



Tesina de grado. Licenciatura en Bioquímica

**Síntesis y evaluación biológica de productos
activos frente a *Trypanosoma cruzi* con
capacidad de inhibición de *TcTIM***



Elena Aguilera

Tutor: Dr. Hugo Cerecetto

Co-Tutor: Dr. Guzmán Alvarez

Grupo de Química Medicinal-Laboratorio de Química Orgánica

Facultad de Ciencias

Diciembre de 2013

Montevideo-Uruguay

A mi TATA y abuela por su apoyo, contención y amor, GRACIAS.

Agradezco a todas aquellas personas que me acompañaron en este recorrido y me han ayudado a que este sueño salga adelante:

A Hugo y Merche por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo brindándome su confianza, apoyo y aliento.

A Guzmán por sus ideas, apoyo, confianza y guía en esta etapa.

A mis abuelos por todo lo que me han brindado desde pequeña y porque sin ellos no hubiera logrado este sueño. Pero por sobre todo por hacerme feliz.

A Sabrina por su amor, compañía y alegría que me brinda día a día.

A mis padres por su amor, apoyo y contención en este recorrido no dejándome en ningún momento que baje los brazos.

A mis tíos y primos por su amor, compañía y humor que me han ayudado a seguir adelante.

A Marcelo por su amor, compañía y tranquilidad que me brindó en esos momentos que sentí desvanecer.

A mis amigas; Dahiana, Kath, Isa y Manu por siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos alentándome y por todas las experiencias de vida compartidas.

A mis amigas de generación: Ana, Stefaní, Estefanía, Jeny, Ceci, Caro, Gabriela, Vero y Vanessa por todos los momentos compartidos y los exámenes salvados.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo, y los momentos lindos compartidos.

A Javier y Estefanía, por los ensayos in vitro de T.cruzi y citotoxicidad respectivamente.

A Martín Gabay por el ensayo de Test de Ames.

A Lucía Minini por el estudios de docking para los compuestos 1d1 y 1d2 y TcTIM.

A la ANII por la beca de Iniciación a la Investigación.

Resumen

La Enfermedad de Chagas, una de las parasitemias con la mayor incidencia en América. Es una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, afecta a millones de personas en el mundo y no tiene un tratamiento adecuado aún. Dado la importancia de encontrar potenciales fármacos para la Enfermedad de Chagas en la actualidad, en el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron química y biológicamente diecisiete nuevos compuestos entre los cuales se encuentran derivados de 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona, 4,6-diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona, 4*H*-pirazol, arilidenonas y piperidin-4-ona. Estos compuestos diseñados para inhibir un enzima esencial del parásito, la triosafosfato isomerasa (TcTIM). El diseño se basó en estructuras simétricas que pueden actuar interactuando negativamente en la interfase del dímero de dicha enzima, inhibiéndola. Los compuestos fueron evaluados frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y aquellos que fueron activos ($IC_{50} < 25$) se ensayaron por su citotoxicidad frente a macrófagos murinos. Se destaca el derivado **6d2** con un IC_{50} de $(5,1 \pm 0,3) \mu\text{M}$ frente a *T. cruzi*. Adicionalmente, se estudió la inhibición enzimática de la isomerasa. De estos estudios se identificó que el derivado **1d2** posee una excelente capacidad de inhibición enzimática con un IC_{50} de $1,2 \mu\text{M}$ y no afecta la enzima análoga de *homo sapiens* ($IC_{50} \gg 100 \mu\text{M}$). Este derivado además presentó buena actividad tripanosomicida, selectividad y ausencia de mutagenicidad en una de las cepas del test de Ames. Se destaca de estas moléculas la simplicidad estructural y su síntesis verde.

1. Introducción y antecedentes.

1.1. Generalidades sobre la enfermedad de Chagas	2
1.2. Terapia actual para la enfermedad	3
1.3. Ciclo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4. Metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
1.5. Triosafosfato isomerasa de <i>T.cruzi</i> (TcTIM)	9
1.6 Antecedentes	11

2. Propuesta de trabajo y objetivos.

2.1. Propuesta de trabajo	13
2.2. Objetivos generales	15
2.3. Objetivos específicos	15

3. Materiales y métodos.

3.1. Química	17
3.1.1. Generalidades	18
3.2. Biología	27
3.2.1. Ensayo de actividad de los compuestos frente a <i>T.cruzi</i> .	27
3.2.2. Ensayo de inhibición de la TcTIM.	27
3.2.3. Ensayo de citotoxicidad frente a macrófagos murinos.	28
3.2.4. Determinación de cambio metabólico en <i>T.cruzi</i> utilizando ¹ H-RMN	29
3.2.5. Ensayos de mutagenicidad (Test de Ames)	30
3.3. Cálculos teóricos para estudiar la distribución espacial de los compuestos 4d1 y 6d1	31
3.4. Estudios de docking para los compuestos 1d1 y 1d2 y TcTIM	31

4. Resultados y discusión.

4.1. Química	34
4.2. Estudio de simetría de los derivados 4d1 y 6d1.	43
4.3. Biología	48
4.3.1. Evaluación de la actividad frente a <i>T. cruzi</i>	48
4.3.2. Ensayo de inhibición de la TcTIM.	50
4.4. Estudios de <i>Docking</i> realizado para el compuesto 1d1 y 1d2 de la TcTIM.	51
4.5. Estudio de la excreción de metabolitos por <i>T. cruzi</i> utilizando ¹ H-RMN	53
4.6. Ensayo de Ames para el compuesto 1d1	56

5. Conclusiones y perspectivas.

5.1. Conclusiones	57
5.2. Perspectivas	58

6. Bibliografía.	60
------------------	----

Abreviaturas

1,3 BPGA	Acrónimo inglés de 1,3-bisfosfoglicerato
2Ket	Acrónimo inglés de 2-cetoglutarato
3PGA	Acrónimo inglés de 3-fosfoglicerato
ATP	Acrónimo inglés de adenosina trifosfato
ADP	Acrónimo inglés de adenosina difosfato
AMP	Acrónimo inglés de adenosina monofosfato
AA	Acrónimo inglés de amino ácido
Bz	Benznidazol
CoASH	Acrónimo inglés de coenzyma A
CC	Columna cromatográfica
DCM	Diclorometano
DHAP	Acrónimo inglés de dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Acrónimo inglés de ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
F-6-P	Acrónimo inglés de fructosa 6-fosfato
FBP	Acrónimo inglés de fructosa 1,6-bisfosfato
FADH ₂	Flavin adenina dinucleótido (forma reducida)
FAD	Flavin adenina dinucleótido (forma oxidada)
G-6-P	Acrónimo inglés de glucosa 6-fosfato
G-3-P	Acrónimo inglés de gliceraldehido 3-fosfato
GLU	Acrónimo inglés de glicerol 3-fosfato
Isocit	Acrónimo inglés de isocitrato
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Acrónimo inglés de nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NAD ⁺	Acrónimo inglés de nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
Nfx	Nifurtimox
OA	Acrónimo inglés de 2-oxoácido
Oxac	Acrónimo inglés de oxaloacetato
PEP	Acrónimo inglés de fosfoenolpiruvato

PPi	Acrónimo inglés de pirofosfato inorgánico
Pi	Acrónimo inglés de fosfato inorgánico
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TIM	Triosafosfato isomerasa
THF	Tetrahidrofurano
TLC o CCF	Cromatografía en capa fina
T(SH) ₂	Forma reducida de la tripanotona
UFC	Unidades formadoras de colonia
γSAG	Acrónimo inglés de glutamato γ-semialdehído

1- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Generalidades sobre la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, enfermedad parasitaria de transmisión vectorial afecta a más de 8 millones de personas y 64 millones de personas están bajo riesgo de infección. Es endémica en 21 países de América y decenas de países no endémicos en el mundo que se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad por movimientos de población. El descubrimiento de dicha enfermedad fue realizado por el científico brasileño, Carlos Chagas en el año 1909. El Dr. Carlos Chagas en sus investigaciones develó el agente, vector, patología, clínica y epidemiología, siendo uno de los más completos descubrimientos acerca de una enfermedad realizado por una sola persona en la historia¹.

El agente causante de esta enfermedad es un protozooario monoflagelado hemotesidual *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*); el cual se transmite al hombre y a otros animales a través de deyecciones de insecto hemíptera, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, conocido como “vinchucas”^{2 3 4}.

El período de incubación de la enfermedad se estima entre 5 y 7 días, aceptándose que en algunos casos pueda llegar a 10 ó 12. Los síntomas generales y más frecuentes son: fiebre, abatimiento, cefalea, raquialgia, nerviosismo, irritabilidad, llanto, convulsiones, anorexia, vómitos, diarrea, meteorismo, palpitaciones, precordialgias, dolores musculares, astenia y algunos otros de menor importancia. De todos los síntomas, la “fiebre” es sin duda el más destacado y se observa más frecuentemente en lactantes y niños pequeños. La fiebre desaparece simultáneamente con los síntomas característicos de la enfermedad siendo el más común el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña (Figura 1.1.1)^{5 6 7 8 9}.

Sin embargo, en la mayoría de los individuos, la infección es asintomática debido a que la parasitemia inicial es baja y el período agudo transcurre sin manifestaciones llamativas¹⁰.



Figura 1.1.1. Síntoma oftalmoganglionar o signo de Romaña.

1.2. Terapia actual para la enfermedad

En la actualidad se emplean dos fármacos que no son eficientes para la enfermedad dado que no la curan, Nifurtimox y Benznidazol (Figura 1.2.1)^{11 12}. A continuación se realiza una pequeña reseña de los mismos.

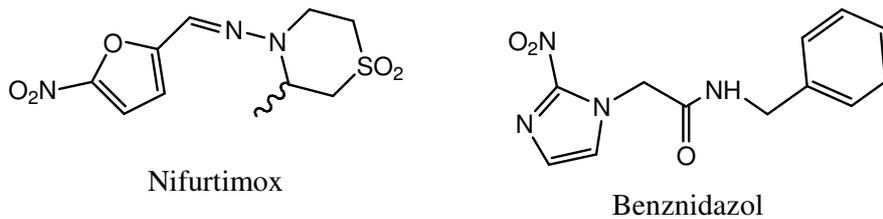


Figura 1.2.1. Fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

El Nifurtimox (Nfx) comercialmente distribuido como Lampit^(R) por Bayer¹³ actúa por la formación de radicales libres o metabolitos electrofílicos o ambos. El grupo nitro se reduce a grupo amino por la acción de una aminoreductasa¹⁴. Se estima que el Nfx podría inhibir la enzima tripanotión reductasa del parásito, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi*, sin embargo hoy en día no existe seguridad acerca del mecanismo de acción del fármaco que ejerce su efecto tóxico sobre el parásito^{15 16}.

El Benznidazol (Bz), por otro lado, produciría la modificación de enlaces covalentes de macromoléculas vía nitroreducción del fármaco y nitroreducción de intermedios con los componentes del parásito; o la unión con el ADN, lípidos o proteínas¹⁷.

Ambos fármacos resultan efectivos durante el tratamiento en infecciones agudas de pacientes (recién infectados), presentando efectos secundarios debido a su toxicidad (anorexia, irritabilidad, náuseas, polineuropatías, entre otros) y además no son buenos eliminando la forma amastigote del parásito. Además se encuentran contraindicados en caso de embarazo y son mutagénicos¹⁸.

En la Figura 1.2.2 se muestran algunos compuestos, de investigación, que presentaron mejor actividad contra *T. cruzi*¹⁹ que los agentes de referencia, destacándose el azol hidroxilado ((a), Figura 1.2.2) que presentó actividad anti- *T. cruzi in vivo* al igual que algunas tiadiazinas ((b), Figura 1.2.2) que presentaron mayor índice de selectividad contra el parásito. Otro compuesto que mostró actividad contra *T. cruzi* y que involucra mecanismos de acción como unión al ADN, estrés oxidativo e

inhibición de la enzima tripanotión reductasa, es el complejo metálico (e) (Figura 1.2.2). Los tiazol combinado con oxazol, benzoxaboroles e indazoles ((c), (d) y (g), Figura 1.2.2) resultaron ser muy activos en *T. cruzi in vitro* presentando un muy buen índice de selectividad. Los compuestos que fueron activos contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo* son los derivados del sistema etenilbenzofuroxano (por ejemplo (f) de la Figura 1.2.2), no presentando toxicidad en células de mamíferos.

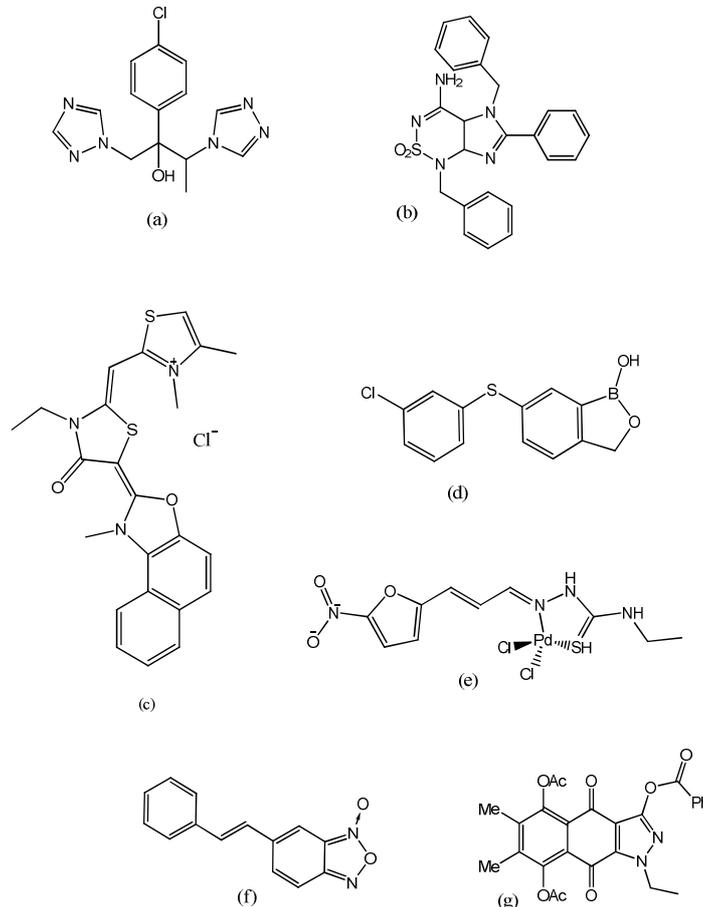


Figura 1.2.2. Estructuras químicas planteadas como inhibidores de *T. cruzi* recientemente desarrolladas.

Sin embargo estos compuestos han fracasado en las etapas finales del desarrollo de medicamentos, por problemas de toxicidad inespecífica. Por esta misma razón, continúa siendo un gran desafío desarrollar nuevos fármacos para la detención de esta enfermedad, sin efectos tóxicos ni mutagénicos, entre otros, presentando excelentes índices de selectividad para el parásito.

1.3. Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo se inicia cuando el insecto hematófago (“vinchuca”) infectado pica a un ser humano y defeca cerca de la herida. En la herida producida durante la picadura o a través de las membranas mucosas los tripomastigotes metacíclicos entran al huésped. Cuando entran a una célula humana, se

convierten en amastigotes. En esta etapa se reproducen a través de fisión binaria. Después de la reproducción una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula formando pseudoquistes. El amastigote se convierte de nuevo en tripomastigote y la célula se rompe, infectando de nuevo otras células y repitiéndose el ciclo de multiplicación^{20 21 22}. Cuando un insecto vector (por ejemplo en Uruguay el vector domiciliario *Triatoma infestans*) succiona sangre de un huésped infectado, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre. En el intestino medio del insecto se diferencian a epimastigotes los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva. Luego de la reproducción a través de fisión binaria, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en tripomastigotes metacíclicos y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped, repitiéndose el ciclo^{23 24 25}.

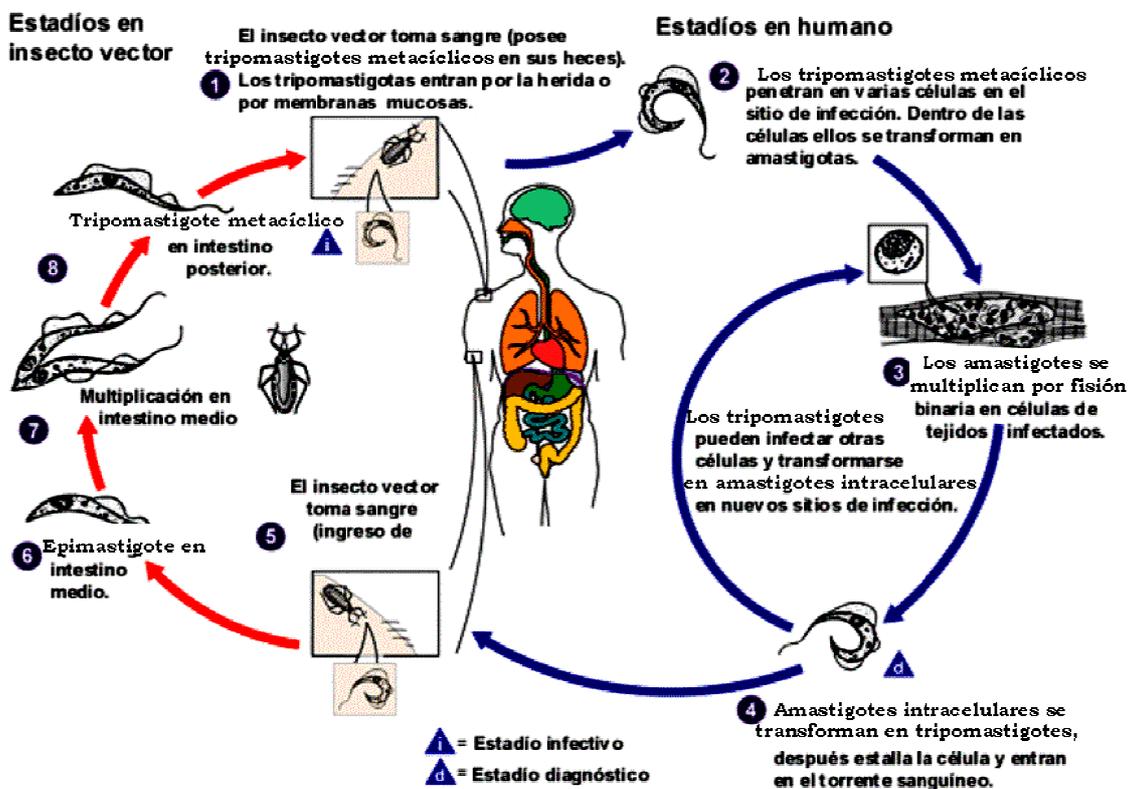


Figura 1.3.1 En la figura se muestra el ciclo de *T. cruzi*, sus etapas en el hombre y en *Triatoma infestans*. (Adaptado al español de ²⁶).

1.4. Metabolismo energético de *T. cruzi*

En su metabolismo, dicho parásito degrada la glucosa solo parcialmente hasta dióxido de carbono, excretando hacia el medio una cantidad considerable del carbono de la glucosa como ácidos carboxílicos. Al proceso anterior se le denomina "fermentación aeróbica"²⁷ destacando que en la mayoría de los organismos esto sucede en condiciones anaeróbicas no siendo así para *T. cruzi*. En la

literatura se indica que existen diversas técnicas empleadas para el estudio de los productos del catabolismo de la glucosa en tripanosomatoideos, un ejemplo es el uso de ^{13}C - ó ^1H -RMN^{28 29 30 31}. En muchos casos dichos estudios se combinan con ensayos enzimáticos específicos como forma de corroborar la excreción de esos metabolitos²⁸.

El succinato es el producto del metabolismo energético universal del catabolismo de la glucosa de los tripanosomatídeos a excepción de los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* que presentan un metabolismo muy simple basado en la glicólisis de la glucosa^{27 30}. Los demás estadios parasitarios de los diferentes tripanosomatídeos presentan un metabolismo más complejo el cual se esquematiza en la Figura 1.4.1. Es de destacar que los datos más recientes conciernen a los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* convirtiéndose en el modelo favorito de estudio del metabolismo de tripanosomatídeos. Como se muestra en la Figura 1.4.1, la glicólisis ocurre en todos los tripanosomatídeos y no muestra grandes diferencias con la vía estándar, sin embargo, se pueden destacar dos importantes diferencias con las células de mamíferos:

- 1) la mayoría de las enzimas se ubican en un organelo particular, el glicosoma;
- 2) la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, enzimas regulatorias claves en la mayoría de los sistemas glicolíticos, desde bacterias a mamíferos, son poco o no son afectadas en absoluto por los efectores más comunes.

La casi completa falta de controles inhibitorios determinan la ausencia del “efecto Pasteur”; si bien en la mayoría de los organismos la transición de anaerobiosis a aerobiosis se acompaña por una rápida y considerable disminución en el consumo de glucosa, es decir, el proceso de glicólisis es inhibido por oxígeno, los tripanosomatídeos no muestran dicho efecto o incluso presentan el efecto opuesto²⁵. La glicólisis se organiza de tal forma que las siete enzimas que convierten glucosa en 3-fosfoglicerato están dentro del glicosoma, mientras que las últimas tres se ubican en el citosol.

Como se observa en la Figura 1.4.1, el piruvato está localizado en un punto metabólico de ramificación llevando a la excreción de varios productos finales, tales como acetato, alanina y lactato. El acetato es el producto final que se forma en mayor cantidad en la mitocondria y es excretado por difusión simple a través de la membrana citoplasmática. Por otro lado la mayoría de los tripanosomatídeos producen lactato a partir de glucosa aunque a menudo como un producto final minoritario^{26 30}.

Los estadios del parásito que habitan en los insectos usan aminoácidos presentes en sus hospederos para la producción de energía. Por ejemplo, los estadios de insectos de *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp. y *Crithidia* spp. viven en un ambiente rico en L-prolina.

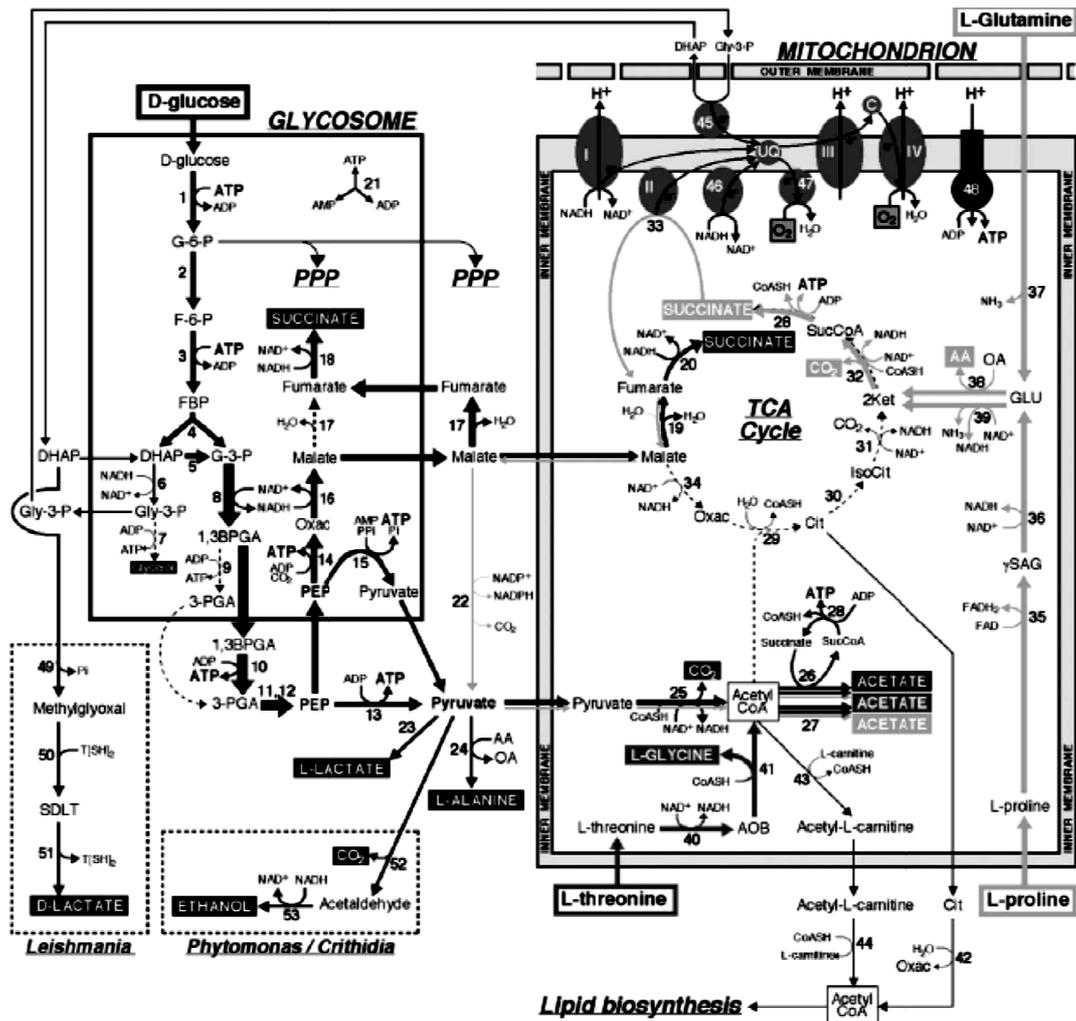


Figura 1.4.1. (extraída de la referencia 31): Metabolismo de las fuentes de carbono en tripanosomatídeos en un medio rico en glucosa. Flechas oscuras, grises y grises claras representan los pasos enzimáticos del metabolismo de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina, respectivamente. Los productos finales excretados (Acetato, Alanina, glicerol, Glicina, Lactato, Succinato y CO_2) de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina están escritos con letras blancas en rectángulos negros, grises o grises claros, respectivamente. Las flechas con diferente grosor representan el flujo metabólico de cada paso enzimático. Las flechas punteadas indican pasos que posiblemente ocurren en un bajo nivel o no ocurren. Se muestra el compartimento glicosomal, el compartimento mitocondrial, el ciclo de los TCA, el vínculo con la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la biosíntesis de lípidos. La membrana mitocondrial externa, que es permeable a metabolitos, sólo se muestra en la vecindad de la cadena de transporte de electrones. Las vías de producción de D-lactato y EtOH (rectángulos punteados) sólo han sido observados en *Leishmania* spp. y *Phytomonas/Crithidia*, respectivamente. Las enzimas involucradas en este proceso catabólico son: 1, hexoquinasa; 2, glucosa-6-fosfato isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, aldolasa; 5, **triosafosfato isomerasa**; 6, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 7, glicerol quinasa; 8, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 9, fosfoglicerato quinasa glicosomal; 10, fosfoglicerato quinasa citosólica; 11, fosfoglicerato mutasa; 12, enolasa; 13, piruvato quinasa; 14, fosfoenolpiruvato carboquinasa; 15, piruvato fosfato diquinasa; 16, malato deshidrogenasa glicosomal; 17, fumarasa glicosomal y mitocondrial; 18, fumarato reductasa glicosomal dependiente de NADH; 19, fumarasa mitocondrial; 20, fumarato reductasa mitocondrial dependiente de NADH; 21, adenilato quinasa glicosomal; 22, enzima málica; 23, enzima desconocida; 24, alanina aminotransferasa; 25, complejo piruvato deshidrogenasa; 26, acetato:succinato CoA-transferasa; 27, enzima desconocida; 28, succinil-CoA sintasa; 29, citrato sintasa; 30, aconitasa; 31, isocitrato deshidrogenasa; 32, complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa; 33, succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena respiratoria); 34, malato deshidrogenasa mitocondrial; 35, L-prolina deshidrogenasa; 36, pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa; 37, L-glutamina deaminasa; 38, glutamato aminotransferasa; 39, glutamato deshidrogenasa; 40, L-treonina deshidrogenasa; 41, acetyl-CoA: glicina C-acetiltransferasa; 42, citrato liasa; 43 y 44, acetyl-L-carnitina transferasa; 45, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; 46, NADH deshidrogenasa insensible a rotenona; 47, oxidasa alternativa; 48, F_0F_1 -ATP sintasa; 49, reacción espontánea; 50, glioxalasa I; 51, glioxalasa II; 52, piruvato descarboxilasa; 53, alcohol deshidrogenasa ligada a NAD; complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria.

Por otro lado, la maquinaria enzimática para el metabolismo oxidativo está completa en la mayoría de los estadios parasitarios. Esto incluye una cadena respiratoria funcional capaz de generar un gradiente de protones, así como también dos oxidasas terminales independientes (la citocromo oxidasa cianuro sensible-complejo IV y la oxidasa alternativa salicilhidroxámico sensible, paso 47). En un medio rico en glucosa, la mayoría del ATP es producido por fosforilación a nivel de sustrato (pasos 10, 13 y 28), mientras que en medios pobres en glucosa, pero ricos en aminoácidos, la fosforilación oxidativa se convierte en la principal fuente de energía. No se conoce con exactitud cómo es que se regula la producción de energía en los tripanosomatídeos³².

La triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) se ha vuelto una enzima esencial en el diseño de nuevos fármacos en la actualidad, ya que es una enzima esencial para la obtención de energía a partir de la glucosa. Por esta razón en la actualidad se propone en muchos trabajos tratar de diseñar compuestos capaces de inhibirla sin alterar la triosafosfato isomerasa de *homo sapiens* (HTIM), de modo de matar al parásito sin afectar la vida humana.

1.5. Triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM)

Como se mencionó anteriormente TIM se ha convertido en un blanco terapéutico de importancia dado que es una enzima central en la vía glicolítica del parásito. Asegura la producción neta de ATP en la conversión de glucosa a piruvato; y por lo tanto es una enzima esencial para mantener la vida del parásito³³. El homodímero de la enzima es catalíticamente activo sólo como dímero. Es por esto que se podrían buscar moléculas capaces de interactuar con las dos subunidades, desestabilizando el dímero y llevando a una pérdida de actividad catalítica. Esta misma enzima existe en la mayoría de los seres vivos, incluyendo los humanos. La TcTIM y la de *homo sapiens* (HTIM) presentan iguales residuos catalíticos, sin embargo 32 residuos interfaciales de la TIM en parásitos y de la HTIM son distintos. La homología es aproximadamente 52 % en esta zona, por lo que podrían encontrarse productos que presenten cierta especificidad por las interfaces en las enzimas parasitarias^{34 35}. Las interfaces entre los monómeros ocupan una posición significativa de la superficie de cada monómero cerca de 1492 Å² de TcTIM³⁶.

Además de lo anterior, parásitos con ausencia de TIM no son viables, en este sentido la enzima ha sido propuesta como un posible blanco para el diseño de fármacos para la enfermedad de Chagas³⁷
³⁸.

En la Figura 1.5.1 se representa la estructura de la TcTIM, la cual consiste en ocho cadenas betas paralelas rodeadas por ocho alfa-hélices, formando una estructura tipo barril^{39 40}.

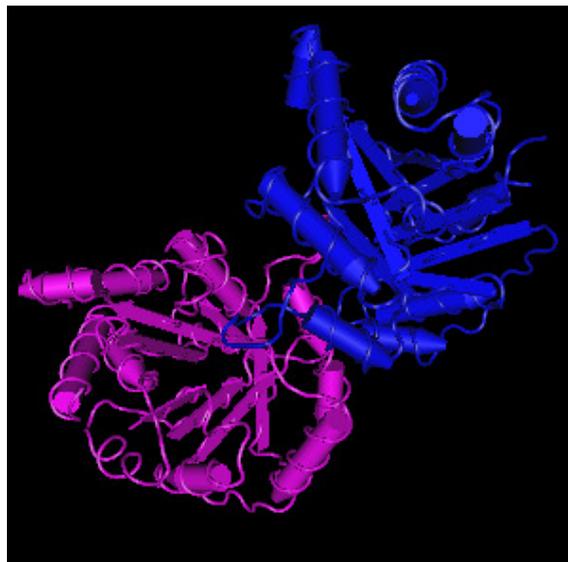


Figura 1.5.1. Representación gráfica de la estructura de la TcTIM obtenida mediante difracción de rayos X (PDB ID: 3Q37).

El grupo de Ruy Pérez Montfort, perteneciente a la Universidad Autónoma de México (UNAM) ha descrito compuestos que inhiben la TcTIM que tienen la particularidad de ser simétricos. Además se ha indagado las interacciones que realizan dichos compuestos con la TcTIM y se observó que el compuesto (i) (Figura 1.5.2) se une irreversiblemente según lo indica la difracción de rayos X; sin embargo para el compuesto (h) (Figura 1.5.2), por los estudios de cinética correspondientes, se piensa que la unión es reversible (no se ha obtenido buenos resultados para la difracción de rayos X)^{38,39}.

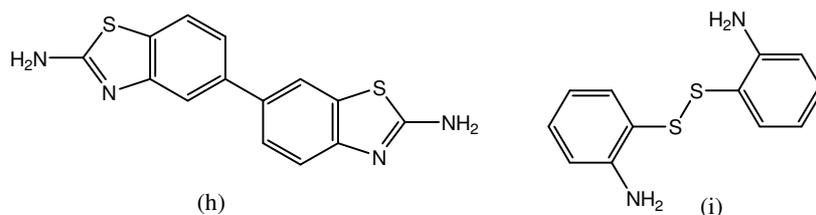


Figura 1.5.2: Estructuras compuestos, (h) e (i), identificados por el grupo de investigación del Dr. Ruy Pérez Montfort que interaccionan con la TcTIM.

Con lo anterior mencionado algunos grupos de investigación han tratado de indagar la búsqueda de compuestos que sean capaces de intervenir en la interface de la TcTIM desestabilizando la estructura de la enzima volviéndola inactiva, interrumpiendo la ruta glicolítica de forma de detener la proliferación del parásito.

1.6. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación ha realizado una búsqueda de compuestos que tengan la particularidad de inhibir a la TcTIM y ha utilizado alrededor de 250 compuestos de su quimioteca, donde se seleccionaron diferentes quimiotipos estructurales. Encontrando interesante actividad en algunos de ellos, entre los que se destacan los compuestos mostrados en la Figura 1.2.1 que presentaron un $IC_{50} < 30\mu M$ ³⁷.

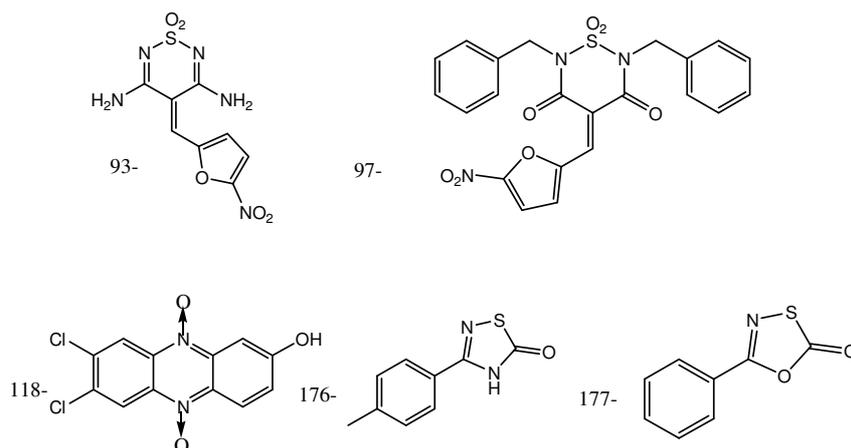


Figura 1.6.1. Compuestos inhibidores de TcTIM, y además inhibidores de crecimiento de *T. cruzi*, previamente identificados por nuestro grupo de trabajo los cuales presentan un $IC_{50} < 30\mu M$ ³⁷ (la numeración de los compuestos es la original de la publicación).

Intentando encontrar patrones o similitudes estructurales de los compuestos con mejor inhibición de TcTIM, de la Figura 1.6.1, se puede destacar la presencia de sistemas electrofílicos α,β -insaturados en los compuestos 93, 97, 176 y 177, o estructuras *cuasi*-simétricas en los compuestos 93, 97 y 118. Estos dos aspectos han sido directores para el desarrollo del presente trabajo, convirtiéndose en parte de los objetivos del mismo (ver apartado 2).

En referencia a la actividad biológica de compuestos que sustentan sistemas electrofílicos α,β -insaturados se han descrito en la literatura variadas y destacadas propiedades, ya sea como preventivos contra el cáncer⁴¹ como antibacterianos^{42 43} y antifúngicos⁴⁴. Especialmente se caracterizan por tener efectos antimicrobianos, en variados microorganismos ya sea en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* e inclusive se ha encontrado que la dibenzalacetona (figura 1.6.2 compuesto (k)) y derivados de la misma presentan actividad contra *T. cruzi*, sin haberse descrito ningún blanco molecular, inclusive inhibición de TcTIM^{42 43 49}.

A su vez en el marco de la tesis doctoral de Guzmán Álvarez⁴⁵ se identificaron unos bis-tiazoles electrofílicos α,β -insaturados (Figura 1.6.2, compuesto (j)) que además de ser inhibidores del crecimiento de *T. cruzi* mostraron moderada capacidad inhibidora de TcTIM. De estos compuestos se observa que, desde el punto de vista estructural, presentan simetría, al igual que el compuesto (h) (Figura 1.5.2).

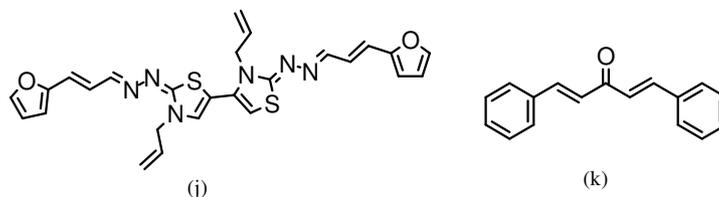


Figura 1.6.2. Estructura química del bistiazol simétrico desarrollado en la tesis doctoral de G. Álvarez⁴⁵ y dibenzalacetona que presenta actividad contra *T. cruzi*.

Por todo lo anteriormente mencionado se propone sintetizar compuestos con actividad anti-*T. cruzi*, sin efectos tóxicos, con potencial aplicación en la enfermedad de Chagas que sean capaces de inhibir a TcTIM.

2- PROPUESTA DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1. Propuesta de trabajo

En el presente trabajo de finalización de carrera se pretende sintetizar compuestos que sean capaces de inhibir el crecimiento del parásito afectando la actividad de la TcTIM (enzima esencial en la ruta metabólica de *T. cruzi*) sin efectos citotóxicos en mamíferos. Para esto se propone el diseño, basado en los antecedentes (inhibidor (h), inhibidor 97 y dibenzalacetona, Figuras 1.5.2, 1.6.1 y 1.6.2), de compuestos de fórmula general **1** (Figura 2.1.1).

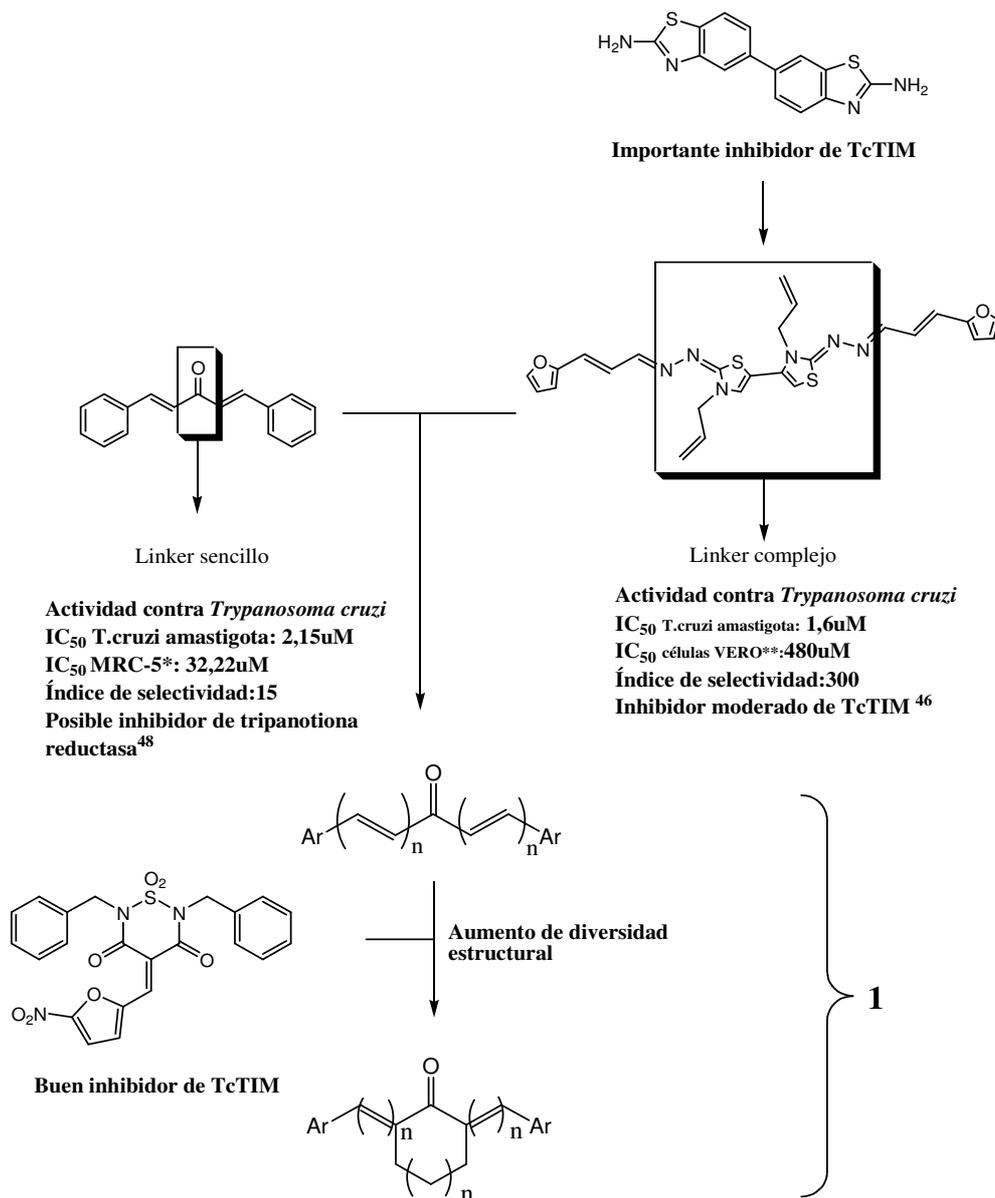


Figura 2.1.1. Esquema general de diseño de arilidenonas (fórmula general 1) a sintetizar en el presente trabajo. Ar= sistema aromático (furilo, fenilo, tiofenilo), siendo n=1,2,3⁴⁹. *MRC-5=células humanas de pulmón; células VERO**=hepatocitos de mono.

Otros cuatro quimiotipos a desarrollar en este trabajo son diseñados en base a la estructura de los inhibidores identificados en la quimioteca de nuestro grupo de investigación (93 y 97, Figura 1.6.1) (fórmulas generales **2**, **3**, **4** y **5**, Figura 2.1.2)^{46 47 48 49}.

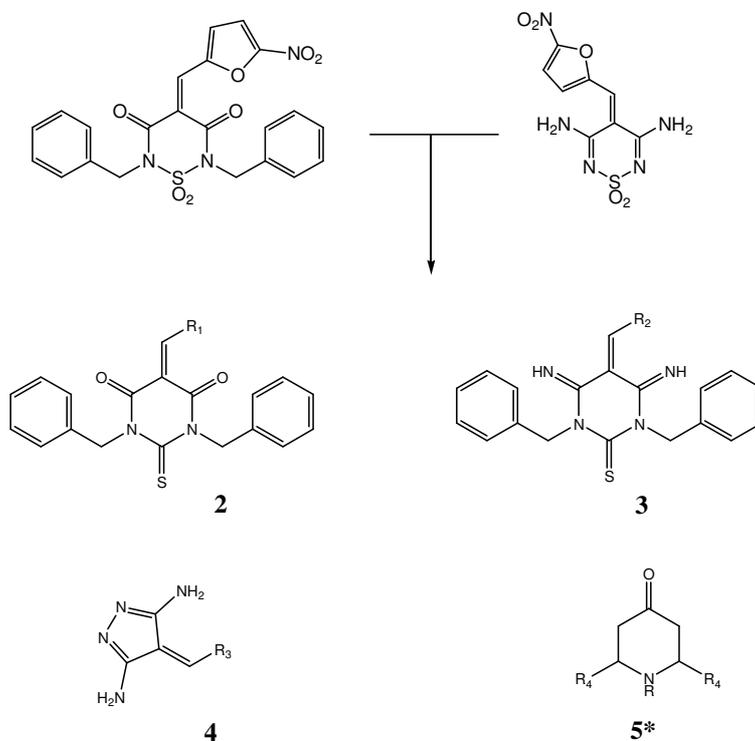


Figura 2.1.2. Estructuras generales diseñadas en el presente trabajo siendo: R₁₋₃ furilo, tiofenilo o CH=CH-furilo, CH=CH-tiofenilo; R₄ sistemas aromáticos conjugados a uno, dos o tres dobles enlaces (los sistemas aromáticos son furilo, fenilo, tiofenilo). *Se destaca que los compuestos de fórmula general 5 requieren intermedios sintéticos de fórmula general 1 (Figura 2.1.1).

2.2. Objetivos generales

Desarrollar compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento del parásito y además con capacidad de inhibir la TcTIM sin efectos citotóxicos inespecíficos.

2.3. Objetivos específicos

- 1) Sintetizar compuestos derivados de arilidenonas, 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona, 4,6-diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tione, 4*H*-pirazol y piperidin-4-ona.
- 2) Estudiar *in vitro* su capacidad de inhibir el crecimiento del parásito y su capacidad para disminuir la actividad de la TcTIM.
- 3) Evaluación de la citotoxicidad de los productos con actividad anti-*T. cruzi*. Luego de identificar los productos activos en la objetivo 2, se determinará la citotoxicidad en macrófagos murinos para identificar aquellos productos que no lo sean, y por lo tanto serán considerados candidatos a estudios *in vivo*.
- 4) Realizar estudios de relación estructura – actividad (SAR). Como forma de racionalizar los resultados obtenidos, tanto en TcTIM como sobre parásitos enteros.

3. Materiales y métodos

3.1. Química

3.1.1. Generalidades

Los disolventes empleados en el presente trabajo experimental fueron destilados previamente a su uso. Además, algunos de ellos son secados mediante procedimientos preestablecidos^{50 51}. El etanol absoluto empleado es de origen comercial (DORWIL), al igual que otros de los reactivos fueron obtenidos de BAKER ANALIZED, Janssen, Fluka, SIGMA-ALDRICH, Merck. Otros se sintetizaron en nuestro grupo de trabajo por parte del Dr. Guzmán Álvarez en su tesis de doctorado⁴⁵ y otros fueron sintetizados por la estudiante de doctorado Sheila Martínez, del Centro de Biotecnología Genómica-IPN, México, la cual los sintetizó en una estadía en Uruguay y otros en su laboratorio de México.

El avance de las reacciones y pureza de los productos se controlan empleando cromatografía en capa fina (CCF o TLC) en placas de poliéster recubiertas con sílica o alúmina y para revelado con luz ultravioleta de 254 nm. Las fases móviles que se han utilizado consisten en mezclas de distintas proporciones de hexano y acetato de etilo.

Para llevar a cabo el revelado de los cromatogramas se emplean diferentes técnicas:

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm)
- Exposición a vapores de yodo
- Rociado con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidracina etanólico en medio ácido)
- Rociado con una mezcla de *p*-anisaldehído:H₂SO₄:etanol en una proporción 1:4:95 (v/v/v)

Algunos productos son purificados por cromatografía en columna (CC) utilizando sílica de granulometría adecuada.

Alcanzada la síntesis de un determinado producto en la presente tesis se procede al análisis de las propiedades fisicoquímicas, realizando anteriormente el secado del producto sintetizado mediante el uso de técnicas convencionales realizadas en el laboratorio, tales como secado en desecadores sílica gel para eliminar el exceso de disolventes empleados para su síntesis.

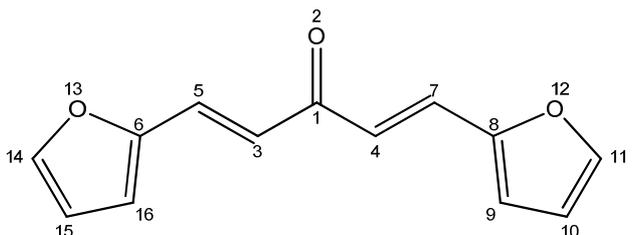
Los espectros de ¹H-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes indicados con cada producto y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt), doble cuarteto (dc) y señal ancha (sa). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Para obtener los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC, HMBC y NOESY se utilizan las secuencias de pulso disponibles en el software del equipo^{52 53}.

Los espectros de masa se realizan en un espectrómetro de masas SHIMADZU GCMS-QP 2010 ULTRA utilizando impacto electrónico (EI) como forma de ionización.

Los puntos de fusión de los compuestos que en literaturas no se encuentra descritos se determinan experimentalmente utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100 y no están corregidos.

3.1.2. Síntesis de los compuestos

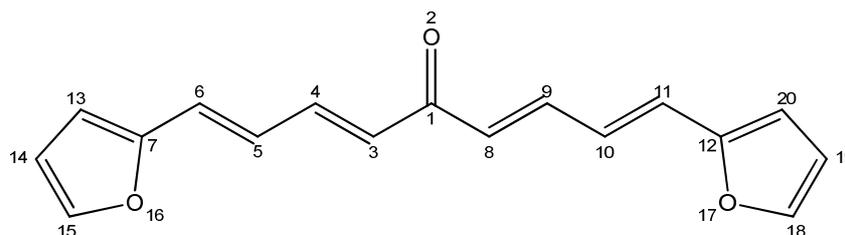
Síntesis de (1E,4E)-1,5-bis(furan-2-il)penta-1,4-dien-3-ona (1d1): En un balón de 50mL se hace reaccionar 5,2mmol (0,24mL) de acetona (VIII) y 10mmol de furaldehído (I), en 8,0mL de agua y 6,0mL de etanol. La reacción se lleva a cabo en medio básico agregando 24,9mmol (996mg) de NaOH (s). La reacción se deja media hora a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. El sólido naranja que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se recristaliza en etanol y se obtienen 1,1g de un sólido naranja.



(1E,4E)-1,5-Bis(furan-2-il)penta-1,4-dien-3-ona (1d1): sólido naranja, R=99%, PF=60-61°C⁵⁴, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,54 (2H,dd,**H**_{11,14}), 7,51 (2H,d,J=15,9,**H**_{5,7}), 6,96 (2H,d,J=15,6,**H**_{3,4}), 6,72 (2H,d,**H**_{9,16}), 6,52 (2H,m,**H**_{15,10}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 112(**C**_{9,16}), 115 (**C**_{10,15}), 124 (**C**_{5,7}), 128 (**C**_{3,4}), 145 (**C**_{11,14}), 147 (**C**_{6,8}), 194 (**C**₁). MS (EI) *m/z* (%): 214 (**M**⁺, 100); 121 (**C**₇H₅O₂⁺, 60,48); 93 (**C**₆H₅O⁺; 23,89).

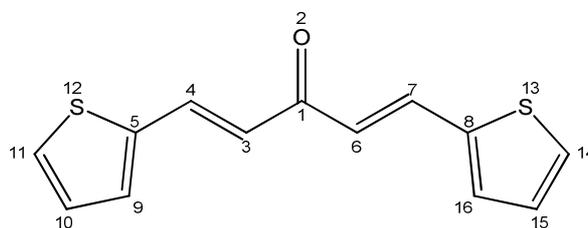
Síntesis de (1E,3E,6E,8E)-1,9-bis(furan-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (1d2). En un balón de 50 mL se hace reaccionar 2,2mmol (0,1mL) de acetona (VIII) y 4,5mmol de (E)-3-(furan-2-il)acroleína (II) (552mg), en 4,4mL de agua y 3,5mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 11,2mmol (466 mg) de NaOH (s). La reacción se lleva a cabo durante una hora a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (7:3, v/v) como fase móvil. El sólido naranja que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se recristaliza en etanol y se obtienen 298,4 mg de un sólido naranja.

¹ En toda esta sección los carbonos e hidrógenos de los compuestos han sido numerados arbitrariamente (sin seguir nomenclatura de IUPAC).



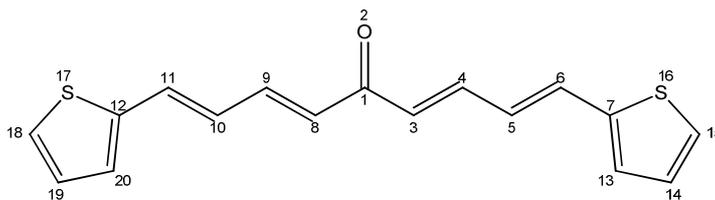
(1E,3E,6E,8E)-1,9-Bis(furan-2-yl)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (1d2): Sólido naranja, R=51%, PF:121°C⁵⁵, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,46 (2H,d,H_{15,18}), 7,42 (2H,d,J=11,04,H_{3,8}), 6,87 (2H,d,J=11,07,H_{4,9}), 6,75 (2H,d,J=11,06,H_{6,11}), 6,55 (2H,d,H_{14,19}), 6,52 (2H,d,J=11,0,H_{5,10}), 6,47 (2H,c,H_{13,20}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 100 (C_{13,20}), 113 (C_{14,19}), 125 (C_{6,11}), 128 (C_{3,8}), 143(C_{4,9}), 153 (C_{15,18}), 189 (C₁). MS (EI) m/z (%): 266 (M⁺, 100); 185 (C₁₂H₁₀O₂⁺, 18,49); 81,05 (C₅H₄O⁺, 38,62).

Síntesis de (1E,4E)-1,5-bis(tiofen-2-yl)penta-1,4-dien-3-ona (2d1): En un balón de 50mL se hace reaccionar 4,3mmol (0,26mL) de acetona (VIII) y 8,92mmol (1,2mL) de 2-tiofencarbaldehído (III), en 8,7mL de agua y 7,0mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 22,2mmol (887,2 mg) de NaOH (s). La reacción se deja 24 horas a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo por TLC de sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. El sólido amarillo que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se obtiene 734 mg de un sólido amarillo.



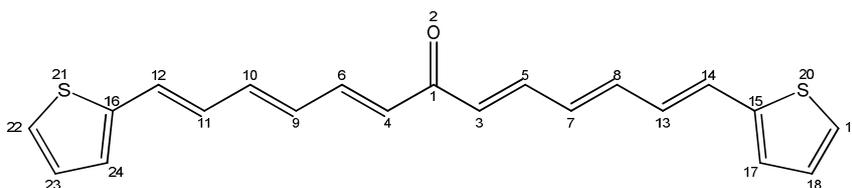
(1E,4E)-1,5-Bis(tiofen-2-yl)penta-1,4-dien-3-ona (2d1): Sólido amarillo, R=69%, PF:119-120°C⁵⁶, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,87 (2H,d,J=15,6,H_{4,7}), 7,43 (2H,d,H_{11,14}), 7,36 (2H,d,CH_{9,16}), 7,11 (2H,m,H_{10,15}), 6,84 (2H,d, J=15,5, H_{3,6}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 100 (C_{4,7}), 124 (C_{3,6}), 129 (C_{9,16}), 132 (C_{11,14}), 135 (C_{10,15}), 140 (C_{5,8}), 189 (C₁). MS (EI) m/z : 246(M⁺, 100), 109 (C₆H₅S⁺, 95,64), 137 (C₇H₅OS⁺, 52,14).

Síntesis de (1E,3E,6E,8E)-1,9-bis(tiofen-2-yl)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (2d2): En un balón de 50mL se hace reaccionar 0,70mmol (0,032mL) de acetona (VIII) y 1,45mmol de (E)-3-(tiofen-2-yl)acroleína (IV)⁴⁶ en 1,4mL de agua y 1,1mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico con 3,6mmol (144mg) de NaOH (s). La reacción se deja una hora y treinta minutos a temperatura ambiente. La reacción se monitorea en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (7:3, v/v) como fase móvil. El sólido marrón que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se recristaliza en etanol y se obtiene 139 mg de un sólido marrón.



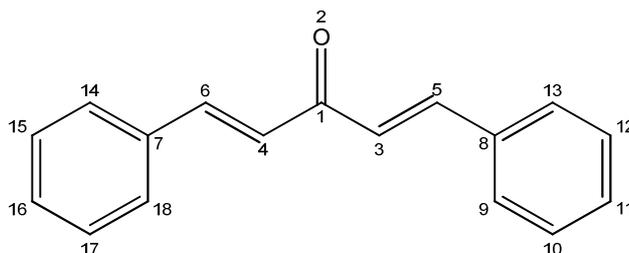
(1E,3E,6E,8E)-1,9-Bis(thiophen-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (2d2): sólido marrón, R=32%, PF=133-138°C, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,66 (2H,d,J=15,9,H_{4,9}), 7,44 (2H,d,H_{15,18}), 7,32 (d, H_{13,20}), 7,11 (2H,m,H_{14,19}), 7,11 (2H,m,H_{5,10}), 6,56 (2H,d,J=15,9,H_{6,11}), 5,98 (2H,d,J=21,3,H_{3,8}). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 127 (C_{15,18}), 128 (C_{14,19}), 129 (C_{13,20}), 130 (C_{5,10}), 132(C_{6,11}), 133 (C_{3,8}), 138 (C_{4,9}), 141(C_{7,12}), 199 (C₁). MS (EI) m/z : 298 (M⁺, 100), 91 (C₇H₇⁺, 96,30).

Síntesis de (1E,3E,5E,8E,10E,12E)-1,13-bis(thiophen-2-il)trideca-1,3,5,8,10,12-hexaen-7-ona (2d3): En un balón de 50mL se hace reaccionar 1,22mmol (0,055mL) de acetona (VIII) con 2,44mmol (400mg) de (2E,4E)-5-(thiophen-2-il)penta-2,4-enal (V)⁴⁶ en 2,4mL y 1,9mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 6,04mmol (242 mg) de NaOH (s). La reacción se deja 40 minutos a temperatura ambiente. El sólido marrón que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se obtiene 28 mg de un sólido marrón.



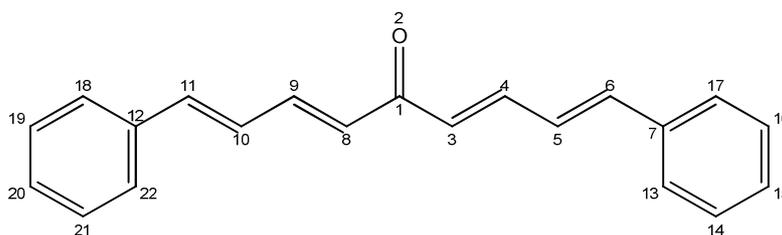
(1E,3E,5E,8E,10E,12E)-1,13-Bis(thiophen-2-il)trideca-1,3,5,8,10,12-hexaen-7-ona (2d3): Sólido marrón, R=5%, PF=164-174°C, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,42 (2H, d,J=11,5,H_{5,6}), 7,39 (2H,dd,H_{19,22}), 7,26 (2H,dd,H_{17,24}), 7,05 (2H,m,H_{11,13}), 7,03 (2H,t,H_{18,23}), 6,91 (2H,d,J=14,6,H_{12,14}), 6,77 (2H,d,J=10,8,H_{7,9}), 6,75 (2H,m,H_{8,10}), 6,47 (2H,d,J=14,9,H_{3,4}). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 126 (C_{17,24}), 128 (C_{18,19,22,23}), 130 (C_{12,14}), 131 (C_{3,4}), 132 (C_{11,13}), 136 (C_{7,8,9,10}), 141(C_{15,16}), 142 (C_{5,6}), 192 (C₁). MS (EI) m/z (%): 350 (M⁺, 53,40), 254 (C₁₆H₁₅OS₂⁺, 23,00), 97 (C₅H₅S₂⁺, 100).

Síntesis de (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (3d1): En un balón de 250mL se hace reaccionar 18mmol de acetona (VIII) (0,82mL) con 37mmol de benzaldehído (VI) (4,33mL) en 36mL de agua y 29mL de etanol. La reacción se lleva a cabo en medio básico agregando 92mmol (5,244g) de NaOH (s). La reacción se deja 24 horas a temperatura ambiente. Se monitorea la reacción en TLC de sílica utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3, v/v). El sólido verde-flúo que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se obtiene 2,248 g de un sólido verde flúo.



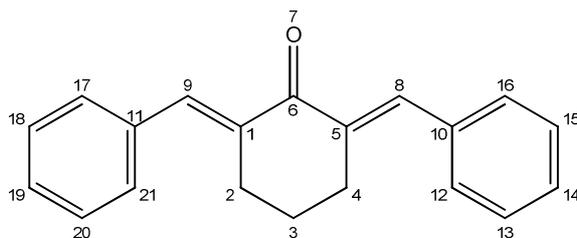
(1E,4E)-1,5-Difenilpenta-1,4-dien-3-ona (3d1): Sólido verde-flúo, R=70%, PF=106-107°C⁴⁹, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,85 (2H,d,J=15,2,H_{5,6}), 7,55 (4H,m,H_{9,13,14,18}), 7,41 (4H,m,H_{10,12,15,17}), 7,14 (2H,d,J=15,2,H_{3,4}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 128 (C_{9,13,14,18}), 129 (C_{3,4}), 130 (C_{10,12,15,17}), 131 (C_{11,16}), 136 (C_{7,8}), 143 (C_{5,6}), 190 (C₁). MS (EI) *m/z* (%): 234,2 (M⁺, 100)⁴⁹

Síntesis (1E,3E,6E,8E)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (3d2): En un balón de 50mL se hace reaccionar 3,68mmol (0,169mL) de acetona (VIII) y 7,57mmol (1,05mL) de cinamaldehído (VII), en 7,4mL de agua y 5,9mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 22,2mmol (887,2 mg) de NaOH (s). La reacción se deja 35 minutos a temperatura ambiente. El seguimiento se realiza en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. El sólido amarillo que precipita durante la reacción es filtrado a vacío y lavado con agua. Se recristaliza en etanol y se obtiene 270,3 mg de un sólido amarillo.



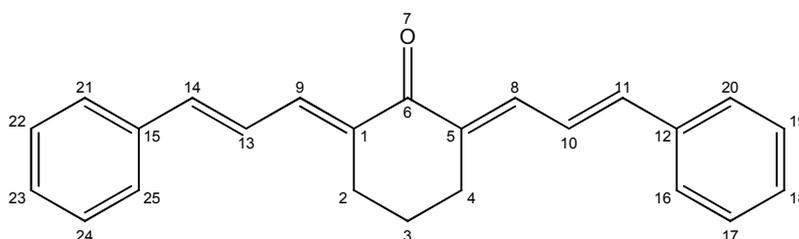
(1E,3E,6E,8E)-1,9-Difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona (3d2): Sólido amarillo, R=26%, PF=207°C⁵⁷, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,53 (2H,m,H_{4,9}), 7,51 (4H,m,H_{13,17,18,22}), 7,37 (6H,m,H_{14,15,16,19,20,21}), 7,37 (2H,m,H_{5,10}), 7,02 (2H,d,J=15,1,H_{6,11}), 6,96 (2H,d,J=15,5,H_{3,8}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 100 (C_{13,17,18,22}), 127 (C_{10,5}), 128 (C_{15,20}), 129 (C_{14,16,19,21}), 135 (C_{3,8}), 137 (C_{7,12}), 141 (C_{6,11}), 143 (C_{4,9}), 189 (C₁). MS (EI) *m/z*: 286 (M⁺, 100), 128 (C₁₂H₁₈O⁺, 86,16), 91 (C₇H₇⁺, 47,24).

Síntesis de (2E,6E)-2,6-dibencilidenciclohexanona (4d1): En un balón de 50mL se hace reaccionar 2,0mmol (0,21mL) de ciclohexanona (IX) con 4,0mmol (0,40mL) de benzaldehído (VI) en 3,9mL de agua y 3,1mL de etanol. Se lleva a cabo en medio básico agregando 9,9mmol (398mg) de NaOH (s). La reacción se deja una hora a temperatura ambiente. La reacción se monitorea en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. A los tres minutos precipita un sólido de color blanco, a los 15 minutos ese sólido cambia a color verde y a la hora se termina la reacción filtrando el sólido a vacío, lavándolo con agua. Se recristaliza en etanol. Se obtiene 142 mg de un sólido amarillo.



(2E,6E)-2,6-Dibencilidenciclohexanona (4d1): Sólido amarillo, R=31%, PF=155°C⁵⁸, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,83 (2H,s,H_{8,9}), 7,50 (4H,m,H_{12,16,17,21}), 7,43 (4H,m,H_{13,15,18,20}), 7,32 (2H,m,H_{14,19}), 2,96 (4H,m,H_{2a,2b,4a,4b}), 1,82 (2H,m,H_{3a,3b}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 24 (C₃), 28 (C_{2,4}), 128 (C_{12,16,17,21}), 130 (C_{13,15,18,20}), 136 (C_{8,9}), 142 (C_{1,5}), 190 (C₆). MS (EI) m/z : 274 (M⁺, 100), 183 (C₁₃H₁₁O⁺, 4,03), 91 (C₇H₇⁺, 9,23).

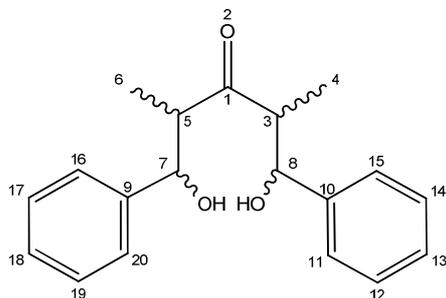
Síntesis de (2E,6E)-2,6-bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]ciclohexanona (4d2): En un balón de 50mL se hace reaccionar 2,0mmol (0,21mL) de ciclohexanona (IX) con 4,0mmol (0,55mL) de cinamaldehído (VII) en 3,9mL de agua y 3,1mL de etanol. Se lleva a cabo en medio básico agregando 9,9mmol (398mg) de NaOH (s). La reacción se deja 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se monitorea en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. A los tres minutos precipita un sólido de color naranja y a los 15 minutos ese sólido cambia a color mostaza y termina la reacción filtrando el sólido a vacío, lavándolo con agua. Se recristaliza en etanol. Se obtiene 83,2 mg de un sólido mostaza.



(2E,6E)-2,6-Bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]ciclohexanona (4d2): Sólido mostaza, R=27%, PF=179°C⁵⁹, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,51 (4H,m,H_{16,20,21,25}), 7,36 (2H,m,H_{8,9}), 7,33 (4H,m,H_{17,19,22,24}), 7,08 (2H,d,J=11,3,H_{10,13}), 7,01 (2H, d,J=15,H_{11,14}), 2,83 (4H,m,H_{2a,2b,4a,4b}), 1,90 (2H,m,H_{3a,3b}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 24 (C₃), 28 (C_{2,4}), 125 (C_{10,13}), 128 (C_{16,20,21,25}), 129 (C_{17,19,22,24}), 137 (C_{11,12,14,15}), 138 (C_{8,9}), 141 (C_{1,5}), 189 (C₆). MS (EI) m/z : 326(M⁺,100), 207 (C₁₅H₁₄O⁺, 16,86), 115 (C₉H₉⁺, 35,04).

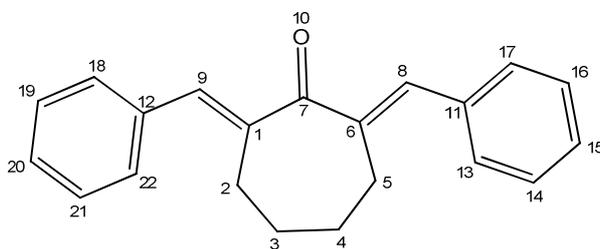
Síntesis de 1,5-difenil-1,5-dihidroxi-2,4-dimetilpentan-3-ona (5): En un balón de 50mL se hace reaccionar 2,3mmol (0,16mL) de 3-pentanona (X) y 4,6mmol (0,46mL) de benzaldehído (VI) en 4,5mL de agua y 3,6mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 11,38mmol (455 mg) de NaOH (s). La reacción se lleva a cabo durante 14 horas a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase

móvil. En la mezcla se observa un precipitado color rosado el cual luego de 14 horas a temperatura ambiente se filtra y se recrystaliza en etanol obteniendo 150 mg de un sólido blanco.



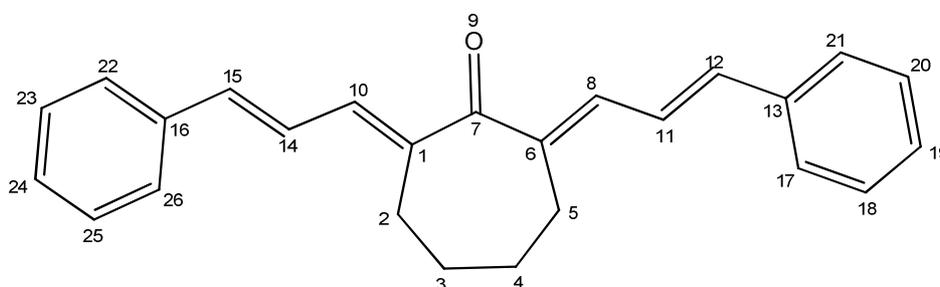
1,5-Difenil-1,5-dihidroxi-2,4-dimetilpentan-3-ona (5): Sólido blanco, R=25%, PF=104-105°C, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,47 (4H,m, $\text{H}_{11,15,16,20}$), 7,38 (4H,m, $\text{H}_{12,14,17,18}$), 7,33 (2H,m, $\text{H}_{13,18}$), 4,35 (2H,dd, $J=10,3$, $\text{H}_{7,8}$), 2,90 (2H,dc, $\text{H}_{3,5}$), 1,58 (2H,sa,OH), 0,90 (6H,d, $\text{H}_{4,6}$). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 45 ($\text{C}_{4,6}$), 46 ($\text{C}_{3,5}$), 49 ($\text{C}_{7,8}$), 124 (C_6), 127 ($\text{C}_{11,15,16,20}$), 129 ($\text{C}_{12,13,14,17,18,19}$), 133 (C_7), 137 ($\text{C}_{9,10}$), 210 (C_1). MS (EI) m/z : 280 ($\text{M}^{++}-\text{H}_2\text{O}$, 1,5), 262 ($\text{M}^{++}-2\text{H}_2\text{O}$, 1,1), 118 ($\text{C}_9\text{H}_{10}^+$, 100), 172 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}^+$, 11,85), 278 ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}^+$, 1,17).

Síntesis de (2E,7E)-2,7-dibencilidencicloheptanona (6d1): En un balón de 50mL se hace reaccionar 1,78mmol (0,19mL) de cicloheptanona (XI) y 3,56mmol (0,36mL) de benzaldehído (VI), en 3,5mL de agua y 2,8mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 8,81mmol (352 mg) de NaOH (s). La reacción se lleva a cabo durante 72 horas a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. En la mezcla de reacción se separa un aceite amarillo. El disolvente de reacción se evapora a vacío, se realiza un reparto con HCl (ac) y acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a vacío. El residuo se purifica por CC éter de petróleo y acetato de etilo (gradiente desde 9:1 a 7:3). Se obtienen 195 mg de un sólido amarillo.



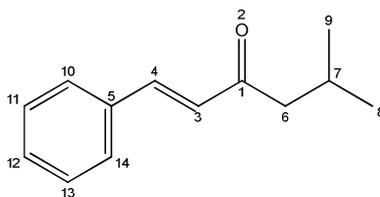
(2E,7E)-2,7-Dibencilidencicloheptanona (6d1): Sólido amarillo, R=31%, PF=105-107°C⁶⁰, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,83 (2H,s, $\text{H}_{8,9}$), 7,48 (4H,m, $\text{H}_{13,17,18,22}$), 7,40 (4H,m, $\text{H}_{14,16,19,21}$), 7,35 (2H,m, $\text{H}_{15,22}$), 2,74 (4H,m, $\text{H}_{2a,2b,5a,5b}$), 1,82 (4H,m, $\text{H}_{3a,3b,4a,4b}$). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 28 ($\text{C}_{3,4}$), 30 ($\text{C}_{2,5}$), 128 ($\text{C}_{13,17,18,22}$), 130 ($\text{C}_{14,16,20,22}$), 134 ($\text{C}_{9,8}$), 136 ($\text{C}_{11,12}$), 142 ($\text{C}_{1,6}$), 199 (C_7). MS (EI) m/z (%): 288 (M^{++} , 100); 260 ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4^+$; 16,01).

Síntesis de (2E,7E)-2,7-bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]cicloheptanona (6d2): En un balón de 50mL se hace reaccionar 1,78mmol (0,19mL) de cicloheptanona (XI) y 3,56mmol (0,49mL) de cinamaldehído (VII), en 3,5mL de agua y 2,8mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 8,81mmol (352 mg) de NaOH (s). La reacción se lleva a cabo durante una hora a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla de hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. En la mezcla se separa un aceite marrón. El disolvente de reacción se evapora a vacío, se realiza un reparto con HCl (ac) y acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a vacío. El residuo se purifica por CC éter de petróleo y acetato de etilo (gradiente desde 9:1 a 7:3). Se obtienen 30 mg de un sólido amarillo.



(2E,7E)-2,7-Bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]cicloheptanona (6d2): Sólido amarillo, R=5%, PF=212-214°C⁶¹, ¹H-RMN, δ H (ppm): 7,51 (4H,m,H_{17,21,22,26}), 7,39 (4H,m,H_{18,20,23,26}), 7,30 (2H,m,H_{18,25}), 7,12 (2H,d,J=11,2,H_{12,15}), 7,07 (2H,d,J=11,2,H_{11,14}), 6,97 (2H,d,J=15,3,H_{8,10}), 2,69 (8H,m,H_{2,3,4,5}). ¹³C-RMN, δ C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 122 (C_{11,14}), 127 (C_{17,21,22,26}), 129(C_{18,20,24,26}), 129(C_{18,25}), 135(C_{8,10}), 136 (C_{12,15}), 137 (C_{13,16}), 140 (C_{1,6}), 205 (C₇). MS (EI) m/z (%):340 (M⁺, 86,63), 249 (C₁₈H₁₈O⁺, 100).

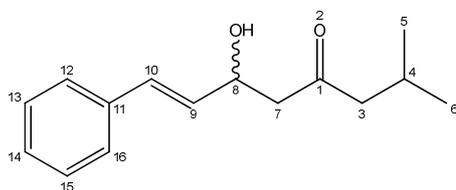
Síntesis de (1E)-1-fenil-5-metilhex-1-en-3-ona (7d1): En un balón de 50mL se hace reaccionar 2,0mmol (0,16mL) de 4-metil-2-pentanona (XII) y 2,0mmol (0,20mL) de benzaldehído (VI), en 3,9mL de agua y 3,1mL de etanol. La reacción se realiza en medio básico agregando 9,9mmol (396 mg) de NaOH (s). La reacción se lleva a cabo durante 22 horas a temperatura ambiente. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (6:4, v/v) como fase móvil. En la mezcla se separa un aceite amarillo. El disolvente de reacción se evapora a vacío, se realiza un reparto con HCl (ac) y acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a vacío obteniéndose el producto como un aceite amarillo.



(1E)-1-Fenil-5-metilhex-1-en-3-ona (7d1): Aceite amarillo, R=89%, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,57 (3H,m, $\text{H}_{4,10,14}$), 7,42 (3H,m, $\text{H}_{11,12,13}$), 6,77 (1H,d, $J=16,2,\text{H}_3$), 2,56 (2H,d, H_6), 2,26 (1H,m, H_7), 1,01 (6H,d, $\text{H}_{8,9}$). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 22 ($\text{C}_{8,9}$), 25 (C_7), 50 (C_6), 125 (C_3), 128 ($\text{C}_{10,14}$), 129 ($\text{C}_{11,13}$), 130 (CH_{12}), 144 (C_7), 190 (C_1). MS (EI) m/z (%): 188 ($\text{M}^{+\bullet}$, 18,79), 131 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}^+$, 100), 77 (C_6H_5^+ , 25).

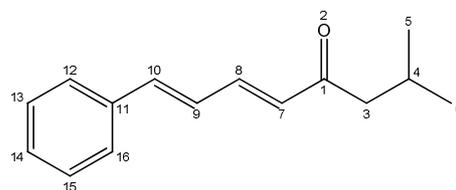
Síntesis de (5E,7E)-8-fenil-2-metilocta-5,7-dien-4-ona y (7E)-8-fenil-6-hidroxi-2-metilocta-7-en-4-ona (7d2): En un balón de 50mL se hace reaccionar 2,0mmol (0,16mL) de 4-metil-2-pentanona (XII) con 2,0mmol (0,28mL) de cinamaldehído (VII) en 3,9mL de agua y 3,1mL de etanol. La reacción se lleva a cabo en medio básico agregando 9,9mmol (398mg) de NaOH (s). El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (7:3, v/v). La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, a las 21 horas se evapora el disolvente a vacío, se realiza un reparto con HCl (ac) y acetato de etilo. Se obtienen 276 mg de un aceite de color marrón.

En este caso, según los datos de resonancia magnética nuclear, se obtuvo una mezcla de los siguientes compuestos:

**7d21-**

Exact Mass: 232,15

30%

**7d22-**

Exact Mass: 214,14

70%

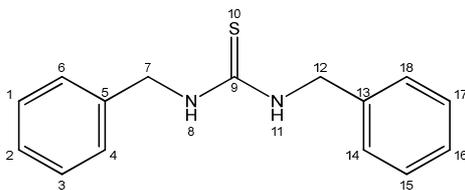
Aceite de color marrón, R=64%.

(5E,7E)-8-Fenil-2-metilocta-5,7-dien-4-ona (7d22): $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,60-7,30 (6H,m, $\text{H}_{12,13,14,15,16,10}$), 6,98 (1H,dd, H_9), 6,90 (1H,m, H_8), 6,31 (1H,d, $J=15,2,\text{H}_7$), 2,49 (2H,d, H_3), 2,21 (1H,m, H_4), 0,99 (6H,m, $\text{H}_{5,6}$). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 22 ($\text{C}_{5,6}$), 27 (C_4), 27 (C_3), 125, 128, 129, 130, 136, 137, 146 (C_{7-16}), 202 (C_1). MS (EI) m/z (%): 214($\text{M}^{+\bullet}-\text{H}_2\text{O}$, 4,92), 131 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}^+$, 100); 103(C_8H_7^+ ; 45,91);

(7E)-8-Fenil-6-hidroxi-2-metilocta-7-en-4-ona (7d21): $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,60-7,30 (6H,m, $\text{H}_{12,13,14,15,16,10}$), 6,77 (1H,d, $J=16,2,\text{H}_9$), 4,14 (1H,c, H_8), 2,64 (2H,m, H_7), 2,56 (2H,d, H_3), 2,26 (1H,m, H_4), 1,60 (1H,sa, OH), 0,99 (6H,m, $\text{H}_{5,6}$). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y

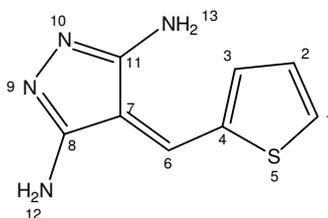
HMBC): 22 ($C_{5,6}$), 27 (C_4), 27 ($C_{3,7}$), 50 (C_8), 125, 128, 129, 130, 137, 146 (C_{7-16}), 202 (C_1). MS (EI) m/z (%): 214(M^{+} , 4,92), 131 ($C_9H_7O^+$, 100); 103($C_8H_7^+$; 45,91);

Síntesis de 1,3-dibenciltiourea (8): En un balón de 50 mL conteniendo 5,3mmol (0,510mL) de bencilamina disuelta en DMF (0,5mL) se adicionan 5,3mmol de bencilisotiocianato (0,713mL) a 0°C. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo en TLC de sílica con una mezcla hexano:acetato de etilo (8:2, v/v). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. El sólido se filtra y se lava con hexano. Se obtiene 1,0166 g de un sólido blanco.



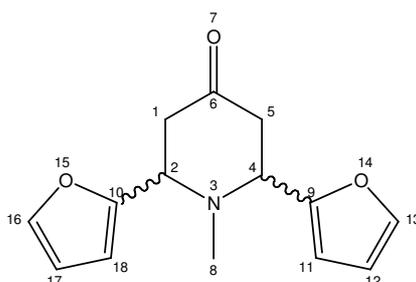
1,3-Dibenciltiourea (8): Sólido blanco, R=75%, PF=150-153°C, 1H -RMN, δH (ppm): 7,36 (4H,m, $H_{4,6,14,18}$), 7,33 (4H,m, $H_{1,3,15,17}$), 7,26 (2H,m, $H_{2,16}$), 6,08 (2H,sa,NH), 4,65 (4H,s, $H_{7,12}$). ^{13}C -RMN, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 49 ($C_{7,12}$), 127 ($C_{1,3,15,17}$), 128 ($C_{6,4,14,18}$), 129 ($C_{2,16}$), 137 ($C_{5,13}$), 186 (C_9). MS (EI) m/z (%): 257(M^{+} , 100); 108 ($C_7H_{10}N^+$, 90).

Síntesis de 4-(tiofen-3-il-metilen)-4H-pirazol-3,5-diamina (9): En un balón de 50 mL se hace reaccionar 0,294mmol de 2-(tiofen-2-il-metilen)malononitrilo (XIV) (50,05mg) con 0,235mmol (0,0151mL) de hidracina (XV) en 2,5 mL de etanol. Se deja 3 horas a reflujo y se detiene el calentamiento por evidenciar la desaparición de los reactivos (evidenciado por TLC en sílica utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3, v/v)). El disolvente de reacción se evapora a vacío, se realiza un reparto con HCl (*ac*) y diclorometano. La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se evapora a vacío. El residuo se purifica por CC en sílica utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (gradiente desde 9:1 a 8:2) obteniéndose 10 mg de un sólido amarillo.



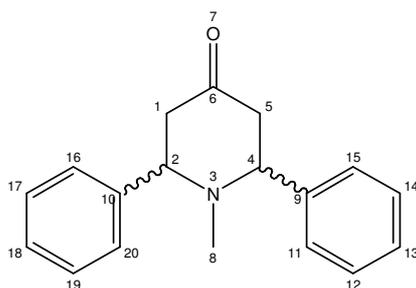
4-(Tiofen-3-il-metilen)-4H-pirazol-3,5-diamina (9): Sólido amarillo, R=11%, PF=146-148°C, 1H -RMN, δH (ppm): 8,80 (1H,s, H_6), 7,50 (1H,dd, H_2), 7,45 (1H,dd, H_1), 7,15 (1H,dd, H_3), 1,62 (4H,s, $H_{12,13}$). ^{13}C -RMN, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 100 (C_7), 128 (C_3), 130 (C_2), 130 (C_6), 134 (C_1), 138 (C_4), 152 (C_{11}), 154(C_8). MS (EI) m/z (%): 192 (M^{+} , 30,55), 137 ($C_7H_7NS^+$, 11,14), 96 ($C_5H_4S^+$, 19,85).

Síntesis de 2,6-di(furan-2-il)-1-metilpiperidin-4-ona (10): En un balón de 100mL se hace reaccionar 0,93mmol de **1d1** con 2,4mmol de *N*-metilamina (XII) en 15mL de etanol. La reacción se monitorea por TLC en sílica utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3, v/v). La reacción se lleva a cabo durante 48 horas a temperatura ambiente. El producto se purifica por CC en sílica, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (gradiente desde 9:1 a 8:2) obteniéndose 38,9 mg de un aceite color naranja.



2,6-di(furan-2-il)-1-metilpiperidin-4-ona (10): Aceite naranja, R=17%, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,44 (2H,dd, $\text{H}_{13,16}$), 6,35 (2H,m, $\text{H}_{12,17}$), 6,20 (2H,dd, $\text{H}_{11,18}$), 4,10 (2H,t, $\text{H}_{2,4}$), 2,84 (4H,d, $\text{H}_{1a,1b,5a,5b}$), 2,18 (3H,s, H_8). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 42 (C_8), 55 ($\text{C}_{1,5}$), 67 ($\text{C}_{2,4}$), 101 ($\text{C}_{11,18}$), 110 ($\text{C}_{12,17}$), 141 ($\text{C}_{13,16}$), 154 ($\text{C}_{9,10}$), 204 (C_6). MS (EI) m/z (%): 245 (M^{++} , 20,04), 136 ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}^+$, 45,88), 94 ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2^+$, 100).

Síntesis de 2,6-difenil-1-metilpiperidin-4-ona (11): En un balón de 100mL se hace reaccionar 0,84mmol de **3d1** (200mg) con 2,12mmol de *N*-metilamina (XIII) (0,2mL) en 15mL de etanol. La reacción se monitorea por TLC en sílica utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (8:2, v/v). La reacción se lleva a cabo durante 48 horas a temperatura ambiente. Se filtra el sólido resultante a vacío. El producto se recristaliza en etanol y agua obteniendo 310 mg de un sólido blanco.



2,6-Difenil-1-metilpiperidin-4-ona (11): Sólido blanco, R=43%, PF=138-140°C⁴⁹, $^1\text{H-RMN}$, δH (ppm): 7,40 (4H,m, $\text{H}_{12,14,17,19}$), 7,38 (4H,m, $\text{H}_{11,15,16,20}$), 7,33(2H,m, $\text{H}_{13,18}$), 3,75 (2H,m, $\text{H}_{2,4}$), 2,85 (2H,dd, $\text{H}_{1a,5a}$), 2,54 (2H,m, $\text{H}_{1b,5b}$), 1,85 (3H,s, H_8). $^{13}\text{C-RMN}$, δC (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 40 (C_8), 45 ($\text{C}_{1,5}$), 68 ($\text{C}_{2,4}$), 127 ($\text{C}_{13,18}$), 129 ($\text{C}_{11,15,16,20}$), 130 ($\text{C}_{12,14,17,19}$), 142 ($\text{C}_{9,10}$), 202 (C_6). MS (EI) m/z (%): 266 (M^{++} , 100)⁴⁹.

3.2. Biología

3.2.1. Ensayo de actividad de los compuestos frente a *T. cruzi*

Estos ensayos fueron realizados por el Lic. Javier Varela (responsable en el Grupo de Química Medicinal de estos ensayos).

Los cultivos de *T. cruzi*, epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 o cepa Y, se cultivan a 28 °C en medio axénico (infusión cerebro-corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, hemina 0,02 g/L, D-(+)-glucosa 0,3 g/L, estreptomycin 0,2 g/L, penicilina 200000 U/L, complementado con 10 % de suero fetal bovino). Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones aeróbicas. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Los compuestos a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO (solución madre de 24 mM) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (25 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM). Los parásitos son incubados con los compuestos a 28 °C por 5 días.

El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células⁶². El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como: $PI = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es la absorbancia a 610 nm (A_{610}) del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A_{0p} es A_{610} del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); A_c es A_{610} del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A_{0c} es A_{610} en ausencia del compuesto al día 0. El IC_{50} corresponde a la concentración del compuesto capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar \log_{10} (concentración) vs % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.2.2. Ensayo de inhibición de la TcTIM

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Beatriz Aguirre López perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México.

En la mezcla de la reacción (pH=7,4) conteniendo trietanolamina 100mM, EDTA 10mM, NADH 0,2mM, gliceraldehído-3-fostato 1mM y 0,9 unidades de α -glicerol-fostato deshidrogenasa, se determina la actividad de la enzima en la dirección de gliceraldehído-3-fostato a dihidroxiacetona-fostato^{63 64 65}.

Los compuestos que se evaluaron con dicha enzima y que fueron activos contra *T. cruzi* se disuelven en un 10% v/v de DMSO, incubándolos durante 2 horas con la enzima (5 μ g/mL) a una temperatura de 37 °C. La reacción enzimática comienza con el agregado de 5 μ L de la mezcla de pre-incubación a la mezcla de reacción (volumen final 1 mL), midiendo el descenso en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard a 25°C.

3.2.3. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos¹⁸

Estos ensayos fueron realizados por la estudiante Estefanía Birriel (responsable en el Grupo de Química Medicinal de dichos ensayos).

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos contra *T. cruzi* y calcular el índice de selectividad, definido como concentración inhibitoria 50 del crecimiento de células mamíferas dividido la concentración inhibitoria 50 del crecimiento del parásito, se realizó el ensayo de citotoxicidad por MTT.

Se emplean macrófagos murinos J774. Se siembra una placa de 96 pocillos transparente con confluencia, con 50000 células/pocillo, la misma se incuba durante 24 horas a 37 °C. Luego de este periodo, las células deben estar en un 70-80 % de confluencia. Se preparan disoluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado (DMSO) a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0.5 %. Luego se coloca medio de cultivo fresco en tubos eppendorf estériles y se realizan las diluciones seriadas de los compuestos. Se retira el medio de cultivo de la placa y se adiciona el compuesto ya disuelto en medio de cultivo fresco (volumen final 200 μ L). Se incuba durante 48 horas en estufa a 37 °C, 5 % CO₂.

Se realizan los siguientes controles: células con disolvente y MTT, células sin disolvente y con MTT, blanco de lectura: células con disolvente y sin MTT.

Luego del periodo de incubación se observan las células en el microscopio y se realizan anotaciones acerca del estado de las mismas. El medio de cultivo se retira, se prepara la disolución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 0.1 mg/mL) en PBS estéril 0,2 % glucosa (D-+)-glucosa 200 mg, PBS 10 x 10 mL, agua milliQ 90 mL) y se adicionan 100 μ L de esta disolución en cada pocillo.

En el blanco de lectura se colocan 100 μ L de PBS estéril 0,2 % glucosa sin MTT. Posteriormente, se incuba durante 3 horas a 37 °C. Luego de este procedimiento se retira la disolución de MTT y se adicionan en cada pocillo 180 μ L de DMSO y 20 μ L de disolución amortiguadora glicina para MTT (glicina 0.1 M, NaCl 0.1M, EDTA 0.5 M). Se agita la placa en agitador *shaker* por lo menos durante un minuto y se realiza la lectura de absorbancia a 560 nm. Se calcula el % citotoxicidad según la fórmula:
% citotoxicidad = $1 - [(Abs_{muestra}/Abs_{control \text{ con DMSO y MTT}}) \times 100]$.

3.2.4. Determinación del cambio metabólico en *T. cruzi* utilizando 1H -RMN²⁹⁻³²

Para evaluar el cambio del perfil metabólico que inducen los compuestos en estudio, se incuba 1 mL de 10 millones de epimastigotes, cepa Y, en medio de cultivo, a 28 °C, durante 48 h con el compuesto de interés. A la hora cero del experimento, previo a preparar el repique de 10 millones/mL, se hace un lavado para sustituir el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, para ello se centrifuga a 3000 g, 10 min, se descarta el medio y se sustituye por medio fresco. Se incluye en cada ensayo un “Control medio de cultivo” que contiene 1 mL de medio de cultivo más el disolvente en el que se disuelven los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los parásitos tratados. A las 48 h se centrifuga a 3000 g, 10 min y se toman 500 μ L del sobrenadante que se agrega a un tubo de RMN de 5 mm. Se le adicionan además 10 μ L de DMF (estándar interno) y 90 μ L de D₂O. Los espectros se adquieren realizando un total de 8 escanes y se procesan según: sobre el FID se aplica “Full FT” y se realiza el referenciado del espectro respecto al EtOH a 1,17 ppm. Los resultados se expresan como porcentaje relativo a la DMF y respecto a un “Control parásitos sin tratamiento” que contiene 1 mL de una suspensión de 10 millones de parásitos/mL de medio de cultivo, más el disolvente en el que se disuelven los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los tratados.

Un porcentaje positivo (+) significa un incremento en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos metabolitos” y un porcentaje negativo (–) implica una disminución en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos sin tratamiento”.

3.2.5. Ensayos de mutagenicidad (Test de Ames)

Estos ensayos fueron realizados por el Lic. Martín Gabay (responsable en el Grupo de Química Medicinal de dichos ensayos).

La capacidad mutagénica del compuesto **1d2** fue determinada a partir de un cultivo 2×10^9 UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial de *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (hisD3052, dependiente de histidina)^{63 66 67 68}. Se evaluaron cinco diluciones seriadas al tercio en DMSO partiendo de la máxima dosis no tóxica estimada a partir de los resultados del ensayo de toxicidad realizado inicialmente.

El efecto mutagénico causado por la metabolización de los compuestos se evaluó con el agregado de disolución de fracción S9 (5 %) de hepatocitos de hígado de ratón tratado con Aroclor-1254 obtenida de Moltox Inc. (Annapolis, MD, USA).

Se realizaron controles positivos con 4-nitro-*o*-fenilendiamina (20,0 µg/placa) en el caso de mutagenicidad sin activación metabólica y con 2-aminofluoreno (10,0 µg/placa) en el caso de mutagenicidad con activación metabólica. Como control negativo se utilizó DMSO (50 µL/placa) y control del fenotipo (resistencia a ampicilina, tetraciclina, cristal violeta y luz UV sensible). Se incubó por 1 h a 37 °C. Se adicionó 2 mL de una disolución de agar que contiene 10 mL de disolución de histidina [(0,5 mM) / biotina (0,5 mM)] por cada 100 mL. Se cultivó luego en agar mínimo glucosa durante 48 h a 37 °C.

El número de revertientes fue contado manualmente y se expresó como el promedio de duplicados \pm desviación estándar. El producto se consideró mutagénico cuando el número de colonias revertientes duplica al control negativo en al menos dos dosis consecutivas.

La preparación de la suspensión bacteriana, de disolución de la fracción S9, del producto y de la primera parte del ensayo (hasta que los tubos con todas las disoluciones pasan a la estufa para su incubación) se realizó en condiciones de esterilidad, a saber en cabina de flujo laminar y con material estéril (autoclave a 121 °C por 20 min o manteniendo la esterilidad del fabricante).

El agregado de la disolución de histidina/biotina y la siembra de las placas se realizó al lado de una corriente de aire ascendente generada por un mechero.

3.3. Cálculos teóricos para estudiar la distribución espacial de los compuestos 4d1 y 6d1

Para los mismos se empleó el programa Spartan-Wavefunction^{69 70 71 72 73}.

El procedimiento de trabajo consistió en una búsqueda conformacional, *in vacuo*, a nivel semiempírico, AM1, posteriormente realizando un cálculo *single point* utilizando funciones híbridas DFT-B3LYP.

3.4. Estudios de docking para los compuestos 1d1 y 1d2 y TcTIM

Estos cálculos fueron realizados por la Lic. Lucía Minini perteneciente al Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC) del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias.

Se realizó la optimización de geometría de los compuestos a estudiar mediante un método semiempírico PM6, utilizando el paquete Gaussian 09⁷⁴.

Se realizó una dinámica molecular de TcTIM (PDB ID: 1TCD) en ausencia de ligando a partir de la cual se obtuvo una estructura representativa que presenta al loop 6 abierto, esto es necesario para que el sustrato pueda unirse al sitio activo.

Los archivos de entrada para realizar el *docking* se obtuvieron mediante la interfase gráfica AutoDockTools⁷⁵. En todos los experimentos de *docking* se cubrió toda la superficie proteica usando grillas de 124 x 126 x 126 puntos en las direcciones x, y, z respectivamente. Los mapas generados fueron centrados en la macromolécula. El espaciado de la grilla fue de 0,603 Å. Se generaron 50 corridas con un algoritmo genético Lamarckiano usando parámetros establecidos por defecto en el programa.



Figura 4.1.2. Montaje experimental para la síntesis de las arilidenonas.

Mecánicamente el proceso planificado es el de una condensación aldólica (Figura 4.1.3) sin embargo, en algunos casos se obtuvieron los correspondientes productos de adición. Los productos obtenidos en cada uno de los casos se resumen en la Tabla 4.1.1.

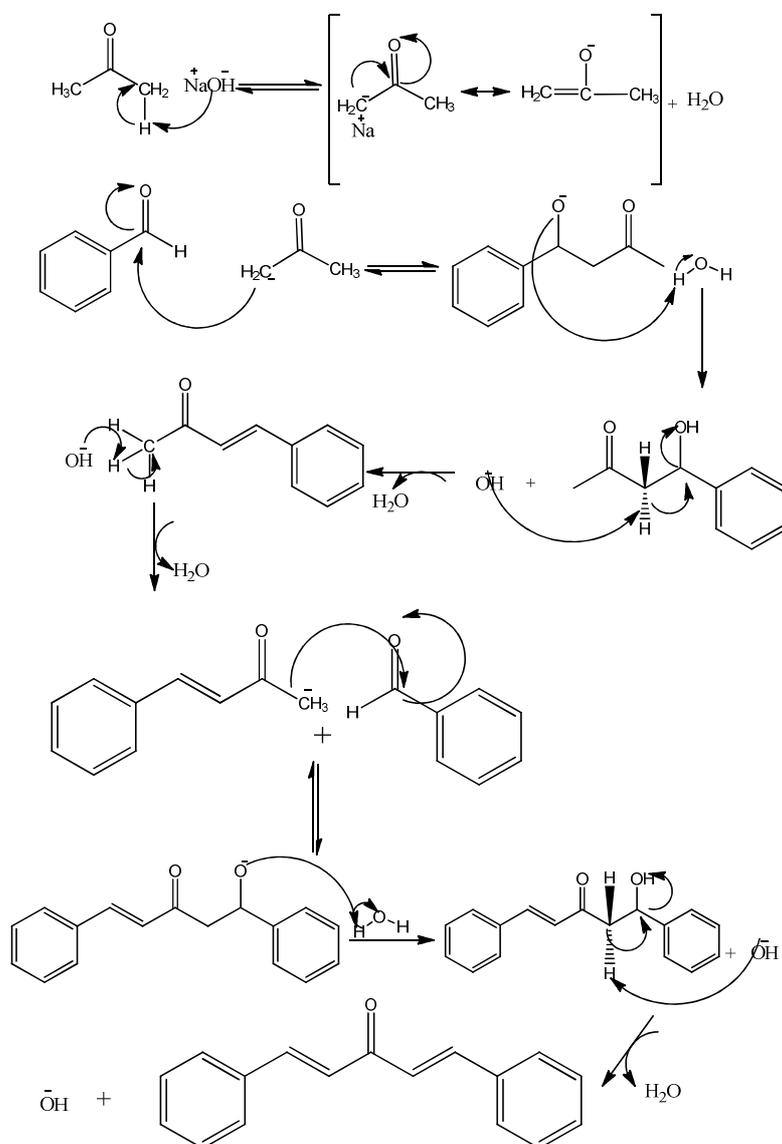


Figura 4.1.3. Mecanismo de reacción para la formación del producto **3d1**.

Tabla 4.1.1. Resultado de síntesis de arilidenonas.

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Nombre
1d1		99	(1E,4E)-1,5-bis(furan-2-il)penta-1,4-dien-3-ona
1d2		51	(1E,3E,6E,8E)-1,9-bis(furan-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona
2d1		69	(1E,4E)-1,5-bis(tiofen-2-il)penta-1,4-dien-3-ona
2d2		32	(1E,3E,6E,8E)-1,9-bis(tiofen-2-il)nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona
2d3		5	(1E,3E,5E,8E,10E,12E)-1,13-bis(tiofen-2-il)trideca-1,3,5,8,10,12-hexaen-7-ona
3d1		70	(1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona
3d2		26	(1E,3E,6E,8E)-1,9-difenilnona-1,3,6,8-tetraen-5-ona
4d1		31	(2E,6E)-2,6-dibencilidenciclohexanona
4d2		27	(2E,6E)-2,6-bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]ciclohexanona
5		25	1,5-difenil-1,5-dihidroxi-2,4-dimetilpentan-3-ona
6d1		31	(2E,7E)-2,7-dibencilidencicloheptanona
6d2		5	(2E,7E)-2,7-bis[(2E)-3-fenil-2-propeniliden]cicloheptanona
7d1		89	(1E)-1-fenil-5-metilhex-1-en-3-ona
7d2		64	(5E,7E)-8-fenil-2-metilocta-5,7-dien-4-ona y (7E)-8-fenil-6-hidroxi-2-metilocta-7-en-4-ona

Con respecto a los derivados de 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona y 4,6-diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona se diseñaron las rutas sintéticas mostradas en la Figura 4.1.4.

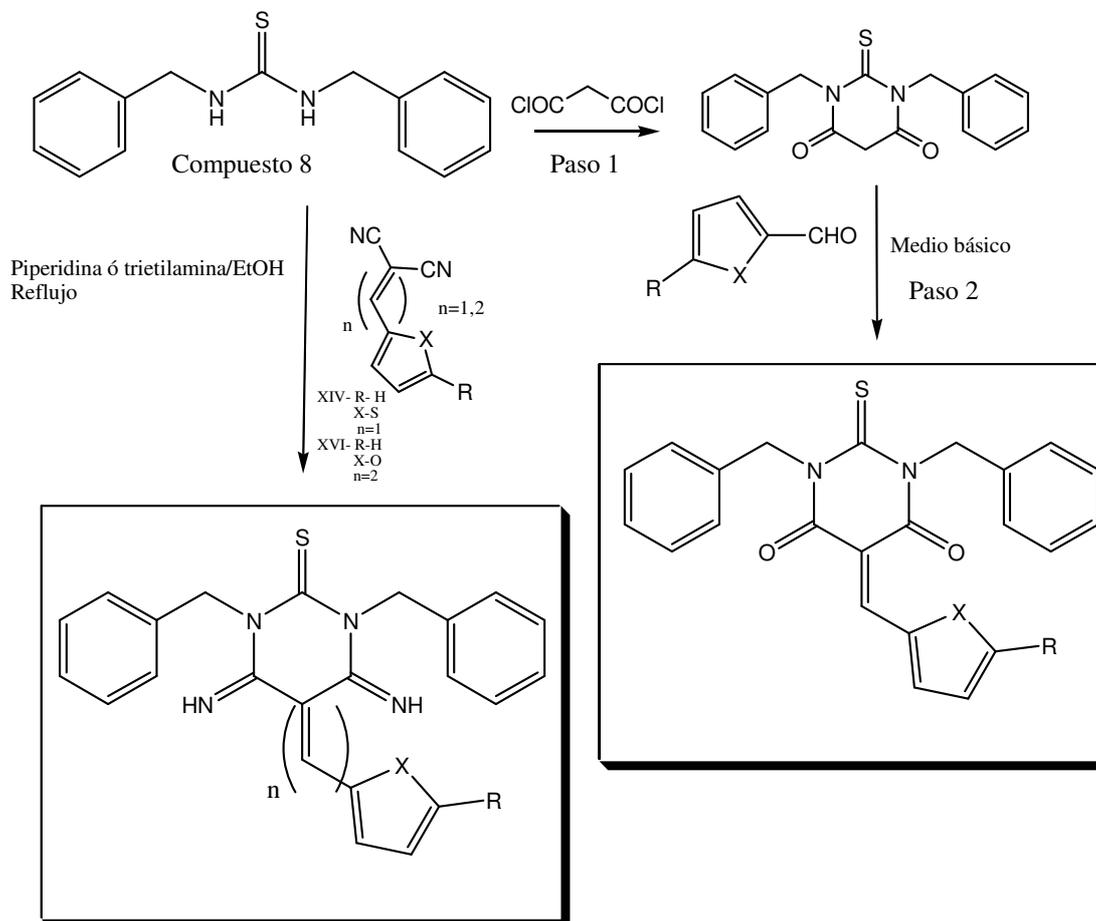


Figura 4.1.4. Rutas sintéticas diseñadas para la síntesis de los derivados de 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona y 4,6-diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona.

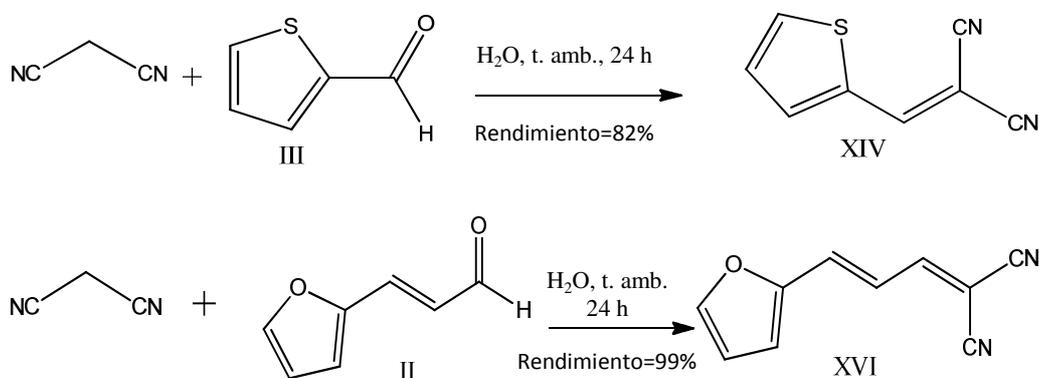
Para la obtención de los compuestos mencionados en la figura 4.1.4 primero se sintetiza la benciltiourea **8**. Una vez obtenida la benciltiourea se ensayan condiciones para la obtención de los derivados de 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona, intentando en primera instancia la preparación del compuesto intermedio 1,3-dibencil-2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona sin éxito. Las diferentes condiciones ensayadas para esta preparación se resumen en la Tabla 4.1.2.

Ante los resultados negativos en esta primera etapa del proceso no se prosiguió con la etapa siguiente, condensación con los diferentes aldehídos.

Tabla 4.1.2. Intentos de obtención de 2-tioxodihidropirimidin-4,6(1*H*,5*H*)-diona.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN	RESULTADOS
Trietilamina (cantidades catalíticas), THF, temperatura ambiente, agregado de cloruro de malonilo gota a gota con ecualizador, 2 horas	Se obtiene un sólido amarillo. No se obtiene el producto deseado, según se confirma por espectrometría de masa
Trietilamina (cantidades catalíticas), DCM, temperatura ambiente, agregado de cloruro de malonilo gota a gota con ecualizador, 48 horas	No se obtiene el producto deseado, el cloruro de malonilo con el tiempo se descompone y cuando se monitorea por TLC sólo se observa la benciltiurea

Para la obtención de los compuestos derivados de diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona se prepararon previamente los intermedios dinitrilos correspondientes (Figura 4.1.5).

**Figura 4.1.5.** Esquema de síntesis de los intermedios dinitrilos utilizados.

Una vez sintetizados los compuestos XIV y XVI se prosigue con el intento de preparación de los derivados de diiminotetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona (Figura 4.1.4). Sin embargo, todos los intentos realizados no condujeron a los productos de interés (Tabla 4.1.3).

Tabla 4.1.3. Resultados de las condiciones ensayadas en el intento de obtención de 1,3-dibencil-4,6-diimino-5-(tiofen-2-ilmetilen)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN	RESULTADOS
Piperidina (cantidades catalíticas), EtOH, reflujo 3 horas	No se obtiene el producto de interés. Se separa por CC (sílica EP:AcOEt, 9:1 a 7:3) dibenciltiurea sin reaccionar y se observa descomposición del dinitrilo
Trietilamina (cantidades catalíticas), ETOH, temperatura ambiente 7 días, reflujo 18 horas	No se obtiene el producto de interés

La preparación de los derivados de 4*H*-pirazol es llevada a cabo utilizando los intermedios sintéticos dinitrilos (Figura 4.1.5) que se hacen reaccionar con hidrato de hidracina como se muestra en la Figura 4.1.6. El producto 9 se obtiene luego de algunos intentos sintéticos en muy bajo rendimiento, mientras que el homólogo derivado de furilo no es posible obtenerlo (Tabla 4.1.4).

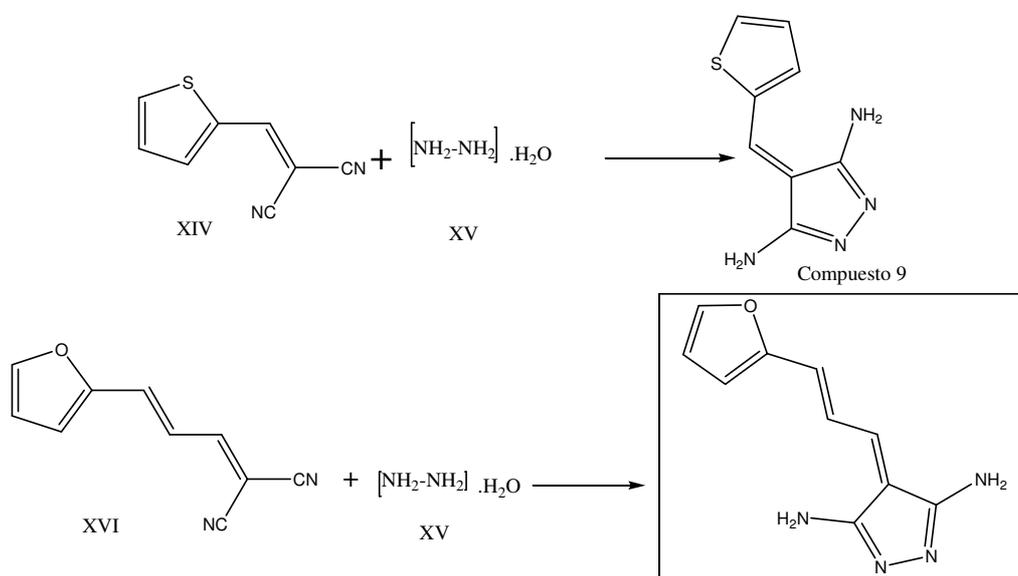


Figura 4.1.6. Esquema general de preparación de los derivados de 4*H*-pirazol.

Tabla 4.1.4. Resultados de síntesis para la obtención del **compuesto 9**

PRODUCTO	CONDICIONES DE LAS REACCIONES	RESULTADOS
4-(tiofen-3-il-metilen)-4 <i>H</i> -pirazol-3,5-diamina (compuesto 9)	triethylamina (cantidades catalíticas), EtOH, reflujo 5,5 horas	No se obtiene el producto de interés
	EtOH, reflujo 3 horas	El producto de interés se obtiene con un 11 % de rendimiento después de que se purifica por CC (sílica, EP:AcOEt de 9:1 a 8:2)
(<i>E</i>)-4-[3-(furan-2-il)propeniliden]-4 <i>H</i> -pirazol-3,5-diamina	EtOH, reflujo 3 horas	Se purifica la mezcla de reacción por CC (sílica, EP:AcOEt de 9:1 a 8:2). Pero los resultados espectroscópicos muestran la no formación del producto deseado

A partir de algunas arilidenonas se procede a preparar los derivados de piperidin-4-ona (Figura 4.1.7). Así, por reacción a temperatura ambiente, en etanol como disolvente, se combinan las arilidenonas **1d1** o **3d1** con *N*-metilamina (XIII) para dar los productos de interés (Tabla 4.1.5).

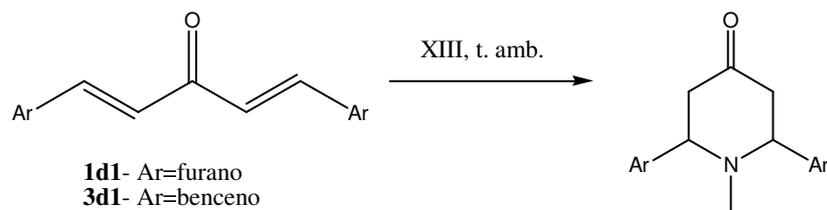


Figura 4.1.7. Reacción para la obtención de piperidin-4-onas.

Tabla 4.1.5. Resultado de la síntesis de los derivados pertenecientes a las familias 2, 3, 4 y 5.

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Nombre
8		75	dibenciltiourea
9		11	4-(tiofen-3-il-metilen)-4H-pirazol-3,5-diamina
10		17	2,6-di(furan-2-il)-1-metilpiperidin-4-ona
11		43	1-metil-2,6-difenilpiperidin-4-ona

Para la obtención de los compuestos **6d1**, **6d2**, **9** y **10** en estado puro fue necesario realizar purificación cromatográfica, por CC, utilizando como fase móvil mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (Ep:AcOEt en gradiente desde 9:1 a 8:2). Los demás productos precipitan en el medio de reacción, obteniéndose en estado puro, en algunos casos fue necesaria una recrystalización de etanol como técnica de purificación.

La elucidación estructural de los compuestos se realizó combinando varias técnicas espectroscópicas ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear, COSY, HSQC y HMBC y espectrometría de masas⁷⁶.

A continuación, a modo de ejemplo, se presenta el análisis de la espectroscopía de **1d1**.

En la figura 4.1.8 se muestra el espectro de ^1H -RMN de **1d1**, donde se muestra las señales características de los protones del grupo furilo, que se marcan en naranja, azul y amarillo, y los

protones olefínicos, que se marcan en violeta y verde, con constantes de acoplamiento, 15,6 y 15,9 Hz, que indican la distribución *E* de la insaturación.

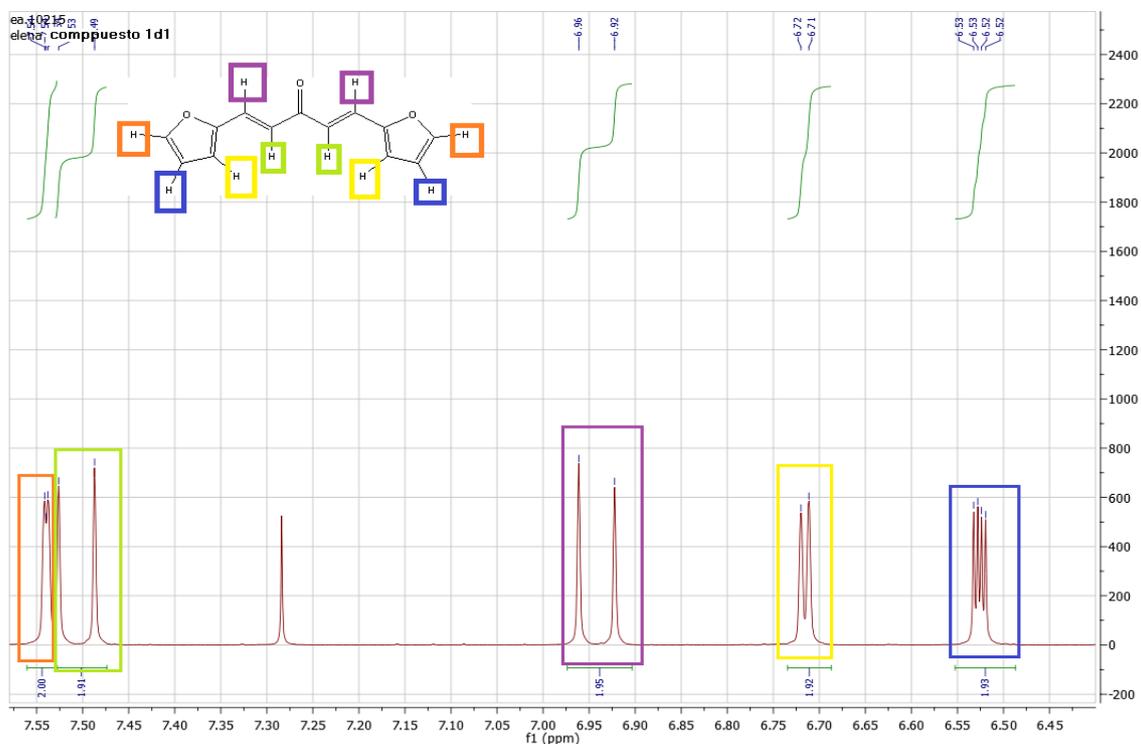


Figura 4.1.8. Espectro ^1H -RMN del compuesto **1d1** en CDCl_3 adquiridos a 25°C .

Como se muestra en la figura 4.1.8 la señal remarcada en naranja se corresponde con aquellos protones que pertenecen al sustituyente furilo y se encuentran más cercanos al oxígeno. Con un desplazamiento de 7,54 ppm se encuentran enlazados a carbonos que presentan desplazamientos de 145 ppm (figura 4.1.9). La asignación de estos protones resultó del experimento de HMBC (figura 4.1.10), el cual permite analizar correlaciones a largas distancias, por lo tanto se pueden identificar los carbonos que no se encuentran enlazados directamente a un protón. Los protones en azul del furilo se encuentran enlazados a un carbono que presenta un desplazamiento de 116 ppm, por otro lado los protones en amarillo se encuentran enlazados a un carbono que presenta un desplazamiento de 112 ppm. Los protones que se encuentran en violeta y verde pertenecientes al doble enlace se encuentran enlazados a carbonos que presentan desplazamientos de 124 ppm y 129 ppm, respectivamente.

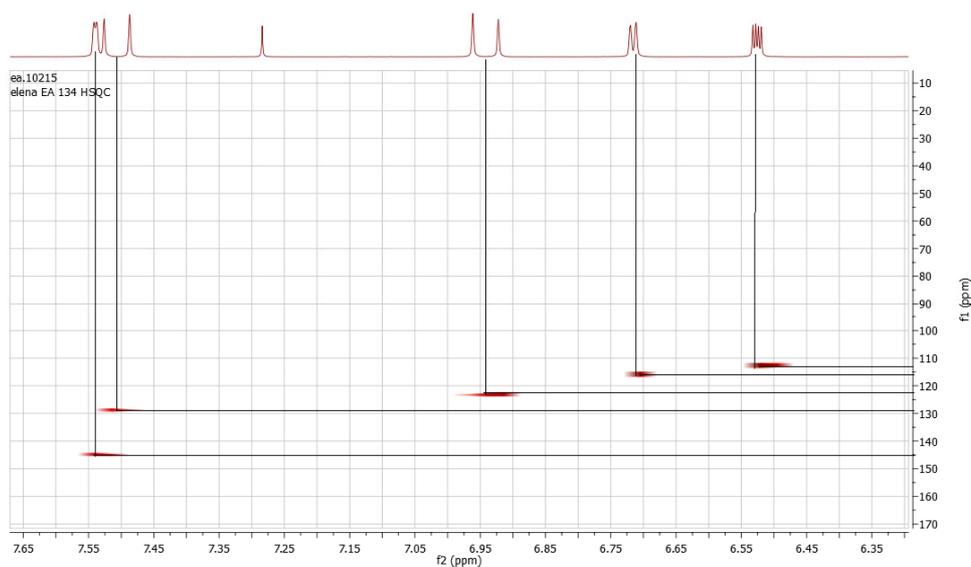


Figura 4.1.9. Resultado del experimento de correlación heteronuclear a un enlace de distancia (HSQC) del compuesto **1d1**. Las líneas coloreadas indican correlaciones a un enlace.

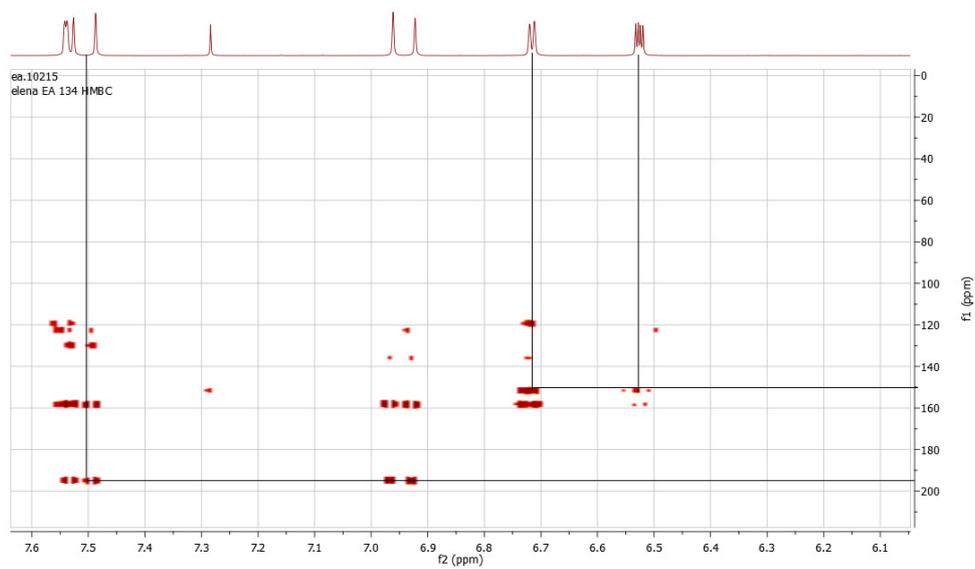


Figura 4.1.10. Resultado del experimento de correlación heteronuclear a larga distancia (HMBC) del compuesto **1d1**. Las líneas coloreadas indican correlaciones a dos enlaces.

El experimento de correlación homonuclear COSY, permite estudiar la conectividad de una molécula mediante la determinación del acoplamiento escalar protón – protón.

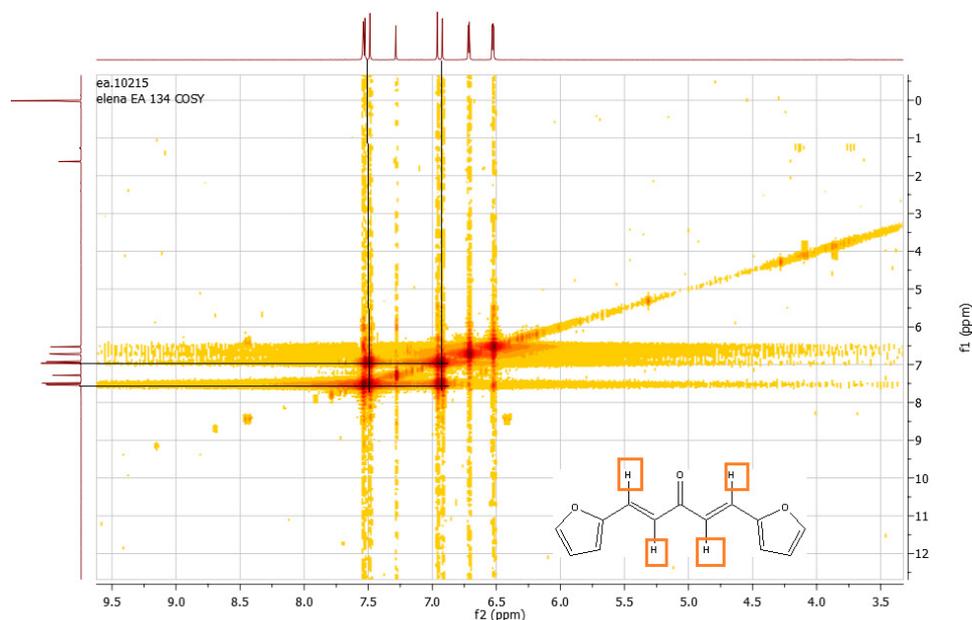


Figura 4.1.11. Resultado del experimento de correlación homonuclear (COSY) del compuesto **1d1**. En naranja se muestran las correlaciones y sus respectivos protones en la molécula.

En cuanto a la espectrometría de masas se utilizará como ejemplo los resultados obtenidos con el derivado **1d1**.

Como se puede observar en la figura 4.1.12, está presente un ion de relación m/z 214 que corresponde al ión molecular (M^+). Además, están presentes iones de relación m/z 121 y 93 que evidencian fragmentaciones completamente esperables para cetonas, fragmentaciones en α y β .

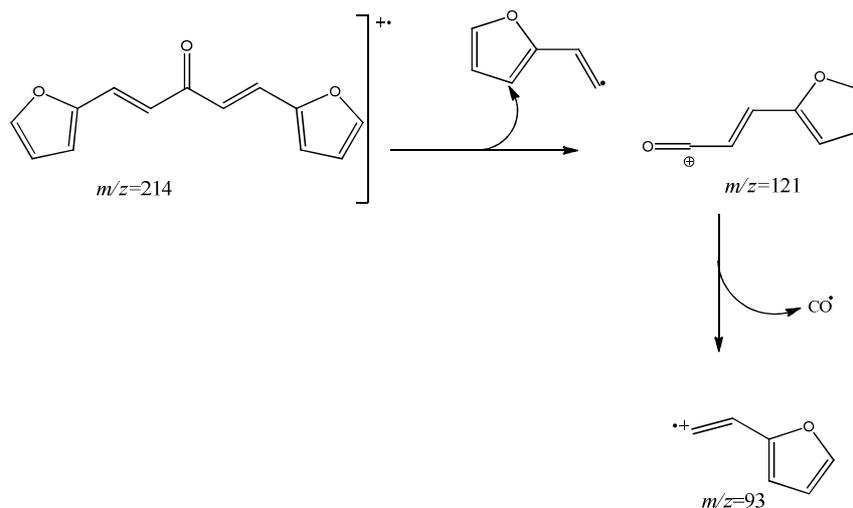


Figura 4.1.12. Análisis de las fragmentaciones posibles observadas en la espectrometría de masas para el compuesto **1d1**.

4.2. Estudio de la simetría de los derivados **4d1** y **6d1**

4.2.1. Cálculos teóricos

Dado que las actividades biológicas de los compuestos desarrollados parecen estar relacionadas con las simetrías de las moléculas (ver sección 4.3), resultó interesante que los homólogos **4d1** y **6d1** presentasen actividades biológicas muy disímiles (muy activo **4d1** e inactivo **6d1**, ver sección 4.3). Por otro lado, analizando la serie completa de arilidenonas desarrolladas se observó que la actividad biológica, frente al parásito, podría estar relacionada con la simetría estructural en las mismas.

Dado que la espectroscopía convencional, ^1H - y ^{13}C -RMN, no permitía definir para **4d1** y **6d1** la configuración a nivel de los dobles enlaces, los compuestos podían haberse obtenido como el isómero *E,E*, el isómero *E,Z* o el isómero *Z,Z*, generando en cada caso situaciones muy diferentes en cuanto a la simetría molecular (Figura 4.2.1).

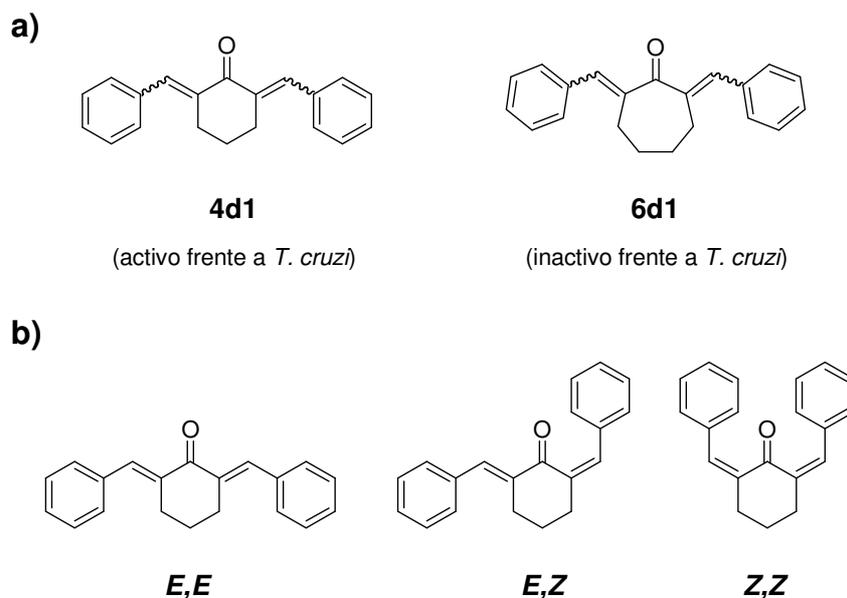


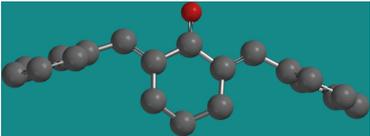
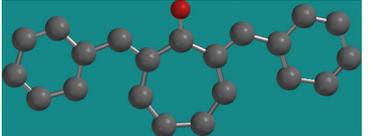
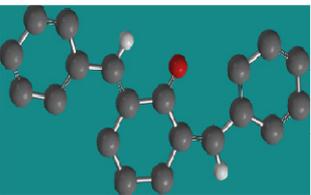
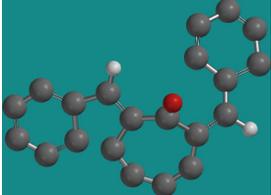
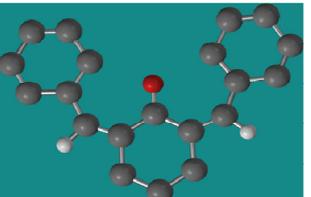
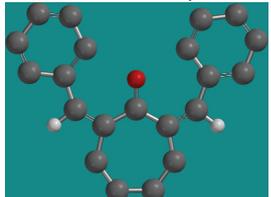
Figura 4.2.1. a) Arilidenonas homólogas con comportamiento biológico disímil. b) Posibles situaciones isoméricas a obtenerse, mostradas para el derivado **4d1**.

Para definir el isómero que se genera experimentalmente se procedió, en primera instancia, a realizar un cálculo teórico que diera muestra de la estabilidad y simetría de las distintas situaciones posibles a obtener.

Para ello, se realizó una búsqueda conformacional para cada uno de los isómeros, in vacuo, a nivel semiempírico (AM1) y posteriormente sobre el confórmero se determinó la energía a nivel DFT

(B3LYP)^{71 72 73 74 75}. En la Tabla 4.2.1 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los isómeros de cada uno de los compuestos

Tabla 4.2.1. Energías teóricas de los conformeros para los posibles isómeros de 4d1 y 6d1 calculados a nivel AM1/B3LYP.

Estructura del conformero	Energía del conformero	Estructura del conformero	Energía del conformero
(2E,6E)-2,6-dibencilidenciclohexanona 	-848,166 au	(2E,6E)-2,6-dibencilidencicloheptanona 	-874,076 au
(2E,6Z)-2,6-dibencilidenciclohexanona 	-837,422 au	(2E,6Z)-2,6-dibencilidencicloheptanona 	-875,765 au
(2Z,6Z)-2,6-dibencilidenciclohexanona 	-837,386 au	(2Z,6Z)-2,6-dibencilidencicloheptanona 	-875,394 au

Se puede observar que de los distintos isómeros de 2,6-dibencilidenciclohexanona el (2E,6E) es el más estable, menor energía. Sin embargo para los isómeros de 2,6-dibencilidencicloheptanona el (2E,6Z) resulta ser el más estable.

El resultado con el derivado de cicloheptanona no sigue los conceptos generales de estabilidad de alquenos, o sea que la forma *E* sea más estable que la *Z*. Por ello se recurre a determinar experimentalmente el isómero presente en cada caso.

4.2.2. Caracterización isomérica, por experimentos NOESY, de los derivados 4d1 y 6d1

Los experimentos de NOESY son útiles para conocer los acoplamientos espaciales, que son los que se quieren evidenciar en este tipo de derivados, ya que los protones olefínicos, que pueden dar cuenta de la isomería presente, aparecen como singuletes por tratarse de alquenos trisustituídos. En un

experimento de NOESY los protones olefinicos de los potenciales isómeros poseerán diferentes comportamientos (Figura 4.2.2), así por ejemplo la presencia de una isomería *Z* mostrará un resultado positivo de acoplamiento especial de dichos protones con los metilenos del ciclo (Figura 4.2.2 a)). Por otro lado, este experimento permitirá confirmar si la distribución espacial en disolución es la misma que la obtenida por los cálculos teóricos, a saber: estructura plana (izquierda en la Figura 4.2.2 b) o estructura “mariposa” (derecha en la Figura 4.2.2 b)).

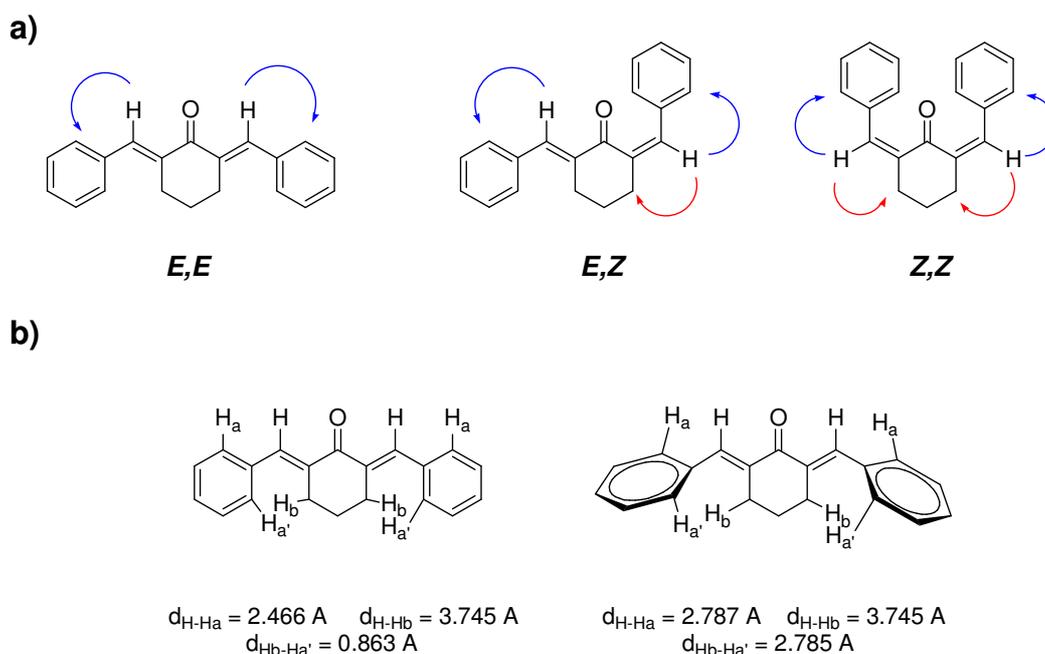


Figura 4.2.2. a) Posibles resultados de los experimentos NOESY, para el derivado **4d1**, que permitirían determinar el isómero presente. **b)** Posibles situaciones espaciales, plana (izquierda) y “mariposa” (derecha), mostradas para el derivado **4d1**. Las distancias inter-atómicas (en Å) son las generadas en el cálculo teórico (AM1) para cada una de las situaciones.

Los resultados del experimento NOESY, con un tiempo de mezclado de 250 ms, para el derivado **4d1** muestran claramente que los protones olefinicos no poseen acoplamientos espaciales alguno (Figura 4.2.3). Esto está mostrando que las distancias desde el protón olefínico a los protones en *orto* del grupo fenilo (H_a , Figura 4.2.2 b)) o a los protones metilénicos del sistema cíclico (H_b , Figura 4.2.2 b)) son lo suficientemente grandes como para no ser detectadas. Por lo que permitiría confirmar que en disolución existe la misma estructura de mínima energía que la generada en los cálculos teóricos, estructura “mariposa” (Tabla 4.2.1).

Similarmente, para el derivado **6d1** se observa (Figura 4.2.4) que en disolución no aparecen señales de acoplamiento espacial, lo que estaría indicando, también en este caso, que la forma predominante por este compuesto es una forma tipo “mariposa” del isómero *E,E*.

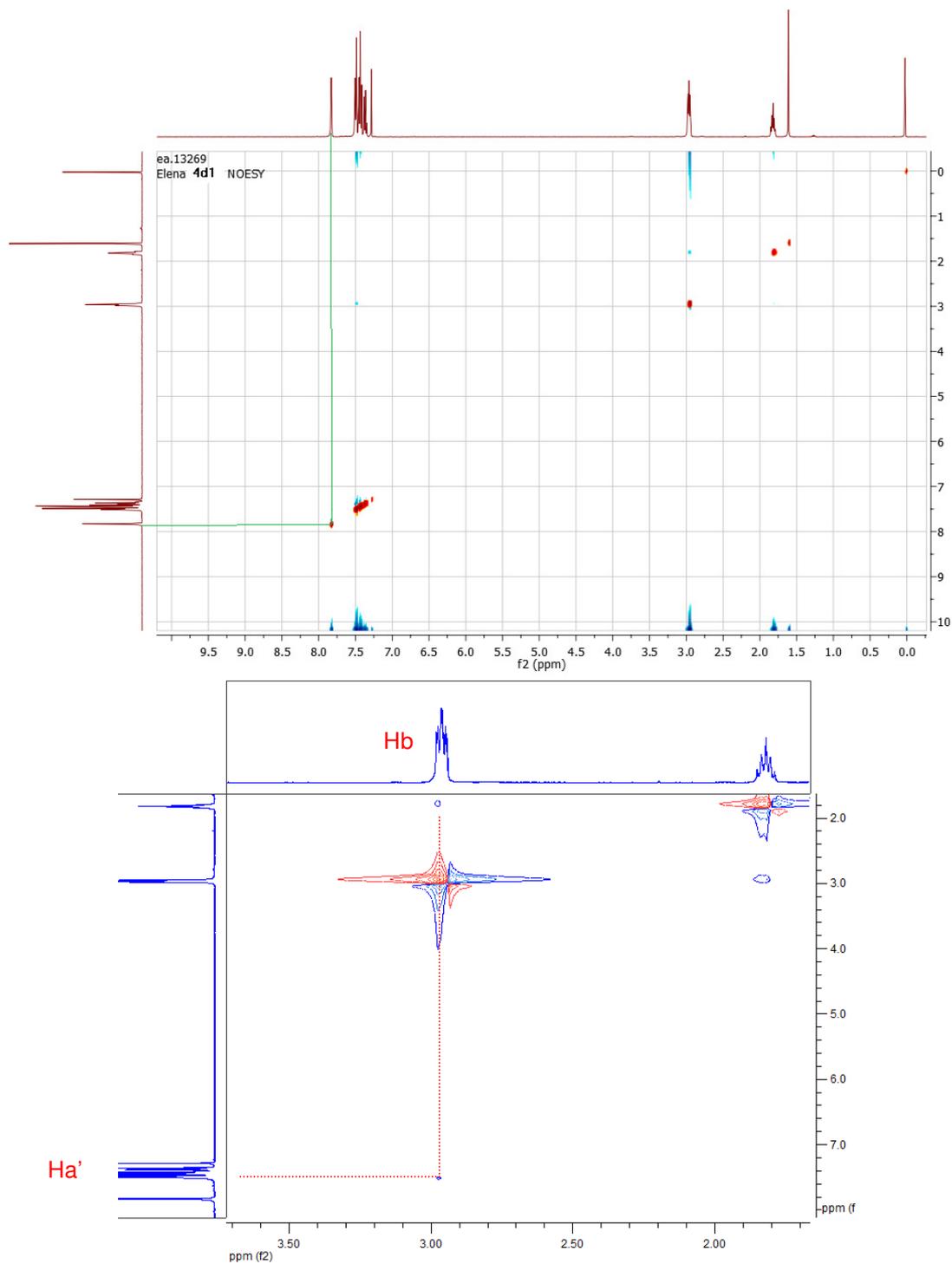


Figura 4.2.3. Espectro NOESY para el compuesto **4d1**.

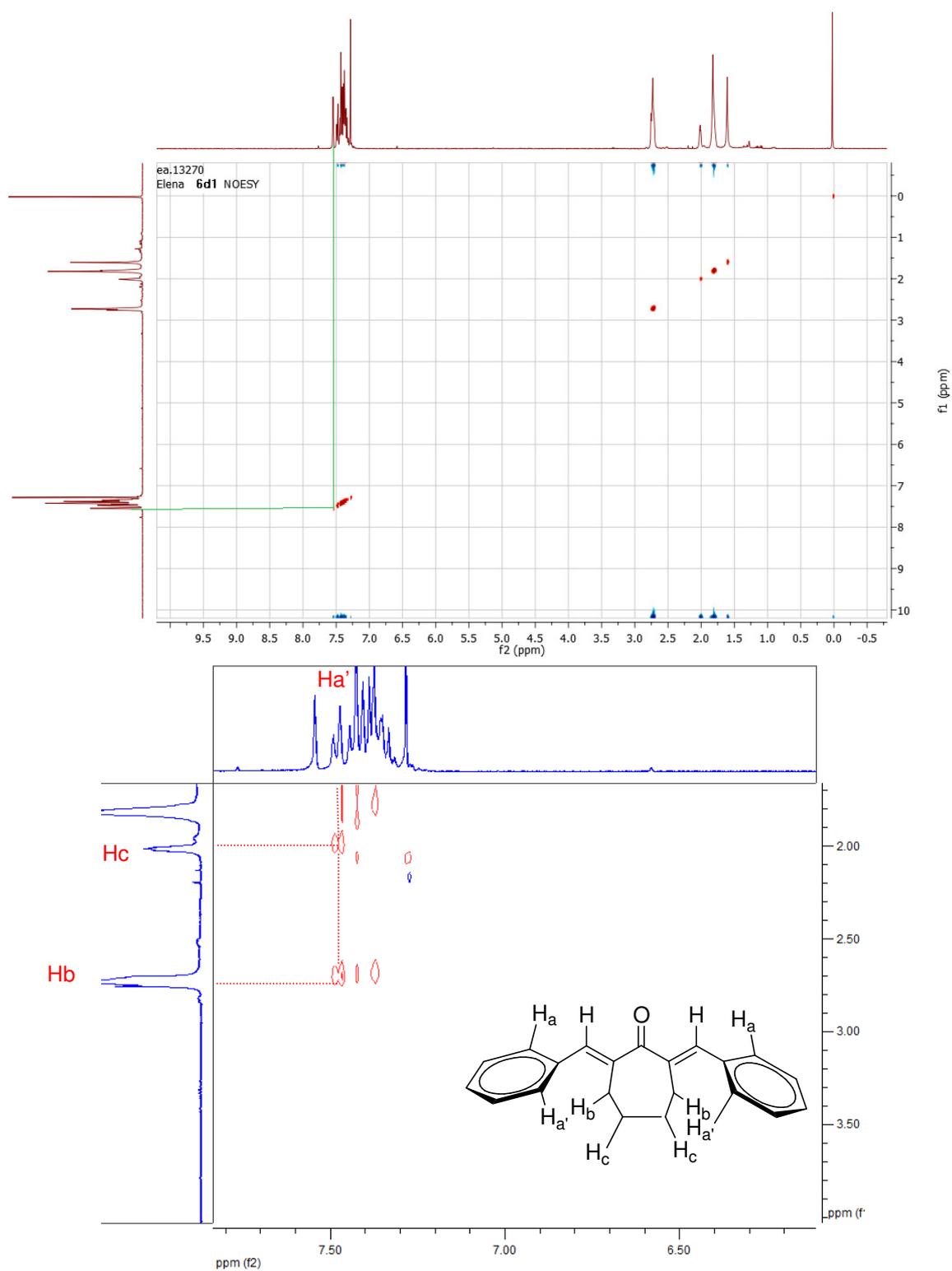


Figura 4.2.4. Espectro NOESY para el compuesto **6d1**.

Todos los resultados permiten concluir que la forma generada, en los compuestos **4d1** y **6d1**, es la del isómero *E,E*.

Si se vuelve a analizar los confórmeros de ambos derivados (Figura 4.2.5) es posible visualizar la falta de simetría en el derivado de cicloheptano, pudiendo reafirmar la justificación para la diferencia de bioactividad en los mismos.

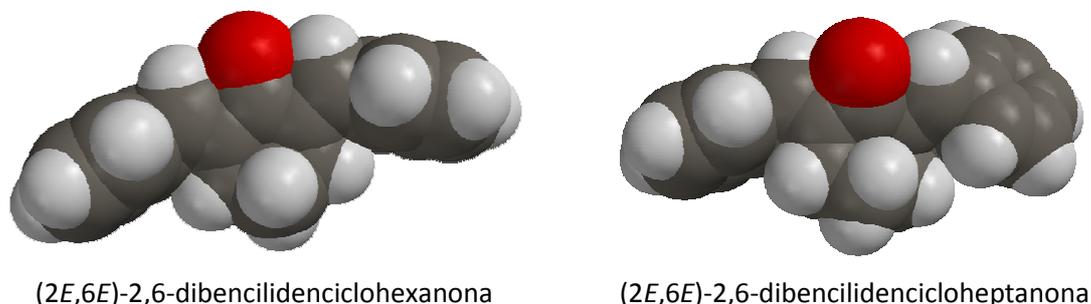


Figura 4.2.5. Confórmeros de los derivados **4d1** y **6d1**, representados en radios de van der Waals, donde se evidencia la pérdida de la simetría para el compuesto (2E,6E)-2,6-dibencilidencicloheptanona, no siendo así para (2E,6E)-2,6-dibencilidenciclohexanona.

4.3. Biología

4.3.1. Evaluación de la actividad frente a *T. cruzi*

Se estudia la actividad de los derivados, sintetizados en el presente trabajo de tesina, frente a *T. cruzi* como forma de reconocer su potencial actividad como agentes antichagásicos.

Para ello, se trabaja con la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2. En primera instancia se determina el porcentaje de inhibición del crecimiento (PI) a una concentración fija de 25 μM de un cultivo de 5 días de crecimiento y luego, para aquellos compuestos con actividad apreciable en dichas condiciones, se trabaja a concentraciones variables para determinar el IC_{50} de cada compuesto. Este último corresponde a la concentración necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento de los parásitos^{77 78} (Tabla 4.3.1).

Observando los resultados biológicos y haciendo un análisis de las diferentes estructuras, se pueden extraer ciertas observaciones relevantes.

Los derivados **1d2**, **2d1**, **3d1** y **4d1** son más activos que Nfx ya que poseen menor IC_{50} . Por lo que las arilidenonas resultan ser los derivados más activos de los desarrollados en este trabajo.

Tabla 4.3.1. Actividad antiproliferativa de los derivados desarrollados sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*.

Compuesto	PI (%) ^a a 25µM	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> ^b (µM)	IC ₅₀ J774 ^c (µM)	IS ^d
1d1	54,6±2,2	23,9 ± 1,5	115 ± 6	4,8
1d2	96,3 ± 1,7	5,0 ± 0,7	60 ± 3	12
2d1	88,9 ± 0,6	5,0 ± 0,8	38 ± 4	7,6
2d2	98,4 ± 2,3	12,6 ± 1,4	188 ± 6	14,9
2d3	43,6 ± 5,1	> 25	ND	ND
3d1	97,0 ± 2,2	7,2 ± 0,8	22 ± 5	3,0
3d2	70,9 ± 1,7	11,0 ± 1,3	50 ± 5	4,5
4d1	100,0	5,1 ± 0,3	115 ± 5	22,5
4d2	66,2 ± 3,4	14,2 ± 2,7	168 ± 6	12
5	30,6 ± 0,8	> 25	ND	ND
6d1	0	> 25	ND	ND
6d2	25,6 ± 1,7	> 25	ND	ND
7d1	14,4 ± 3,4	> 25	ND	ND
7d2	23,4 ± 0,3	> 25	ND	ND
9	0	> 25	ND	ND
10	0	> 25	ND	ND
11	22,8 ± 0,4	> 25	ND	ND
Nfx^e	100 ± 9	8 ± 1	316	39,5

^a Porcentaje de inhibición de crecimiento a 25 µM, con su respectiva desviación estándar. ^b Concentración que inhibe el 50 % de crecimiento del parásito. ^c Concentración que inhibe el 50 % de crecimiento de macrófagos murinos J774. ^d Índice de selectividad hacia el parásito = IC₅₀ macrófagos/IC₅₀ *T. cruzi*. ^e Nifurtimox, fármaco de referencia.

Por otro lado, las arilidenonas **1d2**, **2d2**, **4d1** y **4d2** son las más selectivas hacia el parásito *T. cruzi* necesitando una dosis al menos 12 veces mayor en macrófagos murinos para generar los mismos efectos que sobre los epimastigotes (ver IS de los compuestos en verde de la Tabla 4.3.1).

Adicionalmente, como ya se mencionó anteriormente, las arilidenonas simétricas resultan ser las más activas frente a *T. cruzi*.

Dado que los derivados compuestos **9**, **10** y **11** no presentaron actividad contra el parásito no se continuó con las modificaciones sintéticas diseñadas, para generar otros derivados de 4*H*-pirazol y 4-piperidin-ona.

En general, en la serie de las arilidenonas se observa que existe una tendencia a mejorar la actividad anti-*T. cruzi* y el índice de selectividad al aumentar el número de insaturaciones.

4.3.2. Ensayo de inhibición de la TcTIM

Se estudió la inhibición, a través del ensayo enzimático convencional en la dirección gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato, de todas las arilidenonas sintetizadas y la piperidin-4-ona **11** ya que en su mayoría presentaron actividad contra *T. cruzi*. En primera instancia se evaluó la actividad a una dosis fija de 25 μ M y para aquellos compuestos que mostraron actividad a dicha dosis se realizaron estudios dosis respuesta.

A la dosis inicial de trabajo solamente tres de los derivados, dos arilidenonas y la piperidin-4-ona, mostraron ser capaces de inhibir a la enzima del parásito (Tabla 4.3.2).

La arilidenona **1d2** mostró una excelente actividad por lo que fue estudiada a otras dosis, resultando ser un potente inhibidor de la enzima de *T. cruzi* con $IC_{50} = 1,2 \mu$ M (Figura 4.3.1), no inhibiendo a la TIM humana aún a una concentración de 100 μ M. Esto muestra una relevante selectividad hacia la enzima parasitaria. Las demás arilidenonas, no mostradas en la Tabla 4.3.2, no inhibieron a 25 μ M a TcTIM, por lo que su IC_{50} es mayor a 25 μ M.

Tabla 4.3.2. Actividad específica de TcTIM salvaje en los distintos tratamientos.

Compuesto ^a	AE (%) ^b
1d1	75
1d2	13
11	91
Control^c	100

^a Los compuestos fueron evaluados a 25 μ M. ^b Actividad específica de la enzima, expresada como porcentaje respecto a la enzima salvaje sin tratamiento. ^c Enzima sin tratamiento.

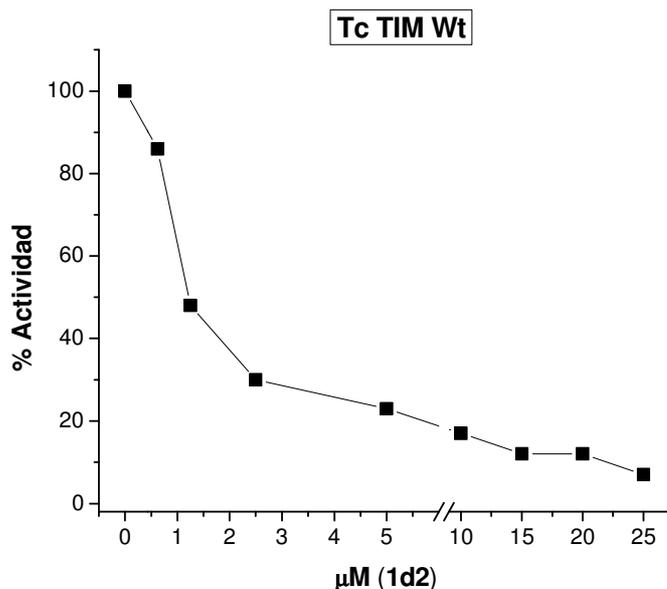


Figura 4.3.1. Actividad de la enzima TcTIM vs concentración de 1d2.

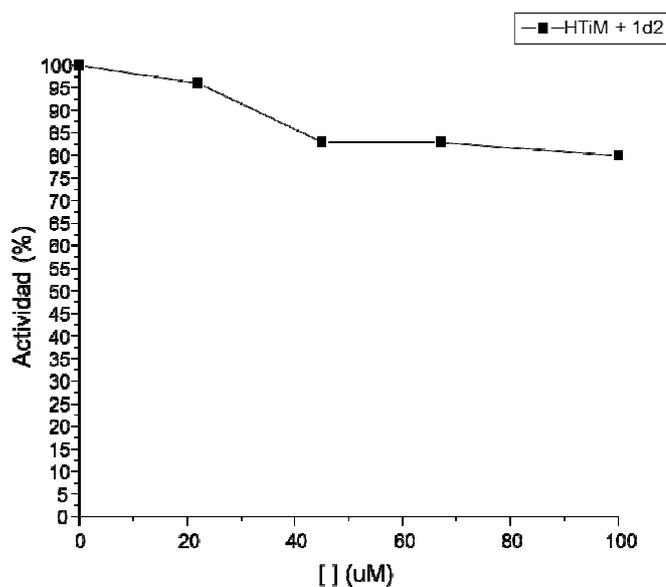


Figura 4.3.2. Actividad de la enzima HTiM vs concentración de 1d2.

4.4. Estudios de docking para los derivados 1d1 y 1d2 sobre TcTIM y HTiM

Debido a los resultados particulares que se obtuvieron en los ensayos de inhibición de TcTIM y HTiM, por ejemplo que el derivado **1d2** inhibiese a la enzima TcTIM ($IC_{50}=1,2\mu M$) mientras que el derivado **1d1** fuese un muy moderado inhibidor de TcTIM se decide estudiar el fenómeno de interacción de estos compuestos con la biomolécula a través de cálculos teóricos, por técnicas del docking molecular.

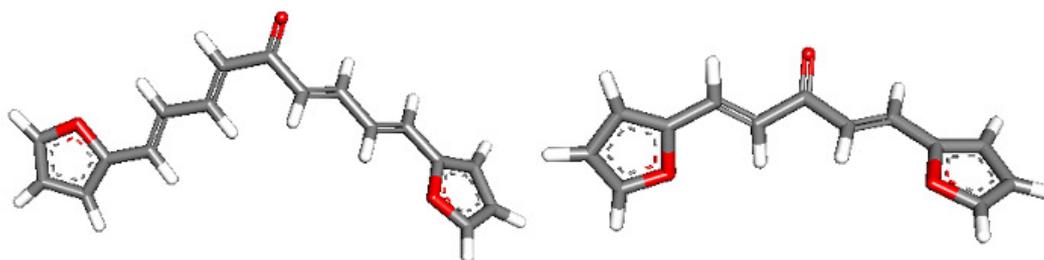


Figura 4.4.1. Estructuras, de **1d2** (izquierda) y de **1d1** (derecha), utilizadas para los estudios de docking molecular.

Mediante el cálculo de *docking* se pudo confirmar que el derivado **1d2** interacciona con los aminoácidos de la interfaz de la proteína (Figura 4.4.2 A)), ampliamente reconocidos como fundamentales para la integridad y actividad de la enzima³², por tanto este resultado explicaría la actividad del compuesto. Por otra parte, es posible explicar la baja actividad del derivado **1d1** (Figura 4.4.2 B)) debido a que este compuesto interacciona con la biomolécula en un sitio lejano a la interfaz o al sitio activo.

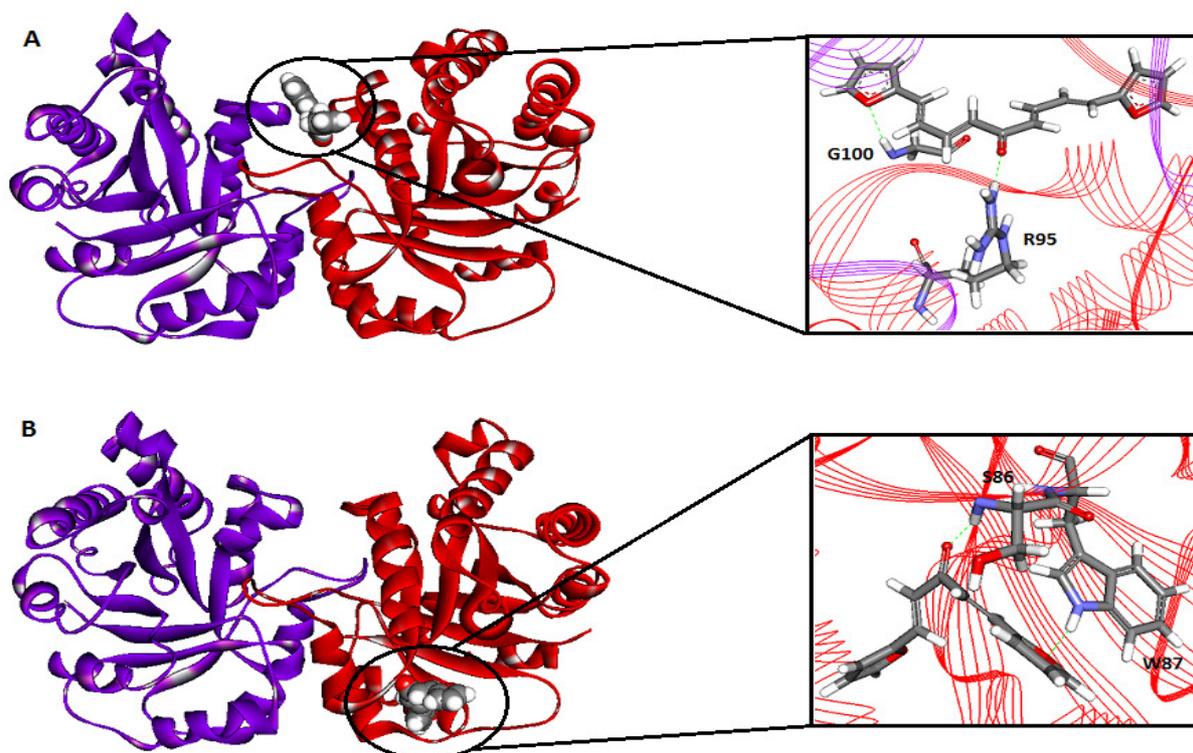


Figura 4.4.2. Cálculo teórico de interacción del compuesto **1d2** (A) y **1d1** (B) con TctIM.

Mediante este tipo de cálculos también es posible explicar porque **1d2** no es activo en HTIM. Como es posible observar en la Figura 4.4.3 el derivado **1d2** interacciona con la biomolécula en otro sitio diferente de aquellos responsables de la respuesta biológica de la misma.

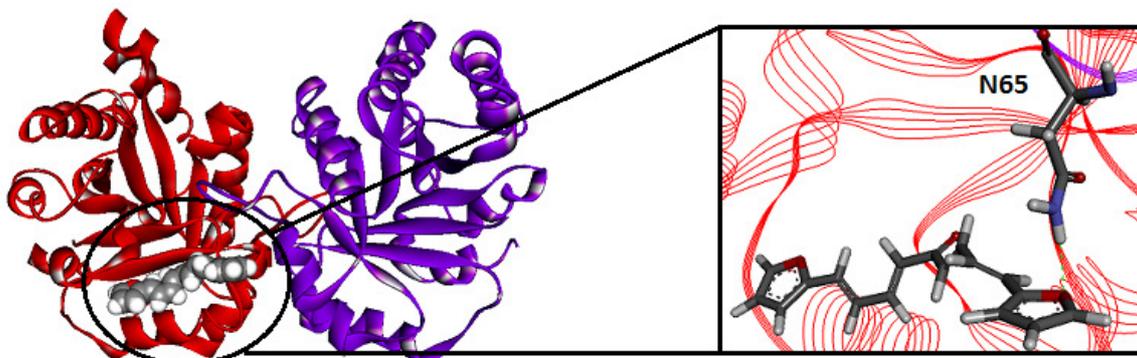


Figura 4.4.3. Cálculo teórico de interacción del compuesto **1d2** con HTIM.

4.5. Estudio de la excreción de metabolitos por *T. cruzi* utilizando ^1H -RMN

Dado que el compuesto **1d2** resultó ser activo sobre el parásito entero *T. cruzi*, pero además es un excelente inhibidor, *in vitro*, de la enzima TcTIM se decidió estudiar si este es el principal mecanismo de acción de dicho compuesto.

Para ello, se procedió a realizar un ensayo donde se pudiese analizar el cambio del perfil metabólico cuando *T. cruzi* es expuesto al compuesto **1d2**. La enzima TcTIM localizada en el glicosoma tiene incidencia en los niveles de ciertos metabolitos tales como piruvato (Pyr), lactato (Lac), alanina (Ala), acetato (Ace) y succinato (Succ) (Figura 1.1.5) por lo que si **1d2** inhibiese en el parásito a dicha enzima se debería notar un cambio en el perfil metabólico.

Una técnica de cuantificación de metabolitos excretados al medio de cultivo es a través de ^1H -RMN, técnica implementada recientemente en nuestro grupo de investigación³⁰. La misma es sencilla ya que, a diferencia de las técnicas bioquímicas estándares, en un solo experimento se pueden identificar todos los metabolitos excretados. El procedimiento consiste en analizar por ^1H -RMN las señales de los metabolitos excretados al medio de cultivo por los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y. Los metabolitos analizados son: glicina (Gly), Succ, Pyr, Ace, Ala, Lac y etanol (EtOH) y las características de las señales son:

Señales de metabolitos identificados en el medio de cultivo para epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y

	Gly	Succ	Pyr	Ace	Ala	Lac	EtOH
δ^a (ppm)	3,547	2,391	2,358	2,121	1,465	1,316	1,170
Multiplicidad	s ^d	s	S	s	d ^e	d	t ^f
Rango de integración	3,552 a 3,542	2,402 a 2,376	2,367 a 2,347	2,124 a 2,117	1,488 a 1,436	1,338 a 1,296	1,198 a 1,136
J (Hz) ^b	- ^c	-	-	-	7,24	6,85	7,08

^a Los valores de δ (desplazamiento químico) presentan un error de $\pm 0,002$. ^b Los valores de J (constante de acoplamiento) presentan un error de $\pm 0,03$. ^c No acopla. ^d Singulete. ^e Doblete. ^f Triplete.

Es sabido de estudios previos que los principales metabolitos identificados en condiciones normales en cultivos de *T. cruzi*, por ¹H-RMN, son carboxilatos (Ace, Lac, Pyr, Succ) y aminoácidos (Ala y Gly)²⁷. Por lo que, en esta tesis de grado se realizarán controles de medio de cultivo con DMSO para determinar la composición de los metabolitos en el sistema de trabajo, controles de los parásitos sin tratamiento para conocer la excreción normal y parásitos tratados con los derivados **1d1** y **1d2** para indagar si afectan o no en las vías metabólicas de *T. cruzi*.

En la Tabla 4.5.1 se muestran los resultados de dichos estudios. Como se puede observar para ambos derivados, no existen cambios estadísticamente significativos, según test *t-student*, con $p < 0,05$. Sin embargo, en el caso del tratamiento con **1d2** se observa, con $p < 0,15$, una diferencia estadísticamente válida en la cantidad de succinato excretado con respecto al mismo valor para los parásitos sin tratamiento.

Tabla 4.5.1. Perfil de metabolitos excretados por *T. cruzi* sin o con tratamientos de **1d1** y **1d2**.

Compuesto\metabolito	Gly	Succ	Pyr	Ace	Ala	Lac
1d1^a	3,17 \pm 0,43	7,40 \pm 0,83	18,98 \pm 0,49	25,62 \pm 4,00	22,36 \pm 3,87	13,54 \pm 4,68

<i>T. cruzi</i> sin tratamiento	3,17 \pm 0,51	7,62 \pm 1,30	18,28 \pm 1,03	26,15 \pm 3,25	22,67 \pm 3,20	13,26 \pm 5,15
---------------------------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------

^a n=2. Todos los resultados no son significativamente diferentes respecto a *T. cruzi* sin tratamiento (test *t-student*).

Compuesto\metabolito	Gly	Succ	Pyr	Ace	Ala	Lac
1d2^a	3,00 \pm 0,45	7,25 \pm 1,16*	18,16 \pm 1,31	25,36 \pm 3,04	21,92 \pm 3,38	12,12 \pm 4,34

<i>T. cruzi</i> sin tratamiento	3,07 \pm 0,40	7,69 \pm 0,93	18,00 \pm 0,87	25,11 \pm 2,96	22,05 \pm 2,79	12,20 \pm 4,08
---------------------------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------

^a n=3. *significativamente diferente que el *T. cruzi* sin tratamiento para $p < 0,15$ (test *t-student*).

pipeline de los estudios pre-clínicos, se decide realizar este estudio para el derivado más prometedor, **1d2**.

Para ello, se realizaron estudios de mutagenicidad *in vitro* mediante test de Ames⁶⁹. En este ensayo, con *S. typhimurium* cepa TA98 (hisD3052, dependiente de histidina), un compuesto se considera mutagénico cuando el número de colonias revertientes (mutadas) duplica el número de colonias naturalmente revertientes (control negativo) al menos en dos niveles de dosis consecutivas y además hay un efecto dosis-respuesta. Además, para tener en cuenta el potencial mutagénico de productos de metabolización hepática se realiza en ensayo en presencia de fracción S9 de hepatocitos de rata.

Como se observa en la Tabla 4.6.1. **1d2** no es mutagénico, en esta cepa y en ninguna de las dos condiciones, ya que la cantidad de colonias revertientes es casi igual al control negativo y no se observa efecto dosis-respuesta.

Tabla 4.6.1. Test de Ames utilizando la cepa TA98 de *S. typhimurium* en ausencia y en presencia de activación metabólica para el compuesto **1d2**.

COMPUESTO	[µg/placa	PBS	S9
Control (+)NPD		840	
Control (-)PBB		12,7±3,7	
Control (+)2AF			594
Control (-)S9			8±1
1d2	0,2	8,5±3,5	8,5±2,1
	0,067	11,0±1,4	15,0±8,5
	0,022	9,5±2,1	12,5±,1
	0,007	10,5±0,7	11,5±3,5
	0,002	11,0±1,4	7,0±1,4
Nfx¹⁸	0,0	21±4	31±10
	0,5	29±6	37±5
	1,0	43±17	39±18
	3,0	62±2	53±9
	10,0	144±11	64±6
	30,0	117±17	139±11
Bnz¹⁸	0,0	21±4	31±10
	62,0	56±1	65±9
	185,0	77±6	83±5
	556,0	115±8	151±2
	1667,0	232±2	192±10
	5000,0	254±103	309±3

Este promisorio resultado, que debe ser completado con las restantes cepas recomendadas por la O.E.C.D⁶⁸, ubica al compuesto **1d2** en un buen sitio para continuar sus estudios pre-clínicos como potencial agente antichagásico.

5.1. Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron once compuestos derivados de arilidenonas, un compuesto derivado de tiourea, un compuesto derivado de 4*H*-pirazol y dos compuestos derivados de 4-piperidona tomando como referencia los antecedentes del grupo y realizando cambios estructurales a partir de los resultados biológicos que se generaron durante el trabajo.

De los derivados de arilidenonas, se destacan los compuestos **1d2**, **2d1** y **4d1** que presentan una IC_{50} frente a *T. cruzi* próxima a 5 μ M. A su vez se obtuvieron otros derivados de arilidenonas que presentaron actividad intermedia frente a *T. cruzi* como el compuesto **1d1** (IC_{50} = 23,9 μ M), **2d2** (IC_{50} = 12,6 μ M), **3d1** (IC_{50} = 7,6 μ M), **3d2** (IC_{50} = 11 μ M), **4d2** (IC_{50} = 14,2 μ M) (Figura 5.1.1).

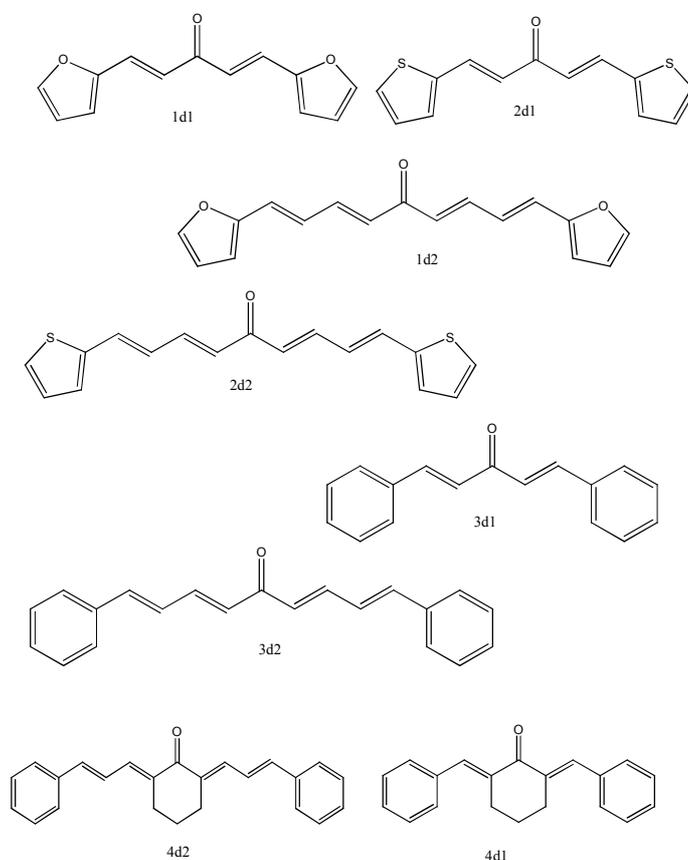


Figura 5.1.1. Estructura de los compuestos activos frente a *T. cruzi* desarrollados en este trabajo.

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad en la línea celular de macrófagos murinos J774 con aquellos compuestos que resultaron activos frente a *T. cruzi* y de esta manera se pudo obtener un índice de selectividad de cada compuesto. Resultando los derivados **4d1** (índice de selectividad = 22,5), **4d2** (índice de selectividad = 14,9), **2d2** (índice de selectividad = 12,0) y **1d2** (índice de selectividad = 12,0) citotóxicos para el parásito en una dosis más de diez veces menor que para las

células mamíferas. Con respecto al derivado **4d2** resultó ser más de 20 veces más activos frente a *T. cruzi* que a macrófagos murinos.

Como método de evaluación de los compuestos frente a TcTIM se realizó el ensayo convencional de inhibición de catálisis enzimática. El derivado **1d2** mostró excelentes resultados en la inhibición de la enzima con un $IC_{50} = 1,2 \mu M$. El mismo presenta un agrupamiento sencillo cetónico conectado a través de dos dobles enlaces a grupos aromáticos (furilo).

Los estudios de *docking* para los derivados **1d1** y **1d2** confirman el hecho de que un compuesto inhiba la actividad de la enzima triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* y el otro no. El compuesto **1d1** no interacciona con la interfaz ni el sitio activo de la enzima, por lo contrario el derivado **1d2** interacciona con la interfaz, no mostrando una interacción disruptora de la TIM de *homo sapiens*.

Los estudios de metabolitos excretados por el parásito en presencia de **1d2** podrían estar indicando que este mecanismo es operativo en el parásito entero.

Las otras arilidenonas con buena actividad tripanosomicida que no inhibieron la actividad de TcTIM (**1d1**, **2d1**, **3d1**, **3d2**, **4d1** y **4d2**) estarán actuando por otro mecanismo de acción con diferente blanco dentro del parásito.

Adicionalmente, el derivado **1d2** es no mutagénico frente a *S. typhimurium* cepa TA98 en ausencia y presencia de sistemas metabolizantes.

5.2. Perspectivas

Como perspectivas principales que derivan del presente trabajo se plantean las siguientes:

- Continuar con el trabajo sintético de los derivados de arilidenonas aumentando la diversidad estructural modificando los sustituyentes de modo de generar compuestos más compatibles con estructuras de fármacos.
- Continuar con la evaluación de la mutagenicidad de los compuestos que resultaron activos frente a *T. cruzi*; aplicando el test de Ames, y completando las cepas recomendadas en las ordenanzas.
- Evaluar los compuestos activos y no tóxicos en un modelo murino *in vivo* y agudo de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>
- ² Salvatella R., Gonzalez, J. Reservorios animales de *T. cruzi* en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay* **1986**, 2: 101 – 105.
- ³ Neghme A. Hipotesis acerca de la evolucion de la tripanosomiasis americana. *Parasitología al Día* **1982**, 6: 23 – 25.
- ⁴ Usinger R., Wygodzinsky P., Rycknran R. The biosystematics of Triatomine. *Ann. Rev. Entomol.* **1966**, 2: 309 – 330.
- ⁵ Lugones HS. Consideraciones acerca de los síntomas del período agudo de la Enfermedad de Chagas aguda. *Segundo Simposio Internacional de Enfermedad de Chagas* **1970**, 9: 331
- ⁶ Lugones HS. Consideraciones acerca de los síntomas del período agudo de la Enfermedad de Chagas en la infancia. *AAnais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas* **1959**; Río de Janeiro, Brasil; 861
- ⁷ Mazza S., Freire R. Manifestaciones cutáneas en Enfermedad de Chagas. *Chagoma de Inoculación, Chagomas Metastásicos y Chagomas Hematógenos. Rev. MEPRA* **1940**; 46: 3-38.
- ⁸ Romaña C. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires; *López Libreros Editores*; 1963
- ⁹ Lugones H. Chagas agudo: situación actual (conferencia). 1° Simposio virtual de Enfermedad de Chagas. Federación Argentina de Cardiología; **1999**. Disponible en URL: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas/c03lugon/c031lugon/c03lugon.htm>.
- ¹⁰ Usinger R., Wygodzinsky P., Rycknran R. The biosystematics of Triatomine. *Ann. Rev. Entomol.* **1966**, 2: 309 – 330.
- ¹¹ Cerecetto, H., González, M. Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments. *Curr. Trop. Med. Chem.* **2002**, 2: 1187-1213.
- ¹² Cerecetto, H., González, M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' Disease: Compounds at the final stage of "Hit-To-Lead" phase. *Pharmaceuticals.* **2010**, 3: 810-838
- ¹³ Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, I., Solórzano, F., Miranda, G. *Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)*. 17ª edición, **2008**, capítulo 71.
- ¹⁴ Maya JD., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J.M., Tellez, R., Gaule, C., Morello, A. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 86: 101–106.
- ¹⁵ Hall B. S., Bot C., Wilkinson S. R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286: 13088 – 13095.
- ¹⁶ Boiani M., Piacenza L., Hernandez P., Boiani L., Cerecetto H., Gonzalez M., Denicola A. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide – containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79: 1736 – 1745.
- ¹⁷ Diaz de Toranzo E.G., Castro J.A., Franke de Cazzulo B.M., Cazzulo J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* **1988**, 44: 880 – 881.
- ¹⁸ Cabrera M., Lavaggi M.L., Hernandez P., Merlino A., Gerpe A., Porcal W., Boiani M., Ferreira A., Monge A., Lopez de Cerain A., Gonzalez M., Cerecetto H. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti – *T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicol. Lett.* **2009**, 190: 140 – 149
- ¹⁹ Gonzalez M., Cerecetto H. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. *Expert Opin. Ther Pat.* **2011**, 5: 699 – 715
- ²⁰ Rassi A. Jr, Rassi A., Marin-Neto J.A. Chagas disease. *The Lancet* **2010**, 375: 1388 –1402.
- ²¹ Rassi A., Rassi A. Jr, Rassi S.G. Doença de Chagas. En: Lopes AC, ed. *Tratado de clínica médica*, 2nd edition. Sao Paulo: Editora Roca **2009**, 4123 – 4134.
- ²² Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1971**, 13: 171 – 78.
- ²³ Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C., A. *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.* **2002**, 185: 401–413.
- ²⁴ Burgos, J.M., Begher, S., Freitas, J.M., Bisio, M., Duffy, T., Altchek, J., Teijeiro, R., Lopez Alcoba, H., Decarli, F., Freilij, H., Levin, M.J., Levalle, J., Macedo, A.M., Schijman, A.G. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73: 1016–1018.

- ²⁵ Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*:e24
- ²⁶ <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>
- ²⁷ Cazzulo, J.J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB Journal.* **1992**, *6*: 3153-3161.
- ²⁸ Boiani, L., Aguirre, G., González, M., Cerecetto, H., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Bertinaria, M., Guglielmo, S. Furoxan-, alkyl nitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: Mechanism of action studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*: 7900-7928.
- ²⁹ Boiani, M., Boiani, L., Merlino, A., Hernández, P., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Cerecetto, H., González, M. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: Synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*: 4426-4433.
- ³⁰ Penin, P., Sanchez-Moreno, M., de Diego J.A. Proton nuclear magnetic resonance analysis of metabolic end products of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and three of its clones. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* **1998**, *120*: 571-574.
- ³¹ Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *149*: 1-9.
- ³² Benitez, Diego. N-Óxido de heterociclos aromáticos con actividad sobre *Trypanosoma cruzi*: Aproximación al tipo de muerte celular y mecanismo de acción. Tesis de maestría, Universidad de la República, **2011**.
- ³³ Cháñez-Cárdenas, M.E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G., Costas, M., Vázquez-Contreras, E.. Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium Hydrochloride Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates. *Biochemistry* . **2005**, *44*: 10883-10892
- ³⁴ Olivares-Illana V., Rodríguez-Romero A., Becker I., Berzunza M., Garcia J., Perez- Montfort R., Cabrera N., Lopez-Calahorra F., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez-Puyou A. Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2007**, *1*: 1 – 8.
- ³⁵ Olivares-Illana V., Perez-Montfort R., Lopez-Calahorra F., Costas M, Rodríguez-Romero A., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez Puyou A. Structural Differences in Triosephosphate Isomerase from Different Species and Discovery of a Multitrypanosomatid Inhibitor. *Biochemistry* . **2006**, *45*: 2556-2560.
- ³⁶ E. Maldonado, M. Soriano-García, A. Moreno, N. Cabrera, G. Garza-Ramos, M. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, R. Perez-Montfort. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology* . **1998**, *283*: 193-203.
- ³⁷ Velanker S.S., Ray S.S., Gokhale R.S., Balaram H., Balaram P., Murthy M.R.N. Triosephosphate isomerase from *plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* **1997**, *5*: 751 – 761.
- ³⁸ Alvarez G., Aguirre-Lopez B., Varela J., Cabrera M., Merlino A., Lopez G.V, Lavaggi M.L, Porcal W., Di Maio R., Gonzalez M., Cerecetto H., Cabrera N., Perez-Montfort R., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez-Puyou A. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer – interface – irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*: 5767 – 5772.
- ³⁹ Gonzalez M., Cerecetto H. Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective. *Expert Opin. Ther Pat.* **2011**, *5*: 699 – 715
- ⁴⁰ Olivares-Illana V., Perez-Montfort R., Lopez-Calahorra F., Costas M, Rodríguez-Romero A., Tuena de Gomez-Puyou M., Gomez Puyou A. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitrypanosomatid inhibitor. *Biochem.* **2006**, *45*: 2556 – 2560
- ⁴¹ Padron J.M., Miranda P., Padrón J.I., Martín V. β' -Hydroxy- α,β -unsaturated ketones: A new pharmacophore for the design of anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2006**, *16*: 2263-2269.
- ⁴² Rani A., Jain S. Studies in *Enterococcus Faecium* growth-inhibitory action of 1,5-bis(2-hydroxyphenyl)pent-1,4-diene-2-one and related compounds: a search for environmentally benign anti-bacterial agent. *Rasayan J. Chem.* **2008**, *1*: 795-801.
- ⁴³ Loranda T., Kocsis B., Sohar P., Nagyd G., Kispale G., Kranef H., Schmittg H., Weckerth E. Synthesis and antibacterial study of unsaturated Mannich ketones. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*: 705-717.
- ⁴⁴ López S., Castelli M., Zacchino S., Domínguez J., Lobo G., Charris-Charris J., Cortés J.C.G., Ribas J.C., Devia C., Rodríguez A.M., Enriz R. In Vitro Antifungal Evaluation and Structure–Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2001**, *9*: 1999-2013.
- ⁴⁵ Alvarez, G. Investigación y desarrollo de agentes anti- *Trypanosoma cruzi* con moderados efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas. Tesis de doctorado en química, Universidad de la República, **2013**.

- ⁴⁶ Di Maio R. Síntesis de fármacos con actividad antichagásica. Tesis de doctorado en química, Universidad de la República, **1998**.
- ⁴⁷ Merlino A. Investigación y desarrollo de nuevos fármacos Anti-T. cruzi: inhibidores de cruzipaina derivados del sistema benzofuroxano y 1,3 de benzimidazol. Tesis de doctorado en química, Universidad de la República, **2010**.
- ⁴⁸ Venkatapuram P., Sri V; Bhumireddy C., Akkarapalli M. Synthesis and antioxidant activity of a new class of bis and tris heterocycles. *Archiv der Pharmazie*, **2011**, Manuscript ID: ardp.201100361
- ⁴⁹ Davioud C., Wenzel I., Müller T., Hanquet G., Lafranchi D.A., Leroux F., Gendron T. "Compounds useful against Kinetoplastidae parasites", WO2011/033115 A2, Marzo 24, **2011**
- ⁵⁰ Perrin D.D., Armarego W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth-Heinemann: Oxford **1996**
- ⁵¹ Perry, R.H.; Green, D.W. *Perry's. Chemical Engineers Handbook*. 7th Edition, editorial McGraw-Hill, New York, USA **1997**.
- ⁵² Aue, W. P., Bartholdi, E., and Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance," *Journal of Chemical Physics*. **1976**, 64 : 2229-2246
- ⁵³ Martin, G. E; Zekter, A. S. *Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity*. New York: VCH Publishers, Inc. **1988**, 59
- ⁵⁴ Kaminsky, P., Gaidamak D. Therapeutic trial of fluocinolone acetonide. *Dia Med*. **1962**, 12: 21-22.
- ⁵⁵ Hinz, Alfred; Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen **1943**, 76B, 676-89.
- ⁵⁶ Šebesta, R.; Pizzuti, M. G.; Minnaard, A. J.; Feringa, B. L. Catalyzed Enantioselective Conjugate Addition of Organometallic Reagents to Acyclic Dienones. *Adv. Synth. Catal*. **2007**, 349: 1931-1937.
- ⁵⁷ Edwards, R.L.; 661. Muscarufin. Part II. 2-(4-Carboxybuta-1,3-dienyl)-1,4-benzoquinones. *J. Chem. Soc.* **1959**, 0: 3254-3258.
- ⁵⁸ Pal, Rammohan; Base-catalysed cyclocondensation of bis(arylmethylene)cyclohexanones with thiourea: Formation of E-8-(arylmethylene)-4-aryl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydrobenzo[d]pyrimidine-2-thiones. *Journal of the Indian Chemical Society*. **2009**, 86: 402-405.
- ⁵⁹ Yi, Wen-Bin; Aldol condensations of aldehydes and ketones catalyzed by rare earth(III) perfluorooctane sulfonates in fluoruous solvents. *Journal of Fluorine Chemistry*. **2005**, 126: 1553-1558.
- ⁶⁰ Hasaninejad, Alireza; Solvent-Free, Cross-Aldol Condensation Reaction Using Silica-Supported, Phosphorus-Containing Reagents Leading to α, α' Bis(arylidene)cycloalkanones. *Synthetic Communications*. **2010**, 40: 3488-3495.
- ⁶¹ Al-Arab, Mohammad M.; Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Imidazo[1',2':5,6]pyrimido[4,5-c]pyridazines and Related Heterocycles. *Journal of Chemical and Engineering*. **1998**, 34: 137-139.
- ⁶² Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.* **1983**, 113: 173- 215.
- ⁶³ Gomez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R.A, Rojo Dominguez A., Perez-Montfort R. Using evolutionary changes to achieve species - specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol*. **1995**, 2: 847 - 855.
- ⁶⁴ Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gomez-Puyou M., Ostoa- Saloma P., Perez-Montfort R., Gomez-Puyou A. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity - triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem*. **1998**, 253: 684 - 691.
- ⁶⁵ Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G., Ramirez J., Becker I., Berzunza M., Landa A., Gomez-Puyou A., Tuena de Gomez-Puyou M., Perez-Montfort R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem*. **1997**, 244: 700 - 705.
- ⁶⁶ Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mut. Res.* **2000**, 455: 29-60.
- ⁶⁷ Guía OECD, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf> (acceso 15/02/2013).
- ⁶⁸ Ames, B.N.; Lee, F.D; Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 782-786, 1976.
- ⁶⁹ *Computational Chemistry*, David Young, Wiley-Interscience, 2001. Appendix A. A.1.6 pg 330, SPARTAN
- ⁷⁰ Hehre, Warren J.; Leo Radom, Paul v.R. Schleyer, and John A. Pople (1986). AB INITIO Molecular Orbital Theory. John Wiley & Sons. ISBN 0-471-81241-2.
- ⁷¹ Hohenberg, P., Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review* . 1964, 136: B864-B871.
- ⁷² Cramer, Christopher J. (2002). Essentials of Computational Chemistry. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-09182-1.

⁷³ Larry A. Curtiss, Paul C. Redfern, Krishnan Raghavachari, Vitaly Rassolov, and John A. "Gaussian-3 theory using reduced Møller-Plesset order". *The Journal of Chemical Physics (The American Institute of Physics)*. **1998**, *110*: 4703–4710.

⁷⁴ 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. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

⁷⁵ Morris GM., Huey R., Lindstrom MF., Sanner RK., Belew DS., Goodsell AJ., Olson, J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*: 2785 - 2791.

⁷⁶ Hesse M., Meier H., Zeeh B. *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*. 5ta edición revisada, Síntesis **1995**. Capítulo 3.

⁷⁷ Buckner F.C., Verlinde C.L., La Flamme A.C., Van Voorhis W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta – galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*: 2592 – 2597.

⁷⁸ Santoro G.S., Cardoso M.G., Guimaraes L.G., Freire G.F., Soares M.J. Antiproliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol.* **2007**, *134*: 1649 – 1665.