



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias



GRUPO
QUÍMICA
MEDICINAL



25
AÑOS
FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Tesina de grado. Licenciatura en Bioquímica

**Desarrollo de compuestos
fluorescentes derivados de agentes
con actividad anti-*Trypanosoma cruzi***

Gonzalo Rodríguez

Tutor: Dr. Hugo Cerecetto

Co-Tutor: Dr. Carlos Osorio

***Grupo de Química Medicinal-Laboratorio de Química
Orgánica***

Área de Radiofarmacia-CIN

Facultad de Ciencias

Diciembre de 2015

Montevideo-Uruguay

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Hugo y Merche por abrirme las puertas del laboratorio.

A Carlos y los demás compañeros de laboratorio por ayudarme en todo momento y siempre compartir sus conocimientos.

A los compañeros de estudio, especialmente a Maru que tantas clases y exámenes compartimos.

A mi familia, y amigos por su apoyo constante.

A la Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de iniciación en la investigación.

RESUMEN

La imagenología molecular se encuentra en una fase de crecimiento, esto es debido a que a las tradicionales técnicas para estudios *in vivo* (rayos X y radiaciones ionizantes, a través de radiofármacos) se les han sumado nuevas metodologías que hacen uso de radiaciones no ionizantes como es el caso del ultrasonido, la resonancia magnética y la espectroscopia óptica. En el año 2014 la Facultad de Ciencias, con el apoyo de la ANII, adquirió un equipo de imagenología molecular, “*in vivo* Multispectral FX PRO Fixed Lens”, para estudios con pequeños animales que tiene la capacidad de combinar fluorescencia multi-espectro, radio-imágenes y rayos X.

Por otra parte la Enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* es una de las mayores parasitemias que afectan a América Latina. En la actualidad no existe ningún fármaco adecuado para el tratamiento, es por ello que el grupo de Química Medicinal de Facultad de Ciencias ha trabajado durante años en el desarrollo de nuevos agentes anti-*T. cruzi*.

En el presente trabajo se desarrolló la sonda fluorescente híbrida (**16**), que posee en su estructura un fragmento proveniente de un reconocido agente anti-*T. cruzi* y un fragmento con características fluorocrómica, con el fin de estudiar la biodistribución del fármaco, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La sonda (**16**) se caracterizó en sus propiedades fisicoquímicas, fluorescentes, y biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

ÍNDICE

Introducción

La enfermedad de Chagas	2
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	2
Farmacología	4
Imagenología óptica	5
Técnicas de fluorescencia	5
Fluorescencia	6
Fluoróforos	8

Antecedentes y Propuesta de Trabajo

Antecedentes	12
Propuesta de trabajo	12

Objetivos

Objetivos generales	15
Objetivos específicos	15

Materiales y métodos

Materiales y métodos	17
Química. Generalidades	17
Síntesis	18
Determinación de propiedades fisicoquímicas de los compuestos (1) y (16)	22
Determinación de la lipofilia ($\text{LogD}_{7,4}$)	22
Espectros de fluorescencia	22
Biología	22
Microscopía	23
Estudios de imagenología <i>in vivo</i>	24

Resultados y discusión

Resultados y discusión	26
Química	26
1. Intentos de obtención de sondas derivadas de cumarina	26

2. Sondas derivadas de BODIPYs y análogos	28
Caracterización espectroscópica de (16)	32
Determinación de la lipofilia	38
Caracterización óptica. Espectrofotometría UV-Visible	40
Espectros de fluorescencia	41
Biología. Inhibición del crecimiento de epimastigotes	43
Microscopia	43
Estudios <i>in vivo</i>	44
Conclusiones y perspectivas	
Conclusiones y perspectivas	49
Bibliografía	46
Bibliografía	51

Abreviaturas

Bnz	Benznidazol
BODIPY	Acrónimo del inglés de borodipirrometeno
CC	Cromatografía de columna
CDI	1,1-Dicarbonildimidazol
COSY	Acrónimo del inglés COrelation Spectroscopy
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
EtOH	Etanol
FITC	Acrónimo del inglés de fluorescein isotiocyanate
FMN	Flavin mononucleótido
HMBC	Acrónimo del inglés Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Acrónimo del inglés Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC₅₀	Concentración que inhibe el 50% del crecimiento
m/z	Relación masa carga
MO	Microscopía Óptica
MS	Acrónimo del inglés Mass Spectroscopy
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Nf	Nifurtimox
PBS	Buffer fosfato salino
PF	Punto de fusión
RMN	Resonancia magnética nuclear
TA	Temperatura ambiente
TcNTR	Nitroreductasa del tipo 1 dependiente de NADH
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Acrónimo del inglés de thin layer chromatography
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Introducción

La enfermedad de Chagas se estima que afecta alrededor de 16 a 18 millones de personas en Latinoamérica con más de 300,000 nuevos casos por año.^{1,2} La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es transmitida por las excreciones del vector *hematophagus triatome*. Estos insectos se encuentran presentes en prácticamente toda América latina y el sur de los Estados Unidos. Además la enfermedad puede ser transmitida a través de transfusiones de sangre, donaciones de órganos o de la madre al hijo al momento del parto, que son preocupación en regiones no endémicas.³

Los tripanosomatídeos son organismos eucariotas unicelulares flagelados, parásitos, pertenecientes al orden Kinetoplastida, género *Trypanosoma* que infectan invertebrados, mamíferos y plantas. En América son los causantes de la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*), mientras que en África el *Trypanosoma brucei* causa la enfermedad del sueño.⁴

La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas consta principalmente de dos fases, la aguda y la crónica, cada una de ellas con características distintas.

La fase aguda se inicia luego de adquirir la infección y dura entre 1 y 3 meses. La principal característica que posee es la alta parasitemia. Generalmente no presenta ningún síntoma o si no, solo presenta síntomas inespecíficos como fiebre, diarrea, etc. Se estima que en sólo el 8% de los casos aparece algún síntoma específico como el chagoma de inoculación. En países no endémicos la fase aguda solo se puede observar en neonatos (transmisión congénita), personas transfundidas o trasplantadas.⁵

A diferencia de la fase aguda, en la fase crónica la parasitemia periférica es escasa. Esta fase puede persistir sin presentar ningún síntoma por el resto de la vida del paciente, pero de 20% a 30% de los casos después de 10 ó 20 años de la infección evoluciona hacia una fase crónica sintomática que se caracteriza por disfunciones anatómicas, micro inflamaciones y fibrosis, produciendo lesiones irreversibles en órganos como corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico.⁵

Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla con varios estadios en el insecto vector y otros en el hospedero mamífero. En los mamíferos se presentan la forma no reproductiva tripomastigote y la

forma reproductiva amastigote, mientras que la forma reproductiva epimastigote e infectiva de tripomastigotes metacíclicos se encuentran en el vector (Figura 1).

En el mamífero, durante la fase aguda cualquier célula nucleada es un potencial blanco para la infección. Después de la respuesta inmune la parasitemia disminuye substancialmente, indicando el fin de la fase aguda. De todas maneras, como el parásito no es completamente eliminado, la infección de tejidos específicos como músculo o ganglios entéricos persiste indefinidamente.⁶

En la sangre de los hospederos mamíferos la población de *T. cruzi* se presenta bajo la forma de tripomastigotes, estos tienen una morfología variable en la cual se distinguen dos formas básicas: alargada, o ancha. El siguiente paso en el ciclo de vida de *T. cruzi* se da cuando un insecto de la familia *reduvidae* pica a un mamífero infectado para succionar su sangre, este se lleva consigo parásitos, de los cuales un 90% de estos se encuentran en la forma de tripomastigotes. Los parásitos pasan entonces al intestino delgado del insecto, aquí comienzan a transformarse hacia la forma de amastigotes (forma reproductiva). Posteriormente se transforman en epimastigotes que también son reproductivos, los epimastigotes se unen a la cutícula cerosa de la pared del intestino grueso del insecto antes de diferenciarse a la forma metacíclica.⁷

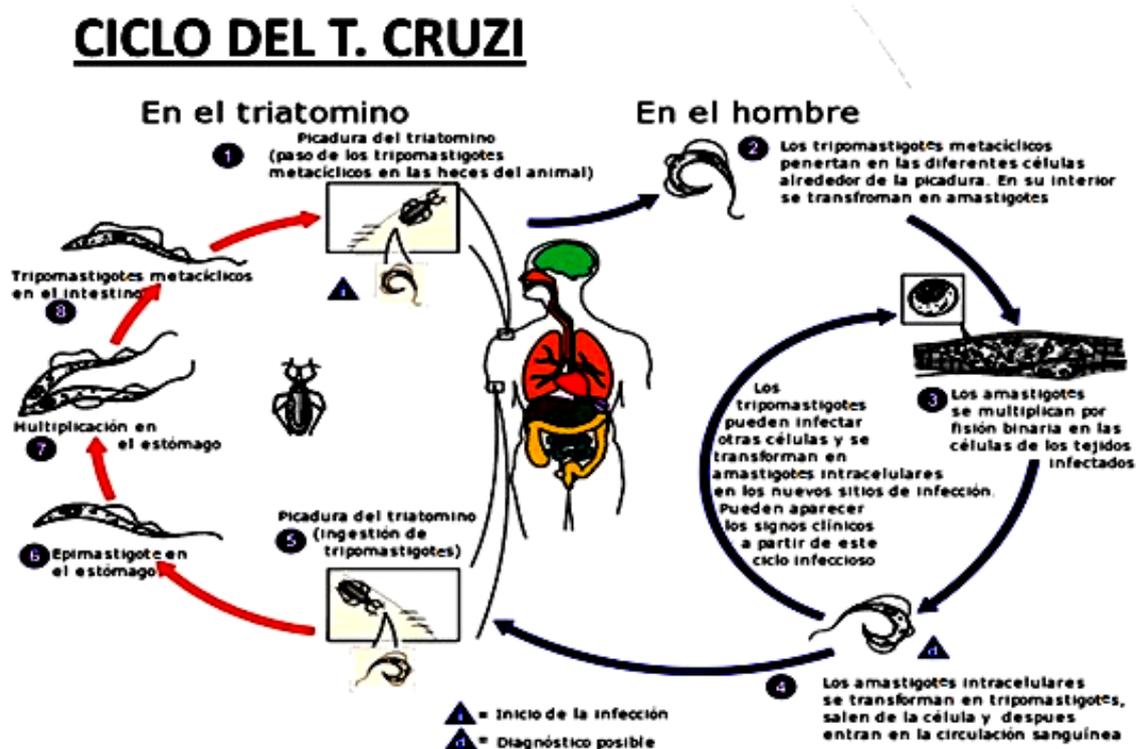


Figura 1: Ciclo de vida del *T. cruzi*.⁸

Una vez diferenciados, las formas metacíclicas son excretadas, y a través de las heridas provocadas por las picaduras reducidas a mamíferos, o a través de las diferentes mucosas, permite la invasión de tripomastigotes metacíclicos que son capaces de invadir cualquier célula nucleada del mamífero.

Los tripomastigotes entran a la célula por vía lisosomal y luego escapan al citoplasma en donde se diferencian en amastigotes que son capaces de proliferar en este medio por fisión binaria. A su vez, estos crecen y se diferencian hacia tripomastigotes que se escapan del pseudocisto hacia la sangre o linfa, bajo la forma alargada que tiene la capacidad de infectar nuevas células de manera similar a los tripomastigotes metacíclicos.

Por último, la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre, pueden ser traspasados al insecto por una picadura y así completar el ciclo.⁷

Farmacología

Actualmente los únicos dos fármacos que están propuestos para el tratamiento son Nifurtimox (Nf) y Benznidazol (Bnz). Ambos tienen buenos resultados en la fase aguda de la infección, pero cuando esta se vuelve crónica los fármacos pierden su efectividad. Además están contraindicados para mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal o hepática severa.⁵

Otro punto negativo es que Bnz puede producir efectos secundarios gastrointestinales al inicio del tratamiento, además de producir hipersensibilidad cutánea con aparición de erupciones cutáneas que en ocasiones pueden ser graves. Otros posibles síntomas son la anorexia, las náuseas, los vómitos y, en menor medida, dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, irritabilidad, somnolencia y alteraciones psiquiátricas.⁵

Nfx provoca síntomas digestivos como náusea, vómitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso. También se relaciona con trastornos neuropsiquiátricos como irritabilidad, trastornos para dormir y neuropatías periféricas.⁹

Bnz y Nf son pro-fármacos y ambos son activados en el parásito por una enzima nitro-reductasa de tipo I dependiente de NADH (TcNTR) que utiliza FMN como cofactor.¹⁰

En cuanto a los mecanismos de acción de estos fármacos, la reducción del Bnz resulta en la generación de metabolitos citotóxicos que generan estrés reductivo, por la modificación covalente de macromoléculas.¹¹

El efecto tóxico de Nf podría ser por la reducción del grupo nitro al radical nitroanión, el cual tendría la capacidad para inhibir enzimas relacionadas a la eliminación de radicales en *T. cruzi*.¹²

Imagenología óptica

La imagenología óptica, es una de las técnicas modernas más versátiles y ampliamente utilizadas en la clínica e investigación. Una de las principales razones para utilizar la imagenología óptica en la investigación biomédica, es la diversidad de técnicas que se pueden utilizar empleando todas las propiedades físicas de la luz (polarización, interferencia, etc.), también aprovechando todas las posibles interacciones fotofísicas y fotoquímicas de los procesos a nivel molecular (multifotón, absorción, fluorescencia, etc.).¹³

En las últimas décadas, la microscopia e imagenología de fluorescencia ha aumentado de manera exponencial, debido al incremento en la disponibilidad de proteínas, moléculas pequeñas y también diversos tipos de sondas fluorescentes, que son capaces de contribuir con un estudio no invasivo, de expresión génica, interacciones proteína-proteína, localización su celular y diversos estudios de biodistribución.^{13,14}

Por otra parte, la imagenología de fluorescencia a nivel macroscópico esta ganado importancia en el estudio de pequeños animales a nivel de órganos y tejidos. La posibilidad de la combinación de diferentes métodos de imagenología in vivo, permite tener una importante herramienta con gran potencial en la investigación básica, descubrimiento de nuevos fármacos, y aplicación clínica, entre otras.¹³

Uno de los últimos desarrollos en imagenología fluorescente es la tomografía por fluorescencia en animal completo o a nivel tisular.¹⁵ Estas tecnologías permiten el estudio tridimensional de biodistribución entre otras aplicaciones.

Técnicas de fluorescencia

Las diferentes técnicas de imagenología por fluorescencia se pueden clasificar como directas o indirectas.

Fluorescencia directa. Está asociada con la administración de una sonda fluorescente que tiene un blanco específico, como un receptor o una enzima, las sondas fluorescentes para la imagenología directa pueden ser subdivididas en activas o activables.

Las sondas activas son esencialmente el fluorocromo que es unido a un ligando específico para dirigirse a un blanco determinado. En esencia es el mismo mecanismo utilizado en la imagenología nuclear, a diferencia que se utiliza un fluorocromo y no un radionucleido. Ejemplos de esto pueden

ser anticuerpos unidos a moléculas fluorescentes, péptidos modificados y pequeñas moléculas orgánicas unidas a fluorocromos. Una característica de este tipo de sondas es que fluorescen a pesar de que no estén unidos al blanco y por lo tanto pueden mostrar señales de background inespecífico.¹³

Por otro lado, las sondas activables son moléculas que portan un fluorocromo “apagado” (*quencheado*) por la presencia de otro fluorocromo. Usualmente los fluorocromos son ubicados uno cerca de otro y se auto-*quenchean*. Otra opción es que los fluorocromos están situados cerca de un *quencher*, utilizando secuencia de péptidos específica. Estas secuencias son cortadas por una enzima liberando al fluorocromo emitiendo luz. En oposición a las sondas activas, no presentan problemas de background importantes.¹³

Fluorescencia indirecta. Esta estrategia que evolucionó en base a las técnicas utilizadas de genes reporteros. En la cual se introduce un transgen (llamado gen reportero) en la célula. Que codifica para una proteína fluorescente que produce la proteína reportera. Usualmente se coloca estas secuencias cerca del promotor que se quiera estudiar, de manera que cuando se activa, la proteína fluorescente se transcribe.¹⁶

Fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de luz desde una sustancia y ocurre por los estados electrónicos excitados. Ésta se puede dividir en dos categorías fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. Una manera de explicar estos procesos es a través de la física cuántica. En estados excitados singuletes, el electrón en el estado excitado se encuentra apareado por otro electrón con spin opuesto que está en el estado basal. Por lo tanto, para el electrón excitado retornar al estado basal es una transición permitida y ocurre de manera muy rápida, como consecuencia se produce la emisión de un fotón. El tiempo que demora este proceso ronda en los 10ns (Figura 2).¹⁷

En cambio la fosforescencia es la emisión de luz desde un estado de triplete excitado, en el cual el electrón en el estado excitado tiene el mismo número de spin que el electrón del estado basal, por lo tanto la transición al estado basal es no permitida, lo que conlleva a tiempos de emisión lentos, en el orden de 10^{-3} a 100 s, o inclusive mayores.

Una de las formas de representar el proceso de fluorescencia y fosforescencia es la utilización de los diagramas de Jablonski (Figura 2).¹⁸ En la figura 2 se observa un diagrama de energías con dos

posibles estados electrónicos, basal (S_0) y excitado (S_1 , S_2 , S_n). También se muestran diferentes estados vibracionales de energía por cada estado electrónico de una molécula (líneas horizontales negras). Cuando una entidad química es iluminada a una longitud de onda que pueda excitarla, ésta absorberá energía en forma de cuanto de luz (fotón) y un electrón sufrirá una transición desde su estado basal (S_0) hacia un estado excitado (S_1).¹⁸

Este electrón tiene dos posibilidades: se puede relajar hacia el estado basal nuevamente de manera radiativa o lo puede hacer de manera no radiativa, dependiendo del ambiente local de la molécula. En una transición no radiativa la relajación ocurre por generación de calor vía conversión interna.

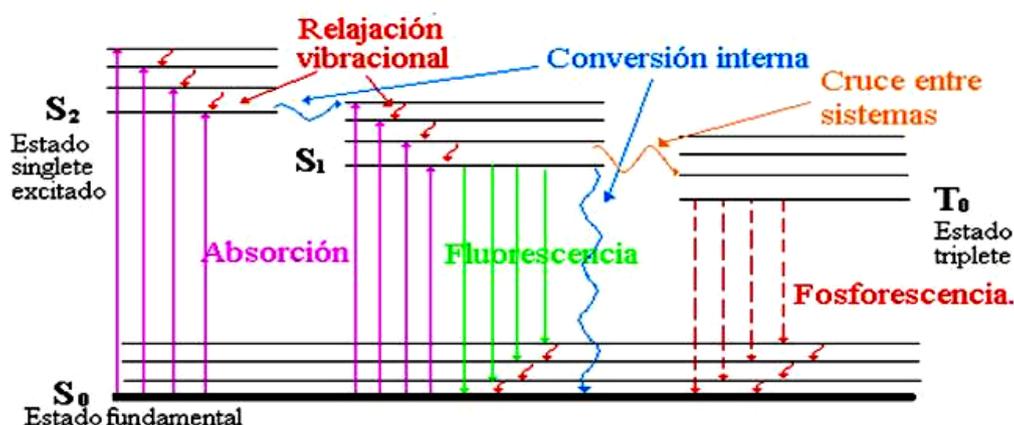


Figura 2: Diagrama de Jablonski que muestra el fenómeno de absorción y fluorescencia de una entidad química (extraído de la referencia¹⁸).

En una transición radiativa la relajación ocurre vía fluorescencia a una longitud de onda específica. Este proceso ocurre en tres etapas. En primer lugar el electrón que se encuentra en un nivel de excitación S_1 , S_2 , S_3 , S_n y estado vibracional alto, cede parte de su energía en forma de vibración a otros orbitales de la molécula llegando al nivel vibracional más bajo del estado excitado S_1 . Esta energía es disipada rápidamente debido a colisiones inelásticas en lo que se denomina un proceso de conversión interna. Un proceso que sucede muy rápido, en el orden de 10^{-15} s. A medida que este tiempo se prolonga, mayor es la cantidad de energía que se pierde por procesos no radiativos. Luego el electrón hace un decaimiento radiativo hacia el nivel basal de energía, en esta etapa es donde se emite un fotón. Por último el electrón realiza otra transición no radiativa hacia el nivel vibracional más bajo del nivel basal.¹⁸

Una de las propiedades más importantes de la fluorescencia se puede explicar mediante el diagrama anterior. Se ve que la energía del fotón que fue absorbido es mayor a la del fotón emitido debido a

perdidas de energía por procesos no radiativos, este fenómeno se conoce como corrimiento de Stokes. En esencia, se puede traducir a que la longitud de onda máxima de emisión siempre va a ser mayor a la longitud de onda máxima de excitación.¹⁸

Fluoróforos

Existen una gran variedad de moléculas fluorescentes, estas se pueden dividir en dos grandes grupos: fluoróforos intrínsecos y extrínsecos.

Se llama fluoróforos intrínsecos a todas las moléculas fluorescentes que se encuentran en los tejidos biológicos.

Hay un grupo de fluoróforos que están presentes en los tejidos biológicos que son los aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina). Como se observa en la figura 3 tienen la particularidad de que los tres presentan anillos aromáticos en su estructura. Todos ellos emiten en la región UV.

Otros tipos de fluoróforos son algunas moléculas que actúan como co-factores enzimáticos (Figura 4). Un ejemplo de ello es el NADH que presenta un máximo de excitación y emisión a 340nm y 460nm, respectivamente.

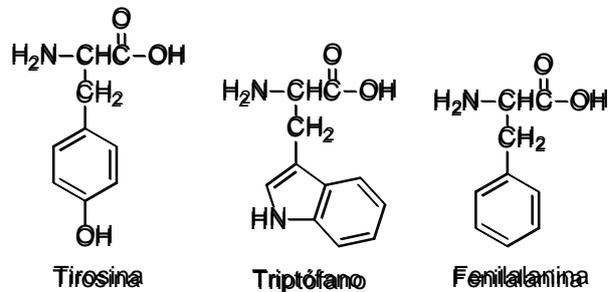


Figura 3: Aminoácidos fluorescentes.

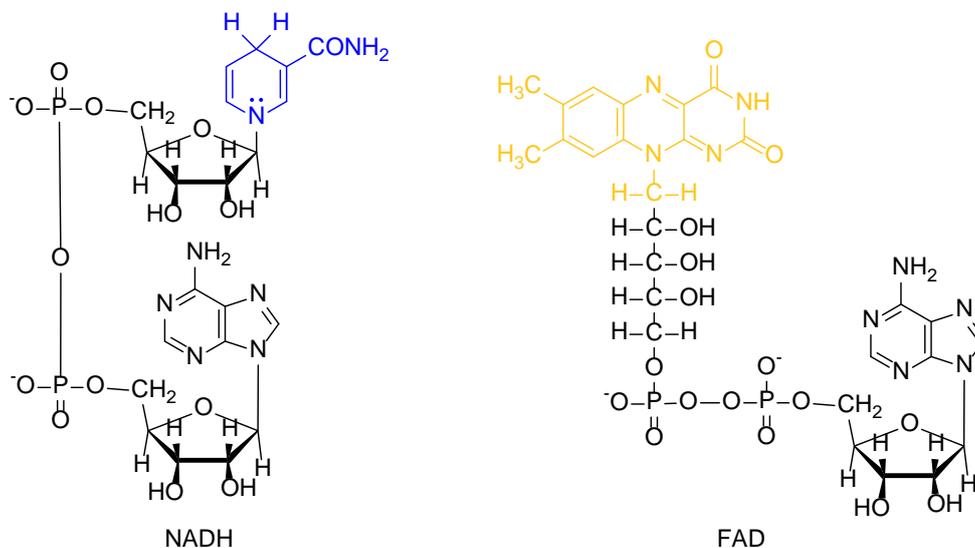


Figura 4: Fluoróforos intrínsecos que son co-factores enzimáticos.

Los fluoróforos extrínsecos son moléculas que se agregan a las muestras biológicas con el fin de resaltar alguna característica específica de las mismas.

En la actualidad existe una inmensa variedad de fluoróforos, cada uno de ellos con una aplicación específica. Por ejemplo el cloruro de dansilo (Figura 5) es ampliamente utilizado para marcar proteínas y tiene como particularidad que su máximo de emisión depende de la polaridad de solvente.¹⁹

Otro grupo de fluoróforos ampliamente utilizados son la fluoresceína, comercialmente disponible en su forma de isotiocianato (FITC, Figura 5), y rodamina, típicamente utilizados para el marcado de anticuerpos. Los máximos de emisión de estas moléculas se encuentran entre 500 y 600 nm. Y una de las características principales es su alto coeficiente de extinción molar cercano a $80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.²⁰

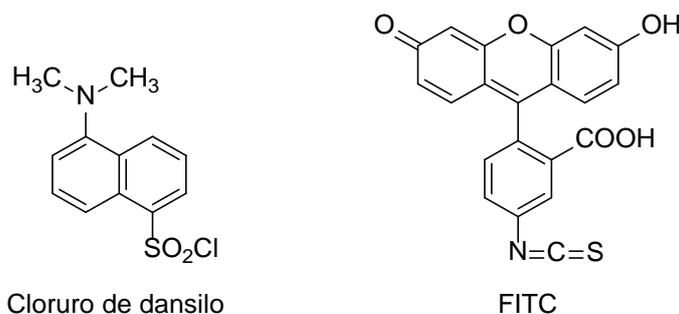


Figura 5: Estructura molecular del cloruro de dansilo y FITC.

Un grupo de fluoróforos cuya emisión se encuentra por encima de los 550 nm son los derivados de cianinas, entre ellos Cy-3, Cy-5 y Cy-7 (Figura 6). Las ventajas que presentan estos fluoróforos es que al emitir en longitudes de onda altas se disminuye el background inespecífico, propio de los tejidos biológicos.^{21,22}

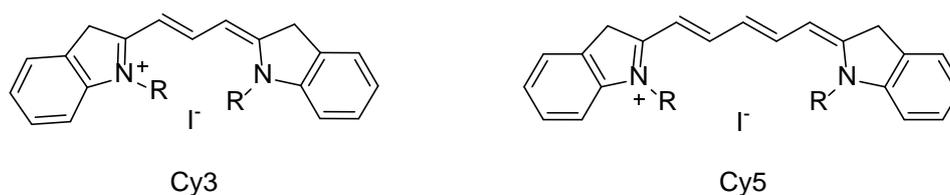


Figura 6: Ejemplo de dos moléculas derivadas de las cianinas.

Las moléculas derivadas del sistema cumarina, heterociclo perteneciente a la familia de los benzopironas (Figura 7), han sido originalmente utilizadas como precursores para diferentes tipos de fármacos, en especial para tratar edemas o como anticoagulante.^{23,24} Sin embargo, se han descrito diversas cumarinas con propiedades fluorescentes, de las cuales se utilizan en mayor medida para aplicaciones láseres. También se han descrito usos para las cumarinas como sondas en medios biológicos.²⁵

Por último, cabe destacar al grupo de moléculas de la familia de los borodipirrometenos (BODIPYs de sus siglas en inglés). El descubrimiento de estos se remonta al 1968 donde Treibs y Kreuzer descubrieron, por casualidad²⁶, no obstante no fue hasta la década del 90 cuando los BODIPYS empezaron a estudiarse en profundidad.

Tomando como referencia el BODIPY base (Figura 7) existe una inmensa variedad de moléculas diseñadas a partir de este, debido a la facilidad para modificarlo ya sea después de la síntesis, o a través de los reactivos, por lo tanto es posible generar un amplio número moléculas con diversas características espectroscópicas. Esto, trae como consecuencia que existan BODIPYS que prácticamente cubran todo el espectro visible.²⁷



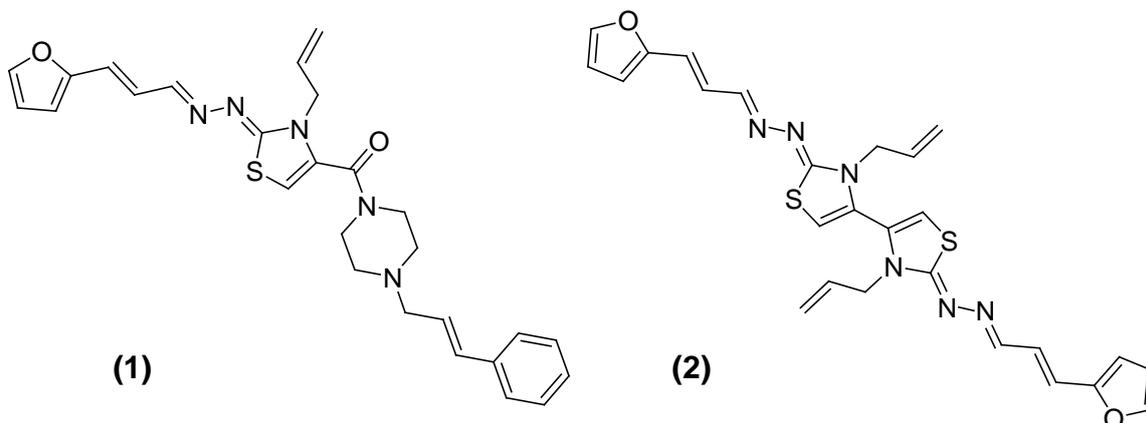
Figura 7: Estructura básica de las cumarinas (izquierda) y BODIPYs (derecha).

El éxito de los BODIPYs en las diferentes áreas de aplicación se debe a que tienen altos rendimientos cuánticos (cerca de $\Phi=1$), altos coeficientes de extinción molar en el entorno de $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, químicamente estables y presenta alta foto y termosensibilidad.²⁸ En contrapartida la principal desventaja que poseen es tener un bajo corrimiento de Stokes.

ANTECEDENTES Y PROPUESTA DE TRABAJO

Antecedentes

El grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias, UdelaR, ha trabajado durante años en la búsqueda de potenciales fármacos anti-chagásicos. En particular durante la tesis doctoral del Dr. Guzmán Álvarez se sintetizaron numerosos compuestos anti-*T. cruzi* de los cuales dos se destacaron por su buena actividad tripanosomicida *in vitro* y por no presentar efectos tóxicos ni mutagénicos.²⁹



El derivado **1** posee una potencia similar a la de Bnz y además demostró ser no genotóxico *in vivo*. Aparentemente presenta un mecanismo de acción dirigido hacia múltiples dianas, afectando enzimas vitales para el parásito como tripanotionareductasa, cruzipaina, e interviniendo en la biosíntesis de esteroides de membrana.

Este compuesto ha ingresado, por parte del grupo de Química Medicinal, en estudios pre-clínicos. Entre otros, uno de los estudios de relevancia que se debe realizar es el estudio de biodistribución de **5F** que daría cuenta del comportamiento una vez que ingresa al organismo del paciente.

Propuesta de Trabajo

En el presente trabajo de finalización de carrera se plantea como propuesta de trabajo la síntesis de una sonda híbrida, que posea una funcionalidad anti-*T. cruzi* por un lado y un fluoróforo por otro, para el estudio de biodistribución tanto *in vitro* como *in vivo* del agente anti-*T. cruzi* (**1**). Para ello se propone el diseño mostrado en la página siguiente (Figura 8).

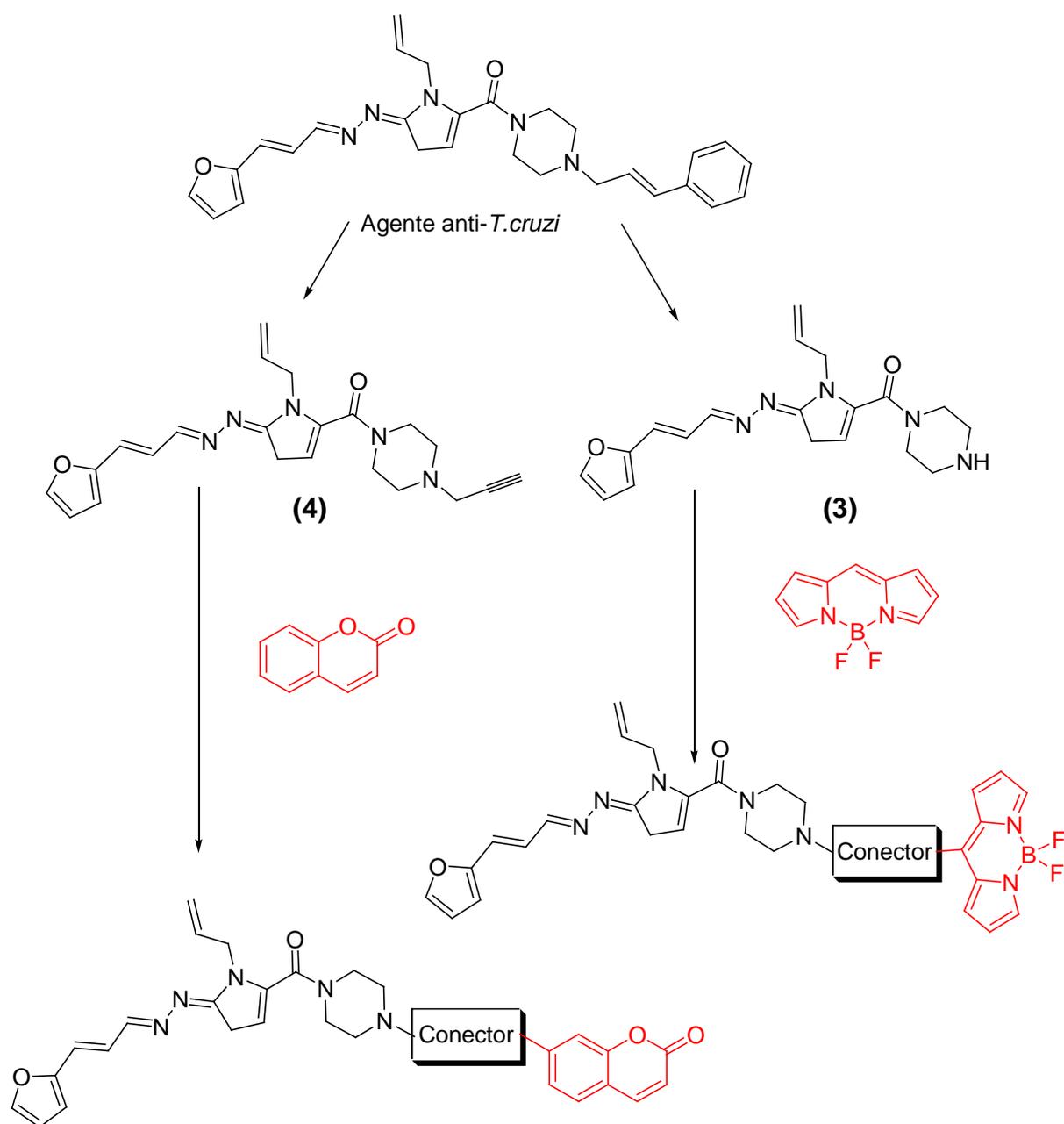


Figura 8: Esquema general del diseño de sondas fluorescentes a sintetizar en el presente trabajo.

Así, se trabajará con dos tipos de fluoróforos, los sistemas cumarina y BODIPY.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Obtener agentes anti-*T. cruzi* fluorescentes, estructuralmente relacionados con **1**, para estudiar su biodistribución *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

Diseñar y sintetizar agentes anti-*T. cruzi* utilizando un derivado de (2*E*,2*Z*)-2-{2-[(*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden]hidrazono}-3-alil-*N*-(1-cinamilpiperazin)-2,3-dihidrotiazol-4-carboxamida **1** y empleando distintas entidades fluorescentes.

Caracterización fisicoquímica de las sondas desarrolladas.

Caracterización biológica *in vitro* e *in vivo* de las sondas desarrolladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Química

Generalidades

Los disolventes empleados en el presente trabajo experimental fueron destilados previamente a su uso. De ser necesario fueron secados mediante procedimientos preestablecidos. Los reactivos fueron obtenidos de BAKER ANALIZED, Janssen, Fluka, SIGMA-ALDRICH, Merck. Los compuestos (2*E*,2*Z*)-2-{2-[(*E*)-3-(furan-2-il)propeniliden]hidrazono}-3-*alil*-2,3-dihidrotiazol-4-piperazinamida ((**3**)), (**7**), (**10**), (**14**) y piperacin-1-carboxilato de *tert*-butilo se sintetizaron siguiendo las técnicas previamente descritas.²⁹⁻³²

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

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

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm)
- Exposición a vapores de yodo

Los productos fueron purificados por cromatografía en columna (CC) utilizando sílica o alumina como fase móvil.

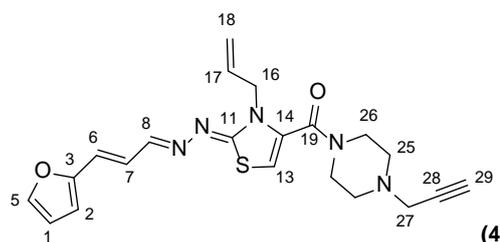
Los espectros de ¹H-RMN se realizaron en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes indicados con cada producto y tetrametilsilano como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las multiplicidades según: singulete (s), doblete (d), triplete (t),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

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

Los puntos de fusión de los compuestos que en literaturano se encuentra descritos se determinaron experimentalmente utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100 y no están corregidos³³⁻³⁵.

Síntesis

Síntesis de 3-alil-2(Z)-[(1E,2E)-3-(furan-2-il)propeniliden]hidrazono-4-[4-(1-propargil)]piperacínil carbonil-2,3-dihidrotiazol(4): En un balón de 10mL se hace reaccionar 30mg (0,8 μ mol) de **(3)**, 5,8 μ L (0,8 μ mol) de bromuro de propargilo y 14,7 μ L (0,8 μ mol) de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) en 2mL de EtOH. Se adiciona el bromuro lentamente a 0°C. La reacción se deja 24h a temperatura ambiente. El seguimiento de ésta se lleva a cabo por TLC ensílica utilizando hexano:acetato de etilo (3:7, v/v). En el caso de que no desaparezca por completo el reactivo se agrega 1 equivalente de bromuro de propargilo y DIPEA. Cuando se confirma la desaparición del reactivo, se evapora el disolvente a vacío, se agrega acetato de etilo y se realizan 3 extracciones con disolución acuosa de NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se evapora a vacío y sobre el residuo se realiza una columna de sílica con gradiente de hexano:acetato de etilo de 9:1 a 3:7 (v/v). Se obtienen 10,8mg (R = 32 %) de un sólido marrón, PF=139-140°C.



RMN 400/100 MHz, CDCl ₃					
Número ¹	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6,42	1	s	-	111
2	6,42	1	s	-	111
3	-	-	-	-	152
5	7,41	1	sa	-	143
6	6,63	1	d	15,8	123
7	6,49	1	dd	15,8/9,9	124
8	8,05	1	d	9,9	153
11	-	-	-	-	168
13	6,15	1	s	-	103
14	-	-	-	-	132
16	4,64	2	d	5,7	45
17	5,90	1	m	-	132
18	5,21	2	m	-	118
19	-	-	-	-	160
26	3,68	4	sa	-	51
25	2,57	4	sa	-	42
27	3,36	2	s	-	46
28	-	-	-	-	77
29	2,31	1	s	-	74

¹ En la caracterización espectroscópica todos los compuestos han sido numerados arbitrariamente, no siguiendo reglas IUPAC.

Procedimiento general para las reacciones del tipo clickchemistry

En un balón protegido de la luz se adiciona 1 equivalente del alquino y 1 equivalente de la correspondiente azida en EtOH. Paralelamente se prepara en un tubo eppendorf, protegido de la luz, 0,05 equivalente de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disuelto en $200\mu\text{L}$ de H_2O , de igual manera en otro tubo eppendorf se prepara 0,1 equivalente de ascorbato de sodio en $200\mu\text{L}$ de H_2O . Se mezcla el contenido de ambos tubos, se adiciona al balón y se deja a temperatura ambiente por 24h. El seguimiento de esta reacción se lleva a cabo en TLC de sílica utilizando hexano:acetato de etilo como fase móvil.

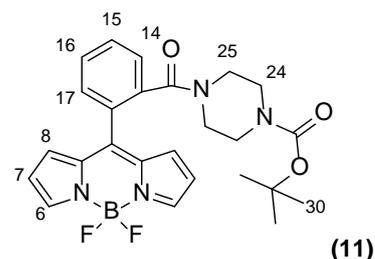
Procedimiento general para las reacciones de sustitución nucleofílica aromática

En un balón de dos bocas se hace reaccionar 1 equivalente del BODIPY correspondiente, 1 equivalente de la amina correspondiente y 1 equivalente de K_2CO_3 en CH_3CN (5 mL por cada 0,025mmol de BODIPY). La reacción se deja 24h a 80°C . El seguimiento de esta reacción se lleva a cabo en TLC de sílica utilizando hexano:acetato de etilo como fase móvil. Se evapora el disolvente a vacío, se agrega acetato de etilo y se realizan 3 extracciones con H_2O . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se evapora a vacío y el residuo se purifica por columna de sílica con gradiente de hexano:acetato de etilo como fase móvil.

Procedimiento general para las reacciones de amidación

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de nitrógeno, se hace reaccionar 1 equivalente del BODIPY correspondiente con 2 equivalentes de 1,1-dicarbonildimidazol (CDI) en THF seco (5 mL por cada 0,25 mmol de BODIPY). El seguimiento de esta reacción se lleva a cabo en TLC de alúmina utilizando hexano:acetato de etilo (1:1, v/v) como fase móvil. Una vez que se observa la activación del ácido (2h aproximadamente) se adiciona 1 equivalente de la amina correspondiente y nuevamente se controla por TLC de sílica con igual fase móvil. Se evapora el disolvente a vacío, se agrega acetato de etilo y se realizan 3 extracciones con H_2O . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se evapora a vacío y el residuo se purifica por columna de sílica con gradiente de hexano:acetato de etilo de 9:1 a 1:1 (v/v) como fase móvil.

2-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-8-il)-1-[4-(*tert*-butiloxicarbonil)piperacínil]carbonilbenceno(11): Se obtienen 18 mg (R = 17 %) de un sólido violeta.



Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J(Hz)
7	6,26	2	d	4,1
8	7,45	2	s	-
9	6,20	2	d	4,1
14	7,74	1	d	8,1
15	7,55	1	m	-
16	7,55	1	t	6,7
17	6,34	1	m	-
24	3,05	4	sa	-
25	3,43	4	sa	-
32	1,51	9	s	-

Procedimiento general para las reacciones de sustitución nucleofílica alifática

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de nitrógeno, se coloca 1 equivalente de la amina correspondiente, 1 equivalente del BODIPY (**14**), 1 equivalente de K_2CO_3 , 1 equivalente de KI y THF seco (5 mL por cada 10 mg del BODIPY). La mezcla se calienta a reflujo. Se controla por TLC de sílica utilizando hexano:acetato de etilo como fase móvil. Se evapora el disolvente a vacío, se agrega diclorometano y se realizan 3 lavados con H_2O . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía de columna de sílica con gradiente de hexano:acetato de etilo como fase móvil.

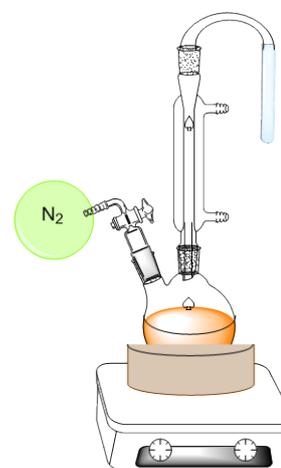
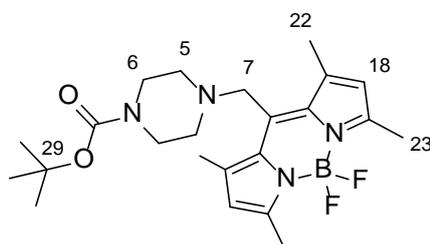


Figura 9: Montaje experimental para las reacciones de sustitución nucleofílica.

8-(4-tert-Butiloxicarbonilpiperacín-1-ilmetil)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (15): Se obtienen 17mg (R = 34 %) de un sólido naranja, PF=152°C.

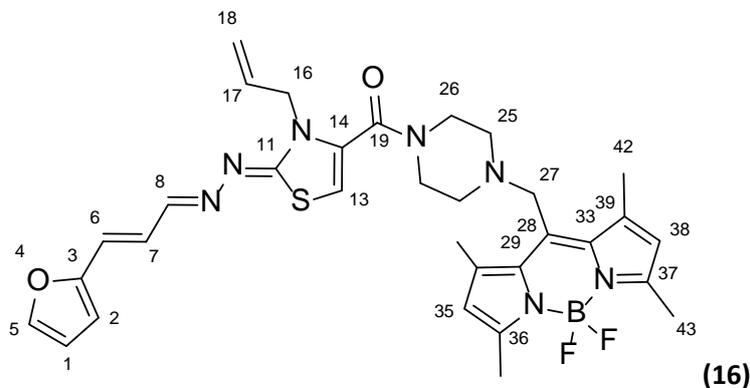


(15)

Número	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J(Hz)
5	3,50	4	sa	-
6	2,55	4	sa	-
7	3,69	2	s	-
18	7,20	2	s	-
22	3,36	6	s	-
23	3,27	6	s	-
29	1,48	9	s	-

3-Alil-4-[(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-**il)metil]piperacínilcarbonil]-2(Z)-[(1E,2E)-3-(furan-2-il)propeniliden]hidrazono-2,3-dihidrotiazol**

(16): Se obtienen 24 mg (R = 24 %) de un sólido rojo, PF=190°C. MS (EI) m/z (%): 631 (M^+ , 47), 371 ($C_{18}H_{21}N_5O_2S^+$, 31), 260 ($C_{14}H_{15}BF_2N^2$).



RMN 400/100 MHz, $CDCl_3$					
Número	δ^1H (ppm)	Integración	Multiplicidad	J(Hz)	$\delta^{13}C$ (ppm)
1	6,45	2	s	-	111
2	6,45	2	s	-	111
3	-	-	-	-	154
5	7,44	1	sa	-	143
6	6,64	1	d	15,9	124
7	6,97	1	dd	15,8/9,8	124
8	8,06	1	d	10,1	152
11	-	-	-	-	160
13	6,12	1	s	-	103
14	-	-	-	-	132
16	4,68	2	dd	21,7/5,9	46
17	5,91	1	m	-	132
18	5,16	2	m	-	117
19	-	-	-	-	160
26	4,63	4	sa	-	52
25	2,62	4	sa	-	46
27	3,84	2	s	-	51
28	-	-	-	-	139
33	-	-	-	-	133
35	6,10	2	s	-	122
36	-	-	-	-	141
38	-	-	-	-	141
42	2,50	6	s	-	17
43	2,55	6	s	-	17

Determinación de propiedades fisicoquímicas de los compuestos (1) y (16)

Determinación de la lipofilia (LogD_{7,4})

Para la realización del estudio de la lipofilia de los compuestos, se colocaron 450 µL de una disolución 4mM de los compuestos, (1) y (16), en octanol saturado con PBS (pH=7,4) y 450µL de PBS saturado con octanol, en un tubo eppendorf de 1,5 mL (por triplicado). Se agita durante 1 minuto en vortex y se deja toda la noche en agitación orbital. Por último se deja decantar 2 horas y se toman 200µL de cada fase por duplicado. Se mide absorbancia a 378 nm, para (1), y a 510nm, para (16), utilizando un equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader en placas de 96 pocillos.

El LogD_{7,4} se calcula según³⁶:

$$\text{LogD}_{7,4} = \text{Log} \frac{[\text{Concentración en octanol}]}{[\text{Concentración en H}_2\text{O}]}$$

Espectros de fluorescencia³²

Para la determinación de los espectros de excitación y emisión se utilizó un equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader.

Biología

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

Los cultivos de *T. cruzi*, epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 o cepa Y, se cultivan a 28 °C en medio axénico (infusión cerebro-corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, hemina 0,02 g/L, D-(+)-glucosa 0,3 g/L, estreptomycin 0,2 g/L, penicilina 200000 U/L, complementado con 10 % de suero fetal bovino). Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones aeróbicas. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Los compuestos a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO o de una microemulsión de 24mM y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (50, 25, 12.5 y 6.25 µM). Los parásitos son incubados con los compuestos a 28 °C por 5 días.

El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como: $Pi = \frac{1-(Ap-A0p)}{Ac-A0c}$, donde Ap es la absorbancia a 610 nm (A610) del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A0p es A610 del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); Ac es A610 del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A0c es A610 en ausencia del compuesto al día 0. El IC₅₀ corresponde a la concentración del compuesto capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar log₁₀(concentración) vs % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos ensayos se realizan por triplicado.

Preparación de la microemulsión

Se mezclan 0,25g de colesterol, 0,45g de oleato de sodio y 0,3g de fosfatidilcolina cada 10mL de buffer fosfato pH=7,4 con el compuesto a vehicular. Se deja en agitación por 1 día y finalmente se trata con ultrasonido por 30 minutos.

Microscopía

Para los estudios de microscopía se utilizaron cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento. A una disolución de parásitos de 10.000.000 células/mL se realizaron ensayos con tres condiciones distintas.

Incubación con el compuesto. Se incuba únicamente con una disolución 25 µM del compuesto **(16)** con los parásitos por 72h.

Incubación con el compuesto vehicularizado. Se incuba una disolución 25 µM del compuesto**(16)** vehicularizado con la microemulsión por 72h.

Permeabilización con Triton X-100. A la disolución de parásitos se la trata con Triton X-100 (0,02%) simultáneamente se agrega el compuesto **(16)** y se deja incubar por 15minutos.

En todas las condiciones, luego del tratamiento se centrifuga a 1500g por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y el pellet se lava con PBS (pH=7,4). Nuevamente se centrifuga a 1500g por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se re-suspende el pellet en la disolución de montaje (glicerol:PBS (50:50)). Se coloca en un portaobjetos, se cubre y se sella.

Estudios de imagenología *in vivo*

El trabajo con animales fue realizado por el Dr. Marcelo Fernández.

Se utilizan ratones de la cepa C57BL/6.

Se administra por vía sanguínea (intravenosa a través de la vena de la cola, una dosis de 50mg/kg de compuesto**(16)**).

Luego del tiempo establecido, 30, 60 y 120 minutos, el animal se anestesia y se toman las imágenes en el equipo In vivo Multispectral FX PRO Fixed Lens.

Posteriormente se sacrifica el animal y se realiza una imagen a cuerpo abierto y otra de los órganos individualmente (imágenes ex vivo midiendo en cada uno de ellos la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

Química

Para generar la sonda se siguieron dos rutas sintéticas a partir de distintos derivados del agente anti-*T. cruzi* (Figura 10).

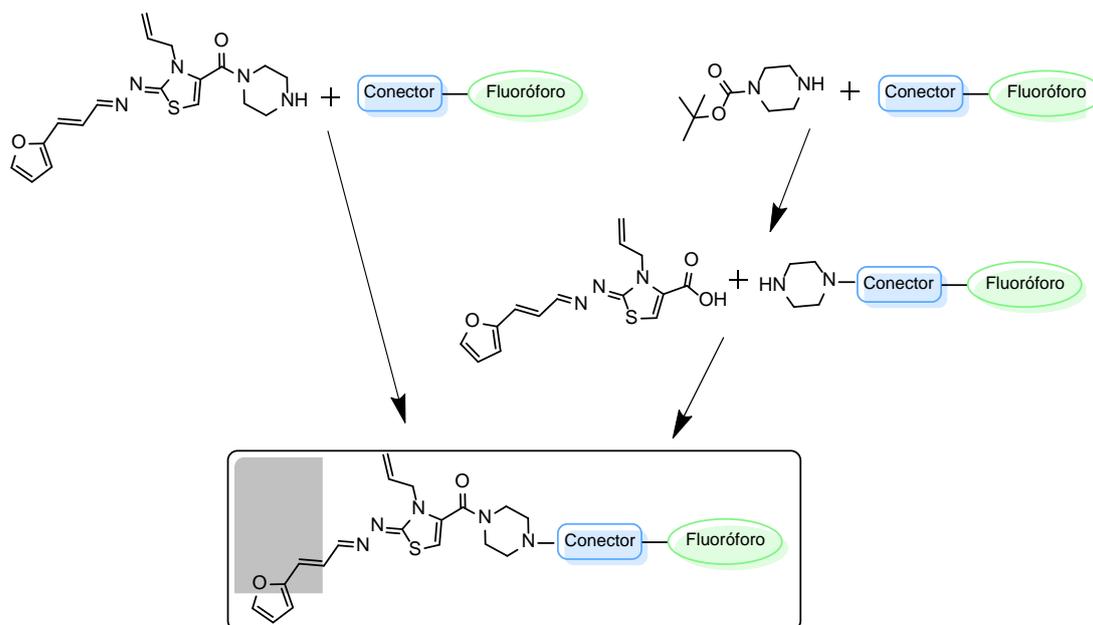


Figura 10: Dos posibles rutas de síntesis utilizadas para llegar a la sonda híbrida deseada.

En principio en este trabajo se estudiaron dos sistemas fluorocrómicos: el sistema cumarina y el sistema BODIPY.

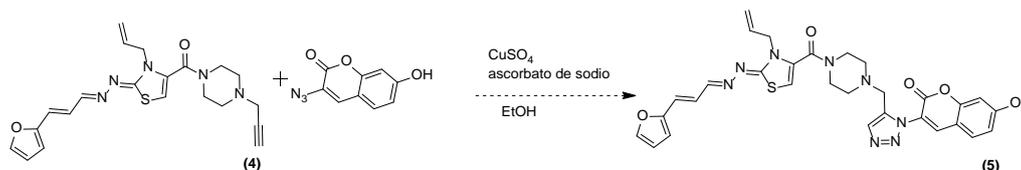
1. Intentos de obtención de sondas derivadas de cumarina

Una de las ventajas del sistema cumarina es su pequeño tamaño, su biocompatibilidad y su fácil síntesis.³⁷ Las cumarinas, de por sí, presentan baja fluorescencia pero al conjugarse con un agrupamiento triazol incrementa la fluorescencia.³⁸

Por ello, en primer lugar se decide utilizar un derivado de cumarina con un grupo funcional azida, para de esta forma a través de una reacción del tipo click chemistry, generar la entidad fluorescente.

La reacción propuesta es una cicloadición de un grupo azida y un alquino terminal catalizada con Cu (I), para dar como resultado la formación de un grupo 1,2,3 triazol. En principio, este tipo de reacciones poseen alta eficiencia con buenos rendimientos.

Para ello, se prepara el alquino (**4**) (Figura 8) según se muestra en el Esquema 1 para hacerlo reaccionar con la azida derivada de cumarina que se muestra.³⁷



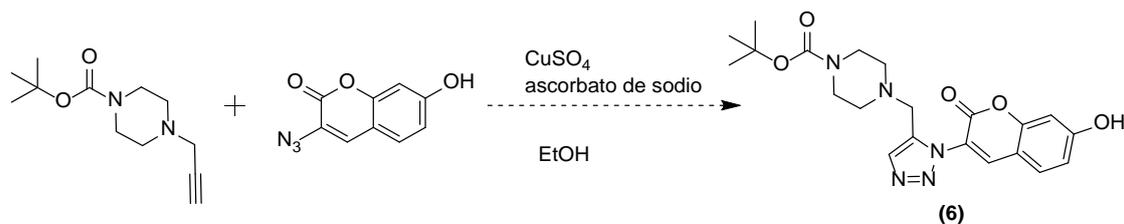
Esquema 1: Ruta de síntesis para dar el compuesto (5).

La reacción no fue exitosa, por ello se probaron diversas condiciones (Tabla 1) y en ninguna de estas condiciones se obtuvo el producto de interés, evidenciándose en todos los casos ausencia de reacción en todas las condiciones probadas

Reacción	Equivalentes de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y de ascorbato de sodio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (h)	Otros
1	1	ambiente	8	-
2	2	ambiente	48	-
3	2	40	24	-
4	2	60	24	-
5	2	80	24	-
6	2	ambiente	24	1 eq. de DIPEA
7	2	80	24	1 eq. de DIPEA

Tabla 1: Condiciones de reacción ensayadas para la preparación del derivado (5).

Debido a los resultados negativos para sintetizar el primer compuesto (5) según el Esquema 1 se plantea un segundo procedimiento (Esquema 2) que hace uso del intermedio (6). Para ello, se hizo reaccionar la misma azida derivada de cumarina con una piperazina portadora de un grupo alquino.



Esquema 2: Síntesis del intermedio (6) de la ruta alternativa para la generación de una sonda utilizando un derivado de la cumarina como fluoróforo.

Para la síntesis del intermedio **(6)** se utilizaron las mismas condiciones de reacción que las mostradas en la Tabla 1.

En este caso si bien se pudo observar fluorescencia en la mezcla de reacción, ninguno de los productos aislados se correspondió, de acuerdo a las espectroscopias realizadas, con el producto deseado.

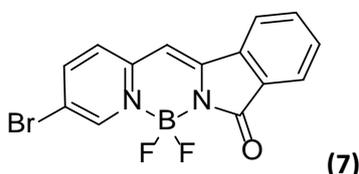
Por esta razón, se decidió pasar a la otra familia de fluoróforos planteada en la propuesta de trabajo.

2.Sondas derivadas de BODIPYs y análogos

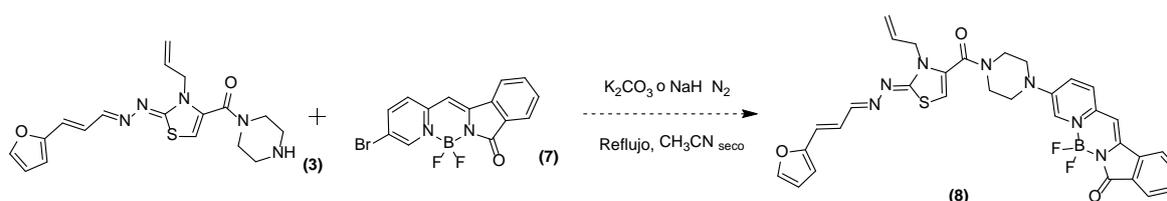
Dada la gran variedad de derivados de BODIPYs, y análogos, descritos en la literatura, se estudiaron diferentes aproximaciones sintéticas para obtener las sondas deseadas.

2.1.Sustitución nucleofílica aromática

Una de las diferentes rutas sintéticasplanteadas se basó en utilizar una sustitución nucleofílica aromática sobre el compuesto **(7)**. Este tipo de sistema presenta un máximo de emisión en 453nm.³⁰

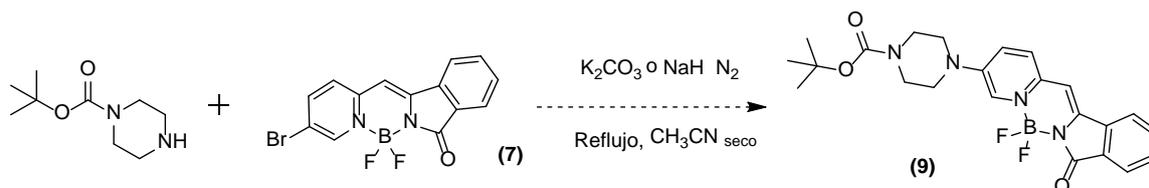


Así, el bromuro **(7)** se puso a reaccionar con el compuesto **(3)** (Figura 8) en diferentes condiciones (Esquema 3). El proceso se ensayo en condiciones suaves, K_2CO_3 en CH_3CN a reflujo (durante 24h), y ante la falta de reacción se utilizó la base fuerte NaH en idénticas condiciones. En este último caso, la espectroscopia evidenció la completa descomposición de los reactivos.



Esquema 3: Síntesis de la posible sonda **(8)**.

Para conservar la integridad del sistema furánico, proveniente del reactivo **(3)**, se plantea realizar el proceso en etapas. Así, se propone la obtención del intermedio **(9)** (Esquema 4) que luego de la desprotección correspondiente por una reacción de amidación podría conducir al producto deseado **(8)**. Este proceso se ensaya, nuevamente, en la condición K_2CO_3/CH_3CN /reflujo, sin evidenciar reacción, por lo que se incrementa la fuerza de la base, NaH/CH_3CN /reflujo, conduciendo a una completa descomposición del fluoróforo de partida.

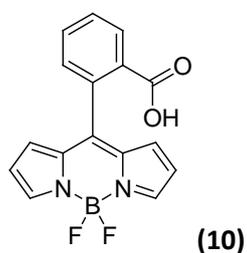


Esquema 4: Síntesis del producto**(9)**.

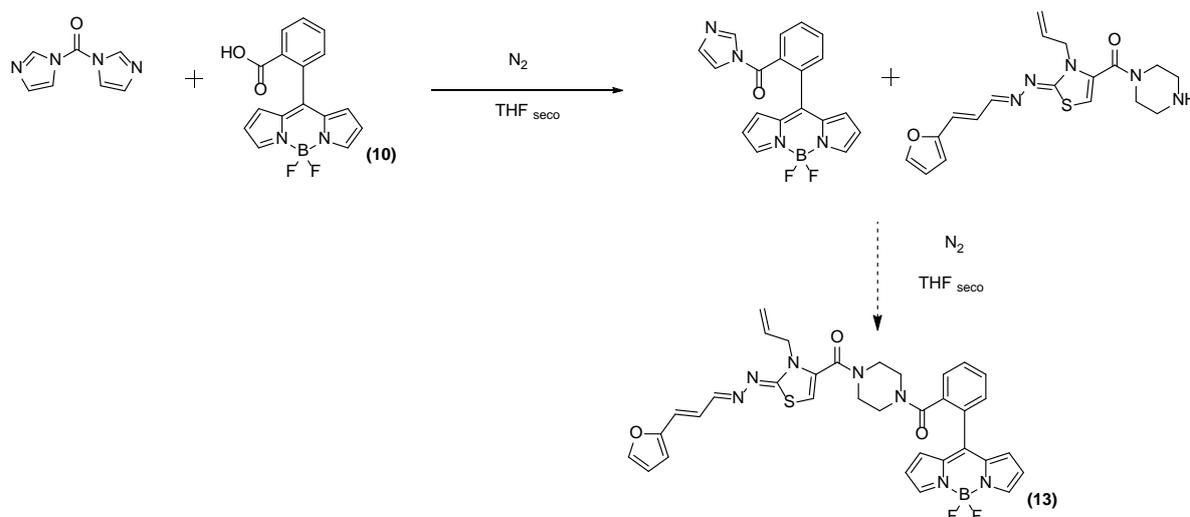
En ambos casos utilizando condiciones de reacción descritas en la literatura para este tipo de sistemas, la reacción no se produjo y luego del transcurso de un tiempo no se observan cambios en los patrones de TLC. En cambio cuando se variaron las condiciones a unas más fuertes, se descompuso el fluoróforo.

2.2.Amidación

Para este tipo de síntesis se utilizaron BODIPYS de acuerdo al procedimiento descrito por X. Peng *et al.* que poseen un grupo ácido carboxílico separado por un conector en la posición 8 del núcleo del BODIPY.³¹



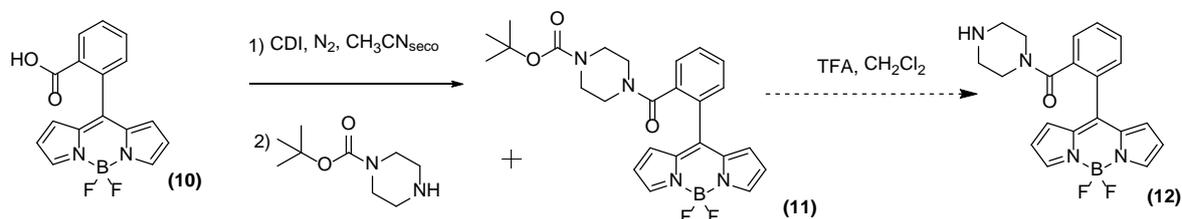
Así, se puso a reaccionar el ácido **(10)** activado con CDI con la amina **(3)** (Esquema 5). Sin embargo, ni trabajando a temperatura ambiente o calentando la mezcla de reacción a reflujo por 24 h se observó reacción.



Esquema 5: Síntesis de la posible sonda (13).

Dado que la ausencia de reacción puede ser resultado de la baja reactividad del ácido carboxílico por impedimento estérico se plantea realizar el proceso en etapas (Esquema 6).

Por ello, una vez más se recurre a la reacción del ácido (10) con el derivado de piperacina mono-protectado (Esquema 6). De esta forma fue posible obtener el intermedio (11) el que fue sometido posteriormente a condiciones de desprotección con ácido trifluoroacético (TFA) para intentar generar el intermedio (12).³⁹ Este tratamiento fue acompañado con un oscurecimiento de la reacción que posteriormente se confirmó, por espectroscopia de 1H -RMN del crudo, está asociada a la completa descomposición del reactivo.

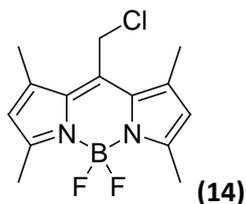


Esquema 6: Ruta de síntesis para la generación del compuesto (12).

Se ensayaron otras condiciones de desprotección, variando la concentración de TFA y los tiempos de reacción, pero en todos los casos se observa la completa descomposición del intermedio (11).

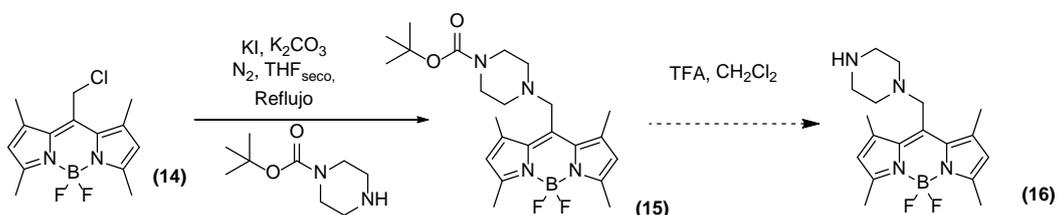
2.3. Sustitución nucleofílica

Por último, otra estrategia empleada se basó en el BODIPY (**14**) (ver estructura a continuación) que puede ser sustrato de una sustitución nucleofílica.^{32,40}



En este caso, en primer lugar se hizo reaccionar el BODIPY (**14**) con el derivado de piperacina mono-prottegido en las condiciones mostradas en el Esquema 7.

Esta reacción evoluciona correctamente, generando el compuesto, (**15**). Sin embargo, cuando se intenta desprotegerlo con TFA, nuevamente se observó completa descomposición del reactivo (**15**). Confirmando la baja estabilidad de los BODIPYs en dichas condiciones.



Esquema 7: Ruta de síntesis alternativa para la generación de una sonda utilizando el BODIPY (**14**).

Debido a que la *N*-alquilación fue exitosa con la piperacina mono-prottegida se decide realizar la reacción con la amina (**3**) (Figura 11).³² Para este caso si se formó un producto nuevo, que se aisló y se confirmó espectroscópicamente la estructura de la sonda deseada. Mecánísticamente, se trata de una reacción sencilla en un paso la cual se explica por un mecanismo de S_N2 (Figura 11).

Al realizar la reacción, luego de unas horas se observa en el origen de la TLC (sílica, hexano:acetato de etilo (1:1, v/v)) que se forma un producto de coloración similar al producto obtenido. Éste puede ser el correspondiente amonio que, debido a que la nucleofilia de las aminas aumenta acorde con el grado de sustitución de las mismas, se forma por ataque de la amina terciaria formada (**16**). Es por esto que la reacción debe detenerse cuando se comienza a observar que la mancha en el origen va aumentando más que el producto de interés. Además, otra de las precauciones que se toma

para evitar este problema es aumentar al doble la relación de equivalentes de la amina frente a los equivalentes del BODIPY.

La nueva sonda, **(16)**, se caracteriza por diferentes técnicas espectroscópicas.

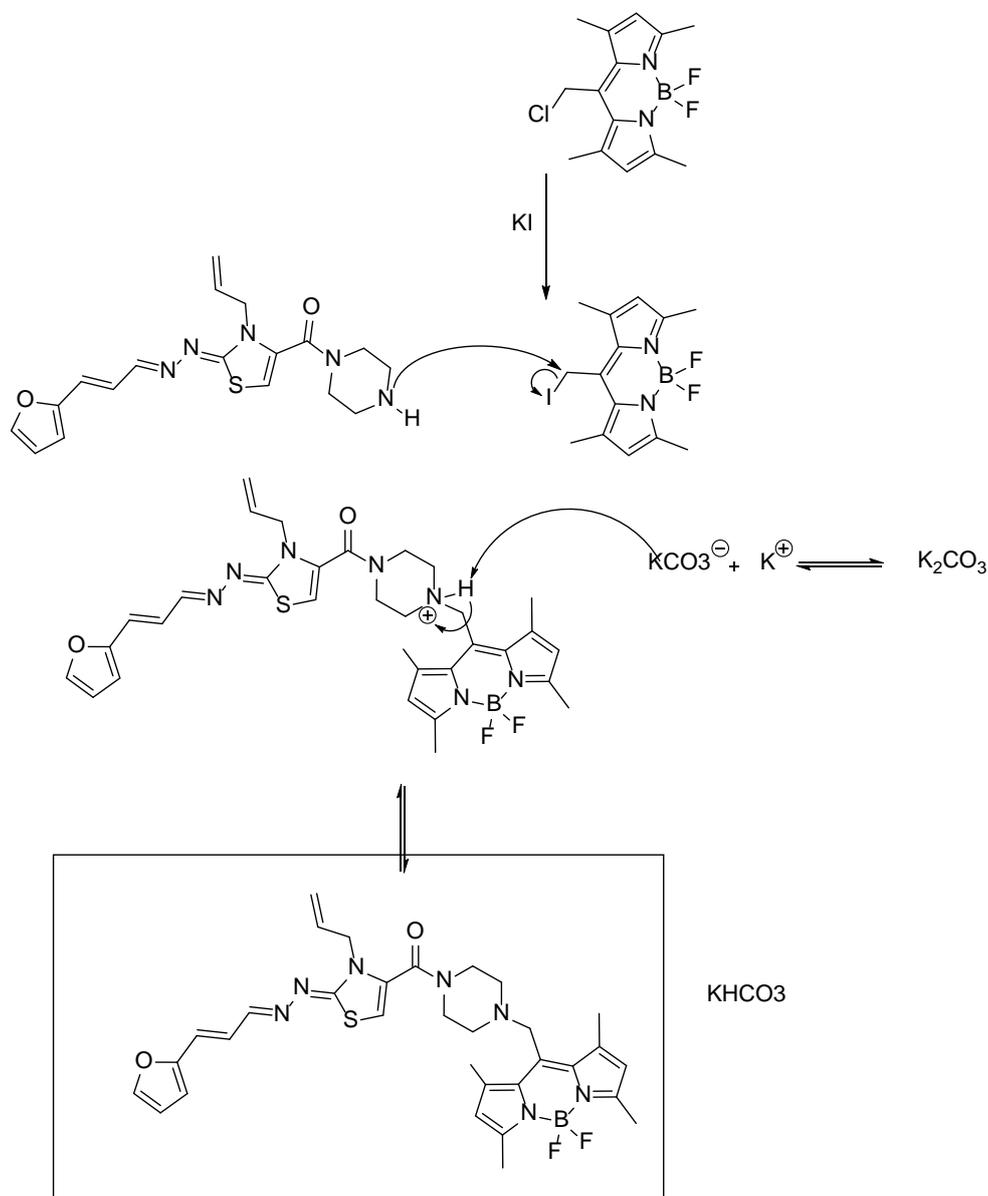


Figura 11: Posible mecanismo de S_N2 para la obtención de **(16)**.

Caracterización espectroscópica de **(16)**

En primer lugar si se comparan los espectros de ¹H-RMN de **(16)** con el material de partida, amina **(3)**, se puede asegurar que la reacción tuvo lugar y no se trata de una mezcla de los reactivos. Ya que, al darse la reacción se espera que el desplazamiento de los protones de la piperacina cercanos al agrupamiento heterocíclico dipirrolometeno se ven afectados y también se espera una nueva

señal proveniente de los protones que forman el puente metilénico entre el agente anti-*T. cruzi* y el sistema fluorocromo (Figura 12).

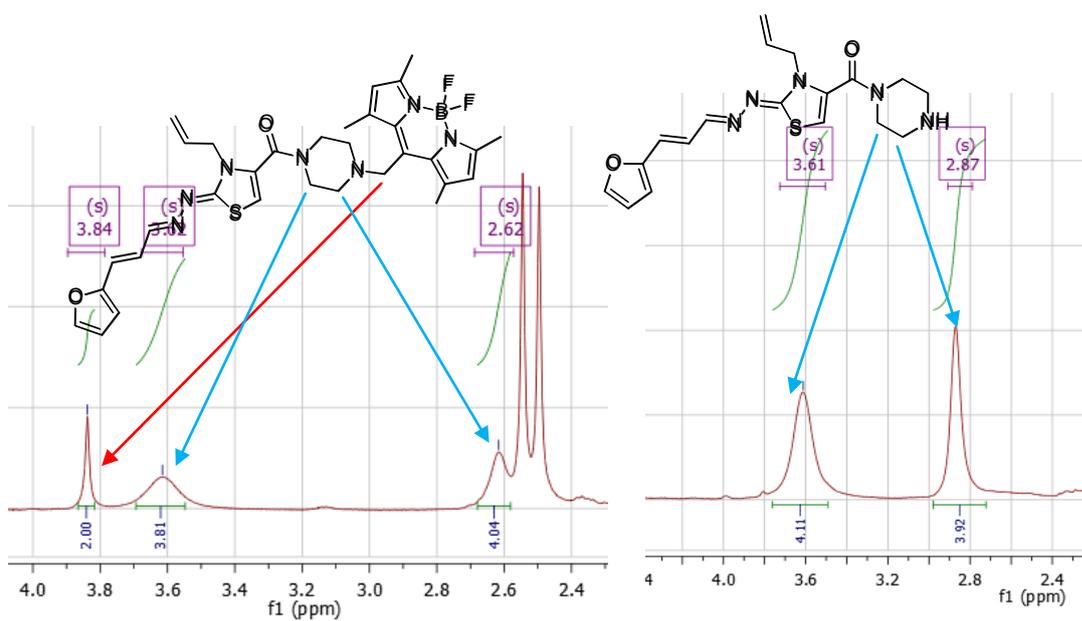


Figura 12: Sección del espectro de ^1H -RMN de **(16)** (izquierda) y **(3)** (derecha) que confirman la formación del producto deseado.

Como se puede observar en la figura 12, hay un desplazamiento de los valores de desplazamientos químicos correspondientes a los protones de la piperacina cercanos al fluorocromo como era de esperar, mientras que los otros se mantienen prácticamente en la misma posición. Con respecto a los protones que se encuentran en el carbono puente, CH_2 , se observa que también hay una modificación del desplazamiento (no mostrado en la figura) en donde el valor del desplazamiento de estos en el BODIPY reactivo corresponde a 4,78 ppm (un CH_2 unido a Cl) mientras que cuando el BODIPY se une al átomo de nitrógeno se encuentra en 3,84 ppm.

En el espectro ^1H -RMN completo mostrado en la figura 13 se asignan con rojo a los protones del grupo furilo, siendo la señal con desplazamiento más alto la correspondiente al H(4) más cercano al O que se corresponde con el C que presenta un desplazamiento de 143 ppm. Mientras que los dos protones restantes (1 y 5) se relacionan al carbono que se encuentra en 110 ppm. La asignación de estos protones fue el resultado del análisis del experimento de HSQC (Figura 14).

Por otra parte los protones señalados en violeta (6, 7 y 8) situados en los dobles enlaces propenílicos se corresponden con los carbonos que se encuentran a desplazamientos de 124 y 152 ppm respectivamente. Las asignaciones fueron confirmadas por el experimento de HSQC y por el experimento de COSY.

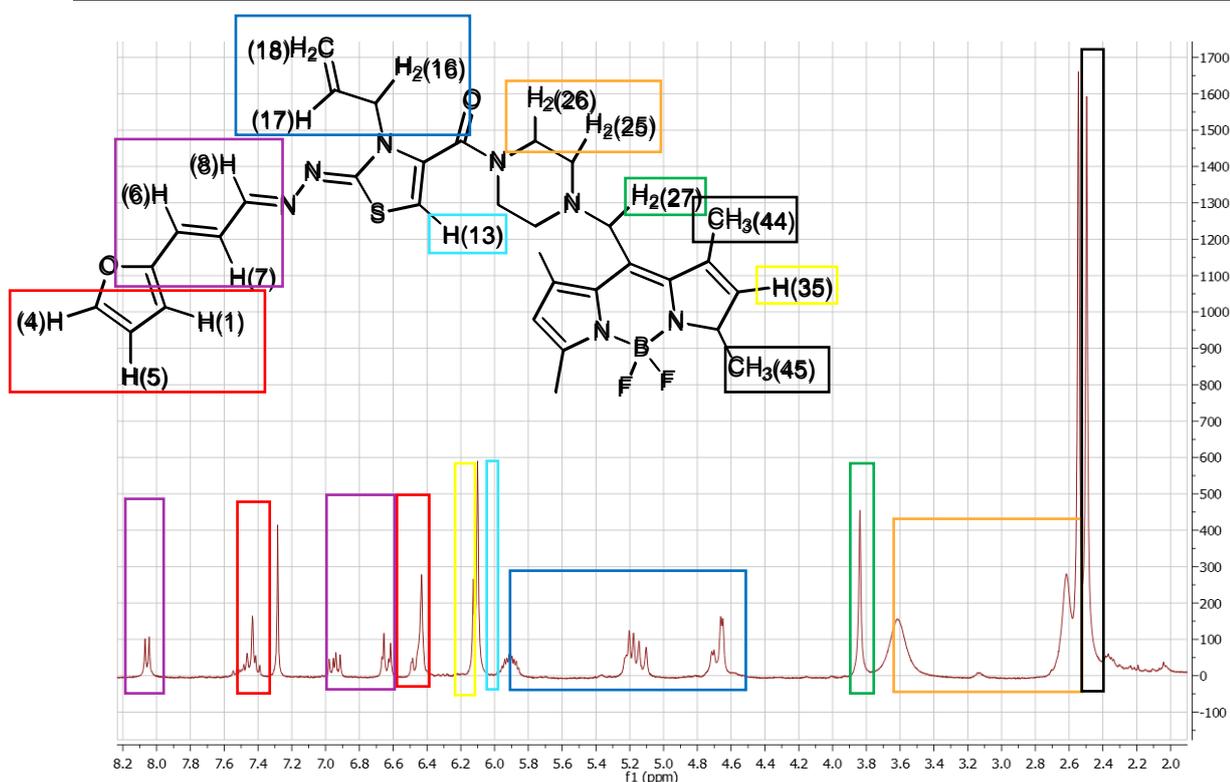


Figura 13: Espectro de ^1H -RMN de **(16)** en CDCl_3 a temperatura ambiente.

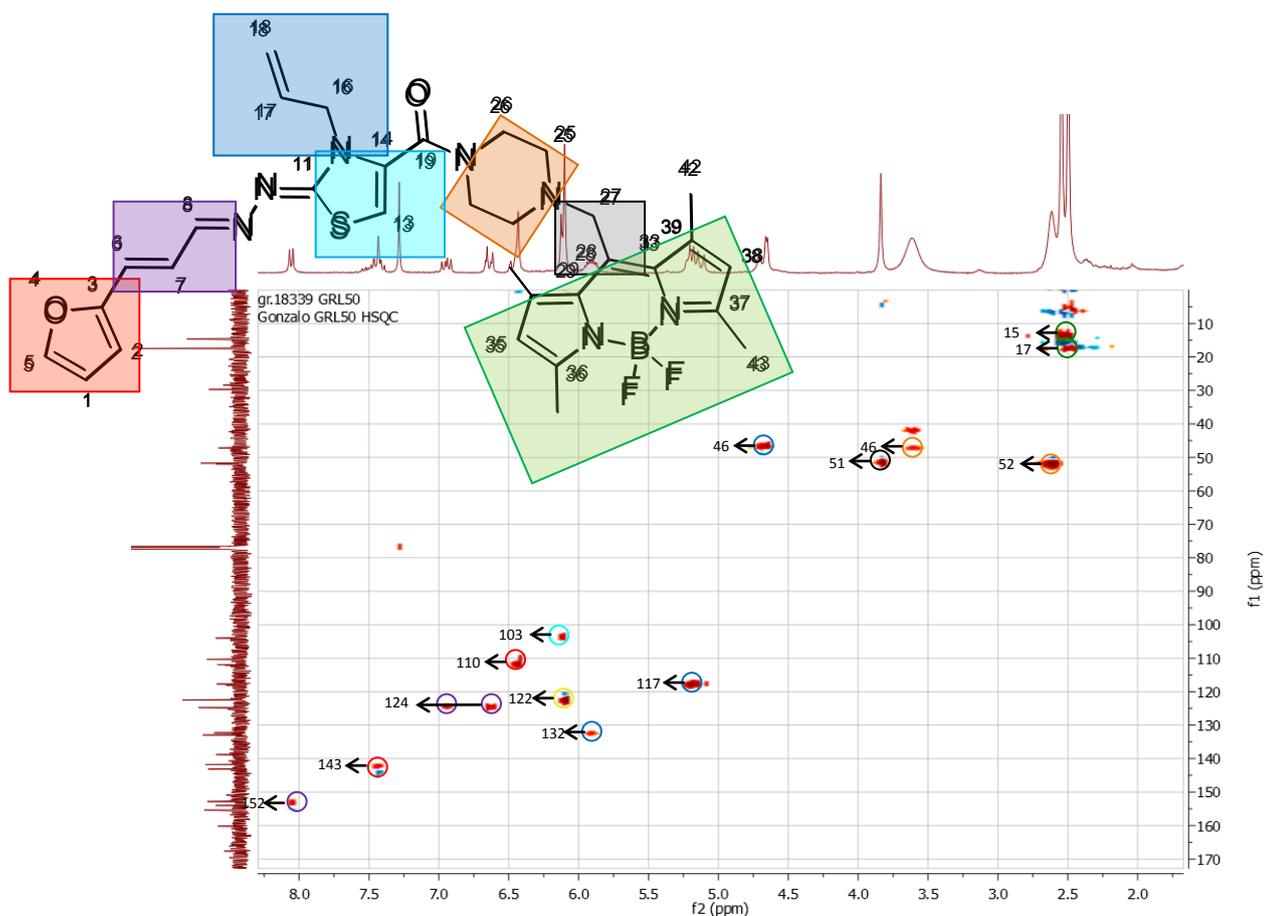


Figura 14: Experimento de HSQC para **(16)** en CDCl_3 y a temperatura ambiente. Las flechas indican los desplazamientos químicos de los átomos de carbonos, mientras que el color indica el átomo de hidrógeno que se está relacionando con cada átomo de carbono.

El grupo de protones del sustituyente alilo, marcados en color azul (16, 17 y 18, según Figura 13), presentan desplazamientos de 4,68, 5,91 y 5,16 ppm. Estos se encuentran enlazados con los carbonos a 47,132 y 117 ppm, respectivamente. Estos datos también fueron confirmados combinando los experimentos de HSQC y COSY.

El único protón del sistema tiazol (señalado en celeste, 13, Figura 13) se evidencia como un singulete en 6,12 ppm. La señal de carbono asignada para éste, se encuentra en 103 ppm.

Los protones de la piperacina (26, 25, señal marcada con naranja en Figura 13), se ven en el espectro a 3,62 y 2,62 ppm como dos señales anchas, debido a las conformaciones adoptadas por el sistema heterocíclico saturado, que integran 4 H cada una de ellas. Los carbonos a los que se encuentran enlazados se ven a desplazamientos de 46 y 52 ppm, respectivamente.

Los protones del puente, entre el farmacóforo anti-*T cruzi* y el fluorocromo, (27, que se encuentran señalados con color verde en la Figura 13) tienen un desplazamiento de 3,84 ppm y están enlazados con el carbono que se encuentra a 51 ppm.

Por último resta asignar los desplazamientos químicos de los protones del núcleo de BODIPY, ellos son los de los metilos (44 y 45, marcados en negro en la Figura 13) y los de los aromáticos (35, en amarillo, Figura 13). Los desplazamientos para estos son 2,50 y 2,25 ppm, para los primeros, mientras que para los aromáticos se encuentran a 6,10 ppm. Los valores de los carbonos enlazados a estos son de 17 y 141 ppm, respectivamente.

Para la asignación de los carbonos restantes, que no se encuentran unidos a protones, se utilizó el experimento de HMBC (Figura 15).

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **(16)** se muestra en la Figura 16.

Por otro lado, a partir de la espectrometría de masas (Figura 17) se pudo confirmar la masa molecular del compuesto **(16)**. Así, como se puede observar en la Figura 17, está presente un ión de relación m/z 631 que se correspondería al ión molecular (M^+).

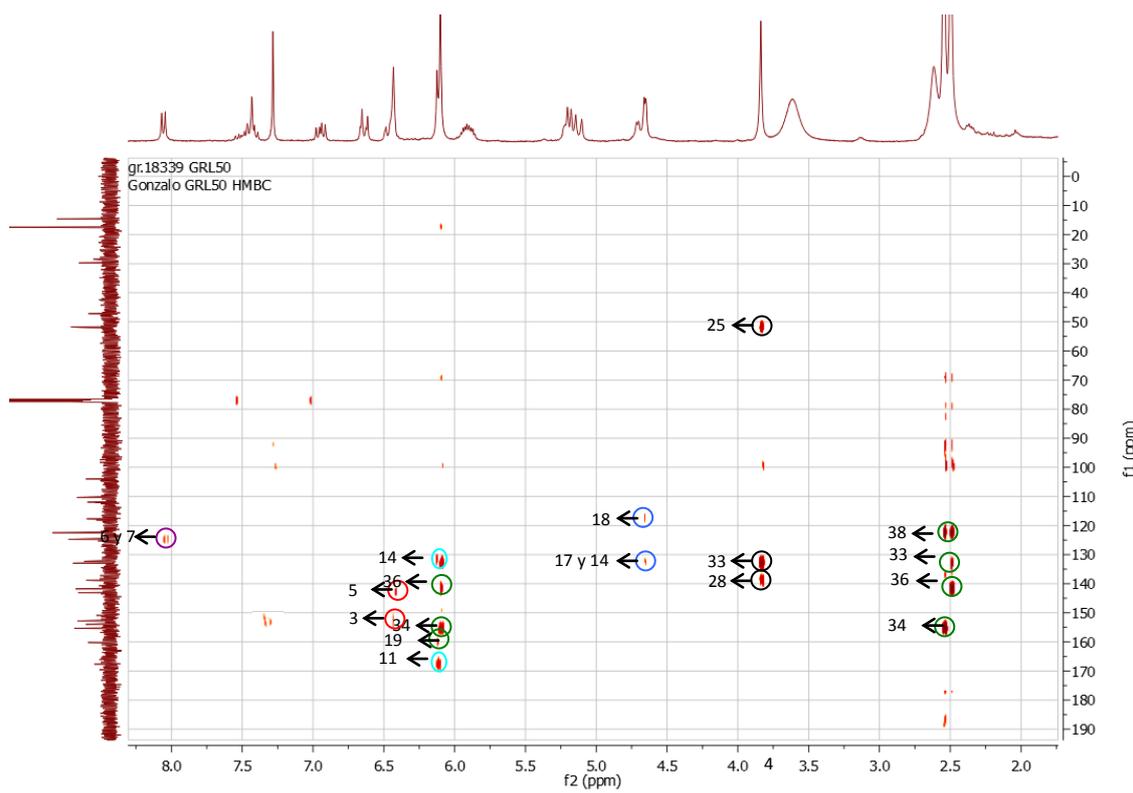


Figura 15: Experimento de HMBC para **(16)** en CDCl_3 y a temperatura ambiente. Las flechas indican los átomos de carbonos, mientras que el color indica el átomo de hidrógeno que se está relacionando con cada átomo de carbono.

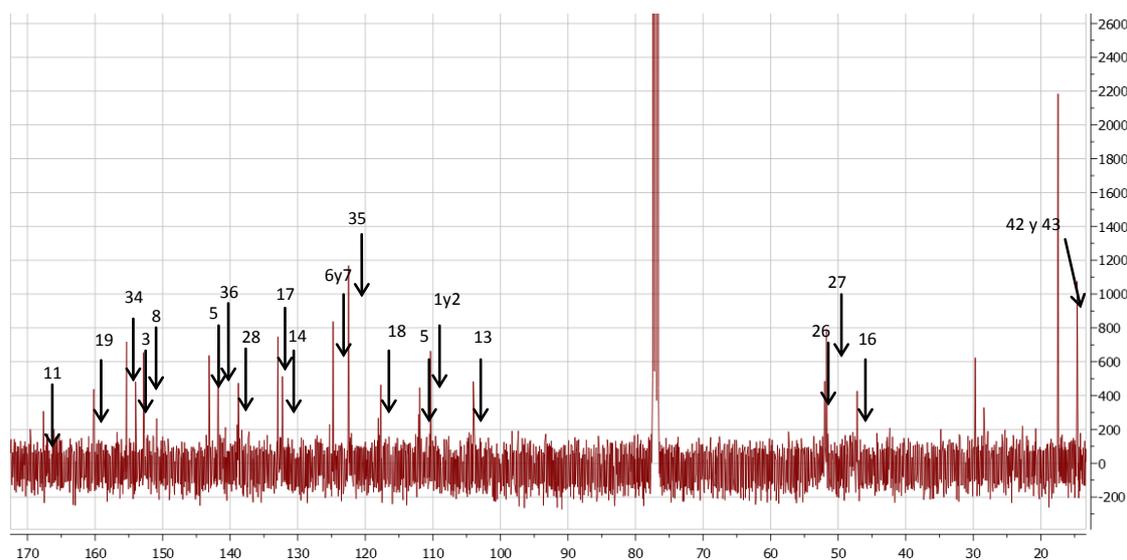


Figura 16: Espectro de ^{13}C -RMN para **(16)** en CDCl_3 y a temperatura ambiente. Los números se corresponden con la nomenclatura utilizada en la Figura 14.

Además, están presentes otros iones, entre los más relevantes se encuentran aquellos de relación m/z de 611, 371, 260 y 241, que evidencian fragmentaciones esperables para la molécula (Figura 18). El patrón de fragmentación se condice completamente con la estructura de la sonda (**16**). Por otro lado, a partir de datos de literatura y por la espectrometría de masas realizada, en idénticas condiciones, sobre un BODIPY simple (Figura 19) se confirma que la principal ruptura que sufren estos fluoróforos es la pérdida de HF.⁴¹

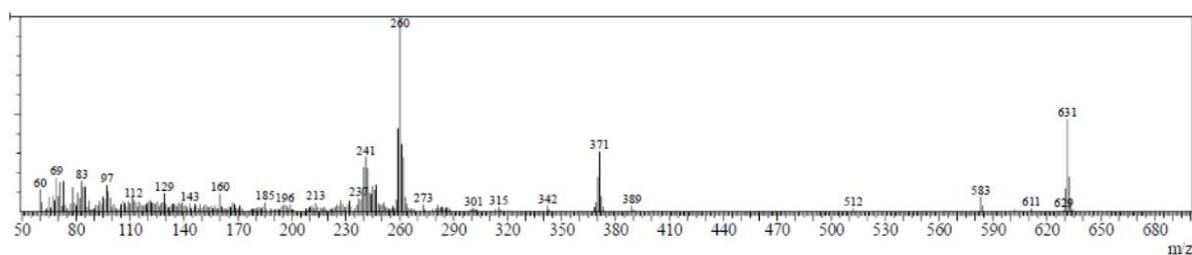


Figura 17: Espectro de masas del compuesto (**16**) (EI).

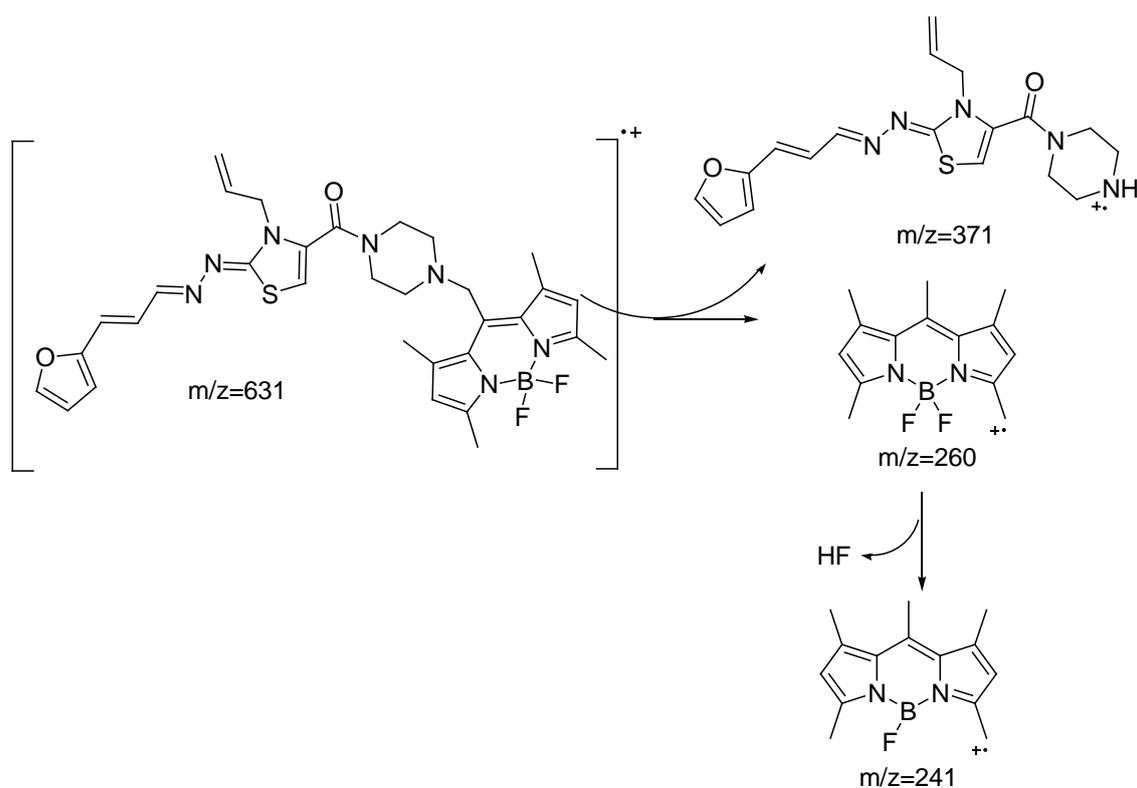


Figura 18: Fragmentaciones propuestas para el compuesto (**16**) que sufre en MS-EI (Figura 17).

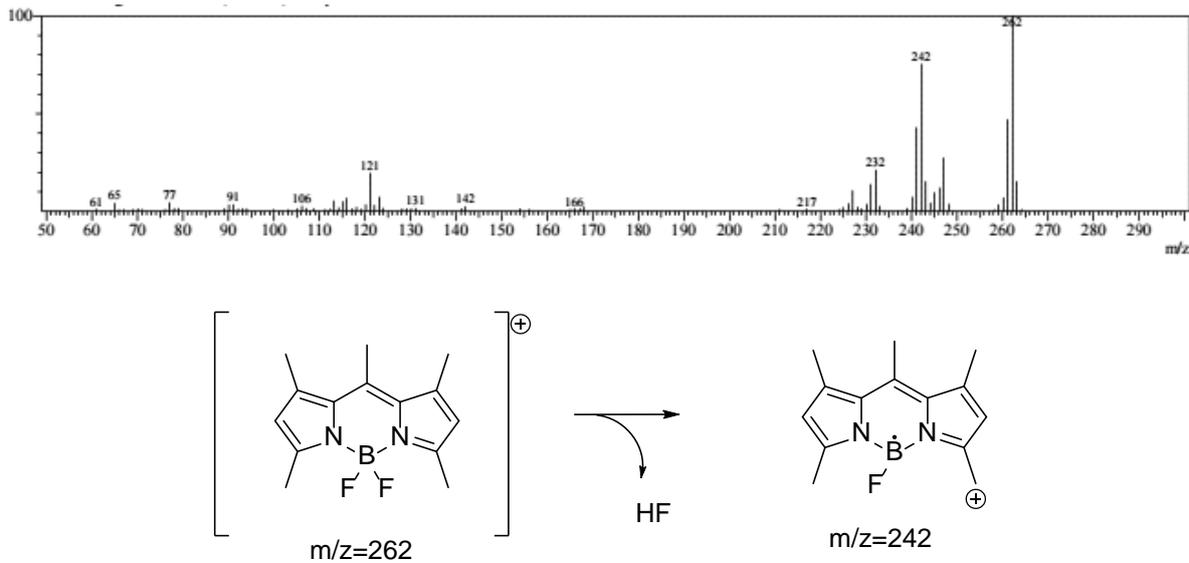


Figura 19: Espectro de masas de un BODIPY simple, donde se evidencia la clara pérdida de HF.

Determinación de la lipofilia

El estudio de la lipofilia de un compuesto biológicamente activo es una de las propiedades fisicoquímicas más estudiadas. Esta propiedad da una idea de la distribución del compuesto entre una fase no polar y una fase acuosa. Se ha visto que la variación en los valores de lipofilia afecta la permeabilidad, absorción, distribución, eliminación y toxicidad de un compuesto en un sistema biológico.

En general los compuestos que posean valores de LogP entre 0 y 3, se estima que pueden presentar buena absorción gastrointestinal por difusión pasiva después de una dosis oral (Figura 20).

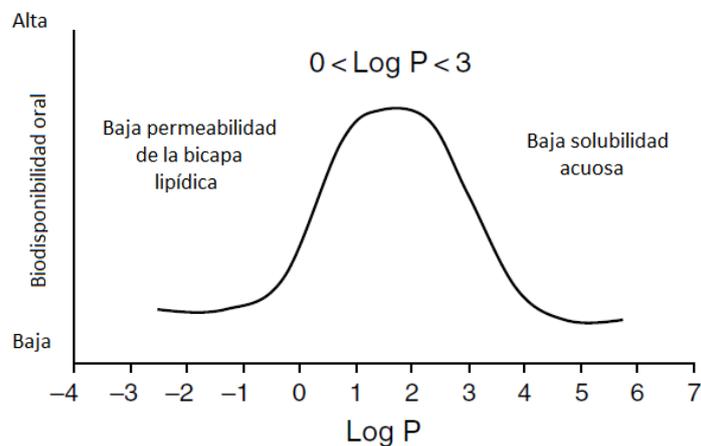


Figura 20: Dependencia de la lipofilia con la biodisponibilidad oral.

Compuestos con valores inferiores a 0 son más polares y es por ello que tienen bajo poder de penetrar la bicapa lipídica. Compuestos con valores superiores a 3, son más apolares y por lo tanto tienen baja solubilidad en agua.

La lipofilia puede ser estimada experimentalmente por la determinación de la distribución de un compuesto entre un disolvente orgánico (generalmente *n*-octanol) y una fase acuosa. La lipofilia se define como el logaritmo del cociente entre la concentración del compuesto en la fase orgánica y la concentración del compuesto en la fase acuosa (Log del coeficiente de partición, P).

En nuestro caso se decide utilizar un buffer, a pH=7,4, para evitar posibles errores relacionados con la carga del compuesto, además es el valor de pH que se encuentra en los medios biológicos. Así, se determina el Log_{D_{7,4}}. Paralelamente, se determina esta propiedad para el agente anti-*T. cruzi* (1).

(16) Absorbancias a 510nm						
Tubo	1	1	2	2	3	3
Blanco Octanol	0,047	0,049	0,046	0,050	0,046	0,049
Blanco PBS	0,048	0,052	0,049	0,053	0,044	0,054
Octanol	1,027	1,531	1,422	1,620	1,667	1,677
PBS	0,122	0,121	0,120	0,156	0,128	0,127
Oct-Blanco	0,979	1,483	1,374	1,572	1,619	1,629
PBS-Blanco	0,072	0,071	0,070	0,106	0,078	0,077
D_{7,4}	13,640	20,836	19,489	14,888	20,817	21,251
Log D_{7,4}	1,135	1,319	1,290	1,173	1,318	1,327

$$\text{LogD}_{7,4} = 1,26 \pm 0,08$$

(1) Absorbancias a 387nm						
Tubo	1	1	2	2	3	3
Blanco Octanol	0,053	0,051	0,055	0,056	0,054	0,063
Blanco PBS	0,054	0,054	0,058	0,061	0,049	0,063
Octanol	0,765	1,235	1,290	1,281	1,458	1,603
PBS	0,070	0,075	0,071	0,075	0,066	0,068
Oct-Blanco	0,710	1,180	1,235	1,226	1,402	1,548
PBS-Blanco	0,014	0,019	0,014	0,019	0,010	0,012
D_{7,4}	52,172	62,906	86,370	65,803	141,394	134,098
Log D_{7,4}	1,717	1,799	1,936	1,818	2,150	2,127

$$\text{LogD}_{7,4} = 1,92 \pm 0,18$$

En comparación con el agente **(1)**, la incorporación del fluoróforo para la generación de la sonda **(16)** parece no haber modificado demasiado esta propiedad. Esto es importante a la hora de validar futuros ensayos, puesto que la lipofilia es una de las principales características a tener en cuenta para justificar que la sonda se comporte de igual manera que el agente anti-*T. cruzi*(**1**). Por otra parte, los valores de lipofilia, de ambos compuestos, parecen caer en el rango óptimo de absorción gastro-intestinal, permitiendo la administración oral de la sonda.

Caracterización óptica

Espectrofotometría UV-visible

Como forma de conocer el comportamiento del compuesto **(16)** como sonda se realizaron los espectros ópticos, en el rango UV-visible, de dicho compuesto y del agente **(1)** (Figura 21).

U.A

Figura 21: Espectro de absorbancia de **(16)** y **(1)**, en DMSO.

Del espectro del compuesto **(16)** se observa, claramente, que existe un corrimiento del máximo de absorción hacia la zona del visible. Además, se destaca que el compuesto **(16)** no absorbe el

610nm, longitud de ondas utilizada para medir el crecimiento parasitario durante los ensayos biológicos *in vitro*.

Espectros de fluorescencia

La principal característica para la caracterización de un compuesto como sonda, es la capacidad que tenga éste como fluoróforo. En todo momento (durante el seguimiento de las reacciones, el aislamiento cromatográfico y la preparación de disoluciones) el compuesto **(16)** mostró fluorescencia típica de los sistemas BODIPYs (Figura 22).



Figura 22: Izquierda, fotografía de una disolución de MetilBODIPY (Figura 19, izquierda) y **(16)** (derecha) en etanol. Derecha, fotografía de las mismas disoluciones pero bajo la lámpara de 365 nm.

Los espectros de absorción y emisión del compuesto **(16)** se realizaron en diferentes disolventes y se compararon con el 1,3,5,7,8-pentametil-BODIPY (Figura 19).

Para el compuesto **(16)** el máximo de excitación es de 517nm en una solución de DMSO (Figura 23) mientras que el de emisión se encuentra en 530 nm. En comparación al 1,3,5,7,8-pentmetil-BODIPY utilizado como fluorocromo de referencia (Figura 19) los valores se desplazan aproximadamente 30 nm.

Con estos datos, se realizaron los espectros de excitación a 550nm (para no interferir con la absorción del compuesto) en diferentes disolventes (Figura 24) y los espectros de emisión a 460nm para las mismas disoluciones. En cuanto a los comportamientos de la sonda en diferentes disolventes se destaca que el cambio de la polaridad del disolvente no afecta el máximo de emisión

en cuanto a su longitud de onda. En cambio si es afectada la intensidad de la fluorescencia siendo máxima en octanol y mínima en DMSO.

Otro dato importante es el rendimiento cuántico. Éste brinda una idea de la eficiencia del fluoróforo. Se define como el número de fotones emitidos sobre el número de fotones absorbidos. Según la literatura el rendimiento cuántico para el 1,3,5,7,8-pentametil-BODIPY es $\phi=1$, es decir que todos los fotones absorbidos son emitidos. A partir de este dato teórico es posible calcular el rendimiento cuántico para **(16)** (Tabla 2).

Figura 23: Espectros de emisión (línea continua) y excitación (línea punteada) normalizados de la sonda en comparación con el fluorocromo 1,3,5,7,8-pentametil-BODIPY (Figura 19).

Figura 24: Izquierda, espectros de emisión (línea continua) y excitación (línea punteada) de **(16)** normalizados en diferentes disolventes. Derecha, espectros de emisión (línea continua) y excitación (línea punteada) de **(16)** sin normalizar en diferentes disolventes.

Compuesto	URF en el máximo de emisión	Rendimiento cuántico (Φ)
1,3,5,7,8-pentametil-BODIPY	249	1
(16)	81	0,32

Tabla 2: Rendimientos cuánticos.

En este caso se observa un menor rendimiento cuántico, en comparación con el fluorocromo 1,3,5,7,8-pentametil-BODIPY, de todas maneras esto no descarta que la sonda no sea efectiva.

Biología

Inhibición del crecimiento de epimastigotes

Para evaluar si la sonda mantiene las mismas propiedades anti-*T. cruzi* que el compuesto **(1)**, se realiza el estudio de la actividad anti-epimastigote de *T. cruzi*.

Inicialmente, se determina el porcentaje de inhibición de crecimiento a 25 μM del compuesto **(16)** a los 5 días de crecimiento parasitario. A partir de este valor se trabaja con distintas concentraciones del compuesto para determinar la correspondiente IC_{50} .

En primer lugar se realiza el estudio de la sonda **(16)** en DMSO, dando como resultado la ausencia de actividad biológica. Este resultado fue interpretado, a pesar de que los valores de lipofilia de la sonda **(16)** y el fármaco **(1)** son similares, en que la mayor hidrofilia de **(16)** no permite que el compuesto ingrese al parásito y por lo tanto no pueda ejercer su acción citotóxica.

Ante este potencial motivo, se prepararon microemulsiones lipídicas del compuesto **(16)**, con el objetivo de facilitar la permeabilización del compuesto, para nuevamente ser evaluado. En este caso la IC_{50} es de 9,1 μM , este resultado concuerda con la hipótesis planteada de la baja permeabilización de la sonda.

Este resultado es muy próximo al valor del compuesto padre **(1)**, cuya IC_{50} es 3,1 μM , lo que estaría garantizando un comportamiento biológico similar sobre el parásito entero.

Microscopía

Si bien al momento de la preparación de los parásitos para los estudios de microscopia se pudo observar que captan al compuesto **(16)** (en cualquiera de las condiciones estudiadas), debido a que luego de sucesivos lavados el “pellet” parasitario mantiene el color naranja típico del compuesto. Sin embargo, por microscopia no se pudo observar fluorescencia o ésta es de muy baja intensidad, por lo que resulta imperceptible para la cámara del equipo y apenas visible para el ojo humano. Una de las explicaciones posibles, es que el fluoróforo no tenga el suficiente rendimiento cuántico para poder ser utilizado como sonda sub-celular. Otra posibilidad es que, debido a la limitada capacidad de elección de los filtros ópticos del microscopio, y sumado a la baja diferencia entre los máximos de excitación y emisión de la sonda el equipo no sea el óptimo para la utilización del compuesto **(16)** como sonda sub-celular.

Estudios *in vivo*

El primer estudio realizado fue tomar imágenes *in vivo* con los ratones anestesiados, pero debido al rango de fluorescencia del compuesto **(16)** no es posible que la fluorescencia atraviese la piel y sumado a la autofluorescencia del pelo del animal, no es posible visualizar la sonda (imagen no mostrada). Es por ello que se sacrifican los animales y se les realiza una incisión abdominal, de manera que los órganos queden expuestos a la cámara del equipo (Figura 25).

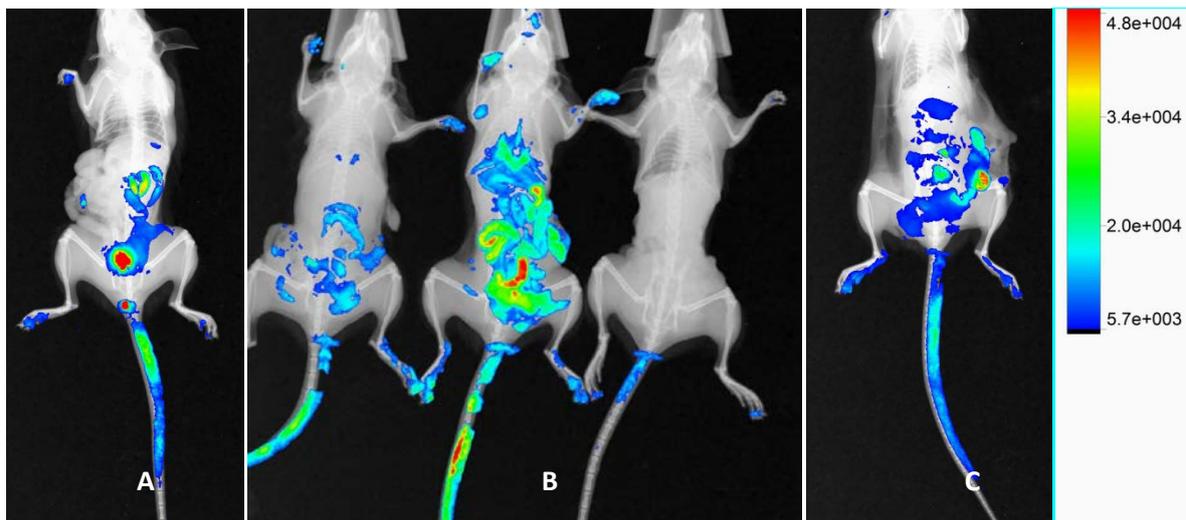


Figura 25: Imágenes a 480/535 nm. A) Imagen adquirida 30 minutos post-inyección de ratón administrado con una disolución del compuesto **(16)** en DMSO/H₂O. B) Imágenes adquiridas 60 minutos post-inyección de ratones con diferentes administraciones. Izquierda: compuesto **(16)** vehiculado con la microemulsión; Centro: compuesto **(16)** vehiculado con DMSO/H₂O; Derecha:

control administrado con PBS.C) Imagen adquirida 120 minutos post-inyección de ratón administrado con una disolución del compuesto **(16)** en DMSO/H₂O.

Como se observa en la Figura 25, comparado con el ratón control, la fluorescencia confirma la distribución de la sonda en los organismos.

También es posible observar, Figura 25B-izquierda, que la microemulsión de alguna forma *aqueos* la intensidad de fluorescencia del compuesto **(16)**

En el estudio de imagenología se destaca que a bajos tiempos (30 m) se evidencia una rápida eliminación del compuesto a través de la vejiga. Luego, a mayores tiempos se observa que las regiones que más captaron el compuesto **(16)** son el intestino y el hígado. Además, se observa fluorescencia en la cola, las patas y en la mucosa bucal del animal, esto puede ser debido a que las mismas son zonas vascularizadas que tienen poco espesor de piel. Como el compuesto tiene baja capacidad para atravesar el tejido biológico el menor espesor en estas regiones permite la visualización de la fluorescencia en dichas regiones. Además, esto estaría indicando que el compuesto **(16)** se biodistribuye por todo el animal. Por otro lado, si se considera la observación descrita por Álvarez [30] durante los estudios *in vivo* del compuesto **(1)**, observación de coloración amarilla en orejas y patas para los animales tratados con dicho compuesto (que es amarillo) (Figura 26), los datos del presente trabajo también podrían estar re-afirmando que este compuesto se biodistribuye preferencialmente hacia esas regiones.



Figura 26: Aspecto de animal tratado compuesto **(1)** (arriba) y sin tratar (abajo) (extraído de referencia [30]). Se observa una clara coloración amarilla en orejas y patas.

Para comprobar que las imágenes sean representativas de la captación individual de cada órgano, y que no haya órganos que hayan quedado enmascarados por otros, se realiza la extirpación de estos y se mide la fluorescencia de cada uno utilizando el software del equipo (Figuras 27-29).

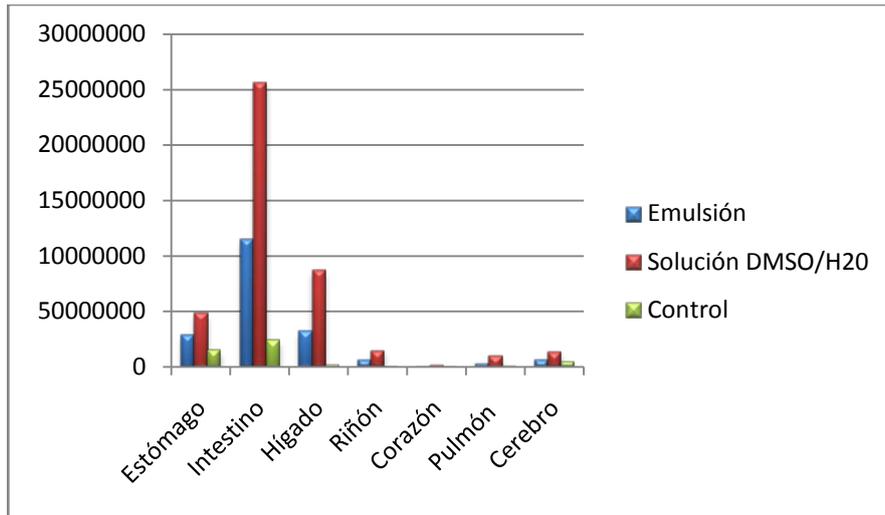


Figura 27: Biodistribución a 1 hora de **(16)** en emulsión o en disolución acuosa.

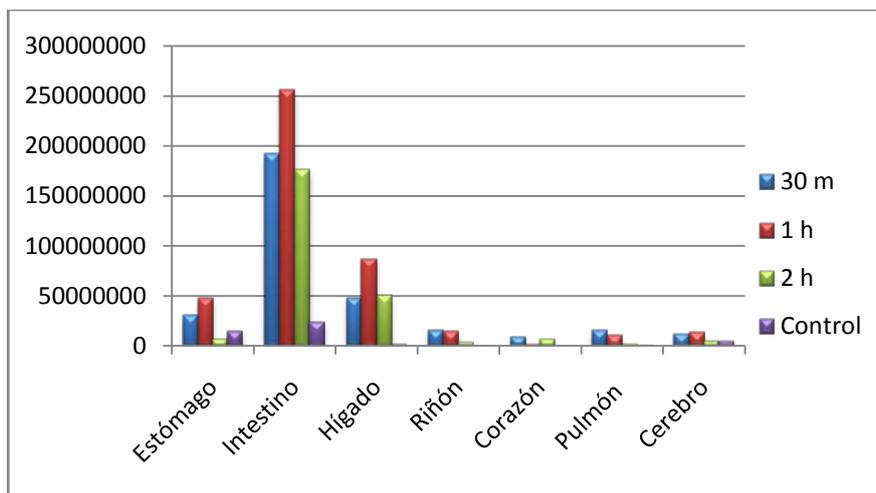


Figura 28: Variación de los valores de fluorescencia a diferentes tiempos para la disolución de **(16)** en DMSO/H₂O.

Los resultados que se muestran en las Figuras 27 y 28 confirman las imágenes obtenidas con cuerpo entero.

Así, en el intestino se concentra la mayor parte de la sonda **(16)**, lo que extrapolándolo al compuesto **(1)** sería de gran interés puesto que es uno de los sitios en donde se aloja el parásito *T. cruzi* en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Otro de los sitios de interés, por la localización del parásito en esa fase de la enfermedad, es el corazón. Como muestran los resultados, este órgano presenta una mínima captación de la sonda **(16)**, en las condiciones estudiadas.

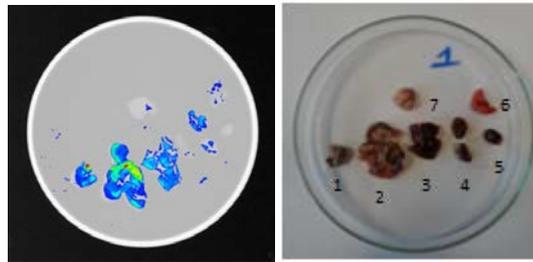


Figura 29: Ejemplo del método empleado para obtener los datos de la biodistribución de la sonda. Izquierda imagen obtenida en el equipo (rayos X y fluorescencia). Derecha fotografía de los órganos distribuidos en una placa de Petri. (1, estómago. 2, intestino. 3, hígado. 4, riñones. 5, corazón. 6, pulmón. 7, cerebro)

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones y perspectivas

Se logró la síntesis de un agente híbrido, que contiene en su estructura un grupo anti-*T. cruzi* por un lado y un fluoróforo por el otro. El compuesto sintetizado (**16**) fue caracterizado por diferentes técnicas, además se realizaron estudios fisicoquímicos, biológicos y espectroscópicos para comprobar que mantenga propiedades similares al agente anti-*T. cruzi*(**1**) y que a su vez tenga buenas características como sonda fluorescente.

Por un lado, la sonda (**16**) presentó un comportamiento anti-*T. cruzi* similar al del compuesto padre, misma potencia entre ambos, y además similar lipofilia. Esto podría garantizar un comportamiento biológico similar para ambas entidades.

Con respecto a su capacidad como sonda, el compuesto presentó un leve corrimiento en la emisión hacia el rojo, respecto al BODIPY sin el farmacóforo, pero el rendimiento cuántico disminuyó con respecto a dicho fluorocromo.

Las características ópticas del compuesto llevaron a que no se pudiera observar correctamente en los estudios de microscopia sub-celular.

Sin embargo, fue posible obtener imágenes de su biodistribución en estudios ex vivo.

Como perspectivas a futuro del presente trabajo se deberían realizar más estudios para confirmar con certeza que el comportamiento de la sonda representa el del fármaco, para ello se podrían sintetizar nuevas sondas, ya sea con diferentes tipos de BODIPYs o utilizando otras familias de fluoróforos. Otra posibilidad es modificar al fármaco en diferentes lugares con el objetivo de confirmar la existencia de funcionalidades que son relevantes para la actividad y que potencialmente afecten el patrón de biodistribución.

También se debe continuar con los estudios a nivel sub-celular, ya sea variando las metodologías empleadas, o variando la sonda.

Por último se debería continuar con los estudios de imagenología *in vivo* para evaluar el comportamiento de la sonda a tiempos mayores.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.

1. Schofield C.J., Jannin J., Salvatella, R. The future of chagas disease control. *Trends Parasitol.***22**, 583–588 (2006).
2. Moncayo A., Silveira A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.***104**, 17–30 (2009).
3. Carabarin-Lima A., González-Vázquez M.C., Rodríguez-Morales O., Baylón-Pacheco L., Rosales-Encina J.L., Reyes-López P.A., Arce-Fonseca M. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop.***127**, 126–135 (2013).
4. Barrett M P., burchmore R. J., Stich A., Lazzari J.O., Frasc A.C, Cazzulo J.J., Krishna, S. The trypanosomiasis. *Lancet.* **362**, 1469–1480 (2003).
5. Roca Saumell C., Soriano-Arandes A., Solsona Díaz L., Gascón Brustenga J. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Atención Primaria.* **47**, 308–317 (2015).
6. Rassi A., Marin-Neto J. A. Chagas disease. *Lancet.***375**, 1388–1402 (2010).
7. Tyler K.M., Engman D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.***31**, 472–481 (2001).
8. CDC. *T. cruzi* life cycle. at <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>
9. Lescure F.X., Le Loup G., Freilij H., Develoux M., Paris L., Brutus L., Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect.***10**, 556–565 (2010).
10. Wilkinson S.R., Taylor M.C., Horn D., Kelly J.M., Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci.***105**, 5022–5027 (2008).
11. Hall B.S., Wilkinson S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother.***56**, 115–123 (2012).
12. Hall B.S., Bot C., Wilkinson S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem.***286**, 13088–13095 (2011).
13. Ntziachristos, V. Fluorescence molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng.***8**, 1–33 (2006).
14. Suzuki T., Matsuzaki T., Hagiwara H., Aoki T., Takata K. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. *Acta Histochem Cytochem.***40**, 131–137 (2007).

15. Lasser T., Ntziachristos V. Optimization of 360 degrees projection fluorescence molecular tomography. *Med Image Anal.***11**, 389–99 (2007).
16. Jiang T., Xing B., Rao J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng.***25**, 41–75 (2008).
17. Lakowicz, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2010).
18. Ramanujam, N. *Fluorescence spectroscopy in vivo*. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons Ltd, 2000).
19. Chen, R. F. Dansyl labeled proteins: Determination of extinction coefficient and number of bound residues with radioactive dansyl chloride. *Anal Biochem.***25**, 412–416 (1968).
20. Beija, M., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.***38**, 2410 (2009).
21. Markova L.I., Terpetschnig E.A., Patsenker L.D. Comparison of a series of hydrophilic squaraine and cyanine dyes for use as biological labels. *Dye Pigment.***99**, 561–570 (2013).
22. Panigrahi M., Dash S., Patel S., Mishra B.K. Syntheses of cyanines: a review. *Tetrahedron***68**, 781–805 (2012).
23. Casley-Smith J.R., Morgan R.G., Piller N.B. Tratament of lymphedema of the arms and legs with 4,5-Benzo-[a]-pyrone. *New Engl J Chem.***329**, 1158–1163 (2013).
24. Holbrook A.M., Pereira J.A., Labiris R. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med.***165**, 1095–1106 (2005).
25. Long L., Zhou L., Wang L., Meng S., Gong A., Du F., Zhang C. A coumarin-based fluorescent probe for biological thiols and its application for living cell imaging. *Org Biomol Chem.***11**, 8214–8220 (2013).
26. Treibs A., Kreuzer F.H. Difluorboryl-complexes de di- y tripyrromethen. *Liebigs Ann Chem.***78**, 208–223 (1968).
27. Loudet A., Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem Rev.***197**, 4891–932 (2007).
28. Ulrich G., Zissel R., Harriman. A. The chemistry of fluorescent Bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew Chem Int Ed Engl.***47**, 1184–1201 (2007).
29. Álvarez G. Investigación y desarrollo de agentes anti-*Trypanosoma cruzi* con moderados efectos tóxicos y dirigidos a múltiples dianas. (Universidad de la Republica, 2013).

-
30. Andrés A., Rosés M., Ràfols C., Bosch E., Espinosa S., Segarra V., Huerta, J. M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur J Pharm Sci.***76**, 181–191 (2015).
31. Wu Y., Peng X., Guo B., Fan J., Zhang Z., Wang J., Cui A., Gao Y. Boron dipyrromethene fluorophore based fluorescence sensor for the selective imaging of Zn(II) in living cells. *Org Biomol Chem***3**, 1387–1392 (2005).
32. Sivakumar K., Xie F., Cash B.M., Long S., Barnhill H.N., Wang Qian.. A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. *Org Lett.***6**, 4603–4606 (2010).
33. Perrin D.D., Armarego W.L.F *Purification of Laboratory Chemicals.*(Butterworth-Heinemann, 1996).
34. Perry R.H., Green D.W. *Chemical Engineers Handbook.* (McGraw-Hill, 1997).
35. Aue W.P., Bartholdi E., Ernst R R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem Physics.***64**, 2229–2246 (1976).
36. Qiu S., Li X., Xiong W., Xie L., Guo L., Lin Z., Qiu B., Chen G. A novel fluorescent sensor for mutational p53 DNA sequence detection based on click chemistry. *Biosens Bioelectron.***41**, 403–8 (2013).
37. Zhou Y., Xiao Y., Li D., Fu M., Qian X. Novel fluorescent fluorine-boron complexes: synthesis, crystal structure, photoluminescence, and electrochemistry properties. *J Org Chem.***73**, 1571–4 (2008).
38. Wang D., Fan J., Gao X., Wang B., Sun S., Peng X. Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: One-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling. *J Org Chem.***74**, 7675–7683 (2009).
39. Zhanga A.J., Russella D.H., Zhub Z., Burgess K. A method for removal of N-BOC protecting groups from substrates on TFA-sensitive resins. *Tetrahedron Lett.***39**, 7439–7442 (1998).
40. Guo B., Peng X., Cui A., Wu Y., Tian M., Zang L., Chen X., Gao Y. Synthesis and spectral properties of new boron dipyrromethene dyes. *J Org Chem.***72**, 8376–82 (2007).
41. Qi Y., Geib T., Huynh A., Jung G., Volmer D. Fragmentation patterns of boron-dipyrromethene (BODIPY) dyes by electrospray ionization high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **29**, 885–890 (2015).