tolueno, aproximadamente a la mitad del disolvente, esto con la finalidad de eliminar el agua formada y evitar que la reacción fuera reversible, adicionando posteriormente tolueno fresco. Sin embargo, después de 3 días de reacción aún se tenía presencia de materia prima, por lo que se trató de purificar el producto a través de eliminar el tolueno, redissolver en acetato de etilo y extraer el 2-amino con lavados de HCl al 10%. A pesar de esto tampoco pudo ser purificado el producto esperado. Una variante más a esta técnica fue adicionar una pequeña cantidad de ácido *p*-toluensulfónico a la mezcla de reacción, como catalizador. Al igual que se destilaba constantemente el tolueno y adicionaba más disolvente al igual que más ácido. La reacción después de 5 días de reacción seguía presentando 2-amino sin reaccionar, por lo que la mezcla de reacción se concentró a sequedad y se trató de purificar por recristalización en éter de petróleo sin conseguirlo. Después se trató de purificar haciendo pasar la mezcla en una columna empacada con gel de sílice usando como fase móvil cloroformo, lo cual tampoco resultó en la purificación del producto esperado.

Tabla 17. Ensayo de síntesis para obtener el producto **10**

Reactivos	Condiciones	Tiempo	Producto	Rendimiento
Etolanol, ácido acético, 3,4-dimetoxibenzaldehído, (1.5 eq), mallas moleculares	70 °C	2 días	Reacción incompleta	n.d.
Etolanol, ácido acético, 3,4-dimetoxibenzaldehído, (1 eq), mallas moleculares	25 a 70 °C	4 días	Reacción incompleta	n.d.
Acetonitrilo, ácido acético, 3,4-dimetoxibenzaldehído, (1 eq), mallas moleculares	80 °C	3 días	Reacción incompleta y con impurezas	n.d.
Tolueno, 3,4-dimetoxibenzaldehído, (1 eq)	110 °C	24 h	Puro	48.78%

En otro estudio, a la mezcla de reacción se le adicionó ácido sulfúrico como catalizador en vez de del ácido *p*-toluensulfónico. Al igual que el último método se destilaba constantemente tolueno para eliminar el agua formada, adicionaba tolueno nuevo y más ácido sulfúrico. Sin embargo, después de 5 días a este ritmo, no se tenía el consumo total de la materia prima, por lo que esta ruta sintética también fue abandonada. Posiblemente esta reacción no se completa debido a que el benzaldehído está impuro con el ácido correspondiente. A pesar de que viene de la marca comercial Aldrich, una CCF reveló que tenía un 30% de impureza del ácido. Por esta razón se purificó el benzaldehído por medio de destilación a presión reducida y de bulbo a bulbo. Aunque no

se pudo purificar del todo, solo se mantuvo un 10% del ácido, por lo que se volvió a intentar la reacción con este benzaldehído. Se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, tiempo y cantidades. Aunque se tenía una mejor calidad del benzaldehído la reacción siguió sin terminar.

Una alternativa que se estudió fue la propuesta por Abdel-Magid,¹¹⁴ donde se estudia la reacción de formación de imina y su posterior reducción en un solo paso (one-pot reaction). Aquí se estudió esta reacción entre el 2-aminobencimidazol y el benzaldehído disueltos en THF anhidro en presencia del triacetoxiborhidruro de sodio. El $(\text{AcO})_3\text{BHNa}$ se preparó a partir de mezclar NaBH_4 y ácido acético en THF en frío. Una vez formado el triacetoxi se adicionó a la mezcla las materias primas. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 5 días. Al final de este tiempo seguía sin reaccionar toda la materia prima, por lo que esta reacción fue abandonada. Posiblemente la obtención del triacetoxiborhidruro no estuvo muy bien realizado, razón por la cual una alternativa a esta técnica fue utilizar un $(\text{AcO})_3\text{BHNa}$ comercial de la casa Aldrich. Se disolvieron el 2-amino y el benzaldehído, se adicionó 1.5 eq de $(\text{AcO})_3\text{BHNa}$ y se mantuvo a temperatura ambiente por 48 h. Al no haber un avance significativo en la reacción, se decidió calentarla a 45°C. Después de 24 h había muy avance, por lo que se decidió adicionar 0.5 eq de ácido acético para favorecer la reacción y se mantuvo a 48 h a 45 °C. Después de este tiempo no se había consumido más del 50% por lo que esta reacción se desechó.

Se reintentó la reacción entre el benzaldehído y el bencimidazol, pero esta vez se utilizó un disolvente polar no prótico, como el acetonitrilo anhidro; empleando el benzaldehído purificado a razón de 2 eq. Se mantuvo en agitación y calentamiento de 80 °C durante 24 h, pero la reacción aún no terminaba. También se intentó con otro disolvente polar como etanol, pero la reacción aún se completaba del todo.

Un último ensayo de este tipo se realizó nuevamente con tolueno pero esta vez se adicionó ortoformiato de trimetilo anhidro como agente desecante. Además se acondicionó una trampa de Dean-Stark para destilar el tolueno y eliminar el agua que se forma como consecuencia de la reacción. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C y solo se aumentaba la temperatura a 110 °C para destilar el tolueno. Después del tiempo de reacción solo se apreciaba un avance del 80%, lo que indicaba que aún la materia prima no se consumía del todo.

Si bien en la mayoría de los diversos ensayos se consumía una gran cantidad de la materia prima, el producto se intentó purificar haciéndolo pasar por una columna empacada con alúmina ácida para que el 1-(3-metilbutil)-1*H*-bencimidazol-2-amino se retuviera en la columna y solo eluyera el producto imina correspondiente. Esta técnica falló ya que no se lograba separar la materia prima del producto final, siempre salía en todas las fracciones.

Tabla 18. Ensayo de síntesis para obtener el producto **53**.

Reactivos	Condiciones	Tiempo	Reacción	Rendimiento
Tolueno, benzaldehído.	110 °C	2 días	Incompleta	n.d.
Tolueno, benzaldehído.	110 °C, destilación constante de tolueno	3 días	Incompleta	n.d
Tolueno, benzaldehído, ácido <i>p</i> -toluensulfónico.	110 °C, destilación constante de tolueno y adición del ácido <i>p</i> -toluensulfónico	5 días	Incompleta	n.d
Tolueno, benzaldehído, ácido sulfúrico.	110 °C, destilación constante de tolueno y adición del ácido sulfúrico.	5 días	Incompleta	n.d
Tolueno, benzaldehído purificado.	110 °C, destilación constante de tolueno.	5 días	Incompleta	n.d
THF, benzaldehído, (AcO) ₃ BHNa (preparado)	60 °C	5 días	Incompleta	n.d.
THF, benzaldehído, (AcO) ₃ BHNa (preparado)	45 °C	5 días	Incompleta	n.d.
Acetonitrilo, benzaldehído purificado.	80 °C	24 h	Incompleta	n.d
Etanol, benzaldehído purificado.	70 °C	24 h	Incompleta	n.d
Tolueno, ortoformiato de trimetilo anhidro.	80 °C – Destilación de tolueno con una trampa Diels-Alder	36 h	Incompleta	n.d.

Continuando en la búsqueda del mejor método para la obtención de las iminas, se decidió intentar una prueba de las técnicas anteriores utilizando un reactor de microondas.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Los ensayos se resumen en la **Tabla 19**. Para todos los ensayos se utilizó un Microondas Synthos 3000 de Anton-Paar. Las condiciones de un microondas permiten reducir el tiempo de reacción a altas temperaturas, ya sea con el mínimo de disolvente o en ausencia de éste, reduciendo al mínimo los contaminantes. En el primer ensayo (I) se utilizó etanol como disolvente sometándolo a las condiciones iniciales que se muestran en la **Tabla 19**, pero estas condiciones no fueron las ideales ya que solo se obtuvo un avance del 10%. Razón por la cual, en el ensayo II se repitió la reacción sin disolvente, aumentando la potencia de la reacción de 210 a 250 watts durante 10 min, lo que resultó en un avance del 20% alcanzando una temperatura final de 160 °C. Esta misma mezcla de reacción se volvió a someter al microondas pero ahora se aumentó la potencia a 500 watts durante los mismos 10 min, lo que aumentó la reacción a un 50% a un máximo de 160 °C. En la reacción III se sometió la mezcla sin disolvente directamente a una potencia de 800 watts por 10 min, lo que resultó en un avance del 80% de reacción. Para favorecer aún más esta reacción, se decidió someterla nuevamente a las mismas condiciones, pero no se logró completar la reacción.

En el ensayo IV se aumentó el tiempo de reacción con la misma potencia, de 10 a 20 min a 800 watts, lo que resultó en un avance del 50% de reacción. Esto pudo deberse a que al aumentar el tiempo de reacción se pudo favorecer la reversibilidad de la reacción, lo que disminuyó la

presencia del producto final. Por esa razón en el ensayo V se utilizó DMF como disolvente, ya que este absorbe más la energía, lo que permite mantener una alta temperatura de manera constante. Además se redujo la potencia y el tiempo a 250 watts por 15 min lo que no impidió que la temperatura llegara a 160 °C, pero el avance fue muy poco (10%). Se volvió a someter esta mezcla de reacción a las mismas condiciones, pero el avance solo fue de un 60%. Por último en el ensayo VI se volvió a prescindir del disolvente y se aumentó la potencia a 800 watts por 15 min, pero tampoco se obtuvo un gran avance (50%).

Tabla 19. Ensayo de síntesis para obtener el producto **53** por el método de Microondas

Reacción	1-(3-metilbutil)-1H-bencimidazol-2-amino	Benzaldehído	Disolvente	Condiciones	Avance
I	0.1 g	0.06 mL (1.2 eq)	Etanol 2 mL	(1) Rampa: 210 w – 2 min (2) Hold: 210 w - 10 min – 140 °C	10%
II	0.1 g	1 mL	Sin disolvente	(1) Rampa: 400 w – 2 min (2) Hold: 250 w - 10 min – 160 °C	20%
II.I	0.1 g	1 mL	Sin disolvente	(1) Rampa: 800 w – 2 min (2) Hold: 500 w - 10 min – 160 °C	50%
III	0.1 g	1 mL	Sin disolvente	(1) Rampa: 800 w – 4 min (2) Hold: 800 w – 0.5 min (3) Hold: 800 w – 10 min – 160 °C	80%
IV	0.1 g	1 mL	Sin disolvente	(1) Rampa: 800 w – 4 min (2) Hold: 800 w – 20 min – 160 °C	50%
V	0.1 g	0.13 mL (2.5 eq)	DMF 1.5 mL	(1) Rampa: 450 w – 3 min (2) Hold: 250 w – 15 min – 160 °C	10%
V.I	0.1 g	0.13 mL (2.5 eq)	DMF 1.5 mL	(1) Rampa: 450 w – 3 min (2) Hold: 250 w – 15 min – 160 °C	60%
VI	0.1 g	1 mL	Sin disolvente	(1) Rampa: 800 w – 4 min (2) Hold: 800 w – 15 min – 160 °C	50%

Dados que se hicieron una gran cantidad de ensayos para obtener este intermediario, se decidió buscar un método diferente para lograr obtener el compuesto final **53**. Estudiando la técnica

propuesta por Wu,⁶⁹ se determinó partir de la *o*-fenilendiamina **50** para condensarla con el isotiocianato de bencilo en presencia de DCC. Esto dio como resultado la ausencia total de la materia prima pero presentaba dos manchas principales, las cuáles se lograron separar con una columna empacada con gel de sílice y usando cloroformo como fase móvil. Ambas fracciones se analizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos para determinar cuál de las dos era el producto esperado. Además, previo a su separación por columna, se realizó una recristalización con tolueno para limpiar la mayoría de las impurezas. Gracias a esto la separación fue mucho más rápida y eficiente.

Finalmente, también se realizaron varios ensayos para la obtención del compuesto **26**, el resumen de estos ensayos se muestran en la **Tabla 20**. Dado que no se contaba con el acetaldehído comercial para realizar la formación de la imina sino el acetaldehído amoniaco, se pusieron a reaccionar el compuesto **25** (1-(2,5-dimetilbencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina) con el acetaldehído amoniaco disueltos en tolueno a 80 °C. Después de 5 días de reacción, solo se tenía un avance del 50%. Se intentó separar el producto final a través de la recristalización del producto en éter de petróleo y mediante una filtración por alúmina. A pesar de esto no se logró obtener el producto puro.

Un método alternativo consistió en formar la amida a través de la reacción entre el 2-amino y el anhídrido acético a temperatura ambiente. Después de 1.5 h se consumió toda la materia prima formándose un precipitado blanco. Este sólido fue filtrado, disuelto en ácido acético y se realizaron lavados con agua carbonatada. Después de eliminar todo el disolvente se obtuvo un sólido blanco puro que resultó ser el producto esperado (II). Este mismo producto se sometió a una reacción de etilación, en presencia de yoduro de etilo y utilizando como base sosa disuelta en agua, todo disuelto en metanol. Después de 3 días a temperatura ambiente, la reacción sólo avanzó un 10%, a pesar de que se ajustó la reacción a un pH básico para favorecer la desprotonación de la acetanilida y que se efectuó la sustitución nucleofílica. Sin embargo, esto pudo ocasionar que parte del reactivo se hidrolizara o se perdiera el yoduro de etilo al utilizar una base nucleofílica. A pesar de que se adicionó a la mezcla de reacción solo 1 eq de la sosa en frío y posteriormente se adicionó lentamente el yoduro.

En otro ensayo, se colocó el producto de la reacción II disuelto en DMF en presencia de 1.4 eq del yoduro de etilo. Posteriormente se adicionó gota a gota 3 eq de hidróxido de sodio disuelto en agua. Una vez terminada la adición, se calentó la reacción a 30 °C y se mantuvo así por 14 h. Después de este tiempo se observó ausencia de materia prima, por lo que el producto se recuperó al verter el contenido en agua, extraerlo con acetato de etilo y posteriormente concentración en el rotaevaporador. El producto, una resina café, se sometió inmediatamente a la siguiente reacción con hidróxido de potasio disuelto en metanol a reflujo, con la finalidad de hidrolizar la amida.

Después de 5 h de reacción, una ccf reveló la ausencia de materia prima, por lo que se trabajó para obtener el producto. El contenido se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo y se purificó mediante una placa preparativa. Al recuperarlo se obtuvo un sólido puro, que al realizar la identificación mediante la Espectrometría de Masas se demostró que el producto no era el esperado. Se volvió a intentar hidrolizar el producto de la reacción IV, esta vez adicionando 2 eq de potasa que se mantuvo en agitación a 30 °C por 1 h. Al no haber avance, se adicionó otro equivalente de potasas y la temperatura se aumentó a 50 °C por 3 h más, sin que hubiera un avance significativo en la reacción.

Por otro lado, se intentó formar la amida con el grupo 2-amino y posteriormente reducir la amida para obtener el etilamino.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Utilizando el producto de la reacción II se disolvió en ácido acético y en frío se adicionó poco a poco el borohidruro de sodio. Después de 1 h a temperatura ambiente se realizó una ccf, la cual reveló que no había avance en la reacción. Se adicionó 0.5 eq de NaBH₄ y se mantuvo en agitación por 1 h. Después se adicionó 0.5 eq más del borhidruro de sodio y después de 12 h seguía sin haber avance, por lo que esta reacción fue desechada.

Como último recurso se utilizó la misma técnica para obtener el compuesto **53**, poniendo a reaccionar la *o*-fenilendiamina sustituida (**24**) disuelta en THF con el isotiocianato de etilo, en presencia de DCC a 70 °C. Después de 2 días de reacción se logró obtener el producto esperado con algunas impurezas. Para su purificación se recurrió a una separación por columna empacada con gel de sílice, utilizando cloroformo como fase móvil. De esta forma se logró obtener el producto puro con un rendimiento bajo (24.19%).

Tabla 20. Ensayo de síntesis para obtener el producto **26**

Reacción	Reactivos	Condiciones	Tiempo	Reacción
I	Acetaldehído amoniaco, tolueno.	80 °C	5 días	Incompleta
II	Anhídrido acético	Temp. amb.	1.5 h	Completa
III	Producto de la reacción II, yoduro de etilo, NaOH, metanol.	Temp. amb.	3 días	Incompleta
IV	Producto de la reacción II, yoduro de etilo, NaOH, DMF.	30 °C	14 h	Completa
V	Producto de la reacción IV, KOH, metanol.	60 °C	5 h	No producto
VI	Producto de la reacción IV, KOH (3 eq), metanol.	50 °C	4 h	No producto
VII	Producto de la reacción II, NaBH ₄ , ácido acético.	Temp. amb.	14 h	Sin reacción
VIII	<i>N</i> -(2,5-dimetilbencil)benzeno-1,2-diamina, DCC, THF.	70 °C	2 días	Completa

Todos los esfuerzos en la síntesis se concentraron en obtener los derivados 2-amino-1*H*-bencimidazol 1,2-disustituídos, ya que según el análisis retrosintético eran los compuestos que presentaban una mayor facilidad sintética. No obstante, se intentó obtener los compuestos tricíclicos (**114**, **115**, **116**, **117** y **118**) según las referencias consultadas mediante la ruta sintética propuesta que se muestra en el **Esquema 6**.¹²⁰⁻¹²² Los ensayos pueden estudiarse también en el **Esquema 7** y la **Tabla 21**. En el primer estudio se requería obtener 1*H*-bencimidazol-2-ilacetonitrilo, para esto en la reacción **I** se hizo una prueba en tubo, en donde se colocó la *o*-fenilendiamina junto con el ácido cianoacético sin disolvente. Posteriormente se sumergió en un baño de aceite caliente a 180 °C y se mantuvo así por 20 min. Se observó cómo los dos sólidos se fusionaron cambiando a un color morado oscuro que cuando se enfrió se tornó a un color morado claro. Una ccf reveló la aparente ausencia de materia prima, así como la formación de 4 subproductos, por lo que se decidió intentar aislar el producto. El contenido se lavó con éter de petróleo, filtró al vacío y se dejó secar. El sólido morado se intentó recrystalizar de agua y carbón activado, pero no se logró cristalizar. Se extrajo con acetato de etilo y eliminó el disolvente pero se obtuvo un sólido anaranjado oscuro, cuya ccf reveló que aún tenía los 4 subproductos, por lo que se desechó esta reacción.

Otra reacción que se estudió (**II**) fue para obtener el intermediario 2-(clorometil)-1*H*-bencimidazol con la finalidad de someterlo a una sustitución con cianuro de sodio y obtener el acetonitrilo correspondiente. Primero se disolvió la *o*-fenilendiamina en agua con 1 eq de HCl. Posteriormente se adicionó el ácido cloroacético poco a poco y se calentó a reflujo por 18 h. Una ccf indicó la ausencia de la materia prima con la formación de otros 4 subproductos. La mezcla de reacción se neutralizó con carbonato de sodio formándose un sólido amarillo, el cual se filtró, lavó, recrystalizó de agua, pero sin lograrlo. Se extrajo con acetato de etilo y al remover el disolvente se obtuvo un sólido verdoso que aún tenía todas las impurezas.

Se repitió la reacción anterior, pero esta vez *o*-fenilendiamina se disolvió en acetona (**III**), se adicionó carbonato de potasio y poco a poco se fue adicionando el cloruro de cloroacetilo. La reacción se mantuvo en agitación por 48 h a temperatura ambiente. Una vez que la ccf mostró la ausencia de materia prima, la mezcla de reacción se filtró para eliminar el carbonato, el filtrado se concentró a sequedad dando un sólido verdoso. Se recrystalizó de benceno y carbón activado obteniéndose cristales amarillo claros en forma de agujas gruesas. El producto aún tenía un aligera impureza, pero aun así se decidió mandarlo a identificar por espectrometría de masas. Sin embargo esto demostró que el producto no era el esperado, ya que el peso molecular no correspondía con el esperado, además de que ninguna de las señales correspondía con este valor.

En un cuarto intento (**IV**) se colocó la materia prima disuelta en 10 mL de ácido clorhídrico junto con el ácido cloroacético. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 3 h y después a 80 °C por

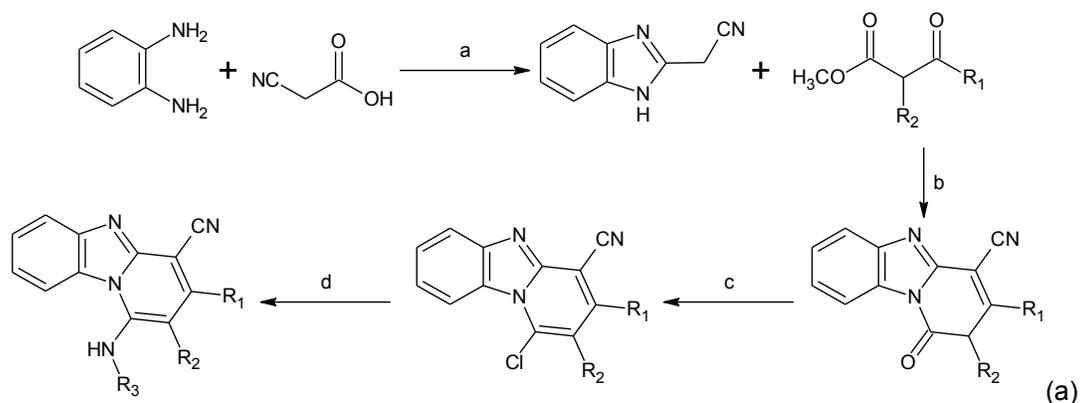
12 h. Al finalizar este tiempo la reacción no presentaba materia prima. La mezcla de reacción se neutralizó con carbonato de potasio formando un sólido amarillo el cual se filtró al vacío. Se recrystalizó de benceno pero no se logró purificar del todo, por lo que también se intentó purificar por una columna de gel de sílice sin lograr quitarle todas las impurezas.

En el ensayo **V** se partió del 1*H*-bencimidazol-2-ilmetanol para hacerlo reaccionar con cloruro de tionilo y obtener el clorometil correspondiente. La materia prima se resuspendió en cloroformo y el sistema se enfrió. Posteriormente se adicionó lentamente 1 eq de cloruro de tionilo y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 1 h. Al no haber un avance significativo en la reacción se adicionó 1 eq más de SOCl₂ y esta vez se calentó a 80 °C por 12 h. Aún sin haber un avance significativo en la reacción se destiló el cloroformo, se adicionó tolueno y 1 eq de SOCl₂ calentando a 100 °C por 12 h. Una ccf mostró que la reacción mostró un avance del 10 % por lo que la mezcla de reacción se desechó.

La reacción anterior se repitió (**VI**) pero en esta ocasión se suspendió la materia prima en tolueno, se adicionó 1 eq de cloruro de tionilo y se calentó a 100 °C por 3 h. Se observó un cambio en el color de la suspensión, de café claro a morado. La ccf mostró que no había materia prima, por lo que la mezcla de reacción se filtró al vacío y se dejó secar. El sólido y el filtrado se trabajaron por separado. El sólido se redisolvió en agua, se neutralizó con bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. Al retirar la fase orgánica se obtuvo un sólido café claro que junto con las aguas madres se realizó una ccf mostrando 4 manchas de subproductos. Al no poder purificarlo se decidió desechar la reacción.

A pesar de todos estos esfuerzos, no se pudo obtener el intermediario puro para continuar con la siguiente reacción. Dado que ya se tenían problemas al obtener el producto de SNAr para los intermediarios de los 2-aminobencimidazoles, se decidió dejar a un lado estas reacciones de obtención de los triciclos para concentrarse en las otras reacciones. Posteriormente, si daba tiempo, regresar a esta ruta sintética y obtener los productos faltantes. Hecho que no se pudo realizar dado los problemas que se obtuvieron al tener los productos finales de los primeros compuestos, lo que no permitió regresar a mejorar la ruta anterior. Por esta razón la síntesis de estos compuestos o sus compuestos alternos se dejarán para trabajos futuros.

Esquema 6. Propuesta de ruta sintética para la obtención de los compuestos tricíclicos **114**, **115**, **116**, **117** y **118**.



Acetona, NaOH, 60 °C; (b) Tolueno, Na₂CO₃, 80 °C; (c) SOCl₂, 25 °C; (d) Sustitución con las aminas correspondientes.

Esquema 7. Ensayos para la síntesis del compuesto **114**.

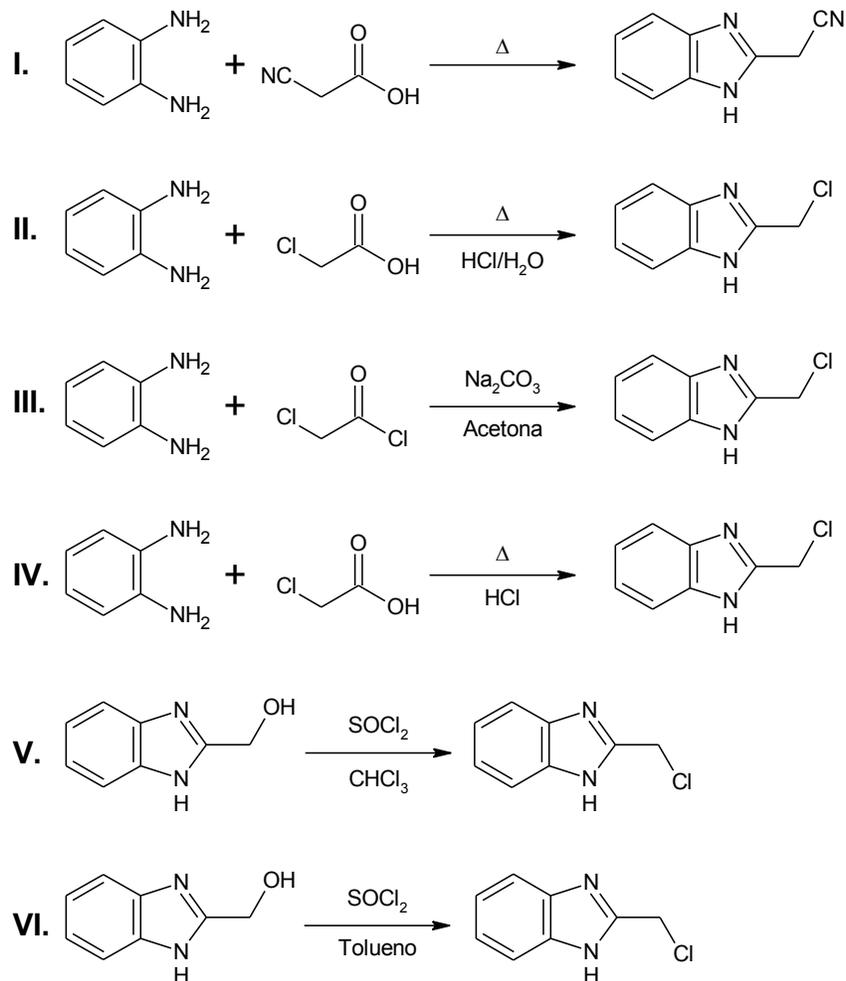


Tabla 21. Ensayos para la síntesis del compuesto **114**.

Reacción	Reactivos	Condiciones	Tiempo	Producto
I	o-Fenilendiamina, ácido cianoacético.	180 °C en tubo	20 min	Anaranjado sucio
II	o-Fenilendiamina, ácido cloroacético	100 °C	18 h	Amarillo sucio
III	o-Fenilendiamina, cloruro de cloroacetilo	Temp. amb.	48 h	Producto no esperado
IV	o-Fenilendiamina, ácido cloroacético	100 °C	3 h	Sólido amarillo puro (80%)
V	1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilmetanol, cloruro de tionilo, cloroformo.	80 °C	15 h	Poco avance en la reacción
VI	1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilmetanol, cloruro de tionilo, tolueno.	100 °C	3 h	Sólido morado sucio

7.3 PARTE BIOLÓGICA

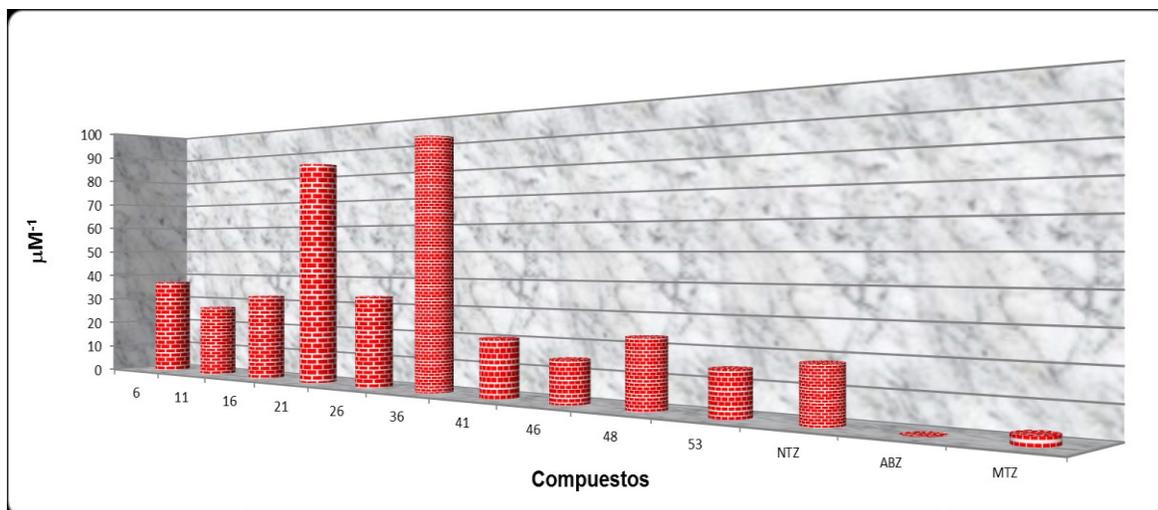
7.3.1. Actividad contra los protozoarios *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*

Los compuestos diseñados, sintetizados y determinadas sus estructuras a través de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas, se sometieron a evaluación biológica. Primero se probaron como antiprotozoarios. Dada su naturaleza bencimidazólica se probaron contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Los resultados obtenidos de la Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) se muestran en la **Tabla 22** y las **Gráficas 3, 4 y 5**.

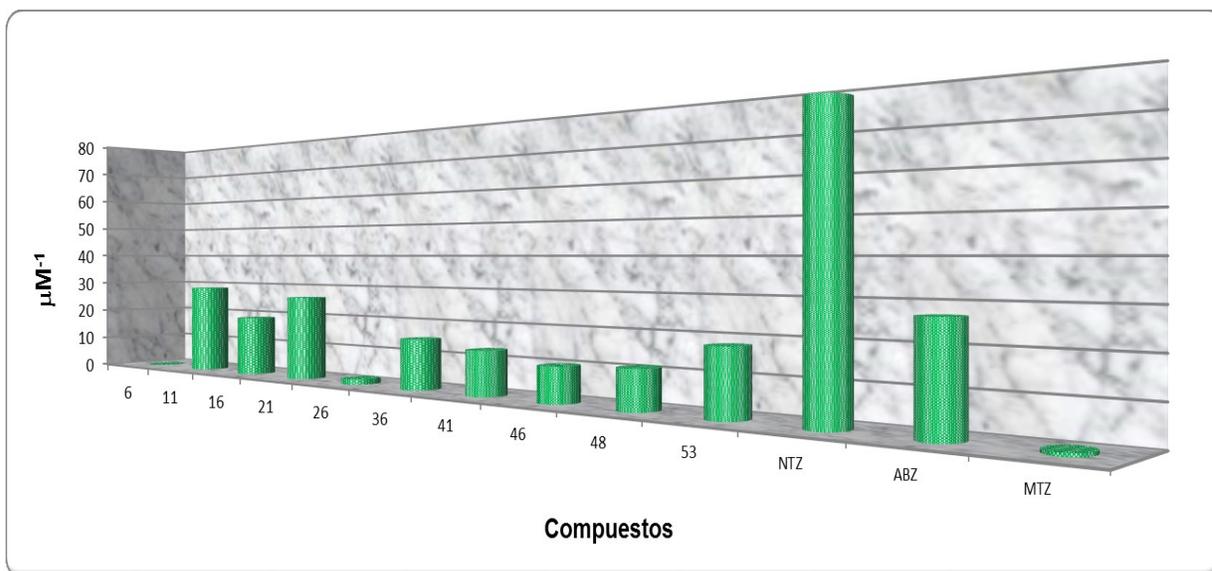
Tabla 22. Actividad de los compuestos sintetizados contra los protozoarios *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*

Compuesto	CI_{50} (μM)		
	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
06	0.027	10.545	0.781
11	0.037	0.035	0.088
16	0.031	0.053	0.107
21	0.012	0.038	0.094
26	0.030	0.612	0.721
36	0.011	0.066	0.191
41	0.049	0.076	0.136
46	0.068	0.098	0.217
48	0.043	0.089	0.267
53	0.067	0.055	0.065
NTZ	0.055	0.013	0.11
ABZ	56.6	0.037	1.592
MTZ	0.35	1.228	0.216

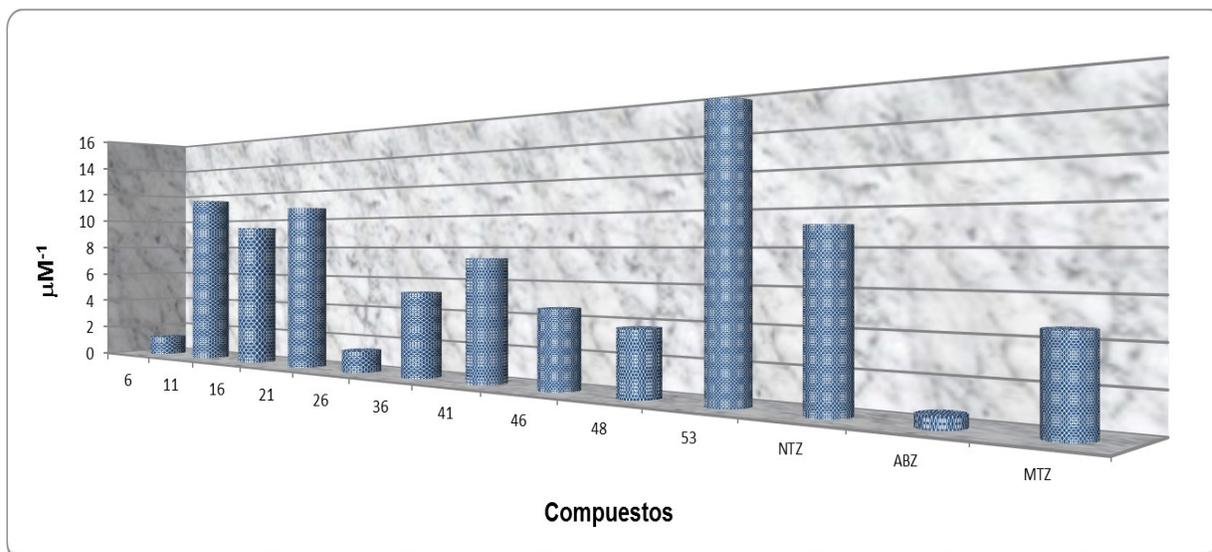
Gráfica 3. Inverso de la CI_{50} de los compuestos sintetizados contra *G. intestinalis*



Gráfica 4. Inverso de la CI_{50} de los compuestos sintetizados contra *E. histolytica*



Gráfica 5. Inverso de la CI_{50} de los compuestos sintetizados contra *T. vaginalis*



Como se puede observar en las tablas anteriores, los compuestos en general fueron muy activos, algunos mejores que los fármacos de elección.

En el caso de *G. intestinalis* todos los compuestos fueron más activos que el MTZ y el ABZ; con excepción de 46 y 53, mejores que la NTZ. En la **Gráfica 3** se muestra el inverso de la CI_{50} , donde entre más alta es la columna, su actividad es mayor. De todos los compuestos, el **36** (2-[(1-pentil-1*H*-bencimidazol-2-il)amino]metil}fenol) y después el **21** (1-etil-*N*-(3,4,5-trimetoxibencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina) fueron los compuestos que presentaron la mayor actividad contra la *G.*

intestinalis en comparación con los fármacos de elección. Si bien la NTZ tiene una actividad mayor que los otros fármacos de elección (MTZ y ABZ), el compuesto **36** fue 5 veces más activo y el compuesto **21** fue 4.6 veces más activo que la NTZ. Estos datos muestran que estos derivados del bencimidazol son buenos antiprotozoarios, en especial contra *G. intestinalis*, lo que en un principio puede decirse que su actividad es prometedora como antiparasitario. Los estudios de acoplamiento molecular demostraron que los compuestos que tenían una mayor energía de unión fueron los encontrados contra la enzima AN de *L. mexicana*, sin embargo, las actividades demuestran que los más activos fueron los encontrados para la enzima PC de *L. mexicana*. A pesar de que solo el compuesto **36** de la serie de AN fue el más activo, mientras que el **21** de la serie de PC fue el más activo y el resto de esta serie fue mejor que los compuestos de la serie de AN.

Podemos deducir que si bien el mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce con exactitud, puede ser que estén actuando a nivel de una enzima muy parecida a la PC, por lo que registran una mayor actividad. Como se observó en la parte computacional, el compuesto **36** forma puentes de hidrógeno con varios residuos de aminoácidos, al igual que el compuesto **21** que además forma un enlace con el Mg^{2+} de la enzima. Por lo que estos compuestos pueden estar formando puentes de hidrógeno estables con otros residuos o con los metales de varias enzimas, lo que inhibe su actividad. De esta forma se colapsan las rutas metabólicas en *G. intestinalis*, lo que lleva a la muerte del parásito.

Con respecto al parásito *E. histolytica*, todos los compuestos a excepción del **6** fueron más activos que el MTZ; los compuestos **11** y **21** mostraron una actividad igual a la del ABZ; pero ninguno de estos fue más activo que la NTZ. De esta forma se puede concluir que si bien los compuestos **36** y **21** fueron los más potentes contra la *G. intestinalis*, contra *E. histolytica* no se tuvo ningún compuesto lo suficientemente activo para ser mejor que el MTZ ni la NTZ. Posiblemente este hecho se debe a que el metabolismo de *E. histolytica* es muy diferente al de *G. intestinalis*, haciendo que los compuestos no fueran muy selectivos a ninguna enzima en particular, ya que no se favorecen del todo las interacciones presentes con las enzimas AN y PC de *L. mexicana*. Curiosamente se observa que el compuesto **6**, supuestamente el más activo contra la PC de *L. mexicana*, fuera el que obtuvo la menor actividad respecto a los fármacos de elección. Por un lado, estos datos indican que no necesariamente los compuestos *in silico* son los más activos *in vitro*; por otro lado, que el diseño sobre una enzima de un protozario no afecta a otro protozario de una especie distinta. A partir de estos resultados se pueden realizar más estudios de estructura-actividad para encontrar otros compuestos que tengan una estructura con mayor actividad, ya que estos compuestos no tenían el objetivo de ser amebicidas, sino mostrar su capacidad antiprotozoaria.

En el caso de la *T. vaginalis* todos los compuestos tuvieron una actividad mayor respecto al ABZ; los compuestos **11**, **16**, **21**, **36**, **41** y **53** mostraron una actividad mayor al del MTZ; los compuestos **11**, **16**, **21** y **53** fueron los que mostraron una actividad mayor respecto a la NTZ. De todos los compuestos, el más activo resultó ser el compuesto **53**, cuya estructura solo presenta un grupo bencilamino en posición 2 y un grupo isopentilo en posición 1 del anillo del bencimidazol; siendo 1.7 veces más activo que NTZ. Además, nuevamente se observa que los compuestos de la serie PC son más activos que los compuestos de la serie AN. Quizás porque la enzima PC que forma parte del metabolismo de la glucosa está presente en una gran cantidad de microorganismos que dependen de esta ruta para sobrevivir. Por otro lado, la enzima AN no es tan importante en otros organismos como en *L. mexicana*, ya que es parte de su mecanismo de defensa contra el sistema inmune del huésped. Razón por la cual se puede explicar que solo uno de los compuestos de esta serie fuera más activo contra este parásito.

En general, los compuestos fueron muy activos en el orden de nanomolar, en especial el compuesto **21** resultó tener la mejor actividad contra los tres protozoarios de este estudio respecto a los fármacos de elección ABZ, MTZ y NTZ, teniendo un valor un poco menor a la NTZ en el caso de *E. histolytica*. Además de que en general los compuestos de la serie PC fueron más activos que los de la serie AN para todos los parásitos. Como se mencionó anteriormente, se tienen más enzimas del metabolismo de la glucosa, como la PC, que son vitales para la sobrevivencia del parásito. Si bien no son exactamente iguales, sí pueden tener estructuras similares o sitios activos similares, ya que son regiones conservadas entre las diferentes especies de parásitos. Por esta razón esta serie presentó las mejores actividades. Por otro lado, los de la serie AN, presentaban a lo más un compuesto superior a la NTZ, pero el resto no, por lo que la enzima arginasa es de vital importancia sólo en el parásito *L. mexicana*, lo que explica su baja actividad en estos otros parásitos.

Si bien el propósito de este estudio no fue encontrar compuestos con una gran actividad sobre *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, solo se realizó para observar el potencial antiprotozoario de estos compuestos. Como una prueba de que tan buenos podrían ser contra protozoarios parásitos y dar una idea de su posible actividad contra los promastigotes de *L. mexicana*, un protozoario. Además, estos resultados podrían ser útiles para realizar más estudios estructura-actividad (QSAR) y obtener mejores compuestos contra estos protozoarios; así como realizar estudios de proteómica para encontrar las posibles enzimas blancos y encontrar mejores inhibidores.

7.3.2. Actividad sobre los promastigotes de *L. mexicana*

Los resultados de las pruebas de actividad contra los promastigotes de *L. mexicana* se muestran en la **Tabla 23** y en la **Gráfica 6**. Como se puede observar, todos los compuestos tuvieron una

actividad mucho menor respecto al control anfotericina B (ANF). Las actividades están en el rango de los 50 a los 200 μM , siendo el más activo de todos ellos el compuesto **41**, con un valor de 52.91 μM . Con respecto al resto de los compuestos el **48**, el **11**, el **46** y el **6** presentaron la actividad por debajo de los 70 μM . Los compuestos que tuvieron la menor actividad fueron los compuestos **16**, **53**, **26** y **21**, cuyo valor de CI_{50} es mayor a los 100 μM . Como se puede observar, ninguno de los compuestos tuvo una actividad superior o igual a la ANF, cuyo valor de CI_{50} es de 0.81 μM en promastigotes de *L. mexicana*, así como con respecto a la pentamidina, cuyo valor de CI_{50} es de 2.42 μM .

Al realizar la comparación entre la actividad *in vitro* contra el promastigote de *L. mexicana* y los valores de ΔG de los estudios computacionales, se puede observar que hay una correlación entre unos y otros datos. En la serie de compuestos para la PC, el compuesto **6** que teóricamente tiene la mayor energía de afinidad, este ocupa el segundo lugar de inhibición; ya que el de mayor inhibición es el compuesto **11** que ocupa el segundo valor de energía de unión. La diferencia entre el valor teórico es de 1.36 kcal/mol, mientras que el valor de CI_{50} difiere en 1.86 unidades. A pesar de esta diferencia, el estudio teórico indicó que los dos compuestos más afines presentaban la mayor inhibición del crecimiento del parásito. También se puede observar que la diferencia entre el segundo y el tercer compuesto es de 0.41, pero sus actividades *in vitro* difiere en 38.45 unidades. Esto indica que no necesariamente el valor teórico corresponde con el valor real *in vitro*, aún menos si la predicción es en la enzima y el ensayo biológico es con el parásito completo. El resto de los compuestos que presentaban la menor energía de unión tienen valores cada vez menores de inhibición, mostrando una tendencia descendente.

Con respecto a los compuestos mostrados en la serie AN, se observa que el compuesto más activo fue el **41**, el segundo en la escala de valores teóricos, siguiendo en la tendencia descendente el compuesto **48**, **46**, **36** y **53**, mientras que los valores teóricos en forma descendente son **36**, **41**, **46**, **48** y **53**. Si bien nuevamente observamos que el compuesto **41**, colocado como el segundo compuesto más afín a la enzima, presenta el mayor valor de inhibición, en cambio el compuesto más afín a la enzima AN está en el cuarto valor de actividad. Los compuestos **46** y **48** mostraron un valor menor de energía de afinidad, lo que corresponde con los valores *in vitro*. Nuevamente se puede decir que los valores teóricos no corresponden al 100% con los valores *in vitro*, ya que no se hicieron los ensayos con la enzima AN de *L. mexicana* y solo se tiene los valores sobre el promastigote.

Los compuestos más activos tanto de la serie PC como de la serie AN presentan grupos hidroxilo, metoxilos y un cloro en el sustituyente bencilamino, capaces de formar puentes de hidrógeno que aumentan su interacción con las enzimas presentes en el parásito. Además, en la posición 1 los

compuestos más activos presentan grupos pequeños, como etilo, propilo o isopropilo, lo cual indica que estos requerimientos son necesarios para encontrar compuestos con buena actividad. Grupos capaces de formar puentes de hidrógeno o enlaces con los metales, así como cadenas pequeñas en la posición 1 del bencimidazol.

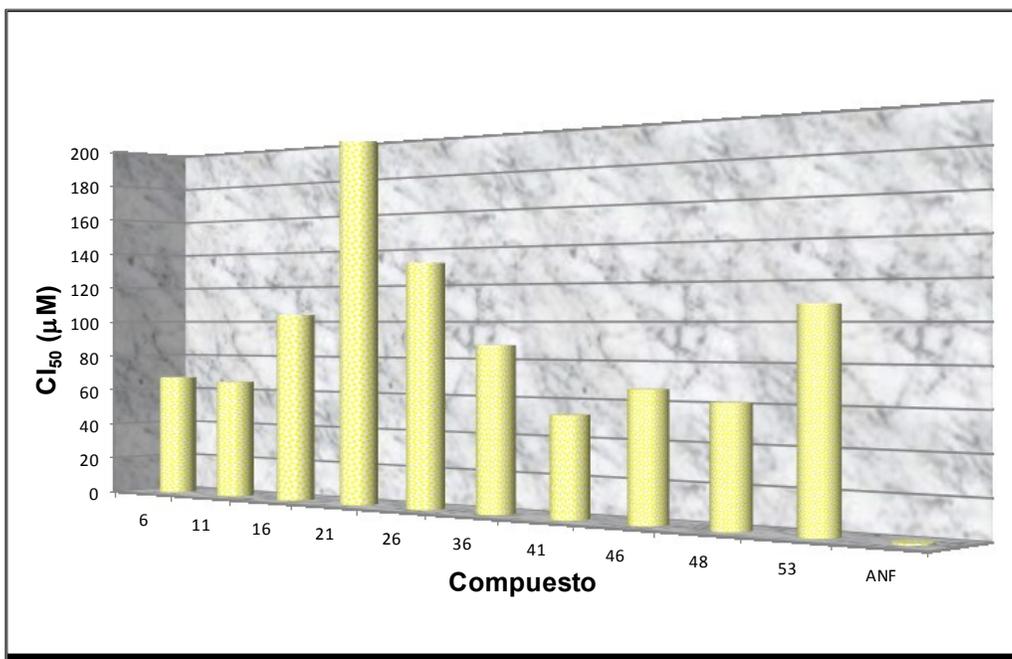
En general, no se puede comparar del todo los valores teóricos con los experimentales, por un lado porque las pruebas de actividad no son enzimáticas; por otro lado, porque el metabolismo y la biología del promastigote de *L. mexicana* son muy complejos. Esto hace que estos compuestos tengan miles de blancos más en el parásito que puedan inhibir, más, menos o igual que con las enzimas de estudio. Por esta razón, es importante que se realicen estudios complementarios, como el ensayo enzimático y la proteómica, para encontrar otros blancos de estos compuestos. Lo que sí se puede decir es que los compuestos que se eligieron por los resultados computacionales, para posteriormente sintetizar y ensayar resultaron tener actividades moderadas, que se pueden mejorar más adelante.

La AN está en mayor abundancia en la fase de amastigote del parásito, por lo que aún queda por realizar el ensayo en esta fase para observar si los fármacos son efectivos contra el parásito. Además, influye también la solubilidad de los compuestos y la permeabilidad por parte del parásito. Entre otras cosas, también puede deberse al metabolismo que sufren los compuestos, ya que no tienen grupos protectores en las posiciones 5 y 6 del anillo de bencimidazol que eviten esta desactivación. Por lo que estos resultados no son concluyentes, pero sí dan una amplia idea de las posibles actividades, de la efectividad de los ensayos *in silico* de su efectividad y selectividad, así como de modificaciones futuras a estas estructuras.

Tabla 23. Comparación entre la actividad de los compuestos sobre el promastigote de *L. mexicana* a las 48 h con la ΔG obtenido con los ensayos *in silico*

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	ΔG (kcal/mol) PC de <i>L. mexicana</i>	ΔG (kcal/mol) AN de <i>L. mexicana</i> Sin Mn ²⁺	ΔG (kcal/mol) AN de <i>L. mexicana</i> Con Mn ²⁺
6	67.22	-8.42		
11	65.36	-7.06		
16	103.81	-6.78		
21	198.33	-6.65		
26	131.43	-5.92		
36	87.80		-9.10	-5.03
41	52.91		-8.96	-4.98
46	66.93		-8.78	-4.88
48	61.45		-8.60	-4.80
53	108.45		-8.52	-4.01
ANF	0.81	n.d.	n.d.	n.d.
Pentamidina	2.42	n.d.	n.d.	n.d.

Gráfica 6. Actividad de los compuestos sintetizados sobre los promastigotes de *L. mexicana*



Para complementar este estudio, se realizaron pruebas de citotoxicidad (CC_{50}) para observar el efecto nocivo de estos compuestos. Con estos datos y con los valores de CI_{50} se pudo calcular el Índice de Selectividad (IS), dividiendo la CC_{50} entre el CI_{50} en μM (Tabla 24, Gráfica 7 y 8).

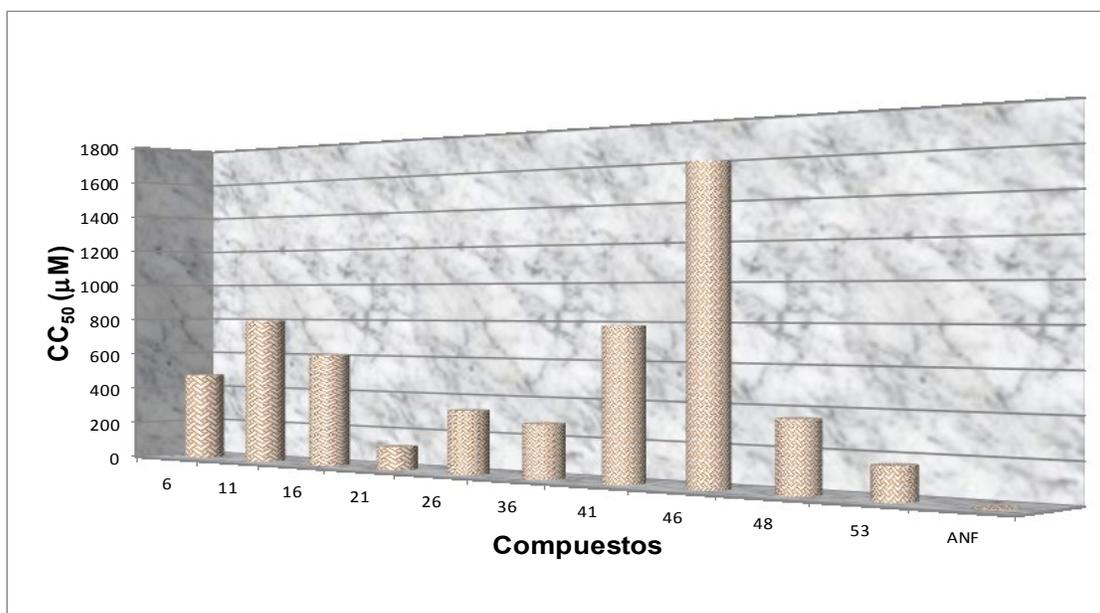
Tabla 24. Citotoxicidad y determinación del Índice de Selectividad (IS) de los compuestos sintetizados

Compuesto	CI_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	$IS = CC_{50}/CI_{50}$
6	67.22	477.08	7.10
11	65.36	795.03	12.16
16	103.81	608.30	5.86
21	198.33	123.48	0.62
26	131.43	333.95	2.54
36	87.80	281.24	3.20
41	52.91	785.32	14.84
46	66.93	1577.63	23.57
48	61.45	358.06	5.83
53	108.45	165.28	1.52
ANF	0.81	1.88	2.31

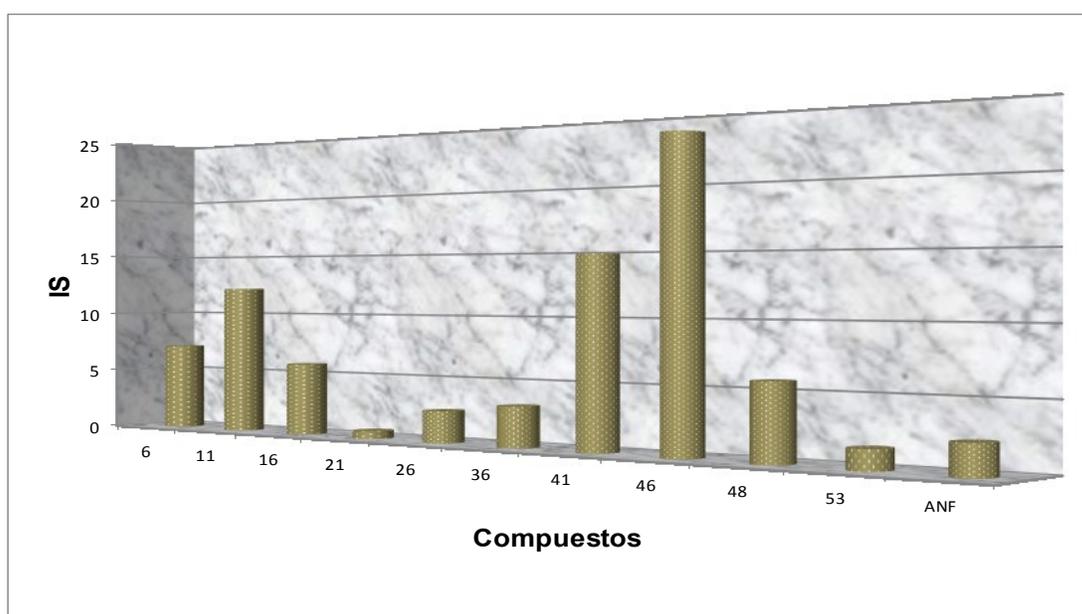
Entre más alta sea la concentración del valor de la CC_{50} , el compuesto es menos citotóxico. Como se puede observar en la Tabla 7, el compuesto con menor citotoxicidad fue el **46** con un valor superior a los 1500 μM . Lo que indica que este compuesto es el menos tóxico de todos los compuestos sintetizados. Además, todos los compuestos excepto el **21** y el **53** tienen valores de citotoxicidad menor a 200 μM . En el caso del compuesto **41**, el cual fue el más activo, su CC_{50} fue de 785 μM , lo cual lo coloca, no sólo como el mejor compuesto de la serie, sino también como un

compuesto no tóxico, lo que puede derivar en un fármaco seguro y eficiente. En el caso de los compuestos **21** y **53**, su valor de CI_{50} y de CC_{50} son muy cercanos, lo que no asegura la seguridad de estos compuestos.

Gráfica 7. Concentración Citotóxica media (CC_{50}) de los compuestos sintetizados sobre células VERO



Gráfica 8. Índice de Selectividad de los compuestos sintetizados



La mayoría de los compuestos presentaron valores altos de CC_{50} , lo que se puede deber gracias a los estudios computacionales que se realizaron para descartar compuestos que tuvieran mayor energía de unión sobre las enzimas del humano. En el caso de la PC, los compuestos presentaban diferencias de energía grandes entre la enzima de *L. mexicana* y la de humano. Para el caso de la AN, se seleccionaron solo los compuestos que se unían selectivamente a la enzima de *L. mexicana* y no a la de humano, lo que se refleja en los altos valores de CC_{50} . Gracias a estos estudios previos se pudieron tener posibles fármacos que aparte de ser eficientes fueran seguros.

Otro valor a considerar es el de IS, el cual indica la selectividad del compuesto sobre el parásito y no sobre las células humanas. Este valor se obtiene dividiendo el valor de CC_{50} entre la CI_{50} y entre más alto sea valor es mayor su selectividad. Se considera que la eficacia biológica no es debida a un efecto citotóxico *per se*, cuando el índice de selectividad es > 10 . Por lo general el valor de IS va de la mano con el valor de CC_{50} , ya que entre más alto es su valor de CC_{50} es mayor su selectividad. En este caso, el compuesto **46** es el que tenía el valor más alto de IS (23.57), incluso mayor al de ANF, cuyo valor es de 2.31, lo cual indica que no es muy selectivo, lo que explica la mayoría de sus efectos secundarios. Al mismo tiempo, el compuesto **46** tiene el valor más alto de CC_{50} , pero no era el que presentaba la mayor actividad, aunque su valor era cercano al de compuesto más activo. Esto le permitió tener un índice de selectividad más alto respecto al compuesto más activo, el **41**, cuyo valor de IS es de 14.84 y es el segundo valor más alto de selectividad. En general la mayoría de los compuestos, excepto el **21** y el **53**, tenían un valor de IS mayor al de la ANF, por lo que si bien los compuestos no fueron tan activos como la anfotericina, si fueron más selectivos y menos tóxicos. Lo que les das una ventaja y con esto se puede trabajar en su diseño para obtener fármacos más selectivos, con mayor actividad y seguros.

Con esto se puede ver que no necesariamente los compuestos más activos tienen la menor citotoxicidad, es por eso que es requisito hacer esta prueba para evitar en un futuro que estos compuestos puedan no solo afectar al parásito, sino también al humano, lo cual es lo menos deseado.

La prueba de actividad enzimática no se pudo realizar por falta de tiempo y por lo difícil que es obtener la enzima recombinante, por lo que no se pudo saber si los compuestos eran buenos inhibidores. Por esta razón se pasó directamente a la prueba *in vitro* con los promastigotes de *L. mexicana*. De esta forma se pudo saber si los compuestos presentaban actividad en un sistema complejo como es el promastigote. Quizás se pueden tener mejores resultados si las pruebas se pudieran realizar con los amastigotes del parásito, ya que es esta fase donde ocurre la mayor parte de la infección y deriva en los estados más graves de la leishmaniosis. Sin embargo, con el promastigote se obtuvo información valiosa de la actividad y eficiencia de los compuestos encontrados por los ensayos computacionales, lo cual evita probar una gran cantidad de

compuestos en ensayos biológicos consumiendo mucho tiempo y dinero. De esta forma se redujo tiempo de síntesis y se obtuvieron compuestos prometedores que pueden llegar a ser potenciales fármacos eficientes y seguros.

8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el modelo por homología de la arginasa de *L. mexicana* utilizando como molde la arginasa de hígado de *Rattus norvegicus* obtenido por el programa Modeller. La evaluación por las gráficas de Ramachandran fue de 99.3%.
2. La dinámica molecular del modelo homólogo de arginasa de *L. mexicana* demostró su estabilidad a lo largo de 3 ns.
3. La técnica de acoplamiento molecular resultó ser un modelo con alta capacidad predictiva, ya que permitió obtener compuestos selectivos sobre la enzima PC y AN de *L. mexicana*.
4. La diferencia en energía entre los ligandos de la enzima PC de *L. mexicana* y la de *H. sapiens* es de 3 a 4 unidades de ΔG , más selectivos sobre la enzima del parásito.
5. Los compuestos obtenidos para el modelo de AN sin Mn^{2+} de *L. mexicana* se unieron selectivamente a la enzima del parásito pero ninguno se unió a la enzima de humano.
6. Los compuestos obtenidos para el modelo de AN con Mn^{2+} de *L. mexicana* se unieron selectivamente a la enzima del parásito pero ninguno se unió a la enzima de humano, aunque su ΔG disminuyó de 3 a 4 unidades.
7. La mayoría de los compuestos obtenidos por acoplamiento molecular presentaron la estructura base *N*,1-disustituido 2-amino-1*H*-bencimidazol.
8. Se lograron sintetizar 10 compuestos (**6**, **11**, **16**, **21**, **26**, **36**, **41**, **46**, **48**, **53**) puros y con buenos rendimientos.
9. Los compuestos **11**, **16**, **21** y **41** fueron los más activos en general contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*, por lo que son considerados de amplio espectro.
10. Los compuestos **6**, **11**, **41**, **46** y **48** presentaron actividades moderadas sobre el promastigote de *L. mexicana*, pero no fueron más activos que los fármacos de elección ANF y pentamidina.
11. Los resultados experimentales siguen una tendencia similar con los resultados teóricos, lo que demuestra el potencial de los estudios computacionales para la obtención de nuevos líderes.

12. Todos los compuestos presentaron una menor citotoxicidad respecto a la ANF, siendo los menos tóxicos los compuestos **11**, **41** y **46**.
13. El Índice de Selectividad de casi todos los compuestos fue mayor que la ANF, en especial el IS de los compuestos **11**, **41** y **46** presentaron mejores resultados, indicando que estos compuestos son los más seguros.
14. El compuesto **46** tiene la mejor actividad, la menor citotoxicidad y el mayor Índice de Selectividad, por lo que es el mejor candidato para ser un líder en el diseño de nuevos fármacos leishmanicidas.
15. El estudio computacional-químico-biológico es una parte importante en Química Farmacéutica para la obtención de nuevos fármacos o posibles fármacos contra la leishmaniosis.

9. PERSPECTIVAS

Para complementar estos ensayos es indispensable realizar la evaluación enzimática, tanto contra PC como con AN de *L. mexicana*, con la finalidad de validar el modelo computacional.

Es recomendable volver a realizar el acoplamiento molecular con la arginasa con los iones Mn^{2+} ampliando la base de datos de posibles ligandos, ya que la base de ZINC aumentó su número de ligandos de 8 millones en 2008 a 21 millones a la fecha. Además de ampliar el tipo de estructuras aparte de los bencimidazoles.

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 Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión a los promastigotes tratados con estos compuestos. De esta forma se puede estudiar los efectos que ocurren en el parásito a nivel estructural, ayudando a elucidar el posible mecanismo de acción.

Realizar estudios de proteómica para evaluar el efecto que tienen estos compuestos a nivel de proteínas, para determinar si son estas enzimas (PC y AN) las responsables de la inhibición del parásito. Si no se pueden encontrar otras enzimas que resulten afectadas con mayor fuerza en presencia de los compuestos. Así se pueden diseñar fármacos contra esta enzima, para que sean específicos, eficientes y seguros.

Con los resultados biológicos, podemos decir que el compuesto **46** es el mejor por su actividad, seguridad y selectividad. Por lo que partiendo de su estructura base, donde tiene un grupo isopropilo en la posición 1 y un metoxilo en la posición 2 del bencilamino; así como en los estudios computacionales de acoplamiento molecular y dinámica molecular, se puede hacer diversas modificaciones, en particular para la enzima AN. Por ejemplo se pueden poner otros grupos formadores de puentes de hidrógeno y con los metales de la enzima en el bencilamino, sobre todo en las posiciones 2, 4 y 5. En la posición 1 se requieren grupos pequeños, como metilos, etilos o propilos para que el compuesto interactúe mejor con el sitio catalítico.

Para el caso de la enzima PC, es necesario tener un grupo protonado, como el NH de la piperidina, que forma el enlace con el metal de la enzima, ya sea conservando este grupo o buscando una alternativa más sencilla, como la amina sola o dimetilada. Además de grupos formadores de puentes de hidrógeno en el bencilamino, en especial en las posiciones 2, 3 y 4.

Para evitar el metabolismo de los compuestos bencimidazólicos, se pretende colocar sustituyentes en la posición 5 y/o 6 del núcleo de bencimidazol, 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 bencimidazol, 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 de humano. Estudiar su estabilidad y energía de unión del complejo ligando-enzima, para que pueda realizarse su síntesis, evaluación biológica y citotoxicidad. De esta manera repetir el ciclo para validar el modelo y tener todavía más opciones de tratamiento.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Fairlamb, A.H.; Ridley, R.G., Vial, H.J. Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. Discoveries and drug development. UNDP/World Bank/World Health Organization. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)*, **2003**, 1-222.
- [2]. Ouellette, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicinal & International Health*, **2001**, 6, 874-882.
- [3]. Suresh, S.; Turley, S.; Opperdoes, F.R.; Michels, P.; Hol, W. A potential target enzyme for trypanocidal drugs revealed by the crystal structure of NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*. *Structure*, **2000**, 8(5), 541-551.
- [4]. Griewank, K.; Gazeau, C.; Eichhorn, A.; von Stebut, E. Miltefosine Efficiently Eliminates *Leishmania major* Amastigotes from Infected Murine Dendritic Cells without Altering Their Immune Functions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, 54(2), 652-659.
- [5]. Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S.E.; Sachs, J.D.; Savioli, L. Control of Neglected Tropical Diseases. *The New England Journal of Medicine*, **2007**, 357(10), 1018-1027.
- [6]. Pérez-Victoria, J.M.; Pérez-Victoria, F.J.; Castanys, S.; Gamarro, F. Estrategias terapéuticas y bases moleculares de la resistencia a fármacos frente a la leishmaniasis. *Biojournal.net*, **2007**, 5, 1-18.
- [7]. World Health Organization. Report on Leishmaniasis. *Scientific Working Group*, **2004**, 1-143.
- [8]. Wanasen, N.; Soong, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunology Research*, **2008**, 41(1), 15-25.
- [9]. García-Hernández, R.; Manzano, J.I.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **2012**, 6(12), 1-9.
- [10]. Santos, D.O.; Coutinho, C.E.; Madeira, M.F.; Bottino, C.G.; Vieira, R.T.; Nascimento, S.B.; Bernardino, A.; Bourguignon, S.C.; Corte-Real, S.; Pinho, R.T.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C. Leishmaniasis treatment — a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, **2008**, 103(1), 1-10.

- [11]. Córdova-Uscanga, C.; .Albertos-Alpuche, N.E.; Andrade-Narváez, F.J.; Canto-Lara, S.B. Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Salud Pública México*, **1993**, *35*(4), 345-350.
- [12]. Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R.W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews. Microbiology*, **2007**, *5*, S7-S16.
- [13]. Khabnadideh, S.; Pez, D.; Musso, A.; Brun, R.; Ruiz-Pérez, L.M.; González-Pacanowska, D.; Gilbert, I.H. 2,4-Diaminopyrimidines as Inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal Dihydrofolate Reductase. *Bioorg Med Chem*, **2003**, *11*, 4693-4711.
- [14]. Sereno, D.; Cordeiro da Silva, A.; Mathieu-Daude, F; Ouaiissi, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*, **2007**, *56*, 3-7.
- [15]. Becker, I.; Volkow, P.; Velasco-Castrejon, O.; Salaiza-Suazo, N.; Berzunza-Cruz, M.; Delgado-Dominguez, J.S.; Morales-Vargas, A.; Ruiz-Remigio, A.; Perez-Montfort, R. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research*, **1998**, *85*, 165-170.
- [16]. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Epidemiología, Secretaría de Salud, México*, **2013**, *27*(48), 1-48.
- [17]. Página del Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Transmission Cycle of *Leishmania* spp. *Center for Disease Control & Prevention*. Consultado el 25 de noviembre de 2013.
- [18]. Weigle, K.A; De Dávalos, M.; Heredia, P.; Molineros, R.; Saravia N.G.; D'Alessandro, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **1987**, *36*, 489-496.
- [19]. Camara-Coelho, L.I.; Paes, M.; Guerra, J.A.; das Graças-Barbosa, M.; Coelho, C.; Lima, B.; Brito, M.E.; Brandão-Filho, S.P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*, **2011**, *108*, 671-677.
- [20]. Natera, S.; Machuca, C.; Padrón-Nieves, M.; Romero, A.; Díaz, E.; Ponte-Sucre, A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2007**, *29*, 637-642.

- [21]. Corware, K.D; Rogers, M.; Teo, I.; Müller, I.; Shaunak, S. An amphotericin B-based drug for treating experimental *Leishmania major* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2010**, 104(11), 749-750.
- [22]. Croft, S.L.; Yardley, V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, **2002**, 8, 319-341.
- [23]. Berman, J.D.; Gallalee, J.V.; Best, J.M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*, **1987**, 36, 197-201.
- [24]. Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology*, **2003**, 19(11), 502-508.
- [25]. Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **2006**, 19, 111-126.
- [26]. Pylkkänen, L.; Lähdetie, J. Sperm abnormality of metronidazole and tinidazole. *Mutation Research*, **1984**, 140(2-3), 137-140.
- [27]. Kim, D.W.; Park Baek, J.M.; Kim, J.E.; Kim, S. Metronidazole-induced encephalopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, **2004**, 224(1-2), 107-111.
- [28]. el-Nahas, A.F.; el-Ashmawy, I.M. Reproductive and cytogenetic toxicity of metronidazole in male mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2004**, 94(5), 226-231.
- [29]. Purohit, V.; Basu, A.K. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chemical Research in Toxicology*, **2000**, 13(8), 673-691.
- [30]. Katiyar, S.K.; Gordon, V.R.; McLaughlin, G.L.; Edlind, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1994**, 38, 2086-2090.
- [31]. Kazimierczuk, Z.; Upcroft, J.A.; Upcroft, P.; Górska, A.; Starosciak, B.; Laudy, A. Synthesis, antiprotozoal and antibacterial activity of nitro- and halogeno-substituted benzimidazole derivatives. *Acta Biochimica Polonica*, **2002**, 49(1), 185-195.

- [32]. Navarrete-Vázquez, J.G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, 11(2), 187-190.
- [33]. Navarrete-Vázquez, J.G.; Rojano-Vilchis, M.M.; Yépez-Mulia, L.; Meléndez, V.; Gerena, L.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Hernández-Luis, F. Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole bioisosteres. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 135-141.
- [34]. Navarrete-Vázquez, J.G.; Yépez, L.; Hernández-Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, 11(21), 4615-4622.
- [35]. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, J.G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, 12(16), 2221-2224.
- [36]. Kopanska, K.; Najda, A.; Justyna, Z.; Chomicz, L.; Piekarczyk, J.; Myjak, P.; Bretner, M. Synthesis and activity of 1*H*-benzimidazole and 1*H*-benzotriazole derivatives as inhibitors of *Acanthamoeba castellanii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12(10), 2617-2624.
- [37]. Horton, D.A.; Bourne, G.T.; Smythe, M.L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chemical Reviews*, **2003**, 103(3), 893-929.
- [38]. Townsend, L.B.; Wise, D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*, **1990**, 6(4), 107-112.
- [39]. Mayence, A.; Pietka, A.; Collins, M.S.; Cushion, M.T.; Tekwani, B.L.; Huang, T.L.; Vanden-Eynde, J.J. Novel bisbenzimidazoles with antileishmanial effectiveness. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18(8), 2658-2661.
- [40]. Huang, T.L.; Bacchi, C.J.; Kode, N.R.; Zhang, Q.; Wang, G.; Yartlet, N.; Rattendi, D.; Londono, I.; Mazumder, L.; Vanden-Eynde, J.J.; Mayence, A.; Donkor, I.O. Trypanocidal activity of piperazine-linked bisbenzimidazoles and bisbenzimidoxime, an orally active prodrug. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2007**, 30(6), 555-561.

- [41]. Mayence, A.; Vanden-Eynde, J.J.; LeCour, L.Jr.; Walker, L.A.; Tekwani, B.L.; Huang, T.L. Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 39(6), 547-553.
- [42]. Torres-Gómez, H.; Hernández-Nuñez, E.; León-Rivera, I.; Guerrero-Alvarez, J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M.; Chan-Bacab, M.J.; Navarrete-Vázquez, G. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 3147-3151.
- [43]. Castillo., R., Evaluación de algunos derivados de bencimidazol contra *Leishmania mexicana*, Comunicación personal, *Universidad Nacional Autónoma de México*, Distrito Federal, Facultad de Química, Edificio E, Laboratorio 122, **2013**.
- [44]. Arienti, K.L.; Brunmark, A.; Axe, F.U.; McClure, K.; Lee, A.; Blevitt, J.; Neff, D.K.; Huang, L.; Crawford, S.; Pandit, C.R.; Karlsson, L.; Breitenbucher, J.G. Checkpoint Kinase Inhibitors: SAR and Radioprotective Properties of a Series of 2-Arylbenzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 1873-1885.
- [45]. Doerig, C.; Meijer, L.; Mottram, J.C. Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *TRENDS in Parasitology*, **2002**, 18(8), 366-371.
- [46]. da Silva, E.R.; Castilho, T.M.; Pioker, F.C.; Tomich de Paula Silva, C.H.; Floeter-Winter, L.M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *International Journal for Parasitology*, **2002**, 32, 727-737.
- [47]. Munder, M.; Choi, B.S.; Rogers, M.; Kropf, P. L-Arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. *European Journal of Immunology*, **2009**, 39, 1-12.
- [48]. da Silva, E.R.; Laranjeira da Silva, M.F.; Fischer, H.; Mortara, R.A.; Mayer, M.G.; Framesqui, K.; Silber, A.M.; Floeter-Winter, L.M. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **2008**, 159(2), 104-111.
- [49]. Rigden, D.J.; Phillips, S.E.; Michels, P.A.; Fothergill-Gilmore, L.A. The Structure of Pyruvate Kinase from *Leishmania mexicana* Reveals Details of the Allosteric Transition and Unusual Effector Specificity. *Journal of Molecular Biology*, **1999**, 291, 615-635.

- [50]. Muñoz, M.A.; Ponce, E. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **2003**, 135, 197-218.
- [51]. Valentini, G.; Chiarelli, L.R.; Fortin, R.; Dolzan, M.; Galizzi, A.; Abraham, D.J.; Wang, C.; Bianchi, P.; Zanella, A.; Mattevi, A. Structure and Function of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277(26), 23807-23814.
- [52]. Opperdoes, F. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *TRENDS in Parasitology*, **2007**, 23(4), 149-158.
- [53]. Cazzulo, J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB Journal*, **1992**, 6(13), 3153-3161.
- [54]. McConville, M.J.; de Souza, D.; Saunders, E.; Likic, V.A.; Naderer, T. Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes. *TRENDS in Parasitology*, **2007**, 23(8), 368-375.
- [55]. Medina-Franco, J.L. Diseño de fármacos asistido por computadora. Inhibidores de la transcriptasa reversa del virus del VIH, hipocolesterolemiantes y antiparasitarios. *Tesis de Doctorado*, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Tutor: Dr. Rafael Castillo Bocanegra, **2005**, 1-198.
- [56]. Hopfinger, A.J. Computer-assisted drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1985**, 28, 1133-1139.
- [57]. Ooms, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, **2000**, 7(2), 141-158.
- [58]. Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**, 3, 935-950.
- [59]. Pouplana, R. Química computacional en diseño de fármacos. *Life Sciences Lab*, **2009**, 28-31.
- [60]. Krieger, E.; Nabuurs, S.B.; Vriend, G. Capítulo 25: Homology Modeling. Libro: *Structural Bioinformatics*, Editores: Bourne, P.E.; Weissig, H. Ed. Wiley-Liss Inc, **2003**, 1-15.
- [61]. Wallner, B.; Elofsson, A. All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs. *Protein Science*, **2005**, 14, 1315-1327.

- [62]. Adcock, S.A.; McCammon, J.A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem Rev.*, **2006**, 106(5), 1589-1641.
- [63]. Aguayo-Ortíz, R. Estudio Computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios, *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2012, 1-130.
- [64]. Rastogi, R.; Sharma, S. 2-aminobenzimidazoles in Organic Syntheses. *Synthesis*, **1983**, 11, 861-882.
- [65]. Leonard, N.J.; Curtin, D.Y.; Beck, K.M. Sulfonate salts of substituted benzimidazoles. *Journal of American Chemical Society*, **1947**, 69(10), 2459-2461.
- [66]. Joseph, L. Substituted 2-aminobenzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1963**, 6(5), 601.
- [67]. Watts, J.C. Methyl 2-benzimidazole carbamate. *German Patent (DOS)*, Compañía du Pont de Nemours, E. I. and Co. Alemania, **1973**, Patente DE 2204479, 1-23.
- [68]. Schulze, J.; Tanneberg, H.; Matschiner, H. Substituted nitrobenzoheterocyclics, Patente de la República Democrática Alemana. **1981**, Patente DD 150895, 1-6.
- [69]. Wu, C.Y.; Sun, C.M. Soluble polymer-supported synthesis of 2-(arylamino)benzimidazoles. *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 1529-1533.
- [70]. Da Settimo, A.; Primofiore, G.; Da Settimo, F.; Calzolari, L.; 1-Substituted 2-benzylaminobenzimidazole derivatives: compounds with H₁-antihistaminic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, 27, 395-400.
- [71]. Roberts, S.C.; Tancer, M.J.; Polinsky, M.R.; Gibson, K.M.; Heby, O.; Ullman, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(22), 23668-23678.
- [72]. Kurowski, M.A.; Bujnicki, J.M. GeneSilico protein structure prediction metaserver. *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, 3305-3307.

- [73]. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **1997**, 25, 3389-3402.
- [74]. Ginalski, K.; Elofsson, A.; Fischer, D.; Rychlewski, L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics*, **2003**, 19(8), 1015-1018.
- [75]. Chenna, R.; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T.J.; Higgins, D.; Thompson, J. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31(13), 3497-3500.
- [76]. Bates, P.A.; Kelley, L.A.; MacCallum, R.M.; Sternberg, M.J.E. Enhancement of Protein modelling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM, Proteins: Structure, Function. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **2001**, Suppl. 5, 39-46.
- [77]. Contreras-Moreira, B.; Bates, P.A. Domain Fishing: a first step in protein comparative modelling. *Bioinformatics*, **2002**, 18, 1141-1143.
- [78]. Sali, A.; Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, **1993**, 234, 779-814.
- [79]. Fiser, A.; Do, R.K.; Sali, A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*, **2000**, 9, 1753-1773.
- [80]. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **1993**, 26, 283-291.
- [81]. Hooft, R.W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E.E. Errors in protein structures. *Nature*, **1996**, 381(6580), 272.
- [82]. Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. PROMOTIF: a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science*, **1996**, 5(2), 212-220.
- [83]. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **2006**, 22, 195-201.

- [84]. Tripos Associates Inc., S. Hanley Rd, SYBYL Software Package, Version 8.0. St. Louis, EUA, **2009**.
- [85]. Di Costanzo, L.; Sabio, G.; Mora, A.; Rodriguez, P.C.; Ochoa, A.C.; Centeno, A.C.; Christianson, D.W. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **2005**, 102(37), 13058-13063.
- [86]. Christof, H.R.; Vander-Heiden, M.G.; Wu, N.; Asara, J.M.; Cantley, L.C. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, **2008**, 452, 181-186.
- [87]. Sanner, M.F. Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **1999**, 17, 57-61.
- [88]. Irwin, J.J.; Shoichet, B.K. ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2005**, 45(1), 177-182.
- [89]. Sanchez-Díaz, M.R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1999*, 1-85.
- [90]. Méndez-Cuesta, C.A., Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-Cloro-2-(metiltio)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1 metilados. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2005*, 1-138.
- [91]. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Soria-Arteche, O.; Hernández-Hernández, M.; Yépez-Mulia, L. Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45(7), 3135-3141.
- [92]. Schuttelkopf, A.W.; Van Aalten, D.M. PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallographica*, **2004**, 60, 1355-1363.
- [93]. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, **1992**, 37, 221-224.

- [94]. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, **1986**, 22(2), 271-277.
- [95]. Nieto, R. Evaluación de la actividad antiparasitaria de nuevos derivados de quinazolina y derivados de nicotinamida. *Tesis de Maestría*. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, **2012**.
- [96]. Cox, J.D.; Kim, N.N.; Traish, A.M.; Christianson, D.W. Arginase–boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Natural Structural Biology*, **1999**, 6, 1043-1047.
- [97]. Di Costanzo, L.; Pique, M.E.; Christianson, D.W. Crystal structure of human arginase I complexed with thiosemicarbazide reveals an unusual thiocarbonyl μ -sulfide ligand in the binuclear manganese cluster. *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, 129, 6388-6389.
- [98]. Cama, E.; Colleluori, D.M.; Emig, F.A.; Shin, H.; Kim, S.W.; Kim, N.N.; Traish, A.M.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Human arginase II. Crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry*, **2003**, 42, 8445-8450.
- [99]. Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, **2011**, 27(3), 343-350.
- [100]. Kanyo, Z.F.; Scolnick, L.R.; Ash, D.E.; Christianson, D.W. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, **1996**, 383, 554-557.
- [101]. Perozich, J.; Hempel, J.; Morris Jr, S.M. Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1998**, 1382, 23-27.
- [102]. Lavulo, L.T.; Sossong Jr, T.M.; Burke, M.R.B.; Doyle, M.L.; Cox, J.D.; Christianson, D.W.; Ash, D.E. Subunit–subunit interactions in trimeric arginase. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, 276, 14242-14248.
- [103]. DeLano, W.L. The PyMol Molecular Graphics System. *DeLano Scientific LLC*, Palo Alto, California, EUA. Editor **2007**.
- [104]. Maestro Version 9.3.518. *Schrödinger Software Modules*, Schrödinger, Nueva York, EUA. Editor **2007**.

- [105]. Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Medina-Franco, J.L.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2013**, 41, 12-19.
- [106]. McKenzie, B.M.; Miller, A.K.; Wojtecki, R.J.; Johnson, J.C.; Burke, K.A.; Tzeng, K.A.; Mather, P.T.; Rowan, S.J. Improved synthesis of functionalized mesogenic 2,6-bisbenzimidazolylpyridine ligands. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 8488-8495.
- [107]. Cee, V.J.; Downing, N.S. A one-pot method for the synthesis of 2-aminobenzimidazoles and related heterocycles. *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 3747-3750.
- [108]. Göker, H.; Kuş, C.; Boykin, D.W.; Yildiz, S.; Altanlar, N. Synthesis of Some New 2-Substituted-phenyl-1*H*-benzimidazole-5-carbonitriles and Their Potent Activity Against *Candida* Species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 2589-2596.
- [109]. Plant, S.G.P.; Powell, J.F. Friedel-Crafts reaction in the carbazole series III. *Journal of the Chemical Society*, **1947**, 937-939.
- [110]. Göker, H.; Ölgen, S.; Ertan, R.; Akgün, H.; Özbey, S.; Kendi, E.; Topçu, G. Synthesis of 1,2-disubstituted benzimidazole-5(6)-carboxamides and evaluation of their antimicrobial activity. *II Farmaco*, **1995**, 51(1), 53-58.
- [111]. Hinkley, J.M.; Porcari, A.R.; Walker, J.A.; Swayze, E.E.; Townsend, L.B. An Improved Large-Scale Preparation of Benzimidazole-2-Sulfonic Acids and 2-Chlorobenzimidazoles. *Synthetic Communications*, **1998**, 28(9), 1703-1712.
- [112]. Chakrabarty, M.; Ghosh, N.; Khasnobis, S.; Chakrabarty, M. DBU, a highly efficient reagent for the facile regeneration of (hetero)arylamines from their acetamides and benzamides: influence of solvent, temperature, and microwave irradiation. *Synthetic Communications*, **2002**, 32(2), 265-272.
- [113]. Guida, X.; Jianhua, H.; Xiaomin, L. Synthesis and QSAR studies of novel 1-substituted-2-aminobenzimidazoles derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 1080-1083.

- [114]. Abdel-Magid, A.F.; Carson, K.G.; Harris, B.D.; Maryanoff, C.A.; Shah, R.D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, 61, 3849-3862.
- [115]. Reddy, C.R.; Rani, C.R.; Sekhar Reddy, G.C.; Raju, C.N. Microwave synthesis and antimicrobial activity of dibutyl (substituted)(4-(*N*-pyrimidin-2-yl-sulfamoyl)phenylamino) methylphosphonates. *Der Pharmacia Lettre*, **2011**, 3(4), 134-142.
- [116]. Tabatabaee, M.; Heravi, M.M.; Sharif, M; Esfandiari, F. 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.
- [117]. Bhusnure, O.G.; Zangade, S.B.; Chavan, S.B.; Vibhute, Y.B. Comparative study of conventional and microwave assisted synthesis of novel schiff bases and their antimicrobial screenings. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2010**, 2(6), 234-243.
- [118]. Soai, K.; Ookawa, A. Mixed Solvents Containing Methanol as Useful Reaction Media for Unique Chemoselective Reductions with Lithium Borohydride. *Journal of Organic Chemistry*, **1986**, 51, 4000-4005.
- [119]. Micovic, V.M.; Mihailovic, M.L. The reduction of acid amides with lithium aluminum hydride. *Communication from the Institute of Chemistry of the Serbian Academy of Science and the Institute of Chemistry of the Faculty of Sciences in Belgrade (Yugoslavia)*, **1953**, 1190-1200.
- [120]. Gudasi, K.B.; Shenoy, R.V.; Vadavi, R.S.; Patil, M.S.; Patil, S.A.; Hanchinal, R.R.; Desai, S.A.; Lohithaswa, H. Lanthanide(III) and Yttrium(III) Complexes of Benzimidazole-2-Acetic Acid: Synthesis, Characterisation and Effect of La(III) Complex on Germination of Wheat. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2006**, 2006, 1-8.
- [121]. Thakurdesai, P.A.; Wadodkar, S.G., Chopade, C.T. Synthesis and anti-inflammatory activity of some Benzimidazole-2-carboxylic acids. *Pharmacologyonline*, **2007**, 1, 314-329.
- [122]. Copeland, R.A.; Day, A.R. The preparation and reactions of 2-Benzimidazolecarboxylic acid and 2-benzimidazoleacetic acid. *Contribution from The Department of Chemistry and Chemical Engineering of the University of Pennsylvania*, **1943**, 65, 1072-1075.

APÉNDICE A. PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado se presentan los datos de los equipos e instrumentos, la cromatografía, reactivos y disolventes empleados, así como los procedimientos generales de síntesis realizados para la obtención de los intermediarios y productos finales.

A.1. Instrumentación

El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius A210P, o bien, en una balanza granataria OHAUS E4000.

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

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida por medio de un rotaevaporador Büchi CR-114 con condensador vertical lleno de líquido refrigerante de automóvil y baño B-480. La condensación de los vapores se realizó por enfriamiento del líquido refrigerante con un enfriador en serpentín Brinkmann modelo IC30. Para disminuir la presión del Sistema (hasta 1 mmHg) se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2. Alternativamente se utilizó un rotaevaporador Büchi CR-205 con condensador vertical de dedo frío y baño B-490. El condensador se llenó con líquido refrigerante de automóvil y se enfrió con un elemento refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC30 (hasta -30 °C de capacidad). Para disminuir la presión del Sistema (hasta 10 mmHg) se utilizó una bomba de vacío marca Büchi V-500 con regulador de vacío V-800.

Las reacciones a presión de Sustitución Nucleofílica Aromática se realizaron en un Reactor Parr de 300 mL Modelo 4561M acoplado con un regulador de temperatura y agitación Watlow Modelo 4842.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Büchi B-450 utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformada de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, la frecuencia de las señales se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono (RMN ^1H y RMN ^{13}C) se obtuvieron en un espectrómetro Varian EM-390 (300, 400 MHz) y en un espectrómetro Varian Unity 300 (300 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me_4Si , $\delta = 0$) en DMSO-d_6 y los valores de J en Hz.

Los espectros de masas se determinaron en los espectrómetros JEOL JMS-SX102A y JEOL 1Ax505HA. La simbología utilizada es M^+ = ion molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.

La hidrogenación catalítica se realizó en un aparato de hidrogenación Parr Modelo 3916 EG a 60 lb/in 2 y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Pd/C (al 10 %) de la casa Aldrich; para esto, la botella de hidrogenación conteniendo la sustancia por reducir, el catalizador y el disolvente se lavó tres veces con 30 lb/in 2 de hidrógeno y succión. Después se sometió a hidrogenación a 60 lb/in 2 hasta que no se consumió más hidrógeno.

A.2. Cromatografía

El progreso de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se determinó por cromatografía en placa fina (ccf) empleando cromatoplasmas de la casa Merck recubiertas con gel de sílice 60 F_{254} de 0.2 mm de espesor. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a vapores de yodo.

A.3. Sistemas de elución

Los sistemas eluyentes empleados en las ccf fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Hexano-Éter de petróleo	50:50*
II	CHCl_3 -MeOH	80:20*
III	CHCl_3 -MeOH	90:10*
IV	CHCl_3 -MeOH	95:5*
V	Hexano- CHCl_3 -AcOEt	50:35:15*
VI	Hexano-AcOEt	95:5*

*+ 1 gota de NH_4OH

A.4. Reactivos, disolventes y procedimientos generales

Las materias primas se sintetizaron en el laboratorio a partir de 2-cloronitrobenzoceno y las aminas sustituidas adecuadas comerciales (Aldrich), vía sustitución, reducción, ciclación, formación de imina, seguido de reducción con NaBH_4 en metanol. A continuación se ilustra lo anterior con los siguientes procedimientos de síntesis.

A.4.1. Procedimiento general para la Sustitución Nucleofílica Aromática.

En un reactor Parr de 300 mL se colocaron 24.81 g de 2-cloronitrobenzoceno (0.1574 mol) y 125 mL (1.2596 mol, 8 eq) de la amina correspondiente. El sistema se cerró y calentó a 120 °C con agitación constante durante 12 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se permitió llegar a temperatura ambiente y el contenido se vertió en 300 mL de acetato de etilo. La solución orgánica se lavó con agua (2 x 100 mL), brine (50 mL) y agua (50 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad en el rotaevaporador obteniendo un líquido o sólido correspondiente a la *N*-alquil-2-nitroanilina.

A.4.2. Procedimiento general para la alquilación de 2-nitroanilinas.

En un matraz bola de 100 mL de 1 boca, acondicionado con columna Vigreux, trampa anhidra y agitación magnética, se disolvieron 0.0323 mol de 2-nitroanilina en 5 mL de DMF y se adicionaron 0.0323 mol (1 eq) de bicarbonato de sodio. Enseguida se adicionó gota a gota 0.0646 mol del 2-(clorometil)-1,4-dimetilbenzoceno (2 eq). El sistema se calentó a 110 °C con agitación constante durante 3 días. En ausencia de materia prima, la mezcla de reacción se permitió llegar a la temperatura ambiente. Se formó un sólido naranja, el cual se filtró al vacío, lavó con agua fría y se secó al vacío, de esta forma se obtuvo el *N*-alquil-2-nitroanilina esperado.

A.4.3. Procedimiento general para la reducción con H_2 en Pd/C.

En una botella de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 0.0772 mol del compuesto nitrado en 150 mL de EtOH y 1.5 g (5%) de catalizador Pd/C al 10%, el cual previamente se pesó bajo atmósfera de nitrógeno. El matraz se colocó en el sistema de hidrogenación y se purgó el aire presente mediante tres lavados de aproximadamente 30 lb/in² de hidrógeno, después, la botella se llenó con hidrógeno hasta una presión de 60 lb/in². La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 2 h. La suspensión translúcida se procesó eliminando el catalizador por filtración al vacío. El filtrado resultante se concentró en el rotaevaporador, dando un líquido viscoso café oscuro, obteniéndose la *o*-fenilendiamina.

A.4.4. Procedimiento general para Ciclación A.

En un matraz bola de 500 mL con dos bocas, equipado con termómetro, tapón de teflón y agitación magnética, se suspendieron 0.0772 mol de la *o*-fenilendiamina en 50 mL de agua y con agitación vigorosa se adicionaron, lentamente, 0.0926 mol (1.2 eq) de BrCN, cuidando de que la temperatura no se elevara por encima de los 70 °C. Posteriormente se adicionaron 20 mL de etanol y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 0.5 h. Una vez consumida la materia prima, a la mezcla de reacción se le adicionó 30% en peso de carbón activado, se adaptó un condensador en posición de reflujo y se calentó a ebullición en un baño de aceite por 1 h. Después se filtró en caliente a través de una cama de celita, la cual se lavó con agua caliente. El filtrado se trató con 0.0772 mol (1 eq) de NaOH en agua y se formó un sólido café claro. La mezcla se enfrió a 4 °C para favorecer la completa formación del sólido. El producto crudo se separó por filtración con vacío y se lavó con agua fría repetidas veces, se secó al vacío para obtener el 2-aminobencimidazol correspondiente.

A.4.5. Procedimiento general para Ciclación B.

En un matraz bola de 50 mL de una boca, equipado con condensador en posición de reflujo, trampa anhidra y agitación magnética, se disolvieron 0.0022 mol de la *o*-fenilendiamina sustituida en 10 mL de THF. Una vez en solución, se le adicionó 1 eq de isotiocianato de etilo (0.0022 mol) y 1.85 eq de DCC (0.0040 mol). La mezcla se calentó a 70 °C por 2 días. Una vez consumida la materia prima, el contenido se concentró a sequedad dando una resina café oscuro. Se recrystalizó de tolueno utilizando carbón activado, formándose un sólido café claro, el cual se filtró al vacío, lavó con tolueno frío y se dejó secar. Se obtuvo el compuesto sustituido esperado.

A.4.6. Procedimiento general para formación de Iminas.

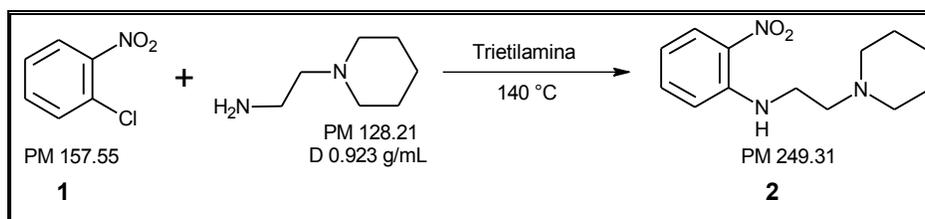
En un matraz bola de 50 mL, equipado con condensador en posición de reflujo, trampa anhidra y agitación magnética, se disolvieron 0.0053 mol del 2-aminobencimidazol en 20 mL de tolueno. Una vez en solución, se le adicionaron 0.0053 mol (1 eq) del benzaldehído sustituido correspondiente. La mezcla se calentó a reflujo por 48 h, destilando constantemente 10 mL de tolueno y reemplazándolo por tolueno anhidro. Cuando la materia prima se consumió en su totalidad, la mezcla se concentró a sequedad dando un sólido amarillo, que correspondía a la imina formada.

A.4.7. Procedimiento general para Reducción de Iminas.

En un matraz bola de 50 mL de una boca, equipado con trampa anhidra y agitación magnética, se disolvieron 0.0016 mol de la imina en 15 mL de metanol. El sistema se enfrió a 0 °C en un baño de

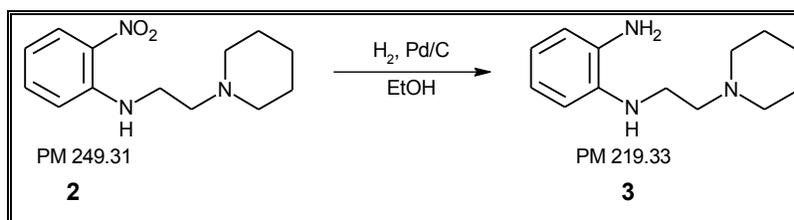
hielo-sal, posteriormente se adicionaron lentamente 0.0008 mol (0.5 eq) de NaBH_4 . La mezcla se mantuvo en agitación por 30 minutos a $0\text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se dejó que el sistema alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo en agitación por 2 h. La materia prima se consumió en su totalidad, por lo que la mezcla se concentró a sequedad dando un sólido amarillo, el correspondiente producto final.

A.4.8. 2-Nitro-*N*-[2-(piperidin-1-il)etil]anilina (**2**)



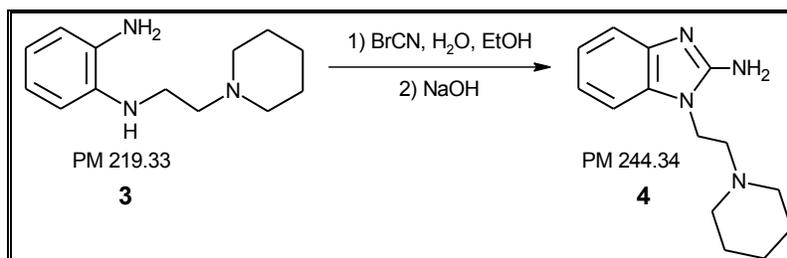
Se utilizó la metodología **A.4.1** modificada al adicionar solo 1 eq de 2-(piperidin-1-il)etanamina y trietilamina. Se obtuvo un sólido crudo que se recrystalizó de hexano obteniendo 2.05 g (33.55%) de cristales en forma de agujas amarillas, una sola mancha por ccf ($R_f = 0.9$, Sistema I) y pf $64.5\text{-}66\text{ }^\circ\text{C}$.

A.4.9. *N*-[2-(Piperidin-1-il)etil]benceno-1,2-diamina (**3**)

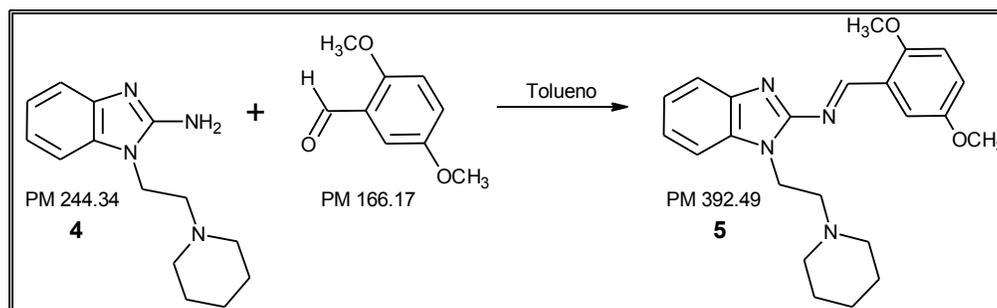


Siguiendo la metodología **A.4.3** se obtuvieron 3.78 g (99.92%) de un líquido viscoso café oscuro, una mancha principal por ccf ($R_f = 0.16$, Sistema II). El compuesto se usó inmediatamente como tal en la siguiente reacción.

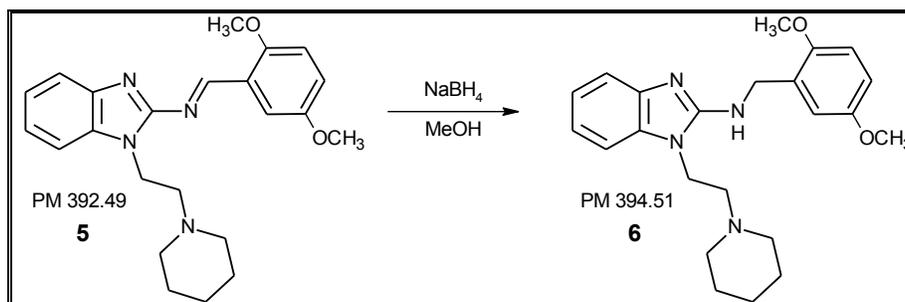
A.4.10. 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-1*H*-bencimidazol-2-amina (**4**)



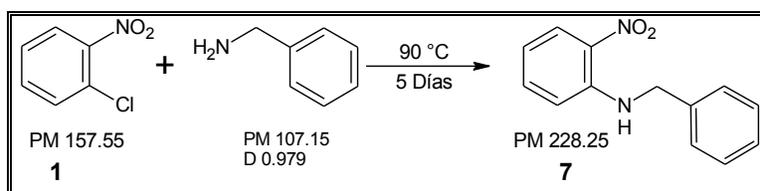
Siguiendo la metodología **A.4.4** se obtuvo un sólido color crema que presentó una mancha principal y pequeñas impurezas, por lo que se recrystalizó de tolueno. Se obtuvieron 0.535 g (10.9%) de agujas blancas, una sola mancha por ccf ($R_f 0.25$, Sistema III) y pf de $176.6\text{-}177.8\text{ }^\circ\text{C}$.

A.4.11. 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-*N*-[(*E*)-(2,5-dimetoxifenil)metilidieno]-1*H*-bencimidazol-2-amina (**5**)

Seguindo la metodología **A.4.6** se obtuvo un líquido aceitoso anaranjado, el cual se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

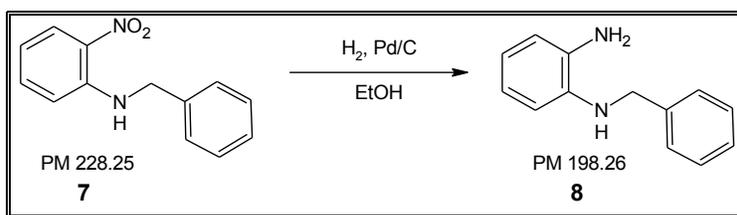
A.4.12. 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-*N*-(2,5-dimetoxibencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**6**)

Seguindo la metodología **A.4.7** se obtuvo una resina café oscura, la cual se sometió a purificación a través de una pequeña columna empacada con gel de sílice, utilizando cloroformo como fase móvil. Después de coleccionar el compuesto puro se obtuvieron 148 mg (92.5%) de un sólido amarillo claro, una sola mancha por ccf (Rf 0.25, Sistema IV) y pf de 178.3-179.4 °C.

A.4.13. *N*-Bencil-2-nitroanilina (**7**)

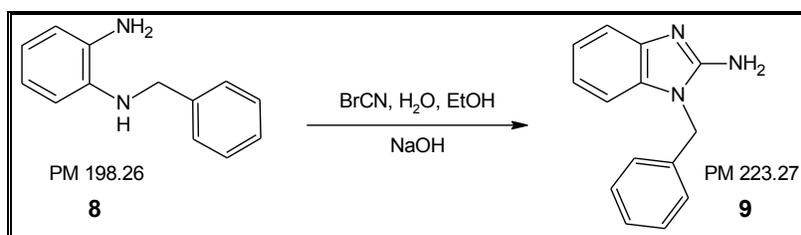
Para la obtención de este producto se modificó la metodología **A.4.1**. Se realizó en un sistema abierto con calentamiento de 90 °C por 5 días. se obtuvieron 9.70 g (64.84%) de un sólido anaranjado, una sola mancha por ccf (Rf 0.38, Sistema I) y un pf de 73.1-73.8 °C.

A.4.14. *N*-Bencilbenceno-1,2-diamina (**8**)



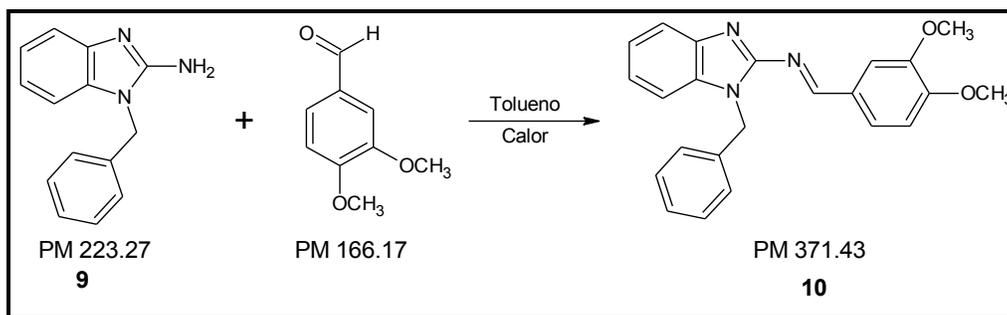
Empleando la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso café oscuro, una mancha principal por ccf (Rf 0.05, Sistema I). El producto crudo se empleó inmediatamente como tal en la siguiente reacción.

A.4.15. 1-Bencil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**9**)



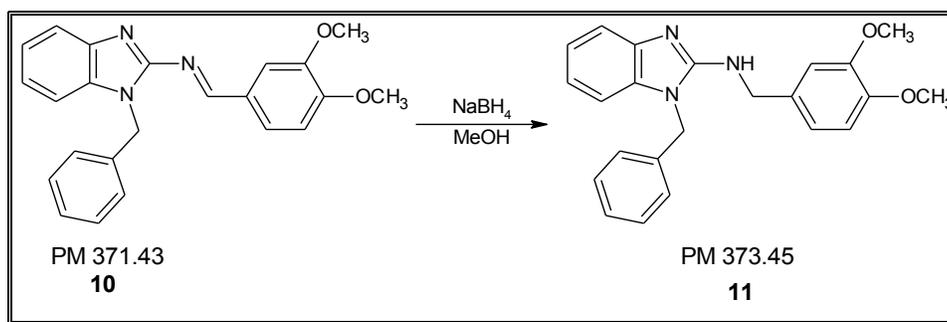
De acuerdo a la metodología **A.4.4**, el producto crudo se recristalizó de agua-etanol. Se obtuvieron 2.5 g (51.33%) de agujas largas blancas, una sola mancha por ccf (Rf 0.44, Sistema IV) y pf de 196.3-197.8 °C.

A.4.16. (*E*)-*N*-(1-Bencil-1*H*-bencimidazol-2-il)-1-(3,4-dimetoxifenil)metanimina (**10**)



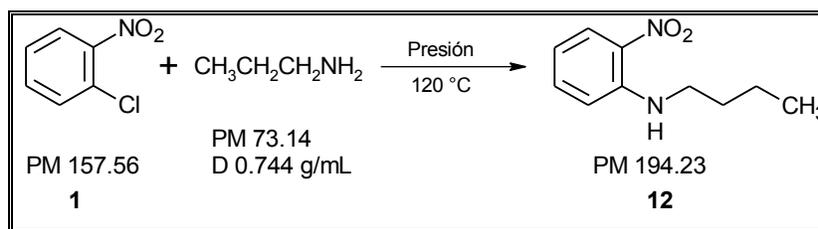
Seguindo la metodología **A.4.6** el residuo, un sólido amarillo paja, se recristalizó de éter de petróleo. Se obtuvieron 1.34 g (79.76%) de cristales largos amarillos, una sola mancha por ccf (Rf 0.42, Sistema V) y pf de 145.8-147.3 °C

A.4.17. 1-Bencil-*N*-(3,4-dimetoxibencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**11**)



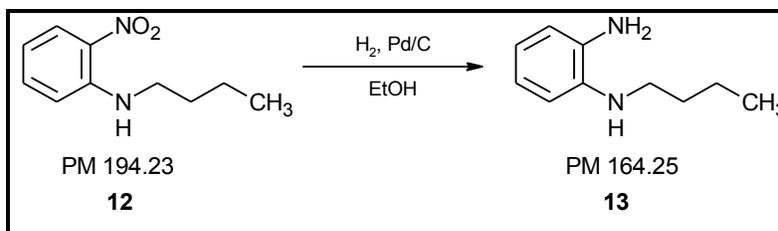
Para obtener este producto se siguió la metodología **A.4.7**, el residuo amarillo se recrystalizó de etanol. Se obtuvieron 0.33 g (66.08%) de un sólido blanco, una sola mancha por ccf (Rf 0.14, Sistema V) y pf de 146.5-147.2 °C.

A.4.18. *N*-Butil-2-nitroanilina (**12**)



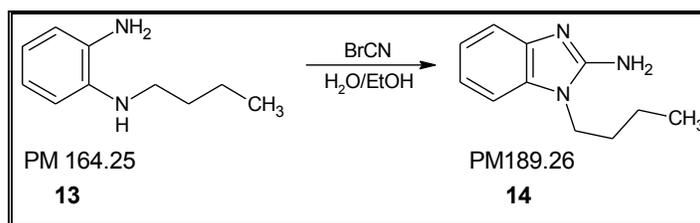
Este producto se obtuvo mediante la metodología **A.4.1**. Se obtuvieron 24.67 g (80.67%) de un líquido anaranjado oscuro, una sola mancha por ccf (Rf 0.39, Sistema VI) y pnb de 268.6-271.2 °C.

A.4.19. *N*-Butilbenceno-1,2-diamina (**13**)



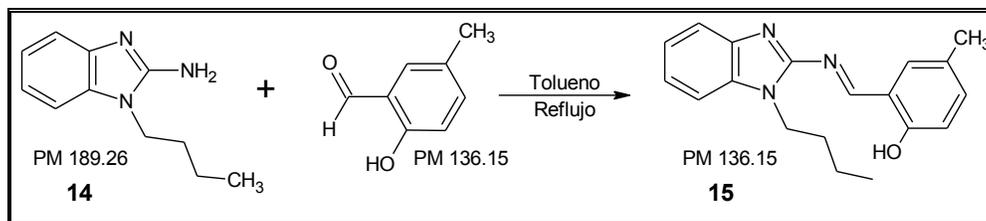
Siguiendo la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso café oscuro con Rf 0.49 (Sistema VI). El producto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.20. 1-Butil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**14**)



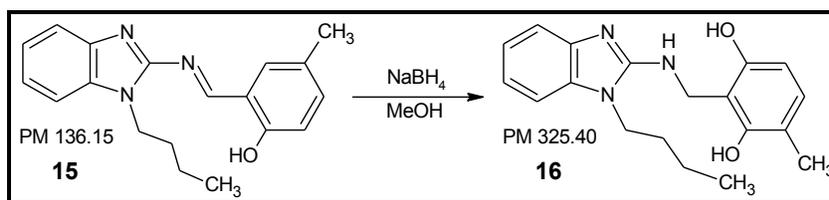
Siguiendo la metodología **A.4.4** se obtuvieron 3.58 g (24.50%) de escamas blancas, una sola mancha por ccf (Rf 0.38, Sistema II) y pf 126.8-127.4 °C.

A.4.21. 2-*{(E)-[(1-Butil-1*H*-bencimidazol-2-il)imino]metil}*-4-metilfenol (**15**)



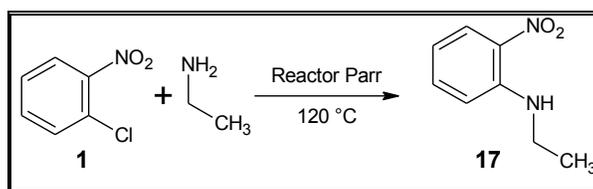
Utilizando la metodología de formación de iminas **A.4.6** se logró obtener un sólido amarillo paja, el cual se recristalizó de éter de petróleo. Se obtuvieron 0.92 g (56.79%) de cristales largos amarillos, una sola mancha por ccf (Rf 0.45, Sistema V) y pf de 101.9-102.9 °C.

A.4.22. 2-*[[1-(1-Butil-1*H*-bencimidazol-2-il)amino]metil}*-4-metilfenol (**16**)



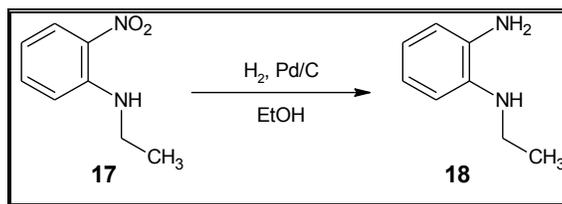
Reduciendo el compuesto **15** según la metodología descrita en **A.4.7** se obtuvieron 0.095 g (19%) de pequeños cristales blancos, una sola mancha por ccf (Rf 0.44, Sistema V) y pf de 181.9-182.9 °C.

A.4.23. *N*-Etil-2-nitroanilina (**17**)



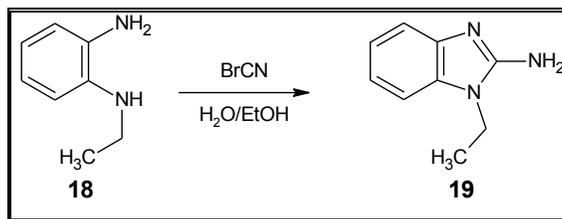
Siguiendo la metodología **A.4.1** se obtuvieron 31.02 g (98.04%) de un líquido color anaranjado oscuro, una sola mancha por ccf (Rf 0.28, Sistema I) y un pnb de 268-275 °C.

A.4.24. *N*-Etilbenceno-1,2-diamina (**18**)



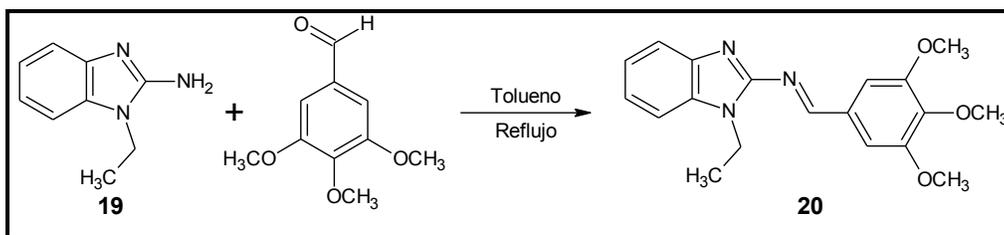
El producto de la reducción del método **A.4.3** resultó ser un líquido viscoso morado oscuro con $R_f = 0.30$ (Sistema II) el cual pesó 8.05 g (98.17%). El compuesto se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.25. 1-Etil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**19**)



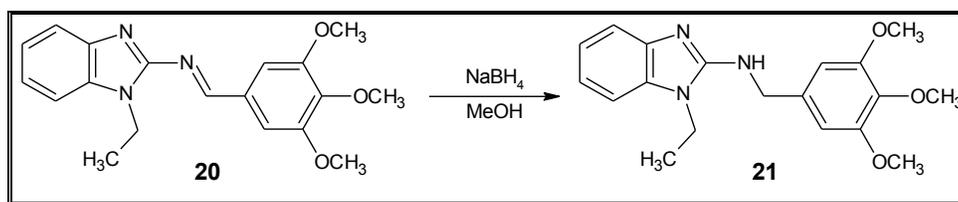
El producto de la ciclación con BrCN con el método **A.4.7** fue de 5.87g (60.45%) de agujas blancas, una sola mancha por ccf (R_f 0.22, Sistema II) y pf de 156.7-158.1°C.

A.4.26. (*E*)-*N*-(1-Etil-1*H*-bencimidazol-2-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)metanimina (**20**)

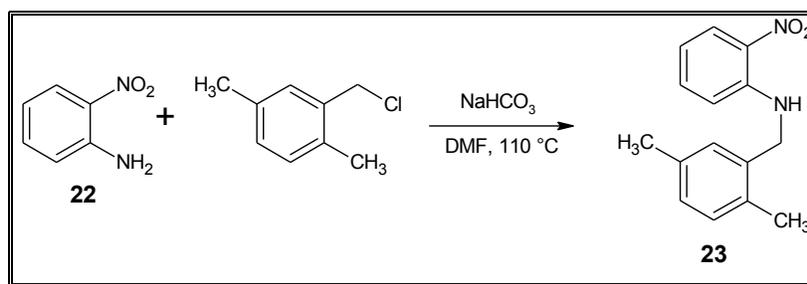


Utilizando la metodología **A.4.6** se obtuvieron 3.79 g (90.02%) de cristales largos amarillos, una sola mancha por ccf (R_f 0.65, Sistema IV) y pf de 105.5-106 °C.

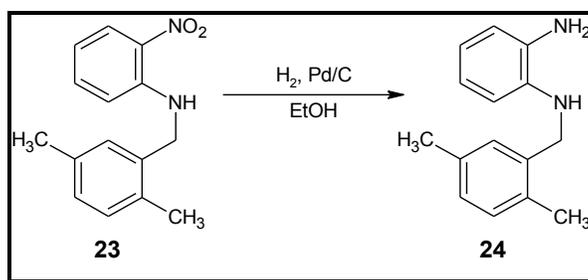
A.4.27. 1-Etil-*N*-(3,4,5-trimetoxibencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**21**)



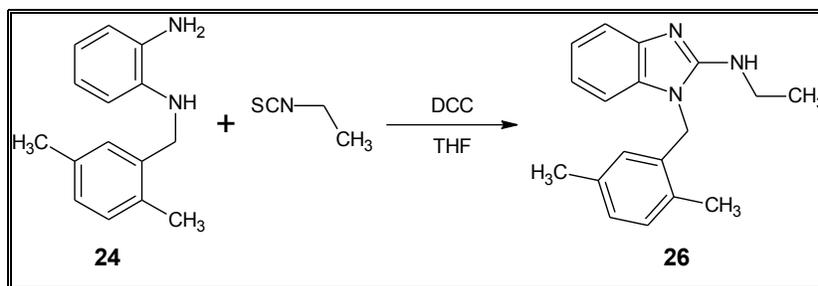
Mediante la reducción de **20** utilizando la metodología **A.4.7** se obtuvieron 2.8 g (73.49%) de pequeños cristales blancos, una sola mancha por ccf (R_f 0.39, Sistema V) y pf de 125.2-126.3 °C.

A.4.28. *N*-(2,5-Dimetilbencil)-2-nitroanilina (**23**)

Seguindo la metodología **A.4.2** se obtuvieron 6.75 g (81.42%) de un sólido anaranjado claro, una sola mancha por ccf (Rf 0.32, Sistema IV) y un pf de 107.7-109 °C.

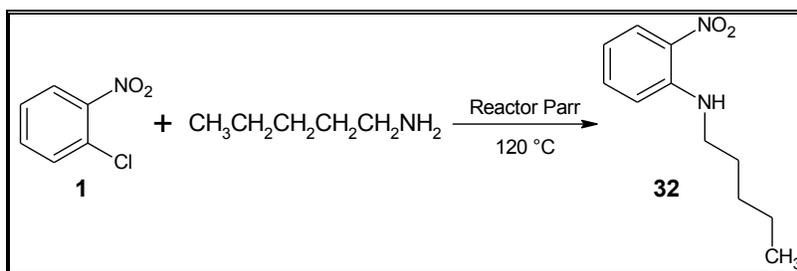
A.4.29. *N*-(2,5-Dimetilbencil)benzeno-1,2-diamina (**24**)

Seguindo la reducción de la metodología **A.4.3** se obtuvieron 4.34 g (98.19%) de un sólido café oscuro, una mancha principal por ccf (Rf 0.17, Sistema VI). El producto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.30. 1-(2,5-Dimetilbenzil)-*N*-etil-1*H*-benzimidazol-2-amina (**26**)

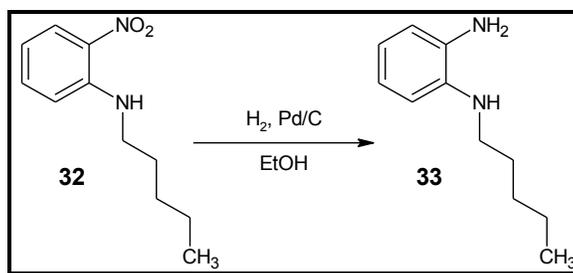
Mediante la metodología **A.4.5**, el sólido obtenido aún presentaba impurezas, por lo que se hizo pasar a través de una columna empacada con gel de sílice, utilizando cloroformo como fase móvil. Se obtuvieron 0.150 g (24.19%) de un sólido fino amarillento, una sola mancha por ccf (Rf = 0.22, Sistema IV) y pf de 166.2-167.4 °C.

A.4.31. 2-Nitro-*N*-pentilanilina (32)



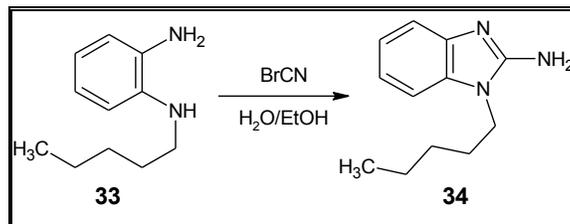
Seguindo la metodología **A.4.1** se obtuvo un líquido naranja claro con un rendimiento del 77.33% (22.75 g), con un $R_f = 0.36$ (VI) y un punto de ebullición de 246.4 – 262.8 °C.

A.4.32. *N*-Pentilbenceno-1,2-diamina (33)



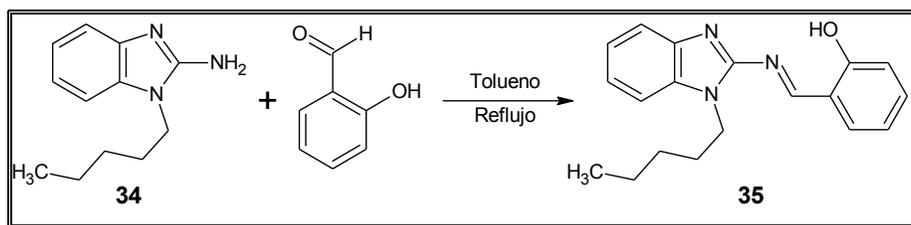
Mediante la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso café oscuro con $R_f = 0.15$ (VI). El producto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.33. 1-Pentil-1*H*-bencimidazol-2-amina (34)



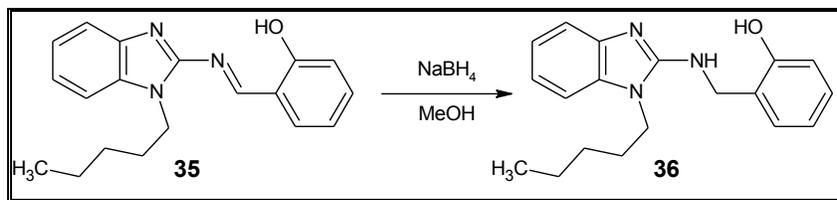
De acuerdo a la metodología descrita en **A.4.4** la ciclación dio como resultado 12.87 g (64.87%) de un sólido blanco en forma de agujas finas largas, una sola mancha por ccf (R_f 0.41, Sistema III) y un pf de 139.5-140.5 °C.

A.4.34. 2-[(*E*)-[(1-Pentil-1*H*-bencimidazol-2-il)imino]metil]fenol (35)



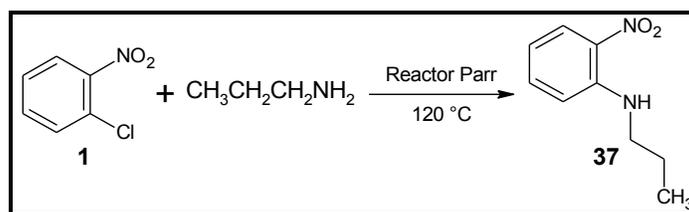
Siguiendo la metodología **A.4.6** se obtuvieron 0.92 g (40.07%) de cristales largos finos amarillos, una mancha por ccf (Rf 0.49, Sistema V) y un pf de 69.8-71.8 °C.

A.4.35. 2-[[1-(1-Butil-1*H*-bencimidazol-2-il)amino]metil]fenol (**36**)



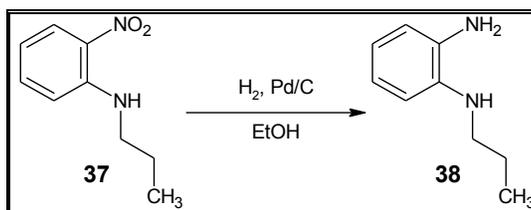
Utilizando la metodología descrita en **A.4.7** se obtuvieron 0.92 g (80.70%) de pequeños cristales amarillo claro, una mancha por ccf (Rf 0.31, Sistema V) y un pf de 169.1-170.3 °C.

A.4.36. *N*-Propil-2-nitroanilina (**37**)



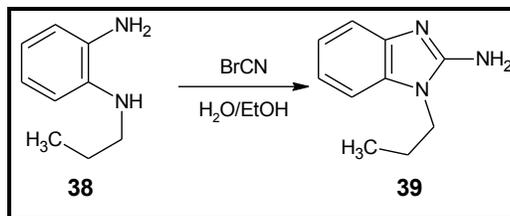
Siguiendo la metodología **A.4.1** se obtuvieron 25.48 g (74.26%) de un líquido anaranjado claro, una mancha por ccf (Rf 0.50) y un peb. de 268.6-271.2 °C.

A.4.37. *N*-Propilbenceno-1,2-diamina (**38**)



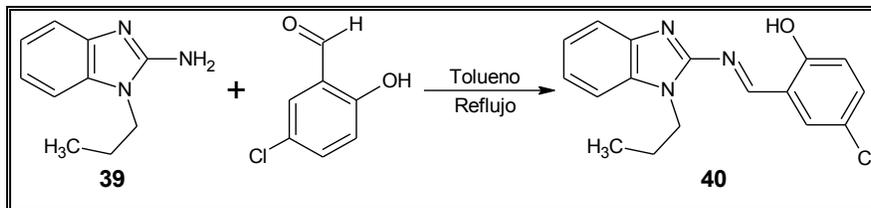
Utilizando la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso café oscuro con Rf = 0.40 (VI). El compuesto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.38. 1-Propil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**39**)



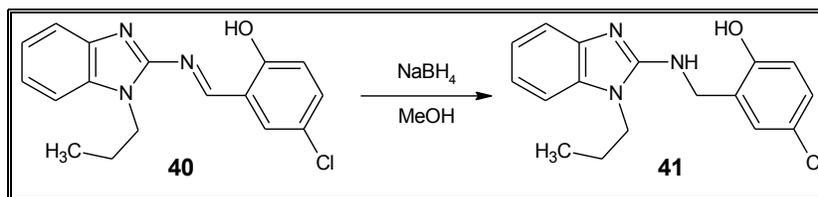
Empleando la técnica **A.4.4** se obtuvieron 7.33 g (37.71%) de un sólido blanco en forma de agujas largas finas y delgadas, una sola mancha por ccf (Rf 0.42, Sistema II) y un pf de 134.6-135.1 °C.

A.4.39. 4-Cloro-2-*[(E)-[(1-propil-1H-benzimidazol-2-il)imino]metil]fenol* (**40**)



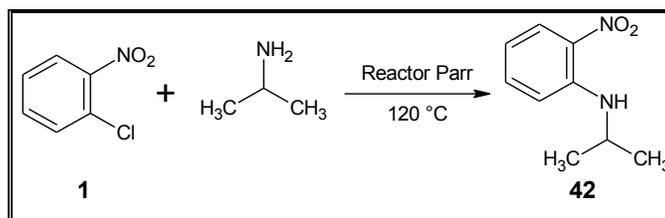
De acuerdo a la técnica descrita en **A.4.6** se obtuvieron 0.92 g (25.70%) de cristales amarillos en forma de agujas, una mancha por ccf (0.39, Sistema V) y un pf de 166.9-167.5 °C.

A.4.40. 4-Cloro-2-*[[[(1-propil-1H-benzimidazol-2-il)amino]metil]fenol* (**41**)



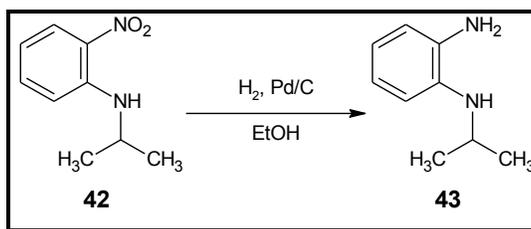
Utilizando la metodología **A.4.7** se obtuvieron 0.118 g (23.60%) de cristales amarillos claros, una mancha por ccf (Rf 0.43, Sistema V) y un pf de 187.9-188.3 °C.

A.4.41. *N*-Isopropil-2-nitroanilina (**42**)



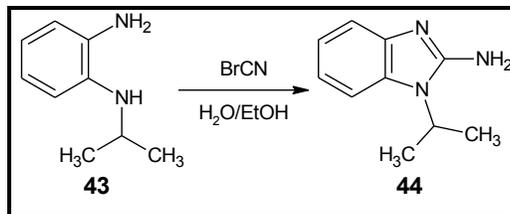
Empleando la metodología descrita en **A.4.3** se obtuvieron 28.66 g (83.53%) de un líquido anaranjado claro, una mancha por ccf (Rf 0.43, Sistema VI) y un punto de ebullición de 271.8-280.3 °C.

A.4.42. *N*-Isopropilbenceno-1,2-diamina (**43**)



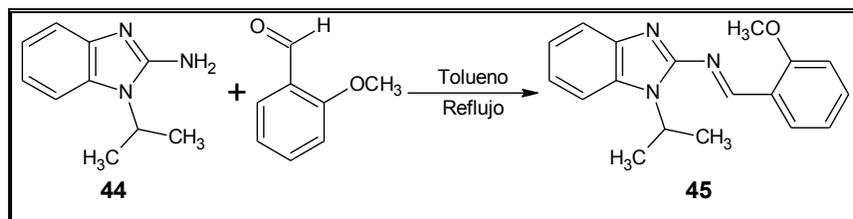
Utilizando la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso morado con Rf 0.36 (VI). El compuesto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.43. 1-Isopropil-1*H*-bencimidazol-2-amina (**44**)



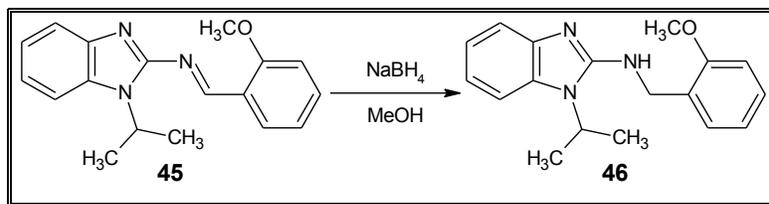
Empleando la metodología descrita en **A.4.4** se obtuvieron 4.35 g (15.81%) de un sólido blanco en forma de agujas largas finas y delgadas, una sola mancha por ccf (Rf 0.58, Sistema II) y un pf de 198.3-198.9 °C.

A.4.44. (*E*)-*N*-(1-Isopropil-1*H*-bencimidazol-2-il)-1-(2-metoxifenil)metanimina (**45**)



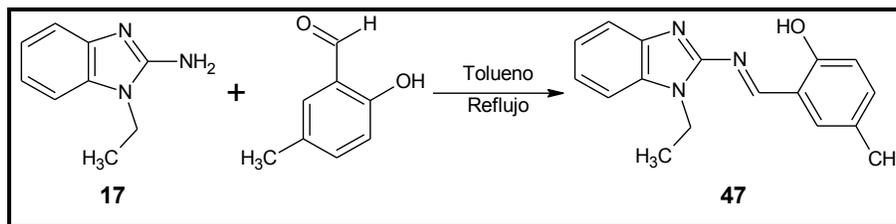
Utilizando la metodología **A.4.3** se obtuvo un líquido viscoso verde oscuro con un Rf 0.49 (Sistema V), el cual se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

A.4.45. 1-Isopropil-*N*-(2-metoxibencil)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**46**)



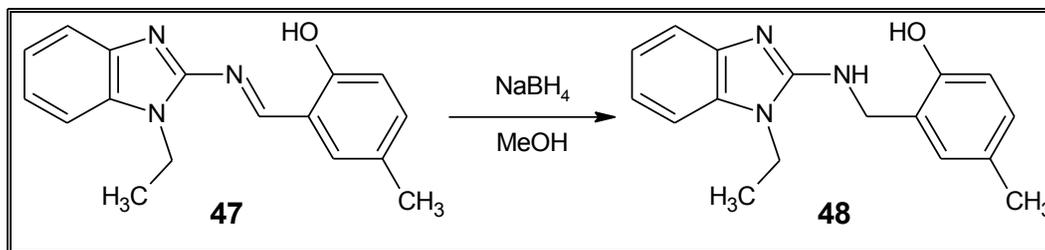
Siguiendo la metodología descrita en **A.4.7** se obtuvieron 0.79 g (48.47%) de cristales amarillos claros, una mancha por ccf (Rf 0.17, Sistema V) y un pf de 187.7-188.9 °C.

A.4.46. 2-{{(*E*)-[(1-Etil-1*H*-bencimidazol-2-il)imino]metil}-4-metilfenol (**47**)



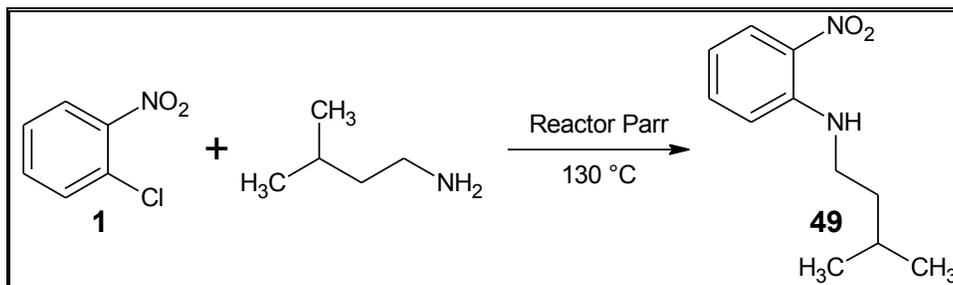
Utilizando la metodología **A.4.6** se obtuvieron 1.83 g (89.71%) de cristales amarillos, una mancha por ccf (Rf 0.37, Sistema V) y un pf de 174.5-175.2 °C.

A.4.47. 2-[[[(1-Etil-1*H*-bencimidazol-2-il)amino]metil]-4-metilfenol (**48**)



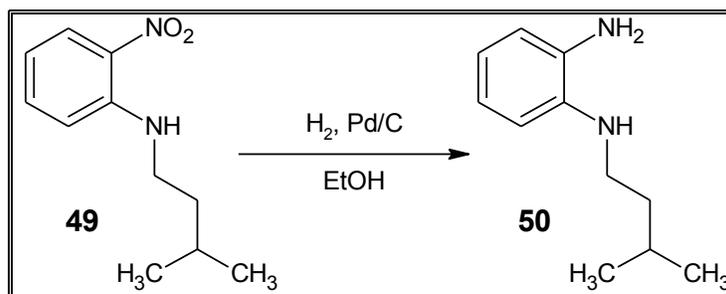
Empleando la metodología **A.4.7** se obtuvieron 0.33 g (66.0%) de cristales nacarados, una mancha por ccf (Rf 0.31, Sistema V) y un pf de 198.6-199.8 °C.

A.4.48. *N*-Isoamil-2-nitroanilina (**49**)

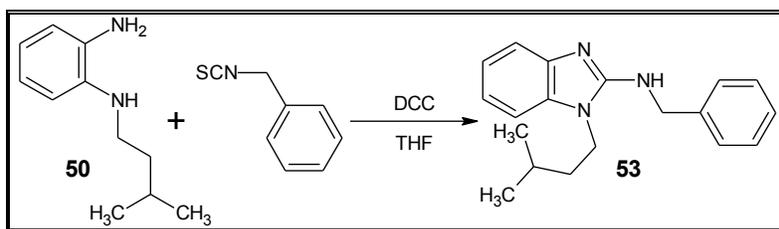


Empleando el método descrito en **A.4.3** se obtuvieron 29.38 g (92.86%) de un líquido anaranjado, una mancha por ccf (Rf 0.37, Sistema VI) y un peb de 255.4-270.7 °C.

A.4.49. *N*-Isoamilbenceno-1,2-diamina (**50**)

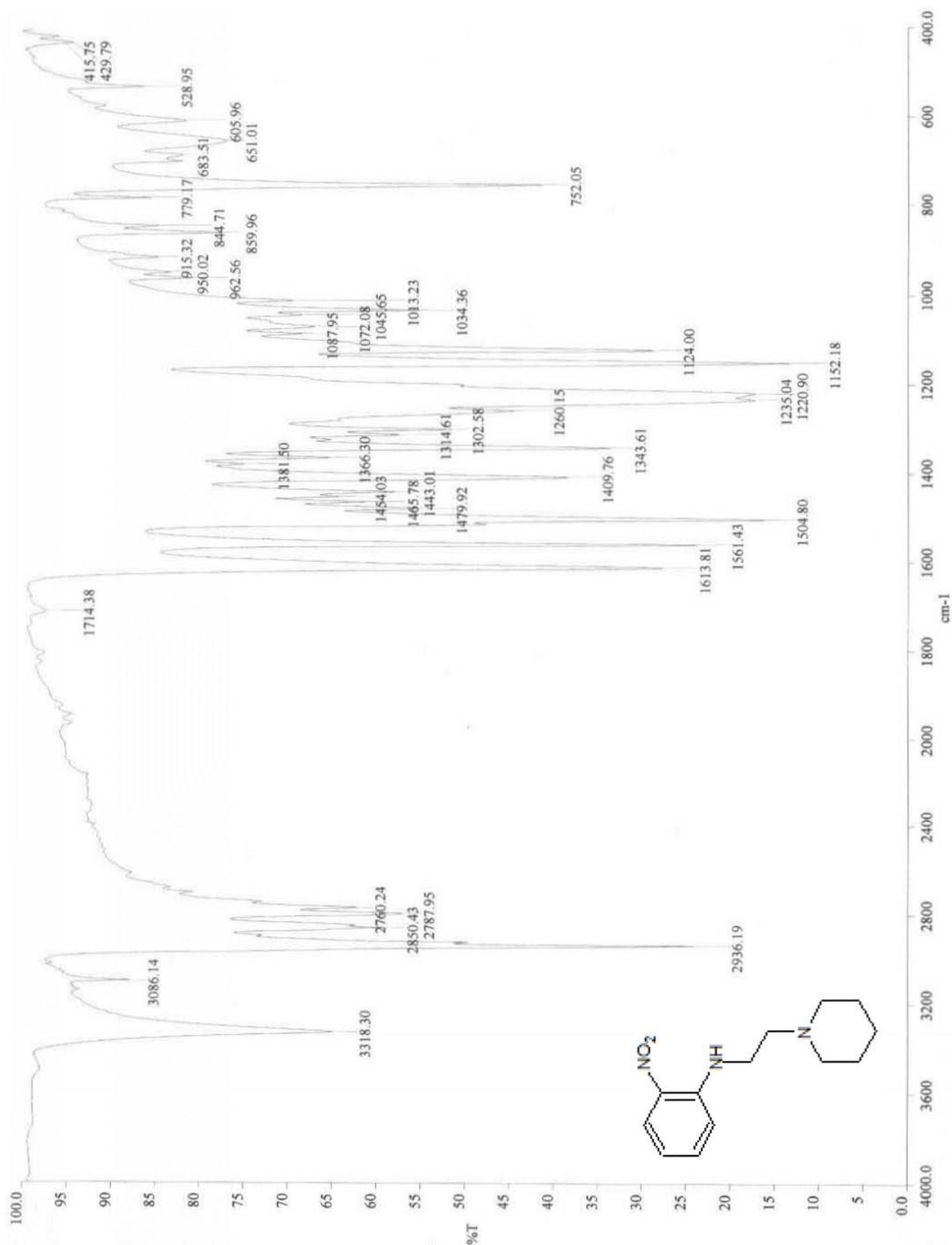


Este compuesto se obtuvo empleando la metodología **A.4.3**. Se obtuvo un líquido viscoso café oscuro con Rf 0.16 (Sistema VI). El producto crudo se sometió inmediatamente a la siguiente reacción.

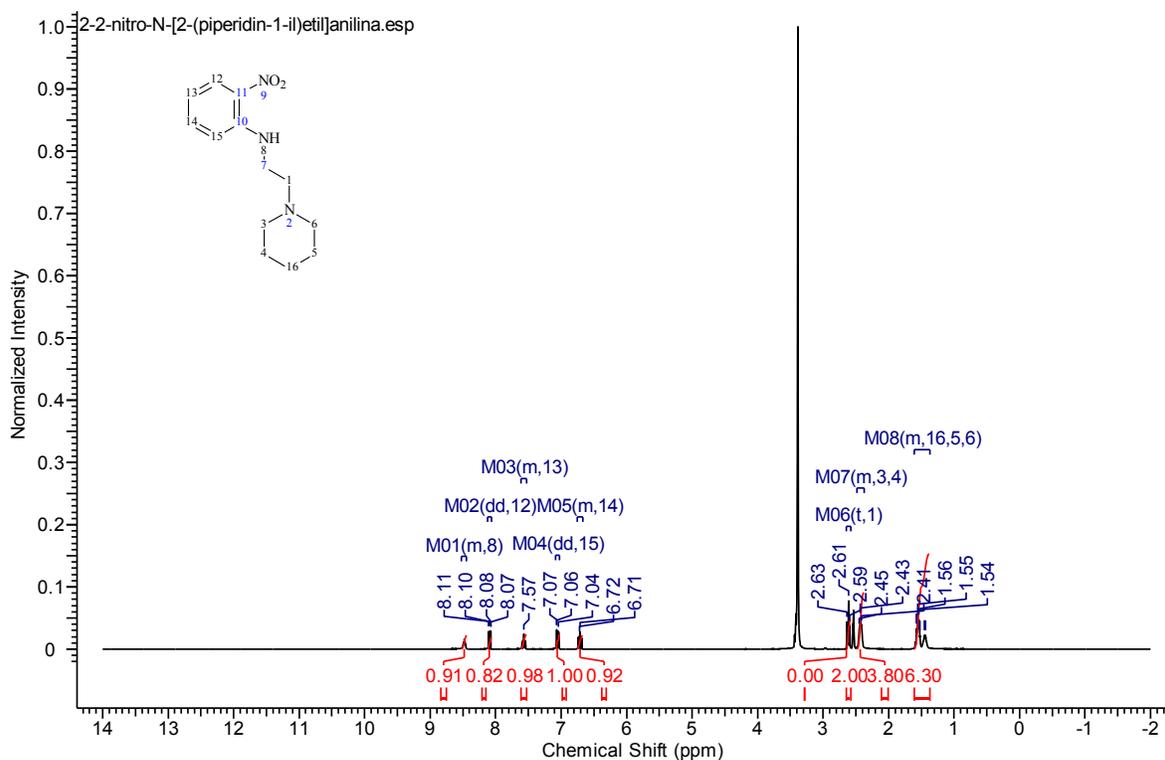
A.4.50. *N*-Bencil-1-(isoamil)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**53**)

Utilizando la metodología **A.4.5** se obtuvo un sólido café claro que se recristalizó con tolueno, sin embargo, aún mostraba impurezas. El sólido se hizo pasar a través de una columna empacada con gel de sílice utilizando cloroformo como fase móvil. Se obtuvieron 1.096 g (13.32%) de un sólido blanco, una sola mancha por ccf (R_f 0.32, Sistema IV) y un pf de 147-149 °C.

APÉNDICE B. ESPECTROS



Espectro 1, IR: 2-Nitro-N-[2-(piperidin-1-yl)etil]anilina (2)



Espectro 2, RMN ¹H: 2-Nitro-N-[2-(piperidin-1-il)etil]anilina (2)

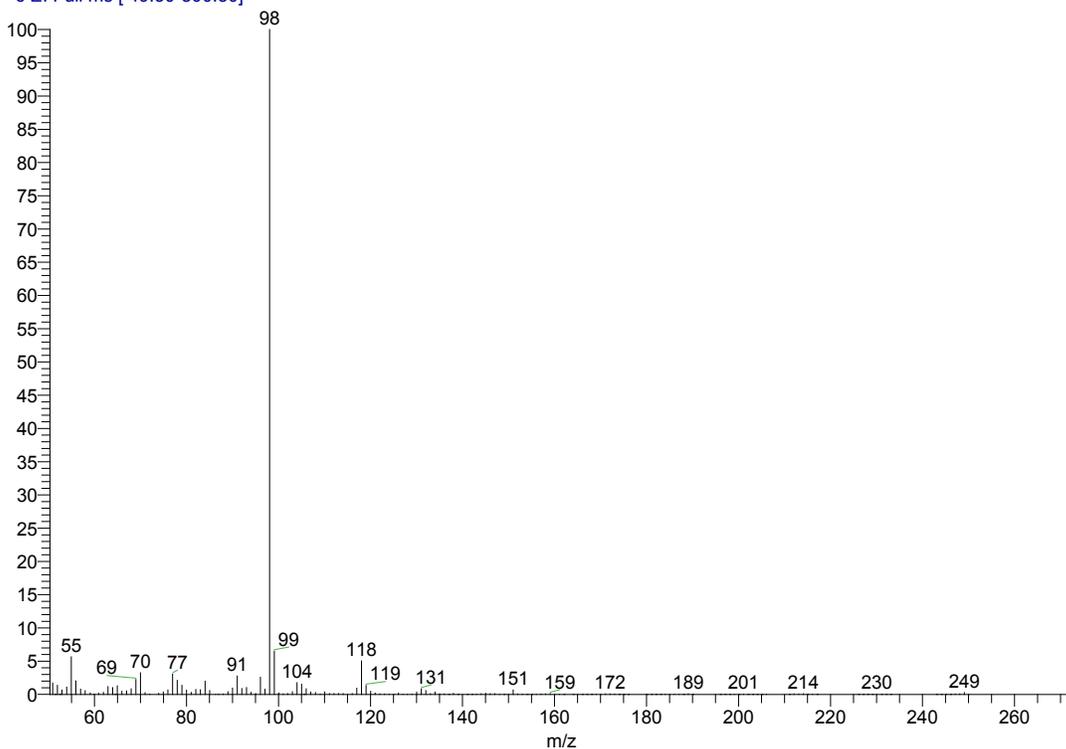
D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT4249_1

6/2/2010 7:34:07 PM

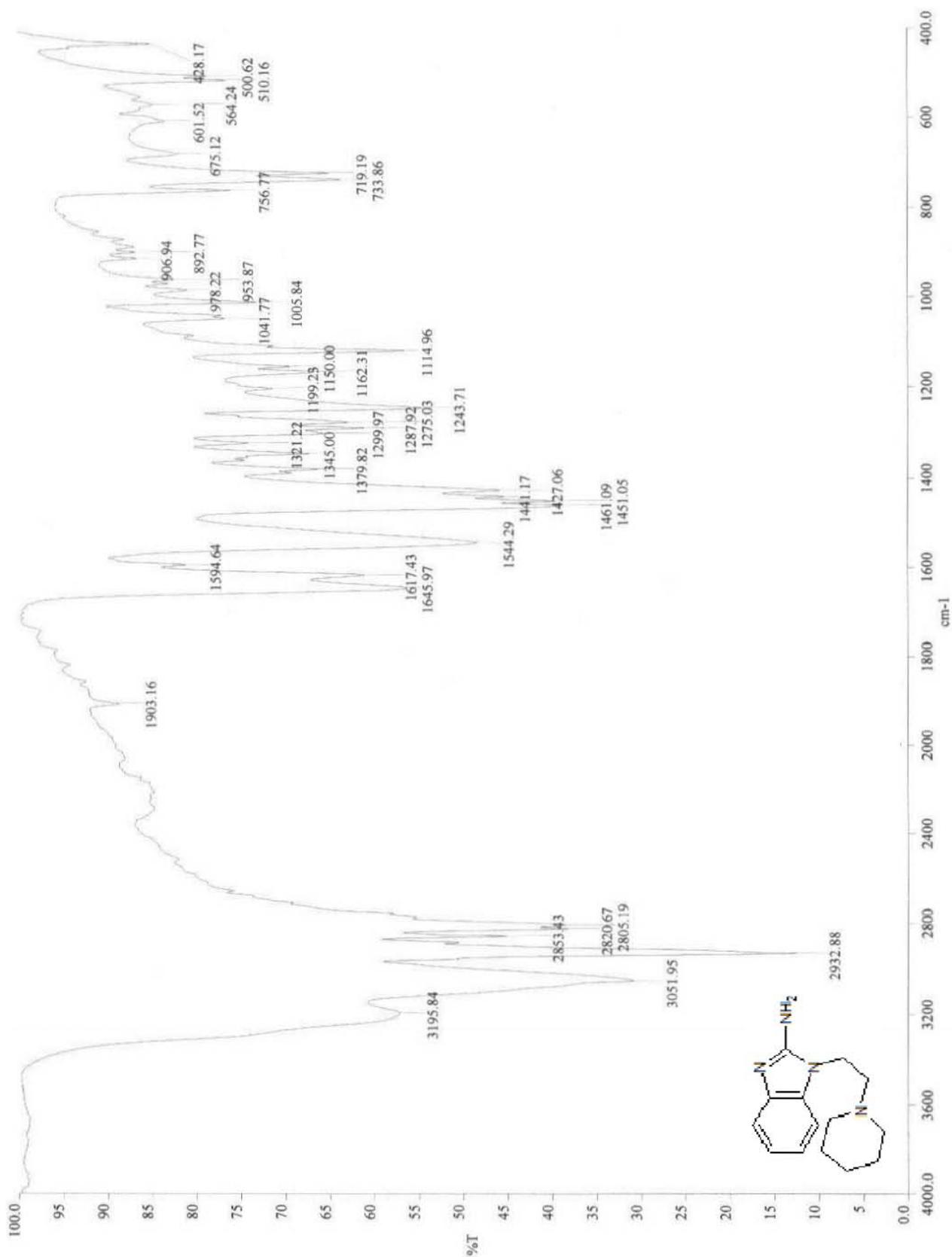
PK-0302

OT4249_1 #4 RT: 0.62 AV: 1 SB: 9 2.67-4.30 NL: 2.30

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 3, EM: 2-Nitro-N-[2-(piperidin-1-il)etil]anilina (2)



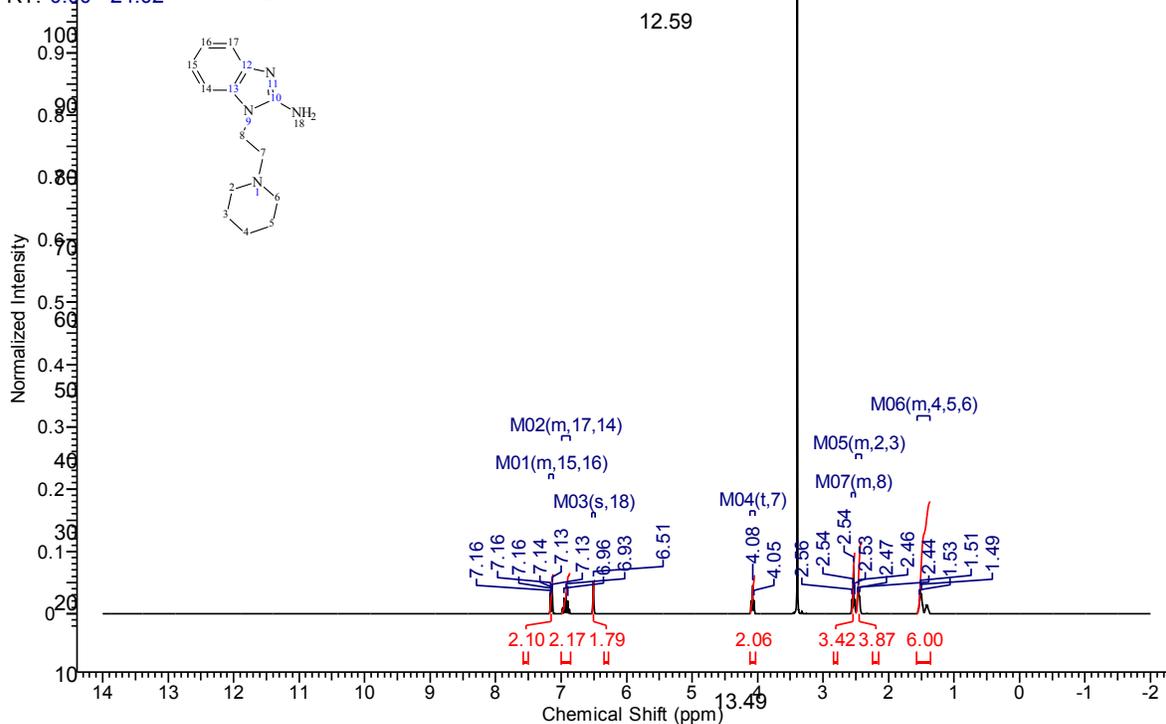
Espectro 4, IR: 1-[2-(Piperidin-1-yl)etil]-1H-benzimidazol-2-amina (4)

D:\Xcalibur\data\USA\ICG\OT5916_2

5/3/2011 2:03:18 PM

AN-0204

RT: 12.57 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-1H-benzimidazol-2-amina.esp

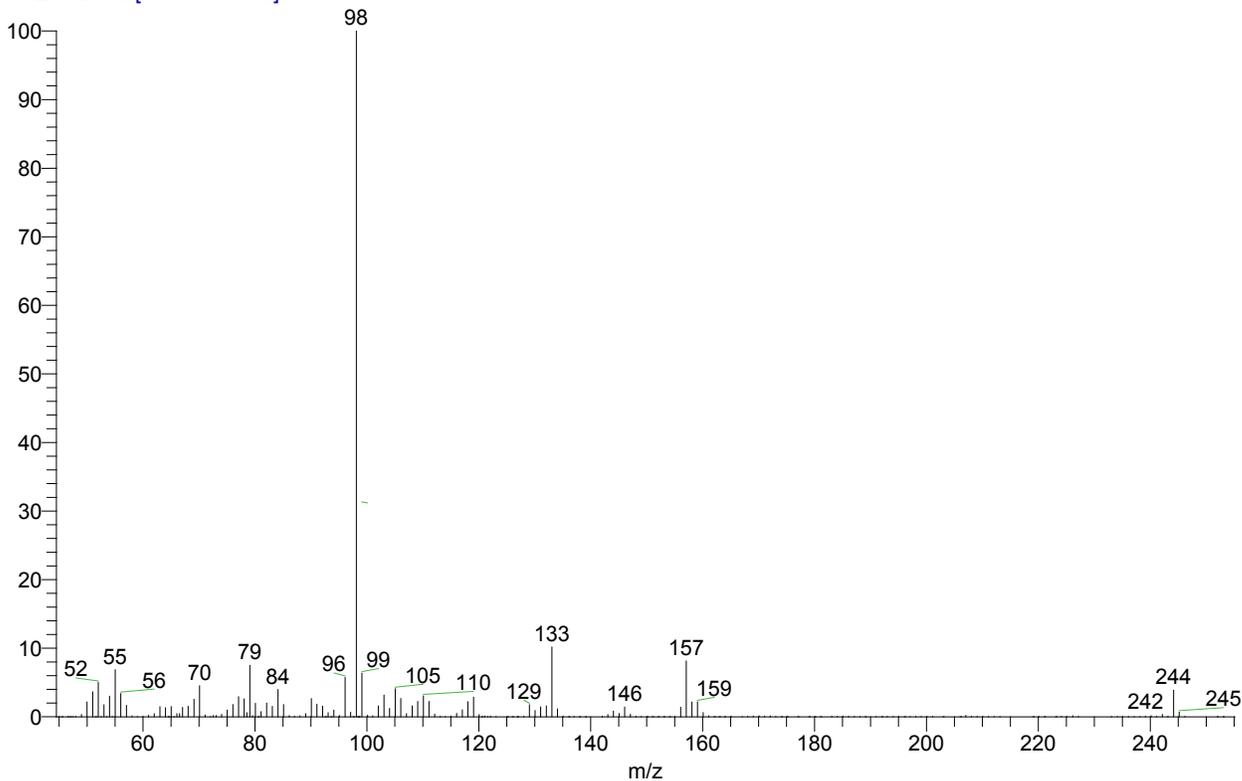


NL:
8.38E7
TIC MS
OT5916_2

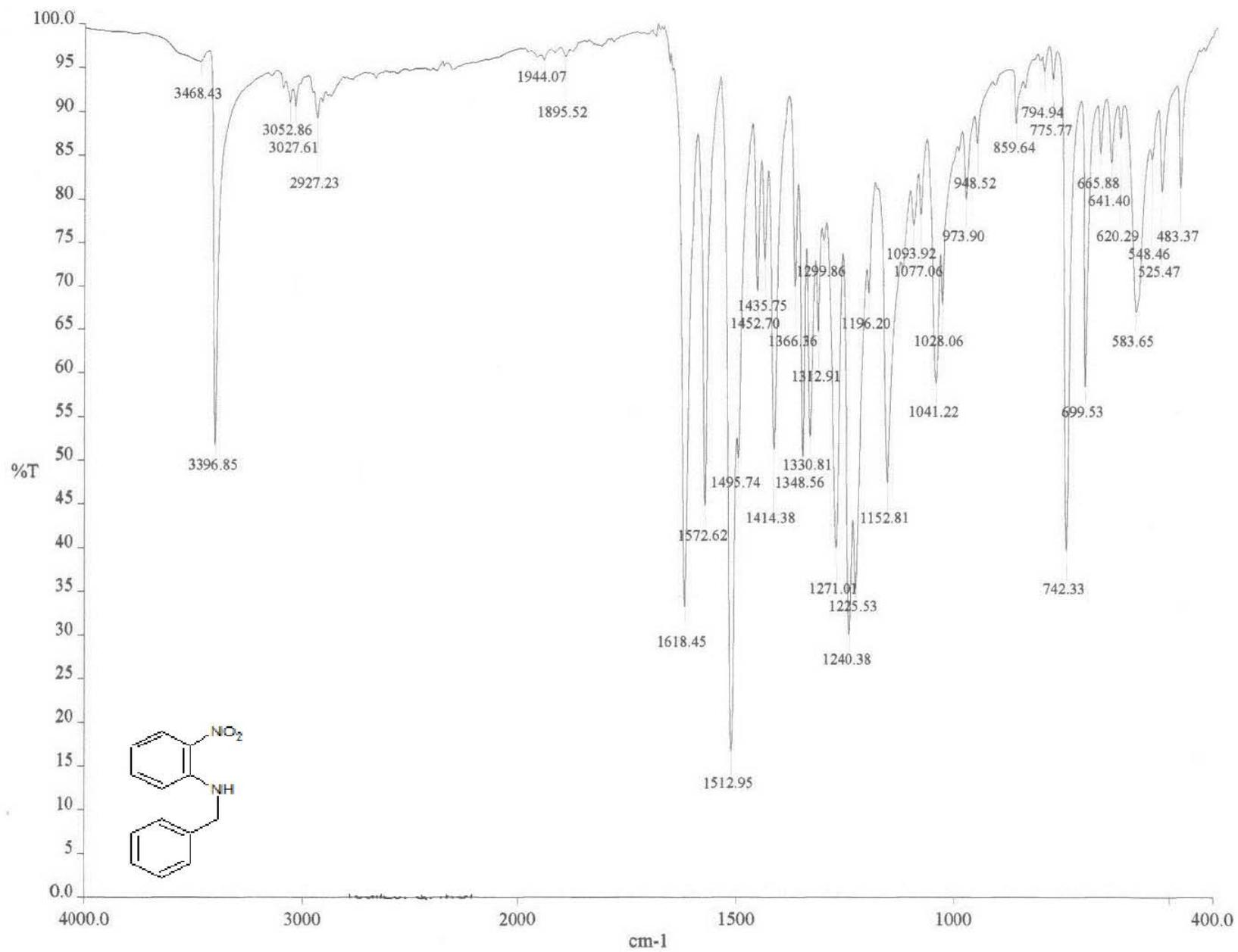
Espectro 5, RMN¹H: 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-1H-benzimidazol-2-amina (4) 22 24
Time (min)

OT5916_2 #598 RT: 12.57 AV: 1 NL: 3.00E7

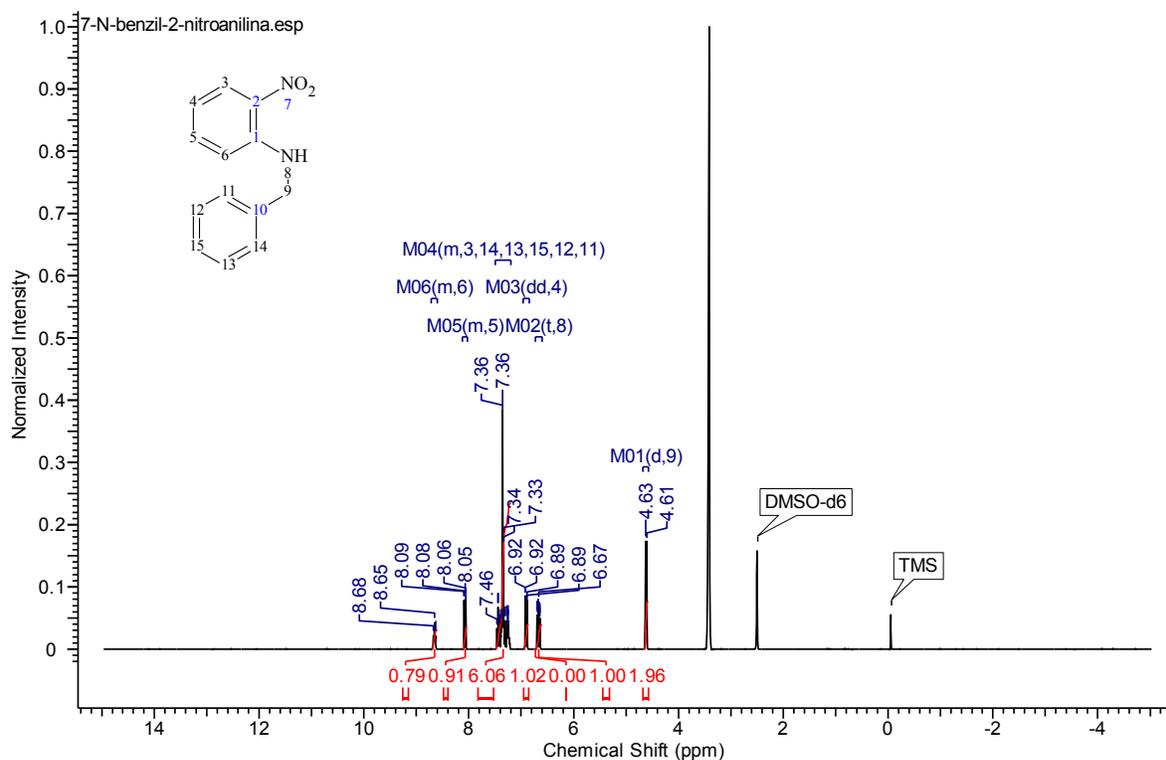
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]



Espectro 6, EM: 1-[2-(Piperidin-1-il)etil]-1H-benzimidazol-2-amina (4)

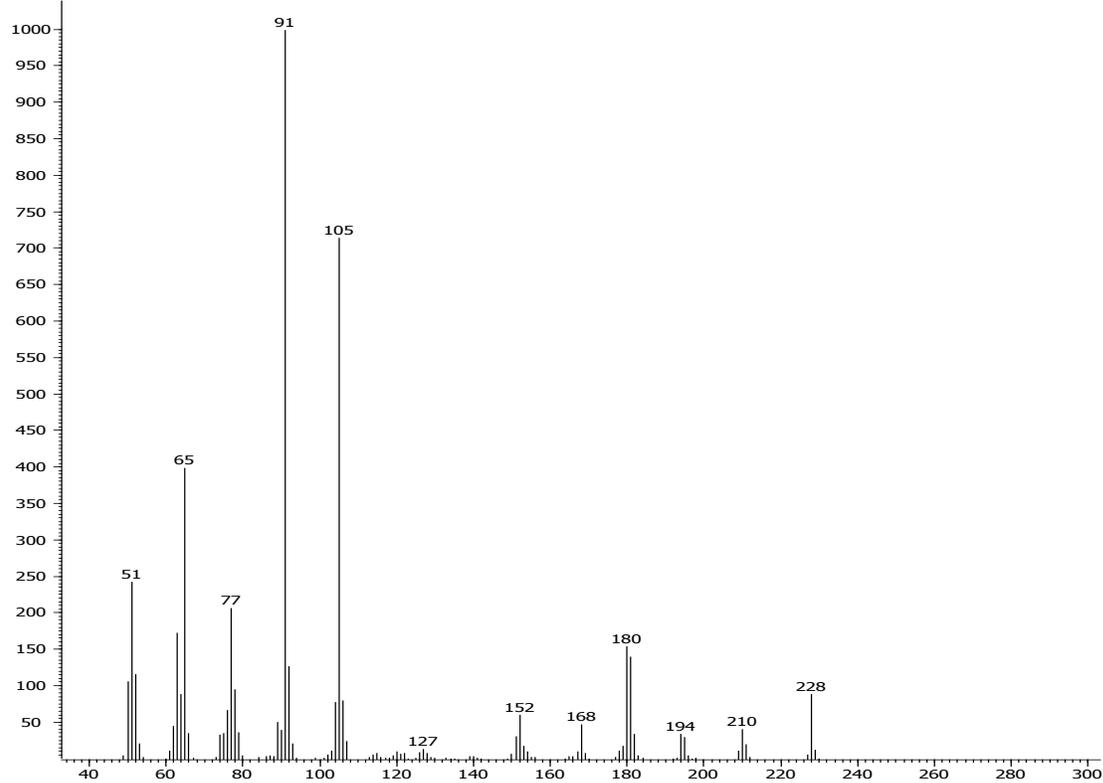


Espectro 10, IR: N-Bencil-2-nitroanilina (7)

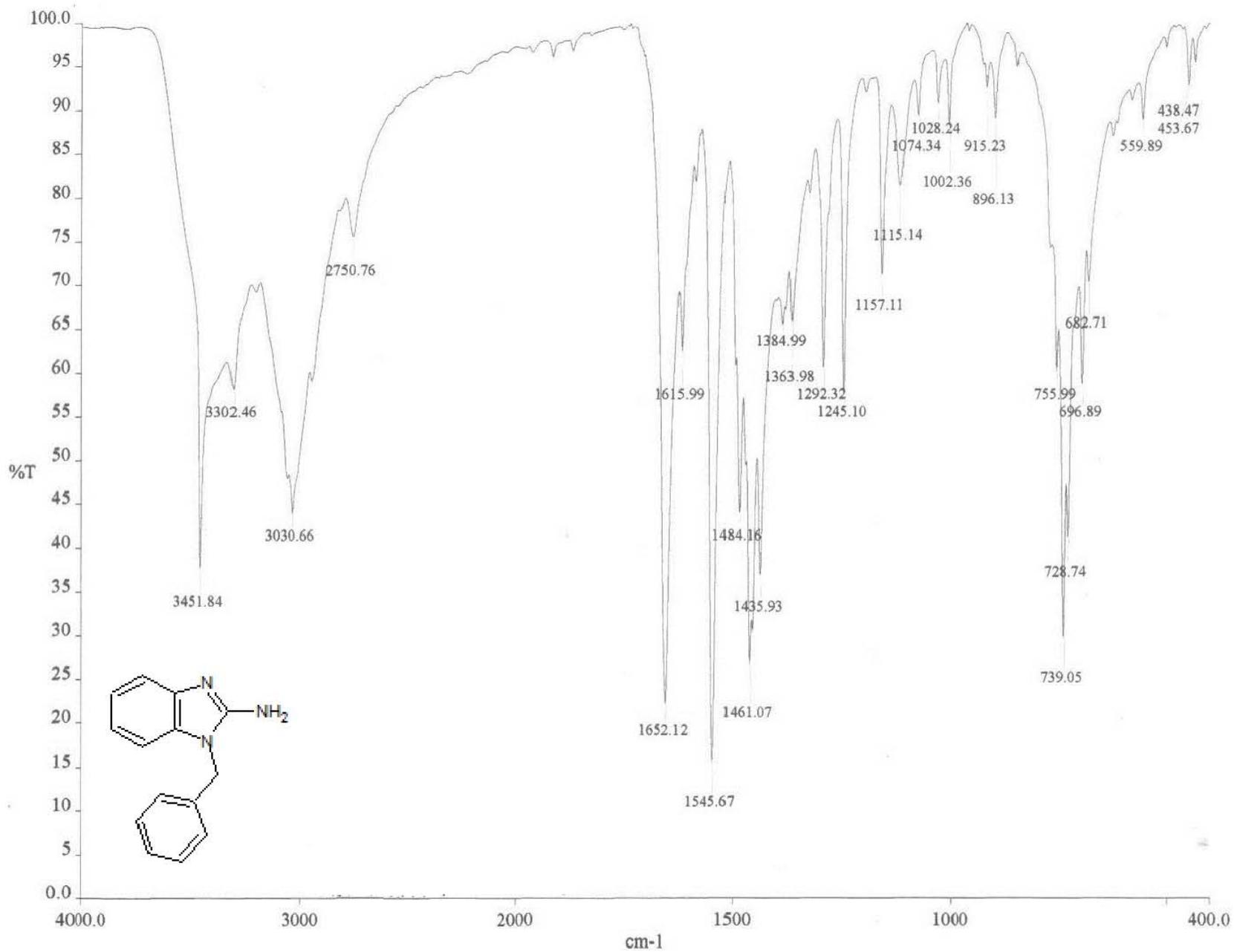


Espectro 11, RMN ¹H: N-Bencil-2-nitroanilina (7)

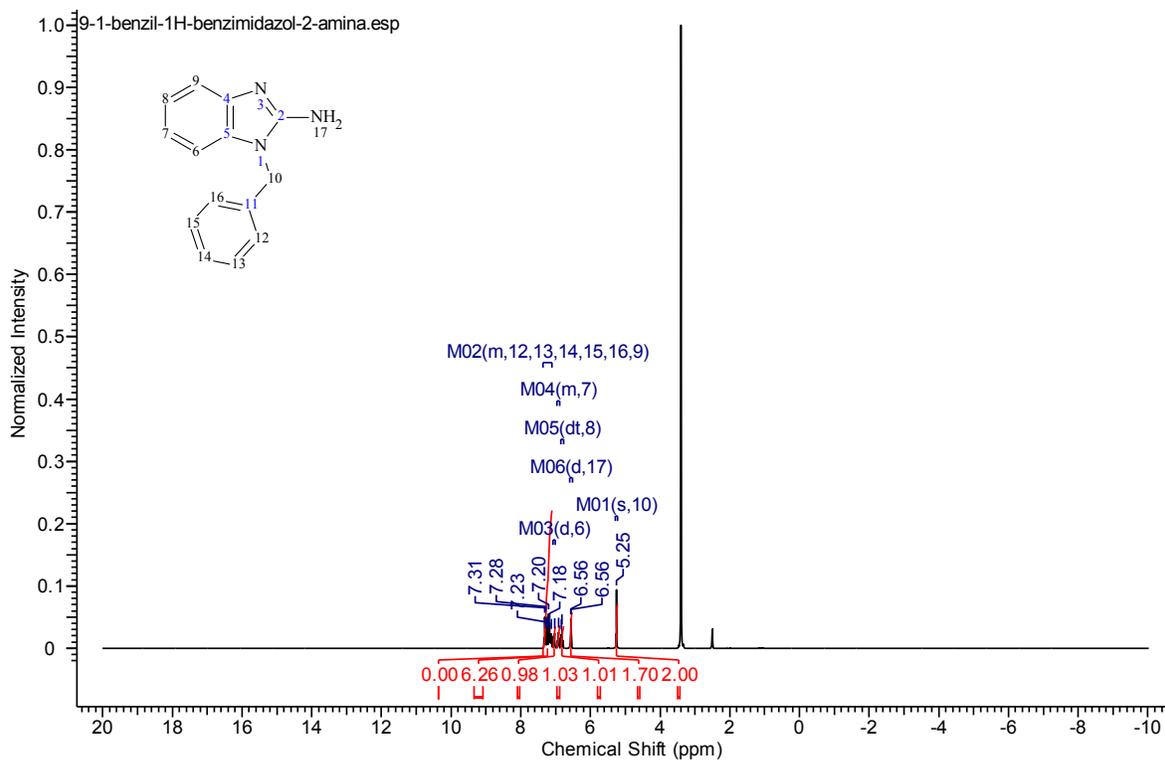
Peak True - sample "OT9488-EN-07:1", peak 1, at 351.612 s



Espectro 12, EM: N-Bencil-2-nitroanilina (7)



Espectro 13, IR: 1-Bencil-1H-benzimidazol-2-amina (9)



Espectro 14, RMN ¹H: 1-Bencil-1H-bencimidazol-2-amina (9)

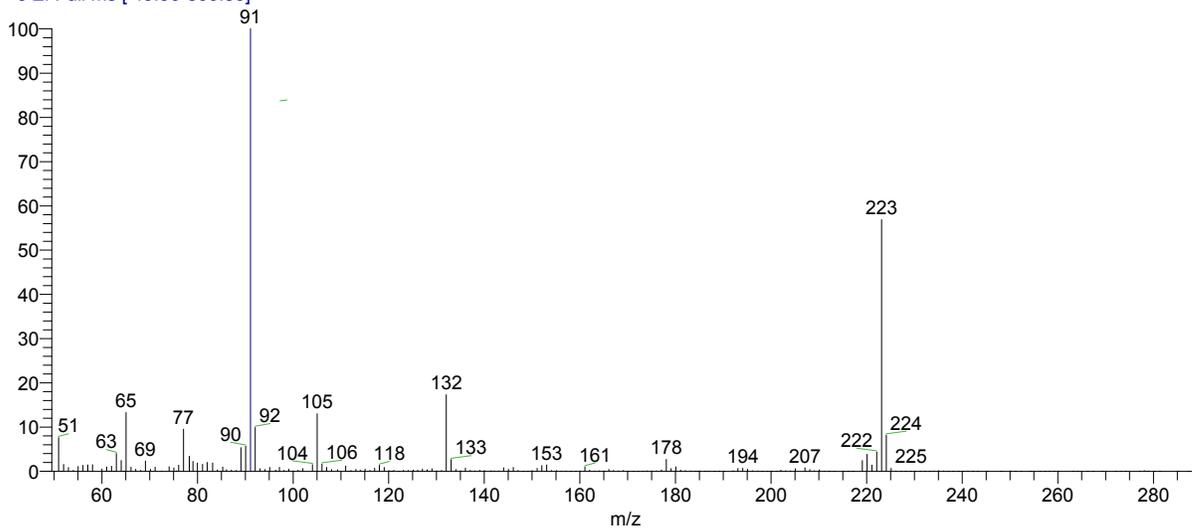
D:\Xcalibur\data\USA\INDOT3271_1

10/16/2009 8:26:57 PM

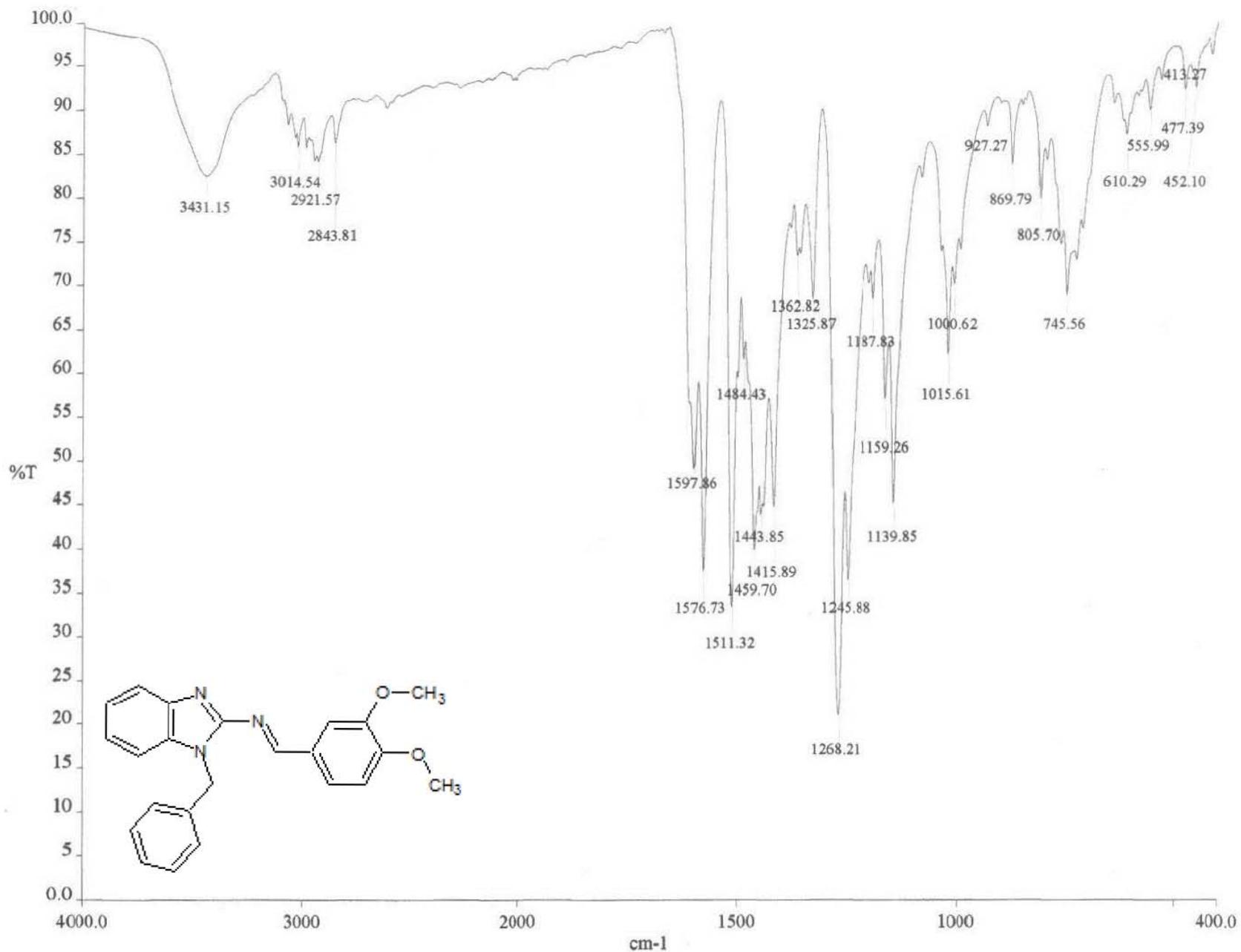
P-0204

OT3271_1 #8 RT: 1.44 AV: 1 SB: 4 2.26-2

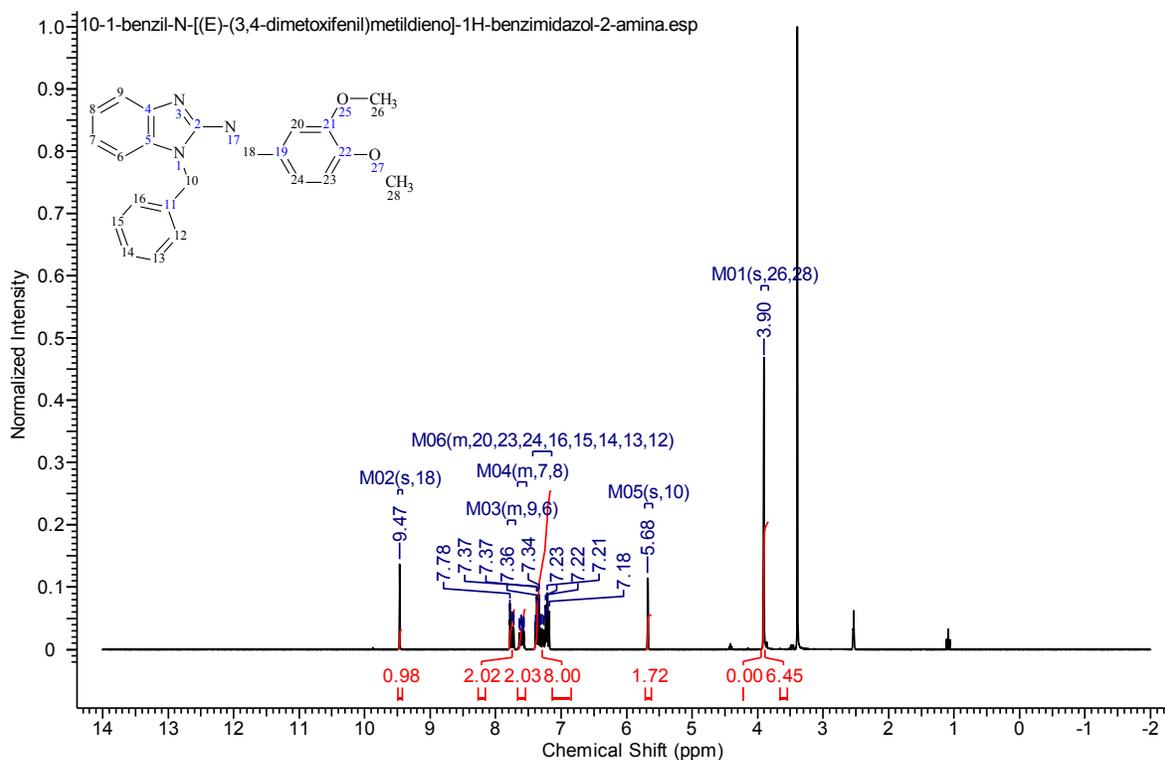
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 15, EM: 1-Bencil-1H-bencimidazol-2-amina (9)



Espectro 16, IR: 1-Bencil-N-[(E)-(3,4-dimetoxifenil)metildieno]-1H-bencimidazol-2-amina (**10**)



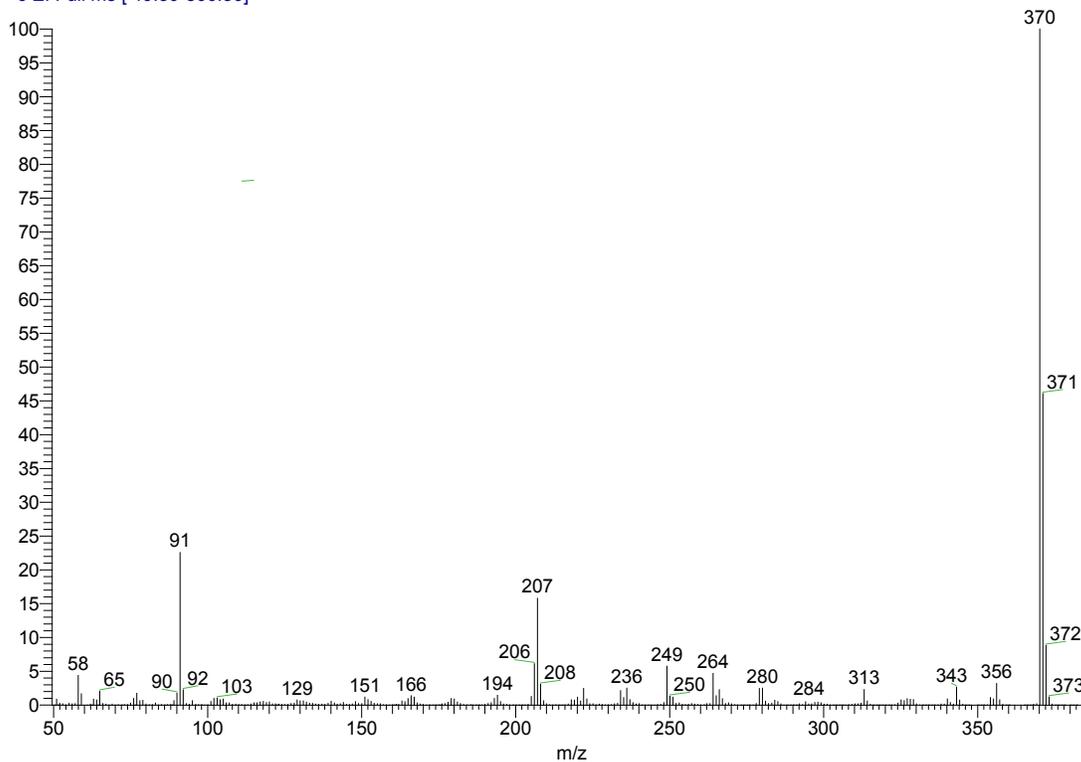
Espectro 17, RMN ¹H: 1-Bencil-N-[(E)-(3,4-dimetoxifenil)metildieno]-1H-benzimidazol-2-amina (10)

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT3572_1

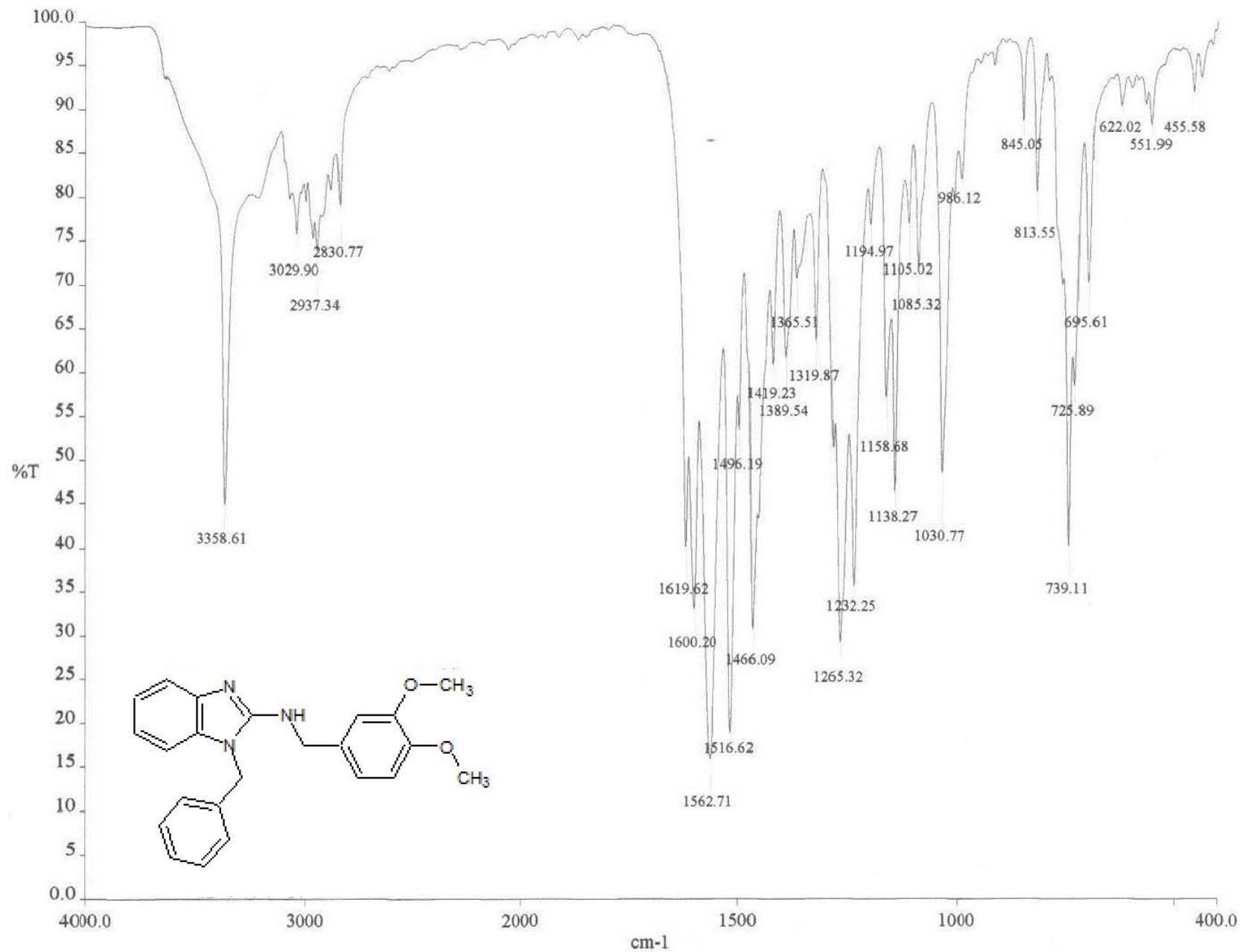
1/12/2010 3:32:24 PM

PK-0205

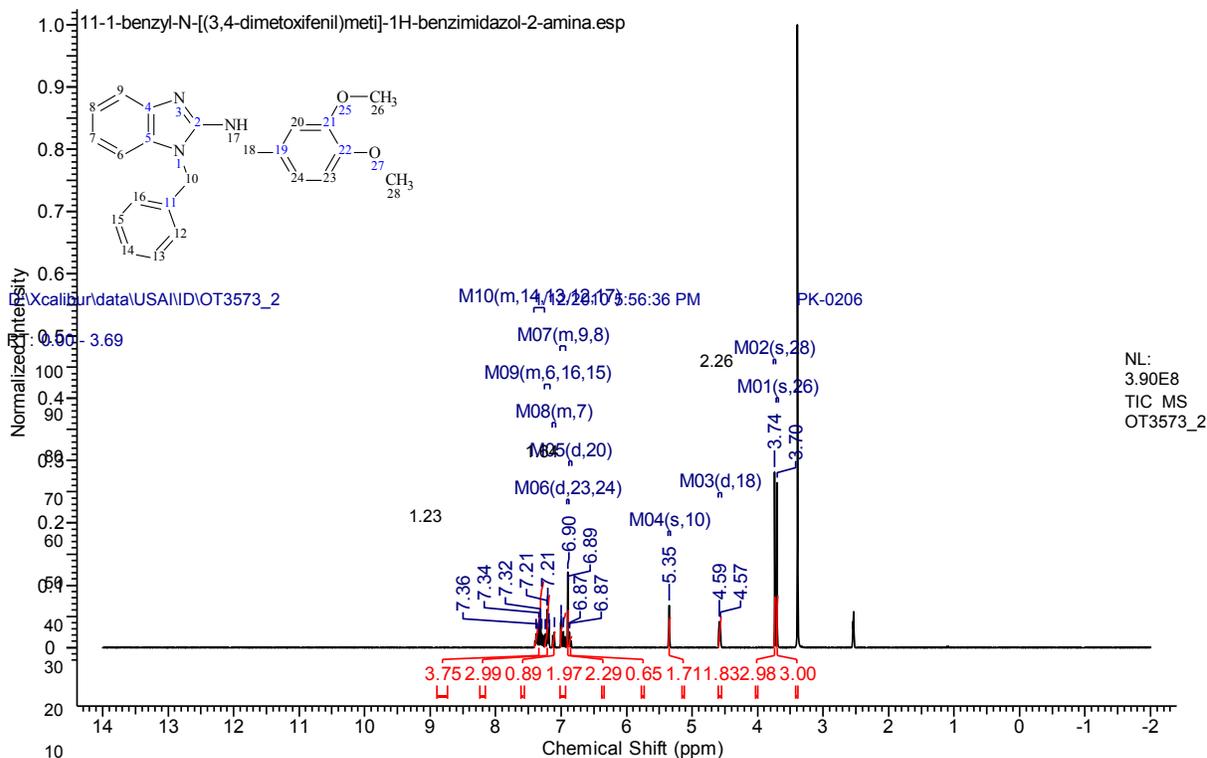
OT3572_1 #3-6 RT: 0.41-1.03 AV: 4 SB: 5 3.08-3.90 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 18, EM: 1-Bencil-N-[(E)-(3,4-dimetoxifenil)metildieno]-1H-benzimidazol-2-amina (10)

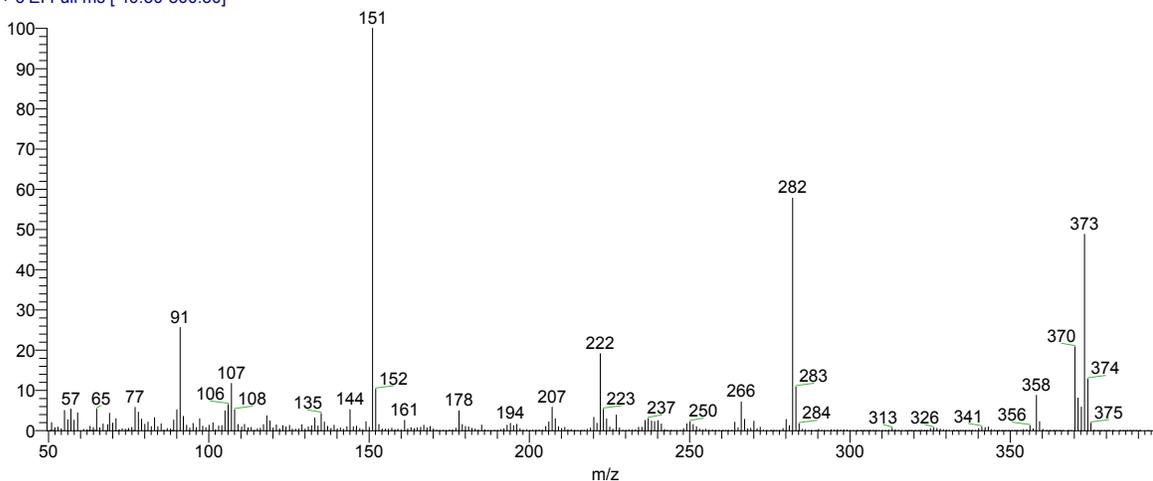


Espectro 19, IR: 11-Bencil-N-(3,4-dimetoxibencil)-1H-benzimidazol-2-amina (11)



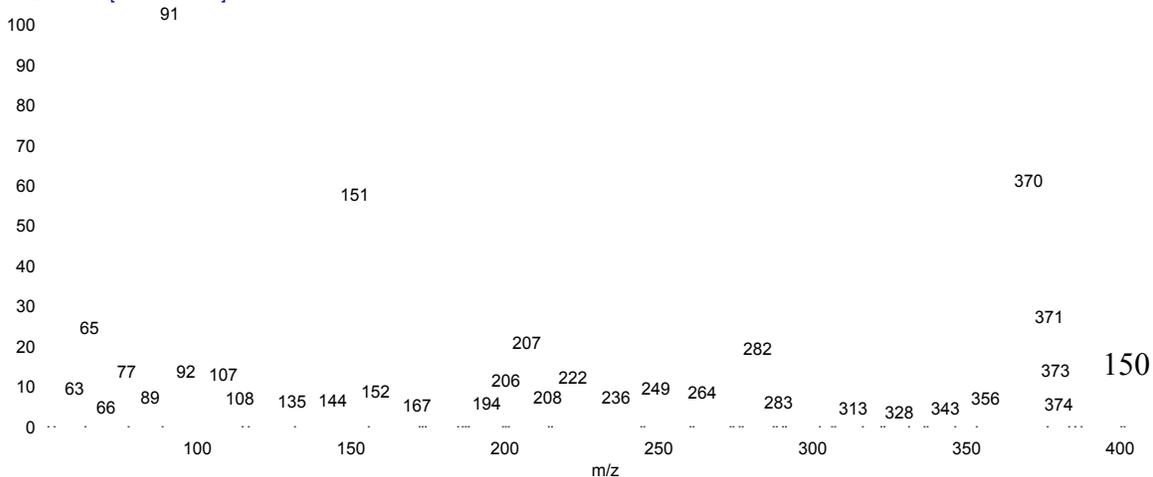
Espectro 20, RMN ¹H; 1-Bencil-N[(3,4-dimetoxibencil)-1H-benzimidazol-2-amina (11)

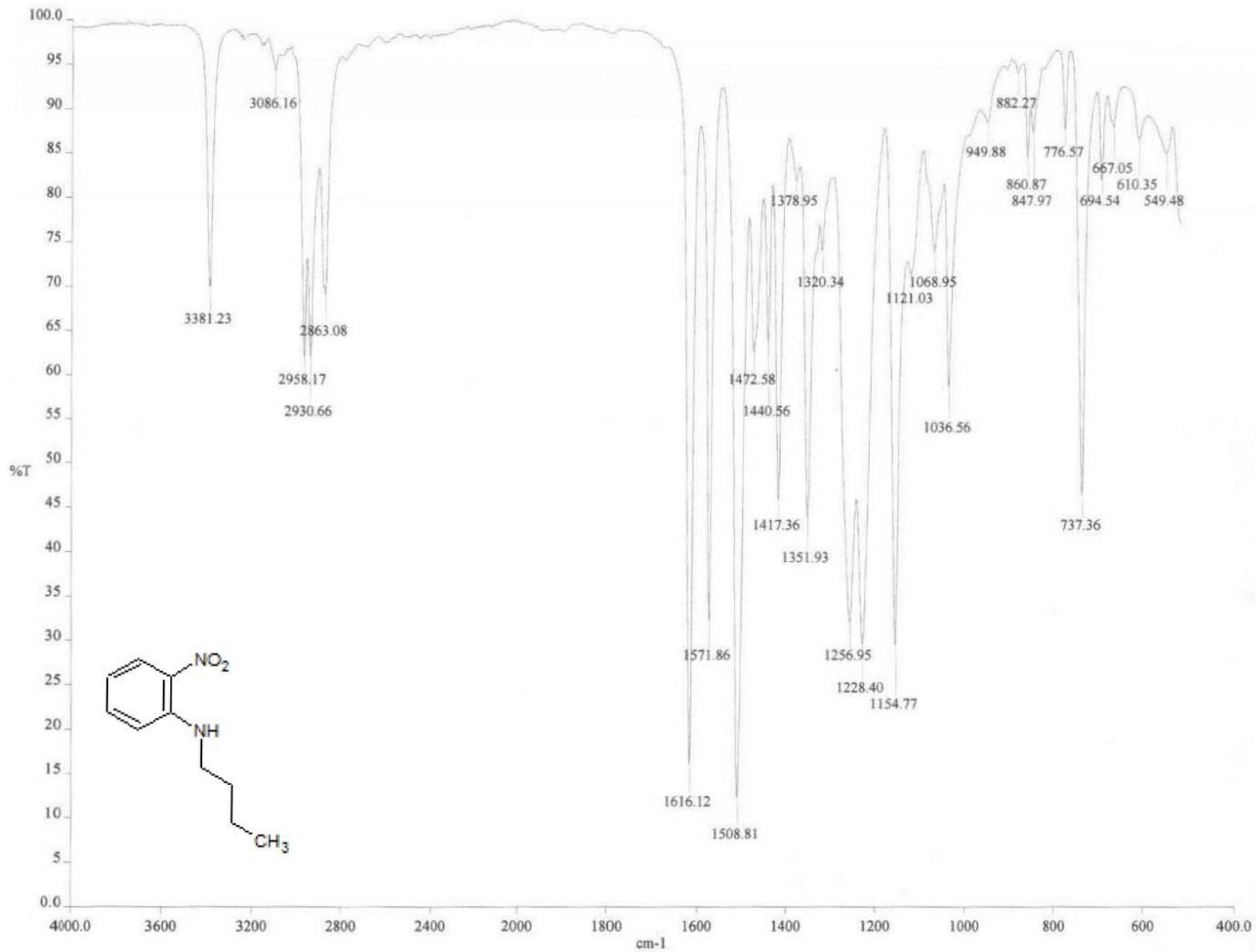
OT3573_2 #4-5 RT: 0.62-0.82 AV: 2 SB: 3 3.08-3.49 NL: 6.61E6
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

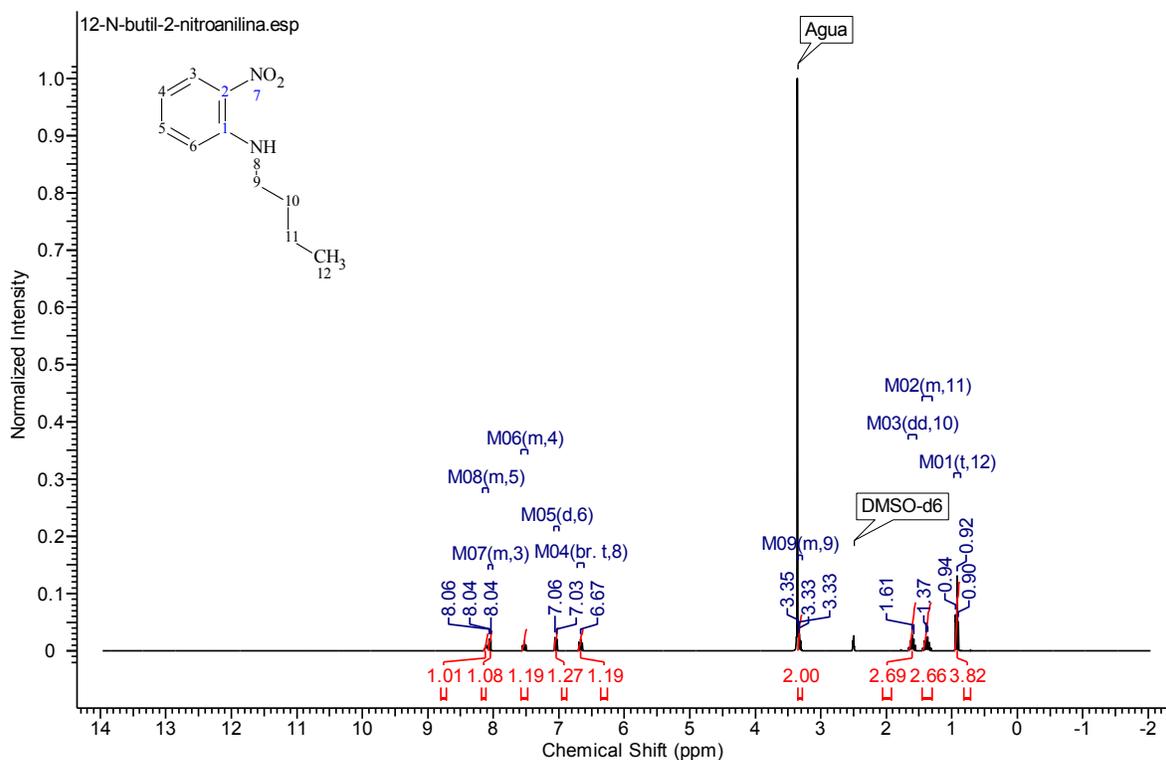


Espectro 21, EM: 1-Bencil-N[(3,4-dimetoxibencil)-1H-benzimidazol-2-amina (11)

OT3573_2 #1 RT: 0.62-0.82 AV: 2 SB: 3 3.08-3.49 NL: 6.61E6
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 22, IR (cm⁻¹): N-Butil-2-nitroanilina (12)



Espectro 23, RMN ¹H: N-Butil-2-nitroanilina (12)

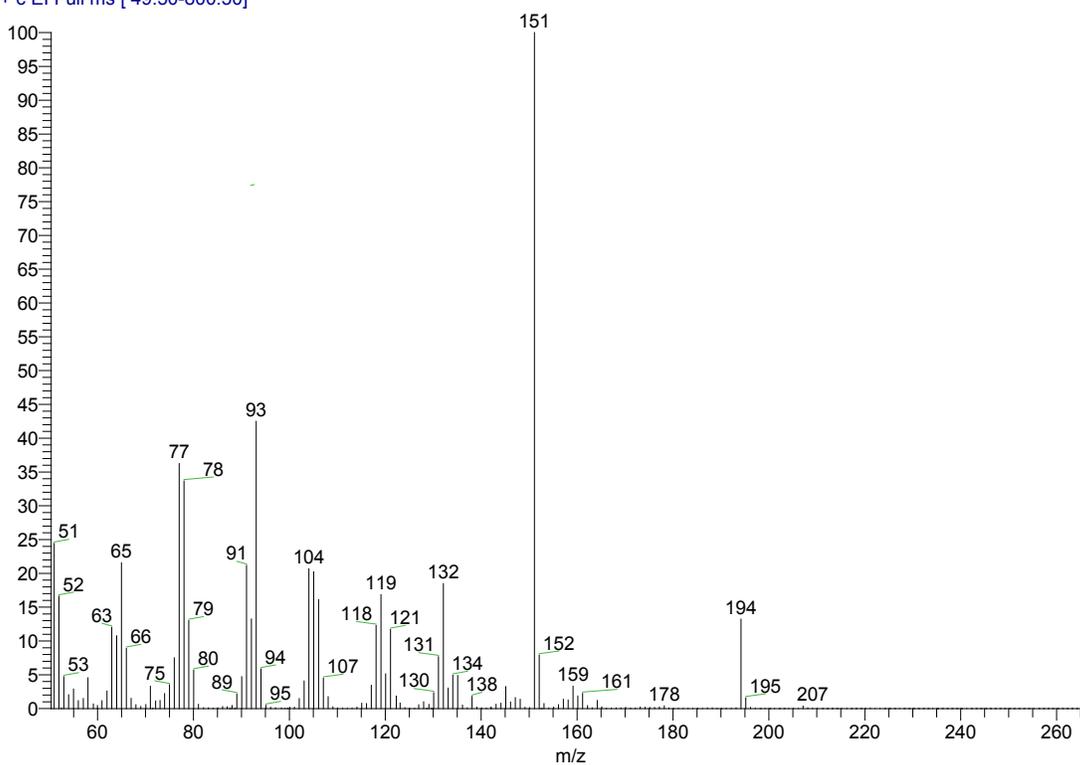
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4450_1
szComment

8/3/2010 6:26:35 PM

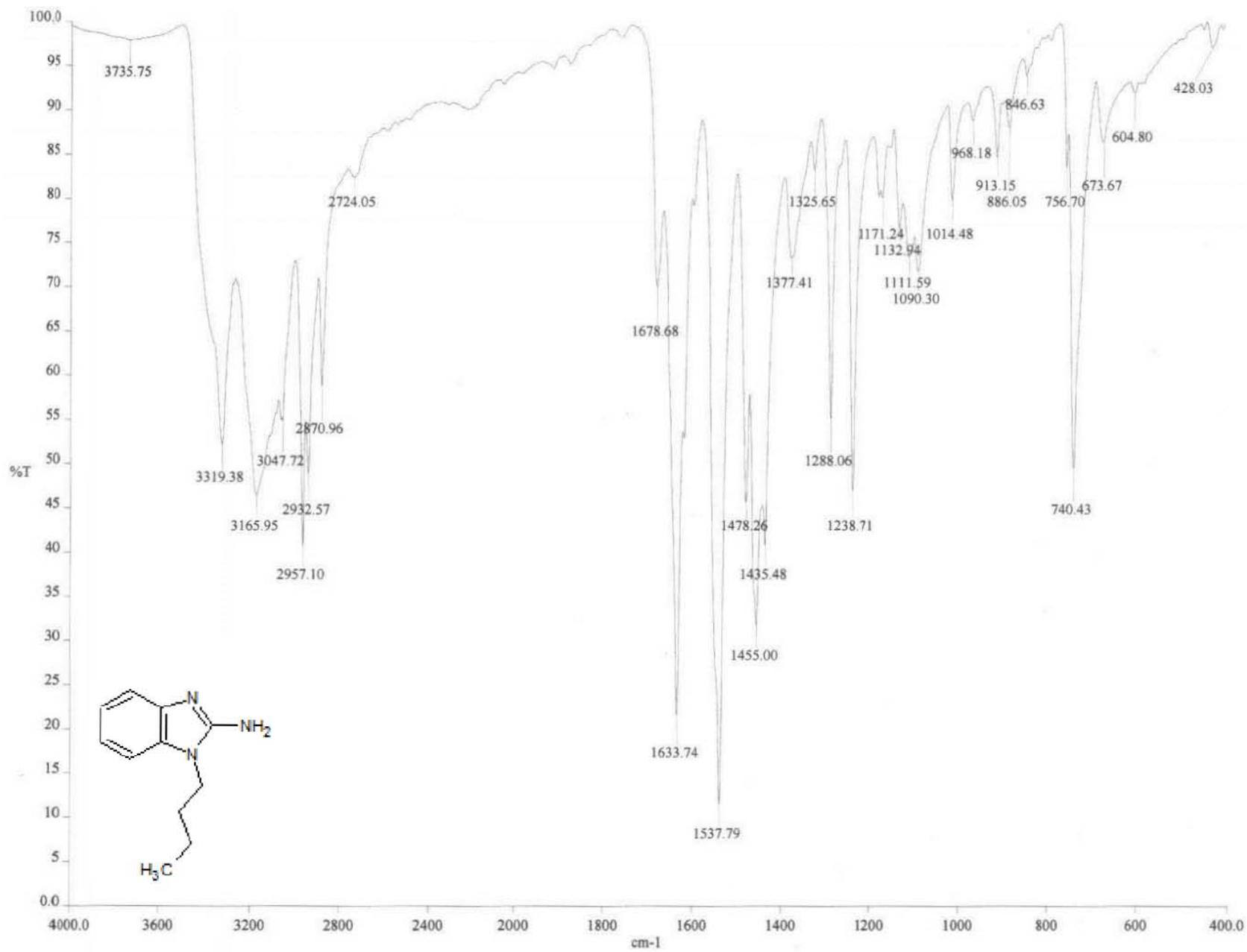
PK-0402

OT4450_1 #4-5 RT: 0.62-0.82 AV: 2 NL: 4.59E7

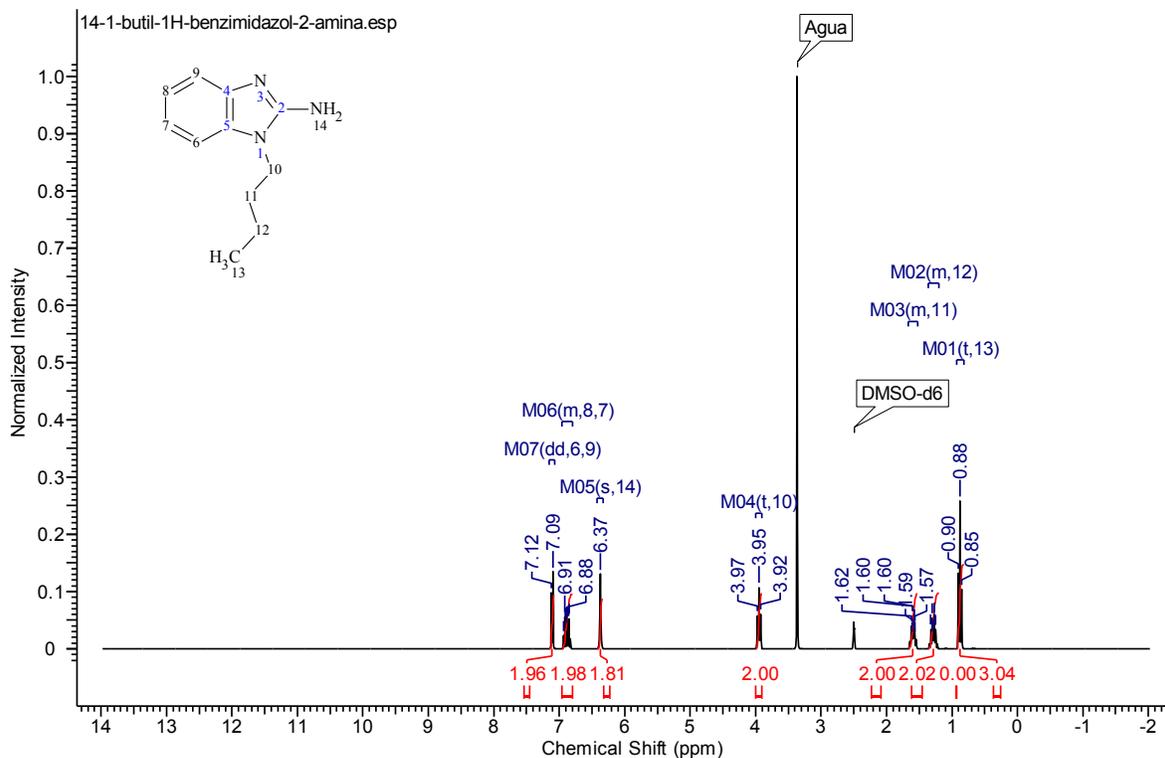
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 24, EM: N-Butil-2-nitroanilina (12)



Espectro 25, IR: 1-Butil-1H-benzimidazol-2-amina (14)



Espectro 26, RMN ¹H: 1-Butil-1H-bencimidazol-2-amina (14)

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4554_1

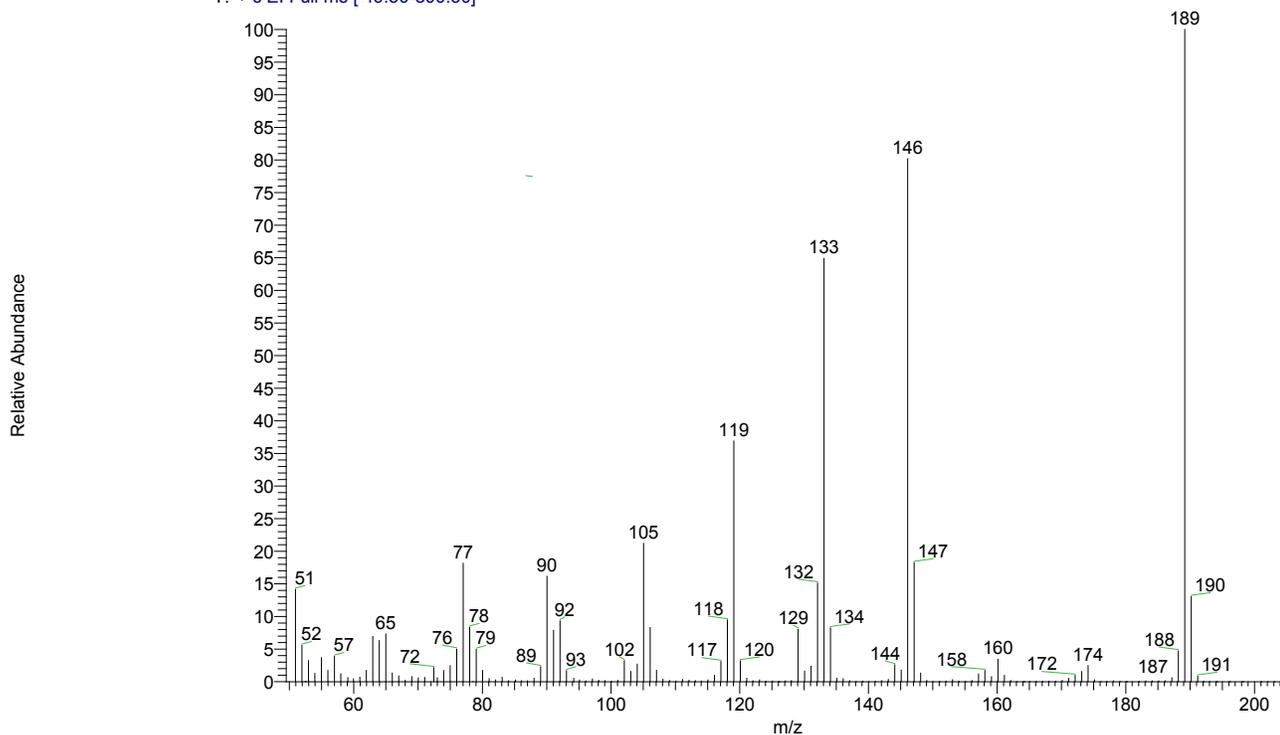
8/17/2010 7:07:16 PM

PK0404

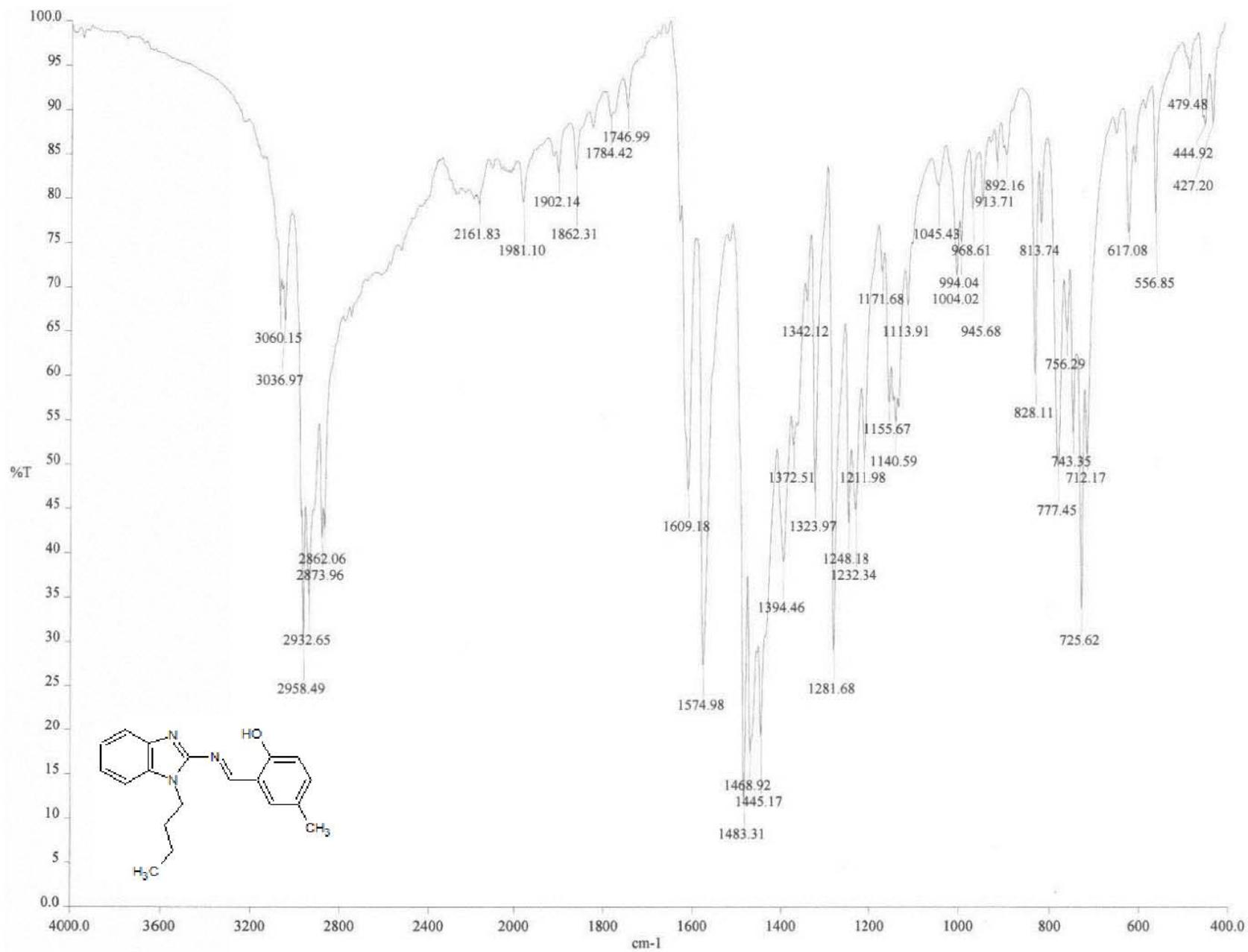
szComment

OT4554_1 #2-3 RT: 0.21-0.41 AV: 2 SB: 2 1.44-1.64 N

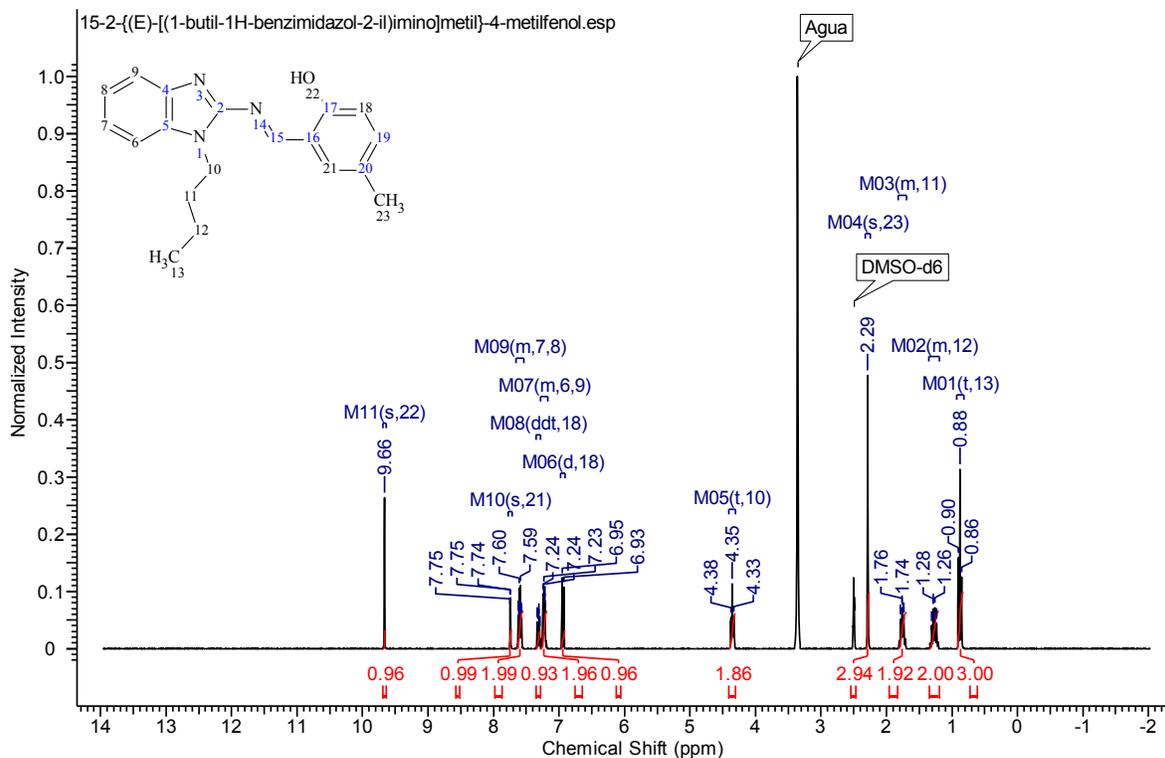
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 27, EM: 1-Butil-1H-bencimidazol-2-amina (14)



Espectro 28, IR: 2-((E)-[(1-Butil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)-4-metilfenol (15)



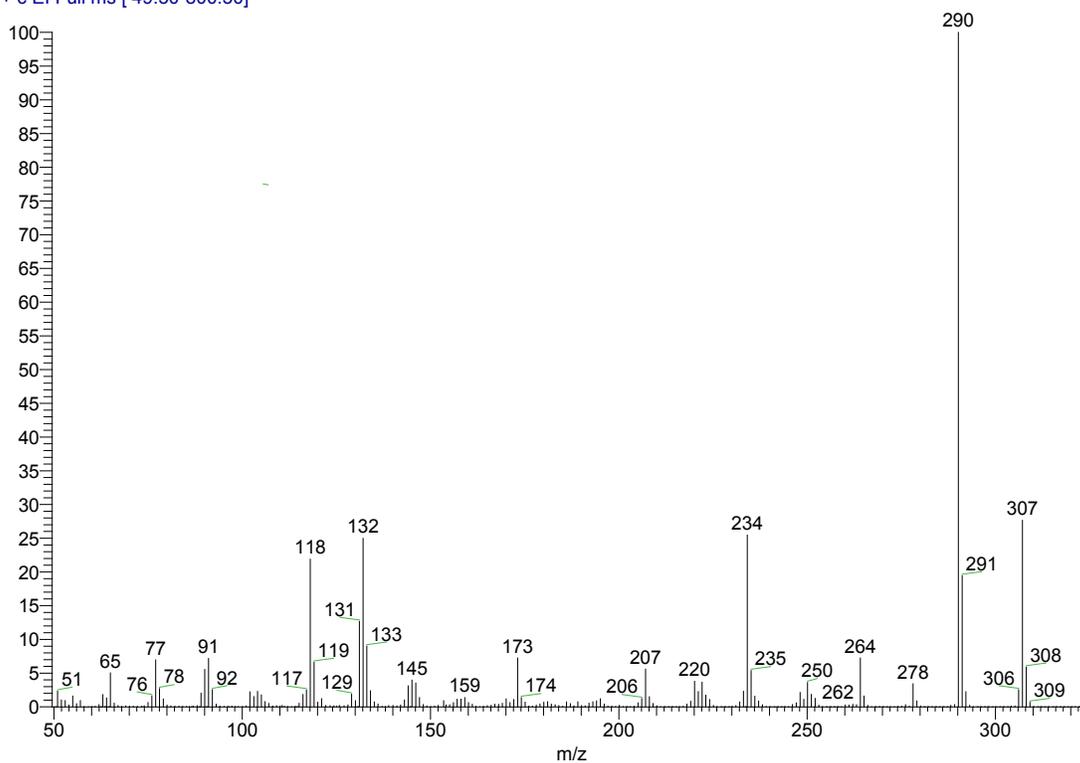
Espectro 29, RMN ¹H: 2- $\{(E)-[(1\text{-Butil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil}\}$ -4-metilfenol (**15**)

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4584_1

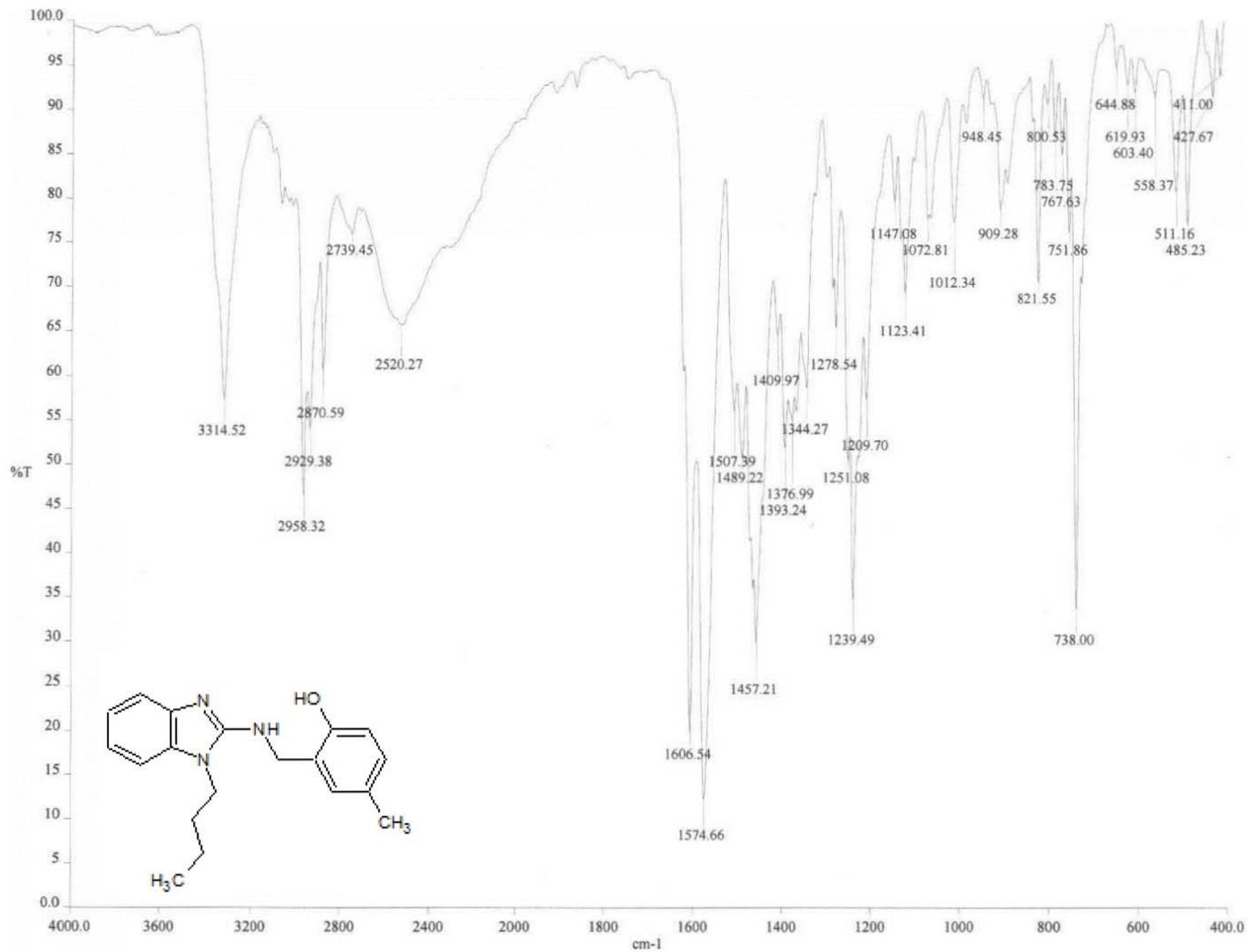
8/23/2010 7:06:30 PM

AN-1305

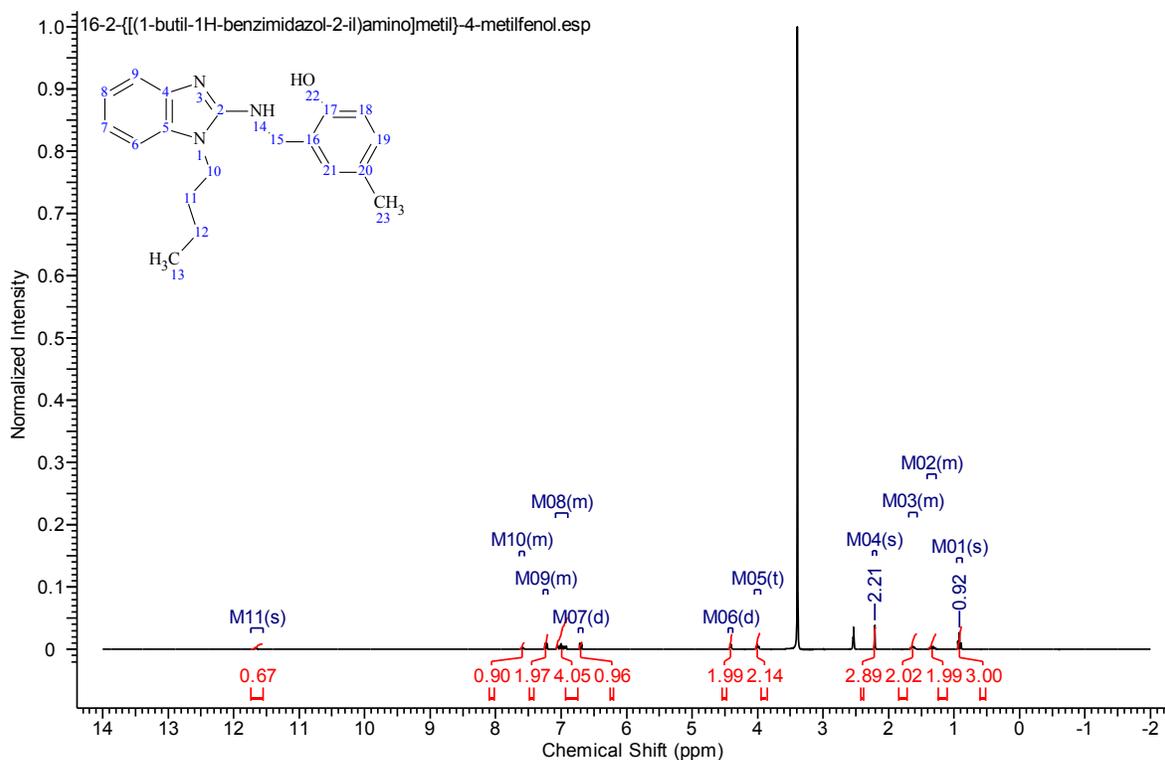
OT4584_1 #5-7 RT: 0.82-1.23 AV: 3 SB: 4 2.05-2.67 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 30, EM: 2- $\{(E)-[(1\text{-Butil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil}\}$ -4-metilfenol (**15**)



Espectro 31, IR: 2-[[1-butyl-1H-benzimidazol-2-yl]amino]metil}-4-metilfenol (16)



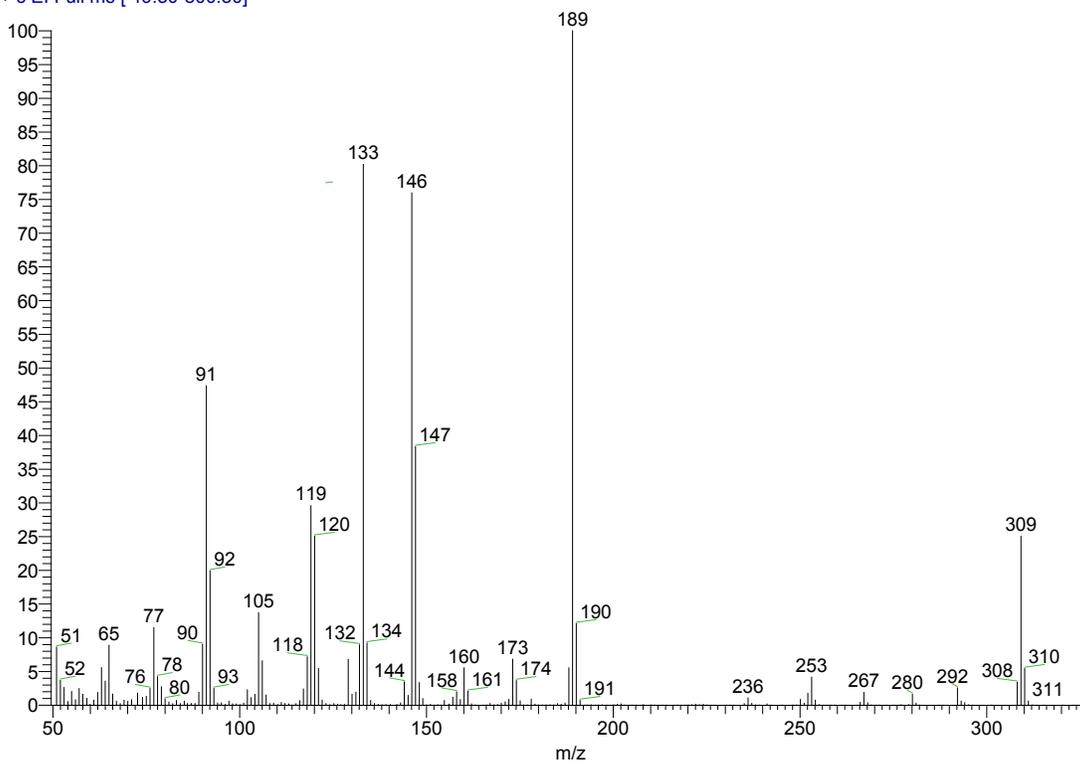
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4675_1
szComment

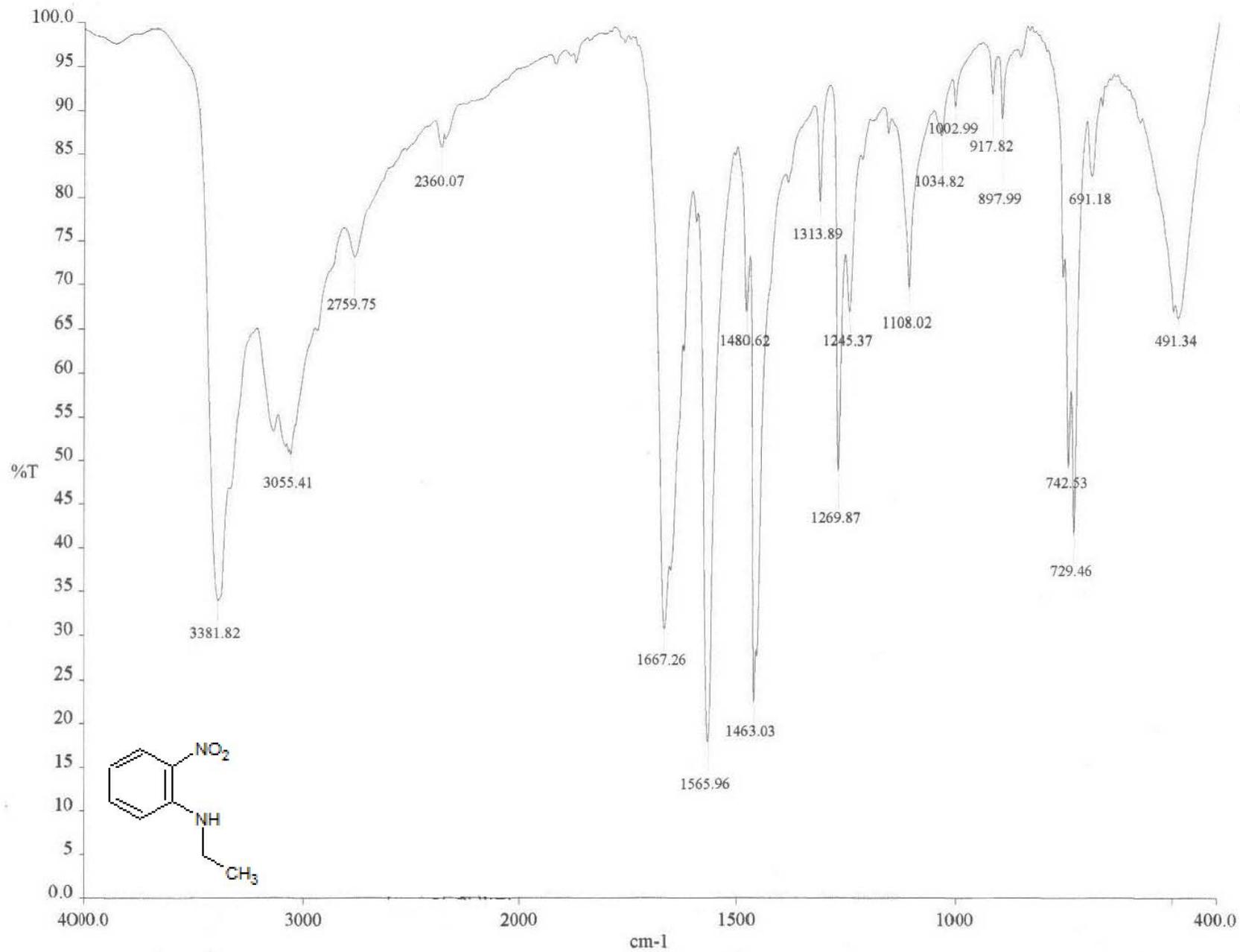
9/14/2010 1:32:37 PM

PK-0306

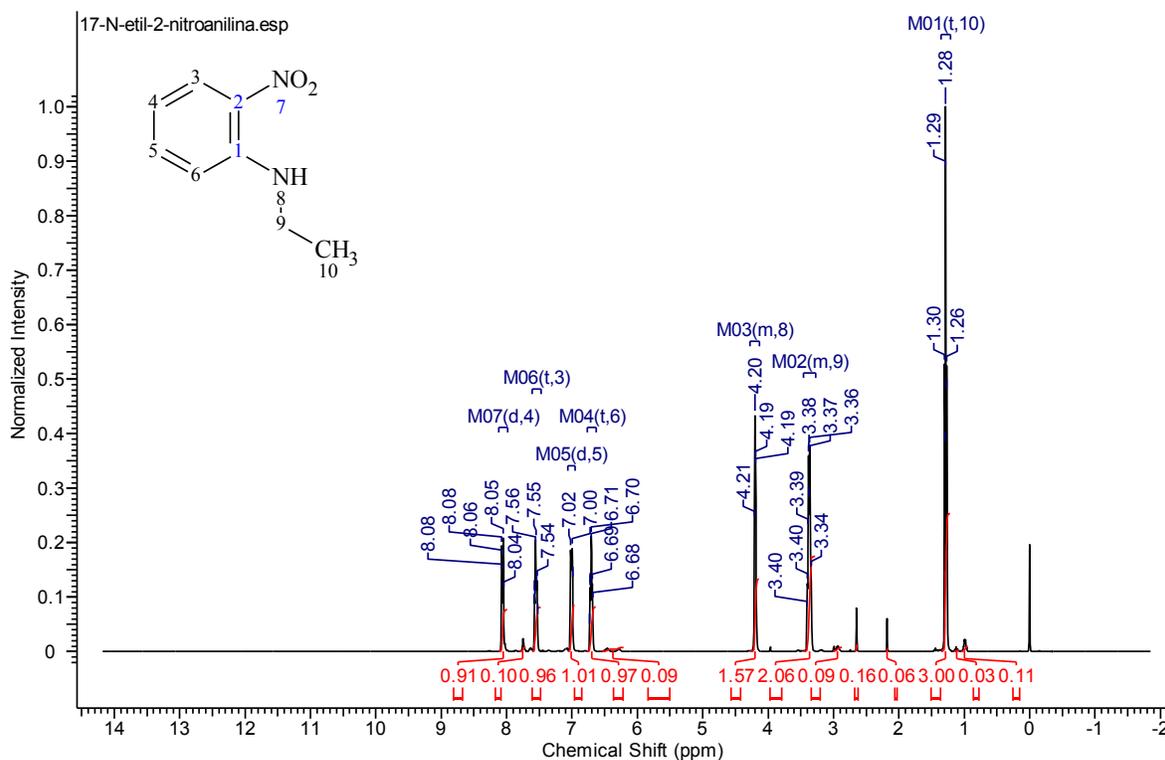
OT4675_1 #4-5 RT: 0.62-0.82 AV: 2 SB: 3 2.87-3.28 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

Relative Abundance





Espectro 34, IR: N-Etil-2-nitroanilina (17)



Espectro 35, RMN ¹H: N-Etil-2-nitroanilina (17)

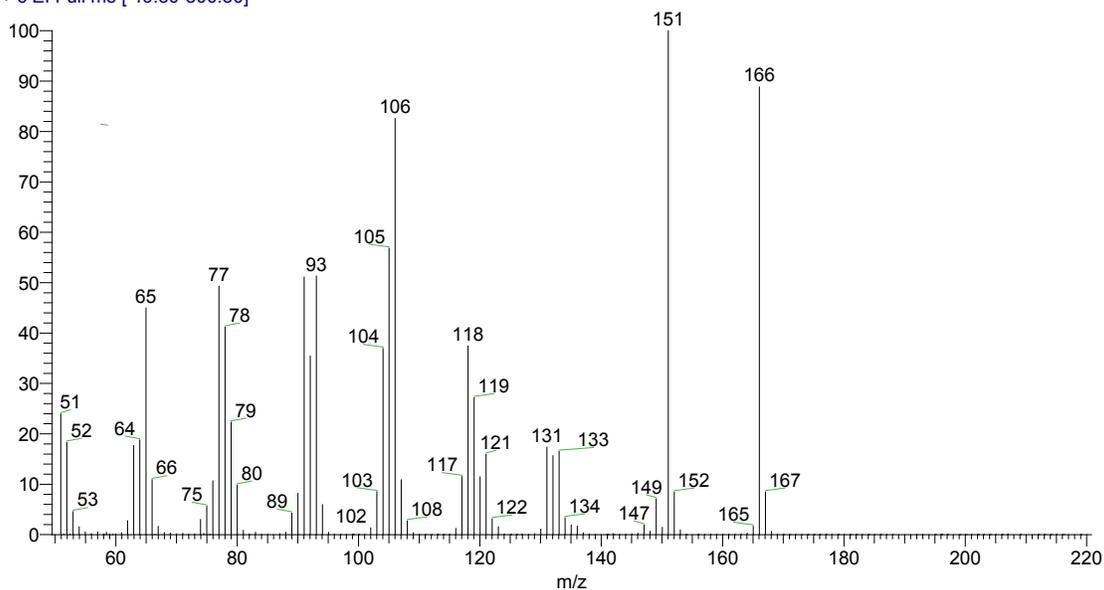
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4053_1

5/3/2010 7:56:12 PM

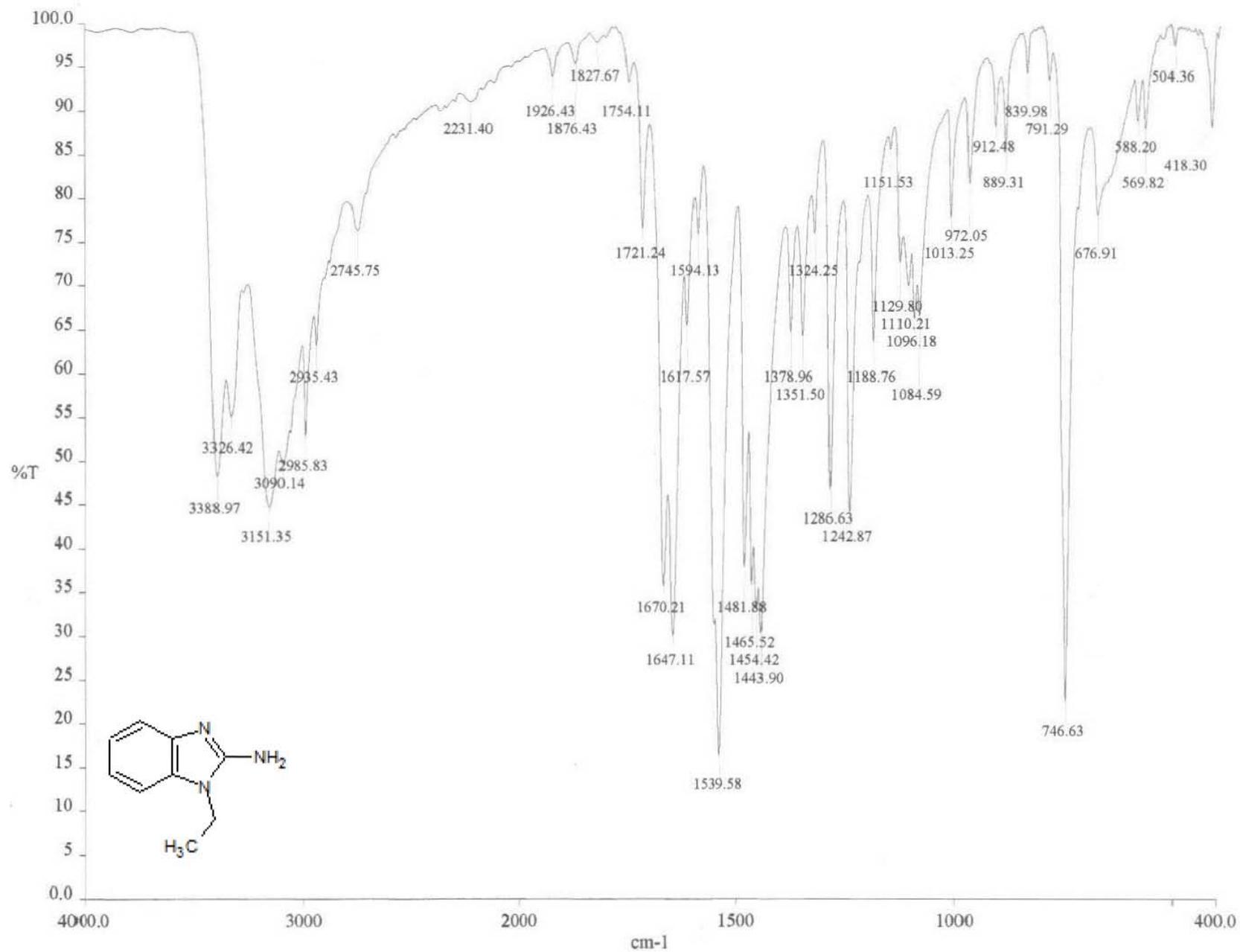
PK-0202

OT4053_1 #4 RT: 0.62 AV: 1 NL: 9.26E5

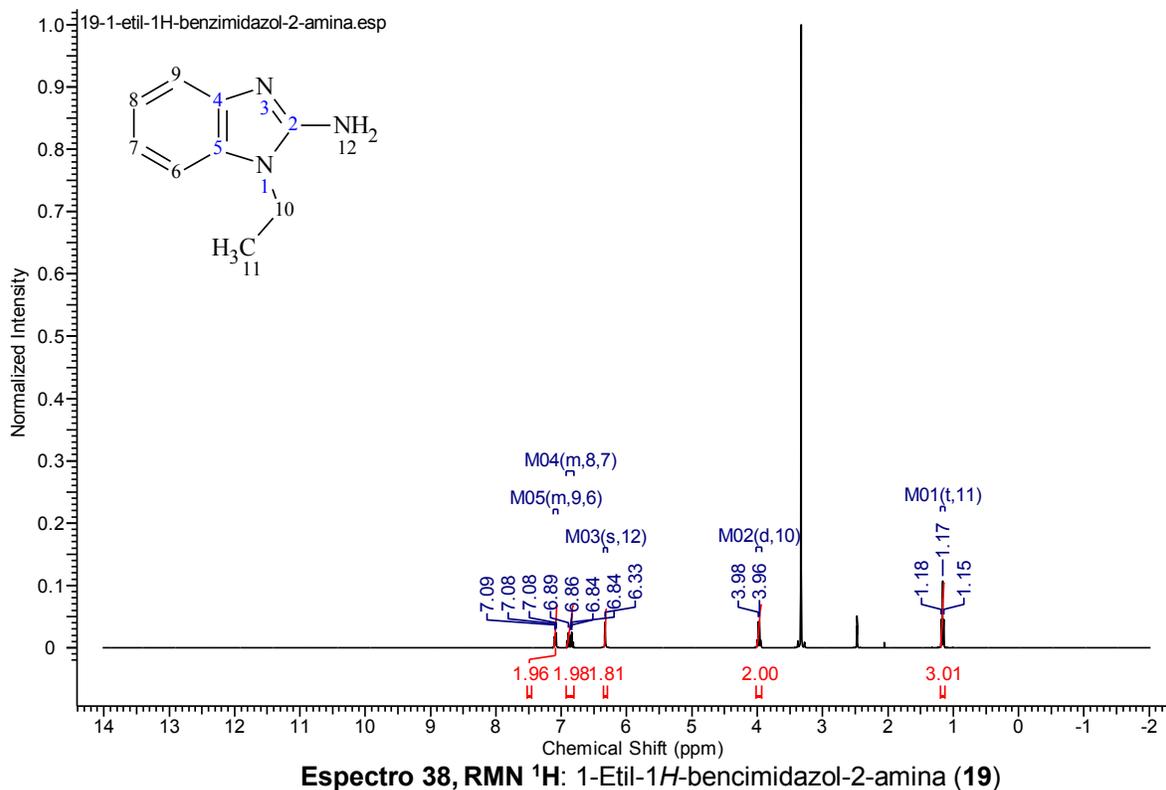
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 36, EM: N-Etil-2-nitroanilina (17)



Espectro 37, IR: 1-Etil-1H-bencimidazol-2-amina (19)

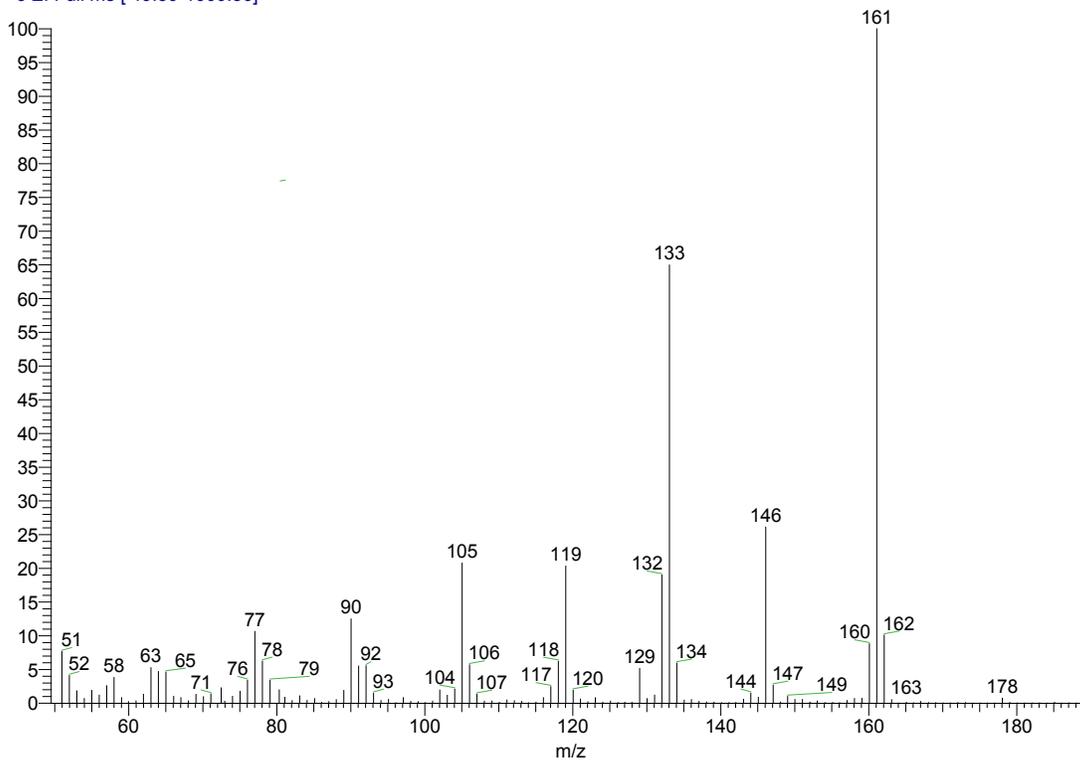


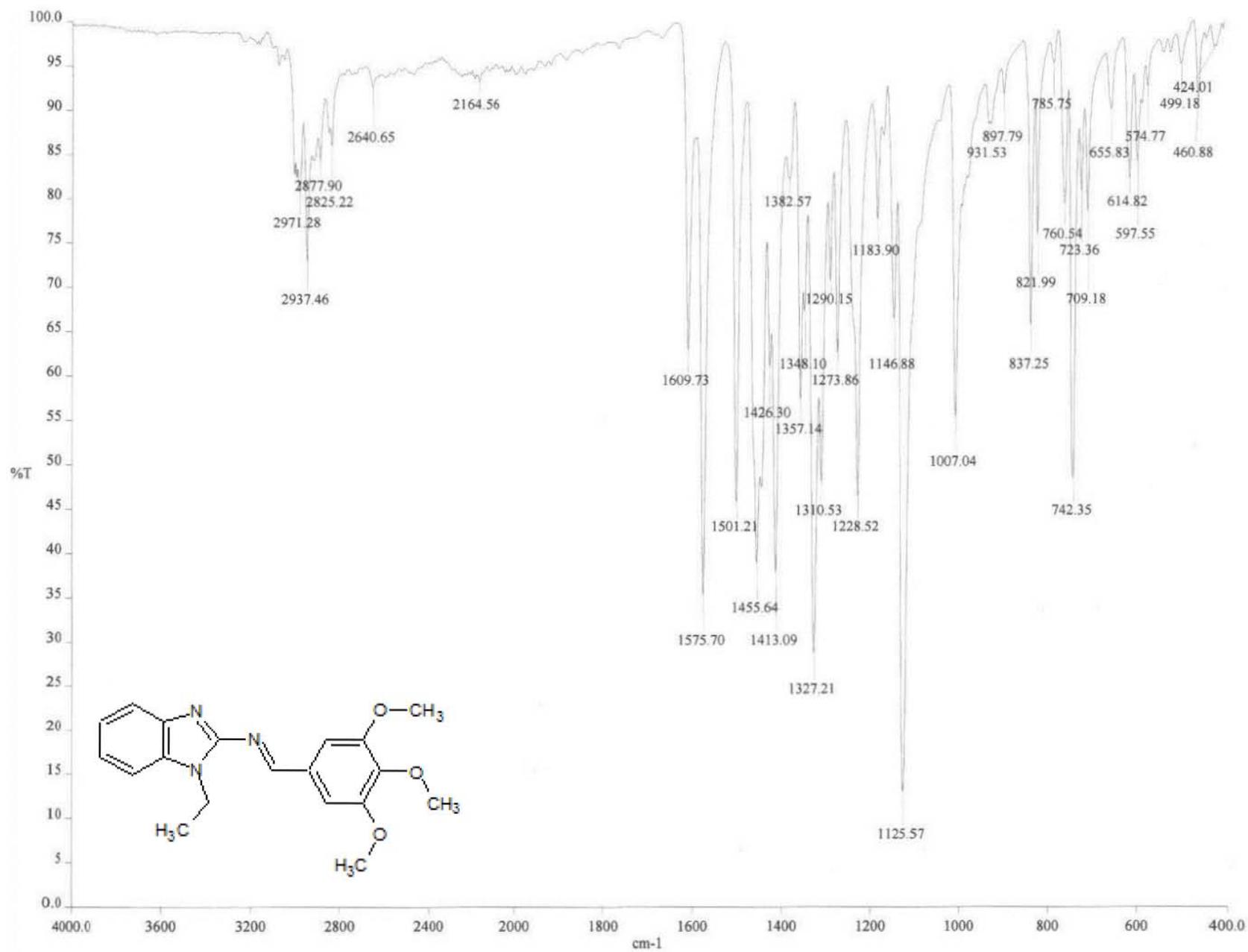
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT2877_1
szComment

6/30/2009 11:21:34 AM

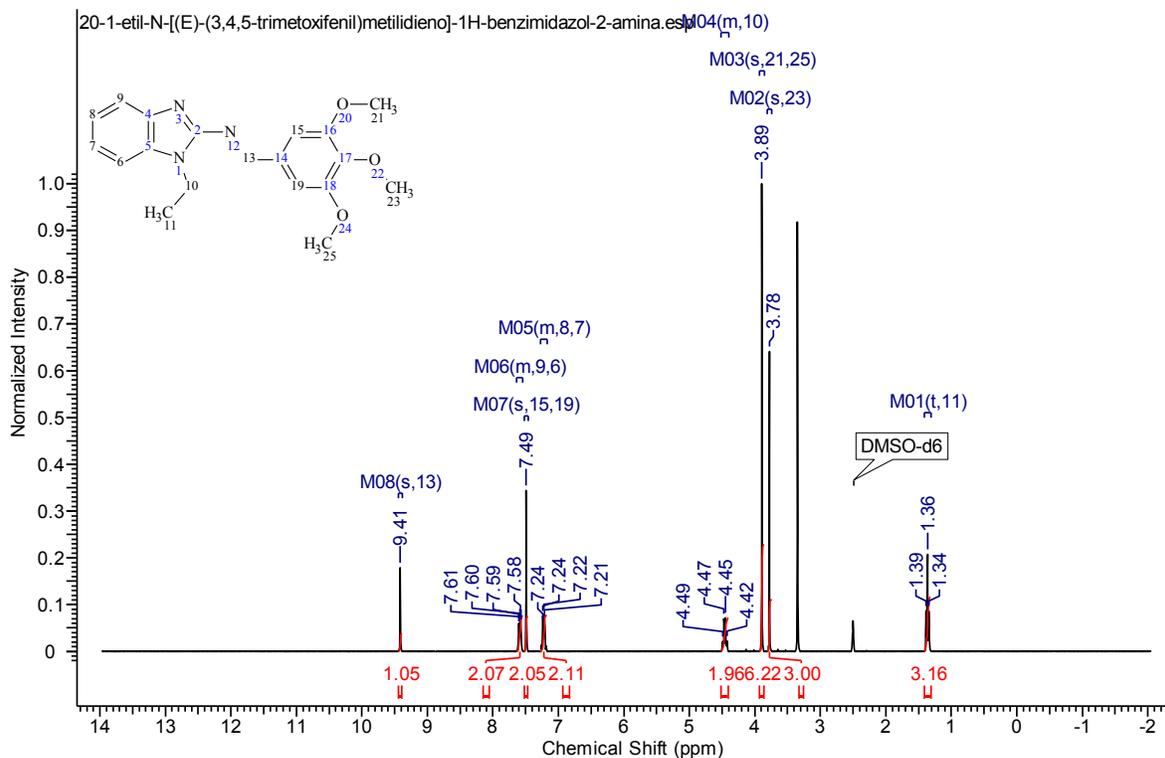
PK-0103

OT2877_1 #25-28 RT: 0.57-0.64 AV: 4 SB: 47 0.79-1.88
T: + c EI Full ms [49.50-1000.50]





Espectro 40, IR: 1-Etil-N-[(E)-(3,4,5-trimetoxifenil)metildieno]-1H-bencimidazol-2-amina (20)



Espectro 41, RMN ¹H: 1-Etil-N-[(E)-(3,4,5-trimetoxifenil)metilidieno]-1H-benzimidazol-2-amina (20)

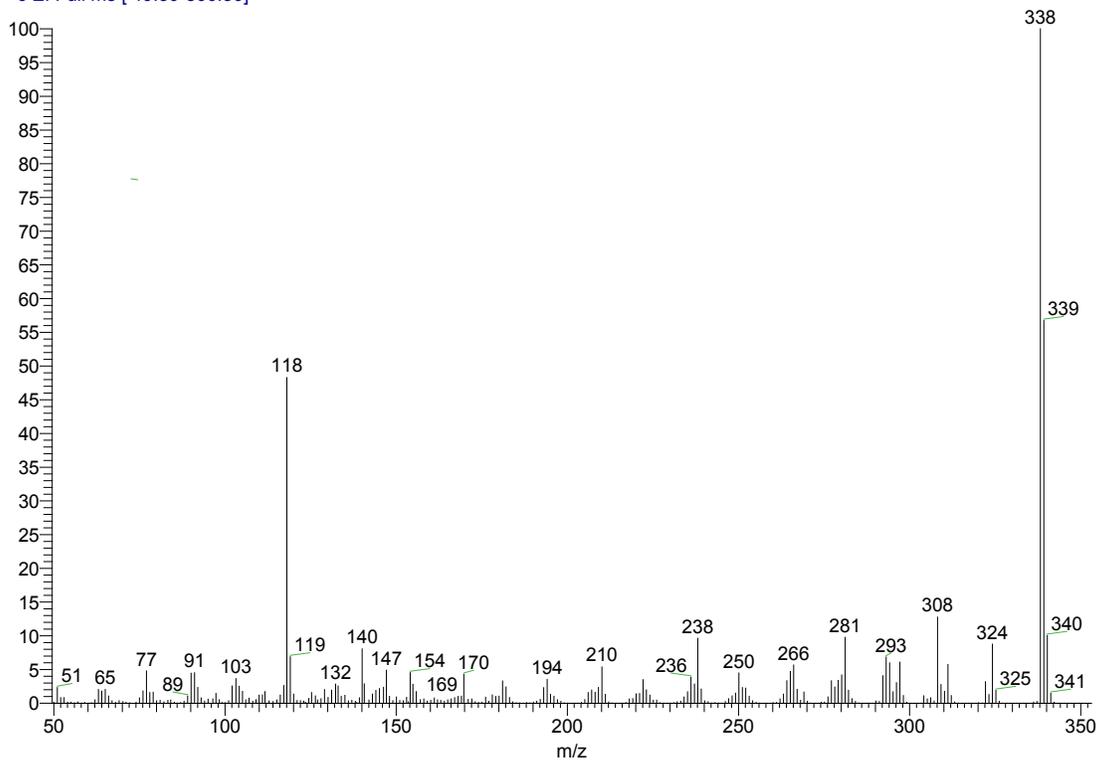
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4115_1

5/17/2010 1:20:05 PM

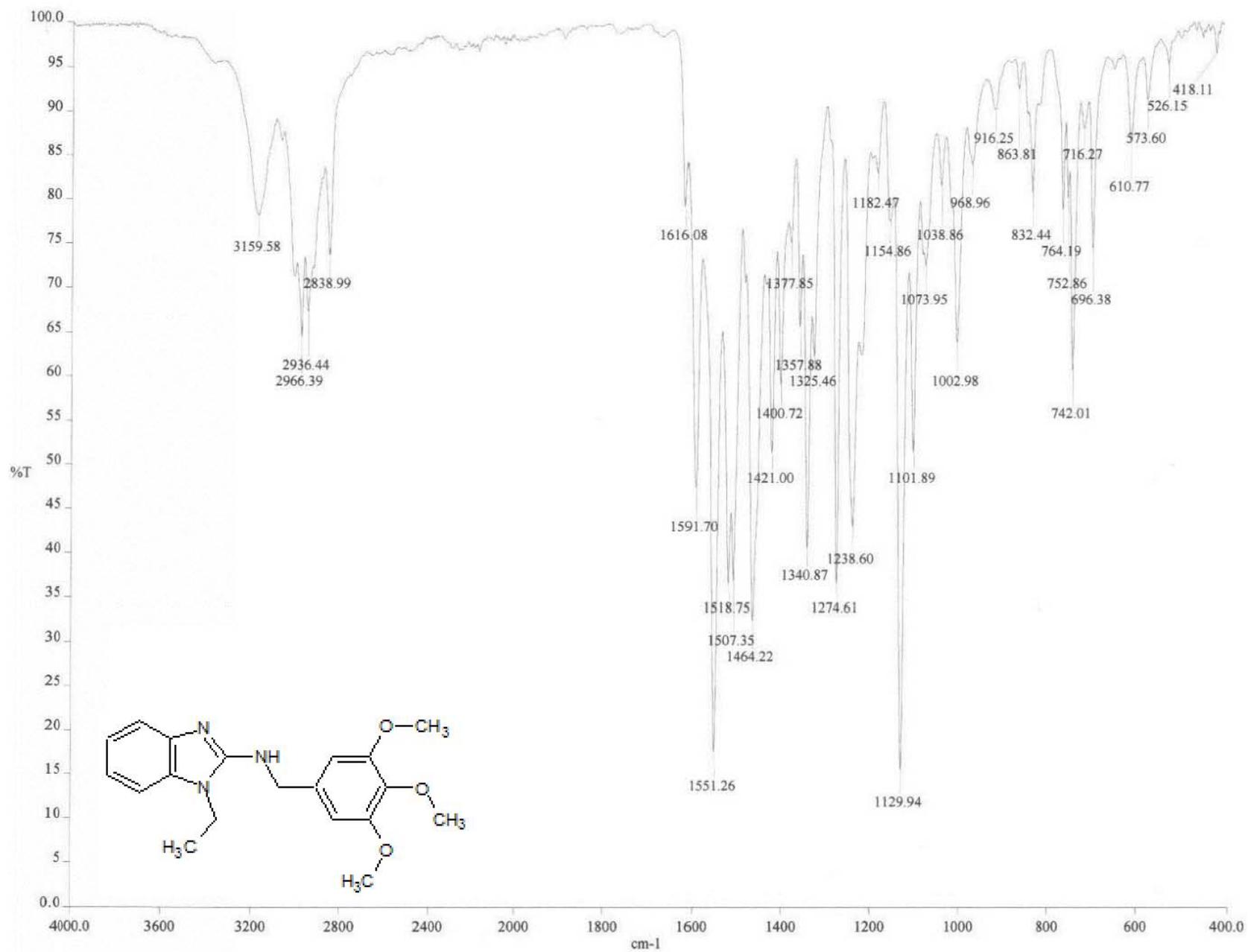
PK-0205

OT4115_1 #8-9 RT: 1.44-1.64 AV: 2 SB: 3 2.26-2.67 N

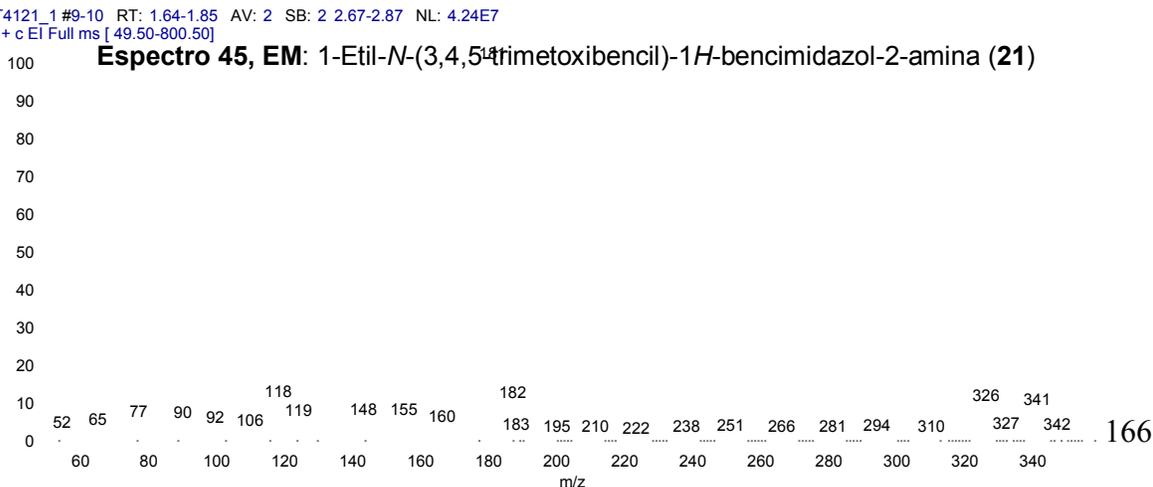
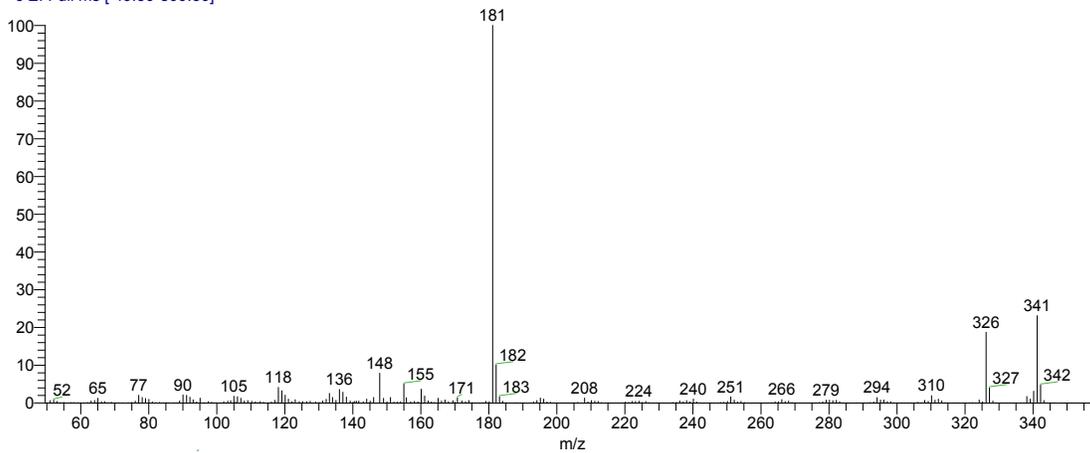
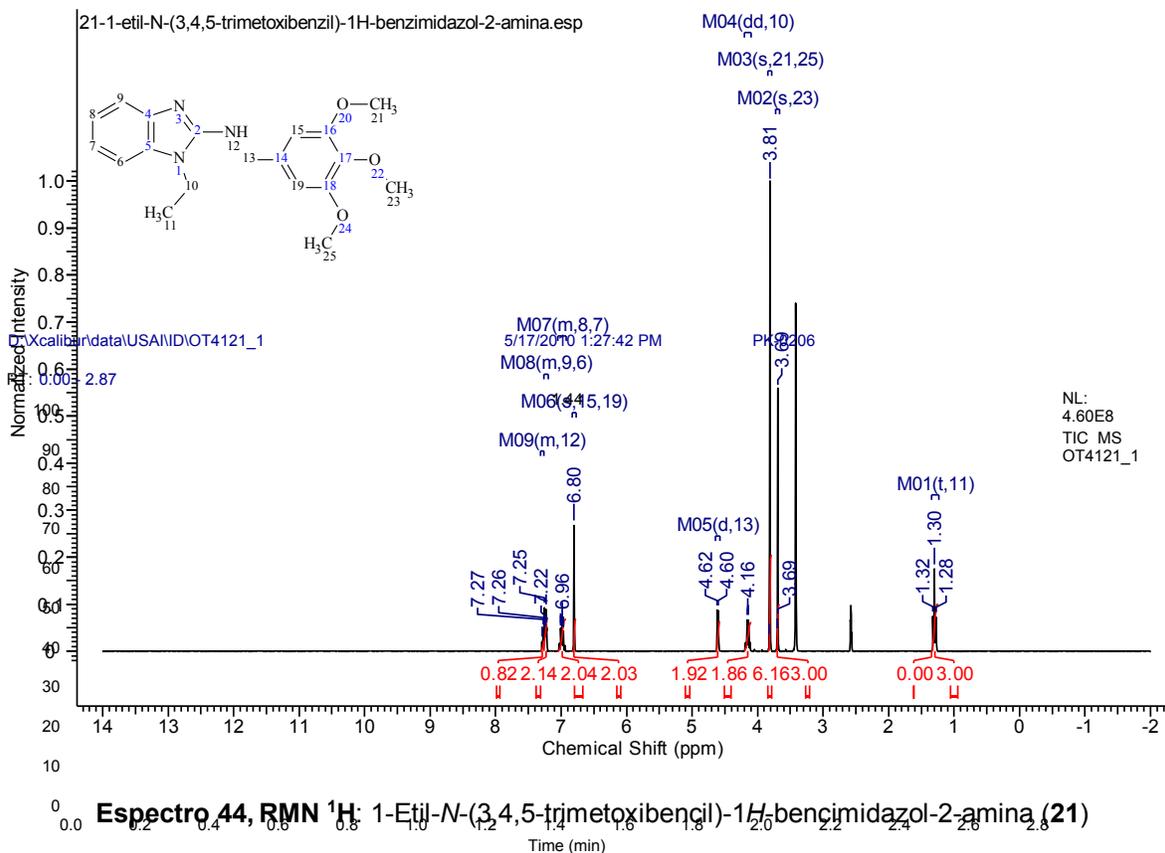
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

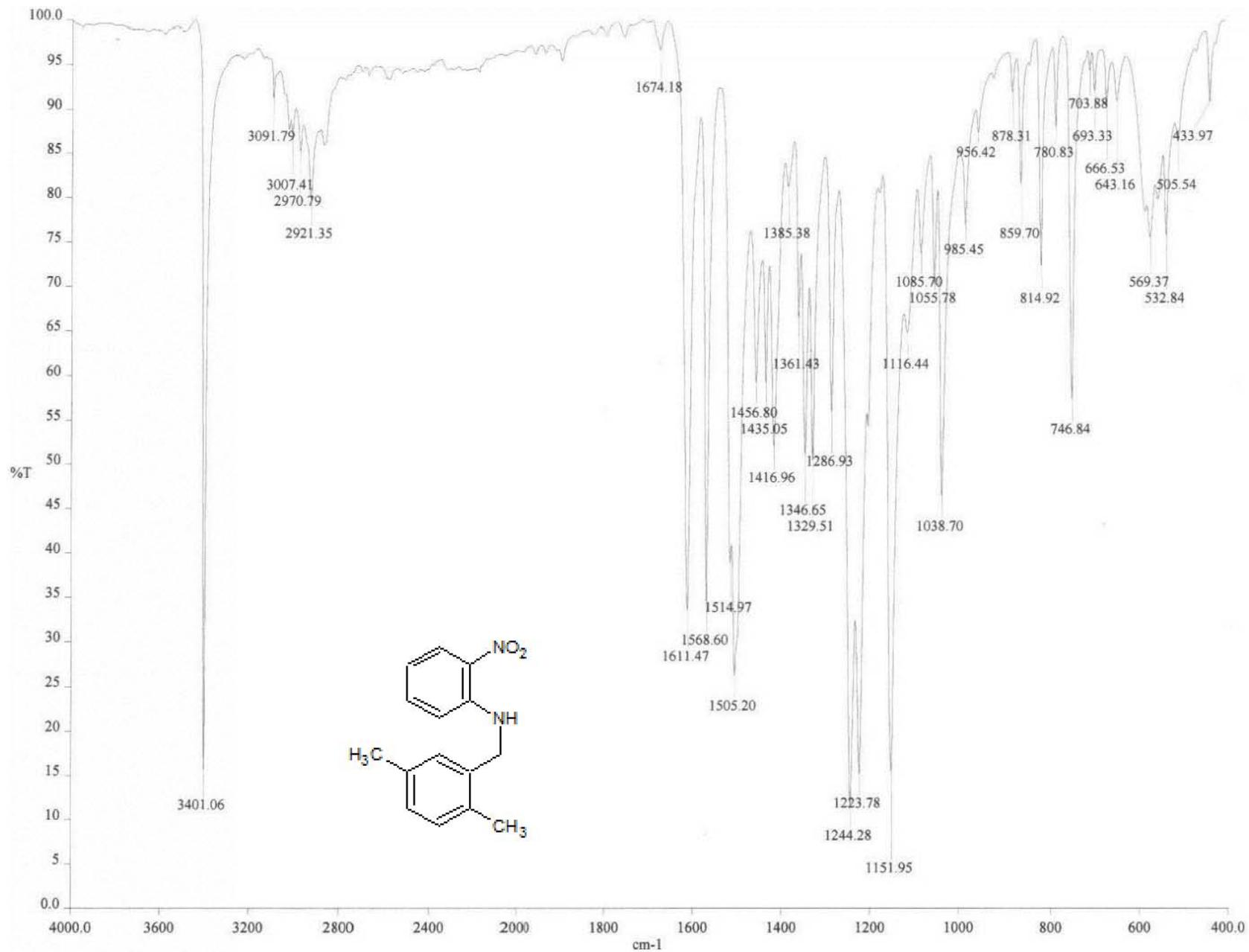


Espectro 42, EM: 1-Etil-N-[(E)-(3,4,5-trimetoxifenil)metilidieno]-1H-benzimidazol-2-amina (20)

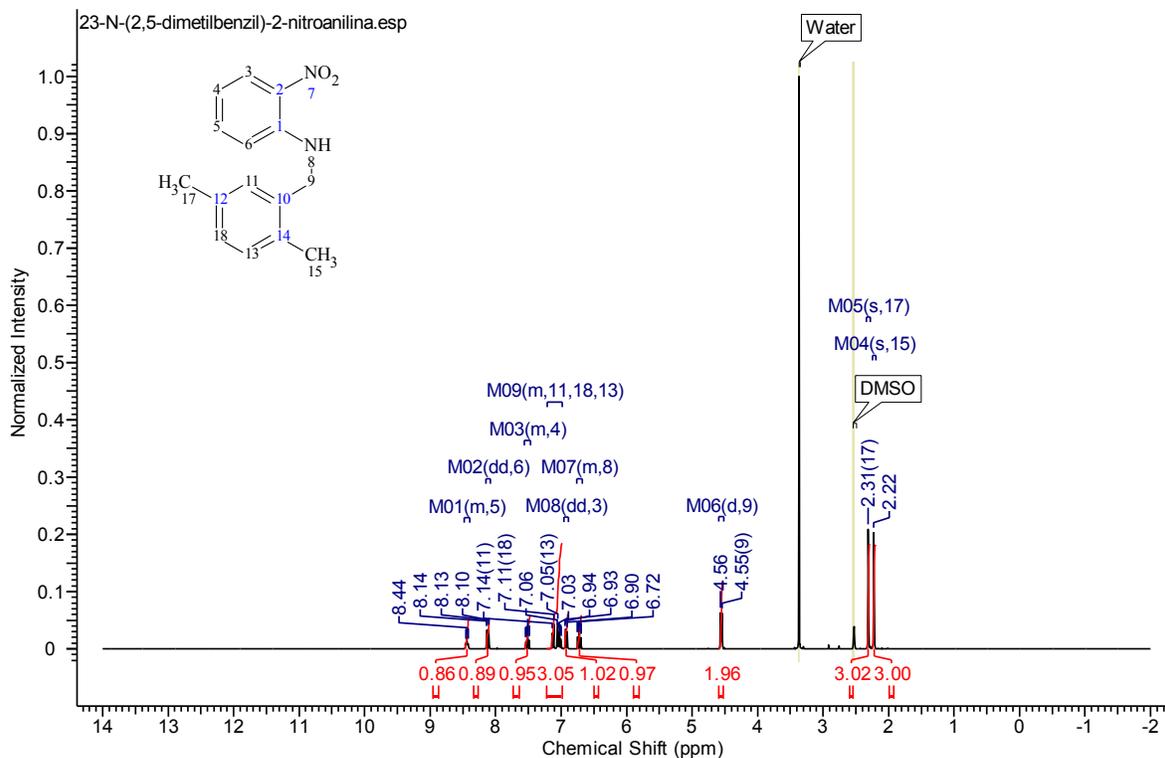


Espectro 43, IR: 1-Etil-N-(3,4,5-trimetoxibencil)-1H-bencimidazol-2-amina (21)





Espectro 46, IR: *N*-(2,5-Dimetilbencil)-2-nitroanilina (23)



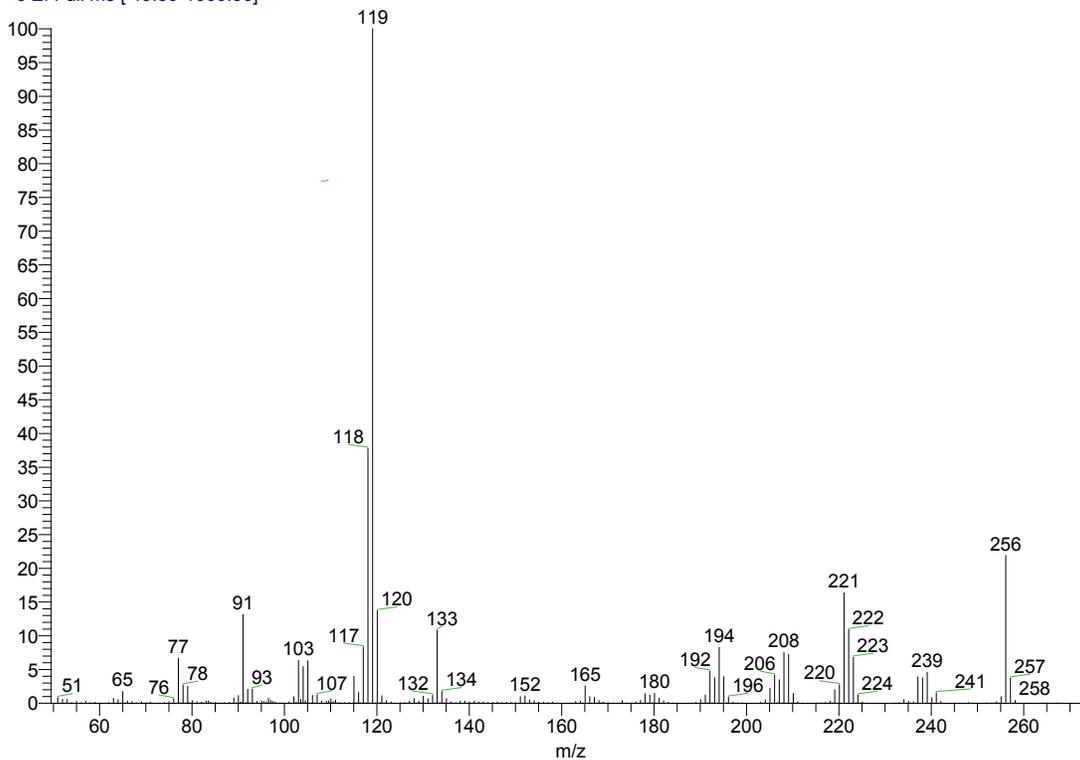
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4993_1
szComment

11/8/2010 8:16:03 PM

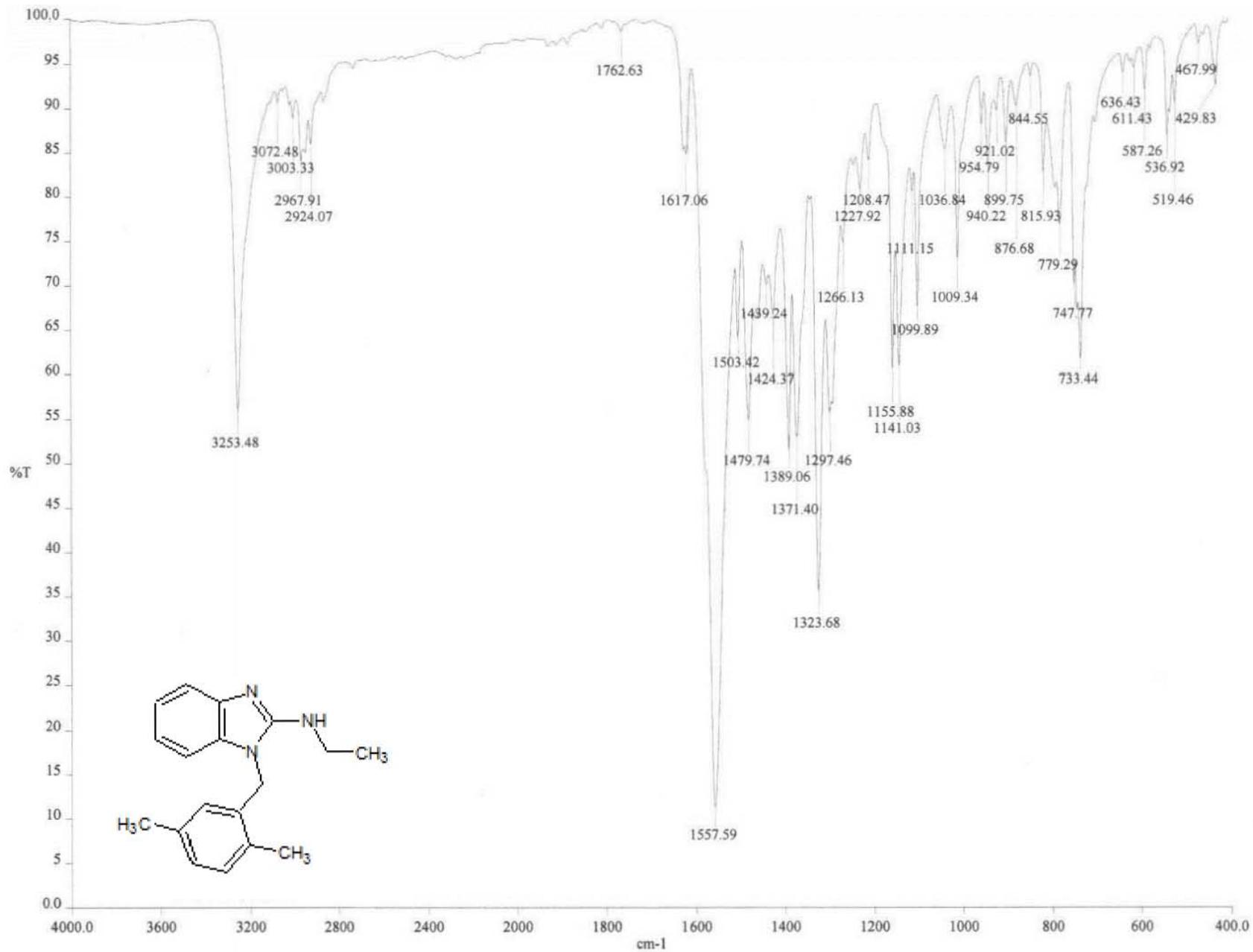
PK-0102

OT4993_1 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.66E7

T: + c EI Full ms [49.50-1000.50]

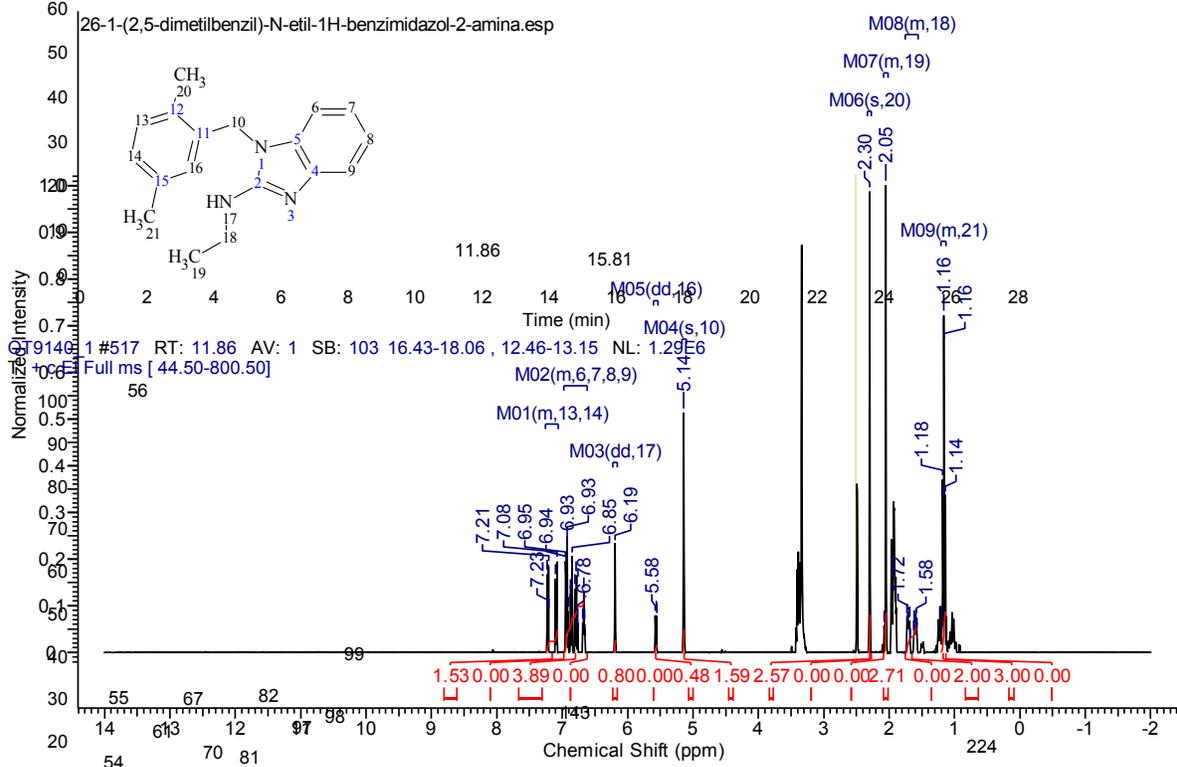


Espectro 48, EM: N-(2,5-Dimetilbenzil)-2-nitroanilina (23)



Espectro 49, IR: 1-(2,5-dimetilbencil)-N-etil-1H-bencimidazol-2-amina (26)

Relative Abundance

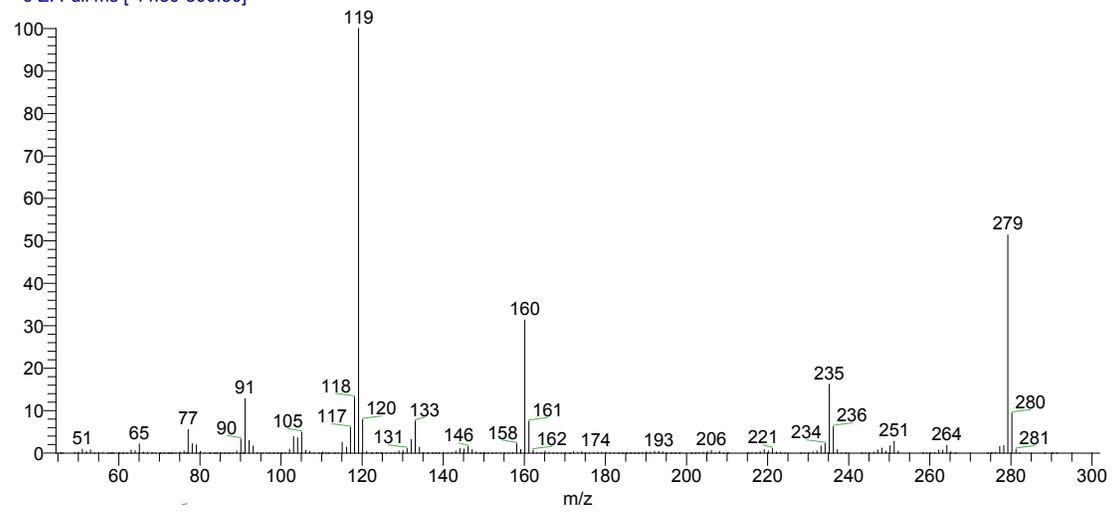


Relative Abundance

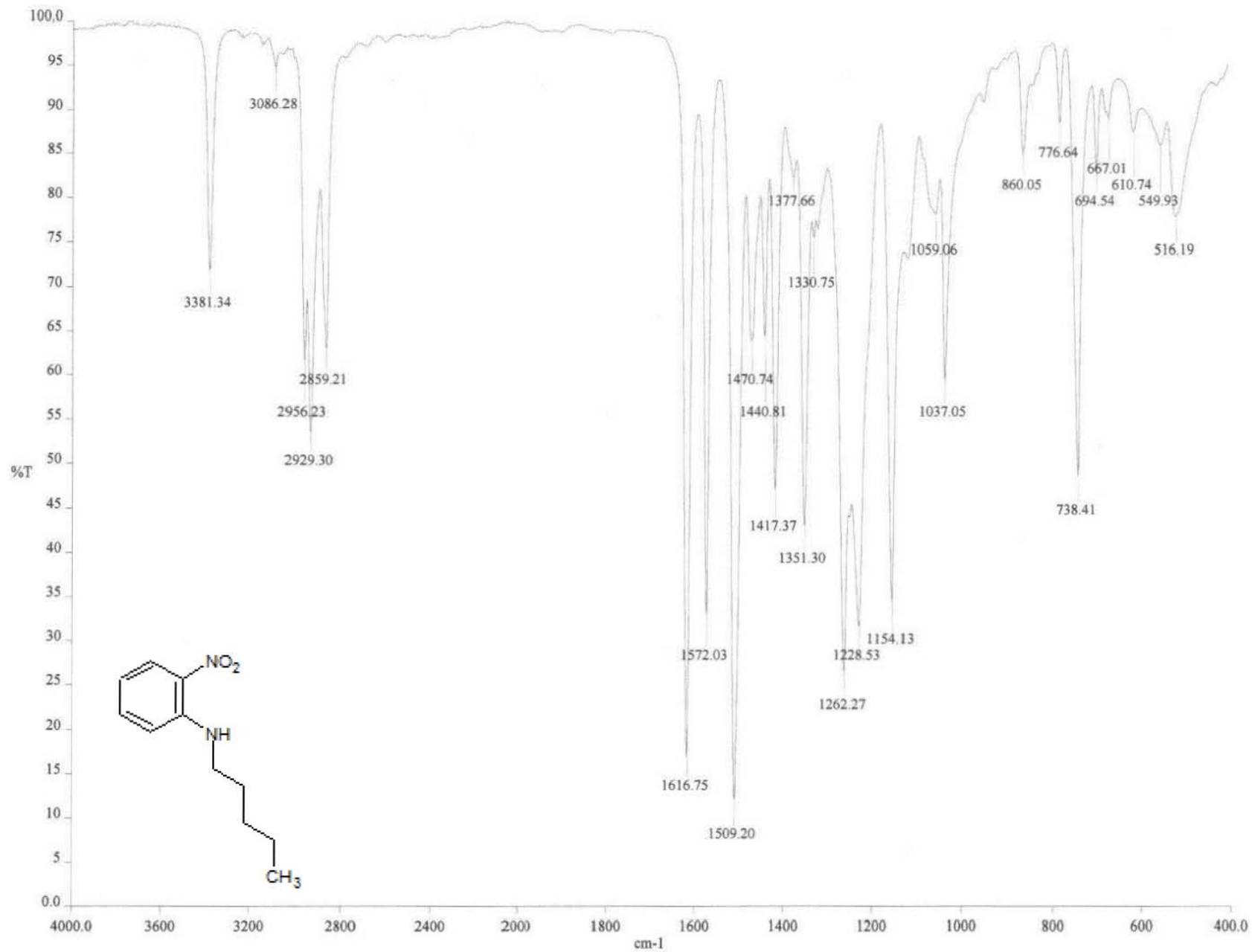
Espectro 50, RMN ¹H: 1-(2,5-dimetilbenzil)-N-etil-1H-benzimidazol-2-amina (26)

OT9140_1 #598 RT: 13.72 AV: 1 SB: 103 16.43-18.06, 12.46-13.15 NL: 6.36E7
T: + c EI Full ms [44.50-800.50]

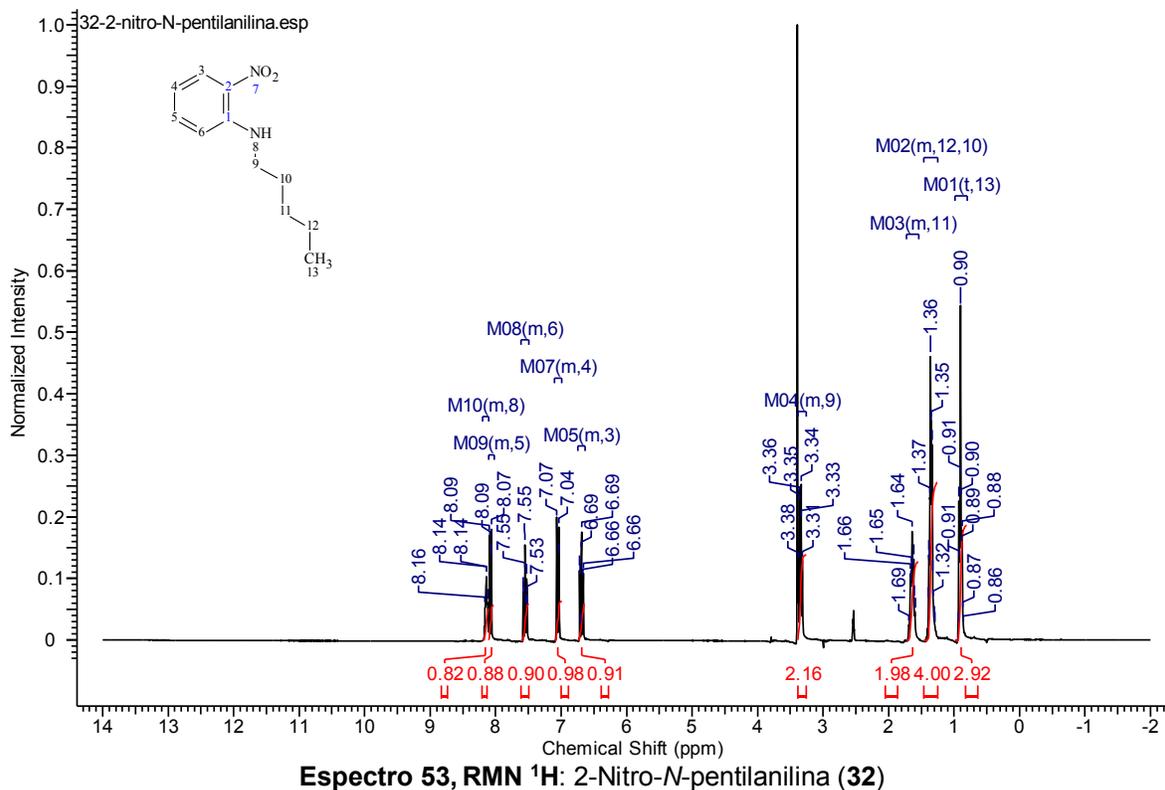
Relative Abundance



Espectro 51, EM: 1-(2,5-dimetilbenzil)-N-etil-1H-benzimidazol-2-amina (26)



Espectro 52, IR: 2-Nitro-N-pentilanilina (32)

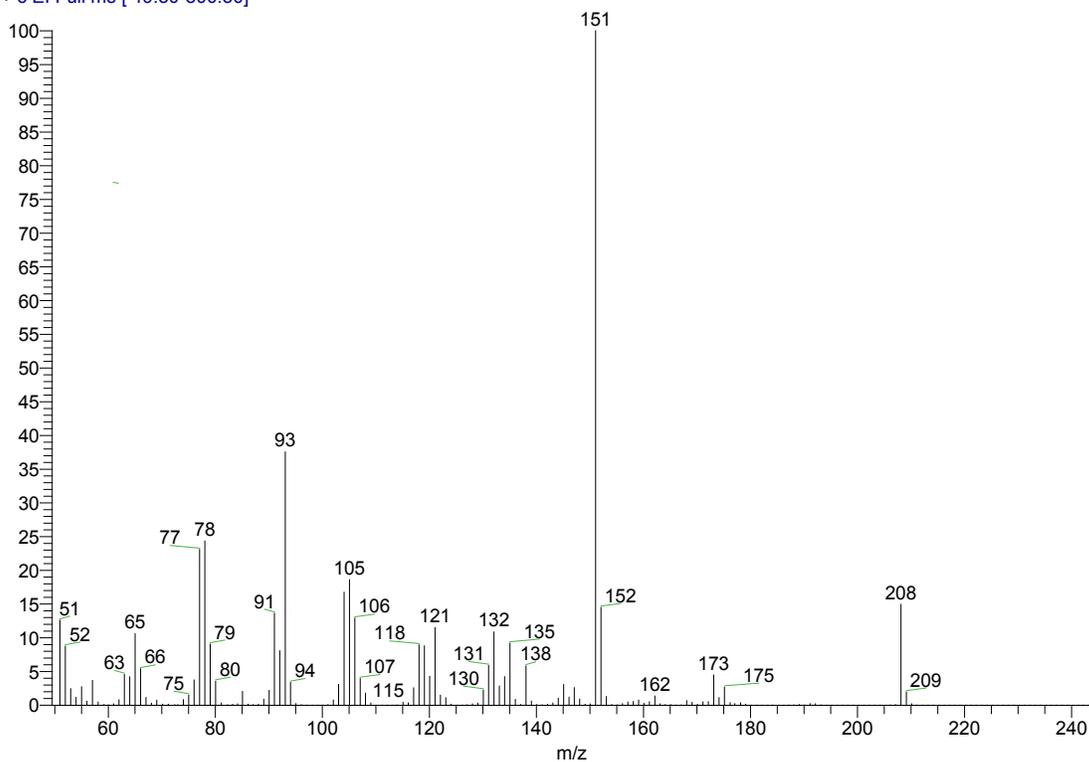


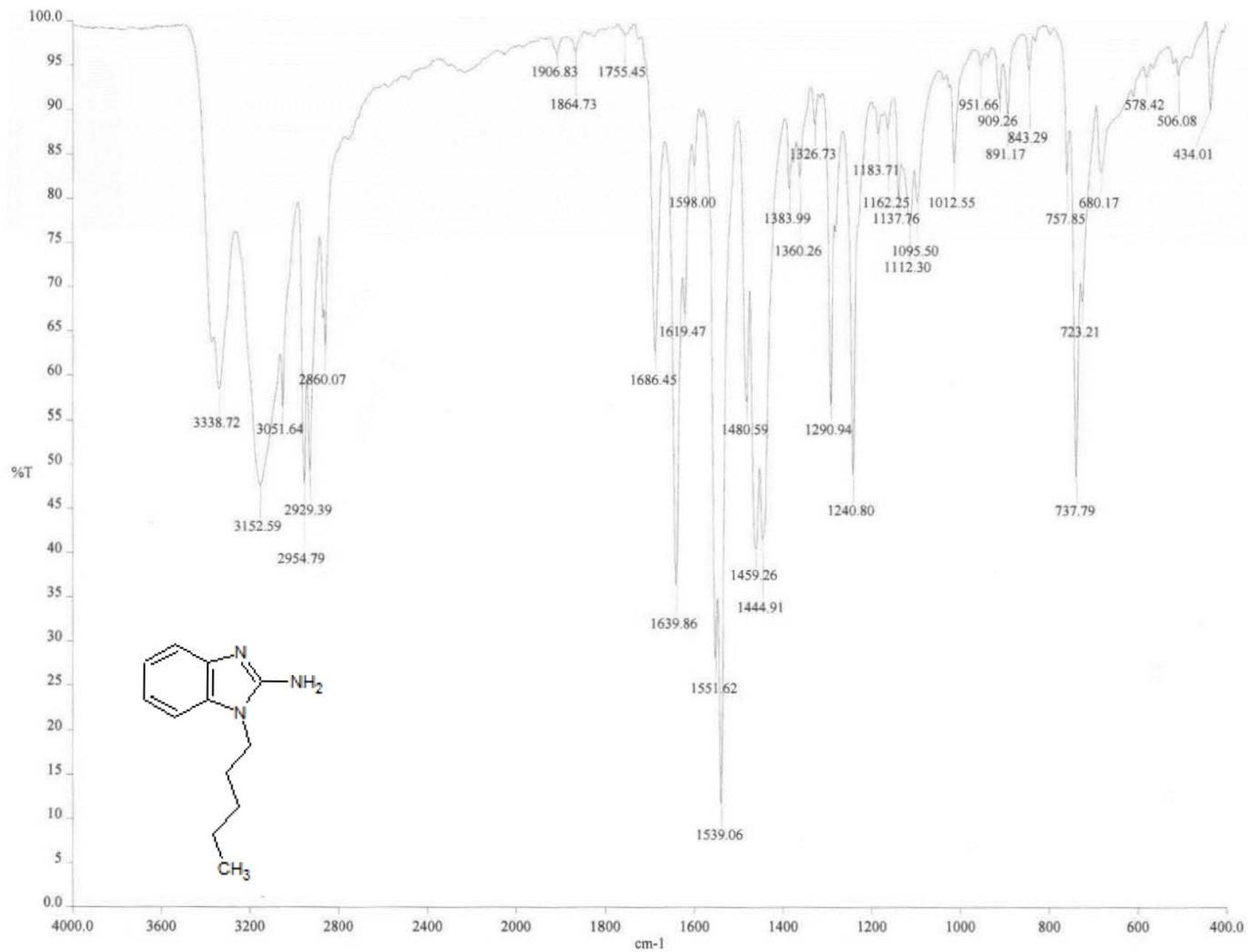
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4922_1
szComment

10/26/2010 8:11:47 PM

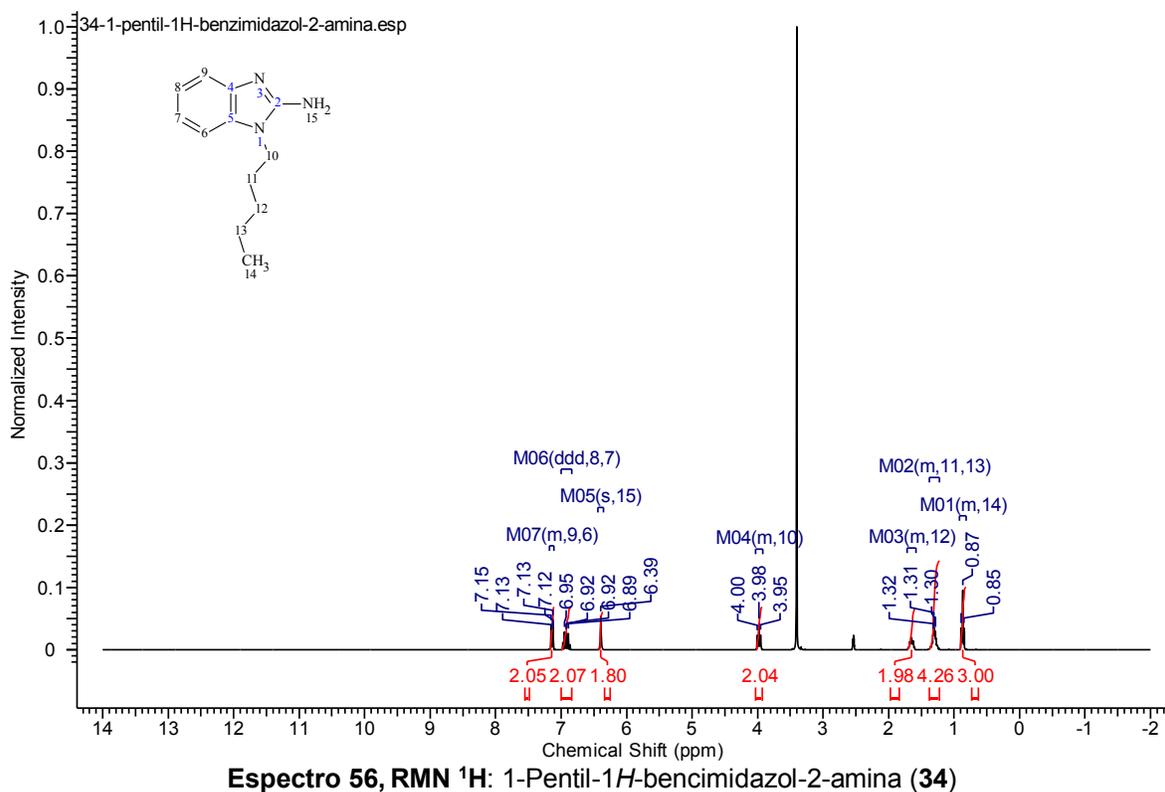
AN-1102

OT4922_1 #3 RT: 0.41 AV: 1 SB: 2 0.82-1.03 NL: 1.20
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 55, IR: 1-Pentil-1H-bencimidazol-2-amina (34)



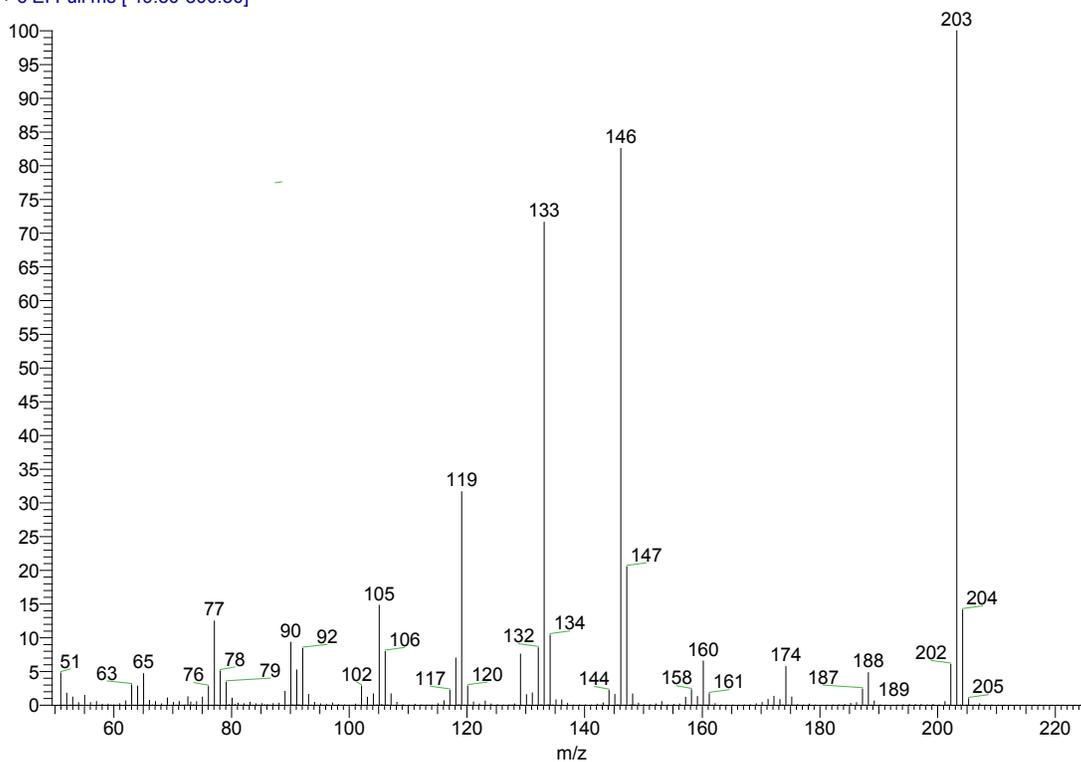
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT6489_1

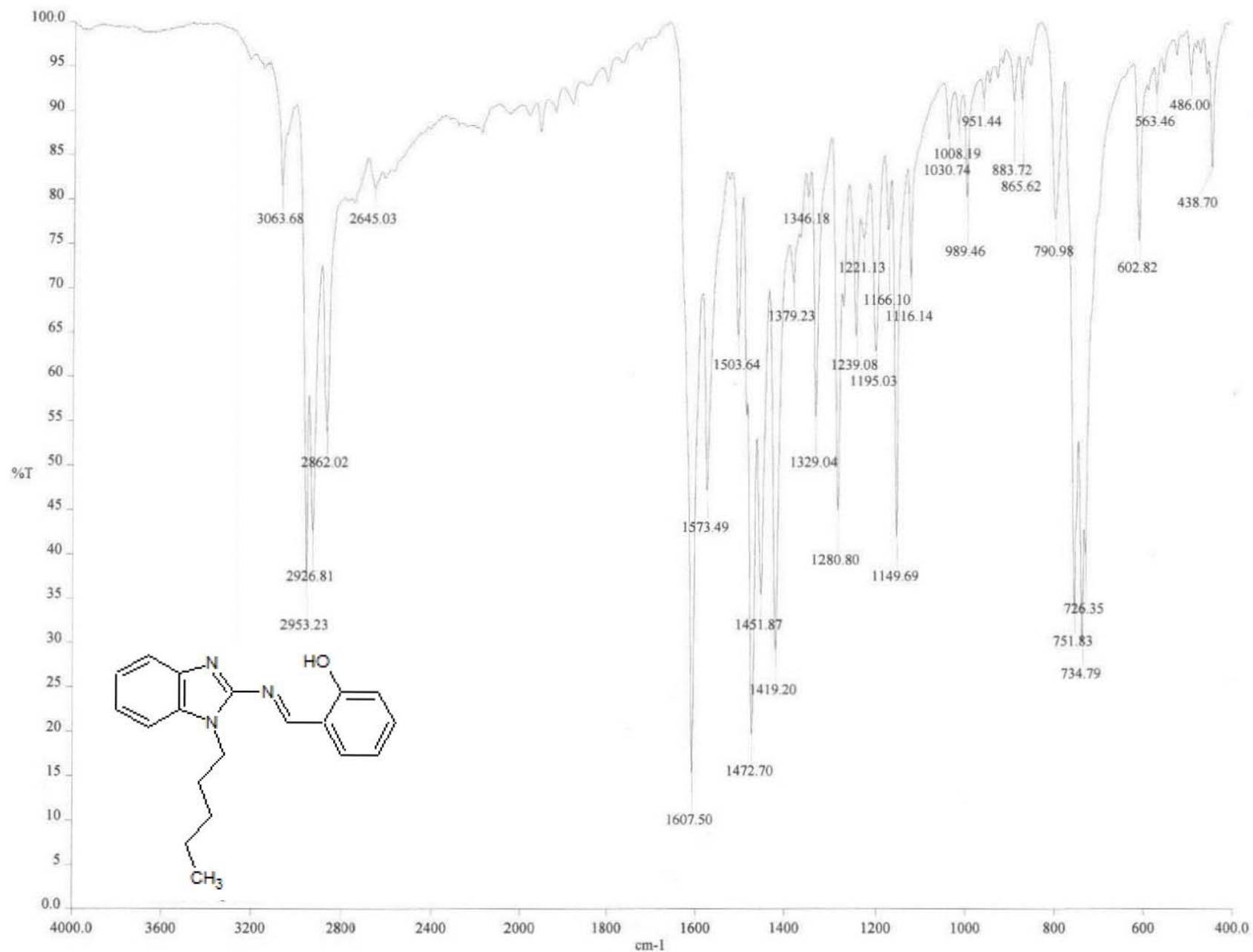
8/15/2011 6:06:32 PM

AN-1104

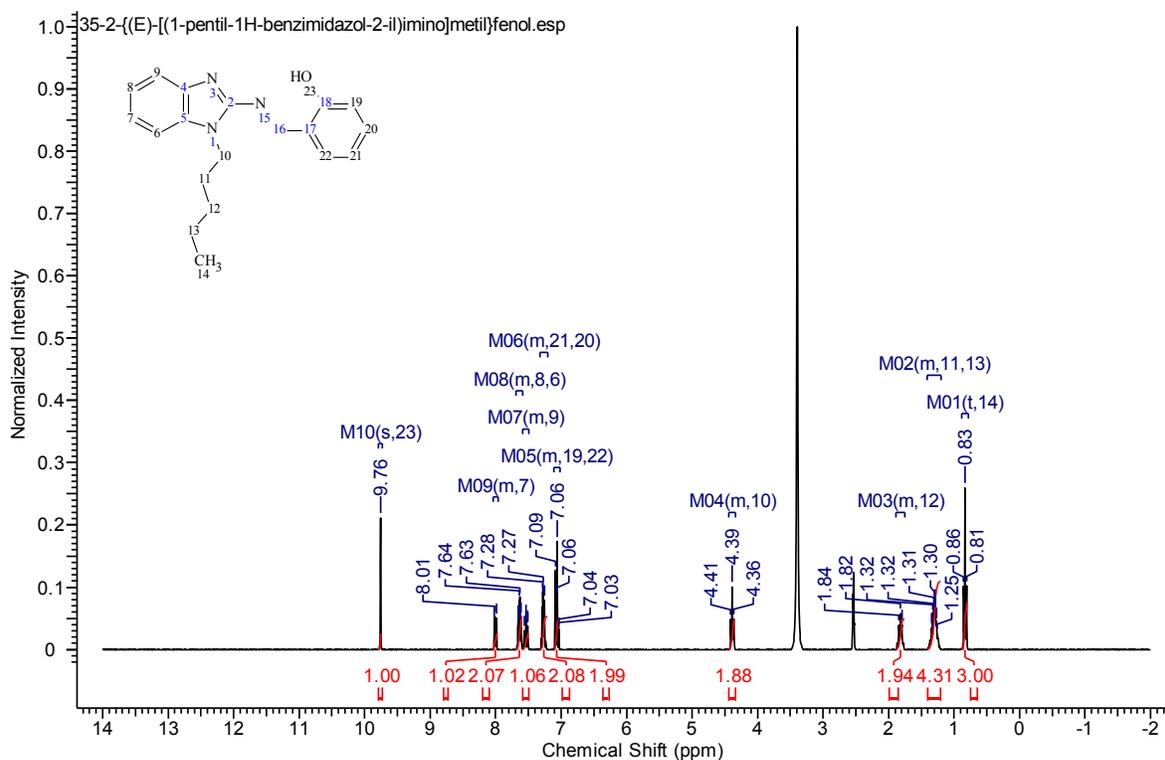
OT6489_1 #2 RT: 0.21 AV: 1 NL: 2.22E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 58, IR: 2-((E)-[(1-Pentil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)fenol (35)

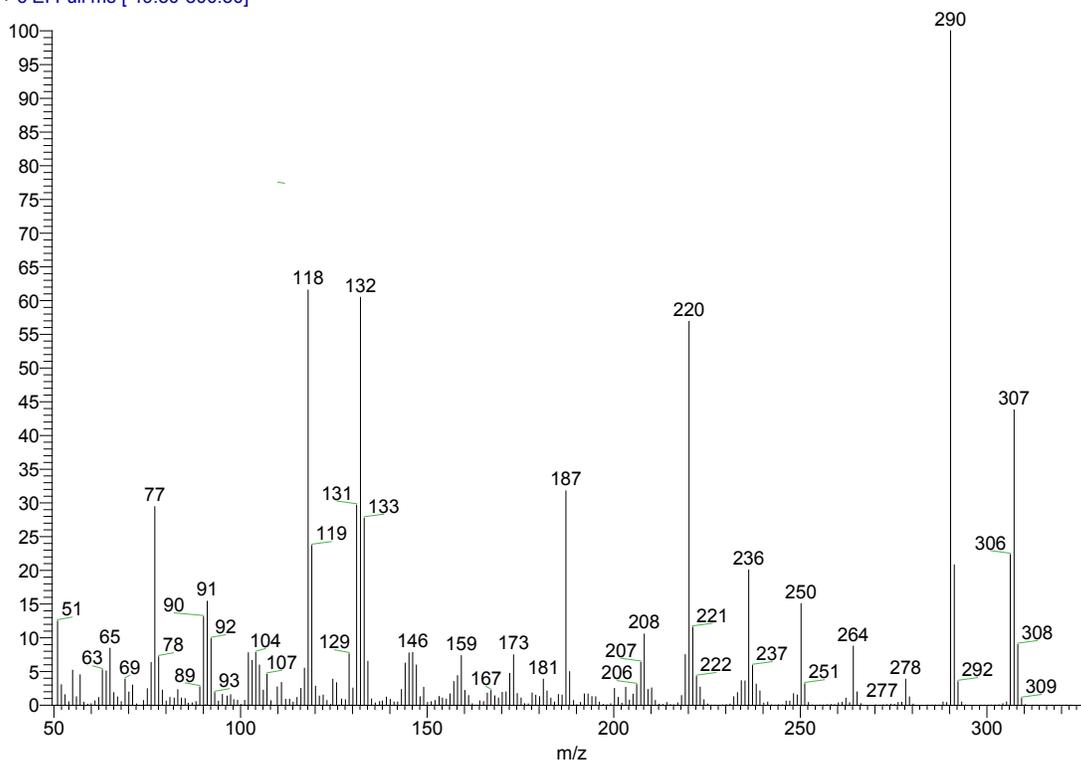


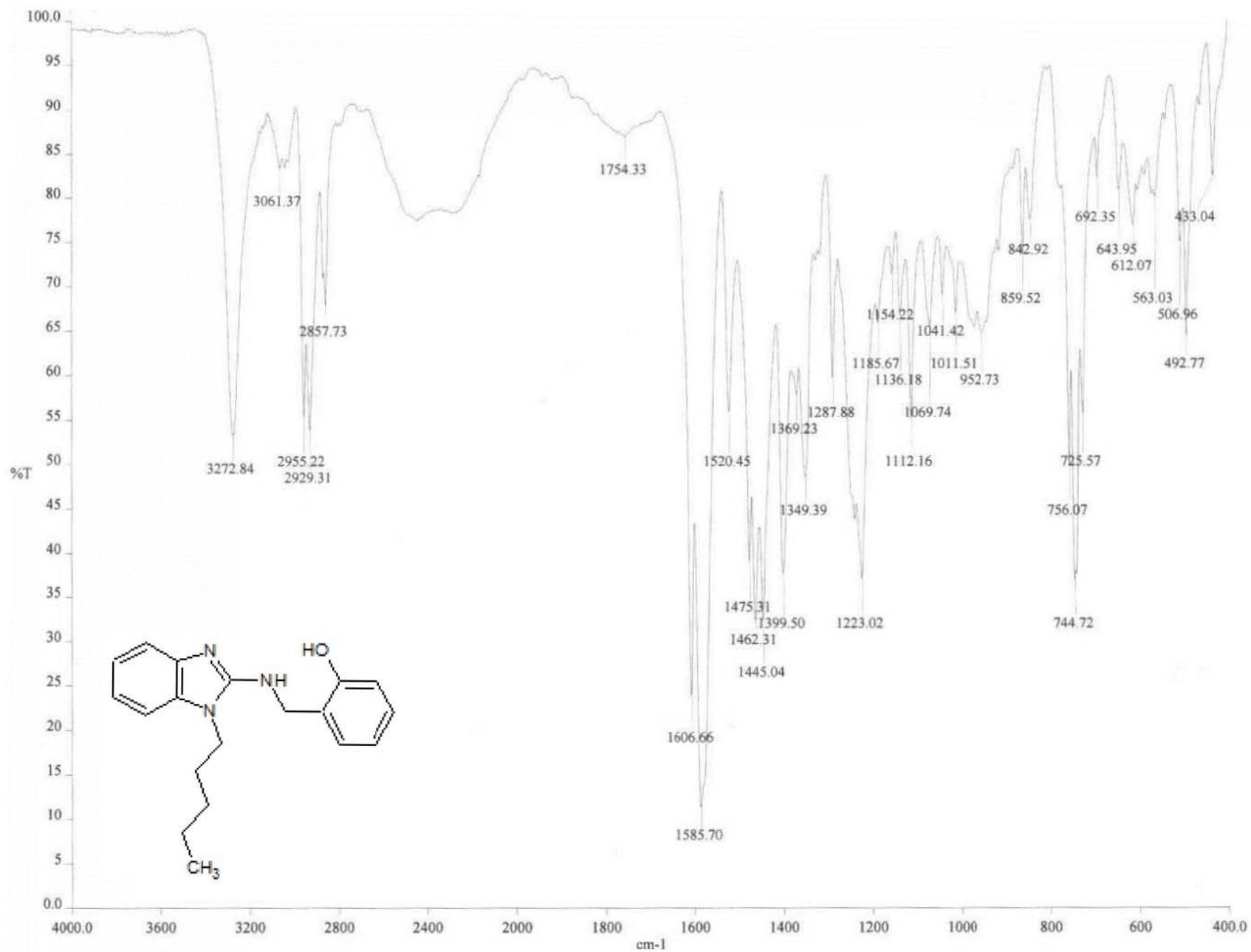
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT5915_1
szComment

5/3/2011 5:35:16 PM

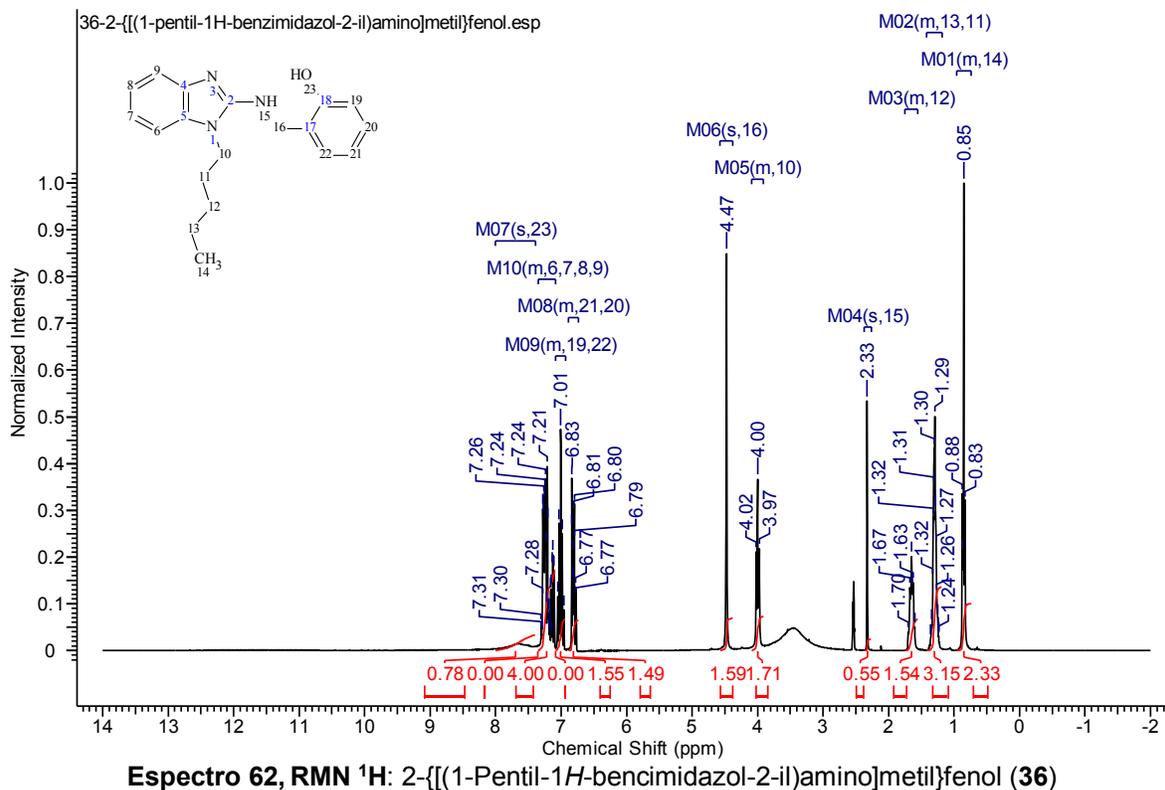
AN-1105

OT5915_1 #12-15 RT: 2.26-2.87 AV: 4 SB: 4 5.95-6.56
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 61, IR: 2-[[1-(1-Pentil-1H-bencimidazol-2-il)amino]metil]fenol (36)



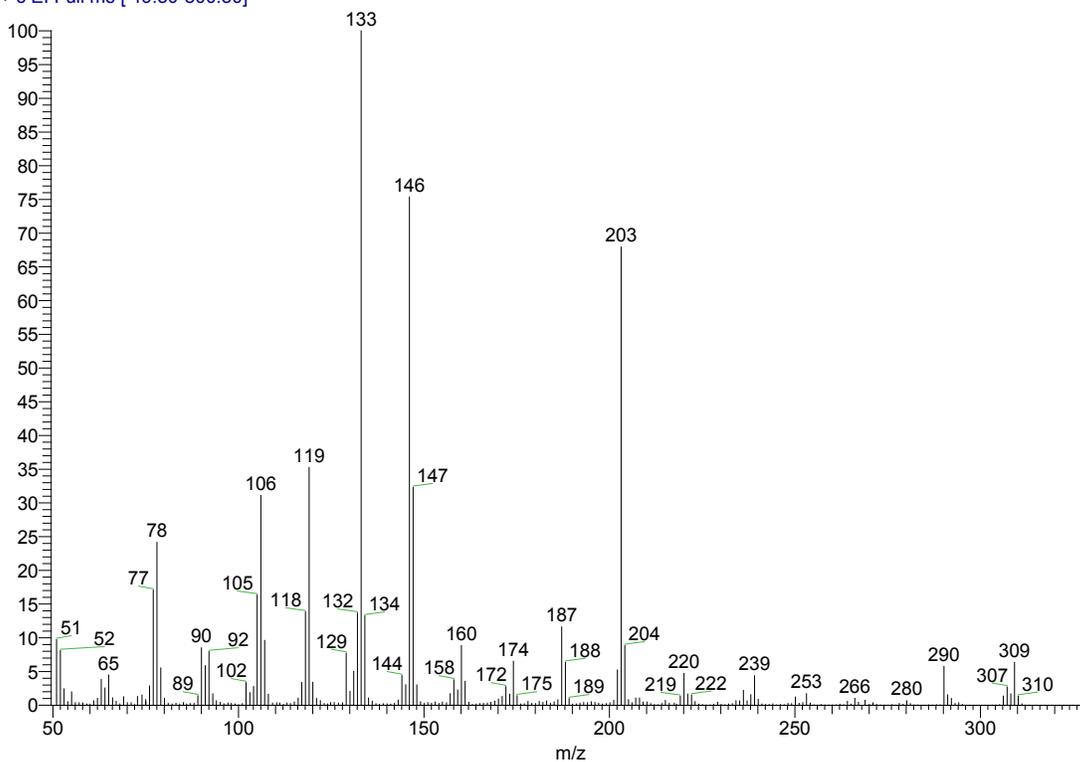
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT5943_1
szComment

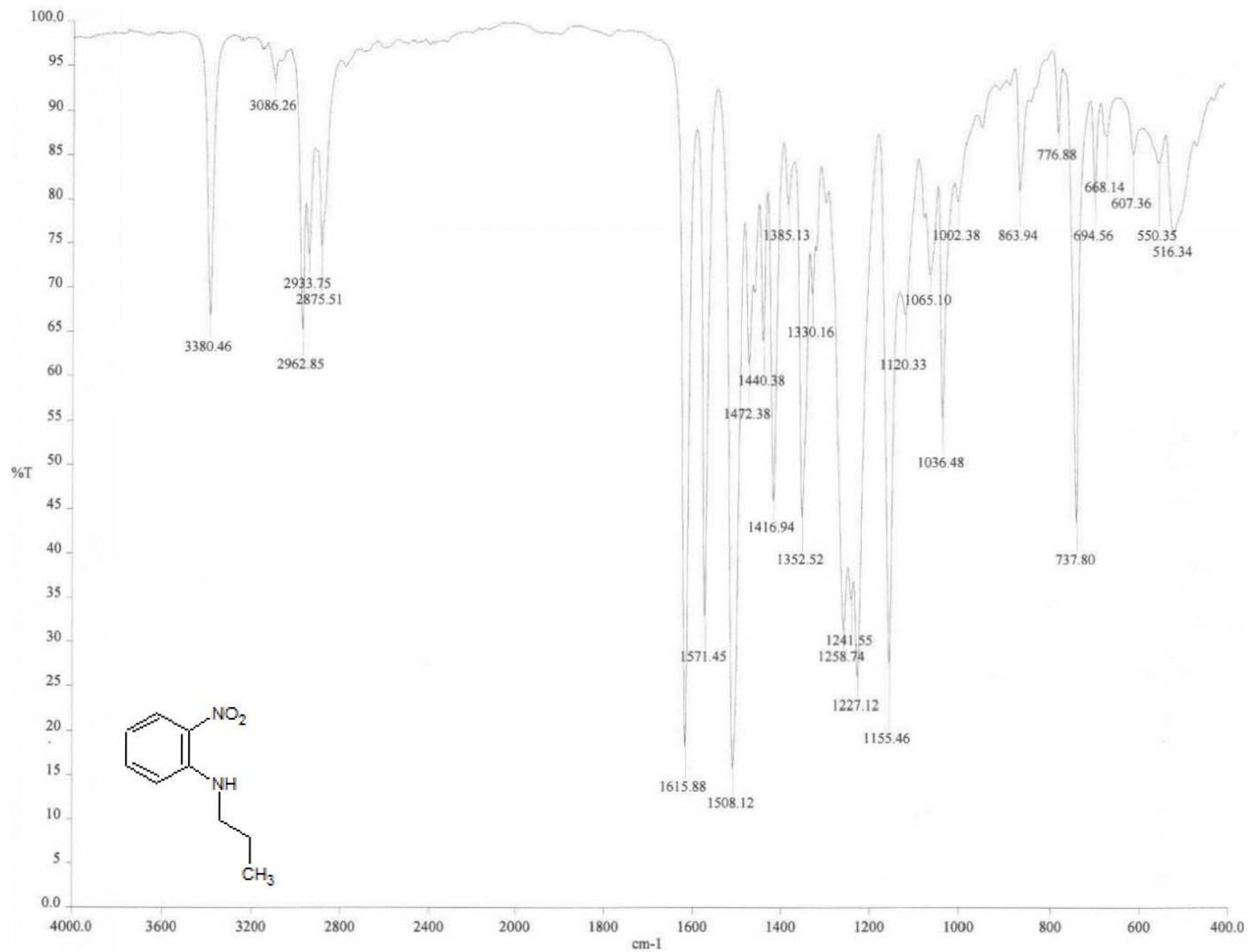
5/6/2011 6:24:43 PM

AN-1106

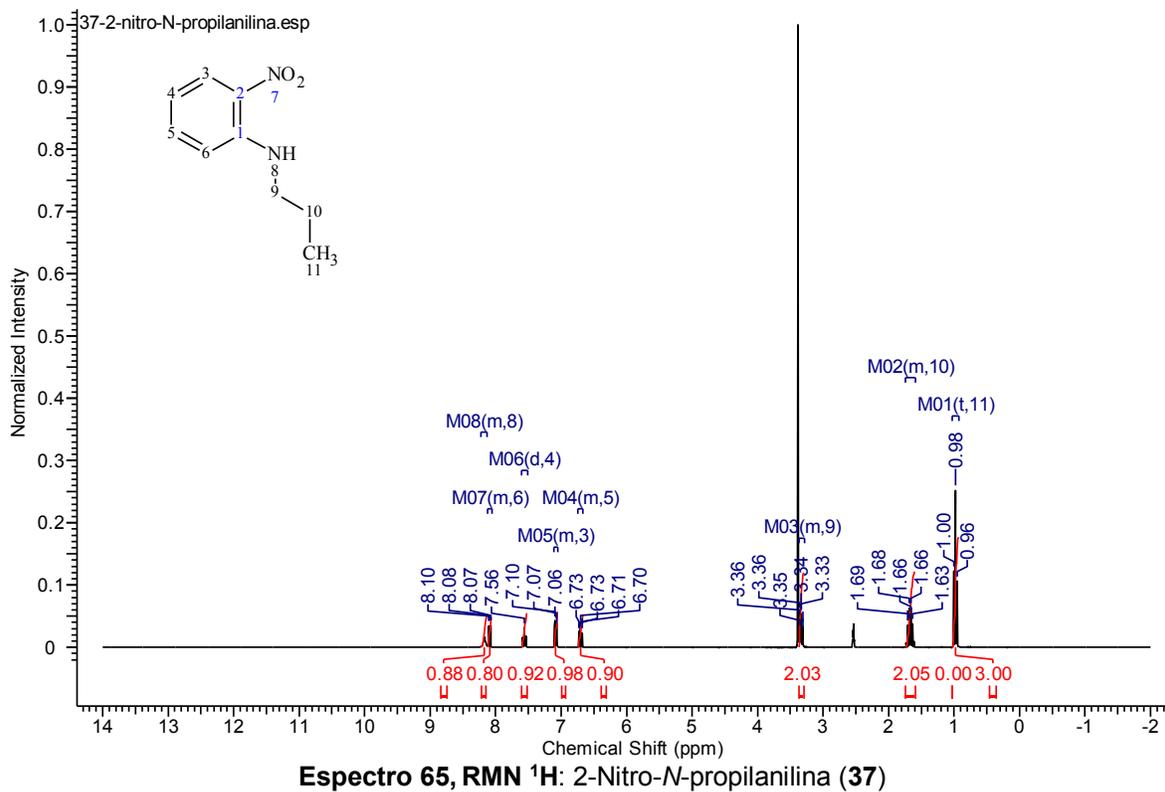
OT5943_1 #12-13 RT: 2.26-2.46 AV: 2 NL: 3.74E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 64, IR: 2-Nitro-N-propilanilina (37)

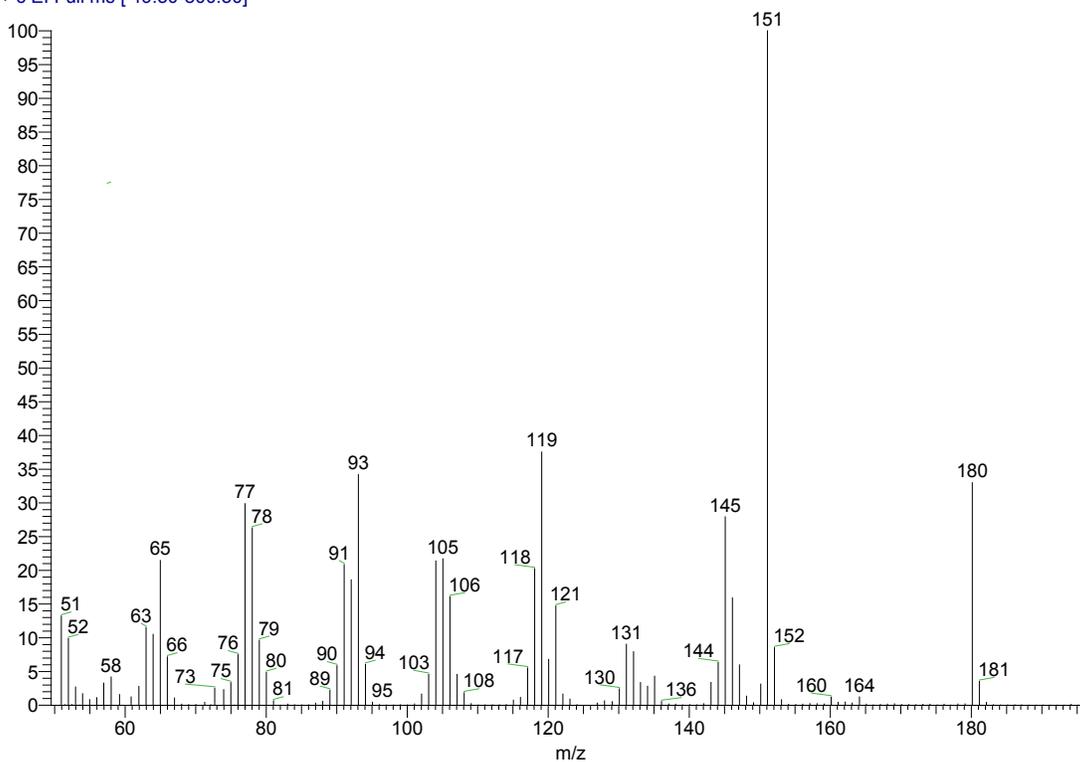


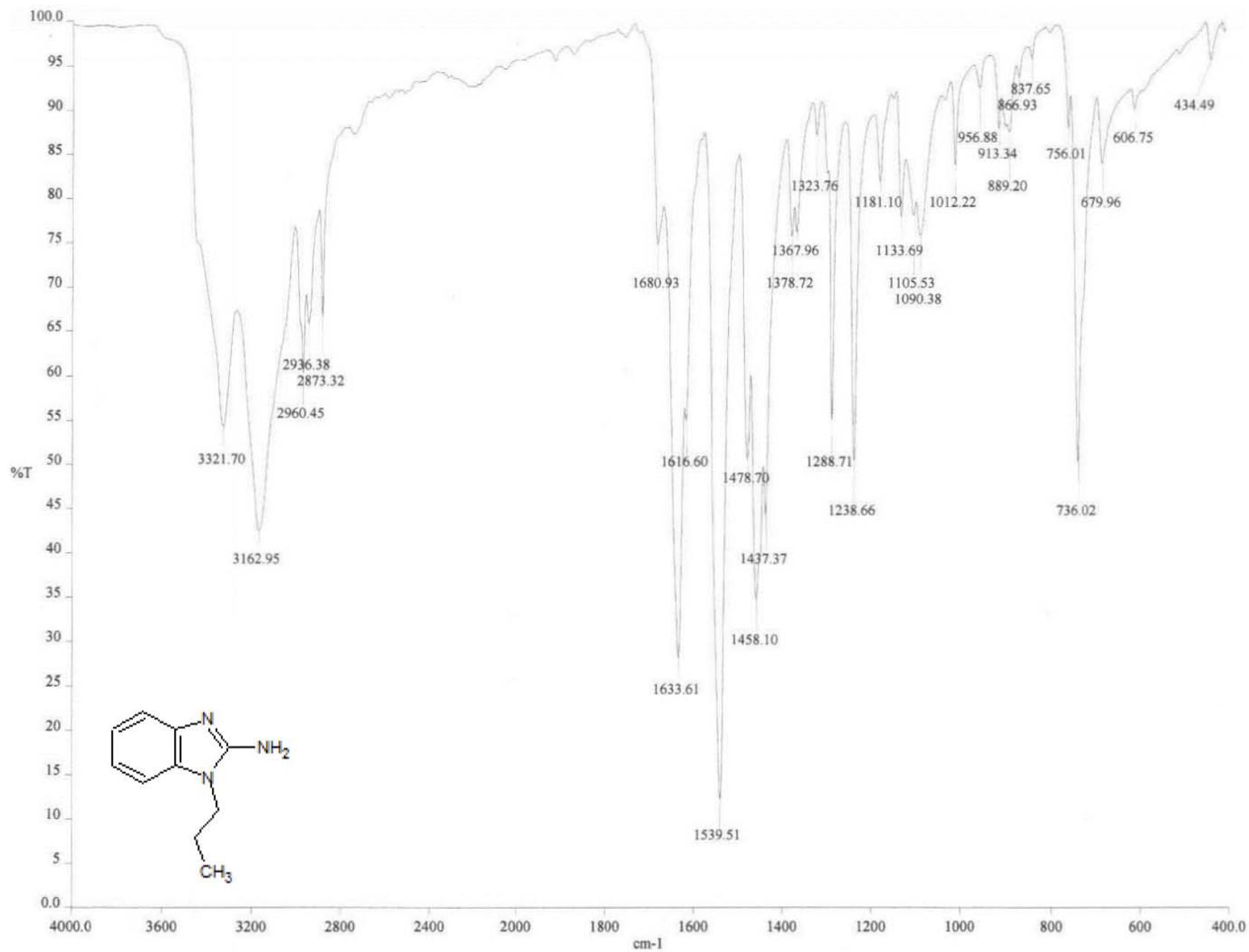
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4570_1
szComment

8/19/2010 6:20:41 PM

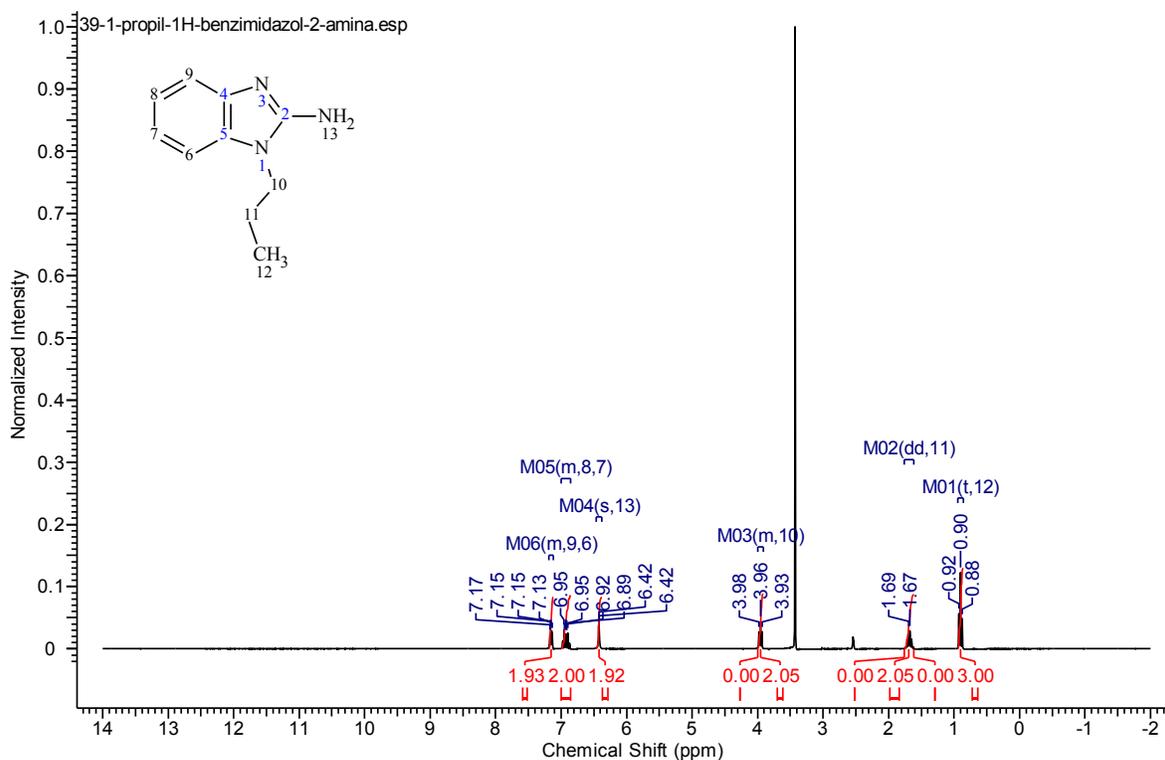
AN-1302

OT4570_1 #2-3 RT: 0.21-0.41 AV: 2 SB: 2 1.23-1.44 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 67, IR: 1-Propil-1H-bencimidazol-2-amina (39)

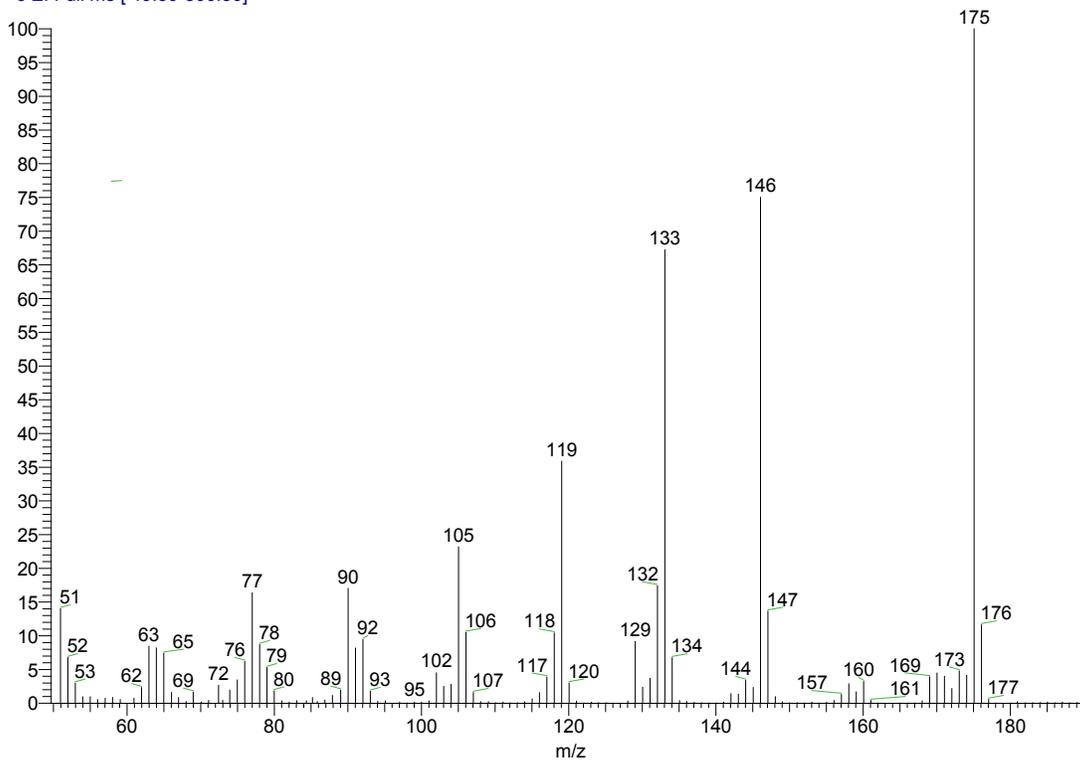


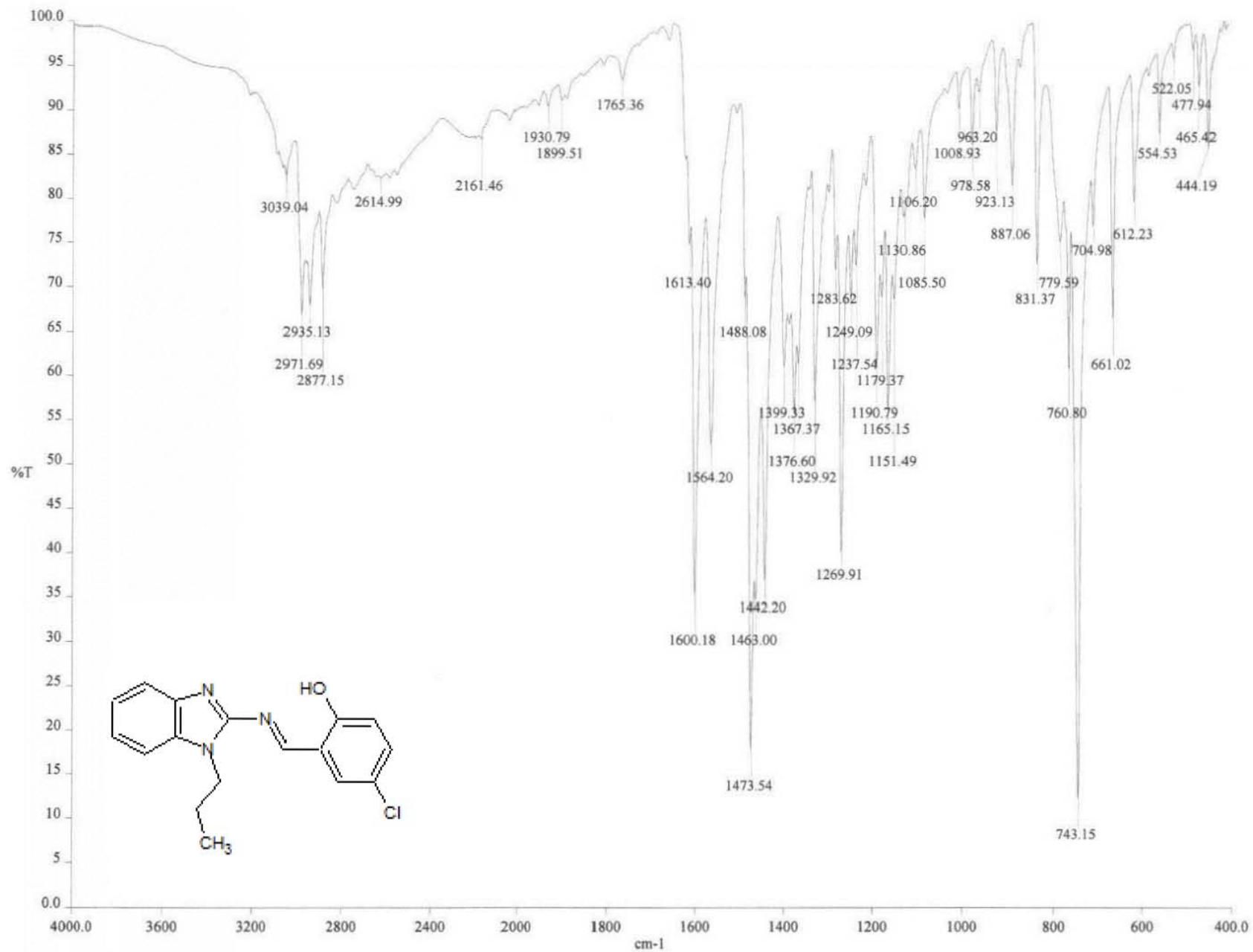
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4622_1
szComment

9/1/2010 3:17:01 PM

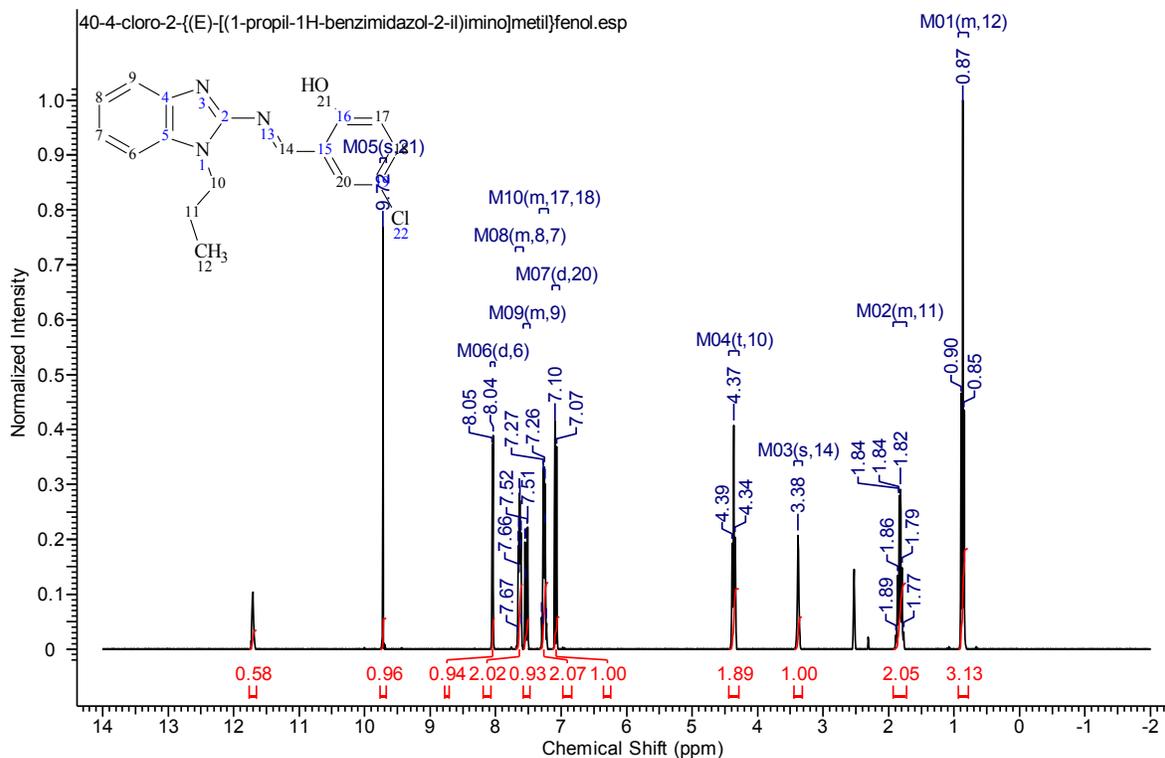
AN-1304

OT4622_1 #3-5 RT: 0.41-0.82 AV: 3 SB: 5 4.92-5.74 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 70, IR: 4-Cloro-2-((E)-[(1-propil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)fenol (40)



Espectro 71, RMN ¹H: 4-Cloro-2-((E)-[(1-propil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)fenol (**40**)

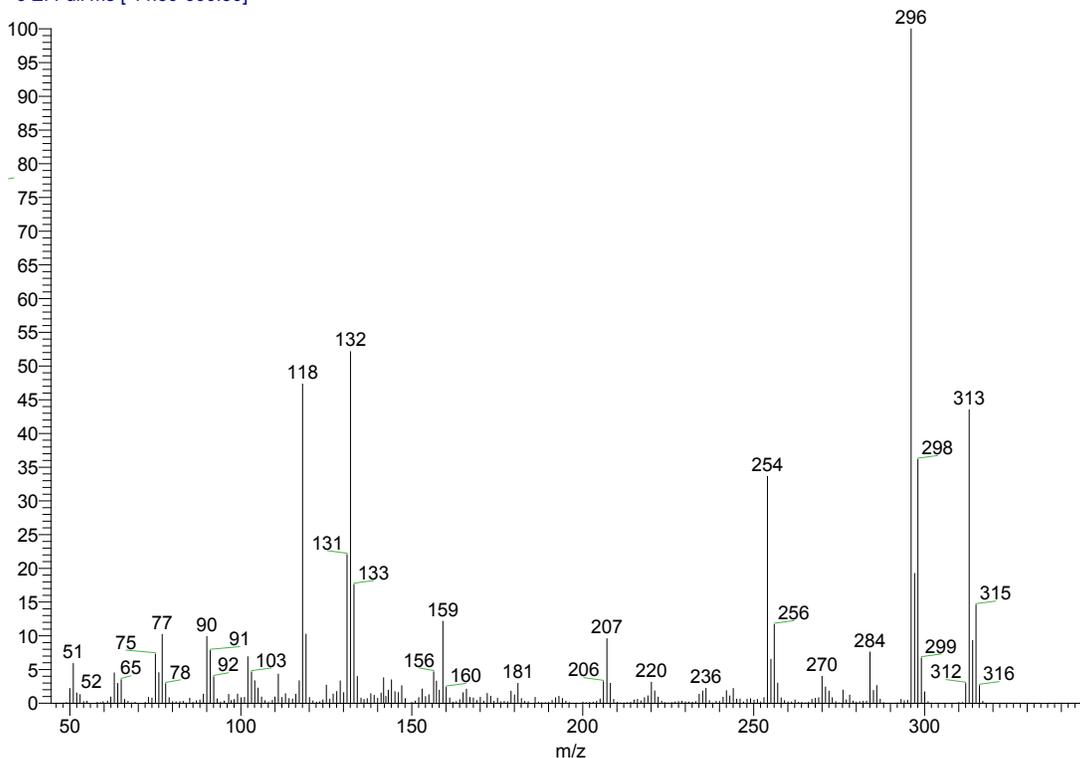
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4708_1
szComment

9/21/2010 5:23:15 PM

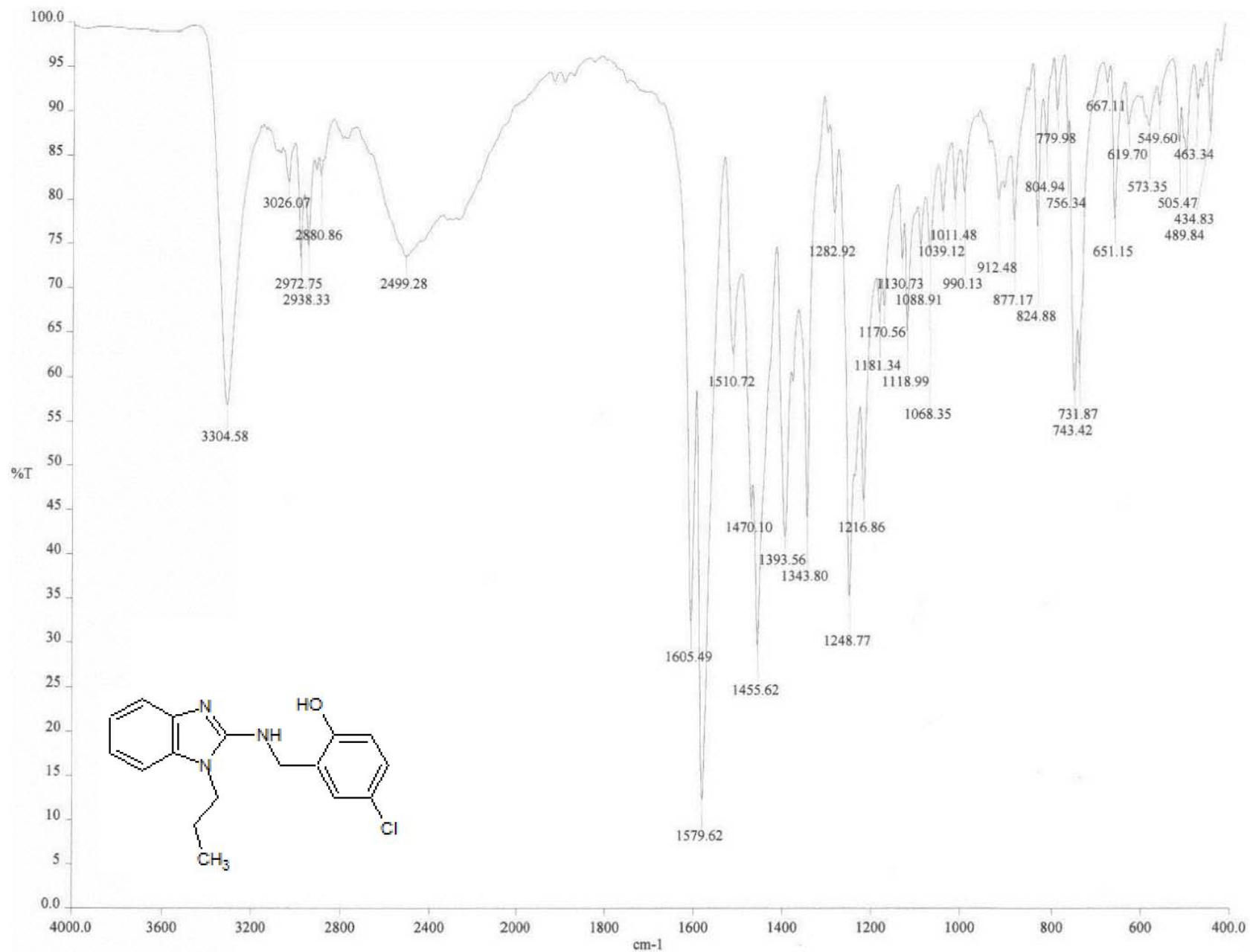
AN-1305

OT4708_1 #2-4 RT: 0.20-0.58 AV: 3 SB: 2 1.34-1.54 N
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]

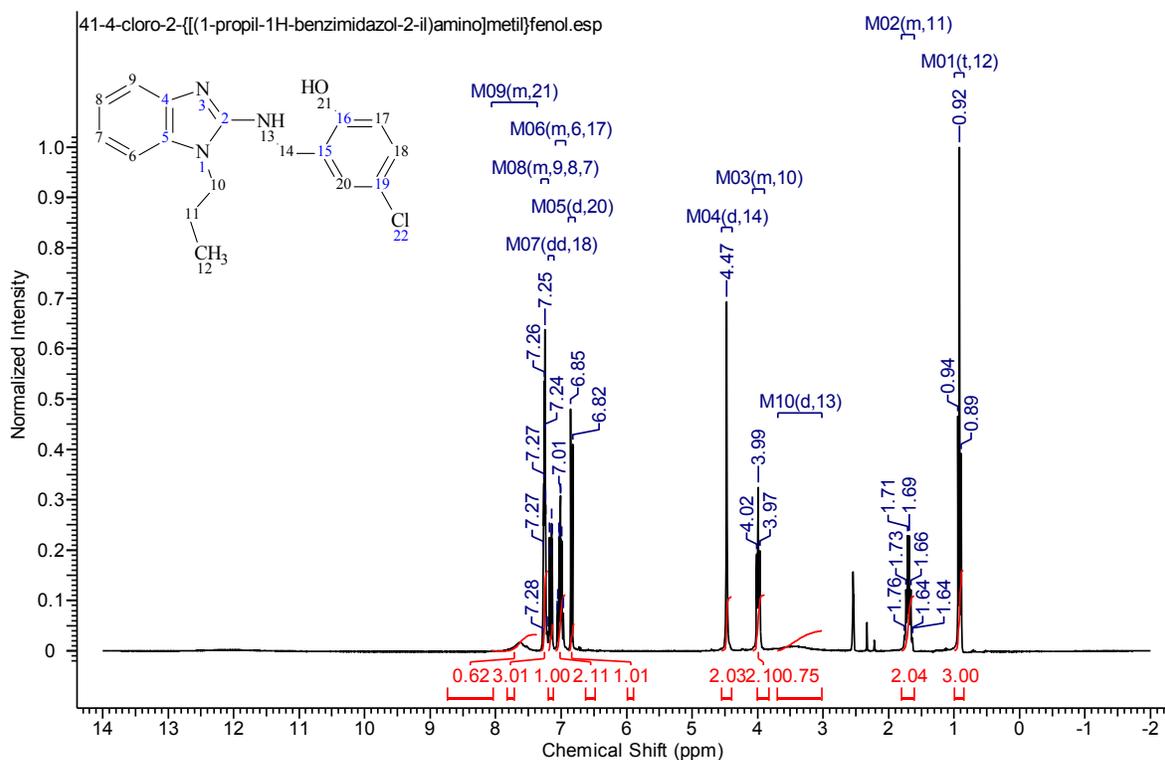
Relative Abundance



Espectro 72, EM: 4-Cloro-2-((E)-[(1-propil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)fenol (**40**)



Espectro 73, IR: 4-Cloro-2-[[1-propil-1H-bencimidazol-2-il]amino]metil}fenol (41)



Espectro 74, RMN ¹H: 4-Cloro-2-(((1-propil-1H-bencimidazol-2-il)amino)metil)fenol (41)

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4737_1

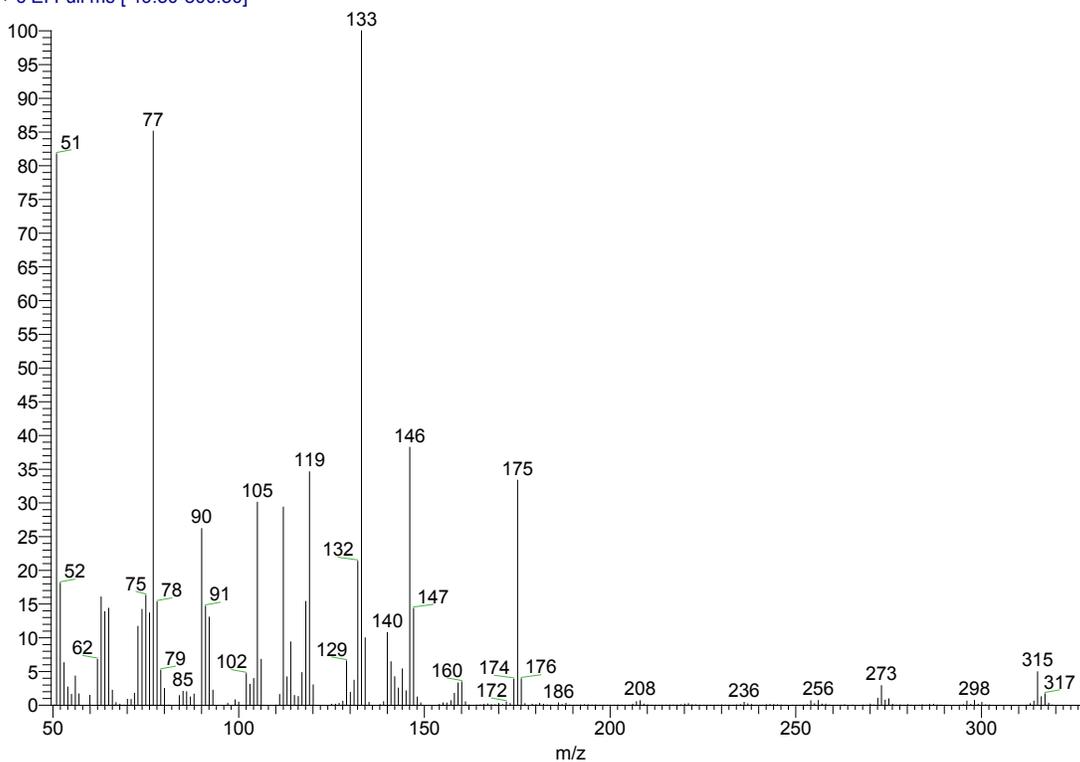
9/24/2010 4:26:39 PM

ABN-1306

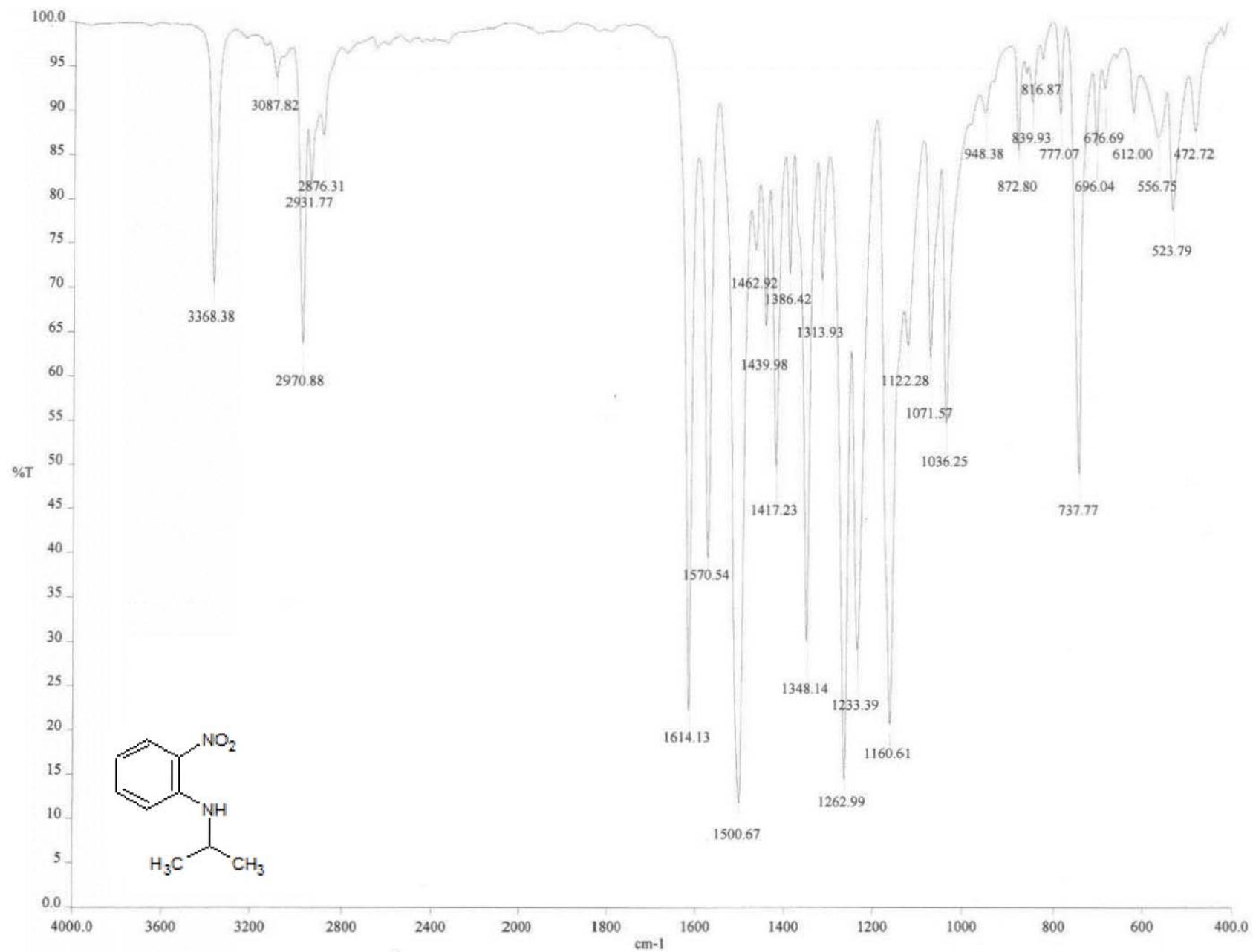
szComment

OT4737_1 #6-9 RT: 1.03-1.64 AV: 4 SB: 2 0.00-0.21 N

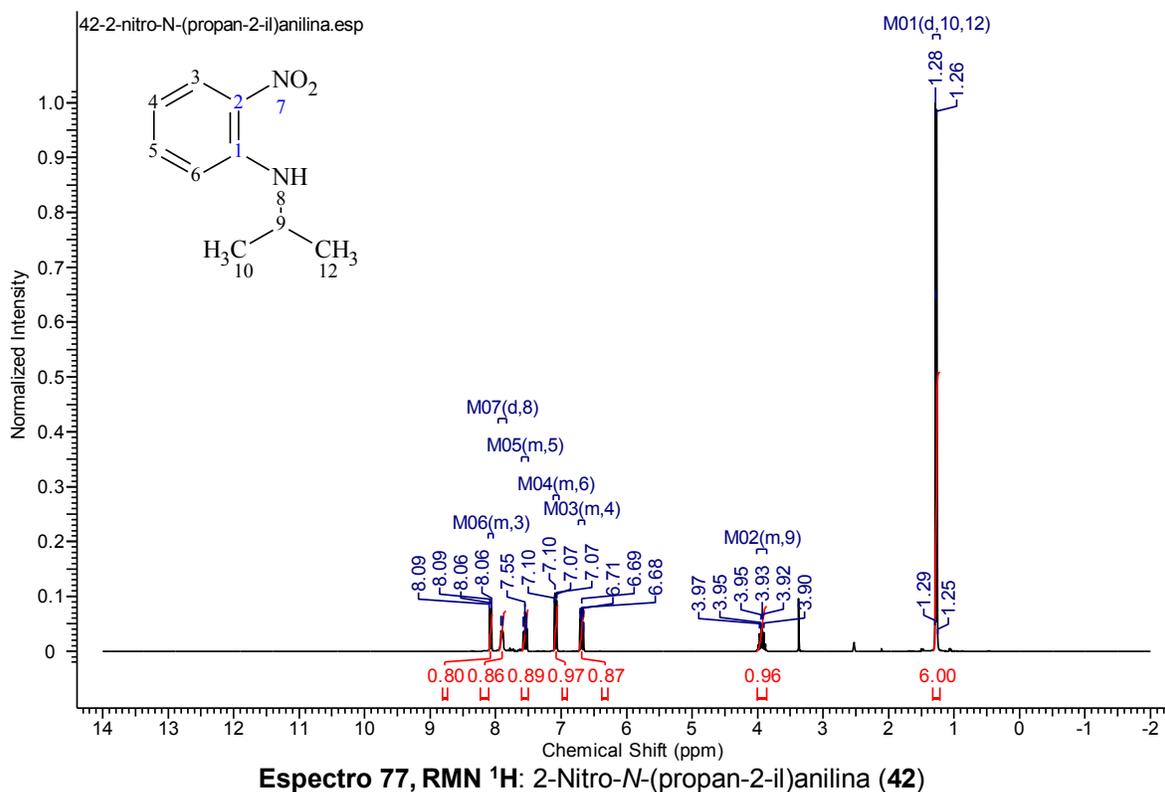
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 75, EM: 4-Cloro-2-(((1-propil-1H-bencimidazol-2-il)amino)metil)fenol (41)



Espectro 76, IR: 2-Nitro-N-(propan-2-il)anilina (42)

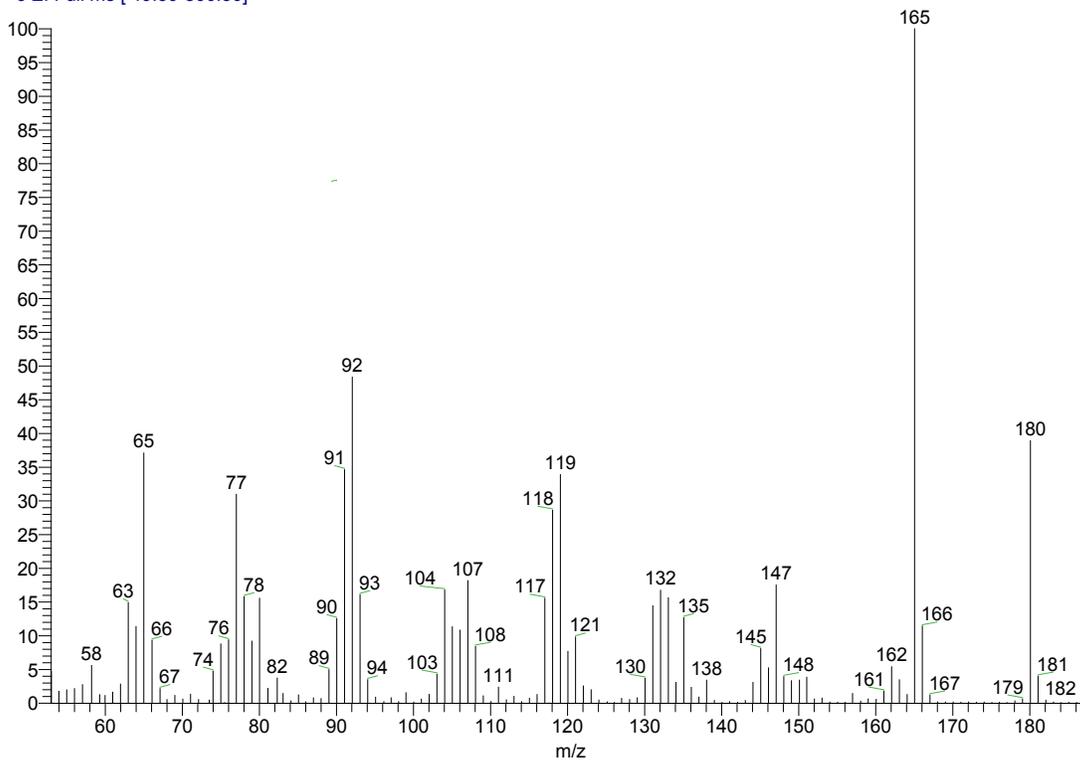


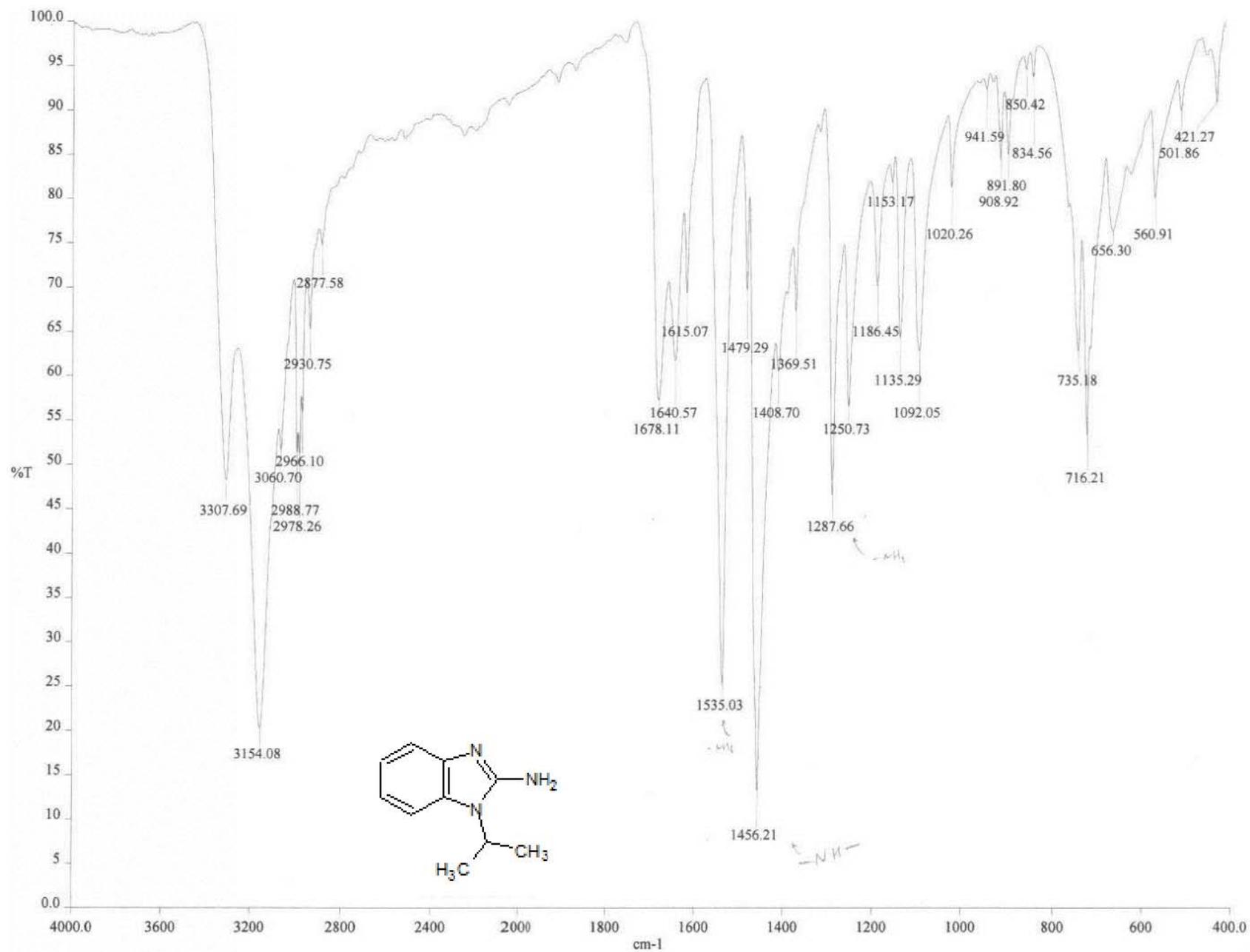
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4676_2
szComment

9/14/2010 1:43:27 PM

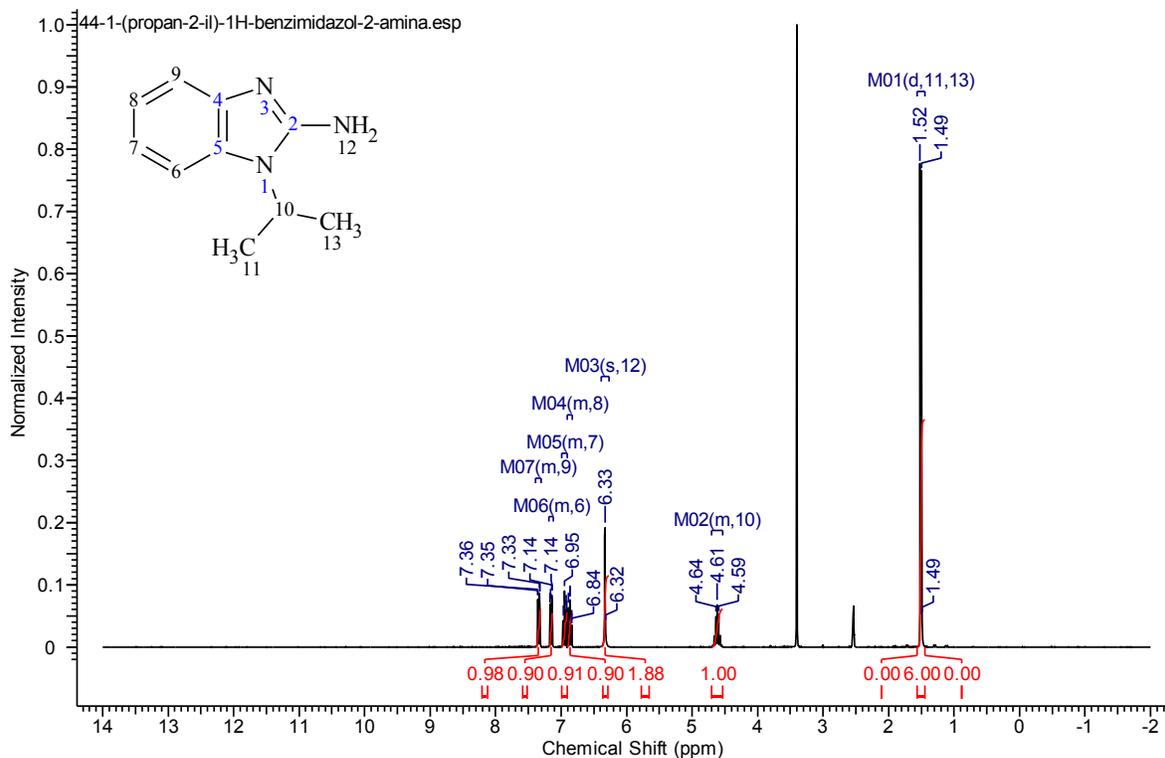
PK-1502

OT4676_2 #2 RT: 0.21 AV: 1 SB: 6 1.03-2.05 NL: 4.15
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 79, IR: 1-(Propan-2-il)-1H-bencimidazol-2-amina (44)



Espectro 80, RMN ¹H: 1-(Propan-2-il)-1H-bencimidazol-2-amina (44)

D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4889_1

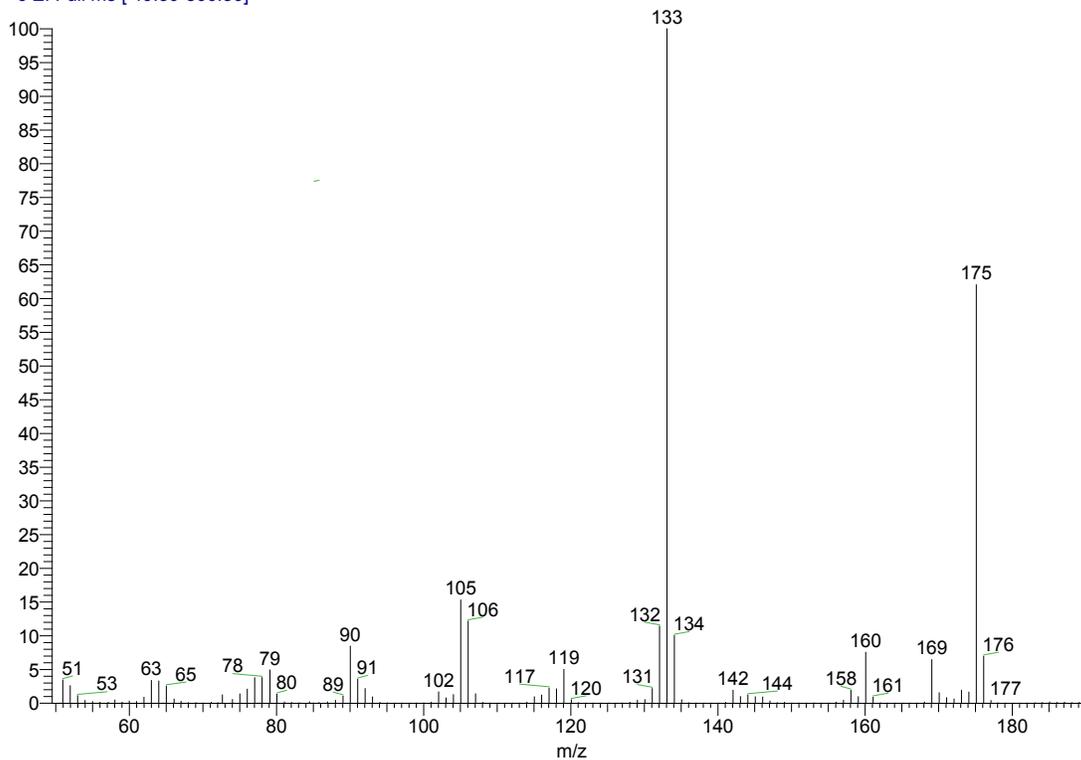
10/19/2010 3:24:28 PM

AN-1504

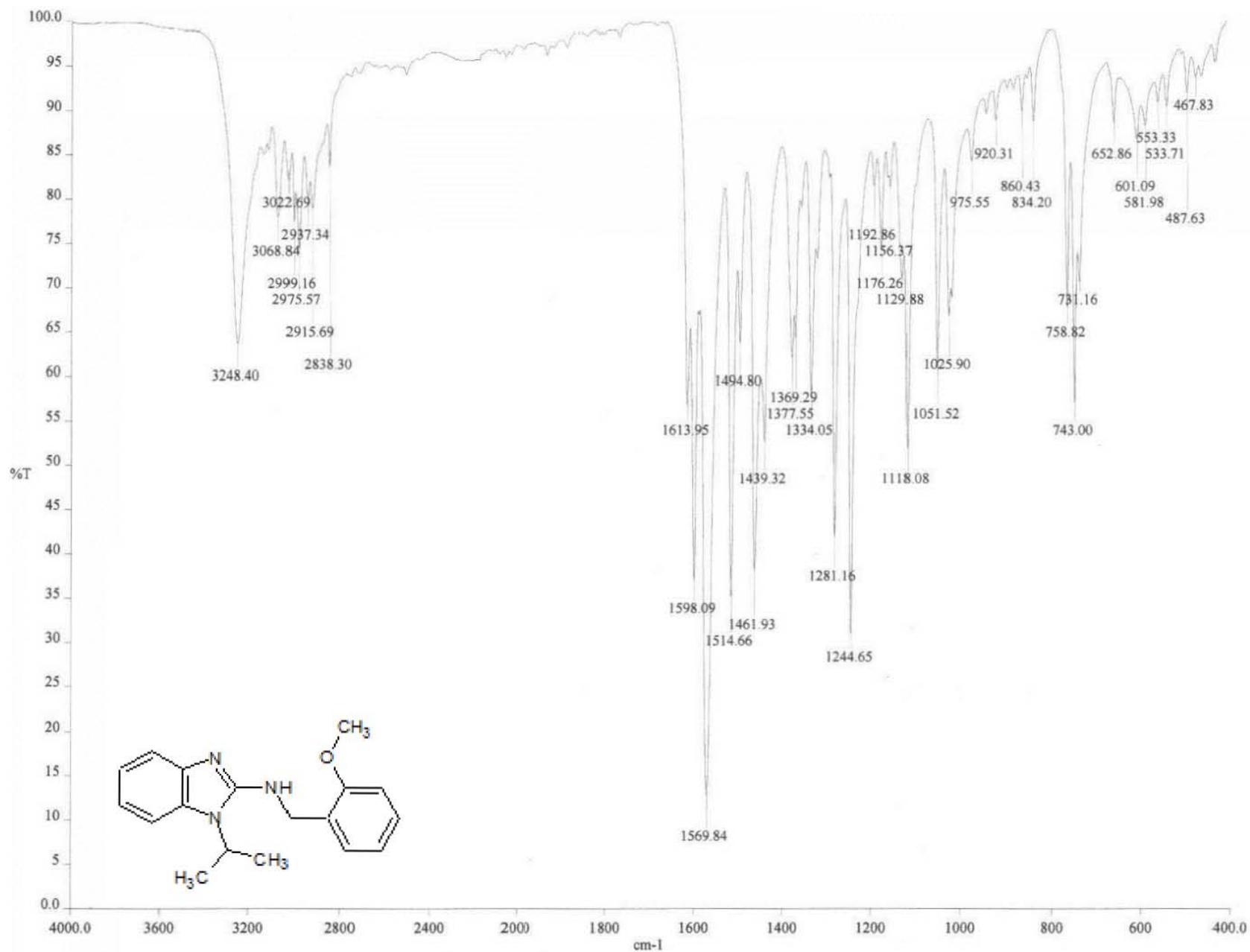
szComment

OT4889_1 #4-7 RT: 0.62-1.23 AV: 4 SB: 38 5.95-13.52

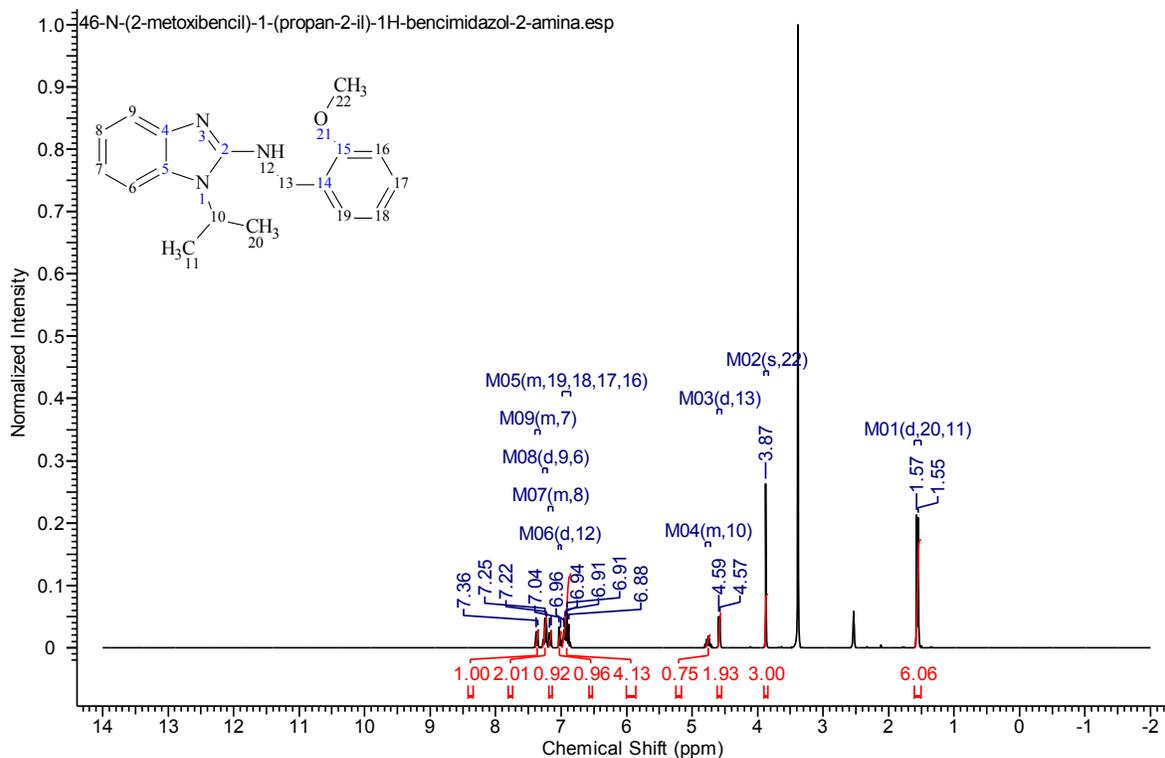
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]



Espectro 81, EM: 1-(Propan-2-il)-1H-bencimidazol-2-amina (44)



Espectro 82, IR: *N*-(2-Metoxibencil)-1-(propan-2-il)-1*H*-bencimidazol-2-amina (46)



Espectro 83, RMN ¹H: *N*-(2-Metoxibencil)-1-(propan-2-il)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**46**)

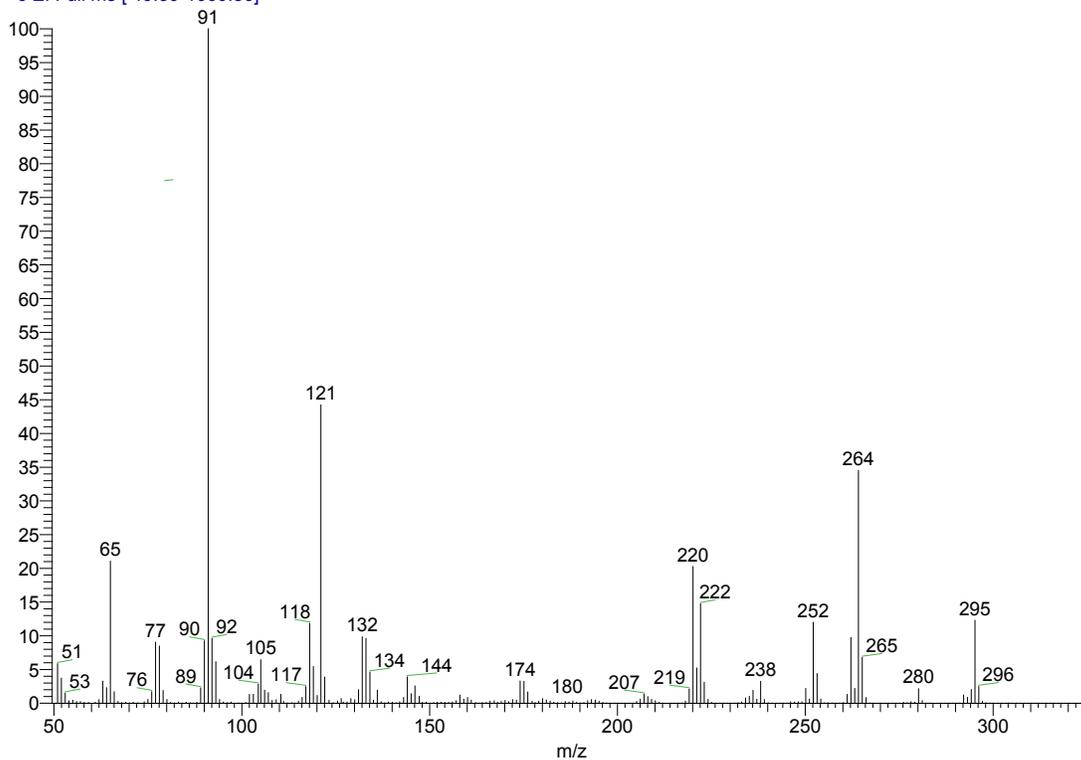
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4994_1
szComment

11/8/2010 8:24:06 PM

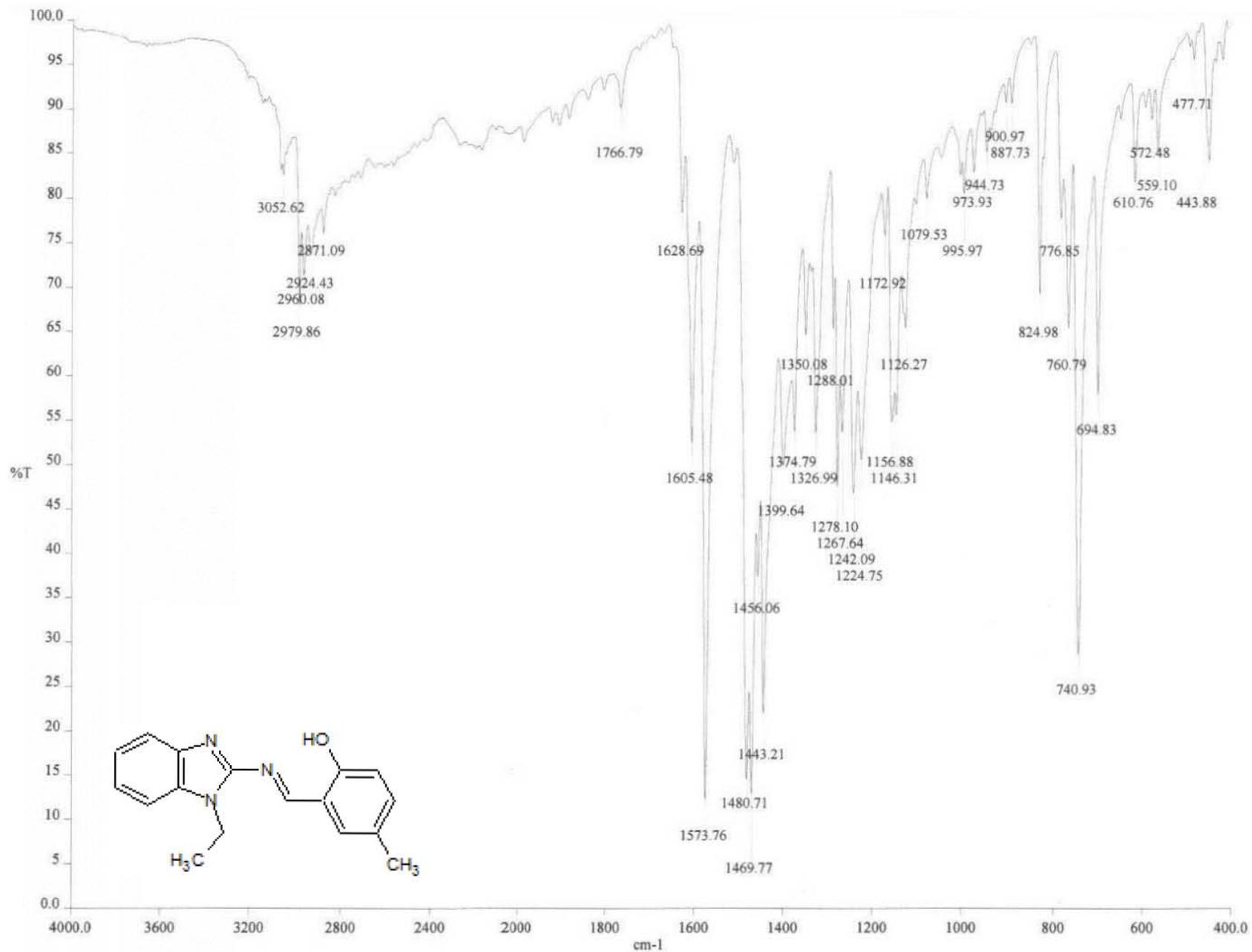
PK-1506

OT4994_1 #8-9 RT: 1.55-1.77 AV: 2 SB: 5 2.43-3.32 N

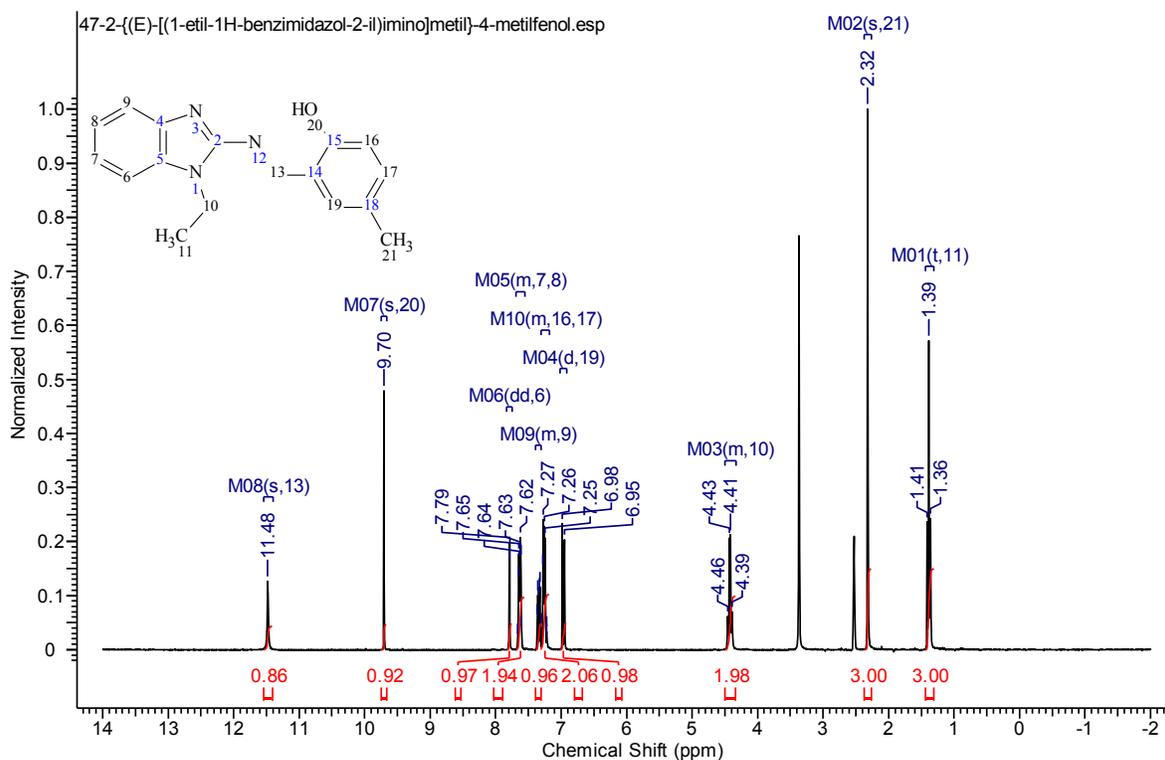
T: + c EI Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 84, EM: *N*-(2-Metoxibencil)-1-(propan-2-il)-1*H*-bencimidazol-2-amina (**46**)



Espectro 85, IR: 2-((E)-[(1-Etil-1H-bencimidazol-2-il)imino]metil)-4-metilfenol (47)



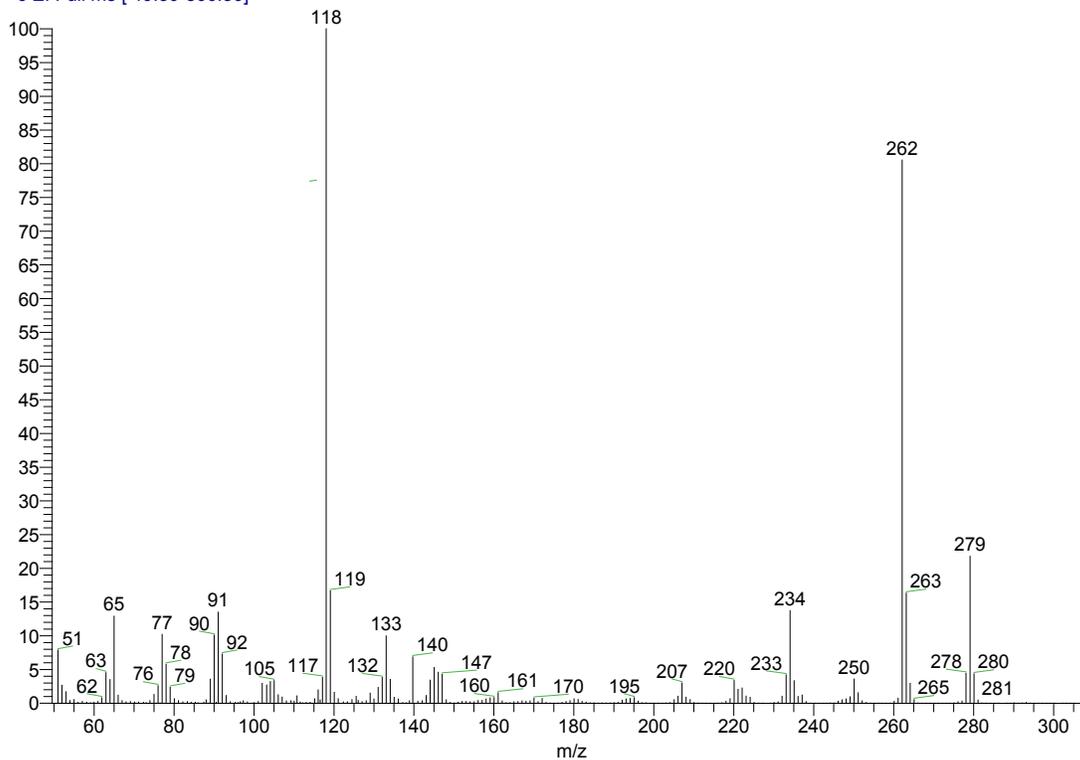
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4677_1
szComment

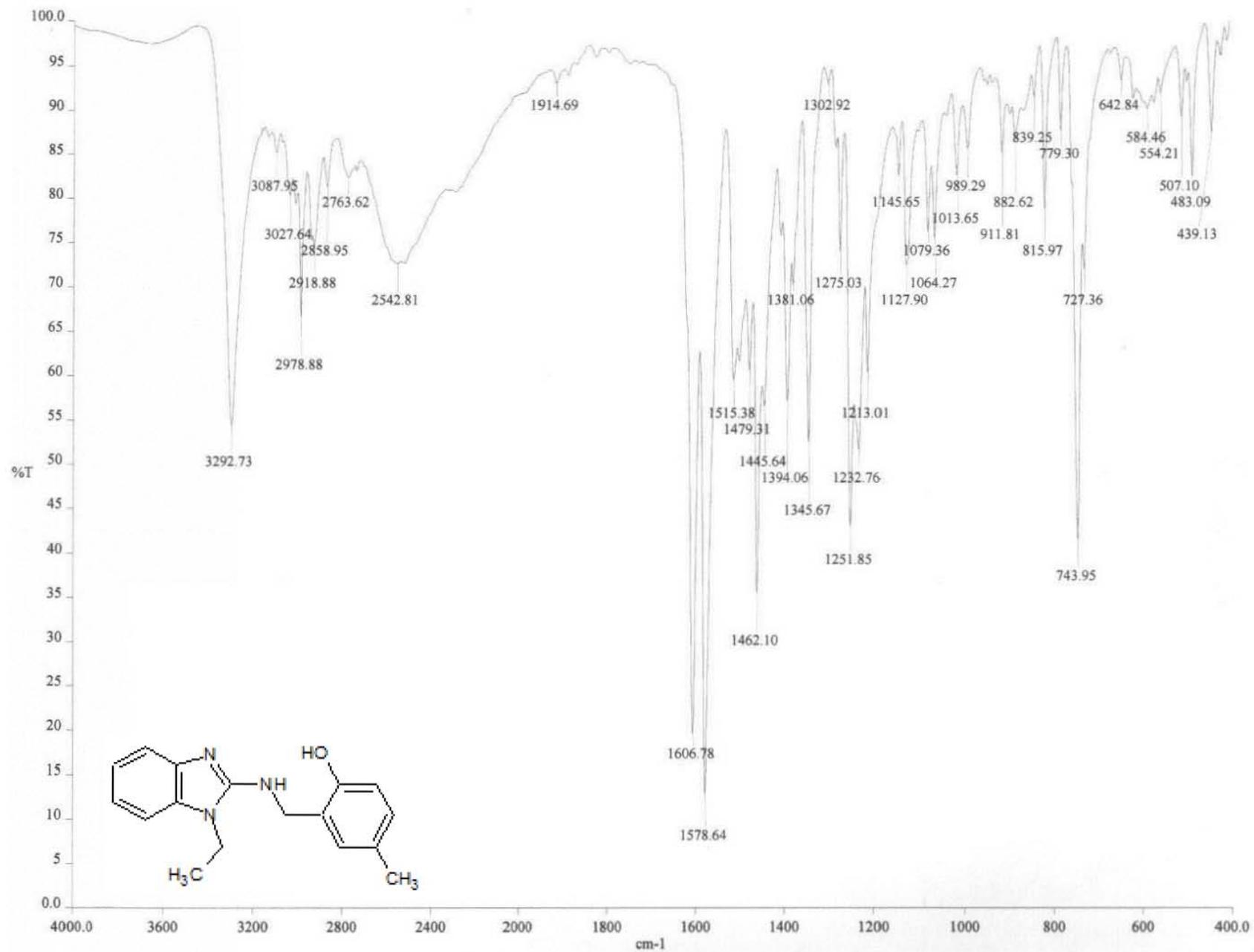
9/14/2010 1:54:15 PM

PK-1205

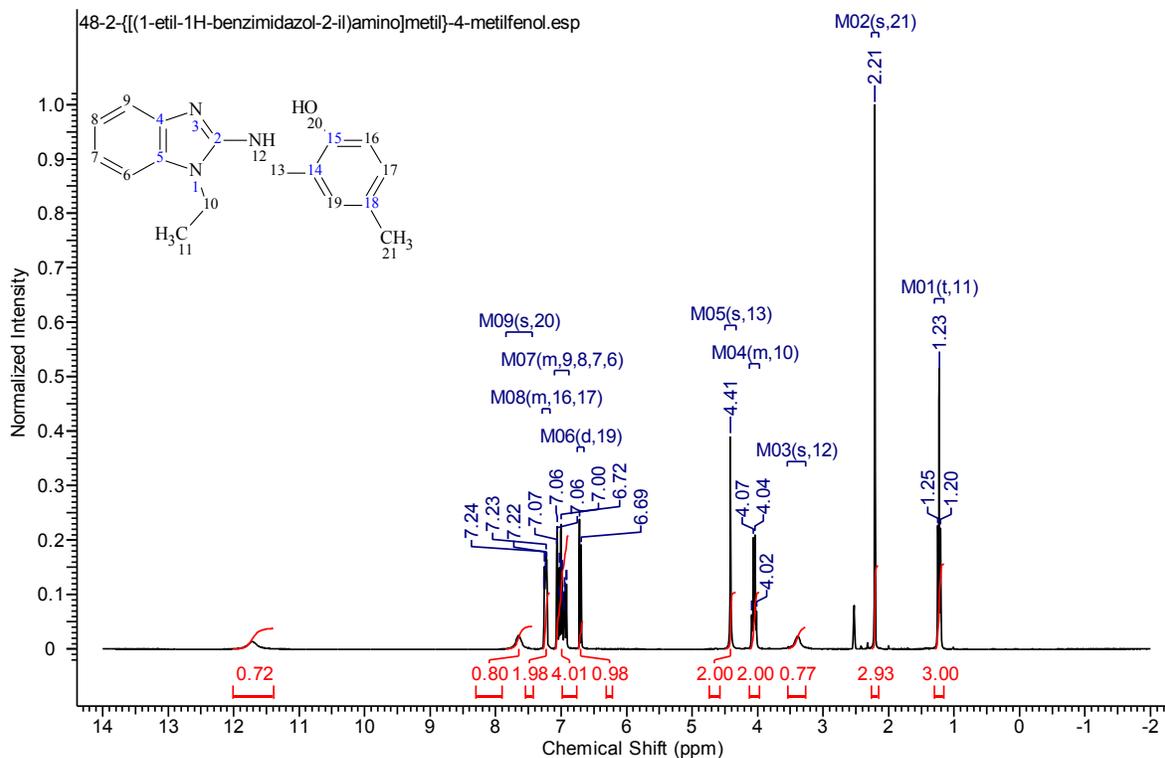
OT4677_1 #6 RT: 1.03 AV: 1 SB: 1 1.64 NL: 1.55E7

T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Espectro 88, IR: 2-[[[1-Etil-1H-bencimidazol-2-il)amino]metil]-4-metilfenol (48)

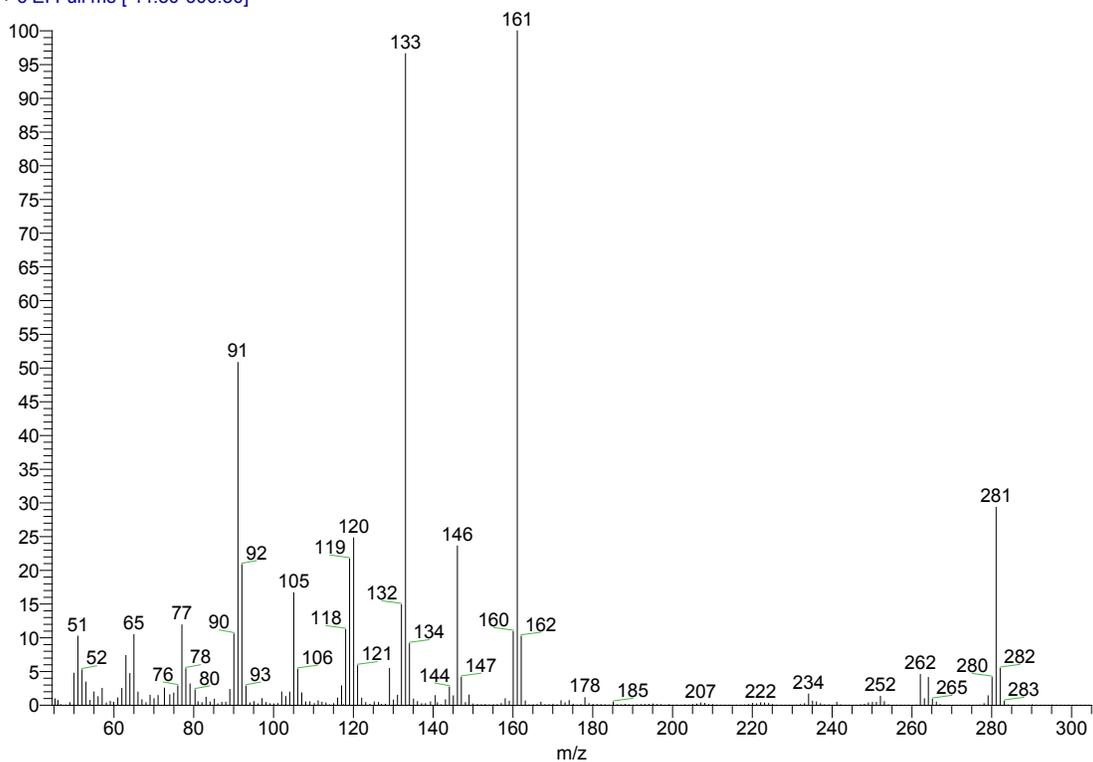


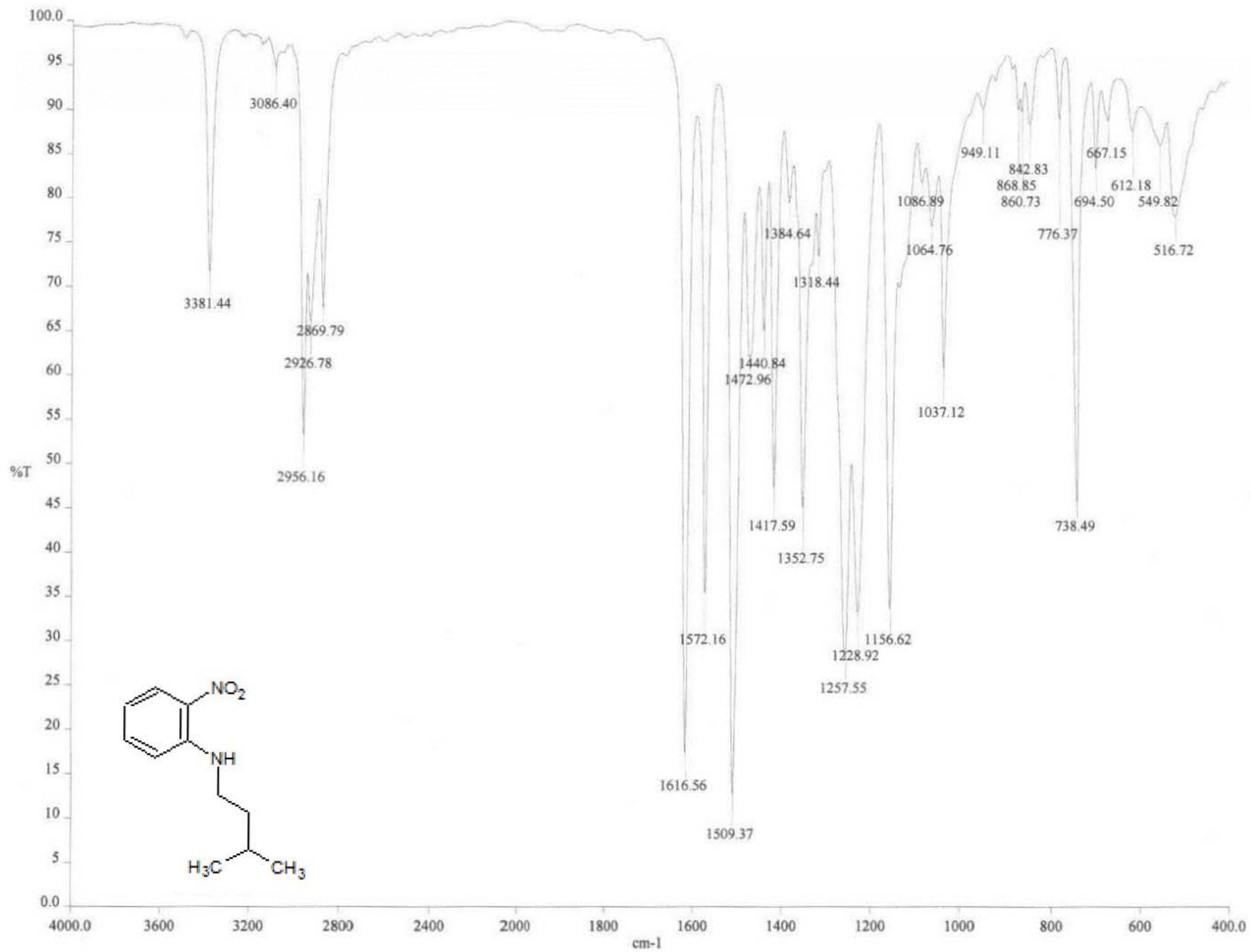
D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT4707_1
szComment

9/21/2010 5:14:31 PM

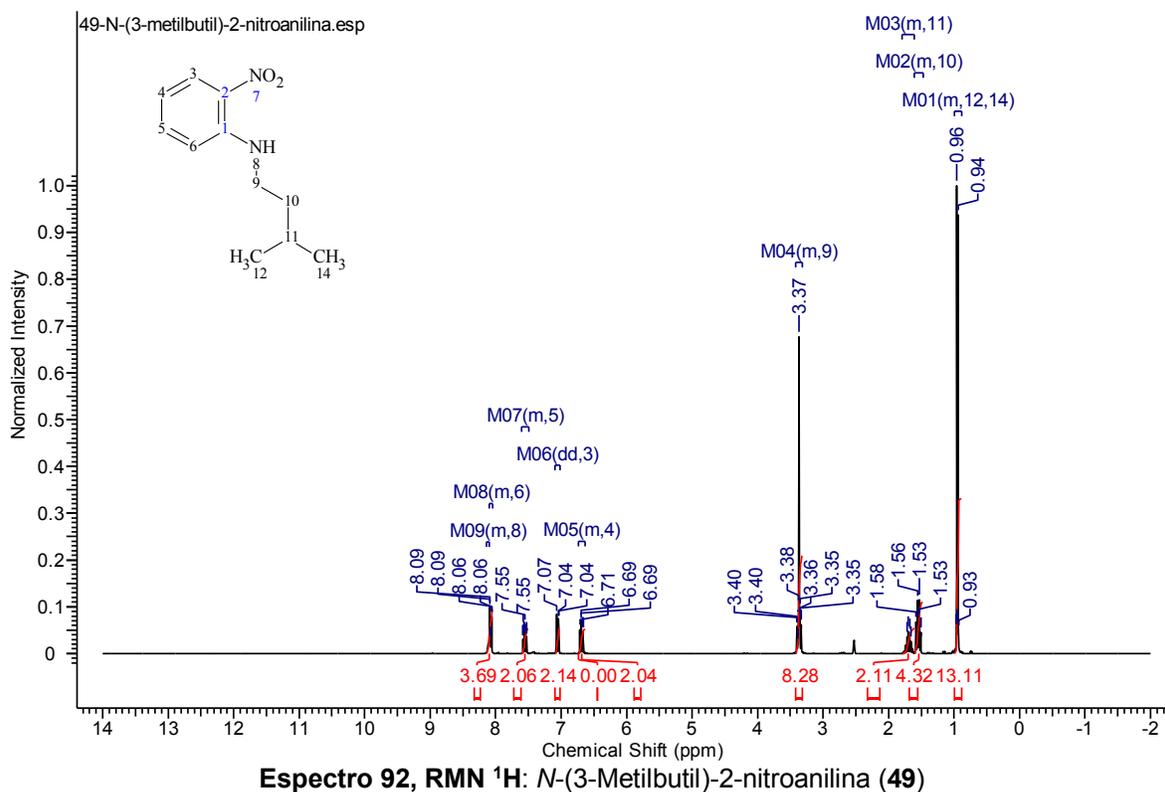
AN-1206

OT4707_1 #6-8 RT: 0.96-1.34 AV: 3 SB: 4 2.49-3.07 N
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]





Espectro 91, IR: N-(3-Metilbutil)-2-nitroanilina (49)

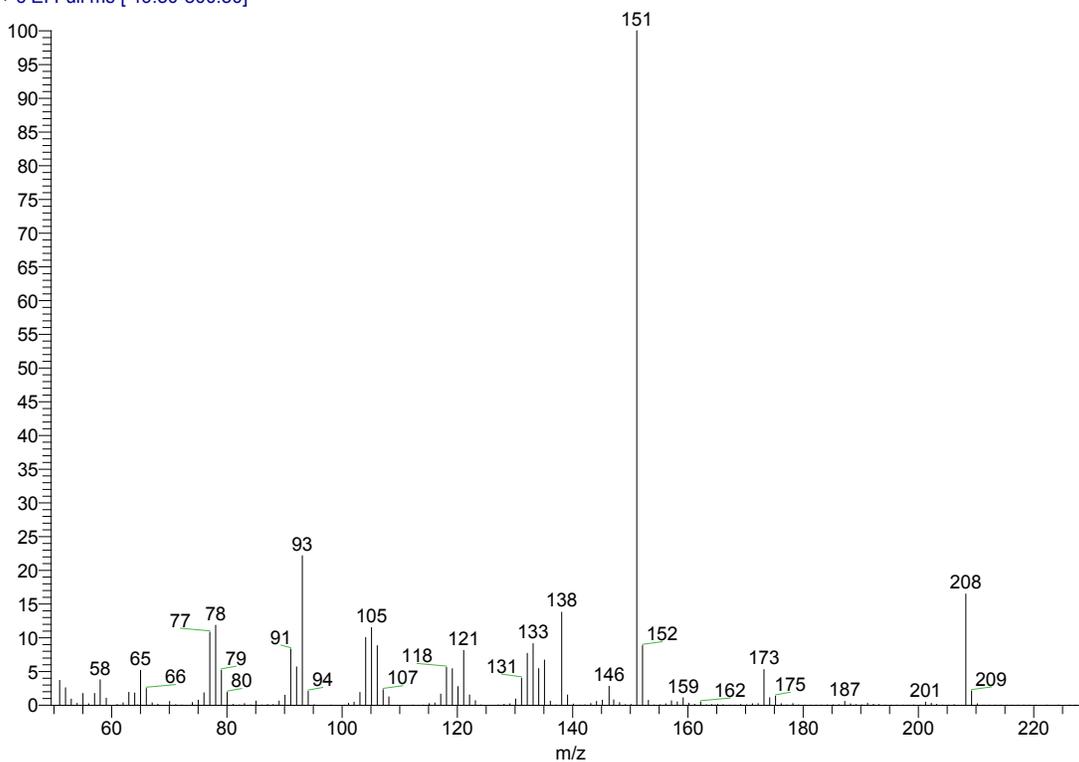


D:\Xcalibur\data\USA\IND\OT5142_1
szComment

12/1/2010 8:26:38 PM

AN-1402

OT5142_1 #1-2 RT: 0.00-0.21 AV: 2 SB: 2 3.49-3.69 N
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]





Homology modeling, docking and molecular dynamics of the *Leishmania mexicana* arginase: A description of the catalytic site useful for drug design[☆]

Carlos A. Méndez-Cuesta, Oscar Méndez-Lucio, Rafael Castillo*

Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, DF 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 2 August 2012

Available online 10 August 2012

Keywords:

Homology

Arginase

Leishmania mexicana

Docking

Molecular dynamic

ABSTRACT

The crystallographic structure of the *Leishmania mexicana* arginase, an attractive target for the design of leishmanicidal agents, is still unknown. For this reason, we report a computer-assisted homology study conducted to build its three-dimensional structure based on the known sequence of amino acids of this enzyme. In this study, the amino acid sequence in the arginase of the parasite was compared with the sequence of the amino acids in the crystallographic structure of rat and human liver arginases. The best similarity was found with the rat liver arginase. The catalytic site of the three-dimensional arginase structure built for *L. mexicana* has important structural differences as compared with that of the human liver arginase with regard to reasonable design selective compounds against *L. mexicana*. With this information, a docking study was conducted to find the inhibitors of this enzyme. 1439 molecules were docked and 18 were selective to the *L. mexicana* arginase. Moreover, molecular dynamics were carried out to study the stability of the homologue protein (including manganese) and the ligand–enzyme complex. The results indicated that the manganese remains inside the protein throughout the simulation. Besides, hydrogen bonds interactions between the ligand and the arginase were analyzed. These results provide important information for the design of new inhibitors.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Protozoa parasites are responsible for most of the common and devastating diseases affecting humans and domestic animals, threatening the lives of one third of the world population [1]. Among these parasites, *Leishmania* spp, a hemo protozoan, stands out as the etiological cause of leishmaniasis, a disease that currently lacks safe and efficient drugs for its treatment. This parasitic disease causes a high number of deaths in many tropical and subtropical regions, thus becoming a major health problem in developing countries [2,3]. In Latin America, the infection exists virtually in all countries [4]. In Mexico, it has affected people since the pre-Hispanic era [5]. Today, the causal agent, now known as *Leishmania mexicana*, is widely distributed throughout the country [6–9].

The disease-causing organisms are several species and subspecies of *Leishmania* (including *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana* and *L. amazonensis*) which are transmitted to humans by the bite of a female sandfly of the subfamily *Phlebotominae* [3,10,11]. *Leishmania* spp has a digenetic life cycle that includes a flagellated and mobile form called a promastigote, which resides in the sandfly, and a motionless and intracellular form called an amastigote,

which multiplies within macrophages of the infected individual, thus avoiding the immune system [12].

The treatment of leishmaniasis is difficult, a fact that is associated with a high degree of morbidity. Generally, the first-choice drugs are Pentavalent antimonials (SbV), such as sodium Stibogluconate (Pentostam) and Meglumine antimoniate (Glucantime). However, these types of drugs present difficulties because of their toxicity and the pain caused by 20 injections of oily material. Moreover, there are several reports of treatment failure, which results from parasite resistance to antimony. Areas such as Bihar in India reported resistance in 70% of the patients treated for visceral leishmaniasis [13–15]. Treatment with Pentamidine isethionate and Amphotericin B (including liposomal formulation) may represent a clinical cure despite their toxicity. In fact, Amphotericin B is the first-choice drug for visceral leishmaniasis in regions where high resistance to treatment with sodium Stibogluconate has been presented. The use of Paromomycin has also been explored, since it has demonstrated efficacy that is similar to Amphotericin B and it is cheaper. A new drug, Miltefosine, has recently been introduced in the market with the great advantage of being able to be administered orally. Nevertheless, the teratogenic effects presented by Miltefosine represent a main disadvantage for further development [13–15].

Since the available treatments for leishmaniasis involve many problems, the discovery of new leishmanicidal agents is of the utmost importance. For this reason, researchers are now looking

[☆] Taken in part from the PhD dissertation of Carlos A. Méndez-Cuesta.

* Corresponding author. Tel.: +52 5556225287; fax: +52 5556225329.

E-mail address: rafaelc@unam.mx (R. Castillo).

for novel biochemical targets in order to develop new drugs. In the last two decades experimental approaches such as gene-cloning, protein crystallography and transfer RNA have been introduced to validate and define new targets for drugs against this parasite [16–18]. One approach in our research was to use *Leishmania* arginase (L-arginine amidinohydrolase, GenBank ID: AAR06176.1) as a possible drug target. This enzyme is a binuclear manganese metalloenzyme that catalyses the hydrolysis of L-arginine to L-ornithine, urea and ATP [19]. It is also involved in the process of invasion and evasion of the host immune system by reducing the concentration of L-arginine, a molecule that activates the nitric oxide synthase (NOS). As a consequence, the generation of nitric oxide in the macrophages is also reduced and the immune response of the host against the parasite is delayed. This evidence brings to light the biological importance of the *Leishmania* arginase and suggests that it could be used as a relevant drug target against this parasite [20].

To date, there have been no reports on the three-dimensional structure of the *L. mexicana* arginase. However, previous homology modeling studies conducted in the structural determination of the *L. amazonensis* arginase can be used as a guideline for generating three-dimensional models of the *L. mexicana* arginase [19]. Herein, we report the homology modeling and molecular dynamics of the *L. mexicana* arginase, including a deep study of its catalytic site. Furthermore, the differences between this enzyme and the human arginase were analyzed in order to determine the potential for the design of new selective inhibitors. Finally, the *L. mexicana* arginase model and the human arginase crystallographic structure were used for a virtual screening, including 1439 compounds.

2. Materials and methods

2.1. Homology modeling

The amino acid sequence of the *L. mexicana* arginase (GenBank: AAR06176.1) was obtained from the NCBI database [21]. The search for sequential homologues to this amino acid sequence was carried out by using crystal structure reported on this database and various search methods online: GenSilico (<https://genesilico.pl/meta2>) [22]; PDB/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [23]; Bioinfobank (<http://meta.bioinfo.pl>) [24]. The sequence alignments were performed with the Clustal-W program server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) [25]. The models were built with three different programs: Bioinfobank (<http://meta.bioinfo.pl>) [24], 3D-Jigsaw (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>) [26,27] and MODELLER 9v1 [28,29]. MODELLER is a general program that implements comparative protein structure modeling by satisfying spatial restraints in terms of probable density functions. The resulting models were evaluated by using PROCHECK to assess the quality of the stereochemistry of the protein structure [30]. Moreover, WHATCHECK [31] and PROMOTIF [31,32], which automatically identify, classify and analyze a number of changes in secondary structure, were used for the verification of protein structures. All these methods of assessment were employed on the SWISS-MODEL server [33].

All the models were submitted to an energy-minimization using Sybyl8.0 in order to remove bad contacts derived from the homology modeling [34,35]. All the calculations were carried out in the Amber 4 force field, assigning Gasteiger–Hückel charges at 300 K with a dielectric constant of 4 and with a maximum of 100,000 iterations.

2.2. Virtual screening

A virtual screening against the homology model of the *L. mexicana* arginase and the *Homo sapiens* arginase (PDB ID: 2aeb) was carried out with AutoDock 4.2 [41]. Compounds from zinc (<http://zinc.docking.org/>), a database that contains more than 21 million molecules that satisfy Lipinski's rules and with a benzimidazole nucleus were selected for this study. A total of 1386 compounds were obtained from zinc and were complemented with a set of 53 benzimidazole derivatives with antiprotozoa activity previously reported by our laboratory [37–40]. The structure of all these compounds was optimized with the Amber 4 force field as implemented in Sybyl8.0. Finally, torsional roots and branches were identified, and Gasteiger–Marsilli atomic charges were assigned for the 1439 compounds using MGLTools 1.5.4 [41].

Before the docking calculations, all water molecules, ligands and the two Mn^{2+} were removed from each protein (*L. mexicana* and human arginases). Moreover, MGLTools 1.5.4 [41] was used to merge all non-polar hydrogens and to assign Gasteiger charges for each atom of the macromolecule. Three-dimensional grids of size $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$ with 0.375 \AA spacing centered at the center of the protein were calculated for each of the following atom types: H, HD, C, A, N, NA, OA, F, P, S, SA, Cl, Br, and I. Electrostatic and desolvation maps were also calculated.

Molecular docking calculations were performed with AutoDock 4.2, using the Lamarckian genetic algorithm (LGA) for ligand conformational searching. The docking of each molecule consisted of a total of 25 runs that were carried out with an initial population of 150 individuals, a maximum of 25 million energy evaluations, a maximum of 270,000 generations, a mutation rate of 0.02, and a crossover rate of 0.8. The resulting conformations for each molecule were clustered using as a threshold a root-mean-square deviation (RMSD) less than 3.0 \AA .

The molecules that bind selectively to the active site of the *L. mexicana* arginase were re-docked with grids of size $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$ centered in the catalytic site of this enzyme. It is important to mention that all possible binding modes were considered throughout all the calculations. For this purpose, flexibility was allowed for all rotatable bonds of the ligand, while the protein was used as a rigid structure.

2.3. Molecular dynamics

The molecular dynamics of the *L. mexicana* arginase with and without a ligand were performed using GROMACS 4.0.5 software. The initial structures of these two simulations were the results of homology modeling and the ligand–enzyme complex with the lowest binding energy. The ligand parameters were calculated with a PRODRG [42] server in the framework of the GROMOS force field, while $C6=5.751$ $C12=4.517$ were employed for the Mn^{2+} . The enzyme and the complex were solvated with water in a periodic cubic box that comprises the enzyme and 0.5 nm of water on all sides. Apart from the two Mn^{2+} , two Na^+ atoms were added randomly in order to neutralize the charge of the system. All the simulations were carried out at 1 bar and 300 K.

First, an energy minimization of the system, containing around 3179 atoms, was carried out employing the GROMOS96 43a1 force field, a single point charge water model and a time step of 0.002 ps . Electrostatic forces were calculated with the PME implementation of the Ewald summation method, and the Lennard–Jones interactions were calculated within a cut-off radius of 0.9 nm . After energy minimization, the system was equilibrated by 20 ps of MD with position restraints on the enzyme, thus enabling the solvent molecules to relax. Finally, a 3 ns MD was performed in order to

Table 1
Comparison among the several search methods using the GenSilico program.

Search methods	Templates	Score	Identity (%)
PDB/Blast	1d3v	1e–128	40
	2aeb	1e–128	43
	1pq3	1e–122	38
	2cev	1e–113	37
	2aeb	2e–62	44
Blastp	1d3v	3e–59	41
	1pq3	7e–55	39
	2cev	2e–53	38
	2ef5	1e–41	38
	2aeb	100	41
Hhsearch	1pq3	100	38
	2cev	100	37
	2aeb	7.3565	43
	1pq3	7.2131	38
	1d3v	7.1987	40
pcons5	2aeb	7.1471	41
	1pq3	7.1009	38
	2cev	6.8098	37
	2cev	6.7062	37
	2aeb	nc	41
jmbrank	1d3v	nc	41
	1pq3	nc	38
	2cev	nc	37
	1pq3	184.19	38
	2aeb	184.19	41
consens3d	1pq3	183.67	38
	1d3v	183.14	40
	2aeb	182.95	43
	2cev	181.10	37
	2cev	180.14	37

nc: the jmbrank program does not calculate score

assess the stability of the arginase model and the ligand–enzyme complex.

3. Results and discussion

3.1. Homology modeling

Several three-dimensional structures with homologous sequences to the *L. mexicana* arginase were found with three different search methods (GenSilico, PDB/BLAST and Bioinfobank), which are listed in Table 1. Interestingly, two structures with a high percentage of similarity were found in the three search methods (above 40%), which is adequate enough to build a reliable model. These two were the crystal structure of the enzyme arginase of *H. sapiens* (PDB ID: 2aeb [43]) and *Rattus norvegicus* (PDB ID: 1d3v [44]), which share a similarity of 44% and 41% similarity to *L. mexicana*, respectively.

H. sapiens (PDB ID: 1wva [43], 2pho [45], 2aeb [43] and 1pq3 [46]) and *R. norvegicus* sequences (PDB ID: 1d3v [44]) were obtained from the NCBI database [23] and aligned by means of the program Clustal-W (Fig. 1). At the primary structure level, the alignment of the amino acid sequences of the arginase of *L. mexicana* and the human arginase (liver and macrophage) show a high degree of similarity, especially in the catalytic site, as can clearly be observed in Fig. 1. Alignment accuracy is the most crucial step to ensure the quality of the homology model, the multiple sequence alignment having always been a preferred approach for this purpose. However, some differences can be seen: while the human enzyme has a no charged Gly235, *L. mexicana* has a polar uncharged Thr246. This difference could be useful for the design of selective inhibitors against this enzyme.

Different 3D models of the *L. mexicana* arginase were built using as a template each of the five different crystal structures reported for the human and the rat arginase [44–46]. For this purpose, Bioinfobank, MODELLER 9v1 and Jigsaw programs to generate a total

Table 2

Evaluation of the models obtained by 3D-Jigsaw, Bioinfobank and MODELLER programs. The reference crystallized structures from *Rattus norvegicus* (1d3v) and the *Homo sapiens* arginase (1wva, 2pho, 2aeb and 1pq3) were used as templates.

Program	Model	Template	Evaluation (%)
3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-1d3v	1d3v	76.0, 21.7, 1.9, 0.4
3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-2aeb	2aeb	71.2, 25.4, 2.7, 0.8
3D-Jigsaw	3D-Jigsaw-2pho	2pho	71.4, 26.3, 0.4, 1.9
Bioinfobank	Bioinfobank-1d3v	1d3v	78.8, 20.0, 0.8, 0.4
Bioinfobank	Bioinfobank-1pq3	1pq3	78.3, 21.3, 0.0, 0.4
Bioinfobank	Bioinfobank-2aeb	2aeb	76.3, 23.3, 0.4, 0.0
Modeller	Modeller-1d3v	1d3v	83.7, 15.6, 0.7, 0.0
Modeller	Modeller-1pq3	1pq3	77.3, 20.2, 1.4, 1.1
Modeller	Modeller-1wva	1wva	77.3, 21.6, 0.7, 0.4
Modeller	Modeller-2aeb	2aeb	73.8, 23.8, 1.8, 0.7

of 10 models were used. Each model was minimized using the Sybyl8.0 program with the conditions previously described (Section 2). The stereochemistry of each model was assessed using Ramachandran plots generated with the program PROCHECK [30] (data shown in Table 2). The best results were obtained with the program MODELLER 9v1, which employed the rat liver arginase (1d3v) as a template. The Ramachandran plot for this model indicates that 83.7% of the residues were located in the most favored zones, 15.6% in allowed regions, 0.7% in generously allowed regions and 0.0% in disallowed regions. Based on the Ramachandran plots, the structure of the generated model has a reliability of 99.3%. It is important to mention that the model obtained using the Bioinfobank program and the human arginase (1pq3) as a template had a reliability of 99.6%; nonetheless, the structure generated for this enzyme had 78.3% of the residues located in the most favored zones, which is lower than that obtained from the rat liver arginase. Although information regarding the crystal structure of the human arginase is available (PDB), its active site and its mechanism of action are still unknown.

In addition, since the scores found in this study for the rat liver arginase model are within the accepted values, the PROCHECK program showed a global Z-score value of –0.57 obtained from the Ramachandran plot. A Z-score value greater than –2.0 is commonly associated with a high-quality model. The QMEAN [47] score was –0.96, a value slightly lower than the limit of two standard deviations (Fig. 2), but still acceptable for a large protein structure. This score is composed of a linear combination of 6 terms, where the pseudo-energy of the contributing terms is given with respect to the scores obtained for high-resolution experimental structures of similar size solved by X-ray crystallography. The distribution of the types of residues, both within and outside of the protein, is normal, with an inside/outside RMS Z-score value of 1.097. WHATIF Z-score, obtained by assessing the 3D structure through a series of measurements of structures crystallized by X-ray and NMR, was –7.9. To be acceptable, this value must be below –6. Compared with other models, Modeller-1d3v was the most acceptable of all. The reliability of this model makes it apt for molecular docking virtual screening to find new specific inhibitors (*vide infra*).

The amino acids that coordinate Mn^{2+} and the ones that bind arginine in the active site [36] are localized in the same region in the *L. mexicana* arginase model and in the 3D structure of the rat liver arginase (PDB ID: 1d3v). Fig. 3 shows His139, Asp243 and Asp245, which coordinate with one Mn^{2+} ; His114, Asp137 and Asp141, which coordinate another Mn^{2+} ; and His154 and Glu288, which are directly involved in the arginine binding [48]. These amino acids are conserved in all arginases that have been compared to date [49], but the variation of amino acid composition shows that the *L. mexicana* enzyme is closer to the human liver arginase. The monomer structure of the arginases of both organisms and details regarding the active site showed that they are highly conserved (Fig. 3). Differences, however, can be seen between two

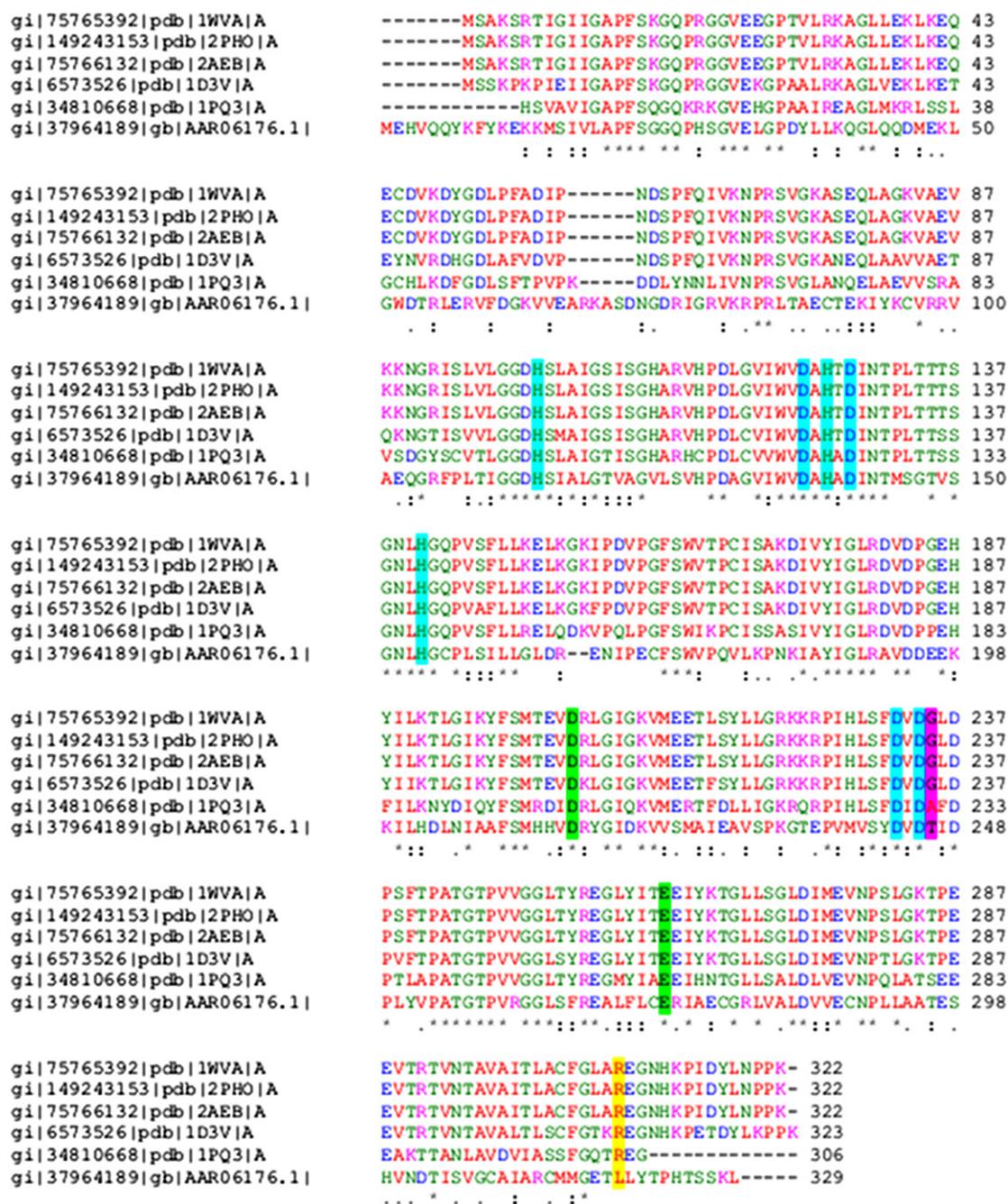


Fig. 1. Multiple sequence alignment using CLUSTALW 2.0.10. Alignment among proteins 1d3v (rat liver arginase); 1wva, 2pho, 2aeb y 1pq3 (human arginases) with the amino acid sequence of the *L. mexicana* arginase (AAR06176.1). Residues marked with blue make up the catalytic site; in the magenta is the residue that differs in the catalytic site of the *L. mexicana*; the rest of the other species, those marked in green, stabilize the trimer; in yellow is the amino acid that stabilizes the intra- and intermonomer trimer.

non-conserved equivalent amino acids, His 228 and Met 239 in the human and the *L. mexicana* arginases, respectively, forming a differential space channel-like structure (Fig. 3C). These differences in the neighborhood of the active site are not conserved and could be explored in the design of specific *L. mexicana* arginase inhibitors.

Using the crystal structure data established for the rat enzyme [48], and based on the model obtained for the monomer of the *L. mexicana* arginase, a simulation of the arginase trimer 3D structure was carried out. To our knowledge, this is the first model reported for an *L. mexicana* arginase trimer and could be useful for understanding the binding mode and for the design of new allosteric inhibitors, especially, those that bind to the interface between the monomers. This trimer model was minimized under

the same conditions previously described in Section 2 (Fig. 4). The trimer model was evaluated using the same criteria as those for monomers. In the evaluation with the PROCHECK program [30], using Ramachandran plots; we observed that 80.3% of residues were located in the most favored zones and 18.9% in allowed regions. In general terms the structure has a total reliability of 99.2%. The program showed a global *G*-factor value of -0.47 obtained from the Ramachandran plot; the value must be greater than -0.5 for the model to have a good acceptance score. The QMEAN score [47] was -4.04 , a low value indicates that the model is above two standard deviations. However, this may be due to the size of the protein, which is more than 900 amino acids, thus making it more difficult to measure accurately, since the QMEAN

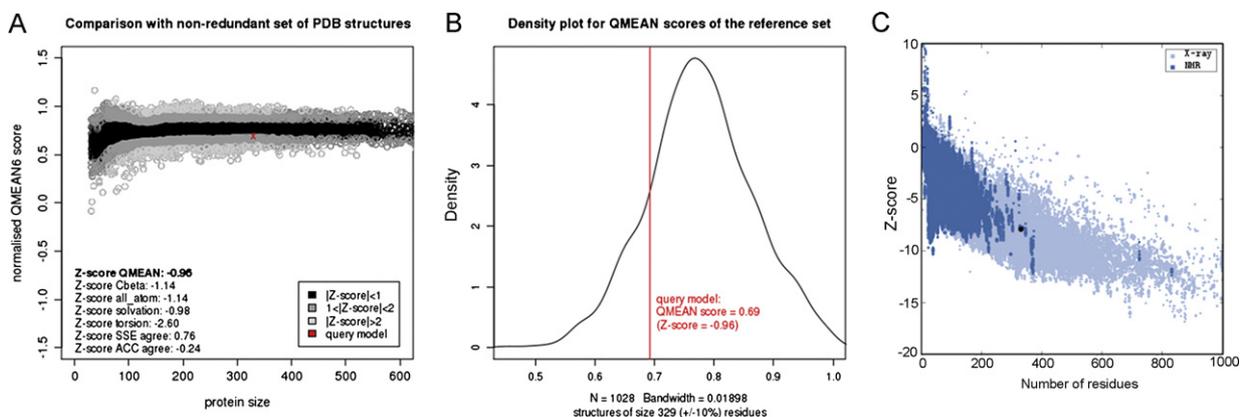


Fig. 2. QMEAN plots for the monomer of the *L. mexicana* arginase. (a) QMEAN6 plot normalized shows the standard deviation of the monomer. (b) Density plot for QMEAN. (c) Z-score plot obtained by WHATIF.

standard is up to 600 residues; over that number the graph is dispersed in measuring the standard deviation (Fig. 5).

The increase in the atomic contact score for the models for the *L. mexicana* arginase and particularly for the trimer in comparison

with the monomer model suggests the existence of a trimeric structure for the *L. mexicana* arginase *in vivo*. In the rat liver arginase, the Arg308 residue forms an intramonomer salt bridge with the Glu262 and an intermonomer salt bridge with the Asp204 on the adjacent

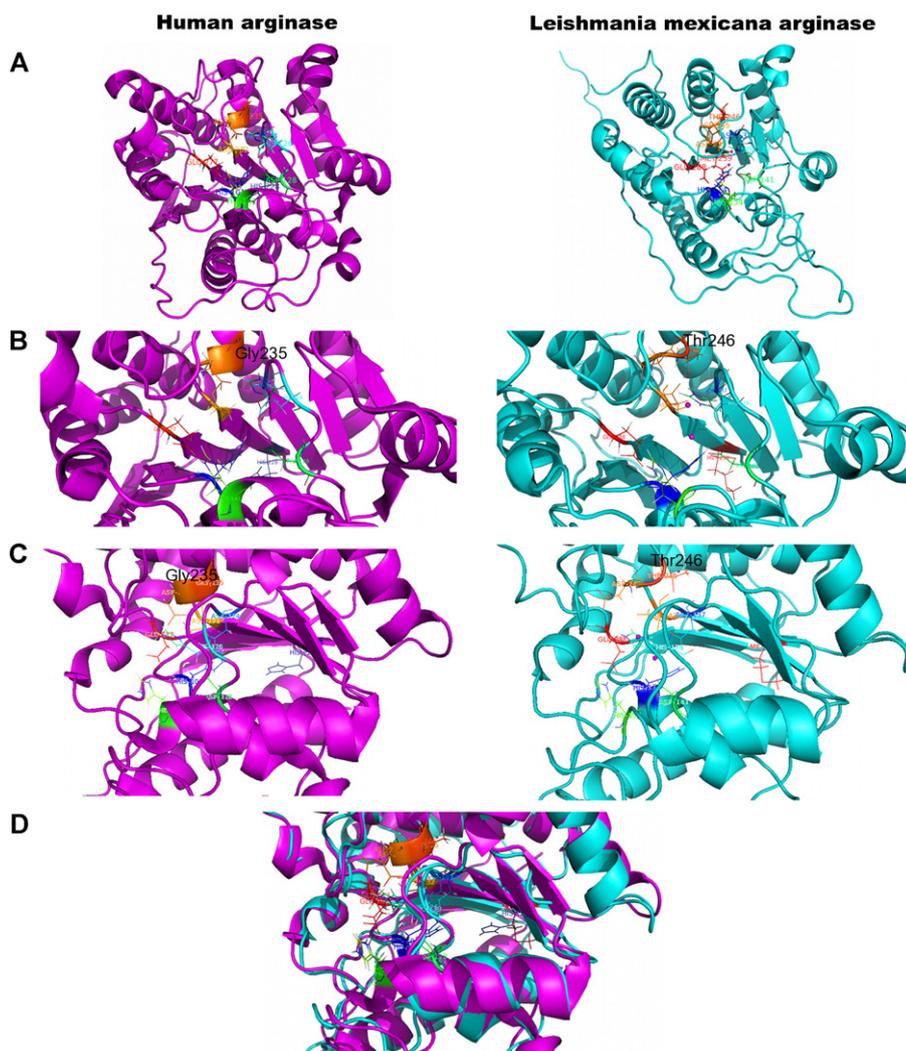


Fig. 3. *Leishmania mexicana* and the human liver type arginase 3D models. (a) The complete monomer model of both human and *L. mexicana* enzymes. Amino acids that participate in the active site are indicated by color. (b) Details of the binuclear Mn^{2+} and of the amino acids that directly interact with the substrate in the active site on both enzymes. (c) Difference in the space "channel-like" structure caused by the presence of Met239 (yellow) in *L. mexicana* instead of His228 (yellow) observed in humans. (d) Overlay of the structures of *L. mexicana* human space showing the difference in the "channel-like". Blue for the human arginase, white for the *L. mexicana* arginase.

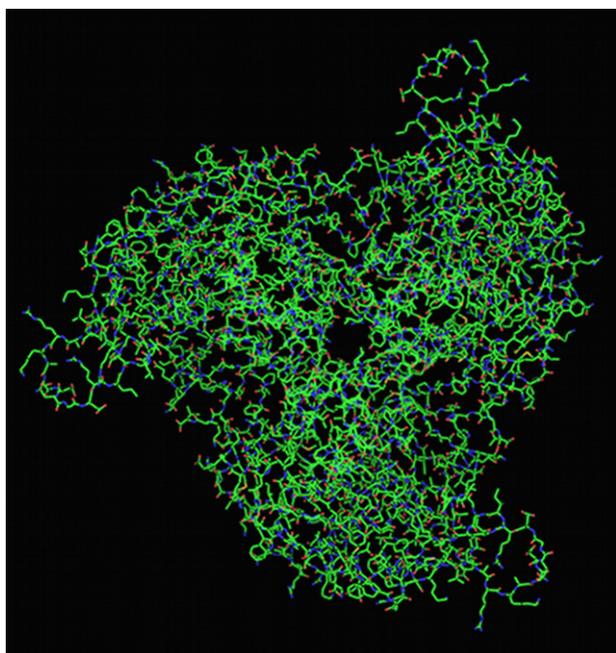


Fig. 4. Model of trimer of the *L. mexicana* arginase.

subunit [50]. Both Glu262 and Asp204 residues are conserved in the arginases of rats, humans, mice and several species of frogs of the genus *Xenopus*. These observations suggest a similar role in stabilizing the oligomeric states of the trimer. In the *L. mexicana* arginase, the Glu262 and Asp204 are conserved at positions 273 and 215, respectively, but the residue Arg308 is absent. However, in many arginases from bacteria there are hexameric arginases (dimers of trimers) rather than trimeric, and the latter three residues are not conserved. For this reason, Arg308 is not essential for the stabilization of the trimer in these organisms or for optimal activity [49].

3.2. Virtual screening

A virtual screening, using molecular docking calculations, was employed to identify molecules that could be bound to the catalytic site of the *L. mexicana* and the *H. sapiens* arginase. As described in Section 2, flexibility was allowed in all the rotatable bonds of

the ligand, while the protein was used as a rigid structure. Both enzymes were used in order to identify selective compounds to the catalytic site of the parasite arginase. The results of the “blind” docking showed that fewer than 100 molecules bind selectively to the catalytic site of the *L. mexicana* arginase, as depicted in Fig. 6. These molecules were submitted to a second docking, focused on the catalytic site of the arginase in order to rank them by taking into account the conformation with the lowest estimated binding energy of each compound. Based on this ranking only 18 molecules could be bound selectively to the catalytic site of the parasite with binding energies < -7.0 kcal/mol. Interestingly, 17 of the 18 compounds are analogues of the *N*-benzyl-1-alkyl-1*H*-benzimidazol-2-amine and other is a 2-ethyl-3-methyl-1-[(3-morpholin-4-ylpropyl)amino]pyrido[1,2-*a*]benzimidazole-4-carbonitrile. The structures of the 18 selective molecules and their estimated binding energies are listed in Table 3. Analyzing the structure of these compounds, it is worth noticed that most of them are 1-alkyl-2-(substituted amine)-1*H*-benzimidazole derivatives. This result shows, once again, the versatility of this structure since it presents biological activity against several parasites [37].

The protein–ligand interactions between the selected molecules and the *L. mexicana* arginase are depicted in Fig. 6. As can be observed, all molecules exhibit the same binding mode. Curiously, important interactions can be found between these molecules and the residues His114, Asp141 and His154, which directly participate in the catalytic mechanism of this enzyme. The ligand–enzyme complex is stabilized mainly by hydrogen bonds, especially those that R₂ forms with His114 and Thr257; the one between N in the 2-amine and Asp141; and some presented between N from the benzimidazole nucleus and the residue His154. Moreover, a π – π interaction can be formed between His139 and the benzyl group of the ligand. In this form, the benzyl moiety acts as an anchor toward the enzyme while benzimidazole helps to maintain the molecule in the binding pocket; the group R₁ helps to position the ligand in the catalytic site.

It is important to mention that none of these molecules has reports of measured biological activity *in vitro* against *L. mexicana* or against the *L. mexicana* arginase. The virtual screening reported in this paper shows *N*-benzyl-1-alkyl-1*H*-benzimidazol-2-amine as possible inhibitors of *L. mexicana* arginase. Even though it is well known that the calculated binding energies do not always reflect the biological response, the specific ligand–enzyme interactions could be used as a guideline for the design of new molecules against leishmaniosis.

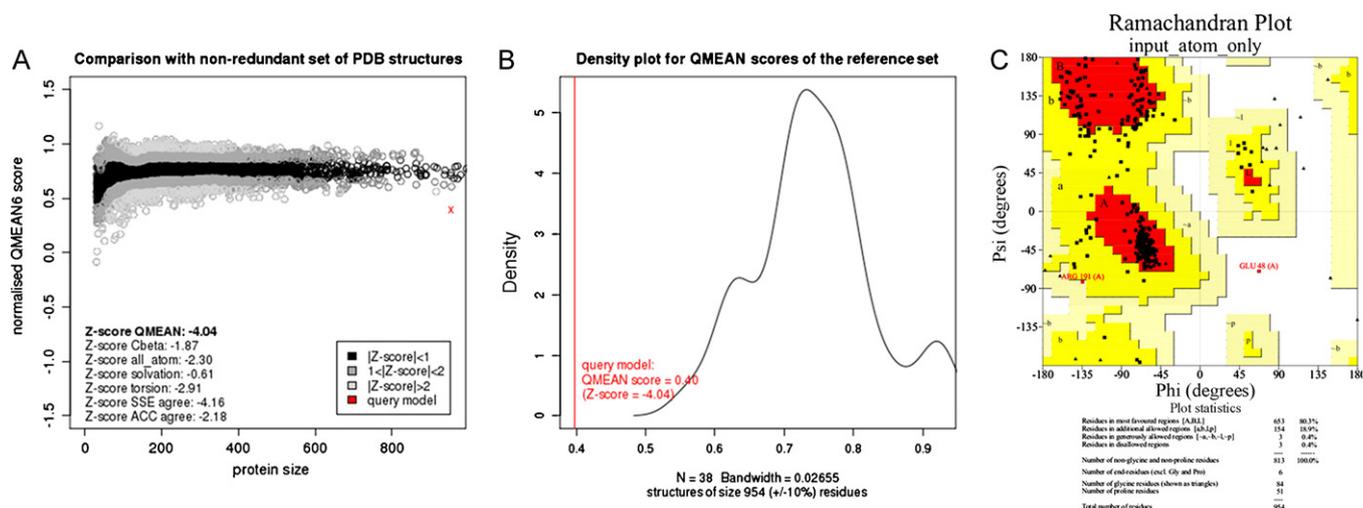


Fig. 5. QMEAN plots for the trimer of the *L. mexicana* arginase. (a) QMEAN6 plot normalized shows the standard deviation of trimer. (b) Density plot for QMEAN. (c) Ramachandran plots for the trimer that shows the most favored zones and disallowed regions.

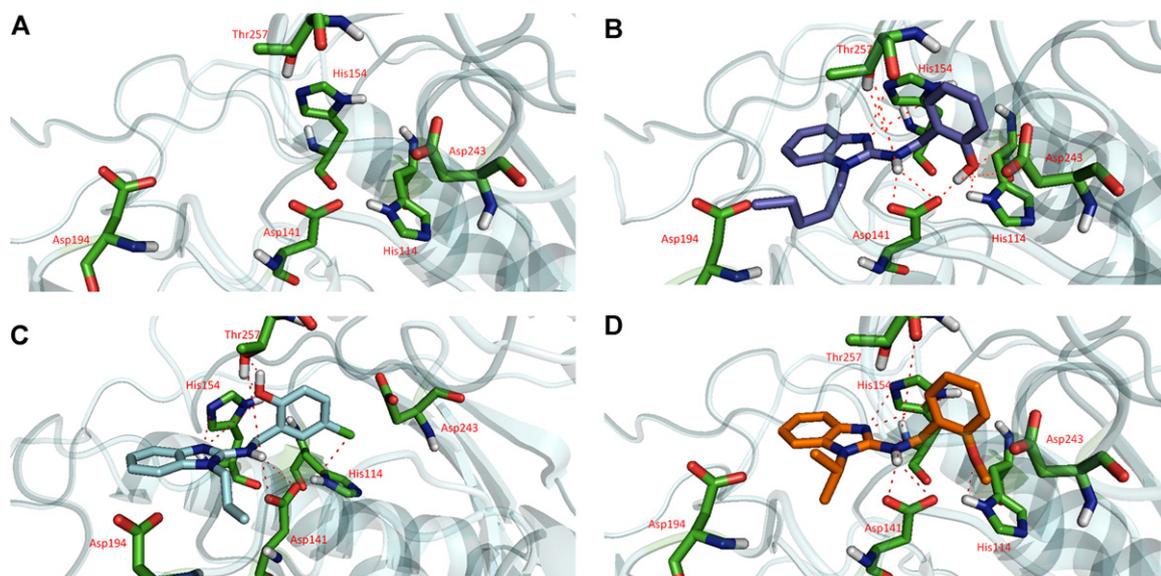


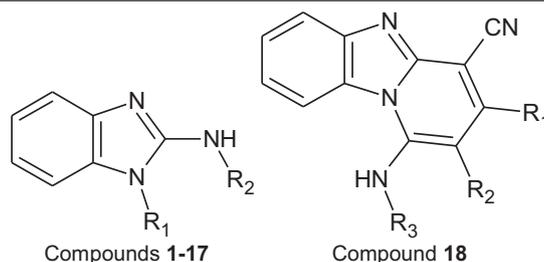
Fig. 6. Protein–ligand interactions. (A) The several ligands can interact with the protein through the amino acids His114, Asp141, His154, Thr257 and Asp243. (B) Compound 1798220 (**1**) interacts with the protein; the hydroxyl group forms a hydrogen bond with the residue His114 and Asp141; the N2 of the benzimidazole nucleus forms a hydrogen bond with the residue His154; and the N1 and N of 2-amine interact with the residue Asp141. (C) Compound 285496 (**2**) interacts with the protein; the chloro interacts with the residue His154; the hydroxyl group forms a hydrogen bond with the residue Thr257; the N2 of the benzimidazole nucleus forms a hydrogen bond with the residue His154; and the N1 and N of 2-amine interact with the residue Asp141. (D) Compound 613506 (**3**) interacts with the protein; the hydroxyl group forms a hydrogen bond with the residue His114 and Asp141; the N2 of the benzimidazole nucleus forms a hydrogen bond with the residue His154; and the N1 and N of 2-amine interact with the residue Asp141.

3.3. Molecular dynamics results

Molecular dynamics were employed to assess the stability of the homology model and of the ligand–enzyme complex. In the homology model we focused on the catalytic site, especially on the amino acids that coordinate Mn^{2+} and the interaction between the

metal and the enzyme. In general, the RMSD of the $C\alpha$ atoms first increased as far as a plateau at 1100 ps, indicating that equilibrium had been reached (Fig. 7A). The RMSD of the manganese through the calculation is plotted also in Fig. 7A, suggesting that the metal is stabilized in the catalytic site after 780 ps. This stabilization is caused by the relaxation of the catalytic site, in which manganese separate

Table 3
Structure of benzimidazole derivative that binds to the *L. mexicana* arginase.



Compound	ZINC code	R ₁	R ₂	R ₃	ΔG (kcal/mol) <i>L. mexicana</i>
1	1798220	Pentyl	2-Hydroxybenzyl		−9.1
2	285496	Propyl	5-Chloro-2-hydroxybenzyl		−8.96
3	613506	Isopropyl	2-Methoxybenzyl		−8.78
4	285488	Ethyl	2-Hydroxy-5-methylbenzyl		−8.6
5	513985	Isopentyl	Benzyl		−8.52
6	513988	Isobutyl	Benzyl		−8.4
7	111419	Methyl	5-Bromo-2-hydroxybenzyl		−8.3
8	2478054	Isopropyl	4-Bromobenzyl		−8.23
9	285495	Methyl	5-Chloro-2-hydroxybenzyl		−8.19
10	3643102	Butyl	4-Chlorobenzyl		−8.11
11	196189	Propyl	1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl		−7.99
12	3643113	Propyl	4-Methoxybenzyl		−7.98
13	526385	Methyl	2-Methoxybenzyl		−7.96
14	2073201	Butyl	Pyridin-4-ylmethyl		−7.93
15	532233	Methyl	4-Bromobenzyl		−7.68
16	613506	Isopropyl	2-Methoxybenzyl		−7.78
17	804806	Ethyl	4-Methoxybenzyl		−7.38
18	4312478	Methyl	Ethyl	3-(Morpholin-4-yl)propyl	−8.2

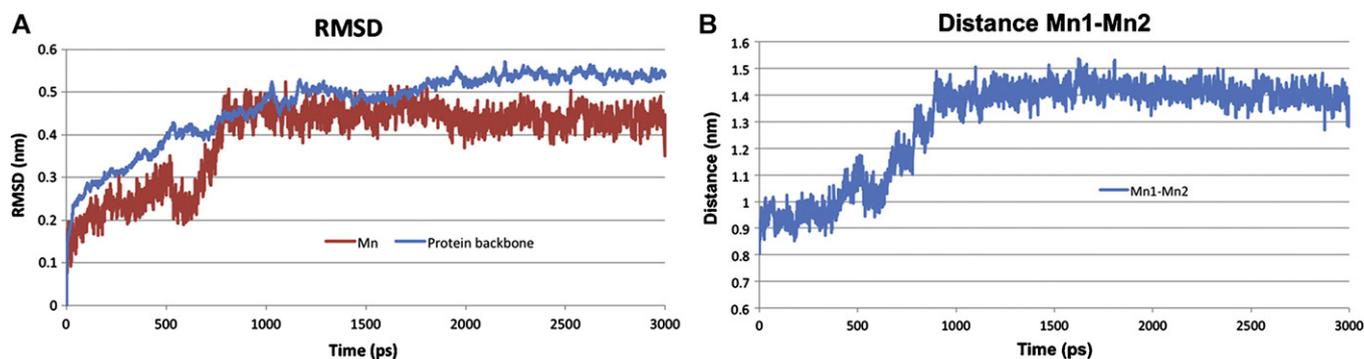


Fig. 7. (A) RMSD of the *L. mexicana* arginase monomer and RMSD of interaction with Mn^{2+} of the *L. mexicana* arginase monomer. (B) Distance between both manganese through all the molecular dynamics.

themselves around 1.3 nm in order to enhance the interaction with acidic residues that coordinate the metals (Fig. 7B). The residues responsible for the metal coordination are Asp 141, Asp194, Glu196 and Glu197 for $Mn^{2+}-1$, while Asp137, Asp243 and Glu288 coordinate $Mn^{2+}-2$, as shown in Fig. 8. During these calculations, it is clear that the average distance between the manganese and these acidic residues is 0.21 nm. In addition, the average distance average between the two manganese is 1.3 nm (Fig. 7B).

As stated above, molecular dynamics simulation was used to analyze the enzyme–ligand complex and to identify the possible bioactive conformation of this molecule. For this purpose, the conformation of compound **1**, obtained from molecular docking, and the model of *L. mexicana* were used as the starting point of the simulation. The RMSD of compound **1**, plotted in Fig. 9A, shows that the ligand reaches equilibrium after 570 ps, which is faster than the protein. As discussed before, the ligand is stabilized mainly by hydrogen bonds, the ones that were analyzed throughout the molecular dynamics. The plot in Fig. 9B shows the distance between the H in the 2-amino group and the oxygen of Asp141 and Thr257. Interestingly, the formation of the hydrogen bond between the ligand and the Asp141 is stable at the beginning of the simulations (first 95 ps), but then, the amine flips to form a hydrogen bond with Thr257, at 750 ps. This result suggests that these two residues of the catalytic site can stabilize the interaction between NH and the protein; nevertheless a longer simulation is needed to support this idea.

A similar situation can be observed when analyzing the interaction between the OH of the ligand in compound **1** and Asp141 (Fig. 9C). In this case, a hydrogen bond is formed between these groups at the beginning of the calculation (60 ps). However, as the

simulation moves forward (around 760 ps), the ligand is internalized and the OH is able to form a new hydrogen bond with Asp243, which is buried in the catalytic site. The interaction OH–Asp243 shows that the benzyl group moves inside of the catalytic site and that the OH interacts with several residues within the binding site (Fig. 10). It is worth mentioning that the ligand remained inside the binding site and the hydrogen bonds were constant

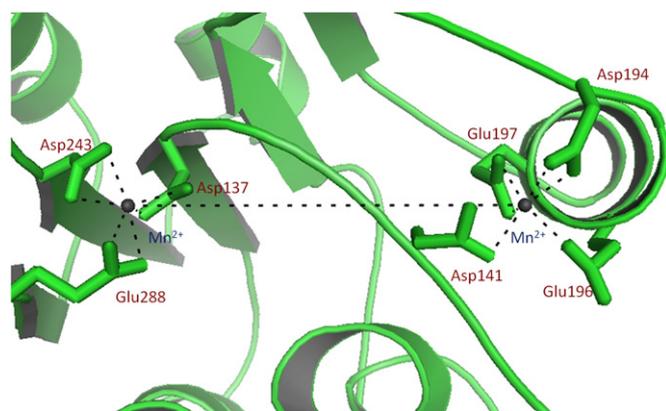


Fig. 8. Interaction between the Mn^{2+} and the residues of aminoacids. The image indicates the type of aminoacids (Glu and Asp) that stabilize the Mn and the distance between the two manganese (an average of 1.3 nm).

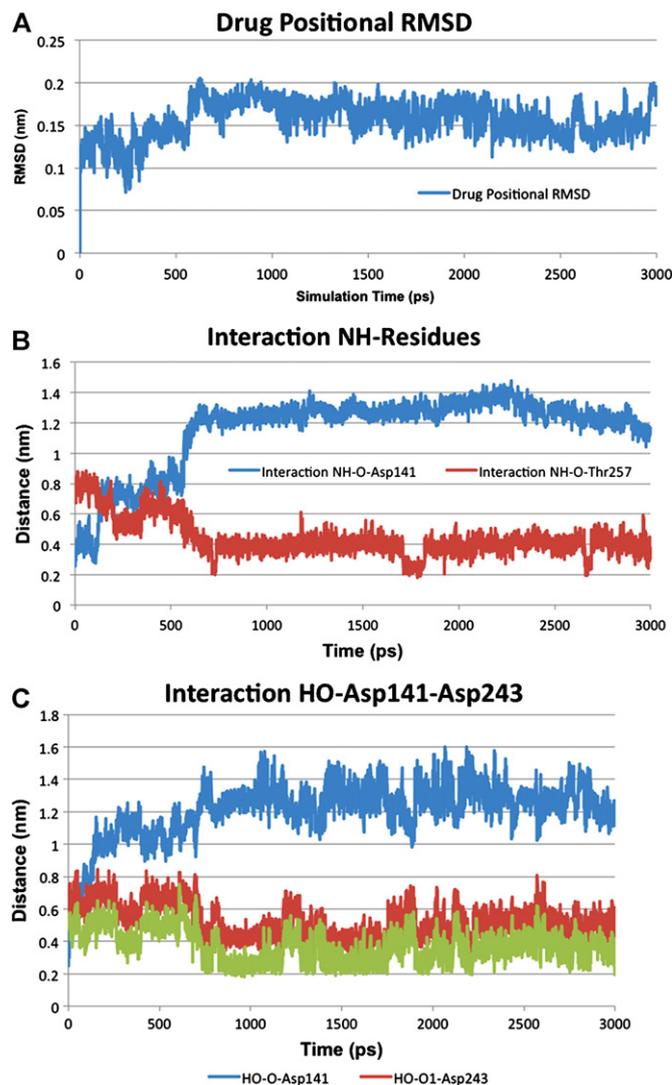


Fig. 9. (A) Drug positional RMSD. (B) Interaction of 2-Amino group with Asp141 and Thr257. (C) Interaction HO group with Asp141 and Asp243.

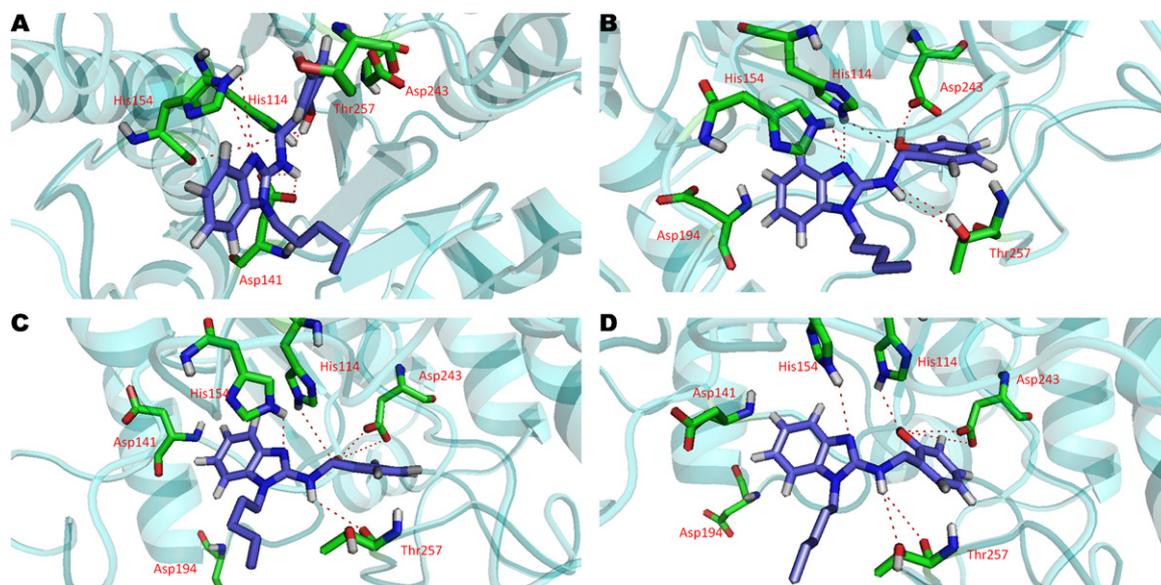


Fig. 10. Position of compound **1** inside the protein during the molecular dynamic. (A) At 1 ps time; the interaction is as shown in Fig. 6B. (B) At 1000 ps time; the initial interaction changes, thus the HO group interacts with the residue Asp243 more than His114; the NH group now changes the interaction with Thr257; the interaction of N2 of the benzimidazole nucleus is stronger than 1 ps. (C) At 2000 ps time; all the interactions in B are conserved and are stronger. (D) At 3000 ps time; the final interaction is similar to B and C.

throughout the simulation time. Furthermore, it was observed that the ligand conformation does not involve important changes. Indeed, all these results provide important information regarding the ligand–enzyme dynamical interaction (Fig. 10).

Furthermore, we have synthesized compounds **1–5** that were predicted to be the most active of the designed series and carried out preliminary *in vitro* evaluation on *L. mexicana* promastigotes. Results so far obtained indicate that these compounds have good activity against this stage of the parasite. However, we are still working on the synthesis of the remaining compounds (**6–18**) to obtain more activity data to complement this study.

4. Conclusions

Although several three-dimensional structures with homologous sequences to the *L. mexicana* arginase were found using three different search methods (GenSilico, PDB/BLAST, and Bioinfobank), only the crystal structures of the *H. sapiens* arginase (PDB ID: 2aeb [43]) and *R. norvegicus* (PDB ID: 1d3v [44]) had a high percentage of similarity (above 40%) with the parasite enzyme. This information, coupled with the reported amino acids in the catalytic site of the three arginases, which differ in one amino acid, suggests that specific inhibitors could be designed for the *L. mexicana* arginase. On the other hand, the best model for the three-dimensional structure of the *L. mexicana* arginase was obtained using the *R. norvegicus* crystal structure. The best model of the *L. mexicana* arginase was used to perform a virtual screening with 1439 benzimidazole derivatives. Among these molecules, *N*-benzyl-1-alkyl-1*H*-benzimidazol-2-amine were identified as possible selective inhibitors of the *L. mexicana* arginase. The molecular dynamics simulations revealed the stability of the monomer of arginase as well as the stability of the ligand–protein complex. The results further suggest that His114, Asp141, Asp194, Asp243 and Thr257 could play an important role for the further optimization of selective inhibitors.

Acknowledgements

Méndez-Cuesta CA is very grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for granting scholarship

170430/170430. We acknowledge DGSCA, UNAM for the support we received to use the HP Cluster Platform 4000 Optron dual core supercomputer (KanBalam).

References

- [1] M. Ouellette, Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites, *Tropical Medicine and International Health* 6 (2001) 874–882.
- [2] A. Armson, S.W. Kamau, F. Grimm, J.A. Reynoldson, W.M. Best, L.M. MacDonald, R.C.A. Thompson, A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*, *Acta Tropica* 733 (1999) 303–311.
- [3] S. Khabnadideh, D. Pez, A. Musso, R. Brun, L.M. Ruiz Pérez, D. González-Pacanowska, I.H. Gilbert, 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (2003) 4693–4711.
- [4] Organización Mundial de la Salud, Lucha contra las leishmaniasis. Serie de Informes Técnicos No. 793, OMS, Ginebra, 1990.
- [5] López de Cogolludo D, Historia de Yucatán, Mérida. Edición original, Madrid, 1688, Reeditado por la Universidad de Yucatán, 1978.
- [6] F. Biagi, Síntesis de 70 historias clínicas de leishmaniasis tegumentaria de México (úlceras de los chicleiros), *Rev Facultad de Medicina UNAM* 33 (1953) 385–396.
- [7] N.F. Andrade, M.M. García, R.A. Cruz, L.S. Canto, D.E. Simmonds, Estudio preliminar de correlación clínica, histológica e inmunológica de la leishmaniasis cutánea mexicana en el hombre, *Archivos de Investigación Médica (México)* 15 (1984) 267–280.
- [8] C.O. Velasco, S.J. Savarino, B.C. Walton, A.A. Gamm, F.A. Neva, Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41 (1989) 280–288.
- [9] Tellaache M, Informe relativo a prevención y control de las leishmaniasis en México, in: Dirección de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Secretaría de Salud, México, 1993.
- [10] D. Sereno, A. Cordeiro da Silva, F. Mathieu-Daude, A. Ouaisi, Advances and perspectives in leishmania cell based drug-screening procedures, *Parasitology International* 56 (2007) 3–7.
- [11] D.O. Santos, C.E. Coutinho, M.F. Madeira, C.G. Bottino, R.T. Vieira, S.B. Nascimento, A. Bernardino, S.C. Bourguignon, S. Corte-Real, R.T. Pinho, C.R. Rodrigues, H.C. Castro, Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review, *Parasitology Research* 103 (1) (2008) 1–10.
- [12] UNICEF-UNDP-WHO Reports of TDR (Tropical Diseases Research). <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/index.html>, 2011 (accessed 13.02.12).
- [13] C.G. Havens, N. Bryant, L. Asher, L. Lamoreaux, S. Perfetto, J.J. Brendle, K.A. Werbovets, Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*, *Molecular and Biochemical Parasitology* 110 (2000) 223–236.
- [14] Reports of the World Health Organization. www.who.int/leishmaniasis/burden/en/, 2011 (accessed 13.02.12).
- [15] S.L. Croft, G.H. Coombs, Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, *Trends in Parasitology* 19 (11) (2003) 503–508.

- [16] M.W. Nowicki, Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (9) (2008) 5050–5061.
- [17] C. Doerig, L. Meijer, J.C. Mottram, Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa, *Trends in Parasitology* 18 (8) (2002) 366–371.
- [18] D.J. Rigden, S.E. Phillips, P.A. Michels, L.A. Fothergill-Gilmore, The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity, *Journal of Molecular Biology* 291 (1999) 615–635.
- [19] E. Da Silva, T. Castilho, F. Pioker, C. Tomich de Paula, L. Floeter-Winter, Genomic organization and transcription characterization of the gene encoding *Leishmania amazonensis* arginase and its protein structure prediction, *International Journal for Parasitology* 32 (2002) 727–737.
- [20] E.R. da Silva, M.F. Laranjeira da Silva, H. Fischer, R.A. Mortara, M.G. Mayer, K. Framesqui, A.M. Silber, L.M. Floeter-Winter, Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme, *Molecular and Biochemical Parasitology* 159 (2) (2008) 104–111.
- [21] S.C. Roberts, M.J. Tancer, M.R. Polinsky, K.M. Gibson, O. Heby, B. Ullman, Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants, *Journal of Biological Chemistry* 279 (22) (2004) 23668–23678.
- [22] M.A. Kurowski, J.M. Bujnicki, GeneSilico protein structure prediction meta-server, *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 3305–3307.
- [23] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389–3402.
- [24] K. Ginalski, A. Elofsson, D. Fischer, L. Rychlewski, 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions, *Bioinformatics* 19 (8) (2003) 1015–1018.
- [25] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D. Higgins, J. Thompson, Multiple sequence alignment with the clustal series of programs, *Nucleic Acids Research* 31 (13) (2003) 3497–3500.
- [26] P.A. Bates, L.A. Kelley, R.M. MacCallum, M.J.E. Sternberg, Enhancement of Protein modelling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM, *Proteins: Structure, Function and Genetics* (Suppl. 5) (2001) 39–46.
- [27] B. Contreras-Moreira, P.A. Bates, Domain Fishing: a first step in protein comparative modelling, *Bioinformatics* 18 (2002) 1141–1142.
- [28] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *Journal of Molecular Biology* 234 (1993) 779–815.
- [29] A. Fiser, R.K. Do, A. Sali, Modeling of loops in protein structures, *Protein Science* 9 (2000) 1753–1773.
- [30] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Journal of Applied Crystallography* 26 (1993) 283–291.
- [31] R.W. Hoof, G. Vriend, C. Sander, E.E. Abola, Errors in protein structures, *Nature* 381 (1996), p. 272.
- [32] E.G. Hutchinson, J.M. Thornton, PROMOTIF: a program to identify and analyze structural motifs in proteins, *Protein Science* 5 (2) (1996) 212–220.
- [33] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [34] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, 2007, <http://www.pymol.org>
- [35] SYBYL Software Package, Version 8.0, Tripos Associates Inc., S. Hanley Rd., St. Louis, MO 63144, USA, 1699.
- [36] J.J. Irwin, B.K. Shoichet, ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening, *Journal of Chemical Information and Modeling* 45 (1) (2005) 177–182.
- [37] J. Valdez, R. Cedillo, A. Hernández-Campos, L. Yépez, F. Hernández-Luis, G. Navarrete-Vázquez, A. Tapia, R. Cortés, M. Hernández, R. Castillo, Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 16 (19) (2002) 2221–2224.
- [38] S. Díaz, M. de los Remedios, Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial, Master of Science Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
- [39] Méndez-Cuesta, Carlos Alberto, Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-Cloro-2-(metilitio)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1H-benzimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Medicinal Chemistry Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
- [40] F. Hernández-Luis, A. Hernández-Campos, R. Castillo, G. Navarrete-Vázquez, O. Soria-Arteche, M. Hernández-Hernández, L. Yépez-Mulia, Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (7) (2010) 3135–3141.
- [41] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 17 (1999) 57–61.
- [42] A.W. Schuttelkopf, D.M.F. Van Aalten, PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes, *Acta Crystallographica* 60 (2004) 1355–1363.
- [43] L. Di Costanzo, G. Sabio, A. Mora, P.C. Rodriguez, A.C. Ochoa, F. Centeno, D.W. Christianson, Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102 (2005) 13058–13063.
- [44] J.D. Cox, N.N. Kim, A.M. Traish, D.W. Christianson, Arginase–boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function, *Natural Structural Biology* 6 (1999) 1043–1047.
- [45] L. Di Costanzo, M.E. Pique, D.W. Christianson, Crystal structure of human arginase I complexed with thiosemicarbazide reveals an unusual thiocarbonyl μ -sulfide ligand in the binuclear manganese cluster, *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007) 6388–6389.
- [46] E. Cama, D.M. Colleluori, F.A. Emig, H. Shin, S.W. Kim, N.N. Kim, A.M. Traish, D.E. Ash, D.W. Christianson, Human arginase. II. Crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal, *Biochemistry* 42 (2003) 8445–8451.
- [47] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, *Bioinformatics* 27 (3) (2011) 343–350.
- [48] Z.F. Kanyo, L.R. Scolnick, D.E. Ash, D.W. Christianson, Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase, *Nature* 383 (1996) 554–557.
- [49] J. Perozich, J. Hempel, MorrisF S.M. Jr., Roles of conserved residues in the arginase family, *Biochimica et Biophysica Acta* 1382 (1998) 23–37.
- [50] L.T. Lavulo, T.M. Sossong Jr., M.R.B. Burke, M.L. Doyle, J.D. Cox, D.W. Christianson, D.E. Ash, Subunit–subunit interactions in trimeric arginase, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 14242–14248.