

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



"Síntesis y caracterización estructural de un derivado de trifenil imidazol de tipo amino alcohol, con perfil citotóxico"

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Arturo Estolano Cobián

Tijuana, B.C.

Noviembre de 1 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA


FOLIO No. 232

Tijuana, B. C., a 12 de noviembre de 2014.

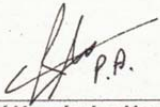
C. Arturo Estolano Cobián
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción: **Tesis** es propuesto por el **Dr. Iván Córdova Guerrero** quién es responsables de la calidad del trabajo que usted presenta, referido al tema: *"Síntesis y caracterización estructural de un derivado de trifenil imidazol de tipo amino alcohol, con perfil citotóxico"*, el cual deberá desarrollar de acuerdo con el siguiente orden:


- I. Introducción
- II. Hipótesis
- III. Objetivo general y particulares
- IV. Generalidades
- V. Metodologías
- VI. Resultados y Discusión de Resultados
- VII. Conclusiones
- VIII. Bibliografía



Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis



Q. Noemí Hernández Hernández
Subdirectora



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Agradecimientos

Le doy gracias a Dios, por todas las bendiciones que me ha dado a mí y a mi familia.

A mis padres y a mi hermano, que siempre me han apoyado en todo. Que creen en mí, me han dado su cariño y están conmigo en las buenas y en las malas. Por sus palabras de aliento y por su comprensión. Ustedes son mi soporte y siempre me ayudan a seguir adelante, muchas gracias por todo.

Al Dr. Iván Córdova Guerrero, por todo su apoyo y enseñanzas durante el tiempo que estuve en su laboratorio preparando la tesis, y su orientación para adentrarme al campo de la investigación. Gracias por todo el esfuerzo que ha invertido en mi formación.

A todos mis maestros, que a lo largo de mi carrera me han brindado sus conocimientos tanto dentro como fuera del salón de clases, su apoyo, su guía y consejos. Gracias por ayudarme a formarme como profesional.

A mis amigos, que durante la carrera compartieron conmigo el esfuerzo, las desveladas, las estudiadas, el gran trabajo que ha significado realizar una carrera profesional. Por todo el compañerismo, el apoyo y el trabajo que hemos realizado estos años, así como el gran cariño que nos tenemos. Por toda la amistad, los gratos recuerdos que compartimos, muchas gracias por todo.

Al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, por todo lo que me han enseñado desde que comencé a trabajar con ustedes, las palabras de aliento, la alegría y el apoyo de cada día, gracias por su amistad.

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

Tanto la religión y la ciencia necesitan para sus actividades la creencia en Dios; para los primeros Dios está al principio, y para los segundos se encuentra al final de todo el pensamiento.

Max Planck

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" sino "Que curioso..."

Isaac Asimov

Resumen

Índice de Figuras	
Índice de Tablas	
Índice de Gráficas	
Índice de Esquemas	
Índice de Anexos	
Abreviaturas y Acrónimos	
1 Introducción.....	1
2 Hipótesis.....	5
3 Objetivo general y particulares.....	6
4 Generalidades.....	7
4.1 Imidazol y sus derivados: propiedades y aplicaciones.....	7
4.2 Síntesis de imidazoles.....	9
4.3 Síntesis de imidazoles: variaciones del proceso sintético.....	13
4.4 Propiedades citotóxicas de amino alcoholes.....	14
4.4.1 Incorporación de fragmentos amino alcohol.....	16
4.5 Evaluación biológica.....	17
4.5.1 Técnica de ABTS.....	17
4.5.2 Ensayos en líneas celulares.....	18
5 Metodologías.....	20
5.1 Ruta sintética	
5.2 Actividad antioxidante	
5.3 Actividad citotóxica	
6 Resultados y Discusión de resultados	
6.1 Ruta sintética	
6.2 Actividad antioxidante	
6.3 Actividad citotóxica	
7 Conclusiones	
8 Bibliografía	
9 Apéndice	
9.1 Técnicas experimentales	

9.2 Anexos

Índice de Figuras

Figura 1. Taxol, fármaco antitumoral aislado del tejo del Pacífico, y un derivado semisintético (Taxotere).....	2
Figura 2. Imidazol y ejemplos de su presencia en moléculas de origen biológico.....	9
Figura 3. Ketoconazol y clotrimazol.....	10
Figura 4. Compuestos de tipo 1,2-dicetona y derivados para síntesis de imidazol.....	15
Figura 5. Amino alcoholes citotóxicos derivados de triptófano.....	16
Figura 6. Jaspina B y aza-derivados, moléculas con perfil citotóxico.....	17
Figura 7. Estructura del ABTS.....	19
Figura 8. Estructura de la sulforrodamina B.....	21

Índice de Tablas

Tabla 1. Absorbancias durante el ensayo de actividad antioxidante

Tabla 2. Porcentajes de actividad antioxidante

Tabla 3. Actividad citotóxica preliminar de IMI-POH e IMI-PAN

Tabla 4. Lecturas del ensayo de citotoxicidad de IMI-POH, IMI-PAN e IMI-IAN

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentajes de actividad antioxidante

Gráfica 2. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-POH

Gráfica 3. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-PAN

Gráfica 4. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-IAN

Índice de Esquemas

Esquema 1. Síntesis de Debus.....	11
Esquema 2. Síntesis de Debus-Radziszewski.....	12
Esquema 3. Síntesis de imidazol a partir de naftoquinonas.....	13
Esquema 4. Síntesis de esqueleto trifenil imidazol del presente trabajo.....	13
Esquema 5. Formación de intermediario benzaldimina.....	13
Esquema 6. Ciclo-condensación del anillo imidazol.....	14
Esquema 7. Derivados amino alcohol del sugiol.....	17
Esquema 8. Generación de amino alcoholes a partir de un epóxido, sobre un esqueleto benzimidazol.....	18
Esquema 9. Ruta sintética A	
Esquema 10. Ruta sintética B	
Esquema 11. Ruta sintética C	

Índice de Anexos

- Anexo 1.** Espectro de IR del compuesto (1)
- Anexo 2.** Espectro de masas del compuesto (1)
- Anexo 3.** Espectro de RMN-1H del compuesto (1)
- Anexo 4.** Espectro de RMN-13C del compuesto (1)
- Anexo 5.** Espectro de IR del compuesto (3)
- Anexo 6.** Espectro de masas del compuesto (3)
- Anexo 7.** Espectro de RMN-1H del compuesto (3)
- Anexo 8.** Espectro de RMN-13C del compuesto (3)
- Anexo 9.** Espectro de IR del compuesto (4)
- Anexo 10.** Espectro de masas del compuesto (4)
- Anexo 11.** Espectro de masas del compuesto (5)
- Anexo 12.** Espectro de masas del compuesto (7)
- Anexo 13.** Espectro de IR del compuesto (8).
- Anexo 14.** Espectro de masas del compuesto (8)
- Anexo 15.** Espectro de RMN-1H del compuesto (8)
- Anexo 16.** Espectro de RMN-13C del compuesto (8)

Abreviaturas y Acrónimos

AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido acético
AcONH ₄	Acetato de amonio
ABTS	Ácido 2-2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG/EM	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
CH ₃ CN	Acetonitrilo
cm	Centímetro
Conc.	Concentración
DE	Desviación Estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
eV	Electronvoltio
F.M.	Fase móvil
GI ₅₀	Inhibición de crecimiento 50
HCl	Ácido clorhídrico
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMI-IAN	Producto (8): 1-((2-iodofenil)amino)-3-(2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)propan-2-ol
IMI-PAN	Producto (3): 2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol
IMI-POH	Producto (1): 4-(4,5-difenil-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)fenol
IR	Infrarrojo
g	Gramo
J	Constante de acoplamiento
m	Metro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo

MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
N	Normal
n-Hex	n-Hexano
nm	Nanómetro
p38MAPK	Cinasa activada por mitógenos p38
pH	Potencial de Hidrógeno
%R	Porcentaje de rendimiento
R_f	Factor de retención
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SRB	Sulforrodamina B
TMS	Tetrametilsilano
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ZnCl $_2$	Cloruro de zinc

1 Introducción

Desde la antigüedad el ser humano ha buscado satisfacer sus necesidades básicas para sobrevivir: debe buscar alimento y un hogar, establecer una familia y una sociedad; debe cumplir necesidades físicas y emocionales. Una necesidad primaria es la salud, y el ser humano ha buscado siempre diversas maneras de cuidar y mejorar el estado de salud propio y de sus congéneres. Desde un principio estas formas tuvieron elementos mágicos y religiosos involucrados, mezclándose con formas primitivas de lo que conocemos como medicamentos: hierbas y plantas, productos de origen animal e incluso mineral. Se recurría constantemente a la naturaleza para buscar elementos que nos ayudasen a cuidar nuestra salud.

Con el paso del tiempo y la evolución de la sociedad y el conocimiento, los elementos para el cuidado de la salud fueron transformándose. Cada época tenía sus propios remedios, los cuales fueron pasando desde materia vegetal cruda, por elementos más elaborados como extractos, ungüentos, tinturas y demás, hasta que el conocimiento científico y químico avanzó a tal grado que se llegó a un uso particular de moléculas con fines terapéuticos, los fármacos.

Es en este punto que se desarrolla un área de la Química que conocemos como Química Medicinal, Farmacéutica o Terapéutica. Esta ciencia tiene como fin estudiar a los fármacos en un nivel de interacción molecular y celular dentro de un organismo, su estructura química y cómo esta repercute en sus propiedades físicas y bioquímicas, las cuales conllevarán a propiedades terapéuticas.

Dentro de la Química Medicinal, Delgado, Minguillón y Joglar (2003) nos mencionan tres etapas clave: 1) El descubrimiento de un compuesto líder o cabeza de serie, obtenido de una fuente natural, un proceso biotecnológico o de forma sintética. 2) La optimización, o modificación química del compuesto con el fin de aumentar o mejorar sus efectos benéficos, o disminuir sus negativos. 3) El desarrollo con el cual se modifican las propiedades farmacocinéticas o galénicas para la obtención de un medicamento.

Como se venía diciendo, la evolución en la búsqueda de elementos terapéuticos llega a un punto interesante con la llegada de la Química Medicinal. Con ella se retoma en esa búsqueda parte de sus principios básicos, se regresa a la naturaleza. De ella igual que

antes se obtienen estos elementos terapéuticos, sólo que ahora a un nivel molecular. Muchos de los fármacos que se han venido utilizando desde hace décadas son de fuentes naturales, los cuales se han aislado y preparado de una nueva forma en que podemos emplearlos como medicinas. Pero nuestros fármacos ahora además de poder tener un origen natural pueden ser sintéticos, o bien ser semi-sintéticos. Esto implica que en un principio se aislaron naturalmente, pero se hicieron modificaciones químicas en su estructura con el fin de mejorar terapéuticamente a estas moléculas.

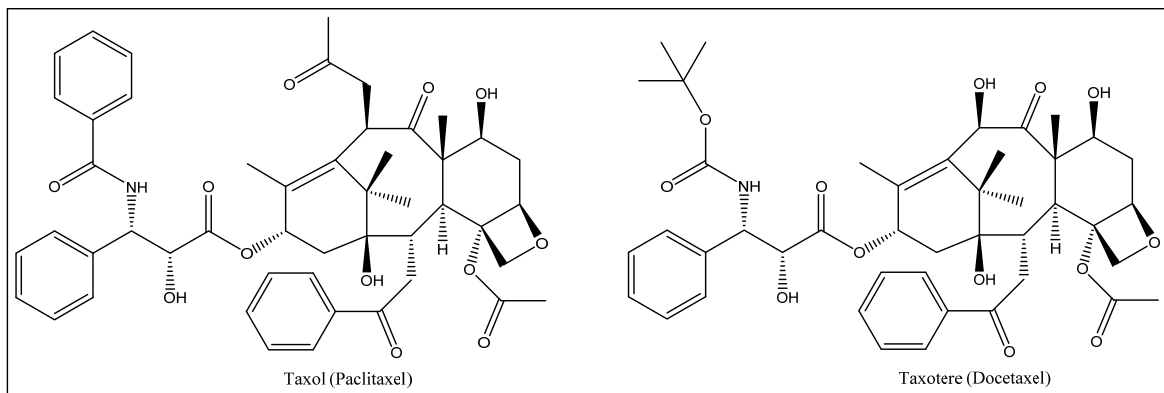


Figura 1. Taxol, fármaco antitumoral aislado del tejo del Pacífico, y un derivado semisintético (Taxotere).

Precisamente, en la actualidad muchas veces seguimos buscando inspiración en la naturaleza. Pero así como recurrimos a ella, siempre queremos buscar mejoras. Esta segunda etapa clave ha marcado una serie de esfuerzos químicos enormes en la búsqueda de nuevas especies químicas terapéuticas. Esto implica la síntesis de análogos de compuestos terapéuticos, significa que se trabaje en la síntesis de derivados que demuestren una mejor actividad biológica. Y es esta mejora química la que marca el presente trabajo, donde queremos sintetizar una serie de compuestos orientándolos a la consecución de una actividad biológica particular, con la propuesta de seguir generando nuevas y mejores alternativas terapéuticas.

Por su parte, el cáncer es un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo humano. Un rasgo característico del cáncer común a sus diferentes variantes es el crecimiento anormal y descontrolado de las células del tejido afectado. En ocasiones éstas células pueden llegar a afectar tejidos y órganos diferentes del que se originaron, lo cual se conoce como metástasis. El cáncer es uno de los principales

problemas de salud a nivel mundial; tan sólo en el año de 2008 la Organización Mundial de la Salud estima que el cáncer fue la causa de muerte de 7.6 millones de personas, lo cual representó el 13% de la muertes a nivel mundial (OMS, 2014).

En el año 2012 el número de muertes a nivel mundial debido al cáncer aumentó a 8.2 millones. El cáncer de pulmón, de hígado, de estómago, colorrectal y de mama son los principales causantes de muerte por cáncer cada año. Si bien la detección temprana y tratamiento del cáncer puede ayudar a reducir la mortalidad, muchas veces ésta no se llega a realizar. En el caso del tratamiento, existen muchas opciones diferentes, siendo las más comunes las quimioterapias, radioterapias y cirugías, o bien combinaciones de estrategias dependiendo del caso.

En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2012 hubo 73,240 defunciones debidas a tumores malignos. Ésta fue la tercera causa con mayor número de defunciones en el país, solamente por debajo de las enfermedades del corazón y de diabetes mellitus.

Debido a la necesidad de tener tratamientos efectivos para combatir al cáncer, éste trabajo se propone emplear el enfoque de la Química Medicinal para sintetizar moléculas que puedan cumplir con un perfil químico que conlleve a una actividad citotóxica, es decir que sean potencialmente fármacos anticancerígenos. Para ello nos basamos en un centro imidazol, que se ha reportado presenta actividades biológicas diversas, como antibacterial, antifúngica, analgésica, antituberculosa, antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, por mencionar unas cuantas. Por esto, se puede encontrar núcleos de imidazol presentes en un gran número de fármacos de tipo antifúngicos, antibióticos, antineoplásicos, entre otros. Viendo su gran versatilidad y utilidad como grupo funcional en el esqueleto de diversos fármacos, se decidió emplearlo como la base del grupo de moléculas presentes en este trabajo.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la Química Medicinal parte de nuestros conocimientos corresponden a relacionar estructuras y grupos químicos a ciertos efectos terapéuticos. Dentro de los amplios estudios de moléculas citotóxicas, se ha observado que fragmentos de tipo aminoalcohol poseen esta clase de actividades (Bai et al, 2011; Rives et al, 2010). Siendo entonces reportada esta bioactividad a moléculas con este grupo funcional, es de nuestro interés el generar nuevos compuestos que contengan este motivo

para así poder generar moléculas con un perfil citotóxico. Además, Córdova et al (2006) mencionan que la incorporación de un fragmento amino alcohol aumenta la actividad antiproliferativa en moléculas que previo a esta incorporación ya presentaran dicha bioactividad. Por ello se propone que a las moléculas sintetizadas en este trabajo, con núcleo imidazol, se dé la incorporación de fragmentos moleculares de tipo amino alcohol.

2 Hipótesis

La funcionalización de sistemas heterocíclicos imidazólicos con fragmentos de tipo amino alcohol, favorece la actividad citotóxica de estos compuestos.

3 Objetivo general y particulares

Objetivo general:

Sintetizar un compuesto derivado de un núcleo de imidazol con un sustituyente de tipo amino alcohol, y evaluar *in vitro* su actividad citotóxica y antioxidante.

Objetivos particulares:

- Diseñar una ruta sintética para la obtención de un compuesto imidazólico de tipo amino alcohol.
- Caracterizar los productos e intermediarios de la ruta sintética propuesta.
- Analizar la actividad citotóxica del producto sintetizado y sus precursores.
- Analizar la actividad antioxidante del producto sintetizado y sus precursores.

4 Generalidades

4.1 Imidazol y sus derivados: propiedades y aplicaciones

El imidazol es un anillo heterocíclico aromático de 5 miembros, formado por tres átomos de carbono y dos de nitrógeno. Es un motivo el cual puede ser encontrado formando parte de diversas moléculas biológicas, por ejemplo en la histamina, en el aminoácido histidina, o en las bases purínicas del ADN (Figura 2). Podemos encontrar imidazoles en otros organismos, como en los alcaloides imidazoles. Ejemplos de estos son las naaminas, isonaaminas, naamidinas e isonaamidinas en esponjas del género *Leucetta* o la lepidina de la hierba *Lepidium sativum* (De Luca, 2006).

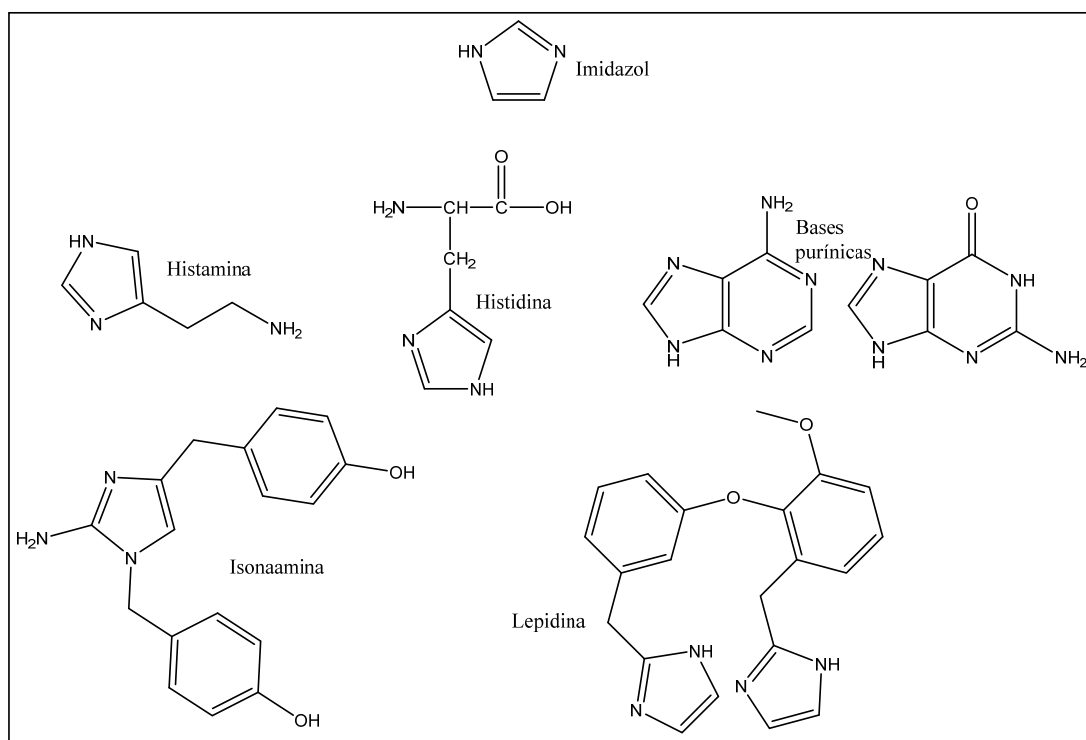


Figura 2. Imidazol y ejemplos de su presencia en moléculas de origen biológico.

El imidazol también puede encontrarse dentro de diversos fármacos y moléculas en investigaciones farmacológicas. Las propiedades que presentan las moléculas, con su núcleo imidazol funcionalizado tanto en sus átomos de carbono como nitrógeno, es muy variada. Se han reportado propiedades biológicas, como lo son las actividades antifúngicas, antibióticas, antituberculosas, antidepresivas, anticancerígenas, antivirales (incluyendo una

interesante actividad contra VIH (Zhan et al, 2009)), antileishmania, antiinflamatoria, analgésicas y antihipertensivas (Shalini, Sharma y Kumar, 2010; Verma, Joshi y Singh, 2013; Malhotra et al, 2011).

Entre los fármacos de uso clínico que contienen imidazol, podemos encontrar la familia de imidazoles antifúngicos, que contienen por ejemplo al ketoconazol, clotrimazol e isoconazol entre otros (Figura 3).

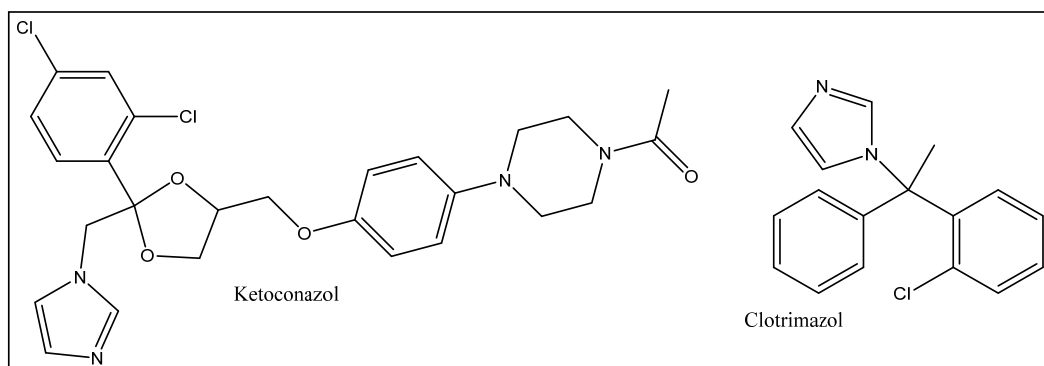


Figura 3. Ketoconazol y clotrimazol.

Moléculas que incluyan en su esqueleto al imidazol presentan una amplia interacción y efecto sobre los diferentes receptores histamínicos. Se ha conseguido sintetizar agonistas del receptor H_1 más potentes que la propia histamina. Aunque generalmente se suelen manejar antagonistas de H_1 como terapia frente a las alergias, estudios señalan que la histamina activando este tipo de receptor puede actuar como anticonvulsivo y antidepresivo, así como modular el dolor y regular el sistema cardiovascular y neuroendócrino (De Luca, 2006). Agonistas más potentes y selectivos que la histamina abren la posibilidad de emplearlos en éstas áreas terapéuticas.

También se han sintetizado nuevos agentes terapéuticos con alta selectividad frente al receptor H_3 , sobre el resto de receptores histamínicos H_1 , H_2 y H_4 por Kazuta et al (2003) y Kitbunnadaj et al (2005). Esta selectividad resulta útil, pues los receptores H_3 regulan la liberación de neurotransmisores como la histamina, acetilcolina, dopamina, noradrenalina y serotonina, por lo que son un blanco terapéutico potencial para desórdenes del sueño, migrañas, asma, entre otros. A su vez, antagonistas del receptor H_3 podrían emplearse en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, esquizofrenia, depresión, demencia y epilepsia (Tozer y Kalindjian, 2000).

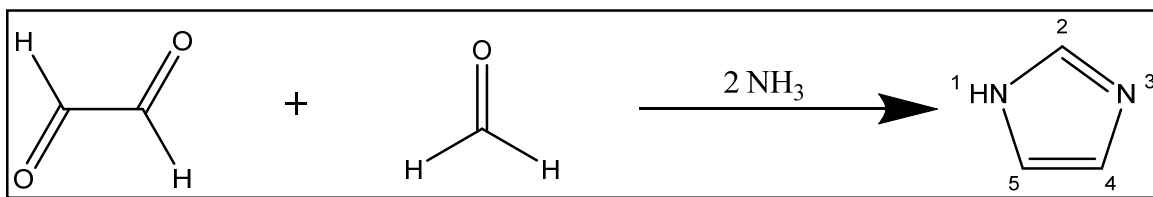
Por su parte, la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK por sus siglas en inglés) es una proteína cinasa de señalización celular que aunque mayormente es activada por estrés celular, también regula la biosíntesis y liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Se han diseñado y mejorado mediante estudios de relación estructura-actividad moléculas inhibitoras selectivas de esta cinasa con un núcleo de imidazol tri- y tetrasustituido, las cuales implican la obtención de nuevos agentes terapéuticos como antiinflamatorios, además de agentes contra la artritis reumatoide (De Luca, 2006; Laufer et al, 2008).

Dentro de los usos no farmacológicos del imidazol podemos encontrar la síntesis de sensores para la detección de aniones. Por ejemplo, los iones fluoruros son de importancia en el cuidado dental y en el tratamiento de osteoporosis; por su parte el cianuro es altamente tóxico pero es ampliamente empleado a nivel industrial. Se han desarrollado moléculas de tipo imidazol-naftoquinonas como sensores que cambian de color al detectar estos aniones (Satheskumar, Manivannan y Elango, 2014).

Otra aplicación del imidazol es su degradación por pirólisis para la formación de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno, lo cual mejora las ya notables características electroquímicas y electrónicas de los nanotubos de carbón (Ghosh et al, 2010). Estos nanotubos con nitrógeno incorporado son electrocatalizadores eficientes para celdas de combustible, o pueden emplearse como sensores electroquímicos para H₂O₂ o glucosa.

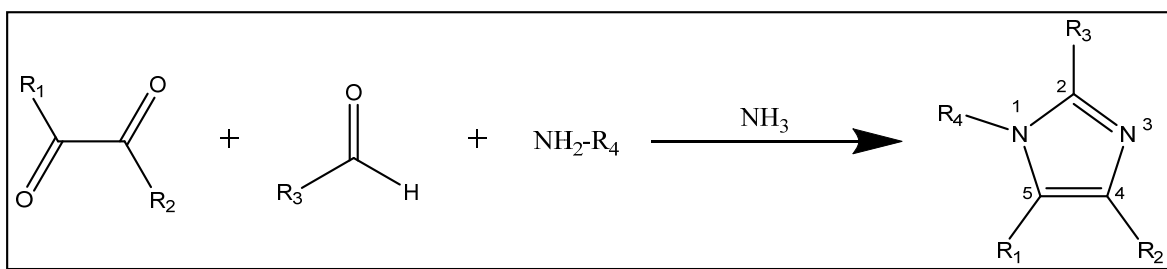
4.2 Síntesis de imidazoles

El primero en sintetizar al imidazol como tal fue el químico alemán Heinrich Debus en 1858, quien lo logró haciendo reaccionar glioxal, amoníaco y formaldehído (Debus, 1858).



Esquema 1. Síntesis de Debus.

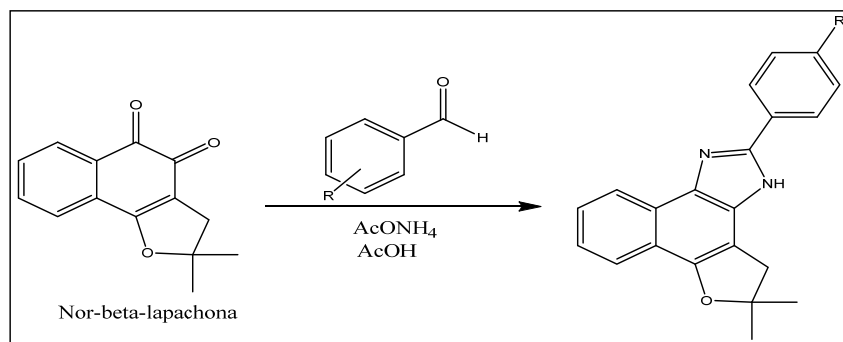
Una particularidad de esta síntesis la cual ha sido aprovechada para darle versatilidad a la misma, es la capacidad de emplear otras moléculas, parecidas a los componentes originales, para lograr imidazoles sustituidos. El empleo de un compuesto 1,2-dicetónico en lugar del glioxal genera un imidazol sustituido en C-4 y C-5 con los respectivos grupos R_1 y R_2 de la dicetona, como puede observarse en el Esquema 2. Una modificación en el grupo R_3 del aldehído permite obtener un imidazol C-2 sustituido. A esta variación se le conoce como síntesis de Debus-Radziszewski. Se debe notar que si bien esta síntesis sigue manteniendo al amoníaco como fuente de nitrógeno, un equivalente de éste puede ser sustituido por una amina NH_2-R_4 , donde el producto final sería un imidazol N-sustituido.



Esquema 2. Síntesis de Debus-Radziszewski.

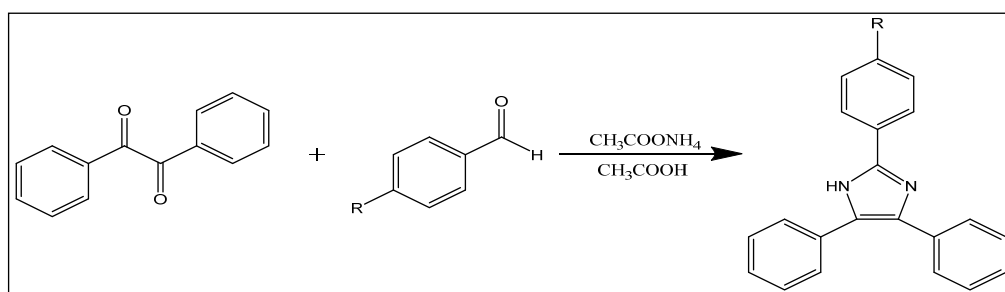
Como podemos observar del Esquema 2, esta reacción de síntesis es muy general y nos puede llevar a una amplia variedad de imidazoles C- y N-sustituidos. Existen por lo tanto numerosos trabajos donde este esquema genera derivados de imidazol para diferentes estudios, como los de propiedades biológicas que ya se han mencionado (Dutta et al, 2010; Malhotra et al, 2011; Shaabani y Rahmati, 2006; Das, Sudhakar y Srinivas, 2010; Karimi et al, 2006).

Otras modificaciones pueden lograrse, como la síntesis de imidazoles 1-sustituidos donde se ha empleado aminoalcoholes como bloque sintético para la porción N-sustituida del anillo (Matsuoka et al, 2006). Cambiando las moléculas precursoras, incluso se puede dar la formación del anillo introduciéndolo como grupo funcional en otra molécula más compleja. Es el caso por ejemplo de la introducción del imidazol sobre el esqueleto naftoquinónico de la nor- β -lapachona (Esquema 3), que es un derivado del compuesto de origen natural lapachol (Moura et al, 2012), o su introducción sobre un esqueleto de tipo quinolina funcionalizado con un aldehído (Kategaonkar et al, 2010).



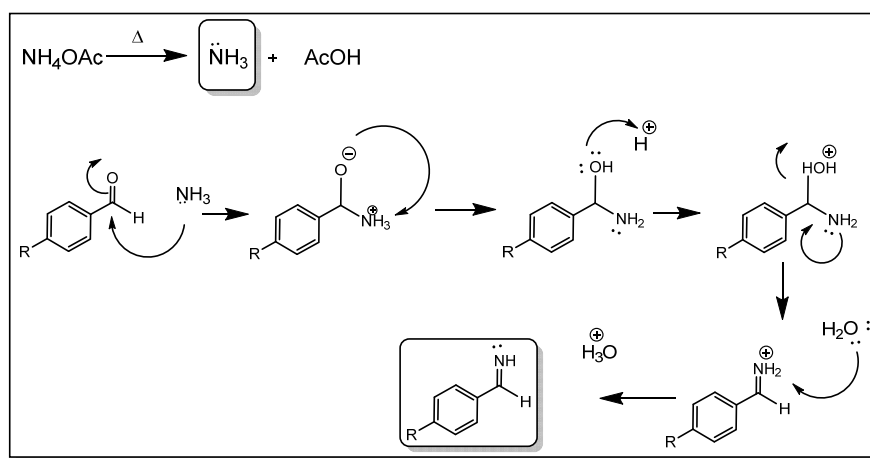
Esquema 3. Síntesis de imidazol a partir de naftoquinonas.

En este trabajo para la síntesis del producto final de tipo amino alcohol, se comenzó por la síntesis de intermediarios con esqueleto de trifenil imidazol, con dos diferentes sustituciones en uno de los anillos fenilos (*p*-hidroxi y *p*-metoxi). La reacción general para la generación de estos productos imidazoles se presenta a continuación en el Esquema 4.



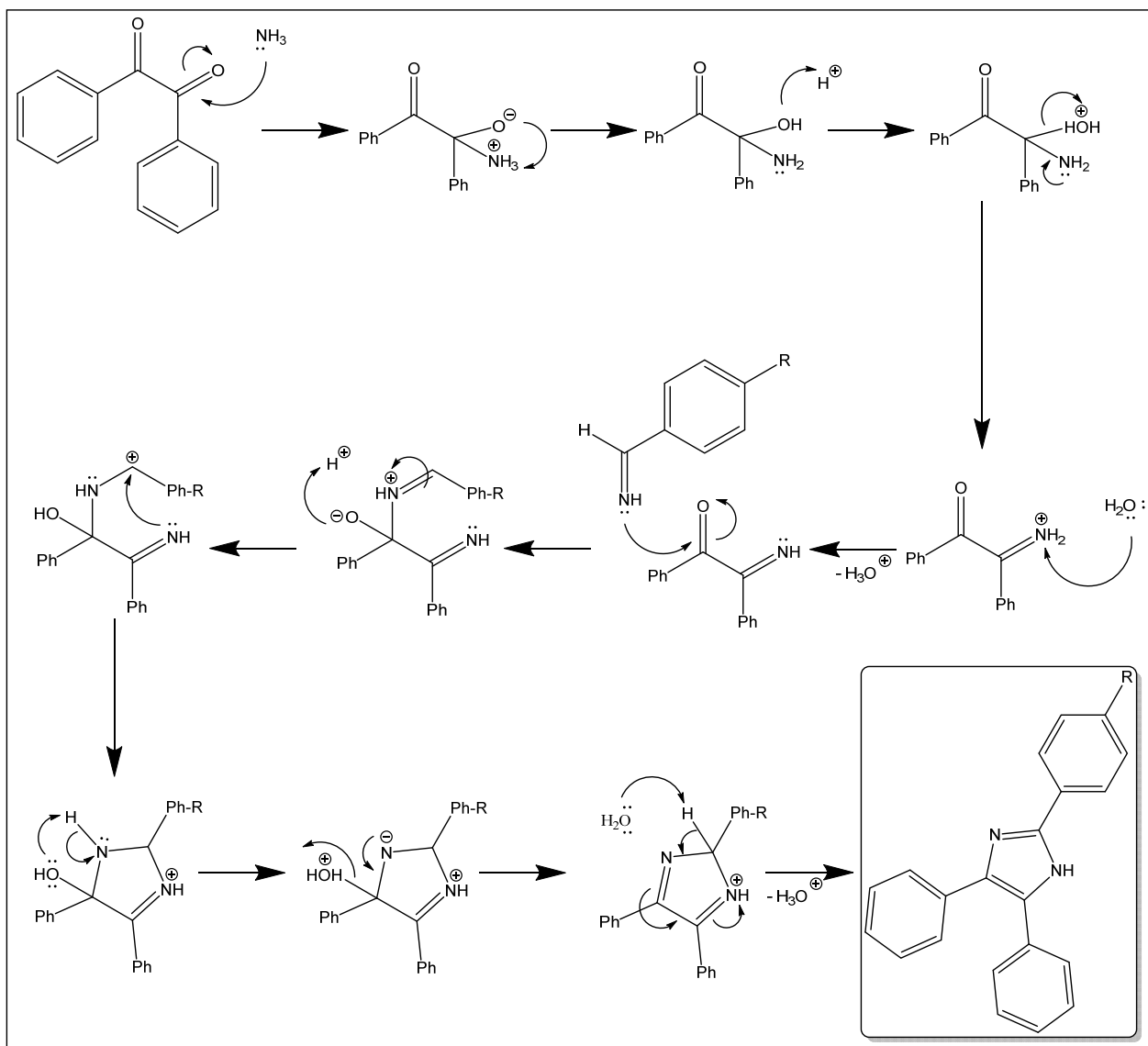
Esquema 4. Síntesis de esqueleto trifenil imidazol del presente trabajo.

El mecanismo de reacción propuesto para esta síntesis es el de formación de una benzaldiimina entre el amoniaco del medio y el aldehído seleccionado (Esquema 5).



Esquema 5. Formación de intermediario benzaldiimina.

En el siguiente paso, se produce una ciclo-condensación entre la benzaldimina y el bencilo (Esquema 6).



Esquema 6. Ciclo-condensación del anillo imidazol.

Es en esta ciclo-condensación donde se genera el anillo imidazólico. Como se mencionó anteriormente, el grupo R para el anillo fenólico sustituido es en un intermediario el grupo hidroxilo y en otro un grupo metoxilo.

4.3 Síntesis de imidazoles: variaciones del proceso sintético

Si bien la síntesis general de imidazoles ya presentada permite generar de manera accesible imidazoles con diferentes grados de sustitución, de manera constante se da la búsqueda de condiciones de reacción con mejoras en rendimientos, tiempos o incluso para introducir síntesis ambientalmente más amigables. Como ejemplo de estos procesos “verdes”, se ha reportado una síntesis de imidazoles sustituidos donde se reemplaza al comúnmente utilizado ácido acético y se utiliza polietilenglicol como disolvente (Das, Sudhakar y Srinivas, 2010). Otro caso donde se cambia el disolvente es en el empleo de líquidos iónicos neutros (como el bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio), donde se obtienen buenos rendimientos y además se reduce el tiempo de reacción a menos de 10 minutos mediante el calentamiento por microondas (Hasaninejad et al, 2010).

Una de las maneras en que se busca mejorar procesos sintéticos es mediante el empleo de catalizadores, y en el caso de los imidazoles se ha buscado en diferentes ocasiones con la ayuda de sílica gel. Shaabani y Rahmati (2006) emplearon sílica gel/ácido sulfúrico como un catalizador ácido sólido, bajo condiciones de reflujo en agua, para la síntesis de imidazoles trisustituidos con buenos rendimientos. Por otra parte Karimi et al (2006) usaron sílica gel, con la diferencia de que esta se encuentra impregnada con bisulfito de sodio. También se trata de una síntesis libre de solvente, la cual se conduce mediante calentamiento convencional o por microondas y de la cual se obtienen rendimientos elevados. Cabe mencionar que estos dos grupos de investigadores, así como Das, Sudhakar y Srinivas (2010), han cambiado incluso uno de los precursores de la formación del anillo imidazol. El compuesto 1,2-dicetonico, en estos trabajos inicialmente bencilo, también fue sustituido por benzoína y por benzilmonoxima (Figura 4).

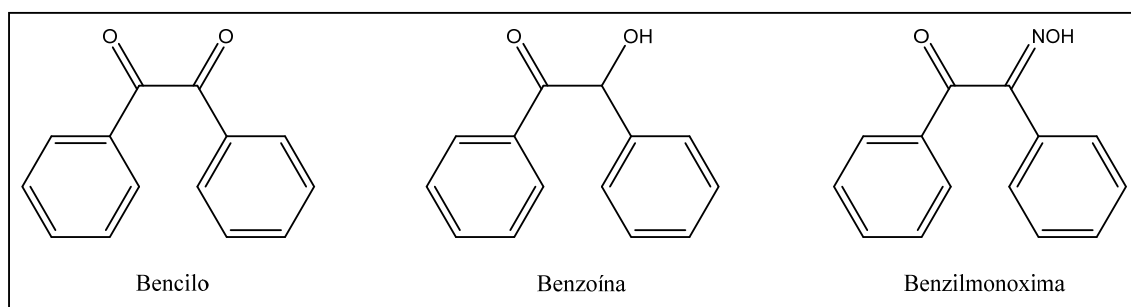


Figura 4. Compuestos de tipo 1,2-dicetona y derivados para síntesis de imidazol.

Otro catalizador, que por su fácil recuperación, reuso sin reducción significativa de potencia, reducción de tiempo de reacción y buenos rendimientos es la zeolita (mineral de tipo aluminosilicato) impregnada con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (Sivakumar, Kathirvel y Lalitha, 2010).

En el caso de la síntesis de trifenilimidazol y otros 2,4,5-triarilimidazoles se realizó un estudio empleando cloruros metálicos hidratados como catalizadores (Marques, 2010). Utilizando bencilo como precursor los mejores catalizadores fueron $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; en el caso del empleo de benzoína los mejores rendimientos se dieron tras el uso de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

4.4 Propiedades citotóxicas de amino alcoholes

Los β -amino alcoholes son compuestos que contienen un grupo funcional amino y otro alcohol; presentan una amplia variedad de actividades biológicas, como lo son antiplasmodia, antileishmania, antimicrobiana y antiproliferativa (Bai et al, 2011), siendo esta última con la cual se busca trabajar en el presente proyecto.

Existen diversas referencias en la literatura donde derivados tipo amino alcohol presentan citotoxicidad. Bai et al (2011) sintetizaron amino alcoholes a partir del aminoácido triptófano (Figura 5) con tres variaciones en el esqueleto generado. Tras realizar pruebas de inhibición sobre 5 líneas celulares humanas de cáncer, se observó que la gran mayoría de los compuestos presentaban una buena actividad antiproliferativa.

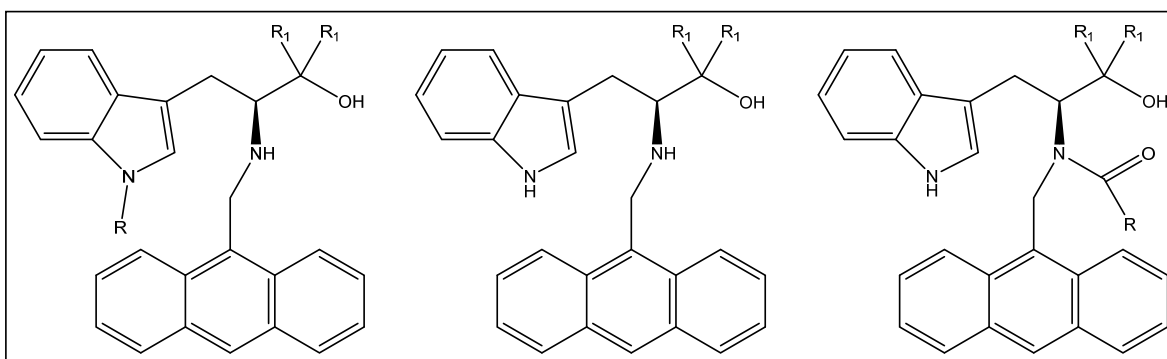


Figura 5. Amino alcoholes citotóxicos derivados de triptófano.

Por su parte, la Pachastrissamina (Jaspina B) es un esfingolípido aislado de la esponja marina *Pachastrissa sp.* a la cual se le ha detectado una potente actividad citotóxica (Kuroda et al 2002). Como se puede observar en la Figura 6, esta molécula es más bien

sencilla y no se encuentra altamente funcionalizada; además de una cadena hidrocarbonada presenta una porción amino alcohol integrada a un anillo tetrahidrofurano. Rives et al (2010) sintetizaron aza-derivados de Jaspina B, es decir se cambió el tetrahidrofurano por un anillo tipo pirrolidina. Los nuevos derivados siguieron presentando actividad citotóxica, por lo que podemos observar que la porción amino alcohol, en estas moléculas inalterada, puede estar continuando el contribuir a esta actividad biológica.

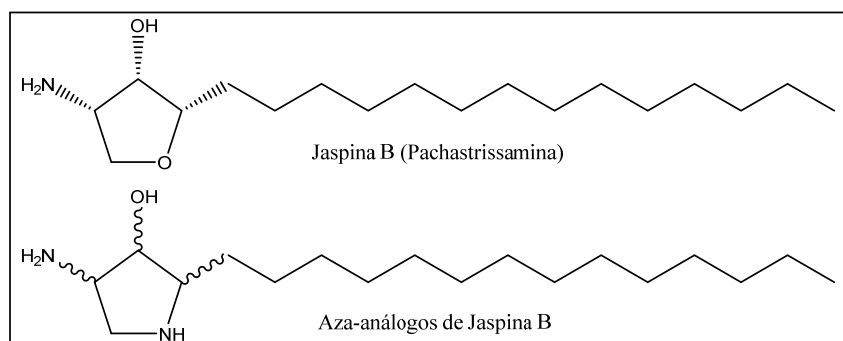
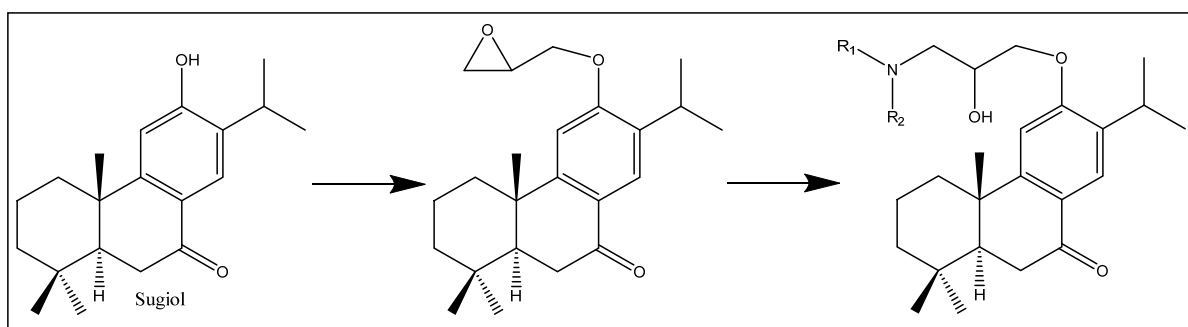


Figura 6. Jaspina B y aza-derivados, moléculas con perfil citotóxico.

Otro ejemplo interesante de la citotoxicidad de los amino alcoholes es el presentado por Córdova et al (2006a). Se comenzó trabajando con el compuesto sugiol, diterpeno aislado de plantas del género *Salvia*, del cual se ha reportado que tiene actividad antiproliferativa. Tras incorporar epiclorhidrina al esqueleto del sugiol y generar del epóxido resultante derivados β -amino alcoholes, se encontró que los nuevos derivados seguían presentando la actividad citotóxica del compuesto de partida sugiol, y lo más importante, esta actividad incluso llegaba a mejorar con el nuevo fragmento (Esquema 7).

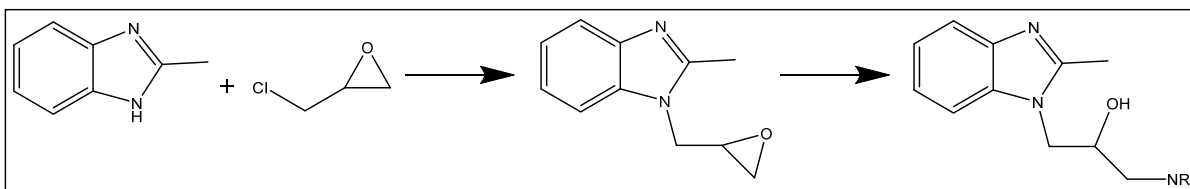


Esquema 7. Derivados amino alcohol del sugiol.

4.4.1 Incorporación de fragmentos amino alcohol

En los primeros ejemplos de amino alcoholes citotóxicos mencionados en este apartado, los diferentes derivados ya presentaban este fragmento (el caso de la Jaspina B), o fue generado de manera relativamente sencilla (como la reducción del ácido carboxílico a alcohol en el aminoácido triptófano). Otra manera muy común para incorporar esta funcionalización a una molécula es la formación o introducción de un epóxido, el cual por aminólisis es capaz de generar un amino alcohol. Este procedimiento es el utilizado en el presente trabajo, y podemos encontrarlo también en los de Córdova et al (2006a) y Birajdar et al (2013).

Cabe destacar que Birajdar et al (2013) también empleó un esqueleto con un fragmento imidazol, aunque la bioactividad evaluada fue antibiótica y antituberculosa. Como se observa en el Esquema 8, se trabajó con un benzimidazol, el cual tras desprotonación de su nitrógeno con carbonato de cesio se le adicionó una molécula de epiclorhidrina. La apertura del epóxido se llevó a cabo con aminas en anillos de 4, 5 y 6 miembros, incluyendo sistemas bicíclicos y espiro, lo cual generó diferentes derivados amino alcohol.



Esquema 8. Generación de amino alcoholes a partir de un epóxido, sobre un esqueleto benzimidazol.

Llama la atención el hecho de que un carbonato sea capaz de desprotonar al nitrógeno de un imidazol. Aunque es ácido este protón, es un ácido débil. En nuestro proyecto para desprotonar al imidazol e introducir la epiclorhidrina se empleó una base fuerte como lo es NaH; solamente al trabajar con un fragmento fenol donde el protón es más ácido se llegó a emplear carbonato como base (K_2CO_3). La particularidad del trabajo de Birajdar consistió en emplear un carbonato diferente, de cesio. Aquí ocurre el llamado “efecto Cesio” (Dijkstra, Kruizinga y Kellogg, 1987), donde por una elevada solubilidad en comparación con otros elementos alcalinos, se da una solvatación prácticamente total del cesio, dejando a su contraión carbonato libre y altamente reactivo. Esto permite llevar a cabo N-arilaciones (Gujadhur, Venkataraman y Kintigh, 2001) y N-alquilaciones (Escudero

et al, 2011) sobre nitrógenos alifáticos y aromáticos, que con otros carbonatos no se podría o sería más complicado de lograr.

4.5 Evaluación biológica

4.5.1 Técnica de ABTS

Los radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados y son por lo tanto especies altamente reactivas. A bajas concentraciones pueden actuar como segundos mensajeros en la señalización celular, sin embargo una alta concentración puede provocar daños a la célula (Agudo Medina, 2012).

Mataix y Battino (en Agudo Medina, 2012) definen a los antioxidantes como compuestos que en presencia de un sustrato oxidable retrasan o inhiben la oxidación de éste. Pueden actuar de diferentes maneras: impidiendo la formación de las ROS, interceptando el ataque de ROS, secuestrando los metabolitos reactivos y reduciendo su reactividad, facilitando el reparo del daño celular causado por ROS, favoreciendo la actividad de otros antioxidantes, o aumentando la resistencia de dianas biológicas sensibles a los radicales libres (Agudo Medina, 2012).

Existen diferentes técnicas que permiten determinar la actividad antioxidante de una molécula, extractos, o mezclas de compuestos. Uno de ellos es la decoloración del radical de ácido 2-2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ABTS (Figura 7).

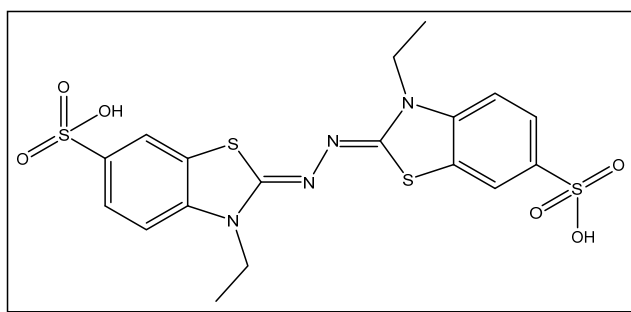


Figura 7. Estructura del ABTS.

El ensayo original se basaba en la activación de metmioglobina con peróxido de hidrógeno en la presencia de ABTS para producir su radical catión en presencia o ausencia de antioxidantes. Pero Re et al (1999) presentaron una modificación ampliamente usada

hasta la fecha donde por medio de persulfato de potasio se genera el radical cromóforo verde/azul de ABTS, el cual tiene absorciones máximas a 645, 734 y 815 nm de longitud de onda de la luz. Al adicionar a una solución de este radical el compuesto o mezcla antioxidante a evaluar, se reduce al radical a su forma ABTS, por lo que la coloración disminuye. Por espectrometría de UV-visible se puede hacer una lectura de esta disminución, determinándose de esta manera la actividad antioxidante del compuesto evaluado.

4.5.2 Ensayos en líneas celulares

Un método muy útil para determinar la actividad citotóxica de un compuesto es mediante el ensayo *in vitro* frente a líneas celulares, las cuales se cultivan en frascos estériles; las células pueden adherirse al frasco o encontrarse en suspensión dependiendo de la línea celular por analizar.

La primer parte necesaria para este ensayo es el cultivo de las células. En este trabajo se siguió el procedimiento de Padrón (s. f.) para evaluación antitumoral *in vitro*. Las células de la línea por trabajar se mantienen en el medio de cultivo adecuado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor y L-glutamina 2 mM, en un incubador a 37 °C en 5% CO₂ y 95% aire humificado.

Después del cultivo las células se recogen por tripsinización y se resuspenden en un medio con antibióticos (penicilina G y estreptomycin). Se establece la viabilidad celular por medio de azul de tripán en una cámara de Neubauer o con equipos automáticos de recuento celular para dar las densidades del cultivo adecuadas para cada línea celular antes de probar la citotoxicidad de los compuestos a evaluar. La técnica del azul de tripán consiste en que este compuesto, un coloide, se introduce en células con membrana rota, por lo que al analizar en la cámara de Neubauer se descartan las células que se observen de color azul por considerarlas no viables.

La segunda parte del ensayo consiste en la siembra de las células y la adición de los compuestos a evaluar. Empleando una placa de 96 pocillos, en una columna se coloca solamente medio de cultivo (como blanco), en otra columna se colocan células con la densidad adecuada de la línea (como control), y en las siguientes columnas se adicionarán

de nuevo las células, pero a las que se les adicionará el compuesto a evaluar en concentraciones decrecientes.

La tercera parte es la determinación de la GI_{50} , donde siguiendo de nuevo la metodología de Padrón (s. f.), encontrada también en referencias de la literatura (Córdova et al, 2006a; Córdova et al, 2006b), se emplea la colorimetría de la sulforrodamina B (SRB). En el caso de este trabajo y las referencias citadas, se sigue el método establecido por la NCI (National Cancer Institute) con ligeras modificaciones.

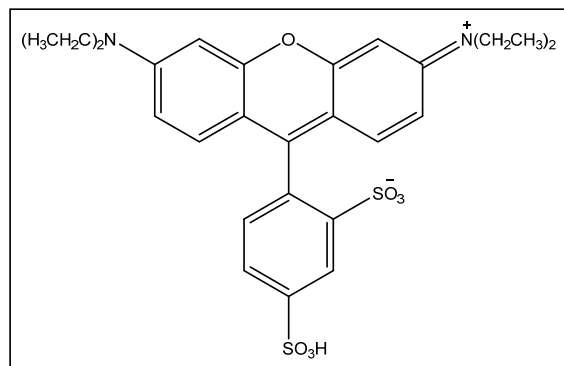


Figura 8. Estructura de la sulforrodamina B.

El compuesto a evaluar se disuelve en DMSO a 400 veces la concentración máxima del ensayo. Tras 48 horas de incubación de las células se adiciona ácido tricloroacético al 50% y se fijan las células a 4 °C por 1 hora. Se añade una solución de SRB y se tiñe por 15 minutos, antes de lavar y leer las absorbancias a 492 nm. Es entonces cuando se dibuja una curva dosis-respuesta a partir de la cual se puede calcular la GI_{50} del compuesto.

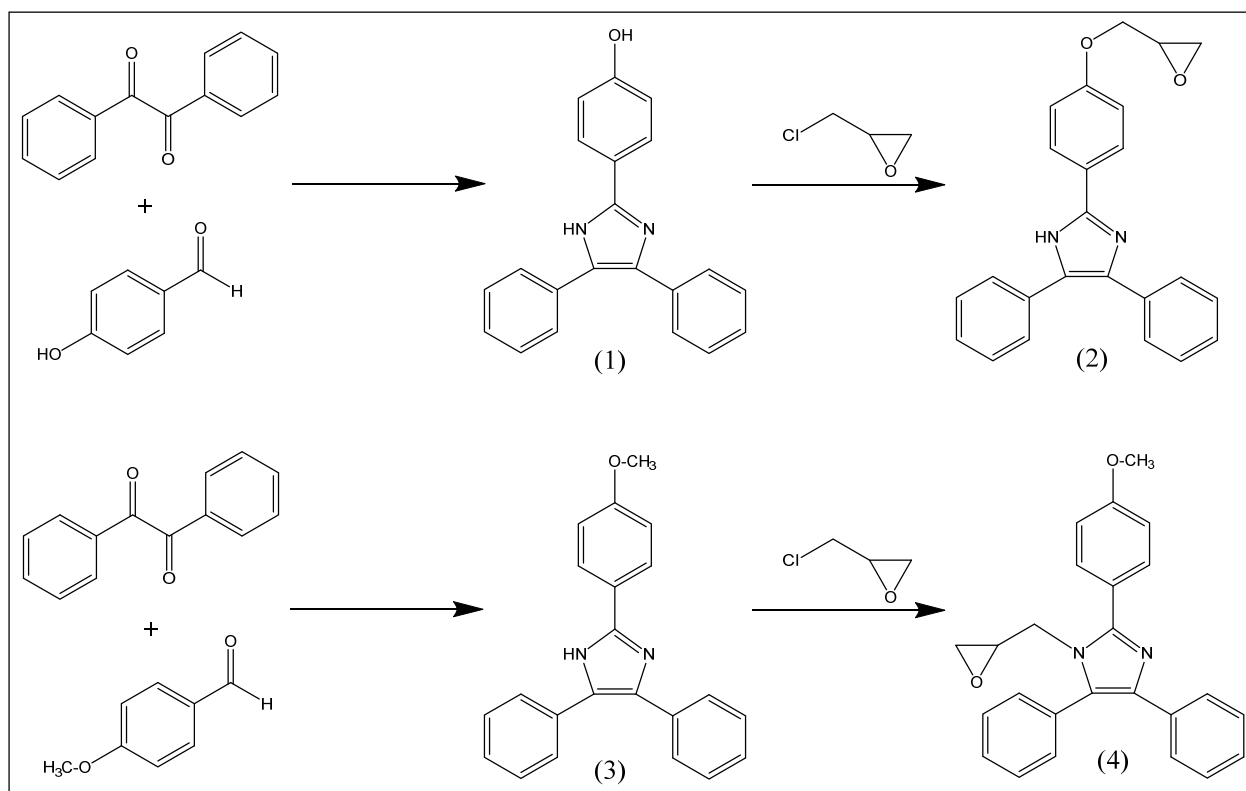
Como ensayos para medir la proliferación celular, la técnica de la SRB se basa en la unión de ésta a aminoácidos básicos fijados con el ácido tricloroacético. Otra técnica con el mismo fin, también empleada en este trabajo, es la de MTT. Esta es una sal de tetrazolio, que en presencia de la enzima succinato deshidrogenasa de la mitocondria es convertida en formazán. Este producto es insoluble e impermeable a la membrana celular por lo que se termina acumulando en las células sanas.

5 Metodología

5.1 Ruta sintética

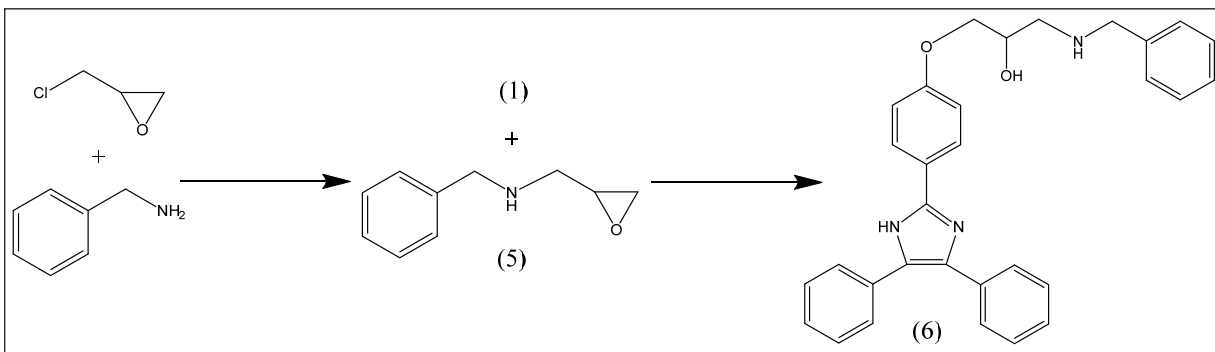
La estrategia sintética propuesta en este trabajo consiste en la formación de un esqueleto de tipo trifenil imidazol, lo cual es logrado mediante la síntesis de Debus-Radziszewski, para su posterior funcionalización amino alcohol. Para lograr la introducción de este grupo funcional, se introduce primero un grupo epóxido, el cual por aminólisis terminará por generar el amino alcohol.

Se siguió la ruta sintética A, que se puede observar en el Esquema 9, para sintetizar los intermediarios de tipo epóxido.



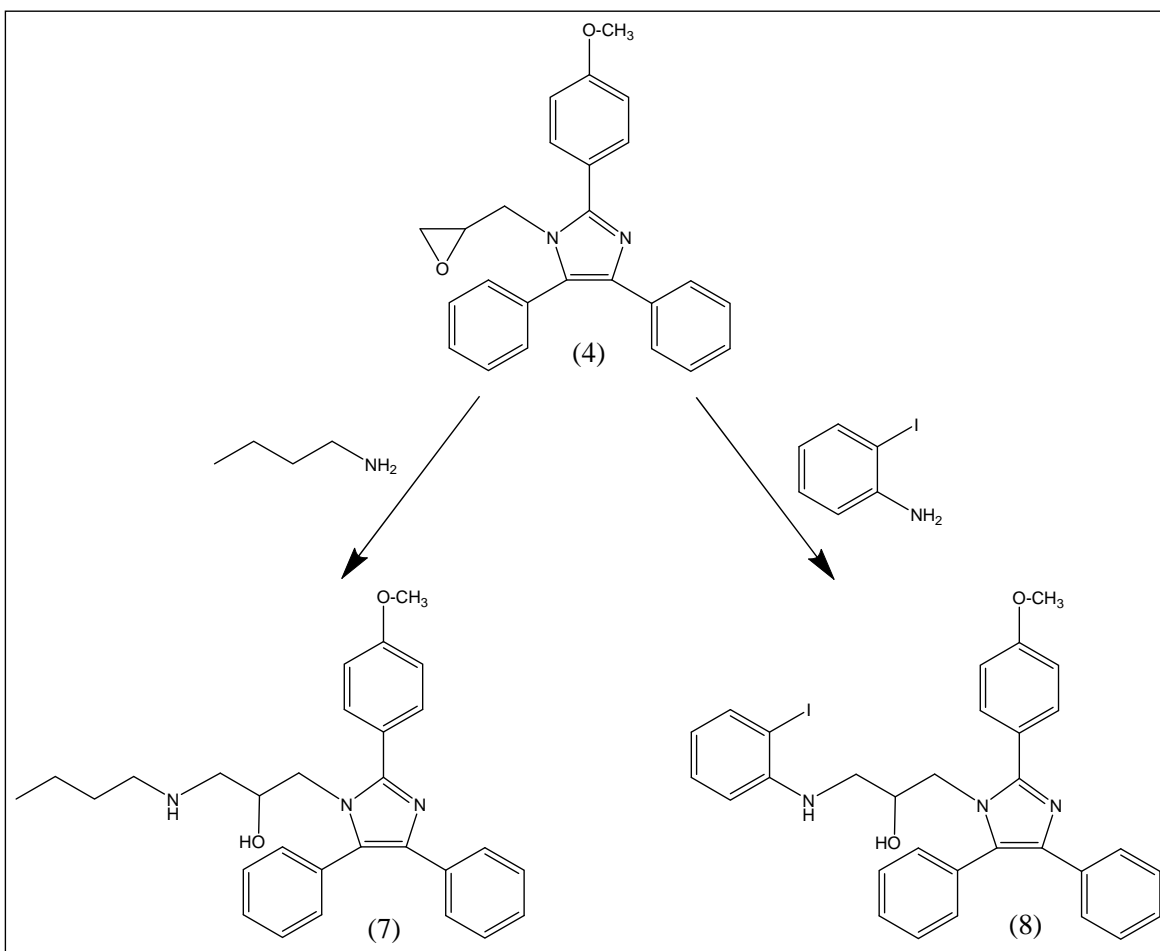
Esquema 9. Ruta sintética A.

Debido a que del producto (2) no se logró identificar su presencia mediante análisis espectrométricos, se propuso una vía sintética alterna para lograr la funcionalización amino alcohol del intermediario trifenil imidazol (1). Esta ruta sintética B se puede apreciar en el Esquema 10.



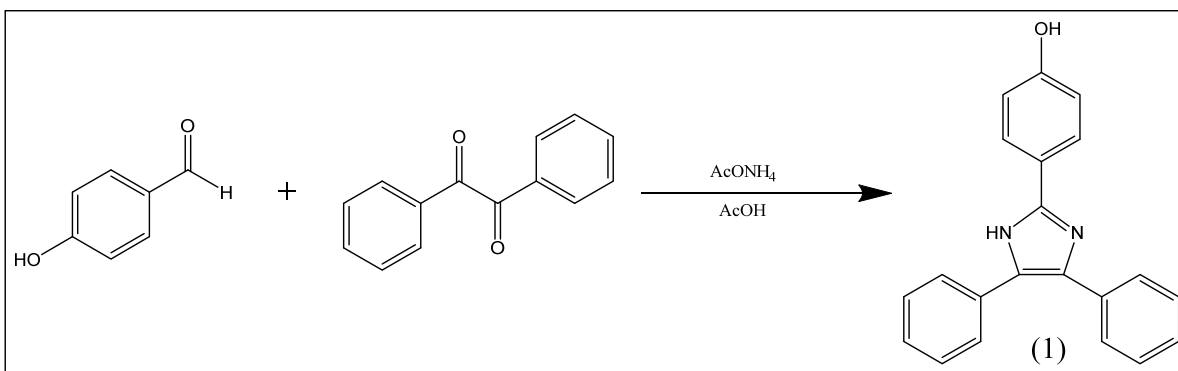
Esquema 10. Ruta sintética B.

Tras la detección mediante espectrometría de masas del intermediario epoxídico (4) se procedió a la apertura del mismo por aminólisis (Esquema 11). Se eligió una amina alifática y otra aromática, para la síntesis de los derivados finales (7) y (8).



Esquema 11. Ruta sintética C.

Síntesis de compuesto (1): IMI-POH



Se colocó a reflujo una mezcla de 2.7470 g (35.6753 mmol) de acetato de amonio en 10 mL de ácido acético. Después de 5 minutos a goteo constante se agregó 1.3070 g (10.7025 mmol) de *p*-hidroxi-benzaldehído. Después de 5 minutos se adicionó 1.5 g (7.1350 mmol) de bencilo. Se procedió con el reflujo por 24 horas. Se agregó hidróxido de amonio hasta llevar a pH 9. Se filtró el sólido precipitado y se lavó repetidas veces con agua destilada. El producto se purificó mediante columna cromatográfica de sílica gel usando como mezcla eluyente *n*-Hexano/AcOEt al 20%, obteniendo 2.1904 g de **4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)fenol (1)**, nombrado IMI-POH, con %R = 98%.

4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)fenol (1)

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₆ON₂

Aspecto Físico: Sólido amorfo color crema claro.

R_f: 0.51 (F.M. *n*-Hex/AcOEt 50%);

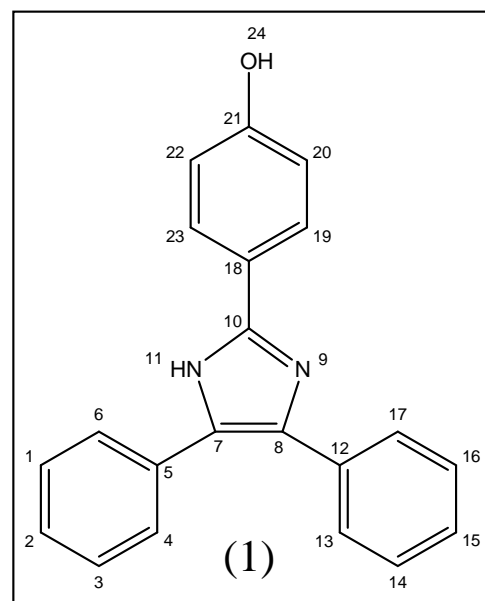
0.31 (F.M. *n*-Hex/AcOEt 40%)

IR (cm⁻¹): 3617, 3423, 1610, 1498, 1280, 1251, 1000, 694

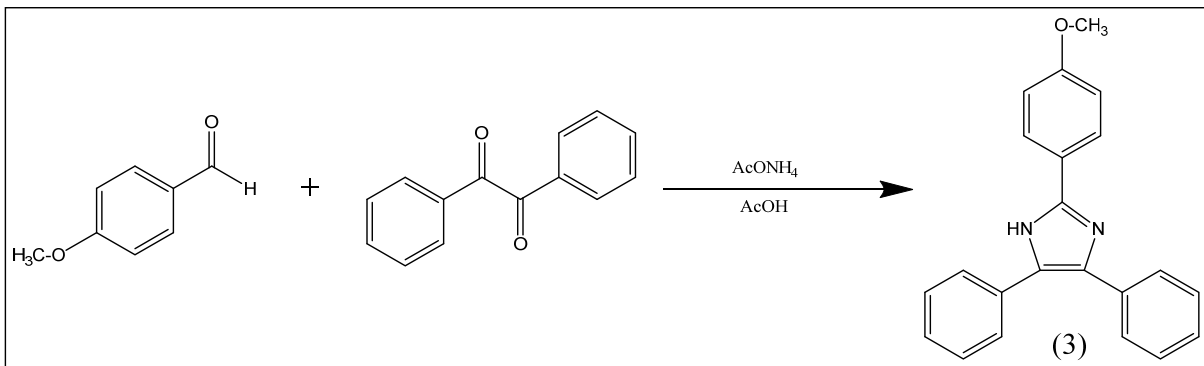
EM m/z (%): 312 [M⁺] (93), 281 (15), 207 (55), 165 (100), 104 (11), 89 (16), 77 (22)

RMN ¹H (CDCl₃) δ:

RMN ¹³C (CDCl₃) δ:



Síntesis de compuesto (3): IMI-PAN



Se colocó a reflujo una mezcla de 1.8333 g (23.8095 mmol) de acetato de amonio en 15 mL de ácido acético. Después de 5 minutos a goteo constante se agregó 0.6483 g (4.7619 mmol) de *p*-anisaldehído. Después de 5 minutos se adicionó 1 g (4.7619 mmol) de bencilo. Se procedió con el reflujo por 12 horas. Se agregó hidróxido de amonio hasta llevar a pH 9. Se filtró el sólido precipitado y se lavó repetidas veces con agua destilada. El producto se purificó con recristalizaciones de etanol, obteniendo 1.3814 g de **2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1*H*-imidazol (3)**, nombrado IMI-PAN, con %R = 89%.

2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1*H*-imidazol (3)

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₈ON₂

Aspecto Físico: Sólido amorfo color blanco.

R_f: 0.83 (F.M. n-Hex/AcOEt 50%);

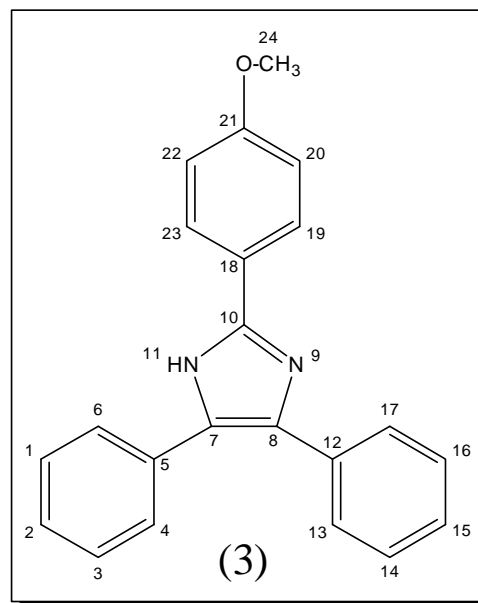
0.67 (F.M. n-Hex/AcOEt 40%)

IR (cm⁻¹): 1613, 1496, 1295, 1246, 1033, 695

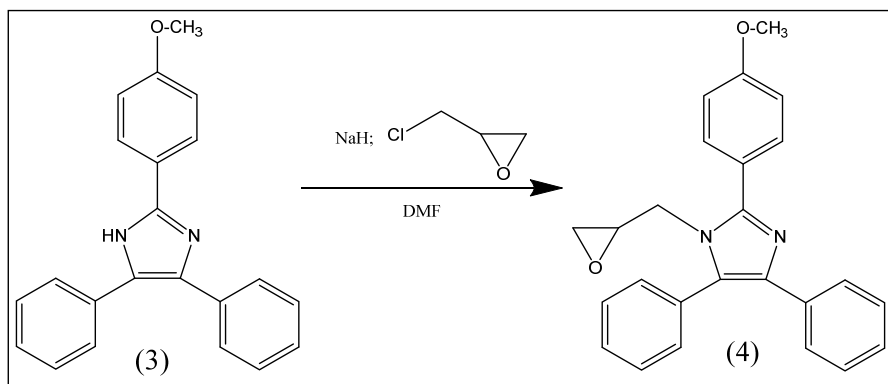
EM m/z (%): 326 [M⁺] (100), 311 (27), 283 (9), 193 (3), 178 (2), 165 (23), 119 (5), 104 (3), 89 (8), 77 (8)

RMN ¹H (CDCl₃) δ:

RMN ¹³C (CDCl₃) δ:



Incorporación de Epiclorhidrina a IMI-PAN (3)



Una suspensión de 0.4 g (1.2270 mmol) de IMI-PAN (3) y 0.0294 g (1.2270 mmol) de NaH en 24 mL de DMF se calentó a 100°C durante 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente para luego colocarla en un baño de hielo/agua y adicionar 0.2270 g (2.4540 mmol) de epiclorhidrina. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 75°C durante 96 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Al terminar el tiempo de reacción se realizaron extracciones con acetato de etilo, las cuales se lavaron con H₂O y Brine. Se eliminó el disolvente en el rotoevaporador y se purificó mediante columna cromatográfica de sílica gel usando como mezcla eluyente *n*-Hexano/AcOEt al 5%, obteniendo 0.1723 g de **2-(4-metoxifenil)-1-(oxiran-2-ilmetil)-4,5-difenil-1H-imidazol (4)**, con %R = 37%.

2-(4-metoxifenil)-1-(oxiran-2-ilmetil)-4,5-difenil-1H-imidazol (4)

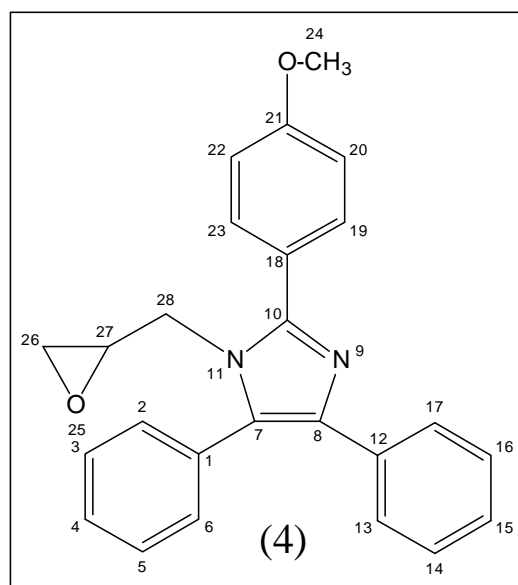
Fórmula molecular: C₂₅H₂₂O₂N₂

Aspecto físico: Sólido color blanco/crema.

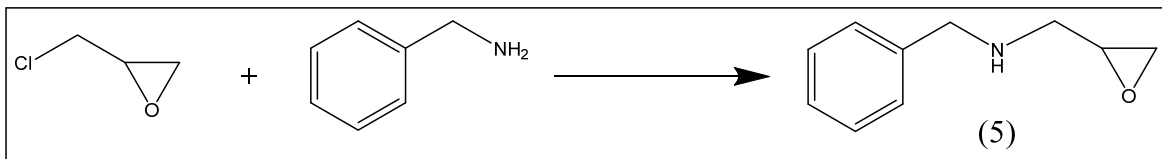
Rf: 0.54 (F.M. *n*-Hex/AcOEt 40%)

IR (cm⁻¹): 2923, 1610, 1494, 1252, 1030, 698

EM m/z (%): 382 [M⁺] 100, 353 (6), 339 (3), 325 (32), 281 (5), 207 (8), 178 (12), 165 (16), 119 (26), 103 (13), 89 (24), 77 (9), 31 (6)



Apertura de Epiclorhidrina con Bencilamina



Se mezclaron 2 mL de epiclorhidrina (2.3624 g; 25.5339 mmol) con 1.86 mL de bencilamina (1.8214 g; 17.0226 mmol) en un matraz bola. Se calentó a 40°C y se dejó en agitación overnight. Se obtuvo el producto *N*-bencil-1-(oxiran-2-il)metanamina (5), el cual sin purificación posterior, fue empleado en la siguiente reacción.

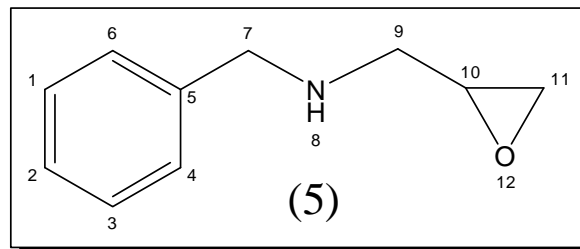
N-bencil-1-(oxiran-2-il)metanamina (5)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃ON

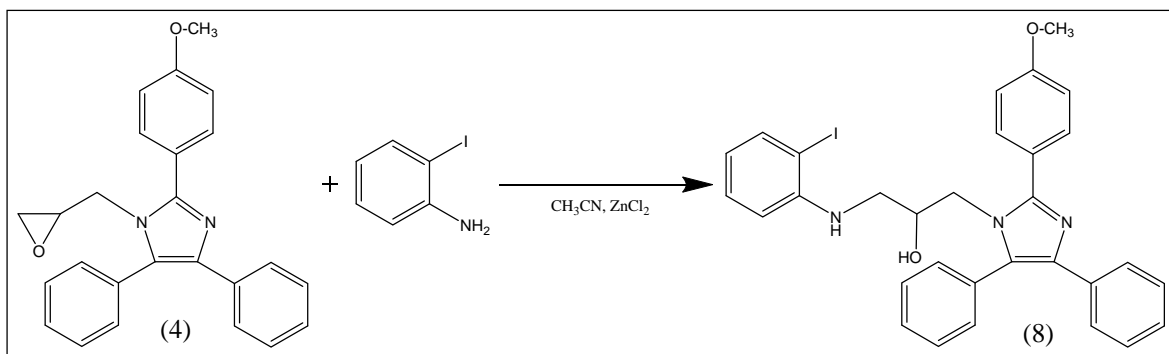
Aspecto físico: Resina traslúcida (crudo de reacción)

Rf: 0.63 (F.M. n-Hex/AcOEt 50%)

EM m/z (%): 162 [M⁺-1] (1), 120 (19), 91 (100), 77 (1), 43 (5)



Apertura del intermediario epoxídico (4) con 2-I-anilina



A una disolución de 0.0522 g (0.1366 mmol) del epóxido (4) en 9 mL de acetonitrilo, se adicionó 0.0449 g (0.2050 mmol) de 2-I-anilina y una cantidad catalítica de ZnCl₂. La mezcla se calentó a reflujo por 25 horas. El sistema se enfrió y se eliminó el disolvente con un rotoevaporador. El residuo se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa, obteniendo 16.2 mg del producto **1-((2-iodofenil)amino)-3-(2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)propan-2-ol (8)**, nombrado IMI-IAN, con %R = 20%.

1-((2-iodofenil)amino)-3-(2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)propan-2-ol (8)

Fórmula Molecular: C₃₁H₂₈O₂N₃I

Aspecto Físico: Sólido amorfo color crema/amarillento.

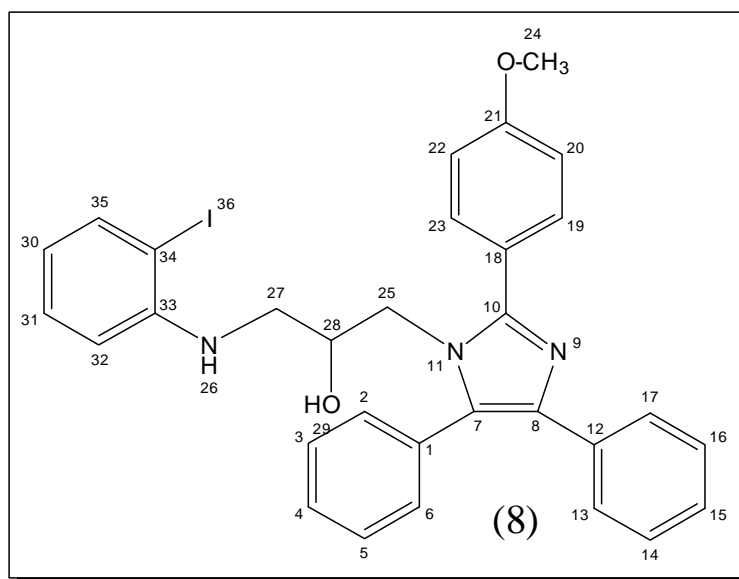
R_f: 0.16 (F.M. n-Hex/AcOEt 40%)

IR (cm⁻¹): 3371, 3173, 3059, 2918, 2850, 1615, 1465, 1252, 1029, 700

EM m/z (%): 553 [M⁺-48] (<1), 383 (2), 369 (70), 339 (100), 326 (10), 206 (9), 165 (2), 104 (5)

RMN ¹H (CDCl₃) δ:

RMN ¹³C (CDCl₃) δ:



5.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los compuestos sintetizados se evaluó mediante el ensayo de decoloración de ABTS, el cual ya se mencionó en el apartado de generalidades. Para la elaboración de esta prueba primero se preparó la solución patrón de ABTS la cual tras dejar un tiempo de reposo, se utilizó para realizar el ensayo con los compuestos IMI-POH (1), IMI-PAN (3) e IMI-IAN (8). Las absorbancias del ensayo se leen con un espectrofotómetro UV-visible.

Procedimiento:

- 1.- Se pesa en balanza analítica 0.0033 g de persulfato de potasio y 0.0194 g de ABTS y se disuelven con 5 mL de agua desionizada.
- 2.- La solución preparada se tapa con aluminio y se deja reposar en la oscuridad por 18 horas antes de realizar el ensayo.
- 3.- Al realizar el ensayo, se toman 150 μ L de la solución patrón de ABTS y se diluyen con 15 mL de MeOH. La solución obtenida se protege de la luz.
- 4.- Se preparan las muestras pesando 1 mg de cada compuesto a evaluar y disolviendo en un tubo de ensayo con 1 mL de MeOH, para obtener una concentración de 1 mg/mL (se realiza por triplicado).
- 5.- Se adicionan 500 μ L de MeOH a 5 tubos de ensayo por cada uno de los triplicados a evaluar.
- 6.- Se toman 500 μ L del tubo con concentración 1 mg/mL y se añaden al primer tubo con MeOH, para realizar después diluciones seriadas en los tubos restantes. Esto se realiza mezclando y tomando 500 μ L, pasándolos al siguiente tubo repitiendo sucesivamente. En el sexto y último tubo se desechan los 500 μ L tomados. Se obtienen así concentraciones desde 1 mg/mL hasta 0.03125 mg/mL.
- 7.- Protegiendo de la luz, se toma 1 mL de la solución de ABTS y se realiza la lectura de su absorbancia en una celda de cuarzo a 734 nm para obtener la Absorbancia Inicial, tras utilizar un blanco de MeOH.
- 8.- Protegiendo de la luz, se mezclan 980 μ L de la solución de ABTS con 20 μ L de cada concentración por analizar. Se deja reposar 7 minutos y se lee para obtener la Absorbancia Final.

Tras la obtención de las absorbancias, se calcula el porcentaje de actividad antioxidante mediante la fórmula:

$$\% \text{ de actividad antioxidante} = \frac{\text{Absorbancia Inicial} - \text{Absorbancia Final}}{\text{Absorbancia Inicial}} \times 100$$

Con las actividades calculadas para cada lectura, se obtiene un promedio para el triplicado de cada concentración. Con estos datos se puede entonces realizar la gráfica correspondiente de actividad antioxidante contra concentración del compuesto analizado.

5.3 Actividad citotóxica

Se determinó la actividad citotóxica de los compuestos IMI-POH (1), IMI-PAN (3) e IMI-IAN (8). Para evaluar esta actividad se emplearon líneas celulares que se mantuvieron en el medio de cultivo adecuado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor y L-glutamina 2 mM, en un incubador a 37°C en 5% CO₂ y 95% aire humificado. Tras el cultivo se procedió a la tripsinización y recuento de células viables, así como la siembra y adición de los compuestos a analizar. Posteriormente se determinó la GI₅₀ mediante los métodos de la SRB y MTT.

Procedimiento de tripsinización y recuento celular, siembra y adición de compuestos:

- 1.- Las células cultivadas se recogen en un tubo por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende a las células en medio de cultivo fresco.
- 2.- Se aspira el medio de cultivo y se lava a las células con 2-3 mL de buffer de fosfato salino estéril, el cual luego se aspira.
- 3.- Se añade 0.5-1 mL de solución de tripsina-EDTA estéril y se incuba a 37°C por 1 minuto.
- 4.- Se recoge las células con 5-10 mL de medio de cultivo fresco y se coloca la suspensión en un tubo de 15 mL estéril.
- 5.- Se mezcla en un tubo de 1.5 mL, 100 µL de solución de azul de tripán y 100 µL de suspensión de células.
- 6.- Se homogeniza la mezcla y se coloca 10 µL en una cámara de Neubauer.

- 7.- Se cuenta las células viables y se calcula la cantidad a utilizar para la siembra en placa de 96 pocillos. Se manejan diferentes densidades celulares, dependiendo del tiempo de duplicación de las células empleadas en el ensayo.
- 8.- En la placa se coloca medio de cultivo en una columna (como blanco) y en otra columna se cultivan células que no serán expuestas a los compuestos (como control). El resto de columnas contendrán las células que serán expuestas a los fármacos. Se siembra 100 μL de la suspensión de células preparada en los pocillos correspondientes.
- 9.- Los compuestos a evaluar se disuelven en DMSO a 400 veces la máxima concentración de ensayo. Se calcula el volumen de disolución del compuesto a diluir en 1 mL de medio de cultivo para hacer la dilución madre. Se preparan las diluciones seriadas y se añade 100 μL de las diluciones a los pocillos correspondientes.
- 10.- Se incuba durante 48 horas.

Procedimiento del método de SRB:

- 1.- Se añade 25 μL de una solución fría de ácido tricloracético al 50% a cada pocillo y se fija a 4°C durante 1 hora.
- 2.- Se lava generosamente con agua y se seca la placa golpeando sobre papel de filtro.
- 3.- Se añade 25 μL de una solución de SRB al 0.4% y se tiñe por 15 min.
- 4.- Se lava el exceso de SRB con una solución de AcOH al 1% y se seca la placa golpeando sobre papel de filtro.
- 5.- Se añade 150 μL de una solución de TRIS 10 mM y se lee la absorbancia a 492 nm.
- 6.- Se dibuja la curva dosis-respuesta y se calcula la GI_{50} .

Procedimiento del método de MTT:

- 1.- Se reconstituye 15 mg de MTT con 3 mL del medio. A cada pocillo se añade el MTT reconstituido en una cantidad igual al 10% del volumen del medio de cultivo.
- 2.- Se regresa la placa a la incubadora por 2-4 horas, dependiendo del tipo de célula (generalmente se emplean 2 horas).
- 3.- Después del periodo de incubación, se retira la placa de la incubadora y se disuelven los cristales de formazán formados añadiendo Solución Solubilizadora de MTT en una

cantidad igual al volumen original del medio de cultivo (esta solución es 10% Triton X-100 plus y HCl 0.1 N en 125 mL de isopropanol anhidro).

4.- Leer la absorbancia a 570 nm. Leer la absorbancia de fondo a 690 nm y restarla de la lectura de 570 nm.

5.- Se dibuja la curva dosis-respuesta y se calcula la GI₅₀.

Tanto en el método de SRB como MTT, se deben promediar las lecturas de los blancos, controles, y cada concentración analizada de los compuestos. El valor promedio del blanco se resta a los valores del control C y concentraciones D_i, y el efecto E_i para cada dosis se calcula mediante la fórmula:

$$E_i\% = \frac{D_i}{C} \times 100$$

El valor E para el control es 100%. Graficando estos resultados con el efecto en el eje 'y' y dosis en el eje 'x' en escala logarítmica, por extrapolación se obtiene la GI₅₀.

6 Resultados y Discusión de resultados

6.1 Ruta sintética

Primeras reacciones

.

.

.

Tras realizar la reacción de apertura de epóxido (Esquema x) se procedió a realizar la purificación del producto. Tras concluir el monitoreo mediante TLC se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió en una cantidad mínima de metanol, tras lo cual se sembró sobre una placa preparativa. Tras correr la placa con una F.M. de nHex/AcOEt al 40% se observó bajo luz UV el siguiente patrón (Figura x).

Figura x. Placa preparativa

Considerando que tras la apertura del epóxido se genera un amino alcohol y éste debe ser más polar, se pensó que el posible producto fuera la mancha marcada como A o la B. Incluso la apertura del epóxido puede darse con la amina atacando a los dos diferentes carbonos, por lo que se podría observar la obtención de dos isómeros de posición (Figura x). Así pues se aisló ambas manchas y se analizaron por CG/EM.

Los cromatogramas de ambas muestras no mostraron señales concluyentes sobre algún compuesto, se observaba sobre todo ruido. Tras cambiar los parámetros de la curva de calentamiento y de inyección de muestra en el equipo, se procedió a una nueva lectura donde de nuevo la señal imperante fue de ruido en el sistema. Una señal muy leve daba un ión molecular de 414, cuya fragmentación correspondía en algunas señales con las ya observadas en otros imidazoles (como en x, x, x, x,). Por probable fragmentación temprana del producto en el equipo, se procedió a cambiar de técnica y se empleó la inserción directa de la muestra sólida.

En esta ocasión se pudo observar la pureza de los productos A y B. Ambos presentaron un ión molecular de 414 m/z, encontrando de nuevo los fragmentos x, x, x, x, correspondientes a la fragmentación de un imidazol. Se consideró de nuevo que el elevado peso de la molécula favoreciera su fragmentación temprana, y que la señal de 414

correspondiera a un fragmento del producto Px. Por su parte, la similitud en el patrón de fragmentación reforzó nuestra hipótesis de la formación de isómeros de posición para esta reacción.

Sin embargo, la señal de 414 encontramos corresponde como ión molecular del producto que se obtendría si el epóxido fuese abierto durante la reacción por una molécula de metanol, generando los compuestos Px y Px (Figura x). Esto podría deberse a que el metanol, como disolvente de la reacción y gracias a su nucleofilicidad y relativo menor tamaño compitió con la 2-I-anilina para abrir el epóxido.

Figura x. Posibles productos por apertura de MeOH, Px y Px.

Tras considerar esta posibilidad no considerada al iniciar la reacción, se regresó a la placa preparativa en búsqueda de nuevas manchas que pudiesen corresponder con el producto esperado Px. En esta ocasión se dirigió nuestra atención a las manchas C y D de la preparativa observada en Figura x. D sigue nuestra idea de un producto más polar, y C aunque parece restos del material de partida (que pensamos en un inicio casi desaparecido) se consideró importante el analizarlo con el fin de obtener más información con respecto a la reacción para así comprender el qué sucede en ella.

Las muestras se analizaron por inserción directa. Si bien encontramos más señales de las esperadas en el cromatograma, probablemente debido a una descomposición de los productos tras varios días de contacto con la sílica, se pudo observar un par de señales interesantes.

Para comenzar, el análisis de D reveló impurezas, si bien una de las moléculas definidas en el cromatograma mostraba un ión molecular de x, con señales de x, x, x, que señalan definitivamente un producto de tipo imidazol cuyo epóxido fue abierto (Figura x). Al no encontrar señales con m/z mayor, no se pudo determinar qué fragmento en particular provocó la apertura del epóxido ni que producto se obtuvo, tan sólo podemos advertir que fue uno producto secundario de la reacción.

Figura x. Fragmentos correspondientes de señales de D (imi)

Lo interesante surgió con el análisis de C, que en un inicio se pensó eran restos del material de partida Px. Éste tiene una masa molecular de 382 uma, sin embargo el cromatograma mostraba una única señal claramente definida con un peso molecular mayor. Se encontró varias señales en los 400's y 600's m/z, por lo que se pensó que aquí se

tenía el producto Px esperado de la reacción. Con una baja prevalencia se observó el posible ión molecular de 601 m/z del producto Px; la aparición de otras señales también menores con pesos diferentes, así como fragmentos cuya estructura no se pudo identificar claramente nos hace pensar que el producto quizá sufrió una degradación por la sílica a la cual estuvo unidas por un lapso de varios días.

Sin embargo, la presencia de las señales 601, x, x, x, x, x nos hicieron pensar muy probablemente que teníamos la primer evidencia de nuestro producto (Figura x).

Figura x. Fragmentos posibles del producto 2-I-anilina + imi

Reaccion final, cambiando disolvente. Obtención de producto final IMI-IAN....

6.2 Actividad antioxidante

De manera complementaria a la evaluación citotóxica de los productos sintetizados en este trabajo, se decidió determinar a su vez la actividad antioxidante de los mismos. Diversos estudios (Šavikin et al, 2009; Lee et al, 2005) han encontrado que existe una correlación entre las actividades antioxidantes y antiproliferativas, por lo que este ensayo se realizó para identificar si existe esta correlación con los compuestos sintetizados.

Se evaluó la capacidad antioxidante de los productos IMI-POH (1), IMI-PAN (3) e IMI-IAN (8) mediante la técnica de ABTS. Se realizó una solución inicial de 1 mg/mL de cada uno de los compuestos con una dilución seriada hasta una concentración mínima de 0.03 mg/mL y se hizo el análisis por triplicado. En el apartado de Metodologías del trabajo se detalla el procedimiento seguido. Las absorbancias leídas para cada compuesto pueden observarse en la Tabla 1. A partir de estas lecturas se calcularon los porcentajes que se muestran en la Tabla 2.

Conc. de muestras (mg/mL)	Absorbancias								
	IMI-POH			IMI-PAN			IMI-IAN		
1	0.007	0.002	0.004	0.076	0.114	0.092	0.206	0.234	0.203
0.5	0.010	0.008	0.171	0.115	0.128	0.107	0.160	0.188	0.164
0.25	0.026	0.120	0.094	0.153	0.139	0.129	0.169	0.159	0.143
0.125	0.024	0.013	0.158	0.155	0.144	0.144	0.149	0.158	0.151
0.0625	0.158	0.056	0.028	0.134	0.150	0.142	0.152	0.152	0.143

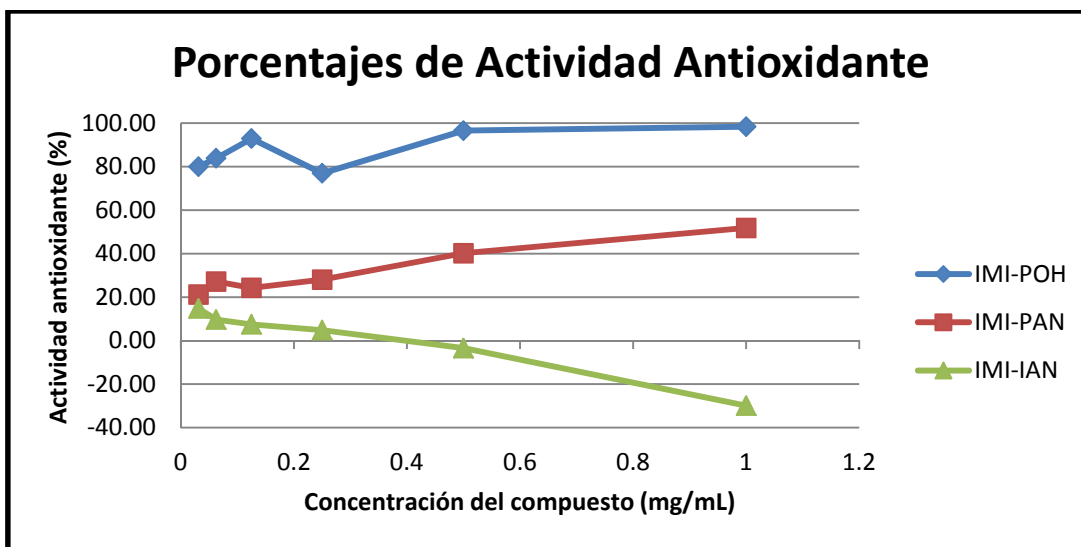
0.03125	0.069	0.035	0.230	0.160	0.153	0.148	0.142	0.141	0.139
	ABTS inicial=		0.260	ABTS inicial=		0.195	ABTS inicial=		0.165

Tabla 1. Absorbancias durante el ensayo de actividad antioxidante.

Conc. de muestras (mg/mL)	Porcentajes de Actividad Antioxidante											
	IMI-POH				IMI-PAN				IMI-IAN			
1	97.31	99.23	98.46	98.33	61.03	41.54	52.82	51.79	-24.85	-41.82	-23.03	-29.90
0.5	96.15	96.92	34.23	96.54	41.03	34.36	45.13	40.17	3.03	-13.94	0.61	-3.43
0.25	90.00	53.85	63.85	76.92	21.54	28.72	33.85	28.03	-2.42	3.64	13.33	4.85
0.125	90.77	95.00	39.23	92.88	20.51	26.15	26.15	24.27	9.70	4.24	8.48	7.47
0.0625	39.23	78.46	89.23	83.85	31.28	23.08	27.18	27.18	7.88	7.88	13.33	9.70
0.03125	73.46	86.54	11.54	80.00	17.95	21.54	24.10	21.20	13.94	14.55	15.76	14.75

Tabla 2. Porcentajes de actividad antioxidante.

En las Tablas 1 y 2 se pueden observar datos en color rojo los cuales representan valores que se alejan del resto, por lo que son valores omitidos en el cálculo del promedio de actividad antioxidante para cada concentración y producto. Este promedio se encuentra graficado contra la concentración en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentajes de actividad antioxidante.

En esta gráfica se puede observar que tanto el compuesto IMI-POH (1) como IMI-PAN (3) presentan una actividad antioxidante, la cual aumenta conforme se aumenta la

concentración del compuesto analizado. Por su parte, a mayor concentración de IMI-IAN (8) su actividad antioxidante disminuye, incluso se presentan valores negativos. Esta diferencia de resultados puede deberse tanto a que los productos (1) y (3) efectivamente sean antioxidantes y (8) no, como a las dificultades presentadas durante la realización del ensayo: esto es, el producto IMI-IAN no se solubilizó completamente en metanol. Mientras que en los otros casos la disolución no presentó complicaciones, en el caso de (8) no se terminó de solubilizar el producto y se realizó el ensayo con una suspensión del mismo. Esto pudo repercutir en el resultado, aunque llama la atención de que se lograra observar un comportamiento en la gráfica como lo fue una disminución sostenida.

A diferencia de la aparente nula actividad citotóxica de IMI-IAN, se observan buenos resultados con IMI-PAN e IMI-POH. IMI-PAN presenta una actividad moderada, comenzando en su concentración más baja alrededor del 20% de actividad hasta llegar cerca del 50% en su concentración más alta. En el caso de IMI-POH podemos ver una muy buena actividad antioxidante. En la concentración más baja ya presenta una actividad considerable con 80%, para acercarse al 100% al aumentar su concentración.

Comparando las estructuras de estos dos compuestos, los resultados del ensayo terminan siendo lógicos. IMI-POH presenta en su estructura un grupo fenol, el cual con frecuencia ha sido considerado un elemento que aporta la actividad antioxidante a diferentes moléculas de origen natural.

Esto podría deberse a la reactividad del grupo donde el protón del fenol es altamente ácido, y mientras éste ayuda a reducir a las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), la estructura resultante tras su desprotonamiento puede entrar en resonancia, sobre todo en nuestro producto donde la molécula se encuentra altamente conjugada. Esto explicaría por qué en el caso de IMI-PAN, donde el fenol se encuentra protegido (se tiene un grupo metoxilo) la actividad antioxidante disminuye considerablemente al compararlo con IMI-POH.

6.3 Actividad citotóxica

Para la evaluación de la actividad citotóxica de los productos de este trabajo, se comenzó por analizar a los esqueletos de trifeníl imidazol. Esto se hizo con la idea de

observar la actividad inherente a este esqueleto, para posteriormente comparar con la actividad del producto con la funcionalización amino alcohol y determinar si efectivamente este fragmento permite una mejora de la actividad.

Se evaluó entonces a los compuestos IMI-POH (1) e IMI-PAN (3) para determinar su actividad citotóxica, frente a 6 líneas celulares cancerígenas diferentes. Estas líneas son: A549 (carcinoma de pulmón), HBL-100 (carcinoma de mama), HeLa (cáncer cervical), SW1573 (carcinoma de células alveolares), T-47D (cáncer de mama), y WiDr (carcinoma colorectal). A continuación se presentan los resultados del ensayo en la Tabla 3.

	IMI-POH			IMI-PAN		
	GI ₅₀ (M)	DE	# de Exp.	GI ₅₀ (M)	DE	# de Exp.
A549	1.8 E ⁻⁵	2.9 E ⁻⁶	2	1.0 E ⁻⁴	-	1
HBL-100	1.5 E ⁻⁵	2.9 E ⁻⁷	2	1.0 E ⁻⁴	-	1
HeLa	7.6 E ⁻⁶	1.4 E ⁻⁶	2	1.0 E ⁻⁴	-	1
SW1573	1.6 E ⁻⁵	5.8 E ⁻⁷	2	1.0 E ⁻⁴	-	1
T-47D	1.9 E ⁻⁵	1.0 E ⁻⁶	2	1.0 E ⁻⁴	-	1
WiDr	1.7 E ⁻⁵	1.1 E ⁻⁶	2	1.0 E ⁻⁴	-	1

Tabla 3. Actividad citotóxica preliminar de IMI-POH e IMI-PAN.

Lo primero que podemos observar en estos resultados es que el producto IMI-POH (1) presenta una mayor citotoxicidad, al tener valores de GI₅₀ menores que IMI-PAN (3). Es en este producto (1) donde los valores van desde 7.6 hasta 19 μM, mientras que para (3) observamos valores de 100 μM.

Para IMI-POH se realizó el ensayo por duplicado, y podemos ver que las desviaciones estándar son muy bajas (incluso en el orden de décimas de μM para la línea SW1573). Aunque en el caso de IMI-PAN sólo se realizó una vez el ensayo, los resultados son consistentes si los comparamos con la actividad antioxidante de estos compuestos. En ambos ensayos resulta más activo el producto (1), el cual solamente difiere de (3) por la porción p-hidroxi del primero por un grupo p-metoxi para el segundo. De nueva cuenta observamos que las propiedades del esqueleto trifeníl imidazol mejora con un grupo fenol sobre uno metoxifenilo.

Los resultados citotóxicos para el producto IMI-PAN (3), si bien no son tan buenos como lo son para (1), ya están revelando una actividad biológica considerable. Estos resultados preliminares nos permitieron determinar que sí hay una actividad citotóxica en

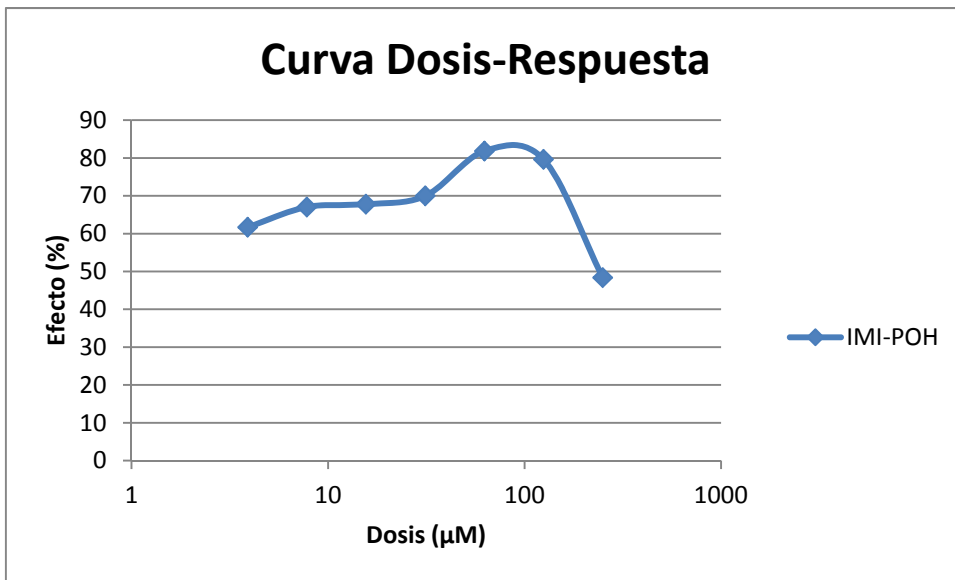
nuestro esqueleto trifenil imidazol, y continuar con la síntesis de productos cuya actividad pueda ser mayor.

Tras seguir la ruta sintética propuesta en el trabajo y confirmar la incorporación de un fragmento amino alcohol a uno de nuestros precursores trifenil imidazólicos, se procedió a evaluar la actividad de este producto final. En este ensayo solamente se manejó una línea celular (HeLa), sin embargo se analizaron tanto los precursores IMI-POH e IMI-PAN, como el producto final IMI-IAN (8). A continuación en la Tabla 4 se pueden observar los promedios de las lecturas del ensayo correspondiente para los tres compuestos.

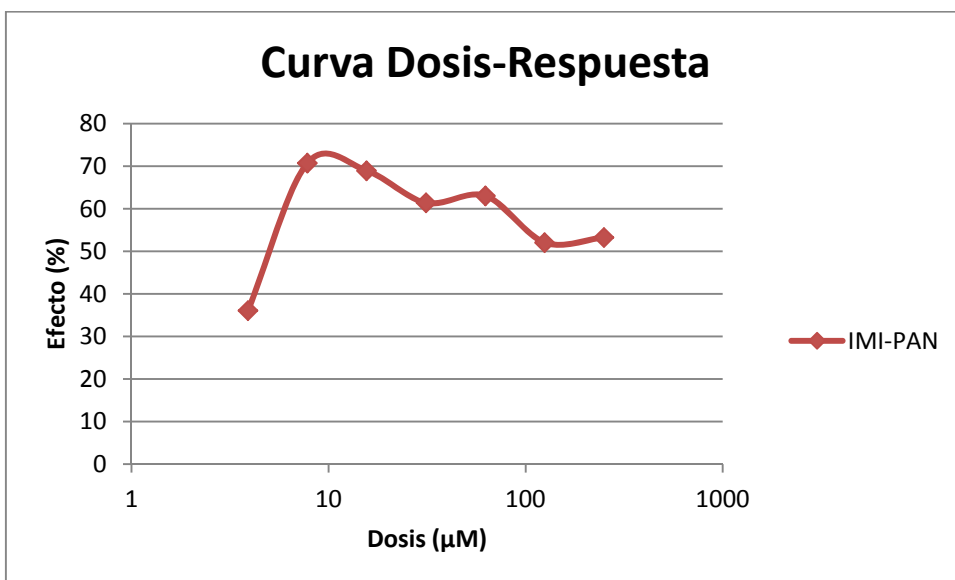
Concentración μM	IMI-POH	IMI-PAN	IMI-IAN
250	0.17	0.1865	0.0117
125	0.2755	0.1825	0.0267
62.5	0.283	0.2195	0.1323
31.25	0.243	0.214	0.1705
15.6	0.2355	0.2395	0.1843
7.8	0.233	0.2455	0.1876
3.9	0.215	0.1285	0.2033
Control	0.3443		
Blanco	0.0067		

Tabla 4. Lecturas del ensayo de citotoxicidad de IMI-POH, IMI-PAN e IMI-IAN.

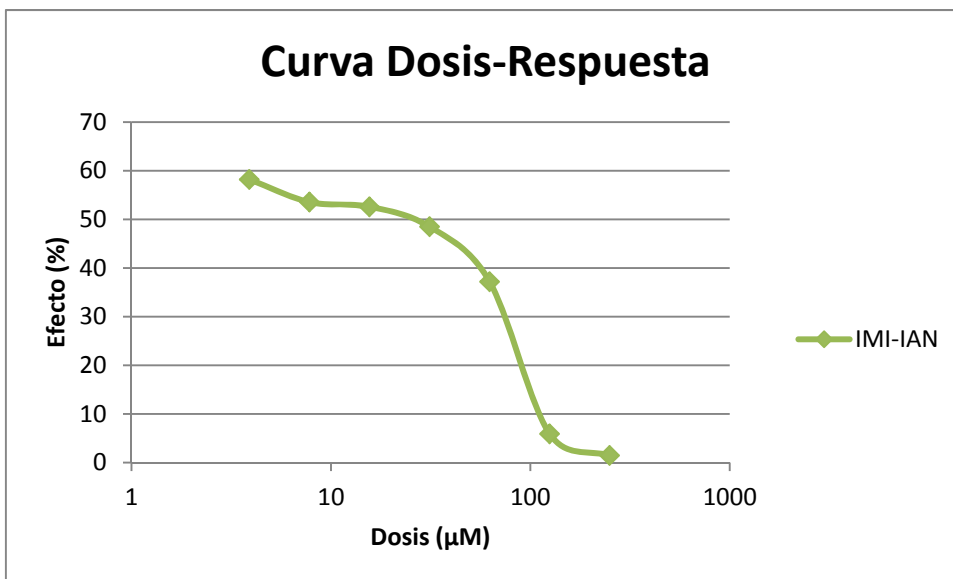
Tras darle el tratamiento a estos datos mencionados en el apartado de Metodología, se procedió a elaborar las gráficas para la extrapolación de la GI_{50} de los productos. Como se puede apreciar en las Gráficas 2, 3 y 4, solamente IMI-IAN presentó la curva sigmoidea adecuada para el cálculo de la GI_{50} .



Gráfica 2. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-POH.



Gráfica 3. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-PAN.



Gráfica 4. Curva Dosis-Respuesta para citotoxicidad de IMI-IAN.

El hecho de que tanto para IMI-POH como para IMI-PAN no se presente la curva sigmoidea, o un patrón definido en el comportamiento de dosis-respuesta, nos hace pensar que al momento de llevar a cabo el ensayo se presentaron problemas de solubilidad para estos compuestos. Si bien en un principio la inclusión de estos dos productos nos hubiese permitido una comparación de resultados (al usar la misma línea celular que en el primer ensayo), al final no se pudo realizar esto.

Sin embargo, el valor de GI_{50} del producto amino alcohol IMI-IAN sí se puede calcular al presentar la forma sigmoidea necesaria para este fin, como se ve en la Gráfica 4. Por extrapolación, obtenemos una GI_{50} de $25.5 \mu\text{M}$ para IMI-IAN en la línea celular HeLa.

Es aquí donde podemos hacer la comparación de los precursores trifenil imidazol en el primer ensayo con el producto funcionalizado amino alcohol. Tomando los valores de GI_{50} para HeLa de IMI-POH e IMI-PAN del primer ensayo de citotoxicidad, 7.6 y $100 \mu\text{M}$ respectivamente, observamos primeramente que IMI-IAN con $25.5 \mu\text{M}$ presenta una actividad intermedia. El compuesto (1), con el fragmento fenólico, sigue siendo el compuesto más activo.

Lo interesante resulta de comparar directamente IMI-PAN con IMI-IAN. Estas dos moléculas se encuentran relacionadas entre sí, ya que la primera es precursora de la segunda. IMI-PAN pasa de tener una GI_{50} de $100 \mu\text{M}$ a $25.5 \mu\text{M}$ con la incorporación del

fragmento amino alcohol. Esto nos permite confirmar que el grupo amino alcohol no solamente es capaz de otorgar una actividad citotóxica importante a la molécula a la cual pertenece, sino que es capaz de mejorarla en un precursor que previamente mostraba poseer esta capacidad antiproliferativa. El derivado amino alcohol IMI-IAN requiere de una dosis cuatro veces menor para tener el mismo efecto que la molécula de la cual se puede partir para su síntesis.

7 Conclusiones

De la ruta sintética propuesta se lograron sintetizar y caracterizar los productos **4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)fenol** (1), **2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol** (3), **2-(4-metoxifenil)-1-(oxiran-2-ilmetil)-4,5-difenil-1H-imidazol** (4), **N-bencil-1-(oxiran-2-il)metanamina** (5), y **1-((2-iodofenil)amino)-3-(2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)propan-2-ol** (8). Las estructuras de estos compuestos fueron confirmadas por diversas técnicas espectroscópicas.

Se evaluó la actividad antioxidante de los productos (1), (3) y (8). Éste último no presentó capacidad antioxidante mediante la técnica de ABTS, si bien su baja solubilidad durante el ensayo pudo afectar sus resultados. El producto (3) presentó una actividad antioxidante moderadamente buena, y se presentó una muy buena actividad antioxidante por parte del producto (1).

Se determinó que la presencia de un fragmento fenol en el esqueleto de la molécula (1) es la responsable de la mejor actividad antioxidante frente a (3), que no presenta esta porción.

Se evaluó de forma preliminar la actividad citotóxica de (1) y (3) frente a 6 líneas celulares cancerígenas diferentes. Ambos productos mostraron tener capacidad citotóxica frente a todas las líneas ensayadas, siendo (1) quien presentó mejores resultados.

Se evaluó la actividad citotóxica de (1), (3) y (8) en un nuevo ensayo frente a una de las líneas celulares evaluadas en el ensayo preliminar. Los productos (1) y (3) no pudieron analizarse adecuadamente en esta ocasión, presumiblemente por problemas de solubilidad. Sin embargo el producto (8) sí se pudo evaluar, presentando una GI_{50} de 25.5 μM frente a la línea celular HeLa.

En la comparación de los tres productos evaluados contra la línea HeLa, la mejor actividad citotóxica fue de (1) con una GI_{50} de 7.6 μM , seguido de (3) con 25.5 μM , y (8) con 100 μM .

Los productos (1) y (3) se evaluaron exitosamente tanto en sus actividades antioxidantes como citotóxicas. En ambos casos (1) presentó mejores resultados, por lo que de manera inicial se observa una relación entre ambas actividades, a falta de realizar esta comparación con una mayor cantidad de productos.

Finalmente, se comparó los resultados de citotoxicidad de los productos (8) y (3), donde (3) es el precursor trifenil imidazol de (8), a quien se le incorporó un fragmento amino alcohol. La GI_{50} de (3) disminuyó hasta una cuarta parte con el nuevo fragmento, por lo que se confirmó la hipótesis inicial de que la incorporación de un grupo amino alcohol favorece la actividad citotóxica de estos compuestos.

Trabajos futuros

Sintetizar más compuestos siguiendo la ruta sintética propuesta en este trabajo, para evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de los productos e intermediarios y confirmar la correlación de ambas actividades.

Sintetizar una mayor cantidad de derivados de trifenil imidazol de tipo amino alcohol, para poder realizar un estudio de relación estructura-actividad y poder llegar a compuestos con mejores perfiles citotóxicos.

8 Bibliografía

Agudo Medina, L. (2012) “Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos” *Autodidacta* (9):27-34

Bai, B., Li, X., Li, Y., Zhu, H. (2011) “Design, synthesis and cytotoxic activities of novel β -amino alcohol derivatives” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (21):2302-2304

Birajdar, S. S., Hatnapure, G. D., Keche, A. P., Kamble, V. M. (2013) “Synthesis and biological evaluation of amino alcohol derivatives of 2-methylbenzimidazole as antitubercular and antibacterial agents” *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* (5):583-589

Córdova, I., León, L.G., León, F., San Andrés, L., Luis, J.G., Padrón, J.M. (2006a) “Synthesis and antiproliferative activity of novel sugiol β -amino alcohol analogs” *European Journal of Medicinal Chemistry* (41):1327-1332

Córdova, I., San Andrés, L., León, L. G., Machín, R. P., Padrón, J. M., Luis, J. G., Delgadillo, J. (2006b) “Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic Activity against Human Cancer Cell Lines” *Journal of Natural Products* (69):1803-1805

Das, B., Sudhakar, C., Srinivas, Y. (2010) “Efficient synthesis of 5-substituted 2,3-diphenyl and 5-substituted 1-aryl-2,3-diphenyl imidazoles using polyethylene glycol” *Synthetic Communications* (40):2667-2675

De Luca, L. (2006) “Naturally occurring and synthetic imidazoles: their chemistry and their biological activities” *Current Medicinal Chemistry* (13):1-23

Debus, H. (1858) “Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Glyoxal” *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (107):199-208

- Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C., Joglar Tamargo, J. (2003) *Introducción a la Química Terapéutica*, 2º edición, Barcelona: Díaz de Santos
- Dijkstra, G., Kruizinga, W. H., Kellog, R. M. (1987) “An Assessment of the Causes of the ‘Cesium Effect’ ” *Journal of Organic Chemistry* (52):4230-4234
- Dutta, S., Singh, S. Kr., Mariappan, G., Pandey, L. (2010) “Synthesis and Antimicrobial Activity of Some 2-Substituted-4,5-Diphenyl Imidazole” *International Journal of Applied Chemistry* (6):59-65
- Escudero, M. I., Kremenchuzky, L. D., Perillo, I. A., Cerecetto, H., Blanco, M. M. (2011) “Efficient Cesium Carbonate Promoted N-Alkylations of Aromatic Cyclic Imides Under Microwave Irradiation” *Synthesis* (4):571-576
- Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006) “In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride” *Toxicology Letters* (160):171-177
- Ghosh, K., Kumar, M., Maruyama, T., Ando, Y. (2010) “Controllable growth of highly N-doped carbon nanotubes from imidazole: a structural, spectroscopic and field emission study” *Journal of Materials Chemistry* (20):4128-4134
- Gujadhur, R., Venkataraman, D., Kintigh, J. T. (2001) “Formation of aryl-nitrogen bonds using a soluble copper(I) catalyst” *Tetrahedron Letters* (42):4791-4793
- Hasaninejad, A., Zare, A., Shekouhy, M., Rad, J. A. (2010) “Catalyst-Free One-Pot Four Component Synthesis of Polysubstituted Imidazoles in Neutral Ionic Liquid 1-Butyl-3-methylimidazolium Bromide” *Journal of Combinatorial Chemistry* (12):844-849
- INEGI (2012) Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>

Karimi, A. R., Alimohammadi, Z., Azizian, J., Mohammadi, A. A., Mohammadzadeh, M. R. (2006) "Solvent-free synthesis of tetrasubstituted imidazoles on silica gel/ NaHSO_4 support" *Catalysis Communications* (7):728-732

Kategaonkar, A. H., Sapkal, S. B., Madje, B. R., Shingate, B. B., Shingare, M. S. (2010) "Synthesis of new 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)tetrazolo[1,5- α]quinolines from tetrazolo[1,5- α]quinolines" *Chemistry of Heterocyclic Compounds* (46):754-758

Kazuta, Y., Hirano, K., Natsume, K., Yamada, S., Rimura, R., Matsumoto, S.-i., Furuichi, K., Matsuda, A., Shuto, S. (2003) "Cyclopropane-Based Conformational Restriction of Histamine. (1S,2S)-2-(2-Aminoethyl)-1-(1H-imidazol-4-yl)cyclopropane, a Highly Selective Agonist for the Histamine H_3 Receptor, Having a cis-Cyclopropane Structure" *Journal of Medicinal Chemistry* (46):1980-1988

Kitbunnadaj, R., Hashimoto, T., Poli, E., Zuiderveld, O. P., Menozzi, A., Hidaka, R., de Esch, I. J. P., Bakker, R. A., Menge, W. M. P. B., Yamatodani, A., Corrucci, G., Timmerman, H., Leurs, R. (2005) "N-Substituted Piperidinyl Alkyl Imidazoles: Discovery of Methimepip as a Potent and Selective Histamine H_3 Receptor Agonist" *Journal of Medicinal Chemistry* (48):2100-2107

Kuroda, I., Musman, M., Ohtani, I. I., Ichiba, T., Tanaka, J., Garcia Gravalos, D., Higa, T. (2002) "Pachastrissamine, a Cytotoxic Anhydrophytosphingosine from a Marine Sponge, *Pachastrissa* sp." *Journal of Natural Products* (65):1505-1506

Laufer, S. A., Hauser, D. R. J., Domeyer, D. M., Kinkel, K., Liedtke, A. J. (2008) "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Tri- and Tetrasubstituted Imidazoles as Highly Potent and Specific ATP-Mimetic Inhibitors of p38 MAP Kinase: Focus on Optimized Interactions with the Enzyme's Surface-Exposed Front Region" *Journal of Medicinal Chemistry* (51):4122-4149

Lee, B. W., Lee, J. H., Lee, S-T., Lee, H. S., Lee, W. S., Jeong, T-S., Park, K. H. (2005) "Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (15):5548-5552

Malhotra, V., Pathak, S. R., Nath, R., Mukherjee, D., Shanker, K. (2011) "Substituted imidazole derivatives as novel cardiovascular agents" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (21):936-939

Marques, M. V. (2010) "Síntese multicomponente de 2,4,5-triarilimidazóis catalisada por cloretos metálicos hidratados" Disertación de Maestría, Universidad Federal de Río Grande del Sur

Matsuoka, Y., Ishida, Y., Sasaki, D., Saigo, K. (2006) "Synthesis of enantiopure 1-substituted, 1,2-disubstituted and 1,4,5-trisubstituted imidazoles from 1,2-amino alcohols" *Tetrahedron* (62):8199-8206

Moura, K. C. G., Carneiro, P. F., Pinto, MdC. F. R., da Silva, J. A., Malta, V. R. S., de Simone, C. A., Dias, G. G., Jardim, G. A. M., Cantos, J., Coelho, T. S., da Silva, P. E. A., da Silva Jr, E. N. (2012) "1,3-Azoles from *ortho*-naphthoquinones: Synthesis of aryl substituted imidazoles and oxazoles and their potent activity against *Mycobacterium tuberculosis*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (20):6482-6488

Organización Mundial de la Salud (2014) Cáncer

<http://www.who.int/topics/cancer/en/>

<http://www.who.int/cancer/en/>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

<http://www.who.int/features/factfiles/cancer/facts/en/index1.html>

Padrón, J. M. (s. f.) "Curso 'Fármacos antitumorales: diseño, producción y actividad biológica' Evaluación de actividad antitumoral *in vitro*" Universidad de La Laguna

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology & Medicine* (26):1231-1237

Rives, A., Ladeira, S., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Génisson, Y. (2010) "Synthesis of Cytotoxic Aza Analogues of Jaspine B" *Journal of Organic Chemistry* (75):7920-7923

Satheshkumar, A., Manivannan, R., Elango, K. P. (2014) "Spectroscopic, electrochemical and theoretical studies on anion recognition by receptors with redox active ferrocene and quinine centers bridged by imidazole" *Journal of Organometallic Chemistry* (750):98-106

Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Stanojković, T., Juranić, Z., Menković, N. (2009) "In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygria*" *Natural Product Research* (23):1731-1739

Shaabani, A., Rahmati, A. (2006) "Silica sulfuric acid as an efficient and recoverable catalyst for the synthesis of trisubstituted imidazoles" *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* (249):246-248

Shalini, K., Sharma, P. K., Kumar, N. (2010) "Imidazole and its biological activities: A review" *Der Chemica Sinica* (3):36-47

Sivakumar, K., Kathirvel, A., Lalitha, A. (2010) "Simple and efficient method for the synthesis of highly substituted imidazoles using zeolite-supported reagents" *Tetrahedron Letters* (51):3018-3021

Tozer, M. J., Kalindjian, S. B. (2000) "Histamine H₃ receptor antagonists" *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (10):1045-1055

Verma, A., Joshi, S., Singh, D. (2013) “Imidazole: Having versatile biological activities”
Journal of Chemistry (2013):ID de artículo 329412, 12 páginas

Zhan, P., Liu, X., Zhu, J., Fang, Z., Li, Z., Pannecouque, C., De Clercq, E. (2009)
“Synthesis and biological evaluation of imidazole thioacetanilides as novel non-nucleoside
HIV-1 reverse transcriptase inhibitors” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (17):5575-5781

9.1 Técnicas experimentales

Intrumentación

- Resonancia Magnética Nuclear

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro VARIAN de 200 MHz. Se utilizó CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. También se empleó un espectrómetro BRUKER de 400 MHz. Se utilizó CDCl_3 y DMSO como disolventes y TMS como referencia interna. En ambos equipos, los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s=singlete; d=doblete; t=tripleto; dd=doble de doblete; m=multiplote. En los experimentos de RMN- ^{13}C , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: q (CH_3); t (CH_2); d (CH); s (C).

- Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados en espectrofotómetros Thermo Scientific modelo Nicolet is5. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

- Espectroscopía de UV-Visible

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 20, en una celda de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleó MeOH. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.

- Espectrometría de Masas

Para la obtención de los espectros de masas, se emplearon las técnicas de ionización por impacto electrónico (EI), utilizando el equipo Agilent Technologies 7890A / 5975C. Las dimensiones de la columna capilar son $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$. El volumen de inyección de las muestras fue de $0.5 \text{ }\mu\text{L}$, con una dilución con gas 1:2000. La temperatura de columna fue de 70°C , la temperatura del inyector de 250°C y la rampa de calentamiento de columna fue desde 70°C hasta 100°C a $2^\circ\text{C}/\text{min}$, siendo posteriormente de 100°C hasta 250°C a $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

También se empleó el equipo Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 Series GC System. Las dimensiones de la columna capilar son $30\text{ m} \times 320\text{ }\mu\text{m} \times 0.00\text{ }\mu\text{m}$. El volumen de inyección de las muestras fue de $1\text{ }\mu\text{L}$. La temperatura de la columna fue de 50°C ; durante la rampa de calentamiento se mantuvo esta temperatura por 1 min, para luego aumentar $20^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 200°C , aumentar $50^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 280°C y mantener esta temperatura por 20 min.

A su vez se utilizó un equipo de inserción directa Thermo Electron Corporation Finnigan Polaris Q. Durante la rampa de calentamiento se comenzó a 50°C por 30 segundos, para aumentar a $50^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 250°C y detenerse ahí 10 segundos, y finalizar aumentando $80^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 300° , deteniéndose en esta temperatura 180 segundos.

Condiciones de reacción

Los rendimientos de las reacciones se establecieron una vez purificados los productos de cada reacción. Los reactivos y los disolventes empleados fueron comprados de la más alta calidad comercial, y usados sin purificaciones posteriores. Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina.

Técnicas cromatográficas

- Cromatografía de Capa Fina

Se emplearon placas FLUKA Analytical de 0.2 mm, usando como agente visualizador luz ultravioleta a 254 nm.

- Cromatografía en Capa Fina Preparativa

Se utilizaron placas preparativas Analtech de $20 \times 20\text{ cm}$, con una fase estacionaria de sílica gel con un poro de $500\text{ }\mu\text{m}$. La detección de los productos en las placas se hizo mediante una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm.

- Cromatografía de columna

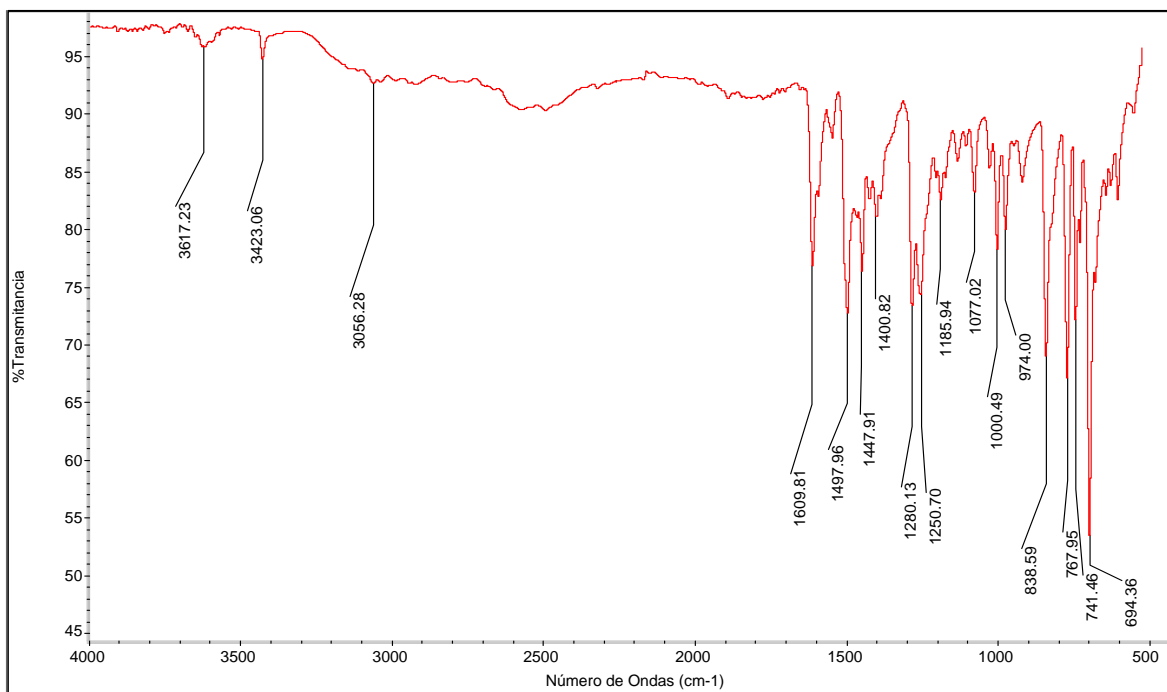
Se empleó sílica gel con tamaño de partícula de $0.04\text{-}0.063\text{ mm}$ y de $0.063\text{-}0.200\text{ mm}$ de marca MERCK. La preparación de las columnas consistió en el empaquetado con una mezcla de sílica gel y n-Hex, a la que posteriormente se le adicionaba en la parte

superior el crudo de reacción por purificar. Los eluyentes habituales fueron mezclas de n-Hex/AcOEt en distintas proporciones.

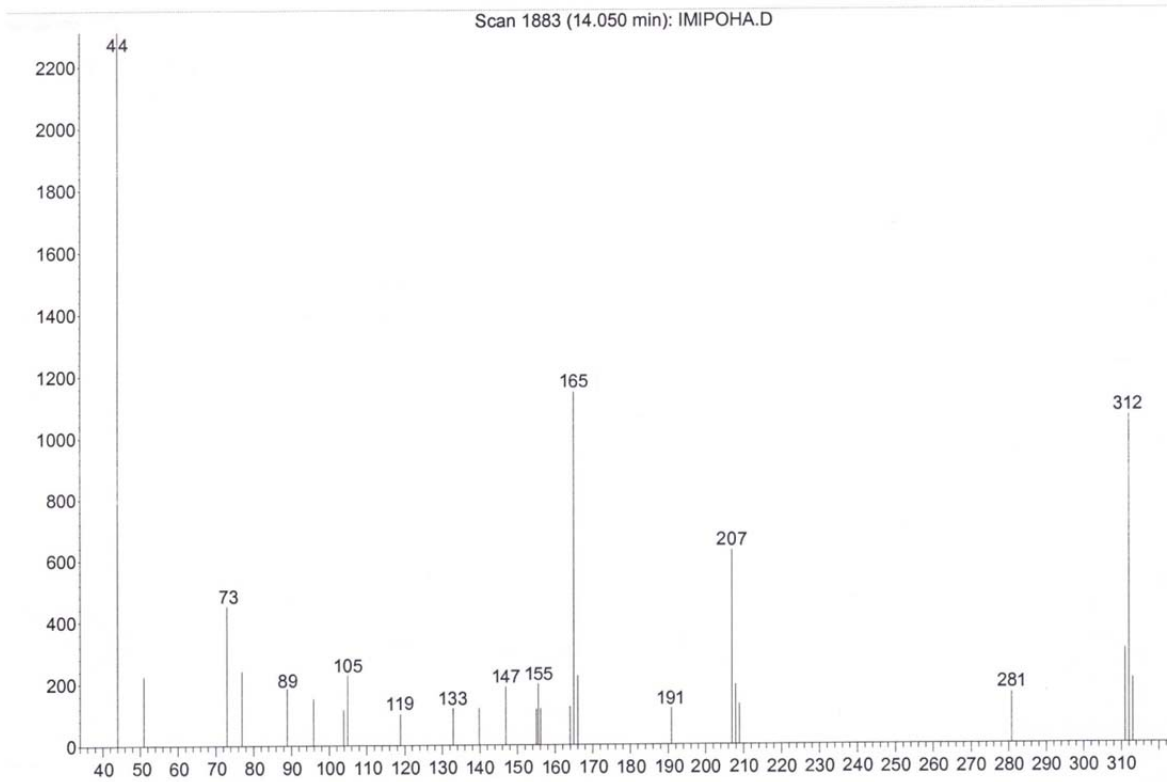
Programas informáticos

Se empleó el programa ChemBioDraw Ultra 14.0 de Perkin Elmer para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados. Con este mismo programa se realizó la numeración de átomos mostrada en el apartado de Metodología de este trabajo. Esta numeración no es otorgada sistemáticamente, y sólo fue empleada para la señalización de los diferentes átomos de la molécula para facilitar su identificación al momento de otorgarle sus datos espectroscópicos.

9.2 Anexos



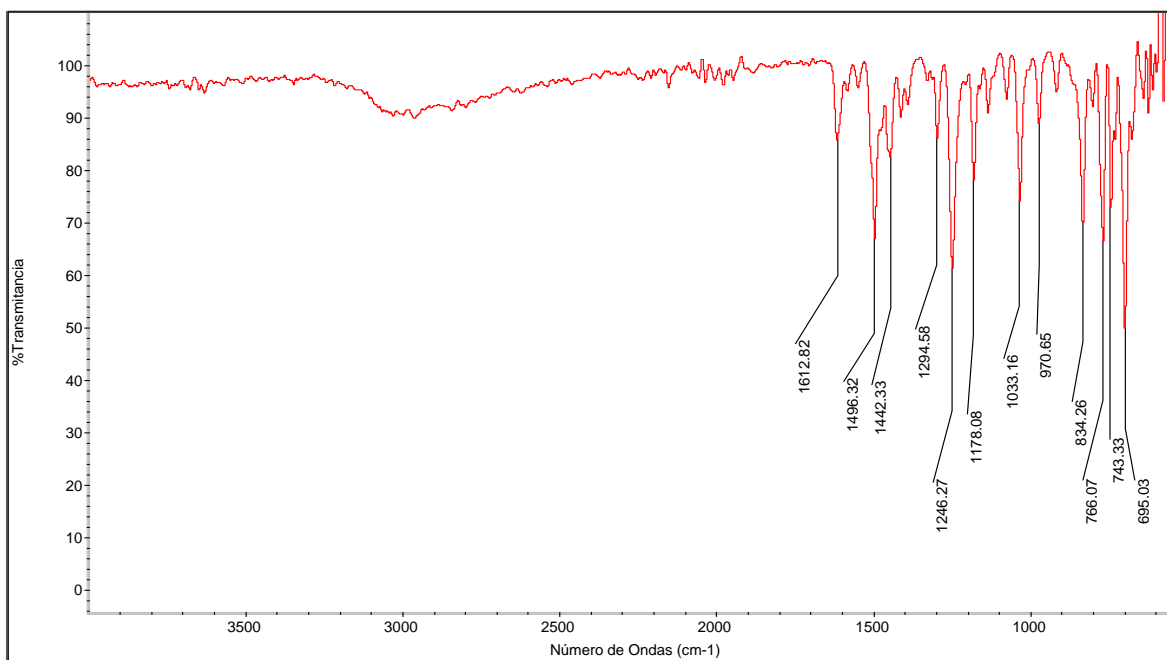
Anexo 1. Espectro de IR del compuesto (1).



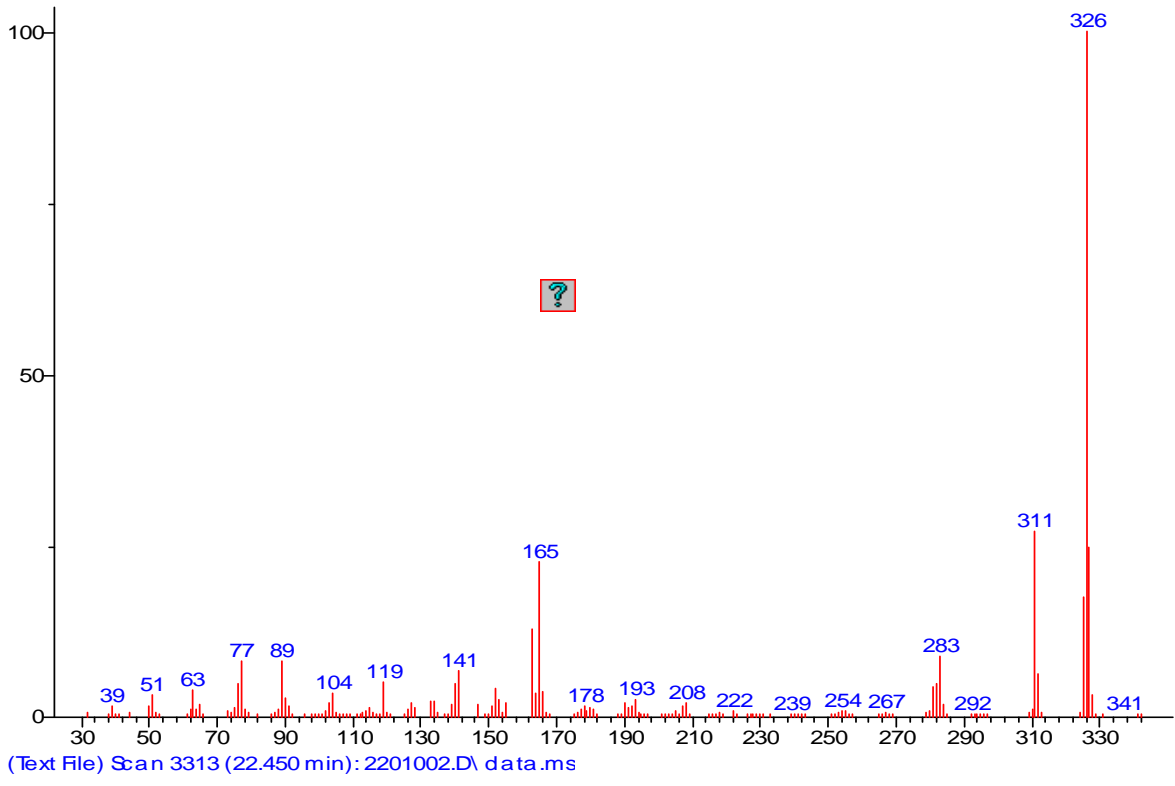
Anexo 2. Espectro de masas del compuesto (1).

Anexo 3. Espectro de RMN-1H del compuesto (1).

Anexo 4. Espectro de RMN-13C del compuesto (1).

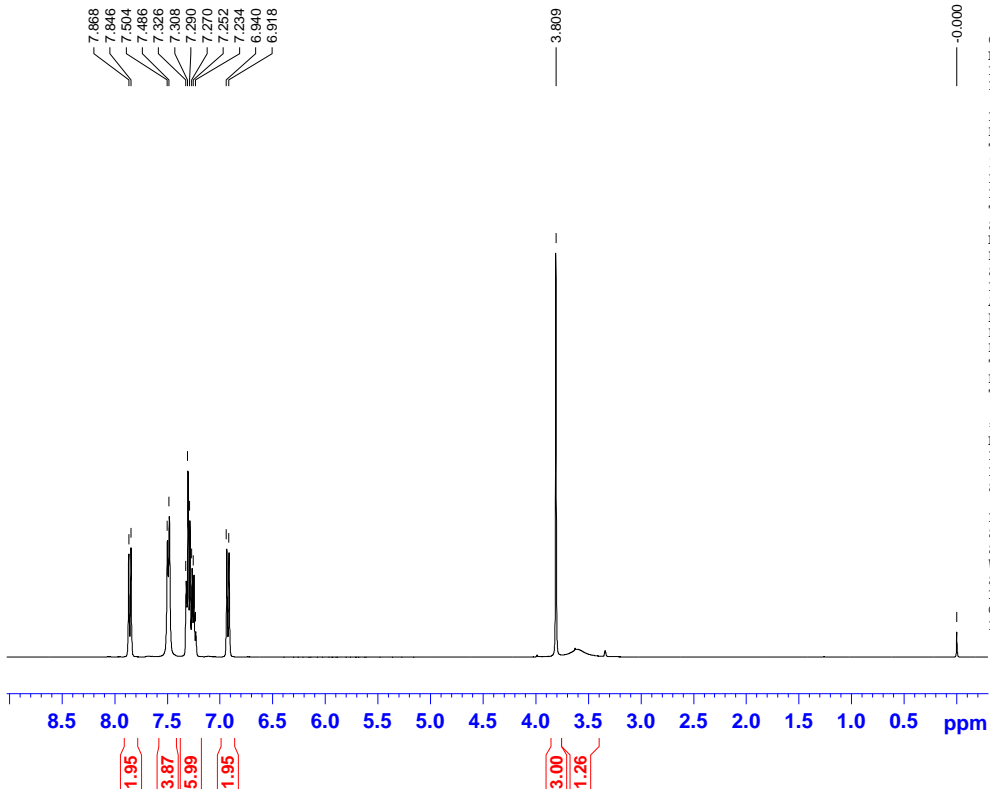


Anexo 5. Espectro de IR del compuesto (3).



Anexo 6. Espectro de masas del compuesto (3).

ICG-PAN, CDCl3 + MeOD, 1HNMR



Current Data Parameters
NAME ICG-PAN
EXPNO 1
PROCNO 1

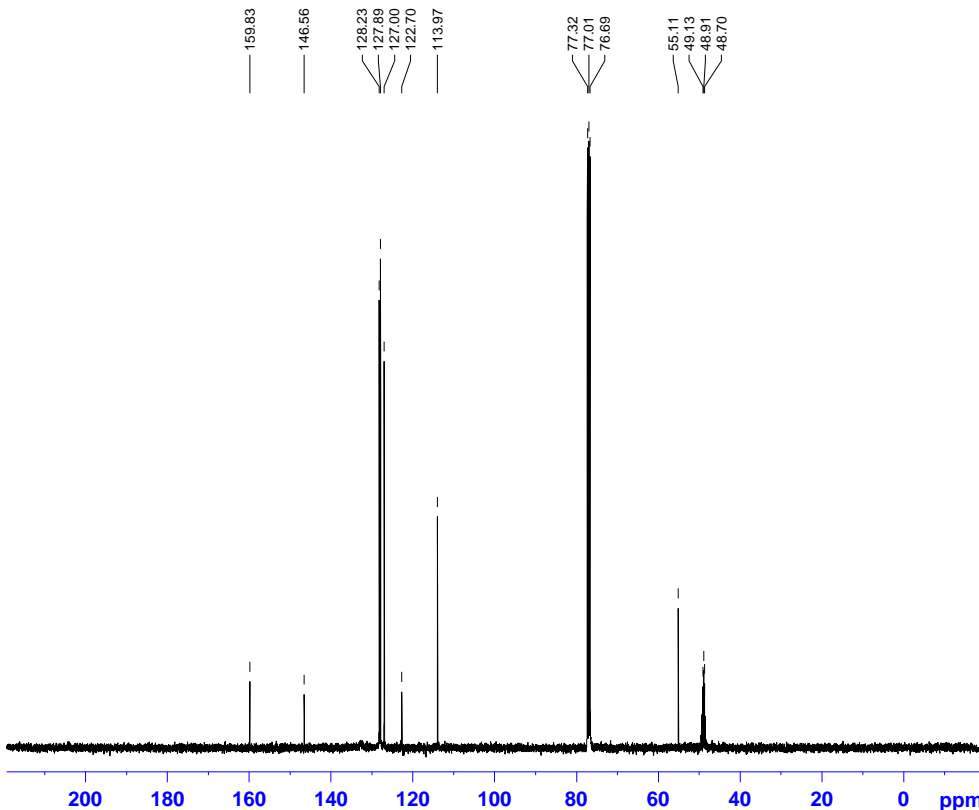
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131119
Time 8.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 2
SWH 8250.825 Hz
FIDRES 0.125898 Hz
AQ 3.9715316 sec
RG 228.1
DW 60.600 usec
DE 6.00 usec
TE 683.2 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -4.20 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1299857 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Anexo 7. Espectro de RMN-1H del compuesto (3).

ICG-PAN, 13CNMR



```
Current Data Parameters
NAME          ICG-PAN
EXPNO         2
PROCNO        1

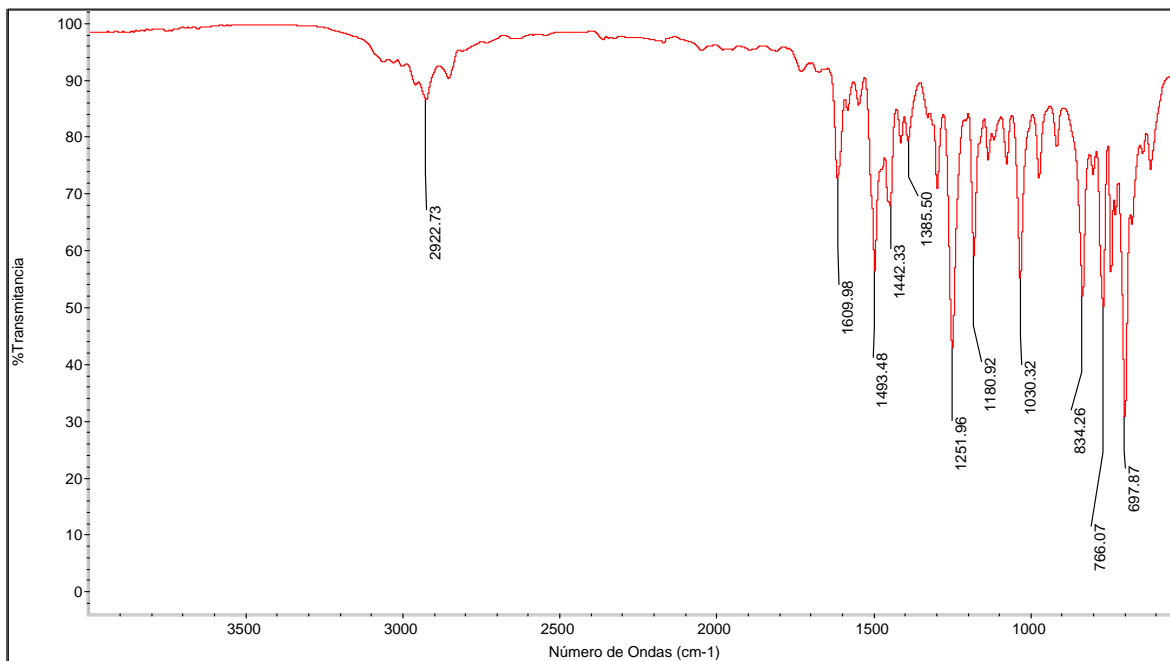
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20131119
Time          9.22
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm BBO BB-1H
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            1000
DS            2
SWH           24038.461 Hz
FIDRES        0.366798 Hz
AQ            1.3631988 sec
RG            2896.3
DW            20.800 usec
DE            6.00 usec
TE            683.2 K
D1            2.00000000 sec
d11           0.03000000 sec
DELTA         1.89999998 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            10.20 usec
PL1           -1.00 dB
SFO1         100.6228298 MHz

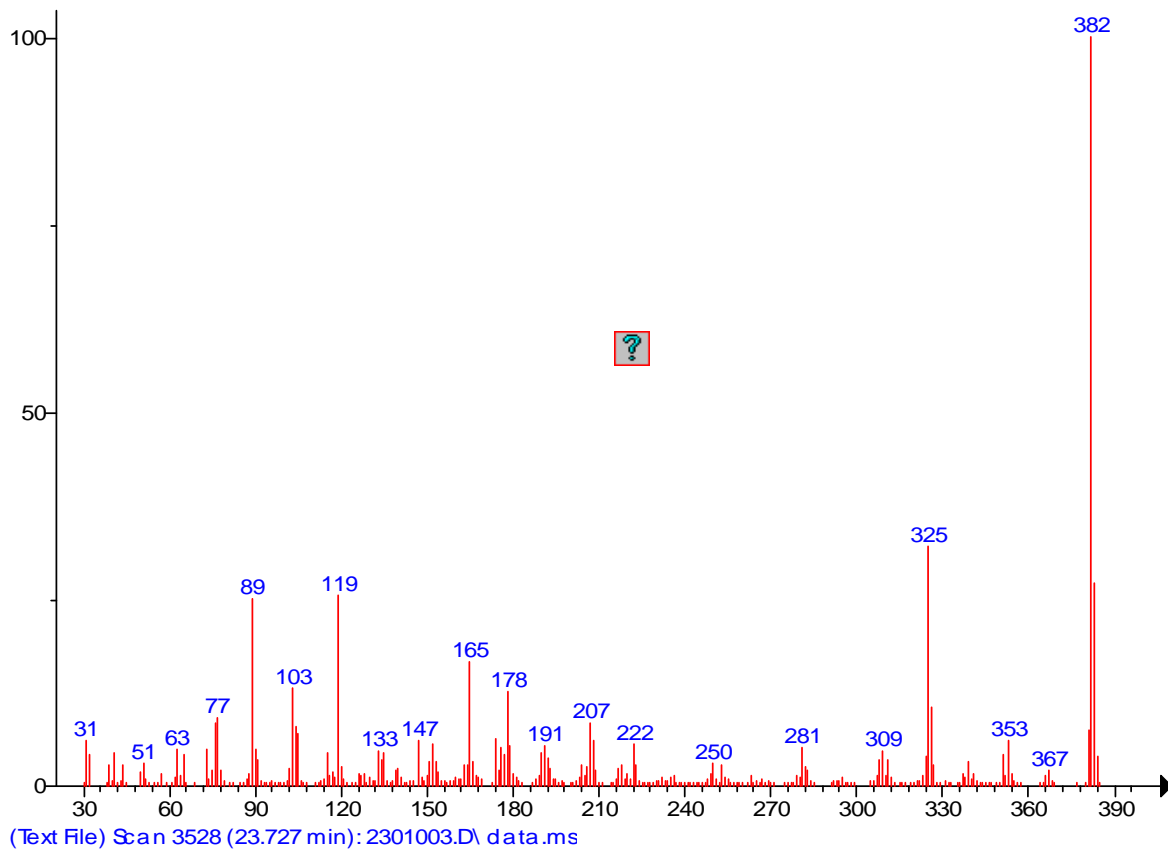
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        90.00 usec
PL2           -4.20 dB
PL12         11.96 dB
PL13         16.00 dB
SFO2         400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            100.6127802 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
```

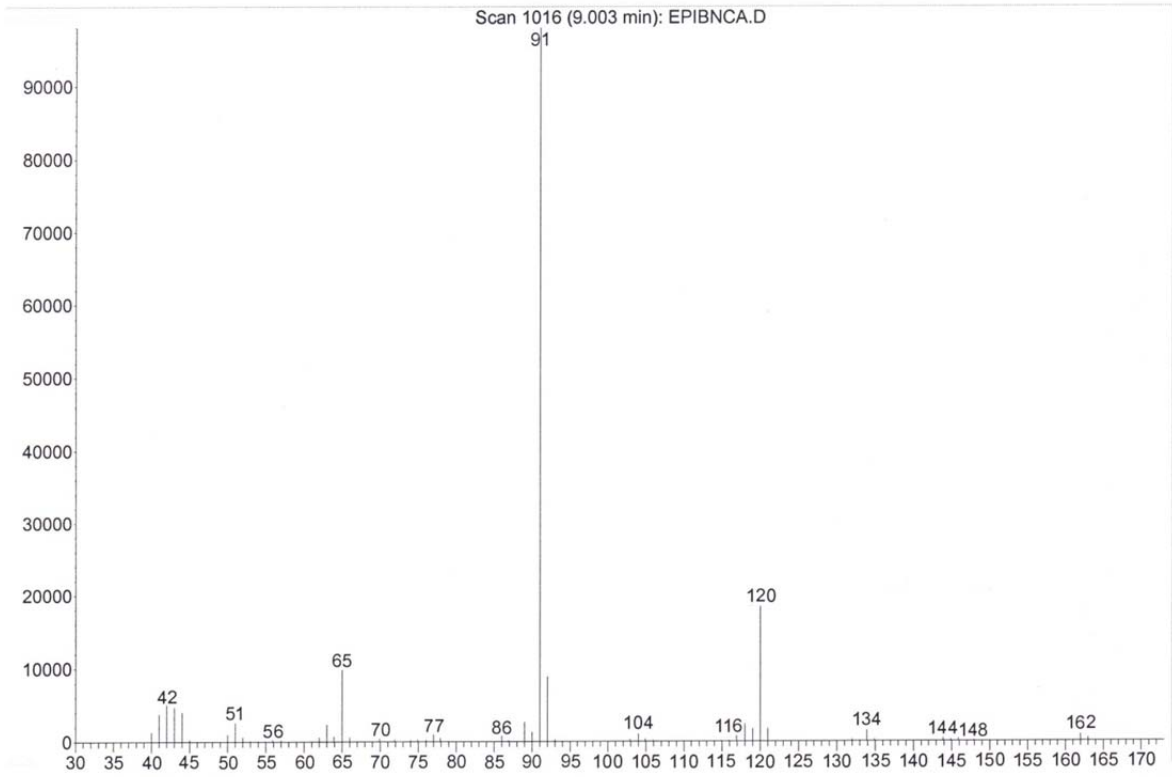
Anexo 8. Espectro de RMN-13C del compuesto (3).



Anexo 9. Espectro de IR del compuesto (4).

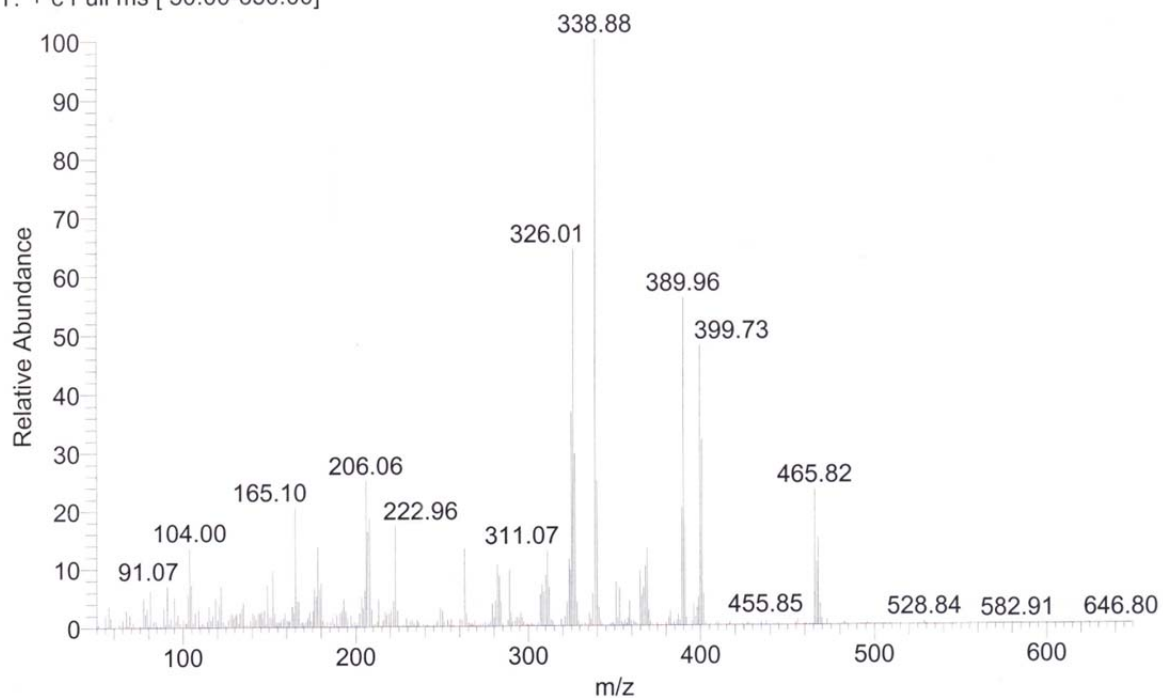


Anexo 10. Espectro de masas del compuesto (4).

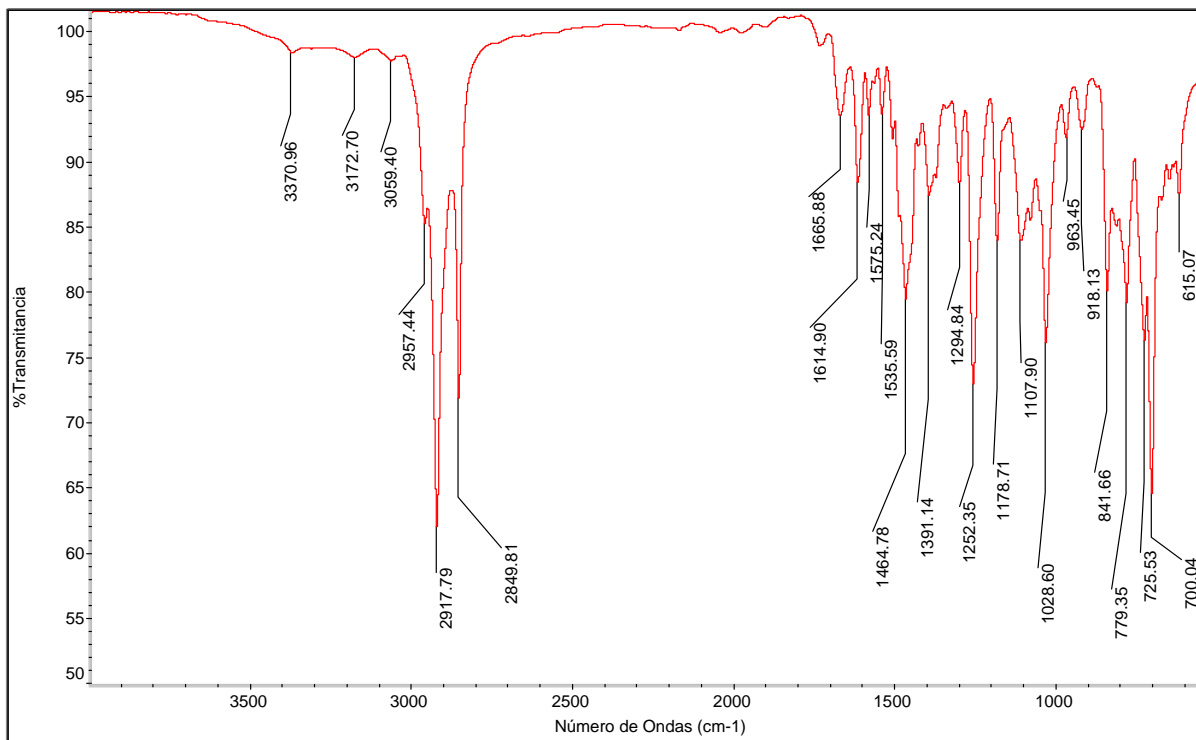


Anexo 11. Espectro de masas del compuesto (5).

imi-butam #564 RT: 5.45 AV: 1 NL: 4.08E7
T: + c Full ms [50.00-650.00]

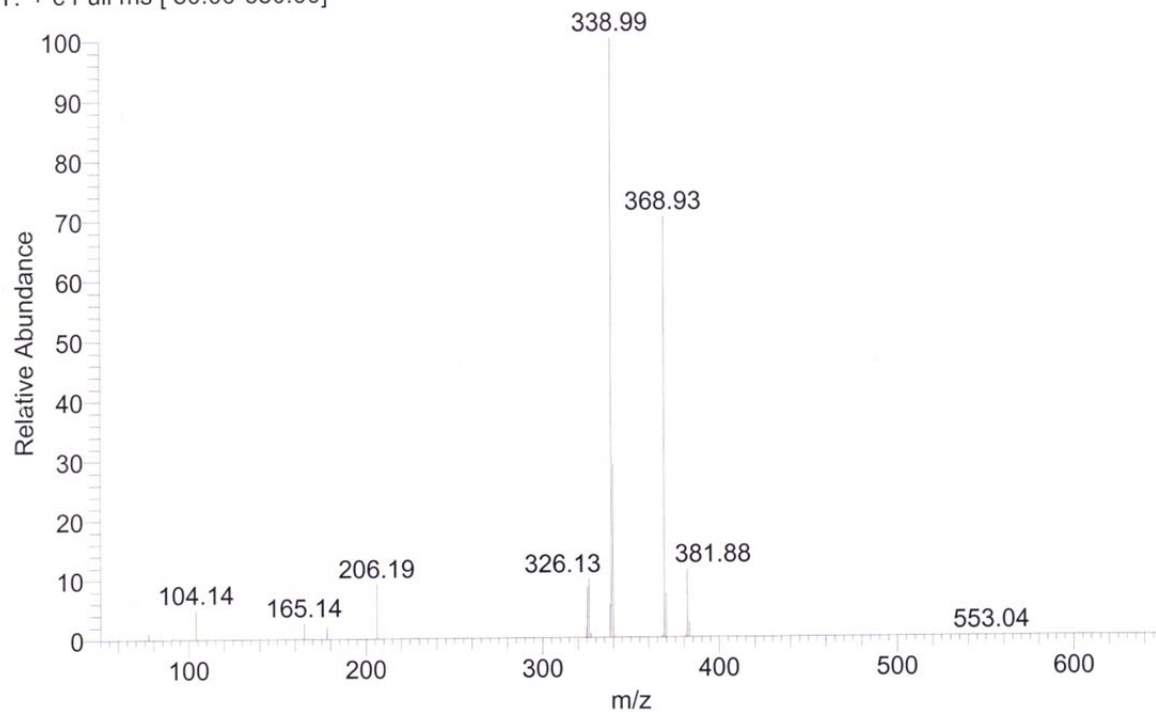


Anexo 12. Espectro de masas del compuesto (7).

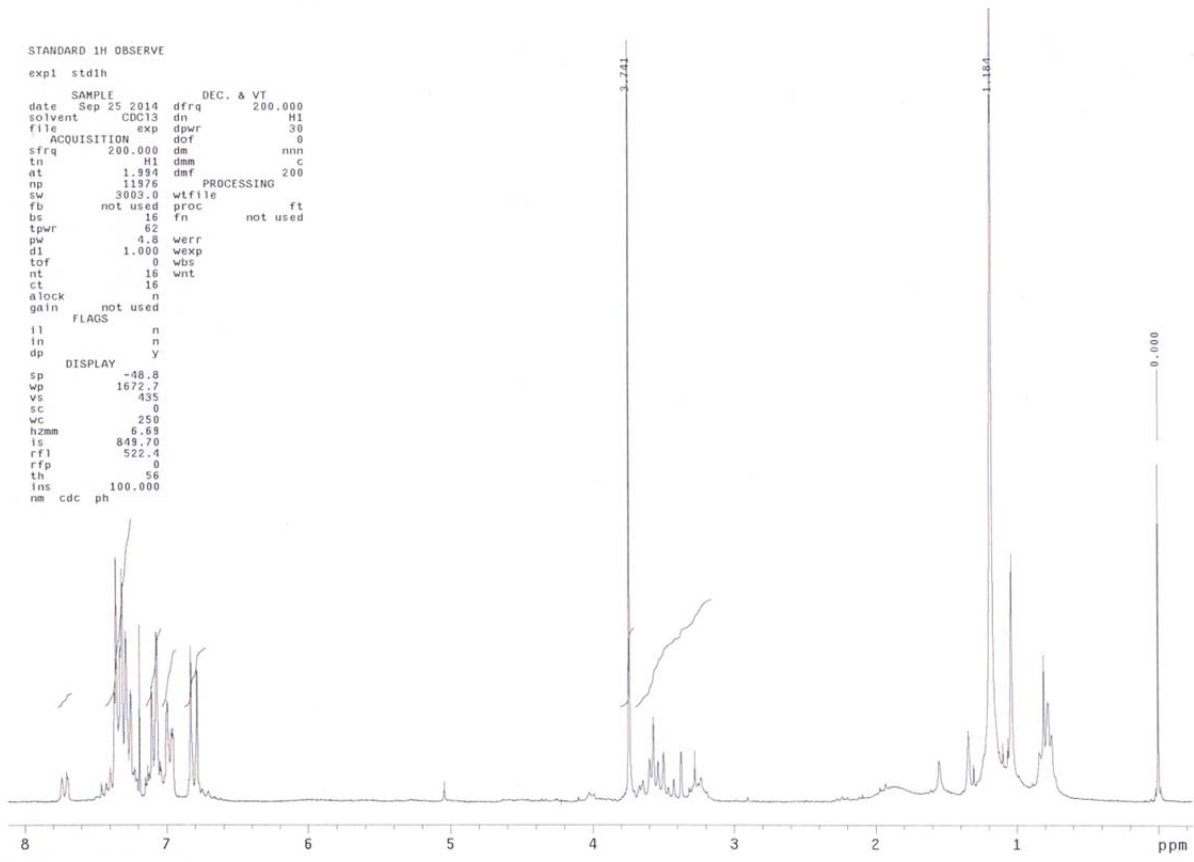


Anexo 13. Espectro de IR del compuesto (8)

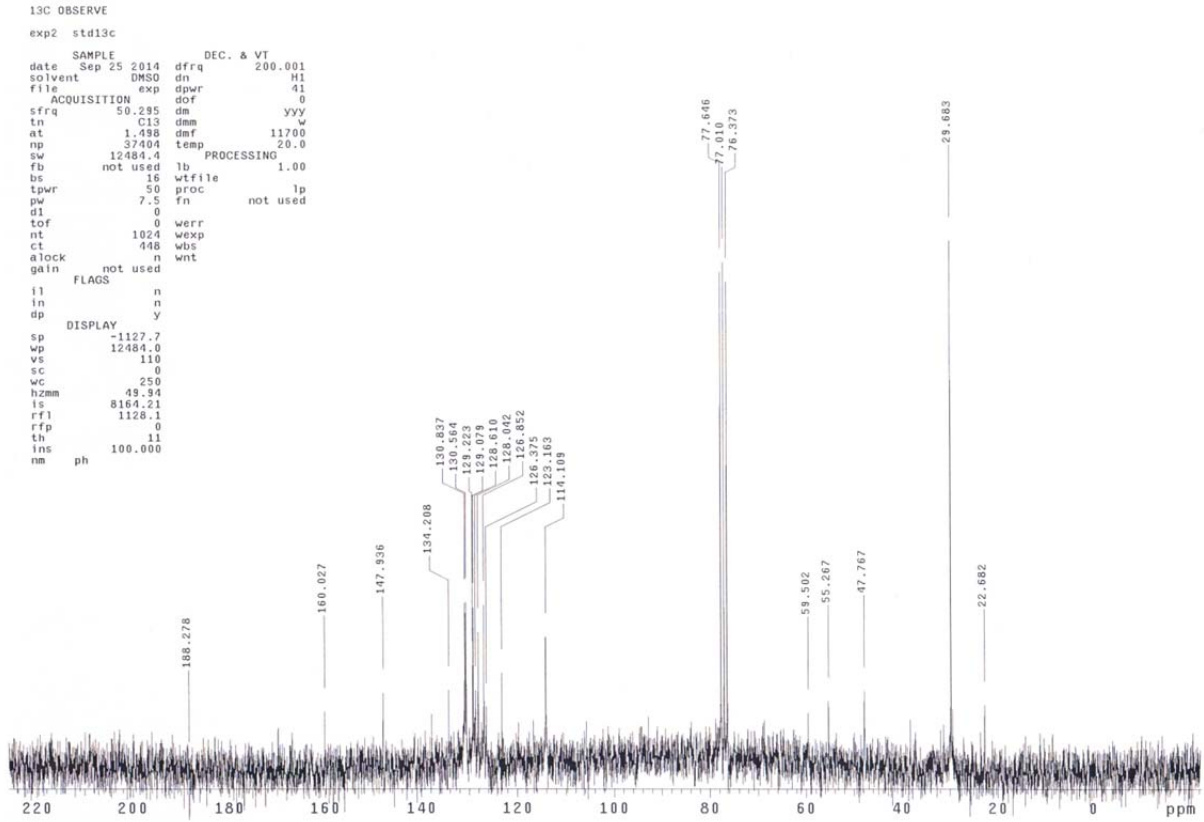
IMIIANBB #877 RT: 7.58 AV: 1 NL: 1.97E5
T: + c Full ms [50.00-650.00]



Anexo 14. Espectro de masas del compuesto (8).



Anexo 15. Espectro de RMN-1H del compuesto (8).



Anexo 16. Espectro de RMN-13C del compuesto (8).