



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

Síntesis de bencimidazoles e indazoles como potenciales antibacterianos

PROYECTO GENERICO

Síntesis y modificación de sustancias bioactivas

PRESENTA

Carlos de Jesus Limón Gutiérrez

Matricula: 2202030664

LUGAR Y FECHA DE REALIZACIÓN

Laboratorio N-015, edificio N, UAM Xochimilco

14 de agosto del 2023 al 14 de febrero del 2024

VoBo. De Asesores

Dr. Jaime Pérez Villanueva
Profesor Titular C de TC No.
Económico: 35386

Dra. Karen Rodríguez Villar
Asesor Externo
Número de cédula: 10952378

Resumen

Las enfermedades causadas por bacterias representan un problema de salud pública a nivel global, en especial por el incremento de cepas resistentes a los antibióticos. Actualmente estas infecciones afectan gravemente a personas inmunocomprometidas, sin embargo, poco a poco comienzan a presentarse en personas completamente sanas y se prevé que en los años posteriores se presentes cepas bacterianas más difíciles de erradicar.

Se han planteados distintas alternativas para solucionar este problema, principalmente desde el área de la biología molecular, sin embargo, la solución más segura parece estar en el diseño de nuevos antibióticos con mecanismo de acción diferente a los ya conocidos.

Uno de los blancos farmacológicos más estudiados en los últimos años es la proteína FtsZ, teniendo un papel fundamental en la división celular y encontrándose altamente conservada en el genoma bacteriano. Se han identificado derivados del indol, benzotiazol y benzimidazol como inhibidores de esta proteína, siendo este el punto de partida para los compuestos propuestos.

Se obtuvieron cinco compuestos derivados del benzimidazol e indazol empleando la síntesis orgánica, obteniendo rendimientos globales de 21–94%, los compuestos fueron caracterizado por su punto de fusión, factor de retención y espectro RMN, para posteriormente ser evaluados tanto *in silico* como *in vitro*. Los compuestos mostraron actividad que va desde baja a moderada en el método de difusión en agar, al contrastarlo con los resultados *in silico*, se determinaron algunos factores estructurales que parecen no favorecer la actividad antimicrobiana. Aunque los compuestos no mostraron una alta actividad, los resultados obtenidos parecen ser un buen punto de partida para continuar derivatizando, siendo necesario realizar más estudios para confirmar la inhibición de FtsZ.

Agradecimientos

A mis padres, por todo el apoyo que me brindaron para continuar con mi preparación universitaria, pero sobre todo, por el amor que me han dado, los consejos, los regaños y los valores que me han inculcado a lo largo de mi vida, no pude haber deseado mejores figuras a seguir y nunca terminaré de pagarles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanas, por siempre impulsarme a creer en mí, por compartir mis tristezas y alegrías a lo largo de mi licenciatura y de toda mi vida.

A Stephanie, por acompañarme en toda la realización de este trabajo y hacer mucho más agradable mi estancia en la universidad.

Al doctor Jaime, por contagiarme en sus clases ese gusto por la síntesis orgánica, darme la oportunidad de estar en su equipo de investigación y ayudarme en todo lo que necesitara dentro del laboratorio.

A la doctora Karen, porque sin todos sus conocimientos la realización de este trabajo no habría sido posible, gracias por la paciencia y la disponibilidad que siempre mostró al enseñarme.

Contenido

Agradecimientos	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	3
2.1. Infecciones bacterianas	3
2.2. Bacterias y resistencia a los antibióticos.....	4
2.3. La proteína FtsZ.....	5
2.4. Compuestos inhibidores de FtsZ.....	6
3. Planteamiento del problema y justificación.....	8
4. Objetivo general	8
5. Objetivos específicos.....	8
6. Metodología	9
6.1. Rutas generales de síntesis.....	9
6.2. Procedimientos experimentales de síntesis.....	11
6.3. Síntesis de productos finales CLG_1–5.....	14
6.4. Acoplamiento molecular sobre FtsZ.....	17
6.1. Evaluación biológica.....	18
7. Resultados y discusión	18
7.1. Síntesis orgánica	18
7.2. Elucidación estructural de los compuestos finales.....	19
7.3. Acoplamiento molecular.....	22
7.4. Evaluación biológica sobre bacterias.....	24
8. Conclusiones	25
9. Referencias.....	26
10. Anexos	29

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias representan un problema de salud pública debido al incremento de cepas resistentes a los fármacos actuales. Aunque las tasas de mortalidad reportadas no son alarmantes, las tasas de morbilidad crecen año con año y disminuyen la esperanza de vida de las personas al ser infecciones cada vez más fuertes y prolongadas. Además, las infecciones de bacterias multirresistentes actualmente ya cuestan la vida de algunas personas, sobre todo aquellas que se encuentran inmunodeprimidas como son los pacientes con VIH, diabetes y cáncer (Mateos-Gil *et al*, 2018).

Actualmente se buscan alternativas a los antibióticos ya existentes, para hacer frente a este problema, se ha planteado el uso de péptidos antimicrobianos, lisinas, bacteriófagos, anticuerpos e incluso el uso de CRISPR/Cas9 (Ghosh *et al*, 2019). Estos tratamientos, aunque novedosos, resultan ser bastante caros y aún no se encuentran completamente estudiados.

Desde los años 90 se ha estudiado el complejo proceso de división bacteriana, siendo de particular interés la proteína FtsZ, la cual se ha identificado como un posible blanco farmacológico debido a su papel fundamental en división celular, su alta conservación entre distintas especies bacterianas y baja resistencia microbiana (Mateos-Gil *et al*, 2018); Motivo por el cual este trabajo consiste en la síntesis de heterociclos nitrogenados como inhibidores de FtsZ.

2. Antecedentes

2.1. Infecciones bacterianas

Las bacterias se encuentran distribuidas en prácticamente todos los rincones del planeta, formando parte de los ecosistemas y jugando un papel importante en la captación del nitrógeno; el ser humano no es la excepción a esto, las bacterias se encuentran colonizando principalmente los tejidos epiteliales como el tracto intestinal, desempeñando funciones inmunológicas e incluso proporcionando algunos micronutrientes fundamentales para el ser humano (Karp, Iwasa, & Marshall, 2014). Sin embargo, muchas bacterias son patógenas, y son capaces de adherirse a los tejidos para comenzar a competir por los nutrientes de las células, liberando toxinas, causando la lisis celular y finalmente desencadenando en infecciones, que, si rebasan las capacidades del sistema inmunológico, pueden desencadenar en la muerte (Madigan *et al*, 2009).

Durante gran parte de la historia humana las enfermedades infecciosas fueron la principal causa de morbilidad y mortalidad, situación que perduró en México hasta 1950 con la introducción de los antibióticos en el sistema de salud (Soto-Estrada *et al.*, 2016; Alós, 2015). Sin embargo, algunas enfermedades bacterianas aún no se han podido erradicar, como es el

caso de síndrome linfocutáneo causado por *Nocardia brasiliensis*, una actinobacteria capaz de producir una respuesta inmunológica descontrolada, formando eritemas que se expanden en todo el cuerpo, y para la cual no existe cura una vez avanzada la enfermedad (Bernal *et al*, 2008). Otro ejemplo importante es *Helicobacter pylori*, un bacilo gramnegativo que habita en la mucosa gástrica, el cual desde hace años ha sido asociado como el causante de la gastritis y recientemente, el principal factor de riesgo del cáncer gástrico (Moss, 2017). Muchas otras bacterias siguen representando un grave problema de salud a lo largo del mundo y año con año se portan casos más graves de estas enfermedades (Reardon, 2014).

2.2. Bacterias y resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un mecanismo natural en la supervivencia de las bacterias, presentándose incluso antes de la creación de los antibióticos (Alós, 2015). Los mecanismos por los cuales las bacterias generan resistencia a los antibióticos son esencialmente genéticos, y el hecho de que se utilicen prácticamente los mismos tratamientos desde los años 60, ha diversificado los genes de resistencia.

La adquisición de genes de resistencia puede darse por mutaciones aleatorias, conjugación entre dos bacterias, transducción por medio de virus y transformación por parte de células sobrevivientes de algún tratamiento farmacológico. Estos procesos son especialmente peligrosos, ya que no solo pueden transmitirse estos genes entre bacterias de un mismo género o especie, sino que puede transmitirse entre distintos géneros; por lo cual, la existencia de estas bacterias multirresistentes genera un problema de salud crítico para la humanidad (Larson & Flash. 2022).

Dentro de los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana destacan:

1. Bombas de eflujo, que son sistemas de transporte activo que expulsan los antimicrobianos fuera de la célula, reduciendo su concentración intracelular y su interacción con los blancos. Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un tipo de antimicrobiano o tener un amplio espectro de sustratos. Algunas bacterias, como las *Pseudomonas* tienen múltiples bombas de eflujo que les confieren una alta resistencia a diversos antimicrobianos (Marchetti, Errecalde & Mestorino, 2011).
2. Formación de biopelículas, comunidades de bacterias se adhieren a una superficie y se rodean de una matriz extracelular que las protege de los factores ambientales, incluyendo los antimicrobianos. Las biopelículas dificultan la penetración de los antimicrobianos, favorecen el intercambio genético entre las bacterias y crean un ambiente propicio para la selección de las más resistentes (Ortega-Peña, & Hernández-Zamora, 2018).

3. Mutaciones en el sitio diana, se suscitan principalmente a través de cambios en el ADN que codifica la estructura, modificando la estructura y función del blanco farmacológico, como las proteínas, los ácidos nucleicos o la pared celular. Estas mutaciones pueden impedir la unión o la inhibición de los antimicrobianos, así como disminuir su afinidad por el blanco (Chambers & Deleo, 2009).

4. Producción de enzimas inactivantes. Algunos antimicrobianos como la isoniazida y el ácido *p*-aminosalicílico actúan generando peróxido de hidrógeno en el interior de las bacterias. Sin embargo, bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* tienen enzimas catalasas, que les permite neutralizar el efecto del peróxido de hidrógeno, y con ello resistir el tratamiento con isoniazida (Zhang & Yew, 2009).

A lo largo de la historia se han vivido diversas pandemias causadas por bacterias, y recientemente, el SARS-CoV-2 ha demostrado el peligro que suponen las mutaciones en un organismo, por lo que es de suma importancia desarrollar medicamentos que puedan ayudar a erradicar bacterias multirresistentes. Una de las principales estrategias que se han propuesto para combatir la resistencia es la creación de nuevos antibióticos con un blanco terapéutico y mecanismo de acción diferente a los ya conocidos (Iwasa & Marshall, 2020).

2.3. La proteína FtsZ

Los antibióticos actuales actúan principalmente sobre los siguientes procesos celulares: replicación del ADN, transcripción, traducción, síntesis de peptidoglicano y la síntesis de folato; sin embargo, ninguno de ellos se ha dirigido directamente procesos de división celular (Hurley *et al.*, 2016). Una de las principales proteínas involucradas en la proliferación bacteriana es la *Filamenting temperature-sensitive mutant Z* (FtsZ), la cual es análoga de la tubulina humana y es considerada un blanco terapéutico prometedor (Bi & Lutkenhaus, 1991).

La FtsZ es la principal proteína del citoesqueleto encargada de dirigir la citocinesis bacteriana, y en presencia de GTP se autoensambla bidireccionalmente en el centro de la célula para formar el “anillo Z”, que posteriormente se contrae para iniciar la división celular (Erickson *et al.*, 2010). La inhibición total o parcial de esta proteína conduce a la muerte celular, ya que la incorrecta formación del anillo Z, produce el alargamiento excesivo de la célula, lo cual finalmente induce la apoptosis (**Figura 1a**) (Slayden, 2006). Además, FtsZ presenta algunas ventajas respecto a los blancos terapéuticos conocidos, ya que es una proteína altamente conservada en procariontes, haciendo posible diseñar inhibidores específicos y de amplio espectro para el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas. Así mismo, dado que es una proteína fundamental y conservada para la división celular bacteriana, se ha encontrado que son casi nulas las bacterias que pueden generar resistencia mediante la mutación de esta proteína (Awasthi *et al.*, 2011).

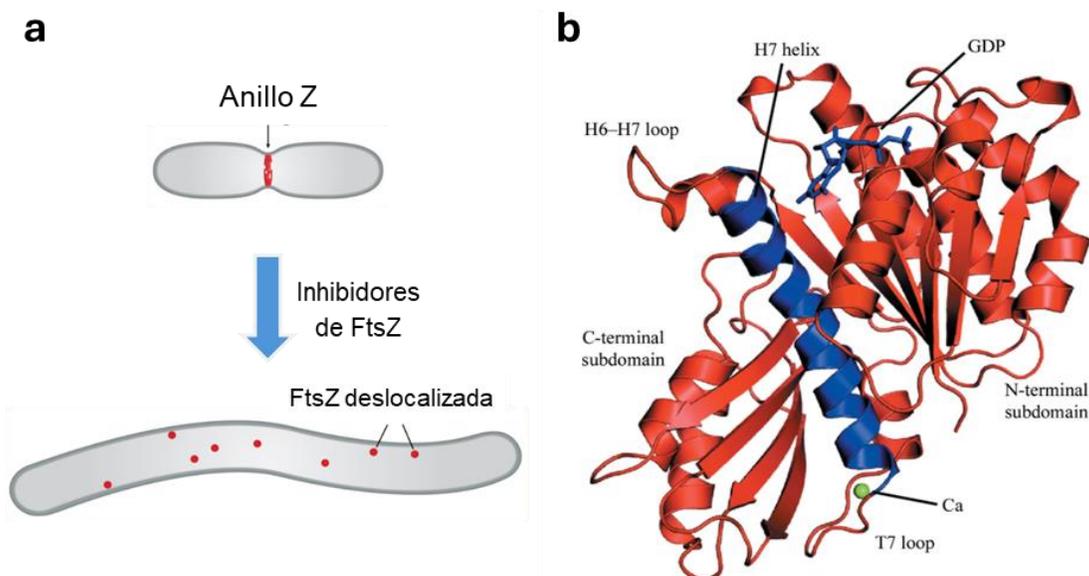


Figura 1. a) Efecto de los inhibidores de FtsZ sobre la morfología bacteriana; b) Estructura de la proteína FtsZ en presencia de GDP. Figuras adaptadas de Matsui *et al* (2012) y Hurley *et al* (2016).

FtsZ consta de dos dominios principales (**Figura 1b**) unidos por una hélice alfa conocida como H7. Por un lado, se encuentra la región del amino terminal que consta de una lámina β de seis hebras con cadenas alfa intercaladas entre cada hebra y esta región contiene el dominio GTPasa (Matsui *et al*, 2012). Por el otro lado, se encuentra la región C-terminal que consiste en una lámina β de cuatro hebras, además de dos pequeñas hélices alfa, que dejan expuesta la lámina β , y es en esta región donde FtsZ se une a otras proteínas para iniciar la formación del anillo Z, por lo cual es un sitio alostérico de gran relevancia (Hurley *et al*, 2016).

2.4. Compuestos inhibidores de FtsZ

Actualmente se han identificado una amplia variedad de familias de compuestos que pueden funcionar como inhibidores de FtsZ, como lo son los 2-carbamoilpteridinas, taxanos, flavanonas, derivados del OTBA y bencimidazoles (Awasthi *et al.*, 2011). De manera particular, el núcleo de bencimidazol es un heterociclo nitrogenado ampliamente estudiado y de gran relevancia por su presencia en varios fármacos como antihistamínicos, antihipertensivos, antipsicóticos y antihelmínticos; en este último caso, teniendo como blanco molecular a la tubulina (Slayden, 2006).

Se han reportado distintos compuestos como inhibidores de FtsZ y similitud estructural al bencimidazol (**Figura 2**), tal es el caso del derivado 9PC (núcleo tiazolo[4,5-*b*]piridina). Además, se han reposicionado fármacos ya existentes, como el albendazol y el tiabendazol, que, aunque presentaron menor potencia en comparación con 9PC, parecen ser estructuras base prometedoras. También derivados de 2,4-difenilindazol mostraron tener una excelente actividad frente a esta proteína (Hurley *et al*, 2016).

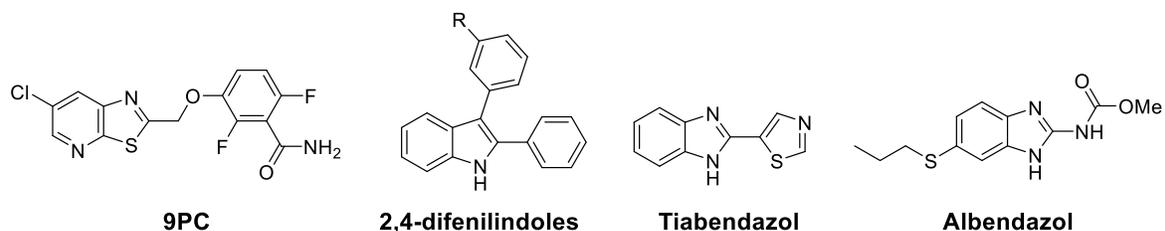


Figura 2. Inhibidores conocidos de FtsZ

La síntesis y evaluación *in silico* e *in vitro* de nuevas moléculas derivadas del bencimidazol dirigidas a la inhibición de FtsZ son esenciales para el desarrollo de compuestos líderes en el diseño de nuevos fármacos; así mismo, resulta interesante explorar la interacción de derivados de indazol (isómero) con FtsZ. Por lo anteriormente, el presente trabajo comprende las siguientes moléculas para su síntesis, evaluación antimicrobiana y acoplamiento molecular sobre FtsZ.

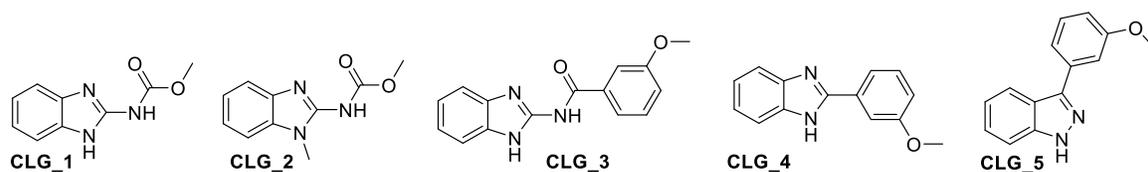


Figura 3. Compuestos propuestos derivados del bencimidazol e indazol.

3. Planteamiento del problema y justificación

En los últimos años se ha registrado una disminución de la efectividad de los fármacos utilizados como antibacterianos, con lo cual las enfermedades infecciosas vuelven a posicionarse como una de las principales causas de morbilidad y representan un problema serio a nivel mundial (Soto-Estrada *et al.*, 2016; Alós, 2015).

Actualmente, la búsqueda de nuevos blancos moleculares para el desarrollo de nuevos antibióticos es una prioridad, siendo la proteína FtsZ, uno de los blancos más prometedores por su importancia en el proceso de división celular en bacterias. Al mismo tiempo, se han identificado distintos inhibidores de esta enzima destacando los derivados de bencimidazol. Por ello, se busca el desarrollo de compuestos líderes para el diseño de nuevos fármacos con actividad antimicrobiana, a partir de la obtención de nuevos derivados de bencimidazol e indazol por síntesis química, así como explorar su capacidad antimicrobiana.

4. Objetivo general

- Sintetizar y evaluar compuestos derivados del bencimidazol e indazol con potencial antibacteriano.

5. Objetivos específicos

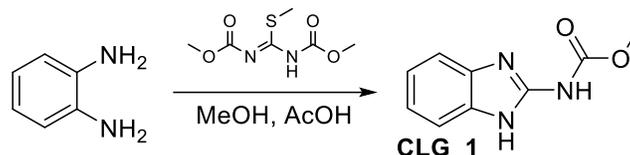
- Sintetizar los compuestos **CLG_1–5**.
- Caracterizar los compuestos sintetizados.
- Evaluar los compuestos sobre dos cepas bacterianas.
- Evaluar la afinidad de los compuestos sobre FtsZ empleando acoplamiento molecular.

6. Metodología

6.1. Rutas generales de síntesis

6.1.1. (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**CLG_1**)

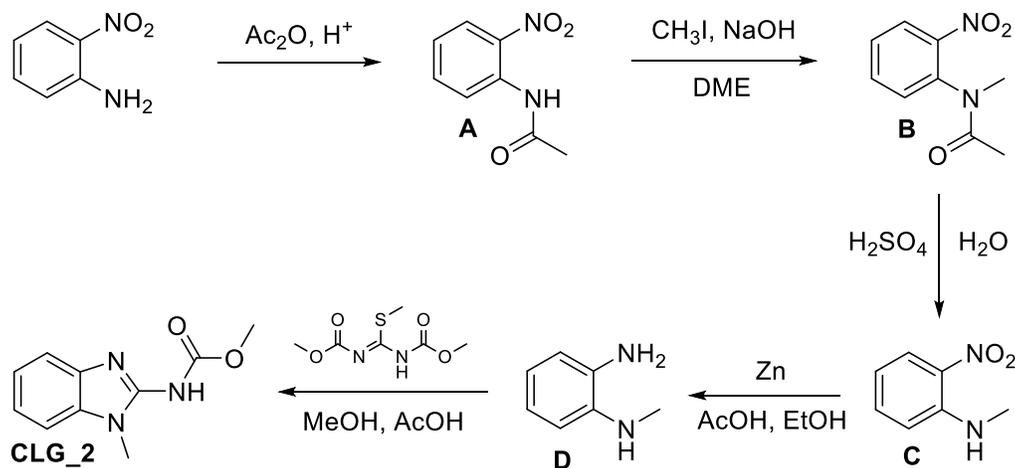
Se obtuvo por medio de una ciclación entre la *o*-fenilendiamina y el 1,3-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea como reactivos para obtener el carbamato **CLG_1**, **Esquema 1** (Palomares-Alonso *et al.*, 2009)



Esquema 1. Síntesis del carbamato **CLG_1**.

6.1.2. (1-metil-1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (**CLG_2**)

La ruta de síntesis consta de seis etapas (**Esquema 2**), partiendo de la acetilación de la 2-nitroanilina, seguido de una *N*-metilación de la amida **A** utilizando CH_3I en presencia de NaOH (Pérez-Villanueva, 2013). Posteriormente, se realizó una hidrólisis, seguida de una reducción para obtener el precursor **D** (Palomares-Alonso *et al.*, 2009). Finalmente, se realizó la reacción de ciclación con **D** y hemisulfato de 2-metil-2-tiopseudourea para obtener el carbamato **CLG_2**, bajo las mismas condiciones usadas para **CLG_1**.

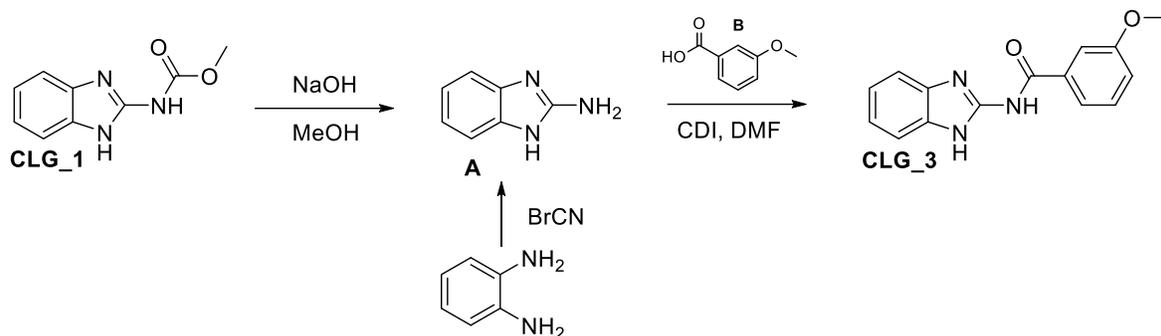


Esquema 2. Ruta de síntesis del compuesto **CLG_2**.

6.1.3. *N*-(1*H*-bencimidazol-2-il)-3-metoxibenzamida (**CLG_3**)

Para obtener el compuesto **CLG_3** se emplearon dos metodologías (**Esquema 3**). Una ruta parte del carbamato **CLG_1**, al cual se realizó una hidrólisis básica para obtener el intermediario **A**; en la segunda etapa, el ácido benzoico **B** se trata con carbonildiimidazol (CDI) como activador y se hace reaccionar con el intermediario **A** para obtener el compuesto **CLG_3** (Palomares-Alonso *et al.*, 2009). La ruta alternativa plantea obtener el 2-

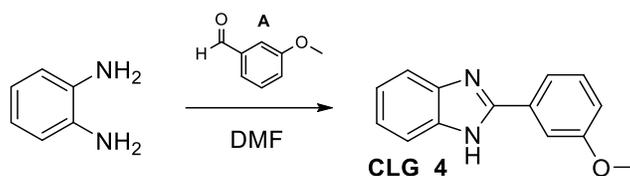
aminobencimidazol **A**, a través de la ciclación de la *o*-fenilendiamina con bromuro de cianógeno.



Esquema 3. Ruta de síntesis del compuesto **CLG_3**.

6.1.4. 2-(3-metoxifenil)-1H-benzimidazol (**CLG_4**)

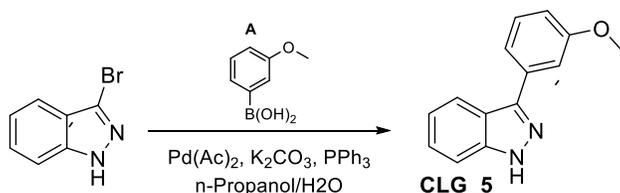
Se obtuvo en una sola etapa de condensación entre la *o*-fenilenediamina y el 3-metoxibenzaldehído (**A**) utilizando dimetilformamida (DMF) como disolvente, **Esquema 4** (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2006).



Esquema 4. Síntesis del compuesto **CLG_4**.

6.1.5. 3-(3-metoxifenil)-1H-indazol (**CLG_5**)

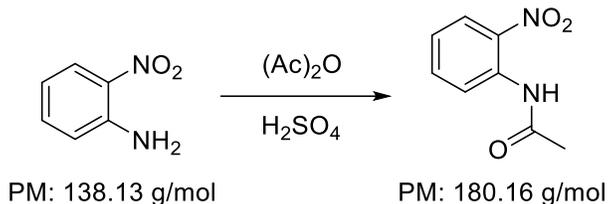
El compuesto **CLG_5** se obtuvo mediante una reacción de acoplamiento C-C de Suzuki-Miyaura (**Esquema 5**), donde se hizo reaccionar al 3-bromo-1H-indazol con el ácido 2-metoxifenilborónico (**A**) en presencia de Pd(OAc)₂ como catalizador, empleando radiación de microondas como fuente de calentamiento (Rodríguez-Villar *et al.*, 2021).



Esquema 5. Síntesis del compuesto **CLG_5**.

6.2. Procedimientos experimentales de síntesis

6.2.1. Obtención de 2-nitroacetanilida

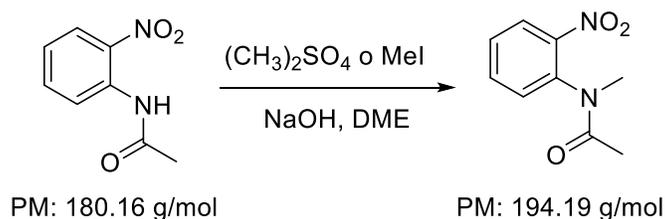


Esquema 6. Acetilación de 2-nitroacetanilida para obtener 2-nitroacetanilida.

En un vaso de precipitados de 50 mL adaptado con un termómetro, se colocaron 6 g (43.43 mmol) de 2-nitroanilina, 7 mL (74.05 mmol, 1.7 eq) de anhídrido acético y se agitó hasta suspender el compuesto, posteriormente se agregaron 2 gotas de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se dejó en agitación por 30 minutos, cuidando que la temperatura no sobrepasara los 70 °C. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre 100 mL de hielo-agua. El precipitado formado se filtró al vacío y se lavó repetidamente con agua fría hasta obtener un pH neutro. Se obtuvieron 7.461 g (95.34 %) de un sólido café/verdoso, el cual se observó como único producto en el sistema Hexano:CHCl₃:AcOEt (50:35:15) y se utilizó sin ninguna otra purificación para la siguiente reacción, **Esquema 6**.

6.2.2. Obtención de *N*-metil-2-nitroacetanilida

La *N*-metil-2-nitroacetanilida se sintetizó por dos metodologías, empleando como agente alquilante al sulfato de dimetilo (Método A) o yodometano (Método B). Ambas metodologías se detallan a continuación, **Esquema 7**.



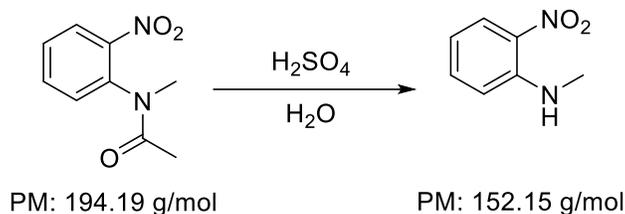
Esquema 7. Síntesis del *N*-metil-2-nitroacetanilida.

Método A: En un matraz de 3 bocas de 15 mL adaptado con termómetro y un embudo de adición se colocaron 250 mg (1.38 mmol) de *N*-metil-2-nitroacetanilida, 280 mg (2.22 mmol, 1.6 eq) de sulfato de dimetilo y 0.1 mL de dimetoxietano (DME). La mezcla se calentó a 30 °C y se agregó gota a gota 0.22 mL de NaOH al 40% (2.22 mmol, 1.6 eq), cuidando que la temperatura se mantuviera entre 30-35 °C por 1 hora. Al término, se agregaron 10 mL de agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (10 mL x 3), las fases orgánicas juntas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 258.3 mg de un aceite amarillo impuro.

Método B: En un matraz de 3 bocas de 25 mL adaptado con termómetro y un embudo de adición se colocaron 5.975 g (33.16 mmol) de *N*-metil-2-nitroacetanilida, 3.5 mL (8 g, 56.37

mmol, 1.7 eq) de yodo metano y 3 mL de dimetoxietano (DME). La mezcla se calentó a 30 °C y se agregó gota a gota 5 mL de NaOH al 40% (49.74 mmol, 1.5 eq), cuidando que la temperatura se mantuviera en 30-35 °C. Después de 1 hora de reacción, se agregaron 20 mL de agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (25 mL x 3), las fases orgánicas juntas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 6.341 g de un aceite amarillo impuro, el cual se usó sin purificar en la siguiente reacción.

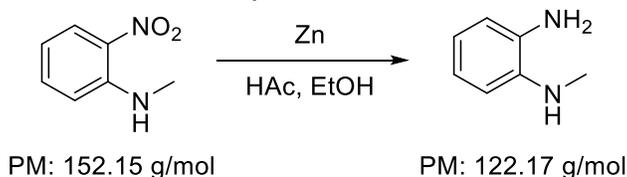
6.2.3. Obtención de *N*-metil-2-nitroanilina



Esquema 8. Síntesis del *N*-metil-2-nitroanilina empleando hidrólisis acida.

En un matraz de 25 mL adaptado con un sistema de reflujo, se colocaron 6.3 g (32.44 mmol) de *N*-metil-2-nitroacetanilida, 4.9 mL de H₂O y 2.1 mL de H₂SO₄. La reacción se calentó a 120 °C por 5 h. Al término, la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (20 mL x 3), la fase orgánica se recuperó y secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente por presión reducida. Se obtuvieron 4.642 g de un líquido aceitoso de color rojo. El producto se disolvió en diclorometano y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente, formando cristales de color rojo, **Esquema 8**.

6.2.4. Obtención de *N*-metil-1,2-fenilendiamina.

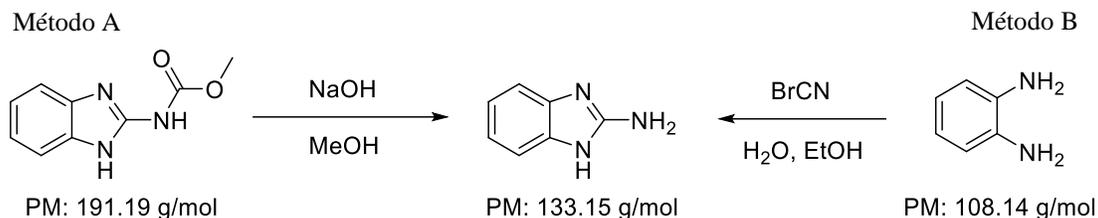


Esquema 9. Síntesis del *N*-metil-1,2-fenilendiamina por medio de una reducción.

En un matraz de 250 mL se disolvieron 5.0587 g (33.24 mmol) de *N*-metil-2-nitroanilina en 100 mL de una mezcla de AcOH:EtOH (1:1). Posteriormente se agregaron poco a poco, 1.3 g de Zinc metálico cada 10 minutos, hasta adicionar un total de 13 g (199.5 mmol, 6 eq), manteniendo agitación constante por 5 h más. La mezcla se filtró sobre celita para retirar el Zinc y se lavó con AcOEt. La solución filtrada se llevó a pH básico y se extrajo con AcOEt, La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente por presión reducida. Se obtuvieron 1.5182 g de un aceite rojo oscuro, el cual se usó sin purificar en la siguiente reacción.

6.2.5. Obtención de 2-aminobenzimidazol

Este intermediario se preparó por dos metodologías, la primera consistió en la hidrólisis del carbamato **CLG_1** (Método A) y la segunda por condensación de la 1,2-fenilendiamina con bromuro de cianógeno (Método B), los cuales se detallan a continuación (**Esquema 10**).

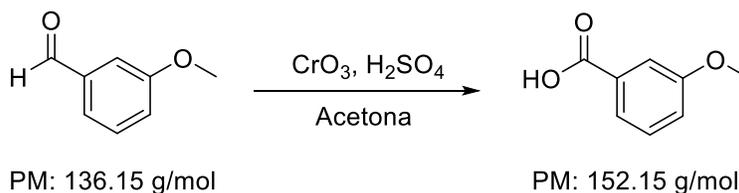


Esquema 10. Síntesis del 2-aminobenzimidazol utilizando hidrólisis básica (A) y bromuro de cianógeno (B).

Método A: En un vial para microondas de 30 mL se colocaron 500 mg (2.615 mmol) de (bencimidazol-2-il)carbamato de metilo, 15 mL de metanol y 157 mg (3.925 mmol, 1.5 eq) de NaOH disueltos en la mínima cantidad de agua. El vial sellado se calentó en un reactor de microondas por 10 min a 140 °C, posteriormente, se sometió a un segundo ciclo de calentamiento a la misma temperatura por 15 minutos adicionales. Al término, se evaporó el metanol en un rotavapor, se ajustó el pH a 11 utilizando HCl al 10%. Enseguida se realizaron extracciones con acetato de etilo (3x20 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente con presión reducida. Se obtuvieron 334.2 mg (95.9 %) de un polvo blanco cristalino con punto de fusión de 215.1 °C, el cual mostró ser un solo compuesto con en el sistema Hexano:AcOEt (70:30).

Método B: En un matraz de 2 bocas de 25 mL adaptado con un termómetro, baño de hielo y agitación magnética, se colocaron 502.5 mg (4.646 mmol) de 1,2-fenilendiamina y 5 mL de una mezcla de H₂O:EtOH (8:2). Se adicionaron 590.5 mg (5.576 mmol, 1.2 eq) de bromuro de cianógeno, cuidando que la temperatura no rebasara los 70 °C, después de 10 minutos se retiró el baño de hielo, y se mantuvo la agitación por 30 minutos más. Después, se agregó carbón activado a la mezcla de reacción y se filtró sobre celita, a la solución recuperada se le ajustó el pH a 11 con hidróxido de amonio, y se realizaron extracciones sucesivas con AcOEt (3x25 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente por presión reducida. Se obtuvieron 610.1 mg (98.6 %) de cristales blancos con punto de fusión de 214.3 °C, el cual mostró ser un solo compuesto con en el sistema Hexano:AcOEt (70:30).

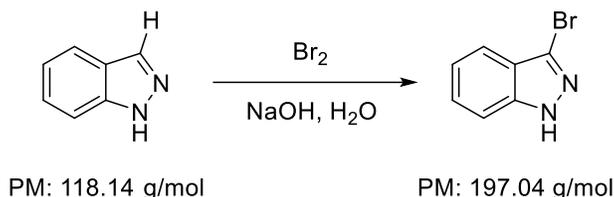
6.2.6. Obtención de ácido 3-metoxibenzoico



Esquema 11. Oxidación de Jones para la síntesis del ácido 3-metoxibenzoico.

En un matraz bola de 50 mL adaptado con un embudo de adición, baño de hielo y agitación, se disolvieron 510.1 mg (3.746 mmol) de 3-metoxibenzaldehído en 10 mL de acetona; después, se agregaron gota a gota 2.25 mL (5.62 mmol, 1.5 eq) del reactivo de Jones al 25%. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y baño de hielo por 30 minutos y después la reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 2 h más. Al finalizar, se evaporó la acetona usando presión reducida y se agregaron 10 mL de agua. El precipitado formado se recuperó por filtración con vacío y se lavó repetidas veces con agua. Se obtuvieron 542 mg (94.0 %) de un precipitado blanco con punto de fusión de 106.2–107.8 °C, el cual mostró ser un solo compuesto en el sistema Hexano:CHCl₃:AcOEt (50:35:15), **Esquema 11**.

6.2.7. Obtención de 3-bromo-1H-indazol

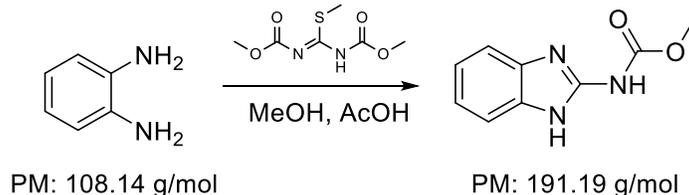


Esquema 12. Bromación de indazol para la síntesis de 3-bromo-1H-indazol.

En un matraz bola de 100 mL provisto con agitación magnética se colocó 1 g (8.46 mmol) de indazol y 25 mL de NaOH 2M. Se agregó gota a gota 14 mL de una solución 0.6 M de Br₂ (8.4 mmol, 0.99 eq) en NaOH al 10%. Después de terminar la adición, se continuó la agitación por 1 hora más. Al término, la reacción se neutralizó con HCl al 10%, para después filtrar al vacío y lavar repetidas veces con agua. Se obtuvieron 1.547 g (92.8 %) de un precipitado blanco en forma de gránulos, el cual mostró ser un solo compuesto con factor de retención igual a la referencia, **Esquema 12**.

6.3. Síntesis de productos finales CLG_1–5

6.3.1. Síntesis de (bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (CLG_1)



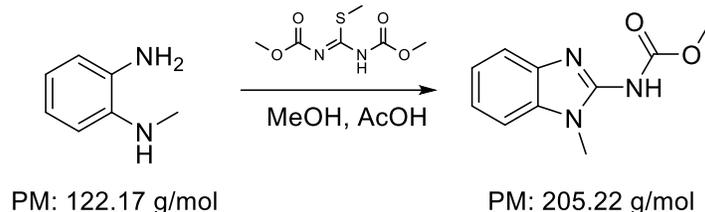
Esquema 13. Ciclación de fenilendiamina para obtener CLG_1.

En un matraz de 250 mL adaptado con un refrigerante en posición de reflujo y conectado a una trampa de cloro, se colocaron 2.5 g (23.12 mmol) de 1,2-fenilendiamina y 5.3 g (27.72 mmol, 1.12 eq) de 1,3-bis(metoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea disueltos en 45 mL de MeOH:H₂O (1:1) y 0.5 mL de AcOH. La mezcla se calentó a 70 °C por 3 h. Al finalizar, la reacción se vertió sobre 50 g de hielo, para después filtrar al vacío y lavar repetidas veces el sólido con agua fría. Se obtuvieron 4.2351 g (93.1 %) de pequeños cristales blancos en forma de agujas, siendo un solo compuesto en cromatografía de capa fina en el sistema

CH₂Cl₂:MeOH (90:10) con una gota de AcOH, con punto de fusión de 319.1-319.8 °C (descomposición), **Esquema 13**.

¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.68 (s, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.07 (m, 2H), 3.75 (s, 3H) ppm; ¹³C RMN (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 155.65, 148.06, 121.36, 113.89, 52.82 ppm.

6.3.2. Síntesis de (1-metil-bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (CLG_2)

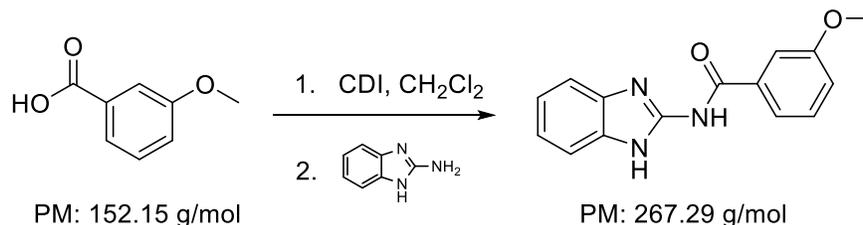


Esquema 14. Ciclación de *N*-metil-1,2-fenilendiamina para obtener **CLG_2**.

En un matraz de 100 mL adaptado con un refrigerante en posición de reflujo y conectado a una trampa de cloro, se colocaron 1.3866 g (11.35 mmol) de *N*-metil-1,2-fenilendiamina y 2.6 g (12.61 mmol, 1.11 eq) de 1,3-bis(metoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea disueltos en 24 mL de MeOH:H₂O (1:1) y 0.25 mL de AcOH. La reacción se calentó a 70 °C por 3 h. Después, se adicionaron 0.25 mL de AcOH y se mantuvo el calentamiento por 2 h más, hasta consumir la totalidad de la materia prima. Al finalizar, la reacción se vertió sobre 25 g de hielo, formándose un sólido verde-oscuro, que posteriormente se filtró al vacío y se lavó con agua fría. El sólido fue purificado por cromatografía en columna, utilizando Hexano:AcOEt (80:20). Se obtuvieron 1.509 g (62.1 %) de un sólido rosa, siendo un solo compuesto en cromatografía de capa fina en el sistema Hexano:AcOEt (60:40). Una muestra de este compuesto se recrystalizó en etanol, obteniendo cristales blancos en forma de aguja con punto de fusión de 187.1–188.3 °C.

¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.05 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.44 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.52 Hz, 1H), 7.18 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.50 (s, 3H) ppm; ¹³C RMN (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.97, 153.84, 130.63, 129.41, 122.57, 111.74, 109.50, 52.09, 28.37 ppm.

6.3.3. Síntesis de *N*-(bencimidazol-2-il)-3-metoxibenzamida (CLG_3)



Esquema 15. Sustitución de grupo acilo para la obtención de **CLG_3**.

En un matraz de 50 mL se disolvieron 508.5 mg (3.34 mmol) de ácido 3-metoxibenzoico en 20 mL de CH₂Cl₂, posteriormente se agregaron 651 mg (4.01 mmol, 1.2 eq) de CDI, la mezcla se mantiene en agitación constante a temperatura ambiente por 40 minutos, momento

En un vial para microondas se colocaron 250 mg (1.289 mmol) de 3-bromoindazol, 215.3 mg (1.416 mmol, 1.1 eq) de ácido 3-metoxifenilborónico, 163.6 mg (1.544 mmol, 1.2 eq) de carbonato de sodio, 9.96 mg de trifetilfosfina, 2.85 mg de Pd(OAc)₂ y 6.4 mL de agua/n-propanol (25:75). La reacción se calentó a 130°C durante 10 minutos, empleando microondas como fuente de calentamiento. La mezcla de reacción se filtró al vacío y se lavó con metanol, para después recuperar y evaporar las aguas madre por presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna en el sistema Hexano:AcOEt (90:10), obteniendo un líquido ligeramente amarillento, al cual se le agregaron 7 mL de hexano con trazas de diclorometano y se dejó en refrigeración para favorecer su cristalización; después, el producto se recuperó por filtración, obteniendo 150 mg (51.9 %) de un polvo blanco cristalino con punto de fusión de 73–74 °C, el cual mostró ser un solo compuesto en el sistema Hexano:CHCl₃:AcOEt (50:35:15)(Esquema 17).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ = 11.38 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.22 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.56 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.98 Hz, 1H), 7.37 (td, *J*₁ = 7.26 Hz, *J*₂ = 0.84 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.34 Hz, 1H), 7.22 (td, *J*₁ = 7.44 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz, 1H), 7.01 (ddd, *J*₁ = 8.28 Hz, *J*₂ = 2.52 Hz, *J*₃ = 0.65 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H) ppm.

6.4. Acoplamiento molecular sobre FtsZ

6.4.1. Preparación de los ligandos y del receptor

Los compuestos **CLG_1–5** fueron construidos en ChemDraw y salvados en formato *.sdf. La estructura de los compuestos se optimizó empleando el campo de fuerza MMFF94 en el programa DataWarrior. La estructura de la FtsZ se obtuvo de *The Protein Data Bank*, seleccionando la proteína 3VOB, la cual fue preparada usando el programa Yasara mediante los siguientes pasos: 1) remoción de las moléculas de agua y otros residuos ajenos a la estructura proteica, 2) Asignación de los estados de protonación para los residuos de aminoácidos a pH fisiológico, 3) Minimización de la proteína empleando el campo de fuerza NOVA.

6.4.2. Acoplamiento molecular

Se definieron dos *grids* de búsqueda: uno centrado en el ligando cocrystalizado (sitio alostérico) y otro sobre el ligando natural GDP (sitio catalítico). En ambos se empleó el *grid* de forma cubica y se extendió 5 Å más allá de los límites del ligando. El proceso se validó construyendo ambos ligandos (9PC y GDP) bajo el mismo protocolo que los compuestos de prueba, para posteriormente acoplar el ligando correspondiente para cada sitio, empleando con el campo de fuerza AMBER03 y 200 corridas en Autodock Vina y Autodock 4.2 desde la interfaz de Yasara. Finalmente, el ligando obtenido se comparó con la estructura cristalográfica original calculando el RMSD (< 2Å). Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron para cada compuesto prueba en ambos sitios, empleando la misma metodología utilizada en la validación. Los resultados se expresan como energías de unión en kcal/mol (ΔG).

6.1. Evaluación biológica

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó siguiendo el método de difusión en disco descrito en las guías CLSI (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*). Para este ensayo se utilizaron cepas ATCC de *E. coli* (EC25922 y EC25404) y *S. aureus* (SA25923 y SA6538) incubadas a 35 ± 2 °C en caldo Soya Trypticaseína (MCD Lab) por 24 h. Después, se prepararon cajas Petri de 120 x 15 mm con 20 mL de una suspensión bacteriana de agar Soya Trypticaseína (MCD Lab) ajustada a 0.5 McFarland (1×10^7 – 1×10^8 CFU/mL). Una vez solidificado el agar, se colocaron sobre la superficie discos de papel de 6 mm de diámetro previamente cargados con los compuestos de prueba y las cajas fueron incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Finalmente, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm) empleando un Vernier.

Los discos con los compuestos de prueba fueron cargados con 1 mg/disco, empleando MeOH o DMC como vehículo, el disolvente se eliminó por evaporación a temperatura ambiente. El control positivo fue ampicilina 0.1 µg /disco para *e. coli* y 0.05 mg/disco para *s. aureus*, y como control negativo se usó el vehículo. Finalmente, los compuestos que mostraron un halo de inhibición a 1 mg/disco sobre alguna de las cepas fueron evaluados a distintas concentraciones (1, 0.75, 0.5 y 0.25 mg/disco) para determinar su concentración mínima inhibitoria.

7. Resultados y discusión

7.1. Síntesis orgánica

Se obtuvieron cuatro compuestos derivados de bencimidazol y uno de indazol en cantidad suficiente, y se caracterizaron por su punto de fusión, factor de retención y espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H). Las principales características fisicoquímicas de cada compuesto se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de CLG_1 a CLG_5, así como los rendimientos de reacción

Compuesto	Punto de fusión	Sistema de CCF	R _f	Apariencia	Rendimiento global	Rendimiento última etapa
CLG_1	319.1–319.8 °C	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	0.63	Cristales blancos	NA	93.1 %
CLG_2	187.1–188.3 °C	Hexano:AcOEt (60:40)	0.25	Cristales blancos	20.6 %*	62.1 %
CLG_3	235.5–235.9 °C	Hexano:AcOEt (60:40)	0.33	Cristales color crema	85.5 %*	94.9 %
CLG_4	211.0–211.5 °C	Hexano:AcOEt (60:40)	0.46	Cristales blancos	NA	81.0 %
CLG_5	73–74 °C	Hexano:CHCl ₃ :AcOEt (50:35:15)	0.24	Polvo blanco	48.1 %	51.9 %

NA: No aplica; *Se expresan los rendimientos globales utilizando la metodología B correspondiente.

La ruta de síntesis para obtener el compuesto **CLG_2** presentó muy buenos rendimientos tanto en la acetilación como en la *N*-metilación utilizando CH₃I (Método **B**), en contraste con la metodología que usa sulfato de dimetilo (Método **A**) que presentó un bajo rendimiento, esto pudo deberse a la degradación del reactivo. Por su parte, la reacción de ciclación utilizando 1,3-bis(metoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea para obtener el bencimidazol **CLG_2** también presentó bajo rendimiento, y esto puede atribuirse al intermediario diamino, el cual se utilizó sin purificar y es sabido que las diaminas suelen degradarse fácilmente al exponerse a la luz y oxígeno, por lo cual debe considerarse una etapa previa de purificación y mantener el reactivo bajo atmosfera inerte.

Por otro lado, ambas metodologías para la síntesis del intermediario 2-aminobenzimidazol mostraron tener excelentes rendimientos, siendo de suma importancia ajustar el pH a 11 en esta etapa de reacción, ya que en cualquier otro valor el compuesto se extrae pobremente. En cuanto a la reacción de amidación, el CDI mostró ser un excelente reactivo de acoplamiento nucleofílico para la obtención del compuesto **CLG_3**.

Para el compuesto **CLG_4**, se modificó ligeramente la metodología para la síntesis de bencimidazoles a partir de diaminas y benzaldehídos, empleando microondas como fuente de calentamiento, con lo cual los tiempos de reacción se redujeron a 15 minutos aproximadamente, en comparación de otros métodos que reportan reflujo por varias horas (Kumar *et al*, 2006), esto sin comprometer el rendimiento de la reacción.

7.2. Elucidación estructural de los compuestos finales

La asignación de las señales de RMN¹H para cada compuesto se muestran en las **Figuras 4–8** y los espectros completos puede consultarse en la sección de anexos (**Espectro 1–7**).

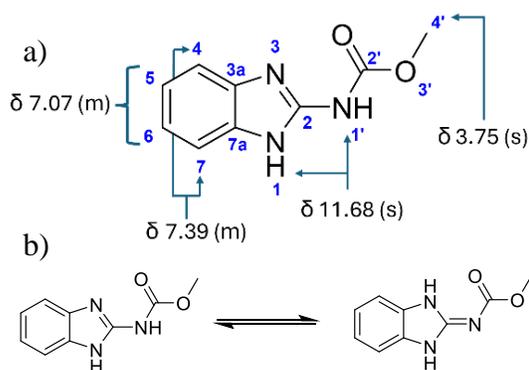


Figura 4. a) asignación de señales de RMN para el compuesto **CLG_1** b) tautomería del compuesto.

Para el compuesto **CLG_1**, la señal con desplazamiento de 11.68 ppm corresponde a los hidrógenos del tipo N-H, ya que se trata de una señal ancha, cuya integración para dos hidrógenos puede explicarse debido a la tautomería que presenta este compuesto tal como se muestra en la **Figura 4**. Las señales con desplazamiento de 7.39 y 7.07 ppm, pueden atribuirse a los hidrógenos de la posición 4, 7 y 5, 6 respectivamente, ya que como Pretch *et al* (2009) menciona, la alta simetría del bencimidazol hace que los hidrógenos 4 y 7 se presenten como una sola señal, además de tener un desplazamiento químico mayor que las posiciones 5 y 6, hidrógenos que también se

presentan como una sola señal, ya que como Pretch *et al* (2009) menciona, la alta simetría del bencimidazol hace que los hidrógenos 4 y 7 se presenten como una sola señal, además de tener un desplazamiento químico mayor que las posiciones 5 y 6, hidrógenos que también se

observan como una sola señal. Finalmente, la señal con desplazamiento de 3.75 ppm corresponde a los hidrógenos del éster metílico.

El compuesto **CLG_2** presenta una señal con desplazamiento igual a 12.05 ppm característica de un hidrógeno tipo N-H, el metilo en la posición 1 rompe con la simetría de la molécula, con lo cual las señales aromáticas pueden diferenciarse ligeramente, observando dos dobletes con desplazamiento de 7.42 y 7.38 ppm que corresponden a los hidrógenos de las posiciones 4 y 7. Mientras que la señal en 7.18 ppm, no logra resolverse completamente pero integra para 2H que pertenecen a los hidrógenos de las posiciones 5 y 6. Finalmente, los singuletes en 3.61 y 3.50 ppm, corresponden a los metilos de la posición 4'' y 1' respectivamente.

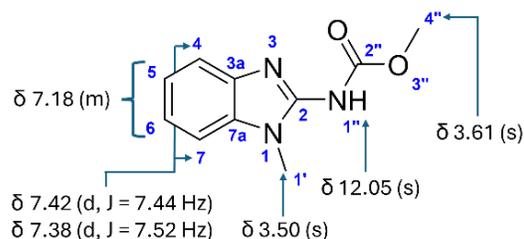


Figura 5. a) asignación de señales de RMN para el compuesto **CLG_2**.

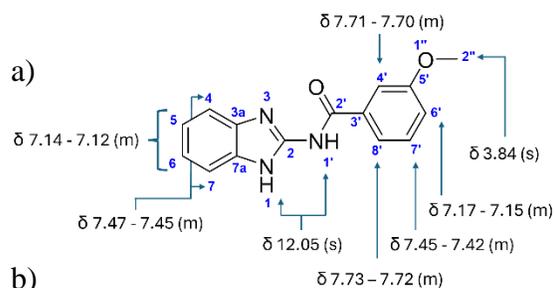


Figura 6. a) asignación de señales de RMN para el compuesto **CLG_3** b) tautomería del compuesto.

El compuesto **CLG_3** presenta un singulete en 12.05 ppm, característico de hidrógenos N-H, del cual nuevamente su integral de 2H puede ser explicada por la tautomería del compuesto, como se muestra en la **Figura 6**. El singulete con desplazamiento de 3.84 ppm corresponde al metoxilo. Respecto a las señales aromáticas, prácticamente ninguna de ellas se encuentra resuelta, pero es posible hacer algunas asignaciones considerando las constantes de acoplamiento y desplazamientos típicos; los multipletes con desplazamiento en 7.47-7.45 ppm y 7.14-7.12 ppm son similares a los que presenta el compuesto **CLG_1**, teniendo constantes de acoplamiento prácticamente iguales ($J_{CLG_1} = 3.08$ y $J_{CLG_3} = 3.19$) por lo cual podemos sugerir que estas señales corresponden a los hidrógenos de las posiciones 4,7 y 5,6 respectivamente. Por su parte, las señales típicas del patrón de sustitución del benceno fue posible diferenciarlas, como dobletes que van de 7.73-7.72 ppm y 7.17-7.15 ppm, con constante de acoplamiento $J = 7.71$ Hz y $J_1 = 8.15$, $J_2 = 1.9$ Hz, respectivamente, las cuales pueden pertenecer a los hidrógenos de las posiciones 6' y 8'. En un desplazamiento de 7.71-7.70 ppm se presenta un doblete con constante de acoplamiento meta ($J = 2.43$ Hz) el cual corresponde al hidrógeno de la posición 4' y finalmente, el triplete que se observa en 7.45-7.42 ppm ($J = 7.85$ Hz) pertenece al hidrógeno de la posición 7'.

El compuesto **CLG_4** presenta un singulete con desplazamiento de 12.90 ppm característico de un hidrógeno tipo N-H, las señales de los hidrógenos de la posición 4 y 7 pueden asignarse a los dobletes con desplazamiento de 7.67 y 7.54 ppm, debido a que poseen patrones similares con los espectros de otros bencimidazoles, los hidrógenos de posición 5 y 6 al estar lejos del benceno sustituido sienten menos la atracción electrónica, con lo cual presentar cierta simetría y es por eso que se observa como una señal multiplete en 7.21 ppm que integra para 2H. La señal que se encuentra a 3.87 ppm es característica de los hidrógenos del metoxilo por su intensidad e integral de 3H. El patrón de sustitución del benceno puede resolverse si consideramos que el multiplete de 7.77 ppm se compone de 2 señales no resueltas, un doblete y un singulete debido a la intensidad de la señal en 7.77 ppm e integral de 2H, siendo el singulete de 7.767 ppm la señal del hidrógeno 2' y el doblete del hidrógeno de la posición 6'; además el triplete de 7.46 ppm probablemente pertenece al hidrógeno de la posición 5' y el doblete dobleteado de 7.07 ppm al hidrógeno de la posición 4'.

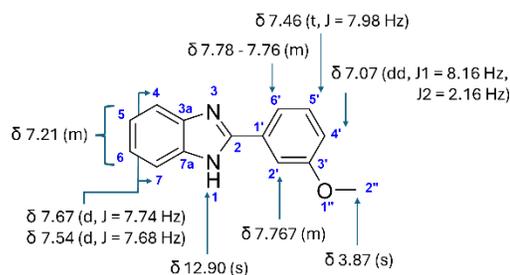


Figura 7. a) asignación de señales de RMN para el compuesto **CLG_4**.

El compuesto **CLG_5** todas las señales se encuentran resueltas, la señal de 11.38 ppm al tener una intensidad tan baja y desplazamiento alto pertenece al hidrógeno N-H de la posición 1. La señal de 3.86 ppm nuevamente es característica para el metoxilo. Las señales aromáticas del indazol reportadas en la literatura concuerdan con el espectro obtenido, siendo que los tripletes de 7.22 y 7.37 ppm corresponden a los hidrógenos de la posición 5 y 6 respectivamente, de acuerdo con Pretch *et al* (2009); así mismo, los dobletes de 8.04 y 7.33 ppm pueden pertenecen al mismo sistema debido a su contante de acoplamiento es similar ($J = 8.22$ y 8.34 Hz), por lo cual pueden asignarse a los hidrógenos de la posición 4 y 7. Las señales restantes pertenecen al patrón de sustitución del benceno, observando un doblete en 7.61 ppm que pertenece al hidrógeno de la posición 6', el singulete en 7.57 ppm es asignado a la posición 2' ya que no presenta hidrógenos vecinos con los cuales acoplarse fuertemente, el triplete en 7.45 ppm pertenece a la posición 5' debido a sus dos hidrógenos vecinos y finalmente el ddd con desplazamiento 7.01 ppm puede asignarse a la posición 4' debido al desplazamiento característico observado tanto en el compuesto **CLG_3** y **CLG_4**.

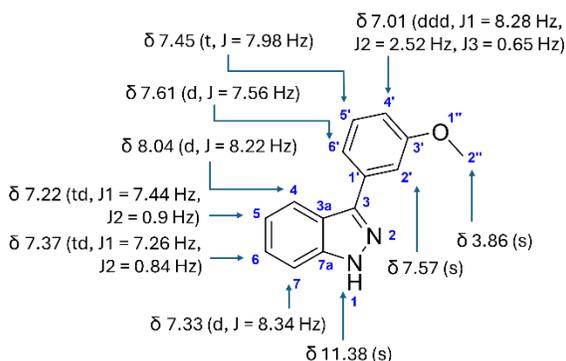


Figura 8. a) asignación de señales de RMN para el compuesto **CLG_5**.

7.3. Acoplamiento molecular

El acoplamiento realizado fue del tipo flexible-rígido, siendo estandarizado con 200 ciclos tanto para Vina y Autodock, así mismo, el análisis fue realizado tanto en el sitio alostérico como con el sitio catalítico de FtsZ, teniendo como ligandos cocrystalizados la 3-[(6-choro[1,3]tiazol[5,4-b]piridin-2-il)metoxi]-2,6-difluorobenzamida (9PC) y el 5'-difosfato de guanosina (GDP). Como se muestra en la **Tabla 2**, se obtuvieron valores de RMSD menores a 1.5 Å; además se puede observar en las **Figuras 9A** y **9B** que las moléculas reproducen la pose de unión y las interacciones con la proteína, por lo cual se puede considerar el método se desempeña satisfactoriamente. Este mismo resultado se observó con Vina.

Tabla 2. Resultados obtenidos del docking, para 9PC, GDP y los compuestos **CLG_1** a **5**

Compuesto		Sitio alostérico		Sitio catalítico	
		Autodock*	Vina*	Autodock*	Vina*
9PC	Energía de unión	-11.58	-10.321	NA	
	RMSD	0.573 [×]	0.586 [×]		
GDP	Energía de unión	NA		-9.87	-9.905
	RMSD			1.487 [×]	1.469 [×]
CLG_1		-7.030	-7.728	-5.580	-7.209
CLG_2		-6.520	-7.701	-5.710	-6.875
CLG_3		-9.350	-9.771	-7.400	-8.388
CLG_4		-8.350	-8.511	-6.340	-7.530
CLG_5		-8.330	-8.350	-7.180	-7.644

* Las energías de unión se expresan en kcal/mol, [×] los valores de RMSD se expresan en Å.

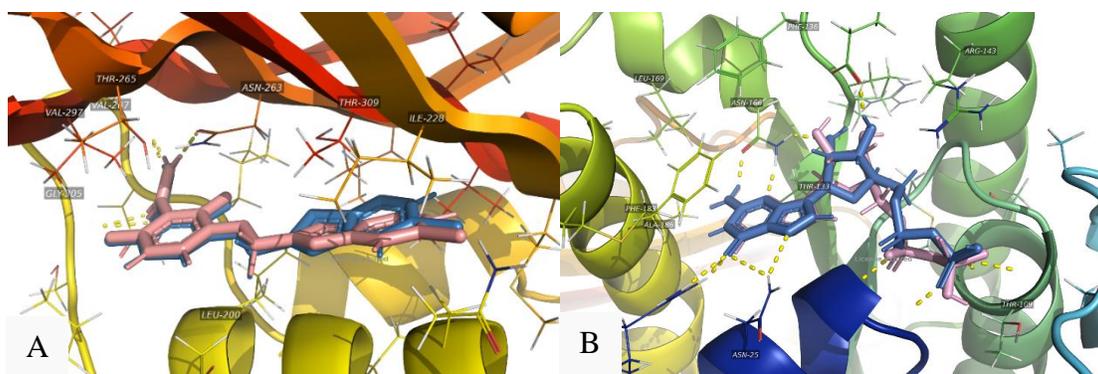


Figura 9. **A)** poses de unión en el sitio alostérico de 9PC cocrystalizado (azul) y reacoplado con Autodock (rosa); **B)** poses de unión en el sitio catalítico de GDP cocrystalizado (azul) y reacoplado con Autodock (rosa).

Los compuestos propuestos mostraron tener mayor afinidad por el sitio alostérico, presentando mejores energías de unión, sin embargo, estos valores no son mejores que los obtenidos por la referencia **9PC** (**Tabla 2**). No obstante, el compuesto **CLG_3** obtuvo la mejor puntuación en ambos programas y podría ser un buen prospecto para crear nuevos

derivados debido la pose de unión tan similar a **9PC** y su gran cantidad de interacciones (**Figura 10**). De acuerdo con los resultados obtenidos los compuestos **CLG_3**, **CLG_4** y **CLG_5** tienen mayor potencial para presentar actividad antimicrobiana.

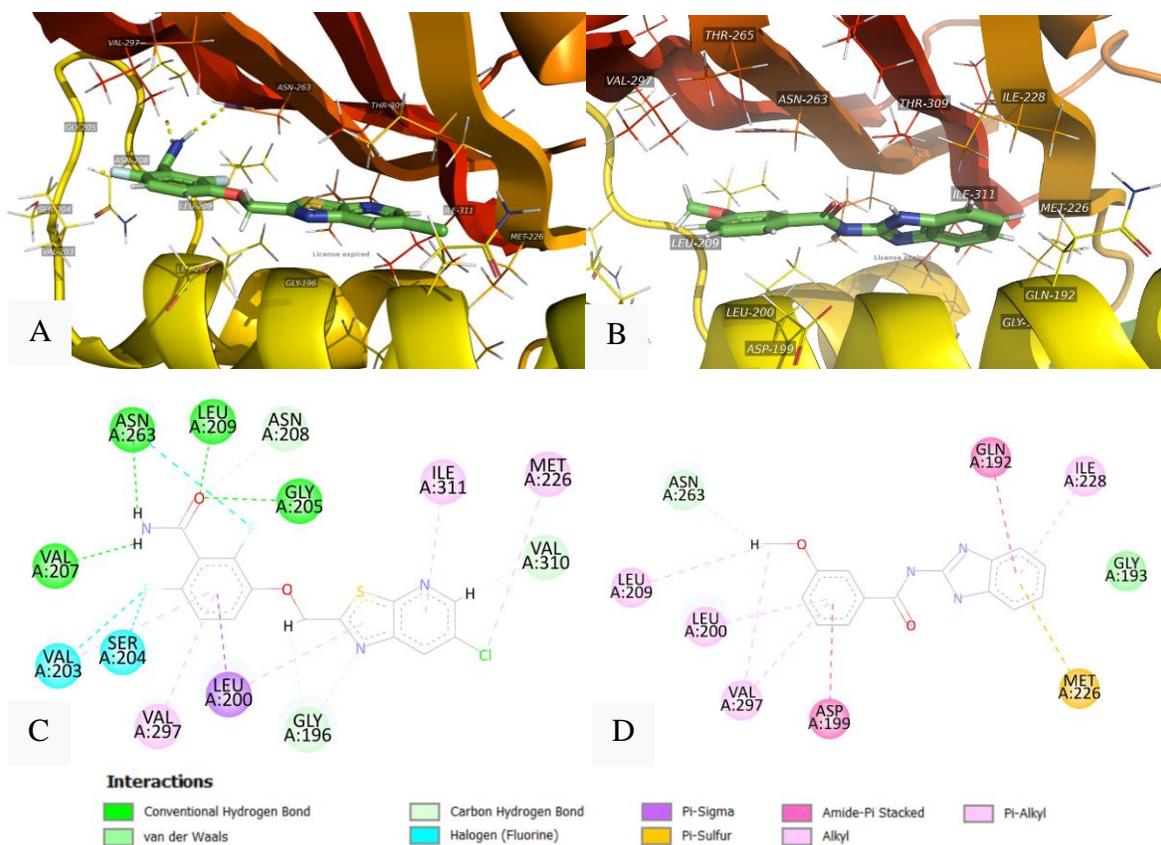


Figura 10. Pose de unión en el sitio alostérico de **9PC** reacomplado con Autodock (**A**) así como sus interacciones con FtsZ (**C**); Pose de unión en el sitio alostérico de **CLG_3** acoplado con Autodock (**B**) así como sus interacciones con FtsZ (**D**).

En cuanto a la disminución de la afinidad de los compuestos por FtsZ puede deberse a distintas cuestiones, por ejemplo, que las moléculas propuestas son sistemas rígidos y planos, lo cual restringe las poses de unión en comparación con la referencia **9PC** que posee un Csp³ y un Oxígeno como puente entre el heterociclo y el anillo sustituido, incrementando la flexibilidad de la molécula. Otro motivo, puede atribuirse a la selección de los sustituyentes, ya que se ha demostrado que la presencia de amidas y halógenos contribuye a mayores interacciones con FtsZ, además, un reciente artículo realizado por Barbier *et al.* (2023) demuestra que no es suficiente el grupo amida, sino que existe un efecto exponencial cuando se adicionan 2 grupos electroattractores vecinos a la amida, por lo que probar estos sustituyentes en el compuesto **CLG_3** podría ser una estrategia para aumentar la afinidad.

7.4. Evaluación biológica sobre bacterias

Los cinco compuestos propuestos fueron evaluados a 1mg/disco, de los cuales **CLG_1** y **CLG_4** no presentaron actividad contra ninguna de las cepas evaluadas y los compuestos **CLG_2**, **CLG_3** y **CLG_5** mostraron una moderada actividad antibacteriana al presentar halos de inhibición pequeños (**Tabla 3**). Estos tres compuestos se evaluaron a concentraciones menores (0.75, 0.5 y 0.25 mg/disco) con la finalidad de determinar la cantidad mínima donde el efecto inhibitorio se mantiene.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la evaluación biológica, se muestran las dosis en mg/disco y los halos de inhibición en milímetros (mm).

Compuesto	mg/disco	SA6538	SA25923	EC25404	EC25922
CLG_2	1	8	14	7	7
	0.75	6 [†]	10	6 [†]	6 [†]
	0.5	-	7	-	-
	0.25	-	6	-	-
CLG_3	1	6 [†]	7	6 [†]	-
	0.75	-	6 [†]	-	-
	0.5	-	-	-	-
	0.25	-	-	-	-
CLG_5	1	12	10	8	6 [†]
	0.75	9	7	6 [†]	-
	0.5	7	6 [†]	-	-
	0.25	6 [†]	-	-	-
Ampicilina	0.1	21	16*	18	15

(-) no hay inhibición del crecimiento; * Ampicilina usada a 0.05 mg/disco, [†] inhibición de crecimiento solo en el área bajo el disco.

Los compuestos evaluados presentaron actividad inhibitoria principalmente contra las cepas de *S. aureus* y menor actividad contra *E. coli*, siendo los compuestos **CLG_5** (SA6538 a 0.5 mg/disco) y **CLG_2** (SA25923 a 0.5 mg/disco) los que presentaron mejor actividad. En el caso particular de **CLG_5**, los compuestos derivados de 3-fenilindazol ya han mostrado actividad sobre algunos microorganismos, aunque principalmente contra levaduras del género *Candida* (Pérez-Villanueva *et al*, 2017), por lo que sería importante identificar el posible mecanismo de acción y si hay relación con bacterias. Por su parte, en relación con **CLG_2**, ya que se ha reportado la capacidad de los carbamatos de metilo para inhibir cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (Zadrazilova *et al*, 2015), no obstante, otros mecanismos pueden estar implicados en la actividad.

Finalmente, el hecho de que los compuestos tengan actividad antibacteriana no garantiza que su acción sea sobre FtsZ, por lo que sería necesario realizar un ensayo cuantitativo por fluorescencia (Trusca & Bramhill, 2002), o bien, un método cualitativo evaluando el alargamiento y deformación de las bacterias en su división celular (Pereira *et al*, 2016).

8. Conclusiones

Se realizó la síntesis de cinco derivados del bencimidazol e indazol, siendo caracterizados por punto de fusión, factor de retención y RMN de ^1H . Las rutas de síntesis empleadas permitieron obtener los compuestos con buenos rendimientos, por lo que se consideran óptimas para sintetizar más derivados. Además, se logró adaptar un método de condensación más eficaz para obtener bencimidazoles, mediante síntesis asistida por microondas.

La concordancia mostrada entre algunos resultados del docking y la evaluación biológica refuerzan la importancia de realizar previamente estudios *in silico*, así como considerar las características fisicoquímicas, como lo es la solubilidad en el diseño de nuevos compuestos inhibidores. La restricción de la rotación entre los anillos aromáticos parece no favorecer la inhibición de FtsZ *in silico*, además, esta misma característica no es favorable para la inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* para los compuestos evaluados. Los compuestos mostraron baja actividad antibacteriana, sin embargo, al ser estructuras pequeñas parece prometedor continuar derivatizando para encontrar los requerimientos estructurales que favorezcan la inhibición bacteriana.

9. Referencias

Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004

Awasthi, D., Kumar, K., & Ojima, I. (2011). Therapeutic potential of FtsZ inhibition: a patent perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(5), 657–679. doi:10.1517/13543776.2011.568483

Barbier, T., Dumitrescu, O., Lina, G., Queneau, Y., & Soullère, L. (2023). Importance of the 2,6-Difluorobenzamide Motif for FtsZ Allosteric Inhibition: Insights from Conformational Analysis, Molecular Docking and Structural Modifications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5), 2055. doi:10.3390/molecules28052055

Bernal, E., Ahmad, N., López, P., & Gutiérrez, F. (2008). Síndrome linfocutáneo por *Nocardia brasiliensis* en una paciente inmunocompetente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(1), 58–60. doi:10.1157/13114398

Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354(6349), 161–164. doi:10.1038/354161a0

Chambers HF, Deleo FR. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 7(9):629-41. doi:10.1038/nrmicro2200

Erickson, H., Anderson, D., & Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 504–528. doi:10.1128/mmbr.00021-10

Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., & Haldar, J. (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*. 27(4), 323–338. doi:10.1016/j.tim.2018.12.010

Hurley, K. A., Santos, T. M. A., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., & Weibel, D. B. (2016). Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(15), 6975–6998. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01098

Karp, G., Iwasa, J. & Marshall, W. (2014). *Biología Celular y Molecular*. México: McGraw-Hill Interamericana.

Kumar, J. R., Jawahar L., J., & Pathak, D. P. (2006). Synthesis of Benzimidazole Derivatives: As Anti-hypertensive Agents. *E-Journal of Chemistry*, 3(4), 278–285. doi:10.1155/2006/765712

Larsson D, Flach C. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol.* 20(5), 257-269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). *Biología de los microorganismos*. España: Pearson Educacion.

Marchetti, M., Errecalde, J., & Mestorino, N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo, impacto en la multiresistencia. *Analecta Veterinaria*, 31(2), 40-53.

Mateos-Gil, P., Tarazona, P., & Vélez, M. (2019). Bacterial cell division: modeling FtsZ assembly and force generation from single filament experimental data. *FEMS microbiology reviews*, 43(1), 73–87. doi:10.1093/femsre/fuy039

Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., & Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(9), 1175–1188. doi:10.1107/s0907444912022640

Moss, S. F. (2017). The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 183–191. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.12.001

Navarrete-Vázquez, G., Moreno-Díaz, H., Aguirre-Crespo, F., León-Rivera, I., Villalobos-Molina, R., Muñoz-Muñiz, O., & Estrada-Soto, S. (2006). Design, microwave-assisted synthesis, and spasmolytic activity of 2-(alkyloxyaryl)-1H-benzimidazole derivatives as constrained stilbene bioisosteres. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(16), 4169–4173. doi:10.1016/j.bmcl.2006.05.082

Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 79-88.

Palomares-Alonso, F., Jung-Cook, H., Pérez-Villanueva, J., Piliado, J. C., Rodríguez-Morales, S., Palencia-Hernández, G., ... Hernández-Luis, F. (2009). Synthesis and in vitro cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1794–1800. doi:10.1016/j.ejmech.2008.05.005

Pereira, A. R., Hsin, J., Król, E., Tavares, A. C., Flores, P., Hoiczky, E., ... Pinho, M. G. (2016). FtsZ-Dependent Elongation of a Coccoid Bacterium. *mBio*, 7(5). doi:10.1128/mbio.00908-16

Pérez-Villanueva, J., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Méndez-Cuesta, C., Méndez-Lucio, O., Hernández-Luis, F., & Castillo, R. (2013). Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(14), 4221–4224. doi:10.1016/j.bmcl.2013.05.012

Pérez-Villanueva, J., Yépez-Mulia, L., González-Sánchez, I., Palacios-Espinosa, J., Soria-Arteche, O., Sainz-Espuñes, T., ... Estrada-Castro, D. (2017). Synthesis and Biological Evaluation of 2H-Indazole Derivatives: Towards Antimicrobial and Anti-Inflammatory Dual Agents. *Molecules*, 22(11), 1864. doi:10.3390/molecules22111864

Pretsch, E., Badertscher, M., Bühlmann, P. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds*. Springer. doi:10.1007/978-3-540-93810-1

Reardon, S. (2014). Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*, 509(7499), 141–142. doi:10.1038/509141a

Rodríguez-Villar, K., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Sainz-Espuñes, T. del R., Soria-Arteche, O., Palacios-Espinosa, J. F., ... Pérez-Villanueva, J. (2021). Design, Synthesis and Anticandidal Evaluation of Indazole and Pyrazole Derivatives. *Pharmaceuticals*, 14(3), 176. doi:10.3390/ph14030176

Slayden, R. (2006). Identification of cell cycle regulators in *Mycobacterium tuberculosis* by inhibition of septum formation and global transcriptional analysis. *Microbiology*, 152(6), 1789–1797. doi:10.1099/mic.0.28762-0

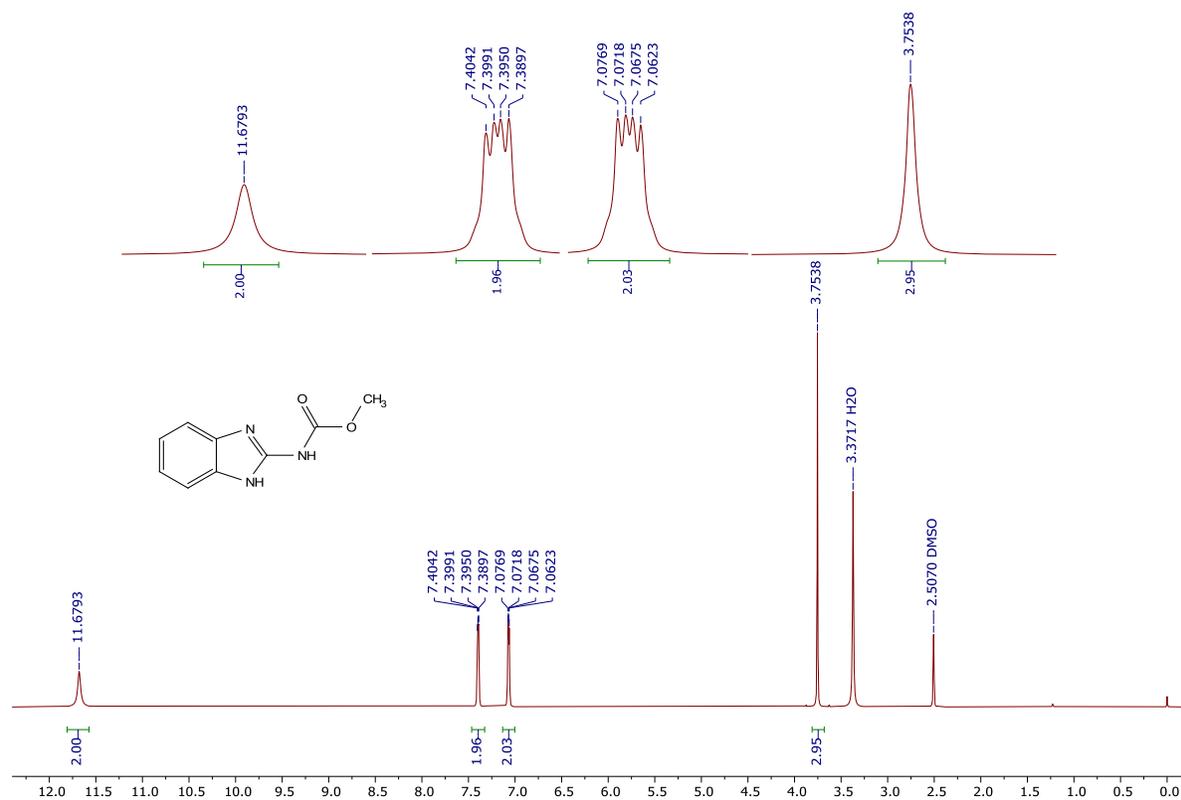
Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahuja, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(6), 8-22.

Trusca, D., & Bramhill, D. (2002). Fluorescent assay for polymerization of purified bacterial FtsZ cell-division protein. *Analytical Biochemistry*, 307(2), 322–329. doi:10.1016/s0003-2697(02)00036-2

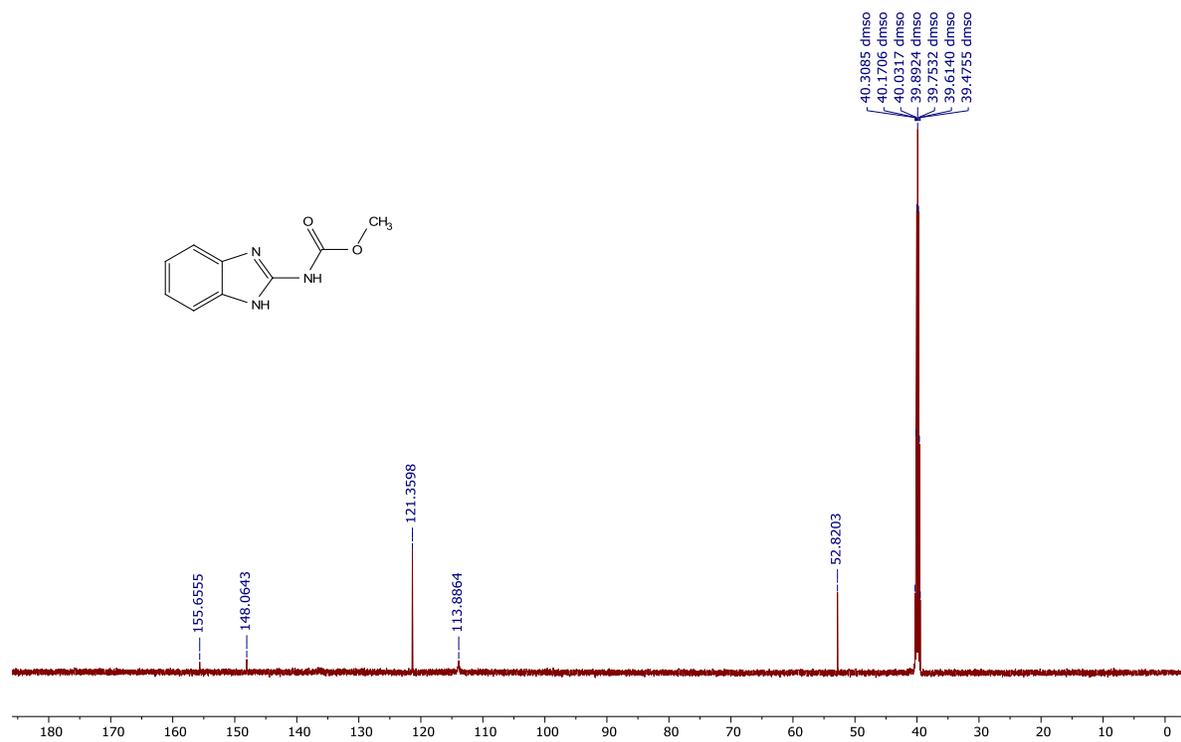
Zadrazilova, I., Pospisilova, S., Masarikova, M., Imramovsky, A., Ferriz, J. M., Vinsova, J., ... Jampilek, J. (2015). Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 197–207. doi:10.1016/j.ejps.2015.06.009

Zhang, Y., & Yew, W. W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *IJTL*, 13(11), 1320–1330.

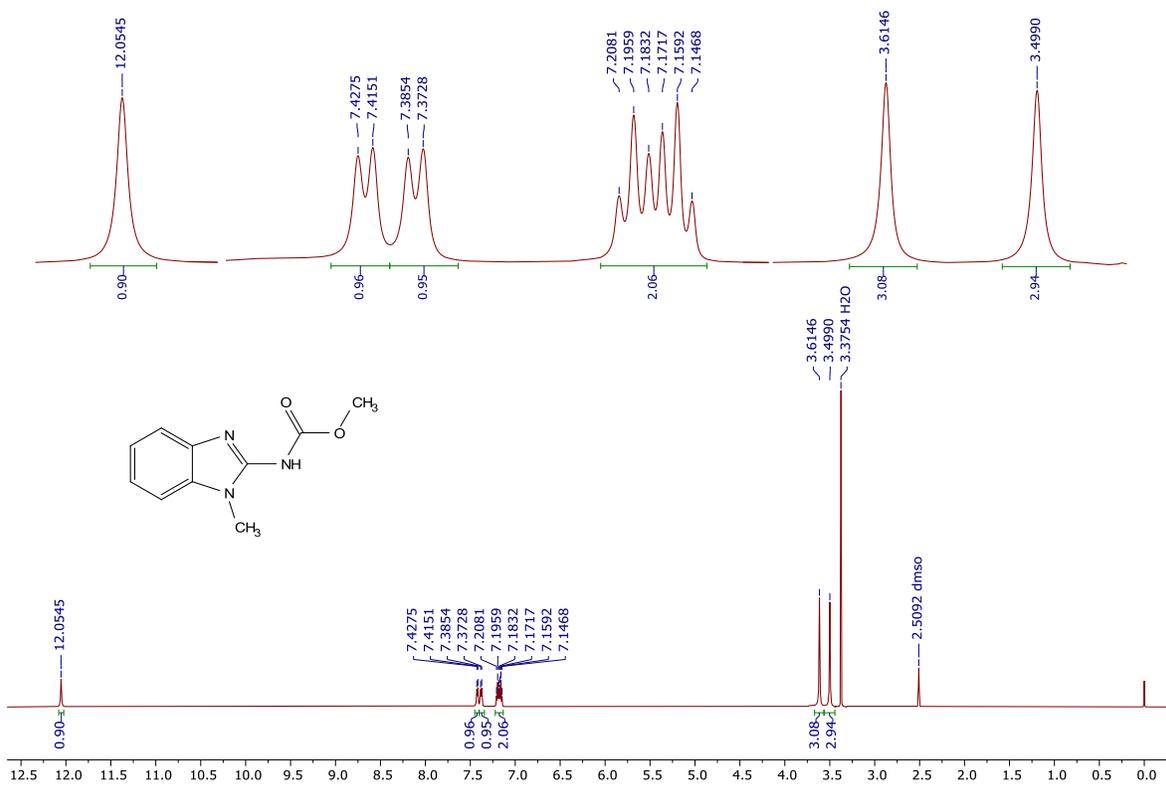
10. Anexos



Espectro 1. RMN ^1H de (bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (CLG_1).



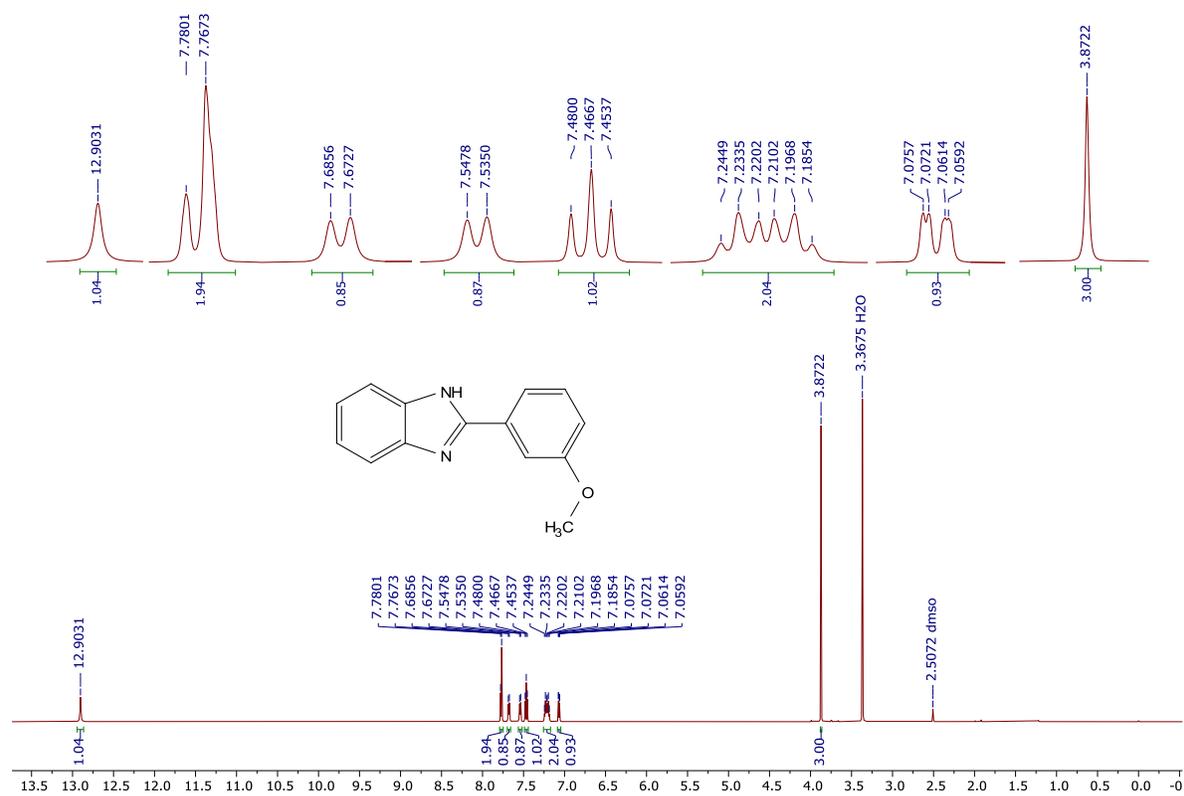
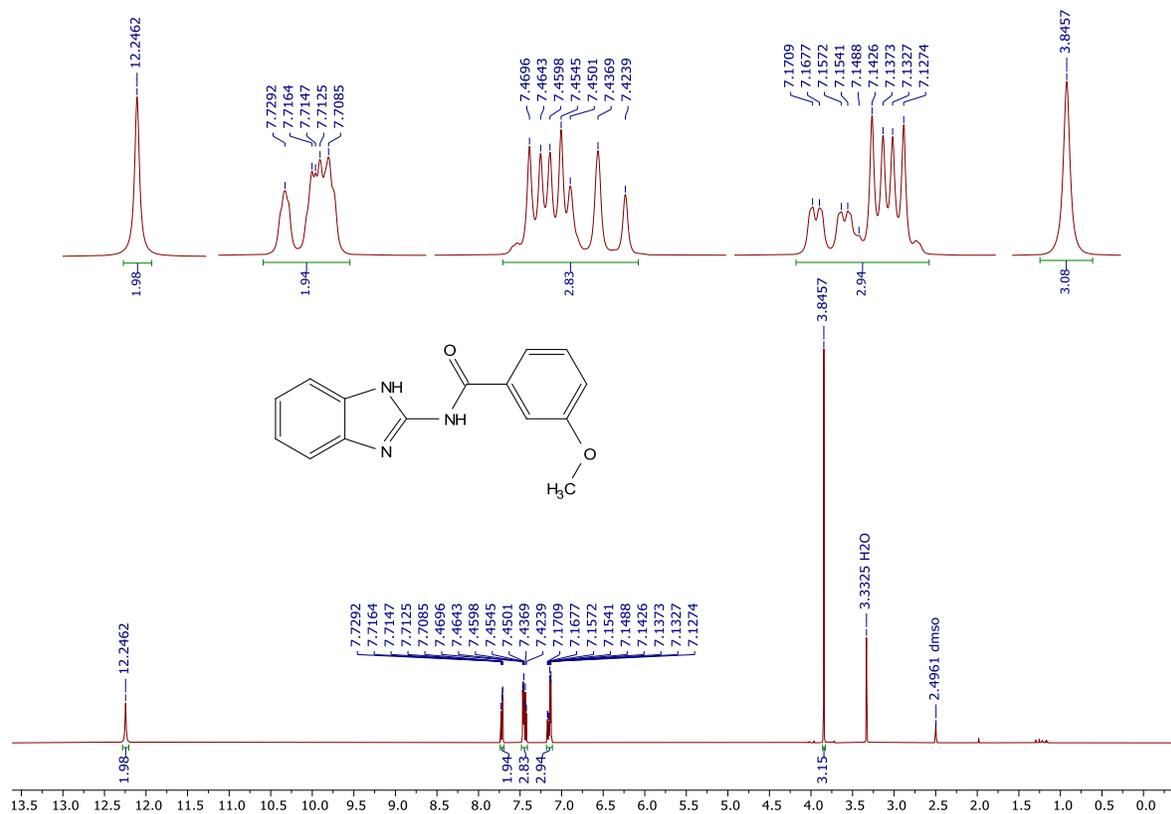
Espectro 2. RMN ^{13}C de (bencimidazol-2-il)carbamato de metilo (CLG_1).

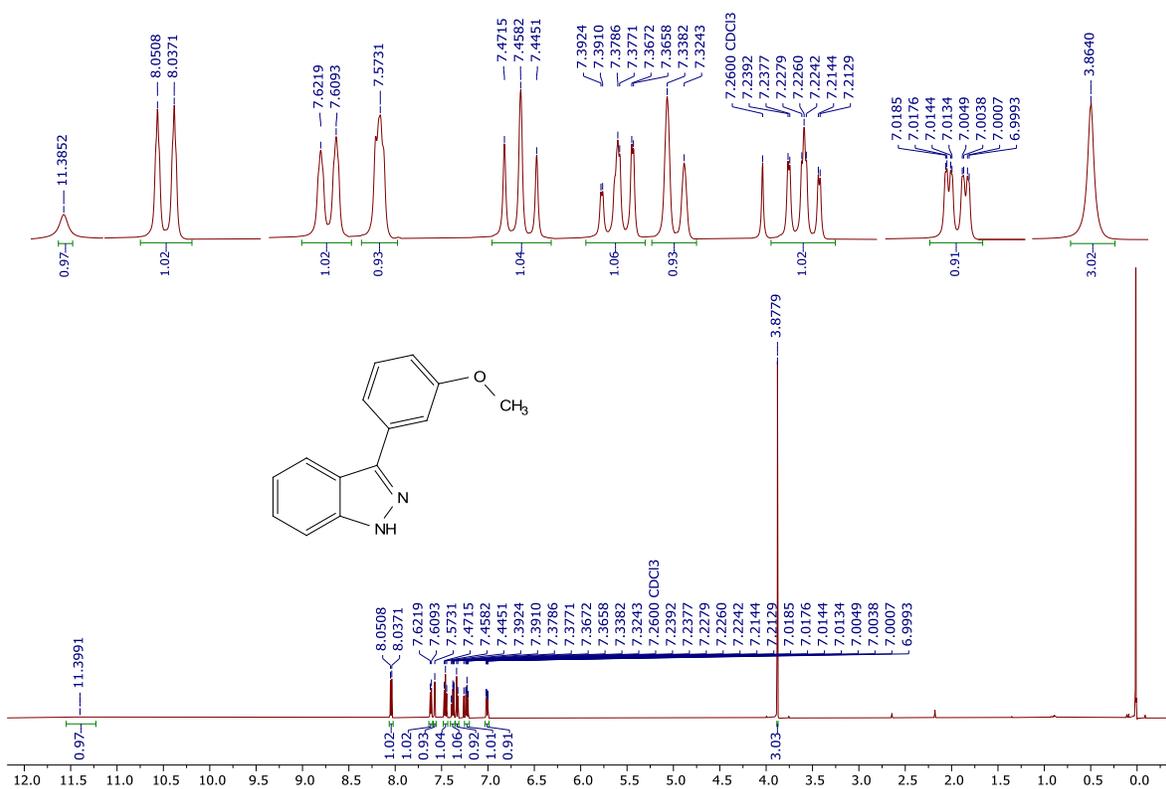


Espectro 3. RMN ¹H de (1-metil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (**CLG_2**).



Espectro 4. RMN ¹³C de (1-metil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (**CLG_2**).





Espectro 7. RMN ¹H de 3-(3-metoxifenil)-1H-indazol (CLG_5).