



**Investigación y desarrollo de agentes  
anti-*Trypanosoma cruzi* con moderados  
efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas**

**Lic. en Bioquímica Guzmán Ignacio Álvarez Touron**

**Tesis de Doctorado en Química**

**Facultad de Química-Universidad de la República  
PEDECIBA**

**Directores: Dra. Mercedes González, Dr. Hugo Cerecetto**

**Grupo de Química Medicinal  
Facultad de Ciencias-Facultad de Química  
Universidad de la República, Uruguay**

**Febrero 2013**





## **Agradecimientos**

A las instituciones que apoyaron este proyecto: Universidad de la República, CSIC, ANII, IPMont (UBC, UByPA, BRT), PEDECIBA, SER (México), CYTED-REDIMEDCHAG, IQB, CIN, LOBBM, Instituto de Fisiología Celular- UNAM-México, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales- Colombia, Instituto de Ciencias de la Salud- UNA- Paraguay. CSIC- España.

A mis tutores Hugo y Merche,  
a mis padres Myriam y Ramón,  
a Lía y su gran familia,  
a mis amigos de hoy, de antes y de siempre,  
a mis compañeros de laboratorio.

A todos los colegas que colaboraron conmigo para hacer posible este trabajo, en orden cronológico: de México, a Ruy, Armando, Bety y Nallely; de Colombia, a Patricia y Sandra; de Paraguay, a Isabel Vera, Gloria, Elva, Susana, Alicia y a todo el grupo; a Marlus Chorilli (Brasil); de Uruguay, a Javi, Ale, MC, WP, VL, Naty, Alicia, ML, Paola, Martin, Estefanía, Jenny y Horacio (GQM); Marcelo (CIN); Adriana y su grupo (FMed); Diego y Marcelo (LBT-IPMont); Andrea, Paula y Carlos (UBM-IPMont); Madelón, Magdalena, Analía, Rosario y Carlos (UByPA-IPMont).

*Dedicado a Myriam Touron y Ramón Álvarez.*



## Índice

Resumen

Abreviaturas

Introducción

Enfermedad de Chagas	1
I+D de nuevos fármacos	5
Antecedentes	6
Esteroles de membrana	8
Triosafofato isomerasa	10
Cruzipaina	11
Tripanotión sintetasa	12
Estudios preclínicos	15
Objetivos	16
Propuesta de trabajo	17
Bibliografía (1-77)	20

Química

Resultados	27
Experimental	54
Bibliografía (78-92)	125

Biología

Resultados	127
Experimental	170
Bibliografía (93-115)	179

Bioquímica

Resultados	182
Experimental	190
Bibliografía (116-129)	195

Conclusiones

197



**Resumen:** La Enfermedad de Chagas es una enfermedad no resuelta, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Existe desde hace miles de años y afecta a millones de personas, mayoritariamente en América Latina. Hasta el momento no existe un fármaco adecuado para tratar esta enfermedad.

Con el objetivo de buscar terapias apropiadas para esta problemática, en este trabajo se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron ochenta y cinco nuevos compuestos. Se determinaron sus capacidades tripanosomicidas *in vitro* obteniéndose más de veinte derivados con destacada actividad anti-*Trypanosoma cruzi*. Se estudió la toxicidad de los mismos frente a células de mamífero determinándose la selectividad de los derivados biológicamente activos. Se realizaron estudios de mutagenicidad *in vitro*. Se realizaron estudios *in vivo* con tres de los derivados más relevantes.

Se identificó un derivado con potencialidad a fármaco que posee varias ventajas. Desde el punto de vista químico: sencillez sintética, producto escalable y de producción económica. Desde el punto de vista biológico: activo en diferentes estadios y cepas del parásito, baja toxicidad inespecífica, ausencia de mutagenicidad, actividad *in vivo* similar a la del fármaco de referencia y ausencia de genotoxicidad *in vivo*. Además, posee un mecanismo de acción múltiple, interfiriendo en la biosíntesis de esteroides de membrana, e inhibiendo levemente las enzimas cruzipaina y tripanotión sintetasa.



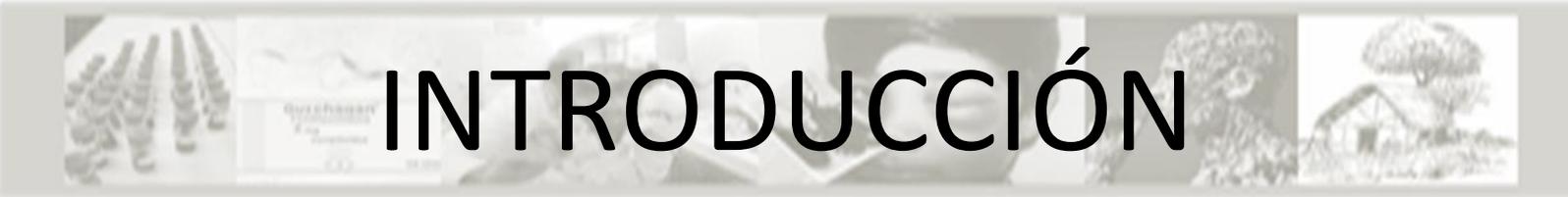
## Abreviaturas.

2-FA	2-aminofluoreno	IC <sub>50</sub>	Concentración que inhibe el 50% del crecimiento.
ADP	difosfato de adenosina	IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
AnfoB	Anfotericina B.	IS	Índice de selectividad, relación entre el IC <sub>50</sub> en células de mamífero y el IC <sub>50</sub> en los parásitos (forma amastigote).
ATP	trifosfato de 5'-adenosina	Lan	lanosterol
BHI	del inglés Brain heart infusion	<i>m/z</i>	Relación masa carga
Bnz	Benznidazol	MeOH	metanol
CDI	carboxidimidazol	MES	ácido 2-( <i>N</i> -morfolino)etansulfónico
Col	colesterol	MO	microscopía óptica
DCM	diclorometano	MS	Espectrometría de Masa
DEMEM	medio Dulbecco modificado de Eagle	Mut	Mutagénico en el Test de Ames.
Desc.	descomposición	NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
DMSO	dimetilsulfóxido	NaOAc	Acetato de sodio
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado	Nd	no determinado
DO <sub>590</sub>	absorbancia a 590nm	Nfx	Nifurtimox
DTT	ditiotritol	NOE	acrónimo del inglés Nuclear Overhaussen Effect
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	NoMut	No mutagénico en el Test de Ames.
EI	Impacto electrónico	NoMut 5	No mutagénico en las 5 cepas del Test de Ames.
Erg	ergosterol	NPD	4-nitro- <i>o</i> -fenilendiamina
Esc	escualeno	ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
EtOH	Etanol	p/mL	parásitos por mililitro
FPLC	acrónimo del inglés Fast protein liquid chromatography	PBS	buffer fosfatos
GRH	glóbulos rojos humanos	PEP	Phosphoenolpyruvic acid
HMBC	acrónimo del inglés Heteronuclear Multiple Bond Correlation	PF	punto de fusión
HPLC	acrónimo del inglés High-performance liquid chromatography	Ph	Fenil
HSQC	acrónimo del inglés Heteronuclear Single Quantum Correlation	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>ia</i>	inmersión de aceite	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride



R:	rendimiento de la reacción	TFA	Acido trifloro acético
RF	coeficiente de reparto	Tbf	Terbinafine
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	TBS	buffer Tris-HCl
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute	TLC	acrónimo del inglés thin layer chromatography
S9	Fracción microsomal de hígado de rata o ratón.	Tm	Tiempo de mezclado
SF	suero fisiológico	$t_R$	Tiempo de retención en la columna de HPLC en fase reversa.
SFB	suero fetal bovino	UV	Ultravioleta
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	VERO	Células epiteliales de riñón de Mono Verde Africano.
TA	temperatura ambiente		





# INTRODUCCIÓN





# Introducción

**Enfermedad de Chagas.** Más de mil millones de personas en todo el mundo sufren de enfermedades olvidadas. Esto equivale a aproximadamente un sexto de la población mundial. Estas infecciones suelen ser endémicas de regiones tropicales, en zonas remotas de poblaciones empobrecidas donde los vectores pueden prosperar y las personas infectadas no pueden ser tratadas eficazmente debido a la falta de hospitales, equipos médicos, medicamentos y personal capacitado.

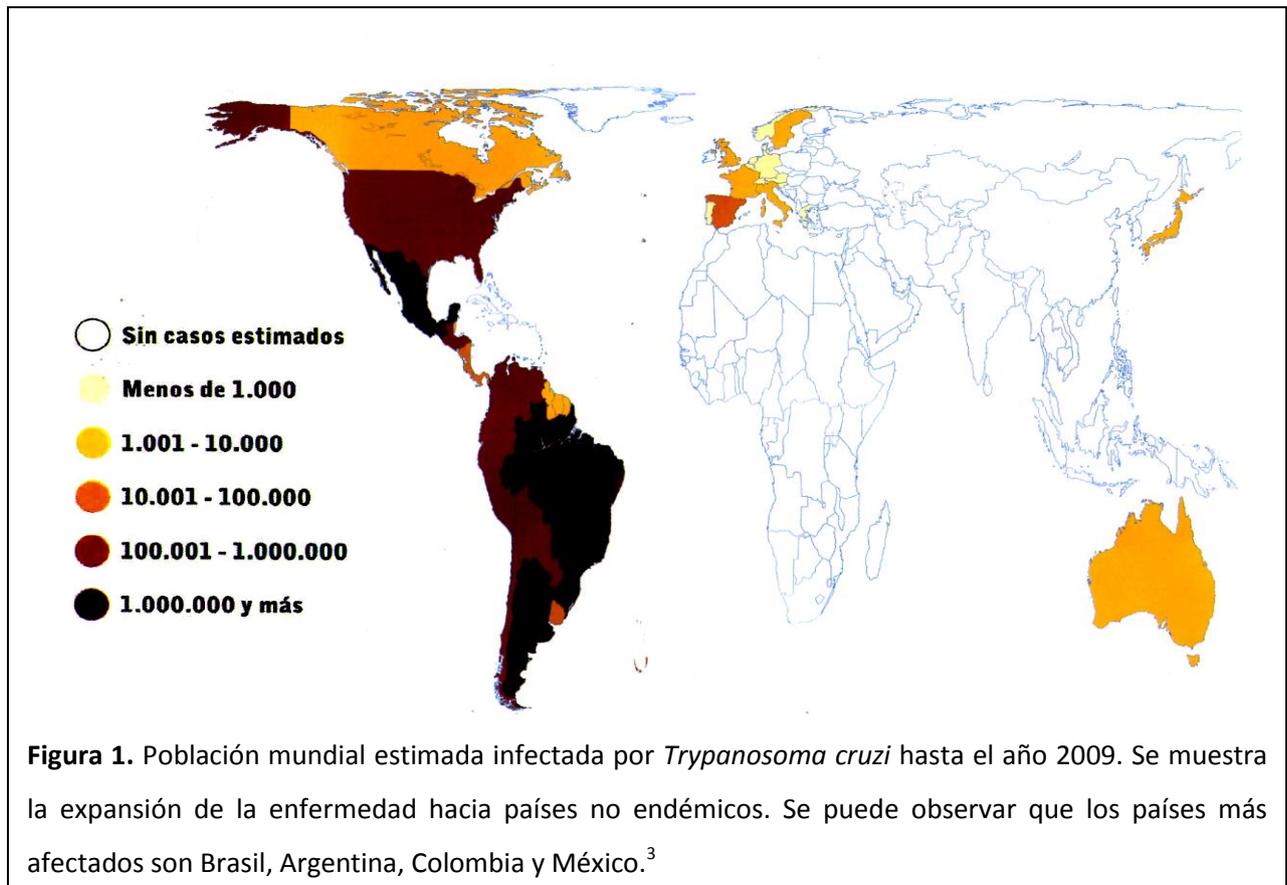
Los pocos medicamentos que han sido aprobados para los tratamientos de estas enfermedades no son ampliamente utilizados, ya que están plagados de consecuencias inadecuadas, son costosos, inseguros, de poca disponibilidad, administrados por vías invasivas y con generación de resistencia. Por lo tanto, existe una necesidad inminente para el diseño y el desarrollo de nuevas terapias mejoradas.<sup>1</sup>

Los tripanosomatídeos son organismos eucariotas unicelulares, parásitos, pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, género *Trypanosoma* que infectan invertebrados, mamíferos y plantas. El ser humano es afectado por dos tipos de tripanosomiasis: la enfermedad de Chagas en el continente Americano, causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y la enfermedad del sueño en África, causada por *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). El orden *Kinetoplastida* también incluye especies del género *Leishmania* que causan diversas formas de leishmaniosis en países tropicales y subtropicales, también en el continente Americano.<sup>2</sup>

Esta historia comenzó hace más de 9000 años atrás con la aparición del parásito *T. cruzi*, según las evidencias fósiles. Más de 100 años pasaron desde que el Dr. Carlos Chagas describe por completo la enfermedad que por eso lleva su nombre, enfermedad de Chagas. Es aún la enfermedad parasitaria con los más altos niveles de incidencia en América Latina (figura 1). A pesar de los avances recientes en el control de la transmisión del vector (por ejemplo *Triatoma infestans*, figura 2) y transfusional de su agente etiológico, se estima que unas 20 millones de personas se encuentran infectadas. Además recientemente se ha esparcido hacia países no endémicos en América del Norte, Europa, Asia y Australia.<sup>3,4,5,6</sup>

La enfermedad comienza usualmente como una infección aguda seguida de un proceso inflamatorio crónico que causa, en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes, daños en el sistema nervioso autónomo del corazón y del intestino. La enfermedad no tiene altos índices de letalidad pero el daño que causa en los órganos disminuye ampliamente la calidad de vida del paciente.

# Introducción



**Figura 2.** Sucesión de los diferentes estadios del insecto vector (Vinchuca). Se observan, de izquierda a derecha, desde el estado adulto hasta el estado larvario y los huevos a la derecha. Compárese el tamaño del dedo pulgar con el insecto adulto.



# Introducción

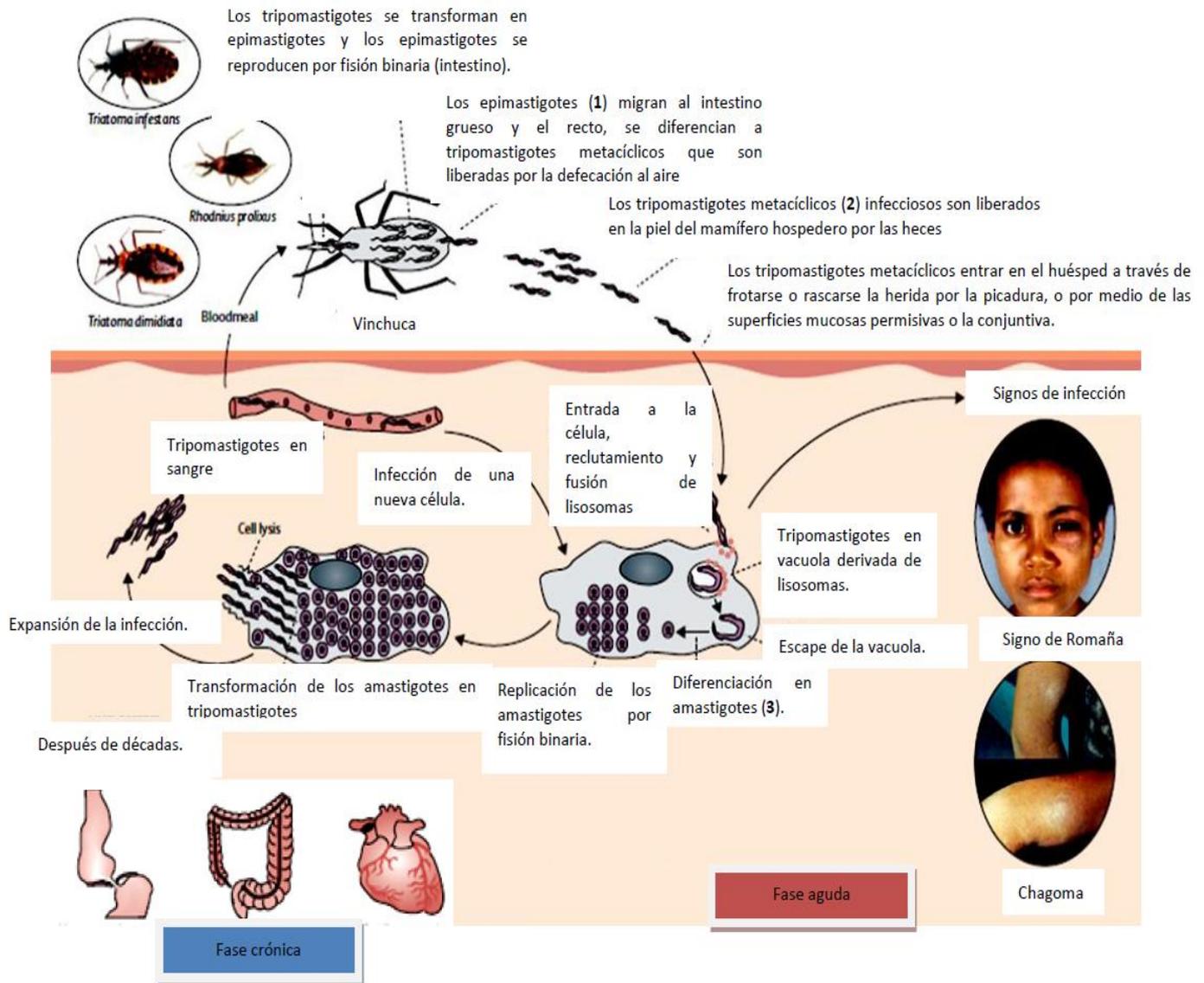
El ciclo de vida de *T. cruzi* incluye fundamentalmente tres tipos morfológicos caracterizados por la posición relativa del flagelo, kinetoplasto y núcleo (figura 3)<sup>7</sup>; (1) *epimastigotes*: células fusiformes con kinetoplasto anterior al núcleo, representan la forma replicativa del parásito en el intestino del triatomineo y es la forma predominante en cultivo (2) *trypomastigotes*: células fusiformes, kinetoplasto subterminal, constituye la forma infectiva y se encuentra en el torrente sanguíneo del mamífero y en la ampolla rectal del vector, y (3) *amastigotes*: células redondeadas sin un flagelo emergente, se multiplican principalmente por fisión binaria dentro de la célula del mamífero produciendo su ruptura y liberando tripomastigotes hacia el torrente sanguíneo que pueden nuevamente invadir cualquier célula nucleada.<sup>8,9</sup>

Los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de esta enfermedad incluyen un nitrofurano, Nifurtimox (Nfx), y un nitroimidazol, Benznidazol (Bnz). Nfx ejerce su efecto citotóxico en el parásito mediante la reducción del grupo nitro al radical nitroanión, el cual puede reaccionar a su vez produciendo especies reducidas del Nfx e inhibiendo las enzimas relacionadas con este proceso.<sup>10,11</sup> Bnz aparentemente ejercería su efecto por un mecanismo diferente (estrés reductivo), que involucra la modificación covalente de macromoléculas por intermedios generados vía nitrorreducción.<sup>12,13,14</sup>

Ambos fármacos resultan efectivos fundamentalmente en el tratamiento de pacientes agudos (infección reciente) y presentan efectos secundarios debidos a su toxicidad inespecífica (anorexia, náuseas, polineuropatía, genotoxicidad y mutagenicidad, etc.)<sup>15</sup>, así como la generación de resistencia. Cabe destacar, por otra parte, que hasta el momento no se dispone de un tratamiento efectivo para la cura de los pacientes crónicos.

Recientemente se han descrito varias moléculas como potenciales fármacos para la enfermedad de Chagas, pero la mayoría tienen en común ser de producción compleja y costosa, aspecto de importancia cuando la población afectada es de recursos limitados. El medicamento ideal para la enfermedad de Chagas debe de ser eficaz en las etapas aguda y crónica, debe tener actividad tripanosomicida en todas las cepas y estadios del parásito, debe tener la más baja toxicidad inespecífica, no ser mutagénico, genotóxico, ni teratogénico, debe ser eficaz en tratamientos cortos (menores a 30 días), por vía oral, una vez al día. Debe ser producido a bajo costo y ser estable en ambientes tropicales.<sup>16,17,18,19,20</sup>

# Introducción



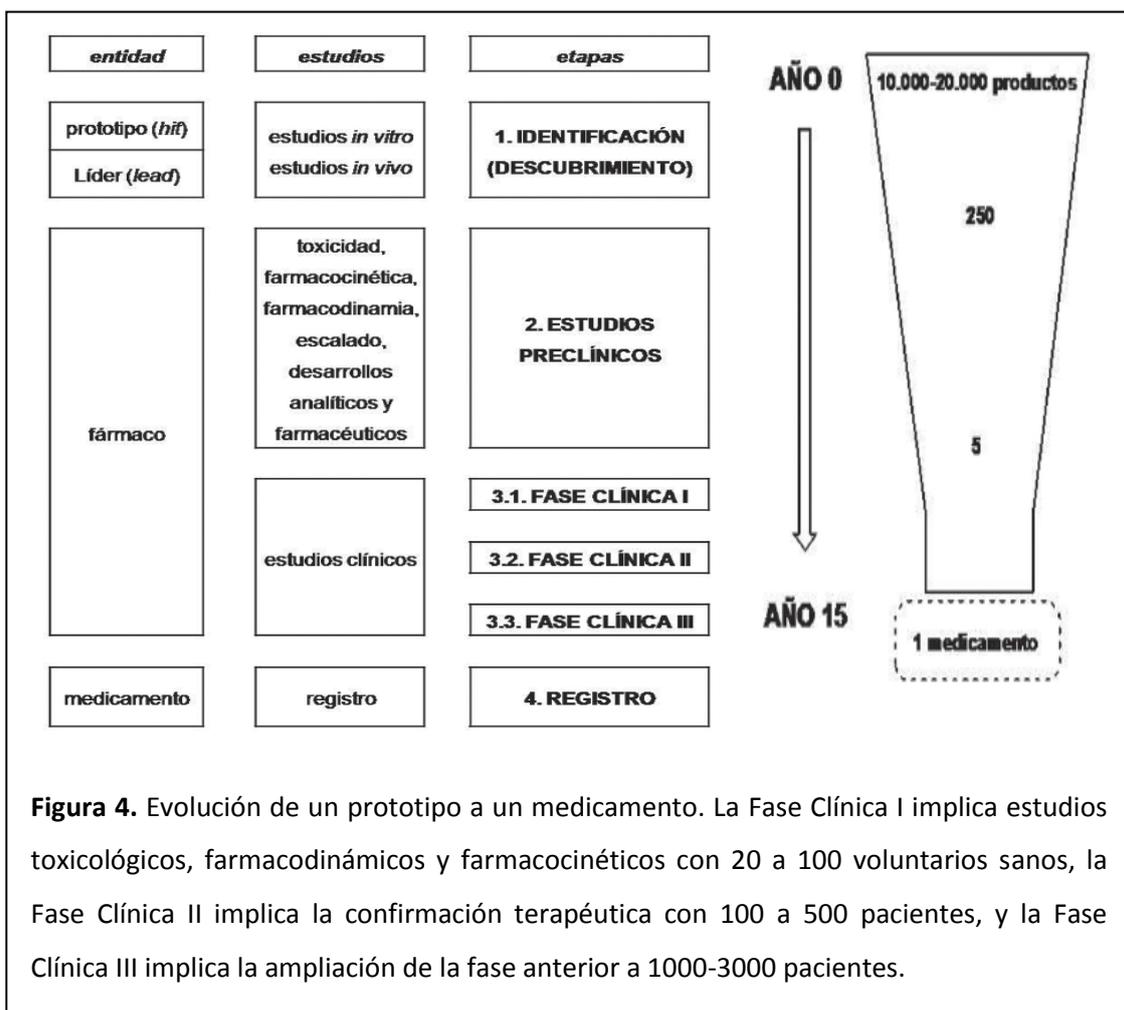
**Figura 3.** Ciclo de infección de *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas. El ciclo inicia cuando un insecto que porta el parásito pica y deposita sobre la herida los parásitos. Los parásitos ingresan al torrente sanguíneo, buscan las células diana las infectan y se reproducen dentro de ellas hasta la lisis. El ciclo termina con la salida de los tripomastigotes de la célula lisada y la infección de una nueva célula.<sup>7</sup>



## Introducción

**Investigación y Desarrollo (I+D) de nuevos fármacos antichagásicos.** La I+D de nuevos medicamentos es un proceso largo que lleva a la industria farmacéutica, en promedio, unos 15 años. En este proceso se distinguen distintos niveles de estados del desarrollo de medicamentos: prototipos, líderes, fármacos y, finalmente, medicamentos (Figura 4). Se ha planteado que aquellos compuestos que producen estrés oxidativo o reductivo pueden constituir potenciales fármacos antichagásicos, dado que serán selectivamente reducidos por óxidorreductasas únicas del parásito. Siguiendo este razonamiento, en nuestro laboratorio se ha trabajado en la búsqueda de compuestos menos tóxicos y más selectivos, utilizando como grupo biorreducible a los grupos funcionales 5-nitrofurano, 5-nitrotiofeno, 5-nitroindazol y *N*-óxido. Es así que se han sintetizado y evaluado, frente a la forma epimastigote de *T. cruzi in vitro*, un gran número de estos compuestos (aproximadamente mil) pertenecientes a distintas familias estructurales, trabajo que se inició hace ya más de 15 años. Dentro de estos compuestos se han encontrado un amplio rango de actividades tripanosomicida y se han identificado interesantes prototipos moleculares. Asimismo, también se han realizado ensayos *in vivo* de algunos compuestos, en un modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas, obteniéndose resultados equivalentes a los obtenidos con los fármacos de referencia.<sup>21,22,23,24,25,26,27,28,29</sup>

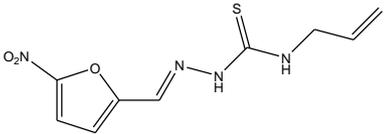
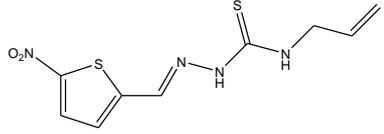
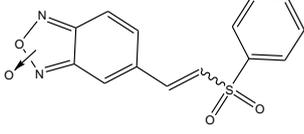
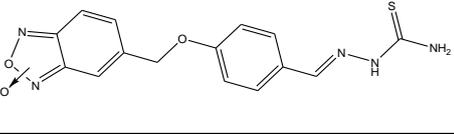
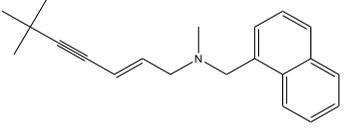
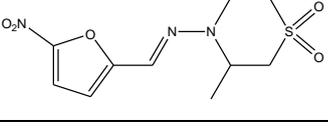
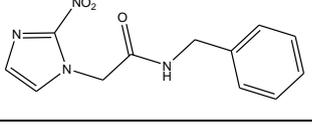
# Introducción



**Antecedentes.** Una estrategia reciente de nuestro grupo en el diseño de nuevos agentes anti-*T. cruzi* ha sido utilizar el concepto de agentes dirigidos a múltiples dianas (compuestos híbridos o quiméricos).<sup>30,31,32</sup> En esta aproximación se combinan, en una misma estructura química, farmacóforos orientados a actuar en distintas rutas bioquímicas esenciales del parásito. Las ventajas de este tipo de compuestos son aumentar la potencia, utilizar menores dosis (por ende disminuir los efectos tóxicos inespecíficos), y evitar la generación de resistencia.<sup>33</sup> Entre los diferentes compuestos desarrollados con este fin pueden ser destacados los líderes I al IV (tabla 1) que han mostrado, además de excelentes porcentajes de inhibición de crecimiento de *T. cruzi in vitro*, ser capaces de afectar diferentes rutas bioquímicas del parásito.<sup>34,35,36</sup>

# Introducción

**Tabla 1.** Ejemplos de compuestos más característicos desarrollados por nuestro grupo durante estos últimos 15 años. Se muestra la actividad tripanosomicida frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y la toxicidad inespecífica (índice de selectividad, mutagenicidad, genotoxicidad).

N <sup>o</sup>	LÍDER	IC <sub>50</sub> (μM) <i>T. cruzi</i> <sup>a</sup>	Ruta bioquímica afectada	IS <sup>b</sup>	Muta <sup>c</sup>	Geno <sup>d</sup>
I		8.2	Estrés oxidativo y acumulación de escualeno (16 μg/mL) <sup>e</sup>	24	(+) <sup>f</sup>	Roturas y daño oxidativo de ADN a 20 μM
II		4.2	Estrés oxidativo y acumulación de escualeno (7.4 μg/mL)	< 24	(-) <sup>j</sup>	nd <sup>g</sup>
III		1.6	Inhibición de la enzima cruzipaína (IC <sub>50</sub> > 50 μM)	409 <sup>h</sup>	(+) <sup>f</sup>	Importante daño al ADN a partir de 25 μM
IV		15	Inhibición de la enzima cruzipaína (IC <sub>50</sub> = 43 μM)	27	nd	nd
Tbf <sup>i</sup>		17	Acumulación de escualeno (12 μg/mL) <sup>e</sup>	20	nd	nd
Nfx		7.7	Estrés oxidativo	40	(+)	(+)
Bnz		7.0	Estrés reductivo	100	(+)	(+)

<sup>a</sup> Concentración que inhibe el 50% del crecimiento del parásito en la forma epimastigote (Cepa Tulahuen 2), <sup>b</sup> Índice de Selectividad (IC<sub>50,macrófago 1774</sub>/IC<sub>50,T. cruzi</sub>), <sup>c</sup> Mutagenicidad por el Test de Ames, <sup>d</sup> Genotoxicidad por ensayo del cometa, <sup>e</sup> Blanco: escualeno = 0.62 – 2.08 μg/mL, <sup>f</sup> mutagénico en la estirpe TA 98, <sup>g</sup> nd no estudiado, <sup>h</sup> Frente a premonocitos THP-1, <sup>i</sup> Terbinafine antifúngico comercial para uso humano y de actividad anti-*T. cruzi* *in vitro*, <sup>j</sup> no mutagénico en la estirpe TA 98.



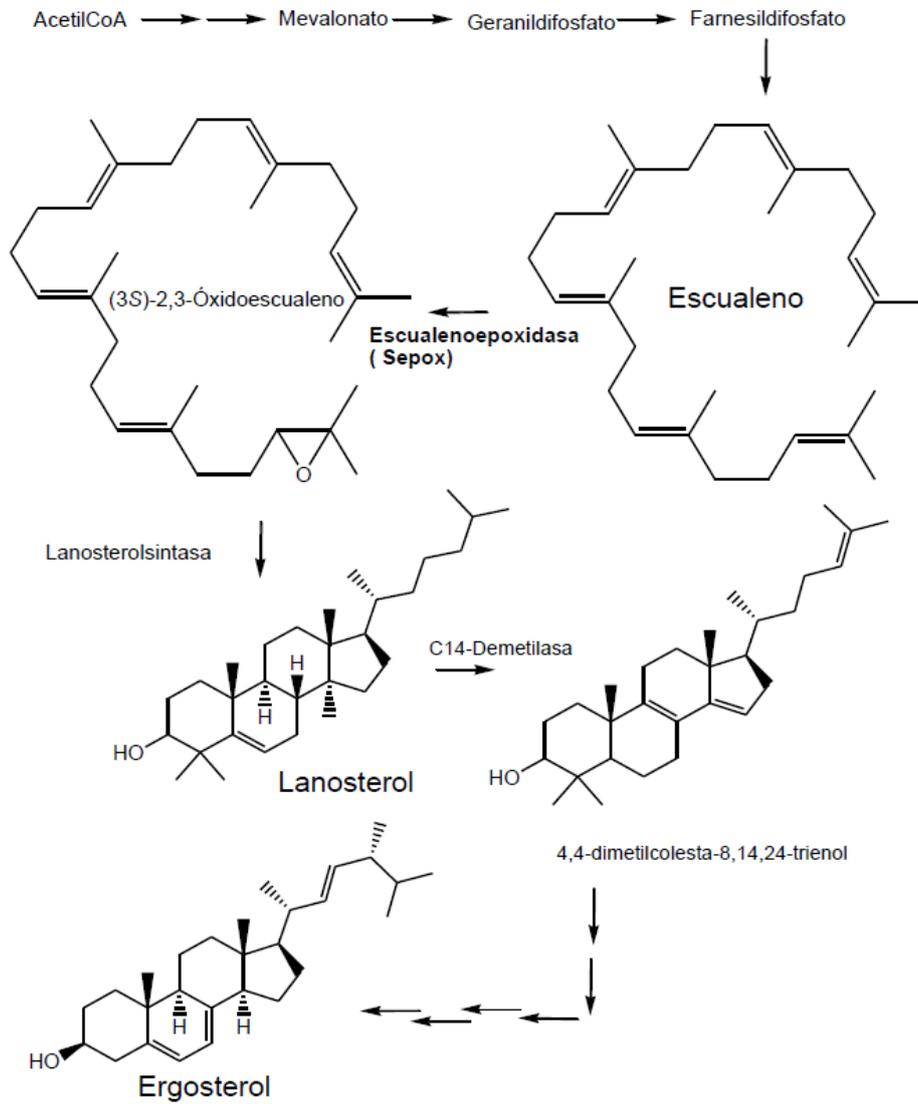
## Introducción

En este sentido, con la secuenciación completa del genoma de *T. Cruzi*, se ha identificado un gran número de potenciales y validadas dianas terapéuticas para ser utilizadas en el desarrollo de agentes multifuncionales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se pueden mencionar, entre otras, escualenoepoxidasa, C14-demetilasa, farnesiltransferasas, *trans*-sialidasa, cAMP-fosfodiesterasas, ribosafosfato isomerasa, triosafosfato isomerasa, tripanotión sintetasa y proteasas como potenciales blancos para el desarrollo de nuevas entidades bioactivas contra este parásito.<sup>37,38</sup>

**Biosíntesis de esteroides de membrana.** Al igual que los hongos el parásito *T. cruzi* posee claras diferencias, respecto al huésped mamífero, en la biosíntesis de esteroides de membrana. Las principales diferencias radican en que los mamíferos producen colesterol utilizando complejos multicatalíticos, mientras que este protozoo produce ergosterol utilizando proteínas monofuncionales. A partir de estas diferencias y del conocimiento de la ruta biosintética de esteroides de membrana (figura 5), se han investigado como dianas terapéuticas varias etapas en la biosíntesis de ergosterol a partir de ácido mevalónico.<sup>39,40</sup>

Una de las dianas bioquímicas más estudiada es la enzima C-14 esteroil demetilasa. Analizando la actividad antichagásica de inhibidores de dicha enzima comercialmente disponibles, como Ketoconazol e Itraconazol, se encontró que resultaron ser activos *in vitro*, pero no suficientemente poderosos para eliminar *T. cruzi* de animales o humanos infectados crónicamente. Otros potentes inhibidores selectivos de la C-14 esteroil demetilasa como el Posaconazol y el Ravuconazol, también han resultado ser muy activos contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo*. La mayoría de los compuestos mencionados han completado buena parte del desarrollo preclínico y clínico humano como antimicóticos, siendo el más avanzado el Posaconazol, que ha sido recientemente registrado como agente antimicótico sistémico en Estados Unidos, Unión Europea y Australia. Sin embargo, aún no se ha completado la evaluación de dichos compuestos en humanos como agentes anti-*T. cruzi*. Se debe tener en cuenta que estos compuestos presentan importantes efectos cardiotóxicos. Este potencial efecto tendrá que tenerse en cuenta para el diseño de estudios clínicos en humanos, particularmente en lo que se refiere a seguridad en pacientes con alteraciones cardíacas de origen chagásico. También existen otros problemas de aspecto sintético y económico que dificultan su completo desarrollo.<sup>17,41,42,43,44</sup>

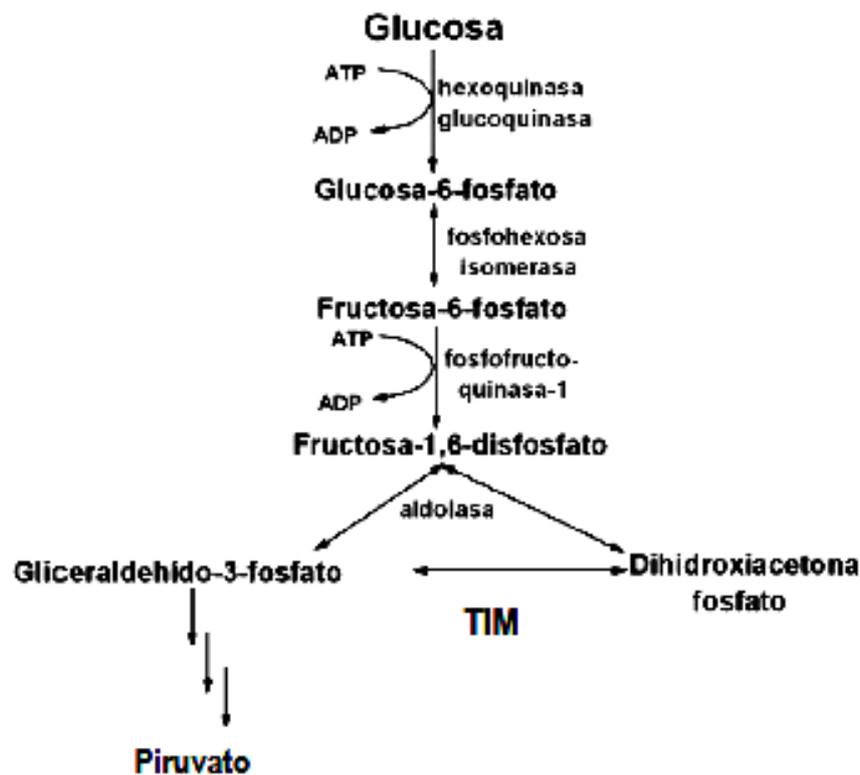
# Introducción



**Figura 5.** Ruta metabólica de la biosíntesis de ergosterol a partir de AcetilCoA. La ruta presentada es en hongos, pero para el parásito esta ruta es muy similar. Se muestran sólo los pasos de biosíntesis que poseen inhibidores estudiados en *T. cruzi*. El parásito no puede utilizar colesterol, ni ergosterol exógenos.

# Introducción

Otra característica importante del metabolismo de *T. cruzi* es que la forma amastigote utiliza glucosa como la principal fuente de ATP. Es por esto que las enzimas involucradas en la glicólisis son consideradas un blanco interesante para el desarrollo de inhibidores selectivos que afecten su función metabólica. Entre estas enzimas, la **triosafosfato isomerasa (TIM)** ha resultado un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos, ya que se ha visto que además de ser una enzima clave para la supervivencia del parásito, presenta diferencias estructurales importantes con la correspondiente enzima humana.<sup>45,46,47</sup>



**Figura 6.** Ruta glicolítica en la cual participa la TIM. La glucólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa para obtener energía para la célula. Consiste en diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato. La falta de producción de piruvato detiene el ciclo de Krebs y la producción de ATP necesario para la vida celular.



## Introducción

La **TIM** cataliza la isomerización de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetonafosfato en el quinto paso de la vía glicolítica (figura 6).<sup>48</sup> Estructuralmente, todas las TIMs conocidas son homodímeros siendo activas solamente en su forma dimérica. Esta característica fue la que inspiró la búsqueda de compuestos dirigidos a la interfase entre los monómeros con el objetivo de inducir modificaciones estructurales que alteraran la integridad del dímero, provocando así la inactivación de la enzima.<sup>49,50,51,52,53,54</sup>

**Cruzipaína (CP)**, la principal cisteín proteasa presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. Cruzi*, es una endopeptidasa que, al igual que otras enzimas de esta clase, une el sustrato en una conformación extendida ubicándose las cadenas laterales del mismo en subsitios de unión localizados en el sitio activo de la proteína.

**CP** es codificada por diversos genes polimórficos organizados en tándem (hasta 130 en la cepa Tulahuen 2).<sup>55</sup> Esta variabilidad génica resulta en la expresión de diversas isoformas, algunas de las cuales presentan variaciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos que influyen en la especificidad de la enzima. Se ha visto que la composición de isoformas varía entre cepas y en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito lo que podría determinar las variaciones observadas en la susceptibilidad a distintos inhibidores.<sup>56,57,58</sup> Una forma recombinante de **CP** que carece del extremo C-terminal (denominada cruzaina) ha sido expresada en *Escherichia coli* y posteriormente cristalizada en presencia de distintos inhibidores peptídicos. Para la forma recombinante es que se han descrito la mayor parte de los inhibidores de cruzipaina.<sup>59</sup>

En relación a la importancia funcional de **CP**, además del rol fundamental que juega en la nutrición del parásito, existen evidencias de su participación en la penetración del tripanosoma dentro de las células en distintos mecanismos de evasión del sistema inmune del mamífero, así como en la supervivencia y diseminación del parásito dentro del hospedero.<sup>60,61,62</sup>

Cabe destacar que muchos de los compuestos desarrollados hasta el momento que presentan actividad frente a **CP** son peptidomiméticos que inhiben irreversiblemente a la enzima. A pesar de que existe una gran controversia al respecto, los inhibidores irreversibles han sido en general ignorados debido a la idea de que un péptido o pseudopéptido unido covalentemente al sitio activo de una proteasa es un epítope potencial que puede provocar respuestas autoinmunes en los individuos tratados. Los inhibidores con estructuras peptídicas tienen el

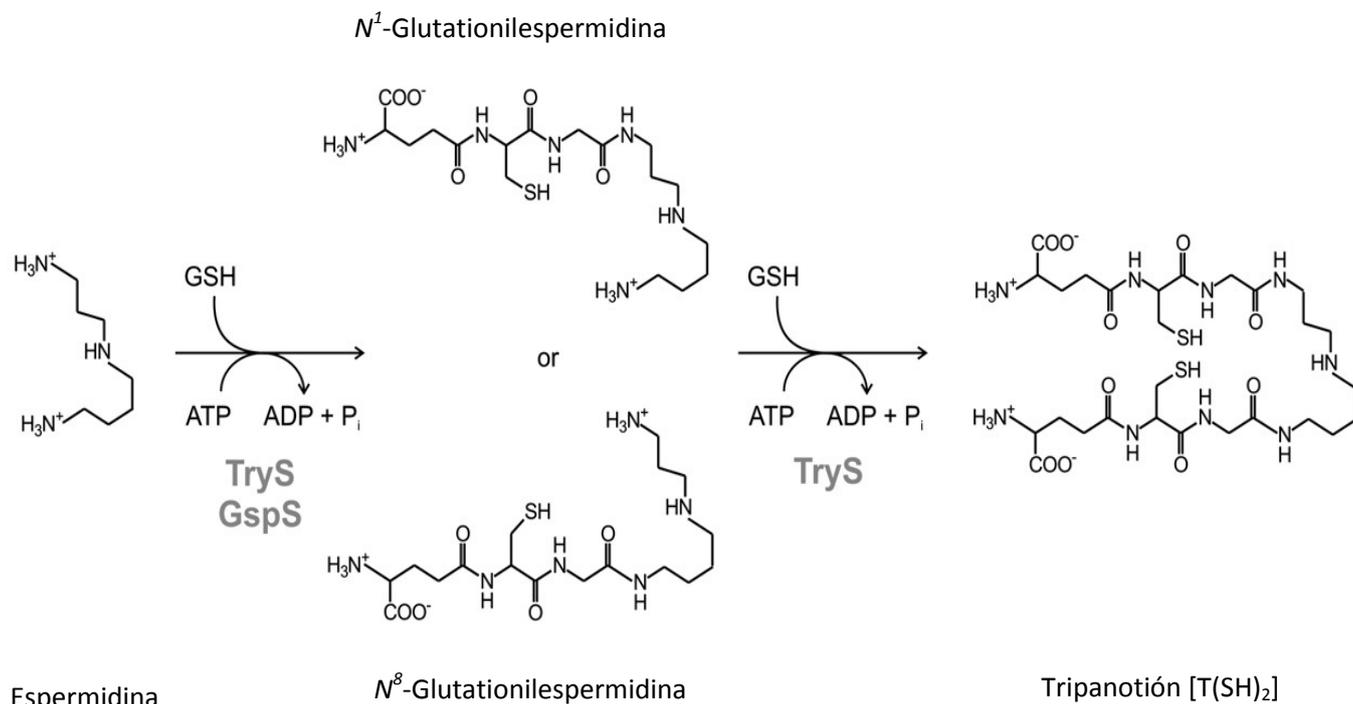
problema adicional de ser inestables en plasma, aunque se ha mejorado mucho en relación a esto mediante la utilización de aminoácidos no naturales como reactivos de construcción de los inhibidores. Por otra parte, los pocos inhibidores reversibles que han sido sintetizados, si bien muestran una muy buena actividad contra **CP *in vitro***, son inactivos cuando se evalúan *in vivo* debido a problemas de biodisponibilidad.<sup>63,64,65,66</sup>

Las enzimas involucradas en la síntesis y **metabolismo redox** del tripanotión son potenciales blancos contra *T. cruzi*. Esta ruta bioquímica es única de protozoarios del orden Kinetoplastida, en los cuales cumple funciones análogas a las del glutatión y la glutatión reductasa de otras células en el mantenimiento del estado redox de los grupos tiol. Los genes de todas las enzimas de esta ruta bioquímica han sido clonados, expresados heterológamente, y las estructuras tridimensionales de todas las enzimas determinadas por cristalografía de rayos-X.

Asimismo, varias enzimas de la ruta, incluyendo la tripanotión reductasa (TR) y la **tripanotión sintetasa (TryS)**, han sido validadas genéticamente como esenciales para estos parásitos. La **TryS** lleva a cabo tanto la síntesis de la glutationil-espermidina como la formación del tripanotión (Figura 7). Además, se demostró que esta enzima tiene una doble función de sintetasa y amidasa capaz de hidrolizar tripanotión, homotripanotión y glutationil-espermidina, actividades que no se han observado en ningún tripanosomatídeo. Debido a lo antes descrito, esta enzima resulta un blanco interesante para el diseño de nuevos fármacos específicos contra *T. cruzi*.<sup>67</sup>

La forma en que los tripanosomatídeos obtienen espermidina varía. *T. brucei spp.* y *Leishmania spp.* son capaces de sintetizar poliaminas *de novo* a partir de arginina. En *T. cruzi* el escenario metabólico es bastante diferente y las poliaminas han sido un asunto de controversia durante casi 20 años. Los tres estadios del parásito son capaces de secuestrar poliaminas del medio.<sup>68</sup> La teoría de que *T. cruzi* es auxotrófico para poliaminas y no puede sintetizarlas *de novo* se basó en pruebas provenientes principalmente del trabajo en epimastigotes. Por otra parte, cuando epimastigotes fueron cultivados en un medio deficiente en poliaminas, la proliferación fue detenida después de 3 a 4 días y los niveles de GSH se incrementaron y los de glutationil-espermidina (SGP) y tripanotión (T(SH)<sub>2</sub>) eran casi indetectables. Cuando el medio se suplementó con putrescina o espermidina la proliferación fue restaurada junto con los niveles de SGP y T(SH)<sub>2</sub>, y este último se convirtió en el tiol predominante. Esta recuperación no se observó cuando el cultivo fue suplementado sólo con arginina.

# Introducción



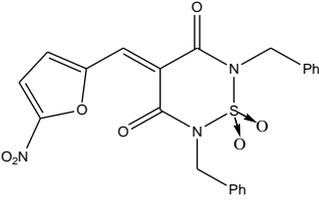
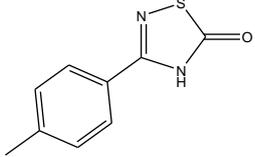
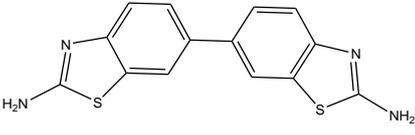
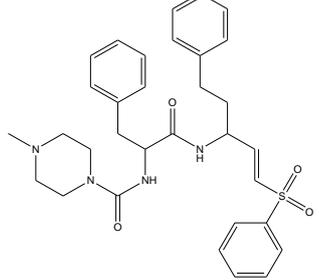
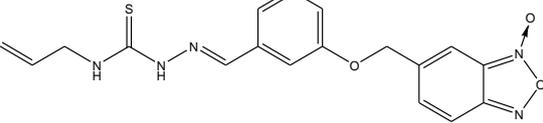
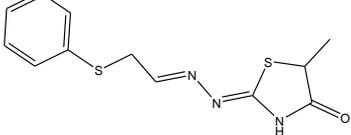
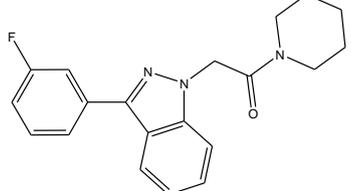
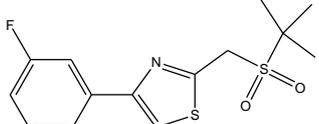
**Figura 7.** Vía metabólica donde actúa la TryS. La síntesis de tripanotión es el resultado de la unión covalente de glutatión (GSH) y espermidina por la acción de la TryS. Esta enzima es esencial para mantener el ambiente reductor intracelular del parásito.

La TryS posee actividad amidasa, lo que permite al parásito recuperar sustratos para la síntesis de más tripanotión. También tiene un amplio rango de especificidad de sustratos, ya que puede sintetizar tripanotión mediante la conjugación de glutatión con otras poliaminas fisiológicas diferentes a la espermidina. Esto resulta favorable para el parásito ya que, como se mencionó anteriormente, en *T. cruzi* no se lleva a cabo síntesis *de novo* de poliaminas. Esta característica resulta importante en el diseño de fármacos, ya que se pueden diseñar inhibidores del metabolismo de tripanotión utilizando el esqueleto de poliaminas.<sup>69,70,71</sup>

Algunos ejemplos característicos de las distintas familias de inhibidores de las enzimas discutidas anteriormente, **TIM**, **CP**, y **TryS**, que se han desarrollado hasta el momento se presentan en la Tabla 2.

# Introducción

**Tabla 2.** Inhibidores de Triosafato isomerasa, Cruzipaina y Tripanotión sintetasa.

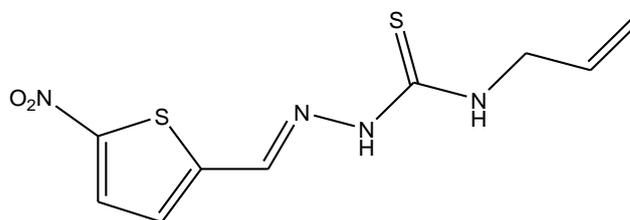
Estructura	Diana	Actividad inhibitoria IC <sub>50</sub> (μM)
	TIM	13
	TIM	4.0
	TIM	100% a 50 μM
	cruzaína	4.0 nM
	CP	55
	cruzaína	20
	TryS	0.1
	TryS	0.3

# Introducción

**Estudios preclínicos.** Otro aspecto que nuestro grupo de investigación está interesado en abordar, desde etapas temprana de la I+D de agentes antiparasitarios, es el estudio de la toxicidad hacia el huésped. Estos estudios pueden ser abordados en términos de toxicidad inespecífica hacia sistemas celulares de mamíferos, o en forma más específica, estudiando efectos mutagénicos y genotóxicos. Estos últimos estudios son, sin dudas, los más relevantes para que el líder pueda continuar hacia la etapa de fármaco e ingrese en forma segura a los estudios pre-clínicos y clínicos.<sup>72,73</sup>

En este sentido, los resultados de nuestro grupo que se muestran en la Tabla 1 destacan a los líderes I, III y IV que, aunque poseen excelentes comportamientos *in vitro* (y aún *in vivo*) frente a *T. cruzi* y baja toxicidad en sistemas mamíferos, deben ser descartados para estudios posteriores hacia las etapas que conducen al medicamento ya que resultan mutagénicos o genotóxicos, sino ambos.

Se destaca el **líder II** (tabla 1), con un muy buen comportamiento *in vitro* frente a *T. cruzi* y un mecanismo de acción novedoso (acumulación de escualeno, un intermedio de la biosíntesis de esteroides de membrana del parásito, y producción de estrés oxidativo). Además, no fue mutagénico al ser evaluado en test de Ames empleando *Salmonella thyphimurium* (estirpe TA98). Esto es lo que lo convierte en una entidad a ser profundamente estudiada en etapas preclínicas y por ende, en un programa de química médica, susceptible a modificaciones químico-estructurales para identificar nuevos agentes bioactivos con mejorado perfil terapéutico en términos de mecanismo y toxicidad.<sup>74</sup>



**Líder II**



# Introducción

## Objetivos generales

Investigar y desarrollar nuevos fármacos anti-*T. cruzi* dirigidos a múltiples dianas y sin efectos tóxicos (mutagénicos y genotóxicos).

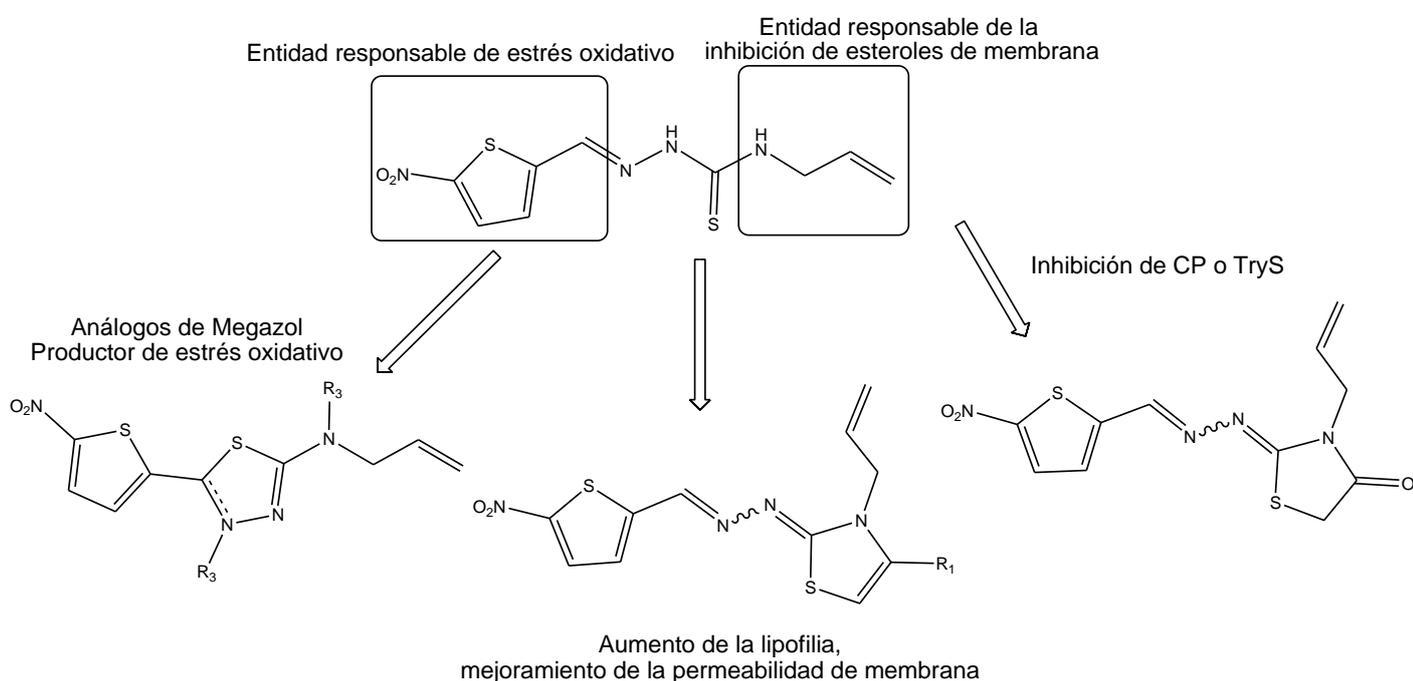
## Objetivos específicos

1. Realizar modificaciones químicas del **líder II**: diseño, síntesis, caracterización espectroscópica y fisicoquímica de nuevos derivados.
2. Caracterizar biológicamente los nuevos derivados desarrollados *in vitro* frente a *T. cruzi*.
3. Estudiar mutagenicidad y genotoxicidad de algunos de los nuevos derivados desarrollados.
4. Generar compuestos dirigidos a múltiples dianas, que sustenten en su estructura el esqueleto base del **líder II** y farmacóforos reconocidos: diseño, síntesis, caracterización espectroscópica y fisicoquímica de los nuevos derivados.
5. Caracterizar biológicamente los derivados desarrollados en el objetivo anterior *in vitro* frente a *T. cruzi*.
6. Estudiar mutagenicidad y genotoxicidad de los derivados identificados en el objetivo anterior.
7. Realizar estudios *in vivo* de toxicidad y de actividad en modelo agudo de la enfermedad de Chagas.

# Introducción

## Propuesta de trabajo

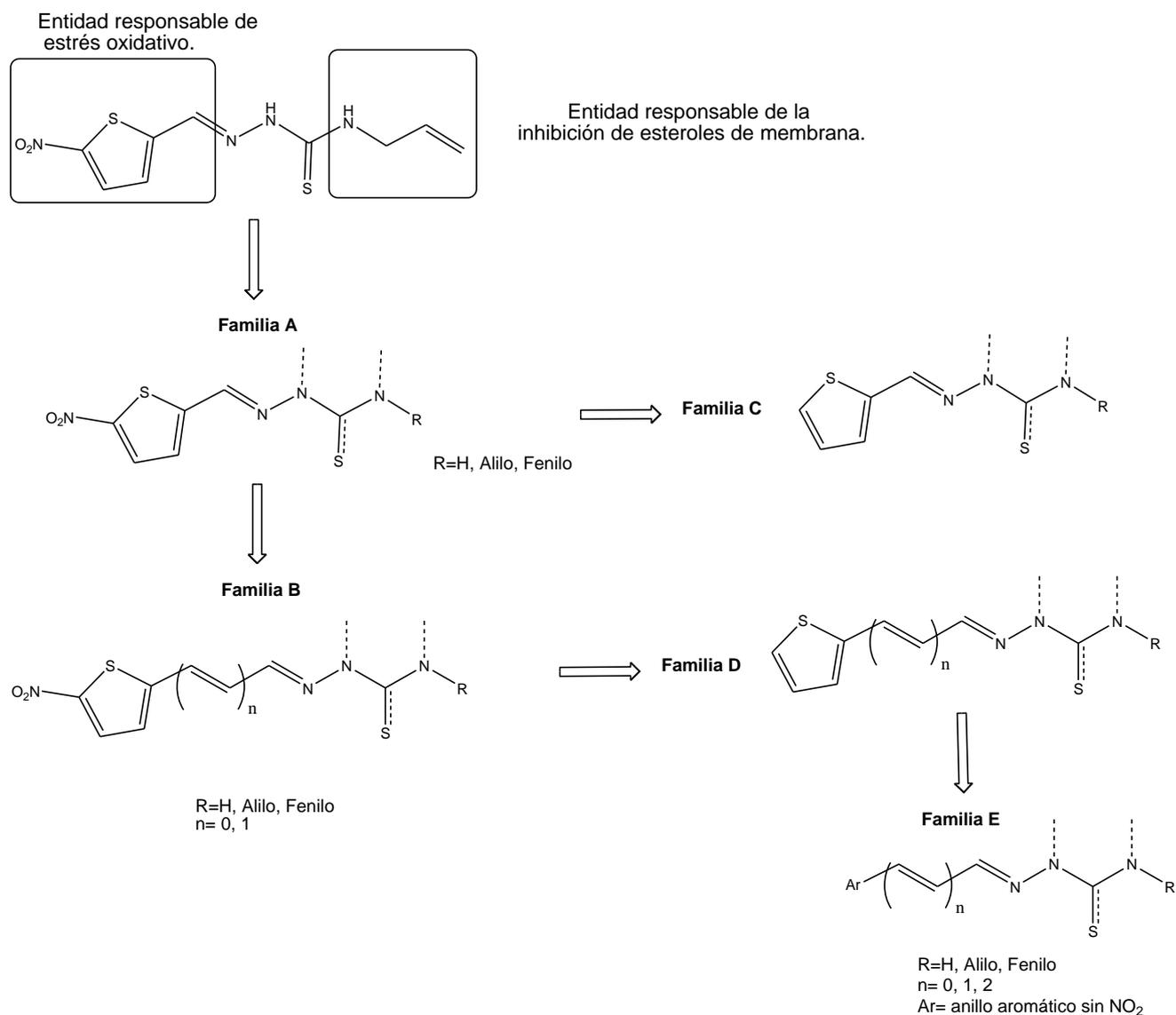
Se propone en primera instancia diseñar moléculas dirigidas a múltiples dianas del parásito. Las modificaciones químicas planteadas serán sobre el compuesto **líder II**, buscando agentes con adecuado perfil de mutagenicidad/genotoxicidad y con actividad tripanosomicida mejor que los fármacos de referencia. A continuación se ejemplifican algunas de las modificaciones sintéticas, inicialmente planificadas, que serán estudiadas y optimizadas en el presente trabajo de tesis, para la generación de derivados de cada familia:



Se utilizarán tres tipos de modificaciones estructurales. Por un lado, la formación del heterociclo tiadiazol, para obtener análogos de Megazol (fármaco antifúngico) con actividad tripanosomicida y buenos perfiles toxicológicos.<sup>75</sup> Por otro lado, la formación de un sistema tiazol en busca de aumentar la lipofilia para lograr una penetración en la forma amastigote de *T. cruzi*, forma que prolifera dentro de las células de mamífero.<sup>76</sup> La tercera modificación propuesta es la formación de la tiazolidona, una amida cíclica, como potencial inhibidor de amidasas y proteasas esenciales del parásito.

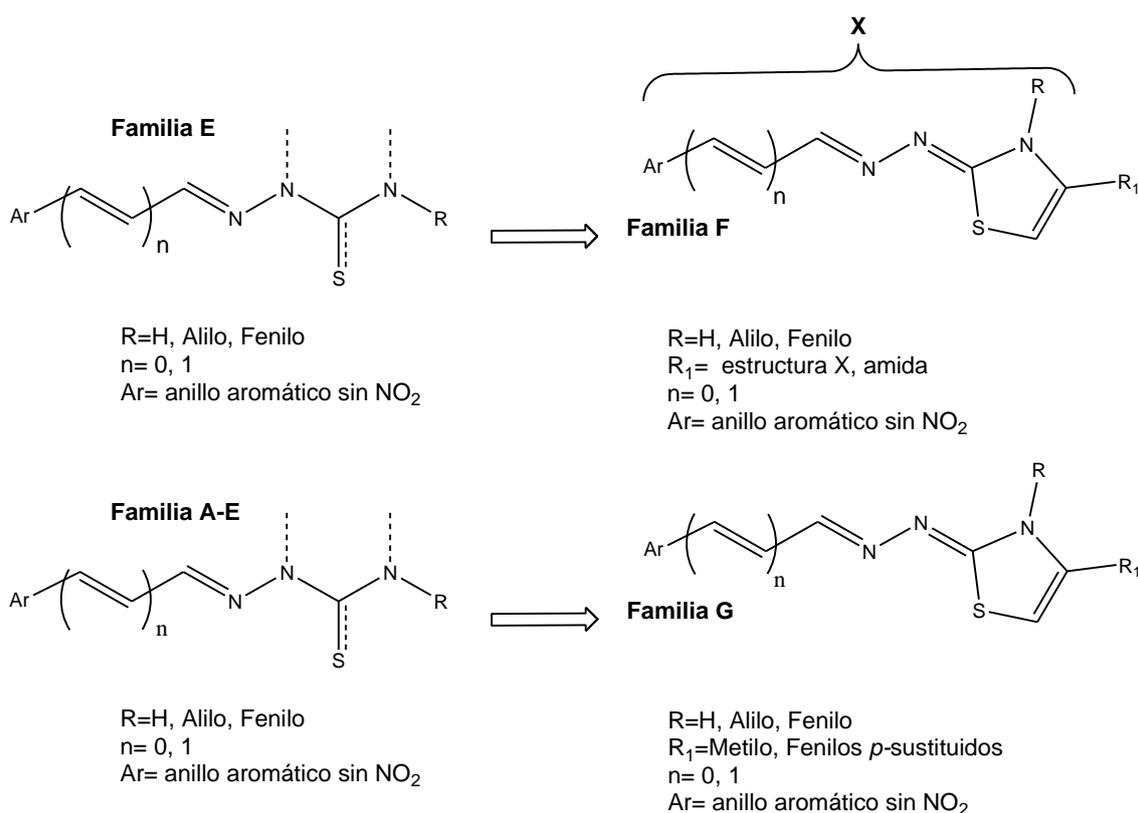
# Introducción

Dentro de esta propuesta se sintetizaron siete familias mediante el diseño bioguiado, las cuales se muestran en el esquema siguiente. La **Familia A** la constituyen los compuestos que surgen por modificaciones directas sobre el **Líder II**. La **Familia B** incorpora insaturaciones como forma de potenciar la actividad tripanosomicida de los nuevos derivados de la **Familia A**.<sup>77</sup> La **Familia C** surge de la supresión del grupo nitro de los derivados de la **Familia A** para obtener moléculas potencialmente no mutagénicas. La **Familia D** plantea la potenciación de la acción tripanosomicida de los derivados de la **Familia C** por homologación de la cadena lateral. Por último, para pensar la actividad tripanosomicida de diferentes anillos aromáticos sin grupo nitro, se planea la **Familia E**.



# Introducción

Luego de optimizar la actividad tripanosomicida de las **Familias A-E**, se rediseñan moléculas a partir de los derivados más activos encontrados, surgiendo las **Familias F y G** (ver a continuación). La **Familia F** es producto de la incorporación de farmacóforos reconocidos con actividad frente a **TIM, CP y TryS**. La **Familia G** es consecuencia de la optimización de la/las moléculas identificadas como nuevos líderes de las **Familias A-E** por incorporación de pequeñas modificaciones estructurales.



**Caracterización biológica *in vitro*** frente a *T. cruzi* de los nuevos derivados desarrollados. Se plantea emplear el estadio epimastigote de *T. cruzi*, de la cepa Tulahuen 2, en el estudio de la actividad antichagásica de todos los compuestos seleccionados. En primera instancia, se estudiará la actividad tripanosomicida de todos los compuestos, empleando un método turbidimétrico. Como fármacos de referencia se emplearán Nfx y Bnz. En este punto y con este ensayo biológico se realizará el diseño bioguiado de nuevos derivados. Si se encuentran compuestos con actividad tripanosomicida mejorada con respecto al líder de partida, se ensayarán en otros estadios y cepas del parásito.



# Introducción

**Estudios de toxicidad inespecífica** (índices de selectividad, mutagenicidad y genotoxicidad de los nuevos derivados desarrollados). Se plantea emplear el ensayo de citotoxicidad en células de mamífero (macrófagos murinos, células VERO o glóbulos rojos humanos) para el cálculo del índice de selectividad. Se utilizará el test de Ames como ensayo de mutagenicidad, utilizando *Salmonella typhimurium* como microorganismo indicador de mutaciones. Para el estudio de genotoxicidad se utilizará el ensayo de micronúcleos. Esta etapa dará lugar a ensayos *in vivo* en animales de experimentación si los derivados desarrollados tienen actividad tripanosomicida y baja toxicidad inespecífica.

**Estudios *in vivo*.** Si algún nuevo derivado presenta un adecuado perfil de actividad frente a *T. cruzi* y baja toxicidad frente a sistemas mamíferos, será ensayado en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas.

**Estudios de mecanismo de acción.** Se plantea el estudio de los modos de acción de los productos más relevantes. Se utilizarán diferentes metodologías para identificar las posibles dianas de los nuevos derivados. También se ensayarán en las dianas para lo cual fueron diseñados, ensayo de inhibición de cruzipaina, inhibición de triosafosfato isomerasa, inhibición de biosíntesis de esteroides de membrana y de tripanotión sintetasa.

---

## Bibliografía

<sup>1</sup> Renslo RA, McKerrow JH, Drug discovery and development for neglected parasitic diseases, *Nature*, **2006**, 2, 701-710.

<sup>2</sup> Barret MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S, The trypanosomiasis, *The Lancet*, **2003**, 362, 1469-1480.

<sup>3</sup> Organización Panamericana de la Salud, Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas, *OPS/HDM/CD/425-06*, **2006**.

<sup>4</sup> Guerri-Guttemberg RA, Guana DR, Ambrosio G, Milei J, Chagasic cardiomyopathy: Europe is not spared!, *Eur Heart J*, **2008**, 29, 2587-2591.

<sup>5</sup> Schmunis GA, Epidemiology of Chagas Disease in non endemic countries, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2007**, 102, 75-85.

<sup>6</sup> De Ayala AP, Pérez-Molina JA, Norman F, López Vélez R, Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain, *Emerg Infect Dis*, **2009**, 15, 607-608.

<sup>7</sup> Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA, Chagas disease, *Lancet*, **2010**, 375, 1388-1402.

- <sup>8</sup> Bringaud F, Rivière L, Coustou V, Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources, *Mol Biochem Parasitol*, **2006**, 149, 1-9.
- <sup>9</sup> Elias MC, da Cunha JPC, de Faria FP, Mortara RA, Freymuller E, Schenkman S, Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle, *Protist*, **2007**, 158, 147-157.
- <sup>10</sup> Bot C, Hall SH, Alvarez G, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Wilkinson SR, Evaluating 5-nitrofurans as trypanocidal agents, *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**, en prensa.
- <sup>11</sup> Boiani M, Piacenza L, Hernández P, Boiani L, Cerecetto H, González 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.
- <sup>12</sup> Cerecetto H, González M, Chemotherapy of Chagas disease: status and new developments, *Curr Top Med Chem*, **2002**, 2, 1187- 1213.
- <sup>13</sup> Docampo R., Moreno S.N.J., Free radical metabolism of antiparasitic agents, *Fed Proc*, **1986**, 45, 2471-2476.
- <sup>14</sup> Docampo R, Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs, *Chem Biol Interact*, **1990**, 73, 1-27.
- <sup>15</sup> Cabrera M, Lavaggi ML, Hernández P, Merlino A, Gerpe A, Porcal W, Boiani M, Ferreira A, Monge A, de Cerain AL, González 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.
- <sup>16</sup> Keenan M, Abbott MJ, Alexander PW, Armstrong T, Best WM, Berven B, Botero A, Chaplin JH, Charman SA, Chatelain E, von Geldern TW, Kerfoot M, Khong A, Nguyen T, McManus JD, Morizzi J, Ryan E, Scandale I, Thompson RA, Wang SZ, White KL, Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease, *J Med Chem*, **2012**, 55, 4189-4204.
- <sup>17</sup> Buckner FS, Urbina JA, Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease, *Int J Parasit*, **2012**, ISSN 2211-3207, 10.1016/j.ijpddr.2011.12.002.
- <sup>18</sup> Diniz Lde F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, Talvani A, Urbina JA, Bahia MT, Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob Agents Chemother*, **2010**, 54, 2979-2986.
- <sup>19</sup> Caballero AB, Marín C, Rodríguez-Diéguez A, Ramírez-Macías I, Barea E, Sánchez-Moreno M, Salas JM, In vitro and in vivo antiparasital activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one-based complexes, *J Inorg Biochem*, **2011**, 105, 770-776.
- <sup>20</sup> Sanchez-Sancho F, Campillo NE, Paez JA, Chagas Disease: Progress and New Perspectives, *Curr Med Chem*, **2010**, 17, 423-452.
- <sup>21</sup> Cerecetto H, Di Maio R, González M, Risso M, Saenz P, Seoane G, Denicola A, Peluffo G, Quijano C, Olea-Azar C, 1,2,5-Oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships, *J Med Chem*, **1999**, 42, 1941-1950.

- <sup>22</sup> Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, González M, Denicola A, Otero L, Gambino D, Rigol C, Olea-Azar C, Faundez M, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg Med Chem*, **2004**, 12, 4885-4893.
- <sup>23</sup> Aguirre G, Boiani L, Boiani M, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Porcal W, Denicola A, Piro OE, Castellano EE, Sant'Annae CNR, Barreiro EJ, New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: quantitative structure-activity relationship studies, *Bioorg Med Chem*, **2005**, 13, 6336-6346.
- <sup>24</sup> Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Porcal W, Denicola A, Möller M, Thomson L, Tórtora V, Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds, *Bioorg Med Chem*, **2005**, 13, 6324-6335.
- <sup>25</sup> Aguirre G, Boiani M, Cerecetto H, Gerpe A, González M, Fernández Sainz Y, Denicola A, Ochoa de Ocaríz C, Nogal JJ, Montero D, Escario JA, Novel antiprotozoal products: imidazole and benzimidazole *N*-oxide derivatives and related compounds, *Arch Pharm (Weinheim)*, **2004**, 337, 259-270.
- <sup>26</sup> Aguirre G, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Montoya Alfaro ME, Jaso A, Zarranz B, Ortega MA, Aldana I, Monge-Vega A, Quinoxaline *N,N'*-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships, *Bioorg Med Chem Lett*, **2004**, 14, 3835-3839.
- <sup>27</sup> Aguirre G, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Porcal W, Seoane G, Denicola A, Ortega MA, Aldana I, Monge-Vega A, Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. Part II, *Arch Pharm (Weinheim)*, **2002**, 335, 15-21.
- <sup>28</sup> Boiani M, Boiani L, Denicola A, Torres de Ortiz S, Serna E, Vera de Bilbao N, Sanabria L, Yaluff G, Nakayama H, Rojas de Arias A, Vega C, Rolan M, Gómez-Barrio A, Cerecetto H, González M, 2*H*-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents, *J Med Chem*, **2006**, 49, 3215-3224.
- <sup>29</sup> Gerpe A, Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, González M, Olea-Azar C, Rigol C, Maya JD, Morello A, Piro OE, Arán VJ, Azqueta A, López de Ceráin A, Monge A, Rojas MA, Yaluff G, Indazole *N*-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies, *Bioorg Med Chem*, **2006**, 14, 3467-3480.
- <sup>30</sup> Prado-Prado FJ, García-Mera X, González-Díaz H, Multi-target spectral moment QSAR versus ANN for antiparasitic drugs against different parasite species, *Bioorg Med Chem*, **2010**, 18, 2225-2231.
- <sup>31</sup> Korcsmáros T, Szalay S, Böde C, Kovács I, Csermely P, How to design multi-target drugs: Target search options in cellular networks, *Expert Op Drug Discov*, **2007**, 2, 1-10.
- <sup>32</sup> Cavalli A, Bolognesi ML, Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*, *J Med Chem*, **2009**, 52, 7339-7359.
- <sup>33</sup> Korcsmáros T, Szalay MS, Böde C, Kovács IA, Csermely P, How to design multi-target drugs: Target search options in cellular networks. *Expert Opin Drug Discov*, **2007**, 2, 1-10.
- <sup>34</sup> Gerpe A, Boiani L, Hernández P, Sortino M, Zacchino S, González M, Cerecetto H, Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Eur J Med Chem*, **2010**, 45, 2154-2164.

<sup>35</sup> Castro D, Boiani L, Benitez D, Hernández P, Merlino A, Gil C, Olea-Azar C, González M, Cerecetto H, Porcal W, Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies, *Eur J Med Chem*, **2009**, 44, 5055-5065

<sup>36</sup> Boiani M, Boiani L, Merlino A, Hernández P, Chidichimo A, Cazzulo JJ, 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.

<sup>37</sup> El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*, **2005**, 309, 409-415.

<sup>38</sup> Castaño T, Wang H, Campillo NE, Ballester S, González-García C, Hernández J, Pérez C, Cuenca J, Pérez-Castillo A, Martínez A, Huertas O, Gelpí JL, Luque FJ, Ke H, Gil C, Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors, *ChemMedChem*, **2009**, 4, 866-876.

<sup>39</sup> Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ, Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa, *Mol Biochem Parasitol*, **2003**, 126, 129-142.

<sup>40</sup> Urbina JA, Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches, *Acta Trop*, **2010**, 115, 55-68.

<sup>41</sup> Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA, Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts, *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**, 44, 150-155.

<sup>42</sup> Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartoli J, *In-vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, *Antimicrob Agents Chemother*, **2000**, 44, 2498-2502.

<sup>43</sup> Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas S L, Rodríguez J, Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up, *Ann Trop Med Parasitol*, **2003**, 97, 23-29.

<sup>44</sup> Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ, The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benzimidazole, *Antimicrob Agents Chemother*, **2007**, 51, 1359-1364.

- <sup>45</sup> Souza DHF, Garratt RC, Araujo APU, Guimaraes BG, Jesus WDP, Michels PAM, Hannaert V, Oliva G, *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design, *FEBS Lett*, **1998**, 424, 131-135.
- <sup>46</sup> Figueroa-Cortés AA, Torres-Pérez A, Salaiza N, Cabrera N, Escalona-Montaño A, Rondán A, Aguirre-García M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Becker I, A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth *in vitro* and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase, *Parasitol Res*, **2008**, 102, 635-643.
- <sup>47</sup> Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WGJ, Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme, *Protein Sci*, **1994**, 3, 810-821.
- <sup>48</sup> Rieder SV, Rose IA, The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction, *J Biol Chem*, **1959**, 234, 1007-1010.
- <sup>49</sup> Waley SG, Refolding of triosephosphate isomerase, *Biochem J*, **1973**, 135, 165-172.
- <sup>50</sup> Téllez-Valencia A, Avila-Rios S, Pérez-Montfort R, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, López-Calahorra F, Gómez-Puyou A, Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**, 295, 958-963.
- <sup>51</sup> Téllez-Valencia A, Olivares-Illana V, Hernández-Santoyo A, Pérez-Montfort R, Costas M, Rodríguez-Romero A, López-Calahorra F, Tuena de Gómez-Puyol M, Gómez-Puyol A, Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface, *J Mol Biol*, **2004**, 341, 1355-1365.
- <sup>52</sup> Alvarez G, Aguirre-López B, Varela J, Cabrera M, Merlino A, López GV, Lavaggi ML, Porcal W, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Massive screening yields novel and selective *T. cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity, *Eur J Med Chem*, **2010**, 45, 5767-5772.
- <sup>53</sup> Alvarez G, Aguirre-López B, Cabrera N, Marins EB, Tinoco L, Batthyany CI, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Cerecetto H, González M, 1,2,4-Thiadiazol-5(4H)-ones: A new class of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase. Study of the mechanism of inhibition, *J Enzym Inhib Med Chem*, **2012**, doi:10.3109/14756366.2012.700928.
- <sup>54</sup> Alvarez G, Martínez J, Aguirre-López B, Cabrera N, Pérez-Díaz L, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Garat B, Merlino A, González M, Cerecetto H, New chemotypes as *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors. A deeper insight into the mechanism of inhibition, *J Enzym Inhib Med Chem*, **2013**, en prensa.
- <sup>55</sup> Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch ACC, Petersson U, Cazzulo JJ, The major cysteine proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes, *Mol Biochem Parasitol*, **1992**, 50, 225-234.
- <sup>56</sup> Lima AP, dos Reis FC, Serveau C, Lalmanach G, Juliano L, Ménard R, Vernet T, Thomas DY, Storer AC, Scharfstein J, Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors, *Mol Biochem Parasitol*, **2001**, 114, 41-52.
- <sup>57</sup> Duschak VG, Barboza M, Couto A, *Trypanosoma cruzi*: partial characterization of minor cruzipain isoforms non-adsorbed to Concanavalin A-Sepharose, *Exp Parasitol*, **2003**, 104, 122-130.

- <sup>58</sup> Gomes SAO, Misael D, Silva BA, Feder D, Silva CS, Gonçalves TCM, Santos ALS, Santos-Mallet JR, Major cysteine protease (cruzipain) in Z3 sylvatic isolates of *Trypanosoma cruzi* from Rio de Janeiro, Brazil, *Parasitol Res*, **2009**, 105, 743-749.
- <sup>59</sup> Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS, The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*, *J Biol Chem*, **1992**, 267, 7411-7420.
- <sup>60</sup> Aparicio IM, Scharfstein J, Lima APC, A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes, *Infect Immun*, **2004**, 72, 5892-5902.
- <sup>61</sup> Berasain P, Carmona C, Frangione B, Cazzulo JJ, Goñi F, Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, *Mol Biochem Parasitol*, **2003**, 130, 23-29.
- <sup>62</sup> Giordanengo L, Guiñazú N, Stempin C, Fretes R, Cerbán F, Gea S, Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite, *Eur J Immunol*, **2002**, 32, 1003-1011.
- <sup>63</sup> Lima Leite AC, Souza de Lima R, Moreira DR, Cardoso MV, Gouveia de Brito AC, Farias dos Santos LM, Zaldini M, Kiperstok AC, Santana de Lima R, Soares MBP, Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*, *Bioorg Med Chem*, **2006**, 14, 3749-3757.
- <sup>64</sup> Hernandez MZ, Rabello MM, Leite AC, Cardoso MV, Moreira DR, Brondani DJ, Simone CA, Reis LC, Souza MA, Pereira VR, Ferreira RS, McKerrow JH, Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents, *Bioorg Med Chem*, **2010**, 18, 7826-7835.
- <sup>65</sup> Merlino A, Benítez D, Campillo N, Paez J, Tinoco L, González M, Cerecetto H, Amidines bearing benzofuroxan or benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors: structural basis for their interactions with cruzipain, *MedChemCom*, **2012**, 3, 90-101.
- <sup>66</sup> Chen YT, Brinen LS, Kerr ID, Hansell E, Doyle PS, McKerrow JH, Roush WR, *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl Trop Dis*, **2010**, 4, pii: e825.
- <sup>67</sup> Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH, Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*, *J Biol Chem*, **2003**, 278, 27612-27619.
- <sup>68</sup> Olin-Sandoval V, González-Chávez Z, Berzunza-Cruz M, Martínez I, Jasso-Chávez R, Becker I, Espinoza B, Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling, *FEBS J*, **2012**, 279, 1811-1833.
- <sup>69</sup> Torrie LS, Wyllie S, Spinks D, Oza SL, Thompson S, Harrison JR, Gilbert IH, Wyatt PG, Fairlamb AH, Frearson JA, Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis, *J Biol Chem*, **2009**, 284, 36137-36145.
- <sup>70</sup> Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH, A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*, *J Biol Chem*, **2002**, 277, 35853-35861.
- <sup>71</sup> Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R, Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification, *Free Radic Biol Med*, **2008**, 45, 733-742.



## Introducción

---

<sup>72</sup> Bjorseth A, Eidsa G, Gether J, Landmark L, Detection of mutagens in complex samples by the *Salmonella* assay applied directly on thin-layer chromatography plates, *Science*, **1982**, 215, 87-89

<sup>73</sup> Carvalho AS, Lopes FAZ, Salomão K, Romeiro NC, Wardell SMSV, de Castro SL, da Silva EF, Fraga CAM, Studies toward the structural optimization of new brazilizone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 413-421.

<sup>74</sup> Gerpe A, Alvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernández P, Sortino M, Zacchino S, González M, Cerecetto H, 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene, *Bioorg Med Chem*, **2009**, 17, 7500-7509.

<sup>75</sup> Salomao M., de Souza EM., Carvalho SA., da Silva EF., Fraga AM, Barbosa, HS., de Castro SL., *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of Megazol against *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob Agents Chemother*, **2010**, 2023–2031.

<sup>76</sup> Bekhit AA, Ashour HM, Abdel Ghany YS, Bekhit Ael-D, Baraka A, Synthesis and biological evaluation of some thiazolyl and thiadiazolyl derivatives of 1*H*-pyrazole as anti-inflammatory and antimicrobial agents, *Eur J Med Chem*, **2008**, 43, 456-463.

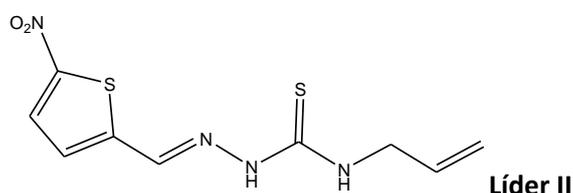
<sup>77</sup> Cerecetto H, González M, Anti-*T. cruzi* agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds, *Mini Rev Med Chem*, **2008**, 8, 1355-1383.

# QUÍMICA



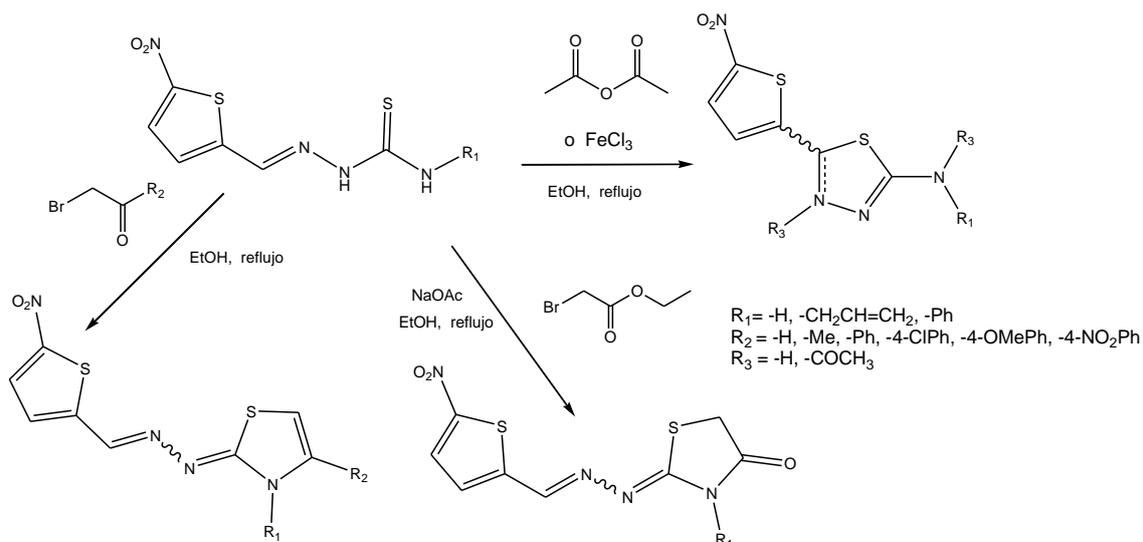


Los compuestos del presente trabajo se obtienen mediante metodologías sintéticas sencillas. Utilizando reactivos relativamente económicos y tendiendo a usar materiales lo más amigables posible con el ambiente. El diseño inicial de los compuestos se realiza basándose en los antecedentes previamente descritos. Luego se van modificando las moléculas siguiendo un diseño bioguiado. El diseño comienza con una serie de modificaciones de la molécula **Líder II** previamente descrita, que tiene destacada actividad tripanosomicida, un mecanismo de acción dual, y es inhibidora de la biosíntesis de esteroides de membrana del parásito y productora de estrés oxidativo.<sup>74</sup>



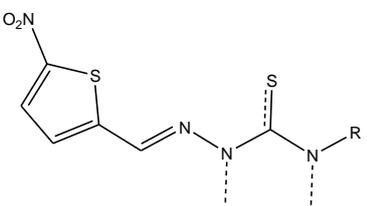
Así, como se plantea en la sección Introducción, se ha trabajado en la síntesis de 7 familias distintas (**Familias A-G**) cuyos resultados se describirán a continuación.

**Síntesis de la Familia A.** Se realizan una serie de modificaciones sobre el **Líder II** en busca de mejorar la actividad tripanosomicida incorporando nuevos posibles farmacóforos. En el esquema 1 se muestran las tres rutas sintéticas empleadas para la preparación de los mismos y en la tabla 3 se presenta información sobre los productos generados.

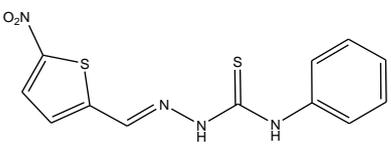
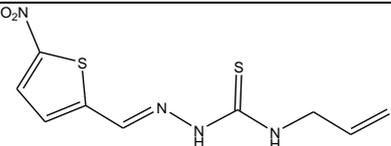
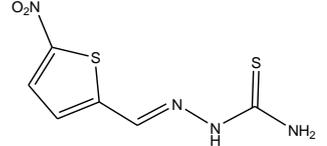
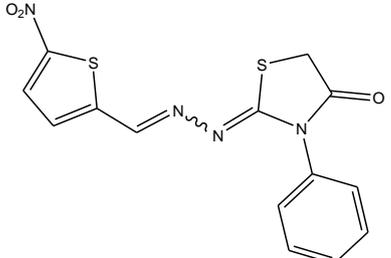
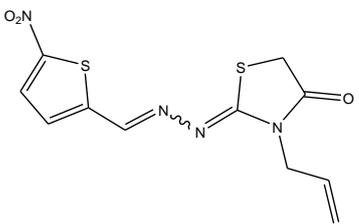
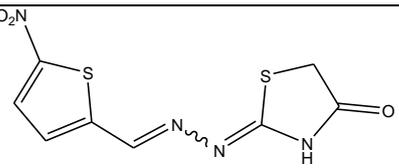


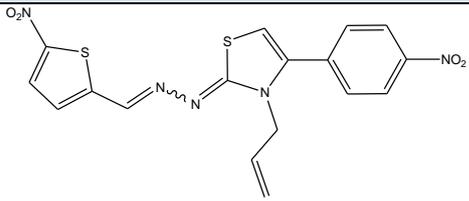
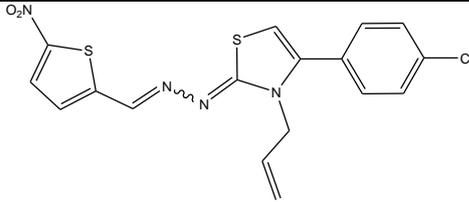
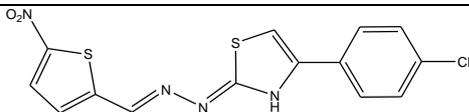
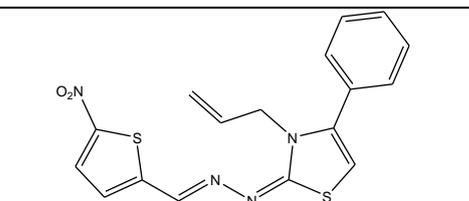
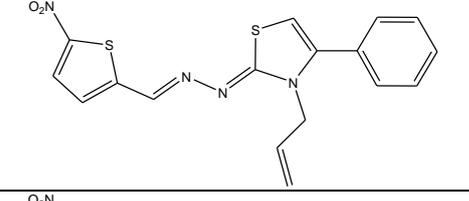
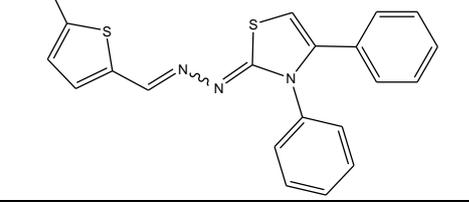
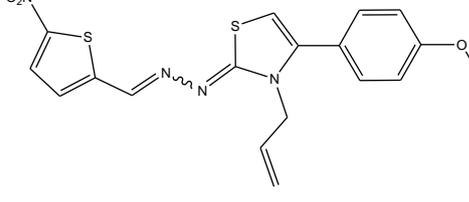
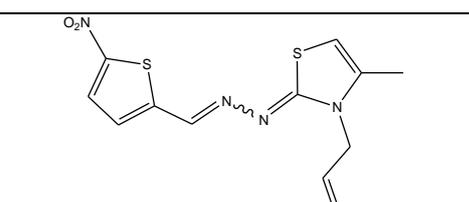
**Esquema 1** Rutas sintéticas utilizadas para la preparación de los derivados de la **Familia A**.

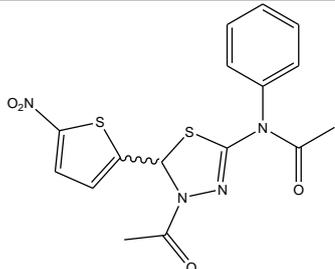
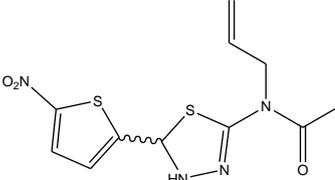
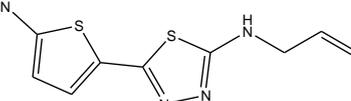
**Tabla 3.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia A**. Primera serie de modificaciones al **Líder II**.



**Familia A**

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>1A</b>	95	<i>nc</i> <sup>c</sup>	Sólido naranja
	<b>Líder II</b>	89	<i>nc</i>	Sólido naranja
	<b>3A</b>	92	<i>nc</i>	Sólido amarillo
	<b>4A</b>	95	1/0.5	Sólido amarillo
	<b>5A</b>	60	1/0.4	Sólido amarillo
	<b>6A</b>	43	1/0.4	Sólido amarillo

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>7A</b>	65	1/0.3	Sólido burdeos
	<b>8A</b>	40	1/0.8	Sólido rojo metalizado
	<b>9A</b>	37	1/0	Sólido rojo
	<b>10A<sub>EE</sub></b>	12	0/1	Sólido rojo
	<b>10A<sub>EZ</sub></b>	72	1/0	Sólido rojo
	<b>12A</b>	32	1/0.2	Sólido rojo
	<b>13A</b>	87	1/1	Sólido cobrizo
	<b>14A</b>	36	1/0.3	Sólido rojo metalizado

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>15A</b>	52	<i>nc</i>	Sólido marrón claro
	<b>16A</b>	58	<i>nc</i>	Aceite marrón
	<b>17A</b>	75	<i>nc</i>	Sólido marrón oscuro

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E.= relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> *nc*= no corresponde.

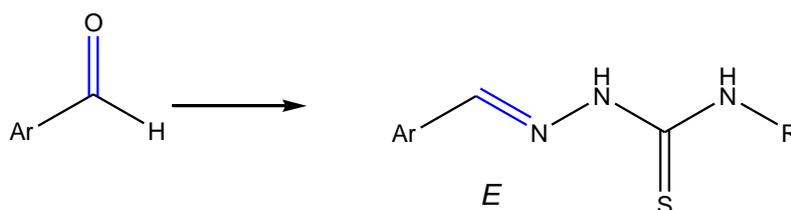
La **Familia A** (tabla 3) constituida por derivados de 5-nitrotiofeno conteniendo 2-hidrazinotiazoles (**4A-14A**) y tiadiazoles-5-sustituido por amidas o aminas *N*-sustituidas (**15A-17A**), obtenidos a partir de las tiosemicarbazonas **1A**, **II** y **3A**, se obtienen con rendimientos de buenos a excelentes. Los productos se preparan utilizando síntesis en paralelo. Este equipamiento permite la obtención simultánea de seis compuestos de forma rápida y sencilla, dado que al obtenerse en estado sólido, con la posterior filtración se logra el producto con alta pureza (figura 8).

**Figura 8.** Equipo de síntesis en paralelo. Este equipamiento permite la obtención simultánea de seis compuestos de forma rápida y sencilla. Fue utilizado para la preparación de los derivados de la **Familia A** y de las restantes familias.



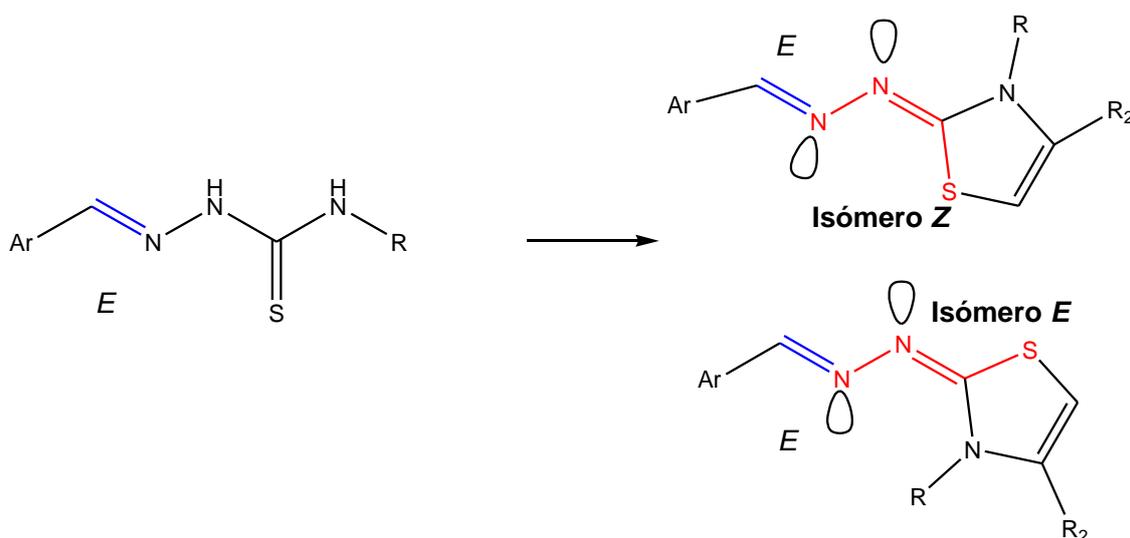
Todos los productos se purifican por recristalización con EtOH, excepto el tiadiazol **16A** que se purifica por cromatografía en columna. Los derivados hidrazinotiazoles **4A-14A** se obtienen como mezcla de isómeros geométricos *Z/E*, a nivel del enlace hidrazinotiazol, en diferentes proporciones.

**Isomería.** En esta parte se describe la elucidación de la isomería de los derivados **4A-14A**. En la primera etapa del proceso, la formación de la tiosemicarbazona, se obtiene como único producto de reacción el isómero *E* (esquema 2).<sup>74</sup>



**Esquema 2.** Estereoisomería de tiosemicarbazonas

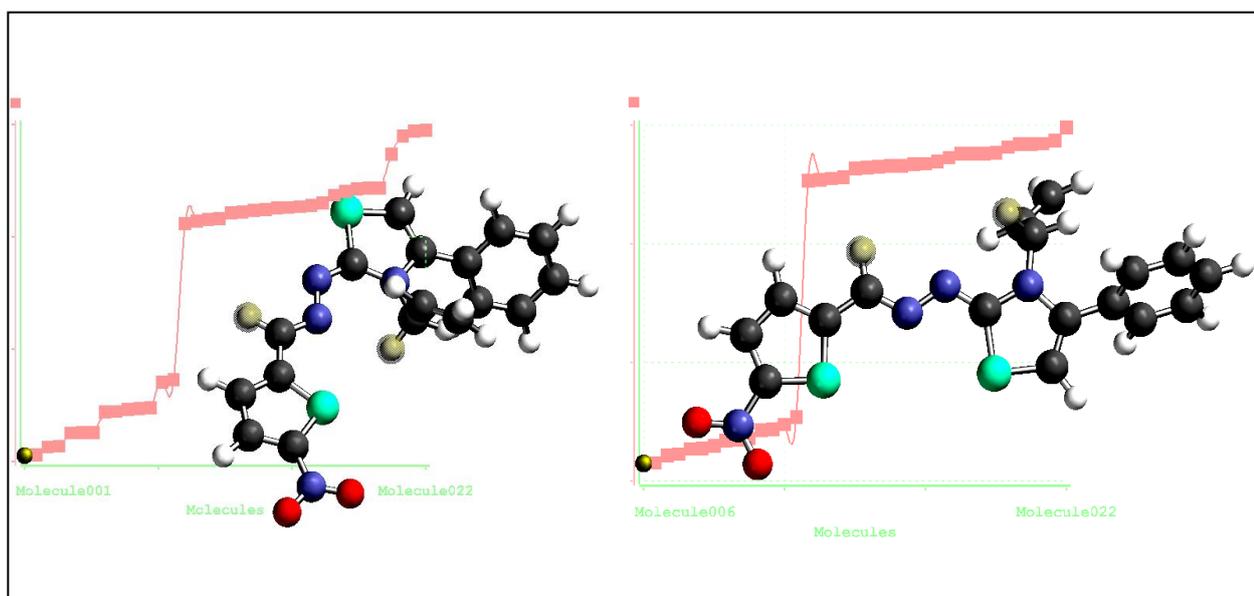
En la etapa siguiente, la formación del heterociclo, genera una nueva isomería a nivel del enlace hidrazino (en rojo, esquema 3), que puede ser *E* o *Z*. En la mayoría de los productos luego de purificarlos se obtiene un isómero en mayor proporción que el otro. Esto sugiere que uno es más estable o que su formación está favorecida con respecto al otro.



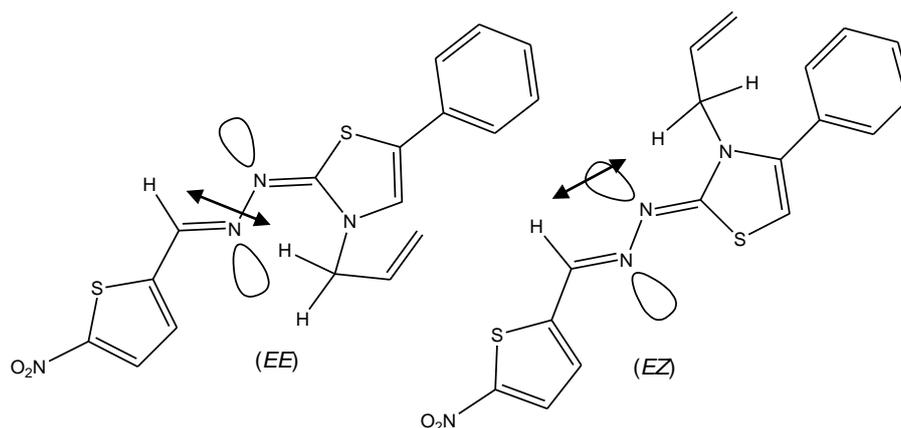
**Esquema 3.** Estereoisomería de los derivados hidrazinotiazoles

Para el estudio de la distribución de isómeros, se selecciona el derivado **10A** dado que fue posible a partir de la recristalización de EtOH la obtención del isómero mayoritario, y la posterior purificación en columna cromatográfica de las aguas madres permitió obtener el otro isómero minoritario, **10A<sub>EZ</sub>** y **10A<sub>EE</sub>** (tabla 3), respectivamente.

Según estudios teóricos, realizados a nivel semiempírico,<sup>78</sup> de energía conformacional con los dos isómeros del derivado **10A** (figura 9), el isómero *Z* (energía del conformero más estable -1821.49454 au) es más estable que el isómero *E* (energía del conformero más estable -1821.48418 au). Además, cabe mencionar que en el conformero del isómero *Z* los protones alilínicos se encuentran cercanos (4.363 Å) a los protones del metileno del grupo alilo (en amarillo en la figura) mientras que en el conformero del isómero *E* éstos se encuentran más distantes (4.604 Å). Por este motivo, se realizan experimentos de NOE (figura 10), donde se irradia el protón alilínico y se observan las señales de los protones metilénicos mencionados a diferentes tiempos de mezclado, para poder identificar inequívocamente cada isómero. En el esquema 4 se observan los dos isómeros del compuesto **10A** y se marca con flechas la interacción que se espera en el experimento de NOE, entre los protones alilínicos y del grupo alilo.



**Figura 9.** Gráfico teórico (Spartan '02, AM1) de la distribución conformacional de cada uno de los isómeros geométricos del derivado **10A**. El isómero **10A<sub>EE</sub>** se muestra a la izquierda y el **10A<sub>EZ</sub>** a la derecha. En amarillo se resaltan los protones estudiados en los experimentos de NOE.



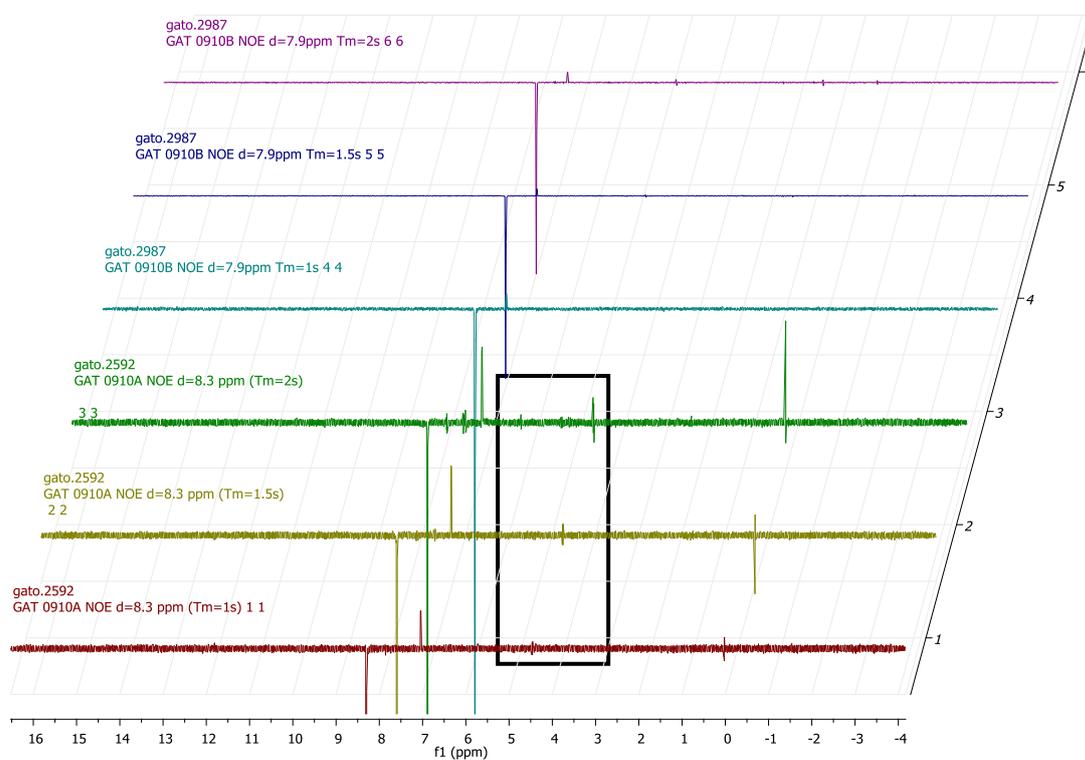
**Esquema 4.** Efectos NOE esperados entre protones ilidénico y del metileno alílico para los isómeros *EE* y *EZ* del compuesto **10A**.

De acuerdo a los experimentos NOE se observa claramente (recuadro negro, figura 10) que a todos los tiempos de mezclado utilizados el protón ilidénico ejerce efecto NOE en los protones metilénicos ( $\text{CH}_2$ ) para el caso del isómero mayoritario. En cambio, para el isómero minoritario no se observan señales significativas de los  $\text{CH}_2$  del grupo alilo, lo que está demostrando la falta de cercanía de los correspondientes protones. Esto se encuentra completamente de acuerdo con los cálculos teóricos, llevando a identificar inequívocamente que el isómero mayoritario es el isómero *EZ* y el minoritario el *EE*.

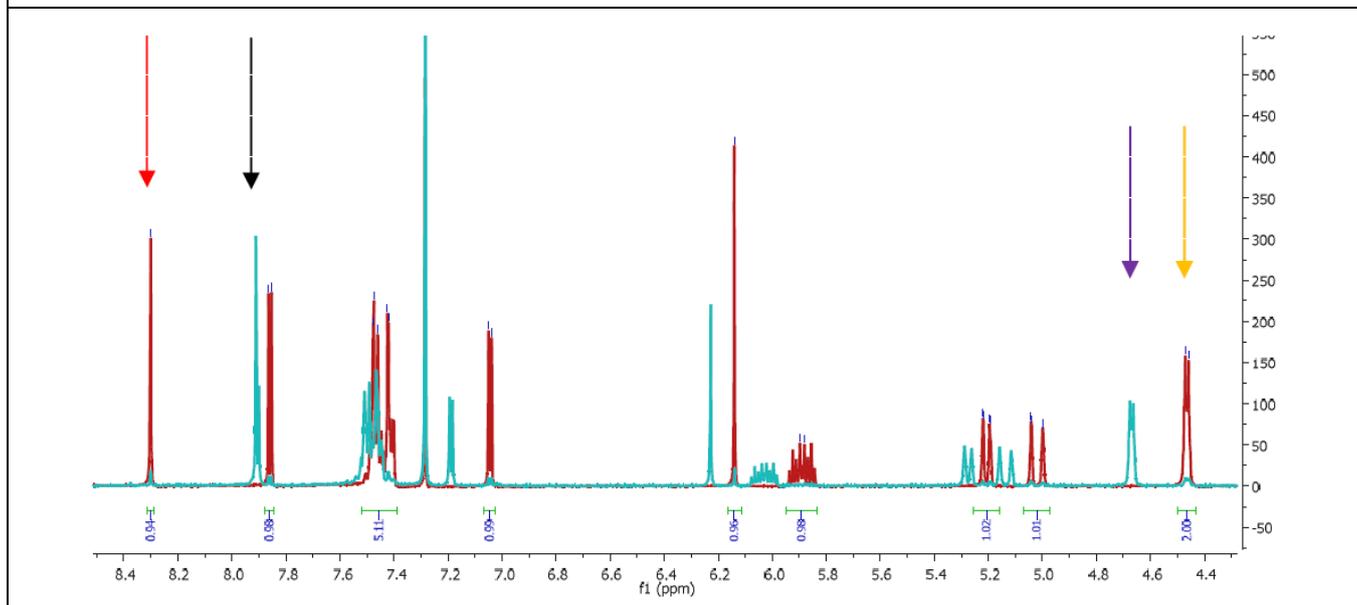
Como forma de caracterizar los desplazamientos químicos de ambos isómeros, se realiza el estudio de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de ambos isómeros aislados del compuesto **10A** (figura 11). La flecha roja indica el protón ilidénico del isómero *EZ* y la negra del *EE* los cuales se encuentran separados casi 0.4 ppm como se describe en la bibliografía para sistemas análogos.<sup>79</sup> Obsérvese que la gran mayoría de las señales del isómero *EE* se corren a deltas mayores, excepto el protón ilidénico. Basados en este corrimiento, se identifican y se determina la proporción de los diferentes isómeros del resto de las moléculas de esta familia. En la figura 11 se muestran también los protones alílicos observados en los experimentos NOE, mostrados en la figura 10, que aparecen aquí marcados con flechas violeta ( $\text{CH}_2$ -alilo *EE*) y naranja ( $\text{CH}_2$ -alilo *EZ*).

Para identificar la isomería de los derivados del resto de las familias, se utiliza el corrimiento de los protones en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, comparando con los isómeros aislados de **10A**.

**Figura 10.** Espectros de NOE-Dif para los isómeros *EE* (rosa, azul y celeste) y *EZ* (verde, mostaza y rojo) del compuesto 10A. Se realizó el experimento irradiando el protón alidénico (opciones default del equipo) y a diferentes tiempos de mezclado. Espectro 1 (según numeración del eje vertical, de abajo hacia arriba): isómero mayoritario ( $T_m$  1.0s); espectro 2: isómero mayoritario ( $T_m$  1.5s); espectro 3: isómero mayoritario ( $T_m$  2.0s); espectro 4: isómero minoritario ( $T_m$  1.0s); espectro 5: isómero minoritario ( $T_m$  1.5s); espectro 6: isómero minoritario ( $T_m$  2.0s).

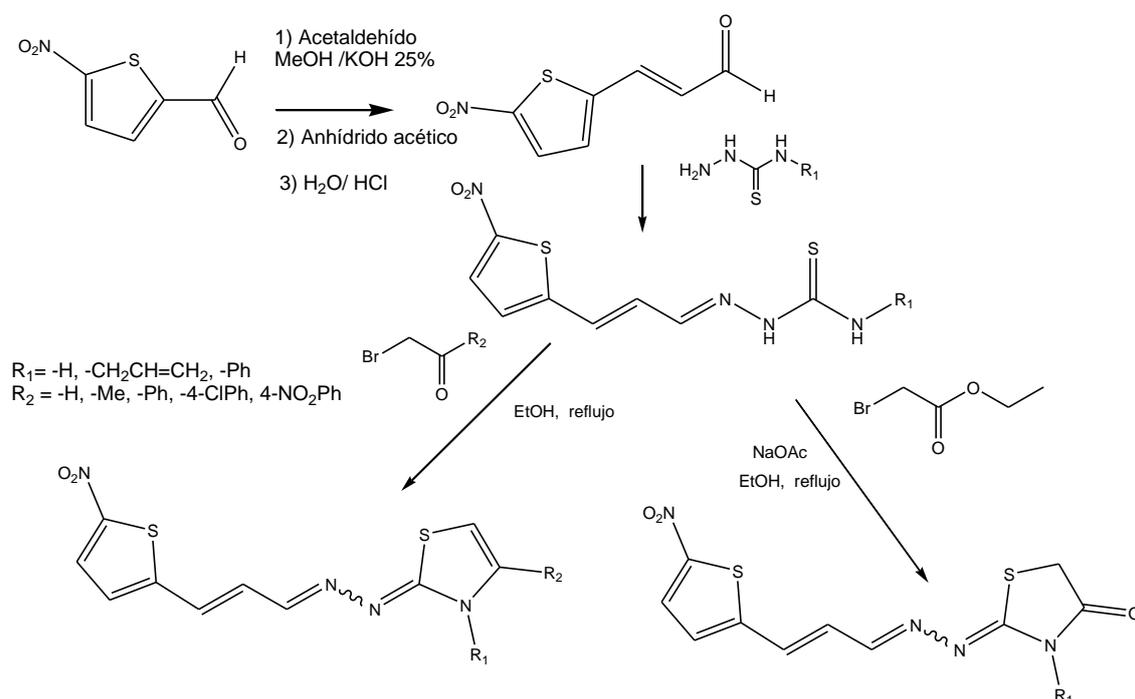


**Figura 11.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de 10A. Superposición de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los isómeros *EZ* (rojo) y *EE* (celeste) del compuesto 10A. Flechas roja y negra protón ilidénico, violeta y amarilla,  $\text{CH}_2$ -alilo.



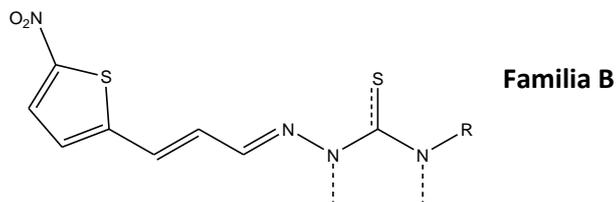
Luego de caracterizar química y biológicamente la **Familia A**, se sintetizan los derivados de la **Familia B**. Se mantienen todas las modificaciones antes planificadas pero se incorpora una insaturación entre el nitrotiéfeno y la tiosemicarbazida. Este tipo de arreglo estructural aparece repetido en numerosas estructuras con actividad tripanosomicida descritas por nuestro grupo.<sup>77</sup>

**Síntesis de los derivados de la Familia B.** Se realiza la homologación, para el posterior enlace hidrazino, de los derivados de la **Familia A** de acuerdo a las rutas sintéticas que se muestran en el esquema 5. En la tabla 4 se presenta información sobre los productos generados en esta familia.



**Esquema 5.** Rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los compuestos pertenecientes a la **Familia B**.

**Tabla 4.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia B**. Segunda serie de modificaciones al **Líder II**.



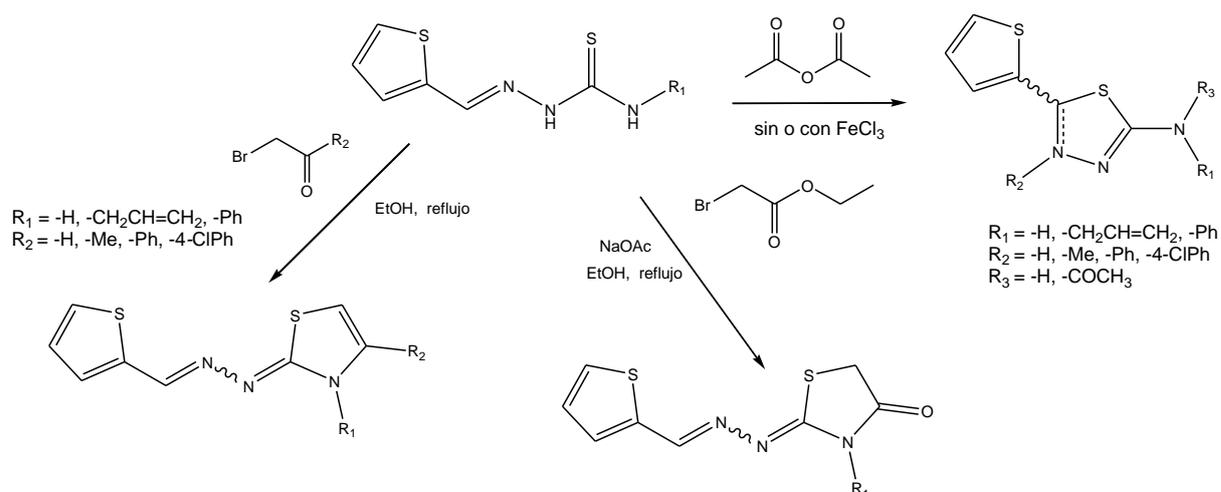
Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom. Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>2B<sup>c</sup></b>	75	<i>nc</i> <sup>d</sup>	Sólido burdeos
	<b>5B</b>	35	1/0	Sólido naranja
	<b>7B</b>	55	1/0.2	Sólido rojo metalizado
	<b>8B</b>	60	1/0.3	Sólido rojo metalizado
	<b>14B</b>	31	1/0	Sólido rojo metalizado

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E = relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración está asociada al compuesto análogo perteneciente a la **Familia A**. <sup>d</sup> *nc* = no corresponde.

Los cinco nuevos compuestos de la **Familia B** se obtienen con rendimientos de moderados a buenos. Dos de los derivados se obtienen como mezcla inseparable de isómeros geométricos *Z/E*. Todos los productos se purifican por recristalización de EtOH. Al igual que para la **Familia A**, la formación de la tiosemicarbazona **2B** conduce exclusivamente al isómero *E* a nivel del enlace imínico.

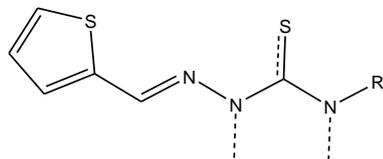
Luego de caracterizar química y biológicamente a los derivados de la **Familia B**, se diseña una nueva familia (**Familia C**) derivada del **Líder II**. Se mantienen todas las modificaciones antes planificadas pero se suprime el grupo nitro del heterociclo tiofeno. Por el potencial involucramiento de este grupo en problemas de mutagenicidad.<sup>80,81</sup>

**Síntesis de los derivados de la Familia C.** En el esquema 6 se muestran las rutas sintéticas desarrolladas y en la tabla 5 se presenta información sobre los productos generados en esta familia.



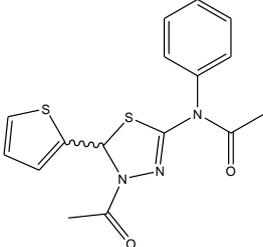
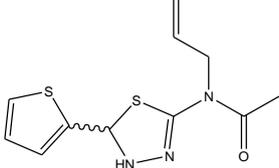
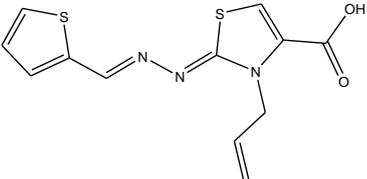
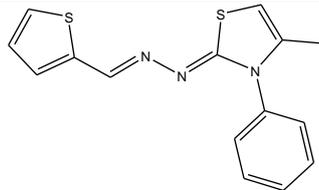
**Esquema 6.** Rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los compuestos pertenecientes a la **Familia C**.

**Tabla 5.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia C**. Tercera serie de modificaciones al **Líder II**.



Familia C

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>1C<sup>c</sup></b>	80	<i>nc</i> <sup>d</sup>	Sólido amarillo
	<b>V<sup>e</sup></b>	95	<i>nc</i>	Sólido blanco
	<b>4C</b>	92	1/0	Sólido blanco
	<b>5C</b>	64	1/1	Sólido blanco
	<b>8C</b>	79	1/0	Sólido naranja
	<b>10C</b>	68	1/0	Sólido amarillo
	<b>14C</b>	39	1/0	Sólido Amarillo

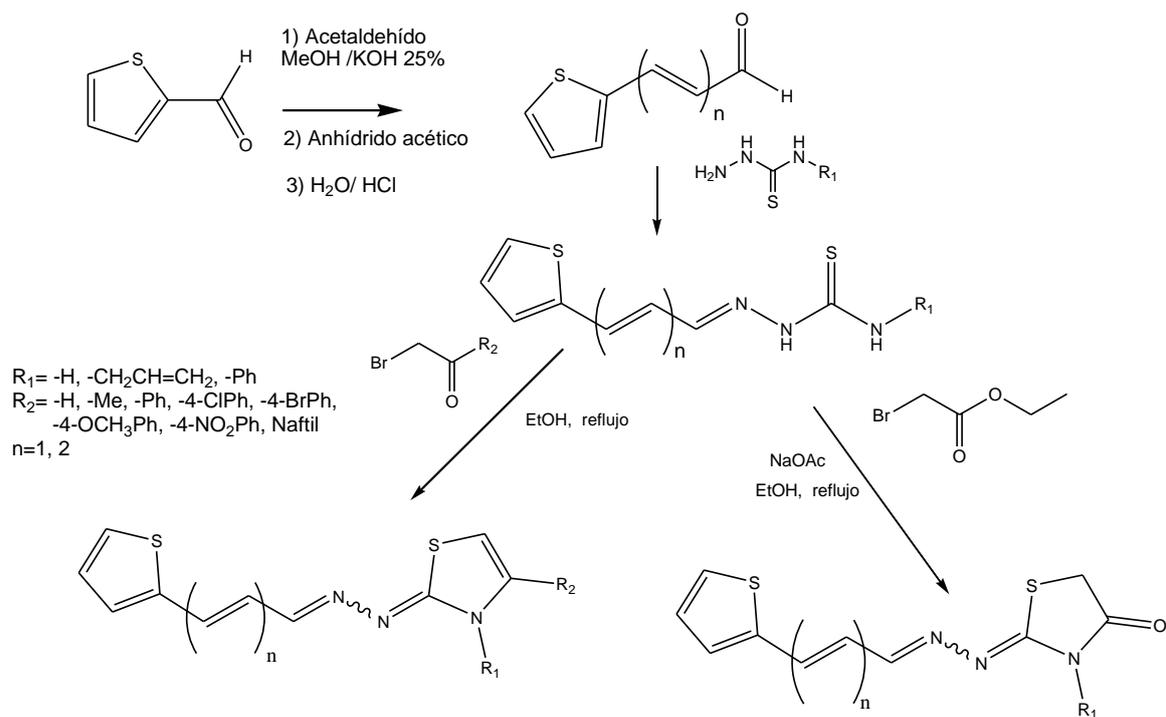
Estructura	Derivado	R (%)	Rel. isom (Z/E)	Aspecto
	<b>15C</b>	69	nc	Aceite Amarillo
	<b>16C</b>	30	nc	Aceite amarillo
	<b>18C</b>	70	1/0	Sólido amarillo
	<b>19C</b>	70	1/0	Sólido Amarillo

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E = relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración está asociada al compuesto análogo perteneciente a la **Familia A**. <sup>d</sup> nc = no corresponde. <sup>e</sup> Descrito previamente en referencia 74.

Los nueve nuevos derivados de la **Familia C** se obtienen con rendimientos de buenos a excelentes. La mayoría de los mismos se sintetizan en paralelo en equipo de seis viales. Todos los productos se purifican por recristalización de EtOH, excepto los tiadiazoles que se purifican por columna. A diferencia de lo que sucede con los productos de la **Familia A**, en esta familia la mayoría se obtiene como un isómero geométrico único a excepción del derivado **5C**, el cual es una mezcla equimolar de los isómeros Z/E a nivel del enlace hidrazino.

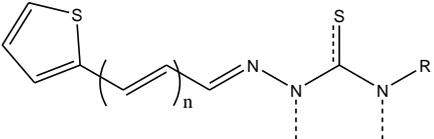
Luego de caracterizar química y biológicamente la **Familia C**, se diseña una nueva familia derivada del **Líder II**. Se mantienen todas las modificaciones antes planificadas pero se suprime el grupo nitro de la **Familia B** para generar la **Familia D**. Se busca potenciar la actividad tripanosomicida de la **Familia C** sin los potenciales efectos mutagénicos de los derivados de la **Familia B**.

**Síntesis de los derivados de la Familia D.** En el esquema 7 se muestran las rutas sintéticas desarrolladas y en la tabla 6 se presenta información sobre los productos generados en esta familia.

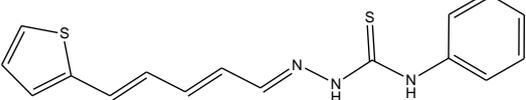
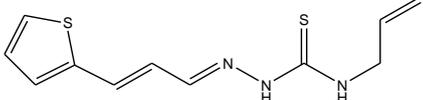
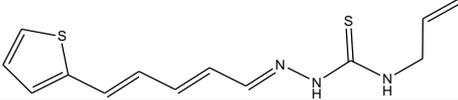
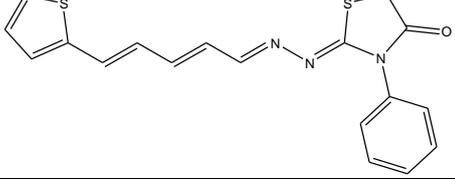
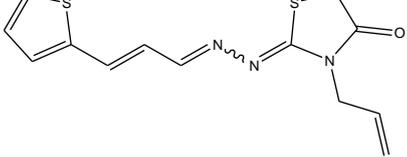
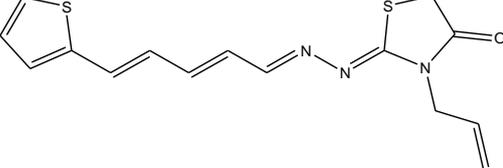
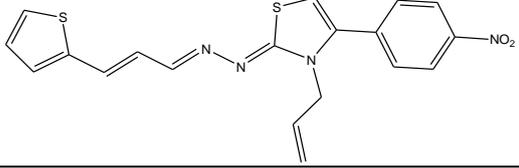
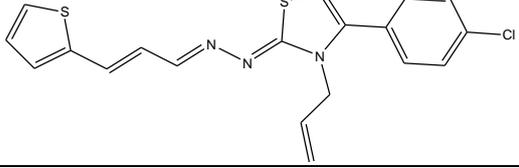
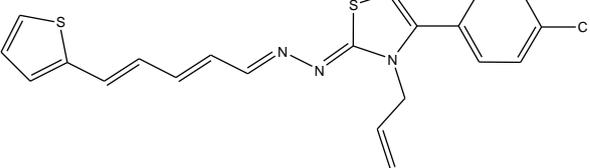


**Esquema 7.** Rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los compuestos pertenecientes a la Familia D.

**Tabla 6.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia D**. Cuarta serie de modificaciones al **Líder II**.



**Familia D**

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>1D2<sup>c,d</sup></b>	50	<i>nc</i> <sup>e</sup>	Sólido amarillo
	<b>2D1</b>	78	<i>nc</i>	Sólido amarillo
	<b>2D2</b>	50	<i>nc</i>	Sólido naranja
	<b>4D2</b>	95	1/0	Sólido Marrón
	<b>5D1</b>	95	1/0.2	Sólido naranja
	<b>5D2</b>	76	1/0	Sólido naranja
	<b>7D1</b>	95	1/0	Sólido rojo
	<b>8D1</b>	95	1/0.45	Sólido naranja
	<b>8D2</b>	50	1/0	Sólido amarillo

Estructura	Derivado	R (%)	Rel. isom Z/E	Aspecto
	<b>10D1</b>	95	1/0	Sólido naranja
	<b>13D1</b>	95	1/0	Sólido marrón
	<b>14D1</b>	95	1/0	Sólido naranja
	<b>20D1</b>	95	1/0.2	Sólido naranja
	<b>21D1</b>	95	1/0	Sólido rojo

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E = relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración está asociada al compuesto análogo perteneciente a la **Familia A**. <sup>d</sup> El último dígito en la numeración indica el número de dobles enlaces entre el tiofeno y el grupo imina. <sup>e</sup> nc = no corresponde.

Los catorce nuevos derivados de la **Familia D** se obtienen con rendimientos de buenos a excelentes. La mayoría de los productos se sintetizan en paralelo en equipo de seis viales. Todos los productos se purifican por recristalización de EtOH. La mayoría de los productos se obtienen como isómeros geométricos únicos EZ. La síntesis de los tiofencarbaldehídos reactivos de partida se optimizó para obtenerlos con una y dos insaturaciones en la misma reacción (ver en *Experimental*).

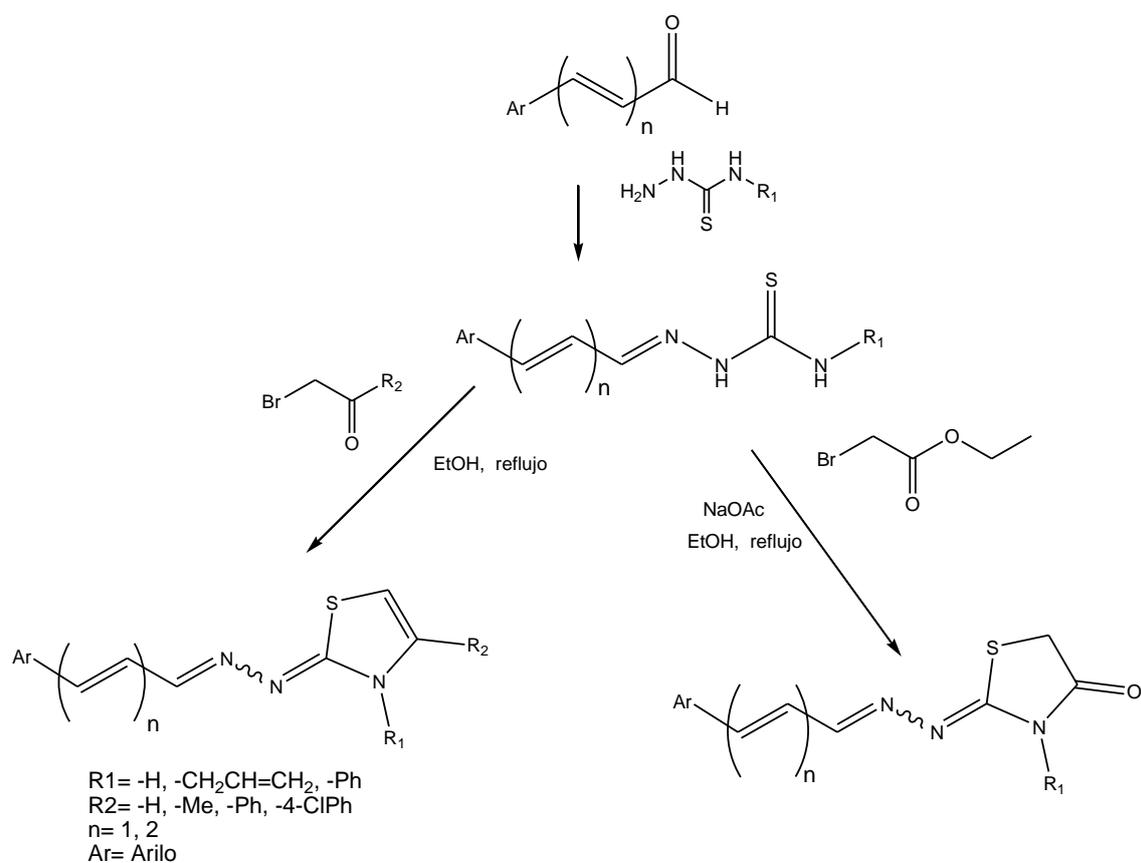
El proceso de obtención de los tiofencarbaldehído homologados, material de partida para la preparación de las tiosemicarbazonas de la **Familia D**, requiere de condiciones controladas para la incorporación, en la condensación aldólica, de un sólo mol de acetaldehído al tiofen-2-carbaldehído (figura 12).

**Figura 12.** Dispositivo de síntesis utilizado para la reacción de condensación aldólica, preparación de 3-(2-tienil)propenal. El tiempo de agregado es clave para lograr la incorporación de un sólo mol de acetaldehído. Cuanto más lento sea, mayor proporción del derivado de propenal se obtiene. En el proceso también se genera el derivado de pent-2,4-dienal, con un rendimiento del 25%. El producto de interés se purifica por cromatografía en columna.



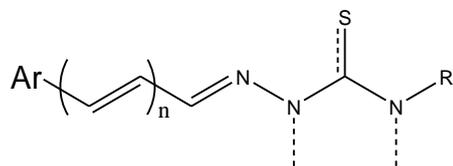
Luego de caracterizar química y biológicamente a los derivados de la **Familia D**, se diseña una nueva familia derivada del **Líder II (Familia E)**. En este caso se decide censar la actividad tripanosomicida de diversos anillos aromáticos en sustitución al anillo de tiofeno de las familias anteriores. Esta familia está conformada por tiosemicarbazonas similares al **líder II** e incorporando algunas de las modificaciones antes planteadas.

**Síntesis de los derivados de la Familia E.** En el esquema 8 se muestran las rutas sintéticas desarrolladas y en la tabla 7 se presenta información sobre los productos generados en esta familia. La ciclación de las distintas tiosemicbazonas de la **Familia E** se hizo después de los estudios biológicos frente a *T. cruzi*, dependiendo de estos se realizó o no la ciclación (ver criterios en sección Biología).



**Esquema 8.** Rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los compuestos pertenecientes a la **Familia E**.

**Tabla 7.** Resultados de la síntesis de los derivados de la **Familia E**. Búsqueda de anillos aromáticos como sustitutos de tiofeno.



Familia E

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>1E<sup>c,d</sup></b>	95	1/0	Sólido marrón
	<b>2E</b>	98	1/0	Sólido marrón
	<b>3E<sup>d</sup></b>	83	1/0	Sólido naranja
	<b>4E</b>	83	1/0	Sólido amarillo crema
	<b>5E</b>	86	<i>nc<sup>e</sup></i>	Sólido amarillo
	<b>6E</b>	87	1/0	Sólido amarillo claro
	<b>7E</b>	86	1/0	Aceite marrón

Estructura	Derivado	R (%)	Rel. isom Z/E	Aspecto
	<b>8E</b>	88	1/0	Sólido rojo ladrillo
	<b>6I<sup>f</sup></b>	95	nc	Sólido amarillo
	<b>10E</b>	70	1/0.3	Sólido amarillo claro
	<b>11E</b>	74	1/0	Sólido rojo
	<b>12E</b>	65	1/0	Aceite marrón oscuro
	<b>13E<sup>d</sup></b>	36	1/0	Sólido amarillo
	<b>14E</b>	71	1/0	Sólido naranja
	<b>15E</b>	79	nc	Sólido blanco
	<b>16E</b>	95	1/0	Sólido amarillo
	<b>17E</b>	86	nc	Sólido Blanco
	<b>18E</b>	87	nc	Sólido naranja

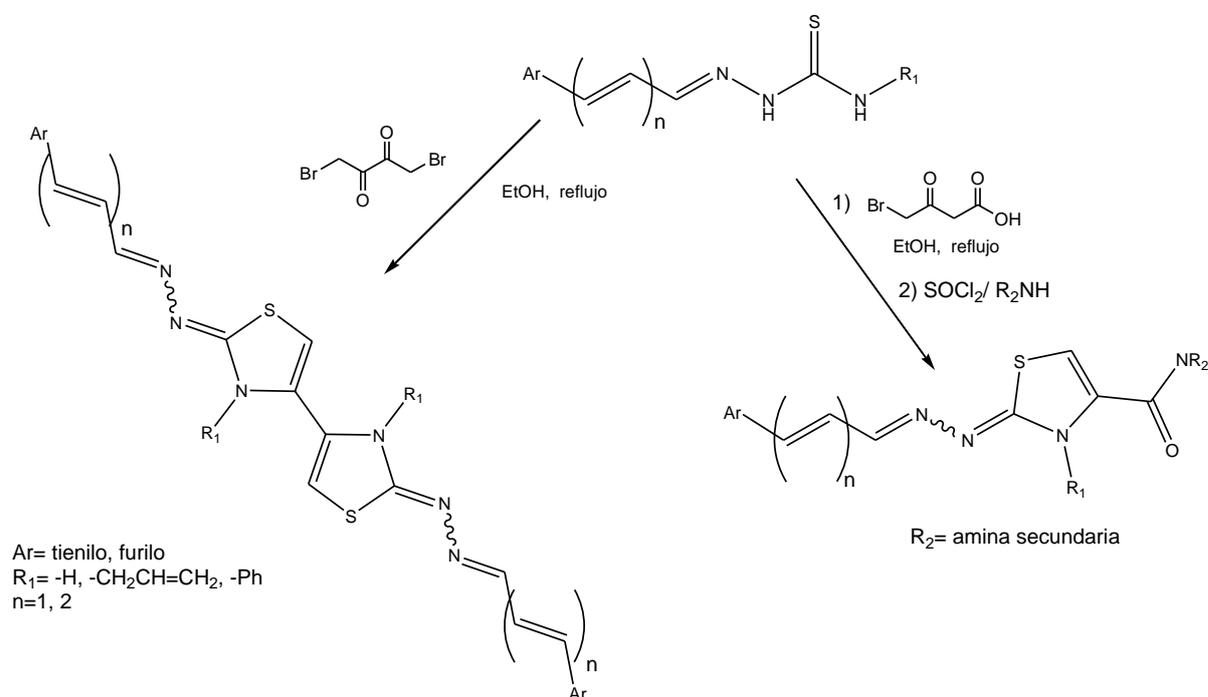
Estructura	Derivado	R (%)	Rel. isom Z/E	Aspecto
	19E	80	nc	Sólido amarillo claro
	20E	70	1/0	Sólido amarillo
	21E	88	nc	Sólido blanco
	22E	42	nc	Sólido rosado
	23E	74	nc	Sólido amarillo
	24E	95	nc	Sólido blanco
	25E	73	1/0	Sólido blanco
	26E	73	1/0	Sólido amarillo
	27E	65	nc	Sólido amarillo
	28E	95	1/0	Sólido amarillo
	29E	48	1/0	Sólido amarillo

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E.= relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración de los derivados de esta familia es arbitraria y no tiene relación con las anteriores. <sup>d</sup> La tiosemicarbazona precursora que no aparece en la tabla, está descrita previamente, o no fue aislada. <sup>e</sup> nc = no corresponde. <sup>f</sup> Previamente descrito en referencia 74.

Los veinticinco nuevos compuestos de la **Familia E** se obtienen con rendimientos de buenos a excelentes. La mayoría de los productos se sintetizan en paralelo en un equipo de seis viales. Todos los sólidos se purifican por recristalización de EtOH. La mayoría de los productos se obtienen como isómeros geométricos únicos *E* a nivel del enlace imínico y *Z* a nivel del enlace hidrazinotiazol.

Luego de caracterizar química y biológicamente la **Familia E**, se sintetizan dos nuevas familias derivadas del líder II y del nuevo líder identificado de la **Familia E (11E)** (ver sección Biología). La **Familia F** incorpora agrupamientos identificados como potenciales inhibidores de enzimas del parásito, mientras que la **Familia G** deriva de aplicar pequeñas modificaciones estructurales al nuevo líder para optimizar su actividad biológica.

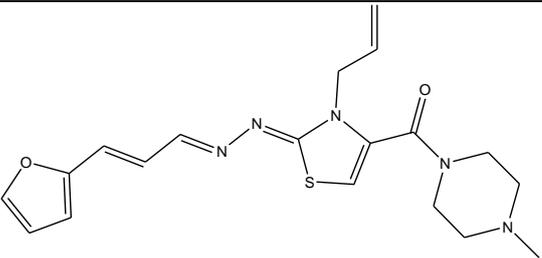
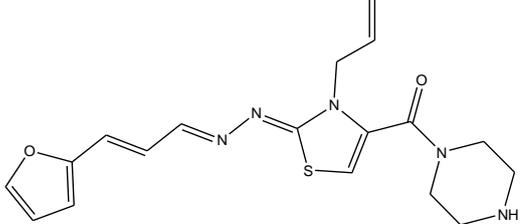
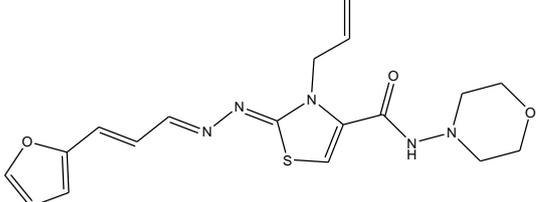
**Síntesis de los derivados de la Familia F.** En el esquema 9 se muestran las rutas sintéticas desarrolladas y en la tabla 8 se presenta información sobre los productos generados en esta familia. Las amidas diseñadas de esta familia están, en principio, relacionadas con estructuras activas frente a *T. cruzi* previamente desarrolladas por el grupo<sup>77</sup>.



**Esquema 9.** Rutas sintéticas utilizadas para la obtención de los compuestos pertenecientes a la **Familia F**.

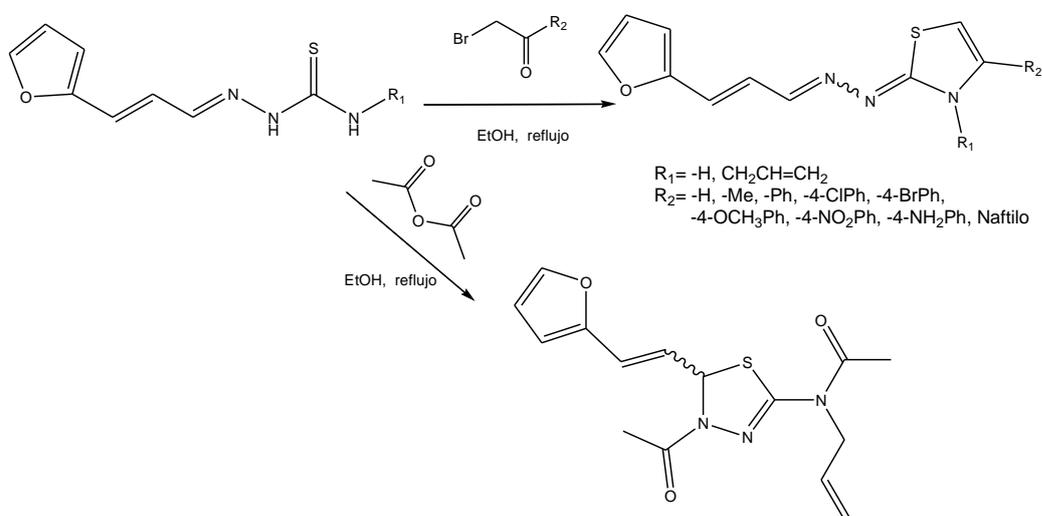
**Tabla 8.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia F**. Incorporación de posibles farmacóforos.

Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>1F<sup>c</sup></b>	75	1/0	Sólido amarillo
	<b>2F</b>	95	1/0	Sólido naranja
	<b>3F</b>	95	1/0	Sólido marrón verdoso
	<b>4F</b>	31	1/0.8	Aceite amarillo
	<b>5F</b>	60	1/0	Sólido amarillo

Estructura	Derivado	R (%)	Rel. isom Z/E	Aspecto
	<b>6F</b>	52	1/0	Sólido amarillo
	<b>7F<sup>d</sup></b>	88	1/0	Aceite amarillo
	<b>8F</b>	35	1/0	Aceite marrón oscuro

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E.= relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración de los derivados de esta familia es arbitraria y no tiene relación con las anteriores. <sup>d</sup> Preparado en dos etapas, en la primera por reacción del ácido activado de **18G** con *N*-Boc-piperacina seguida de una desprotección con ácido trifluoroacético.

**Síntesis de los derivados de la Familia G.** En el esquema 10 se muestran las rutas sintéticas desarrolladas y en la tabla 9 se presenta información sobre los productos generados en esta familia.



**Tabla 9.** Resultados de las síntesis de los derivados de la **Familia G** Optimización estructural del nuevo líder.

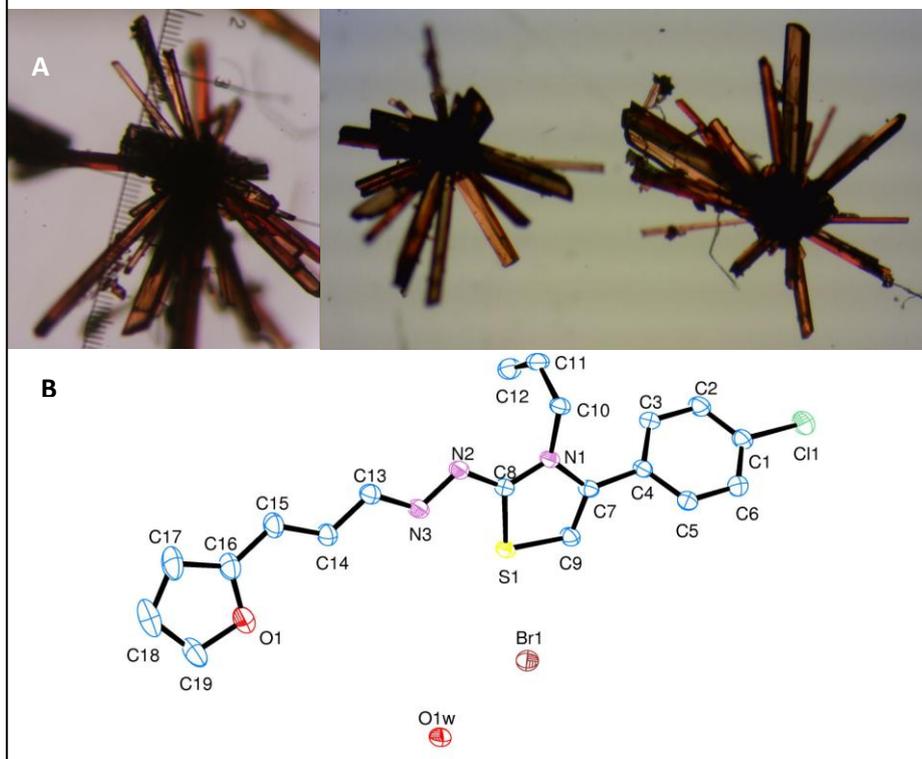
Estructura	Derivado	R (%) <sup>a</sup>	Rel. isom Z/E <sup>b</sup>	Aspecto
	<b>7G<sup>c</sup></b>	90	1/0	Sólido naranja ladrillo
	<b>8G</b>	97	1/0	Sólido amarillo
	<b>13G</b>	90	1/0	Sólido naranja
	<b>16G</b>	11	nc <sup>d</sup>	Aceite marrón
	<b>18G</b>	64	1/0	Sólido marrón
	<b>20G</b>	92	1/0	Sólido rojo
	<b>21G</b>	56	1/0	Sólido rojo
	<b>22G<sup>e</sup></b>	30	1/0	Sólido rojo

<sup>a</sup> Rendimiento de la reacción después de la purificación. <sup>b</sup> Rel. isom. Z/E.= relación de isómeros geométricos a nivel de enlace hidrazinotiazol. <sup>c</sup> La numeración está asociada al compuesto análogo perteneciente a las **Familias A-D**. <sup>d</sup> nc= no corresponde, <sup>e</sup> El derivado **22G** se obtiene por reducción del derivado **7G**.

Las **Familias F y G** (16 nuevos compuestos) se obtienen con rendimientos de buenos a excelentes. La mayoría de los productos se sintetizan en paralelo en un equipo de seis viales. Todos los productos se purifican por recristalización de EtOH a excepción de las amidas **4F-8F** y del derivado **22G** que se purifican por cromatografía en columna de alúmina.

Todos los productos se obtienen como isómeros geométricos *E* a nivel del enlace imínico y *Z* a nivel del enlace hidrazinotiazol. La **Familia G**, conteniendo un doble enlace extra entre el heterociclo furano y el sistema imínico, posee una isomería definida a nivel de esta tercera insaturación, obteniéndose siempre el isómero *EEZ*. Este aspecto, además de ser evidenciado por espectroscopía de RMN, tanto  $^1\text{H}$  como  $^{13}\text{C}$ , pudo ser confirmado en estado sólido, ya que para el derivado **8G** se obtuvieron cristales adecuados para realizar una difracción de rayos X (figura 13). De los experimentos de cristalografía de rayos X se confirma que la isomería es *EEZ*, correlacionando con los estudios teóricos, iniciales, y en solución por RMN.

**Figura 13. A.** Fotografía de los cristales obtenidos del derivado **8G**, por cristalización en un sistema en equilibrio líquido-vapor de EtOH, a temperatura ambiente. **B.** Diagrama ORTEP del derivado **8G**.

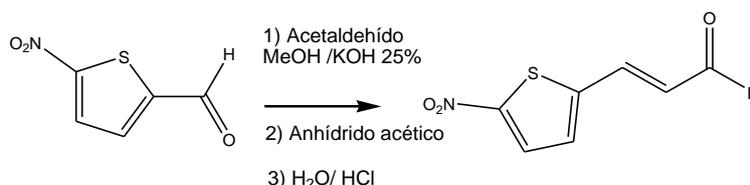


## Experimental

**Aspectos Generales:** Los reactivos de origen comercial se utilizaron sin purificación previa, excepto que se especifique. Los disolventes fueron destilados antes de usarse. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por TLC. Se utilizó sílica gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub>) y alúmina (POLYGRAM® ALOX N/UV<sub>254</sub>) con indicador UV. Los cromatogramas se revelaron por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta a 254 nm, revelado con vapores de yodo, revelado con reactivo de Brady (3 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se agrega a 20 mL de H<sub>2</sub>O y 70 mL de EtOH) o asperjado con una mezcla de EtOH: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(c) : anisaldehído (95:4:1) (%V:V:V) y posterior quemado. Para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel (Merck, 60-230 mesh) o alúmina neutra (Merck, 70-230 mesh). Los espectros de resonancia magnética nuclear, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN, se realizaron a 303 K en un equipo BRUKER DPX400 a 400 y 100 MHz respectivamente, utilizando los disolventes deuterados que se indican en cada caso y empleando tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). Las multiplicidades se designan como: s singulete, d doblete, t triplete, c cuarteto, m multiplete, sa señal ancha. Las secuencias de pulsos utilizadas para los experimentos HSQC, HMBC y NOE son las establecidas por defecto en el software del equipo. Para los experimentos de NOE diferencial se utilizó el tiempo de mezclado indicado en cada experimento. Los espectros de masa (MS) se realizaron en un espectrómetro de masa HEWLETT PACKARD MSD 5973 o LC/MSD-Serie 100 utilizando impacto electrónico (IE) o ionización por electrospray (ESI), respectivamente. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100 y no fueron corregidos.

**Síntesis.** En esta sección se describen los procedimientos de síntesis de los nuevos compuestos y su caracterización estructural, rendimientos de reacción, espectrometría de masa (MS) y asignaciones de los protones y carbonos de la molécula por resonancia magnética nuclear (RMN). Los datos de RMN se muestran en tablas con su correspondiente asignación en la estructura. Algunos compuestos son obtenidos como mezcla de isómeros a nivel de enlace hidrazinotiazol.

#### Síntesis de aldehídos insaturados: procedimiento 1.<sup>82</sup>



A una solución de 6.3 mmol del aldehído correspondiente, se adiciona gota a gota y en baño de hielo acetaldehído (8.0 mmol) en 30 min y luego se adiciona la base 0.2 mL (MeOH/KOH al 25 % v/v) también gota a gota a 0 °C en 30 min. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Al finalizar el agregado se incorpora anhídrido acético (2.0 mL) y se calienta a reflujo 20 min. Luego se agregan 5.0 mL de HCl 1M y se calienta a 100 °C, 15 min. Se deja enfriar y se reparte entre éter etílico y H<sub>2</sub>O, se lava con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio hasta que la capa etérea quede incolora, se seca con sulfato de sodio y se evapora a vacío.

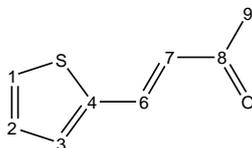
Nota: El derivado **(E)-3-(5-nitro-2-tienil)acrilaldehído**, R: 80 %, se obtiene como un aceite inestable a temperatura ambiente y aire, por lo que se utiliza inmediatamente para la formación de tiosemicarbazonas correspondientes.

#### Síntesis de aldehídos insaturados: procedimiento 2.<sup>83</sup>

A 4.0 mmol del aldehído correspondiente se le agrega una mezcla de 1.0 g de NaOH, 6.0 mL de EtOH, 12 mL de H<sub>2</sub>O, gota a gota por 15 min a 0 °C. Luego se le agrega 125 moles de acetaldehído en agua (40%v/v) gota a gota por 4 h a 0 °C o hasta la aparición del producto deseado y el consumo total del aldehído correspondiente. La formación del producto se controla por TLC en alúmina, con una fase móvil de éter de petróleo. Luego se reparte entre éter etílico y H<sub>2</sub>O y se lava con ácido acético hasta neutralidad, la capa orgánica se seca con sulfato de sodio y evapora a vacío. El producto se purifica por columna de alúmina en éter de petróleo, con un gradiente de acetato de etilo (0% a 5%). Nota: en el proceso, que depende de

la velocidad de agregado y la proporción de acetaldehído, se genera el aldehído- $\alpha,\beta$ -insaturado mayoritariamente y en menor proporción el aldehído  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado.

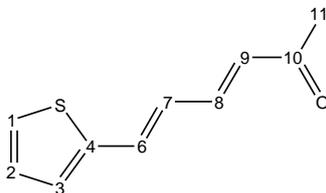
**(E)-3-(2-tienil)acrilaldehído**, aceite amarillo, R: 40 %, MS (EI)  $m/z$  (abundancia %):  $M^+$ 161 (100).



RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número <sup>i</sup>	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	7.48	1	d	5.1	130
2	7.09	1	dd	5.0/3.7	129
3	7.35	1	d	3.7	132
4	-	-	-	-	139
6	6.48	1	dd	16/7.8	127
7	7.57	1	d	16	145
8	-	-	-	-	-
9	9.59	1	d	7.7	193

**(2E,4E)-5-(2-tienil)penta-2,4-dienal**, aceite amarillo, R: 25 %, MS (EI)  $m/z$  (abundancia %):  $M^+$ 187 (100).

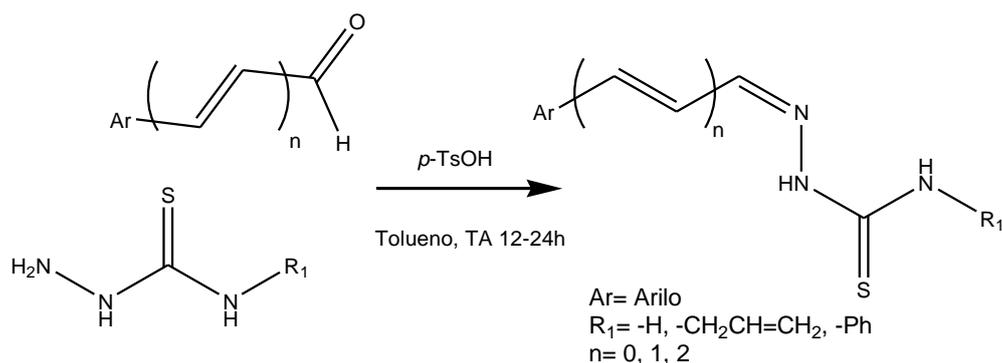


RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	7.34	1	d	5.0	127
2	7.04	1	dd	5.0/3.6	127
3	7.15	1	m	-	128
4	-	-	-	-	141
5	-	-	-	-	-
6	6.76	1	dd	15/11	126
7	7.15	1	m	-	134
8	7.15	1	m	-	151
9	6.20	1	dd	15/8	131
10	-	-	-	-	-
11	9.57	1	d	8	194

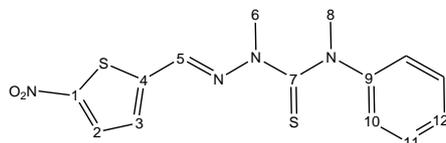
<sup>i</sup> En todos los casos de esta sección, los números con que se designan a los átomos no coinciden, necesariamente, con los localizadores según IUPAC, son arbitrarios.

Procedimiento general de síntesis de las diferentes tiosemicarbazonas.<sup>74</sup>



A una mezcla del aldehído correspondiente (1.05 mmol) en tolueno anhidro (1.00 mL por cada 100 mg de reacción), se agrega la tiosemicarbazida correspondiente (1.0 mmol) y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico y se deja a temperatura ambiente por 12-24 h. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego de finalizada la reacción se filtra el sólido y se lava con éter de petróleo. Se recristaliza de EtOH. Nota: en caso de que no precipite ningún sólido se evapora el tolueno a vacío y se resuspende el crudo en éter de petróleo y se filtra y luego recristaliza de EtOH.

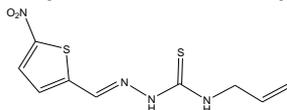
**(*E*)-1-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)-4-feniltiosemicarbazida (1A)**, sólido naranja, **R**: 95 %, **PF**: 203-205 °C, **MS (EI)** *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 306 (29) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 214 (50).



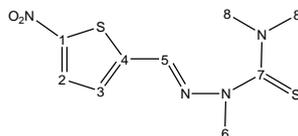
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	152
2	8.17	1	d	4.4	131
3	7.61	1	d	4.4	130
4	-	-	-	-	147
5	8.31	1	s	-	136
6	12.20	1	s	-	-
7	-	-	-	-	178
8	10.20	1	s	-	-
9	-	-	-	-	139
10	7.51	2	d	7.6	127
11	7.39	2	d	7.7	129
12	7.24	1	d	7.4	126

(*E*)-4-alil-1-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)tiosemicarbazida (**II**), sólido naranja, R: 98%, PF: 210-211 °C.<sup>74</sup>



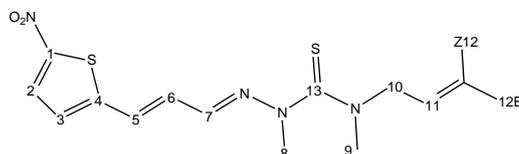
(*E*)-1-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)tiosemicarbazida (**3A**), sólido amarillo, R: 92%, PF: 250 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 230 (100) C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 213 (27).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	146
2	7.32	1	d	4.3	129
3	6.72	1	d	16	126
4	-	-	-	-	151
5	6.95	1	sa	-	135
6	11.24	1	s	-	-
7	-	-	-	-	179
8	7.65/6.95	2	sa	-	-

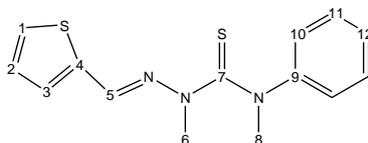
(*E*)-4-alil-1-((*E*)-3-(5-nitrotiofen-2-il)propeniliden)tiosemicarbazida (**2B**), sólido bordó, R: 75 %, PF: 181-183 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 296 (4) C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 115 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	152
2	7.86	1	d	3.0	126
3	7.06	1	d	3.0	129
4	-	-	-	-	149
5	6.96	1	d	16	130
6	6.85	1	dd	16/9.0	128
7	7.61	1	d	8.7	143
8	9.68	1	s	-	-
9	7.50	1	sa	-	-
10	4.38	2	s	-	47
11	5.97	1	m	-	134
12Z/E	5.28/5.34	1/1	d/d	11/16	118
13	-	-	-	-	178

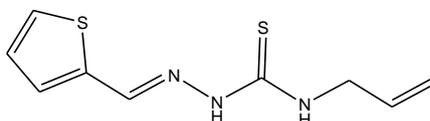
(*E*)-4-fenil-1-(tiofen-2-ilmetilen)tiosemicarbazida (**1C**), sólido amarillo, R: 80 %, PF: 188-189 °C, HPLC  $t_R$  4.7 min, MS (EI)  $m/z$  (abundancia %):  $M^+$  261 (100)  $C_6H_6N_2S_2^+$  169 (80).



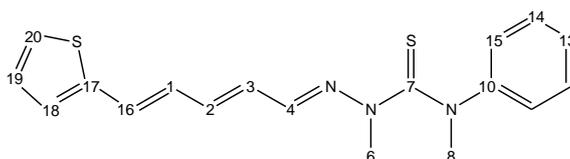
RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	7.13	1	sa	-	131
2	6.89	1	sa	-	128
3	7.03	1	sa	-	125
4	-	-	-	-	138
5	8.11	1	s	-	138
6	10.41	1	s	-	-
7	-	-	-	-	174
8	9.01	1	s	-	-
9	-	-	-	-	139
10	7.21	2	m	-	129
11	7.47	2	m	-	124
12	7.21	1	m	-	129

(*E*)-4-alil-1-(tiofen-2-ilmetilen)tiosemicarbazida (**V**), sólido blanco, R: 90%, PF: 153-155 °C.<sup>74</sup>



(*E*)-4-fenil-1-((*2E,4E*)-5-(tiofen-2-il)penta-2,4-dieniliden)tiosemicarbazida (**1D2**), sólido amarillo, R: 50 %, PF: 190-192 °C.

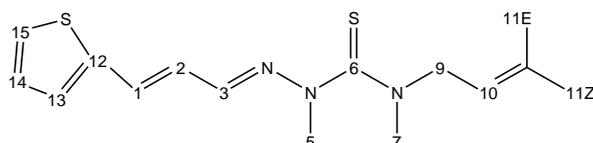


RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	6.67	1	m	-	128
2	6.67	1	m	-	140
3	6.36	1	m	-	128
4	7.72	1	d	9.8	145
6	10.8	1	s	-	-
7	-	-	-	-	175
8	9.12	1	s	-	-
10	-	-	-	-	123
13	7.17	1	m	-	126

14	7.33	2	d	7.9	128
15	7.63	2	d	8.2	124
16	6.81	1	m	-	128
17	-	-	-	-	142
18	7.03	1	d	3.2	127
19	6.97	1	dd	5.1/3.6	127
20	7.21	1	d	5.0	125

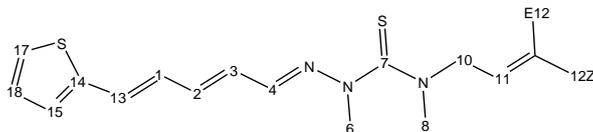
**(E)-4-alil-1-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)tiosemicarbazida (2D1)**, sólido amarillo, R: 78 %, PF: 116-118 °C, MS (EI)  $m/z$  (abundancia %):  $M^+$   $C_{11}H_{13}N_3NaS_2$  274 (100).



RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	7.06	1	m	-	132
2	6.63	1	dd	16/9.4	124
3	7.73	1	d	9.4	144
5	10.2	1	sa	-	-
6	-	-	-	-	177
7	7.48	1	sa	-	-
9	4.36	2	d	5.7	46
10	5.97	1	m	-	133
11Z/E	5.23/5.30	1/1	dd/dd	10-1.2/17-1.4	117
12	-	-	-	-	141
13	7.13	1	d	3.4	128
14	7.05	1	m	-	128
15	7.32	1	d	5.1	127

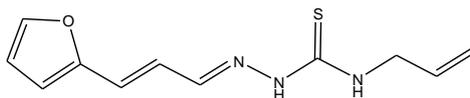
(*E*)-4-alil-1-((2*E*,4*E*)-5-(tiofen-2-il)penta-2,4-dieniliden)tiosemicarbazida (2D2), sólido naranja, R: 50 %, PF: 200-202 °C.



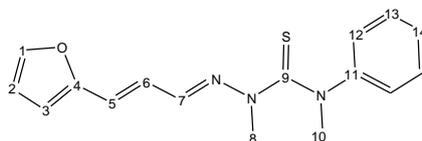
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	6.69	1	m	-	127
2	6.69	1	m	-	140
3	6.36	1	m	-	128
4	7.54	1	d	9.6	144
6	9.49	1	s	-	-
7	-	-	-	-	178
8	7.44	1	sa	-	-
10	4.37	2	m	-	47
11	5.96	1	m	-	133
12Z/E	5.2/5.3	1/1	dd/dd	10-1.4/17-1.4	117
13	6.87	1	m	-	128
14	-	-	-	-	142
15	7.09	1	d	3.5	128
17	7.27	1	d	5.1	125
18	7.02	1	m	-	128

(*E*)-4-alil-1-((*E*)-3-(furan-2-il) propeniliden)tiosemicarbazida (VI), sólido amarillo, R: 98 %, PF: 131-133 °C.<sup>74</sup>



(*E*)-1-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)-4-feniltiosemicarbazida (5E), sólido amarillo, R: 86 %, PF: 180-182 °C, HPLC t<sub>R</sub> 4.9 min, MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 271 (10) C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>ON 120 (100).

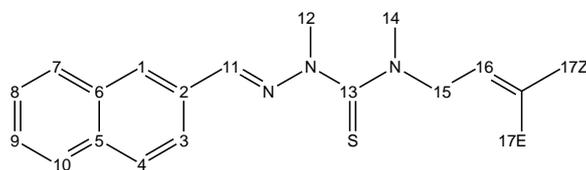


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.74	1	d	6.7	144
2	6.34	1	m	-	112
3	6.34	1	m	-	112

4	-	-	-	-	152
5	6.62	1	m	-	127
6	6.62	1	m	-	123
7	7.34	1	m	-	143
8	11.10	1	s	-	-
9	-	-	-	-	174
10	9.11	1	s	-	-
11	-	-	-	-	139
12	7.54	2	d	9.0	128
13	7.25	2	m	-	124
14	7.08	1	m	-	125

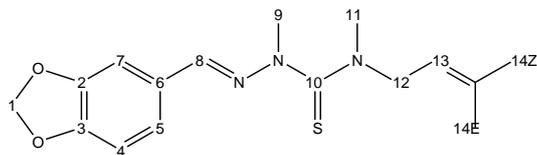
**(E)-4-alil-1-(naftalen-2-ilmetileno)tiosemicarbazida (15E)**, sólido blanco, **R**: 79 %, **PF** 173-174 °C, **MS (EI)**  $m/z$ (abundancia, %):  $M^+$  269 (3)  $C_4H_7N_2S^+$  115 (92)  $C_{11}H_8N^+$  155 (100)  $C_{10}H_7^+$  127 (29).



**RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>**

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	7.96	1	s	-	129
2	-	-	-	-	122
3	7.88	1	m	-	128
4	7.88	1	m	-	128
5	-	-	-	-	134
6	-	-	-	-	134
7	7.88	1	m	-	128
8	7.55	1	m	-	127
9	7.55	1	m	-	127
10	7.88	1	m	-	128
11	8.08	1	s	-	142
12	10.12	1	sa	-	-
13	-	-	-	-	177
14	7.63	1	sa	-	-
15	4.46	2	d	5.7	47
16	6.05	1	m	-	134
17Z/E	5.28/5.37	1/1	d/d	10/17	117

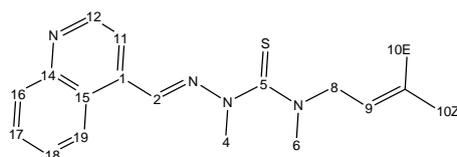
(*E*)-4-alil-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)tiosemicarbazida (**17E**), sólido blanco, R: 86 %, PF: 171-173 °C, HPLC  $t_R$  4.5 min, MS (EI)  $m/z$  (abundancia %):  $M^+$  263 (100)  $C_9H_8O_2N_2S^+$  207 (70).



RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	6.04	2	s	-	102
2	-	-	-	-	150
3	-	-	-	-	150
7	7.85	1	s	-	105
4	6.85	1	d	7.3	108
5	7.04	1	d	7.9	126
6	-	-	-	-	128
8	7.80	1	s	-	144
9	9.85	1	s	-	-
10	-	-	-	-	177
11	7.45	1	sa	-	-
12	4.40	2	m	-	46
13	5.97	1	m	-	134
14Z/E	5.24/5.34	1/1	d/d	10/17	117

(*E*)-4-alil-1-(quinolin-4-ilmetileno)tiosemicarbazida (**18E**), sólido naranja, R: 87 %, PF 197-199 °C.

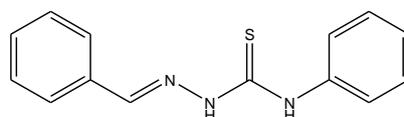


RMN: 400/100 MHz,  $DMSO-d_6$

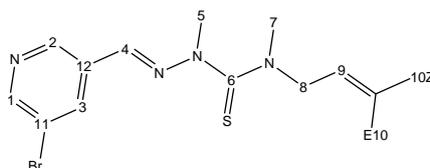
Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	$J$ (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	-	-	-	-	136
2	8.67	1	s	-	138
4	10.46	1	s	-	-
5	-	-	-	-	177
6	7.66	1	m	-	-
7	-	-	-	-	-
8	4.52	2	m	-	47
9	6.03	1	m	-	132
10Z/E	5.28/5.36	1/1	dd/dd	10-1.3/17-1.3	117
11	7.79	1	m	-	118

12	8.99	1	d	4.5	150
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	149
15	-	-	-	-	124
16	8.29	1	d	7.8	122
17	7.65	1	m	-	128
18	7.79	1	m	-	129
19	8.21	1	d	8.5	130

**(E)-1-bencilidene-4-feniltiosemicarbazida (19E)**, sólido amarillo claro, R: 86 %, PF: 192-193 °C.<sup>84</sup>



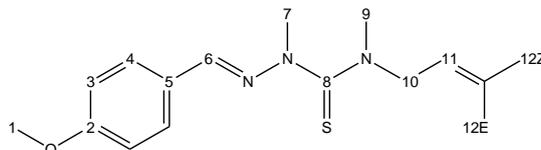
**(E)-4-alil-1-((5-bromopiridin-3-il)metileno)tiosemicarbazida (21E)**, sólido blanco, R: 88 %, PF 162-164 °C.



RMN: 400/100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	8.75	1	s	-	152
2	8.75	1	s	-	145
3	8.16	1	s	-	137
4	7.92	1	s	-	137
5	10.42	1	s	-	-
6	-	-	-	-	178
7	7.54	1	sa	-	-
8	4.42	2	m	-	47
9	5.99	1	m	-	132
10Z/E	5.28/5.34	1/1	d/d	10/17	117
11	-	-	-	-	121
12	-	-	-	-	131

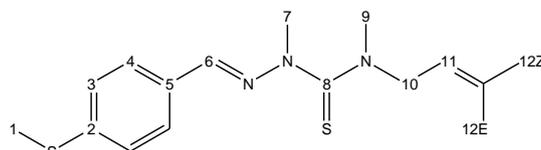
(*E*)-1-(4-hidroxibenciliden)-4-alitiosemicarbazida (**22E**), sólido rosa, R: 42 %, PF: 187-188 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 235 (5) C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 115 (100).



RMN: 400/100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	9.16	1	s	-	-
2	-	-	-	-	160
3	6.64	2	d	8.7	116
4	7.30	2	d	8.7	129
5	-	-	-	-	125
6	7.74	1	s	-	143
7	10.75	1	s	-	-
8	-	-	-	-	178
9	7.42	1	sa	-	-
10	4.15	2	d	5.7	45
11	5.76	1	m	-	133
12Z/E	5.07/4.98	1/1	d/d	10/17	116

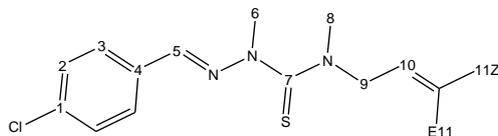
(*E*)-1-(4-(metiltio)benziliden)-4-alitiosemicarbazida (**23E**), sólido amarillo, R: 74 %, PF: 126-128 °C, HPLC t<sub>R</sub> 4.8 min, MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 265 (100) C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 209 (70).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	2.53	3	s	-	15
2	-	-	-	-	138
3	7.58	2	d	8.7	125
4	7.26	2	d	9.0	127
5	-	-	-	-	130
6	7.87	1	s	-	143
7	9.97	1	s	-	-
8	-	-	-	-	177
9	7.53	1	sa	-	-
10	4.41	2	m	-	46
11	6.00	1	m	-	134
12Z/E	5.26/5.35	1/1	d/d	10/17	117

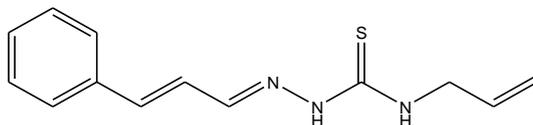
(*E*)-1-(4-clorobenciliden)-4-alitiosemicarbazida (**24E**), sólido blanco, R: 95 %, PF: 177-178 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia %): M<sup>+</sup> 253 (2) C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 115 (100).



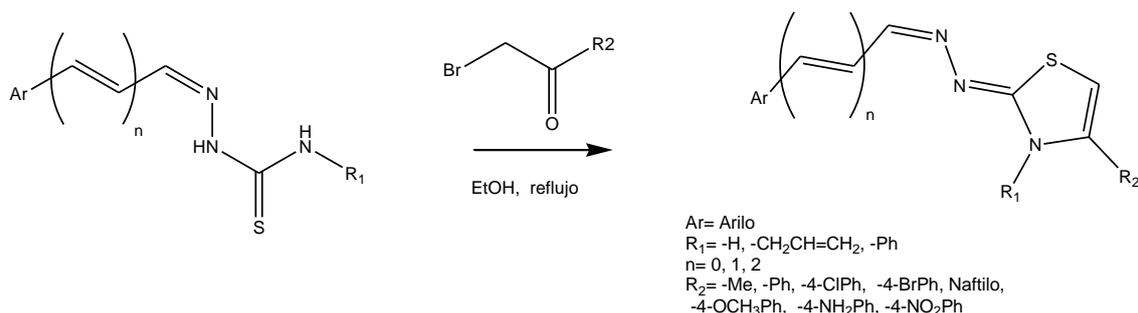
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	127
2	7.41	2	d	8.5	127
3	7.61	2	d	8.6	128
4	-	-	-	-	140
5	7.91	1	s	-	145
6	10.12	1	s	-	152
7	-	-	-	-	180
8	7.52	1	sa	-	135
9	4.41	2	m	-	49
10	6.01	1	m	-	131
11Z/E	5.25/5.35	1/1	d/d	10/17	117

(*E*)-4-*alil*-1-((*E*)-3-fenilpropeniliden)tiosemicarbazida (**27E**), sólido amarillo, R: 65 %, PF 163-165 °C.<sup>85</sup>

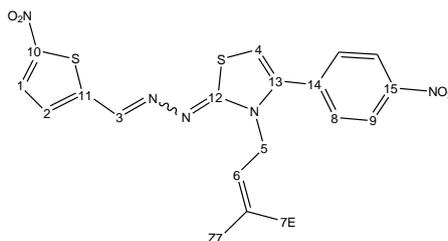


Procedimiento general de síntesis de los derivados de tiazolilidenhidrazina.<sup>86,87,88</sup>



Se hace reaccionar la tiosemicarbazona correspondiente (1.0 mmol), con la bromoacetona correspondiente (1.0 mmol) o cloroacetona (2.0 mmol) a reflujo de etanol absoluto (1.0 mL cada 100 mg de tiosemicarbazona) entre 4-10 h. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego de finalizada la reacción, la mezcla se deja enfriar, se filtra el producto obtenido, se lava con etanol/agua (80/20 % v/v) fría y el sólido se recristaliza de etanol o etanol/agua. Nota: en caso de que no precipite ningún sólido se evapora el etanol a vacío, se agregan dos volúmenes de éter de petróleo se evapora a vacío y luego se resuspende el crudo en agua y se filtra y luego se recristaliza.

**(1E/Z,2E)-1-(3-alil-4-(4-nitrofenil)tiazol-2(3H)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (7A)**, sólido rojo oscuro, **R**: 65 %, **MS (EI)** *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup>: 415 (100) C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 369 (31) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 260 (47) C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 219 (47).

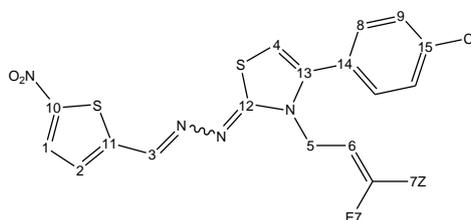


**RMN: isómeros EZ/EE, 400 /100 MHz, CDCl<sub>3</sub>**

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.87/7.91	1/0.35	d	4.0	128
2	7.08/7.22	1/0.35	d	4.4	126/128
3	8.32/7.92	1/0.35	s	-	144/141
4	6.29/6.37	1/0.35	s	-	104
5	4.49/4.68	2/0.7	d	4.6	48/49
6	5.91/6.17	1/0.35	m	-	133
<b>7Z/E</b>	5.25- 5.34/5.02-	1-0.35/1- 0.35	d/d	11/17	118

	5.16				
8	7.63/7.68	2/0.7	d	8.7	130
9	8.34/8.37	2/0.8	d	9.2	124
10	-	-	-	-	151
11	-	-	-	-	149
12	-	-	-	-	172
13	-	-	-	-	144
14	-	-	-	-	137
15	-	-	-	-	149

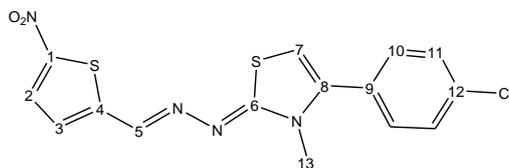
**(1E/Z,2E)-1-(3-ali-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3H)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (8A)**, sólido rojo, R: 40 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 404 (100) 406 (33) C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 358(29) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>S 249 (93).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicida d	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	7.90/7.86	1/0.8	d	4.0	127/129
2	7.19/7.05	1/0.8	d	4.3	127/125
3	7.91/8.30	1/0.8	s	-	143/140
4	6.23/6.14	1/0.8	s	-	102
5	4.65/4.45	2/1.6	d	5.3	49/48
6	6.04/5.88	1/0.8	m	-	131
7Z/E	5.23- 5.30/5.04- 5.11	1-0.8/1-0.8	d/d	10/17	117
8	7.47/7.44	1/0.8	d	8.5	130
9	7.40/7.35	1/0.8	d	8.3	128
10	-	-	-	-	151
11	-	-	-	-	154/150
12	-	-	-	-	173
13	-	-	-	-	140
14	-	-	-	-	136
15	-	-	-	-	133

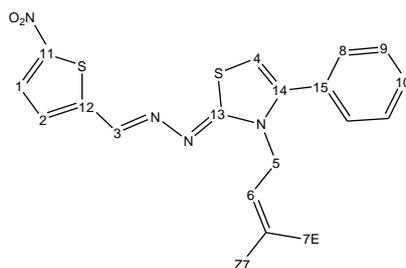
(1*Z*,2*E*)-1-(4-(4-clorofenil)thiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (9A), sólido rojo, R: 37 %, PF 215-216°C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 364 (49) 366 (12) C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 209 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	151
2	7.89	1	d	4.3	128
3	7.29	1	d	4.3	128
4	-	-	-	-	153
5	8.50	1	s	-	143
6	-	-	-	-	169
7	6.93	1	s	-	105
8	-	-	-	-	150
9	-	-	-	-	132
10	7.74	1	d	8.3	127
11	7.42	1	d	8.4	127
12	-	-	-	-	134
13	7.68	1	s	-	-

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-feniltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (10A<sub>EZ</sub>), sólido rojo, R: 72 %, PF 172-173 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 370 (100) C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 324 (27) C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 215 (73).

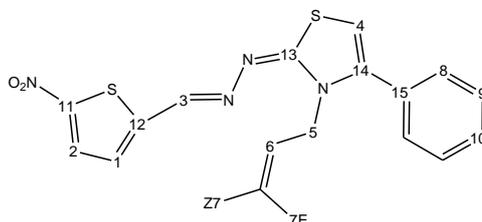


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.86	1	d	4.4	129
2	7.04	1	d	4.0	126
3	8.30	1	s	-	143
4	6.14	1	s	-	102
5	4.46	2	d	5.0	48
6	5.89	1	m	-	132

<b>7Z/E</b>	5.20/5.00	1/1	d/d	10/16	117
<b>8</b>	7.46	2	m	-	128
<b>9</b>	7.46	2	m	-	128
<b>10</b>	7.46	1	m	-	128
<b>11</b>	-	-	-	-	150
<b>12</b>	-	-	-	-	149
<b>13</b>	-	-	-	-	172
<b>14</b>	-	-	-	-	141
<b>15</b>	-	-	-	-	127

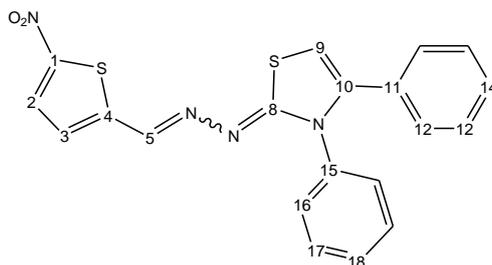
**(1E,2E)-1-(3-alil-4-feniltiazol-2(3H)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (10A<sub>EE</sub>)**, sólido rojo, **R**: 20 %, **PF** 216-218 °C, **MS (EI)** *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 370 (100) C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 324(27) C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 215 (73).



**RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>**

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
<b>1</b>	7.90	1	m	-	127
<b>2</b>	7.19	1	d	4.5	128
<b>3</b>	7.90	1	m	-	140
<b>4</b>	6.23	1	s	-	102
<b>5</b>	4.67	2	d	4.8	48
<b>6</b>	6.03	1	m	-	131
<b>7E</b>		1	d	17	117
<b>7Z/E</b>	5.28/5.14	1/1	d/d	10/17	117
<b>8</b>	7.48	2	m	-	129
<b>9</b>	7.48	2	m	-	129
<b>10</b>	7.48	1	m	-	129
<b>11</b>	-	-	-	-	153
<b>12</b>	-	-	-	-	152
<b>13</b>	-	-	-	-	172
<b>14</b>	-	-	-	-	141
<b>15</b>	-	-	-	-	130

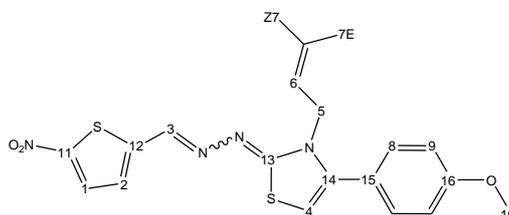
(1*E*/*Z*,2*E*)-1-(3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (12A), sólido rojo, R: 32 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 406 (100) C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NS 237 (49).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	152
2	7.85/7.77	1/0.2	d	4.4	127
3	7.07	1/0.2	d	4.4	127
4	-	-	-	-	149
5	8.52/8.22	1/0.2	sa	-	143
8	-	-	-	-	172
9	6.44/6.39	1/0.2	s	-	104
10	-	-	-	-	141
11	-	-	-	-	128
12	7.39	-	m	-	128
13	7.39	5/1	m	-	128
14	7.39	-	m	-	128
15	7.11	2/0.4	m	-	128
16	7.24	-	m	-	128
17	7.24	3/0.6	m	-	128
18	7.24	-	m	-	128

(1*Z*/*E*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-metoxifenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (13A), sólido cobrizo, R: 87 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 400 (100) C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 354 (20) C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 245 (52).

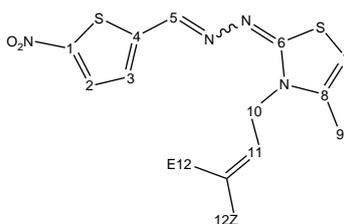


RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.89/7.90	1/1	d	4.5	128
2	7.18/7.33	1/1	d	4.6	126
3	7.89/9.54	1/1	s	-	139
4	6.17/6.70	1/1	s	-	102/107

5	4.65/5.20	2/2	d/sa	4.6/-	49/52
6	5.92/6.13	1/1	m	-	129/130
7Z/E	5.15/5.28- 5.37	2/1-1	d/d	10/16	118/120
8	7.33/7.37	2/2	d	8.9	132
9	6.99/7.03	2/2	d	8.5	115
10	3.89/3.90	3/3	s	-	56
11	-	-	-	-	154
12	-	-	-	-	144
13	-	-	-	-	173
14	-	-	-	-	162
15	-	-	-	-	142
16	-	-	-	-	160

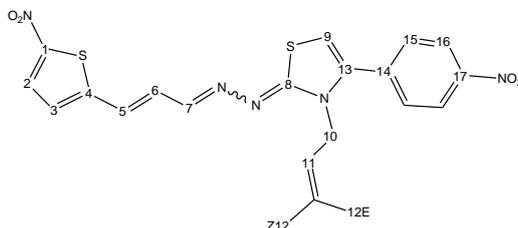
**(1E/Z,2E)-1-(3-alil-4-metiltiazol-2(3H)-iliden)-2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazina (14A)**, sólido rojo, R: 36 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 308 (100) C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 262 (17) C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 153 (58).



RMN: isómeros EZ/EE, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	151
2	7.84/7.90	1/0.35	d	4.4/4.6	129/127
3	7.01/7.16	1/0.35	d	4.4/4.6	126/127
4	-	-	-	-	150
5	8.24/7.87	1/0.35	s	-	139/142
6	-	-	-	-	172
7	5.89/5.98	1/0.35	d	1.4	99
8	-	-	-	-	136
9	2.18/2.25	3/1	d	1.4	14
10	4.57/4.77	2/0.7	d	4.7	47/48
11	5.94/6.08	1/0.35	m	-	131
12Z/E	5.25- 5.31/5.08- 5.20	1-0.35/1- 0.35	d/d	10/16	117

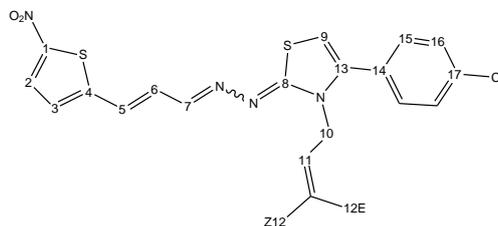
(1*E*/2*Z*,2*E*)-1-(3-alil-4-(4-nitrofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-(3-(5-nitrotiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (7B), sólido rojo, R: 55 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 441 (100) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 246 (51).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	150
2	7.85	1.2	d	4.0	129
3	7.03/7.06	1/0.2	d	4.0	125
4	-	-	-	-	150
5	6.88	1.2	d	16	127
6	7.11/7.72	1/0.2	dd	16/6.0	131
7	8.09/7.46	1/0.2	d	9.6	153
8	-	-	-	-	170
9	6.24/6.22	1/0.2	s	-	103
10	4.48/4.52	1/0.2	d	5.0	48
11	5.92	1.20	m	-	131
12 <i>Z/E</i>	5.23- 5.31/5.01- 5.13	1-0.2/1-0.2	d/d	10/17	118
13	-	-	-	-	140
14	-	-	-	-	138
15	7.63	2.4	d	8.7	129
16	8.34	2.4	d	9.2	124
17	-	-	-	-	148

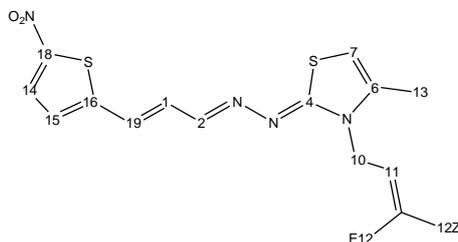
(1*E*/2*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-(3-(5-nitrotiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (**8B**), sólido rojo, R: 60 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 430 (100) 432 (29) C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 389 (12) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 249 (65).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	150
2	7.85	1.3	d	4.0	129
3	7.01/7.05	1/0.3	d	4.0	125
4	-	-	-	-	150
5	6.83/6.88	1/0.3	d	16	127
6	7.10/7.72	1/0.3	dd	16/6.0	132
7	8.08/7.44	1/0.3	d	9.5	152
8	-	-	-	-	170
9	6.07/6.09	1/0.3	s	-	102
10	4.43/4.46	2/0.6	d	4.9	48
11	5.90	1.3	m	-	131
12 <i>Z/E</i>	5.20- 5.26/5.02- 5.11	1-0.3/1/0.3	d/d	10/17	117
13	-	-	-	-	140
14	-	-	-	-	138
15	7.44	2.6	m	-	128
16	7.36	2.6	m	-	130
17	-	-	-	-	136

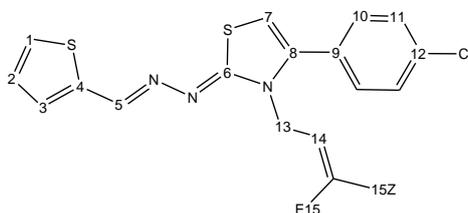
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-*metiltiazol*-2(3*H*)-*iliden*)-2-((*E*)-3-(5-*nitrotiofen*-2-*il*)*propeniliden*)*hidrazina* (14*B*), sólido rojo metalizado, R: 60 %, PF 124-126 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 334 (100) C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>NS<sup>+</sup> 140 (88) C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 194 (27) C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 151 (51).



RMN: 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número localizador	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.09	1	dd	9.6/16	131
2	8.06	1	d	9.7	150
4	-	-	-	-	170
6	-	-	-	-	136
7	5.86	1	sa	-	98
10	4.57	2	d	4.6	46
11	5.95	1	m	-	131
12 <i>Z/E</i>	5.24/5.10	1/1	d/d	10/17	117
13	2.19	3	sa	-	12
14	7.83	1	d	4.3	129
15	6.99	1	d	4.3	124
16	-	-	-	-	150
18	-	-	-	-	150
19	6.80	1	d	16	126

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-*clorofenil*)*tiazol*-2(3*H*)-*iliden*)-2-(*tiofen*-2-*ilmetilen*)*hidrazina* (8*C*), sólido amarillo, R:79 %, PF 127-128 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 359 (100) 361 (13) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 249 (57) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClNS<sup>+</sup> 235 (28).

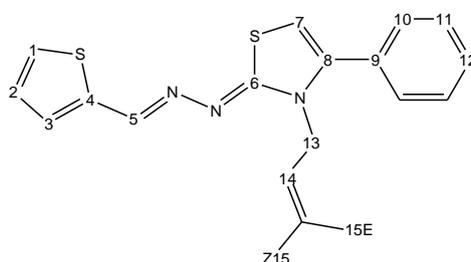


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.34	1	d	5.0	125
2	7.07	1	dd	5.0/5.0	128
3	7.23	1	d	5.0	129
4	-	-	-	-	140
5	8.59	1	s	-	146

6	-	-	-	-	190
7	6.09	1	s	-	102
8	-	-	-	-	100
9	-	-	-	-	137
10	7.42	2	d	8.0	125
11	7.34	2	d	8.0	132
12	-	-	-	-	137
13	4.51	2	s	-	48
14	5.88	1	m	-	132
15Z/E	5.22/5.01	1/1	d/d	10/17	116

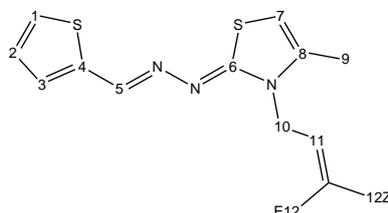
**(1Z,2E)-1-(3-alil-4-feniltiazol-2(3H)-iliden)-2-(tiofen-2-ilmetilen)hidrazina (10C)**, sólido amarillo R: 68 %, PF 114-116 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 325 (100) C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NS<sup>+</sup> 201 (27) C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 215 (51) C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>S<sup>+</sup> 134 (51).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.34	1	d	4.0	127
2	7.06	1	m	-	127
3	7.26	1	d	3.0	127
4	-	-	-	-	140
5	8.64	1	sa	-	147
6	-	-	-	-	163
7	6.11	2	sa	-	101
8	-	-	-	-	144
9	-	-	-	-	134
10	7.45	-	m	-	129
11	7.45	5	m	-	129
12	7.45	-	m	-	129
13	4.56	2	sa	-	48
14	5.90	1	m	-	132
15Z/E	5.21/5.02	1/1	d/d	10/17	118

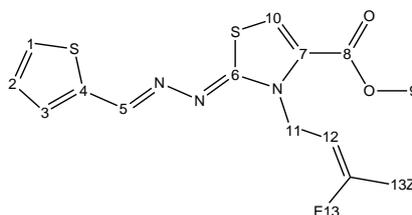
(1*Z*,2*E*)-1-(3-alil-4-metilthiazol-2(3*H*)-iliden)-2-(tiofen-2-ilmetilen)hidrazina (**14C**), sólido amarillo, R: 39 %, PF 95-96 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 263 (100) C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NS<sup>+</sup> 139 (25) C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 153 (49) C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 248 (8).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.32	1	d	4.8	127
2	7.05	1	d	4.5	127
3	7.22	1	d	3.3	128
4	-	-	-	-	140
5	8.57	1	s	-	145
6	-	-	-	-	152
7	5.85	1	s	-	98
8	-	-	-	-	135
9	2.17	3	s	-	9
10	4.64	2	s	-	48
11	5.96	1	m	-	131
12Z/E	5.25/5.09	1/1	d/d	9.5/17	117

Ácido (2*E*,2*Z*)-3-alil-2-(2-(tiofen-2-ilmetilen)hidrazono)-2,3-dihydrothiazol-4-carboxílico (**18C**), sólido amarillo, R:70 %, PF 160-162 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 293 (100) C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 183 (34), C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 169 (34).

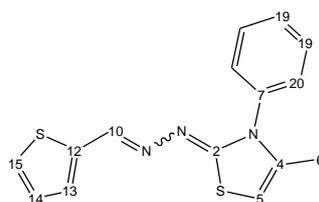


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.21	1	d	5.0	127
2	6.95	1	dd	3.6/5.0	127
3	7.11	1	d	3.6	128
4	-	-	-	-	140
5	8.33	1	s	-	144
6	-	-	-	-	160

7	-	-	-	-	131
8	-	-	-	-	169
9	4.38	-	-	-	-
10	7.07	1	s	-	114
11	4.87	2	d	5.2	47
12	5.88	1	m	-	132
13Z/E	5.08/5.04	1/1	m/m	-	117

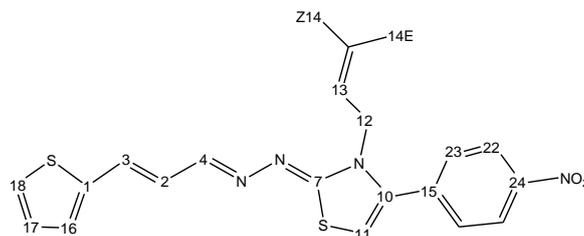
(1Z/E,2E)-1-(4-metil-3-feniltiazol-2(3H)-iliden)-2-(tiofen-2-ilmetil)hidrazina (19C), sólido amarillo, R: 70 %.



RMN: isómeros EZ/EE, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	-	-	-	170
4	-	-	-	-	136
5	6.07/5.92	1/0.3	s	-	99
6	1.92	3/0.9	s	-	14
7	-	-	-	-	136
10	8.86/8.52	1/0.3	s	-	146
12	-	-	-	-	140
13	7.02	1.3	dd	5.1/3.6	127
14	7.02	1.3	dd	5.1/3.6	127
15	7.21	1.3	d	3.6	130
18	7.40	1/0.3	m	-	129
19	7.40	1/0.3	m	-	129
20	7,40	1/0,3	m	-	129

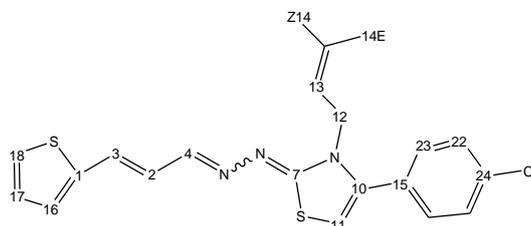
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-nitrofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (7D1), sólido rojo, R: 95 %, PF 206-208 °C, MS (EI), *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 397 (95).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	137
2	6.64	1	dd	16/9.6	122
3	7.29	1	d	16	137
4	9.14	1	d	9.6	155
7	-	-	-	-	167
10	-	-	-	-	140
11	6.86	1	s	-	108
12	5.26	2	m	-	51
13	5.90	1	m	-	129
14 <i>Z/E</i>	5.30/5.04	1/1	d/d	10/17	119
15	-	-	-	-	133
16	7.20	1	d	3.5	130
17	7.07	1	dd	5.0/3.6	128
18	7.38	1	d	5.0	128
22	8.38	2	d	8.6	125
23	7.86	2	d	8.6	131
24	-	-	-	-	149

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (8D1), sólido naranja, R: 95 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): 388 (33), M<sup>+</sup> 386 (100).

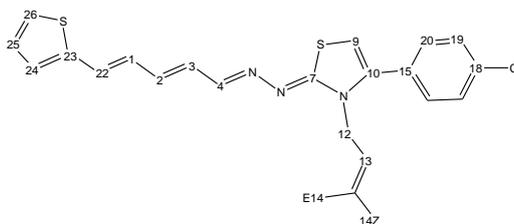


RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.44	1.45	m	-	122
3	6.97	1.45	m	-	135
4	8.73/8.43	1/0.45	d/d	9.6/9.4	155/154

7	-	-	-	-	168
10	-	-	-	-	141
11	6.65	1.45	s	-	107
12	4.85/4.54	1/0.45	sa/sa	-	49
13	5.58	1.45	m	-	129
14Z/E	5.00/4.79	1.45/1.45	d/d	10/17	118
15	-	-	-	-	126
16	6.97	1.45	m	-	128
17	6.28	1.45	m	-	128
18	7.13	1.45	m	-	127
22	7.13	2.90	m	-	132
23	7.26	2.90	m	-	128
24	-	-	-	-	137

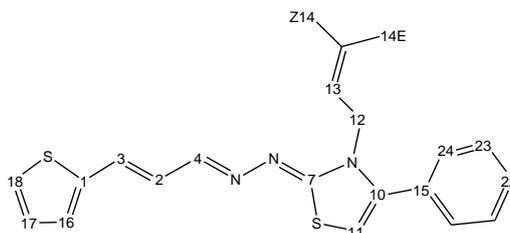
(1Z,2E)-1-(3-aliil-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3H)-iliden)-2-((2E,4E)-5-(tiofen-2-il)penta-2,4-dieniliden)hidrazina (8D2), sólido amarillo, R: 50 %, PF 182-184 °C.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6.72	1	dd	15/11	127
2	6.87	1	m	-	142
3	6.44	1	dd	15/9.7	127
4	8.95	1	sa	-	155
7	-	-	-	-	166
9	6.56	1	sa	-	106
10	-	-	-	-	141
12	5.12	2	sa	-	50
13	5.88	1	m	-	130
14Z/E	5.31/5.06	1	d/d	11/17	118
15	-	-	-	-	137
18	-	-	-	-	137
19	7.35	2	d	8.4	131
20	7.50	2	d	8.4	129
22	6.93	1	d	15	130
23	-	-	-	-	142
24	7.11	1	d	3.4	128
25	7.03	1	dd	5.0/3.6	128
26	7.28	1	d	3.8	126

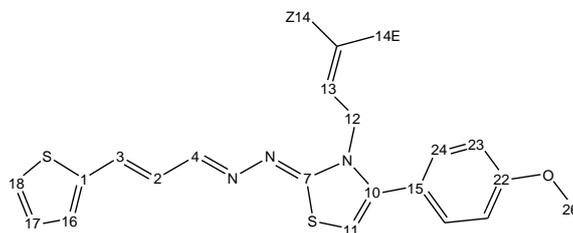
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-*feniltiazol*-2(3*H*)-*iliden*)-2-((*E*)-3-(*tiofen*-2-*il*)propeniliden)hidrazina (10D1), sólido naranja, R: 95 %, PF 210-211 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 352 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.66	1	dd	16/9.6	122
3	7.30	1	d	16	136
4	9.17	1	d	9.6	154
7	-	-	-	-	168
10	-	-	-	-	143
11	6.68	1	s	-	106
12	5.24	2	sa	-	50
13	5.90	1	m	-	129
14 <i>Z/E</i>	5.30/5.80	1/1	d/d	10/17	118
15	-	-	-	-	130
16	7.19	1	d	3.6	130
17	7.06	1	dd	5.1/3.6	128
18	7.37	1	m	-	129
22	-	-	-	-	129
23	7.38	2	m	-	129
24	7.55	2	m	-	129

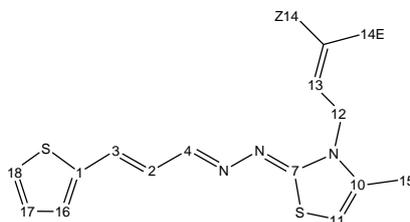
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-metoxifenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (**13D1**), sólido marrón, R: 95 %, PF 205 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 382 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
18	7.36	1	d	5.1	128
17	7.05	1	dd	5.1/3.6	128
16	7.18	1	d	3.6	129
1	-	-	-	-	141
3	7.29	1	m	-	135
4	9.15	1	d	9.6	154
2	6.65	1	dd	9.6/10.4	123
7	-	-	-	-	167
11	6.62	1	s	-	106
10	-	-	-	-	142
12	5.21	2	d	4.6	50
13	5.89	1	m	-	129
14 <i>Z/E</i>	5.31/5.08	1/1	d/d	10/17	118
15	-	-	-	-	119
24	7.29	2	m	-	135
23	7.00	2	d	8.8	114
22	-	-	-	-	160
26	3.88	3	s	-	55

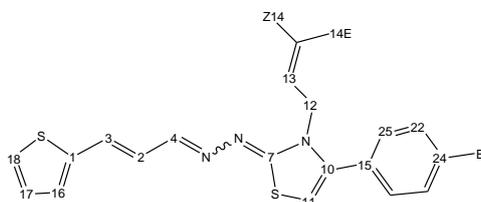
**(1Z,2E)-1-(3-alil-4-metiltiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (14D1)**, sólido naranja, R: 95 %, PF 147-149 °C, MS (EI)  $m/z$  (abundancia, %):  $M^+$  290 (100)  $C_{11}H_{10}N_3S_2^+$  248 (20).



RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta$ $^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ $^{13}C$ (ppm)
1	-	-	-	-	141
2	6.62	1	dd	15.7/9.6	122
3	7.22	1	d	15.7	136
4	8.99	1	d	9.6	155
7	-	-	-	-	168
10	-	-	-	-	138
11	6.44	1	sa	-	105
12	5.29	2	sa	-	49
13	6.03	1	m	-	129
14Z/E	5.30/5.10	1/1	d/d	10/17	118
15	2.52	3	s	-	14
16	7.15	1	d	3.5	128
17	7.03	1	dd	5.0/3.6	128
18	7.33	1	d	5.0	127

**(1Z/E,2E)-1-(3-alil-4-(4-bromofenil)thiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (20D1)**, sólido naranja, R: 95 %, MS (EI)  $m/z$  (abundancia, %):  $M^+$  430 (95) 431 (14).

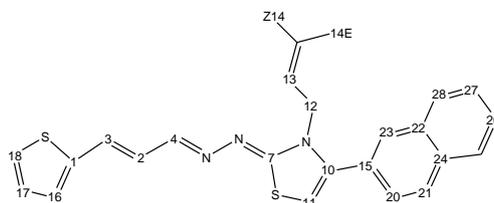


RMN: isómeros EZ/EE, 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta$ $^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ $^{13}C$ (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.14	1.2	dd	16/9.6	121
3	6.75	1.2	m	-	134
4	8.08/7.65	1/0.2	d/d	9.5/9.3	152
7	-	-	-	-	168
10	-	-	-	-	140

11	6.50	1.2	s	-	107
12	4.30	2.4	sa	-	48
13	5.27	1.2	m	-	129
14Z/E	4.70/4.50	1.2/1.2	d/d	10/17	117
15	-	-	-	-	131
16	6.70	1.2	m	-	129
17	6.52	1.2	m	-	127
18	6.90	1.2	d	5.0	126
22	7.11	2.4	d	8.3	130
23	6.82	2.4	d	8.5	130
24	-	-	-	-	124

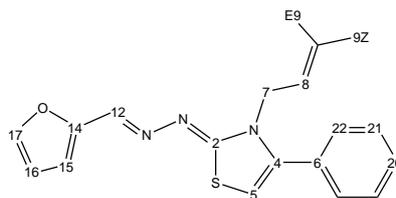
**(1Z,2E)-1-(3-aliil-4-(naftalen-2-il)tiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (21D1)**, sólido rojo, R: 95 %, PF 202-204 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 402 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.70	1	dd	16/9.6	122
3	7.28	1	d	16	136
4	9.20	1	d	9.6	154
7	-	-	-	-	167
10	-	-	-	-	142
11	6.79	1	s	-	106
12	5.29	2	sa	-	50
13	5.88	1	m	-	129
14Z/E	5.30/5.12	1/1	d/d	10/17	118
15	-	-	-	-	133
16	7.18	1	d	3.3	129
17	7.05	1	dd	5.1/3.6	128
18	7.36	1	d	5.0	128
20	7.43	1	d	8.4	125
21	7.95	1	m	-	128
22	-	-	-	-	129
23	7.95	1	m	-	128
24	-	-	-	-	129
26	7.63	1	m	-	127
27	7.63	1	m	-	127
28	7.95	2	m	-	128

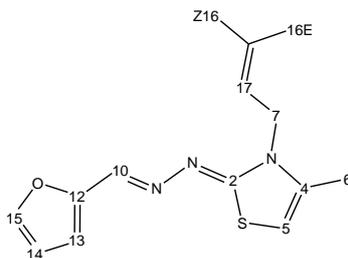
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-*feniltiazol*-2(3*H*)-*iliden*)-2-(*furan*-2-*ilmetilen*)*hidrazina* (1*E*), sólido marrón,  
R: 95 %, PF 186 °C (Desc.).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
2	-	-	-	-	168
4	-	-	-	-	149
5	6.50	1	s	-	105
6	-	-	-	-	129
7	5.02	2	sa	-	49
8	5.89	1	m	-	130
9Z/E	5.27/5.06	1/1	d/d	11/17	118
12	8.98	1	s	-	141
14	-	-	-	-	149
15	6.58	1	d	3.4	116
16	6.52	1	dd	3.4/1.7	111
17	7.57	1	m	-	145
20	7.51	1	m	-	130
21	7.51	2	m	-	130
22	7.40	2	d	8.3	130

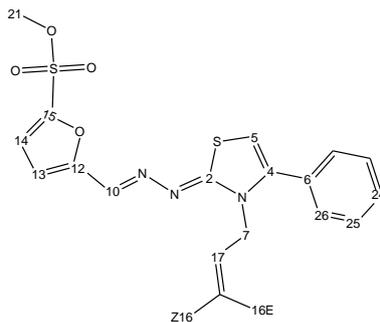
(1*Z*,2*E*)-1-(3-alil-4-metiltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-(furan-2-ilmetilen)hidrazina (2*E*), sólido marrón,  
R: 98 %, PF 80-82 °C.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
2	-	-	-	-	170
4	-	-	-	-	135
5	5.73	1	d	1.3	98
6	2.11	3	d	1.3	13
7	4.51	2	d	4.7	47
10	8.14	1	s	-	140
12	-	-	-	-	151
13	6.63	1	d	3.4	112
14	6.45	1	dd	3.4/1.8	112
15	7.48	1	d	1.2	143
16 <i>Z/E</i>	5.19/5.08	1/1	dd/dd	10-1.1/17-1.0	116
17	5.92	1	m	-	132

Ácido (2*E*,2*Z*)-4-fenil-3-alil-2,3-dihidrotiazol-2-(2-(hidrazono(furan-2-ilmetilen-5-sulfónico))) (3*E*), sólido naranja, R: 83 %, PF 234 °C (Desc.).

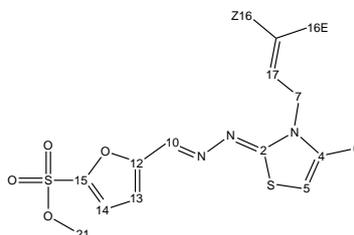


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
2	-	-	-	-	169
4	-	-	-	-	142
5	6.81	1	m	-	104
6	-	-	-	-	132
7	4.50	2	m	-	48
10	8.21	1	s	-	141

12	-	-	-	-	149
13	6.87	1	m	-	110
14	6.57	1	d	3.4	116
15	-	-	-	-	160
16Z/E	5.15/4.87	1/1	d/d	10/17	118
17	5.82	1	m	-	132
21	4.08-3.84	1	sa	-	-
24	7.51	1	m	-	130
25	7.51	2	m	-	130
26	7.51	2	m	-	130

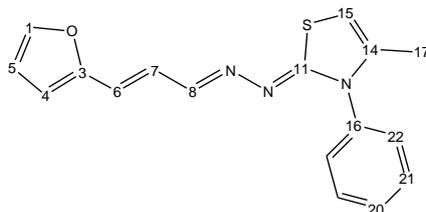
Ácido (2E,2Z)-4-metil-3-alil-2,3-dihidrotiazol-2-(2-(hidrazono(furan-2-ilmetilen-5-sulfónico))) (4E), sólido amarillo crema, R: 83 %, PF 240-241 °C.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
2	-	-	-	-	169
4	-	-	-	-	139
5	6.63	1	sa	-	103
6	2.22	3	s	-	13
7	4.79	2	d	4.5	48
10	8.39	1	s	-	140
12	-	-	-	-	160
13	6.87	1	d	3.4	116
14	6.56	1	d	3.4	110
15	-	-	-	-	149
16Z/E	5.24/5.05	1/1	d/d	11/17	118
17	5.98	1	m	-	132
21	3.79-3.86	1	sa	-	-

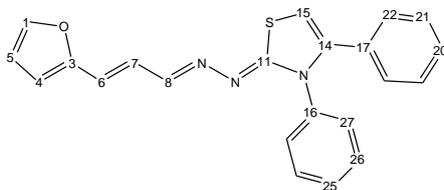
(1*E*,2*Z*)-1-((*E*)-3-(furan-2-il) propeniliden)-2-(4-metil-3-feniltiazol-2(3*H*)-iliden)hidrazina (7*E*), aceite marrón, R: 86 %.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.46	1	m	-	142
3	-	-	-	-	152
4	6.40	1	m	-	111
5	6.40	1	m	-	111
6	6.56	1	d	16	124
7	6.92	1	dd	16/10	124
8	8.01	1	d	9.9	152
11	-	-	-	-	170
14	-	-	-	-	135
15	5.91	1	s	-	98
16	-	-	-	-	136
17	1.89	3	s	-	14
20	7.46	1	m	-	129
21	7.46	2	m	-	129
22	7.46	2	m	-	129

(1*Z*,2*E*)-1-(3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (8*E*), sólido ladrillo, R: 88 %, PF 230 °C (Desc.).

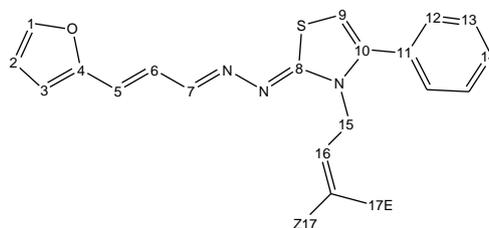


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.15	1	d	1.6	144
3	-	-	-	-	153
4	6.19	1	d	3.4	112
5	6.12	1	dd	3.4/1.8	112
6	6.41	1	m	-	122
7	6.41	1	m	-	129
8	7.86	1	dd	7.8/1.3	154

11	-	-	-	-	169
14	-	-	-	-	142
15	6.51	1	s	-	105
16	-	-	-	-	134
17	-	-	-	-	130
20	7.11	1	m	-	130
21	6.95	2	m	-	127
22	7.11	2	m	-	130
25	6.95	1	m	-	127
26	6.86	2	m	-	128
27	6.74	2	dd	8.3/1.3	129

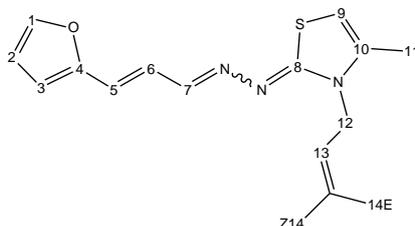
(1*Z*, 2*E*)-1-(3-alil-4-feniltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (11*E*), sólido rojo, R: 74 %, PF 190 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 335 (10) C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 117 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.52	1	m	-	144
2	6.48	1	dd	3.4/1.6	112
3	6.56	1	d	3.2	113
4	-	-	-	-	152
5	6.92	1	d	16	130
6	6.79	1	dd	9.7/6.0	122
7	9.17	1	d	9.2	155
8	-	-	-	-	168
9	6.67	1	s	-	106
10	-	-	-	-	144
11	-	-	-	-	130
12	7.40	2	d	8.0	129
13	7.49	2	m	-	129
14	7.49	1	m	-	132
15	5.25	2	d	5.3	51
16	5.89	1	m	-	130
17 <i>Z/E</i>	5.06/5.33	1/1	d/d	10/18	118

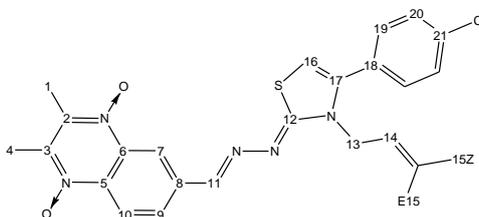
(1*E*/2*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-metiltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (12*E*), aceite marrón, R: 65 %, MS (EI), *m/z* (abundancia, %); M<sup>+</sup> 273 (100) C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NS<sup>+</sup> 139 (43).



RMN: isomería *EEZ/EEE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.43	1/0.2	m	-	152
2	6.43	1/0.2	m	4.4	127
3	6.43	1/0.2	m	4.4	127
4	-	-	-	-	149
5	6.65	1/0.2	d	17	
6	6.95	1/0.2	d	10	143
7	8.16	1/0.2	m		
8	-	-	-	-	172
9	5.83	1/0.2	s	-	104
10	-	-	-	-	141
11	2.16	3/0.6	s	-	18
12	4.58	2/0.4	sa	-	48
13	5.97	1/0.2	m	-	128
14 <i>Z/E</i>	5.21/5.12	1-0.2/1-0.2	d/d	10/17	118

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((1,4-dioxi-2,3-dimetil-quinoxalin-6-il)metilén)hidrazina (14*E*), sólido naranja, R: 71 %, PF 233-235 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 465 (14) 467 (5) C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>5</sub>OS<sup>+</sup> 449 (100) C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>5</sub>S<sup>+</sup> 433 (61) C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub><sup>+</sup> 391 (18) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 249 (88).

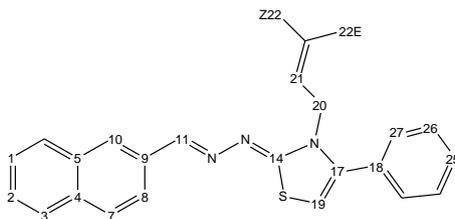


RMN: 400/100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	2.75	3	s	-	14
2	-	-	-	-	142
3	-	-	-	-	142
4	2.75	3	s	-	14
5	-	-	-	-	137

6	-	-	-	-	137
7	8.64	1	s	-	118
8	-	-	-	-	139
9	8.60	1	d	9.0	118
10	8.43	1	d	9.0	129
11	8.40	1	s	-	148
12	-	-	-	-	172
13	4.47	2	d	4.8	47
14	5.91	1	m	-	132
15Z/E	5.22/5.04	1/1	d/d	10/17	117
16	6.10	1	s	-	102
17	-	-	-	-	142
18	-	-	-	-	133
19	7.44	2	d	8.6	128
20	7.37	2	d	8.6	130
21	-	-	-	-	133

(1Z,2E)-1-(3-alil-4-feniltiazol-2(3H)-iliden)-2-(naftalen-2-ilmetilen)hidrazina (16E), sólido amarillo, R: 95 %, PF 146-148 °C, MS (EI), m/z (abundancia, %); M<sup>+</sup> 370 (100).

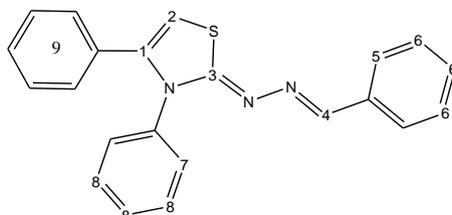


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.53	1	m	-	128
2	7.53	1	m	-	128
3	7.42	1	m	-	130
4	-	-	-	-	130
5	-	-	-	-	130
7	7.87	1	m	-	130
8	8.01	1	dd	8.6/1.5	123
9	-	-	-	-	143
10	8.10	1	s	-	132
11	9.34	1	s	-	153
14	-	-	-	-	168
17	-	-	-	-	143
18	-	-	-	-	135
19	6.55	1	s	-	105
20	5.12	2	m	-	50
21	5.94	1	m	-	130
22Z/E	5.31/5.12	1/1	d/m	5.3/-	119

25	7.53	1	m	-	128
26	7.53	2	m	-	128
27	7.87	2	m	-	130

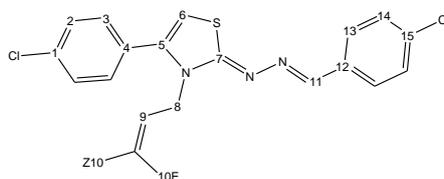
(1*E*,2*Z*)-1-benciliden-2-(3,4-difeniltiazol-2(3*H*)-iliden)hidrazina (20*E*), sólido amarillo, R: 70 %, PF 189-192 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 355 (100) C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NS<sup>+</sup> 237 (55).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.25	2	m	-	103
3	-	-	-	-	152
4	8.35	1	sa	-	155
5	7.75	2	m	-	127
6	7.35	3	m	-	128
7	7.13	2	m	-	128
8	7.23	3	m	-	128
9	7.37	6	m	-	128

(1*E*,2*Z*)-1-(4-clorobenciliden)-2-(3-alil-4-(4-clorofenil)thiazol-2(3*H*)-iliden)hidrazina (26*E*), sólido amarillo, R: 73 %, PF 137-138 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 387 (100) 389 (33) C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 249 (78) C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClN<sup>+</sup> 138 (14).

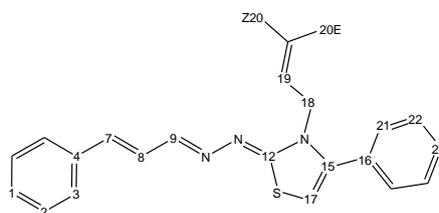


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	134
2	7.37	2	m	-	129
3	7.37	2	m	-	129
4	-	-	-	-	140
5	-	-	-	-	140
6	6.07	1	s	-	102
7	-	-	-	-	152

8	4.48	2	sa	-	48
9	5.89	1	m	-	132
10Z/E	5.22/	1/1	d/d	10/17	118
11	8.37	1	sa	-	150
12	-	-	-	-	130
13	7.70	2	d	8.5	129
14	7.44	2	d	8.7	129
15	-	-	-	-	130

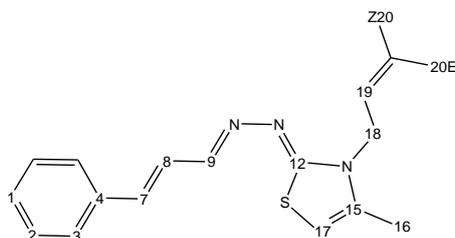
(1Z,2E)-1-(3-*alil*-4-feniltiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-fenilaliliden)hidrazina (28E), sólido amarillo, R:95 %, PF 201-203 °C, MS (EI), *m/z* (abundancia, %); M<sup>+</sup> 346 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.39	1	m	-	129
2	7.39	2	m	-	129
3	7.39	2	m	-	129
4	-	-	-	-	135
7	7.17	1	d	16	144
8	6.88	1	dd	16/9.5	123
9	9.21	1	d	9.3	155
12	-	-	-	-	168
15	-	-	-	-	143
16	-	-	-	-	130
17	6.66	1	s	-	106
18	5.23	2	sa	-	50
19	5.89	1	m	-	130
20Z/E	5.32/5.10	1/1	d/d	10/17	119
21	7.55	2	m	-	129
22	7.55	2	m	-	129
23	7.55	1	m	-	129

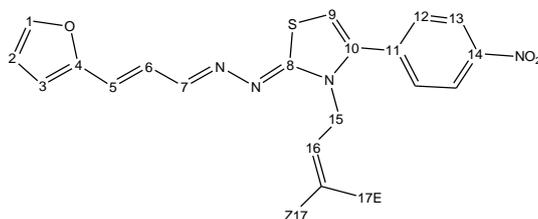
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-metiltiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-fenilaliliden)hidrazina (29*E*), sólido amarillo, R: 48 %, PF 83-85 °C, MS (EI), *m/z* (abundancia, %); M<sup>+</sup> 284 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.28	1	t	7.2	129
2	7.36	2	t	7.5	127
3	7.49	2	d	7.4	126
4	-	-	-	-	138
7	6.85	1	d	16	136
8	7.07	1	dd	16/9.6	126
9	8.24	1	d	9.3	153
12	-	-	-	-	169
15	-	-	-	-	136
16	2.17	3	s	-	14
17	5.82	1	s	-	98
18	4.62	2	sa	-	46
19	5.97	1	m	-	131
20 <i>Z</i> / <i>E</i>	5.20/5.12	1/1	d/d	10/17	116

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-nitrofenil)thiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (7*G*), sólido naranja, R: 90 %, PF 179-180 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 381 (100) C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> 366 (58).

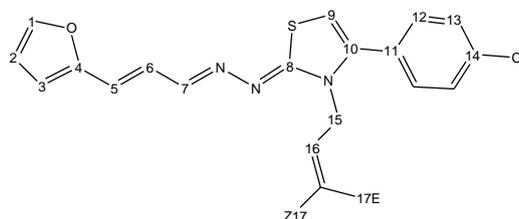


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.46	1	d	0.8	144
2	6.47	1	m	-	112
3	6.47	1	m	-	112
4	-	-	-	-	152
5	6.73	1	d	16	127
6	6.92	1	dd	9.8/16	125

7	8.37	1	sa	-	154
8	-	-	-	-	160
9	6.34	1	sa	-	104
10	-	-	-	-	139
11	-	-	-	-	136
12	7.63	2	d	8.7	130
13	8.34	2	d	8.7	125
14	-	-	-	-	148
15	4.68	2	sa	-	48
16	5.92	1	m	-	131
17Z/E	5.26/5.04	1/1	d/d	10/17	108

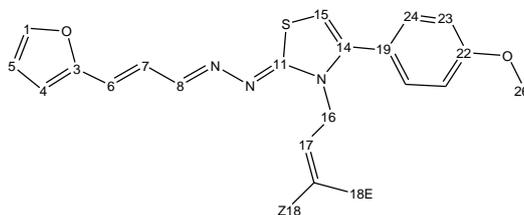
**(1Z,2E)-1-(3-aliil-4-(4-clorofenil)tiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (8G)**, sólido amarillo, R: 97 %, PF 200 °C (Desc.), MS (EI)  $m/z$  (abundancia, %):  $M^+$  369 (100) 371 (30)  $C_{12}H_{10}ClNS^+$  235 (42), UV-vis:  $\epsilon_{379}$  ( $14,7 \pm 0,5$ )  $cm^{-1}mM^{-1}$ .



RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$

Número	$\delta$ $^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ $^{13}C$ (ppm)
1	7.46	1	m	-	144
2	6.47	1	m	-	111
3	6.47	1	m	-	112
4	-	-	-	-	152
5	6.76	1	d	16	126
6	6.89	1	dd	16/5.8	123
7	8.48	1	m	-	154
8	-	-	-	-	168
9	8.25	1	s	-	103
10	-	-	-	-	140
11	-	-	-	-	130
12	7.44	2	d	8.0	129
13	7.36	2	d	8.0	130
14	-	-	-	-	136
15	4.71	2	s	-	48
16	5.88	1	m	-	131
17Z/E	5.25/5.05	1/1	d/d	10/17	117

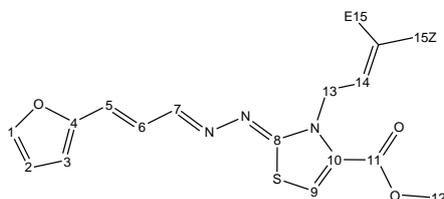
(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-metoxifenil)tiazol-2-(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (**13G**), sólido naranja, R: 90 %, PF 140-141 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 366 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.48	1	d	1.6	144
5	6.48	1	dd	3.4/1.8	112
4	6.54	1	d	3.4	113
3	-	-	-	-	151
6	6.92	1	d	16	129
7	6.76	1	dd	16/9.7	121
8	9.13	1	d	9.7	154
11	-	-	-	-	167
15	6.60	1	s	-	106
14	-	-	-	-	143
19	-	-	-	-	124
24	7.31	2	d	8.8	131
23	7.01	2	d	8.8	114
22	-	-	-	-	160
26	3.89	3	s	-	54
16	5.22	2	d	4.6	50
17	5.89	1	m	-	129
18 <i>Z/E</i>	5.31/5.09	1/1	d/d	10/17	118

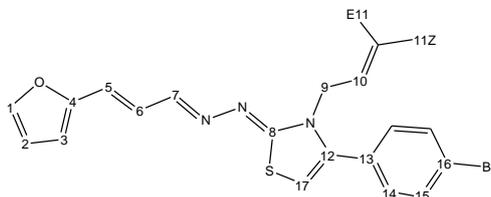
Ácido-(2*E*,2*Z*)-2-(2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-alil-2,3-dihidrotiazol-4-carboxílico (18*G*), sólido marrón, R: 64 %, PF 164 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 303 (100) C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 169 (18).



RMN: 400/100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.02	1	d	1.5	143
2	5.96	1	dd	1.8/3.4	112
3	6.06	1	d	3.4	112
4	-	-	-	-	151
5	6.34	1	d	16	122
6	6.29	1	dd	9.5/16	124
7	7.90	1	d	9.5	153
8	-	-	-	-	160
9	7.22	1	s	-	118
10	-	-	-	-	142
11	-	-	-	-	168
12	5.00	-	sa	-	-
13	4.76	1	d	5.0	48
14	5.42	1	m	-	131
15 <i>Z/E</i>	4.73/4.67	1/1	d/d	10/17	118

(1*Z*,2*E*)-1-(3-alil-4-(4-bromofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (20*G*), sólido rojo, R: 92 %, PF 182-184 °C.

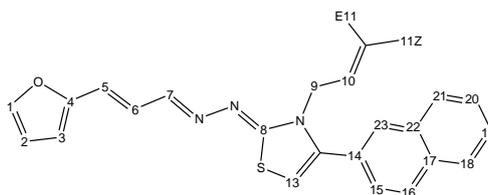


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.29	1	sa	-	145
2	6.27	1	dd	1.8/3.4	113
3	6.35	1	d	3.3	113
4	-	-	-	-	152
5	6.66	1	d	16	128

6	6.55	1	dd	9.5/16	122
7	8.66	1	d	9.42	154
8	-	-	-	-	168
9	4.80	2	sa	-	50
10	5.65	1	m	-	129
11Z/E	5.08/4.80	1/1	d/d	10/16	118
12	-	-	-	-	144
13	-	-	-	-	133
14	7.09	2	d	8.6	131
15	7.43	2	d	8.6	133
16	-	-	-	-	122
17	6.59	1	sa	-	108

**(1Z,2E)-1-(3-allyl-4-(naftalen-2-il)thiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (21G)**, sólido rojo, R: 56 %, PF 124-126 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 385 (100), C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NS<sup>+</sup> 251 (30), C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>S<sup>+</sup> 184 (29).

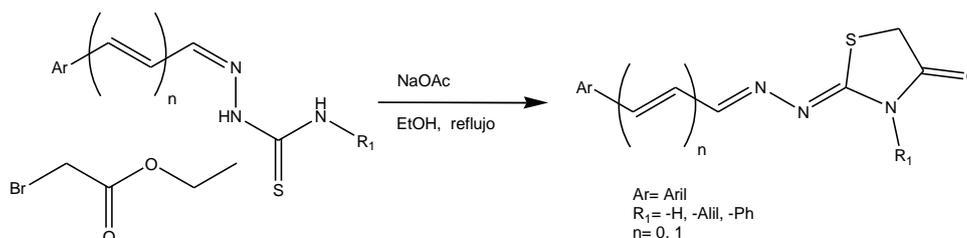


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.57	1	m	-	142
2	6.45	1	m	-	112
3	6.45	1	m	-	112
4	-	-	-	-	153
5	6.68	1	d	16	125
6	7.00	1	dd	9.9/16	125
7	8.18	1	d	9.6	154
8	-	-	-	-	169
9	4.52	2	sa	-	48
10	5.93	1	m	-	132
11Z/E	5.21/5.05	1/1	d/d	10/17	118
12	-	-	-	-	144
13	6.13	1	s	-	101
14	-	-	-	-	138
15	7.57	1	m	-	126
16	7.91	1	m	-	128
17	-	-	-	-	133
18	7.91	1	m	-	128
19	7.58	1	m	-	127
20	7.58	1	m	-	127

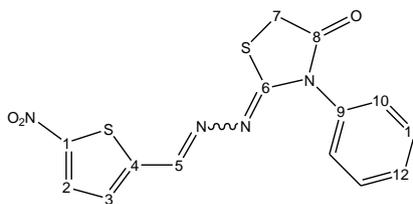
21	7.91	1	m	-	128
22	-	-	-	-	133
23	7.91	1	m	-	128

Procedimiento general de síntesis de derivados de hidrazinotiazolidinona.<sup>87</sup>



Se hace reaccionar la tiosemicarbazona correspondiente (1.0 mmol) con bromoacetato de etilo (2.0 mmol) en presencia de acetato de sodio (4.0 mmol) a reflujo de etanol absoluto (1.0 mL cada 100 mg de tiosemicarbazona) entre 4-10 h. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego de finalizada la reacción, la mezcla se deja enfriar, se filtra el producto obtenido, se lava con etanol/agua (80/20 % v/v) fría y el sólido se recristaliza de etanol o etanol/agua.

**(2E,2Z/E)-2-(2-((5-nitrotiofen-2-il)metil)hidrazono)-3-feniltiazolidin-4-ona (4A)**, sólido amarillo, R: 95 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 346 (100) C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 300 (1) C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>OS<sup>+</sup> 205 (9).

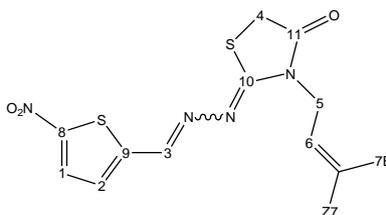


RMN: isómeros EZ/EE, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	156
2	7.77/7.87	1/0.5	d	4.0	127/129
3	7.18	1.5	m	-	130/129
4	-	-	-	-	137
5	8.34/8.01	1/0.5	s	-	151/148
6	-	-	-	-	100
7	4.09/4.02	2/1	s	-	32

8	-	-	-	-	172
9	-	-	-	-	128
10	7.65	3	m	-	130
11	7.39/7.53	3/1.5	m	-	128/129
12	7.39/7.53	3/1.5	m	-	128/129

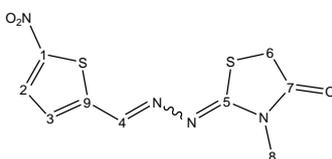
(*2E,2Z/E*)-3-alil-2-(2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazono)tiazolidin-4-ona (**5A**), sólido amarillo, R: 60 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 310 (37) C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 264 (96) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 155 (51) C<sub>3</sub>H<sub>5</sub> 41 (100).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.90/7.92	1/0.4	d	4.4	129
2	7.24/7.32	1/0.4	d	4.3	128
3	8.47/8.09	1/0.4	s	-	138
4	3.86/3.91	2/0.8	s	-	32
5	4.45/4.67	2/0.8	d	6.1	39
6	5.90	1.4	m	-	131
7Z/E	5.30/5.30	1-0.8/1-0.8	m/m	-	119
8	-	-	-	-	151
9	-	-	-	-	153
10	-	-	-	-	163
11	-	-	-	-	171

(*2E,2Z/E*)-2-(2-((5-nitrotiofen-2-il)metilen)hidrazono)tiazolidin-4-one (**6A**), sólido amarillo, R: 43 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %) M<sup>+</sup> 270 (100) C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 169 (18) C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 123 (12).

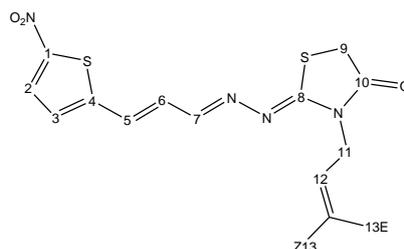


RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Numero	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	139
2	8.14/8.11	1/0.4	d	4.0	131/129
3	7.55/7.60	1/0.4	d	4.6	131/132

4	8.60/8.30	1/0.4	s	-	150/146
5	-	-	-	-	168
6	3.94/3.97	2/0.8	s	-	33
7	-	-	-	-	176
8	12.28	1	sa	-	-
9	-	-	-	-	152/156

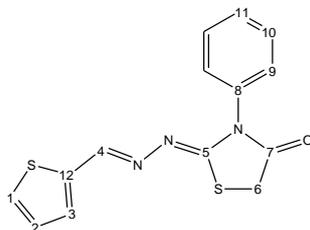
**(2E,2Z)-2-(2-((E)-3-(5-nitrotiofen-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-aliltiazolidin-4-ona (5B)**, sólido naranja, R: 35 %, PF 171-173 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 336 (100) C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 290 (21) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 155 (25) C<sub>3</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup> 41 (19).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	151
2	7.87	1	d	4.4	129
3	7.10	1	d	4.3	127
4	-	-	-	-	149
5	7.53	1	m	-	131
6	7.53	1	m	-	130
7	8.23	1	s	-	158
8	-	-	-	-	166
9	3.86	2	s	-	33
10	-	-	-	-	172
11	4.47	2	sa	-	46
12	5.92	1	m	-	130
13Z/E	5.30/5.25	1/1	d/d	10/17	119

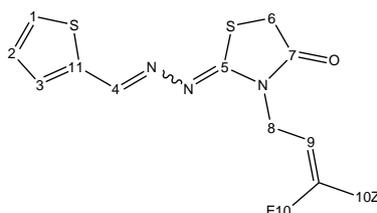
(2*Z*,2*E*)-3-fenil-2-(2-(tiofen-2-ilmetileno)hidrazono)tiazolidin-4-ona (**4C**), sólido blanco, R: 92 %, PF 226-228 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 301 (100) C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS<sup>+</sup> 218 (6).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.68	1	d	5.0	129
2	7.13	1	dd	3.6/5.0	128
3	7.42	1	d	3.6	129
4	8.46	1	s	-	152
5	-	-	-	-	164
6	4.10	2	s	-	32
7	-	-	-	-	172
8	-	-	-	-	135
9	7.53	1	m	-	128
10	7.46	1	m	-	132
11	7.40	1	m	-	128
12	-	-	-	-	139

(1*E/Z*, 2*E*)-3-alil-2-(2-(tiofen-2-ilmetileno)hidrazono)tiazolidin-4-ona (**5C**), sólido blanco, R: 64 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 265 (100), C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 156 (35) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS<sup>+</sup> 141 (74) C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>NS<sup>+</sup> 110 (92).

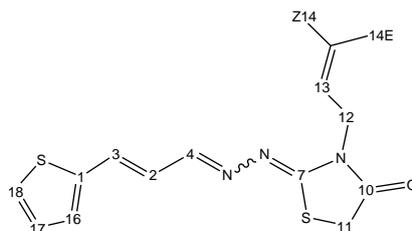


RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.44/7.74	1/1	dt/d	5.0-0.9/5.0	130/136
2	7.09/7.16	1/1	dd/dd	5.0-3.7/5.1-3.8	127/126
3	7.37/7.56	1/1	dd/d	3.6-1.0/3.7	131/135
4	8.59/8.22	1/1	s/sa	-	152/148
5	-	-	-	-	163
6	3.83/3.91	1/1	s/s	-	32
7	-	-	-	-	171
8	4.47/4.62	1/1	d/d	5.8/5.9	45

9	5.93/6.05	1/1	m/m	-	129
10Z/E	5.32- 5.42/5.25- 5.29	1/1	dd/dd	17-1.2/10-1.2	118
11	-	-	-	-	138/132

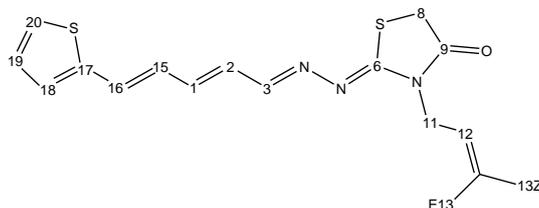
(2E,2E/Z)-2-(2-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-aliltiazolidin-4-ona (5D1), sólido amarillo, R: 95 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 314 (100).



RMN: isómeros EZ/EE 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	141
2	6.90	1.2	dd	16/9.7	124
3	7.14	1.2	d	16	133
4	8.20/7.90	1/0.2	d/d	9.7/9.6	161/156
7	-	-	-	-	162
10	-	-	-	-	171
11	3.83/3.93	2/0.4	s/s	-	133
12	4.45/4.49	2/0.4	d/dt	6.1/5.8- 1.3	44
13	5.90	1.2	m	-	130
14Z/E	5.20/5.30	1.2/1.2	dd/dd	10-1.2/17- 1.3	118
16	7.18	1.2	d	3.5	128
17	7.05	1.2	dd	5.1/3.6	128
18	7.35	1.2	d	5.0	128

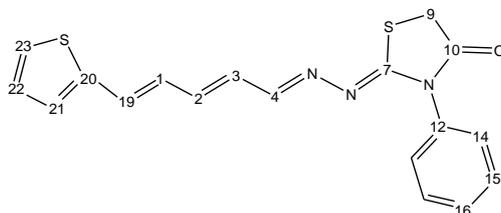
(2*E*,2*Z*)-2-(2-((2*E*,4*E*)-5-(tiofen-2-il)penta-2,4-dieniliden)hidrazono)-3-aliltiazolidin-4-ona (5D2), sólido naranja, R: 76 %, PF 139-140 °C.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6.76	1	m	-	141
2	6.57	1	m	-	129
3	8.13	1	d	9.8	160
6	-	-	-	-	162
8	3.81	2	s	-	32
9	-	-	-	-	172
11	4.44	2	d	5.8	45
12	5.91	1	m	-	130
13Z/E	5.25/5.31	1/1	dd/dd	10-1.1/17-1.2	118
15	6.76	1	m	-	128
16	6.91	1	d	14	129
17	-	-	-	-	127
18	7.09	1	d	3.4	127
19	7.03	1	dd	5.0/3.6	128
20	7.28	1	d	5.6	125

(2*E*,2*Z*)-2-(2-((2*E*,4*E*)-5-(tiofen-2-il)penta-2,4-dieniliden)hidrazono)-3-feniltiazolidin-4-ona (4D2), sólido marrón, R: 95 %, PF 219-220 °C.

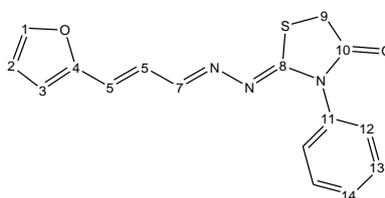


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6.71	1	m	-	126
2	6.71	1	m	-	141
3	6.57	1	m	-	128
4	8.00	1	d	9.7	161
7	-	-	-	-	163
9	3.97	2	s	-	32

10	-	-	-	-	171
12	-	-	-	-	135
14	7.53	2	m	-	129
15	7.36	2	m	-	127
19	6.88	1	d	15	129
20	-	-	-	-	141
23	7.27	1	d	5.0	126
22	7.02	1	dd	5.0/3.6	128
16	7.53	1	m	-	129
21	7.07	1	d	3.6	127

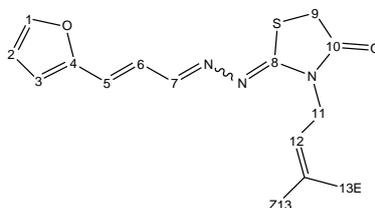
(2E,2Z)-2-(2-((E)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-feniltiazolidin-4-ona (6E), sólido amarillo claro, R: 87 %, PF 230-232 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 311 (46) C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>NO<sup>+</sup> 119 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.37	1	m	-	143
2	6.46	1	dd	1.8/ 3.4	112
3	6.50	1	dd	3.4	112
4	-	-	-	-	152
5	6.69	1	d	16	128
6	6.94	1	dd	9.9/16	123
7	8.04	1	d	10	160
8	-	-	-	-	161
9	3.98	2	s	-	32
10	-	-	-	-	172
11	-	-	-	-	134
12	7.48	2	m	-	129
13	7.54	2	m	-	129
14	7.37	1	m	-	129

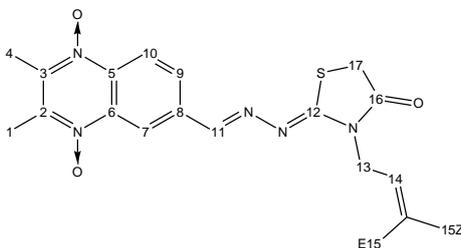
(2*E*,2*Z*/2*E*)-2-(2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-aliltiazolidin-4-ona (**10E**), sólido amarillo claro, R: 70 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 275 (100) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 155 (8) C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 234 (3).



RMN: isómeros *EEZ/EEE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.48/7.62	1/0.3	d	1.9	143/146
2	6.48	1	dd	3.3/2.0	112
3	6.53	1	d	3.2	112
4	-	-	-	-	152
5	6.81/6.77	1/0.3	s	-	119/129
6	6.97	1	dd	9.8/6.4	124
7	8.20/7.92	1/0.3	d	13	160/158
8	-	-	-	-	162
9	3.83/3.94	2/0.6	s	-	33
10	-	-	-	-	170
11	4.45/4.49	2/0.6	d	5.8/3.9	46
12	5.93	1.3	m	-	130
13Z/E	5.24- 5.29/5.34- 5.42	1-0.3/1-0.3	d/d	10/17	119

(2*E*,2*Z*)-3-alil-2-(2-((1,4-dioxi-2,3-dimetilquinoxalin-6-il)metilen)hidrazono)tiazolidin-4-ona (**13E**), sólido amarillo, R: 36 %, PF 246 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 371 (47) C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 354 (90) C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>OS<sup>+</sup> 337 (100) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>OS<sup>+</sup> 169 (28) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 184 (23).

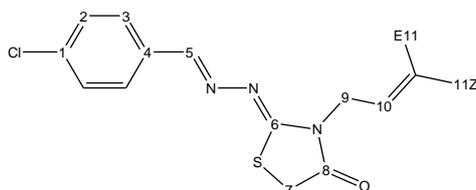


RMN: 400/100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	2.77	3	s	-	14
2	-	-	-	-	142
3	-	-	-	-	142
4	2.77	3	s	-	14

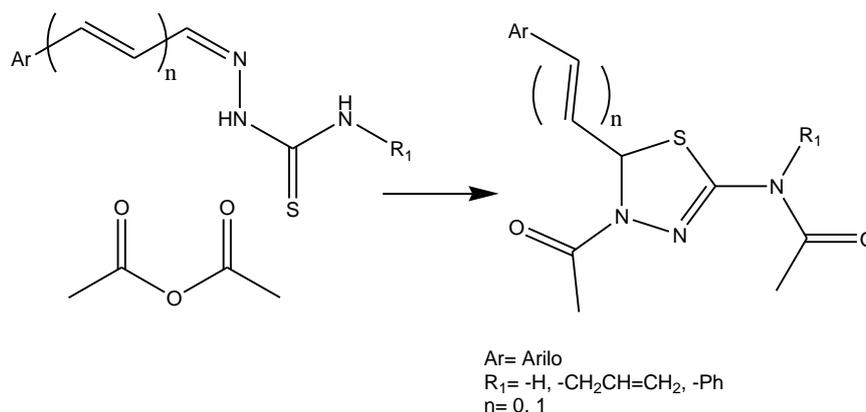
5	-	-	-	-	129
6	-	-	-	-	129
7	8.78	1	s	-	121
8	-	-	-	-	138
9	8.66	1	d	9.0	120
10	8.41	1	d	9.0	128
11	8.61	1	s	-	155
12	-	-	-	-	166
13	4.50	2	d	5.8	45
14	5.95	1	m	-	130
15Z/E	5.28/5.35	1/1	d/d	10/17	118
16	-	-	-	-	173
17	3.87	2	s	-	32

(2E, 2Z)-2-(2-(4-clorobenciliden)hidrazono)-3-aliltiazolidin-4-ona (25E), sólido blanco, R: 73 %, PF 130-132 °C, MS (EI) m/z (abundancia, %): M<sup>+</sup> 292 (67) 294 (12) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> 155 (42).



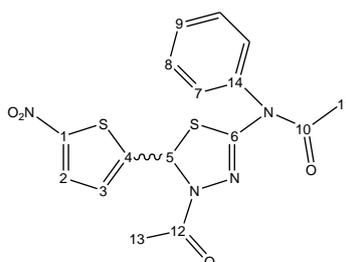
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	132
2	7.40	2	d	8.7	129
3	7.71	2	d	8.7	129
4	-	-	-	-	137
5	8.43	1	s	-	156
6	-	-	-	-	163
7	3.84	2	s	-	32
8	-	-	-	-	172
9	4.48	2	d	6.2	45
11Z/E	5.36/5.25	1/1	d/d	10/17	118
10	5.94	1	m	-	130

Síntesis de derivados de tiadiazol-*N*-acetamido.<sup>87</sup>

Una mezcla de 0.23 mmol de la tiosemicarbazona correspondiente y 2.00 mL de anhídrido acético se calienta a reflujo 2-4 h. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/AcOEt (70/30, % v/v). Al finalizar la reacción se reparte entre acetato de etilo y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, la capa orgánica se seca y evapora a vacío. El producto se purifica por columna de sílica en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 40 %.

***N*-(4-acetil-5-(5-nitrotiofen-2-il)-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il)-*N*-fenilacetamida (15A)**, sólido marrón claro, **R**: 52 %, **MS (EI)** *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 390 (37) C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 347 (100) C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 304 (68) C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 258 (6).

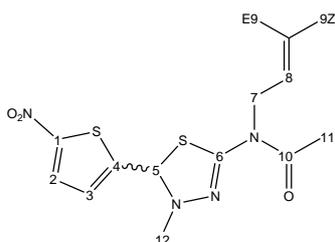


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	152
2	7.78	1	d	4.0	128
3	7.15	1	d	4.2	126
4	-	-	-	-	149
5	7.02	1	s	-	63
6	-	-	-	-	78
7	7.30	2	d	8.5	129
8	7.53	2	m	-	130
9	7,53	1	m	-	120

10	-	-	-	-	169
11	1,95	3	s	-	22
12	-	-	-	-	171
13	2,02	3	s	-	22
14	-	-	-	-	142

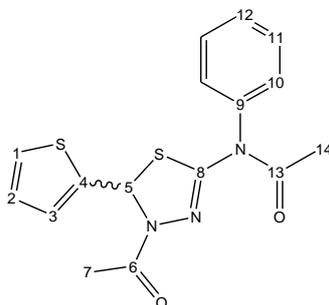
***N*-alil-*N*-(5-(5-nitrotiofen-2-il)-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida (16A)**, aceite marrón,  
**R**: 58 %, **MS (EI)** *m/z* (abundancia, %):  $M^+$  312 (74)  $C_8H_7N_4O_3S_2^+$  270 (47).



**RMN: 400/100 MHz,  $CDCl_3$**

Número	$\delta^1H$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	-	-	-	-	151
2	7.77	1	d	4.2	127
3	7.15	1	d	4.2	125
4	-	-	-	-	128
5	4.84	1	sa	-	63
6	-	-	-	-	152
7	3.96	2	m	-	48
8	5.94	1	m	-	132
9Z	5.24	1	d	10	118
9E	5.30	1	d	17	118
10	-	-	-	-	169
11	2.25	3	s	-	22
12	7.25	1	sa	-	-

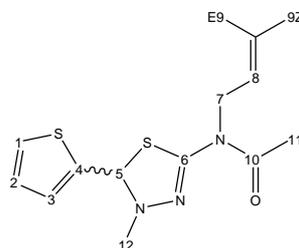
***N*-(4-acetil-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il)-*N*-fenilacetamida (15C)**, aceite amarillo, R: 30 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 345 (71) C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 303 (100) C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 259 (61).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.26	1	d	5.2	126
2	6.95	1	dd	4.0/5.2	127
3	7.16	1	d	4.0	126
4	-	-	-	-	148
5	7.14	1	s	-	62
6	-	-	-	-	124
7	2.03	3	s	-	24
8	-	-	-	-	148
9	-	-	-	-	140
10	7.33	2	m	-	128
11	7.52	2	m	-	129
12	7.53	1	m	-	129
13	-	-	-	-	168
14	1.95	3	s	-	22

***N*-alil-*N*-(5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida (16C)**, aceite amarillo, R: 69 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 267 (69) C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 225 (26).

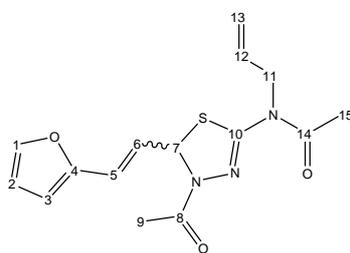


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.24	1	d	5.1	125
2	6.92	1	dd	3.6/5.1	126
3	7.14	1	d	3.6	126
4	-	-	-	-	152

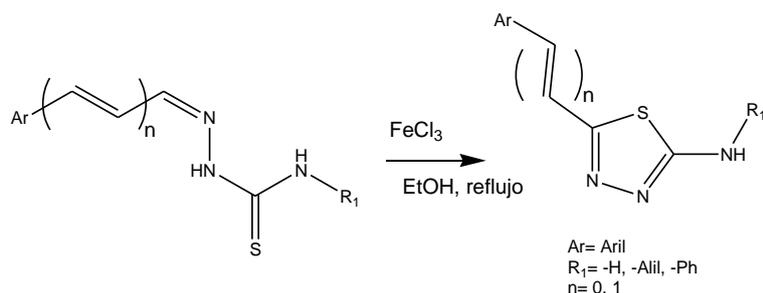
5	4.97	1	m	-	50
6	-	-	-	-	133
7	3.94	2	m	-	47
8	5.92	1	m	-	134
9E	5.30	1	d	17	117
9Z	5.20	1	d	10	117
10	-	-	-	-	169
11	2.23	3	s	-	22
12	7.32	1	s	-	-

**(E)-N-(4-acetil-5-(2-(furan-2-il)vinil)-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il)-N-alilacetamida (16G)**,  
aceite marrón, R: 11 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 319 (25) C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 277 (55).



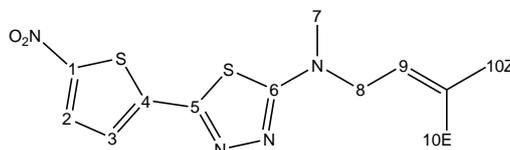
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.34	1	m	-	143
2	6.46	1	m	-	112
3	6.44	1	m	-	110
4	-	-	-	-	151
5	6.29	1	m	-	119
6	6.11	1	m	-	124
7	6.40	1	m	-	66
8	-	-	-	-	171
9	2.31	3	m	-	21
10	-	-	-	-	149
11	4.52	2	sa	-	51
12	5.90	1	m	-	131
13	5.27	1	dd	10/16	119
14	-	-	-	-	169
15	2.26	3	m	-	22

Síntesis de derivados de tiadiazol.<sup>87</sup>

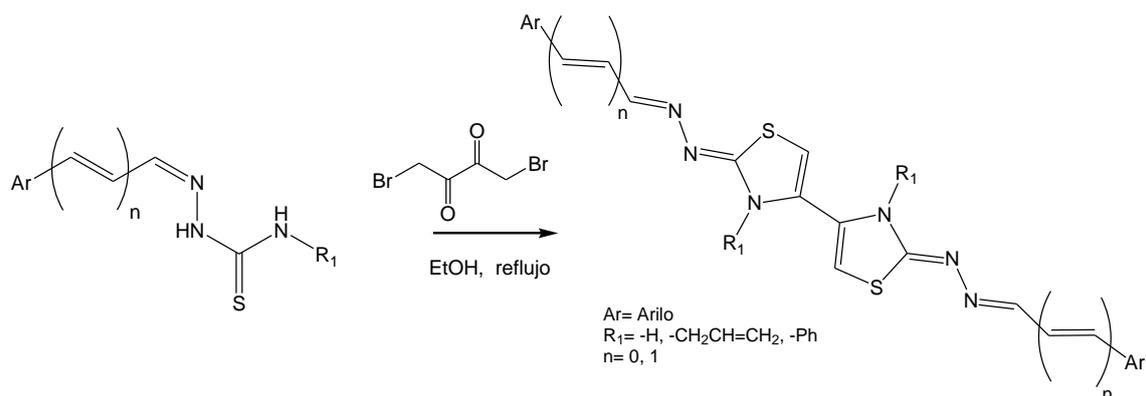
Una mezcla de 3.0 mmol de tiosemicarbazona y 1.2 mmol de cloruro férrico se calienta a reflujo 5-8 h, en 3.0 mL de etanol absoluto. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (60/40, % v/v). Al finalizar la reacción, se reparte entre acetato de etilo y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, la capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y evapora a vacío. El producto se purifica por columna de sílica en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 40 %.

**N-alil-5-(5-nitrotiofen-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (17A)**, sólido marrón, **R**: 75 %, **PF** 172-174 °C, **MS (EI)** *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 268 (100) C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> 253 (20) C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>NS<sub>2</sub><sup>+</sup> 172 (31).



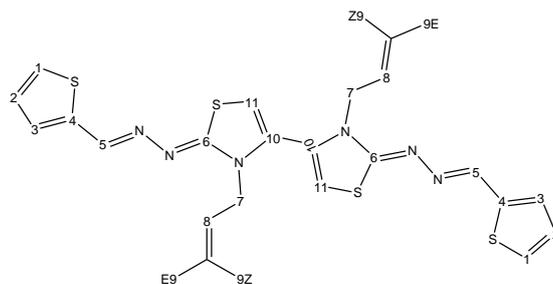
RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	-	-	-	150
2	8.05	1	d	4.4	131
3	7.42	1	d	4.4	126
4	-	-	-	-	140
5	-	-	-	-	157
6	-	-	-	-	169
7	8.48	1	sa	-	-
8	3.97	2	t	5.5	47
9	5.92	1	m	-	134
10Z/E	5.20/5.27	1/1	d/d	10/17	117

Síntesis de derivados de bis-tiazoles.<sup>87</sup>

Se hace reaccionar la tiosemicarbazona correspondiente (2 mmol), con la 1,4-dibromobutan-2,3-diona (1 mmol) a reflujo de etanol absoluto (1 mL cada 100 mg de tiosemicarbazona) entre 4-10 h. La formación del producto se controla por TLC en sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (80/20, % v/v). Luego de finalizada la reacción, la mezcla se deja enfriar, se filtra el producto obtenido, se lava con etanol/agua a 4 °C (80/20 % v/v) y el sólido se recrystaliza de etanol o etanol/agua. Nota: en caso de que no precipite ningún sólido, se evapora el etanol a vacío, se agregan dos volúmenes de éter de petróleo, se evapora a vacío nuevamente y luego se resuspende el crudo en agua, se filtra y se recrystaliza.

**(1Z,2E)-1-(3-alil-4-Bis-tiazol-2(3H)-iliden)-2-(tiofen-2-ilmetilen)hidrazina (1F)**, sólido amarillo, R:75 %, PF 167-169 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 497 (100) C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>S<sub>4</sub><sup>+</sup> 455 (11) C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>S<sub>4</sub><sup>+</sup> 414 (3).

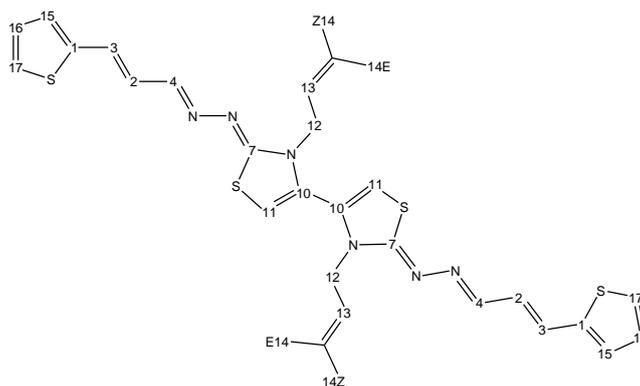


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.33	1	d	5.0	128
2	7.06	1	dd	3.6/5.0	127
3	7.24	1	d	3.6	128
4	-	-	-	-	140
5	8.45	1	s	-	147
6	-	-	-	-	168
7	4.34	2	sa	-	47
8	5.90	1	m	-	131

9Z/E	5.20/5.11	1/1	d/d	10/17	118
10	-	-	-	-	127
11	6.28	1	s	-	106

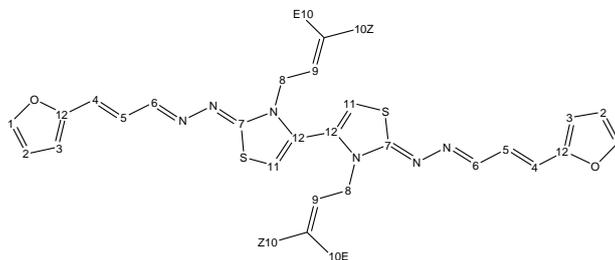
**(1Z,2E)-1-(3-ailil-4-bistiazol-2(3H)-iliden)-2-((E)-3-(tiofen-2-il)propeniliden)hidrazina (2F),**  
 sólido naranja, R: 95 %, PF 198 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 549 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	-	-	-	-	140
2	6.27	1	dd	16/9.6	123
3	6.77	1	m	-	135
4	8.13	1	d	9.6	154
7	-	-	-	-	167
10	-	-	-	-	127
11	6.78	1	s	-	114
12	4.35	2	sa	-	49
13	5.47	1	m	-	130
14Z/E	4.85/4.68	1/1	d/d	10/17	118
15	6.77	1	m	-	128
16	6.62	1	dd	5.1/3.6	128
17	6.97	1	d	5.1	127

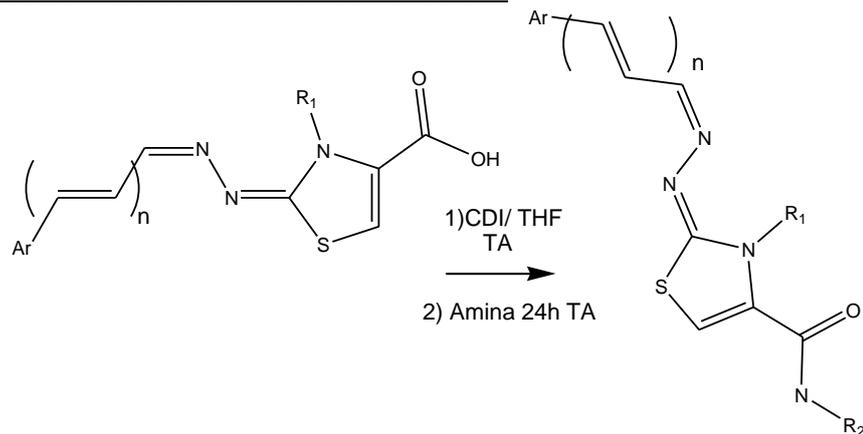
(1*E*/2*Z*,2*E*)-1-(3-alil-4-Bistiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (3*F*), sólido marrón, R: 95 %, PF 183-185 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 516 (100) C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 475 (10) C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>OS 258 (8), UV-vis: ε<sub>382</sub> (27 ± 1) cm<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.34	1	sa	-	142
2	6.36	1	m	-	125
3	6.64	1	m	-	111
4	6.61	1	d	16	124
5	6.75	1	dd	9.8/16	125
6	8.18	1	sa	-	153
7	-	-	-	-	143
8	4.38	2	s	-	49
9	5.78	1	m	-	131
10Z/E	5.20/4.94	1/1	d/d	11/17	118
11	6.32	1	m	-	110
12	-	-	-	-	152

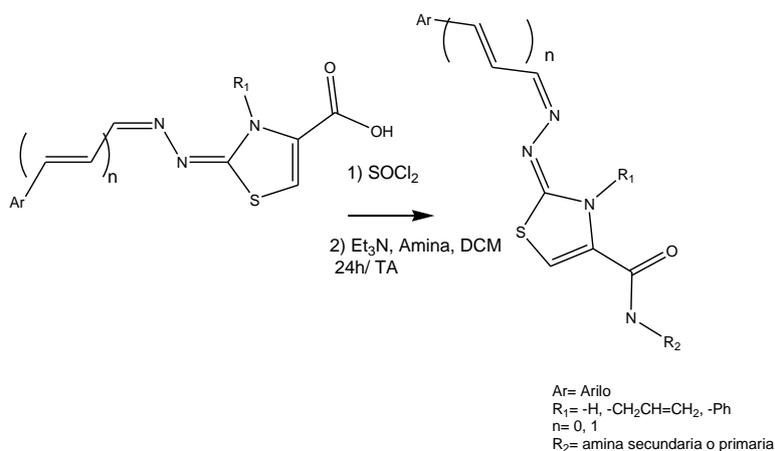
Síntesis de amidas de la **Familia F** utilizando CDI.<sup>89</sup>



Ar= Arilo  
R<sub>1</sub>= -H, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, -Ph  
n= 0, 1  
R<sub>2</sub>= amina secundaria o primaria

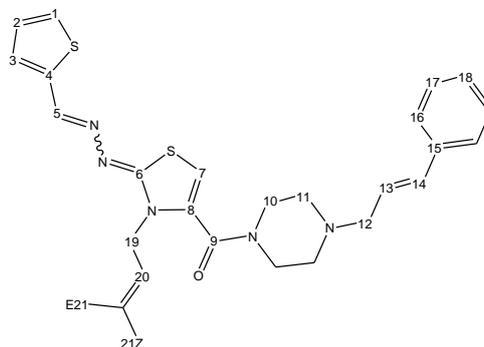
A 1.0 mmol del ácido correspondiente se le agrega 2.0 mmol de CDI en THF seco (1.0 mL cada 100 mg de ácido) y se deja 2 h a temperatura ambiente, se sigue la reacción hasta la desaparición de ácido por TLC de sílica, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego en baño de hielo se le incorporan 2.0 mmol de la amina correspondiente, 1.0 mmol de trietilamina y se deja 12-24 h a temperatura ambiente. La formación del producto se controla por TLC en alúmina, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego de finalizado, se reparte entre diclorometano y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio para eliminar los restos de ácido que no reaccionaron. Luego se lava la capa orgánica con una solución buffer fosfato pH 4-5, la capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y evapora a vacío. Se purifica por cromatografía en columna de alúmina en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 40 %.

Síntesis de amidas de la Familia F utilizando  $\text{SOCl}_2$ .<sup>90</sup>



A 2.05 mmol del ácido correspondiente se los hace reaccionar con 2.5 mmol de cloruro de tionilo por 1 h a 100 °C en tolueno anhidro (1.0 mL cada 100 mg de ácido). Se observa el cambio de color, si no ocurre luego de transcurrido el tiempo se agrega 1.0 mmol más de cloruro de tionilo y se deja 1 h de calentamiento, hasta ver el cambio de color. Luego se agrega, gota a gota durante 30 min, una mezcla de 10 mmol de trietilamina y 2.0 mmol de la amina correspondiente en diclorometano anhidro (1 mL cada 100 mg de ácido) en baño de hielo y atmósfera de nitrógeno. Luego se deja la mezcla a temperatura ambiente durante 12-24 h. La formación del producto se controla por TLC en alúmina con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (70/30, % v/v). Luego de finalizado, se reparte entre diclorometano y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio para eliminar los restos de ácido que no reaccionaron. Posteriormente se lava la capa orgánica con una solución buffer fosfato pH 4-5, la capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y evapora a vacío. Se purifica por cromatografía en columna de alúmina en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 40 %.

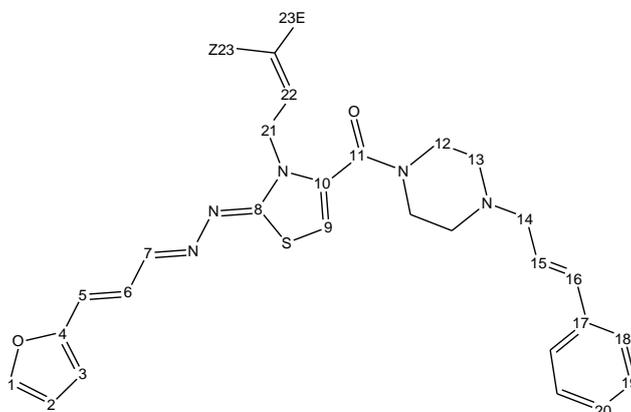
(2*E*,2*Z*/*E*)-3-*alil-N*-(1-cinamilpiperazin)-2-(2-(tiofen-2-ilmetilen)hidrazono)-2,3-dihidrotiazol-4-carboxamida (**4F**), vía CDI, aceite amarillo, R: 31 %, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 477 (100) C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>OS<sub>2</sub><sup>+</sup> 360 (12).



RMN: isómeros *EZ/EE*, 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.53/7.30	0.8/1	d/m	5.1	131/128
2	7.09/7.05	0.8/1	dd/dd	3.7-5.1/ 3.6-5.0	125/127
3	7.34/7.21	0.8/1	m/d	-/3.6	128
4	-	-	-	-	140
5	7.92/8.43	0.8/1	s	-	146/142
6	-	-	-	-	160
7	6.21/6.15	0.8/1	s	-	104
8	-	-	-	-	132
9	-	-	-	-	168
10	3.68	7.4	sa	-	42/47
11	2.52	7.4	sa	-	52
12	3.20	3.7	d	6.9	60
13	6.25	1.8	m	-	125
14	6.56	1.8	d	16	133
15	2.26	3	m	-	126
16	-	-	-	-	-
17	7.34	9	m	-	128
18	-	-	-	-	-
19	4.86/4.67	1.6/2	d/d	5.9/5.6	47
20	6.06/5.93	0.8/1	m	-	132
21 <i>Z/E</i>	5.27- 5.22/5.22- 5.16	0.8-1/0.8-1	d-m/m-d	10/17	118

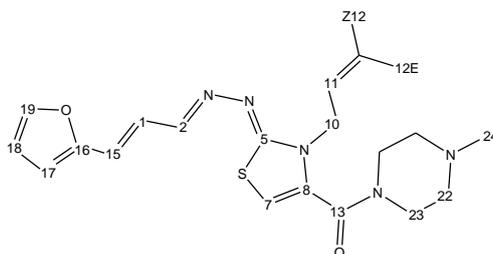
(2*E*,2*Z*)-2-(2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-alil-*N*-(1-cinamilpiperazin)-2,3-dihidrotiazol-4-carboxamida (**5F**), vía SOCl<sub>2</sub>, sólido amarillo, R: 60 %, PF 157-159 °C, MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> Cl 521 (16) C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 487 (13) C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>OS<sup>+</sup> 407 (10) C<sub>9</sub>H<sub>9</sub><sup>+</sup> 117 (100), UV-Vis: ε<sub>387</sub> (27,2 ± 0,4) cm<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.44	1	m	-	142
2	6.46	1	m	-	110
3	6.46	1	m	-	110
4	-	-	-	-	132
5	6.64	1	d	16	125
6	6.92	1	dd	9.9/16	125
7	8.07	1	d	9.9	152
8	-	-	-	-	168
9	6.15	1	s	-	104
10	-	-	-	-	142
11	-	-	-	-	170
12	3.68	4	sa	-	42
13	2.52	4	sa	-	47
14	3.2	2	d	6.6	60
15	6.25	1	m	-	124
16	6.56	1	d	16	134
17	-	-	-	-	135
18	7.38	2	m	-	128
19	7.38	2	m	-	128
20	7.38	1	m	-	128
21	4.66	2	d	5.6	47
22	5.91	1	m	-	132
23Z/E	5.19/5.19	1/1	m/m	-	118

(2*E*,2*Z*)-2-(2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-alil-*N*-(1-metilpiperazin)-2,3-dihidrotiazol-4-carboxamida (**6F**), vía SOCl<sub>2</sub>, sólido amarillo R: 52 %, PF 112-115 °C.

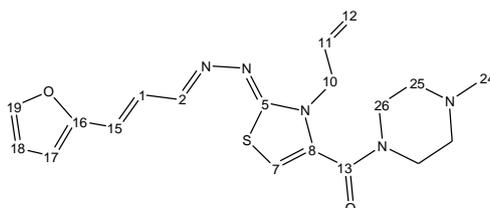


RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	6.91	1	dd	16/9.9	124
2	8.02	1	d	9.9	154
5	-	-	-	-	168
7	6.12	1	s	-	103
8	-	-	-	-	124
10	4.60	2	d	5.7	46
11	5.88	1	m	-	132
12 <i>Z</i> / <i>E</i>	5.18/5.11	1/1	dd/dd	10-1.3/17-1.4	118
13	-	-	-	-	160
15	6.60	1	d	16	124
16	-	-	-	-	154
17	6.39	1	m	-	112
18	6.39	1	m	-	112
19	7.39	1	m	-	142
22	3.61	4	sa	-	42/47
23	2.37	4	sa	-	55
24(metilo)	1.20	3	s	-	29

**(2E,2Z)-2-(2-((E)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-alil-2,3-dihidrotiazol-4-**

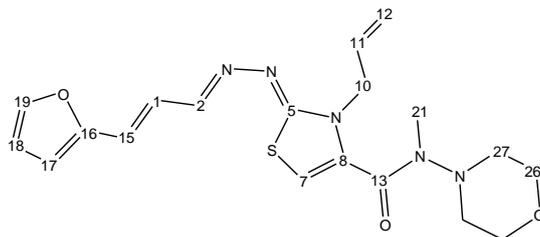
**piperazinamida (7F)**, vía CDI, se prepara a partir de piperazina monoboc. Luego de finalizada la reacción de formación de la amida se extrae el producto como se dijo anteriormente. La amida con la piperazina monoboc se desprotege mediante un tratamiento con TFA (0.5 mmol) por 24 h a TA, posteriormente se purifica como se indicó en el procedimiento general de síntesis, aceite amarillo, **R**: 88 %.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	6.90	1	dd	9.9/16	124
2	8.03	1	d	9.9	154
5	-	-	-	-	167
7	6.12	1	s	-	103
8	-	-	-	-	142
10	4.63	2	d	5.6	46
11	5.88	1	m	-	132
12	5.16	2	m	-	117
13	-	-	-	-	160
15	6.61	1	d	16	124
16	-	-	-	-	152
17	6.40	1	sa	-	112
18	6.40	1	sa	-	112
19	7.41	1	sa	-	142
24(H)	2.15	1	s	-	-
25	2.84	4	sa	-	45
26	3.58	4	sa	-	43/48

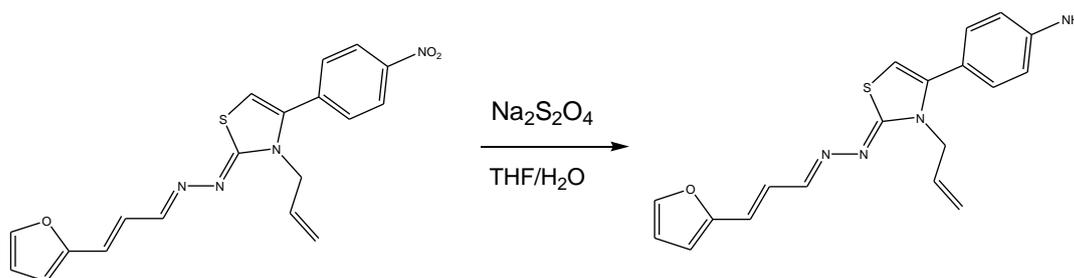
(2*E*,2*Z*)-2-(2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazono)-3-alil-*N*-morfolino-2,3-dihidrotiazol-4-carboxamida (**8F**), vía CDI, aceite oscuro, R: 35 %.



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

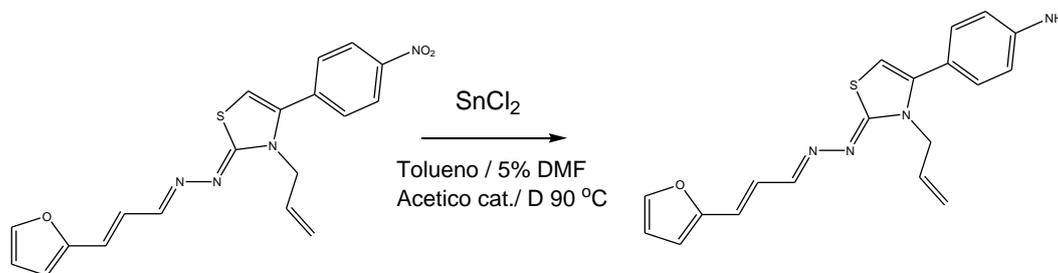
Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6.93	1	dd	16/9.9	124
2	8.13	1	d	9.9	155
5	-	-	-	-	168
7	7.17	1	s	-	115
8	-	-	-	-	142
10	4.98	2	d	5.1	48
11	5.98	1	m	-	132
12	5.18	2	m	-	117
13	-	-	-	-	157
15	6.65	1	d	16	124
16	-	-	-	-	152
17	6.43	1	sa	-	112
18	6.43	1	sa	-	112
19	7.43	1	sa	-	143
21	2.35	1	sa	-	-
26	3.49	4	sa	-	41
27	3.25	4	t	6.4	5

Reducción del *p*-nitro derivado **7G** al *p*-amino derivado **22G** utilizando ditionito de sodio.<sup>91</sup>



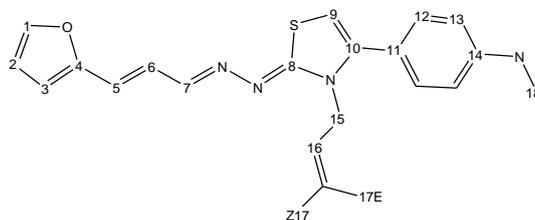
A una solución a reflujo de 0.26 mmol del nitro derivado **7G** en 10 mL de THF y 1.0 mL H<sub>2</sub>O, se le agrega 4.00 mmol de ditionito de sodio cada 10 min (en 7 porciones). Se calienta a reflujo durante 8 h con agitación vigorosa y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La reacción se sigue por TLC en alúmina, con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (80/20, % v/v). Al finalizar se evapora el disolvente a vacío, el crudo se reparte entre diclorometano y solución acuosa de HCl (1M). La capa acuosa se neutraliza (con una solución saturada de bicarbonato de sodio) y se reparte con diclorometano. La capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y evapora a vacío. El producto se purifica en columna de alúmina en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 30 %.

Reducción del 4-nitro derivado **7G** al 4-amino derivado **22G** utilizando SnCl<sub>2</sub>.<sup>92</sup>



A 0.26 mmol del nitro derivado en tolueno anhidro y atmósfera de N<sub>2</sub> se les agregan 10 mmol de SnCl<sub>2</sub>, 5% de DMF y cantidad catalítica de ácido acético. La mezcla se calienta a 90 °C por 2 h. La reacción se sigue por TLC en alúmina con una fase móvil mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (80/20, % v/v). Al finalizar, se evapora el disolvente a vacío, se reparte entre diclorometano y solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La capa orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y evapora a vacío. El producto se purifica en columna de alúmina en éter de petróleo con un gradiente de acetato de etilo de 0 a 60 %.

(1*Z*,2*E*)-1-(3-*alil*-4-(4-aminofenil)tiazol-2(3*H*)-iliden)-2-((*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden)hidrazina (22*G*), sólido rojo, R: 80 %, vía SnCl<sub>2</sub>, PF 140 °C (Desc.), MS (EI) *m/z* (abundancia, %): M<sup>+</sup> 351 (100).



RMN: 400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

Número localizador	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Integración	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1	7.46	1	d	0.8	144
2	6.46	1	m	-	112
3	6.46	1	m	-	112
4	-	-	-	-	152
5	6.76	1	m	-	126
6	6.89	1	dd	9.9/16	123
7	8.54	1	sa	-	153
8	-	-	-	-	168
9	6.19	1	sa	-	102
10	-	-	-	-	143
11	-	-	-	-	124
12	7.16	2	d	8.6	131
13	6.72	2	d	8.6	114
14	-	-	-	-	148
15	4.77	2	sa	-	49
16	5.90	1	m	-	132
17 <i>Z/E</i>	5.23/5.06	1/1	d/d	10/17	117
18	4	2	sa	-	-

### Bibliografía

<sup>78</sup> Spartan'04; Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370. Irvine, California 92612, USA.

<sup>79</sup> Todeschini AR, de Miranda ALP, da Silva KCM, Parrini SC, Barreiro EJ, Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazones derivatives, *Eur J Med Chem*, **1998**, 33, 189-199.

<sup>80</sup> Vogt RA, Crespo-Hernández CE, Structure-activity relationships in nitro-aromatic compounds, *Pract Asp Comput Chem*, **2010**, 10, 217-240.

<sup>81</sup> Nair PC, Sobhia ME, Comparative QSTR studies for predicting mutagenicity of nitro compounds, *J Mol Graph Model*, **2008**, 26, 916-934.

- <sup>82</sup> Carrara G, Ettore R, Fava F, Rolland G, Testa E, Vecchi A, 4-Nitrocinnamic and  $\beta$ -(5-nitro-2-thienyl)-acrylic derivatives, *J Am Chem Soc*, **1954**, 76, 4391–4395.
- <sup>83</sup> Keskin H, Miller R, Nord FF, Studies of the chemistry of heterocyclics. XII. Preparation of acetylenic derivatives of thiophene, *J Org Chem*, **1951**, 16, 199–206.
- <sup>84</sup> De Aquino TM, Liesen AP, da Silva RE, Lima VT, Carvalho CS, de Faria AR, de Araújo JM, de Lima JG, Alves AJ, de Melo EJ, Góes AJ, Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids, *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 446–456.
- <sup>85</sup> Baklien A, Serban A, Warner RB, Alcock KT, Treating seeds against fungi, *A1 19791023 Patent*, **1979**, 12-15.
- <sup>86</sup> Bekhit AA, Ashour HM, Abdel Ghany YS, Bekhit Ael-D, Baraka A, Synthesis and biological evaluation of some thiazolyl and thiadiazolyl derivatives of 1H-pyrazole as anti-inflammatory antimicrobial agents, *Eur J Med Chem*, **2008**, 43, 456-463.
- <sup>87</sup> Medne A, Saldabols N, Synthesis and transformations of furan derivatives. V. Synthesis of 4-methyl-2-thiazolylhydrazones of aldehydes and ketones of the furan series, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenij*, **1965**, 4, 629-631.
- <sup>88</sup> Omar A, Mohsen ME, Ahmed Ibrahim C, AboulWafa Omaima M, Hassan Ahmed M, Abou-Shleib H, Ismail Khadiga A, Novel thiosemicarbazones, thiazolines and thiazolidinones derived from chalcones: synthesis, antimicrobial and anticancer properties, *Alexandria J Pharm Sci*, **1989**, 3, 211-216.
- <sup>89</sup> Bu X, Deady LW, Finlay GJ, Baguley BC, Denny WA, Synthesis and cytotoxic activity of 7-oxo-7H-dibenz[f,ij]isoquinoline and 7-oxo-7H-benzo[e]piperimidine derivatives, *J Med Chem*, **2001**, 44, 2004-2014.
- <sup>90</sup> Rodríguez-Loaiza P, Quintero A, Rodríguez-Sotres R, Solano JD, Lira-Rocha A, Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals, *Eur J Med Chem*, **2004**, 39, 5-10.
- <sup>91</sup> Mizuno CS, Rimando AM, Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth, *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**, 20, 7385–7387.
- <sup>92</sup> Slade RM, Berger JG, Application of an almost traceless linker in the synthesis of 2-alkylthiobenzimidazole combinatorial libraries, *Mol Divers*, **1998**, 4, 215–219.

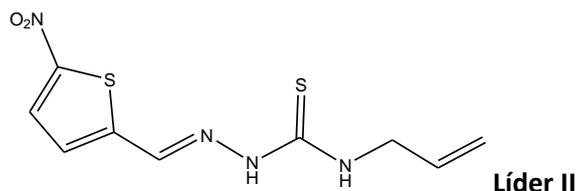


# BIOLOGÍA





En esta sección se describen los diferentes ensayos biológicos realizados para los nuevos derivados sintetizados. En primer lugar, en la **Etapa 1** (esquema 11) del desarrollo de este trabajo, se ensayaron los compuestos derivados del **Líder II**, en la forma epimastigote de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. Se buscó que los nuevos derivados tuviesen una actividad tripanosomicida mejor que el líder, con  $IC_{50} < 4.0 \mu M$ .



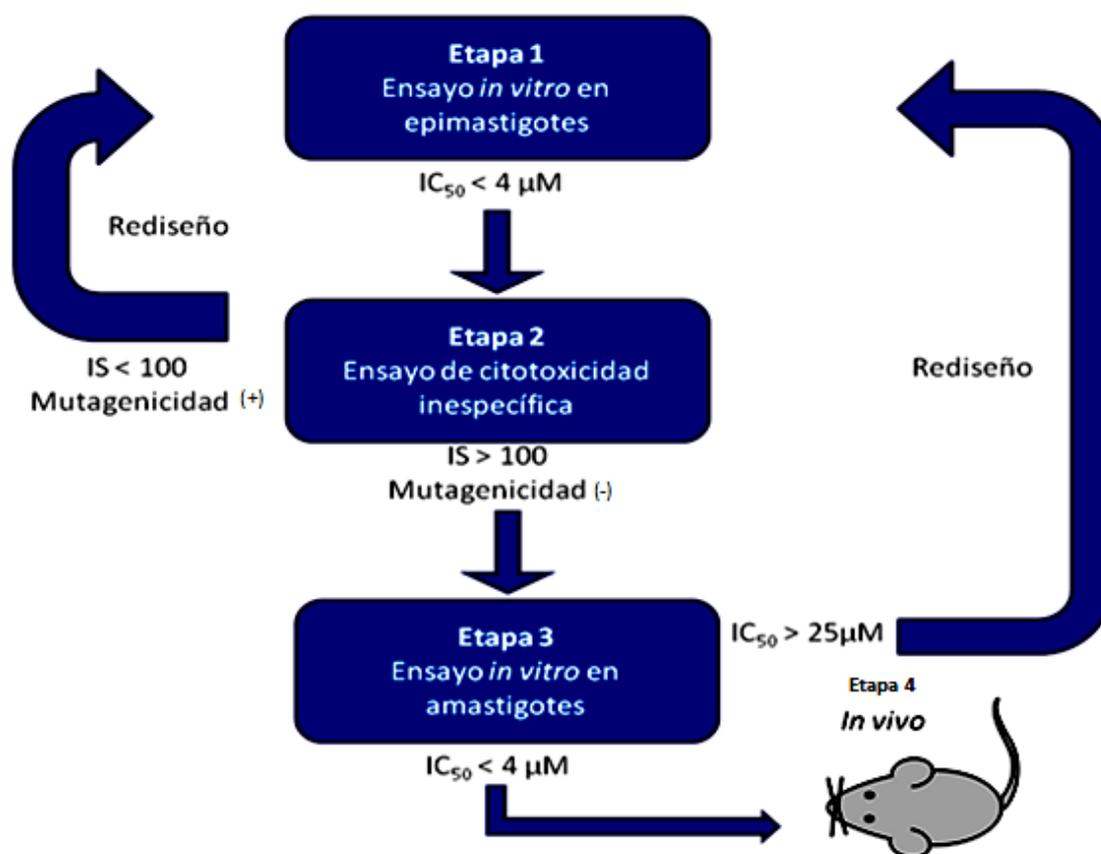
Con aquellos compuestos con actividad mejorada se continuó con los ensayos de citotoxicidad inespecífica, principalmente sobre glóbulos rojos humanos, y mutagenicidad, aplicando test de Ames empleando *Salmonella typhimurium* (**Etapa 2**).

Con los compuestos que superasen esta etapa, es decir con un buen índice de selectividad ( $IS > 100$ ) y mutagenicidad negativa, se siguió con los ensayos en otros estadios y cepas de *T. cruzi*, a saber amastigotes y tripomastigotes (**Etapa 3**). En esta instancia también se realizaron estudios de toxicidad sobre las células mamíferas utilizadas en el ensayo con amastigotes.

Cuando los nuevos derivados resultaron más activos que el **Líder II**, con baja toxicidad inespecífica y ausencia de mutagenicidad, fueron sometidos a ensayos *in vivo* (**Etapa 4**). La **Etapa 4** consistió en ensayar la toxicidad en ratones sanos y el efecto farmacológico en modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas.

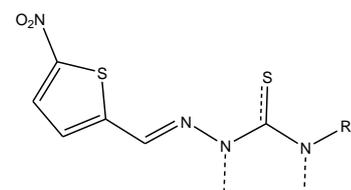
Si en alguna etapa no se cumple con los requisitos para el pasaje a la siguiente etapa, se rediseñan nuevas modificaciones estructurales y se sintetizan nuevos derivados (Diseño Bioguíado).

**Esquema 11.** Diseño Bioguíaado: se divide en cuatro etapas que simbolizan el desarrollo preclínico desde la síntesis hasta los ensayos *in vivo*. La **Etapa 1** corresponde a la identificación de prototipos moleculares. En las **Etapas 2 y 3** se identifican los líderes, que cumplen con los requisitos de mejoras en las actividades biológicas, tanto desde la actividad tripanosomicida como de la citotoxicidad inespecífica. En la **Etapa 4** se consolidan los líderes. En todos los puntos del desarrollo se trabaja, con la información generada, en un re-diseño y una retroalimentación de cada una de las etapas.

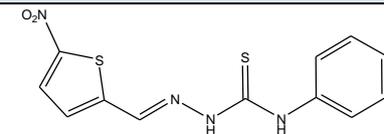
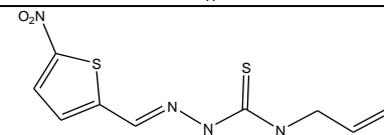
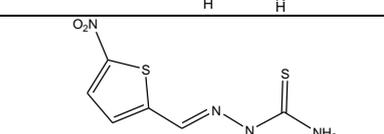
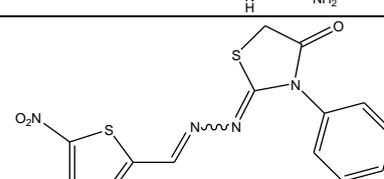
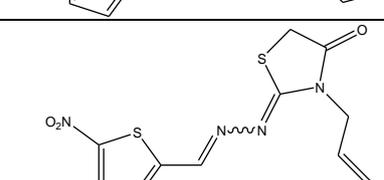
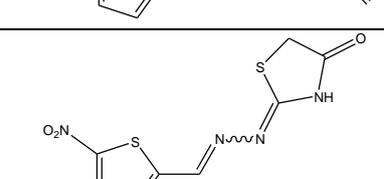
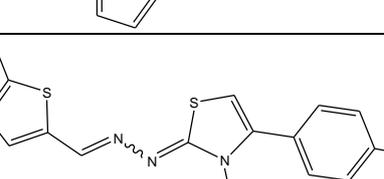
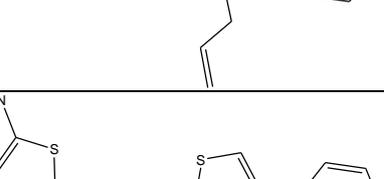


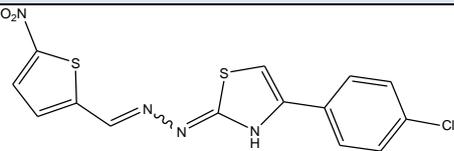
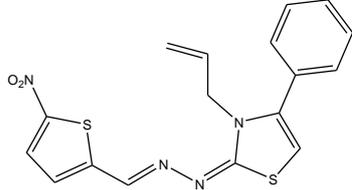
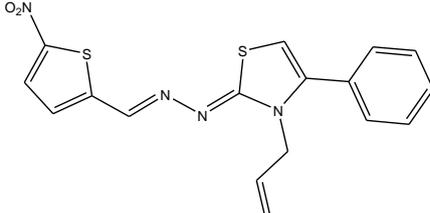
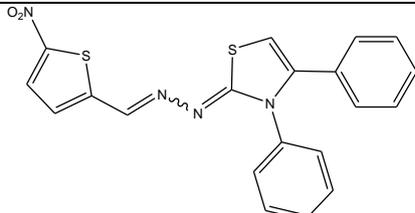
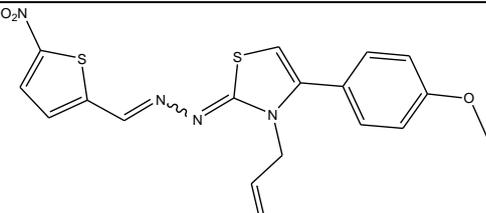
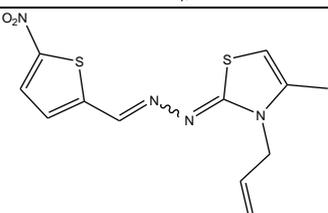
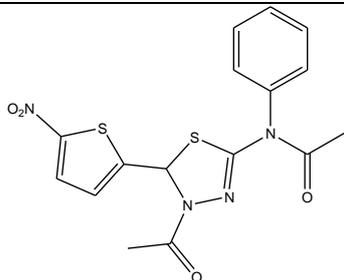
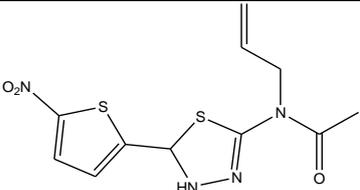
Caracterización biológica *in vitro* frente a epimastigotes de *T. cruzi* (Etapa 1). Para todos los derivados desarrollados en el presente trabajo de tesis, se evaluó *in vitro* la capacidad de inhibir el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*, cepa *Tulahuen 2*. Como evaluación primaria de actividad tripanosomicida, los compuestos fueron ensayados a una concentración inicial de 25 µM. La concentración necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento parasitario ( $IC_{50}$ ) se determinó para aquellos derivados que presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento mayor al 50 % a 25 µM. Los resultados se presentan, a continuación, por familia. En la tabla 10 se muestran los resultados de los derivados de la **Familia A**.

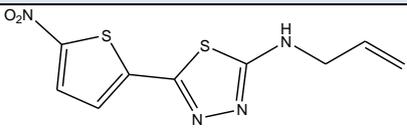
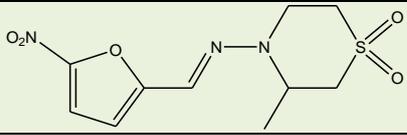
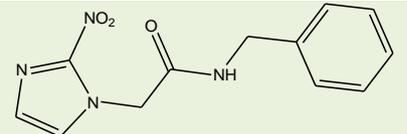
**Tabla 10.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de la primer serie de derivados del Líder II, Familia A.



**Familia A**

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> ± DS <sup>b</sup>
	<b>1A</b>	4.0 ± 0.4
	<b>Líder II<sup>c</sup></b>	4.2 ± 0.6
	<b>3A</b>	25 ± 4
	<b>4A</b>	13 ± 2
	<b>5A</b>	>25 ± 4
	<b>6A</b>	>25 ± 4
	<b>7A</b>	10 ± 1
	<b>8A</b>	14 ± 2

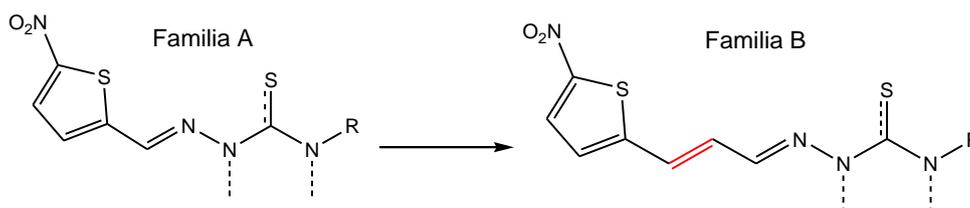
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>9A</b>	4.9 ± 0.5
	<b>10A<sub>EE</sub></b>	20 ± 3
	<b>10A<sub>EZ</sub></b>	6 ± 1
	<b>12A</b>	>25 ± 4
	<b>13A</b>	10 ± 1
	<b>14A</b>	20 ± 3
	<b>15A</b>	2.9 ± 0.3
	<b>16A</b>	>25 ± 3

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>17A</b>	12 ± 2
	<b>Nfx</b>	8 ± 1
	<b>Bnz</b>	7 ± 1

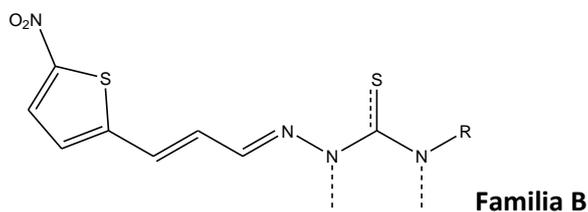
<sup>a</sup> Concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular, <sup>b</sup> desviación estándar. <sup>c</sup> Descrito previamente en referencia 74.

En esta familia de compuestos se obtienen derivados con mejores actividades que las de los agentes de referencia utilizados en el mismo ensayo, Nfx y Bnz, a saber **1A**, **9A**, **10A<sub>EZ</sub>**, y **15A**. Al compararlos con el compuesto líder y según las exigencias indicadas en el esquema 11, se puede decir que en esta familia existen dos productos con actividad moderada, **9A** y **10A<sub>EZ</sub>**. Para este último derivado, el único que pudo ser resuelto en sus isómeros geométricos, se observa que el isómero Z a nivel del hidrazinotiazol es levemente más activo que el isómero E, **10A<sub>EE</sub>**. Por otro lado, el compuesto **15A** es el derivado de esta familia que supera la actividad del **Líder II** y por ende pasa a los estudios de la **Etapa 2** (ver más adelante).

Se observa claramente que con ninguna de las modificaciones planificadas se logra mejorar considerablemente la actividad tripanosomicida del compuesto **Líder II** (IC<sub>50</sub> < 4 μM). Por esta razón al diseño de partida se le incorpora la adición de un doble enlace entre el anillo aromático y la hidrazona. Este arreglo estructural se observa repetido en estructuras con actividad tripanosomicida, sintetizadas previamente en nuestro laboratorio.<sup>77</sup> De este rediseño surgen los derivados de la **Familia B**, cuyas actividades tripanosomicidas se presentan en la tabla 11.



**Tabla 11.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia B**. Se presentan en **negrita** aquellos derivados con actividad mejorada con respecto al **Líder II**.



Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>Líder II</b>	<b>4.2 ± 0.6</b>
	<b>2B</b>	<b>1.2 ± 0.2</b>
	<b>5B</b>	<b>1.3 ± 0.2</b>
	<b>7B</b>	<b>3.3 ± 0.5</b>
	8B	10 ± 1
	14B	10 ± 1

Si se comparan estas actividades biológicas con la de los análogos de la **Familia A** se puede observar que la incorporación del doble enlace efectivamente logra mejorar la actividad tripanosomicida. Además, se obtienen tres compuestos (**2B**, **5B** y **7B**) con  $IC_{50} < 4 \mu M$ , los cuales son sometidos a los estudios de la **Etapa 2**.

### Toxicidad inespecífica y caracterización biológica *in vitro* frente a amastigotes de *T. cruzi*

**Etapas 2 y 3** de los derivados de las familias **A** y **B** que superaron la **Etapa 1**. A aquellos derivados con buenos perfiles sintéticos y mejor actividad frente a la forma epimastigote que el **Líder II**, se les evaluó su actividad frente a la forma amastigote de *T. cruzi*, cepa Y, y la citotoxicidad inespecífica en células mamíferas.

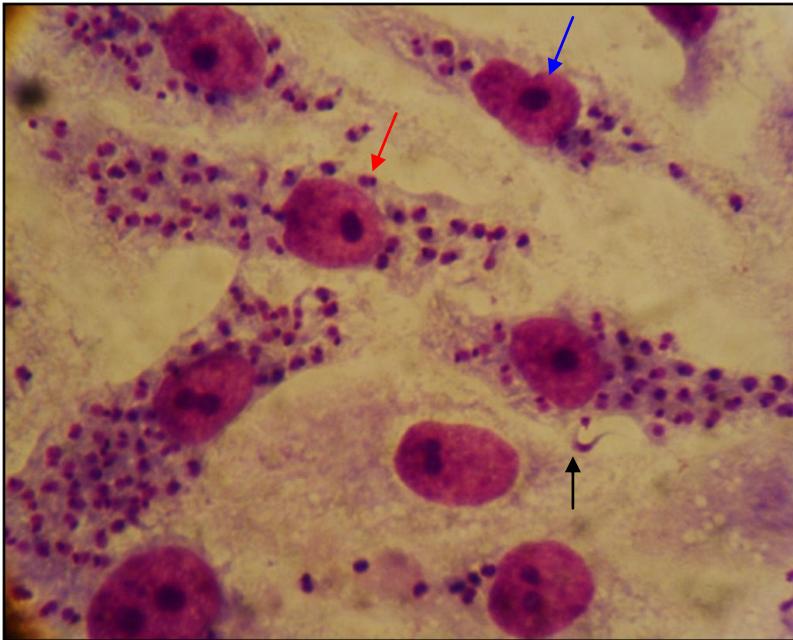
**Citotoxicidad inespecífica (Etapa 2)**. A fin de evaluar la selectividad hacia los parásitos, se determinó la toxicidad de los productos desarrollados en el presente trabajo de tesis, sobre células mamíferas (células VERO y glóbulos rojos humanos, GRH). Como forma de evidenciar la citotoxicidad selectiva hacia *T. Cruzi*, se determinó el índice de selectividad (IS), que se define como la relación entre el  $IC_{50}$  en las células de mamífero y el  $IC_{50}$  en la forma amastigote de *T. cruzi*. Como control positivo en el ensayo de lisis de GRH se utilizó Anfotericina B (**Anfo B**). Los resultados de IS para los derivados de las familias **A** y **B** se presentan en la tabla 12.

**Tabla 12.** Índices de selectividad ( $IS = IC_{50, \text{células mamíferas}}/IC_{50, \text{amastigotes}}$ ). En negrita se resaltan los resultados más relevantes y en color las estructuras menos citotóxicas, para las Familias A y B.

Estructura	Derivado	IS (Células VERO)	IS (GRH)
	<b>Líder II</b>	100	nd <sup>a</sup>
	<b>1A</b>	20	nd
	<b>9A</b>	<5 <sup>b</sup>	nd
	<b>10A</b>	5	nd
	<b>15A</b>	<8 <sup>b</sup>	3
	<b>17A</b>	50	nd
	<b>2B</b>	<b>60</b>	<b>82</b>
	<b>5B</b>	<b>80</b>	<b>28</b>
	<b>7B</b>	13	nd
Fármaco de referencia	<b>Nfx</b>	200	150
Fármaco de referencia	<b>Anfo B</b>	nd	10

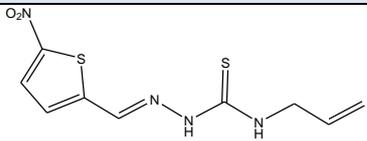
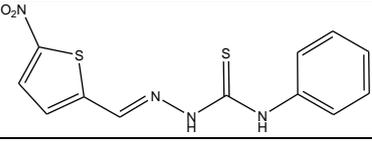
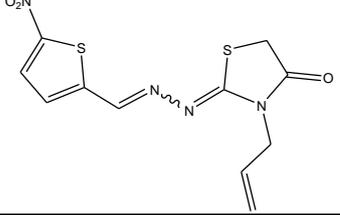
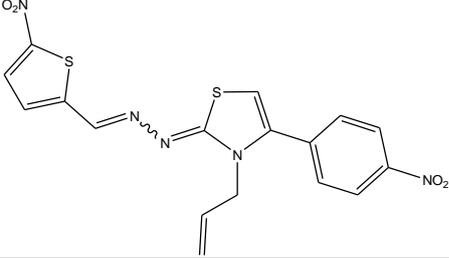
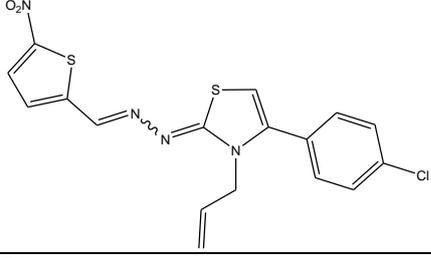
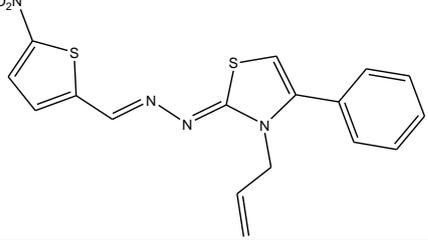
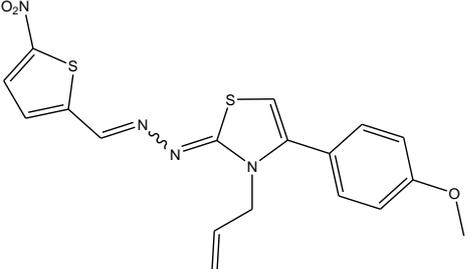
<sup>a</sup> no determinado, <sup>b</sup> inhibió más del 50% del crecimiento celular (células VERO) a concentraciones < 25  $\mu$ M

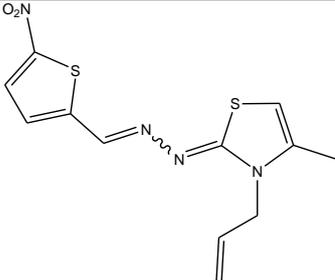
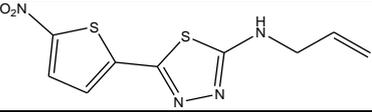
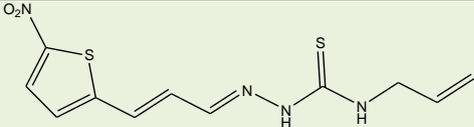
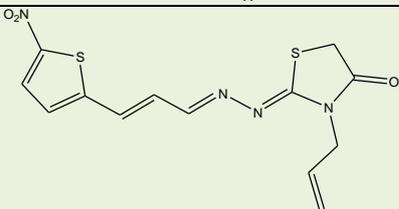
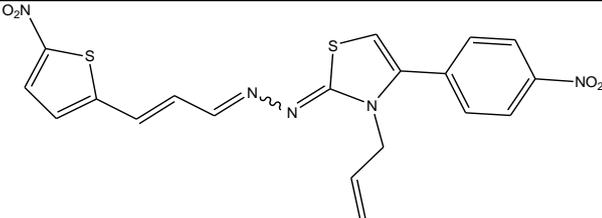
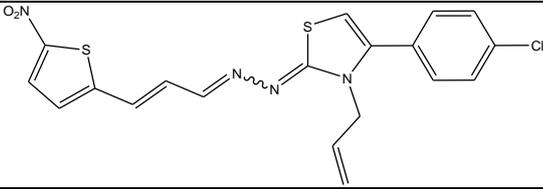
**Actividad frente amastigotes (Etapa 3).** Los compuestos se evalúan en un ensayo de 72 h sobre células VERO infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* (figura 14, tabla 13). En este ensayo se incluyen otros derivados aunque no superasen las exigencias del organigrama del esquema 11, como forma de no descartar ningún arreglo estructural potencialmente relevante para la actividad biológica deseada.



**Figura 14.** Micro-fotografía de cultivo de células VERO infectadas. Se muestran los tripomastigotes (flecha negra), los núcleos de las células (flecha azul) y en el citoplasma de la célula los amastigotes (flecha roja). MO a 100x, con tinción de Giemsa.

**Tabla 13.** Actividad biológica frente a amastigotes de *T. cruzi*. En negrita y en color se resaltan las estructuras más relevantes, para las Familias A y B.

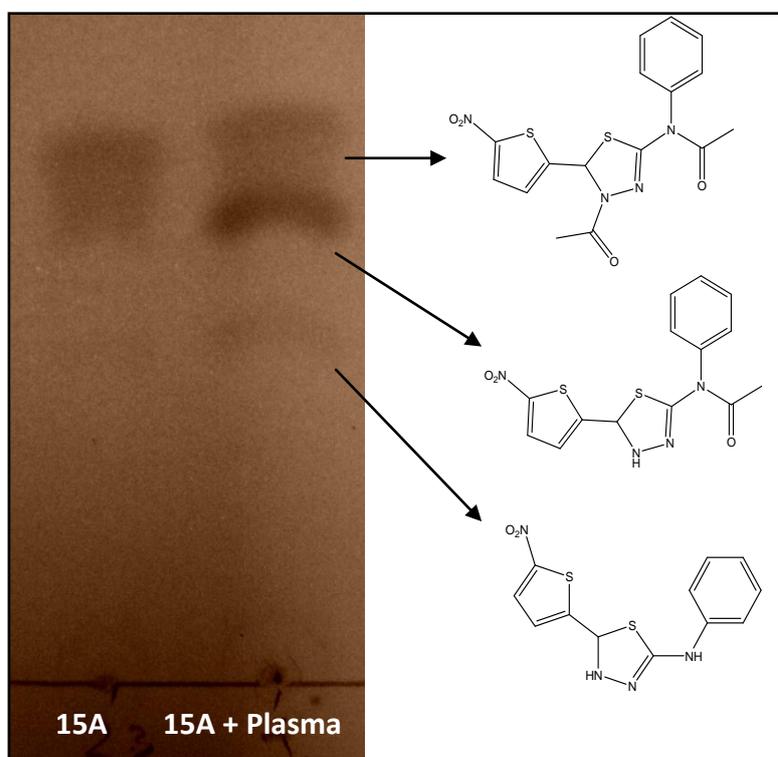
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>Líder II</b>	>25 ± 4
	<b>1A</b>	13 ± 1
	<b>5A</b>	>25 ± 4
	<b>7A</b>	>25 ± 4
	<b>8A</b>	>25 ± 4
	<b>10A<sub>EZ</sub></b>	>25 ± 4
	<b>13A</b>	>25 ± 4

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>14A</b>	8.3 ± 0.8
	<b>17A</b>	5.0 ± 0.5
	<b>2B</b>	4.4 ± 0.4
	<b>5B</b>	2.8 ± 0.3
	<b>7B</b>	19 ± 2
	<b>8B</b>	>25 ± 4
Fármaco de referencia	<b>Nfx</b>	1.6 ± 0.2
Fármaco de referencia	<b>Anfo B</b>	1.1 ± 0.1

Así, es posible observar que dos compuestos resultan ser moderadamente mejores tripanosomicidas frente a amastigotes de *T. cruzi*, los derivados **2B** y **5B**, que además resultaron ser selectivos (tabla 12). Desde un punto de vista estructural, estos compuestos son derivados del **Líder II** con la incorporación de una insaturación.

De los cuatro derivados seleccionados a partir de los ensayos de la **Etapa 1 (2B, 5B, 7B y 15A)**, de las más de veinte nuevas moléculas pertenecientes a estas dos familias, sólo dos superan exitosamente las etapas **2 y 3**, resultando los derivados **15A y 17A** poco selectivos y el derivado **7B** poco activo frente a la forma amastigote.

**Estabilidad en plasma sanguíneo.** Se decide ensayar la estabilidad en plasma de los derivados preseleccionados. Todos los nuevos derivados que poseen actividad frente a *T. cruzi* ( $IC_{50} < 25$ ), derivados del **Líder II**, son estables en plasma en las condiciones ensayadas, excepto los derivados acetilados (**14A, 15A y 16A**) (ver ejemplo del derivado **15A** en figura 15). Es de esperar que en un medio rico en amidasas<sup>93</sup>, como el plasma, esto ocurra. La toxicidad de **15A** (tabla 12) podría estar asociada con la formación del metabolito desacetilado y la acetilación de alguna enzima involucrada en el proceso y de esa forma ser inespecífico ( $IS < 8$ ).



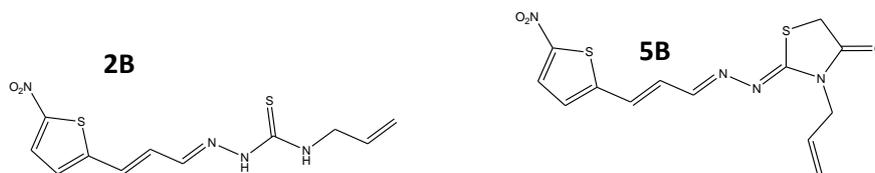
**Figura 15.** Cromatografía en capa fina del patrón de degradación del derivado **15A** en plasma e interpretación de los productos de degradación. TLC de alúmina como fase estacionaria y una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (60/40, % v/v) como fase móvil. Revelado con vapores de yodo.

**Ensayo de mutagenicidad.** Otro de los estudios planteados en la **Etapas 2** es la evaluación de la potencial mutagenicidad de los compuestos a través del test de Ames. Este ensayo detecta la reversión de mutaciones en *Salmonella typhimurium* y está diseñado para el descubrimiento de un amplio rango de compuesto capaces de producir daños que conduzcan a mutaciones genéticas.<sup>94</sup> El ensayo emplea cinco cepas histidina dependientes y cada una de ellas se caracteriza por el tipo de mutación y el lugar de la mutación dentro de genes del operón histidina. La cepa más utilizada, y recomendada por muchos organismos internacionales<sup>95</sup> para la evaluación inicial de la mutagenicidad es la cepa TA98, que presenta la mutación de tipo deleción *hisD3052*, que provoca un corrimiento en el marco de lectura en el gen *hisD* que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa. Además de la mutación para la histidina, esta cepa presenta otras dos mutaciones; la mutación *rfa* que produce una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos incrementando la permeabilidad a compuestos, y la deleción del gen *uvrB* que codifica para el sistema reparador de escisión del DNA incrementando la sensibilidad para la detección de agentes mutagénicos. Además, esta cepa está transfectada con el plásmido pKM101 que le confiere resistencia a la Ampicilina e incrementa la mutagénesis inducida por compuestos químicos y luz UV interfiriendo con la vía de reparación del ADN.<sup>96</sup> El ensayo cuenta de dos partes; en una primera instancia se calcula la dosis máxima a emplear mediante un ensayo de toxicidad sobre la bacteria, y luego se ensayan los compuestos desde esas concentraciones sin y con activación metabólica, con fracción microsomal S9 (fracción subcelular de células hepáticas murinas), en la cepa TA98.

Luego de determinada la mutagenicidad del nuevo derivado en una cepa, si es negativa, se sigue con las siguientes cuatro cepas del test de Ames. Estas cepas son similares a la antes descrita pero dejan en evidencia otro tipo de eventos de mutación como ser la sustitución de una base nucleotídica. Estas cepas son la TA100, TA102, TA1535 y la TA1537. Cada una tiene asociados controles fenotípicos particulares y controles positivos de mutación (sin y con activación metabólica).

Los resultados para los dos compuestos que superaron las etapas anteriores, **2B** y **5B**, se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Test de mutagenicidad. Resultados del test de Ames para los compuestos **2B** y **5B**.



TA98 <b>2B</b> Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	N° colonias revertantes/placa $\pm$ DS		TA98 <b>5B</b> Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	N° colonias revertantes/placa $\pm$ DS	
	PBS	S9		PBS	S9
250	<b>165 <math>\pm</math> 33</b>	<b>152 <math>\pm</math> 30</b>	2.00	<b>61 <math>\pm</math> 12</b>	<b>12 <math>\pm</math> 2</b>
83	<b>201 <math>\pm</math> 40</b>	<b>135 <math>\pm</math> 27</b>	0.70	<b>105 <math>\pm</math> 21</b>	<b>12 <math>\pm</math> 2</b>
27	<b>140 <math>\pm</math> 28</b>	<b>78 <math>\pm</math> 16</b>	0.20	<b>29 <math>\pm</math> 6</b>	<b>7 <math>\pm</math> 1</b>
9	<b>77 <math>\pm</math> 15</b>	<b>54 <math>\pm</math> 11</b>	0.07	<b>16 <math>\pm</math> 3</b>	<b>6 <math>\pm</math> 1</b>
3	<b>71 <math>\pm</math> 14</b>	<b>28 <math>\pm</math> 6</b>	0.02	<b>11 <math>\pm</math> 2</b>	<b>7 <math>\pm</math> 1</b>
0	<b>9 <math>\pm</math> 2</b>	<b>7 <math>\pm</math> 1</b>	0	<b>6 <math>\pm</math> 1</b>	<b>8 <math>\pm</math> 2</b>

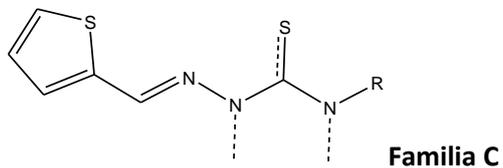
Nota: El compuesto se clasifica como mutagénico cuando en dos o más concentraciones consecutivas producen el doble de revertantes naturales o que exista una correlación dosis-respuesta.<sup>97</sup>

Así, se puede observar que los derivados **2B** y **5B** resultan mutagénicos. Dado que al tratar el derivado **5B** no se producen metabolitos mutagénicos (tratamiento con fracción S9, tabla 14), resulta interesante ver si estos mantienen la actividad tripanosomicida.

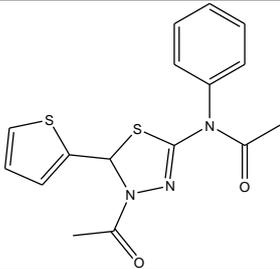
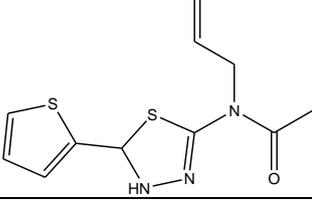
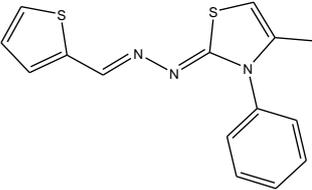
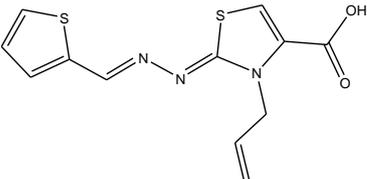
Dado que repetidamente el grupo nitro,<sup>80,81</sup> en este caso en un sistema tiofeno, aparece en compuestos mutagénicos, se decide indagar si otros anillos aromáticos, sin grupo nitro, mantienen la actividad tripanosomicida.

Este concepto retroalimenta a las modificaciones que dan lugar a los derivados de la **Familias C, D y E**. Sobre los derivados de estas familias se comienza con el estudio en la forma epimastigote de *T. cruzi*, tal como se ha descrito previamente, en lo que involucra a la **Etapas 1**. Las tablas 15, 16 y 17 presentan esta información.

**Tabla 15.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia C**. Se presentan en **negrita** al **Líder II** y los derivados con actividad mejorada.



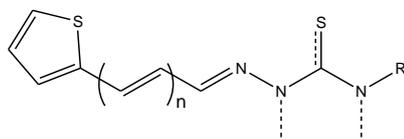
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>Líder II</b>	<b>4.2 ± 0.6</b>
	<b>1C</b>	<b>4.7 ± 0.5</b>
	<b>V<sup>a</sup></b>	<b>7.9 ± 0.8</b>
	<b>4C</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>5C</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>8C</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>10C</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>14C</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>15C</b>	>25 ± 4
	<b>16C</b>	>25 ± 3
	<b>19C</b>	>25 ± 3
	<b>18C</b>	>25 ± 4

<sup>a</sup> Descrito previamente en referencia 74.

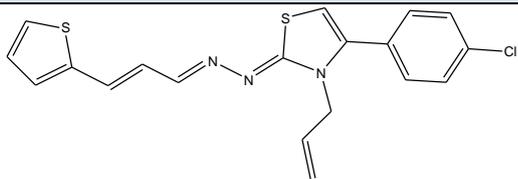
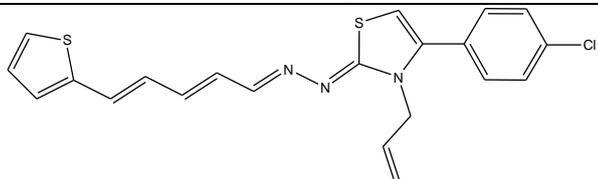
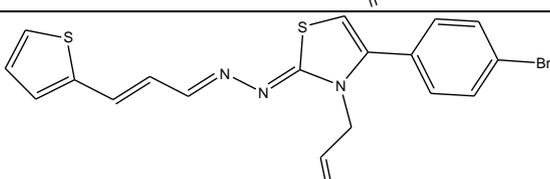
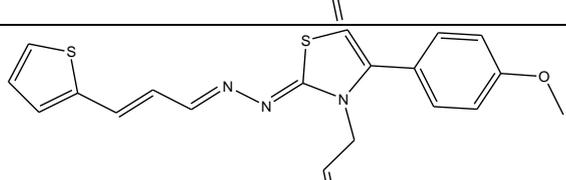
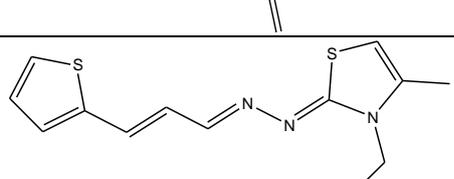
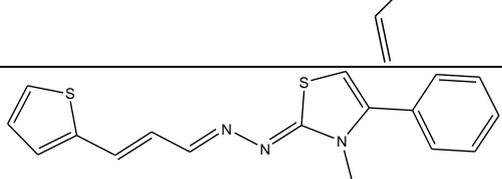
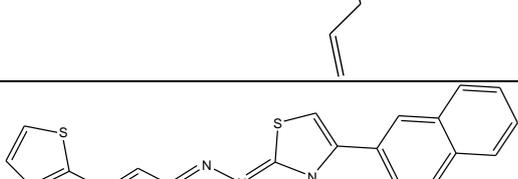
Se observa claramente que los derivados sin grupo nitro, en la **Familia C**, en su mayoría resultan no activos frente a la forma epimastigote de la cepa Tulaluen 2 de *T. cruzi*. Solamente las tiosemicarbazonas **1C** y el derivado anteriormente reportado **V**, mantienen una actividad tripanosomicida moderada, por lo que fueron utilizadas en etapas posteriores de diseño.

**Tabla 16.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia D**. Se presentan en negrita aquellos derivados con actividad mejorada con respecto al **Líder II**.



Familia D

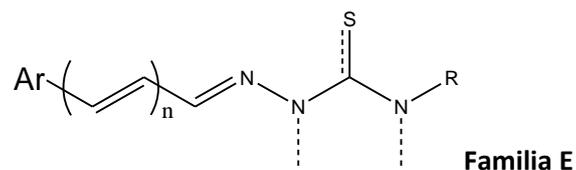
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>Líder II</b>	<b>4.2 ± 0.6</b>
	<b>1C</b>	<b>4.7 ± 0.5</b>
	<b>1D2</b>	<b>1.7 ± 0.2</b>
	<b>2D1</b>	<b>&gt;25 ± 3</b>
	<b>2D2</b>	<b>0.60 ± 0.06</b>
	<b>4D2</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>5D1</b>	<b>20 ± 4</b>
	<b>5D2</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>
	<b>7D1</b>	<b>&gt;25 ± 4</b>

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>8D1<sup>a</sup></b>	>25 ± 4
	<b>8D2</b>	13 ± 1
	<b>20D1</b>	>25 ± 4
	<b>13D1</b>	>25 ± 4
	<b>14D1</b>	>25 ± 4
	<b>10D1</b>	>25 ± 4
	<b>21D1</b>	>25 ± 4

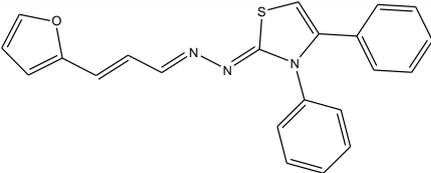
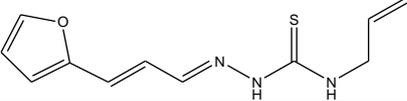
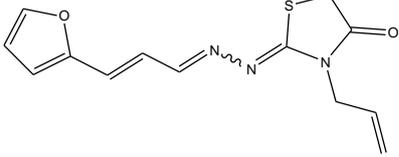
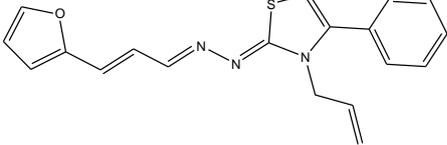
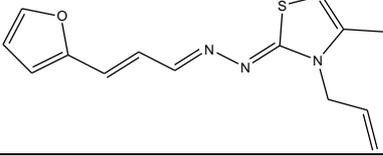
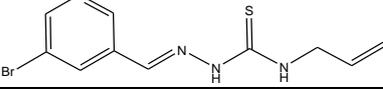
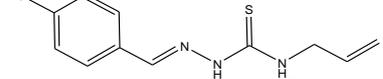
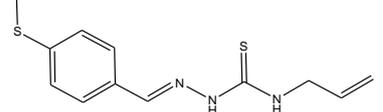
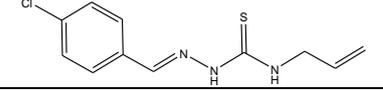
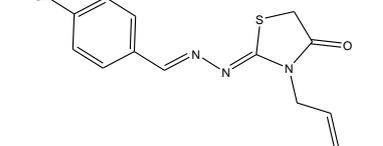
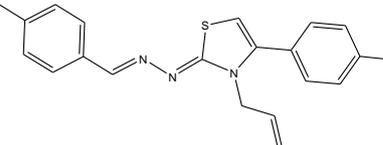
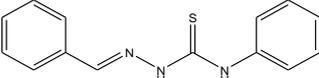
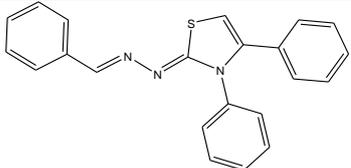
<sup>a</sup> Los derivados se encuentran ordenados por el efecto estereo-electrónico de los sustituyentes a nivel del anillo tiazol.

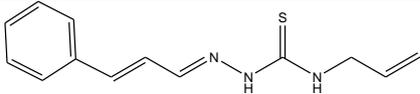
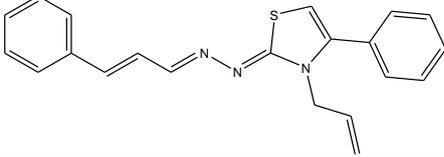
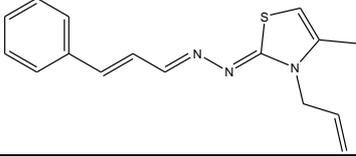
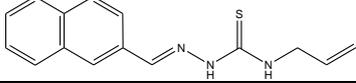
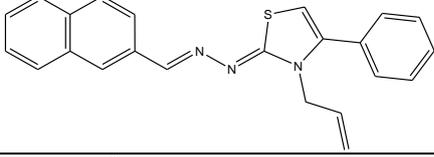
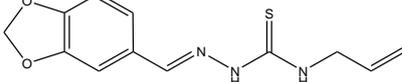
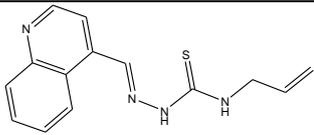
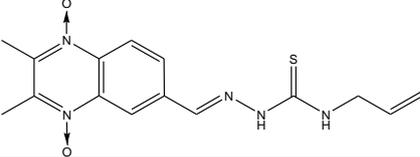
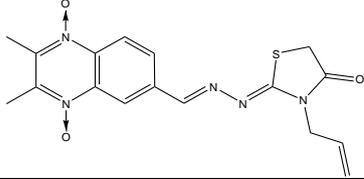
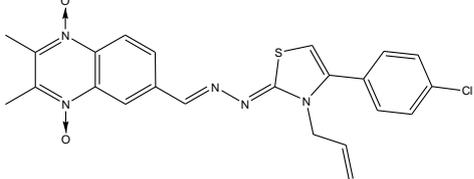
Como se puede apreciar, la incorporación de una insaturación no logra una mejora en la actividad tripanosomicida, pero la adición de dos insaturaciones (comparar, por ejemplo, las actividades de los derivados **8D1** y **8D2**), da como resultado las tiosemicarbazonas **1D2** y **2D2** con excelente actividad. Estos derivados fueron utilizados en etapas siguientes.

**Tabla 17.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia E**.



Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	Líder II	4.2 ± 0.6
	VII <sup>a</sup>	>25 ± 3
	1E	>25 ± 3
	2E	>25 ± 3
	3E	>25 ± 3
	4E	>25 ± 3
	5E	11 ± 1
	6E	>25 ± 3
	7E	25 ± 3

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	8E	5.0 ± 0.6
	VI <sup>a</sup>	7.0 ± 0.7
	10E	>25 ± 3
	11E	4.2 ± 0.4
	12E	>25 ± 4
	21E	>25 ± 4
	22E	>25 ± 3
	23E	10 ± 1
	24E	11 ± 1
	25E	>25 ± 4
	26E	>25 ± 4
	19E	19 ± 2
	20E	>25 ± 3

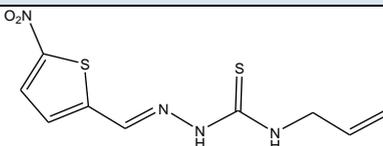
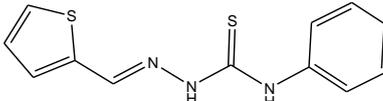
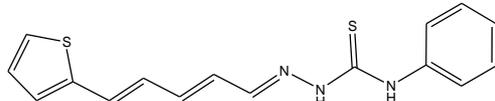
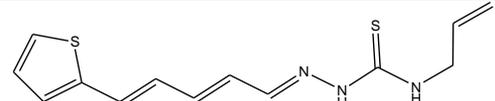
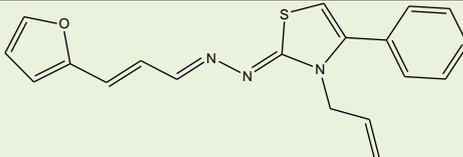
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	27E	6.6 ± 0.7
	28E	>25 ± 3
	29E	>25 ± 3
	15E	5.4 ± 0.5
	16E	>25 ± 3
	17E	>25 ± 3
	18E	17 ± 2
	VIII <sup>a</sup>	>25 ± 3
	13E	>25 ± 3
	14E	15 ± 2

<sup>a</sup> Descrito previamente en referencia 74.

Se observa que la mayoría de las tiosemicarbazonas tienen actividad tripanosomicida del orden del compuesto **Líder II** y de los compuestos de referencia Nfx y Bnz, pero pierden actividad cuando son cicladas para formar un sistema tiazol, excepto para los derivados **8E**, **11E** y **14E**. También se identifican nueve derivados con actividad tripanosomicida moderada, **5E**, **7E**, **23E**, **24E**, **19E**, **27E**, **15E**, **18E** y **14E**. Los derivados **8E** y **11E** fueron los únicos con actividad tripanosomicida similar al **líder II**, además están ciclados, como fue planificado en el diseño previo.

De estas tres familias (**C**, **D** y **E**) se destacan dieciséis nuevos derivados con actividad tripanosomicida, de los cincuenta y dos desarrollados (31 %). Los compuestos **1C** (una tiosemicarbazona de tiofencarbaldehído), **1D2** y **2D2** (tiosemicarbazonas de 5-(2-tienil)pent-2,4-dienal), y el derivado de tiazol **11E**, tienen muy buena actividad tripanosomicida. Todos ellos sin grupos nitro en su estructura fueron evaluados en los ensayos de toxicidad inespecífica y actividad tripanosomicida frente a amastigotes de *T.cruzi* (tabla 18).

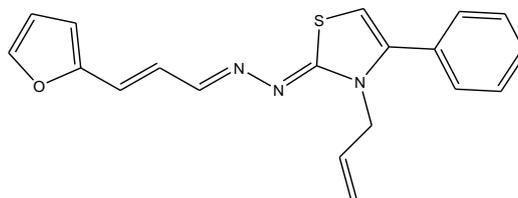
**Tabla 18. Etapas 2 y 3 para los derivados de las Familias C, D y E. Actividad biológica frente a amastigotes de *T. cruzi* y selectividad frente a células mamíferas. Índices de selectividad (IS =  $IC_{50}$ , células mamíferas /  $IC_{50}$ , *T. cruzi*(amastigotes)).**

Estructura	Derivado	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	IS (Células VERO)	IS (GRH)
	Líder II	$>25 \pm 4$	nd <sup>a</sup>	nd
	1C	$>25 \pm 4$	nd	21
	1D2	$>25 \pm 4$	nd	nd
	2D2	$>25 \pm 4$	nd	nd
	11E <sup>b</sup>	$<0.30 \pm 0.02$	<b>&gt;1000</b>	<b>196</b>
Fármaco de referencia	Nfx	$1.6 \pm 0.2$	200	150

<sup>a</sup> no determinado. <sup>b</sup> También se evaluó en epimastigotes del clon Dm 28c con una  $IC_{50}$  de  $4\mu$ M.

La mayoría de los productos son tiosemicarbonas sin actividad en amastigote porque seguramente no puedan atravesar las membranas celulares correctamente. Los NH del agrupamiento tiosemicarbona le podrían conferir a la molécula dicha dificultad. En cambio el tiazol, que es más lipófilo porque no posee NH, atraviesa las membranas más fácilmente. Esto es debido a una tendencia que se observa en cuanto a exigencia estructural para atravesar las membranas de cada sistema biológico. Para este tipo de moléculas, las más lipófilas, las actividades biológicas serán mejores en amastigote y menos en epimastigote y viceversa. El derivado **11E** es el más lipófilo y es más activo. Se observa que el derivado **11E** es un excelente tripanosomicida, con índices de selectividad mayores que los del fármaco de referencia, por lo que se resuelve continuar con este compuesto en las etapas siguientes de estudio.

Se estudia entonces en el test de mutagenicidad frente a la cepa TA98 de *S. typhimurium* (tabla 19).

**Tabla 19.** Test de mutagenicidad. Resultados del test de Ames para el compuestos **11E**.

TA 98 Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	N° colonias revertantes/placa $\pm$ DS	
	PBS	S9
250	13 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3
83	11 $\pm$ 2	19 $\pm$ 4
28	8 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3
9.3	16 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2
3.1	10 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3
0	14 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3

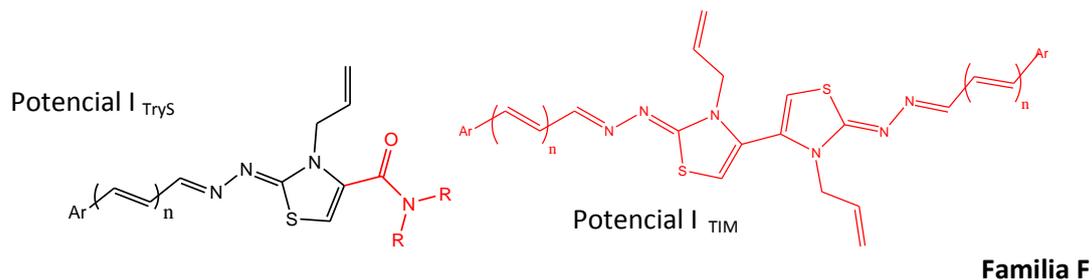
Nota: El compuesto se clasifica como mutagénico cuando en dos o más concentraciones consecutivas produce el doble de revertantes naturales o si existe una correlación dosis-respuesta.<sup>97</sup>

El compuesto no es mutagénico en la cepa TA98 a ninguna concentración. Se pudo ensayar a las concentraciones máximas recomendadas, dado que este compuesto no fue tóxico para las bacterias del ensayo. Se decide tomar a este compuesto como un **Nuevo Líder**. Será utilizado para el diseño de la **Familia G**.

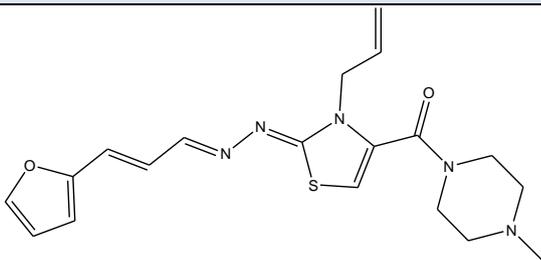
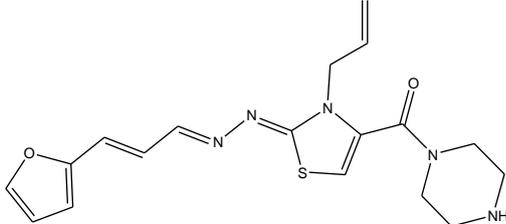
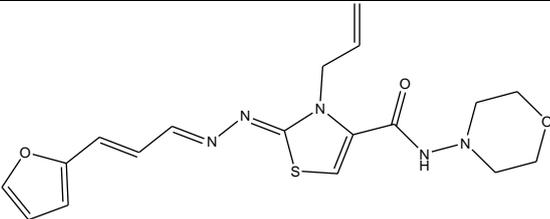
La **Familia F** surge del diseño de moléculas dirigidas a, potencialmente, inhibir enzimas específicas esenciales del parásito, tales como son triosafosfato isomerasa (**TIM**) y tripanotión sintetasa (**TryS**). Las moléculas diseñadas debían cumplir: 1. Contar con un agrupamiento amida para ser potencial inhibidor de **TryS**.<sup>98</sup> 2. Poseer un eje de simetría central que dividiera a la molécula en dos fragmento idénticos o similares para ser potenciales disruptores de la estructura dimérica activa de **TIM**.<sup>99</sup>

Las actividades tripanosomicidas sobre la forma epimastigote de los derivados de esta familia se presentan en la tabla 20.

**Tabla 20.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia F**.



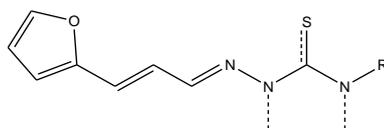
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>1F</b>	>25 ± 3
	<b>2F</b>	>25 ± 3
	<b>3F</b>	<b>3.5 ± 0.4</b>
	<b>4F</b>	7.5 ± 0.8
	<b>5F</b>	<b>3.1 ± 0.3</b>

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	6F	25 ± 3
	7F	>25 ± 3
	8F	25 ± 3

Los compuestos **3F** y **5F** tienen una actividad tripanosomicida mejor que los fármacos de referencia, Nfx y Bnz, y que el **Líder II**. El compuesto **5F**, además, contiene en su estructura el agrupamiento cinamilpiperazina que fue catalogado con actividad tripanosomicida en trabajos previos de nuestro grupo.<sup>34</sup> Asimismo, el agrupamiento piperazina interacciona con residuos importantes de la cruzipaina, otra de las enzimas relevantes en el diseño de agentes anti-*T. cruzi*, según lo que se observó en estudios computacionales y de RMN previos de nuestro grupo.<sup>65</sup>

Los derivados de la **Familia G**, que surgen de modificaciones estructurales del compuesto **11E** (tabla 17), se evalúan frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* (tabla 21).

**Tabla 21.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*. Actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los derivados de la **Familia G**.



Familia G

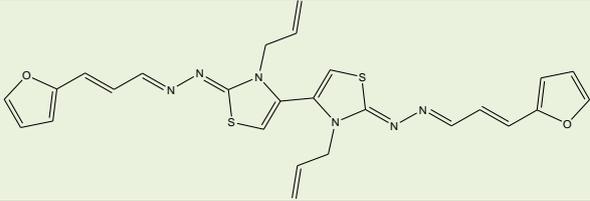
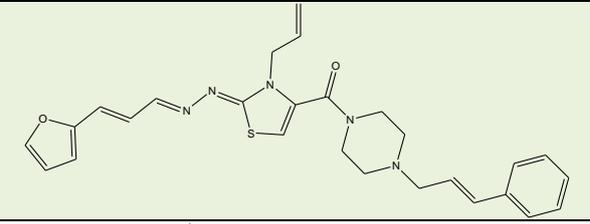
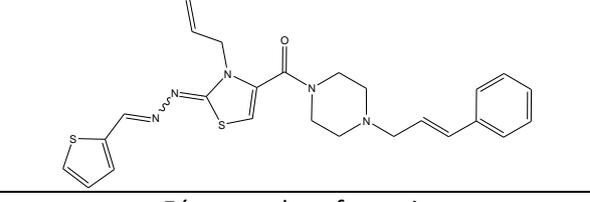
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) ± DS
	<b>16G</b>	>25 ± 3
	<b>18G<sup>a</sup></b>	>25 ± 3
	<b>7G</b>	>25 ± 3
	<b>20G</b>	<b>3.5 ± 0.4</b>
	<b>8G</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>
	<b>21G</b>	<b>2.9 ± 0.3</b>
	<b>13G</b>	6.0 ± 0.6
	<b>22G</b>	9.0 ± 0.9

<sup>a</sup> Los derivados se encuentran ordenados por el efecto estérico-electrónico de los sustituyentes a nivel del anillo tiazol.

En esta serie, se identificaron derivados con muy buena actividad tripanosomicida, siendo éstos **8G**, **20G** y **21G**. Así, se logra una optimización de la actividad biológica, siendo el derivado *p*-clorofenilo (**8G**) el más activo. Contrariamente, se observa que la existencia de un grupo fuertemente electrón-atrayente en la misma posición, por ejemplo en el derivado **7G** que posee un grupo nitro, conduce a la pérdida de actividad tripanosomicida.

Posteriormente, se realizaron las **Etapas 2 y 3** para los derivados pertenecientes a la **Familia F** (tabla 22). Se incluyó el derivado **4F** con una actividad sobre epimastigotes intermedia.

**Tabla 22.** Etapas 2 y 3 para los derivados de la Familia F. Actividad biológica frente a amastigotes de *T. cruzi*, selectividad *T. cruzi* – células mamíferas y mutagenicidad (test de Ames) para los derivados de la **Familia F**.

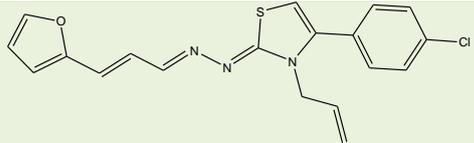
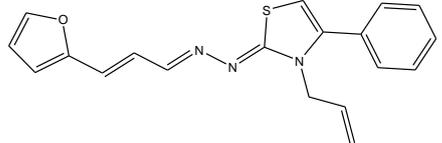
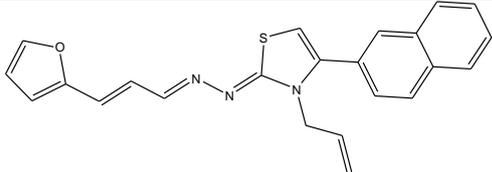
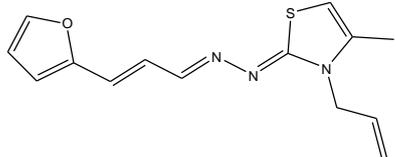
Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) amastigotes	IS (Células VERO)	Test de Ames
	<b>3F</b>	1.6 ± 0.4	300	NoMut 5 <sup>a</sup>
	<b>5F</b>	0.89 ± 0.04	350	NoMut 5 <sup>a</sup>
	<b>4F</b>	2.0 ± 0.3	100	NoMut <sup>b</sup>
Fármaco de referencia	<b>Nfx</b>	1.6 ± 0.2	200	Mut <sup>c</sup>

<sup>a</sup> No mutagénico en las estirpes de *S. thyphimorium* TA98, TA 100, TA 102, TA 1535 y TA 1537 en ausencia y presencia de S9, <sup>b</sup> No mutagénico en la estirpe de *S. typhimorium* TA98 en ausencia y presencia de S9, <sup>c</sup> Mutagénico.

Se observa que los derivados **3F** y **5F** poseen excelentes actividades tripanosomicidas sobre el estadio amastigote. Poseen además índices de selectividad muy altos y no resultan mutagénicos, habiendo superado estos derivados las cinco estirpes de *Salmonella typhimurium* recomendadas por las reglamentaciones vigentes para la agencia de regulación de fármacos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA)<sup>100</sup>.

Los derivados de la **Familia G** también fueron sometidos a estudios sobre la forma amastigote de *T. cruzi* (tabla 23).

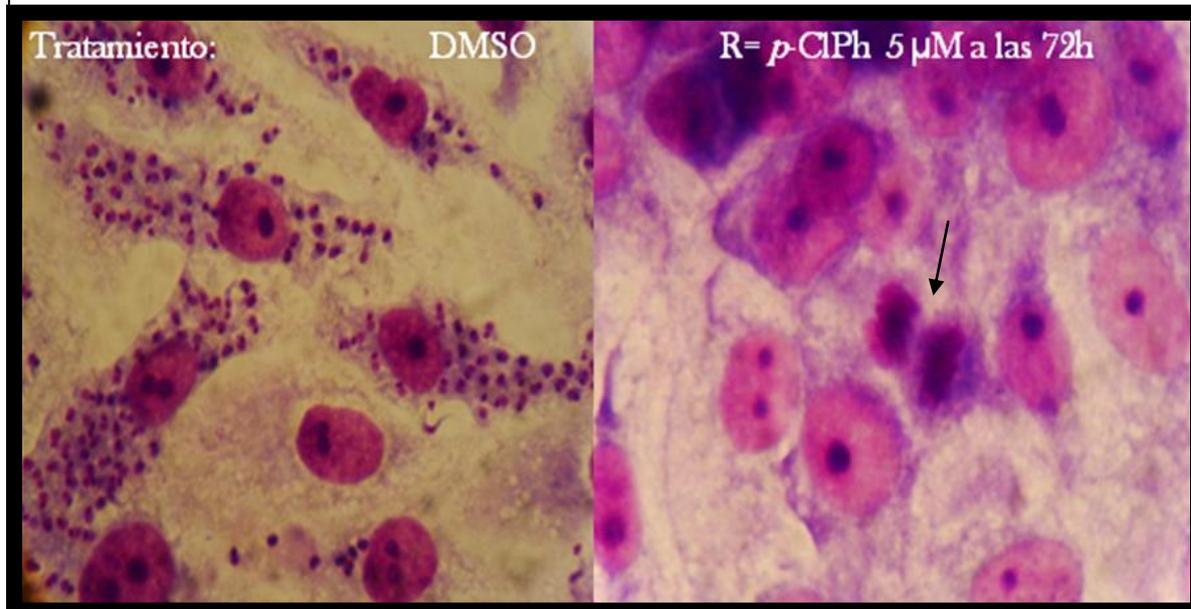
**Tabla 23.** Etapas 2 y 3 para los derivados de la **Familia G** Actividad biológica frente a amastigotes de *T. cruzi* y selectividad *T. cruzi* – células mamíferas.

Estructura	Derivado	IC <sub>50</sub> (μM) amastigotes	IS (Células VERO)	IS (Células MØ) <sup>a</sup>	IS (GRH)
	<b>8G</b>	<0.30 ± 0.02	>1000	>200	>234
	<b>11E</b>	<0.30 ± 0.02	>1000	>120	>196
	<b>21G</b>	<0.25 ± 0.02	>1000	>120	nd <sup>b</sup>
	<b>12E</b>	6.3 ± 0.6	50	7	nd
Fármaco de referencia	<b>Nfx</b>	1.6 ± 0.2	200	200	150

<sup>a</sup> IS es IC<sub>50</sub> mamífero / IC<sub>50</sub> amastigotes, con MØ macrófagos murinos J774.1, <sup>b</sup> No determinado

El compuesto **8G** posee excelente actividad tripanosomicida en el orden de nanomolar frente a la cepa Y en el estadio amastigote (ver ejemplo en figura 16), y es muy selectivo hacia el parásito en comparación con los sistemas celulares de mamíferos, células humanas y células murinas.

**Figura 16.** Microscopía óptica de células VERO infectado con *T. cruzi*. Control sin tratamiento (izquierda) y del cultivo tratado con el derivado **8G** a 5  $\mu$ M por 72 h. Se observa que la monocapa de células tratadas con **8G** se encuentra en perfecto estado y libre de infección. Se observan algunas células en división (flecha) indicando la viabilidad celular. (100x en *ia*).

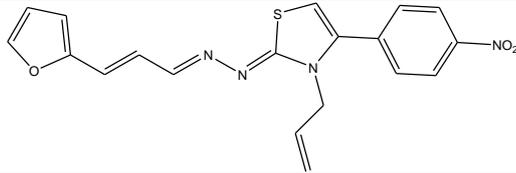
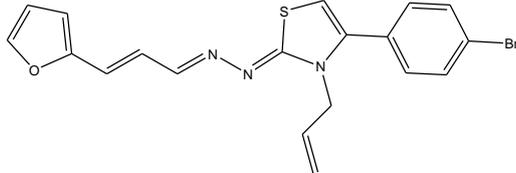
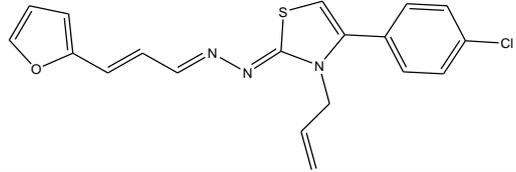
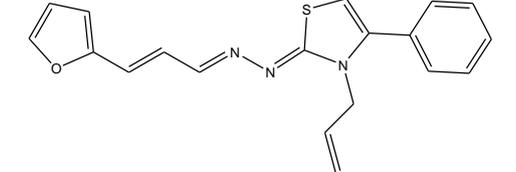
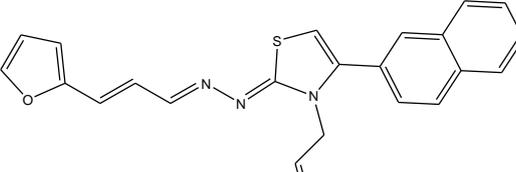
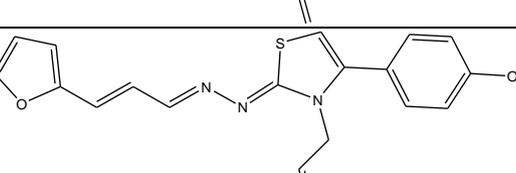
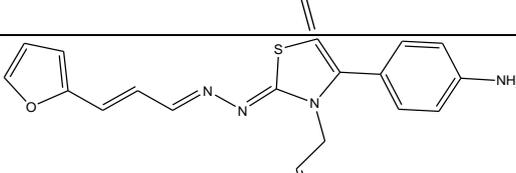
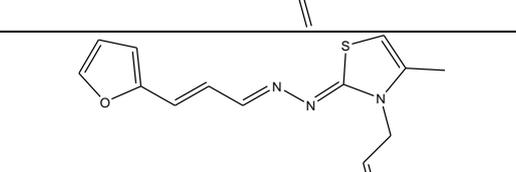


Estos resultados, conllevan a realizar el ensayo de todos los miembros de esta familia en el test de Ames frente a la estirpe TA98 de *S. typhimurium*. Para aquellos compuestos con la mejor actividad tripanosomicida se sigue con las otras estirpes de *S. typhimurium*, hasta completar las cinco.

Así, es posible evidenciar que el compuesto **11E** no es mutagénico en la estirpe TA98 (tabla 19) sin y con metabolización. Más adelante se muestra que también es no mutagénico en las restantes estirpes (tabla 24).

En la tabla 24 se completan los ensayos del resto de los derivados de esta familia. Excepto un derivado, todos los miembros de la **Familia G** son no mutagénicos, lo que transforma a ésta en muy buena para seguir en el desarrollo de fármacos tripanosomicidas. La excepción es el derivado **7G** que es mutagénico frente a la cepa TA98. Obsérvese que éste es un derivado con grupo nitro, agrupamiento responsable, en descripciones anteriores, de la mutagenicidad. Además, este derivado carece de actividad tripanosomicida a la dosis del ensayo correspondiente. El mismo se ensayó para sumar información a la evidencia de que los grupos nitro aromáticos son potencialmente mutagénicos.

**Tabla 24.** Test de mutagenicidad. Resultados del test de Ames para el resto de los derivados de la **Familia G** frente a diferentes cepas de *Salmonella*.

Estructura	Derivado	TA98	TA100
	<b>7G</b>	Mut <sup>a</sup>	nd <sup>b</sup>
	<b>20G</b>	NoMut <sup>c</sup>	nd
	<b>8G<sup>d</sup></b>	NoMut	NoMut
	<b>11E</b>	NoMut	NoMut
	<b>21G</b>	NoMut	nd
	<b>13G</b>	NoMut	nd
	<b>22G</b>	NoMut	nd
	<b>15E</b>	NoMut	NoMut

<sup>a</sup> Mutagénico en ausencia y en presencia de S9, <sup>b</sup> No determinado, <sup>c</sup> No mutagénico en ausencia y en presencia de S9, <sup>d</sup> este derivado se ensayó en las 5 cepas, resultando **no** mutagénico para todas ellas.

Los compuestos **8G**, **3F** y **5F** tienen excelentes perfiles biológicos *in vitro*, tanto desde el punto de vista de la toxicidad inespecífica, como de su actividad tripanosomicida y la ausencia de mutagenicidad.

Por otro lado, poseen excelentes perfiles sintéticos, isomería definida, altos rendimientos sintéticos, de química poco contaminante, escalables y de bajo costo.

Por todo lo anterior, se decide evaluar estos tres compuestos en los estudios *in vivo* (**Etapa 4**, esquema 11), en un modelo de ratón con enfermedad de Chagas aguda, y de esta forma determinar la eficacia y el potencial como fármaco, para el tratamiento de dicha enfermedad, de cada uno de ellos.

### Ensayos *in vivo* (Etapa 4).

En esta etapa final de la parte biológica se describen los distintos ensayos realizados para probar la potencia y eficacia de los nuevos derivados en un modelo de ratón de la enfermedad de Chagas aguda.

Previamente, se evalúa la capacidad de muerte de la forma sanguínea del parásito, tripomastigotes, en sangre de ratón por los productos a estudiar *in vivo*. Así, se realiza un ensayo de viabilidad de las formas tripomastigotes a las 24 h y 48 h de incubación.

**Actividad frente a la forma tripomastigote de *T. cruzi* (*ex vivo*).** Con los compuestos **3F**, **5F** y **8G** se realizó el ensayo de actividad tripanosomicida frente a la forma tripomastigote de *T. cruzi* (clon CL Brener y cepa Y). Se parte de sangre infectada de ratones *Balb/c* en pico de parasitemia y se incubaba a 4 °C por 24 y 48 h con los respectivos compuestos a 25 µM (tabla 25).

**Tabla 25.** Ensayo en la forma infectiva de *T. cruzi*. Viabilidad de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) para los tres derivados seleccionados ensayados a 25  $\mu$ M.

Estructura	Derivado	% de muerte celular 24 h	% de muerte celular 48 h
	<b>8G</b>	10	70
	<b>3F</b>	10	60
	<b>5F</b>	<5	40
Fármaco de referencia	<b>Bnz<sup>a</sup></b>	50	90

<sup>a</sup> Ensayado a 25  $\mu$ M

Los compuestos no muestran el mismo perfil de actividad que frente a los otros estadios, hay que tener en cuenta que este es el estadio más resistente y es no replicativo. Igualmente, es de esperar una buena actividad *in vivo* por su actividad en la forma replicativa amastigote. Dado que en estado fisiológico la temperatura es de 37 °C, donde la cinética de los procesos es mayor, se esperaría que en la situación fisiológica los derivados tuvieran mayor actividad tripanosomicida en la sangre de los ratones infectados.

## Estudios *in vivo*

**Vías de administración.** La vía oral es la seleccionada, por ser la preferida para un futuro medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

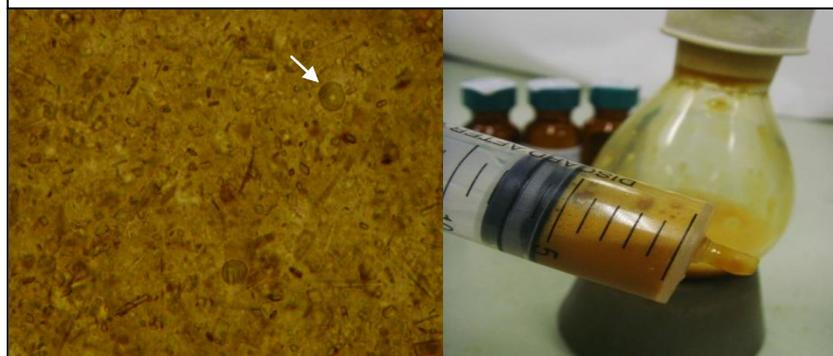
Estos tres compuestos tienen muy baja solubilidad en agua o en suero fisiológico, por ser muy lipófilos. Por ende, es de importancia definir el vehículo de la administración.

**Formulaciones.** Se utilizaron dos tipos de formulaciones para lograr la homogeneidad en la administración de los compuestos por vía oral, una simple **V1** y una compleja **V2**.

**Formulación V1:** se realiza una suspensión del compuesto a administrar en suero fisiológico: Tween 80 4:1. Se logra una suspensión del sólido homogénea pero que decanta al fondo del recipiente a lo largo del tiempo. La solubilidad del compuesto, para dosis de 50mg/Kg de peso en 250  $\mu$ L, es menor al 10 %. Se ensayó el uso de hasta un 10% v/v de DMSO para mejorar la solubilidad.

**Formulación V2 (emulsiones lipídicas):** Se prepara una emulsión lipídica que contiene 10% de tensoactivo (Eumulgin HRE<sup>®</sup> 40, oleato de sodio y fosfatidilcolina), 10% de fase oleosa (colesterol) y 80% de buffer fosfato (pH 7.4). De esta forma se logra obtener una suspensión del compuesto en solución. Para dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso en 100  $\mu$ L se logra una solubilidad completa. Si bien el aspecto macroscópico es totalmente homogéneo, microscópicamente se observa cierta heterogeneidad (figura 17). Posiblemente, la agitación por ultrasonido (sonicado) produce partículas pequeñas pero de mayor heterogeneidad. Se observan algunas esferas tipo liposomas de gran tamaño que pueden estar encapsulando los compuestos (flecha, figura 17).

**Figura 17.** Fotografía que muestra el aspecto de **V2**. Preparada para el derivado **3F** (izquierda, aspecto microscópico en MO 40x; derecha, aspecto macroscópico).



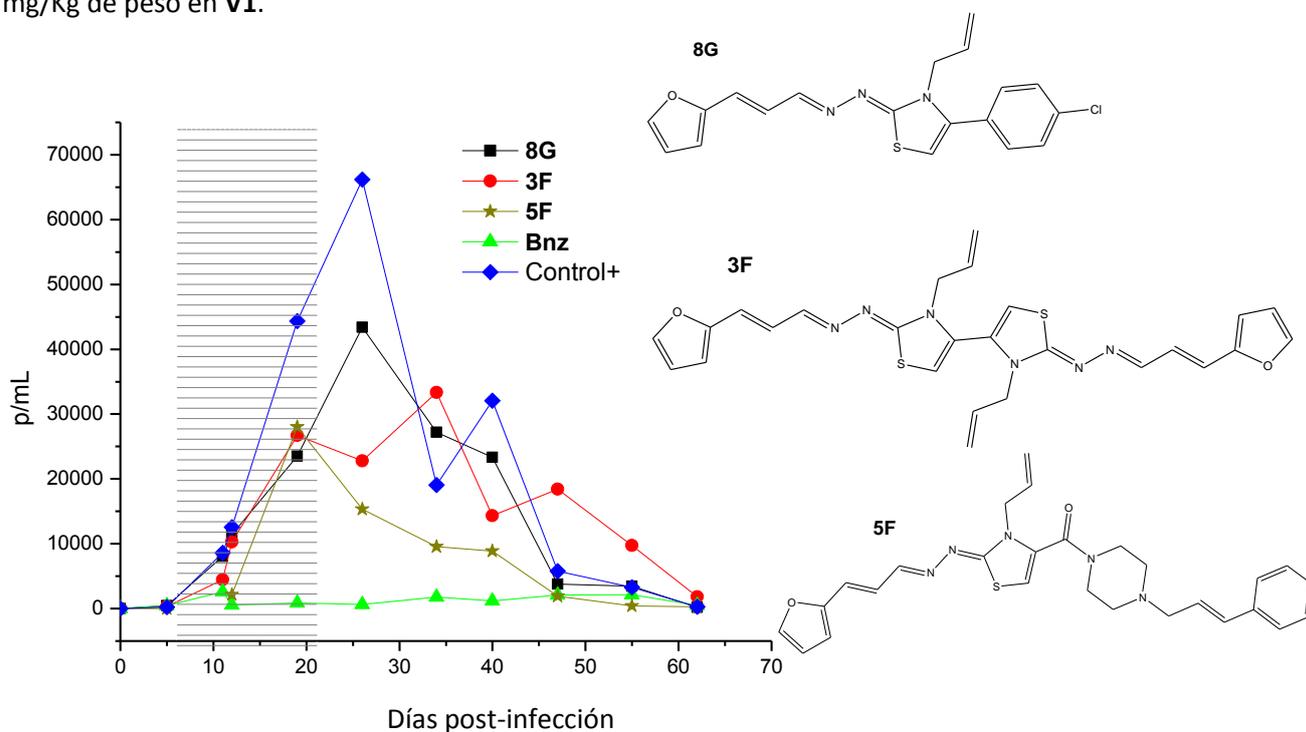
**Toxicidad vía Oral.** Se realizaron estudios de toxicidad a dosis fija en ratones *Balb/c* sanos, por administración oral diaria de 100 mg/Kg de peso durante 14 días. Se ensayan los derivados **3F**, **5F** y **8G**. Se utilizan dos ratones por grupo, un grupo control (sólo vehículo) y un grupo por cada derivado. Como medidas de toxicidad se observan el aspecto general, el comportamiento del animal y el cambio de peso diario. Al finalizar el experimento los ratones se sacrifican, se realiza la necropsia y se observan macroscópicamente los órganos para visualizar signos de toxicidad. Se realiza una segunda prueba para determinar la dosis máxima, mediante un ensayo de *up and down*, llegándose a 2000 mg/Kg de peso utilizando el **V1** y todos los derivados.

El derivado **5F** se ensayó, además, a dosis fija repetida de 200 mg/Kg de peso en el **V2**, durante 5 días consecutivos, se descansa 2 y se continúa el tratamiento por 5 días más. No se observó toxicidad aparente ni pérdida de peso. En todos los casos hubo una sobrevida del 100 %.

**Ensayo en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas.** Se inicia con la infección de ratones *Balb/c* (día 0) de 3 meses de edad, inoculando intraperitonealmente sangre infectada de ratones, con el clon CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, en inicio del pico de parasitemia. Las medidas de parasitemia se realizan por el micrométodo de hemoconcentración y conteo. Cuando todos los ratones del grupo son positivos se inicia el tratamiento por administración oral de los compuestos una vez al día, durante 14 días consecutivos. Las distintas condiciones que se estudian se resumen a continuación bajo el título de **Ensayos 1-3**.

**Ensayo 1.** En primera instancia se analizaron los derivados **3F**, **5F** y **8G** y Bnz (fármaco de referencia), junto con un control positivo de parasitemia (administración exclusivamente de vehículo), preparados en **V1**. Las dosis utilizadas son de 50 mg/Kg de peso para los tres compuestos y Bnz, con un volumen de dosis oral de 250  $\mu$ L. En este caso el tratamiento se inicia en el día 6 post-infección y finaliza el día 20. Se determinan parasitemias cada 7 días durante 60 días. Al final se sacrifican los animales, se procede a las necropsias y se extraen tejidos para estudios anátomo-patológicos (no se muestran los resultados en este trabajo de tesis). La figura 18 muestra las curvas de parasitemia de este ensayo.

**Figura 18.** Gráfico de parasitemia (parásitos/mL) vs días post-infección del **Ensayo 1**. En barras horizontales se indican los días de tratamiento. Todos los compuestos se ensayaron a 50 mg/Kg de peso en **V1**.



Se puede observar, para todos los compuestos, una leve mejoría con respecto a los animales no tratados. Pero muy por encima del perfil de Bnz. Estos resultados aparentemente negativos, deben ser analizados considerando los siguientes dos aspectos. En primer lugar, se debe recordar que los compuestos en **V1** se encuentran precipitados, por lo que la manipulación en el momento de la administración, agitación vigorosa, puede conllevar a una inadecuada dosificación de los mismos. Esa baja solubilidad, además, puede promover una baja absorción. En segundo término, la dosis utilizada (en moles, tabla 26) para los compuestos **3F**, **5F** y **8G** fue aproximadamente la mitad que la de Bnz.

Tabla 26. Ensayo *in vivo* con V1 a 50 mg/Kg. Datos destacables del Ensayo 1.

Compuesto	Dosis en mg/Kg ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Pico de máxima parasitemia		Sobrevida <sup>c</sup> (%)
		p/mL (%) <sup>a</sup>	día post-infección <sup>b</sup>	
Control (+)	0 (0)	66393	26	6/8 (75)
8G	50 (107)	43169 (65)	26	6/8 (75)
3F	50 (70)	33333 (50)	34	7/8 (88)
5F	50 (85)	27914 (42)	18	8/8 (100)
Bnz	50 (192)	2438 (4)	11	8/8 (100)

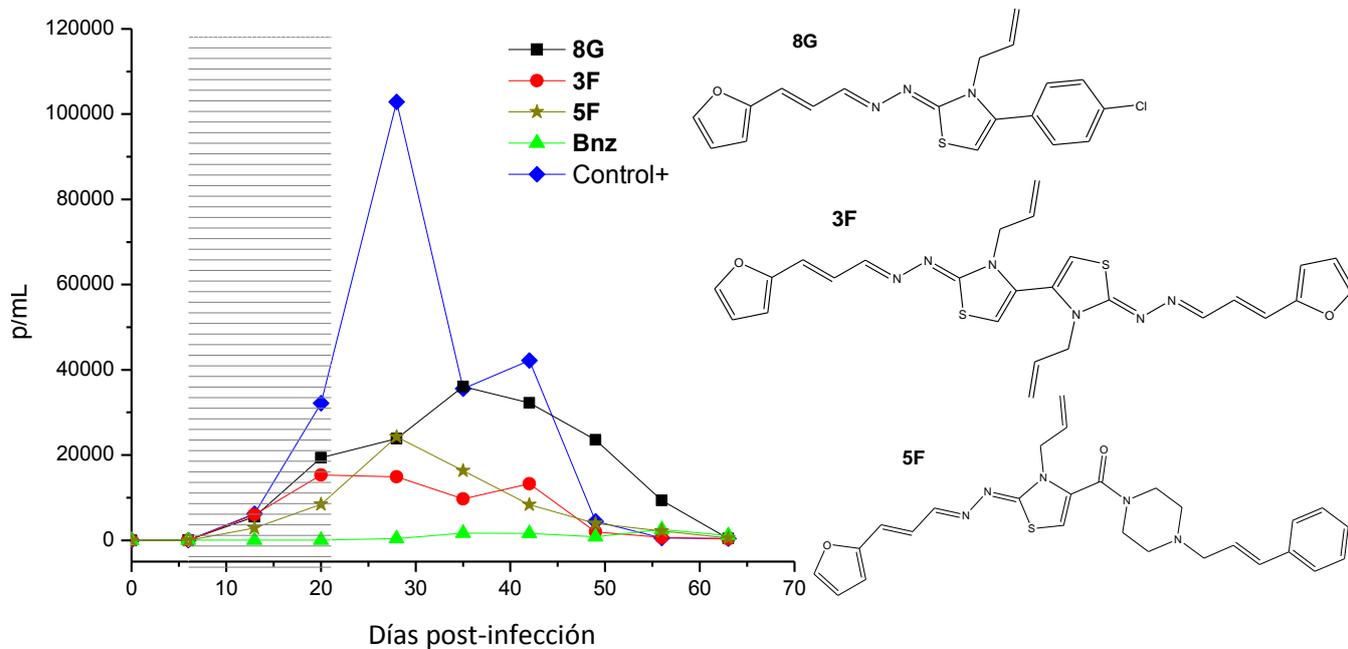
<sup>a</sup> Porcentaje de parasitemia con respecto al pico del grupo control (+), <sup>b</sup> Días del pico de máxima parasitemia,

<sup>c</sup> Número de ratones vivos sobre el total de ratones utilizados por grupo al final del experimento.

Analizando algunos otros datos que surgen del **Ensayo 1** (tabla 26) se puede destacar que los derivados **3F** y **5F** proporcionan mayor protección que su análogo **8G** ya que promueven mayor supervivencia que en el control. El compuesto **5F** es sin dudas, en este experimento, el mejor de los tres derivados ya que proporciona un 100 % de supervivencia y mantiene la parasitemia siempre por debajo del control positivo y en la mayoría de los casos por debajo de los otros derivados. Por otro lado, el derivado **3F** retarda el pico de parasitemia hacia tiempos mayores a los 30 días, momento en el cual el animal comienza a protegerse con su sistema inmunológico, por la producción de IgG específica contra *T. cruzi*.

**Ensayo 2.** En segunda instancia y con el objetivo de mejorar la absorción de los compuestos, se utiliza el vehículo **V2** (emulsión lipídica) manteniendo el resto de las condiciones experimentales iguales a las del **Ensayo 1**. En la figura 19 y tabla 27 se muestran los resultados de este ensayo.

**Figura 19.** Gráfico de parasitemia (parásitos/mL) vs días post-infección del **Ensayo 2**. En barras horizontales se indican los días de tratamiento. Todos los compuestos se ensayaron a 50 mg/Kg de peso en **V2**.



Como se puede observar los picos de parasitemia para los ratones tratados con los distintos compuestos no son picos como tal, sino que las curvas poseen un plateau. Esto estaría indicando que los compuestos brindan una protección a la infección. Si se comparan las curvas con las del **Ensayo 1** (figura 18), donde se utilizó **V1**, se puede concluir que efectivamente la absorción no fue la adecuada en el primer caso y que **V2** la mejora considerablemente.

**Tabla 27.** Ensayo *in vivo* con **V2** a 50 mg/Kg. Algunos otros datos relevantes del **Ensayo 2** (**negrita**) y comparación con **Ensayo 1**.

Compuesto	Dosis en mg/Kg ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Pico de máxima parasitemia		Sobrevida <sup>c</sup> (%)
		p/mL (%) <sup>a</sup>	día post-infección <sup>b</sup>	
<b>Control (+)</b>	0 (0)	103082	28	4/6 (67)
<b>8G</b>	<b>50 (107)</b>	<b>35737 (35)</b>	<b>35</b>	<b>6/7 (86)</b>
<b>8G (V1)</b>	50 (107)	43169 (65)	26	6/8 (75)
<b>3F</b>	<b>50 (70)</b>	<b>15344 (15)</b>	<b>20</b>	<b>6/7 (86)</b>
<b>3F (V1)</b>	50 (70)	33333 (50)	34	7/8 (88)
<b>5F</b>	<b>50 (85)</b>	<b>23993 (23)</b>	<b>28</b>	<b>7/7 (100)</b>
<b>5F (V1)</b>	50 (85)	27914 (42)	18	8/8 (100)
<b>Bnz (V1)</b>	50 (192)	2493 (2)	56	7/7 (100)

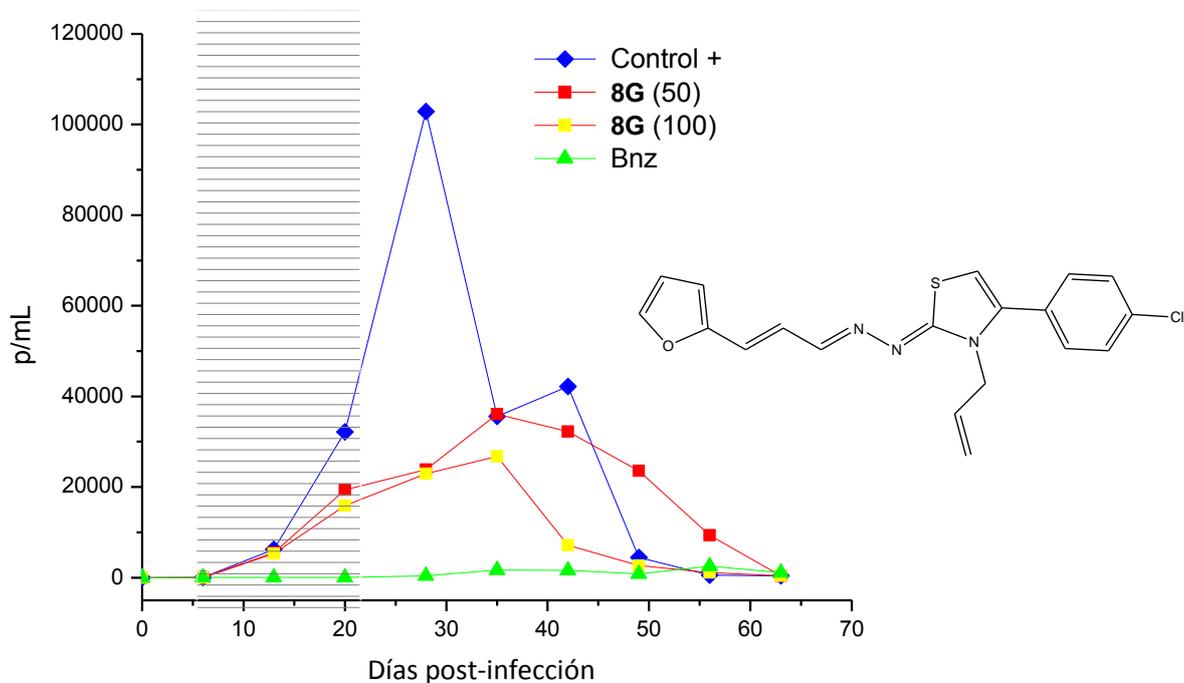
<sup>a</sup> Porcentaje de parasitemia con respecto al pico del grupo control (+), <sup>b</sup> Días del pico de máxima parasitemia,

<sup>c</sup> Número de ratones vivos sobre el total de ratones utilizados por grupo al final del experimento.

Si se comparan los resultados de pico de máxima parasitemia y sobrevivida (tabla 27) entre la administración de los compuestos en **V1** con la administración en **V2**, se observa claramente que existe una franca mejoría en estos parámetros (tabla 27). Por ejemplo, los niveles de parásitos en los picos de parasitemia son siempre menores en el segundo caso.

**Ensayo 3.** En tercera instancia se realiza un estudio de dosis-respuesta para dos de los derivados, **5F** y **8G**, en el vehículo **V2** como forma de alcanzar, en moles, la dosis del fármaco de referencia, Bnz. En la figura 20 y la tabla 28 se muestran los resultados de este ensayo para **8G** (ensayo 3a).

**Figura 20.** Gráfico de parasitemia (parásitos/mL) vs días post-infección. En el **Ensayo 3a** el derivado **8G** se utilizó a las dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso en **V2**. En barras horizontales se muestran los días de tratamiento.



Se observa que el derivado **8G** a la dosis de 100mg/Kg, que es aproximadamente la misma dosis en moles que el Bnz, posee una leve mejoría en la actividad respecto a 50 mg/Kg, evidenciándose una respuesta dependiente de la dosis, pero siendo algo menos activo que Bnz. Sin embargo, a dicha dosis, 100 mg/Kg por día, el compuesto **8G** logra una sobrevida del 100 % (tabla 28). En estas condiciones, el pico de máxima parasitemia se mantiene en días superiores a los 30. Si bien el derivado **8G**, en estos estudios, no resulta igualmente eficiente que Bnz para eliminar la parasitemia, sus mejores perfiles toxicológicos pueden hacer de éste un buen candidato a fármaco para estudios posteriores hacia un medicamento para la enfermedad de Chagas.

**Tabla 28.** Ensayo *in vivo* con **V2** a 50 y 100 mg/Kg. Algunos otros datos relevantes del Ensayo 3a para **8G**.

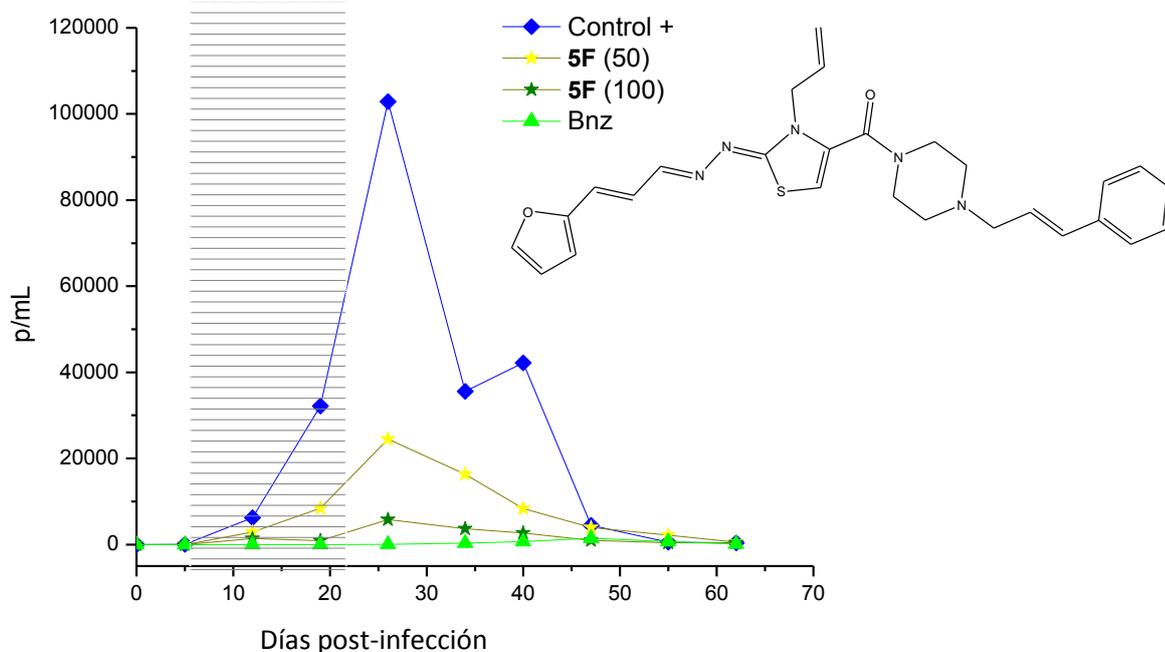
Compuesto	Dosis en mg/Kg ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Pico de máxima parasitemia p/mL (%) <sup>a</sup>	día post-infección <sup>b</sup>	Sobrevida <sup>c</sup> (%)
Control (+)	0 (0)	103082	28	4/6 (67)
<b>8G</b>	50 (107)	35737 (35)	35	6/7 (86)
<b>8G</b>	100 (214)	26606 (26)	35	7/7 (100)
<b>Bnz</b>	50 (192)	2493 (2)	56	7/7 (100)

<sup>a</sup> Porcentaje de parasitemia con respecto al pico del grupo control (+), <sup>b</sup> Días del pico de máxima parasitemia,

<sup>c</sup> Número de ratones vivos sobre el total de ratones utilizados por grupo al final del experimento.

En última instancia se ensayó el derivado **5F** a diferentes dosis (50 y 100 mg/Kg de peso) empleando **V2**. En la figura 21 y la tabla 29 se muestran los resultados de este ensayo para **5F**.

**Figura 21.** Gráfico de parasitemia (parásitos/mL) vs días post-infección. Ensayo 3b para el derivado **5F** a las dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso en **V2**. En barras horizontales se muestran los días de tratamiento.



Como se puede observar en la figura 21, el compuesto **5F** posee un claro comportamiento dependiente de la dosis, presentando a 100 mg/Kg (dosis similar a la de Bnz en moles), una eficacia similar a la del fármaco de referencia (tabla 29).

**Tabla 29.** Ensayo *in vivo* con **V2** a 50 y 100 mg/Kg. Algunos otros datos relevantes del **Ensayo 3b** para **5F**.

Compuesto	Dosis en mg/Kg ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Pico de máxima parasitemia p/mL (%) <sup>a</sup>	día post-infección <sup>b</sup>	Sobrevida <sup>c</sup> (%)
Control (+)	0 (0)	103158	26	3/7 (43)
<b>5F</b>	50 (85)	24775 (24)	26	7/7 (100)
<b>5F</b>	100 (170)	5872 (6)	26	7/7 (100)
<b>Bnz</b> <sup>**</sup>	50 (192)	1465 (1)	49	6/6 (100)

<sup>a</sup> Porcentaje de parasitemia con respecto al pico del grupo control (+), <sup>b</sup> Días del pico de máxima parasitemia,

<sup>c</sup> Número de ratones vivos sobre el total de ratones utilizados por grupo al final del experimento.

Además de una máxima supervivencia de los animales, el tratamiento con el derivado **5F** mejora en forma notoria el estado sanitario de los animales portadores de la enfermedad (figura 22).



**Figura 22.** Ratón tratado con 100 mg/Kg de peso con el derivado **5F**, por 7 días consecutivos (ratón de arriba) y ratón no tratado y enfermo (ratón de abajo). Se observa claramente una coloración amarillenta en las orejas del ratón tratado, evidenciando la distribución del compuesto por todo el organismo. Además se puede ver que el ratón tratado tiene el pelaje más ordenado que el ratón no tratado, esto es evidencia de una baja parasitemia o de bienestar sanitario.

Además de la equipotencia del derivado **5F** respecto a Bnz, es menos tóxico y no mutagénico. Todo esto lo transforma en un buen candidato a fármaco para estudios posteriores hacia un medicamento para la enfermedad de Chagas.

**Ensayo de genotoxicidad (test de micronúcleos).** Con el objetivo de avanzar en el desarrollo del candidato a fármaco **5F**, se estudia la genotoxicidad *in vivo* del mismo. Para ello, se trata a ratones sanos con 200 mg/Kg del derivado **5F** en **V2** por vía oral durante dos días consecutivos. Se utiliza un control negativo de genotoxicidad (sólo **V2**) y un control positivo de tratamiento intraperitoneal con 40 mg/Kg de ciclofosfamida. En la tabla 30 se observa que el número de células aberrantes en el tratamiento con el derivado **5F** es igual al número en el control negativo, lo cual significa que el compuesto **5F** es no genotóxico.

**Tabla 30.** Test de genotoxicidad. Resultados del ensayo de micronúcleos para el tratamiento con 200 mg/Kg de **5F**.

Tratamiento <sup>a</sup>	Número de EPMn <sup>b</sup>	Número de EPC <sup>c</sup>	%EPMn±SD <sup>d</sup>
<b>V2</b>	16	5000	0.3±0.9
<b>5F</b>	16	5000	0.3±0.9
<b>ciclofosfamida</b>	140	5000	2.8±2.4

<sup>a</sup> Se realizan 5 ensayos idénticos en momentos independientes, <sup>b</sup> Eritrocitos policromáticos micronucleados, <sup>c</sup> Eritrocitos policromáticos, <sup>d</sup> Porcentaje de eritrocitos policromáticos micronucleados ± desviación estándar

## Experimental

Los ensayos biológicos *in vitro* se realizan en cabinas de bioseguridad de clase II. El material utilizado se esteriliza previamente en autoclave a 121 °C durante 20 min o se utiliza esterilizado por el fabricante. El recuento de células se realiza en microscopio óptico utilizando cámara de Neubauer.

**Actividad frente a epimastigotes.** Se parte de un cultivo de 5-7 días de crecimiento (fase exponencial) de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2 en la forma epimastigote cultivado en medio de cultivo BHI suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se realiza un recuento de los parásitos y las diluciones necesarias con medio de cultivo fresco para obtener una concentración de  $3.0 \times 10^6$  células/mL. Los compuestos disueltos en DMSO se evalúan a concentraciones menores o iguales a 25 µM de forma que la cantidad de DMSO presente en el ensayo no supere el 1 %. Se incluyen controles negativos con 1.0 % de DMSO y controles positivos con Nfx a una concentración final de 7.7 µM. Se mide la turbidez del cultivo al día 0 a 610 nm y se incuba a 28 °C durante 5 días. Al quinto día se vuelve a medir la turbidez del cultivo a 610 nm para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento con referencia al control negativo (ausencia de compuesto, 100 % de crecimiento) y se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento de los parásitos, según la fórmula:  $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} * 100$ . Se calcula el valor de la IC<sub>50</sub> a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos por duplicado para cada concentración.<sup>101</sup>

**Estabilidad en plasma sanguíneo.** Se prepara una mezcla 1:1 de plasma y buffer fosfato pH 7.4, se agrega el compuesto a las concentraciones de 25 y 50 µM, en un volumen final de 1 mL (en los casos que sea necesario se agrega un volumen de DMSO no superior al 1% v/v). Se incuba la mezcla a 37 °C por 3 h. Luego de la incubación se agregan 100 µL de MeOH para precipitar las proteínas y se centrifuga a 3000 rpm por 10 min a 10 °C. Con el sobrenadante se hace un reparto agua/diclorometano (200µL x3) y se evapora a vacío. Luego se realiza una TLC utilizando los compuestos puros como estándares.<sup>102</sup>

**Ensayo de lisis de glóbulos rojos humanos.** Una solución de citrato de sodio (3.8 %) conteniendo sangre se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante y los eritrocitos se resuspenden en PBS, pH 7.2, en baño de hielo. Las células se centrifugan nuevamente a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Este procedimiento se repite dos veces más para asegurar la remoción de cualquier resto de hemoglobina libre. Una vez removido el sobrenadante luego del último lavado, las células se resuspenden en PBS para

obtener una solución al 2.0 % peso/volumen de glóbulos rojos. Los compuestos se disuelven en DMSO y se colocan 7.2  $\mu\text{L}$  en 400  $\mu\text{L}$  de PBS. La solución de PBS conteniendo los compuestos a evaluar (concentración final 25, 50, 150 y 300  $\mu\text{M}$ ), PBS (control negativo) o Anfo B (concentración final 1,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  en GRH) se agrega a 400  $\mu\text{L}$  de solución de glóbulos rojos en diez tubos de microcentrífuga para cada concentración y se incuban por 24 h a 37 °C. Como control positivo (100 % de hemólisis) se utiliza agua MiliQ conteniendo 7.2  $\mu\text{L}$  de DMSO. Luego de la incubación, se centrifugan los tubos y se recupera el sobrenadante. La liberación de hemoglobina se determina a partir de la absorbancia del sobrenadante a 405 nm usando un lector de placas EL 301 MICROWELL STRIP. Los resultados son expresados como cantidad de hemoglobina liberada como porcentaje del total teniendo en cuenta la absorción del compuesto a la longitud de onda en que se realiza la determinación de acuerdo a la siguiente ecuación: % Hemólisis =  $[(A_1 - A_0) / A_{100\%}] * 100$ , donde  $A_1$  es la absorbancia a 405 nm del compuesto a estudiar luego de 24 h de incubación,  $A_0$  es la absorbancia a 405 nm del compuesto a estudiar previo a la incubación y  $A_{100\%}$  es la absorbancia del control positivo luego de 24 h de incubación. Los experimentos se realizan por quintuplicado.<sup>103,104</sup>

**Ensayo de citotoxicidad en células VERO.** Se evalúa la citotoxicidad en células VERO (células epiteliales de riñón de mono verde Africano *Chlorocebus*). Se realiza una evaluación visual del cultivo luego de la fijación en el ensayo de la forma amastigota. Se observa en microscopio óptico (MO) a 100x en inmersión de aceite el cultivo con la máxima concentración de compuesto utilizado. Si en esta concentración se observa lisis de las células independientemente de la infección, se cataloga al compuesto como tóxico en esa concentración. Las células se cuentan a la máxima dosis de compuesto ensayada, ese valor de concentración se toma para el cálculo del índice de selectividad  $\text{IS} = \text{Concentración máxima no tóxica ensayada en la forma amastigote de } T. \text{ cruzi} / \text{IC}_{50} \text{ en amastigote de } T. \text{ cruzi}$ .

#### **Ensayo de citotoxicidad en macrófagos (células J774.1)**

Se cultivan macrófagos murinos J774.1 (ATCC, USA) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1 % de penicilina-estreptomicina. Los macrófagos se siembran en una placa de 96 pozos ( $5.0 \times 10^4$  células en 200 mL de medio de cultivo) y se incuban durante 48 h a 37 °C y atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. El medio de cultivo se retira y los compuestos disueltos en DMSO (< 0,5 %) se adicionan al medio fresco DMEM a las concentraciones finales deseadas (12.5, 25.0, 50.0, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ ). A continuación, la placa se incuba durante 48 h a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, el medio de cultivo se retira y la viabilidad celular se evalúa midiendo la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) a formazán por

acción de reductasas celulares. Para esto, se adiciona una solución de MTT (0.1 mg/mL), en PBS glucosa (0.2%) estéril y se incuba durante 3 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se remueve la solución anterior y se disuelven los cristales de formazán adicionando DMSO (180 mL) y buffer fosfato para MTT (20 mL) (0.1M glicina, 0.1M NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 10.5). Se mide la absorbancia a 560 nm en lector de ELISA. El valor de la IC<sub>50</sub> se determina en base al porcentaje de inhibición de duplicados.<sup>105, 106</sup>

**Evaluación de toxicidad para Test de Ames.** En primer lugar se determina la toxicidad de los compuestos sobre *Salmonella typhimurium* TA98. Este ensayo permite determinar la dosis máxima a la cual se lleva a cabo el ensayo de mutagénesis de Ames. Según las reglamentaciones vigentes, este ensayo de toxicidad se realiza con cinco diluciones seriadas desde 500 a 0.05 µg/placa del compuesto de interés. No se realiza a mayores concentraciones por problemas de solubilidad.<sup>107</sup>

Posteriormente, el ensayo de Ames de mutagenicidad se realiza en presencia de PBS para determinar la capacidad mutagénica del compuesto *per se* y en presencia de fracción microsomal S9 (10%) de hígado de ratón para simular condiciones de metabolización que sufriría el compuesto *in vivo*, o sea determinar la capacidad mutagénica de los metabolitos del compuesto. Se incluyen controles positivos 4-nitro-*o*-fenilendiamina para la condición sin metabolismo, y 2-aminofluoreno para la condición con S9 (con metabolismo). El número de revertantes se cuenta manualmente y se compara con el número de revertantes espontáneos. El compuesto es considerado mutagénico cuando el número de colonias revertientes *His+* es al menos el doble del número de revertientes espontáneos (control con DMSO) en dos dosis consecutivas, no existe una correlación estadísticamente válida entre las dosis y el número de revertantes.<sup>97</sup>

Las dosis ensayadas se toman de los estudios de toxicidad y de solubilidad de los compuestos, partiendo de la concentración más alta no tóxica y que no presente problemas de solubilidad, trabajando con cinco diluciones consecutivas al tercio.

Para la determinación de la toxicidad de los compuestos en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (*hisD3052*, dependiente de histidina) se parte de un cultivo  $1.0 \times 10^8$  UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial. Los compuestos se evalúan a una concentración máxima de 500 mg/placa y diluciones seriadas al décimo de ésta. Se incluyen controles negativos con DMSO (50 mL/placa). Las *S. typhimurium* se cultivan en Agar Mínimo Glucosa (AMG) en

presencia de histidina (0.5 mM) durante 24 h a 37 °C. Se realiza una evaluación de las características de los cultivos para determinar la máxima concentración no tóxica.<sup>108</sup>

**Test de Ames.** Para la determinación de la mutagenicidad de los compuestos en *S. typhimurium* estirpe TA98 (*hisD3052*, dependiente de histidina) se parte de un cultivo  $2.0 \times 10^9$  UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial. Se ensayan los compuestos disueltos en DMSO a diferentes dosis comenzando por el promedio entre la dosis más alta con toxicidad y la siguiente sin toxicidad y realizando diluciones seriadas al tercio de ésta. Se incluyen controles positivos 4-nitro-*o*-fenilendiamina (20 µg/placa, sin activación metabólica con S9) y 2-aminofluoreno (10 µg/placa, con activación metabólica con S9), controles negativos con DMSO (50 mL/placa) y control del fenotipo (Ampicilina resistente, Tetraciclina, Cristal violeta y luz UV sensible). La influencia de la activación metabólica se ensaya adicionando fracción S9 de hígado de ratones tratados con Aroclor-1254 obtenida de Moltox, Inc. (Annapolis, MD, USA). Se cultiva *S. typhimurium* en Agar Mínimo Glucosa (AMG) en presencia de histidina (0.05 mM) durante 48 h a 37 °C. El número de revertantes se cuenta manualmente y se expresa como el promedio de duplicados  $\pm$  SD. La muestra es considerada mutagénica cuando el número de colonias revertantes es al menos el doble del promedio de los controles negativos por al menos dos niveles de dosis consecutivas.<sup>106</sup>

**Actividad frente a amastigotes de *T. cruzi* cepa Y** Se hacen crecer las células VERO en medio RPMI (adicionado con glucosa 4.5 g/mL y bicarbonato de sodio 2.0 g/mL, según manual de fabricante y la ATCC (<http://www.atcc.org/>) o DEMEM en 10 % de SFB, con o sin antibióticos. El color adecuado del medio es rojo y el pH 7.6- 7.4 (si a lo largo del tiempo el medio se pone de color amarillo, significa acidificación del mismo, indicativo de contaminación o envejecimiento).

Las células VERO deben estar con una confluencia de aproximadamente 20 %. Se infectan las células con una relación 10 a 1 (parasito: célula). A los 20 minutos comienza la infección y a los tres días aproximadamente (observar los cultivos al MO diariamente) aparecen tripomastigotes lisando las células infectadas, con ese sobrenadante se re infectan nuevos cultivos. A las 24 h de infectar se descarta el sobrenadante y se lava con medio fresco repetidamente para eliminar los epimastigotes no infectivos (en el caso de que la infección se haga con cultivo envejecido).

Para evaluar la actividad frente a la forma amastigote intracelular, se hacen crecer las células VERO a una cantidad inicial de 5000 células/pocillo en medio, para la formación de la

monocapa (chamber slide system de 8 pocillos) o en placa de 24 pocillos (utilizando cubre objetos estériles dentro de cada pocillo), 24 h, 37 °C.

Luego de formada la monocapa se infecta con tripomastigotas (cepa Y de *T.cruzi*) en relación 10:1 (parásitos: células), obtenidos de sucesivos pasajes por células VERO (como se explica al inicio), 24 h, 37 °C. Pasado este tiempo se incorpora la primera dosis de compuesto, primero se lava con PBS las células infectadas, después por triplicado y a 4 concentraciones se agrega el compuesto disuelto en DMSO (concentración de DMSO en el medio de cultivo menor a 0.1% v/v), se retiran los cubre objetos a las 72 h y se cuenta en MO al 100x en inmersión de aceite. Se cuentan de 300 células totales el número de células infectadas. Las láminas se fijan con metanol (1 minuto y se lava con agua miliQ) y colorean con Giemsa (15 minutos y se lava con agua miliQ). El ensayo se hace por cuadruplicado.

Análisis de los datos: Se observa la monocapa para la valoración subjetiva de la citotoxicidad. Para determinar el porcentaje de células infectadas se cuenta un total de 300 células, dentro de estas 300, se cuentan infectadas y no infectadas y se aplica la siguiente fórmula para el cálculo:

Porcentaje células infectadas =  $(n^{\circ} \text{ células infectadas en 300 células tratadas}) * 100 / \text{número de células infectadas en 300 células, control sin tratamiento sólo DMSO}$ . El promedio de los cuadruplicados de cultivos no tratados fue tomado para servir como control del 100% de infección, contra el porcentaje de inhibición de células infectadas en los cultivos tratados. Se calculó el IC<sub>50</sub> y IC<sub>90</sub> con el algoritmo de ajuste de curva no-lineal sigmoideal de Levenburg Marquardt (Microsoft xfit; ID Business Solution, Guildford, UK).<sup>109,110</sup>

## Estudios *in vivo*

### **Actividad frente a la forma tripomastigotes.**

Se parte de ratones infectados con 7 días postinfección con pico de parasitemia ( $> 1.0 \times 10^6$ ), se extrae la sangre del ratón vivo (anestesiado) de aorta u ojo (1 mL por ratón), se usa citrato como anticoagulante, se la distribuye en placa de 96 pocillos. Se utiliza un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  (90  $\mu\text{L}$  de sangre + 10  $\mu\text{L}$  de compuesto), para dar una concentración final de compuesto de 25  $\mu\text{M}$  (concentración de DMSO final no excede 0.4% v/v). Se deja a 4°C, 24 y 48 h, se cuentan 5  $\mu\text{L}$  en MO 40x (método 50 campos). Notas: es importante tener una buena cantidad de parásitos iniciales para poder tener un conteo correcto a las 24 y 48 h. Asimismo, es importante que el llenado de la placa se haga homogeneizando bien antes de llenar cada pocillo (muy lentamente), y que se haga por triplicado o cuadruplicado.<sup>111,28</sup>

### **Preparación de Formulaciones.**

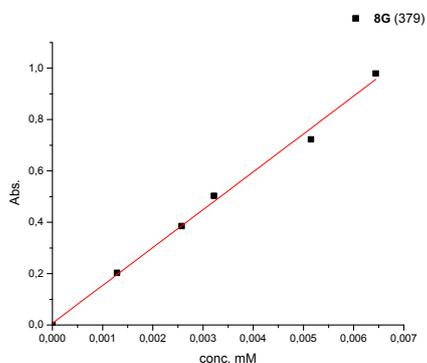
**Vehículo 1:** Constituido por 80 % SF + 20 % Tween 80. Los compuestos previamente molidos en mortero se adicionan a la mezcla de SF + Tween 80, se homogeniza el sistema por agitación en cámara de ultrasonido (Ultasonic Cleaner, Hwashin instruments, Power sonic 405) durante 10 minutos a máxima potencia, se utiliza 10 % de DMSO. La suspensión obtenida se deja agitando suavemente 24 h en agitador horizontal.

**Vehículo 2:** Constituido por 10% de tensoactivo compuesto por Eumulgin HRE® 40, oleato de sodio y fosfatidilcolina (8:6:3), 10% de fase oleosa formada por colesterol y 80 % de buffer fosfato (pH = 7,4). Para preparar un volumen de 10 mL de vehículo 2 se utilizó: 1.0 g de tensoactivo (460 mg de aceite de ricino polioxil- 40 - hidrogenado -Eumulgin HRE® 40, 360 mg de oleato de sodio, 180 mg de fosfatidilcolina de soya), 1.0 g de colesterol, buffer cantidad suficiente para 10 mL.<sup>112</sup>

Primero se disuelve el colesterol, eumulgin y fosfatidilcolina y compuesto, si corresponde, en cloroformo hasta solubilización completa, y se evapora a vacío el disolvente hasta sequedad. Para asegurar la total remoción del cloroformo se hace pasar una corriente de N<sub>2</sub> por 5 min. Paralelamente se disuelve el oleato de sodio en el buffer y se deja en agitación orbital durante 12 h a temperatura ambiente. Luego se adiciona esta solución a la mezcla sólida obtenida previamente, se homogeniza y se sumerge en un baño de ultrasonido a máxima potencia durante 30 minutos, de no ser homogénea la solución o no tener la consistencia deseada, se sumerge en baño de ultrasonido durante 30 minutos más.<sup>115</sup>

**Cuantificación de la solubilidad.** Se toman 200  $\mu\text{L}$  de formulación (equivalente a una dosis), se filtra la suspensión en papel watman N° 1 a vacío, se hacen diluciones seriadas de la solución filtrada en acetonitrilo, se mide la absorbancia de las disoluciones, y se calcula la concentración real en solución a partir de las curvas de calibración.

## Derivado 8G



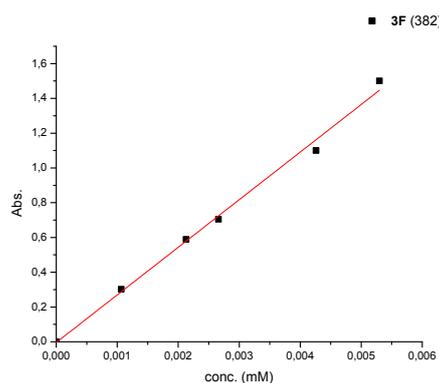
Equation

$$A = a + \epsilon b * c; \text{Adj. R-Square} = 0.99414, \text{Value, Standard Error } \mathbf{8G} (379)$$

Intercept  $a = -0.019 \pm 0.007$ , Slope  $\epsilon b = 14.8 \pm 0.5$

$\epsilon = (14.7 \pm 0.5) \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = \text{dos picos } 379 \text{ nm y } 280 \text{ nm (pico menor)}$ .

## Derivado 3F



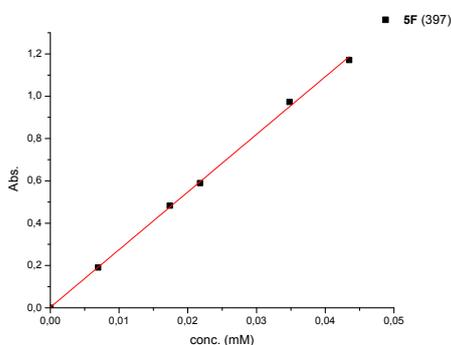
Equation

$$A = a + \epsilon b * c; \text{Adj. R-Square} = 0.99369, \text{Value, Standard Error } \mathbf{3F} (382)$$

Intercept  $a = -(0.031 \pm 0.004)$   $\mathbf{3F} (382)$ , Slope  $\epsilon b = 27 \pm 1$

$\epsilon = (27 \pm 1) \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 382 \text{ nm}$ .

## Derivado 5F



Equation

$$A = a + \epsilon b * c; \text{Adj. R-Square} = 0.99889, \text{Value, Standard Error } \mathbf{5F} (387)$$

Intercept  $a = 0.010 \pm 0.003$ ,  $\mathbf{5F} (387)$ , Slope  $\epsilon b = 27.2 \pm 0.4$

$\epsilon = (27.2 \pm 0.4) \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = \text{dos picos } 387 \text{ nm y } 307 \text{ nm (pico menor)}$ .

### Ensayo con animales.

Los animales fueron proporcionados y se manipularon en las instalaciones del Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay. Los protocolos experimentales utilizados fueron avalados por los Comités de Éticas del Instituto y según la reglamentación de dicho país. Los animales tenían alimento y agua *ad libitum*.

### Toxicidad vía oral.

Se utilizaron ratones *CD1* y *Balb/c*, de 3 meses de edad, con un peso aproximado de entre 25-30 g. Los compuestos se administran por vía oral utilizando cánula intragástrica con el vehículo indicado durante 15 días (ensayo a dosis repetida, durante 5 días consecutivos, se descansa 2 y se continúa hasta completar los 15 de tratamiento). Se realiza con 2 ratones por grupo, por dos grupos: uno se trata sólo con el vehículo y el otro con el compuesto y el doble de la dosis a ensayar en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas (MAEC).

El ensayo de *up and down*, se realiza con 2 ratones por cada grupo, y sólo se usó **V1**. Se administran vía oral los compuestos a la dosis a ensayar en el MAEC. Se espera un día, y si no hay signos de toxicidad se duplica la dosis. Se espera un día, sino hay signos de toxicidad, se administra una dosis diez veces mayor. Se espera un día y se sacrifican los animales.

Como medida de toxicidad se observa el aspecto general y comportamiento del animal y el cambio de peso diario. Al finalizar el experimento los ratones se sacrifican por dislocación cervical, se realiza la necropsia y se observan macroscópicamente los órganos para visualizar signos de toxicidad.<sup>113</sup>

### Estudios en el modelo agudo de la enfermedad de Chagas -modelo murino-.

Se infectan ratones *Balb/c* (día 0) de 3 meses de edad con sangre infectada de ratones en inicio del pico de parasitemia (parasitemia mayor a  $1.0 \times 10^6$  p/mL), con el clon CI Brener de *T. cruzi* (10000 parásitos por ratón), se inocula intraperitonealmente. Se sigue la parasitemia a partir del cuarto día post infección y hasta que todos los ratones del grupo estén positivos. Las medidas de parasitemia se hacen por el Micrométodo de Hemoconcentración y conteo (se detalla el método más adelante). Una vez que todos los ratones están positivos se inicia el tratamiento. El tratamiento dura 15 días consecutivos, se administran los compuestos vía oral mediante cánula intragástrica una vez al día. La parasitemia se sigue semanalmente, a los 30 y 60 días se extraen 200  $\mu$ L de sangre de la cola del ratón para pruebas serológicas (test de ELISA

para detectar antígenos de *T. cruzi*). El día 60 es el final del experimento y se sacrifican los animales.

Seguimiento de la parasitemia en sangre. Micrométodo de Hemoconcentración y conteo; se extrae la sangre de los ratones por un pinchazo en la cola y tomando con capilares la sangre. Un capilar por ratón saca entre 8-18 mm de altura de sangre. Los milímetros se convierten a  $\mu\text{L}$  por una tabla previamente descrita y calibrada en el laboratorio. Se centrifugan los capilares a 3000g por 40 s. Se observa la carga parasitaria en el capilar por MO (en el capilar se reparten los Glóbulos Rojos (GR) en un extremo y el suero de sobrenadante, en la interfase se encuentran los tripomastigotes. Luego se corta el capilar unos mm sobre la interface hacia la parte de GR, se extiende en un portaobjetos, se cubre con un cubreobjeto y se cuentan los parásitos en 50 campos (MO en el 40x), luego se aplica la ecuación de Freilij. Para la serología, se toman de la misma forma 4 capilares llenos de sangre, se cortan y se guardan en tubos para realizar el ELISA.<sup>114</sup>

### Ensayo de Genotoxicidad (Test de Micronúcleo).

Se realiza el tratamiento agudo vía oral utilizando sonda intragástrica (48-72h) de ratones *CD-1* de 3 meses de edad con diferentes concentraciones del compuesto a estudiar. Al final del experimento se sacrificaran los animales, se retiran los fémures y se remueve la médula ósea con FBS (suero fetal bovino), mantenido a 37 °C. Se homogeniza el material y se transfiere a un tubo de centrifuga cónico. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se prepararan las muestras con las células restantes. Luego de 24 h se fijan las muestras en metanol absoluto por 5 minutos. Se tiñen las muestras con colorante Giemsa al 4% por 3 minutos. Se analizan las muestras por MO y se cuentan los eritrocitos policromáticos incluyendo los que presenten micronúcleos (MNs). Como control negativo se utilizan células de animales tratados con el disolvente y diluyente utilizados en el tratamiento de los animales.

Se emplean 3 grupos de tratamiento; GRUPO I: control negativo, tratado con 200  $\mu\text{L}$  de **Vehículo 2**; GRUPO II: tratado con 200 mg/Kg de **5F**. GRUPO III: control positivo, tratado con 50 mg/Kg de ciclofosfamida. El tratamiento de cada grupo fue repetido cinco veces, totalizando 5 animales por concentración. La vía utilizada en la administración del control negativo y del compuesto en el grupo I y II fue oral y en el grupo III la vía fue intraperitoneal, para el fármaco utilizado como control positivo.

Administración de las Dosis: El compuesto es administrado vía oral, mediante una cánula esofágica. La intervención se hizo en dos dosis: a las 24 y 48 h antes del sacrificio. La administración de la sustancia utilizada como control positivo se hizo vía intraperitoneal, en única dosis, 24 h antes del sacrificio.

Ensayo de Micronúcleo: Se utilizó el método de Schmid para el ensayo de Micronúcleo. Los animales tratados se sacrificaron por ruptura cervical a 48 h del tratamiento. Se tiñen las muestras con colorante Giemsa al 5%, diluido en agua destilada estabilizada con buffer fosfato pH 7.4. Se analizan las muestras en microscopio óptico de inmersión y se cuentan 1000 eritrocitos policromáticos (EPCs) por animal tratado, incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMNs). También se evaluó la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) versus los eritrocitos normocromáticos (ENC), en 100 células. La proporción de EPCMNs fue realizada para cada grupo y los grupos de tratamiento con el compuesto y ciclofosfamida se comparan con el grupo control negativo.

Análisis estadístico: A partir de los valores individuales de los parámetros evaluados se calculan los valores medios y sus desviaciones estándar, para cada uno de los grupos experimentales. Los datos son procesados mediante el software de análisis estadístico EpiInfo™ versión 3.5.1. Ensayo estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ).<sup>115</sup>

**Aspectos Éticos:** Se siguieron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, 2007). Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

---

### Bibliografía

<sup>93</sup> Madden SC, Whiffle GH, Plasma proteins: Their source, production and utilization, *Physiol Rev*, **1940**, 20, 194-217.

<sup>94</sup> Chang JB, Lu HF, Liao NC, Lee CS, Yeh MY, Liu CM, Chung MT, Man-Kuan A, Lin JJ, Wu MF, Chung JG, Evaluation of genotoxicity and subclinical toxicity of *Agaricus blazei Murrill* in the Ames test and in histopathological and biochemical analysis, *In Vivo*, **2012**, 26, 437-445.

<sup>95</sup> OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. 21 July 1997.

- <sup>96</sup> Maron DM, Ames BN, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat Res*, **1983**, 113, 173-215.
- <sup>97</sup> Chu KC, Patel KM, Lin AH, Tarone RE, Linhart MS, Dunkel VC, Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutat Res*, **1981**, 85, 119-132.
- <sup>98</sup> Papadopoulou MV, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Chatelain E, Kaiser M, Wilkinson SR, McKenzie C, Ioset JR, Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents, *J Med Chem*, **2012**, 55, 5554-5565.
- <sup>99</sup> Olivares-Illana V, Rodríguez-Romero A, Becker I, Berzunza M, García J, Pérez-Montfort R, Cabrera N, López-Calahorra F, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A, Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl Trop Dis*, **2007**, 1, e1.
- <sup>100</sup> <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm094212.htm>
- <sup>101</sup> Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, González M, Denicola A, Otero L, Gambino D, Rigol C, Olea-Azar C, Faundez M, *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg Med Chem*, **2004**, 12, 4885-4893.
- <sup>102</sup> Kerns EH, Di L, *Drugs-like properties: Concepts, structure, design and methods*, Elsevier, **2008**, USA, p:169.
- <sup>103</sup> Dausset J, Contu L, Drug-induced hemolysis, *Annu Rev Med*, **1967**, 18, 55-70.
- <sup>104</sup> Merlino A, Benítez D, Chavez S, Da Cunha J, Hernández P, Tinoco LW, Campillo NE, Páez JA, Cerecetto H, González M, Development of second generation amidinohydrazone, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds *MedChemComm*, **2010**, 1, 216-228.
- <sup>105</sup> Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- <sup>106</sup> López G, Blanco F, Hernández P, Ferreira A, Piro OE, Batthyány C, González M, Rubbo H, Cerecetto H, Second generation of alpha-tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization, *Bioorg Med Chem*, **2007**, 15, 6262-6272.
- <sup>107</sup> <http://www.oecd.org>. OECD guideline for testing of chemicals. **1997**.
- <sup>108</sup> Mortelmans K, Zeiger E, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat Res*, **2000**, 455, 29-60.
- <sup>109</sup> Seifert K, Escobar P, Croft SL, In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* host cell dependent, *J Antimicrob Chemother*, **2010**, 65, 508-511.
- <sup>110</sup> Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P, *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole, *Biomedica*, **2009**, 29, 448- 455.

<sup>111</sup> Mafezoli J, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MF, de Albuquerque S, *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, *J Ethnopharmacol*, **2000**, 73, 335-340.

<sup>112</sup> Chorilli M, Desenvolvimento e Caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo, *Tesis de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Sao Pablo, Brasil, **2007**, <http://www.fcfar.unesp.br/posgraduacao/cienciasfarmaceuticas/Disertacoes/2007/MarlusChorilliDO.pdf>, 54-57.

<sup>113</sup> Rispin A, Farrar D, Margosches E, Gupta K, Stitzel K, Carr G, Greene M, Meyer W, McCall D. Alternative methods for the median lethal dose (LD(50)) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity, *ILAR J*, **2002**, 43, 233-243.

<sup>114</sup> Benitez D, Cabrera M, Hernández P, Boiani L, Lavaggi ML, Di Maio R, Yaluff G, Serna E, Torres S, Ferreira ME, Vera de Bilbao N, Torres E, Pérez-Silanes S, Solano B, Moreno E, Aldana I, López de Ceráin A, Cerecetto H, González M, Monge A. 3-Trifluoromethylquinoxaline *N,N'*-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-*T. cruzi* agents and mechanism of action studies, *J Med Chem*, **2011**, 54, 3624-3636.

<sup>115</sup> Krishna G, Hayashi M, *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, *Mutat Res*, **2000**, 20, 155-166.





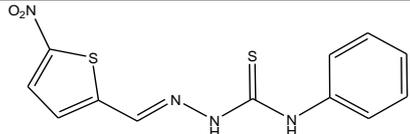
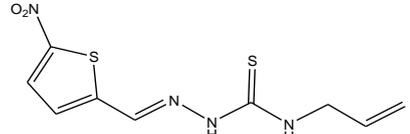
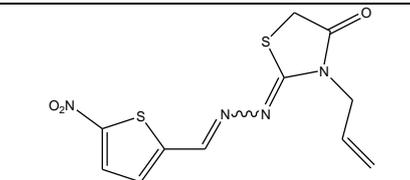
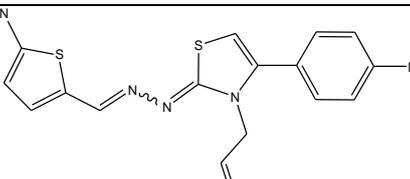
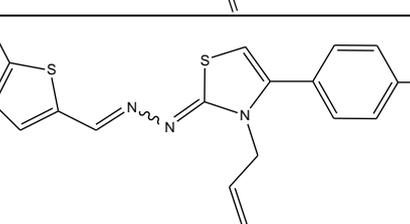
# BIOQUÍMICA

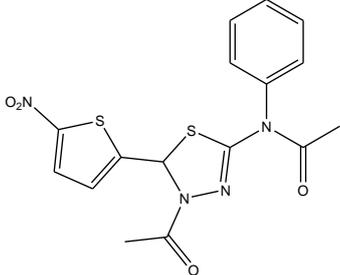
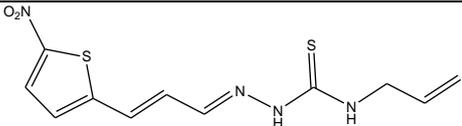
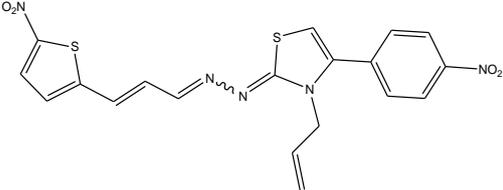
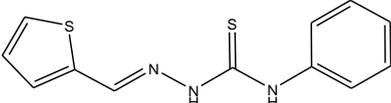
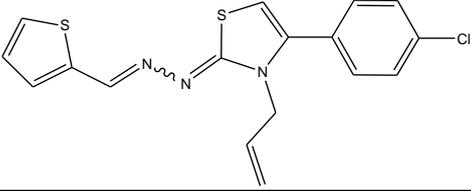
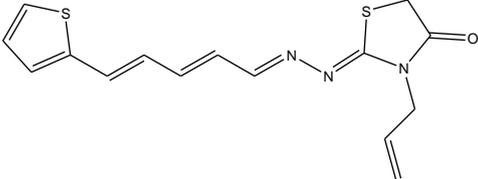
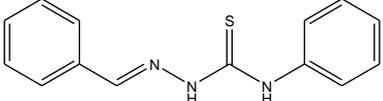
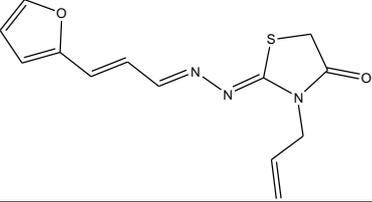
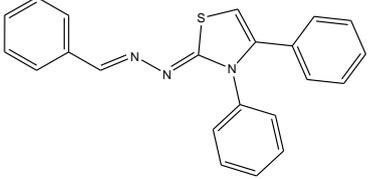


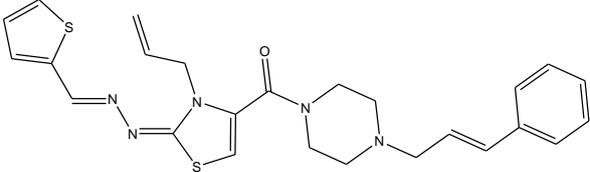
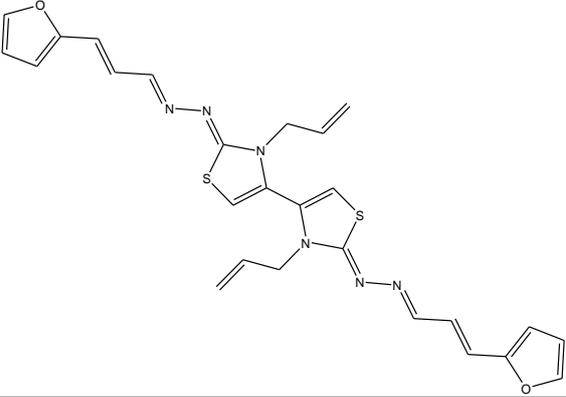
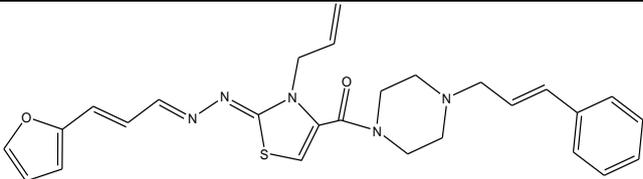
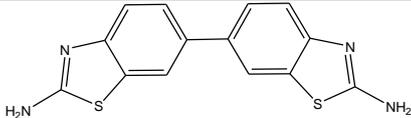
En esta sección se describen los distintos ensayos realizados para elucidar los mecanismos de acción de los nuevos compuestos sintetizados con actividad tripanosomicida. Se incluyen estudios de inhibición enzimática de **triosafosfato isomerasa (TIM)**, **cruzipaina (CP)** y **tripanotión sintetasa (TryS)**, de vías metabólicas a través de la inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana, y de proteómica utilizando captura de proteínas del parásito en columnas de afinidad y su identificación por espectrometría de masa.

En la tabla 31 se muestran los resultados de inhibición enzimática obtenidos para los derivados del **Líder II** seleccionados de acuerdo a sus destacadas actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

**Tabla 31.** Actividad frente a dianas moleculares esenciales de *T. cruzi*. Se ensayaron los derivados del Líder II seleccionados según los criterios de actividad tripanosomicida y diseño.

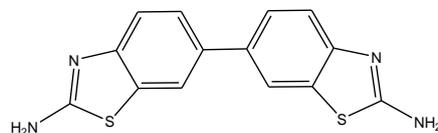
Estructura	Derivado	Porcentaje Inhibición 100 TIM <sup>a</sup>	Porcentaje Inhibición 100 CP <sup>b</sup>	Porcentaje Inhibición 30 TryS <sup>c</sup>
	<b>1A</b>	25	nd <sup>d</sup>	nd
	<b>Líder II</b>	58	nd	nd
	<b>5A</b>	55	nd	0
	<b>7A</b>	64 (30) <sup>e</sup>	8	nd
	<b>8A</b>	0	12	nd

Estructura	Derivado	Porcentaje Inhibición 100 TIM <sup>a</sup>	Porcentaje Inhibición 100 CP <sup>b</sup>	Porcentaje Inhibición 30 Trys <sup>c</sup>
	<b>15A</b>	26	nd	0
	<b>2B</b>	26	nd	nd
	<b>7B</b>	63 (30) <sup>e</sup>	20	nd
	<b>1C</b>	40	nd	nd
	<b>8C</b>	47	0	nd
	<b>5D2</b>	nd	nd	30
	<b>19E</b>	100	nd	nd
	<b>10E</b>	nd	40	0
	<b>20E</b>	50	nd	nd

Estructura	Derivado	Porcentaje Inhibición 100 TIM <sup>a</sup>	Porcentaje Inhibición 100 CP <sup>b</sup>	Porcentaje Inhibición 30 TryS <sup>c</sup>
	<b>4F</b>	nd	40	0
	<b>3F</b>	100	nd	0
	<b>5F</b>	0	50	30
	<b>IX<sup>f</sup></b>	100	nd	nd

<sup>a</sup> porcentaje de inhibición a 100  $\mu\text{M}$  de compuesto, en la enzima triosafosfato isomerasa de *T. cruzi*. <sup>b</sup> Porcentaje de inhibición a 100  $\mu\text{M}$  de compuesto, en la enzima cruzipaina de *T. cruzi*. <sup>c</sup> porcentaje de inhibición a 30  $\mu\text{M}$  de compuesto, en la enzima tripanotión sintetasa de *T. brucei*. <sup>d</sup> no determinado. <sup>e</sup>  $\text{IC}_{50}$  del compuesto frente a la enzima en  $\mu\text{M}$ , <sup>f</sup> Descrito previamente en referencia 99.

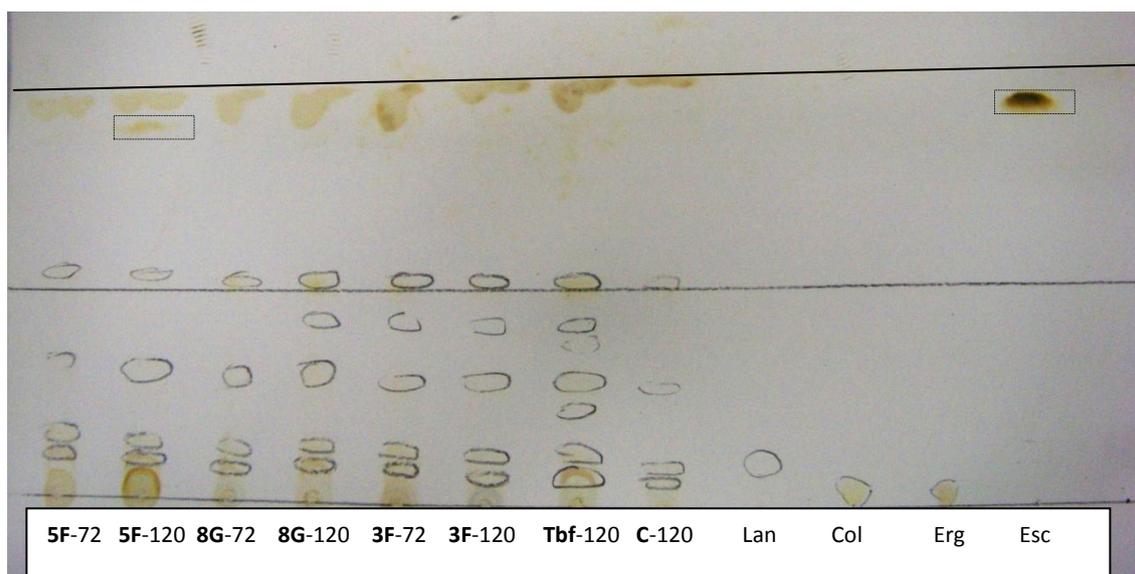
De acuerdo a los resultados obtenidos alguno de los compuestos ensayados tiene una leve actividad frente a CP y frente a TryS. Algunos compuestos tienen actividad de buena a moderada frente a TIM, donde se destacan los derivados tiazoles **7A**, **7B** y **3F**. Interesantemente el derivado **3F** además posee excelente actividad tripanosomicida tanto *in vitro* como *in vivo*. El diseño de este compuesto fue planteado a partir de una estructura simétrica para interactuar en la interface dimérica de la TIM y así inhibir la enzima. Como existen compuestos diméricos como el que se muestra en la figura 23 con interesante actividad inhibitoria de TIM.<sup>99,116</sup> Aunque la inhibición de la TIM no explica por completo la actividad tripanosomicida de **3F**, se puede afirmar que debe existir algún otro blanco molecular involucrado.



**Figura 23.** Estructura del compuesto **IX**. Este compuesto simétrico es uno de los buenos inhibidores de **TIM** previamente descritos.<sup>99,116</sup>

El compuesto **5F** con actividad moderada-baja frente a **CP** y **TryS** podría ser considerado un compuesto con actividad sobre múltiples dianas. Si bien estas actividades podrían no ser consideradas buenas para un fármaco multi-dianas, cabe mencionar que son adecuadas, ya que se postula que este tipo de productos deben tener actividades de bajas a moderadas en distintas vías metabólicas del parásito. Este hecho se basa en que al actuar sobre diversas dianas lleva al parásito a una especie de “caos” interno y por consiguiente a la posterior muerte<sup>117</sup>. Las dos enzimas que afecta el compuesto **5F** tienen actividad amidasa y al presentar el compuesto en su estructura un enlace amida, éste podría actuar como análogo de sustrato de estas enzimas. La leve inhibición de **CP** y **TryS** no explican por completo la actividad tripanosomicida de **5F**, sugiriendo que debe existir algún otro blanco molecular.

Además de las enzimas anteriormente mencionadas, el diseño de algunos de los compuestos de este trabajo ha sido dirigido a la biosíntesis de esteroides de membrana. Para ensayar los compuestos frente a esta vía metabólica se usa un test que involucra la incubación de los parásitos en su forma epimastigote por 72 y 120 h con los diferentes compuestos y la posterior extracción de los lípidos de membrana. Los lípidos extraídos se analizan por cromatografía en capa fina (TLC) y se comparan con patrones puros de escualeno, colesterol, lanosterol y ergosterol.<sup>74,118</sup> En la figura 24 se muestran los resultados del perfil de lípidos de membrana para los derivados **3F**, **5F** y **8G** al ser incubados con *T. cruzi* durante 72 y 120 h.

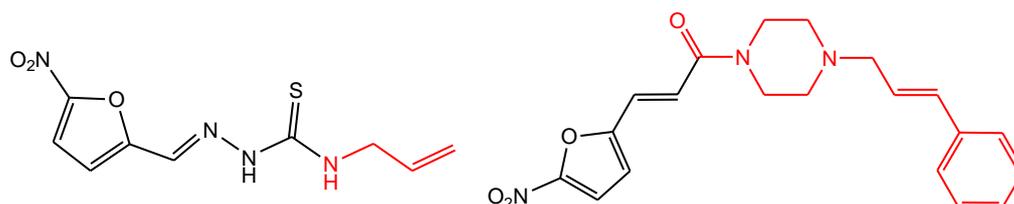


Tbf= terbinafine, C= control negativo, Lan= lanosterol, Col= colesterol, Erg=ergosterol, Esc= escualeno

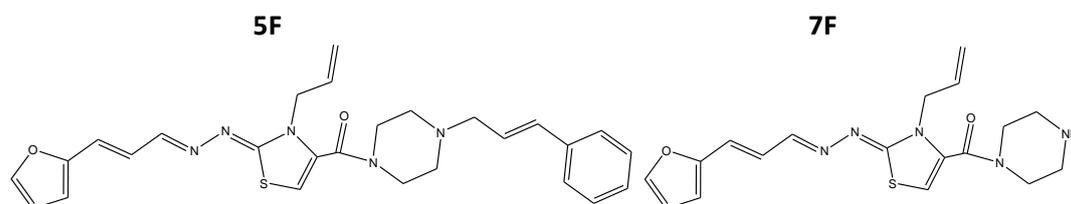
**Figura 24.** Fotografía de la placa cromatográfica revelada con vapores de yodo (revelador específico de escualeno). La banda correspondiente al escualeno se enmarca en el recuadro negro. El yodo es un revelador específico del escualeno, un revelado que es habitualmente reversible con calor, en presencia de escualeno se fija la coloración, como la que se muestra en el estándar (Esc).

De los tres compuestos evaluados, sólo el derivado **5F** tiene actividad en la biosíntesis de esteroides de membrana ya que se observa acumulación de escualeno. El escualeno es de los primeros lípidos sintetizados en esta vía metabólica, por lo que alguna de las enzimas que actúan después de este metabolito podría estar siendo afectada. Algunas de estas enzimas son la escualeno epoxidasa, lanosterol sintasa y la C14 demetilasa, entre otras.

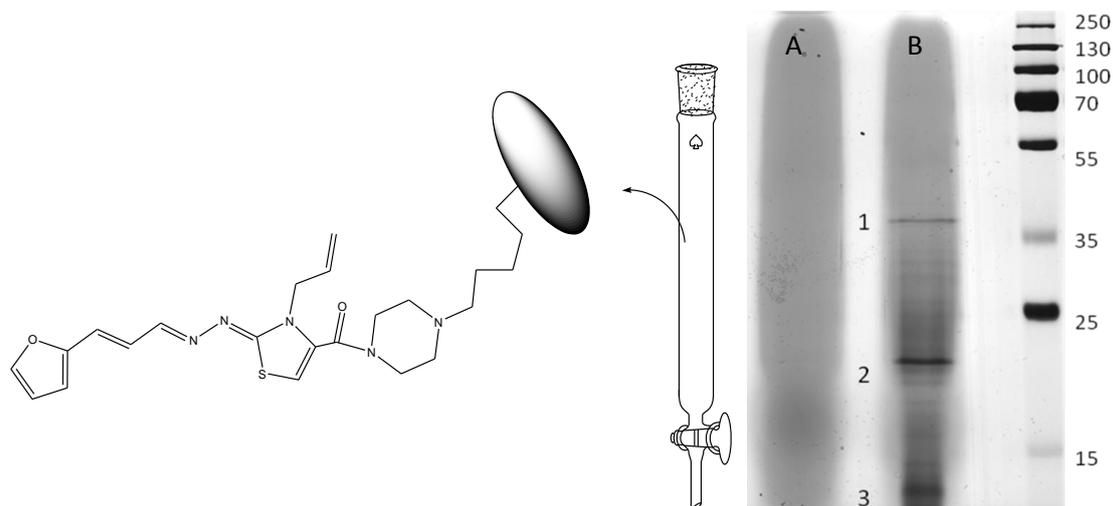
Desde el punto de vista estructural el derivado **5F** posee dobles enlaces conjugados como en el escualeno y otros intermedios de la biosíntesis de ergosterol. Además posee en su estructura algunos agrupamientos que se repiten en otros inhibidores de la biosíntesis de esteroides, descritos por nuestro grupo de investigación, como los nitrofuranos que se muestran a continuación.<sup>74</sup>



Para explorar cuál puede ser otro posible blanco de estas moléculas tripanosomicidas, se plantea el diseño de una molécula que represente a la familia de derivados activos. Para ello se prepara el derivado **7F** (figura 25). Este derivado con una amina libre se inmoviliza en una resina de purificación de proteínas. A esta resina, con el derivado **7F** unido covalentemente como se muestra en la figura 26, se la empaqueta en una mini-columna y se le pasa un extracto de parásitos de la forma epimastigote. Se espera que aquellas proteínas que sean capaces de interactuar con el compuesto queden retenidas en la columna. Luego esas proteínas se eluyen de la columna en condiciones desnaturalizantes. Se resuelven por electroforesis de geles de poliacrilamida y se analiza su identidad por espectrometría de masa. En la figura 26 se muestra un esquema de la columna unida a la resina y el gel resultante de la elución.



**Figura 25.** Derivado **5F** y su análogo nucleofílico, **7F**, desarrollado para los estudios de inmovilización en una resina de purificación de proteínas.



**Figura 26.** Esquema de la columna utilizada para capturar proteínas afines a los compuestos tripanosomicidas. A la derecha se muestra el gel de poliacrilamida, de la elución de la cromatografía de afinidad. **A** es el blanco sin ligando, **B** es la columna con ligando. Las tres bandas marcadas corresponden a tres subunidades del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial de *T. cruzi*.

En el gel de poliacrilamida se visualizan tres bandas que son cortadas y procesadas proteolíticamente con tripsina y analizadas por espectrometría de masa. A modo de ejemplo se muestra en la figura 27 el análisis de espectrometría de masa que se utilizó para la identificación de las tres proteínas de *T. cruzi*. Las mismas son subunidades de la citocromo C oxidasa, subunidad IV, subunidad V y la subunidad X. Esta enzima es del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial de todas las células y es esencial para el mantenimiento energético de las mismas. Se trata de la última enzima de la cadena de transporte de electrones. Recibe un electrón de cada una de las cuatro moléculas de citocromo C, y los transfiere a una molécula de oxígeno, reduciéndola a dos moléculas de agua. Acoplada a este proceso, se produce una translocación de protones a través de la membrana, lo cual genera un gradiente electroquímico que la enzima ATP sintasa emplea para sintetizar trifosfato de adenosina (ATP).<sup>119</sup>

**Figura 27.** Resultados del análisis de la espectrometría de masa con el programa Mascot.

**Protein sequence coverage: 66%**

Matched peptides shown in **bold red**.

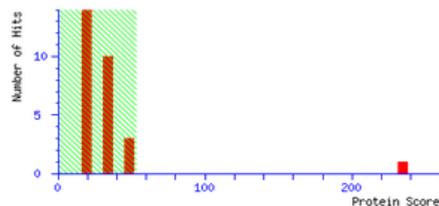
```

1 MKRFASISLV AVSTCRHFFG KGWDNASLDT IYSCMLRKPE VNDRVRSQYA
51 STMDPRDADV LRRLGEVAKE NKTfirVFLP PHLGDPHRL KCYSLMAYPI
101 LDDKGGQLKV EMDGHHLDAF ADPDDDYAKV VIPHIELVEY LAKSLLETMK
151 WEATPRGAAS LLESLYRGAD IPDHVFOTPA VIERIDEFKD GNKVTO

```

**Mascot Score Histogram**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 53 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Peptide Summary Report**

Format As	Peptide Summary	<a href="#">Help</a>
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits 20
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/> Ions score or expect cut-off 0	Show sub-sets 0
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/> Sort unassigned	Decreasing Score
Preferred taxonomy	All entries	Require bold red <input type="checkbox"/>

Error tolerant

1. [gi|71412456](#) Mass: 22287 Score: 234 Matches: 3(2) Sequences: 3(2)  
cytochrome c oxidase subunit V [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">11</a>	1179.6721	1178.6648	1178.6295	0.0353	0	49	0.25	1	U	<b>R.GAASLLESLYR.G</b>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">29</a>	1622.9857	1621.9784	1621.9443	0.0341	0	82	1.5e-05	1	U	<b>K.VVIPHIELVEYLAK.S</b>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">36</a>	1865.0013	1863.9940	1863.9479	0.0461	0	103	5.6e-07	1	U	<b>R.GADIPDHVFQTPAVIER.I</b>

Como siguiente paso para la confirmación del blanco molecular se plantea ensayar si el compuesto **5F** es capaz de inhibir a este complejo enzimático en un ensayo con parásitos vivos. El ensayo de inhibición del complejo IV se realiza de dos modos; en una primera instancia se determina directamente el consumo de oxígeno del parásito entero en presencia de **5F**, y en segunda instancia se permeabilizan las membranas del parásito y se determina directamente la actividad de la citocromo C oxidasa. En ambos casos se usan concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{M}$  de **5F**.

No se observa cambio en la respiración del parásito a ninguna concentración, ni tampoco cuando se incubó 1 y 2 h previamente el compuesto con los parásitos en cultivo. El derivado **5F** tampoco inhibió el complejo IV, pero éste sí se inhibió en presencia de cianuro (inhibidor del complejo IV).

Como conclusión de esta sección, el compuesto **3F** tiene una actividad moderada-baja frente a una enzima glicolítica (**TIM**) esencial del parásito. El compuesto **5F** tiene actividad frente a múltiples dianas afectando tres vías metabólicas diferentes: **CP** (alimentación y protección del ataque del sistema inmune del hospedero), **TryS** (protección al estrés oxidativo) e inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana.

## Experimental

**Purificación de triosafosfato isomerasa (TIM).**<sup>120</sup> Se cultiva 1L de bacterias *E. coli* que contienen el plásmido de sobreexpresión de la **TIM**. Cuando el cultivo alcanza un  $DO_{590}$  de 1.0 se induce la expresión con IPTG (0.05 g/500 mL) y ampicilina (40  $\mu$ L de 50 mg/mL) toda la noche. Luego se centrifuga a 6500 rpm 20 min a 4 °C y se descarta el sobrenadante. Se resuspende en buffer de lisis (MES 100 mM, DTT 1.0 mM, PMSF 0.2 mM, EDTA 0.5 mM, pH 6.3) y se homogeniza con sonicador (Branson sonifier) en hielo de 4 a 7 ciclos de 40 s (alternando 1 min de descanso). El extracto se centrifuga a 45000 rpm durante 60 min. El sobrenadante se lleva a un volumen de 60 mL de buffer A (MESNa 50 mM, pH 6.3) y se inyecta a una columna de SP Shepharose en FPLC previamente equilibrada con buffer A, 2.0 mL/min. Se lava la columna con 100 mL de buffer A, se inicia el gradiente de 0-500 mM de NaCl, y se colectan fracciones de la 17-24 (4.0 mL, 17 min). Se precipita con sulfato de amonio 70% (472 g/mL) en frío y agitación constante por 2 h. Se centrifuga a 16000 rpm por 20 min y se retira el sobrenadante. Se resuspende el *pellet* en buffer C (trietanolamina-HCl 100 mM, EDTA 1.0 mM, pH 7.4) agregando sulfato de amonio hasta alcanzar la concentración de 2.2M. Se inyecta la muestra en una columna hidrofóbica, previamente equilibrada con buffer D (trietanolamina-HCl 100 mM, EDTA 1.0 mM, sulfato de amonio 2.2 M, pH 7.4). Se lava con 100 mL de buffer D, se inicia el gradiente de 2.0 a 0.0 M de sulfato de amonio, y se colecta el pico (4.0 mL, 60 min). Se concentra en un filtro Amicón PM10 hasta superar los 5 mg/mL de proteína. Se corre un gel de poliacrilamida 16 % SDS-PAGE para verificar la pureza.

**Ensayo de actividad enzimática de la triosafosfato isomerasa (TIM)**<sup>53,54</sup> La actividad se determina en la dirección de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. Se mide el descenso en la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard, a 25 °C. La mezcla de reacción (pH 7.4, 1.0 mL) contiene trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, gliceraldehído-3-fosfato 1 mM y 0.9 unidades de  $\alpha$ -glicerol-fosfato deshidrogenasa. La reacción enzimática comienza con el agregado de 5 ng de **TIM**. Para la inhibición se incuban los compuestos a 100  $\mu$ M con 5.0  $\mu$ g de TIM en 1.0 mL de buffer por 2 h a 37 °C. Luego se toman 5 ng de **TIM** para medir la actividad. La concentración de DMSO en la mezcla de incubación no excede el 10%v/v.

**Purificación de cruzipaina (CP)**<sup>121</sup> La enzima se purifica a partir de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. Los parásitos se cultivan a 28 °C con agitación en medio de cultivo BHI-triptosa, se cosechan a 7000 rpm (Sorvall, rotor SS34) durante 10 min a 4 °C, se lavan dos veces con una solución de sacarosa 0.25 M y KCl 5.0 mM y luego de descartar el último lavado se congela el *pellet* (10.3 g de parásitos) a -20°C durante 48 h. La ruptura de los epimastigotes se lleva a cabo mediante tres ciclos de congelado a -20°C y descongelado. Se agregan 26 mL (2.5 mL/g parásitos) de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, conteniendo NaCl 150 mM (TBS) y el homogenizado se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El *pellet* se lava con 26 mL de la misma solución, se centrifuga nuevamente y los sobrenadantes se combinan y se vuelven a centrifugar a 16000 rpm durante 45 min a 4 °C. Se conserva el sobrenadante (extracto libre de células) y el *pellet* se descarta.

Al sobrenadante obtenido (50 mL) se le agregan 5 mM (concentración final) de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub>, se centrifuga a 15000 rpm por 5 min a 4 °C y se siembra en una columna empacada con resina de afinidad (ConA-Sefarosa, 3 mL), equilibrada con 100 mL de buffer A (TBS conteniendo CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub> 3 mM). El procedimiento se repite tres veces a 4 °C. Posteriormente la columna se lava exhaustivamente con buffer A (200 mL), se inyectan 5 mL de buffer A conteniendo α-metil D-manósido 0,5 M (buffer B) y se equilibra bajo agitación durante 1 h a 37 °C. La elución de CP se realiza a 37 °C utilizando 25 mL de buffer B preincubado a la misma temperatura. El percolado se dializa (bolsas de diálisis Thomas Scientific 3787-D22, M.W. cutoff 12-14000 Da) durante toda la noche (dos cambios) contra 4 L de Tris Buffer Salino.

La solución dializada se filtra a través de un filtro de 0.22 μm, se inyecta en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 utilizando buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.6 y se analiza por HPLC en un equipo pH/C-900 ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech, en las siguientes condiciones: flujo 1 mL/min y gradiente de elución 0-0.3 NaCl aplicando un paso isocrático a 0.18 y 0.3 M durante 20 min. Como buffer de elución se utiliza Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, conteniendo NaCl 1.0 M. Se recogen fracciones de 0.5 mL y la elución se controla midiendo la absorbancia a 280 nm.

La actividad **CP** presente en las fracciones recogidas en el paso anterior se determina en una mezcla de reacción (100 μL) conteniendo (concentración final) buffer Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM, 150 μM del sustrato cromogénico Bz-Pro-Phe-Arg-p-NA y 10 mM de β-mercaptoetanol. El aumento en la absorbancia se mide a 410 nm durante 5 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

**Ensayo de inhibición de CP.**<sup>122,123</sup> Se incubó cruzipaina (6.0  $\mu\text{M}$ ) en una mezcla de reacción conteniendo (concentración final en 100  $\mu\text{L}$ ) PBS, pH 7.4, o amortiguador acetato de sodio, pH 5.3, 50 mM, DTT 5.0 mM y 100  $\mu\text{M}$  del compuesto a estudiar durante 5 min a TA. Posteriormente, se agrega el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC ( $K_m = 1.8 \mu\text{M}$ ) para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  y se controla el aumento en la fluorescencia (excitación 380 nm y emisión 460 nm) durante 10 min a temperatura ambiente en un espectrofotómetro y espectrofluorímetro Varioskan (Thermo, Waltham, MA). Los compuestos se agregan disueltos en DMSO y el control (100% de actividad enzimática) contiene la misma concentración de disolvente. La concentración de DMSO nunca excede el 10 %. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. Para estudiar la inhibición no específica se realizaron los ensayos en presencia del detergente no iónico Triton X-100. Una solución del detergente 0.02 % v/v se prepara en el momento en PBS o amortiguador acetato 100 mM (pH 7.4 y 5.3 respectivamente) y se agregan 50  $\mu\text{L}$  de esta solución para obtener una concentración final de detergente de 0.01 %. Dicha concentración fue evaluada previamente y mostró no interferir con la actividad enzimática.

**Actividad de tripanotona sintetasa (TryS).**<sup>124</sup> La actividad se mide indirectamente, por un ensayo acoplado, donde se sigue el consumo de ATP (o producción de ADP) por la **TryS** que es directamente proporcional a la oxidación de NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido) por la lactato deshidrogenasa (LDH). En este ensayo, la piruvato quinasa conecta ambas reacciones al regenerar ATP a partir de ADP y fosfoenol piruvato, y producir piruvato, que es reducido a lactato por la LDH utilizando NADH. La mezcla de reacción de 125  $\mu\text{L}$  en cubeta de cuarzo de 10 mm, se midió en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Uv-Vis. La mezcla de reacción contiene, DTT 0.8mM, GSH 0.8 mM, PEP 3.6mM, ATP 3.1mM, LDH 1.6U en buffer Hepes 100 mM con EDTA 0.5 mM y  $\text{MgSO}_4$  10 mM. La actividad enzimática se mide con 250 nM de **TryS**, NADH 250  $\mu\text{M}$ , incubando a temperatura ambiente hasta estabilización de la medida a 340 nm. La reacción comienza con el agregado de espermidina a una concentración de 10 mM. Para el ensayo de inhibición se pre incubó **TryS** 15 min en 10% DMSO. GSH se usa como control positivo a 2.82 mM para *TcTryS*.

**Ensayos de inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana del parásito.**<sup>118</sup> Para los ensayos de inhibición de esteroides de membrana del parásito, se incuban los compuestos (disueltos en DMSO) con el parásito, partiendo de una carga parasitaria de  $9.0 \times 10^6$  células/mL y  $6.0 \times 10^6$  células/mL, durante 72 y 120 h, respectivamente, a 28 °C a la concentración de  $2 \times \text{IC}_{50}$  y  $1 \times \text{IC}_{50}$ . Los parásitos se hacen crecer en el medio antes mencionado en las placas de

cultivo de 24 pocillos. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca excede el 0.4 %, se realiza un blanco (parásitos en ausencia de producto) con 0.4 % de DMSO para cada ensayo. Como control positivo se utiliza un compuesto con reconocida actividad de inhibición de la biosíntesis de esteroides de membrana, Terbinafine (Tbf) a 11 $\mu$ M. Los experimentos se realizan por triplicado. Todas las manipulaciones con las células vivas se hacen bajo cámara de seguridad de nivel dos, y todo el material utilizado es esterilizado previo a su uso.

Finalizada la incubación, se procede a la extracción de los esteroides de membrana. Para ello se centrifuga (centrífuga SIGMA 3K18) el contenido del pocillo de la placa de cultivo (1 mL aproximadamente) a 3000 rpm durante 15 min, se descarta el sobrenadante y el *pellet* se suspende con 1 mL de solución tampón de fosfato de sodio (0.05 M, pH 7.4), luego se centrifuga nuevamente a 3000 rpm durante 15 min y se descarta el sobrenadante. El *pellet* resultante se resuspende (agitando en vortex 1 min) en 1 mL de una solución de cloroformo/metanol (2:1) y se mantiene dicha suspensión a 4 °C durante 12 h. Posteriormente se agrega 1 mL de H<sub>2</sub>O saturada en NaCl y se extrae una vez con 600  $\mu$ L de cloroformo y una vez con 600  $\mu$ L de hexano, cuidando de no tomar fase acuosa.

El volumen extraído se siembra completamente en una placa de TLC, evaporando el disolvente bajo corriente de nitrógeno previamente. La siembra se hace con un capilar de vidrio y todo el material que se usa desde finalizadas las centrifugaciones debe ser de vidrio para evitar la contaminación con sustancias apolares que interfieran en el proceso cromatográfico de identificación. La cromatografía se realiza en sílicagel eluyendo con hexano, dos corridas para identificar escualeno, y una vez en hexano:acetato de etilo (8:2) para ergosterol.

**Búsqueda de otras dianas moleculares.**<sup>125</sup> Acoplamiento del **7F** a la resina de purificación de proteína. El derivado **7F** se une covalentemente a Sepharose activada con NHS 4 Fast Flow (GE Healthcare) según lo recomendado por el fabricante. Brevemente, la resina se lava tres veces con HCl frío 1 mM, inmediatamente se resuspende en tampón de acoplamiento (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl pH 8) con 10 moles de **7F** disuelto en DMSO por 1 mL de resina y se incuba 30 min a 20 °C, más cantidad equimolar de trietilamina. Después de la unión, los sitios libres son inactivados con tres ciclos de lavado con buffer A (1 M etanolamina, 0,5 M NaCl pH 8) y buffer B (0.1 M de acetato sódico, 0.5 M NaCl pH 4) La resina se resuspende en tampón de acoplamiento y se almacena a 4 °C hasta su uso. El acoplamiento se sigue por cromatografía de capa fina.

Los extractos de proteínas totales se preparan a partir del crecimiento exponencial de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm 28c ( $5 \times 10^7$  células por mL). Los parásitos se centrifugaron a 2000 g, se lavan tres veces con PBS frío (1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 130 mM NaCl, 2.6 mM KCl pH 7.4) y se resuspende en buffer de lisis frío (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% de NP40, Hepes 50 mM, DTT 1 mM, cóctel inhibidor de proteasa 1X (Sigma), 1 mM PMSF, pH 7.9). Los parásitos fueron lisadas con tres ciclos de congelación-descongelación con  $\text{N}_2$  líquido / 37 °C. Se centrifuga el lisado a 100000 g durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se utilizan inmediatamente o se conservan a -80 °C hasta su uso. Las proteínas se cuantifican con el reactivo de Bradford (Sigma).

Para la cromatografía de afinidad, la resina se lava dos veces con buffer de lisis y después se incuba con los extractos de proteínas durante 2 h a 4 °C (3 mg proteína/25  $\mu\text{L}$  de resina). Después de la incubación de proteínas, las perlas se lavan tres veces con buffer de lavado (150 mM NaCl, 0.25% de NP40, 50 mM Hepes pH 7.9). Las proteínas unidas se eluyen mediante incubación con buffer de muestra desnaturante (2% SDS, 10% de glicerol, 1.55% de DTT, 0.002% de azul de bromofenol, 67.5 mM Tris-HCl) durante 5 min a 95 °C. Las proteínas eluidas se separaron por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12% y se visualizan mediante tinción con plata como se ha descrito previamente.<sup>125,126</sup>

### **Análisis por espectrometría de masa.**<sup>127</sup>

Las bandas de proteínas seleccionadas fueron tratadas en gel con tripsina (Sequencing-grade Promega) durante la noche a 37 °C y los péptidos resultantes se extraen usando 60 % de acetonitrilo en 0.2 % TFA, se concentra por secado al vacío y se eliminan las sales utilizando micro-columnas C18 de fase reversa (OMIX Pipette tips, Varian). La elución de péptidos de las micro-columnas se realiza directamente en la placa de la muestra del espectrómetro de masa, con 3.0  $\mu\text{L}$  de solución de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico en 60 % de acetonitrilo, que contiene 0.2 % de TFA). Los espectros de masa para las mezclas de digestión se adquieren en un instrumento MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) en el modo de reflector, externamente calibrado usando una mezcla de péptidos estándares (Applied Biosystems). Se realizan experimentos de disociación inducida por colisión de MS / MS a los péptidos seleccionados. Las proteínas se identifican mediante búsquedas en la base de datos NCBI nr (2012) utilizando el motor de búsqueda MASCOT en el modo "Mascot sequence query". Se utilizan los siguientes parámetros de búsqueda: taxonomy, all entries; monoisotopic mass tolerance, 0.05 Da; fragment mass tolerance, 0.6 Da; oxidación de metionina como una

modificación variable y se permitió hasta un salto de escisión triptica. Se utilizan como criterios para la identificación de proteínas positivo, significant peptide ion and protein scores ( $p < 0.05$ ).

**Respiración Mitocondrial.**<sup>128, 129</sup> Las medidas se realizan en un oxímetro Cole-Parmer (Vernon Hills, IL) con un water-jacketed Clark-type electrode (model 5300; YSI, Yellow Springs, OH) en una cubeta de 2 mL, se mide el consumo de oxígeno directamente de  $3.0 \times 10^7$  p/mL de epimastigotes. El instrumento se calibra previamente con el medio de cultivo de los parásitos. Una vez que el consumo de oxígeno es estable, se incorpora hasta 100  $\mu$ M de compuesto, sin exceder el 1.0 % de DMSO y se observa la pendiente de consumo de oxígeno. También se ensayo con los parásitos pre incubados con 25  $\mu$ M de compuesto por 60 min.

El ensayo de respiración mitocondrial se lleva a cabo en un buffer de respiración (125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1.0 mM  $MgCl_2$ , 2.5 mM fosfato de potasio) a 28 °C. Se agrega 1 mM de ADP para estimular el consumo mitocondrial de oxígeno, Digitonina (64  $\mu$ M) para permeabilizar las membranas del parásito y Antimicina A (AA; 2.0  $\mu$ M) como inhibidores del complejo III. Se agrega TMPD 0.1 mM/ascorbato 10 mM para medir la actividad del complejo IV. EL compuesto disuelto en DMSO (<1% V/V) se agrega una vez el consumo de oxígeno es estable, con pulsos de 10  $\mu$ M hasta alcanzar una concentración de 100  $\mu$ M. La respiración se inhibió con la adición de 1 mM de KCN (control positivo).

---

### Bibliografía.

<sup>116</sup> Olivares-Illana V, Pérez-Montfort R, López-Calahorra F, Costas M, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez Puyou A, Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitrypanosomatid inhibitor, *Biochem*, **2006**, 45, 2556-2560.

<sup>117</sup> Csermely P, Agoston V, Pongor S, The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design, *TRENDS Pharm Sci*, **2005**, 26, 179-182.

<sup>118</sup> Alvarez G, Gerpe A, Benitez D, Garibotto F, Zacchino S, Graebin CS, Gomes da Rosa R, Eifler-Lima VL, González M, Cerecetto H, New limonene-hybrid derivatives with anti-*T. cruzi* activity, *Lett Drug Des Dis*, 2010, 7, 452-460.

<sup>119</sup> Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S, Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science*, **1995**, 269, 1069-1074.

- <sup>120</sup> Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Puyou A, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R, Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*, *Eur J Biochem*, **1997**, 244, 700-705.
- <sup>121</sup> Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U, Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, *Mol Biochem Parasitol*, **1989**, 33, 33-42.
- <sup>122</sup> Zanatta N, Amaral SS, dos Santos JM, de Mello DL, Fernandes L, Bonacorso HG, Martins MAP, Andricopulo, AD, Borchhardt DM, Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines, *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 10236-10243.
- <sup>123</sup> Caputto ME, Fabian LE, Benítez D, Merlino A, Ríos N, Cerecetto H, Moltrasio GY, Moglioni AG, González M, Finkielstein LM, Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Bioorg Med Chem*, **2011**, 19, 6818-6826.
- <sup>124</sup> Comini M, Menge U, Wissing J, Flohé L, Trypanothione synthesis in *crithidia* revisited, *J Biol Chem*, **2005**, 280, 6850-6860.
- <sup>125</sup> Trochine A, Alvarez G, Corre S, Faral-Tello P, Durán R, Batthyany CI, Cerecetto H, González M, Robello C, *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benzimidazole, *BMC Chem Bio*, **2013**, submitido, [http://www.biomedcentral.com/imedia/1559118576876611\\_article.pdf](http://www.biomedcentral.com/imedia/1559118576876611_article.pdf).
- <sup>126</sup> Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, 227, 680-685.
- <sup>127</sup> Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C, Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, *J Mass Spectrom*, **2007**, 42, 1422-1432.
- <sup>128</sup> Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de León A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R, Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants, *J Neurosci*, **2008**, 28, 4115-4122.
- <sup>129</sup> Genes C, Baquero E, Echeverri F, Maya JD, Triana O, Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens prodigiosin* in the alternative treatment of Chagas disease, *Parasit Vectors*, **2011**, 4, 1-8.





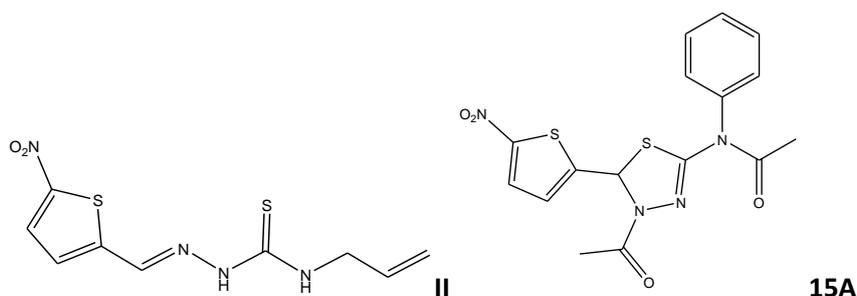
# CONCLUSIONES



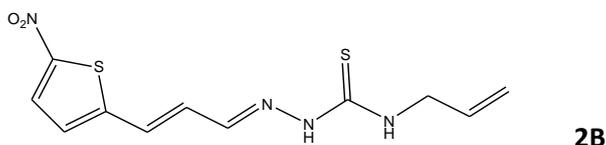
# Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron espectroscópicamente ochenta y cinco nuevos compuestos y se optimizaron los procesos de síntesis para aquellos que demostraron tener mejor actividad biológica obteniéndose rendimientos de buenos a excelentes. Los compuestos de las **Familias F y G**, sintetizados en paralelo, se obtienen todos con excelentes rendimientos. Se realizó el escalado de las moléculas con mejor actividad biológica de las **Familias F y G**, optimizando las reacciones para usar disolventes ambientalmente amigables (etanol y agua), por procedimientos sencillos y con reactivos de bajo costo. La isomería de los derivados de las **Familias F y G** es definida.

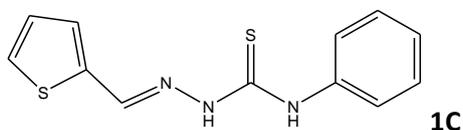
En el estudio de la actividad tripanosomicida frente a epimastigotes de *T. cruzi* de los 16 derivados de la **Familia A**, solo un derivado el **15A** mejora la actividad del **Líder II**. Pero este derivado resulto ser toxico para las células de mamífero.



Del rediseño, **Familia B**, surgen derivados con mejor actividad, por ejemplo **2B**, que lamentablemente no supera las etapas de estudios de toxicidad, especialmente mutagenicidad.

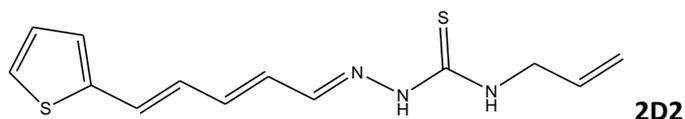


De la eliminación del grupo nitro por encontrarse, potencialmente, relacionado con la mutagenicidad, resultaron los derivados de la **Familia C**. Un sólo derivado mantiene actividad tripanosomicida, **1C**, mientras que el resto la pierde por completo. Se deduce que la actividad biológica de las **Familias A y B** está íntimamente relacionada con el grupo nitro.

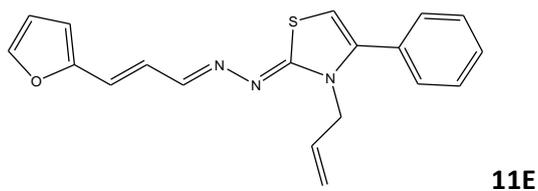


## Conclusiones

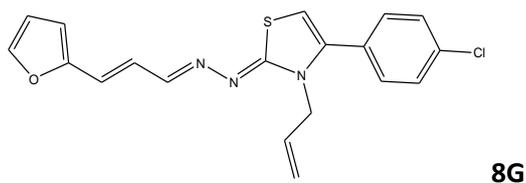
Por analogía con la **Familia B**, se incorporan insaturaciones entre el heterociclo y el enlace hidrazona, surgiendo los derivados de la **Familia D**. Algunos derivados poseen mejor actividad que el **Líder II**, por ejemplo **1D2** y **2D2**, pero carecen de actividad frente a amastigotes de *T. cruzi*.



Del uso de otros anillos aromáticos diferentes del 5-nitrotienilo, surge la **Familia E**. De la misma resultan derivados con muy buena actividad tripanosomicida, por ejemplo **8E**, **11E**, **15E** y **27E**. Específicamente, **11E** es activo frente a epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, en cepas Tulahuen 2, Y y los clones Dm 28c y CL Brener, presentando, además, baja toxicidad inespecífica.

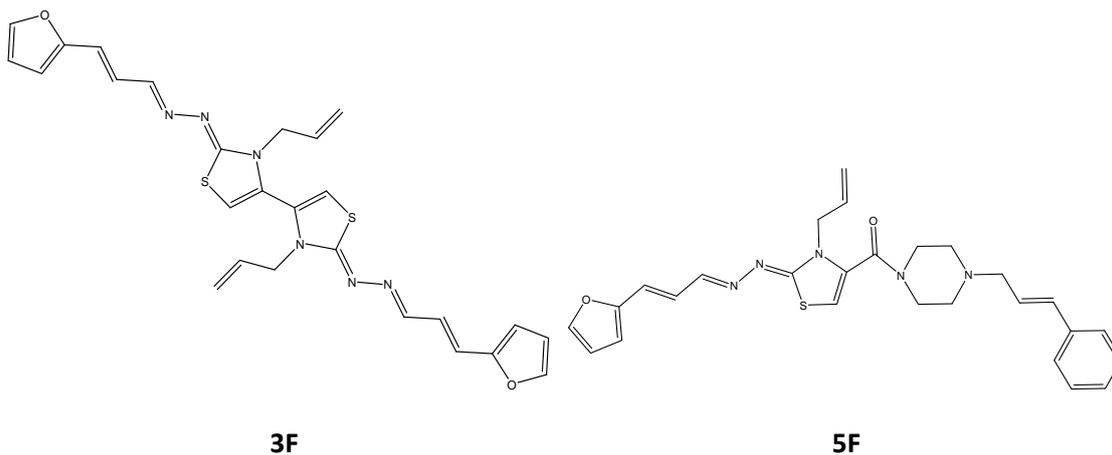


Se desarrollan derivados de **11E** para encontrar la estructura con máxima actividad tripanosomicida (**Familia G**). De esta familia resultan los derivados **13G** y **22G** con actividad moderada y **8G**, **20G** y **21G** con muy buena actividad tripanosomicida.



Paralelamente se diseña una familia de derivados, **Familia F**, potencialmente dirigidos a inhibir enzimas claves del parásito, CP, TryS o TIM. De este proceso se destacan los derivados **3F** y **5F**, con muy buena actividad tripanosomicida *in vitro* y sin efectos tóxicos ni mutagénicos.

# Conclusiones



Los derivados **3F**, **5F** y **8G** fueron estudiados *in vivo* en un modelo murino agudo de enfermedad de Chagas, demostrando un comportamiento altamente destacable. Por los perfiles biológicos y sintéticos de estos derivados se concluye que son candidatos a fármacos para la enfermedad de Chagas. Especialmente, el derivado **5F** posee una potencia similar a la de benznidazol y además demostró ser no genotóxico *in vivo*.

Se realizaron ciertos estudios bioquímicos como forma de identificar alguna de las dianas biológicas sobre las que actúan los compuestos más activos. De estos estudios se puede destacar que el derivado **5F** posee un mecanismo de acción aparentemente hacia múltiples dianas, pudiendo afectar enzimas esenciales del parásito como **TryS** y **CP**, e interviniendo en la biosíntesis de esteroides de membrana.

Por todo lo anterior, de este trabajo se concluye además que el derivado **5F** es un **potencial fármaco para la enfermedad de Chagas**.

