

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Diseño de derivados del imidazol como inhibidores de NADH-fumarato reductasa  
de *Trypanosoma cruzi***

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Doctora en Biología Experimental

**PRESENTA**

M. en C. Linda Verónica Campos Fernández  
Matrícula: 2183802059

**COMITÉ DE TUTORES:**

**Codirectoras de tesis**

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Dra. Catalina Soriano Correa

**Asesora**

Dra. Edith Cortés Barberena

Iztapalapa, Ciudad de México, 27 de julio del 2022.

## Declaración de originalidad

La que suscribe **Linda Verónica Campos Fernández**, alumna del posgrado **Doctorado en Biología Experimental**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "**Diseño de derivados del imidazol como inhibidores de NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi***",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante **el comité de Posgrado en Biología Experimental** para lo obtención del grado de **Doctora en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **11 de julio del 2022**.

Atentamente



---

**Linda Verónica Campos Fernández**

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro **001482**, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave **DAFCYT-2003IDPTNNN0020**. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **727184**.

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada:

“Diseño de derivados del imidazol como inhibidores de NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*”, que presentó

Linda Verónica Campos Fernández

El día 27 de julio del año 2022.

**Dra. Edith Cortés Barberena (Presidente)**

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
Correo electrónico: cobe@xanum.uam.mx

**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez (Secretario)**

Adscripción: Profesor-Titular C. Depto. Ciencias de la Salud  
Correo electrónico: jcap@xanum.uam.mx

**Dr. Francisco Hernández Luis (Vocal)**

Adscripción: Facultad de Química, UNAM.  
Correo electrónico: franher@unam.mx

**Dra. María Luisa Roxana Licona Ibarra (Vocal)**

Adscripción: Profesora Investigadora del Departamento de Fisicomatemáticas de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP  
Correo electrónico: maria.licona@correo.buap.mx, liconamx@yahoo.com



## MIEMBROS COMITÉ DE TUTORES

### CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

e-mail: arom@xanum.uam.mx

Teléfono: 5804-6480

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de CBS, Departamento de Ciencias de la Salud

### CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Catalina Soriano Correa

e-mail: csorico@comunidad.unam.mx

Teléfono: 55736333

Adscripción: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Área de Química Computacional y Modelado Molecular de la carrera de QFB.

### ASESORA

Dra. Edith Cortés Barberena

e-mail: cobe@xanum.uam.mx

Teléfono: 5804-6480.

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de CBS, Departamento de Ciencias de la Salud

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, con número de apoyo 727184.

Agradezco a la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la asignación de tiempo de cómputo en la supercomputadora (Miztli, LANCAD-UNAM-DGTIC-203).

Este proyecto contó con el financiamiento económico otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN230419) de la DGAPA-UNAM.

Esta tesis se realizó en el Área de Química Computacional y Modelado Molecular de la FES Zaragoza-UNAM, en el Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM Iztapalapa, en el Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM-campus Morelos y en el Laboratorio 4 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la FES Zaragoza-UNAM.

Agradezco a mi comité tutorial por sus enseñanzas, tiempo, disponibilidad y apoyo, que han sido fundamentales para la conclusión de este proyecto.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

*A mi mamá, Norma Laura Fernández Camargo*

*Todo es por ti y para ti. Te amo eternamente.*

*A mi abuelita Esperancita (q. e. p. d.) y a mi abuelito Miguel (q. e. p. d.).*

*Han sido un gran impulso en mi vida y mis referentes para nunca dejarme caer.*

*Siempre los llevaré en mi mente y mi corazón.*

*GNZ, te agradezco infinitamente por tomarme de la mano cuando me sentía sin rumbo.*

*Cambiaste mi vida, y sin ti, no sería nada de la persona que ahora soy. Gracias por nunca soltarme. Gracias por tu cariño. Gracias por tu amistad.*

*Eli, muchas gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme y por comprenderme.*

*Gracias por tanto. Gracias por todo.*

*Agradezco a mi padre, mis hermanos y mi cuñada por motivarme siempre. Los amo*

*Agradezco a mis tíos, primas, primos y sobrinos por darme alegría. Gracias por ser mi familia.*

*Agradezco a mis amigas PAJUM y MUDA por todo lo vivido.*

## Resumen

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. El benznidazol y el nifurtimox son fármacos que se han utilizado para su tratamiento; sin embargo, tienen efectos colaterales en tratamientos a largo plazo. La NADH-fumarato reductasa es una potencial diana farmacológica, debido a que es esencial para la supervivencia del parásito y no se encuentra en humanos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue diseñar a través de métodos computacionales una familia de moléculas derivadas del imidazol, caracterizar su estructura electrónica, propiedades fisicoquímicas e interacciones intermoleculares con la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*, con el propósito de seleccionar a la molécula con menor toxicidad y con potencial efecto terapéutico como inhibidora enzimática. Los descriptores químico-cuánticos permitieron seleccionar a las moléculas con las mejores propiedades fisicoquímicas y la menor toxicidad. Mediante estudios de modelado por homología se obtuvo una estructura tridimensional de alta calidad de la NADH-fumarato reductasa. Se comprobó que las moléculas de agua no tienen influencia en la interacción entre el fumarato y la NADH-fumarato reductasa. Asimismo, se identificaron las principales interacciones por puentes de hidrógeno para el fumarato en NADH, Lys172 y Arg89; así como, las interacciones hidrofóbicas en Phe479, Thr174, Met63. Finalmente, se encontró que las moléculas S3-8, S2-8 y S1-8 podrían ser potenciales inhibidores de la NADH-fumarato reductasa.

## Abstract

American Trypanosomiasis is a parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Benznidazole and nifurtimox are drugs that have been used for its therapy; nevertheless, they have collateral effects in long-term treatments. NADH-fumarate reductase is a potential pharmacological target since it is essential for the survival of parasites and is not found in humans. Therefore, the aim of this work was to design through computational methods a family of new molecules derived from imidazole, to characterize their electronic structure, physicochemical properties, and intermolecular interactions with the enzyme NADH-fumarate reductase of *Trypanosoma cruzi*, with the purpose of selecting the molecule with lower toxicity and potential therapeutic effect as an enzymatic inhibitor. The quantum-chemical descriptors allowed us to select the molecules with the best physicochemical properties and lowest toxicity. A high-quality three-dimensional structure of NADH-fumarate reductase was obtained by homology modeling studies. Water molecules do not have an influence in the interaction between fumarate and NADH-fumarate reductase. The main hydrogen bonding interactions for fumarate were identified in NADH, Lys172 and Arg89; while hydrophobic interactions in Phe479, Thr174, Met63. Finally, it was found that the molecules S3-8, S2-8 and S1-8 could be potential inhibitors of NADH-fumarate reductase.

## Índice general

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>Tripanosomiasis Americana</b>	<b>3</b>
<b>Imidazoles</b>	<b>9</b>
<b>Benznidazol</b>	<b>11</b>
<b>NADH-fumarato reductasa</b>	<b>14</b>
<b>Química computacional y su relación en el diseño de fármacos</b>	<b>17</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>19</b>
<b>METODOLOGÍA: SECCIÓN TEÓRICA</b>	<b>21</b>
<b>Parámetros farmacocinéticos y predicción toxicológica</b>	<b>21</b>
<b>Cálculos de la Estructura Electrónica</b>	<b>22</b>
<i>Afinidad Protónica (AP)</i>	23
<i>Descriptores de reactividad global: dureza química (<math>\eta</math>),</i>	
<i>potencial de ionización (<math>I</math>) e índice de electrofilia (<math>\omega</math>)</i>	23
<i>Índice de aromaticidad (<math>\Delta</math>)</i>	25
<i>Descriptor de estabilidad SESE</i>	25
<i>Cargas atómicas</i>	27
<i>Función condensada de Fukui</i>	28

<i>Isosuperficies de los Orbitales Moleculares Frontera HOMO y LUMO</i>	29
<b>Modelado por Homología</b>	<b>29</b>
<i>Selección de moldes y alineamiento estructural</i>	30
<i>Construcción del Modelo</i>	31
<i>Optimización del Modelo</i>	32
<b>Acoplamiento Molecular</b>	<b>32</b>
<i>Preparación de los ligandos y del receptor</i>	32
<i>Estudios de Acoplamiento</i>	33
<i>Validación del protocolo de acoplamiento (redocking)</i>	34
<i>Evaluación del papel de las moléculas de agua dentro del sitio de unión de NADH-fumarato reductasa</i>	34
<b>METODOLOGÍA: SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>36</b>
<b>Síntesis química</b>	<b>36</b>
<i>Síntesis de 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo</i>	36
<i>Síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo</i>	36
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: SECCIÓN TEÓRICA</b>	<b>37</b>
<b>Parámetros farmacocinéticos y predicción toxicológica</b>	<b>37</b>
<b>Cálculos de la estructura electrónica</b>	<b>44</b>
<i>Afinidad Protónica (AP)</i>	48
<i>Dureza química (<math>\eta</math>)</i>	49
<i>Potencial de ionización (I)</i>	51
<i>Índice de electrofilia (<math>\omega</math>)</i>	52
<i>Índice de aromaticidad (<math>\Delta</math>)</i>	54
<i>Descriptor de estabilidad SESE</i>	55
<i>Cargas atómicas</i>	56

<i>Función condensada de Fukui</i>	59
<i>Isosuperficies de los Orbitales Moleculares Frontera HOMO y LUMO</i>	63
<b>Modelado por Homología</b>	<b>66</b>
<i>Selección de moldes y alineamiento estructural</i>	66
<i>Construcción del Modelo</i>	69
<b>Acoplamiento Molecular</b>	<b>73</b>
<i>Formación del complejo Coenzima-FRD</i>	73
<i>Validación del protocolo de acoplamiento (Re-docking)</i>	75
<i>Validación del protocolo de acoplamiento de moléculas de agua dentro del sitio de unión de NADH-fumarato reductasa</i>	80
<i>Acoplamiento de moléculas de agua en el sitio de unión del complejo NADH-5299-fumarato</i>	83
<i>Estudio de acoplamiento Complejo-Ligando</i>	85
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>88</b>
<b>Síntesis química</b>	<b>88</b>
<i>Síntesis de 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo</i>	89
<i>Síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo</i>	91
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>94</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>95</b>
<b>PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>113</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fotografía de <i>Triatoma dimidiata</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas en México (2000-2017) .....	6
<b>Figura 3.</b> Estructuras de heterociclos nitrogenados con actividad biológica. ....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura del imidazol.....	10
<b>Figura 5.</b> Estructura del benznidazol .....	12
<b>Figura 6.</b> Reacciones enzimáticas de los <i>Trypanosomas</i> , en dirección inversa al Ciclo de Krebs. ....	16
<b>Figura 7.</b> Estructuras cabeza de serie.....	21
<b>Figura 8.</b> Estructuras derivadas del nitroimidazol seleccionadas para los cálculos del descriptor SESE, donde X es la fracción transmisora. ....	27
<b>Figura 9.</b> Estructuras del BNZL, moléculas de referencia y moléculas derivadas del nitroimidazol seleccionadas, de acuerdo con los resultados de los parámetros farmacocinéticos y de la predicción de toxicidad.....	42
<b>Figura 10.</b> Estructuras de moléculas derivadas del imidazol seleccionadas, de acuerdo con los resultados de los parámetros farmacocinéticos y de la predicción de toxicidad. ....	43
<b>Figura 11.</b> Geometrías de derivados de 2-nitroimidazol y 5-nitroimidazol, optimizadas a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	45
<b>Figura 12.</b> Geometrías de derivados de imidazol no nitrados, optimizadas a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	46
<b>Figura 13.</b> Función condensada de Fukui para derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.....	62

**Figura 14.** Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO, para los derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6–311+G(d,p) en fase acuosa..... 65

**Figura 15.** Alineamiento múltiple de secuencias para la proteína problema y moldes seleccionados. Los residuos que integran el sitio catalítico de FAD están resaltados en color verde, mientras que los residuos que integran el sitio catalítico de fumarato, están resaltados en amarillo..... 68

**Figura 16.** Modelos generados para: a) 1QJD (morado), b) 1KSU (azul), c) 5GLG (rojo), d) 1QO8 (verde). Los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) se calcularon con ProFit y la puntuación estadística DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) se calculó con MODELLER 9.21 ..... 69

**Figura 17.** Modelos seleccionados (magenta) comparados con sus respectivos moldes (azul): a) 1QJD vs el modelo 2735, b) 1KSU vs el modelo 5299, c) 5GLG vs el modelo 4560, d) 1QO8 vs el modelo 9109. Los modelos se generaron con MODELLER 9.21 ..... 71

**Figura 18.** Gráficos de Ramachandran para los modelos seleccionados: a) Modelo 2735 (1QJD), b) Modelo 5299 (1KSU), c) Modelo 4560 (5GLG), d) Modelo 9109 (1QO8)..... 72

**Figura 19.** a) Acoplamiento molecular de FAD-1QJD cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-2735 (azul), b) Acoplamiento molecular de FAD-1KSU cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-5299 (rojo), c) Acoplamiento molecular de FAD-5GLG cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-4560 (amarillo), y d) Acoplamiento molecular de FAD-1QO8 cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-9109 (magenta)..... 74

**Figura 20.** Localización espacial del FAD cristalizado (verde) superpuesto con los acoplamientos de: FAD-5299 (azul), FAD-1KSU (magenta), NADH-1KSU (amarillo) y NADH-5299 (rojo). ..... 76

**Figura 21.** a) Interacciones del complejo FAD-1KSU; b) Interacciones del complejo NADH-5299. Las líneas de puntos verdes ilustran las interacciones por puente de hidrógeno, y las líneas de puntos rojas muestran las interacciones hidrofóbicas. .... 78

**Figura 22.** La estructura cristalina de 1KSU no revela la presencia de moléculas de agua conservadas dentro del sitio de unión del fumarato. .... 81

**Figura 23.** Acoplamiento de moléculas de agua a los complejos: A) FAD-1KSU y B) FAD-1KSU-fumarato, donde las moléculas de agua están representadas en esferas rojas. .... 82

**Figura 24.** Acoplamiento de moléculas de agua a los complejos: A) NADH-5299 y B) NADH-5299-fumarato, donde las moléculas de agua están representadas en esferas rojas. .... 84

**Figura 25.** Acoplamiento molecular del complejo NADH-5299 con el fumarato, los ligandos seleccionados y las moléculas de referencia que conservan el sitio catalítico del fumarato. .... 86

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Parámetros farmacocinéticos y predicción de toxicidad para nitroimidazoles de referencia y moléculas cabeza de serie. ....	38
<b>Tabla 2.</b> Parámetros farmacocinéticos y predicción de toxicidad para derivados de imidazoles y nitroimidazoles. ....	39
<b>Tabla 3.</b> Descriptores químicos-cuánticos para moléculas de referencia y derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	47
<b>Tabla 4.</b> Cargas atómicas para derivados del imidazol y nitroimidazol a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.....	57
<b>Tabla 5.</b> Función condensada de Fukui para derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.....	60
<b>Tabla 6.</b> Criterios de Calidad Estructural .....	66
<b>Tabla 7.</b> Interacciones del complejo NADH-5299 con ligandos seleccionados. ....	87

## Índice de Gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Afinidades protónicas para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	48
<b>Gráfica 2.</b> Valores de dureza química ( $\eta$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	50
<b>Gráfica 3.</b> Valores de potencial de ionización ( $I$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	51
<b>Gráfica 4.</b> Valores de índice de electrofilia ( $\omega$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	53
<b>Gráfica 5.</b> Valores de índice de aromaticidad ( $\Delta$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa. ....	55

## Lista de Abreviaturas

- AP. Afinidad Protónica
- BLAST. Herramienta básica de búsqueda de alineación local (The Basic Local Alignment Search Tool)
- BNZ. Benznidazol
- CIE-10. Clasificación Internacional de Enfermedades
- DFT. Teoría de Funcionales de la Densidad (Density Functional Theory)
- DNA. Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
- DOPE. Energía de Proteína Optimizada Discreta (Discrete optimized protein energy)
- ESP. Potencial Electrostático (Electrostatic Potential)
- FAD. Flavín Adenín Dinucleótido
- FDA. Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)
- FRD. Fumarato reductasa
- HOMO. Orbital molecular ocupado de mayor energía (Highest Occupied Molecular Orbital)
- IR. Infra rojo
- LUMO. Orbital molecular desocupado de menor energía (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
- MTZ. Metronidazol

- NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido
- NCBI. Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
- NFX. Nifurtimox
- OMS. Organización Mundial de la Salud
- OPS. Organización Panamericana de la Salud
- PDB. (Protein Data Bank)
- P.f. Punto de fusión
- RMSD. Raíz de la desviación media cuadrática (Root-Mean-Square Deviation)
- SDH. Succinato deshidrogenasa
- SESE. Energía de estabilización por el efecto del sustituyente (Substituent Effect Stabilization Energy)
- *T. cruzi*. *Trypanosoma cruzi*

## INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes del mundo [WHO, 2022]. Se estima que aproximadamente entre 6 y 7 millones de personas están infectadas y menos del 1% recibe tratamiento [WHO, 2022 & 2015; DNDI, 2022; OPS, 2003], causando alrededor de 14 000 muertes anuales en las regiones endémicas [DNDI, 2022].

Esta enfermedad se transmite principalmente por la picadura de triatomíneos, pero también puede transmitirse de forma congénita, por trasplantes, transfusiones de sangre, entre otros [WHO, 2022; Izquierdo, 2021]. Los únicos fármacos aprobados por la OMS para su tratamiento son el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ), los cuales son efectivos si se administran al inicio de la infección; sin embargo, se ha reportado que en tratamientos largos su efectividad disminuye y su toxicidad aumenta, por lo cual su venta ha sido prohibida en la mayoría de los países [WHO, 2022; DNDI, 2022; Von Trompowsky, 2019; Ribeiro, 2020; Bern, 2015]. Dicha toxicidad se relaciona con la formación de radicales libres generados por la reducción del grupo nitro, la cual somete al parásito a un estrés oxidativo que provoca su muerte, pero al mismo tiempo, esta oxidación causa daños en las células humanas. No obstante, se ha reportado en la literatura que el efecto antichagásico del benznidazol no depende únicamente de la producción de radicales libres, ya que también actúa contra el parásito por otras rutas, por lo que su principal mecanismo de acción sigue siendo desconocido [Maya, 2007; Turrens, 1996; Merlino, 2014; Turrens, 2012]. Una de las rutas propuestas es la inhibición de la enzima NADH-fumarato reductasa [Turrens, 1996], debido a que dicha



enzima cataliza la reducción de fumarato a succinato, permitiendo así, que el succinato intervenga en la cadena de transporte de electrones y el parásito obtenga la energía necesaria para su supervivencia [Merlino, 2014; Turrens, 2012; Maya, 2007; Kim, 2018].

Estudios previos de la estructura electrónica, a niveles *ab initio* y de teoría de funcionales de la densidad (DFT), permitieron establecer un modelo teórico y un grupo farmacóforo [Campos-Fernández, 2017 & 2019], que se utilizaron para diseñar una familia de nuevas moléculas antichagásicas derivadas de nitroimidazoles. En dicho estudio, tres moléculas fueron sintetizadas y analizadas experimentalmente para evaluar su actividad biológica y toxicidad *in vitro* [Campos-Fernández, 2017]. Los resultados mostraron que las estructuras propuestas por los cálculos teóricos (M3 e ISO3) inhibieron el crecimiento parasitario *in vitro*, en las cepas CL-Brener y CL-14 de *Trypanosoma cruzi* y no presentaron citotoxicidad en macrófagos, por lo que estos resultados fueron utilizados como referencia para futuros diseños.

Dado que la Tripanosomiasis Americana es un importante problema de salud pública y ante la ausencia de fármacos para tratarla, es necesario encontrar nuevas estrategias terapéuticas basadas en dianas farmacológicas específicas, que conduzcan a un diseño racional de fármacos con mayor eficacia y menor toxicidad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue diseñar a través de métodos computacionales una familia de moléculas derivadas del imidazol, caracterizar su estructura electrónica, propiedades fisicoquímicas e interacciones intermoleculares con la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*, para seleccionar a la

molécula con menor toxicidad y potencial efecto terapéutico como inhibidora enzimática.

## **ANTECEDENTES**

### **Tripanosomiasis Americana**

La Tripanosomiasis Americana, también llamada enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este parásito es transmitido al humano y mamíferos principalmente por la picadura de triatomíneos infectados (conocidos como vinchucas o chinche besucona), los cuales se alimentan de sangre al picar zonas de la piel expuestas, como rostro y extremidades, para posteriormente, orinar o defecar cerca de la picadura. El ingreso de los parásitos al organismo inicia cuando la zona lesionada es frotada, arrastrando las heces u orina infectada al interior de la herida y, al mismo tiempo, a los ojos, boca o alguna lesión cutánea [WHO, 2022; DNDI, 2022]. Esta vía de transmisión es el motivo principal del aumento de la incidencia de la enfermedad de Chagas, debido a que existen cerca de 140 especies de triatomíneos en el mundo, de las cuales, 31 han sido identificadas en México, lo que lo coloca como el país con mayor número de vectores que la transmiten [UNAM, 2022; Centro Nacional de Programas Preventivos, 2019]. Por lo general, estos insectos pueden localizarse en grietas de paredes, orificios, tejados, corrales, tierra, debajo de piedras y adobe, de zonas rurales y suburbanas [WHO, 2022; DNDI, 2022].

En la Figura 1 se puede observar a la especie *Triatoma dimidiata*, la cual, es una de las especies con mayor tasa de infección, que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha transmitido el parásito *Trypanosoma cruzi* a más de 300 mil personas, incluyendo niños y adultos [WHO, 2022].



**Figura 1.** Fotografía de *Triatoma dimidiata* [WHO, 2022]

La enfermedad de Chagas también puede transmitirse por transfusión sanguínea y trasplante de órganos de donantes infectados, por leche materna, por vía transplacentaria, por accidentes de laboratorio y por alimentos contaminados. La transmisión por alimentos es considerada una de las transmisiones más graves y con mayor mortalidad, debido a que pueden infectarse simultáneamente varias personas [WHO, 2022].

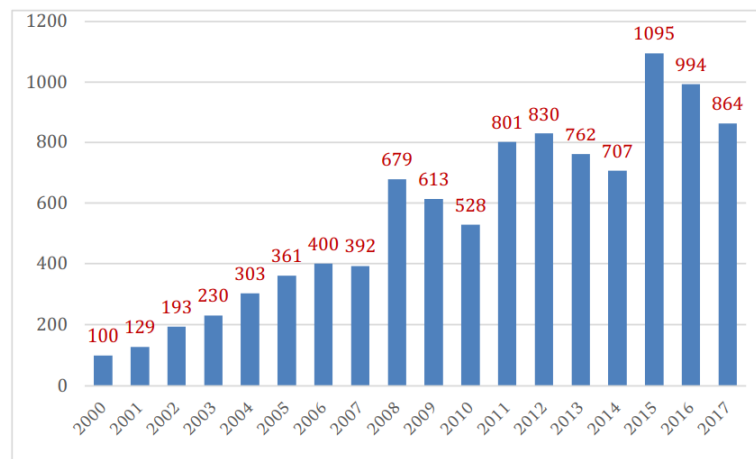
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), la enfermedad de Chagas está ubicada en el capítulo B57, la cual corresponde a la categoría de enfermedades ocasionadas por protozoos [OPS, 2003], y a partir del año 1993, el Banco Mundial la consideró como la enfermedad parasitaria más grave de América Latina [Vidal, 2000].

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud la ha clasificado dentro de la lista de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes del mundo, con presencia en 21 países de América Latina, como: Belice, Bolivia, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname, Uruguay, Venezuela, Argentina, Brasil, y México [WHO, 2022; DNDI, 2022], donde, estos últimos, ocupan los tres primeros lugares en relación al número de infectados [WHO, 2015]. Sin embargo, debido a la migración, la enfermedad de Chagas también se ha encontrado en otros países y continentes, como: Estados Unidos de Norteamérica (con aproximadamente 300,000 personas infectadas) [FDA, 2017], Canadá, Japón, Australia y diversos países europeos, con lo cual, se ha colocado como un importante problema de salud pública para el resto del mundo [WHO, 2022; DNDI, 2022; Von Trompowsky, 2019; Merlino, 2014].

Se estima que aproximadamente entre 6 y 7 millones de personas están infectadas, de las cuales, menos del 10% han sido diagnosticadas con la enfermedad, además, 7 de cada diez personas ignoran que podrían estar infectados y menos del 1% recibe tratamiento [WHO, 2022; OPS, 2022; DNDI, 2022; OPS, 2003; WHO, 2015], causando alrededor de 14 000 muertes anuales en las regiones endémicas, por lo que ha sido clasificada como la infección parasitaria que provoca el mayor número de muertes en dichas zonas [DNDI, 2022]. Asimismo, según los datos reportados por la Organización Panamericana de la Salud, tiene una incidencia de 30 000 nuevos casos por año en el Continente Americano [PanAmerican Health Organization], lo cual

repercute en un importante impacto económico, que, en el año 2015, fue de casi 450 millones de dólares tan solo en América Latina [Chuit, 2019].

En México, la enfermedad de Chagas afecta a más de un millón de personas [Rojo-Medina, 2018; UNAM, 2022 & 2019], y cada año se reportan aproximadamente entre quinientos y mil casos nuevos, destacando Veracruz como el estado con el primer lugar de incidencia a nivel nacional, lo cual incrementa de manera importante su perfil epidemiológico entre las enfermedades transmitidas por vector, como se muestra en la Figura 2 [Centro Nacional de Programas Preventivos, 2019; Secretaría de Salud, 2022].



**Figura 2.** Perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas en México (2000-2017) [Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2019].

Es importante mencionar que una gran cantidad de personas infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* no tienen síntomas manifiestos de la enfermedad, por lo que las cifras reportadas en los diferentes organismos de la salud no corresponden a

los casos reales. Lo anterior es debido a que la enfermedad está dividida en dos fases clínicas y un periodo de latencia de tiempo indeterminado [WHO, 2022; DNDI, 2022].

La primera fase (fase aguda) inicia desde que el parásito ingresa al organismo y puede extenderse de dos a 8 semanas después [WHO, 2022; Rojo-Medina, 2018]. En el desarrollo de esta fase, los parásitos circulan por el torrente sanguíneo en cantidades detectables y los síntomas suelen manifestarse como: edema subcutáneo, signo de Romaña, eritema, fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, vómito, dolor abdominal, malestar general, diarrea, dificultad para respirar, erupciones cutáneas e inflamación en nódulos y ganglios linfáticos [WHO, 2022 & 2015; DNDI, 2022; Rojo-Medina, 2018].

El periodo de latencia inicia después de la fase aguda y puede durar años o décadas. En este periodo, las personas infectadas no presentan manifestaciones clínicas y el parásito no es detectable para su diagnóstico en pruebas serológicas, debido a que dichos parásitos se alojan principalmente en músculo cardiaco y músculo digestivo, sin embargo, los pacientes que desarrollan esta fase, aún pueden transmitir la enfermedad por trasplante, transfusión o de manera vectorial [DNDI, 2022; WHO, 2015; Rojo-Medina, 2018].

Durante el periodo de latencia inicia la fase crónica, debido a que los parásitos alojados en los tejidos y músculos, ocasionan que del 30% al 40% de las personas infectadas sufran afectaciones cardiacas, como: insuficiencia cardiaca progresiva, arritmias, tromboembolia, aneurisma y muerte súbita en el 55 a 65 % de los pacientes, ocasionada por la destrucción del músculo cardíaco. Del mismo modo, hasta el 10% de las personas infectadas pueden sufrir afectaciones digestivas, como la inflamación

de esófago y colon [WHO, 2022 & 2015; DNDI, 2022; Rojo-Medina, 2018]. Recientemente, se ha reportado que las personas que padecen conjuntamente COVID-19 y enfermedad de Chagas, corren el riesgo de presentar síntomas graves de miocarditis, alteraciones cardíacas, accidentes cerebrovasculares y trombosis [WHO, 2022].

El tratamiento para la enfermedad de Chagas consta de dosificaciones orales con benznidazol y nifurtimox. Estos medicamentos son las únicas alternativas terapéuticas autorizadas por la OMS desde hace más de medio siglo y son eficaces casi al 100% si son administrados en la fase aguda, debido a que tienen mayor efecto cuando el parásito se encuentra en el torrente sanguíneo, que cuando se encuentra en tejidos y músculos, sin embargo, hasta el 40% de los pacientes tratados han presentado reacciones adversas a estas quimioterapias [WHO, 2022; DNDI, 2022; Rojo-Medina, 2018].

El nifurtimox es un nitrofurano que inicialmente fue fabricado con el nombre de Lampit por Bayer farmacéutica. Su mecanismo de acción está dado principalmente por la formación de radicales libres de oxígeno, producto de la reducción del grupo funcional nitro, los cuales inhiben la síntesis de ácidos nucleicos del parásito. Sin embargo, la producción de radicales libres también es tóxica para el ser humano, por lo tanto, el nifurtimox está contraindicado en personas embarazadas, con insuficiencia renal o hepática y con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos [WHO, 2022]. Debido a lo anterior, su venta fue prohibida en gran parte del mundo y sólo se recomienda su uso cuando el parásito muestra resistencia al tratamiento con benznidazol [WHO, 2022; Ribero, 2020; Rojo-Medina, 2018; Bern, 2018].

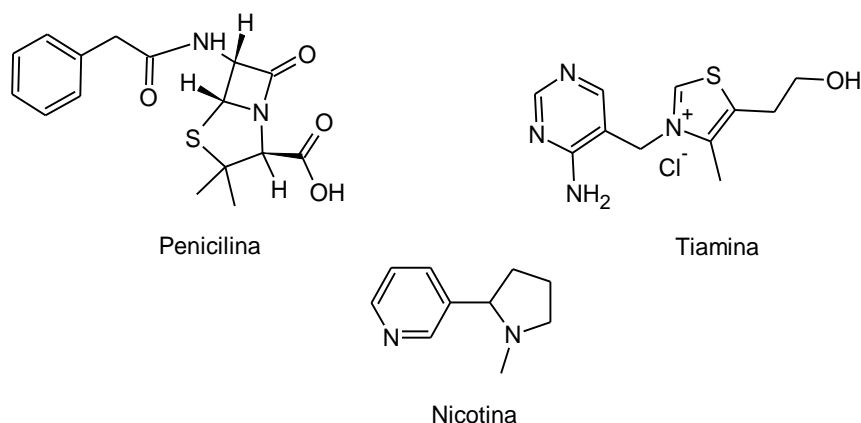
El benznidazol es un nitroimidazol que es fabricado por el Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco (de Brasil), por el Laboratorio Elea (de Argentina) y por Chemo Research, S. L. (de España) [Von Trompowsky, 2019; FDA, 2017]. Su acción está dada por diferentes rutas, las cuales tienen efecto sobre la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) del parásito *Trypanosoma cruzi*. Debido a que está reportado que tiene un margen terapéutico estrecho, está contraindicado en personas embarazadas por posible daño fetal, también en personas con insuficiencia renal o hepática y con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos [WHO, 2022; FDA, 2017]. Sin embargo, debido a los resultados de ensayos clínicos de seguridad y eficacia, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó en el 2017 al benznidazol como el primer medicamento en Estados Unidos de América para tratar a pacientes pediátricos de entre 2 y 12 años de edad infectados con *Trypanosoma cruzi*, lo que permitió mejorar el acceso a tratamientos oportunos [FDA, 2017].

## Imidazoles

Los compuestos heterociclos son estructuras de gran importancia en diversas ramas de la medicina, ingeniería, agricultura, química industrial y química medicinal [Hossain, 2018]. Dichos compuestos están definidos químicamente, como moléculas cíclicas (aromáticas o no aromáticas) que poseen dentro de su anillo uno o más átomos diferentes al carbono, los cuales, pueden ser el oxígeno, nitrógeno y azufre [Paquette, 1999; Morrison, 1998].

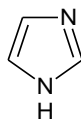


Diversos estudios han reportado que los heterociclos con átomos de nitrógeno dentro de su anillo, presentan mayor probabilidad de poseer actividad biológica de manera favorable [Hossain, 2018], puesto que pueden aceptar o donar fácilmente electrones y formar diversas interacciones intermoleculares débiles. Algunos ejemplos de estas moléculas son: la penicilina (antibiótico), tiamina (vitamina B1), reserpina (tranquilizante) y la nicotina (alcaloide del tabaco), entre otros [Morrison, 1998], como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructuras de heterociclos nitrogenados con actividad biológica.

El imidazol es un heterociclo aromático de cinco miembros, entre los cuales se encuentran dos átomos de nitrógeno (en posición 1, 3) y tres átomos de carbono (en posición 2, 4, 5), por lo que también es llamado 1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno o 1,3-diazol, como puede observarse en la Figura 4.



**Figura 4.** Estructura del imidazol

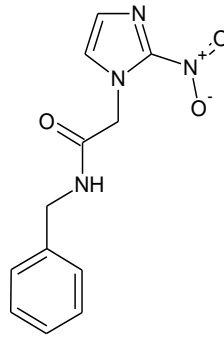
Es plano, altamente polar, soluble en agua y con propiedades de naturaleza anfótera, debido a que el nitrógeno N1 es considerado un sitio ácido, que posee una reactividad muy similar al pirrol, y el nitrógeno N3 es considerado un sitio básico, que posee una reactividad muy similar a la piridina, por lo que, cuando el imidazol actúa como ácido, posee un pKa de 14.5, y, por otro lado, cuando actúa como base posee un pKa de 7, aproximadamente. Estos nitrógenos son muy importantes, debido a que contribuyen con la existencia de dos tautómeros imidazoles, que son producto de la formación de enlaces covalentes que alterna el átomo de hidrógeno con ellos [Bhatnagar, 2011; Richaud 2011 & 2010; Paquette, 1999; Shalini, 2010].

Los imidazoles tienen diferentes propiedades terapéuticas, por lo que han sido diseñados múltiples derivados estructurales con gran importancia biológica. Algunos ejemplos son las moléculas con grupos funcionales de tipo bencimidazol, los cuales tienen actividad antiparasitaria y antiinflamatoria. Otros usos de algunos derivados del imidazol son: antineoplásicos, antifúngicos, inhibidores enzimáticos, antifiláricos, antivirales, antibacteriales, antiparasitarios, agentes antienvjecimiento, anticoagulantes, antivirales y anticancerígenos, entre otros [Bhatnagar, 2011; Shalini, 2010].

### **Benznidazol**

El benznidazol (N-bencil-2-nitro-1H-imidazol-1-acetamida) es un imidazol que posee en su estructura al grupo funcional nitro como sustituyente unido al C2 del anillo

imidazol y un sustituyente bencil acetamida unido al N1 del anillo imidazol, como se puede observar en la Figura 5.



**Figura 5.** Estructura del benznidazol

El benznidazol es el medicamento de primera línea en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, debido a que inhibe de manera efectiva la proliferación parasitaria de *Trypanosoma cruzi*, además de que tiene un mejor perfil de tolerancia, penetración en el tejido y eficacia que el nifurtimox; sin embargo, a pesar de que es considerado menos tóxico que el nifurtimox, hay evidencia de que también posee actividad genotóxica provocada por el grupo nitro y la posición de sus sustituyentes en el anillo imidazol, así como toxicidad embriofetal, efectos en el sistema nervioso, infertilidad masculina, reacciones cutáneas y manifestaciones hematológicas [Von Trompowsky, 2019; FDA, 2017].

Además, su principal mecanismo de acción es controversial, puesto que, durante muchos años, se consideró que su actividad estaba dada por el estrés oxidativo que ejerce sobre el parásito. No obstante, hay evidencias que indican que su efecto tripanocida no depende únicamente de la producción de radicales libres del

oxígeno y anión nitro, debido a que sus concentraciones son mucho menores a las producidas por otras estructuras nitroaromáticas y a la concentración mínima requerida para matar al *Trypanosoma cruzi* [Turrens, 2012; Maya, 2007].

Algunos de los posibles mecanismos de acción son: la formación de enlaces covalentes de sus metabolitos reducidos con algunas macromoléculas más importantes para el parásito, la actividad tripanocida por la presencia de INF- $\gamma$ , la inhibición de la síntesis de proteínas y la interrupción de la cadena de transporte de electrones por la inhibición de la enzima NADH-Fumarato reductasa [Ribeiro, 2020; Merlino, 2014; Turrens, 2012 & 1996; Maya, 2007].

Turrens y colaboradores [Turrens, 1996], analizaron la actividad tripanocida del benznidazol y otros nitroimidazoles (como el fexinidazol, misonidazol y megazol), así como de algunos benzimidazoles antihelmínticos (como el mebendazol, albendazol, cambendazol, fenbendazol, oxfendazol, parbendazol y el tiabendazol). Los resultados del estudio mostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas no es el principal mecanismo de acción del benznidazol, debido a que su inhibición está dada como resultado secundario del metabolismo del parásito. Asimismo, se observó que todas las moléculas derivadas del imidazol disminuyeron la proliferación parasitaria de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, e inhibieron la acción reductora de la enzima NADH-fumarato reductasa en ambos parásitos; sin embargo, dicha actividad disminuía cuando el anillo imidazol era sustituido por un anillo de tiazol. Este estudio permitió a los investigadores concluir que el anillo imidazol es la estructura responsable de la actividad tripanocida y se identificó por primera vez a la enzima NADH-fumarato reductasa como una diana farmacológica potencial y específica del benznidazol, ya

que no se encuentra en humanos ni en huéspedes mamíferos, por lo que su estudio es de gran interés.

### **NADH-fumarato reductasa**

La NADH-fumarato reductasa (también llamada fumarato reductasa dependiente de NADH o FRD dependiente de NADH) es una enzima que puede encontrarse en bacterias y otros parásitos, por lo que su actividad catalítica depende del microorganismo y de las condiciones anaeróbicas en las que se encuentre expuesta.

Debido a ello, se le ha dividido en dos tipos principales [Coustou, 2005]:

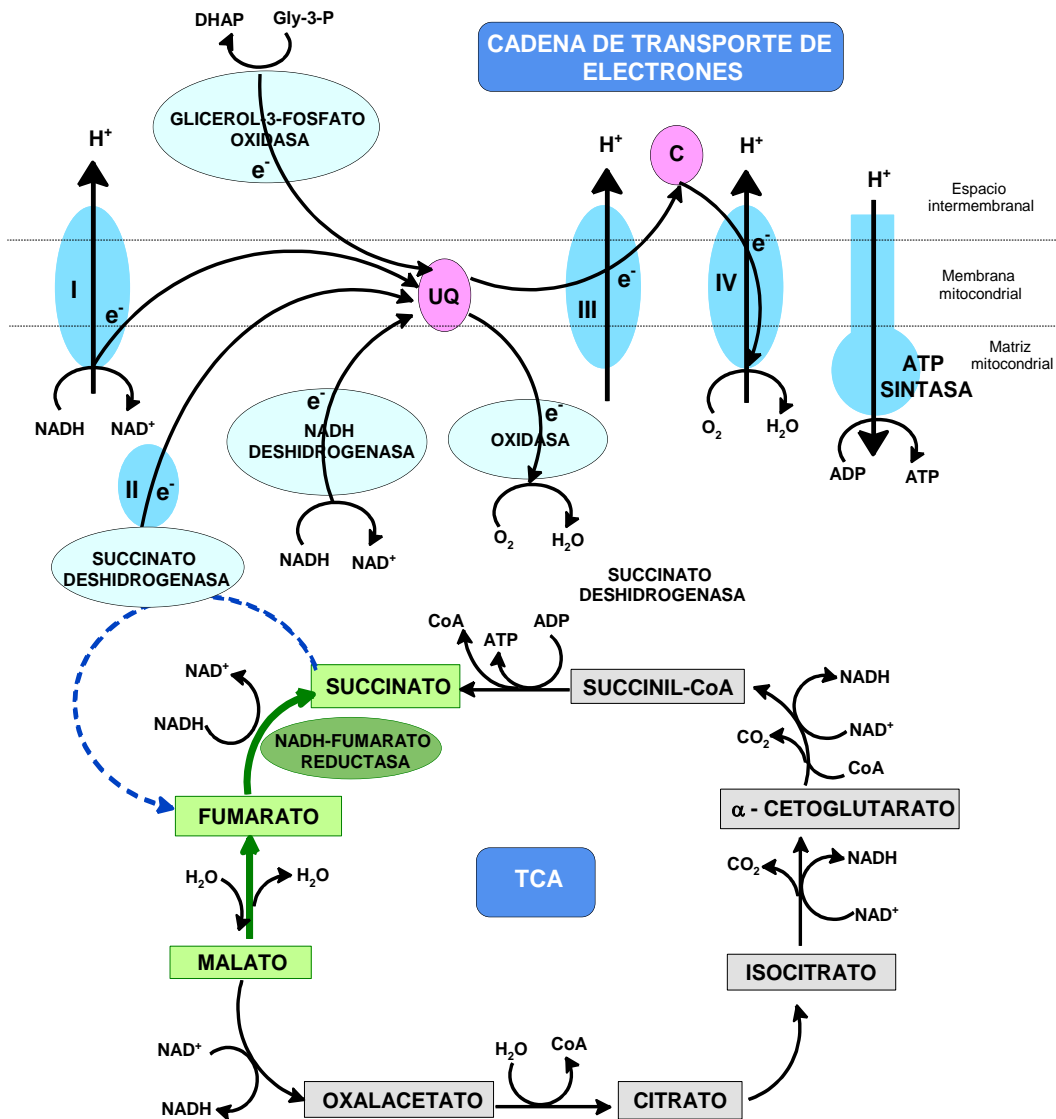
- Las FRD que pertenecen a un complejo multimérico asociado con la cadena respiratoria y transfieren electrones de un quinol al fumarato.
- Las FRD que transfieren electrones de una coenzima que actúa como cofactor cuando se une de forma no covalente al fumarato.

En los tripanosomátidos la FRD se localiza en las mitocondrias de todos los estadios morfológicos de los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* y *Trypanosoma brucei*, por lo que está considerada como una de las enzimas más importantes para llevar a cabo su metabolismo [Jardim-Messeder, 2017; Coustou, 2005; Van Hellemond, 1994].

En el caso del *Trypanosoma cruzi*, está conformada por 1215 aminoácidos [El-Sayed, 2005], donde la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) es el cofactor unido a la proteína FRD, formando la enzima NADH-fumarato reductasa, que, mediante su acción catalítica, reduce al fumarato para que los parásitos obtengan la energía que requieren para vivir [Turrens, 2012; Kim, 2019]. Lo anterior está dado en el contexto de una hipótesis que plantea que diversos microorganismos llevan a cabo una reversión parcial o completa del Ciclo de Krebs, también llamada como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos inverso o ciclo TCA inverso, lo cual proporciona un mecanismo central para la síntesis de biomoléculas esenciales, que son producto de las reacciones entre el CO<sub>2</sub> y el agua [Jardim-Messeder, 2017; Coustou, 2005; Van Hellemond, 1994; Zhang, 2006].

Para los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* y *Trypanosoma brucei*, el ciclo de Krebs únicamente cambia el sentido de las reacciones del malato y fumarato [Villafranz, 2021]. La participación de la NADH-fumarato reductasa es fundamental en dichas reacciones, ya que, la coenzima NADH unida a la proteína fumarato reductasa, interacciona con el doble enlace del fumarato, proporcionándole un par de iones de hidrógeno (2H<sup>+</sup>) y al mismo tiempo, transportando dos electrones (2e<sup>-</sup>), lo que da como resultado la reducción del fumarato, y, por consiguiente, la formación de succinato [Merlino, 2014; Turrens, 2012; Maya, 2007; Kim, 2018; Coustou, 2005]. El succinato es uno de los metabolitos principales para la supervivencia de los tripanosomátidos, debido a que estos parásitos requieren de cantidades significativas de él para mantener el equilibrio redox y continuar con su cadena de transporte de electrones [Turrens, 2012; Coustou, 2005; Kim, 2019]. En la Figura 6 se muestran (en color verde)

las reacciones enzimáticas en dirección inversa al Ciclo de Krebs que son características de los *Trypanosomas* [Coustou, 2005; Villafray, 2021].



**Figura 6.** Reacciones enzimáticas de los *Trypanosomas*, en dirección inversa al Ciclo de Krebs [Coustou, 2005; Villafray, 2021].

## Química computacional y su relación en el diseño de fármacos

Para lograr el desarrollo de un nuevo medicamento, se llevan a cabo una serie de investigaciones que inician desde el descubrimiento de una molécula con cierta actividad farmacológica, y finalizan años después con su comercialización. Las etapas o fases de investigación son largas y costosas, siendo aproximadamente de 10 a 15 años de ensayos en laboratorios y un costo promedio de 800 millones de dólares por cada medicamento nuevo que sale al mercado [Saldívar-González, 2017].

En las últimas décadas, la química computacional, la química médica, la bioinformática y el modelado molecular han alcanzado un nivel muy alto como herramientas predictivas de fenómenos relacionados a sistemas de interés biológico, debido a que permiten analizar las estructuras químicas a nivel atómico, la evolución de sistemas a través del tiempo, la toxicidad de ciertos grupos funcionales, así como la obtención de sus diferentes parámetros fisicoquímicos [Prieto-Martínez, 2018]. Debido a ello, los diseños computacionales pueden utilizar diferentes procedimientos para establecer un modelo que tenga como único propósito la construcción de una molécula (cabeza de serie o farmacóforo) que compita en potencia, efecto, farmacocinética o toxicidad con el fármaco de interés; o también, pueden utilizar otros procedimientos que tengan como propósito el estudio de macromoléculas que funcionan como receptores o dianas farmacológicas (desde su construcción hasta sus interacciones intermoleculares e intramoleculares).

Por lo tanto, en la actualidad, el desarrollo de medicamentos seguros, eficaces y específicos, conlleva un diseño más racional y dirigido, con el que se logra disminuir



las grandes cantidades de experimentos y se minimizan los costos de investigación. Esto ha sido posible gracias al trabajo multidisciplinario de diferentes grupos de investigación y a los avances tecnológicos, los cuales, han derivado en la obtención de moléculas con actividad terapéutica específica.

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la OMS, la enfermedad de Chagas es una de las enfermedades tropicales olvidadas más importantes, debido a que afecta a aproximadamente de 6 a 7 millones de personas, de las cuales, menos del 1% recibe tratamiento [WHO, 2022 & 2015; DNDI, 2022; OPS, 2003].

Inicialmente, la infección ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi* se distribuía únicamente en las regiones endémicas, que, en su mayoría, pertenecen a América Latina, sin embargo, en los últimos años se ha reportado un incremento de casos en otros países y continentes, como Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Japón, Australia y diversos países europeos, colocando a la enfermedad de Chagas como un importante problema de salud pública para el resto del mundo [WHO, 2022; DNDI, 2022; Von Trompowsky, 2019; Merlino, 2014].

El tratamiento para la terapia de esta enfermedad, consta de dosificaciones orales de benznidazol y nifurtimox, sin embargo, hasta el 40% de los pacientes tratados con estos medicamentos han presentado reacciones adversas [WHO, 2022; DNDI, 2022; Rojo-Medina, 2018].

Debido a que la enfermedad de Chagas es considerada por la industria farmacéutica como una “enfermedad de pobres”, los recursos que se han invertido en

la investigación y búsqueda de alternativas para su tratamiento han sido escasos, por lo tanto, es prioritario encontrar nuevas estrategias terapéuticas basadas en dianas farmacológicas específicas, que conduzcan a un diseño racional de fármacos con mayor eficacia y menor toxicidad.

## **HIPÓTESIS**

La caracterización de la estructura electrónica y el estudio de las interacciones intermoleculares, permitirán el diseño de nuevas moléculas derivadas del imidazol con las mejores características fisicoquímicas, las cuales, inhibirán a la enzima NADH-fumarato reductasa y presentarán baja toxicidad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseñar a través de métodos computacionales una familia de moléculas derivadas del imidazol, caracterizar su estructura electrónica, propiedades fisicoquímicas e interacciones intermoleculares con la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*, con el propósito de seleccionar a la molécula con menor toxicidad y con potencial efecto terapéutico como inhibidora enzimática.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

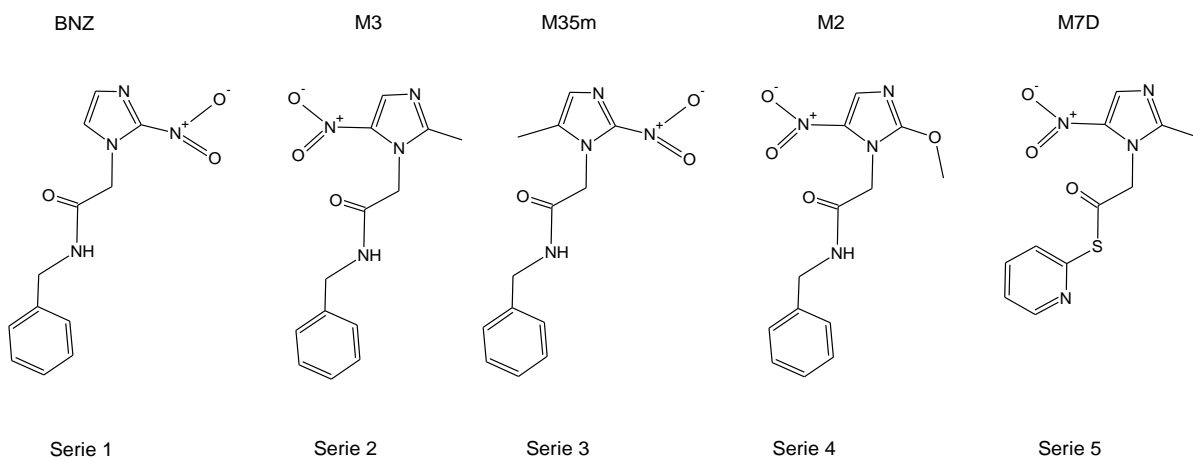
1. Diseñar nuevos derivados del imidazol y nitroimidazol a partir de un modelo teórico establecido.

2. Analizar las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas de los nuevos derivados del imidazol y nitroimidazol, mediante el uso de plataformas virtuales.
3. Caracterizar la estructura electrónica de las moléculas diseñadas, empleando descriptores químico-cuánticos locales y globales, a nivel DFT-M06-2X en fase acuosa.
4. Determinar descriptores de estabilidad, cargas atómicas, funciones Fukui e isosuperficies de orbitales moleculares, para identificar los sitios de mayor reactividad.
5. Modelar la enzima NADH-fumarato reductasa, a partir de la secuencia de aminoácidos que aparece en la base de datos y evaluar su homología estructural.
6. Realizar un estudio de acoplamiento molecular de las moléculas diseñadas y fármacos de referencia, con la enzima NADH-fumarato reductasa.
7. Seleccionar la molécula con los mejores parámetros fisicoquímicos, estructurales, farmacocinéticos, toxicológicos y de afinidad como inhibidora de la proteína NADH-fumarato reductasa.
8. Iniciar la síntesis química de la molécula seleccionada.

## METODOLOGÍA: SECCIÓN TEÓRICA

### Parámetros farmacocinéticos y predicción toxicológica

Se realizó el diseño inicial de las nuevas familias de moléculas derivadas del imidazol y nitroimidazol, a partir de moléculas de referencia y moléculas reportadas en la literatura como activas contra la enfermedad de Chagas [Turrens, 1996; Campos-Fernández, 2017 & 2019; Sánchez-Moreno, 2011; Romero, 2017; De Andrade, 2015; Papadopoulou, 2016]. Se establecieron como moléculas cabeza de serie a las moléculas que cumplieron con el modelo teórico propuesto en estudios previos [Campos-Fernández, 2017], y al benzimidazol (BNZ) como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Estructuras cabeza de serie [Campos-Fernández, 2017 & 2019]

Se analizaron los efectos mutagénicos, tumorigénicos, de irritabilidad y reproductivos utilizando la plataforma virtual de Osiris Molecular [Sander, T], y se realizó la predicción de sus propiedades farmacocinéticas empleando la plataforma

virtual Molinspiration [Molinspiration Cheminformatics free web services], de acuerdo con las reglas de Lipinski [Lipinski, 1997].

A partir de los resultados obtenidos, se realizó una primera selección de 31 derivados de imidazol y nitroimidazol, los cuales presentaron las mejores propiedades farmacocinéticas y baja toxicidad.

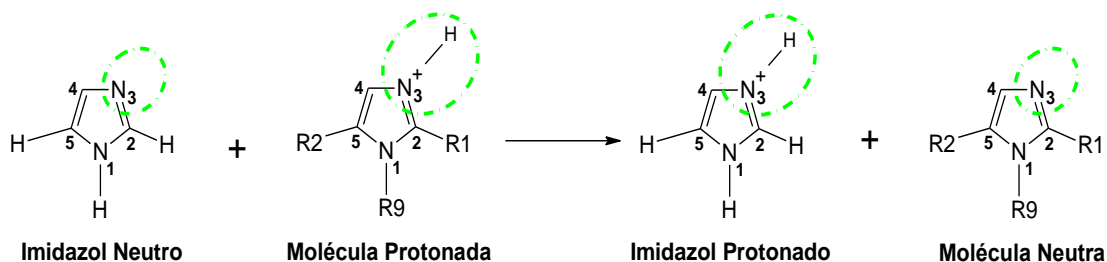
### **Cálculos de la Estructura Electrónica**

A las 31 moléculas seleccionadas se les realizó la caracterización de la estructura electrónica, empleando descriptores químico-cuánticos locales y globales, a nivel DFT-M06-2X en fase acuosa.

Los cálculos de la estructura electrónica se realizaron en la súper computadora "Miztli", mediante el uso del paquete computacional Gaussian 09 [Frisch, 2013]. Las estructuras neutras se optimizaron empleando el funcional M06-2X [Zhao, 2008; Mardirossian, 2017], mientras que las estructuras protonadas (catiónicas) se optimizaron en niveles restringidos RM06-2X. Todas las estructuras fueron optimizadas con el conjunto base 6-311+G(d,p) [Hehre, 1986]. Las energías fueron corregidas al mismo nivel de teoría para incluir la energía vibracional al punto cero (ZPVE), mediante la determinación de las frecuencias vibracionales. Los cálculos puntuales fueron realizados a partir de las geometrías optimizadas, a nivel de teoría M06-2X, con el conjunto base 6-311++G(2df,2p). Todos los cálculos se llevaron a cabo en solución acuosa, utilizando el modelo universal SMD [Marenich, 2009].

### Afinidad Protónica (AP)

Para determinar el carácter básico del átomo N3 del anillo imidazol, fueron calculadas las energías de afinidad protónica mediante reacciones isodésmicas, debido a que dichas reacciones corrigen los errores energéticos del sistema. Los valores obtenidos son el resultado de la diferencia entre la energía de la molécula neutra y la energía de la molécula protonada, conservando el mismo número de enlaces en ambos lados de la reacción [Campos-Fernández, 2017 & 2019; Soriano-Correa, 2010], como se muestra a continuación:



Además, los valores de afinidad protónica incluyen cálculos de frecuencia para la corrección de la energía vibracional del punto cero (ZPVE, por sus siglas en inglés), con lo cual, se obtuvieron resultados más confiables y fue posible garantizar que las energías se encuentran en su mínimo global y no local.

### Descriptores de reactividad global: dureza química ( $\eta$ ), potencial de ionización (I) e índice de electrofilia ( $\omega$ )

Por otro lado, para determinar los valores de la reactividad global de las estructuras bajo estudio, se determinaron los descriptores químicos-cuánticos

globales: dureza química ( $\eta$ ), potencial de ionización ( $I$ ) e índice de electrofilia ( $\omega$ ) [Parr, 1999; Pearson, 1992 & 1997; Chattaraj, 2011; Soriano-Correa, 2010].

El índice de electrofilia se define como la capacidad de una molécula para aceptar carga electrónica y fue calculado a través del potencial químico electrónico y la dureza química, a través de las siguientes ecuaciones:

$$\mu = -\chi = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})} \quad (1)$$

Parr y Pearson [Parr, 1983; Pearson, 1997] propusieron la dureza química ( $\eta$ ) dentro de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT), por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\eta = \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(\vec{r})} \quad (2)$$

Usando la aproximación de diferencias finitas [Parr, 1989]:

$$\eta \approx \frac{E_{N-1} - 2E_N + E_{N+1}}{2} \approx I - A \quad (3)$$

y

$$-\mu \approx \frac{(E_{N-1} - E_{N+1})}{2} \approx \frac{I+A}{2} \quad (4)$$

Donde, son las energías de  $E_N$ ,  $E_{N-1}$  y  $E_{N+1}$  son las energías del sistema electrónico  $N$ ,  $(N-1)$  y  $(N+1)$ , los cuales, son sustituidos por  $I$  y  $A$ , que corresponden al potencial de ionización adiabático y a la afinidad electrónica, respectivamente. De esta

forma, el índice de electrofilia es obtenido en términos de su potencial químico y dureza química, de acuerdo con la siguiente expresión [Chattaraj, 2011; Parr, 1999]:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (5)$$

### **Índice de aromaticidad ( $\Delta$ )**

Para identificar una posible relación entre la aromaticidad y carcinogenicidad de los derivados del imidazol y nitroimidazol seleccionados, se realizó el cálculo del índice de aromaticidad ( $\Delta$ ). El índice de aromaticidad es una medida que, de acuerdo con las reglas de Barone [Barone, 1996; Braga, 1999], predice de manera indirecta la carcinogenicidad de los compuestos bajo estudio, y es calculado mediante la diferencia energética entre los orbitales moleculares HOMO y HOMO-1.

Una molécula con estructura similar a los pirenos es considerada fuertemente carcinogénica, si los valores obtenidos son mayores que  $0.25\beta$ , donde  $\beta=2.4$  eV, es decir, si  $\Delta>0.60$  eV.

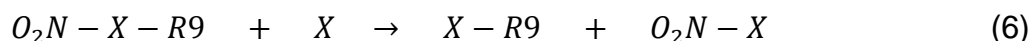
Por otro lado, una molécula con estructura diferente a los pirenos es considerada fuertemente carcinogénica, si los valores obtenidos son mayores que  $0.15\beta$ , es decir, si  $\Delta>0.36$  eV.

### **Descriptor de estabilidad SESE**

El descriptor que determina la energía de estabilización por el efecto del sustituyente (SESE), fue calculado a través del uso de reacciones homodésmicas



[Jezuita, 2021; Szatyłowicz, 2018 & 2017], mediante la diferencia de las energías de los productos y reactivos, conservando el mismo número de electrones en ambos lados de la reacción, de acuerdo con la estructura de la molécula, como se muestra a continuación:



Usando la ecuación de la diferencia de las energías de los productos y reactivos:

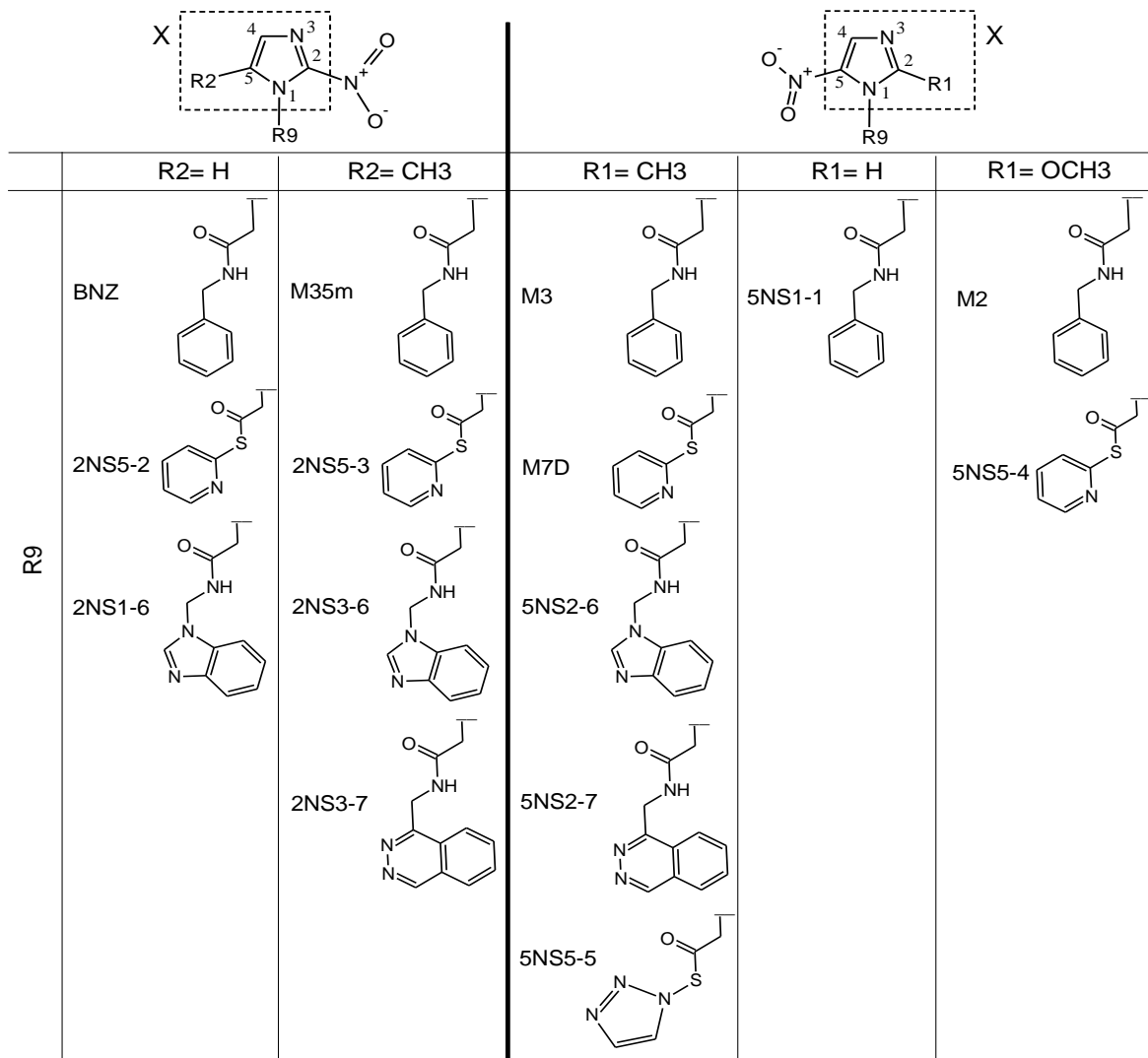
$$SESE = \Sigma E_{\text{productos}} - \Sigma E_{\text{reactivos}} \quad (7)$$

y

$$SESE = E(X - R9) + E(O_2N - X) - E(O_2N - X - R9) - E(X) \quad (8)$$

Donde, X es una fracción transmisora que comprende al anillo imidazol y a los sustituyentes R1 o R2, que forman enlaces con el C2 y C5, respectivamente; el R9 corresponde al sustituyente que forma un enlace con el N1 del anillo imidazol, como se muestra en la Figura 8.

Un valor del descriptor  $SESE < 0$  indica una mayor energía de estabilización causada por el sustituyente. [Jezuita, 2021; Szatyłowicz, 2018 & 2017].



**Figura 8.** Estructuras derivadas del nitroimidazol seleccionadas para los cálculos del descriptor SESE, donde X es la fracción transmisora.

### Cargas atómicas

Las cargas atómicas indican la forma en la que se distribuye o localiza la carga de una molécula, lo que permite obtener los valores de carga de un átomo específico en un sistema, o bien, el efecto que tiene un átomo sobre la carga de otro átomo al

unirse en un enlace; sin embargo, su determinación depende del método y base utilizados. En este estudio, los valores de las cargas fueron obtenidos a través del potencial electrostático (ESP) [Levine, 2001; Politzer, 1981], para analizar los sitios de naturaleza nucleofílica o electrofílica, así como, para elucidar la influencia de la carga de los sustituyentes al anillo imidazol.

### **Función condensada de Fukui**

La función condensada de Fukui es un descriptor local utilizado para cuantificar la población electrónica en una región atómica dentro de un sistema, lo que conlleva el análisis de la reactividad química de una molécula y su selectividad [Hirshfeld, 1977; Parr, 1984; Fukui, 1982; Yang, 1986]. Este descriptor, representa una variación del potencial químico, inducido por una perturbación externa, por lo tanto, la reactividad de un sitio específico es directamente proporcional a dicha variación. Los valores fueron determinados a través de un esquema poblacional de Hirshfeld y está definido de acuerdo con las siguientes ecuaciones [Hirshfeld, 1977]:

$$f(\vec{r}) = \left[ \frac{\delta\mu}{\delta v(\vec{r})} \right]_N = \left[ \frac{\partial \rho(\vec{r})}{\partial N} \right]_{v(\vec{r})} \quad (9)$$

Se han propuesto tres tipos de funciones de Fukui, que están definidas dependiendo de la transferencia de electrones [Parr, 1984; Fukui, 1982]. Las funciones condensadas de Fukui fueron calculadas utilizando un enfoque de diferencias finitas propuesto por Yang y Mortier [Yang, 1986], de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad \text{para ataques nucleofílicos,}$$
$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad \text{para ataques electrofílicos,}$$
$$f_k^0 = [q_k(N + 1) - q_k(N - 1)]/2 \quad \text{para ataques radicales,}$$

donde,  $q_k(N + 1)$ ,  $q_k(N - 1)$ ,  $q_k(N)$ , denotan la población electrónica del átomo  $k$ , en una especie catiónica, aniónica y neutra, respectivamente.

### Isosuperficies de los Orbitales Moleculares Frontera HOMO y LUMO

Las isosuperficies de los orbitales moleculares frontera representan la localización de la distribución electrónica de un sistema, por lo que fueron analizados para conocer la influencia del sustituyente sobre la naturaleza de regiones estructurales de los derivados del imidazol y nitroimidazol. Los orbitales moleculares de mayor energía ocupados (HOMO), ilustran la ubicación de la densidad de carga electrónica, lo cual sugiere sitios de interacción susceptibles a ataques electrofílicos. Por otro lado, los orbitales moleculares de menor energía desocupados (LUMO), ilustran la ubicación de la deficiencia de carga electrónica, lo cual sugiere sitios de interacción susceptibles a ataques nucleofílicos.

### Modelado por Homología

El modelado comparativo se basa en la construcción de un modelo enzimático tridimensional de alta calidad, a partir de la identificación de estructuras molde con los porcentajes más altos de similitud de secuencia. En este caso, no se dispone de la

estructura cristalizada de la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*, por lo que el modelado comparativo es de gran importancia para continuar con el estudio, y consta de los procedimientos que serán explicados en las siguientes secciones.

### **Selección de moldes y alineamiento estructural**

Para identificar estructuras homólogas a la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*, se recuperó la secuencia de aminoácidos que están reportados en la base de datos del NCBI, con ID: XP\_807320.1 [El-Sayed, 2005] y ID: PWV10286.1 [Berná, 2018]. A partir de la secuencia bajo estudio, se realizó una búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas en Protein Data Bank [Berman, 2000], con el propósito de identificar las estructuras homólogas, por medio de BLAST-P [Altschul, 1990]. Los resultados de dicha búsqueda, identificaron cuatro estructuras que mostraban una alta identidad de secuencia (PDB ID: 5GLG [Kim, 2018], PDB ID: 1KSU [Pankhurst, 2002], PDB ID: 1QJD [Taylor, 1999], y PDB ID: 1QO8 [Bamford, 1999]). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia de la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* con cada uno de los moldes seleccionados, utilizando la plataforma virtual MultAlin [Corpet, 1988], manteniendo los parámetros que están seleccionados por defecto. Los alineamientos fueron inspeccionados y ajustados manualmente para reducir los gaps e inserciones, así como para asegurar que los sitios catalíticos estuvieran conservados.

## Construcción del Modelo

Para generar los modelos correspondientes se utilizó el software MODELLER 9.21 [Webb, 2016], tomando como referencia los alineamientos con sus respectivos moldes y las restricciones espaciales. Para realizar el modelado por homología, se utilizaron los cuatro moldes con mayor identidad de secuencia, lo cual permitió incorporar flexibilidad en la proteína, ya que cada molde se encuentra en una conformación activa diferente:

- PDB ID: 1QJD, tiene cristalizado como ligando al malato, que es la forma oxidada del fumarato.
- PDB ID: 1KSU, tiene cristalizado como ligando al fumarato, que es el ligando de interés.
- PDB ID: 5GLG, tiene cristalizado como ligando al succinato, el cual es producto de la reducción del fumarato.
- PDB ID: 1QO8, no tiene ningún ligando cristalizado, es decir, se encuentra en su forma inactiva.

Se modelaron diez mil modelos para cada uno de los cuatro moldes y fueron seleccionados los mejores modelos, de acuerdo con la correlación de la puntuación estadística DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) calculada por MODELLER 9.21 y los valores de desviación media cuadrática (RMSD) calculados con el software ProFit [McLachlan, 1982; Martin, (s. f.)]. Posteriormente, se evaluó su calidad estereoquímica utilizando PROCHECK [Laskowski, 1993] y se seleccionaron los mejores modelos, de acuerdo con los gráficos de Ramachandran.

## **Optimización del Modelo**

Los modelos seleccionados fueron refinados utilizando el software ModRefiner [Xu, 2011], el cual realiza una búsqueda conformacional en las cadenas laterales y cadena principal de cada proteína mediante una minimización energética, con el propósito de generar una estructura con mejor calidad física. Del mismo modo, se verificó nuevamente la calidad estereoquímica de cada modelo a través de diagramas de Ramachandran, utilizando PROCHECK [Laskowski, 1993].

## **Acoplamiento Molecular**

### **Preparación de los ligandos y del receptor**

Los ligandos, las coenzimas (NADH y FAD) y las moléculas de referencia, fueron tomadas de las geometrías optimizadas de los cálculos de la estructura electrónica. Para el estudio del acoplamiento molecular, se llevó a cabo el proceso de preparación de los ligandos, asignando cargas, estados de protonación y flexibilidad, utilizando OpenBabel [O'Boyle, 2011]. Para el proceso de preparación de los modelos enzimáticos 5299(1KSU), 2735(1QJD), 4560(5GLG) y 9109(1QO8), se asignaron estados de protonación e hidrógenos faltantes, utilizando PROPKA3 [Sondergaard, 2011; Olsson, 2011], y se optimizaron las posiciones de los aminoácidos GLU, HIS y ASP, así como sus rotámeros, mediante el servidor Molprobit [Williams, 2018].

## Estudios de Acoplamiento

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el software AutodockVina 1.1.2 [Trott, 2010]. Se tomó como referencia la posición del FAD cristalizado en los moldes, con el propósito de ubicar la posición en la que NADH debe localizarse. Se realizaron los primeros cuatro acoplamientos para formar los complejos NADH-FRD, utilizando la coenzima NADH y los modelos de la enzima FRD que fueron generados en el modelado por homología: 5299 (del molde 1KSU), 2735 (del molde 1QJD), 4560 (del molde 5GLG) y 9109 (del molde 1QO8).

Para cada modelo, se estableció una búsqueda de espacio de acoplamiento conformacional. El espacio de búsqueda definido incluía todo el dominio catalítico, lo que garantizó que el análisis incluyera todos los posibles sitios de unión dentro de este dominio.

Para el modelo 5299 (1KSU) se definió el espacio de búsqueda para cubrir una región de análisis tridimensional de  $36\text{\AA} \times 21\text{\AA} \times 18\text{\AA}$ , centrada en  $x: 14.083$ ,  $y: -2.972$ ,  $z: 5.917$ . Para el modelo 2735 (1QJD) el espacio de búsqueda fue  $22.50\text{\AA} \times 21.00\text{\AA} \times 35.25\text{\AA}$ , centrada en  $x: 26.417$ ,  $y: 32.861$ ,  $z: 64.361$ . Para el modelo 9109 (1QO8) el espacio de búsqueda fue  $32\text{\AA} \times 22\text{\AA} \times 22\text{\AA}$ , centrada en  $x: 39.417$ ,  $y: 68.472$ ,  $z: 20.500$ . Para el modelo 4560(5GLG) el espacio de búsqueda fue  $24\text{\AA} \times 26\text{\AA} \times 28\text{\AA}$ , centrada en  $x: 8.417$ ,  $y: 28.472$ ,  $z: 0.667$ .

Para realizar el acoplamiento molecular entre el complejo NADH-FRD y los ligandos, se seleccionó el modelo 5299 (modelado por homología a partir del molde 1KSU), debido a que es el único modelo que conservó el sitio de interacción de FAD-FRD de su respectivo molde. Para dichos acoplamientos, se utilizó una rejilla con



dimensiones de 20Åx22Åx22Å, centrada en x:6.500, y:5.111, z:10.556. Para analizar los archivos de entrada y salida, se utilizó MGLTOOLS 1.5.6 [Sanner, 1999; Morris, 2009], y la selección de los mejores ligandos se realizó por medio de la energía de acoplamiento y localización dimensional.

### **Validación del protocolo de acoplamiento (redocking)**

Para verificar y garantizar que la ubicación del NADH es adecuada, se llevó a cabo la validación del protocolo de acoplamiento mediante Re-docking. El procedimiento comprende la comparación de la ubicación espacial del complejo FAD-1KU cristalizado (que fue descargado en la base de datos PDB), con la ubicación de la coenzima FAD acoplada al molde 1KSU y con la ubicación de la coenzima FAD acoplada al modelo 5299. Del mismo modo, se realizó la comparación de la ubicación espacial de la coenzima NADH acoplada al molde 1KSU y la ubicación de la coenzima NADH acoplada al modelo 5299. Todas las comparaciones se realizaron por medio de los valores de RMSD. En todos los casos se utilizó el software AutodockVina 1.1.2 [Trott, 2010] y una rejilla con dimensiones de 36Åx21Åx18Å, centrada en x: 14.083, y: -2.972, z: 5.917.

### **Evaluación del papel de las moléculas de agua dentro del sitio de unión de NADH-fumarato reductasa**

Estudios recientes sobre el diseño racional de fármacos han reportado que el agua sirve de puente en diversas interacciones ligando-proteína [Morozenko, 2016; Mitusińska, 2020; Jukič, 2017; Defelipe, 2018; Sridhar, 2017]. En este sentido, se

postula que un ligando debe desplazar primero a las moléculas de agua de la zona que define su sitio de unión para interactuar con la proteína. Sin embargo, algunas moléculas de agua (también conocidas como no desplazables o conservadas) interactúan fuertemente y permanecen unidas a la proteína, afectando así el posicionamiento de los ligandos dentro del sitio de unión y, en consecuencia, influyen en la afinidad de unión del ligando [Morozenko, 2016; Mitusińska, 2020; Jukič, 2017; Defelipe, 2018; Sridhar, 2017]. Por lo tanto, antes de acoplar a los derivados del imidazol y nitroimidazol al modelo 5299, se analizó la posible presencia de moléculas de agua conservadas (no desplazables) dentro del sitio de unión, que podrían influir en el modo de unión y la afinidad de los ligandos.

Para este análisis se utilizaron los softwares WaterDock [Ross, 2012] y WaterDock2 [Sridhar, 2017], debido a que el uso de ambos programas permite obtener una estimación más completa y precisa de la presencia de moléculas de agua, dentro del sitio de unión del ligando e identifican a las moléculas de agua desplazables y a las moléculas de agua conservadas. Además, se seleccionaron estos programas porque fueron diseñados y validados mediante el uso de datos cristalográficos experimentales, mostrando una tasa de éxito extremadamente alta: 88% de precisión para WaterDock y 91% para WaterDock2.0 [Mitusińska, 2020].

WaterDock predice la ubicación de las moléculas de agua conservadas sin la presencia explícita del ligando; este programa es relevante porque realiza la predicción independientemente de la naturaleza del ligando. En cambio, WaterDock2.0, predice la ubicación de las moléculas de agua conservadas con la presencia explícita del

ligando e incluye datos de solvatación de sus grupos funcionales [Mitusińska, 2020; Sridhar, 2017; Ross, 2012].

## **METODOLOGÍA: SECCIÓN EXPERIMENTAL**

### **Síntesis química**

#### **Síntesis de 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo**

En un matraz en agitación, fueron disueltos 4 mL de metilbromoacetato en 30 mL de DMF y se añadieron 5.2 g de 2-metilimidazol y 11.2 g de carbonato de potasio. La mezcla se colocó en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas y se sometió a extracciones de agua:acetato de etilo, conservando la fase orgánica. Después se eliminó el disolvente para obtener las fracciones por cromatografía en columna [Altana Pharma, 2006].

#### **Síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo**

En un matraz sellado en agitación, se colocaron (en medio inerte durante 10 minutos) 0.1 g de 1,4-dicloroftalazina, 0.02585 g de cianuro de sodio y 1 mL de DMF anhidro. Posteriormente, se colocó en calentamiento a 120-130 °C durante 24 horas. Se dejó enfriar en agitación constante, se diluyó con cloruro de amonio saturado y se extrajo acetato de etilo. Una vez evaporado el disolvente, se lavó el producto con salmuera, para purificarlo por cromatografía, en un medio de elución acetato de etilo:hexano (2:8). [Babu, 2016; Cee, 2014].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: SECCIÓN TEÓRICA

### Parámetros farmacocinéticos y predicción toxicológica

Para realizar el diseño de los derivados del imidazol y nitroimidazol, se conservó como estructura fundamental el anillo imidazol, de acuerdo con el modelo teórico establecido [Campos-Fernández, 2017 & 2019]. Se le realizaron modificaciones estructurales en los sustituyentes R9, R1 y R2, tomando como referencia al benznidazol (BNZ), a las moléculas cabeza de serie, así como, a las moléculas que han sido reportadas como activas en la literatura [Turrens, 1996; Sánchez-Moreno, 2011; Romero, 2017; De Andrade, 2015; Papadopoulou, 2016].

En la Tablas 1 y 2, se muestran los resultados de las predicciones farmacocinéticas (de acuerdo con las reglas de Lipinski) y las predicciones de toxicidad (efectos mutagénicos, tumorigénicos, de irritabilidad y reproductivos) del BNZ, moléculas cabeza de serie, moléculas de referencia y moléculas diseñadas. Las predicciones de toxicidad se realizaron utilizando la plataforma virtual de Osiris Molecular [Sander, T], y la predicción de sus propiedades farmacocinéticas se realizó empleando la plataforma virtual Molinspiration [Molinspiration Cheminformatics free web services].

Como se puede observar en la Tabla 1, el BNZ y el metronidazol poseen un potencial riesgo reproductivo, lo cual coincide con lo reportado en la literatura [FDA, 2017], donde se menciona que el BNZ y algunos nitroimidazoles podrían ocasionar toxicidad embriofetal e infertilidad masculina [Von Trompowsky, 2019; FDA, 2017], por lo que fueron señalados en fondo color rojo. Asimismo, los resultados de la predicción

farmacocinética muestran que las moléculas de referencia y las moléculas cabeza de serie, poseen buena biodisponibilidad, de acuerdo con lo descrito por Lipinski [Lipinski, 1997].

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos y predicción de toxicidad para nitroimidazoles de referencia y moléculas cabeza de serie.

Molécula	M*	T*	R*	I*	Log P**	Donadores de Puentes de Hidrógeno**	Aceptores de Puentes de Hidrógeno**	Masa Molecular**
NITROIMIDAZOLES DE REFERENCIA								
BNZ	----	----	Alta	----	0.78	1	7	260.25
Metronidazol	----	----	Alta	----	-0.47	1	6	171.16
MOLÉCULAS CABEZA DE SERIE								
M3	----	----	----	----	0.67	1	7	274.28
M35m	----	----	----	----	1.00	1	7	274.28
M2	----	----	----	----	0.96	1	8	290.28
M7D	----	----	----	----	1.37	0	7	278.29

M=Mutagenicidad; T=Tumorigenicidad, R=Efectos en la reproducción, I=Irritabilidad. \* Valores obtenidos en [Sander, T]. \*\* Valores obtenidos en [Molinspiration Cheminformatics free web services].

**Tabla 2.** Parámetros farmacocinéticos y predicción de toxicidad para derivados de imidazoles y nitroimidazoles.

Molécula	M*	T*	R*	I*	Log P**	Donadores de puentes de Hidrógeno**	Aceptores de puentes de Hidrógeno**	Masa Molecular**
SERIE 1								
S1-1	----	---	---	---	0.50	1	4	215.26
S1-2	---	---	---	---	-1.23	1	6	205.22
S1-3	---	---	---	---	-2.05	1	7	247.26
S1-4	---	---	---	---	-1.58	2	8	248.25
S1-5	---	---	---	---	-0.94	2	8	352.40
S1-6	---	---	---	---	0.27	1	6	255.28
S1-7	---	---	---	---	0.12	1	6	237.33
S1-8	---	---	---	---	0.14	3	7	282.31
S1-9	---	---	---	---	-1.37	1	7	206.21
S1-10	---	---	---	---	-1.76	1	7	206.21
SERIE 2								
S2-1	---	---	---	---	0.59	1	4	229.28
S2-2	---	---	---	---	-1.14	1	6	219.25
S2-3	---	---	---	---	-1.96	1	7	261.29
S2-4	---	---	---	---	-2.04	2	8	247.61
S2-5	---	---	---	---	-0.76	2	8	352.38
S2-5B	---	---	---	---	-0.63	2	8	380.45
S2-6	---	---	---	---	0.36	1	6	269.31
S2-7	---	---	---	---	0.21	1	6	281.32
S2-8	---	---	---	---	0.23	3	7	296.33
S2-9	---	---	---	---	-1.28	1	7	220.24
S2-10	---	---	---	---	-1.68	1	7	220.24
SERIE 3								
S3-1	---	---	---	---	0.72	1	4	229.28
S3-2	---	---	---	---	-1.01	1	6	219.25
S3-3	---	---	---	---	-1.83	1	7	261.29
S3-4	---	---	---	---	-1.90	2	8	276.30
S3-5	---	---	---	---	-0.50	2	8	380.45
S3-6	---	---	---	---	0.49	1	6	269.31
S3-7	---	---	---	---	0.34	1	6	281.32
S3-8	---	---	---	---	0.36	3	7	296.33
S3-9	---	---	---	---	-1.15	1	7	220.24
S3-10	---	---	---	---	-1.54	1	7	220.24

M=Mutagenicidad; T=Tumorigenicidad, R=Efectos en la reproducción, I=Irritabilidad. \* Valores obtenidos en [Sander, T]. \*\* Valores obtenidos en [Molinspiration Cheminformatics free web services].

**Tabla 2 (Continuación).** Parámetros farmacocinéticos y predicción de toxicidad para derivados de imidazoles y nitroimidazoles

Molécula	M*	T*	R*	I*	Log P**	Donadores de puentes de Hidrógeno**	Aceptores de puentes de Hidrógeno**	Masa Molecular**
<b>SERIE 4</b>								
S4-1	---	---	---	---	0.88	1	5	245.28
S4-2	---	---	---	---	-0.85	1	7	235.25
S4-3	---	---	---	---	-1.67	1	8	277.28
S4-4	---	---	---	---	-1.75	2	9	292.30
S4-5	---	---	---	---	-0.18	2	10	412.45
S4-5B	---	---	---	---	-0.38	2	10	412.15
S4-6	---	---	---	---	0.65	1	7	285.31
S4-7	---	---	---	---	0.50	1	7	297.32
S4-8	---	---	---	---	0.52	3	8	312.33
S4-9	---	---	---	---	-0.99	1	8	236.24
S4-10	---	---	---	---	-1.39	1	8	236.24
<b>SERIE 5</b>								
S5-1	---	---	---	---	1.28	0	4	233.30
S5-2	---	---	---	---	1.20	0	4	219.27
S5-3	---	---	---	---	1.42	0	4	233.30
S5-4	---	---	---	---	1.57	0	5	249.29
S5-5	---	---	---	---	0.00	0	6	223.26
S5-6	---	---	---	---	-0.39	0	6	223.26
<b>NITROIMIDAZOLES</b>								
2NS1-6	---	---	---	---	0.55	1	9	300.28
2NS1-8	---	---	---	---	0.42	3	10	327.30
2NS3-6	---	---	---	---	0.77	1	9	314.31
2NS3-7	---	---	---	---	0.62	1	9	326.32
2NS3-8	---	---	---	---	0.64	3	10	341.33
2NS5-2	---	---	---	---	1.48	0	7	264.27
2NS5-3	---	---	---	---	1.70	0	7	278.29
5NS2-6	---	---	---	---	0.44	1	9	314.31
5NS2-7	---	---	---	---	0.29	1	9	326.32
5NS2-8	---	---	---	---	0.31	3	10	341.33
5NS4-6	---	---	---	---	0.73	1	10	330.30
5NS4-7	---	---	---	---	0.58	1	10	342.31
5NS4-8	---	---	---	---	0.60	3	11	357.33
5NS5-4	---	---	---	---	1.66	0	8	294.29
5NS5-5	---	---	---	---	0.08	0	9	268.26

M=Mutagenicidad; T=Tumorigenicidad, R=Efectos en la reproducción, I=Irritabilidad. \* Valores obtenidos en [Sander, T]. \*\* Valores obtenidos en [Molinspiration Cheminformatics free web services].

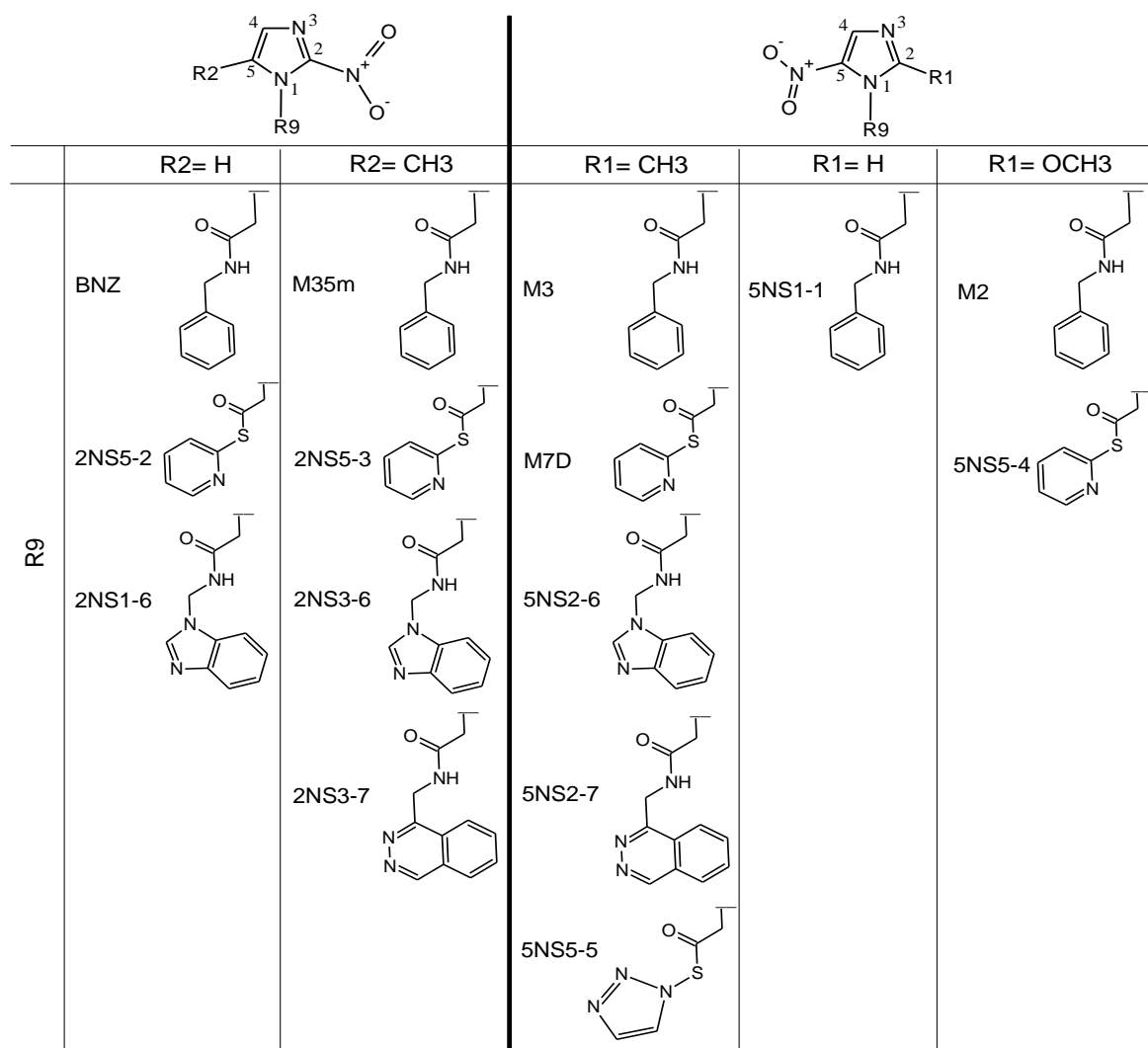
En la Tabla 2 se muestra que los derivados del imidazol y nitroimidazol diseñados no presentaron toxicidad, de acuerdo con los resultados de la predicción toxicológica. Por otro lado, conforme a los resultados de la predicción farmacocinética, las moléculas con valores negativos en el coeficiente de partición (Log P) y 10 aceptores de puentes de hidrógeno, fueron señaladas en color rojo y descartadas para continuar el estudio, debido a que podrían presentar dificultades para que el fármaco se absorba correctamente, de acuerdo con las reglas descritas por Lipinski [Lipinski, 1997].

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 31 estructuras, que comprenden 4 series, como se pueden observar en las Figuras 9 y 10.

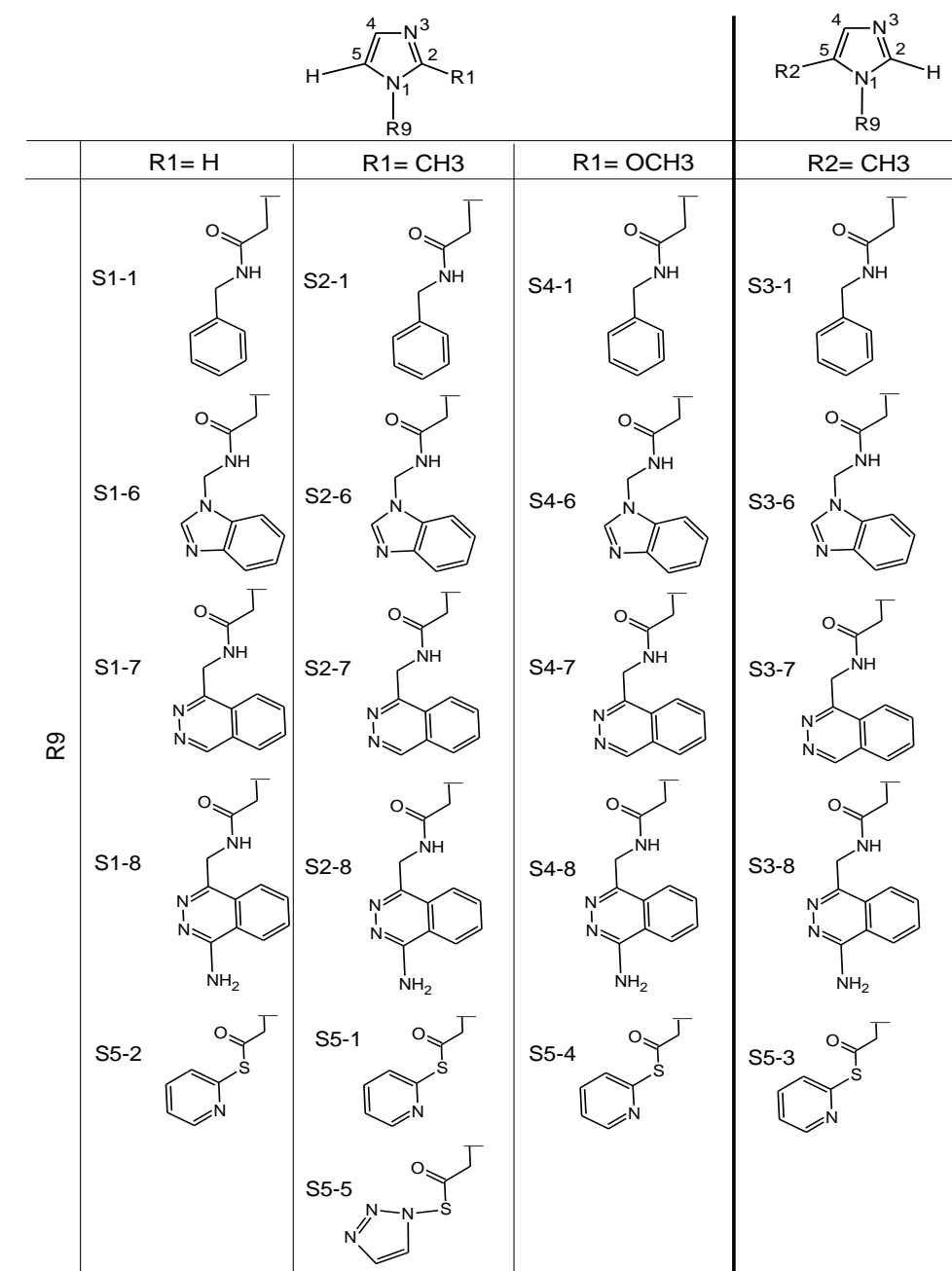
- La primera serie corresponde a las moléculas derivadas del 2-nitroimidazol, las cuales poseen diferentes sustituyentes R2 unidos al C5 del anillo imidazol.
- La segunda serie, corresponde a las moléculas derivadas del 5-nitroimidazol con diferentes sustituyentes R1 unidos al C2 del anillo imidazol.
- La tercera serie corresponde a las moléculas derivadas del imidazol no nitradas, con sustituyentes R1 unidos al C2 del anillo imidazol.
- La cuarta serie, corresponde a las moléculas derivadas del imidazol no nitradas, con sustituyentes R2 unidos al C5 del anillo imidazol.

Todas las series fueron organizadas en filas de acuerdo con su sustituyente R9, y en columnas, de acuerdo con su sustituyente R1 y R2, respectivamente.





**Figura 9.** Estructuras del BNZL, moléculas de referencia y moléculas derivadas del nitroimidazol seleccionadas, de acuerdo con los resultados de los parámetros farmacocinéticos y de la predicción de toxicidad.

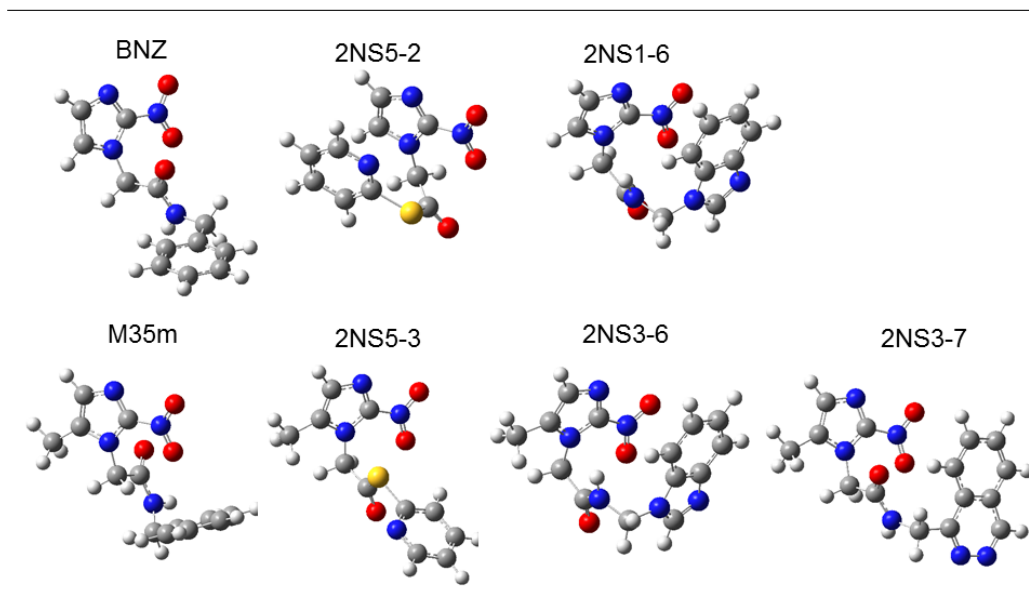


**Figura 10.** Estructuras de moléculas derivadas del imidazol seleccionadas, de acuerdo con los resultados de los parámetros farmacocinéticos y de la predicción de toxicidad.

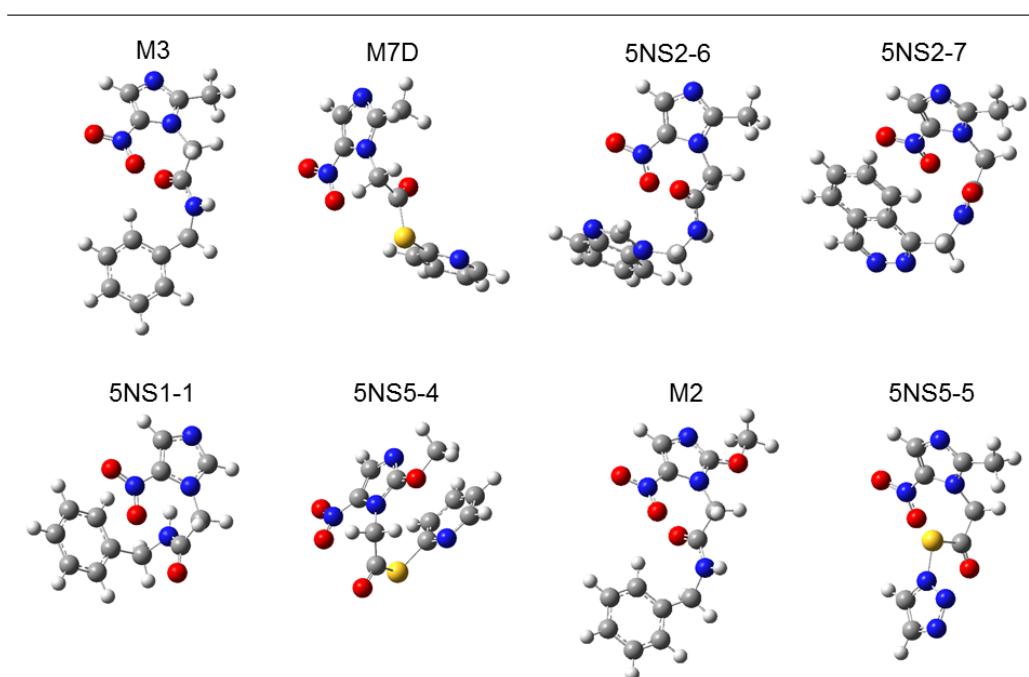
## **Cálculos de la estructura electrónica**

En las Figuras 11 y 12, se pueden observar las geometrías optimizadas de las moléculas derivadas del imidazol y nitroimidazol, las cuales fueron comparadas con los datos experimentales de rayos-X que se encuentran disponibles en la literatura [Soares-Sobrinho, 2008; Campos-Fernández, 2019].

2-NITROIMIDAZOLES

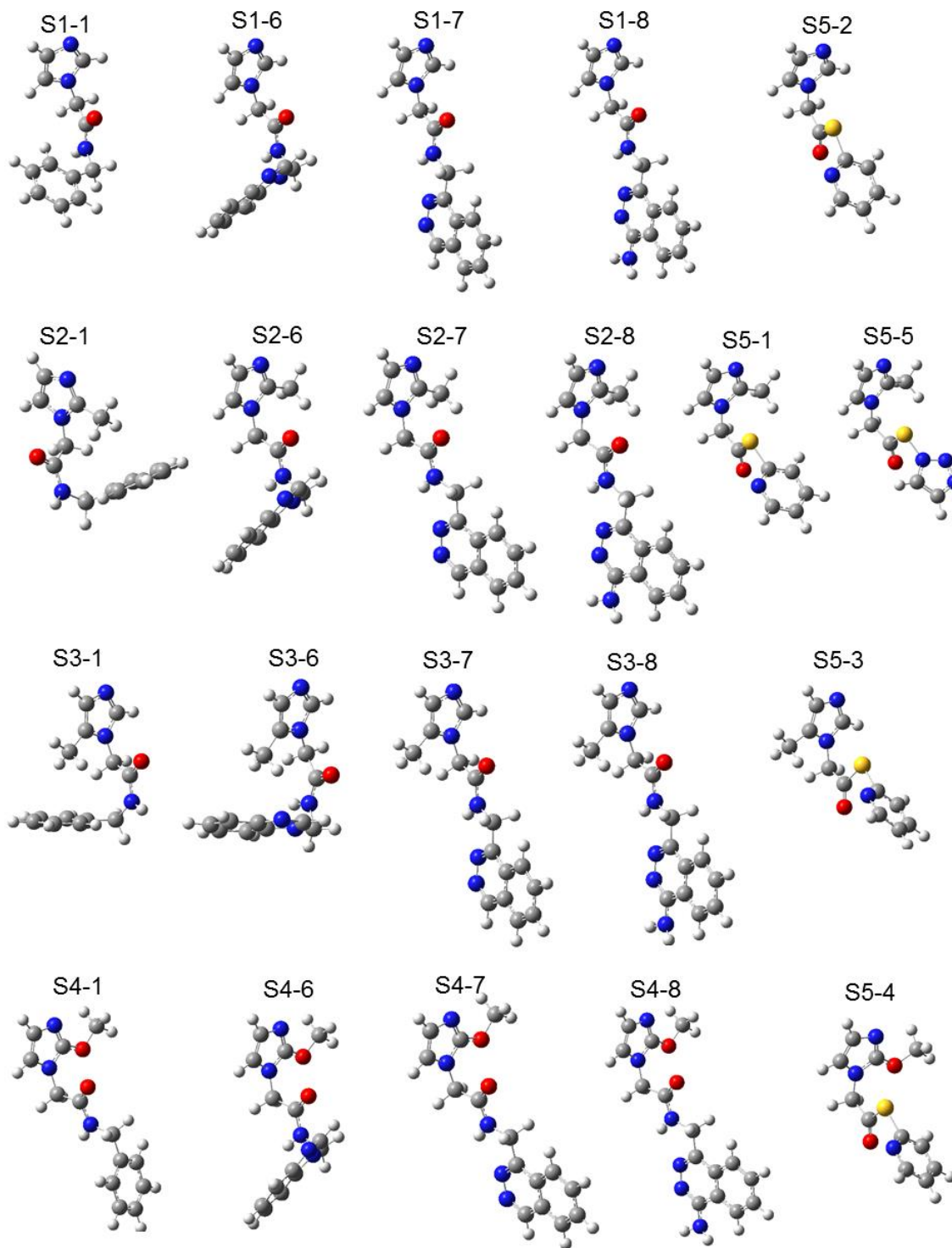


5-NITROIMIDAZOLES



**Figura 11.** Geometrías de derivados de 2-nitroimidazol y 5-nitroimidazol, optimizadas a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.

IMIDAZOLES



**Figura 12.** Geometrías de derivados de imidazol no nitrados, optimizadas a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.

Con el propósito de analizar la reactividad química de las moléculas estudiadas, se determinó la afinidad protónica (AP), el descriptor de estabilidad SESE y los descriptores químico-cuánticos globales: dureza química ( $\eta$ ), potencial de ionización (I), índice de electrofilia ( $\omega$ ) e índice de aromaticidad ( $\Delta$ ). La Tabla 3 muestra los valores de dichos descriptores, los cuales serán analizados en su respectiva sección.

**Tabla 3.** Descriptores químicos-cuánticos para moléculas de referencia y derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p)//6-311+G(d,p) en fase acuosa.

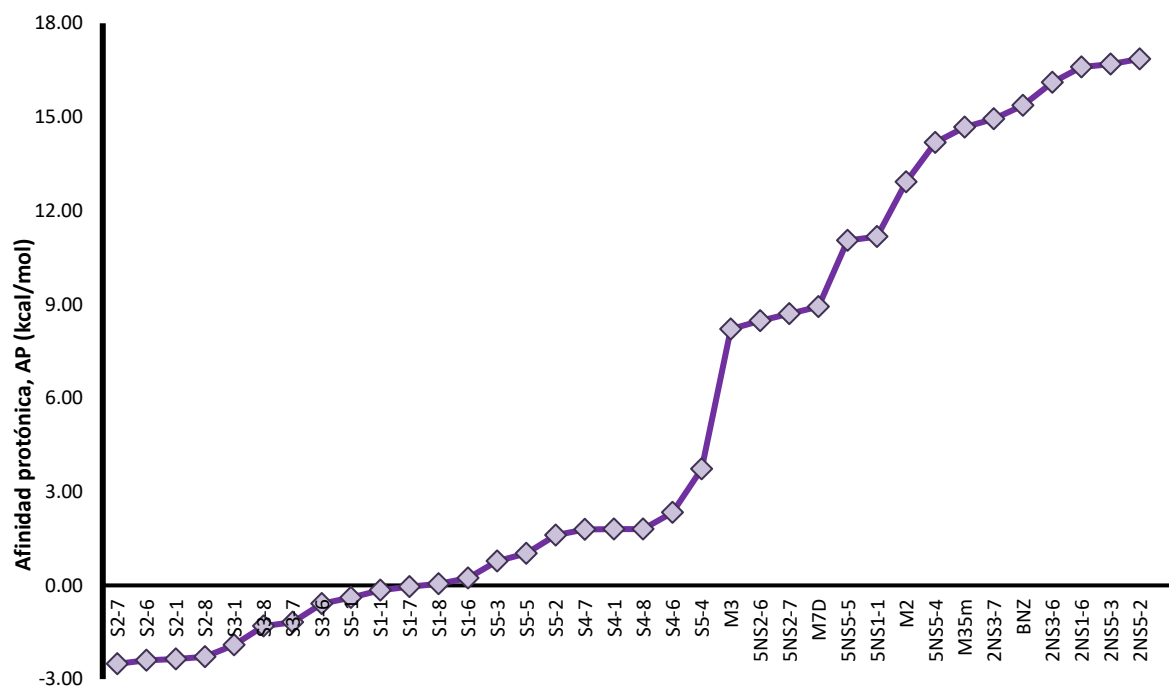
Molécula		AP (kcal/mol)	$\eta$ (eV)	I (eV)	$\omega$ (eV)	SESE (kcal/mol)	$\Delta$ (eV)
Moléculas de Referencia	BNZ*	15.37	10.18	6.83	0.15	-0.47	0.24
	M3**	8.21	10.09	6.88	0.17	10.23	0.18
	M35m	14.67	10.18	6.88	0.16	-0.70	0.08
	M2**	12.92	10.01	6.82	0.16	0.42	0.16
	M7D**	8.92	10.46	7.20	0.19	7.66	0.20
Imidazoles	S1-1	-0.15	7.36	6.47	0.53	-----	0.31
	S1-6	0.24	7.69	6.54	0.47	-----	0.07
	S1-7	-0.04	8.60	6.46	0.27	-----	0.41
	S1-8	0.05	8.39	6.45	0.30	-----	0.21
	S2-1	-2.36	7.18	6.22	0.48	-----	0.68
	S2-6	-2.40	7.39	6.24	0.44	-----	0.15
	S2-7	-2.51	8.37	6.22	0.25	-----	0.69
	S2-8	-2.29	8.16	6.22	0.28	-----	0.08
	S3-1	-1.91	7.15	6.19	0.48	-----	0.71
	S3-6	-0.58	7.39	6.21	0.43	-----	0.21
	S3-7	-1.18	8.33	6.19	0.25	-----	0.73
	S3-8	-1.30	8.12	6.19	0.28	-----	0.10
	S4-1	1.80	6.96	6.02	0.46	-----	1.01
	S4-6	2.34	7.19	6.04	0.42	-----	0.39
	S4-7	1.79	8.16	6.02	0.23	-----	0.92
	S4-8	1.80	7.95	6.02	0.26	-----	0.30
	S5-1	-0.39	8.05	6.37	0.34	-----	0.96
	S5-2	1.61	8.26	6.58	0.36	-----	0.78
	S5-3	0.78	8.01	6.32	0.34	-----	0.99
	S5-4	3.73	7.83	6.16	0.32	-----	1.11
S5-5	1.02	8.25	6.48	0.34	-----	1.15	
Nitroimidazoles	2NS5-2	16.86	10.78	7.38	0.18	-2.02	0.08
	2NS1-6	16.60	9.89	6.55	0.13	2.40	0.11
	2NS5-3	16.69	10.40	7.02	0.16	-2.03	0.32
	2NS3-6	16.11	9.85	6.54	0.13	0.88	0.11
	2NS3-7	14.94	10.51	7.22	0.18	-1.44	0.15
	5NS2-6	8.47	9.75	6.53	0.14	10.44	0.07
	5NS2-7	8.70	10.27	7.04	0.18	8.45	0.40
	5NS5-5	11.05	10.73	7.39	0.19	6.58	0.39
	5NS1-1	11.17	10.17	6.91	0.16	11.20	0.16
	5NS5-4	14.18	10.23	6.97	0.17	-0.27	0.25

\* Valores obtenidos de la referencia. [Campos-Fernández, 2019]. \*\* Valores obtenidos de la referencia [Campos-Fernández, 2017]. eV= electrón Volts.

### Afinidad Protónica (AP)

La afinidad protónica (AP) es un descriptor local que determina la basicidad del átomo N3 del anillo imidazol mediante las reacciones isodérmicas, donde los valores obtenidos son el resultado de la diferencia entre la energía de la molécula neutra y la energía de la molécula protonada, conservando el mismo número de enlaces de ambos lados de la reacción, con lo que se eliminan los errores.

En la Tabla 3 y Gráfica 1, se muestran los valores de afinidad protónica del átomo N3 de las moléculas de referencia, así como de sus derivados nitrados y no nitrados, con respecto a la influencia de sus respectivos sustituyentes R9. Valores energéticos altos implican una mayor basicidad.



**Gráfica 1.** Afinidades protónicas para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa.

Como se puede observar en la Gráfica 1, el BNZL y sus derivados 2-nitroimidazol: 2NS5-2, 2NS5-3, 2NS1-6, 2NS3-6, 2NS3-7 y M35m, poseen los valores de afinidad protónica más altos, lo que indica que los átomos de N3 de dichas estructuras poseen mayor basicidad que sus análogos 5-nitroimidazol: 5NS5-4, M2, 5NS1-1, M7D, 5NS2-6 y M3. Este comportamiento podría deberse a que los 2-nitroimidazol tienen mayor proximidad del grupo nitro al átomo de N3, y como consecuencia, es mayor la influencia ejercida por los efectos inductivos y de resonancia.

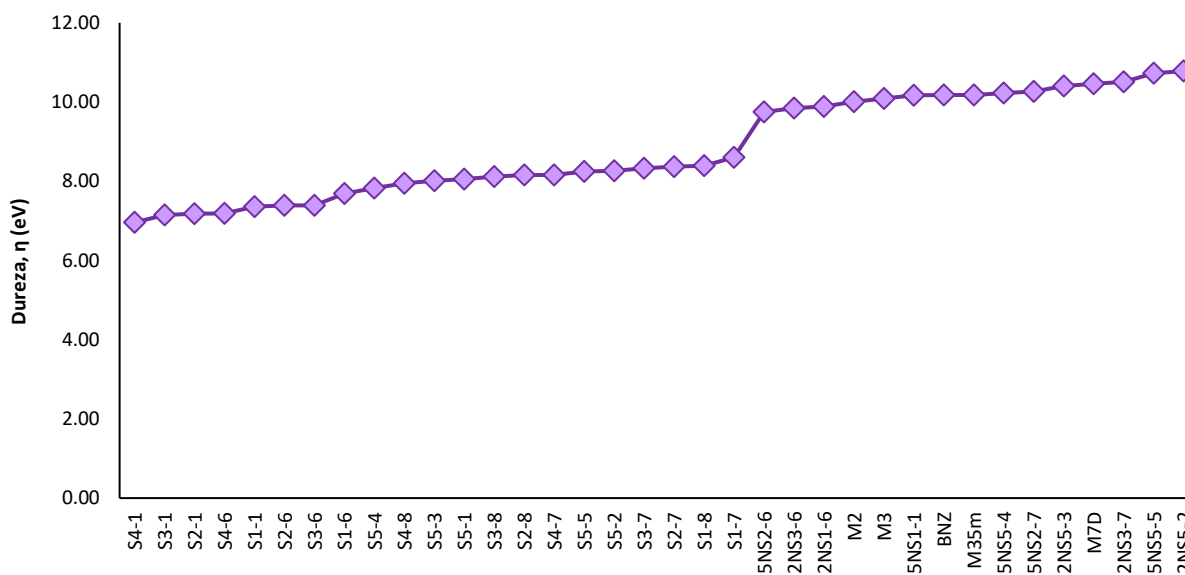
Cabe destacar que, en todos los casos, la presencia del grupo metilo en los sustituyentes R1 (para los 5-nitroimidazoles) y R2 (para los 2-nitroimidazoles), disminuye los valores de afinidad protónica. En contraste, la basicidad del átomo de N3 aumenta con la presencia del grupo metoxilo (metil éter) en los sustituyentes R1.

Por otro lado, los derivados del imidazol no nitrados tienen los valores más bajos de afinidad protónica, lo que indica que la presencia del grupo nitro es crucial para preservar la basicidad del átomo de N3. Estos resultados concuerdan con estudios semejantes reportados previamente [Campos-Fernández, 2017].

### **Dureza química ( $\eta$ )**

La dureza química ( $\eta$ ) es un descriptor de reactividad global, en el que los valores de energía más altos están relacionados con moléculas más estables, es decir, menos reactivas.





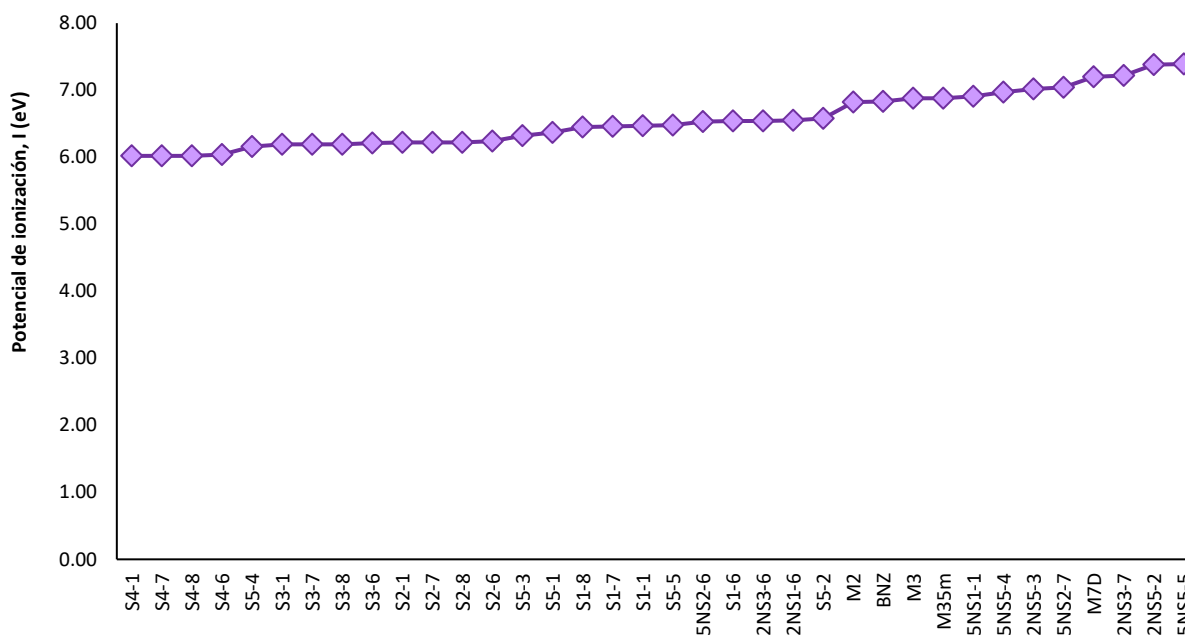
**Gráfica 2.** Valores de dureza química ( $\eta$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa.

Los resultados de la Tabla 3 y Gráfica 2 muestran que el BNZ y las moléculas nitradas tienen valores mayores de dureza química en comparación con sus respectivos análogos no nitrados, lo que sugiere que son las moléculas más estables. Sin embargo, dicha estabilidad disminuye por la presencia del benzimidazol en el sustituyente R9, como se observa en las moléculas 2NS1-6, 2NS3-6 y 5NS2-6, en comparación con sus análogas, las moléculas cabeza de serie BNZ, M35m y M3.

Por otro lado, se observa que los imidazoles no nitrados que poseen el grupo ftalazina en el sustituyente R9 (S1-7, S1-8, S2-7, S3-7, S4-7, S2-8, S3-8 y S4-8), tienen valores más altos de dureza química que sus análogos con sustituyente benzimidazol (S1-6, S2-6, S3-6) o grupos bencílicos (S1-1, S2-1, S3-1, S4-1). Estos resultados indican que la presencia del grupo ftalazina en el sustituyente R9 confiere mayor estabilidad a los derivados de imidazol no nitrados.

### Potencial de ionización (I)

El potencial de ionización (I) es un descriptor global que mantiene una relación directamente proporcional entre los valores energéticos obtenidos, con la estabilidad de las moléculas analizadas, debido a que representa la energía necesaria para que una molécula pueda liberar un electrón; es decir, si los valores son menores, la liberación del electrón se dará con mayor facilidad, por lo tanto, tendrá un mayor efecto oxidativo; si los valores son mayores, la liberación del electrón será menos factible, por lo tanto, el efecto oxidativo será menor.



**Gráfica 3.** Valores de potencial de ionización (I) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa.

En la Tabla 3 y Gráfica 3 se puede observar que las moléculas derivadas del nitroimidazol poseen los valores de potencial de ionización más altos, por lo que la

presencia del grupo nitro puede relacionarse con mayor estabilidad estructural. Tal es el caso de las moléculas cabeza de serie: BNZ, M3, M35m y M2, las cuales, tienen valores mayores de potencial de ionización que sus respectivos análogos imidazoles no nitrados: S1-1, S2-1, S3-1 y M2. Estos resultados coinciden con lo observado en la dureza química.

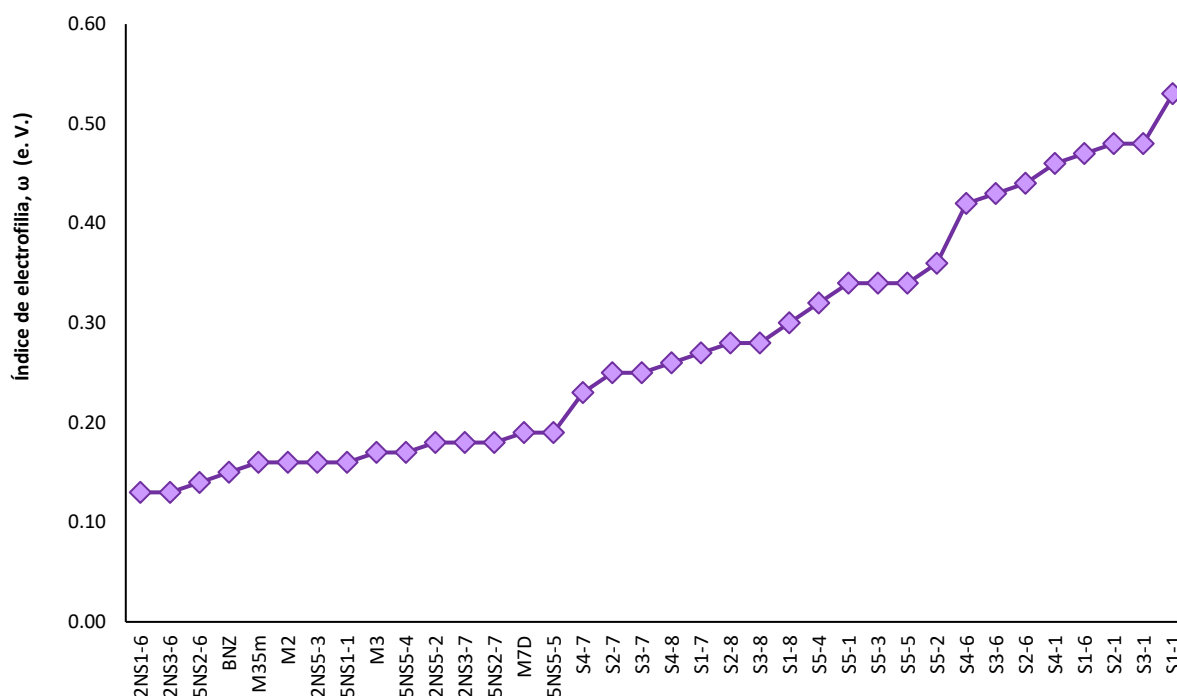
Asimismo, se observa que las moléculas S5-2, S1-6, S1-1, S1-7 y S1-8, tienen valores de potencial de ionización más altos que sus análogos derivados de imidazol no nitrados, lo que sugiere que la presencia del sustituyente R1= H, aumenta la estabilidad estructural de dichas moléculas.

### **Índice de electrofilia ( $\omega$ )**

El índice de electrofilia está definido como la capacidad de una molécula de aceptar carga electrónica, por lo que puede relacionarse con la reactividad global del sistema.

En la Tabla 3 y Gráfica 4 se puede observar que el BNZ y los derivados del nitroimidazol tienen los valores más bajos de índice de electrofilia, lo que sugiere que las estructuras nitradas son menos susceptibles de aceptar carga electrónica que los derivados del imidazol no nitrados. Este comportamiento concuerda con los resultados de la dureza química y el potencial de ionización, lo cual comprueba que la presencia del grupo nitro modifica la estructura electrónica de las moléculas y por consecuencia, en sus propiedades de reactividad.

Del mismo modo, se puede observar que los imidazoles no nitrados con el grupo ftalazina en el sustituyente R9, poseen los valores de electrofilia más bajos de su respectiva serie, lo que indica que esta estructura confiere mayor estabilidad a dichas moléculas, lo cual coincide con los resultados de dureza química.



**Gráfica 4.** Valores de índice de electrofilia ( $\omega$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa.

Considerando que la toxicidad es un parámetro crítico en el diseño de fármacos, en las últimas décadas Roy et al. [Roy, 2005 & 2006], han realizado estudios en donde correlacionaron el índice de electrofilia con datos experimentales de toxicidad de diversos grupos de moléculas orgánicas. Valores altos están relacionados con mayor

probabilidad de formar enlaces covalentes con el DNA, lo cual podría causar mutaciones y daño genético [LoPachin, 2019].

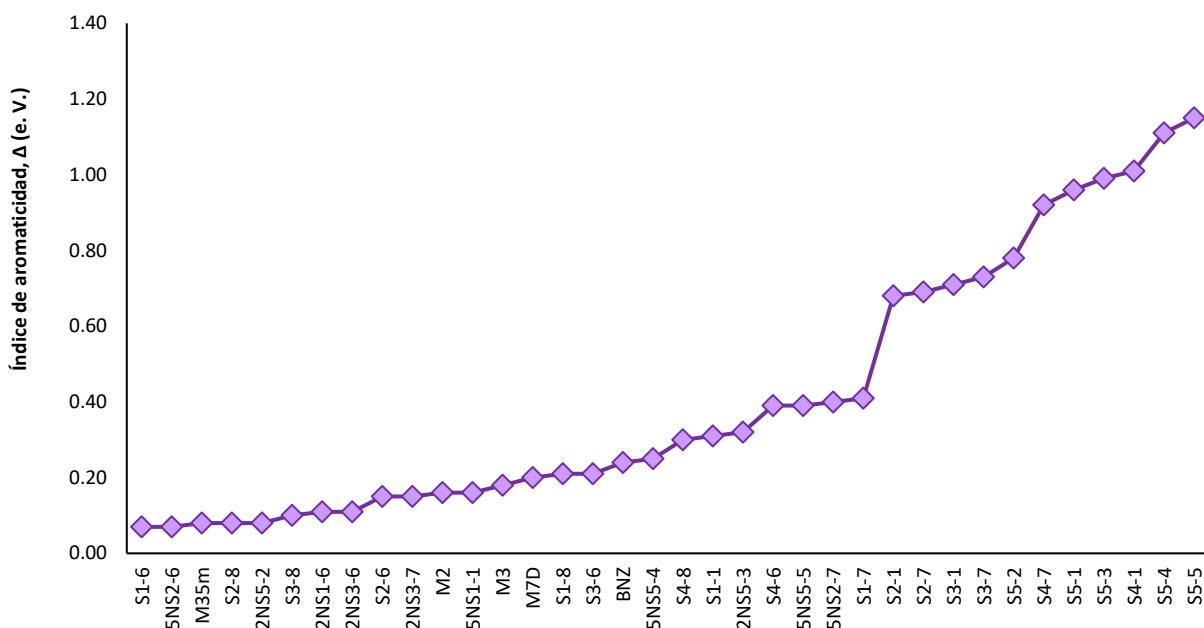
En este sentido, en la Tabla 3 y Gráfica 4 se puede observar que las moléculas no nitradas S1-1, S1-6, S2-1, S2-6, S3-1, S3-6 y S4-1 tienen los valores más altos de índice de electrofilia, por lo que podrían considerarse como las moléculas con mayor probabilidad de ocasionar mutaciones genéticas, mientras que, las estructuras nitradas, así como S1-8, S2-8, S3-8 y S4-8, poseen los valores más bajos, por lo que pueden considerarse como las estructuras menos mutagénicas de este estudio.

### **Índice de aromaticidad ( $\Delta$ )**

El índice de aromaticidad ( $\Delta$ ) es un descriptor global que predice indirectamente la carcinogenicidad de un compuesto, cuando tiene anillos aromáticos en su estructura. De acuerdo con los índices de Barone [Barone, 1996; Braga, 1999], una molécula con estructura diferente al pireno es considerada carcinogénica, si los valores obtenidos son mayores que 0.36 eV.

En este sentido, en la Tabla 3 y Gráfica 5, se muestra que las moléculas S2-1, S3-1 y S4-1 tienen los valores más altos de  $\Delta$ , por lo que estas moléculas son las más aromáticas del estudio y, por lo tanto, podrían considerarse como las más carcinogénicas. En cambio, se observa que las moléculas 5NS2-6, S1-6, 2NS5-2, S2-8, S3-8, M35m, 2NS1-6 y 2NS3-6 poseen los valores más bajos, lo que indica que pueden considerarse como las estructuras con menor probabilidad de presentar carcinogenicidad.

Las moléculas con valores por encima de 0.36 eV fueron descartadas para continuar los estudios de acoplamiento molecular.



**Gráfica 5.** Valores de índice de aromaticidad ( $\Delta$ ) para derivados de imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) //6-311+G(d,p) en fase acuosa.

### Descriptor de estabilidad SESE

Con el propósito de analizar la influencia de los sustituyentes R9 y el grupo nitro en la estabilidad y reactividad química de los derivados de imidazol y nitroimidazol, se realizó la evaluación energética de las moléculas bajo estudio por medio del descriptor de estabilidad SESE, donde, los valores SESE < 0 indican una mayor estabilidad energética.

En la Tabla 3, se puede observar que los 2-nitroimidazoles que poseen el sustituyente R9 con grupos funcionales mercaptopiridina, bencilo y ftalazina (2NS5-2,

2NS5-3 y 2NS3-7-así como BNZ, M35m), son las moléculas energéticamente más estables, debido a que tienen valores negativos del descriptor SESE.

Por otro lado, la estabilidad de los nitroimidazoles disminuye cuando el grupo nitro se encuentra en la posición 5, como se observa en las moléculas M7D, M3, 5NS2-6 y 5NS1-1, lo que indica que las moléculas de 5-nitroimidazol son menos estables que los 2-nitroimidazoles. Estos resultados concuerdan con lo analizado en los descriptores de reactividad global: dureza química y el potencial de ionización.

### **Cargas atómicas**

En la farmacología, es importante conocer la distribución de carga de las moléculas de interés, debido a que la identificación de los sitios reactivos puede otorgar información relevante para determinar las posibles interacciones intra e intermoleculares.

La Tabla 4 muestra los valores de las cargas atómicas de los derivados del imidazol y nitroimidazol para los átomos: N1, C2, N3, C4, C5, así como, del sustituyente R9 y el grupo funcional NO<sub>2</sub>, con el propósito de identificar los sitios reactivos del sistema.

Como se puede observar, las cargas negativas están localizadas en el átomo N3 y en el grupo NO<sub>2</sub>, mientras que las cargas positivas están localizadas en los átomos C2, C4 y en los sustituyentes R9, excepto en el caso de S3-6 y 5NS1-1. Del mismo modo, los resultados indican que, en todas las moléculas, los átomos N3 tienen valores más negativos que las cargas atómicas de los átomos N1, lo que concuerda con las propiedades anfóteras del imidazol reportadas en la literatura [Bhatnagar,

2011; Richaud 2011 & 2010; Paquette, 1999; Shalini, 2010] y en estudios anteriores [Campos-Fernández, 2017].

**Tabla 4.** Cargas atómicas para derivados del imidazol y nitroimidazol a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.

Molécula	N1	C2	N3	C4	C5	O7	O8	R9	NO <sub>2</sub>
BNZ*	0.314	0.201	-0.595	0.221	-0.347	-0.511	-0.528	0.072	-0.212
M3**	0.257	0.444	-0.683	0.269	-0.357	-0.558	-0.564	0.050	-0.169
M35m	-0.228	0.432	-0.604	0.059	0.143	-0.489	-0.453	0.308	-0.309
M2**	0.075	0.706	-0.649	0.207	-0.316	-0.569	-0.581	0.100	-0.191
M7D**	-0.021	0.545	-0.683	0.244	-0.243	-0.547	-0.556	0.167	-0.183
S1-1	0.291	0.167	-0.685	0.220	-0.471	----	----	0.028	----
S1-6	0.300	0.147	-0.680	0.199	-0.419	----	----	0.030	----
S1-7	0.169	0.212	-0.694	0.215	-0.392	----	----	0.098	----
S1-8	0.172	0.211	-0.694	0.212	-0.388	----	----	0.098	----
S2-1	-0.039	0.525	-0.738	0.171	-0.395	----	----	0.200	----
S2-6	0.229	0.408	-0.727	0.152	-0.449	----	----	0.047	----
S2-7	0.128	0.455	-0.732	0.152	-0.409	----	----	0.103	----
S2-8	0.121	0.446	-0.732	0.152	-0.398	----	----	0.105	----
S3-1	-0.074	0.235	-0.689	0.060	0.060	----	----	0.182	----
S3-6	0.250	0.135	-0.678	0.073	-0.106	----	----	-0.002	----
S3-7	0.093	0.192	-0.680	0.046	0.014	----	----	0.087	----
S3-8	0.082	0.189	-0.677	0.046	0.002	----	----	0.101	----
S4-1	0.027	0.682	-0.677	0.052	-0.378	----	----	0.116	----
S4-6	0.039	0.681	-0.679	0.052	-0.398	----	----	0.120	----
S4-7	-0.100	0.756	-0.690	0.051	-0.336	----	----	0.184	----
S4-8	-0.068	0.743	-0.695	0.075	-0.365	----	----	0.172	----
S5-1	0.129	0.454	-0.724	0.191	-0.402	----	----	0.058	----
S5-2	0.191	0.234	-0.685	0.235	-0.394	----	----	0.041	----
S5-3	0.104	0.240	-0.684	0.100	-0.042	----	----	0.048	----
S5-4	-0.026	0.728	-0.680	0.097	-0.372	----	----	0.108	----
S5-5	0.188	0.395	-0.723	0.249	-0.436	----	----	0.006	----
2NS5-2	0.280	0.242	-0.575	0.201	-0.273	-0.459	-0.419	0.062	-0.244
2NS1-6	0.367	0.178	-0.585	0.222	-0.355	-0.486	-0.477	0.022	-0.194
2NS5-3	0.026	0.339	-0.579	0.078	0.059	-0.467	-0.426	0.132	-0.279
2NS3-6	0.226	0.177	-0.567	0.080	-0.002	-0.504	-0.483	0.059	-0.205
2NS3-7	0.158	0.183	-0.560	0.062	0.030	-0.525	-0.531	0.122	-0.230
5NS2-6	0.167	0.461	-0.681	0.236	-0.271	-0.487	-0.546	0.068	-0.186
5NS2-7	0.098	0.469	-0.681	0.235	-0.197	-0.545	-0.488	0.111	-0.231
5NS5-5	0.228	0.468	-0.671	0.252	-0.244	-0.509	-0.477	-0.027	-0.200
5NS1-1	0.378	0.228	-0.630	0.259	-0.328	-0.540	-0.509	-0.023	-0.148
5NS5-4	-0.045	0.778	-0.683	0.209	-0.209	-0.524	-0.453	0.177	-0.236

Las cargas atómicas de los átomos y grupos funcionales están dadas en unidades atómicas (u.a)  
\* Valores obtenidos de la Ref. [Campos-Fernández, 2019]. \*\* Valores obtenidos de la Ref. [Campos-Fernández, 2017].



También, es posible observar que, las cargas atómicas de los átomos N1, N3, C5 y del sustituyente R9, se modifican debido a la presencia del grupo nitro y de sus sustituyentes R1= -CH<sub>3</sub> y R2= -OCH<sub>3</sub>, como se muestra para las moléculas cabeza de serie BNZ, M3, M35m y M2, con respecto a sus respectivos análogos imidazoles no nitrados: S1-1, S2-1, S3-1 y S4-1.

Es importante mencionar que, los átomos de N3 para los derivados del imidazol no nitrados, tienen valores más negativos que los derivados del nitroimidazol; estos resultados ilustran que el efecto electro-atractor del grupo NO<sub>2</sub> es más fuerte que el efecto del sustituyente R9. Del mismo modo, en el caso de los nitroimidazoles, las cargas atómicas de los átomos C2 y C5 se ven afectadas por la presencia del grupo nitro en la posición dos, mientras que las cargas atómicas de los átomos C4 se ven afectadas principalmente por la presencia del grupo nitro en la posición cinco del anillo de imidazol, respectivamente.

Cabe destacar que, en los derivados del 2-nitroimidazol, el sustituyente R2 tiene una importante influencia sobre las cargas del N1 y R9, ya que, cuando el sustituyente R2= H (como en el caso del BNZ), el átomo N1 posee un valor de carga positivo; en contraste, cuando R2= CH<sub>3</sub> (como en el caso de la molécula M35m), el N1 tiene un valor de carga negativo. Estos resultados están relacionados con las características electrófilas del grupo nitro, las cuales no son equilibradas cuando el sustituyente R2 es hidrógeno.

### **Función condensada de Fukui**

La función condensada de Fukui es un descriptor local obtenido mediante el análisis poblacional de las cargas atómicas de Hirshfeld [Hirshfeld, 1977], el cual, permite analizar los sitios de interacción en regiones específicas de una molécula y relacionar a los átomos que son potenciales sitios reactivos para ataques electrofílicos, nucleofílicos o radicales, respectivamente.

La Tabla 5 muestra los valores de la función Fukui, para los átomos C2, N3, C4, C5, N6, O7 y O8, así como del sustituyente R9, de las moléculas de referencia, los derivados del imidazol y derivados del nitroimidazol.

Como se puede observar, para los derivados del imidazol no nitrados, la función negativa ( $f^-$ ) se encuentra principalmente en los átomos C2, N3, C4 y C5, y, para los derivados de nitroimidazol, así como para las moléculas S1-6 y S1-8, se localiza principalmente en el sustituyente R9, lo que indica que estos sitios pueden sufrir posibles ataques electrofílicos.

Por otro lado, la función positiva ( $f^+$ ) para los derivados de nitroimidazol está localizada principalmente en los átomos N6, O7 y O8, y para los derivados del imidazol no nitrados, se localiza en el sustituyente R9, lo cual indica que estos sitios podrían sufrir ataques nucleofílicos.

Los valores de la función radical ( $f^0$ ) para los derivados del imidazol no nitrados se localizan en los átomos C4 y C5, y, para los derivados de nitroimidazol, en los átomos O7 y O8, lo que sugiere posibles ataques radicales.

**Tabla 5.** Función condensada de Fukui para derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.

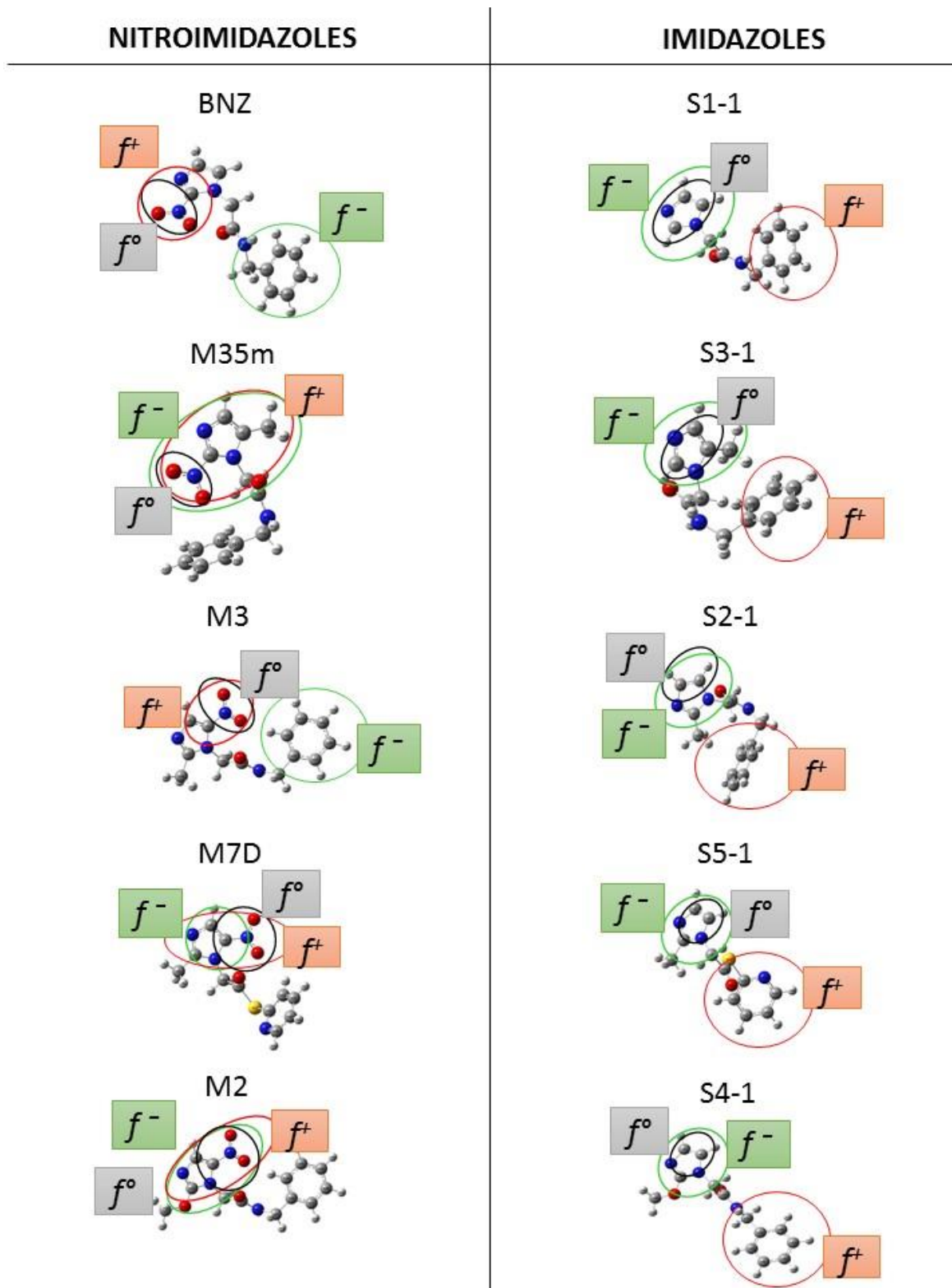
Mol	<i>f</i> <sup>-</sup>					<i>f</i> <sup>+</sup>				<i>f</i> <sup>°</sup>			
	C2	N3	C4	C5	R9	N6	O7	O8	R9	C4	C5	O7	O8
BNZ*	----	----	----	----	0.145 0.181	0.164	0.245	0.212	----	0.027	0.034	0.123	0.106
M3**	----	----	----	----	0.148 0.181	0.159	0.229	0.192	----	0.051	0.013	0.115	0.097
M35m	0.132	0.065	0.188	0.145	----	0.163	0.239	0.196	----	0.121	0.099	0.158	0.129
M2**	0.078	0.087	0.115	0.141	----	0.156	0.223	0.191	----	0.113	0.085	0.159	0.129
M7D	0.109	0.085	0.135	0.162	----	0.160	0.230	0.198	----	0.118	0.094	0.164	0.133
S1-1	0.161	0.090	0.202	0.216	----	----	----	----	0.153 0.152	0.102	0.108	----	----
S1-6	----	----	----	----	0.123 0.136	----	----	----	0.129 0.133	----	----	----	----
S1-8	----	----	----	----	0.142 0.167	----	----	----	0.109 0.108	----	----	----	----
S2-1	0.123	0.087	0.197	0.208	----	----	----	----	0.141 0.145	0.099	0.105	----	----
S2-6	0.122	0.088	0.196	0.210	----	----	----	----	0.129 0.133	0.099	0.105	----	----
S2-8	0.123	0.088	0.197	0.210	----	----	----	----	0.109 0.108	0.099	0.105	----	----
S3-1	0.158	0.089	0.199	0.167	----	----	----	----	0.142 0.145	0.101	0.084	----	----
S3-6	0.160	0.089	0.199	0.168	----	----	----	----	0.123 0.131	0.100	0.084	----	----
S3-8	0.158	0.089	0.199	0.167	----	----	----	----	0.109 0.108	0.100	0.084	----	----
S4-1	0.094	0.091	0.183	0.197	----	----	----	----	0.147 0.148	0.092	0.099	----	----
S4-8	0.094	0.091	0.183	0.198	----	----	----	----	0.109 0.108	0.092	0.099	----	----
S5-1	0.116	0.087	0.194	0.202	----	----	----	----	0.144 0.141	0.100	0.102	----	----
2NS5-2	----	----	----	----	0.169 0.124	0.162	0.244	0.206	----	0.029	0.031	0.129	0.107
2NS1-6	----	----	----	----	0.118 0.133	0.155	0.225	0.193	----	0.027	0.036	0.116	0.098
2NS5-3	0.125	----	0.187	0.141	----	0.160	0.240	0.201	----	0.069	0.061	0.159	0.131
2NS3-6	----	----	----	----	0.122 0.129	0.153	0.222	0.190	----	0.028	0.028	0.115	0.096
2NS3-7	0.058	0.034	0.083	0.067	0.078 0.078	0.156	0.226	0.191	----	----	----	0.127	0.110
5NS2-6	----	----	----	----	0.131 0.145	0.159	0.227	0.184	----	0.051	0.012	0.115	0.092
5NS1-1	----	----	----	----	0.143 0.179	0.156	0.221	0.197	----	0.049	0.011	0.114	0.101
5NS5-4	0.070	0.083	0.107	0.134	0.099	0.154	0.225	0.196	----	0.106	0.077	0.161	0.132

\* Valores obtenidos de la Ref. [Campos-Fernández, 2019]. \*\* Valores obtenidos de la Ref. [Campos-Fernández, 2017].

De manera general, en la Tabla 5 se muestra que los principales sitios reactivos de los nitroimidazoles están localizados en el grupo nitro (para la función positiva ( $f^+$ )) y en el anillo aromático de su respectivo sustituyente R9 (para la función negativa ( $f^-$ )). Por otro lado, los principales sitios reactivos para los análogos del imidazol no nitrados, están localizados en el C4 y C5 del anillo imidazol (para la función negativa ( $f^-$ )), y en el anillo aromático de su respectivo sustituyente R9 (para la función positiva ( $f^+$ )).

Por este motivo, en la Figura 13, fueron organizadas las estructuras de las moléculas cabeza de serie y sus respectivos análogos derivados del imidazol no nitrados, con el propósito de comparar la ubicación de los sitios reactivos más representativos y la influencia del grupo nitro en su reactividad estructural.

Como se puede observar en la Figura 13 y Tabla 5, las regiones susceptibles de sufrir ataques nucleofílicos, electrófilos y radicales, cambian de posición debido a la presencia del grupo nitro. Un ejemplo de este comportamiento es el caso del BNZ y su análogo S1-1, la molécula M3 y su análogo S2-1, así como en los derivados del nitroimidazol y sus respectivos análogos no nitrados (excepto M35m, M2 y M7D), donde el sustituyente R9 es susceptible a ataques electrofílicos para los nitroimidazoles, y para los imidazoles no nitrados, es susceptible a ataques nucleofílicos. Estos resultados comprueban que el efecto inductivo del grupo nitro influye directamente en la reactividad de las moléculas estudiadas, como se mencionó en los descriptores globales de reactividad química y las cargas atómicas, lo cual, concuerda con la información reportada en estudios anteriores [Campos-Fernández, 2019].



**Figura 13.** Función condensada de Fukui para derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311++G(2df,2p) // M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.

### Isosuperficies de los Orbitales Moleculares Frontera HOMO y LUMO

Las isosuperficies de los orbitales moleculares permiten identificar a los sitios de interacción más importantes susceptibles a ataques electrofílicos y nucleofílicos de una molécula, respectivamente.

La Figura 14 muestra las isosuperficies de los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO de las moléculas cabeza de serie y sus respectivos análogos derivados del imidazol no nitrados. Las estructuras fueron organizadas con el propósito de comparar la ubicación de los sitios reactivos más representativos y la influencia del grupo nitro en su distribución electrónica.

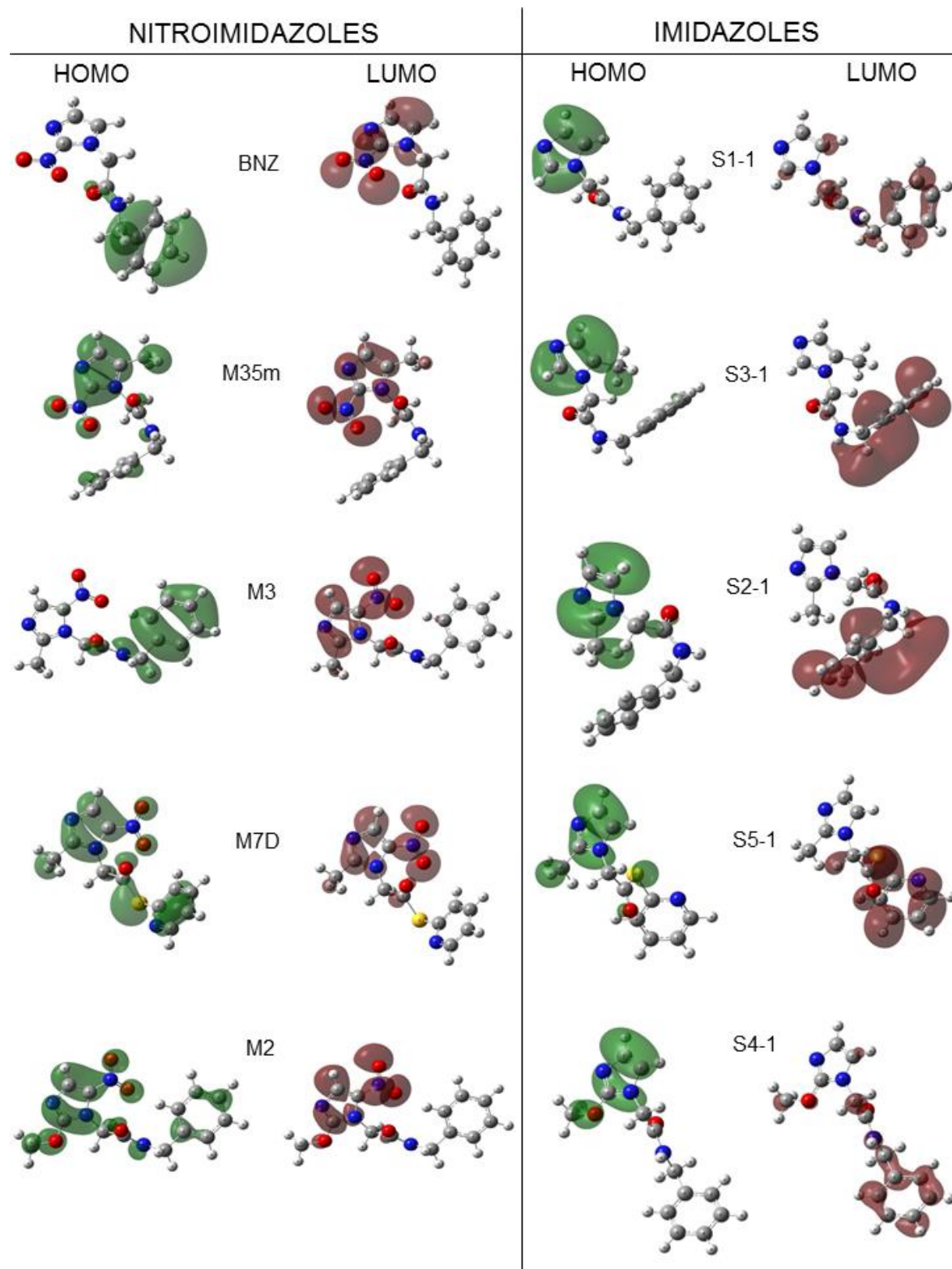
Para el BNZ y M3, se puede observar que los orbitales HOMO están localizados en el bencilo del sustituyente R9, mientras que, para M7D, M2 y M35m, se localizan principalmente en el anillo de imidazol, lo cual indica que estas regiones son susceptibles a sufrir ataques electrofílicos. Por otro lado, se puede observar que para BNZ, M3, M35m, M7D y M2, los orbitales LUMO están localizados en el anillo de imidazol y en el grupo nitro, lo que indica que estas regiones podrían sufrir ataques nucleofílicos.

En el caso de las moléculas derivadas del imidazol no nitradas, los orbitales HOMO están localizadas en el anillo imidazol, mientras que los orbitales LUMO se localizan en el sustituyente R9.

Cabe destacar que, si se compara al BNZ con su análogo S1-1 y a las moléculas cabeza de serie con sus respectivos análogos derivados del imidazol no nitrados, se puede observar nuevamente que la presencia del grupo nitro influye en la ubicación de los sitios reactivos de las moléculas, como se había mencionado anteriormente. En

este caso, las regiones susceptibles a los ataques nucleofílicos y electrofílicos, cambian de posición cuando el grupo nitro no está presente en la estructura.

Además, en todas las moléculas, las isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO y LUMO se localizan en las mismas zonas que las funciones de Fukui y cargas atómicas previamente analizadas, confirmando los sitios de interacción más importantes para cada estructura.



**Figura 14.** Isosuperficies de los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO, para los derivados del imidazol y nitroimidazol, a nivel de teoría M06-2X/6-311+G(d,p) en fase acuosa.



## Modelado por Homología

Debido a que la estructura cristalina de la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* no se encuentra disponible en la base de datos, se realizó un protocolo de modelado por homología para obtener su estructura tridimensional y utilizar dicho modelo en los estudios de acoplamiento molecular.

### Selección de moldes y alineamiento estructural

Como primer paso, se realizó la búsqueda de estructuras de proteínas en el Protein Data Bank, mediante el uso de la plataforma BLAST-P [Altschul, 1990].

A través de un análisis de calidad estructural, se seleccionaron los moldes que cumplían los criterios requeridos para llevar a cabo el modelado por homología. Los criterios a evaluar utilizados fueron: porcentaje de cobertura > 30%, porcentaje de identidad > 30%, e-value <  $10^{-4}$ , resolución < 3.5, score > 200, R-value < 0.2 y R-free > R-value. La Tabla 6 muestra las cuatro proteínas con mayor porcentaje de identidad de secuencia y cobertura identificadas.

**Tabla 6.** Criterios de Calidad Estructural<sup>‡</sup>

ID	% Identidad	E-value	% Cobertura	Score	Coenzima	Resolución	R-free	R-value	Ligando
5GLG*	37.33	5.00E-80	40.00	272.0	FAD	1.80	0.214	0.179	Succinato
1KSU**	35.39	1.00E-67	39.00	239.0	FAD	2.00	0.239	0.167	Fumarato
1QJD**	35.19	5.00E-67	39.00	238.0	FAD	1.80	0.267	-----	Malato
1QO8**	34.79	5.00E-68	41.00	240.0	FAD	2.15	0.281	0.225	-----

<sup>‡</sup>Valores obtenidos por cristalografía de Rayos X

\* Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*. \*\* Microorganismo: *Shewanella frigidimarina*

De acuerdo con el análisis de calidad estructural, las proteínas identificadas fueron: PDB ID: 5GLG [Kim, 2018], con 37.33% de porcentaje de identidad; PDB ID: 1KSU [Pankhurst, 2002], con 35.39% de porcentaje de identidad; PDB ID: 1QJD [Taylor, 1999], con 35.19% de porcentaje de identidad; y PDB ID: 1QO8 [Bamford, 1999], con 34.79% de porcentaje de identidad.

Cabe destacar que todas las proteínas disponibles en la base de datos del Protein Data Bank mostraron un porcentaje de cobertura de  $\leq 41\%$ , además, sólo una de las proteínas identificadas tenía cristalizado al fumarato (que es el ligando de interés) y ninguna tenía cristalizada a la coenzima NADH. No obstante, dichas proteínas incluyen el segmento de aminoácidos del 315 a 950, el cual, corresponde al sitio catalítico del fumarato y al sitio de interacción para la formación del complejo coenzima-FRD, como está reportado en la literatura [Merlino, 2014; Kim, 2018; Kim, 2019; Reid, 2000; Van Hellemond, 1994].

Por lo tanto, las cuatro proteínas fueron seleccionadas como moldes para realizar la construcción de los modelos, con el propósito de observar el comportamiento de la proteína en sus diferentes etapas y simular cierta flexibilidad.

La Figura 15 muestra el alineamiento múltiple, donde los residuos que integran el sitio catalítico de la proteína con el FAD están resaltados en verde, mientras que los residuos que forman el sitio catalítico de la proteína con el fumarato están resaltados en amarillo.

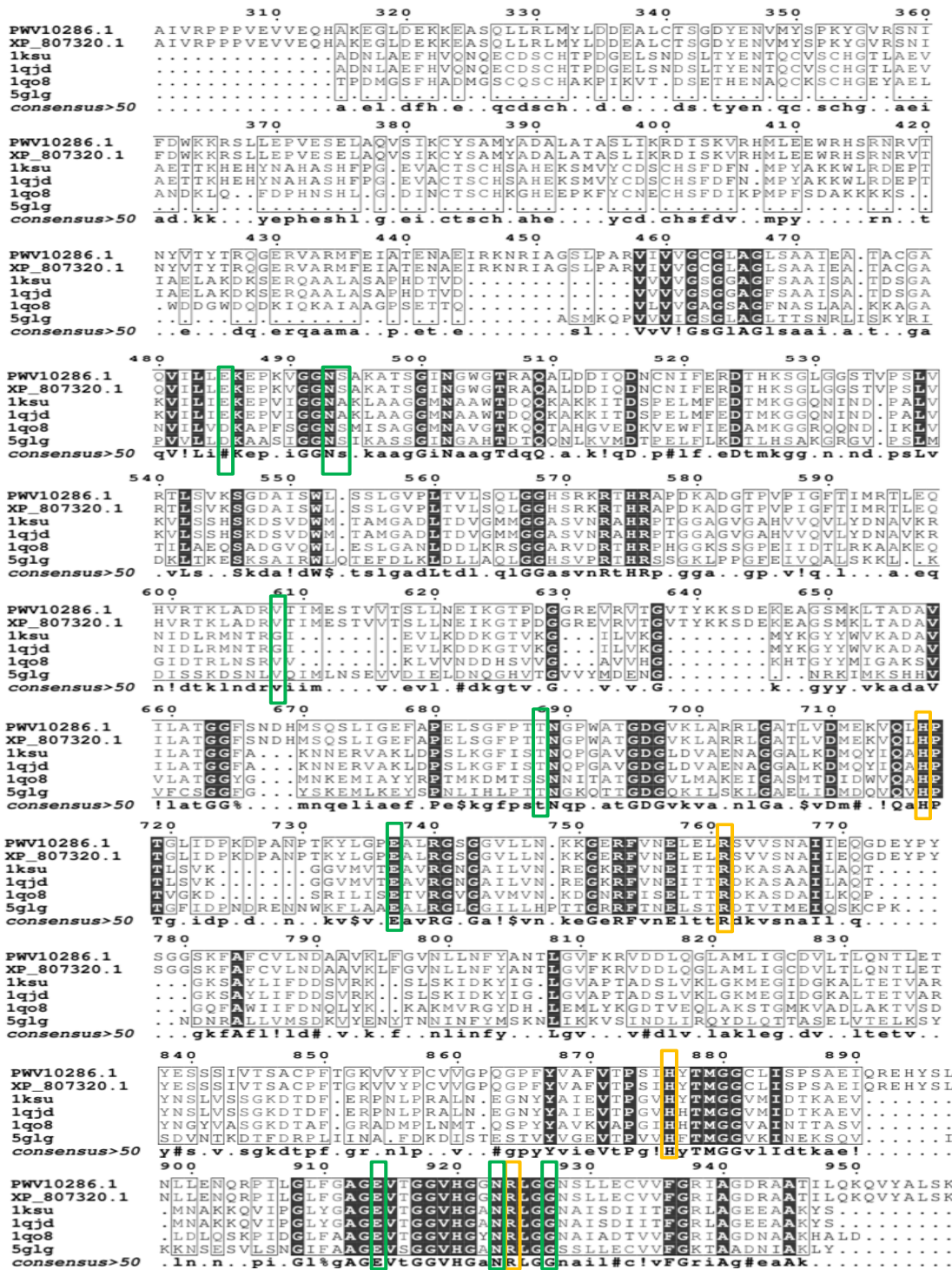
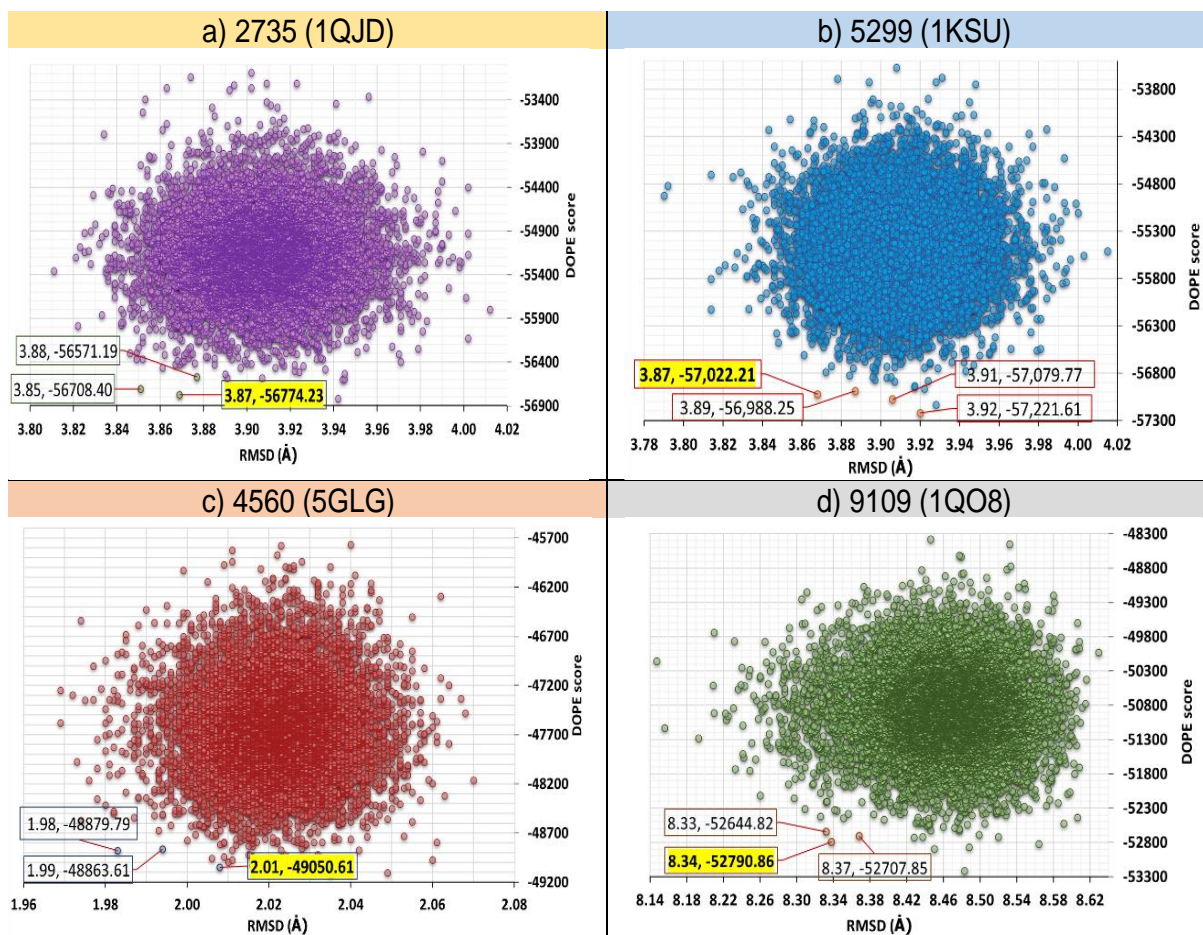


Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias para la proteína problema y moldes seleccionados. Los residuos que integran el sitio catalítico de FAD están resaltados en color verde, mientras que los residuos que integran el sitio catalítico de fumarato, están resaltados en amarillo.

### Construcción del Modelo

Se construyeron 10 000 modelos, lo cuales fueron generados a partir de cada uno de los moldes propuestos y se seleccionaron los cuatro modelos con los mejores valores de RMSD y DOPE score, es decir, se seleccionó un modelo por cada molde; como se muestra en la Figura 16.

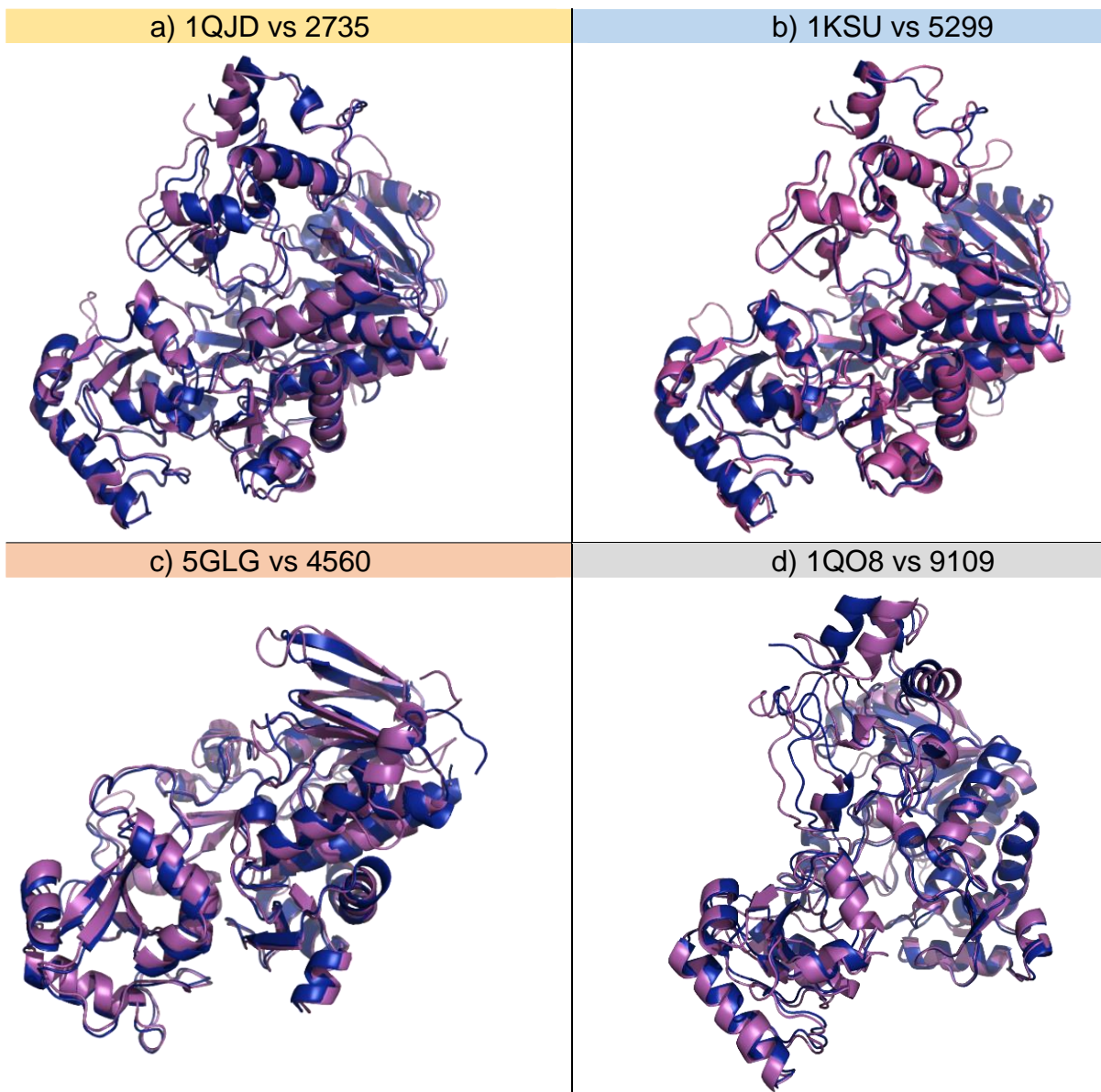


**Figura 16.** Modelos generados para: a) 1QJD (morado), b) 1KSU (azul), c) 5GLG (rojo), d) 1QO8 (verde). Los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) se calcularon con ProFit [McLachlan, 1982; Martin (s.f.)] y la puntuación estadística DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) se calculó con MODELLER 9.21 [Webb, 2016].

Del molde 1QJD, se seleccionó el modelo 2735 con valores de RMSD=3.87 Å, DOPE=-56 774.23. Para el molde 1KSU, se seleccionó el modelo 5299 con valores de RMSD=3.87 Å, DOPE=-57 022.21. Para el molde 5GLG, se seleccionó el modelo 4560 con valores de RMSD=2.01 Å, DOPE=-49 050.61. Para molde 1QO8, se seleccionó el modelo 9109 con valores de RMSD=8.34 Å, DOPE=-52 790.86.

Dichos modelos fueron evaluados y comparados visualmente con sus respectivos moldes utilizando el software PyMOL [Pymol, Versión 2.0], como se muestra en la Figura 17.

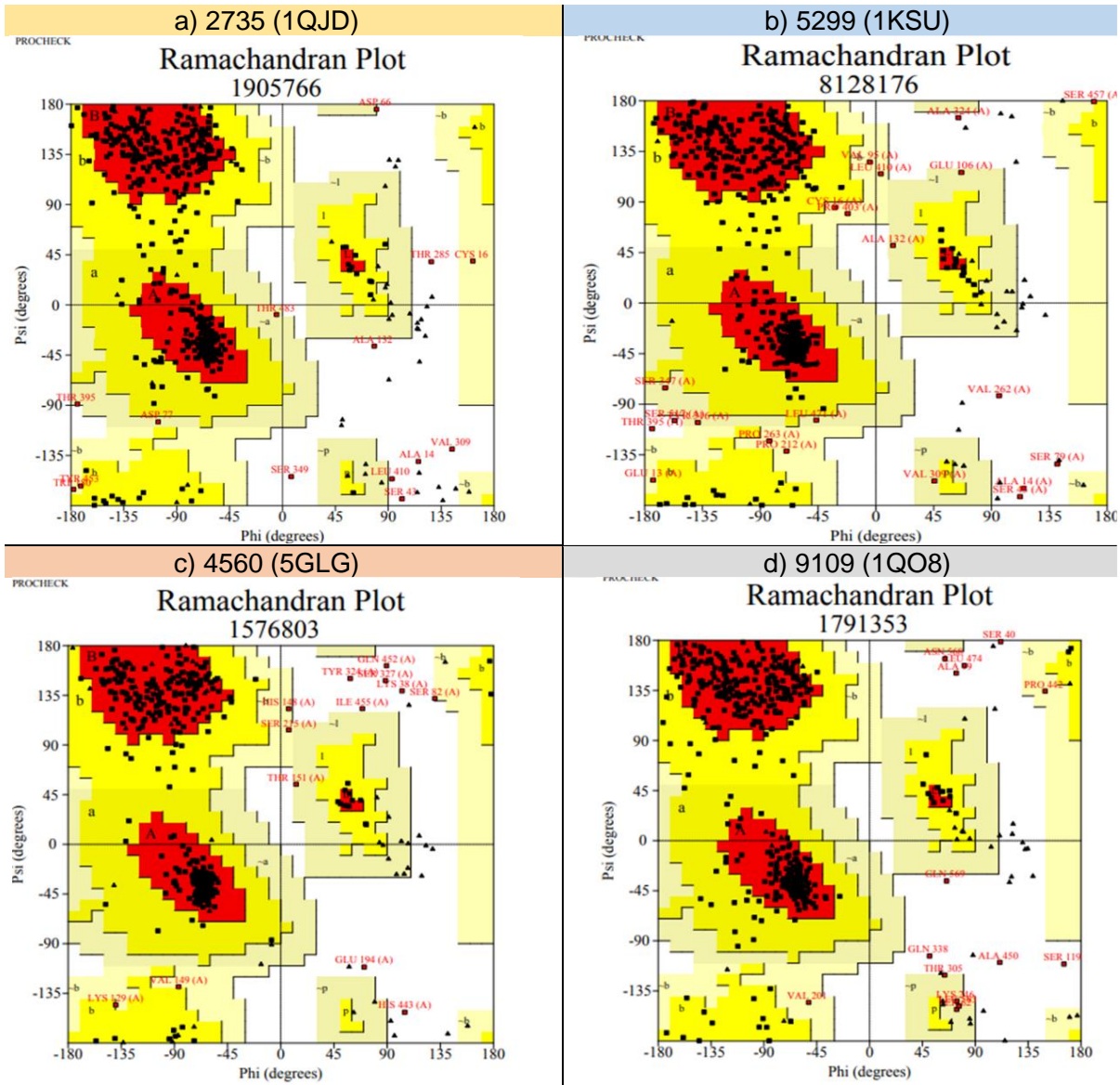




**Figura 17.** Modelos seleccionados (magenta) comparados con sus respectivos moldes (azul): a) 1QJD vs el modelo 2735, b) 1KSU vs el modelo 5299, c) 5GLG vs el modelo 4560, d) 1QO8 vs el modelo 9109. Los modelos se generaron con MODELLER 9.21 [Webb, 2016].

En la Figura 17 se puede observar que las estructuras de los modelos enzimáticos son muy similares a las de sus respectivos moldes, especialmente en las regiones del sitio catalítico, por lo cual, se realizó la evaluación de la calidad

estereoquímica de los modelos a través de los gráficos de Ramachandran, como se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Gráficos de Ramachandran para los modelos seleccionados: a) Modelo 2735 (1QJD), b) Modelo 5299 (1KSU), c) Modelo 4560 (5GLG), d) Modelo 9109 (1QO8).

Los resultados de los gráficos de Ramachandran mostraron que los aminoácidos de cada modelo seleccionado se encuentran en sitios permitidos

[Ramachandran, 1963]. En el caso del modelo 2735 (1QJD), se obtuvo un porcentaje total del 98,7%. Para el modelo 5299 (1KSU), se obtuvo un porcentaje total del 98,7%. Para el modelo 4560 (5GLG), se obtuvo un porcentaje total del 98,3%. Para el modelo 9109 (1QO8), se obtuvo un porcentaje total del 98,5%. De acuerdo con los resultados mostrados en el estudio de modelado por homología, se confirmó que las estructuras modeladas tienen la calidad requerida [Ramachandran, 1963] para continuar con el estudio de acoplamiento molecular.

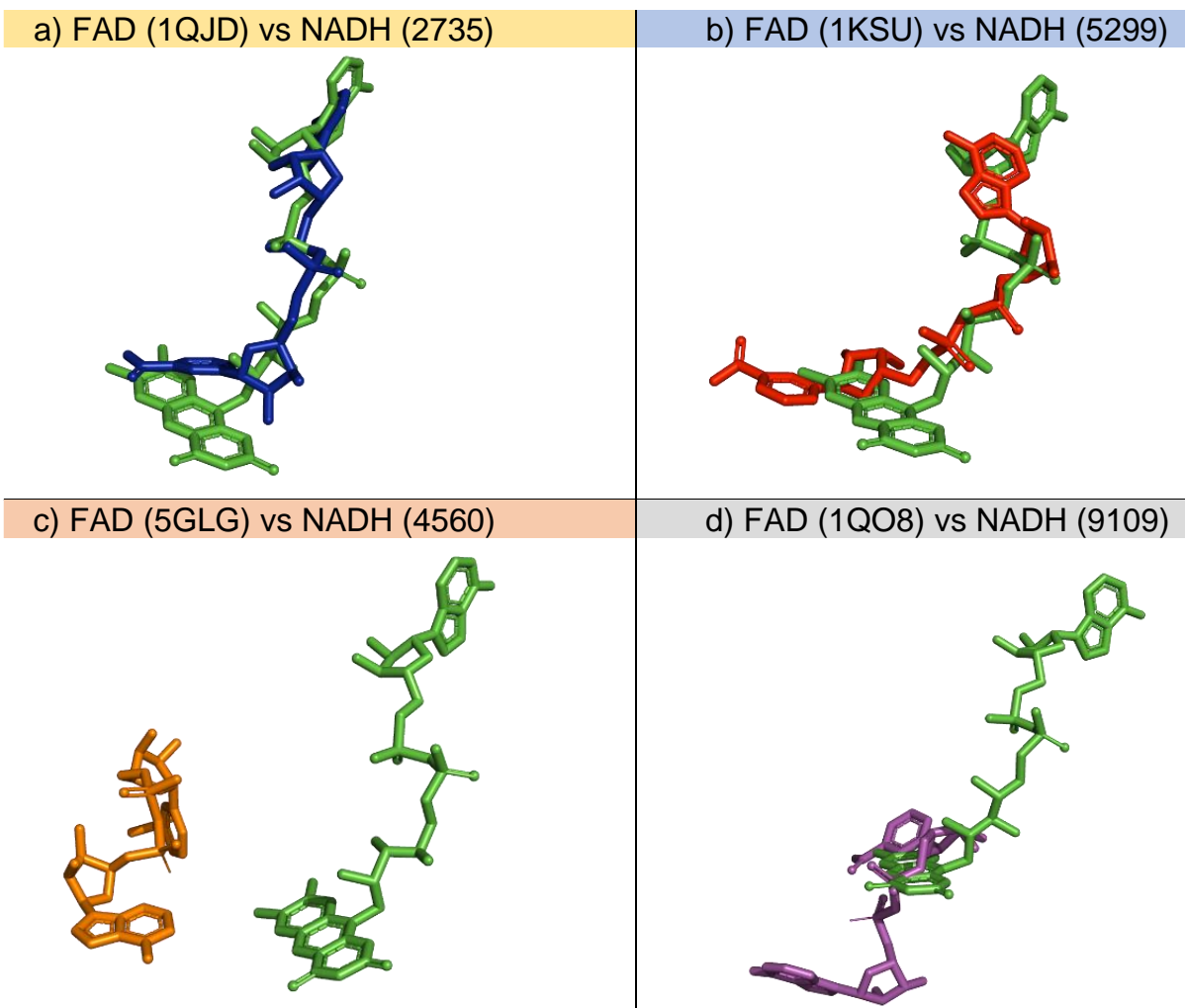
## **Acoplamiento Molecular**

### **Formación del complejo Coenzima-FRD**

Inicialmente se realizó el estudio de acoplamiento molecular para formar y seleccionar al complejo NADH-FRD más adecuado, comparando la ubicación espacial del FAD cristalizado, con la ubicación espacial del NADH acoplado al modelo respectivo, como se muestra en la Figura 19.

Los complejos formados por acoplamiento son: NADH-5299, NADH-2735, NADH-4560 y NADH-9109; mientras que los complejos cristalizados con los que fueron comparados son: FAD-1KSU, FAD-1QJD, FAD-5GLG y FAD-1QO8, respectivamente.





**Figura 19.** a) Acoplamiento molecular de FAD-1QJD cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-2735 (azul), b) Acoplamiento molecular de FAD-1KSU cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-5299 (rojo), c) Acoplamiento molecular de FAD-5GLG cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-4560 (amarillo), y d) Acoplamiento molecular de FAD-1QO8 cristalizado (verde) superpuesto con el acoplamiento de NADH-9109 (magenta).

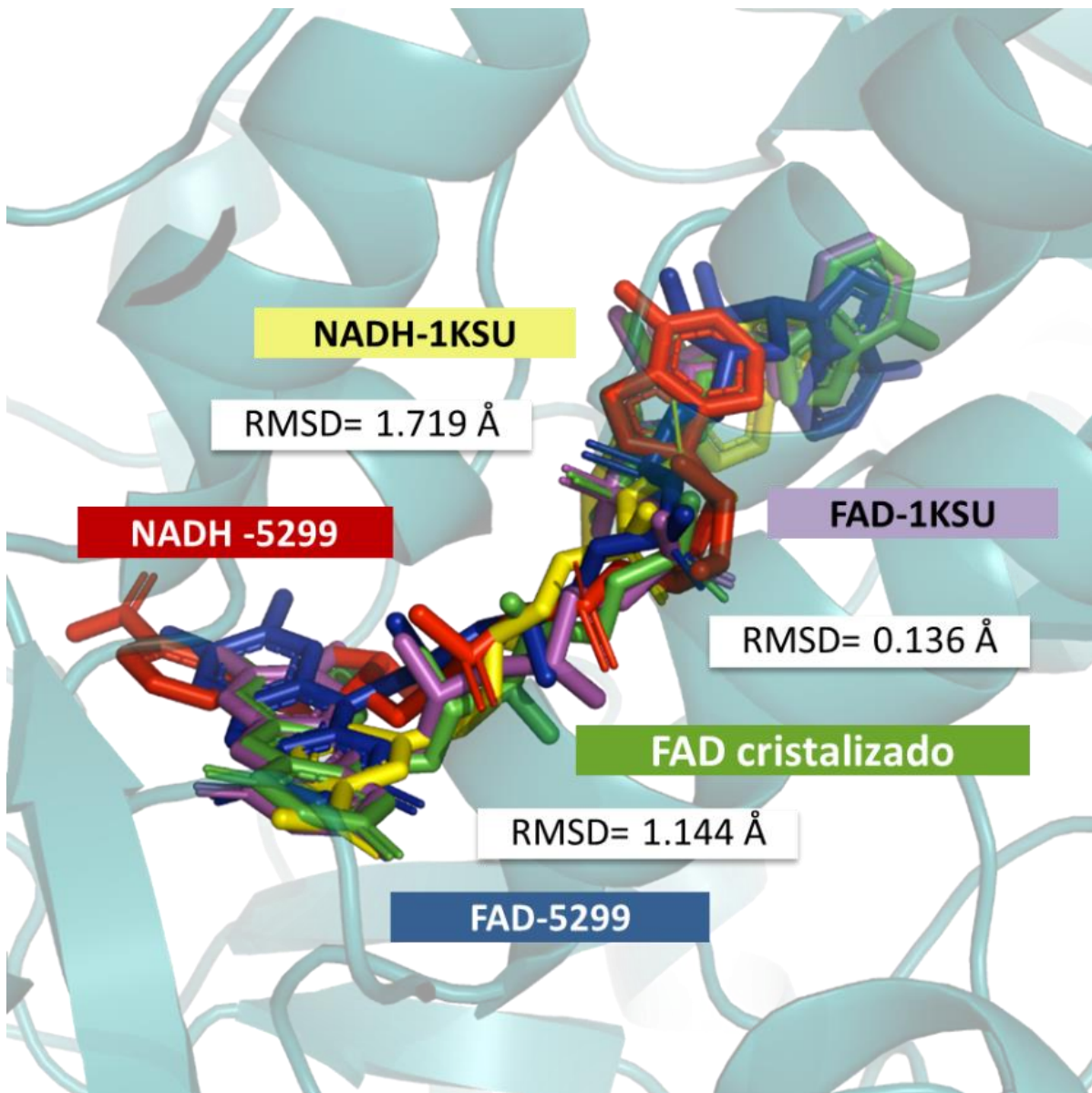
En la Figura 19, se puede observar que el complejo NADH-5299 es el único de los cuatro complejos formados que conservó el sitio de interacción del FAD con su respectivo molde (1KSU), con un valor de energía de unión de -7.1 kcal/mol. Debido a

ello, este complejo fue seleccionado para continuar con los estudios, por lo que, se realizó la validación del protocolo de acoplamiento (Re-Docking).

### **Validación del protocolo de acoplamiento (Re-docking)**

La validación del protocolo de acoplamiento fue realizada mediante la comparación de la ubicación espacial del complejo FAD-1KSU cristalizado, con el FAD acoplado al molde 1KSU. También se comparó la ubicación del complejo FAD-1KSU cristalizado, con el FAD acoplado al modelo 5299. Dicha comparación se llevó a cabo por medio de los valores RMSD obtenidos.

Del mismo modo, se compararon las ubicaciones espaciales de la coenzima NADH acoplada al molde 1KSU y de la coenzima NADH acoplada al modelo 5299, como se muestra en la Figura 20.

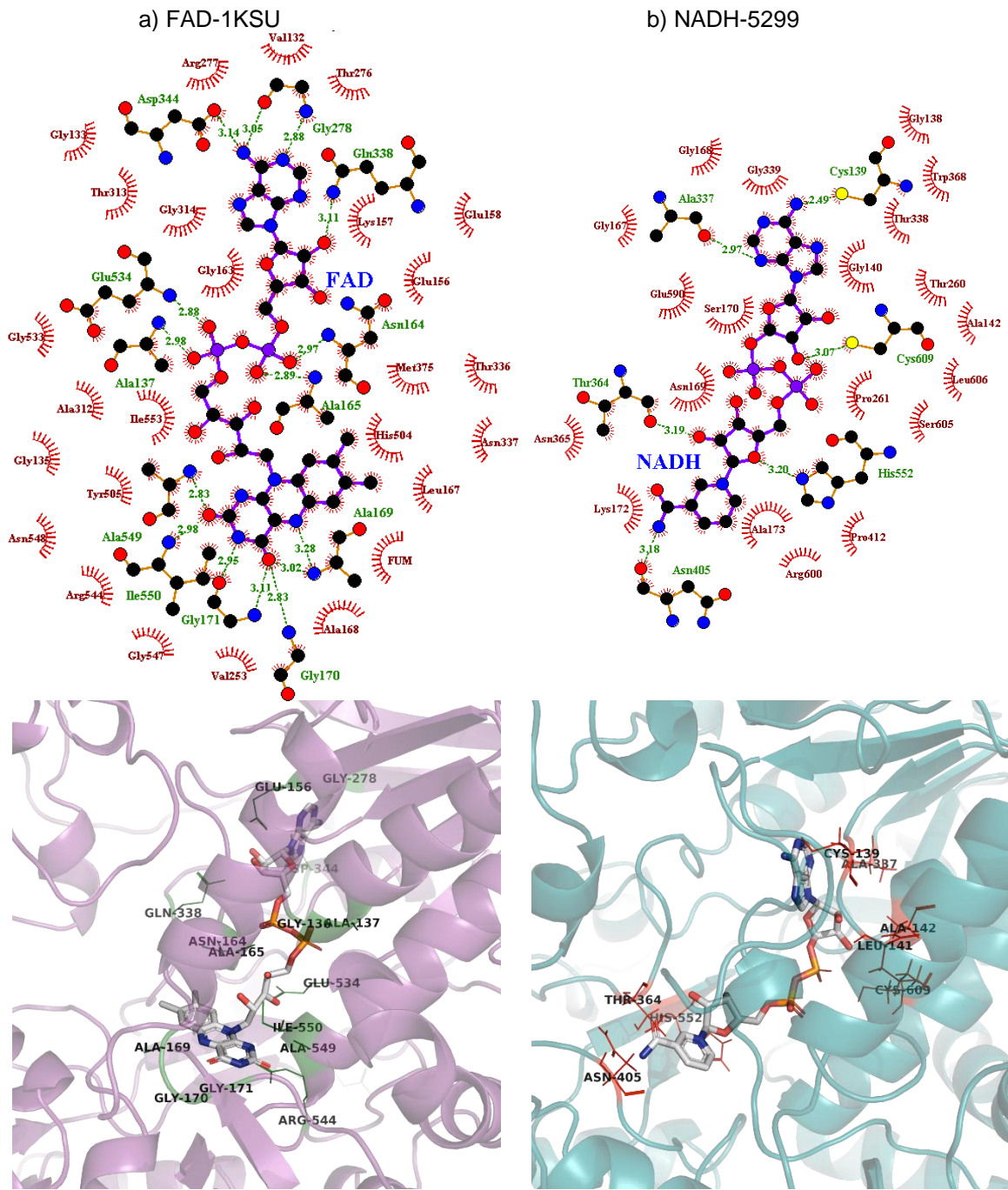


**Figura 20.** Localización espacial del FAD cristalizado (verde) superpuesto con los acoplamientos de: FAD-5299 (azul), FAD-1KSU (magenta), NADH-1KSU (amarillo) y NADH-5299 (rojo).

La Figura 20 muestra que los sitios de unión que presenta el acoplamiento FAD-1KSU frente al complejo FAD-1KSU cristalizado, tienen una diferencia mínima en su localización espacial, con  $\text{RMSD}=0.136 \text{ \AA}$ . También, se puede observar que la localización del FAD acoplado al 5299 coincide con la posición del FAD cristalizado en

1KSU, con una diferencia de RMSD=1.144 Å. Por otro lado, las posiciones de acoplamiento entre el complejo NADH-5299 y NADH-1KSU son muy similares, con una diferencia de RMSD=1.719 Å. Es importante destacar que, las localizaciones espaciales de todos los complejos generados en la validación del acoplamiento, coinciden con la posición del FAD cristalizado al molde 1KSU, por lo tanto, estos resultados confirman que el complejo seleccionado posee el sitio de interacción de interés.

Para realizar un análisis adecuado entre las interacciones del complejo FAD-1KSU y las interacciones del complejo NADH-5299, se compararon los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, las cuales fueron obtenidas con el software LigPlotPlus [Wallace, 1996] y PyMOL [PyMol, Versión 2.0] como se muestra en la Figura 21.



**Figura 21.** a) Interacciones del complejo FAD-1KSU; b) Interacciones del complejo NADH-5299. Las líneas de puntos verdes ilustran las interacciones por puente de hidrógeno, y las líneas de puntos rojas muestran las interacciones hidrofóbicas.

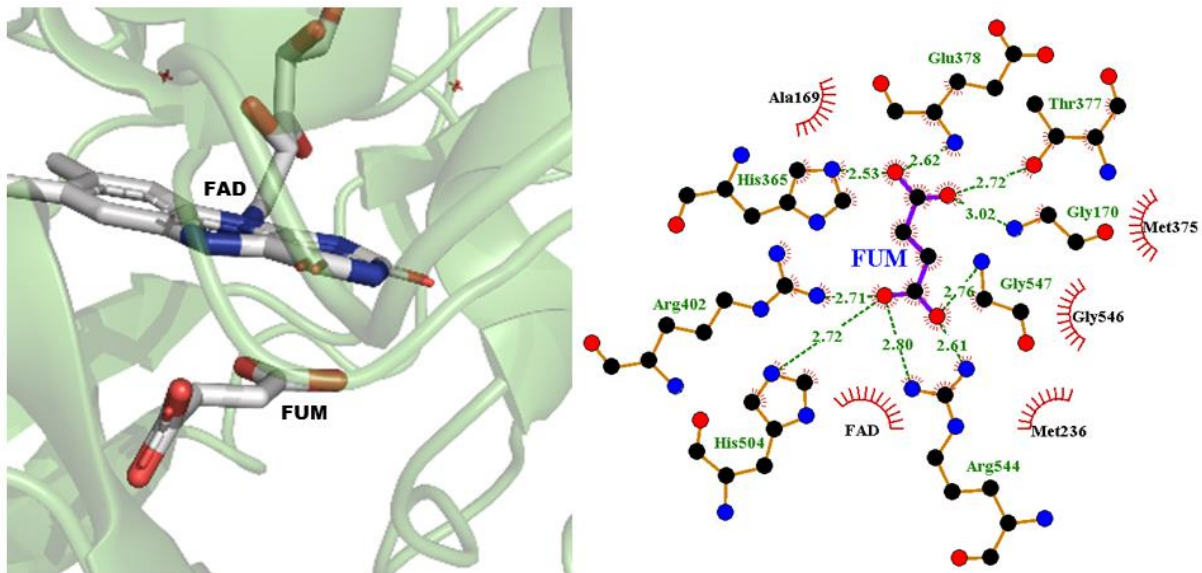
La Figura 21 muestra que las interacciones intermoleculares correspondientes a los puentes de hidrógeno del complejo FAD-1KSU fueron localizadas en los residuos de 1KSU: Gly278 (con el átomo de N5 de la 6-aminopurina y el átomo de N del sustituto amino de la 6-aminopurina del FAD), Asp344 (con el átomo de N de la 6-aminopurina del FAD), Glu534 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido flavina del FAD), Gly136 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido flavina del FAD), Ala137 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido flavina del FAD), Glu156 (con el átomo de O de la hidroxil ribosa del nucleótido adenina del FAD), Ala549 (con el átomo de O del grupo flavina del FAD), Ile550 (con el átomo de O del grupo flavina del FAD), Gly171 (con el átomo de O y el átomo de N del grupo flavina del FAD), Gly170 (con el átomo de O del grupo flavina del FAD), Ala169 (con el átomo de O y átomo de N del grupo flavina del FAD), Ala165 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido adenina del FAD), Asn164 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido adenina del FAD), y Gln338 (con el átomo de O del hidroxilo de la ribosa del FAD). Del mismo modo, sus interacciones hidrofóbicas fueron localizadas en los residuos: Val132, Arg277, Gly133, Thr313, Gly314, Gly163, Gly533, Ala312, Ile553, Gly135, Tyr505, Asn548, Arg544, Gly547, Val253, Ala168, Leu167, His504, Asn337, Met375, Thr336, Glu156, Lys157, Glu158, Thr276.

Además, las interacciones intermoleculares que corresponden a los puentes de hidrógeno del complejo NADH-5299, fueron localizadas en los residuos: Asn405 (con el átomo de N de la nicotinamida del NADH), His552 (con el átomo de O de la ribosa del nucleótido de nicotinamida del NADH), Cys609 (con el átomo de O de la ribosa de hidroxilo del nucleótido de adenina del NADH), Cys139 (con el átomo de N de la 6-

aminopurina del NADH), Ala337 (con el átomo de N8 de la 6-aminopurina del NADH), Ala142 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido nicotinamida de la NADH), Leu141 (con el átomo de O del fosfato del nucleótido nicotinamida de la NADH), Thr364 (con el átomo de O de la ribosa del hidroxilo del nucleótido nicotinamida de la NADH), mientras que sus interacciones hidrofóbicas fueron localizadas en los residuos: Arg600, Ala173, Pro412, Ser605, Pro261, Leu606, Ala142, Thr260, Gly140, Thr338, Trp368, Gly138, Gly339, Gly168, Gly167, Ser170, Glu590, Asn365, Ser170, Glu590.

### **Validación del protocolo de acoplamiento de moléculas de agua dentro del sitio de unión de NADH-fumarato reductasa**

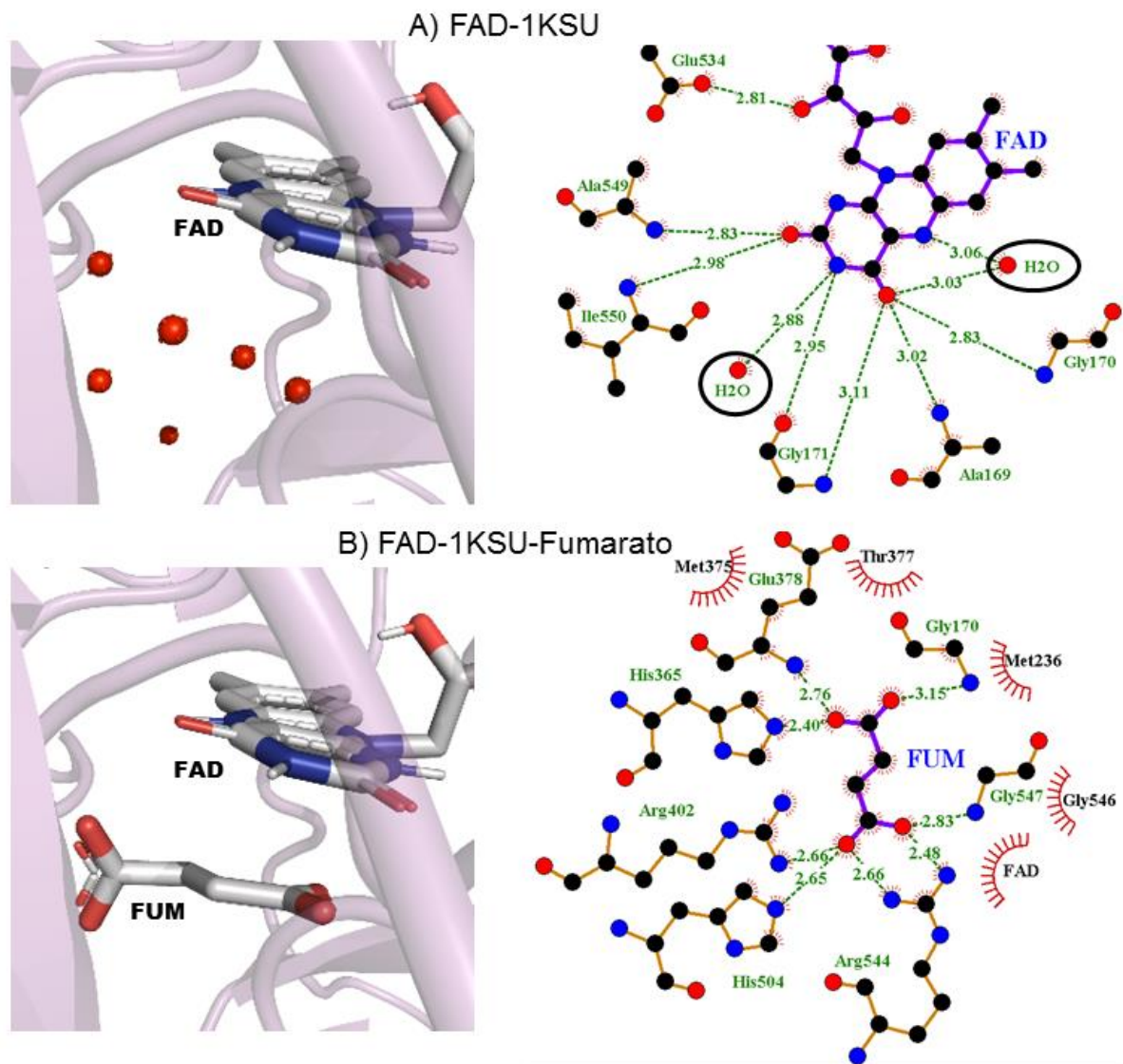
El protocolo de acoplamiento de agua se validó evaluando si los programas podían reproducir la presencia o ausencia de moléculas de agua conservadas en la estructura cristalina del complejo de alta resolución 1KSU [Pankhurst, 2002] (que es homóloga a la enzima NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*). Aunque esta proteína está unida a su coenzima (FAD) y al fumarato, los datos cristalográficos no muestran evidencia de la presencia de moléculas de agua conservadas en las proximidades del sitio de unión del ligando, como se muestra en la Figura 22.



**Figura 22.** La estructura cristalina de 1KSU no revela la presencia de moléculas de agua conservadas dentro del sitio de unión del fumarato.

La Figura 23A muestra que, al acoplar el agua al complejo FAD-1KSU (en ausencia de fumarato), seis moléculas de agua fueron conservadas en los alrededores del sitio de unión al ligando; sin embargo, sólo dos moléculas de agua forman puentes de hidrógeno con el FAD y, dichos puentes de hidrógeno, muestran distancias grandes, de acuerdo con lo reportado en la literatura [Frenking, 2014; Jeffrey, 1998], con longitudes que van desde 2.88 Å y hasta 3.06 Å, lo que sugiere que las interacciones pueden ser considerablemente débiles [Frenking, 2014; Jeffrey, 1998], y su influencia en la estabilización del complejo FAD-1KSU es muy baja.





**Figura 23.** Acoplamiento de moléculas de agua a los complejos: A) FAD-1KSU y B) FAD-1KSU-fumarato, donde las moléculas de agua están representadas en esferas rojas.

En la Figura 23B se puede observar que, en presencia explícita de fumarato, no se conservó ninguna molécula de agua dentro del sitio de unión al ligando. Esto puede confirmar que las interacciones producidas por las moléculas de agua en el complejo FAD-1KSU son realmente débiles, y fueron completamente desplazadas por la presencia del fumarato. Este hallazgo indica que la interacción del fumarato con el

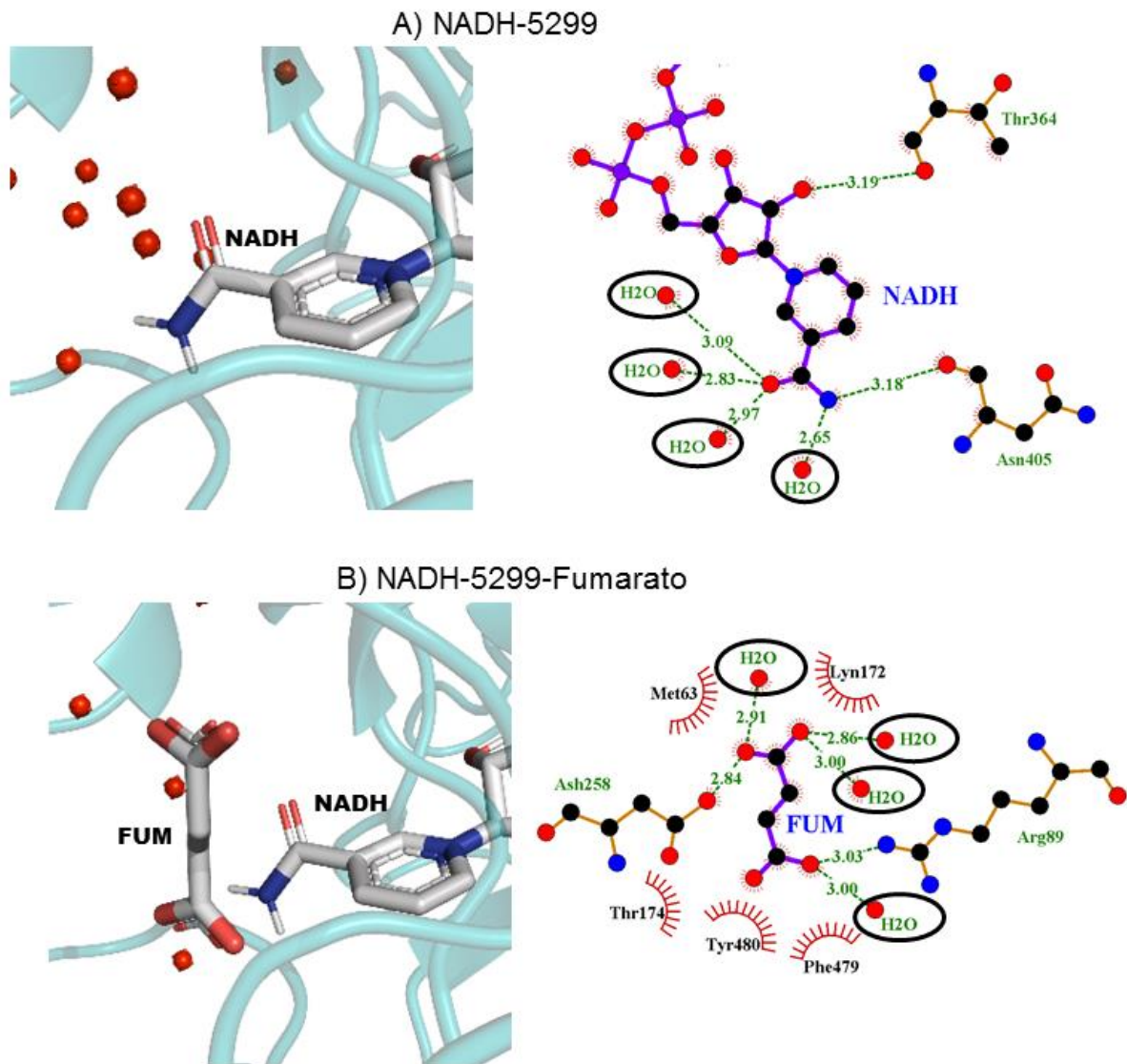
complejo FAD-1KSU tiene mayor afinidad que las moléculas de agua cercanas al sitio de unión, por lo que el fumarato puede estabilizarse con dicho complejo a través de los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que fueron observadas.

Estos resultados coinciden con la ausencia de moléculas de agua conservadas en la estructura cristalográfica original de 1KSU [Pankhurst, 2002], por lo que nuestro protocolo es adecuado para predecir moléculas de agua conservadas en los complejos ligando-proteína similares, como se analizará en la siguiente sección, donde se acoplaron moléculas de agua a los complejos NADH-5299 y NAD-5299-fumarato.

### **Acoplamiento de moléculas de agua en el sitio de unión del complejo NADH-5299-fumarato**

En esta sección se utilizó el protocolo validado para estudiar la posible presencia de moléculas de agua conservadas en el sitio de unión del fumarato con la enzima NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi*. Para llevar a cabo este estudio, se empleó el modelo validado 5299.

En la Figura 24A se puede observar el acoplamiento de las moléculas de agua al complejo NADH-5299, es decir, sin la presencia explícita de fumarato. En dicho acoplamiento identificaron seis moléculas de agua conservadas en el sitio de unión, las cuales, interaccionan con la coenzima formando cuatro puentes de hidrógeno.



**Figura 24.** Acoplamiento de moléculas de agua a los complejos: A) NADH-5299 y B) NADH-5299-fumarato, donde las moléculas de agua están representadas en esferas rojas.

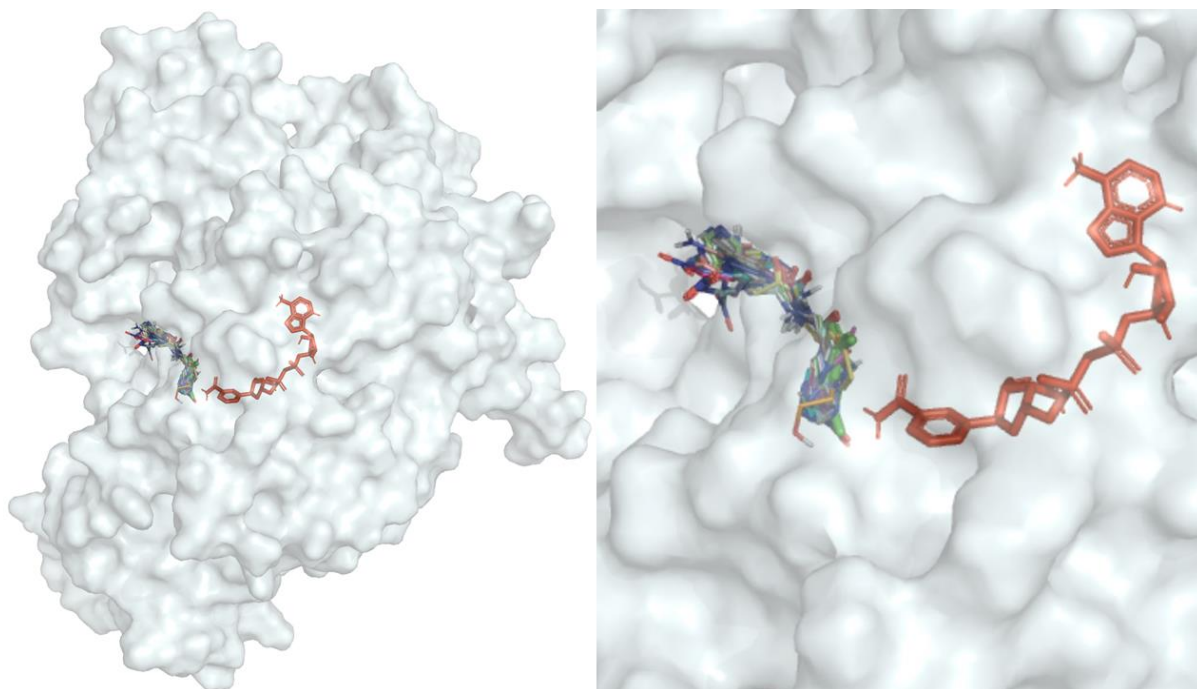
Por otro lado, en la Figura 24B se puede observar que, en presencia explícita del fumarato, cuatro moléculas de agua se encuentran conservadas y forman cuatro puentes de hidrógeno con el fumarato. Sin embargo, las distancias de interacción entre el fumarato y las moléculas de agua, tienen longitudes de enlace de 3.00 Å, 3.00 Å,

2.86 Å y 2.91 Å, lo que da lugar a interacciones débiles, de acuerdo con lo reportado en la literatura [Frenking, 2014; Jeffrey, 1998].

Estos resultados coinciden con los datos cristalográficos experimentales reportados en la estructura 1KSU [Pankhurst, 2002], donde no hay evidencia de que moléculas de agua influyan en la afinidad del fumarato con el complejo coenzima-proteína, por lo tanto, se realizaron los estudios de acoplamiento de los ligandos al complejo NADH-5299 sin incorporar moléculas de agua explícitas.

### **Estudio de acoplamiento Complejo-Ligando**

Una vez obtenido y validado el complejo NADH-FRD (NADH-5299), se realizó el acoplamiento molecular del complejo con el fumarato, los ligandos seleccionados y las moléculas de referencia que conservan el sitio catalítico del fumarato. Además, para corroborar que las interacciones se encuentran en la parte interna de la proteína y no en la superficie, se realizó un análisis visual de la localización espacial del acoplamiento de los ligandos diseñados, como se muestra en la Figura 25.



**Figura 25.** Acoplamiento molecular del complejo NADH-5299 con el fumarato, los ligandos seleccionados y las moléculas de referencia que conservan el sitio catalítico del fumarato.

Las estructuras mostradas en la Figura 25 corresponden a las moléculas S1-1, S1-6, S1-8, S2-8, S3-6, S3-8, S4-8, 5NS1-1 y 2NS1-6, las cuales, se encuentran en la región internalizada de la proteína y conservan el sitio catalítico del fumarato con el complejo NADH-5299. Por el contrario, las estructuras BNZ, M3, M35m, M2, M7D, S2-6, S4-6, 5NS2-6, 2NS3-6, 2NS3-7, 2NS5-2, 2NS5-3 y 5NS5-4, están localizadas en la región superficial de la proteína, lo que dificulta su interacción con el sitio catalítico del fumarato. Las energías de unión e interacciones intermoleculares entre el complejo NADH-5299 y los ligandos seleccionados, las moléculas de referencia y el fumarato, se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Interacciones del complejo NADH-5299 con ligandos seleccionados.

Ligandos	Energía de Enlace (kcal/mol)	Interacciones Hidrofóbicas	Puentes de Hidrógeno
<b>FUM</b>	<b>-4.7</b>	<b>Asp258, Phe479, Thr174, Met63</b>	<b>NAD, Lys172, Tyr480, Arg89</b>
BNZ	-6.2	Ala62, Arg89, Ile57, Thr483, Met63, Thr174, Tyr480, Tyr64, Phe479, NAD	Lys172
M3	-6.4	Ala62, Leu85, Ile57, Arg89, Asp258, Lys172, Thr174, Phe479, Lys58, Met63, Tyr64, Ser61, NAD	
M35m	-6.0	Ile57, Ala62, Leu85, Phe479, Met63, Tyr64, Asp258, Thr174, Arg89, Lys172, NAD	
M2	-6.7	Arg89, Lys172, Asp258, Thr174, Phe479, Met63, Tyr64, Ala62, Lys58, Ser61, Ile57, Leu85	
M7D	-5.7	Ser56, Lys58, Met63, Leu85, Ala62, Ser61, Thr483, Phe479	Asn482
S1-1	-6.0	Tyr64, Ile57, Thr483, Leu85, Phe479, Met63, Thr174, NAD	Arg89, Lys172
S1-6	-6.0	Tyr480, Thr174, Phe479, Met63, Ala62, Ile57, Leu85	Arg89, Lys172
S1-8	-7.2	Ile57, Ala62, Met63, Tyr480, Thr174, Phe479, Leu85	Arg89, Lys172
S2-6	-6.7	Leu85, Ala62, Met63, Ser56, Phe479, Asn482, Ile57, Thr483, Lys58	Arg89, Ser61
S2-8	-7.5	Leu85, Ile57, Tyr64, Tyr480, Phe479, Thr174, Met63	Arg89, Lys172
S3-6	-6.1	Met63, Tyr64, Ile57, Leu85, Arg89, Phe479, Thr174, Tyr480, NAD	Lys172
S3-8	-8.0	Ala62, Met63, Tyr480, Thr174, Phe479, Tyr64, Leu85, Ile57, NAD	Arg89, Lys172, Ser61
S4-6	-6.4	Thr483, Asn482, Met63, Phe479, Ser56, Arg89, Leu85, Ile57, Lys58, Ala62	Ser61
S4-8	-6.8	Leu85, Ile57, Thr174, Tyr480, Phe479, Met63	Arg89, Lys172
2NS5-2	-6.1	Ser61, Thr483, Ser56, Phe479, Met63, Tyr64, Ala62, Leu85, Ile57	Arg89, Lys58
2NS1-6	-6.8	Thr174, Met63, Arg89, Ile57, Leu85, Tyr64, Phe479	Tyr480, Lys172, NAD
2NS5-3	-5.8	Phe479, Thr483, Ser56, Met63, Leu85, Ala62, Ser61	Asn482
2NS3-6	-7.0	Phe479, Lys58, Ile57, Arg89, Ala62, Leu85, Met63, Thr483	Asn482, Ser56
2NS3-7	-7.3	Phe479, Ser56, Lys58, Ile57, Met63, Ala62, Leu85, Arg89, Thr483	Asn482
5NS2-6	-6.9	Phe479, Lys58, Met63, Ile57, Ala62, Leu85, Arg89, Thr483	Asn482, Ser56
5NS1-1	-6.5	Leu85, Tyr64, Phe479, Ser61, Ala62, Met63, Arg89, Lys172, Thr174, NAD	
5NS5-4	-5.8	Ser56, Phe479, Thr483, Ile57, Arg89, Leu85, Ala62	Lys58

En la Tabla 7, se pueden observar las interacciones intermoleculares del fumarato por puentes de hidrógeno, las cuales se localizan en los residuos: NADH, Lys172, Tyr480, Arg89; mientras que las interacciones hidrofóbicas se localizan en los residuos: Asp258, Phe479, Thr174, Met63. Del mismo modo, se colocó en fondo verde a los ligandos que conservaron el sitio catalítico del fumarato y que se acoplaron con los residuos internalizados de la proteína.

Es importante mencionar que, aunque el BNZ y las moléculas cabeza de serie se localizan en la región superficial de la proteína, coinciden con algunos de los residuos que llevan a cabo las interacciones intermoleculares más representativas

entre el fumarato y el complejo NADH-5299, por lo que podrían influir en el modo de unión del fumarato de forma alostérica.

Por otro lado, los puentes de hidrógeno formados entre el fumarato y los residuos Lys172 y Arg89, así como, las interacciones hidrofóbicas formadas entre el fumarato y los residuos: Phe479, Thr174, Met63, se localizaron en casi todos los ligandos acoplados, por lo que dichos aminoácidos son considerados como residuos esenciales para que se lleven a cabo las interacciones.

De acuerdo con los resultados de la sección teórica se seleccionaron a las estructuras S3-8 (-8,0 kcal/mol), S2-8 (-7,5 kcal/mol) y S1-8 (-7,2 kcal/mol) como las moléculas propuestas para la síntesis química, debido a que pueden ser consideradas como potenciales inhibidores de la enzima NADH-fumarato reductasa.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN: SECCIÓN EXPERIMENTAL**

### **Síntesis química**

De las moléculas propuestas en la sección teórica para realizar la síntesis química, se seleccionó a la molécula S2-8 para iniciar la sección experimental, debido a la disposición de los reactivos requeridos.

Para la síntesis química de S2-8, se propuso la formación de cuatro intermediarios, donde, el 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo es el primer intermediario y el 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo, es segundo intermediario. La

formación de estos dos intermediarios fue realizada a través de reacciones de sustitución nucleofílica, como se muestra a continuación:

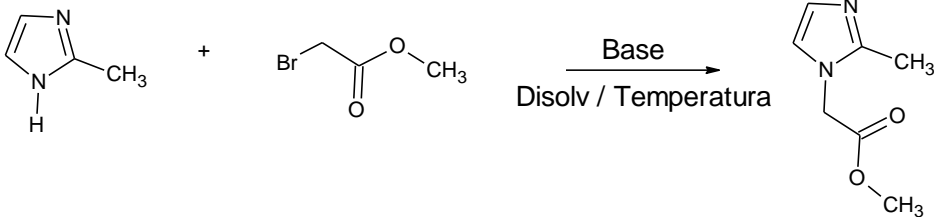
### **Síntesis de 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo**

En la referencia citada [Altana Pharma, 2006], se propone una reacción de metilbromoacetato con el 2-metilimidazol y carbonato de potasio, sin embargo, por cuestiones de logística en los reactivos, se iniciaron las reacciones con carbonato de litio, sin obtener resultados satisfactorios. Del mismo modo, se propusieron otras metodologías, donde se sustituyó el carbonato de litio por TEA o se eliminó la base en el inicio de la reacción y se neutralizó al finalizar; además, se cambiaron los disolventes y las proporciones del 2-metilimidazol y el bromoacetato, sin embargo, tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios. Posteriormente, se inició el trabajo de síntesis con el carbonato de potasio y se reprodujo la metodología citada, con algunas variaciones en los disolventes.

En la Tabla 8 se pueden observar las diferentes condiciones y metodologías probadas para la síntesis del 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo.



Tabla 8. Metodologías utilizadas para obtener el 2-(2-metil-1H-imidazol) acetato de metilo

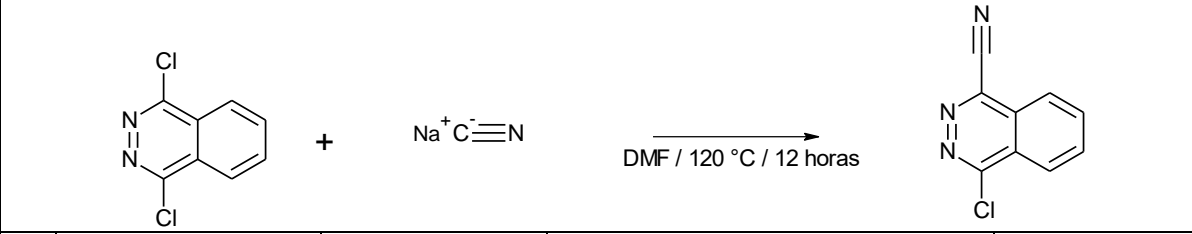
					
	Base	Disolvente / Temperatura / Tiempo	Proporción 2-metilimidazol: metilbromoacetato	Condiciones de Extracción	Resultado
1	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF / 25°C / 14 días	1.5 : 1.0	Tratamiento acuoso:AcOEt. Mantener fase orgánica. Evaporar disolvente	No se obtuvo producto
2	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF / 60°C / 7 días	1.5: 1.0	Tratamiento acuoso:AcOEt. Mantener fase orgánica. Evaporar disolvente	Producto viscoso ámbar. Sin separación de materia prima
3	Sin Base	Sin Disolvente / 70°C / 12 h	2.0 : 1.0	Adicionar 3 mL de DMF. Tratamiento acuoso:AcOEt. Producto en fase orgánica. Evaporar disolvente	Producto viscoso ámbar. Sin separación de materia prima
4	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Metanol / 55°C / 72 h	1.5 : 1.0	Filtrado en frío. Evaporar disolvente Lavar producto viscoso con mezcla de disolventes. Evaporar disolventes. Lavar sólido con AcOEt. Evaporar disolvente	Producto sólido ámbar. Sin separación de materia prima
5	TEA	Sin Disolvente / 0°C / 24 h	1.5 : 1.0	Filtrado en frío. Evaporar disolvente Lavar producto viscoso con mezcla de disolventes. Evaporar disolventes. Lavar sólido con AcOEt. Evaporar disolvente	Producto sólido ámbar. Sin separación de materia prima
6	TEA	Metanol / 70°C / 24 h	1.5 : 1.0	Filtrado en frío. Evaporar disolvente Tratamiento acuoso:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Tratamiento acuoso:AcOEt. Evaporar disolventes. Purificación con Cromatografía en columna	Producto sólido blanco. Pendiente de caracterizar
7	Sin Base	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / 0°C / 24 h	2 : 1.0	Tratamiento acuoso:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Tratamiento acuoso:AcOEt. Evaporar disolventes. Purificación con Cromatografía en columna	Producto sólido viscoso ámbar. Pendiente de caracterizar
8	Sin Base	Tolueno / 25 °C / 48 h	1.0 : 1.5	Filtrado en frío. Lavar con AcOEt y decantar. Neutralizar sólido con NaOH / MetOH. Extraer con AcOEt. Evaporar disolventes. Purificación con Cromatografía en columna	Producto sólido viscoso ámbar. Pendiente de caracterizar
9	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Metanol / 70°C / 72 h	1.5 : 1.0	Filtrado en frío. Evaporar disolvente Tratamiento acuoso:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Tratamiento acuoso:AcOEt. Evaporar disolventes. Purificación con Cromatografía en columna	Producto líquido aceitoso ámbar. Sin separación de materia prima.
10	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF / 25°C / 48 h	1.5 : 1.0	Tratamiento acuoso:AcOEt. Mantener fase orgánica. Evaporar disolvente. Purificación con Cromatografía en columna	Producto sólido ámbar. Pendiente de caracterizar

### Síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo

La síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo se planteó a partir de la referencia citada [Babu, 2016] y la metodología de una patente [Cee, 2014], sustituyendo el cianuro de zinc por cianuro de sodio, y con ausencia del catalizador que estaba propuesto en la referencia inicial.

En la Tabla 9 se pueden observar las diferentes condiciones y metodologías probadas para la síntesis del 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo.

Tabla 9. Metodologías utilizadas para obtener el 4-cloro-1-ftalazinacarbonitrilo

				
	Disolvente / Temperatura / Tiempo	Proporción 1,4-dicloroftalazina: cianuro de sodio	Condiciones de Extracción	Resultado
1	DMF / 120 °C / 24 horas	1 : 1.5	Mantener en agitación a temperatura ambiente por 1 hora. Diluir en una solución saturada de NH <sub>4</sub> Cl y extraer con AcOEt. Lavar con salmuera. Purificar por cromatografía en columna.	Sin producto
2	DMF / 130 °C / 12 horas	1 : 3	Mantener en agitación a temperatura ambiente por 1 hora. Diluir en una solución saturada de NH <sub>4</sub> Cl y extraer con AcOEt. Lavar con salmuera. Purificar por cromatografía en columna.	Producto no relacionado
3	DMSO / 130 °C / 12 horas	1 : 3	Mantener en agitación a temperatura ambiente por 1 hora. Diluir en una solución saturada de NH <sub>4</sub> Cl y extraer con AcOEt. Lavar con salmuera. Purificar por cromatografía en columna.	Producto no relacionado
4	DMF / 120 °C / 24 horas	1 : 1.05	Mantener en agitación a temperatura ambiente por 1 hora. Diluir en una solución saturada de NH <sub>4</sub> Cl y extraer con AcOEt. Lavar con salmuera. Purificar por cromatografía en columna.	Producto pendiente de purificación.

Cabe destacar que la conclusión de la síntesis de la molécula propuesta, forma parte de las perspectivas de este trabajo, las cuales, se tiene contemplado realizar en un proyecto posterior.

## RESUMEN DE RESULTADOS

En el presente estudio se realizó el diseño de nuevas moléculas derivadas del imidazol y nitroimidazol, con baja toxicidad y con potencial efecto terapéutico como inhibidoras enzimáticas de la proteína NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*.

Las plataformas virtuales permitieron una primera selección de moléculas, las cuales, no presentaron toxicidad en la predicción realizada por “Osiris Molecular”. Del mismo modo, se seleccionaron a las moléculas con las mejores propiedades farmacocinéticas obtenidas en la plataforma “Molinspiration”, para mejorar su biodisponibilidad, de acuerdo con lo reportado en la literatura.

A partir de la caracterización y análisis de la estructura electrónica de las moléculas analizadas, se comprobó la importancia del grupo nitro y los efectos del sustituyente en la basicidad, estabilidad, reactividad química y las características fisicoquímicas de los derivados del imidazol y nitroimidazol, lo cual es semejante a lo descrito en estudios previos y en la literatura.

Los resultados de los descriptores químico-cuánticos locales y globales, permitieron la selección de las estructuras S2-8, S3-8, 2NS5-2, 2NS3-7, 2NS5-3 y 5NS1-1, las cuales mostraron las mejores propiedades fisicoquímicas y baja probabilidad de ocasionar mutagenicidad y carcinogenicidad, de acuerdo con lo reportado en la literatura. Además, se observó que la presencia del grupo ftalazina en el sustituyente R9, confiere mayor estabilidad en los derivados de imidazol no nitrados, como se observó en la dureza química, potencial de ionización e índice de electrofilia.

Se modeló una estructura 3D de alta calidad de la enzima NADH-fumarato reductasa para el parásito *T. cruzi*. El modelo 5299 se construyó por modelado por homología a partir de la estructura cristalográfica experimental de *Shewanella frigidimarina* (PDB ID:1KSU). Dicho modelo mostró la mayor robustez estereoquímica y consistencia estructural, con un RMSD de 3.87Å, cuando se superpone a la proteína molde.

Este modelo fue utilizado para analizar la posible presencia de moléculas de agua conservadas dentro del sitio de unión al ligando, complementado con datos cristalográficos experimentales para su validación. Los resultados mostraron la ausencia de moléculas de agua en las interacciones moleculares de la NADH-fumarato reductasa con los ligandos, lo cual coincide con lo reportado en la estructura cristalográfica. Este hallazgo nos permitió realizar el acoplamiento de los ligandos sin incorporar moléculas de agua explícitas en los estudios posteriores.

Las moléculas seleccionadas y evaluadas a través de los estudios de la estructura electrónica, fueron utilizadas como ligandos en el acoplamiento molecular. Los resultados mostraron que los ligandos S1-1, S1-6, S1-8, S2-8, S3-6, S3-8, S4-8, 5NS1-1 y 2NS1-6 interaccionan en el sitio catalítico del fumarato, formando puentes de hidrógeno con los residuos Lys172 y Arg89, e interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe479, Thr174, Met63. Estos residuos fueron identificados como los más importantes del estudio.

Finalmente, a partir de los resultados de la sección teórica, se seleccionaron a las estructuras S3-8 (-8,0 kcal/mol), S2-8 (-7,5 kcal/mol) y S1-8 (-7,2 kcal/mol) como potenciales inhibidoras de la NADH-fumarato reductasa. Cabe destacar que dichas

moléculas no contienen al grupo funcional nitro, lo cual es de gran importancia para disminuir la toxicidad reportada en los fármacos de referencia. Por lo tanto, se eligió a la molécula S2-8 para iniciar con la síntesis química.

## CONCLUSIONES

La caracterización de la estructura electrónica permitió seleccionar a las moléculas con las mejores propiedades fisicoquímicas, de reactividad química y menor toxicidad. Se construyó una estructura 3D de alta calidad de la enzima NADH-fumarato reductasa para el parásito *T. cruzi*, mediante un protocolo de modelado por homología. El análisis de las interacciones intermoleculares entre las moléculas diseñadas y el modelo generado, mostró que las moléculas S3-8, S2-8 y S1-8, podrían considerarse como potenciales inhibidores de la enzima NADH-fumarato reductasa. Dichas moléculas, son consideradas las menos tóxicas del estudio, de acuerdo con los cálculos teóricos y con la ausencia del grupo funcional nitro en su estructura.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó a la molécula S2-8 para la síntesis química y posteriores estudios experimentales, cumpliendo con los objetivos planteados en el presente estudio.

## PERSPECTIVAS

a) Se continuará y concluirá con la síntesis química de la molécula S2-8.

- b) Se realizará la caracterización fisicoquímica de la molécula S2-8, mediante técnicas espectroscópicas de IR y RMN.
- c) Se analizará la toxicidad *in vitro* de las moléculas de referencia y la molécula S2-8, mediante la determinación de la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>).
- d) Se evaluará la genotoxicidad de las moléculas de referencia y la molécula S2-8, mediante el análisis de la inestabilidad genética en eritrocitos de sangre periférica, por medio de citometría de flujo.
- e) Se realizará la evaluación biológica en un sistema *in vitro*, empleando cepas de referencia.

## REFERENCIAS

- Altana Pharma A. G. Tetrahydropyridothiophenes for use in the treatment of cancer. International Patent, WO 2006/125815 A3, 2006.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bamford, V., Dobbin, P. S., Richardson, D. J., & Hemmings, A. M. (1999). Open conformation of a flavocytochrome c3 fumarate reductase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6, 1104-1107. <https://doi.org/10.1038/70039>
- Barone, P. M. V. B., Camilo, Jr., A., & Galvão, D. S. (1996). Theoretical approach to identify carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Physical Review Letters*, 77(6), 1186-1189. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.1186>

- Babu, K. S., Prabhakar, V., Ravindranath, L. K., Kishore, N. V. K., & Latha, J. (2016). Synthesis, characterization and study of antibacterial activity of some novel substituted sulphonamide pthalazine-tetrazole derivatives. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 4 (3), 51-63. Online ISSN 2321-1040
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Berná, L., Rodríguez, M., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2018). Expanding an expanded genome: Long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microbial Genomics*, 4(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>
- Bhatnagar, A., Sharma, P. K., & Kumar, N. (2011). A review on "Imidazoles": Their chemistry and pharmacological potentials. *Int J PharmTech Res*, 3(1), 268-282.
- Braga, R. S., Barone, P. M. V. B., & Galvão, D. S. (1999). Identifying carcinogenic activity of methylated polycyclic aromatic hydrocarbons (Pahs). *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 464(1-3), 257-266. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(98\)00557-0](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(98)00557-0)
- Campos-Fernández, L. (2017). Estudio Teórico-experimental en el diseño de nuevos fármacos derivados de imidazoles con potencial actividad antichagásica. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México.

- Campos-Fernández, L., Barrientos-Salcedo, C., Herrera Valencia, E. E., Ortiz-Muñiz, R., & Soriano-Correa, C. (2019). Substituent effects on the stability, physicochemical properties and chemical reactivity of nitroimidazole derivatives with potential antiparasitic effect: A computational study. *New Journal of Chemistry*, 43(28), 11125-11134. <https://doi.org/10.1039/C9NJ02207D>
- Cee, V. J., Deak, H. L., Du, B., Geuns-Meyer, S. D., Hua, Z., Martin, M. W., Marx, I., Nguyen, H. N., Olivieri, P. R., Panter Faber, K., Romero, K., Schenkel, L., White, R. (2014). Aurora Kinase Modulators and Method of Use. US 2014/336182 A1, 2014.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. Subsecretaría de Prevención y Promoción a la Salud, Programas de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Secretaría de Salud, 2019.
- Chattaraj, P. K., Giri, S., & Duley, S. (2011). Update 2 of: Electrophilicity index. *Chemical Reviews*, 111(2), PR43-PR75. <https://doi.org/10.1021/cr100149p>
- Chuit, R., Meiss, R., & Salvatella, R. (2019). Epidemiology of chagas disease. En J. M. Altcheh & H. Freilij (Eds.), *Chagas Disease* (pp. 91-109). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7_4)
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881-10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Coustou, V., Besteiro, S., Rivière, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J.-M., Boshart, M., Baltz, T., & Bringaud, F. (2005). A mitochondrial nadh-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic



- trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16559-16570.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M500343200>
- De Andrade, P., Galo, O. A., Carvalho, M. R., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sesti-Costa, R., de Melo, E. B., Silva, J. S., & Carvalho, I. (2015). 1,2,3-Triazole-based analogue of benznidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(21), 6815-6826.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.008>
- Defelipe, L., Arcon, J., Modenutti, C., Marti, M., Turjanski, A., & Barril, X. (2018). Solvents to fragments to drugs: Md applications in drug design. *Molecules*, 23(12), 3269. <https://doi.org/10.3390/molecules23123269>
- DNDi - Drugs for Neglected Diseases initiative América Latina. Enfermedad de Chagas. (s. f.) DNDi en América Latina, 2022.  
<https://www.dndial.org/es/enfermedades/enfermedad-chagas/>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J.,

- Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Aken, S. V., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., & Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- FDA - U. S. Food and Drug Administration- Commissioner, O. of the. (2020, marzo 24). La FDA aprueba el primer tratamiento de los Estados Unidos para la enfermedad de Chagas. News-events: comunicados de prensa - FDA statement (Statement From: Scott Gottlieb, M.D.), 2017. <https://www.fda.gov/news-events/comunicados-de-prensa/la-fda-aprueba-el-primer-tratamiento-de-los-estados-unidos-para-la-enfermedad-de-chagas>
- Frenking, G., & Shaik, S. (Eds.). (2014). *The chemical bond: Chemical bonding across the periodic table (Vol.2)*. John Wiley & Sons.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, G. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr. J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J.,

- Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., & Fox, D. J. (2013). Gaussian 09, Rev. E.01; Gaussian Inc: Wallingford, CT, 2013.
- Fukui, K. (1982). Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, *218*(4574), 747-754. <https://doi.org/10.1126/science.218.4574.747>
  - Hehre, W. J., Random, L., Schleyer, P. v. R., Pople, J. A. (1986). *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. John Wiley & Sons.
  - Hirshfeld, F. L. (1977). Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. *Theoretica Chimica Acta*, *44*(2), 129-138. <https://doi.org/10.1007/BF00549096>
  - Hossain, M., & Nanda, A. K. (2018). A review on heterocyclic: synthesis and their application in medicinal chemistry of imidazole moiety. *Science*, *6*(5), 83-94.
  - Izquierdo-Polanco, J., Hernández-Rincón, E. H., & Jaimes-Peñuela, C. L. (2021). Abordaje integral de la enfermedad de Chagas desde la atención primaria en salud. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, *28*(6), 324-328. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2020.05.011>
  - Jardim-Messeder, D., Cabreira-Cagliari, C., Rauber, R., Turchetto-Zolet, A. C., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2017). Fumarate reductase superfamily: A diverse group of enzymes whose evolution is correlated to the establishment of different metabolic pathways. *Mitochondrion*, *34*, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.01.002>

- Jeffrey, G. A. (1997). *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press.
- Jezuita, A., Ejsmont, K., & Szatyłowicz, H. (2021). Substituent effects of nitro group in cyclic compounds. *Structural Chemistry*, 32(1), 179-203. <https://doi.org/10.1007/s11224-020-01612-x>
- Jukič, M., Konc, J., Gobec, S., & Janežič, D. (2017). Identification of conserved water sites in protein structures for drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(12), 3094-3103. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00443>
- Kim, Kwon, Jung, Chun, Ha, & Park. (2019). Crystal structure of the active site mutant form of soluble fumarate reductase, osm1. *Crystals*, 9(10), 504. <https://doi.org/10.3390/cryst9100504>
- Kim, S., Kim, C. M., Son, Y.-J., Choi, J. Y., Siegenthaler, R. K., Lee, Y., Jang, T.-H., Song, J., Kang, H., Kaiser, C. A., & Park, H. H. (2018). Molecular basis of maintaining an oxidizing environment under anaerobiosis by soluble fumarate reductase. *Nature Communications*, 9(1), 4867. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07285-9>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Levine, I. N. (2001). *Química cuántica*. Pearson educación.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug

- discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- LoPachin, R. M., Geohagen, B. C., & Nordstroem, L. U. (2019). Mechanisms of soft and hard electrophile toxicities. *Toxicology*, 418, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.02.005>
  - Mardirossian, N., & Head-Gordon, M. (2017). Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals. *Molecular Physics*, 115(19), 2315-2372. <https://doi.org/10.1080/00268976.2017.1333644>
  - Marenich, A. V., Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (2009). Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(18), 6378-6396. <https://doi.org/10.1021/jp810292n>
  - Martin, A. C. R., & Porter, C. T. The program ProFit. (s. f.). <http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>
  - Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 601-620. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>
  - McLachlan, A. D. (1982). Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallographica Section A*, 38(6), 871-873. <https://doi.org/10.1107/S0567739482001806>

- Merlino, A., Vieites, M., Gambino, D., & Laura Coitiño, E. (2014). Homology modeling of T. cruzi and L. major NADH-dependent fumarate reductases: Ligand docking, molecular dynamics validation, and insights on their binding modes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 48, 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.12.001>
- Mitusińska, K., Raczyńska, A., Bzówka, M., Bagrowska, W., & Góra, A. (2020). Applications of water molecules for analysis of macromolecule properties. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.02.001>
- Molinspiration Cheminformatics free web services. *Calculation of molecular properties and bioactivity score*. (s. f.). Slovensky Grob, Slovakia. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- Morozenko, A., & Stuchebrukhov, A. A. (2016). Dowser++, a new method of hydrating protein structures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(10), 1347-1357. <https://doi.org/10.1002/prot.25081>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1998). *Química Orgánica*. Pearson educación.
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). Propka3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical  $pK_a$  predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525-537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>
- OPS, OMS. (2003). CIE-10: Clasificación internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. *International statistical classification of diseases and related health problems*, 1 (554), 157-158.
- OPS, OMS. (2022). Menos del 10% de los infectados con Chagas es diagnosticado en forma oportuna y recibe tratamiento. Recuperado 28 de mayo de 2022, de <https://www.paho.org/es/noticias/13-4-2022-menos-10-infectados-con-chagas-es-diagnosticado-forma-oportuna-recibe>
- Pan American Health Organization, World Health Organization. Chagas disease.(s. f.). Recuperado 28 de mayo de 2022, de <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>
- Pankhurst, K. L., Mowat, C. G., Miles, C. S., Leys, D., Walkinshaw, M. D., Reid, G. A., & Chapman, S. K. (2002). Role of his505 in the soluble fumarate reductase from *shewanella frigidimarina*. *Biochemistry*, 41(27), 8551-8556. <https://doi.org/10.1021/bi020155e>
- Papadopoulou, M. V., Bloomer, W. D., Rosenzweig, H. S., Wilkinson, S. R., Szular, J., & Kaiser, M. (2016). Nitrotriazole-based acetamides and propanamides with broad spectrum antitrypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 895-904. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.002>
- Paquette, L. A. (1999). *Fundamentos de química heterocíclica*. Limusa.

- Parr, R. G., & Pearson, R. G. (1983). Absolute hardness: Companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American Chemical Society*, 105(26), 7512-7516. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>
- Parr, R. G., Szentpály, L. v., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922-1924. <https://doi.org/10.1021/ja983494x>
- Parr, R. G., & Yang, W. (1984). Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 106(14), 4049-4050. <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>
- Parr, R. G., & Yang, W. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, New York.
- Pearson, R. G. (1997). *Chemical hardness* (1<sup>a</sup> ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527606173>
- Pearson, R. G., & Palke, W. E. (1992). Support for a principle of maximum hardness. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(8), 3283-3285. <https://doi.org/10.1021/j100187a020>
- Politzer, P., Truhlar, D. G., & American Chemical Society (Eds.). (1981). *Chemical applications of atomic and molecular electrostatic potentials: Reactivity, structure, scattering, and energetics of organic, inorganic, and biological systems*. Plenum Press.
- Prieto-Martínez F. D., & Medina-Franco J. L. (2018). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21 (2), 124-134.



- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95-99. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6)
- Reid, G. A., Miles, C. S., Moysey, R. K., Pankhurst, K. L., & Chapman, S. K. (2000). Catalysis in fumarate reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(2-3), 310-315. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00166-3)
- Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Pratesi, R., & Hecht, M. (2020). Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 12, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>
- Richaud, A. (2010). Estudios de la reactividad del imidazol en compuestos modelo de superóxido dismutasa cobre-zinc (Tesis Doctoral). *Universidad Autónoma Metropolitana, México*.
- Richaud, A., Barba-Behrens, N., & Méndez, F. (2011). Chemical reactivity of the imidazole: A semblance of pyridine and pyrrole? *Organic Letters*, 13(5), 972-975. <https://doi.org/10.1021/ol103011h>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018) Enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica de México*, 154, 605-612. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2018/gm185k.pdf>
- Romero, A. H., & López, S. E. (2017). In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalaziny-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and

- Leishmania enzyme targets. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 76, 313-329. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2017.07.013>
- Ross, G. A., Morris, G. M., & Biggin, P. C. (2012). Rapid and accurate prediction and scoring of water molecules in protein binding sites. *PLoS ONE*, 7(3), e32036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032036>
- Roy, D. R., Parthasarathi, R., Maiti, B., Subramanian, V., & Chattaraj, P. K. (2005). Electrophilicity as a possible descriptor for toxicity prediction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(10), 3405-3412. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.03.011>
- Roy, D. R., Sarkar, U., Chattaraj, P. K., Mitra, A., Padmanabhan, J., Parthasarathi, R., Subramanian, V., Van Damme, S., & Bultinck, P. (2006). Analyzing toxicity through electrophilicity. *Molecular Diversity*, 10(2), 119-131. <https://doi.org/10.1007/s11030-005-9009-x>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: Un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- Sánchez-Moreno, M., Sanz, A. M., Gómez-Contreras, F., Navarro, P., Marín, C., Ramírez-Macias, I., Rosales, M. J., Olmo, F., Garcia-Aranda, I., Campayo, L., Cano, C., Arrebola, F., & Yunta, M. J. R. (2011). *In vivo* trypanosomicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(4), 970-979. <https://doi.org/10.1021/jm101198k>

- Sander, T. Molecular properties prediction-Osiris Property Explorer.(s. f.). Idorsia Pharmaceuticals Ltd, Switzerland. <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- Sanner, M. F. (2022). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17 (1), 57-61. PMID: 10660911
- Secretaría de Salud. (2022). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica-Sistema Único de Información (Boletín Epidemiológico). *Dirección General de Epidemiología*, 38 (52), 38.
- Shalini, K., Kumar, S. P., & Kumar, N. (2010). Imidazole and its biological activities: A review. *Der Chemica Sinica*, 1(3), 36-47.
- Soares-Sobrinho, J. L., Cunha-Filho, M. S. S., Rolim Neto, P. J., Torres-Labandeira, J. J., & Dacunha-Marinho, B. (2008). Benznidazole. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 64(3), o634-o634. <https://doi.org/10.1107/S1600536808005023>
- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of  $pK_a$  values. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(7), 2284-2295. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>
- Soriano-correa, C., Barrientos-salcedo, C., Raya, A., Póo, C. R., & Esquivel, R. O. (2010). The influence of electron donor and electron acceptor groups on the electronic structure of the anti-inflammatory tripeptide Cys-Asn-Ser. *International Journal of Quantum Chemistry*, 110(13), 2398-2410. <https://doi.org/10.1002/qua.22673>

- Sridhar, A., Ross, G. A., & Biggin, P. C. (2017). Waterdock 2.0: Water placement prediction for Holo-structures with a pymol plugin. *PLOS ONE*, 12(2), e0172743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172743>
- Szatyłowicz, H., Jezuita, A., Ejsmont, K., & Krygowski, T. M. (2017). Substituent effect on the  $\sigma$ - and  $\pi$ -electron structure of the nitro group and the ring in *meta*—*And para*-substituted nitrobenzenes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 121(27), 5196-5203. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b03418>
- Szatyłowicz, H., Jezuita, A., Siodła, T., Varaksin, K. S., Ejsmont, K., Shahamirian, M., & Krygowski, T. M. (2018). How far the substituent effects in disubstituted cyclohexa-1,3-diene derivatives differ from those in bicyclo[2.2.2]octane and benzene? *Structural Chemistry*, 29(4), 1201-1212. <https://doi.org/10.1007/s11224-018-1113-5>
- Taylor, P., Pealing, S. L., Reid, G. A., Chapman, S. K., & Walkinshaw, M. D. (1999). Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase. *Nature Structural Biology*, 6(12), 1108-1112. <https://doi.org/10.1038/70045>
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0; Schrödinger, LLC.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Turrens, J. F. (2012). The Enzyme NADH-Fumarate Reductase in trypanosomatids: a potential target against parasitic diseases. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 4(3), 117-122.

- Turrens, J. F., Watts, B. P., Zhong, L., & Docampo, R. (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82(1), 125-129. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02722-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02722-3)
- UNAM - Universidad Nacional Autónoma de México. *PODRÍA PROVOCAR MUERTE SÚBITA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS*. (s. f.). Boletín UNAM-DGCS-296. Recuperado 28 de mayo de 2022, de [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022\\_296.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022_296.html)
- UNAM - Universidad Nacional Autónoma de México. *Más de un millón de infectados en México con la enfermedad de Chagas*. (s. f.). Boletín UNAM-DGCS-718. Recuperado 28 de mayo de 2022, de [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019\\_718.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019_718.html)
- Van Hellemond, J. J., & Tielens, A. G. M. (1994). Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochemical Journal*, 304(2), 321-331. <https://doi.org/10.1042/bj3040321>
- Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S., & Martínez-Campos, C. (2000). Infección natural de chinches *Triatominae* con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de México*, 42(6), 496-503. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342000000600005>
- Von Trompowsky, A. C. M., Conde, T. R., Lemos, R. C., Quaresma, B. M. C., Pitombeira, M. C. S., de Carvalho, A. S., Boechat, N., Salomão, K., de Castro, S. L., & Zamith, H. P. da S. (2019). In vitro genotoxicity of nitroimidazoles as a tool in

- the search of new trypanocidal agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114, e190017. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190017>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2), 127-134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
  - Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
  - Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation: PROTEIN SCIENCE.ORG. *Protein Science*, 27(1), 293-315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>
  - WHO - World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record*, 90 (6), 33-43.
  - WHO - World Health Organization. *Chagas disease*. (s. f.). Recuperado 28 de mayo de 2022, de [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
  - Xu, D., & Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical Journal*, 101(10), 2525-2534. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>

- Yang, Weitao., & Mortier, W. J. (1986). The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. *Journal of the American Chemical Society*, 108(19), 5708-5711. <https://doi.org/10.1021/ja00279a008>
- Zhang, X. V., & Martin, S. T. (2006). Driving parts of Krebs cycle in reverse through mineral photochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 128(50), 16032-16033. <https://doi.org/10.1021/ja066103k>
- Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, 120(1-3), 215-241. <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>

## PRODUCTOS DERIVADOS DE LA INVESTIGACIÓN

### Artículos

- Campos-Fernández, L., Ortiz-Muñiz, R., Cortés-Barberena, E., Mares-Sámano, S., Garduño-Juárez, R., Soriano-Correa, C. Imidazole and nitroimidazole derivatives as NADH-fumarate reductase inhibitors: Density functional theory studies, homology modeling, and molecular docking. *J. Comput. Chem*, 2022; 1. <https://doi.org/10.1002/jcc>. Factor de Impacto JCR: 3.376
- Campos-Fernández, L., Barrientos-Salcedo, C., Herrera Valencia, EE., Ortiz-Muñiz, R., Soriano-Correa, C. Substituent effects on the stability, physicochemical properties and chemical reactivity of nitroimidazole derivatives with potential antiparasitic effect: A computational study. *New J. Chem*, 2019; 43, 11125-11134. <https://doi.org/10.1039/C9NJ02207D>. Factor de Impacto JCR: 3.591

### Congresos

- XIX Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Inhibidores de NADH-fumarato reductasa: DFT, modelado por homología y docking molecular. 18 y 19 de noviembre del 2021.
- XX Reunión Internacional de Ciencias Médicas. Diseño computacional de fármacos derivados del imidazol como inhibidores de NADH-Fumarato Reductasa de *Trypanosoma cruzi*. Del 14 al 16 de octubre del 2020.





Received: 7 August 2021 | Revised: 12 March 2022 | Accepted: 9 June 2022

DOI: 10.1002/jcc.26959

## RESEARCH ARTICLE

Journal of  
COMPUTATIONAL  
CHEMISTRY WILEY

# Imidazole and nitroimidazole derivatives as NADH-fumarate reductase inhibitors: Density functional theory studies, homology modeling, and molecular docking

Linda Campos-Fernández<sup>1,2,3</sup> | Rocío Ortiz-Muñiz<sup>2</sup> | Edith Cortés-Barberena<sup>2</sup> | Sergio Mares-Sámano<sup>4</sup> | Ramón Garduño-Juárez<sup>5</sup> | Catalina Soriano-Correa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Iztapalapa, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Iztapalapa, Mexico

<sup>3</sup>Unidad de Química Computacional, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Iztapalapa, Mexico

<sup>4</sup>CONACYT-Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>5</sup>Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

**Correspondence**

Catalina Soriano-Correa, Unidad de Química Computacional, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Iztapalapa, C.P. 09230, Mexico.  
Email: csorico@comunidad.unam.mx

**Abstract**

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*. Benznidazole and nifurtimox are drugs used for its therapy; nevertheless, they have collateral effects. NADH-fumarate (FUM) reductase is a potential pharmacological target since it is essential for survival of parasite and is not found in humans. The objectives are to design and characterize the electronic structure of imidazole and nitroimidazole derivatives at DFT-M06-2X level in aqueous solution; also, to model the NADH-FUM reductase and analyze its intermolecular interactions by molecular docking. Quantum-chemical descriptors allowed to select the molecules with the best physicochemical properties and lowest toxicity. A high-quality three-dimensional structure of NADH-FUM reductase was obtained by homology modeling. Water molecules do not have influence in the interaction between FUM and NADH-FUM reductase. The main hydrogen-binding interactions for FUM were identified in NADH, Lys172, and Arg89; while hydrophobic interactions in Phe479, Thr174, Met63. The molecules S3-8, S2-8, and S1-8 could be inhibitors of NADH-FUM reductase.

**KEYWORDS**

Chagas disease, DFT calculations, homology modeling, molecular docking, NADH-fumarate reductase

## 1 | INTRODUCTION

American Trypanosomiasis, also called Chagas disease, is a parasitic disease caused by the hemoflagellate parasite *Trypanosoma cruzi*. Currently, the World Health Organization (WHO) classifies it as one of the most important neglected tropical diseases worldwide. It is estimated that approximately 6–7 million people are infected and less than 1% receive treatment,<sup>1–4</sup> causing around

14,000 deaths annually in endemic regions.<sup>2</sup> At present, Chagas disease has an incidence of 30,000 new cases per year in the Americas,<sup>5</sup> with an economic impact in 2015 of almost USD 450 million in Latin America.<sup>6</sup> This disease is transmitted mainly by the bite of triatomines, but can also be transmitted congenitally, by transplants, blood transfusions, among other forms.<sup>1,7</sup> The only drugs approved by the WHO for its treatment are two nitroaromatic compounds: nifurtimox and benznidazole (BNZ), which are

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Computational Chemistry* published by Wiley Periodicals LLC.

effective if they are administered at the onset of the infection; however, it has been reported that their effectiveness decreases and their toxicity increases in long-term treatments, which makes them banned in many countries.<sup>1,2,8-10</sup> Such toxicity relates to the formation of free radicals generated by the reduction of the nitro group, which puts the parasite under oxidative stress and causes its death, but also causes damage to human cells. Nevertheless, in the literature it has been reported that the antichagasic effect of BNZ does not depend on the production of free radicals and can act against the parasite in different ways, so its main mechanism of action is still unknown.<sup>11-14</sup>

Turrens et al.<sup>12</sup> analyzed the trypanocidal activity of BNZ and other nitroimidazoles, as well as of some anthelmintic benzimidazoles. The results of the study showed that all the molecules studied decreased the parasite proliferation of *T. cruzi* and *Trypanosoma brucei*, and inhibited the reducing action of the enzyme NADH-fumarate (FUM) reductase in both parasites; however, its activity decreased when the imidazole ring was replaced by a thiazole ring. These findings led the researchers to conclude that the imidazole ring was responsible of the trypanocidal activity. Furthermore, this analysis allowed the enzyme NADH-FUM reductase to be identified for the first time as a potential and specific pharmacological target of BNZ since it was not found in humans or mammalian hosts.

The NADH-FUM reductase is an enzyme present in the mitochondria of all morphological stages of trypanosomatid parasites (such as *T. cruzi*, *Leishmania* sp., and *T. brucei*), because of this, it is considered one of the most important enzymes in their metabolism. Likewise, it catalyzes the reduction of FUM to succinate, which is essential for them to carry out their electron transport chain, maintain redox balance and obtain the necessary energy for their survival.<sup>12-14</sup>

Previous studies of the electronic structure, at the ab initio level and at the density functional theory (DFT) level, allowed us to establish a theoretical model and a pharmacophore group,<sup>15,16</sup> which were used to design a family of new antichagasic molecules derived from nitroimidazoles. These molecules were experimentally analyzed to evaluate their biological activity and cytotoxicity.<sup>15</sup> The results showed that the structures proposed by the theoretical calculations (M3 and ISO3) inhibited parasitic growth in vitro, in the CL-Brener and CL-14 strains of *T. cruzi* and did not present cytotoxicity in macrophages.<sup>15</sup>

Given that the American trypanosomiasis is an important public health problem and in the absence of drugs to treat it, it is necessary to find new therapeutic strategies based on specific pharmacological targets, which leads to a rational design of drugs with better effectiveness and lower toxicity. The objectives of this study were: (a) to design and characterize the electronic structure, the physicochemical properties and the chemical reactivity of imidazole and nitroimidazole derivatives at the DFT-M06-2X level in an aqueous solution; (b) to model the three-dimensional structure of the enzyme NADH-FUM reductase, using homology modeling; and (c) to visualize and analyze their intermolecular interactions and binding energy via molecular docking studies, with the purpose of identifying new molecules with potential antichagasic therapeutic effect and a reduced chemical toxicity.

## 2 | COMPUTATIONAL DETAILS

### 2.1 | Pharmacokinetic parameters and toxicological prediction

The initial design of new molecules derived from imidazole and nitroimidazole was carried out, considering the theoretical model established in previous studies,<sup>15,16</sup> and molecules reported as active against Chagas disease were added as reference and head of series,<sup>12,15-20</sup> as shown in Figure 1. The mutagenic, tumorigenic, irritability, and reproductive effects of these structures were analyzed using the virtual database of Osiris Molecular.<sup>21</sup> Similarly, the prediction of its pharmacokinetic properties was carried out employing the Molinspiration database<sup>22</sup> and taking into account Lipinski's Rule.<sup>23</sup>

### 2.2 | Electronic structure calculations

According to pharmacokinetic parameters and toxicological predictions results, a group of 31 imidazole and nitroimidazole derivatives was selected (see Figures 2 and 3), with the objective to characterize the physicochemical properties and the chemical reactivity.

Electronic structure calculations were carried out using the Gaussian 09 program suite.<sup>24</sup> All neutral structures were optimized employing M06-2X functional<sup>25,26</sup> with a 6-311+G(d,p) basis set,<sup>27</sup> while protonated (cationic) structures were optimized at restricted RM06-2X levels, all these with a 6-311+G(d,p) basis set. Energies were corrected to include zero-point vibrational energy at the same levels of theory. Single-point calculations were performed on optimized structures at the M06-2X level of theory with a 6-311++G(2df,2p) basis set. All calculations were carried out in an aqueous solution, and the solvent effects were described through the SMD model.<sup>28</sup> First, the proton affinity (PA) energies were calculated by isodesmic reactions, according to previous works,<sup>15,16,29</sup> with the purpose to know the basic character of the N3 atom of the imidazole ring.

Then, to describe a more reliable chemical reactivity, we determined some selected global quantum chemical descriptors, such as chemical hardness ( $\eta$ ), ionization potential ( $I$ ), and electrophilicity index ( $\omega$ ). The electrophilicity index is defined as the ability of a molecule to accept an electronic charge and was calculated through the electronic

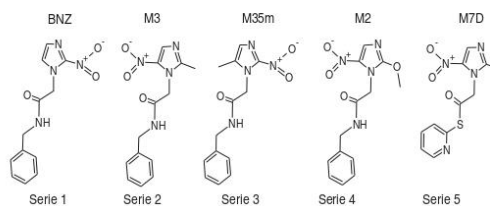
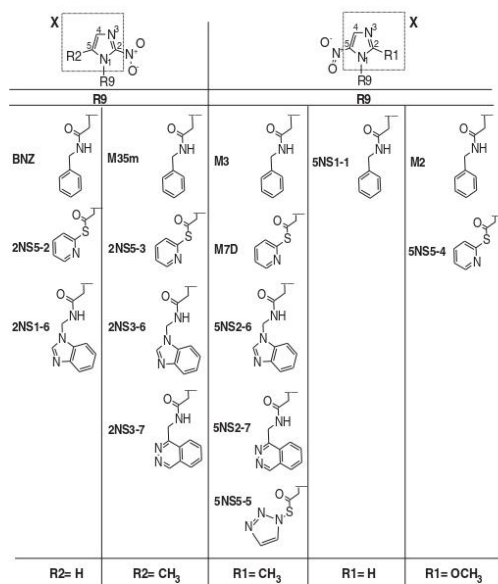
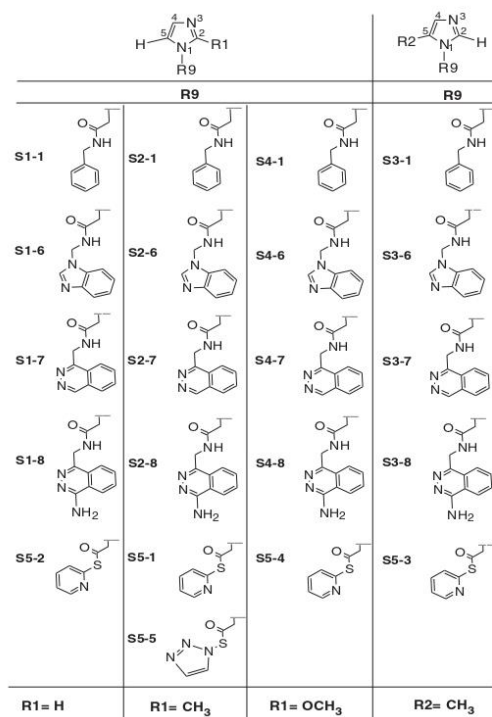


FIGURE 1 Head structures of series<sup>15,16</sup>



**FIGURE 2** Selected structures of the 2-nitroimidazole and 5-nitroimidazole derivatives, according to their pharmacokinetic parameters and toxicological predictions results. For SESE calculations: X is a transmitting moiety (imidazole ring linked to R1 or R2 groups, respectively) and the R9 is the substituent group



**FIGURE 3** Selected structures of the imidazole derivatives according to their pharmacokinetic parameters and toxicological predictions results

chemical potential and the chemical hardness using the following equations.<sup>29-33</sup>

$$\mu = -\chi = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})} \quad (1)$$

Parr and Pearson<sup>33,34</sup> proposed the chemical hardness ( $\eta$ ) within the DFT as follows:

$$\eta = \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(\vec{r})} \quad (2)$$

Using finite-difference approximation,<sup>35</sup> Equations (1) and (2) would be:

$$\eta \approx \frac{E_{N-1} - 2E_N + E_{N+1}}{2} \approx I - A \quad (3)$$

and

$$-\mu \approx \frac{(E_{N-1} - E_{N+1})}{2} \approx \frac{I + A}{2}, \quad (4)$$

where  $E_N$ ,  $E_{N-1}$ , and  $E_{N+1}$  are the energies of  $N$ ,  $(N-1)$ , and  $(N+1)$  electron systems;  $I$  and  $A$  are the adiabatic ionization potential and the electron affinity, respectively. The electrophilicity index of a system, in terms of its chemical potential and chemical hardness, is given by the next expression<sup>30,31</sup>:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (5)$$

Furthermore, to identify a possible relationship between carcinogenicity and aromaticity of imidazole and nitroimidazole derivatives, we estimated the energetic difference between the molecular orbitals HOMO and HOMO-1, taking the aromaticity index ( $\Delta$ ) as an indirect measure of the carcinogenic compounds according to Barone's rules.<sup>36,37</sup> Taking into account the first of Barone's rules: a molecule will be strongly carcinogenic if it contains a pyrene-like structure and the parameter  $\Delta$  is greater than  $0.25\beta$  ( $\beta \approx 2.4$  eV), or if the molecule is nonpyrene and the parameter  $\Delta$  is greater than  $0.15\beta$ . Thus, this



descriptor could be an indicator that allows the analysis of the relative aromaticity of the imidazole ring and its derivatives.

In the design of novel therapeutic molecules, it is critical to know how a molecule's lateral groups influence each other in the electronic structure, chemical reactivity, and physicochemical properties. Therefore, the homodesmotic reactions<sup>38-40</sup> were calculated using the substituent effect stabilization energy (SESE) descriptor, according to the following equations and Figure 2,



and

$$SESE = E(X-R9) + E(O_2N-X) - E(O_2N-X-R9) - E(X), \quad (7)$$

where X is a transmitting moiety (imidazole ring linked to R1 or R2 groups, respectively) and the R9 is the substituent group (see Figure 2). A value of SESE < 0 descriptor indicates larger stabilization energy caused by the substituent effect, and a value of SESE > 0 indicates an increase of pi-electron delocalization.<sup>38-40</sup>

In addition, atomic charges fitted to the electrostatic potential<sup>41,42</sup> were obtained to analyze the nucleophilic/electrophilic nature sites and investigate the electron-withdrawing/electron-donating influence of the substituents, mainly of the substituent -R9 on the imidazole ring.

In addition, an interesting local density functional descriptor of reactivity is the Fukui function used to analyze the chemical reactivity and sites selectivity within a molecule.<sup>43-46</sup> The Fukui function values were obtained from the Hirshfeld's population scheme and are defined by the expressions described below,<sup>43</sup>

$$f(\vec{r}) = \left[ \frac{\delta\mu}{\delta v(\vec{r})} \right]_N = \left[ \frac{\partial\rho(\vec{r})}{\partial N} \right]_{v(\vec{r})}. \quad (8)$$

There are three types of Fukui functions that are defined depending on the electron transfer.<sup>44,45</sup>

The condensed Fukui functions were calculated using a finite difference approach just as proposed by Yang and Mortimer,<sup>46</sup> according to the following expressions

$$f_k^+ = q_k(N+1) - q_k(N) \text{ for nucleophilic attack,}$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N-1) \text{ for electrophilic attack,}$$

$$f_k^0 = [q_k(N+1) - q_k(N-1)]/2 \text{ for radical attack,}$$

where  $q_k$  is the electronic population of atom  $k$  in a molecule.

Furthermore, we analyzed the frontier molecular orbitals, HOMO and LUMO (The highest occupied molecular orbital and lowest unoccupied molecular orbital, respectively) to investigate the substituent effect on the nucleophilic/electrophilic nature sites of the imidazole and nitroimidazole derivatives.

## 2.3 | Template selection and sequence structural alignment

Comparative modeling is based on identifying template structures with the highest sequence similarity to carry out the construction of a three-dimensional enzymatic model. Since, the crystallized structure of the enzyme NADH-FUM reductase of *T. cruzi* is not available, the amino acids sequence was retrieved from the NCBI database (ID: XP\_807320.1<sup>47</sup> and ID: PWV10286.1<sup>48</sup>) and a search BLAST-P<sup>49</sup> was carried out against the Protein Data Bank,<sup>50</sup> in order to identify homologous structures. Four template structures were identified that showed high sequence identity (PDB ID: 5GLG,<sup>51</sup> PDB ID: 1KSU,<sup>52</sup> PDB ID: 1QJD,<sup>53</sup> and PDB ID: 1QO8<sup>54</sup>). The sequence of the enzyme NADH-FUM reductase of *T. cruzi* was aligned to each selected template using MultAlin,<sup>55</sup> maintaining the default parameters. The alignments were inspected and manually adjusted to reduce gaps and insertions, and ensure that the catalytic sites were conserved.

## 2.4 | Model building

The homology models of the enzyme were built using the MODELLER 9.21 software<sup>56</sup> based on its alignments with templates and satisfying spatial restraints. The four templates with the highest sequence identity were used to perform homology modeling and incorporate flexibility in the receptor since the protein shows three different active conformations and one inactive conformation (PDB ID: 1QO8). Ten thousand models were modeled for each of the four templates. The best models were selected based on the DOPE statistical score (Discrete Optimized Protein Energy) and based on the root mean square deviation (RMSD) values against their respective templates. The DOPE statistical score was calculated by MODELLER 9.21<sup>56</sup> and the RMSD was calculated using ProFit.<sup>57,58</sup> Then, we evaluated their stereochemical quality using PROCHECK<sup>59</sup> and selected the best models, according to the Ramachandran plots.

## 2.5 | Model optimization

The selected models were refined using the ModRefiner software<sup>60</sup> to generate a better quality structure. ModRefiner is an algorithm that performs a conformational search in the side chains and main chain of each amino acids of the protein through energy minimization. In the same way, we verified the stereochemical quality of each model through Ramachandran plots, using PROCHECK.<sup>59</sup>

## 2.6 | Receptor and ligands preparation

The optimized geometries of the ligands, the coenzymes NADH and FAD, and the reference molecules used for the molecular docking studies were taken from the theoretical calculations, at the M06-2X/6-311+G

(d,p) level of theory in aqueous solution. The ligands preparation process was performed for the molecular docking study by assigning charges, protonation states, and flexibility using the OpenBabel software.<sup>61</sup> For the process of preparing the enzymatic models: 5299 (1KSU), 2735 (1QJD), 4560 (5GLG), and 9109 (1QO8), were assigned protonation states and missing hydrogens, using PROPKA3.<sup>62,63</sup> In addition, the rotamers and the positions of the amino acids GLU, HIS, and ASP were optimized using the MolProbity server.<sup>64</sup>

## 2.7 | Docking studies

The molecular docking was performed employing Autodock Vina 1.1.2 software.<sup>65</sup> The position of the crystallized FAD of the template structures was taken as a reference to locate the NADH's position and performed the first four couplings to form the NADH-FRD complexes. The complexes were formed between the NADH and the model 5299 (from the PDB ID: 1KSU template), the NADH and the model 2735 (from the PDB ID: 1QJD template), the NADH and the model 4560 (from the PDB ID: 5GLG template); and the NADH and the model 9109 (from the PDB ID: 1QO8 template).

For each model, a conformational docking space search was set up. The defined search space included the entire catalytic domain, which ensured the analysis of all potential binding sites. For the model 5299 (1KSU), the search space was defined to cover a three-dimensional analysis region of  $36 \text{ \AA} \times 21 \text{ \AA} \times 18 \text{ \AA}$  points, centered at  $x:14.083$ ,  $y:-2.972$ ,  $z:5.917$ . A similar procedure was performed for all models. For the model 2735 (1QJD) the region of  $22.50 \text{ \AA} \times 21.00 \text{ \AA} \times 35.25 \text{ \AA}$ , centered at  $x:26.417$ ,  $y:32.861$ ,  $z:64.361$  was defined. For the model 9109 (1QO8) the region of  $32 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA}$ , centered at  $x:39.417$ ,  $y:68.472$ ,  $z:20.500$  was defined. For the model 4560 (5GLG) the region of  $24 \text{ \AA} \times 26 \text{ \AA} \times 28 \text{ \AA}$ , centered at  $x:8.417$ ,  $y:28.472$ ,  $z:0.667$  was defined.

To achieve the molecular docking between the NADH-FRD complex and the ligands, the model 5299 (1KSU) were selected, since it is the only model that preserved the FAD-FRD interaction site of its original template. For these couplings, a grid box with dimensions of  $20 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA}$ , centered at  $x:6.500$ ,  $y:5.111$ ,  $z:10.556$  was used. In order to analyze the input and output files, the MGLTOOLS 1.5.6 was employed.<sup>66,67</sup> The best ligands using coupling energy and dimensional location were selected.

## 2.8 | Validation of docking protocol (redocking)

To verify and ensure that the position of NADH is adequate, the validation of the docking protocol was carried out, where the spatial location of the crystallized FAD-1KSU complex was compared, with the docking of FAD and the 1KSU template used for modeling. This comparison was performed based on the RMSD values obtained. In the same way, docking of the coenzyme NADH with the template 1KSU and the model 5299 was performed, and the RMSD values were compared. In all cases, the Autodock Vina 1.1.2 software<sup>65</sup> and a grid with

dimensions of  $36 \times 21 \times 18$  points, with a spacing of  $1 \text{ \AA}$ , centered at  $x:14.083$ ,  $y:-2.972$ ,  $z:5.917$  was used.

## 2.9 | Evaluation of the role of water molecules in the binding pocket of NADH-fumarate reductase

Rational drug design studies have reported that water mediates some ligand-protein interactions.<sup>68-72</sup> In this sense, it is postulated that a ligand must first displace the water molecules from the area that defines its binding pocket to interact with the protein. However, some water molecules—also known as nondisplaceable or conserved—interact strongly and remain attached to the protein, thus affecting the positioning of ligands within the binding site and, consequently, influencing the ligand-binding affinity.<sup>68-72</sup>

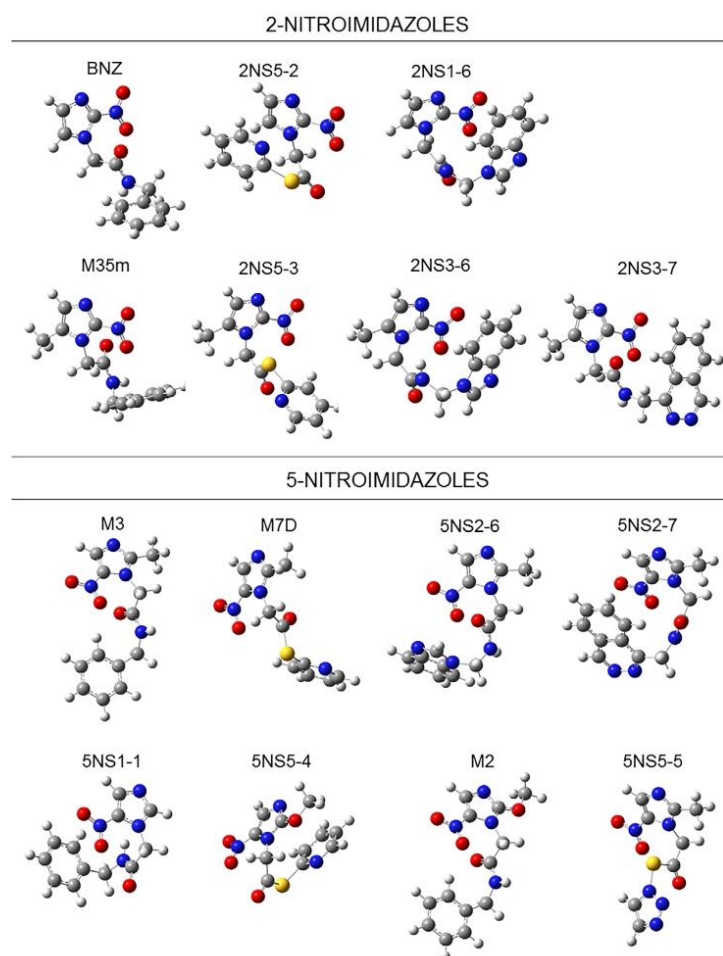
There is evidence that imidazole derivatives inhibit the enzyme NADH-FUM reductase and that these ligands may bind at the FUM-binding pocket.<sup>12</sup> Therefore, before docking imidazole and nitroimidazole derivatives into the homology model of the enzyme NADH-FUM reductase, we investigated the potential presence of conserved (nondisplaceable) water molecules within the binding site, which could play a role in the mode of binding and affinity of ligands. To identify such water molecules, WaterDock<sup>73</sup> and WaterDock2.0<sup>72</sup> were used. These programs dock water molecules within the protein's binding pocket to identify those that are nondisplaceable or conserved.

WaterDock predicts the location conserved water molecules within the binding pocket without the explicit presence of the ligand. This program is relevant because it makes the prediction independently of the nature of the ligand. By contrast, WaterDock2.0 predicts the location of conserved water molecules with the explicit presence of the ligand and includes solvation data of the ligand functional groups. We used both programs to obtain a more complete and accurate estimation of the potential presence of conserved water molecules within the ligand-binding site. In addition, these programs were selected because they were validated using crystallographic data, showing an extremely high-success rates: 88% accuracy for WaterDock and 91% for WaterDock2.0.<sup>69</sup>

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 | Pharmacokinetic parameters and toxicological prediction

In the present discussion, the BNZ is the reference molecule, since it is used as a first-line drug to treat Chagas disease. From BNZ, we made structural modifications with the different functional groups reported as active against *T. cruzi*, as previously mentioned. The structures analyzed in this study comprise the following series: first, 2-nitroimidazoles with R2 substituent in position five. Second, 5-nitroimidazoles with R1 substituent in position two. Third, nonnitrated imidazole derivatives with R1 substituent in position two. Fourth, nonnitrated imidazole derivatives with R2 substituent in



**FIGURE 4** Optimized structures for 2-nitroimidazole and 5-nitroimidazole derivatives at the M06-2X/6-311+G(d,p) levels of theory. The H, C, N, S, and O atoms are represented as white, gray, blue, yellow, and red balls, respectively

position five, as shown in Figures 2 and 3. According to the results of *in silico* prediction and considering Lipinski's Rules, we selected 32 molecules that were not toxic. It is important to notice that the results of the *in silico* predictions showed that the BNZ and other reference structures indicated a potential reproductive risk. Similarly, metronidazole (MTZ) showed negative values in the partition coefficient ( $\log P$ ), which could result in poor absorption of the drug (Tables S1 and S2, See Supporting Information).

### 3.2 | Calculations of the electronic structure

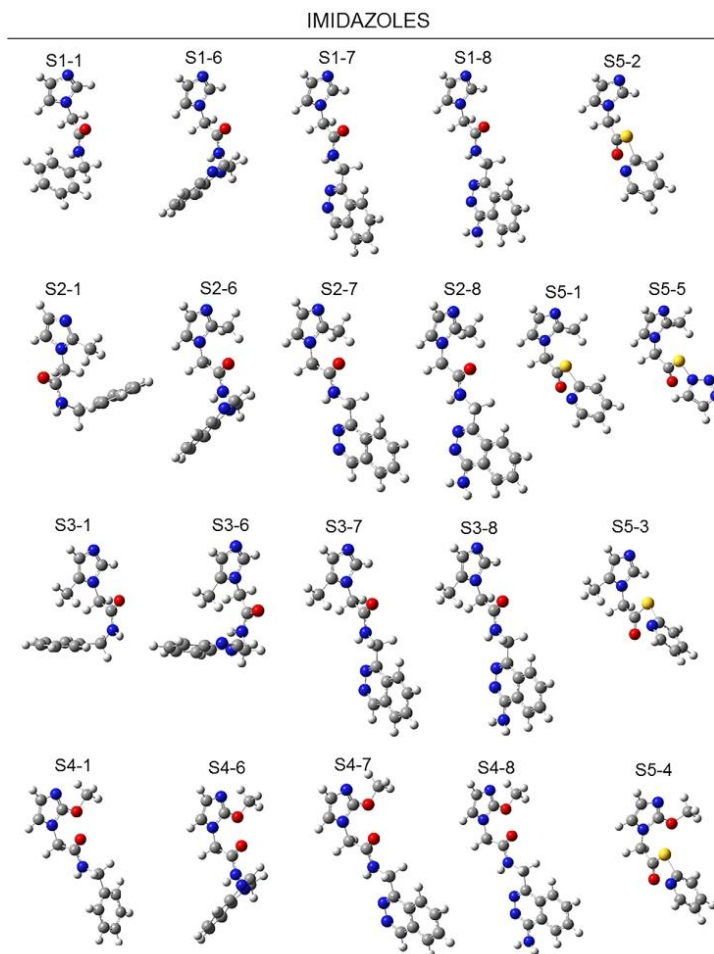
The optimized geometry of the selected molecules for imidazole and nitroimidazole derivatives is shown in Figures 4 and 5. The geometrical parameters agree with the available X-ray experimental data.<sup>16,74</sup>

On the other hand, the analysis of electron density-based molecular descriptors in pharmacological molecules is important. In this sense, it is essential to know the interaction sites and the chemical reactivity of these molecules. Tables 1 and S3 show the calculated values for the global reactivity quantum chemical descriptors: PA energy, chemical hardness ( $\eta$ ), ionization potential ( $I$ ), electrophilicity index ( $\omega$ ), the SESE, and aromatic index ( $\Delta$ ).

The PA values of the reference molecules and their nitrated and nonnitrated analogs are shown in Tables 1 and S3; a larger value of the protonation energy implies higher basicity. Hence, we analyzed the basicity features of the nitrogen atom (N3) of the imidazole group with respect to the R9-substituent groups and their relationship with the position of the nitro group. The results indicated that the basicity of the N3 atoms is larger for 2-nitroimidazole derivatives, 2NS5-2, 2NS5-3, 2NS1-6, 2NS3-6, BNZ, 2NS3-7, and M35m than the



**FIGURE 5** Optimized structures for imidazole derivatives at the M06-2X/6-311+G(d,p) levels of theory. The H, C, N, S, and O atoms are represented as white, gray, blue, yellow, and red balls, respectively



5-nitroimidazoles derivatives, 5NS5-4, M2, 5NS1-1, M7D, 5NS2-6, and M3. This behavior could be due to the proximity of the nitro group to the N3 atom and the influence exerted by their inductive and resonance effects. In addition, the imidazole derivatives without the nitro group have the lowest PA values, indicating that the presence of the nitro group is crucial for preserving the basicity of the N3 atom. These results are consistent with previously reported studies.<sup>16</sup>

Chemical hardness ( $\eta$ ) is a descriptor of global reactivity, in which larger energy values are related to more stable molecules. In Tables 1 and S3, it is observed that the nitrated molecules have larger chemical hardness values compared to their respective nonnitrated imidazole analogs, which suggests that these molecules are less reactive. Moreover, it is observed that the nonnitrated molecules that possess a phthalazine group in the R9 substituent (S1-8, S2-8, S3-8 and S4-8)

have higher values of chemical hardness than its analogs with benzimidazole substituent (S1-6, S2-6, S3-6) or benzyl groups (S1-1, S2-1, S3-1, S4-1) as shown in Tables 1, S3 and Figures 3 and 5. These results indicate that the presence of the phthalazine group in the R9 substituent confers more stability to nonnitrated imidazole derivatives. In addition, a similar behavior was observed for phthalazine and benzimidazole substituents in the 5-nitroimidazole derivatives (Figures 2 and 4).

The ionization potential ( $I$ ) values are shown in Tables 1 and S3. It is observed that the 2-nitroimidazole and 5-nitroimidazoles derivatives, as well as molecules of series 1 (S1-1, S1-6, and S1-8), have higher ionization potential values than nonnitrated imidazole derivatives. These results suggest a lower oxidative effect on nonnitrated imidazole derivatives with R1= H and nitroimidazoles with electron-

**TABLE 1** Proton affinity and quantum-chemical descriptors for reference and selected molecules, at the M06-2X/6-311++G(2df,2p)//6-311+G(d,p) levels of theory

	Molecule	PA (kcal/mol)	$\eta$ (eV)	$I$ (eV)	$\omega$ (eV)	SESE (kcal/mol)	$\Delta$ (eV)
Ref. Mol.	BNZ*	15.37	10.18	6.83	0.15	-0.47	0.24
	M3**	8.21	10.09	6.88	0.17	10.23	0.18
	M35m	14.67	10.18	6.88	0.16	-0.70	0.08
	M2**	12.92	10.01	6.82	0.16	0.42	0.16
	M7D	8.92	10.46	7.20	0.19	7.66	0.20
Imidazoles	S1-1	-0.15	7.36	6.47	0.53	-	0.31
	S1-6	0.24	7.69	6.54	0.47	-	0.07
	S1-8	0.05	8.39	6.45	0.30	-	0.21
	S2-1	-2.36	7.18	6.22	0.48	-	0.68
	S2-6	-2.40	7.39	6.24	0.44	-	0.15
	S2-8	-2.29	8.16	6.22	0.28	-	0.08
	S3-1	-1.91	7.15	6.19	0.48	-	0.71
	S3-6	-0.58	7.39	6.21	0.43	-	0.21
	S3-8	-1.30	8.12	6.19	0.28	-	0.10
	S4-1	1.80	6.96	6.02	0.46	-	1.01
S4-8	1.80	7.95	6.02	0.26	-	0.30	
Nitroimidazoles	2NS5-2	16.86	10.78	7.38	0.18	-2.02	0.08
	2NS1-6	16.60	9.89	6.55	0.13	2.40	0.11
	2NS5-3	16.69	10.40	7.02	0.16	-2.03	0.32
	2NS3-6	16.11	9.85	6.54	0.13	0.88	0.11
	2NS3-7	14.94	10.51	7.22	0.18	-1.44	0.15
	5NS2-6	8.47	9.75	6.53	0.14	10.44	0.07
	5NS1-1	11.17	10.17	6.91	0.16	11.20	0.16
	5NS5-4	14.18	10.23	6.97	0.17	-0.27	0.25

Abbreviations: eV, electron Volts;  $I$ , ionization potential; PA, proton affinity energy; SESE, substituent effect stabilization energy;  $\Delta$ , aromatic index;  $\eta$ , chemical hardness;  $\omega$ , electrophilicity index.

\*Values obtained from Reference [16].

\*\*Values obtained from Reference [15].

donor substituents in R9, indicating an increase in its structural stability.

Furthermore, to know how the substituent groups influence these molecules' stability and chemical reactivity, we investigated and evaluated the effect of the R9 substituents and the nitro group on the nitroimidazole derivatives via the (SESE) descriptor, where more negative values indicate greater energy stability. In Tables 1 and S3, we can see that the 2-nitroimidazoles that contain mercaptopyridine, benzyl, and phthalazine functional groups in the R9 substituent, respectively (2NS5-2, 2NS5-3, and 2NS3-7—as well as BNZ, M35m)—have negative values of the SESE descriptor. Therefore, they are the most energetically stable molecules, which agrees with the results obtained regarding chemical hardness and ionization potential. However, the stability decreases when the nitro group is in position 5, as it can be observed in the M7D, M3, 5NS2-6, and 5NS1-1 molecules, which indicates that the 5-nitroimidazole molecules are less stable than the 2-nitroimidazoles.

Since toxicity is a critical parameter in drug design, the descriptors electrophilicity index ( $\omega$ ) and aromaticity index ( $\Delta$ ) were determined.

In the last decades, these descriptors have been related to mutagenicity or carcinogenicity of organic molecules, respectively. In this context, Roy et al.,<sup>75,76</sup> have related high values of electrophilicity index to biological toxicity due to organic molecules with high values could form covalent bonds with DNA, which might cause mutations.<sup>77</sup> In this respect, it was observed in Tables 1 and S3 that nonnitrated molecules S1-1, S1-6, S2-1, S2-6, S3-1, S3-6, and S4-1, have the largest electrophilicity index values, therefore, they could be considered as the molecules with the highest probability of causing mutagenicity; on the other hand, nitrated structures and nonnitrated molecules S1-8, S2-8, S3-8, and S4-8, possess the lowest values, and they could be considered the least mutagenic structures in this study. In addition, the electrophilicity index ( $\omega$ ) values showed that the presence of the nitro group decreases the electrophilicity index of nitroimidazole derivatives, that is, BNZ, reference molecules and nitrated molecules have lower electrophilicity index values than their respective nonnitrated analogs, therefore, nitrated structures are less susceptible to accepting electronic charge. This behavior may be related to the



TABLE 2 Atomic charges values for imidazole and nitroimidazole derivatives at the M06-2X/6-311++G(2df,2p)//6-311+G(d,p) levels

Molecule	N1	C2	N3	C4	C5	O7	O8	R9	NO <sub>2</sub>
BNZ*	0.314	0.201	-0.595	0.221	-0.347	-0.511	-0.528	0.071	-0.212
M3**	0.257	0.444	-0.683	0.269	-0.357	-0.558	-0.564	0.050	-0.169
M35m	-0.228	0.432	-0.604	0.059	0.143	-0.489	-0.453	0.308	-0.309
M2**	0.075	0.706	-0.649	0.207	-0.316	-0.569	-0.581	0.100	-0.191
M7D	-0.021	0.545	-0.683	0.244	-0.243	-0.547	-0.556	0.167	-0.183
S1-1	0.291	0.167	-0.685	0.220	-0.471	-	-	0.028	-
S1-6	0.300	0.147	-0.680	0.199	-0.419	-	-	0.030	-
S1-8	0.172	0.211	-0.694	0.212	-0.388	-	-	0.098	-
S2-1	-0.039	0.525	-0.738	0.171	-0.395	-	-	0.200	-
S2-6	0.229	0.408	-0.727	0.152	-0.449	-	-	0.047	-
S2-8	0.121	0.446	-0.732	0.152	-0.398	-	-	0.105	-
S3-1	-0.074	0.235	-0.689	0.060	0.060	-	-	0.182	-
S3-6	0.250	0.135	-0.678	0.073	-0.106	-	-	-0.002	-
S3-8	0.082	0.189	-0.677	0.046	0.002	-	-	0.101	-
S4-1	0.027	0.682	-0.677	0.052	-0.378	-	-	0.116	-
S4-8	-0.068	0.743	-0.695	0.075	-0.365	-	-	0.172	-
S5-1	0.129	0.454	-0.724	0.191	-0.402	-	-	0.058	-
2NS5-2	0.280	0.242	-0.575	0.201	-0.273	-0.459	-0.419	0.062	-0.244
2NS1-6	0.367	0.178	-0.585	0.222	-0.355	-0.486	-0.477	0.022	-0.194
2NS5-3	0.026	0.339	-0.579	0.078	0.059	-0.467	-0.426	0.132	-0.279
2NS3-6	0.226	0.177	-0.567	0.080	-0.002	-0.504	-0.483	0.059	-0.205
2NS3-7	0.158	0.183	-0.560	0.062	0.030	-0.525	-0.531	0.122	-0.230
5NS2-6	0.167	0.461	-0.681	0.236	-0.271	-0.487	-0.546	0.068	-0.186
5NS1-1	0.378	0.228	-0.630	0.259	-0.328	-0.540	-0.509	-0.023	-0.148
5NS5-4	-0.045	0.778	-0.683	0.209	-0.209	-0.524	-0.453	0.177	-0.236

Note: Atomic charges of atoms and groups are in a.u.

\*Values obtained from Reference [16].

\*\*Values obtained from Reference [15]

global reactivity of the molecules, which is consistent with the results of chemical hardness and ionization potential.

The aromaticity index ( $\Delta$ ) is a global descriptor that indirectly predicts the carcinogenicity of a compound when it has aromatic rings.<sup>36,37</sup> According to the Barone indexes, a molecule is considered carcinogenic if it presents values above 0.36 eV. Tables 1 and S3 show that the molecules S2-1, S3-1, and S4-1 have highest aromaticity values, therefore, these molecules could be considered carcinogenic. By contrast, it is observed that the molecules 5NS2-6, S1-6, 2NS5-2, S2-8, S3-8, M35m, 2NS1-6, and 2NS3-6 possess the lowest values, which indicates that they can be considered as the molecules with the least probability of causing carcinogenicity.

On the other hand, the Tables 2 and S4 show the atomic charge values (fitted to ESP) of nonnitrated molecules and nitroimidazole derivatives for the following atoms: N1, C2, N3, C4, C5, and the substituent (R9), as well as NO<sub>2</sub> groups, in order to estimate which atomic or group charges could be related to the active sites. It is observed that the negative charges were located in N3 atom and NO<sub>2</sub> group, whereas the positive charges were located in C2, C4 atoms, and R9

substituent groups, except for S3-6 and 5NS1-1. Similarly, the results suggest that N3 atoms have larger negative values of the atomic charges than N1 atoms in all molecules, which agrees with the PAs and the amphoteric properties of imidazole derivatives reported in previous studies.<sup>15</sup>

In addition, it is observed that the atomic charges of the N1, N3, C5 atoms, and the R9-substituent are modified due to the presence of the nitro group and of its substituents R1= -CH<sub>3</sub> and R2= -OCH<sub>3</sub>, as shown for the BNZ, S1-1, M35m, S3-1, M3, S2-1, M2, and S4-1 molecules (see Tables 2 and S4). It is interesting to note that N3 atoms for no-nitrated analogs have larger negative values of the atomic charges than nitroimidazole derivatives; these results show that the electron-withdrawing effect of the NO<sub>2</sub> group is stronger than the R9-substituent effect. In addition, it was observed that for nitroimidazoles, the atomic charges of C2 and C5 atoms are affected by the presence of the nitro group in position two, while the atomic charges of C4 atoms are affected mainly by the presence of the nitro group in position five of the imidazole ring, respectively (see Figures 4 and 5).

TABLE 3 Condensed Fukui function values for imidazole and nitroimidazole derivatives at the M06-2X/6-311++G(2df,2p)//6-311+G(d,p) levels

Mol	$f^-$					$f^+$					$f^0$			
	C2	N3	C4	C5	R9	N6	O7	O8	R9	C4	C5	O7	O8	
BNZ*	-	-	-	-	0.145 C21 0.181 C29	0.164	0.245	0.212	-	0.027	0.034	0.123	0.106	
M3**	-	-	-	-	0.148 C16 0.181 C24	0.159	0.229	0.192	-	0.051	0.013	0.115	0.097	
M35m	0.132	0.065	0.188	0.145	-	0.163	0.239	0.196	-	0.121	0.099	0.158	0.129	
M2**	0.078	0.087	0.115	0.141	-	0.156	0.223	0.191	-	0.113	0.085	0.159	0.129	
M7D	0.109	0.085	0.135	0.162	-	0.160	0.230	0.198	-	0.118	0.094	0.164	0.133	
S1-1	0.161	0.090	0.202	0.216	-	-	-	-	0.153 C20 0.152 C24	0.102	0.108	-	-	
S1-6	-	-	-	-	0.123 C22 0.136 C24	-	-	-	0.129 C20 0.133 C24	-	-	-	-	
S1-8	-	-	-	-	0.142 N32 0.167 N33	-	-	-	0.109 C21 0.108 C25	-	-	-	-	
S2-1	0.123	0.087	0.197	0.208	-	-	-	-	0.141 C19 0.145 C23	0.099	0.105	-	-	
S2-6	0.122	0.088	0.196	0.210	-	-	-	-	0.129 C19 0.133 C23	0.099	0.105	-	-	
S2-8	0.123	0.088	0.197	0.210	-	-	-	-	0.109 C20 0.108 C24	0.099	0.105	-	-	
S3-1	0.158	0.089	0.199	0.167	-	-	-	-	0.142 C20 0.145 C21	0.101	0.084	-	-	
S3-6	0.160	0.089	0.199	0.168	-	-	-	-	0.123 C19 0.131 C23	0.100	0.084	-	-	
S3-8	0.158	0.089	0.199	0.167	-	-	-	-	0.109 C20 0.108 C24	0.100	0.084	-	-	
S4-1	0.094	0.091	0.183	0.197	-	-	-	-	0.147 C19 0.148 C23	0.092	0.099	-	-	
S4-8	0.094	0.091	0.183	0.198	-	-	-	-	0.109 C20 0.108 C24	0.092	0.099	-	-	
S5-1	0.116	0.087	0.194	0.202	-	-	-	-	0.144 C17 0.141 N23	0.100	0.102	-	-	
2NS5-2	-	-	-	-	0.169 S11 0.124 C17	0.162	0.244	0.206	-	0.029	0.031	0.129	0.107	
2NS1-6	-	-	-	-	0.118 C21 0.133 C23	0.155	0.225	0.193	-	0.027	0.036	0.116	0.098	
2NS5-3	0.125	-	0.187	0.141	-	0.160	0.240	0.201	-	0.069	0.061	0.159	0.131	
2NS3-6	-	-	-	-	0.122 C20 0.129 C22	0.153	0.222	0.190	-	0.028	0.028	0.115	0.096	
2NS3-7	0.058	0.034	0.083	0.067	0.078 C19 0.078 C23	0.156	0.226	0.191	-	-	-	0.127	0.110	
5NS2-6	-	-	-	-	0.131 C18 0.145 C22	0.159	0.227	0.184	-	0.051	0.012	0.115	0.092	
5NS1-1	-	-	-	-	0.143 C16 0.179 C23	0.156	0.221	0.197	-	0.049	0.011	0.114	0.101	
5NS5-4	0.070	0.083	0.107	0.134	0.099 O10	0.154	0.225	0.196	-	0.106	0.077	0.161	0.132	

\*Values obtained from Reference [16].

\*\*Values obtained from Reference [15].

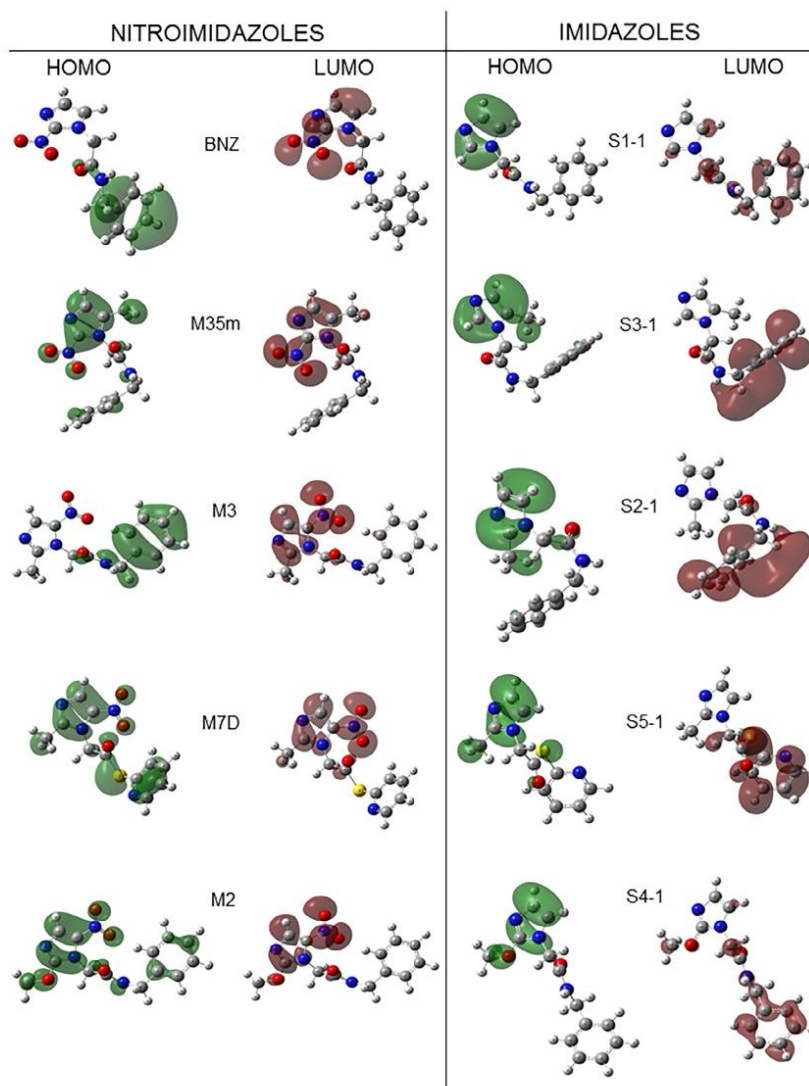


FIGURE 6 Frontier molecular orbitals (HOMO and LUMO) for imidazole and nitroimidazole derivatives at the M06-2X/6-311+G(d,p) level of theory

The condensed Fukui function allows the analysis of the interaction sites in specific regions of a molecule and the analysis of which atoms are potential reactive sites for electrophilic, nucleophilic, or radical attacks, respectively. Tables 3 and S5 collect the Fukui function values for the following atoms: C2, N3, C4, C5, N6, O7, and O8 for the reference molecules, nitroimidazole derivatives, and their respective nonnitrated analogs.

From these results, it can be noted that for nonnitrated imidazole derivatives, the negative function ( $f^-$ ) is found mainly on the C2, N3, C4, and C5 atoms; likewise, the Fukui functions, for nitroimidazole derivatives, as well as for the S1-6 and S1-8 molecules are mainly located on the R9-substituent. Therefore, these results indicate that these sites can undergo possible electrophilic attacks. The positive function ( $f^+$ ) for nitroimidazole derivatives is principally located

TABLE 4 Structural quality criteria

ID	% Identity	R-value	R-free	% Coverage	Resolution	Score	E-value	Coenzyme	Ligand
5GLG	37.3	0.18	0.21	40	1.80*	272	5.00E-80	FAD	Succinate
1KSU	35.4	0.17	0.24	39	2.00**	239	1.00E-67	FAD	Fumarate
1QJD	35.2	-	0.27	39	1.80***	238	5.00E-67	FAD	Malate
1QO8	34.8	0.23	0.28	41	2.15****	240	5.00E-68	FAD	-

\*Method X-ray diffraction (Values obtained from Reference [51]).

\*\*Method X-ray diffraction (Values obtained from Reference [52]).

\*\*\*Method X-ray diffraction (Values obtained from Reference [53]).

\*\*\*\*Method X-ray diffraction (Values obtained from Reference [54]).

on the N6, O7, and O8 atoms, and for nonnitrated imidazole derivatives, is located on the R9-substituent; these results indicate that these sites could suffer a nucleophilic attack. The radical function values ( $f^0$ ) for nonnitrated molecules are located on the C4 and C5 atoms, and, for nitroimidazole derivatives on the O7 and O8 atoms, suggesting possible radical attacks. It is interesting to mention that, in some cases, the regions susceptible to nucleophilic, electrophilic, and radical attacks change their position when the nitro group is not present in the structure, that is, the inductive effect of the nitro group in position two or five modifies the reactivity sites in the nitroimidazole molecules. These results agree with the reported in previous studies.<sup>16</sup>

The frontier molecular orbitals allow to identify the most important interaction sites susceptible to electrophilic and nucleophilic attacks of a molecule of pharmacological interest. Figure 6 shows the molecular orbitals (HOMO and LUMO) of the reference molecules, nitroimidazole derivatives and their nonnitrated analogs, respectively. Hence, the HOMO orbitals for BNZ and M3 are located on the R9 substituent, while for M7D, M2, and M35m, they are mainly located on the imidazole ring, which indicates that these regions are susceptible to electrophilic attacks. On the other hand, the LUMO orbitals are located on the imidazole ring and on the nitro group for BNZ, M3, M35m, M7D, and M2, which indicates that these regions could undergo nucleophilic attacks, respectively. On the contrary, in nonnitrated molecules, the HOMO orbitals are located on the imidazole ring, while the LUMO orbitals are located on the R9 substituent. Interestingly, in all molecules, the HOMO and LUMO molecular orbitals are located in the same areas as the Fukui functions and the atomic charges previously analyzed, confirming the most important interaction sites for these structures.

### 3.3 | Template selection and structural alignment

In absence of the crystal structure of the enzyme NADH-FUM reductase of *T. cruzi*,<sup>12-14</sup> we carried out homology modeling to obtain its three-dimensional structure and to use this model in subsequent molecular docking studies. Through a structural quality analysis, the templates that met the criteria required for such modeling were selected (percentage of coverage >30%, percentage of identity > 30%,

E-value < 10<sup>-4</sup>, resolution < 3.5, score > 200, R-value < 0.2, and R-free > R-value).

Table 4 shows the four template structures with the highest sequence identity that were identified: PDB ID: 5GLG,<sup>51</sup> chain A with 37.33% identity, crystallized ligand: succinate, coenzyme: FAD; PDB ID: 1KSU,<sup>52</sup> chain A with 35.39% identity, crystallized ligand: FUM, coenzyme: FAD; PDB ID: 1QJD,<sup>53</sup> chain A with 35.19% identity, crystallized ligand: malate, coenzyme: FAD; PDB ID: 1QO8,<sup>54</sup> chain A with 34.79% identity, no crystallized ligand, coenzyme: FAD.

Although available templates in the Protein Data Bank database<sup>51-54</sup> showed a coverage percentage of  $\leq 41\%$ , they include the segment spanning from residues 315 to 950, which correspond to the catalytic site of FUM and the site of interaction for the formation of the Coenzyme-FRD complex, as reported in literature.<sup>13,51,78-80</sup> Figure 7 shows the multiple alignment where the residues that integrate the catalytic site of the protein with FAD are highlighted in green, whereas the residues that form the catalytic site of the protein with FUM are highlighted in yellow.

### 3.4 | Model building

The 10,000 models generated based on each of the four proposed templates are shown Figure 8. From these results, the models with the best values of RMSD and DOPE score were selected. Based on 1QJD template, the model 2735 was selected, with values of RMSD = 3.87 Å and DOPE = -56,774.23. For the 1KSU template, the model 5299 was selected, with values of RMSD = 3.87 Å and DOPE = -57,022.21. For the 5GLG template, the model 4560 was selected, with values of RMSD = 2.01 Å and DOPE = -49,050.61. For template 1QO8, the model 9109 was selected, with values of RMSD = 8.34 Å and DOPE = -52,790.86.

We visually evaluated and compared the selected models with their respective templates using the PyMOL software,<sup>81</sup> as shown in Figure 9. The results illustrated that the modeled structures are highly similar to their respective templates, especially in the regions of the catalytic site, therefore, Ramachandran plots were constructed to evaluate the stereochemical quality of models, as shown in Figure 10.



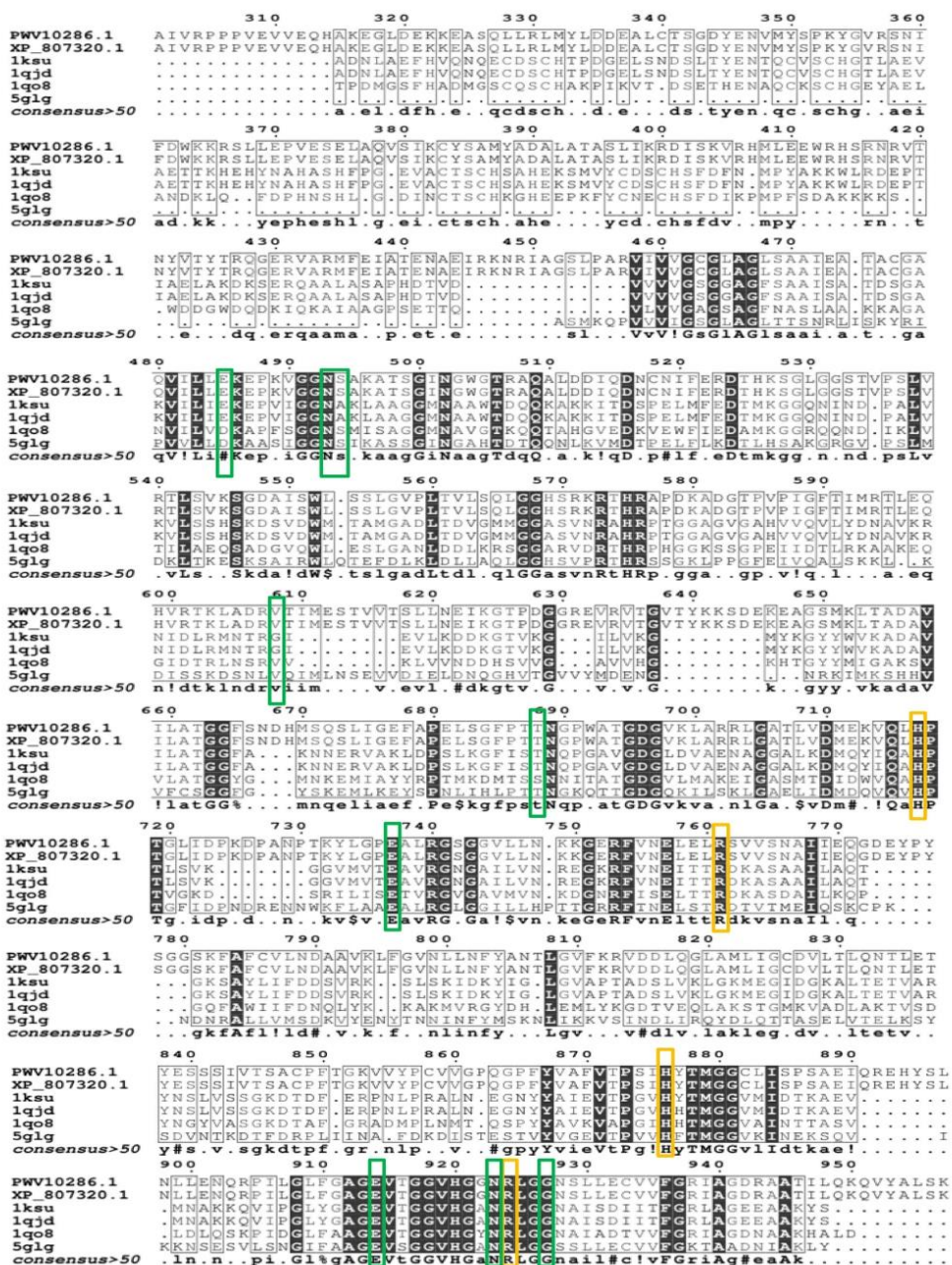
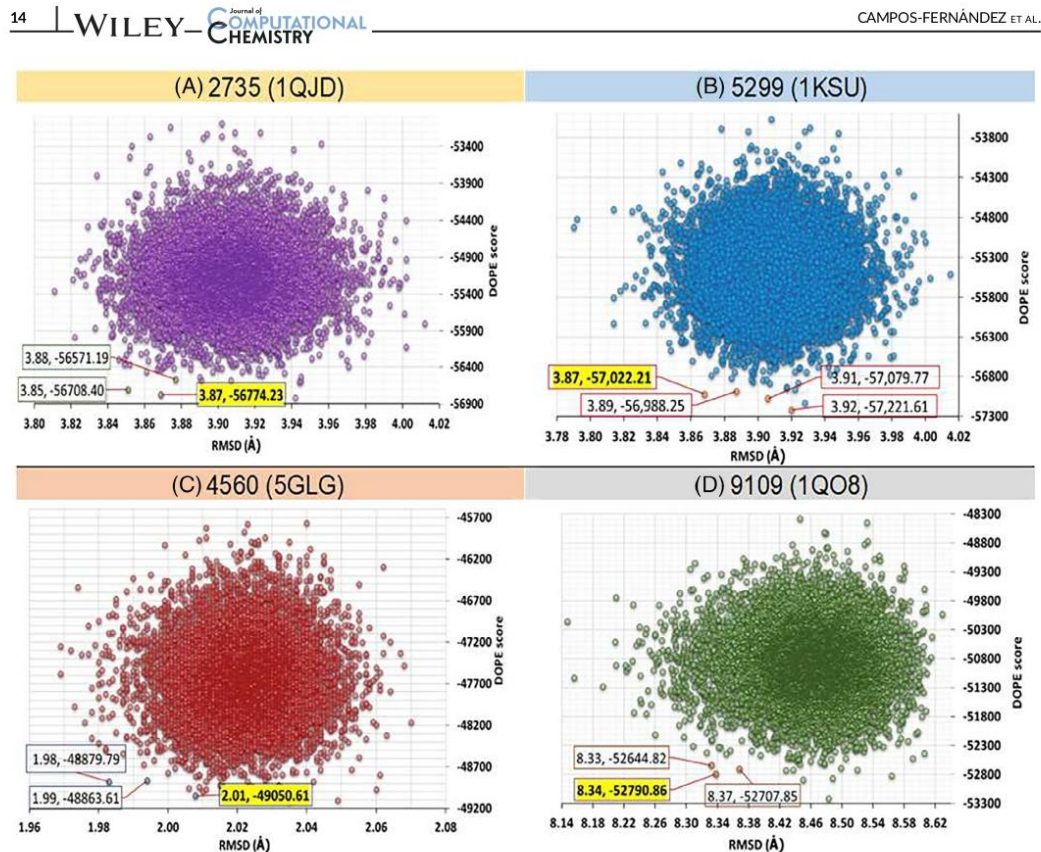


FIGURE 7 Multiple sequence alignment for template and problem sequence.<sup>55</sup> The residues that integrate the catalytic site of the FAD are in green box, and the residues that integrate the catalytic site of the fumarate are in yellow box



**FIGURE 8** Models generated for: (A) 1QJD (purple), (B) 1KSU (blue), (C) 5GLG (red), (D) 1QO8 (green). The values of the root mean square deviation (RMSD) were calculated with ProFit,<sup>57,58</sup> and the DOPE statistical score (discrete optimized protein energy) was calculated by MODELLER 9.21<sup>56</sup>

The Ramachandran plots showed that the amino acids of each selected model were located in allowed sites. In the case of the model 2735 (1QJD), a total percentage of 98.7% was obtained; for the model 5299 (1KSU), a total percentage of 98.7% was obtained; for the model 4560 (5GLG), a total percentage of 98.3% was obtained; and for the model 9109 (1QO8), a total percentage of 98.5% was obtained. According to our results shown in the homology modeling study, was confirmed that the modeled structures have the quality required<sup>82</sup> to continue with the molecular docking study.

### 3.5 | Docking studies of coenzyme-protein complex

We performed molecular docking between the NADH and the model 5299 (1KSU), the NADH and the model 2735 (1QJD), the NADH and the model 4560 (5GLG), as well as the NADH and the model 9109

(1QO8), to form the respective NADH-FRD complexes. We also compared the spatial location of the coenzyme, taking as reference the position of the crystallized FAD in the template structures, as shown in Figure 11.

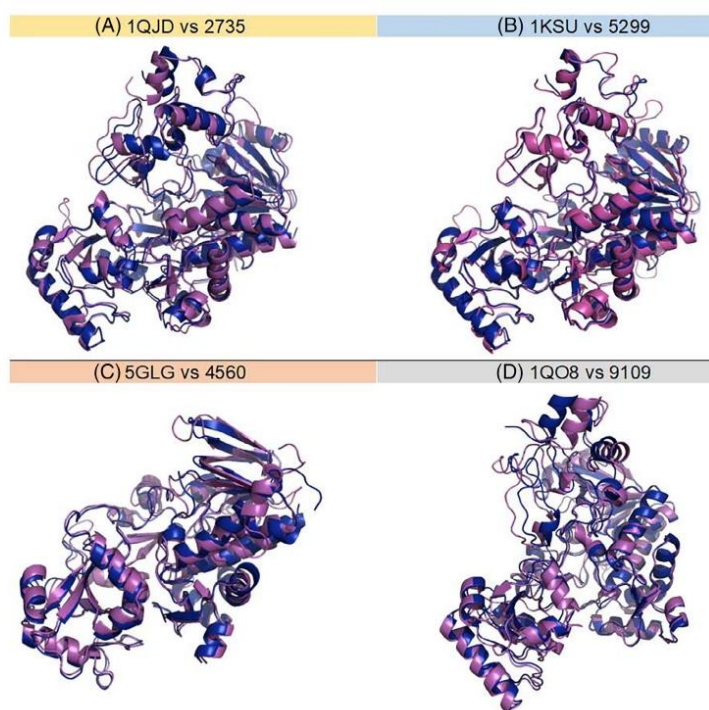
The results shown in Figure 11 indicated that, the NADH-5299 (1KSU), is the only one out of the four analyzed complexes that conserved the interaction space of the FAD with its respective template, with a binding energy value of  $-7.1$  kcal/mol. Therefore, we selected the model 5299 to continue with the molecular docking studies and validate the docking protocol (redocking).

### 3.6 | Validation of docking protocol (redocking)

The validation of the docking protocol was carried out by means of comparing the spatial location of the crystallized FAD-1KSU complex, with the FAD coupled to the 1KSU template and with



**FIGURE 9** Selected models (magenta) and compared with their respective templates (blue): (A) 1QJD vs the model 2735, (B) 1KSU vs the model 5299, (C) 5GLG vs the model 4560, (D) 1QO8 vs the model 9109. The models were generated by MODELLER 9.21<sup>56</sup>



the FAD coupled to model 5299. Similarly, the spatial locations of NADH coenzyme coupled to the 1KSU template, with NADH coupled to model 5299, were compared. All the comparisons were carried out through the RMSD values, as shown in Figure 12.

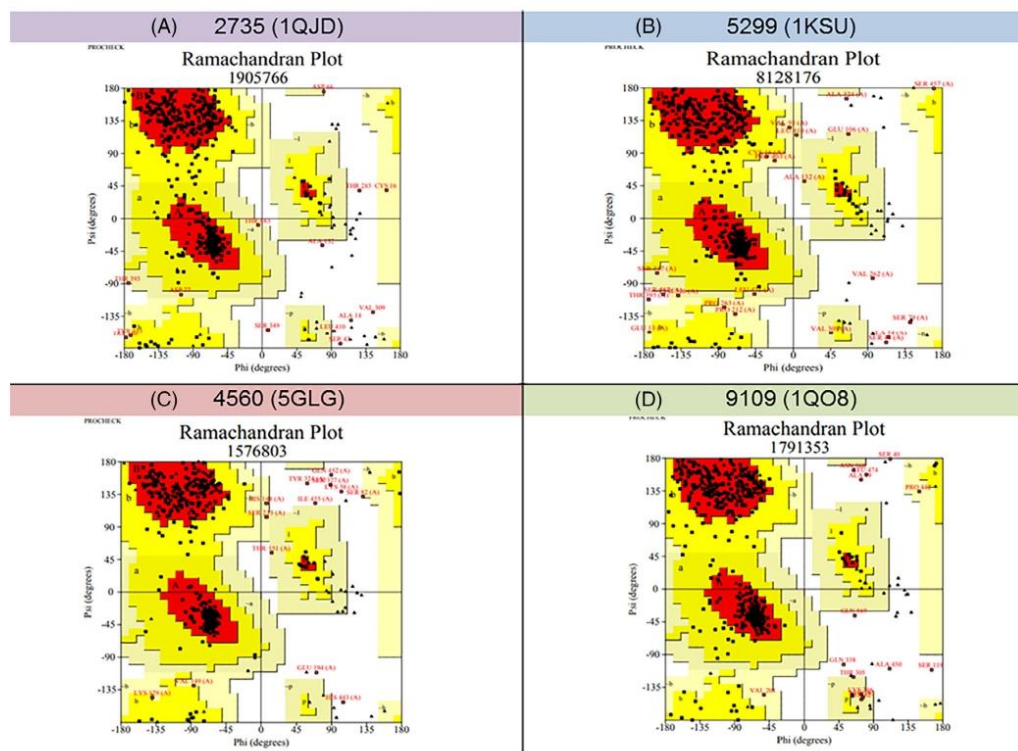
Figure 12 shows that the binding positions presented by the FAD coupled to 1KSU template, versus the crystallized FAD-1KSU complex, have a minimal difference in their spatial location, with  $\text{RMSD} = 0.136 \text{ \AA}$ . In addition, it shows that the location of the FAD coupled to model 5299, agrees with the position of the crystallized FAD at 1KSU, with a difference of  $\text{RMSD} = 1.144 \text{ \AA}$ . Likewise, the coupling positions between the complex NADH-5299 and NADH-1KSU are very similar, with a difference of  $\text{RMSD} = 1.719 \text{ \AA}$ . It is important to note that the spatial locations of all the complexes generated in the validation of the coupling agree with the position of the crystallized FAD at the 1KSU template; therefore, these results allowed us to confirm that the NADH possesses a very similar interaction site to that of the crystallized FAD.

To analyze hydrogen bonds and hydrophobic interactions, we compared the FAD-1KSU complex with the NADH-5299 complex. The interactions were visualized by the LigPlot<sup>63</sup> and PyMOL software,<sup>81</sup> as shown in Figure 13.

Figure 13 shows the intermolecular interactions that correspond to the hydrogen bonds for FAD-1KSU complex are located in the

1KSU residues: Gly278 (with N5 atom from 6-aminopurine and N atom from the amine substituent of the 6-aminopurine of the FAD), Asp344 (with N atom from the 6-aminopurine of the FAD), Glu534 (with O atom from the phosphate of the flavin nucleotide of the FAD), Gly136 (with O atom from the phosphate of the flavin nucleotide of the FAD), Ala137 (with O atom from the phosphate of the flavin nucleotide of the FAD), Glu156 (with O atom from the hydroxyl ribose of the adenine nucleotide of the FAD), Ala549 (with O atom from the flavin group of the FAD), Ile550 (with O atom from the flavin group of the FAD), Gly171 (with O and N atoms from the flavin group of the FAD), Gly170 (with O atom from the flavin group of the FAD), Ala169 (with O and N atoms from the flavin group of the FAD), Ala165 (with O atom from the phosphate of the adenine nucleotide of the FAD), Asn164 (with O atom from the phosphate of the adenine nucleotide of the FAD), and Gln338 (with O atom from the hydroxyl ribose of the FAD). Similarly, it was observed that its hydrophobic interactions are located in the following residues: Val132, Arg277, Gly133, Thr313, Gly314, Gly163, Gly533, Ala312, Ile553, Gly135, Tyr505, Asn548, Arg544, Gly547, Val253, Ala168, Leu167, His504, Asn337, Met375, Thr336, Glu156, Lys157, Glu158, Thr276.

Moreover, the intermolecular interactions that correspond to the hydrogen bonds of the NADH-5299 complex are located in the residues: Asn405 (with N atom from the nicotinamide of the



**FIGURE 10** Ramachandran plots for the selected models: (A) model 2735 (1QJD), (B) model 5299 (1KSU), (C) model 4560 (5GLG), (D) model 9109 (1QO8)

NADH), His552 (with O atom from the ribose of the nicotinamide nucleotide of the NADH), Cys609 (with O atom from the hydroxyl ribose of the adenine nucleotide of the NADH), Cys139 (with N atom from the 6-aminopurine of the NADH), Ala337 (with N8 atom from the 6-aminopurine of the NADH), Ala142 (with O atom from the phosphate of the nicotinamide nucleotide of the NADH), Leu141 (with O atom from the phosphate of the nicotinamide nucleotide of the NADH), Thr364 (with O atom from the hydroxyl ribose of the nicotinamide nucleotide of the NADH), while their hydrophobic interactions are located in the residues: Arg600, Ala173, Pro412, Ser605, Pro261, Leu606, Ala142, Thr260, Gly140, Thr338, Trp368, Gly138, Gly339, Gly168, Gly167, Ser170, Glu590, Asn365, Ser170, Glu590, Asn365.

### 3.7 | Validation of the water docking protocol

The water docking protocol was validated by assessing whether programs could reproduce conserved water molecules' presence or absence in an experimental 3D protein crystal structure. High-

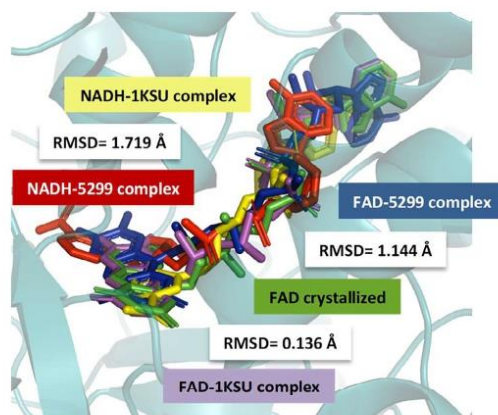
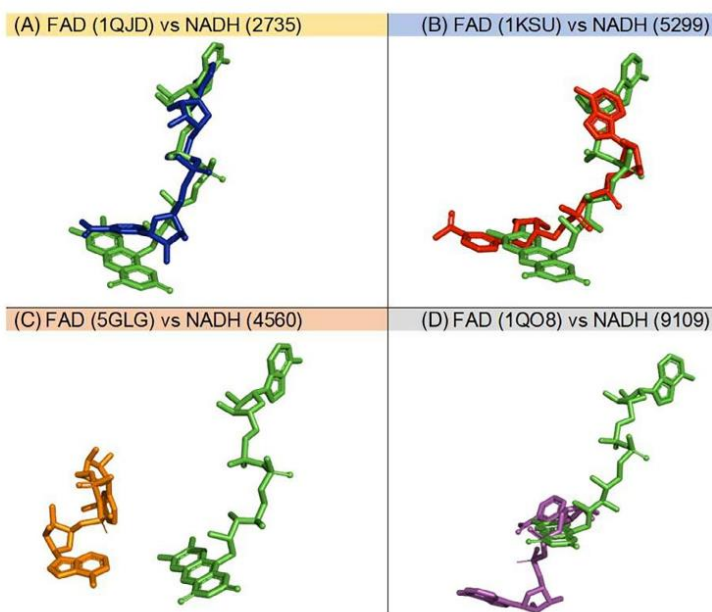
resolution complex crystal structure 1KSU,<sup>52</sup> which is homologous to enzyme NADH-FUM reductase, served as input for the validation analysis. This protein is bound to its coenzyme, FAD, and to its native ligand, FUM. Importantly, crystallographic data<sup>52</sup> show no evidence of the presence of conserved water molecules in the vicinity of the ligand (FUM)-binding pocket of 1KSU, as shown in Figure 14.

When water was docked into FAD-1KSU complex, in the absence of ligand (FUM), six water molecules were identified as potentially conserved in the environs of the ligand-binding pocket (Figure 15A, left panel). However, only two of those water molecules were found to interact with the complex through hydrogen bonds with FAD. Hydrogen bonds show long lengths, ranging from 2.88 Å and up to 3.06 Å, suggesting that the interactions may be considerably weak,<sup>B4,B5</sup> and thus, significantly reducing their influence in the stabilization of the FAD-1KSU complex.

Interestingly, in the explicit presence of the ligand (FUM), the docking of water molecules into FAD-1KSU-FUM complex revealed no conserved water molecules within the ligand-binding pocket (Figure 15B, left panel). This may confirm that the interactions of



**FIGURE 11** Molecular docking for: (A) The crystallized FAD-1QJD (green) overlaid with NADH coupled to model 2735 (blue), (B) the crystallized FAD-1KSU (green) overlaid with NADH coupled to model 5299 (red), (C) the crystallized FAD-5GLG (green) overlaid with NADH coupled to model 4560 (yellow), and (D) the crystallized FAD-1QO8 (green) overlaid with NADH coupled to model 9109 (magenta)



**FIGURE 12** Spatial location of the crystallized FAD (green) overlaid with FAD coupled to model 5299 (blue), the FAD coupled to 1KSU template (magenta), the NADH coupled to 1KSU template (yellow), and the NADH coupled to model 5299 (red)

conserved water molecules, identified previously, are indeed weak and that such molecules are completely displaced by the presence of the ligand, FUM, which is strongly stabilized through a series of hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the protein (Figure 15B, right panel). These results agree with the lack of conserved water molecules in the crystallographic structure of 1KSU,<sup>52</sup>

therefore, these findings indicate that our protocol may be suitable to predict conserved (non-displaceable) waters in similar ligand-protein complexes.

### 3.8 | Docking of water molecules into the homology model of NADH-fumarate reductase

We used the validated protocol to investigate the potential presence of conserved water molecules within the ligand-binding pocket of the enzyme NADH-FUM reductase. To conduct this study, in the absence of a 3D crystal structure of the enzyme to *T. cruzi*, we employed a homology model (model 5299, see section Model Building), which was built based on the structure of 1KSU.<sup>52</sup> This protein model is bound to NADH (coenzyme) and to FUM (ligand).

Without the explicit presence of FUM, the docking of water molecules into the homology model found six conserved water molecules (Figure 16, left panel). However, these water molecules appear to be somewhat displaced toward the vicinity of the NADH-binding pocket, where four of such molecules interact with the coenzyme by forming hydrogen bonds, Figure 16(A) (right panel). This suggests that the influence of these water molecules may be insignificant within the FUM-binding site.

In the explicit presence of FUM (ligand), water docking into the NADH-5299-FUM complex identified eight potential non-displaceable water molecules (Figure 16B, left panel). But only four of such molecules form hydrogen bonds with FUM (Figure 16B, right panel). However, the interaction distances between FUM and water

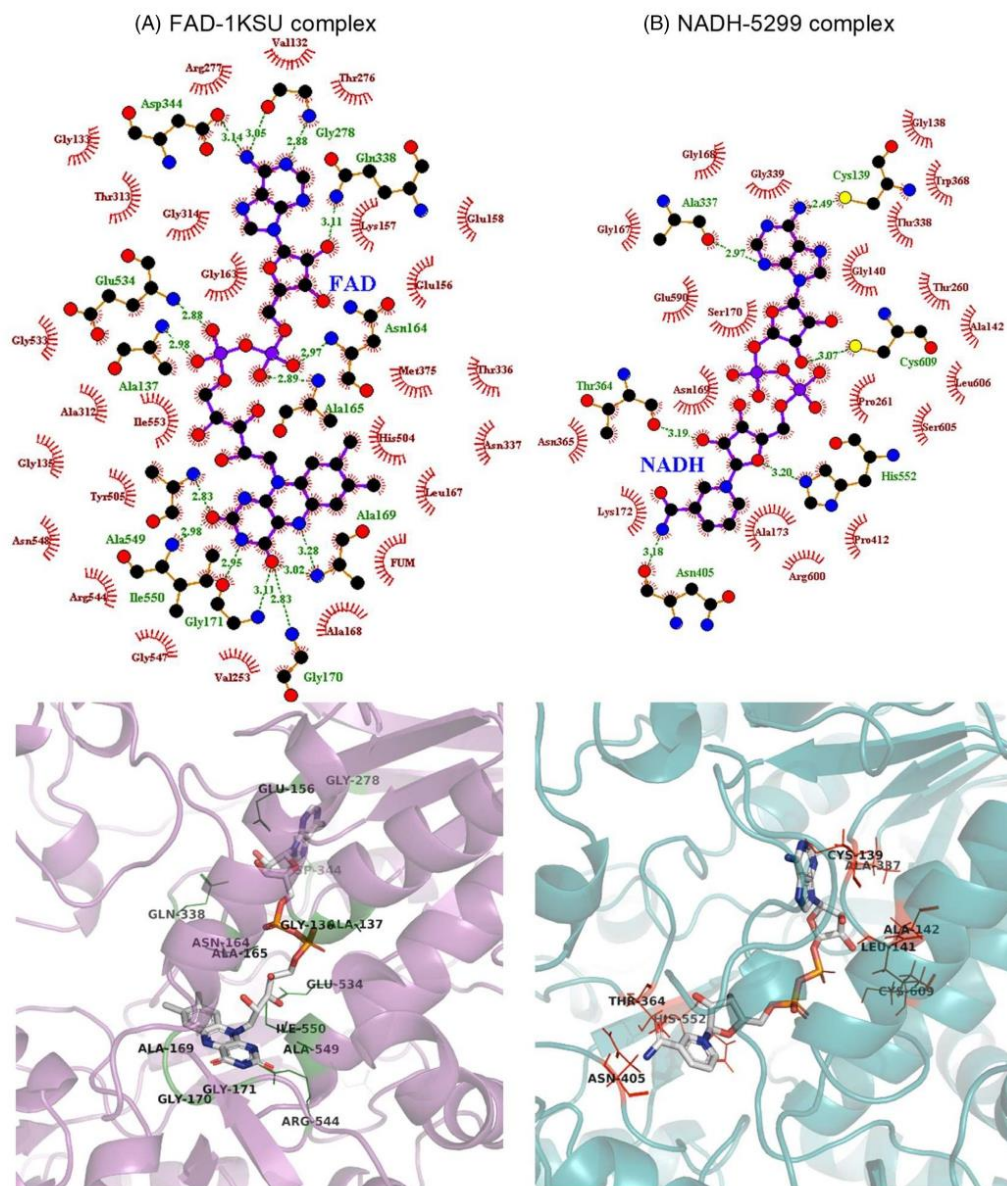
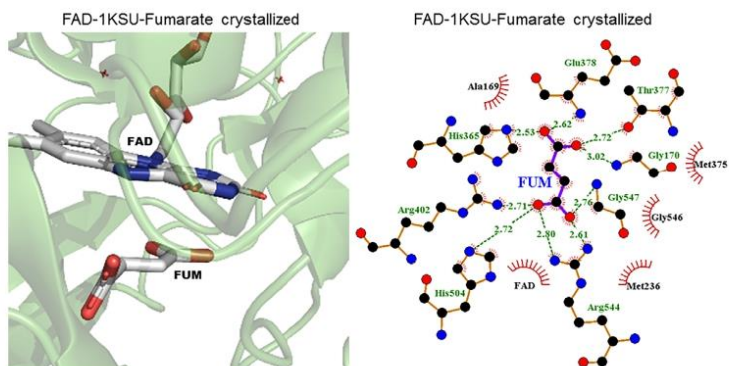


FIGURE 13 (A) Interactions of the FAD-1KSU complex; (B) interactions of the NADH-5299 complex. The green dotted lines illustrate the hydrogen bonds interactions, and red dotted lines display the hydrophobic interactions

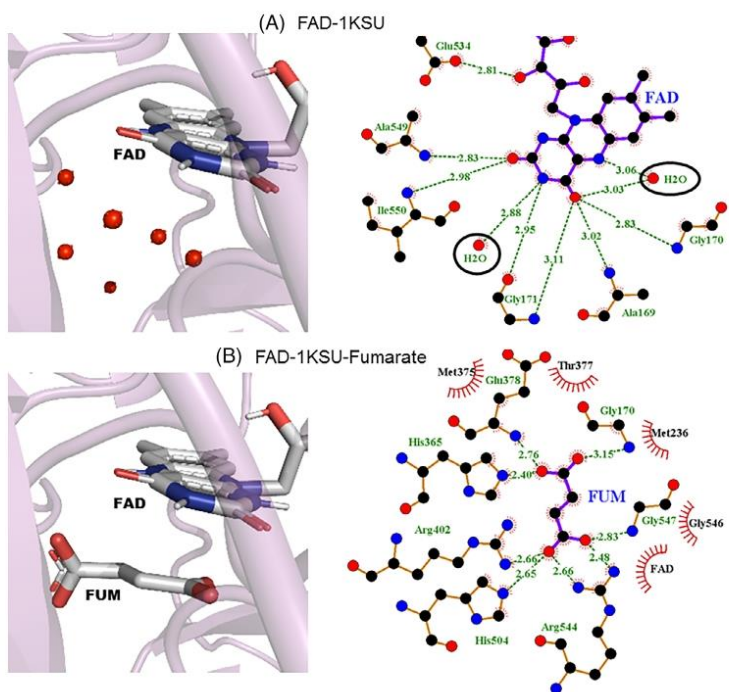
molecules are significantly long, with bond lengths of 2.86, 2.91, 3.00, and 3.00 Å, which, according to the literature, result in weak interactions.<sup>84,85</sup>

Thus, our *in silico* docking assessment suggest the absence of conserved water molecules in the vicinity of the FUM-binding site of the enzyme NADH-FUM reductase. These findings are

**FIGURE 14** Crystal structure of 1KSU reveals no evidence of the presence of conserved water molecules within the ligand (fumarate, FUM)-binding pocket



**FIGURE 15** Docking of water molecules to (A) FAD-1KSU complex and to (B) FAD-1KSU-fumarate (FUM) complex (red spheres represent water molecules)

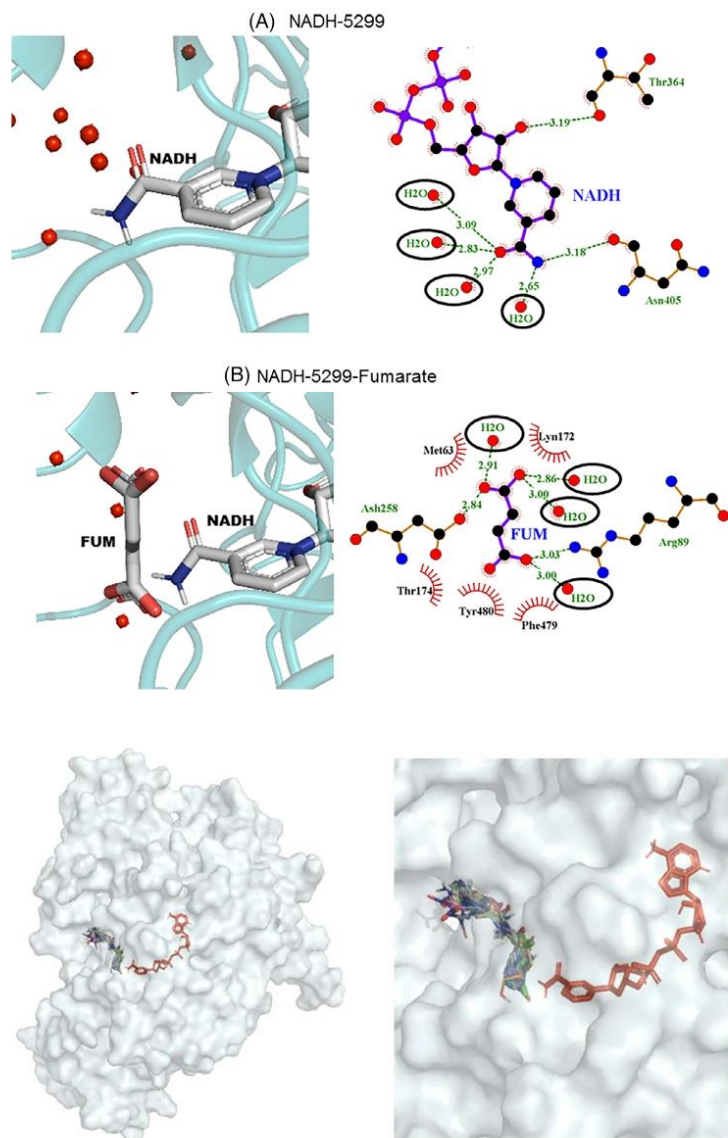


consistent with experimental crystallographic data. High-resolution crystal structure of 1KSU<sup>52</sup> reveals no conserved water molecules, and crucially, it is an evolutionary homolog to the enzyme NADH-FUM reductase. Hence, this reductase, similar to 1KSU, should also lack conserved water molecules, which our findings precisely suggest. Therefore, subsequent docking studies involving this enzyme may be conducted without incorporating explicit water molecules.

### 3.9 | Docking studies of coenzyme-protein-ligand complex

Once the NADH-FRD (NADH-5299) complex was obtained and validated, the molecular docking of the complex with FUM, reference molecules and selected ligands were carried out. In addition, to corroborate that the interactions are found in the internal part of the protein and not on the surface, a visual analysis was carried





**FIGURE 16** Docking of water molecules to (A) NADH-5299 complex and (B) NADH-5299-fumarate (FUM) complex (red spheres represent water molecules)

**FIGURE 17** Molecular docking of the NADH-5299 complex with fumarate, selected ligands and reference molecules that conserve the catalytic site of the fumarate

out of the spatial location of the designed ligands, as shown in Figure 17.

The structures shown in Figure 17 correspond to the molecules S1-1, S1-6, S1-8, S2-8, S3-6, S3-8, S4-8, 5NS1-1, and 2NS1-6 which were found in the internalized region of the protein and conserved the catalytic site of FUM with the NADH-5299 complex. By contrast, the structures BNZ, M3, M35m, M2, M7D, S2-6, S4-6, 5NS2-6, 2NS3-6, 2NS3-7, 2NS5-2, 2NS5-3, and 5NS5-4 were located on the

superficial region of the protein, which hinders their interaction with the catalytic site of FUM.

In order to analyze the binding energies and intermolecular interactions among the NADH-5299 complex and the selected ligands, in Table 5, we formatted against an italic the ligands that conserved the FUM catalytic site; so, it can be observed that the main intermolecular interactions of FUM for the hydrogen bonds are located on NADH, Lys172, Tyr480, Arg89; while for the hydrophobic interactions, the

TABLE 5 Ligand interactions with the NADH-5299 complex

Ligands	Binding energy (kcal/mol)	Hydrophobic interactions	Hydrogen bonds
FUM	-4.7	Asp258, Phe479, Thr174, Met63	NAD, Lys172, Tyr480, Arg89
BNZ	-6.2	Ala62, Arg89, Ile57, Thr483, Met63, Thr174, Tyr480, Tyr64, Phe479, NAD	Lys172
M3	-6.4	Ala62, Leu85, Ile57, Arg89, Asp258, Lys172, Thr174, Phe479, Lys58, Met63, Tyr64, Ser61, NAD	
M35m	-6.0	Ile57, Ala62, Leu85, Phe479, Met63, Tyr64, Asp258, Thr174, Arg89, Lys172, NAD	
M2	-6.7	Arg89, Lys172, Asp258, Thr174, Phe479, Met63, Tyr64, Ala62, Lys58, Ser61, Ile57, Leu85	
M7D	-5.7	Ser56, Lys58, Met63, Leu85, Ala62, Ser61, Thr483, Phe479	Asn482
S1-1	-6.0	Tyr64, Ile57, Thr483, Leu85, Phe479, Met63, Thr174, NAD	Arg89, Lys172
S1-6	-6.0	Tyr480, Thr174, Phe479, Met63, Ala62, Ile57, Leu85	Arg89, Lys172
S1-8	-7.2	Ile57, Ala62, Met63, Tyr480, Thr174, Phe479, Leu85	Arg89, Lys172
S2-6	-6.7	Leu85, Ala62, Met63, Ser56, Phe479, Asn482, Ile57, Thr483, Lys58	Arg89, Ser61
S2-8	-7.5	Leu85, Ile57, Tyr64, Tyr480, Phe479, Thr174, Met63	Arg89, Lys172
S3-6	-6.1	Met63, Tyr64, Ile57, Leu85, Arg89, Phe479, Thr174, Tyr480, NAD	Lys172
S3-8	-8.0	Ala62, Met63, Tyr480, Thr174, Phe479, Tyr64, Leu85, Ile57, NAD	Arg89, Lys172, Ser61
S4-6	-6.4	Thr483, Asn482, Met63, Phe479, Ser56, Arg89, Leu85, Ile57, Lys58, Ala62	Ser61
S4-8	-6.8	Leu85, Ile57, Thr174, Tyr480, Phe479, Met63	Arg89, Lys172
2NS5-2	-6.1	Ser61, Thr483, Ser56, Phe479, Met63, Tyr64, Ala62, Leu85, Ile57	Arg89, Lys58
2NS1-6	-6.8	Thr174, Met63, Arg89, Ile57, Leu85, Tyr64, Phe479	Tyr480, Lys172, NAD
2NS5-3	-5.8	Phe479, Thr483, Ser56, Met63, Leu85, Ala62, Ser61	Asn482
2NS3-6	-7.0	Phe479, Lys58, Ile57, Arg89, Ala62, Leu85, Met63, Thr483	Asn482, Ser56
2NS3-7	-7.3	Phe479, Ser56, Lys58, Ile57, Met63, Ala62, Leu85, Arg89, Thr483	Asn482
5NS2-6	-6.9	Phe479, Lys58, Met63, Ile57, Ala62, Leu85, Arg89, Thr483	Asn482, Ser56
5NS1-1	-6.5	Leu85, Tyr64, Phe479, Ser61, Ala62, Met63, Arg89, Lys172, Thr174, NAD	
5NS5-4	-5.8	Ser56, Phe479, Thr483, Ile57, Arg89, Leu85, Ala62	Lys58

residues are located on Asp258, Phe479, Thr174, Met63. It is important to mention that the residues: Lys172 and Arg89 for the hydrogen bonds and the residues: Phe479, Thr174, Met63 for the hydrophobic interactions were localized in almost all coupled ligands.

The molecular docking studies indicated that the structures S3-8 (-8.0 kcal/mol), S2-8 (-7.5 kcal/mol), and S1-8 (-7.2 kcal/mol) have the lowest values of binding energy.

#### 4 | CONCLUSIONS

A computational study was undertaken, at the DFT-M06-2X level in aqueous solution, to characterize and analyze the electronic structure and evaluate the importance of the nitro group and the substituent effects on the chemical reactivity and the physicochemical features of new imidazole and nitroimidazole derivatives. The virtual platforms indicated that the selected molecules were not toxic and had good pharmacokinetic properties.

The results of the quantum chemical descriptors allowed us to identify the structures: S2-8, S3-8, 2NS5-2, 2NS3-7, 2NS5-3, and 5NS1-1, which showed the best physicochemical properties and the lowest toxicity. In addition, the results showed that, the presence of the phthalazine group in the R9 substituent confers more stability to nonnitrated imidazole derivatives.

Using homology modeling and applying a thorough refinement protocol, we constructed a high-quality 3D structure of the enzyme NADH-FUM reductase. The homology model was built based on the experimental crystallographic structure from *Shewanella frigidimarina* (PDB ID:1KSU). It showed the highest stereochemical robustness and structural consistency as demonstrated by the low RMSD, 3.87 Å, when superimposed to the template protein.

This model was then used to investigate the potential presence of conserved water molecules within the ligand-binding pocket of the enzyme. Our in silico docking approach, complemented with experimental crystallographic data, revealed the absence of water molecules in the molecular interactions of NADH-FUM reductase with ligands.

This finding allowed us to perform subsequent ligand-docking studies without incorporating explicit water molecules in the simulations.

The selected molecules and evaluated via DFT studies were tested as ligands in molecular docking. The results showed that the ligands S1-1, S1-6, S1-8, S2-8, S3-6, S3-8, S4-8, SNS1-1, and 2NS1-6 interacted at the catalytic site of the FUM with similar intermolecular interactions.

Finally, the computational studies showed that the molecules S3-8 (−8.0 kcal/mol), S2-8 (−7.5 kcal/mol), and S1-8 (−7.2 kcal/mol), could be considered as potential inhibitors of the enzyme NADH-FUM reductase; however, future studies of molecular dynamics simulations and experimental studies of enzymatic inhibition are contemplated.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for allocation of computer time in the supercomputer (Miztli, LANCAD-UNAM-DGTIC-203). This research was supported by DGAPA-UNAM grant PAPIIT-IN230419. Linda Campos-Fernández thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for support through a graduate scholarship: 727184.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

#### ORCID

Catalina Soriano-Correa  <https://orcid.org/0000-0003-3366-9387>

#### REFERENCES

- World Health Organization, *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*, Fact Sheets, Newsroom 2021. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed July 2021).
- Drugs for Neglected Diseases initiative América Latina, Enfermedad de Chagas. DNDi en América Latina, 2021, <https://www.dndi.org/es/enfermedades/enfermedad-chagas/> (accessed July 2021).
- OPS, OMS, *Int. Stat. Classif. Dis. Relat. Health Probl.* 2003, 1(554), 157.
- Organización Mundial de la Salud, *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015, 90(6), 33.
- Pan American Health Organization, World Health Organization, Chagas disease, <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease> (accessed July 2021).
- R. Chuit, R. Meiss, R. Salvatella, in *Chagas Disease. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases* (Eds: J. Altcheh, H. Freilij), Springer, Argentina 2019, p. 91. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7_4)
- J. Izquierdo-Polanco, E. H. Hernández-Rincón, C. L. Jaimes-Peñuela, *FMC Form. Medica Contin. en Atención Primaria.* 2021, 28(6), 324.
- A. C. M. Von Trompowsky, T. R. Conde, R. C. Lemos, B. M. Quaresma, M. C. S. Pitombeira, A. S. de Carvalho, N. Boechat, K. Salomao, S. L. de Castro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2019, 114, 1.
- V. Ribeiro, N. Dias, T. Paiva, L. Hagström-Bex, N. Nitz, R. Pratesi, M. Hecht, *Int. J. Parasitol-Drug.* 2020, 12, 7.
- C. Bern, *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 456.
- J. D. Maya, B. K. Cassels, P. Iturruga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira, A. Morello, *CBP Part A* 2007, 14(4), 601.
- J. F. Turrens, J. B. P. Watts, L. Zhong, R. Docampo, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996, 82(1), 125.
- A. Merlino, M. Vieites, D. Gambino, E. L. Coitño, *J. Mol. Graphics Modell.* 2014, 48, 47.
- J. F. Turrens, *Mol. Cell. Pharmacol.* 2012, 4(3), 117.
- L. Campos-Fernández, *Master Thesis*, Instituto Politécnico Nacional (México), 2017.
- L. Campos-Fernández, C. Barrientos-Salcedo, V. E. E. Herrera, R. Ortiz-Muñoz, C. Soriano-Correa, *New J. Chem.* 2019, 43, 11125.
- M. Sánchez-Moreno, A. M. Sanz, F. Gómez-Contreras, P. Navarro, C. Marín, I. Ramírez-Macias, M. J. Rosales, F. Olmo, I. García-Aranda, L. Campayo, C. Cano, F. Arrebola, M. J. R. Yunta, *J. Med. Chem.* 2011, 54(4), 970.
- A. H. Romero, S. E. López, *J. Mol. Graphics Modell.* 2017, 76, 313.
- P. de Andrade, O. A. Galo, M. R. Carvalho, C. D. Lopes, Z. A. Carneiro, R. Sesti-Costa, E. B. de Melo, J. S. Silva, I. Carvalho, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 23(21), 6815.
- M. V. Papadopoulou, W. D. Bloomer, H. S. Rosenzweig, S. R. Wilkinson, J. Szular, M. Kaiser, *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 123, 895.
- Sander, T., Osiris Molecular. Osiris Property Explorer. Idorsia Pharmaceuticals Ltd, Switzerland, <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- Molinspiration Cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997, 23(1-3), 3.
- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, G. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven Jr., J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Rev. E.01*, Gaussian Inc, Wallingford, CT 2013.
- Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* 2008, 120, 215.
- N. Mardirossian, M. Head-Gordon, *Mol. Phys.* 2017, 115(19), 2315.
- W. J. Hehre, L. Radom, P. V. R. Schleyer, J. A. Pople, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, John Wiley & Sons, New York 1986.
- A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* 2009, 113(18), 6378.
- C. Soriano-Correa, C. Barrientos-Salcedo, A. Raya, C. Rubio-Póo, R. O. Esquivel, *Int. J. Quantum Chem.* 2010, 110(13), 2398.
- P. K. Chattaraj, S. Giri, S. Duley, *Chem. Rev.* 2011, 111(2), PR43.
- R. G. Parr, L. V. Szentpály, S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121(9), 1922.
- R. G. Pearson, W. E. Palke, *J. Phys. Chem.* 1992, 96(8), 3283.
- R. G. Pearson, *Chemical Hardness*, John Wiley & Sons, Inc, Toronto 1997. <https://doi.org/10.1002/3527606173.fmatter>
- R. G. Parr, R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105(26), 7512.
- R. G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York 1989.
- P. M. V. B. Barone, A. Camilo, D. S. Galvao, *Phys. Rev. Lett.* 1996, 77, 1186.
- R. S. Braga, P. M. V. B. Barone, D. S. Galvao, *Theo. Chem.* 1999, 464(1-3), 257.



- [38] A. Jezuita, K. Ejsmont, H. Szatyłowicz, *Struct. Chem.* **2021**, *32*, 179.
- [39] H. Szatyłowicz, A. Jezuita, T. Siodla, K. S. Varaksin, K. Ejsmont, M. Shahamirian, T. M. Krugowski, *Struct. Chem.* **2018**, *29*, 1201.
- [40] H. Szatyłowicz, A. Jezuita, K. Ejsmont, T. M. Krygowski, *J. Phys. Chem.* **2017**, *121*(27), 5196.
- [41] I. N. Levine, *Química Cuántica*, 5th ed., Prentice Hall, Madrid **2001**.
- [42] P. Politzer, D. G. Truhlar Eds., *Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials: Reactivity, Structure, Scattering, and Energetics of Organic, Inorganic, and Biological Systems*, Springer Science & Business Media, New York **2013**.
- [43] F. L. Hirshfeld, *Theor. Chim. Acta* **1977**, *44*, 129.
- [44] R. G. Parr, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(14), 4049.
- [45] K. Fukui, *Science* **1982**, *218*(4574), 747.
- [46] W. Yang, W. J. Mortimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*(19), 5708.
- [47] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. V. Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart, B. Andersson, *Science* **2005**, *309*(5733), 409.
- [48] L. Berná, M. Rodríguez, M. L. Chiribao, A. Parodi-Talice, S. Pita, G. Rijo, F. Alvarez-Valin, C. Robello, *Microb. Genom.* **2018**, *4*(5), 1.
- [49] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*(3), 403.
- [50] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*(1), 235.
- [51] S. Kim, C. M. Kim, Y. J. Son, J. Y. Choi, R. K. Siegenthaler, Y. Lee, T. Jang, J. Song, H. Kang, C. A. Kaiser, H. H. Park, *Nat. Commun.* **2018**, *9*(4867), 1.
- [52] K. L. Pankhurst, C. G. Mowat, C. S. Miles, D. Leys, M. D. Walkinshaw, G. A. Reid, S. K. Chapman, *Biochemistry* **2002**, *41*(27), 8551.
- [53] P. Taylor, S. L. Pealing, G. A. Reid, S. K. Chapman, M. D. Walkinshaw, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 1108.
- [54] V. Bamford, P. S. Dobbin, D. J. Richardson, A. M. Hemmings, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 1104.
- [55] F. Corpet, *Nucl. Acids. Res.* **1988**, *16*(22), 10881.
- [56] B. Webb, A. Sali, *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*(1), 5.6.1.
- [57] A. D. McLachlan, *Acta Cryst. A* **1982**, *38*(6), 871.
- [58] A. C. R. Martin, C. T. Porter. The program ProFit. <http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>
- [59] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*(2), 283.
- [60] D. Xu, Y. Zhang, *Biophys. J.* **2011**, *101*(10), 2525.
- [61] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G. R. Hutchison, *Aust. J. Chem.* **2011**, *3*(33), 1.
- [62] C. R. Sondergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski, J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*(7), 2284.
- [63] M. H. M. Olsson, C. R. Sondergaard, M. Rostkowski, J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*(2), 525.
- [64] C. J. Williams, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, W. B. Arendall III, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Protein Sci.* **2018**, *27*(1), 293.
- [65] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*(2), 455.
- [66] M. F. Sanner, *J. Mol. Graphics Modell.* **1999**, *17*(1), 57.
- [67] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*(16), 2785.
- [68] A. Morozenko, A. A. Stuchebrukhov, *Proteins* **2016**, *84*(10), 1347.
- [69] K. Mitusińska, A. Raczyska, M. Bzówka, W. Bagrowska, A. Góra, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 355.
- [70] M. Jukić, J. Konc, S. Gobec, D. Janežič, *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*(12), 3094.
- [71] L. A. Defelipe, J. P. Arcon, C. P. Modenutti, M. A. Marti, A. G. Turjanski, X. Barril, *Molecules* **2018**, *23*(12), 3269.
- [72] A. Sridhar, G. A. Ross, P. C. Biggin, *PLoS One* **2017**, *12*(2), e0172743.
- [73] G. A. Ross, G. M. Morris, P. C. Biggin, *PLoS One* **2012**, *7*(3), e32036.
- [74] J. L. Soares-Sobrinho, M. S. S. Cunha-Filho, P. J. Rolim-Neto, J. J. Torres-Labandeira, B. Dacunha-Marinho, *Acta Cryst. E: Struct. Rep. Online* **2008**, *E64*(3), o634.
- [75] D. R. Roy, R. Parthasarathi, B. Maiti, V. Subramanian, P. K. Chattaraj, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*(10), 3405.
- [76] D. R. Roy, U. Sarkar, P. K. Chattaraj, A. Mitra, J. Padmanabhan, R. Parthasarathi, V. Subramanian, S. Van Damme, P. Bultinck, *Mol. Diversity* **2006**, *10*, 119.
- [77] R. M. LoPachin, B. C. Geohagen, L. U. Nordstrom, *Toxicology* **2019**, *418*, 62.
- [78] C. M. Kim, S. Kwon, K. H. Jung, H. L. Chun, H. J. Ha, H. H. Park, *Crystals* **2019**, *9*(10), 504.
- [79] G. A. Reid, C. S. Miles, R. K. Moysey, K. L. Pankhurst, S. K. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1459*(2–3), 310.
- [80] J. J. Van Hellemond, A. G. M. Tielens, *Biochem. J.* **1994**, *304*(2), 321.
- [81] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0; Schrödinger, LLC.
- [82] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*(1), 95.
- [83] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng., Des. Sel.* **1996**, *8*(2), 127.
- [84] G. Frenking, S. Shaik Eds., *The Chemical Bond: Chemical Bonding Across the Periodic Table*, Vol. 2, John Wiley & Sons, Germany **2014**.
- [85] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Vol. 12, Oxford University press, New York **1997**, p. 5604.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** L. Campos-Fernández, R. Ortiz-Muñiz, E. Cortés-Barberena, S. Mares-Sámano, R. Garduño-Juárez, C. Soriano-Correa, *J. Comput. Chem.* **2022**, *1*. <https://doi.org/10.1002/jcc.26959>



NJC

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2019, 43, 11125

## Substituent effects on the stability, physicochemical properties and chemical reactivity of nitroimidazole derivatives with potential antiparasitic effect: a computational study†

Linda Campos-Fernández,<sup>ab</sup> Carolina Barrientos-Salcedo,<sup>cd</sup> Edtson E. Herrera Valencia,<sup>e</sup> Rocío Ortiz-Muñiz<sup>b</sup> and Catalina Soriano-Correa<sup>b,\*a</sup>

Neglected tropical diseases caused by parasitic pathogens have caused an increase in research interest in drug discovery. Chagas disease is caused by protozoan *Trypanosoma cruzi*. Benznidazole and nifurtimox are effective drugs in the acute phase; nevertheless, for long-time treatment, they are toxic and have side effects, because these molecules produce free radicals and suffer oxidation–reduction processes. Studies of the structure and mode of action of these drugs have been performed and, until today, no effective treatment for this disease has been established yet. DFT-M06-2X studies in solution allowed us to explore the substituent effects on stability energy, physicochemical properties and chemical reactivity of nitroimidazoles with potential antiparasitic effects, using quantum-chemical descriptors: proton affinities, substituent effect stabilization energy, ionization potential, electrophilicity, hardness, atomic charges, dipole moment and Fukui functions. The basicity of the N3 atom and dipole moment decrease while the ionization potential, electrophilicity, and hardness increase with the electron-withdrawing substituents. Atomic charges, Fukui functions, and electrostatic potential showed that the main reactivity was on the nitro group and N3 atom. The methyl group linked to C2, and the position and inductive effect caused by the nitro group provoked major changes in the physicochemical features, chemical reactivity, and geometrical and energetic stabilities. Quantum-chemical descriptors allowed us to analyze and design novel nitroimidazole derivatives.

Received 4th May 2019,  
Accepted 5th June 2019

DOI: 10.1039/c9nj02207d

rsc.li/njc

### Introduction

In the last few decades, neglected tropical diseases caused by parasitic pathogens have caused an increase in research interest in drug discovery. Chagas disease, leishmaniasis, and sleeping sickness affect 20 million people worldwide and lead to more than 50 000 deaths annually.<sup>1–4</sup> American trypanosomiasis, also known as Chagas disease, which is endemic in Latin America,

is a zoonosis caused by the *Trypanosoma cruzi* agent and it is transmitted by the blood-feeding reduviid bugs. Chagas disease is cataloged as a neglected tropical disease by the World Health Organization; in Latin America, it is the most widespread parasitic disease, despite efforts to contain the vector-borne disease or to report on precautions in blood transfusion.<sup>1,5–8</sup> Also, migration of infected people has spread the disease to non-endemic regions such as the United States, Europe, Australia and Japan, presenting a new worldwide challenge.<sup>1,5–9</sup>

Numerous pharmacological treatments for Chagas disease have been based on benznidazole (BNZ) and nifurtimox (NFX), which are used only in acute stages of the infections. However, these molecules are toxic and require long-term treatments that can give rise to severe side effects. In this sense, for many years, a wide variety of drugs have been investigated with the aim of developing a safe and efficient chemotherapy, through experimental evaluation of several chemical compounds and plant extracts, such as, sulphates, aminoquinols, azoles, hydrazines, and nitroheterocycles, among others,<sup>3,6,10–14</sup> and of these, only a few compounds have shown antiparasitic effects and have been

<sup>a</sup> Unidad de Química Computacional, Facultad de Estudios Superiores (FES)-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México, Mexico. E-mail: csorico@comunidad.unam.mx; Tel: +52 (55) 5773-6333

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Iztapalapa, C.P. 09340 Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Doctorado en Biología Experimental, UAM, Iztapalapa, C.P. 09340 Ciudad de México, Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis Campus Veracruz, Universidad Veracruzana, C.P. 91700 Veracruz, Mexico

<sup>e</sup> Departamento de Ingeniería Química, FES Zaragoza UNAM, Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9nj02207d



*El Comité Nacional de la*

# **XIX Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica**

Otorga la presente



A: Linda Campos-Fernández<sup>1,2,5</sup>, Rocío Ortiz-Muñiz<sup>2</sup>, Edith Cortés-Barberena<sup>2</sup>, Sergio Mares-Sámmano<sup>3</sup>, Ramón Garduño-Juárez<sup>4</sup>, Catalina Soriano-Correa<sup>5</sup>

Por su participación en la XIX RMFQT con el trabajo titulado "Inhibidores de NADH-fumarato reductasa: DFT, modelado por homología y docking molecular", ocurrida virtualmente del 18 al 19 de noviembre de 2021

Dr. Gabriel Merino  
CINVESTAV  
Comité Nacional de la RMFQT

Dr. Joaquín Barroso Flores  
UNAM  
Comité Local de la RMFQT





Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00141  
Matrícula: 2183802059

Diseño de derivados del imidazol como inhibidores de NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 27 del mes de julio del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH CORTES BARBERENA  
DR. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS  
DRA. MARIA LUISA ROXANA LICONA IBARRA  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ



*Linda Verónica Campos Fernández*  
LINDA VERONICA CAMPOS FERNANDEZ

ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: LINDA VERONICA CAMPOS FERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

*Rosalía Serrano de la Paz*  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

*Dr. José Luis Gómez Olivares*  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

*Dr. Edith Cortes Barberena*  
DRA. EDITH CORTES BARBERENA

VOCAL

*Dr. Francisco Hernández Luis*  
DR. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

VOCAL

*Dr. María Luisa Roxana Licóna Ibarra*  
DRA. MARIA LUISA ROXANA LICONA IBARRA

SECRETARIO

*Dr. Julio César Almanza Pérez*  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ