

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Síntesis y evaluación de la actividad anticolinesterasa de compuestos  
tipo benzimidazol”



Que para obtener el título de  
Químico Farmacobiólogo



Presenta

Javier Isaías Rubio Clemente

Tijuana, B.C.

Diciembre del 2023

"2023. AÑO DE LA CONCIENCIACIÓN SOBRE LAS PERSONAS  
CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA"

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**  
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

**FOLIO No. 061**

Tijuana, Baja California, a 13 de diciembre de 2023

**C. JAVIER ISAÍAS RUBIO CLEMENTE**  
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTE:

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
opción de Tesis

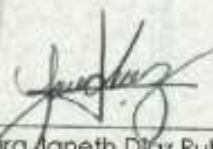
es propuesto, por el Dr. Iván Córdova Guerrero y la Dra. Laura Janeth Díaz Rubio, quienes serán  
los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema: **"Síntesis y  
evaluación de la actividad anticolinérgica de compuestos de tipo benzimidazol"**, el cual  
deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

**RESUMEN**

- I. INTRODUCCIÓN
- II. HIPÓTESIS
- III. OBJETIVOS
- IV. ANTECEDENTES
- V. METODOLOGÍAS
- VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFÍA



  
Dr. Iván Córdova Guerrero  
Director de Tesis

  
Dra. Laura Janeth Díaz Rubio  
Co- Directora de Tesis

  
M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez  
Director

  
Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez  
Subdirectora

### **Agradecimientos:**

**A mi familia**, por siempre haberme apoyado en mis estudios, por su paciencia y comprensión brindada, su cariño y todo el esfuerzo que llegaron a dedicarme para finalizar mis estudios profesionales en excelencia. Por esto y muchas cosas más por las que no se puede describir todo en una sola página, los amo con todo mi ser.

**Al Dr. Iván Córdova, a la Dra. Laura Díaz, al Dr. Arturo Estolano y al laboratorio de Agroquímica y Productos Naturales**, por haberme brindado apoyo emocional y por la paciencia para redactar este documento gracias a sus observaciones, comentarios y asesorías al respecto. Quedo en deuda con ustedes por todo el aprendizaje que me han transmitido a lo largo de mi carrera universitaria. Gracias infinitamente por haberme acogido en su laboratorio y por haberme otorgado un lugar en su familia para hacer llegar al mundo todos nuestros descubrimientos científicos descubiertos que llegaran en un futuro a apoyar a la humanidad con nuevos conocimientos del área de la Química Medicinal; porto con orgullo la bata de laboratorio gracias a ustedes.

**Mis compañeros de laboratorio y de clase**, que siempre estuvieron presentes en cada uno de mis tropiezos y brindándome una mano para continuar hacia la recta final, los tendré siempre presentes en mi corazón.

**Ariel Alejandra Núñez de la Cruz**, por tu enorme comprensión y paciencia a lo largo de mi tiempo elaborando esta investigación, por el apoyo emocional que no puede medirse en ningún tipo de unidad de medida, por siempre estar ahí para mi y hacerme reconocer que por mas que el mundo pueda llegar a ser un lugar de caos desenfrenado, siempre habrán momentos para parar, tomar un respiro y continuar. Te amo infinitamente, con todas las fuerzas que la vida me puede otorgar, gracias a ti es que he podido seguir en este plano terrenal.

## **Resumen:**

En esta tesis se presenta el arduo trabajo de síntesis química y evaluación enzimática de los compuestos tipo benzimidazol; se conoce información suficiente para entender que los benzimidazoles tienen efectos inhibidores contra la enzima acetilcolinesterasa, pero no es lo suficiente para comprender a fondo como es que estos derivados pueden llegar a comportarse en el ámbito terapéutico contra la enfermedad de alzheimer y como es que puede llegar a mejorar la calidad de vida de las personas que padezcan de la enfermedad. Por lo tanto, se proponen las síntesis de los derivados y su análisis de actividades biológicas para conocer más acerca de esta área de la química medicinal.

Para el proyecto, se sintetizará el benzimidazol a partir del o-fenilendiamina; utilizando técnicas de espectrometría, espectroscopia y por resonancia magnética nuclear para su caracterización. Su producción es necesario para tener un punto de comparación sobre cuál de los otros derivados que se lleguen a sintetizar presentan una mejor actividad inhibitoria. Para determinar la potencia de los derivados sintetizados se calcularán por medio de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), en donde a base de los resultados obtenidos superiores a un 50%, se contarán como nuevos fármacos para futuras pruebas donde se demuestra la seguridad de su ingesta o administración en el paciente, sin presentar efectos citotóxicos.

El estudio de modelaje molecular de los compuestos sintetizados se producirá de forma digital con el apoyo de programas como PyMol para la visualización de la estructura enzimática, Auto Dock Tools para la preparación de los ligandos (observación de los enlaces rotables y el cálculo de cargas) para así dar continuación con el análisis del sitio catalítico de la enzima. Se finalizará con una evaluación *in vitro* de inhibición de la AChE con benzimidazoles sintéticos y así cumplir con la meta principal de buscar sustancias capaces de presentar una mejor actividad inhibitoria de la enzima para futuros tratamientos de la EA, con la compensación de la perdida de la función colinérgica en pacientes afectados.

Además de la metodología, se indagará más acerca de la enfermedad para comprender mejor como es que los compuestos de tipo benzimidazol pueden funcionar como un tratamiento paliativo y desde que etapa de la EA sería mejor su administración futura; adicional a lo antes mencionado, se busca primordialmente el descubrimiento de nuevas propiedades para este grupo de compuestos químicos con alta gama de usos terapéuticos para apoyar así las próximas investigaciones sobre

medicamentos novedosos. Con estos pequeños descubrimientos científicos se espera que las personas con Alzheimer puedan disfrutar en un tiempo extendido a lo habitual las maravillas que la vida misma puede otorgar, tales como el crear nuevas memorias junto a sus seres queridos, convivir y conversar con las personas de nuestro alrededor y con ello poder otorgar la oportunidad de una mejor calidad de vida.

## **Índice General:**

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice de figuras.....                                                                                                                   | 7  |
| Índice de tablas.....                                                                                                                    | 8  |
| Índice de graficas.....                                                                                                                  | 9  |
| Índice de esquemas.....                                                                                                                  | 10 |
| Índice de anexos.....                                                                                                                    | 11 |
| Abreviaturas y acrónimos.....                                                                                                            | 13 |
| Introducción.....                                                                                                                        | 15 |
| Hipótesis.....                                                                                                                           | 17 |
| Objetivo general y particulares.....                                                                                                     | 18 |
| Antecedentes.....                                                                                                                        | 19 |
| Metodología y resultados de la síntesis y caracterización de los derivados de benzimidazol.....                                          | 25 |
| Metodología y resultados del estudio de modelaje molecular (docking).....                                                                | 38 |
| Metodología y resultados de la evaluación <i>in vitro</i> de inhibición de la acetilcolinesterasa con los benzimidazoles sintéticos..... | 44 |
| Conclusiones.....                                                                                                                        | 53 |
| Bibliografía.....                                                                                                                        | 55 |
| Anexos.....                                                                                                                              | 59 |

## Índice de figuras:

|                  |                                                                                                                                                                                   |    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> | Degradación de la acetilcolina.....                                                                                                                                               | 16 |
| <b>Figura 2.</b> | Estructura química del benzimidazol.....                                                                                                                                          | 16 |
| <b>Figura 3.</b> | Estructura fisiológica del cerebro y las neuronas de un cerebro sano (Healthy brain), con punto de comparación el cerebro con la enfermedad de Alzheimer (Alzheimer disease)..... | 21 |
| <b>Figura 4.</b> | Algunos fármacos empleados actualmente que poseen el núcleo benzimidazol...                                                                                                       | 22 |
| <b>Figura 5.</b> | Estructura de la hAChE. El esquema nos muestra la ubicación del centro activo (CA) y el sitio aniónico periférico (SAP). Generado con UCSF Chimera.....                           | 39 |
| <b>Figura 6.</b> | Localización del ligando en su pose más favorable en relación al sitio activo.....                                                                                                | 43 |

## Índice de tablas:

|                  |                                                                                                                                              |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b>  | Rendimientos de síntesis de derivados.....                                                                                                   | 32 |
| <b>Tabla 2.</b>  | Condiciones para el minimizado de energía en UCSF Chimera.....                                                                               | 38 |
| <b>Tabla 3.</b>  | Ligandos utilizados en el docking molecular, ilustrados por UCSF Chimera.....                                                                | 40 |
| <b>Tabla 4.</b>  | Mejores puntajes de ligandos analizados.....                                                                                                 | 41 |
| <b>Tabla 5.</b>  | Contenido de la mezcla de reacción para determinar la cinética de los compuestos a 100 $\mu$ M.....                                          | 44 |
| <b>Tabla 6.</b>  | Contenido de la mezcla de reacción para determinar la cinética de los compuestos a 300 $\mu$ M.....                                          | 44 |
| <b>Tabla 7.</b>  | Preparación de las ocho concentraciones finales con las que se llevó a cabo la determinación de la IC <sub>50</sub> para cada compuesto..... | 46 |
| <b>Tabla 8.</b>  | Contenido de la mezcla de reacción para leer la actividad enzimática a una longitud de onda de 412 nm por 1 minuto.....                      | 47 |
| <b>Tabla 9.</b>  | Resultados de la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima AChE....                                                             | 48 |
| <b>Tabla 10.</b> | Resultados de IC <sub>50</sub> de los 4 compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición.....                                       | 53 |

## Índice de graficas:

|                   |                                                                                                                                                                    |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfica 1.</b> | Porcentaje de inhibición enzimática a dos concentraciones de inhibición. Los resultados se muestran como medias y desviación estándar de n=3.....                  | 49 |
| <b>Gráfica 2.</b> | Curvas concentración-respuesta de los cuatro benzimidazoles ensayados. Todos los resultados se encuentran expresados como medias y desviación estándar de n=3..... | 50 |
| <b>Gráfica 3.</b> | Curva concentración-respuesta del benzimidazol (1b).....                                                                                                           | 51 |
| <b>Gráfica 4.</b> | Curva concentración-respuesta del 2-metil benzimidazol (2b).....                                                                                                   | 51 |
| <b>Gráfica 5.</b> | Curva concentración-respuesta del 2-etil benzimidazol (3b).....                                                                                                    | 52 |
| <b>Gráfica 6.</b> | Curva concentración-respuesta del 2-etil benzimidazol (4b).....                                                                                                    | 52 |

## Índice de esquemas:

|                |                                                                                                        |    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esq. 1.</b> | Reacción general de síntesis para la obtención de benzimidazoles, a partir del método de Phillips..... | 23 |
| <b>Esq. 2.</b> | Síntesis de Benzimidazol (1b).....                                                                     | 25 |
| <b>Esq. 3.</b> | Síntesis de 2-metil benzimidazol (2b).....                                                             | 26 |
| <b>Esq. 4.</b> | Síntesis de 2-etil benzimidazol (3b).....                                                              | 28 |
| <b>Esq. 5.</b> | Síntesis de 2-fenil benzimidazol (4b).....                                                             | 29 |
| <b>Esq. 6.</b> | Síntesis de 2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol (5b).....                                                | 30 |

## Índice de anexos:

|                  |                                                                                        |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1.</b>  | Espectro de IR del compuesto 1b.....                                                   | 59 |
| <b>Anexo 2.</b>  | Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 1b.....                        | 60 |
| <b>Anexo 3.</b>  | Espectro de resonancia magnética nuclear (isótopos de carbono 13) de compuesto 1b..... | 61 |
| <b>Anexo 4.</b>  | Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 1b.....            | 61 |
| <b>Anexo 5.</b>  | Espectro de IR del compuesto 2b.....                                                   | 62 |
| <b>Anexo 6.</b>  | Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 2b.....                        | 63 |
| <b>Anexo 7.</b>  | Espectro de resonancia magnética nuclear (isótopos de carbono 13) de compuesto 2b..... | 64 |
| <b>Anexo 8.</b>  | Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 2b.....            | 64 |
| <b>Anexo 9.</b>  | Espectro IR del compuesto 3b.....                                                      | 65 |
| <b>Anexo 10.</b> | Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 3b.....                        | 66 |
| <b>Anexo 11.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (isótopos de carbono 13) de compuesto 3b..... | 67 |
| <b>Anexo 12.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 3b.....            | 67 |
| <b>Anexo 13.</b> | Espectro IR del compuesto 4b.....                                                      | 68 |

|                  |                                                                                        |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 14.</b> | Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 4b.....                        | 69 |
| <b>Anexo 15.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 4b..... | 70 |
| <b>Anexo 16.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 4b.....            | 70 |
| <b>Anexo 17.</b> | Espectro de IR del compuesto 5b.....                                                   | 71 |
| <b>Anexo 18.</b> | Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 5b.....                        | 72 |
| <b>Anexo 19.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 5b..... | 73 |
| <b>Anexo 20.</b> | Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 5b.....            | 73 |
| <b>Anexo 21.</b> | Docking molecular de ligando 1b.....                                                   | 74 |
| <b>Anexo 22.</b> | Docking molecular del ligando 2b.....                                                  | 74 |
| <b>Anexo 23.</b> | Docking molecular del ligando 3b.....                                                  | 74 |
| <b>Anexo 24.</b> | Docking molecular de ligando 4b.....                                                   | 75 |
| <b>Anexo 25.</b> | Docking molecular del ligando 5b.....                                                  | 75 |
| <b>Anexo 26.</b> | Docking molecular del ligando Donepezilo.....                                          | 75 |

## Abreviaturas y acrónimos:

|                                                      |                                                          |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| EA.....                                              | Enfermedad de Alzheimer.                                 |
| AChE.....                                            | Acetilcolinesterasa.                                     |
| ACh.....                                             | Acetilcolina.                                            |
| SNC.....                                             | Sistema Nervioso Central.                                |
| NMDA.....                                            | N-Metil-D-aspartato.                                     |
| IC <sub>50</sub> .....                               | Concentración inhibitoria media.                         |
| AND.....                                             | Ácido Desoxirribonucleico.                               |
| CCF.....                                             | Cromatografía de Capa Fina.                              |
| pH.....                                              | Potencial de Hidrogeno.                                  |
| IR.....                                              | Infrarrojo.                                              |
| CG-EM.....                                           | Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas. |
| RMN.....                                             | Resonancia Magnética Nuclear.                            |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....                 | Ácido Fosfórico.                                         |
| CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                 | Ácido Fórmico.                                           |
| CH <sub>3</sub> COOH.....                            | Ácido Acético.                                           |
| C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> .....   | Ácido Propanoico.                                        |
| C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> .....   | Ácido Benzoico.                                          |
| C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ..... | Ácido Naftalenacético.                                   |
| g.....                                               | Gramos.                                                  |
| nm.....                                              | Nanómetros.                                              |
| cm <sup>-1</sup> .....                               | Numero de onda.                                          |
| m/z.....                                             | Relación masa carga.                                     |
| g/mol.....                                           | Gramos por mol.                                          |
| MHz.....                                             | Megahercio.                                              |
| %.....                                               | Porcentaje.                                              |
| °C.....                                              | Grados Centígrados.                                      |
| Ml.....                                              | Mililitro.                                               |

|                                              |                                         |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| $\mu\text{l}$ .....                          | Microlitro.                             |
| mg.....                                      | Miligramo.                              |
| mmol.....                                    | Milimolar.                              |
| $\mu\text{M}$ .....                          | Micromolar.                             |
| mM.....                                      | Milimolar.                              |
| M.....                                       | Molar.                                  |
| $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2$ .....       | Benzimidazol.                           |
| $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2$ .....       | 2-metil benzimidazol.                   |
| $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2$ .....    | 2-etil benzimidazol.                    |
| $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2$ ..... | 2-fenil benzimidazol.                   |
| $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2$ ..... | 2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol.      |
| Å.....                                       | Angstroms.                              |
| PDB.....                                     | Protein Data Bank.                      |
| hAChE.....                                   | Acetilcolinesterasa humana.             |
| CA.....                                      | Centro Activo.                          |
| SAP.....                                     | Sitio aniónico periférico.              |
| $\text{H}_2\text{O}$ .....                   | Agua.                                   |
| $\text{NO}_3$ .....                          | Nitrato.                                |
| RMSD.....                                    | Raíz de la desviación cuadrática media. |
| Kcal.....                                    | Kilocalorías.                           |
| DMSO.....                                    | Dimetil sulfóxido.                      |
| PBS.....                                     | Suero Bovino Purificado.                |
| BSA.....                                     | Albumina Anti-Bovina.                   |
| DTNB.....                                    | Reactivo de Ellman.                     |
| Abs/min.....                                 | Absorbancias por minuto.                |
| ATCh.....                                    | Sustrato de Acetilcolinesterasa.        |
| SD.....                                      | Desviación Estándar.                    |
| Log.....                                     | Logaritmo.                              |

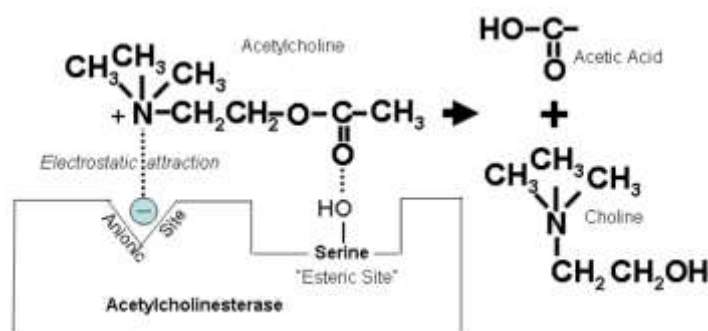
## 1. Introducción:

La demencia o específicamente, la enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, el deterioro cognitivo y el funcionamiento cotidiano; así mismo afectando la calidad de vida del paciente y sus allegados. A partir de 1993, se lanzó al mercado por primera vez un tratamiento paliativo para la enfermedad, empleando inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) [6].

El desarrollo de fármacos para tratamiento de la EA ha ido elevándose de forma proporcional al aumento progresivo del envejecimiento en la población mundial, causando así que el planteamiento previsto para la enfermedad sea modificado para encontrar el fármaco ideal. En la actualidad se utilizan la galantamina, donepezilo y la rivastigmina como inhibidores de la AChE en etapas tempranas de la EA [2]; así mismo se emplea la memantina como antagonista del receptor NMDA (N-Metil-D-aspartato) para etapas moderadas a severas.

Sin importar el mecanismo de acción por el cual los fármacos trabajan, el objetivo principal de este tipo de tratamientos viene siendo el mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus allegados. Los fármacos que entran en la categoría de inhibidores de acetilcolinesterasa se encargan de retrasar la inactivación de la acetilcolina posterior a su liberación sináptica y como resultado se aprueba como principal tratamiento utilizado para la enfermedad de alzheimer [6].

La acetilcolinesterasa (AChE) tiene un papel fundamental en la rápida y eficaz hidrólisis de la acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas que suceden en el sistema nervioso central (SNC); con la ayuda del ACh se lleva a cabo el envío de mensajes entre células, así como células nerviosas, glandulares y musculares. La hidrólisis del neurotransmisor se lleva a cabo por medio de un ataque nucleofílico al grupo carbonilo, acilando la enzima y provocando la liberación del metilo para finalmente llegar a hidrolizar la enzima acilada, obteniendo como producto al ácido acético. Por ende, los inhibidores que actúan en el sitio activo de la AChE impiden la unión de la enzima con la molécula de sustrato; esto conlleva a que mediante la serina próxima al centro catalítico, se bloquee de forma irreversible (figura 1).

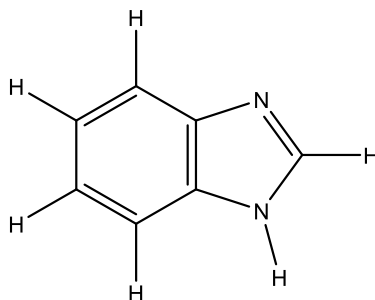


**Figura 1.** Degradación de la acetilcolinesterasa

(Imagen obtenida de: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase-inhibitors/inhibitors.html>)

Se ha demostrado en ensayos que compuestos con estructuras aromáticas presentan una mejor actividad inhibitoria sobre la AChE [2], así también derivados del benzimidazol han mostrado resultados positivos como inhibidores de la enzima [27]. Los compuestos de tipo benzimidazol se han utilizado como antihipertensivos, antiácidos, antihelmínticos de amplio espectro y para el tratamiento de urticaria y la rinitis aguda, y conforme el paso de los años se han encontrado nuevas aplicaciones para este grupo de fármacos.

El benzimidazol (figura 2) tiene en su estructura química un anillo aromático, fusionado con un anillo de imidazol. La similitud estructural entre el núcleo benzimidazol con varios compuestos endógenos como las bases puricas del ADN y su presencia en la vitamina B<sub>12</sub> confirman su potencial farmacológico. Debido a esto los compuestos tipo benzimidazol se consideran compuestos privilegiados dentro del diseño de fármacos



**Figura 2.** Estructura química del benzimidazol.

## 2. **Hipótesis:**

Compuestos con estructuras análogas al benzimidazol presentan inhibición de la AChE en el ser humano, evaluables mediante técnicas *in vitro*.

### 3. Objetivos:

#### 3.1. Objetivo general:

Evaluar la actividad anticolinesterasa de compuestos de tipo benzimidazol mediante bioensayos *in vitro* y modelaje molecular.

#### 3.2. Objetivos particulares:

- Determinar las condiciones adecuadas de reacción para la síntesis de derivados de benzimidazol.
- Caracterizar los productos obtenidos mediante técnicas de espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos ante la acetilcolinesterasa mediante bioensayos enzimáticos.
- Analizar e identificar el sitio farmacóforo de cada uno de los compuestos por modelaje molecular.
- Establecer los elementos estructurales que determinan la actividad inhibitoria a la acetilcolinesterasa de los compuestos de tipo benzimidazol.

#### 4. Antecedentes:

##### **Enfermedad de Alzheimer (EA).**

A más de 100 años de haber sido descrita la enfermedad de Alzheimer (EA) la cual es la forma más común de demencia principalmente en adultos mayores, esta incidencia va en aumento con el envejecimiento de la población en todo el mundo, en el 2015 las estadísticas a nivel mundial mostraron una prevalencia de 44 millones de personas, en su mayoría mayores de 60 años y esta cifra se estima en se duplicará 2050 lo que conlleva a una enorme carga socioeconómica. Esta enfermedad se caracteriza como un trastorno neurodegenerativo multifactorial propiciado por el estrés oxidativo, deterioro mitocondrial, neuroinflamación, disfunción sináptica y alteración de la barrera hematoencefálica, que puede ser causada en parte por la acumulación extracelular anormal de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) en placas amiloides y agregación de proteínas tau en ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT) [22].

En la EA el paciente puede pasar por cinco etapas que se describen a continuación:

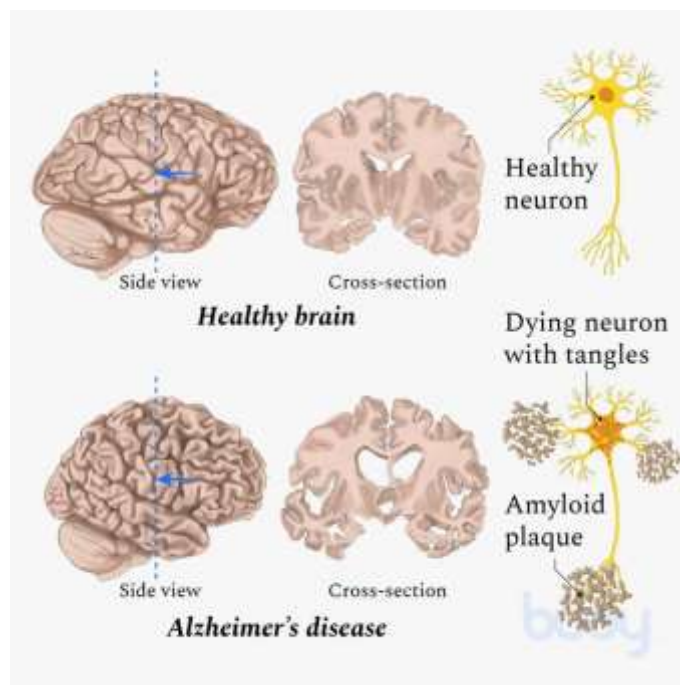
- I. Etapa preclínica.
- II. Deterioro cognitivo leve.
- III. Demencia leve.
- IV. Demencia moderada.
- V. Demencia grave.

La EA llega a tener inicio en un tiempo remoto previo a la aparición de los primeros síntomas; este periodo puede tener una duración de años o incluso décadas, pero puede ser diagnosticado con el apoyo de imágenes cerebrales observando placas amiloides y ovillos neurofibrilares, siendo estos últimos la característica distintiva de la enfermedad apareciendo cuando las proteínas tau cambian de forma [23]. Esta técnica de diagnóstico puede respaldarse actualmente con la identificación de biomarcadores, pudiéndose encontrar en muestras de sangre; sin embargo, los biomarcadores aparecen una vez se llegan a desarrollar los primeros síntomas (etapa de deterioro cognitivo leve).

Una vez llegada a la segunda etapa, la persona comenzara a presentar ligeros cambios en la retención de información (pérdida de memoria) y a su vez en la capacidad de pensamiento, llegando a proceder a lagunas mentales con información que generalmente es fácil de recordar. Esta etapa no tiene un tiempo definido y con el transcurso de este llegara a evolucionar en demencia leve, presentando de forma más notoria pérdida de memoria, problemas al querer resolver problemas o tareas complejas, cambios en la personalidad del paciente y dificultades para la organización y expresión de pensamientos.

Con la disminución significativa de la memoria y juicio progresivamente insuficiente, cambios en la personalidad, conducta y necesidad de requerir apoyo para las actividades diarias, el paciente ha entrado a la cuarta etapa (demencia moderada); el individuo comienza a confundirse con mayor facilidad y se volverán más olvidadizas, siendo esta etapa en donde los familiares o cuidadores comenzaran a tener un papel vital para el cuidado de la persona afectada, siendo obligatoriamente necesario la observación y cuidado constante. La quinta y última etapa de la enfermedad procederá a la aparición de la incapacidad por comunicarse, así también como el deterioro de capacidades físicas como son el caminar, sentarse o mantener la cabeza en alto; en esta etapa los músculos se vuelven rígidos y los reflejos serán anormales y con el paso del tiempo, se perderá la capacidad para deglutir alimentos y controlar las funciones de retención de orina y funciones de los intestinos [16].

Siendo un padecimiento de larga evolución y duración, el Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor énfasis en el área de la medicina. En México se estima que un millón trecientas mil personas padecen de la EA, representando entre el 60%-70% de los diagnósticos de demencia en el país, afectando con mayor frecuencia a las personas de 65 años en adelante [17].



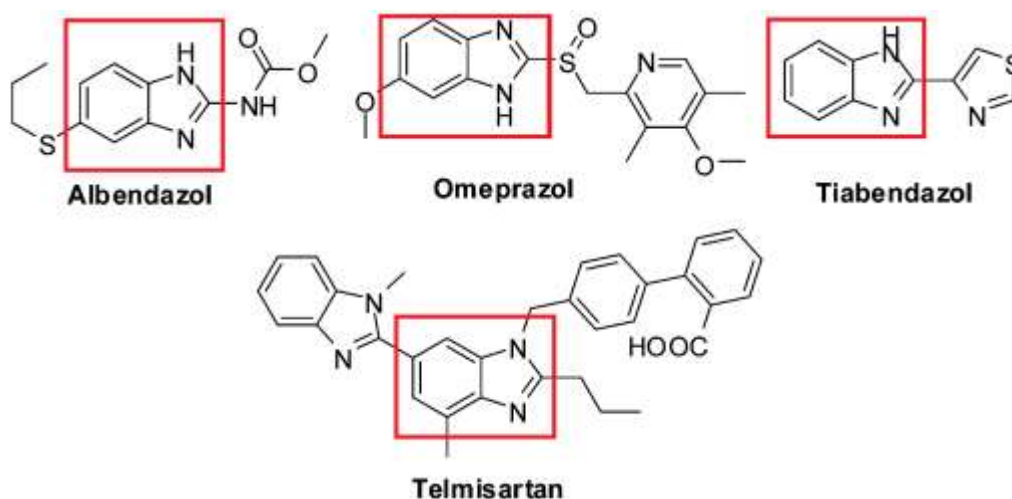
**Figura 3.** Estructura fisiológica del cerebro y las neuronas de un cerebro sano (Healthy brain), con punto de comparación el cerebro con la enfermedad de Alzheimer (Alzheimer disease) [13].

La acumulación de las proteínas beta amiloides o placas amiloides son las causantes de que la acetilcolina no pueda recorrer el cerebro con normalidad, debido a que las placas llegan a cubrir las dendritas de las neuronas impidiendo el paso del neurotransmisor y consecuente a esto aumentar el nivel de acetilcolina en el cuerpo humano (figura 3). Es aquí donde la AChE entra en juego, encargándose de hidrolizar la acetilcolina y así mismo disminuyendo su nivel en sangre [25].

Con lo anteriormente mencionado, se entiende que las neuronas se encuentran bloqueadas, impidiendo el paso de la acetilcolina por estas mismas; por otro lado, la AChE comenzara a degradar la acetilcolina en exceso encontrado en el sistema humano, teniendo una cantidad reducida del mismo, que junto con el bloqueo de las placas amiloides, limitaran significativamente la sinapsis nerviosa, provocando la perdida de la función de las células neuronales y finalmente la muerte celular.

## Benzimidazoles.

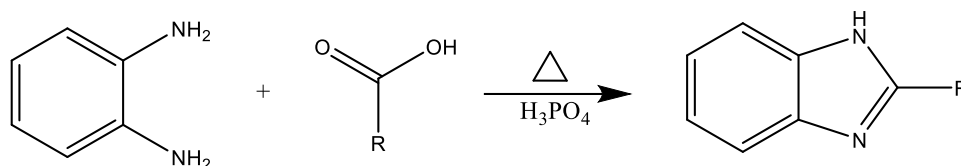
En las áreas de química medicinal y agroquímica los compuestos heterocíclicos tienen una gran relevancia por poseer múltiples actividades biológicas; entre ellas se destacan sus propiedades antimicrobianas contra *Mycobacterium tuberculosis*, prevención del cáncer, antiparasitaria, antialérgica y efectos antioxidantes en proteínas, ADN y lípidos. Estos compuestos así mismo presentan efectos herbicidas, insecticidas y antifúngicos. Los benzimidazoles podrían ser considerados un farmacóforo de vital importancia por sus múltiples efectos terapéuticos, y sus derivados no son la excepción; medicamentos como el albendazol, omeprazol, tiabendazol y telmisartán son claro ejemplo de ello [7].



**Figura 4.** Algunos fármacos empleados actualmente que poseen el núcleo benzimidazol

Actualmente se pueden encontrar métodos de síntesis del benzimidazol a partir de diferentes reactivos, aunque el más común y mayormente utilizado es la utilización de o-fenilendiamina por el método de Phillips. Alexandra Phillips reportó en 1928 la reacción entre una orto-fenilendiamina y un ácido monobásico (Esq. 1) en un medio ácido (ácido clorhídrico o ácido

fosfórico), y subsecuente precipitación del benzimidazol gracias a la neutralización de una solución concentrada de hidróxido de amonio.



**Esq. 1.** Reacción general de síntesis para la obtención de benzimidazoles, a partir del método de Phillips.

Recientemente, *Neumann et al* demostró que era posible minimizar la aparición de compuestos colaterales si se empleaba  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante en la presencia de ácidos minerales, esto además de aumentar el rendimiento de la reacción llevo a una disminución considerable del tiempo de reacción requerido. Sus resultados demuestran que esta metodología es una ruta viable y efectiva para la generación de compuestos tipo benzimidazol a partir de O-fenilendiaminas y aldehídos.

### **Benzimidazoles y el Alzheimer**

Los estudios realizados acerca de este tipo de compuestos brindan información suficiente para teorizar sobre el empleo de estas moléculas como inhibidores colinérgicos; tanto los compuestos aromáticos como los anillos de imidazol (ambos presentes en el benzimidazol) han presentado resultados favorables para dicho fin, convirtiendo la idea de un nuevo tratamiento paliativo para la EA sea posible.

La utilización de los derivados del benzimidazol se puede contemplar para su administración en la primera y segunda etapa de la enfermedad, dependiendo de a que altura se llegue a obtener el diagnostico, ya que contemplando que el desarrollo de placas amiloides comienzan a generarse en este punto, la utilización de inhibidores vendría resultando en una extensión de tiempo hasta el inicio de la etapa final, aumentando la estimación de una década [19]. El fin por el cual se utilizan inhibidores de AChE es meramente como tratamiento paliativo, al no

tener en la actualidad una cura definitiva para la EA se busca prolongar el tiempo en donde el paciente sufre las consecuencias de la enfermedad, otorgándole así una mejor calidad de vida; como tratamientos paliativos para el Alzheimer se cuentan ya con medicamentos en el mercado, entre ellos el donepezilo, galantamina y la rivastigmina [20]. El conocer que los benzimidazoles puedan entrar en esta categoría de inhibidores no solo da la oportunidad de tener mas opciones de tratamientos terapéuticos, sino que también abre el panorama para futuras investigaciones sobre los efectos de los benzimidazoles en la EA y como sus diferentes tipos de derivados pueden llegar a ser más efectivos que otros para la inhibición de la enzima.

## 5. Síntesis y caracterización de los derivados de benzimidazol:

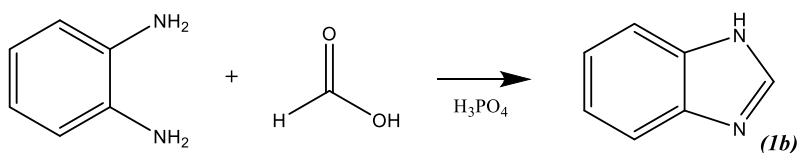
### 5.1. Metodología:

En la propuesta del desarrollo sintético, se trabajaron con diferentes ácidos carboxílicos con características adecuadas para la síntesis, siendo los siguientes:

- a) Ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ).
- b) Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).
- c) Ácido propanoico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ ).
- d) Ácido benzoico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ).
- e) Ácido naftalenacético ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ).

Se mezclaron el *o*-fenilendiamina y el ácido carboxílico en un sistema de reflujo con calor constante y periódicamente se realizan monitoreos por cromatografía de capa fina (CCF). Al finalizar la reacción se precipitó con hidróxido de amonio a un pH de 10 y el precipitado posteriormente se pesó y caracterizó por IR, CG-EM y RMN.

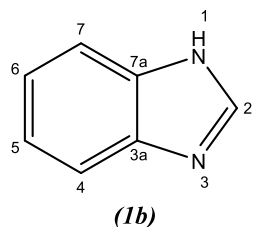
### Benzimidazol (1b):



**Esq. 2.** Síntesis de Benzimidazol (1b).

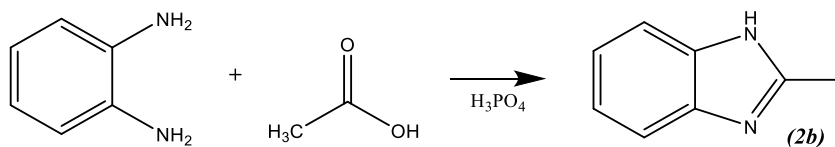
Una mezcla de 0.2g (1.85 mmol) de *o*-fenilendiamina y 0.12g (2.77 mmol) de ácido fórmico en 2mL de ácido fosfórico, se sometió a reflujo por dos horas en agitación constante. Pasado el tiempo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente para

posteriormente adicionar hidróxido de amonio hasta un pH de 10. El precipitado formado se filtró a vacío y se purifico por extracción liquido/liquido con acetato de etilo.



| Nombre                                                          | Benzimidazol                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Formula y peso molecular                                        | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> , 118.14 g/mol                                                                     |
| IR (cm <sup>-1</sup> )                                          | 3115.06 cm <sup>-1</sup> ; 1666.04 cm <sup>-1</sup> ; 1590.49 cm <sup>-1</sup> ; 1452.87 cm <sup>-1</sup> -770 cm <sup>-1</sup> |
| EM m/z (%)                                                      | 117.79 m/z; 90.98 m/z; 62.97 m/z; 118.31 m/z                                                                                    |
| RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Solvente-d <sub>6</sub> ) <b>6</b> | 7.604; 7.599; 7.591; 7.208; 7.200; 7.193; 7.185; 3.455                                                                          |
| RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, Solvente-d <sub>6</sub> ) <b>6</b> | 142; 122; 40                                                                                                                    |
| Punto de fusión                                                 | 125 °C                                                                                                                          |

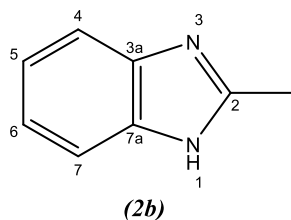
### 2-metil benzimidazol (2b):



**Esq. 3.** Síntesis de 2-metil benzimidazol (2b).

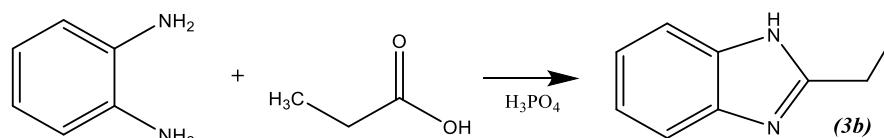
En un matraz bola se vertieron 0.2g (1.85 mmol) de o-fenilendiamina y 0.16g (2.77 mmol) de ácido acético, se disolvieron en 2mL aproximadamente de ácido fosfórico

con calentamiento y agitación constante; se enfrió la mezcla a temperatura ambiente la mezcla, precipitando con hidróxido de amonio. Se continuó con el filtrado y secado para después pesarlo. El curso de la reacción fue motitoreado por CCF.



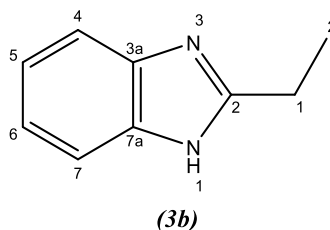
|                                                                     |                                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                                                       | 2-metil benzimidazol                                                                                 |
| <b>Formula y peso molecular</b>                                     | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> , 132.16 g/mol                                          |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>                                         | 2874.91 cm <sup>-1</sup> ; 1555.41 cm <sup>-1</sup> ; 1452.87 cm <sup>-1</sup> -730 cm <sup>-1</sup> |
| <b>EM m/z (%)</b>                                                   | 31.98 m/z; 104.10 m/z; 131.05 m/z; 206.56 m/z                                                        |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>) <b>6</b></b> | 6.611; 6.603; 6.596; 6.588; 6.265; 6.257; 6.251; 6.243                                               |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>) <b>6</b></b> | 152; 122; 40; 15                                                                                     |
| <b>Punto de fusión</b>                                              | 135 °C                                                                                               |

### 2-etil benzimidazol (3b):



**Esq. 4.** Síntesis de 2-etil benzimidazol (3b).

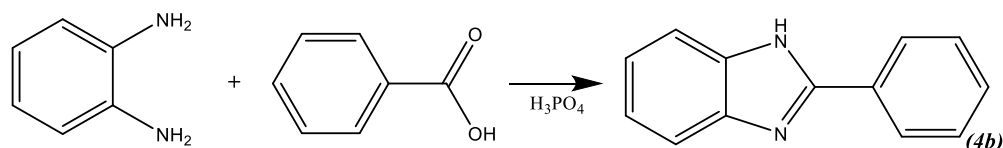
Se mezclaron 0.2g (1.85 mmol) de o-fenilendiamina y 0.2g (2.77 mmol) de ácido propanoico en 2mL aproximadamente de ácido fosfórico; la reacción se detuvo a las 2 horas y se precipitó el producto con hidróxido de amonio hasta un pH de 11 para filtrarlo después por vacío. Se realizaron dos lavados de la fase acuosa del filtrado para extraer remanentes del producto. El curso de la reacción fue monitoreado por CCF.



|                                 |                                                                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                   | 2-etil benzimidazol                                                                                 |
| <b>Formula y peso molecular</b> | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> , 146.09 g/mol                                        |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>     | 2977.45 cm <sup>-1</sup> -2893.80 cm <sup>-1</sup> ; 1455.22 cm <sup>-1</sup> -730 cm <sup>-1</sup> |
| <b>EM m/z (%)</b>               | 145.01 m/z; 146.06 m/z; 130.98 m/z; 92.01 m/z                                                       |

|                                                            |                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>)</b> | 7.481; 7.473; 7.467; 7.459; 7.127;<br>7.119; 7.112; 7.104; 2.867; 2.848;<br>2.829; 2.810; 2.510; 1.344; 1.325;<br>1.306 |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>)</b> | 121; 115; 40; 22; 12                                                                                                    |
| <b>Punto de fusión</b>                                     | 130 °C                                                                                                                  |

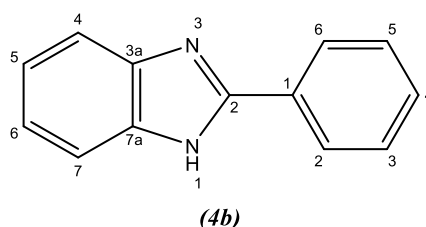
**2-fenil benzimidazol (4b):**



**Esq. 5.** Síntesis de 2-fenil benzimidazol (4b).

En un matraz bola se agregaron 0.2g (1.85 mmol) de *o*-fenilendiamina diluidos en 2mL de ácido fosfórico, y la mezcla se mantuvo en agitación y calentamiento constante. Después de incrementar la temperatura (>130 °C), se adicionó 0.3g (2.77 mmol) de ácido benzoico hasta disolverse en el medio.

La reacción se detuvo a las 2 horas , se precipito y se filtró el producto y se prosiguió con el seacdo y pesado.

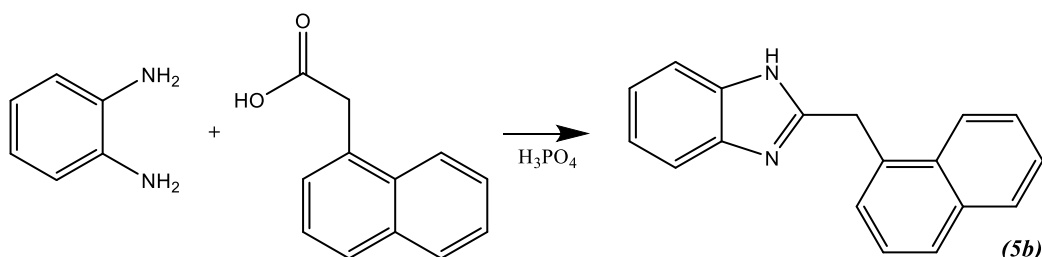


**Nombre**

2-fenil benzimidazol

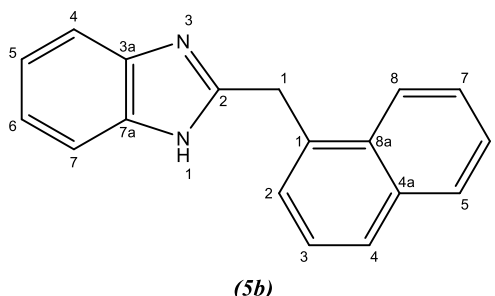
|                                                            |                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Formula y peso molecular</b>                            | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> , 194.13 g/mol                                                                                                                                               |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>                                | 3047.60 cm <sup>-1</sup> ; 1456.22 cm <sup>-1</sup> -770 cm <sup>-1</sup> ;<br>770 cm <sup>-1</sup> -730 cm <sup>-1</sup>                                                                                   |
| <b>EM m/z (%)</b>                                          | 194.08 m/z; 193.09 m/z; 63.05 m/z;<br>195.10 m/z                                                                                                                                                            |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>)</b> | 12.077; 7.369; 7.364; 7.346; 6.740;<br>6.737; 6.733; 6.719; 6.716; 6.700;<br>6.677; 6.673; 6.670; 6.661; 6.655;<br>6.649; 6.640; 6.637; 6.634; 6.381;<br>6.371; 2.596; 1.677; 1.673; 1.663;<br>1.664; 1.659 |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>)</b> | 151; 131; 127; 40                                                                                                                                                                                           |
| <b>Punto de fusión</b>                                     | >260 °C                                                                                                                                                                                                     |

**2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol (5b):**



**Esq. 6.** Síntesis de 2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol (5b).

La reacción se llevó a cabo con 0.2g (1.85 mmol) de o-fenilendiamina y 0.5g (2.77 mmol) de ácido naftalenacético en un sistema de reflujo con calentamiento y agitación constante por 2 horas; se precipito el compuesto 5b con hidróxido de amonio, se filtró y el precipitado se lavó con agua destilada fría para dejar secar durante la noche y al día siguiente pesar y analizar.



|                                                                     |                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                                                       | 2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol                                                                                           |
| <b>Formula y peso molecular</b>                                     | C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> , 258.18 g/mol                                                               |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>                                         | 2739.99 cm <sup>-1</sup> ; 1622.87 cm <sup>-1</sup> ; 1533.83 cm <sup>-1</sup> ; 770 cm <sup>-1</sup> -730 cm <sup>-1</sup> |
| <b>EM m/z (%)</b>                                                   | 243.06 m/z; 257.10 m/z; 258.10 m/z; 128.06 m/z                                                                              |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>)<b>6</b></b>  | 7.003; 7.684; 6.713; 6.696; 6.637; 6.620; 6.615; 6.282; 6.273; 6.255; 6.238; 5.889; 5.881; 5.875; 5.867; 3.424; 2.250       |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, Solvente-d<sub>6</sub>) <b>6</b></b> | 153; 135; 132; 128; 127; 126; 124; 40; 33                                                                                   |
| <b>Punto de fusión</b>                                              | 175 °C                                                                                                                      |

## 5.2. Discusión de Resultados:

Para la obtención de diferentes derivados del benzimidazol se siguió el método de Phillips como anteriormente se menciona; los ácidos carboxílicos utilizados fueron seleccionados con el fin de analizar como los elementos estructurales pueden aumentar o disminuir la actividad inhibitoria. El método de Phillips es el más eficaz para la síntesis de benzimidazoles, es el más comúnmente usado en la actualidad y por ello procede en su mayoría una buena obtención de rendimientos de reacción que van desde 90% y 45% (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Rendimientos de síntesis de derivados.

| Compuesto | Sustituyente         | % Rendimiento |
|-----------|----------------------|---------------|
| 1b        | -H                   | 83.08         |
| 2b        | 2-metil              | 90.18         |
| 3b        | 2-etil               | 83            |
| 4b        | 2-fenil              | 45            |
| 5b        | 2-(1-naftilmetil)-1H | 80            |

**Benzimidazol (compuesto 1b):**

De este compuesto se obtuvo un peso de 181.6 mg y su caracterización se describe a continuación

Espectroscopia infrarroja (IR):

Se puede visualizar en el espectro una banda a  $3115.06\text{ cm}^{-1}$ , interpretándose como el estiramiento N-H de una amina secundaria, a  $1666.04\text{ cm}^{-1}$  representando otra banda de estiramiento de C=N, a  $1590.49\text{ cm}^{-1}$  representando a un grupo N-H, y entre  $1458.27\text{ cm}^{-1}$  y  $770\text{ cm}^{-1}$ , se presentan los estiramientos de C-C y C-N, indicando la presencia de anillos aromáticos.

Cromatografía de gases y espectroscopia de masas (CG-EM):

En el cromatograma el compuesto se pudo observar a un tiempo de 4.33 min; y en el espectro de masas se observaron el pico base y el ion molecular a 118.14 g/mol y 117.79 m/z respectivamente.

Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN):

En este espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , del esqueleto base del benzimidazol aparece una señal a 3.48 ppm que integra para 1 protón, correspondiente del protón de la posición 1, el cual representa la posición más protegida. En el área a 7.20 ppm, dentro del desplazamiento de la región aromática, se encuentra la señal

correspondiente de los protones de la posición 5 y 6, la cual integra para 2 protones y presenta un cuartero, seguido de otra señal aromática a 7.62 ppm, correspondiente de las posiciones 4 y 7 con un cuarteto más a campo bajo, integrando para 2 protones. La señal más desprotegida corresponde a los 8.23 ppm del protón de la posición 2, adyacente a dos nitrógenos, el cual integra para un protón. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , la señal más desprotegida se encuentra a 142.57 ppm, correspondiente de la posición 2, mientras que se aprecia una señal a 122.32 ppm, que corresponde a una señal de los carbonos aromáticos de las posiciones 4, 5, 6, 7, 8 y 9, de la estructura del benzimidazol, además de la señal correspondiente del disolvente, cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) a 40.25 ppm, que aparece en los demás espectros de carbono  $^{13}$  analizados.

## **2-metil benzimidazol (compuesto 2b):**

De este producto se obtuvo una masa de 220.5 mg, y su caracterización se describe a continuación:

### Espectroscopia infrarroja (IR):

En el espectro se visualizan bandas a  $2874.91\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de metilos; a  $1555.41\text{ cm}^{-1}$  un grupo N-H y entre  $1452.87\text{ cm}^{-1}$  a  $770\text{ cm}^{-1}$  el estiramiento entre C-C y C-N, indicando la presencia de un anillo aromático.

### Cromatografía de gases y espectroscopia de masas (CG-EM):

En el cromatograma se puede observar el producto a un tiempo de retención en 4.46 min; y en el espectro de masas el pico base y el ion molecular se identificaron a  $31.98\text{ m/z}$  y  $131.05\text{ m/z}$  respectivamente.

### Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN):

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se muestran señales similares a las presentadas en el espectro del compuesto 1b, en la región aromática a 6.61 ppm, la señal correspondiente de los protones de la posición 4 y 7 que integra para 2 protones

en forma de cuartero, una señal a los 6.27 ppm correspondiente a los protones en posición 5 y 6 que integran para 2 protones como un cuarteto. También se logra confirmar la desaparición del protón en posición 2, ya que ahora se encuentra enlazado un metilo en su lugar, al cual le la señal a 1.63 ppm, con una integración de 3 protones a campo más protegido como es de esperarse. Para el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , aparecen las mismas señales esperadas del esqueleto base del benzimidazol, como lo es la señal a 151.66 ppm del carbono de la posición 2, además de la señal a 121.54 ppm, de los carbonos en las posiciones 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Además, en contraste con la estructura del compuesto 1b, aparece la señal del metilo unido al carbono en posición 2, a 15.6 ppm, en el área más protegida, correspondiente de la región más alifática.

### **2-etil benzimidazol (compuesto 3b):**

De este producto se obtuvo una masa de 163.1 mg y su caracterización de describe a continuación:

#### Espectroscopia infrarroja (IR):

En el espectro podemos observar bandas entre  $2977.45\text{ cm}^{-1}$  y  $2893.80\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de grupos metilos y metilenos y de  $1455.22\text{ cm}^{-1}$  a  $770\text{ cm}^{-1}$ , interpretándose como el estiramiento de C-C y C-N, indicando la presencia de un anillo aromático.

#### Cromatografía de gases y espectroscopia de masas (CG-EM):

En el cromatograma se puede observar el compuesto un tiempo de retención en el minuto 4.62; y en el espectro de masas el pico base y el ion molecular se identificaron a  $145.01\text{ m/z}$  y  $146.06\text{ m/z}$  respectivamente.

#### Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN):

En este espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se presentan las señales correspondientes del área aromática a 7.47 ppm, integrando para 2 protones, en un cuarteto correspondiente a los protones de las posiciones 4 y 7. La otra señal aromática se haya a 7.12 ppm, un cuarteto que integra para 2 protones, correspondiente de los protones de las posiciones 5 y 6. Además, a 2.87 ppm se encuentra la señal correspondiente de los protones del metileno del etilo, la cual integra para dos protones y se encuentra como un cuarteto. La otra señal alifática, aun a campo más alto y protegido, a 1.35 ppm hay un triplete que integra para 3 protones, asignado a los 3 protones presentes en el metilo de la ramificación alifática del benzimidazol.

En su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , la señal más desprotegida, a 156.60 ppm corresponde al carbono en posición 2 adyacente a dos átomos de nitrógeno. A 139.20 ppm se encuentra una señal asignada a los carbonos en posición 8 y 9. A 121.80 ppm, se aprecia una señal que corresponde a los carbonos en posición 5 y 6. A 115.05 ppm se encuentra una señal que corresponde a los carbonos en posición 4 y 7. Más a campo alto, en la región más protegida, a 22.59 ppm, hay una señal correspondiente del metileno unido en la posición inmediata al carbono 2, mientras que a 12.98 ppm aparece la señal más protegida, correspondiente al metilo de la cadena alifática unida al carbono de la posición 2.

### **2-fenil benzimidazol (compuesto 4b):**

De este producto se obtuvo una masa de 161.4 mg y su caracterización se describe a continuación.

#### Espectroscopia infrarroja (IR):

En el espectro de IR podemos visualizar una banda a  $3047.60\text{ cm}^{-1}$  representando el estiramiento de una amina secundaria; entre  $1456.22\text{ cm}^{-1}$  y  $770\text{ cm}^{-1}$  la

presencia de un anillo aromático debido al estiramiento entre C-C; y de  $770\text{ cm}^{-1}$  a  $730\text{ cm}^{-1}$ , la presencia de una sustitución de tipo fenilo en el compuesto analizado.

#### Cromatografía de gases y espectroscopia de masas (CG-EM):

En el cromatograma se puede observar un tiempo de retención en el minuto 6.32; y en el espectro de masas el pico base y el ion molecular coinciden a  $194.08\text{ m/z}$ .

#### Espectroscopia por resonancia magnética nuclear:

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se encuentra a campo muy bajo, el protón enlazado directamente con el átomo de nitrógeno, sumamente desprotegido en la posición 1, a  $12.08\text{ ppm}$  como un singulete. A  $7.36\text{ ppm}$ , se encuentra una señal que corresponde a los protones equivalentes del fenilo que están conectados al átomo de carbono de este anillo aromático, que está directamente unido al carbono de la posición 2. La señal a  $6.721\text{ ppm}$  corresponde a un multiplete de los protones en posición 4 y 7. La señal a  $6.657\text{ ppm}$  trata de un multiplete asignado a los protones en las posiciones restantes de los 3 protones del grupo fenilo unido al benzimidazol en su posición 2. A  $6.377\text{ ppm}$  se encuentra la señal correspondiente de los protones en posiciones 5 y 6, del anillo aromático. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de este compuesto, no se encuentran carbonos alifáticos o protegidos, por lo que no aparecen señales a campo alto a excepción de la señal del disolvente.

Por tanto, se encuentra que la señal más desprotegida, a  $151.66\text{ ppm}$ , corresponde al carbono en posición 2, el carbono adyacente a dos nitrógenos y a un fenilo. Después, a  $130.65\text{ ppm}$  se encuentra la señal correspondiente a los carbonos 8 y 9. A  $130.29\text{ ppm}$  aparece la señal del carbono del anillo aromático unido directamente al carbono en posición 2. A  $129.46\text{ ppm}$  corresponde su señal a los carbonos de los otros 5 carbonos del grupo fenilo adherido al esqueleto del benzimidazol en posición 2. Finalmente,

a 126.92 ppm corresponde a los carbonos de las posiciones 4, 5, 6 y 7 del anillo aromático del esqueleto del benzimidazol.

### **2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol (compuesto 5b):**

De este producto se obtuvo una masa de 382.11 mg, y su caracterización se describe a continuación:

#### Espectroscopía infrarroja (IR):

En el intervalo de  $2904.59\text{ cm}^{-1}$  a  $2739.99\text{ cm}^{-1}$ , se identifican un  $-\text{CH}_2-$  a  $1622.87\text{ cm}^{-1}$ , las bandas de estiramiento de  $\text{C}=\text{N}$  son observadas a  $1533.83\text{ cm}^{-1}$  siendo este el dobles entre  $\text{N}-\text{H}$ , y entre  $770\text{ cm}^{-1}$  y  $730\text{ cm}^{-1}$ , se indica la presencia de una sustitución de tipo fenilo en el compuesto.

#### Cromatografía de gases y espectroscopía de masas (CG-EM):

En el espectro de masas se identifica el pico base a  $243.06\text{ m/z}$  y el ion molecular a  $258.10\text{ m/z}$ .

#### Espectroscopia por resonancia magnética nuclear:

Dentro del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se encuentran las señales de los protones del esqueleto del benzimidazol en la región aromática, pero también se aprecia la señal clave a 3.44 ppm como un singulete que integra para dos protones, correspondiente del grupo metileno que conecta al benzimidazol en la posición 2, y al naftaleno. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se encuentran las señales características anteriormente mencionadas del esqueleto del benzimidazol, principalmente encontrados todos en la región aromática del espectro. También se logra apreciar la relevante señal a 33.24 ppm, correspondiente del carbono del metileno que une al benzimidazol con el naftaleno.

## 6. Modelaje molecular:

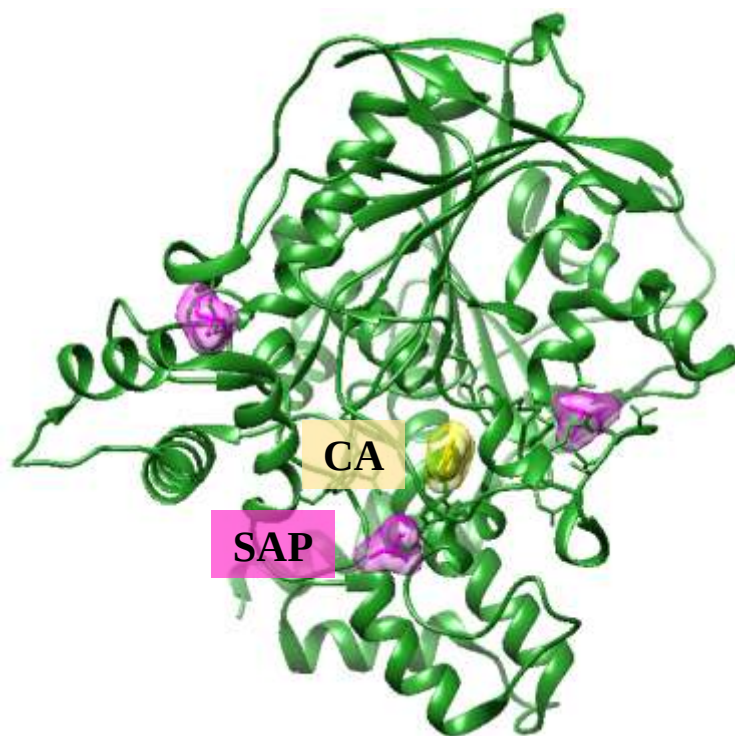
### 6.1. Metodología

Se designaron como ligandos a los compuestos 1b al 5b, junto con Donepezilo como control positivo de los bioensayos enzimáticos. Todo se ilustra utilizando el programa UCSF Chimera, introduciendo el código SMILES generado desde el programa ChemDraw Professional. Se prepararon de forma individual a los ligandos, seleccionando enlaces rotables en AutoDock Tools y minimizando su energía en UCSF Chimera empleando las condiciones predeterminadas para el procedimiento.

**Tabla 2.** Condiciones para el minimizado de energía en UCSF Chimera.

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| <b>Pasos descendentes más pronunciados</b>            | 100     |
| <b>Tamaños de pasos descendentes más pronunciados</b> | 0.02 Å  |
| <b>Pasos de gradiente conjugados</b>                  | 10      |
| <b>Tamaño de pasos de gradiente conjugados</b>        | 0.02 Å  |
| <b>Intervalo de actualización</b>                     | 10      |
| <b>Átomos fijos</b>                                   | Ninguno |

A su vez, se agregaron hidrógenos y posteriormente se designaron las cargas por medio del método Gasteiger en UCSF Chimera. Los ligandos se grabaron en formato “.pdb” para utilizarse en el resto del docking. La proteína hAChE, siendo este el receptor, se descargó de la página web Protein Data Bank (6O4W).



**Figura 5.** Estructura de la hAChE. El esquema nos muestra la ubicación del centro activo (CA) y el sitio aniónico periférico (SAP). Generado con UCSF Chimera.

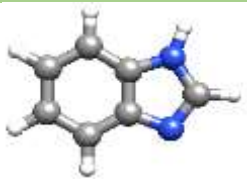
El archivo presentaba además de la enzima co-cristalizada moléculas de donepezilo (centro activo),  $H_2O$ ,  $NO_3$  y glicerol (sitio aniónico periférico) que fueron removidos para así proceder con el cálculo de las cargas y el docking en el programa de AutoDock Tools; el receptor se guardó en formato “.pdb” para su uso subsecuente. El docking molecular se realizó mediante el algoritmo de AutoDockVina, se designó el espacio de búsqueda utilizando las siguientes coordenadas del sitio activo ( $x = 87.9541$ ,  $y = 84.5448$ ,  $z = -3.23301$ ), sitio donde se encontraba anteriormente la molécula de donepezilo en el archivo PDB y que se llegó a utilizar con los demás ligandos; por análisis se obtuvieron las 10 mejores poses con mejor interacción con la enzima y la exhaustividad de la búsqueda fue configurado a 8.

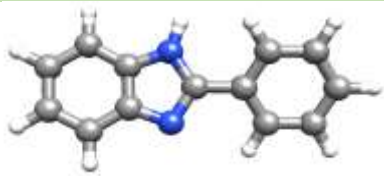
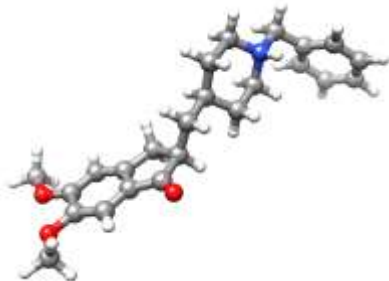
## 6.2. Discusión de Resultados:

La evaluación *in silico* nos permite la visualización de las interacciones producidas entre pequeñas moléculas y grandes, así como proteínas a nivel atómico; primeramente, se trabajó en el algoritmo de muestreo (predicción de “poses del ligando”) y se continuó con la función de puntuación (estimación de energía libre de la unión ligando-receptor). Una vez se hayan procedido sus posibles orientaciones, conformaciones y posiciones hacia el receptor, se determinó la cantidad de energía libre con origen de la unión del complejo ligando-receptor; para cada una de las posiciones del ligando se expresarán como un puntaje o “score: en donde podremos conocer si se presenta una interacción favorable o espontanea, siendo que un valor de menor cifra sea el más próspero.

Con lo antes mencionado podremos deshacernos de las poses de los ligandos con una afinidad menor al receptor y así proseguir con la comparación entre los derivados del benzimidazol y el control positivo del bioensayo enzimático. La comparación de puntajes se llevó a cabo con AutoDockVina, junto con la enzima hAChE (pdb 6O4W) y los siguientes ligandos:

**Tabla 3.** Ligandos utilizados en el docking molecular, ilustrados por UCSF Chimera.

| Nombre de ligando                | Estructura del ligando                                                               |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1b (Benzimidazol)</b>         |  |
| <b>2b (2-metil benzimidazol)</b> |  |
| <b>3b (2-etil benzimidazol)</b>  |  |

|                                               |                                                                                    |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>4b (2-fenil benzimidazol)</b>              |  |
| <b>5b (2-(1-naftilmetil)-1H-benzimidazol)</b> |  |
| <b>Donepezilo</b>                             |  |

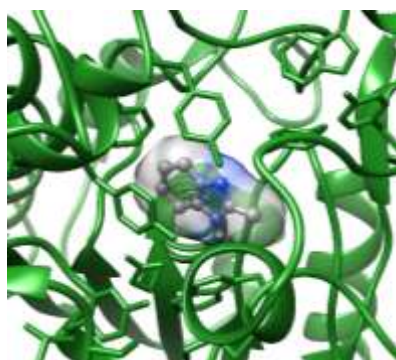
La mayoría de los ligandos mantienen la rigidez en su estructura debido a la estabilidad del anillo aromático y de imidazol, pero manteniendo flexibilidad en sus cadenas alifáticas, a comparación con la proteína, que se trató como una estructura rígida; gracias a poca flexibilidad de los ligandos no fue necesario disminuir drásticamente los enlaces rotables correspondientes a la amina secundaria del benzimidazol.

El docking se llevó a cabo con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los bioensayos enzimáticos; siendo ahora que el programa (AutoDock Tools) nos arrojó los 10 mejores puntajes más favorables en cada uno de los análisis (los puntajes de cada uno de los análisis se muestran en los anexos). De los puntajes obtenidos se seleccionaron los que presentaban una mejor afinidad por el sitio de unión, siendo los siguientes:

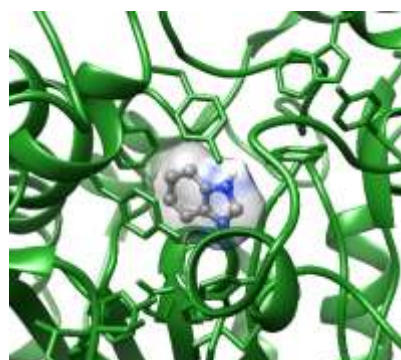
**Tabla 4.** Mejores puntajes de ligandos analizados.

| <b>Ligandos</b> | <b>Puntaje o score<br/>(kcal/mol)</b> |
|-----------------|---------------------------------------|
| <hr/>           |                                       |

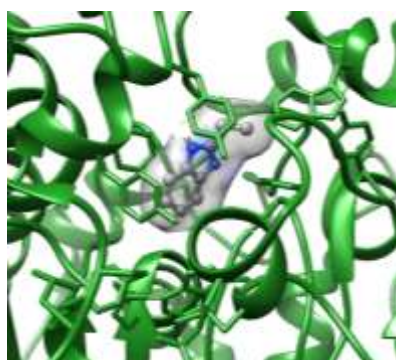
|            |       |
|------------|-------|
| 1b         | -6.0  |
| 2b         | -6.7  |
| 3b         | -7.2  |
| 4b         | -9.2  |
| 5b         | -11.2 |
| Donepezilo | -15.6 |



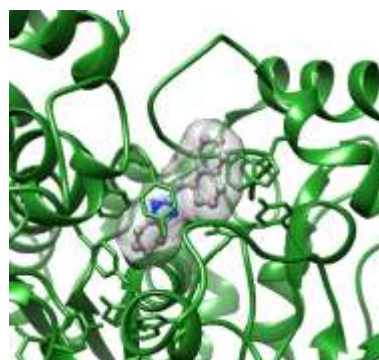
*1b*



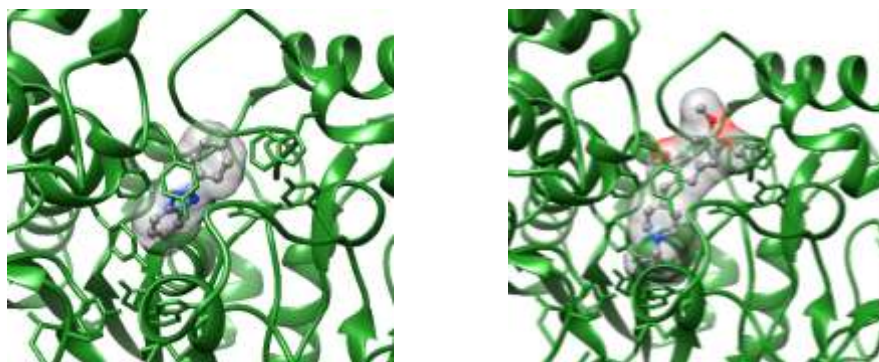
*2b*



*3b*



*4b*



**5b**

**Donepezilo**

**Figura 6.** Localización del ligando en su pose más favorable en relación al sitio activo.

Se encontraron puentes de hidrógeno en los ligandos 3b (2.993Å), 4b (3.050Å) y 5b (3.180Å), todos relacionados entre la tirosina 124 del receptor y el nitrógeno en la posición 3 del ligando. Interpretando los puntajes de la tabla 4, el ligando 1b presenta el puntaje más grande, por ende, es el compuesto con una interacción menor o no tan favorable con la enzima; que el benzimidazol sea el portador del puntaje más alto nos confirma como la planificación de la síntesis fue satisfactoria ya que se buscó aumentar la eficiencia de este compuesto con respecto a su efecto terapéutico. La adición de cadenas alifáticas y de anillos aromáticos al benzimidazol reiteran el fundamento de como los anillos aromáticos no solo producen un aumento de la inhibición enzimática, sino que también aumentan su interacción con la enzima.

La molécula 5b presentó el mejor puntaje de los derivados, sin sobrepasar al donepezilo, que terminó presentando una mejor actividad ligando-receptor en un 28% más que el compuesto mencionado. La adición de un benceno disminuye el puntaje en -2.6 kcal/mol; observando el puntaje obtenido para la molécula 5b (-11.1 kcal/mol) se confirma nuevamente como los anillos benefician la interacción ligando-receptor con la hAChE. La molécula 2b fue la que presento *in vitro* una inhibición colinérgica mayor a comparación de los demás derivados, volviendo cuestionable cómo es que los anillos aromáticos mejoran la actividad del ligando con la enzima, pero no elevando el efecto terapéutico esperado de la molécula.

## 7. Evaluación *in vitro* de inhibición de la acetilcolinesterasa con los benzimidazoles sintéticos:

### 7.1. Metodología:

#### 7.1.1. Prueba de cribado para determinar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima:

Para llevar a cabo el cribado de los compuestos de prueba, se corrieron los experimentos a dos concentraciones diferentes en escala micromolar ( $\mu\text{M}$ ) para tener una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  de cada uno, partiendo desde un stock de 100  $\mu\text{M}$  de los compuestos disueltos en dimetil sulfoxido (DMSO).

Previo al análisis se corrió un blanco de reactivo para concentración de los compuestos, con el fin de calibrar el espectrofotómetro; Se colocaron dentro de una celda de reacción los reactivos y volúmenes descritos en la tabla 1 para obtener un volumen final de 1 mL. La actividad enzimática se determinó a una temperatura constante de 20 °C por cero minutos de incubación (la reacción inicial de forma inmediata al agregar el sustrato).

**Tabla 5.** Contenido de la mezcla de reacción para determinar la cinética de los compuestos a 100  $\mu\text{M}$ .

| Reactivo               | Problema ( $\mu\text{L}$ ) | Control ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Enzima                 | 10                         | 10                        |
| Ellman Buffer          | 970                        | 970                       |
| PBS/BSA 0.01% (pH 7.4) | 9                          | 9                         |
| Compuesto de prueba    | 1                          | -                         |
| DMSO                   | -                          | 1                         |

**Tabla 6.** Contenido de la mezcla de reacción para determinar la cinética de los compuestos a 300  $\mu\text{M}$ .

| Reactivo               | Problema ( $\mu\text{L}$ ) | Control ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Enzima                 | 10                         | 10                        |
| Ellman Buffer          | 970                        | 970                       |
| PBS/BSA 0.01% (pH 7.4) | 7                          | 7                         |

|                     |   |   |
|---------------------|---|---|
| Compuesto de prueba | 3 | - |
| DMSO                | - | 3 |

Los ensayos se repitieron por triplicado bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente para obtener el promedio y su desviación estándar. Una vez obtenidos los datos de la cinética de la reacción, se calcularon los porcentajes de actividad enzimática de acuerdo a la Ecuación 1, para calcular el porcentaje de inhibición de utilizo la Ecuación 2:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\Delta Abs / \text{min del compuesto}}{\Delta Abs / \text{min del control}} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\% \text{ Inhibicion} = 100 - \% \text{ Actividad} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Una vez se obtuvieron los resultados se procedió a graficar el cribado utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0, donde el eje X representa los compuestos y el eje Y representa el porcentaje de inhibición enzimática (gráfica 2).

Las mezclas de ambas concentraciones se reservaron a temperatura ambiente e inmediatamente se adicionaron 10 µL de ATCh 10 µM, procediendo a leer la cinética en el espectro a 412 nm.

#### 7.1.2. Determinación de la potencia de los benzimidazoles mediante la CI<sub>50</sub> con la enzima hAChE:

Para poder realizar el estudio de la potencia de los compuestos, se seleccionaron como compuestos a estudiar cinco benzimidazoles que presenten una inhibición mayor al 50% de la hAChE, partiendo desde resultados de prueba del cribado a 300µM. La concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) se mide a una concentración de sustrato fija de 10mM utilizando ocho diferentes concentraciones de los compuestos a analizar (tabla 7). Todas las diluciones se llevaron a cabo utilizando DMSO como disolvente para preparar las soluciones stock de los compuestos.

**Tabla 7.** Preparación de las ocho concentraciones finales con las que se llevó a cabo la determinación de la IC<sub>50</sub> para cada compuesto.

| C  | M                  | log M | [Final] $\mu$ M | [Stock] mM |
|----|--------------------|-------|-----------------|------------|
| C1 | 1x10 <sup>-7</sup> | -7    | 0.1             | 0.01       |
| C2 | 1x10 <sup>-6</sup> | -6    | 1               | 1          |
| C3 | 1x10 <sup>-5</sup> | -5    | 10              | 10         |
| C4 | 5x10 <sup>-5</sup> | -4.3  | 50              | 50         |
| C5 | 1x10 <sup>-4</sup> | -4    | 100             | 100        |
| C6 | 3x10 <sup>-4</sup> | -3.52 | 300             | 300        |
| C7 | 5x10 <sup>-4</sup> | -3.30 | 500             | 300        |
| C8 | 1x10 <sup>-3</sup> | -3    | 1000            | 300        |

Para obtener la concentración final de los compuestos se tomó 1 $\mu$ l de la solución stock para obtener una concentración final de solvente no mayor al 0.3% [24]. La cuantificación de la cinética enzimática se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro anteriormente descrito en la sección del cribado y en las mismas condiciones.

Para el actual experimento se prepararon suficientes tubos eppendorf con 970 $\mu$ l del reactivo de Ellman (PBS + BSA al 0.01% + DTNB) los cuales se utilizaron en las determinaciones de la actividad enzimática para cada concentración de los compuestos. Se calibro el espectrofotómetro con un blanco de reactivo para cada una de las 8 concentraciones diferentes, colocando en una celda de reacción 970 $\mu$ l del reactivo de Ellman mas lo indicado en la tabla 8 para obtener un volumen final de 1ml. Para correr los controles, se procedió a colocar en los tubos eppendorf con 970 $\mu$ l de reactivo de Ellman, más lo indicado en la tabla 8, para obtener un volumen final de 1ml. La solución enzimática previamente se preparó a una concentración de 300 UI, para obtener un cambio de absorbancia de 0.2 a 0.3 Abs/min.

Los ensayos se repitieron por triplicado bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para obtener el promedio y la desviación estándar. Una vez obtenidos los datos de la cinética, se calculó el porcentaje de actividad enzimática de acuerdo a la Ecuación 1, para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la Ecuación 2. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta semi-logarítmicas de la concentración de ligando contra la actividad de AChE con respecto al control, utilizando el software GraphPad Prism 8.0.

**Tabla 8.** Contenido de la mezcla de reacción para leer la actividad enzimática a una longitud de onda de 412 nm por 1 minuto.

| Reactivo                                                                       | Problema (μL) | Blanco de reactivo (μL) | Control |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|---------|
| PBS 0.1M, pH 7.4/BSA 0.01%                                                     | 9             | 19                      | 9       |
| Compuesto + DMSO                                                               | 1             | 1                       | -       |
| Enzima (hAChE)                                                                 | 10            | -                       | 10      |
| DMSO                                                                           | -             | -                       | 1       |
| La mezcla se reservó a temperatura ambiente e inmediatamente se adiciono:      |               |                         |         |
| ATCh 10mM                                                                      | 10            | 10                      | 10      |
| Se procedió a leer la actividad en 1 minuto, en el espectrofotómetro a 412 nm. |               |                         |         |

## 7.2. Resultados:

### 7.2.1. Prueba de cribado para determinar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima:

La actividad inhibitoria sobre la enzima AChE humana inducida por los cinco compuestos derivados del benzimidazol se midieron en ensayos espectrofotométricos basados en la reacción de Ellman a temperatura ambiente (20 °C). Los ensayos se llevaron a cabo a una concentración de inhibición de 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M sin incubar, hallando que cuatro de cinco compuestos que se ensayaron inhiben a la enzima en porcentajes variados según la prueba de cribado. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3:

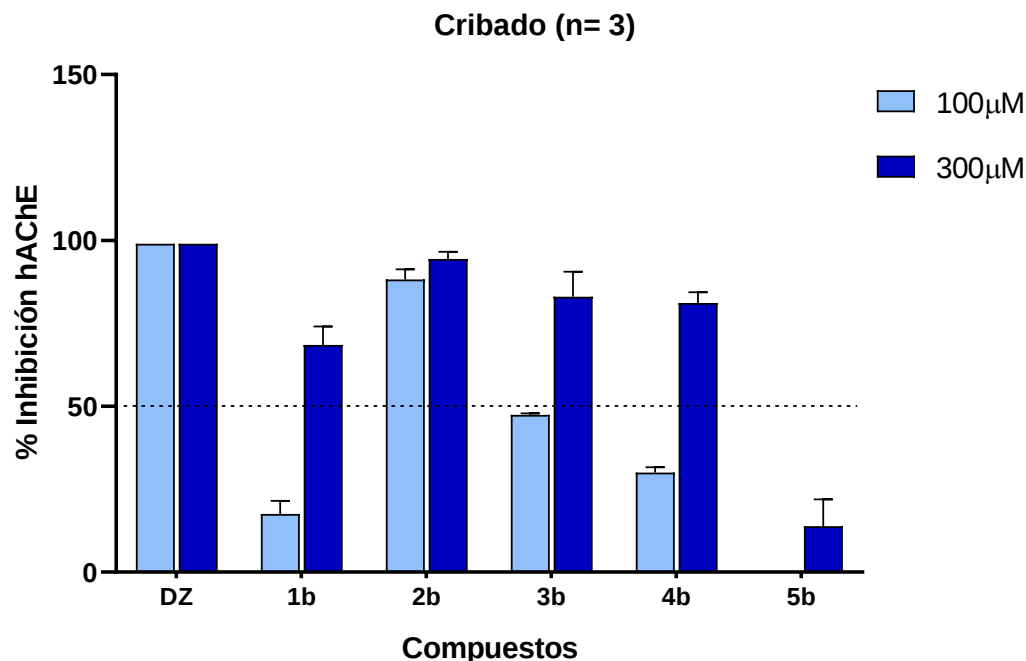
**Tabla 9.** Resultados de la actividad catalítica de los compuestos sobre la enzima AChE.

| Compuesto | Inhibición 100 $\mu$ M (% , SD) | Inhibición a 300 $\mu$ M (% , SD) |
|-----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1b        | 17.11 $\pm$ 4                   | 68.46 $\pm$ 5.5                   |
| 2b        | 88.23 $\pm$ 3                   | 94.44 $\pm$ 2                     |
| 3b        | 47.39 $\pm$ 0.5                 | 83.0 $\pm$ 7.5                    |
| 4b        | 30.05 $\pm$ 1.6                 | 81.15 $\pm$ 3.20                  |
| 5b        | 0 $\pm$ 0                       | 13.90 $\pm$ 8                     |

En base a los resultados del porcentaje de actividad inhibitoria de los compuestos, sobre la enzima AChE humana presentados en la Tabla 3, se demostró que los 4 compuestos que inhibieron a la enzima a una concentración de inhibición de 100  $\mu$ M fueron los compuestos 2b y 3b. Por otra parte, al aumentar la concentración de inhibición a 300  $\mu$ M, también se incrementó el porcentaje de inhibición de todos los compuestos en este caso, el orden de las actividades de inhibición de los compuestos fue el siguiente: 2b>3b>4b>1b>5b.

Los resultados se contrastaron con pruebas control, para este efecto se utilizó donepezilo, fármaco anticolinérgico, como control positivo. En la Figura 7 se muestra

la gráfica con el porcentaje de inhibición para cada compuesto a una concentración de inhibición de 100 y 300  $\mu\text{M}$ , a temperatura ambiente.

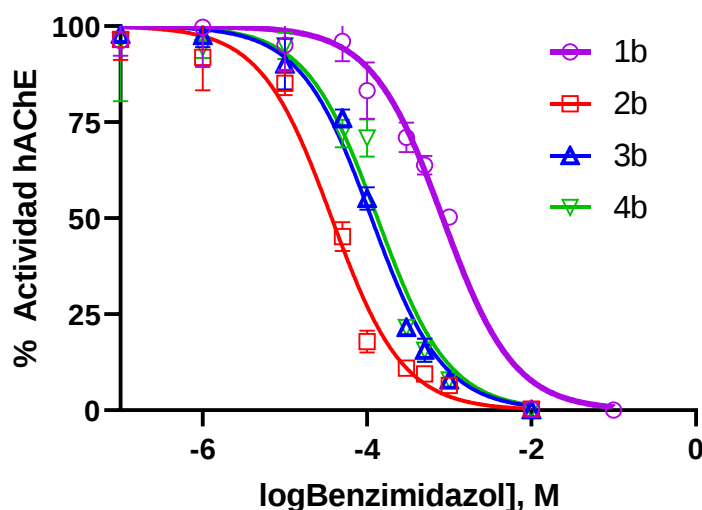


**Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición enzimática a dos concentraciones de inhibición. Los resultados se muestran como medias y desviación estándar de  $n=3$ .

Como es notable en la figura 1, los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición por arriba del 50% a 300  $\mu\text{M}$  fueron los siguientes compuestos: 1b ( $68.46 \pm 5.5$ ), 2b ( $94.44 \pm 2.1$ ), 3b ( $83.06 \pm 7.5$ ) y 4b ( $81.5 \pm 3.2$ ). Cabe resaltar que el compuesto que presente una inhibición inferior al 50%, no presentan afinidad por la enzima, por lo que se requiere una cantidad mayor de compuesto para observar un cambio. Sin embargo, a altas concentraciones del compuesto pudiera existir un hidrólisis del sustrato; el cribado del compuesto 5b, además de presentar insolubilidad en el buffer, presento un porcentaje de inhibición inferior al 50%, por lo que se descartara para la curva  $\text{IC}_{50}$ .

### 7.2.2. Determinación de la potencia de los benzimidazoles mediante la $CI_{50}$ con la enzima hAChE:

Se seleccionaron los cuatro compuestos que presentaron un mayor porcentaje de inhibición según los resultados de la prueba de cribado, en este caso fueron los compuestos benzimidazolicos: 1b, 2b, 3b, y 4b. La actividad inhibitoria de estos compuestos fue evaluada con al menos ocho concentraciones diferentes de los compuestos y una concentración fija del sustrato, con lo cual se determinó su potencia inhibitoria expresada como la concentración del compuesto que se requiere para inhibir a la enzima en un 50% ( $CI_{50}$ ). Con los resultados experimentales se graficó el porcentaje de actividad enzimática contra el logaritmo de la concentración de los compuestos, como se muestran en la figura #.

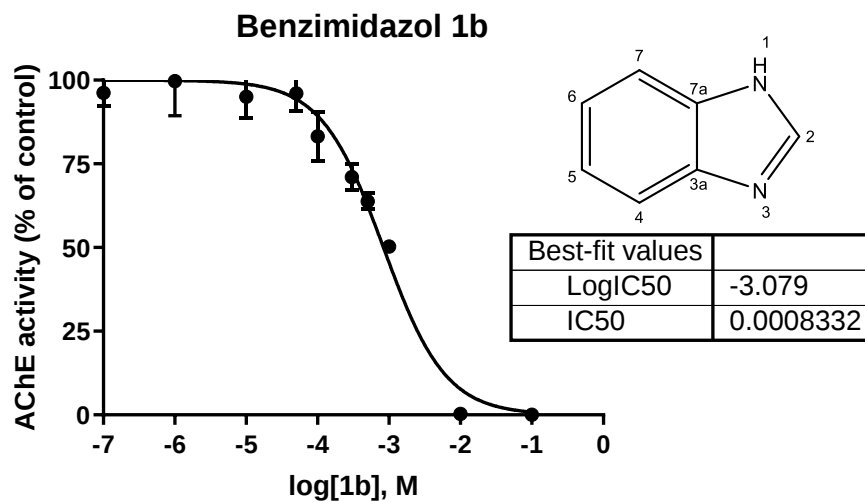


**Gráfica 2.** Curvas concentración-respuesta de los cuatro benzimidazoles ensayados. Todos los resultados se encuentran expresados como medias y desviación estándar de  $n=3$ .

La grafica anterior corresponde al concentrado de las curvas de concentración respuesta, representada como logaritmo de la concentración de los compuestos utilizados en este ensayo contra la actividad de la enzima con respecto al control. Donde se deduce que las curvas más cercanas al eje de las ordenadas corresponden a los compuestos con mayor potencia. De igual manera se pueden apreciar las gráficas

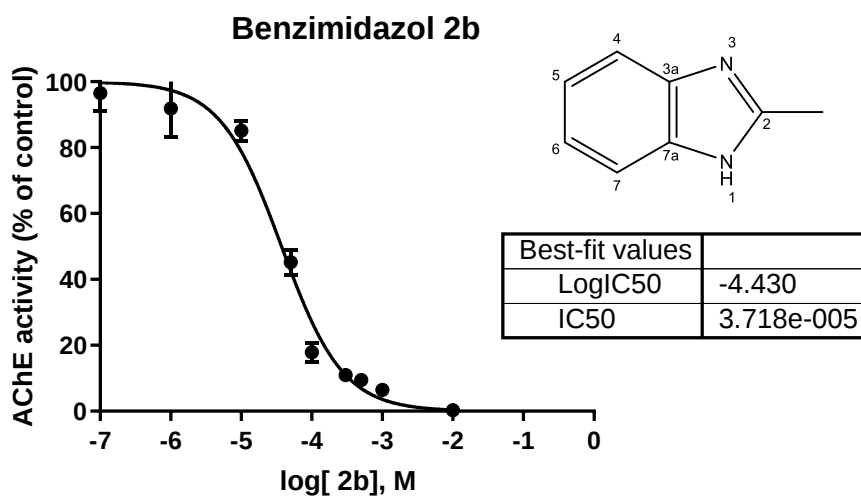
individuales de los compuestos 1b, 2b, 3b y 4b junto con su estructura química. La potencia del compuesto 5b no fue determinada.

Benzimidazol (1b):



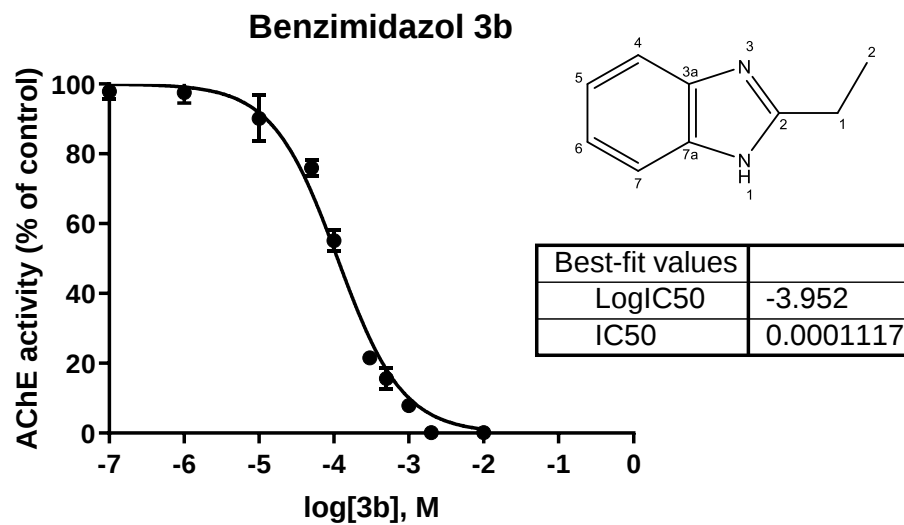
**Gráfica 3.** Curva concentración-respuesta del benzimidazol (1b).

2-metil benzimidazol (2b):



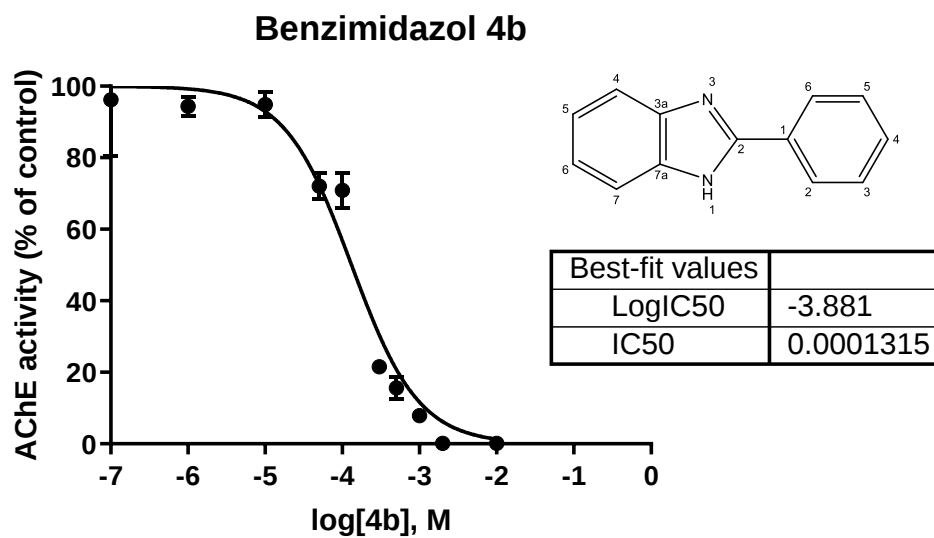
**Gráfica 4.** Curva concentración-respuesta del 2-metil benzimidazol (2b).

2-etil benzimidazol (3b):



**Gráfica 5.** Curva concentración-respuesta del 2-etil benzimidazol (3b).

2-fenil benzimidazol (4b):



**Gráfica 6.** Curva concentración-respuesta del 2-etil benzimidazol (4b).

Con base en los valores de la  $CI_{50}$  obtenidos en el ensayo para cada compuesto, se determinó que el compuesto que inhibe con mayor potencia a la enzima hAChE es el 2b ( $37.1 \pm 1 \mu M$ ), seguido por el 3b ( $111.7 \pm 1 \mu M$ ) y en tercer lugar el compuesto 4b ( $131.5 \pm 1.1 \mu M$ ). El compuesto restante (1b) presento valor de  $CI_{50} \sim 833 \mu M$ , como se puede apreciar en la tabla #, en donde se recopilan los valores de la  $CI_{50}$  para cada compuesto que demostró una inhibición mayor al 50% en la prueba de cribado a  $300 \mu M$ .

**Tabla 10.** Resultados de  $IC_{50}$  de los 4 compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición.

| Derivado de benzimidazol | $CI_{50}$ ( $\mu mol/L$ ) |
|--------------------------|---------------------------|
| 1b                       | $833.2 \pm 1.08$          |
| 2b                       | $37.1 \pm 1.09$           |
| 3b                       | $111.7 \pm 1.1$           |
| 4b                       | $131.5 \pm 1.06$          |

## 8. Conclusiones:

1. La síntesis de compuestos de tipo benzimidazol procede satisfactoriamente con el método de Phillips, evidencia de esta afirmación es el tiempo y los rendimientos de reacción.
2. Todos los productos sintetizados fueron caracterizados por técnicas de espectrometría de masas y espectroscopía para definir sus estructuras moleculares.
3. Con el estudio de modelaje molecular, se establece que la molécula 5b presenta una mejor actividad ligando-receptor que el resto de los derivados sintetizados.
4. El estudio de modelaje molecular sugiere que la adición de cadenas alifáticas y anillos aromáticos al benzimidazol producen un aumento de la inhibición enzimática y de la interacción con la enzima.
5. Con los resultados del porcentaje de actividad inhibitoria sobre la enzima AChE humana, se determinó que los compuestos 2b y 3b fueron los más activos a una concentración de inhibición de 100 y 300  $\mu\text{M}$ .
6. En la determinación de la  $\text{CI}_{50}$  con la enzima hAChE, el compuesto con mayor potencia enzimática fue el derivado 2b ( $37.1 \pm 1 \mu\text{M}$ ).

## 9. Bibliografía:

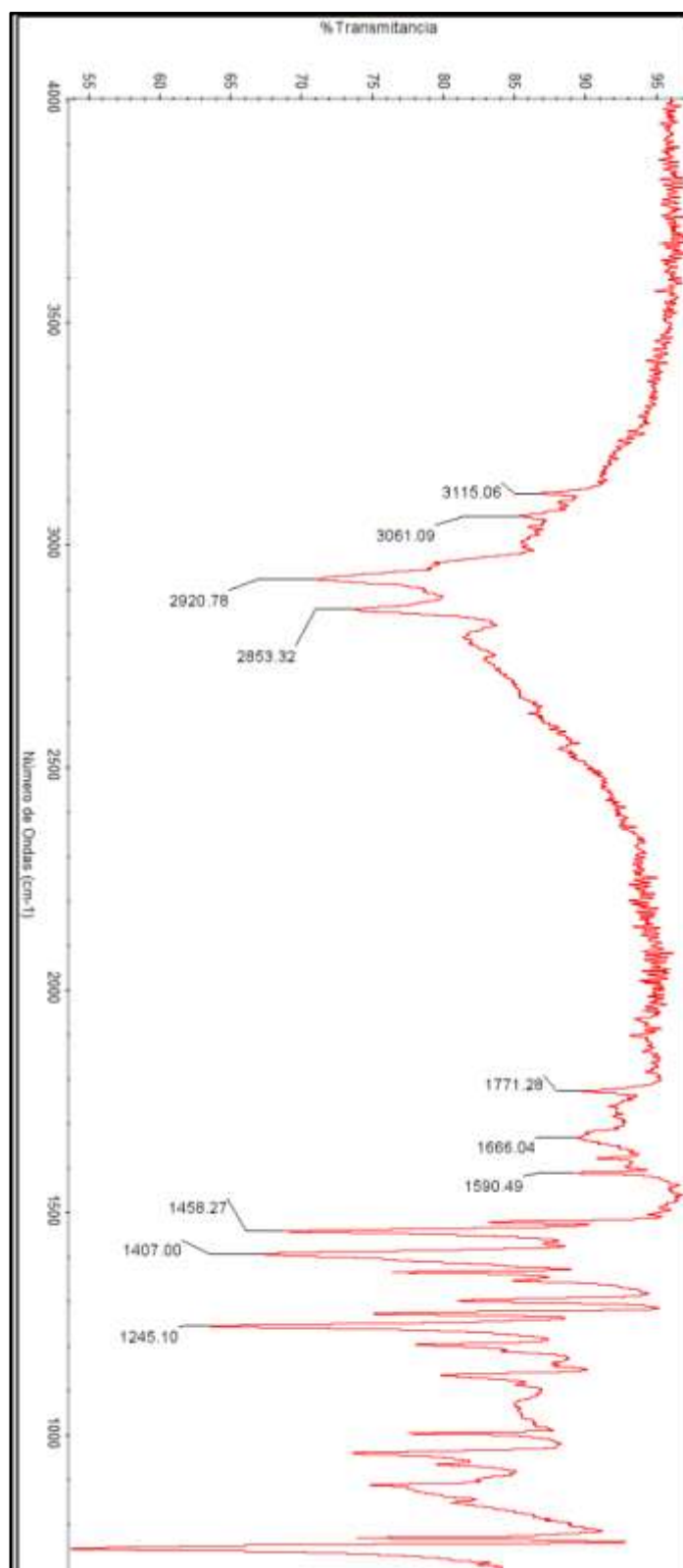
- [1] Wagner Barajas-Carrillo, V. (2020, 23 noviembre). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activity of aliphatic and aromatic edaravone derivatives. Medical Chemistry Research. Recuperado 5 de Octubre de 2022, de <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02667-5>
- [2] Maragall, F. P. (s. f.). *Donepezilo, rivastigmina y galantamina: fármacos específicos Alzheimer*. <https://blog.fpmaragall.org/donepezilo-rivastigmina-galantamina>
- [3] Garcia, G. L. M. (2011a, mayo 5). *Derivados de Bis(aralquil)amino y sistemas (hetero)aromáticos de seis miembros y su uso en el tratamiento de patologías neurodegenerativas, incluida la enfermedad de alzheimer*. csic.es. Recuperado 19 de octubre de 2023, de <https://digital.csic.es/bitstream/10261/41464/1/WO2011051535A1.pdf>
- [4] Martínez, M. G. A. (2007a, agosto 16). *Inhibidores de la acetilcolinesterasa del sitio de unión dual para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*. csic.es. Recuperado 19 de octubre de 2023, de [https://digital.csic.es/bitstream/10261/6303/1/2279143\\_T3.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/6303/1/2279143_T3.pdf)
- [5] Neira, F. (s. f.-a). *Antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA en el tratamiento del dolor crónico*. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1134-80462004000400005#:~:text=RECEPTOR%20GLUTAMAT%C3%89RGICO%20N-METIL-D,de%20fibras%20aférentes%20primarias%20nociceptivas](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462004000400005#:~:text=RECEPTOR%20GLUTAMAT%C3%89RGICO%20N-METIL-D,de%20fibras%20aférentes%20primarias%20nociceptivas).
- [6] Alpízar-Quesada, C. L. (2003, junio). *La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa*. scielo.sa.cr. Recuperado 20 de octubre de 2023, de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022003000200005#:~:text=Desde%20principios%20de%20los%20noventa,primer%20medicamento%20de%20esta%20clase](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005#:~:text=Desde%20principios%20de%20los%20noventa,primer%20medicamento%20de%20esta%20clase)
- [7] Pardeshi, V. A. S., Chundawat, N. S., Pathan, S., Sukhwai, P., Chundawat, T. P. S., & Singh, G. P. (2020). A review on synthetic approaches of benzimidazoles. *Synthetic Communications*, 51(4), 485-513. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1841239>
- [8] Carvente, C. A. C. G. (2016). *Diseño por acoplamiento molecular, síntesis y evaluación de derivados de bencimidazol como inhibidores de la enzima PTP1B* [Tesis para obtención de título]. Universidad Nacional Autónoma de México.

- [9] Cordes, M. M. C. (1968). I~ared and Raman studies of heterocyclic compounds--H In~ared spectra and normal vibrations of ben~mid~)le and bis-(ben~midazolato)-metal complexes\*. *Spectrochimica*, 24A, 1421-1435. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1968AcSpA..24.1421C/abstract>
- [10] Nie, Q., Du, X., y Geng, M. (2011) Small molecule inhibitors of amyloid  $\beta$  peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 545-551.
- [11] Hamley, I. W. (2012) The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* 112, 5147-5192
- [11] Carretero, M. (2003, 1 julio). *Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer*. Offarm. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-inhibidores-acetilcolinesterasa-el-tratamiento-13050017#:~:text=El%20papel%20primordial%20de%20la,enzima%20y%20liberaci%C3%B3n%20de%20Ch.>
- [12] *Nuevo asedio a la beta amiloide, proteína clave del Alzheimer*. (2021, 2 junio). CiQUS - USC - Universidad de Santiago de Compostela. [https://www.usc.es/ciqus/es/ndp\\_ab#:~:text=La%20acumulaci%C3%B3n%20de%20beta%20amiloide,responsables%20del%20progresivo%20deterioro%20cognitivo.](https://www.usc.es/ciqus/es/ndp_ab#:~:text=La%20acumulaci%C3%B3n%20de%20beta%20amiloide,responsables%20del%20progresivo%20deterioro%20cognitivo.)
- [13] Gambrah-Lyles, C. G. (2022, 7 febrero). Alzheimer's Disease. buoyhealth.com. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.buoyhealth.com/learn/alzheimers-disease#definition>
- [14] Jimenez Barreto, E. (2014). Síntesis, purificación y caracterización de 2-arilmetil-1H-benzimidazoles mediante el empleo de energía infrarroja. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado 5 de Octubre de 2023, de <http://132.248.9.195/ptd2014/febrero/07009543/0709543.pdf>
- [15] Trott, O. T. (2010). *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading*. National Library of Medicine. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041641/>

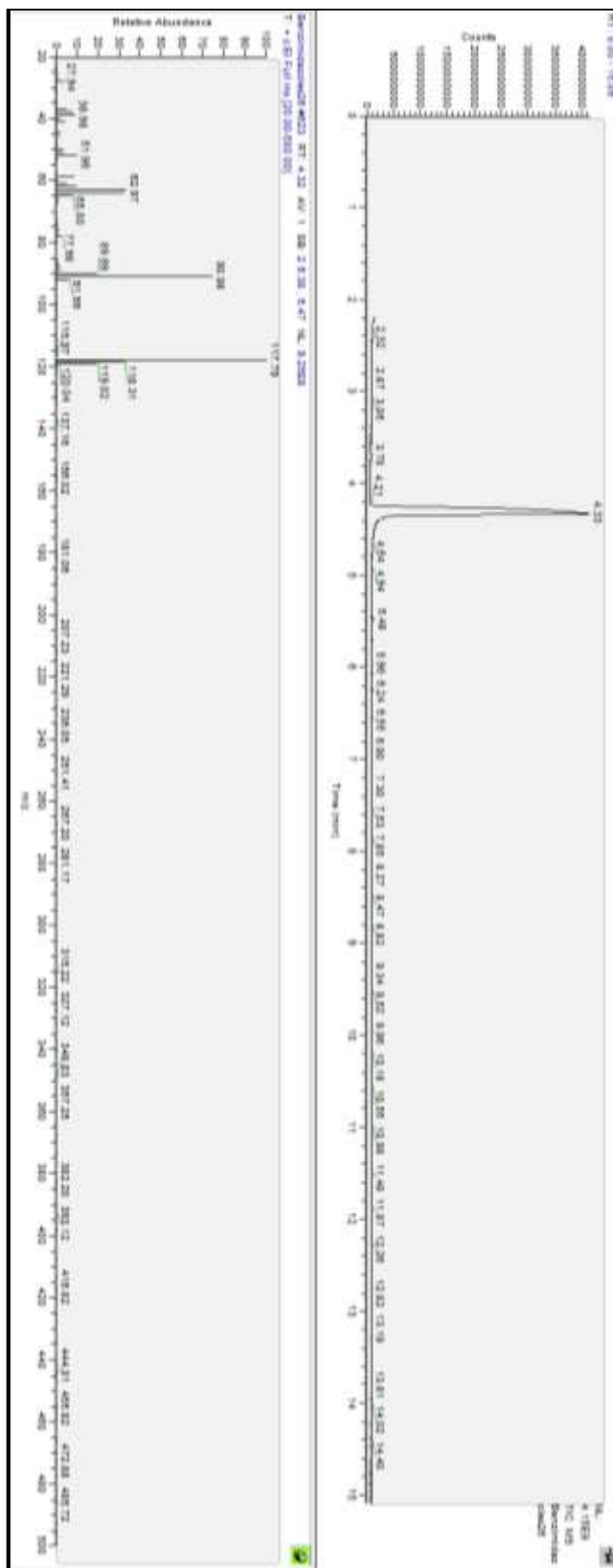
- [16] *Estadios del Alzheimer: Cómo avanza la enfermedad*. (2023, 7 junio). Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-stages/art-20048448>
- [17] De Salud, S. (s. f.). *Enfermedad de Alzheimer, demencia más común que afecta a personas . . .* gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/es/articulos/enfermedad-de-alzheimer-demencia-mas-comun-que-afecta-a-personas-adultas-mayores?idiom=es>
- [18] *Etapas*. (s. f.). Alzheimer's Disease and Dementia. <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/etapas>
- [19] *Enfermedad de Alzheimer: los medicamentos ayudan a controlar los síntomas*. (2023, 30 agosto). Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048103#:~:text=Suelen%20ser%20m%C3%A1s%20eficaces%20en,en%20etapa%20inicial%20a%20moderada>.
- [20] Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *The Cochrane library*, 2016(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd005593>
- [21] Díaz, L. J. D. R. (2019). *Caracterización fitoquímica de metabolitos bioactivos de tipo terpeno y flavonoide de la raíz de Salvia brandegeei y aproximación sintética de análogos flavónicos* [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Baja California.
- [22] Islas, E. I. T. (2019). Síntesis del 2-metil-1H-benzo[d]imidazol y 2-etil-1H-benzo[d]imidazol a partir de de L-serina, L-treonina, L-cisteína. *uaeh.edu.mx*. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icbi/historial.html>
- [23] Kumar, S. K. M. (2018, 19 julio). Design, synthesis of novel azo derivatives of benzimidazole as potent antibacterial and anti tubercular agents. *sciencedirect.com*. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S231485351630066X>
- [24] Fekonja, O. F. (2018). Inhibition and protection of cholinesterases by methanol and ethanol. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 407-415. <https://doi.org/10.1080/14756360601143857>
- [25] M., A. M. R. (2018, 15 marzo). Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *revistas.unc.edu.ar*. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFYN/article/view/16814>

- [26] Neira, A. C. N. D. (2015). *Estudio de complejos de cobre con ligantes derivados del bencimidazol inspirados en el sitio activo de las enzimas polisacárido monooxigenasas AA9, AA10 y AA11* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [27] Noriega-Irbe, E. N. (2020). In Vitro and In Silico Screening of 2,4,5-Trisubstituted Imidazole Derivatives as Potential Xanthine Oxidase and Acetylcholinesterase Inhibitors, Antioxidant, and Antiproliferative Agents. *MDPI*. <https://doi.org/10.3390/app10082889>
- [28] Núñez, R. R. N. M. (2004). Cinética de degradación del naftaleno por células inmovilizadas húmedas de *Bacillus alcalophilus* cepa IDO-225. *redalyc.org*. Recuperado 13 de diciembre de 2023, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226079003>
- [29] Martínez, P. M. M. (2012). ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA EN EL TEJIDO PULMONAR HUMANO Y SUS ALTERACIONES EN DISTINTOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS [Tesis de doctorado]. Universidad de Murcia.
- [30] Segura, M. S. R. (2018). INHIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASA Y OTROS TRATAMIENTOS PARA EL ALZHEIMER (II). [Trabajo de fin de grado]. Universidad Complutense.
- [31] Universidad Nacional de Cuyo, & Retta, G. R. (2018). Estudio de modelado molecular de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. Jornadas de jóvenes investigadores AUGM.

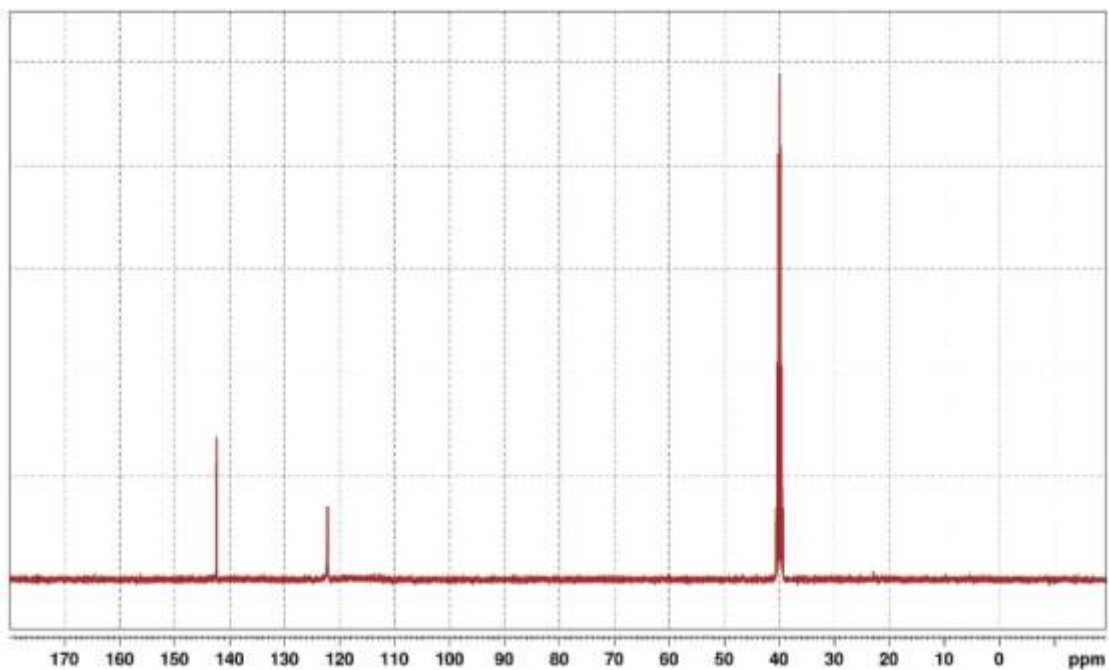
## 10. Anexos:



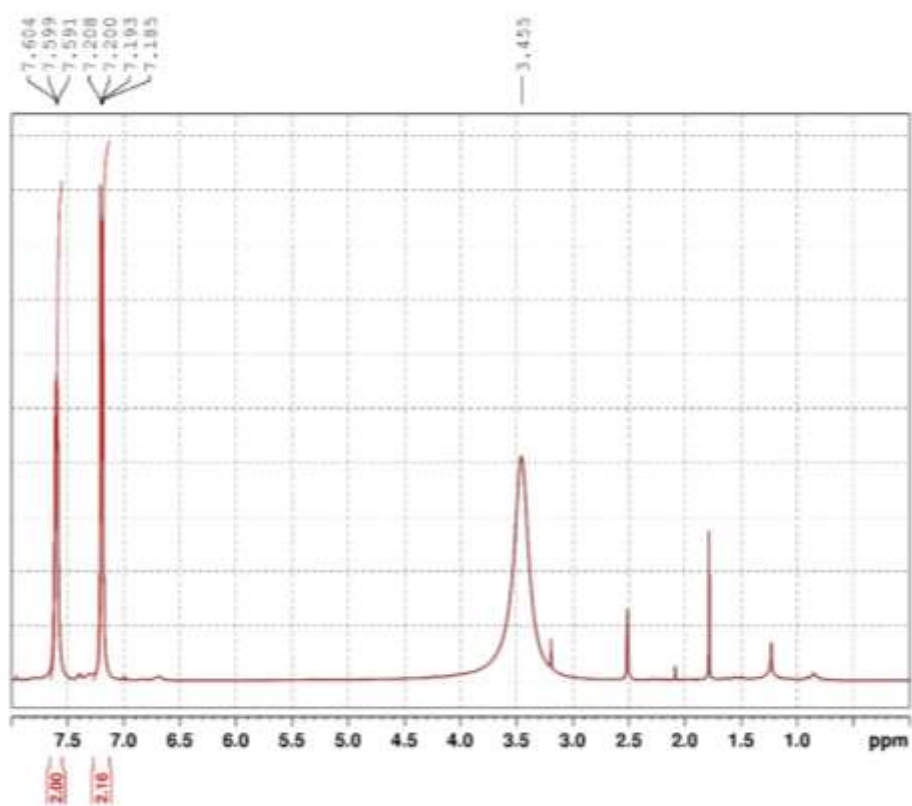
**Anexo 1.** Espectro de IR del compuesto 1b.



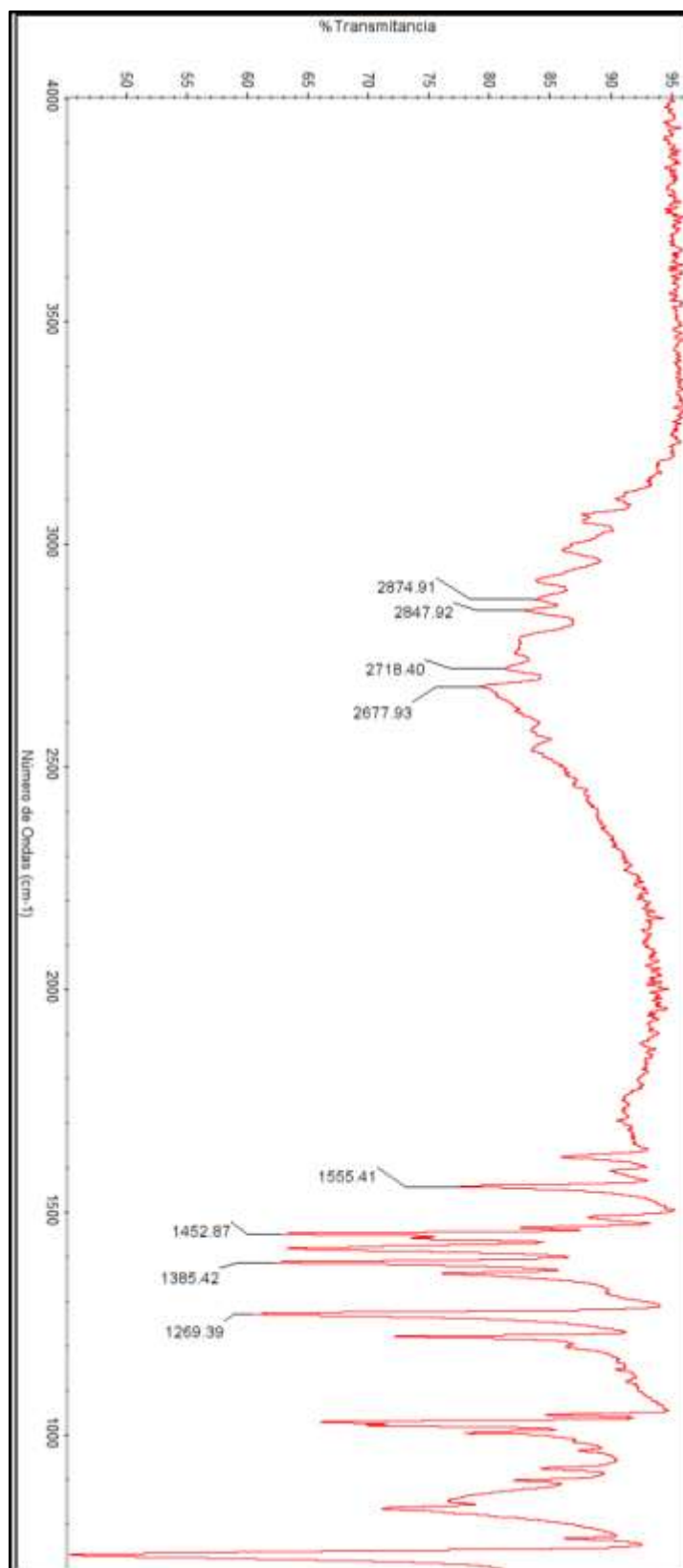
**Anexo 2.** Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 1b.



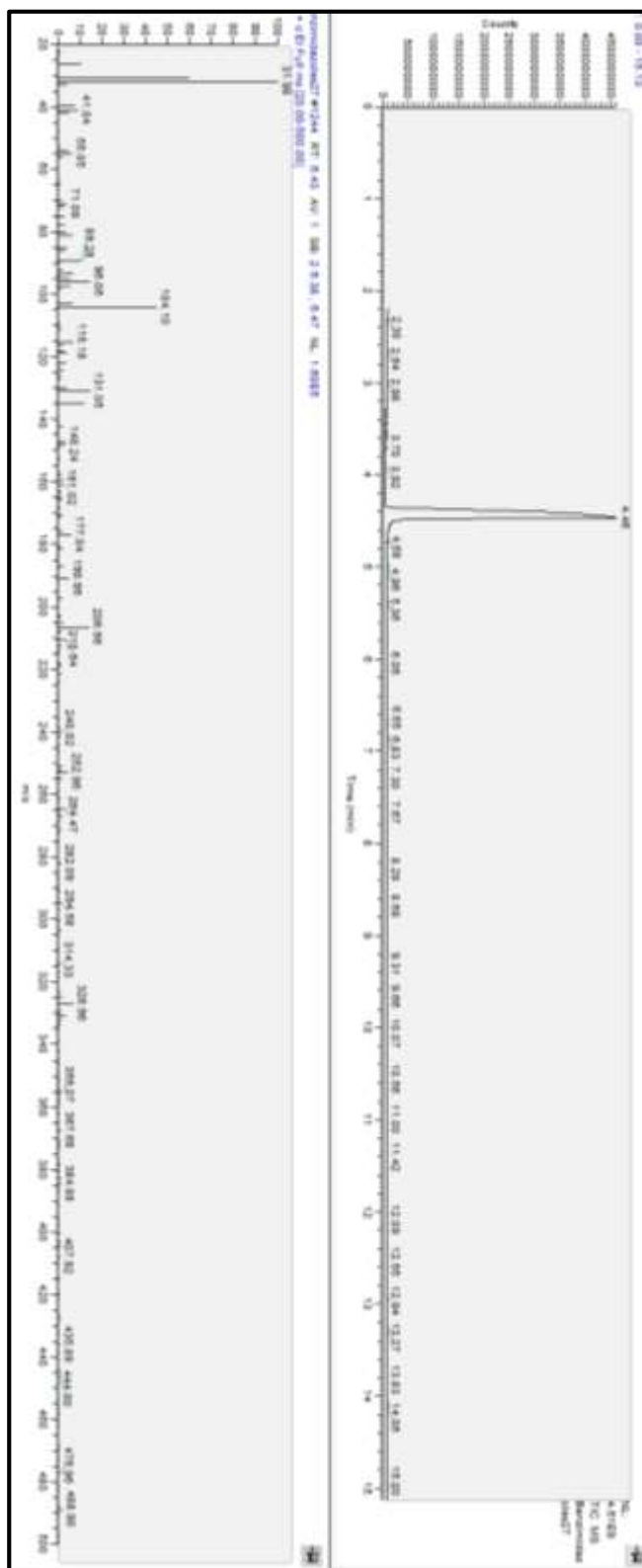
**Anexo 3.** Espectro de resonancia magnetica nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 1b.



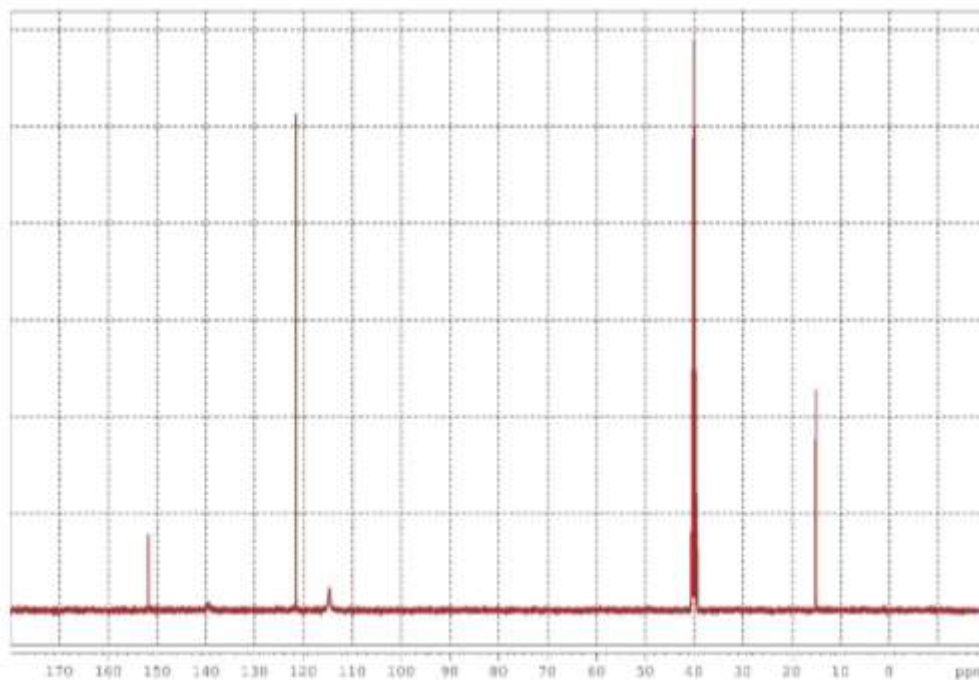
**Anexo 4.** Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 1b.



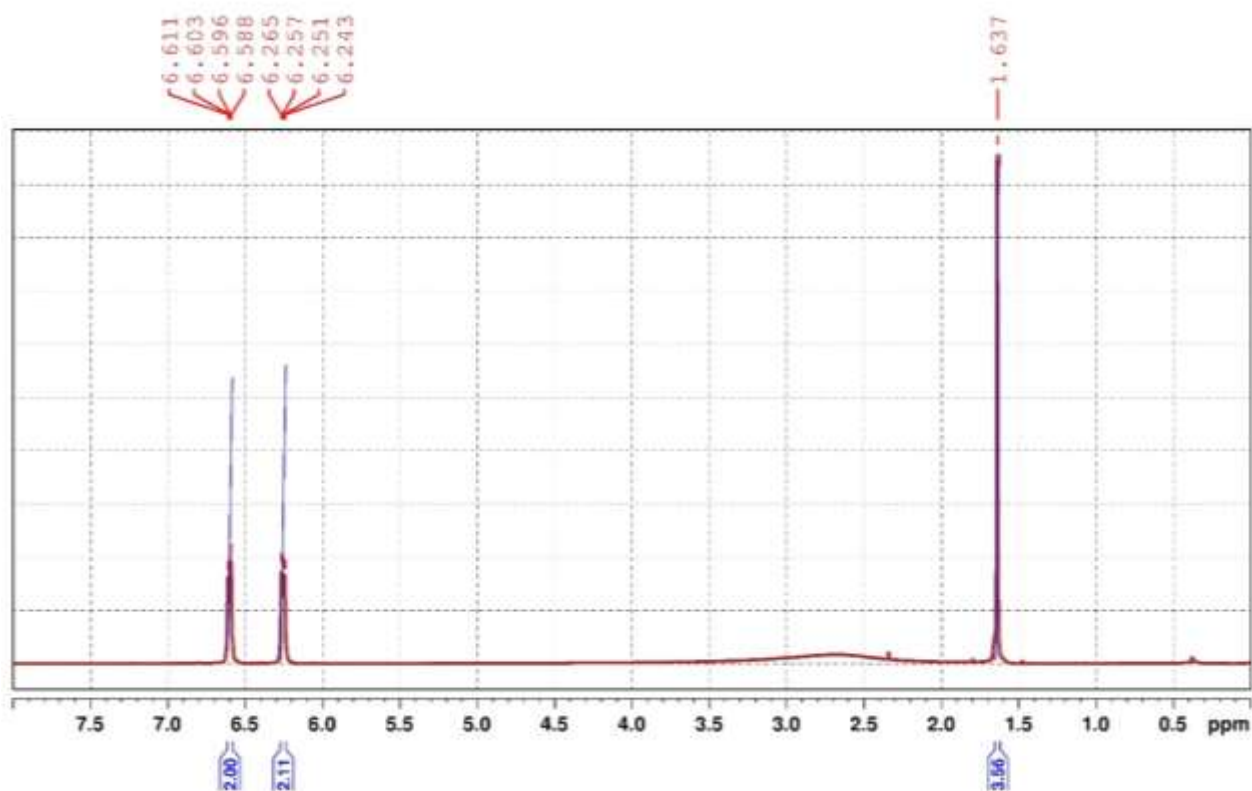
**Anexo 5.** Espectro de IR del compuesto 2b.



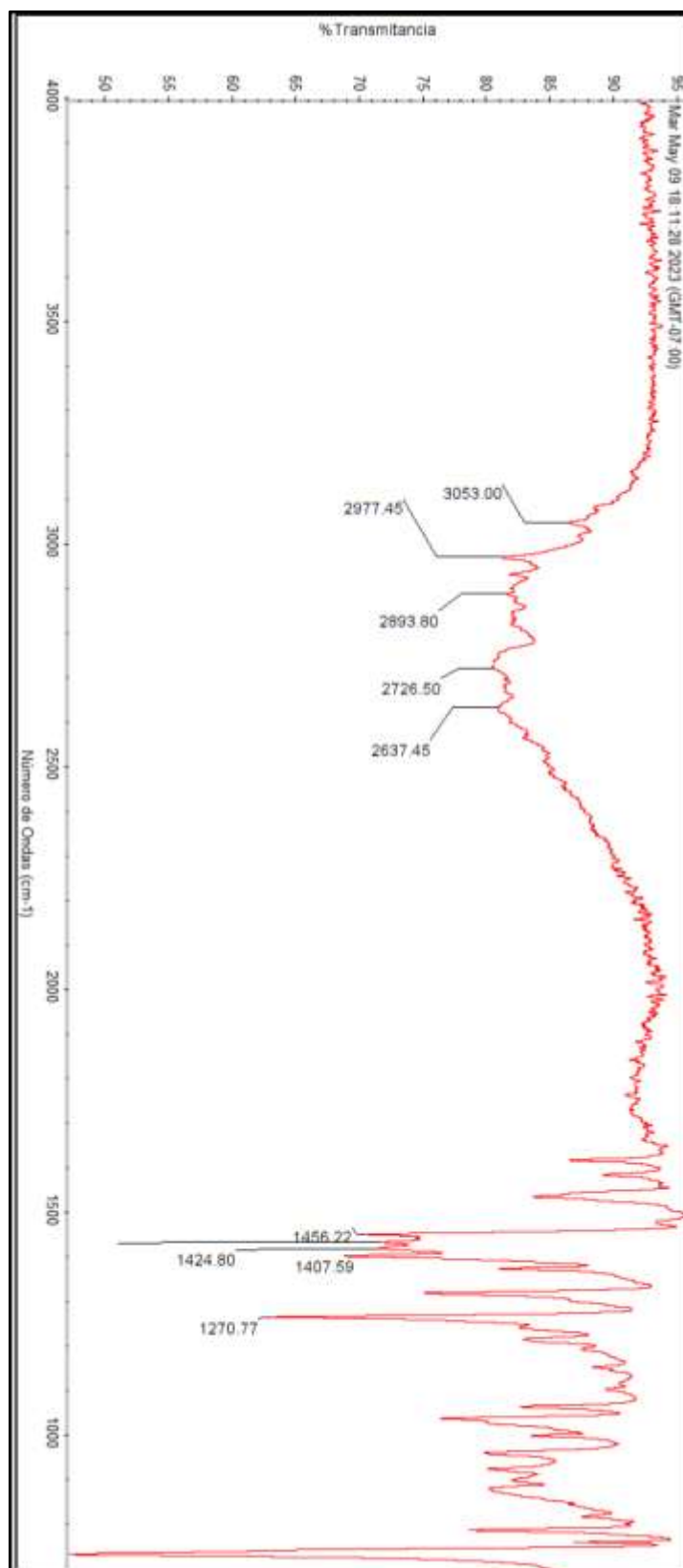
**Anexo 6.** Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 2b.



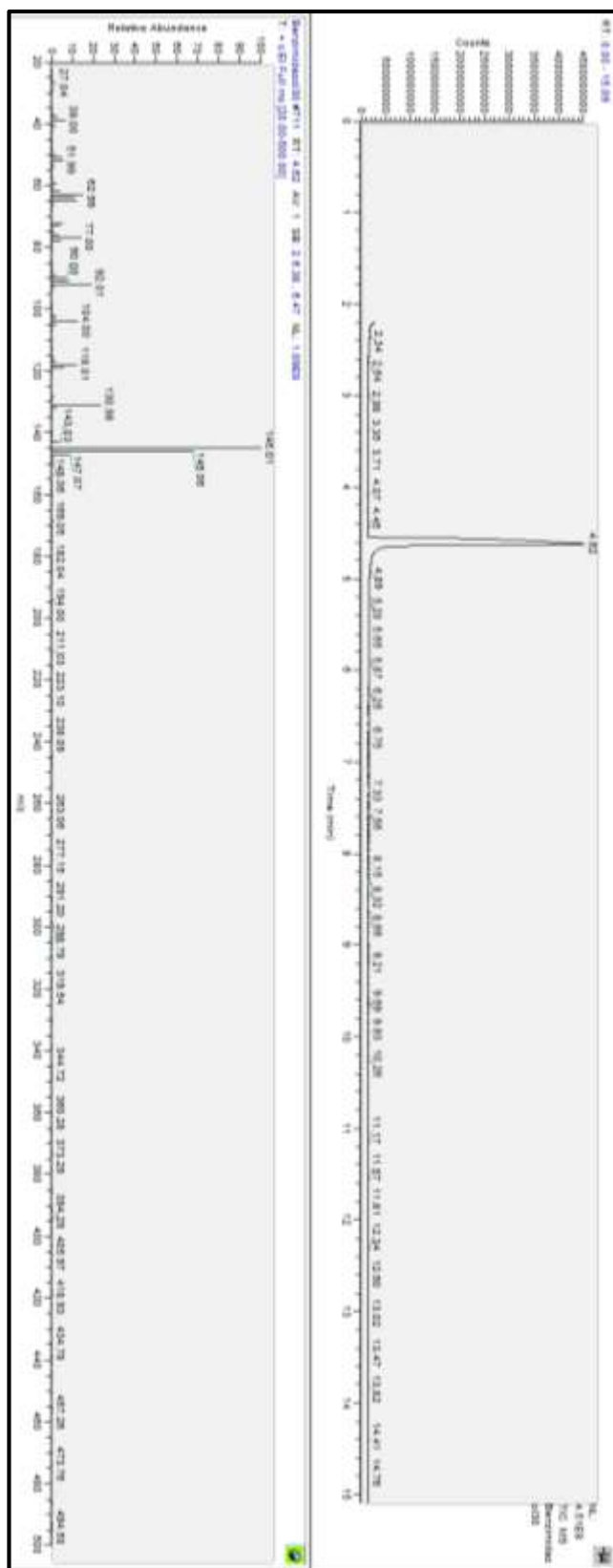
**Anexo 7.** Espectro de resonancia magnetica nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 2b.



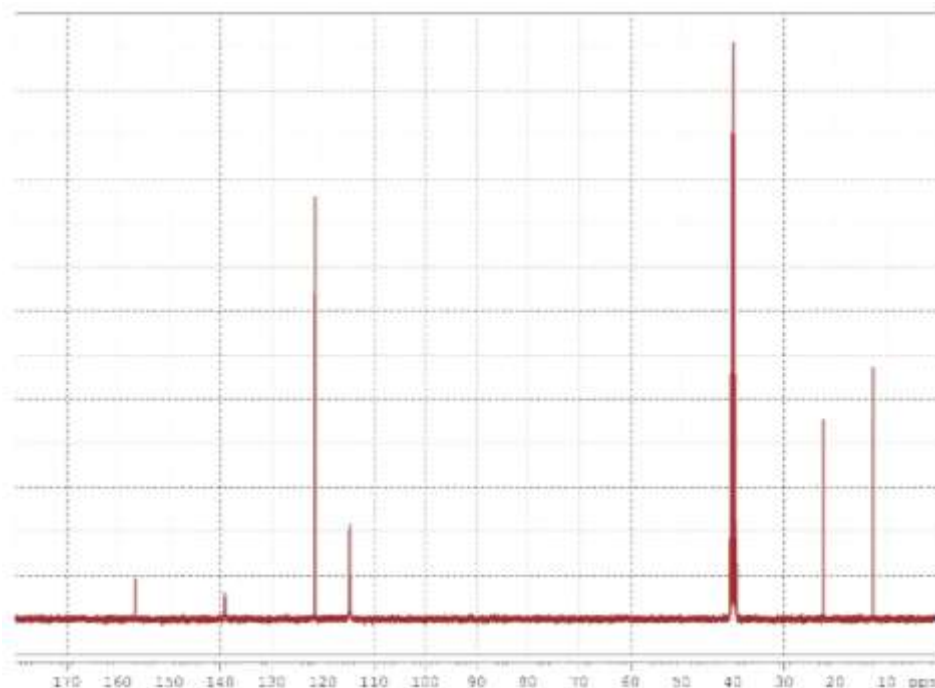
**Anexo 8.** Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 2b.



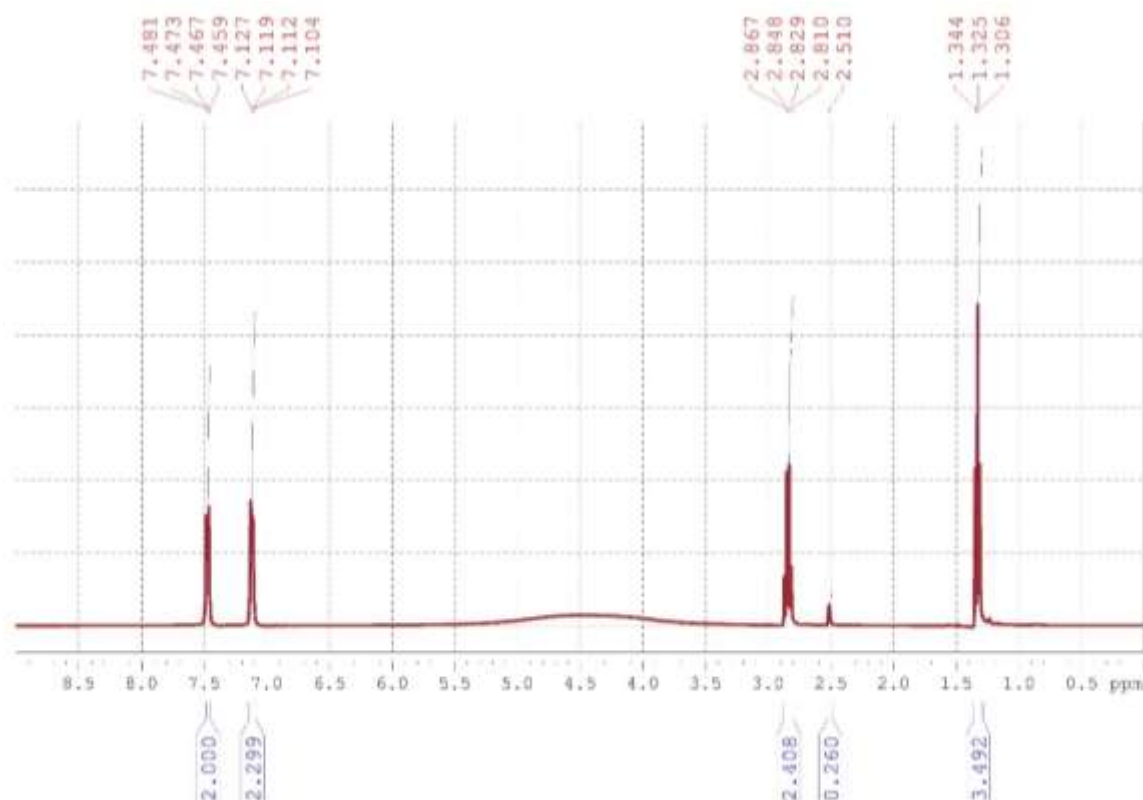
**Anexo 9.** Espectro IR del compuesto 3b.



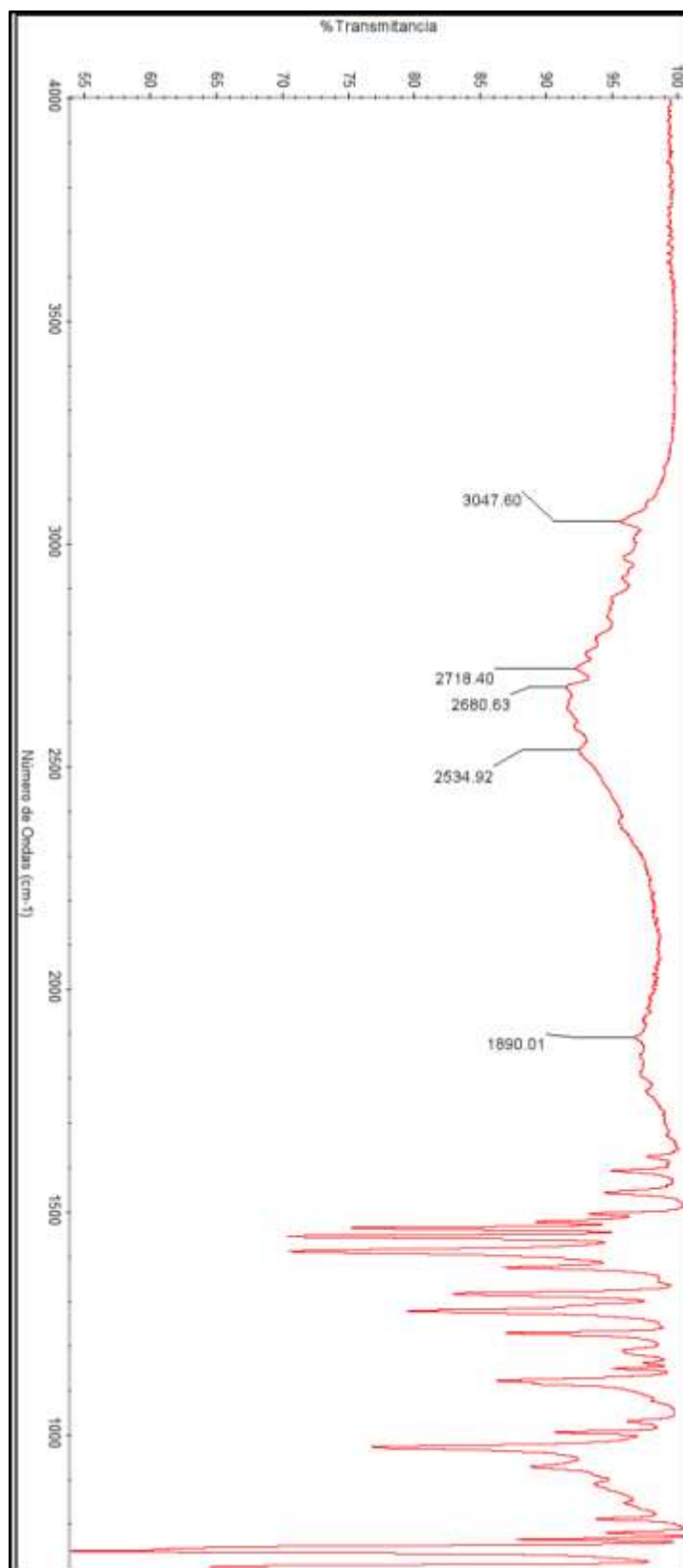
**Anexo 10.** Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 3b.



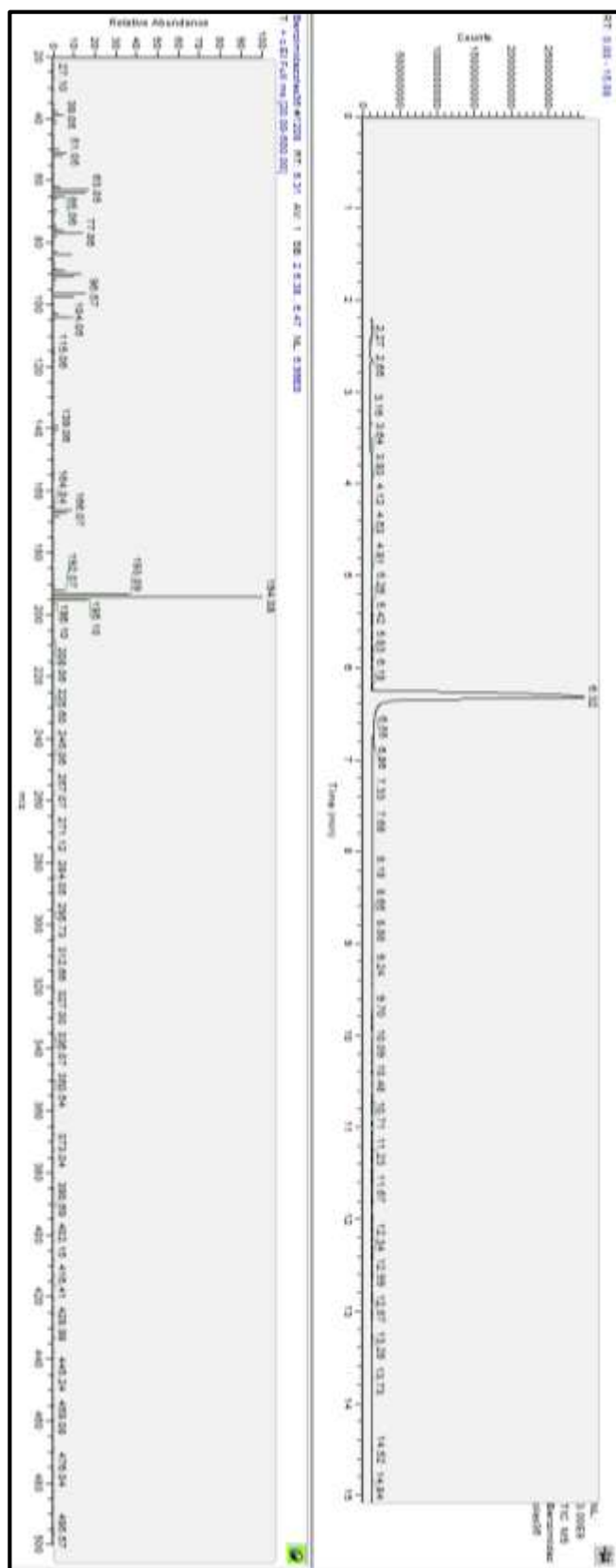
**Anexo 11.** Espectro de resonancia magnetica nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 3b.



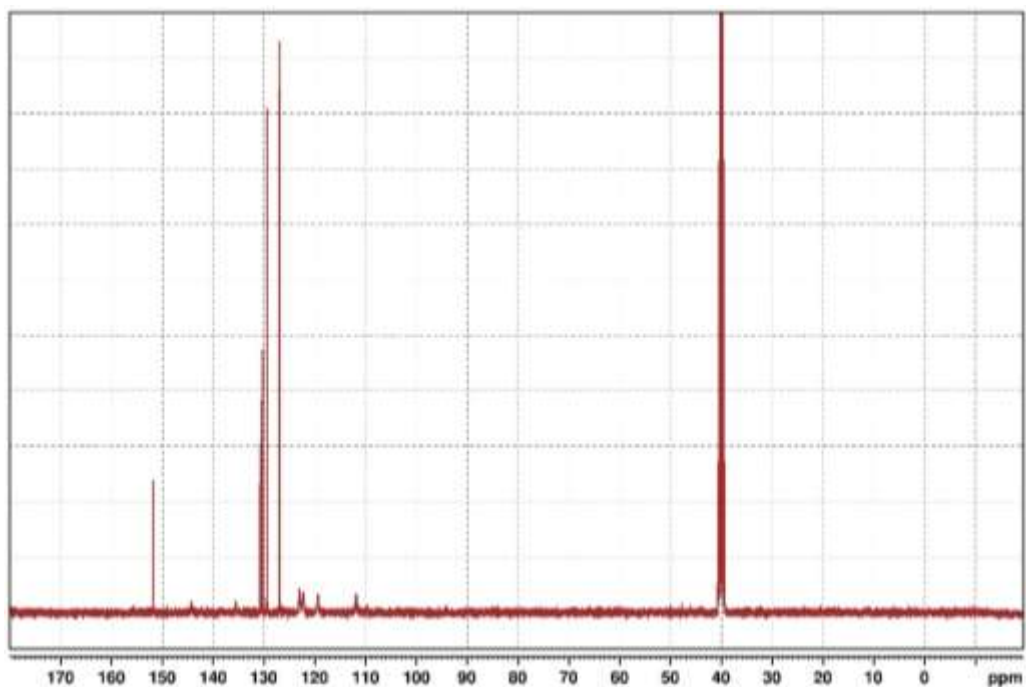
**Anexo 12.** Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 3b.



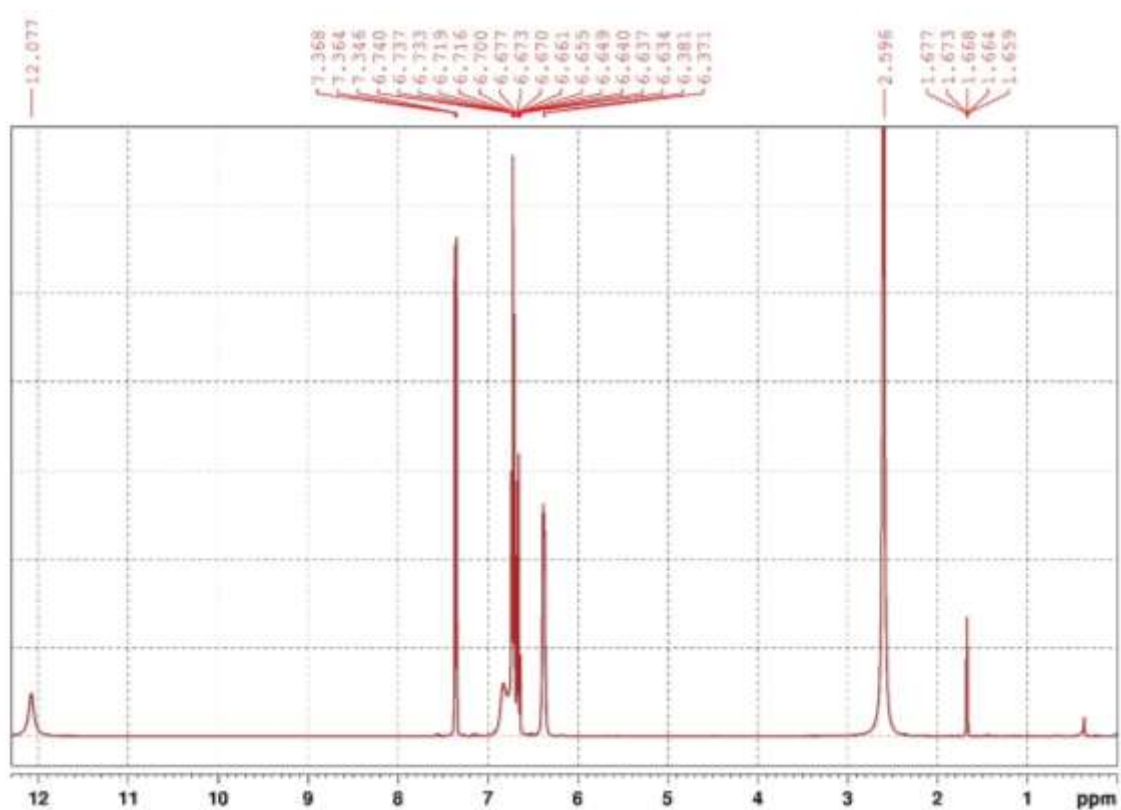
**Anexo 13.** Espectro IR del compuesto 4b.



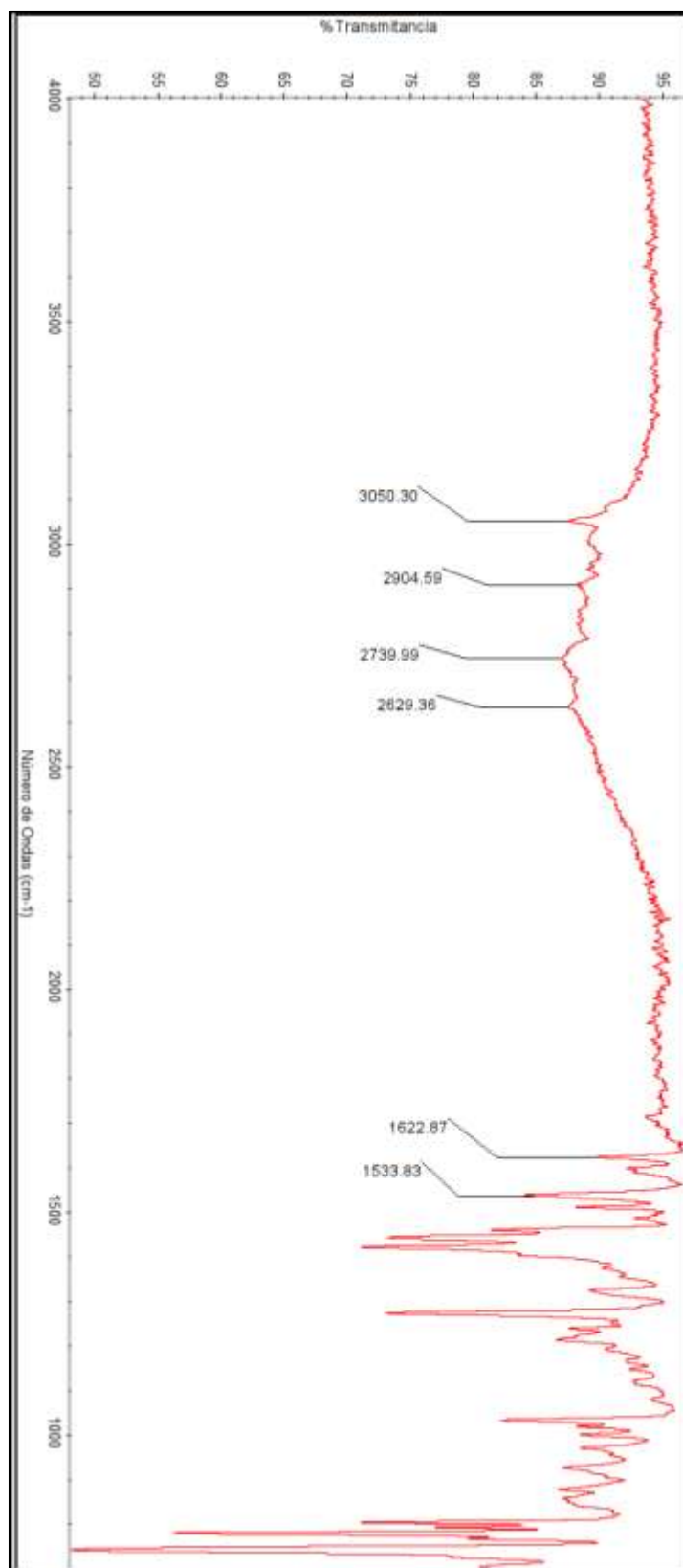
**Anexo 14.** Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 4b.



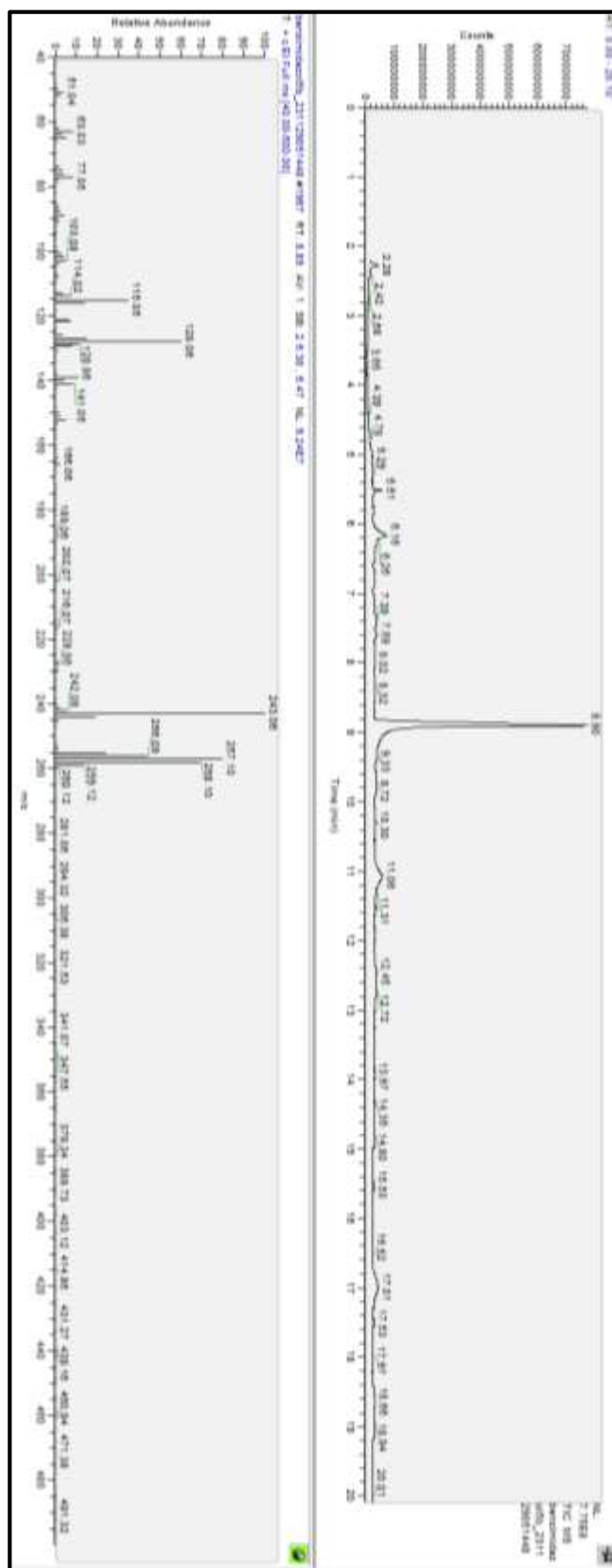
**Anexo 15.** Espectro de resonancia magnética nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 4b.



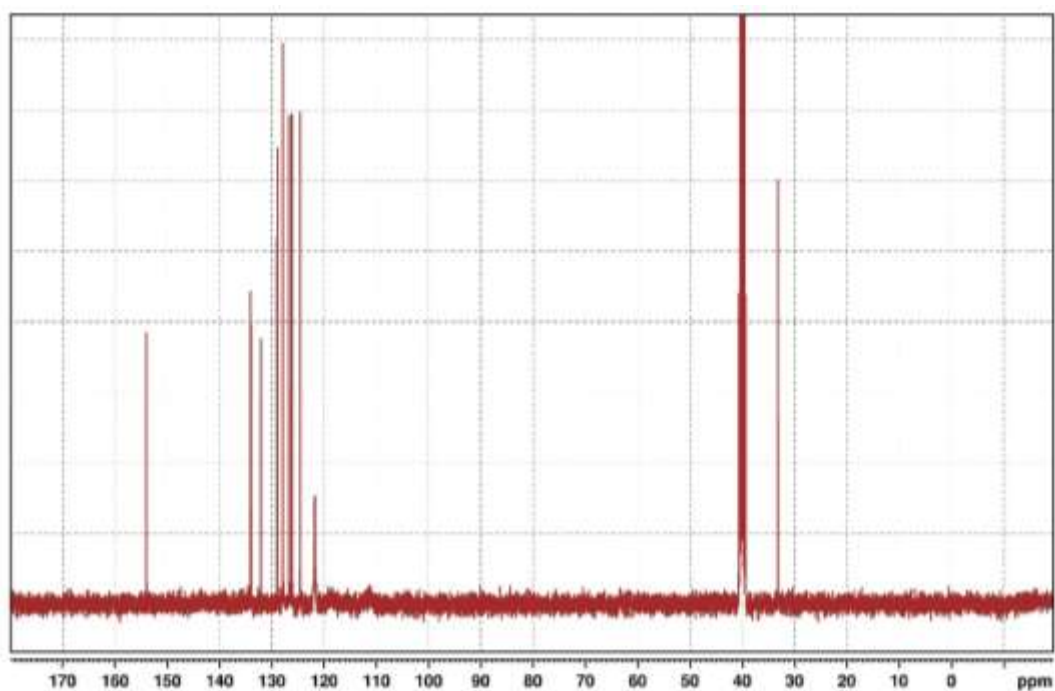
**Anexo 16.** Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 4b.



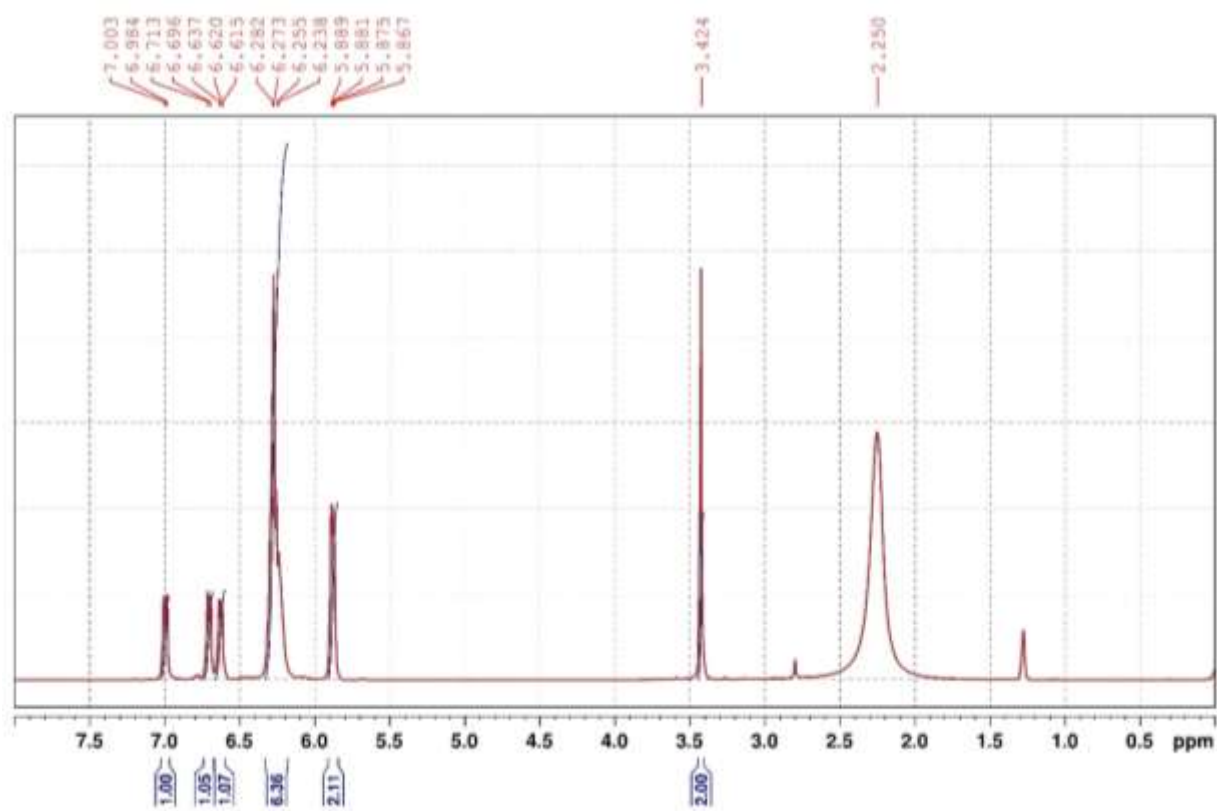
**Anexo 17.** Espectro de IR del compuesto 5b.



**Anexo 18.** Cromatograma de gases y espectro de masas del compuesto 5b.



**Anexo 19.** Espectro de resonancia magnética nuclear (isotopos de carbono 13) de compuesto 5b.



**Anexo 20.** Espectro de resonancia magnética nuclear (protón de H) de compuesto 5b.

| Pose | Afinidad<br>(kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|------------------------|--------------|--------------|
| 1    | -6.0                   | 0.000        | 0.000        |
| 2    | -6.0                   | 0.039        | 1.955        |
| 3    | -6.0                   | 1.332        | 2.653        |
| 4    | -5.9                   | 2.660        | 3.088        |
| 5    | -5.9                   | 2.895        | 3.682        |
| 6    | -5.7                   | 2.454        | 3.473        |
| 7    | -5.6                   | 4.177        | 5.295        |
| 8    | -5.6                   | 2.323        | 3.125        |
| 9    | -5.3                   | 6.075        | 7.321        |
| 10   | -5.3                   | 5.943        | 7.309        |

**Anexo 21.** Docking molecular de ligando 1b.

| Pose | Afinidad<br>(kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|------------------------|--------------|--------------|
| 1    | -6.7                   | 0.000        | 0.000        |
| 2    | -6.6                   | 0.189        | 1.883        |
| 3    | -6.6                   | 3.249        | 4.067        |
| 4    | -6.6                   | 3.245        | 3.789        |
| 5    | -6.3                   | 3.591        | 4.879        |
| 6    | -6.2                   | 2.464        | 3.616        |
| 7    | -6.2                   | 2.457        | 3.488        |
| 8    | -6.0                   | 3.120        | 3.718        |
| 9    | -5.9                   | 1.993        | 3.684        |
| 10   | -5.9                   | 5.451        | 6.865        |

**Anexo 22.** Docking molecular del ligando 2b.

| Pose | Afinidad<br>(kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|------------------------|--------------|--------------|
| 1    | -7.2                   | 0.000        | 0.000        |
| 2    | -7.0                   | 0.541        | 1.944        |
| 3    | -6.8                   | 4.731        | 5.573        |
| 4    | -6.6                   | 1.781        | 4.711        |
| 5    | -6.6                   | 2.309        | 4.846        |
| 6    | -6.6                   | 1.995        | 2.451        |
| 7    | -6.4                   | 3.277        | 6.466        |
| 8    | -6.3                   | 3.277        | 4.519        |
| 9    | -6.2                   | 2.322        | 2.453        |
| 10   | -6.1                   | 3.463        | 5.116        |

**Anexo 23.** Docking molecular del ligando 3b.

| Pose | Afinidad (kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|---------------------|--------------|--------------|
| 1    | -9.2                | 0.000        | 0.000        |
| 2    | -9.2                | 0.057        | 1.514        |
| 3    | -9.0                | 1.002        | 5.934        |
| 4    | -8.9                | 1.033        | 6.034        |
| 5    | -8.8                | 1.773        | 2.363        |
| 6    | -8.7                | 1.834        | 5.801        |
| 7    | -7.9                | 2.239        | 6.971        |
| 8    | -7.9                | 3.247        | 5.314        |
| 9    | -7.9                | 3.253        | 5.287        |
| 10   | -7.7                | 3.481        | 7.710        |

**Anexo 24.** Docking molecular de ligando 4b.

| Pose | Afinidad (kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|---------------------|--------------|--------------|
| 1    | -11.2               | 0.000        | 0.000        |
| 2    | -11.1               | 2.792        | 8.086        |
| 3    | -11.0               | 0.126        | 1.316        |
| 4    | -10.8               | 1.389        | 7.231        |
| 5    | -10.7               | 1.137        | 2.702        |
| 6    | -10.4               | 1.633        | 7.019        |
| 7    | -10.1               | 1.453        | 7.404        |
| 8    | -9.9                | 2.482        | 7.301        |
| 9    | -9.8                | 1.802        | 7.444        |
| 10   | -9.7                | 0.976        | 2.466        |

**Anexo 25.** Docking molecular del ligando 5b.

| Pose | Afinidad<br>(kcal/mol) | RMSD<br>l.d. | RMSD<br>u.b. |
|------|------------------------|--------------|--------------|
| 1    | -15.6                  | 0.000        | 0.000        |

**Anexo 26.** Docking molecular del ligando Done