

Síntesis de Inhibidores Enzimáticos utilizando diferentes Herramientas de Diseño

Trabajo presentado por la QF. Chiara Pizzo para aspirar al título de

Doctor en Química

Director de Tesis: Dra. S. Graciela Mahler

Co-Director por PEDECIBA: Dr. Gustavo Salinas

Tribunal: Dr. Gustavo Seoane, Dra. Virginia López, Dr. Marcelo Comini

Cátedra de Química Farmacéutica Departamento de Química Orgánica Facultad de Química, Universidad de la República

Abril 2015

A mi familia

"La verdadera inteligencia actúa silenciosamente. Es en la quietud donde encontramos la creatividad y la solución a los problemas."

—Eckhart Tolle

Agradecimientos

A mis tutores:

Graciela, por elegirnos mutuamente a fines del 2007; por enseñarme como trabajar en el lab; por crecer juntas en este trayecto; por proponerme ir a Pittsburgh cuando recién empezaba, lo que me hizo crecer mucho profesional y personalmente; por proponerme viajar por todos lados a mostrar nuestro trabajo; por los aportes para esta tesis.

Gustavo, por aceptar ser mi co tutor; por recibirme en Inmuno y en el Pasteur, y enseñarme todo lo biológico, viniendo de un palo totalmente diferente; por los aportes para esta tesis.

A las instituciones financiadoras:

ANII por dos becas de posgrado (maestría y doctorado) las cuales fueron fundamentales para llevar a cabo mi trabajo. PEDECIBA por varias alícuotas de posgrado, muy útiles para insumos de laboratorio y costear pasajes/viáticos para concurrir a congresos.

A mis compañeros de lab:

Con los que empecé y aprendí mucho: Chelo, Danilo, Daniela, Diver, Eduardo, Gloria, Gumo, Ivana, Laura, Marga.

A los de todos los días, de ayer y hoy: Anderson, Ceci, Carlos, Cathe, Guille, José, Jaime, Lucia, Stella, Vero, Vale.

A los que empezaron conmigo: Rafa y Agustín.

A los compañeros de inmuno/Pasteur: Laura, Martin, Lucía, Hugo, Mariana.

A los compa de orgánica.

A los lugares donde hice pasantías:

Al Prof. JJ Cazzulo y Agustina Chidichimo de la Universidad de San Martín.

Al Prof. Peter Wipf de la Universidad de Pittsburgh.

A los colaboradores biológicos:

A la Lic. Gloria Yaluff del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de Asunción, Paraguay, por los ensayos de selenosemicarbazonas *in vivo* en ratones infectados con *T. cruzi.*

Al Dr. Carlos Robello y Msc. Paula Faral por los ensayos de compuestos *in vitro* en diferentes estadíos de *T. cruzi*.

A la Dra. Alejandra Rodríguez y Lic. Rafael González del Polo Tecnológico de Pando, por los HRMS.

A Horacio, Vero y Gumo por los ¹H RMN y ¹³C RMN.

A Fabiana, gracias por todo...

A mis amigas: Lu, Nany, Natu, Manu, Maggie, Nati.

A mis amores: Javier y Tito, mi alegría de todos los días.

A mi sister Lu que la tengo lejos y cerca al mismo tiempo 😊.

A mis viejos, por el apoyo incondicional, el empuje y darme todo en la vida!

A mi Familia TODA: mis abuelos, tíos, primos, los que están cerca y los que están lejos! Siempre presentes!

Índice

Abreviaturas

- 2. Utilización de Screening Virtual: síntesis y evaluación biológica de hidrazolil tiazolidinonas

2.1 Antecedentes	27
2.2 Objetivos específicos	30
2.3 Resultados y Discusión	31
2.4 Conclusiones	50
2.5 Parte experimental	51

3. Reemplazo isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas

3.1 Antecedentes	79
3.2 Objetivos específicos	82
3.3 Resultados y Discusión	82
3.4 Conclusiones	116
3.5 Parte experimental	118

4. Síntesis y evaluación biológica de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados

4.1	Antecedentes	151
4.2	Objetivos específicos	151

4.3 Resultados y Discusión	152
4.4 Conclusiones	172
4.5 Parte experimental	173

5. Síntesis y evaluación biológica de selenazoles

5.1 Antecedentes	195
5.2 Objetivos específicos	198
5.3 Resultados y Discusión	
5.4 Conclusiones	223
5.5 Parte experimental	

6. Conclusiones generales y Perspectivas

6.1 Conclusiones generales	253
6.2 Perspectivas	256

7. Anexo

MALDI-TOF	
Artículos publicados	269

Abreviaturas

¹³C RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ¹H RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón AcOH: ácido acético AcOEt: acetato de Etilo AcOPip: acetato de piperidonio AIBN: Azobisisobutironitrilo Bnz: Benznidazol Cz: Cruzipaína Cb: Catepsina b CH₂Cl₂: diclorometano DCC: diclohexil carbodiimida DMF: N,N-dimetilformamida DMSO: dimetil sulfóxido Et₃N: trietilamina EtOH: etanol g: gramo h: hora HBTU: hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilamonio HOBt: N-hidroxibenzotriazol HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation Hz: Hertz IR: infrarrojo *J*: constante de acoplamiento MeOH: metanol

mg: miligramo

min: minutos mL: mililitro mmol: milimol Nfx: Nifurtimox NOESY: Nuclear Overhauser Enhacement Spectroscopy p-TsOH: ácido p-toluensulfónico PF: Punto de Fusión PhMe: tolueno PhH: benceno ppm: partes por millón RMN: Resonancia Magnética Nuclear REA: Relación Estructura Actividad RW: Reactivo de Woollins SV: Screening Virtual tamb: temperatura ambiente THF: tetrahidrofurano TLC: Thin Layer Chromatography TSC: tiosemicarbazonas μ**w:** microondas °C: grados Celcius

Capítulo 1:

Introducción y Objetivos generales

Introducción 1.1

Enfermedades huérfanas 1.1.1

Se denominan enfermedades huérfanas o neglected tropical diseases (NTDs) a un grupo de enfermedades tropicales, que resultan endémicas en poblaciones de bajos recursos económicos, principalmente ubicadas en África, Asia y las Américas.¹

Existe una relación permanente entre estas enfermedades y la pobreza. En general, los poblados en estas regiones sufren la infección de diferentes parásitos, teniendo de esta manera varias NTDs simultáneamente.² Es por ello que es de vital importancia trabajar con un conjunto de fármacos para combatirlas.

Estas enfermedades se caracterizan por altos índices de mortalidad y morbilidad.³ Actualmente afectan a más de 1400 millones de personas⁴ en el mundo y causan alrededor de 534000 muertes anuales.⁵ Este número es substancialmente menor a los causados por infecciones del tracto respiratorio, diarrea, HIV-SIDA o malaria.

Las enfermedades catalogadas como NTDs incluyen las causadas por cuatro patógenos: protozoarios, helmintos, bacterias y virus. Algunas de las transmitidas por parásitos helmínticos incluyen filariasis, oncocercosis, dracunculiasis y esquitosomiasis, y las ocasionadas por bacterias como Buruli ulcer, lepra y tracoma.⁶ Dentro de las causadas por parásitos protozoarios del género tripanosoma se incluyen la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño⁷ y la leishmaniasis.⁸

¹ Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE (2007) Control of neglected tropical diseases. N Engl J Med 357: 1018-1027

² (a) Raso G, Luginbuhl A, Adjoua CA, Tian-Bi NT, Silué KD, et al. (2004) Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. Int J Epidemiol 33: 1092-1102; (b) Lammie PJ, Fenwick A, Utzinger J (2006) A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. Trends Parásitol 22: 313-321

³ World Health Organization (2012) Global report for research on infectious diseases of poverty. Geneva: WHO/TDR on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

⁴ http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

⁵ http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/fastfacts.html

⁶ Hotez PJ, Ottesen E, Fenwick A, Molyneux D (2006) The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. Adv Exp Biol Med 582: 22-33

⁷ Fèvre EM, Wissmann Bv, Welburn SC, Lutumba P (2008) The Burden of Human African Trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis 2: e333

1. Introducción y Objetivos generales

En la mayoría de los casos, las NTDs reciben menos inversión en términos de atención y acciones adecuadas, o son simplemente ignoradas por la comunidad en general.⁹ La poca redituabilidad de la inversión realizada por las compañías farmacéuticas al investigar en esta área ha llevado a su desmotivación frente al emprendimiento de nuevos proyectos vinculados con el descubrimiento de posibles candidatos a fármacos contra las NTDs.¹⁰ Actualmente, el desarrollo farmacéutico esta focalizado desproporcionalmente en enfermedades de sectores económicos ricos, como ser las cardíacas y el cáncer.¹¹

Existe una brecha entre la investigación académica y la industria farmacéutica, que desde hace ya un tiempo ha comenzado a acortarse, debido al apoyo de diferentes asociaciones que colaboran sobretodo en el financiamiento de proyectos de investigación en el tercer mundo. En este sentido, se creó *Global Network of Neglected Tropical Diseases*, una iniciativa del Sabin Vacine Institute, dedicada a transmitir y advertir la problemática. La misma, está trabajando hacia la búsqueda de la voluntad política y económica necesaria para eliminar hacia el año 2020 siete de las NTDs más comunes.¹²

Pese a la campaña de apoyo por parte de organizaciones como *Drugs for Neglected Diseases Initiative* e importantes donaciones realizadas por grupos como la fundación Bill & Melinda Gates, en los últimos diez años, el 4% de los fármacos nuevos y vacunas fueron dirigidos a NTDs, pero ninguna resultó efectiva para las enfermedades existentes.¹³

En la actualidad, la quimioterapia preventiva es una de las estrategias más utilizadas para la prevención de NTDs, aunque ciertas enfermedades no se afectan por esta iniciativa, como ser la enfermedad de Chagas, del sueño y la leishmaniasis. La estrategia en este sentido se basa en el control, diagnóstico precoz y tratamiento, al igual que controles en el vector de transmisión.¹⁴

⁸ Bern C, Maguire JH, Alvar J (2008) Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 2: e313

⁹ Pokhrel S, Reidpath DD, Allotey P (2011) Social sciences research in neglected tropical diseases 3: Investment in social science research in neglected diseases of poverty: a case study of Bill and Melinda Gates Foundation. Health Res Policy Syst 9: 2-6

¹⁰ Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M (2004) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. Nat Rev Drug Discovery 4: 727–740

¹¹ Hayden EC (2014) Projects set to tackle neglected diseases. Nature 505: 142

¹² http://www.globalnetwork.org/

¹³ Pedrique B, Strub-Wourgaft N, Some C, Olliaro P, Trouiller P, *et al.* (2013) The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. Lancet Glob Health 1: e371–e379

¹⁴ (a) Févre EM, Picozzi K, Jannin J, Welburn SC, Maudlin I (2006) Human African trypanosomiasis: epidemiology and control. Adv Parásitol 61: 167-221; (b) Yamagata Y, Nakagawa J (2006) Control of Chagas disease. Adv

1.1.2 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades huérfanas que afectan a más cantidad de personas en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 7-8 millones de personas están infectadas a nivel mundial, principalmente en Latinoamérica, donde es endémica (Figura 1.1).¹⁵ Debido a los movimientos migratorios, los casos de Chagas están en aumento en regiones como en Estados Unidos y Europa. Se estima que toma 20000 vidas por año y 100 millones de personas viven en zonas con riesgo de transmisión.¹⁶



Figura 1.1 Distribución de Chagas a nivel mundial, basados en información del período 2006-2010¹⁷

El agente etiológico de la enfermedad es el protozoario *Tripanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual se transmite a humanos y a otros vertebrados principalmente por transmisión vectorial, a través de la picadura de insectos triatominos (del latín triatominae). Los más relevantes son *Triatoma infestans* (vinchuca), *Rhodnius prolixus y Triatoma dimidiata* (Figura 1.2 A). En Uruguay la transmisión por *Triatoma infestans*, el vector principal, fue erradicada en 1997.¹⁸

Parásitol 61: 129-65; (c) Alvar J, Croft S, Olliaro P (2006) Chemotherapyin the treatment and control of leishmaniasis. Adv Parasitol 61: 223-274

¹⁵ (a) <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/;</u> (b) Tarleton RL, Curran JW (2012) Is Chagas disease really the "New HIV/AIDS of the Americas"? PLoS Negl Trop Dis 6: e1861

¹⁶ Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, et al. (2012) Chagas Disease: 'The New HIV/AIDS of the Americas'. PLoS Negl Trop Dis 6: e1498

¹⁷ World Health Organization (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases.

¹⁸ WHO (1998) Chagas disease, interruption of transmission in Uruguay. Weekly Epidemiol Rec 2: 1-4

Otros mecanismos de transmisión no vectoriales incluyen las transfusiones sanguíneas, los trasplantes de órganos y la transmisión de la madre al feto durante el embarazo.

La enfermedad consta de dos etapas: una aguda y otra crónica.

En humanos, la fase **aguda** dura de 6 a 8 semanas. En esta primera etapa, la mayoría de los pacientes infectados resultan asintomáticos, impidiendo ser detectada. Puede presentarse fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. Un signo inicial característico, en menos del 50% de las personas picadas por un triatomino, puede ser una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado (Figura 1.2 B). En el 5% de los pacientes infectados, puede ocasionar la muerte.¹⁹



Figura 1.2 (A) Vinchuca; (B) Niño con Chagas agudo con inflamación en el ojo derecho;²⁰ (C) Mega colon presente en etapa crónica²¹

Un porcentaje de aproximadamente 40% de los pacientes en fase aguda avanzan a la fase **crónica**, la cual puede durar de 10 a 30 años.¹⁹ En ésta, los parásitos permanecen latentes bajo la forma de amastigote, principalmente en el músculo cardíaco y digestivo, (Figura 1.2 C) generando hasta en un 30% trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas.^{15a} El corazón es el órgano más afectado y con los años, arritmias u otras fallas cardiacas, causan la muerte.^{15a}

¹⁹ Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. Lancet 375: 1388–1402

²⁰ Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), número de identificación #2617

²¹ Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE (2007) The challenges of Chagas Disease—grim outlook or glimmer of hope? PLoS Med 4: e332

La farmacoterapia disponible para la enfermedad recae en dos fármacos descubiertos entre 1960 y 1970: Nifurtimox y Benznidazol, los cuales han sido utilizados durante los últimos 40 años. Con estos, no se ha visto un control notorio de la enfermedad²² y además presentan severos efectos adversos (Figura 1.3).²³



Figura 1.3 Fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad

Ambos fármacos son prodrogas, las cuales se activan luego de la reducción del grupo nitro, por nitrorreductasas del parásito.²⁴ El mecanismo de acción de estos derivados nitro aromáticos no es claro; se cree que el Benznidazol actuaría a través de la unión covalente de intermedios de la nitro reducción²⁵ a macromoléculas (lípidos, ADN y proteínas) modificando su actividad.²⁶ En cambio, el Nifurtimox actuaría por producción de metabolitos del oxígeno, como ser superóxido y peróxido de hidrógeno, que resultan tóxicos para los parásitos, que carecen de mecanismos de desintoxicación.²⁷

Ambos son efectivos durante la etapa aguda (menos de 6 meses desde la infección)²⁸ y son indicados para el tratamiento en los comienzos de la etapa crónica, y en casos de niños con transmisión congénita.^{15a} Pese a que aún no se ha logrado un tratamiento adecuado para el

²² Wilkinson SR, Kelly JM (2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med 11: e31

²³ Lannes-Vieira Joseli, de Araújo-Jorge TC, de Nazaré Correia Soeiro M, Gadelha P, Corréa-Oliveira Rodrigo (2010) The Centinennial of the Discovery of Chagas Disease: Facing the Current Challenges. PLoS Negl Trop Dis 4: e645

²⁴ (a) Hall BS, Bot C, Wilkinson SR (2011) Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. J Biol Chem 286: 13088-13095; (b) Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proc Natl Acad Sci USA 105: 5022-5027

²⁵ Urbina JA (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop 115: 55-68

²⁶ (a) Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ (1988) Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from Trypanosoma cruzi. Experientia 44: 880–881; (b) Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, *et al.* (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 146: 601–620

 ²⁷ Docampo R (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interact 73:
1-27

²⁸ Guedes PM, Silva GK, Gutierrez FR, Silva JS (2011) Current status of Chagas disease chemotherapy. Expert Rev Anti Infect Ther 9: 609-620

Chagas crónico, estudios recientes muestran una eficacia significativa al administrar Benznidazol²⁹ y proponen su administración durante todas las etapas de la enfermedad.³⁰

El Benznidazol ocupa la primera línea de tratamiento frente a la enfermedad de Chagas pues posee mejores perfiles de actividad y de seguridad que Nifurtimox. De todas maneras, ente 12-18% de los pacientes suspenden el tratamiento por los efectos adversos.³¹ Para evitar esto, se han sugerido cambios en los tratamientos de dosificación prolongados y en las terapias combinadas.³² Se necesitan nuevas opciones terapéuticas no sólo por la toxicidad sino por la susceptibilidad del Benznidazol y Nifurtimox a las diferentes cepas de *T.cruzi* presentes.

Recientemente se han evaluado como posibles agentes antichagásicos a dos potentes antifúngicos como son los derivados de triazol, el Ravuconazol y Posaconazol, conocidos inhibidores en la biosíntesis del ergosterol (Figura 1.4).³³ Estos inhibirían la síntesis de la pared celular de *T. cruzi*, alterando de esta manera el crecimiento y supervivencia del parásito. Han mostrado una importante actividad *in vitro* e *in vivo* en modelo murino de Chagas agudo, incluyendo aquellas cepas resistentes al Benznidazol.³⁴

²⁹ (a) Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Moreno S, Fernandez-Gonzalez MC, Zamora J, *et al.* (2009) Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. J Antimicrob Chemother 64: 1139- 1147; (b) Bern C (2011) Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. N Engl J Med 364: 2527-2534

³⁰ (a) Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, *et al.* (2013) A serological, parásitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Mem Inst Oswaldo Cruz 108: 873–880; (b) Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, *et al.* (2014) Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. Antimicrob Agents Chemother 58: 635–639

³¹ Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti G, *et al.* (2009) Side effects of Benznidazol as treatment in chronic Chagas' disease: fears and realities. Expert Rev Anti Infect Ther 7: 157-163

³² Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL (2014) New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure Trypanosoma cruzi infection on mice. J Infect Dis 209: 150–162.

³³ Urbina JA (2009) Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 311–318

³⁴ (a) Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ (2003) In vitro and in vivo activities of ravuconazole on Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease. Int J Antimicrob Agents 21: 27-38; (b) Olivieri BP, Molina JT, de Castro SL, Pereira MC, Calvet CM, *et al.* (2010) A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. Int J Antimicrob Agents 36: 79–83; (c) Pinazo MJ, Espinosa G, Gallego M, Lopez-Chejade PL, Urbina JA, *et al.* (2010) Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. Am J Trop Med Hyg 82: 583–587



Figura 1.4 Potentes antifúngicos con actividad tripanocida

En 2011, comenzaron los estudios de fase clínica II de una prodroga de Ravuconazol denominada E1224, para el tratamiento de Chagas crónico, pero aun no ha finalizado.³⁵ A fines de 2013 se concluyó el estudio en fase clínica II de la coadministración de Posaconazol con Benznidazol, el cual demostró la cura parasitológica de las muestras sanguíneas y la seguridad y tolerancia de ambos fármacos.³⁶

Asimismo, también se confirmó la actividad tripanocida de la Amiodarona, conocido fármaco antiarrítmico, la cual sinergiza la actividad de Posaconazol.³⁷ Este año, finalizó el ensayo clínico en fase clínica II de Posaconazol en humanos, administrado individualmente para el tratamiento de Chagas agudo, pero aún no se han publicado los resultados.³⁸

El cribado fenotípico representa un método efectivo para identificar blancos farmacológicos desconocidos y establecer una vista más amplia de la actividad antiparasitaria que puede tener un fármaco, pudiendo ser efectiva para uno o múltiples blancos.³⁹ Particularmente, las técnicas de high throughput screening (HTS) son de gran

³⁵ <u>https://clinicaltrials.gov</u> Proof-of-Concept Study of E1224 to Treat Adult Patients With Chagas Disease ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01489228

³⁶ <u>https://clinicaltrials.gov</u> Protocol for Phase II Clinical Trial, Randomized and open for etiological treatment of chronic Chagas Disease with Posaconazole and Benznidazole. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01162967

³⁷ Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, *et al.* (2006) Amiodarone has intrinsic anti-Trypanosoma cruzi activiy and acts synergistically with posaconazole. J Med Chem 49: 892-899

 ³⁸ <u>https://clinicaltrials.gov</u> Phase II Proof-of-Activity Study of Oral Posaconazole in the Treatment of Asymptomatic Chronic Chagas Disease (Phase 2, Protocol No. Po5267). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01377480
³⁹ Sykes ML, Avery VM (2013) Approaches to protozoan drug discovery: phenotypic screening. J Med Chem 56: 7727–7740

interés para el desarrollo de fármacos contra *T.cruzi*,⁴⁰ y últimamente ha surgido el interés de empresas farmacéuticas en el screening de bibliotecas de compuestos.⁴¹

1.1.3 Ciclo de vida del Tripanosoma Cruzi⁴²

El ciclo de vida de *T. cruzi* transcurre entre dos hospederos, uno invertebrado (el insecto vector) y uno vertebrado. El parásito alterna entre cuatro estadíos diferentes: **tripomastigotes** metacíclicos, **amastigotes**, **tripomastigotes** celulares y **epimastigotes** (Figura 1.5).¹⁹



Figura 1.5 Ilustración de los estadíos del ciclo de vida del parásito T. cruzi⁴³

El ciclo de vida del parásito comienza cuando un insecto de la familia *Reduviidae* (*Triatoma infestans o* Vinchuca) succiona la sangre de algún vertebrado (perro, gato, mono, etc) infectado con los **tripomastigotes** que circulan en su sangre. Los parásitos son lisados en el estómago del insecto y en este estadío sobreviven durante un tiempo hasta transformarse en **epimastigotes**. Estos migran hacia el intestino donde se dividen y en este proceso, los **epimastigotes** no infectivos se transforman en **tripomastigotes** altamente infectivos, conocidos como **tripomastigotes** metacíclicos. Estos luego son liberados con las heces y orina del insecto (Figura 1.6).

⁴⁰ Alonso-Padilla J, Rodriguez A (2014) High Throughput Screening for Anti-Trypanosoma cruzi Drug Discovery. Plos Negl Trop Dis 8: e3259

⁴¹ Bustamante JM, Park HJ, Tarleton RL (2011) Report of the 2nd Chagas drug discovery consortium meeting, held on November 2010; Atlanta GA, USA. Expert Opin Drug Discov 6: 965–973

⁴² de Souza W, de Carvalho TMU, Barrias ES (2010) Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol 2010: 1-18

⁴³ Toso M A, Vial U F, Galanti N (2011) Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chile 139: 258-266



Figura 1.6 Ciclo de Vida de T. cruzi44

El estadío **tripomastigote** es altamente infectivo para varias especies de mamíferos, incluyendo los humanos. En este caso, la infección ocurre a partir de la inoculación directa de los desechos del insecto infectado en la mucosa ocular o en la piel dañada luego de la picadura. Los **tripomastigotes** metacíclicos (forma infectiva, flagelada) invaden luego las células adyacentes a la picadura convirtiéndose en **amastigotes** (forma intracelular, redondeada sin flagelo) y se multiplican. Posteriormente se transforman en **tripomastigotes** celulares, rompen la célula donde están contenidos y se liberan nuevamente al torrente sanguíneo, para así infectar nuevas células, quedar en el torrente sanguíneo o colonizar tenido muscular o nervioso, formando nidos de **amastigotes** (Figura 1.6).

Otros insectos pueden ingerir parásitos a través de sangre infectada, los cuales en el tracto digestivo del insecto viran a **epimastigotes**, se replican, alcancen el recto y allí viran a **tripomastigotes** metacíclicos, completando el ciclo de vida del parásito (Figura 1.6).

⁴⁴ DPD CDC <u>http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm</u>

1.1.4 Cisteín proteasa de T. cruzi: Cruzipaína (Cz)

La Cruzipaína (Cz) es la catepsina tipo-L-cisteín proteasa responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadíos del ciclo de vida del *T. cruzi*. Esta es la cisteín proteasa más abundante de *T. cruzi* y es codificada por más de 100 copias de genes polimórficos.⁴⁵ De esta manera, es expresada como una compleja mezcla de isoformas debida a la simultánea expresión de varios genes.⁴⁶ La enzima recombinante cruzaína, que es en general utilizada en los screening biológicos de compuestos, tiene una actividad homogénea y carece de la extensión C terminal y la glicosilación presente en la enzima nativa.⁴⁷

Se han descripto en literatura diferentes valores de inhibición para las isoformas de Cz y cruzaína.^{46,48} A modo de ejemplo, Cz-2 es aproximadamente 30 veces menos sensible a la inhibición por E-64 que cruzaína.⁴⁹ El trabajo de Lima *et al.* es por lo tanto uno de los pocos que utiliza Cz para evaluar bibliotecas de compuestos.⁴⁹

Cz ha sido localizada en diferentes compartimentos del parásito.⁵⁰ En la forma epimastigote, la proteasa está localizada en el lisosoma; en la forma amastigote, estadío infectivo del parásito, la misma no sólo está en dicho compartimento sino que sobre la superficie del parásito, en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped y así directamente involucrado en la relación huésped-parásito.⁵¹

⁴⁵ Serveau C, Lalmanach G, Juliano M, Scharfstein J, Juliano L, *et al.* (1996) Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitor. Biochem J 313: 951-956

⁴⁶ Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch ACC, Petterson U, *et al.* (1992) The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. Mol Biochem Parasitol 50: 225-234

⁴⁷ (a) Eakin AE, Mills AA, Harth G, Mc Kerrow JH, Craik CS (1992) The Sequence, Organization, and Expression of the Major Cysteine Protease (Cruzain) from Trypanosoma cruzi. J Biol Chem 267: 7411-7420; (b) Duschak VG, Couto AS (2009) Cruzipain, and the Major Cysteine Protease of Trypanosoma cruzi: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. Curr Med Chem 16: 3174-3202

⁴⁸ Judice WAS, Cezari MHS, Lima APCA, Scharfstein J, Chagas JR, *et al.* (2001) Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. Eur J Biochem 268: 6578-6586

⁴⁹ Lima APCA, dos Reis FCG, Serveau C, Lalmanach G, Juliano L, *et al.* (2001) Cysteine protease isoforms from Trypanosoma cruzi, cruzipain 2 and cruzain present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. Mol Biochem Parasitol 114: 41-52

⁵⁰ Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ (1994) Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. FEMS Microbiol Lett 124: 81–86

⁵¹ McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, *et al.* (2009) Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 263–269

Si bien la función exacta de la enzima no es conocida, se cree estaría involucrada en la degradación de proteínas proveniente de la sangre del insecto vector. Dicha hipótesis está basada en la función de las proteasas homólogas para Plasmodium falciparum y Schistosoma mansoni cuya función es la degradación de la hemoglobina.⁵²

Las funciones incluirían:

1) digestión lisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito,

2) protección contra la respuesta inmune del hospedador,

 participación en la penetración del tripomastigote en la célula del mamífero, pues se sabe que inhibidores de proteasas inhiben parcialmente este proceso,

4) participación en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito.

Es así que los inhibidores de Cz serían potencialmente activos en todas las fases de la enfermedad (aguda y crónica) y no sólo en los primeros estadíos de la misma, como es el caso de los fármacos actualmente disponibles. Al ser autocatalítica, se cree que la inhibición de Cz produce una acumulación del precursor químico de esta proteinasa dentro del aparato de Golgi del parásito, lo que ocasionaría un posterior shock osmótico y la muerte celular.53

1.1.5 Inhibidores de Cz

Existe una clara necesidad de encontrar nuevos fármacos para tratar la enfermedad de Chagas. Con el transcurso de los años se han investigado varios blancos moleculares para el desarrollo de nuevos agentes anti T. cruzi, que incluyen la lanosterol 14-demetilasa,54 tripanotiona reductasa,⁵⁵ cruzaína,⁵⁶ trans-sialidasa⁵⁷ y fosfatidil inositol 3-quinasa.⁵⁸

⁵² (a) Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, et al. (1998) Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in Trypanosoma cruzi. J Cell Sci 111: 597-606; (b) Choe Y, Brinen LS, Price MS, Engel JC, Lange M, et al. (2005) Development of Alpha-Keto-based Inhibitors of Cruzain, a Cysteine Protease Implicated in Chagas Disease. Bioorg Med Chem 13: 2141-56; (c) Cazzulo J, Stoka V, Turk V (2001) The Major Cysteine Proteinase of Trypanosoma cruzi: A Valid Target for Chemotherapy of Chagas Disease. Curr Pharm Design 7: 1143-1156

⁵³ Rodrigues GC, Aguiar AP, da Silva Gonçalves Vianez JL, Macrae A, de Melo ACN, et al. (2010) Peptidase inhibitors as a possible therapeutic strategy for Chagas disease. Curr Enz Inhib 6: 183–194

⁵⁴ Buckner FS, Urbina JA (2012) Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. Int J Parasitol Drug Resist 2: 236-242

⁵⁵ Lantwin CB, Schlichting I, Kabsch W, Pai EF, Krauth-Siegel RL (1994) The structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state. Proteins 18: 161-173

⁵⁶ Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH (1998) Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection. J Exp Med 188: 725-734

Particularmente, en lo que se refiere a inhibidores de cruzaína se han investigado compuestos del tipo peptídicos como las ureas,⁵⁹ las hidrazonas,⁶⁰ triazoles⁶¹ y tiosemicarbazonas.⁶² En la Figura 1.7 se muestran algunos de los inhibidores reversibles del tipo tiosemicarbazonas,⁶² triazol ariloxi metil cetonas y mercaptometilcetonas.^{61a}



Figura 1.7 Inhibidores reversibles conocidos de cruzaína

Inhibidores selectivos de esta proteasa involucran invasión a la célula huésped,⁶³ bloquear la proliferación de epimastigotes y amastigotes e interrumpir la metaciclogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos).

⁵⁷ Dc-Rubin SS, Schenkmanc S (2012) Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. Cellular Microbiology 14: 1522-1530

⁵⁸ Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL (2001) Trypanosoma cruzi: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. Exp Cell Res 264: 211-218

⁵⁹ Du X, Hansell E, Engel JC, Caffrey CR, Cohen FE, *et al.* (2000) Aryl ureas represent a new class of antitrypanosomal agents. Chem Biol 7: 733-742

⁶⁰ (a) dos Santos Filho JM, Leite ACL, de Oliveira BG, Moreira DRM, Lima MS, *et al.* (2009) Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4- substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agents. Bioorg Med Chem 17: 6682-6691; (b) Romeiro NC, Aguirre G, Hernández P, González M, Cerecetto H, *et al.* (2009) Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. Bioorg Med Chem 17: 641-652

⁶¹ (a) Brak K, Doyle PS, McKerrow JH, Ellman JA (2008) Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzaína. J Am Chem Soc 130: 6404-6410; (b) Barrett KT, Fuchi N, Debnath M, Ang K, Engel JC, *et al.* (2010) Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. J Med Chem 53: 1763-1773; (c) Franklim TN, Freire-de-Lima L, Diniz JNS, Previato JO, Castro RN, *et al.* (2013) Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. Molecules 18: 6366-6382

⁶² Cohen FE, Du X, Guo C, McKerrow JH (2004) Thiosemicarbazone and semicarbazone inhibitors of cysteine proteases and methods of their use. US Pattent Application 20040014801

⁶³ Meirelles MNL, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, *et al.* (1992) Inhibitors of the mayor cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. Mol Biochem Parasitol 52: 175–184

Esta enzima está muy relacionada estructuralmente con la familia de cisteín proteasas humanas, las catepsinas, por lo que es importante desarrollar inhibidores selectivos sobre Cz.⁶⁴ Recientemente, se describieron los primeros inhibidores reversibles de Cz activos vía oral, capaces de curar la infección de T.*cruzi* en modelo *in vivo*.⁶⁵

Se han realizado estudios de inhibidores irreversibles de cruzipaína, los cuales han demostrado el impacto de inhibir esta enzima en la vida del parásito *T.cruzi*. Dentro de éstos, la más importante es la vinil sulfona K777 (también conocido como K11777), que ha mostrado curar la infección por *T. cruzi* en Chagas agudo y crónico, aparte de disminuir los daños cardiacos en modelo de perros (Figura 1.8).⁶⁶ También, se ha visto su eficacia en modelos preclínicos de la enfermedad.⁵¹

Recientemente se han identificado otros inhibidores irreversibles, particularmente una alfa ariloximetil cetona mostró ser eficaz en modelo murino (Figura 1.8).⁶⁷ Este tipo de inhibidores contienen grupos electrofílicos, como vinil sulfonato, tetrafluoro fenoximetil cetona, y epoxicetona, los cuales reaccionarían con un residuo de cisteína del sitio activo de Cz, quedando unido covalentemente.



Figura 1.8 Potentes Inhibidores irreversibles de cruzaína

⁶⁴ Nicoll-Griffith DA (2012) Use of cysteine-reactive small molecules in drug discovery for trypanosomal disease. Expert Opin Drug Discov 7: 353-366

⁶⁵ Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, *et al.* (2014) Reversible Cysteine Protease Inhibitors Show Promise for a Chagas Disease Cure. Antimicrob Agents Chemother 58: 1167–1178

⁶⁶ (a) Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, *et al.* (2005) A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by Trypanosoma cruzi. Antimicrob Agents Chemother 49: 5160-5161; (b) Doyle PS, Zhou YM, Engel JC, McKerrow JH (2007) A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. Antimicrob Agents Chemother 51: 3932-3939

⁶⁷ Brak K, Kerr ID, Barrett KT, Fuchi N, Debnath M, *et al.* (2010) Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. J Med Chem 53: 1763-1773

El inconveniente con este tipo de inhibidores es que también podrían inhibir proteasas del hospedero, generando efectos adversos no deseados. Por este motivo existe un particular interés en el desarrollo de inhibidores reversibles, específicos para Cz, de manera de lograr una terapéutica más segura para la enfermedad de Chagas.

1.1.6 Selenio y compuestos organoselenados

El Selenio (Se) es un micronutriente esencial; sus beneficios a nivel nutricional están asociados a su incorporación en las proteínas formando las selenoproteínas. Se han identificado 25 selenoproteínas en humanos, pero para muchas de ellas se desconoce su función.⁶⁸ Las selenoproteínas incluyen enzimas como las Glutatión peroxidasas (GPX), Tiorredoxin reductasas (TrxR) y las Iodotironin deiodinasas (ID). Se ha determinado que estas juegan un rol importante en la regulación redox como moduladores de las especies reactivas de oxígeno (ROS).⁶⁹

Este nutriente se adquiere a través de la dieta en su forma orgánica (seleno-L-metionina, metil seleno–L-cisteína, selenocistina)⁷⁰ o en su forma inorgánica (selenito, selenato).⁷¹ Su forma más predominante en la dieta es como selenometionina. Los niveles normales de Se dependen de la zona geográfica y de la cantidad de selenometionina que se consume, al igual que la expresión individual de selenoproteínas.⁷²

El consumo deficiente de este micronutriente tiene asociado efectos biológicos adversos como miocardiopatía (enfermedad de Keshan), algunos tipos de cáncer, infecciones, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson), entre otros.⁷³ Por el contrario, algunos estudios en suplementación (NHANES, SELECT) no han podido evidenciar los beneficios del selenio contra el cáncer de próstata, pero determinaron que altas

⁶⁸ Moghadaszadeh B, Beggs AH (2006) Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. Physiology 21: 307-315

⁶⁹ Muecke R, Schomburg L, Buentzel J, Kisters K, Micke O (2010) Selenium or no selenium-that is the question in tumor patients: a new controversy. Integr Cancer Ther 9: 136–141

⁷⁰ Sunde RA. Selenium. In: Bowman B, Russell R, eds. Present Knowledge in Nutrition. 9th ed. Washington, DC: International Life Sciences Institute; 2006: 480-97

⁷¹ Terry EN, Diamond AM. Selenium. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. Present Knowledge in Nutrition. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell; 2012:568-87

⁷² Méplan C, Nicol F, Burtle BT, Crosley LK, Arthur JR, *et al.* (2009) Relative abundance of selenoprotein P isoforms in human plasma depends on genotype, Se intake, and cancer status. Antioxid Redox Signal 11: 2631-2640

⁷³ Papp LV, Holmgren A, Khanna KK (2010) Selenium and selenoproteínas in health and disease. Antioxid Redox Signal 12: 793–795

concentraciones de Se en plasma están asociadas con un incremento en el riesgo de contraer diabetes tipo 2.74

Aunque los mecanismos detrás de los efectos adversos de altas dosis de Se aún no están dilucidados, se cree involucran daño en el ADN e inducción del stress oxidativo.75 Se cree que el selenuro de hidrogeno tiene un papel clave en la toxicidad del selenio,⁷⁶ pero su mecanismo de acción ha sido poco estudiado. Recientemente, tomando como modelo S. *cerevisiae* se evidenció que el selenuro de hidrogeno (H_2 Se, HSe₂, Se⁻²), en presencia de O_2 , daña el ADN in vitro.77

Se han identificado dos miocardiopatías asociadas al déficit de selenio, la enfermedad de Keshan y la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Keshan es una cardiopatía que surge por una baja en los niveles de selenio, asociados a la poca cantidad de este micronutriente en la región de Keshan, en China.⁷⁸ Hasta el momento se desconoce el mecanismo mediante el cual el selenio influye en la enfermedad,⁷⁹ pero se ha visto que su suplementación previene las cardiopatías asociadas, entre otros efectos.^{78a}

La enfermedad de Chagas también parecería estar asociada con la captura de selenio. Algunos pacientes infectados con T. cruzi desarrollan miocardiopatías, siendo esta una de las razones de fallas cardíacas que se presentan.⁸⁰ Pacientes con la enfermedad poseen bajos niveles de selenio y tienden a incrementar la disfunción cardíaca, lo que sugiere la función protectora de las selenoproteínas. Tal como ocurre con la enfermedad de Keshan, los mecanismos mediante los cuales ocurre esto no han sido establecidos.

⁷⁴ Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E (2009) Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004. Environ Health Perspect 117: 1409-1413

⁷⁵ Letavayova L, Vlasakova D, Vlckova V, Brozmanova J, Chovanec M (2008) Rad52 has a role in the repair of sodium selenite-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Mutat Res 652: 198-203

⁷⁶ (a) Tarze A, Dauplais M, Grigoras I, Lazard M, Ha-Duong NT, et al. (2007) Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 282: 8759– 8767; (b) Brozmanova' J, Manikova' D, Vlckova' V, Chovanec M (2010) Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. Arch Toxicol 84: 919–938

⁷⁷ Peyroche G, Saveanu C, Dauplais M, Lazard M, Beuneu F, et al. (2012) Sodium Selenide Toxicity Is Mediated by O2-Dependent DNA Breaks. PLoS One 7: e36343

⁷⁸ (a) Xu GL, Wang SC, Gu BQ, Yang YX, Song HB, et al. (1997) Further investigation on the role of selenium deficiency in the aetiology and pathogenesis of Keshan disease. Biomed Environ Sci 10: 316–326; (b) Loscalzo J (2014) Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. N Engl J Med 370: 1756–1760

⁷⁹ Beck MA, Matthews CC (2000) Micronutrients and host resistance to viral infection. Proc Nutr Soc 59: 581–585 ⁸⁰ Rossi MA, Bestetti RB (1995) The challenge of Chagasic cardiomyopathy: the pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. Cardiology 86: 1-7

Se ha evaluado la relación del selenio con las cardiopatías asociadas a la enfermedad de Chagas.⁸¹ Hay evidencia en modelo animal⁸² que bajos niveles del micronutriente empeoran las cardiopatías asociadas a esta enfermedad y su suplementación es beneficiosa.⁸³ Se ha propuesto un estudio clínico de suplementación con selenito de sodio (100 µg) diarios durante 1 año;⁸⁴ actualmente, el mismo está en fase III de ensayos clínicos, reclutando pacientes.⁸⁵

Organoselenados biológicamente activos

El interés en el uso de compuestos organoselenados en bioquímica comenzó cuando se comprobó que los derivados de este tipo resultaban menos tóxicos que los inorgánicos.⁸⁶ A partir de allí, se ha comenzado a trabajar en la síntesis de este tipo de compuestos con fines medicinales.⁸⁷

Ebselen es uno de los organoselenados más relevantes, el cual ha mostrado actividad antioxidante contra el daño celular reduciendo el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos,⁸⁸ lo que se asemeja a la actividad antioxidante de la Glutatión peroxidasa

⁸¹ Rivera MT, de Souza AP, Moreno AH, Xavier SS, Gomes JA, *et al.* (2002) Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. Am J Trop Med Hyg 66: 706–712

⁸² (a) de Souza AP, Melo de Oliveira G, Nève J, Vanderpas J, Pirmez C, *et al.* (2002) Trypanosoma cruzi: host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. Exp Parásitol 101: 193–199; (b) Gomez RM, Solana ME, Levander OA (2002) Host selenium deficiency increases the severity of chronic inflammatory myopathy in Trypanosoma cruzi-inoculated mice. J Parásitol 88: 541–547

⁸³ (a) de Souza AP, de Oliveira GM, Vanderpas J, de Castro SL, Rivera MT, *et al.* (2000) Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental Trypanosoma cruzi infection. Parásitol Res 91: 51–54; (b) de Souza AP, Jelicks LA, Tanowitz HB, Olivieri BP, Medeiros MM, *et al.* (2010) The benefits of using selenium in the treatment of Chagas disease: prevention of right ventricle chamber dilatation and reversion of Trypanosoma cruzi-induced acute and chronic cardiomyopathy in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 746–751

⁸⁴ Alvarenga Americano do Brasil PE, de Souza AP, Hasslocher-Moreno AM, Salles Xavier S, Lambert SR, *et al.* (2014) Selenium Treatment and Chagasic Cardiopathy (STCC): study protocol for a double-blind randomized controlled trial. Trials 15: 388

⁸⁵<u>https://clinicaltrials.gov</u> Selenium Treatment and Chagasic Cardiopathy (STCC) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00875173

⁸⁶ Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology (1993) Klayman DL, Gunther WHH, Eds.; Wiley: New York

⁸⁷ Shamberger RJ. Biochemistry of Selenium; Plenum Press: New York, 1983

⁸⁸ (a) Ramakrishnan N, Kalinich JF, McClain DE (1996) Ebselen inhibition of apoptosis by reduction of peroxides. Biochem Pharmacol 51: 1443-1451; (b) Yang CF, Shen HM, Ong CN (1999) Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. Biochem Pharmacol 57: 273-279

(GPx) (Figura 1.9 A).⁸⁹ Se han descripto derivados de Ebselen como inhibidores de sintasas de oxido nítrico (NOS),⁹⁰ lipoxigenasas⁹¹ y como antifúngicos⁹² y antibacterianos.

El Etaselen ha mostrado ser un agente anticancerígeno de baja toxicidad en modelo animal y en este momento está en estudios clínicos, fase I (Figura 1.9 A). Su efectividad se ha demostrado en varias líneas celulares humanas y en modelo murino.⁹³

También se han descripto algunos organoselenados fotoactivos útiles como sensibilizadores en la terapia fotodinámica (PDT) (Figura 1.9 B).⁹⁴



Figura 1.9 Organoselenados biológicamente activos

⁸⁹ Sies H (1994) Ebselen: a glutathione peroxidasa mimic. Methods Enzymol 234: 476-482

⁹⁰ Wang JF, Komarov P, Sies H, de Groot H (1992) Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by Ebselen in rat Kupffer cells. Hepatology 15: 1112-1116

⁹¹ Tabuchi Y, Sugiyama N, Horiuchi T, Furusawa M, Furuhama K (1995) Ebselen, a seleno-organic compound, protects against ethanol-induced murine gastric mucosal injury in both in vivo and in vitro systems. Eur J Pharmacol 272: 195-201

⁹² Bien' M, Blaszczyk B, Kalinowska K, Mlochowski J, Inglot AD (1999) Antifungal activity of 2-(4-chlorophenyl-1,2benzisoselenazol- 3(2H)-one, the analog of Ebselen. Arch Immun Ther Exp 47: 185–193

⁹³ (a) Shi C, Yu LZ, Yang FG, Yan J, Zeng HH (2003) A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun 309: 578–583; (b) Xing F, Li S, Ge X, Wang C, Zeng HH, *et al.* (2008) The inhibitory effect of a novel organoselenium compound BBSKE on the tongue cancer Tca8113 in vitro and in vivo. Oral Oncol 44: 963–969; (c) Lin F, Zhou LN, Liang Y, Lv L (2008) A study of long term (12 weeks) toxicity test on rats with ethaselen. J Basic Clin Oncol 21: 369–373

⁹⁴ Leonard KA, Hall JP, Nelen MI, Davies SR, Gollnick SO, *et al.* (2000) A selenopyrylium photosensitizer for photodynamic therapy related in structure to the antitumor agent AA1 with potent in vivo activity and no long-term skin photosensitization. J Med Chem 43: 4488-4498

Los heterociclos organoselenados del tipo selenazol 1 están siendo ampliamente estudiados debido a sus interesantes propiedades biológicas (Figura 1.10).⁹⁵



Figura 1.10 Compuestos del tipo selenazol 1 con actividad biológica relevante

Uno de los primeros selenazoles con interesantes propiedades biológicas fue la *selenazofurina;* Wray *et al.* en 1986 describieron su potente actividad antiviral frente a influenza A y B (Figura 1.10).⁹⁶ Años después, el derivado *amselamina* fue descripto como potente agonista selectivo de receptores H_2 , siendo más activo que su análogo azufrado amtamina e histamina (Figura 1.10).⁹⁷

Sekiguchi *et al.* publicaron una serie de 2-amino selenazoles con actividad de scavenger de superóxido (Figura 1.10).⁹⁸ Por otro lado, Nam *et al.* describieron derivados de selenazoles 2piperidino y 5-cloroacetil-2-morfolino, como inhibidores potentes de la liberación de oxido nítrico en células microgiales BV2 (Figura 1.10).⁹⁹

⁹⁵ (a) Koketsu M, Ishihara H (2003) Synthesis of 1,3-Selenazine and 1,3-Selenazole and Their Biological Activities. Curr Org Chem 7: 175-185; (b) Mlochowski J, Kloc K, Lisiak R, Potaczek P, Wojtowicz H (2007) Developments in the chemistry of selenaheterocyclic compounds of practical importance in synthesis and medicinal biology. ARKIVOC 6: 14–46; (c) Koketsu M, Ishihara H (2008) 1,3-Selenazoles. In Comprehensive Heterocyclic Chemistry III. Eds: Katritzky AR, Ramsden CA, Scriven EFV, Taylor RJK. Elsevier, Oxford, Vol. 4, pp 791–821

⁹⁶ Wray SK, Smith RHA, Gilbert BE, Knight V (1986) Effects of selenazofurin and ribavirin and their 5'triphosphates on replicative functions of influenza A and B viruses. Antimicrob Agents Chemother 29: 67–72

⁹⁷ (a) Traiffort E, Ruat M, Arrang JM, Leurs R, Piomelli D, *et al.* (1992) Expression of a cloned rat histamine H2 receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 89: 2649–2653; (b) van der Goot H, Eriks JC, Leurs R, Timmerman H (1994) Amselamine, a new selective Histamine H2-Receptor agonist. Bioorg Med Chem Lett 4: 1913–1916

⁹⁸ Sekiguchi A, Nishina A, Kimura H, Fukumoto RH, Kanoh K, *et al.* (2005) Superoxide Anion-Scavenging Effect of 2-Amino-1,3-selenazoles. Chem Pharm Bull 53: 1439–1442

⁹⁹ Nam KN, Koketsu M, Lee EH (2008) 5-Chloroacetyl-2-amino-1,3-selenazoles attenuate microglial inflammatory responses through NF-κB inhibition. Eur J Pharmacol 589: 53–57

Por otro lado, Hak et al. encontraron el 2-(4-metilfenil)-1,3-selenazol como inductor de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de ovario humano (SKOV3) y leucemia (HL6) (Figura 1.10).¹⁰⁰ Posteriormente, Choi et al. determinaron que su análogo para cloro sustituído presentaba actividad antiinflamatoria, por inhibición de la sintasa de oxido nítrico, afectando la producción de NO (Figura 1.10).¹⁰¹

En 2014, Guan et al. describieron la síntesis y actividad biológica de ácidos 2-fenil-4-metil-1,3selenazol-5-carboxílicos, obteniendo potentes inhibidores de la xantina oxidasa (Figura 1.10).¹⁰² Recientemente, se patentó la preparación de derivados 2-aril selenazoles, así como su actividad como inhibidores de esta enzima.¹⁰³

Algunos derivados selenazoles también han sido descriptos como buenos inhibidores de la enzima Tiorredoxin Reductasa (TrxR), con IC_{50} menores a 10 μ M, siendo algunos inclusive menores a 1 μ M.¹⁰⁴

1.2 Objetivos generales

El objetivo general de esta tesis es el diseño de posibles inhibidores enzimáticos activos en sistemas de relevancia en enfermedades huérfanas y el desarrollo de metodologías sintéticas para su preparación y caracterización. Principalmente, el trabajo se centra en la enzima Cruzipaína, principal cisteín proteasa del parásito Tripanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Otros de los sistemas en estudio incluyen la enzima Tiorredoxin Glutatión Reductasa (TGR), presente en el platelminto Echinococcus granulosus, parásito responsable de la hidatidosis quística.

¹⁰⁰ Hak JA, Koketsu M, Eun MYE, Yong MK, Ishihara H, et al. (2006) 2-(4-methylphenyl)-1,3-selenazol-4-one induces apoptosis by different mechanisms in SKOV3 and HL 60 cells. J Cell Biochem 99: 807-815

¹⁰¹ Choi SY, Jo YO, Koketsu M, Ishihara H, Kim SH et al. (2009) Inhibitory effects of 2-(4-chlorophenyl)-1,3selenazol-4-one on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. J Korean Soc App Biol Chem 52: 371-374

¹⁰² Guan Q, Cheng Z, Ma X, Wang L, Feng D, et al. (2014) Synthesis and bioevaluation of 2-phenyl-4-methyl-1,3selenazole-5-carboxylic acids as potent xanthine oxidase inhibitors. Eur J Med Chem 85: 508-516

¹⁰³ Shi D, Fu Changjin, Wu J, Liu J (2014) 2-aryl selenazole compound and pharmaceutical composition thereof. WO 2014082548 A1

¹⁰⁴ Li DD, He J, Zeng HH (2012) Biological evaluation of novel selenazole-based compounds as potential thioredoxin reductase inhibitors. Applied Organometallic Chemistry 26: 619-624

Capítulo 2:

Utilización de Screening Virtual: síntesis y evaluación biológica de hidrazolil tiazolidinonas
2.1 Antecedentes

El término Screening Virtual (SV) apareció por primera vez en 1997,¹ aunque el origen de los métodos computacionales se remonta más atrás en el tiempo. Esta es una metodología capaz de evaluar automáticamente bibliotecas de compuestos, utilizando programas computacionales,² siendo muy utilizada en la actualidad por las compañías farmacéuticas. Desde sus comienzos y a lo largo de los años, el SV ha afianzado su credibilidad como punto de partida en el desarrollo de fármacos.³

Partiendo de un universo químico de 10⁶⁰ estructuras aproximadamente,⁴ el SV posibilita seleccionar un número acotado de compuestos, capaz de ser sintetizados o comprados, para posteriormente ser evaluados biológicamente. En la Figura 2.1 se esquematiza la secuencia hacia la obtención de los compuestos Hits a ensayar.



Figura 2.1 Camino de selección del Hit Virtual

¹ Horvath D (1997) A virtual screening approach applied to the search for trypanothione reductase inhibitors. J Med Chem 40: 2412-2423

² Walters WP, Stahl MT, Murcko MA (1998) Virtual screening – an overview. Drug Discov Today 3: 160–178

³ (a) Abagyan R, Totrov M (2001) High-throughput docking for lead generation. Curr Opin Chem Biol 5: 375-382; (b) Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nat Rev Drug Discov 3: 935-949

⁴ Bohacek RS, McMartin C, Guida WC (1996) The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. Med Res Rev 16: 3–50

La metodología de SV puede ser dividida en dos categorías: el Screening Virtual Basado en la Estructura (SVBE) y el Screening Virtual Basado en Ligando (SVBL) (Figura 2.2).

El SVBL asume que estructuras químicas similares tienen actividad biológica similar, concepto introducido por primera vez Maggiora *et al.*⁵ De esta manera, la herramienta computacional utiliza la Relación Estructura-Actividad (REA) de un set de compuestos activos, con la conveniente evaluación de su similitud, de manera de poder identificar futuros candidatos, asumiendo que podrían unirse al sitio activo asociado y así actuar en el blanco.⁶ Para ello, se han descripto una gran variedad de descriptores moleculares, los cuales pueden clasificarse en función del tipo de información de similitud calculada entre las estructuras.⁷ El SVBL utiliza información basada en descriptores moleculares calculados a partir de la estructura 2D⁸ y 3D⁹ de los compuestos de referencia. Posteriormente, se eligen expresiones matemáticas predefinidas para cuantificar la similitud molecular,⁹ permitiendo así comparar las moléculas biológicamente activas conocidas con los potenciales hits. Finalmente, se logra determinar las posibles estructuras biológicamente activas llamadas en su conjunto Hit Virtual (Figura 2.2).

El SVBE, por lo contrario, utiliza la estructura tridimensional 3D de un blanco biológico, determinado experimentalmente por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear RMN.⁴ Posteriormente, se realizan estudios de docking de los posibles candidatos y se evalúan en función de la afinidad de unión predicha al sitio activo (Figura 2.2).¹⁰

⁵ Maggiora GA, Johnson MA (1990) Concepts and Applications of Molecular Similarity. Wiley-Interscience, New York

⁶ Bajorath J (2002) Integration of virtual and high-throughput screening. Nature Rev Drug Discov 1: 882–894

⁷ (a) Sheridan R (2002) Why do we need so many chemical similarity search methods? Drug Discov Today 7: 903-911; (b) Bender A, Jenkins JL, Scheiber J, Sukuru SC, Glick M, *et al.* (2009) How Similar Are Similarity Searching Methods? A Principal Component Analysis of Molecular Descriptor Space. J Chem Inf Model 49: 108-119

⁸ (a) Carhart RE, Smith DH, Venkataraghavan R (1985) Atom Pairs as Molecular Features in Structure-Activity Studies: Definition and Applications. J Chem Inf Comput Sci 25: 64–73; (b) Nilakantan R, Bauman N, Dixon JS, Venkataraghavan R (1987) Topological Torsion: A New Molecular Descriptor for SAR Applications. Comparison with other Descriptor. J Chem Inf Comput Sci 27: 82–85; (c) Kearsley S, Sallamack S, Fluder EM, Andose JD, Mosley RT, *et al.* (1996) Chemical Similarity Using Physiochemical Property Descriptors. J Chem Inf Comput Sci 36: 118–127

⁹ Willett P (1998) Chemical Similarity Searching. J Chem Inf Comput Sci 38: 983-996

¹⁰ Gohlke H, Klebe G (2002) Approaches to the description and prediction of the binding affinity of smallmolecule ligands to macromolecular receptors. Angew Chem Int Ed 41: 2644–2676



Figura 2.2 Clasificación de tipos de SV en función de las herramientas utilizadas para la generación de hits virtuales

Aunque en un estudio reciente, Ripphausen *et al.* concluyeron que el docking es la herramienta más utilizada en las primeras instancias del descubrimiento de fármacos, también sostienen que el SVBL brinda una mayor fracción real de potenciales hits (Figura 2.3). Mientras que la mayoría de los hits reportados por SVBL caen en el rango de potencia menor a 1 μ M, la mayoría de los obtenidos por SVBE se ubican en los rangos 1-10 μ M (Figura 2.3).¹¹



Figura 2.3 Relevamiento de Hits reportados en literatura hasta 2010 utilizando SV como herramienta, siendo SVBE (rojo) o SVBL (verde), clasificados según cuatro rangos de potencia de actividad biológica (AB)

¹¹ Ripphausen P, Nisius B, Peltason L, Bajorath J (2010) Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications. J Med Chem 53: 8461-8467

Los avances en las metodologías de SV han permitido a los químicos medicinales poder evaluar bibliotecas de compuestos con actividad farmacológica probada contra nuevos blancos biomoleculares, minimizando los costos asociados con la búsqueda de nuevos fármacos, asociados básicamente en las primeras etapas de su desarrollo. Un ejemplo de ello es el caso de los inhibidores de Cruzipaína descriptos recientemente, la Amiodarona conocido fármaco antiarrítmico y la Bromocriptina, un antiparkinsoniano y antidiabético.¹²

El alcance y los éxitos logrados en el desarrollo de fármacos utilizando las diferentes metodologías de SV han sido muy discutidos en literatura,¹³ así como los recientes avances en el tema.¹⁴

Los métodos computacionales se han convertido en componentes cruciales en los programas de desarrollo de fármacos. Específicamente, el SV permite hacer el proceso de selección de los compuestos potencialmente activos de manera más directa, pero no sustituye la necesidad e importancia de la evaluación e instinto del investigador.

2.2 Objetivos específicos

En el presente capítulo se plantea como objetivo la preparación de nuevos compuestos inhibidores de Cruzipaína (Cz) utilizando Screening Virtual (SV) como criterio de elección de los compuestos a sintetizar. Los derivados más promisorios serán evaluados como agentes antichagásicos en epimastigotes de *T. cruzi*.

¹² Bellera CL, Balcazar DE, Alberca L, Labriola CA, Talevi A, *et al.* (2013) Application of Computer-Aided Drug Repurposing in the Search of New Cruzipain Inhibitors: Discovery of Amiodarone and Bromocriptine Inhibitory Effects. J Chem Inf Model 53: 2402–2408

¹³ (a) Ekins S, Mestres J, Testa B (2007) In Silico Pharmacology for Drug Discovery: Applications to Targets and Beyond. Br J Pharmacol 152: 21–37; (b) Guido RVC, Oliva G, Andricopulo AD (2008) Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. Curr Med Chem 15: 37–46; (c) Seifert MHJ, Lang M (2008) Essential Factors for Successful Virtual Screening. Mini-Rev Med Chem 8: 63–72; (d) Waszkowycz B (2008) Towards Improving Compound Selection in Structure-Based Virtual Screening. Drug Discovery Today 13: 219–226 ¹⁴ Ma DL, Chan DS, Leung CH (2013) Drug repositioning by structure-based virtual screening. Chem Soc Rev 42: 2130-2141

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Elección de compuestos potencialmente inhibidores de Cz utilizando SV

El grupo de investigación de McKerrow ha trabajado ampliamente en el desarrollo de inhibidores de cruzaína, como agentes tripanocidas. Dentro de sus trabajos, describieron dos series de inhibidores no peptídicos de esta enzima, derivados bisarilacilhidrazida¹⁵ y bisarilurea.¹⁶ Posteriormente, se prepararon y ensayaron una serie de tiosemicarbazonas (TSC) 1, compuestos de bajo peso molecular, que resultaron potentes inhibidores de cruzaína además de agentes tripanocidas, con valores de IC_{50} en la enzima del orden nM (Figura 2.4).¹⁷



Figura 2.4 Tiosemicarbazonas (TSC) **1** descriptas como inhibidores reversibles de cruzaína; IC₅₀ determinadas en la enzima siendo ^a [cruzaína] = 1 nM, ^b [cruzaína] = 2 nM, ^c [cruzaína] = 0.1 nM

¹⁵ Ring C, Sun E, McKerrow J, Lee G, Rosenthal P, *et al.* (1993) Structure-based Inhibitor Design by Using Protein Models for the Development of Antiparasitic Agents. Proc Natl Acad Sci USA 90: 3583-3587

¹⁶ Du X, Hansell E, Engel JC, Caffrey CR, Cohen FE *et al.* (2000) Aryl Ureas Represent a New Class of Antitrypanosomal Agents. Chem Biol 7: 733-742

¹⁷ Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, *et al.* (2002) Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. J Med Chem 45: 2695-2707

Du *et al.* determinaron la REA de estos compuestos y algunas de sus ventajas descriptas incluyen:

- i) mínima toxicidad celular
- ii) propiedades físicas compatibles con las propiedades farmacocinéticas deseadas, bajo PM y log P favorable
- iii) potentes y eficaces, con IC₅₀ del orden nanomolar contra cruzaína
- iv) efectividad contra macrófagos infectados con T. cruzi
- v) fácil síntesis con bajo costo
- vi) al no ser derivados peptídicos, mejorarían su biodisponibilidad

Pese a que el mecanismo de inhibición de las TSC no es conocido, en base a estudios de QSAR y docking, este grupo planteó que podría involucrar un ataque nucleofílico del grupo tiolato de (Cys25) del sitio activo de la enzima, al grupo tiocarbonilo de la TSC (Figura 2.5).¹⁷



Figura 2.5 Mecanismo de interacción reversible entre TSC y cruzaína, propuesto por Du *et al.*¹⁷ basado en resultados experimentales y cálculos teóricos de docking

En el 2004 el mismo grupo patentó la metodología de preparación y su aplicación como potentes inhibidores de cruzipaína y agentes tripanocidas.¹⁸

En el mismo año, Greenbaum *et al.* prepararon una serie de derivados difenil, diarilamina y diaril éter de TSC con diferentes sustituyentes en anillo aromático, los cuales fueron evaluados en cruzaína y *T. cruzi.*¹⁹ El compuesto más promisorio, con la mejor actividad inhibitoria en la enzima y el parásito, sin resultar tóxico en células de mamífero, resultó ser

¹⁸ Cohen FE, Du X, Guo C, McKerrow JH (2004) U.S. Pattent 6897240

¹⁹ Greenbaum DC, Mache Z, Hansell E, Doyle P, Gut J, *et al.* (2004) Synthesis and structure activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against P. falciparum, T. brucei and T. cruzi. J Med Chem 47: 3212–3219

un derivado aromático sustituído en posición meta del anillo (Figura 2.4), lo que reafirma lo previamente descripto por Du et al. respecto a la importancia de un sustituyente en esta posición.

Fujii et al. investigaron la influencia de los patrones de sustitución de las hidrazonas en la actividad inhibitoria de las TSC y determinaron que sustituyentes alquilo R² voluminosos potenciaban aún más la actividad inhibitoria en cruzaína (Figura 2.4).²⁰

Siles et al. prepararon una serie de derivados TSC con anillos fusionados y describieron una nueva gama de compuestos muy promisoria como inhibidores de cruzaína, lo cual permitió ampliar la discusión de la REA de las TSC (Figura 2.4).²¹

Muchos trabajos en el área de fármacos antitripanosomátidos está dedicada ampliamente a las TSC, su actividad inhibitoria en Cz y la relación con su actividad tripanocida in vitro.^{17-20,22} Estos compuestos han mostrado además actividad inhibitoria de otras cisteín proteasas presentes en parásitos como T. brucei y P. falciparum.¹⁹⁻²⁰ De esta manera, las TSC y sus derivados continúan siendo estudiadas debido a la versatilidad farmacológica que presentan contra enfermedades microbianas²³ y parasitarias²⁴ (Figura 2.4). Contra P. falciparum,²⁵ agente causante de la malaria, resultaron más activas que la desferrioxamina (DFO),²⁶ compuesto utilizado en estudios experimentales y con aplicaciones clínicas.²⁷

²⁰ Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, Mackey Z, Doyle P, et al. (2005) Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. Bioorg Med Chem 15: 121–123

²¹ Siles R, Chen S, Zhou M, Pinney KG, Trawick ML (2006) Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. Bioorg Med Chem Lett 16: 4405-4409

²² (a) Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, Gonzalez M, et al. (2004) In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. Bioorg Med Chem 12: 4885 –4893; (b) Steverding D, Caffrey CR, Sajid M (2006) Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. Mini-Rev Med Chem 6: 1025–1032

²³ (a) Halve AK, Bhashkar B, Sharma V, Bhadauria R, Kankoriya A, et al. (2008) Synthesis and in vitro antimicrobial studies of some new 3-[phenyldiazenyl] benzaldehyde N-phenyl thiosemicarbazones. J Enzyme Inhib Med Chem 23: 77-81; (b) Umamatheswari S, Kabilan S (2011) Synthesis and antimicrobial studies of novel 2,4-diaryl-3azabicyclo[3.3.1]nonan-9-one 4'-phenylthiosemicarbazones. J Enzyme Inhib Med Chem 26: 430-439

²⁴ Mallari JP, Shelat A, Kosinski A, Caffrey CR, Michele C, et al. (2008) Discovery of trypanocidal thiosemicarbazones inhibitors of rhodesain and TbcatB. Bioorg Med Chem Lett 18: 2883–2885

²⁵ Mallari JP, Guiguemde WA, Guy RK (2009) Antimalarial activity of thiosemicarbazones and purine derived nitriles. Bioorg Med Chem Lett 19: 3546-3549

 $^{^{26}}$ Chibale K, Biot C (2006) Novel approaches to antimalarial drug discovery. Infec Disord Truf Targests 6: 173-204 ²⁷ Weinberg ED, Moon J (2009) Malaria and iron: history and review. Drug Metab Rev 41: 644-662

Por otro lado, las TSC tienen descriptas propiedades antineoplásicas ampliamente discutidas en literatura.²⁸

Otro tipo de inhibidores reversibles altamente potentes y selectivos para ciertas cisteín proteasas contienen como centro farmacofórico derivados cetona.²⁹ Huang *et al.* describieron una serie de mercaptometil cetonas **2**, potentes inhibidores selectivos de cruzaína (K_1 menor a 1 nM) frente a Catepsina B y Catepsina L humanas (Figura 2.6 A).³⁰ Posteriormente en 2008, Brak *et al.* describieron un potente inhibidor irreversible no peptídico de esta enzima, con propiedades anti T. *cruzi* muy promisorias (Figura 2.6 B).³¹



Figura 2.6 Derivados cetona descriptos como potentes inhibidores de cruzaína

Pese a los resultados interesantes en torno a la búsqueda de inhibidores de Cz, ninguno de estos ha logrado transformarse en fármaco antichagásico. Por lo tanto, la necesidad de continuar trabajando en esta área es altamente importante.

Frente a la búsqueda de fármacos útiles en enfermedades desatendidas, varias herramientas son utilizadas. La química computacional, específicamente el Screening Virtual (SV) ha resultado muy efectivo en el descubrimiento de nuevos fármacos. En 2010,

²⁸ (a) Hu W-X, Zhou W, Xia C-N, Wen X (2006) Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. Bioorg Med Chem Lett 16: 2213–2218; (b) Richardson DR, Kalinowski DS, Richardson V, Sharpe PC, Lovejoy DB, *et al.* (2009) 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones are potent iron chelators and antiproliferativa agents: redox activity, iron complexation and characterization of their antitumor activity. J Med Chem 52: 1459–1470

 ²⁹ (a) Otto HH, Schirmeister T (1997) Cysteine Proteases and Their Inhibitors. Chem Rev 97: 133-171; (b) Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000) Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. J Med Chem 43: 305-341
³⁰ Huang L, Lee A, Ellman JA (2002) Identification of Potent and Selective Mechanism-Based Inhibitors of the

³⁰ Huang L, Lee A, Ellman JA (2002) Identification of Potent and Selective Mechanism-Based Inhibitors of the Cysteine Protease Cruzain Using Solid-Phase Parallel Synthesis. J Med Chem 45: 676-684

³¹ Brak K, Doyle PS, McKerrow JH, Ellman JA (2008) Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. J Am Chem Soc 130: 6404-6410

Ferreira et al. evaluaron una biblioteca de casi 200000 compuestos por SVBE, utilizando la estructura de rayos X de Cz y mediante docking molecular eligieron los hits. De esta manera describieron cinco nuevos inhibidores competitivos de la enzima, con $K_{\rm l}$ en el orden del bajo nM.32

Recientemente. Parameswaran et al. utilizando herramientas computacionales, describieron cuatro agentes contra la Leishmania, específicamente inhibidores del la lipasa LdLip3, la cual es fundamental en varios de los estadíos de vida del parásito L. donovani. Los productos mostraron actividad antileishamania, con IC₅₀ en el orden del bajo μ M.³³

Utilizando SV como herramienta, también se han reportado resultados promisorios en la búsqueda de fármacos contra el Dengue,³⁴ Malaria,³⁵ y Chagas.³⁶

Con el objetivo de encontrar nuevos inhibidores de Cz, se utilizó SV como criterio de elección de los compuestos a sintetizar. Esta instancia fue realizada en colaboración con el Prof. Luis Bruno-Blanch y Alan Talevi de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina, los cuales tienen una vasta experiencia en química computacional.

Particularmente, el trabajo se centró en Screening Virtual Basado en Ligando (SVBL); como ya se mencionó, este no toma en cuenta directamente la estructura del blanco como base, sino que trabaja asumiendo que compuestos de topología similar tienen actividades biológicas similares.

En nuestro caso, para la construcción de la función discriminante, se utilizó una aproximación QSAR 2D por consenso basada en la aplicación de Análisis Lineal Discriminante (ALD), que utiliza descriptores constitucionales y topológicos utilizando el programa DRAGON®. Algunos de los descriptores utilizados incluyeron número de grupos

³² Ferreira RS, Simeonov A, Jadhav A, Eidam O, Mott BT, et al. (2010) Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. J Med Chem 53: 4891-4905

³³ Parameswaran S, Saudagar P, Dubey VK, Patra S (2014) Discovery of novel anti-leishmanial agents targeting LdLip3 lipase. J Mol graph model 49: 68-79

³⁴ Viswanathan U, Tomlinson SM, Fonner JM, Mock SA, Watowich SJ (2014) Identification of a Novel Inhibitor of Dengue Virus Protease through Use of a Virtual Screening Drug Discovery Web Portal. J Chem Inf Model 54: 2816-2825

³⁵ Yadav MK, Singh A, Swati D (2013) A Knowledge-Based Approach for Identification of Drugs Against Vivapain-2 Protein of Plasmodium vivax Through Pharmacophore-Based Virtual Screening with Comparative Modelling. Appl Biochem Biotechnol 173: 2174-88

³⁶ Wiggers HJ, Rocha JR, Fernandes WB, Costa RS, Carneiro ZA, et al. (2013) Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. Plos NTD 7: e2370

funcionales, información de conectividad entre átomos, correlación 2D, entre otros. Dicha función fue construida en base a un conjunto de estructuras descriptas en bibliografía con altos valores de inhibición sobre la enzima Cz (valor de corte $IC_{50}<1 \mu$ M), particularmente las tiosemicarbazonas 1 y las mercaptometilcetonas **2.** Con los datos recabados en bibliografía se clasificaron los compuestos en dos grupos: uno de 50 compuestos activos y otro de 50 inactivos y con ellos se construyó la Función Discriminante (Figura 2.7). Una vez elegida esta, se realizó el screening en base a 537503 estructuras pertenecientes a la base de datos pública ZINC.³⁷ La función predijo un conjunto de estructuras denominadas Hit Virtuales, potenciales candidatos para inhibir la enzima Cz (Figura 2.7).



Figura 2.7 Secuencia de SV desde la creación de la Función Discriminante hasta la predicción del Hit Virtual, donde se seleccionaron los posibles inhibidores de Cz

De este conjunto se seleccionaron los derivados 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas **3** como potenciales inhibidores de Cz (Figura 2.7). Este tipo de moléculas combinan tiosemicarbazonas (TSC) **1** con 4-tiazolidinonas **4**, ambas con interesantes propiedades biológicas (Figura 2.8).

³⁷ (a) Irwin JJ, Shoichet BK (2005) ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening, J Chem Inf Model 45: 177-182; (b) http://zinc.docking.org/



Figura 2.8 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3

Al comienzo de este capítulo se mencionó la importancia farmacológica de las TSC, las cuales pueden ser vistas como bioisósteros no clásicos de 4-tiazolidinonas (Figura 2.8).³⁸ El sistema cíclico de las 4-tiazolidinonas y sus derivados son relevantes en el área de química medicinal.³⁹ Este núcleo farmacofórico está presente en varias estructuras mostrando un amplio espectro de actividades biológicas como antibacterianas,⁴⁰ antiinflamatorias,⁴¹ antihistamínicas,⁴² antifúngicas⁴⁰ y anticancerígenas.⁴³

Desde el siglo pasado se ha discutido en literatura la combinación de ambos farmacóforos, resaltando la importancia biológica que presentan.⁴⁴ En 2006, Leite *et al.* prepararon una serie de TSC y aminoacil tiazolidinonas. Algunos de los derivados resultaron inhibidores del crecimiento de *T. cruzi*, en concentraciones no tóxicas en células de mamífero. Utilizando docking como herramienta, investigaron el patrón de unión de éstos a la enzima cruzaína y determinaron que el anillo 4-tiazolidinona es un requerimiento importante para la interacción con la enzima (Figura 2.9).⁴⁵

Posteriormente, Hernándes et al. describieron una promisoria serie de hidrazolil tiazolidinonas activas contra Cz y T. cruzi, con IC_{50} en el orden del bajo μ M. La baja toxicidad

 ³⁸ (a) Patani GA, LaVoie EJ (1996) Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. Chem Rev 96: 3147 –3176;
(b) Lima LM, Barreiro EJ (2005) Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. Curr Med Chem 12: 23–49

³⁹ Verma A, Saraf SK (2008) 4-Thiazolidinone - A biologically active scaffold. Eur J Med Chem 43: 897–905

⁴⁰ Omar K, Geronikaki A, Zoumpoulakis P, Camoutsis C, Sokovic´ M, *et al.* (2010) Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs. Bioorg Med Chem 18: 426-432

⁴¹ Ottaná R, Maccari R, Barreca ML, Bruno G, Rotondo A (2005) 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. Bioorg Med Chem 13: 4243–4252

⁴² Previteral T, Vigorita MG, Basilel M, Orsin F, Benetollos F (1994) 3,3'-Di [1,3-thiazolidine-4-one] system. VI.

Structural and conformational studies on configurational isomers with antihistaminic activity. Eur J Med Chem 29: 317-324

⁴³ Havrylyuk D, Mosula L, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Gzella A (2010) Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety. Eur J Med Chem 45: 5012-5021

⁴⁴ Krbavčič A, Plut M, Pollak A, Tisler M, Likar M, *et al.* (1966) Derivatives of 5-Carboxymethylthiazolidine-2,4dione, a New Group of Antiviral Compounds. J Med Chem 9: 430–431

⁴⁵ Leite ACL, Santos LMF, Lima RS, Cardoso MVO, Moreira DRM, *et al.* (2006) Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi. Bioorg Med Chem 14: 3749 –3757

de estos derivados (100 μ g/mL) fue considerable en comparación con las TSC, las cuales resultaron tóxicas a bajas concentraciones (<1 μ g/mL), sugiriendo que el grupo tiocarbonilo contribuiría a la poca selectividad molecular frente a otras cisteín proteasas (Figura 2.9).⁴⁶



Figura 2.9 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3 reportadas con actividad anti T. cruzi.

Tenorio *et al.* describieron derivados ácidos de hidrazolil tiazolidinona, altamente efectivas contra las infecciones por *T. gondii.*⁴⁷ Posteriormente, Aquino *et al.* prepararon una serie de TSC y 4-tiazolidinonas, resultando activas frente a este parásito con IC₅₀ entre 0.05-1 mM.⁴⁸

Las 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas **3** seleccionadas por el SV como posibles inhibidores de Cz, son interesantes no sólo por la facilidad de su preparación, sino que la presencia de cuatro regiones variables, lo que permitiría explorar ampliamente el espacio químico. Teniendo en cuenta el modo de preparación de los compuestos, las mismas serían: los sustituyentes R_1 y R_2 en el grupo hidrazolil, el sustituyente R_3 en el nitrógeno de la tiazolidinona, la presencia o ausencia de la insaturación en el enlace C_5 - C_6 y el sustituyente R_4 de la cadena lateral (Figura 2.10).

⁴⁶ Hernándes MZ, Rabello MM, Lima Leite AC, Oliveira Cardoso MV, Moreira DRM, *et al.* (2010) Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. Bioorg Med Chem 18: 7826-7835

⁴⁷ Tenório RP, Carvalho CS, Pessanha CS, de Lima JG, de Faria AR *et al.* (2005) Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-Toxoplasma gondii activity. Bioorg Med Chem Lett 15: 2575–2578

⁴⁸ de Aquino TM, Liesen AP, da Silva REA, Lima VT, Carvalho CS, *et al.* (2008) 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 16: 446–456



Figura 2.10 Estructuras 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3, con posible actividad antichagásica

Esta variabilidad podría generar una diversidad estructural importante, en cuanto a la preparación de derivados potencialmente inhibidores de Cz. Basándonos en estos resultados, se diseñaron, sintetizaron y evaluaron una serie de análogos 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas **3**, contra Cz y epimastigotes de *T. cruzi*.

2.3.2 Síntesis de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas

En literatura se describen ampliamente diferentes aproximaciones para la síntesis de hidrazolil tiazolidinonas. Dentro de las metodologías de obtención de estos compuestos, Tenorio *et al.* plantearon que ocurre en dos etapas: **1**) reacción de aldehídos con fenil tiosemicarbazida para dar las TSC **1**; y **2**) adición tia-Michael de la TSC **1** con anhídrido maléico, en PhMe/DMF a reflujo, para dar la hidrazolil tiazolidinona **3** (Figura 2.11).⁴⁷



Figura 2.11 Secuencia sintética para la obtención de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3

En nuestro caso, para la preparación de estos compuestos se pensó en la utilización de reacciones multicomponente o multipasos, las cuales se definen como procesos en donde

dos o más reacciones pueden ocurrir en un recipiente o 'one pot'.⁴⁹ Son muy atractivas debido a su facilidad de estandarización. En los procesos tradicionales, el aislamiento del producto debe ser llevado a cabo de manera repetitiva e independiente hasta sintetizar el compuesto objetivo. Los procesos en tándem permiten minimización de desechos, solventes, reactivos y energía.⁵⁰

El uso de radiación por microondas en síntesis orgánica ha tomado gran atención en los últimos 15 años. Varias publicaciones han concluido que este tipo de calentamiento disminuye notablemente los tiempos de reacción⁵¹ y se considera que minimiza las reacciones secundarias y acelera la velocidad de reacción.⁵²

En este sentido, nuestro grupo desarrolló una metodología sintética para la preparación de derivados ácidos de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas **3a-e**.⁵³ Estas estructuras fueron preparadas siguiendo una reacción en tándem asistida por microondas, a partir de productos comercialmente disponibles, en un sólo paso de reacción, entre aldehídos **5**, tiosemicarbazida **6a** y anhídrido maléico **7** (Tabla 2.1). En base a estos antecedentes, nuestro objetivo se centró en la síntesis de derivados amida y ésteres utilizando la metodología previamente desarrollada.

De esta manera, se prepararon 2-hidrazolil-4-tiazolidinin amidas **3f-n**, a partir de aldehídos o cetonas **5**, hidrazidas **6** (**6a**: $R_3 = H$, **6b**: $R_3 = Me$) y *N*-metilmaleimida **8**, para dar los productos deseados con buen rendimientos (Tabla 2.1). Los parámetros de sustitución de las cetonas y aldehídos fueron elegidos en función de las tiosemicarbazonas biológicamente activas descriptas en literatura.

⁴⁹ Ho T (1992) Tandem Organic Reactions. Wiley-Interscience, New York

⁵⁰ (a) Tietze LF, Beifuss U (1993) Sequential Transformations in Organic Chemistry: A Synthetic Strategy with a Future. Angew Chem Int Ed 32: 131–163; (b) Tietze, LF (1996) Domino Reactions in Organic Synthesis. Chem Rev 96: 115-136

⁵¹ Wipf P, Fletcher JM, Scarone L (2005) Microwave promoted oxazole synthesis: cyclocondensation cascade of oximes and acyl chlorides. Tetr Lett 46: 5463–5466

⁵² Hayes BL (2002) Microwave Synthesis, Chemistry at the Speed of Light; CEM: Matthews, North Carolina, capítulo 1

⁵³ Saiz C, Pizzo C, Manta E, Wipf P, Mahler SG (2009) Microwave-assisted tandem reactions for the synthesis of 2hydrazolyl-4-thiazolidinones. Tetr Lett 50: 901-904



Comp	Х	R ₁	R ₂	R ₃	R (%)	Comp	Х	R ₁	R ₂	R ₃	R (%)
3a	0	p-OMePh	Н	Н	61 ^a	3h	NMe	<i>p</i> -OMePh	Н	Н	81 ^b
3b	0	2-tiofenil	Н	Н	33 [°]	3i	NMe	p-ClPh	Н	Me	88 ^b
3c	0	o-FPh	Н	Н	57 ^a	3j	NMe	o-BrPh	Н	Me	55 ^b
3d	0	o-NO₂Ph	Н	Н	61 ^a	3k	NMe	<i>p</i> -FPh	Н	Me	65 ^b
3e	0	p-ClPh	Н	Н	70 ^a	31	NMe	m-BrPh	Н	Me	75 ^b
3f	NMe	Ph	Н	Н	65 ^b	3m	NMe	m-BrPh	Me	Me	88 ^b
3g	NMe	2-tiofenil	Н	Н	75 ^b	3n	NMe	p-CF ₃ Ph	Н	Me	90 ^b

Condiciones: ^aPhMe/DMF, p-TsOH (cat.), 100°C, μw; ^bPhMe, p-TsOH (cat.), 100°C, μw

Tabla 2.1 Síntesis de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3a-n.

La formación de este tipo de compuestos ocurre en dos etapas: 1) reacción entre el aldehído o cetona 5 con la hidrazida (tiosemicarbazida 6a o metil tiosemicarbazida 6b) para dar la tiosemicarbazona 1; 2) seguido de una adición tia-Michael entre la tiosemicarbazona 1 y el anhídrido maléico 7 o metilmaleimida 8, que luego cicla por ataque nucleofílico del nitrógeno al carbonilo del anhídrido para dar finalmente las 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3 (Figura 2.12).



Figura 2.12 Mecanismo de formación de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3a-n

면 Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo

Utilizando el mismo concepto se preparó una serie de ésteres derivados de 2-hidrazolil-4tiazolidinonas-5,6- α , β insaturados **10a-e.** Los mismos fueron obtenidos de manera similar en reacciones multicomponente entre aldehídos **5**, hidrazida (tiosemicarbazida **6a** o metil tiosemicarbazida **6b**) y acetilendicarboxilato de metilo **9** (Tabla 2.2).



Compuesto	R ₁	R ₃	³ J (C ⁴ ,H ⁶) Hz	R(%)
10a	p-OMePh	Н	5.2	71
10b	p-ClPh	Me	5.2	85
10C	<i>p</i> -FPh	Me	5.2	81
10d	p-CF ₃ Ph	Me	6.3	90
10e	p-OMePh	Me	5.2	87

Tabla 2.2 Síntesis de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas-5,6- α , β -insaturados 10a-e

La reacción ocurre, al igual que en los casos anteriores, mediante la formación de la correspondiente tiosemicarbazona 1, seguida por la adición conjugada del azufre al triple enlace, dando lugar a la formación del intermedio I que posteriormente cicla (Figura 2.13). De acuerdo a las reglas de Baldwin la formación de los productos de ciclación 5-*exo*-trig 10 y 6-*exo*-trig 11 estarían favorecidas termodinámicamente, ocurriendo la formación de heterociclos de tiazolidinona 10, 1,3-tiazina-4-ona 11, o ambos.



Figura 2.13 Mecanismo propuesto para la formación de los heterociclos 10 y 11.

La elucidación estructural mediante el uso de espectroscopía de ¹H y ¹³C RMN de las tiazolidinona **10** o la 1,3-tiazina-4-ona **11** no es trivial pues ambos presentan señales muy similares en los espectros. Una herramienta útil para poder distinguir entre ambos isómeros es utilizando un experimento HMBC desacoplado para medir las constantes de acoplamiento a 3 enlaces de distancia (Figura 2.14).⁵⁴



Figura 2.14 HMBC desacoplado para determinar las constantes de acoplamiento ³J a tres enlaces de distancia

⁵⁴ Summers MF, Marzilli LG, Bax A (1986) Complete ¹H and ¹³C Assignments of Coenzyme B₁₂ through the Use of New Two-Dimensional NMR Experiments. J Am Chem Soc 108: 4285–4294

Los valores de ³J entre H₆ y C₄ para todos los productos **10a-e** fueron entre 6.3 y 5.2 Hz (Tabla 2.2), que según literatura corresponden al alqueno *exo* a la tiazolidinona **10** (Figura 2.15).⁵⁵ Según el solvente utilizado, en nuestro caso se obtuvieron una mezcla de **10** y **11** (en PhMe) o sólo **10** (en EtOH).



Figura 2.15 Valores de ³J para tiazolidinona 10 y 1,3-tiazina-4-ona 11 descriptos en literatura⁵⁵

⁵⁵ Vogeli U, Philipsborn W, Nair MD (1978) Structures of Addition Products of Acetylenedicarboxylic Acid Esters with Various Dinucleophiles. An application of C, H-spin-coupling constants. Helv Chim Acta 61: 607–617

2.3.3 Evaluación biológica in vitro de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas

2.3.3a Evaluación en Cruzipaína (Cz)

Esta instancia fue realizada en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Juan José Cazzulo del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de General San Martín, Argentina (IIB-INTECH UNSAM- CONICET), el cual proporcionó la enzima Cz.⁵⁶ Los ensayos fueron realizados en su laboratorio, el cual tiene una vasta experiencia en el trabajo con la enzima desde su obtención a partir de epimastigotes de *T. cruzi* hasta su purificación y el screening *in vitro* de compuestos en el parásito y Cz.

La evaluación de los diferentes derivados tiazolidinonas en la enzima, incluyendo los ácidos **3a-e**, acetamidas **3f-n** y ésteres α,β -insaturados **10a-e** fue realizada utilizando el ensayo espectrofotométrico puesto a punto por el grupo del Prof. Cazzulo. Este trabaja a concentraciones de enzima del orden micromolar, [Cz] = 0.140 μ M, lo que requiere la purificación de grandes cantidades de enzima para realizar el ensayo. Particularmente, en esta instancia se utilizó [inhibidor] = 100 μ M (Tabla 2.3).

Compuesto	PIE (%)	Compuesto	PIE (%)	Compuesto	PIE (%)
3a	36	3h	22	10a	7
3b	34	3i	7	10b	75
3c	6	3j	0	10C	0
3d	4	3k	3	10d	65
3e	11	31	17	10e	71
3f	3	3m	22	E-64	100
3g	27	3n	27		

PIE = Porcentaje de Inhibición Enzimática de Cz a [inhibidor] = 100 μ M, expresado como promedio de dos medidas; [Cz] = 0.140 μ M; E64: compuesto de referencia a 10 μ M

Tabla 2.3 Actividad inhibitoria de tiazolidinonas 3a-n y 10a-e en Cz

De la serie de compuestos evaluados, las tiazolidinonas **10b**, **10d** y **10e**, derivados de ésteres α , β -insaturados resultaron levemente inhibidores de Cz, teniendo en cuenta la concentración elevada de enzima con la que se trabajó (Tabla 2.3). El resto de los derivados resultaron menos activos.

⁵⁶ Labriola C, Sousa M, Cazzulo JJ (1993) Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi by affinity chromatography. Biol Res 26: 101-107

2.3.3b Evaluación en epimastigotes de T. cruzi y células Vero

Se ha descripto en literatura la buena correlación entre la actividad *in vitro* en epimastigotes de *T. cruzi* con los resultados vistos *in vivo*.⁵⁷ Tomando en cuenta estos antecedentes, se utilizó este ensayo para validar nuestros posibles hits.

En función de los resultados obtenidos en Cz, se seleccionó una serie de tiazolidinonas a ser evaluadas como agentes antichagásicos por inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) (Tabla 2.4).

Compuesto	PIC (%)	Toxicidad	Compuesto	PIC (%)	Toxicidad
3a	0	Nd	3m	60	No tóxico
3b	0	Nd	3n	42	No tóxico
3c	0	Nd	10b	39	Tóxico
3d	0	Nd	10C	50	Tóxico
3i	50	Tóxico	10d	46	Tóxico
3j	52	Tóxico	10e	38	No tóxico
3k	50	Tóxico	Nfx	100	nd
31	28	No tóxico			

PIC: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 a [inhibidor] = 50 μM; Toxicidad determinada a [inhibidor] = 50 y 100 μM por microscopia de contraste, en comparación con control en células Vero sin inhibidor; nd: no determinado; Ntf: Nifurtimox, compuesto de referencia a 50 μM

Tabla 2.4 Actividad anti T. cruzi y toxicidad de tiazolidinonas seleccionadas

Respecto a los derivados acetamida seleccionados **3i-n**, la actividad antiparasitaria no pudo ser correlacionada con la actividad inhibitoria en Cz, pues los compuestos más activos contra *T. cruzi* **3i**, **3j**, **3k** y **3m**, resultaron inactivos contra la enzima; de esta manera, es independiente a la actividad cisteín proteasa. De los derivados éster, el compuesto **10d** mostró una moderada actividad anti *T. cruzi*, que coincide con lo visto en Cz, resultando activo en ambos ensayos.

Tiazolidinonas similares fueron descriptas por Leite *et al.* como potenciales inhibidores de Cz, basados en cálculos teóricos de docking y su actividad anti *T. cruzi* fue determinada utilizando ensayos *in vitro* contra el parásito.⁴⁵

⁵⁷ Boiani L, Gerpe A, Arán VJ, Torres de Ortiz S, Serna E (2009) In vitro and in vivo antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. Eur J Med Chem 44: 1034-1040

Los resultados en nuestro caso muestran otro escenario: *la actividad antiparasitaria* de estos compuestos sería *independiente de la actividad inhibitoria en Cz,* involucrando entonces otro mecanismo de acción. Los mejores resultados anti *T. cruzi* se obtuvieron para los derivados hidrazolil tiazolidinonas **3** ó **10**, conteniendo $R_3 = Me$, $R_2 = H$ o Me, $R_1 = Ph$ con sustituyente halógeno, e independiente de la presencia o no de la insaturación en C_5 - C_6 (Figura 2.16 B).

Los derivados **3a-n** y los ésteres **10a-e** también fueron evaluados en epimastigotes cepa Y, resistente a Nifurtimox y Benznidazol, resultando sólo **10b** con moderada actividad anti *T. cruzi* (PIC (cepa Y) = 37% a 50 μ M).⁵⁸

La toxicidad de los compuestos más activos **3i-n** y **10b-e** también fue evaluada *in vitro* a 100 y 50 μ M de concentración del inhibidor, utilizando células Vero como modelo. Los resultados mostraron que los compuestos **3l, 3m** y **3n** no fueron tóxicos a la concentración más alta ensayada. De esta manera, **3m** resultó ser el compuesto con el mejor perfil por ser el más selectivo como agente anti-*T. cruzi* y menos tóxico (Figura 2.16 C).



PIE: Porcentaje de Inhibición Enzimática; PIC: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Figura 2.16 (A) Inhibidores de cruzipaína a [Cz] = 0.140 μM, [inhibidor] = 100 μM; **(B)** Agentes anti *T. cruzi* cepa Tul 2, [inhibidor] = 50 μM; **(C)** Hidrazolil tiazolidinona más selectiva

⁵⁸ Porcal W, Hernández P, Aguirre G, Boiani L, Boiani M, *et al.* (2007) Second generation of 5ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth: Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. Bioorg Med Chem 15: 2768-2781

2.3.4 Modelado Molecular y estudios QSAR

Como ya se ha discutido, la propuesta mecanística de inhibición de Cz planteada por Du *et al.* involucra el ataque nucleofílico de un átomo de azufre de la cisteína del sitio activo de la enzima a una especie electrofílica capaz de aceptar electrones.¹⁷

De acuerdo a esta idea, se propuso estudiar la distribución de cargas atómicas de las hidrazolil tiazolidinonas así como la contribución de cada átomo a los orbitales de frontera. Además, se calcularon los parámetros fisicoquímicos más comunes frecuentemente relacionados con la actividad biológica como ser la similitud farmacológica (drug likeness), el logP teórico (Moriguchi's LogP-mlogP), (mlogP)², refractividad molecular (RM) y peso molecular (PM). Estos se obtuvieron utilizando el programa DRAGON®. Los parámetros electrónicos fueron determinados a partir de las energías HOMO y LUMO, los coeficientes LUMO Y HOMO normalizados para cada átomo.⁵⁹ Para esto se realizó un análisis conformacional y optimización de geometría utilizando programas *ab initio*, de acuerdo a como se detalla en la parte experimental de este capítulo.

El análisis QSAR determinó una baja correlación entre la actividad inhibitoria en Cz y los descriptores calculados. Por otra parte, se obtuvo una buena correlación entre la inhibición del crecimiento del parásito y algunos descriptores. Se encontraron correlaciones significantes entre la actividad antiparasitaria y RM (coeficiente de correlación r = 0.83), LogP Moriguchi (r = 0.79) y (mlogP)² (r = 0.74).

Estos resultados reafirman la idea que el mecanismo de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* no ocurriría por inhibición de la cisteín proteasa Cz.

⁵⁹ Locke J, Griffith R, Bailey T, Crumbie R (2009) Competition between cyclisation and bisimine formation in the reaction of 1,3-diaminopropanes with aromatic aldehydes. Tetrahedron 65: 10685-10692

2.3.5 Docking

Se utilizó docking molecular para analizar el modo de unión de las hidrazolil tiazolidinonas a la enzima Cz. Para ello, se seleccionó **10b** por ser el compuesto más activo en Cz del set analizado. La conformación de docking más estable para este derivado se muestra en la Figura 2.17.



Figura 2.17 Representación del sitio activo de cruzaína. En modelo de palos se representan el ligando e importantes residuos. Los átomos de hidrógeno no han sido representados. Los átomos coloreados son C (verde), N (azul), O (rojo), S (amarillo) y Cl (celeste). La interacción de enlace de hidrogeno es de d = 1.93 Å

Se predijo una interacción del tipo enlace de hidrógeno entre el grupo éster del inhibidor y el residuo TRP184, con una distancia de 1.93 Å. Además, el anillo aromático de **10b** hace posible las interacciones lipofílicas con el bolsillo hidrofóbico S₂ de la enzima, representado por los residuos LEU60, ALA136 y MET68. El átomo de cloro se direcciona hacia el final de la cavidad, delimitada por el residuo GLU105, que es capaz de extender su grupo carboxílico para evitar interacciones negativas con ligandos lipofílicos.

Pese a estas interacciones no covalentes que estabilizan el complejo, no se pudo establecer ninguna entre **10b** y los residuos catalíticos CYS25 y/o HIS162, ni ningún ataque nucleofílico. Esta observación podría explicar los resultados observados de la baja actividad inhibitoria en Cz.

2.4 Conclusiones

- Se describió una secuencia sintética en tándem, a partir de reactivos comercialmente disponibles aldehídos o cetonas, metilmaleimida o anhídrido maléico y tiosemicarbazida ó metil tiosemicarbazida, para la obtención de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas, derivadas de ácido, éster y amida.

- Se determinó la actividad biológica en Cz y en *T. cruzi* de los compuestos sintetizados. Los derivados **3i, 3j, 3k, 3m** y **1oc** mostraron la actividad antiproliferativa más alta de *T. cruzi*, en cepa Tul2 a 50 μ M. El compuesto **1ob** resultó el más activo contra Cz pero no así en el parásito. El modo de acción propuesto para estos compuestos se basaría en un mecanismo diferente y no por inhibición de Cz.

 Se evaluó la toxicidad de los compuestos siendo la amida 3m el más selectivo. Para mejorar la actividad antichagásica serían necesarias modificaciones estructurales en estos compuestos.

- Los cálculos de docking permitieron explicar con bases moleculares por que los inhibidores seleccionados fueron capaces de inhibir Cz en el orden μ M. Parecería que **10b** interactuaría con el residuo hidrofóbico de la enzima y no se evidenció un posible ataque nucleofílico de los residuos catalíticos. Los análisis QSAR mostraron una correlación significativa entre mlogP y RM vs actividad anti *T. cruzi* en Tul 2. Se podría inferir que estas correlaciones podrían estar asociadas a la permeación a través de la membrana celular.

- Como todos los métodos de predicción, no debería asumirse que el SV es una estrategia direccional y sin errores; depende de la cantidad y calidad de la información disponible⁶⁰ y de la capacidad predictiva-discriminatoria del algoritmo matemático computacional diseñado. Los descriptores con mejor correlación son usualmente utilizados para caracterizar permeabilidad y biodisponibilidad. Estos resultados podrían ser utilizados de manera iterativa para construir nuevos y refinados modelos para futuros SV.

- El trabajo realizado ha sido publicado en una revista científica arbitrada (7.Anexo).⁶¹

⁶⁰ Scior T, Bernard P, Medina-Franco JL, Maggiora GM (2007) Large Compound Databases for Structure-Activity Relationships Studies in Drug Discovery. Mini-Rev Med Chem 7: 851–860

⁶¹ Pizzo C, Saiz C, Talevi A, Gavernet L, Palestro P, Bellera C, Blanch LB, Benıítez D, Cazzulo JJ, Chidichimo A, Wipf P, Mahler SG (2011) Synthesis of 2-Hydrazolyl-4-Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against Trypanosoma Cruzi. Chem Biol Drug Des 77: 166–172

Parte Experimental 2.5

Consideraciones Generales: aplican a las partes experimentales de todos los capítulos

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN se realizaron en espectrómetros Bruker Avance 400 y 500 MHz, para espectros de ¹H, y 100 y 125 MHz para los ¹³C, en los solventes deuterados que se indican en cada caso. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm tomando como referencia la señal del disolvente o TMS (tetrametilsilano) y las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hz. Los experimentos HMBC desacoplados se obtuvieron utilizando una secuencia de pulsos hmbcgplpndqf de Bruker.

Infrarrojo

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR 8101A Shimadzu, Perkin Elmer 1310 y Bomem MB-102 FTIR en film sobre pastilla de NaCl o formando pastilla de KBr.

Espectrometría de Masas

Las medidas de masa de baja resolución (MS) fueron realizadas en un espectrómetro de masas GCMS Shimadzu QP 1100-EX. Las medidas de masa de alta resolución (HRMS) fueron realizadas en un espectrómetro de masas ESI Q-Tof y VG AutoSpect (modo IE).

Punto de Fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en aparatos Laboratory Devices Gallenkamp y Stuart Digital.

Cromatografía

El seguimiento de las reacciones y columnas cromatográficas fueron realizadas por TLC utilizando placas de Sílica Gel F_{254} de 0.25-mm (Polygram[®] SIL G/UV 254; Macherey-Nagel). La detección se realizó por luz UV (λ = 254 nm), vapores de l₂ o reveladores irreversibles mediante inmersión o pulverización y posterior calentamiento. Los reveladores utilizados fueron p-hidroxibenzaldehído (etanol: H_2SO_4 :PHB, 95:4:1), acido fosfomolíbdico (solución 10% en EtOH), ninhidrina (solución al 5% en BuOH) y vainillina (solución 0.015 g/mL de

vainillina, 1.5% H_2SO4). La purificación de los crudos de reacción se realizó por columna cromatográfica con sílica gel flash 60, de 40 μ m diámetro de partícula (Merck grado 60, 230-400 mesh) como fase estacionaria.

• Microondas

Las reacciones en microondas se realizaron en reactor CEM Discover, equipado con viales de 10 mL.

• Disolventes y reactivos

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de distintas fuentes comerciales y utilizados sin previa purificación. Los disolventes anhidros fueron destilados previamente y luego secados según lo descripto en bibliografía.⁶²

⁶² Perrin D, Amarengo W (1988) Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press, Oxford

2.5.1 Elección de compuestos potencialmente inhibidores de Cz utilizando (SV)

Para seleccionar los posibles nuevos inhibidores de Cz, se realizó un SV Sobre 537503 estructuras químicas obtenidas de la base de datos ZINC 5.37 La metodología utilizada incluyó QSAR 2D basada en la aplicación de análisis lineal discriminante (ALD) y múltiples regresiones lineales (MRL) sobre descriptores moleculares oD-2D, que incluyeron descriptores constitucionales y topológicos, número de grupos funcionales, índice de conectividad, entre otros, obtenidos utilizando el programa DRAGON® (Milano Chemometrics, 2003). De esta manera, se obtuvieron cinco funciones discriminantes (DF1-5) y dos modelos QSAR (Q1 y Q2), para lograr predecir la actividad inhibitoria en Cz. Los datos necesarios para conformar las ecuaciones QSAR se seleccionaron en función de las tiosemicarbazonas¹⁷⁻¹⁸ y mercaptometil cetonas,³⁰ conocidos inhibidores de cruzaína. Los modelos fueron validados internamente con test de randomización y externamente con grupos de compuestos independientes. El tipo de descriptores y el número de vecinos para el set de moléculas de entrada con el coeficiente de similitud de Tanimoto (pasado en pares de átomos) > 0.5, >0.7 y >0.8, fueron utilizados como criterio para la asignación del dominio de aplicabilidad. Los descriptores moleculares incluidos en DF1-5 y Q1-2 así como sus respectivos parámetros estadísticos se resumen en la Tabla 2.5. Todos los modelos resultaron estadísticamente significativos con altos valores de tolerancia.

Modelo	Descriptor	N/d	Tolerancia	% buen	% buen	F	r²
				training set	training set		
DF1	nNH2, nCs,						
	GATS1e,	16.7	0.5	91.0	91.4	27.6	-
	MATS5e,						
	JGI3, JGI8						
DF2	MATS1m,						
	MATS7e,						
	nCt,	17.2	0.5	94.2	96.0	47.1	-
	nCOOH,						
	nC=N,						
	nC=NPh						
DF3	nO,						
	Uindex,	34.3	0.5	87.3	96.0	56.1	-
	GATS1p						
DF4	C-024, C-	34.3	0.5	95.1	100.0	121.9	-
	041, S-108						
DF5	C-041, S-	24.2	0.5	07.1	100.0	12.4.5	
	108, JGI3	34.3	0.5	97.1	100.0	124.5	-
Qı	T(NS), nNHR,	9.4	0.5	-	-	56.9	0.87

Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo

2. Utilización de Screening Virtual: síntesis y evaluación biológica de hidrazolil tiazolidinonas



Tabla 2.5 Caracteristicas generales de los modelos clasificatorios y QSAR utilizados en el SV

2.5.2 Síntesis de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas



Preparación de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3a-e⁵³

La preparación de 3a es representativa

Ácido (RS) 2-(*p*-metoxibenciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il acético (3*a*). Se adicionaron tiosemicarbazida **6a** (220 mg, 2.4 mmol), ácido *p*-TsOH (30 mg, 0.2 mmol) y anhídrido maléico **7** (987 mg, 10.0 mmol), a una solución de *p*-metoxibenzaldehído **5a** (150 mg, 2.0 mmol), en PhMe (1 mL) y DMF (1 mL). La mezcla de reacción se calentó en vial de microondas durante 9 min a 120°C, con agitación, $P_{máx} = 200$ W. Posteriormente, se volcó en H₂O (30 mL) y se extrajo la mezcla con AcOEt (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se recristalizó de MeOH para dar **3a** (170 mg, 61%) como un sólido blanco: PF = 262-263°C; IR (KBr) 3079, 2952, 1729, 1690, 1605, 1513, 1255, 1169, 1007, 831 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.87 (dd, *J* = 8.8, 17.6 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 3.8, 17.6 Hz, 1H), 3.79 (s, 3 H), 4.33 (dd, *J* = 3.8, 8.8 Hz, 1H) 7.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.30 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 36.8, 43.6, 55.5, 79.2, 114.5, 126.9, 129.5,

155.9, 161.4, 163.1, 171.9, 175.6; EIMS calculado para C₁₃H₁₄N₃O₄S [M+H]⁺ 308.1, valor encontrado 308.1.

Ácido (RS) 2-(tiofen-2-ilmetilen hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il acético (3b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3a, utilizando 2-tiofencarbaldehído **5b** para dar **3b** (188 mg, 33%) como un sólido blanco: PF = 255-256°C; IR (KBr) 3032, 2964, 2770, 1696, 1639, 1418, 1345, 1229, 1043, 712 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆)δ2.89 (dd, J = 8.7, 17.6 Hz, 1H), 3.01 (dd, J = 3.8, 17.6 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 3.8, 8.7 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 3.2 Hz, 5.0 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSOd₆) δ 36.6, 43.5, 128.1, 129.8, 131.9, 138.9, 150.7, 163.4, 171.8, 171.8 175.3; EIMS calculado para $C_{10}H_{10}N_{3}O_{3}S_{2}[M+H]^{+}$ 284.0, valor encontrado 284.0.

Ácido (RS) 2-(o-fluorobenciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il acético (3c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3a, utilizando ofluorobenzaldehído 5c para dar 3c (337 mg, 57%) como un sólido blanco: PF = 272-273°C; IR (KBr) 3079, 2775, 2467, 1731, 1683, 1595, 1407, 1231, 947, 759 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.90 (dd, J = 8.8, 17.4 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 3.6, 17.4 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 3.6, 8.8 Hz, 1H), 7.28-7.33 (m, 2H), 7.52 (dd, J = 6.8, 14.0 Hz, 1H), 7.91 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 36.6, 43.6, 116.2 (d, J_{CF} = 21 Hz), 121.7 (d, J_{CF} = 10 Hz), 125.0 (d, J_{CF} = 4 Hz), 127.3, 132.7 (d, J_{CF} = 9 Hz), 149.0, 160.9 (d, J_{CF} = 250 Hz), 171.8, 175.5; EIMS calculado para C₁₂H₁₁FN₃O₃S [M+H]⁺ 296.0, valor encontrado 296.1.

Ácido (RS) 2-(p-nitrobenciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il acético (3d). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3a, utilizando pnitrobenzaldehído 5d para dar 3d (393 mg, 61%) como un sólido blanco: PF = 270-271°C (dec); IR (KBr) 2946, 2779, 1716, 1641, 1527, 1344, 1263, 846 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.92 (dd, J = 11.5, 16.3 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 3.7, 16.3 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 3.7, 11.5 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.31 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.55 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 36.5, 43.6, 124.0, 128.5, 140.3, 148.2, 154.2, 167.7, 171.6, 175.4; EIMS calculado para C₁₂H₁₁N₄O₅S [M+H]⁺ 323.0, valor encontrado 323.0.

Ácido (RS) 2-(p-clorobenciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidinin-5-il acético (3e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3a, utilizando pclorobenzaldehído 5e para dar 3e (436 mg, 70%) como un sólido blanco: PF = 273-274°C; IR (KBr) 3089, 2964, 2784, 1734, 1689, 1629, 1404, 1294, 1089, 824 cm⁻¹; ¹H RMN (D_2O/K_2CO_3) δ 2.41 (dd, J = 11.5, 16.2 Hz, 1H), 3.00 (dd, J = 3.6, 16.2 Hz, 1H), 4.15 (dd, J = 3.6, 11.5 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.17 (s, 1H); ¹³C RMN (D_2O/K_2CO_3) δ 41.9, 49.9, 128.9, 132.7, 135.7, 153.7, 166.6, 179.3, 182.1, 191.7; HRMS calculado para C₁₂H₁₁ClN₃O₃S [M+H]⁺ 312.01314, valor encontrado 312.02200.

Preparación de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas 3f-n La preparación de **3f** es representativa

(RS)-2-((2-(benciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3f). Se adicionaron tiosemicarbazida 6a (136 mg, 1.5 mmol) y ácido *p*-TsOH (2 mg, 0.01 mmol), a una solución de benzaldehído 5f (200 mg, 1.9 mmol), en PhMe (1 mL) y DMF (1 mL). La mezcla de reacción se calentó en vial de microondas durante 3 min a 90°C, con agitación, $P_{máx}$ = 200 W. Por TLC se detectó la formación de la tiosemicarbazona y se adicionó metilmaleimida 8 (138 mg, 1.3 mmol) y la mezcla de reacción se calentó en microondas durante 10 min a 110°C. El residuo se recristalizó de MeOH/H₂O (1:1) para dar 3f (237 mg, 65%) como un sólido blanco: PF = 253–254°C (dec); IR (KBr) 3321, 1712, 1644, 1569 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.58 (d, *J* = 4.7, 3H), 2.64 (dd, *J* = 9.9, 16.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 3.7, 16.2 Hz 1H), 4.31 (dd, *J* = 3.7, 9.9 Hz 1H), 7.44-7.46 (m, 3H), 7.74-7.76 (m, 2H), 8.00 (c, *J* = 4.7, 1H), 8.39 (s, 1H), 11.93 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.9, 37.8, 44.1, 127.4, 127.7, 128.7, 128.9, 130.7, 134.3, 156.1, 164.7, 169.3, 175.9; HRMS calculado para C₁₃H₁₅N₄O₂S [M+H]⁺ 291.09160, valor encontrado 291.09180.

(RS)-2-(2-(tiofen-2-ilmetilen hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3g). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando 2-tiofen-3-carbaldehído 5b para dar 3g (333 mg, 75%) como un sólido amarillo: PF = 246–247°C (dec); IR (KBr) 3324, 1712, 1640, 1571 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.59 (d, J = 4.7 Hz, 3H), 2.60-2.67 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 3.5, 16.1 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 3.5, 9.7 Hz, 1H), 7.14-7.16 (m, 1H), 7.49 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 0.8, 4.2 Hz, 1H), 7.97 (c, J = 4.7 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 11.82 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.5, 37.8, 44.0, 128.0, 129.7, 131.9, 138.9, 150.5, 164.7, 169.2, 175.7; HRMS calculado para C₁₁H₁₃N₄O₂S₂ [M+H]⁺ 297.04800, valor encontrado 297.04870.

(RS)-2-(2-(p-metoxibenciliden hidrazono)-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3h). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando p-metoxibenzaldehído 5a para dar 3h (389 mg, 81%) como un sólido blanco: PF = 250–251°C; IR (KBr) 3320, 1714, 1641, 1613, 1513 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 2.62-2.66 (m, 1H), 2.92 (dd, *J* = 3.7, 16.1 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.29 (dd, *J* = 3.7, 9.9 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.99 (c, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 11.85 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.6, 37.9, 44.0, 55.4, 114.4, 126.9, 129.3, 155.7, 155.8, 161.3, 169.2, 175.9; HRMS calculado para C₁₄H₁₇N₄O₃S [M+H]⁺ 321.10210, valor encontrado 321.10220.

(RS)-2-(2-(p-clorobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3i). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando p-clorobenzaldehído 5e y metil tiosemicarbazida 6b para dar 3i (447 mg, 88%) como un sólido blanco: PF = 225–226°C; IR (KBr) 3305, 1717, 1646, 1621, 1578 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.66 (dd, J = 10.2, 16.1 Hz, 1H), 2.86 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 3.17 (dd, J = 3.8, 16.1 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 4.37 (dd, J = 3.8, 10.2 Hz, 1H), 5.56 (bs, 1H), 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.37 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.5, 29.4, 37.6, 43.1, 129.0, 129.3, 133.1, 135.2, 156.1, 165.2, 169.1, 174.2; HRMS calculado para $C_{14}H_{15}CIN_4O_2SNa$ [M+Na]⁺ 361.04960, valor encontrado 361.04980.

(RS)-2-(2-(o-bromobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3j). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando obromobenzaldehído 5j y metil tiosemicarbazida 6b para dar 3j (334 mg, 55%) como un sólido blanco: PF = 208–209°C; IR (KBr) 3318, 1716, 1644, 1623, 1609 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.58 (d, J = 4.5 Hz, 3H), 2.71 (dd, J = 9.6, 16.4 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 3.6, 16.4 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 4.39 (dd, J = 3.6, 9.6 Hz 1H), 7.45 (dt, J = 7.6, 28.7 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.01 (c, J = 4.5 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.6, 29.5, 37.6, 43.2, 124.1, 128.0, 128.3, 132.5, 132.6, 133.4, 155.4, 166.5, 169.2, 174.3; HRMS calculado para $C_{14}H_{15}BrN_4O_2SNa [M+Na]^+ 404.99970$, valor encontrado 404.99860.

(RS)-2-(2-(p-fluorobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3k). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando pfluorobenzaldehído 5k y metil tiosemicarbazida 6b para dar 3k (314 mg, 65%) como un sólido blanco: PF = 226–227°C; IR (KBr) 2957, 1721, 1698, 1630 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.59 (d, J = 4.6 Hz, 3H), 2.69 (dd, J = 9.7, 16.3 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 3.7, 16.3 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 4.37 (dd, J = 3.7, 9.7 Hz, 1H), 7.29-7.33 (m, 2H), 7.82-7.85 (m, 2H), 8.02 (c, J = 4.6 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25.5, 29.4, 37.7, 43.1, 116.0 (d, J_{CF} = 22 Hz), 130.0 (d, J_{CF} = 9 Hz), 130.8 (d, J_{CF} = 3 Hz), 156.2, 163.6 (d, J_{CF} = 245 Hz), 169.1, 174.2; HRMS calculado para $C_{14}H_{16}FN_4O_2S[M+H]^+$ 323.09780, valor encontrado 323.09730.

(RS)-2-(2-(m-bromobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (31). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando mbromobenzaldehído 5l y metil tiosemicarbazida 6b para dar 3l (431 mg, 75%) como un sólido blanco: PF = 214–215°C; IR (KBr) 3309, 1717, 1644, 1621, 1571 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.67 (dd, J = 10.1, 16.0 Hz, 1H), 2.86 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 3.16 (dd, J = 3.7, 16.0 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 4.37 (dd, J = 3.7, 10.1 Hz, 1H), 5.60 (bs, 1H), 7.25-7.29 (m, 2H), 7.56 (ddd, J = 1.0, 1.8, 7.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.92 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 26.7, 29.9, 39.5, 43.6, 123.0, 127.0, 130.3, 130.7, 133.7, 136.4, 156.9, 164.9, 169.4, 174.4; HRMS calculado para $C_{14}H_{16}BrN_4O_2S[M+H]^+$ 383.01770, valor encontrado 383.01710.

(RS)-2-(2-(1-(m-bromofeniletiliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3m). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando m-bromoacetofenona 5m y metil tiosemicarbazida 6b para dar 3m (524 mg, 88%) como un sólido amarillento: PF = 181–182°C; IR (KBr) 3313, 1706, 1644, 1609, 1571 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.42 (s, 3H), 2.58 (d, J = 4.6 Hz, 3H), 2.70 (dd, J = 9.5, 16.3 Hz, 1H), 2.97 (dd, J = 3.6, 16.3 Hz, 1H), 3.21 (s, 3H), 4.35 (dd, J = 3.6, 9.5 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.01 (t, J = 1.8 Hz, 1H); 13 C (DMSO-d₆) δ 14.4, 25.5, 29.5, 37.6, 43.1, 121.9, 125.5, 128.8, 130.7, 132.5, 140.0, 160.1, 164.2, 169.1, 174.2; HRMS calculado para $C_{15}H_{18}BrN_4O_2S[M+H]^+$ 397.03340, valor encontrado 397.03380.

(RS)-2-(2-(p-trifluorometilbenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (3n). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 3f, utilizando p-trifluorometilbenzaldehído **5n** y metil tiosemicarbazida **6b** para dar **3n** (503 mg, 90%) como un sólido blanco: PF = 220-221°C; IR (KBr) 3294, 1719, 1644, 1623, 1586, 1559 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.68 (dd, J = 12.0, 23.1 Hz, 1H), 2.86 (d, J = 4.5 Hz, 3H), 3.17 (dd, J = 3.7, 23.1 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 4.37 (dd, J = 3.7, 12.0 Hz, 1H), 5.64 (bs, 1H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.87 $(d, J = 8.2 \text{ Hz}, 2\text{H}), 8.43 (s, 1\text{H}); {}^{13}\text{C} \text{ RMN} (\text{CDCl}_3) \delta 26.7, 29.8, 39.5, 43.6, 124.0 (c, J_{CF3} = 272 \text{ Hz}),$

125.7 (c, J_{CF_3} = 4 Hz), 128.4, 132.3 (c, J_{CF_3} = 32 Hz), 137.7, 156.8, 165.5, 169.4, 174.4; HRMS calculado para $C_{15}H_{16}F_3N_4O_2S [M+H]^+$ 373.09460, valor encontrado 373.09470.



Preparación de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas-5,6-α,β-insaturados 10a-e La preparación de **10c** es representativa

(5Z)-2-(p-fluorobenciliden hidrazono)-3-metil-5-metoxicarbonilmetilen-tiazolidin-4-ona (1oc). Se adicionaron metil tiosemicarbazida **6b** (140 mg, 1.3 mmol) y ácido *p*-TsOH (15 mg, 0.1 mmol) a una solución de *p*-fluorobenzaldehído **5k** (150 mg, 1.2 mmol) en EtOH seco (5 mL). Por TLC se detectó la formación de la metil tiosemicarbazona y se adicionó acetilendicarboxilato de metilo **9** (189 mg, 1.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 h, formándose un precipitado amarillo. Este se recristalizó de AcOEt para dar **10c** (304 mg, 81%) como un sólido amarillo: PF = 214–215°C; IR (KBr) 3077, 1716, 1633, 1595 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.44 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 7.09-7.14 (m, 2H), 7.79-7.83 (m, 2H), 8.44 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.8, 52.7, 116.0, 116.2, 130.2 (d, *J*_{CF} = 3 Hz), 130.6 (d, *J*_{CF} = 9 Hz), 141.9, 158.7, 160.7, 164.8 (d, *J*_{CF} = 252 Hz), 166.2, 166.6; HRMS calculado para C₁₄H₁₃FN₃O₃S [M+H]⁺ 322.06620, valor encontrado 322.06500.

(5Z)-2-(p-metoxibenciliden hidrazono)-5-metoxicarbonilmetilen-tiazolidin-4-ona (10a). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 10c, utilizando p-metoxibenzaldehído 5a y tiosemicarbazida 6a para dar 10a (272 mg, 71%) como un sólido amarillo: PF = $260-261^{\circ}C$ (dec); IR (KBr) 2961, 1725, 1700 1643, 1606 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.66 (s, 1H), 7.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.46 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 52.4, 55.4, 114.0, 114.5, 126.3, 129.8, 143.1, 158.3, 161.8, 165.7, 165.9.

(5Z)-2-(p-clorobenciliden hidrazono)-3-metil-5-metoxicarbonilmetilen-tiazolidin-4-ona (10b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 10c, utilizando pclorobenzaldehído 5e para dar 10b (367 mg, 85%) como un sólido amarillo: PF = 204–205°C; IR (KBr) 2949, 1711, 1703, 1621, 1581 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.44 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.42 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 52.7, 116.1, 129.2, 129.7, 132.4, 137.4, 141.8, 158.7, 161.1, 165.2, 166.6; HRMS calculado para C₁₄H₁₂ClN₃O₃SNa [M+Na]⁺ 360.01800, valor encontrado 360.01790. (5Z)-2-(p-trifluorometilbenciliden hidrazono)-3-metil-5-metoxicarbonilmetilen-tiazolidin-4ona (1od). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 10c, utilizando p-trifluorometilbenzaldehído 5n para dar 10d (425 mg, 90%) como un sólido amarillo: PF = 187–188°C; IR (KBr) 2956, 1711, 1646, 1630 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.46 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 6.93 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.51 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 52.7, 116.4, 123.9 (c, J_{CF3} = 272 Hz), 125.8 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 128.7, 132.8 (c, J_{CF3} = 33 Hz), 137.2, 141.6, 158.4, 162.0, 165.2, 166.6; HRMS calculado para C₁₅H₁₂F₃N₃O₃SNa [M+Na]⁺ 394.04440, valor encontrado 394.04430.

(5Z)-2-(p-metoxibenciliden hidrazono)-3-metil-5-metoxicarbonilmetilen-tiazolidin-4-ona (10e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la tiazolidinona 10c, utilizando p-metoxibenzaldehído 5a para dar 10e (349 mg, 87%) como un sólido amarillo: PF = 192–193°C; IR (KBr) 2958, 1703, 1631, 1604 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.44 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.90 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.42 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.8, 52.6, 55.6, 114.4, 115.7, 126.7, 130.3, 142.2, 159.6, 159.7, 162.4, 165.3, 166.7; HRMS calculado para C₁₅H₁₅N₃O₄S [M+H]⁺ 334.08560, valor encontrado 334.08568.

2.5.3 Evaluación biológica in vitro de 2-hidrazolil-4-tiazolidinonas

2.5.3a Evaluación en Cruzipaína (Cz)

La Cruzipaína (Cz) utilizada en el presente trabajo fue proporcionada por el grupo del Prof. Juan José Cazzulo, el cual purificó la misma a partir de un extracto de epimastigotes de T. *cruzi* cepa Tulahuen 2.⁵⁶ El extracto se obtuvo mediante un proceso de congelamiento y descongelamiento y luego se purificó la enzima por cromatografía de afinidad en ConA-Sepharose, la cual une carbohidratos, seguido por cromatografía de intercambio iónico Mono Q. Esta última instancia es necesaria para obtener los stocks de Cz libres de serín carboxipeptidasas, que copurifican con Cz en la cromatografía con ConA-Sepharose.⁶³

La actividad inhibitoria enzimática de las hidrazolil tiazolidinonas se ensayó a concentración final de inhibidor 100 μ M, conteniendo Buffer Tris-HCl, pH 7.6 (50 mM), Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (0.150 mM), β -mercaptoetanol (10 mM) y Cruzipaína (Cz) (0.140 μ M). La absorbancia se midió a 410 nm y fue monitoreada a 30°C, utilizando un espectrofotómetro Beckman® Model 25. Las soluciones de las tiosemicarbazonas fueron preparadas en DMSO y el control positivo utilizado fue E64 (100% inhibición a 10 μ M). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. El Porcentaje de Inhibición Enzimática (PIE) en Cz se calculó como: PIE (%) = (A_i/A)x100, siendo A_i y A las absorbancias con y sin inhibidor, respectivamente.

⁶³ Parussini F, García M, Mucci J, Agüero F, Sánchez D, *et al.* (2003) Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 131: 11–23

2.5.3b Evaluación en epimastigotes de T. cruzi y células Vero

Actividad tripanocida

Los epimastigotes de la cepa Tulhahuen 2 crecieron a 28°C en medio axénico (BHT-triptosa), complementado con 10% suero fetal inactivado. Luego de 4 días del cultivo (fase exponencial), las células se inocularon con medio fresco para lograr una concentración final de 13×10^6 /mL. Luego de la inoculación, cada cultivo se suplementó con los inhibidores logrando una concentración final de 50 μ M. El crecimiento de los epimastigotes se monitoreó por conteo de los parásitos en campana de Neubauer. Los valores correspondieron a la densidad de parásitos luego de 8 días. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue entre 0.7-1.5%; el control se realizó a la misma concentración de DMSO en ausencia de inhibidor. Este rango de concentraciones de DMSO en el medio de cultivo no causó efectos significativos en el crecimiento de los epimastigotes. El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) se calculó: PIC (%) = {1-[(N_p-No_p)/(N_c-No_c)]}% 100, donde Np y Nop son el número de células del medio de cultivo conteniendo el inhibidor a 8 y o días, respectivamente; Nc y Noc son el número de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de celulas del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de células del medio de cultivo conteniendo el inhibidor a 8 y o días, respectivamente; Nc y Noc son el número de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero de células del medio de cultivo conteniendo el inhibidor a 8 y o días, respectivamente; Nc y Noc son el número de células del medio de cultivo en ausencia de inhibidor a fuero día 8 y o, respectivamente.

Toxicidad en células Vero

Se sembraron las células Vero en una placa de 24 pocillos Corning® (10000 células/pocillo) con tapa, conteniendo 500 μ L de medio de cultivo MEM suplementado con 10% de suero fetal de ternero. Las células crecieron durante 24 h en ambiente 5% CO₂/95% aire, a 37°C. Luego, se agregaron los compuestos (50 y 100 μ M) y se dejaron durante 24 h. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se adicionó medio MEM con 4% de suero fetal de ternero (sin inhibidor); luego la placa fue incubada a 37°C durante 48 h. Las células se fijaron y tiñeron con May Grunwald–Giemsa. Utilizando microscopía de contraste se determinó la actividad de los inhibidores en células Vero, [inhibidor] = 100 μ M, por comparación con los controles de células Vero sin inhibidor; de esta manera se logró clasificar los compuestos como tóxicos y no tóxicos.

2.5.4 Modelado Molecular y estudios QSAR



Compuesto	HOMO (eV)	LUMO (eV)	MR	mlogP
-----------	-----------	-----------	----	-------

заR	-5.660	-1.415	70.19	-0.024
3aS	-5.687	-1.442	70.19	-0.024
3bR	-5.823	-1.415	64.42	-0.645
3bS	-5.905	-1.633	65.26	-0.606
3cR	-6.095	-1.769	63.67	0.600
3cS	-6.041	-1.796	63.67	0.600
3dR	-6.449	-2.749	69.95	0.199
3dS	-6.531	-2.776	69.95	0.199
3eR	-6.041	-1.823	71.64	0.481
3eS	-6.041	-1.823	71.64	0.481
3fR	-5.823	-1.551	70.18	0.061
3fS	-6.041	-1.769	70.18	0.061
3gR	-6.041	-1.687	71.98	-0.720
3gS	-6.041	-1.687	71.98	-0.720
1hR	-6.449	-1.524	76.91	-0.167
3hS	-5.850	-1.660	76.91	-0.167
зiR	-6.041	-1.850	82.97	1.000
3iS	-6.041	-1.850	82.97	1.000
3jR	-6.068	-2.041	85.86	1.126
3jS	-6.150	-2.041	85.86	1.126
3kR	-5.960	-1.551	78.23	0.873

ସ Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo

2. Utilización de Screening Virtual: síntesis y evaluación biológica de hidrazolil tiazolidinonas

3kS	-6.150	-1.687	78.23	0.873
3IR	-6.231	-1.905	85.96	1.126
3IS	-6.231	-1.905	85.96	1.126
3mR	-6.041	-1.741	90.37	1.372
3mS	-6.041	-1.741	90.37	1.372
3nR	-6.231	-2.041	83.66	1.372
3nS	-6.340	-2.068	83.66	1.372
10a	-5.796	-2.395	75.99	0.124
10b	-6.095	-2.531	78.96	1.139
10C	-6.123	-2.503	74.37	1.012
10d	-6.259	-2.612	80.13	1.511
10e	-5.633	-2.313	81.73	0.418

Tabla 2.6 Propiedades moleculares y electrónicas de las hidrazolil tiazolidinonas ensayadas 3a-n y 10a-e. EELUMO, MR y mlogP.

2.5.5 Docking

Análisis conformacional y Docking⁶⁴

El análisis conformacional de los compuestos ensayados se realizó utilizando una herramienta de búsqueda conformacional, proveniente del programa HyperChem® versión 7.01 (Hypercube Inc., 2002). La minimización de geometría se realizó utilizando mecánica molecular (MM+) con un gradiente convergente de 0.1 kcal/(Å mol). Los cinco confórmeros de menor energía se refinaron a un nivel semiempírico con la base PM3 y un gradiente convergente de 0.05 kcal/(Å mol). Los confórmeros seleccionados fueron refinados utilizando el programa Gaussiano3 ® (B3LYP/6-31G**). Las cargas fueron calculadas bajo los mismos parámetros. La unión del compuesto **10b** a Cz se analizó utilizando programas de docking AutoDockTools 1.5.2 y AutoDock 4.0.

⁶⁴ Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, *et al.* (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. J Comput Chem 19: 1639-1662


ගි Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo





























र्ज Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo









Capítulo 3:

Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas

3.1 Antecedentes

Las tiosemicarbazonas 1 (TSC) son compuestos que han sido descriptos como inhibidores reversibles de la enzima cruzaína, la proteína recombinante de Cruzipaína. Estos han mostrado valores de IC_{50} entre 20-200 nM, siendo tripanocidas a estas concentraciones (Figura 3.1).^{1,2,3}



Figura 3.1 Valores publicados de IC₅₀ para TSC, como compuestos inhibidores de cruzaína. **1a:** *m*-bromofenilmetil tiosemicarbazona, [cruzaína] = 1 nM;¹ **1b:** *bis m*-bromofenilmetil tiosemicarbazona, [cruzaína] = 0.1 nM;² **1c:** *m*,*p*-diclorofenilbutil tiosemicarbazona, [cruzaína] = 0.1 nM.³

El mecanismo de inhibición de estos compuestos no es conocido, pero Du *et al.* plantearon que podría involucrar un ataque nucleofílico del grupo tiolato de la Cys-25 de la enzima al grupo tiocarbonilo de la TSC (Figura 2.5, capítulo 2).¹ Pese a que estos compuestos y sus aplicaciones han sido previamente patentados,⁴ estudios posteriores fueron discontinuados.

La utilización de compuestos organoselenados en química medicinal ha venido creciendo como consecuencia de sus interesantes propiedades biológicas, algunas de las cuales los describen como inhibidores de tiorredoxin reductasa,⁵ inhibidores de butiril colinesterasa⁶ y como agentes antitumorales,⁷ entre otros.

¹ Du X, Guo C, Hansell E, Doyle P, Caffrey C, *et al.* (2002) Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the tryanosomal cysteine protease Cruzain. J Med Chem 45: 2695-2707

² Siles R, Chen S, Zhou M, Pinney KG, Trawick ML (2006) Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. Bioorg Med Chem Lett 16: 4405–4409

³ Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, Mackey Z, Doyle P, *et al.* (2005) Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. Bioorg Med Chem Lett 15: 121–123

⁴ Cohen FE, Du X, Guo C, McKerrow JH (2004) Thiosemicarbazone and semicarbazone inhibitors of cysteine proteases and methods of their use. US Pattent Application 20040014801

 $^{^{5}}$ (a) Nogueira C W, Zeni G, Rocha J (2004) Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxic Pharma. Chem Rev 104: 6255-6285; (b) Halehatty RPN, Halehatty SBN, Thangali RRN, H Raja N, K Gouthamchandra, *et al.* (2009) Synthesis of novel benzo[*h*]quinolines: Wound healing, antibacterial, DNA binding and in vitro antioxidant activity. Eur J Med Chem 44: 981–98

Dentro de esta familia de compuestos, las selenosemicarbazonas han sido ampliamente mencionadas en literatura en base a sus propiedades como antivirales⁸ y antimaláricos,⁹ (Figura 3.2). Recientemente, Filipovic *et al.* prepararon derivados de selenosemicarbazona que presentaron actividad antibacterial y antineoplásica (Figura 3.2).¹⁰



Figura 3.2 Selenosemicarbazonas biológicamente activas

El reemplazo isostérico es una estrategia muy utilizada en el diseño de fármacos. Teniendo como base una molécula líder, se pueden realizar modificaciones estructurales buscando potenciar o atenuar ciertas propiedades biológicas.¹¹

A partir de tiosemicarbazonas biológicamente activas y utilizando esta estrategia, se han descripto varias selenosemicarbazonas en los que su actividad biológica está potenciada, en comparación con la de sus análogos azufrados y oxigenados (Figura 3.3).^{12,13}

⁶ Tasso B, Catto M, Nicolotti O, Novelli F, Tonelli M, *et al.* (2011) Quinolizidinyl derivatives of bi- and tricyclic systems as potent inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase with potential in Alzheimer's disease. Eur J Med Chem 46: 2170–2184

⁷ Arsenyan P, Rubina K, Shestakova I, Domracheva I (2007) 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides: Antitumor action and cytotoxic effect correlation. Eur J Med Chem 42: 635-664

⁸ Turk SR, Shipman Jr C, Drach JC (1986) Structure-activity relationships among alpha-(N)-heterocyclic acyl thiosemicarbazones and related compounds as inhibitors of herpes simplex virus type 1-specified ribonucleoside diphosphate reductasa. J Gen Virol 67: 1625-1632

⁹ (a) Klayman DL, Scovill JP, Bartosevich JF, Mason CJ (1981) 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. Eur J Med Chem 16: 317-320; (b) Klayman DL, Scovill JP (1987) 2-acetyl and 2-propionylpyridine selenosemicarbazone. US patent 4665173

¹⁰ Filipovic' N, Polovic' N, Raskovic' B, Misirlic'-Dencic' S, Dulovic' M, et al. (2014) Biological activity of two isomeric N-heteroaromatic selenosemicarbazones and their metal complexes. Monatsh Chem 145:1089–1099

¹¹ Moreira LM, Barreiro EJ (2005) Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. Curr Med Chem 12: 23–49.

¹² Kowol CR, Eichinger R, Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, *et al.* (2007) Effect of metal ion complexation and chalcogen donor identity on the antiproliferative activity of 2-acetylpyridine N, N dimethyl (chalcogen) semicarbazones. J Inorg Biochem 101: 1946-1957

¹³ Revenko MD, Prisacari VI, Dizdari AV, Stratulat EF, Corja ID, *et al.* (2011) Synthesis, antibacterial, and antifungal activities of 8-quinolinealdehyde chalcogensemicarbazones and their copper(II) complexes. Pharm Chem J 45: 351-354



Figura 3.3 Reemplazo isostérico de azufre por oxígeno y selenio en tiosemicarbazonas biológicamente activas

Kowol *et al.* discutieron el efecto citotóxico de 2-piridin N,N-dimetil (chalcógeno) semicarbazonas (Figura 3.3). Determinaron que la actividad antiproliferativa depende del sustituyente X, siendo las semicarbazonas las menos activas, luego las tiosemicarbazonas y las selenosemicarbazonas mostraron los mejores resultados.¹²

Posteriormente, Revenko *et al.* estudiaron las actividades antibacteriales de una serie semicarbazonas derivadas de isoquinolin carbaldehído y sus análogos de S y Se (Figura 3.3). Solamente las selenosemicarbazonas mostraron actividad contra organismos gram positivo, mientras que las tiosemicarbazonas resultaron activas solamente al estar coordinadas con Cu(II). Las semicarbazonas resultaron inactivas.¹³

Centrándonos en nuestro objetivo hacia la preparación de selenosemicarbazonas **2**, y considerando que el Selenio comparte propiedades electrónicas similares con el Azufre, se propuso preparar derivados selenados, por reemplazo isostérico del S presente en las TSC **1** por Se, y generar un grupo selenocarbonilo (Figura 3.4).



Figura 3.4 Reemplazo isostérico S-Se en tiosemicarbazonas 1 para dar selenosemicarbazonas 2. R₁: alquilo, arilo; R₂: H, alquilo

De acuerdo a lo planteado por Du *et al.*¹ respecto a el mecanismo de inhibición de las tiosemicarbazonas, las selenosemicarbazonas podrían tener un mecanismo similar. Dicho reemplazo podría transformar el selenocarbonilo en una especie más efectrofílica al ataque del tiolato del sitio activo de la Cz, resultando mejores inhibidores enzimáticos.

3.2 Objetivos específicos

En el presente capítulo se plantea como objetivo la preparación de compuestos organoselenados del tipo selenosemicarbazona, su evaluación biológica como inhibidores enzimáticos de Cz y como agentes anti *T. cruzi*.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Preparación de selenosemicarbazonas

3.3.1a Síntesis de selenosemicarbazonas a partir de selenosemicarbazida

Con el fin de sintetizar análogos selenados de tiosemicarbazonas, se preparó una serie de seis selenosemicarbazonas **2a-f**, a partir de reactivos comercialmente disponibles: cetonas o aldehídos **3** y selenosemicarbazida **4**. Los parámetros de sustitución de las cetonas y aldehídos se eligieron en función de los resultados biológicos que se obtuvieron para sus análogos azufrados. Se trabajaron en dos condiciones de reacción: EtOH y AcOH, con calentamiento a reflujo, *condiciones* A, o con calentamiento utilizando microondas (μ w), *condiciones* B (Tabla 3.1).

	Se H ₂ N N	Condiciones	R ₂ NNN NHa
3a-f	H 4	ΑοΒ	Н ^{н. 12} R ₁ 2а-f

Entrada	R ₁	R ₂	Condiciones	R (%)
1	<i>m</i> -BrPh	Me	А	2a, 53
2	m-BrPh	Н	А	2b, 46
3	<i>m,p-</i> diClPh	Н	А	2c, 77
4	m-CF ₃ Ph	Н	В	2d, 52
5	m-BrPh	m-BrPh	В	2e, 27
6	<i>m,p-</i> diClPh	n-But	В	2f, 55

Condiciones: A) AcOH (cat.)/EtOH, reflujo 4 h; B) *p*-TsOH (cat.)/EtOH, μw 6 min, 90°C.

Tabla 3.1 Síntesis de selenosemicarbazonas 2a-f a partir de aldehídos o cetonas 3 y selenosemicarbazida 4.

Los rendimientos resultaron moderados a buenos (46-77%), excepto por **2e** que fue obtenido en un modesto 27%, probablemente debido a la baja reactividad de la cetona **3e**.

Las selenosemicarbazonas derivadas de cetonas **2a** y **2f**, dependiendo de las condiciones de reacción presentaron isomería *Z*:*E*. En condiciones de reflujo, **2a** se obtuvo como un solo isómero. Para distinguir cuál de ellos fue el obtenido, se realizó un experimento de NOESY RMN (Figura 3.5). Mediante el mismo, se irradió selectivamente un H (correspondiente al NH de la carbazona, ¹H δ = 10.5 ppm) y se evaluó el efecto generado en su entorno químico cercano. Se observó que la irradiación fue captada por una señal que aparece a 2.3 ppm, que corresponde al CH₃ de la imina. Así, se concluye que ambos estarían orientados hacia el mismo lado del plano, por lo tanto se estaría frente al isómero *E*, que es el termodinámicamente más estable.



Figura 3.5 Efecto NOE para isómeros Z:E de 2a

Al utilizar microondas, se obtuvo **2a** como mezcla de isómeros. En este caso, mediante ¹H RMN se determinó la proporción de ambos, la cual resultó ser 1:1. Los intentos de aislar ambos isómeros fueron fallidos pues al cabo de un tiempo (12 h) en solución lograron reequilibrarse y se obtuvo nuevamente la mezcla.

La selenosemicarbazona **2f** se obtuvo como mezcla inseparable de isómeros *Z*:*E*, y los intentos para aislarlos tampoco resultaron fructíferos pues se reequilibraron luego de 3 h, aproximadamente. El derivado **2e** posee un plano de simetría en la molécula y no presenta isomería *Z*:*E* en torno del doble enlace C=N.

Los aldehídos **3b-d**, y la cetona **3a** son reactivos comercialmente disponibles. Las cetonas **3e-f** fueron sintetizadas a partir de los aldehídos correspondientes mediante una adición de Grignard al carbonilo y posterior oxidación; los resultados se muestran en la Tabla 3.2.



Entrada	R ₁	R ₂	R(%)	R (%)
1	<i>m</i> -BrPh	m-BrPh	5e, 25	3e, 23
2	m,p-diClPh	n-Bu	5f, 62	3f , 68

Tabla 3.2 Síntesis de cetonas 3e-f, por reacción de Grignard con el aldehído correspondiente, y posterioroxidación del alcohol 5e-f

La reacción de Grignard dio rendimientos variados. Para el alcohol **5e** fue relativamente bajo y podría explicarse por la voluminosidad del reactivo de Grignard correspondiente, lo que podría dificultar la formación del alcohol.

Desarrollo de nuevas metodologías de obtención de selenosemicarbazonas

La ruta sintética utilizada hasta el momento para la preparación de selenosemicarbazonas partía de selenosemicarbazida como reactivo que contiene el selenio. Debido a la discontinuidad de éste en el mercado y con la idea de preparar nuevos derivados se trabajó en la puesta a punto de metodologías alternativas para la preparación de selenosemicarbazonas.

3.3.1b Síntesis de selenosemicarbazonas a partir de KSeCN

Las rutas sintéticas conocidas para la preparación de tiosemicarbazonas podrían aplicarse de manera análoga para la preparación de selenosemicarbazonas. Una de ellas es utilizando KSCN, hidracina y cetonas, para la obtención de tiosemicarbazonas.¹⁴

¹⁴ Puetzer B (1954) Preparation of benzalthiosemicarbazones. US patent 2688636

Huls *et al.* describieron la utilidad de KSeCN para la preparación de selenosemicarbazida, a partir de hidracina y aldehídos o cetonas. Los autores sintetizaron una serie de selenosemicarbazonas con bajos rendimientos.¹⁵

Recientemente, Bippus *et al.* plantearon la optimización del procedimiento sintético previamente patentado,¹⁶ para la obtención de la selenosemicarbazona derivada de la ciclohexanona.¹⁷ Dada la estabilidad de la ciclohexanona selenosemicarbazona y los buenos rendimientos obtenidos en su síntesis, los autores proponen utilizar la ciclohexanona selenosemicarbazona para efectuar intercambios con aldehídos. Es así que prepararon una serie de selenosemicarbazonas derivadas de aldehídos, con buenos rendimientos (Figura 3.6).



Figura 3.6 Síntesis de selenosemicarbazonas utilizando ciclohexanona selenosemicarbazona como material de partida, por intercambio con diferentes aldehídos, de acuerdo a Bipus *et al.*¹⁷

Tomando en cuenta este antecedente, se pensó en utilizar esta metodología para la preparación de nuevos derivados selenosemicarbazona. En primera instancia, se trabajó en las condiciones planteadas para la ciclohexanona selenosemicarbazona **2g** (Entrada 1, Tabla 3.3), en la que se obtuvo una mezcla compleja de difícil purificación, aislándose **2g** con 24% de rendimiento.

¹⁵ Huls R, Renson M (1956) La selenosemicarbazida et ses derives. Bull Soc Chim Helg 65: 511-522

¹⁶ Fry DJ, Keogh PJ (1973) Production of selenium compounds. UK patent 1326597

¹⁷ Bippus P, Molter A, Müller D, Mohr F (2010) Cyclohexanone selenosemicarbazone: A convenient starting material for the preparation of functionalized selenosemicarbazones and their Pt and Pd complexes. J Organomet Chem 695: 1657-1662

Cuando se intentó aplicar esta metodología utilizando otras cetonas, se obtuvieron los derivados correspondientes con bajos rendimientos (Entradas 2-4, Tabla 3.3).



Entrada	R ₁	R ₂	R (%)
1	-(CH ₂)	;-	2g, 24
2	Ph	Me	2h, 8*
3	m, p-diClPh	Me	2i , 6*
4	m-BrPh	Me	2a, 5*

*Rendimiento del producto aislado obtenido como mezcla Z:E.

Tabla 3.3 Síntesis de selenosemicarbazonas 2g-i y 2a a partir de KSeCN e hidracina y la cetona correspondiente.

Si bien el KSeCN está comercialmente disponible, los rendimientos de la reacción de obtención de **2h, 2i, 2a** (Entradas 2-4, Tabla 3.3), resultaron muy bajos y poco reproducibles, por lo que ésta ruta sintética fue descartada y se continuó trabajando en el diseño de nuevas metodologías.

3.3.1c Síntesis de selenosemicarbazonas utilizando Reactivo de Woollins (RW)

Desde el siglo pasado se han descripto diversos reactivos útiles para la obtención de compuestos organoselenados, por intercambio O-Se, como ser [PhP(Se)Cl₂] y selenuro de bis(dimetilaluminio).¹⁸ En general, tienen un alcance limitado y era necesario un reactivo selenante útil en mayor espectro.

Recientemente, se describió el 2,4-difenil-1,3,2,4-diselenadifosfetan-2,4-diselenuro, también conocido como Reactivo de Woollins (WR). Este es una análogo selenado del ya conocido Reactivo de Lawesson (RL), que intercambia azufre por oxígeno (Figura 3.7). Su utilidad

¹⁸ (a) Michael JP, Reid DH, Rose BG, Speirs RA (1988) Oxygen-selenium exchange using phenylselenophosphonic dichloride [PhP(Se)Cl₂]: conversion of carbonyl into selenocarbonyl. J Chem Soc, Chem Comm 22: 1494-1496; (b) Segi M, Koyama T, Nakajima T, Suga S, Murai S, *et al.* (1989) Novel route to selenoketones by the use of bis(dimethulaluminuy) selenide. Tetr Lett 30: 2095-2098

como reactivo de transferencia de Se permite el intercambio O-Se a partir de amidas y aldehídos y fue reportado inicialmente por el grupo de Woollins.¹⁹



Figura 3.7 Reactivo de Woollins (RW) vs Reactivo de Lawesson (RL)

La reactividad del RW se asemeja a la del RL en varios aspectos, solamente que los compuestos organoselenados derivados del RW reaccionan rápidamente, formando nuevas especies reactivas.²⁰ Se ha visto que los 4 átomos de Se pertenecientes al RW son transferidos a la molécula orgánica de interés;²¹ de esta manera, la transferencia de Se es más efectiva que la que ocurre para el S con su análogo RL, donde la mitad de los átomos S son utilizados para generar la tioamida. El RW presenta importantes ventajas con respecto al uso de H₂Se, como ser una mayor estabilidad al contacto con el aire y puede ser preparado fácilmente a partir de PhPCl₂ y Na₂Se.²²

Se ha discutido ampliamente en literatura sus características como reactivo selenante de compuestos orgánicos, implicando reacciones de intercambio O-Se o la formación de heterociclos fosfato-selenados.²³ Hacia el 2003, se describió la síntesis de selenoamidas N,N-disustituídas, por intercambio O-Se, utilizando RW (Figura 3.8).²⁴

Posteriormente, Hua *et al.* desarrollaron una metodología sintética fácil y ampliamente efectiva para la obtención de arilselenoamidas primarias, a partir de nitrilos por reacción con RW (Figura 3.8).²⁵

 ¹⁹ Bhattacharyya P, Woollins JD (2001) Selenocarbonyl synthesis using Woollins reagent. Tetr Lett 42: 5949–5951
 ²⁰ Woollins JD (2012) How Not to Discover a New Reagent. The Evolution and Chemistry of Woollins' Reagent Synlett 8: 1154-1169

²¹ Bethke J, Karaghiosoff K, Wessjohann LA (2003) Synthesis of N,N-disubstituted selenoamides by O/Seexchange with selenium-Lawesson's reagent. Tetr Lett 44: 6911–6913

²² Gray IP, Bhattacharyya P, Slawin AMZ, Woollins JD (2005) A New Synthesis of (PhPSe₂)₂ (Woollins Reagent) and Its Use in the Synthesis of Novel P–Se Heterocycles. Chem Eur J 11: 6221–6227

²³ Woollins JD, Hua G (2009) Formation and Reactivity of Phosphorus–Selenium Rings. Angew Chem Int Ed 48: 1368–1377

²⁴ Bethke J, Karaghiosoff K, Wessjohann LA (2003) Synthesis of N,N-disubstituted selenoamides by O/Seexchange with selenium-Lawesson's reagent. Tetr Lett 44: 6911–6913

²⁵ Hua G, Li Y, Slawin AMZ, Woollins JD (2006) Synthesis of Primary Arylselenoamides by Reaction of Aryl Nitriles with Woollins' Reagent. Org Lett 8: 5251–5254

3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas



Figura 3.8 Utilidad del RW para la obtención de selenoamidas

En este sentido, se propuso preparar selenosemicarbazonas a partir de sus análogos oxigenados semicarbazona **7** y RW, para lograr el intercambio O-Se (Tabla 3.4).



Entrada	R ₁	R ₂	Condiciones	R (%)
1	5-nitro-2-furilo	Н	RW (1 equiv.)/PhMe, 70°C 5 h	2 j , -
2	<i>m</i> -BrPh	Н	RW (1 equiv.), p-TsOH (cat.)/PhMe, reflujo 12 h	2b, -

Tabla 3.4 Síntesis de selenosemicarbazonas 2j-2b utilizando RW, a partir de sus respectivos análogosoxigenados, semicarbazona 7j-7b.

Se ensayaron las condiciones clásicas de intercambio O-Se descriptas por Woollins y cuando se utilizó la 5-nitro-furfural semicarbazona **7j** como material de partida, no se logró obtener el análogo selenado buscado **2j** (Entrada 1, Tabla 3.4). Al cambiar las condiciones de reacción utilizando medio ácido/PhMe a reflujo, partiendo de **7b**, tampoco se logró obtener el producto de intercambio **2b** (Entrada 2, Tabla 3.4).

Con la necesidad de lograr una metodología reproducible, capaz de obtener selenosemicarbazonas con mejores rendimientos, se continuó trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas.

3.3.1d Síntesis de selenosemicarbazonas utilizando LiAlHSeH

En literatura se describen diferentes agentes capaces de intercambiar O por Se;^{23,26} uno de los más recientes es el Reactivo de Ishihara o LiAlHSeH. Este fue desarrollado por Ishihara en 2001 y presenta un amplio espectro de utilización para la preparación de derivados selenocarbonilos;²⁷ algunos de ellos se muestran en la Figura 3.9.



Figura 3.9 (A) Preparación de LiAlHSeH; (B) Aplicación del Reactivo de Ishihara en la síntesis de selenocarbonilos

Este reactivo se prepara *in situ*, a partir de LiAlH₄ y Se(o), ambos comercialmente disponibles, en THF y bajo atmósfera de N₂. El Se se consume rápidamente y se desprende H₂ de la reacción (Figura 3.9 A). El Reactivo de Ishihara debe prepararse en el momento justo antes de ser utilizado, pues se descompone a temperatura ambiente.²⁷ Recientemente, Vishwanatha *et al.* describieron la síntesis de selenopéptidos a partir de péptidos N- α protegidos, con PCl₅ y LiAlHSeH.²⁸ Esta metodología se basa en la formación

 $^{^{26}}$ (a) Klayman DL, Griffin TS (1973) Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. A Facile Method for the introduction of selenium into organic molecules. J Am Chem Soc 95: 197-199; (b) Gladysz JA, Hornby JL, Garbe JE (1978) Convenient one-flask synthesis of dialkyl selenides and diselenides via lithium triethylborohydride reduction of Se_x. J Org Chem 43: 1204-1208; (c) Copeland CM, Ghosh J, McAdam DP, Skelton BW, Stick RV (1988) The Synthesis of Some Compounds Containing the Selenocarbonyl Group by Using Viehe's Salt/Sodium Hydrogen Selenide: an Approach to Cyclic Selenocarbonates in the Monosaccharide Series. Aust J Chem 41: 549-561; (d) Li GM, Zingaro RA (1998) Reaction of diisobutylaluminium hydride with selenium and tellurium: new reagents for the synthesis of seleno- and telluro-amides. J Chem Soc Perkin Trans 1: 647-650 ²⁷ Ishihara H, Koketsu M, Fukuta Y, Nada F (2001) Reaction of Lithium Aluminum Hydride with Elemental Selenium: Its Application as a Selenating Reagent into Organic Molecules. J Am Chem Soc 123: 8408-8409 ²⁸ Vishwanatha TM, Narendra N, Chattopadhyay B, Mukherjee M, Sureshbabu VV (2012) Synthesis of Selenoxo

Peptides and Oligoselenoxo Peptides Employing LiAlHSeH. J Org Chem 77: 2689–2702

de un iminocloruro utilizando PCI₅, DMF en cantidades catalíticas y PhMe como disolvente. Una vez formado éste, se agrega el Reactivo de Ishihara para intercambiar CI por Se (Figura 3.10). La metodología resulta simple, eficiente y con altos rendimientos para la preparación de selenopéptidos.



Figura 3.10 Preparación de selenopéptidos a partir de los péptidos correspondientes, por intercambio O-Se, utilizando LiAIHSeH; R¹ = alquilo, arilo; R² = H, alquilo, arilo

Basándonos en estos antecedentes, se pensó en estudiar la utilidad del reactivo LiAlHSeH en la preparación de selenosemicarbazonas **2**, a partir de sus análogos oxigenados semicarbazona **7**. Primero, se trabajó en la optimización de la metodología de síntesis, utilizando la semicarbazona **7h** como modelo (Tabla 3.5).



Entrada	Condiciones	Conversión (%)	R (%) ª
1	I) PCI ₅ (2.0 equiv.), DMF (0.3 equiv.),	43	12
	PhMe, o°C; II) LiAlHSeH (1.5 equiv.) , o°C		
2	 PCl₅ (2.0 equiv.), CH₂Cl₂, 0°C; 	85	28
	II) LiAlHSeH (1.5 equiv.) , o°C		
3	 PCl₅ (2.0 equiv.), CH₂Cl₂, 0°C; 	100	19
	II) LiAlHSeH (2.0 equiv.) , 0°C		
4	 PCl₅(3 equiv.), CH₂Cl₂, -20°C; 	100	<10
	II) LiAlHSeH (1.5 equiv.) , -20°C		
5	 PCl₅ (3 equiv.), CH₂Cl₂, 0°C; 	100	50
	II) LiAlHSeH (3.2 equiv.) , o°C		

^a Rendimiento del producto aislado.

 Tabla 3.5 Optimización de las condiciones de reacción para la preparación de selenosemicarbazonas 2, utilizando la semicarbazona 7h como modelo.

Al trabajar en las condiciones utilizadas por Vishwanatha *et al.* para selenopéptidos, se vio que el reactivo **7h** no se consumía totalmente, por lo que se optó por aumentar la cantidad de PCl₅ a 2.0 equivalentes, para así desplazar completamente el equilibrio hacia la formación de iminocloruro (Entrada 1, Tabla 3.5). Por otro lado, también se bajó la temperatura a o°C, considerando la posible inestabilidad del iminocloruro formado a temperatura ambiente (Entrada 1, Tabla 3.5). En estas condiciones se logró obtener la selenosemicarbazona **2h**, con un 43% conversión y 12% rendimiento. El bajo rendimiento podría deberse a que se aisló mayoritariamente el producto de intercambio de DMF con LiAlHSeH, selenoformamida; por ese motivo, en los siguientes intentos no se utilizó.

Con el fin de promover la completa conversión de **7h** a **2h**, se exploró la influencia del disolvente en la reacción. Utilizando CH_2Cl_2 , se logró un 85% conversión pero aún se obtuvo con bajo rendimiento (28%) (Entrada 2, Tabla 3.5).

Al aumentar la cantidad de LiAlHSeH (2.0 equiv.) en CH_2Cl_2 se logró finalmente una completa conversión de la semicarbazona **7h** al producto **2h**, con 19% rendimiento (Entrada 3, Tabla 3.5).

Cuando se quiso optimizar el rendimiento, trabajando a -20°C e incrementando la cantidad de PCl₅, se logró un 100% conversión pero el rendimiento fue menor al 10% (Entrada 4, Tabla 3.5).

Explorando la influencia en la cantidad de PCI_5 y LiAlHSeH en la reacción (Entradas 3 y 5, Tabla 3.5), se encontró que los mejores rendimientos eran alcanzados cuando se utilizaba PCI_5 (3 equiv.) y LiAlHSeH (3.2 equiv.) (Entrada 5, Tabla 3.5), en CH_2CI_2 a 0°C. De esta manera, en las condiciones optimizadas se preparó la selenosemicarbazona **2h**, con un 100% conversión y 50% rendimiento.

Así, se prepararon doce selenosemicarbazonas **2a-c, 2h-i, 2k-q** bajo una metodología de dos pasos en tándem (Tabla 3.6). Algunas de ellas ya fueron preparadas por nuestro grupo siguiendo otras metodologías, discutidas en este capítulo.

Los compuestos fueron obtenidos a partir de las semicarbazonas **7a-c, 7h-i, 7k-q** correspondientes, y PCI_5 (3 equiv.) en CH_2CI_2 a 0°C, seguido el agregado de LiAlHSeH (3.2 equiv.) a 0°C, preparado en el momento (Tabla 3.6).



Entrada	ntrada R ₁		R (%)	
1	<i>m</i> -BrPh	Me	2a , 36	
2	<i>m</i> -BrPh	Н	2b, 5	
3	<i>m</i> ,p-diClPh	Н	2c, 5	
4	Ph	Me	2h, 50	
5	m,p-diClPh	Me	2i, 13	
6	m-ClPh	Me	2k, 25	
7	m-CF₃Ph	Et	21 , 65	
8	m-MePh	<i>m</i> -MePh Me 2m, 1		
9	9 p-ClPh		2n, 20	
10	<i>p</i> -NMe₂Ph	Н	20, 5	
11	p-OMePh	Н	2p, 12	
12	i-propil	Me	2q, 7	

Los recuadros indican los derivados aldehído.

 Tabla 3.6 Síntesis de selenosemicarbazonas 2a-c, 2h-i, 2k-q a partir de sus semicarbazonas correspondientes 7ac, 7h-i, 7k-q, utilizando LiAlHSeH.

Los rendimientos obtenidos fueron bajos a moderados (5-65%). En general, aquellas obtenidas a partir de aldehídos (compuestos **2b-c** y **2n-p**) resultaron con rendimientos menores a las derivadas de cetonas (compuestos **2a**, **2h-i**, **2k-m**).

En los derivados de cetona **2a**, **2h-i**, **2k-m** se observó una diferencia en función del sustituyente del anillo aromático; aquellos no sustituidos o *meta* sustituidos con grupos electrón atrayentes, se obtuvieron con mejores rendimientos. El agregado de un sustituyente adicional en *para* disminuye notablemente el rendimiento, al igual que el agregado de un sustituyente electrón dador en posición *meta*.

Para los derivados de aldehído **2b-c** y **2n-p**, el rendimiento fue bajo en todos los casos independientemente del carácter electrónico del sustituyente del anillo aromático. Cabe aclarar, que el derivado alquílico **2q** también fue obtenido en un bajo rendimiento.

La selenosemicarbazona **21** fue obtenida con el mayor rendimiento y se aisló como una mezcla inseparable de isómeros *Z*:*E*, en torno al grupo imino C=N. Intentos de obtenerlos por separados resultaron fallidos, pues los isómeros se reequilibraron con el tiempo, como se ha visto anteriormente en la síntesis de **2a** utilizando selenosemicarbazida en condiciones de radiación por microondas.

Por analogía a lo planteado por Vishwanatha *et al.* nuestro grupo ha propuesto un mecanismo posible para la formación de estos derivados (Figura 3.11)



Figura 3.11 Mecanismo propuesto para la síntesis de selenosemicarbazonas 2 a partir de semicarbazonas 7, utilizando LiAlHSeH

En primera instancia, ocurriría la formación del imino cloruro **I**, por reacción de la semicarbazona **7** con PCl₅. Posteriormente, LiAlHSeH reaccionaría con **I** para dar el producto de interés **2**.

Una explicación posible a la variabilidad en los rendimientos encontrados en la síntesis de selenosemicarbazonas sería la diferente reactividad de sus análogos oxigenados semicarbazonas **7**, en la formación del iminocloruro **I** correspondiente, frente al agregado

de PCl₅. O bien, los sustituyentes R₁ y R₂ de la semicarbazona **7** (R₁ = aromático con sustituyentes dadores de electrones, R₂ = alquilo) aumentarían la densidad electrónica del carbono del C=O, volviendo el O más nucleofílico y reactivo frente al PCl₅, en la formación del iminocloruro; ó una vez formado el mismo resultaría más inestable cuando R₁ = aromático con sustituyentes atractores de electrones y R₂ = H, siendo más reactivo el carbono del Cl-C=NH. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos, donde las selenosemicarbazonas derivadas de cetona **2a**, **2h**, **2k-I** dieron mejores rendimientos que las obtenidas a partir de aldehídos **2b-c** y **2n-p**.

3.3.2 Evaluación biológica in vitro-in vivo de selenosemicarbazonas

La Cruzipaína (Cz) utilizada en el presente trabajo fue proporcionada por el Prof. Juan José Cazzulo. De acuerdo al protocolo establecido por su grupo, purificaron la enzima a partir de un extracto de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuen 2,²⁹ según lo detallado en la parte experimental 2.5 del capítulo 2.

3.3.2a Evaluación in vitro de selenosemicarbazonas 2a-f como inhibidores de Cruzipaína (Cz)

Las selenosemicarbazonas preparadas **2a-f** y la tiosemicarbazona **1a** (análogo azufrado de **2a**) fueron ensayadas utilizando el stock de Cz proporcionado por el Prof. Cazzulo. Las concentraciones utilizadas en el screening primario fueron de [inhibidor] 0.3, 2 y 10 μ M, (Tabla 3.7).

A diferencia de las hidrazolil tiazolidinonas discutidas en el capítulo anterior, estos compuestos fueron evaluados utilizando un ensayo espectrofluorimétrico puesto a punto por nuestro grupo, en el Laboratorio de Inmunología, FQ-UdelaR. Al ser una metodología de mayor sensibilidad (10 a 100 veces más sensible que la espectrofotometría), se trabajó a menores concentraciones de enzima e inhibidor.

También, se preincubó la Cz durante 5 min a 37°C, siendo [Cz] = 1 nM.

²⁹ Labriola C, Sousa M, Cazzulo JJ (1993) Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi by affinity chromatography. Biol Res 26: 101

3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas

		PIE (%)		
Compuesto	10 µM	2 μΜ	ο.3 μΜ	Log P
2a	98 ± 1%	87 ± 5%	81 ± 1%	2.69
2b	93 ± 1%	93 ± 1%	40 ± 1%	2.78
2C	99 ± 1%	96 ± 1%	57 ± 5%	3.28
2d	91 ± 3%	88 ± 3%	24 ± 5%	2.87
2e	99 ± 1%	98 ± 1%	90 ± 4%	4.70
2f	100 ± 1%	98 ± 1%	95 ± 1%	4.76
1a	80 ± 1%	79 ± 3%	24 ± 5%	2.58

PIE (%) : Porcentaje de Inhibición Enzimática. Los experimentos fueron realizados por triplicado; Log P: calculado como el logaritmo del coeficiente de partición n-octanol/agua del compuesto

Tabla 3.7 Actividad inhibitoria de los compuestos 2a-f en Cz

Todas las selenosemicarbazonas resultaron ser más activas que **1a**, el análogo azufrado de **2a**. Además, los compuestos derivados de cetonas **2a**, **2e-f** ($R_2 = Me ext{ o} m$ -Br Ph $ext{ o} n$ -butilo) son más activos que los sintetizados a partir de aldehídos **2b-d** ($R_2 = H$). Esto concuerda con lo previamente descripto por Du *et al.* para las tiosemicarbazonas.¹

La lipofilicidad de los compuestos (Log P) fue calculada teóricamente y se muestra en la Tabla 3.7.³⁰ Este es un parámetro molecular que pareciera correlacionar con la actividad inhibitoria, ya que el compuesto más lipofílico **2f** resultó ser el más activo.

³⁰ Log P fue estimado según: http://www.molinspiration.com/cgibin/properties.

3.3.2b Caracterización del mecanismo de inhibición de las selenosemicarbazonas

La mayoría de los fármacos cuyo mecanismo de acción transcurre por inhibición enzimática, logran unirse a su blanco de manera simple y reversible.³¹ De esta manera, los equilibrios enzima-ligando que tienen lugar, tienen asociadas determinadas constantes de equilibrio. Particularmente, en la catálisis enzimática, pueden darse varias modalidades de interacción, durante la unión de un inhibidor con la enzima blanco. El mecanismo catalítico comienza con la unión reversible del sustrato (*S*) con la enzima libre (*E*), para formar el complejo *ES*, que tiene asociado una constante de disociación *K*_s. Este complejo, puede evolucionar hacia los productos, con una constante de equilibrio asociada, *k*_{cat}, obteniendo E y P (Figura 3.12).



Figura 3.12 Esquema de equilibrio de la enzima E en presencia y ausencia de inhibidores reversibles

El inhibidor, en tanto, puede interaccionar con la enzima libre, con el complejo ES o con ambos (Figura 3.13). Así, en el marco de interacciones enzima inhibidor del tipo reversible, se definen entonces diferentes tipos de inhibidores:

- A) competitivos: se unen exclusivamente a la enzima libre E
- B) no competitivos: se unen con cierta afinidad a la enzima libre E y al complejo ES
- C) acompetitivos: se unen exclusivamente al complejo ES

³¹ Copeland RA (2005) Slow binding inhibitors. Evaluation of Enzyme inhibitors in Drug Discovery. New Jersey, USA: Willey Press 3:48



E: enzima libre, I: inhibidor, S: sustrato

Figura 3.13 Esquema representativo de las tres formas principales de inhibición reversible de I con E: (A) inhibición competitiva; (B) inhibición no competitiva; (C) inhibición acompetitiva

Estos mecanismos de inhibición pueden alterar de diferente manera ciertos parámetros asociados a la catálisis enzimática, como ser K_M (constante de Michaelis Menten) y $V_{máx}$ (velocidad máxima de la catálisis enzimática). De esta manera, el estudio de reacciones enzimáticas implica conocer plenamente los equilibrios que tienen lugar, para saber que tipo de mecanismo tienen asociado. Es importante también, tener en cuenta las condiciones en las que se lleva a cabo el ensayo enzimático, las cuales influyen en la formación del complejo *EI*, para que las interacciones entre E e I tengan lugar y se de la inhibición enzimática. En general, tanto la temperatura como el tiempo de incubación de E+I, influyen en este sentido.

En el trabajo presentado, las selenosemicarbazonas **2a, 2e** y **2f** mostraron ser las más activas como inhibidoras de Cz, en las condiciones ensayadas y fueron seleccionadas para su completa caracterización mediante la evaluación del equilibrio de inhibición.

97

• Las selenosemicarbazonas son inhibidores lentos y reversibles

Para evaluar la cinética del mecanismo de inhibición, se realizaron los cursos temporales de la reacción enzimática, en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor (se ejemplifica para el compuesto **2f**, Figura 3.14).

El tiempo óptimo de preincubación de enzima con inhibidor fue estimado como el tiempo a partir del cual la velocidad de hidrólisis del sustrato se vuelve constante. Luego de media hora, los equilibrios de inhibición fueron alcanzados para todos los inhibidores. Algunos mecanismos podrían explicar este comportamiento, como ser la isomerización de alguno de los patrones de interacción enzima-inhibidor.³²



AMC (aminometil cumarina): producto de hidrólisis del sustrato Z-Phe-Arg-AMC

Figura 3.14 Curso temporal de la reacción enzimática de Cz, seguida por formación de AMC (μM) vs t (s), sin inhibidor y utilizando **2f** a concentraciones de 40, 100, 200 y 500 nM.

El compuesto **2f** podría actuar como inhibidor lento; la velocidad de hidrólisis del sustrato resulta constante en el estado estacionario, el cual fue alcanzado en minutos, indicando que en las condiciones del ensayo, la formación del complejo enzima-inhibidor es un proceso lento.

³² Copeland RA (2005) Slow binding inhibitors. Evaluation of Enzyme inhibitors in Drug Discovery. New Jersey, USA: Willey Press 6: 141
Para investigar si estos compuestos presentaban un comportamiento reversible o irreversible con la enzima, **2a** fue preincubado con Cz durante 30 minutos y luego se lo sometió a una gel filtración, a través de una columna PD10.³³ Estas columnas están empacadas en Sephadex y diseñadas para la separación rápida y sencilla de proteínas y otras macromoléculas de alto peso molecular, de moléculas de bajo peso molecular (como los inhibidores en estudio). La base de su funcionamiento es la gel filtración y las moléculas pueden ser separadas en función de su diferencia en el tamaño:

- Alto PM: moléculas de tamaño mayor al de los poros del Sephadex quedan excluidas de la matriz y eluyen primero, junto e inmediatamente después luego del volumen muerto
- *Bajo PM*: moléculas pequeñas pueden penetrar los poros hasta cierto punto y de esta manera eluir, luego de las moléculas grandes

En nuestro caso, las selenosemicarbazonas son de bajo PM, en comparación con la enzima Cz. Si la interacción E-I fuese reversible, debería poder separarse el complejo *EI* y permitir a Cz eluir de la columna, recuperando la actividad enzimática. De lo contrario, indicaría que la misma continúa unida al inhibidor, por interacciones más fuertes, del tipo irreversible, y esto se reflejaría en la ausencia de actividad enzimática.

Al realizar el experimento, la actividad enzimática fue recuperada, sugiriendo un mecanismo de inhibición reversible. El exceso de inhibidor requerido para inhibir completamente la enzima, también confirma estos resultados.

• Las selenosemicarbazonas son inhibidores reversibles no competitivos

El compuesto **2f** fue seleccionado para posteriores caracterizaciones, pues mostraba el mejor perfil de inhibición. Para finalmente determinar a qué mecanismo se asociaba la inhibición, se realizaron curvas de velocidad vs [S], a concentraciones crecientes de [**2f**], siendo [S] concentración de sustrato, (Figura 3.15).

³³ PD-10 Desalting Columns (2007) Instructions 52-1308-00 BB GE Healthcare, pag 1-12



Figura 3.15 [S] (μ M) vs velocidad (μ M/seg), para 2f.

```
v = V_{\text{máxapp}}[S]/(K_{\text{M}} + [S])
```

Ecuación 1. Ecuación de velocidad de inhibición enzimática v, siendo $V_{\text{máxapp}}$ la velocidad máxima aparente ($V_{\text{máx}}$ en el ensayo con inhibidor) y K_M la constante de Michaelis Menten

Luego, se calcularon los valores de K_M y $V_{\text{máxapp}}$ a partir de la Figura 3.15 y la Ecuación 1, utilizando el programa Origin® (Tabla 3.8).

2f (nM)	V _{maxapp} x 10 ⁻³ (μM/seg)	K _M (μM)
0	5.9 ± 0.4	13 ± 2
2	4.7 ± 0.4	12 ± 2
5	3.7 ± 0.1	11 ± 1
10	2.0 ± 0.1	16 ± 3
20	1.1 ± 0.1	24 ± 3

Tabla 3.8 V_{máxapp} y K_M calculadas a 2, 5, 10 y 20 nM [2f], por triplicado, utilizando la Ecuación 1

Estos resultados muestran que $V_{\text{máxapp}}$ disminuye de manera no lineal a medida que [**2f**] aumenta. Por el contrario, no se logró establecer claramente un patrón de comportamiento para los valores de K_{M} . Si se consideran los datos de la constante de Michaelis y sus correspondientes errores, en el rango de [**2f**] 0-10 nM, K_{M} se mantiene prácticamente

constante. Por definición, este comportamiento se podría asociar a un mecanismo de inhibición no competitivo de 2f (Figura 3.15).³⁴

Recientemente se ha publicado la caracterización computacional de un "druggable pocket" adicional, adyacente al sito activo de Cz, que podría estar aportando y participando en la regulación alostérica, estabilidad estructural o interacciones proteína-proteína.³⁵ Este podría ser un buen punto de partida para una continuación del trabajo en relación al mecanismo de inhibición enzimática de estos compuestos.

• Determinación de K₁ de compuestos seleccionados

Infiriendo un comportamiento no competitivo, se calculó la K_1 (constante de inhibición) para **2f**, como una función de $V_{máxapp}$ y [**2f**] a partir de los datos de la Tabla 3.8, utilizando la Ecuación 2 asociada a este tipo de inhibidores. El valor encontrado fue de **2f** K_1 = 6.4 nM.

$$V_{\text{máxapp}} = V_{\text{máx}} / (1 + \frac{[2f]}{K_{I}})$$

Ecuación 2. Ecuación de velocidad máxima aparente de inhibición enzimática, donde V_{máx} es la velocidad máxima de catálisis enzimática sin inhibidor

 K_1 pudo también ser determinado utilizando la ecuación de velocidad asociada a un modelo de inhibición no competitivo, Ecuación 3, expresado como una función de la velocidad vs [**2f**] (Figura 3.16).

$$v = V_{\text{máx}}[S] / \left[(1 + \frac{[2f]}{K_{\text{I}}})(K_{\text{M}} + [S]) \right]$$

Ecuación 3. Ecuación de velocidad para inhibidores no competitivos, donde V_{máx} es la velocidad máxima de catálisis enzimática sin inhibidor

³⁴ Copeland RA (2005) Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. Evaluation of Enzyme inhibitors in Drug Discovery. New Jersey, USA: Willey Press 3: 48

³⁵ Durrant JD, Keränen, Wilson BA, McCammon JA (2010) Computational Identification of Uncharacterized Cruzain Binding Sites. PLoS Neglected Trop Dis 4: e676, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000676.



Figura 3.16 Determinación de K₁ para 2f, a partir de la Ecuación 3 asociada al modelo de inhibidor no competitivo, $K_1 = 3.7$ nM.

A partir de este modelo, el K_1 encontrado fue de 3.7 nM, siendo concordante con el valor calculado utilizando un set completamente diferente de datos y la Ecuación 2 (K_1 = 6.4 nM).

Considerando las estructuras químicas similares entre los diferentes inhibidores, se supuso un mecanismo de inhibición similar y se calcularon los K_1 para **2a**, **2e** y **1a** a partir de la Ecuación 3, siendo la [1] entre 0.02 y 0.6 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 3.9.

Compuesto	K _I (nM) ^a
2a	29.7 ± 6.8
2e	13.3 ± 4.0
2f	3.7 ± 0.2
1a	142.3 ± 31

Tabla 3.9 K1 de 2a, 2e, 2f y 1a, calculadas por triplicado, utilizando un ajuste no lineal para inhibidores nocompetitivos, Ecuación 3

Los valores de K_1 obtenidos para estas selenosemicarbazonas están en el orden de nM (3.7 a 29.7 nM), por lo que indicaría una fuerte interacción enzima-inhibidor, del tipo de alta afinidad, las cuales poseen K_1 del orden de pM (10⁻¹² M).

Se ha descripto en literatura que el Captopril, conocido inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina, posee un K_1 = 1.5 nM, mientras que la del Enalapril es aún menor, 0.18 nM.³⁶ Ambos, están definidos como inhibidores de alta afinidad.

Los resultados encontrados muestran que el reemplazo isostérico del átomo de S del compuesto **1a** por Se (**2a**) logró una disminución del K_1 de 4 veces (**1a** K_1 = 142.3 nM vs **2a** K_1 = 29.7 nM). Por estos resultados, se podría predecir que el Se sería el factor que contribuiría mayoritariamente a este efecto.

Evaluación de la pureza del extracto de enzima

Luego de la caracterización de los inhibidores, donde fue dificultoso establecer un modelo de inhibición definido considerando el conjunto total de datos, se consideró evaluar la pureza del stock de enzima. Se corrió un gel SDS-PAGE, en el que se constató la presencia de dos bandas, de aproximadamente 50 y 30 kDa, que se aislaron y evaluaron por espectrometría de masa de péptidos. La banda de 50 kDa correspondió a la Cruzipaína nativa (Cz), en tanto la banda de 31 kDa correspondió a otra cisteín proteasa, del tipo Catepsina b (Cb).³⁷ Estos resultados fueron inesperados. La proteína Cb ha sido descripta previamente en *T. cruzi*³⁷ y aunque su función no es completamente conocida, Yong *et al.* propusieron que surge como mecanismo de resistencia frente a inhibidores de Cz.³⁸

Debido a la presencia de estas dos enzimas se trabajó en la purificación de las mismas; para ello se utilizó una columna de afinidad con un anticuerpo monoclonal (MoAb) específico para Cz, inmovilizado.³⁹ Las fracciones eluídas fueron evaluadas por SDS-PAGE 10%, y teñidas con Ag. De esta manera, se obtuvo Cb pura en las fracciones percoladas (no unidas al MoAb) de los carriles 2-5 (Figura 3.17).

³⁶ Copeland RA, Anderson PS (2002) Enzymes and enzyme Inhibitors. Drug Design and Discovery. New York, USA: Taylor and Francis: 328-363

³⁷ Garcia MP, Nobrega OT, Teixeira AR, Sousa MV, Santana JM (1998) Characterization of a Trypanosoma cruzi acidic 30 kDa cysteine protease. Mol Biochem Parasitol 91: 263-272.

³⁸ Yong V, Schmitz V, Vannier-Santos MA, de A. Lima AP, Lalmanach G, Juliano J, Gauthier F, Scharfstein J (2000) Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a Trypanosoma cruzi cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. Mol Biochem Parasitol 109: 47–59

³⁹ González G, Örn A, Cazzulo JJ, Grönvik K-O (1994) Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against the Major Cysteine Proteinase of Trypanosoma cruzi. Scandinavian Journal of Inmunology 40: 389–394



Figura 3.17 Cromatografía de afinidad utilizando anticuerpo monoclonal contra Cz; carril 1) Stock de enzima purificada por ConA e intercambio iónico, utilizada en los ensayos enzimáticos; carriles 2 a 5) fracciones de percolado; carriles 6 a 10) eluatos de la columna.

Los intentos de recuperar de forma pura a la Cz retenida en la columna con buffer Glicina-HCl pH 2.5 no fueron exitosos. Esto se visualiza en la Figura 3.17, donde en los carriles 6-10 aparece una banda adicional en el gel de 25 KDa, ausente en la mezcla original, correspondiente a fragmentos de inmunoglobulinas, de acuerdo al MALDI-TOF realizado (se adjunta en capítulo 7. Anexo). Los resultados obtenidos indican que la actividad proteolítica de la preparación enzimática cliva al anticuerpo monoclonal.

Actividad cisteín proteasa de Cb

El stock de Cz contenía Cz y Cb, en una proporción relativa 40:60 aproximadamente. Visto que se logró aislar la Cb pura, se quiso evaluar su actividad proteolítica, para determinar su influencia en la mezcla enzimática. Para ello, se determinó la concentración de Cb en la fracción más concentrada, que según el gel parecería ser la correspondiente al carril 5. Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar proteínas totales, y aplicando la ecuación de Lambert-Beer se determinó la concentración de enzima, resultando [Cb] = 3.9 μ M. Se utilizó el mismo sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC, a 10 y 50 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 3.10.

Cisteín proteasa (CP)	ACP (%) = 10 μM	ACP (%) = 50 μM
Cz + Cb	100 ± 1	100 ± 1
Cb	3.3 ± 0.2	4.1 ± 0.6

Tabla 3.10 Actividad Cisteín Proteasa (ACP) de Cz vs Cb a [sustrato] 10 y 50 μM, [Cz +Cb] = 2 nM, [Cb] = 1 nM; Sustrato: Z-Phe-Arg-AMC

Visto que la fracción pura de Cb mostró un actividad enzimática mínima frente al sustrato utilizado, a 10 y 50 μ M, (Tabla 3.10) en comparación con la obtenida para las cisteín proteasas (CPs: Cz + Cb), la actividad del stock de enzima es atribuible mayoritariamente a Cz. Esto descartaría la posibilidad de que los valores de inhibición enzimática encontrados utilizando la mezcla enzimática correspondieran a la inhibición de Cb.

De todas maneras, se quiso evaluar la capacidad de inhibición de las selenosemicarbazonas frente a Cb. Para ello, se seleccionó la selenosemicarbazona **2f** como representativa, y se evaluó su actividad inhibitoria, en las condiciones del ensayo espectrofluorimétrico puesto a punto; se utilizó Z-Phe-Arg-AMC como sustrato, siendo [Cb] = 10 nM y [sustrato] = 10 μ M (Tabla 3.11).

	PIE (%)		
Compuesto	1 nM	10 nM	100 nM
2f	26 ± 1%	37 ± 2%	71 ± 5%

Tabla 3.11 Porcentaje de Inhibición de Enzimática de Cb, utilizando 2f como inhibidor, siendo [2f] 1, 10 y 100 nM y[Cb] = 10 nM

Los resultados encontrados utilizando **2f** como referencia, siendo la concentración del inhibidor [**2f**] = 300 nM y [Cz +Cb, 40:60] = 2 nM, mostraron un PIE = 95% (Tabla 3.7), relación aproximada **2f:Cz, 300:1**. Al utilizar una concentración de [**2f**] = 100 nM y [Cb] = 10 nM, el porcentaje de inhibición enzimática resultó PIE = 71% (Tabla 3.11), relación **2f:Cb, 10:1**.

Si bien en el ensayo enzimático utilizado para el screening y caracterización del mecanismo de inhibición de las selenosemicarbazonas, la actividad enzimática de Cb en el stock de enzima resultó insignificante, de manera aislada se vio que las selenosemicarbazonas también actúan inhibiendo Cb. Esto resulta muy interesante, pues las selenosemicarbazonas podrían presentar inclusive mejor actividad inhibitoria enzimática sobre Cb que sobre Cz.

Para poder caracterizar correctamente la actividad enzimática de Cb y el poder inhibitorio de estos compuestos en la enzima, se debería poner a punto el ensayo utilizando el sustrato fluorogénico N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr- AMC (LLVY), el cual según lo descripto en literatura resulta ser el adecuado.³⁷

A modo de reflexión...

La utilización de un stock impuro de Cz podría en parte explicar las desviaciones encontradas en los valores de $K_{\rm M}$ de **2f**, así como los problemas a la hora de establecer con certeza el mecanismo de inhibición de las selenosemicarbazonas.

Por otro lado, si bien los valores de *K*_i hallados no serían correctos en términos absolutos podrían utilizarse para comparar la serie de selenosemicarbazonas entre sí, en términos de mayor o menor actividad inhibitoria sobre Cz.

El diseño racional de drogas busca que los principios activos sean diseñados de manera que no afecte a otras moléculas importantes, usualmente denominadas como "off targets", ya que las interacciones con estas moléculas pueden dar lugar a efectos secundarios no deseados. Sin embargo, un inhibidor que haga blanco en un "off target" podría ser eventualmente deseable,⁴⁰ si la inhibición de este tiene una consecuencia biológica deseada, en este caso la actividad tripanocida. Recientemente, Choy *et al.* describieron inhibidores de la 14- α -demetilasa, análogos a K777, que tienen como off target a la Catepsina b de T. *cruzi.*⁴¹

Nuestros resultados dejan una puerta abierta en el estudio de las selenosemicarbazonas como inhibidores enzimáticos de otras cisteín proteasas, como la Catepsina b (Cb), lo que en el contexto de la infección por el parasito sería muy beneficioso ya que inhibirían Cz y la Cb, que surgiría como mecanismo de resistencia.

⁴⁰ Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, *et al.* (2009) Predicting new molecular targets for known drugs. Nature 462: 175-182

⁴¹ Choy JW, Bryant C, Calvet CM, Doyle PS, Gunatilleke SS, *et al.* (2013) Chemical–biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. Beilstein J Org Chem 9: 15–25

3.3.2c Evaluación in vitro de selenosemicarbazonas en epimastigotes de T. cruzi y células Vero

La evaluación biológica *in vitro* sobre el parásito fue realizada en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Carlos Robello, del Institute Pasteur de Montevideo. Se evaluó la capacidad de las selenosemicarbazonas de inhibir el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi,* cepa Dm28c (Tabla 3.12). Para ello, los parásitos fueron incubados a diferentes concentraciones de selenosemicarbazonas (entre o.8 μ M – 100 μ M), para así luego de 72 h obtener una curva dosis-respuesta que permitiera calcular el IC₅₀ (Tabla 3.12). El screening de los compuestos fue realizado en dos etapas; en primera instancia, se evaluaron las selenosemicarbazonas **2a-f** obtenidas con la metodología que utiliza selenosemicarbazida. También, se determinó su toxicidad en células de mamífero no infectadas (células Vero) y el Índice de Selectividad (IS) fue calculado según CC₅₀/IC₅₀, (Tabla 3.12).

Communato	R ₁	R ₂	Dm28c	Vero CC ₅₀ ^b	١S٢
Compuesto			IC ₅₀ ^a (μM)	(μM)	
2a	<i>m</i> -BrPh	Me	1.2 ± 0.8	46.4 ± 6.3	39
2b	<i>m</i> -BrPh	Н	5.9 ± 1,6	171.7 ± 13.5	29
2C	m, p-diClPh	Н	2.3 ± 0.6	95 . 1 ± 14	41
2d	m-CF ₃ Ph	Н	3.8 ± 0.8	167.3 ± 17.4	44
2e	<i>m</i> -BrPh	m-BrPh	5.2 ± 0.3	71.2 ± 9.7	14
2f	m, p-diClPh	n-But	3.2 ± 0.3	81.8 ± 8.5	25
2h	Ph	Me	12.4 ± 0.1		-
2i	m, p-diClPh	Me	50.2 ± 0.1	-	-
2k	m-ClPh	Me	12.5 ± 0.1	-	-
21	m-CF ₃ Ph	Et	6.5 ± 0.1		-
2m	m-MePh	Me	12.2 ± 0.1		-
2n	p-ClPh	Н	12.1 ± 0.1	-	-
20	<i>p</i> -NMe₂Ph	Н	26.2 ± 0.3	-	-
2р	p-OMePh	Н	25.5 ± 0.1	-	-
2q	i-propil	Me	50.2 ± 0.1	-	-
Bnz			12.5 ± 2.0	309.1 ± 2.0	25

^aIC₅₀: Concentración de un compuesto que inhibe el 50% de crecimiento de epimastigotes de *T. cuzi*, cepa Dm28c, comparado con un control; ^bCC₅₀: Concentración de un compuesto que mata el 50% de las células Vero, comparado con un control; ^cIS: Índice de Selectividad: Cociente entren CC₅₀ e IC₅₀. Todos los valores están dados como promedios de un triplicado.

Tabla 3.12 IC₅₀, LC₅₀ e IS de selenosemicarbazonas ensayadas en epimastigotes de T. Cruzi (cepa Dm28c)

Los derivados **2a-f** mostraron ser buenos inhibidores del crecimiento de epimastigotes con $IC_{50} = 1.2-5.9 \ \mu$ M, comparando con Benznidazol ($IC_{50} = 12.5 \ \mu$ M). En estos casos, la correlación entre la actividad antiparasitaria y la enzimática no es lineal, mostrando que pese a que **2e** y **2f** tienen los menores valores de K_1 , no muestran los mejores resultados anti-*T. cruzi*. Esto podría atribuirse a la variación en la permeabilidad, solubilidad, estabilidad y metabolismo *in vivo*, o diferencias entre la enzima nativa (Cz) de Tulahuen 2 y la perteneciente a la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Los compuestos **2a-d** son más selectivos que el Benznidazol, la droga actualmente utilizada en la farmacoterapia de la enfermedad, mientras que **2e-f** son menos selectivos.

En una segunda instancia, se evaluaron las selenosemicarbazonas **2h-i** y **2k-q** preparadas utilizando LiAlHSeH. Los derivados de cetona aromáticos **2h** y **2k-m** mostraron IC₅₀ próximos o inferiores al Benznidazol. Particularmente, para **2h**, **2k** y **2m** no se logró determinar claramente una tendencia en los resultados, pues la selenosemicarbazona **2h** (no sustituida), la **2k** (*meta* sustituida con grupo electrón atrayente) y la **2m** (*meta* sustituida con grupo electrón dador) mostraron similares valores de IC₅₀. Mientras que los derivados de aldehído **2o** y **2p** mostraron IC₅₀ superiores a la droga de referencia, el derivado **2n** resultó con una IC₅₀ del orden de las selenosemicarbazonas **2h** y **2m**. Tanto la cetona aromática **2i** como el derivado alquílico **2q** resultaron poco activos, con IC₅₀ superior al Benznidazol. El derivado de aldehído **2n**, sustituido en *para* con grupo electrón atrayente, mostró un resultado muy parecido a los derivados de cetona **2h**, **2k** y **2m** con diferentes patrones de sustitución, lo que resulta difícil establecer una relación estructura-actividad.

Pese a que algunos derivados resultaron promisorios, los valores de IC₅₀ encontrados para las selenosemicarbazonas obtenidas utilizando LiAlHSeH **2h-i**, **2k-q** fueron, en la mayoría de los casos, hasta 10 veces superiores a los encontrados para los compuestos **2a-f**. Esto resulta llamativo, pues las modificaciones estructurales realizadas en la segunda tanda de compuestos no justificarían tal desviación. Cabe destacar que la evaluación de los compuestos fue realizada en dos instancias, en las que ciertas variables biológicas pudieron haber influido en los resultados. El medio de cultivo utilizado donde crecieron los epimastigotes (LIT: liver infusion tryptose), suplementado con 10% de suero fetal bovino, no es químicamente definido, sino que varios de los componentes incluyen extracto de levadura, infusión de hígado, triptosa y FBS. Estos pueden variar la proporción de sus componentes intrínsecos, de stock a stock, como ser las vitaminas, hormonas, proteinas, lípidos, entre otros, lo que podría afectar en varios aspectos biológicos, como ser la velocidad de crecimiento y diferenciación de los epimastigotes.⁴² Esto podría estar influyendo en los resultados encontrados, pudiendo explicar, en parte, las desviaciones observadas. De esta manera, para poder comparar todos los resultados, debería realizarse un único screening incluyendo todo el set de selenosemicarbazonas y de esta manera minimizar las variables biológicas.

3.3.2d Evaluación in vitro de selenosemicarbazonas en amastigotes de T. cruzi

Visto los resultados y con la idea de evaluar los compuestos en un estadio clínicamente más relevante del parásito, se seleccionaron una serie de selenosemicarbazonas para ser ensayadas en amastigotes, el estadio infectivo del parásito. El criterio para la selección estuvo basado en aquellos con mejor índice de selectividad **2a** (IS = 39), **2c** (IS = 41) y **2d** (IS = 44). También se seleccionó **2f** (IS = 25) pues fue la selenosemicarbazona más activa contra Cz. Las concentraciones seleccionadas para trabajar fueron en función de los valores de IC₅₀ determinados para epimastigotes, IC₅₀ x 2 e IC₅₀ x 4. Todos los compuestos seleccionados mostraron buenos Porcentajes de Inhibición del Crecimiento (PIC), a concentraciones del orden del bajo micromolar (Tabla 3.13).

Communali		Dm28c	
compuesto	Concentracion (μM)	PIC (%)	
2a	1.2	76 ± 3	
2a	2.4	77 ± 1	
2a	4.8	78 ± 3	
2C	2.3	63 ± 6	
2C	4.6	69±5	
2C	9.2	72 ± 1	
2d	3.8	34 ± 7	
2d	7.6	70 ± 2	
2d	15.2	74 ± 4	
2f	3.2	66 ± 2	
2f	6.4	73 ± 3	
2f	12.8	74 ± 1	
Bnz	1.0	27 ± 5	
Bnz	15.0	77 ± 1	
Bnz	30.0	85 ± 1	

PIC (%) expresado como la desviación estándar de tres experimentos independientes; Bnz: Benznidazol. **Tabla 3.13** Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) de amastigotes de *T. cruzi*, cepa Dm28c, para las selenosemicarbazonas **2a**, **2c**, **2d**, **2f** y Benznidazol (Bnz).

⁴² De Paula Lima CV, Batista M, Kugeratski FG, Vincent IM, Soares MJ, *et al.* (2014) LM14 defined medium enables continuous growth of Trypanosoma cruzi. BMC Microbiology 14:238

El compuesto más activo **2a** (1.2 μ M, PIC = 76%) redujo el crecimiento de amastigotes sin mostrar efecto tóxico en células Vero y resultó más activo que Bnz (1.0 μ M, IC = 27%). El mismo comportamiento se vio reflejado en el ensayo en epimastigotes. El compuesto **2f**, el cual posee la mejor K₁ = 3.7 nM, no resultó ser el mejor inhibidor del crecimiento de amastigotes, algo que también se observó en el ensayo de epimastigotes.

En la Figura 3.18 se muestran fotografías del ensayo de infección de células Vero con tripomastigotes, los cuales se diferencian intracelularmente a amastigotes. El ensayo, particularmente evalúa la velocidad de replicación de los parásitos en este estadío intracelular, al incubar las células Vero infectadas con las diferentes selenosemicarbazonas durante 24 h. En las fotos se distinguen los núcleos de las células Vero y los amastigotes en replicación. En los cuadrantes C (compuesto 2f) y E (compuesto 2c) se distinguen amastigotes en replicación, mientras que en los cuadrantes B (compuesto 2a) y D (compuesto 2d) no es tan notorio (Figura 3.18). De esta manera, las selenosemicarbazonas 2a y 2d resultarían ser las más promisorias.

3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas



Figura 3.18 Fotos del ensayo de inhibición de crecimiento de amastigotes de *T. cruzi*, en células Vero, en presencia de selenosemicarbazonas, tomadas con microscopio de epifluoresencia: A: Control; B: **2a** 4.8 μM; C: **2f** 12.8 μM; D: **2d** 15.2 μM; E: **2c** 9.2 μM; F: Bz 30 μM

Según el programa de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (sigla en inglés: TDR), la OMS considera a un compuesto como droga hit cuando el mismo muestra $IC_{50} \le 1 \ \mu g/mL$ contra el parásito y IS > 50.⁴³

Aunque las selenosemicarbazonas sintetizadas no representan exactamente esos valores, algunas de ellas resultan promisorios puntos de partida para posteriores exploraciones. Según este criterio, el compuesto **2a** resulta ser el mejor candidato pues $IC_{50} = 0.4 \mu g/mL$ e

⁴³ Nwaka S, Hudson A (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nat Rev Drug Disc 5: 941-955

IS = 39, además de tener la mejor correlación enzima-parásito. En este caso, la muerte de los parásitos podría atribuirse a la inhibición de Cz.

Se ha descripto en literatura que la administración de Selenio (4-16 ppm) a ratones infectados con *T. cruzi* logra una disminución de la parasitemia dosis-dependiente y reducción del daño cardíaco.⁴⁴ Este estudio está en fase clínica Fase 3 y los resultados del mismo aun no han sido publicados.⁴⁵

Este punto sería de interés para las selenosemicarbazonas ya que podrían tener un efecto benéfico adicional a ser evaluado. Hemos observado que en solución tienden a descomponerse en un sólido negro, presumible Se(o), que precipita con el tiempo.

3.3.2e Escalado de m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a y su evaluación biológica in vivo en modelo murino de Chagas agudo

La *m*-bromofenilmetil selenosemicarbazona **2a** resultó ser el compuesto más activo, capaz de inhibir el crecimiento de *T. cruzi* en el estadío amastigote, con menor efecto tóxico en células Vero, siendo inclusive más activo que la droga de referencia Benznidazol (Figura 3.19).



PIC : Porcentaje de Inhibición del Crecimiento, en amastigotes de T. cruzi

Figura 3.19 Benznidazol (Bnz) vs m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a

En función de los resultados obtenidos, se seleccionó esta selenosemicarbazona para ser evaluada *in vivo*, en modelo murino de Chagas agudo.

⁴⁴ de Souza AP, de Oliveira GM, Vanderpas J, de Castro SL, Rivera MT, *et al.* (2003) Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental Trypanosoma cruzi infection. Parasitol Res 91: 51-54.

⁴⁵ <u>http://clinicaltrials.gov</u>, Selenium Treatment and Chagasic Cardiopathy. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00875173

Para el ensayo fue necesario escalar la reacción de **2a** al gramo. Utilizando la nueva metodología con LiAlHSeH (Tabla 3.6), se obtuvo el derivado **2a** a partir de su análogo oxigenado semicarbazona **7a**, con rendimiento moderado (Figura 3.20).



Figura 3.20 Escalado de m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a, a partir de la semicarbazona 7a

Luego de aislar el compuesto **2a,** confirmando su pureza por resonancia magnética nuclear, se logró obtener la cantidad de selenosemicarbazona necesaria para continuar con los ensayos *in vivo*.

La evaluación de **2a** fue realizada en colaboración con la Lic. Gloria Yaluff del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de Asunción, Paraguay, de acuerdo a un protocolo desarrollado por su grupo.⁴⁶ Para ello se inocularon intraperitonealmente 30 ratones BALB/c con 5.000 parásitos, en estadio infectivo tripomastigote, por mL de sangre, de la cepa CL Brener, y el tratamiento con el compuesto comenzó a los 10 días post infección. Se trabajó en dos lotes de 7 ratones, administrando vía oral 10 y 50 mg/kilo ratón/día de **2a**, respectivamente, durante 13 días. También se realizaron controles con Bnz (50 mg/kilo ratón/día) y PBS, inoculando 8 y 7 ratones, respectivamente. Todos los ensayos involucraron la serología de los ratones durante 61 días, para así estudiar la evolución de la parasitemia con y sin administración de **2a** (Figura 3.21).

⁴⁶ Boiani M, Boiani L, Denicola A, Torres de Ortiz S, Serna E, *et al.* (2006) 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: A New Family of Water-Soluble Anti-Trypanosomatid Agents. J Med Chem 49: 3215-3224

3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas



Figura 3.21 Esquema de análisis in vivo de la m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a en modelo murino de Chagas agudo

Se utilizaron dos parámetros independientes para evaluar la actividad de la selenosemicarbazona **2a** *in vivo*. Por un lado, el porcentaje de supervivencia de ratones (Figura 3.22), determinado en animales infectados y en tratamiento, semana a semana, y la parasitemia semanal post infección (Figura 3.23).



Figura 3.22 Porcentaje de supervivencia de ratones en cuatro subgrupos: al suministrar 2a (10 mg/kg ratón/día) y 2a (50 mg/kg ratón/día), Bnz (control positivo), PBS (blanco); evaluados durante 9 semanas.



Figura 3.23 Parasitemia de ratones tratados con 2a (10 mg/kg ratón/día), Bnz (50 mg/kg ratón/día) y PBS (control), evaluados durante 61 días post infección

Para la selenosemicarbazona **2a** 10 mg/kg/día y el control con PBS, el porcentaje de supervivencia resultó en un 71%, al finalizar el experimento (Figura 3.22). Al administrar **2a** 50 mg/kg/día, el compuesto resultó tóxico, matando a los ratones al día 20 post infección. Por el contrario, para Bnz el porcentaje de supervivencia se sostuvo en 100% durante todo el ensayo (Figura 3.22).

En la Figura 3.23 se puede evidenciar un máximo de parasitemia, al día 26 del ensayo, para todos los casos. La selenosemicarbazona a una concentración cinco veces menor a Bnz, disminuyó el pico máximo a la mitad, respecto al control, pero no fue tan efectivo como el Bnz. También es de notar la ausencia del segundo máximo de parasitemia, que se evidenció en el control sin tratar, al día 40 del ensayo (Figura 3.23). De esta manera, al administrar **2a** 10 mg/kg/día se observó un buen perfil de parasitemia, siendo el número de tripomastigotes en ratones tratados inferior al presente en los no tratados.

Con estos resultados se concluyó que el compuesto **2a** resultó activo frente a la infección experimental con *T. cruzi* a dosis bajas, pero tóxico a 50 mg/kilo ratón/día, para ratones MALB/c cepa CL Brener (Figura 3.22). Así se refuerza la idea de seguir trabajando en la preparación de derivados selenados, evaluando modificaciones estructurales, vías de administración o la posibilidad de la coadministración de selenosemicarbazonas con otros fármacos, con el fin de atenuar estos efectos adversos.

3.4 Conclusiones

- Se describieron dos metodologías de obtención de selenosemicarbazonas: I) a partir de simples bloques de construcción, cetonas o aldehídos y selenosemicarbazida, II) a partir de semicarbazonas, utilizando LiAIHSeH para el intercambio O-Se.

- Se demostró que el reemplazo isostérico de un átomo de azufre (tiosemicarbazonas 1) por Selenio (selenosemicarbazonas 2) resultó en un aumento significativo de la actividad inhibitoria de Cz para los compuestos preparados. De esta manera, esta estrategia sintética basada en el diseño de inhibidores enzimáticos mediante reemplazo isostérico resultó ampliamente satisfactoria.

 Se caracterizó el mecanismo de inhibición de las selenosemicarbazonas, las cuales resultaron ser inhibidores lentos y reversibles, con valores de K1entre 3.7 nM – 29.7 nM.

- Se trabajó en la purificación del extracto de CPs (Cz + Cb) mediante columna monoclonal, permitiendo purificar una Captepsina B (Cb), la cual resultó con actividad cisteín proteasa (ACP) insignificante en la mezcla enzimática. La selenosemicarbazona **2f** resultó buen inhibidor de esta cisteín proteasa, y resulta un punto de partida interesante para futuros trabajos.

- Independientemente de su actividad inhibitoria enzimática, lograron ser efectivos agentes anti-*T. cruzi in vitro.* En el estadio no infectivo epimastigote y en el infectivo intracelular amastigote, mostraron ser muy buenos antichagásicos. Su actividad antiparasitaria puede ser atribuida principalmente al efecto inhibitorio en Cz, la principal cisteín proteasa.

- El derivado más promisorio, la selenosemicarbazona **2a**, fue evaluada *in vivo* en modelo murino de Chagas agudo, mostrando un perfil de parasitemia menor que para los ratones no tratados (control con PBS). Estos derivados podrían ser muy promisorios como agentes anti-*T. cruzi*, en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas en fase aguda (inicio de la enfermedad).

- Todo indicaría que estos nuevos hits con bajos valores de actividad anti-T. cruzi (en el rango μ M) y mayor índice de selectividad que el Benznidazol serían buenos puntos de partida para futura optimización y análisis SAR.

- Parte del trabajo presentado ha sido publicado en una revista científica arbitrada (7.Anexo).⁴⁷

⁴⁷ Pizzo C, Faral-Tello P, Salinas G, Fló M, Robello C, Wipf P, Mahler SG (2012) Selenosemicarbazones as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against Trypanosoma cruzi. Med Chem Commun 3: 362–367

3.5 Parte Experimental



Síntesis de m-bromofeniletanona tiosemicarbazona (1a).¹ Se adicionó *m*-bromoacetofenona (500 mg, 2.5 mmol) a una solución de tiosemicarbazida (273 mg, 3.0 mmol) y ácido *p*-TsOH (50 mg, 0.30 mmol), en PhMe (1 mL). La mezcla de reacción se calentó en vial de microondas por 10 min a 100°C, con agitación, $P_{máx} = 200$ W. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 1:1) para dar 1a (150 mg, 22%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H), 7.33 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 0.9, 1.8, 8.0 Hz, 1H), 7.88 (ddd, *J* = 0.9, 1.8, 8.0 Hz, 1H), 8.12 (bs, 1H), 8.19 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.33 (bs, 1H), 10.26 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 14.0, 122.1, 125.8, 128.9, 130.3, 131.8, 140.0, 146.3, 179.0.

3.5.1 Preparación de selenosemicarbazonas

3.5.1a Síntesis de selenosemicarbazonas a partir de selenosemicarbazida



Preparación de selenosemicarbazonas 2a-c

Condiciones A: La preparación de 2a es representativa

(E) *m*-bromofeniletanona selenosemicarbazona (2a). Se adicionó selenosemicarbazida 4 (100 mg, 0.72 mmol) y ácido acético (1 mL) a una solución de *m*-bromofeniletanona **3a** (145 mg, 0.74 mmol) en EtOH (25 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 h y luego se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad. El residuo se volcó en agua (30 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con ACOEt (5 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se

purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **2a** (72 mg, 53%) como un sólido amarillo: PF = 143–144°C (dec); IR (KBr) 3380, 3199, 3139, 1653, 1592, 1560,1540, 1508, 1468, 1418, 1332, 1290, 1101, 1072, 994, 888, 827, 781, 699, 681, 621, 539, 412 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (s, 3H), 6.87 (bs, 1H), 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 1.6, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 1.6, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.76 (bs, 1H), 7.86 (dd, *J* = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 9.08 (bs, 1H); ¹³C RMN δ (CDCl₃) 13.9, 123.1, 125.3, 129.6, 130.3, 133.2, 139.1, 147.8, 177.1; HRMS calculado para C₉H₁₀BrN₃SeNa [M + Na]⁺ 341.91120, valor encontrado 341.91110.

m-bromobenzaldehído selenosemicarbazona (2b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2a, utilizando *m*-bromobenzaldehído 3b. El residuo sólido se recristalizó de CHCl₃ para dar 2b (69 mg, 46%) como un sólido blanco: PF = $186-187^{\circ}$ C (dec); IR (KBr) 3372, 3229, 3144, 2980, 1602, 1528, 1474, 1424, 1357, 1281, 1215, 1099, 1057, 995, 942, 886, 785, 681, 606, 561, 547, 496, 436, 399, 250 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7.35 (dd, *J* = 7.6, 8.0 Hz, 1H), 7.58 (ddd, *J* = 1.4, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 1.4, 7.6 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 1.4, 2.0 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 11.79 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 122.4, 127.3, 129.0, 130.8, 132.6, 136.5, 141.9, 173.9; HRMS calculado para C₈H₈BrN₃SeNa [M + Na]⁺ 327.89560, valor encontrado 327.89260.

m,p-diclorobenzaldehído selenosemicarbazona (2c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2a**, utilizando *m,p*-diclorobenzaldehído **3c**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **2c** (118 mg, 77%) como un sólido blanco: PF = 294–295°C (dec); IR (KBr) 3413, 3266, 3160, 1612, 1602, 1552, 1524, 1552, 1472, 1389, 1361, 1271,1218, 1127, 1092, 1030, 929, 825, 787, 722, 697, 678, 587, 527, 490, 452, 353 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.76 (bs, 2H), 11.84 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 128.1, 128.4, 130.9, 131.9, 132.2, 135.0, 140.9, 174.1; HRMS calculado para C₈H₇Cl₂N₃SeNa [M + Na]⁺ 317.90690, valor encontrado 317.90550.

Preparación de selenosemicarbazonas 2d-f

Condiciones B: La preparación de **2d** es representativa.

m-trifluorometilbenzaldehído selenosemicarbazona (2d). Se adicionaron selenosemicarbazida 4 (36 mg, 0.26 mmol) y ácido p-TsOH (1 mg) a una solución de mtrifluorometilbenzaldehído 3d (50 mg, 0.29 mmol) en EtOH (1 mL). La mezcla de reacción se calentó en vial de microondas durante 6 min a 90°C, con agitación, P_{max} = 200 W. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 3:1) para dar 2d (40 mg, 52%) como un sólido blanco: PF = 200-201°C (dec); IR (KBr) 3230, 3148, 2358, 1605, 1527, 1451, 1410, 1342, 1326, 1313, 1281, 1210, 1173, 1129, 1071, 946, 803, 696, 663 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6.80 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (bs, 1H), 7.32 (s, 1H); ¹³C RMN $(DMSO-d_6) \delta$ 115.5 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 118.2 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 121.2, 122.6, 122.8 (c, J_{CF3} = 32 Hz), 127.0, 131.8 (c, J_{CF_3} = 272 Hz), 134.9, 166.4; HRMS calculado para $C_9H_8F_3N_3SeNa [M + Na]^+$ 317.97280, valor encontrado 317.97320.

bis(m-bromofenil)metanona selenosemicarbazona (2e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2d, utilizando bis(*m*-bromofenil)metanona **3e**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 8:1) para dar **2e** (12 mg, 27%) como un sólido amarillo: PF = 170–171°C (dec); IR (KBr) 3392, 2920, 1630, 1560, 1524, 1484, 1465, 1419, 1290, 1255, 1176, 1072, 994, 829, 788, 716, 688, 437 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃) δ 6.91 (bs, 1H), 7.22-7.25 (m, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 1.2, 1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 1.2, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 7.74 (ddd, *J* = 1.2, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.83 (bs, 1H), 8.85 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 123.2, 124.6, 126.9, 127.0, 130.3, 130.4, 131.3, 131.8, 132.4, 133.8, 134.3, 137.9, 148.6, 177.2; HRMS calculado para C₁₄H₁₀Br₂N₃Se [M - H]⁻ 457.84070, valor encontrado 457.84210.

(E,Z) *m,p-diclorofenilpentan-1-ona selenosemicarbazona* (*2f*). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2d, utilizando *m,p*-diclorofenil pentan-1-ona 3f. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar 2f (69 mg, 55%) como un sólido amarillo (50:50, mezcla *Z*:E): PF = 130–131°C (dec); IR (KBr) 2927, 1735, 1719, 1686, 1655, 1648, 1637,1618, 1560, 1509, 1440, 1377, 1273, 1137, 1027, 820 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 0.84-0.88 (m, 3H), 1.33-1.35 (m, 4H), 2.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 2.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.61-7.66 (m, 1H), 7.86 (dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 10.68 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.7, 13.8, 21.9, 22.0, 25.6, 26.0, 27.5, 28.2, 126.5, 127.2, 127.9, 128.6, 130.4, 130.8, 131.5, 131.6, 131.9, 132.0, 136.9, 137.3, 150.2, 154.2, 175.1; HRMS calculado para C₁₂H₁₄Cl₂N₃Se [M - H]⁻ 349.97310, valor encontrado 349.97210.

3.5.1b Síntesis de selenosemicarbazonas a partir de KSeCN¹⁷



Preparación de selenosemicarbazonas 2g-i

La preparación de 2g es representativa

2-ciclohexanona selenosemicarbazona (2g). Se adicionó hidracina hidrato (2.0 mL) y HCl concentrado (2.8 mL) a una solución de EtOH (55 mL) y agua (7.0 mL). A la solución resultante, se le adicionó lentamente en baño de agua-hielo, una solución de KSeCN **6** (2.0 g, 10 mmol) en agua (7.0 mL). Posteriormente, se adicionó ciclohexanona **3g** (3.8 g, 40 mmol) a la mezcla y esta se calentó a reflujo durante 2 h. Luego, la solución se filtró para

remover el sólido negro presente, presumible Se(o). El filtrado se concentró a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 2:1) para dar **2g** (0.74 g, 24%) como un sólido incoloro: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.64-1.74 (m, 6H), 2.24–2.32 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 8.93 (s, 1H).

(E,Z) acetofenona selenosemicarbazona (2h). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2g, utilizando acetofenona 3h. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 4:1) para dar 2h (8%), como un sólido blanco (50:50, mezcla Z:E). La caracterización espectroscópica completa se detalla en el apartado 3.5.1d.

(E,Z) *m,p-diclorofeniletanona selenosemicarbazona* **(2i).** Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2g**, utilizando *m,p*-dicloroacetofenona **3i.** El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **2i** (125 mg, 6%), como un sólido amarillo (36:64, mezcla *Z:E*). La caracterización espectroscópica completa se detalla en el apartado 3.5.1d.

(E,Z) m-bromofeniletanona selenosemicarbazona (2a). Se prepara siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2g, utilizando mbromoacetofenona 3a. El residuo se purifica por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 2:1) para dar 2a (20 mg, 5%), como un sólido amarillo (40:60, mezcla Z:E). Las propiedades espectroscópicas son idénticas a las ya descriptas por nuestro grupo.⁴⁷

3.5.1d Síntesis de selenosemicarbazonas utilizando LiAlHSeH

Preparación de LiAlHSeH 0.1 M:²⁸

LiAlH₄ + Se $\xrightarrow{\text{THF}}$ LiAlHSeH + H₂ 0°C, 30 min

Se adicionó bajo atmósfera de nitrógeno, una solución de LiAlH₄ (1.0 M) en THF (1 mL, 1.0 mmol), a una suspensión de selenio (80 mg, 1.0 mmol) en THF seco (9 mL), a 0°C. La mezcla se agitó durante 30 min a 0°C. LiAlHSeH se formó *in situ*, resultando en una solución gris, la cual fue directamente utilizada en las reacciones presentadas.

Preparación de selenosemicarbazonas 2a-c, 2h-i, 2k-q



La preparación de **2h** es representativa

acetofenil selenosemicarbazona (2h). Se le adicionó PCI_5 (437 mg, 2.1 mmol) a una solución de la acetofenil semicarbazona 2h (82 mg, 0.70 mmol) en CH_2CI_2 seco (7 mL) a 0°C y la solución se dejó con agitación a esa temperatura durante 30 min. Posteriormente, se adicionó una solución de LiAlHSeH en THF (2.2 mmol, 22 mL, 0.1 M) recientemente preparada, a 0°C. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a esa temperatura durante 1 hr. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad. El residuo se volcó en agua (50 mL), se ajustó a pH 7-8 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (5 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo fue purificado por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt, 5:1) para dar 2h (84 mg, 50%) como un sólido blanco: PF = 135-136°C (dec); ¹H RMN (CDCl₃) 2.31 (s, 3H), 6.83 (bs, 1H), 7.39-7.44 (m, 3H), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.78 (bs, 1H), 9.04 (bs, 1H); ¹³C RMN δ (CDCl₃) 14.1. 126.6, 128.7, 130.3, 137.0, 149.7, 176.4; HRMS calculado para C₉H₁₂N₃Se [M + H]⁺ 242.01182, valor encontrado 241.01283.

m-bromofeniletanona selenosemicarbazona (2a). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *m*-bromofeniletanona semicarbazona **7a** para dar **2a** (81 mg, 36%) como un sólido amarillo. Las propiedades espectroscópicas son idénticas a las ya descriptas por nuestro grupo.⁴⁷

m-bromobenzaldehído selenosemicarbazona (2b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *m*-bromobenzaldehído semicarbazona **7b** para dar **2b** (3 mg, 5%) como un aceite translucido. Las propiedades espectroscópicas son idénticas a las ya descriptas por nuestro grupo.⁴⁷

m,p-diclorobenzaldehído selenosemicarbazona (2c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *m,p*-diclorobenzaldehído semicarbazona **7c** para dar **2c** (11 mg, 5%) como un sólido blanco. Las propiedades espectroscópicas son idénticas a las ya descriptas por nuestro grupo.⁴⁷

m,p-diclorofeniletanona selenosemicarbazona (2i). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *m,p*-diclorofeniletanona semicarbazona **7i** para dar **2i** (28 mg, 13%) como un sólido amarillo: PF = 199–200°C (dec); ¹H RMN (CDCl₃) 2.28 (s, 3H), 6.90 (bs, 1H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.74 (bs, 1H), 7.81 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 9.10 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) 13.8, 125.7, 128.4, 130.8, 133.3, 134.6, 136.9, 146.9, 177.3; HRMS calculado para C₉H₉Cl₂N₃SeNa [M + Na]⁺ 331.93390, valor encontrado 331.92260.

m-clorofeniletanona selenosemicarbazona (2k). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2h, utilizando *m*-clorofeniletanona semicarbazona 7k para dar 2k (47 mg, 25%) como un sólido amarillo: PF = 133–134°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (s, 3H), 7.07 (bs, 1H), 7.34 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.40 (ddd, *J* = 1.2, 1.8, 7.8 Hz, 1H), 7.56-7.58 (m, 1H), 7.70 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.78 (bs, 1H), 9.12 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.1, 124.8, 126.6, 130.0, 130.2, 134.9, 138.8, 148.1, 176.8; HRMS calculado para C₉H₁₀ClN₃SeNa [M + Na]⁺ 297.97285, valor encontrado 297.96101.

(E,Z) m-trifluorometilfenilpropanona selenosemicabazona (2I) Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2h, utilizando m-trifluorometilfeniletanona selenosemicabazona 7l para dar 2h (146 mg, 65%) como un sólido amarillo (43:57, mezcla Z:E): PF = 160–161°C (dec); Isómero mayoritario: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.23 (t, J = 7.7 Hz, 3H), 2.78 (c, J = 7.7 Hz, 2H), 7.20 (bs, 1H), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.79 (bs, 1H), 7.88 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 9.27 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 10.5, 20.6, 123.4 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 123.9 (c, J_{CF3} = 271 Hz), 126.7 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 129.5, 129.8 (c, J_{CF3} = 1 Hz), 131.4 (c, J_{CF3} = 32 Hz), 136.9, 152.8, 176.9; Isómero minoritario: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.13 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 2.57 (c, J = 7.3 Hz, 2H), 7.08 (bs, 1H), 7.43 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.75 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 7.79 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 10.7, 31.8, 123.5 (c, J_{CF3} = 271 Hz), 123.8 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 127.2 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 130.3, 130.6, 132.6 (c, J_{CF3} = 33 Hz), 133.8, 155.2, 176.3; HRMS calculado para C₁₁H₁₂F₃N₃SeNa [M + Na]⁺ 346.01480, valor encontrado 346.00410.

m-metilfeniletanona selenosemicabazona (2m) Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona 2h, utilizando *m*-metilfenilpropanona semicarbazona 7m para dar 2m (26 mg, 15%) como un sólido blanco: PF = 143–144°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 6.83 (bs, 1H), 7.26-7.32 (m, 2H), 7.49-7.51 (m, 2H), 7.79 (bs, 1H), 9.04 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.3, 21.6, 123.9, 127.3, 128.7, 131.3, 137.1, 138.6, 150.5, 176.1; HRMS calculado para C₁₀H₁₃N₃SeNa [M + Na]⁺ 278.02750, valor encontrado 278.01670.

p-clorobenzaldehído selenosemicarbazona (2n). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *p*-clorobenzaldehído semicarbazona **7n** para dar **2n** (20%) como un sólido blanco: PF = 140-141°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 6.73 (bs, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 9.55 (bs, 1H); HRMS calculado para C₈H₈ClN₃SeNa [M + Na]⁺ 283.95720, valor encontrado 283.94620.

p-dimetilaminobenzaldehído selenosemicarbazona (20). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *p*-dimetilamino

semicarbazona **70** para dar **20** (9 mg, 5%) como un sólido amarillo: PF = 134-135°C (dec); ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.03 (s, 6H), 6.61 (bs, 1H), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.55 (bs, 1H), 7.79 (s, 1H), 9.47 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 44.1, 111.9, 120.0, 128.4, 129.5, 152.5, 177.2; HRMS calculado para C₁₀H₁₄N₄SeNa [M + Na]⁺ 293.03837, valor encontrado 293.02760.

p-metoxibenzaldehído selenosemicarbazona (2p). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando *p*-metoxibenzaldehído semicarbazona **7p** para dar **2p** (21 mg, 12%) como un sólido naranja: PF = 181-182°C (dec); ¹H RMN (acetona-d₆) δ 3.84 (s, 3H), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.85 (bs, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.30 (bs, 1H), 10.64 (s, 1H); ¹³C RMN (acetona-d₆) δ 55.7, 115.0, 127.4, 129.9, 144.8, 162.5, 176.5; HRMS calculado para C₉H₁₂N₃OSe [M + H]⁺ 258.00673, valor encontrado 258.01400.

3-metil-2-butanona selenosemicarbazona (2q). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **2h**, utilizando 3-metil-2-butanona semicarbazona **7q** para dar **2q** (10 mg, 7%) como un aceite traslúcido: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.09 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 2.50 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.70 (bs, 1H), 7.62 (bs, 1H), 8.76 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.07, 19.6, 37.2, 159.6, 175.7; HRMS calculado para C₆H₁₃N₃SeNa [M + Na]⁺ 230.02747, valor encontrado 230.01670.

Síntesis de alcoholes 5e-f y cetonas 3e-f



Preparación de alcoholes 5e-f

La preparación de **5e** es representativa

bis(*m*-bromofenil) metanol (5e). Se adicionó lentamente 1,3-dibromo benceno (1.31 mL, 0.01 mmol) sobre granallas de Mg (130 mg, 5.4 mmol) en Et₂O anhidro (15 mL). La reacción se volvió turbia y el disolvente entró en ebullición, manteniéndose la agitación durante 30 min. Luego, se adicionó lentamente, durante 30 min, *m*-bromobenzaldehído (1 g, 5.4 mmol) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, por 30 min. Posteriormente, la solución se volcó en agua y se adicionó una solución HCl 5% hasta disolver el Mg(OH)₂ completamente. Luego, se adicionó Brine y se extrajo con Et₂O (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con solución saturada de NaHCO₃, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 7:1) para dar **5e** (480 mg, 25%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.28 (dt, *J* = 4.0, 8.0 Hz, 2H), 7.42 (dt, *J* = 4.0, 8.0 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 1.7 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 74.9, 122.8, 125.1, 129.5, 130.3, 131.0, 145.3.

m,p-diclorofenil pentanol (5f). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el alcohol **5e**, utilizando bromobutano y *m,p*-diclorobenzaldehído. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 10:1) para dar **5f** (830 mg, 62%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0.89 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.20–1.41 (m, 4H), 1.62–1.79 (m, 2H), 1.92 (d, *J* = 3.4, 1H), 4.61–4.66 (m, 1H), 7.16 (dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.2, 1H), 7.44 (d, *J* = 2.0, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.0, 22.5, 27.7, 38.8, 73.4, 125.2, 127.9, 130.3, 131.1, 132.4, 145.1.

Preparación de cetonas 3e-f

La preparación de **3e** es representativa

bis(*m*-bromofenil)*metanona* (3*e*). Se adicionó MnO₂ (1.15 g, 10 mmol) a una solución de bis(*m*-bromofenil) metanol 5*e* (469 mg, 1.3 mmol) en PhMe y se calentó a reflujo durante 1 h. La suspensión obtenida se filtró por celite y se lavó con AcOEt. La solución de filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por columna en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 8:1) para dar 3*e* (103 mg, 23%) como un sólido blanco.[±] ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (dt, *J* = 1.2, 7.8 Hz, 2H), 7.87 (t, *J* = 1.2 Hz, 2H), 7.89–7.92 (m, 2H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 122.4, 129.2, 131.3, 132.3, 136.1, 139.0, 193.5.

m,p-diclorofenilpentanona (3f). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la cetona **3e**, utilizando *m,p*-diclorofenilpentanol **5f.** El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **3f** (650 mg, 68%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.31–1.47 (m, 2H), 1.65–1.75 (m, 2H), 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 13.9, 22.4, 26.2, 38.3, 127.1, 130.1, 130.7, 133.2, 136.6, 137.4, 198.2.

Preparación de semicarbazonas 7a-c, 7h-i, 7k-q



m-bromofeniletanona semicarbazona (7a). Se adicionó acetato de sodio (340 mg, 2.5 mmol) a una solución de clorhidrato de semicarbazida (279 mg, 2.5 mmol) en EtOH (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se adicionó *m*-bromoacetofenona **3a** (500 mg, 2.5 mmol) a la mezcla y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado formado se filtró a vacío, se lavó con agua y EtOH y se secó para dar **7a** (582 mg, 91%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H), 6.59 (bs,

1H), 7.32 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.46-7.59 (m, 1H), 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.07 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 9.41 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.3, 121.9, 125.0, 128.4, 130.3, 131.1, 140.7, 142.5, 157.2.

m-bromobenzaldehído semicarbazona (7b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona 7a, utilizando m-bromobenzaldehído 2b para dar 7b (555 mg, 85%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6.62 (bs, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 0.9, 1.9, 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 8.07 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 10.36 (s, 1H).

m,p-diclorobenzaldehído semicarbazona (7c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *m,p*-diclorobenzaldehído **3c** para dar **7c** (1.2 g, 76%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6.66 (bs, 2H), 7.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 1.9, 8.3 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 8.13 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 10.44 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 126.9. 127.7, 130.7, 130.1, 131.7, 135.8, 136.4, 156.6.

acetofenil semicarbazona (7h). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando acetofenona **3h** para dar **7h** (257 mg, 91%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H), 7.34–7.43 (m, 3H), 7.57–7.76 (m, 2H), 8.02 (bs, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.3, 125.9, 128.2, 128.4, 138.3, 144.0, 157.4.

m,p-diclorofeniletanona semicarbazona (7i). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *m,p*-diclorofenilacetofenona **3i** para dar **7i** (2.9 g, 89%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H), 6.62 (bs, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 2.2, 8.5 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 9.48 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.1, 126.2, 127.6, 130.2, 130.8, 131.3, 138.9, 141.6, 157.1.

m-clorofeniletanona semicarbazona (7k). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona 7a, utilizando m-clorofenilacetofenona 3k para dar 8k (576 mg, 85%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H), 6.61 (bs, 2H), 7.38 (dd, J = 1.3, 4.0 Hz, 1H), 7.75–7.78 (m, 1H), 7.94 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 9.45 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.3, 124.7, 125.6, 128.2, 130.0, 133.3, 140.4, 142.5, 157.2.

m-trifluorometilfeniletanona semicarbazona (7l). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona 7a, utilizando *m*-trifluorometilfenilacetofenona 3l para dar 7l (1.2 g, 87%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1.00 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 2.79 (c, J = 7.5 Hz, 2H), 6.58 (bs, 2H), 7.61 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.13 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 9.61 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 10.3, 18.7, 122.3 (c, $J_{CF3} = 4$ Hz), 124.3 (c, $J_{CF3} = 270$ Hz), 124.8 (c, $J_{CF3} = 4$ Hz), 129.4 (c, $J_{CF3} = 31$ Hz), 129.5, 130.0, 138.1, 146.7, 157.1.

m-metilfenilpropanona semicarbazona (7m). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *m*-metilfenilacetofenona **3m** para dar **7m** (586 mg, 82%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.16 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 6.48 (bs, 2H), 7.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.25 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 9.30 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 13.4. 21.1, 123.2, 126.5, 128.1, 129.2, 137.4, 138.2, 144.2, 157.4.

p-clorobenzaldehído semicarbazona (7n). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *p*-clorobenzaldehído **3n** para dar **7n** (689 mg, 97%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6.54 (bs, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 10.38 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 128.7, 129.1, 133.8, 134.3, 138.3, 157.1.

p-dimetilaminobenzaldehído semicarbazona (70). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *p*-dimetilaminobenzaldehído **3o** para dar **70** (476 mg, 70%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.94 (s, 6H), 6.33 (bs, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 9.94 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 39.9. 111.8, 122.2, 127.7, 140.3, 150.9, 156.9.

p-metoxibenzaldehído semicarbazona (7p). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la semicarbazona **7a**, utilizando *p*-metoxibenzaldehído **3p** para dar **7p** (78 mg, 93%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3.78 (s, 3H), 6.42 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 10.10 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 55.2, 114.1, 127.5, 128.1, 139.2, 156.9, 160.0.

3-metil-2-butanona semicarbazona (7q). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenosemicarbazona **7a**, utilizando 3-metil 2-butanona **3q** para dar **7q** (403 mg, 46%) como un sólido blanco: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 1.77 (s, 3H), 2.47 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 13.2, 19.8, 36.8, 154.6, 157.7.

3.5.2 Evaluación biológica in vitro-in vivo de selenosemicarbazonas

Purificación de Cruzipaína (Cz) y Catepsina b (Cb)

La Cz se purificó a partir de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, como ya fue descripto.²⁹ Brevemente, el extracto obtenido por congelamiento y descongelamiento se purificó por cromatografía de afinidad en ConA-Sepharose, seguido por cromatografía de intercambio iónico Mono Q. Las fracciones unidas fuertemente a la resina aniónica eluyeron con 0.25-0.50 M NaCl. La cromatografía de intercambio iónico Mono Q es necesaria para obtener los stocks de Cz libres de serín carboxipeptidasas, que copurifican en la instancia de la cromatografía en ConA-Sepharose.⁴⁸

La pureza de las proteinas se analizó corriendo geles 10 y 12% SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras y por tinción con Ag. Se determinó la identidad de las proteinas purificadas, por espectrometría de masas de péptidos de las bandas del SDS-PAGE, utilizando tripsina (Sequencing-grade, Promega). Los fragmentos de la digestión con tripsina fueron analizados por MALDI-TOF (4800 MALDI TOF-TOF Analyzer System, Applied Biosystems). Los resultados se incluyen en el capítulo 7, Anexo.

⁴⁸ Parussini F, García M, Mucci J, Agüero F, Sánchez D, *et al.* (2003) Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 131: 11–23

Las fracciones eluídas de Mono Q se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna con anticuerpo monoclonal específico para Cz.³⁹ A esta columna se le agregó la fracción de cisteín proteasa obtenida por la cromatografía de intercambio aniónico, se lavó con PBS, 0.2 M NaCl, 0.4 % n-octil-D-glucopiranosida y Cz eluyó con 100 mM buffer glicina-HCl, pH 2.5. Se elevó el pH del eluato rápidamente a 7 agregando tris(hidroximetil)aminometano pH 9. Los lavados y eluatos se analizaron por 10% SDS-PAGE.

3.5.2a Evaluación in vitro de selenosemicarbazonas 2a-f como inhibidores de Cruzipaína (Cz)

Actividad cisteín-proteasa determinada por ensayo fluorimétrico: procedimiento estándar

Se incubó Cz (1 nM) en 50 mM Tris–HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA, conteniendo 1 M DTT y DMSO por 5 min a 37°C. Luego, se agregó el sustrato fluorogénico Z-PhenylArginine 7-amido-4-metilcumarina clorhidrato (Z-Phe-Arg-AMC) ($K_{\rm M}$ = 10 µM), a una concentración final de 10 µM. Los cambios en la intensidad de fluorescencia detectados, correspondientes a la formación del producto de hidrólisis 7-amino-4-metilcumarina (AMC), fueron registrados a dos longitudes de onda (390 y 460 nm), correspondientes a la excitación y emisión, respectivamente, en un equipo lector de fluorescencia (FLUOstar* OPTIMA, BMG Lab Technologies).

Las velocidades iniciales de hidrólisis del sustrato se calcularon en la porción lineal del gráfico (AMC) vs tiempo, cuando menos del 10% del sustrato es consumido. El volumen final del ensayo fue de 200 μ L, [DMSO] final 10%. A esta concentración, el DMSO no afectó significativamente a la actividad de Cz. Se realizaron curvas de calibración de Unidades de Fluorescencia (UF) vs AMC (μ M) antes de cada experimento, para poder convertir UF a formación de AMC (μ M).

Screening de selenosemicarbazonas utilizando ensayo fluorimétrico:

Según el procedimiento estándar descripto, en la mezcla de reacción se preincubaron los compuestos **2a-f** y **1a**, con Cz durante 5 min. Luego, comenzó la reacción enzima-sustrato con el agregado de Z-Phe-Arg-AMC (10 μ M) y la misma fue monitoreada durante 10 min. Las soluciones stock de las selenosemicarbazonas se prepararon a 10 mM en DMSO y con ellas se realizó un screening a 10, 2 y 0.3 μ M, por duplicado.

Los Porcentajes de Inhibición Enzimática (PIE) fueron calculados según: PIE (%) = $(v_i/v_o) \times 100$ -100, donde $v_i y v_o$ corresponden a las velocidades de formación de AMC (μ M)/t (s), con y sin inhibidor, respectivamente. Se utilizó E64 como inhibidor referencia (control).

Determinación de Log P:

Los valores fueron estimados a partir de los códigos SMILES de los compuestos, utilizando el paquete de software Molinspiration Cheminformatics (Slovensky Grob, Slovak Republic).³⁰

Determinación de la actividad cisteín proteasa de Cb

Se realizó de manera análoga a lo descripto en el apartado 3.5.2a, utilizando [Cb] = 1 nM, y [sustrato] = 10 y 50 μ M.

Actividad inhibitoria de 2f en Cb

Se realizó de manera análoga a lo descripto en el apartado 3.5.2a, utilizando [Cb] = 10 nM, [sustrato] = 10 μ M y [**2f**] = 1, 10 y 100 nM

3.5.2b Caracterización del mecanismo de inhibición de selenosemicarbazonas

Estudio de cursos temporales del equilibrio enzima-inhibidor:

Se determinó el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario (tiempo donde la velocidad de hidrólisis de la enzima es constante) para **2a**, **2e**, **2f** y **1a**. Para ello, se estudió la reacción enzima-sustrato, iniciada por el agregado de Cz (0.2 nM), a varias concentraciones de inhibidor (5, 10, 40, 100, 200 y 500 nM) y concentración fija de sustrato (10 μ M) y esta fue monitoreada durante 1 h. Los datos de los cursos temporales fueron analizados utilizando Origin® software (OriginLab). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Caracterización del mecanismo de inhibición:

Se preincubaron Cz (1 nM) y la selenosemicarbazona **2a** (10 μ M) durante 30 min y luego se pasaron por una columna preempacada PD-10 desalting column (GE Healthcare, conteniendo 8.3 mL de medio SephadexTM G-25). El volumen muerto conteniendo inhibidor no unido fue descartado y la fracción conteniendo la enzima (o el complejo enzimainhibidor) se eluyó con 3.5 mL de buffer. Esta fracción se guardó durante 30 min hasta que se alcanzó nuevamente el equilibrio. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de la fracción eluída, como se describió previamente.

Determinación de K_M y V_{máx}:

Se preincubó Cz a cuatro concentraciones diferentes de **2f** (2, 5, 10 y 20 nM) y sin inhibidor, según el procedimiento estándar, pero con un tiempo de preincubación de 30 min. Luego, se evaluó la reacción enzima-sustrato con el agregado de diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.5, 3, 5, 10, 20, 35 y 50 μ M) de Z-Phe-Arg-AMC. Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado. La evaluación de los datos se realizó utilizando Origin® software (OriginLab), el cual permitió estimar K_M y $V_{máx}$, a diferentes concentraciones de inhibidor y sin inhibidor, según la Ecuación 1. K_1 puede ser determinado según la Ecuación 2, teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir de las concentraciones de **2f** = 0-10 nM, donde $V_{máxapp}$ varía, y K_M no ($K_M = K_{Mapp}$).

Determinación de K_I:

Se midieron las velocidades iniciales de hidrólisis de manera de determinar las constantes de inhibición (K_1) de Cz para **2a**, **2e**, **2f** y **1a**. Se preincubaron diferentes concentraciones de inhibidor (entre 0.02-0.6 μ M) con la enzima ([Cz] = 1 nM) durante 30 min, según el procedimiento estándar. Luego, se inició la reacción enzima-sustrato con el agregado de Z-Phe-Arg-AMC (10 μ M) y se monitoreó como se describió previamente. Las soluciones stock de inhibidor se prepararon a 10 mM en DMSO y se evaluaron a 0.02, 0.03, 0.06, 0.09, 0.2, 0.35 y 0.6 μ M, por duplicado. La evaluación y análisis de los datos se realizó utilizando Origin® software (OriginLab), que permitió estimar K_1 . Las constantes de inhibición se calcularon por ajuste no lineal utilizando la Ecuación 3, para inhibidores no competitivos.

3.5.2c Evaluación biológica in vitro de selenosemicarbazonas en epimastigotes de T. cruzi y células Vero

Infección en células Vero:

Se cultivaron células Vero (línea derivada de riñón de mono verde africano, ATCC CLL-81TM) en recipientes de 75 cm², a una densidad de 1.5 x 10⁶ y fueron mantenidas en medio DMEM GlutamaxTM (GIBCO BRL), suplementadas con 10% de FBS inactivado y 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina, a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego de 24 h de sembradas, los cultivos fueron infectados con tripomastigotes cepa Dm28c de *T. cruzi.* Para la infección, el medio fue sustituido por DMEM GlutamaxTM, suplementado con 2% FBS. Luego de la infección, los cultivos celulares fueron incubados durante 24 h para permitir la internalización del parásito a las células. Luego de transcurrido ese tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS y se dejaron en ese mismo medio. Los tripomastigotes liberados de las células Vero fueron utilizados para la infección de nuevas células crecidas en recipientes de 75 cm², en relación parasito/células huésped 10:1 y mantenidas para realizar cuatro instancias de cultivo en células vero.

Ensayo de inhibición del crecimiento de epimastigotes:

Se cultivaron epimastigotes cepa Dm28c,⁴⁹ en fase logarítmica de crecimiento, en placas de 96 pocillos, a una concentración final de 3 x 10⁶ células/mL, e incubadas con diferentes concentraciones de inhibidor. El medio de cultivo fue LIT (liver infussion tryptose) suplementado con 10% FBS: la cantidad de DMSO en el medio de cultivo no excedió una concentración final de 0.5%. Se incluyeron controles de parásitos sin inhibidor y medio sin parásitos. Los pocillos fueron incubados por 72 h a 28°C. Se adicionó resazurina a una concentración final de 100 μ M y se incubaron a 28°C con los parásitos por 24 h. Se midió la absorbancia a 490 y 595 nm con un lector de microplaca (Bio-Tek ELx800). Los datos se

⁴⁹ Contreras VT, Araujo-Jorge T, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa H, *et al.* (1988) Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metaciclogénesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 123–133

analizaron según lo descripto por Rolón y colaboradores y la viabilidad de los parásitos se determinó en comparación con las condiciones control (100% viabilidad).⁵⁰

Ensayo de citotoxicidad en células de mamífero:

Se cultivaron células Vero (ATCC Cat. no.CCL-81TM) en medio DMEM, suplementado con 10% FBS y solución de penicilina/estreptomicina. Se sembraron un total de 50000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, se dejaron crecer y luego de 24 h se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos. Luego de 72 h de incubación, se determinó CC_{50} (concentración citotóxica que mata el 50% de las células, comparadas con un control no tratado), por el método resazurina.⁵¹

3.5.2d Evaluación in vitro de selenosemicarbazonas en amastigotes de T. cruzi

Ensayo de invasión de T. cruzi en células de mamífero (ensayo de infección):

La cepa de *T. cruzi* Dm28c, se mantuvo cíclicamente en células Vero, como ya se describió. Se realizaron los ensayos de invasión *in vitro* en células huésped según lo ya descripto.⁵¹ Brevemente, se adicionaron 3×10^5 tripomastigotes, en cada una de las 8 placas Nunc® Lab-Tek® chamber Slide[™], conteniendo 3×10^4 células Vero (10:1). Luego de 8 h de adsorción, se sustituyó el medio por otro suplementado con tres concentraciones diferentes de los compuestos (IC₅₀ determinada para epimastigotes, IC₅₀ \times 2 e IC₅₀ \times 4). Luego de 24 h post infección, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS y las células se fijaron con EtOH 95%. Las células se colocaron en portaobjetos montados con reactivo ProLong® Gold con DAPI (Invitrogen) y se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) de amastigotes intracelulares, en las condiciones del tratamiento con el inhibidor, respecto al control, como el número de amastigotes por 100 células infectadas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para realizar la contabilización, se utilizó un microscopio de epifluoresencia Olypmus IX81.

3.5.2e Escalado de m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a y su evaluación biológica en vivo en modelo murino de Chagas agudo

Escalado de m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 2a:

La reacción se realizó siguiendo la metodología puesta a punto por nuestro grupo, que utiliza LiAlHSeH. Las propiedades espectroscópicas del producto son idénticas a las ya descriptas.⁴⁷

⁵⁰ Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A (2006) Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res 99: 103–107

⁵¹ O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 267: 5421–5426

Determinación de actividad anti- T. cruzi in vivo (modelo agudo):⁴⁶

Se infectaron intraperitonealmente 30 ratones machos BALB/c (30 días de vida, 25-30 g peso), con 5000 tripomastigotes cepa CL brener por mL de sangre. Un grupo de 7 animales se utilizó como control (PBS) y otros dos grupos con **2a**, mientras que un grupo de 8 animales se trató con Benznidazol. La primera parasitemia se realizó 5 días post infección, y el tratamiento comenzó 10 días después. Los compuestos se administraron oralmente, en solución de PBS a 10 y 50 mg/kg/día de **2a** y 50 mg/kg/día de Bnz, durante 13 días. El nivel de parasitemia se controló semanalmente en campana de Neubauer, determinando la cantidad de parásitos en 5 μ L de sangre extraída de la cola del ratón y diluída 1/10 en cloruro de amonio. La serología se analizó utilizando ELISA (test de Chagas)⁵² a 30 y 60 días post infección.

⁵² Kaspar P, Velazquez G, Monzon M, Vera M, Pozzoli L *et al.* (1988) Evolution of a new anti-T.*cruzi* antibody ELISA kit. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 125



ස් Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo












3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas



3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas



당 Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo

3. Reemplazo Isostérico: síntesis y evaluación biológica de selenosemicarbazonas





















Capítulo 4:

Síntesis y evaluación biológica de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados

4.1 Antecedentes

El Selenio (Se) conocido principalmente como micronutriente fundamental de varias especies incluido los humanos,¹ al ser administrado en altas dosis resulta tóxico,² mientras que en condiciones subtóxicas tiene descripta actividad anticancerígena.^{2,3} Aunque los mecanismos detrás de los efectos adversos de altas dosis de Se aún no han sido totalmente dilucidados, se sabe que involucran daño al ADN y la inducción de stress oxidativo.⁴

En el capítulo 2 se vio que al condensar tiosemicarbazonas con diferentes aceptores de Michael se obtenían heterociclos del tipo hidrazolil tiazolidinonas, los cuales no conservaban la actividad inhibitoria en Cruzipaína (Cz), pero mostraban actividades tripanocidas moderadas. De esta manera, surgió la idea de preparar análogos selenados de estos heterociclos y observar su actividad anti *T. cruzi* y en Cz. Nuestra hipótesis se basó en que los mismos podrían resultar más estables que las selenosemicarbazonas ya descriptas por nuestro grupo.

4.2 Objetivos específicos

En el presente capítulo se plantea como objetivo la preparación de derivados heterocíclicos de Selenio para el estudio de sus propiedades biológicas en Cruzipaína (Cz) y como agentes anti *T. cruzi*.

¹ Papp LV, Holmgren A, Khanna KK (2010) Selenium and selenoproteins in health and disease. Antioxid Redox Signal 12: 793–795

² Brozmanova' J, Ma'nikova' D, Vlckova' V, Chovanec M (2010) Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. Arch Toxicol 84: 919–938

³ (a) Muecke R, Schomburg L, Buentzel J, Kisters K, Micke O (2010) Selenium or no selenium– that is the question in tumor patients: a new controversy. Integr Cancer Ther 9: 136–141; (b) Selenius M, Rundlof AK, Olm E, Fernandes AP, Bjornstedt M (2010) Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. Antioxid Redox Signal 12: 867–880; (c) Wu M, Kang MM, Schoene NW, Cheng WH (2010) Selenium compounds activate early barriers of tumorigenesis. J Biol Chem 285: 12055–12062 ⁴ (a) Wycherly BJ, Moak MA, Christensen MJ (2004) High dietary intake of sodium selenite induces oxidative

DNA damage in rat liver. Nutr Cancer 48: 78–83; (b) Letavayova L, Vlasakova D, Spallholz JE, Brozmanova J, Chovanec M (2008) Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in saccharomyces cerevisiae. Mutat Res 638: 1-10

4.3 Resultados y Discusión

Con el objetivo de ganar estabilidad en el grupo funcional selenocarbonilo C=Se, se planteó la preparación de heterociclos que condensan selenosemicarbazonas 1 o selenoureas 2 con aceptores de Michael (AM), resultando en hidrazolil selenazolidinonas 3 ó selenazolinonas 4-6, respectivamente (Figura 4.1).



Figura 4.1 Derivados de selenosemicarbazona 1 o de selenoureas 2: hidrazolil selenazolidinonas 3 y selenazolinonas 4-6

4.3.1 Síntesis de heterociclos organoselenados

4.3.1a Síntesis de hidrazolil selenazolidinonas

Las oxazolidinonas⁵ y tiazolidinonas⁶ han sido descriptas con diversas propiedades biologicas, básicamente como antifúngicos y antibacterianos, entre otras.

Hacia 1964, Comrie *et al.* describieron por primera vez la evaluación biológica de las selenazolidinonas, los análogos selenados de oxa y tiazolidinonas.⁷ Las mismas mostraron poca actividad antibacteriana y leve actividad antihistamínica.

⁵ Pandit N, Singla RK, Shrivastava B (2012) Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance. Int J Med Chem 2012: Article ID 159285

 $^{^6}$ Elkanzi NAA (2013) Short Review on Synthesis of Thiazolidinone and β-Lactam. World J Org Chem 1: 24-51

Posteriormente, Nishina *et al.* evidenciaron la actividad antioxidante de 1,3selenazolidinonas como "scavenger" molecular,⁸ interveniendo en la reducción del stress oxidativo celular, uno de los mecanismos más comunes de toxicidad celular.

En lo que se refiere a la metodología de obtención de selenazolidinonas, se han planteado varias alternativas. Las más actuales utilizan selenoureas⁹ e isoselenocianatos¹⁰ como material de partida (Figura 4.2).



Figura 4.2 Algunas rutas sintéticas para la obtención de selenazolidinonas

En el capítulo 2 del presente trabajo se han discutido los resultados en torno a la preparación y evaluación biológica de hidrazolil tiazolidinonas. Estos compuestos fueron descriptos como agentes inhibidores de Cz, con leve actividad tripanocida.¹¹

Dado que la metodología de reemplazo isostérico S-Se resultó exitosa en el caso de las selenosemicarbazonas,¹² se pensó en utilizar esta herramienta para preparar los análogos selenados de las tiazolidinonas, en búsqueda de compuestos menos tóxicos e igualmente activos contra Cz y anti *T. cruzi*.

⁷ Comrie AM, Dingwall D, Stenlake JB (1964) Some 2-Iminoselenazolidin-4-ones and related compounds. J Pharm Pharmacol 16: 268-272

⁸ Nishina A, Kimurab H, Kozawab K, Sommenc G, Nakamurad T, *et al.* (2011) A superoxide anion-scavenger, 1,3selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. Toxicol Appl Pharmacol 257: 388–395

⁹ Koketsu M, Nada F, Ishihara H (2002) Facile Preparation of 2-Imino-1,3-selenazolidin-4-one Derivatives by Reaction of N,N'-Disubstituted Selenoureas with α-Haloacyl Halides. Synthesis 2: 195–198

¹⁰ Xie Y, Liu J, Li J (2011) Selective synthesis of novel 2-imino-1,3-selenazolidin-4-ones and 2-amino-1,3,4selenadiazin-5-ones from isoselenocyanates. Tetr Lett 52: 932–935

¹¹ Pizzo C, Saiz C, Talevi A, Gavernet L, Palestro P, Bellera C, Blanch LB, Benítez D, Cazzulo JJ, Chidichimo A, Wipf P, Mahler SG (2011) Synthesis of 2-Hydrazolyl-4 Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against Trypanosoma Cruzi Chem Biol Drug Des 77: 166-172

¹² Pizzo C, Faral-Tello P, Salinas G, Fló M, Robello C, Wipf P, Mahler SG (2012) Selenosemicarbazones as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against Trypanosoma cruzi. Med Chem Commun 3: 362–368

Por analogía a lo ya descripto por nuestro grupo, en lo que se refiere a la preparación de hidrazolil tiazolidinonas a partir de tiosemicarbazonas y un aceptor de Michael, se propuso estudiar la adición de selenosemicarbazonas a diferentes aceptores, con el fin de evaluar el alcance de la misma. Del grupo de selenosemicarbazonas ya sintetizadas, se seleccionó la *m*-bromofenilmetil selenosemicarbazona **1a** por su buena actividad inhibitoria frente a Cz y relativamente baja toxicidad.¹² Se estudió la reactividad de la selenosemicarbazona **1a** en la reacción de adición con acetilendicarboxilato de etilo **7b** (Figura 4.3), para dar la selenazolidinona **3a**.



Figura 4.3 Adición de *m*-bromofenilmetil selenosemicarbazona 1a a acetilendicarboxilato de etilo 7b, para dar la hidrazolil selenazolidinona 3a

Uno de los inconvenientes presentados en las condiciones descriptas para las hidrazolil tiazolidinonas, fue la poca solubilidad de la selenosemicarbazona en EtOH, siendo necesario variar el disolvente a una mezcla PhMe/DMF. La reacción de adición al acetilendicarboxilato de etilo **7b** ocurrió a temperatura ambiente, obteniendose un único producto, el más favorecido en dichas condiciones.

Esta reacción ocurriría mediante un mecanismo similar al ya propuesto en el capítulo 2. De forma análoga a lo que sucede con las hidrazolil tiazolidinonas, la elucidación estructural de los derivados selenados mediante el uso de ¹H y ¹³C RMN no fue trivial; podría tratarse de la selenazolidinona **3a** (heterociclo de 5 miembros) ó de la 1,3-selenazina-4-ona **8** (heterociclo de 6 miembros). Ambos posibles productos presentarían señales muy similares en los espectros y para poder distinguir entre ambos isómeros, se realizó un experimento HMBC desacoplado, en el que se midieron las constantes de acoplamiento a 3 enlaces de distancia.



Figura 4.4 Selenazolidinona 3a y 1,3-selenazina-4-ona 8 factibles a formarse en la reacción de adición de la selenosemicarbazona 1a al aceptor de Michael 7b

En literatura no se describen las constantes de acoplamiento ³J entre H₆ y C₄ para las selenazolidinonas **3**. En nuestro caso, los resultados del HMBC pudieron determinar un valor de ³J = 6 Hz para nuestro producto. Por analogía a las tiazolidinonas, se supone se obtuvo el heterociclo de 5 miembros y esto podría confirmarse realizando cristalografía de rayos X del producto.

Siguiendo parámetros similares de sustitución con los que se obtuvieron las mejores actividades biológicas, se seleccionó la *m*,*p*-diclorofenilmetil selenosemicarbazona **1b**. La misma reaccionó frente a otro aceptor de Michael, la metilmaleimida **9**. En este caso, se obtuvo la selenazolidinona **3b** a partir de la selenosemicarbazona **1b**, con un 22% de rendimiento (Figura 4.5).



Figura 4.5 Adición de *m,p*-diclorofenilmetil selenosemicarbazona **1b** a metilmaleimida **9**, para dar la hidrazolil selenazolidinona **3b**

Pese a que la conversión a los productos resultó total, el rendimiento de la reacción de obtención de **3b** fue menor que para **3a**, donde se utilizó una selenosemicarbazona análoga, pero se varió el aceptor de Michael. La metilmaleimida **9** al ser un sustrato menos reactivo para la reacción de adición, podría influir en el rendimiento de la reacción. La posible menor reactividad de la selenosemicarbazona **1b** también podría influir.

Por otro lado, se exploró el alcance de la adición utilizando una ceto propargil amida como aceptor de Michael, particularmente a partir de la selenosemicarbazona **1a** y la cetona **10** (Figura 4.6), pero no se logró formar el compuesto **11**. La menor reactividad de la ceto propargil amida **10** podría deberse a la presencia de un sólo aceptor de electrones en su estructura, en lugar de dos como es el caso del acetilendicarboxilato.



Figura 4.6 Alcance de la reacción de adición de la selenosemicarbazona 1a a la ceto propargil amida 10

Se observa una clara influencia de los aceptores de Michael utilizados en las reacciones de adición, siendo el acetilendicarboxilato de etilo el más reactivo, luego la metilmaleimida y finalmente la ceto propargil amida.

Sería interesante trabajar en la optimización de los condiciones de reacción, en aquellos casos que se aislaron productos de adición (**3a** y **3b**), con el objetivo de incrementar los rendimientos. También, ampliar el alcance de la metodología trabajando con otras selenosemicarbazonas, al igual que con otros aceptores de Michael.

4.3.1b Síntesis de selenazolinonas

Las selenoureas y selenoamidas han sido utilizadas para la preparación de 1,3-selenazinas y 1,3-selenazoles.¹³

Los acetilendicarboxilatos son sistemas muy reactivos, que participan en diversas reacciones químicas. Ramazani *et al.* describieron la reacción *one pot* de estos compuestos

¹³ Koketsu M, Ishihara H (2003) Synthesis of 1,3-selenazine and 1,3-selenazole and their biological activities. Curr Org Chem 7: 175-185

con selenourea, utilizando microondas, para la obtención de 2-amino-selenazolinonas.¹⁴ Un año más tarde, Koketsu *et al.* ampliaron la metodología para selenoureas sustituidas y trabajaron en la derivatización de su estructura hacia selenazolinonas 2-amino sustituidas (Figura 4.7).¹⁵



Figura 4.7 Metodologías de obtención de selenazolinonas a partir de selenoureas

Focalizando nuestro objetivo en preparar una serie de derivados de este tipo, se optó por utilizar la metodología de Ramazani como referencia. La selenourea **2**, a diferencia de la selenosemicarbazida, es un reactivo comercialmente disponible. Con éste y acetilendicarboxilato de metilo **7a** y etilo **7b** se trabajó en la puesta a punto de la metodología sintética (Tabla 4.1).



Entrada	R	Condiciones	R (%)
1	Me	PhMe/DMF, µw 90°C, 10 min	4a , 25
2	Et	DMF, 30 min, tamb	4b, 43

Tabla 4.1 Selenazolinonas 4a-b preparadas utilizando acetilendicarboxilato de metilo 7a o etilo 7b

¹⁴ Ramazani A, Ahmadi E, Gangeie B, Kazemizadeh AR, Morsali (2005) A Microwave Induced One-pot Stereoselective Synthesis of Alkyl Z-2-[2-amino-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-yliden)acetates in Solvent-less Conditions. Asian J Chem 17: 2371-2374

¹⁵ Koketsu M, Kanoh K, Ishihara H (2006) Synthesis of 2-Amino-4,5-dihydro-1,3-selenazol-4-ones by Reaction of N,N-Disubstituted Selenoureas with Acetylenedicarboxylate. Heterocycles 68: 2627-2633

El grupo de Ramazani describe la obtención de estos compuestos en condiciones sin disolvente. En nuestro caso, debido a la poca solubilidad de los reactivos, fue necesario el agregado de una mínima cantidad de PhMe y DMF catalítica. El rendimiento para la selenazolinona **4a** resultó bajo (25%) (Entrada 1, Tabla 4.1), en comparación a lo reportado en literatura (58%). Cuando se agregó únicamente DMF (0.5 mL), cantidad suficiente para disolver los reactivos, y se trabajó a temperatura ambiente, se obtuvo el compuesto **4b** con 43% de rendimiento (Entrada 2, Tabla 4.1).

Con la idea de estudiar el alcance de esta metodología, se pensó en utilizar otro aceptor de Michael, la metilmaleimida **9** (Tabla 4.2).



Entrada	Condiciones	R(%)
1	DMF, 1 h tamb	-
2	PhMe, DMF, µw 90°C, 25 min	mc
3	EtOH, p-TsOH, μw 90°C, 5 min	mc
4	DMF, <i>p</i> -TsOH, 1 h tamb	mc
	mc: mezcla compleja	

Tabla 4.2 Condiciones ensayadas para la obtención de la selenazolinona 5 utilizando metilmaleimida 9

En la Entrada 1, Tabla 4.2, se trabajó en las mismas condiciones optimizadas para la obtención del producto **4b** (Entrada 2, Tabla 4.1). Durante el transcurso de la reacción, se percibió la formación de un producto, el cual no fue posible aislar durante la etapa de purificación, recuperando material de partida y un producto de descomposición, con presumible Se(o).

Para mejorar el resultado, se cambió el disolvente a PhMe/DMF catalítica (Entrada 2, Tabla 4.2). En este caso, la utilización de radiación por μ w permitió que la reacción ocurriera rápidamente, visualizándose por TLC la formación de un posible producto. Finalmente, se determinó por ¹H RMN la presencia de una mezcla compleja de 3 productos, los cuales no fueron posibles ni aislar ni caracterizar.

Frente a estos inconvenientes, se pensó en evaluar la influencia del disolvente en la reacción. Previamente hemos puesto a punto una metodología para la obtención de tiazolidinonas derivadas de metilmaleimida, utilizando EtOH. Con este y el agregado de *p*-TsOH (Entrada 3, Tabla 4.2), se favorecería la formación de la amida en el producto final, la cual necesita captar un protón del medio. Luego de transcurrir 5 minutos, se divisó la formación de un precipitado negro, presumible Se(o), en el fondo de la solución de reacción. Al purificar el crudo, se aisló una mancha que finalmente correspondió a 3 productos, los mismos aislados en las condiciones anteriores y que no fue posible su identificación (Entrada 3, Tabla 4.2). Al utilizar DMF/*p*-TsOH y trabajando a temperatura ambiente, se obtuvieron los mismos resultados (Entrada 4, Tabla 4.2).

De esta manera, la reacción de adición de Michael de la selenourea **2** con acetilendicarboxilato **7a-b** dio lugar a la formación de selenazolinonas **4a-b**, conteniendo ésteres α , β insaturados. Sin embargo, la reacción de **2** con metilmaleimida **9** no tuvo lugar en las condiciones ensayadas.

Derivatización de selenazolinonas

Con el fin de obtener variaciones estructurales de las selenazolinonas, se trabajó en torno a la funcionalización de la selenazolinona **4b**, básicamente por acilación del grupo 2-amino libre.

Las reacciones de formación de amidas han sido muy estudiadas en el tiempo y se han descripto diferentes metodologías sintéticas. En nuestro caso, se ensayaron varias condiciones de reacción a partir de la selenazolinona **4b**, hacia la obtención de sus correspondientes derivados: **I)** a partir del cloruro de ácido correspondiente y **II)** realizando reacciones de acoplamiento del grupo 2-amino libre de **4b**, con diferentes ácidos, utilizando agentes acoplantes. Este tipo de metodologías han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo, el cual cuenta con vasta experiencia en síntesis de péptidos.¹⁶ En la tabla 4.3 se describen las condiciones ensayadas hacia la acilación de la selenazolinona **4b**.

¹⁶ Sellanes D (2004) Síntesis de heterociclos como potenciales agentes antihelmínticos y citotóxicos basados en productos naturales de origen marino. Tesis de Maestría, Universidad de la República



Entrada	Condiciones	R	R ^a (%)
1	I) RCOOH, DMF, tamb	m-ClPh	6a, 44
	II) HOBt, DCC, o°C		
2	I) RCOOH, DMF, tamb	<i>p</i> -isopropilPh	6b, 30
	II) HOBt, DCC, o°C		
3	I) RCOOH, DMF, tamb	4-quinolina	6c, 61
	II) HOBt, DCC, o°C		
4	RCOOH, HBTU, DMF, 0°C	<i>p</i> -isopropilPh	6b, 20
5	I) RCOOH, DMF, tamb	p-NH ₂ Ph	-
	II) HOBt, DCC, o°C		
6	RCOCI, Et ₃ N, DMF, 0°C	<i>p</i> -NO₂Ph	mp

^a Rendimiento de producto aislado; mp: material de partida

Tabla 4.3 Síntesis de selenazolinonas 2-amino sustituidas 6, a partir de la selenazolinona 4b

En primera instancia (Entradas 1-3, Tabla 4.3), se trabajó en condiciones de acoplamiento HOBT/DCC descriptas en literatura, a partir del derivado RCOOH de interés.¹⁶ En estos casos, la reactividad de los ácidos se vio reflejada en el rendimiento de la reacción; con un sutituyente dador de electrones como el isopropilo (Entrada 2, Tabla 4.3), lo que disminuye la electrofilia del C carbonílico, se obtuvo el producto **6b** con bajo rendimiento (30%). En cambio, los atrayentes de electrones (Cl y quinolina (Entradas 1 y 3, Tabla 4.3, respectivamente) mejoraron estos resultados, y se aislaron **6a** (44%) y **6c** (61%), con buenos rendimientos.

Procurando mejorar la metodología de obtención de **6b**, se variaron las condiciones de acoplamiento y se utilizó el agente acoplante HBTU (Entrada 4, Tabla 4.3). En dichas condiciones, la reacción avanzó lentamente hacia el derivado acilado, aislandose el producto **6b** en un 20% redimiento, luego de 24 h de reacción, recuperandose además material de partida (ácido y selenazolinona **4b**).

En las condiciones de las Entradas 1-3, Tabla 4.3 (HOBt/DCC), a partir del derivado ácido con un grupo NH_2 en posición *para*, no se observó la formacion del producto deseado (Entrada 5, Tabla 4.3).

Mediante el uso de la clásica síntesis de amidas, a partir del cloruro de acido $p-NO_2$ sustituido y la amina de interés (grupo amino 2-amino libre de **4b**), no se logró obtener el derivado selenazolinona correspondiente, recuperándose el material de partida (Entrada 6, Tabla 4.3).

Las reacciones de acomplamiento llevadas a cabo permitieron preparar una serie de derivados 2-amino selenazolinona, con rendimientos moderados. Los problemas de estabilidad de la selenourea frente a la luz y el oxígeno, y el precio de este reactivo, dificultaron la preparación de nuevos derivados.

4.3.1c Alcance de la reacción de hidrazolil tiazolidinonas con Reactivo de Woollins (RW)

El Reactivo de Woollins es un agente selenante, que se ha descripto como reactivo de intercambio O-Se, por ejemplo para sistemas del tipo amida.¹⁷ Particularmente, en el capítulo 3 se ha discutido ampliamente la versatilidad del mismo.

Como reactivo de intercambio O-Se, se lo utiliza con éxito para la síntesis de selenoamidas y de ácidos selenocarboxílicos; en este último caso, intercambiando el grupo C=OOH por C=OSeH (Figura 4.8).¹⁸ Aún no se ha visto la utilidad del RW para la formación de selenoésteres; su preparación ha sido descripta por Wright *et al.*, a partir del éster correspondiente por reacción con LDA/Me₃SiCl y H₂Se.¹⁹

Este versátil reactivo también puede dar otro tipo de reacciones; particularmente, aldehídos y cetonas aromáticas en PhMe/reflujo utilizando RW, sufren dimerización reductiva obteniéndose las (E) olefinas (Figura 4.8).²⁰

 ¹⁷ Bhattacharyya P, Woollins JD (2001) Selenocarbonyl synthesis using Woollins reagent. Tetr Lett 42: 5949–5951
¹⁸ Knapp S, Darout E (2005) New Reactions of Selenocarboxylates. Org Lett 7: 203-206

¹⁹ Wright SW (1994) A convenient preparation of O-alkyl selenoesters from esters. Tetr lett 35: 1331-1334

²⁰ Hua G, Li Y, Slawin AMZ, Woollins JD (2007) Stereoselective synthesis of olefins by a reductive coupling reaction. Dalton Trans 15: 1477-1480



Figura 4.8 Alcance del Reactivo de Woollins para ácidos carboxílicos y dimerización reductiva de aldehídos y cetonas

Se pensó en la preparación de selenocarbonil derivados utilizando RW, a partir de las hidrazolil tiazolidinonas **12** preparadas en el capítulo 2. Esto nos permitiría estudiar el alcance de la metodología para obtener selenocarbonil tiazolidinas **13** (Figura 4.9).



Figura 4.9 Reemplazo isostérico O-Se mediante el uso de RW (R₁ = arilo; R₂ = H, alquilo; R₃ = H, Me; X = OMe, NHMe)

Cabe destacar que las tiazolidinonas **12** tienen 2 carbonilos factibles o no de ser intercambiados por Se: la amida ó el éster exocíclico y la lactama de la tiazolidinona (Figura 4.9). Como ya se mencionó, se han establecido condiciones de intercambio O-Se para la formación de selenoamidas a partir de su correspondiente amida, utilizando RW.¹⁷ La reacción análoga parece no funcionar para ésteres, por lo que en las tiazolidinonas el grupo éster exocíclico no resultaría reactivo y se podría lograr el intercambio selectivo a nivel del heterociclo.

En primera instancia, se evaluaron las condiciones para el intercambio O-Se utilizando la hidrazolil tiazolidinona **12a** derivado éster, preparada según lo detallado en el capítulo 2. Utilizando RW (1 equiv.), en PhMe a temperatura ambiente, se aisló un producto definido (Figura 4.10).



Figura 4.10 Alcance de la reacción de la tiazolidinona 12a con el RW.

En el espectro de ¹H RMN del producto se observó la ausencia de la señal correspondiente al protón de la olefina (H6) y aparecieron tres señales nuevas: la del metino en posición 5 y la de un metileno diasterotópico en posición 6 (Tabla 4.4). Basados en experimentos de HSQC y HMBC, se consideró que correspondería al producto 5,6 reducido **14a** (Figura 4.10).

El análisis elemental del mismo nos permitió confirmar que no se incorporó Se a la molécula orgánica y coincide con la estructura propuesta del producto reducido. De esta manera, no se obtuvo la selenocarbonil tiazolidina **13a** y se confirmó la formación del producto reducido **14a**, en un 55% de rendimiento.



'Η	12a (ppm)	14a (ppm)	¹³ C	12a (ppm)	14a (ppm)
4	-	-	4	164.7	173.8
5	-	4.29 (dd, J = 3.7, 9.8 Hz, 1H)	5	142.4	43.0
6	6.91 (s, 1H)	2.87 (dd, J = 9.8, 17.5 Hz, 1H)	6	115.8	37.9
		3.26 (dd, J = 3.7, 17.5 Hz, 1H)			
7	-	-	7	166.7	170.8
8	3.86 (s, 3H)	3.74 (s, 3H)	8	52.6	52.5
6 7 8	6.91 (s, 1H) - 3.86 (s, 3H)	2.87 (dd, J = 9.8, 17.5 Hz, 1H) 3.26 (dd, J = 3.7, 17.5 Hz, 1H) - 3.74 (s, 3H)	6 7 8	115.8 166.7 52.6	37.9 170.8 52.5

Tabla 4.4 Desplazamientos de protones y carbonos relevantes en ¹H y ¹³C RMN, correspondientes a la
tiazolidinona 12a y su producto reducido 14a

Realizando una revisión bibliográfica, se encontró el uso de NaSeH y LiSeH para la reducción de sistemas carbonílicos α , β insaturados. Los autores Nishiyama *et al.* plantearon que éstos actúan como reductores selectivos de la olefinas, con buenos rendimientos (Figura 4.11).²¹ Mesquita *et al.* describieron el uso de PhSeSePh como agente reductor selectivo de dichos sistemas, utilizando glicerol/H₃PO₂ como disolvente, enfatizando las características "green" de la metodología (Figura 4.11).²²



Figura 4.11 Agentes reductores selenados selectivos 1,4 para sistemas carbonílicos α,β insaturados

Por otra parte, recientemente Mandal *et al.* describieron el uso del RW como agente reductor selectivo de 1,4-enodionas y 1,4-inodionas, obteniendo 1,4-dionas saturadas.²³ En estas condiciones, un sistema monocarbonílico como el cinamato de etilo no logró ser reducido (Figura 4.12).



Figura 4.12 RW como agente reductor selectivo en sistemas dicarbonílicos α,β insaturados

²¹ Nishiyama Y, Yoshida M, Ohkawa S, Hamanaka S (1991) New Agents for the Selective Reduction of the Carbon-Carbon Double Bond of α -β-Unsaturated Carbonyl Compounds. J Org Chem 56: 6720-6722

²² Mesquita KD, Waskow B, Schumacher RF, Perin G, Jacob RG *et al.* (2014) Glycerol/Hypophosphorous Acid and PhSeSePh: An Efficient and Selective System for Reactions in the Carbon-Carbon Double Bond of (E)-Chalcones. J Braz Chem Soc 25: 1261-1269

²³ Mandal M, Chatterjee S, Jaisankar P (2012) Woollins Reagent: A Chemoselective Reducing Agent for 1,4-Enediones and 1,4-Ynediones to Saturated 1,4-Diones. Synlett 18: 2615-2618

Resulta interesante el resultado encontrado, ya que nuestra metodología permite reducir selectivamente la olefina de tiazolidinonas α , β insaturados, en condiciones aún no descriptas.

Con el objetivo de ampliar el espectro de resultados, se utilizaron hidrazolil tiazolidinonas α , β insaturadas, preparadas en las condiciones ya descriptas, a partir de aldehídos aromáticos, tiosemicarbazida o metil tiosemicarbazida y acetilendicarboxilato de metilo (Entradas 1-4, Tabla 4.5).



Entrada	R ₁	R ₂	R ₃	Condiciones	R (%)
1	p-ClPh	Н	Me	RW (1 equiv.)/ PhMe, tamb	14b, 68
2	p-CF ₃ Ph	Н	Me	RW (1 equiv.)/ PhMe, tamb	14c, 79
3	p-OMePh	Н	Me	RW (2 equiv.)/ PhMe, tamb	14d, 74
4	p-OMePh	Н	Н	RW (1 equiv.)/ PhMe, tamb	14e, 58

Tabla 4.5 Reducción selectiva de la olefina en hidrazolil tiazolidinonas α,β insaturadas 12b-e utilizando RW, paraobtener los productos reducidos 14b-e

El sustituyente del anillo aromático mostró poca influencia en la variabilidad de los rendimientos. En cambio, los derivados de aldehído **14b-e** (Entrada 1-4, Tabla 4.5) se obtuvieron con un rendimiento levemente mayor al derivado cetona **14a** (Figura 4.10).

También se evaluó el efecto del sustituyente sobre el nitrógeno de la lactama. Al utilizar la tiazolidinona derivada de tiosemicarbazida **12e**, se asiló el producto **14e** con un rendimiento menor (58%) al obtenido para su análogo **14d** (74%), obtenido a partir de metil tiosemicarbazida (Entrada 3, Tabla 4.5).

De esta manera, se pudo evaluar el alcance de la reacción de reducción de olefinas de tiazolidinonas conjugadas a ésteres, utilizando el RW. Sería interesante trabajar en el

análisis de otros derivados de tiazolidinonas con diferentes patrones de sustitución, para ampliar el alcance de la metodología.

La propuesta mecanística presentada por Mandal *et al.*²³ fue basada en tratar el reactivo dicarbonílico α,β insaturado con RW, en CD₃OD. Los resultados del ¹H RMN y espectrometría de masas del producto confirmaron la formación del compuesto reducido. Teniendo en cuenta dicha planteo, nuestra propuesta se detalla en la Figura 4.13.



Figura 4.13 Mecanismo propuesto para la reducción de olefinas en sistemas carbonílicos α, β insaturados de tiazolidinonas del tipo 12

Se ha descripto que el RW se encuentra en equilibrio con una especie del tipo diselenafosforano, siendo ésta la especie reactiva en solución.²⁴ De esta manera, el Se se adicionaría a la olefina de manera conjugada dando lugar a la formación del intermedio I. Luego, mediante una reacción de óxido-reducción, eliminaría Se(o), evolucionando hacia la formación del producto reducido **14**.

Tomando como modelo el derivado **14d**, se evaluó la posibilidad del intercambio O-Se, a nivel de la tiazolidinona (Figura 4.14).

²⁴ Hua G, Y Li, Slawin AMZ, Woollins JD (2007) Synthesis of Novel Vinylic P–Se Heterocycles from Selenation of Alkynes by [PhP (Se)(μ-Se)]2. Eur J Inorg Chem 891-897



Figura 4.14 Evaluación del intercambio O-Se a nivel de la lactama de la tiazolidinona 14d

Utilizando RW (2 equiv.) en PhMe y calor, no fue posible obtener el derivado selenado **13d**, recuperándose el material de partida. De esta manera, con las condiciones ensayadas con el RW, no se pudieron preparar las selenocarbonil tiazolidinas deseadas.

Continuando el análisis para otro tipo de derivados, se tomó como referencia la tiazolidinona preparada a partir de *p*-clorobenzaldehído, metil tiosemicarbazida y metilmaleimida: el derivado de amida **12f** (Tabla 4.6), obtenido en el capítulo 2 como el derivado **3i**.



mp: material de partida; pd: producto de descomposición

Tabla 4.6 Alcance del intercambio O-Se en la hidrazolil tiazolidinona 12f para la obtención de la selenocarboniltiazolidina 13f

En las mismas condiciones en las que se trabajó previamente para derivados del tipo éster, no se logró el intercambio O-Se a nivel de la lactama ni de la amida exocíclica (Entrada 1, Tabla 4.6), recuperando el material de partida **12f**.

Variando el número de equivalentes de RW al doble y aumentando el tiempo de reacción a temperatura ambiente, no se logró incrementar el porcentaje de conversión a los

productos. Al calentar a reflujo por algunas horas (Entrada 2, Tabla 4.6), se obtuvo un producto de descomposición y se recuperó material de partida **12f**.

Visto que el reactivo tiazolidinona **12f** se descompone luego de las horas de reacción, se optó por mantener el número de equivalentes de RW y calentar durante menos tiempo (Entrada 3, Tabla 4.6). En este caso, luego de aislar un posible producto, fue necesario recurrir a herramientas de RMN para dilucidar su estructura.

Básicamente, las señales del ¹H RMN variaron levemente su desplazamiento, en comparación con el reactivo. Las diferencias más significativas se observaron en el ¹³C RMN, y se utilizaron herramientas de HMBC y HSQC para asignar los carbonos C7 y C4 en el espectro. El desplazamiento del C=O (C7) de amida exocíclica varió de **174.2** ppm (**12f**) a **206.0** ppm (**15f**) y el correspondiente C=O (C4) de la lactama de **169.1** ppm (**12f**) a **174.1** ppm (**15f**) (Figura 4.15).



Figura 4.15 ¹³C RMN de 12f y 15f

Esto podría ser indicativo de que el intercambio ocurrió a nivel de la amida exocíclica, formándose la selenoamida correspondiente **15f**. Este resultado fue confirmado con el análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).

De esta manera, con la metodología planteada utilizando el RW como fuente de selenio, no fue posible obtener la selenocarbonil tiazolidina **13f** a partir de su tiazolidina correspondiente **12f**. El intercambio O-Se a nivel de la lactama no ocurrió, sino a nivel del enlace amida exocíclico.

4.3.2 Evaluación biológica in vitro de organoselenados

4.3.2a Evaluación en Cruzipaína (Cz)

Algunos de los compuestos preparados en este contexto fueron seleccionados para evaluar su capacidad de inhibir la enzima Cruzipaína (Cz). Se llevó a cabo el ensayo de inhibición enzimática utilizando la metodología espectrofluorimétrica puesta a punto previamente para la evaluación de selenosemicarbazonas.¹² En primera instancia, se realizó un screening de los compuestos trabajando a una concentración de inhibidor elevada, del orden micromolar (50 μ M), a la cual las selenosemicarbazonas ya preparadas resultaron altamente inhibidoras (PIE: porcentaje de inhibición enzimática = 100%). Los resultados para las selenazolinona **4b**, sus derivados acilados **6a-c**, la selenazolidinona **3b** y la hidrazolil tiazolidinona **15f** se muestran en la Figura 4.16.



Figura 4.16 Porcentaje de Inhibición Enzimática (PIE) para los derivados organoselenados seleccionados; [inhibidor] = 50 μM.

169

Excepcionalmente, la hidrazolil selanazolidinona **3b** presentó un porcentaje de inhibición enzimática moderado (PIE = 49%), a 50 μ M. A la misma concentración, se evaluó la selenosemicarbazona **1b**, material de partida de obtencion de **3b**, la cual mostró el mejor resultado con un PIE = 100%, en concordancia con lo ya observado para este tipo de derivados. Inclusive, a una concentración 100 veces menor mostró el mismo comportamiento. De esta manera, se observó una disminución en la actividad inhibitoria enzimática en derivados ciclíclos selenazolidinona (**1b** *vs* **3b**). Se podría considerar la influencia de la estructura selenosemicarbazona en la actividad inhibitoria enzimática, la cual disminuyó considerablemente en el caso del producto de adición **3b**.

Por otro lado, los compuestos **4b**, **6a-c** y **15f** resultaron inactivos, lo que al trabajar a concentraciones altas de inhibidor resulta poco alentador. Es de esperar que heterociclos organoselenados de este tipo, estructuralmente diferentes a las selenosemicarbazonas, disminuyan su actividad.

4.3.2b Evaluación en epimastigotes de T. cruzi

Pese a que los resultados encontrados en torno a la inhibición enzimática no resultaron muy promisorios, se seleccionaron ciertos organoselenados para ser evaluados *in vitro*, en epimastigotes de *T. cruzi* cepa Dm28c. La evaluación biológica fue realizada en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Carlos Robello del Institute Pasteur de Montevideo. Se evaluaron los derivados acilados **6a-c** y se tomó la selenosemicarbazona **1b** como referencia (Tabla 4.7).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)		
1b	50.2 ± 0.1		
6a	3.7 ± 0.1		
6b	25.3 ± 0.1		
6c	50.9 ± 0.4		
Bnz	12.1 ± 0.1		

^aIC₅₀: Concentración de un compuesto que inhibe el 50% del crecimiento de epimastigotes comparado con un control; Bnz: Benznidazol, fármaco de referencia. Todos los valores están dados como promedios de un triplicado.

Tabla 4.7 IC₅₀ de ciertos organoselenados preparados, en epimastigotes de T. Cruzi (cepa Dm28c).
Las selenazolidinonas **6a-b** mostraron valores de IC₅₀ inferiores a la selenosemicarbazona **1b**. Inclusive, el derivado **6a** (IC₅₀ = 3.7 μ M) resultó más activo en *T. cruzi* que el fármaco de referencia, Benznidazol (IC₅₀ = 12.1 μ M). Estos datos son muy promisorios pues, hasta el momento, el derivado organoselenado más activo en *T. cruzi* fue descripto en el capítulo 3, la *m*-bromofenilmetil selenosemicarbazona. En este momento, se está evaluando la toxicidad del derivado **6a** en células Vero, y en caso de tener un buen perfil *in vitro*, se prepararan nuevos derivados acilados.

Cabe destacar que no fue posible evaluar la selenazolidinona **3b** debido a que en el momento del análisis *in vitro* estaba descompuesta. Se piensa poner a punto una nueva metodología sintética con la cual preparar nuevos derivados de este tipo, e incluir el compuesto **3b**.

4.4 Conclusiones

- A partir de dos selenosemicarbazonas conocidas **1a** y **1b** y utilizando como aceptor de Michael el acetilendicarboxilato de metilo **7a** y etilo **7b**, se obtuvieron 2 productos de adición: las hidrazolil selenazolidinonas **3a** y **3b**, respectivamente.

- Utilizando la selenourea **2** y acetilendicarboxilato de metilo y etilo en condiciones de microondas y temperatura ambiente, se aislaron dos productos de adición, las selenazolinonas **4a** y **4b**, respectivamente, con rendimientos moderados (25% y 43%, respectivamente). Se debería trabajar en la optimización de las condiciones de reacción para mejorar estos resultados. Al variar el aceptor de Michael por metilmaleimida **9**, se obtuvo una mezcla compleja de 3 productos, difícil de purificar.

- A partir de la selenazolinona **4b** y realizando reacciones de acoplamiento sobre el grupo NH₂ libre, se obtuvieron una serie de derivados acilados **6a-c**, con rendimientos moderados a buenos.

- Con la utilización del RW como reactivo dador de Se, no fue posible lograr el intercambio O-Se a nivel de la tiazolidinona **12** para obtener la selenocarbonil tiazolidina **13** correspondiente. Por el contrario, se logró reducir el enlace α,β instaurado exocíclico a la tiazolidinona, obteniéndose una serie de análogos reducidos **14a-e**. De esta manera, se incursionó en una nueva aplicabilidad de este reactivo; sus características como agente reductor selectivo de olefinas de tiazolidinonas conjugadas ésteres, aún no ha sido descripta en literatura.

- A partir de derivado amida **12f** en condiciones de intercambio O-Se utilizando RW, no logró obtenerse la selenocarbonil tiazolidina **13f**. Por el contrario, se logró el intercambio a nivel de la amida exocíclica, aislando el producto **15f**.

- Frente a Cz, el derivado **15f** a 50 μM resultó inactivo, lo que indicaría en primera instancia que esta modificación isostérica no incrementa la actividad inhibitoria enzimática, en comparación con sus isósteros oxigenados. Podría ser interesante preparar nuevos derivados amida del tipo **15** y confirmar esta hipótesis.

- Los derivados selenazolidinona **6a-c** mostraron buen perfil tripanocida *in vitro* en *T*. cruzi, siendo el derivado **6a** el compuesto más promisorio ($IC_{50} = 3.7 \mu M$). Su actividad antichagásica no estaría relacionada por inhibición de Cz, ya que el ensayo en la enzima resultó negativo.

172

4.5 Parte Experimental

4.5.1 Síntesis de heterociclos organoselenados

4.5.1a Síntesis de hidrazolil selenazolidinonas



(5Z)-2-(m-bromobenciliden hidrazono)-3-metil-5-metoxicarbonilmetilen-selenazolidin-4-ona (3a). Se adicionó acetilendicarboxilato de etilo 7b (29 mg, 0.17 mmol) y ácido p-TsOH (2 mg, 0.012 mmol) a una solución de m-bromofenilmetil selenosemicarbazona 1a (50 mg, 0.16 mmol) en PhMe (1 mL) y DMF (0.1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El residuo se volcó en H₂O (20 mL), se ajustó a pH a 7-8 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*hexanos/AcOEt 1:4) para dar 3a (30 mg, 41%) como un sólido amarillo: PF = 192.0-193.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.45 (s, 3H), 4.34 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.27-7.31 (m, 2H), 7.56 (ddd, *J* = 0.8, 1.7, 8.0 Hz, 1H), 7.81-7.83 (m, 1H), 7.96 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 9.35 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.3, 15.6, 62.2, 120.7, 122.8, 125.6, 130.0, 130.1, 133.4, 139.6, 142.3, 159.3, 162.9, 167.1, 167.5; HRMS calculado para C₁₅H₁₅BrN₃O₃Se [M + H]⁺ 443.94640, valor encontrado 443.94540



(RS)-2-(2-(m,p-diclorobenciliden hidrazono)-4-oxo-5-selenazolidin-N-metilacetamida (3b). Se adicionó metilmaleimida (24 mg, 0.33 mmol) y ácido p-TsOH (2 mg, 0.012 mmol) a una solución de m,p-diclorofenilmetil selenosemicarbazona 1b (30 mg, 0.09 mmol) en PhMe (1 mL) y DMF (0.5 mL). La mezcla de reacción se calentó con agitación en un vial de microondas por 70 min a 90°C. El residuo se volcó en H₂O (20 mL), se ajustó a pH 7-8 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se

secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **3b** (9 mg, 22%) como un sólido blanco: PF = 185.0-186.0°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2.39 (s, 3H), 2.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 2.67 (dd, *J* = 11.4, 16.2 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 3.7, 16,2 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 3.7, 11.4 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.03 (c, *J* = 4.6 Hz, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 14.7, 25.5, 37.7, 37.8, 126.4, 127.9, 130.7, 131.4, 132.3, 138.2, 158.5, 163.8, 169.9, 177.1; HRMS calculado para C₁₄H₁₄Cl₂N₄O₂SeNa [M + Na]⁺ 442.95590, valor encontrado 442.95467.

4.5.1b Síntesis de selenazolinonas



(5Z)-metil 2-(2-amino-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-iliden) acetato (4a). Se adicionó acetilendicarboxilato de metilo 7a (58 mg, 0.41 mmol) a una solución de selenourea 2 (50 mg, 0.41 mmol) en PhMe (1 mL) y DMF (0.1 mL). La mezcla de reacción se calentó con agitación en un vial de microondas por 10 min a 90°C. El residuo se volcó en H₂O (10 mL), se ajustó a pH 7-8 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 2:1) para dar 4a (24 mg, 25%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3.78 (s, 3H), 6.96 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.79 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 52.7, 118.1, 152.5, 167.1, 174.7, 181.1.

(5Z)-etil 2-(2-amino-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-iliden) acetato (4b). Se adicionó acetilendicarboxilato de etilo 7b (69 mg, 0.41 mmol) a una solución de selenourea 2 (50 mg, 0.41 mmol) en DMF (0.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 min. El residuo se volcó en H₂O (10 mL), se ajustó a pH 7-8 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 2:1) para dar 4a (41 mg, 43%) como un sólido blanco: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.23 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 9.78 (s, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 14.1, 61.6, 118.5, 152.3, 166.6, 174.9, 181.0.

Derivatización de selenazolinonas



Preparación de selenazolinonas 6a-c

La preparación de **6a** es representativa

(5Z)-etil 2-(2-(m-clorobenzamido)-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-iliden) acetato (6a). Se adicionó ácido m-cloro benzoico (29 mg, 0.183 mmol) a una solución de selenazolinona 4b (50 mg, 0.20 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se agregó HOBt (27 mg, 0.201 mmol) y DCC (42 mg, 0.201 mmol) a la solución, en baño a hielo y se agitó durante 1 h y luego 1 h a temperatura ambiente. El residuo se volcó en H₂O (30 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar 4a (30 mg, 44%) como un sólido blanco: PF = 194.5-195.5°C (dec); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.29 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.77 (ddd, *J* = 1.0, 2.2, 8.0 Hz, 1H), 8.13 (dt, *J* = 1.0, 8.0 Hz, 1H), 8.18–8.19 (m, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 14.0, 62.0, 122.9, 128.2, 129.2, 130.9, 133.5, 133.6, 136.4, 144.1, 166.0, 172.2, 172.4, 176.4; HRMS calculado para C₁₄H₁₁ClN₂O₄SeNa [M + Na]⁺ 408.94627, valor encontrado 408.94859.

(5Z)-etil 2-(2-(p-isopropilbenzamido)-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-iliden) acetato (6b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenazolinona 6a, utilizando ácido p-isopropil benzoico. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 5:1) para dar 6b (7 mg, 30%) como un sólido blanco: PF = 205.0-206.0°C (dec); ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.27 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 2.98 (dt, J = 6.9, 13.9 Hz, 1H), 4.35 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 8.3 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.4, 23.8, 29.8, 34.5, 62.3, 124.9, 126.7, 127.0, 130.4, 131.7, 155.8, 166.3, 169.9, 176.3; HRMS calculado para C₁₇H₁₈N₂O₄SeNa [M + H]⁺ 395.05050, valor encontrado 394.99110.

(5Z)-etil 2-(4-oxo-2-(quinolina-4-carboxamido)-1,3-selenazol-5(4H)-ilidene) acetato (6c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la selenazolinona 6a, utilizando ácido 4-quinolin carboxílico. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 3:1) para dar 6c (26 mg, 61%) como un sólido marrón: PF = 253.0-254.0°C (dec); ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.76 (ddd, J = 1.4, 6.9, 8.4 Hz, 1H), 7.87 (ddd, J = 1.4, 6.9, 8.4 Hz 1H), 8.15–8.17 (m, 2H), 8.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 9.14 (d, J = 4.4 Hz, 1H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 14.0, 62.0, 122.3, 123.1, 124.2, 125.7,

128.3, 129.7, 129.9, 138.8, 144.4, 148.6, 150.6, 166.0, 173.3, 185.6; HRMS calculado para $C_{17}H_{14}N_3O_4Se\,[M + H]^+$ 404.00713, valor encontrado 404.00280.

(5Z)-etil 2-(2-(p-isopropilbenzamido)-4-oxo-1,3-selenazol-5(4H)-iliden) acetato (6b). Se adicionó HBTU (83 mg, 0.22 mmol) a una solución de selenazolinona 4b (50 mg, 0.20 mmol) y ácido p-isopropil benzoico (36 mg, 0.22 mmol) en DMF (0.5 mL), en baño de hielo. La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura por 15 min y luego a temperatura ambiente durante la noche. El residuo se volcó en H₂O (30 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y se extrajo la mezcla con AcOEt (4 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*hexanos/AcOEt 5:1) para dar 6b (16 mg, 20%) como un sólido blanco. Las propiedades espectroscópicas son idénticas a las ya descriptas para este producto más arriba.

4.5.1c Alcance de la reacción de hidrazolil tiazolidinonas con Reactivo de Woollins (RW)

La preparación de hidrazolil tiazolidinonas **12a-f** es análoga a la descripta en la parte experimental 2.5 del capítulo 2. La caracterización espectroscópica de **12b-f** se incluye en la misma sección.



(5Z)-metil-2-((Z)-3-metil-4-oxo-2-((Z)-(1-feniletiliden hidrazono)-tiazolidin-5-iliden-acetato (12a). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo utilizando acetofenona, metil tiosemicarbazida y acetilendicarboxilato de metilo 7a para dar 12a (113 mg, 30%) como un sólido amarillo: PF = 190.0-191.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 7.43 (dt, *J* = 2.2, 3.0 Hz, 3H), 7.89-7.97 (m, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 15.0. 29.9, 52.6, 115.8, 127.1, 128.5, 130.5, 137.6, 142.4, 158.9, 164.7, 165.3, 166.7.



Preparación de hidrazolil tiazolidinonas 14a-e

La preparación de 14a es representativa

(RS) 2-((Z)-3-metil-4-0x0-2-((Z)-(1-feniletiliden hidrazono)tiazolidin-5-il) acetato de metilo (14a). Se adicionó Reactivo de Woollins (RW) (33 mg, 0.06 mmol) a una solución de la tiazolidinona 12a (78 mg, 0.24 mmol) en PhMe (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 10:1) para dar 14a (42 mg, 55%) como un sólido amarillo: PF = 125.1-126.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.47 (s, 3H), 2.87 (dd, J = 9.8, 17.5 Hz, 1H), 3.26 (dd, J = 3.7, 17.5 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.29 (dd, J = 3.7, 9.8 Hz, 1H), 7.38-7.41 (m, 3H), 7.87–7.89 (m, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.9, 30.0, 37.9, 43.0, 52.5, 126.9, 128.5, 130.1, 138.1, 161.7, 163.1, 170.8, 173.8; HRMS calculado para $C_{15}H_{17}N_{3}O_{3}SNa[M + Na]^{+}$ 342.08830, valor encontrado 342.08540.

(RS) 2-((Z)-2-((Z)-(p-clorobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxotiazolidin-5-il)acetato de metilo (14b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la hidrazolil tiazolidinona 14a, utilizando la tiazolidinona 12b. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (nhexanos/AcOEt 6:1) para dar 14b (48 mg, 68%) como un sólido amarillo: PF = 139.9-140.9°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.88 (dd, J = 9.8, 17.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 3.6, 17.6 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.30 (dd, J = 3.6, 9.8 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.7, 37.7, 42.9, 52.5, 129.1, 129.3, 132.7, 136.8, 157.2, 163.8, 170.7, 173.6; análisis elemental calculado para C₁₄H₁₄ClN₃O₃S C: 49.49%, N: 12.37%, H: 4.15%, S: 9.44%, encontrado C: 50.05%, N: 11.85%, H: 4.21%, S: 8.76%.

(RS) 2-((Z)-2-((Z)-(p-(trifluorometil)benciliden hidrazono)-3-metil-4-oxotiazolidin-5-il) acetato de metilo (14c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la hidrazolil tiazolidinona 14a, utilizando la tiazolidinona 12c. El residuo se purificó por cromatografía en SiO_2 (n-hexanos/AcOEt 5:1) para dar 14c (40 mg, 79%) como un sólido blanco: PF = 140.0-141.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.90 (dd, J = 9.7, 17.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 3.6, 17.6 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.31 (dd, J = 3.6, 9.7 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.45 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 30.1, 37.7, 43.1, 52.6, 124.0 (c, J_{CF3} = 272 Hz), 125.6 (c, J_{CF3} = 4 Hz), 128.4, 132.3 (c, J_{CF3} = 32 Hz), 137.6, 157.0, 164.9, 170.7, 173.8; HRMS calculado para $C_{15}H_{15}F_{3}N_{3}O_{3}S[M + H]^{+}$ 373.07080, valor encontrado 374.07963.

(RS) 2-((Z)-2-((Z)-(p-metoxibenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxotiazolidin-5-il) acetato de metilo (14d). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la hidrazolil tiazolidinona 14a, utilizando la tiazolidinona 12d. El residuo se purificó por cromatografía en SiO_2 (n-hexanos/AcOEt 6:1) para dar 14d (50 mg, 74%) como un sólido blanco: PF = 112.0-113.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.87 (dd, J = 9.8, 17.5 Hz, 1H), 3.26 (dd, J = 3.7, 17.5 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.29 (dd, J = 3.7, 9.8 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.36 (s, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 37.9, 43.0, 52.5, 55.5, 114.3, 127.0, 129.9, 158.3, 161.9, 162.2, 170.8, 173.7; HRMS calculado para C₁₅H₁₈N₃O₄S [M + H]⁺ 336.09398, valor encontrado 336.10417.

(RS) 2-((Z)-2-((Z)-(p-metoxibenciliden hidrazono)-4-oxotiazolidin-5-il) acetato de metilo (14e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la hidrazolil tiazolidinona 14a, utilizando la tiazolidinona 12e. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (nhexanos/AcOEt 1:1) para dar 14e (35 mg, 58%) como un sólido blanco: PF = 120-121°C; ¹H RMN

 $(CDCl_3) \delta 2.92 (dd, J = 9.9, 17.5, Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 3.7, 17.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.33 (dd, J = 3.7, 9.9 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.61 (s, 1H); ¹³C RMN <math>\delta$ (CDCl₃) 37.5, 44.0, 52.5, 55.4, 114.1, 126.5, 129.9, 157.8, 161.9, 163.7, 170.7, 175.3.

(RS)-2-(Z)-2-(Z)(p-clorobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metilacetamida (12f). El compuesto 12f es análogo al 3i (capítulo 2), por lo que su preparación fue descripta en la parte experimental 2.5 de dicho capítulo.



(RS)-2-(Z)-2-(Z)-(p-clorobenciliden hidrazono)-3-metil-4-oxo-tiazolidin-5-il-N-metiletano selenoamida (15f). Se adicionó Reactivo de Woollins (RW) (31 mg, 0.06 mmol) a una solución de la tiazolidinona 12f (40 mg, 0.12 mmol) en PhMe (3 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 h. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 2:1) para dar 15f (11 mg, 23%) como un sólido naranja: PF = 200.0-201.0°C (dec); ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.95 (dd, J = 9.9, 15.5 Hz, 1H), 3.27 (d, J = 4.7 Hz, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.47 (dd, J = 4.4, 15.5 Hz, 1H), 4.85 (dd, J = 4.4, 9.9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.37 (s, 1H), 8.49 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 36.8, 47.8, 52.4, 129.2, 129.5, 132.7, 136.9, 157.6, 163.6, 174.1, 206.0; HRMS calculado para C₁₄H₁₆ClN⁴OSSe [M + H]⁺ 402.98203, valor encontrado 402.98900.

4.5.2 Evaluación biológica in vitro de organoselenados

4.5.2a Evaluación en Cruzipaína (Cz)

El procedimiento de evaluación *in vitro* en la enzima Cruzipaína es análogo al descripto en la parte experimental 3.5 del capítulo 3.

4.5.2b Evaluación en epimastigotes de T. cruzi

El procedimiento de evaluación *in vitro* en epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) es análogo al descripto en la parte experimental 3.5 del capítulo 3.



4. Síntesis y evaluación biológica de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados



180



छे Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo







4. Síntesis y evaluación biológica de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados



क प्रि Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo

4. Síntesis y evaluación biológica de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados









명 Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo







ස් Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo







Capítulo 5:

Síntesis y evaluación biológica de selenazoles

5.1 Antecedentes

El interés en los compuestos organoselenados ha crecido en las últimas décadas debido a su importancia como intermediarios útiles en química sintética¹ y como precursores de nuevos materiales.² De todas maneras, su relevancia más destacada es en el área de la biología y la medicina.³

Varias estrategias han surgido para la síntesis de selenazoles 1, principalmente vinculadas a variaciones en la síntesis de Hantzsch, utilizada para la preparación de oxazoles y tiazoles (Figura 5.1).⁴ La reacción ocurre mediante una cicloadición [3+2] entre selenoureas y α -halocetonas, y la diversidad estructural del anillo de selenazol en posiciones 4 y 5, es generada por los sustituyentes presentes en la α -halocetona.



Figura 5.1 Selenazoles 1

¹ (a) Liotta D, Monahan R (1986) Selenium in Organic Synthesis. Science 231: 356–361; (b) Wirth T (2000) Organoselenium Chemistry in Stereoselective Reactions. Angew Chem Int Ed 39: 3740–3749; (c) Rhoden CRB, Zeni G (2011) New development of synthesis and reactivity of seleno- and tellurophenes. Org Biomol Chem 9: 1301–1313; (d) Levason W, Reid G, Zhang W (2011) The chemistry of the p-block elements with thioether, selenoether and telluroether ligands. Dalton Trans 40: 8491–8506

² (a) Beri RK, Khanna PK (2010) "Green" and controlled synthesis of single family "magic-size" cadmium selenide nanocrystals by the use of cyclo-hexeno-1,2,3-selenadiazole an organoselenium compound. Cryst Eng Commun 12: 2762–2768; (b) Manjare ST, Kim S, Heo WD, Churchill DG (2014) Selective and Sensitive Superoxide Detection with a New Diselenide-Based Molecular Probe in Living Breast Cancer Cells. Org Lett 16: 410–412; (c) Kumar A, Rao GK, Kumar S, Singh AK (2014) Formation and Role of Palladium Chalcogenide and Other Species in Suzuki–Miyaura and Heck C–C Coupling Reactions Catalyzed with Palladium(II) Complexes of Organochalcogen Ligands: Realities and Speculations. Organometallics 33: 2921–2943

³ (a) Mugesh G, du Mont WW, Sies H (2001) Chemistry of Biologically Important Synthetic Organoselenium Compounds. Chem Rev 101: 2125–2179; (b) Nogueira CW, Zeni G, Rocha TBT (2004) Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. Chem Rev 104: 6255–6286; (c) Ninomiya M, Garud DR, Koketsu M (2011) Biologically significant selenium-containing heterocycles. Coord Chem Rev 255: 2968–2990 ⁴ (a) Larsen R (1996) 1,3-Selenazoles. In Comprehensive Heterocyclic Chemistry II. Eds: Kartritzky A, Rees CW, Scriven EFV. Elsevier Science, Oxford, Vol. 3, Cap. 8; (b) Geisler K, Pfeiffer WD, Muller C, Nobst E, Bulka E, *et al.* (2003) Synthesis and Functionalization of 4-Halomethyl-1,3-selenazoles. Synthesis 8: 1215-1220; (c) Ninomiya M, Garud DR, Koketsu M (2010) Selenium-containing heterocycles using selenoamides, selenoureas, selenazadienes, and isoselenocyanates. Heterocycles 81: 2027–2055

Narender *et al.* describieron la síntesis de estos heterociclos por condensación de α halocetonas con selenourea o selenoamidas, utilizando β -ciclodextrina como catalizador (Figura 5.2).⁵ En general, estas reacciones ocurren por formación *in situ* de un complejo entre la β -ciclodextrina y la α -bromocetona, seguida del agregado de la selenourea, para dar los selenazoles en rendimientos casi cuantitativos (Figura 5.2).

Posteriormente, Madhav *et al.* describieron por primera vez una reacción tricomponente, en tándem, a partir de fenil acetileno, NBS y selenourea, para la preparación de selenazoles utilizando también β -ciclodextrina como catalizador en medio acuoso (Figura 5.2).⁶

Siguiendo también variaciones de la ciclación de Hantzsch, recientemente Zaharia *et al.* obtuvieron 2-hidracil-selenazoles por reacción entre selenosemicarbazonas o acil-selenosemicarbazida y α -halocarbonilos (Figura 5.2).⁷

Zang *et al.* describieron la síntesis de selenazoles utilizando iodo hipervalente, por α -tosiloxilación de cetonas y dicetonas con [hidroxil(tosiloxi)iodo]benceno (HTIB) y selenoamidas (Figura 5.2).^{8a}

 $^{^5}$ Narender M, Reddy MS, Kumar VP, Reddy VP, Nageswar YVD, et al. (2007) Supramolecular Synthesis of Selenazoles Using Selenourea in Water in the Presence of β -Cyclodextrin under Atmospheric Pressure. J Org Chem 72: 1849–1851

⁶ Madhav B, Narayana S, Murthy BSP, Kumar A, Ramesh K, *et al.* (2012) A tandem one-pot aqueous phase synthesis of thiazoles/selenazoles. Tetr Lett 53: 3835–3838

⁷ Zaharia V, Ignat A, Ngameni B, Kuete V, Moungang ML, *et al.* (2013) Heterocycles 23: Synthesis, characterization and anticancer activity of new hydrazinoselenazole derivatives. Med Chem Res 22: 5670-5679

⁸ (a) Zhang PF, Chen ZC (2000) Hypervalent lodine in Synthesis 53: Synthesis of 2,4-Disubstituted and 2,4,5trisubstituted 1,3-Selenazoles. Synthesis 9: 1219-1222; (b) Zhang PF, Chen ZC (2001) Hypervalent iodine in synthesis 50: A novel method of synthesis of selenazoles by cyclocondensation of selenoamides and alkynyl(phenyl)iodonium salts. J Heterocycl Chem, 38: 503-505



Figura 5.2 Síntesis de selenazoles por reacción entre α -halocetonas y selenoureas, selenoamidas o sus derivados.

Este grupo también describió la preparación de estos heterociclos por ciclocondensación de selenoamidas primarias y sales de alquinil(fenil)iodonio (Figura 5.3).^{8b}

Para la síntesis de 4-arilmetil selenazoles se describió la cicloadición de selenoamidas primarias vía catión α -selenil propadienilo utilizando sales de escandio como catalizador (Figura 5.3).⁹

⁹ Yoshimatsu M, Yamamoto T, Sawa A, Kato T, Tanabe G, *et al.* (2009) α-Sulfanyl and α-Selanyl Propadienyl Cations: Regioselective Generations and Cycloadditions with Thioamides and Selemides Controlled by $MeNO_2-H_2O$ System. Org Lett 11: 2952-2955



Figura 5.3 Síntesis de selenazoles por cicloadición de selenoamidas a alquinos

Las selenoureas están comercialmente disponibles pero tienen ciertas desventajas como su elevado costo en el mercado y su baja estabilidad con el aire y la luz.¹⁰ Pese a las opciones alternativas mencionadas para la síntesis de estos heterociclos organoselenados, aún quedan nuevos enfoques por abordar y se consideró la utilización de propargil selenoamidas para la preparación de selenazoles.

5.2 Objetivos específicos

En el presente capítulo se plantea como objetivo la preparación de selenazoles 2,5disustituídos vía propargil selenoamidas y su evaluación biológica contra diferentes blancos parasitarios, *T. cruzi* y *N. brasiliensis*, y su actividad inhibitoria enzimática en TGR.

¹⁰ Dictionary of Organic Compounds 6th Edition (1996) Eds: Chapman and Hall. New York, Vol. 6, pp 5646

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Preparación de selenazoles

5.3.1a Síntesis de 5-metil selenazoles a partir de propargil amidas terminales

Como parte de nuestro interés en la preparación y evaluación biológica de compuestos organoselenados,¹¹ se pensó en explorar una nueva metodología para la preparación de derivados selenazol, estudiando la cicloisomerización de propargil selenoamidas.

La cicloadición es una metodología muy utilizada para preparar heterociclos del tipo oxazol y tiazol partiendo de propargil amidas y tioamidas, respectivamente. El grupo de Hacksell, demostró que las propargil amidas pueden ciclar para dar los correspondientes oxazoles en condiciones básicas de reacción.¹² El mecanismo propuesto ocurriría por ciclación *5-exo-dig* vía formación de un intermediario alénico, obteniendo el oxazol.

Recientemente se han descripto variaciones a esta metodología, utilizando otros catalizadores como SiO_2 ,¹³ Au(I),¹⁴ Ag(I)¹⁵ y *p*-TsOH,¹⁶ (Figura 5.4). En particular, Wipf *et al.* plantearon la obtención de 2,4,5-selenazoles trisustituídos a partir de propargil amidas terminales y no terminales, utilizando SiO₂ como catalizador.¹³

En el mismo año, Hashmi *et al.* describieron la preparación de oxazoles por cicloisomerización de propargil amidas terminales con AuCl₃, siendo ineficaz con reactivos

¹¹ Pizzo C, Faral-Tello P, Salinas G, Fló M, Robello C, Wipf P, Mahler SG (2012) Selenosemicarbazones as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against Trypanosoma cruzi. Med Chem Commun 3: 362–367

¹² Nilsson BM, Hacksell U (1989) Base-Catalyzed cyclization of N-propargylamides to oxazoles. J Heterocycl Chem 26: 269-275

¹³ Wipf P, Aoyama Y, Benedum TE (2004) A Practical Method for Oxazole Synthesis by Cycloisomerization of Propargyl Amides. Org Lett 6: 3593– 3595

¹⁴ (a) Hashmi ASK, Weyrauch JP, Frey W, Bats JW (2004) Gold Catalysis: Mild Conditions for the Synthesis of Oxazoles from N-Propargylcarboxamides and Mechanistic Aspects. Org Lett 6: 4391–4394; (b) Doherty S, Knight JG, Hashmi ASK, Smyth CH, Ward NAB, *et al.* (2010) Efficient Cycloisomerization of Propargyl Amides by Electrophilic Gold(I) Complexes of KITPHOS Monophosphines: A Comparative Study. Organometallics 29: 4139–4147; (c) Hashmi ASK, Blanco Jaimes MC, Schuster AM, Rominger F (2012) From Propargylic Amides to Functionalized Oxazoles: Domino Gold Catalysis/Oxidation by Dioxygen. J Org Chem 77: 6394–6408

¹⁵ Verniest G, Padwa A (2008) Gold- and Silver-Mediated Cycloisomerizations of N-Propargylamides. Org Lett 10: 4379–4382

¹⁶ Pan Y, Zheng F, Lin H, Zhan Z (2009) Brønsted Acid-Catalyzed Propargylation/Cycloisomerization Tandem Reaction: One-Pot Synthesis of Substituted Oxazoles from Propargylic Alcohols and Amides. J Org Chem 74: 3148–3151

no terminales;^{14a} por lo tanto, en estas condiciones es crucial que el alquino sea terminal para que ocurra el proceso de ciclación (Figura 5.4).

Verniest *et al.* estudiaron el proceso de cicloisomerización de propargil amidas por activación del alquino con catalizadores de Au o Ag.¹⁵ La preparación de estos heterociclos puede darse en tándem, a partir de alcoholes propargílicos y amidas, utilizando *p*-TsOH.¹⁶



Figura 5.4 Síntesis de 1,3-oxazoles vía cicloisomerización de propargil amidas utilizando diferentes catalizadores

En base a estos antecedentes, se decidió investigar acerca de la posibilidad de la ciclación de propargil selenoamidas. En primera instancia, se trabajó en la optimización de la síntesis de selenoamidas y para ello se exploró la utilización de dos reactivos de intercambio O-Se: el Reactivo de Woollins (RW)¹⁷ y el de Ishihara (LiAlHSeH),¹⁸ ambos introducidos en

¹⁷ Hua G, Woollins JD (2009) Formation and Reactivity of Phosphorus–Selenium Rings. Angew Chem Int Ed 48: 1368–1377

capítulos anteriores. Se eligió la propargil amida 2a como compuesto modelo para estudiar las mejores condiciones de reacción (Tabla 5.1).



Entrada	Condiciones A	Condiciones B	Productos, ^a R ^b
			(%)
1	RW (1.5 equiv.), PhMe reflujo 10 h	-	2a, 70
2	I) PCl ₅ (3 equiv.), DMF (0.3 equiv.), PhH, tamb;	p-TsOH tamb	4a, 72
	II) LiAlHSeH (3 equiv.), tamb		
3	I) PCl5 (3 equiv.), DMF (11 equiv.), PhMe, tamb;	-	4a + 1a (40:60),
	II) LiAlHSeH (3 equiv.), tamb		10
4	l) PCl ₅ (3 equiv.), DMF (0.3 equiv.), PhMe, tamb;	Et₃N (1 equiv.),	4a + 1a (70:30),
	II) LiAlHSeH (3.2 equiv.), tamb	reflujo, 9 h	40
5	l) PCl ₅ (1 equiv.), DMF (0.3 equiv.), PhMe, tamb;	AcOPip	4a + 1a (30:70),
	II) LiAlHSeH (1.2 equiv.), tamb	(1 equiv.)	31
6	I) PCl ₅ (2 equiv.), DMF (0.3 equiv.), PhMe, tamb;	AcOPip	1a, 74
	II) LIAIHSeH (1.5 equiv.), tamb	(1 equiv.)	

^a Proporción calculada en función de la integración de las señales de ¹H RMN. ^b Rendimiento de la mezcla de productos; AcOPip = acetato de piperidonio.





Al utilizar el RW como agente selenante, en las condiciones clásicas de intercambio O-Se en amidas, se recuperó el material de partida (Entrada 1, Tabla 5.1), por ello no se continuó trabajando con este reactivo.

El LiAlHSeH es una herramienta útil para la preparación de selenopeptidos.¹⁹ En nuestro caso, ha resultado efectivo como reactivo en la preparación de selenosemicarbazonas a partir de sus análogos semicarbazona, como se describió en el capítulo 3.

¹⁸ Ishihara H, Koketsu M, Fukuta Y, Nada F (2001) Reaction of Lithium Aluminum Hydride with Elemental Selenium: Its Application as a Selenating Reagent into Organic Molecules. J Am Chem Soc 123: 8408-8409 ¹⁹ Vishwanatha TM, Narendra N, Chattopadhyay B, Mukherjee M, Sureshbabu VV (2012) Synthesis of Selenoxo Peptides and Oligoselenoxo Peptides Employing LiAlHSeH. J Org Chem 77: 2689–2702

En las condiciones descriptas por Vishwanatha *et al.* para la conversión de amidas peptídicas a selenoamidas, se utiliza: PCI_5 (1 equiv.), DMF catalítica (0.3 equiv.), en PhH. La reacción ocurre mediante la formación del iminocloruro *in situ*, seguido del intercambio Cl-Se mediante el LiAlHSeH (1 equiv.), siendo éste último preparado en el momento, previo a ser utilizado, a partir de Se(0) y LiAlH₄.^{18,19}

En estas condiciones, a partir de la propargil amida **2a**, se obtuvo la selenazolina **4a** en un 72% de rendimiento, vía formación de selenoamida **3a**, seguida de la ciclación espontánea 5exo-dig (Entrada 2, Tabla 5.1). Los intentos de isomerizar el doble enlace exocíclico para obtener el selenazol **1a**, utilizando ácido *p*-TsOH y calor, resultaron ineficaces (Entrada 2, Tabla 5.1).

Al aumentar la cantidad de DMF (11 equiv.) se obtuvo la selenazolina **4a** y el selenazol **1a** en una proporción 40:60 respectivamente, aislando el producto con un rendimiento del 10% (Entrada 3, Tabla 5.1).

Con la idea de promover la completa isomerización de **4a** en **1a**, se utilizó Et_3N (1 equiv.) y acetato de piperidonio (AcOPip) (1 equiv.) como catalizadores (Entradas 4 y 5, Tabla 5.1, respectivamente). Al utilizar Et_3N en las mismas condiciones A que la Entrada 2, Tabla 5.1, el porcentaje de conversión al selenazol **1a** aumentó al 30%, pero el rendimiento del producto aislado fue del 40% (Entrada 4, Tabla 5.1). Cuando se utilizó AcOPip, mejoró la conversión de **4a** en **1a** a 70% pero el producto se aisló con un 31% de rendimiento (Entrada 5, Tabla 5.1).

Al estudiar el efecto en la cantidad de PCI_5 y LiAlHSeH (Entradas 4 y 5, Tabla 5.1 respectivamente), se encontró que los mejores rendimientos fueron obtenidos cuando se utilizó PCI_5 (2 equiv.) y LiAlHSeH (1.5 equiv.) (Entrada 6, Tabla 5.1). De esta manera, bajo las condiciones optimizadas, se obtuvo un 100% de conversión al selenazol **1a**, con un 74% rendimiento.

Se logró así poner a punto una metodología en tándem para la síntesis de selenazoles 2,5disustituídos y con ella se prepararon una serie de derivados **1a-j** a partir de propargil amidas **2a-j**, alifáticas y aromáticas (Tabla 5.2), las cuales fueron preparadas por nuestro grupo, según metodologías descriptas en literatura.²⁰



Entrada	R	R (%)
1	Ph	1a, 74
2	<i>p</i> -BrPh	1b, 70
3	p-CF ₃ Ph	1c, 55
4	m-ClPh	1 d, 42
5	<i>p</i> -isopropilPh	1e, 61
6	p-OMePh	1 f, 88
7	propilo	1g, 25
8	isopropilo	1h, 23
9	t-butilo	1 i, 20
10		1j , 36

Tabla 5.2 Síntesis de 2,5-selenazoles disustituídos 1a-j, utilizando una secuencia sintética en tándem

Las propargil amidas **2a-f** sustituidas con grupos aromáticos, con o sin sustituyente, dieron lugar a los selenazoles **1a-f**, con rendimientos moderados a buenos, 42-88% (Entradas 1-6, Tabla 5.2). Por el contrario, las propargil amidas alquílicas **2g-j** dieron los selenazoles **1g-j** con rendimientos moderados del 20 al 36% (Entradas 7-10, Tabla 5.2).

Visto lo interesante de la metodología y para explorar su alcance, se evaluó la cicloisomerización utilizando la propargil amida α,β insaturada **2k** (Figura 5.5).

²⁰ (a) Para propargil amidas **2a-c**, **2h-i**, **2k**: ref 13; (b) Para propargil amidas **2d-g**, **2j**: Bodanszky A (1994) The practice of peptide synthesis; Springer Berlin Heidelberg; 2nd Ed; pp 90



Figura 5.5 Alcance de la cicloisomerización utilizando propargil amida α - β insaturada 2k

Con la metodología puesta a punto, no se logró obtener el selenazol **1k**; por el contrario, se recuperó un porcentaje del material de partida y se aisló un producto de estructura definida, pero que no se logró dilucidar.

Por otra parte, se evaluó el alcance de la reacción utilizando propargil amidas no terminales **2l-m** (Figura 5.6).



Figura 5.6 Propargil amidas no terminales 21-m

La idea fue utilizar la bis propargil amida **2l** con el fin de evaluar la posibilidad de obtener el bis selenazol **1l**, mientras que con el reactivo **2m**, se podría obtener el selenazol 2,5disustituído **1m** (Figura 5.7).



Figura 5.7 Intentos de cicloisomerización de propargil amidas no terminales 21-m utilizando la metodología puesta a punto para la síntesis de selenazoles

En ambos casos se obtuvieron mezclas complejas, conteniendo productos de descomposición y recuperándose material de partida.

En literatura se describen cicloisomerizaciones a partir de propargil amidas terminales y no terminales, para la obtención de oxazoles. Particularmente, utilizando la metodología puesta a punto por nuestro grupo y con los ejemplos seleccionados fue posible obtener los correspondientes selenazoles a partir de propargil amidas terminales.

La propuesta mecanística para la formación de los selenazoles 1 consta de dos etapas (Figura 5.8): 1) formación de la propargil selenoamida 3, y consecuentemente II) ciclación intramolecular 5-exo-dig para dar el selenazol 1, vía selenazolina 4, basada en lo discutido por Vishwanatha et al.¹⁹ para la formación de selenopéptidos.



Figura 5.8 Mecanismo propuesto para la formación de los selenazoles 1

Una vez formada la selenoamida **3**, el átomo de Se promovería la ciclación 5-*exo-dig*, favorecida por las reglas de Baldwin.²¹ Luego, los electrones del triple enlace tomarían un protón del medio para formar la selenazolina **4**, para que finalmente ocurra la isomerización del doble enlace exocíclico catalizado por la sal acetato de piperidonio (AcOPip), para dar el selenazol **1**.

En caso de utilizar una propargil amida no terminal (Figura 5.6) la reacción no avanzaría hacia **4**, obteniéndose productos de descomposición y recuperando material de partida **2**.

²¹ Gilmore K, Alabugin IV (2011) Cyclizations of Alkynes: Revisiting Baldwin's Rules for Ring Closure. Chem Rev 111: 6513-6556
5.3.1b Síntesis de 5-halometil selenazoles

Considerando el mecanismo propuesto para la formación de selenazoles se pensó en estudiar el rol de diferentes electrófilos capaces de competir con el protón del medio de reacción.

En literatura se describen varios electrófilos que podrían cumplir esta función. Gai *et al.* ensayaron PhSeBr, CuCl₂ y CuBr₂, en la síntesis de tetrahidroselenofenos y describieron la síntesis de estos heterociclos por ciclación de 1-butilseleno-4-alquinos, utilizando iodo molecular como electrófilo (Figura 5.9).²²



Figura 5.9 Ciclación intramolecular a partir de alquinos no terminales para la obtención de selenofenos, utilizando I₂ como electrófilo

Los autores proponen como mecanismo la generación de un catión iodonio, seguido por el ataque intramolecular 5-*exo-dig* del par de electrones del selenio al carbono del ion iodonio, para dar selectivamente el iodo vinil selenofeno.

<u>Iodación</u>

En nuestro caso, se evaluó I_2 como posible electrófilo en el proceso de ciclación hacia la obtención de la 5-iodovinil selenazolina **5** (Tabla 5.3).

²² Gai RM, Schumacher RF, Back DF, Zeni G (2012) Regioselective Formation of Tetrahydroselenophenes via 5exo-dig-Cyclization of 1-Butylseleno-4-alkynes. Org Lett 14: 6072–6075



Entrada	Condiciones	Producto R (%)
1	I) PCl ₅ (2 equiv.), PhMe, DMF (0.3 equiv.), tamb;	1a + 5 (70:30), 19
	II) LiAlHSeH (1.5 equiv.), 0°C;	
	III) I₂ (1.5 equiv.), o°C	
2	I) PCl ₅ (2 equiv.), CH₂Cl₂, -10°C;	1a +5 (70:30), 39
	II) LiAlHSeH (1.5 equiv.), –10°C;	
	III) I₂ (1.5 equiv.), –10°C	
3	I) PCl ₅ (1.5 equiv.), CH ₂ Cl ₂ , 0°C;	1a + 5 (70:30), 33
	II) I₂ (2 equiv.), o°C;	
	III) LiAlHSeH (1.5 equiv.), 0°C	

^a Proporción calculada en función de la integración de las señales de ¹H RMN. ^b Rendimiento de la mezcla

Tabla 5.3 Condiciones ensayadas para la sintesis de 5-iodovinil selenazolina 5

En primera instancia, se ensayaron las condiciones optimizadas para la preparación de la selenazolina **4** (Entrada 6, Tabla 5.1), seguido del agregado de I_2 a 0°C (Entrada 1, Tabla 5.3). Por TLC se determinó el avance de la reacción por ausencia de reactivo **2a**, pues el producto formado corría con el mismo Rf que el selenazol **1a**. Analizando el ¹H RMN del crudo, se determinó la formación de una mezcla del selenazol **1a** y la 5-iodovinil selenazolina **5**, en una proporción 70:30 (Entrada 1, Tabla 5.3).

Basados en lo propuesto por Gai *et al.*, el iodo se adicionaría al triple enlace, y formaría el catión iodonio, que al darse la ciclación 5-*exo-dig* por ataque del par de electrones libres del selenio al correspondiente carbono del catión, daría la 5-iodovinil selenazolina **5** (Figura 5.10).



Figura 5.10 Mecanismo propuesto para la formación de la 5-iodovinil selenazolina 5

Con el fin de mejorar el porcentaje de conversión hacia la 5-iodovinil selenazolina **5**, se trabajó en la optimización de las condiciones de reacción a partir de la propargil amida **2a**, variando cantidad, temperatura y orden de agregado del I_2 (Entradas 2-3, Tabla 5.3). Se evaluó el efecto del disolvente y al sustituirlo por CH_2CI_2 no se observó variación en la relación de productos. El orden y la temperatura de agregado de I_2 también se tuvieron en cuenta, pero no afectó en la distribución del producto (Entradas 2 y 3, Tabla 5.3).

Estos resultados nos llevaron a pensar que el proceso de ciclación estaría marcado por una competencia entre la facilidad en la formación del catión iodonio y la velocidad de ciclación intramolecular del selenio al carbono del catión, y captura de un H⁺. Probablemente, esta reacción ocurra más rápidamente, por lo que se aísla el selenazol **1a** en mayor proporción.

La derivatización de los 5-halometil selenazoles por reacción con nucleófilos generaría una importante diversidad estructural en estos heterociclos organoselenados. Es por ello que se estudiaron las condiciones para isomerizar el doble enlace exocíclico de la 5-iodovinil selenazolina **5** para obtener el 5-iodometil selenazol **6**, utilizando AcOPip (Tabla 5.4).



Entrada	Condiciones	Conversión (%) ^ª
1	CH_2Cl_2 /reflujo 8 h, tamb 12 h	19
2	CH_2Cl_2 /reflujo 8 h, tamb 15 h	47
3	PhMe/reflujo 24 h	0

^a % Conversión determinado por ¹H RMN

Tabla 5.4 Condiciones para la isomerización del enlace vinílico de la selenazolina 5, para dar el 5-iodometilselenazol 6.

Utilizando CH_2Cl_2 a reflujo, se determinó por ¹H RMN una conversión del 19% al selenazol **6** (Entrada 1, Tabla 5.4). Pese a utilizar diferentes fases móviles, la purificación de este producto resultó dificultosa pues los tautómeros **5** y **6** muestran el mismo Rf por TLC.

Vista la dificultad para seguir la reacción de esta manera, y aprovechando la volatilidad de los selenazoles se utilizó GC-MS como herramienta. El cromatograma mostró dos picos a t = 12 min y otro a t = 14 min, que corresponden al ion molecular [349 M/z]⁺. Esto indicaría la presencia de la 5-iodovinil selenazolina **5** y 5-iodometil selenazol **6**, que al ser tautómeros presentan la misma masa. Se utilizó esta herramienta como complemento a la de resonancia magnética nuclear, para la optimización de las condiciones de isomerización.

Cuando se incrementó el tiempo de reacción, mejoró el porcentaje de conversión a **6** (47%), pero no se logró aislar el producto puro (Entrada 2, Tabla 5.4). Pensando en aumentar la temperatura y el tiempo de reflujo se utilizó PhMe como disolvente, pero en dichas condiciones se descompuso el material de partida, evidenciándose en primera instancia, con la coloración violácea de la mezcla de reacción (Entrada 3, Tabla 5.4), probablemente debido a la formación de Yodo molecular.

Debido a que no fue posible encontrar condiciones óptimas para la completa isomerización del enlace vinílico de la selenazolina **5** y no logró aislarse el 5-iodometil selenazol **6**, se descartó continuar el trabajo aplicando esta ruta sintética.

<u>Bromación</u>

Los bajos rendimientos encontrados y la dificultad de desplazar el equilibrio hacia la formación del 5-iodometil selenazol **6** nos llevaron a trabajar sobre las condiciones de bromación, utilizando NBS como reactivo generador de bromo (Figura 5.11).



Relación **1a:7:4a** determinada por ¹H RMN **Figura 5.11** Síntesis de 5-bromovinil selenazolina **7** a partir de propargil amida **2a,** utilizando NBS.

En primera instancia, en las condiciones de cicloisomerización optimizadas a partir de la propargil amida **2a** utilizando NBS, se obtuvo una mezcla del selenazol **1a**, la 5-bromovinil selenazolina **7** y la selenazolina **4a**, en una proporción 52:26:22 (determinada por ¹H RMN), respectivamente (Figura 5.11).

A diferencia de los intentos de iodación, en este caso además se observó la formación de la selenazolina **4a**, haciendo la mezcla de reacción aún más compleja para su purificación, ya que todos estos productos corren con Rf similares.

Bromación del selenazol en posición 5

La isomerización de las selenazolinas **5** y **7** a sus correspondientes selenazoles no ocurrió espontáneamente. La dificultad para obtener estos heterociclos aromáticos, para posteriormente trabajar sobre su derivatización, nos llevó a continuar investigando en otros alcances sintéticos.

En este sentido, se han descripto en literatura diferentes alternativas para la mono bromación de tiazoles y oxazoles, en posición 5 del anillo aromático.

Particularmente, la síntesis del 4-halometil tiofeno a partir de su correspondiente metil tiazol es muy dependiente tanto del reactivo halogenante utilizado como de las condiciones de reacción.²³

Rubina *et al.* observaron que la cloración por radicales libres del 4-metil tiazol con *N*clorosuccinimida, en presencia de peróxido de benzoilo o de radiación UV, conducía al 5cloro-4-metil tiazol.²⁴ Al continuar la reacción de cloración, disminuyó el rendimiento por formación de tiazoles más funcionalizados.

Posteriormente Fillion y colaboradores ensayaron la reacción de bromación del 4,5dimetiltiazol con 1.1 equivalentes de NBS y AIBN (azobisisobutironitrilo) como iniciador radicalario, obteniendo exclusivamente el producto de la monobromación sobre el metilo en posición 5.²⁵

Recientemente, Sierra *et al.* prepararon 4-metil-5-bromometil tiazoles a partir del 4,5-dimetil tiazol correspondiente, utilizando PBr_3/CH_2Cl_2 , a 0°C (Figura 5.12).²⁶

También se han descripto metodologías donde a partir de ciclaciones intramoleculares se obtienen los heterociclos sustituídos deseados. Zhou *et al.* describieron una ciclación intramolecular oxidativa a partir de alilbenzamidas, para obtener 2-aril-5-bromometil oxazoles con buenos rendimientos (Figura 5.12).²⁷

²³ (a) Campaigne E, Lesuer W (1948) 3-Substituted Thiophenes. I. J Am Chem Soc 70: 1555-1558; (b) Dittmer K, Martin R, Herz W, Cristol S (1949) The Effect of Benzoyl Peroxide on the Bromination of Methylthiophenes by N-Bromosuccinimide. J Am Chem Soc 71: 1201-1204

²⁴ Rubina KI, Lovel G, Goldberg Yu Sh, Shimanskaya VF (1989) Free radical chlorination of methyl derivatives of pyridine, pyrazine, and thiazole by N-chlorosuccinimide. Chem Heterocycl Compd Engl Transl 25: 454-457

²⁵ Al Hariri M, Galley O, Pautet F, Fillion H (1998) Selective Bromination of 4,5-Dimethylthiazole with N-Bromosuccinimide. Eur J Org Chem 1998: 593-594

²⁶ Sierra ML, Beneton V, Boullay AB, Boyer T, Brewster AG, et al. (2007) Substituted 2-[(4-Aminomethyl)phenoxy]-2-methylpropionic Acid PPARα Agonists. 1. Discovery of a Novel Series of Potent HDLc Raising Agents. J Med Chem 50: 685–695

²⁷ Zhou W, Xie C, Han J, Pan Y (2012) Catalyst-Free Intramolecular Oxidative Cyclization of N-Allylbenzamides: A New Route to 2,5-Substituted Oxazoles. Org Lett 14: 4766-4769



Figura 5.12 Diferentes alcances en la 5-mono bromación de 1,3-tiazoles/oxazoles

En base a estos antecedentes y teniendo en cuenta su similitud en reactividad con los heterociclos organoselenados, se seleccionó el 5-metil selenazol **1a** como modelo, y se evaluó su reactividad frente a la reacción de bromación.

Se utilizó NBS como agente de bromación y se ensayaron las condiciones de reacción con el objetivo de lograr la monobromación en posición 5 y evitar los productos secundarios polibromados (Tabla 5.5).



Entrada	NBS (equiv.)	IR* (equiv.)	t hv (h)	t calentamiento	Conversión ^a	R (%) ^b
				(h)	(%)	
1	1.1	-	1	tamb, ovn	45	20
2	1.8	-	8	tamb, ovn	100	11
3	1.1	[PhC(=O)O-] ₂ (0.02)	-	reflujo, 4 h	75	21
4	0.9	[PhC(=O)O-] ₂ (0.02)	1	reflujo, 2 h	78	44
5	1.5	[PhC(=O)O-] ₂ (0.02)	-	reflujo, 6 h	30	10
6	1.1	AIBN (0.1)	1	tamb, 15 h	100	68

^a% Calculado en función de la integración de las señales de ¹H RMN; ^bRendimiento de producto aislado; IR*: iniciador radicalario [PhC(=O)O-],: peróxido de benzoilo; AIBN: azobisisobutironitrilo

Tabla 5.5 Optimización de las condiciones de bromación para obtener el 5-bromometil selenazol 8

En primer lugar, se trabajaron en condiciones de bromación radicalaria iniciada por hv (Entrada 1, Tabla 5.5). De esta manera se logró una baja conversión del selenazol **1a** a **8** (45%), y este se aisló en bajo rendimiento (20%).

Al aumentar el tiempo de luz a 8 h, se completó la conversión hacia el producto pero el rendimiento disminuyó al 11% (Entrada 2, Tabla 5.5).

Visto que la luz no resultaba plenamente eficaz, se utilizó peróxido de benzoilo como iniciador radicalario. En las condiciones descriptas por la Dra. Serra en su tesis doctoral para la bromación de tiazoles,²⁸ utilizando 0.02 equivalentes de iniciador radicalario y a reflujo, se obtuvo un porcentaje de conversión del 75% y una mejora en el rendimiento (21%) (Entrada 3, Tabla 5.5). En estas condiciones, Serra describe la obtención del 5-bromometil tiazol, como producto mayoritario, y en menor porcentaje los productos de 4 y 5,5 bromación.

En las mismas condiciones que la Entrada 3 pero irradiando con hv durante 1 h, y disminuyendo el tiempo de reflujo, aumentó el porcentaje de conversión (78%) y rendimiento del producto aislado **8** a 44% (Entrada 4, Tabla 5.5).

Al aumentar el tiempo de reflujo y la cantidad de NBS a 1.5 equivalentes, disminuyó notoriamente el porcentaje de conversión (30%) y rendimiento (10%) (Entrada 5, Tabla 5.5), lo que indicó no sólo la inestabilidad del producto con el calor, sino la necesidad trabajar con luz e iniciador radicalario.

En las últimas condiciones ensayadas se varió el iniciador radicalario por AIBN y se irradió con hv por 1 h, agitando la reacción a temperatura ambiente durante la noche (Entrada 6, Tabla 5.5). De esta manera se logró un 100% de conversión hacia el selenazol **8** con un 68% de rendimiento.

En todos los casos ensayados se obtuvo selectivamente el derivado mono bromado, 5bromometil selenazol **8** (Tabla 5.5). Esto marca una diferencia de reactividad frente a los 5metil tiazoles, de acuerdo a lo reportado por la Dra. Serra en su tesis doctoral.

²⁸ Serra S (1998) Hacia la síntesis de Mycotiazol: Estudios sintéticos y de reactividad de sistemas heterocíclicos de 5 miembros 1,3 tiaza. Tesis Doctoral, Universidad de la República

Las mejores condiciones para la sintesis del 5-metil selenazol **8** resultaron al utilizar NBS (1.1 equiv.), AIBN (0.1 equiv.), hv(1 h) y CCl₄, a temperatura ambiente (Entrada 6, Tabla 5.5), lo que permitió escalar la reacción y posteriormente trabajar en la derivatización de su estructura.

5.3.1c Derivatización del 5-bromometil selenazol 8

Una vez obtenido el 5-bromometil selenazol **8**, se centraron los esfuerzos en evaluar su reactividad frente a diferentes nucleófilos utilizándolo como modelo frente a la sustitución nucleofílica.

Geisler *et al.* estudiaron la derivatización de 4-halometil-2-amino selenazoles, por sustitución nucleofílica a nivel del metilo en posición 4. A la hora de la optimización de las condiciones de reacción, varios factores fueron claves como el tiempo y concentración de reactivos.^{4b} Así, prepararon una serie de selenazoles funcionalizados, por sustitución del 4-halometilo con diferentes nucleófilos, según se muestra en la Figura 5.13.



Figura 5.13 Derivatización del 4-halometil selenazoles

Ejemplos de este tipo de reacciones de derivatización para oxazoles en posición 5 se han descripto ampliamente en literatura. Recientemente, se prepararon bis oxazoles por reacción de 5-bromometil oxazoles con bencilamina.²⁷ En el mismo año, se describió la sustitución nucleofílica del iodovinílico del tetrahidroselenofeno con CuCN, en DMF con buen rendimiento.²²

Con estos antecedentes, se ensayó la reacción del 5-bromometil selenazol **8** con NaCN, en condiciones suaves de reacción, que permitió obtener el 5-cianometil selenazol **9** con 36% rendimiento, sustituyendo el bromo por un grupo ciano (Figura 5.14).



Figura 5.14 Derivatización del 5-bromometil selenazol 8 para obtener los derivados 9, 10 y 11

La formación de bis selenazoles, por *n*-alquilación del 5-bromometil selenazol **8** utilizando bencilamina como reactivo (Figura 5.14), dio el 100% conversión a los productos de monoalquilación **10** (27%) y el dialquilación **11** (11%). Esto es coincidente con la reactividad de la amina dialquilada, la cual resultaría más nucleofílica que la monoalquilada (BnNH₂), por lo que la reacción evolucionaría hacia la formación de **11**. Se debería trabajar en la optimización de las condiciones para lograr desplazar la reacción hacia este producto.

Con estos resultados, se confirma la reactividad y versatilidad del 5-bromometil selenazol **8** como interesante bloque de construcción para futuras derivatizaciones, hacia la preparación de bibliotecas químicas de selenazoles.

5.3.2 Evaluación biológica in vitro de selenazoles

5.3.2a Evaluación in vitro de selenazoles en epimastigotes de T. cruzi

Visto los interesantes resultados de los organoselenados preparados por nuestro grupo como agentes anti *T. cruzi*, se quiso realizar una evaluación fenotípica de los selenazoles frente a este parásito.

La evaluación biológica en T.*cruzi* fue realizada en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Carlos Robello, del Institut Pasteur Montevideo. Un grupo de selenazoles fue seleccionado para su evaluación en epimastigotes de T. *cruzi*, cepa Dm28c. Se evaluó su capacidad de inhibir el crecimiento de los parásitos, los cuales fueron incubados a diferentes concentraciones (entre o.8 μ M – 100 μ M) de selenazol, para así luego de 72 h obtener una curva dosis-respuesta que permitiera calcular el IC₅₀ (Tabla 5.6).



Compuesto	R ¹		IC ₅₀ (μM)
1C	p-CF ₃ Ph	Н	>100
1e	<i>p</i> -isopropilPh	Н	>100
1f	p-OMePh	Н	>100
1j		Н	>100
9	Ph	CN	>100
Bnz	-		12.5 ± 2.0

^aIC₅₀: Concentración de un compuesto que inhibe el 50% del crecimiento de epimastigotes comparado con un control; Bnz: Benznidazol, fármaco de referencia. Todos los valores están dados como promedios de un triplicado.

Tabla 5.6 IC₅₀ de selenazoles ensayados en epimastigotes de T. Cruzi (cepa Dm28c).

En todos los casos evaluados, los selenazoles resultaron poco activos como agentes tripanocidas de epimastigotes de *T. cruzi*, con IC_{50} superiores a 100 μ M. De esta manera, no se continuó con el ensayo del resto de la serie de compuestos sintetizados, pues mostraron ser significativamente menos activos que el Benznidazol.

5.3.2b Cribado Fenotípico

Históricamente, esta estrategia clásica ha sido la base para el descubrimiento de nuevos fármacos. Básicamente, los compuestos de interés se ensayan en modelos de enfermedad celular o animal para identificar compuestos que causan un cambio en el fenotipo deseable. Una vez determinados aquellos compuestos activos, se trabaja en determinar la diana biológica de los mismos.²⁹

5.3.2b 1 Evaluación in vitro de actividad antihelmíntica de selenazoles en N. Brasiliensis

Vista la diversidad de actividades biológicas descriptas en literatura para los selenazoles, se consideró su evaluación como antihelmínticos utilizando el nematodo *Nippostronglyus brasiliensis*. Esta instancia fue realizada en colaboración con la Prof. Jenny Saldaña del Laboratorio de Experimentación Animal CIENFAR, UdelaR. Se seleccionaron ciertos selenazoles, y el screening primario de los compuestos se realizó a [inhibidor] = 40 μ M, aplicando el protocolo descripto por Gordon *et al.*, en el estadío parasitante L4 de *N. braziliensis.*³⁰ El albendazol fue utilizado como control positivo, siendo su CE₅₀ = 0.34 μ M (concentración necesaria para matar el 50% de las larvas).



Compuesto	R ¹	R²	PM (%)
1C	p-CF ₃ Ph	Н	61
1e	<i>p</i> -isopropilPh	Н	63
1f	p-OMePh	Н	35
1j	Etil-p-OMePh	Н	51
9	Ph	CN	32

PM (%): Porcentaje de Muerte

Tabla 5.7 Actividad antihelmíntica de selenazoles en N. brasiliensis a [inhibidor] = 40 μ M

²⁹ Lee JA, Uhlik MT, Moxham CM, Tomandl D, Sall DJ (2012). Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy. J Med Chem 55: 4527–4538.

³⁰ Gordon S, Costa L, Incerti M, Manta E, Saldaña J, *et al.* (1997) Synthesis and in vivo antihelmintic activity against Nippostronglyus brasiliensis of new 2-amino-4-hidroxy-δ-valerolactam derivatives. Il Fármaco 52: 603-608

Los selenazoles fueron ensayados a una concentración 100 veces mayor al Albendazol, y el porcentaje de muerte de larvas fue moderado. No se lograron actividades antiparasitarias relevantes, por lo que los selenazoles no serían efectivos en este sentido. Por este motivo, no se continuó trabajando a menores concentraciones de selenazol.

5.3.2b 2 Evaluación in vitro de selenazoles en TGR

La búsqueda de nuevos fármacos y blancos de acción contra los parásitos platelmintos es de gran importancia, dada la escasez de drogas disponibles y la resistencia generada a la farmacoterapia utilizada.

El platelminto *Echinococcus granulosus* es responsable de la hidatidosis quística, la cual produce infecciones crónicas en mamíferos. Estos, al infectarlo están expuestos al stress oxidativo generado por la respuesta inmune de su hospedero y deben mantener un balance redóx celular adecuado para sobrevivir.

La caracterización reciente de los sistemas redóx en estos organismos ha evidenciado la presencia de un escenario bioquímico único.³¹ La homeostasis redóx del *E. granulosus* depende de una única enzima: los sistemas Trx y GSH están ligados mediante una enzima multifuncional conocida como tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), esencial para el parásito.

³¹ Salinas G, Selkirk Me, Chalar C, Maizels RM, Fernández C (2004) Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. TRENDS in Parasitology 20: 340-346



Figura 5.15 Vías de la tiorredoxina y del glutatión en platelmintos y en sus hospederos. GR: glutatión reductasa; TR: tiorredoxina reductasa

Los hospederos de los platelmintos (por ejemplo el ser humano) poseen sistemas independientes para la reducción del glutatión y de la tiorredoxina: la glutatión reductasa (GR) reduce al glutatión oxidado, en tanto la tiorredoxina reductasa (TR) reduce a la tiorredoxina oxidada. Estos sistemas tienen funciones solapantes y diferenciales. Los platelmintos carecen de GR y TR convencionales; poseen, en cambio, una única enzima, la TGR capaz de reducir tiorredoxina y glutatión oxidados. Todas las funciones dependientes de tiorredoxina y glutatión dependen de la TGR.

Existen descriptas en literatura diversas estructuras que inhiben dichos sistemas.³² El organoselenado Ebselen es un conocido sustrato de la tiorredoxina reductasa humana.³³ Visto que éste actúa como sustrato de TGR y considerando su similitud con los selenazoles, se quiso evaluar la actividad biológica de los derivados preparados en esta enzima.

³² (a) Rai G, Sayed AA, Lea WA, Luecke HF, Chakrapani H, *et al.* (2009) Structure Mechanism Insights and the Role of Nitric Oxide Donation Guide the Development of Oxadiazole-2-Oxides as Therapeutic Agents against Schistosomiasis. J Med Chem 52: 6474-6483; (b) Angelucci F, Sayed AA, Williams DL, Boumis G, Brunori M, *et al.* (2009) Inhibition of Schistosoma mansoni Thioredoxinglutathione Reductase by Auranofin: structural and kinetic aspects. J Biol Chem 284: 28977-28985; (c) Urig S, Fritz-Wolf K, Reau R, Herold-Mende C, Toth K (2006) Undressing of Phosphine Gold (I) Complexes as Irreversible Inhibitors of Human Disulfide Reductases. Angew Chem Int Ed 45: 1881-1886;

³³ Zhao R, Masayas H, Holmgren A (2002) Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. PNAS 13: 8579-8584

Se ensayó la actividad Tiorredoxina (TR) de la enzima TGR, dado que el flujo de electrones a través del módulo TR del la TGR es un paso obligado en todas sus actividades.³⁴ La actividad TR es dependiente de NADPH, por lo que la catálisis enzimática estaría acompañada de una caída en NADPH, con la consiguiente reducción de TR y formación de NADP+.

De esta manera, para evaluar la actividad de los selenazoles como sustrato, se midió la actividad enzimática a 340 nM, longitud de onda a la cual se puede detectar la caída del NADPH. Para ello, se trabajó a [TGR] = 20 nM, concentración de enzima que permita ver el cambio en el curso temporal de la catálisis y [selenazol] = 5 mM, concentración a la cual el DTNB, sustrato no fisiológico de la enzima a expensas del NADPH, cataliza su actividad enzimática. Los resultados mostraron una ausencia de catálisis enzimática, al no haber caída de NADPH, inclusive a [selenazol] = 100 μ M, y por lo tanto, los selenazoles no actuarían como sustrato de TGR.

Por otro lado, se consideró evaluar la actividad inhibitoria de estos organoselenados en TGR. Para ello se empleó el método del DTNB,³⁵ donde la velocidad de reacción enzimática es determinada a partir del aumento en la absorbancia a 412 nm debido a la producción de ácido-5-tionitrobenzoico (TNB) por reducción del acido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman).

Dado que en muchos casos los inhibidores actúan sobre la forma reducida de la enzima, y que la unión de ellos a la enzima puede ser lenta, lo inhibidores fueron preincubados con ésta en presencia de NADPH, y la reacción se inició por el agregado de sustrato (DTNB). Se seleccionaron ciertos derivados para ser evaluados en TGR, [enzima] = 2 nm y [selenazol] = 100 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 5.8.

³⁴ Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, *et al.* (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. J Biol Chem 283: 17898-17907

³⁵ Arner ESJ, Sarioglu H, Lottspeich F, Holmgren A, Böck A (1999) High-level expression in Escherichia coli of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterialtype SECIS elements and co-expression with the selA, selB and selC genes. J Mol Biol 292: 1003-1016



Compuesto	R ¹	R ²	PIE (%)
1a	1a Ph		27
1b	<i>p</i> -BrPh	Н	40
1C	p-CF ₃ Ph	Н	42
1e	<i>p</i> -isopropilPh	Н	26
1f	<i>p</i> -OMePh		24
1j	Etil- <i>p</i> -OMePh	Н	33
9	Ph	CN	17

PIE (%): Porcentaje de inhibición enzimática

Tabla 5.8 Porcentaje de inhibición enzimática de selenazoles en TGR, [enzima] = 2 nM, [selenazol] = 100 μM

Nuestros resultados muestran una caída en la actividad enzimática de TGR, pero no es significativa considerando la elevada concentración de selenazol utilizada. Por ello, no se consideró continuar trabajando en el screening de estos compuestos.

5.4 Conclusiones

- Se desarrolló una nueva metodología para la preparación de selenazoles 2,5disustituídos, vía cicloisomerización de propargil selenoamidas. Estas fueron preparadas *in situ* utilizando LiAIHSeH, con la posterior ciclación espontánea para dar los selenazoles correspondientes.

- Se prepararon 10 selenazoles **1a-j**, utilizando reactivos comercialmente disponibles, con rendimientos moderados a buenos (20-80%), lo que demuestra la robustez de la síntesis, la cual tolera sustituyentes alquilo y arilo.

- Pese a existir reportes en torno a la obtención de oxazoles por cicloisomerización de propargil amidas no terminales, en las condiciones de reacción optimizadas por el grupo no fue posible obtener los selenazoles correspondientes. Esto sería una limitante a la metodología puesta a punto.

- Se trabajó en el estudio del proceso de cicloisomerización utilizando I₂ y NBS como electrófilos. En ambos casos, se logró obtener las 5-halometil selenazolinas deseadas 5 y 7, pero estas no isomerizaron espontáneamente a sus correspondientes selenazoles 6 y 8.

- El 5-metil selenazol **1a** fue utilizado como material de partida para la síntesis de 5bromometil selenazol **8**, por bromación radicalaria con NBS y hu. Este, se tomó como bloque de construcción para futuras derivatizaciones. Particularmente, el 5-cianometil selenazol **9** y los productos de mono y dialquilación **10** y **11**, respectivamente, fueron obtenidos a partir del selenazol **8**.

 El trabajo sintético presentado ha sido publicado en una revista científica arbitrada (7. Anexo).³⁶

- Una serie de selenazoles fue evaluada como antiparasitarios contra T. cruzi y N. Brasiliensis, así como su actividad biológica en la enzima TGR. Su actividad antiparasitaria así como la actividad biológica en TGR resultaron poco significativas.

³⁶ Pizzo C, Mahler SG (2014) Synthesis of Selenazoles by in Situ Cycloisomerization of Propargyl Selenoamides Using Oxygen–Selenium Exchange Reaction. J Org Chem 79: 1856–1860

5.5 Parte experimental

5.5.1 Preparación de selenazoles

LiAlHSeH 0.1 M

El procedimiento de preparación del Reactivo de Ishihara ya fue descripto en la parte experimental 3.5 del capítulo 3.

5.3.1a Síntesis de 5-metil selenazoles a partir de propargil amidas terminales



Preparación de 5-metil selenazoles 1a-j

La preparación de 1a es representativa

2-fenil-5-metil selenazol (1a). Se adicionó lentamente PCl₅ (291 mg, 1.4 mmol) y DMF (0.016 mL, 0.03 mmol) a una solución de N-(prop-2-inil)benzamida **2a** (0.70 mmol) en PhMe seco (3.5 mL), y la solución quedó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó, a temperatura ambiente, una solución de LiAlHSeH recién preparada (1 mmol, 10 mL, 0.1 M) y la mezcla de reacción quedó en agitación a la misma temperatura por 1 h. Se le adicionó acetato de piperidonio (102 mg, 0.7 mmol) y la reacción se reflujó durante 2 h, y luego quedó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad, y el residuo se volcó en agua (50 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con AcOEt (5 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **1a** (89 mg, 74%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.58 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 7.39-7.42 (m, 3H), 7.48 (c, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.83-7.85 (m, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.8, 126.8, 129.0, 129.9, 136.6, 141.3, 142.3, 173.9; HRMS calculado para C₁₀H₁₀NSe [M + H]⁺ 223.99000, valor encontrado 223.99100.

2-(p-bromofenil)-5-metil selenazol (1b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando *p*-bromo-N-(prop-2-in-1-il)benzamida **2b**. El

residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **1b** (148 mg, 70%) como un sólido amarillo: PF = $82.3-84.1^{\circ}$ C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.59 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.46 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.9, 124.1, 128.2, 132.2, 135.7, 142.0, 142.6, 172.5; HRMS calculado para C₁₀H₉BrNSe [M + H]⁺ 301.90050, valor encontrado 301.90300.

2-(p-(trifluorometil)fenil)-5-metil selenazol (1c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando N-(prop-2-in-1-il)-*p*-(trifluorometil)benzamida **2c.** El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **1c** (111 mg, 55%) como un sólido amarillo: PF 109.0–111.6°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.62 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.53 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.9, 124.1 (c, *J*_{CF3} = 271 Hz), 126.1 (c, *J*_{CF3} = 4 Hz), 127.0, 131.5 (c, *J*_{CF3} = 32 Hz), 139.8, 142.9, 143.0, 171.9; HRMS calculado para C₁₁H₉F₃NSe [M + H]⁺ 291.97740, valor encontrado 291.97440.

2-(m-clorofenil)-5-metil selenazol (1d). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando *m*-cloro-N-(prop-2-in-1-il)benzamida **2d**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 8:1) para dar **1d** (75 mg, 42%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.61 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.31-7.38 (m, 2H), 7.49 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.69 (dt, *J* = 1.6, 7.3 Hz, 1H), 7.85 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.9, 125.0, 126.6, 129.8, 130.3, 135.1, 138.4, 142.4, 142.7, 172.0; HRMS calculado para C₁₀H₉CINSe [M + H]⁺ 257.95100, valor encontrado 257.95400.

2-(p-isopropilfenil)-5-metil selenazol (1e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando *p*-isopropil-N-(prop-2-in-1-il)benzamida **2e**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 4:1) para dar **1e** (112 mg, 61%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 2.58 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H) 2.93 (hept, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.8, 23.9, 34.1, 126.8, 127.1, 134.5, 140.6, 142.2, 151.0, 174.0; HRMS calculado para C₁₃H₁₆NSe [M + H]⁺ 266.03690, valor encontrado 266.03990.

2-(p-metoxifenil)-5-metil selenazol (1f). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando *p*-metoxi-N-(prop-2-in-1-il)benzamida **2f**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **1f** (115 mg, 88%) como un sólido blanco: PF = 65.2–66.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.57 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.40 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.9, 55.5, 114.4, 128.2, 129.8, 140.2, 142.1, 161.1, 173.7; HRMS calculado para C₁₁H₁₂NOSe [M + H]⁺ 254.00060, valor encontrado 254.00360.

2-etil-5-metil selenazol (1g). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando N-(prop-2-in-1-il)propionamida **2g**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **1f** (31 mg, 25%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.51 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 2.96 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.22 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.8, 30.7, 140.1, 140.3, 179.5; HRMS calculado para C₆H₁₀NSe [M + H]⁺ 175.99000, valor encontrado 175.99020.

2-isopropil-5-metil selenazol (1h). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando N-(prop-2-inil)isobutiramida **2h**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 6:1) para dar **1h** (31 mg, 23%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.51 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 3.21 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.24 (c, *J* = 1.4 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.8, 23.7, 36.6, 139.7, 140.2, 185.2; HRMS calculado para C₇H₁₂NSe [M + H]⁺ 190.00570, valor encontrado 190.00350.

2-(tert-butil)-5-metil selenazol (1i). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando N-(prop-2-in-1-il)pivalamida **2i**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 10:1) para dar **1i** (29 mg, 20%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.40 (s, 9H), 2.51 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.24 (c, *J* = 1.3 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.7, 31.3, 40.5, 139.7, 140.3, 188.4.; HRMS calculado para C₈H₁₃NSe [M]⁺ 203.02130, valor encontrado 203.02370.

2-(p-metoxibenzil)-5-metil selenazol (1j). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para el selenazol **1a**, utilizando 2-(*p*-metoxifenil)-N-(prop-2-in-1·il)acetamida **2j**. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **1j** (67 mg, 36%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.47 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.27 (c, *J* = 1.4 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 14.7, 42.6, 55.4, 114.3, 130.3, 130.8, 140.7, 141.4, 158.8, 178.1; HRMS calculado para C₁₂H₁₄NOSe [M +H]⁺ 268.01620, valor encontrado 268.01750.

Preparación de propargil amidas terminales 2a-c, 2h-i, 2k.¹³



La preparación de **2a** es representativa

N-(prop-2-inil)benzamida (2a). Se adicionó cloruro de benzoilo (1.8 mL, 20 mmol) y Et₃N (2.8 mL, 20 mmol) a una solución de propargil amina (1.0 mL, 20 mmol) en CH₂Cl₂ (40 mL), a 0°C. La reacción quedó en agitación durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se ajustó a pH 6-7 con solución de HCl 1.0 M y la mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con Brine, se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron, para dar **2a** (2.0 g, 64%) como un sólido amarillento: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 6.34 (bs, 1H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.50-7.54 (m, 1H), 7.79 (dd, J = 1.3, 8.3 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 71.9, 79.6, 127.2, 128.7, 131.9, 133.8, 167.3.

p-bromo-N-(prop-2-in-1-il)benzamida (2b). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida 2a, utilizando cloruro de *p*-bromo benzoilo para dar 2b (1.8 g, 95%) como un sólido naranja: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.30 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 6.24 (bs, 1H), 7.56-7.60 (m, 2H), 7.62-7.68 (m, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 30.0, 72.2, 79.3, 126.7, 128.8, 132.0, 132.6, 166.3.

N-(prop-2-in-1-il)-p-(trifluorometil)benzamida (2c). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2a**, utilizando cloruro de *p*-trifluorometil benzoilo para dar **2c** (0.82 g, 90%) como un sólido amarillento: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.30 (t, J = 2.6 Hz, 1H). 4.27 (dd, J = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 6.48 (s, 1H), 7.70 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 30.1, 72.4, 79.4, 123.7 (c, $J_{CF3} = 272$ Hz), 125.9 (c, $J_{CF3} = 4$ Hz), 127.7 (c, $J_{CF3} = 1$ Hz), 133.7 (c, $J_{CF3} = 31$ Hz), 137.1, 167.0.

N-(prop-2-in-1-il)isobutiramida (2h). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2a**, utilizando cloruro de isobutirilo para dar **2h** (1.1 g, 83%) como un sólido naranja: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.21 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.37 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.03 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 5.87 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 19.6, 29.1, 35.3, 71.5, 79.8, 176.7.

N-(*prop-2-in-1-il*)*pivalamida* (*2i*). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2a**, utilizando cloruro de pivaloilo para dar **2i** (1.1 g, 99%) como un sólido amarillento: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.21 (s, 9H), 2.23 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 2.6, 5.1 Hz, 2H), 5.77 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 27.4, 29.4, 38.6, 71.6, 79.8, 178.1.

N-(prop-2-in-1-il)cinnamamida (2k). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2a**, utilizando cloruro de cimaoilo para dar **2k** (1.3 g, 90%) como un sólido naranja: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.20 (dd, *J* = 2.6, 5.3 Hz, 2H), 5.80 (bs, 1H), 6.39 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.35-7.40 (m, 3H), 7.50 (dd, *J* = 3.1, 6.5 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.5, 71.8, 79.4, 119.7, 127.9, 128.8, 128.9, 134.6, 142.0, 165.5.

Preparación de propargil amidas terminales 2d-g, 2j.^{20b}



La preparación de 2d es representativa

m-cloro-N-(prop-2-in-1-il)benzamida (2d). Se adicionó cloroformiato de etilo (0.30 mL, 3.2 mmol) y trietilamina (0.44 mL, 3.2 mmol) a una solución de ácido *m*-clorobenzoico (500 mg, 3.2 mmol) en THF seco, en baño de hielo. Luego de transcurrido 1 h aproximadamente, por TLC se detectó la formación del anhídrido y se adicionó propargil amina (0.25 mL, 3.8 mmol) sobre la mezcla de reacción, la cual quedó en agitación a temperatura ambiente. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad, y al residuo se le adicionó AcOEt (50 mL) y se lavó con NaHCO₃ 10% (10 mL), H₂O (10 mL), HCl 5% (10 mL) y H₂O (10 mL) nuevamente. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 2:1) para dar **2d** (355 mg, 57%) como un sólido blanco: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.29 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.63– 7.67 (m, 1H), 7.78 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.9, 72.2, 79.1, 125.1, 127.4, 130.0, 131.9, 134.9, 135.5, 165.8.

p-isopropil-N-(prop-2-in-1-il)benzamida (2e). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2d**, utilizando ácido *p*-isobutilrilbenzoico. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (CHCl₃/AcOEt 6:1) para dar **2e** (168 mg, 28%) como un aceite: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.26 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.28 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.95 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 6.28 (bs, 1H), 7.31 (d, *J* = 4 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 4 Hz, 2H).

p-metoxi-N-(prop-2-in-1-il)benzamida (2f). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2d**, utilizando ácido *p*-metoxibenzoico. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **2f** (196 mg, 17%) como un sólido blanco: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.28 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.24 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.8, 55.5, 71.8, 79.7, 113.8, 125.9, 128.9, 162.4, 166.6.

N-(prop-2-in-1-il)propionamida (2g). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2d**, utilizando ácido propiónico. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 4:1) para dar **2g** (0.63 g, 85%) como un sólido amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.20-2.26 (m, 3H), 4.05 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 5.71 (bs, 1H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 9.6, 29.2, 29.4, 71.5, 79.7, 173.4.

2-(p-metoxifenil)-N-(prop-2-in-1-il)acetamida (2j). Se preparó siguiendo el procedimiento representativo para la propargil amida **2d**, utilizando ácido 2-(*p*-metoxifenil) acético. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 4:1) para dar **2j** (188 mg, 31%) como un sólido amarillento: ¹H RMN (CDCl₃) δ 2.19 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.01 (dd, *J* = 2.6, 5.2 Hz, 2H), 5.56 (bs, 1H), 6.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 29.3, 42.6, 55.3, 71.6, 79.4, 114.5, 126.2, 130.6, 159.0, 171.0.

Preparación de propargil amidas no terminales 21-m.



N,N'-(hexa-2,4-diene-1,6-diel)dibenzamida (21).³⁷ Se adicionó $Cu(OAc)_2.H_2O$ (63 mg, 0.3 mmol) y piperidina (0.3 mL) a una solución de N-(prop-2-inil)benzamida **2a** (500 mg, 3.1 mmol) en CH_2Cl_2 (6 mL). La mezcla de reacción se dejó agitando a presión atmosférica, en recipiente abierto, durante la noche. Luego, esta se filtró por celite y se concentró el filtrado a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 1:1) para dar **2l** (110 mg, 22%) como un sólido naranja: ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 4.18 (d, *J* = 5.4 Hz, 4H), 7.46-7.50 (m, 4H), 7.53-7.57 (m, 2H), 7.84-7.86 (m, 4H), 9.00 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 29.6, 66.3, 76.8, 127.7, 128.9, 132.0, 134.0, 166.5.



4-benzamido-1-(p-clorofenil)but-2-in-1-il p-bromobenzoato (2m).³⁸ Se adicionó Et₃N (0.07 mL, 0.5 mmol), 4-dimetilamino-piridina (2.1 mg, 0.02 mmol) y cloruro de *p*-bromobenzoilo (81 mg, 0.4 mmol), a una solución de 4-(*p*-clorofenil)-4-hidroxi-2-butinil benzamida³⁹ (100 mg, 0.3 mmol) en CH₂Cl₂ (2.0 mL). La solución resultante se agitó durante 20 min a temperatura ambiente, y posteriormente se concentró a vacío. Se lavó con NaHCO₃ (ac) hasta lograr un pH aproximadamente neutro, se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró vacío. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 3:1) para dar **2m** (122 mg, 76%) como un aceite: ¹H RMN (CDCl₃) δ 4.40 (dt, *J* = 1.6, 5.2 Hz, 2H), 6.30 (bs, 1H), 6.66 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.49- 7.55 (m, 3H), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 30.1, 65.8, 79.8,

³⁷ Balaraman K, Kesavan V (2010) Efficient Copper(II) Acetate Catalyzed Homo- and Heterocoupling of Terminal Alkynes at Ambient Conditions. Synthesis 20: 3461-3466

³⁸ Nicolaou KC, Montagnon T, Vassilikogiannakis G, Mathison CJN (2005) The Total Synthesis of Coleophomones B, C, and D. J Am Chem Soc 127: 8872-8888

³⁹ Fue preparado por la QF. Lucía Castellano, en el contexto de su trabajo experimental según ref 13

83.9, 127.1, 128.4, 128.8, 128.9, 129.1, 129.3, 131.5, 132.0, 132.0, 133.8, 135.2, 135.3, 164.8, 167.2; HRMS calculado para $C_{24}H_{17}BrCINO_3 [M]^+$ 481.00800, valor encontrado 481.00500.



5-metilen-2-fenil-4,5-dihidro-1,3-selenazol (4a). Se adicionó lentamente PCl₅ (291 mg, 1.4 mmol) y DMF (0.016 mL, 0.03 mmol) a una solución de N-(prop-2-inil)benzamida **2a** (0.70 mmol) en PhMe seco (3.5 mL). La solución quedó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó a temperatura ambiente una solución de LiAlHSeH recién preparada (1 mmol, 10 mL, 0.1 M), y la mezcla de reacción quedó en agitación a la misma temperatura durante la noche. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad, y el residuo se volcó en agua (50 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con AcOEt (5 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (n-hexanos/AcOEt 5:1) para dar **4a** (108 mg, 70%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 5.18 (t, *J* = 2.7 Hz, 2H), 5.32 (dd, *J* = 2.7, 4.6 Hz, 1H), 5.60 (dd, *J* = 2.7, 4.6 Hz, 1H), 7.40-7.49 (m, 3H), 7.69 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 75.8, 108.0, 128.7, 128.8, 131.4, 135.5, 149.2, 166.4; HRMS calculado para C₁₀H₁₀NSe [M + H]⁺ 223.99000, valor encontrado 223.99300.

5.5.1b Síntesis de 5-halometil selenazoles



(E)-5-(iodometilen)-2-fenil-4,5-dihidroselenazol (5). Se adicionó lentamente PCI_5 (291 mg, 1.4 mmol) a una solución de N-(prop-2-inil)benzamida 2a (0.70 mmol) en CH_2CI_2 seco (3.5 mL), a -10°C y la solución quedó en agitación durante 30 min. Posteriormente, se le adicionó una solución de LiAlHSeH recién preparada (1 mmol) y la mezcla de reacción quedó en agitación a la misma temperatura por 1 h. A continuación, se le adicionó I_2 (267 mg, 1.0 mmol) y la reacción quedó en agitación durante la noche a -10°C. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se volcó en agua (50 mL), se ajustó a pH 7 con NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con AcOEt (5 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 5:1) para dar 5 (29 mg, 12%) como un aceite amarillo: ¹H RMN (CDCl₃) δ 5.08 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 6.16 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.41-7.49 (m, 3H), 7.65-7.68 (m, 2H); ¹³C RMN δ

 $(CDCl_3)$ 62.9, 79.7, 128.5, 128.9, 131.7, 135.4, 146.7, 166.0; HRMS calculado para $C_{10}H_8INSe [M]^+$ 348.88660, valor encontrado 348.88690.

Método GC-MS para el seguimiento de la isomerización



Equipo GCMS = QP2010 Ultra Shimadzu, Columna HP-5 MS, diámetro (0.25 mm), espesor de film (0.254 mm), largo de la columna (30 mts).

Rampa de calentamiento: t (0 min) = 150° C; t (5 min) = 20° C/min hasta 250° C; t (10-15 min) = 250° C; t (15 min) = 10° C/min hasta 300° C; t (20-40 min) = 300° C.



5-(bromometil)-2-fenilselenazol (8). Se adicionó lentamente NBS (529 mg, 3.0 mmol) y AIBN (49 mg, 0.3 mmol) a una solución del selenazol **1a** (600 mg, 2.7 mmol) en CCl₄ (45 mL). La solución se irradió con hu durante 1 h (200 W, lámpara de tugnsteno), utilizando un baño de hielo para evitar sobrecalentamiento. En estas condiciones, quedó protegida de la luz y en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, se filtró la succinimida formada y se concentró la solución del filtrado a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 3:1) para dar **8** (554 mg, 68%) como un sólido blanco: PF 80.6–82.0°C; ¹H RMN δ (CDCl₃) 4.82 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H), 7.40-7.45 (m, 3H), 7.76 (t, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 1.6, 7.9 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 26.6, 127.0, 129.3, 130.8, 136.3, 143.1, 144.2, 177.4; HRMS calculado para C₁₀H₉NSe [M – Br+ H]⁺ 222.90050, valor encontrado 222.90280.

5.5.1c Derivatización del 5-bromometil selenazol 8



5-(cianometil)-2-fenilselenazol (9). Se adicionó lentamente NaCN (39 mg, o.60 mmol) a una solución de 5-(bromometil)-2-fenilselenazol 8 (150 mg, o.5 mmol), en DMF (10 mL) a o°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 h, se volcó en agua y se extrajo con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*-hexanos/AcOEt 4:1) para dar 9 (38 mg, 36%) como un sólido amarillo: PF 76.8–78.0°C; ¹H RMN (CDCl₃) δ 4.02 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 7.41-7.47 (m, 3H), 7.72 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 1.7, 7.8 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 18.7, 116.7, 127.1, 129.3, 130.9, 132.4, 135.9, 144.2, 176.8; HRMS calculado para C₁₀H₁₀NSe [M – CN + H]⁺ 223.99000, valor encontrado 223.99260.



N-bencil-1-(5-fenil-1,3-selenazol-2-il)metanamina (11). Se adicionó 5-(bromometil)-2fenilselenazol **8** (100 mg, 0.33 mmol) a una solución de bencilamina (18 mg, 0.17 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL). La mezcla de reacción se reflujó durante 4 h y quedó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se removió el disolvente a presión reducida hasta sequedad y el residuo se volcó en agua (50 mL), se ajustó a pH 7-8 con HCl 5% y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), filtraron y concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en SiO₂ (*n*hexanos/AcOEt 4:1) para dar **10** (30 mg, 27%) como un aceite amarillo y **11** (20 mg, 11%) como un aceite incoloro:

10: ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.87 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 7.28-7.30 (m, 1H), 7.35 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H), 7.41-7.43 (m, 3H), 7.64 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 3.2, 6.4 Hz, 2H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 47.5, 52.9, 126.9, 127.3, 128.3, 128.7, 129.1, 130.2, 136.8, 139.8, 141.4, 147.1, 175.1; HRMS calculado para C₁₇H₁₆N₂Se [M]⁺ 328.04790, valor encontrado 328.05090.

11: ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.75 (s, 2H), 3.91 (s, 4H), 7.29 (dt, *J* = 1.8, 4.5 Hz, 1H), 7.35-7.38 (m, 2H), 7.40 (s, 2H), 7.42 (tt, *J* = 1.8, 3.7 Hz, 6H), 7.66 (s, 2H), 7.87-7.90 (m, 4H); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 51.9, 57.6, 126.9, 127.6, 128.7, 128.8, 129.1, 130.3, 136.7, 138.3, 142.2, 145.8, 175.6; HRMS calculado para C₂₇H₂₃N₃Se₂ [M + H]⁺ 550.02220, valor encontrado 550.02520.

5.5.2 Evaluación biológica in vitro de selenazoles

5.5.2a Evaluación in vitro de selenazoles en epimastigotes de T. cruzi

El procedimiento de evaluación *in vitro* en epimastigotes de *T. cruzi* es análogo al descripto en la parte experimental 3.5 del capítulo 3.

5.3.2b Cribado Fenotípico

5.3.2b 2 Evaluación in vitro de selenazoles en TGR

Ensayo de actividad enzimática de TR, utilizando selenazoles como sustrato

La actividad de los selenazoles como sustratos de TGR fue seguida por disminución en la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH. La absorbancia se midió utilizando el espectrofotómetro PG-T70+ (PG Instruments, UK), conectada a un centro de control de temperatura. Las mezclas de reacción (1 mL) fueron preparadas conteniendo NADPH 150 μ M, selenazol 5 mM, EDTA 10 mM, y la enzima EgTGRWT 20 nM, en 0.1 M de buffer fosfato de potasio. Las soluciones stock de selenazol fueron preparadas en DMSO, concentración final 50 mM. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Ensayo de inhibición enzimática de TR utilizando selenazoles

La actividad TR fue evaluada utilizando el ensayo de reducción de DTNB ya mencionado.³⁵La reducción NADPH-dependiente del 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) fue seguida por aumento en la absorbancia a 412 nm, debido a la formación de 5-tionitrobenzoico a 25°C, (ε = 13.6 mM⁻¹cm⁻¹). La absorbancia se midió utilizando el espectrofotómetro PG-T70+ (PG Instruments, UK), conectada a un centro de control de temperatura. Las mezclas de reacción (1 mL) fueron preparadas conteniendo NADPH 150 µM, DTNB 5 mM, EDTA 10 mM, selenazol 100 µM y la enzima EgTGRWT 2 nM, en 0.1 M de buffer fosfato de potasio. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado de DTNB. Las soluciones stock de selenazol fueron preparadas en DMSO, concentración final 50 mM. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.













 $<^{2.61}_{2.60}$











5. Selenazoles



E Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo





5. Selenazoles



Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo


5. Selenazoles



Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo



165 160

 140 135 130

125 120 115

110 105



Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo









Tesis Doctoral QF. Chiara Pizzo







Capítulo 6:

Conclusiones generales y Perspectivas

6.1 Conclusiones Generales

• Se trabajó en la búsqueda de inhibidores de Cruzipaína (Cz), la principal cisteín proteasa de T. cruzi utilizando diferentes herramientas de diseño: I) Screeening Virtual y II) Reemplazo Isostérico.

I) El Screening Virtual predijo una serie de compuestos del tipo hidrazolil tiazolidinonas como buenos inhibidores enzimáticos. Estos fueron sintetizados y resultaron poco inhibidores de Cz (PIE < 75% a [inhibidor] = 100 μ M) y con actividad antiproliferativa sobre *T. cruzi,* cepa Tulahuen 2 (PIC < 60% a [inhibidor] = 50 μ M). De esta manera, el modo de acción propuesto para estos compuestos se basaría en un mecanismo diferente y no por inhibición de Cz (Figura 6.1 A).

II) El *reemplazo isostérico* fue realizado sobre tiosemicarbazonas, preparándose selenosemicarbazonas, que resultaron muy buenos inhibidores enzimáticos (K_1 del orden nM). Como agentes tripanocidas, el compuesto más promisorio resultó **2a (capitulo 3)** IC₅₀ = 1.2 μ M (en epimastigote, cepa Dm28c) y en el estadio amastigote, PIC = 70%, [**2a**] = 2.4 μ M. El ensayo *in vivo* de este derivado en modelo murino de Chagas agudo mostró un perfil de parasitemia menor que para los ratones no tratados, para un tratamiento de 20mg/kg ratón/día, pero resultaron tóxicos a 50mg/kg ratón/día (Figura 6.1 B).

• Se describió un off-target para las selenosemicarbazonas, las cuales resultaron buenos inhibidores de la Catepsina b (Cb), cisteín proteasa presente en *T. cruzi* que surgiría como mecanismo de resistencia a inhibidores de este tipo de enzima.

• Se desarrolló una nueva metodología sintética para la preparación de selenosemicarbazonas, a partir de semicarbazonas utilizando el Reactivo de Ishihara (LiAlHSeH) (Figura 6.1 C), y con ella se obtuvo una serie de derivados con rendimientos moderados.

• Se preparó una serie de heterociclos organoselenados de 5 miembros parcialmente insaturados: hidrazolil selenazolidinonas y selenazolinonas. Estos compuestos fueron obtenidos por adición de Michael de selenosemicarbazonas y selenoureas sobre acetilendicarboxilato y/o maleimida. Particularmente, el derivado hidrazolil selenazolidinona **3b** (**capítulo 4**) resultó levemente inhibidor de Cz (PIE = 49%, a [**3b**] = 50 μ M) y las selenazolidinonas resultaron buenos agentes tripanocidas, siendo el compuesto más promisorio la selenazolidinona **6a** (**capítulo 4**), IC₅₀ = 3.7 μ M (epimastigote, cepa Dm28c) (Figura 6.1 D). El mecanismo detrás de la actividad anti *T. cruzi* de **6a** no sería por inhibición de Cz, ya que en las condiciones ensayadas no mostró actividad inhibitoria enzimática. Estos compuestos son un buen punto de partida para realizar futuros REA y estudios de toxicidad.

 Se describió un nuevo alcance del Reactivo de Woollins, para la reducción selectiva de olefinas exo a tiazolidinonas conjugadas con un éster, obteniéndose una serie de análogos reducidos con buenos rendimientos (Figura 6.1 E).

• Se logró el intercambio O-Se a nivel de la amida exocíclica de la hidrazolil tiazolidinona **12f (capítulo 4)**, utilizando el Reactivo de Woollins, para dar la selenoamida correspondiente **15f** (Figura 6.1 F). Este *reemplazo isostérico* parece no mejorar la actividad inhibitoria en Cz, respecto a su análogo oxigenado.

• Se desarrolló una nueva metodología para la preparación de selenazoles 2,5disustituídos. Estos se obtuvieron a partir de propargil amidas terminales y utilizando LiAIHSeH, permitiendo el intercambio O-Se, con la posterior ciclación espontánea. Algunos de ellos fueron evaluados como antiparasitarios contra *T. cruzi* y *N. Brasiliensis,* así como su actividad biológica en la enzima TGR, resultando poco significativas en ambos casos (Figura 6.1 G).



Inh: inhibidor; IC₅₀: determinada en epimastigote de T. cruzi; PIE: Porcentaje de Inhibición Enzimática; PIC: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de amastigotes

Figura 6.1 Resúmen de resultados obtenidos en el trabajo presentado.

Como resumen de los resultados biológicos obtenidos en el trabajo presentado, la selenosemicarbazona **2a (capítulo 3)** resultó ser el compuesto con el mejor perfil de actividad biológica *in vitro* en T. *cruzi*. En modelo murino de Chagas agudo resultó tóxico en las condiciones ensayadas. La selenazolidinona **6a (capítulo 4)** mostró actividad anti T. *cruzi* del orden de la desarrollada por la selenosemicarbazona más activas, pero resulto químicamente más estable.

Como resumen de los resultados sintéticos obtenidos en el trabajo presentado, se logró establecer nuevas metodologías para la preparación de compuestos organoselenados: selenosemicarbazonas a partir de semicarbazonas y selenazoles a partir de propargil amidas, en ambos casos utilizando el Reactivo de Ishihara (LiAIHSeH).

A partir de hidrazolil tiazolidinonas α,β insaturadas a ésteres se logró reducir selectivamente la olefina utilizando el Reactivo de Woollins (RW). De esta manera, se encontró un nuevo alcance en la reducción de dobles enlaces utilizando dicho reactivo.

6.2 Perspectivas

Optimización de la actividad tripanocida de selenosemicarbazonas

Visto que los derivados selenosemicarbazonas resultaron activos en *T. cruzi in vitro*, pero tóxicos a concentraciones elevadas en modelo murino de Chagas agudo, podrían evaluarse los mismos en un modelo de Chagas crónico. También, podría considerarse su coadministración con Benznidazol, en el modelo murino ya ensayado, lo que permitiría trabajar a menores concentraciones de ambos compuestos, donde no resulten tóxicos.

Recientemente, Moreira *et al.* prepararon una serie de tiosemicarbazonas aromáticas que incorporan un espaciador entre el de sustituyente fenilo y la tiosemicarbazona. Estos compuestos mostraron mantener o potenciar la actividad anti *T. cruzi*, en comparación con los análogos que no lo presentan. Aquellas más promisorias en el parásito, no resultaron activas en cruzaína, sugiriendo que el modo de acción de estos compuestos no sería por inhibición enzimática. Por el contrario, determinaron que inducen la apoptosis celular en *T. cruzi* (Figura 6.2).¹



Figura 6.2 Nueva tiosemicarbazona con actividad anti T. cruzi

Se podrían preparar una serie de análogos del tipo selenosemicarbazona de acuerdo a lo detallado en la Figura 6.3 y considerar su evaluación biológica en el parásito *T. cruzi*.



Figura 6.3 Secuencia sintética hacia la obtención de selenosemicarbazonas. Ar: aromático

¹ Moreira DRM, Travassos de Oliveira AD, Teixeira de Moraes Gomes PA, de Simone CA, Silva Villela F, *et al.* (2014) Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. Eur J Med Chem 75: 467-478

Determinación del origen de la toxicidad de selenosemicarbazonas

Se ha discutido que las selenosemicarbazonas son inestables en solución; al cabo de unos días, se visualiza un precipitado negro, presumible Se(o). Para minimizar este efecto, se determinará la velocidad de descomposición de los compuestos y se cuantificaran los componentes de la mezcla. Así, se determinará su influencia en los análisis biológicos en *T. cruzi* y la toxicidad en células Vero.

Disminución de la toxicidad de selenosemicarbazonas

La actividad biológica de semicarbazonas y tiosemicarbazonas ha sido ampliamente estudiada. Este tipo de estructuras pueden actuar como ligandos de diferentes metales formando complejos, los cuales en muchos casos potencian su actividad biológica.² Esta, ha sido atribuida en mayor parte a sus propiedades quelantes.³

Análogamente a los derivados de S y O, las selenosemicarbazonas muestran varios modos de coordinación. Pueden actuar como ligandos monodentados (vía coordinación con Se o N terminal) o bidentados (vía coordinación C=N y Se). En este sentido, se ha descripto la síntesis y caracterización de más de 200 complejos de selenosemicarbazonas con metales.⁴ Se ha visto que la unión de selenosemicarbazonas a metales *d* sinergiza la actividad biológica; particularmente, pueden mostrar un aumento en la actividad citotóxica⁵ como es el caso de los descriptos por Gligorijevic *et al.*,^{4b} y Srdic-Rajic *et al.*,⁶ (Figura 6.4).

² (a) Beraldo H, Gambino D (2004) The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. Mini Rev Med Chem 4: 31-9; (b) Lobana TS, Sharma R, Bawa G, Khanna S (2009) Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview. Coord Chem Rev 253: 977–1055

³ (a) West DX, Liberta AE, Padhye SB, Chikate RC, Sonawane PB, *et al.* (1993) Thiosemicarbazone complexes of copper (II): structural and biological studies. Coord Chem Rev 123: 49-71; (b) Pelosi G (2010) Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. Open Crystallogr J 3: 16-28

⁴ (a) Todorović TR, Bacchi A, Pelizzi G, Juranić NO, Sladić DM, *et al.* (2006) Synthesis and characterization of Zn(II) and Cd(II) complexes with 2,6-diacetylpyridine-bis(selenosemicarbazone). Crystal structure of a Ni(II) complex with a modified 2,6-diacetylpyridine-bis(selenosemicarbazone). Inorg Chem Commun 9: 862–865; (b) Gligorijević N, Todorović T, Radulović S, Sladić D, Filipović N, *et al.* (2009) Synthesis and characterization of new Pt(II) and Pd(II) complexes with 2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbazone: Cytotoxic activity evaluation of Cd(II), Zn(II), Ni(II), Pt(II) and Pd(II) complexes with heteroaromatic selenosemicarbazones. Eur J Med Chem 44: 1623–1629

⁵ Kowol CR, Eichinger R, Jakupec MA, Galanski MA, Arion VB, *et al.* (2007) Effect of metal ion complexation and chalcogen donor identity on the antiproliferative activity of 2-acetylpyridine N,N-dimethyl(chalcogen)semicarbazones (2007) J Inorg Biochem 101: 1946-1957

⁶ Srdic-Rajic T, Zec M, Todorovic T, Andelkovic K, Radulovic S (2011) Non-substituted N-heteroaromatic selenosemicarbazone metal complexes induce apoptosis in cancer cells via activation of mitochondrial pathway. Eur J Med Chem 46: 3734-3747

Molter *et al.* prepararon complejos de selenosemicarbazonas con Au(I), los cuales mostraron actividad antimálarica, con resultados muy promisorios (Figura 6.4).⁷



Figura 6.4 Complejos biológicamente relevantes, de selenosemicarbazonas con metales del grupo d

Recientemente, Dekanski *et al.* describieron el potencial antioxidante de complejos de selenosemicarbazonas con metales del grupo *d*, lo cual resulta beneficioso para un amplio grupo de patologías mediadas por procesos oxidativos desbalanceados.⁸ También se destacan la disminución de su toxicidad, lo que resulta importante a la hora de posteriores análisis *in vivo* (Figura 6.4).

La formación de complejos de selenosemicarbazonas con determinados metales podría ser una alternativa en nuestro caso, para atenuar la toxicidad de organoselenados sin perder la actividad tripanocida. Para ello, se seleccionaran las selenosemicarbazonas más activas en *T. cruzi* y se preparara una serie de complejos con metales como Pd y Pt (Figura 6.5). Esto se llevará a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Lucía Otero y Dra. Dinorah Gambino, de la Cátedra de Química Inorgánica, UdelaR. Allí, también se prepararan sus análogos oxigenados y azufrados. Se evaluará su actividad en *T. cruzi* al igual que su toxicidad.

⁷ Molter A, Rust J, Lehmann CW, Deepa G, Chiba P, et al. (2011) Synthesis, structures and anti-malaria activity of some gold (I) phosphine complexes containing seleno- and thiosemicarbazonato ligands. Dalton Transactions 40: 9810-9820

⁸ Dekanski D, Todorovic T, Mitic D, Filipovic N, Polovic N, *et al.* (2013) High antioxidative potential and low toxic effects of selenosemicarbazone metal complexes. J Serb Chem Soc 78: 1503-1512



Figura 6.5 Complejos de selenosemicarbazona con Pd(II) y Pt(II) y sus análogos azufrados y oxigenados, a preparar.

Nuevas selenazolidinonas

Debido a la inestabilidad de la selenourea y su elevado costo, no se pudieron preparar nuevos derivados selenazolidinonas. Visto los resultados promisorios de estos organoselenados, se propone la puesta a punto de una nueva metodología sintética; en primera instancia, partiendo de diferentes cloruros de ácido aromáticos, utilizando isoselenocianato de potasio como dador de selenio y amoníaco, para dar la benzoilselenourea correspondiente.⁹ Posteriormente, con su adición al acetilendicarboxilato de metilo se obtendrían los derivados selenazolidinona deseados para ser evaluados en epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su toxicidad (Figura 6.6).



Figura 6.6 Nueva metodología para la obtención de selenazolidinonas (Ar: aromático)

Capítulo 7: Anexo

MALDI-TOF

Banda de 50 kDa:

El resultado fue obtenido utilizando el modo reflector positivo



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

885.4685 iones(169.3014, 175.1371, 256.2713, 284.2940, 300.2820, 311.1280, 328.2886, 361.1959, 410.2733, 525.2531, 576.9324, 696.0636, 711.4452, 717.4059) 917.4620, 963.5301, 1053.5513, 1212.6450, 1229.6667, 1233.6251, 1238.7147, 1267.6665, 1297.6649, 1326.6659, 1598.7456, 1668.7798, 1682.7677

1712.7693 iones(175.0947, 372.0459, 388.0962, 433.5146, 451.1873, 470.9857, 489.0656, 508.1814, 517.0624, 521.9936, 572.0989, 605.1861, 606.1620, 623.1868, 700.0972, 702.1462, 708.1705, 752.2441, 792.1904, 809.2057, 819.1145, 904.2786, 962.2712, 978.2226, 995.2759, 1123.2596, 1224.3387, 1325.3361, 1598.3544)

1728.7720 iones(175.1163, 371.0049, 388.0807, 451.1332, 465.1009, 472.1186, 488.9393, 501.0404, 508.1598, 514.1543, 527.1586, 572.3439, 590.0803, 605.2003, 607.1227, 608.6340, 623.1829, 637.1141, 645.3373, 699.0197, 703.0598, 773.3026, 793.0571, 802.8572, 809.1749, 823.3770, 864.2573, 886.0699, 904.0641, 920.1353, 978.2696, 992.2648, 993.3108, 995.3481, 1009.3223, 1221.4427, 1264.4097, 1325.3600, 1326.4656, 1450.4885, 1615.2076) 1738.7958, 1742.7795, 1744.7646, 1914.9803, 2059.0239

Parámetros de búsqueda:

Tipo de búsqueda: Sequence Query Enzima: Tripsina Modificaciones variables: Oxidacion (M),Oxidacion (HW) Valores de masas: Monoisotopico Protein Mass : Unrestricted Peptide Mass Tolerance : ± 0.05 Da Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da Max Missed Cleavages : 1 Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Number of queries : 21 Mascot search (<u>www.matrixscience.com</u>)

Database	:	: NCBInr 20110429 (13841106 sequences; 4750259772 residues)						
Timestamp		: 9 May 2011 at 20:12:45 GMT						
Protein hits		gi 237637236 c	cysteine proteinase [Trypanosoma cruzi]					
		gi 118127 R	RecName: Full=Cysteine proteinase COT44; Flags: Precursor					
		gi 134294871 m	major facilitator transporter [Burkholderia vietnamiensis G4]					
	gi 224093995 PREDICTED: glutamate receptor interacting protein 1 [Taeniopygia guttata]							
		gi 18855029 h	nypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]					
		gi 170740084 h	nypothetical protein M446_1820 [Methylobacterium sp. 4-46]					
		gi 297622866 d	dihydrodipicolinate synthetase [Truepera radiovictrix DSM 17093]					
	gi 320334493 hypothetical protein Deima_1894 [Deinococcus maricopensis DSM 21211]							
	gi 329934285 hypothetical protein SGM_0076 [Streptomyces griseoaurantiacus M045]							
	gi 196005385 hypothetical protein TRIADDRAFT_56691 [Trichoplax adhaerens]							
		gi 312385465 h	nypothetical protein AND_00750 [Anopheles darlingi]					
	gi 123503838 hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]							
	gi 255083546 Drug/Metabolite transporter superfamily [Micromonas sp. RCC299]							
	gi 260892247 NADH dehydrogenase (quinone) [Ammonifex degensii KC4]							
		gi 18403167 Å	ASK8 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 8); protein binding / ubiquitin-protein ligase [Arabidopsis thaliana]					
		gi 117619592 p	protease II [Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966]					
		gi 222475908 o	prc1/cdc6 family replication initiation protein [Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239]					
	gi 224099295 predicted protein [Populus trichocarpa]							
		gi 309789664 h	nypothetical protein OSCT_0196 [Oscillochloris trichoides DG6]					
		qi 188523740 M	MHC class II beta chain [Leopoldamys sabanus]					

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 52 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Se identificó la enzima Cruzipaína de Trypanosoma cruzi con significancia estadística.

Banda de 30 kDa:

El resultado fue obtenido utilizando el modo reflector positivo



Lista de masas MS Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

932.4676, 939.4520, 973.5022, 1003.5051, 1020.4536, 1139.5677, 1165.5635, 1179.5758, 1193.5895, 1234.6365, 1263.6674, 1277.6862, 1307.6517, 1349.7136, 1363.5602, 1379.5638, 1383.6589, 1427.7581, 1456.6812, 1457.6736, 1475.7235

1647.7800 iones(175.0815, 315.1608, 333.1731, 428.0619, 428.2063, 430.1192, 464.1211, 496.1744, 576.1917, 593.2405, 639.0927, 643.3666, 722.2615, 727.9716, 755.3263, 779.2912, 781.3434, 783.3980, 787.4006, 826.2078, 844.2889, 870.3604, 877.2847, 893.3510, 894.3447, 1006.4152, 1007.3708, 1029.3452, 1038.4539, 1046.2043, 1055.4020, 1056.4202, 1135.4082, 1136.4017, 1192.4399, 1193.4949, 1316.5546, 1378.4779, 1380.5458, 1435.5007, 1436.5203, 1535.4396)

1648.7727, 1663.7684, 1686.7782, 1707.7435, 1797.9727, 1838.8865, 1908.7794, 1987.9751, 1993.9399, 2144.8445, 2212.0657, 2263.0957

2279.0471 iones(175.1054, 229.1048, 359.2189, 368.0755, 381.0286, 453.1767, 456.1494, 472.3120, 528.2323, 619.1996, 619.4333, 624.4146, 629.2368, 647.2664, 686.0778, 711.0959, 782.3881, 795.2285, 823.1675, 824.0607, 837.6320, 838.0723, 838.4198, 839.3409, 865.2581, 908.4056, 909.2173, 924.3306, 936.3017, 938.0964, 952.1996, 954.3752, 1110.3958, 1111.6031, 1138.2423, 1138.4316, 1141.3474, 1142.2346, 1142.5557, 1143.4022, 1195.2562, 1196.4385, 1204.3424, 1205.7728, 1270.3726, 1310.4301, 1326.4214, 1327.4624, 1329.6759, 1334.5464, 1426.3445, 1440.4836, 1441.4651, 1442.3539, 1443.6162, 1456.5337, 1458.5774, 1460.2389, 1466.6002, 1500.5586, 1593.5914, 1594.5966, 1595.7001, 1597.4425, 1661.4971, 1675.5530, 1690.5680, 1692.5339, 1707.5449, 1708.5469, 1709.6150, 1807.6304, 1894.6985, 1980.6563, 1981.7081, 1982.6262, 1985.5800, 2034.6682, 2078.7212, 2095.6880, 2098.5779, 2105.7417, 2107.6118, 2123.7012, 2124.2761, 2125.4509)

2280.0415 , 2295.0403, 2296.0330, 2311.0283, 2329.0229, 2367.2190, 2383.9390, 2398.9836, 2510.1072, 2689.3545, 2705.1350, 2872.3584, 2888.3645, 2902.3816, 3048.4482, 3052.5173, 3053.5774, 3224.2727, 3264.4871

Parámetros de búsqueda:

Tipo de búsqueda: Sequence Query Enzima: Tripsina Modificaciones variables: Oxidacion (M) Valores de masas: Monoisotopico Protein Mass : Unrestricted Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da Fragment Mass Tolerance: ± 0.25 Da Max Missed Cleavages : 1 Instrument type : MALDI-TOF-TOF Number of queries : 54

Mascot search (<u>www.matrixscience.com</u>)

Search title								
Database	: NCBInr 20110429 (13841106 sequences; 4750259772 residues)							
Timestamp)11 at 18:55:36 GMT							
Protein hits	: gi[3088522 cathepsin B-like protease precursor [Trypanosoma cruzi]							
	gi 119481201 pheromone P-factor (Map2), putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]							
	gi 298713511 LRR-GTPase of the ROCO family, incomplete sequence [Ectocarpus siliculosus]							
	gi[301644942 hypothetical protein HMPREF9543_01575 [Escherichia coli MS 146-1]							
	gi 15615596 stage II sporulation protein B (endospore development) [Bacillus halodurans C-125]							
	gi 224825360 PA14 domain protein [Lutiella nitroferrum 2002]							
	gi 309778717 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Ralstonia sp. 5 7 47FAA]							
	gi 225432116 PREDICTED: similar to vacuolar protein sorting 13C protein-like [Vitis vinifera]							
	gi 254568470 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 3, involved in glycolysis and gluconeogenesis [Pichia pastoris GS115]							
	gi 288960380 TPR repeat-containing protein [Azospirillum sp. B510]							
	gi 183983771 type I modular polyketide synthase [Nycobacterium marinum M]							
	gi 159795662 Chain A, Crystal Structure Analysis Of Diaminopimelate Decarboxylate (Lysa)							
	gi 125524754 hypothetical protein OsI_00740 [Oryza sativa Indica Group]							
	gi[295829859 AT3G52930-like protein [Capsella grandiflora]							
	gi 46127539 hypothetical protein FG08147.1 [Gibberella zeae PH-1]							
	gi 169612105 hypothetical protein SNOG_09169 [Phaeosphaeria nodorum SN15]							
	gi 290976919 predicted protein [Naegleria gruberi]							
	gi 26991837 hypothetical protein PP_5161 [Pseudomonas putida KT2440]							
	gi 35210426 probable acinetobactin biosynthesis protein [Acinetobacter baumannii]							

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 51 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Se identificó la proteasa Catepsina B de Trypanosoma cruzi con significancia estadística.

Banda de 25 kDa:

El resultado fue obtenido utilizando el modo reflector positivo



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

729.3483, 733.3693, 738.4020, 755.4108, 842.5100, 1040.5457, 1045.5665, 1077.1951, 1168.6368, 1179.6038

1228.6879 iones(171.1317, 175.1248, 270.1902, 272.1797, 300.1692, 316.1471, 344.1909, 357.1606, 359.1805, 361.2029, 368.1887, 383.2687, 413.2165, 429.2412, 441.2064, 456.2663,

457.2587, 458.2545, 470.2723, 474.2648, 486.2137, 540.2741, 541.2729, 541.4063, 543.2756, 557.2897, 569.3429, 571.2587, 573.3535, 599.3290, 613.3331, 628.3076, 630.3908, 642.3386, 656.3420, 726.4054, 727.4061, 730.2562, 737.3790, 739.1717, 743.4758, 755.4255, 756.9897, 799.3916, 851.4632, 868.5019, 895.4381, 912.5276, 923.5247, 927.5062, 929.5370, 973.1083, 1023.5460, 1041.4646, 1055.1537, 1058.5812, 1061.6947, 1077.5785, 1081.4973, 1109.5690)

1244.6819, 1260.6780, 1277.6985, 1292.6637, 1376.5946, 1392.5840, 1475.7662, 1493.7327, 1592.7146, 1697.9136, 1707.7813

1715.9709 iones(175.1357, 186.1263, 199.1955, 227.1940, 229.1258, 246.2003, 249.2025, 256.1473, 277.1766, 283.2045, 298.2213, 301.2202, 326.1997, 340.2877, 343.2382, 348.2373, 386.2258, 390.2646, 411.3379, 425.2872, 442.3191, 444.2443, 453.4312, 461.3064, 475.3452, 486.2715, 499.3404, 501.2916, 503.3535, 515.2853, 531.3344, 568.3041, 574.3927, 586.3855, 588.4042, 616.4493, 642.3749, 659.4259, 661.4416, 662.4175, 670.4997, 687.4903, 715.4388, 725.3828, 730.4796, 747.4766, 756.4652, 758.4527, 769.4449, 774.4928, 775.4940, 811.4573, 828.5356, 843.5024, 870.5992, 871.5297, 878.4753, 888.5721, 904.5629, 908.5367, 925.5393, 942.5938, 984.6428, 1000.6161, 1001.7014, 1011.6480, 1017.6109, 1029.6057, 1100.6649, 113.7614, 1116.1898, 1130.7323, 1213.7496, 1215.6322, 1218.7023, 1257.8511, 1274.8643, 1335.5685, 1355.9745, 1373.8097, 1376.8346, 1378.7299, 1489.8435, 1541.7753)

1739.9974, 1783.0081, 1806.8065, 1855.0314, 1877.8379

1898.0326 iones(175.1322, 229.1298, 256.1031, 272.1456, 286.1953, 303.2180, 317.1537, 326.1975, 343.2026, 354.1761, 360.2262, 369.1791, 370.2171, 371.2181, 412.2697, 430.1799, 430.2939, 440.2779, 456.2916, 473.3292, 484.3043, 527.3318, 529.3383, 539.3485, 542.3580, 543.3346, 560.3619, 567.3718, 585.3802, 598.4361, 608.4335, 626.3776, 642.4327, 659.3438, 659.4521, 695.3881, 713.4586, 718.4009, 721.4967, 730.4507, 739.3245, 756.3713, 757.4862, 782.4506, 783.3275, 799.4973, 800.4791, 814.6050, 826.5385, 843.5840, 855.5143, 914.6019, 930.6301, 968.5206, 1012.7598, 1063.6942, 1081.6871, 1098.7173, 1168.7813, 1185.7340, 1187.6271, 1296.7692, 1313.8165, 1414.8201, 1510.8832, 1527.9197, 1626.9633, 1695.9434, 1721.8440, 1739.9833, 1743.2479, 1853.6371, 1854.3326, 1880.0011)

1951.8707

2029.0444 iones(175.1179, 213.1646, 230.0808, 256.1220, 268.1682, 285.1845, 286.1519, 303.2019, 317.1638, 325.1723, 326.1715, 343.1616, 360.2094, 369.1818, 369.2876, 371.2121, 403.1288, 412.2274, 430.2146, 440.2433, 456.2260, 473.2927, 502.2098, 527.1579, 527.3703, 529.2747, 539.3079, 543.2925, 560.3066, 598.3517, 608.3096, 615.3307, 626.3854, 642.5366, 655.4235, 659.4120, 667.3198, 685.3560, 698.3560, 713.4635, 716.3635, 730.4386, 739.3615, 756.3094, 756.4764, 780.4210, 798.3439, 798.5515, 813.5789, 843.5681, 855.4315, 912.5233, 913.3502, 913.5828, 930.6403, 931.5229, 934.5076, 1006.3895, 1011.5362, 1063.7499, 1081.6566, 1098.6649, 1143.7671, 1167.6854, 1168.6511, 1185.7244, 1199.8440, 1200.6499, 1297.7394, 1313.7782, 1397.8550, 1414.7830, 1416.9126, 1527.8950, 1539.8513, 1626.9517, 1740.0237, 1742.9271, 1749.9316, 1811.0208, 1825.0288, 1836.9965, 1838.1134, 1854.9810, 1858.8826, 1896.8032)

2211.0999, 2214.9990, 2225.1072, 2227.0227, 2231.9817, 2243.9932, 2247.9880, 2367.2595, 2384.9663, 2556.1853, 2804.4092, 2820.4067, 2835.2576, 2873.3796, 3446.5342, 3515.7048, 3670.7952

Database		NCBInr 20110911 (15270974 sequences: 5234858139 residues)							
Timestamn		23 Sen 2011	Sen 2011 at 16:06:08 GMT						
Protein hits	: di 2017 de l'otorio dan								
reoccan hirob	dillings1 To kenne chein V region - mouse								
		g1 110301 g1 1251927140	iy Appa chain v region - mouse						
		<u>g1[231637140</u>	chain L, crystal structure of Anti-11-23 Antibody Child4088						
		gr 38098725	ANA immunoglobulin kappa light chain [Hus musculus]						
		gi 39933426	site-specific DNA-methyltransferase [Rhodopseudomonas palustris CGA009]						
		gi 27729266	immunoglobulin heavy chain variable region [Mus musculus]						
		gi 110132	Ig heavy chain V region (36.1.2D) - mouse (fragment)						
	gi 284912 Ig light chain V region (clone 17s-c4) - mouse (fragment)								
	gi]28371608 immunoglobulin kappa light chain variable region [Trichosurus vulpecula] gi]325915491 transcription elongation factor GreA [Xanthomonas vesicatoria ATCC 35937]								
		gi 72382513	adaptive-response sensory kinase [Prochlorococcus marinus str. NATL2A]						
		gi 296139745	imidazole glycerol phosphate synthase, glutamine amidotransferase subunit [Tsukamurella paurometabola DSM 20162]						
		gi 156097302	hypothetical protein [Plasmodium vivax SaI-1]						
		gi 89901915	cupin 2 protein [Rhodoferax ferrireducens T118]						
		gi 5802418	immunoglobulin light chain variable region [Ovis aries]						
	immunoglobulin heavy chain variable region [Oryctolagus cuniculus]								
		gi 317152014	family 5 extracellular solute-binding protein [Desulfovibrio aespoeensis Aspo-2]						
		gi 332019198	hypothetical protein G5I_12110 [&cromyrmex echinatior]						
		gi 167393315	hypothetical protein [Entamoeba dispar SAW760]						
		gi 331698948	cation diffusion facilitator family transporter [Pseudonocardia dioxanivorans CB1190]						

Mascot Score Histogram

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 55 indicate identity or extensive homology (p<0.05). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Parámetros de búsqueda:

Tipo de búsqueda: Sequence Query Enzima: Tripsina Modificaciones variables: Oxidacion (M), Oxidacion (HW), Deamidated (NQ) Valores de masas: Monoisotopico Protein Mass : Unrestricted Peptide Mass Tolerance : ± 0.05 Da Fragment Mass Tolerance: ± 0.2 Da Max Missed Cleavages : 1 Instrument type : MALDI-TOF-TOF Number of queries : 48

Mascot search (<u>www.matrixscience.com</u>)

Se identificaron inmunoglobulinas con significancia estadística.

Synthesis of 2-Hydrazolyl-4-Thiazolidinones Based on Multicomponent Reactions and Biological Evaluation Against *Trypanosoma Cruzi*

Chiara Pizzo¹, Cecilia Saiz¹, Alan Talevi², Luciana Gavernet², Pablo Palestro², Carolina Bellera², Luis Bruno Blanch², Diego Benítez³, Juan J. Cazzulo⁴, Agustina Chidichimo⁴, Peter Wipf⁵ and S. Graciela Mahler^{1,*}

¹Departamento de Química Orgánica, Cátedra de Química Farmacéutica, Universidad de la República (UdelaR), Avda. General Flores 2124, CC1157 Montevideo, Uruguay

²Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina

³Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruquay

⁴IIB-INTECH Universidad Nacional de General San Martín – CONICET, San Martín, Argentina

⁵Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA

*Corresponding author: S. Graciela Mahler, gmahler@fq.edu.uy

A series of 18 novel 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones-5-carboxylic acids, amides and 5,6- α , β -unsaturated esters were synthesized, and their *in vitro* activity on cruzipain and *T. cruzi* epimastigotes was determined. Some agents show activity at 37 μ M concentration in the enzyme assay. Computational tools and docking were used to correlate the biological response with the physicochemical parameters of the compounds and their cruzipain inhibitory effects.

Key words: 2-hydrazolyl-4-thiazolidinone, Chagas disease, cruzipain, inhibitors, multicomponent connection reaction, *Trypanosoma cruzi*

Received 19 August 2010, revised 8 December 2010 and accepted for publication 11 December 2010

A century after its discovery, Chagas disease still represents a major public health challenge in Latin America where currently an estimated 11 million people are currently infected. Because of growing population movements, an increasing number of Chagas disease cases have now been detected in non-endemic areas, such as North America and some European countries. Unfortunately, only benznidazole and nifurtimox are clinically available for treatment of the disease, and both demonstrate only limited efficacy during the acute phase of the disease and show severe side effects (1).

The growing knowledge of the basic biology of *Trypanosoma cruzi*, the ethiological agent causative of Chagas disease, empowers the development of new, rationally developed approaches to specific chemotherapy. The cathepsin L-like cysteine protease termed cruzipain or cruzain is responsible for the major proteolytic activity of all stages of the parasite life cycle and represents an interesting target for the development of potential therapeutics for the treatment of the disease (2). Cruzipain is differentially expressed in the four main stages of the parasite's biological cycle; it is located in different cellular compartments and is essential for the survival of *T. cruzi* within host cells (3). While its exact function is unknown, it is likely involved in the degradation of proteins scavenged from the blood meal of the insect vector (1).

The computer-assisted, rational search for new drugs has emerged as a popular strategy for the development of new chemotherapeutic agents. It involves both target- and ligand-based approaches. In particular, virtual screening (VS) has proven to be very useful in the discovery of new chemical entities for common as well as neglected diseases (4). A VS campaign led to the 2-hydrazolyl-4thiazolidinone core as a potential cruzipain inhibitor. Based on this result, we designed, synthesized, and biologically evaluated a series of analogs against cruzipain and epimastigotes of *T. cruzi*. Computational tools were used to correlate the biological responses with physicochemical parameters of the compounds and to simulate the cruzipain–inhibitor interactions by docking calculations.

Methods and Materials

Chemistry

Reactions were monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) on 0.25-mm silica gel-coated plastic sheets (Polygram[®] SIL G/UV 254; Macherey-Nagel Düren, Germany). Flash chromatography on Silica gel 60 (J. T. Baker, 40 μ m average particle diameter) was used to purify the crude reaction mixtures. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 400 and 100 MHz, respectively, on a Bruker AVANCE. Chemical shifts (δ) are in ppm relative to the residual solvent signal, and coupling constants (*J*) are reported in Hz. Decoupled HMBC spectra were obtained using the Bruker hmbcgplpndqf pulse sequence using standard parameters. IR spectra were obtained on a Perkin Elmer 1310 (Wellesley, MA, USA) and Shimadzu 8101A FTIR spectrophotometers (Salem, OR, USA). Low-resolution mass spectra were measured on a GCMS Shimadzu QP 1100-EX spectrometer. High-resolution mass spectra were measured on VG AutoSpect spectrometer (El mode). Microwave-assisted reac-

tions were carried out on a CEM Discover microwave reactor equipped with 10-mL vials. Melting points were determined using a Laboratory Devices Gallenkamp (Loughborough, Leicestershire, UK). All reactions were carried out in dry, freshly distilled solvents under anhydrous conditions unless otherwise stated. Yields are reported for chromatographic and spectroscopic (¹H and ¹³C-NMR) pure compounds unless otherwise stated.

(1f-n) General procedure for the preparation of thiazolidineacetamides

The preparation of compound **1f** is representative.

(1f) (*RS*)-2-((2-(Benzylidene)hydrazono)-4-oxo-5thiazolidine-*N*-methylacetamide

To a stirred solution of benzaldehyde (200 mg, 1.9 mmol) in PhMe (1 mL) and DMF (1 mL) were added thiosemicarbazide 3 (136 mg, 1.5 mmol) and p-TsOH acid (2 mg, 0.01 mmol). The reaction mixture was heated in stirred microwave vial for 3 min at 90 °C. After formation of thiosemicarbazone derivate, (followed by TLC) maleimide (138 mg, 1.26 mmol) was added, and the reaction mixture was heated 10 min at 110 °C in the microwave. The residue was finally recrystallized from MeOH/H2O (1:1) to give 1f (237 mg, 65% yield) as a white solid: mp 253-254 °C dec.; IR (KBr) 3321, 1712, 1644, 1569 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.60 (d, J = 4.6, 3H), 2.64 (dd, J = 16.2, J = 9.9, 1H, 2.94 (dd, J = 16.2, J = 3.7, 1H), 4.32 (dd, J = 9.9, J = 3.7, 1H, 7.47 (m, 3H), 7.76 (m, 2H), 8.00 (d, J = 4.6, J1H), 8.40 (s, 1H), 11.94 (bs, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 25.9, 37.8, 44.1, 127.4, 127.7, 128.7, 128.9, 130.7, 134.3, 156.1, 164.7, 169.3, 175.9; HRMS calculated for C₁₃H₁₄N₄O₂S [M-H]⁺: 291.0916, found: 291.0918.

(1g) (*RS*)-2-(2-(Thiophen-2-ylmethylene) hydrazono)-4-oxo-5-thiazolidine-*N*methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using 2-thiophenecarboxaldehyde to give thiazolidinone **1g** (75% yield) as a yellowish solid: mp 246–247 °C dec.; IR (KBr) 3324, 1712, 1640, 1571 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.59 (d, J = 4.7, 3H), 2.64 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 16.1, J = 3.5, 1H), 4.29 (dd, J = 9.7, J = 3.5, 1H), 7.16 (m, 1H), 7.49 (d, J = 4.2 1H), 7.68 (dd, J = 4.2, J = 0.8, 1H), 7.97 (d, J = 4.7, 1H), 8.54 (s, H), 11.82 (bs, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 25.5, 37.8, 44.0, 128.0, 129.7, 132.7, 138.9, 150.5, 164.8, 169.7, 176.2; HRMS calculated for C₁₁H₁₂N₄O₂S₂ [M-H]⁺: 297.0480, found: 291.0487.

(1h) (*RS*)-2-(2-(4-Methoxybenzylidene)hydrazono)-4-oxo-5thiazolidine-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *p*-OMe-benzaldehyde to give thiazolidinone **1h** (81% yield) as a white solid: mp 250–251 °C; IR (KBr) 3320, 1714, 1641, 1613, 1513 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.59 (d, J = 4.6, 3H), 2.64 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 16.1, J = 3.7, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.29 (dd, J = 9.9, J = 3.7, 1H), 7.01 (d, J = 8.8, 2H), 7.70 (d, J = 8.8, 2H), 7.99 (d,

Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones

J=4.6, 1H), 8.31 (d, J=3.0, 1H), 11.86 (bs, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) 25.6, 37.9, 44.0, 55.4, 78.7–79.3, 114.4, 126.9, 129.3, 155.7, 161.3, 169.2; HRMS calculated for $C_{14}H_{16}N_4O_3S$ $[M-H]^+$: 321.1021, found: 321.1022.

(1i) (*RS*)-2-(2-(4-Chlorobenzylidene)hydrazono)-3methyl-4-oxo-5-thiazolidine-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *p*-Cl benzaldehyde and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1i** (88% yield) as a white solid: mp 225–226 °C; IR (KBr) 3305, 1717, 1646, 1621, 1578 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 2.68 (dd, J = 16.1, J = 10.2, 1H), 2.87 (d, J = 4.8, 3H), 3.17 (dd, J = 16.1, J = 3.8, 1H), 3.33 (s, 3H), 4.38 (dd, J = 10.2, J = 3.8, 1H), 5.58 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.5, 2H), 7.71 (d, J = 8.5, 2H), 8.38 (s, 1H); ¹³C NMR (DMS0-d₆) 26.4, 30.2, 38.5, 44.0, 129.9, 130.2, 133.9, 136.1, 157.0, 166.0, 170.0, 175.1; HRMS calculated for C₁₄H₁₅ClN₄O₂S [M+Na]⁺: 361.0496, found 361.0498.

(1j) (*RS*)-2-(2-(2-Bromobenzylidene)hydrazono)-3methyl-4-oxo-5-thiazolidine-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *o*-Br-benzaldehyde and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1j** (55% yield) as a white solid: mp 208–209 °C; IR (KBr) 3318, 1716, 1644, 1623, 1609 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.58 (d, J = 4.2, 3H), 2.71 (dd, J = 16.4, J = 9.6, 1H), 2.98 (dd, J = 16.4, J = 3.6, 1H), 3.19 (s, 3H), 4.39 (dd, J = 9.6, J = 3.6, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.49 (t, J = 16.0, J = 8.0, 1H), 7.73 (d, J = 8.0, 1H), 7.98 (d, J = 8.0, 1H), 8.04 (d, J = 4.2, 1H), 8.67 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 26.0, 29.9, 37.9, 43.6, 124.5, 128.4, 128.7, 132.9, 133.0, 133.8, 155.8, 166.9, 169.6, 174.7; HRMS calculated for C₁₄H₁₅BrN₄O₂S [M+Na]⁺: 404.9997, found: 404.9986.

(1k) (*RS*)-2-(2-(4-Fluorobenzylidene)hydrazono)-3-methyl-4-oxo-5-thiazolidin-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *p*-F-benzaldehyde and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1k** (65% yield) as a white solid: mp 226–227 °C; IR (KBr) 2957, 1721, 1698, 1630 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.59 (d, J = 4.6, 3H), 2.70 (dd, J = 16.3, J = 9.7, 1H), 2.97 (dd, J = 16.3, J = 3.7, 1H), 3.17 (s, 3H), 4.37 (dd, J = 9.7, J = 3.7, 1H), 7.32 (t, J = 12.4, J = 5.4, 2H), 7.85 (m, 2H), 8.03 (d, J = 4.6, 1H), 8.51 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 26.0, 29.8, 38.1, 43.6, 116.4 (d, $J_{CF} = 22$), 130.4 (d, $J_{CF} = 9$), 131.3 (d, $J_{CF} = 3$), 156.6, 164.5 (d, $J_{CF} = 245$), 165.2, 169.6, 174.6; HRMS calculated for C₁₄H₁₅FN₄O₂S [M+H]^{*}: 323.0978, found: 323.0973.

(11) (*RS*)-2-(2-(3-Bromobenzylidene)hydrazono)-3methyl-4-oxo-5-thiazolidine-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *m*-Br-benzaldehyde and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1l** (75% yield) as a white solid: mp 214–215 °C; IR (KBr) 3309, 1717, 1644, 1621, 1571 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 2.71 (dd, J = 16.0, J = 10.1, 1H), 2.88 (d, J = 4.8, 3H), 3.19 (dd, J = 16.0, J = 3.7, 1H), 3.35 (s, 3H), 4.39 (dd, J = 10.1, J = 3.7, 1H), 5.62 (s,

Pizzo et al.

1H), 7.30 (m, 2H), 7.56 (ddd, J = 7.9, J = 1.8, J = 1.0, 1H), 7.68 (d, J = 7.9, 1H), 7.94 (d, J = 1.8, 1H), 8.36 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 26.6, 29.8, 39.4, 43.5, 122.9, 126.9, 130.2, 130.6, 133.6, 136.3, 156.8, 165.0, 169.3, 174.3; HRMS calculated for C₁₄H₁₅BrN₄O₂S [M+H]⁺: 383.0177, found 383.0171.

(1m) (*RS*)-2-(2-(1-(3-Bromophenyl) ethylidene)hydrazono)-3-methyl-4-oxo-5thiazolidine-5-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *m*-Br phenylacetophenone and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1m** (88% yield) as a yellowish solid: mp 181–182 °C; IR (KBr) 3313, 1706, 1644, 1609, 1571 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 2.43 (s, 3H), 2.58 (d, J = 4.6, 3H), 2.71 (dd, J = 16.3, J = 9.5, 1H), 2.97 (dd, J = 16.3, J = 3.6, 1H), 3.21 (s, 3H), 4.36 (dd, J = 9.5, J = 3.6, 1H), 7.43 (t, J = 16.0, J = 8.0, 1H), 7.66 (d, J = 8.0, 1H), 7.86 (d, J = 8.0, 1H), 8.01 (t, J = 1.8, 1H); ¹³C (DMSO-d₆) 14.4, 25.5, 29.4, 37.6, 43.1, 121.9, 125.5, 128.8, 130.7, 132.5, 140.0, 160.0, 164.2, 169.1, 174.2; HRMS calculated for C₁₅H₁₈BrN₄O₂S EIMS [M+H]⁺: 397.0334, found: 397.0338.

(1n) (*RS*)-2-(2-(4-Trifluoromethyl)benzy lidene)hydrazono)-3-methyl-4-oxo-5-thiazolidin-*N*-methylacetamide

The typical procedure for thiazolidinone **1f** preparation was followed using *p*-CF₃-benzaldehyde and methylthiosemicarbazide to give thiazolidinone **1n** (90% yield) as a white solid: mp 220–221 °C; IR (KBr) 3294, 1719, 1644, 1623, 1586, 1559 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 2.69 (dd, *J* = 23.1, *J* = 12.0, 1H), 2.87 (d, *J* = 4.5, 3H), 3.18 (dd, *J* = 23.1, *J* = 3.7, 1H), 3.34 (s, 3H), 4.38 (dd, *J* = 12.0, *J* = 3.7, 1H), 5.66 (d, *J* = 4.5, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.2, 2H), 8.45 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 26.6, 29.8, 39.3, 43.5, 125.7 (q, *J*_{CF3} = 4 Hz), 126.5 (q, *J*_{CF3} = 262 Hz), 128.3, 131.9 (q, *J*_{CF3} = 32 Hz), 137.5, 156.7, 165.4, 169.3, 174.3; HRMS calculated for $C_{15}H_{15}F_{3}N_4O_2S$ [M+H]⁺: 373.0946 373.0947.

(6a–e) General procedure for α , β -unsaturated thiazolidine esters

The preparation of compound **6c** is representative.

(6c) (*Z*)-2-(4-Fluorobenzylidene)hydrazono)-3methyl-5-methoxycarbonylmethylene) thiazolidin-4-one

To a stirred solution of *p*-F-benzaldehyde (150 mg, 1.2 mmol) in dry EtOH (5 mL) were added methylthiosemicarbazide (140 mg, 1.3 mmol) and *p*-TsOH acid (15 mg, 0.1 mmol). After formation of methylthiosemicarbazone derivate (followed by TLC) was added dimethyl acetylenedicarboxylate (189 mg, 1.3 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 2 h, and a yellow precipitate was collected. The solid was recrystallized from ethyl acetate to give **6c** (304 mg, 81% yield) as yellow solid: mp 214–215 °C; IR (KBr) 3077, 1716, 1633, 1595 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 3.45 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 6.92 (s, 1H), 7.15–7.11 (m, 2H), 7.84–7.81 (m, 2H), 8.45 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 29.7, 52.6, 115.9, 116.1, 130.1 (d, $J_{CF} = 3$), 130.4 (d, $J_{CF} = 9$), 141.8, 158.6,

160.6, 164.7 (d, J_{CF} = 252), 165.1, 166.5; HRMS calculated for $C_{14}H_{13}FN_3O_3S \ [M+H]^+:$ 322.0662, found: 322.0650.

(6a) (Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)hydrazono-5methoxycarbonylmethylene)thiazolidin-4-one

The typical procedure for thiazolidinone **6c** preparation was followed using *p*-OMe-benzaldehyde and thiosemicarbazide to give thiazolidinone **6a** (71% yield) as a yellow solid: mp 260–261 °C dec; IR (KBr) 2961, 1725, 1700 1643, 1606 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.67 (s, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.46 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 52.9, 55.9, 114.5, 114.9, 126.7, 130.3, 143.6, 158.8, 159.8, 162.2, 166.4.

(6b) (*Z*)-2-[4-Chlorobenzylidene)hydrazono]-3methyl-5-methoxycarbonylmethylene) thiazolidin-4-one

The typical procedure for thiazolidinone **6c** preparation was followed using *p*-Cl-benzaldehyde to give thiazolidinone **6b** (85% yield) as a yellow solid: mp 204–205 °C; IR (KBr) 2949, 1711, 1703, 1621, 1581 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 3.45 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 6.92 (s, 1H), 7.41 (d, J = 8.5, 2H), 7.76 (d, J = 8.5, 2H), 8.43 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 29.9, 52.7, 116.1, 129.2, 129.7, 132.4, 137.4, 141.8, 158.7, 161.0, 165.2, 166.6; HRMS calculated for C₁₄H₁₂CIN₃O₃S [M+Na]⁺: 360.0180, found: 360.0179.

(6d) (Z)-2-[(4-Trifluoromethyl) benzyliden)hydrazono]-3-methyl-5-

methoxycarbonylmethylene) thiazolidin-4-one

The typical procedure for thiazolidinone **6c** preparation was followed using *p*-CF₃-benzaldehyde to give thiazolidinone **6d** (90% yield) as a yellow solid: mp 187–188 °C; IR (KBr) 2956, 1711, 1646, 1630 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 3.49 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.94 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.2, 2H), 7.94 (d, J = 8.2, 2H), 8.52 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 29.8, 52.6, 116.3, 123.8 (q, $J_{CF3} = 273$), 125.7 (q, $J_{CF3} = 4$), 128.6, 132.6 (q, $J_{CF3} = 33$), 137.1, 141.5, 158.3, 161.9, 165.1, 166.5; HRMS calculated for C₁₅H₁₂F₃N₃O₃S [M+Na]⁺: 394.0444, found: 394.0443.

(6e) (Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)hydrazono)-3methyl-5-methoxycarbonylmethylene) thiazolidin-4-one

The typical procedure for thiazolidinone **6c** preparation was followed using *p*-OMe-benzaldehyde to give thiazolidinone **6e** (87% yield) as a yellow solid: mp 192–193 °C; IR (KBr) 2958, 1703, 1631, 1604 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 3.45 (s, 3H), 3.88 (d, *J* = 1.1, 6H), 6.91 (s, 1H), 6.96 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 8.43 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 30.0, 52.8, 55.8, 114.6, 115.9, 126.9, 130.6, 142.4, 159.8, 162.6, 165.5, 166.9; HRMS calculated for $C_{15}H_{15}N_3O_4S$ [M+H]⁺: 334.0856, found: 334.0856.

Cruzipain inhibitory activity

The activity was assayed in a reaction mixture (100 μ L) containing in final concentration: Tris-HCl buffer, pH 7.6 (50 mM), Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (0.150 mM), β -mercaptoethanol (10 mM) and cruzipain (0.140 μ M). Absorbance at 410 nm was monitored at 30 °C on a Beckman Model 25 spectrophotometer. The potential inhibitors were added as solutions in DMSO, and the control inhibitor was E64 (100% inhibition at 10 μ M) added at same solvent concentration. All inhibitors were assayed by duplicate. The percentage of cruzipain inhibition (PCI) was calculated as follows: PCI (%) = (A_i/A_0) × 100, where A_i and A_0 are the absorbance with and without inhibitor respectively.

Trypanocidal activity

Epimastigotes of the Tulhahuen 2 strain were grown at 28 °C in an axenic medium (BHT-Tryptose) complemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cells from 4-day-old culture (exponential phase) were inoculated to fresh medium to give an initial concentration of 13×10^6 /mL. After the inoculation, each culture was supplemented with the inhibitors to a final concentration of 50 μ M. Epimastigotes growth was monitored by counting the parasites in a Neubauer chamber.

The values given are means of parasite densities after 8 days. The final concentration of DMSO in the culture media was between 0.7% and 1.5%, the control was run in the same amount of DMSO and in the absence of any compound. The presence of up to 1.5% of DMSO in the culture medium does not have substantial effect on the epimastigote growth. The percentage of growth inhibition (PGI) was calculated as follows: inhibition $(\%) = \{1 - [(N_p - N_{0p})/(N_c - N_{0c})]\}\%$ 100, where N_p and N_{0p} is the number of cells of the culture containing the drug at 8 and 0 day respectively; $N_{\rm c}$ and $N_{\rm 0c}$ is the number of cells of the culture in the absence of any drug at day 8 and at day 0 respectively.

Effects of inhibitors on the growth of Vero cells

Vero cells were seeded (10 000 cells/well) in 24-well cell culture cluster flat bottom (Corning) containing glass coverslips with 500 μ L of MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were allowed to attach for 24 h in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37 °C.

Then, the cells were exposed to the compounds (50 and 100 μ M) for 24 h. Afterwards, the cell culture media was removed. Fresh MEM medium with 4% fetal calf serum and without inhibitors was added, and the coverslips were incubated at 37 °C for 48 h. The cells were then fixed and stained with May Grunwald–Giemsa. The effects of inhibitors in Vero cells at 100 μ M inhibitor concentration were determined by contrast phase microscopy comparisons to Vero cells controls without inhibitor and classified as toxic and non-toxic.

Virtual screening

The methodology included a 2D QSAR approach based on application of linear discriminant analysis (LDA) and multiple linear regression (MLR) on 0D–2D molecular constitutional and topological descriptors from Dragon (Milano Chemometrics, 2003), including constitutional and topological descriptors, counts of functional groups, counts of fragments, information index, connectivity index, 2D autocorrelations and others. Detailed information on the models used is given in the Data S1.

Conformational analysis and docking

The conformational analysis of the tested compounds was carried out using the Conformational Search tool from the HyperChem 7.01 software package (Hypercube Inc, 2002). Geometry optimization was performed through molecular mechanics (MM + force field) with a gradient convergence threshold of 0.1 kcal/(Å mol). The five lowest-energy conformers were then refined at a semiempirical level with the PM3 base and a gradient convergence threshold of 0.05 kcal/(Å mol). The selected conformers were refined using Gaussian03 software (B3LYP/6-31G**). Charges were calculated at the same level of theory. The binding of compound **6b** to cruzain (Figure 3) was analyzed using AutoDockTools 1.5.2 and AutoDock 4.0 docking programs (5).

Results and Discussion

Synthesis

A VS strategy was applied to 537 503 chemical structures from the ZINC 5 database (6) to select new cruzipain inhibitors. 2-Hydrazolyl-4-thiazolidinone (1) cores were selected for synthesis, from the possible candidates. These are hybrid molecules that combine thiose-micarbazones with 4-thiazolidinones, two building blocks with interesting biological activities. The combination of both pharmaco-phores has been used to exhibit anti-*Toxoplasma gondii* (7), and also anti-*Trypanosoma cruzi* activity (8).

The selected scaffold **1** presents four regions to explore the chemical space: the substituents R¹ and R² at the hydrazolyl group, the substituent R³ at the nitrogen of the thiazolidinone, the presence or absence of saturation at $\Delta^{5,6}$, and the substituent R⁴ in the side chain (Figure 1).

We previously developed a Multicomponent Connection Reaction (MCR) for the synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones-5-carboxylic acids. Compounds **1a-e** were prepared using a tandem sequence assisted by microwave irradiation of a reaction mixture containing aldehydes (**2**, $R^2 = H$), thiosemicarbazide (**3**, $R^3 = H$) and maleic anhydride (**4**, X = 0), see Table 1, entries 1–5 (9). The former process, compared to a stepwise reaction, allows the minimization of waste, amount of solvent, reagents, adsorbents, and energy.

A similar tandem sequence was applied for the synthesis of new 2hydrazolyl-4-thiazolidinones amides **1f-n**, combining aldehydes or



Figure 1: Hydrazolyl-4-thiazolidinones scaffold.

Table 1: Synthesis of thiazolidinones 1a-n.



^aReagents and conditions: PhMe/DMF, p-TsOH (cat.), 100 °C, μ W. ^bReagents and conditions: PhMe, p-TsOH (cat.), 100 °C, μ W.

ketones (2), hydrazides (3, $R^3 = H$ or Me) and *N*-methylmaleimide (4, X = NMe), to give the desired amides in good yields (75–90% Table 1, see entries 6–14).

Finally, a series of new 2-hydrazolyl-4-thiazolidinone-5,6- α , β -unsaturated esters (6) was synthesized using an MCR between aldehydes 2, thiosemicarbazides 3, and dimethyl acetylenedicarboxylate 5, to yield compounds **6a–e**, in EtOH at r.t. in excellent yields (71–90%), independent of the presence of electron-withdrawing or electron-donating groups, Table 2.

The reaction occurs first by thiosemicarbazone formation, followed by Michael addition of the sulfur atom to the triple bond and then cyclization to give in theory two possible products thiazolidines **6** or







Figure 2: Thiazolidine 6 and 1,3-thiazine 7 isomers.

thiazines **7**, see Figure 2. The discrimination by ¹H-NMR and ¹³C-NMR for compound **6** or **7** is not trivial, because they have almost identical signals in the spectra. A useful technique for the identification of the two possible isomers was the decoupled HMBC experiment to measure the coupling constant at 3 bonds (10). The ³J values between H₆ and C₄ for all products **6a–e** were 6.3 to 5.2 Hz, and according to the literature these values correspond to an *exo* double bond in thiazolidines **6** (11) (see Table 2). Depending on the solvent used, a mixture of compounds **6** and **7**, in PhMe, or only the thiazolidinone **6** (in EtOH) was obtained.

All the compounds were prepared using a one-pot methodology and provided the desired structures in good yields from readily accessible starting materials.

Cruzipain inhibition

Different thiazolidinone derivatives including carboxylic acids **1a–e**, acetamides **1f–n** and α , β -unsaturated esters **6a–e** were evaluated against the cruzipain enzyme (12). Only thiazolidines **6b–e**, bearing an α , β -unsaturated ester, showed interaction with the enzyme at μ M concentration (entries 16–18, Table 3); the remaining thiazolidinones were less active.



Figure 3: Surface representation of the active site of cruzain. Ligand and important residues were highlighted as stick representations. Hydrogen atoms are not shown. Colored atoms are as follows: Carbon atoms in green, nitrogen atom in blue, oxygen atoms in red, sulfur atoms in yellow, and chlorine atoms in light blue. Hydrogen bond interaction d = 1.93Å.

Table 3: Biological activities of synthetic thiazolidinones **1a–n**, and **6a–e** against cruzipain.

Entry	Compound	PCI (%) ^a	Entry	Compound	PCI (%) ^a	Entry	Compound	PCI (%) ^a
1	1a	36	8	1h	22	15	6a	7
2	1b	34	9	1i	7	16	6b	75
3	1c	6	10	1j	0	17	6d	65
4	1d	4	11	1k	3	18	6e	71
5	1e	11	12	11	17	19	6c	0
6	1f	3	13	1m	22	20	E-64	100
7	1g	27	14	1n	27	-	-	-

 $^{a}\text{PCI}=\%$ of cruzipain inhibition at (Inhibitor) = 100 $\mu\text{M},$ (Cruzipain) = 0.140 $\mu\text{M},$ values are means of two values.

E64: trans-Epoxysucciny-L-leucyl-amido(4-guanidino) butane; (L-3-*trans*-Carboxyoxiran-2-Carbonyl)-L-Leucyl-Admat was used as reference compound.

Anti-Trypanosoma cruzi activity and toxicity

According to these assays, a subset of selected compounds was evaluated in their capability to inhibit the epimastigote form of *T. cruzi* (Tulahuen 2, strain) growth, (Table 4). A good correlation between in vitro anti-*T. cruzi* epimastigote and in vivo anti-*T. cruzi* activities has been reported (13); therefore, we used this biological test to validate our possible hits.

It is interesting to note that related thiazolidinones were predicted by Lima *et al.* (8) as potential cruzipain inhibitors based on docking calculations, and their activity was supported by anti-*T. cruzi* (epimastigotes) assays. Our results pointed toward a different scenario; the antiparasitic activity of this core is independent of the cruzipain inhibition. The most active compounds against *T-cruzi* Tul-2 **1i**, **j**, **k**, **m** are inactive at the enzyme, so this activity is indeed independent on the cystein protease activity. Thiazolidinone **6c** is the only compound active in both assays. We can conclude that these compounds involve a different mechanism of action. The best results for anti-*T. cruzi* activity were obtained with the compounds **1** or **6**, having as substituents: $R^3 = Me$; $R^2 = H$ or Me; $R^1 = Ph$ bearing an halogen, independent of the presence or absence of the $\Delta^{5,6}$ alkene.

Furthermore, compounds 1a-n and 6a-e were also evaluated using epimastigotes Y, a resistant strain against Nifurtimox and

 Table 4:
 Anti-Trypanosoma cruzi
 Tulahuen 2 and cytotoxic activities

Compound	Inhibition ^a (%) Tul2	Cytotoxic category ^b	Compound	Inhibition ^a (%) Tul2	Cytotoxic category ^b
1a	0	nd	1m	60	Non-toxic
1b	0	nd	1n	42	Non-toxic
1c	0	nd	6b	39	Toxic
1d	0	nd	6c	50	Toxic
1i	50	Toxic	6d	46	Toxic
1j	52	Toxic	6e	38	Non-toxic
1k	50	Toxic	Nfx ^c	100	nd
11	28	Non-toxic	-	-	-

^aInhibition % was tested at 50 μ M.

^bDetermined at 100 μ M inhibitor concentration by contrast phase microscopy comparisons to Vero controls; nd = not determined. ^cNfx: Nifurtimox was used as reference drug. Benznidazole, but only compound **6d** showed a moderate activity (PGI-Y = 37% at 50 μM) (14).

The unspecific cytotoxicity for the most active compounds **1i–n** and **6b–e** was evaluated in vitro against mammalian cells at 100 and 50 μ M, using Vero cells as the cellular model. The results showed that compounds **11**, **1m**, and **1n** were non-toxic at the highest doses assayed, and compound **1m** was found to have the best selectivity as anti-*T. cruzi* Tul 2 agent, see Table 4.

Molecular modeling and OSAR studies

The mechanistic proposal for cruzipain inhibition involves a nucleophilic attack of the cysteine sulfur atom to an electrophilic moiety able to accept electrons. According to this idea, we decided to gain insight into the atomic distribution of charges as well as the contribution of each atom to the frontier orbital. A systematic conformational analysis and ab *initio* geometry optimization was carried out as described in the experimental section. The electronic parameters computed were HOMO and LUMO energies, LUMO and HOMO coefficients, normalized LUMO and HOMO coefficients for each atom (15). Common physicochemical properties are frequently related to biological activity and the drug-likeness concept, such as theoretical logP (Moriguchi's LogP–mlogP), (mlogP)², molecular refractivity (MR) and molecular weight (MW), which also calculated using DRAGON software.

The QSAR analysis showed a very poor correlation between cruzipain inhibition (PCI) and the calculated descriptors.

However, better results were obtained between PGI-Tul2 activity and the descriptors, revealing significant correlations with MR (correlation coefficient r = 0.83), Moriguchi's logP (r = 0.79), and (mlogP)² (r = 0.74). The MR explained around 70% of the variance of the 14 assayed compounds.

Docking

Molecular docking was used to analyze the binding mode of **6b**, the most active compound of the set. The most stable docking conformation obtained for **6b** is shown in Figure 3. A hydrogen-bonding interaction was predicted between the ester group of the inhibitor and the TRP184 residue, with a 1.93 Å measured distance. Additionally, the aromatic ring of **6b** makes positive lipophilic interactions with the hydrophobic S2 pocket of the enzyme, characterized by LEU60, ALA136, and MET68 residues. The chlorine atom points toward the end of the cavity, delimited by the GLU105 residue, which is capable of extending its carboxylic group out to avoid negative interactions with lipophilic ligands. Despite these nonbonded interactions that stabilized the complex, no interactions were found between **6b** and the CYS25 and/or HIS162 catalytic residues and no nucleophilic attack can be predicted. This observation may explain the observed weak inhibition of cruzipain.

Conclusions

New 2-hydrazoyl-4-thiazolidinone scaffolds could be obtained from commercially available starting materials by using MCR and well-

Pizzo et al.

established methodologies. Compounds **1i**, **1j**, **1k**, **1m**, and **6c** showed the highest antiproliferative activity when screened on *T. cru-zi*-Tul2. Compound **6b** was the most active on cruzipain but only moderately active on the parasite. The mode of action proposed for these compounds is based on a different mechanism rather than cruzipain inhibition. Toxicity screening was also performed pinpointing the amide **1m** as the most selective compound. Further structure optimization is needed to increase the antichagasic activity.

Docking calculation of the compounds allowed explaining, on a molecular basis, why the selected inhibitors were only able to inhibit cruzipain at the μ M level. Inhibitor **6b** seems to interact with the hydrophobic pocket of the enzyme, and no nucleophilic attack was predicted.

QSAR analysis showed significant correlations between mlogP and MR versus anti-*T. cruzi* Tul 2 activity. One might infer that these correlations could be associated with permeation through the parasite cellular membrane. Remarkably, the best-correlated descriptors are usually used to characterize permeability and bioavailability.

These results might be used in an iterative way to construct new, refined models with improved predictive capability, to conduct new virtual screening campaigns.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institutes of Health-FIRCA (R03TW007772). We greatly appreciate Prof. Mercedes González for providing valuable suggestions and corrections to this paper. G.M. thanks RIDIMEDCHAG-CYTED. A.T., L.G., and J.J.C. are members of the Research Career of CONICET (Argentina). L.B.-B. and L.G. thank ANPCyT and Incentivos UNLP. P.P. thanks CIC-BsAs.

References

- McKerrow J.H., Doyle P.S., Engel J.C., Podust L.M., Robertson S.A., Ferreira R., Saxton T., Arkin M., Kerr I.D., Brinen L.S., Crack C.S. (2009) Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz;104:263–269.
- 2. Cazzulo J., Stoka V., Turk V. (2001) The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Design;7:1143–1156.
- Franke de Cazzulo B.M., Martinez J., North M.J., Coombs G.H., Cazzulo J.J. (1994) Effect of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett;124:81–86.
- Ferreira R., Simeonov A., Jadhav A., Eidam O., Mott B.T., Keiser M.J., McKerrow J.H., Maloney D.J., Irwin J., Shoichet B.K. (2010) Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new Cruzain inhibitors. J Med Chem;53:4891–4905.
- 5. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. (1998) Automated docking using a

Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. J Comput Chem;19:1639–1662.

- Irwin J.J., Shoichet B.K. (2005) ZINC a free database of commercially available compounds for virtual screening. J Chem Inf Model;45:177–182.
- de Aquino T.M., Liesen A.P., da Silva R.E.A., Lima V.T., Carvalho C.S., de Faria A.R., de Araujo J.M., de Lima J.G., Alves A.J., de Melo E.J.T., Goes A.J.S. (2008) Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3phenyl-5-thiazolidineacetic acids. Bioorg Med Chem;16:446–456.
- Lima A.C., Souza R., Moreira D.R., Cardoso M.V.O., Gouveia A.C., Farias L.M., Zaldini M., Costa A., Santana R., Soares M.B.P. (2006) Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazidesand acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Med Chem;14:3749–3757.
- Saiz C., Pizzo C., Manta E., Wipf P., Mahler S.G. (2009) Microwave assisted tandem reactions for the synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones. Tetrahedron Lett;50:901–904.
- Laughlin M.R., Taylor J., Chesnick A.S., Balaban R.S., Summers M.F., Marzilli L.G., Bax A. (1986) Complete H-1 and C-13 assignments of coenzyme-B12 through the use of new two-dimensional NMR experiments. J Am Chem Soc;108:4285–4294.
- Vogeli U., Philipsborn W. (1978) Structures of addition products of acetylenedicarboxylic acid esters with various dinucleophiles. An application of C,H-spin-coupling constants. Helv Chim Acta;61:607–617.
- Labriola C., Sousa M., Cazzulo J.J. (1993) Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. Biol Res;26:101–112.
- Boiani L., Gerpe A., Arán V.J., Torres de Ortiz S., Serna E., Vera de Bilbao N., Sanabria L., Yaluff G., Nakayama H., Rojas de Arias A., Maya J.D., Morello A., Cerecetto H., González M. (2009) In vivo studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas disease. Eur J Med Chem;44:1034–1040.
- Porcal W., Hernández P., Aguirre G., Boiani L., Boiani M., Merlino A., Ferreira A., Di Maio R., Castro A., González M., Cerecetto H. (2007) Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. Bioorg Med Chem;15:2768–2781.
- Locke J., Griffith R., Bailey T., Crumbie R. (2009) Competition between cyclization and bisimine formation in the reaction of 1,3-diaminopropanes with aromatic aldehydes. Tetrahedron;65:10685–10692.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Data S1. General procedure for the preparation and characterization of all new compounds.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Cite this: Med. Chem. Commun., 2012, 3, 362

www.rsc.org/medchemcomm

CONCISE ARTICLE

Selenosemicarbazones as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against *Trypanosoma cruzi*[†]

Chiara Pizzo,^a Paula Faral-Tello,^b Gustavo Salinas,^c Martín Fló,^c Carlos Robello,^{bd} Peter Wipf^e and S. Graciela Mahler^{*a}

Received 11th November 2011, Accepted 6th December 2011 DOI: 10.1039/c2md00283c

The cysteine protease cruzipain is an essential *T. cruzi* enzyme and one of the few validated drug targets for Chagas disease. Thiosemicarbazones have been described as cruzipain inhibitors. While searching for new antichagasic drugs, we synthesized a series of selenosemicarbazone analogs and demonstrated that the isosteric replacement of the sulfur atom with selenium resulted in an enhancement of the cysteine protease inhibitory effect. Three selenosemicarbazones were characterized enzymatically and proved to be reversible, slow-binding inhibitors for the Z-Phe-Arg-AMC substrate. Their $K_{\rm I}$ values were in the low nM range (3.7 to 29.7 nM), suggesting a strong interaction with the enzyme, approaching a tight binding definition. All selenosemicarbazones tested showed better activities against epimastigotes than Benznidazole, the currently used drug, with IC₅₀ values ranging from 1.2 to 5.9 μ M (Bnz IC₅₀ = 12.5 μ M). Three of these compounds showed a better Selectivity Index (SI) than Benznidazole. These compounds also displayed activity against the infective intracellular amastigote form at low micromolar range. Overall, our results support the role of these novel organoselenium compounds as promising lead candidates for further drug development studies.

Introduction

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected parasitic tropical disease affecting, according to the World Health Organization (WHO), an estimated of 10 million people, mostly in South and Central America where it is endemic.¹

At present, there are only two drugs used in the clinical treatment of this disease: Nifurtimox and Benznidazole (Bnz). Although their use in the acute and early chronic phases of Chagas disease can reach a 70% cure rate, they have limited effectiveness in the chronic phase and serious side effects.² The mechanism of action for these nitro-aromatic derivatives still remains unclear. Recently, ravuconazole and posaconazole, both known as potent anti-fungals inhibiting the ergosterol

362 | Med. Chem. Commun., 2012, 3, 362–368

biosynthesis, have entered into clinical trials for Chagas as promising anti-trypanosomatid agents.³ The development of new strategies and targets for an effective disease management is still a challenge.⁴

Inhibitors of the major cysteine protease

The cysteine protease cruzipain (Cz) is the enzyme responsible for the major proteolytic activity in all stages of the *T. cruzi* life cycle and has been localized in different parasite compartments.⁵ In the epimastigote form, the protease is located into the lysosome: in contrast, in the amastigote form, the infective intracellular state, the protease not only appears in the lysosome but also on the surface of the parasite, where it is in contact with the host cell cytoplasm and therefore directly involved in the host–parasite relationship.⁶ The use of selective inhibitors of this protease impairs host cell invasion,⁷ blocks the proliferation of epimastigotes and amastigotes, and arrests metacyclogenesis (transformation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes) *in vitro*, supporting the role of this enzyme in essential functions for parasitic survival and growth.⁸

Thiosemicarbazones have previously been described as reversible cruzain inhibitors; the enzyme is the purified recombinant protein lacking the *C*-terminal domain. These compounds have IC_{50} values ranging from 20 to 200 nM, and show a trypanocidal effect (Fig. 1).⁹⁻¹¹

^aCátedra de Química Farmacéutica, DQO, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), CC 1157 Montevideo, Uruguay. E-mail: gmahler@fq.edu.uy; Fax: +5982 9241906; Tel: +5982 9244856 ^bUnidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay ^cCátedra de Inmunología, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay

^dDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay ^eDepartment of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, 15260, USA

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: Additional experimental details for the preparation of selenosemicarbazones, ¹H and ¹³C-NMR for compounds **3a–f**, K_I curves, MS-cruzipain, growth inhibition and cell panel lines of amastigotes. See DOI: 10.1039/c2md00283c

$$\overset{R^{1}}{\underset{R^{2}}{\overset{N}}} \overset{N}{\underset{H}{\overset{N}}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}{\overset{N}}} \overset{N}{\underset{H}{\overset{N}}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}{\overset{N}}} \overset{N}{\underset{H}}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}}} \overset{N}{\overset{N}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\underset{H}} \overset{N}{\overset{N}} \overset{N}{$$

 R^1 = Me, R^2 = 3-BrPh; IC₅₀ = 200 nM, [Cz] = 1 nM⁹ R^1 = 3-BrPh, R^2 = 3-BrPh, IC₅₀ = 24 nM, [Cz] = 0.1 nM¹⁰ R^1 = n-Bu, R^2 = 3,4-(Cl)₂Ph, IC₅₀ = 20 nM, [Cz] = 1 nM¹¹

Fig. 1 Published IC_{50} values of thiosemicarbazone based cruzain inhibitors.

Although these compounds and their applications have been patented,¹² further studies were discontinued.

The spread of organoselenium compounds in medicinal chemistry projects has been growing due to their biologically diverse properties as glutathione peroxidase mimics, antioxidants, thioredoxin reductase inhibitors,^{13,14} butyrylcholinesterase inhibitors,¹⁵ and antitumor agents.¹⁶ Recently, the drug ebselen was the first organoselenium compound entering into phase II clinical trials, for the study of signaling mechanisms and vascular function in patients with diabetes mellitus.¹⁷

Since selenium possesses similar electronic properties as sulfur, an isosteric replacement¹⁸ of the sulfur atom by selenium in the selenocarbonyl group could generate a more electrophilic inhibitor compared to the species with a thiocarbonyl moiety, Fig. 2.

With this hypothesis in mind, we prepared six selenosemicarbazones starting from simple building blocks: ketones or aldehydes and selenosemicarbazide. The biological characterization of the synthetic compounds revealed novel and potent cruzipain inhibitors, which are also effective in inhibiting the growth of *T. cruzi in vitro*.



Fig. 2 Isosteric replacement for thiosemicarbazones.

Results and discussion

Synthesis of selenosemicarbazones

Selenosemicarbazones 3a-f were prepared according to the general reaction sequence shown in Scheme 1. The compounds were obtained starting from aldehydes or ketones 1 and selenosemicarbazide 2 in EtOH and acidic media, by conventional heating at reflux (conditions a), or under microwave radiation (conditions b), Scheme 1. The yields ranged from moderate to good (46–77%), except for 3e, which was obtained in a modest 27%, probably due to the lower reactivity of ketone 1e.

Compound **3f** was obtained as an inseparable mixture of Z : E isomers, of the C=N group. Attempts to isolate both isomers failed due to their re-equilibration within 3 h.



Scheme 1 Selenosemicarbazone 3a-f synthesis.

Cruzipain inhibition profile of selenosemicarbazones

Compounds **3a–f**, and the thiosemicarbazone **4**, the sulfur analogue of **3a**, were screened against Cz^{19} at three inhibitor concentrations: 10, 2 and 0.3 μ M (Table 1). The lipophilicity (log *P*) for all compounds was also calculated (Table 1).²⁰

All assayed selenosemicarbazones are more active than the thiosemicarbazone **4**. Furthermore, the seleno-compounds derived from ketones **3a**, **3e** and **3f** ($\mathbb{R}^2 = \mathbb{M}e$ or 3-BrPh or *n*-Bu) are more active than those prepared from aldehydes **3b**, **3c**, and **3d** ($\mathbb{R}^2 = \mathbb{H}$). Similar findings have been described for thiosemicarbazones.⁹ The lipophilicity (log *P*) is a molecular parameter that appears to partly correlate with the inhibitory activity, since the most lipophilic compound **3f** is also the most active one (Table 1).

Table 1 Screening of selenosemicarbazones 3a–f and sulfur analogue 4 against Cz at $[{\it I}]=10,\,2$ and 0.3 μM

	% of Cz inhi				
Compound	10 µM	2 µM	0.3 μΜ	$\log P^b$	
3a	$98 \pm 1\%$	$87 \pm 5\%$	$81 \pm 1\%$	2.69	
3b	$93 \pm 1\%$	$93 \pm 1\%$	$40 \pm 1\%$	2.78	
3c	$99 \pm 1\%$	$96 \pm 1\%$	$57 \pm 5\%$	3.28	
3d	$91 \pm 3\%$	$88\pm3\%$	$24 \pm 5\%$	2.87	
3e	$99 \pm 1\%$	$98 \pm 1\%$	$90 \pm 4\%$	4.70	
3f	$100 \pm 1\%$	$98 \pm 1\%$	$95 \pm 1\%$	4.76	
4	$80\pm1\%$	$79\pm3\%$	$24\pm5\%$	2.58	

^{*a*} Values are means of three independent experiments. ^{*b*} log *P*: calculated logarithm of compound partition coefficient between *n*-octanol and water.

Inhibition studies for selenosemicarbazones

Compounds **3a**, **3e** and **3f** were the most active under the screening conditions mentioned above. In order to evaluate their binding equilibria, they were selected for further characterization.

To determine the kinetics of the inhibition mechanism, progress curves of the enzymatic reaction in the presence of increasing inhibitors concentration were measured (for compound 3f, curves are shown in Fig. 3), and the optimum time was estimated as the one when the substrate hydrolysis rate became constant. After 30 min, the inhibition equilibria were reached in all cases.



Fig. 3 Slow binding kinetics for 3f.

Compound **3f** could act as a slow-binding inhibitor; the rate of substrate hydrolysis reached the inhibited steady-state rate in a time scale of minutes, suggesting that the formation of the enzyme–inhibitor complex is a slow process.

In order to establish if these compounds showed a reversible or irreversible inhibitor behavior, compound **3a** was pre-incubated with the enzyme for 30 min and then passed through a PD-10 column. After elution of the enzyme, the enzymatic activity was recovered, indicating that a reversible inhibition could be taking place. The excess of inhibitor required to inhibit the enzyme also confirmed these findings.

$K_{\rm I}$ and mode of action determination

Compound **3f** was selected for further characterization since it had the best inhibition profile. In order to determinate the mechanism of inhibition, velocity *vs.* [S] curves were analyzed at increasing [**3f**], where [S] is the substrate concentration, see Table 2.

Table 2 V_{maxapp} and K_{M} estimated from eqn (1) for **3f**

3f ∕nM	$V_{\rm maxapp}{}^a imes 10^{-3}/\mu{ m M~seg^{-1}}$	$K_{\rm M}{}^a/\mu{ m M}$
0	5.9 ± 0.4	13 ± 2
2	4.7 ± 0.4	12 ± 2
5	3.7 ± 0.1	11 ± 1
10	2.0 ± 0.1	16 ± 3

^{*a*} All values are given as the mean and standard deviation of three different experiments.

 $K_{\rm M}$ and $V_{\rm maxapp}$ were obtained from Fig. 4 and eqn (1):

$$v = V_{\text{maxapp}}[S]/(K_{\text{M}} + [S]) \tag{1}$$

where V_{maxapp} is the apparent maximum velocity and K_{M} is the Michaelis constant.

The results showed that V_{maxapp} decreased curvilinearly with increasing inhibitor concentration, and K_{M} remained constant at the inhibitor concentration range studied. This suggested a non-competitive inhibition mechanism associated with **3f** (Fig. 4).



Fig. 4 [S] (μ M) vs. velocity (μ M seg⁻¹), for 3f.

Interestingly, a recent article computationally characterized an additional "druggable pocket", adjacent to the active site of cruzain, that may play a role in allosteric regulation, structural stability, or protein–protein interactions.²¹ This could be a good starting point for further investigations of the mechanism of the enzyme inactivation with selenosemicarbazones.

Inferring a non-competitive behavior, the corresponding $K_{\rm I}$ (inhibition constant) was calculated for **3f** as a function of $V_{\rm maxapp}$ and [**3f**] using the data from Table 2 and eqn (2). The calculated value was **3f** $K_{\rm I} = 6.4$ nM.

$$V_{\text{maxapp}} = V_{\text{max}} / (1 + [I]/K_{\text{I}})$$
⁽²⁾

where V_{max} is maximum velocity without inhibitor.

The K_{I} value was also estimated according to a model for noncompetitive inhibitors corresponding to eqn (3), as a function of velocity *vs.* [**3f**] (Fig. 5). Using this model, the K_{I} was found to be 3.7 nM, in good agreement with the K_{I} value determined using a completely different set of data (K_{I} 6.4 nM).

$$v = V_{\max}[S] \times 1/(1 + [I]/K_{I})(K_{M} + [S])$$
(3)

The $K_{\rm I}$ calculation for **3f** using different methodologies (eqn (2) and (3)) resulted in consistent values of 6.4 and 3.7 nM, respectively.



Fig. 5 $K_{\rm I}$ determination for 3f, using eqn (3) corresponding to a noncompetitive model, $K_{\rm I} = 3.7$ nM.
Considering the chemical and structural similarities among the inhibitors, the $K_{\rm I}$ for 3a, 3e and 4 was also calculated using eqn (3), with [I] ranging from 0.02 to 0.6 μ M. The results are shown in Table 3.

Table 3 $K_{\rm I}$ values for **3a**, **3e**, **3f** and **4** using eqn (3)

Compound	$K_{\rm I}^{\ a}/{ m nM}$
3a 3e 3f 4	$\begin{array}{c} 29.7 \pm 6.8 \\ 13.3 \pm 4.0 \\ 3.7 \pm 0.2 \\ 142 \pm 31 \end{array}$

^a Values were obtained in triplicate, using non-linear fitting for noncompetitive inhibitors.

Growth inhibition of T. cruzi epimastigotes

Selenosemicarbazones 3a-f were assayed against epimastigote parasites to test their inhibition profile (Table 4). Also, the toxicity of each compound in uninfected mammalian cell (Vero cell) culture was determined, and the Selective Index (SI) calculated as CC₅₀/IC₅₀, see Table 4.

Table 4 IC₅₀, CC₅₀ and respective SI values of selected compounds for the epimastigote form Dm28c of T. cruzi

Compound	Dm28c IC ₅₀ ^{<i>a</i>} /µM	Vero CC ₅₀ ^b /µM	SI^c
3a	1.2 ± 0.8	46.4 ± 6.3	39
3b	5.9 ± 1.6	171.7 ± 13.5	29
3c	2.3 ± 0.6	95.1 ± 14	41
3d	3.8 ± 0.8	167.3 ± 17.4	44
3e	$5,2 \pm 0.3$	71.2 ± 9.7	14
3f	3.2 ± 0.3	81.8 ± 8.5	25
Bnz	12.5 ± 2.0	309.1 ± 2.0	25

 a IC_{50}, concentration of a compound that inhibits 50% of growth compared to a non-treated control. b CC_{50}, concentration of a compound that kills 50% of the Vero cells when compared to a nontreated control. ^c SI, selective index: ratio between CC₅₀ and IC₅₀; all values are given as the mean and standard deviation of three different experiments.

All assayed compounds show better activities against epimastigotes than Benznidazole, with IC50 values ranging from 1.2 to 5.9 μ M (IC₅₀ Bnz = 12.5 μ M). The correlation between antiparasitic and enzymatic activity was not linear, showing that while 3e and 3f have the lowest $K_{\rm I}$ values, they do not elicit the best antiparasitic results. This could be attributed to a variation in the permeability, solubility, in vivo stability and metabolism, or differences between the native cysteine proteases from Tulahuen-2 and Dmc28 strains of T. cruzi.

Selenosemicarbazones 3a, 3b, 3c, and 3d are more selective drugs than Benznidazole, which is used as a clinical therapeutic. Instead, compound 3f presents the same SI as the reference and **3e** is the least selective.

Amastigote cell infection assay

A subset of selected selenosemicarbazones was evaluated against the clinically more relevant form of the parasite, the intracellular amastigotes. The criteria for the selection was made based on

Table 5 Amastigote growth inhibition GI (%) for compounds 3a, 3c, 3d, 3f and Benznidazole (Bnz)

Compound	Concentration/µM	Dm28c ^a GI (%)	
3 a	1.2	76 ± 3	
3a	2.4	77 ± 1	
3a	4.8	78 ± 3	
3c	2.3	63 ± 6	
3c	4.6	69 ± 5	
3c	9.2	72 ± 1	
3d	3.8	34 ± 7	
3d	7.6	70 ± 2	
3d	15.2	74 ± 4	
3f	3.2	66 ± 2	
3f	6.4	73 ± 3	
3f	12.8	74 ± 1	
Bnz	1.0	27 ± 5	
Bnz	15.0	77 ± 1	
Bnz	30.0	85 ± 1	

^{*a*} GI: growth inhibition (%), expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments. Bnz: Benznidazole.

their best selectivity index 3a (SI = 39), 3c (SI = 41) and 3d (SI = 44). Also, we chose 3f (SI = 25), which is the most active against cruzipain. The tested concentrations were selected based on the IC₅₀ values determined for epimastigotes, IC₅₀ \times 2 and IC₅₀ \times 4. All compounds exhibited good profiles of growth inhibition (GI), at low micromolar concentrations, see Table 5. The most active **3a** (1.2 μ M, GI = 76%) was able to reduce growth inhibition without any toxic effect on Vero cells and was also more active than Benznidazole (1.0 μ M, GI = 27%). The same behavior could be observed for the epimastigote form of the parasites. Compound 3f with the best $K_{I} = 3.7$ nM was not the best inhibitor of amastigote growth, a fact that was also observed for the epimastigote assay.

According to the program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), WHO's criteria considers a compound as a drug hit for Chagas disease with an $IC_{50} \le 1 \ \mu g \ m L^{-1}$ against whole organism and a SI > $50.^{22}$ Even though our compounds do not yet quite meet these criteria, they are promising starting points for further explorations. Compound 3a has the best profile with epimastigote IC₅₀ = $0.4 \,\mu g \, m L^{-1}$ and SI = 39. Also, it has the best enzymatic-parasitic activity correlation (Tables 3, 4 and 5).

The antiparasitic activity of selenosemicarbazones could be attributed mainly to their cruzipain inhibition. Recently, independent studies have shown that administering Se (4-16 ppm) to infected mice led to a dose-dependent decrease of parasitemia, and also a reduction of heart damage;23 this study has moved on to clinical trials.¹⁷ These findings could point out an additional beneficial effect for the selenosemicarbazones to be assessed.

Conclusions

In summary, the synthesis of six selenium analogues of thiosemicarbazones has been achieved using simple building blocks. We have demonstrated that the isosteric replacement of the sulfur atom (compound 4) with selenium (compound 3a) resulted in an improvement of the cruzipain inhibitory activity.

The enzymatic inhibition mechanism of cruzipain with selenosemicarbazones has been studied, and the compounds appear to act as reversible slow-binding inhibitors, with $K_{\rm I}$ values close

Downloaded by University of Sydney on 08/05/2013 08:40:53.

to a tight binding definition. The inhibitory activities range from 3.7 nM to 29.7 nM and are therefore remarkably low for small molecules with a reversible inhibition mode.

The selenosemicarbazones are also effective as anti-*T. cruzi* agents against non-infective epimastigotes and infective intracellular amastigotes. Their antiparasitic activity could be attributed mainly to their cysteine protease inhibitory effect. All evidence indicates that these new hits with low micromolar anti-*T. cruzi* activity and better selectivity than Benznidazole represent good starting points for future SAR and further optimization efforts.

Experimental section

Preparation of selenosemicarbazones 3a, 3b and 3c

Method A: the preparation of compound **3a** is representative.

(E)1-(3-Bromophenyl)ethanone selenosemicarbazone (3a). To a stirred solution of 1-(3-bromophenyl)ethanone 1a (145 mg, 0.74 mmol) in EtOH (25 mL), selenosemicarbazide 2 (100 mg, 0.72 mmol) and acetic acid (1 mL) were added. The reaction mixture was heated at reflux for 4 h with stirring. Then, the solvent was removed at reduced pressure until dryness. The residue was poured into water (30 mL), NaHCO₃ was added until pH 7 and the mixture was extracted with ethyl acetate (5 \times 30 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography on SiO₂ to give **3a** (72 mg, 53%) as a yellow solid: mp 143-144 °C (dec); IR (KBr) 3380, 3199, 3139, 1653, 1592, 1560, 1540, 1508, 1468, 1418, 1332, 1290, 1101, 1072, 994, 888, 827, 781, 699, 681, 621, 539, 412 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 2.28 (s, 3H), 6.86 (bs, 1H), 7.28 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, J = 1.6, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.61 (ddd, J = 1.6, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.76 (bs, 1H), 7.86 $(dd, J = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 9.07 (bs, 1H); {}^{13}C NMR (CDCl_3) 13.8,$ 122.9, 125.1, 129.4, 130.2, 133.1, 138.9, 147.7, 176.9; HRMS calcd for C₉H₁₀BrN₃SeNa [M + Na]⁺ 341.9112, found 341.9111.

3-Bromobenzaldehyde selenosemicarbazone (3b). The representative procedure for selenosemicarbazone **3a** was followed using 3-bromobenzaldehyde **1b** to give **3b** (46%) as a white solid: mp 186–187 °C (dec); IR (KBr) 3372, 3229, 3144, 2980, 1602, 1528, 1474, 1424, 1357, 1281, 1215, 1099, 1057, 995, 942, 886, 785, 681, 606, 561, 547, 496, 436, 399, 250 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 7.35 (dd, J = 7.6, 8.0 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J = 1.4, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 1.4, 7.6 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.22 (dd, J = 1.4, 2.0 Hz, 1H), 8.72 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 11.79 (bs, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 122.4, 127.3, 129.0, 130.8, 132.6, 136.5, 141.9, 173.9; HRMS calcd for C₈H₈BrN₃SeNa [M + Na]⁺ 327.8956, found 327.8926.

3,4-Dichlorobenzaldehyde selenosemicarbazone (3c). The representative procedure for selenosemicarbazone **3a** was followed using 3,4-dichlorobenzaldehyde **1c** to give **3c** (77%) as an off-white solid: mp 294–295 °C (dec); IR (KBr) 3413, 3266, 3160, 1612, 1602, 1552, 1524, 1552, 1472, 1389, 1361, 1271, 1218, 1127, 1092, 1030, 929, 825, 787, 722, 697, 678, 587, 527, 490, 452, 353 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.27 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.76

(bs, 2H), 11.84 (bs, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 129.1, 129.3, 131.8, 132.8, 133.1, 135.9, 141.8, 175.1; HRMS calcd for $C_8H_7Cl_2N_3SeNa [M + Na]^+$ 317.9069, found 317.9055.

Preparation of selenosemicarbazones 3d, 3e and 3f

Method B: the preparation of compound 3d is representative.

3-(Trifluoromethyl)benzaldehyde selenosemicabazone (3d). To a stirred solution of 3-(trifluoromethyl)benzaldehyde 1d (50 mg, 0.29 mmol) in EtOH (1 mL) were added selenosemicarbazide 2 (36 mg, 0.26 mmol) and p-TsOH ac. (1 mg). The reaction mixture was heated in a microwave vial for 6 min at 90 °C with stirring, $P_{\rm max} = 200$ W. Then, the solvent was removed at reduced pressure until dryness and the residue was purified by chromatography on SiO₂, to give 3d (40 mg, 52%) as an off-white solid: mp 200-201 °C (dec); IR (KBr) 3230, 3148, 2358, 1605, 1527, 1451, 1410, 1342, 1326, 1313, 1281, 1210, 1173, 1129, 1071, 946, 803, 696, 663 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 6.80 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.31 (bs, 1H),7.32 (bs, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 115.5 (q, $J_{CF3} = 4.0$ Hz), 118.2 (q, $J_{CF3} = 4.0$ Hz), 121.2, 122.6, 122.8 (q, $J_{CF3} = 32.4$ Hz), 127.0, 131.8 (q, $J_{CF3} = 272.0$ Hz), 134.9, 166.4; HRMS calcd for C₉H₈F₃N₃SeNa [M + Na]⁺ 317.9728, found 317.9732.

Bis(3-bromophenyl)methanone selenosemicarbazone (3e). The representative procedure for the preparation of selenosemicarbazone **3d** was followed using bis(3-bromophenyl)methanone **1e** to give **3e** (17%) as a yellow solid: mp 170–171 °C (dec); IR (KBr) 3392, 2920, 1630, 1560, 1524, 1484, 1465, 1419, 1290, 1255, 1176, 1072, 994, 829, 788, 716, 688, 437 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) 6.91 (bs, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.32 (ddd, J = 1.2, 1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, J = 1.2, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 1.6, 2.0 Hz, 1H), 7.74 (ddd, J = 1.2, 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.83 (bs, 1H), 8.85 (s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 123.0, 124.5, 126.8, 130.2, 130.3, 131.2, 131.7, 132.3, 133.7, 134.2, 137.8, 148.6, 177.1; HRMS calcd for C₁₄H₁₀Br₂N₃Se [M – H]⁻ 457.8407, found 457.8421.

(*E*,*Z*)-1-(3,4-Dichlorophenyl)pentan-1-one selenosemicabazone (3f). The representative procedure for selenosemicarbazone 3d was followed using 1-(3,4-dichlorophenyl)pentan-1-one 1f to give 3f (55%) as a yellow solid (1 : 1 *Z* : *E* mixture): mp 130–131 °C (dec); IR (KBr) 2927, 1735, 1719, 1686, 1655, 1648, 1637, 1618, 1560, 1509, 1440, 1377, 1273, 1137, 1027, 820 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) 0.86 (m, 3H), 1.33 (m, 4H), 2.67 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H_{isomer a}), 7.67 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H_{isomer b}), 8.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.66 (bs, 1H), 8.82 (bs, 1H), 10.68 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-d₆) 13.7, 13.8, 21.9, 22.0, 25.6, 26.0, 27.5, 28.2, 126.4, 127.2, 127.9, 128.6, 130.4, 130.8, 131.5, 131.6, 131.8, 131.9, 136.9, 137.3, 150.2, 154.1, 175.0; HRMS calcd for C₁₂H₁₅Cl₂N₃Se [M - H]⁻ 349.9731, found 349.9721.

Less polar isomer (AcOEt : Hexanes : NH₄OH 4 : 10 : 0.3, $R_f = 0.6$): ¹H NMR (acetone-d₆) 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.44 (m, 4H), 2.97 (m, 2H), 6.86 (bs, 1H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 2.2, 8.4 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 2.2 Hz, 1H).

More polar isomer (AcOEt : Hexanes : NH₄OH 4 : 10 : 0.3; $R_f = 0.4$): ¹H NMR (acetone-d₆) 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.50 (m, 4H), 2.99 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz, 1H), 8.13 (bs, 1H), 8.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.58 (bs, 1H), 9.78 (bs, 1H).

The thiosemicarbazone 1-(3-bromophenyl)ethanone thiosemicarbazone 4 was prepared according to a previously described methodology.⁹

Biology

Cysteine protease activity determined by fluorometric assay: Procedure 1. Cz (1 nM) was incubated in 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM sodium chloride, 100 mM EDTA, containing 1 M DTT and DMSO for 5 min at 37 °C. Then, fluorogenic substrate Z-phenylarginine 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (Z-Phe-Arg-AMC) ($K_{\rm M} = 10 \ \mu M$) was added to give 10 μM substrate. The changes in fluorescence intensity, corresponding to the formation of the hydrolysis product 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), were registered at excitation and emission wavelengths of 390 and 460 nm, respectively, with a microplate fluorescence reader (FLUOstar* OPTIMA, BMG Lab Technologies). Initial steady-state rates of substrate hydrolysis were calculated from the linear portion of product (AMC) vs. timeplots when less than 10% of substrate had been consumed. The final assay volume was 200 µL with a DMSO concentration of 10%. At this concentration, DMSO did not significantly affect the activity of cruzipain. A calibration curve of Fluorescence Units (FU) vs. AMC (µM) was carried out before each experiment, in order to convert FU into AMC formation (µM).

Screening of selenosemicarbazones using the fluorometric assay. According to Procedure 1, compounds **3a–f** and **4** were preincubated with Cz in the reaction buffer for 5 min. Then, the enzyme–substrate reaction was started by addition of the Z-Phe-Arg-AMC substrate (10 μ M) and monitored for 10 min. Inhibitor stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO, and screened at 10, 2 and 0.3 μ M in duplicate. The percentage of cruzipain inhibition (CI) was calculated as follows: CI (%) = (v_i/v_o) × 100 – 100, where v_i and v_o correspond to the velocity of AMC formation (μ M)/*t* (s) with and without inhibitor, respectively. E64 was used as an inhibitor reference compound and was included in the analysis as a control.

log *P* **prediction.** The value was estimated from the SMILES code of the compounds using the software package Molinspiration Cheminformatics (Slovensky Grob, Slovak Republic).²⁰

Study of progress curves for enzyme–inhibitor equilibrium. The necessary time to reach the steady state (time when enzyme hydrolysis rate becomes constant) was studied for **3a**, **3e**, **3f** and **4**. At several inhibitor concentrations (5, 10, 40, 100, 200 and 500 nM) and at a fixed substrate concentration (10μ M), the enzyme–substrate reaction was started by addition of Cz (0.2 nM) and monitored for 1 h. Data of progress curves were performed using Origin® software (OriginLab). All experiments were carried out three independent times.

Characterization of the mechanism of inhibition. Cz (1 nM) and inhibitor **3a** (10 μ M) were pre-incubated for 30 min and then added to a prepacked PD-10 (GE Healthcare, containing 8.3 mL

of SephadexTM G-25 Medium) desalting column. The flowthrough containing the unbound inhibitor was discarded, and the fraction containing the enzyme (or inhibitor–enzyme complex) was eluted with 3.5 mL buffer; this fraction was left for 30 min until the new equilibrium state was reached. Afterwards, the enzymatic activity of the eluted fraction was determined as described above.

 $K_{\rm M}$ and $V_{\rm max}$ determination. Cz was preincubated using three different concentrations of compound **3f** (2, 5 and 10 nM) and without inhibitor, according to Procedure 1, but with a preincubation time of 30 min. Then, the enzyme–substrate reaction was started by addition of different concentrations (0.25, 0.5, 1.5, 3, 5, 10, 20, 35 and 50 µM) of the Z-Phe-Arg-AMC substrate. All assays were performed at least in triplicate. Data evaluation was performed using Origin® software (OriginLab), which allowed $K_{\rm M}$ and $V_{\rm max}$ to be estimated at different inhibitor concentrations and without inhibitor, according to eqn (1). Since $V_{\rm maxapp}$ varied, and $K_{\rm M}$ did not (*i.e.* $K_{\rm M} = K_{\rm Mapp}$), $K_{\rm I}$ could be estimated according to eqn (2).

 K_{I} determination. The initial steady-state rates of substrate hydrolysis were measured in order to determine the inhibition constants (K_{I}) towards cruzipain for 3a, 3e, 3f and 4. Different compound concentrations (in the 0.02 to 0.6 μ M range) were preincubated with the enzyme ([Cz] = 1 nM) for 30 min, according to Procedure 1. Then, the enzyme–substrate reaction was started by addition of the Z-Phe-Arg-AMC substrate (10 μ M) and monitored as described above. Inhibitor stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO, and screened at 0.02, 0.03, 0.06, 0.09, 0.2, 0.35 and 0.6 μ M in duplicate. Data evaluation and analysis were performed using Origin® software (OriginLab), which allowed K_{I} to be estimated. The inhibition constants were calculated by nonlinear fitting to the noncompetitive using eqn (3).

Cell culture infections. Vero cell lines (carcinoma-derived African green monkey fibroblast cells) were seeded in 75 cm² flasks at a density of 1.5×10^6 and maintained in DMEM Glutamax[™] medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% of inactivated FBS and 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After 24 h of plating, the cultures were infected with bloodstream Dm28c strain trypomastigotes. For the infection, the media were replaced for DMEM Glutamax[™] supplemented with 2% FBS. After infection, the cell cultures were incubated for 24 h for parasite internalization. After this time, cells were washed three times with PBS and the same medium was added. The newly released cell-derived trypomastigotes were used for infection of new cells grown in 75 cm² flasks in a parasite/host cell ratio of 10:1 and maintained for four sub-cultivation passages in Vero cells.

Epimastigote growth inhibition assay. Epimastigotes of the Dm28c strain,²⁴ in logarithmic phase of growth, were seeded into 96-well plates at a final concentration of 3×10^6 cells per mL and incubated with different concentrations of the inhibitors. The growth culture was medium in LIT supplemented with 10% FBS: DMSO in the culture media never exceeded a final concentration

of 0.5%. Control conditions as parasites without drug and medium without parasites were included. The plate was incubated for 72 h at 28 °C. Resazurin was added to a final concentration of 100 μ M, and was incubated at 28 °C with the parasites for 24 h. Absorbance at 490 and 595 nm was measured with a microplate reader (Bio-Tek ELx800). Data were analyzed as described by Rolón and co-workers, and viability of parasites with respect to control conditions (100% viability) was determined.²⁵

Mammalian cell cytotoxicity assay. Vero cells (ATCC Cat. no. CCL-81TM) were grown in DMEM media supplemented with 10% FBS and a penicillin streptomycin solution. A total of 50 000 cells per well were seeded into 96 well plates and allowed to grow and after 24 h different concentrations of the compounds were added. After 72 h of incubation viability for the CC₅₀ (cytotoxic concentration that kills the 50% of cells compared to non-treated control) determination was measured by the resazurin method.²⁶

T. cruzi mammalian cell invasion assays (infectivity assays). T. cruzi Dm28c strain was maintained cyclically in Vero cells as described above. In vitro host cell invasion assays were carried out as previously described.²⁶ Briefly, 3×10^5 trypomastigotes were placed in each well of Nunc® Lab-Tek® chamber Slide™ system of 8 wells containing 3×10^4 Vero cells (10 : 1). After 8 h of adsorption, the medium was replaced with the medium supplemented with 3 different concentrations of compounds (the IC₅₀ determined for epimastigotes, IC₅₀ \times 2 and IC₅₀ \times 4). After 24 hours of infection, the wells were washed five times with PBS and fixed with 95% ethanol. In order to determine the percentage of Growth Inhibition (GI) of intracellular amastigotes in conditions of drug treatment with respect to control, cover-slips were mounted with ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) and the number of amastigotes per 100 infected cells was obtained. Experiments were performed in triplicate. For the counts an epifluorescence microscope Olypmus IX81 was used.

Acknowledgements

The authors wish to thank NIH-FIRCA (R03TW007772) and CSIC-Grupos (UdelaR) for financial support, and F. LLorente and Dr A. Rodríguez for HRMS (Polo Tecnólogico-FQ, UdelaR). We greatly appreciate Prof. J. J. Cazzulo (UNSAM, Argentina) for helpful discussions, A. Chidichimo for cruzipain purification, and Dr A. Merlino for technical support in the development of the cruzipain inhibition assay. CP is grateful for a fellowship from ANII (BE_POS_2010_1_2362).

Notes and references

- 1 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html.
- 2 J. Lannes-Vieira, T. C. de Araújo-Jorge, N. Soeiro Mde, P. Gadelha and R. Corrêa-Oliveira, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2010, 4, e645, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000645.
- 3 J. A. Urbina, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2009, 104, 311-318.
- 4 R. L. Tarleton, R. Reithinger, J. A. Urbina, U. Kitron and R. E. Gurtler, *PLoS Med.*, 2007, 4, e332.
- 5 B. M. Franke de Cazzulo, J. Martínez, M. J. North, G. H. Coombs and J. J. Cazzulo, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **124**, 81–86.
- 6 J. H. McKerrow, P. S. Doyle, J. C. Engel, L. M. Podust, S. A. Robertson, R. Ferreira, T. Saxton, M. Arkin, I. D. Kerr, L. S. Brinen and C. S. Craik, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009, 104 (suppl. I), 263–269.
- 7 M. N. L. Meirelles, L. Juliano, E. Carmona, S. G. Silva, E. M. Costa, A. C. M. Murta and J. Scharfstein, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, 52, 175–184.
- 8 P. S. Doyle, Y. M. Zhou, J. C. Engel and J. H. McKerrow, Antimicrob. Agents Chemother., 2007, 51, 3932–3939.
- 9 X. Du, C. Guo, E. Hansell, P. Doyle, C. Caffrey, T. P. Holler, J. H. McKerrow and F. E. Cohen, J. Med. Chem., 2002, 45, 2695– 2707.
- 10 R. Siles, S. E. Chen, M. Zhou, K. G. Pinney and M. L. Trawick, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 4405–4409.
- 11 N. Fujii, J. P. Mallari, E. J. Hansell, Z. Mackey, P. Doyle, Y. M. Zhou, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow and R. K. Guy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 121–123.
- 12 F. E. Cohen, X. Du, C. Guo and J. H. McKerrow, US Pat., Application 20040014801, 2004.
- 13 C. W. Nogueira, G. Zeni and J. Rocha, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 6255–6285.
- 14 H. R. P. Naik, H. S. B. Naik, T. R. R. Naik, H. R. Naika, K. Gouthamchandra, R. Mahmood and B. M. K. Ahamed, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, 44, 981–998.
- 15 B. Tasso, M. Catto, O. Nicolotti, F. Novelli, M. Tonelli, I. Giangreco, L. Pisani, A. Sparatore, V. Boido, A. Carotti and F. Sparatore, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46, 2170–2184.
- 16 P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova and I. Domracheva, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, **42**, 635–664.
- 17 http://clinicaltrials.gov.
- 18 L. M. Moreira and E. J. Barreiro, Curr. Med. Chem., 2005, 12, 23-49.
- 19 The enzyme was purified according to: F. Parussini, M. García, J. Mucci, F. Agüero, D. Sánchez, U. Hellman, L. Aslund and J. J. Cazzulo, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003, 131, 11–23.
- 20 log *P* was estimated according to http://www.molinspiration.com/cgibin/properties.
- 21 J. D. Durrant, H. Keränen, B. A. Wilson and J. A. McCammon, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2010, 4, e676, DOI: 10.1371/journal. pntd.0000676.
- 22 S. Nwaka and A. Hudson, Nat. Rev. Drug Discovery, 2006, 5, 941–955.
- 23 A. P. de Souza, G. M. de Oliveira, J. Vanderpas, S. L. de Castro, M. T. Rivera and T. C Araújo-Jorge, *Parasitol. Res.*, 2003, 91, 51–54.
- 24 V. T. Contreras, T. Araujo-Jorge, M. C. Bonaldo, N. Thomaz, H. Barbosa, M. Meirelles and S. Goldenberg, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1988, 83, 123–133.
- 25 M. Rolón, C. Vega, J. A. Escario and A. Gómez-Barrio, *Parasitol. Res.*, 2006, **99**, 103–107.
- 26 J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 5421–5426.

Synthesis of Selenazoles by in Situ Cycloisomerization of Propargyl Selenoamides Using Oxygen–Selenium Exchange Reaction

Chiara Pizzo and S. Graciela Mahler*

Departamento de Química Orgánica, Cátedra de Química Farmacéutica, Universidad de la República (UdelaR), Avda. General Flores 2124, CC1157 Montevideo, Uruguay

S Supporting Information

ABSTRACT: Herein, we describe an approach toward selenazole preparation based on the cycloisomerization of propargyl selenoamides. The selenoamides were synthesized in situ using the Ishihara reagent with spontaneous cyclization to form the 2,5-disubstituted selenazoles. Heterocylcles 9a-j were prepared using readily available starting materials, and yields ranged from moderate to good (20–80%). Methyl-



selenazole 9a could be transformed into a bromomethyl derivative 13 using NBS. The intermediate 13 would provide a more versatile building block for further derivatizations, e.g., the cyanide 14.

T he interest in organoselenium compounds has been growing during the last decades due to its importance as useful intermediates in synthetic chemistry¹ and as precursors of new materials,² but the most outstanding field is related to its biological and medicinal significance.³ In particular, selenazole heterocycles are being currently studied because of their interesting biological properties; see Figure 1.⁴



Figure 1. Biologically relevant selenazole derivatives.

Selenazole 1a is able to induce apoptosis in human ovarian cancer (SKOV3) and leukemia HL6 cell lines;⁵ selenazole 1b is useful for prevention of nitric oxide-mediated inflammatory damages;⁶ selenazofurin 2 is a potent known antiviral agent;⁷ amselamine 3 is a selective histamine H₂-agonist;⁸ 2-piperidinoselenazole 4a and 4-phenyl-2-piperidinoselenazole 4b exhibit superoxide anion-scavenging activity,⁹ while 2-piperidino- and 5-(chloroacetyl)-2-morpholinoselenazoles (Sa,b) strongly inhibit LPS-induced nitric oxide release from microglial cells.¹⁰

The selenazole heterocyclic structure is closely related to its sulfur and oxygen analogue compounds, but their properties often present marked differences. There are few strategies for the synthesis of selenazoles, mainly concerning variations of the Hantzsch procedure used for oxazole and thiazole synthesis. This methodology is based on the condensation of α -halo ketone with selenoureas or selenoamides.¹¹ Selenoureas are inconvenient due to their high cost and low stability to air and light.

As part of our interest in the preparation and biological evaluation of organoselenium compounds,¹² we are interested in a general approach toward the preparation of selenazolyl compounds. We decided to explore the cycloisomerization of propargyl selenoamides to obtain selenazoles. Cycloaddition is a powerful methodology used to prepare aromatic heterocycles like thiazole and oxazole. The cycloisomerization of propargyl amides or thioamides has been reported using different catalysts such as SiO₂,¹³ Au(I),¹⁴ Ag(I),¹⁵ and *p*-Ts-OH acid,¹⁶ among others. Herein, we report an efficient tandem procedure for the synthesis of 2,5-disubtituted selenazoles by in situ cyclo-isomerization of propargyl selenoamides.

First, we optimized the preparation of selenoamide using different conditions for O-Se exchange, employing propargyl amide **6a** as a model. The strategies involved the use of the Woollins reagent (WR)¹⁷ or the Ishihara reagent (LiAlH-SeH).¹⁸ Attempts to obtain selenoamides using WR failed, leading to the recovery of the starting material (see entry 1, Table 1). The second strategy used LiAlHSeH as reagent, according to the conditions reported by Sureshbabu and coworkers for the preparation of selenopeptides.¹⁹ This methodology uses PCl₅ (1 equiv) with a catalytic amount of DMF (0.3 equiv) in PhH for the conversion of peptide amides into iminochloride, followed by the Cl–Se exchange using Ishihara reagent (1 equiv), freshly prepared from Se⁰ and LiAlH₄. Propargyl amide **6a** in the mentioned conditions led to the formation of selenazoline **8a** (72%), probably via selenoamide

Received: December 6, 2013

Table 1. Optimization of the Reaction Conditions forSynthesis of 2-Phenyl-5-methylselenazole

∭ N 6a H	$\begin{array}{c} Ph & a \\ \downarrow & Ph \\ \downarrow & & \\ O \end{array} \qquad \begin{array}{c} Ph \\ \downarrow & & \\ N \\ H & 7a \\ selenoamide \\ selena \\ \end{array}$	Ph b	Se Se 9a selenazole
entry	conditions a	conditions b	product (ratio), ^a yield ^b (%)
1	WR (1.5 equiv), PhMe, reflux 10 h		6a , 70
2	(i) PCl_5 (3 equiv), DMF (0.3 equiv), PhH, rt; (ii) LiAlHSeH (3 equiv), rt	<i>p</i> -TsOH ac, rt	8a, 72
3	(i) PCl ₅ (3 equiv), DMF (11 equiv), PhMe, rt; (ii) LiAlHSeH (3 equiv), rt		8a + 9a (4:6), 10
4	(i) PCl ₅ (3 equiv), DMF (0.3 equiv), PhMe, rt; (ii) LiAlHSeH (3.2 equiv), rt	Et ₃ N (1 equiv), reflux 9 h	8a + 9a (7:3), 40
5	(i) PCl _s (1 equiv), DMF (0.3 equiv), PhMe, rt; (ii) LiAlHSeH (1.2 equiv), rt	PipAcOH (1 equiv)	8a + 9a (3:7), 31
6	(i) PCl ₅ (2 equiv), DMF (0.3 equiv), PhMe, rt; (ii) LiAlHSeH (1.5 equiv), rt	PipAcOH (1 equiv)	9 a, 74

"Ratio based on integration of separated ¹H NMR signals. ^bIsolated yield of the mixture; PipAcOH = piperidinium acetate.

7a formation, followed by a spontaneous 5-exo-dig cyclization (see entry 2, Table 1). Attempts to isomerize the exo double bond to obtain selenazole 9a, by using p-TsOH acid and heat, were unsuccessful (see entry 2, Table 1). An increase in the amount of DMF (11 equiv) led to selenazoline 8a (4%) and the selenazole 9a (6%), in low yields (see entry 3, Table 1). In order to promote the complete isomerization of 8a to 9a, we used Et₃N (1 equiv) or piperidinium acetate (PipAcOH) (1 equiv) as catalyst (see entries 4 and 5, Table 1, respectively). However, the conversion of 8a to 9a was improved when PipAcOH was used but in moderate yield (see entry 5, Table 1). Exploring the effect of the amount of PCl₅ and LiAlHSeH (see entries 4 and 5, Table 1, respectively), we found that the best yields were achieved when PCl₅ (2 equiv) and LiAlHSeH (1.5 equiv) were used (see entry 6, Table 1). Selenazole 9a, then, was prepared under these optimized conditions in 74% vield.

Under optimized conditions, a wide range of aromatic and aliphatic terminal propargyl amides were converted into the desired heterocycles (see Scheme 1). Aromatic propargyl amides 6a-f bearing neutral and both electron-rich and electron-deficient groups gave the cyclized products 9a-f in high and good yields from 88 to 55% (see Scheme 1). In contrast, alkyl propargyl amides 6g-j were converted into their corresponding selenazoles 9g-j in modest yields (20–36%).

In order to explore the scope of the cyclization process we tried to cyclize nonterminal propargyl amides like **10** and **11**, but in all cases the starting material was recovered; see Figure 2.

The proposed mechanism for selenazole formation is similar to those presented for the oxazole synthesis, and it is depicted in Figure 3.^{14a} Once the selenoamide 7 is formed, the Se atom promotes a 5-*exo-dig* cyclization, favored according to Baldwin's rules. The electrons of the triple bond take a proton from the media to form selenazoline 8. The *exo*-double bond isomerizes with PipAcOH toward the aromatic selenazole 9.

Based on this mechanism, we decided to study the effect of using different electron acceptors to see how electrophiles can compete with the proton uptake within the cyclization reaction





^aPercent conversion was 100% in all cases; yields are given as isolated products.



Figure 2. Nonterminal propargyl amides 10 and 11.



Figure 3. Mechanistic proposal for selenazole 9 formation.

process. The product distribution in the presence of NBS or I_2 as electrophiles was analyzed; see Scheme 2.

Scheme 2. Synthesis of 5-(Halomethyl)selenazoline 12 Using Different Electrophiles



The cycloisomerization of propargyl amide **6a** using NBS did not lead to the desired 5-(bromomethyl)selenazole (**12a**); a mixture of compound **8a** and **9a** in a 3:7 ratio and low yield was isolated. When I_2 was used as electrophile, a mixture of the desired vinyl iodide **12b** was obtained, together with compounds **8a** and **9a**. The first attempt using the optimized conditions for selenazoline preparation followed by the

Table 2. Conditions Assayed for the Synthesis of 5-(Iodomethyl)selenazoles

entry	conditions	product (ratio), ^{<i>a</i>} yield, ^{<i>b</i>} %	
1	(i) PCl ₅ (2 equiv), DMF (0.3 equiv), PhMe, rt; (ii) LiAlHSeH (1.5 equiv), 0 $^{\circ}$ C; (iii) I ₂ (1.5 equiv), 0 $^{\circ}$ C	9a + 12b (7:3), 19	
2	(i) PCl₅ (2 equiv), CH₂Cl₂, −10 °C; (ii) LiAlHSeH (1.5 equiv), −10 °C; (iii) I₂ (1.5 equiv), −10 °C	9a + 12b (7:3), 39	
3	(i) PCl ₅ (1.5 equiv), CH ₂ Cl ₂ , 0 $^{\circ}$ C; (ii) I ₂ (2 equiv), 0 $^{\circ}$ C; (iii) LiAlHSeH (1.5 equiv), 0 $^{\circ}$ C	9a + 12b (7:3), 33	
Ratio based on integration of separated ¹ H NMR signals. ^b Isolated yield of the mixture.			

Table 3. Optimization of the Bromination Reaction To Obtain 5-(Bromomethyl)selenazole 13

$ \underbrace{\bigwedge_{Se}^{N}}_{R} R \xrightarrow{NBS}_{CCl_{4}} Br \underbrace{\bigwedge_{Se}^{N}}_{Se} R $						
9a , R = Ph 13 , R = Ph						
entry	NBS (eq)	radical initiator (eq)	$h\nu$ time (h)	heating time (h)	conversion a (%)	compd 13 yield ^{b} (%)
1	1.1		1	rt, overnight	45	20
2	1.8		8	rt, overnight	100	11
3	1.1	$[PhC(=O)O-]_2$ (0.02)		reflux, 4 h	75	21
4	0.9	$[PhC(=O)O-]_2$ (0.02)	1	reflux, 2 h	78	44
5	1.5	$[PhC(=O)O-]_2$ (0.02)		reflux, 6 h	30	10
6	1.1	AIBN (0.1)	1	rt, overnight	100	68
³ % based on integration of separated ¹ H NMR signals. ^b Isolated yield.						

addition of I₂ at 0 °C led to a mixture of **9a** and **12b** in a 7:3 ratio (see entry 1, Table 2). We also explored the effect of the solvent influence by replacing with CH_2Cl_2 , but no change in the product ratio was observed. Furthermore, the order and temperature of I₂ addition did not seem to affect the product distribution (see entries 2 and 3, Table 2). Attempts to isomerize the vinyl iodoselenazoline **12b** toward the corresponding 5-(iodomethyl)selenazole using PipAcOH led to decomposition of the starting material.

We then decided to investigate further transformations of the methyl selenazole **9a** and performed a selective bromination of the methyl group present at the 5-position; see Table 3. *N*-Bromosuccinimide (NBS) was used as brominating reagent under different conditions; in all cases, the bromo derivative **13** was selectively obtained (see Table 3). The best conditions were obtained when NBS (1.1 equiv), AIBN (0.1 equiv), $h\nu$ (1 h) in CCl₄ at room temperature were used (see entry 6, Table 3).

Compound 13 would provide an easy access to different building blocks for the construction of chemical libraries; e.g., it was readily converted into the cyanide 14 (see Scheme 3).



In conclusion, we have developed a catalyst-free pathway for the preparation of 2,5-disubstituted selenazoles directly from terminal propargyl amides. This reaction involves readily available starting materials and tolerates a wide range of aryl and alkyl substituents. Bromination using NBS, under freeradical conditions, was also a useful strategy, providing further transformations into the selenazole moiety.

EXPERIMENTAL SECTION

LIAIHSEH 0.1 M Preparation. To a stirred suspension of selenium powder (0.08 g, 1.0 mmol) in dry THF (9 mL) was added lithium aluminum hydride solution (1 M) in THF (1 mL, 1.0 mm)

mmol) at 0 $^{\circ}$ C under a nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 30 min at 0 $^{\circ}$ C. The reagent lithium hydrogen selenide (LiAlHSeH) was formed in situ as a gray solution that was directly used in our present studies.

Synthesis of 5-Methylene-2-phenyl-4,5-dihydro-1,3-selenazole (8a). To a stirred solution of N-(prop-2-ynyl)benzamide 6a (0.70 mmol) in dry PhMe (3.5 mL) were added PCl₅ (291 mg, 1.4 mmol) and DMF (0.016 mL, 0.03 mmol) at room temperature and the solution allowed to sit for 30 min. A freshly prepared THF solution of LiAlHSeH (1.0 mmol, 10 mL, 0.1 M) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then the solvent was removed at reduced pressure until dryness. The residue was poured into water (50 mL), NaHCO3 was added until pH 7, and the mixture was extracted with ethyl acetate (5 \times 30 mL). The combined organic layers were dried (Na2SO4), filtered, and concentrated. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (n-hexane/EtOAc 5:1) to give 8a (108 mg, 70%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 5.18 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 5.32 (dd, J = 2.8, 4.6 Hz, 1H), 5.60 (dd, J = 2.4, 4.3 Hz, 1H), 7.40 - 7.49 (m, 2H), 7.69 (d, J = 6.8 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 75.8, 108.0, 128.7, 128.8, 131.4, 135.5, 149.2, 166.4; HRMS calcd for C₁₀H₁₀NSe [M + H]⁺ 223.9900, found 223.9930.

Optimized Procedure for the Synthesis of Selenazoles. 5-Methyl-2-phenylselenazole (9a). To a stirred solution of N-(prop-2ynyl)benzamide 6a (0.70 mmol) in dry PhMe (3.5 mL) were added at room temperature PCl₅ (291 mg, 1.4 mmol) and DMF (0.016 mL, 0.03 mmol) and the solution allowed to sit for 30 min. A freshly prepared of LiAlHSeH solution in THF (1 mmol, 10 mL, 0.1 M) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h. Then piperidinium acetate (102 mg, 0.7 mmol) was added, and the reaction was refluxed for 2 h and stirred overnight at room temperature. Then the solvent was removed at reduced pressure until dryness. The residue was poured into water (50 mL), NaHCO3 was added until pH 7, and the mixture was extracted with ethyl acetate (5 \times 30 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 5:1) to give 9a (89 mg, 74%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 2.58 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 7.39 – 7.42 (m, 3H), 7.48 (dd, J = 1.4, 2.5 Hz, 1H), 7.83 - 7.85 (m, 2H); ¹³C NMR δ 14.8, 126.8, 129.0, 129.9, 136.6, 141.3, 142.3, 173.9; HRMS calcd for C₁₀H₁₀NSe [M + H]⁺ 223.9900, found 223.9910.

2-(4-Bromophenyl)-5-methylselenazole (9b). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from 4-bromo-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide 6b. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 5:1) to give 9b (148 mg, 70%) as a yellow solid: mp 82.3–84.1 °C; ¹H NMR δ 2.59 (d, J = 1.3 Hz, 3H), 7.46 (d,

J = 1.3 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 14.9, 124.1, 128.2, 132.2, 135.7, 142.0, 142.6, 172.5; HRMS calcd for C₁₀H₉BrNSe [M + H]⁺ 301.9005, found 301.9030.

5-Methyl-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)selenazole (9c). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from *N*-(prop-2-yn-1-yl)-4-(trifluoromethyl)benzamide 6c. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 5:1) to give 9c (111 mg, 55%) as a yellow solid: mp 109.0–111.6 °C; ¹H NMR δ 2.62 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.53 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 14.9, 124.1 (*q*, *J*_{CF3} = 271 Hz), 126.1 (*q*, *J* = 4 Hz), 127.0, 131.5 (*q*, *J* = 32 Hz), 139.8, 142.9, 143.0, 171.9; HRMS calcd for C₁₁H₉F₃NSe [M + H]⁺ 291.9774, found 291.9744.

2-(3-Chlorophenyl)-5-methylselenazole (9d). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from 3-chloro-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide 6d. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 8:1) to give 9d (75 mg, 42%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 2.61 (d, J = 1.3 Hz, 3H), 7.31 – 7.38 (m, 2H), 7.49 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 7.69 (dt, J = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.85 (t, J = 1.6 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 14.9, 125.0, 126.6, 129.8, 130.3, 135.1, 138.4, 142.4, 142.7, 172.0; HRMS calcd for C₁₀H₉ClNSe [M + H]⁺ 257.9510, found 257.9540.

2-(4-lsopropylphenyl)-5-methylselenazole (9e). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from 4-isopropyl-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide 6e. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 4:1) to give 9e (112 mg, 61%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 1.27 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 2.58 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H) 2.93 (hept, *J* = 6.9,Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 1.3, 2.5 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 14.8, 23.9, 34.1, 126.8, 127.1, 134.5, 140.6, 142.2, 151.0, 174.0; HRMS calcd for C₁₃H₁₆NSe [M + H]⁺ 266.0369, found 266.0399.

2-(4-Methoxyphenyl)-5-methylselenazole (9f). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from 4-methoxy-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide 6f. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 6:1) to give 9f (115 mg, 88%) as a white solid: mp 65.2–66.0 °C; ¹H NMR δ 2.57 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 14.9, 55.5, 114.4, 128.2, 129.8, 140.2, 142.1, 161.1, 173.7; HRMS calcd for C₁₁H₁₂NOSe [M + H]⁺ 254.0006, found 254.0036.

2-Ethyl-5-methylselenazole (**9g**). Prepared in an analogous route as described for **9a** starting from *N*-(prop-2-yn-1-yl)propionamide **6g**. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 6:1) to give **9g** (31 mg, 25%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 1.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.51 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 2.96 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 14.8, 30.7, 140.1, 140.3, 179.5; HRMS calcd for C₆H₁₀NSe [M + H]⁺ 175.9900, found 175.9902.

2-Isopropyl-5-methylselenazole (9h). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from *N*-(prop-2-ynyl)isobutyramide 6h. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n* hexane/EtOAc 6:1) to give 9h (31 mg, 23%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 2.51 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 3.21 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 14.7, 23.7, 36.6, 139.6, 140.1, 185.2; HRMS calcd for C₇H₁₂NSe [M + H]⁺ 190.0057, found 190.0035.

2-(tert-Butyl)-5-methylselenazole (9i). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from N-(prop-2-yn-1-yl)pivalamide 6i. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 10:1) to give 9i (29 mg, 20%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 1.40 (s, 9H), 2.51 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H), 7.24 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 14.7, 31.3, 40.5, 139.7, 140.3, 188.4.; HRMS calcd for C₈H₁₃NSe [M]⁺ 203.0213, found 203.0237.

2-(4-Methoxybenzyl)-5-methylselenazole (9j). Prepared in an analogous route as described for 9a starting from 2-(4-methoxyphenyl)-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide 6j. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 5:1) to give 9j (67 mg, 36%) as a yellow oil: ¹H NMR δ 2.47 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 6.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.27 (dd, J = 1.4, 2.6 Hz, 1H); ¹³C NMR δ 14.7, 42.6, 55.4, 114.3, 130.3, 130.8, 140.7, 141.4, 158.8, 178.1; HRMS calcd for C₁₂H₁₄NOSe [M + H]⁺ 268.0162, found 268.0175.

Synthesis of (E)-5-(iodomethylene)-2-phenyl-4,5-dihydroselenazole (12b). To a stirred solution of N-(prop-2-ynyl)benzamide 6a (0.70 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3.5 mL) was added crystalline PCl₅ (291)mg, 1.4 mmol) at -10 °C. Stirring was continued for 30 min. A freshly prepared THF solution of LiAlHSeH (1.0 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at the same temperature for another 1 h. Then I₂ (267 mg, 1.0 mmol) was added, and the reaction was stirred overnight at -10 °C. The solvent was removed at reduced pressure until dryness. The residue was poured into water (50 mL), NaHCO₃ was added until pH 7, and the mixture was extracted with ethyl acetate $(5 \times 30 \text{ mL})$. The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (n-hexane/EtOAc 5:1) to give 12b (29 mg, 12%) as yellow oil: ¹H NMR δ 5.08 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 6.16 (t, J = 3.1 Hz, 1H), 7.41 – 7.49 (m, 3H), 7.65 – 7.68 (m, 2H); ¹³C NMR δ 62.9, 79.7, 128.5, 128.9, 131.7, 135.4, 146.7, 166.0; HRMS calcd for C₁₀H₈INSe 348.8866, [M]⁺ found 348.8869

Synthesis of 5-(Bromomethyl)-2-phenylselenazole (13). To a stirred solution of 9a (600 mg, 2.7 mmol) in CCl₄ (45 mL) were added NBS (529 mg, 3.0 mmol) and AIBN (49 mg, 0.3 mmol). Then the solution was irradiated with $h\nu$ for 1 h (200 W, tungsten lamp) using an ice bath to avoid overheating and stirred overnight at room temperature, protected from light. The formed succinimide was filtered off, and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 3:1) to give 13 (554 mg, 68%) as a white solid: mp 80.6–82.0 °C; ¹H NMR δ 4.82 (d, J = 0.8 Hz, 2H), 7.40 – 7.45 (m, 3H), 7.76 (t, J = 0.8 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 1.6, 7.9 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 26.6, 127.0, 129.3, 130.8, 136.3, 143.1, 144.2, 177.4; HRMS calcd for C₁₀H₉NSe [M – Br + H]⁺ 222.9005, found 222.9028.

Synthesis of 5-(Cyanomethyl)-2-phenylselenazole (14). To a stirred solution of 9a (150 mg, 0.5 mmol) in DMF (10 mL) was added KCN (39 mg, 0.60 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, poured into water, and extracted with Et₂O. The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by chromatography on SiO₂ (*n*-hexane/EtOAc 4:1) to give 14 (38 mg, 36%) as a yellow solid: mp 76.8–78.0 °C; ¹H NMR δ 4.02 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 7.41 – 7.47 (m, 3H), 7.72 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 1.7, 7.8 Hz, 2H); ¹³C NMR δ 18.7, 116.7, 127.1, 129.3, 130.9, 132.4, 135.9, 144.2, 176.8; HRMS calcd for C₁₀H₁₀NSe [M – CN + H]⁺ 223.9900, found 223.9926.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information

¹H and ¹³C spectra for compounds **9a**–**j**, **12b**, **13**, and **14**. This material is available free of charge via the Internet at http:// pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: gmahler@fq.edu.uy.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The CSIC-UdelaR supported this work. C.P. is grateful to the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for a fellowship from (BE_POS_2010_1_2362). We thank Dr. A. Rodríguez-Haralambides for HRMS.

REFERENCES

(1) (a) Liotta, D.; Monahan, R. Science 1986, 231, 356-361.
(b) Wirth, T. Angew. Chem., Int. Ed. 2000, 39, 3740-3749. (c) Rhoden, C. R. B.; Zeni, G. Org. Biomol. Chem. 2011, 9, 1301-1313.
(d) Levason, W.; Reid, G.; Zhang, W. Dalton Trans. 2011, 40, 8491-8506.

(2) (a) Beri, R. B.; Pawan, K.; Khanna, P. K. *Cryst. Eng. Commun.* 2010, *12*, 2762–2768. (b) Sudesh, T.; Manjare, S. T.; Kim, S.; Heo, W. D.; Churchill, D. G. *Org. Lett.* 2014, *16*, 410–412. (c) Kumar, A.; Rao, G. K.; Kumar, S.; Singh, A. K. *Organometallics* 2014, DOI: 10.1021/om4007196.

(3) (a) Mugesh, G.; du Mont, W. W.; Sies, H. Chem. Rev. 2001, 101, 2125–2179. (b) Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, T. B. T. Chem. Rev. 2004, 104, 6255–6285. (c) Ninomiya, M.; Garud, D R.; Koketsu, M. Coord. Chem. Rev. 2011, 255, 2968–2990.

(4) Koketsu, M.; Ishihara, H. 1,3-Selenazoles. In Comprehensive Heterocyclic Chemistry III; Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Scriven, E. F. V., Taylor, R. J. K., Eds.; Elsevier: Oxford, 2008; Vol. 4, pp 791–821. (b) Koketsu, M.; Ishihara, H. Curr. Org. Chem. 2003, 7, 175. (c) Mlochowski, J.; Kloc, K.; Lisiak, R.; Potaczek, P.; Wojtowicz, H. ARKIVOC 2007, 6, 14–46.

(5) Hak, J. A.; Koketsu, M.; Eun, M. Y. E.; Yong, M. K.; Ishihara, H.; Hyun, O. Y. J. Cell. Biochem. **2006**, *99*, 807–815.

(6) Choi, S. Y.; Jo, Y. O.; Koketsu, M.; Ishihara, H.; Kim, S. H.; Kim, S. Y. J. Korean Soc. App. Biol. Chem. **2009**, *52*, 371–374.

(7) Wray, S. K.; Smith, R. H. A.; Gilbert, B. E.; Knight, V. Antimicrob. Agents Chemother. **1986**, 29, 67–72.

(8) (a) Traiffort, E.; Ruat, M.; Arrang, J. M.; Leurs, R.; Piomelli, D.; Schwartz, J. C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1992**, 89, 2649–2653. (b) van der Goot, H.; Eriks, J. C.; Leurs, R.; Timmerman, H. Bioorg.

Med. Chem. Lett. **1994**, 4, 1913–1916.

(9) Sekiguchi, A.; Nishina, A.; Kimura, H.; Fukumoto, R. H.; Kanoh, K.; Ishihara, H.; Koketsu, M. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, *53*, 1439–1442.
(10) Nam, K. N.; Koketsu, M.; Lee, E. H. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, *589*, 53–57.

(11) (a) Narender, M.; Reddy, M. S.; Kumar, V. P.; Prakash Reddy, V. P.; Nageswar, Y. V. D.; Rao, R. K. J. Org. Chem. 2007, 72, 1849–1851. (b) Madhav, B.; Narayana, S.; Murthy, B. S. P.; Kumar, A.; Ramesh, K.; Nageswar, Y. V. D. Tetrahedron Lett. 2012, 53, 3835–3838. (c) Ninomiya, M.; Garud, D. R.; Koketsu, M. Heterocycles 2010, 81, 2027–2055.

(12) Pizzo, C.; Faral-Tello, P.; Salinas, G.; Fló, M.; Robello, C.; Wipf, P.; Mahler, S. G. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 362–367.

(13) Wipf, P.; Aoyama, Y.; Benedum, T. E. Org. Lett. 2004, 6, 3593-3595.

(14) (a) Hashmi, A. S. K.; Weyrauch, J. P.; Frey, W.; Bats, J. W. Org. Lett. 2004, 6, 4391–4394. (b) Kang, J.-E.; Kim, H.-B.; Lee, J.-W.; Shin, S. Org. Lett. 2006, 8, 3537–3540. (c) Doherty, S.; Knight, J. G.; Hashmi, A. S. K.; Smyth, C. H.; Ward, N. A. B.; Robson, K. J.; Tweedley, S.; Harrington, S. T.R. W.; Clegg, W. Organometallics 2010, 29, 4139–4147. (d) Hashmi, A. S. K.; Blanco Jaimes, M. C.; Schuster, A. M.; Rominger, F. J. Org. Chem. 2012, 77, 6394–6408.

(15) Verniest, G.; Padwa, A. Org. Lett. 2008, 10, 4379-4382.

(16) Pan, Y.; Zheng, F.; Lin, H.; Zhan, Z. J. Org. Chem. 2009, 74, 3148-3151.

(17) Hua, G.; Woollins, J. D. Angew. Chem., Int. Ed. 2009, 48, 1368–1377.

(18) Ishihara, H.; Koketsu, M.; Fukuta, Y.; Nada, F. J. Am. Chem. Soc. **2001**, *123*, 8408–8409.

(19) Vishwanatha, T. M.; Narendra, N.; Chattopadhyay, B.; Mukherjee, M.; Sureshbabu, V. V. J. Org. Chem. 2012, 77, 2689–2702.