



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Diseño y síntesis de nuevos agentes
antituberculosos basados en la estructura de
Linezolid, Pretomanid y Delamanid**

Tesis que presenta
Armando López Tristán

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Diseño y síntesis de nuevos agentes antituberculosos basados en la estructura de Linezolid, Pretomanid y Delamanid**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Armando López Tristán** y aprobada el **8 de junio del 2026** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa
Director/Codirectores de la tesis

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No.1320923 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Dedicatorias

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres: **María Guadalupe Tristán Díaz y Amando López Bear** por haberme apoyado, por brindarme la oportunidad de acceder a una educación y el constante impulso para alcanzar nuevas metas, gracias por el amor, compañía y sus valiosos consejos. Gracias por todo.

A mis compañeros de laboratorio que, han hecho de manera directa o indirecta más ameno el trabajo en el laboratorio y siempre estuvieron dispuestos en apoyarme, no solo en ámbitos académicos sino en personales, por todo eso y más, gracias, Lic. Jazmin, MC. Gennesis, Dr. Elihu y Dr. Nemorio.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa, quien me abrió la puerta a su laboratorio, me orientó y apoyó durante todo este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por el apoyo y la oportunidad de estudiar la maestría.

A mi comité tutorial, Dr. Samuel Lara González y Dr. Antonio De León Rodríguez, por todo su apoyo y recomendaciones a mi trabajo.

Al Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda por su apoyo en la parte de Espectrometría de masas y RMN.

A mis maestros, por compartir su conocimiento y apoyarme durante mi formación académica.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de figuras	iv
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
Glosario	xiv
Resumen	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Definición y estadísticas	3
2.2 Características de Mycobacterium tuberculosis	4
2.3 Clasificación de la tuberculosis	6
2.4 Factores de riesgo	8
2.5 Síntomas	8
2.6 Diagnostico	9
2.7 Fisiopatología de la TB	14
2.8 Tratamiento	17
2.9 Clasificación racional de fármacos utilizados en TB	20
2.9.1 Grupo 1	20
2.9.2 Grupo 2	21
2.9.3 Grupo 3	21
2.9.4 Grupo 4	22
3. JUSTIFICACION	29
4. HIPOTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
6.1 Diseño molecular de los compuestos	31
6.2 PARTE QUIMICA	34
6.2.1 Síntesis de los compuestos	34
6.2.1.1 Metodología de síntesis del compuesto 1	35
6.2.1.2 Metodología de síntesis del compuesto 2	35
6.2.1.3 Metodología de síntesis del compuesto 3	36
6.2.1.4 Metodología de síntesis del compuesto 4	37
6.2.1.5 Metodología de síntesis del compuesto 5	38
6.2.1.6 Metodología de síntesis del compuesto 6	39
6.2.2 Caracterización química de los compuestos sintetizados	41

6.3 EVALUACION BIOLOGICA	42
6.3.1 Ensayo para la determinación de toxicidad de los compuestos 1-5 utilizando el modelo de <i>Artemia salina</i>	42
6.3.2 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos 1-5	43
6.4 PARTE COMPUTACIONAL	44
6.4.1 Acoplamiento molecular de los compuestos 1-5 sobre la enzima Ddn	44
6.4.2 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre blancos moleculares en <i>S. aureus</i>	45
6.4.2.1 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la enzima DNA-girasa	46
6.4.2.2 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a)	47
6.4.2.3 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la ligasa D-alanil-D-alanina (Ddl)	48
7. RESULTADOS Y DISCUSION	49
7.1 Diseño de compuestos 1-5	49
7.2 PARTE QUIMICA	50
7.2.1 Síntesis química de los compuestos 1-5	50
7.2.2 Caracterización química de los compuestos sintetizados	51
7.2.2.1 Caracterización estructural del compuesto 1 (2-(morfolin)-1H-5-nitrobencimidazol)	51
7.2.2.2 Caracterización estructural del compuesto 2 (2-(p-hidroxibencil)-1H-5-nitrobencimidazol)	54
7.2.2.3 Caracterización estructural del compuesto 3 (2-(3,5-diclorobencil)-1H-5-nitrobencimidazol)	57
7.2.2.4 Caracterización estructural del compuesto 4 (2-(2-hidroxi-5-nitrobencil)-1H-5-nitrobencimidazol)	59
7.2.2.5 Caracterización estructural del compuesto 5 (2-(p-nitrobencil)-1H-5-nitrobencimidazol)	62
7.3 EVALUACION BIOLOGICA	65
7.3.1 Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	65
7.3.2 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos 1-5	67
7.4 PARTE COMPUTACIONAL	69
7.4.1 Acoplamiento e interacciones moleculares de pretomanid y los compuestos 1 a 5 con la enzima Ddn	69
7.4.2 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con blancos de <i>S. aureus</i>	73
7.4.2.1 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la enzima DNA-girasa	74
7.4.2.2 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a)	75
7.4.2.3 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la ligasa D-ala D-ala (Ddl)	76
8. CONCLUSIONES	78
9. REFERENCIAS	79
10. ANEXOS	82

Lista de figuras

1. Países que reportaron más de 100,000 casos de incidencia de tuberculosis en el 2023 (World Health Organization, 2024)	4
2. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> (Gorocica et al., 2005)	5
3. Tendencia mundial de las notificaciones de personas diagnosticadas con tuberculosis 2010-2023 (World Health Organization (WHO), 2022)	7
4. Tendencia mundial de las notificaciones de personas diagnosticadas con tuberculosis 2010-2023 (World Health Organization (WHO), 2022)	14
5. Esquema de los blancos de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de tuberculosis (Horsburgh et al., 2015)	23
6. Estructura 2D de Linezolid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024)	24
7. Estructura 2D de Delamanid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024)	25
8. Estructura 2D de Delamanid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024)	25
9. Representación esquemática de diferentes ligandos dispuestos alrededor del sitio activo en una proteína	27
10. Estructura química del bencimidazol (Mahurkar et al., 2023)	28
11. Grupos químicos de interés en los fármacos base para el diseño de compuestos	32
12. Compuestos híbridos propuestos y sus grupos químicos de interés en su estructura	33
13. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 1	35
14. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 2	36
15. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 3	37
16. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 4	37
17. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 5	38
18. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 6	39
19. Espectro de RMN H1 del compuesto 1 adquirido en DMSO-d ₆	52
20. Espectro de RMN C13 del compuesto 1 adquirido en DMSO-d ₆	53
21. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI ⁺), mostrando el ion cuasimolecular [M+H] ⁺ a m/z 325.12836, correspondiente con el compuesto 1	54
22. Espectro de RMN H1 del compuesto 2 adquirido en DMSO-d ₆	55
23. Espectro de RMN C13 del compuesto 2 adquirido en DMSO-d ₆	57
24. Espectro de RMN H1 del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d	58
25. Espectro de RMN C13 del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d	59
26. Espectro de RMN H1 del compuesto 4 adquirido en DMSO-d ₆	61
27. Espectro de RMN C13 del compuesto 4 adquirido en DMSO-d ₆	62
28. Espectro de RMN H1 del compuesto 5 adquirido en DMSO-d ₆	63

29. Espectro de RMN C13 del compuesto 5 adquirido en DMSO-d ₆	64
30. Ensayo de toxicidad de los compuestos 2 a 5 “% de mortalidad vs concentración” utilizando el modelo de artemia salina	65
31. A. Visualización 3D de pretomanid (azul) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D de pretomanid y sus interacciones	70
32. A. Visualización 3D de compuesto 1 (rosa) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 1 y sus interacciones	70
33. A. Visualización 3D de compuesto 2 (amarillo) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 2 y sus interacciones	71
34. A. Visualización 3D de compuesto 3 (rosa) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 3 y sus interacciones	72
35. A. Visualización 3D de compuesto 4 (gris) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones	72
36. A. Visualización 3D de compuesto 5 (azul) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 5 y sus interacciones.	73
37. A. Visualización 3D de compuesto 4 (rosa) en el sitio catalítico reportado de la DNA-girasa (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones	75
38. A. Visualización 3D de compuesto 4 (azul) en el sitio catalítico reportado de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones	76
39. A. Visualización 3D de compuesto 4 (azul) en el sitio catalítico reportado de la ligasa D-ala D-ala (Ddl) (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones	77
40. Espectro de RMN H1 del compuesto 1 adquirido en DMSO-d ₆	82
41. Espectro de RMN C13 del compuesto 1 adquirido en DMSO-d ₆	82
42. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI ⁺), mostrando el ion cuasimolecular [M+H] ⁺ a m/z 325.12836, correspondiente con el compuesto 1	83
43. Espectro de RMN H1 del compuesto 2 adquirido en DMSO-d ₆	83
44. Espectro de RMN C13 del compuesto 2 adquirido en DMSO-d ₆	84
45. Espectro de RMN H1 del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d	84
46. Espectro de RMN C13 del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d	85
47. Espectro de RMN H1 del compuesto 4 adquirido en DMSO-d ₆	85
48. Espectro de RMN C13 del compuesto 4 adquirido en DMSO-d ₆	86
49. Espectro de RMN H1 del compuesto 5 adquirido en DMSO-d ₆	86
50. Espectro de RMN C13 del compuesto 5 adquirido en DMSO-d ₆	87

Lista de tablas

1. Fármacos de primera línea en el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017)	20
2. Fármacos de segunda línea en el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017)	21
3. Fármacos de inyectables de segunda línea para el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017)	21
4. Fármacos de segunda línea con menor experiencia clínica. IV: intravenosa (Caminero et al., 2017)	22
5. Propiedades de los compuestos diseñados calculados con el programa SwissADME	49
6. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados	50
7. Clasificación de la toxicidad de cada compuesto en base a la CL50 y UT	66
8. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericida (CMB) de los compuestos 1-5 frente a bacterias del grupo ESKAPE-E	67
9. Concentración mínima inhibitoria 50 (CMI50) y bactericida del compuesto 4 sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	68
10. Parámetros del acoplamiento molecular entre los fármacos de referencia y los compuestos sintetizados con la enzima Ddn	69
11. Parámetros del acoplamiento molecular entre el compuesto 4 y diferentes blancos moleculares en <i>S. aureus</i>	73

Abreviaturas

ARN.	Ácido ribonucleico
ARNm.	Ácido ribonucleico mensajero
BAAR.	Bacilos alcohol ácido-resistentes
BCG.	Bacilo de Calmette-Guérin
CCF.	Cromatografía en capa fina
Cl.	Cloro
Ddl	Enzima ligasa D-alanil-D-alanina
Ddn.	Enzima dependiente de deazaflavina
DE50.	Dosis efectiva 50
DL50.	Dosis letal 50
DMSO.	Dimetilsulfóxido
DRF.	Diseño Racional de Fármacos
ETB.	Etambutol
EtOH.	Etanol
F.	Flúor
FQ.	Fluoroquinolonas
IFN-γ.	Interferón gamma
IGRA.	Pruebas de liberación de interferón gamma
IM.	Intramuscular
INH.	Isoniazida
IPICYT.	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
IV.	Intravenosa
LAM.	Lipoarabinomanana
LGA.	Algoritmo genético Lamarckian
MA.	Macrófagos
mAGP.	Ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano
MHC.	Complejo de histocompatibilidad
MOE.	Molecular Operating Environment
MTB.	Mycobacterium tuberculosis
NO.	Óxido nítrico
NO2.	Nitro
OMS.	Organización Mundial de la Salud
PBP2a	Proteína de unión a penicilina 2a
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB.	Protein Data Bank

PMN.	Polimorfonucleares
PT.	Prueba de tuberculina
PZA.	Pirazinamida
RIF.	Rifampicina
RMN.	Resonancia Magnética Nuclear
SNC.	Sistema Nervioso Central
TB.	Tuberculosis
TB-MDR.	Tuberculosis multirresistente
TB-XDR.	Tuberculosis extremadamente resistente
TOF-MS.	Espectrometría de masas de tiempo en vuelo
UT.	Unidades de toxicidad
UV.	Ultravioleta
VIH.	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ΔG.	Energía de unión

Glosario

Cromatografía en capa fina. Técnica analítica que permite la separación de mezclas e identificación de compuestos.

Enzima dependiente de deazaflavina. Enzimas oxidorreductasas que catalizan reacciones redox muy importantes en el metabolismo primario y secundario en bacterias.

Dosis efectiva 50. Concentración de una sustancia que produce el efecto deseado en el 50% de la población expuesta a dicha sustancia.

Dosis letal 50. Concentración de una sustancia que ocasiona la muerte del 50% de la población expuesta a dicha sustancia.

Fluoroquinolonas. Familia de antibióticos sintéticos de amplio espectro de actividad bactericida, al inhibir enzimas esenciales como ADN girasa/topoisomerasa IV en la reproducción celular.

Interferón gamma. Citocina crucial en la inmunidad innata y adaptativa mediante la activación de macrófagos en defensa contra microorganismos.

Algoritmo genético Lamarckian. Algoritmo genético que postula que los organismos pueden transmitir características adquiridas durante su vida a su descendencia.

Macrófagos. Glóbulos blancos especializados del sistema inmune innato con diferentes funciones como: fagocitosis, presentación de antígenos, defensa, reparación y localización.

Unidades de toxicidad. Indicador general de la toxicidad de una sustancia en un corto periodo de tiempo.

Resumen

Diseño y síntesis de nuevos agentes antituberculosos basados en la estructura de Linezolid, Pretomanid y Delamanid

La enfermedad de la **Tuberculosis (TB)** es ocasionada principalmente por ***Mycobacterium tuberculosis* (MTB)**, un problema de salud pública que pese a ser curable y los esfuerzos realizados para erradicarla, se ha convertido en la segunda causa infecciosa de muertes a nivel global. El tratamiento de TB implica un régimen de tratamiento con múltiples medicamentos por un periodo de tiempo que puede extenderse de meses a años. Sin embargo, a principios del siglo XXI, se comenzaron a reportar casos de cepas multirresistentes a los principales medicamentos utilizados en su tratamiento, denominadas **multirresistentes (TB-MDR)**. El número de casos ha aumentado considerablemente, comenzando a registrarse casos de cepas resistentes tanto a los medicamentos principales como a los alternativos, denominadas como cepas **extremadamente resistentes (TB-XDR)**. El incremento de casos tanto de TB-MDR y TB-XDR ha generado una necesidad urgente de la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. El uso de diversas estrategias como el **diseño racional de fármacos (DRF)**, ha permitido el desarrollo de nuevas moléculas con potencial terapéutico, disminuyendo factores como capital y tiempo invertidos en el desarrollo de nuevos medicamentos, presentando ventajas en aspectos farmacocinéticos como el aumento de la actividad terapéutica, el aumento de la potencia, disminución de la toxicidad e incluso permite la disminución del consumo de múltiples medicamentos **“polifarmacia”**.

PALABRAS CLAVE. Tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Tuberculosis multirresistente (TB-MDR), Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), Diseño Racional de Fármacos (DRF), Polifarmacia.

Abstract

Design and synthesis of new antituberculosis agents based on the structures of Linezolid, Pretomanid and Delamanid

Tuberculosis disease (TB) is primarily caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), a public health problem that, despite being curable and efforts made to eradicate it, has become the second leading infectious cause of deaths worldwide. TB treatment involves a multipledrug regimen for a period of time that can extend from months to years. However, at the beginning of the 21st century, cases of multidrug-resistant strains, known as multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), began to be reported. The number of cases has increased considerably, with cases of strains resistant to both the main drugs and alternative therapies, known as extremely drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). The increase in both MDR-TB and XDR-TB has generated an urgent need for the search and development of new therapeutic alternatives. The use of various strategies such as rational drug design (RDD), has allowed the development of new molecules with therapeutic potential, reducing factors such as the capital and time invested in the development of new drugs, presenting advantages in pharmacokinetic aspects such as increased therapeutic activity, increased potency, decreased toxicity and even allows for a decrease in the consumption of multiple medications “polypharmacy”.

KEYWORDS: Tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), Extremely drug-resistant tuberculosis (XDR-TB), Rational Drug Design (RDD), Polypharmacy.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), una bacteria que se transmite por vía aérea de persona en persona mayormente y afecta principalmente los pulmones.

En 2022 la organización mundial de la salud (OMS) estimó una cifra aproximada de más de 10.6 millones de personas enfermas con TB y alrededor de 1.3 millones fallecieron por la enfermedad. Estas cifras convierten a la TB en un problema prioritario de salud actual por lo que es necesario tomar medidas en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a combatir la TB. Desde principios de los 2000 a la actualidad, han sido autorizados alrededor de 5 medicamentos específicos en el tratamiento de TB. Esta situación es preocupante debido al aumento de resistencia por parte de MTB y la escasez de fármacos dirigidos a su tratamiento. En la actualidad el esquema de tratamiento para TB engloba múltiples fármacos, como: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, los cuales han demostrado ser eficaces en el tratamiento para MTB y en caso de ser necesario se realiza un ajuste al régimen, incorporando medicamentos con actividad bactericida, los cuales en conjunto ayudan en el tratamiento, sin embargo, dichos medicamentos no están destinados específicamente para combatir la TB, por lo que su actividad terapéutica no es 100% eficaz.

La resistencia a medicamentos por parte de microorganismos se ha convertido en un problema de salud que con el paso del tiempo continúa agravándose y disminuye cada vez más las alternativas terapéuticas farmacológicas efectivas “medicamentos” viables en el tratamiento de enfermedades por bacterias, hongos, etc. Un claro ejemplo de resistencia a los antibióticos es: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp*, dichos agentes componen un grupo que ha sido denominado como ESKAPE-E por las siglas de los agentes que integran el grupo, los cuales son agentes de relevancia clínica debido a su capacidad de generar resistencia hacia medicamentos y se mantienen

como los principales agentes causales de infecciones nosocomiales a nivel mundial.

El hecho de que cada vez existan menos medicamentos efectivos en el tratamiento de enfermedades nosocomiales es alarmante, sin embargo, en enfermedades como TB que mantiene periodos de tratamiento prolongados, plantea una situación preocupante debido a la escasez de fármacos viables, aumento de costo en el tratamiento por los periodos prolongados bajo tratamiento y aumento en la manifestación de efectos adversos y secundarios. Por lo tanto, la situación puede convertirse en un problema de salud grave en años posteriores si no se toman medidas preventivas.

La acción de consumir un medicamento en el día a día, tiene un trasfondo que no es visto de manera inmediata por los consumidores, ya que no se considera todo el tiempo, trabajo y recursos invertidos para el desarrollo de un medicamento. Si, se toma en cuenta que el periodo de tiempo que conlleva el desarrollo, pruebas y finalmente el lanzamiento de un nuevo medicamento al mercado, el tiempo oscila entre 10 y 15 años, lo que a su vez conlleva una gran inversión de recursos financieros en material, equipo y personal hasta su distribución final. Un periodo de espera tan grande entre el lanzamiento de nuevos medicamentos es un problema debido a que las tasas de adaptación por parte de microorganismos son menores, por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias que ayuden a combatir la problemática.

El diseño racional de fármacos (DRF) es una actividad que ha ganado popularidad y relevancia en los últimos años en la industria farmacéutica. El DRF emplea el uso de programas y softwares computacionales especializados para la búsqueda de moléculas de alto impacto “hit” y compuestos “líderes” con actividad terapéutica mediante diseños, cribados, predicciones y modificaciones a estructuras conocidas, lo que permite optimizar tiempo y recursos.

2. ANTECEDENTES

Enfermedad de Tuberculosis

2.1 Definición y estadísticas

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad de tipo infecciosa transmitida comúnmente por aire e ingresa principalmente a través de vías respiratorias, es ocasionada por microorganismos bacilares aerobios del género *Mycobacterium* el cual engloba múltiples especies. Las especies de mayor relevancia clínica son los principales agentes causales de TB en el mundo: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. bovis* (Forrellad et al., 2013).

La TB se ha convertido en la segunda causa de muerte infecciosa, después del COVID-19 a nivel mundial. La TB es una enfermedad que se encuentra diseminada por todo el mundo y que se creía una enfermedad que prevalecía en países en vías de desarrollo, en regiones de África central, el sudeste asiático y algunos países en Latinoamérica son regiones donde se tiene una mayor prevalencia. Sin embargo, en la actualidad existen registros de un aumento de casos en todo el mundo, destacando países con un alto índice migratorio como los Estados Unidos (Barba Evia, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó en su informe mundial sobre la tuberculosis de 2024, las ciudades que presentaron más de 100,000 casos de incidencia en el 2023, destacando países como: India, China, Bangladesh, Filipinas, Indonesia, Pakistán y Nigeria, como se muestra en la **Figura 1** (World Health Organization, 2024).

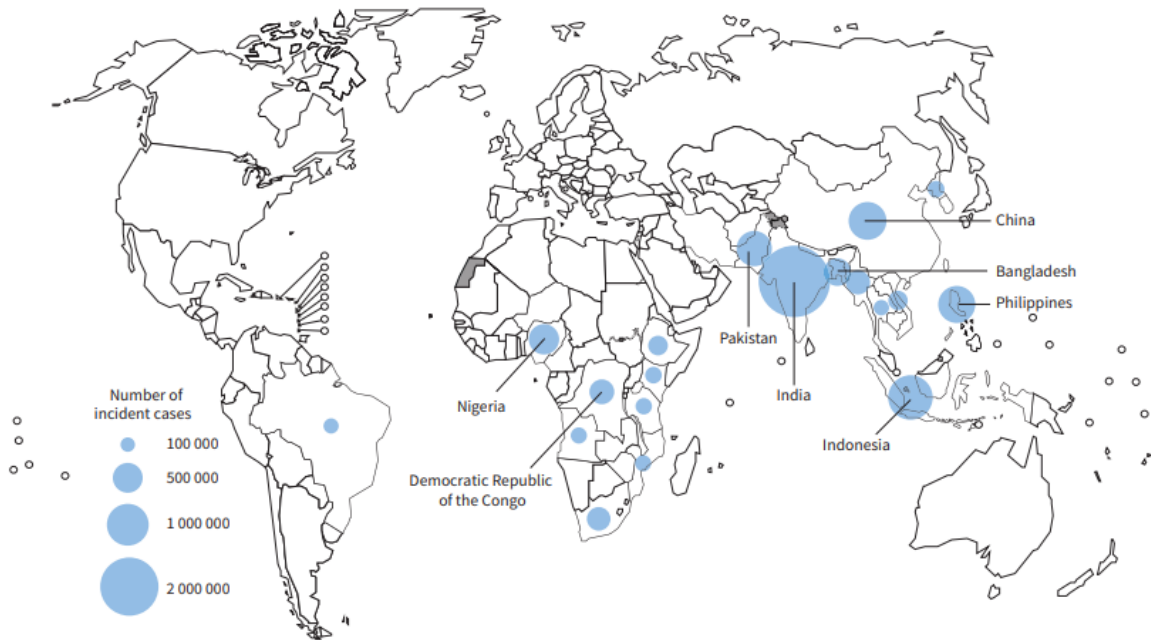


Figura. 1. Países que reportaron más de 100,000 casos de incidencia de tuberculosis en el 2023 (World Health Organization, 2024).

2.2 Características de *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias presentan características morfológicas y estructurales más complejas en su composición a diferencia de las bacterias, estos cambios brindan una mayor protección contra agentes externos, lo que convierte a las micobacterias en un mayor desafío terapéutico en su tratamiento.

Los agentes causales de la TB pertenecen al género *Mycobacterium* los cuales comparten similitudes morfológicas con bacterias gran negativas, pero que, a diferencia de estas, presentan una mayor complejidad en su composición estructural. MTB se encuentra recubierto por una envoltura, una estructura compleja conformada por la capsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es la capa más externa de las micobacterias, la cual dota de protección a MTB contra factores externos y es quien mantiene interacción con los elementos del sistema inmune del huésped. La composición de la capsula es variable según la especie y cepa, sin embargo, comparten componentes principales como: el ácido micólico y glicolípidos, los cuales desempeñan labores antigénicas.

La pared es otro componente importante, la cual se localiza, por debajo de la cápsula separada por un espacio “espacio periplásmico”, compuesto

principalmente por lípidos 50-60%, otorgándole un carácter hidrofóbico. La pared una estructura constituida por el complejo macromolecular de ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP), los cuales actúan como barrera e impiden el paso de agentes antimicrobianos al interior. Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de cadena larga con longitudes de 70-80 carbonos que confieren la naturaleza hidrofóbica de la envoltura además de ser relevantes para su clasificación taxonómica (Gorocica et al., 2005).

La membrana tiene las mismas características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, salvo que presenta diferencia en los derivados de fosfolípidos, ya que estos se encuentran glicosilados por moléculas como la lipoarabinomanana (LAM), los cuales juegan un papel clave en la patogénesis **Figura 2.** Los componentes de la envoltura y su grado de complejidad no permiten que cualquier agente antimicrobiano sea eficaz en el tratamiento de TB (Gorocica et al., 2005).

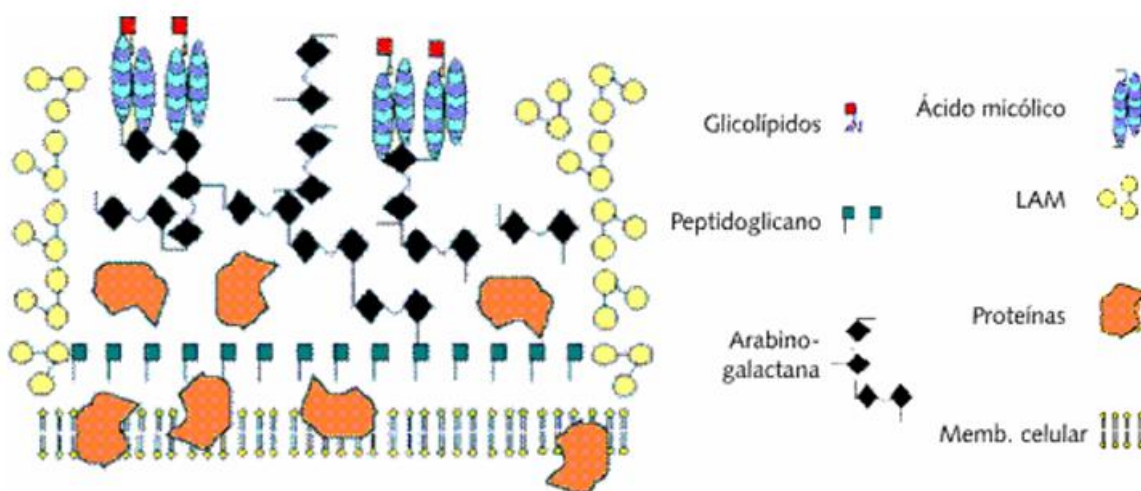


Figura. 2. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de *M. tuberculosis* (Gorocica et al., 2005).

Otra característica en MTB es un tiempo prolongado de crecimiento a nivel de célula única, este crecimiento difiere de una célula a otra, permitiendo la formación de distintas poblaciones bacilares. Las poblaciones bacilares se dividen en distintas poblaciones en base a su crecimiento ligado a las condiciones del medio y su tasa metabólica. Los bacilos presentes en pulmones son metabólicamente activos y con un crecimiento constante debido a las condiciones favorables del

medio “aerobias”, además existen bacilos interiorizados en macrófagos, en un ambiente microaerofílico limitando su actividad metabólica y crecimiento, lo que conlleva a un estado de latencia y existen poblaciones con fases de multiplicación esporádicas en donde no presentan actividades metabólicas.

La presencia de diversas poblaciones bacilares es un reto para su tratamiento, ya que, debido a los múltiples periodos de crecimiento, es necesario un tiempo prolongado de tratamiento y diversos agentes farmacológicos que permitan combatir las diversas poblaciones bacilares en base a sus características y su localización (TB pulmonar o extrapulmonar), con las limitaciones farmacocinéticas de cada fármaco (Forrellad et al., 2013).

2.3 Clasificación de la tuberculosis

La TB puede clasificarse según el sitio donde se encuentre, al ser adquirida principalmente a través de vía aérea, en la mayoría de los casos perjudica los pulmones, denominada como TB pulmonar. Sin embargo, la infección puede diseminarse de los pulmones y extenderse, afectando tejidos y órganos como: cerebro, corazón, médula ósea, etc. La enfermedad ocasionada por TB que se diseminó fuera de los pulmones se conoce como TB extrapulmonar (O’Garra et al., 2013).

Existe otra clasificación para la tuberculosis la cual depende del estadio de la enfermedad, ya que se estima que hasta un tercio de la población mundial está infectada con MTB, pero permanecen asintomáticos, dichas personas presentan la posibilidad de manifestar la enfermedad por lo que recibe el nombre TB latente. La mayoría de estas personas controlarán la infección latente durante toda la vida, sin manifestar la enfermedad y solo del 5-10% desarrollará la enfermedad activa durante su vida **Figura 3**, (O’Garra et al., 2013).

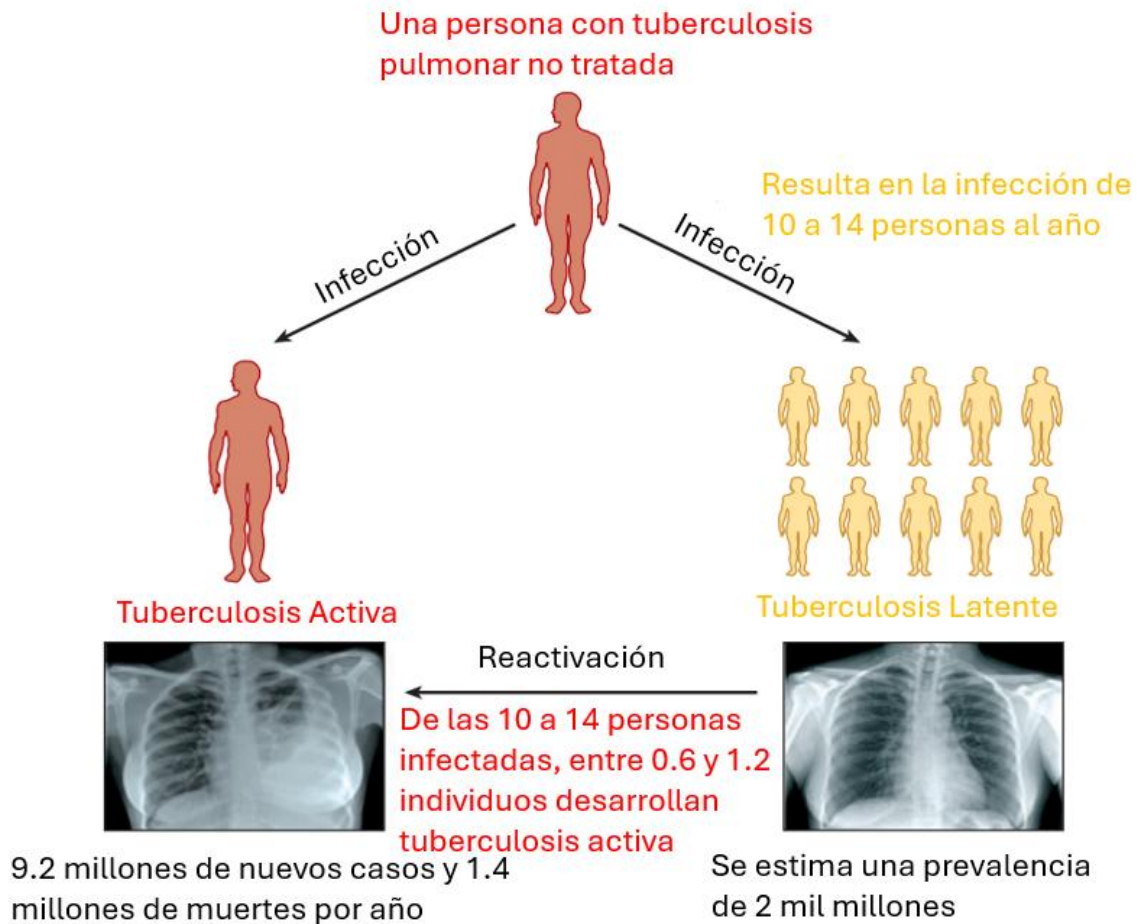


Figura. 3. Epidemiología tradicional de una infección por *M. tuberculosis*: tuberculosis activa y latente (O'Garra et al., 2013).

La TB latente en la mayoría de los casos no presenta evidencia clínica de enfermedad, la probabilidad de que individuos latentes desarrollen la TB activa es baja (O'Garra et al., 2013).

La TB activa puede dividirse en dos etapas, en donde cada una puede manifestarse como enfermedad. Después de la infección inicial por MTB, algunos individuos progresan rápidamente a la enfermedad activa, denominada TB primaria, la cual tiene mayor prevalencia en edades tempranas de la niñez, pero puede manifestarse en etapas adultas. Existen otros casos, en donde se presenta infección latente y tras el paso de los años, debido a algún factor de riesgo se desarrolla la TB activa, a lo que se le conoce como reactivación o TB post primaria (O'Garra et al., 2013).

2.4 Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a una persona a padecer TB, los más comunes son:

- La exposición con personas infectadas
- Coinfección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
- Sistema inmune debilitado por acción de fármacos o alguna enfermedad
- Diabetes mellitus
- Edad avanzada
- Desnutrición
- Condiciones de vida precarias
- Consumo de leche sin hervir, así como sus derivados

El desarrollo de la TB como enfermedad es el resultado de la interacción entre el huésped, patógeno y el medio ambiente, en conjunto con los factores de riesgo mencionados, pese a eso, el proceso de infección a enfermedad depende de la virulencia del bacilo y la respuesta del sistema inmune ante el microorganismo (O'Garra et al., 2013).

2.5 Síntomas

Las personas con tuberculosis inactiva no presentan síntomas. Sin embargo, pueden desarrollar la forma activa y manifestar los síntomas de la enfermedad activa, (Hernández-Solís et al., 2023).

Las personas enfermas de tuberculosis activa manifiestan síntomas dependiendo de la zona en donde se multiplican los bacilos en el cuerpo. Por lo general los bacilos se multiplican inicialmente en los pulmones (TB pulmonar). Los síntomas principales son:

- Tos intensa que se prolonga por 3 semanas o más
- Dolor en el pecho
- Tos con sangre o esputo desde el fondo de los pulmones

Las personas enfermas de tuberculosis activa pueden manifestar otros síntomas como:

- Debilidad y fatiga

- La falta de apetito
- Pérdida de peso
- Escalofríos
- Fiebre y sudores nocturnos

En casos donde se presente tuberculosis extrapulmonar los síntomas varían según el órgano o área afectada (Hernández-Solís et al., 2023):

- La tuberculosis miliar ocurre por diseminación linfohematógena de los bacilos afectando principalmente hígado, bazo y sistema nervioso central (SNC) manifestando síntomas como: fiebre, diaforesis nocturna, pérdida de peso y un cuadro clínico inespecífico el cual varía en función de los órganos afectados.
- La tuberculosis abdominal manifiesta síntomas como: dolor abdominal crónico, fiebre, pérdida de peso, diaforesis nocturna, diarrea y en ocasiones mala absorción intestinal.
- La tuberculosis meníngea presenta síntomas como: malestar general, fatiga, vómito, cefalea, confusión, cambios en la personalidad y convulsiones en algunos casos.
- La tuberculosis genitourinaria afecta primordialmente el epidídimo y la próstata en hombres, sin embargo, suele afectar de manera general el uréter y vejiga causando síntomas como: piuria estéril y microhematuria.

2.6 Diagnostico

En caso de presentar síntomas, es necesario realizar pruebas diagnósticas para determinar una infección o la enfermedad. La prioridad es el diagnostico de enfermos ya que presentan tuberculosis de manera activa y pueden transmitirla.

Existen diversas pruebas utilizadas en el diagnostico de tuberculosis, las cuales pueden ser clasificadas como métodos directos o indirectos (Garcia-Gasalla et al., 2010):

Los métodos directos son:

- Tinción de Ziehl-Neelsen
- Microscopía

- Cultivos microbiológicos
- Pruebas de detención molecular

2.6.1 Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen, es una técnica de coloración diferencial con una sensibilidad de 22-80% utilizada en la identificación de bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) como las micobacterias. La técnica emplea tres productos: Carbol Fucsina (básica), solución de azul de metileno al 1%, solución alcohol-ácido y calor, siguiendo con el protocolo una vez realizada la tinción se deberá revisar los resultados visualizando los BAAR con un microscopio óptico, cubriendo el extendido con una gota de aceite de inmersión, con un aumento de 1000X. Se considerará como resultado positivo la visualización de bacilos de coloración roja sobre un fondo azul. Sin embargo, una tinción negativa no indica una tuberculosis por lo que es necesario realizar más pruebas con el fin de confirmar el diagnóstico (Pérez del Molino et al., 1997 C.E.).

2.6.2 Microscopía

La microscopia o baciloscopia es la prueba más rápida y económica obteniendo resultados en menos de 2 h. Su principal limitación es la sensibilidad ya que se requiere una carga bacteriana promedio de 5000-10000 bacterias/mL en la muestra para ser positiva. La carga bacteriana está ligada a la evolución de la enfermedad por lo que, en etapas tempranas, la microscopia no es una prueba diagnóstica confiable y se requiere de más pruebas para la confirmación del resultado (González-Martin, 2014).

2.6.3 Cultivos microbiológicos

El cultivo es una técnica más sensible que la microscopia, ya que permite detectar 10 bacterias/mL de muestra. Sin embargo, el crecimiento es muy lento aun en condiciones óptimas para su cultivo (temperatura de 37°C, pH=7), pudiendo tardar de 2-4 semanas en medios líquidos y 4-8 semanas en medios sólidos para la visualización de colonias. El cultivo presenta otras ventajas, siendo posible la

identificación de la especie a través de pruebas bioquímicas y pruebas de resistencia a fármacos mediante antibiogramas (González-Martin, 2014).

2.6.4 Pruebas de detección molecular

La detección es realizada mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), las pruebas moleculares permiten la obtención de resultados al cabo de pocas horas. El uso de técnicas como la RT-PCR no solo permite la amplificación y detección de material genético de MTB, sino que permite identificar cambios en su material genético, los cuales suelen estar asociados con resistencia a fármacos, por lo que es posible realizar ajustes al tratamiento de manera casi inmediata. La prueba más utilizada es la prueba “Xpert MTB/RIF” la cual permite identificar si la cepa presenta resistencia a rifampicina (Baquero-Artigao et al., 2023).

Los métodos directos no son los únicos utilizados en el diagnóstico de TB, también existen los indirectos:

- Radiografía de tórax
- Histopatología
- Pruebas serológicas basadas en anticuerpos
- Prueba cutánea de Mantoux o prueba de tuberculina (PT)

2.6.5 Radiografía de tórax

En casos donde el paciente presenta una tos persistente por un periodo >3 semanas, además de presentar los síntomas comunes, se realiza una radiografía de tórax en la búsqueda de lesiones en los pulmones, las cuales son comunes en la presencia de tuberculosis (González-Martin, 2014).

2.6.6 Histopatología

Utilizada comúnmente en casos de tuberculosis extrapulmonar, las muestras de tejido infectado son procesadas utilizando tinción de hematoxilina y eosina, en

donde comúnmente se observa necrosis caseosa y granulomas caseificantes, los cuales son formaciones inflamatorias que contienen células inmunitarias, tejido necrosado y bacilos de MTB, en caso de visualizar bacilos de manera abundante, es necesario realizar tinción de Ziehl-Neelsen. Aunque las pruebas histopatológicas son útiles en el diagnóstico de TB, es necesario realizar más pruebas complementarias como estudios microbiológicos y de laboratorio para la confirmación del diagnóstico (Gómez Tangarife et al., 2018).

2.6.7 Pruebas serológicas basadas en anticuerpos

También conocidas como pruebas de liberación de interferón gamma (IGRA), las pruebas se basan en la medición de la reacción del sistema inmune al interactuar con proteínas de la tuberculosis. El ensayo IGRA consiste en una prueba sanguínea en la que se detecta la producción de interferón gamma (IFN- γ) producido por linfocitos T en respuesta a antígenos específicos de MTB. Existen diversas pruebas IGRA comercializadas hoy en día, las más utilizadas son: QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) y T-SPOT®.TB test (T-Spot).

La prueba T-Spot utiliza antígenos específicos como: ESAT-6 y CFP-10 mientras que QFT-Plus además de los antígenos anteriormente mencionados utiliza TB 7.7. Un resultado se considera positivo por encima de un valor de 0.35 y negativo por un valor inferior. Ambas técnicas permiten diferenciar pacientes infectados con MTB de aquellos sensibilizados por la vacuna BCG, ambas son selectivas, disminuyendo los casos de falsos positivos por micobacterias ambientales.

Si el resultado obtenido es positivo tanto en la prueba PT o en IGRA, es necesario determinar si la infección por tuberculosis es inactiva o la enfermedad de tuberculosis activa. Estas pruebas pueden incluir radiografías de tórax, análisis de esputo, pruebas moleculares o microbiológicas (García-Gasalla et al., 2010).

2.6.8 Prueba cutánea de Mantoux o Prueba de tuberculina (PT)

La prueba de tuberculina también conocida como prueba de Mantoux, se basa en una reacción de hipersensibilidad del organismo frente a las proteínas del bacilo tuberculoso. El paciente recibe una inyección bajo la piel en la parte inferior del

ante Brazo interno, el material inyectado se llama tuberculina y debe esperarse un periodo de 48 a 72 h para el análisis del resultado. Los pacientes infectados presentaran una respuesta inflamatoria en la dermis (zona donde se aplicó la inyección), la cual puede producir eritemas, edemas y la formación de vesículas en raras ocasiones. Se considera como resultado positivo, si la longitud (mm) de induración tiene un diámetro ≥ 5 mm y como negativo si no existe induración o el diámetro es menor. Sin embargo, la PT puede generar falsos positivos en casos donde el paciente recibiera la vacuna de bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o en casos donde se realizó la PT más de una vez en el mismo año, ya que la primera prueba puede “desencadenar la memoria” del sistema inmune, aumentando su reacción a la segunda prueba. Debido a estas limitaciones en la prueba de PT se recomienda realizar otra prueba diagnóstica, como la de prueba de sangre de tuberculosis (Baquero-Artigao et al., 2023).

Como se mencionó anteriormente existe una gran variedad de pruebas útiles en el diagnóstico de TB, cada una con sus respectivas características (ventajas y desventajas), por lo que lo más recomendable es realizar más de una prueba diagnóstica para la obtención de un resultado confiable.

El avance en las pruebas de diagnóstico para TB han permitido obtener una mayor información en cuanto al número de personas identificadas con diagnóstico de TB, dicho número ha ido en aumento con el paso de los años, sin embargo, el flujo de información fue interrumpido en los años 2019-2021 por la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2, mostrando una disminución importante en el número de casos de TB a nivel mundial, sin embargo, la disminución no es atribuida a esfuerzos gubernamentales o instituciones de salud, sino al casi caso omiso que hubo por parte la población general hacia la TB al momento de la pandemia, teniendo como consecuencia un aumento importante en el número de personas diagnosticadas con TB durante el año 2022 y dicha cifra va en aumento considerable (World Health Organization (WHO), 2022) **Figura 4.**

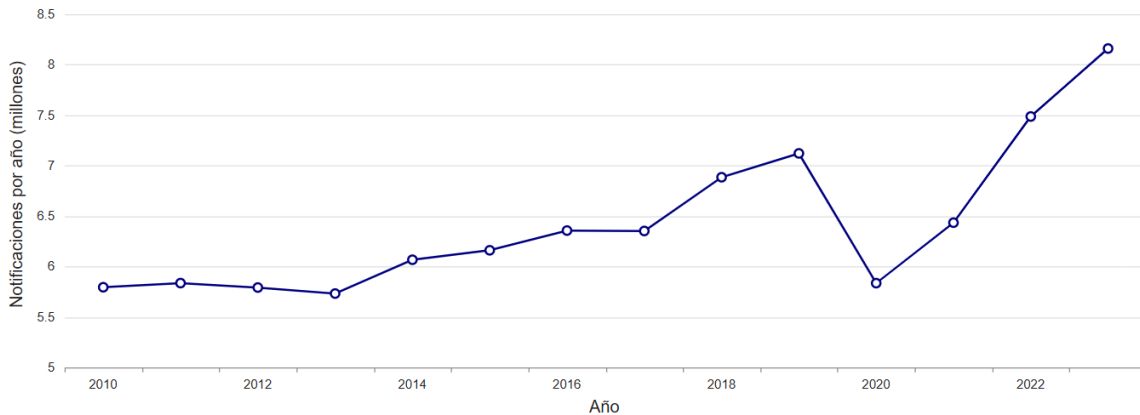


Figura. 4. Tendencia mundial de las notificaciones de personas diagnosticadas con tuberculosis 2010-2023 (World Health Organization (WHO), 2022).

2.7 Fisiopatología de la TB

La enfermedad de TB es el resultado de una infección principalmente causada por MTB. Es un microorganismo bacilar patógeno intracelular, de naturaleza inmóvil, cuyo proceso de replicación curre en un periodo de 18-24 h, ha evolucionado de tal manera que cuenta con la capacidad prosperar dentro del huésped al obtener acceso al sistema inmune del mismo huésped.

Las bacterias de MTB al ser patógenos intracelulares han desarrollado mecanismos antibacterianos que permiten su persistencia dentro del huésped. Se han identificado los pasos que relativos que a traviesa la TB. Estos pasos son: la entrada del bacilo, fagocitosis de los macrófagos, respuesta inmune de célula T tipo 1 (Th1), la formación de granulomas, las manifestaciones clínicas (González-Martin, 2014).

2.7.1 Entrada del bacilo

La entrada o ingreso del bacilo también conocido como proceso de “aerosolización”. Es el proceso a través del cual ingresan los bacilos de MTB, ya que son transmitidos principalmente de persona en persona vía aérea a través de acciones como toser, estornudar, gritar o cantar, lo que libera núcleos de gotitas en el aire que respiramos y que permanecen suspendidos por varias horas.

Cuando una persona inhala, los núcleos de las gotitas pueden llegar a medir menos 5 μm y contener de 1 a 3 bacilos, sin embargo, el tamaño promedio suele

ser mayor a 7 μm , estas gotitas debido a su tamaño de micras son capaces de llegar a los sacos alveolares, permitiendo que las bacterias se alberguen en esa zona como primera instancia (Hernández-Solís et al., 2023).

2.7.2 Fagocitosis por los Macrófagos

El alvéolo es una estructura que se encuentra compuesta por diferentes tipos de células como: células epiteliales, neumocitos, células alveolares planas y macrófagos (MA). Cada alveolo cuenta con MA, el cual cumple con la función de mantener limpio el alvéolo y permitir un óptimo intercambio gaseoso. Los bacilos al llegar al alvéolo encuentran los MA con los que interactúan al unirse a través de un receptor de manosa el cual es receptor de reconocimiento de patógenos y la inflamación en MA. Una vez los bacilos son fagocitados por los MA, los bacilos liberan un péptido *early secretory antigenic target* (ESAT-6). El péptido ESAT-6 evita la fusión de fagosoma-lisosoma y la apoptosis, permitiendo la entrada del bacilo en el citoplasma. Esta acción permite la multiplicación de bacilos en un mismo macrófago por 5-6 ciclos de división, obteniendo de 32 a 64 bacilos al cabo de un periodo de 5 a 6 días. El proceso culmina con la necrosis del MA, por lo que los bacilos regresan al medio extracelular para posteriormente ser fagocitados nuevamente por MA, el ciclo es repetido continuamente de manera que se genera un proceso inflamatorio (González-Martin, 2014).

2.7.3 Respuesta inmune de célula T tipo I (Th1)

El proceso inflamatorio destruye la integridad alveolar, lo que permite el ingreso de células polimorfonucleares (PMN), como neutrófilos y monocitos. El daño en los alvéolos permite el paso hacia los nódulos linfáticos a partir de los capilares linfáticos aferentes, ocasionando linfadenitis y afectando las células dendríticas. Las células dendríticas y los monocitos activarán las células T a través del complejo de histocompatibilidad (MHC) y la liberación de IL-12. Este proceso promoverá la diferenciación de células CD4+, el cual ocurre en promedio tres semanas después de la infección y los bacilos potencialmente se han diseminado a otros órganos. Las células T iniciarán la respuesta Th1, activando en el endotelio

la proliferación de diferentes poblaciones de células T efectoras, interferón gamma (IFN γ) y diferenciación 40 (CD40) para la activación de los MA. El proceso inmunitario mediado por las células sigue diferentes pasos primordiales. El primero es una reacción de hipersensibilidad. El segundo efecto es la liberación de IFN γ , lo que activa MA con mayores propiedades bactericidas para combatir mejor al intruso. El tercer efecto culmina con el desarrollo de granuloma, como resultado de la acumulación de MA en la zona de lesión inicial (O'Garra et al., 2013), (González-Martin, 2014).

2.7.4 Formación de granulomas

La formación de un granuloma tiene como propósito delimitar el espacio que ocupan los bacilos, rodeándolos e impidiendo su salida, quedando aprisionadas por células inmunitarias. Las células Th1 y la liberación de IFN γ estimulara la maduración del fagolisosoma en los MA y la liberación óxido nítrico el cual induce autofagia. La incapacidad de los MA por eliminar el bacilo, liberan TNF alfa (TNF α), que promueve la diferenciación de los monocitos en histiocitos que forman granulomas caseificantes que contienen los bacilos de MTB. El granuloma termina reclutando células T reguladoras (Treg), células asesinas naturales (NK), células B, células dendríticas, neutrófilos, MA, monocitos e histiocitos. El microambiente interno del granuloma es hipóxico lo que restringe el crecimiento MTB, sin embargo, dentro del granuloma, comienza un proceso necrótico que sirve como fuente de nutrientes y actúa como barrera protectora para los bacilos (O'Garra et al., 2013), (González-Martin, 2014).

2.7.5 Manifestaciones clínicas

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes tipos de tuberculosis, la TB latente y la TB activa. En el caso de una TB latente, el sistema inmunitario contiene los bacilos de MTB, aunque no elimina las bacterias. Durante la etapa latente, los bacilos forman biopelículas protectoras en el tejido necrótico, las cuales permanecen aisladas y suelen ser liberadas durante alguna

inmunosupresión posterior, manifestando los síntomas ya mencionados, según la región a donde haya los bacilos se hayan diseminado (Caminero Luna, 2016).

La TB activa es cuando ingresa MTB por primera vez al organismo, la infección procede a convertirse en enfermedad cuando el sistema inmune no puede controlar la infección inicial, lo que ocurre mayoritariamente en personas inmunodeprimidas. Los síntomas y manifestaciones clínicas varían según la región afectada. En este momento es cuando el individuo infectado puede infectar a otros individuos a través de la aerosolización, mediante estornudos, tos, etc, (Caminero Luna, 2016).

2.8 Tratamiento

Existen diversas guías para el tratamiento de TB, los cuales se basan en el múltiple uso de fármacos por largos periodos de tiempo con el fin de eliminar las diversas poblaciones bacilares en el huésped. En casos no complicados, la tasa de éxito en el tratamiento y la curación del paciente es superior al 90%, con base en ciertos criterios, como: una detección temprana, un buen diagnóstico y un régimen terapéutico adecuado, al cual el paciente debe apegarse y cumplirlo hasta concluir con el tratamiento o el medico lo indique (Caminero et al., 2017).

Existen múltiples esquemas terapéuticos en el tratamiento de TB, la OMS recomienda el siguiente régimen para TB pulmonar, incluye la isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETB) y pirazinamida (PZA) durante los primeros 2 meses, posteriormente solo INH y RIF hasta completar los 6 meses de tratamiento. Los cuatro fármacos mencionados son llamados de primera línea (Caminero et al., 2017).

Mecanismo de acción de Isoniazida (INH)

La isoniazida es un profármaco con actividad bactericida en bacilos metabólicamente activos y que mantiene actividad bacteriostática frente a las demás poblaciones bacilares. El mecanismo de acción de INH es realizado mediante su activación por la enzima KatG (catalasa-peroxidasa), formando el radical nicotinoilo (forma activa), el radical reacciona de manera espontánea con

NAD⁺ o NADP⁺ formando un aducto que inhibe la enzima enoil-ACP reductasa, la cual interviene en el proceso de síntesis de ácidos micólicos, sin afectar la biosíntesis de otros ácidos grasos en micobacterias (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

Mecanismo de acción de Rifampicina (RIF)

La rifampicina es un fármaco con actividad bactericida en bacilos metabólicamente activos y presenta actividad en algunas poblaciones con actividad intermitente, su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de ARN mensajero (ARNm), alterando los procesos de transcripción al unirse a la polimerasa del ARN, específicamente a la subunidad β (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

Mecanismo de acción de Etambutol (ETB)

El etambutol es un fármaco con actividad bacteriostática frente a bacilos metabólicamente activos. Su mecanismo de acción es llevado a cabo mediante la inhibición de la enzima arabinosil transferasa III, impidiendo el transporte de arabinosa en el proceso de biosíntesis de arabinogalactanos y lipoarabinogalactanos provocando daños en la pared celular de las micobacterias (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

Mecanismo de acción de Pirazinamida (PZA)

La pirazinamida es un profármaco con actividad bactericida en bacilos en estados de latencia en el interior de macrófagos, el profármaco es activado por la enzima micobacteriana pirazinamidasa, la cual convierte de manera activa a el ácido pirazinóico, el cual se acumula en el interior de la célula, disminuyendo el pH y ocasionando la muerte del bacilo (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

Estos cuatro medicamentos fueron por muchos años la elección principal en el tratamiento de TB, aun en casos donde se presentaban cepas con mutaciones que volvían ineficiente el tratamiento con un medicamento en particular, se optaba

por realizar ajustes en el esquema de tratamiento, modificando las concentraciones y los periodos de tiempo para un óptimo resultado, sin embargo, a principios de siglo XXI se detectó un mayor aumento en el número de casos que presentaban resistencia a más de un medicamento lo que dio origen a cepas conocidas como multirresistentes TB-MDR. Existen múltiples factores que pueden ocasionar resistencia hacia un medicamento, los principales factores para TB son debido a los tiempos prolongados de tratamiento, el costo económico del tratamiento que termina en el desapego o el abandono del tratamiento por parte del paciente, los efectos secundarios y efectos adversos de los medicamentos, lo que normalmente termina en un desapego por parte del paciente hacia su régimen de tratamiento ocasionando la aparición de cepas TB-MDR.

La aparición de cepas TB-MDR principalmente ocurre para medicamentos como RIF e INH, esta situación provoco una necesidad de revalorar los esquemas de tratamiento y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento. Sin embargo, las alternativas terapéuticas específicas para TB son muy pocas por lo que se tuvo la necesidad de una búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para TB.

En la actualidad existen otras alternativas terapéuticas, no utilizadas específicamente para TB, pero que han demostrado tener eficacia en contra de algunas cepas al utilizarse fármacos de primera línea. Estos fármacos son clasificados en diversos grupos, ofreciendo un mejor esquema de tratamiento según las necesidades y condiciones del paciente, sin embargo, los medicamentos más eficaces son los de primera línea debido a que son destinados específicamente para TB, lamentablemente son aquellos que se presenta mayor resistencia por MTB.

Los fármacos utilizados en el tratamiento de TB no pertenecientes al grupo 1 son denominados segunda línea.

2.9 Clasificación racional de fármacos utilizados en el tratamiento de TB

Los fármacos utilizados en el tratamiento de TB, de manera general deben cumplir con 2 criterios: el primero es la combinación de fármacos que eviten la selección de cepas resistentes, incluyendo fármacos de actividad bactericida y bacteriostática que garantice acción frente a las diferentes poblaciones bacilares y el segundo, prolongar el tratamiento el tiempo necesario con el fin de asegurar la curación del paciente sin recaídas (Caminero et al., 2017).

2.9.1 Grupo 1

Se encuentra conformado por los fármacos de primera línea, los cuales en conjunto presentan mayor eficacia, tolerancia y mayor accesibilidad económica los cuales son: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (Caminero et al., 2017) **Tabla 1.**

Tabla. 1. Fármacos de primera línea en el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017).

Grupo	Fármaco	Vía de administración	Dosis	Efectos adversos
I Fármacos de primera línea	Isoniazida	Oral, IV, IM	5 mg/Kg (Máx. 300 mg)	Hepatitis, hepatotoxicidad
	Rifampicina	Oral, IV	10 mg/Kg (Máx. 600 mg)	Hepatitis, hepatotoxicidad
	Etambutol	Oral	15-25 mg/Kg	Neuritis óptica
	Pirazinamida	Oral	25-35 mg/Kg	Hepatitis, hepatotoxicidad, hiperuricemia

2.9.2 Grupo 2

Se conforma únicamente por fármacos conocidos como fluoroquinolonas (FQ), los cuales son antibióticos de amplio espectro, de origen sintético, comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones en vías urinarias, respiratorias y gastrointestinales. Actúan principalmente inhibiendo enzimas vitales para la replicación del DNA bacteriano. El grupo se conforma específicamente por Levofloxacino y Moxifloxacino, los cuales son utilizados en altas dosis, presentando actividad bactericida y bacteriostática (Caminero et al., 2017) **Tabla 2.**

Tabla. 2. Fármacos de segunda línea en el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017).

Grupo	Fármaco	Vía de administración	Dosis	Efectos adversos
II Fluoroquinolonas	Levofloxacino	Oral, IV	15 mg/Kg (Máx. 1g)	Tenosinovitis
	Moxifloxacino	Oral	400 mg	Tenosinovitis

2.9.3 Grupo 3

Lo conforman fármacos inyectables de segunda línea como: estreptomicina, kanamicina, amikacina y capreomicina. Estos fármacos presentan actividad bactericida pero baja actividad frente a poblaciones bacilares latentes o de baja actividad metabólica, a su vez presentan mayor toxicidad que las FQ y es acumulable, esta condición y el hecho de que su administración es inyectable limita mucho su uso en tratamientos prolongados (Caminero et al., 2017) **Tabla 3.**

Tabla. 3. Fármacos de inyectables de segunda línea para el tratamiento de TB. IV: intravenosa, IM: intramuscular (Caminero et al., 2017).

Grupo	Fármaco	Vía de administración	Dosis	Efectos adversos
III Inyectables de segunda línea	Estreptomicina	IM, IV	15 mg/Kg Máx. 1g/48h	Nefrotoxicidad
	Kanamicina	IM, IV	15 mg/Kg Máx. 1g/48h	Ototoxicidad, nefrotoxicidad
	Amikacina	IM, IV	15 mg/Kg Máx. 1g/48h	Ototoxicidad, nefrotoxicidad

Capreomicina	IM, IV	15 mg/Kg Máx. 1g/48h	Ototoxicidad, nefrotoxicidad
--------------	--------	-------------------------	---------------------------------

2.9.4 Grupo 4

El grupo se encuentra conformado por diversos fármacos cuyo blanco terapéutico es diferente entre sí, por lo que pueden administrarse de manera conjunta. El grupo se compone de fármacos cuya efectividad terapéutica ha sido comprobada, sin embargo, existe poca evidencia clínica acumulada. Este grupo mixto incluye a linezolid, bedaquilina, delamanid, pretomanid, etionamida, cicloserina y meropenem (Caminero et al., 2017) **Tabla 4.**

Tabla. 4. Fármacos de segunda línea con menor experiencia clínica. IV: intravenosa (Caminero et al., 2017).

Grupo	Fármaco	Vía de administración	Dosis	Efectos adversos
IV Fármacos de segunda línea con menor experiencia clínica	Linezolid	Oral, IV	600 mg	Pancitopenia, alteraciones gastrointestinales
	Bedaquilina	Oral	200-400 mg/día	Alteraciones gastrointestinales, hepatitis
	Delamanid	Oral	200 mg/día	Anemia, náuseas
	Pretomanid	Oral	200 mg/día	Ototoxicidad
	Etionamida	Oral	1 g	Gastroenteritis, hepatitis
	Cicloserina	Oral	1 g	Depresión, alteraciones en la personalidad
	Meropenem	IV	1 g/8-12 h	Alteraciones hematológicas

Como se mencionó anteriormente, existen múltiples alternativas terapéuticas en el tratamiento de TB. Cabe mencionar que, dentro de un mismo grupo, los fármacos presentan estructuras químicas y propiedades diferentes entre sí, por lo que también difieren en el mecanismo de acción y su sitio blanco. En la **Figura 5** se muestran algunos de los sitios blanco de fármacos utilizados en el tratamiento de TB (Horsburgh et al., 2015).

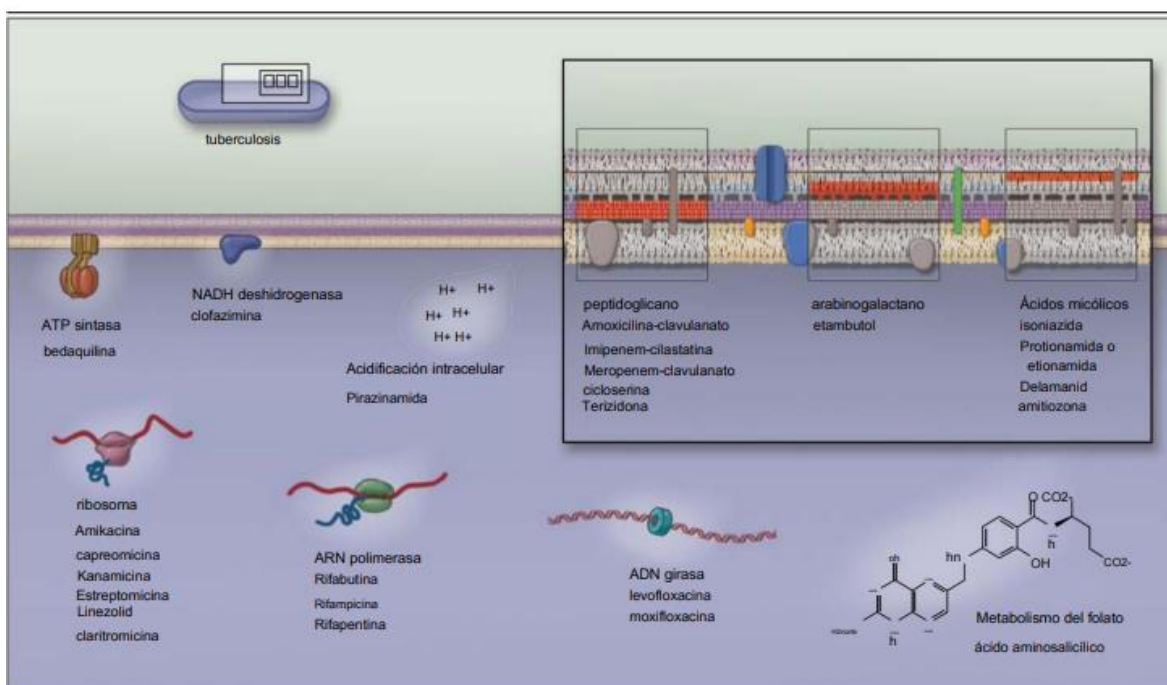


Figura. 5. Esquema de los blancos de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de tuberculosis (Horsburgh et al., 2015).

La adaptación de MTB le permite defenderse de diversos fármacos a través de estrategias como: la disminución de la permeabilidad de la membrana, la modificación y degradación enzimática de medicamentos y el incremento de bombas de eflujo, por lo que, no es recomendable realizar derivados de fármacos de los cuales se tenga evidencia de que presentan resistencia. El tiempo es un factor que considerar, ya que entre mayor sea el tiempo que lleve un fármaco (antimicrobiano) en circulación, es mayor la probabilidad de que se llegue a presentar resistencia, por lo que fármacos de desarrollo reciente como: linezolid, pretomanid y delamanid son de alta relevancia. Linezolid fue aprobado en el 2001 y utilizado en el tratamiento de TB, desde hace poco más de una década, mientras que delamanid ha sido utilizado en el tratamiento de TB desde el año 2012, sin embargo, pretomanid es el fármaco aprobado más reciente en el tratamiento de TB, siendo aprobado en el 2019 por la FDA y comercializado en la unión europea a partir del 2022.

Otro aspecto para considerar es el mecanismo de acción de los compuestos.

Mecanismo de acción de Linezolid

Linezolid es un agente sintético clasificado como antibiótico, perteneciente a la familia de oxazolidinonas, el cual ha demostrado tener actividad *in-vivo* frente a bacterias grampositivas aerobias, anaerobias y frente a MTB. Su mecanismo de acción inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, al unirse a la subunidad 23S del ribosoma bacteriano, modificando la estructura 50S e impidiendo el ensamble del complejo 70S funcional, lo que impide a su vez la traducción de proteínas (Horsburgh et al., 2015). La estructura química de linezolid se muestra en la **Figura 6**.

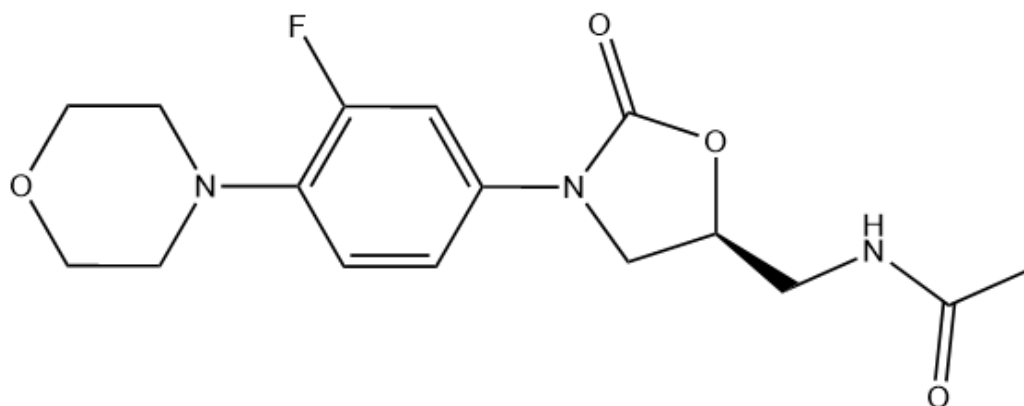


Figura. 6. Estructura 2D de Linezolid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024).

Mecanismo de acción de Delamanid

Delamanid es un profármaco con actividad bactericida, que es biotransformado por la enzima por el sistema coenzimático micobacteriano F420 y la enzima nitroreductasa dependiente de deazaflavina. La biotransformación libera metabolitos (desnitro-imidazoxazol), el cual se cree es responsable de la inhibición de la síntesis de componentes de la pared como: ácido metoximicólico y cetomicólico lo que conlleva al debilitamiento de la pared y la muerte de la micobacteria. Sin embargo, el metabolito también libera especies reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico (NO), debido a las biotransformaciones enzimáticas del grupo nitro (NO₂) (Horsburgh et al., 2015). La estructura química de delamanid se muestra en la **Figura 7**.

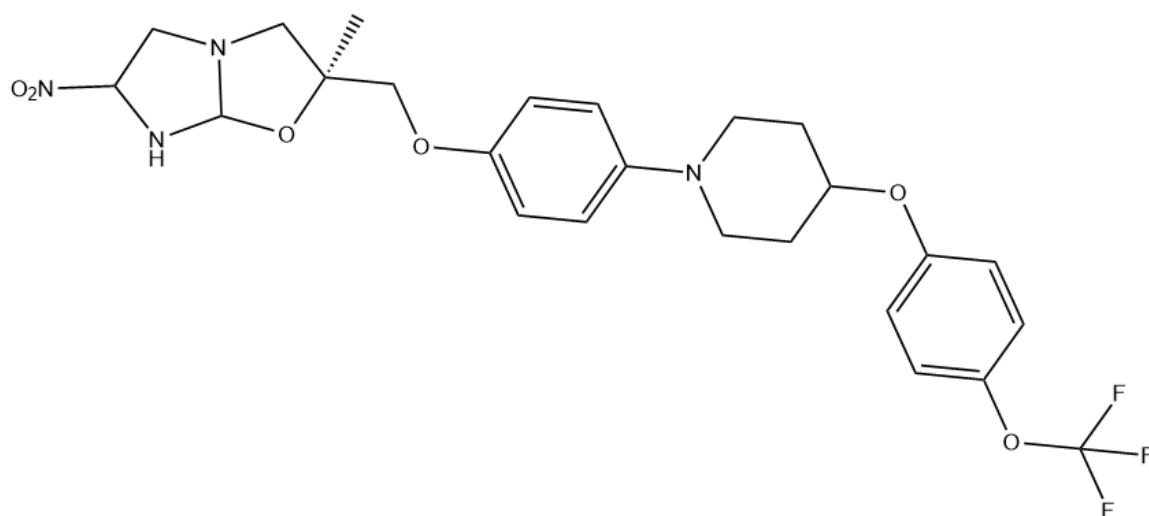


Figura. 7. Estructura 2D de Delamanid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024).

Mecanismo de acción de Pretomanid

Pretomanid es un profármaco, biotransformado por la enzima nitroreductasa dependiente de deazaflavina Ddn y del cofactor F420 reducido, liberando metabolitos activos responsables de la actividad antimicobacteriana, principalmente la liberación de NO, de igual manera que delamanid, tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de ácidos micólicos, sin embargo, el mecanismo molecular es poco conocido, sin embargo, se cree que interviene en el proceso de síntesis de ácidos micólicos a partir de la inhibición de la enzima ciclopropano sintasa 3, (Horsburgh et al., 2015). La estructura química de pretomanid se muestra en la **Figura 8**.

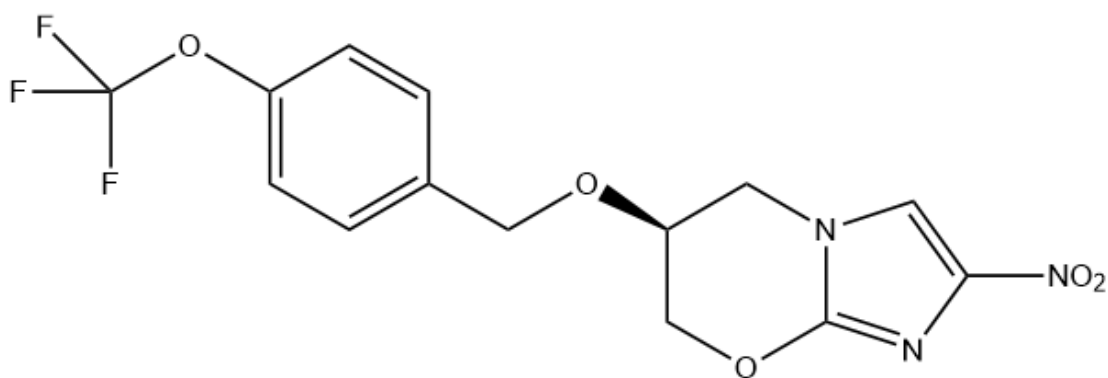


Figura. 8. Estructura 2D de Pretomanid (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024).

La búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de TB además de los de primera línea fue impulsado por la aparición de cepas TB-MDR. Sin embargo, la aparición de resistencia a fármacos de segunda línea, definidos como TB-XDR, es una situación alarmante, debido a las limitaciones y dificultades que conlleva el tratamiento de TB en casos donde haya resistencia a fármacos de primera y segunda línea, comprometiendo la eficacia del tratamiento y extendiéndolo, lo que impacta de manera directa en la salud, la economía del paciente y de manera general en su estilo de vida.

Debido a esta problemática se ha comenzado a utilizar nuevas estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos, con un enfoque más objetivo, denominado diseño racional de fármacos (DRF) la cual parte de un fármaco o molécula con actividad biológica ya documentada, la cual será modificada a través de procesos químicos con la finalidad de mejorar aspectos del fármaco base, como: aumentar la eficacia terapéutica o mejorar las propiedades farmacocinéticas. Este enfoque en combinación con herramientas informáticas y ensayos *in-silico* como el acoplamiento molecular abren un nuevo camino en la búsqueda de nuevos fármacos a partir del diseño, síntesis y la predicción de actividad de compuestos análogos e híbridos.

El acoplamiento molecular permite predecir los cambios conformacionales más favorables de un ligando con el blanco molecular en un sitio específico **Figura 9** a partir información como: rigidez del receptor, formación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, factores electroestáticos y factores rotacionales y traslacionales para obtener información de si existe interacción ligando-receptor y por ende actividad biológica, así como a las uniones responsables de dicho efecto (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

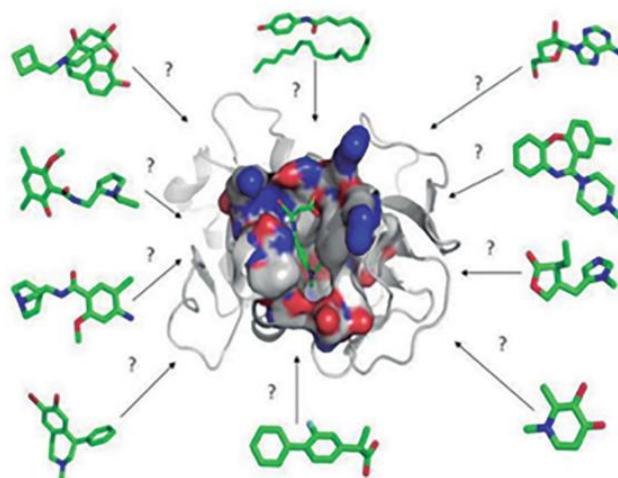


Figura. 9. Representación esquemática de diferentes ligandos dispuestos alrededor del sitio activo en una proteína.

El uso de software y programas para la búsqueda de interacciones entre nuevas moléculas con un blanco molecular específico, trae consigo la ventaja de realizar predicciones sobre las propiedades fisicoquímicas y comportamientos bajo condiciones específicas de una molécula, facilitando la investigación y desarrollo en industrias como la química farmacéutica.

La búsqueda de nuevos agentes antituberculosos siguiendo con el DRF toma en cuenta las características de los fármacos actuales en el tratamiento de TB como punto de referencia para el diseño de nuevos agentes antituberculosos.

En la actualidad se estima que alrededor del 90% del total de fármacos disponibles en el mercado contienen estructuras heterocíclicas, en las cuales abunda nitrógeno (N) y azufre (S) y es debido a la capacidad de formar enlaces y las similitudes estructurales con otros compuestos heterocíclicos que cumplen una función en el organismo como: aminoácidos (prolina, triptófano), vitaminas, enzimas e incluso en el DNA como las purinas, que son estructuras de relevancia en química farmacéutica. Dentro de las estructuras heterocíclicas más conocidas, se encuentran los bencimidazoles (Mahurkar et al., 2023).

Los bencimidazoles son estructuras heterocíclicas de dos núcleos, formado a partir de un anillo de benceno y un anillo de imidazol que se fusionan **Figura 10**.

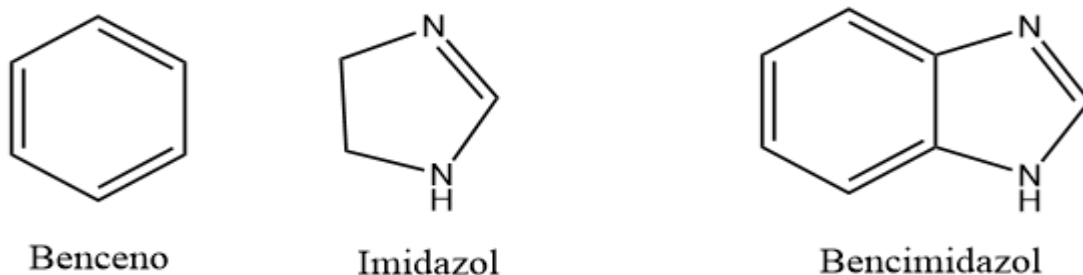


Figura. 10. Estructura química del bencimidazol (Mahurkar et al., 2023).

Los bencimidazoles y sus derivados han sido de gran interés debido a las múltiples aplicaciones en sectores como industrial, agropecuario y farmacéutico, siendo este último el de nuestro interés. Derivados de bencimidazol han sido utilizados como antivirales, hipotensivos, antiparasitarios, antidiabéticos, analgésicos, antiinflamatorios, neuroprotectores, antioxidantes, anticancerígenos y antibacterianos (Mahurkar et al., 2023) (Alheety et al., 2025).

Debido a la simplicidad del grupo bencimidazol, es posible añadir y modificar la estructura dando origen a múltiples derivados de una manera rápida en la búsqueda de derivados funcionales, esto convierte al bencimidazol en un buen punto de partida para el desarrollo de compuestos que presenten actividad frente a MTB.

3. JUSTIFICACIÓN

La TB es una enfermedad crónico-infecciosa diseminada por todo el mundo. En el 2022 se registraron más de 1 millón de muertes, estas cifras posicionan a la TB como la segunda causa de muertes de tipo infeccioso en el mundo. por debajo de COVID-19. Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectado con bacilos latentes de MTB de los cuales entre un 5 aun 10% desarrollaran la enfermedad con el paso del tiempo, incrementando el número de decesos.

Otro aspecto importante que considerar, es el aumento de cepas TB-MDR y TB-XDR, las cuales van en aumento alrededor del mundo, esto genera una problemática importante, debido a que cada vez existen menos alternativas terapéuticas efectivas en el tratamiento de TB.

Debido a la problemática de salud que representa la TB, es de suma importancia el desarrollar nuevas alternativas farmacológicas que ayuden a combatir esta problemática, esto con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos, eficaces en el tratamiento contra cepas resistentes.

Las nuevas estrategias en el diseño racional fármacos (DRF), incluido el uso de herramientas digitales y ensayos *in-silico* permiten disminuir tiempos y costos en el proceso de investigación y desarrollo de un medicamento, lo cual es de gran ayuda en procesos de síntesis química, permitiendo corregir aspectos en el diseño de los mismos compuestos y obtener proyecciones y estimaciones de su actividad, contribuyendo en la mejora del diseño del compuesto.

La inclusión de estructuras heterocíclicas en el desarrollo de fármacos ha tenido muy buenos resultados, debido a que se encuentran presentes en casi la mayoría de los medicamentos, por lo que la integración de bencimidazoles en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que brinda una buena base para el desarrollo de diversos derivados en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana.

4. HIPÓTESIS

La síntesis de nuevos compuestos a partir de las estructuras de Linezolid, Pretomanid y Delamanid, incorporando nitrobencimidazoles incrementará la actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar nuevos agentes antituberculosos a partir de nitrobencimidazoles y las estructuras de Linezolid, Pretomanid y Delamanid.

5.2 Objetivos específicos

- Diseñar compuestos basados en la estructura de Linezolid, Pretomanid y Delamanid.
- Sintetizar, purificar y caracterizar nuevos agentes antituberculosos con mayor espectro de actividad.
- Realizar el acoplamiento molecular y analizar las interacciones.
- Evaluar el espectro de actividad antimicrobiana de los compuestos sintetizados utilizando cepas del grupo ESKAPE-E.

6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Los experimentos de síntesis, purificación, evaluación biológica y simulaciones computacionales de los compuestos sintetizados fueron realizados en el laboratorio de Química Farmacéutica de la División de Biología Molecular en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., ubicado en San Luis Potosí, durante el periodo de abril de 2024 a abril de 2025.

La caracterización estructural de los compuestos mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear H^1 y C^{13} (RMN) se llevó a cabo en colaboración con el Dr. José Rivera del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) con el equipo: Bruker AVANCE III HD 700 MHz, con una sonda: Criosonda TCI 700 H-C/N-D de 5 mm.

Los ensayos de evaluación antibacteriana fueron realizados en la Unidad de Investigación Médica Yucatán, por parte de la Dirección de Educación e Investigación en el Hospital de Especialidades CMN Ignacio García Téllez, en colaboración con la Dra. Gloria María Molina Salinas.

6.1 Diseño molecular de los compuestos

El diseño de compuestos busca a través de la modificación de la estructura química del fármaco base, un incremento en la actividad antimicrobiana por lo que se sugirió realizar el diseño a partir de los fármacos Linezolid, Pretomanid y Delamanid tomando en cuenta el poco tiempo que llevan en el mercado y la baja probabilidad de que MTB genere resistencia a dichos fármacos.

El diseño de compuestos se realizó a partir de las estructuras químicas de los fármacos base, linezolid, pretomanid y delamanid, resaltando los grupos químicos de interés mostrados en la **Figura 11**.

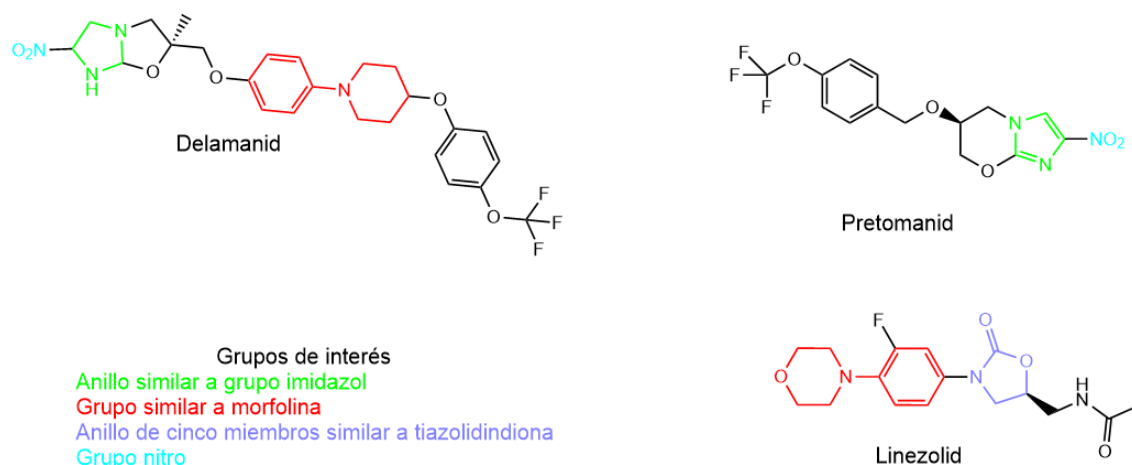


Figura. 11. Grupos químicos de interés en los fármacos base para el diseño de compuestos.

Para el diseño de compuestos se integró el grupo bencimidazol en las estructuras, debido a que derivados de bencimidazoles presentan actividad terapéutica contra hongos, parásitos (nematodos) y algunas bacterias.

Un aspecto relevante que considerar es la presencia de grupos nitro en la estructura de los fármacos base (Pretomanid y Delamanid). El grupo nitro es un grupo funcional con múltiples aplicaciones químicas, pero con la característica de ser un grupo que genera toxicidad (toxicóforo), sin embargo, es debido a esas características que es permitido en la búsqueda y desarrollo de fármacos con actividad anticancerígena y antimicrobiana (Nepali et al., 2019) como es el caso de Pretomanid y Delamanid. Con base en la estructura de los fármacos base pretomanid y delamanid, que poseen el grupo nitro en su estructura química, se integró el grupo nitro como parte del diseño de compuestos.

Se realizó el diseño de 6 compuestos tomando como características principales, los grupos de interés de los fármacos base, la adición del grupo benzimidazol, la adición de grupos nitro y considerando las reglas de Lipinski. Proponiendo la estructura de seis compuestos representados en la **Figura 12**.

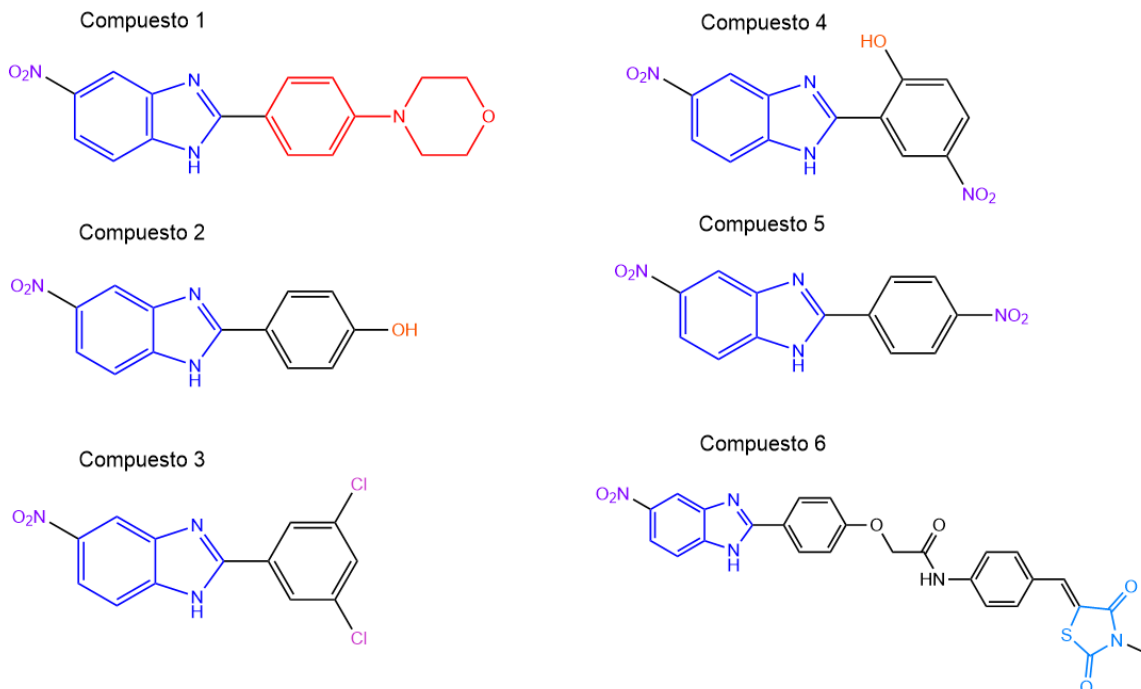


Figura. 12. Compuestos híbridos propuestos y sus grupos químicos de interés en su estructura.

6.1.1 Reglas de Lipinski

Un aspecto para considerar en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad terapéutica son las propiedades fisicoquímicas de la molécula. La estructura química de una molécula le otorga características fisicoquímicas específicas a esa molécula, lo que a su vez afecta la absorción de esta molécula en el organismo al estar ligado a la permeabilidad de membranas.

Se considera que una molécula cuenta con una buena permeabilidad y por tanto una mayor absorción, si cumple con los siguientes criterios:

- Peso molecular inferior a 500 g/mol
- La lipofilidad del compuesto, expresada como logP, debe ser menor a 5
- El número de moléculas que pueden ser donantes de enlaces de hidrogeno, no debe ser mayor a 5
- El número de moléculas que pueden ser aceptores de enlaces de hidrogeno, no debe ser mayor a 10

Las reglas de Lipinski son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, sin embargo, no se considera una ley en el diseño de fármacos, por lo que existen excepciones a la regla y se considera una tolerancia de dos faltas o violaciones a

las reglas de lipinski como tolerables, sin embargo, no es recomendable exceder dos violaciones ya que los resultados obtenidos no serían favorables para una molécula con fines farmacológicos (Lipinski et al., 2001).

Para la determinación de las reglas de lipinski se utilizó el programa SwissADME, el cual es una herramienta utilizada para la predicción de propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, similitud con otros fármacos y biodisponibilidad, permitiendo la obtención de parámetros de interés (Daina et al., 2017).

6.2 PARTE QUIMICA:

6.2.1 Síntesis de los compuestos

Material y equipo:

- Reactivos y disolventes: Se utilizaron los reactivos correspondientes de la marca Sigma-Aldrich los cuales no necesitaron ser purificados previamente a su uso. Como disolventes se utilizaron: diclorometano (DCM), acetonitrilo (CH_3CN), acetona, etanol (EtOH) y dimetilsulfóxido (DMSO), todos de calidad analítica. Además, se empleó trietilamina (TEA) como base y yoduro de potasio (KI) como aditivo para favorecer las reacciones.
- Instrumentos y equipo: Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos se utilizaron vasos de precipitado (DWK Life Sciences, KIMAX, EU.), embudos y material de vidrio, un rotavapor (BUCHI, V-100, México), placas de TLC (Analytical Chromatography, TLC silica gel 60 F254, Alemania), y una cámara de luz para detección bajo luz UV (254/365 nm) para la identificación de placas TLC, una balanza analítica (EQUIPAR, Sartorius, México); una plancha de calentamiento (EQUIPAR, StableTemp, México), un termómetro digital (Digi-Sense, EU); Determinador de punto de fusión (Stuart, SMO10, Reino Unido), ; Bomba de vacío (GAST, OCA-P704-AA, Michigan, EU).

Una vez realizado el diseño es necesario realizar el análisis de las materias primas necesarias para la obtención de los compuestos finales. De manera general los

compuestos **1-5** fueron obtenidos a partir de reacciones de condensación de aldehídos para la obtención del grupo bencimidazol.

6.2.1.1 Metodología de síntesis del compuesto 1

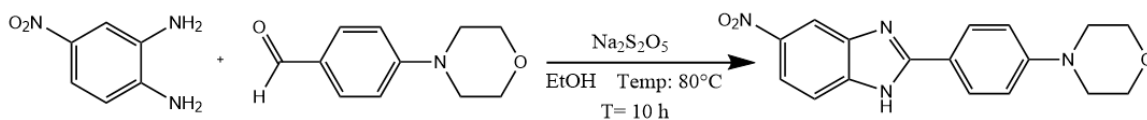


Figura. 13. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 1.

Se disolvieron 1.01 eq de 4-morfolinbenzaldehído (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando etanol (EtOH) como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C), **Figura 13**. La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O₂). La reacción se monitoreó por TLC cada 30 min, utilizando como sistema de elución diclorometano:EtOH (98:2), se detuvo la agitación y el calentamiento transcurridas 10 h, visualizándose un cambio en la tonalidad inicial de la reacción de un color rojo a un naranja intenso. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración anaranjada, llamado 2-(morfolin)-1H-5-nitrobencimidazol, con un rendimiento de 70.14%, con un punto de fusión de 238-240°C. El compuesto **1**, se disolvió en DMSO (deuterado) para RMN y en DMSO para MS.

RMN H¹ (500 MHz, DMSO-d₆, δ=2.5), (agua δ=3.33), (EtOH δ=3.44), δ=8.38 (s, NH), δ=8.08 (d, H-4, H-6, J_o=8.8, J_m=1.2 Hz), δ=7.67 (d, H-7, J_o=8.8 Hz), δ=8.03 y δ=7.08 (d, H-2', H-3', H-5', H-6'), δ=3.6 (s, H-7', H-8', H-9' y H-10').

RMN C¹³ (125 MHz, DMSO-d₆, δ=40.03), δ= 47.62 (C8', C9'), δ=66.34 (C7', C10'), δ=114.72 (C3', C5'), δ=128.62 (C2', C6'), δ=118.19 (C7), δ=118.83 (C6), δ=142.76 (C5, C7a), δ=153.14 (C2).

6.2.1.2 Metodología de síntesis del compuesto 2

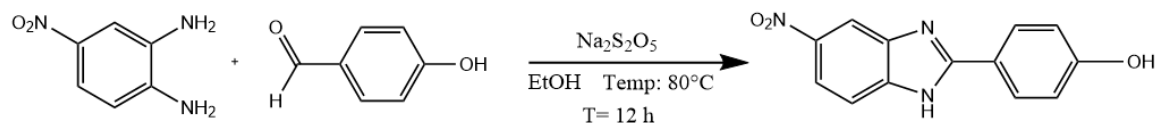


Fig. 14. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 2.

Se disolvieron 1.01 eq de 4-hidroxibenzaldehído (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C), **Figura 14**. La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O_2) y se monitoreó por TLC cada 30 min utilizando un sistema de elución diclorometano:EtOH (95:5), se detuvo la agitación y el calentamiento transcurridas 12 h, visualizando un cambio en su tonalidad de un color rojo amarillo intenso. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración amarillo, llamado 2-(p-hidroxibencil)-1H-5-nitrobencimidazol, con un rendimiento de 67.3%, con un punto de fusión >300°C. El compuesto **2**, se disolvió en DMSO (deuterado) para RMN y en DMSO para MS.

RMN H^1 (300 MHz, DMSO- d_6 , δ =2.5), (EtOH δ =3.44), δ =13.35 (s, NH), δ =10.18 (d, OH), δ =8.47 (s, H-4), δ =8.30 (s, H-6), δ =8.11 (s, H-7), δ =8.05 (d, H-2', J_o =8.4 Hz), δ =7.76 (d, H-6', J_o =8.5 Hz), δ =7.65 (d, H-3', J_o =8.8 Hz), δ =6.95 (d, H-5', J_o =8.7 Hz).

RMN C^{13} (700 MHz, DMSO- d_6 , δ = 40.1), δ = 160.55 (C4'), δ = 156.34 (C2), δ = 149.36 (C5), δ = 143.76 (C3a), δ = 140.39 (C7a), δ = 129.27 (C2', C6'), δ = 120.37 (C1'), δ = 118.27 (C6), δ = 116.45 (C3', C5'), δ = 114.66 (C4), δ = 111.71 (C7).

6.2.1.3 Metodología de síntesis del compuesto 3

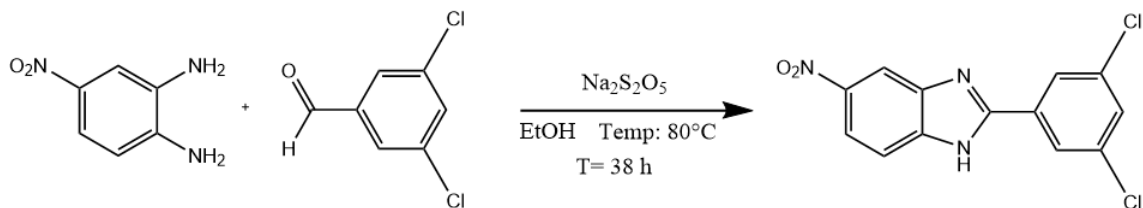


Figura. 15. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 3.

Se disolvieron 1.01 eq de 3,5-diclorobenzaldehído (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C), **Figura 15**. La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O_2). La reacción se monitoreó por TLC cada hora utilizando un sistema de elución hexano:acetato de etilo (90:10), se detuvo la agitación y el calentamiento transcurridas 38 h, visualizándose un cambio en la tonalidad inicial de un color rojo a un amarillo brillante. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración amarillo, llamado 2-(3,5-diclorobencil)-1H-5-nitrobencimidazol, con un rendimiento de 90.78%, con un punto de fusión $>300^\circ\text{C}$. El compuesto **3**, se disolvió en Cloroformo (deuterado) para RMN.

RMN ^1H (500 MHz, cloroformo-d, $\delta=7.26$), (agua, $\delta=1.56$), $\delta=8.57$ (s, H-4'), $\delta=8.05$ (dd, H-6, $J_o=8.8$ Hz y $J_m=2.4$ Hz), $\delta=8.03$ (d, H-4, $J_m=2.4$ Hz), $\delta=7.81$ (d, H-2', $J_m=1.8$ Hz), $\delta=7.5$ (d, H-6', 1.9 Hz), $\delta=6.74$ (d, H-7, $J_o=8.8$ Hz), $\delta=5.02$ (s, NH).

RMN ^{13}C (125 MHz, cloroformo-d, $\delta=77.06$), $\delta=156.76$ (C4'), $\delta=131.70$ (C2'), $\delta=127.53$ (C6'), $\delta=125.07$ (C6), $\delta=113.7$ (C7), $\delta=113.3$ (C4).

6.2.1.4 Metodología de síntesis del compuesto 4

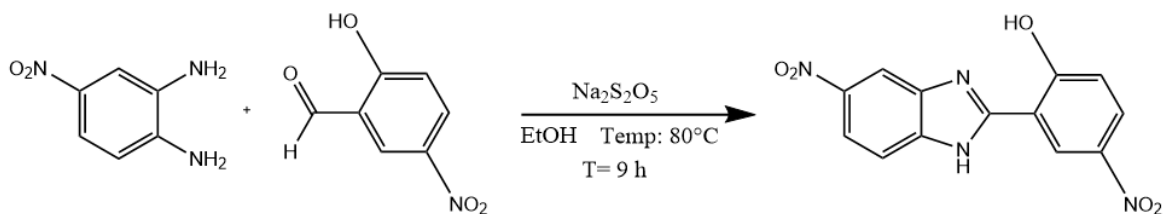


Fig. 16. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 4.

Se disolvieron 1.01 eq de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehido (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C), **Figura 16**. La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O₂). La reacción se monitoreó por TLC cada hora utilizando un sistema de elución cloroformo: éter (95:5), se detuvo la agitación y el calentamiento transcurridas 9 h, visualizándose un cambio en la tonalidad de un color rojo inicial a un color amarillo. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración amarillo, llamado 2-(2-hidroxi-5-nitrobencil)-1H-5-nitrobencimidazol, con un rendimiento de 88.98%, con un punto de fusión >300°C. El compuesto **4**, se disolvió en DMSO (deuterado) para RMN y en DMSO para MS.

RMN H¹ (400 MHz, DMSO-d₆, δ=2.5), (agua δ=3.33), (EtOH δ=1.06), δ=11.34 (s, NH), δ=9.06 (d, H-4', J_m=3 Hz), δ=8.56 (d, H-6', H-8', J_p=0.4 Hz), δ=8.11 (dd, H-6, J_o=8.9 Hz, J_m=2.3 Hz), δ=7.79 (d, H-7, J_o=8.9 Hz), δ= 6.87 (d, OH, J_o=9.2 Hz).

RMN C¹³ (100 MHz, DMSO-d₆, δ= 40.18), δ= 142.99 (C5, C5'), δ= 127.94 (C4'), δ= 125.75 (C6'), δ= 120.47 (C6), δ= 118.37 (C4), δ= 114.36 (C7).

6.2.1.5 Metodología de síntesis del compuesto 5

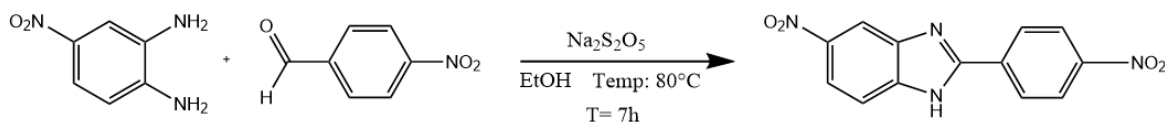


Figura. 17. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 5.

Se disolvieron 1.01 eq de 4-nitrobenzaldehido (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-

fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C), **Figura 17**. La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O₂). La reacción se monitoreó por TLC cada hora utilizando un sistema de elución hexano: diclorometano 40:60, se detuvo la agitación y el calentamiento transcurridas 7 horas, la reacción no presento un cambio en su tonalidad, manteniendo una coloración rojiza. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración rojiza, llamado 2-(p-nitrobencil)-1H-5-nitrobencimidazol con un rendimiento de 59.75%, con un punto de fusión >300°C. El compuesto **5**, se disolvió en DMSO (deuterado) para RMN y en DMSO para MS.

RMN H¹ (400 MHz, DMSO-d₆, δ=2.5), (agua δ=3.33), δ=9.3 (s, NH), δ=8.36 (s, H-3', H-5'), δ=8.16 (d, H-4, *J_m*=2.5 Hz), δ=7.97 (dd, H-6, *J_o*=9 Hz, *J_m*=2.5 Hz), δ=6.93 (s, H-2', H-6'), δ=6.81 (d, H-7, *J_o*=9.1 Hz).

RMN C¹³ (100 MHz, DMSO-d₆, δ= 40.18), δ= 158.06 (C2), δ= 151.99 (C4'), 149.36 (C5), δ= 142.24 (C3a), δ= 136.44 (C7a), δ= 133.32 (C1'), δ= 130.65 (C2', C6'), δ= 125.59 (C6), δ= 124.32 (C3', C5'), δ= 113.94 (C4), 113.78 (C7).

6.2.1.6 Metodología de síntesis del compuesto 6

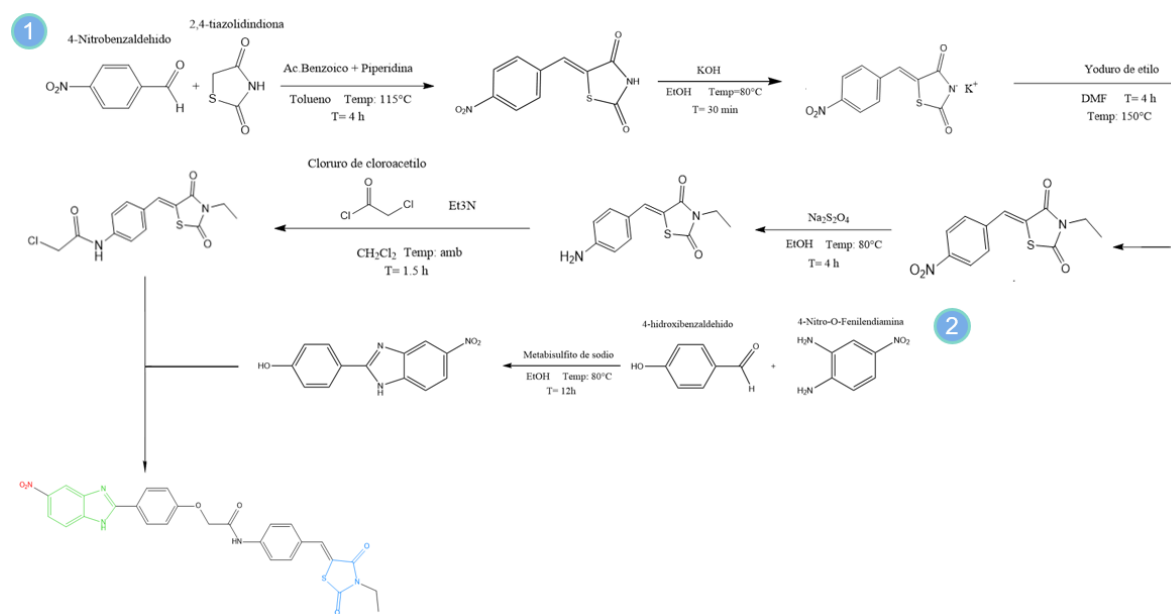


Figura. 18. Esquema general de reacción para la obtención del compuesto 6.

La metodología para la obtención del compuesto **6**, se llevó a cabo mediante varios pasos para la obtención de diversos productos, los cuales se integran en una reacción final de convergencia para la obtención del producto final, **Figura 18**.

Paso 1: Se pesaron 100 mg de nitrobenzaldehído a los cuales se añade 1 eq de tiazolidindiona y 30% mol de ácido benzoico, utilizando tolueno (10 mL) como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C durante 15 min, una vez transcurridos, se añade 30% mol de piperidina y se monta la reacción en una trampa de Dean-Stark durante 4 horas, llevando a reflujo el disolvente. La reacción se monitorea cada hora por TLC hasta el término de las 4 horas, una vez transcurrido se desmonta la trampa de Dean-Stark y se recupera un sólido de coloración blanquecina “producto” el cual corresponde a la unión entre nitrobenzaldehído con la tiazolidindiona. El producto obtenido tiene un grupo amino susceptible a reaccionar en el anillo de la tiazolidindiona por lo que se realizó la alquilación de su grupo amino, añadiendo 1.01 eq de hidróxido de potasio (KOH), utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 80°C durante 30 min, una vez transcurridos se filtra el sólido y se deja secar. El sólido obtenido se disuelve en 5 mL de DMF por cada 300 mg de compuesto obtenido, al cual se le añaden 1.01 eq de yoduro de etilo, en agitación constante a una temperatura de 150°C durante 9 horas, monitoreando cada 30 min por TLC, una vez finalizado el tiempo, se filtra la reacción utilizando agua fría para realizar los lavados y favorecer la precipitación del compuesto, obteniendo un sólido de tonalidad amarilla. En este punto de la reacción se obtiene el nitrobenzaldehído unido a la tiazolidindiona alquilada previamente, el paso a seguir corresponde a la reducción del grupo nitro presente en benzaldehído a un grupo amino el cual sea susceptible para reaccionar con el producto de la segunda reacción y obtener el producto final, sin embargo, se realizaron diversas pruebas siguiendo diversas metodologías pero se han obtenido valores de rendimiento inferiores al 5%, por lo que se continúa optimizando el protocolo para una obtención de mejores rendimientos.

El paso 2 de la reacción requiere la síntesis del 2-(p-hidroxibencil)-1H-5-nitrobenzimidazol (compuesto **2**) debido a que el grupo hidroxilo de su estructura

permite la unión con el grupo amino del paso 1, lo que permite conjugar dos compuestos incrementando los grupos nitro, la incorporación de la estructura de la tiazolidindiona y una estructura similar en tamaño y forma al medicamento delamanid. Para la obtención del compuesto del paso 2, se disolvieron 1.01 eq de 4-hidroxibenzaldehído (2) y 1.1 eq de metabisulfito de sodio, utilizando EtOH como disolvente, en agitación constante a una temperatura de 40°C por 15 min, una vez transcurrido el tiempo, se añadió la 4-nitro-O-fenilendiamina (1), tomando una coloración rojiza debido a la materia prima y se elevó la temperatura a reflujo (80°C). La reacción se mantuvo a reflujo bajo condiciones atmosféricas normales (O₂). La reacción se monitoreó por TLC y se detuvo la agitación y el calentamiento después de 12 h, se visualiza un cambio en la tonalidad de un color rojo amarillo intenso. Después de extraer el EtOH con la bomba de alto vacío, se obtuvo un precipitado sólido de coloración amarillo 2-(p-hidroxibencil)-1H-5-nitrobecimidazol “compuesto 2”.

6.2.2 Caracterización química de los compuestos sintetizados

El proceso de caracterización química se llevó a cabo mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-H¹) y de carbono 13 (RMN-C¹³), para determinar la estructura molecular de los compuestos sintetizados a través del análisis de los estudios en 2D ya mencionados (H¹ y C¹³) para la elucidación estructural de los compuestos **1-5**, permitiendo identificar la existencia de impurezas residuales del proceso de síntesis.

Además de ensayos de RMN, se utilizó espectrometría de masas (EM) por tiempo de vuelo acoplado a una fuente de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺-TOF-MS) por sus siglas en inglés para identificar y cuantificar los compuestos sintetizados mediante el análisis de una muestra en relación masa/carga (m/z), permitiendo identificar el peso del compuesto, la detección de impurezas, formación de aductos y la composición isotópica del compuesto.

6.3 EVALUACION BIOLOGICA:

6.3.1 Ensayo para la determinación de toxicidad de los compuestos 1–5 utilizando el modelo de *Artemia salina*

Material y equipo para la determinación de toxicidad de los compuestos:

- Para la evaluación de la toxicidad de los compuestos **1–5** se utilizaron: un vaso de precipitado de 2 L, solución de NaCl al 3%, nauplios de *Artemia salina*, una lupa con luz incorporada (VERDEN, MO-022, China), micropipetas (10–1000 μ L, ecopipette, NH10225, Suiza), y placas multipocillo (Costar, de 12 o 24 pocillos, según el ensayo).

Para llevar a cabo el ensayo de toxicidad, se incubaron huevos de *Artemia* spp utilizando solución salina (NaCl al 3%) en un vaso de precipitado de 2 L durante 48 h, favoreciendo las condiciones óptimas para la eclosión de los huevos y obtención de los nauplios (estadio de interés). Previamente se prepararon soluciones stock de cada compuesto (**1–5**), utilizando diferentes concentraciones: 1, 10, 25, 50, 70, 85 y 100 μ M. Posteriormente se procede a realizar una selección de 20 nauplios con ayuda de una lupa y micropipeta, los cuales son colocados en placas multipocillo, siendo necesario un pocillo para cada una de las concentraciones para cada uno de los compuestos a evaluar. El ensayo se realizó por triplicado para cada compuesto, siendo requeridos 20 nauplios por pocillo, para 21 pocillos totales en un ensayo triplicado para cada uno de los compuestos a evaluar. En cada pocillo se añadió la concentración correspondiente del compuesto y se mantuvieron en exposición durante 24 h a temperatura ambiente y bajo condiciones constantes de iluminación. Al transcurrir 24 h, se realizó un conteo de los nauplios vivos y muertos con ayuda de una lupa para obtener el valor de % de mortalidad.

Los valores obtenidos fueron utilizados para determinar el valor de concentración a la cual se alcanza un 50% de mortalidad, el valor es conocido como: CL₅₀ (Concentración Letal 50) a través de una regresión lineal para cada compuesto, el valor de unidades de toxicidad (UT) se calculó dividiendo el valor de uno entre el valor de CL₅₀ y multiplicando el resultado por cien ($(1/CL_{50}) \times 100$), el valor

obtenido permitió asignar la clase de toxicidad del compuesto según la información revisada en una escala de uno a cinco (Banti & Hadjikakou, 2021), (Persoone et al., 2003).

6.3.2 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos 1-5

Material y equipo para la evaluación de actividad antibacteriana:

- Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos **1-5** los ensayos fueron realizados en la Unidad de Investigación Médica Yucatán en el Hospital de Especialidades CMN Ignacio García Téllez en colaboración con la Dra. Gloria María Molina Salinas.

La incorporación del grupo bencimidazol en la estructura de los compuestos sintetizados, ha sido utilizada en fármacos con actividad antiparasitaria, inhibidores de la bomba de protones, antineoplásicos, etc., por lo que el grupo bencimidazol puede conferir un espectro de actividad amplia frente a diferentes microorganismos, por lo que se realizó una evaluación de la actividad antibacteriana frente a diversos agentes infecciosos.

La Dra. Gloria María Molina Salinas determinó las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de los compuestos sintetizados (**1-5**) sobre cepas del grupo ESKAPE-E (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp*). Los bioensayos se realizaron por microdilución en caldo con resazurina, los compuestos **1-5** se disolvieron en DMSO en el vial en que fueron enviados y posteriormente se diluyeron en el medio de cultivo, trabajando con una concentración subtóxica de DMSO para las cepas bacterianas. Los rangos de concentración manejados fueron de 125-1.95 µg/mL para todos los compuestos, se utilizó Rifampicina, Tetraciclina o Amikacina como control positivo y las evaluaciones fueron llevadas a cabo tres veces de forma independiente y por duplicado en cada caso.

6.4 PARTE COMPUTACIONAL:

Programas utilizados para realizar tanto el acoplamiento molecular como visualización de las estructuras:

- Proteína en formato PDB.
- ChemDraw 21.0.0
- ChemDraw3D 21.0.0
- MOE (Molecular Operating Environment)
- AutoDock Tools 1.5.6
- Discovery Visualizer 4.0

6.4.1 Acoplamiento molecular de los compuestos 1-5 sobre la enzima Ddn

Los compuestos sintetizados comparten en su estructura grupos nitro, los cuales están presentes en pretomanid y delamanid (fármacos base), los cuales comparten su mecanismo de acción al ser biotransformados por la misma nitroreductasa en MTB, la cual es responsable de la formación de metabolitos activos y de la actividad antibacteriana. Por lo tanto, para realizar el proceso de acoplamiento molecular, se extrajo la estructura cristalográfica (ID:3R5W), correspondiente a la enzima nitroreductasa dependiente de deazaflavina (Ddn), encargada de la biotransformación de compuestos nitrados (pretomanid y delamanid), de la base de datos Protein Data Bank (PDB),

Los ensayos de acoplamiento molecular de los compuestos **1-5** iniciaron a partir de la obtención de las estructuras químicas de los compuestos, utilizando el programa ChemDraw 21.0.0 para generar las estructuras 2D de los ligandos y ChemDraw3D 21.0.0 para la obtención de las estructuras 3D. La estructura del blanco molecular seleccionada fue (ID:3R5W con una resolución de 1.79 Å).

Los ligandos y la enzima fueron tratados en el programa MOE para la eliminación de moléculas de agua y minimización de la energía, utilizando un campo de fuerza Amber 10: EHT, R-Field 1:80; Cutoff [8,10] para el tratamiento de moléculas de

naturaleza proteica (enzima) y un campo de fuerza MMFF94x, R-Field 1:80; Cutoff [8,10] para los ligandos.

El acoplamiento molecular fue realizado con el programa AutoDock Tools 1.5.6, el tamaño grid box de 3R5W fue seleccionado según la información reportada en el trabajo de (Cellitti et al., 2012) en donde el grupo nitroimidazol de Pretomanid muestra interacción a través de puentes de hidrogeno con S78, Y130 y Y136. El centro del grid se estableció en $x = -4.648$, $y = -29.161$, $z = -23.18$, con un tamaño de grid de $50 \times 54 \times 40$ Å y un espacio de grid de 0.375 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckian (LGA), con los parámetros recomendados, aumentando el número de corridas a 100, mostrando la energía de unión entre el ligando con la enzima, obteniendo los valores de energía de unión entre los compuestos con la enzima. Se realizó el cálculo de RMSD a través del reacoplamiento del ligando cristalizado (pretomanid), obteniendo un valor <2 .

Además del acoplamiento molecular se determinó la eficiencia del ligando (LE), el cual es un parámetro utilizado en el diseño de fármacos para determinar la afinidad de unión de la molécula con el sitio blanco en relación con su tamaño (Hevener et al., 2018). La eficiencia del ligando se calcula dividiendo la energía libre de unión (ΔG) entre el número de átomos pesados (HA) del ligando, $LE = \Delta G/HA$ siendo considerados como valores deseables, valores mayores a 0.30, el número de átomos pesados fue calculado con el programa SwissADME.

El acoplamiento se realizó con los fármacos pretomanid y delamanid con la enzima Ddn para obtener valores de ΔG y calcular la eficiencia del ligando y realizar una comparación con los valores de los compuestos sintetizados **1-5**.

Por último se utilizó el programa Discovery Visualizer 4.0 para visualizar las interacciones en 2D de los ligandos con el sitio blanco y analizar dichas interacciones.

6.4.2 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre blancos moleculares en *S. aureus*

La evaluación de la actividad antibacteriana en los compuestos sintetizados, mostro que el compuesto **4** presenta actividad biológica frente a *S. aureus* por lo

que se realizaron ensayos de acoplamiento molecular sobre blancos reportados en *S. aureus*.

S. aureus es un agente de relevancia clínica debido a que es uno de los principales responsables en infecciones nosocomiales a nivel global, esto debido principalmente a su capacidad de generar resistencia, habiendo múltiples tipos de cepas, siendo las más comunes SASM (*S. aureus* sensible a meticilina) y SARM (*S. aureus* resistente a meticilina).

Infecciones SASM son tratadas con fármacos como dicloxacilina, oxacilina, cefazolina y cefalexina. Mientras que infecciones SARM son tratadas con: linezolid, daptomicina, vancomicina, sulfametoxazol/trimetoprima, (Calderón-Parra et al., 2022).

Los principales blancos son aquellos que permiten la supervivencia y patogenicidad de *S. aureus* como: síntesis proteica, pared celular (PBPs), enzimas de identificación (coagulasa), factores de virulencia (proteína A) y genes de resistencia a antibióticos como el gen *gen mecA* (Sinha & Fraunholz, 2010).

6.4.2.1 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la enzima DNA-girasa

El acoplamiento molecular se realizó sobre la enzima DNA topoisomerasa tipo II (DNA-girasa), la cual es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB. La enzima cumple con papel importante durante los procesos de replicación y transcripción al actuar como un componente de ruptura y sellado de la cadena de DNA (Spencer & Panda, 2023).

El acoplamiento molecular se realizó con la estructura cristalográfica ID:5BS3 con una resolución de 2.65 Å, correspondiente con la enzima DNA-girasa de *S. aureus* extraída de la base de datos PDB.

El ligando y la enzima fueron tratados en el programa MOE siguiendo el mismo protocolo utilizado con la enzima Ddn.

El acoplamiento molecular fue realizado con el programa AutoDock Tools 1.5.6, el tamaño grid box de 5BS3 fue seleccionado según la información reportada en el trabajo de (Singh et al., 2015) en donde el ligando reportó interacciones con A68,

V71, M75 y M12. El centro del grid se estableció en las mismas coordenadas reportadas ($x = -5.492$, $y = -44.584$, $z = -28.579$), con un tamaño de grid de $40 \times 48 \times 40$ Å y un espacio de grid de 0.375 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckian (LGA), con los parámetros recomendados, aumentando el número de corridas a 100, mostrando la energía de unión entre el ligando con la enzima. Se realizó el cálculo de RMSD a través del reacoplamiento del ligando cristalizado reportado en (Spencer & Panda, 2023), obteniendo un valor <2 .

Además del acoplamiento molecular se determinó la eficiencia del ligando (LE) y las interacciones en 2D con el sitio blanco utilizando el programa Discovery Visualizer 4.0.

6.4.2.2 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a)

El acoplamiento molecular se realizó sobre la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a), la cual es una transpeptidasa que cataliza un papel clave en la pared celular y evita la acción de fármacos β -lactámicos (Fishovitz et al., 2014).

El acoplamiento molecular se realizó con la estructura cristalográfica ID:4DKI con una resolución de 2.90 Å, correspondiente con la proteína de unión a penicilina de *S. aureus* extraída de la base de datos PDB.

El ligando y la enzima fueron tratados en el programa MOE siguiendo el mismo protocolo utilizado con la enzima Ddn.

El acoplamiento molecular fue realizado con el programa AutoDock Tools 1.5.6, el tamaño grid box de 4DKI fue seleccionado según la información reportada en el trabajo de (Fishovitz et al., 2014). El centro del grid se estableció en las mismas coordenadas reportadas ($x = 29.614$, $y = 29.347$, $z = 85.689$), con un tamaño de grid de $40 \times 40 \times 40$ Å y un espacio de grid de 0.375 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckian (LGA), con los parámetros recomendados, aumentando el número de corridas a 100, mostrando la energía de unión entre el ligando con la enzima. Se realizó el cálculo de RMSD a través del reacoplamiento del ligando cristalizado reportado en (Fishovitz et al., 2014), obteniendo un valor <2 .

Además del acoplamiento molecular se determinó la eficiencia del ligando (LE) y las interacciones en 2D con el sitio blanco utilizando el programa Discovery Visualizer 4.0.

6.4.2.3 Acoplamiento molecular del compuesto 4 sobre la ligasa D-alanil-D-alanina (Ddl)

El acoplamiento molecular se realizó sobre la enzima ligasa D-alanil-D-alanina (Ddl), siendo una enzima de vital importancia para la formación del dipéptido D-alanil-D-alanina, el cual es un componente clave para la biosíntesis de peptidoglicanos para la pared celular en bacterias (Pergolizzi et al., 2016).

El acoplamiento molecular se realizó con la estructura cristalográfica ID:8FFF con una resolución de 1.92 Å, correspondiente con enzima ligasa Ddl en *S. aureus* extraída de la base de datos PDB (Panda et al., 2024).

El ligando y la enzima fueron tratados en el programa MOE siguiendo el mismo protocolo utilizado con la enzima Ddn.

El acoplamiento molecular fue realizado con el programa AutoDock Tools 1.5.6, el tamaño grid box de 8FFF fue seleccionado según la información reportada en el trabajo de (Panda et al., 2024). El centro del grid se estableció en las mismas coordenadas reportadas ($x = 6.464$, $y = -15.648$, $z = 13.488$), con un tamaño de grid de $40 \times 40 \times 40$ Å y un espacio de grid de 0.375 Å. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckian (LGA), con los parámetros recomendados, aumentando el número de corridas a 100, mostrando la energía de unión entre el ligando con la enzima. Se realizó el cálculo de RMSD a través del reacoplamiento del ligando cristalizado reportado en (Panda et al., 2024), obteniendo un valor < 2 .

Además del acoplamiento molecular se determinó la eficiencia del ligando (LE) y las interacciones en 2D con el sitio blanco utilizando el programa Discovery Visualizer 4.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Diseño de los compuestos 1-5

Para la predicción de las propiedades de los compuestos sintetizados y determinar los valores de las reglas de lipinski, se utilizó el programa SwissADME. En la **Tabla 5** se muestran las propiedades de los compuestos determinado con el programa SwissADME.

Tabla. 5. Propiedades de los compuestos diseñados calculados con el programa SwissADME.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	clogP	Número de aceptores de hidrógeno	Número de donadores de hidrógeno	Número de violaciones
Control	<500	<5	<10	<5	<2
1	324.33	2.15	4	1	0
2	255.23	1.73	4	2	0
3	308.12	3.37	3	1	0
4	300.23	1.06	6	2	0
5	284.23	1.58	5	1	0
6	543.55	3.21	7	2	1

Los resultados de la predicción muestran que los compuestos diseñados cumplen con las reglas de lipinski al no presentar violaciones, con la excepción del compuesto **6** que presenta un peso mayor a 500 g/mol siendo su única violación, sin embargo, el resto de los valores se encuentran dentro de los permitidos, se espera que todos los compuestos del diseño presenten buena permeabilidad celular.

7.2 PARTE QUIMICA:

7.2.1 Síntesis química de los compuestos 1–5

En la **Tabla 6** se muestran algunas propiedades fisicoquímicas determinadas de los compuestos sintetizados, utilizando EtOH como disolvente.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Estado físico	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)
1	324.12	Sólido de color naranja	10	70.14	238-240
2	255.06	Sólido de color amarillo brillante	12	67.3	>300
3	306.99	Sólido de color amarillo intenso	38	90.78	>300
4	300.05	Sólido de color amarillo	9	88.98	>300
5	284.05	Sólido de color rojo	7	59.75	>300

Los resultados obtenidos en la síntesis química de los compuestos **1-5** fueron más favorables al utilizar EtOH como disolvente para llevar a cabo la reacción de condensación de aldehídos para la obtención del grupo bencimidazol, obteniendo rendimientos variables desde 55-90% en comparación con el uso de otros disolventes como acetona, DMF y acetonitrilo, los cuales presentaron un % de rendimiento menor que al utilizar EtOH. El uso de EtOH como disolvente también mostro mejores resultados en la obtención de un producto final puro, presentando menor cantidad de impurezas, en contraste con el uso de otros disolventes como: acetona, DMF y Acetonitrilo. Sin embargo, el tiempo requerido desde que la reacción dio inicio hasta su final, fue mayor utilizando EtOH como disolvente en comparación con los tiempos obtenidos al utilizar otros disolventes ya mencionados.

7.2.2 Caracterización química de los compuestos sintetizados

7.2.2.1 Caracterización estructural del compuesto 1 (2-(morfolin)-1H-5-nitrobencimidazol)

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN H^1) del compuesto **1**, se obtuvo con una frecuencia de 500 MHz, el cual confirma la estructura teórica propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. El disolvente utilizado fue DMSO deuterado (DMSO- d_6) el cual presenta una señal residual en $\delta=2.5$ ppm, también se encontró una señal $\delta=3.33$ ppm correspondiente a agua y por último se observa una señal en $\delta=3.44$ ppm correspondiente con restos de etanol (utilizado durante la síntesis). Se observa una señal sencilla a $\delta=8.38$ ppm que se atribuye al protón presente en el grupo imidazol (NH). Dentro del anillo benceno en el grupo de bencimidazol se observa una señal $\delta=8.08$ ppm el cual integra para dos protones con una constante de acoplamiento (J), $J_o = 8.8$ Hz y $J_m = 1.2$ Hz correspondientes a los protones H-4 y H-6 y una doble señal $\delta=7.67$ ppm que integra para un protón con una $J_o = 8.8$ Hz correspondiente al protón H-7. El anillo de benceno unido al grupo morfolina muestra señales en $\delta=8.03$ y $\delta=7.08$ ppm en las que se observan dos señales dobles en las que cada señal integra para dos protones (H-2', H-3', H-5' y H-6'). Por ultimo los protones correspondientes al anillo de morfolina se encuentran cubiertos por la señal emitida por el disolvente (H-7', H-8', H-9' y H-10'). Las asignaciones se muestran en la **Figura 19**.

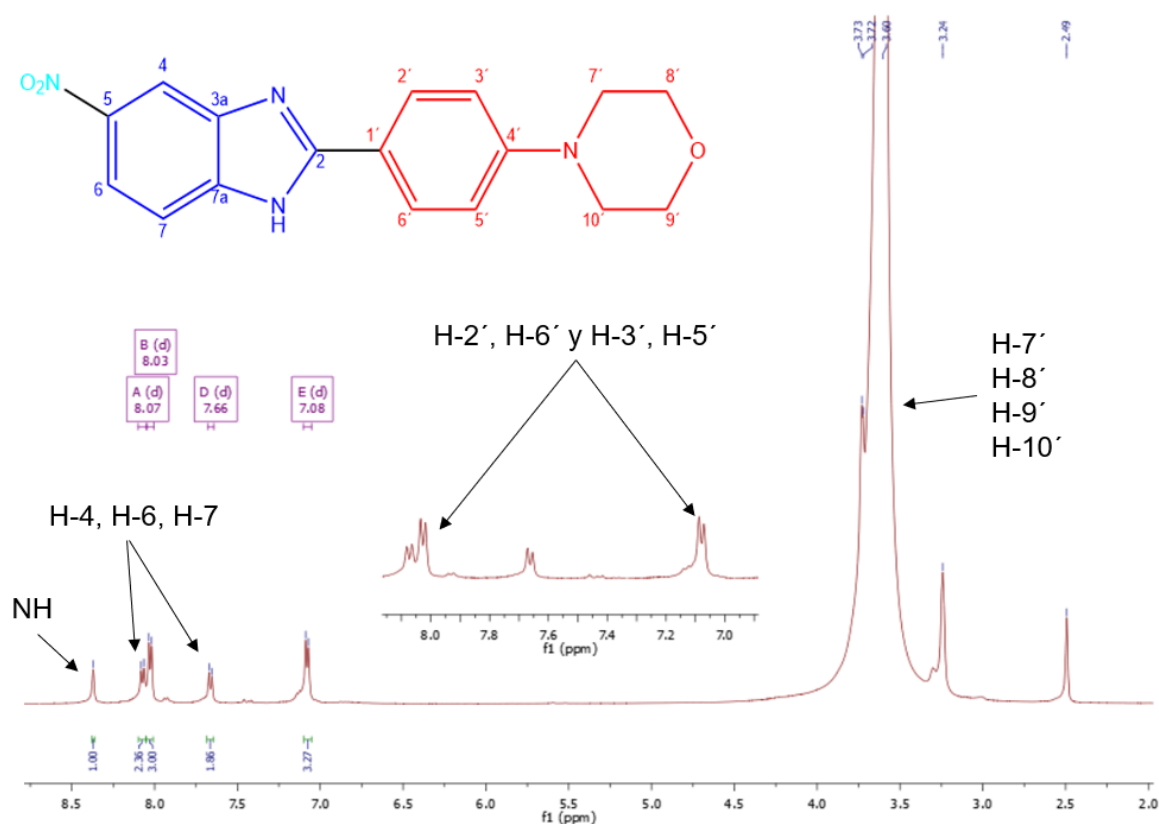


Figura. 19. Espectro de RMN H^1 del compuesto **1** adquirido en $DMSO-d_6$.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN C^{13}) del compuesto **1**, se obtuvo a una frecuencia de 125 MHz, el cual confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados, con la estructura propuesta.

Se observó una señal a $\delta=40.03$ ppm correspondiente con el disolvente $DMSO-d_6$, la siguiente señal aparece en $\delta= 47.62$ ppm la cual pertenece a dos carbonos ($C8'$ y $C9'$) próximos al átomo de oxígeno en el grupo morfolina, mientras que los carbonos próximos al átomo de nitrógeno en el grupo morfolina presentaron un $\delta=66.34$ ppm correspondientes a los carbonos ($C7'$ y $C10'$). Los carbonos pertenecientes al anillo de benceno (CH_2) unido al grupo morfolina presentaron desplazamientos en $\delta=114.72$ ppm para los carbonos ($C3'$ y $C5'$) próximos al enlace de $C4'$ con el grupo morfolina, mientras que los carbonos ($C2'$ y $C6'$) mostraron se encontraron $\delta=128.62$ ppm. Se encontraron dos señales de poca intensidad en $\delta=118.19$ ppm correspondiente con el $C7$, la cual está muy unida a la señal en $\delta=118.83$ ppm del $C6$ pertenecientes a grupos CH , en $\delta=142.76$ ppm

se tienen los carbonos C5 y C7a y por último en 153.14 ppm aparece el C2 unido a los nitrógenos del grupo bencimidazol. Las asignaciones se muestran en la **Figura 20**.

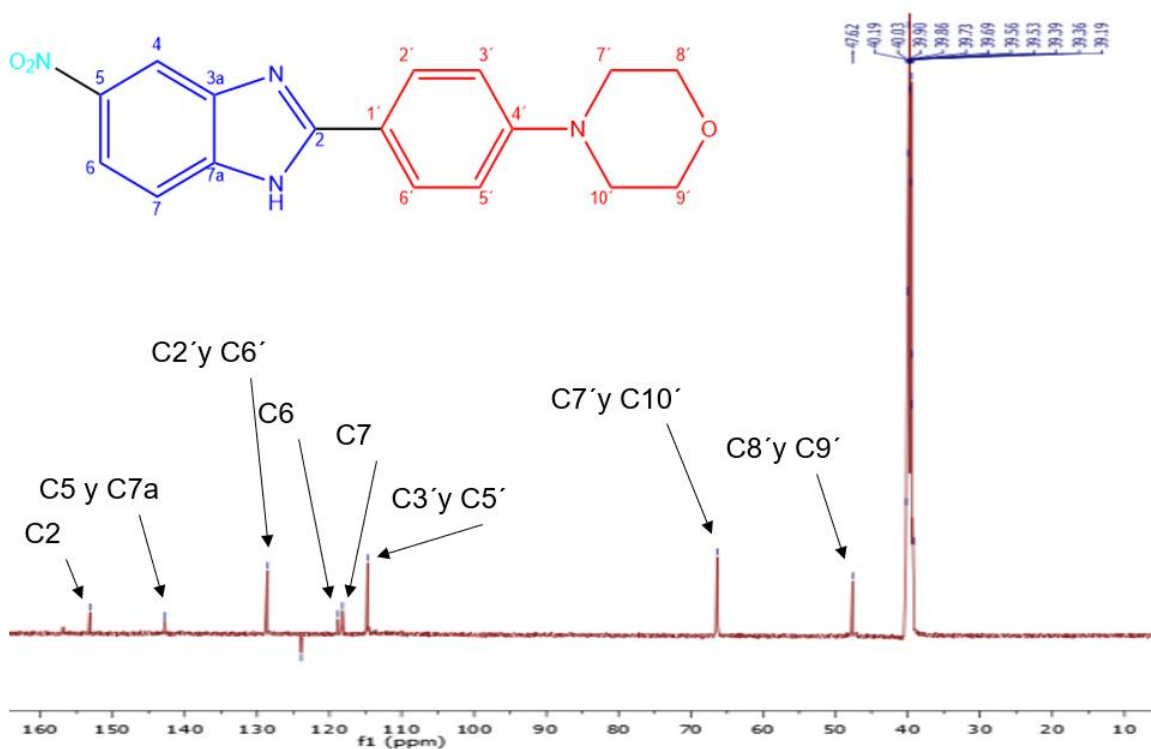


Figura. 20. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 1 adquirido en $DMSO-d_6$.

Para confirmar la estructura molecular del compuesto **1**, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo acoplada a una fuente de ionización por electrospray en modo positivo (ESI^+ -TOF-MS). En el espectro de masas se identificó un pico en m/z 325.12836, con una intensidad relativa de 3.22×10^5 , que corresponde al ion cuasimolecular $[M+H]^+$ del compuesto 1, cuyo peso molecular teórico es 324.12 g/mol. La diferencia no se asocia a la formación de aductos con la molécula debido a la diferencia en la m/z correspondiente con el ion esperado, lo que confirma la identidad de la molécula. Además, se identificó un pico secundario en m/z 326.13305, con una intensidad de 5×10^4 el cual puede ser atribuible a una variante isotópica del compuesto probablemente al isótopo de C^{13} , la presencia de señales de baja intensidad (inferiores al pico secundario), probablemente corresponden a trazas residuales, ruido o variantes isotópicas que no son representativas del compuesto mayoritario **Figura 21**.

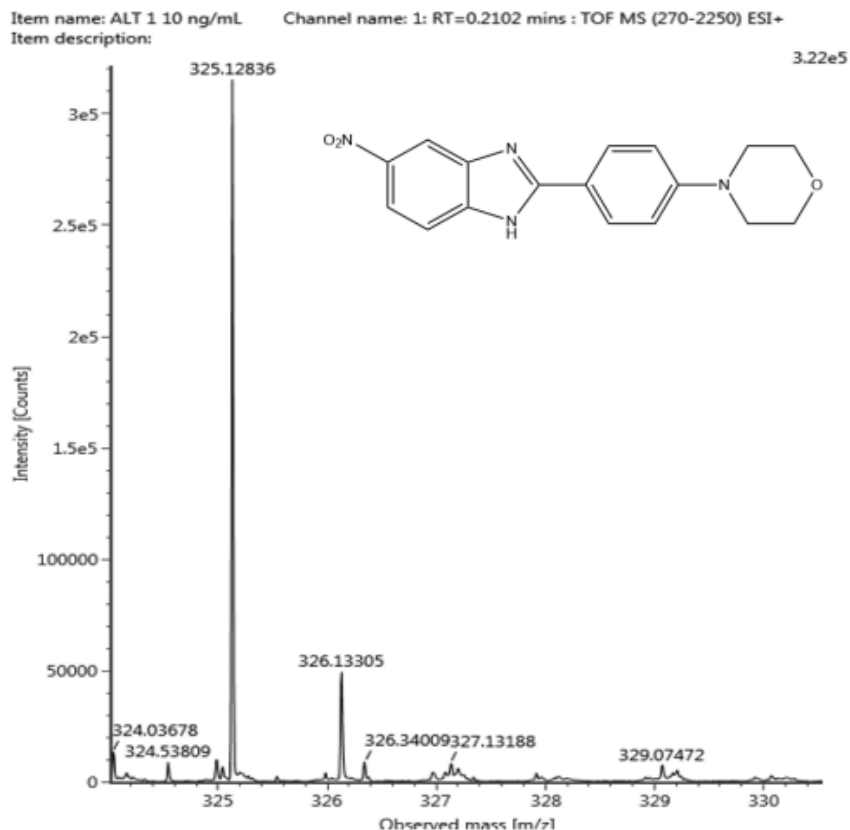


Figura. 21. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI⁺), mostrando el ion cuasimolecular [M+H]⁺ a m/z 325.12836, correspondiente con el compuesto 1.

La presencia de una señal predominante muestra un buen resultado obtenido en el proceso de síntesis química y una correcta purificación, sin la presencia de impurezas o agentes externos.

7.2.2.2 Caracterización estructural del compuesto 2 (2-(p-hidroxibencil)-1H-5-nitrobenzimidazol)

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) del compuesto **2** se obtuvo con una frecuencia de 300 MHz, el cual confirma la estructura teórica propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. El disolvente utilizado fue DMSO-d₆ el cual presenta una señal residual en δ=2.5 ppm, también se encontró una señal δ=3.44 ppm correspondiente con restos de etanol utilizado durante la síntesis del compuesto. Se observa una señal sencilla a δ=13.35 ppm que se atribuye al

protón presente en el grupo imidazol (NH), siguiendo en campo bajo se encontró una señal doble con $\delta=10.18$ ppm correspondiente con el protón del grupo hidroxilo (OH). Se observan tres señales simples continuas, la primera en $\delta=8.47$ ppm correspondiente con H-4, la segunda señal se observa $\delta=8.30$ ppm correspondiente a H-6 y la tercera señal aparece en $\delta=8.11$ ppm atribuido al protón H-7, estas señales simples son atribuidos al sistema de protones en el bencimidazol. El sistema unido al bencimidazol (fenol) tiene el grupo OH orientado en posición *p*- por lo que el sistema presenta simetría, mostrando múltiples señales dobles, la primera en $\delta=8.05$ ppm y la segunda en $\delta=7.76$ ppm con $J_o=8.4$ y 8.5 Hz, las cuales pertenecen al mismo sistema de protones, atribuidos a H-2' y H-6' y H-5' y H-6', la tercera y cuarta señal aparecen en $\delta=7.65$ ppm y $\delta=6.95$ ppm, con $J_o=8.8$ y 8.7 Hz, pertenecientes a los protones H-3' y H-5'. Cabe mencionar que el experimento se realizó con una frecuencia de 300 MHz por lo que puede haber señales solapadas, debido a que no hubo un buen desdoblamiento de las señales por la baja resolución. Las asignaciones se muestran en la **Figura 22**.

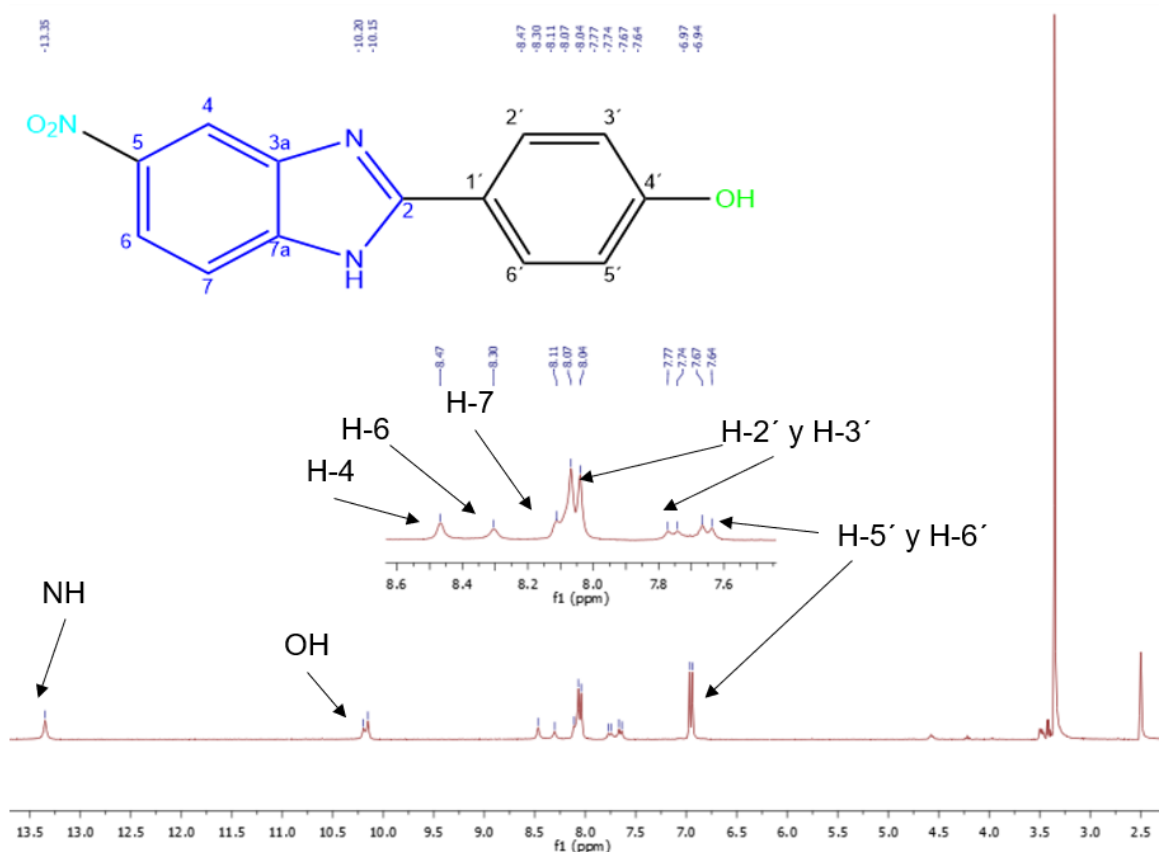


Figura. 22. Espectro de RMN H¹ del compuesto 2 adquirido en DMSO-d₆.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN C^{13}) del compuesto **2**, se obtuvo a una frecuencia de 700 MHz, el cual confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados, con la estructura propuesta, sin embargo, también se observaron señales correspondientes a subproductos de la reacción por lo que para la asignación de los carbonos se tomaron a consideración los valores obtenidos en espectros de otros compuestos, debido a que comparten grupos similares como O-nitro-bencimidazol.

Se observó una señal a $\delta = 40.1$ ppm correspondiente con el disolvente DMSO- d_6 . La primera señal aparece a $\delta = 160.55$ asignado a $C4'$ el cual muestra una señal doble atribuida a un acoplamiento de larga distancia con el protón del grupo hidroxilo. La siguiente señal aparece $\delta = 156.34$ ppm asignado a $C2$, en $\delta = 149.36$ ppm se asignó $C5$, la señal en $\delta = 143.76$ ppm se asignó a $C3a$, la siguiente señal en $\delta = 140.39$ ppm asignada a $C7a$, en $\delta = 129.27$ ppm se muestra una señal de gran intensidad debido a la simetría de los carbonos $C2'$ y $C6'$, la siguiente señal en $\delta = 120.37$ ppm se asignó a $C1'$, la siguiente señal aparece en $\delta = 118.27$ ppm asignado a $C6$ la cual es una señal que siempre se ha encontrado entre señales de carbonos simétricos del grupo bencil, la siguiente señal aparece con la mayor intensidad en el espectro en $\delta = 116.45$ ppm asignado para los carbonos simétricos restantes $C3'$ y $C5'$, las señales restantes aparecen en $\delta = 114.66$ ppm asignado a $C4$ y en $\delta = 111.71$ ppm asignado a $C7$, los cuales han mostrado aparecer después del sistema de electrones simétricos del grupo bencil. El resto de las señales detectadas son atribuidas a la presencia de subproductos en el proceso de síntesis debido a la naturaleza de la materia prima y al uso de EtOH como disolvente práctico lo cual pudo dar origen a subproductos que no fueron tratados correctamente en el proceso de purificación debido a que, por la naturaleza de los subproductos, no fueron perceptibles mediante el monitoreo por TLC. Las asignaciones se muestran en la **Figura 23**.

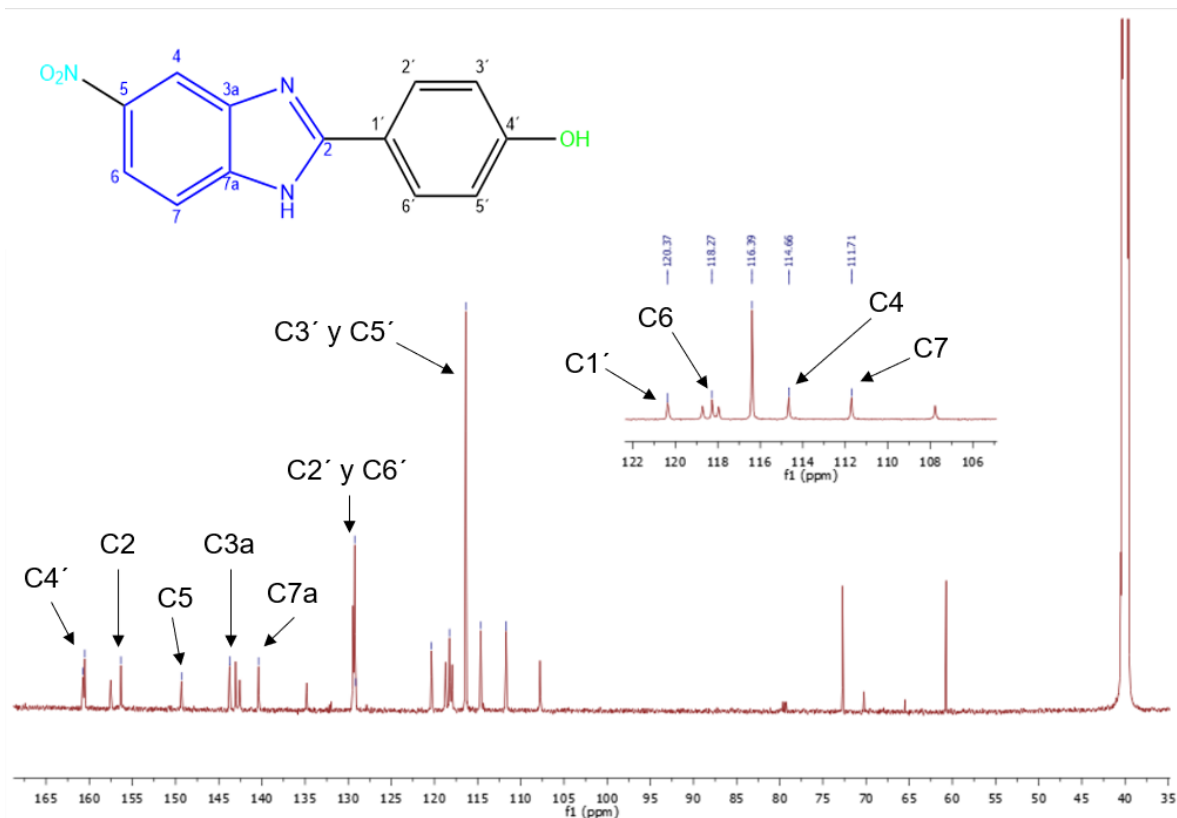


Figura. 23. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 2 adquirido en $DMSO-d_6$.

7.2.2.3 Caracterización estructural del compuesto 3 (2-(3,5-diclorobencil)-1H-5-nitrobenzimidazol)

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN H^1) del compuesto **3** se obtuvo con una frecuencia de 500 MHz, el cual confirma la estructura teórica propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. El disolvente utilizado fue cloroformo- d el cual presenta una señal residual en $\delta=7.26$ ppm y también se encontró una señal a $\delta=1.56$ ppm correspondiente con restos de agua utilizada durante la síntesis del compuesto. Se observa una señal sencilla a $\delta=8.57$ ppm que se atribuye al protón H-4' el cual es desapantallado por los cloros presentes en la estructura, la siguiente señal muestra un doble de dobles en $\delta=8.05$ ppm con una $J_o=8.8$ y 2.4 Hz, correspondiente con el protón H-6 en el benzimidazol, posteriormente se observan cuatro señales dobles, la primera señal muestra un doble en $\delta=8.03$ ppm con una $J_m=2.4$ Hz, indicando que pertenece al sistema anterior, el cual corresponde al protón H-4, la segunda y tercer señal doble aparecen en $\delta=7.81$

ppm y en $\delta=7.5$ ppm con una $J_m=1.8$ y 1.9 Hz, atribuidos a los protones H-2' y H-6', la cuarta señal doble aparece en $\delta=6.74$ ppm con una $J_o=8.8$ Hz indicando que pertenece al sistema de bencimidazol, el cual corresponde al protón H-7, por último se aprecia una señal simple en $\delta=5.02$ ppm el cual corresponde con el protón del grupo amino (NH) del bencimidazol. Las asignaciones se muestran en la **Figura 24**.

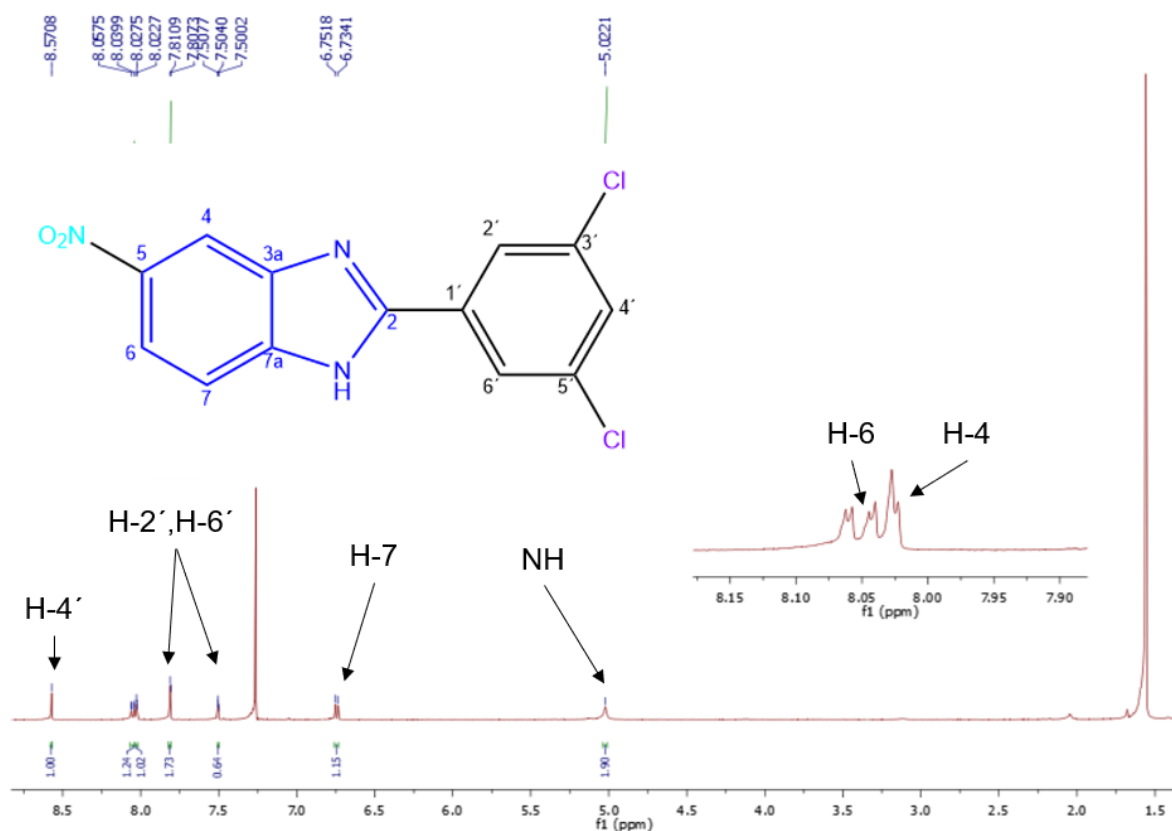


Figura. 24. Espectro de RMN H^1 del compuesto **3** adquirido en cloroformo-d.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN C^{13}) del compuesto **3**, se obtuvo a una frecuencia de 125 MHz, el cual confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados, con la estructura propuesta.

Se observó una señal a $\delta=77.06$ ppm correspondiente con el disolvente cloroformo-d. Las tres primeras señales corresponden a los carbonos del grupo bencil, la primera señal aparece en $\delta=156.76$ ppm asignada al carbono C4', la siguiente señal aparece en $\delta=131.70$ ppm el cual corresponde al C2' y la última señal aparece en $\delta=127.53$ ppm correspondiente con C6'. Las señales restantes

corresponden a carbonos en el grupo bencimidazol, la primera se encontró en $\delta = 125.07$ ppm la cual corresponde a C6, las últimas dos señales se encontraron muy próximas entre sí, la primera en $\delta = 113.7$ ppm correspondiente con C7 y en $\delta = 113.3$ ppm se asignó a C4. Aunque la estructura teórica contiene 13 C en su estructura solo se identificaron 6 señales en el espectro debido a que los carbonos restantes son cuaternarios y no presentan enlaces con protones, por lo que tienen una señal muy débil. Sin embargo, las señales mostradas corroboran enlace con los hidrógenos correspondientes en el espectro de protón por lo que se confirma que la estructura es la planteada. Las asignaciones se muestran en la **Figura 25**.

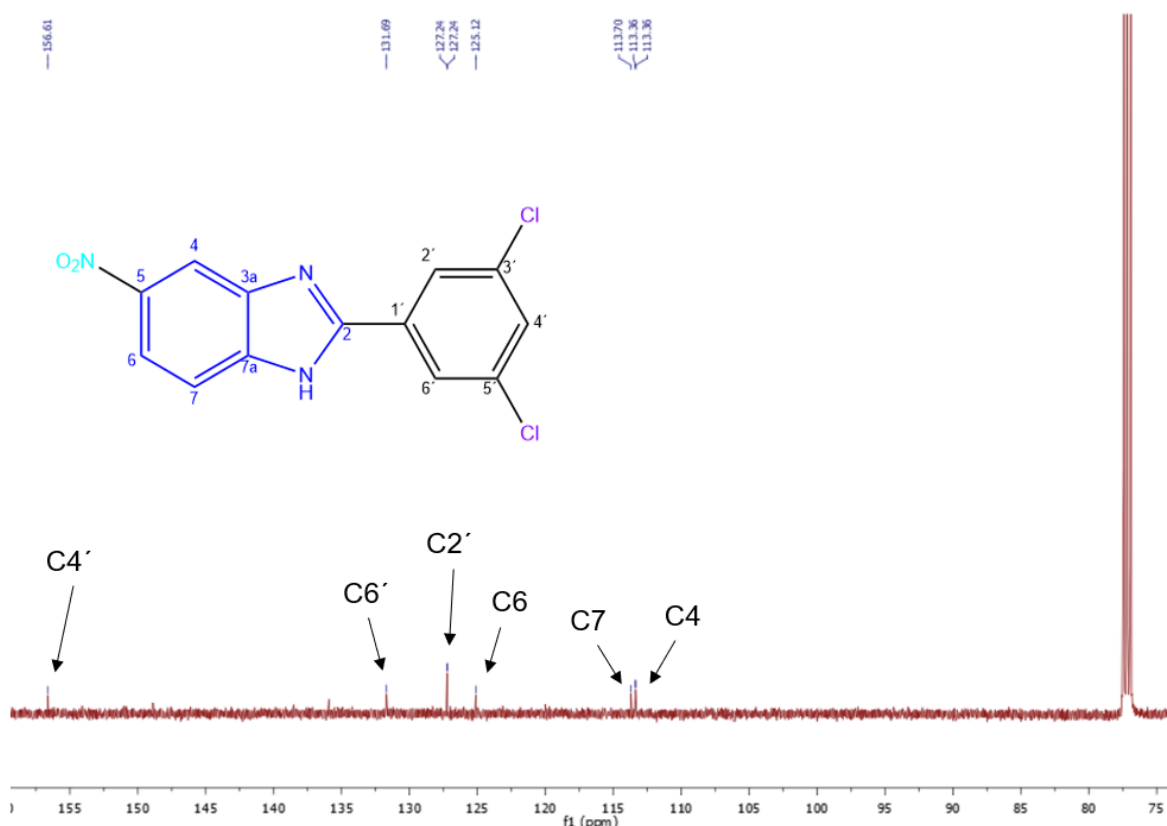


Figura. 25. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d.

7.2.2.4 Caracterización estructural del compuesto 4 (2-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)-1H-5-nitrobenzimidazol)

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN H^1) del compuesto **4** se obtuvo con una frecuencia de 400 MHz, el cual confirma la estructura teórica

propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. El disolvente utilizado fue DMSO- d_6 el cual presenta una señal residual en $\delta=2.5$ ppm, también se encontraron señales residuales $\delta=1.06$ ppm y en $\delta=3.33$ ppm correspondientes con restos de etanol y agua utilizada durante la síntesis del compuesto. La primera señal se observa en $\delta=11.34$ ppm con una señal característica de los grupos amino (NH) posteriormente se identificó una señal doble en $\delta=9.06$ ppm con una $J_m=3$ Hz atribuida al protón H-4', la señal siguiente mostro una señal doble en $\delta=8.56$ ppm con una $J_p=0.4$ Hz, un valor tan bajo se atribuye a un constante de un sistema *p*- por lo que se le atribuye a los protones H-6' y H-8', la siguiente señal se identificó como un doble de dobles en $\delta=8.11$ ppm con una $J_o=8.9$ y $J_m=2.3$ Hz, dicha señal de doble de dobles ha sido consistente en la elucidación de los compuestos anteriores para señales de protones en el grupo bencimidazol, el cual es atribuido al protón H-6, la siguiente señal fue a $\delta=7.79$ ppm con una $J_o=8.9$ Hz, indicando que pertenece al mismo sistema de bencimidazol, el cual se atribuye al protón H-7. El protón H-4 debido a que pertenece al mismo sistema en grupo de bencimidazol, se espera una constante de acoplamiento *m*- con un valor de 2.3 Hz al pertenecer al mismo sistema, la falta de visibilidad de la señal probablemente se deba a un desdoblado incorrecto de la señal y podría encontrarse solapada en la señal de doble de dobles, por lo que se tendría que aumentar la resolución para una mejor visualización. Por último, se encontró una señal doble a $\delta=6.87$ ppm con una $J_o=9.2$ Hz el cual se atribuye al protón del grupo OH. Las asignaciones se muestran en la **Figura 26**.

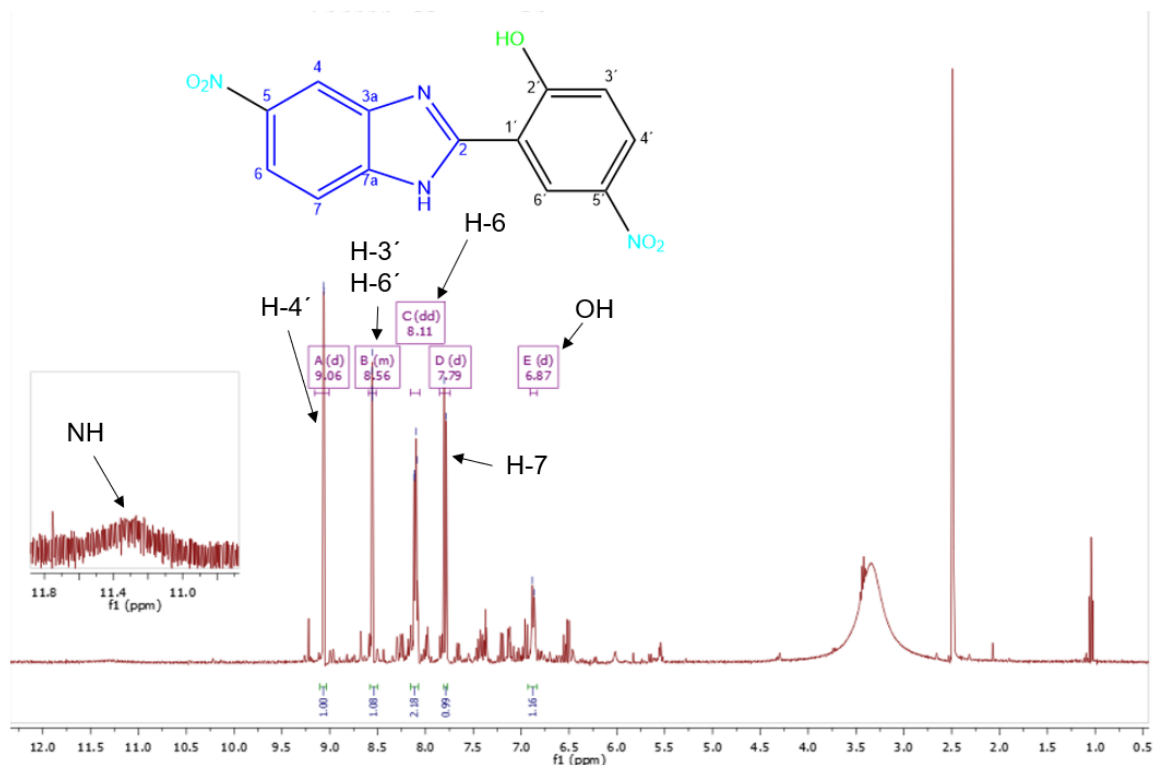


Figura. 26. Espectro de RMN ^1H del compuesto **4** adquirido en DMSO-d_6 .

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN C^{13}) del compuesto **4**, se obtuvo a una frecuencia de 100 MHz. Se observó una señal a $\delta = 40.18$ ppm correspondiente con el disolvente DMSO-d_6 . La estructura planteada presenta 13 átomos de carbono en su estructura, sin embargo, solo se visualizan 6 señales en el espectro, lo cual puede atribuirse a una baja resolución en la obtención del espectro y la presencia de carbonos cuaternarios ocasionando intensidades de señal muy bajas, las cuales no fueron perceptibles. La asignación se realizó en base a los desplazamientos de la molécula y los espectros de otros compuestos. La primera señal aparece en $\delta = 142.99$ ppm el cual es asignado a los carbonos C5 y/o C5' debido a que ambos son carbonos cuaternarios unidos a un grupo nitro, la siguiente señal aparece a $\delta = 127.94$ ppm asignada al C4', una señal próxima aparece en $\delta = 125.75$ ppm asignado a C6' en el grupo bencil. Las señales siguientes fueron asignadas a los carbonos del grupo bencimidazol, comenzando en $\delta = 120.47$ ppm se asignó a C6, la señal en $\delta = 118.37$ ppm se asignó a C4 y por último la señal en $\delta = 114.36$ ppm se asignó a C7. Las asignaciones se muestran en la **Figura 27**.

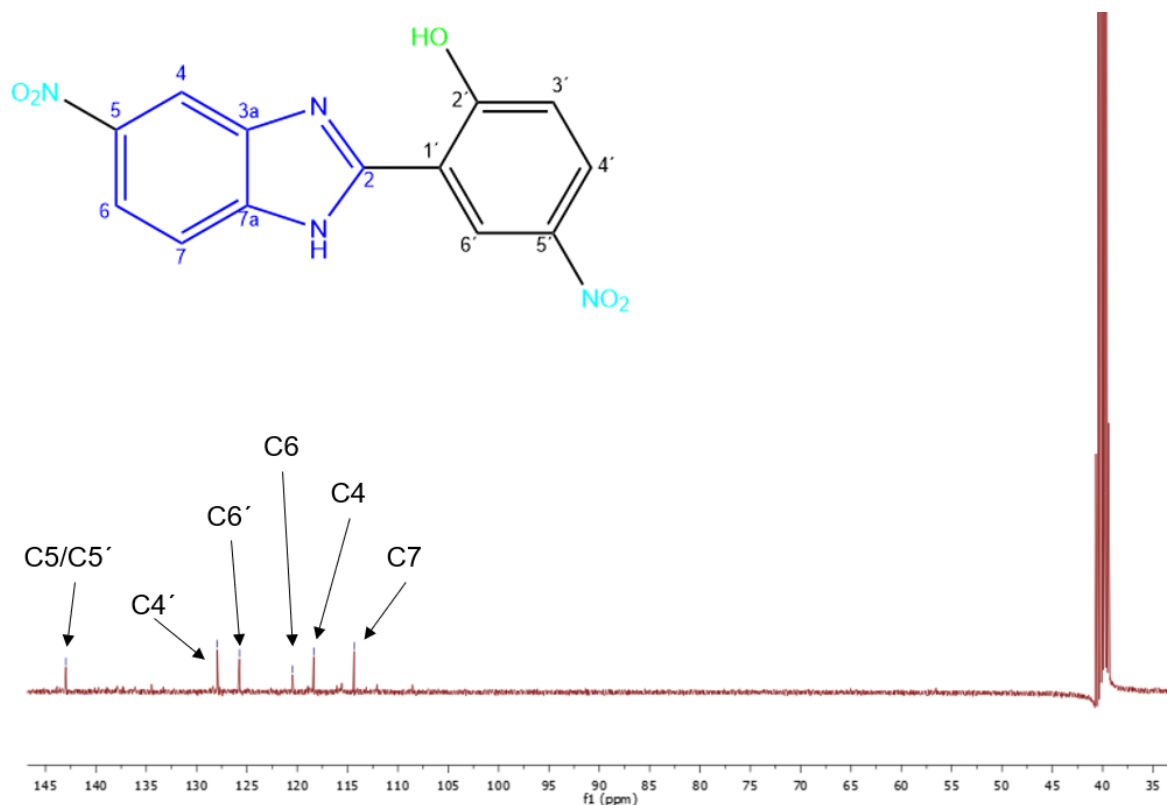


Figura. 27. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 4 adquirido en DMSO- d_6 .

7.2.2.5 Caracterización estructural del compuesto 5 (2-(p-nitrobencil)-1H-5-nitrobenzimidazol)

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón del compuesto **5** se obtuvo con una frecuencia de 400 MHz el cual confirma la estructura propuesta al mostrar señales consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. El disolvente utilizado fue DMSO- d_6 el cual presenta una señal residual en $\delta=2.5$ ppm, también se encontraron señales residuales en $\delta=3.33$ ppm correspondientes con restos de agua utilizada durante la síntesis del compuesto. La primer señal se identificó como simple en $\delta=9.3$ ppm asignada al protón del grupo amino NH, la siguiente señal de igual manera se identificó como una simple en $\delta=8.36$ ppm con una gran intensidad, la cual se asignó a los protones del sistema bencil debido a que presentan simetría para los protones H-3' y H-5', la siguiente señal se identificó como una señal doble en $\delta=8.16$ ppm con una $J_m=2.5$ Hz, la cual se asignó al protón H-4, la señal siguiente se identificó como un señal de doble de

dobles en $\delta=7.97$ ppm con una $J_o=9$ y $J_m=2.5$ Hz por lo que pertenece al sistema de bencimidazol, asignándose al protón H-6, la señal siguiente fue una señal simple de baja intensidad a $\delta=6.93$ ppm la cual se asignó a los protones restantes del sistema simétrico en el bencil, correspondientes con los protones H-2' y H-6', la última señal encontrada fue una señal doble en $\delta=6.81$ ppm con una $J_o=9.1$ Hz, la cual es muy similar al sistema de bencimidazol y se atribuye al protón H-7 que completa el número de protones en la estructura. Las asignaciones se muestran en la **Figura 28**.

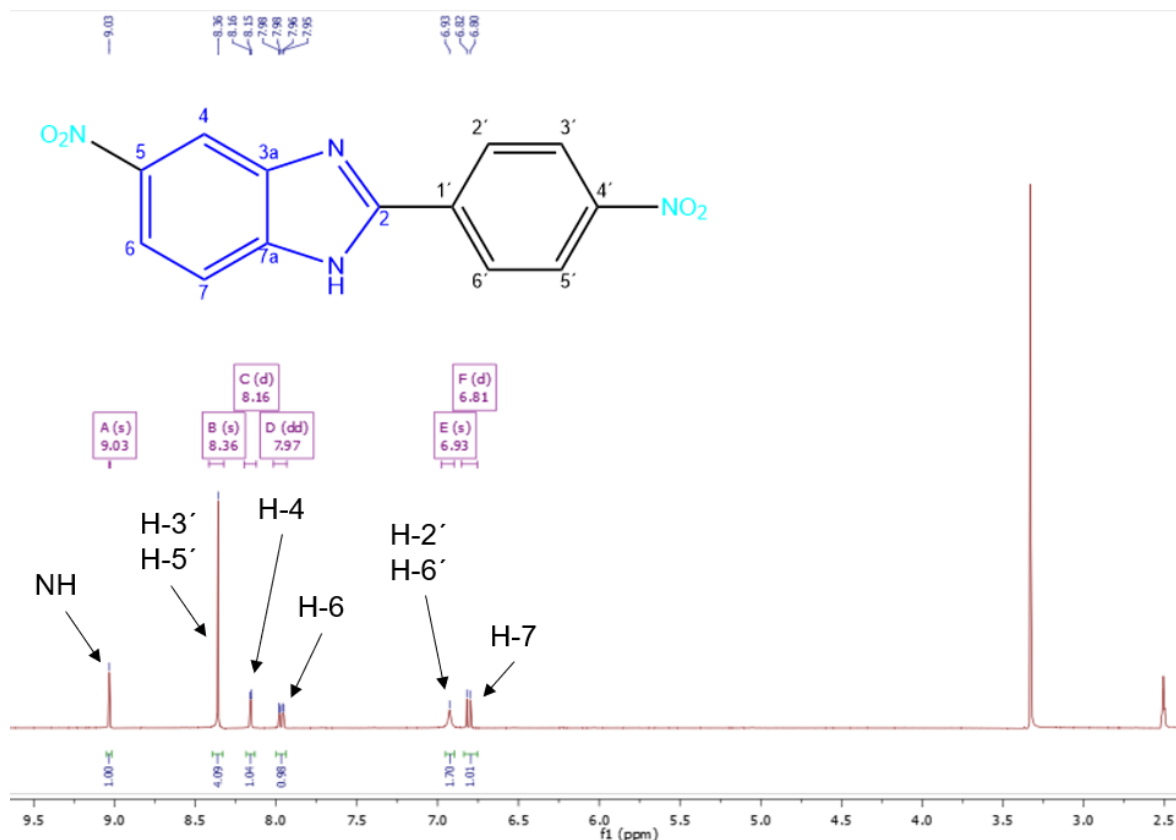


Figura. 28. Espectro de RMN H¹ del compuesto 5 adquirido en DMSO-d₆.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN C¹³) del compuesto **5**, se obtuvo a una frecuencia de 100 MHz. Se observó una señal a $\delta=40.18$ ppm correspondiente con el disolvente DMSO-d₆. Debido a que la estructura presenta simetría en el grupo bencil, dos pares de carbonos muestran dos señales en vez de cuatro debido a la simetría que presentan, por lo que se espera visualizar 11 señales en el espectro, las cuales confirman la estructura del

compuesto. La primera señal aparece en $\delta = 158.06$ ppm correspondiente con C2 debido a la unión directa con los átomos de nitrógeno en el anillo de bencimidazol, las señales en $\delta = 151.99$ y 149.36 ppm corresponden a C4' y C5 respectivamente debido a la unión con los grupos nitro, posteriormente las señales en $\delta = 142.24$ y 136.44 ppm fueron asignadas a C3a y C7a en el anillo de bencimidazol, la siguiente señal en $\delta = 133.32$ ppm corresponde con C1' del grupo bencil, se identificó una señal intensa en $\delta = 130.65$ ppm correspondiente a los carbonos simétricos C2' y C6', en $\delta = 125.59$ ppm se asignó C6, en $\delta = 124.32$ ppm se visualizó una señal con la misma intensidad que la reportada anteriormente, la cual fue asignada al par de carbonos simétricos C3' y C5', por último se encontraron dos señales muy unidas y casi continuas en $\delta = 113.94$ y 113.78 ppm correspondientes con C4 y C7 del anillo de bencimidazol. Las asignaciones se muestran en la **Figura 29**.

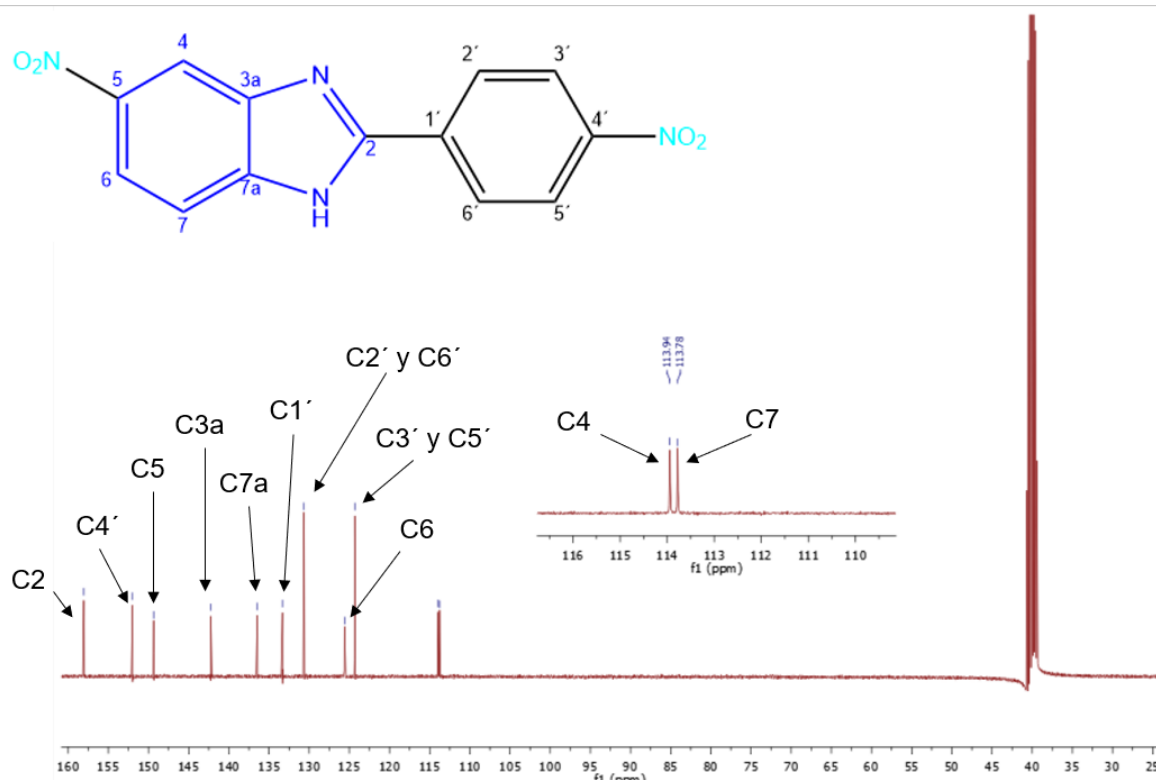


Figura. 29. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 5 adquirido en DMSO- d_6 .

Para confirmar la estructura molecular de los compuestos **2-5**, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo acoplada a una

fuelle de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺-TOF-MS). Sin embargo, no fue posible la detección de los compuestos, esto posiblemente debido a los grupos químicos en las estructuras como Cl, N, O, H, no ionizan tan fácilmente, otro aspecto a considerar son los puntos de fusión de los compuestos, ya que, el compuesto 1, tuvo un punto de fusión <250°C, mientras que los compuestos 2 a 5 no pudieron ser determinados, presentando valores de punto de fusión superiores a los 300°C por lo que son compuestos con baja volatilidad y no se vaporizan de manera adecuada en el sistema para inducir la muestra. Esto plantea la necesidad de recurrir a otra técnica de espectrometría de masas (EM) como impacto electrónico o ionización química.

7.3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

7.3.1 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*

El ensayo de toxicidad aguda utilizando concentraciones de 1, 10, 25, 50, 70, 85 y 100 µM de cada compuesto sintetizado y evaluado sobre nauplios de *Artemia salina* para determinar el % de mortalidad, los resultados se muestran en la **Figura 30**.

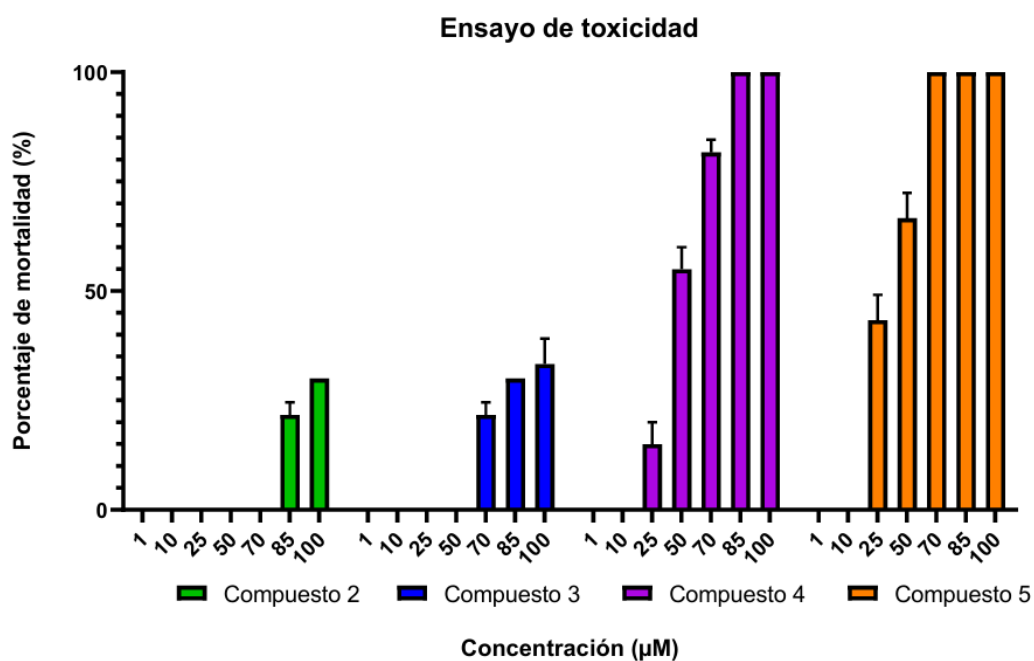


Figura. 30. Ensayo de toxicidad de los compuestos 2 a 5 “% de mortalidad vs Log de la concentración” utilizando el modelo de artemia salina.

Los resultados en la evaluación del compuesto **1** no mostraron valores de mortalidad en ninguna de las concentraciones utilizadas por lo que no se incluyó en la **Figura 30**. Los compuestos **4** y **5** son los compuestos que presentaron los valores de mortalidad más altos de toda la serie de compuestos sintetizados, mostrando valores de mortalidad desde una concentración de 25 μM .

Los valores de la CL_{50} y UT fueron determinadas para cada compuesto y se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla. 7. Clasificación de la toxicidad de cada compuesto en base a la CL_{50} y UT.

Compuesto	CL_{50} (μM)	Unidades de toxicidad (UT)	Categoría de toxicidad (1 – 5)
1	-	-	1
2	158.36	0.6314	2
3	148.52	0.6732	2
4	36.85	2.7135	3
5	29.61	3.3768	3

Categoría 1: No presenta toxicidad aguda, categoría 2: ligera toxicidad aguda, categoría 3: toxicidad aguda, categoría 4: alta toxicidad aguda y categoría 5: muy alta toxicidad aguda.

El compuesto **1** no presentó niveles de mortalidad bajo ninguna de las concentraciones utilizadas, por lo que no pudo ser determinado el valor de la CL_{50} y las UT, por lo que se categorizo como clase 1.

El compuesto **2** y **3** presentaron valores similares en la CL_{50} y en las UT, compartiendo la misma categoría, siendo ambos clase 2.

Los compuestos **4** y **5** mostraron los valores de CL_{50} más bajos, lo que se relaciona directamente con su toxicidad, ya que ambos compuestos presentaron los valores más elevados de UT, siendo el compuesto **5** el que mostro los valores más elevados, siendo el compuesto más tóxico de todos los evaluados. Ambos compuestos fueron categorizados como clase 3, presentando toxicidad aguda.

Los resultados de actividad antibacteriana del compuesto **4** muestran que la CMI y CMB requiere de una concentración mínima de 7.8 µg/mL para presentar actividad antibacteriana, dichos valores son inferiores a los reportados para determinar la CL₅₀, por lo que a pesar de ser clase 3, el compuesto no alcanza los valores de concentración necesaria para presentar toxicidad.

7.3.2 Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos 1-5

Se evaluó la actividad antibacteriana de los compuestos frente a bacterias del grupo ESKAPE-E, las cuales son relevancia clínica, con la finalidad de identificar si los compuestos sintetizados presentan un espectro amplio de actividad biológica. La evaluación fue realizada en la Unidad Médica de Alta Especialidad en el Hospital de Especialidades CMN Ignacio García Téllez, en colaboración con la Dra. Gloria Molina Salinas. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla. 8. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericida (CMB) de los compuestos 1-5 frente a bacterias del grupo ESKAPE-E.

	CMI/CMB (µg/mL)					
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Compuesto	ATCC 700221	ATCC 43300	ATCC 2146	ATCC BAA-1605	ATCC 35032	ATCC 35218
	MDR, VRE	MDR, MRSA	MDR, CBRE, ESβL	XDR, CBRE	MDR, CBRE	CBSU, βL
C1	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB
C2	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB
C3	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB
C4	NA/NB	7.8/125	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB
C5	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB	NA/NB

NA: no activo a 125 µg/mL; NB: no bactericida a 125 µg/mL. VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci; MDR: Multi-Drug-Resistant; MRSA: Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus; CBSU: Carbapenem-Susceptible; CBRE: Carbapenem-Resistant, ESβL: Extended Spectrum Beta-lactamase; βL: beta-Lactamase.

Los resultados mostraron que solo el compuesto **4**, presenta actividad inhibitoria y bactericida frente a *Staphylococcus aureus* MDR y MRSA en concentraciones de 7.8 y 125 µg/mL respectivamente, por lo que se realizó una segunda prueba para la evaluación del compuesto **4**, utilizando cepas de *S. aureus* para determinar la CMI₅₀ y CMB del compuesto **Tabla 9**.

Tabla. 9. Concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) y bactericida del compuesto 4 sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

Compuesto	Efecto	ATCC 43300	UIMY-SAU-1	UIMY-SAU-11	UIMY-SAU-44
		MRSA, MDR	MRSA, MDR, VISA	MRSA, MDR, VSSA	MRSA, MDR, VRSA
C4	CMI ₅₀	2.11±0.35	17.32±0.19	5.46±0.44	6.21±0.42
	CMB	125	NB	62.5	NB

CMI₅₀ (Concentración mínima inhibitoria 50%) y CMB en µg/mL; values $\bar{x} \pm SD$; NB: no bactericida a 125 µg/mL; MDR: Multi-Drug-Resistant; MRSA: Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; VSSA: Vancomycin-Susceptible *Staphylococcus aureus*; VISA: Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*; VRSA: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Los resultados mostraron que el compuesto **4** mantiene actividad bactericida frente a dos cepas de *S. aureus*, por concentraciones inferiores a 125 µg/mL. La estructura química del compuesto **4** y **5**, contiene dos grupos nitro, los cuales difieren en la posición del grupo nitro en el grupo bencil, además el compuesto **4** integra un grupo hidroxilo (OH) a diferencia del compuesto **5**, por lo que la actividad puede deberse a la orientación del grupo nitro y alguna interacción con el grupo OH.

La ausencia de actividad antibacteriana de los compuestos **1**, **2**, **3** y **5**, no indica que no presenten actividad, ya que hay que recordar que los compuestos **1-5** fueron diseñados en base a la estructura de fármacos utilizados en el tratamiento de TB, de manera que su blanco es sobre MTB. Sin embargo, la presencia de grupos químicos como: bencimidazol, grupos nitro y su bajo peso molecular puede brindar una ventaja al favorecer el paso de los compuestos en la membrana de otros microorganismos, por lo que la evaluación permite identificar si existe un mayor espectro de actividad de los compuestos, como es el caso del compuesto **4**.

7.4 PARTE COMPUTACIONAL

7.4.1 Acoplamiento e interacciones moleculares de pretomanid y los compuestos 1 a 5 con la enzima Ddn

Los valores obtenidos de ΔG fueron determinados al realizar el acoplamiento molecular con el programa AutoDock mientras que los valores de HA fueron determinados con el programa SwissADME para cada uno de los compuestos, los cuales se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla. 10. Parámetros del acoplamiento molecular entre los fármacos de referencia y los compuestos sintetizados con la enzima Ddn.

Compuesto	Formula	ΔG (kcal/mol)	HA	LE
Pretomanid	$C_{14}H_{12}F_3N_3O_5$	-7.36	25	0.29
Delamanid	$C_{25}H_{25}F_3N_4O_6$	-5.44	38	0.14
1	$C_{17}H_{16}N_4O_3$	-6.74	24	0.28
2	$C_{13}H_9N_3O_3$	-6.59	19	0.35
3	$C_{13}H_7Cl_2N_3O_2$	-7.97	20	0.40
4	$C_{13}H_8N_4O_5$	-7.65	22	0.35
5	$C_{13}H_8N_4O_4$	-7.36	21	0.35

Los resultados obtenidos de los compuestos de referencia (pretomanid y delamanid) muestran que pretomanid es el fármaco con mayor afinidad en el sitio blanco de la enzima Ddn. El valor de LE de pretomanid fue inferior a los valores deseables (0.30), lo cual indica una buena relación entre la interacción con el sitio blanco y el tamaño del ligando, sin embargo, valores inferiores no son determinados como resultados negativos, debido a que esto puede variar en cada fármaco y cabe mencionar que es el fármaco de referencia aprobado para su venta. En el caso de delamanid, muestra valores inferiores a los de pretomanid, por lo que se tomó a pretomanid como el fármaco de referencia para comparar con los compuestos sintetizados, debido a que los resultados de los compuestos sintetizados mostraron ser más óptimos que delamanid y las imágenes del acoplamiento molecular y sus interacciones no se incluyeron.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones de pretomanid con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 31**. Pretomanid mostro diversas interacciones en el sitio blanco, como enlaces por puentes de hidrogeno con Lys43, Ile44 y Gly80 e interacciones de tipo π - π apiladas con Tyr65 y Tyr130 en el grupo bencil de pretomanid, así como interacciones alquilo y π - alquilo con Tyr136 e interacción con halógenos (flúor) F42201.

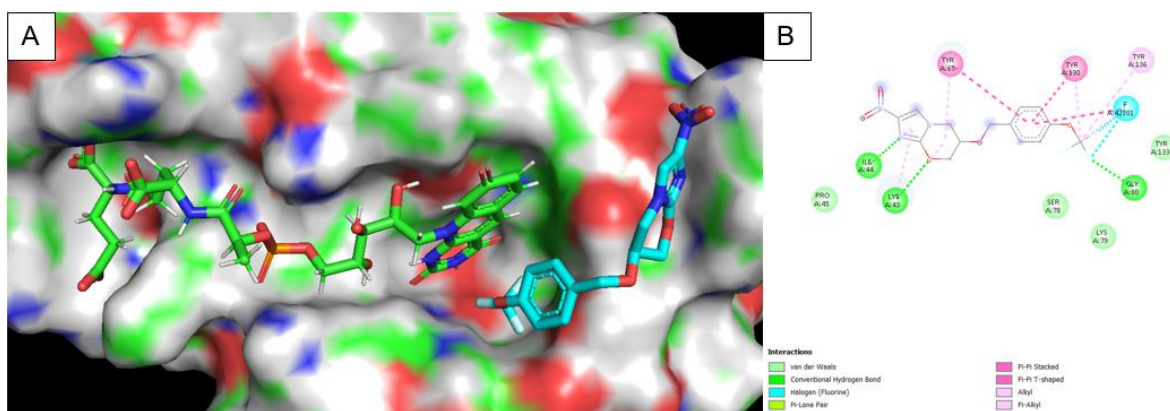


Figura. 31. A. Visualización 3D de pretomanid (azul) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D de pretomanid y sus interacciones.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **1** con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 32**. El compuesto **1**, presenta una doble interacción π - π apiladas con Tyr65 en el anillo de bencimidazol, un enlace mediante puente de hidrogeno con Tyr130 con hidrogeno del grupo amino en el bencimidazol y una interacción alquilo con Lys79 con el grupo morfolina.

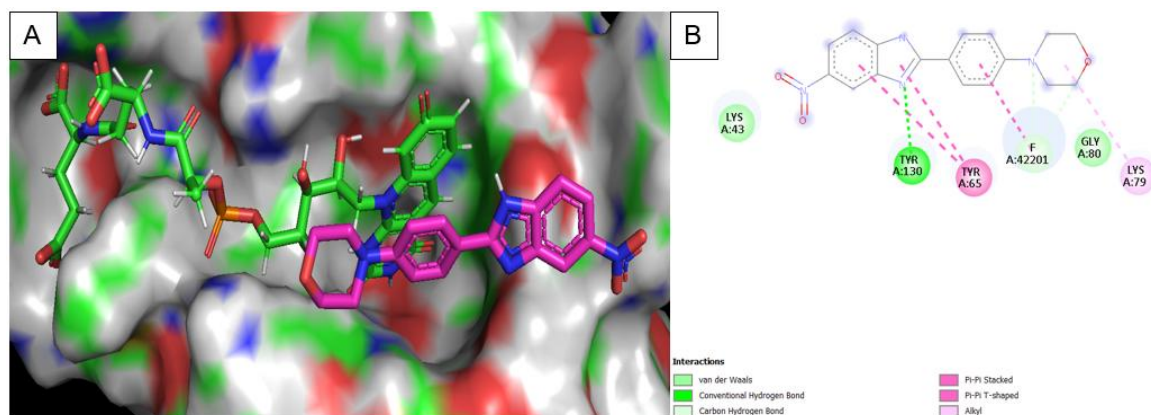


Figura. 32. A. Visualización 3D de compuesto 1 (rosa) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 1 y sus interacciones.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **2** con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 33**. El compuesto **3** presenta múltiples enlaces de puentes de hidrógeno con Lys43 con el grupo nitró del bencimidazol, Ser78 y Gly80 con el grupo hidroxilo y Tyr130 con el grupo amino del bencimidazol, se identificaron interacciones π -donadores para puentes de hidrógeno con Tyr65 y Lys79 e interacciones π - π apiladas con Tyr136 en el grupo bencilo e interacciones de tipo π - π apiladas con F42201. La presencia de interacciones π -donadores para enlaces de hidrógeno pese a ser más débiles que los enlaces de hidrógeno convencionales, aumenta las interacciones con el sitio catalítico.

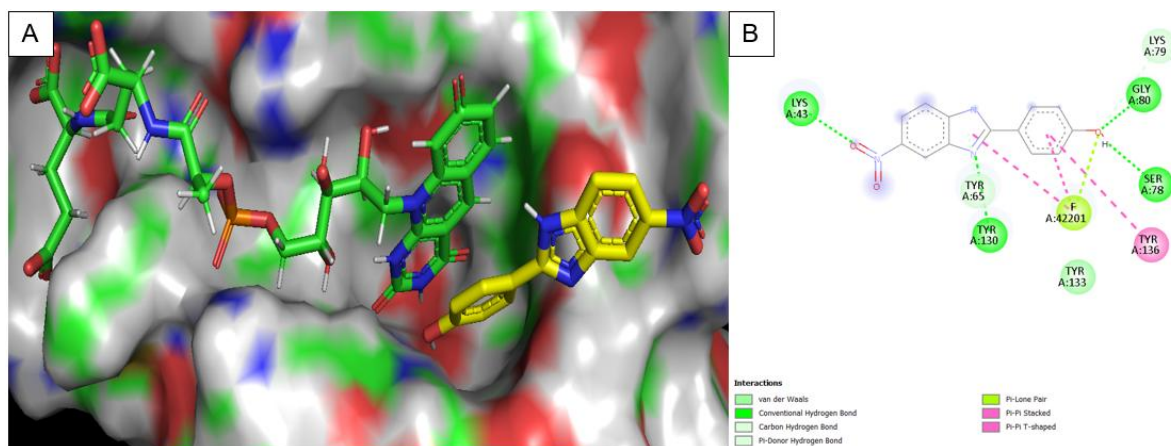


Figura. 33. A. Visualización 3D de compuesto 2 (amarillo) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 2 y sus interacciones.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **3** con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 34**. El compuesto **3** presenta enlaces de puentes de hidrógeno con Lys79 en el grupo nitró del grupo bencimidazol, enlaces π -sigma con un átomo de cloro (ligando) y un átomo de F42201, el cual también interactúa mediante π - π apiladas con el grupo bencil, se identificaron múltiples interacciones de tipo π -alquilo con Tyr65, Tyr130, Tyr133 y Tyr136 con los átomos de cloro, dichas interacciones pueden ser las responsables del aumento en el valor de ΔG y por lo tanto en su mayor afinidad por el sitio activo en comparación con pretomanid.

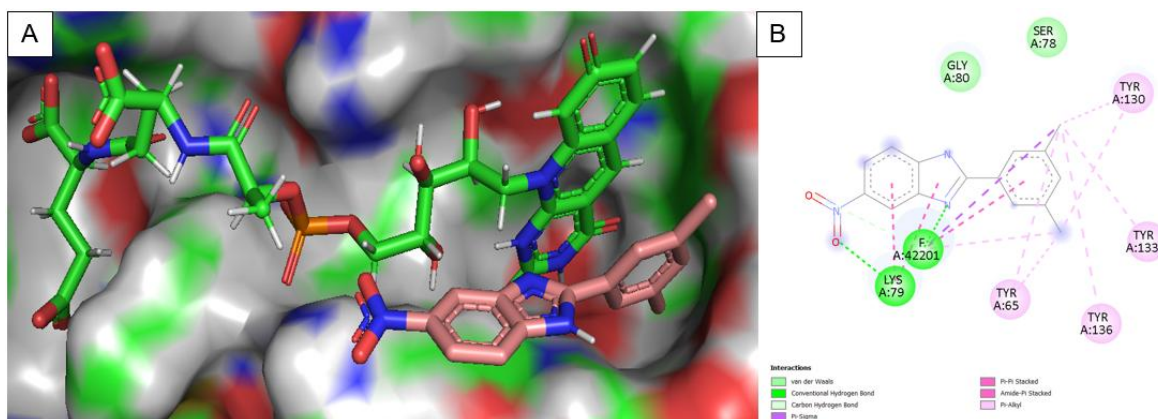


Figura. 34. A. Visualización 3D de compuesto 3 (rosa) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 3 y sus interacciones.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **4** con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 35**. El compuesto **4** muestra enlaces de puente de hidrógeno con Lys43 y Tyr65 con el grupo nitró del grupo bencil y con un F42201 con el grupo nitró del bencimidazol, también se encuentran interacciones de tipo π - π apiladas del F42201 con el grupo bencimidazol.

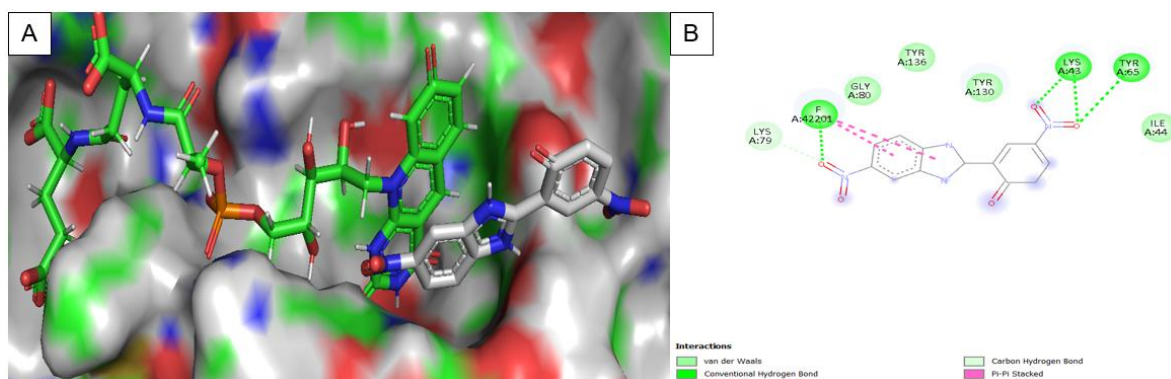


Figura. 35. A. Visualización 3D de compuesto 4 (gris) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones.

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **5** con la enzima Ddn (B) se muestran en la **Figura 36**. El compuesto **5** presenta interacciones de puentes de hidrógeno con Lys43 con el grupo nitró y Tyr130 con el grupo amino en el bencimidazol, también se encontró interacción con Gly80 en el grupo nitró del grupo bencil y con F42201 en la misma zona. Se encontró una interacción débil π -donadora para puentes de hidrógeno con Lys79 con el grupo nitró del

bencil y una interacción desfavorable con Ser78 debido a la cercanía de dos grupos aceptores como son los oxígenos en el grupo nitro en el bencil.

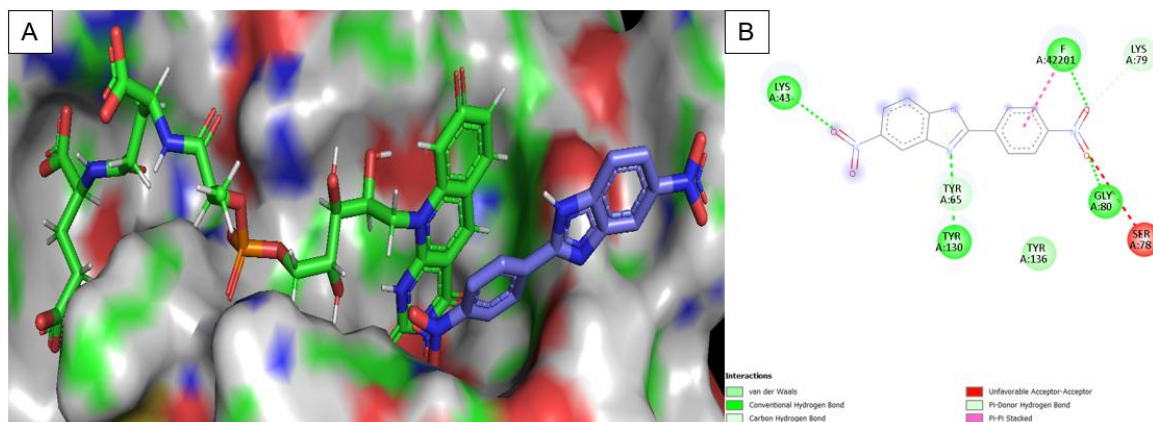


Figura. 36. A. Visualización 3D de compuesto 5 (azul) en el sitio catalítico de Ddn unida a F420 (verde). B. Esquema 2D del compuesto 5 y sus interacciones.

7.4.2 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con blancos de *S. aureus*

Los resultados del acoplamiento molecular del compuesto **4** sobre diferentes blancos en *S. aureus* se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla. 11. Parámetros del acoplamiento molecular entre el compuesto 4 y diferentes blancos moleculares en *S. aureus*.

Blanco molecular	Ligando	ΔG (kcal/mol)	HA	LE
DNA-girasa	Reportado	-11.26	38	0.30
	Compuesto 4	-5.25	22	0.24
PBP2a	Reportado	-9.85	36	0.27
	Compuesto 4	-8.20	22	0.37
Ligasa Ddl	Reportado	-8.19	4	2.05
	Compuesto 4	-7.32	22	0.33

PBP2a: proteína de unión a penicilina 2a, Ddl: enzima ligasa D-alanil-D-alanina

Los resultados obtenidos en los acoplamientos moleculares del compuesto **4** con diferentes blancos en *S. aureus* muestran resultados favorables con el blanco PBP2a debido a que el compuesto **4** mantiene un valor de ΔG cercano con el del

ligando reportado pero presenta un mayor valor de LE, esto debido a un menor número de átomos pesados en la estructura, por lo que, se asume que el compuesto **4** tiene un menor peso molecular que el ligando reportado, el cual puede conferirle ventajas para llegar al sitio blanco en comparación de una molécula de mayor tamaño.

El resultado con la enzima Ddl, es otro resultado que muestra ser favorable debido a que el ligando reportado, es una molécula de muy bajo peso molecular lo que explica el valor tan elevado de LE, sin embargo, el valor de LE para el compuesto **4** no es un valor bajo que muestra un buen equilibrio entre el valor de ΔG y el peso del compuesto.

Estos resultados no son concluyentes debido a que existen mas blancos moleculares en *S. aureus*, por lo que debe realizarse una mayor búsqueda para determinar el sitio blanco del compuesto **4**, responsable de la actividad antibacteriana mostrada en los ensayos de actividad biológica frente a *S. aureus*.

7.4.2.1 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la enzima DNA-girasa

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **4** con la enzima DNA-girasa (B) se muestran en la **Figura 37**. El compuesto **4** presenta interacciones de van der Waals con Ala B:1120, Gly D:1082, Met D:1075, Ala D:1068, Met D:1121, Met B:1075, Ala D:1120 y Gly B: 1082. Además se presentaron interacciones de puente de hidrógeno con Arg B:1122 con el grupo nitro del grupo bencimidazol e interacciones de Asp B:1083 y Arg D:1122 con el grupo nitro del grupo bencil. Además se encontraron interacciones de tipo π - anión con Asp D:1083 con anillo bencimidazol y un enlace π – alquilo con Met B:1121 en el anillo de bencimidazol.

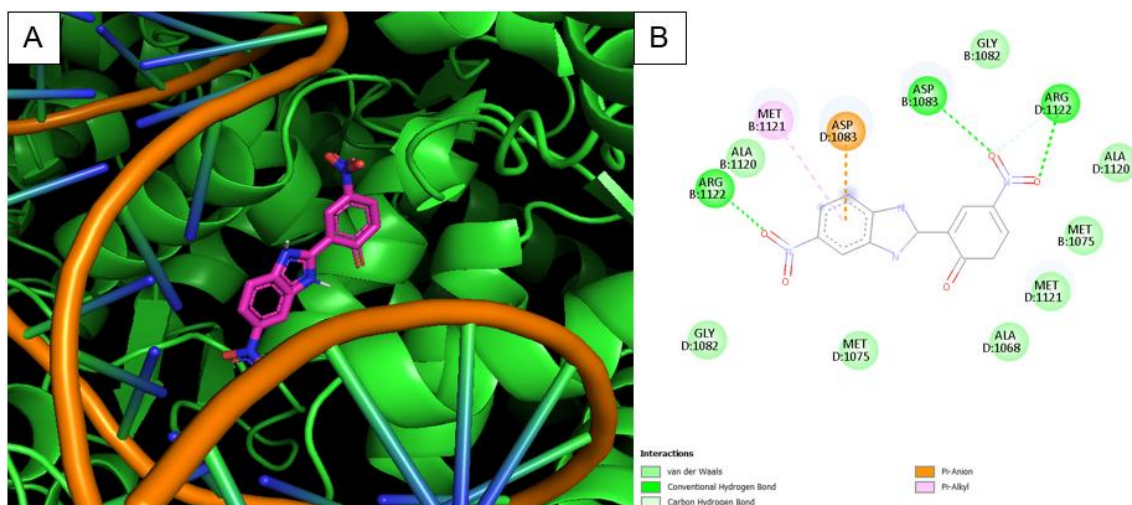


Figura. 37. A. Visualización 3D de compuesto 4 (rosa) en el sitio catalítico reportado de la DNA-girasa (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones.

7.4.2.2 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a)

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **4** con la proteína de unión a penicilinas 2a (PBP2a) (B) se muestran en la **Figura 38**. El compuesto **4** presenta interacciones de van der Waals con His A:583, Thr A:600, Gln A:613, Ala A:601, Glu A:602, Arg A:445, Thr A:444, Asn A:464, Tyr A:519 y Gln A:521. Además se identificaron puentes de hidrógeno con Ala A:642, Ser A:643 y Met A:641 con el grupo nitrógeno en el bencimidazol, se identificó una interacción π – sulfuro con Met A:641 con el grupo bencimidazol al igual que interacciones π - π stacked con Tyr A:446 con el anillo de seis miembros en el bencimidazol y con el grupo bencil.

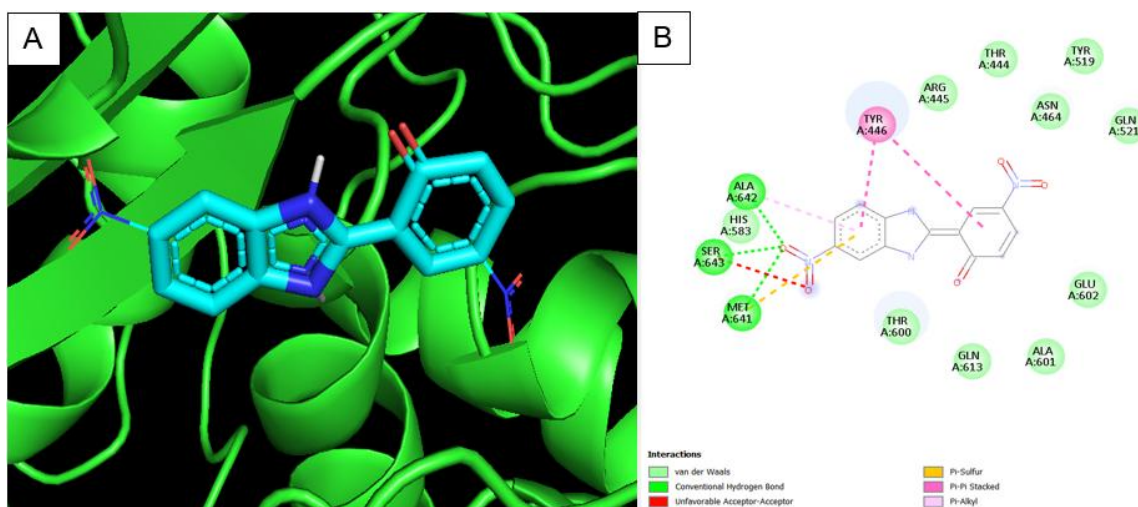


Figura. 38. A. Visualización 3D de compuesto 4 (azul) en el sitio catalítico reportado de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones.

7.4.2.3 Acoplamiento e interacciones moleculares del compuesto 4 con la ligasa D-ala D-ala (Ddl)

El acoplamiento molecular (A) y las interacciones del compuesto **4** con la ligasa D-ala D-ala (Ddl) (B) se muestran en la **Figura 39**. El compuesto **4** presenta interacciones de van der Waals con Val A:257, Gln A:258, Val A:240, Phe A:245, y Asp A:247, se encontraron enlaces de puente de hidrogeno con Lys A:253 con el grupo nitro del bencimidazol y una interacción de Lys A:241 con el grupo hidroxilo del grupo bencil. Se encontraron enlaces π donadores para puentes de hidrógeno con Ser A:184 y Tyr A:248 con el grupo nitro del grupo bencil. Además, se encontraron interacciones $\pi - \pi$ en forma de T con Tyr A:246 con el grupo bencil e interacciones $\pi - \text{alquilo}$ con Val A:239, Lys A:251 con el anillo de seis miembros del grupo bencimidazol y Lys A:249 con el grupo bencil.

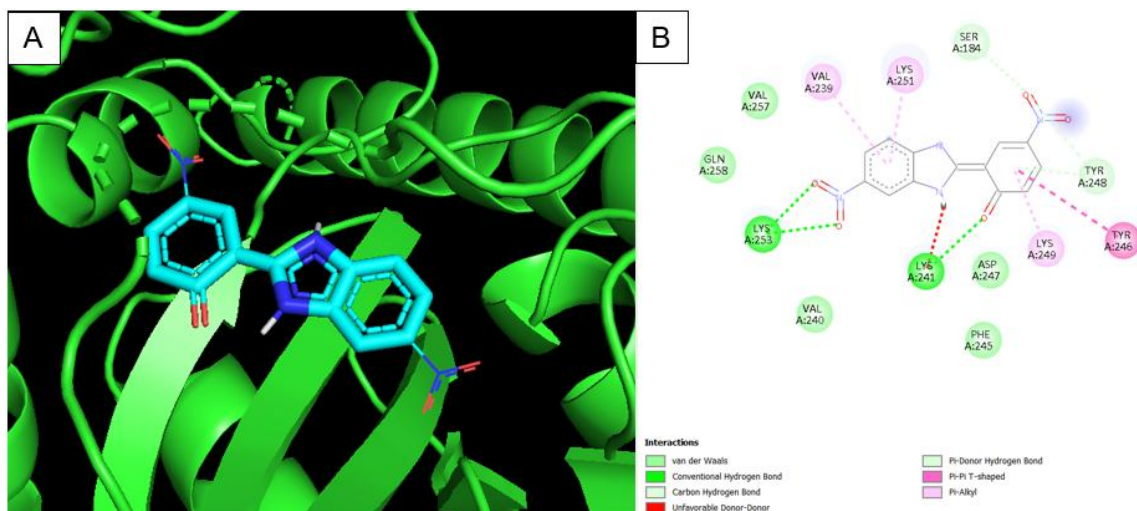


Figura. 39. A. Visualización 3D de compuesto 4 (azul) en el sitio catalítico reportado de la ligasa D-ala D-ala (Ddl) (verde). B. Esquema 2D del compuesto 4 y sus interacciones.

8. CONCLUSIONES

Se diseñaron 6 compuestos a partir de las estructuras químicas de linezolid, delamanid y pretomanid, integrando el grupo nitrobencimidazol en su estructura.

Se logró sintetizar 5 compuestos a partir de reacciones de ciclocondensación de aldehídos, los cuales fueron caracterizados por RMN y MS confirmando los grupos químicos de interés presentes en fármacos utilizados en el tratamiento de tuberculosis.

En el análisis de las interacciones en el acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados con el sitio blanco predominan interacciones de Van Der Waals, Puentes de Hidrógeno e interacciones de tipo π – alquilo atribuidas a los anillos y grupos nitro en sus estructuras.

El compuesto **4** mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, un agente del grupo ESKAPE-E, atribuido a la posición 2 del grupo OH y la posición 5 del grupo nitro en su estructura.

9. REFERENCIAS

- Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acomplamiento molecular:: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55–72. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006
- Banti, C. N., & Hadjikakou, S. K. (2021). Evaluation of toxicity with brine shrimp assay. *Bio-Protocol*, 11(2), e3895. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>
- Barba Evia, J. R. (2020). Tuberculosis. ¿Es la pandemia ignorada? *Revista mexicana de patología clínica*, 67(2), 93–112. <https://doi.org/10.35366/95554>
- Caminero, J. A., Cayla, J. A., García-García, J.-M., García-Pérez, F. J., Palacios, J. J., & Ruiz-Manzano, J. (2017). Archivos de Bronconeumología, 53(9), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.02.006>
- Caminero Luna, J. A. (2016). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Revista Clinica Espanola*, 216(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>
- Cellitti, S. E., Shaffer, J., Jones, D. H., Mukherjee, T., Gurumurthy, M., Bursulaya, B., Boshoff, H. I., Choi, I., Nayyar, A., Lee, Y. S., Cherian, J., Niyomrattanakit, P., Dick, T., Manjunatha, U. H., Barry, C. E., 3rd, Spraggon, G., & Geierstanger, B. H. (2012). Structure of Ddn, the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in bioreductive activation of PA-824. *Structure (London, England: 1993)*, 20(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.001>
- Chowdhury, K., Ahmad, R., Sinha, S., Dutta, S., & Haque, M. (2023). Multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) among children: Where we stand now. *Cureus*, 15(2), e35154. <https://doi.org/10.7759/cureus.35154>
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- Fontalvo Rivera, D., & Gómez Camargo, D. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Revista médicas UIS*, 28(1), 39–51. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- Gómez-Tangarife, V. J., Gómez-Restrepo, A. J., Robledo-Restrepo, J., & Hernández-Sarmiento, J. M. (2018). *Revista de salud publica (Bogota, Colombia)*, 20(4), 491–497. <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.50575>
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M., Garfias, Y., Sada, I., & Lascrain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142–153. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852005000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Granados-Tristán, A. L., González-Escalante, L. A., & Peñuelas-Urquides, K. (2024). La tuberculosis resistente al tratamiento. *Revista Ciencia UANL*, 27(123), 44–51. <https://doi.org/10.29105/cienciauanl27.123-6>

Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 354–373. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>

Hernández-Solis, A., Quintana-Martínez, A., Quintanar-Ramírez, M. I., Álvarez-Maldonado, P., & Reding-Bernal, A. (2023). Tuberculosis extrapulmonar: un problema de salud pública. *Cirugia y Cirujanos*, 91(1), 131–138. <https://doi.org/10.24875/CIRU.21000688>

Horsburgh, C. R., Jr, Barry, C. E., 3rd, & Lange, C. (2015). Treatment of tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, 373(22), 2149–2160. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)

O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 475–527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., & Kolar, B. (2003). A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters: Toxicity Classification System with Microbiotests. *Environmental Toxicology*, 18(6), 395–402. <https://doi.org/10.1002/tox.10141>

Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>

World Health Organization. (2024). Global tuberculosis report 2024. World Health Organization.

Wouters, O. J., McKee, M., & Luyten, J. (2020). Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 323(9), 844–853. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>

Zager, E. M., & McNerney, R. (2008). Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-10>

Eke, I. E., & Abramovitch, R. B. (2025). Functions of nitroreductases in mycobacterial physiology and drug susceptibility. *Journal of Bacteriology*, 207(2). <https://doi.org/10.1128/jb.00326-24>

National Center for Biotechnology Information (2026). PubChem Compound Summary for CID 456199, Pretomanid. Retrieved April 27, 2026 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pretomanid>.

Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21), 7512–7515. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>

Hevener, K. E., Pesavento, R., Ren, J., Lee, H., Ratia, K., & Johnson, M. E. (2018). *Hit-to-Lead: Hit Validation and Assessment* (pp. 265–309). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.09.022>

Pérez del Molino, M., Tuñez Bastida, V., García Ramos, M., & Lado Lado, F. (197 C.E.). Medicina integral: medicina preventiva y asistencial. *Medicina Integral*, 39(5), 207–215. <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-diagnostico-microbiologico-tuberculosis-13029946>

Baquero-Artigao, F., del Rosal, T., Falcón-Neyra, L., Ferreras-Antolín, L., Gómez-Pastrana, D., Hernanz-Lobo, A., Méndez-Echevarría, A., Noguera-Julian, A., Pascual

Sánchez, M. T., Rodríguez-Molino, P., Piñeiro-Pérez, R., Santiago-García, B., & Soriano-Arandes, A. (2023). Actualización del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *Anales de Pediatría*, 98(6), 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2023.03.011>

Mahurkar, N. D., Gawhale, N. D., Lokhande, M. N., Uke, S. J., & Kodape, M. M. (2023). Bencimidazole: A versatile scaffold for drug discovery and beyond – A comprehensive review of synthetic approaches and recent advancements in medicinal chemistry. *Results in Chemistry*, 6, 101139. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101139>

Alheety, N. F., Awad, S. A., Alheety, M. A., Darwesh, M. Y., Abbas, J. A., & Besbes, R. (2025). Benzimidazole Derivatives: A Review of Advances in Synthesis, Biological Potential, Computational Modelling, and Specialized Material Functions. *Chemistry*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/chemistry8010001>

Nepali, K., Lee, H.-Y., & Liou, J.-P. (2019). Nitro-Group-Containing Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(6), 2851–2893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Spencer, A. C., & Panda, S. S. (2023). DNA Gyrase as a Target for Quinolones. *Biomedicines*, 11(2), 371. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020371>

Singh, S. B., Kaelin, D. E., Wu, J., Miesel, L., Tan, C. M., Black, T., Nargund, R., Meinke, P. T., Olsen, D. B., Lagrutta, A., Lu, J., Patel, S., Rickert, K. W., Smith, R. F., Soisson, S., Sherer, E., Joyce, L. A., Wei, C., Peng, X., ... Fukuda, Y. (2015). Tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of left-hand-side moiety (Part-2). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(9), 1831–1835. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.044>

Calderón-Parra, J., Moral, S. de la F., & Santiago, A. D. de. (2022). Protocolo para el manejo de las infecciones graves por *Staphylococcus aureus*. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(50), 2937–2944. <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.02.023>

Sinha, B., & Fraunholz, M. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2–3), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.019>

Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., & Mobashery, S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*, 66(8), 572–577. <https://doi.org/10.1002/iub.1289>

Pergolizzi, G., Wagner, G. K., & Bowater, R. P. (2016). Biochemical and structural characterization of DNA ligases from bacteria and archaea. *Bioscience Reports*, 36(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20160003>

Panda, S., Jayasinghe, Y. P., Shinde, D. D., Bueno, E., Stastny, A., Bertrand, B. P., Chaudhari, S. S., Kielian, T., Cava, F., Ronning, D. R., & Thomas, V. C. (2024). *Staphylococcus aureus* counters organic acid anion-mediated inhibition of peptidoglycan cross-linking through robust alanine racemase activity. <https://doi.org/10.1101/2024.01.15.575639>

10. ANEXOS

Espectro de RMN H^1 del compuesto **1**

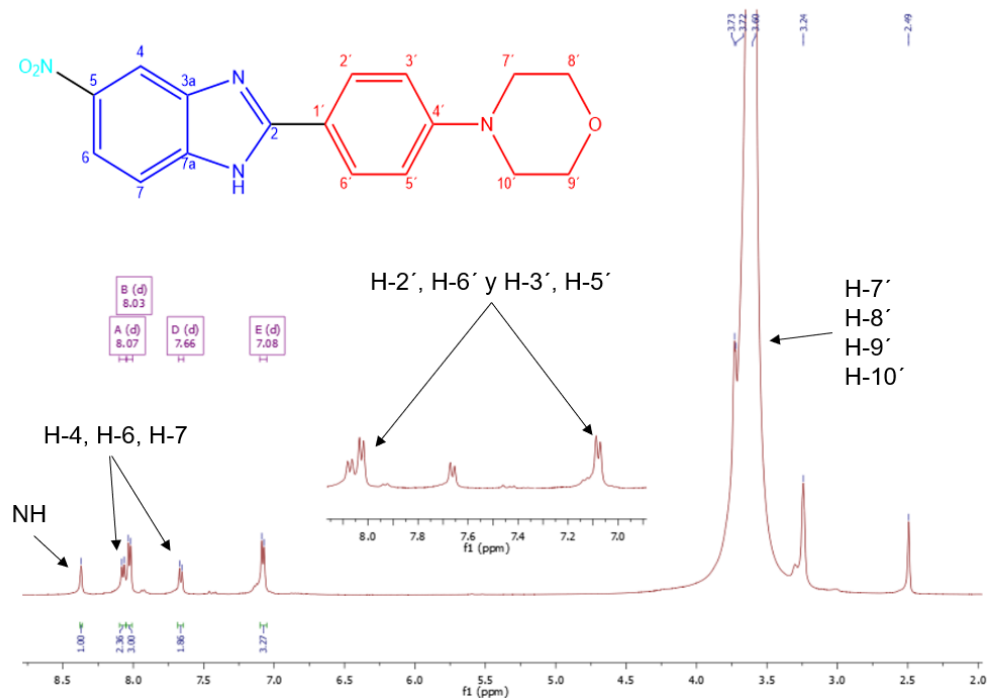


Figura. 40. Espectro de RMN H^1 del compuesto 1 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN C¹³ del compuesto **1**

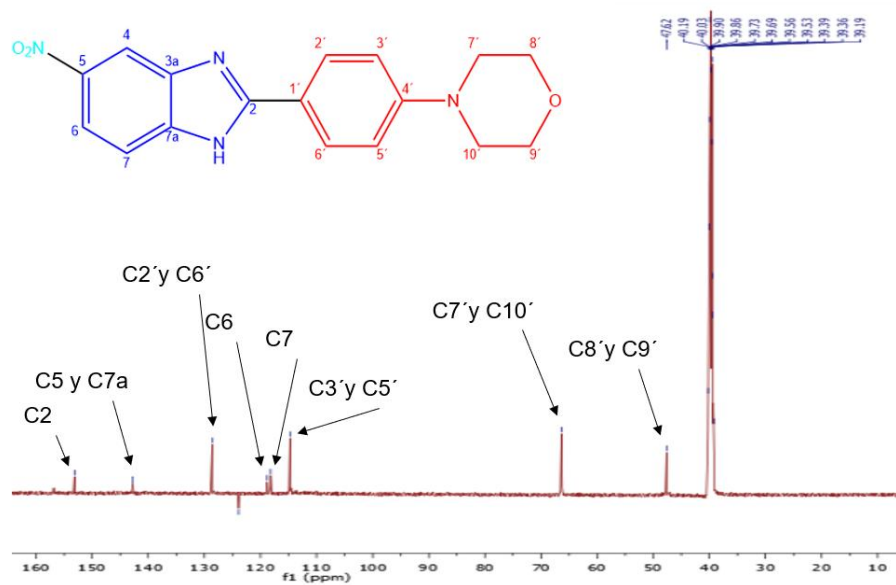


Figura. 41. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 1 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de masas del compuesto 1

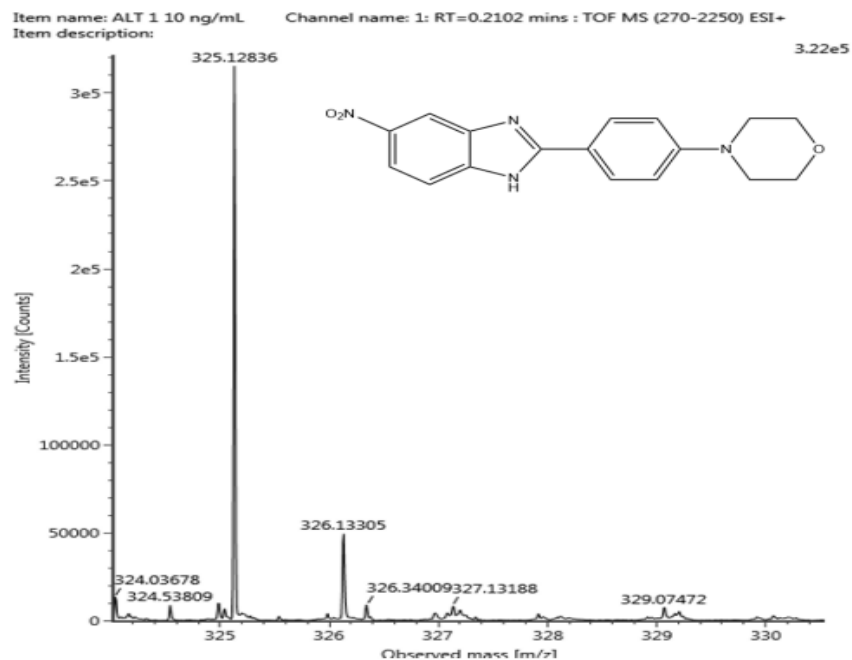


Figura. 42. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI⁺), mostrando el ion cuasimolecular [M+H]⁺ a m/z 325.12836, correspondiente con el compuesto 1.

Espectro de RMN H¹ del compuesto 2

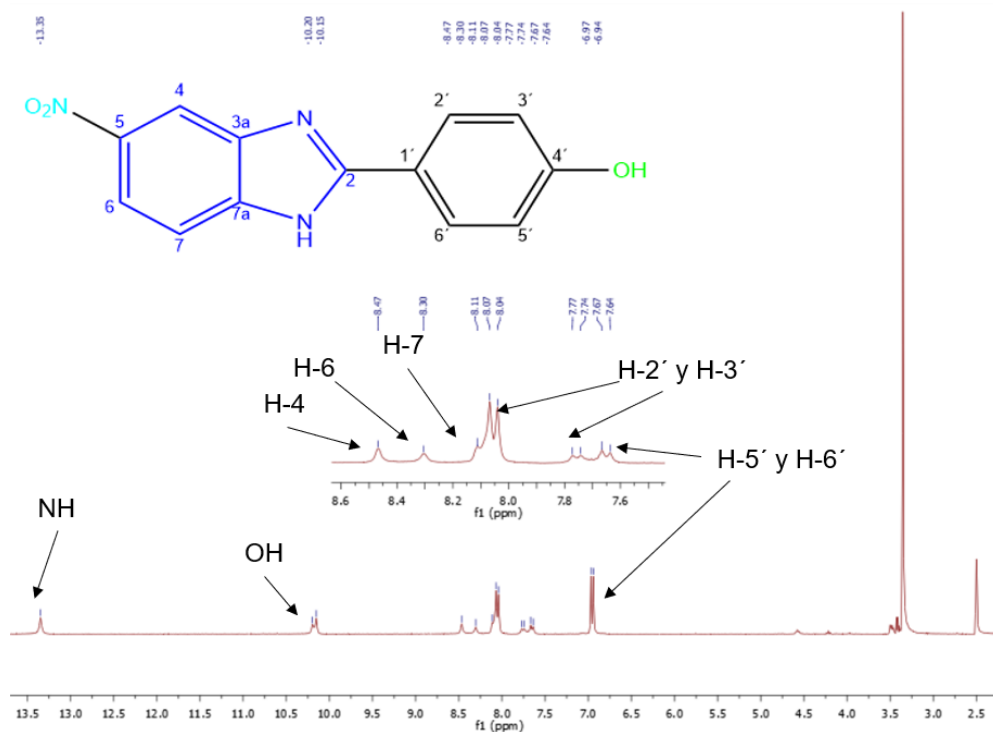


Figura. 43. Espectro de RMN H^1 del compuesto 2 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN C^{13} del compuesto 2

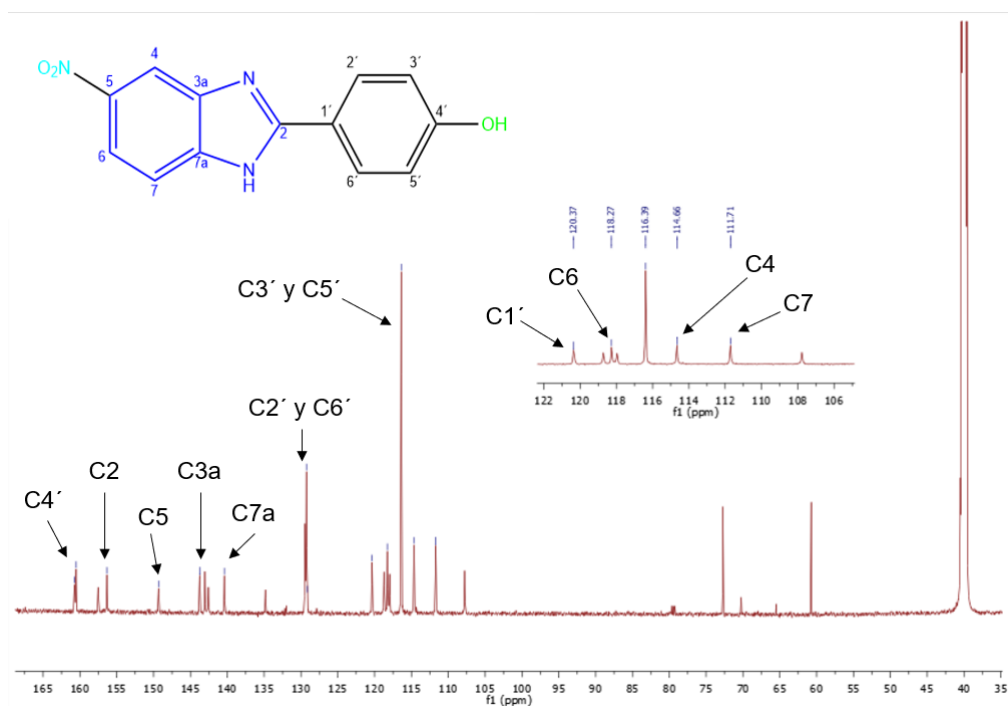


Figura. 44. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 2 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN H^1 del compuesto 3

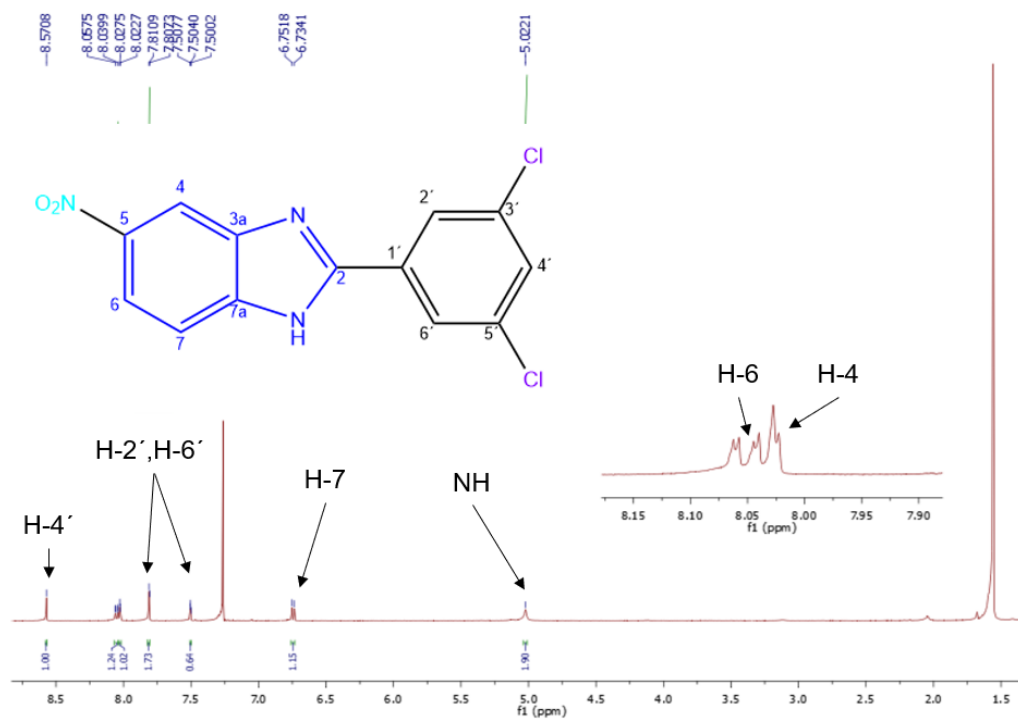


Figura. 45. Espectro de RMN H^1 del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d.

Espectro de RMN C^{13} del compuesto 3

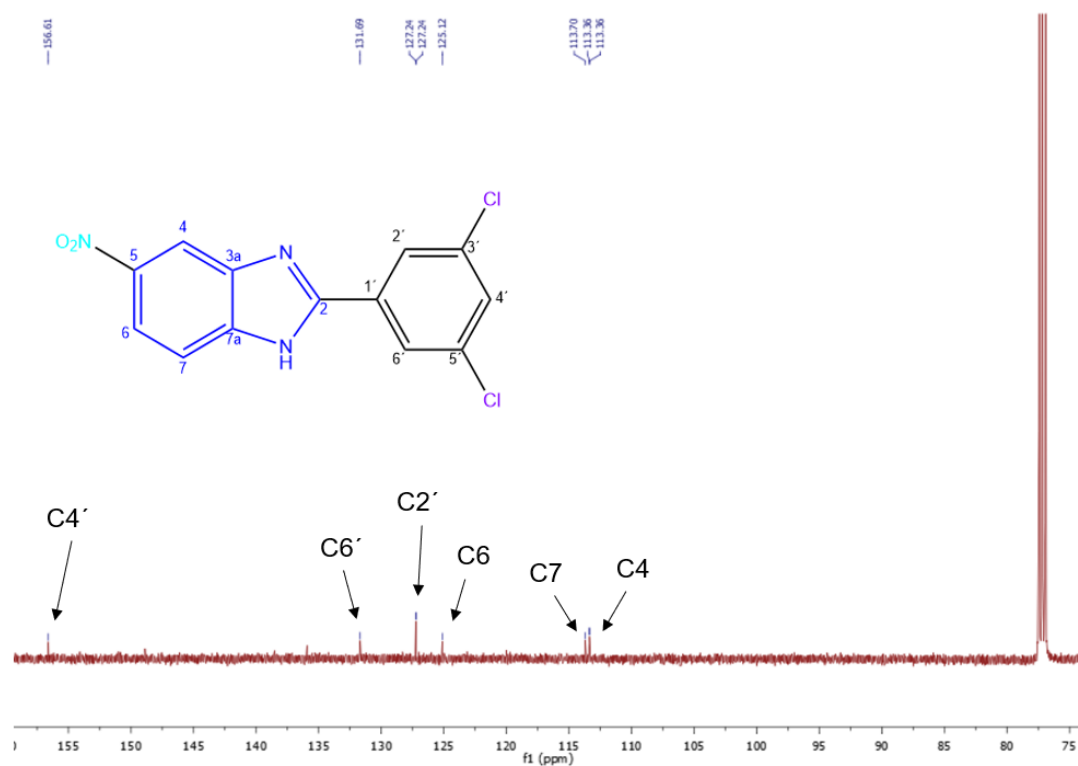


Figura. 46. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 3 adquirido en cloroformo-d.

Espectro de RMN H^1 del compuesto 4

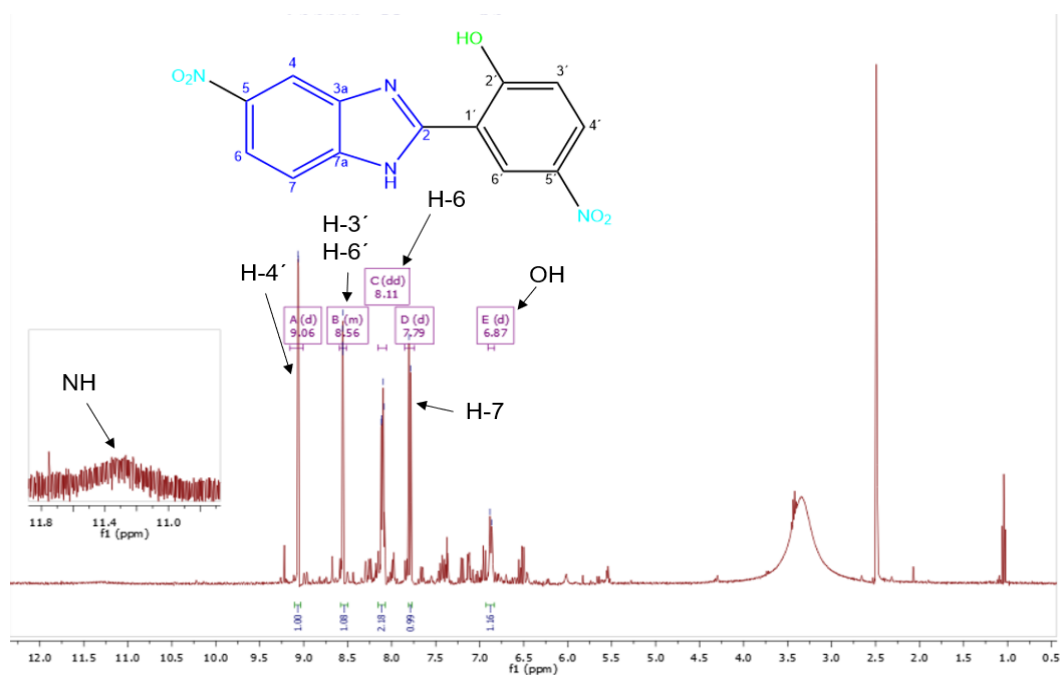


Figura. 47. Espectro de RMN H^1 del compuesto 4 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN C^{13} del compuesto 4

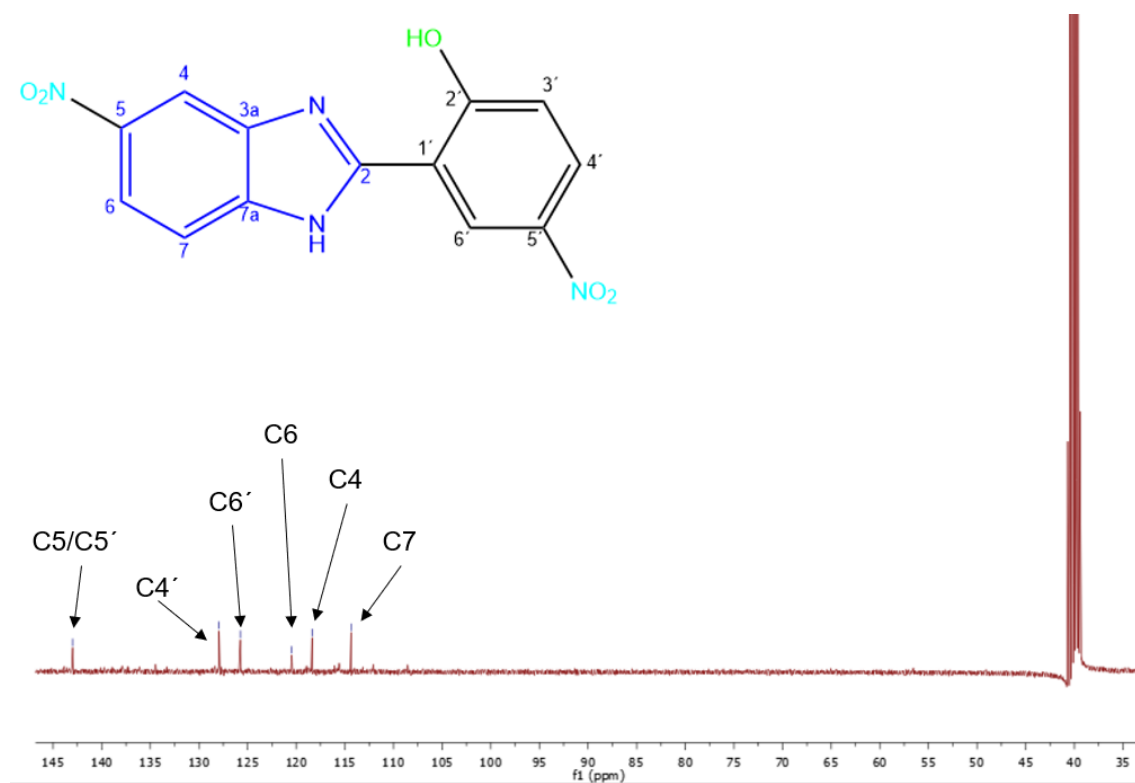


Figura. 48. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 4 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN H^1 del compuesto 5

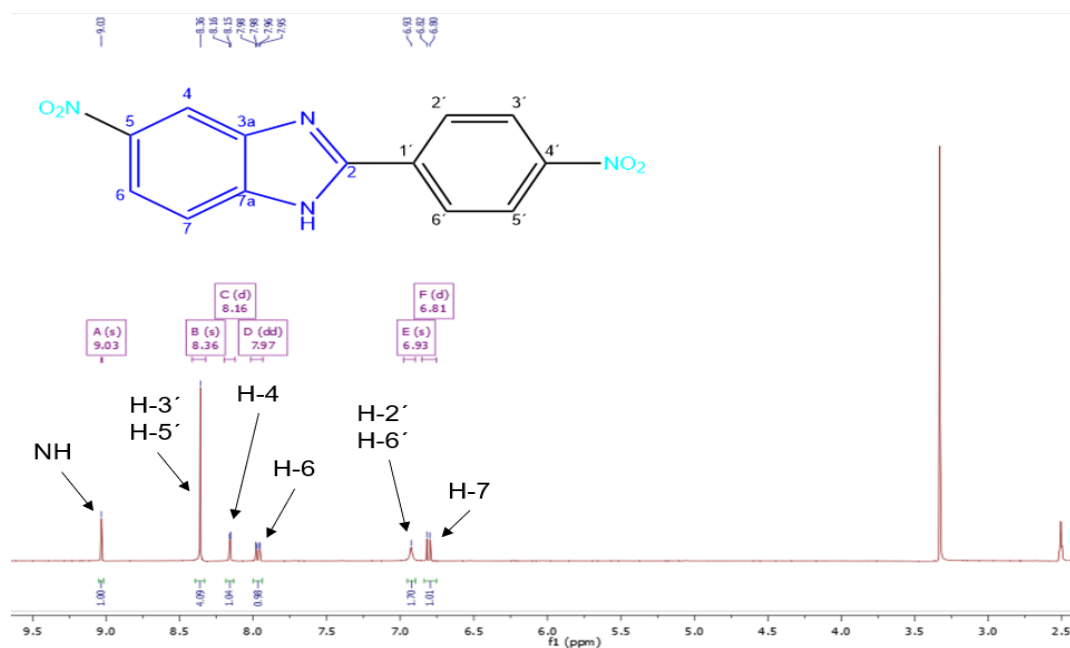


Figura. 49. Espectro de RMN H^1 del compuesto 5 adquirido en DMSO- d_6 .

Espectro de RMN C^{13} del compuesto **5**

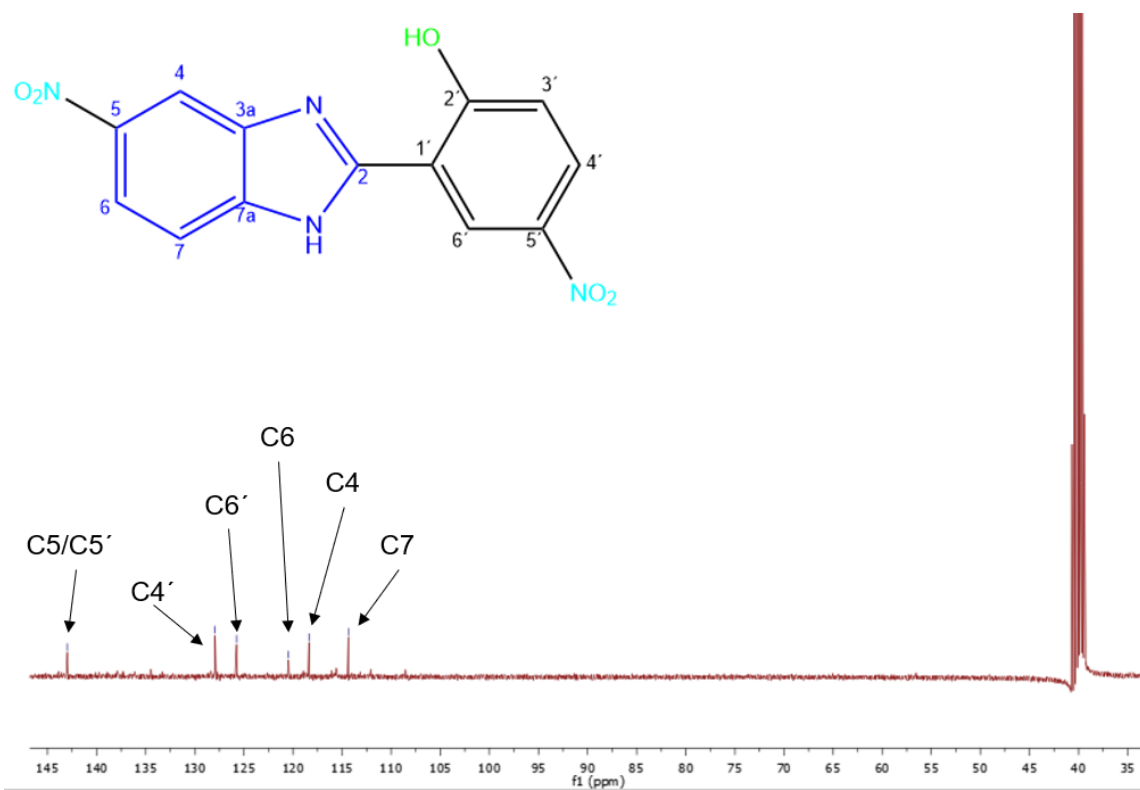


Figura. 50. Espectro de RMN C^{13} del compuesto 4 adquirido en DMSO- d_6 .