

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



***“Síntesis y evaluación de derivados imidazólicos 2,4,5
trisustituidos, como agentes antiproliferativos, antioxidantes
e inhibidores enzimáticos”.***

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. EDUARDO NORIEGA IRIBE

Tijuana, B. C., Diciembre del 2020

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 304

Tijuana, B. C., a 3 de Diciembre del 2020

C. Eduardo Luis Noriega Iribe
Pasante de: Doctor en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

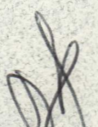
Es propuesto, por los C.C. Dr. Iván Córdova Guerrero

Dr. Raúl Díaz Molina

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema Síntesis y evaluación de derivados imidazólicos 2,4,5
trisustituidos, como agentes antiproliferativos, antioxidantes e inhibidores
enzimáticos.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- HIPÓTESIS
- IV.- OBJETIVOS
- V.- ANTECEDENTES
- VI.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL
- VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VIII.- CONCLUSIONES
- IX.- REFERENCIAS
- X.- APÉNDICES



Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis

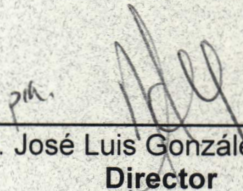
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



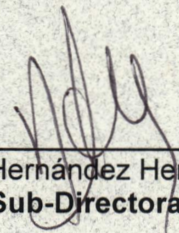
FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Dr. Raúl Díaz Molina
Co- Director de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Director



Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Directora

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	9
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. Antecedentes.....	18
6. Metodología experimental.....	25
6.1 Síntesis y caracterización de los derivados imidazólicos.....	25
6.2 Evaluación antiproliferativa.....	26
6.3 Evaluación de actividad antioxidante.....	27
6.4 Estudios de inhibición enzimática.....	30
6.5 Estudios <i>in silico</i>	33
7. Resultados y discusión.....	36
7.1 Síntesis y caracterización de los derivados imidazólicos.....	36
7.2 Evaluación antiproliferativa.....	51
7.3 Evaluación de actividad antioxidante.....	56
7.4 Estudios de inhibición enzimática.....	59
7.5 Estudios <i>in silico</i>	64
8. Conclusiones.....	71
9. Referencias.....	74
10. Apéndices.....	82
10.1 Técnicas experimentales.....	82
10.2 Anexos.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	9
“El heterociclo aromático imidazol”	
Figura 2.....	21
“Acción de los inhibidores de XO en la cavidad sináptica”	
Figura 3.....	23
“Diagrama general de la ruta de degradación de la purina”	
Figura 4.....	27
“Reducción del radical libre DPPH”	
Figura 5.....	29
“Generación de ABTS•+ mediante la oxidación de ABTS por persulfato de potasio”	
Figura 6.....	53
“Gráfica de rangos de GI ₅₀ de los compuestos evaluados”	
Figura 7.....	60
“Porcentaje de inhibición de AChE por los derivados de trifenil imidazol compuestos 1-13”	
Figura 8.....	61
“Actividad inhibitoria de XO por los compuestos sintetizados 1-13”	
Figura 9.....	66
“Resultados <i>in silico</i> compuesto 11”	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	19
“Principales fuentes endógenas de radicales libres”	
Tabla 2.....	20
“Principales fuentes exógenas de radicales libres”	
Tabla 3.....	38
“Confirmación de las estructuras de los compuestos 1-13 por EM y RMN”	
Tabla 4.....	52
“Actividad antiproliferativa de los compuestos 1-13”	
Tabla 5.....	58
“Actividad antioxidante de los compuestos 1-13”	
Tabla 6.....	65
“Puntuación de <i>docking</i> de trifenil imidazoles sintetizados”	
Tabla 7.....	68
“Cálculos en SwissADME para los compuestos 1-7”	
Tabla 1.....	69
“Cálculos en SwissADME para los compuestos 8-13”	

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.....	37.
----------------	-----

“Esquema general de la reacción para la síntesis de derivados”

RESUMEN

1. RESUMEN

Los nucleos imidazólicos en los compuestos sintéticos han exhibido una amplia gama de actividades biológicas. Una serie de derivados de 2,4,5-trifenil imidazol fueron sintetizados, caracterizados, y evaluados como agentes antioxidantes en ensayos *in vitro* mediante las técnicas de 1,1-difenilpicrilhidrazilo (DPPH), y del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotizolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+}), además se valoró su actividad como inhibidores de enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y xantina oxidasa (XO), así como sus capacidades como agentes antiproliferativos. Asimismo, se llevó a cabo un estudio *in silico* de acoplamiento molecular (docking) y del cálculo de propiedades "ADME": absorción, distribución, metabolismo, y excreción. Los compuestos **3** y **10** mostraron el mejor perfil antioxidante para el ensayo de DPPH con una CE₅₀ de 0.141 y 0.174 mg/mL respectivamente y de 0.168 y 0.162 mg/mL para ABTS. Referente a la actividad de inhibición enzimática, el compuesto **1** presentó el mejor resultado, inhibiendo el 25.8 % de AChE a una concentración de 150 µg/ml, y el compuesto **3** exhibió la mejor actividad de inhibición de XO con una IC₅₀ de 85.8 µg/mL. De manera general, las moléculas **2**, **10**, y **11** presentaron una mayor acción antiproliferativa frente a las seis diferentes líneas celulares cancerosas evaluadas. El estudio de acoplamiento molecular sugiere que el compuesto **11** presenta mayor afinidad con el receptor, y el análisis ADME mostró que los compuestos **11** y **12**, pueden ser candidatos para modulación de su bioactividad mediante derivatización de sus estructuras.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El imidazol (1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno) es un compuesto aromático heterocíclico (Figura 1) presente en una gran variedad de moléculas biológicas, entre ellas histidina, histamina, y nucleótidos naturales. Se trata de un farmacóforo altamente versátil, por lo que existe un gran número de reportes de diversas moléculas con presencia de anillo imidazol, que exhiben una amplia gama de actividades biológicas, destacando la acción antifúngica, antibiótica, antituberculosa, citotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, y analgésica [1-4].

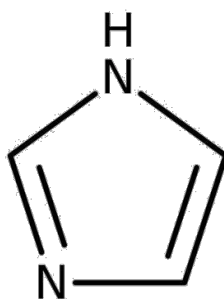


Figura 1. El heterociclo aromático Imidazol

Los compuestos derivados del imidazol, di-, tri-, y tetra-sustituidos, han demostrado actividad antioxidante al ser evaluados por diversas metodologías [5-7]. Esta actividad biológica es de alta importancia para contrarrestar el estrés oxidativo, una condición que se presenta cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) sobrepasan al sistema de defensa antioxidante natural de las células.

El proceso de envejecimiento conlleva, además de múltiples enfermedades crónicas y degenerativas, un deterioro de los sistemas naturales de defensa frente a radicales libres, siendo los principales las ROS, esto se traduce en estrés oxidativo que

ha sido vinculado a afecciones cardiovasculares, neurodegenerativas, y cancerosas [8-9], generando un gran interés en los compuestos con propiedades antioxidantes.

Una de las enfermedades neurodegenerativas a las cuales se ha atribuido como factor subyacente al estrés oxidativo es la enfermedad de Alzheimer (EA) [10], la cual es la principal causa de demencia en adultos mayores [11].

La progresión de la enfermedad de Alzheimer se ha relacionado estrechamente con la deficiencia colinérgica, por lo que el potencial tratamiento para EA se fundamenta principalmente en el uso de fármacos con efecto inhibitorio sobre la enzima acetilcolinesterasa [12]. Diversas molecular con grupo imidazol han sido evaluadas como inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) arrojando resultados interesantes [13].

La enzima xantina oxidasa (XO) es una enzima clave en el metabolismo de purina, además de estar involucrada en la producción de ácido úrico como metabolito final. La producción elevada de ácido úrico puede causar la enfermedad conocida como gota; en consecuencia, la inhibición de esta enzima ha sido señalada como una posible terapia para ese padecimiento, siendo el imidazol uno de los compuestos utilizados para el desarrollo de inhibidores de xantina oxidasa [14]. Dado que la actividad de la enzima XO produce tanto ácido úrico como especies reactivas de oxígeno, un inhibidor de XO con propiedades antioxidantes podría perfilarse como un buen compuesto terapéutico, inhibiendo a la enzima y controlando el daño oxidativo en el tejido circundante [14,15].

En la literatura científica, pueden encontrarse numerosos derivados de imidazol tri-sustituídos tanto en los grupos alquilo como en los arilo, siendo los grupo arilo, frecuentemente, de naturaleza heterocíclica. En años recientes, la síntesis de imidazoles

tri-sustituidos ha provisto de nuevas metodologías sintéticas y nuevos enfoques en la búsqueda de propiedades biológicas de interés [4].

En este trabajo se desarrollaron estructuras tri-sustituídas con ligeras variaciones entre ellas para determinar con mayor detalle la relación estructura-actividad (SAR) evaluando estos compuestos en ensayos biológicos. Con base en la extensa literatura referente a las actividades biológicas de los compuestos derivados del imidazol, en esta tesis se sintetizaron 2,4,5-trifenilimidazoles con sustituciones en el anillo A y se realizó un *screening* de sus actividades como antiproliferativos, antioxidantes, e inhibidores enzimáticos de AChE y XO, con el fin de encontrar compuestos de importancia con estos perfiles biológicos.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Los derivados imidazólicos 2,4,5-trisustituídos, presentan actividad antiproliferativa, antioxidante y de inhibición enzimática.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar y determinar el perfil bioactivo de compuestos imidazólicos 2,4,5 trisustituídos, como agentes antiproliferativos, antioxidantes e inhibidores enzimáticos.

4.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar derivados imidazólicos 2,4,5 trisustituidos mediante la reacción de Radziszewski.
2. Caracterizar los intermedios y productos sintéticos mediante técnicas de espectroscopía infrarroja, espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear.
3. Evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos sintéticos frente a líneas celulares humanas mediante experimentos de tipo bioensayo.
4. Determinar el perfil antioxidante de los productos imidazólicos sintetizados mediante los ensayos de DPPH y ABTS.
5. Realizar un estudio de inhibición enzimática de los compuestos sintetizados, frente a las enzimas de acetilcolinesterasa y xantina oxidasa.

ANTECEDENTES

5. ANTECEDENTES

Estrés oxidativo

Los radicales libres son átomos o moléculas que presentan en su estructura uno o más electrones no apareados, cuya presencia genera inestabilidad en su estructura, lo que les confiere una alta reactividad química. Para estabilizarse, el radical libre tiende a donar o aceptar un electrón, generando reacciones en cadena. De este grupo de compuestos, sobresalen por su alto potencial oxidante, las especies reactivas de oxígeno (EROs).

Los organismos aerobios están expuestos a una variedad de prooxidantes con la capacidad de generar daños a biomoléculas de gran importancia, como lo son los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos [16]. Los procesos metabólicos que requieren oxígeno inevitablemente llevan a la producción de EROs endógenas (Tabla 1) ; de igual manera, existen especies oxidantes de origen exógeno (Tabla 2), como las radiaciones ionizantes, contaminación y exposición a pesticidas, que contribuyen al daño de estas moléculas de importancia biológica [17].

Bajo condiciones normales, la mayor parte del oxígeno es metabolizado por las células sin formación de intermediarios tóxicos, siendo solo un pequeño porcentaje que forma especies altamente reactivas: los radicales libres anión superóxido y el hidroxilo. En situaciones fisiológicas particulares, como en etapas de crecimiento, algunas patologías, y procesos inflamatorios, existe una mayor demanda tisular de oxígeno y la cantidad de sustancias oxidantes generadas es mayor [18].

Tabla 1. Principales fuentes endógenas de radicales libres.

Proceso fisiológico	Información adicional
Respiración mitocondrial	Proceso que genera el radical anión superóxido
Autooxidación	Se forma el radical superóxido a partir de la autooxidación de moléculas biológicas como la hemoglobina y la mioglobina.
Reacciones enzimáticas	Reacciones enzimáticas relacionadas a la lipoxigenasa, aldehído oxidasa, entre otras, pueden generar radicales libres.
Iones metálicos	Iones metálicos de cobre o hierro pueden generar radicales libres al reaccionar con peróxido de hidrógeno.
Ejercicio extenuante	Puede provocar la activación de la xantina oxidasa, que genera radicales libres.
Infección	El sistema inmunológico libera radicales libres para neutralizar microorganismos invasores.

Fuente: Dasgupta, et al., [19].

En condiciones fisiológicas normales, el organismo tiene la capacidad de remediar el daño ocasionado por agentes oxidantes a través una serie de mecanismos antioxidantes [20]. Cuando existe una presencia elevada de radicales libres y otras especies oxidantes y una incapacidad del organismo para eliminar dicho exceso, se presenta un estado de daño conocido como estrés oxidativo, que se ha relacionado al desarrollo de múltiples patologías, como cáncer. La iniciación del cáncer está asociada a defectos cromosómicos y activación de oncogénesis inducida por radicales libres, pues una de las formas más comunes de daño oxidativo es la formación de bases hidroxiladas de ADN, consideradas como un evento importante en la carcinogénesis, pues el ADN dañado tiene el potencial de inducir mutaciones genéticas [21].

La importancia biomédica del estrés oxidativo no solo radica en el papel que juega en la detonación de la carcinogénesis, sino que también se ha estudiado su rol en el desarrollo de diversas afecciones como hipertensión, diabetes, y desórdenes neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer [22, 23].

Tabla 2. Principales fuentes exógenas de radicales libres.

Factor	Información adicional
Contaminación ambiental	Partículas suspendidas en la contaminación ambiental, tienden a generar estrés oxidativo.
Radiaciones ionizantes	La exposición a radiación ultravioleta, rayos X, y radiaciones derivadas de terapias contra el cáncer, pueden provocar la formación de radicales libres en el cuerpo.
Metales	El aumento en la disponibilidad de metales de transición como ocurre en los procesos inflamatorios.
Medicamentos	La acción de fármacos con capacidad de generar anión superóxido por acción enzimática a través de la oxidorreducción cíclica de flavoproteínas
Solventes industriales	La inhalación de algunos solventes industriales, como cloroformo, pueden generar daño oxidativo.
Ingesta de bebidas alcohólicas	El exceso en el consumo de bebidas alcohólicas induce estrés oxidativo, principalmente en personas con alcoholismo,

Fuente: Dasgupta, et al., [19].

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo considerado como la principal causa de demencia entre adultos mayores. La demencia es síndrome con síntomas característico como pérdida de memoria y de lenguaje, dificultades para la resolución de problemas y pérdida general de las capacidades cognitivas, comprometiendo la capacidad de las personas para realizar sus actividades cotidianas [24].

Si bien, la patogénesis de la EA aún no es completamente comprendida, el estrés oxidativo parece ser un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad, con numerosos estudios que han demostrado que éste juega un papel clave en la producción del péptido tóxico β -amiloide, importante en el proceso neurodegenerativo [23,25].

La progresión de la enfermedad de Alzheimer también se ha vinculado a la disfunción colinérgica. El sistema colinérgico es crucial para el aprendizaje y la memoria, la disminución de colina asociada a la edad avanzada y a la EA, implican una deficiencia del neurotransmisor acetilcolina causada por una insuficiente producción de esta por escasez de colina, o por una sobre actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) [26, 27]. La corteza cerebral de los

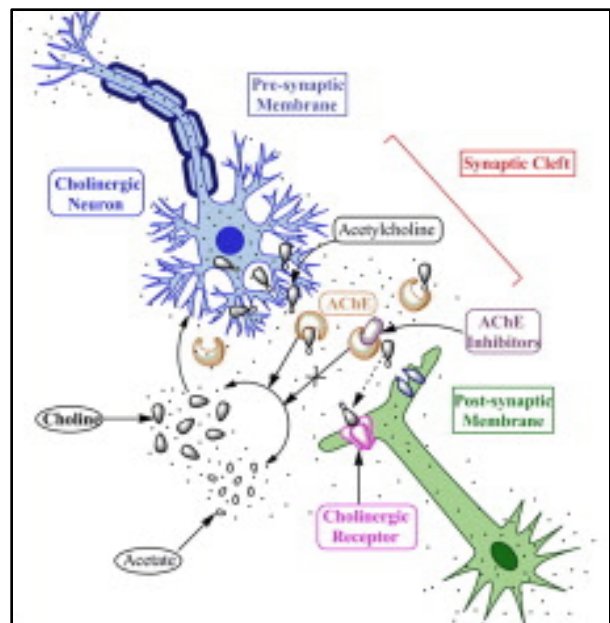


Figura 2. Acción de los inhibidores de XO en la cavidad sináptica.

pacientes de Alzheimer denota una disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina, por ende, la farmacoterapia está basada principalmente en inhibidores de la enzima AChE permitiendo el incremento del neurotransmisor al bloquear su degeneración (Figura 2) [28].

Enfermedad de la gota

El padecimiento conocido como gota es la forma más prevalente de artritis inflamatoria, es ocasionada por altos niveles de ácido úrico (hiperuricemia) generando un exceso de este en los fluidos corporales que a su vez ocasiona la formación y deposición de cristales de urato monosódico (UMS) alrededor de las articulaciones, cuya manifestación clínica incluye ataques agudos de dolor severo, inflamación en la periferia de las articulaciones afectadas, daño articular crónico, y depósitos tofácicos de cristales de UMS en piel [29].

Los tratamientos terapéuticos para este padecimiento, consiste en el uso de fármacos hipouricemiantes, cuyo propósito es la disminución de los niveles de urato. El tratamiento de elección son los inhibidores de xantina oxidasa, que inhiben la producción del ácido úrico [30].

La familia de las xantina oxidasas es un grupo de enzimas con contenido de molibdeno que desempeñan un rol pivotante en el metabolismo de la purina catalizando la conversión de hipoxantina a xantina, y posteriormente a ácido úrico (Figura 3). La sobreexpresión de esta enzima activa cascadas inflamatorias en la patología de diversas afecciones, como problemas cardíacos, diabetes, hipertensión, colitis, y, como se ha mencionado, gota. Vasta evidencia sugiere que la inhibición de la enzima

xantina oxidasa conlleva efectos terapéuticos no solo para la gota, sino para diversas enfermedades que van desde envejecimiento a disfunción neuronal [31-33].

El fármaco inhibidor de xantina oxidasa de elección es el alopurinol. El alopurinol reduce la producción de ácido úrico inhibiendo las reacciones bioquímicas que preceden inmediatamente a su formación. Al ser análogos de la purina, el alopurinol y su metabolito oxipurinol son inhibidores competitivos de la enzima xantina oxidasa; en términos generales, el alopurinol es un fármaco barato y efectivo, sin embargo, puede tener efectos negativos en pacientes con problemas renales, así como la latente posibilidad de que exista respuesta hipersensible a la droga ocasionando reacciones cutáneas y/o sistémicas que pueden llegar a tener consecuencias fatales [33-35], de ahí la necesidad de encontrar compuestos con la capacidad de inhibir la enzima sin los efectos nocivos de los fármacos actuales.

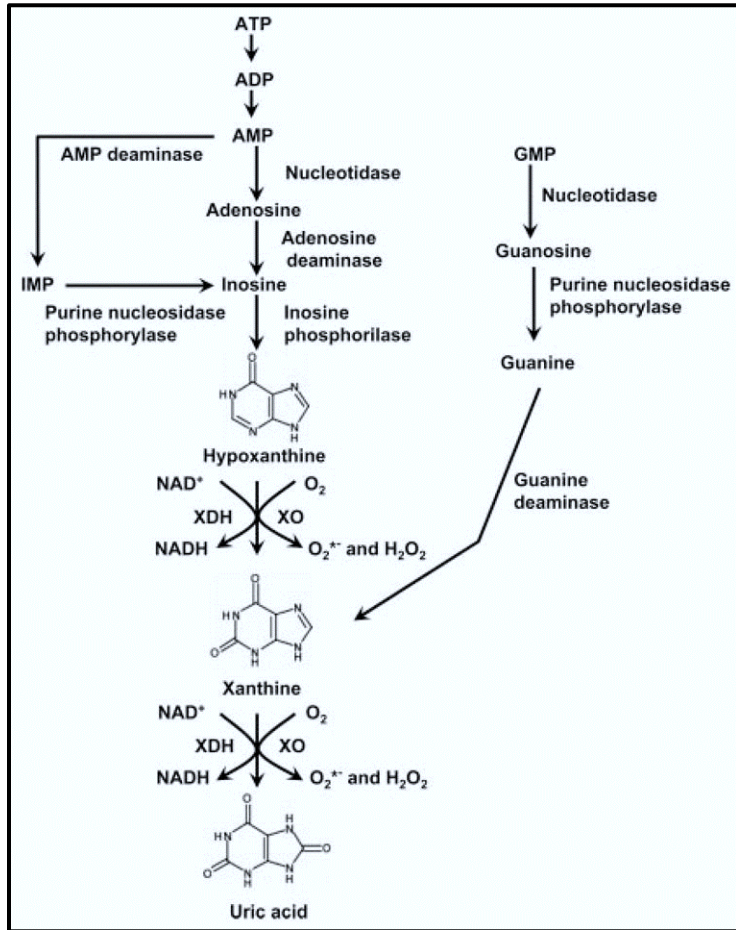


Figura 3. Diagrama general de la ruta de degradación de la purina. Fuente: Pacher [35]

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Síntesis y caracterización de los derivados imidazólicos

Para la síntesis de los derivados de trifenil imidazol, se colocó en reflujo una mezcla de acetato de amonio (5 Eq) y ácido acético (10 mL); cinco minutos de goteo constante, se adicionó 1 Eq del aldehído correspondiente (1-13) ; finalmente, tras cinco minutos adicionales, se agregó 1 Eq de bencilo. El reflujo continuó hasta que la reacción se llevara a cabo por completo, lo cual fue corroborado con cromatografía en capa fina. Para detener la reacción, hidróxido de amonio fue adicionado hasta alcanzar un pH de 9.0, posteriormente, el precipitado obtenido fue filtrado, lavado con agua fría, y secado. Para la purificación de los productos, se hizo uso de la cromatografía en columna o de recristalización.

La confirmación de las estructuras se realizó por las técnicas de análisis instrumental de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

6.2 Evaluación antiproliferativa

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

La evaluación *in vitro* de la actividad antiproliferativa de los compuestos estudiados, se realizó frente a seis líneas celulares tumorales humanas: A549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLa (cervix), y SW1573 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), como sensibles a fármacos; y T-47D (mama) y WiDr (colon) como líneas resistentes a fármacos. Todas las líneas celulares fueron amablemente proporcionadas por el Prof. G. J. Peters (VU Medical Center, Ámsterdam, Países Bajos).

Las células se mantuvieron en viales de cultivo de 25 cm² en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, enriquecido con 5% de suero fetal bovino y glutamina 2 mM/l en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de aire humidificado.

Ensayos antiproliferativos

Las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio conteniente de 5% suero fetal bovino y antibióticos (100 U/mL de penicilina G y 0.1 mg/ml de estreptomycin), contadas (contados de células automatizado Moxi Z), y diluídas hasta alcanzar las densidades celulares adecuadas (2500 células/pocillo para A549, HBL-100, y SW1573, y 5000 células/pocillo para T-47D y WiDr) para ser inoculadas en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24 horas, se hizo la adición de los compuestos en un rango de concentraciones de 0.01 a 100 µM. Como control positivo, se utilizaron cisplatino y etopósido, y como control negativo se empleó DMSO (0.25% v/v).

La incubación con los fármacos fue de 48 h. Posteriormente, las células se fijaron utilizando 25 µl de solución fría (0°C) de ácido tricloroacético (50% w/v) por 60 min a 4°C, una vez transcurrido ese tiempo, las placas fueron lavadas con agua. Después, se adicionaron 25 µl de una solución de sulforodamina B (SRB) (0.4% w/v en ácido acético 1%) por 15 min. El excedente de SRB fue removido mediante un lavado con ácido acético 1%. El colorante restante fue disuelto en una solución Tris (10 mM, pH 10.5).

La densidad óptica de cada pocillo se determinó a 530 y 620 nm en un lector de microplatos. La actividad antiproliferativa, expresada como 50% de inhibición de crecimiento (GI₅₀), se calculó de acuerdo a las fórmulas NCI [36].

6.3 Evaluación de actividad antioxidante

Ensayo de reducción del radical libre DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos mediante la técnica de DPPH, se siguió la metodología propuesta por Salazar-Aranda, *et al.* [37]

El método tiene como fundamento la cuantificación por colorimetría de la reducción del radical estable 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (Figura 4), cuyo electrón desapareado le confiere una coloración violeta intensa, con un máximo de absorbancia a 517 nm. A medida que el radical es neutralizado por los compuestos antioxidantes, la coloración se pierde, reflejándose en una disminución de la absorbancia [38].

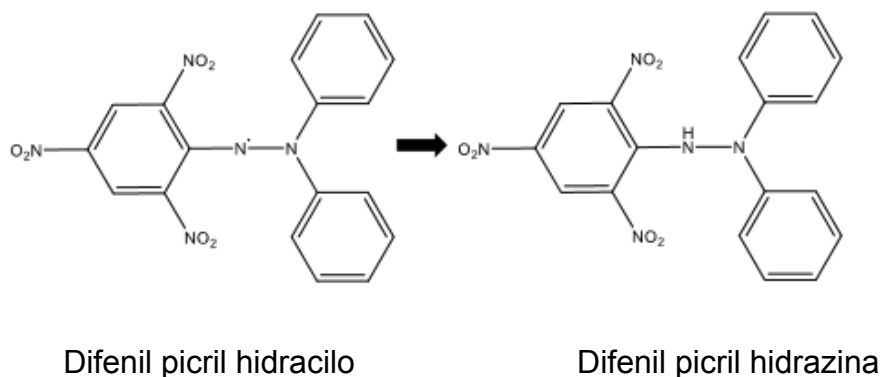


Figura 4. Reducción del radical libre DPPH.

Para el ensayo, se generaron diluciones seriadas de cada muestra en metanol. Alícuotas de 0.5 mL de cada dilución se mezclaron con 0.5 mL de una solución metanólica de DPPH 76 μM . Las mezclas resultantes se dejaron reposar por 30 minutos, a temperatura ambiente y protegidas completamente de la luz. Transcurrido el periodo de incubación, se determinaron las absorbancias de cada muestra a 517 nm, utilizando metanol como blanco para las lecturas. Para calcular la actividad de neutralización de radicales libres, se calculó el porcentaje de decoloración de DPPH de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$DPPH (\%) = \left[1 - \frac{B}{A} \right] \times 100$$

Donde:

A = Absorbancia de la solución de DPPH usada como control.

B = Absorbancia de las soluciones de DPPH con muestra.

Los resultados fueron expresados como CE_{50} , que representa la concentración requerida para reducir la absorbancia del DPPH en un 50%. Como compuesto de referencia, se empleó el flavonoide quercetina.

Ensayo de reducción del radical catión ABTS^{•+}

Para la determinación de la actividad neutralizante del radical catión ABTS^{•+} (Figura 5), se siguieron modificaciones a la metodología sugerida por Re, *et al.*, y Kuskoski, *et al.* [38,39].

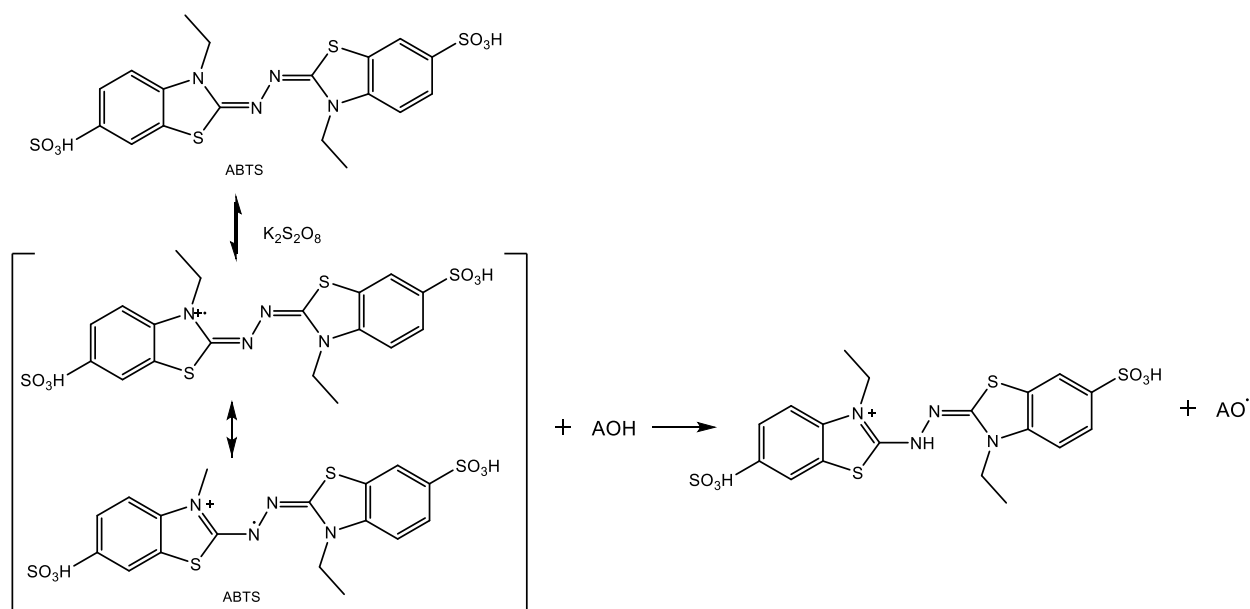


Figura 5. Generación de ABTS^{•+} mediante la oxidación de ABTS por persulfato de potasio, y su neutralización por un agente antioxidante.

Inicialmente, el radical catión ABTS^{•+} se generó al hacer reaccionar una solución acuosa de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla resultante se almacenó a temperatura ambiente, en condiciones de completa oscuridad, por 16-18 horas previas a su uso. Transcurrido el lapso requerido para la generación del radical, la solución de ABTS^{•+} (150 μ l) se diluyó con metanol para obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.02 a una longitud de onda de 754 nm. Dicho valor fue considerado como la absorbancia inicial (A_1).

Para cada una de las muestras se prepararon alícuotas combinando 980 µl de la solución metanólica de ABTS^{•+} con 20 µl de las muestras a diversas concentraciones (diluciones seriadas). Cada mezcla fue agitada e incubada a temperatura ambiente por 7 minutos, para posteriormente leer su absorbancia a 754 nm. Este valor fue considerado como la absorbancia final (A2) para cada una de las muestras.

La actividad neutralizante de radicales libres se expresó como porcentaje de decoloración de ABTS^{•+}, utilizando la siguiente fórmula para su determinación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[\frac{(A1 - A2)}{A1} \right] \times 100$$

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron como CE₅₀, valor que indica la concentración requerida para amortiguar en un 50% la absorbancia del ABTS^{•+}. Como compuesto de referencia, se empleó quercetina.

6.4 Estudio de inhibición enzimática

Evaluación *in vitro* de inhibición de acetilcolinesterasa

La determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa se realizó siguiendo adaptaciones de la metodología reportada por Adewusi, *et al.* [40]. Se colocaron 75 µl de solución tampón Trizma- HCL en las oquedades de una placa de 96 pocillos, donde también se colocaron 75 µl de los compuestos sintetizados diluidos,

obteniendo concentraciones finales de 150 µg/mL (0.15% para el dimetil sulfóxido DMSO). Subsecuentemente, a cada pocillo se añadieron 25 µl de una solución tampón de cloruro de acetilcolina (ATCI) 15 mM en conjunto con 125 µl de una solución tampón de reactivo de Ellman (DNTB) 3 mM, logrando concentraciones de 1.5 mM de ambas soluciones en los pocillos.

Las absorbancias fueron medidas cada 45 s en un equipo lector de microplacas, a una longitud de onda de 405 nm, se realizaron tres lecturas consecutivas bajo estas condiciones.

Una vez medidas las absorbancias, a cada pocillo le fueron adicionados 25 µl de una solución tampón enzimática, proporcionando una concentración de 2 U/mL de acetilcolinesterasa, la solución, además, fue enriquecida con 0.1 mg/mL de albúmina de suero bovino, generando una concentración final en los pocillos de 0.2 U/mL.

Bajo estas nuevas condiciones, se tomaron cinco lecturas consecutivas, cada 45s. En cada una de las placas se reservaron seis pocillos para utilizarse como control para 100% de actividad de la acetilcolinesterasa, sin probarse ningún compuesto sobre ella. Como control positivo, se utilizó galantamina. Se realizó una corrección para la hidrólisis espontánea del sustrato, restando la absorbancia de la muestra previa a la adición de la enzima y la absorbancia de la muestra con enzima.

El porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa se obtuvo empleando la ecuación siguiente:

$$Inhibición(\%) = \left(1 - \frac{A_{muestra}}{A_{control}}\right) \times 100$$

Donde las absorbancias corresponden a la diferencia entre las absorbancias a tiempos 0 y 225 s, tanto para las muestras evaluadas como para el control de 100% de actividad enzimática. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Evaluación *in vitro* de inhibición de xantina oxidasa

La actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa fue evaluada siguiendo adaptaciones al protocolo reportado por Almada-Taylor, *et al.* [41]. A un volumen de 0.33 ml de solución de xantina 150 mM, se le adicionaron 0.4 mL de solución buffer de fosfato 120 mM con un pH de 7.8, y mezclada con 0.25 mL de una solución del compuesto a analizar.

La reacción comenzó con la adición de 0.02 mL una solución de la enzima xantina oxidasa 0.5 U/ml. A continuación, se incubaron por 3 min a 24°C y posteriormente se tomó lectura de sus absorbancias a 295 nm para la cuantificación del ácido úrico formado. Como referencia se utilizó alopurinol, y como control se tomó una lectura de absorbancia sin inhibidor.

El porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa se determinó empleando la siguiente fórmula

$$\text{Inhibición de XO (\%)} = \left[1 - \frac{AS}{AC} \right] \times 100$$

Donde:

AS: velocidad inicial de reacción de la muestra

AC: velocidad de reacción del control

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado, y se realizaron por lo menos tres repeticiones. Utilizando interpolación de datos de un análisis por regresión lineal, se determinó la concentración requerida para disminuir en un 50% la actividad de xantina oxidasa (CI₅₀).

6.5 Estudios *in silico*

Acoplamiento molecular

Los modelos moleculares de los compuestos sintetizados fueron obtenidos insertando sus SMILES en el programa University of California, San Francisco (UCSF) Chimera 1.11.2 [42]. La minimización energética para las estructuras, se llevó a cabo con las condiciones predeterminadas de Chimera con los parámetros *Molecular Modelling Toolkit* (MMTK) y *Anterchamber* [43]. Para definir la rotación de los enlaces y cargas atómicas para cada ligando, se utilizó AutoDock Tools 1.5.6 [44].

La descarga de las estructuras cristalográficas de los receptores EGFR (PDB ID:4HJO) y HER2 (PDB ID:3PP0) se realizó a través de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) [45]. Cada receptor se preparó con AutoDock Tools, removiendo el ligando co-cristalizado y las moléculas de agua incluídas en el modelo, adicionando hidrógenos, y calculando las cargas Gasteiger.

Para el análisis de *docking*, se utilizó AutoDock 4.2 [46], utilizando una caja cuadrículada de 72x72x72 Å con $x = 24.5$, $y = 9$, $z = -1$ como las coordenadas centrales para EGFR; y $x = 17.5$, $y = 17.5$, $z = 27$ para HER2, con espacio de cuadrícula de 0.375 Å.

Se empleó un algoritmo genético lamarckiano con un tamaño de población de 150, con un número máximo de evaluaciones de 2.5×10^6 , número máximo de generaciones de 27000, rango de mutación de 0.02, y rango de entrecruzamiento de 0.8, generando 10 conformaciones de acoplamiento para cada compuesto analizado.

Predicciones *in silico* de potencial como fármacos

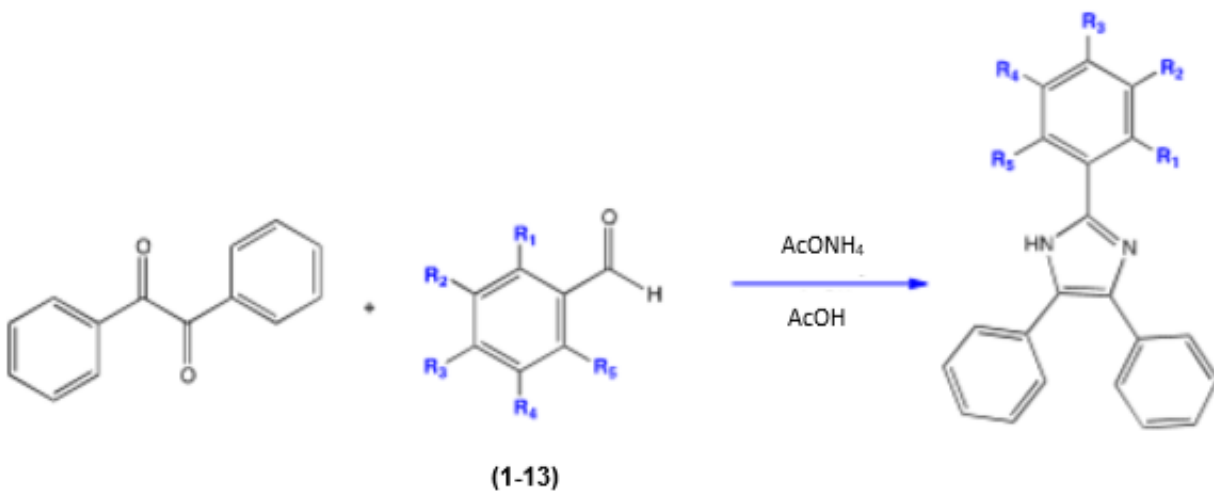
Para determinar la farmacocinética y propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados para ver si son posibles candidatos como fármacos, se hizo uso del servidor web SwissADME [47].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Síntesis y caracterización de los derivados imidazólicos

Los derivados imidazólicos 2,4,5-trisustituídos fueron sintetizados a partir de bencilo, acetato de amonio, y diferentes aldehídos, siguiendo la reacción de Radziszewski y la metodología propuesta por Puratchikody, *et al.*, con algunas modificaciones (Esquema 1) [48], obteniendo de reacción de entre 64 y 99%. Todos los compuestos fueron caracterizados por IR y espectrometría de masas, así como ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. En los espectros de ^1H -RMN de los compuestos 1-13, las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos de las posiciones 4 y 5 del heterociclo imidazol, se observaron en los desplazamientos típicos, entre 7.19 y 7.69 ppm. Para la posición dos de este mismo núcleo, se observaron las señales esperadas de sus hidrógenos en los desplazamientos esperados, con concordancia en las constantes de acoplamiento. En los espectros de ^{13}C -RMN, la señal del carbono 2 del anillo imidazol se identificó entre 159.83 y 143.20 ppm, mientras que los carbonos en posiciones 4 y 5, los desplazamientos se observaron entre 128.54 y 127.64 ppm. En la Tabla 3 se puede observar un resumen de las señales observadas en los espectros de RMN.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	-H	-H	-H	-H	-H
2	-H	-H	-H	-H	-OH
3	-H	-H	-OH	-H	-H
4	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H
5	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H
6	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H
7	-H	-OCH ₃	-OH	-H	-H
8	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H
9	-H	-H	-H	-H	-H
10	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	-H
11	-H	-H	-NO ₂	-H	-H
12	-NO ₂	-H	-H	-H	-H
13	antraceno				

Esquema 1. Esquema general de la reacción para la síntesis de derivados de 2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol.

Tabla 3. Confirmación de las estructuras de los compuestos 1-13 por espectrometría de masas, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

Compuesto 1. 2,4,5-trifenilimidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 296 $[\text{M}]^+$ (97), 281 (18), 207 (63), 165 (100), 147 (20), 73 (46).

Características		Señales IR (KBr)	
Aspecto	Polvo blanco	Señal	cm^{-1}
Rendimiento	95%	C - H (aromático)	3037
Fórmula molecular	$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_6$	C - C	1599
Punto de fusión	$>250^\circ\text{C}$	C - N	1323

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
7.97	d	7.6	2H
7.51	d	7.2	4H
7.47	t	7.2	2H
7.27	m	-	7H

δ ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3)
146.29, 132.63, 131.93, 129.04, 128.75, 128.56, 128.21, 127.92, 127.27.

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

Fragmentos CG-EM (m/z) = 312.3 [M]⁺ (100), 283.1 (8), 209.1 (4), 165.2 (65), 77.2 (15).

Características		Señales IR (KBr)	
Aspecto	Polvo blanco	Señal	cm ⁻¹
Rendimiento	99%	O -H	3205
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O	C – C (aromático)	1601
Punto de fusión	210-212 °C	C - N	1326

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
7.70	dd	J ₁ = 6.4 J ₂ = 1.0	1H
7.54	dd	J ₁ = 8.0 J ₂ = 1.6	4H
7.37	m	-	6H
7.25	m	-	1H
7.11	d	8.00	1H
6.86	dd	J ₁ = 8.0 J ₂ = 1.0	1H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
157.03, 145.17, 130.90, 128.81, 128.38, 128.23, 127.88, 124.30, 119.13, 117.87, 111.81.

Compuesto 3. 4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)fenol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 312 [M]⁺ (93), 281 (14), 207 (55), 165 (100), 73 (39).

Características	
Aspecto	Polvo blanco
Rendimiento	94%
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O
Punto de fusión	248-250 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm ⁻¹
O - H	3423
C – H (aromático)	3056
C – C (aromático)	1609
C - N	1280

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
6.80	d	-	2H
7.85	d	8.0	2H
7.46-7.19	m	-	10H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)	
157.27, 146.25, 127.64, 126.56, 121.36, 114.98.	

Compuesto 4. 2-(4-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol.

Fragmentos CG-EM (m/z) = 326.2[M]⁺ (100), 311.2(32), 283.1 (12), 165.2 (24), 77.1 (9).

Características		Señales IR (KBr)	
Aspecto	Polvo blanco	Señal	cm ⁻¹
Rendimiento	91%	C – H (aromático)	2958
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O	C – C (aromático)	1492
Punto de fusión	230-232 °C	C – O	1251
		C – N	1027

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
7.86	d	8.8	2H
7.50	d	7.2	4H
7.32 – 7.23	m	-	6H
6.94	d	8.8	2H
3.80	s	-	3H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
159.83, 146.56, 128.23, 127.89, 127.00, 122.70, 113.97, 55.11.

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

Fragmentos CG-EM (m/z) = 326 [M]⁺ (100), 282 (10), 207 (10), 165 (74), 89 (28), 77 (21), 44 (61).

Características	
Aspecto	Polvo blanco
Rendimiento	90%
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₂ N ₂ O
Punto de fusión	>250°C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
C - H (aromático)	2998
C - H (alifático)	2961
C - C (aromático)	1458
C - O	1243

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
12.68	s	-	1H
7.69	m	-	2H
7.56	d	7.6	2H
7.51	d	7.2	2H
7.46	t	7.2	2H
7.39	t	7.6	2H
7.31	t	7.2	2H
7.23	t	6.8	1H
6.95	d	7.2	1H
3.83	s	-	3H

δ ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)
160.02, 145.81, 137.52, 135.60, 132.10, 131.53, 130.25, 129.11, 128.95, 128.63,

128.26, 127.52, 126.96, 118.08, 114.67, 110.64, 55.67

Compuesto 6. 2-(2-metoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol.

Fragmentos CG-EM (m/z) = 326.3 [M]⁺ (100), 308.2 (80), 295.1 (39), 221.2 (39), 165.2 (57), 77.2 (16).

Características	
Aspecto	Polvo amarillo
Rendimiento	93%
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O
Punto de fusión	200-202 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
C - C (aromático)	1601
C - C (aromático)	1480
C - O	1240
C - H	766

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
10.48	s	-	1H
8.48	dd	$J_1 = 8$ $J_2 = 1.2$	1H
7.66-7.49	m	-	4H
7.33-7.23	m	-	7H
7.11	t	7.6	1H
7.00	d	8.4	1H
3.99	s	-	3H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)	
155.65, 143.98, 129.46, 128.54, 127.72, 121.58, 118.05, 111.12, 55.80.	

Compuesto 7. 4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)-2-metoxifenol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 342 [M]⁺ (4), 341 (15), 311 (14), 295 (5), 165 (30), 105 (100), 77 (56), 44 (29).

Características	
Aspecto	Polvo blanco
Rendimiento	92%
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₂
Punto de fusión	246-248 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
O - H	3510
C - H	2996
C - C (aromático)	1601
C - C (aromático)	1496
C - O	1274
C - H	695

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
7.57	d	1.6	1H
7.49	d	6.8	4H
7.36 – 7.23	m	-	7H
6.88	s	-	3H

δ ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)	
147.23, 146.75, 146.63, 132.47, 128.26, 127.91, 127.11, 121.78, 118.60, 114.76, 109.08, 55.71.	

Compuesto 8. 2-(3,4-dimetoxifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 356 [M]⁺ (1), 342 (1), 281 (3), 207 (16), 193 (12), 176 (100), 165 (14), 69 (65).

Características	
Aspecto	Polvo blanco
Rendimiento	84%
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₂
Punto de fusión	220-222 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
C - H	2959
C - C (aromático)	1591
C - C (aromático)	1495
C - O	1253
C - H	762

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
7.60	s	-	1H
7.49	m	-	5H
7.32	m	-	6H
6.88	d	8.4	1H
3.89	s	-	3H
3.86	s	-	3H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
149.28, 148.90, 146.51, 132.66, 128.23, 127.90, 127.05, 122.95, 118.12, 111.00, 109.04, 55.68.

Compuesto 9. 2-(2-clorofenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 330 [M]⁺ (18), 281 (18), 207 (65), 176 (71), 165 (61), 89 (35), 44 (100).

Características		Señales IR (KBr)	
Aspecto	Polvo amarillo	Señal	cm ⁻¹
Rendimiento	93%	C - H	2924
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂	C – C (aromático)	1602
Punto de fusión	190-192 °C	C – C (aromático)	1479
		C – H	763
		C - Cl	696

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
10.25	s	-	1H
8.44	dd	J ₁ = 7.6 J ₂ = 1.2	1H
7.66	m	-	2H
7.47- 7.25	m	-	11H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
143.20, 137.91, 134.57, 130.88, 130.48, 129.59, 129.57, 129.04, 129.02, 128.36, 128.06, 127.96, 127.79, 127.67, 127.52, 127.09.

Compuesto 10. 4-(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)-N,N-dimetilanilina.

Fragmentos CG-EM (m/z) = 339[M]⁺ (6), 325(4), 313(17), 269(23), 178(53), 165(100), 89(42), 77(38).

Características	
Aspecto	Polvo café amarillento
Rendimiento	83%
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₂₁ N ₃
Punto de fusión	234-236 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
C – H	3000
C – C (aromático)	1618
C – C (aromático)	1497
C – N	1200
C – H	765
C – Cl	696

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
9.70	s	-	1H
7.77	d	8.8	2H
7.51	d	7.2	4H
7.30 – 7.21	m	-	6H
6.70	m	8.8	2H
2.96	s	-	6H

δ ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)
150.74, 147.01, 132.98, 129.94, 129.06, 128.48, 127.85, 127.15, 126.56, 112.14, 40.32.

Compuesto 11. 2-(4-nitrofenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 341 [M]⁺ (1), 330 (10), 281 (4), 220 (10), 176 (100), 165 (24), 89 (21), 69 (60), 45 (40).

Características	
Aspecto	Polvo Amarillo
Rendimiento	90%
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₂
Punto de fusión	230-232 °C

Señales IR (KBr)	
Señal	cm⁻¹
C - H	2923
C - C (aromático)	1600
N - O	1519
C - C (aromático)	1486
N - O	1339
C - H	765

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
8.19	d	8.8	2H
8.06	d	8.8	2H
7.53 – 7.45	m		4H
7.33	m	-	6H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
147.03, 143.89, 135.83, 128.53, 128.04, 125.70, 124.14.

Compuesto 12. 2-(2-nitrofenil)-4,5-difenil-1H-imidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 341 [M]⁺ (48), 311 (10), 237 (5), 165 (28), 135 (31), 104 (100), 89 (60), 79 (29).

Características	
Aspecto	Polvo rojo
Rendimiento	77%
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₂
Punto de fusión	210-212 °C

Señales IR (ATR diamante)	
Señal	cm⁻¹
C - H	2926
C – C (aromático)	1598
N – O	1517
C – C (aromático)	1485
N – O	1331
C – H	759

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
8.34	d	8.0	2H
8.11	d	8.0	2H
7.69 – 7.30	m	-	10H

δ ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)
147.44, 143.40, 139.83, 135.48, 133.99, 130.27, 129.39, 129.10, 128.57, 128.47, 127.97, 127.71, 127.47, 125.46, 124.43.

Compuesto 13. 2-(antracen-9-il)-4,5-difenil-1H-imidazol

Fragmentos CG-EM (m/z) = 396.2 [M]⁺ (100), 323.1 (3), 291.1 (4), 203 (10), 165 (16), 105 (8), 77 (4).

Características	
Aspecto	Polvo Amarillo
Rendimiento	64%
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₂₀ N ₂
Punto de fusión	204-206 °C

Señales IR (ATR diamante)	
Señal	cm⁻¹
C - H	3074-3020
C – C (aromático)	1609
C – C (aromático)	1447

¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃)			
δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
8.47	s	-	1H
8.00	d	8.0	2H
7.92	d	8.0	2H
7.64 – 7.27	m	-	14H

δ ¹³ C-RMN (100 MHz, CDCl ₃)
143.60, 131.49, 131.10, 128.91, 128.61, 128.42, 127.83, 127.40, 126.55, 125.83, 125.31, 124.58.

7.2 Evaluación antiproliferativa

La evaluación de la actividad antiproliferativa de derivados de trifenil imidazol sintetizados, se llevó a cabo mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB). Las líneas celulares tumorales utilizadas fueron células de adherencia epitelial de diferentes orígenes anatómicos. Todos los resultados se expresan como inhibición de crecimiento 50 (GI_{50}), es decir, la concentración requerida para inhibir el 50% de la población celular, y calculada y expresada en micromolar (μM). Como controles positivos, se utilizaron diferentes fármacos antitumorales como cisplatino, etopósido, y camptotecina, y se empleó imidazol como referencia estructural de los compuestos sintetizados.

Los resultados obtenidos de la evaluación de los 13 compuestos sintetizados en el ensayo SBR frente a líneas celulares tumorales (Tabla 4) no mostraron selectividad hacia ninguna línea en específico. Con base en los resultados de la Tabla 4 y el rango de GI_{50} calculadas (Figura 6), los compuestos de la serie con mayor actividad fueron 10 y 11. Cabe subrayar que el imidazol no presentó actividad inhibitoria en los compuestos utilizados como controles; por otra parte, una de las líneas celulares más resistentes frente a los compuestos sintetizados y fármacos, fue A549, correspondiente a adenocarcinoma de pulmón, estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, pues se ha documentado que esa clase de cánceres de pulmón son, por lo general, resistentes a quimioterapia, incluso frente a uno de los medicamentos antitumorales más utilizado, taxol [49].

De los 13 productos sintetizados, la actividad más baja fue expuesta por el derivado 1, trifenil imidazol con ninguna sustitución, pues no mostró actividad significativa frente a cinco de las seis líneas celulares evaluadas, y una actividad baja frente a SW1573 (89 μM). De manera similar, comparando las moléculas con una

sustitución metoxilo, 4 (*p*-OMe), 5 (*m*-OMe), y 6 (*o*-OMe), que son isómeros posicionales, solamente el producto 5 exhibió actividad baja frente a SW1573, con una GI₅₀ de 76 µM, mientras que 4 y 6 no presentaron actividad significativa frente a ninguna de las líneas celulares evaluadas.

Tabla 4. Actividad antiproliferativa de los compuestos 1-13 frente a seis líneas celulares tumorales humanas.^a

Compuesto	Sustituyente	Líneas celulares (GI ₅₀ , µM)					
		A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
1 ^b	-H	>100	>100	>100	89	>100	>100
2	<i>o</i> -OH	11 ± 5.5	7.0 ± 2.0	4.3 ± 0.6	3.6 ± 0.2	18 ± 0.3	19 ± 0.5
3	<i>p</i> -OH	19 ± 4.0	16 ± 0.4	13 ± 2.5	15 ± 2.3	20 ± 1.5	22 ± 0.7
4	<i>p</i> -OMe	>100	>100	>100	>100	>100	>100
5 ^b	<i>m</i> -OMe	>100	>100	>100	76	>100	>100
6	<i>o</i> -OMe	>100	>100	>100	>100	>100	>100
7	<i>m</i> -OMe	17 ± 1.3	17 ± 0.7	15 ± 1.7	15 ± 0.5	20 ± 2.0	17 ± 1.2
8	<i>p</i> -OH	26 ± 1.0	15 ± 2.0	10 ± 0.4	15 ± 3.1	16 ± 1.2	13 ± 6.8
	<i>m</i> -OMe						
	<i>p</i> -OMe						
9	<i>o</i> -Cl	>100	>100	7.7	17	>100	>100
10	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	3.8^b	5.9 ± 3.1	4.5 ± 1.2	4.4 ± 2.5	5.3 ± 1.9	4.5 ± 0.8
11	<i>p</i> -NO ₂	6.3 ± 3.4	3.3 ± 1.6	3.0 ± 0.9	2.9 ± 0.4	5.5 ± 0.2	4.6 ± 0.2
12	<i>o</i> -NO ₂	>100	>100	6.1	66	>100	>100
13	9-antraceno	45 ± 14	23 ± 10	12 ± 1.5	4.2 ± 1.4	>100	>100
Imidazol	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CDDP	-	4.9 ± 0.3	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.4	17 ± 2.3	23 ± 4.3
VP-16	-	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.9	15 ± 1.5	18 ± 4.4	24 ± 2.6

^aLos valores de GI₅₀ están dados en µM. Las desviaciones estándar se calcularon de dos a cuatro experimentos independientes. Como drogas antiproliferativas de referencia, se utilizaron cisplatino (CDDP) y etopósido (VP-16). Los valores en letra resaltada representan los mejores

valores de actividad antiproliferativa frente a las líneas tumorales, con valores de $GI_{50} < 10 \mu M$.
^bSólo se realizó un experimento.

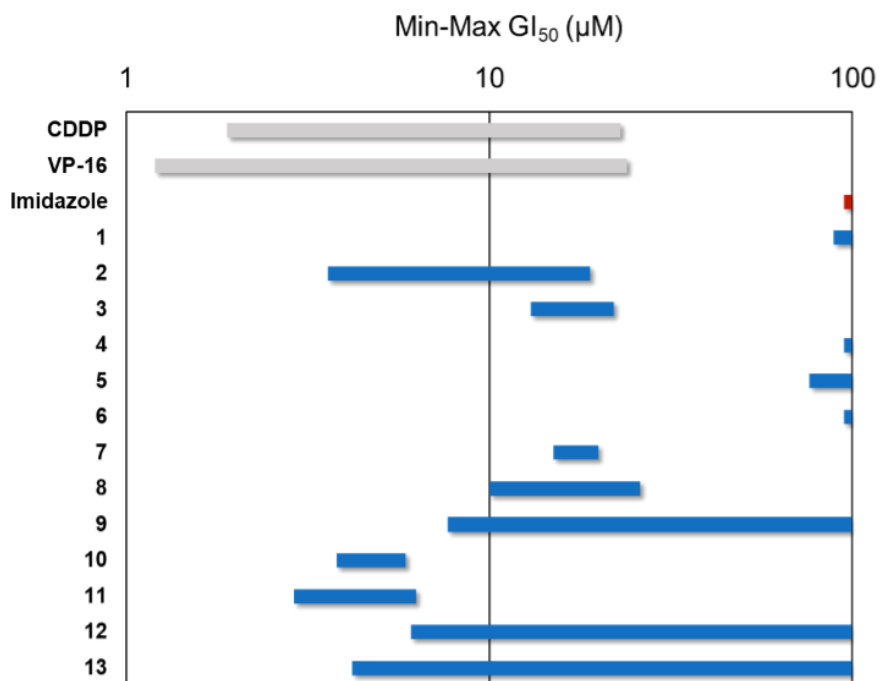


Figura 6. Gráfica de rangos de GI_{50} de los compuestos evaluados.

Continuando con este grupo de compuestos de baja actividad, los derivados 9 (*o*-Cl) y 12 (*o*-NO₂) fueron parcialmente activos, pues presentaron grados variables de actividad frente a, únicamente, un par de líneas celulares. El producto 9 manifestó actividad de buena a moderada exclusivamente frente a dos líneas celulares, HeLa con GI_{50} de 7.7 μM y SW1573 con 17 μM ; el compuesto 12 presentó actividad frente a las mismas líneas celulares que 9, con GI_{50} de 6.1 y 66 μM , respectivamente.

Las siguientes moléculas con mejores resultados, fueron los compuestos 3 (*p*-OH), 7 (*m*-OMe, *p*-OH), 8 (*m*-OMe, *p*-OMe), y 13 (antraceno), ya que este grupo de productos mostró actividad frente a todas las líneas evaluadas, exceptuando únicamente al compuesto 13 frente a las líneas T-47D y WiDr; sin embargo, 13 ostentó uno de los mejores resultados, siendo su GI_{50} de 4.2 μM frente a SW1573. En el caso

de 3, este mostró actividad frente a todas las líneas celulares analizadas, siendo HeLa la más sensible, con una GI_{50} de 13 μM , seguida de SW1573 y HBL-100 con 15 y 16 μM , respectivamente, mientras que para el resto de las líneas, los resultados oscilaron entre 19 y 22 μM .

Con las moléculas 7 y 8, se obtuvieron valores similares de GI_{50} entre ellas. Al ser comparadas contra los compuestos monosustituídos 4, 5, y 6 (con grupos metoxilo en diferentes posiciones), 7 y 8 mostraron que la disustitución mejora la actividad antiproliferativa frente a estas células, siendo estas las sustituciones de tipo hidroxilo y metoxilo. En la literatura, el compuesto 8 ha sido reportado por su actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 con una GI_{50} de 21 μM [50]. Este valor es consistente con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

El grupo de moléculas sintetizadas con mejores resultados, fueron 2 (*o*-OH), 10 (*p*-N(CH₃)₂), y 11 (*p*-NO₂) que ostentaron los menores valores de GI_{50} . El compuesto 2, en particular, presentó actividad significativa frente a las líneas SW1573 y HeLa, con valores de 3.6 y 4.3 μM ; 10 mostró actividad significativa frente a la mayoría de las líneas celulares, con resultados sobresalientes frente a A549, con GI_{50} de 3.8 μM , y frente a SW1573, con 4.4 μM . El compuesto más activo frente a todas las líneas celulares estudiadas fue 11, con GI_{50} en el orden de los 2.9 a 6.3 μM , siendo SW1573 la línea más sensible frente a este producto. Estos dos productos con la mayor actividad presentan sustituciones en posición *para* en el anillo A; de ellos, el segundo más activo contiene en su estructura un nitrógeno de amina terciaria, mientras que el más activo presenta un grupo nitro.

Una de las líneas celulares con mayor sensibilidad a los compuestos sintetizados y los fármacos evaluados fue SW1573, proveniente de carcinoma alveolar. Esto pese a que la línea es perteneciente al grupo de cáncer de pulmón, que, como se mencionó anteriormente para A549, es un tipo de carcinomas de alta resistencia a la farmacoterapia. Sin embargo, ambas líneas celulares relacionadas demostraron ser sensibles al compuesto 11, con valores de GI_{50} de 6.3 para A549 y 2.9 μM para SW1573, que corresponden a los segundos y primeros valores más bajos, respectivamente para estas líneas.

En 2017, el equipo de investigación de Dake [51] reportó la síntesis y evaluación de derivados de trifenil imidazol con sustituciones en sus anillos A frente a la línea A549, donde el compuesto 6f mostró una CI_{50} de 15 μM . Esta molécula presenta sustituciones *m*-I, *m*-OMe, y *p*-OH, donde el yodo es estructuralmente semejante a 7. La presencia de este heteroátomo mejoró la actividad en 2 μM de diferencia, comparado con la actividad en su ausencia (17 μM para la molécula 7).

La sustitución *p*-NO₂ presente en el compuesto 11, juega un papel importante en la actividad antiproliferativa, lo que puede deberse a la estructura nitroaromática. Los compuestos nitroaromáticos han ganado interés como agentes quimioterapéuticos frente a cáncer debido a que las moléculas con grupos nitro generan que el metabolismo realice bio-reducción, que genera especies reactivas causantes de daño a los componentes celulares por medio de estrés oxidativo; las reducciones adicionales se ven favorecidas por condiciones de hipoxia, que generan especies altamente citotóxicas [52]. Pese a que la molécula 12 es un isómero de 11, al ser comparadas, la primera presentó considerablemente menor actividad. Esto puede deberse a que 12 presenta al grupo nitro en posición *orto*, donde es factible la interacción con el hidrógeno del anillo imidazol, disminuyendo el potencial de generación de especies reactivas necesarias para la actividad antiproliferativa.

7.3 Evaluación antioxidante

En los ensayos de determinación de capacidad antioxidante DPPH y ABTS, el imidazol presentó una CE_{50} de >15 y >10 mg/ml respectivamente (Tabla 5), resultados que al ser comparados con los obtenidos al evaluar los derivados, sugieren que la sustitución 2,4,5-trifenil en el imidazol heterocíclico es relevante para la capacidad antioxidante de estos compuestos, donde el efecto de las sustituciones en el anillo A se discutirá más adelante.

El método de neutralización del radical libre DPPH es ampliamente utilizado para evaluar actividades antioxidantes de manera relativamente rápida en comparación con otros métodos. Los resultados de este ensayo se presentan en la Tabla 5, donde se compara la actividad exhibida por los compuestos sintetizados contra el estándar quercetina, siendo los derivados de imidazol sintetizados con mayor actividad los compuestos 3, 10, 7, y 2 con valores respectivos de CE_{50} de 0.141, 0.174, 0.341, y 1.389 mg/ml. Estos resultados indican que la presencia de grupos donadores de electrones, tales como el grupo hidroxilo y el *p*-dimetilamino, en un anillo aromático unido al imidazol son esenciales en la actividad antioxidante. La literatura consultada indica que esto puede deberse al par de electrones libres en el nitrógeno o en el oxígeno del grupo hidroxilo, que pueden reaccionar con los radicales libres, favoreciéndose de la estabilización del anillo aromático [53]. El resto de los compuestos presentaron baja actividad al ser evaluados en este ensayo, principalmente debido a su falta de hidrógenos ácidos en el sistema aromático en posición dos (anillo A); por el contrario, los compuestos 4, 5, 6, y 8 presentan grupos metoxilo, en el compuesto 9 (CE_{50} de 5.62 mg/ml) se encuentra presente un átomo de cloro, un efecto electroatractor de los grupos NO_2 en los productos 11 y 12, y un grupo antraceno en el compuesto 13.

Es interesante mencionar la diferencia observada en la actividad antioxidante entre los isómeros 2 y 3, donde se observó que el compuesto 3 exhibió un mayor potencial de inhibición oxidativa en las dos técnicas empleadas (DPPH y ABTS). Los mecanismos antioxidantes de los compuestos fenólicos son bien conocidos: transferencia de átomo de hidrógeno, y transferencia de un único electrón, y son los mecanismos esperados para los hidroxilos fenólicos presentes en estos isómeros. La diferencia en los resultados podría radicar en que, pese a que ambos compuestos pueden transferir sus hidrógenos altamente ácidos, el hidroxilo en el compuesto 2 de encuentra en posición *orto*, lo que favorece la formación de un puente de hidrógeno con el nitrógeno del núcleo imidazol, formando un anillo estable de seis miembros. Se ha referenciado que estas interacciones de puentes de hidrógeno pueden disminuir la disociación y, por ende, la capacidad antioxidante de estos grupos [54].

En 2015, Hemalathaetal [55] evaluó la actividad antioxidante, mediante un ensayo de DPPH, de los compuestos 2, 3, y 10, reportando valores de CE_{50} de 0.003, 0.0037, y 0.0031 mg/ml, respectivamente. Pese a que las diferencia fueron notorias entre los resultados obtenidos en este ensayo y los reportados por Hemalathaetal, puede pensarse en complicación para realizar una comparación directa, derivada de las diferencias en las metodologías seguidas para los ensayos, pues en [55], se utilizó una concentración más elevada del radical libre DPPH, y los periodos de incubación para las reacciones no fueron estipulados.

De manera similar a los resultados obtenidos del ensayo DPPH, el ensayo de neutralización del radical catión ABTS mostró que los compuestos 10, 3, 2, y 7, con valores respectivos de CE_{50} de 0.162, 0.168, 0.188, y 0.199, fueron los productos más activos; sin embargo, el compuesto 13 exhibió actividad moderada, mientras que los productos 1, 4, 4, 6, 8, 11, y 12 presentaron baja actividad, como se observa en la Tabla 5. Nuevamente, sobre estos compuestos cabe enfatizar que la participación de

los grupos hidroxilo y dimetilalilo desempeña un papel importante en la neutralización de radicales libres. Diversos estudios discuten los posibles mecanismos involucrados en la neutralización de $ABTS^{•+}$, sugiriendo mecanismos mixtos de transferencia de átomo de hidrógeno/ transferencia de electrón [56], y algunos grupos presentan esta propiedad de reactividad química, como los derivados de N,N-dimetilanilina, lo que puede generar radicales estables y eficientes [57].

Tabla 5. Actividad antioxidante (CE_{50}) de los compuestos sintetizados 1-13.

Compuestos	Actividad antioxidante (CE_{50} , mg/ml)	
	DPPH	ABTS
1	3.25 ± 0.137	34.312 ± 0.245
2	1.389 ± 0.631	0.188 ± 0.011
3	0.141 ± 0.094	0.168 ± 0.046
4	16.74 ± 0.003	1.644 ± 0.584
5	16.89 ± 0.636	37.223 ± 2.629
6	7.12 ± 1.916	15.643 ± 0.324
7	0.341 ± 0.101	0.199 ± 0.001
8	12.23 ± 3.042	1.964 ± 0.37
9	5.62 ± 1.75	ND
10	0.174 ± 0.041	0.162 ± 0.006
11	ND	8.025 ± 0.771
12	ND	42.158 ± 2.697
13	4.00 ± 0.135	0.449 ± 0.03
Imidazol	>15	>10
*Quercetina	0.052 ± 0.037	0.075 ± 0.002

*Como compuesto de referencia. Los valores representan las medias $\pm$ SD, DPPH n=2, ABTS n=3. ND= no detectada en la concentración evaluada. CE_{50} = concentración requerida para disminuir la absorbancia en un 50%.

7.4 Estudio de inhibición enzimática

Inhibición de acetilcolinesterasa

En este ensayo, la galantamina presentó mejor actividad que los productos evaluados, sin embargo, el ensayo se propone como un *screening* inicial para relacionar la estructura del compuesto con su actividad, con el propósito de obtener información útil para investigaciones posteriores.

De entre los productos sintetizados, el compuesto 1 exhibió la mejor actividad con un 25.8% de inhibición (Figura 7). Los inhibidores de AChE se unen con la enzima en una cavidad bastante estudiada, la cual en su fondo presenta un residuo Trp (Trp84 para AChE de *Tetronarce californica*, la enzima utilizada en ensayos *in vitro*). Este residuo es de crucial importancia para la interacción con el ligando por medio de una interacción π -catión [58, 59]; sin embargo, también puede tener interacciones meramente hidrofóbicas. En el caso de la galantamina y el donepezil [58, 60] este residuo presenta un apilamiento π - π clásico con el doble enlace de la galantamina, y con el anillo bencilo en el donepezil. De manera similar, el compuesto 1 puede adoptar una posición similar frente a AChE, presentando una interacción π - π con Trp84 a través de su anillo A, el cual no presenta sustituciones que puedan afectar la nube electrónica en el anillo, situación que podría explicar los resultados obtenidos. Las interacciones π - π hidrofóbicas tienden a ser las más observadas entre la AChE y las matrices de diferentes inhibidores [61-63].

Los siguientes compuestos con altos porcentajes de inhibición fueron 11 y 12, los cuales presentan un grupo nitro en posiciones *para* y *orto*. El átomo de nitrógeno de estos grupos se encuentra cargado positivamente; de este modo, estos compuestos pueden tener interacciones π -catión con Trp84, incluso con Phe330, otro residuo que comúnmente presenta esta interacción. Esto podría explicar que 11 y 12 secundaran al compuesto 1 con los mejores resultados.

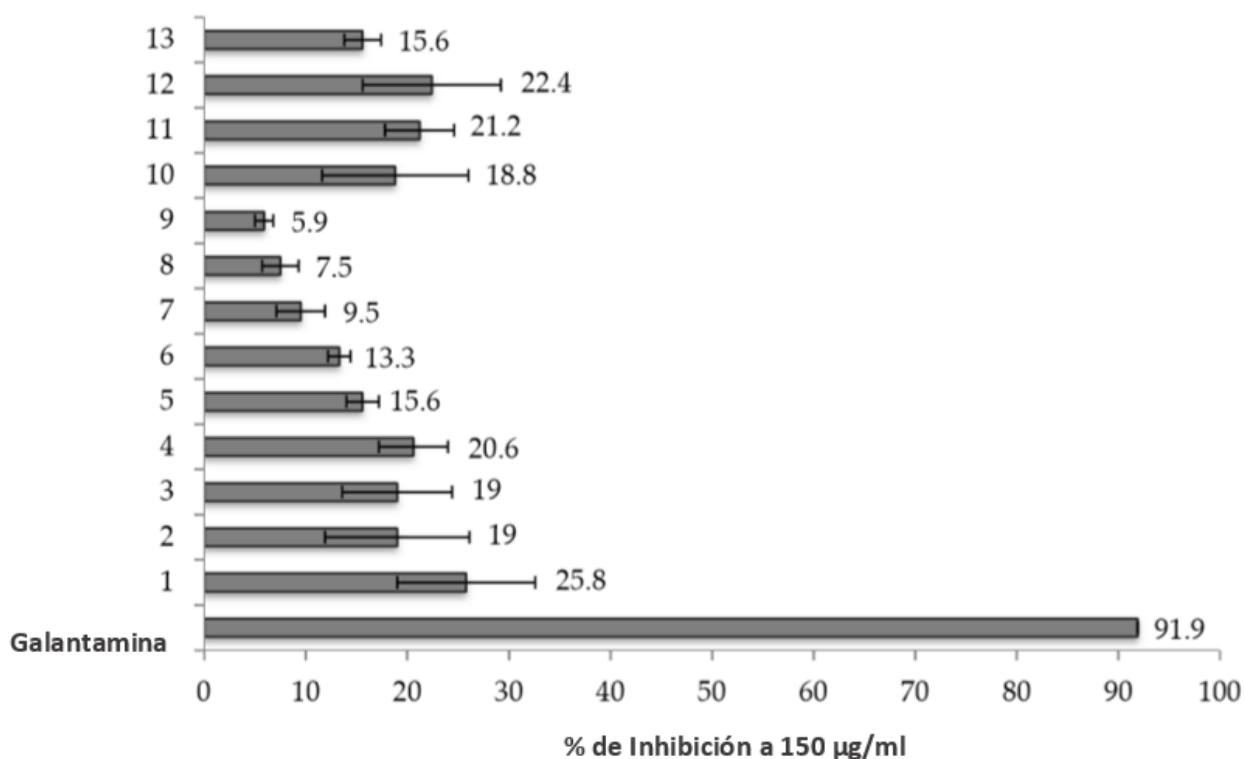


Figura 7. Porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa por los derivados de trifeníl imidazol, compuestos 1-13 (150 µg/ml). Como compuesto de referencia, se empleó galantamina.

Algunas de las tendencias observadas en los resultados cuando se compara 2 (que presenta una sustitución *o*-OH) contra 6 (con una sustitución *o*-OMe), indican que la actividad inhibitoria disminuye; ese mismo patrón puede observarse con 7 y su versión metoxilada 8; no obstante, la comparación entre los productos 3 y 4 parece ser la excepción a esta tendencia de comportamiento. El compuesto 9 presento una

actividad de inhibición de tan solo 5.9%; como las interacciones π - π con AChE son importantes, la presencia de cloro en 9 pudo alterar la nube electrónica del anillo A, perturbando las interacciones π - π que pudieran existir.

Ensayo de xantina oxidasa

Pese a que los compuestos sintetizados no resultaron ser tan activos como el control positivo alopurinol, se notaron algunas tendencias en la relación estructura-actividad, como se aprecia en la Figura 8. Comparando los compuestos 2-6 donde existe la presencia de sustituciones hidroxilo y metoxilo, la sustitución *para* puede inferirse como un requerimiento significativo para estos productos, pues solo los productos con sustituciones *p*-OH y *p*-OMe presentaron actividad. Este fue, también, el caso de los compuestos 7 y 8, con grupo hidroxilo y metoxilo como sustituyentes, donde la presencia de una sustitución *para* además de una *meta*, les confirió actividad.

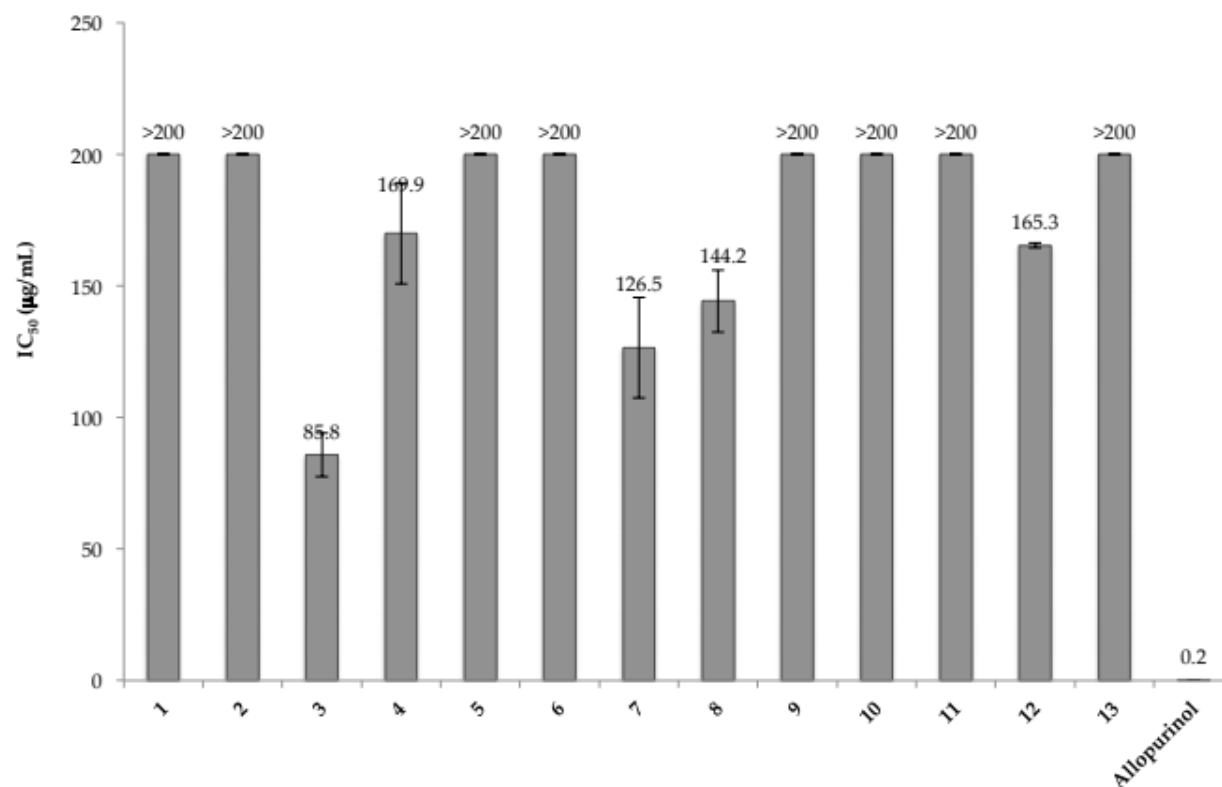


Figura 8. Actividad inhibitoria de xantina oxidasa por los compuestos sintetizados 1-13. Como compuesto de referencia, se utilizó alopurinol. Las barras representan la media $\pm$ SD, $n=3$.

Las tendencias mencionadas parecen indicar que no solo la posición *para* es de importancia, sino que estos compuestos sintetizados deben presentar funcionalidades de tipo -OH o -OMe, es decir, presentar un oxígeno como heteroátomo unido al anillo aromático. Los productos 10 y 11 también presentan sustituciones en esta posición, pero con nitrógeno como el heteroátomo (una amina y un grupo nitro respectivamente), y en estos casos, un grupo nitrogenado en posición *para* no confirió actividad. Para los compuestos sintetizados, la interacción con xantina oxidase, difiere del alopurinol, que interactúa con uno de sus nitrógenos aromáticos para unirse con molibdeno en el sitio catalítico de la enzima [64], por el contrario, parece tener más similitud al topiroxostat. Este inhibidor interactúa con el molibdeno de xantina oxidase con su oxígeno en un enlace covalente [65]. Si bien, el compuesto 10 contiene a su nitrógeno en forma de amina terciaria, y el compuesto 11 en un grupo nitro, parece ser más difícil para ellos

unirse con el centro de Mo de la enzima, que, por el contrario, parece verse facilitada por la presencia de oxígeno en los productos sintetizados.

El producto 3, teniendo un grupo *p*-OH y ninguna otra sustitución que pudiera disminuir su actividad, resultó ser el compuesto más activo del grupo de productos sintetizados. De las sustituciones hidroxilo y metoxilo, la primera aparenta favorecer la actividad inhibitoria sobre xantina oxidasa. El compuesto 3, con sustitución *p*-OH exhibió un CI_{50} de 85.8 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el producto 4, que presenta un *p*-OMe, obtuvo un CI_{50} de casi el doble de magnitud; nuevamente, comparando los compuestos 7 y 8, puede apreciarse que la versión metoxilada fue menos potente que su contraparte hidroxilada. Esto puede estar ligado a las observaciones realizadas para diferentes productos con grupos alcohol en sus estructuras, como los son los polifenoles, que pueden formar puentes de hidrógeno con XO por medio de sus grupos hidroxilo [65,66]. Sin embargo, la excepción a esta relación estructura-actividad fue el compuesto 12, con un sustituyente *o*-NO₂, que carece de sustituciones en *para* al igual que de funcionalidad de oxígeno como heteroátomo. Este compuesto fue uno de los pocos productos que presentaron actividad inhibitoria frente a xantina oxidasa, pese a que mostró la segunda más baja actividad. Se sugiere, para trabajos posteriores, la síntesis de productos con la presencia de *orto*-nitrógeno, que permitan expandir este análisis.

7.5 Evaluaciones *in silico*

Acoplamiento molecular

Motivados por reportes previos generados por nuestro grupo de trabajo donde las técnicas de *acoplamiento molecular* fueron aplicadas con resultados alentadores [67, 68], en esta tesis, se utilizó método como herramienta para la búsqueda de posibles receptores de imidazol. Diversos tumores sólidos son caracterizados por transducción aberrante de señales a través de diferentes receptores pertenecientes a la familia ErbB de receptores tirosina quinasa, a la que pertenecen los receptores EGFR y HER2; por lo tanto, un enfoque terapéutico en oncoterapia es la inhibición de uno o ambos de estos receptores [69, 70]. Los receptores ErbB y sus ligandos se sobre expresan en la mayoría de los neoplasmas sólidos; los receptores EGFR y ErbB se encuentran en promedio en 50% a 70% de carcinomas de pulmón, colon, y mama [71]. HER2 está principalmente relacionado con cáncer de mama (se expresa en 30% de carcinomas de mama primarios [71]), pero también está relacionado con cánceres de ovario, colon, pulmón, útero, cérvix, y esófago, entre otros [72]. Debido a lo habitual de la ocurrencia de la co-expresión de diferentes receptores ErbB, 87% de los tumores positivos para EGFR, también expresan HER2 [71]. Debido a lo anterior, los receptores EGFR y HER2 han sido seleccionados en la literatura [73] para realizar cálculos de actividad anti-cáncer, tanto en ensayos *in vitro* como en *docking in silico*. En esta última referencia, los resultados de *docking* de derivados de imidazol frente a EGFR y HER2, mostraron, en general, buena concordancia con los resultados de citotoxicidad. En el reporte, se evaluaron dos imidazoles que también se estudiaron en el presente trabajo, 11 y 12, con resultados bastante semejantes; utilizando el mismo protocolo y algoritmo de *docking*, las diferencias que puedan resentarse se pueden atribuir a la divergencia en la preparación de ligandos, pues este paso puede influir en los resultados finales [74]. En el presente trabajo, el protocolo de *docking* propuesto fue

utilizado para realizar *screenings* iniciales para EGFR y HER2 como posibles receptores mediadores de cáncer para los derivados de imidazol sintetizados.

Las energías de enlace resultantes en los análisis de *docking* se muestran en la Tabla 6, que incluye al imidazol como control negativo, y a lapatinib, un inhibidor de EGFR y HER2 [75], como control positivo. Todos los compuestos sintetizados exhibieron mejores resultados que el imidazol, sugiriendo que la derivatización mejoró su afinidad por los receptores. Pese a que lapatinib mostró mejores resultados frente a ambas enzimas en comparación con los compuestos, fue cercanamente secundada por algunos de los productos. De entre los compuestos sintetizados, 11, 12, 5, 9, y 7 presentaron los mejores resultados de interacción tanto con EGFR como con HER2, pues se encontraron entre los primeros cinco lugares con menores energías de unión. Los compuestos restantes mostraron variaciones en el orden de resultados de su interacción con estos receptores seleccionados. Comparando los resultados del análisis *docking* para cada receptor con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* para cada una de las líneas celulares evaluadas, hay sólo una ligera concordancia entre ellos. Esto puede ser explicado de diversas maneras, una explicación es el uso de un algoritmo de *docking* específico, siendo que cada uno presenta diferencias en la manera en la que los resultados son alcanzados. El empleo de diferentes algoritmos con el conjunto de datos de las estructuras de los ligandos y los valores de GI_{50} obtenidos en el presente trabajo, podría ser planteado como trabajo a futuro para encontrar los algoritmos más adecuados para los ligandos sintetizados. Por otra parte, es posible que los receptores biológicos donde interactúan los compuestos sean diferentes a los de EGFR y HER2, explicando la baja correlación observada. Adicionalmente, se ha reportado que los resultados de *docking* pueden ser mejorados por medio de refinamiento energético post-*docking* utilizando métodos semi empíricos como PM7 [76]. El compuesto que sí mostró buena similitud entre los resultados *in vitro* e *in silico* fue 11, con una sustitución *p*-nitro en su estructura (Figura 9). Este producto presentó energías de enlace de -9.11 y -9.19 kcal/mol con EGFR y HER2, respectivamente, siendo la segunda mejor afinidad con ambos receptores. Asimismo,

fue el segundo o primer compuesto con mayor actividad frente a las seis líneas celulares evaluadas. Esto sugiere que 11 puede ser un compuesto de partida para futuras derivatizaciones en la búsqueda de nuevos agentes antiproliferativos.

Tabla 6. Puntuaciones de *docking* de los trifenil imidazoles sintetizados y los controles.

Compuestos	Energías de enlace (kcal/mol)	
	EGFR	HER2
1	- 8.32	- 8.59
2	- 7.92	- 8.92
3	- 8.24	- 8.10
4	- 7.89	- 8.40
5	- 8.87	- 9.13
6	- 8.20	- 8.58
7	- 8.68	- 8.99
8	- 7.63	- 8.99
9	- 8.49	- 9.10
10	- 8.28	- 8.98
11	- 9.11	- 9.19
12	- 9.88	- 9.31
13	- 8.37	- 8.23
Imidazol	- 2.89	- 3.21
Lapatinib	- 10.48	- 9.88

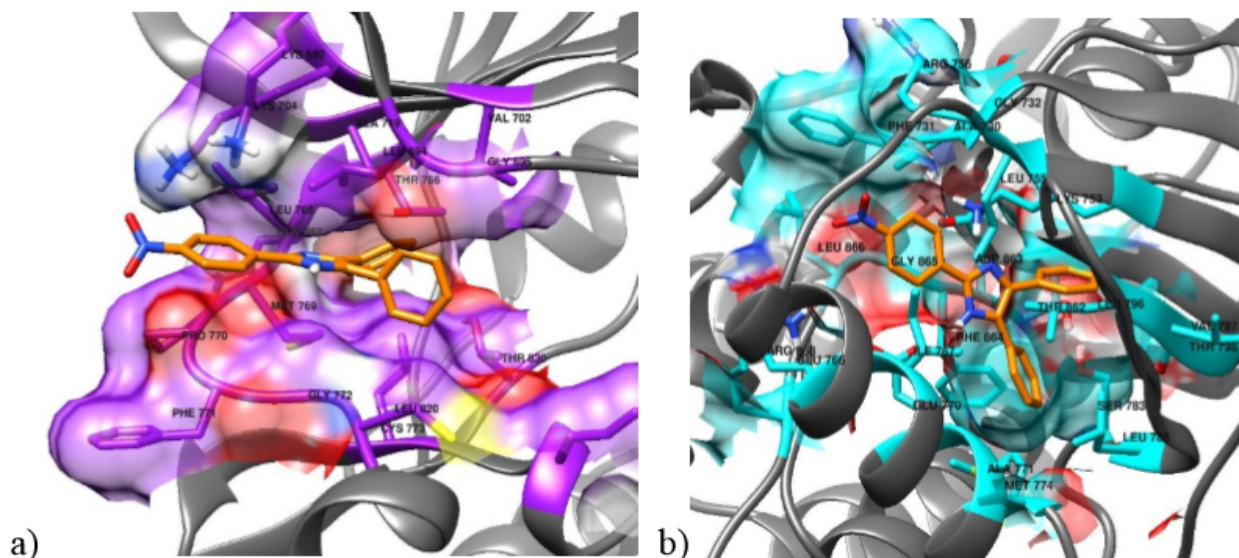


Figura 9. El compuesto 11 (naranja) presentado con los dos receptores analizados. Se resaltan los residuos a distancias <5.0 Å de 11, con algunas superficies activas para mostrar la cavidad arrojada por el análisis *docking* como la mejor para la posición de anclaje, a) EGFR, con los residuos cercanos en púrpura. B) HER2, con los residuos cercanos en turquesa.

Ensayos *in silico* de predicción de similitud a fármaco

Como se observa en las Tablas 7 y 8, los cálculos generados en el sitio web SwissADME, permitieron definir los compuestos sintetizados con mejores farmacocinéticas y propiedades de fármacos.

Todos los productos presentaron un TPSA dentro de los límites sugeridos para buena biodisponibilidad ($20-130$ Å²). La vasta mayoría son inhibidores de enzimas del citocromo, que pueden afectar el metabolismo y las presentes interacciones droga-droga [47], siendo 13 la de menor potencial inhibidor de CYP, seguida de 11, 12, y 9. Si bien, su solubilidad en agua fue moderada, se puede predecir que todos los

compuestas presentarán una alta absorción gastrointestinal (GI) (aunque esta puede ser parcialmente limitada para 1-10, por ser sustratos P-gp). La excepción a este enunciado es el compuesto 13, que presenta una pobre solubilidad y baja absorción GI. La mayoría de los compuestos parecen tener la capacidad de permear la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo, este no es el caso de los compuestos 9, 11, 12, y 13. Pese a ello, debido a que todos los compuestos con permeabilidad de la BHE son también sustratos P-gp, puede esperarse que sean ser excretados del cerebro sin interactuar con el sistema nervioso central. Con base en lo expuesto, se puede esperar que los compuestos sintetizados sean, en general, aptos para administración oral.

Como primer filtro, puede aplicarse la regla de cinco de Lipinski [77], que evalúa las propiedades fisicoquímicas relacionadas a lo adecuado que resulta un compuesto para utilizarse como fármaco. El peso molecular, el número de enlaces de hidrógeno que puede donar o aceptar, y la lipofilidad son, en general, concordantes con la regla de Lipinski. Únicamente los compuestos 9 y 13 presentan una violación a la regla, pues en ambos casos existe una muy alta lipofilidad.

Considerando las farmacocinéticas y aptitudes como fármaco predichas, los compuestos 11 y 12 con sustituciones nitro pueden ser considerados como prometedores compuestos base para futuros estudios, que pueden apoyarse adicionalmente de su alta actividad en los ensayos *in vitro*, ambos como inhibidores de AChE, 12 como inhibidores de XO, y 11 dentro del grupo de los imidazoles antiproliferativos de células de cáncer.

Tabla 7. Cálculos de farmacocinéticas y de semejanza a fármaco realizados en SwissADME para los compuestos sintetizados 1-7.

Descriptores	Compuesto						
	1	2	3	4	5	6	7
PM (g/mol)	296.37	312.36	312.36	326.39	326.39	326.39	342.39
# Aceptores de enlace-H	1	2	2	2	2	2	3
#Donadores de enlace-H	1	2	2	1	1	1	2
TPSA (Å²)	28.68	48.91	48.91	37.91	37.91	37.91	58.14
Consenso Log P	4.59	4.26	4.17	4.56	4.55	4.52	4.27
ESOL Log S	-5.4	-5.24	-5.24	-5.44	-5.44	-5.44	-5.29
ESOL Class	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Permeante BHE	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sustrato P-gp	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP1A2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2C19	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2C9	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP3A4	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
# violaciones a Lipinski	0	0	0	0	0	0	0

PM = Peso molecular; TPSA = Área de superficie polar topológica; Log P = logaritmo de coeficiente de reparto ESOL Log S = Logaritmo de modelo ESOL de solubilidad molar en agua; ESOL class = Clase de solubilidad en escala Log S; MS = Moderadamente soluble; PS = Pobremente soluble; GI = Gastrointestinal; BHE = Barrera hematoencefálica; P-gp = Permeabilidad en Glicoproteína; CYP = citocromo.

Tabla 8. Cálculos de farmacocinéticas y de semejanza a fármaco realizados en SwissADME para los compuestos sintetizados 8-13.

Descriptores	Compuesto					
	8	9	10	11	12	13
PM (g/mol)	356.42	330.81	339.43	341.36	341.36	396.48
# Aceptores de enlace-H	3	1	1	3	3	1
#Donadores de enlace-H	1	1	1	1	1	1
TPSA (Å²)	47.14	28.68	31.92	74.5	74.5	28.68
Consenso Log P	4.54	5.15	4.6	4	3.95	6.36
ESOL Log S	-5.49	-5.97	-5.59	-5.42	-5.42	-7.6
ESOL Class	MS	MS	MS	MS	MS	PS
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja
Permeante BHE	Sí	No	Sí	No	No	No
Sustrato P-gp	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Inhibidor de CYP2C19	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2C9	Sí	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No
Inhibidor de CYP3A4	Sí	Sí	Sí	No	No	No
# violaciones a Lipinski	0	1	0	0	0	1

PM = Peso molecular; TPSA = Área de superficie polar topológica; Log P = logaritmo de coeficiente de reparto ESOL Log S = Logaritmo de modelo ESOL de solubilidad molar en agua; ESOL class = Clase de solubilidad en escala Log S; MS = Moderadamente soluble; PS = Pobremente soluble; GI = Gastrointestinal; BHE = Barrera hematoencefálica; P-gp = Permeabilidad en Glicoproteína; CYP = citocromo.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron una serie de 13 derivados de imizadol 2,4,5-trisustituídos, sus estructuras fueron caracterizadas y corroboradas con técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

La actividad antiproliferativa se evaluó frente a seis líneas celulares de diferentes orígenes anatómicos. Los compuestos sintetizados exhibieron actividades de moderadas a muy buenas. Entre los compuestos más activos se encuentran el 2 (*o*-OH), 10 (*p*-N(CH₃)₂), y 11 (*p*-NO₂), de los cuales el último mostró el desempeño más sobresaliente, siendo el más o segundo más activo frente a todas las líneas celulares evaluadas. Se sugiere que derivados posteriores de esta familia mantengan al nitrógeno en posición *para* en el anillo A, pues parece favorecer la actividad antiproliferativa. En los análisis *in silico*, el *docking* frente a receptores EGFR y HER2 generaron resultados concordantes con los ensayos *in vitro*, mostrando al compuesto 11 entre los dos mejores desempeños en los resultados de afinidad de enlace.

Sus capacidades antioxidantes fueron analizadas mediante las técnicas de neutralización del radical libre DPPH, y neutralización del radical catión ABTS. En el ensayo de DPPH, los compuestos con mayor actividad fueron los identificados como 3 y 10 (CE₅₀ de 0.141 y 0.174 mg/mL, respectivamente), que presentan sustituciones *p*-OH y *p*-dimetilamino en el anillo A; en ABTS, los compuestos más activos fueron nuevamente 10 y 3, con CE₅₀ respectivas de 0.162 y 0.168 mg/mL. Estos resultados sugieren un rol de importancia de los heteroátomos con un par de electrones libres e

hidrógenos fenólicos ácidos, de manera que futuros derivados deben conservar estas características que les confieren una mejor actividad antioxidante.

En los ensayos enzimáticos, si bien no fue tan activo como el control el compuesto uno presentó la mejor actividad en los ensayos de inhibición de AChE, con 25.8% de inhibición, seguido de los compuestos con presencia de grupo nitro: 12 (22.4%) y 11 (21.2%). El inhibidor más activo de XO fue el producto 3, con CI_{50} de 85.8 $\mu\text{g/ml}$ y una sustitución *p*-OH. Estos resultados apuntan a que los grupos aromáticos con carga positiva son relevantes para la actividad inhibitoria de AChE, como es sugerido en la literatura científica. Para la inhibición de XO, la presencia de un oxígeno en posición *para* parece mejor la actividad de los derivados de trifenil imidazol, aunque el resultado inesperado obtenido para el compuesto 12 sugiere la necesidad de explorar el desempeño de derivados con nitrógeno en posición *orto*.

Las predicciones ADME de los 13 compuestos sintetizados mostraron que son aptos para administración oral, siendo 11 y 12 los productos con mejores propiedades de farmacocinética y similitud a fármacos, aunado a sus resultados en las evaluaciones *in vitro*, apuntan a ser buenos candidatos como compuestos principales para futuras derivaciones en la búsqueda de nuevas drogas, especialmente como agentes antiproliferativos e inhibidores de acetilcolinesterasa.

REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

1. Shingalapur, R.V.; Hosamani, K.M.; Keri, R.S. Synthesis and evaluation of invitro anti-microbial and anti-tubercular activity of 2-styrylbenzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4244–4248.
2. Achar, K.C.; Hosamani, K.M.; Seetharamareddy, H.R. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 2048–2054.
3. De Luca, L. Naturally occurring and synthetic imidazoles: Their chemistry and their biological activities. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13, 1–23.
4. Heravi, M.M.; Daraie, M.; Zadsirjan, V. Current advances in the synthesis and biological potencies of tri- and tetra-substituted 1H-imidazoles. *Mol. Divers.* 2015, 19, 577–623.
5. Ghorbani-Vaghei, R.; Izadkhah, V.; Mahmoodi, J.; Karamian, R.; Ahmadi Khoei, M. The synthesis of imidazoles and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Monatsh. Chem. Chem. Mon.* 2018, 149, 1447–1452.
6. Sorrenti, V.; Salerno, L.; Di Giacomo, C.; Acquaviva, R.; Siracusa, M.A.; Vanella, A. Imidazole derivatives as antioxidants and selective inhibitors of nNOS. *Nitric Oxide* 2006, 14, 45–50.
7. Abdel-Wahab, B.F.; Awad, G.E.A.; Badria, F.A. Synthesis, antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic and cytotoxic evaluation of new imidazole-based heterocycles. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 1505–1511.
8. Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Tsikas, D.; Rossi, R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2009, 46, 241–281.
9. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J. Neurochem.* 2006, 97, 1634–1658.
10. Angoa Pérez, M.; Rivas Arancibia, S. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Arch. Neurocién.* 2007, 12, 45–54.
11. Tran, T.D.; Nguyen, T.C.V.; Nguyen, N.S.; Nguyen, D.M.; Nguyen, T.T.H.; Le, M.T.; Thai, K.M. Synthesis of novel chalcones as acetylcholinesterase inhibitors. *Appl. Sci.* 2016, 6, 198.
12. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Curr. Neuropharmacol.* 2016, 14, 101–115.

13. Da Costa, J.S.; Bizarro Lopes, J.P.; Russowsky, D.; Petzhold, C.L.; de Amorim Borges, A.C.; Ceschi, M.A.; Konrath, E.; Batassini, C.; Santana Lunardi, P.; Saraiva Gonçalves, C.A. Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl-and butyryl cholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 62, 556–563.
14. Šmelcerović, A.; Tomović, K.; Šmelcerović, Ž.; Petronijević, Ž.; Kocić, G.; Tomašić, T.; Jakopin, Ž.; Anderluh, M. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 135, 491–516.
15. Zhang, T.; Lv, Y.; Lei, Y.; Liu, D.; Feng, Y.; Zhao, J.; Chen, S.; Meng, F.; Wang, S.; Design, Synthesis and biological evaluation of 1-hydroxy-2-phenyl-4-pyridyl-1H-imidazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 146, 668–677.
16. Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 2003, 24, 345–351.
17. Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004, 55, 373–99.
18. Avello, M.; Suwalsky, M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006, 494, 161–172.
19. Dasgupta, A.; Klein, K. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. *Prevention and treatment of disease*. 2014, 1–18.
20. Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012, 5, 9–19.
21. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008, 4, 89–96.
22. Galano, A. Estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes y...¿Química computacional?. *BSQM*. 2017, 11, 21–26.
23. Roberts, C. K.; Sindhu, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci J.* 2009, 84, 705–712.
24. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers. Dement.* 2018, 14, 367–429,
25. Nunomura A.; Perry, G.; Aliev, G.; Hirai, K.; Takeda, A.; Balraj, E. K.; Jones, P.K.; Ghanbari, H.; Wataya, T.; Shimohama, S.; Chiba, S.; Atwood, C. S.; Petersen, R. B.;

- Smith, M.A. Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *JNEN*. 2001, 60, 759–767.
26. Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70, 165–188.
 27. Muir, J. L. Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease. *PHARMACOL BIOCHEM BE.* 1997, 56, 687–696.
 28. Behl, C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.* 1999, 57, 301–323.
 29. Roddy, E.; Choi, H. K. Epidemiology of Gout. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2014, 40, 155–175.
 30. Neogi, T. Gout. *N. Engl. J. Me.* 2011, 364, 443–452.
 31. Ayyappan, P.; Nampoothiri, S. V. Bioactive natural products as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2020, 391–416.
 32. Du, Y.; Liu, Z.; Qiao, F.; Wang, S.; Chen, K.; Zhang, X. Computational exploration of reactive fragment for mechanism-based inhibition of xanthine oxidase. *J. Organomet. Chem.* 2018, 864, 58–67.
 33. Pacher, P; Nivorozhkin, A; Szabo, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 87–114.
 34. Stamp, L.; Day, R.; Yun, J. Allopurinol hypersensitivity: investigating the cause and minimizing the risk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016, 12, 235–242.
 35. Pillinger, M. H.; Mandell, B. F. (2020). Therapeutic approaches in the treatment of gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2020, 50, S24–S30.
 36. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wol, A.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 1991, 83, 757–766
 37. Salazar-Aranda, R.; Granados-Guzmán, G.; Pérez-Meseguer, J.; González, G.M.; Waksman de Torres, N. Activity of Polyphenolic Compounds against *Candida glabrata*. *Molecules* 2015, 20, 17903–17912
 38. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231–1237.

39. Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci. Technol.* 2005, 25, 726–732.
40. Adewusi, E.A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 2011, 77, 638–644.
41. Almada-Taylor, G.; Díaz-Rubio, L.; Salazar-Aranda, R.; Waksman de Torres, N.; Uranga-Solis, C.; Delgadillo-Rodríguez, J.; Ramos, M.A.; Padrón, J.M.; Hernández-Martínez, R.; Córdova-Guerrero, I. Biological Activities of Extracts from Aerial Parts of *Salvia pachyphylla* Epling Ex Munz. *Plants*. 2018, 7, 105.
42. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25, 1605–1612.
43. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* 2006, 25, 247–260.
44. Sanner, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 1999, 17, 57–61.
45. RSCB PDB Protein Data Bank. Available online: <https://www.rcsb.org/> (accessed on 1 August 2019).
46. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Autodock 4 and AutoDock Tools 4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, 16, 2785–2791.
47. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 2017, 7, 42707.
48. Puratchikody, A.; Doble, M. Antinociceptive and antiinflammatory activities and QSAR studies on 2-substituted-4,5-diphenyl-1H-imidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 1083–1090.
49. Huang, H.; Tong, T.T.; Yau, L.F.; Chen, C.Y.; Mi, J.N.; Wang, J.R.; Jiang, Z.H. LC-MS based sphingolipidomic study on A549 human lung adenocarcinoma cell line and its taxol-resistant strain. *BMC Cancer* 2018, 18, 799.
50. Mohan, C.D.; Srinivasa, V.; Rangappa, S.; Mervin, L.; Mohan, S.; Paricharak, S.; Baday, S.; Li, F.; Shanmugam, M.K.; Chinnathambi, A.; et al. Trisubstituted-imidazoles induce

- apoptosis in human breast cancer cells by targeting the oncogenic PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *PLoS ONE* 2016, 11, e0153155.
51. Dake, S.A.; Kharat, K.R.; Yadav, A.R.; Kendrekar, P.S.; Pawar, R.P. In-vitro antiproliferative activity study of 2,4,5-triphenyl-1H-imidazole derivatives. *J. Org. Inorg. Chem.* 2017, 3, 5.
 52. Lopes, M.S.; de Andrade Sena, C.F.; Silva, B.L.; de Souza, C.M.; Ramos, J.P.; Cassali, G.D.; de Souza-Fagundes, E.M.; Alves, R.J.; de Oliveira, M.C.; de Oliveira, R.B. Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2015, 15, 206–216.
 53. Singh, P.; Kumar, R.; Tiwari, S.; Khanna, R.S.; Tewari, A.K.; Khanna, H.D. Docking, synthesis and evaluation of antioxidant activity of 2,4,5-triaryl imidazole. *Clin. Med. Biochem. Open Access* 2015, 1, 105.
 54. Foti, M.C. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007, 59, 1673–1685.
 55. Hemalatha, S.; Naveena, P.A. Synthesis and biological evaluation of substituted diphenyl imidazole derivatives. *World J. Pharm. Res.* 2015, 4, 1321–1333.
 56. Zheng, L.; Zhao, M.; Xiao, C.; Zhao, Q.; Su, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chem.* 2016, 192, 288–294.
 57. Mateo, J.L.; Bosch, P.; Lozano, A.E. Reactivity of Radicals derived from dimethylanilines in acrylic photopolymerization. *Macromolecules* 1994, 27, 7794–7799.
 58. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* 1999, 7, 297–307.
 59. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 9031–9035.
 60. Bartolucci, C.; Perola, E.; Pilger, C.; Fels, G.; Lamba, D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins* 2001, 42, 182–191.
 61. Zhao, X.-J.; Gong, D.-M.; Jiang, Y.-R.; Guo, D.; Zhu, Y.; Deng, Y.-C. Multipotent AChE and BACE-1 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and

- bio-analysis of 7-amino-1,4-dihydro-2H-isoquin-3-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 138, 738–747.
62. Mughal, E.U.; Sadiq, A.; Murtaza, S.; Rafique, H.; Zafar, M.N.; Riaz, T.; Khan, B.A.; Hameed, A.; Khan, K.M. Synthesis, structure-activity relationship and molecular docking of 3-oxoaurones and 3-thioaurones as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25, 100–106.
 63. De la Torre, P.; Astudillo Saavedra, L.; Caballero, J.; Quiroga, J.; Alzate-Morales, J.H.; Gutiérrez Cabrera, M.; Trilleras, J. A novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis and evaluation of (E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-heteroarylacrylonitriles. *Molecules* 2012, 17, 12072–12085.
 64. Okamoto, K.; Eger, B.T.; Nishino, T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: Crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008, 27, 888–893.
 65. Matsumoto, K.; Okamoto, K.; Ashizawa, N.; Nishino, T. FXY-051: A novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, 336, 95–103.
 66. Lin, S.; Zhang, G.; Liao, Y.; Pan, J. Inhibition of chrysin on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 81, 274–282.
 67. Galindo-Hernández, O.; Córdova-Guerrero, I.; Díaz-Rubio, L.J.; Pulido-Capiz, A.; Díaz-Villanueva, J.F.; Castañeda-Sánchez, C.Y.; Serafín-Higuera, N.; García-González, V. Protein translation associated to PER Karm is a new target for regulation of meta inflammation: A connection with hepatocyte cholesterol. *J. Cell. Biochem.* 2019, 120, 4158–4171.
 68. Díaz-Rubio, L.; Hernández-Martínez, R.; Estolano-Cobián, A.; Chávez-Velasco, D.; Salazar-Aranda, R.; Waksman de Torres, N.; Rivero, I.A.; García-González, V.; Ramos, M.A.; Córdova-Guerrero, I. Synthesis, biological evaluation and docking studies of chalcone and flavone analogs as antioxidants and acetylcholinesterase inhibitors. *Appl. Sci.* 2019, 9, 410.
 69. Park, J.H.; Liu, Y.; Lemmon, M.A.; Radhakrishnan, R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* 2012, 448, 417–423.
 70. Aertgeerts, K.; Skene, R.; Yano, J.; Sang, B.-C.; Zou, H.; Snell, G.; Jennings, A.; Iwamoto, K.; Habuka, N.; Hirokawa, A.; et al. Structural analysis of the mechanism of

- inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 18756–18765.
71. Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M.R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D.S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006, 366, 2–16.
 72. Iqbal, N.; Iqbal, N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: Overexpression and therapeutic implications. *Mol. Biol. Int.* 2014, 2014, 852748.
 73. Guda, R.; Kumar, G.; Korra, R.; Balaji, S.; Dayakar, G.; Palabindela, R.; Myadaraveni, P.; Yellu, N. R.; Kasula, M. EGFR, HER2 target based molecular docking analysis, in vitro screening of 2,4,5-trisubstituted imidazole derivatives as potential anti-oxidant and cytotoxic agents. *J. Photochem. Photobiol. BBiol.* 2017, 176, 69–80.
 74. Butler, K.T.; Luque, F.J.; Barril, X. Toward accurate relative energy predictions of the bioactive conformation of drugs. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, 601–610.
 75. Montemurro, F.; Valabrega, G.; Aglietta, M. Lapatinib: A dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase activity. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007, 7, 257–268.
 76. , A.V.; Kutov, D.C.; Katkova, E.V.; Sulimov, V.B. Combined docking with classical force field and quantum chemical semiempirical method PM7. *Adv. Bioinform.* 2017, 2017, 7167691.
 77. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46, 3–26.

APÉNDICES

10. APÉNDICES

10.1 Técnicas experimentales

Todos los reactivos empleados en la metodología sintética, así como los solventes utilizados a lo largo del trabajo experimental, fueron sometidos a purificaciones previas a su uso.

La determinación de los puntos de fusión de los compuestos se realizó en un equipo SMP11 (Stuart).

En los ensayos de determinaciones de espectros UV-Vis, se emplearon diferentes modelos de espectrofotómetros de UV-Vis: el modelo Genesys 20 (Thermo Scientific) se utilizó en los ensayos antioxidantes; los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa se realizaron en un lector de microplatos Multiskan™FC (Thermo Scientific); y un equipo lector de microplatos modelo PowerWave™ (BioTek) se empleó en los ensayos de actividad antiproliferativa.

La espectroscopia de Infrarrojo (FTIR) se llevó a cabo en un equipo SpectrumOne (Perkin-Elmer).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron en un equipo espectrómetro Bruker modelo Advance DPX de 400 MHz. Los desplazamientos químicos (representados con δ) son presentados utilizando como estándar interno al tetrametilsilano (TMS) como $\delta = 0.00$. La caracterización por cromatografía de gases

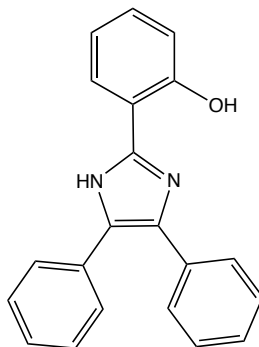
acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se llevó a cabo en los equipos TRACE 1310 (CG) y ISQ LT (EM), ambos de Thermo Scientific.

La purificación de las moléculas sintetizadas se llevó a cabo mediante cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice Sigma-Aldrich de tamaño de poro 60 Å (malla 230-400). Para corroborar el grado de pureza alcanzado, se empleó cromatografía de capa fina (CCF) en placas de aluminio con gel de sílice y revelador fluorescente (Merck). Las placas fueron reveladas bajo luz UV a 254nm.



IMI-SAL, 1H-NMR

6.830
6.832
6.849
6.867
6.869
7.093
7.113
7.192
7.195
7.213
7.231
7.234
7.254
7.293
7.296
7.312
7.329
7.348
7.359
7.363
7.370
7.525
7.528
7.544
7.548
7.684
7.686
7.704



Current Data Parameters
NAME IMI-SAL
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20111110
Time_ 17.27
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8250.825 Hz
FIDRES 0.125898 Hz
AQ 3.9715316 sec
RG 362
DW 60.600 usec
DE 6.00 usec
TE 683.2 K
D1 1.00000000 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 400.1300119 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

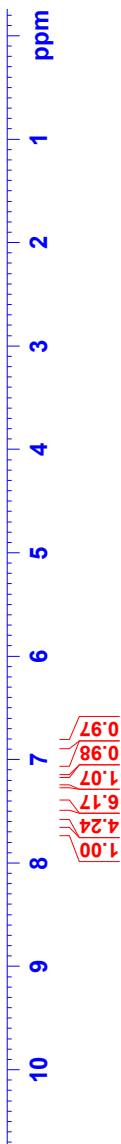


Figure S1. ¹H-NMR Compound 2.

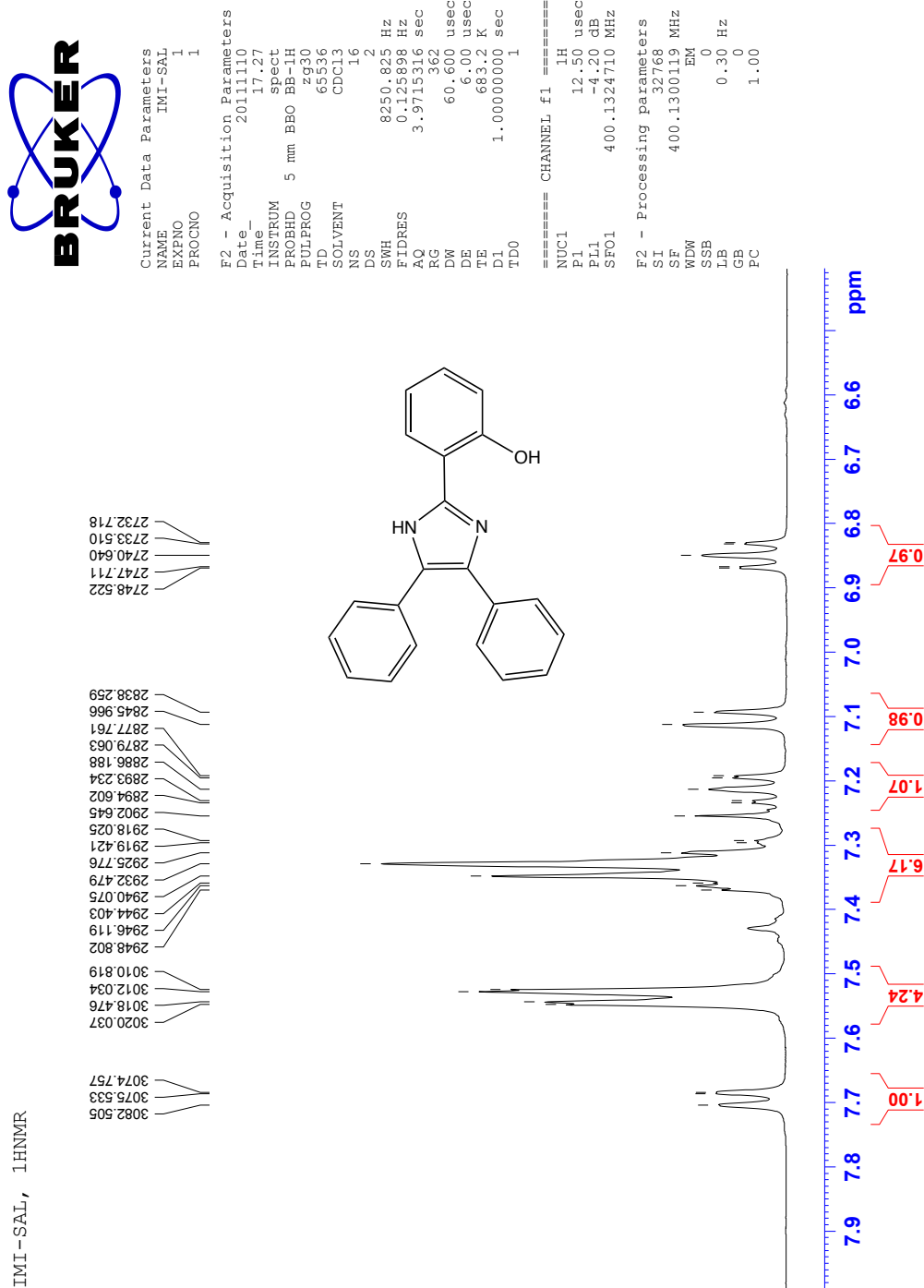


Figure S2. ¹H-NMR extension Compound 2.

IMI-SAL, ¹³CNMR

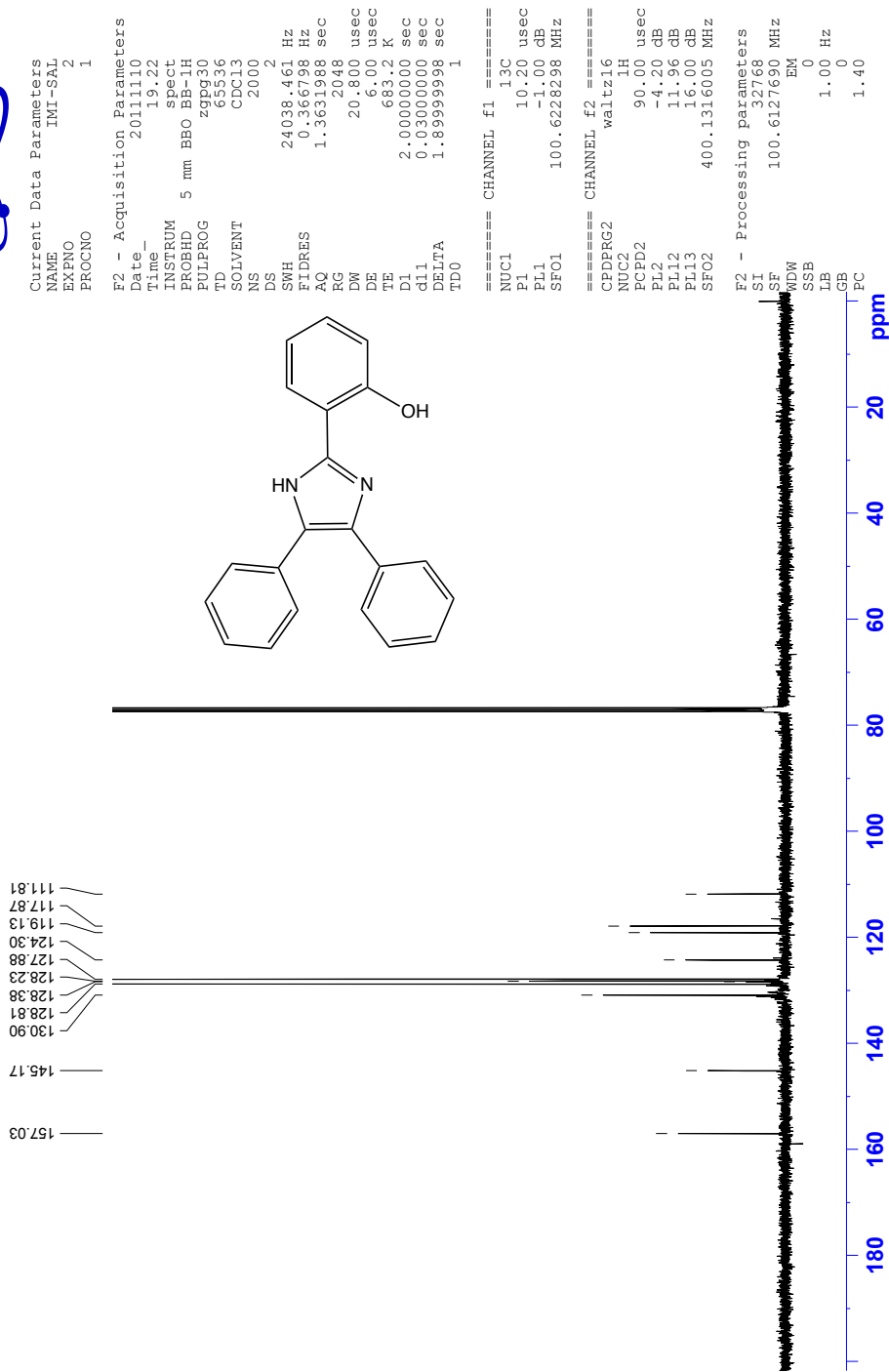
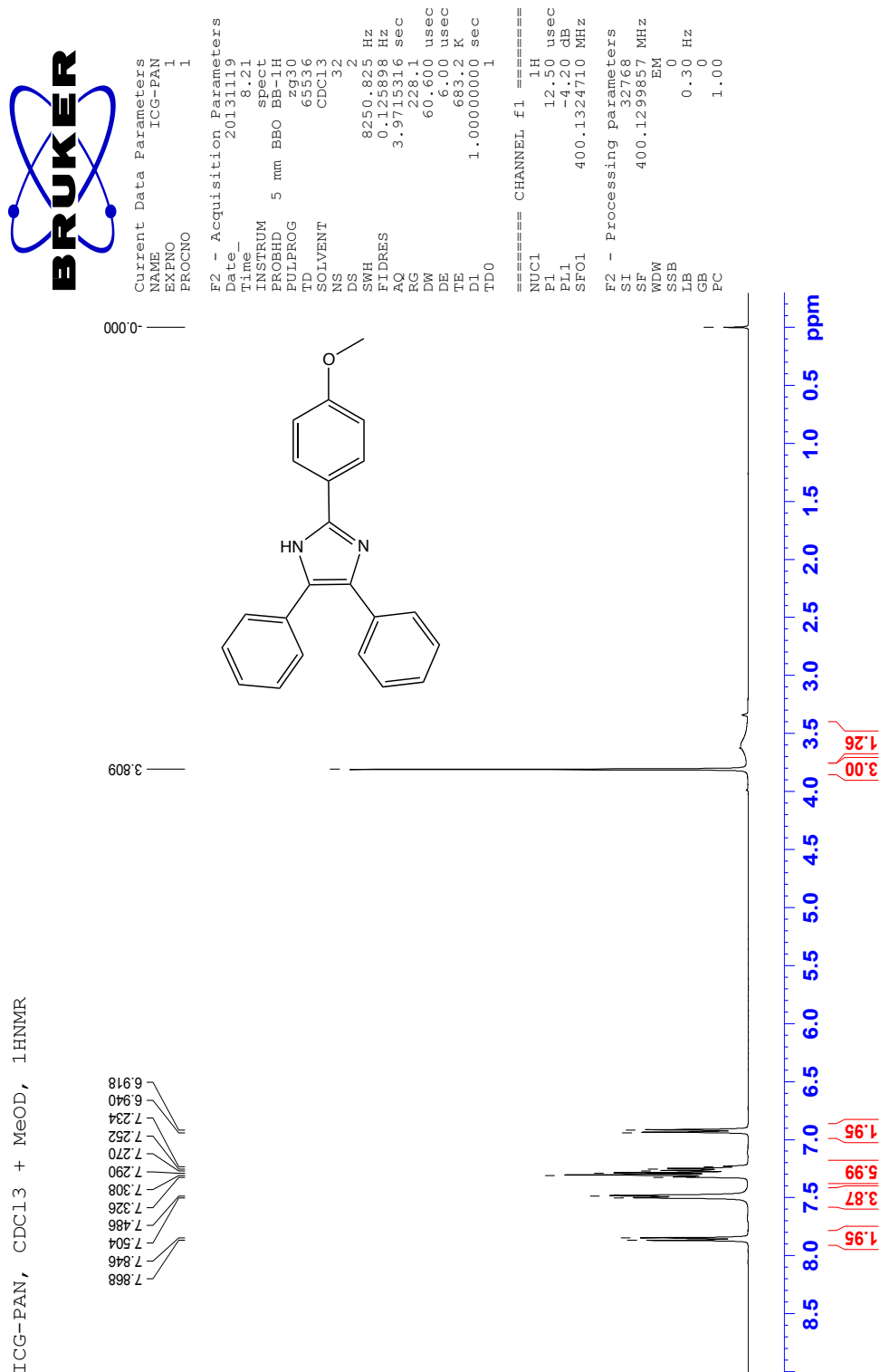


Figure S3. ¹³C-NMR Compound 2.



ICG-PAN, ¹³CNMR



Figure S5. ¹³C-NMR Compound 4.

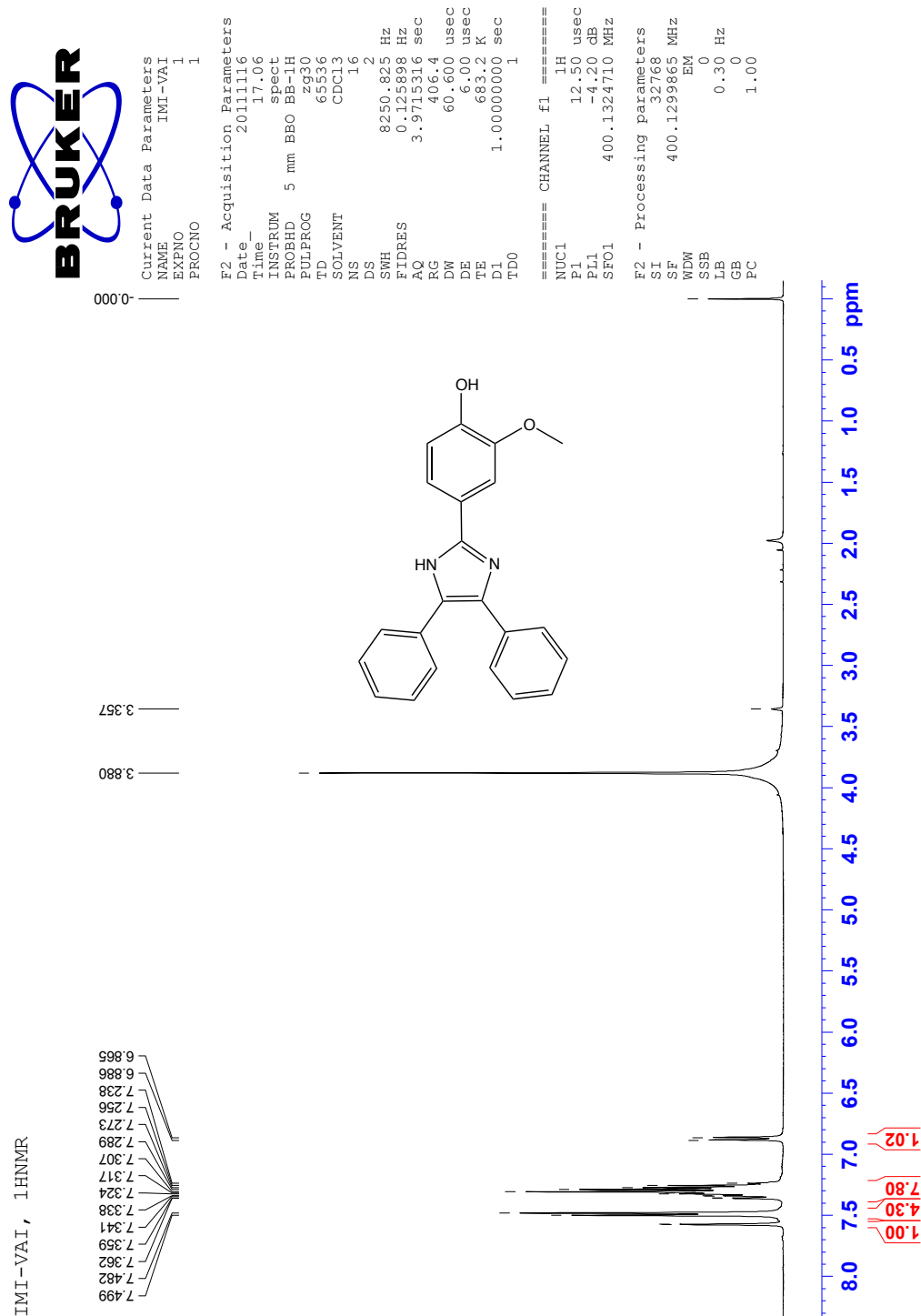


Figure S6. ¹H-NMR Compound 7.

IMI-VAl, ¹³CNMR

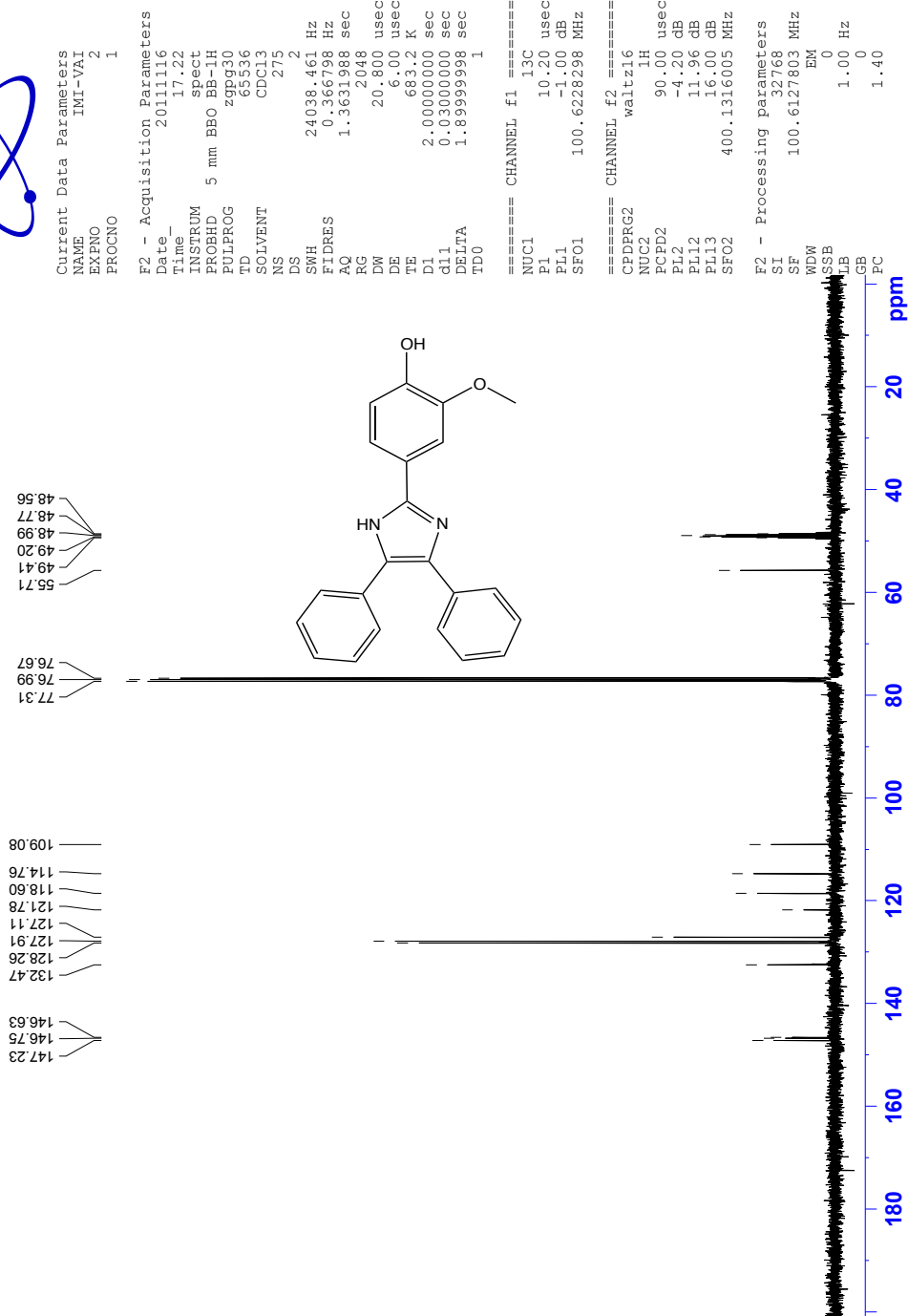


Figure S7. ¹³C-NMR Compound 7.

ICG-DMB, CDCl₃ + MeOD, ¹H NMR

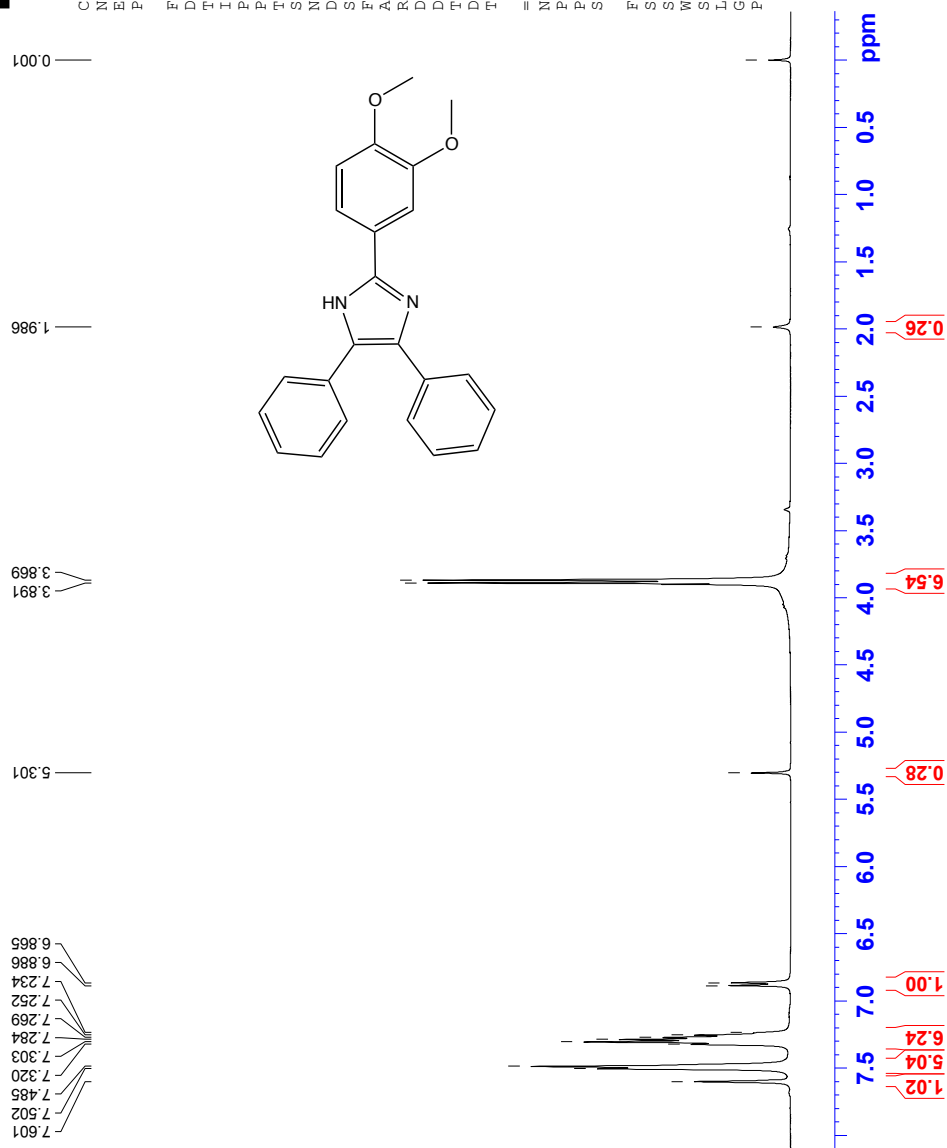


Current Data Parameters
NAME ICG-DMB
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131119
Time_ 10.43
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 161.3
DM 60.600 usec
DE 6.00 usec
TE 683.2 K
D1 1.00000000 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 400.1299845 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



ICG-DMB, ¹³C-NMR

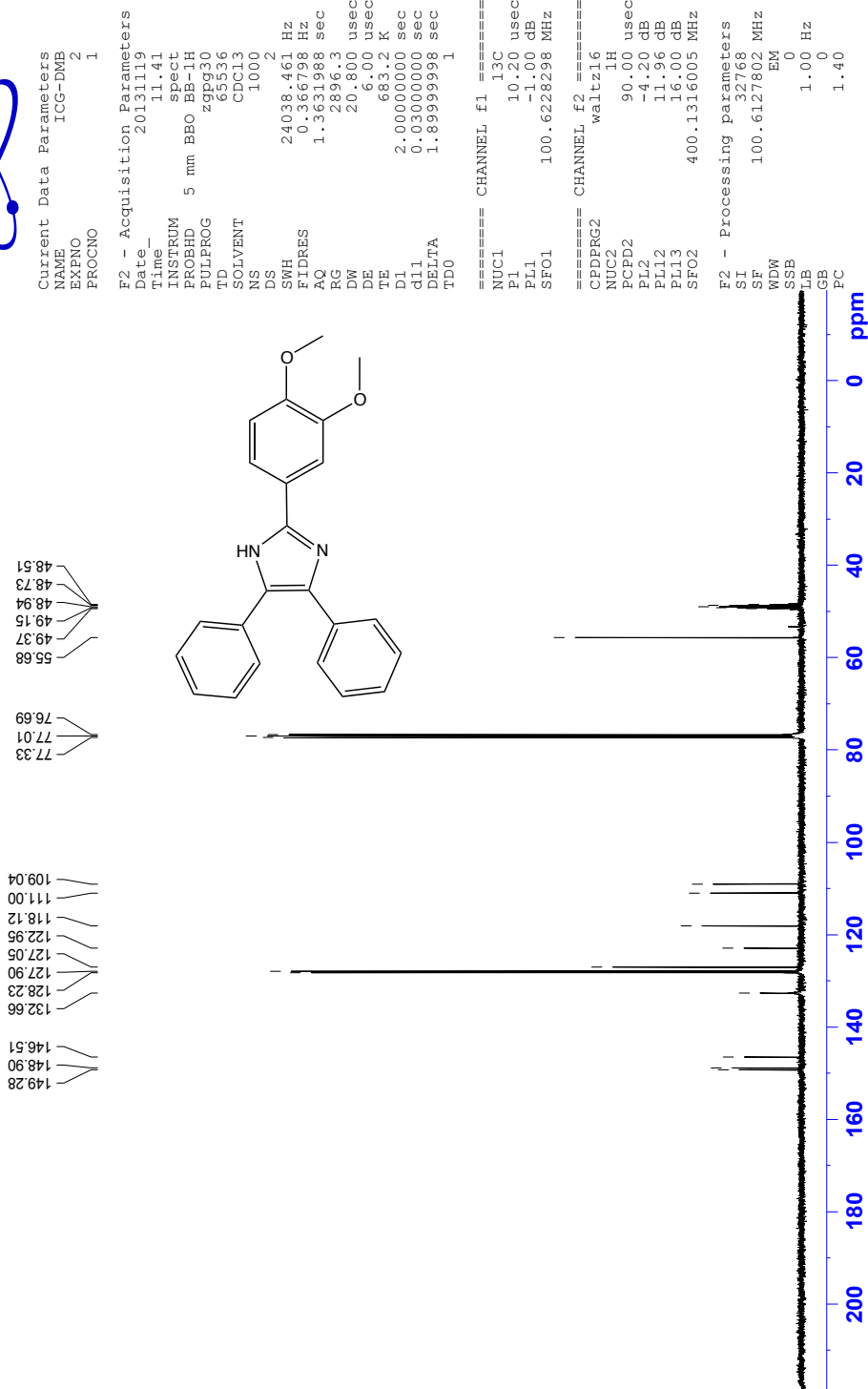


Figure S9. ¹³C-NMR Compound 8.

Figure S8. ¹H-NMR Compound 8.

IMI-OCB, 1H NMR



```

Current Data Parameters
NAME      IMI-OCB
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130514
Time      15.59
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          1.00000000 sec
TD0         1

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

F2 - Processing parameters
SI          32768
SF          400.1300118 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          0.30 Hz
GB          0
PC          1.00
  
```

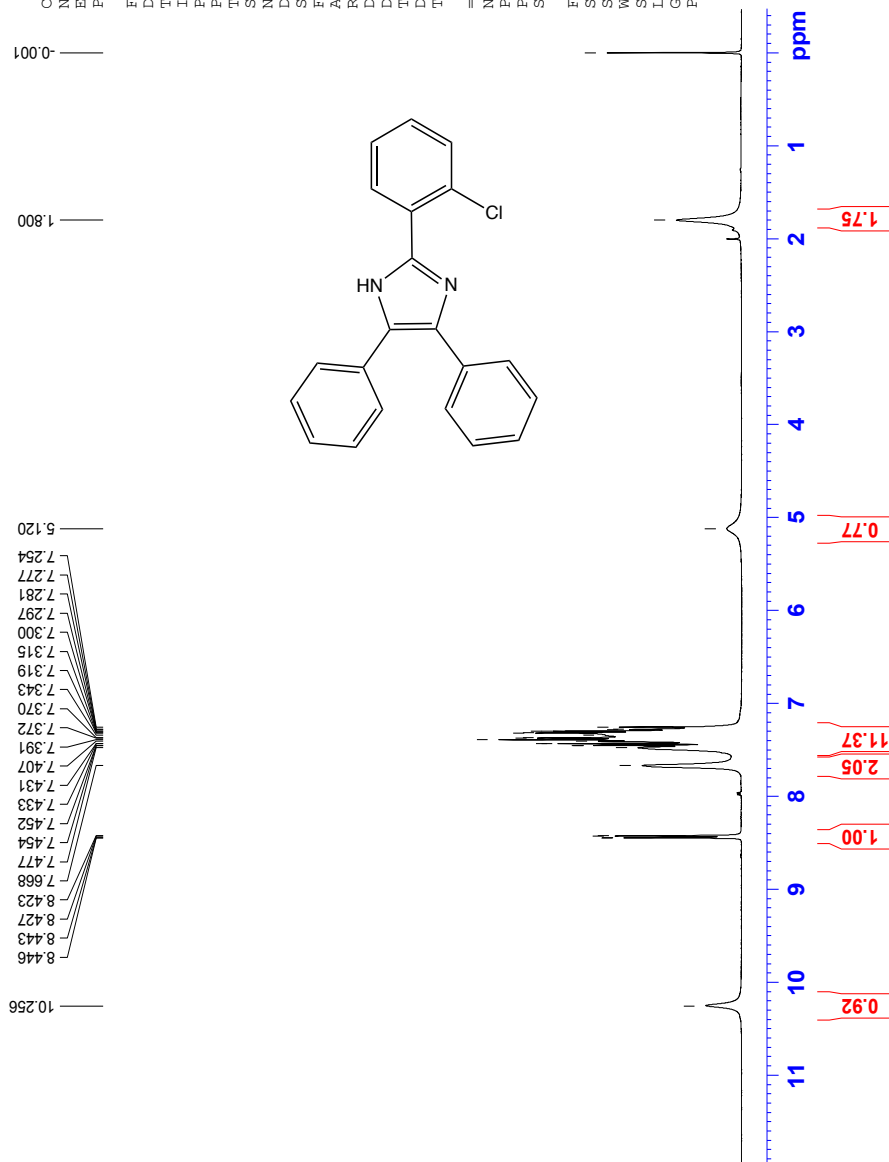


Figure S10. ¹H-NMR Compound 9.

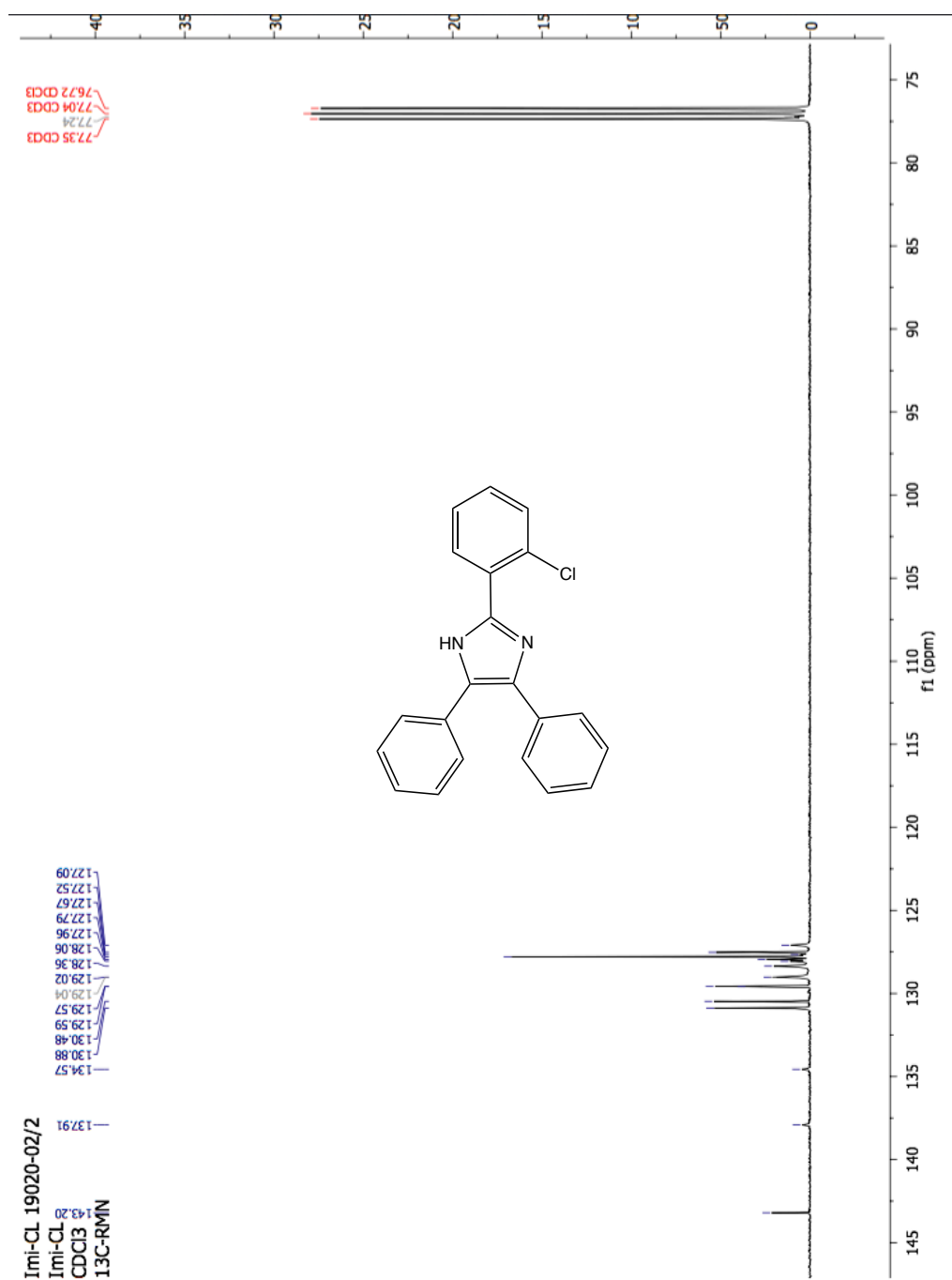


Figure S11. ¹³C-NMR Compound 9.



IMI-PNB, ¹³CNMR

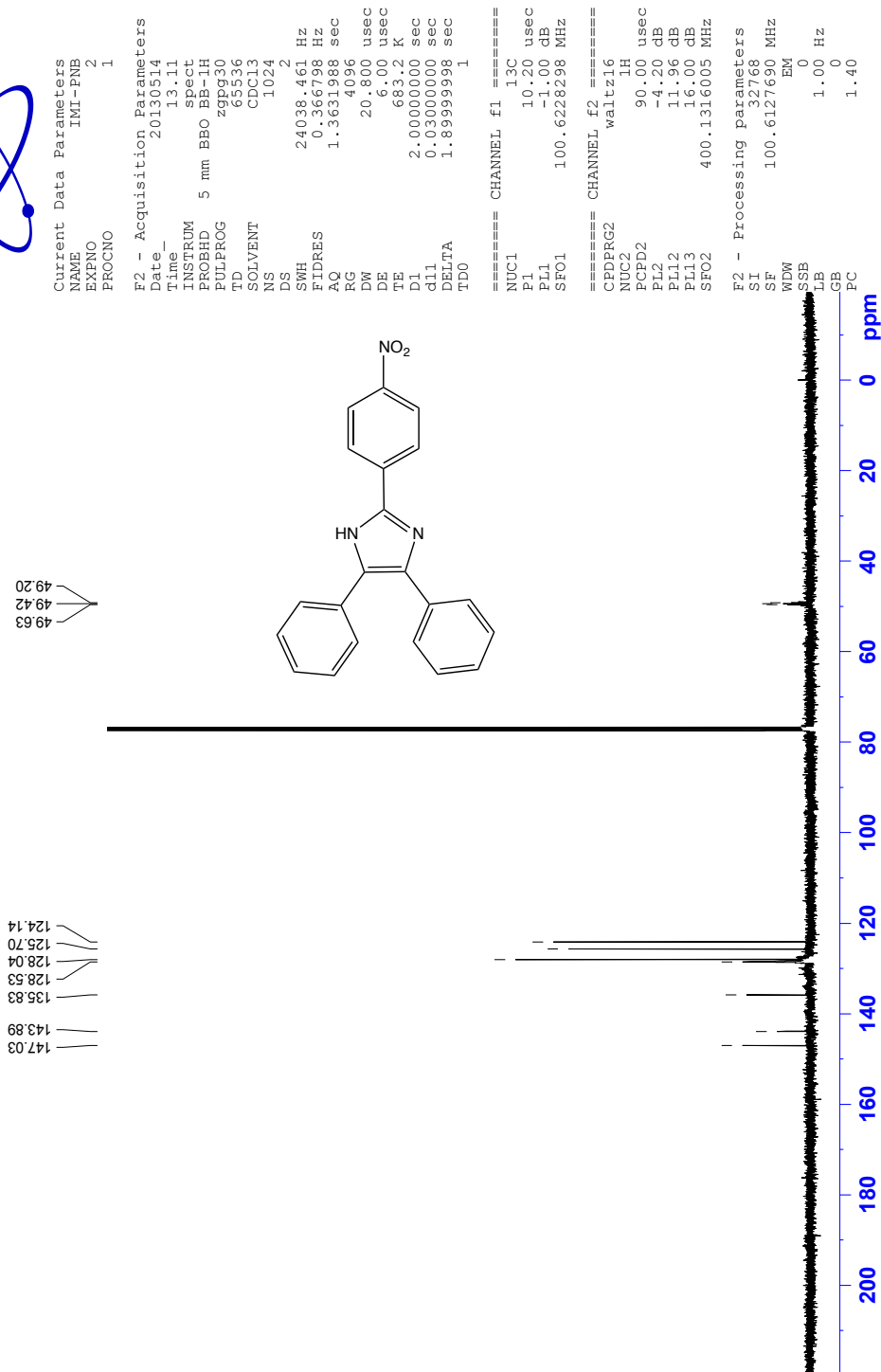


Figure S13. ¹³C-NMR Compound 11.