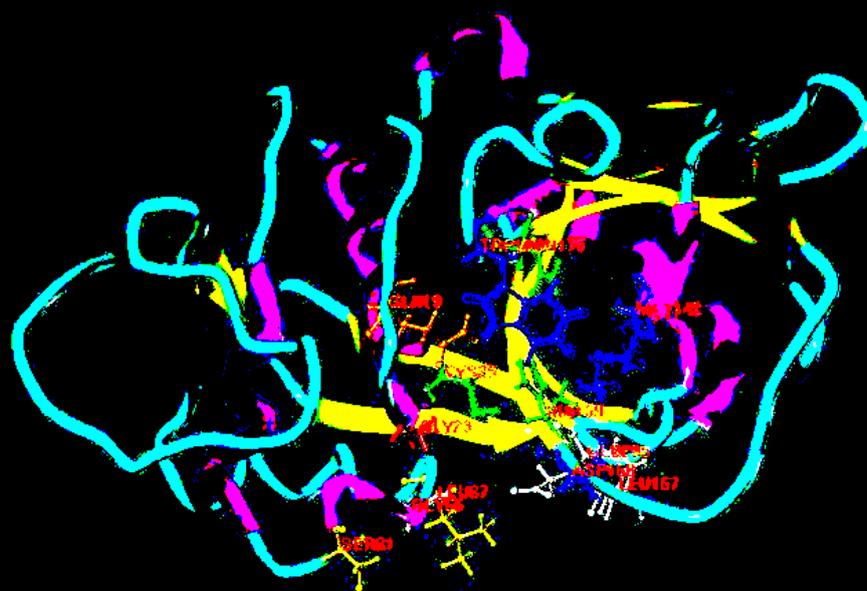


Universidad de la República
Facultad de Química

Investigación y Desarrollo de Nuevos Fármacos
Anti-*T. cruzi*: Inhibidores de Cruzipaína
Derivados del Sistema Benzofuroxano y 1,3-
Dióxido de Benzimidazol

Lic. Alicia Beatriz Merlino Mellognio



Tesis Doctoral

Orientadores: Dr. Hugo Cerecetto,
Dra. Mercedes González

Montevideo, Junio 2010

*“Trabajamos en la oscuridad; hacemos lo que podemos; damos lo que tenemos.
Nuestra duda es nuestra pasión y nuestra pasión es nuestra tarea...”*

Henry James (1843-1916), en **Los años de madurez**, 1893.

A mis amigos del Laboratorio de Química Orgánica

Quiero agradecer a todos aquellos que de una manera u otra contribuyeron para que este trabajo saliera adelante y me acompañaron en esta caminata:

A Hugo y Mertxe, por estos seis años de paternazgo científico y "soportazgo". Para mí al menos, muy lindos años!

A PEDECIBA QUÍMICA y a la ANII por las becas de maestría y doctorado, respectivamente.

A los Dres. Nuria Campillo y Juan Antonio Páez, por recibirme en su laboratorio, enseñarme a usar el SYBYL y ayudarme en mi primera incursión al docking.

Al Dr. Juan José Cazzulo por recibirme en su laboratorio y a Agustina por la semana de apoyo en la purificación de cruzipaína y por el apoyo moral durante las medidas de actividad.

A la Dra. Luzineide Tinoco por recibirme en su laboratorio y enseñarme a usar el Varian 500, por los TOCSY y muy especialmente por invitarme a regresar.

A la Dra. Ana Denicola por permitirme usar el "preciado" Varioskan.

A Gabriela Aguirre, Lucía Bolani y Diego Benítez por los ensayos de actividad biológica. A Benito especialmente, por la locura del tramo final!

A Horacio Pizarro, por los espectros RMN.

A Santiago y Jonathan por darme una mano con los ensayos en cruzipaína y con los estudios de docking, respectivamente.

A la gente del LQTC, Laura, Stephanie, Álvaro y Jenner por hacerme ameno el retorno.

A Lorein, por la visita de Marzo.

Al CDB disminuido, por cada reencuentro.

A Cabrer, Di Lyon y Martita, por las tertulias.

A Maggie y Ceci, por "arrancarme" de la compu en Turismo.

A mis amigos orgánicos, por la sequía y por la lluvia...

A mi hermano, por la mano durante el colapso de mi vieja Toshiba (ella merece una mención especial).

A mi hermano y mi cuñada, por la tradición dominical que a pesar de las quejas más de una vez me salvó!

A mis padres, por estar ahí siempre.

A Javi, por la sangre para los ensayos de GRH, por aprender a ignorarme y, a veces, por el cable a tierra.

¡Muchas gracias a todos!

Índice

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Enfermedad de Chagas	6
1.2. Farmacología	9
1.3. Desarrollo racional de nuevos fármacos	12
1.3.1. Biosíntesis de esteroides de membrana	12
1.3.2. Tripanotona reductasa	14
1.3.3. Enzimas glicolíticas	18
1.3.4. Acidocalcisomas	20
1.3.5. Trans-sialidasa	22
1.3.6. Cisteína proteasas	23
1.4. Cruzipaína como blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas	
1.4.1. Aspectos generales	24
1.4.2. Expresión y localización celular	25
1.4.3. Rasgos estructurales	26
1.4.4. Importancia funcional de cruzipaína	31
1.4.5. Inhibidores de cruzipaína	33
2. ANTECEDENTES, PROPUESTA DE TRABAJO Y OBJETIVOS	
2.1. Antecedentes	39
2.2. Propuesta de Trabajo	44
2.3. Objetivos	45
3. QUÍMICA	
3.1. Diseño de compuestos híbridos derivados del sistema bezofuroxano y 1,3-dióxido de 2,2-dimetil-2H-benzimidazol	48
3.2. Síntesis del intermedio común 5(6)-bromometilbenzofuroxano	51
3.3. Síntesis de hidrazonas	52
3.4. Síntesis de tioureas	54
3.5. Síntesis de carbodiimidas	56
3.6. Síntesis de benzofuroxanos portadores de la funcionalidad aldehído [5-(<i>O</i> alquil)benzofuroxanos]	59

3.7. Síntesis de arilguanidinas	61
3.7.1. Intento de síntesis de bis-arilguanidinas utilizando aminas primarias	62
3.7.2. Síntesis de carboxamidinas a partir de aminas secundarias	66
3.8. Síntesis de compuestos híbridos derivados del sistema benzofuroxano	
3.8.1. Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicar- bazona [<i>Serie I</i>]	70
3.8.2. Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos carboxamidina [<i>Serie II</i>]	72
3.9. Síntesis de compuestos híbridos derivados del sistema 1,3-dióxido de 2 <i>H</i> benzimidazol	77
3.9.1. Síntesis de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de 2 <i>H</i> benzimidazol conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona	78
3.9.2. Síntesis de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de 2 <i>H</i> benzimidazol conteniendo agrupamientos carboxamidina [<i>Serie II</i>]	80
4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA	
4.1. Evaluación de la actividad frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> y estudio de citotoxicidad en células mamíferas	85
4.2. Estudios de inhibición de cruzipaína	94
5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN INHIBIDOR-CRUZIPAÍNA POR RMN Y DOCKING	
5.1. Estudio de la interacción inhibidor-cruzipaína por resonancia magnética nuclear	106
5.2. Estudio teórico de la interacción inhibidor-cruzipaína mediante <i>docking</i>	111
6. CONCLUSIONES	
6.1. Química	119
6.2. Evaluación biológica	
6.2.1. Evaluación de la actividad frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> y estudio de citotoxicidad en células mamíferas	120
6.2.2. Estudios de inhibición de cruzipaína	121
6.3. Estudio de la interacción inhibidor-cruzipaína por RMN y <i>Docking</i>	122

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Química. Aspectos generales	125
7.2. Preparación de <i>N</i> -óxido de 5(6)-metilbenzo[1,2- <i>c</i>]1,2,5-oxadiazol	124
7.3. Preparación de <i>N</i> -óxido de 5(6)-(bromometil)benzo[1,2- <i>c</i>]1,2,5-oxadiazol	126
7.4. Preparación de hidrazonas	126
7.5. Preparación de tioureas	127
7.6. Preparación de carbodiimidias	128
7.7. Preparación de carboxamidinas	129
7.8. Preparación de 5(6)-[<i>O</i> -aril]benzofuroxanos	131
7.9. Preparación de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona	133
7.10. Preparación de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona	137
7.11. Preparación de compuestos híbridos derivados del sistema benzofuroxano conteniendo agrupamientos carboxamidina	142
7.12. Preparación de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo agrupamientos carboxamidina	144
7.13. Evaluación biológica frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	146
7.14. Ensayo de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos	146
7.15. Ensayo de lisis de eritrocitos humanos	147
7.16. Purificación de cruzipaína	148
7.17. Ensayo de inhibición de cruzipaína	149
7.18. Estudios de la interacción ligando-cruzipaína por RMN	149
7.19. Estudios teóricos	151
7.20. Estudios de reconocimiento molecular (<i>docking</i>)	151

Resumen

La enzima cruzipaina, principal cisteín proteasa de Trypanosoma cruzi, está involucrada en diversas etapas relacionadas con el ciclo de vida del parásito lo cual la convierte en un interesante blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos.

En el presente trabajo de tesis doctoral se realizó el diseño, síntesis, evaluación biológica frente al parásito, estudios de inhibición enzimática y estudios de relación estructura-actividad inhibitoria de nuevos compuestos híbridos derivados del sistema benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo agrupamientos semicarbazona, tiosemicarbazona y amidinohidrazona [Serie I] o agrupamientos arilguanidina [Serie II] como potenciales inhibidores de cruzipaina.

Los nuevos compuestos desarrollados se prepararon empleando procedimientos sintéticos eficientes. La caracterización estructural se realizó por técnicas espectroscópicas habituales.

Los nuevos compuestos se evaluaron sobre la forma epimastigota de T. cruzi y se estudió su toxicidad frente a glóbulos rojos humanos y macrófagos murinos. Los derivados de la Serie II mostraron excelentes actividades frente al parásito, identificándose derivados, pertenecientes a ambas series, con índices de selectividad mayores que 50, siendo este valor para las referencias, anfotericina B y nifurtimox, de 10 y mayor que 13, respectivamente.

Los nuevos compuestos presentaron una actividad variable frente a cruzipaina, no encontrándose relación entre ésta y la actividad anti-T. cruzi. En general, los derivados de la Serie I fueron mejores inhibidores de cruzipaina que los de la Serie II.

A fin de racionalizar la actividad frente a cruzipaina se realizaron estudios de interacción inhibidor-enzima empleando técnicas de docking y de resonancia magnética nuclear, experimentos de variación del tiempo de relajación longitudinal, experimentos DOSY y experimentos de diferencia en la transferencia de saturación, que permitieron analizar en forma detallada las interacciones de los distintos ligandos con residuos clave localizados en el sitio activo de la enzima.

Abreviaturas

AcOEt:	Acetato de etilo
AcONa:	Acetato de sodio
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
Al ₂ O ₃ :	Alúmina
AnfoB:	Anfotericina B
BSA:	Seroalbúmina bovina
B3LYP:	Becke, <i>three-parameter</i> ; Lee-Yang-Parr
Boc:	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Bnz:	Benznidazol
BHI:	Infusión de Cerebro y Corazón (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CATB:	Catepsina B
CATL:	Catepsina L
CATS:	Catepsina S
CC:	Columna cromatográfica
CCF:	Cromatografía en capa fina
CP:	Cruzipaína
DBPO:	Peróxido de dibenzoilo
DFT:	Teoría de Funcionales de la Densidad
DIPEA:	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DOSY:	Espectroscopia de orden de difusión (<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>)
DTS:	Diferencia en la transferencia de saturación
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
EP:	Éter de petróleo (fracción 40-65 °C)
ESI:	Ionización por Electrospray
Et ₃ N:	Trietilamina
Et ₂ O:	Éter etílico
EtOH:	Etanol
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GR:	Glutación reductasa
GRH:	Glóbulos rojos humanos
HMBC:	Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a distancia
HMQC:	Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución

IE:	Impacto electrónico
IR:	Espectroscopia de infrarrojo
IS:	Índice de selectividad
MeOH:	Metanol
mbet:	tiosemicarbazona de (<i>m</i> -bromofenil)etilcetona
MS:	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MW:	Microondas
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleótido [oxidado]
NADPH:	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NBS:	<i>N</i> -bromosuccinimida
Nfx:	Nifurtimox
NOE:	Efecto nuclear Overhauser
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
PBS:	Amortiguador fosfato salino
PEM:	Potencial electrostático molecular
RMN:	Resonancia magnética nuclear
RPMI:	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SiO ₂	Sílica gel
TA:	Temperatura ambiente
TBAI:	Ioduro de tetrabutilamonio
TBS:	Amortiguador Tris salino
TcTS:	Trans-sialidasa de <i>T. cruzi</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF:	Tetrahidrofurano
TIM:	Triosafosfato isomerasa
TR:	Tripanotona reductasa
Tris:	<i>tris</i> (hidroximetil)aminometano
V-H ⁺ -PPasa:	Bomba de protones vacuolar dependiente de pirofosfato
Z-Phe-Arg-AMC:	Z-fenilalanina-arginina-7-amido-4-metilcumarina

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Chagas

Los tripanosomatídeos son organismos eucariotas unicelulares, parásitos, pertenecientes al orden Kinetoplastida, género *Trypanosoma* que infectan invertebrados y mamíferos. El ser humano es afectado por dos tipos de tripanosomiasis: la enfermedad de Chagas en el continente Americano, causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y la enfermedad del sueño en África, causada por *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). El orden Kinetoplastida también incluye especies del género *Leishmania* que causan diversas formas de leishmaniosis en países tropicales y subtropicales¹.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana constituye un serio problema de salud pública en las regiones donde es endémica [21 países en América del Sur y Central, desde el Norte de México hasta Argentina, Figura 1.1] debido a que no existen métodos inmunoprolifáticos o quimioterapéuticos efectivos. Por otra parte, el número de pacientes infectados ha aumentado en países desarrollados donde la enfermedad no es endémica [Australia, Canadá, Japón, España y Estados Unidos] debido al creciente movimiento de inmigrantes latinoamericanos que desconocen ser portadores del parásito².

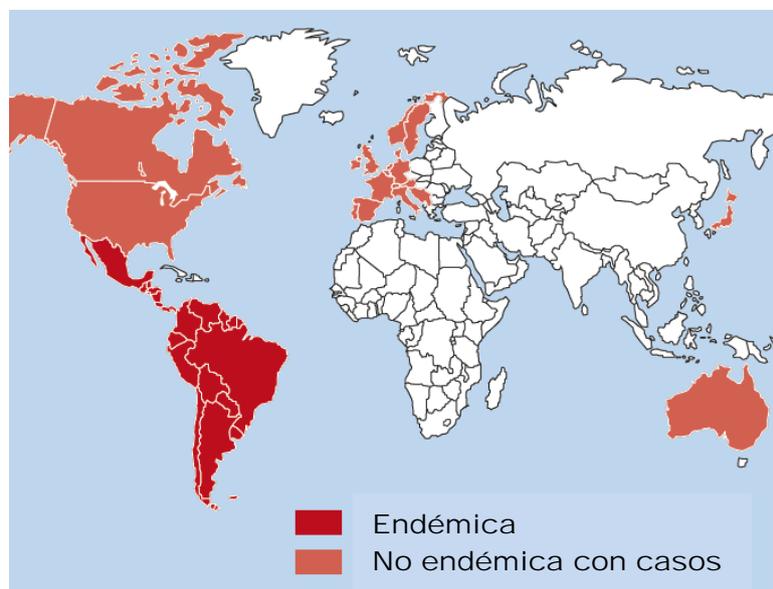


Figura 1.1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Adaptado de ref. [2].

⁽¹⁾ Barret, M.P.; Burchmore, R.J.S.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasch, A.C.; Cazzulo, J.J.; Krishna, S. The trypanosomiasis. *The Lancet* **2003**, *362*, 1469-1480.

⁽²⁾ <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>; consultado 27 de Enero 2010

La morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad de Chagas en América Latina sobrepasan en más de un orden de magnitud a las causadas por malaria, esquistosomiasis o leishmaniosis³. El parásito *T. cruzi* es transmitido por vectores hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae, orden Hemiptera, los cuales depositan sus heces infectadas sobre la piel al picar. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* son los vectores más importantes¹. Actualmente, existen 8-9 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y otros 40 millones con riesgo de adquirir la enfermedad. Investigaciones recientes indican que cada año ocurren 14.000 muertes asociadas con esta condición ubicándose a nivel mundial en tercer lugar entre las afecciones parasitarias².

Al igual que otros parásitos del orden Kinetoplastida, *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, con estadios especializados para la supervivencia tanto en el vector como en el mamífero.

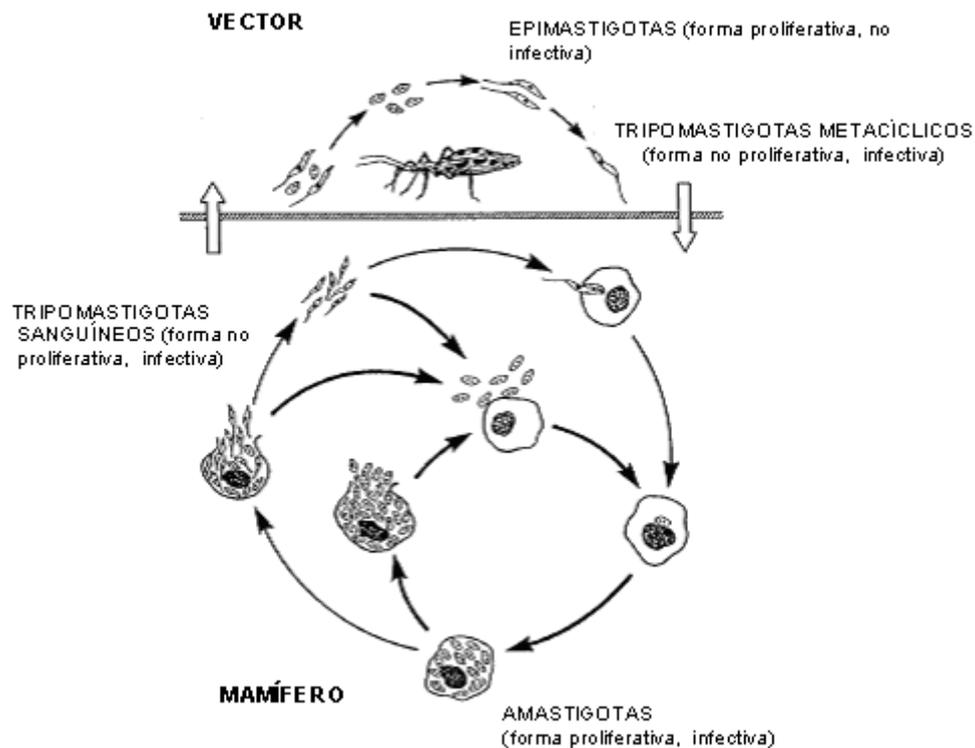


Figura 1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de ref. [4].

⁽³⁾ Urbina, J.A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 495-501.

Después de ser ingeridos por el insecto, los tripomastigotas sanguíneos se transforman en epimastigotas, los cuales proliferan en la luz del tracto gastrointestinal. Los epimastigotas se adhieren a la superficie epitelial en la porción terminal del tubo digestivo (recto) y se diferencian a la forma infectiva tripomastigota metacíclica. Estas formas son eliminadas en las heces cuando el insecto pica a un mamífero e ingresan a éste a través de la piel o mucosas. Estas formas no proliferativas evaden el sistema inmune y pueden invadir diversos tipos celulares, incluyendo células musculares y nerviosas del corazón y el tracto gastrointestinal, así como también células del sistema retículo endotelial e incluso neuronas^{4,5}. Los procesos de evasión e invasión dependen de ciertas proteasas presentes en el parásito entre las que se destaca cruzipaina^{6,7}. Después de la invasión, los parásitos abandonan los fagolisosomas y se diferencian a la forma amastigota, la cual prolifera por fisión binaria y eventualmente se rediferencia a la forma tripomastigota sanguínea a través de formas intermedias, algunas de las cuales presentan una morfología epimastigota^{5,8}. Una vez formados, los tripomastigotas sanguíneos destruyen la célula hospedera pasando a la sangre pudiendo invadir otras células o ser ingeridos por un vector apropiado, completándose así el ciclo⁴.

En humanos, *T. cruzi* induce una fase aguda inicial seguida de una fase crónica de larga duración. La infección aguda, es en general asintomática pero en algunos casos los individuos pueden presentar síntomas como fiebre o anorexia. Si en este momento se diagnostica la infección, el tratamiento con los fármacos comerciales puede detener el avance de la enfermedad. En ausencia de tratamiento los síntomas persisten alrededor de dos meses, con una mortalidad de 2 a 8 %, principalmente en niños⁹. Sin embargo, cuando el sistema inmune disminuye la parasitemia la enfermedad entra en una fase crónica. Los pacientes con infección crónica presentan lesiones cardíacas o dilatación patológica del tracto digestivo (megacolon, megaesófago) y desórdenes en la conducción nerviosa en esos órganos. Las

^[4] Urbina, J.A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* **1999**, *77*, 332-338.

^[5] Tyler, K.M.; Engman, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31*, 472-481.

^[6] Burleigh, B.; Woolsey, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* **2002**, *4*, 701-711.

^[7] Scharfstein, J. Parasite cysteine proteinase interactions with α 2-macroglobulin or kininogens: differential pathways modulating inflammation and innate immunity in infection by pathogenic trypanosomatids. *Immunobiology* **2006**, *211*, 117-125.

^[8] Almeida-de-Faria, M.; Freymüller, E.; Colli, W.; Alves, M.J.M. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp. Parasitol.* **1999**, *92*, 263-274.

^[9] Coura, J.R.; de Castro, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3-24.

personas con enfermedad crónica severa mueren en última instancia por insuficiencia cardíaca^{3,9}.

La aparición de nuevos procesos infecto-contagiosos (VIH) o el aumento de enfermedades asociadas con hábitos actuales (cáncer, enfermedades cardiovasculares) han provocado que la enfermedad de Chagas se convierta, cuando está presente junto con estas patologías, en la causa del deterioro de la salud del individuo^{10,11,12}.

La transmisión de la enfermedad ocurre, principalmente, a través del vector (80 a 90 %) sin embargo se han descrito casos de individuos infectados por transfusión sanguínea (5 a 20 %) o de forma congénita (0.5 a 8 %)⁹.

Después de la implementación de programas sanitarios de control de la enfermedad en los países del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) la OMS anunció la interrupción de la transmisión por el vector *Triatoma infestans* en Uruguay en 1997, en Chile en 1999 y en Brasil en 2001¹³. A pesar de esto, en marzo de 2005 se registraron 24 casos en el estado de Santa Catalina en Brasil, todos como consecuencia de la ingesta de jugo de caña de azúcar contaminado con *T. cruzi*¹⁴.

1.2. Farmacología

Dado que la enfermedad de Chagas, al igual que otras enfermedades desatendidas, es padecida principalmente por poblaciones ya paralizadas por la pobreza y la inequidad, ésta resulta un mercado deprimido para las grandes compañías

^[10] Cohen, J.E.; Tsai, E.C.; Ginsberg, H.J.; Godes, J. Pseudotumoral chagasic meningoencephalitis as the first manifestation of acquired immunodeficiency syndrome - A tropical disease now in the United States. *Surg. Neurol.* **1998**, *49*, 324-327.

^[11] Carnerio-Proietti, A.B.F.; Lima-Martins, M.V.C.; Passos, V.M.A.; Carmo, R.A.; Pinheiro, S.R.; Rocha, P.R.M.; Proietti, F.A. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) and T-lymphotropic virus type I and II (HTLV-I/II) in a haemophilic population in Belo Horizonte, Brazil, and correlation with additional serological results. *Haemophilia* **1998**, *4*, 47-50.

^[12] Concetti, H.; Retequi, M.; Pérez, G.; Pérez, H. Chagas' disease of the cervix uteri in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 120-122.

^[13] <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>; consultado 27 de Enero 2010.

^[14] Steindel, M.; Kramer Pacheco, L.; Scholl, D.; Soares, M.; Hoehr de Moraes, M.; Eger, I.; Kosmann, C.; Marques Sincero, T.C.; Hermes Stoco, P.; Fonseca Murta, S.M.; de Carvalho-Pinto, J.; Grisard, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *60*, 25-32.

farmacéuticas, por lo que sus incentivos para la producción y desarrollo de nuevos fármacos o vacunas son menores¹⁵.

Al no existir vacunas, la quimioterapia sigue siendo el único método para tratar individuos afectados o para disminuir la transmisión poblacional. Los dos fármacos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos, un nitrofurano, Nifurtimox [4-[[5-nitrofurfuriliden]amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dióxido, Lampit®, Bayer] y Benznidazol, un derivado de nitroimidazol [*N*-bencil-2-(2-nitroimidazol)acetamida, Rochagan®, Radanil®, Roche] (Figura 1.3) cuya actividad antiparasitaria fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas¹⁶.

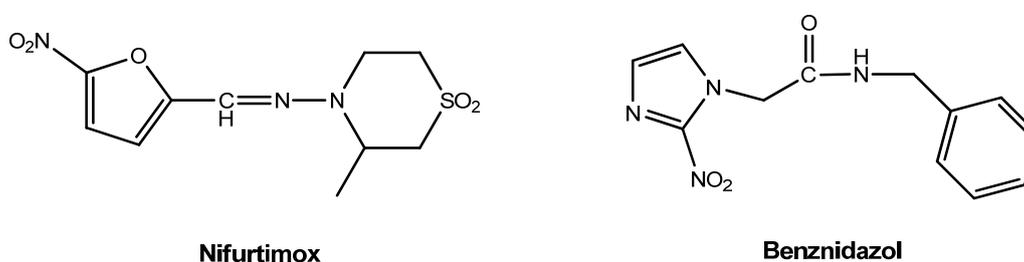


Figura 1.3. Estructura química de los fármacos clínicamente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Si bien durante mucho tiempo se pensó que el mecanismo de acción de Nifurtimox estaba relacionado con la formación del radical nitroanión, por nitroreductasas, el cual reaccionaría generando especies reducidas de oxígeno altamente tóxicas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno) capaces de generar daño celular^{17,18,19} (Figura 1.4, página siguiente), estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que este mecanismo no opera en el parásito²⁰.

^[15] <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/psit-nd-poster.htm>; consultado 27 de Enero 2010.

^[16] Cerecetto, H.; González, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1185-1211.

^[17] Viodé, C.; Bettache, N.; Cenas, N.; Krauth-Siegel, R.L.; Chauvière, G.; Bakalara, N.; Périé, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 549-557.

^[18] Raether, W.; Hänel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, S19-S39.

^[19] de Mecca, M.M.; Bartel, L.C.; Rodríguez de Castro, C.; Castro, J.A. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2008**, *103*, 549-553.

^[20] Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernández, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Denicola, A. Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*. Is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 1736-1745.

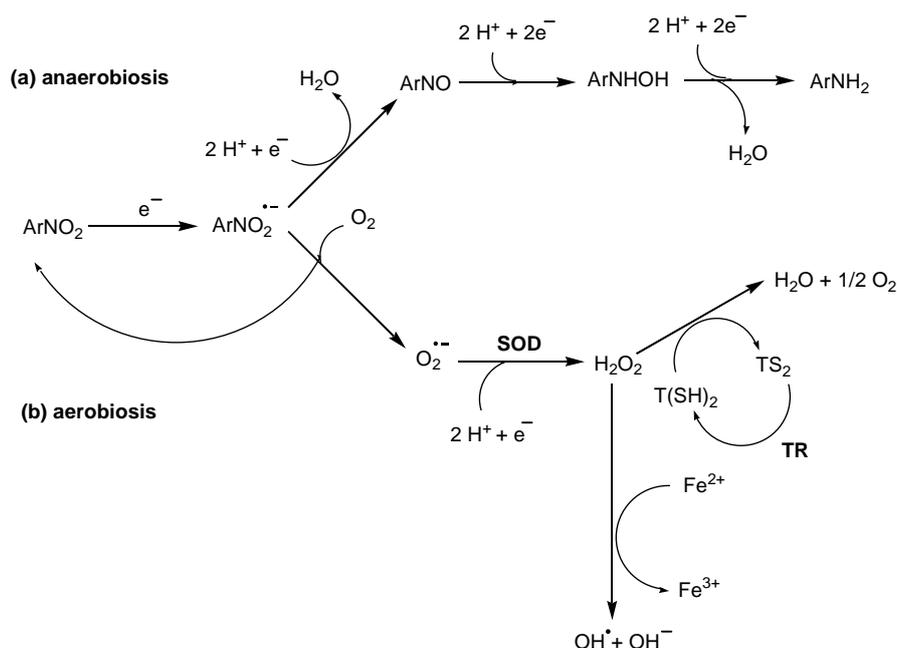


Figura 1.4. Biorreducción de compuestos nitroaromáticos. (a) En condiciones anaeróbicas el anión radical formado en el primer paso puede transformarse en el correspondiente derivado nitroso. La forma nitroso es capaz de interactuar eficientemente con tioles celulares esenciales, reduciéndose en última instancia a la forma amino. (b) En aerobiosis, el nitroanión radical reacciona con oxígeno generando superóxido, el cual es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa. Si el peróxido de hidrógeno se acumula, puede generar radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), los cuales son altamente nocivos para la célula. SOD, superóxido dismutasa; TR, tripanotona reductasa. Adaptado de ref. [17].

Se ha propuesto también que Nifurtimox podría inhibir la enzima tripanotona reductasa, que cataliza la eliminación de especies reactivas del oxígeno en *T. cruzi* (Figura 1.4).

Benznidazol parece actuar por un mecanismo diferente (estrés reductivo), que involucra la modificación covalente de macromoléculas por los intermedios biorreducidos¹⁹.

Si bien Nifurtimox y Benznidazol presentan una buena actividad durante la fase aguda de la enfermedad (se estima un índice promedio de cura parasitológica del 60 %), ninguno de estos fármacos resulta eficaz durante la etapa crónica y ambos provocan serios efectos secundarios. Estos efectos adversos, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica, dermatitis alérgica, leucopenia, entre otros, pueden conducir en algunos casos a la interrupción del tratamiento. Además, ambos fármacos están contraindicados durante el embarazo⁹.

Los hechos mencionados anteriormente, sumados a la aparición de cepas resistentes^{21,22}, impulsan la búsqueda de nuevos fármacos menos tóxicos y más eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

1.3. Desarrollo racional de nuevos fármacos

En los últimos años los avances en el área de la genómica, la proteómica y la bioinformática han permitido la identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas presentes en el parásito. En particular, se ha puesto énfasis en aquellas enzimas que muestran diferencias importantes con respecto a las enzimas presentes en mamíferos o mejor aún que están ausentes en estos últimos a fin de utilizarlas como blanco terapéutico para el diseño racional de nuevos fármacos.

A continuación se presentan algunos procesos bioquímicos y enzimas del parásito que se están utilizando a nivel experimental como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, junto con ejemplos de los inhibidores más relevantes.

1.3.1. Biosíntesis de esteroides de membrana

Se ha observado que *T. cruzi* es extremadamente susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol debido al requerimiento, en todos los estadios de su ciclo vital, de esteroides específicos imprescindibles para la proliferación y viabilidad celular²³. Entre los inhibidores de esta ruta que han mostrado ser efectivos en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto en la etapa aguda como crónica, están los derivados de triazol, DOB70 y Posaconazol (**a** y **b**, respectivamente, Figura 1.5 página siguiente). Estos fármacos, que se utilizan actualmente en el mercado como antifúngicos, son inhibidores selectivos de la 14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51) de hongos y protozoarios³.

^[21] Nozaki, T.; Engel, J.C.; Dvorak, J.A. Cellular and molecular biological analyses of Nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 111-117.

^[22] Murta, S.M.F.; Gazzinelli, R.T.; Brener, Z.; Romanha, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to Benznidazole and Nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *93*, 203-214.

^[23] Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* **2010**, *115*, 55-68.

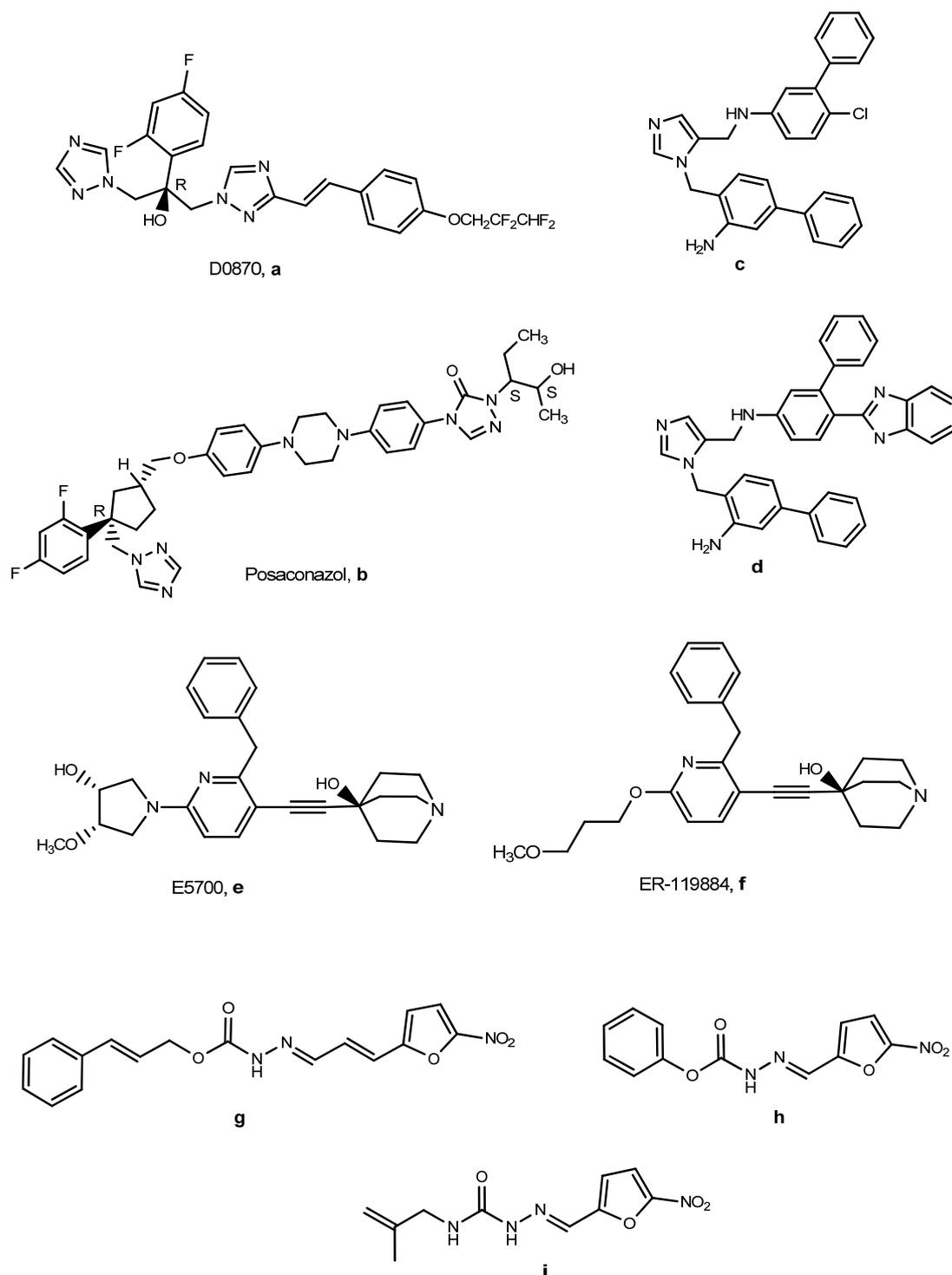


Figura 1.5. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides con actividad anti *T. cruzi*.

Estudios recientes han mostrado que Posaconazol ha resultado muy efectivo en la erradicación de la forma amastigota de *T. cruzi* en cultivos de miocitos²⁴ y está

^[24] Silva, D.T.; de Nazareth, M.; de Meirelles, S.L.; Almeida, D.; Urbina, J.A.; Pereira, M.C.S. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 530–537.

previsto que para mediados de 2010 se comiencen estudios de fase clínica como candidato para el tratamiento específico de la enfermedad de Chagas²³.

En un estudio reciente se ha encontrado que distintos imidazoles alquil-sustituidos presentan una excelente actividad *in vitro* frente a amastigotas de *T. cruzi*, con valores de IC₅₀ de 0.40 a 10 nM. Entre estos derivados, los compuestos **c** y **d** (Figura 1.5, página anterior) mostraron ser buenos inhibidores de CYP51. Estos nuevos derivados presentan una eficacia similar a Posaconazol en cuanto a la disminución de la parasitemia en modelos de ratones infectados con *T. cruzi*, siendo su producción más económica²⁵.

Los inhibidores de la escualeno sintasa E5700 y ER-119884 (**e** y **f**, Figura 1.5, página anterior) presentan una potente actividad *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi*²⁶.

Los compuestos híbridos **g**, **h** e **i** (Figura 1.5), con un mecanismo de acción dual, generan estrés oxidativo en el parásito e inhiben escualeno epoxidasa, una enzima clave en la biosíntesis de esteroides. Estos derivados muestran una excelente actividad *in vitro* tanto en la forma epimastigota como amastigota de *T. cruzi*, con valores de IC₅₀ menores que Nifurtimox o Terbinafine, siendo este último un inhibidor comercial de la escualeno epoxidasa con potente actividad antimicótica²⁷.

1.3.2. Tripanotiona reductasa

Los tripanosomatídeos presentan un metabolismo redox diferente al de casi todo el resto de eucariotas y procariotas. En estos organismos el sistema glutatión/glutatión reductasa presente en mamíferos es reemplazado por el sistema tripanotiona [*N*¹,*N*⁸-bis(glutathionil)perimidina]/tripanotiona reductasa (TR). TR es una flavoproteína dependiente de NADPH que mantiene la tripanotiona en su forma

^[23] Suryadevara, P.K.; Olepu, S.; Lockman, J.W.; Ohkanda, J.; Karimi, M.; Verlinde, C.L.M.J.; Kraus, J.M.; Schoepe, J.; Van Voorhis, W.C.; Hamilton, A.D.; Buckner, F.S.; Gelb, M.H. Structurally Simple Inhibitors of Lanosterol 14 α -Demethylase Are Efficacious In a Rodent Model of Acute Chagas Disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3703-3715.

^[25] Urbina, J.A.; Concepción, J.L.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T.; Hiyoshi, H. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2379-2387.

^[27] Gerpe, A.; Odreman-Nuñez, I.; Draper, P.; Boaini, L.; Urbina, J.A.; González, M.; Cerecetto, H. Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 569-577.

reducida, contribuyendo al mantenimiento de un ambiente intracelular reductor²⁸. Dado que TR es una enzima clave en la defensa antioxidante del tripanosoma y está ausente en mamíferos, la misma ha sido considerada un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos tripanosomicidas.

Desde su identificación y validación como blanco terapéutico en 1985 un gran número de inhibidores de TR han sido descritos. El grupo de inhibidores más ampliamente estudiado han sido las poliaminas, compuestos análogos al sustrato natural que inhiben TR reversiblemente. Dentro de este grupo, el inhibidor más potente encontrado hasta el momento es el derivado *N,N,N',N',N''*-penta[3-fenilpropil]espermina (**a**, Figura 1.6, página siguiente)²⁹. Si bien los compuestos de esta serie presentan una excelente actividad tripanosomicida *in vitro*, no se ha observado una clara correlación entre la inhibición enzimática y la actividad antiparasitaria.

Otra clase de inhibidores reversibles estudiados son compuestos tricíclicos basados en los fármacos antidepresivos derivados de fenotiazina, por ejemplo imipramina. Las sales cuaternarias de fenotiazinas (**b**, Figura 1.6) muestran mayor potencia y selectividad frente a TR en relación a glutatión reductasa (GR) que los análogos no cargados^{30,31}.

Los aminodifenilsulfuros, obtenidos por la apertura del anillo central de las fenotiazinas, presentan una potencia inhibitoria similar a estas últimas pero carecen de los efectos neurolépticos no deseados (**c**, Figura 1.6)³². Distintas 9-aminoacridinas

^[28] Krauth-Siegel, R.L.; Bauer, H.; Schirmer, R.H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 690–715.

^[29] Li, Z.; Fennie, M.W.; Ganem, B.; Hancock, M.T.; Kobašlija, M.; Rattendi, D.; Bacchi, C.J.; Sullivan, M.C.O. Polyamines with *N*-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 251-254.

^[30] Khan, M.O.F.; Austin, S.E.; Chan, C.; Yin, H.; Marks, D.; Vaghjani, S.N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Croft, S.L.; Douglas, K.T. Use of an additional hydrophobic binding site, the Z site, in the rational drug design of a new class of stronger trypanothione reductase inhibitor, quaternary alkylammonium phenothiazines. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3148-3156.

^[31] Iribarne, F.; Paulino, M.; Aguilera, S.; Tapia, O. Assaying phenothiazine derivatives as trypanothione reductase and glutathione reductase inhibitors by theoretical docking and Molecular Dynamics studies. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *28*, 371-381.

^[32] Girault, S.; Davioud-Charvet, E.; Maes, L.; Dubremetz, J-F.; Debreu, M-A.; Landry, V.; Sergheraert, C. Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: bis[2-aminodiphenylsulfides] for fluorescent labeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 837-846.

entre las que se encuentra el fármaco antimalárico mepacrina (**d-f**, Figura 1.6) han demostrado ser potentes inhibidores de la enzima³³.

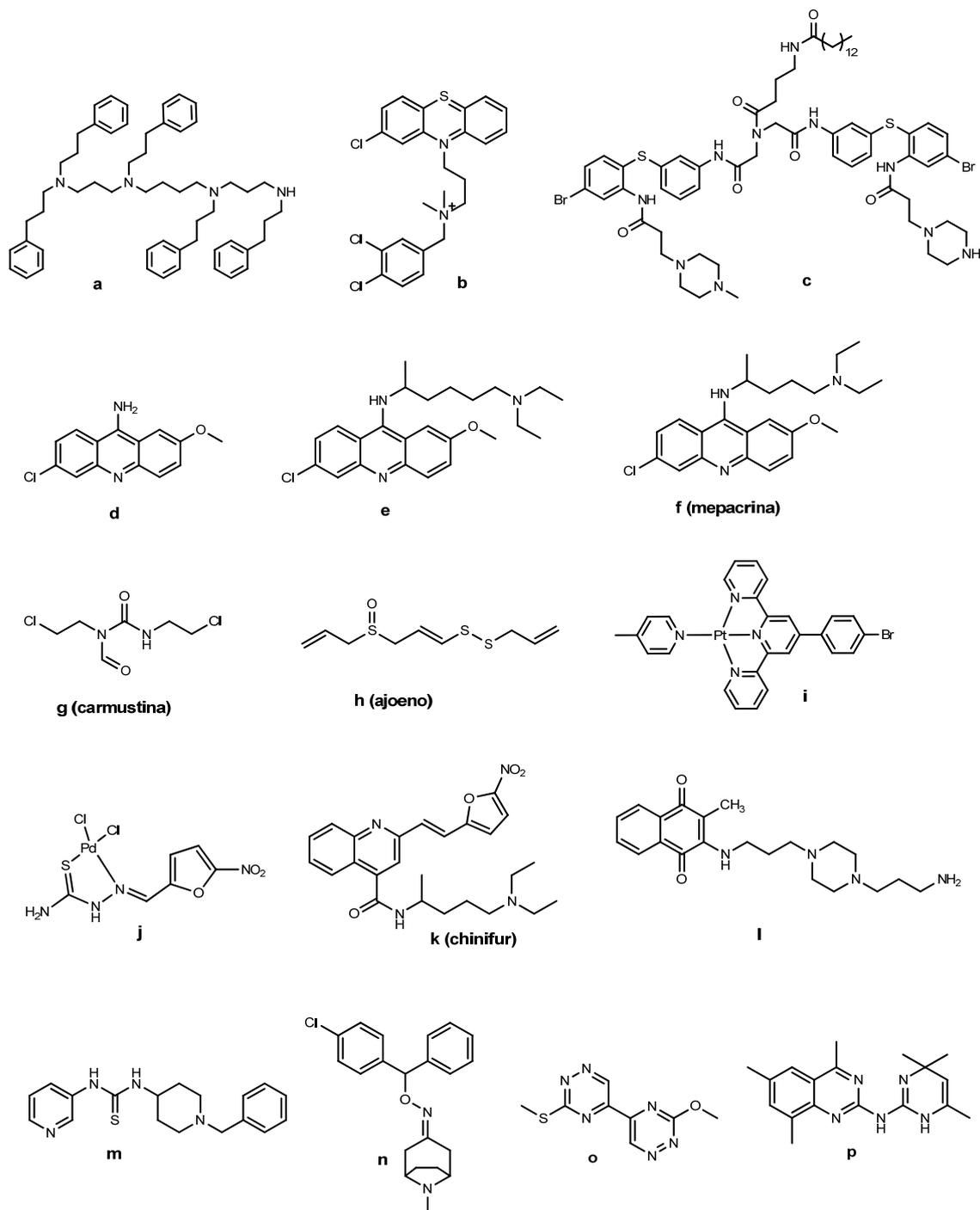


Figura 1.6. Inhibidores de tripanotiona reductasa.

^[33] Bonse, S.; Santelli-Rouvier, C.; Barbe, J.; Krauth-Siegel, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: Kinetic studies and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5448-5454.

Entre los inhibidores irreversibles de TR que se han descrito se encuentra la carmustina y el ajoeno (**g** y **h**, respectivamente Figura 1.6, página anterior), que si bien son inhibidores muy potentes de TR también inhiben la GR mamífera por lo cual carecen de selectividad^{34,35}. Dentro de esta clase de inhibidores se han estudiado complejos de Pt(II) con terpiridinas (**i**, Figura 1.6) que inhiben irreversiblemente a la enzima por coordinación del centro metálico con un residuo de cisteína presente en el sitio activo³⁶. Los complejos de Pt(II) son inhibidores selectivos de TR. Recientemente se ha evaluado una serie de complejos de Pd(II) con 4-(5-nitrofuril)-3-tiosemicarbazonas como potenciales inhibidores de TR y se observó que el complejo **j** (Figura 1.6) es un potente inhibidor irreversible de esta enzima³⁷.

Un tercer grupo de inhibidores son los llamados sustratos subversivos debido al ciclo fútil que inducen en la enzima. Ejemplos de este tipo de inhibidores son los nitrofuranos y las naftoquinonas que inhiben la reducción fisiológica de tripanotona disulfuro y actúan como cicladores redox. De los nitrofuranos estudiados, Chinifur (**k**, Figura 1.6) es el que ha mostrado mayor capacidad inhibitoria además de ser selectivo hacia el aumento de actividad oxidasa de TR con respecto a GR³⁸. La naftoquinona I (Figura 1.6), ha mostrado ser un inhibidor de TR más potente que menadiona y presenta muy buena actividad *in vitro* frente a la forma amastigota de *T. cruzi*³⁹.

^[34] Schirmer, R.H.; Müller, J.G.; Krauth-Siegel, R.L. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 141-154.

^[35] Gallwitz, H.; Bonse, S.; Martinez-Cruz, A.; Schlichting, I.; Schumacher, K.; Krauth-Siegel, R.L. Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 364-372.

^[36] Bonse, S.; Richards, J.M.; Ross, S.A.; Lowe, G.; Krauth-Siegel, R.L. [2,2':6',2' '-terpyridine]platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4812-4821.

^[37] Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J.D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, L.; Piro, O.E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3322-3331.

^[38] Blumenstiel, K.; Schöneck, R.; Yardley, V.; Croft, S.L.; Krauth-Siegel, R.L. Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 1791-1799.

^[39] Salmon-Chemin, L.; Buisine, E.; Yardley, V.; Kohler, S.; Debrey, M.-A.; Landry, V.; Sergheraert, C.; Croft, S.L.; Krauth-Siegel, R.L. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 548-565.

Recientemente, mediante la evaluación masiva de compuestos (*High Throughput Screening*) se encontró que la tiourea **m**, la oxima **n** y los heterociclos nitrogenados **o** y **p** (Figura 1.6, página 16) son buenos inhibidores de TR y presentan una interesante actividad frente a amastigotas de *T. cruzi*⁴⁰. Estos prototipos moleculares resultan atractivos para ser usados en el diseño racional de nuevos inhibidores de TR.

1.3.3. Enzimas glicolíticas

Una característica importante del metabolismo de *T. cruzi* es que la forma amastigota utiliza glucosa como la principal fuente de ATP. Es por esto que las enzimas involucradas en la glicólisis son consideradas blancos interesantes para el desarrollo de inhibidores selectivos que afecten su función metabólica. Entre estas enzimas, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la triosafosfato isomerasa (TIM) han resultado blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de fármacos ya que se ha visto que además de ser enzimas claves para la supervivencia del parásito presentan diferencias estructurales importantes con las correspondientes enzimas humanas^{41,42,43}.

GAPDH cataliza la oxidación y fosforilación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato en presencia de NAD⁺ y fosfato inorgánico.

Los inhibidores más potentes y selectivos de esta enzima desarrollados hasta el momento, en base al diseño basado en la estructura de la enzima, son análogos de

^[40] Holloway, G.A.; Charman, W.N.; Fairlamb, A.H.; Brun, R.; Kaiser, M.; Kostewicz, E.; Novello, P.M.; Parisot, J.P.; Richardson, J.; Street, I.P.; Watson, K.G.; Baelli, J.B. Trypanothione reductase High-Throughput Screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2824-2833.

^[41] Souza, D.H.F.; Garratt, R.C.; Araujo, A.P.U.; Guimaraes, B.G.; Jesus, W.D.P.; Michels, P.A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Lett.* **1998**, *424*, 131-135.

^[42] Figueroa-Cortés, A.A.; Torres-Pérez, A.; Salaiza, N.; Cabrera, N.; Escalona-Montaño, A.; Rondán, A.; Aguirre-García, M.; Gómez-Puyou, A.; Pérez-Montfort, R.; Becker, I. A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth *in vitro* and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitol. Res.* **2008**, *102*, 635-643.

^[43] Mande, S.C.; Mainfroid, V.; Kalk, K.H.; Goraj, K.; Martial, J.A.; Hol, W. G. J. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 810-821.

adenosina (**a** y **b**, Figura 1.7). Estos compuestos presentan además una muy buena actividad *in vitro* frente a amastigotas de *T. cruzi*⁴⁴.

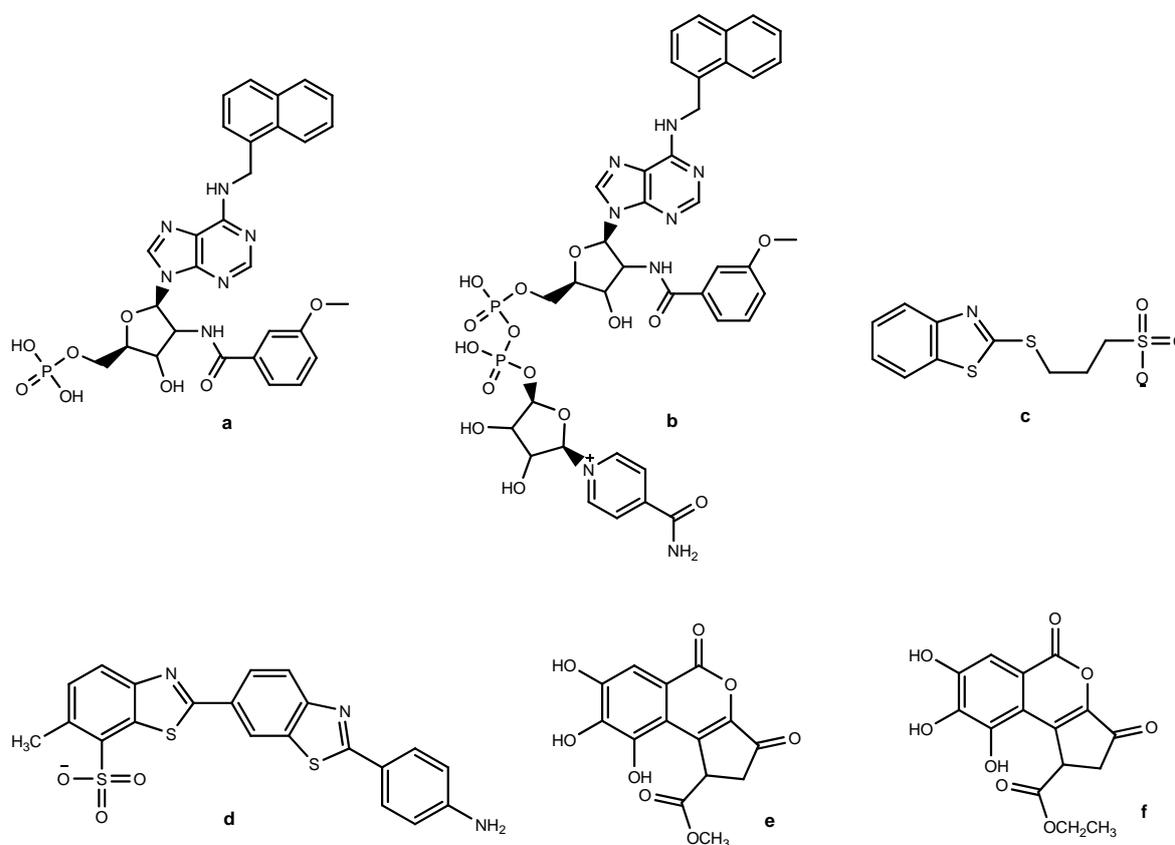


Figura 1.7. Inhibidores de GAPDH (**a** y **b**) y TIM (**c-f**).

TIM cataliza la isomerización de gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetonafofosfato en el quinto paso de la vía glicolítica⁴⁵. Estructuralmente, todas las TIMs conocidas son homodímeros siendo activas solamente en su forma dimérica⁴⁶. Esta característica fue la que inspiró la búsqueda de compuestos dirigidos a la interfase entre los monómeros con el objetivo de inducir modificaciones estructurales que alteraran la integridad del dímero, provocando así la inactivación de la enzima.

^[44] Kennedy, K.J.; Bressi, J.C.; Gelb, M.H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 95-98.

^[45] Rieder, S.V.; Rose, I.A. The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1007-1010.

^[46] Waley, S. G. Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* **1973**, *135*, 165-172.

En este sentido, se han encontrado inhibidores altamente selectivos de la TIM del parásito como los derivados de benzotiazol **c** y **d**^{47,48} y los derivados de brevifolina **e** y **f** (Figura 1.7, página anterior)⁴⁹. Estas estructuras resultan excelentes líderes para la síntesis de moléculas más potentes a fin de obtener nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

1.3.4. Acidocalcisomas

Los acidocalcisomas son organelos ácidos ricos en calcio y fosfatos que se han conservado durante la evolución desde procariotas hasta eucariotas. Estos organelos están involucrados en el almacenamiento de cationes y polifosfatos, metabolismo de pirofosfato y polifosfatos, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH intracelular y osmoregulación⁵⁰. En los parásitos, los acidocalcisomas poseen enzimas que están ausentes o difieren de las análogas presentes en mamíferos, por lo que han sido consideradas posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos⁵¹.

Una de las enzimas presentes en los acidocalcisomas de tripanosomatídeos y que ha sido validada como blanco para el diseño de nuevos fármacos es la bomba de protones vacuolar dependiente de pirofosfato [V-H⁺-PPasa]^{52,53}. En 1998 Scott *et al.* demostraron que los análogos de pirofosfato aminometilbifosfonato [AMBP] e

^[47] Téllez-Valencia, A.; Avila-Rios, S.; Pérez-Montfort, R.; Rodríguez-Romero, A.; Tuena de Gómez-Puyou, M.; López-Calahorra, F.; Gómez-Puyou, A. Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. **2002**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 958–963.

^[48] Téllez-Valencia, A.; Olivares-Illana, V.; Hernández-Santoyo, A.; Pérez-Montfort, R.; Costas, M.; Rodríguez-Romero, A.; López-Calahorra, F.; Tuena de Gómez-Puyou, M.; Gómez-Puyou, A. Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **2004**, **341**, 1355–1365.

^[49] Gayosso-De-Lucio, J.; Torres-Valencia, M.; Rojo-Domínguez, A.; Nájera-Peña, H.; Aguirre-López, B.; Salas-Pacheco, J.; Avitia-Domínguez, C.; Téllez-Valencia, A. Selective inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by brevifolin carboxylate derivatives isolated from *Geranium bellum* Rose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, **19**, 5936-5939.

^[50] Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S.N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, **3**, 251–261.

^[51] Docampo, R.; Moreno, S.N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, **14**, 882-888.

^[52] Lemercier, G.; Dutoya, S.; Luo, S.; Ruiz, F.A.; Rodrigues, C.O.; Baltz, T.; Docampo, R.; Bakalara, N. A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **2002**, **277**, 37369-37376.

^[53] Lemercier, G.; Espiau, B.; Ruiz, F.A.; Viera, M.; Luo, S.; Baltz, T.; Docampo, R.; Bakalara, N. A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J. Biol. Chem.* **2004**, **279**, 3420-3425.

imidodifosfato (IDP) [a y b, Figura 1.8] eran capaces de inhibir la V-H⁺-PPasa presente en acidocalcisomas de *T. cruzi*⁵⁴.

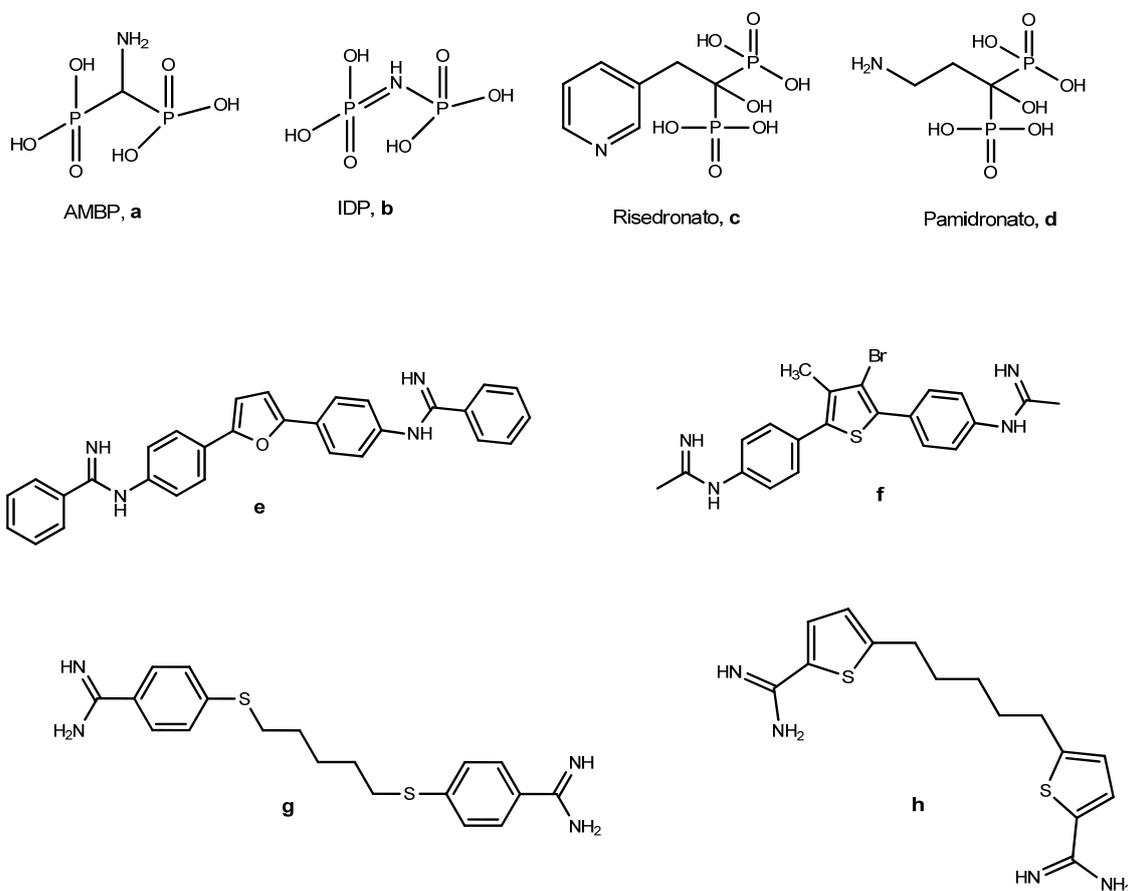


Figura 1.8. Inhibidores de *T. cruzi* que se acumulan en los acidocalcisomas. a y b, inhibidores de V-H⁺-PPasa. c y d, inhibidores de farnesil pirofosfato sintasa. e-h, diamidinas cuyo mecanismo de acción aún no ha sido determinado pero podría estar relacionado con su acumulación en los acidocalcisomas.

Por otro lado, los *N*-alquilbisfosfonatos (c y d, Figura 1.8), inhibidores específicos de la enzima farnesil pirofosfato sintasa, se acumulan en los acidocalcisomas y presentan una potente y selectiva actividad frente a *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*^{23,51}.

Se ha observado que los compuestos amidínicos presentan una importante acumulación en los acidocalcisomas de distintos parásitos⁵¹.

^[54] Scott, D.A.; de Souza, W.; Benchimol, M.; Zhong, L.; Lu, H.G.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22151-22158.

En trabajos recientes se han evaluado los efectos de distintas diamidinas (**e-h**, Figura 1.8, página anterior) sobre *T. cruzi*^{55,56}. Todos los derivados estudiados presentan una potente actividad *in vitro* sobre las formas tripomastigota sanguínea y amastigota de *T. cruzi* y en particular los compuestos **e** y **f**, han resultado efectivos en modelos murinos de la enfermedad^{57,58}. Si bien se ha hipotetizado que el mecanismo de acción de estos compuestos es la interacción con el ADN, su acumulación en los acidocalcisomas podría jugar un rol importante en su acción tripanosomicida⁵⁹

1.3.5. Trans-sialidasa

La trans-sialidasa de *T. cruzi* (TcTS) es una glicoproteína expresada en la superficie de la forma tripomastigota sanguínea del parásito y liberada al medio, constituyendo uno de los pocos ejemplos de glicosiltransferasas de superficie en eucariotas. Los tripanosomas no son capaces de sintetizar ácido siálico y usan esta enzima para transferirlo desde sialoglicoconjugados presentes en la sangre y otros tejidos del hospedero hacia residuos de galactosa terminales presentes en mucinas que cubren la superficie del parásito. Las mucinas sialidadas están involucradas en aspectos clave de la interacción parásito-célula hospedera tales como adhesión e invasión celular así como en la evasión del sistema inmune⁶⁰.

^[55] De Souza, E.M.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Wilson, W.D.; Hu, Q.; Boykin, D.W.; Batista, M.M.; Araújo-Jorge, T.C.; Soeiro, M.N.C. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 593–600.

^[56] Daliry, A.; Da Silva, P.B.; Da Silva, C.F.; Batista, M.M.; De Castro, S.L.; Tidwell, R.R.; Soeiro, M.N.C. *In vitro* analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 747-750.

^[57] Da Silva, C.F.; Meuser Batista, M.; Batista, D.J.; Mello de Souza, E.; Bernardino da Silva, P.; Melo de Oliveira, G.; Souza Meuser, A.; Shareef, A.R.; Boykin, D.W.; Soeiro, M.N.C. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3307-3314.

^[58] De Souza, E.M.; Oliveira, G.M.; Boykin, D.W.; Kumar, A.; Hu, Q.; Soeiro, M.N.C. Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamide DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 610-614.

^[59] Mathis, A.M.; Bridges, A.S.; Ismail, M.A.; Kumar, A.; Francesconi, I.; Anbazhagan, M.; Hu, Q.; Tanius, F.A.; Wenzler, T.; Saulter, J.; Wilson, W.D.; Brun, R.; Boykin, D.W.; Tidwell, R.R.; Hall, J.E. Diphenyl furans and aza analogs: Effects of structural modification on *in vitro* activity, DNA binding and accumulation and distribution in trypanosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2801-2810.

^[60] Buscaglia, C.A.; Campo, V.A.; Frasch, A.C.C.; Di Noia, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 229–236.

Debido a que esta enzima es codificada por aproximadamente 140 genes⁶¹ no ha sido posible la utilización de técnicas moleculares de silenciamiento genómico a fin de evaluar su efecto en el parásito. Lo anterior, sumado a que no se han encontrado inhibidores potentes de TcTS, ha impedido la validación de la enzima como blanco terapéutico⁶². Sin embargo, debido al rol crucial que cumple en los procesos de infección celular y a la ausencia de una enzima similar en mamíferos, TcTS plantea un interesante desafío para continuar con el diseño y desarrollo de inhibidores basados en su estructura.

1.3.6. Cisteín Proteasas

Las cisteín proteasas son enzimas hidrolíticas en las que el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína presente en el sitio activo actúa como nucleófilo durante la catálisis. Para los parásitos del orden Kinetoplastida las cisteín proteasas son importantes factores de virulencia⁶³ y mediante métodos químicos y moleculares se ha comprobado que resultan esenciales para la supervivencia de estos organismos⁶⁴. Las cisteín proteasas parasitarias más ampliamente estudiadas pertenecen a la familia C1 dentro del clan CA. Esta familia contiene la proteasa presente en plantas, papaína, y las catepsinas B, C, L y S presentes en mamíferos⁶⁵. Las proteasas parasitarias participan en distintos procesos relacionados con la patogénesis de la enfermedad incluyendo invasión, migración, nutrición y evasión del sistema inmune^{66,67}. Los estudios sobre esta familia de proteasas que se han realizado en distintos parásitos han permitido conocer en detalle la evolución, localización y función biológica de estas enzimas. El papel fundamental que juegan las cisteín proteasas en las infecciones parasitarias sumado a las sutiles diferencias (posibles de ser

^[61] Frasch, A.C. Functional diversity in the *trans*-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 282-286.

^[62] Neres, J.; Bryce, R.A.; Douglas, K.T. Rational drug design in parasitology: trans sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 110-117.

^[63] Mottram, J.C.; Brooks, D.R.; Coombs, G.H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 455-460.

^[64] McKerrow, J.H.; Engel, J.C.; Caffrey, C.R.; Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 639-644.

^[65] Caffrey, C.R.; Steverding, D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *167*, 12-19.

^[66] Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.

^[67] McKerrow, J.H.; Caffrey, C.; Kelly, B.; Loke, P.; Sajid, M. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **2006**, *1*, 497-536.

explotadas] que presentan con respecto a las correspondientes enzimas mamíferas, han validado esta familia de proteasas como blancos atractivos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos⁶⁸.

Dentro de estas enzimas, cruzipaina, la principal cisteín proteasa presente en *T. cruzi* ha sido una de las más estudiadas y sus características así como los principales inhibidores desarrollados se comentan en detalle en el siguiente apartado.

1.4. Cruzipaina como blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

1.4.1. Aspectos generales

Cruzipaina (CP), la principal cisteín proteasa presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* es una endopeptidasa que, al igual que otras enzimas de esta clase, une el sustrato en una conformación extendida ubicándose las cadenas laterales del mismo en subsitios de unión localizados en el sitio activo de la proteína. Según la convención adoptada por Schechter y Berger⁶⁹ para identificar los residuos del sustrato y los subsitios de la enzima, P designa a residuos presentes en el sustrato y S refiere a los correspondientes subsitios de la enzima. Los residuos identificados como “prima” (P´) están ubicados hacia el extremo C-terminal del enlace peptídico hidrolizado, mientras que los residuos “no prima” se ubican en el extremo N-terminal.

CP es codificada por diversos genes polimórficos organizados en tándem (hasta 130 en la cepa Tulahuen 2)⁷⁰. Esta variabilidad génica resulta en la expresión de diversas isoformas, algunas de las cuales presentan variaciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos que influyen en la especificidad de la enzima^{71,72}. Se ha visto

⁶⁸ McKerrow, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 833-837.

⁶⁹ Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157-62.

⁷⁰ Campetella, D., Henriksson, J., Aslund, L., Frasch, A.C.C., Petersson, U. and Cazzulo, J.J. The major cysteine proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, *50*, 225-234.

⁷¹ Lima, A.P.; dos Reis, F.C.; Serveau, C.; Lalmanach, G.; Juliano, L.; Ménard, R.; Vernet, T.; Thomas, D.Y.; Storer, A.C.; Scharfstein, J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 41-52.

que la composición de isoformas varía entre cepas y en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito lo que podría determinar las variaciones observadas en la susceptibilidad a distintos inhibidores^{71,73}.

La enzima es estable en un rango de pH entre 4.0 y 9.0^{74,72} siendo el pH óptimo para su actividad dependiente del sustrato. La hidrólisis de seroalbúmina bovina (BSA) y hemoglobina es óptima a pH 4.0, mientras que para la azocaseína la máxima actividad se observa a pH 5.0⁷². El rango óptimo de pH para distintos sustratos cromogénicos varía entre 7.0 y 9.0 mientras que para sustratos fluorogénicos es de 6.3 a 7.2^{74,75,76}. CP es capaz de hidrolizar sustratos que contienen tanto residuos básicos como hidrófobos en posición P2 mostrando preferencia por arginina y fenilalanina, un rasgo que comparte con la catepsina B (CATB) presente en mamíferos. Ha sido descrito que a pH 6.0 la preferencia de CP por fenilalanina es sólo de un 15 % mientras que a menor pH la selectividad aumenta notablemente. Este fenómeno se relaciona con la protonación de un residuo de glutamato presente en el sitio S2 de la enzima y que sería el responsable de su especificidad característica⁷⁷ [ver apartado 1.4.3].

1.4.2. Expresión y localización celular

Distintos estudios han demostrado que CP se expresa de forma diferencial en los cuatro estadios principales del ciclo de vida de *T. cruzi*^{78,79}. Si bien la expresión del

⁷²⁾ Duschak, V.G.; Barboza, M.; Couto, A. *Trypanosoma cruzi*. partial characterization of minor cruzipain isoforms non-adsorbed to Concanavalin A-Sepharose. *Exp. Parasitol.* **2003**, *104*, 122-130.

⁷³⁾ Gomes, S.A.O.; Misael, D.; Silva, B.A.; Feder, D.; Silva, C.S.; Gonçalves, T.C.M.; Santos, A.L.S.; Santos-Mallet, J.R. Major cysteine protease (cruzipain) in Z3 sylvatic isolates of *Trypanosoma cruzi* from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 743-749.

⁷⁴⁾ Cazzulo, J.J.; Cazzulo Franke, M.C.; Martínez, J.; Franke de Cazzulo, B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase [cruzipain] from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1037*, 186-191.

⁷⁵⁾ Stoka, V.; Nycander, M.; Lenarcic, B.; Labriola, C.; Cazzulo, J.J.; Bjork, I.; Turk, V. Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. *FEBS Lett.* **1995**, *370*, 101-104.

⁷⁶⁾ Del Nery, E.; Juliano, M.A.; Meldal, M.; Svendsen, I. Scharfstein, J.; Walmsley, A.; Juliano, L. Characterization of the substrate specificity of the major cysteine protease [cruzipain] from *Trypanosoma cruzi* using a portion-mixing combinatorial library and fluorogenic peptides. *Biochem. J.* **1997**, *323*, 427-433.

⁷⁷⁾ Gillmor, S.A.; Craik, C.S.; Fletterick, R.J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1603-1611.

⁷⁸⁾ Campetella, O.; Martínez, J.; Cazzulo, J.J. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *67*, 145-150.

mARN es muy similar en todos los estadíos del parásito, los niveles de proteína son de 4 a 5 veces más elevados en la forma epimastigota, lo cual indica que la regulación de la expresión de esta enzima ocurre a nivel traduccional o postraduccional⁷⁹.

Mediante técnicas inmunocitoquímicas se ha observado que la mayor parte de CP presente en epimastigotas está localizada en organelos análogos a los lisosomas (reservosomas) que almacenan proteína que es digerida por el parásito durante la diferenciación a la forma tripomastigota metacíclica⁸⁰. Otros estudios demostraron, mediante técnicas de criofractura, que la enzima también se localiza en la membrana plasmática del parásito, sobre todo en la forma amastigota, pero también en algunos epimastigotas y tripomastigotas⁸¹. Los tripomastigotas presentan además una isoforma soluble que es liberada al medio⁸².

1.4.3. Rasgos estructurales

CP es sintetizada como una preproenzima de 467 aminoácidos que después de la remoción autoproteolítica del extremo N-terminal (Figura 1.9, página siguiente) da lugar a la enzima madura.

La enzima madura es una glicoproteína rica en manosa (PM 40 Kd, incluyendo dos residuos de manosa), presentando tres sitios de glicosilación sobre residuos de asparagina (Figura 1.9), dos en el dominio catalítico y uno en el extremo carboxilo terminal⁷⁰. Consta de una única cadena polipeptídica que posee un dominio catalítico de 215 aminoácidos y un dominio C-terminal de 130 aminoácidos (Figura 1.9) que es característico de las cisteín proteasas de tripanosomatídeos.

^[79] Tomas, A.M.; Kelly, J.M. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *76*, 91-103.

^[80] Souto-Padrón, T.; Campetella, O.; Cazzulo, J.J.; de Souza, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* **1990**, *96*, 485 - 490.

^[81] Nascimento, A.E.; de Souza, W. High resolution localization of cruzipain and Ssp4 in *Trypanosoma cruzi* by replica staining label fracture. *Biol. Cell* **1996**, *86*, 53-58.

^[82] Cazzulo, J.J.; Stoka, V.; Turk, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1143-1156.

Si bien la función de este dominio no ha sido determinada, cabe destacar que el mismo es altamente inmunogénico^{83,84}. Ha sido descrito que después de la infección, los anticuerpos del hospedero se unen al extremo C-terminal de CP sin alterar las propiedades catalíticas de la enzima⁸³.

```

-122
  MSGWARALLLAAVLVVMAACLVPAAATASLHAEETLTSQFAEFKQKHGRVYESAAEEAFRLS

-62
  VFRENLF LARLHAAANPHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHNGAAHF AAAQERARVPVKVEV

-1 1
  VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQGGCGSCWAFSAIGNVECQWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDK

59
  TDSGCSGGLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEGISPPCTTSGHTVGATITGHVEL

114
  PQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCVSEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYW

172
  I I K N S W T T Q W G E E G Y I R I A K G S N Q C L V K E E A S S A V V G G P G P T P E P T T T T T T S A P G P S P S Y

239
  F V Q M S C T D A A C I V G C E N V T L P T G Q C L L T T S G V S A I V T C G A E T L T E E V F L T S T H C S G P S V R

298
  S S V P L N K C N R L L R G S V E F F C G S S S S G R L A D V D R Q R R H Q P Y H S R H R R L

```

Figura 1.9. Estructura primaria de CP (GenBank, n° de acceso: AAA30181). La proregión N-terminal se muestra en gris, el dominio catalítico aparece en negro y el dominio C-terminal en celeste. Los residuos involucrados en la catálisis aparecen en verde. Los residuos que definen los subsitios que presentan mayor especificidad se muestran según: rojo, S1; magenta, S2; amarillo, S3; azul, S1'; anaranjado, S2'. Los residuos de asparagina N-glicosilados se muestran en violeta.

Una forma recombinante de CP que carece del extremo C-terminal (denominada cruzaina) ha sido expresada en *Escherichia coli*⁸⁵ y posteriormente cristalizada en presencia de distintos inhibidores peptídicos^{77,86,87,88}.

^[83] Rudenskaya, G.N.; Pupov, D.V. Cystein proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry (Moscow)* **2008**, *73*, 1-13.

^[84] Klemba, M.; Godberg, D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 275-305.

^[85] Eakin, A.E.; Mills, A.A.; Harth, G.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S. The sequence, organization and expression of the major cystein protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7411-7420.

^[86] McGrath, M.E.; Eakin, A.E.; Engel, J.C.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S.; Fletterick, R.J. The crystal structure of cruzain: A therapeutic target for Chagas' disease. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 251-259.

^[87] Brinen, L.S.; Hansell, E.; Cheng, J.; Roush, W.R.; McKerrow, J.H.; Fletterick, R.J. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. *Structure* **2000**, *8*, 831-840.

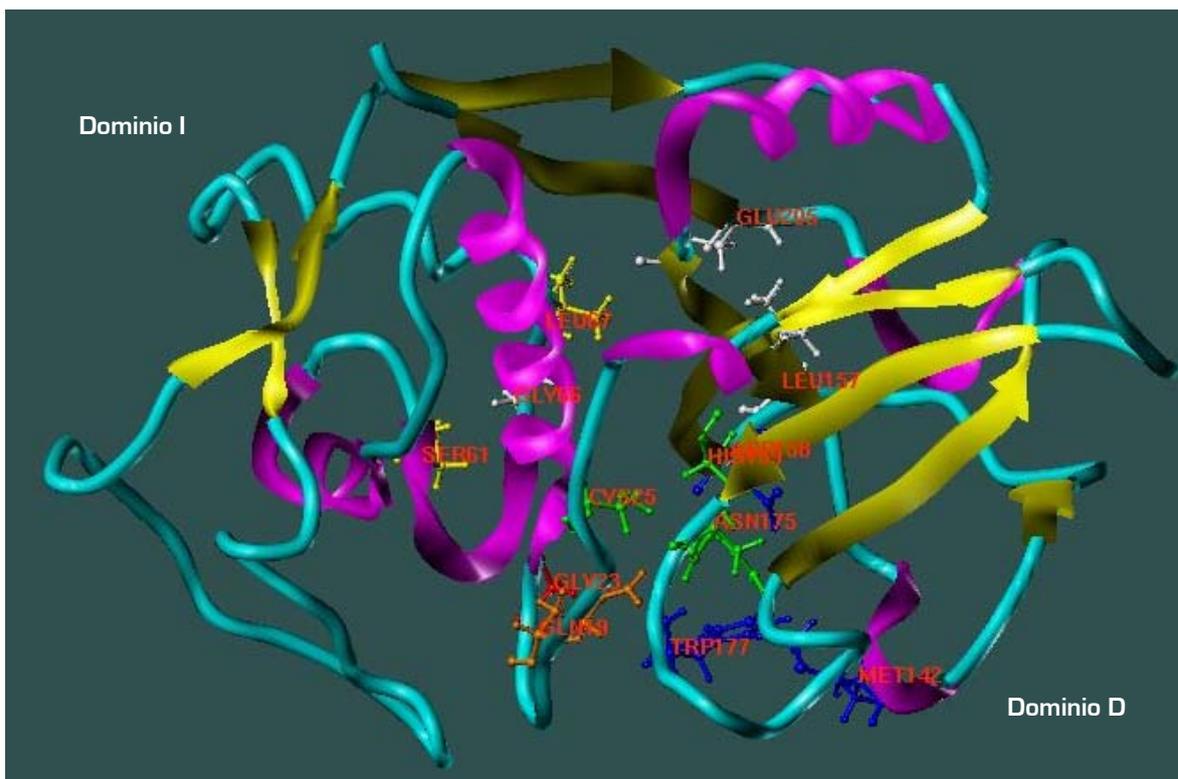


Figura 1.10. Estructura de CP determinada por difracción de rayos X a una resolución de 1.2 Å (Protein Data Bank, nº de acceso 1ME3)⁶⁹. El inhibidor fue retirado del sitio activo para mayor claridad. En colores se muestran los principales residuos que delimitan la hendidura del sitio activo: verde, tríada catalítica; rojo S1; blanco S2; amarillo S3; azul S1'; anaranjado S2'. La figura fue realizada con el programa Sybyl 8.1⁶⁹.

La estructura cristalográfica muestra que la cadena polipeptídica de 215 aminoácidos se pliega en dos dominios claramente definidos. El dominio izquierdo (I, Figura 1.10) presenta tres regiones de hélices α , una de las cuales contiene el residuo catalítico de Cys25 en su extremo N-terminal. El dominio derecho (D) presenta principalmente una topología de hojas β antiparalelas. La tríada catalítica, formada por los residuos de Cys25, His159 y Asn175, y los distintos subsitios (S1-S4 y S1'-S3') de unión al sustrato se encuentran en una hendidura entre los dos dominios (Figura 1.10)⁶⁶.

La especificidad de los distintos subsitios de CP ha sido ampliamente estudiada y se ha observado que S1' presenta una notoria especificidad por agrupamientos aromáticos en P1', definida principalmente por la presencia del residuo de Trp177⁶⁷. Los sitios S1 y S3 presentan especificidad por agrupamientos básicos⁷⁶.

^[69] Huang, L.; Brinen, L.S.; Ellman, J.A. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 21-29.

^[69] Tripos Associates. *Sybyl Molecular Modeling Software*, version 8.1; Tripos Associates: St. Louis, MO, **2008**; <http://www.tripos.com>.

La especificidad del sitio S2 no es clara, pero el residuo de Gln19 presente en el mismo juega un rol fundamental en la estabilización del oxianión formado durante la catálisis (ver Figura 1.12, página 31)⁹⁰. Se ha visto que el sitio S2 es el principal determinante de la especificidad de esta enzima. Este subsitio es capaz de unir tanto residuos hidrofóbicos como básicos debido al comportamiento del residuo de Glu205. Este residuo, cargado negativamente a pH fisiológico, es capaz de adoptar una conformación orientada hacia el sustrato cuando el mismo presenta agrupamientos básicos en P2, con los que establece interacciones electrostáticas. Cuando P2 sustenta agrupamientos hidrofóbicos, Glu205 adopta una conformación orientada hacia el disolvente. Este comportamiento también explica la mayor selectividad de la enzima por sustratos hidrofóbicos a pH ácido debido a la protonación de Glu205⁷⁷.

La fluidez del bolsillo S2 de CP y de otras cisteín proteasas parasitarias diferencia a estas enzimas de las homólogas humanas catepsina L (CATL) y catepsina S (CATS), las cuales carecen de un residuo de Glu en posición 205 y presentan Met y Phe, respectivamente. En CATB, el residuo de Asp en esta posición cumple un rol análogo a Glu (Figura 1.11, página siguiente). Teniendo en cuenta esto, el diseño de compuestos que puedan interactuar con Glu205 resulta fundamental a la hora de generar inhibidores específicos de las enzimas parasitarias.

El análisis del alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de distintas enzimas homólogas a CP (Figura 1.11) muestra que ésta presenta un 70 % de homología con la principal cisteín proteasa de *T. brucei* (TB) y un 58 % de identidad con la proteasa análoga de *Leishmania major* (LP). La identidad de secuencia con las catepsinas humanas es de 42 % con CATL, 37 % con CATS y 19 % con CATB.

⁹⁰ Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D.P. Protease inhibitors: Current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305-341.

```

CP      -APAAVDWRARGAVTAVKDQGGCGSCWAFSAIGNVECCQWFLAGHPLTNLS 49
BP      -APAAVDWREKGAVTPVKDQGGCGSCWAFSTIGNIEGQWQVAGNPLVLSL 49
LP      -VPDAVDWREKGAVTPVKNQGCAGSCWAFSAVGNIESQWAVAGHKLVRLS 49
CATL    -APRSVDWREKGYVTPVKNQGGCGSXWAFSATGALEGQMFRKTGRLISLS 49
CATS    ILPDSVDWREKGCVTEVKYQGSAGACWAFSAVGALEAQLKLTGKLVLSL 50
CATB    ---VSVEVSAEDLLTCCG--SMCGDGCNGGYPAEAWNFWTRKGLVSGGLY 45

CP      EQMLVSCDKTD---SGCSGGLMNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEG 96
BP      EQMLVSCDTID---FGCGGGLMDNANFNWIVNSNGGNVFTASYPYVSGNG 96
LP      EQQLVSCDHVD---NGCGGGLMLQAFEWVLRNMNGTVFTEKSYPYVSGNG 96
CATL    EQNLVDCSGPQ-GNEGCGGLMDYAFQYVQD--NGGLDSEESYPYEATEE 96
CATS    AQNLVDCSTEKYGKGCNGGFMTTAFQYIID--NKGIDSDASYPYKAMDQ 98
CATB    ES-HVGCRRPYS-----IPPEHHVNGSRPCTGEGDTPKCSKIC 83

CP      ISPPCTTSG-HTVGATITGHVELPQ--DEAQIAAWLAVNGPVAVAVDA-- 141
BP      EQPQCQMNG-HEIGAAITDHVDLPQ--DEDAIAAYLAENGLAIAVDA-- 141
LP      DVPECSNSSELAPGARIDGYVSMES--SERVMAAWLAKNGPISIAVDA-- 142
CATL    S---CKYNP-KYSVANDTGFVDIPK--QEKALMKAVATVGPISVAIDAGH 140
CATS    K---CQYDS-KYRAATCSKYTELPYG-REDVLKEAVANKGPVSVGV DARH 143
CATB    EP---GYSP-TYKQDKHYGYSYVSNSSEKDIMAIEIYKNGPVEGAFSVY- 128

CP      SSWMTYTGGMVMTS--CVSEQLD-HGVLLVGYN---DSAAVPYWI I KNSW 184
BP      TSFMDYNGGILTS--CTSEQLD-HGVLLVGYN---DASNPPYWI I KNSW 184
LP      SSFMSYHSGVLTS--CIGEQLN-HGVLLVGYN---MTGEVPPYWI I KNSW 185
CATL    ESFLFYKEGIYFEPDCSSEDMD-HGVLLVVGYGFEFESTEDNKKYWLKNSW 189
CATS    PSFFLYRSGVYEPSC-TQNVN-HGVLLVVGYG---DLNGKEYWLKNSW 187
CATB    SDFLLYKSGVYQH--VTGEMMGHHAIRILGWG---VENGTPLYWLVA NSW 172

CP      TTQWGE EGYIRIAKGS-NQCLVKEEASSAVVG----- 215
BP      SNMWGE EGYIRIEKGT-NQCLMNQAVSSAVVG----- 215
LP      GEDWGE KYVVRVTMGV-NACLLTGYVPVSVHVSQ----- 217
CATL    GEEWGM GGYVVKMAKDRRNHCGIASAASYPTV----- 220
CATS    GHNFGE EGYIRIARMARKGNHCGIASFSPSYPEIGHHHHHH-- 225
CATB    NTDWGD NGFFKILRGQ-DHCGIESEVVAGIPRTDQYWEKI 211

```

Figura 1.11. Alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de distintas cisteína proteasas lisosomales utilizando el programa ClustalW. Los residuos catalíticos se muestran en verde. Los residuos de la posición 205 se muestran en magenta. En negrita se muestran los residuos que son idénticos en las 5 enzimas.

El mecanismo de acción propuesto para esta clase de enzimas se presenta en la Figura 1.12, página siguiente.

Una vez que el sustrato se une al sitio activo de la enzima se forma inicialmente un complejo no covalente. A continuación, el tiolato del residuo de Cys25 ataca el carbono carbonílico del enlace peptídico que será hidrolizado (Figura 1.12a). Se forma un intermedio tetraédrico que es estabilizado por el residuo de Gln19 (Figura 1.12b). Seguidamente se forma un intermedio tioéster, liberándose el extremo C-terminal del sustrato (Figura 1.12c). La hidrólisis de la enzima acilada conduce a la formación de un segundo intermedio tetraédrico que después de su colapso libera el extremo N-terminal del sustrato regenerando la enzima libre (Figura 1.12d)⁹⁰.

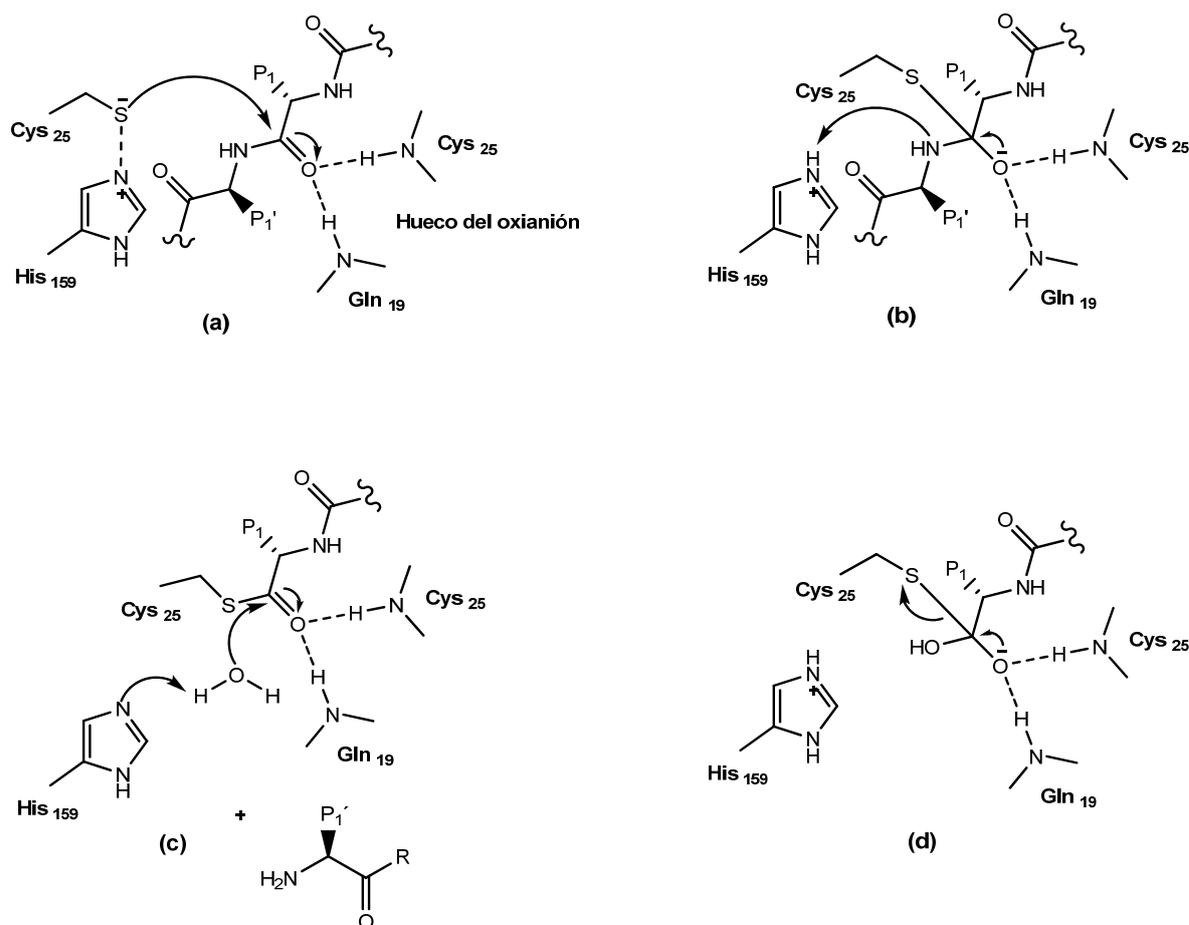


Figura 1.12. Mecanismo catalítico propuesto para cisteín proteasas. (a) El grupo tiol de la cisteína presente en el sitio activo y el anillo imidazol de la histidina forman un par iónico tiolato-imidazol. El anión tiolato es altamente nucleofílico y ataca al carbono carbonílico del enlace amida. (b) El intermedio tetraédrico que se forma es estabilizado en el hueco del oxianión. Este intermedio colapsa, asistido por catálisis ácida, a un intermedio tioéster (c) liberándose el fragmento C-terminal del sustrato. (d) La hidrólisis de la enzima acilada libera el fragmento N-terminal del sustrato y regenera la enzima. Tomado de ref. [90].

1.4.4. Importancia funcional de cruzipaina

En relación a la importancia funcional de esta enzima, además del rol fundamental que juega en la nutrición del parásito existen evidencias de su participación en la penetración del tripanosoma dentro de las células^{6,91,92}, en distintos mecanismos de evasión del sistema inmune del mamífero^{93,94}, así como en la supervivencia y

^[91] Aparicio, I.M.; Scharfstein, J.; Lima, A.P.C. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 5892-5902.

^[92] Scharfstein, J.; Schmitz, V.; Morandi, V.; Capella, M.M.A.; Lima, A.P.C.; Morrot, A.; Juliano, L.; Müller-Esterl, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B₂ receptors. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1289-1299.

^[93] Berasain, P.; Carmona, C.; Frangione, B.; Cazzulo, J.J.; Goñi, F. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 23-29.

diseminación del parásito dentro del hospedero⁹⁵. La participación de CP en los procesos de diferenciación que llevan de un estadio a otro en el ciclo de vida del parásito también ha sido demostrada^{96,97}. En relación a lo anterior, se ha observado que esta enzima produce un efecto antiapoptótico en células cardíacas y estimula la expresión de arginasa-2⁹⁸. Está descrito que la actividad arginasa (mediante la formación de L-ornitina y su posterior metabolización a putrescina) se relaciona con la diferenciación celular en la mayoría de los tipos celulares y favorece el crecimiento del parásito dentro de las células^{99,100}. El rol de CP en los procesos inflamatorios observados en distintas etapas de la infección por *T. cruzi* ha sido demostrado mediante experimentos que prueban que esta enzima es capaz de aumentar la permeabilidad vascular de un modo dosis-dependiente¹⁰¹.

La importancia funcional de CP también ha sido demostrada observando los distintos efectos que la inhibición de la misma causa en el parásito. El tratamiento de epimastigotas de *T. cruzi* con inhibidores de CP detienen el crecimiento del parásito, afectan la localización intracelular de CP e inducen importantes alteraciones morfológicas en el aparato de Golgi. Estos estudios demuestran que los inhibidores bloquean el procesamiento autocatalítico de la enzima, lo cual causa su acumulación en el aparato de Golgi impidiendo el tráfico normal hacia los reservosomas. Estos cambios morfológicos en el Golgi se han observado en parásitos tratados con

^[94] Benítez-Hernández, I.; Enríquez, E.M.; Ostoa, P.; Fortoul, T.; Ramírez, J.A.; Stempin, C.; Cerbán, F.; Soldevila, G.; García-Zepeda, E.A. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology* **2010**, *215*, 413-426.

^[95] Giordanengo, L.; Guiñazú, N.; Stempin, C.; Fretes, R.; Cerbán, F.; Gea, S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 1003-1011.

^[96] Tomas, A.M.; Miles, M.A.; Kelly, J.M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 596-603.

^[97] Santos, C.C.; Sant'Anna, C.; Terres, A.; Cunha-e-Silva, N.L.; Scharfstein, J.; Lima, A.P.C. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 901 - 915.

^[98] Aoki, M.P.; Guiñazú, N.L.; Pellegrini, A.V.; Gotoh, T.; Masih, D.T.; Gea, S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C206-C212.

^[99] Ignarro, L.J.; Buga, G.M.; Wei, L.H.; Bauer, P.M.; Wu, G.; del Soldato, P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98*, 4202-4208.

^[100] Freire-de-Lima, C.G.; Nascimento, D.O.; Soares, M.B.P.; Bozza, P.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; de Mello, F.G.; Dos Reis, G.A.; Lopes, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **2000**, *403*, 199-203.

^[101] Svensjö, E.; Cyrino, F.Z.G.A.; Juliano, L.; Scharfstein, J. Plasma leakage induced in postcapillary venules by the major cysteine-proteinase from *Trypanosoma cruzi* and its modulation by H₁-blocker mepyramin. *Microvasc. Res.* **1997**, *54*, 93-97.

distintas familias de inhibidores, lo cual indica que independientemente de la estructura química o el mecanismo de inhibición, todos los inhibidores de CP producen el mismo efecto¹⁰².

Utilizando modelos murinos de la enfermedad de Chagas se ha observado que distintos derivados de vinilsulfona son capaces de evitar lesiones letales en los ratones tratados¹⁰³. Estudios en perros infectados con *T. cruzi* demostraron que el tratamiento con el derivado de vinilsulfona K777 [Tabla 1.1, página 34] causa una notable mejora en el daño cardíaco provocado por la infección¹⁰⁴.

1.4.5. Inhibidores de cruzipaina

Si bien hasta el momento se ha desarrollado un gran número de inhibidores, debido a que la CP comparte un alto grado de similitud de secuencia y especificidad con CATL y CATS (ver apartado 1.4.3, página 26) una de las desventajas observadas en muchos de estos compuestos es la falta de selectividad y la correspondiente toxicidad, debido a la interacción con proteasas del hospedero⁶⁷. En relación a lo anterior, recientemente se ha publicado un artículo que describe un modelo teórico que permite discriminar entre inhibidores de CP y CATL¹⁰⁵.

Cabe destacar también que la mayoría de los compuestos desarrollados hasta el momento que presentan actividad frente a CP son peptidomiméticos que inhiben irreversiblemente a la enzima. A pesar de que existe una gran controversia al respecto, los inhibidores irreversibles han sido en general ignorados debido a la idea de que un péptido o pseudopéptido unido covalentemente al sitio activo de una proteasa puede ser un epítopo potencial que puede provocar respuestas autoinmunes en los individuos tratados. Los inhibidores con estructuras peptídicas tienen el problema adicional de ser inestables en plasma, aunque en relación a esto se ha mejorado mucho mediante la utilización de aminoácidos no naturales⁶⁷.

^[102] Engel, J.C.; Doyle, P.S.; Palmer, J.; Hsieh, I.; Bainton, D.F.; McKerrow, J.H. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Sci.* **1998**, *111*, 597-606.

^[103] Engel, J.C.; Doyle, P.S.; Hsieh, I.; McKerrow, J.H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 725-734.

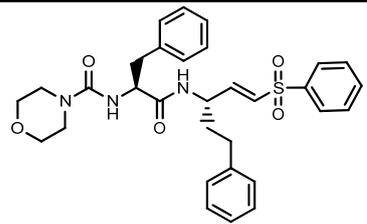
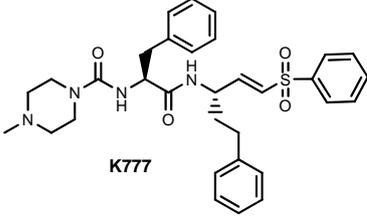
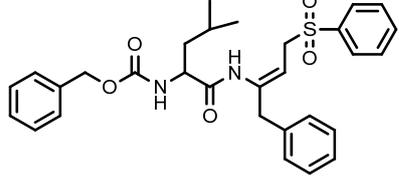
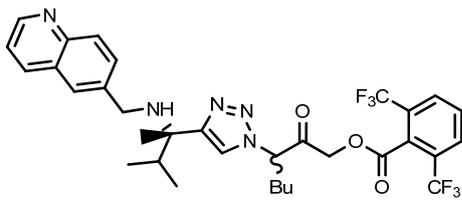
^[104] Barr, S.C.; Warner, K.L.; Kornreic, B.G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J.H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 5160-5161.

^[105] Freitas, R.F.; Oprea, T.I.; Montanari, C.A. 2D QSAR and similarity studies on cruzain inhibitors aimed at improving selectivity over cathepsin L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 838-853.

Por otra parte, los pocos inhibidores reversibles que han sido sintetizados si bien muestran una muy buena actividad en CP *in vitro* son inactivos cuando se evalúan *in vivo* debido a problemas de biodisponibilidad.

Algunos ejemplos de las distintas familias de inhibidores de CP que se han desarrollado hasta el momento se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Distintas familias de inhibidores de CP.

Familia	Estructura	Actividad	Modo de inhibición
Vinilsulfonas		IC ₅₀ = 8.0 nM k ₂ /K = 0.3 × 10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹	Irreversible ⁹⁷
		IC ₅₀ = 4.0 nM	Irreversible ¹⁰⁶
Alilsulfonas		IC ₅₀ = 60 nM	Irreversible ¹⁰⁷
Aciloximetil cetonas		k ₂ /K = 1.6 × 10 ⁸ M ⁻¹ s ⁻¹	Irreversible ¹⁰⁸

^[106] Chen, Y.T.; Lira, R.; Hansell, E.; McKerrow, J.H.; Roush, W.R. Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5860-5063.

^[107] Götz, M.G.; Caffrey, C.R.; Hansell, E.; McKerrow, J.H.; Powers, J.C. Peptidyl allyl sulfones: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5203-5211.

^[108] Brak, K.; Doyle, P.S.; McKerrow, J.H.; Ellman, J. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6404-6410.

Tabla 1.1. (Continuación)

Familia	Estructura	Actividad	Modo de inhibición
Mercaptometil cetonas		K= 0.90 nM	Unión lenta ¹⁰⁹ Inhibición dependiente del tiempo
α -dicarbonilos		IC ₅₀ = 0.64 nM	Análogo del estado de transición ¹¹⁰
Nitrilos		IC ₅₀ = 0.2 nM	Reversible ¹¹¹ covalente
Cetonas cíclicas		K= 16 nM	Reversible ¹¹² competitivo

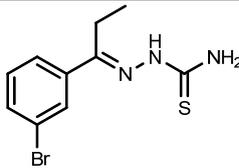
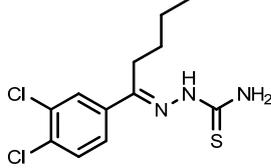
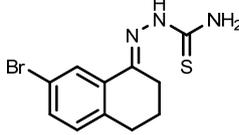
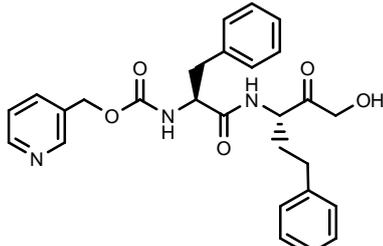
^[109] Huang, L.; Lee, A.; Ellman, J. A. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 676-684.

^[110] Choe, Y.; Brinen, L.S.; Price, M.S.; Engel, J.C.; Lange, M.; Grisostomi, C.; Weston, S.G. Vallai, P.V.; Cheng, H.; Hardy, L.W.; Hartsough, D.S.; McMakin, M.; Tilton, R.F.; Baldino, C.M.; Craik, C.S. Development of α -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2141-2156.

^[111] Mott, B.T.; Ferreira, R.S.; Simenov, A.; Jadhav, A.; Kean-Hooi Ang, K.; Leister, W.; Shen, M.; Silveira, J.T.; Doyle, P.S.; Arkin, M.R.; McKerrow, J.H.; Inglese, J.; Austin, C.P.; Thomas, C.J.; Shoichet, B.K.; Maloney, D.J. Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine proteases: Cruzain, rhodesain, and TbCatB. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 52-60.

^[112] Huang, L.; Ellman, J.A. General solid-phase method to prepare novel cyclic ketone inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2993-2996.

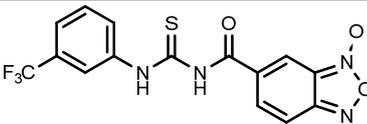
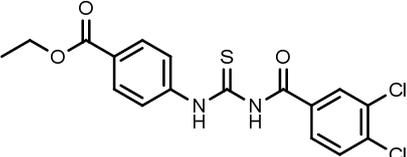
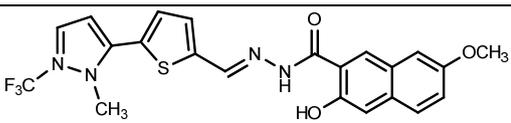
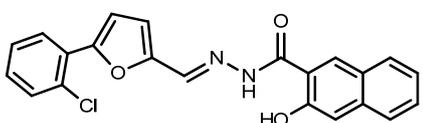
Tabla 1.1. (Continuación)

Familia	Estructura	Actividad	Modo de inhibición
Tiosemicarbazonas		IC ₅₀ = 100 nM	Inhibición ^{113a} dependiente del tiempo
		IC ₅₀ = 60 nM	Inhibición ^{113b} dependiente del tiempo
		IC ₅₀ = 19 nM	Inhibición ^{113c} dependiente del tiempo
		IC ₅₀ = 17 nM	Inhibición ^{113d} dependiente del tiempo
Hidroximetilcetonas		K = 65 nM	Reversible ¹¹⁴ competitivo

^[113] (a) Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P.S.; Caffrey, C.R.; Holler, T.P.; McKerrow, J.H.; Cohen, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695-2707. (b) Greenbaum, D.C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Chibale, K. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3212-3219. (c) Fujii, N.; Mallari, J.P.; Hansell, E.; Mackey, Z.; Doyle, P.; Zhou, Y.M.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; McKerrow, J.H.; Guy, R.K. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 121-123. (d) Silés, R.; Chen, S-E.; Zhou, M.; Pinney, K.G.; Trawick, M.L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4405-4409.

^[114] Huang, L.; Brinen, L.S.; Ellman, J.A. Crystal structures of reversible ketone based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 21-29.

Tabla 1.1. (Continuación)

Familia	Estructura	Actividad	Modo de inhibición
Tioureas		$IC_{50} = 4.8 \mu\text{M}$	Reversible ¹¹⁵ competitivo
		$IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$	Reversible ¹¹⁵ competitivo
Bis-arylacilhidrazidas		$IC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$	Desconocido ¹¹⁶
		$IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$	Desconocido ¹¹⁶

^[115] Du, X.; Hansell, E.; Engel, J.C.; Caffrey, C.R.; Cohen, F.E.; McKerrow, J.H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 733-742.

^[116] Rodríguez, C.R.; Flaherty, T.M.; Springer, C.; McKerrow, J.H.; Cohen, F.E. CoMFA and HQSAR acylhydrazide cruzain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1537-1541.

2. Antecedentes, Propuesta de Trabajo y Objetivos

2.1. Antecedentes

Tratando de disminuir los efectos adversos causados por fármacos como Nifurtimox, nuestro grupo de investigación ha trabajado desde 1990 en el desarrollo de distintas familias de derivados con actividad tripanosomicida¹. En los distintos grupos estudiados han surgido compuestos con excelente actividad *in vitro*, que los convierte en potenciales líderes a fármacos. Entre estos, los derivados del sistema *N*-óxido de benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano) destacan entre las familias más importantes y han sido ampliamente estudiados tanto *in vitro* como *in vivo*. En la Figura 2.1 se muestran ejemplos de los derivados más activos de esta familia obtenidos hasta el momento, junto a datos de actividad *in vitro* frente a la forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2.

⁽¹⁾ a. Cerecetto, H.; González, M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals*. **2010**, *3*, 810-838. b. Cerecetto, H.; González, M. Anti-*T. cruzi* agents: Our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev Med Chem*, **2008**, *8*, 1355-1383. c. Cabrera, M.; Lavaggi, M.L.; Hernández, P.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Monge, A.; López de Cerain, A.; González, M.; Cerecetto, H. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicol. Lett.* **2009**, *190*, 140-149. d. Boiani, M.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Croce, F.; Depaula, S.; Rodríguez, M.A.; Cerecetto, H.; González, M. *o*-Nitroanilines as major metabolic products of anti-*Trypanosoma cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans in microsomal and cytosolic fractions of rat hepatocytes and in whole parasitic cells. *Xenobiotica* **2009**, *39*, 236-248. e. Boiani, L.; Davies, C.; Arredondo, C.; Porcal, W.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Boiani, M.; Pacheco, J.P.; Basombrio, M.A.; Cerecetto, H.; González, M. *In vivo* studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2229-2237. f. Porcal, W.; Hernández, P.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Merlino, A.; Ferreira, A.; Di Maio, R.; Castro, A.; González, M.; Cerecetto, H. Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2768-2781. g. Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Sant'Anna, C.M.R.; Barreiro, E.J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. Quantitative structure-activity relationship studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6336-6346. h. Arán, V.J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Montero, D.; Nogal, J.J.; Gómez-Barrio, A.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Piro, O.E.; Castellano, E.E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3197-3207. i. Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Gambino, D.; Otero, L.; Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Denicola, A. *In vitro* study of nitrofurylthiosemicarbazones as potential antitrypanosomal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4885-4893. j. Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Montoya Alfaro, M.E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Ortega, M.A.; Aldana, I.; Monge-Vega, A. Quinoxaline *N,N*-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14*, 3835-3839. k. Aguirre, G.; Cabrera, E.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Seoane, G.; Duffaut, A.; Denicola, A.; Gil, M.J.; Martínez-Merino, V. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design. *Eur J Med Chem.* **2004**, *39*, 421-431. l. Muelas, S.; Di Maio, R.; Cerecetto, H.; Seoane, G.; Ochoa, C.; Escario, J.A.; Gomez-Barrio, A. New thiadiazine derivatives with activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Folia Parasitol (Praha)*. **2001**, *48*, 105-108. m. Martínez-Merino, V.; Cerecetto, H. CoMFA-SIMCA model for antichagasic nitrofurazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2001**, *9*, 1025-1030. n. Di Maio R, Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Olea-Azar, C. 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1941-1945. o. Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Ibarruri, G.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Paulino, M. Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. *Farmaco.* **1998**, *53*, 89-94. p. Cerecetto, H.; Mester, B.; Onetto, S.; Seoane, G.; González, M.; Zinola, F. Formal potentials of new analogues of nifurtimox: relationship to activity. *Farmaco.* **1992**, *47*, 1207-1213.

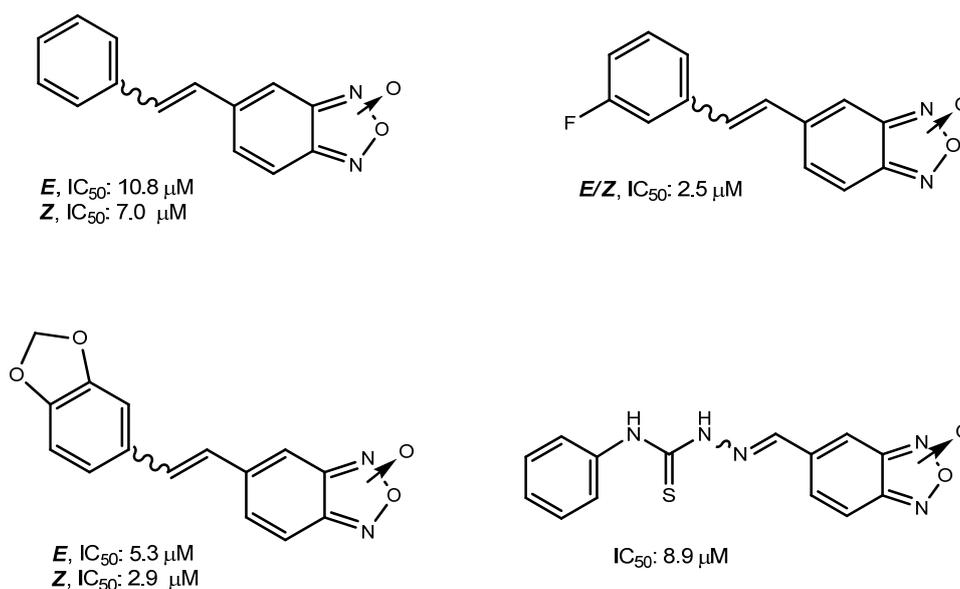


Figura 2.1. Estructura química y actividad inhibitoria (IC₅₀) frente a la forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Tulanuen 2 de distintos derivados de benzofuroxano.

Otra clase de heterociclo que hemos utilizado para el desarrollo de nuevos agentes tripanosomicidas es el sistema *N*-óxido de 2*H*benzo[1,2-*d*]imidazol (2*H*1,3-dióxido de benzimidazol)^{2,3}. Ejemplos de los derivados más activos de este grupo se muestran en la Figura 2.2 [página siguiente]. Inicialmente, se planteó como hipótesis que este heterociclo podría actuar como generador de radicales libres, provocando estrés oxidativo intraparasitariamente, pero recientemente se demostró que este mecanismo de acción no opera en el parásito⁴. Los derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol tienen la ventaja de ser solubles en agua.

^[2] Boiani, M.; Boiani, L.; Merlino, A.; Hernández, P.; Chidichimo, A. Cazzulo, J.J.; Cerecetto, H.; González, M. Second generation of 2*H*benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: Synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4426-4433.

^[3] Boiani, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Torres de Ortiz, S.; Sema, E.; Vera de Bilbao, N.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Vega, C.; Rolan, M.; Gómez Barrio, A.; Cerecetto, H.; González, M. 2*H* benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: A new family of water soluble anti-trypanosomatid agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3215-3224.

^[4] Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernández, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Denicola, A. Mode of action of Nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*. Is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 1736-1745.

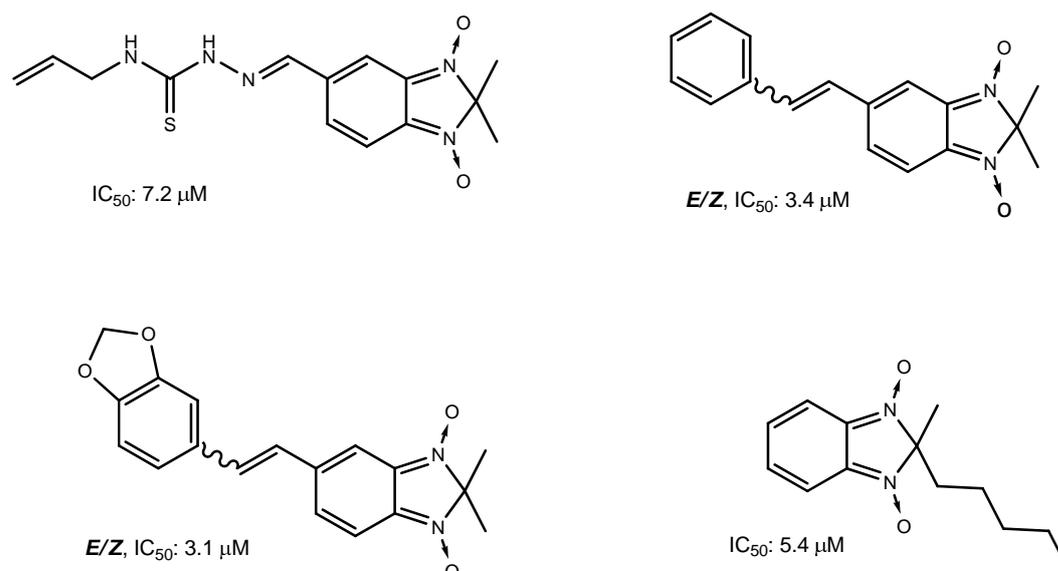


Figura 2.2. Estructura química y actividad inhibitoria (IC_{50}) frente a la forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Tulanuen 2 de distintos derivados de di-Nóxido de benzimidazol.

El uso de moléculas conteniendo uno o más farmacóforos capaces de inhibir múltiples dianas terapéuticas (fármacos híbridos), ha surgido recientemente como una nueva estrategia para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Chagas⁵. Nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en los últimos años en el desarrollo de compuestos híbridos como agentes antichagásicos, combinando un farmacóforo con capacidad de generar radicales libres unido a agrupamientos con capacidad de interactuar con ADN, inhibir la biosíntesis de esteroides de membrana o inhibir CP⁶. En este último sentido, se ha hibridado el sistema benzofuroxano con agrupamientos vinilsulfona, amidinohidrazona, tio- y semicarbazona a fin de obtener compuestos con actividad tripanosomicida debido a dos o más mecanismos de acción^{7B} (Tabla 2.1, página siguiente). Recientemente⁴, hemos demostrado que los

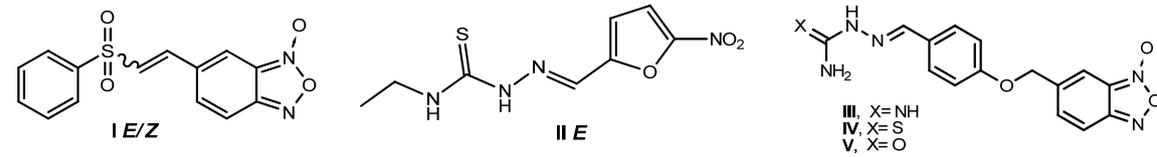
^[5] Cavalli, A.; Bolognesi, M.L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7339-7359.

^[6] a. Gerpe, A.; Boiani, L.; Hernández, P.; Sortino, M.; Zacchino, S.; González, M.; Cerecetto, H. Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2154-2164. b. Gerpe, A.; Álvarez, G.; Benítez, D.; Boiani, L.; Quiroga, M.; Hernández, P.; Sortino, M.; Zacchino, S.; González, M.; Cerecetto, H. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 7500-7509. c. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J.D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel Antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3322-3331.

^[7] Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, M.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Campillo, N.E.; Paez, J.A.; Castro, A.; Krauth-Siegel, L.; Davies, C.; Basombrio, M.A.; González, M.; Cerecetto, H. *In vivo* anti-Chagas vinylthio, vinylsulfinyl and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6004-6015.

derivados de benzofuroxano son capaces de alterar la actividad deshidrogenasa mitocondrial en *T. cruzi*, afectando el potencial de membrana mitocondrial, mientras que los agrupamientos amidinohidrazona y tiosemicarbazona/vinilsulfona han sido descritos como farmacóforos para TR⁹ y CP, respectivamente.

Tabla 2.1. Resultados de actividad anti *T. cruzi in vitro* (cepa Tulahuen 2, Tul2) y de inhibición de CP de compuestos híbridos desarrollados en nuestro laboratorio.



Referencia	IC ₅₀ Tul2 (μM)	IC ₅₀ cruzipaina (μM)
I E/Z	4.2	> 50
I Z	0.5	> 50
II E	4.9	> 100
III	>25	32
IV	15	43
V	>25	>100

En estos estudios se observó que los derivados **I** y **II** (Tabla 2.1) presentan una excelente actividad *in vitro* frente a la forma epimastigota del parásito (cepa Tulahuen 2). En particular, el derivado **I Z** ha resultado ser uno de los compuestos más activos frente a *T. cruzi* obtenido en nuestro laboratorio. Sin embargo, estos compuestos no presentan actividad inhibitoria frente a CP, a excepción de los derivados **III** y **IV** que muestran una modesta IC₅₀ frente a la enzima (Tabla 2.1), lo cual los convierte en prototipos moleculares para el desarrollo de futuros líderes con un mecanismo de acción basado en la inhibición de CP. Cabe destacar que hasta el momento ningún compuesto no peptídico conteniendo agrupamientos amidinohidrazona (como en el caso del compuesto **III**) ha sido descrito como inhibidor de CP.

La falta de inhibición de CP de los derivados más activos frente a *T. cruzi* fue explicada mediante estudios de *docking*, utilizando como estructura de referencia el inhibidor **VSI** (Figura 2.2a, página siguiente)⁷. Al comparar los derivados **I** y **II** con la molécula de referencia se observa que si bien nuestros potenciales inhibidores se ubican en el sitio activo de la enzima, en el caso de los derivados **I E** y **I Z** los mismos

⁹ Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6995-7004.

⁷ Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Rosenmerg, I.; Pereira, M.; Sela, M.; Cerami, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5374-5378.

no establecen interacciones con los residuos de Gly66, Gln19 y Asp158. En el caso del derivado **II E**, está ausente la interacción hidrofóbica con el residuo de Trp177 [Tabla 2.2]¹⁰. Claramente, este conjunto de interacciones parecen ser fundamentales para la inhibición.

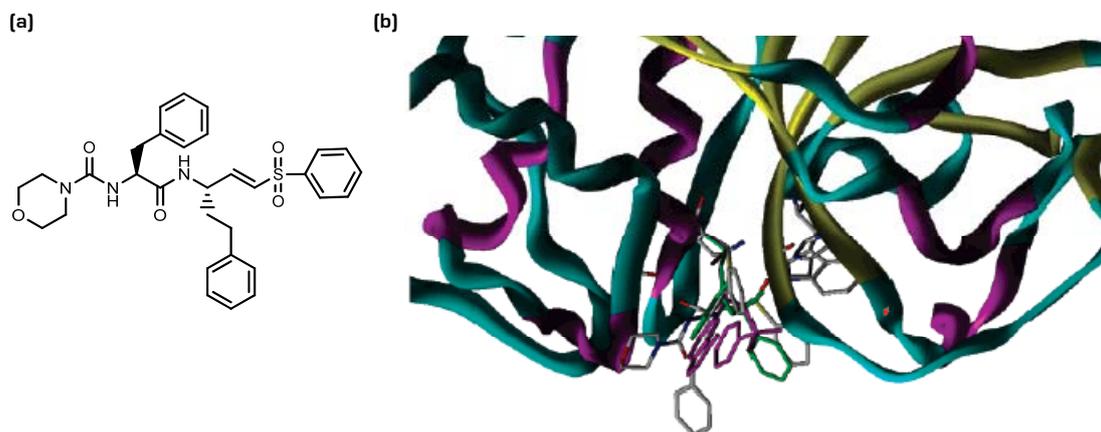


Figura 2.2. (a) Inhibidor **VSI**. (b) Superposición de **1f29** (inhibidor **VSI** coloreado según el tipo de átomo, blanco: C, rojo: O, azul: N, amarillo: S) y los complejos modelados con los compuestos **IE**(verde) y **IZ**(púrpura).

Tabla 2.2. Interacciones ligando-CP y valores de Kd teóricos para los compuestos estudiados.

	Gln19 (Nε2)	Gly66 (O)	Asp158 (O)	His159 (Nδ1)	Trp177	Apilamiento ligando	Kd (M)
1f29 ^a	HB ^b	HB	HB	HB	Ar ^c	+	7.8×10^{-7}
CP- IE	-	-	-	HB	Ar	-	0.5×10^{-3}
CP- IZ	-	-	-	HB	Ar	-	1.1×10^{-3}
CP- II E	HB	HB	HB	HB	-	-	1.9×10^{-3}

^a **1f29**: complejo CP-**VSI** según código PDB. ^bHB: enlace de hidrógeno. ^cAr: Interacción aromática (apilamiento). ^dAusencia de interacción.

Otro aspecto relevante que surge a partir de este trabajo¹⁰ es la observación que los ligandos desarrollados en nuestro grupo carecen de agrupamientos capaces de apilarse (Figura 2.3, página siguiente). El apilamiento de los anillos aromáticos del ligando permite una mejor disposición de la molécula en el sitio activo de la enzima, lo que conduciría a una mayor capacidad inhibitoria. Cabe destacar que este tipo de interacciones en el ligando resultan fundamentales cuando se trata de inhibidores reversibles ya que las mismas confieren mayor estabilidad al complejo ligando-

¹⁰⁰ Cerecetto, H.; Boiani, M.; González, M.; Porcal, W.; Páez, J.A.; Campillo, N. Diseño racional de nuevos fármacos antichagásicos: Uso de cruzaina como diana terapéutica. *VII Congreso Argentino de Protozoología*, Mendoza, Argentina. **2005**.

enzima, resultando en un mayor tiempo de permanencia del ligando en el sitio activo de la enzima.

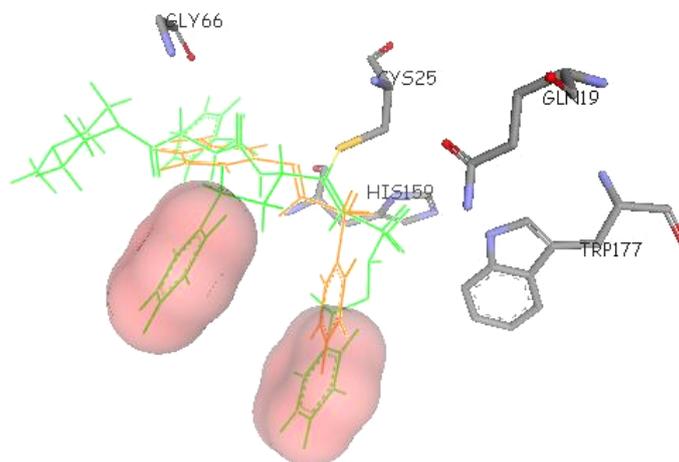


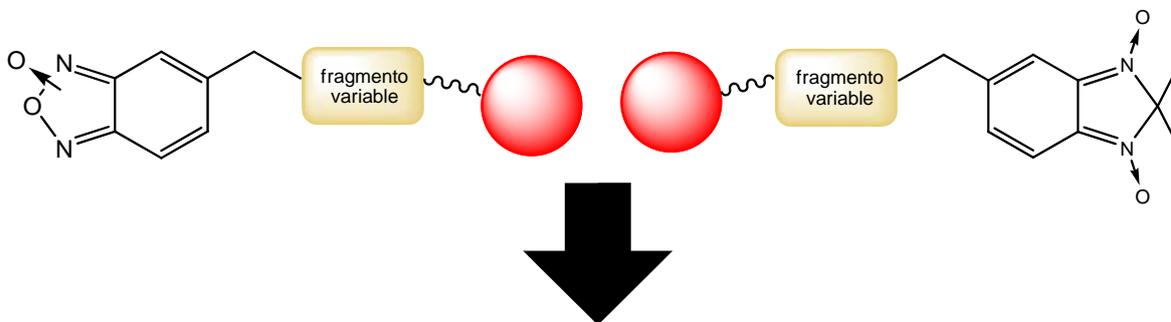
Figura 2.3. Superposición de **VSI** (verde) y **IE** (naranja) en el sitio activo de la CP. Se muestran los residuos del sitio activo involucrados en la interacción con los ligandos. La Cys25 se ha utilizado como aminoácido de referencia para ubicar el sistema vinilsulfona en el sitio activo de la enzima. En rosado se señalan los anillos aromáticos de **VSI** involucrados en interacciones hidrofóbicas de apilamiento.

En base a estos estudios se pudo concluir que si bien los derivados **IE**, **IZ** y **IIE** presentan características estereoelectrónicas tales que permiten una adecuada interacción con el sitio activo de CP, carecen aún de fragmentos estructurales fundamentales. Por lo tanto, nuevos agentes derivados de benzofuroxano deben ser modificados estructuralmente teniendo en cuenta la inclusión de grupos aromáticos que puedan apilarse, tales como fenilo, bencilo o fenetilo, así como grupos funcionales adecuadamente distribuidos capaces de establecer enlaces de hidrógeno con residuos clave ubicados en el sitio activo de la enzima.

2.2. Propuesta de Trabajo

En base a los antecedentes presentados y teniendo en cuenta que CP resulta una interesante diana para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos, en el presente trabajo se propone la investigación y desarrollo de nuevos agentes tripanosomicidas, potenciales inhibidores reversibles de esta enzima, a partir de la modificación estructural del prototipo **III** y sus análogos **IV** y **V** (Tabla 2.1, página 42). Al igual que los compuestos de partida, los nuevos derivados combinarán dos sistemas farmacofóricos, en este caso un farmacóforo responsable de la inhibición

de la enzima [agrupamientos tiosemicarbazona, semicarbazona, amidinohidrazona y tris-arilguanidina] y la estructura bioactiva de los líderes desarrollados por nuestro grupo (benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol).



Agrupamientos capaces de interactuar con CP: grupos aromáticos con capacidad de apilamiento (fenilo, bencilo, fenetilo), grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno.

La estrategia de combinar en la misma molécula agrupamientos químicos responsables de diferentes respuestas biológicas ha sido escasamente investigada en la búsqueda de soluciones para esta parasitemia.

Dicha estrategia, por un lado, sería la fuente de nuevos compuestos químicos que permitan el conocimiento bioquímico de esta enzima. Por otro lado, la combinación de dos o más mecanismos de acción en una misma molécula es una estrategia importante en la disminución de resistencias, además de obtener productos con menores efectos adversos por el uso de menores dosis [mejores fármacos]. En todos los casos se busca que en la misma estructura se encuentren presentes los grupos químicos con potencial acción tripanosomicida.

2.3. Objetivos

Para el desarrollo del presente Proyecto de Tesis se plantearon inicialmente los siguientes objetivos:

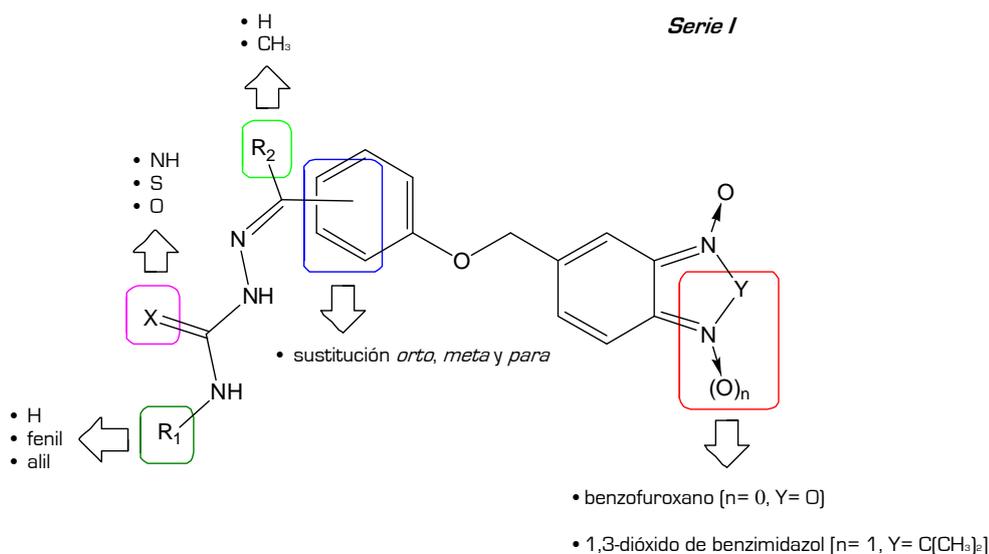
1. Diseño y síntesis orgánica de compuestos híbridos con actividad tripanosomicida y potenciales inhibidores de CP.
2. Evaluación biológica de los compuestos sintetizados mediante ensayos *in vitro* de actividad tripanosomicida en células de la forma epimastigota de *T. cruzi*.

3. Evaluación de la citotoxicidad inespecífica frente a células mamíferas utilizando macrófagos murinos y glóbulos rojos humanos.
4. Ensayos de inhibición enzimática a fin de evidenciar si la diana molecular de los compuestos diseñados y desarrollados corresponde a CP.
5. Estudios de la interacción ligando-CP mediante técnicas experimentales [Resonancia Magnética Nuclear] y teórico-computacionales [*docking*].

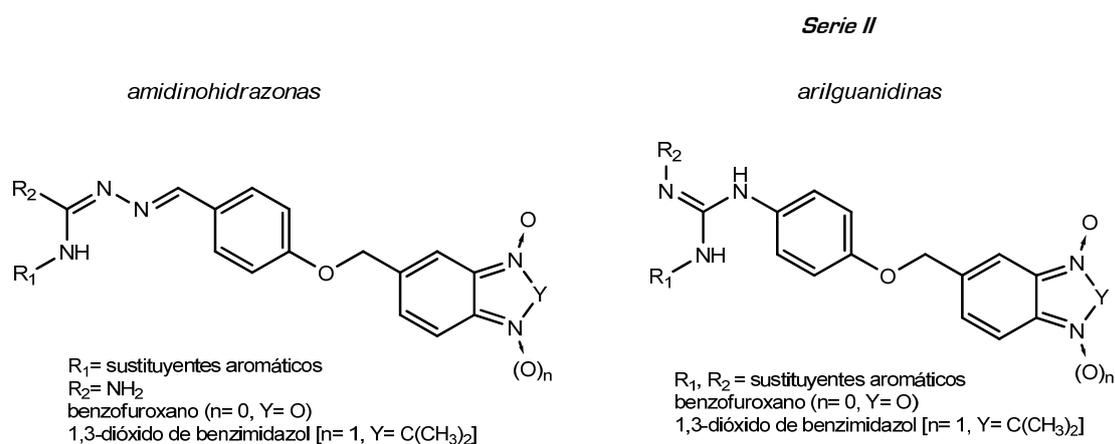
3. Química

3.1. Diseño de compuestos híbridos derivados del sistema bezofuroxano y 1,3-dióxido de 2,2-dimetil-2H-benzimidazol

Para el desarrollo del presente trabajo en primer lugar, se seleccionaron los derivados **III-V** [Tabla 2.1 en Capítulo 2, página 42] previamente desarrollados en nuestro laboratorio, y se planificaron una serie de modificaciones estructurales, las cuales se presentan a continuación:

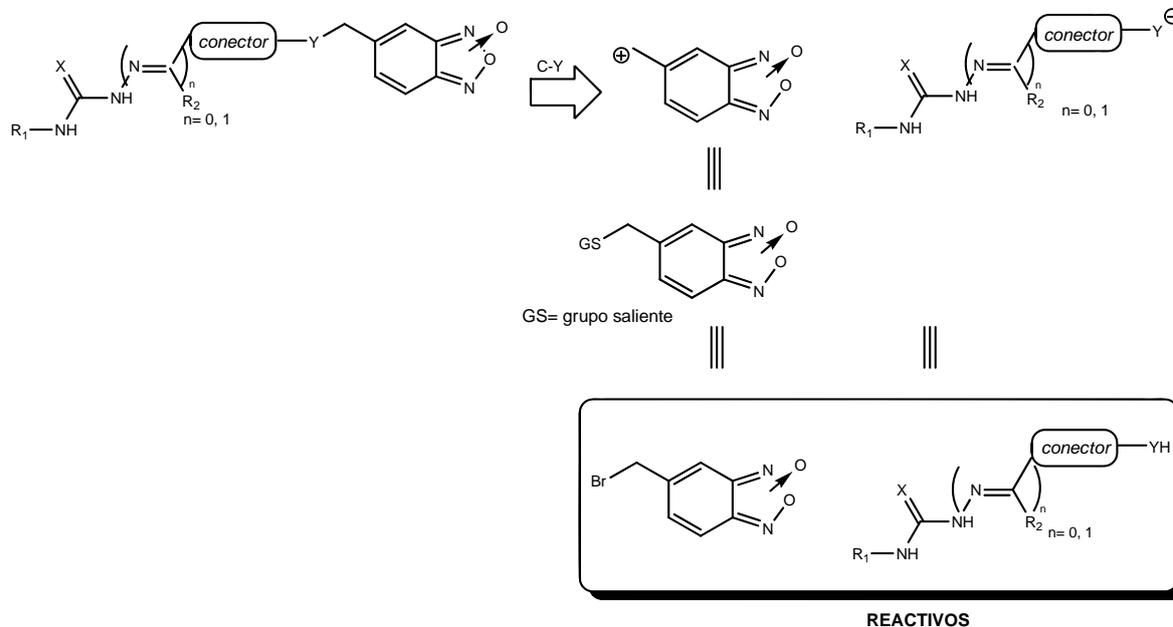


En segundo lugar, tomando como base el esqueleto feniloximetilbenzofuroxano/1,3-dióxido de benzimidazol, se diseña una serie de derivados conteniendo agrupamientos amidinohidrazona o arilguanidina que sustentan sustituyentes capaces de apilarse¹ [ver Capítulo 2].



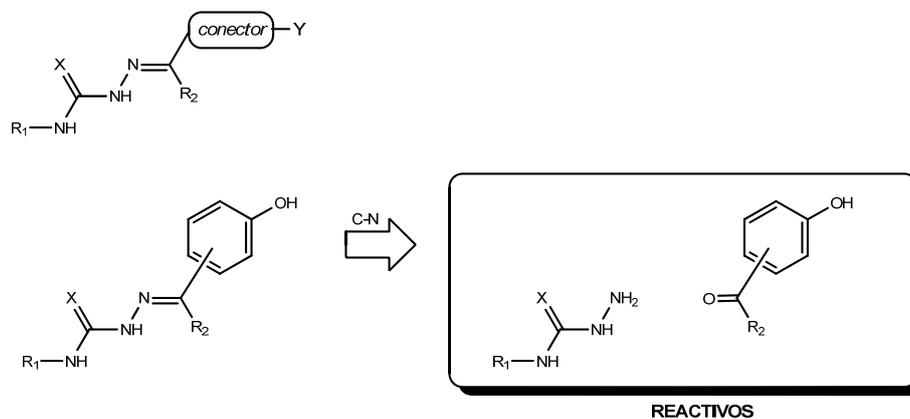
⁽¹⁾ Cerecetto, H.; Boiani, M.; González, M.; Porcal, W.; Páez, J.A.; Campillo, N. Diseño racional de nuevos fármacos antichagásicos: Uso de cruzaina como diana terapéutica. *VII Congreso Argentino de Protozoología*, Mendoza, Argentina. **2005**.

Para llevar a cabo la síntesis de los derivados de las *Serie I* y *II* se planteó el siguiente análisis retrosintético (esquemático para los derivados de benzofuroxano ya que el sistema de 1,3-dióxido de 2,2-dimetil-2H-benzimidazol es generado a partir este heterociclo, ver apartado 3.9, página 77):



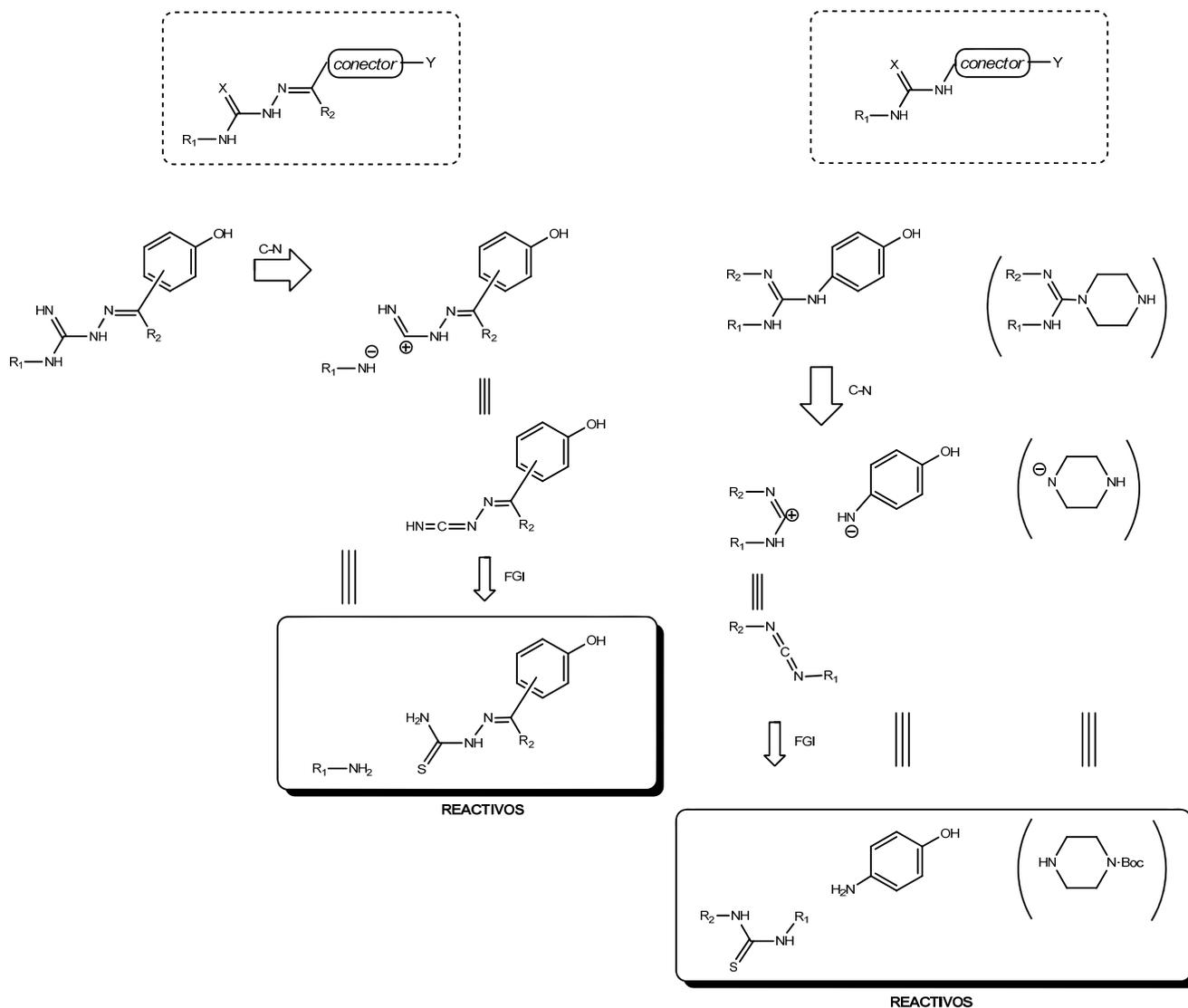
Por lo tanto, los reactivos necesarios para este desarrollo son 5(6)-bromometilbenzofuroxano, común a ambas series, y distintas hidrazonas ($n=1$) para la preparación de los derivados de la *Serie I* y amidinohidrazonas ($n=0$) para aquellos de la *Serie II*.

Para las hidrazonas, reactivos de la *Serie I*, se elige como sistema conector un sistema feniloxi ($Y=O$). Para este tipo de reactivo se plantea el siguiente esquema retrosintético:



Por lo tanto, los otros reactivos necesarios para esta serie son amidinohidrazinas, semicarbazidas, tiosemicarbazidas e hidroxifenilcarbonilos.

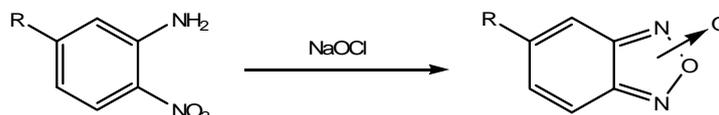
Para las amidinohidrazonas, reactivos de la *Serie II*, se eligen como sistemas conectores un sistema feniloxi ($Y=O$) tanto para $n=1$ y $X=NH_2$ como para $n=0$ y $X=NHR_2$, o un sistema piperazina ($Y=N$) para $n=0$ y $X=NHR_2$. Para este tipo de reactivos se plantean los siguientes esquemas retrosintéticos:



Por lo tanto, los reactivos necesarios para esta serie son aminas, tiosemicarbazonas de hidroxifenilcarbonilos, tioureas *N,N'*-disustituidas y *p*-aminofenol o 1-*tert*-butoxicarbonilpiperazina.

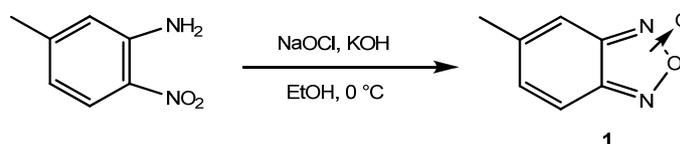
3.2. Síntesis del intermedio común 5(6)-bromometilbenzofuroxano

Se empleó la síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa de *o*-nitroanilinas con hipoclorito de sodio (NaOCl), usando metanol o etanol como disolvente², según se muestra en el siguiente esquema:



Se trata de una técnica sencilla, rápida y económica con la cual se obtuvieron muy buenos resultados.

Como primer paso en la preparación se realizó la síntesis de 5(6)-metilbenzofuroxano, de acuerdo a lo descrito en la literatura³. A una solución de 5-metil-2-nitroanilina y KOH en EtOH se agregó, gota a gota, una solución de NaOCl, obteniéndose el compuesto **1** como un sólido cristalino amarillo con rendimiento cuantitativo.



El producto obtenido se comparó cromatográficamente con el patrón correspondiente y su pureza relativa se determinó por CCF. Dado que la calidad con que se obtiene el benzofuroxano es alta (libre de productos secundarios), se utilizó en las reacciones posteriores sin purificar.

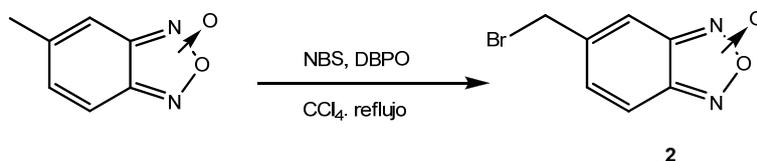
La síntesis de 5(6)-bromometilbenzofuroxano se realizó de acuerdo a lo descrito en la literatura⁴ mediante la bromación de **1** con *N*-bromosuccinimida (NBS) y peróxido de

^[2] Mallory, F.B.; Varimbi, S.P. Furazan Oxides. III. An unusual type of aromatic substitution reaction. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1656-1662.

^[3] Mallory, F.B. Benzofurazan Oxide. *Org. Syn.* **1957**, Coll. Vol. *4*, 74.

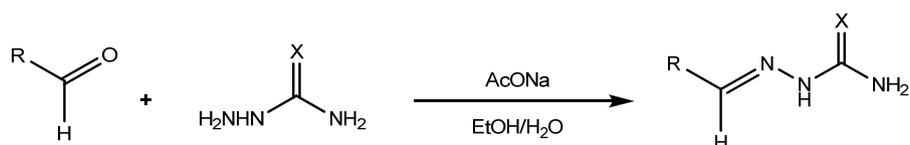
^[4] Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizábal, F.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Morello, A.; Repetto, Y.; Maya, J. D. Novel benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as antichagasic agents: Chemical and biological studies. *Lett. Drugs Des. Dis.* **2005**, *2*, 294-301.

dibenzoilo (DBPO) como catalizador. El crudo se recristaliza de hexano/acetato de etilo para dar el producto esperado.

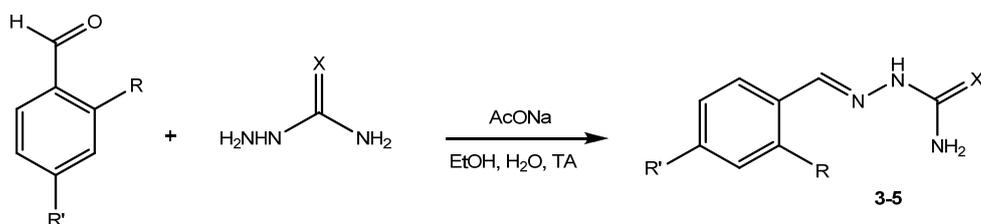


3.3. Síntesis de hidrazonas

La síntesis de las mismas se llevó a cabo según lo descrito en la literatura⁵ utilizando como reactivos aldehídos e hidrazidas adecuadamente sustituidas en presencia de acetato de sodio y utilizando una mezcla etanol/agua como disolvente. De este modo se obtienen las hidrazonas correspondientes de acuerdo al esquema que se presenta a continuación:



La síntesis de amidinohidrazona y semicarbazona de 2-hidroxibenzaldehído y tiosemicarbazona de 4-hidroxibenzaldehído se lleva a cabo utilizando una solución etanólica del hidroxibenzaldehído correspondiente, a la cual se agrega una solución acuosa de aminoguanidina, semicarbazida o tiosemicarbazida y acetato de sodio. El producto que cristaliza en el medio de reacción es lavado con etanol, obteniéndose sin productos secundarios por lo cual se utiliza en las reacciones posteriores sin purificar. Los tiempos de reacción y rendimientos de los procesos sintéticos se muestran en la Tabla 3.1, página siguiente.

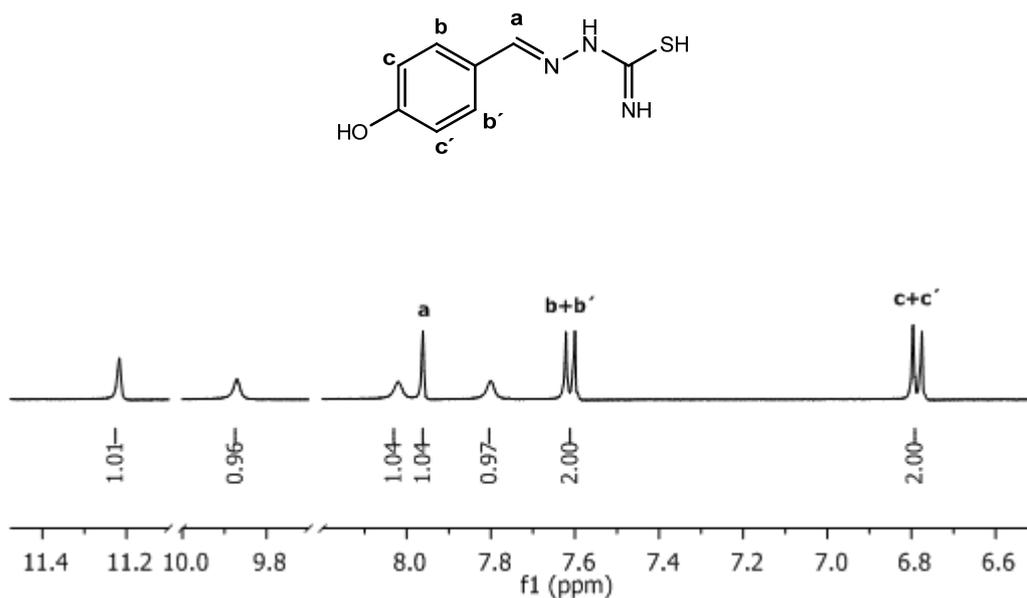


⁵ Aggarwal, N.; Mishra, P. Synthesis and evaluation of 4-substituted semicarbazones of levulinic acid for anticonvulsant activity. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **2005**, *6B*, 617-621.

Tabla 3.1. Síntesis de hidrazonas 3-5.

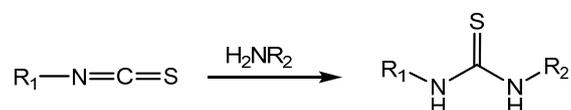
Comp.	-R	-R'	X	Tiempo (h)	R (%)
3	OH	H	O	24	55
4	OH	H	NH	24	60
5	H	OH	S	24	54

Todos los compuestos fueron caracterizados mediante espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$. En los espectros se observan claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en las moléculas. Como ejemplo se muestra el espectro correspondiente al derivado **5** (Figura 3.1). En todos los casos, la aparición en el espectro de una única señal asociada al protón ilidénico (Ha, Figura 3.1), en el entorno de 8 ppm, indica la presencia de sólo uno de los isómeros geométricos (*E* o *Z*). Para el caso del compuesto **5**, en el espectro se observan señales anchas correspondientes a cuatro hidrógenos intercambiables lo cual indica que en dichas condiciones se encuentra en la forma tautomérica que se muestra en la Figura 3.1.

Figura 3.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del derivado **5** en CD_3OD a 303 K.

3.4. Síntesis de tioureas

Para la síntesis de tioureas sustituidas se empleó la reacción de isotiocyanatos orgánicos con aminas primarias^{6,7} según se muestra en el siguiente esquema:



La síntesis se llevó a cabo utilizando fenilisotiocianato y distintas aminas primarias adecuadamente sustituidas como reactivos. Luego del *work-up* se obtienen los productos deseados con rendimientos de buenos a excelentes [Tabla 3.2].

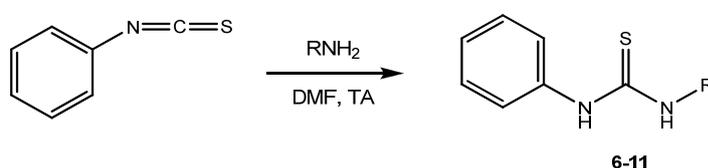


Tabla 3.2. Síntesis de tioureas 6-11.

Comp.	R	Tiempo (h)	R (%)
6		12	61
7		24	65
8		12	63
9		24	90
10		24	33
11		24	88

Los derivados **6-11** fueron caracterizados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMQC y HMBC) siendo los datos espectroscópicos consistentes con las estructuras esperadas. A modo de ejemplo, en la Figura 3.2 se muestra el espectro de la tiourea **6**. En el espectro se observan

⁶Schroeder, D.C. Thioureas. *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 181-228.

⁷Lee, J.; Lee, J.; Kang, M.; Shin, M.; Kim, J.-M.; Kang, S.-U.; Lim, J.-O.; Choi, H.-K.; Suh, Y.-G.; Park, H.-G.; Oh, U.; Kim, H.-D.; Park, Y.-H.; Ha, H.-J.; Kim, Y.-H.; Toth, A.; Wang, Y.; Tran, R.; Pearce, L.V.; Lundberg, D.J.; Blumberg, P.M. *N*-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-*N'*-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: Novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3116-3126.

las señales correspondientes a los protones metilénicos del sustituyente fenetilo a 2.94 (**b**) y 3.09 (**a**) ppm. En la región de protones aromáticos se observa un doblete a 7.02 ppm correspondiente a los protones indicados como **f** y **f'** y otro doblete a 7.17 ppm correspondiente a los protones **c** y **c'**. El multiplete a 7.24 ppm se corresponde con los protones aromáticos **d** y **d'** y el multiplete a 7.32 ppm incluye los protones **g**, **g'**, **h** y **e**. Todos los carbonos y protones de la molécula pudieron ser asignados de forma inequívoca con los experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear, HMQC y HMBC (Figura 3.3a y b, página siguiente).

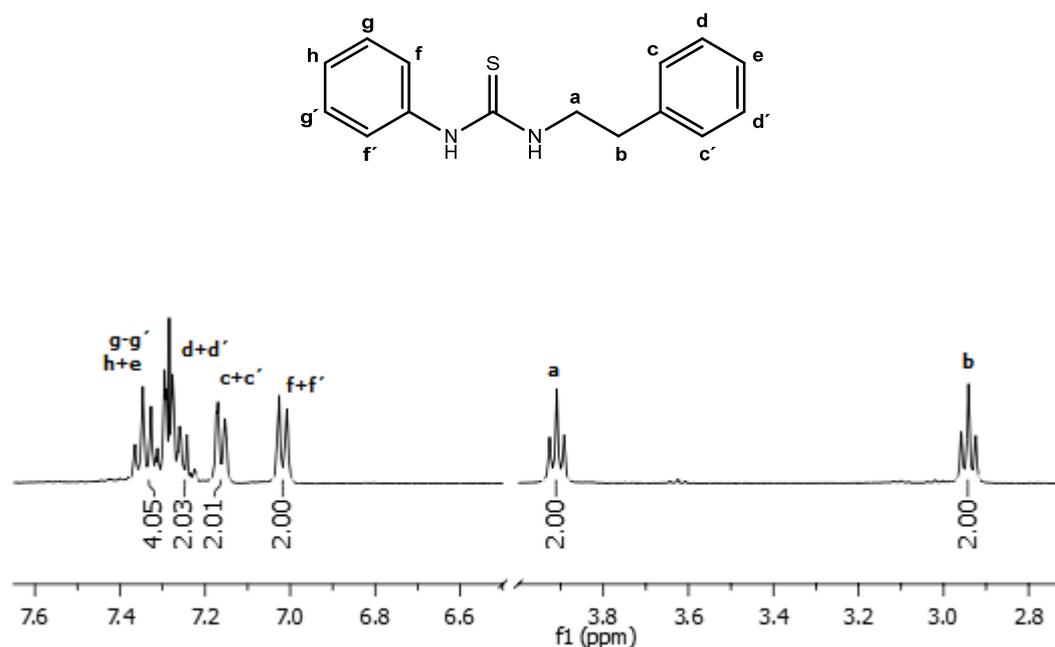


Figura 3.2. Espectro de ^1H -RMN del derivado **6** en CDCl_3 a 303 K.

El espectro HMBC del derivado **6** muestra que los protones metilénicos **a** y **b** se correlacionan a tres y dos enlaces, respectivamente, con el carbono cuaternario **k** y los protones metilénicos **a** se correlacionan a tres enlaces con el carbono tiocarbonílico **j**. A su vez, los protones **f-f'** y **g-g'** se correlacionan a dos y tres enlaces, respectivamente, con el carbono cuaternario del sustituyente fenilo (**i**). La asignación de los protones **c-c'** y **d-d'** se realizó teniendo en cuenta que los primeros se correlacionan a tres enlaces con el carbono metilénico **b** y los segundos se correlacionan a dos enlaces con los primeros.

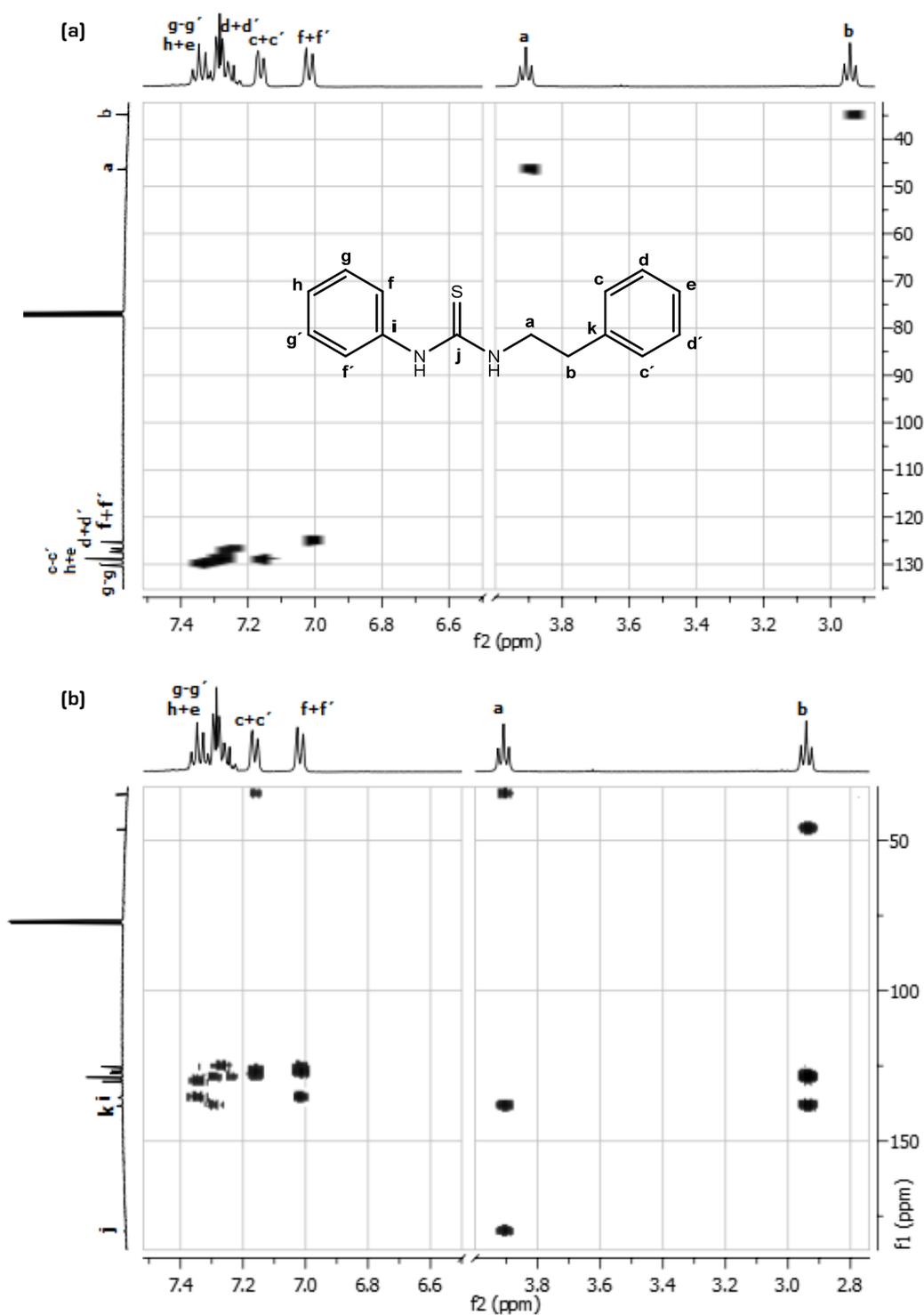
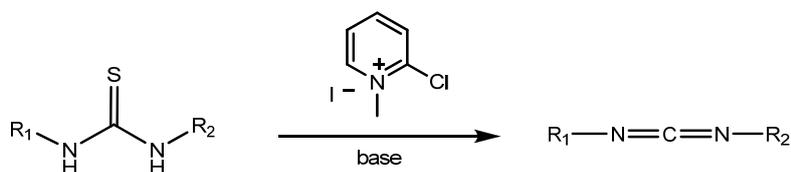


Figura 3.3. a. Espectro HMQC del derivado **6** donde se asignan los carbonos no cuaternarios. b. Espectro HMBC del derivado **6** donde se asignan los carbonos cuaternarios y los distintos protones presentes en la molécula. Espectros realizados en CDCl_3 a 303 K.

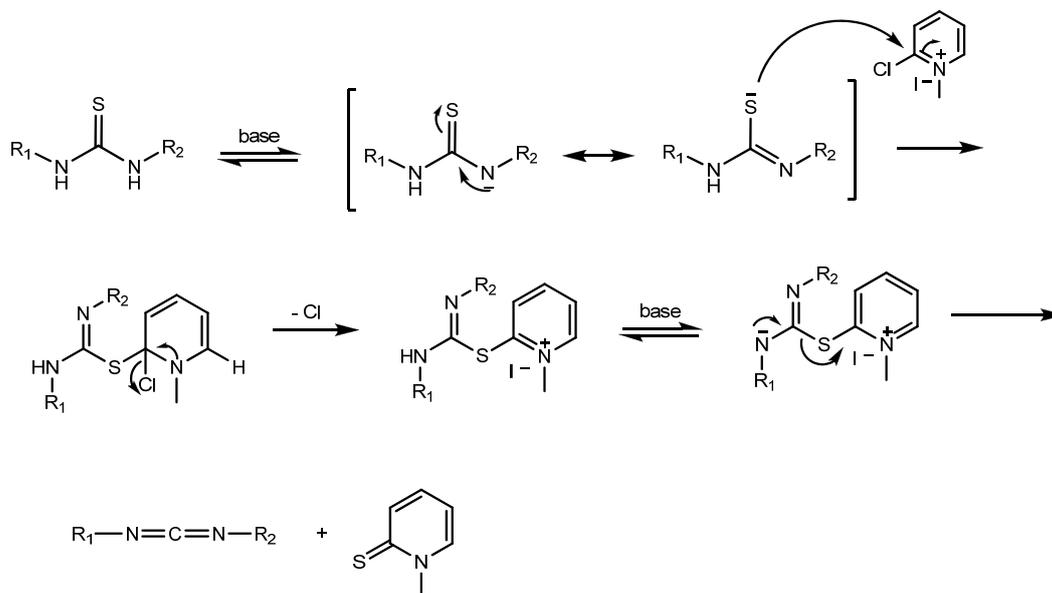
3.5. Síntesis de carbodiimidas

La síntesis de las carbodiimidas reactivos se realizó, según el análisis retrosintético de la página 50, a partir de las correspondientes tioureas mediante la reacción de

éstas con ioduro de 2-cloro-*N*-metilpiridinio [reactivo de Mukaiyama] en presencia de una base⁸ según se muestra en el siguiente esquema.



La reacción transcurre a través del mecanismo propuesto que se indica a continuación⁹:



La abstracción por parte de la base del hidrógeno de uno de los nitrógenos de la tiourea provoca la formación del intermedio tiolato que desplaza al sustituyente 2-cloro del anillo piridínico del reactivo de Mukaiyama. Esta reacción de adición-eliminación se ve favorecida por la carga positiva que sustenta el nitrógeno. El grupo tiolpiridinio, presente ahora en la molécula, actúa como un excelente grupo saliente que lleva a la formación de la carbodiimida cuando el segundo protón es abstraído por la base.

⁸ Tassoni, E.; Giannessi, F.; Bruneti, T.; Pessotto, P.; Renzulli, M.; Travagli, M.; Rajamáki, S.; Prati, S.; Dottori, S.; Corelli, F.; Cabri, W.; Carminati, P.; Botta, M. Novel substituted aminoalkylguanidines as potential antihyperglycemic and food intake-reducing agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3073-3076.

⁹ Hamed, E.A. Nucleophilic substitution at the pyridine ring. Kinetics of the reaction of 2-chloro-3,5-dinitropyridine with arylthiolates in methanol. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *29*, 515-521.

Las tioureas **6-11** (Tabla 3.2, página 54) se hicieron reaccionar con el reactivo de Mukaiyama utilizando *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.3:

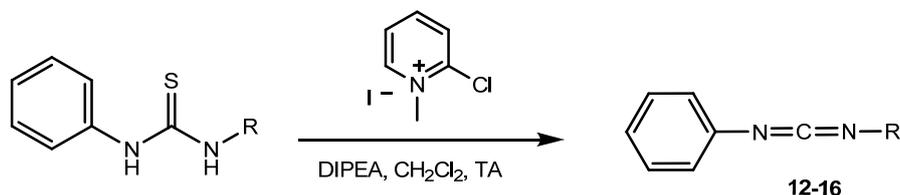


Tabla 3.3. Síntesis de carbodiimidas.

Comp.	R	Tiempo (h)	R (%)
12		3.5	95
13		48	85
14		48	40
15		3	64
16		48	31
-		48	descompone

La obtención de las carbodiimidas correspondientes fue confirmada mediante espectroscopia de ^{13}C -RMN. Al comparar dichos espectros con los de las tioureas de partida se observa la desaparición de la señal correspondiente al carbono tiocarbonílico, en el entorno de 180 ppm [ver Figura 3.3b, página 56], y la aparición de una nueva señal en el entorno de 135-137 ppm, dependiendo del producto, que pudo ser asignada mediante experimentos HMBC al carbono carbodiimidico [j, Figura 3.4, página siguiente]. A modo de ejemplo, en la Figura 3.4 se muestra el espectro HMBC del derivado **12**. El carbono cuaternario *i* también experimenta una variación importante en su desplazamiento químico al pasar de la tiourea a la carbodiimida, de ≈ 136 ppm a ≈ 140 ppm en todos los compuestos estudiados. Variaciones importantes se observan además en los carbonos y protones **h** y **f-f'**.

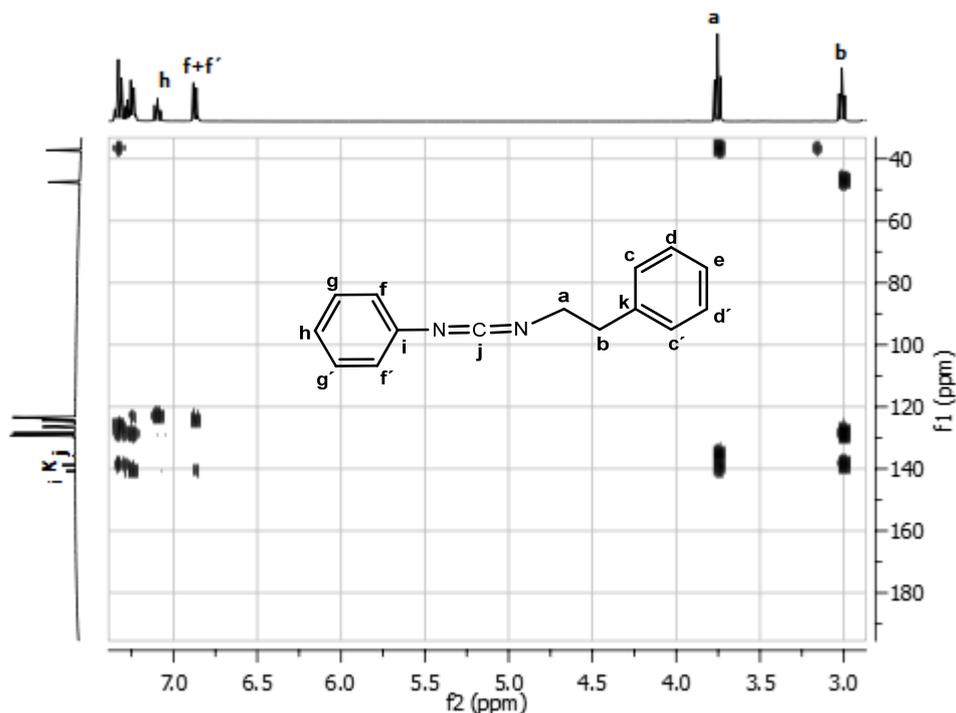


Figura 3.4. . Espectro HMBC del derivado **12** en acetona- d_6 a 303 K.

3.6. Síntesis de benzofuroxanos portadores de la funcionalidad carbonilo [5-(*O*-alquil)benzofuroxanos]

Para preparar los derivados pertenecientes a la *Serie I* fue necesario contar con benzofuroxanos que portasen una funcionalidad carbonilo.

Para la síntesis de dichos reactivos (compuestos **17-20**, Tabla 3.4, página siguiente) se estudiaron distintas condiciones las cuales se presentan en la Tabla 3.4. Así, para la preparación de los intermedios **17** y **18**, 3- y 4-formil-sustituidos, se utilizaron condiciones de reacción tradicionales¹⁰ [benzofuroxano/fenol/ K_2CO_3 (1:1:1)/ CH_3CN /TA] obteniéndose los productos deseados con muy buenos rendimientos. Sin embargo, en estas mismas condiciones la preparación de los derivados 2-carbonil-sustituidos, **19** y **20**, fueron infructuosas.

^[10] Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, M.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Campillo, N.E.; Páez, J.A.; Castro, A.; Krauth-Siegel, L.; Davies, C.; Basombrio, M.A.; González, M.; Cerecetto, H. *In vivo* anti-Chagas vinylthio, vinylsulfinyl and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6004-6015.

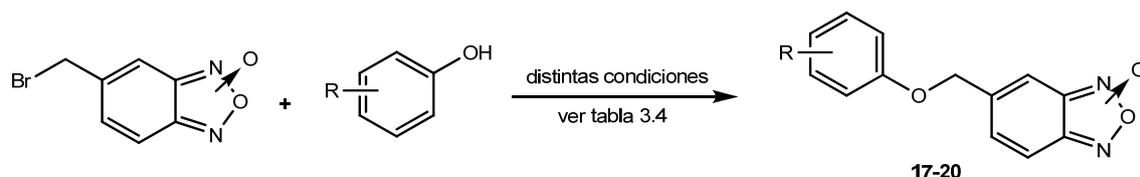


Tabla 3.4. Síntesis de derivados **17-20**.

Comp.	R	Condiciones	R [%]
17	4-formil	K ₂ CO ₃ [1 eq]/CH ₃ CN/TA/15 h	70
18	3-formil	K ₂ CO ₃ [1 eq]/CH ₃ CN/TA/48 h	80
		K ₂ CO ₃ [1 eq]/CH ₃ CN/TA/48 h	Ausencia de reacción
19	2-formil	K ₂ CO ₃ [1 eq]/KI [0.05 eq]/18-crown-6 [0.01 eq]/acetona/reflujo/5 d	Ausencia de reacción
		K ₂ CO ₃ [4 eq]/TBAI [0.1 eq]/MW, 300 W/1.30 min	65
20	2-acetil	K ₂ CO ₃ [4 eq]/TBAI [0.1 eq]/MW, 300 W/1.30 min	32

En el caso de los derivados **19** y **20**, la formación de un enlace de hidrógeno entre el H del grupo OH de 2-hidroxibenzaldehído o 2-hidroxiacetofenona y el O del grupo carbonilo deja al hidrógeno menos disponible para ser abstraído por la base, lo cual podría explicar la ausencia de reacción en las condiciones anteriores. El modelado molecular de 2-hidroxibenzaldehído y 2-hidroxiacetofenona utilizando un método DFT (B3LYP/6-31G*) muestra la adecuada disposición espacial de los grupos funcionales para la formación de un enlace de hidrógeno fuerte, con una distancia de 1.80 Å (Figura 3.5).

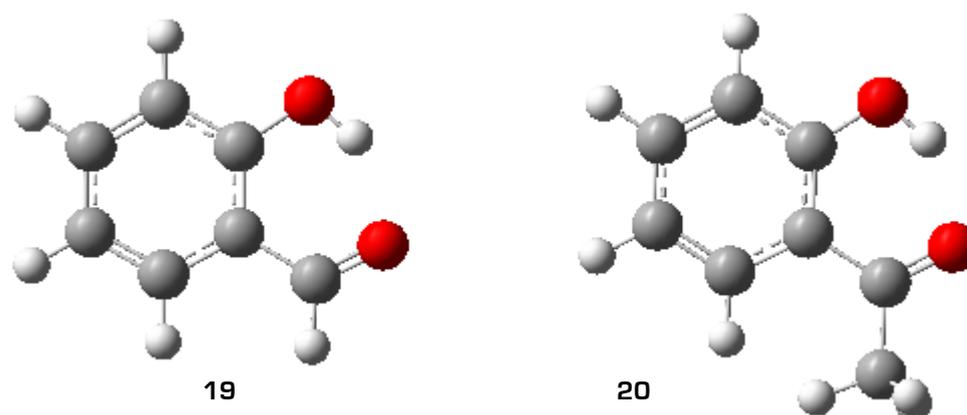


Figura 3.5. El modelado molecular de los derivados **19** y **20** muestra la adecuada disposición espacial de los grupos funcionales para la formación de un enlace de hidrógeno fuerte (1.80 Å).

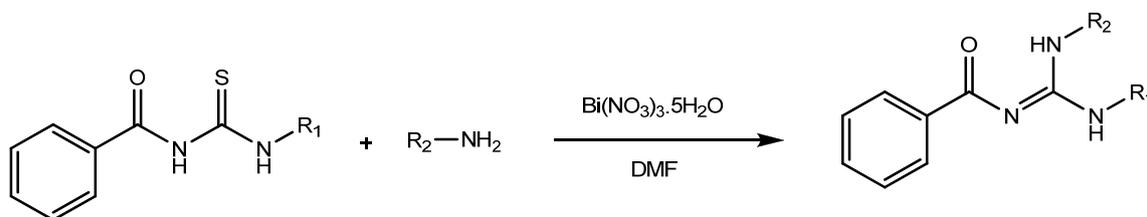
Utilizando una reacción sin disolventes, e irradiando con microondas en exceso de base y en presencia de un catalizador de transferencia de fase (ioduro de

tetrabutilamonio, TBAI], fue posible obtener los compuestos **19** y **20** con rendimientos de buenos a moderados.

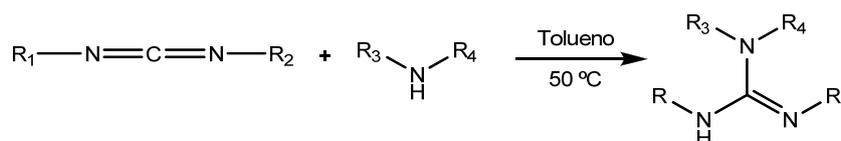
3.7. Síntesis de arilguanidinas

En la literatura se describen distintas metodologías para la obtención de guanidinas trisustituidas^{11,12}. En este trabajo se ensayaron dos, las cuales se detallan seguidamente.

En la primera, la síntesis de arilguanidinas se ensayó utilizando el procedimiento mostrado a continuación, donde una aciltiourea adecuadamente sustituida se hace reaccionar con una amina primaria o secundaria en presencia de nitrato de bismuto como agente guanilante^{13,14}:



En la segunda metodología ensayada, se utilizan aminas secundarias y carbodiimidas como reactivos para obtener las correspondientes guanidinas sustituidas⁸ de acuerdo al siguiente esquema:



^[11] Powell, D. A.; Ramsden, P. D.; Batey, R. A. Phase-transfer-catalyzed alkylation of guanidines by alkyl halides under biphasic conditions: A convenient protocol for the synthesis of highly functionalized guanidines. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2300-2309.

^[12] Ohara, K.; Vasseur, J.J.; Smietana, M. Nis-promoted guanylation of amines. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1463-1465.

^[13] Cunha, S.; de Lima, B.R.; de Souza, A.R. Bismuth nitrate pentahydrate: a new and environmentally benign reagent for guanidylation of *N*-benzoylthioureas. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 49-52.

^[14] Cunha, S.; Rodrigues, M.T. Jr. The first bismuth(III)-catalyzed guanylation of thioureas. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6955-6956.

3.7.1. Intento de síntesis de *bis*-arilguanidinas utilizando aminas primarias

El intento de síntesis se llevó a cabo según lo descrito en la literatura¹³, utilizando tiosemicarbazonas como material de partida. Así, a una disolución de la tiosemicarbazona **5** en DMF, se agregan dos equivalentes de la amina correspondiente y se dejan reaccionar en presencia de nitrato de bismuto pentahidratado (desde 0 °C a temperatura ambiente). Como en estas condiciones se obtuvo principalmente el producto de hidrólisis de la tiosemicarbazona, *p*-hidroxibenzaldehído, se repitió la reacción bajo condiciones que minimizaran esta reacción no deseada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5. Cuando se trabajó bajo atmósfera de N₂ con tamices moleculares de 4 Å, si bien se pudo minimizar la hidrólisis igualmente se observó la aparición de *p*-hidroxibenzaldehído antes de completarse la reacción. Esto puede explicarse por la capacidad de distintos complejos de bismuto(III) de catalizar la hidrólisis de acetales, oximas, hidrazonas y semicarbazonas, por ejemplo, a los correspondientes productos carbonílicos¹⁵. De todas maneras, en estas condiciones se pudo aislar un producto diferente al de hidrólisis con un rendimiento del 21 % (Tabla 3.5).

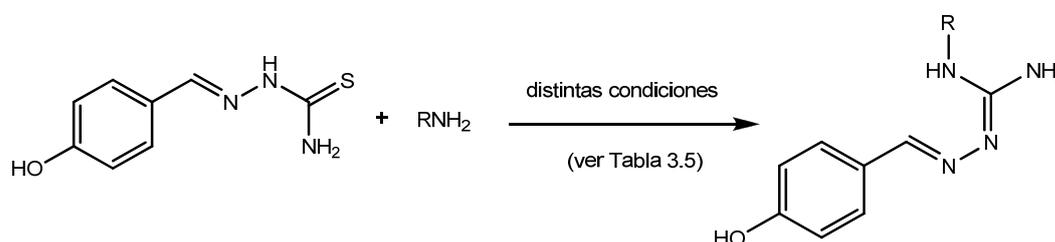


Tabla 3.5. Síntesis de *tris*-alquilguanidinas.

R	Condiciones	R (%)
	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O (1 eq) [*] /Et ₃ N (4eq)/DMF/TA/24 h	Hidrólisis
	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O (1 eq)/Et ₃ N (4eq)/DMF/N ₂ /tamices 4A/TA/24 h	21 [*]

^{*}El Bi(NO₃)₃·5H₂O se mantiene en desecador a vacío durante 48 h antes de la reacción. ^{*} Compuesto propuesto (por detalles ver texto que sigue).

Sin embargo, este producto de reacción mayoritario aislado por columna cromatográfica (CC) no se corresponde con el producto esperado. Si bien la elucidación estructural del compuesto obtenido no ha sido concluyente, en base a los espectros analizados y teniendo en cuenta el mecanismo de reacción descrito en la

⁽¹⁵⁾ Leonard, N.M.; Wieland, L.C.; Mohan, R.S. Applications of bismuth (III) compounds in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8373-8397.

literatura¹⁴ se propone inicialmente el compuesto **21**, que se muestra en la Figura 3.6, como producto principal.

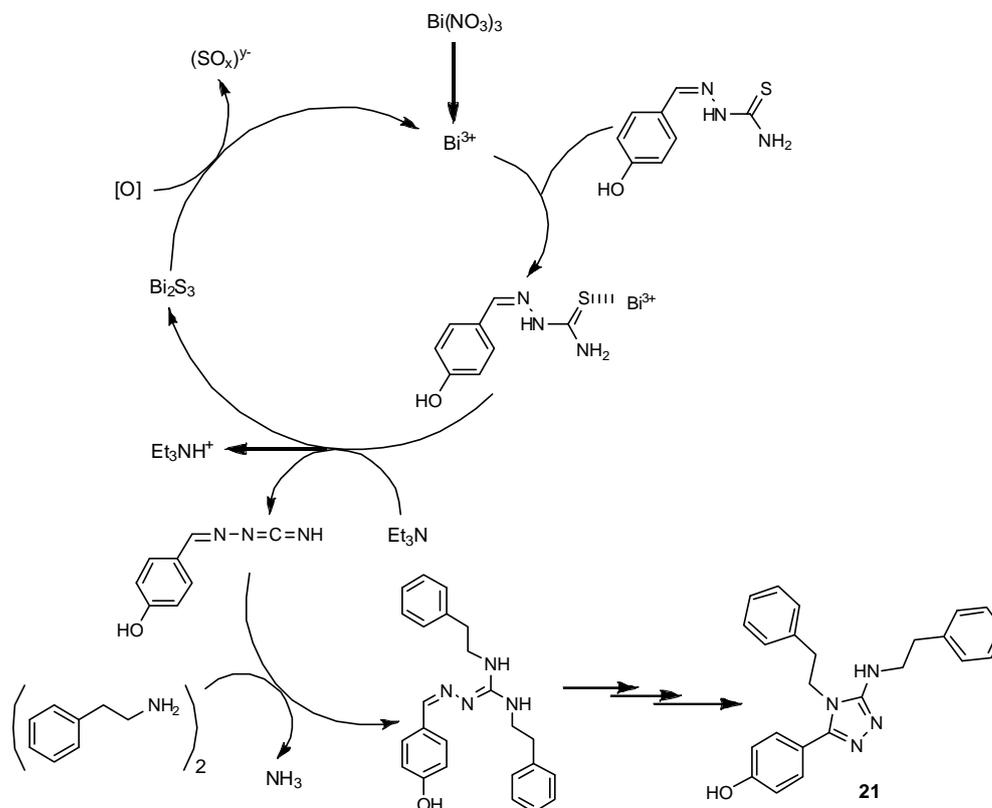


Figura 3.6 Mecanismo propuesto para la formación del compuesto **21**.

La estructura propuesta permite explicar la ausencia, en el espectro de ^1H -RMN, del protón ilidénico y concuerda con el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (Figura 3.7, página siguiente). La formación del compuesto **21** implica un paso de aromatización del heterociclo con pérdida de ión hidruro para formar el 4-*H*-1,2,4-triazol; se piensa que esta reacción pudo haber sido catalizada por el propio bismuto. Está descrito en la literatura que el cloruro de bismuto (III) y el triflato de bismuto (III) son capaces de actuar como catalizadores en reacciones de oxidación de compuestos aromáticos¹⁵. Dado que este producto no era de interés para el presente trabajo, no se realizaron estudios espectroscópicos más profundos para resolver la estructura del mismo.

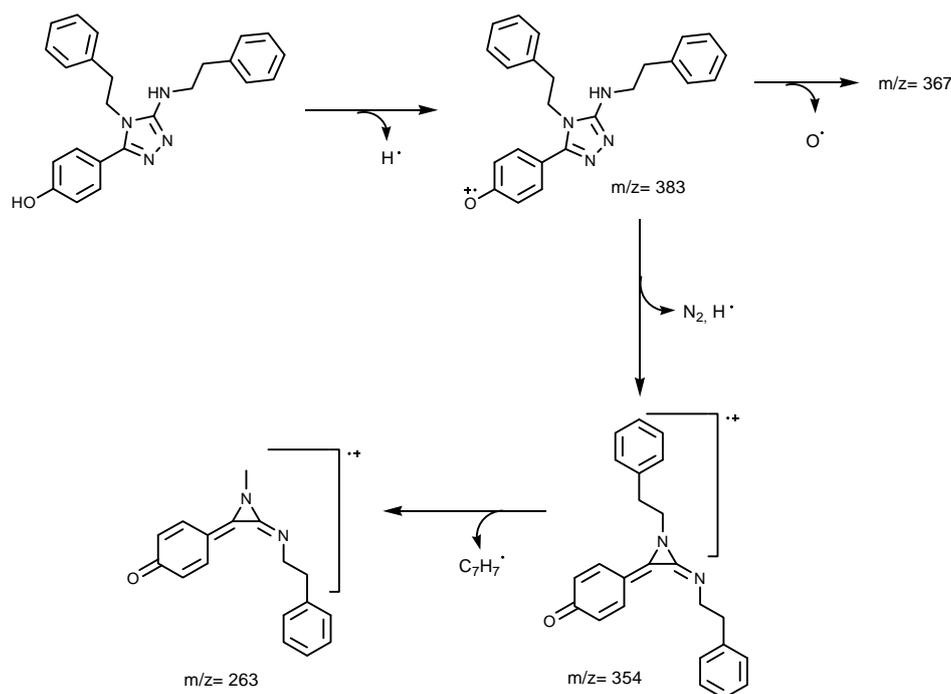
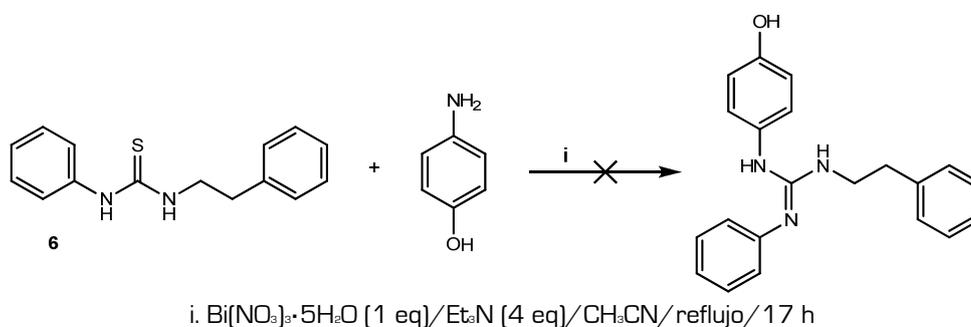


Figura 3.7 Fragmentos, m/z , característicos observados en el MS del compuesto **21**.

Paralelamente, se ensayó la síntesis de *tris*-arilguanidinas [carboxamidinas] utilizando la tiourea **6** y *p*-aminofenol como reactivos, según se muestra en el siguiente esquema:



En este caso se observó, una vez más, ausencia de reacción posiblemente, de acuerdo a los productos aislados, como resultado de la oxidación a nivel del OH del fenol. La formación de la quinona causaría una disminución de la densidad electrónica a nivel del grupo amino, ahora imino, reduciendo de este modo la nucleofilia de la molécula a ese nivel. A fin de racionalizar este resultado se realizó un cálculo a nivel DFT (B3LYP/6.31G*) del potencial electrostático molecular de ambas entidades (Figura 3.8, página siguiente) donde se observa una clara disminución de la densidad electrónica a nivel del nitrógeno en el derivado quinona.

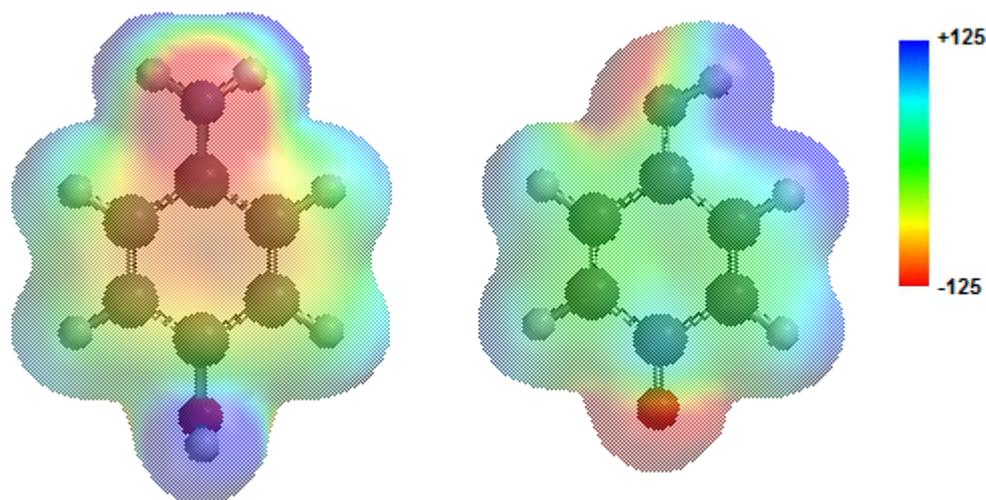
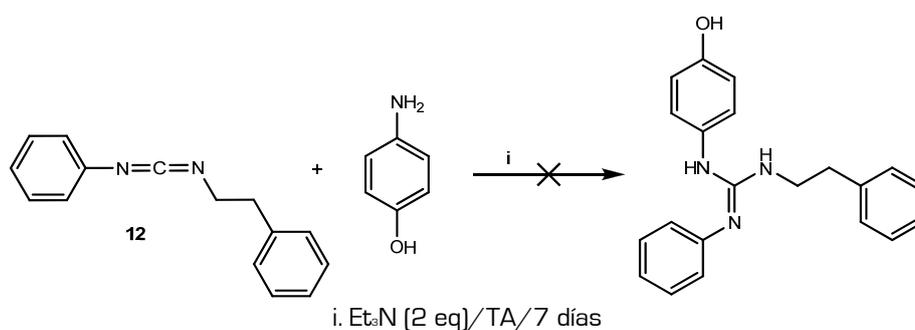
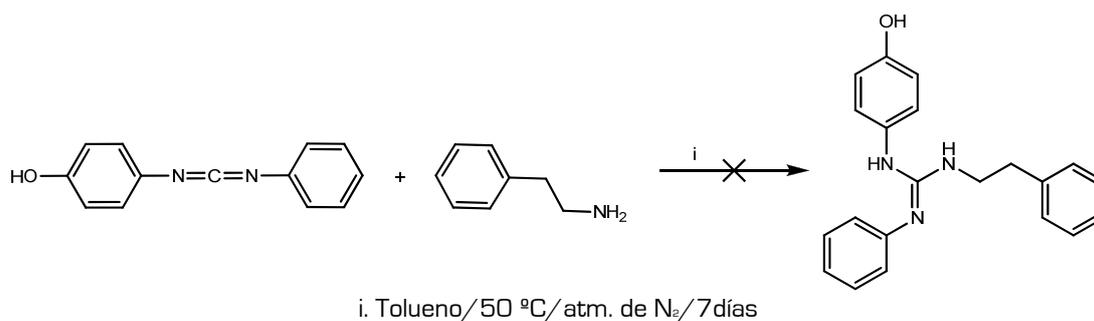


Figura 3.8. Potencial electrostático molecular (PEM) mapeado sobre una superficie de densidad electrónica de 0.005 au. La escala de colores del rojo al azul representa valores de PEM que van de -125 a +125 kJ/mol.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se ensayaron dos rutas sintéticas alternativas con el fin de obtener los compuestos deseados. En una de la rutas, y teniendo en cuenta consideraciones mecanísticas [Figura 3.6, página 63], la carbodiimida **12** se hizo reaccionar con *p*-aminofenol según se muestra en el Esquema 1. En la otra ruta sintética ensayada la carbodiimida **16** se hizo reaccionar con fenetilamina en las condiciones que se presentan en el Esquema 2 y que están descritas en la literatura⁸ para la obtención de carboxamidinas utilizando aminas secundarias.



Esquema 1



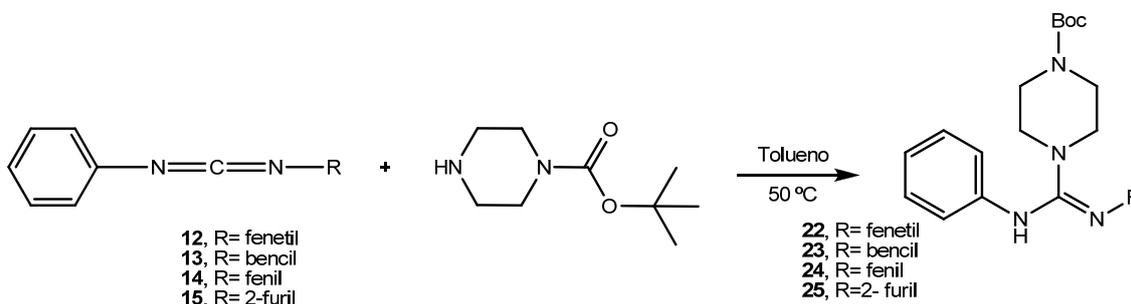
Esquema 2

Ninguna de las dos rutas ensayadas permitió la obtención del producto deseado observándose en ambos casos ausencia de reacción. Este resultado, junto con los datos obtenidos en el apartado siguiente (3.7.2), condujo a la conclusión que, independientemente de la oxidación del reactivo, *p*-aminofenol, observada en los ensayos anteriores, la baja nucleofilia de las aminas primarias utilizadas no permitió la obtención de los productos deseados.

3.7.2. Síntesis de carboxamidas a partir de aminas secundarias

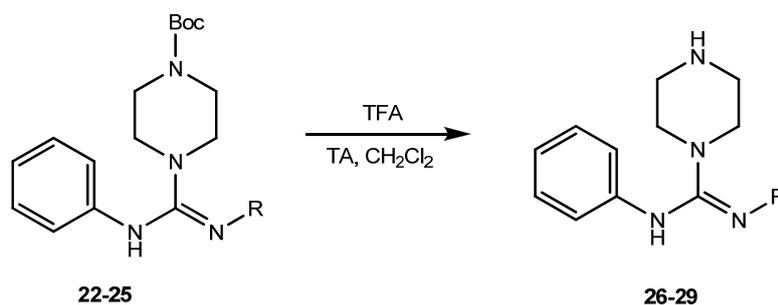
Ante los resultados negativos en la preparación de las carboxamidas deseadas a través de las metodologías descritas en el apartado 3.7.1, se ensayó el procedimiento descrito por Botta *et al.*⁸. En este caso, la síntesis se realizó en dos pasos utilizando una amina secundaria, 1-*tert*-butoxicarbonilpiperazina. El producto resultante de este procedimiento debió ser desprotegido para su utilización en posteriores reacciones de alquilación (ver apartado 3.8.2, página 72).

1. Síntesis de carboxamidas *N*-protegidas con el grupo *tert*-butoxicarbonilo



Las carbodiimidas **12-15** se hicieron reaccionar con 1-*tert*-butoxicarbonilpiperazina durante 3-5 h a 50 °C utilizando tolueno como disolvente. En todos los casos la reacción fue completa y el producto esperado se obtuvo libre de impurezas (determinado por CCF) por lo que se utilizó en la siguiente reacción sin purificación.

2. Desprotección de las carboxamidinas protegidas



Los derivados **22-25** fueron desprotegidos mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) a temperatura ambiente utilizando CH_2Cl_2 como disolvente. Los productos esperados, **26-29**, se obtuvieron con excelentes rendimientos (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Síntesis de carboxamidinas.

Comp.	R	Tiempo (h)	R (%)
26		1.5	78
27		2.0	95
28		5.0	78
29		4.0	87

Los derivados **26-29** fueron caracterizados mediante espectroscopia de RMN (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HMQC y HMBC). En la Figura 3.9, página siguiente, se presenta como ejemplo el espectro ^1H -RMN del derivado **26**, donde se observa claramente que el producto obtenido es el esperado dado que a 2.76 ppm aparece un multiplete que integra seis protones, el cual incluye los protones piperazínicos **l** y **m** y los protones metilénicos **b**, un triplete a 3.10 ppm que integra cuatro protones y corresponde a los protones piperazínicos **n** y **o**, un triplete a 3.30 ppm que corresponde a los protones metilénicos **a** y protones con desplazamientos entre 6.76 y 7.26 ppm correspondientes a los protones aromáticos de los grupos fenilo y fenetilo presentes en la molécula.

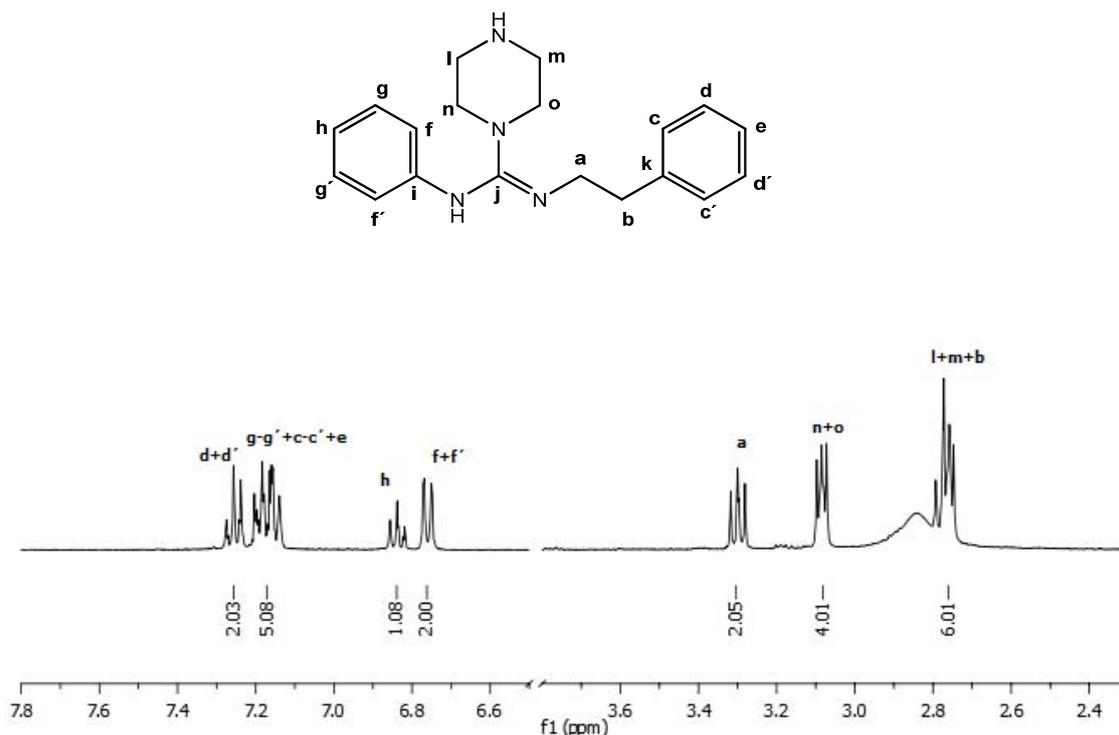


Figura 3.9. Espectro ^1H -RMN del derivado **26** en acetona- d_6 a 303 K.

La asignación de los carbonos se realizó en base a experimentos HMQC y HMBC (Figura 3.10a y b, página siguiente). El espectro HMBC del derivado **26** (Figura 3.10b), a través de la correlación entre los protones piperazínicos **n** y **o** y los protones metilénicos **a** a tres enlaces, permite asignar el carbono amidínico **j** (155 ppm), mientras que, por la correlación entre los protones metilénicos **b**, a dos enlaces, se identifica el carbono cuaternario **k** y, por correlación a tres enlaces, los carbonos **c-c'**. Por otra parte, con este experimento se corroboró el tautómero presente en el agrupamiento guanidina, ya que los protones **g-g'** se correlacionan a tres enlaces con el carbono cuaternario **i** ubicado a 150 ppm, cuyo desplazamiento químico al igual que el de los protones **f-f'** (6.76 ppm) y **h** (6.84 ppm) son característicos de dichos átomos cuando el grupo fenilo está unido a un nitrógeno amínico¹⁶.

¹⁶ Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Afholter, C.; Herrera, A.; Martínez, R. Determinación estructural de compuestos orgánicos. 2005. 4^{ta} Ed., Masson S.A., Barcelona.

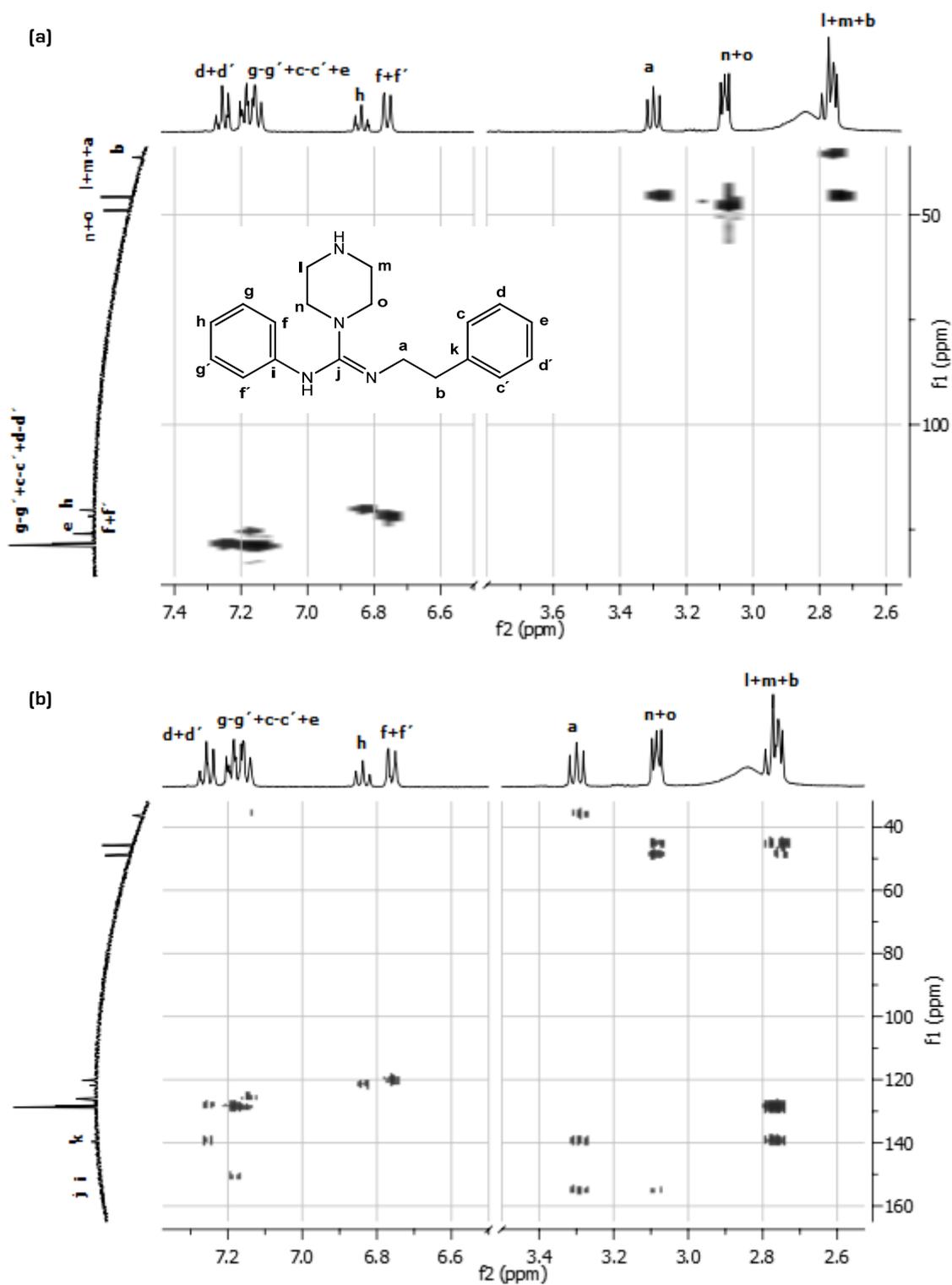
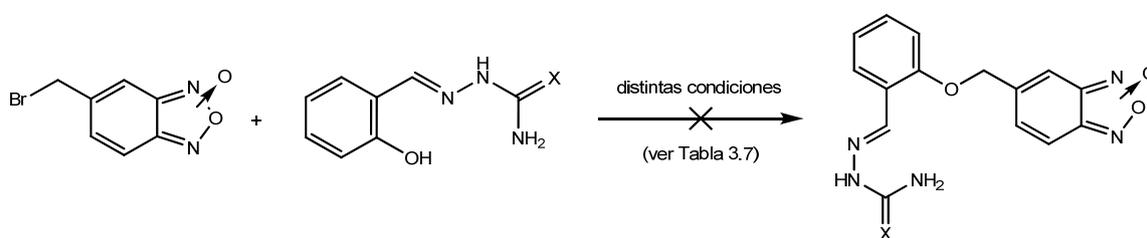


Figura 3.10. a. Espectro HMQC del derivado **26** donde se asignan los carbonos no cuaternarios. b. Espectro HMBC del derivado **26** donde se asignan los carbonos no cuaternarios y los distintos protones presentes en la molécula en acetona- d_6 a 303 K.

3.8. Síntesis de compuestos híbridos derivados del sistema benzofuroxano

3.8.1 Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona (*Serie A*)

Para la síntesis de los compuestos híbridos se llevaron a cabo dos aproximaciones sintéticas. La primera (Esquema 3) involucra la reacción entre 5(6)-bromometilbenzofuroxano y las hidrazonas **3** y **4** (página 52). En la segunda aproximación (Esquema 4, página siguiente), los correspondientes reactivos carbonílicos **17-20** (página 60) se hicieron reaccionar con aminoguanidina, la tiosemicarbazida adecuada o semicarbazida en una reacción de condensación clásica. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3.7 y 3.8 (página siguiente).



Esquema 3

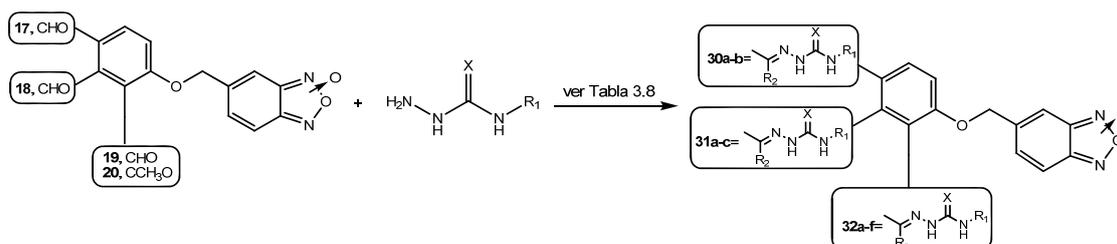
Tabla 3.7. Intento de síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano según el Esquema 3.

X	Condiciones	R [%]
O	K ₂ CO ₃ [2 eq]/KI [0.05 eq]/18-crown-6 [0.01 eq]/acetona/reflujo/12 h	Trazas
	K ₂ CO ₃ [1 eq]/KI [0.05 eq]/DMF/reflujo/5 h	Descomposición
	K ₂ CO ₃ [4 eq]/TBAI [0.1 eq]/MW, 300 W/40 s	No hay reacción
NH	K ₂ CO ₃ [2 eq]/KI [0.05 eq]/18-crown-6 [0.01 eq]/acetona/TA/48 h	Descomposición

El procedimiento de preparación de los derivados híbridos según el Esquema 3 no condujo a los productos de interés o los mismos se obtuvieron con rendimientos muy bajos. Como alternativa, se planteó el procedimiento inverso (Esquema 4, página siguiente) donde en la primera etapa se prepara el derivado carbonílico, seguido de una reacción de condensación con la hidrazida correspondiente.

Para la síntesis de los derivados sustituidos en posición *orto* **32a** y **32b** (Tabla 3.8, página siguiente) se ensayaron diferentes condiciones. Cabe destacar que la reacción en presencia de KOH/EtOH/H₂O está descrita para la síntesis de *o*-quinonadioximas

a partir de benzofuroxanos¹⁷. En este caso, la electrofilia del aldehído dirigió la reacción hacia la generación de los compuestos deseados como productos principales pero también se observaron los análogos deoxigenados (benzofurazanos) como productos secundarios. A fin de evitar la reducción de la funcionalidad *N*-óxido, se ensayó la reacción en etanol seco en ausencia de base. Esta ruta sintética permitió obtener los productos deseados con rendimientos variables, de muy buenos a excelentes, dependiendo del producto.



Esquema 4

Tabla 3.8. Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano según el Esquema 4.

Comp.	X	R ₂	R ₁	Condiciones	R [%]
30a	S	H	C ₆ H ₅	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /48 h	51
30b	S	H	CH ₂ CH=CH ₂	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /48 h	73
31a	NH	H	NH ₂	EtOH seco/AcONa [2eq]/TA/N ₂ /24 h	85
31b	S	H	NH ₂	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /24 h	91
31c	S	H	CH ₂ CH=CH ₂	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /48 h	80
32a	O	H	NH ₂	AcONa/H ₂ O/EtOH/TA/5 días	Trazas
				K ₂ CO ₃ [0.7 eq]/MW, 300 W/2 min	Ausencia de reacción
				K ₂ CO ₃ [4.8 eq]/TBAI [0.1 eq]/THF [0.05 mL]/MW, 300 W/2.20 min	Trazas
				KOH [3 eq]/ EtOH/ H ₂ O/ 60 °C/8 h	56
				EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /48 h	82
32b	NH	H	NH ₂	K ₂ CO ₃ [4.8 eq]/TBAI [0.1 eq]/THF [0.1 mL]/MW, 300 W/2.20 min	Trazas
				KOH [3 eq]/ EtOH/ H ₂ O/ 60 °C/5 h	40
32c	NH	CH ₃	NH ₂	EtOH seco/AcONa [2eq]/TA/N ₂ /24 h	77
				EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /72 h	67
32d	S	H	NH ₂	EtOH seco/TA/N ₂ /24 h	79
32e	S	H	C ₆ H ₅	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /72 h	84
32f	S	H	CH ₂ CH=CH ₂	EtOH seco/ácido acético [0.1%]/TA/N ₂ /72 h	73

La identidad y pureza de todos los derivados sintetizados se estudió mediante RMN (experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMQC y HMBC), IR y MS.

⁽¹⁷⁾Ghosh, P.B., Whitehouse, M.W. Potential antileukemic and immunosuppressive drugs. Preparation and *in vitro* pharmacological activity of some benzo-2,1,3-oxadiazoles (benzofurazans) and their *N*-óxidos (Benzofuroxans). *J. Med. Chem.*, **1968**, *11*, 305-311.

En la Figura 3.11, se muestra el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del derivado **31b** donde las señales correspondientes a los protones metilénicos (**g**, 5.24 ppm) y al protón ilidénico (**h**, 8.03 ppm) así como la señal ancha (3H, 7.45-7.85 ppm) debida al tautomerismo del sistema benzofuroxano confirman la reacción de condensación entre éste y la tiosemicarbazida. En todos los casos, la aparición en el espectro de una única señal asociada al protón ilidénico indica la presencia de sólo uno de los isómeros geométricos [*E* o *Z*]. Por otra parte, la presencia de tres señales a 8.09, 8.27 y 11.50 ppm que integran un protón indica que el derivado adopta la forma tautomérica que se muestra en dicha figura.

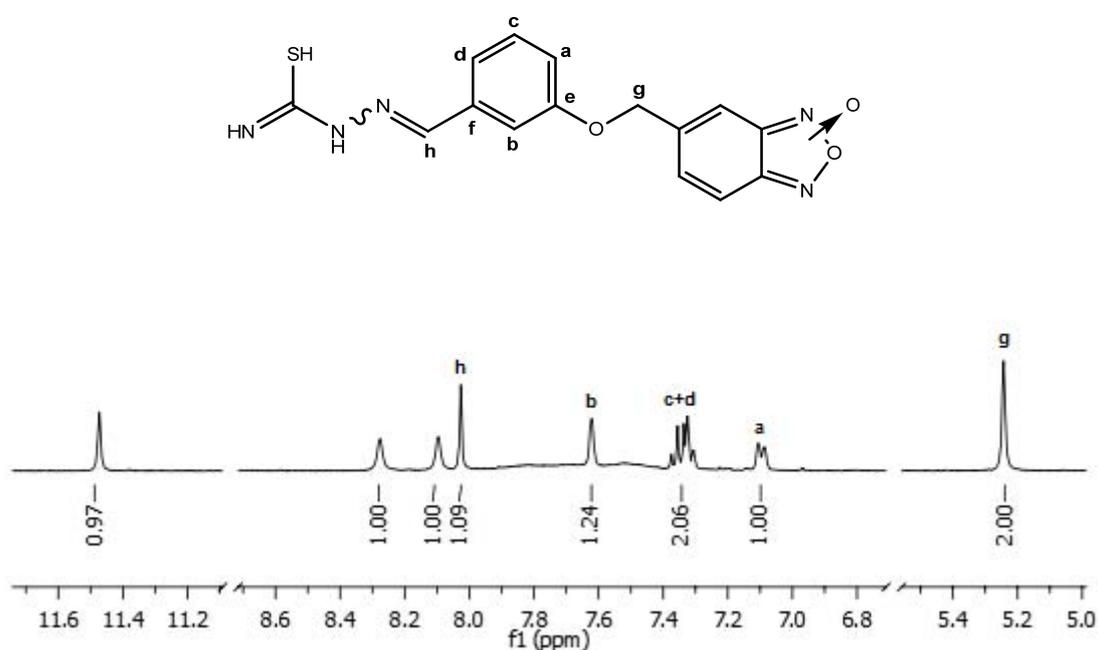


Figura 3.11. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ del derivado **31b** en $\text{DMSO-}d_6$ a 303 K.

3.8.2. Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos carboxamidina [Serie II]

La reacción de alquilación de las carboxamidinas **26-29** [página 67] utilizando 5(6)-bromometilbenzofuroxano se llevó a cabo según las condiciones que se muestran en la Tabla 3.9, página siguiente.

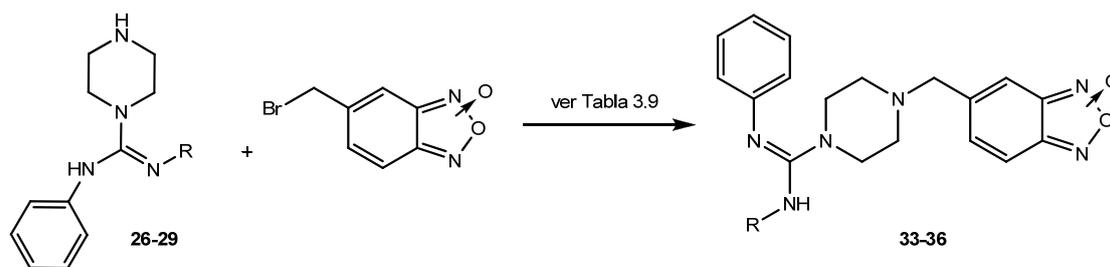


Tabla 3.9. Síntesis de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos piperazinilcarboxamidina.

Comp.	R	Condiciones	R [%]
33		K ₂ CO ₃ [0.5 eq]/THF/reflujo/2.5 h	13
		CH ₃ CN/TA/24 h	77
34		K ₂ CO ₃ [0.5 eq]/THF/reflujo/4.5 h	9
		CH ₃ CN/TA/24 h	98
35		CH ₃ CN/TA/24 h	42
36		K ₂ CO ₃ [0.5 eq]/THF/reflujo/2.5 h	14
		CH ₃ CN/TA/24 h	52

Cuando esta reacción se realizó a reflujo en presencia de base según se describe en la literatura¹⁸ se obtuvieron rendimientos muy bajos, observándose la presencia de varios productos secundarios. La reacción en ausencia de base, utilizando exceso de carboxamidina (1.4 eq), CH₃CN como disolvente y a temperatura ambiente permitió la obtención de los productos deseados con muy buenos rendimientos y mínima presencia de productos secundarios.

La identidad y pureza de los derivados **33-36** se estudió mediante espectroscopia de RMN (experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMQC y HMBC), IR y MS.

En la Figura 3.12, página siguiente, se presenta el espectro ¹H-RMN del derivado **33** donde se observan claramente las señales correspondientes a los protones del sustituyente piperazinilcarboxamidina (discutidas en el apartado 3.7.2, páginas 66-68) y la señal correspondiente a los protones metilénicos **p** a 3.65 ppm, que junto a la señal ancha entre 7.19 y 7.50 ppm correspondiente a los protones del sistema benzofuroxano confirman que efectivamente ocurrió la reacción de alquilación.

¹⁸⁾ Bollini, M.; Casal, J.J.; Bruno, A.M. Design, synthesis and antitumor activity of new bis-aminomethylnaphthalenes. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8003-8010.

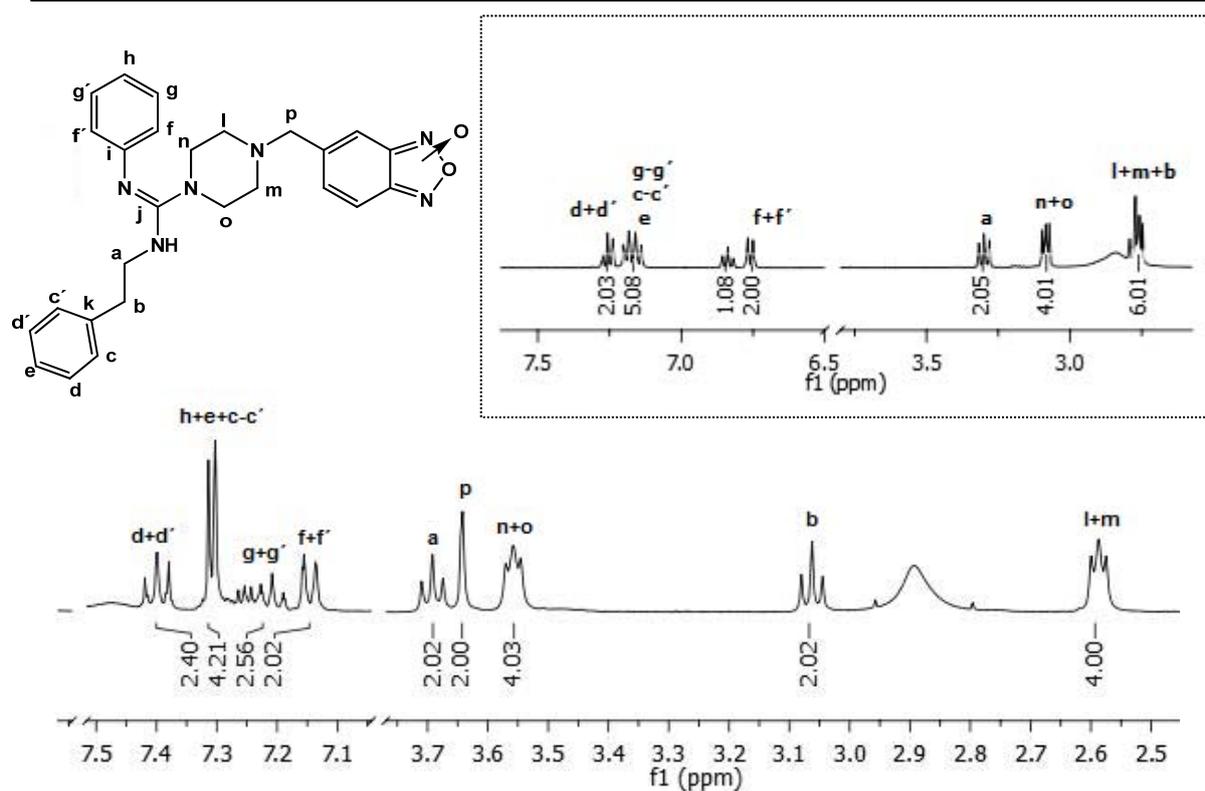


Figura 3.12. Espectro ¹H-RMN del derivado **33** en acetona-*d*₆ a 303 K. **Inserto:** Espectro ¹H-RMN del derivado **26** en acetona-*d*₆ a 303 K.

Al comparar el espectro del compuesto **33** con el del reactivo de partida **26** (Inserto en Figura 3.12) se observan cambios en el desplazamiento químico de los protones del grupo piperazinilcarboxamidina. En el compuesto **33** los protones piperazínicos **l** y **m** presentan un desplazamiento químico menor que en el compuesto **26** (2.65 y 2.80 ppm, respectivamente) debido al apantallamiento causado por el sustituyente metilbenzofuroxano a nivel del nitrógeno N-1 de la piperazina. Por otra parte, los protones de la cadena metilénica del sustituyente fenetilo, **a** y **b**, experimentan un fuerte desapantallamiento en el derivado **33** observándose que las señales correspondientes varían de 3.30/2.80 ppm en **26** a 3.70/3.10 ppm en **33**. Esta diferencia en el desplazamiento químico de dichos protones estaría indicando un cambio de conformación de este agrupamiento una vez que ocurre la reacción de alquilación. Con el fin de racionalizar esta propuesta se realizaron cálculos teóricos de optimización de geometría de ambas moléculas en acetona a nivel DFT [B3LYP/6.31G*] utilizando el método continuo de solvatación SMB. Este estudio mostró que en el compuesto **26** la estructura más estable es aquella que adopta la conformación que se presenta en la Figura 3.13a (página siguiente), donde el grupo fenilo (no perteneciente al sustituyente fenetilo) se ubica casi paralelo al plano del anillo piperazínico mientras que en el derivado **33** ambos grupos fenilo establecen

entre sí interacciones hidrofóbicas del tipo apilamiento π , adoptando la molécula la conformación que se muestra en la Figura 3.13b y que podría explicar la diferencia en el desplazamiento químico de los protones **a** y **b** en ambas entidades.

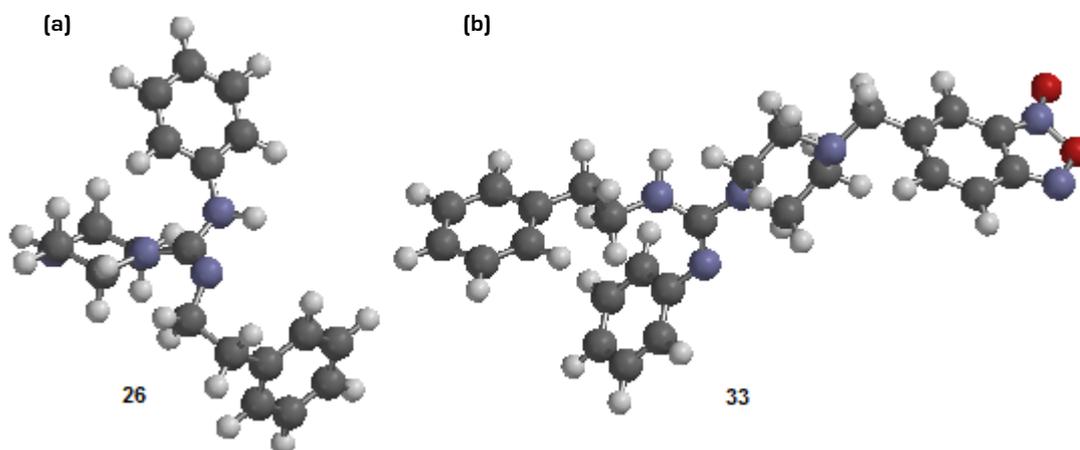


Figura 3.13. a. Conformación más estable del derivado **26** en acetona modelado a nivel DFT (B3LYP/6-31G*) utilizando el método de solvatación SMB. b. Conformación más estable del derivado **33** obtenida al mismo nivel de cálculo.

Experimentos NOE diferencial (NOEdiff) confirman la estructura propuesta, a partir de los cálculos teóricos, para el derivado **33**. Al irradiar la muestra a la frecuencia de resonancia de los protones piperazínicos **n** y **o** no se observa efecto NOE sobre protones aromáticos o metilénicos del agrupamiento fenetilo (Figura 3.14a). Sin embargo, cuando la muestra es irradiada a la frecuencia de resonancia de los protones aromáticos **d-d'** correspondientes al sustituyente fenetilo se evidencia un claro efecto NOE sobre los protones fenílicos **f-f'** y **g-g'** (Figura 3.14b)

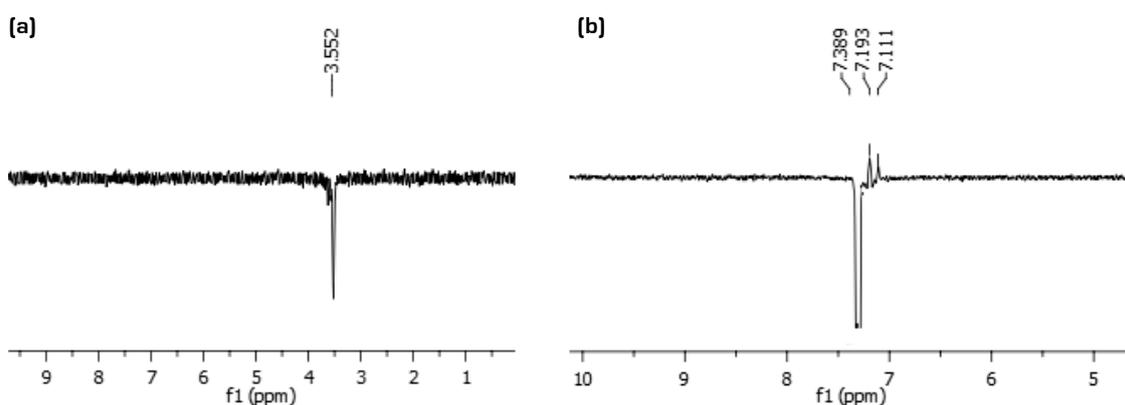


Figura 3.14. a. Espectro NOEdiff del derivado **33** donde no se observa efecto NOE al irradiar los protones piperazínicos **n** y **o**. b. Espectro NOEdiff del derivado **33** donde se observa efecto NOE sobre los protones fenílicos **f-f'** y **g-g'** al irradiar los protones del grupo fenetilo **d-d'**. Espectros realizados en acetona- d_6 a 303 K, tiempo de mezclado= 250 ms.

Cabe destacar que la variación en el desplazamiento de los protones metilénicos **a** junto a la aparición de los protones aromáticos **f-f'** y **h** a desplazamientos mayores

(7.20 y 7.30 ppm), característicos de dichos protones cuando un grupo fenilo está unido a un nitrógeno imínico¹⁷, indican que en el derivado **33** el doble enlace del agrupamiento guanidina cambia su posición ubicándose entre el carbono amidínico *j* y el nitrógeno amidínico que sustenta el grupo fenilo tal como se muestra en la Figura 3.15a.

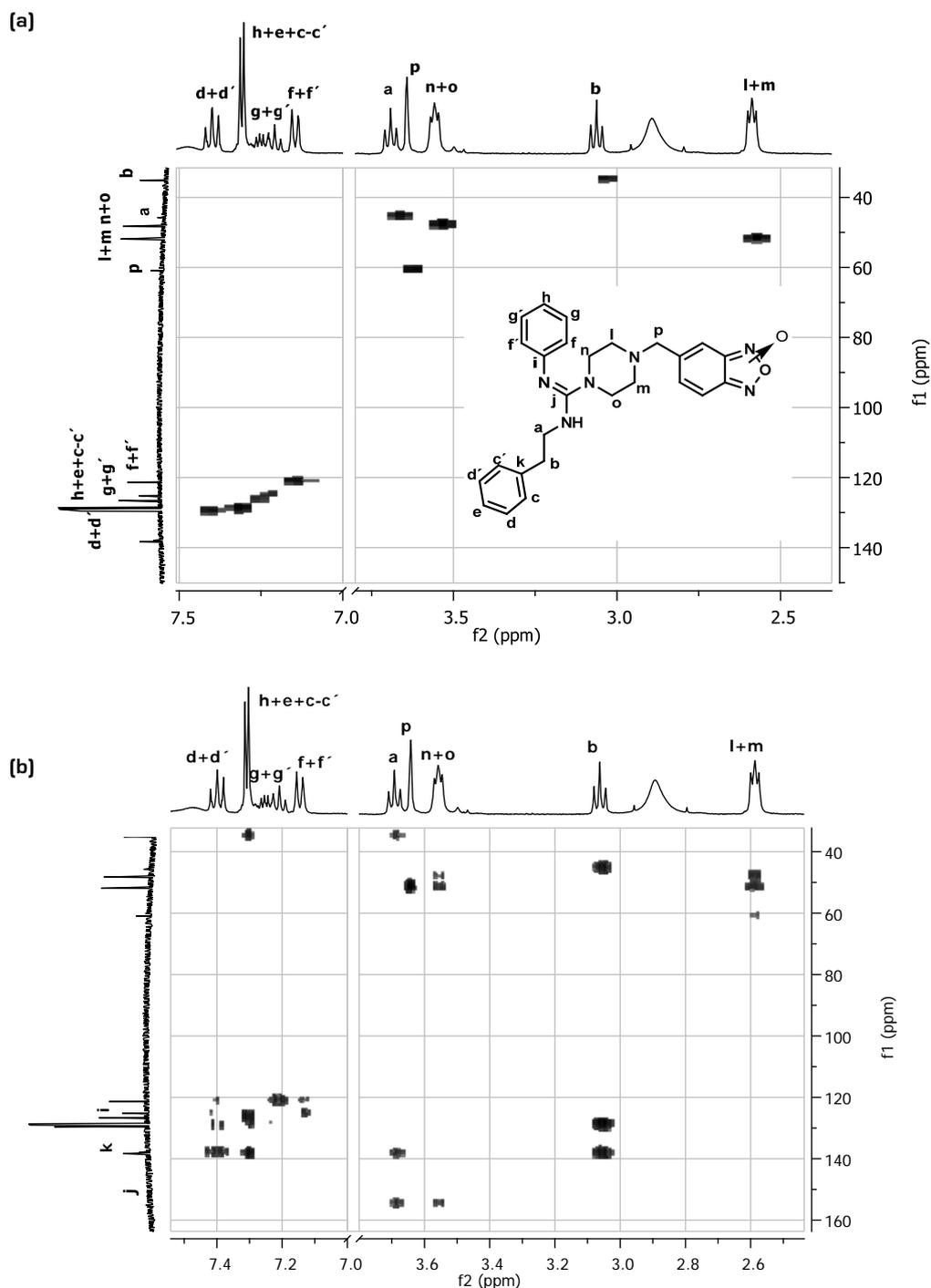


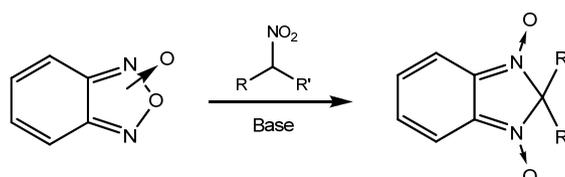
Figura 3.15. a. Espectro HMQC del derivado **33** donde se asignan los carbonos no cuaternarios. b. Espectro HMBC del derivado **33** donde se asignan los carbonos no cuaternarios y los distintos protones presentes en la molécula. Espectros realizados en acetona-*d*₆ a 303 K.

El espectro HMBC del derivado **33** (Figura 3.15b, página anterior) muestra que los protones metilénicos **b** se correlacionan a dos enlaces con el carbono cuaternario **k** (138 ppm) y a tres enlaces con los protones aromáticos **c-c'**. Los protones piperazínicos **n** y **o** y los protones metilénicos **a** se correlacionan a tres enlaces con el carbono amidínico **j** (155 ppm).

El experimento HMBC permitió además confirmar la posición del doble enlace del agrupamiento guanidina estimada a partir del espectro $^1\text{H-RMN}$, ya que los protones **f-f'** se correlacionan a dos enlaces con el carbono cuaternario **i** ubicado a 125 ppm (*vs* 150 ppm en el derivado **26**), cuyo desplazamiento químico al igual que el del carbono **h** (Figura 3.15a), que aparece en el entorno de 129 ppm (*vs* 120 ppm en el derivado **26**), son característicos de dichos átomos cuando el grupo fenilo está unido a un nitrógeno imínico¹⁷.

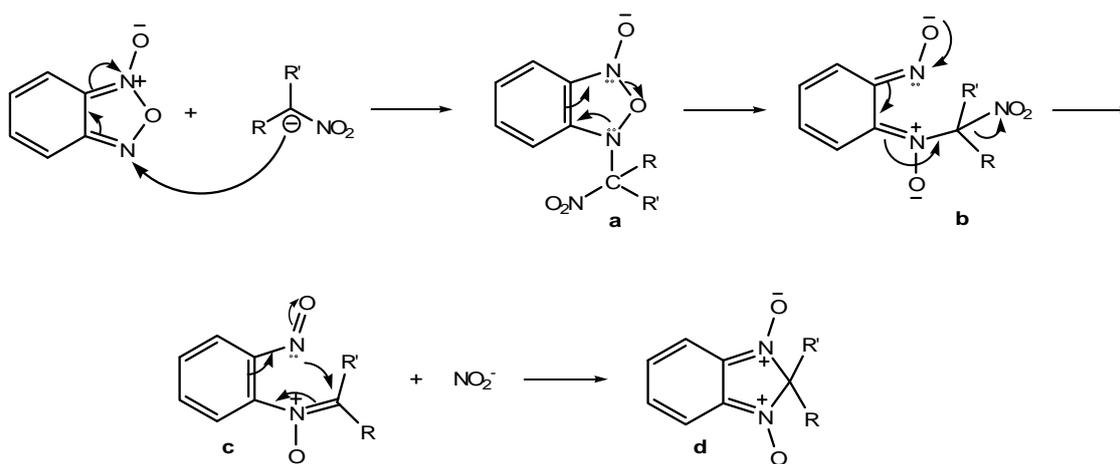
3.9. Síntesis de compuestos híbridos derivados del sistema 1,3-dióxido de benzimidazol

La síntesis de derivados de 1,3-dióxido de 2,2-dialquil-2H-benzimidazol a partir de benzofuroxanos y nitroalcanos secundarios está descrita en la literatura desde el año 1972¹⁹ y ocurre de acuerdo al esquema que se muestra a continuación:



Ha sido propuesto²⁰ que la reacción transcurre de acuerdo al mecanismo que se muestra en la página siguiente:

¹⁹ El-Haj, M.J.A. Novel síntesis of 1-hydroxi-1H-benzimidazole 3-oxides and 2,2-dialkyl-2H-benzimidazole 1,3-dioxides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2519-2520.



El carbanión reaccionaría con el nitrógeno N-3 del benzofuroxano dando lugar al intermedio **a**, el cual puede transformarse en **b**. La eliminación de NO_2^- daría lugar al intermedio **c**, el cual a través de un ataque nucleofílico intramolecular sobre el electrófilo tipo iminio rinde el producto final, **d**.

3.9.1 Síntesis de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de 2H-benzimidazol conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona [Serie I]

La síntesis se llevó a cabo en las condiciones previamente descritas por nuestro grupo para la síntesis de di-*N*-óxidos de benzimidazol, con algunas modificaciones²⁰. Los benzofuroxanos correspondientes se hicieron reaccionar con 2-nitropropano en THF a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N_2 , utilizando piperidina como base. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.10, página siguiente.

Todos los derivados fueron obtenidos con rendimientos entre bajos y moderados, a excepción de las amidinohidrazonas **38a** y **40a**, que no pudieron ser aisladas en ninguna de las condiciones ensayadas, observándose descomposición durante la purificación por CCF preparativa, tanto en sílica como en alúmina.

⁽²⁰⁾ Merlino, A.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; González, M. 2-Benzyl-2-methyl-2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: Spectroscopic and theoretical study. *Spectrochimica Acta A* **2007**, 67, 540-549.

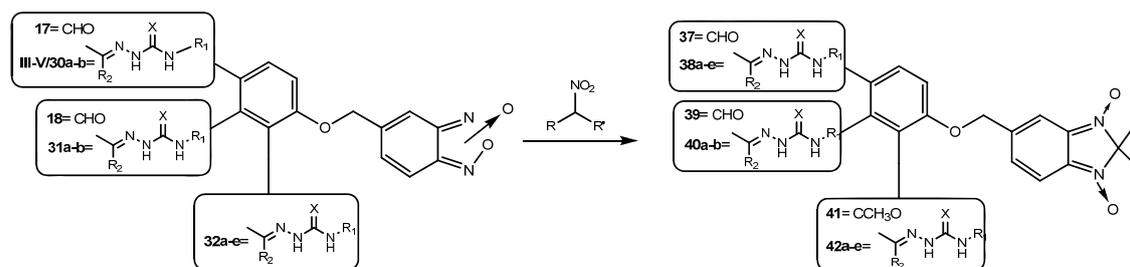


Tabla 3.10. Síntesis de derivados de 1,3-dióxido de 2,2-dimetil-2H/benzimidazol.

Comp.	X	R ₂	R ₁	Condiciones	R (%) ^a
37	-	-	-	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/ 48 h	15
38a	NH	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	Descomposición
38b	S	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/28 h	34
38c	O	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	6
38d	S	H	C ₆ H ₅	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/48 h	13
38e	S	H	CH ₂ CH=CH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	31
39	-	-	-	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	7
40a	NH	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	Descomposición
40b	S	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/48 h	20
41	-	-	-	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/24 h	8
42a	NH	H	NH ₂	2-nitropropano [2.4 eq]/ piperidina [2.4 eq]/48 h	22
42b	O	H	NH ₂	2-nitropropano [2.4 eq]/ piperidina [2.4 eq]/ 48 h	10
42c	S	H	NH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/18 h	30
42d	S	H	C ₆ H ₅	2-nitropropano [2.4 eq]/ piperidina [2.4 eq]/48 h	14
42e	S	H	CH ₂ CH=CH ₂	2-nitropropano [1.2 eq]/ piperidina [1.2 eq]/72 h	20

^aDespués de separación cromatográfica.

En la Figura 3.16, página siguiente, se muestra el espectro de ¹H-RMN del derivado **40b**. En el espectro se observa un singulete a 1.62 ppm que integra 6 protones, correspondiente a los protones metílicos **p+p'**. Este singulete junto a las señales correspondientes a los protones del anillo benzo del sistema benzimidazol (**l, m y k** a 7.08, 7.23 y 7.30 ppm, respectivamente), indican que efectivamente se obtuvo el producto esperado.

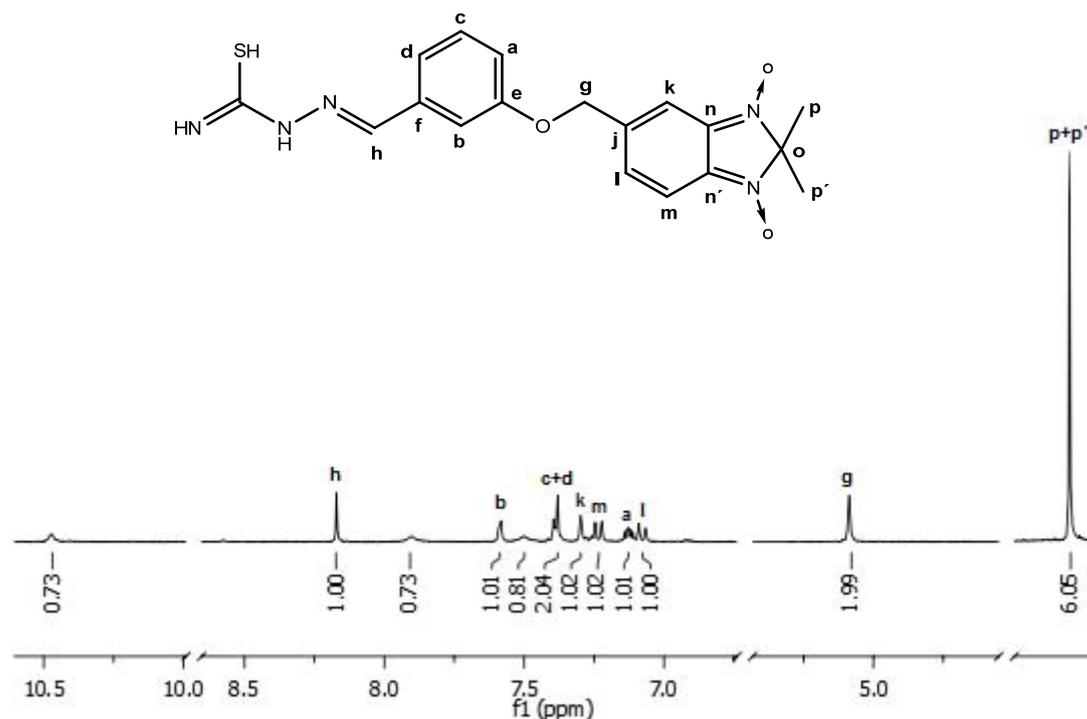


Figura 3.16. Espectro de ^1H -RMN del derivado **40b** en acetona- d_6 a 303 K.

3.9.2. Síntesis de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de 2H-benzimidazolo conteniendo agrupamientos carboxamida (*Serie II*)

Para la síntesis de estos derivados se utilizaron las condiciones mencionadas en el apartado anterior, utilizándose en todos los casos 1.2 equivalentes de 2-nitropropano y 1.2 equivalentes de piperidina. Los resultados se presentan en la Tabla 3.11, página siguiente.

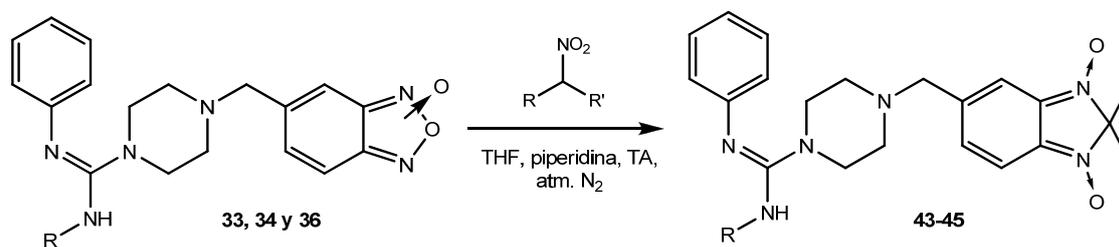
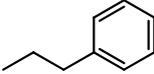
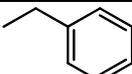
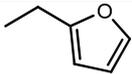


Tabla 3.11. Síntesis de compuestos híbridos derivados de 1,3-dioxido de 2*H*-benzimidazol conteniendo agrupamientos piperazinilcarboxamida.

Comp.	R	R [%]
43		20
44		34
45		40

En la Figura 3.17 se muestra el espectro de ^1H -RMN del derivado **43**. Al igual que ocurre en los benzofuroxanos padre **33-36**, el desplazamiento químico de los protones **a**, **f-f'** y **h** (3.60, 7.17 y 7.23 ppm, respectivamente) indica que los derivados **43-45**, se encuentran en las condiciones del RMN bajo la forma tautomérica, a nivel del agrupamiento guanidina, que se ejemplifica para el derivado **43**. Interesantemente, es posible observar dos señales a 1.64 y 1.66 ppm que integran tres protones cada una, correspondientes a los protones de los grupos metilos (**v+v'**) unidos al carbono C-2.

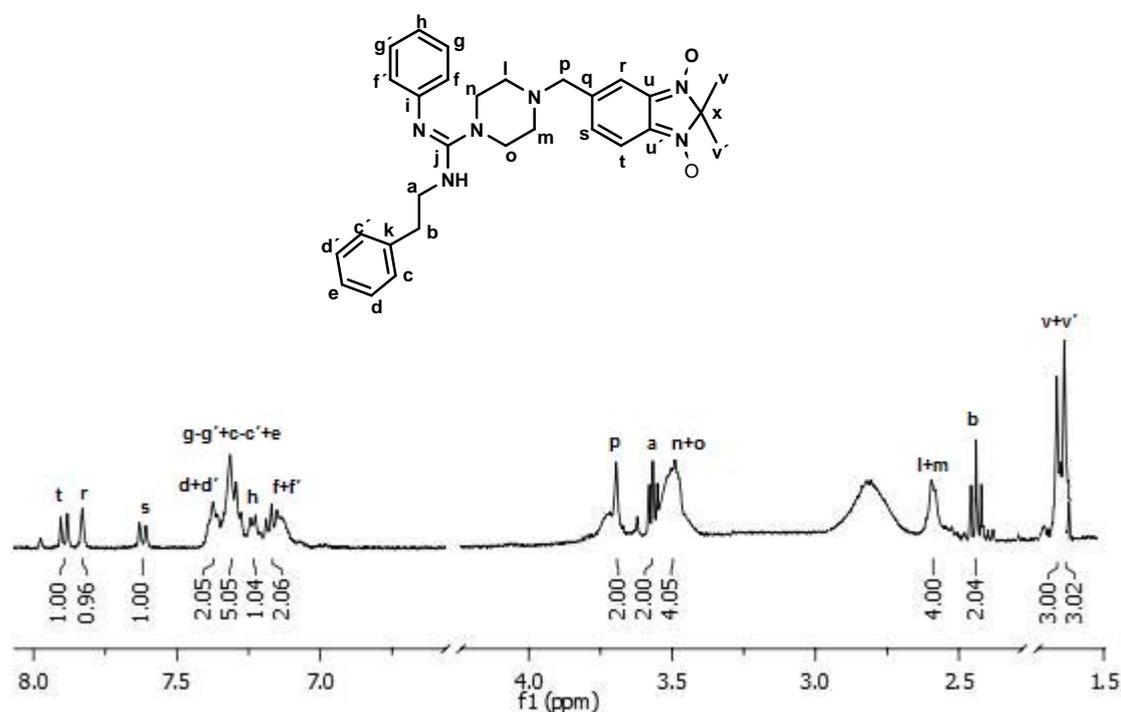


Figura 3.17. Espectro de ^1H -RMN del derivado **43** en acetona- d_6 a 303 K.

La presencia de dos señales asociadas a los protones metílicos, sugiere que este derivado, en las condiciones del experimento, adopta una conformación tal que

conduce a la pérdida de equivalencia de dichos protones. A fin de confirmar este supuesto, se realizaron cálculos de optimización de geometría en acetona del derivado **43** y del derivado **45**, el cual presenta una única señal asociada a los protones metílicos, a fin de comparar el conformero más estable en ambas moléculas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que en ambos derivados el conformero más estable es el que presenta apilamiento entre los grupos aromáticos (ejemplificado para el derivado **45** en la Figura 3.18b) resultado de las interacciones hidrofóbicas π - π (fenómeno descrito anteriormente en las páginas 74-75). Sin embargo, para el derivado **43**, la diferencia de energía entre el conformero que presenta los grupos fenilos apilados y la conformación donde el fenilo se apila al ciclo de piperazina (como se muestra en la Figura 3.18a) es de tan sólo 4.4 kcal/mol, mientras que para el derivado **45** la misma diferencia es de 6.6 kcal/mol. Esta diferencia de energías, lleva a proponer que en el caso del compuesto **43** la conformación mostrada en la Figura 3.18a podría predominar en las condiciones del experimento.

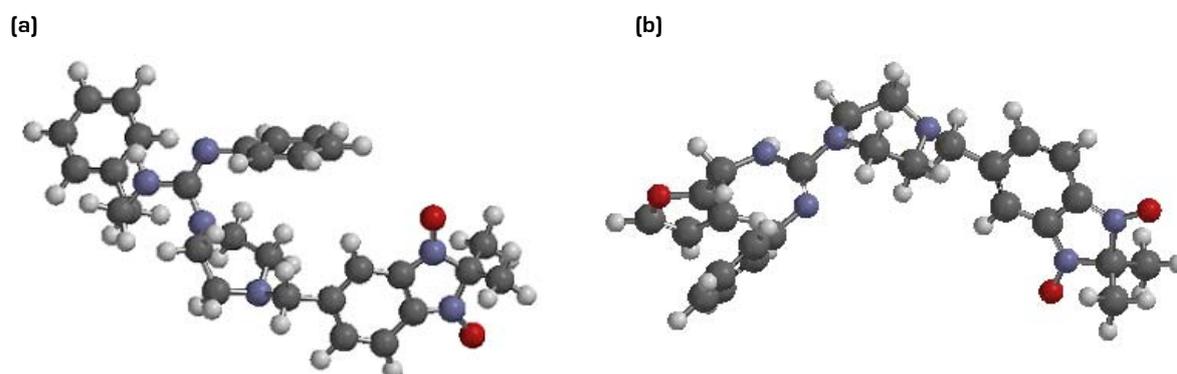


Figura 3.18. a. Conformación del derivado **43** en acetona con el grupo fenilo apilado al ciclo de piperazina obtenido a nivel DFT (B3LYP/6.31G*) utilizando el método de solvatación SMB. b. Conformero más estable del derivado **45** en acetona obtenida al mismo nivel de cálculo.

La disposición espacial que adoptan los anillos aromáticos del agrupamiento piperazinilcarboxamidina en la estructura propuesta para el compuesto **43** (Figura 3.18a) hace que cada uno de los grupos metilo perciba un entorno químico claramente diferente, lo que permite explicar la aparición de dos señales en el espectro de ^1H -RMN. Sin embargo en el conformero más estable del compuesto **45** (Figura 3.18b) los metilos en posición 2 se encuentran lo suficientemente alejados del resto de la molécula (situación de apilamiento de los sistemas aromáticos) lo cual promueve la falta de diferenciación de ambos grupos de protones.

Por otro lado, en este compuesto al igual que en la carboxamidina **26** (Figura 3.12, página 74), los protones metilénicos **a** y **b** aparecen a campos altos, presentando un desplazamiento químico de 3.60/2.40 ppm (Figura 3.17, página 81). Dado que, de acuerdo a los datos teóricos ambos compuestos presentan una conformación similar, apilamiento del grupo fenilo al ciclo de piperazina (Tabla 3.12), podría decirse que el desplazamiento químico de los protones **a** y **b** puede ser indicativo del tipo de conformación que adopta el compuesto en cuanto a estos sustituyentes, hecho altamente relevante cuando se quiera estudiar la interacción de los mismos con la enzima CP (ver Capítulos siguientes).

Tabla 3.12. Desplazamientos químicos de los protones metilénicos del agrupamiento fenilo y conformación obtenida teóricamente para el reactivo **26** y los productos finales **33** y **34**.

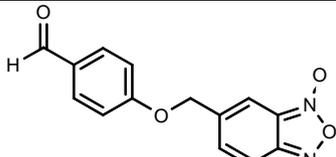
Comp.	Desplazamiento químico (ppm)		Conformación obtenida teóricamente
	Ha	Hb	
26	3.30	2.77	fenilo apilado a la piperazina
33	3.69	3.06	fenilo apilado al grupo fenilo
43	3.57	2.44	fenilo apilado a la piperazina

4. Evaluación Biológica

4.1. Evaluación de la actividad frente a *Trypanosoma cruzi* y estudio de citotoxicidad en células mamíferas

Para todos los derivados de benzofuroxano y 1,3-dióxido 2,2-dimetil-2H-benzimidazol desarrollados en el presente trabajo de tesis se evaluó *in vitro* la capacidad de inhibir el crecimiento de la forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. Como evaluación primaria de actividad tripanosomicida, los compuestos fueron agregados al medio de cultivo a una concentración de 25 μM . Al día 5 post-inoculación se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento con referencia al control negativo [ausencia de fármaco, 100% de crecimiento]. La concentración necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento parasitario (IC_{50}) se determinó para aquellos derivados que presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento mayor a 60 % a 25 μM . Los fármacos antichagásicos de referencia utilizados fueron Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bnz). A fin de evaluar la selectividad hacia los parásitos, se determinó la toxicidad de los productos desarrollados en el presente trabajo de tesis de doctorado sobre células mamíferas, macrófagos murinos J774 y glóbulos rojos humanos (GRH). Los compuestos fueron incorporados al medio de cultivo a una concentración de 100-400 μM en el ensayo en macrófagos y de 50-200 μM en el ensayo de GRH. La toxicidad fue evaluada en referencia al control [ausencia de fármaco] luego de 48 ó 24 h, respectivamente, y expresada como IC_{50} . Como forma de evidenciar la citotoxicidad selectiva hacia *T. cruzi* se determinó el índice de selectividad (IS) que se define como IC_{50} células mamíferas/ IC_{50} *T. cruzi*. Como control positivo en el ensayo de lisis de eritrocitos se utilizó Anfotericina B (Anfo B). Los resultados obtenidos para los derivados de la *Serie I* se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Evaluación biológica de los compuestos híbridos de la *Serie I* frente a *T. cruzi*, macrófagos murinos y glóbulos rojos humanos. Con fines comparativos se presentan los compuestos padres III, IV y V¹.

Comp.	Estructura	IC_{50} (μM)		IC_{50} (μM)		
		Tul2 ^{a,b}	J774 ^c	IS _{MP} ^d	GRH ^e	IS _{GRH} ^f
17		8.7±0.4	60	7.0	<50	<5.7

⁽¹⁾ Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6995-7004.

Tabla 4.1. (Continuación)

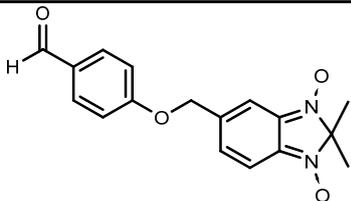
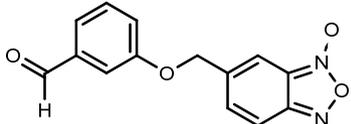
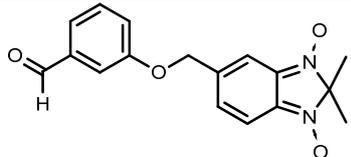
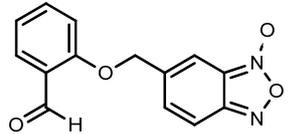
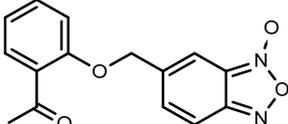
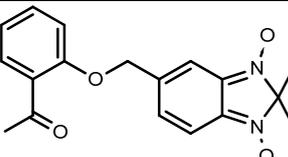
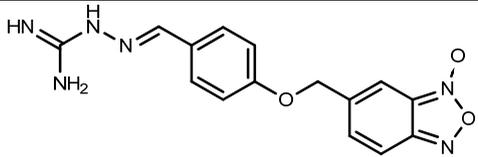
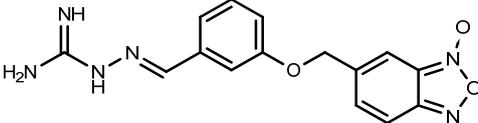
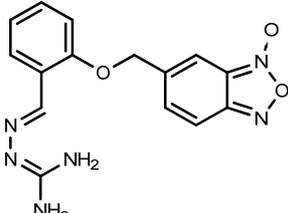
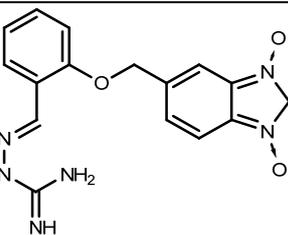
Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		
		Tul2	J774	IS _{MIP}	GRH	IS _{GRH}
37		17±2.0	<100	<5.9	65±3.0	3.8
18		28±2.0	nd ^a	-	50±2.8	1.8
39		>25	nd	-	<50	<2.0
19		6.3±0.2	78±2.0	12	>100 ^a	>16
20		7.0±1.2	nd	-	>200	>21
41		>25	nd	-	<50	<2.0
III		>25 ⁱ	<50 ⁱ	-	>200	-
31a		>25	nd	-	>100 ^a	-
32b		>25	<100	<4.0	58±3.0	<2.3
42a		>25	nd	-	114±3.0	<4.6

Tabla 4.1. (Continuación)

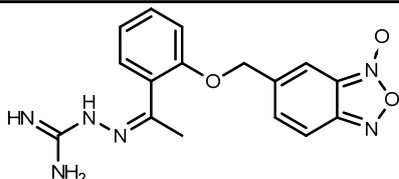
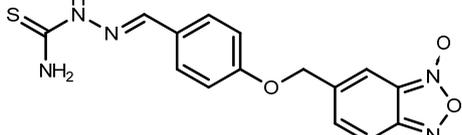
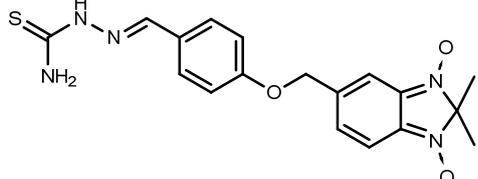
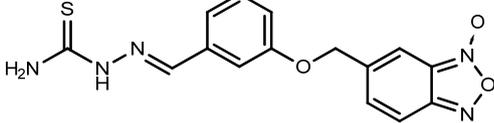
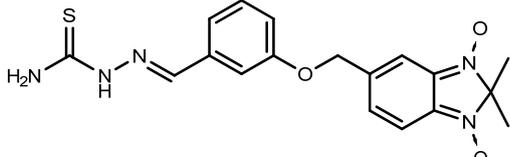
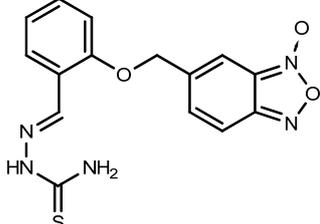
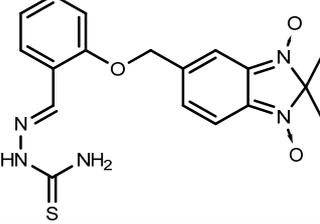
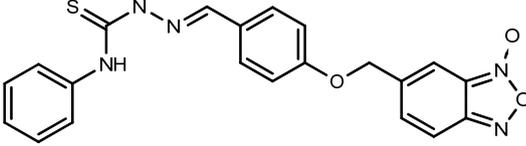
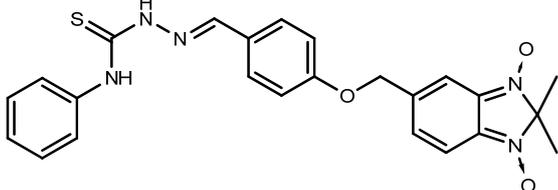
Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μM)	
		Tul2	J774	IS _{MIP}	GRH	IS _{GRH}
32c		17±2.0	nd	-	>200	>12
IV		15 ¹	400 ¹	27	>200	>13
38b		17±0.8	nd	-	ag	-
31b		15±0.4	nd	-	ag	-
40b		24±2.3	nd	-	141±5.0	6.0
32d		>25	<100	<4.0	189±1.0	<7.6
42c		14±2.0	nd	-	ag	-
30a		7.0±0.3	nd	-	ag	-
38d		>25	nd	-	<50	<2.0

Tabla 4.1. (Continuación)

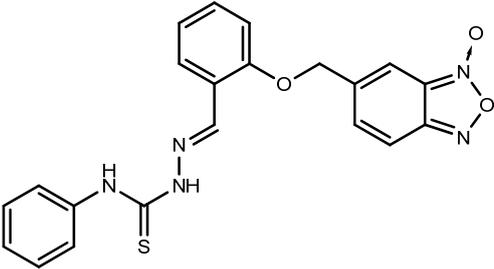
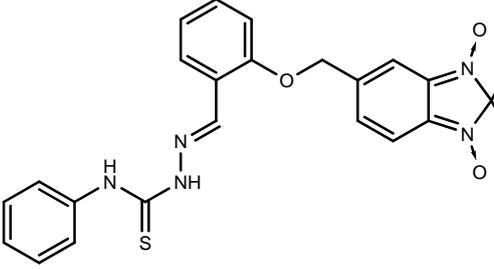
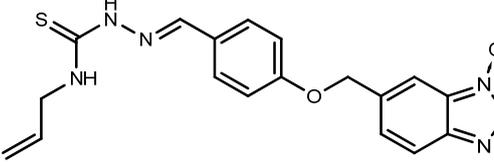
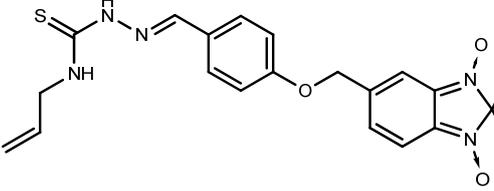
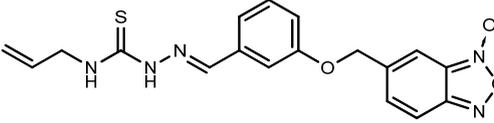
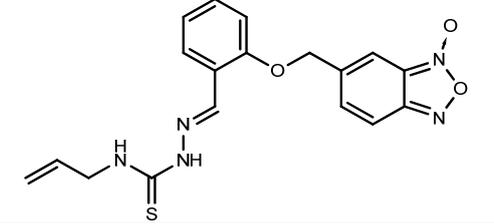
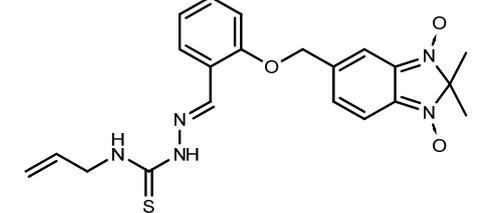
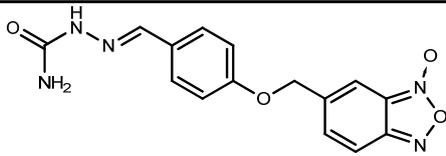
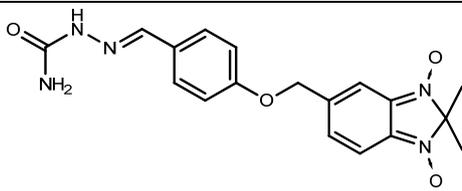
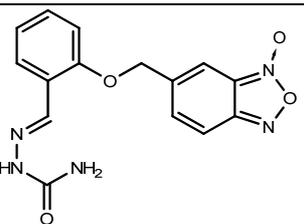
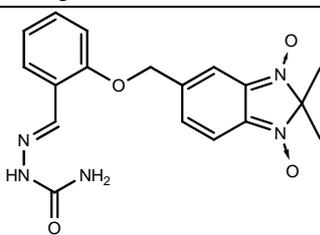
Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		
		Tu12	J774	IS _{MAP}	GRH	IS _{CRHP}
32e		3.6±0.4	>400	>111	>200	>55
42d		7.7±0.3	<100	<13	66±0.8	8.6
30b		>25	nd	-	ag	-
38e		23±1.5	nd	-	>100 ⁿ	>4.3
31c		13±2.1	nd	-	ag	-
32f		23±1.0	138±2.0	6.0	139±1.0	6.0
42e		2.7±0.4	nd	-	ag	-

Tabla 4.1. (Continuación)

Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		
		Tul2	J774	IS _{M.P.}	GRH	IS _{GRHP}
V		>25	nd	-	>200	-
38c		>25	nd	-	>200	-
32a		>25	<100	-	>100 ^a	-
42b		4.7±1.2	nd	-	50±0.4	11
Nfx		7.7	nd		>100 ^a	>13
Bnz		7.4	nd		nd	
AnfoB		0.152±0.006	nd		1.5±0.2	10

^aTul2: cepa Tulahuen 2. ^bLos resultados representan la media de tres experimentos independientes. ^cJ774: macrófagos murinos J774. ^dIS_{M.P.}: Índice de selectividad (IC₅₀ macrófagos J774/IC₅₀ *T. cruzi*). ^eGRH: Glóbulos rojos humanos. ^fIS_{GRHP}: Índice de selectividad (IC₅₀ GRH/IC₅₀ *T. cruzi*). ^gnd: no determinado. ^hEl compuesto precipita a mayores concentraciones. Tomado de ref. [1]. El compuesto precipita en el amortiguador de trabajo a todas las concentraciones ensayadas.

Para los derivados de la *Serie I*, el análisis de los resultados muestra que los compuestos carbonílicos conteniendo el sistema benzofuroxano (**17-19**, Tabla 4.1 páginas 85-86) utilizados como reactivos de partida presentan una excelente actividad anti-*T. cruzi*, siendo el más activo el derivado **19**, sustituido en posición 2. Este derivado presenta además un excelente perfil de selectividad frente a *T. cruzi* en relación a las células mamíferas con un IS_{macrófagos/*T. cruzi*} = 12 y un IS_{GRH/*T. cruzi*} > 16. En el caso de estos derivados, el cambio del sistema benzofuroxano por el sistema 1,3-dióxido de benzimidazol causa una clara disminución en la actividad antiproliferativa de los compuestos frente a *T. cruzi*. Las amidinohidrazonas y semicarbazonas resultan inactivas frente a *T. cruzi*, a excepción de los derivados amidinohidrazona **32c** y semicarbazona **42b** (Tabla 4.1 páginas 87 y 89, respectivamente), siendo este último uno de los compuestos más activos dentro de esta serie, con una IC₅₀ de 4.7 μM. Ambos derivados, resultan ser selectivos frente al parásito con un IS_{GRH/*T. cruzi*} > 12

en el caso del compuesto **32c** y un $IS_{GRH/T. cruzi} = 11$ para el derivado **42b**. Si bien la sustitución del grupo carbonilo de la cetona **20** por el agrupamiento amidinohidrazona (**32c**) disminuye la actividad en *T. cruzi*, la toxicidad frente a GRH no muestra diferencia. En el caso del derivado **42b** la presencia del sistema 1,3-dióxido de benzimidazol transforma el correspondiente derivado de benzofuroxano **30a**, inactivo, en un excelente agente tripanosomicida.

Los nuevos compuestos conteniendo el agrupamiento tiosemicarbazona no sustituido en posición *N*⁶, **31b**, **38b**, **40b**, **32d** y **42c** (Tabla 4.1, página 87) presentan una actividad anti-*T. cruzi* igual o menor que el compuesto padre **IV**, siendo los más activos el derivado de benzofuroxano sustituido en posición 3, **31b** y los derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol **38b** y **42c** sustituidos en posición 4 y 2, respectivamente. La citotoxicidad en células mamíferas no pudo ser determinada para la mayoría de estos derivados debido a que los mismos precipitan en el amortiguador de trabajo (PBS, pH 7.4) incluso a la dosis más baja ensayada.

La sustitución de la posición *N*⁶ del agrupamiento tiosemicarbazona da lugar a compuestos con mejor actividad tripanosomicida que los derivados no sustituidos. En referencia a la sustitución por un grupo fenilo (Tabla 4.1, página 88) el compuesto que presenta mayor actividad anti-*T. cruzi* es el derivado **32e** sustituido en posición 2, con una IC_{50} de 3.6 μ M, siendo además uno de los compuestos más selectivos desarrollados con un $IS_{macrófagos/T. cruzi} > 111$ y un $IS_{GRH/T. cruzi} > 55$. En estos derivados, el cambio de benzofuroxano a 1,3-dióxido de benzimidazol causa una disminución en la actividad antiproliferativa o incluso ausencia de actividad anti-*T. cruzi*, como en el caso del derivado **38d** (Tabla 4.1, página 88). En el caso de los compuestos sustituidos en posición *N*⁶ por un grupo alilo, los derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol resultan más activos que los correspondientes benzofuroxanos (comparar las actividades de **30b** con **38e** y **32f** con **42e**, Tabla 4.1, página 88). Dentro de este grupo el derivado sustituido en posición 2, **42e**, es el que presenta la mayor potencia inhibitoria con una IC_{50} de 2.7 μ M.

Si bien no se observa una clara correlación entre la estructura y la actividad biológica/selectividad, la posición del sustituyente sobre el grupo fenilo parece jugar algún rol en este sentido. En general, la tendencia observada se puede ordenar en actividad decreciente como *orto* > *para* > *meta*. Los compuestos más activos de la *Serie I* son los derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo semicarbazona y *N*⁶-aliltiosemicarbazona en posición 2 (**42b** y **42e**, respectivamente) y el derivado de

benzofuroxano que sustenta el grupo *N*-feniltiosemicarbazona en posición 2 (**32e**), los cuales resultan más activos que los fármacos de referencia Nfx y Bnz.

A fin de estudiar el efecto de la hibridación molecular sobre la actividad tripanosomicida se evaluó *in vitro* la capacidad de los intermedios hidrazona **3-5** de inhibir el crecimiento de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Evaluación biológica de las hidrazonas intermedias frente a *T. cruzi*.

Comp.	Estructura	Tul2 ^{ab}
		PIC 25 ^c
3		6.1±1.8
4		0.0±0.2
5		19±2.1

^aTul2: cepa Tulahuen 2. ^bLos resultados representan la media de tres experimentos independientes. ^cPorcentaje de inhibición de crecimiento a 25 μ M de compuesto.

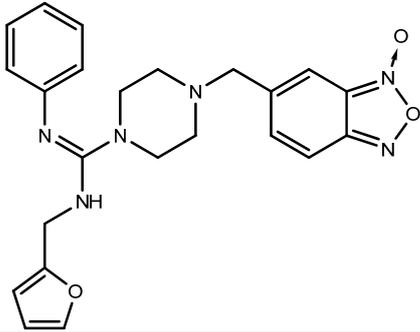
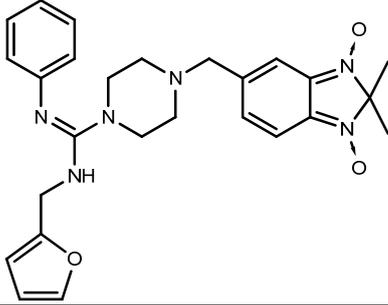
La ausencia de actividad tripanosomicida de los intermedios estudiados demuestra que la combinación de más de una unidad farmacofórica en la misma molécula ha resultado una excelente estrategia para el descubrimiento de nuevos prototipos moleculares. En particular, mediante la hibridación de la semicarbazona **3** con el sistema 1,3-dióxido de benzimidazol se obtuvo uno de los derivados más activos de la *Serie I*, con una IC₅₀ de 4.7 μ M.

Los resultados obtenidos para los derivados de la *Serie II*, arilguanidinas, se muestran en la Tabla 4.3, página siguiente

Tabla 4.3. Evaluación biológica de los compuestos híbridos de la Serie II frente a *T. cruzi*, y glóbulos rojos humanos.

Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)		
		TuI2 ^{a,b}	GRH ^c	IS ^d
33		1.2±0.3	37±2.2	31
43		1.0±0.08	>50 ^e	>50
34		7.3±0.5	83±2.5	11
44		3.0±0.2	>36 ^e	>12
35		5.8±0.6	105±1.7	18

Tabla 4.3. [Continuación]

Comp.	Estructura	IC ₅₀ (μM)		
		Tul2	GRH	IS
36		15±1.3	>200	>13
45		15±1.5	>200	>13
Nfx		7.7	>100 ^a	>13
Bnz		7.4	nd	
AnfoB		0.152±0.006	1.5±0.2	10

^aTul2: cepa Tulahuen 2. ^bLos resultados representan la media de tres experimentos independientes. ^cGRH: Glóbulos rojos humanos. ^dIS: Índice de selectividad ($IC_{50}^{GRH}/IC_{50}^{T. cruzi}$). ^eEl compuesto precipita a mayores concentraciones.

Los derivados de la *Serie II* presentan en todos los casos una excelente actividad anti-*T. cruzi*, encontrándose los compuestos **33** y **43** derivados del sistema benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol, respectivamente (Tabla 4.3) entre las moléculas más activas sintetizadas en nuestro laboratorio. Todos los derivados de esta serie presentan índices de selectividad frente a GRH mayores a 11, siendo el derivado **43** el más selectivo con un $IS_{GRH/T. cruzi} > 50$.

Este grupo de compuestos muestra una clara correlación entre el sustituyente a nivel del agrupamiento carboxamidina y la actividad antiparasitaria. La tendencia observada en este sentido es, en actividad decreciente, fenetilo > fenilo > bencilo > furilo. El efecto del cambio del sistema benzofuroxano por el sistema 1,3-dióxido de benzimidazol es variable, observándose en los derivados **34** (benzofuroxano) y **44** (1,3-dióxido de benzimidazol) un claro aumento de la actividad mientras que en otros casos la misma no se ve alterada.

La mayor parte de los compuestos de esta serie, **33**, **34**, **35**, **43** y **44** han resultado más activos que los fármacos de referencia Nfx y Bnz, presentando índices de selectividad mayores o iguales a Nfx y mayores a AnfoB.

4.2. Estudios de inhibición de Cruzipaína

A fin de conocer si, de acuerdo a lo planificado, los compuestos desarrollados en el presente trabajo eran inhibidores de CP, se estudió la capacidad de los mismos de inhibir la enzima aislada de extractos de *T. cruzi*, forma epimastigota cepa Tulahuen 2. Inicialmente los compuestos fueron ensayados a una concentración de 100 μM a pH 7.4 y la capacidad inhibitoria se determinó comparando con el control (ausencia de compuesto, 100 % de actividad enzimática). La concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC_{50}) se determinó para aquellos derivados más activos. Como sustrato de CP se utilizó el compuesto fluorogénico *Z*-fenilalanina-arginina-7-amido-4-metilcumarina [*Z*Phe-Arg-AMC] y como compuesto de referencia la tiosemicarbazona de (*m*-bromofenil)etilcetona (mbet). Los resultados obtenidos para los derivados de la *Serie I* se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Capacidad de inhibición de CP de los derivados de la *Serie I*.

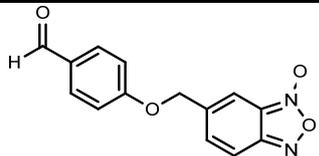
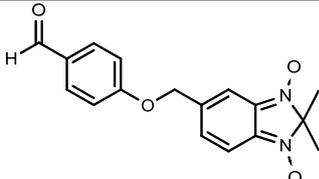
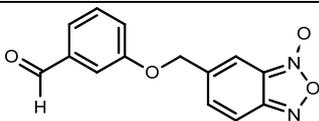
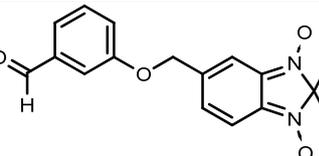
Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μM	IC_{50} (μM)
17		6.3 \pm 0.6	>100
37		35 \pm 1.5	>100
18		43 \pm 0.8	\approx 100
39		45 \pm 1.0	\approx 100

Tabla 4.4. (Continuación)

Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
19		0.0 \pm 1.0	>100
20		12 \pm 0.7	>100
41		0.0 \pm 0.3	>100
III		100 \pm 1.6	32 \pm 0.08 ^b
31a		42 \pm 1.8	\approx 100
32b		39 \pm 1.5	>100
42a		2.5 \pm 0.5	>100
32c		21 \pm 0.8	>100
IV		100 \pm 0.7	43 \pm 0.1 ^b

Tabla 4.4. (Continuación)

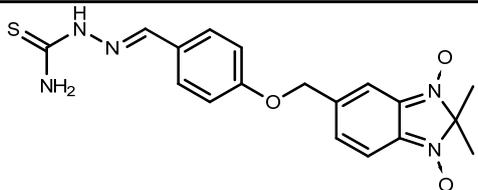
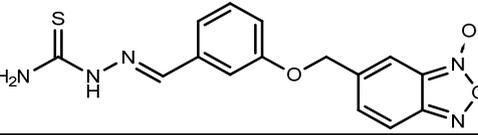
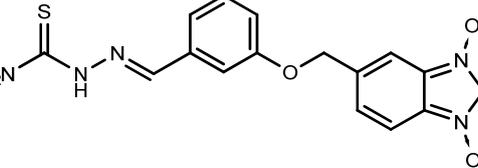
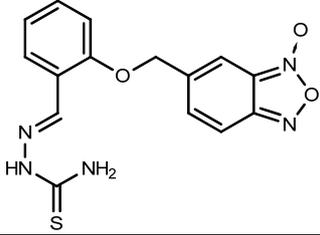
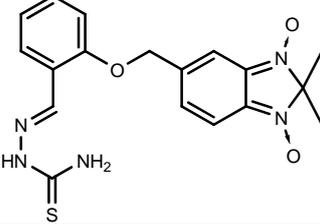
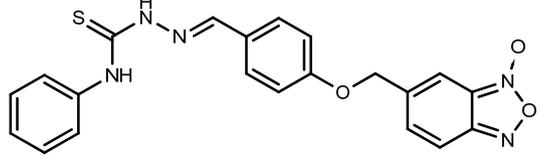
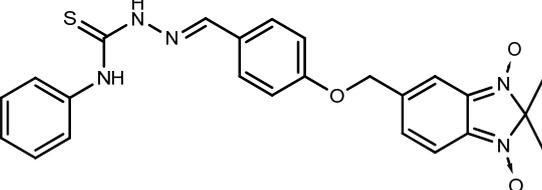
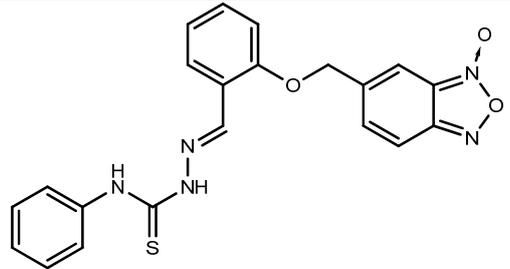
Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
38b		14 \pm 1.9	>100
31b		57 \pm 1.5	78 \pm 1.6
40b		71 \pm 1.5	64 \pm 1.9
32d		50 \pm 2.1	100 \pm 2.0
42c		35 \pm 1.6	>100
30a		56 \pm 1.1	75 \pm 2.1
38d		52 \pm 1.4	85 \pm 1.3
32e		0.0 \pm 1.2	>100

Tabla 4.4. (Continuación)

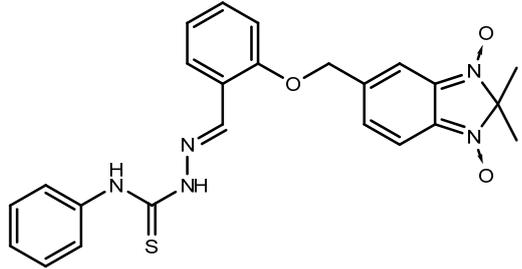
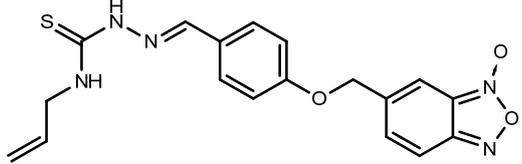
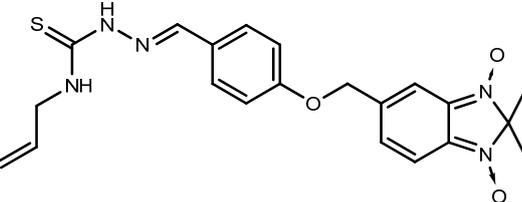
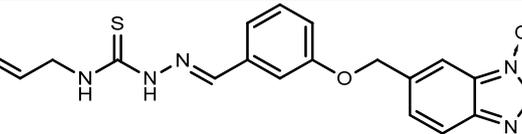
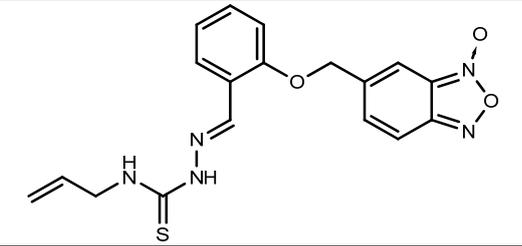
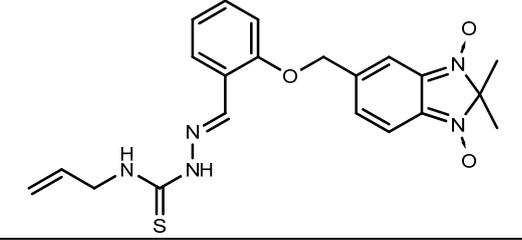
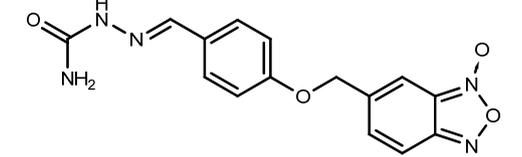
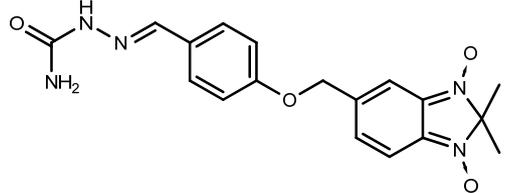
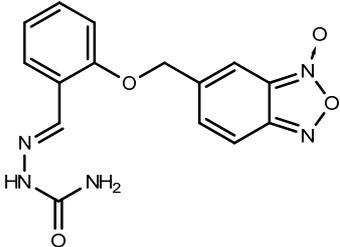
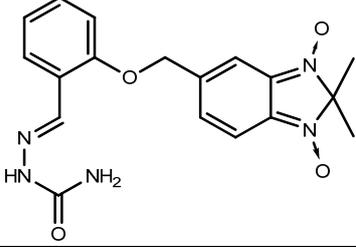
Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
42d		0.0±0.8	>100
30b		38±2.0	>100
38e		50±2.2	100±2.0
31c		100±3.1	55±2.0
32f		11±2.1	>100
42e		6.6±0.9	>100
V		0.8±0.6	>100 ^b
38c		0.0±0.5	>100

Tabla 4.4. (Continuación)

Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
32a		7.0 \pm 1.3	>100
42b		0.0 \pm 1.2	>100
mbet ^c			0.10 \pm 0.08

^aLos resultados representan la media de tres experimentos independientes. ^bTomado de ref. [1]. ^cmbet: tiosemicarbazona de (*m*-bromofenil)etilcetona (compuesto de referencia).

Para los derivados de la *Serie I* los mejores inhibidores de CP obtenidos fueron las tiosemicarbazonas de benzofuroxano sustituido en posición 3 del grupo feniloxi, **31c** (*N*⁶-aliltiosemicarbazona) y **31b** (tiosemicarbazona) junto al benzofuroxano que sustenta en posición 4 del sustituyente feniloxi, el grupo *N*⁴-feniltiosemicarbazona, **30a**, y los di-*N*óxido de benzimidazol análogos de **30a** y **31b**, **38d** y **40b**, respectivamente [Tabla 4.4, página 96]. Cabe mencionar que estos resultados de inhibición de la actividad enzimática indicarían que el mecanismo de acción tripanosomicida de estos compuestos no guarda relación con la inhibición de CP. De hecho, los derivados más activos en *T. cruzi*, **32e**, **42b** y **42e**, resultan inactivos frente a la proteasa del parásito [Tabla 4.4, páginas 96-98]. Al comparar las *N*⁶-aliltiosemicarbazonas derivadas de benzofuroxano **30b**, **31c** y **32f** [Tabla 4.4, página 97] claramente se observa que la sustitución en posición 3 a nivel del grupo feniloxi causa un aumento en la potencia inhibitoria de los compuestos, siendo la tendencia observada en orden de inhibición decreciente *meta* > *para* > *orto*. En el caso de las tiosemicarbazonas *N*⁶-no sustituidas, el derivado *para* sustituido en el anillo feniloxi es el que presenta mayor actividad [comparar el valor de inhibición del compuesto padre **IV** con los valores de los derivados **31b** y **32d**, Tabla 4.4 página 96]. Ninguno de los nuevos derivados sintetizados de la *Serie I* resultó más activo frente a CP que el compuesto líder **III**, observándose que el cambio en la posición del agrupamiento amidinohidrazona a *orto* o *meta* causa una clara disminución en la potencia inhibitoria de la molécula [comparar la actividad inhibitoria de **III**, **31a** y **32b**, Tabla

4.4 página 95). En la mayoría de los casos, la sustitución del grupo feniloxi en posición *orto* lleva a una completa pérdida de la capacidad inhibitoria de CP para estos derivados.

Los resultados para los derivados de la *Serie II* se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Capacidad de inhibición de CP de los derivados de la *Serie II*

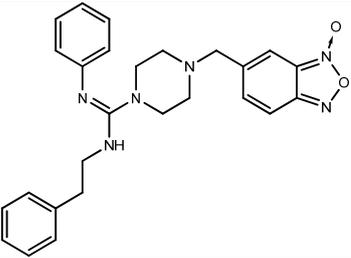
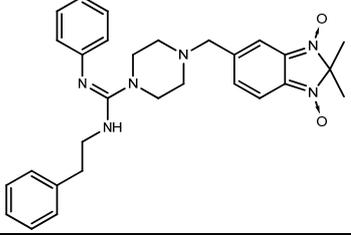
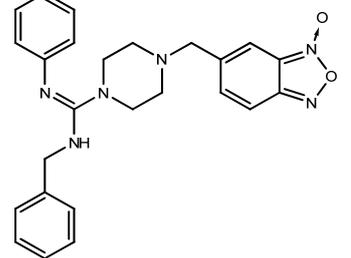
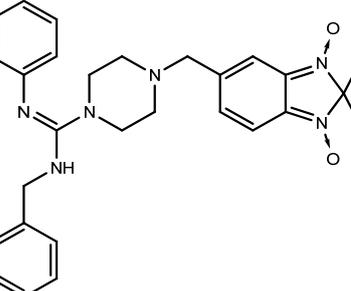
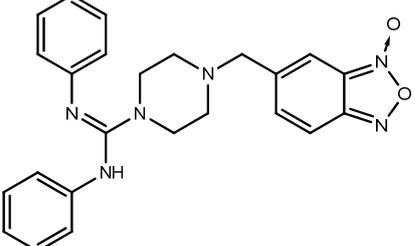
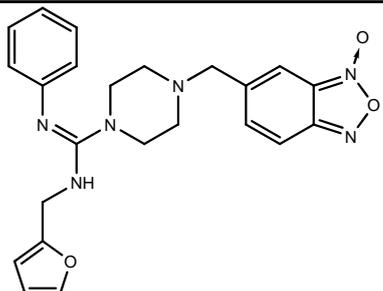
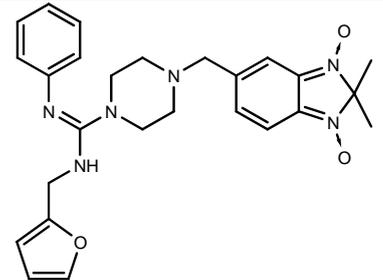
Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
33		25±2.2	>100
43		30±2.8	>100
34		29±1.6	>100
44		34±2.0	>100
35		12±1.4	>100

Tabla 4.5. (Continuación)

Comp.	Estructura	CP (pH 7.4)	
		%Inh a 100 μ M	IC ₅₀ (μ M)
36		0.3±0.2	>100
45		34±1.6	>100
mbet			0.10±0.08

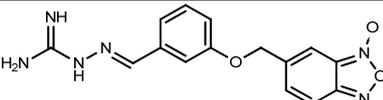
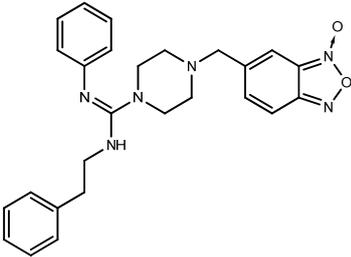
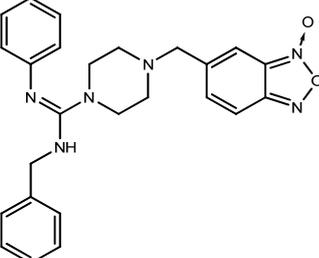
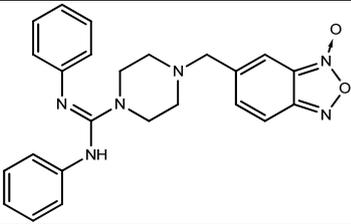
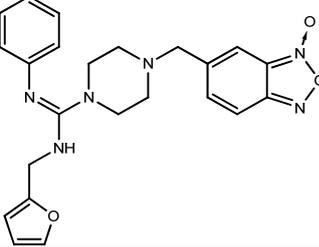
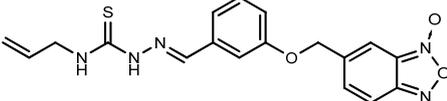
^aLos resultados representan la media de tres experimentos independientes. ^bTomado de ref. [1]. ^cmbet: N¹-[(*m*-bromofenil)etilcetona]tiosemicarbazona (compuesto de referencia).

Si bien los derivados de la *Serie II* presentan una excelente actividad anti-*T. cruzi* ninguno de ellos resultó buen inhibidor de CP, observándose en todos los casos valores de IC₅₀ mayores a 100 μ M [Tabla 4.5, páginas 99-100]. Teniendo en cuenta el porcentaje de inhibición, se puede apreciar una relación entre los distintos sustituyentes y la inhibición de la enzima. Los derivados de benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol que poseen el grupo fenetilo o bencilo presentan una actividad similar y superior a la de los compuestos con sustituyentes furilo o fenilo.

Como se mencionó en la introducción del presente trabajo, CP puede estar localizada en la superficie del parásito, directamente en contacto con el citoplasma de la célula hospedera, o en los reservosomas, organelos análogos a los lisosomas. Por esta razón, la proteasa es capaz de operar en dos microambientes bien diferenciados, a pH ácido dentro de los reservosomas y a pH neutro cuando se expresa en la membrana plasmática. Esto resulta importante en el caso de inhibidores que pueden protonarse a pH ácido ya que este cambio en la estructura puede modificar el tipo de interacciones que se dan en el sitio activo de la enzima. En este sentido, ha sido descrito que inhibidores peptídicos que presentan residuos de arginina en P2

resultan mejores inhibidores de CP a pH ácido², probablemente debido a la posibilidad de establecer interacciones electrostáticas adicionales con el residuo de Glu205 presente en el subsitio S2 de la enzima.

Tabla 4.6. Capacidad de inhibición de CP de amidinohidrazonas, arilguanidinas y del derivado **31c** bajo distintas condiciones experimentales.

Comp.	Estructura	pH 7.4 [% Inh a 100 μM]		pH 5.3 [% Inh a 100 μM]	
		Sin Triton X-100	Con Triton X-100	Sin Triton X-100	Con Triton X-100
31a		42±1.8	-	28±0.9	-
33		25±2.2	-	34±1.3	-
34		29±1.6	-	11±0.6	-
35		12±1.4	-	47±0.7	-
36		0.3±0.2	-	44±1.0	45±1.2
31c		100±3.1	90±1.5	-	-

^[2] 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.; Craik, C.S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 263-269.

Por lo mencionado anteriormente, los derivados con agrupamientos protonables (amidinohidrazonas y arilguanidinas) fueron ensayados a pH 5.3 con el objetivo de evaluar el efecto de la protonación en la capacidad inhibitoria de CP. Por otra parte, a fin de descartar que la inhibición estuviera dada por un mecanismo no específico (inhibición promiscua) debida a la agregación del compuesto^{3,4,5}, se repitió el ensayo a pH 7.4 en presencia del detergente no iónico Triton X-100, utilizando como modelo al derivado **31c**. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.6 [página anterior].

En general puede observarse que la actividad de los compuestos ensayados mejora en condiciones ácidas, disminuyendo en el caso de los derivados **31a** y **34** (Tabla 4.6) lo que indicaría, para éstos, que los nitrógenos protonables del ligando efectivamente interaccionan, en su forma neutra, con residuos de la proteína y que dichas interacciones se ven favorecidas a pH fisiológico. El cambio más notorio en la actividad se observa para la arilguanidina **36**, con un aumento en el porcentaje de inhibición cercano al 50% en condiciones ácidas. La orientación diferencial en el sitio activo de la enzima de las arilguanidinas **34** y **36** podría explicar el comportamiento diferencial de estos derivados en medio ácido.

El ensayo de inhibición de la actividad enzimática en presencia de Triton X-100 permitió confirmar que este tipo de compuestos son inhibidores auténticos de CP, ya que la inhibición no específica pudo ser descartada debido a que la capacidad inhibitoria de los derivados **31c** y **36** no se vio afectada en presencia de 0.01 % del detergente. En caso de que los agregados formados por una molécula promiscua fueran los responsables de la inhibición enzimática, la remoción de los agregados causada por el detergente conduciría a una disminución de la inhibición. Por lo tanto, el resultado obtenido permite descartar posibles mecanismos de inhibición debidos a la interacción de agregados moleculares con CP.

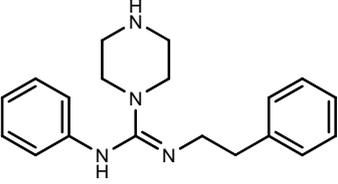
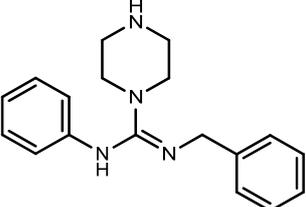
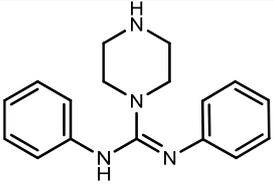
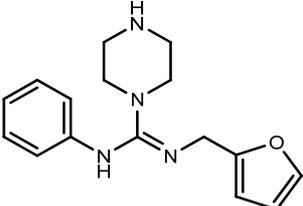
⁽³⁾ Ferreira, R.S.; Bryant, C.; Ang, K.K.H.; McKerrow, J.H.; Shoichet, B.K.; Renslo, A.R. Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5005-5008.

⁽⁴⁾ Freitas, R.F.; Prokopczyk, I.M.; Zottis, A.D.; Oliva, G.; Andricopulo, A.D.; Trevisan, M.T.S.; Vilegas, W.; Silva, M.G.V.; Montanari, C.A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2476-2482.

⁽⁵⁾ Pereira, J.M.; Severino, R.P.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; da Silva, M.F.G.F.; Zottis, A.; Andricopulo, A.D.; Oliva, G.; Corrêa, A.G. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8889-8895.

Para estudiar el efecto de la hibridación molecular sobre la actividad inhibitoria de CP, se evaluó *in vitro* la capacidad de los intermedios carboxamidina **26-29** de inhibir la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Capacidad de inhibición de CP de los intermedios carboxamidina **26-29**.

Comp.	Estructura	pH 5.3 [% Inh a 100 μ M] ^a
26		3.2 \pm 0.5
27		5.4 \pm 0.4
28		6.3 \pm 1.3
29		10 \pm 1.1

^aLos resultados representan la media de tres experimentos independientes.

Claramente, los intermedios estudiados presentan una capacidad inhibitoria despreciable frente a la enzima. El aumento de la potencia inhibitoria que se observa en los compuestos híbridos estaría indicando tanto la efectividad de la hibridación molecular como la importancia del apilamiento de los grupos aromáticos en la estabilidad del complejo inhibidor-proteína. Como se mencionó en el Capítulo 3, todos los intermedios carboxamidina presentan el sustituyente fenilo apilado al ciclo de piperazina mientras que los productos finales, en general, presentan dicho grupo apilado al correspondiente sustituyente aromático. Una excepción a esta última afirmación sería el derivado **43**, para el cual de acuerdo a los experimentos de RMN se propuso una conformación donde el grupo fenilo está apilado a la piperazina (ver Capítulo 3, página 82). Debido a que este compuesto presenta una capacidad

inhibitoria intermedia frente a CP podría pensarse que la unión a la enzima causa una mayor estabilización de la conformación favorable para la actividad.

5. Estudio de la Interacción Inhibidor-Cruzipaina por RMN y *Docking*

5.1. Estudio de la interacción inhibidor-cruzipaína por resonancia magnética nuclear

El estudio de la interacción entre ligandos y biomoléculas puede resultar clave para comprender los procesos biológicos. En los últimos años la espectroscopia de RMN se ha transformado en una técnica muy utilizada en el área del diseño y descubrimiento de fármacos, debido a su capacidad de detectar la unión de ligandos a sus blancos biológicos incluso para compuestos que presentan muy baja afinidad^{1,2}. Una ventaja de esta técnica es que permite estudiar las moléculas de interés en condiciones muy cercanas a las fisiológicas.

Existen dos grandes categorías de métodos usados para detectar la unión: aquellos en los que se observan las señales de la macromolécula, como el mapeo de los desplazamientos químicos, y aquellos en los que se observa el ligando, los cuales se basan en las diferencias en la velocidad de traslación y rotación de las moléculas pequeñas cuando están libres, en solución, o unidas a una macromolécula. Los experimentos basados en la observación del ligando tienen la ventaja de que se requiere una mínima cantidad de la macromolécula [1-10 μ M en 0.5 mL], la cual no necesita estar marcada isotópicamente³.

A fin de estudiar mediante RMN la interacción con CP de los derivados desarrollados en la presente memoria, se utilizaron métodos basados en la observación de las señales del ligando, a saber, variación del tiempo de relajación longitudinal, T1, experimentos de diferencia en la transferencia de saturación (DTS) y experimentos de orden de difusión (DOSY). Los derivados elegidos para desarrollar estos experimentos son el compuesto padre **III**, las tiosemicarbazona de la *Serie I*, **38d** y **40b**, las arilguanidinas de la *Serie II*, **33**, **36** y **35** y las carboxamidinas intermedias **28** y **29**.

Cuando una molécula pequeña interacciona con una macromolécula, se observa una disminución en el tiempo de relajación longitudinal debido a una disminución del

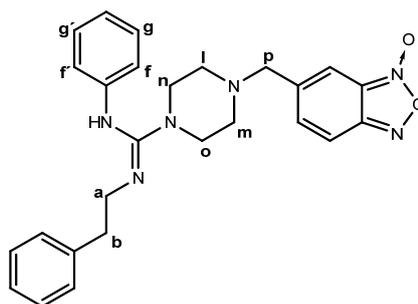
⁽¹⁾ Pellecchia, M. Solution Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy techniques for probing intermolecular interactions. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 961-971.

⁽²⁾ Meyer, B.; Peters, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.

⁽³⁾ Pellecchia, M.; Sem, D.S.; Wüthrich, K. NMR in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 211-219.

movimiento del ligando una vez que se une a la biomolécula⁴. Como ejemplo de los resultados obtenidos en los experimentos de variación de T1, en la Tabla 5.1 se muestra el comportamiento del derivado **33**. Para los derivados de la *Serie I*, **38d** y **40b**, el estudio no pudo ser realizado debido a problemas de descomposición de la enzima o el compuesto, como fue el caso del derivado **40b**.

Tabla 5.1. Tiempo de relajación longitudinal (T1) de los protones del derivado **33** en ausencia (**33**) y presencia de CP (**33+CP**).



H	δ (ppm)	T1 (seg) ^a		$\Delta T1$ (seg)
		33	33+CP	
l+m	2.36	0.23	0.12	0.11
b	2.86	0.22	0.12	0.10
n+o	3.26	0.22	0.14	0.08
a	3.52	0.21	0.13	0.08
p	3.61	0.20	0.15	0.06
f+f'	6.71	0.66	0.51	0.14
g+g'	7.23	0.55	0.54	0.01
Ar	7.34	0.68	0.56	0.13

^aEl ensayo fue realizado en amortiguador PBS deuterado, pH 5.3, a 298 K.

Los resultados muestran que efectivamente el compuesto **33** se une a la enzima, observándose una clara disminución en los tiempos de relajación longitudinal del compuesto en presencia de CP (Tabla 5.1). La variación en el T1 ($\Delta T1$) de los distintos protones de la molécula da una idea de las regiones de ésta más afines por la enzima. La mayor variación en T1 se da a nivel de los protones piperazínicos, en especial **l** y **m**, de los protones alifáticos del sustituyente fenetilo, en especial **b**, y de los protones aromáticos con excepción de **g** y **g'**.

En la Figura 5.1 (página siguiente) se muestra la recuperación de la intensidad de la señal (magnetización en el eje z) en función de distintos tiempos de recuperación (d_2) para los protones aromáticos del ligando (7.34 ppm) en ausencia y presencia de CP.

⁽⁴⁾ Veglia, G.; Delfini, M.; del Giudice, M.R.; Gaggelli, E.; Valensin, G. ¹H NMR studies on the interaction of β -carboline derivatives with human serum albumin. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 281-286.

La dependencia de la magnetización en el eje z con d_z está dada por la siguiente ecuación:

$$M_z(d_z) = M_0 \left(1 - e^{-d_z/T_1} \right)$$

donde M_0 es el valor de equilibrio de la magnetización en el eje z. Por lo tanto, cuando el tiempo transcurrido desde el pulso inicial (d_z) sea igual a T_1 M_z/M_0 será igual a $1 - e^{-1} = 1 - 0.37 = 0.63$, lo que significa que T_1 es el tiempo que tarda la magnetización en recuperar un 63 % de su valor de equilibrio.

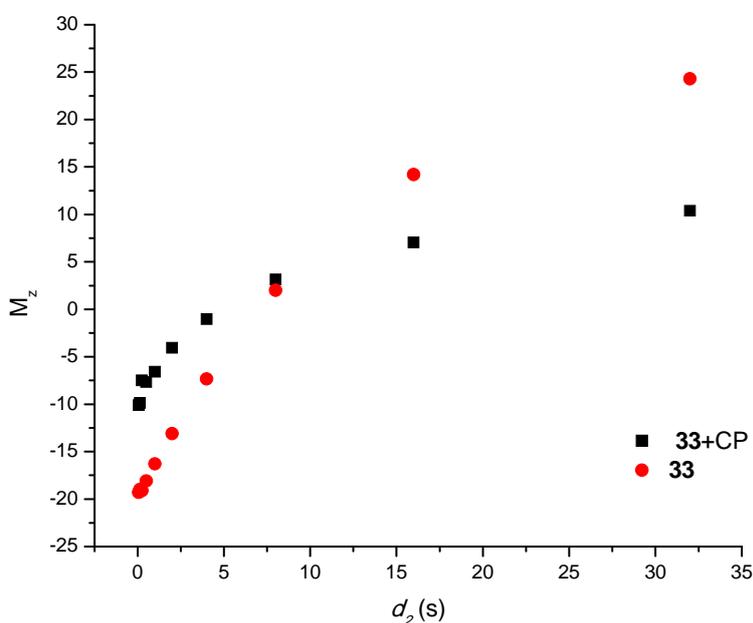


Figura 5.1. Recuperación de la magnetización en el eje z (M_z) en función del tiempo de recuperación d_z para los protones aromáticos en 7.34 ppm en ausencia (**33**) y presencia (**33+CP**) de la enzima. El tiempo d_z se varió de 62 ms a 32 s. El experimento se realizó a 298 K en amortiguador PBS deuterado, pH 5.3.

Los experimentos DTS resultan concordantes con los estudios de variación de T_1 . En la Figura 5.2 (página siguiente) se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el compuesto **33**, con cierta capacidad inhibitoria de CP, y la carboxamidina intermedia **29**, carente de capacidad de inhibición enzimática. En el caso del compuesto **33** se observa claramente que los protones **l** y **m** y los protones aromáticos son los que presentan una mayor interacción con CP, mientras que para la carboxamidina intermedia se observa una modesta interacción por parte de los protones piperazínicos del compuesto.

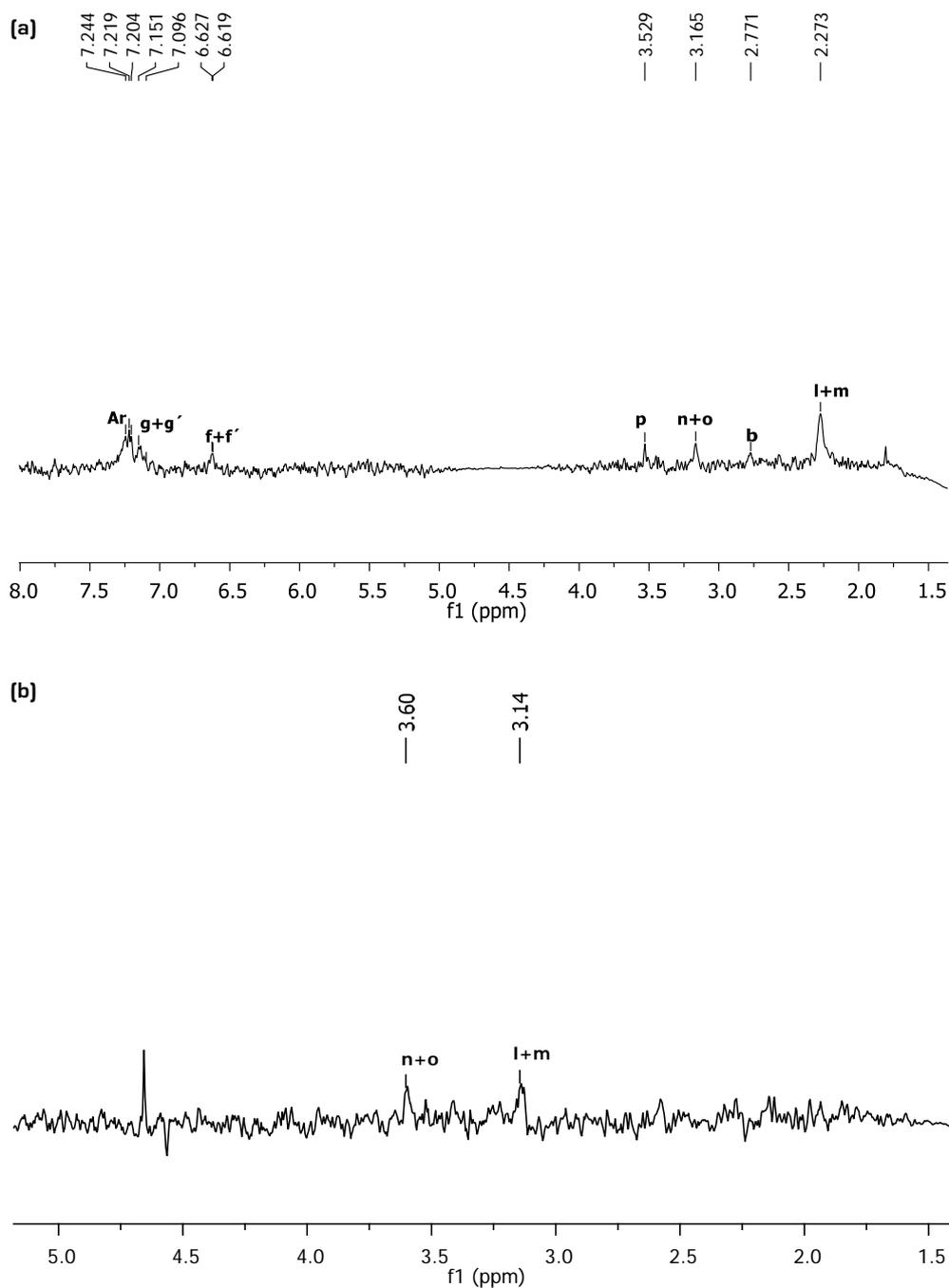


Figura 5.2. Caracterización de la afinidad del derivado **33** (a) por CP y una carboxamida intermedia, **29** (b), mediante DTS. El espectro fue obtenido usando 256 acumulaciones para los espectros dentro y fuera de resonancia y la diferencia entre los mismos fue realizada por ciclaje de fase.

Los experimentos de DOSY, al igual que los anteriores, confirman la capacidad de los distintos compuestos de interactuar con CP. Además, a partir de estos experimentos es posible obtener información sobre la capacidad relativa de interacción, como en los casos que se ejemplifican en la Figura 5.3, página siguiente. Como se puede observar, uno de los derivados desarrollados en el presente trabajo

de tesis, compuesto **36** [Figura 5.3.a], muestra un pequeño cambio en los coeficientes de difusión observados, lo que estaría confirmando su modesta interacción con CP, sin embargo los mismos son claramente mayores para el compuesto padre **III**, que ha sido el mejor inhibidor de CP desarrollado en nuestro grupo [Figura 5.3.b]. En este último caso se puede apreciar, además, que los protones bencílicos del compuesto **III** son los que presentan mayor interacción con la enzima, datos que concuerdan con los estudios teóricos que se describen en el próximo apartado [ver Figura 5.5.d, página 115].

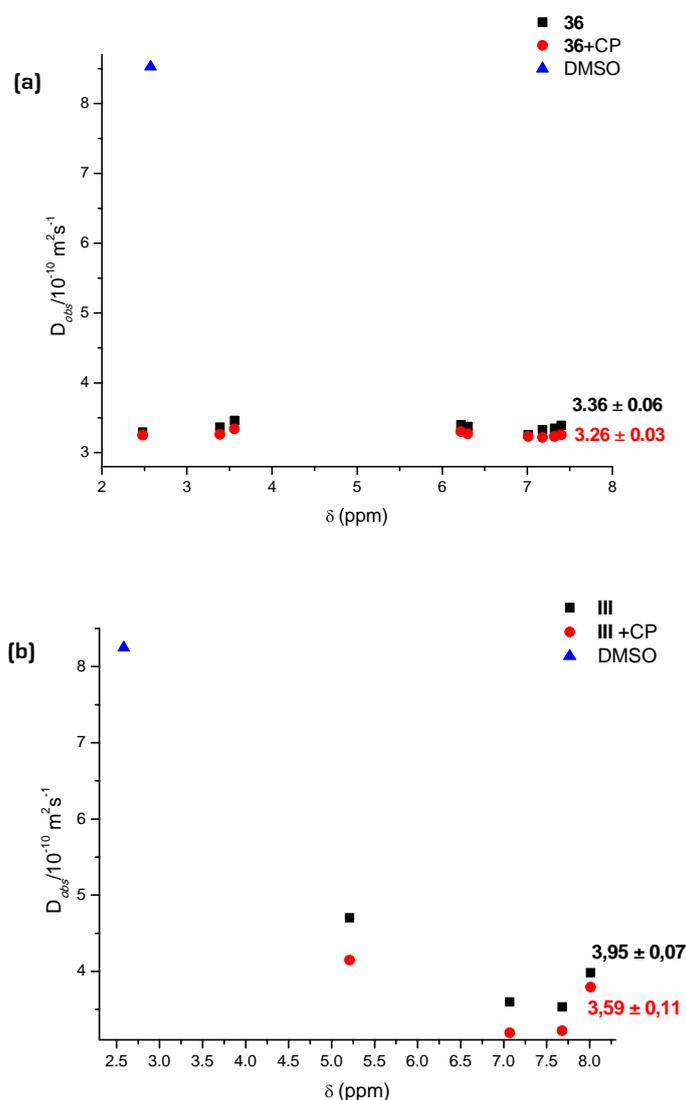


Figura 5.3. a. Coeficientes de difusión observados del derivado **36** en ausencia y en presencia de CP. b. Los mismos resultados para el compuesto **III**. Los experimentos se realizaron usando 64 acumulaciones (para **36**) ó 128 acumulaciones (para **III**) con 15 incrementos de gradiente desde 1.79 a 44.7 Gcm⁻¹.

Por otro lado, al observar el espectro de ^1H -RMN del derivado **33** en solución acuosa (Figura 5.4) puede notarse que la molécula se encuentra bajo una forma tautomérica diferente a la observada en acetona [ver Capítulo 3, páginas 74-75]. Como se discutió en el Capítulo 3, el desplazamiento de los protones **f** y **f'** estaría indicando que en medio acuoso el enlace ilidénico se encuentra a nivel del grupo fenetilo, tal como se muestra en la Tabla 5.1, página 107.

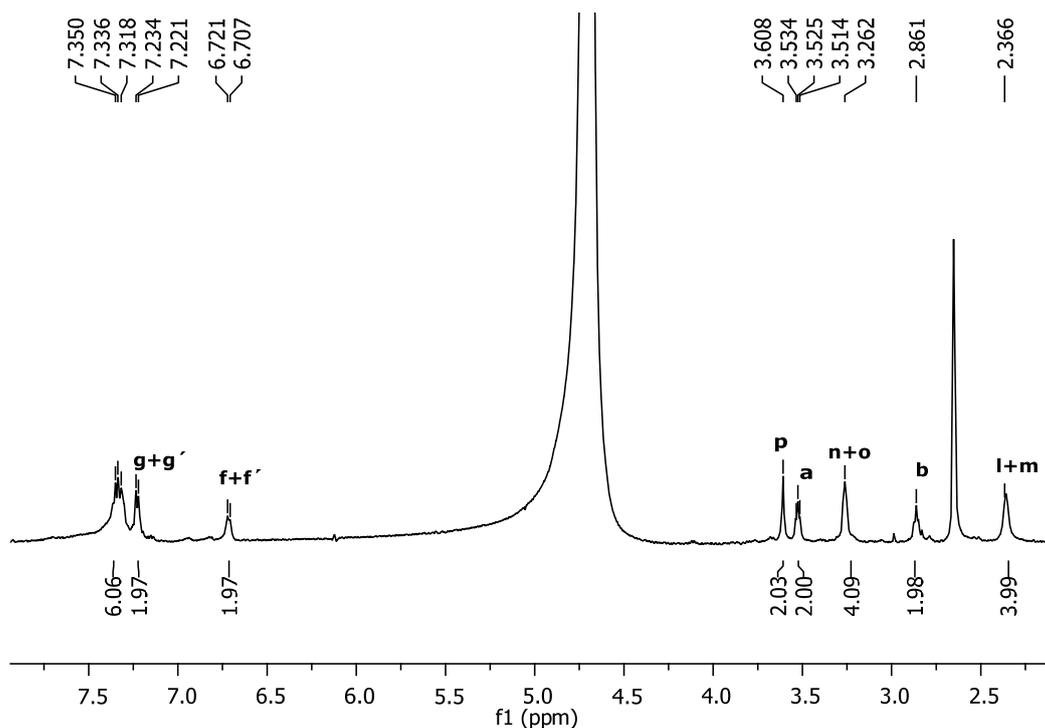


Figura 5.4. Espectro de ^1H -RMN del derivado **33** en amortiguador PBS deuterado, pH 5.3, a 298 K.

5.2. Estudio teórico de la interacción inhibidor-cruzipaina mediante *docking*

El reconocimiento molecular o *docking* es un método teórico que tiene como objetivo predecir las distintas conformaciones que puede adoptar un ligando cuando se une a una biomolécula de estructura tridimensional conocida. A su vez, las conformaciones predichas son ordenadas según criterios energéticos y se les asigna un puntaje (*score*) que es una medida de la afinidad del ligando por el receptor⁵. Debido a que estos métodos son computacionalmente muy eficientes, su utilización en el descubrimiento de nuevos prototipos a partir de bases de datos o en el refinamiento

⁵ Sousa, S.F.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2006**, *65*, 15-26.

estructural de moléculas existentes, se ha vuelto frecuente en el área de la Química Medicinal⁶.

A fin de analizar en detalle el modo de unión a CP de los nuevos derivados desarrollados en este trabajo, se seleccionaron algunos compuestos representativos para realizar estudios de *docking* utilizando el módulo Flexidock implementado en el paquete de programas Sybyl 8.1⁷. Teniendo en cuenta que los residuos presentes en el sitio activo de CP pueden adoptar distintas conformaciones dependiendo del tipo de sustrato, en el presente estudio se tuvo en cuenta la flexibilidad de la enzima permitiendo la libre rotación de aquellos residuos ubicados en un radio de 6 Å alrededor del ligando. Con respecto a las cargas, las amidinohidrazonas de la *Serie I* se modelaron con el nitrógeno amidínico cargado positivamente y en el caso de las arilguanidinas de la *Serie II* a ambos nitrógenos del ciclo piperazina se les asignó una carga positiva. Las interacciones ligando-CP se determinaron utilizando el programa LPC⁸ y las constantes de disociación [Kd] y energías libres (ΔG) de unión se calcularon en base a la diferencia en el área superficial accesible con el programa STC⁹.

Tabla 5.3. Valores de constante de disociación [Kd] y de energía libre de unión (ΔG) de los complejos ligando-CP calculados teóricamente y valores experimentales de inhibición de actividad de cruzipaína expresadas como IC₅₀.

Comp.	Kd (M) ^a	ΔG^a (kcal/mol)	IC _{50,CP}
III	9.7×10 ⁻⁴	-4.11	32.0
30a	4.4×10 ⁻³	-3.21	75.0
31a	6.0×10 ⁻³	-3.03	> 100
31c	2.9×10 ⁻³	-3.46	55.0
32e	5.7×10 ⁻³	-3.06	100.0
32e	3.6×10 ⁻¹	-0.61	> 100
38d	5.4×10 ⁻³	-3.09	85.0
42c	9.6×10 ⁻³	-2.75	> 100
33	8.5×10 ⁻³	-2.82	>100
34	5.1×10 ⁻³	-1.76	>100
35	7.2×10 ⁻³	-2.92	>100
36	4.1×10 ⁻³	-3.25	>100
43	8.9×10 ⁻³	-2.79	>100
44	8.1×10 ⁻³	-2.85	>100
45	8.4×10 ⁻³	-2.83	>100
mbet ^a	6.2×10 ⁻⁴	-4.37	0.10

^aLos valores fueron obtenidos a partir de la conformación más estable

⁶ Marrone, T.J.; Briggs, J.M.; McCammon, J.A. Structure-based drug-design: Computational advances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 71–90.

⁷ Sybyl 8.1, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144, USA, **2008**.

⁸ Sovolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.E.; Abola, E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 327-332.

⁹ Lavigne, P.; Bagu, J.R.; Boyko, R.; Willard, L.; Holmes, C.F.B.; Sykes, B.D. Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 252-264.

En la Tabla 5.3 [página anterior] se observa que los resultados obtenidos mediante el estudio de *docking* son concordantes con los resultados experimentales. Los compuestos que presentan mayor interacción con CP, muestran constantes de disociación y energías libres de unión del mismo orden de magnitud, siendo los compuestos más activos los que presentan valores más próximos al compuesto de referencia tiosemicarbazona de (*m*-bromofenil)etilcetona (mbet).

Tabla 5.4. Residuos de CP en contacto con los compuestos estudiados.

Comp.	Serie I				Serie II			
	Cys25 (S)	Gly66 (N)	Gly66 (O)	Leu67	Leu157	Asp158 (O)	His159 (Nδ1)	Glu205 (Oε2)
III	- ^a	HB ^b (Y=O)	-	Hph ^c	Hph	-	-	HB (N3)
30a	-	-	-	-	Hph	-	-	-
31a	-	-	HB (N4) HB (N2)	-	-	HB (N3)	-	-
31c	-	HB (N1)	HB (N4)	Hph	Hph	-	-	-
32d	-	-	-	-	-	HB (N2)	HB (N4)	-
32e	-	-	-	-	-	-	-	-
38d	-	-	-	-	Hph	-	-	-
42c	-	-	HB (N4)	-	-	HB (N2)	-	-
33	-	-	-	Hph	Hph	HB (N3)	-	-
34	-	-	-	-	Hph	-	-	-
35	-	-	-	Hph	Hph	-	-	-
36	-	-	-	Hph	Hph	-	-	-
43	-	-	-	Hph	Hph	-	-	-
44	-	-	-	-	Hph	-	-	-
45	-	HB (N2)	-	-	-	-	-	-
mbet	-	-	HB (N2)	-	Hph	-	-	-

^a-, ^bHB: ausencia de interacción. ^bHB: enlace de hidrógeno. ^cHph: interacciones hidrofóbicas.

Si bien en los estudios de *docking* el compuesto de referencia, mbet, muestra pequeñas diferencias en el tipo de interacciones en relación a los derivados de la presente memoria (Tabla 5.4), el carbono tiocarbonílico está localizado favorablemente para formar un enlace covalente con el azufre nucleofílico del residuo catalítico de Cys25, como ha sido propuesto para este tipo de compuestos en la bibliografía¹⁰. Además, la His159 se orienta de forma adecuada para protonar el

¹⁰ Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P.S.; Caffrey, C.R.; Holler, T.P.; Mc Kerrow, J.H.; Cohen, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695-2707

anión resultante. Por lo tanto, la potente inhibición que presenta este compuesto podría explicarse por la potencial posibilidad de formar un enlace covalente reversible con el residuo de cisteína.

En este estudio teórico se pudo identificar una serie de interacciones relevantes. En relación a los derivados de la *Serie I*, excepto para el compuesto **32e** todos interaccionan mediante enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas con uno o más residuos presentes en el sitio de unión al sustrato (Tabla 5.4, página anterior). En el complejo CP-**31c** (Figura 5.5a, página siguiente) el residuo de Gly66 forma un enlace de hidrógeno con los átomos de nitrógeno N1 (3.5 Å) y N4 (2.8 Å) del inhibidor (numeración según Tabla 5.4), siendo estas interacciones un rasgo estabilizador común en complejos de CP con inhibidores de pequeño tamaño^{11,12,13,14}.

Además, la unión es estabilizada por interacciones hidrofóbicas entre el anillo benzo del benzofuroxano y el residuo de Leu157 y entre el fragmento alílico del inhibidor y Leu67. El efecto estabilizador de las interacciones hidrofóbicas se hace evidente al observar el complejo CP-**30a** (Figura 5.5b). Según el estudio teórico, el compuesto **30a**, con una IC_{50,CP} de 75 µM, es estabilizado en el sitio activo de la enzima únicamente por el residuo de Leu157 y las regiones no polares del residuo de Ala133 orientadas hacia el sistema benzofuroxano del inhibidor.

El residuo de Glu205 en la base del subsitio de unión S2 es de gran importancia ya que resulta crucial en la determinación de la especificidad de sustrato de esta enzima¹⁵.

¹¹ Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6995-7004.

¹² Brak, K.; Doyle, P.S.; McKerrow, J.H.; Ellman, J. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6404-6410.

¹³ Brinen, L.S.; Hansell, E.; Cheng, J.; Roush, W.R.; McKerrow, J.H.; Fletterick, R.J. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. *Structure* **2000**, *8*, 831 - 840.

¹⁴ Huang, L.; Brinen, L.S.; Ellman, J.A. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 21-29.

¹⁵ Gillmor, S.A.; Craik, C.S.; Fletterick, R.J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1603-1611.

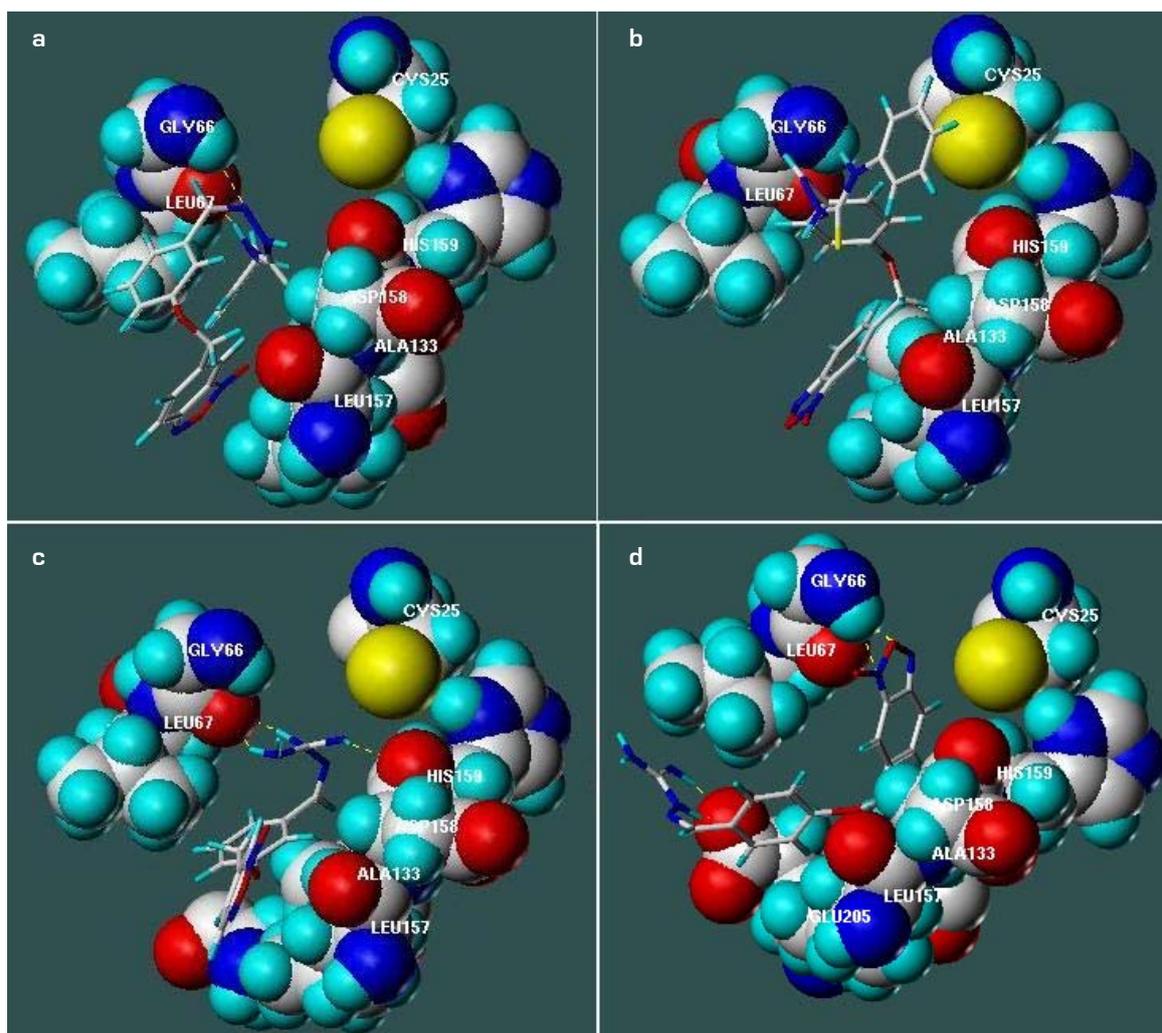


Figura 5.5. Posición de algunos compuestos representativos de la *Serie I* en el sitio de unión de CP según los estudios de *docking*. a. CP-31c. b. CP-30a. c. CP-31a. d. CP-III.

La flexibilidad del residuo de Glu205 en esta posición permite que CP sea capaz de aceptar residuos básicos e hidrofóbicos en el subsitio S2. De hecho, al comparar las estructuras de los complejos CP-**31a** y CP-III (Figura 5.5c y d, respectivamente) puede verse claramente que cuando la molécula se ubica en la hendidura con el grupo benzofuroxano dirigido hacia la base del subsitio S2, como ocurre con **31a**, Glu205 adopta una conformación orientada hacia el disolvente. Sin embargo, cuando un residuo básico se localiza en ese sitio, como ocurre con el agrupamiento amidinohidrazona del compuesto padre **III**, Glu205 se orienta hacia el inhibidor e interacciona con éste mediante un enlace de hidrógeno (2.9 Å) con el nitrógeno del grupo amidino. La capacidad del prototipo **III** de adoptar esta orientación en el sitio activo de la enzima explica su mayor potencia como inhibidor de CP. Estos resultados también explican que no se haya observado una mejora en la actividad inhibitoria de la amidinohidrazona **31a** a pH 5.3 (ver Capítulo 4, página 101).

Para los derivados de la *Serie II*, los resultados teóricos muestran que estos compuestos se unen al sitio activo de la enzima principalmente mediante interacciones de tipo hidrofóbico entre sus agrupamientos aromáticos y los residuos de Leu67 y Leu157 (Tabla 5.4, página 113). En la Figura 5.6 se observa que los grupos aromáticos de estos derivados establecen entre sí interacciones de tipo apilamiento π , las cuales contribuyen a la estabilización de las moléculas en el sitio de unión. Así, según este estudio teórico, con los derivados de arilguanidinas (*Serie II*) se ha conseguido cumplir una de las exigencias estructurales, el apilamiento π en el ligando, que previamente había sido observado como importante para la inhibición de CP, la cual no estaba presente en las primeras series de inhibidores desarrollados en nuestro grupo [ver Capítulo 2, página 44].

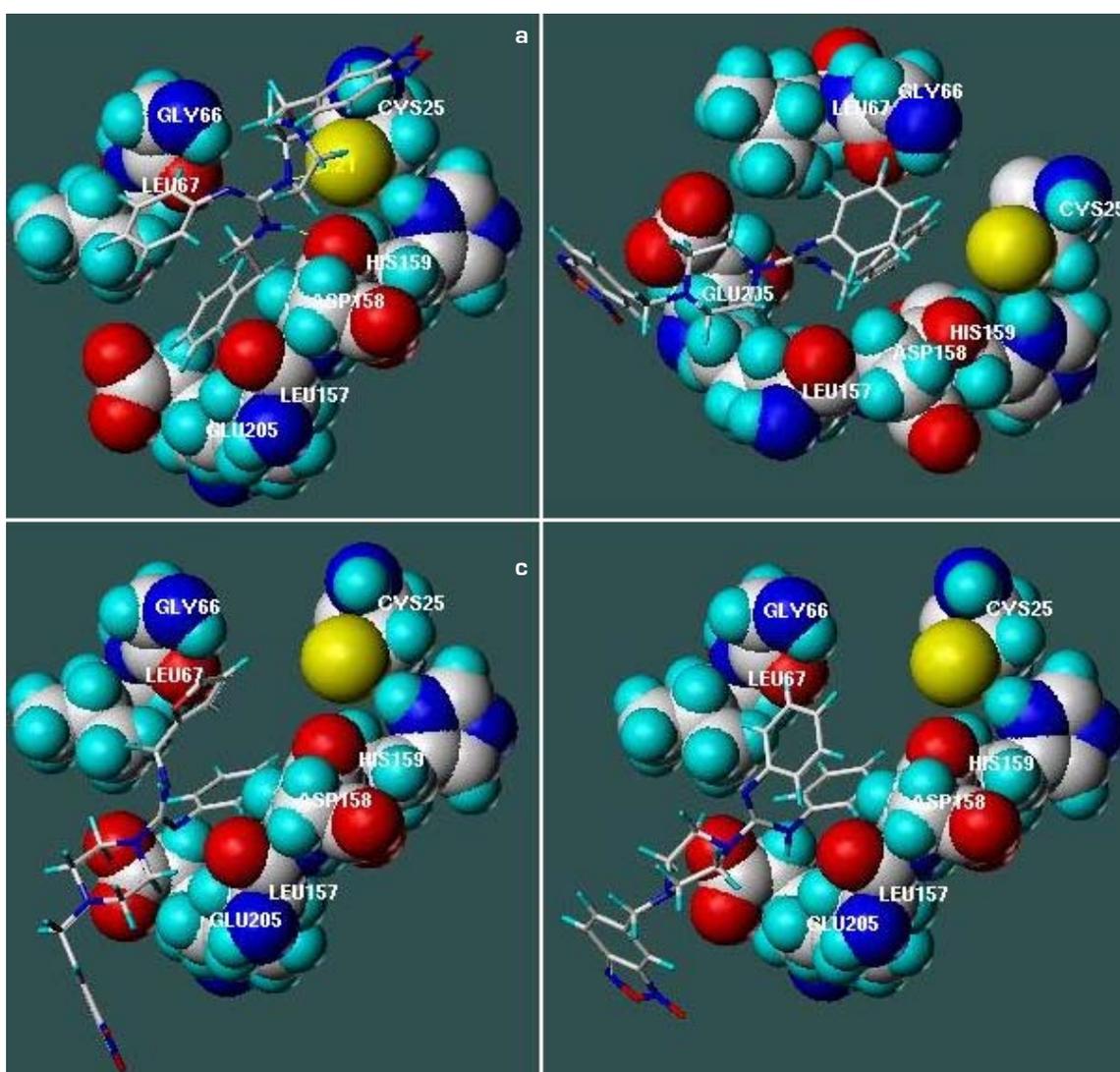


Figura 5.6. Posición de algunos compuestos representativos de la *Serie II* en el sitio de unión de CP según los estudios de *docking*. a. CP-33. b. CP-34. c. CP-36. d. CP-35.

Las interacciones observadas teóricamente para el complejo CP-**33** (Figura 5.6a, página anterior) concuerdan con las estimadas a partir de la variación en el T1 de los distintos protones de la molécula en el estudio por RMN (ver Tabla 5.1, página 107). Los grupos fenilo y fenetilo interaccionan con los residuos de Leu67 y Leu157, respectivamente y se observa además la formación de un enlace de hidrógeno (2.8 Å) entre el nitrógeno N3 del ligando y el residuo de Asp158. El anillo de piperazina, se ubica próximo al residuo catalítico de Cys25 (4.2 Å), lo cual podría explicar el aumento en la actividad inhibitoria de este compuesto a pH ácido debido a la capacidad de establecer interacciones electrostáticas entre los nitrógenos piperazínicos cargados positivamente y el átomo de azufre que sustenta una carga negativa.

La proximidad de la piperazina al residuo de Glu205 en los complejos CP-**36** (4.8 Å) y CP-**35** (4.5 Å) (Figura 5.6c y d) permite también explicar el aumento en la inhibición de estos derivados en condiciones ácidas (ver Capítulo 4, página 101). En el caso del derivado **34**, el cual no presenta un aumento de actividad con la protonación se observa que, en la conformación más estable obtenida a partir del estudio de *docking*, el residuo de piperazina no se ubica cercano a ningún residuo capaz de establecer interacciones electrostáticas (Figura 5.6b).

Como se aprecia en la Figura 5.6, los compuestos están modelados utilizando el tautómero determinado a partir del espectro de RMN realizado en acetona (Capítulo 3, página 74). El modelado de los distintos derivados en la forma tautomérica observada en solución acuosa para el compuesto **33** (Tabla 5.1, página 107), no dio resultados concordantes con los datos experimentales. Esto podría estar indicando falta de consistencia entre ambos tipos de estudios, sin embargo, otra interpretación posible es que los estudios son consistentes en el entendido que en el ambiente hidrofóbico de la enzima los derivados podrían encontrarse en la forma tautomérica observada en acetona.

6. Conclusiones

6.1. Química

La síntesis de los compuestos híbridos derivados de benzofuroxano correspondientes a la *Serie I* implicó el ensayo y búsqueda de distintas estrategias sintéticas, tanto para la obtención de los compuestos carbonílicos de partida, en particular los derivados **19** y **20**, como para la obtención de los productos finales. Los compuestos **19** y **20** pudieron ser preparados con buenos rendimientos utilizando irradiación por microondas en ausencia de disolvente. Se obtuvieron once productos finales con rendimientos de buenos a excelentes mediante la condensación de los benzofuroxanos conteniendo una funcionalidad aldehído o cetona (**17-20**) con distintas hidrazidas adecuadamente sustituidas. A partir de los distintos benzofuroxanos preparados en el presente trabajo y de los prototipos **III-V** se sintetizaron trece nuevos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol con rendimientos moderados.

Para la síntesis de las arilguanidinas de partida, necesarias para la obtención de los compuestos híbridos derivados de benzofuroxano correspondientes a la *Serie II* se ensayaron diversas rutas sintéticas que permitieron concluir que la falta de reactividad de las aminas primarias utilizadas podría ser la principal responsable de la ausencia de reacción observada. Cuando se utilizó una amina secundaria como reactivo, las cuatro carboxamidinas de interés fueron obtenidas con excelentes rendimientos. La reacción de los correspondientes reactivos con 5(6)-bromometilbenzofuroxano en ausencia de base y utilizando acetonitrilo como disolvente, condujo a la obtención de cuatro benzofuroxanos finales con muy buenos rendimientos. Se obtuvieron, además, tres nuevos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol con rendimientos moderados.

Mediante experimentos de RMN fue posible determinar la forma tautomérica que adoptan los derivados de esta serie en las condiciones del experimento. Para el derivado **33** se observó, además, que el mismo adopta en solución acuosa una forma tautomérica diferente a la observada en un disolvente más apolar como acetona. Utilizando distintas estrategias experimentales y teóricas, se pudo determinar la disposición espacial que adoptan los sustituyentes aromáticos de los distintos derivados de la *Serie II*. Estos resultados son altamente relevantes, ya que dan una pauta de la conformación que podría adoptar una determinada molécula

dependiendo del entorno presente en el sitio de unión de una potencial diana terapéutica.

6.2. Evaluación biológica

6.2.1. Evaluación de la actividad frente a *Trypanosoma cruzi* y estudio de citotoxicidad en células mamíferas

Con respecto a los derivados de la *Serie I* se han identificado nuevos derivados de benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol con una interesante actividad tripanosomicida. En especial, los derivados **32e**, **42b** y **42e** presentan una excelente actividad anti-*T. cruzi* lo cual indica que la sustitución en posición 2 a nivel del grupo feniloxi podría jugar un rol relevante en la bioactividad observada. Además, estos derivados presentan una actividad tripanosomicida mayor a la de los fármacos de referencia Nfx y Bnz, siendo el derivado **32e** uno de los compuestos más selectivos desarrollados con un $IS_{\text{macrófagos}/T. \text{cruzi}} > 111$, lo cual lo convierte en un excelente líder para futuros estudios en modelos animales de enfermedad de Chagas.

La ausencia de actividad tripanosomicida de los intermedios hidrazona **3-5** demuestra que la combinación de más de una unidad farmacofórica en la misma molécula ha resultado una excelente estrategia para el descubrimiento de nuevos prototipos moleculares.

Los derivados de la *Serie II* presentan en todos los casos una excelente actividad anti-*T. cruzi*, encontrándose los compuestos **33** y **43**, derivados del sistema benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol, respectivamente, entre las moléculas más activas sintetizadas en nuestro laboratorio. Todos los derivados de esta serie presentan índices de selectividad frente a GRH mayores a 11, siendo el derivado **43** el más selectivo con un $IS_{\text{GRH}/T. \text{cruzi}} > 50$.

Este grupo de compuestos muestra una clara correlación entre el sustituyente a nivel del agrupamiento carboxamida y la actividad antiparasitaria. La tendencia observada en este sentido es, en actividad decreciente, fenetilo > fenilo > bencilo > furilo.

En la Tabla 6.1 se muestra que todos los nuevos derivados que presentan un perfil interesante de actividad frente a *T. cruzi* cumplen con las condiciones que debe

tener un candidato a fármaco según las reglas de Lipinski,¹ a saber, número de dadores de enlace de hidrógeno < 5, número de aceptores de enlace de hidrógeno < 10, logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua (LogP) < 5 y peso molecular < 500.

Tabla 6.1. Propiedades estimadas de algunos de los compuestos desarrollados²

Ref.	LogP	nON	nOHNH	PM	nviolaciones	IC ₅₀ Tul2 (μM)
17	3.28	6	0	270.2	0	8.7
19	3.23	6	0	270.2	0	6.3
20	3.33	6	0	284.3	0	7.0
30a	4.86	8	2	419.5	0	7.0
31b	3.40	8	3	343.4	0	15
31c	4.43	8	2	383.4	0	13
32e	4.82	8	2	419.5	0	3.6
40b	2.94	8	3	385.4	0	24
42e	3.93	8	2	425.5	0	2.7
42d	4.35	8	2	461.5	0	7.7
42b	2.37	9	3	369.4	0	4.7
33	4.73	8	1	456.5	0	1.2
34	4.32	8	1	442.5	0	7.3
35	4.62	8	1	428.5	0	5.8
36	3.58	9	1	432.5	0	15
43	4.26	8	1	498.6	0	1.0
44	3.85	8	1	484.6	0	3.0
45	3.11	9	1	474.6	0	15
Nfx	0.71	8	0	287.3	0	7.7

¹log P: logaritmo del coeficiente de partición (n-octanol/agua) del compuesto. nON: número de aceptores de enlace de hidrógeno. NOHNH: número de dadores de enlace de hidrógeno. PM: peso molecular. nviolaciones: número de violaciones a la regla de Lipinski

6.2.2. Estudios de inhibición de Cruzipaína

Dentro de los derivados de la *Serie I* se encontraron cinco compuestos que presentan una actividad interesante frente a CP a pH 7.4, siendo todos ellos tiosemicarbazonas de benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol. Con respecto a la relación entre la estructura y la actividad frente a CP se observó que la sustitución en posición 3 a nivel del grupo feniloxi del sistema benzofuroxano o 1,3-dióxido de benzimidazol causa un aumento en la potencia inhibitoria de los compuestos, siendo la tendencia observada, en actividad inhibitoria de CP decreciente, *meta* > *para* > *orto*.

La evaluación de la amidinohidrazona **31a** a pH 5.4 muestra una disminución en la actividad inhibitoria, lo cual indica que para este compuesto los nitrógenos

⁽¹⁾ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

⁽²⁾ El log P y la violación a las reglas de Lipinski se determinaron utilizando la herramienta de cálculo de propiedades moleculares Molinspiration: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

protonables del ligando efectivamente interaccionan, en su forma neutra, con residuos de la proteína y que dichas interacciones se ven favorecidas a pH fisiológico.

Los resultados de inhibición de la actividad enzimática indican que el mecanismo de acción tripanosomicida de estos compuestos no guarda relación con la inhibición de CP. De hecho, los derivados más activos en *T. cruzi* **32e**, **42b** y **42e** resultan completamente inactivos frente a la proteasa del parásito.

Ninguno de los derivados de la *Serie II* resulta ser buen inhibidor de CP a pH 7.4, observándose en todos los casos valores de IC₅₀ mayores a 100 μM. Sin embargo, a pH 5.4 la actividad inhibitoria de estos derivados aumenta notablemente, en especial en el caso del compuesto **36** que presenta un aumento en su potencia inhibitoria cercano al 50 % en condiciones ácidas. Estos resultados indican que la protonación de los nitrógenos piperazínicos en condiciones ácidas resulta favorable para la interacción con la enzima. Este es un dato sumamente relevante, ya que la presencia en el inhibidor de agrupamientos cargados positivamente, capaces de establecer interacciones electrostáticas con el residuo de Glu205 presente en el sitio activo de la enzima, resulta clave para que los mismos presenten selectividad frente a CP en relación a las catepsinas humanas³.

El ensayo de inhibición de la actividad enzimática en presencia de Triton X-100 permitió confirmar que los derivados más activos de la *Serie I* y la *Serie II* son inhibidores auténticos de CP, ya que la inhibición no específica pudo ser descartada debido a que la capacidad inhibitoria de los derivados **31c** y **36** no se vio afectada en presencia de 0.01 % del detergente.

6.3. Estudios de la interacción inhibidor-cruzipaína por RMN y *docking*

A partir de los estudios de *docking* se observó que todos los derivados que presentan actividad frente a CP son capaces de establecer interacciones con distintos aminoácidos presentes en el sitio activo de la enzima, destacándose la importancia de las interacciones hidrofóbicas en relación a la estabilidad del complejo inhibidor-CP. Interesantemente, la disposición espacial de los distintos derivados

³ Gillmor, S.A.; Craik, C.S.; Fletterick, R.J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1603-1611.

amidinohidrazonas y arilguanidinas en el sitio de unión de CP ha permitido explicar el comportamiento diferencial de estos compuestos en condiciones ácidas y neutras.

Los resultados obtenidos a partir de los distintos estudios de RMN (T1, DTS y DOSY) de las arilguanidinas **33** y **36**, confirman los resultados del estudio teórico y han permitido validar el modelo de *docking* como una herramienta bioinformática capaz de predecir adecuadamente la interacción de esta familia de compuestos con CP. Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de los experimentos de RMN indican que los derivados **33** y **36** se unen reversiblemente a la enzima. Estos datos muestran que pese a la modesta inhibición que presentan los derivados de la *Serie II* frente a CP, estos compuestos cumplen con requisitos estructurales necesarios para ser considerados prototipos moleculares interesantes, a saber, apilamiento de los agrupamientos aromáticos que estabilizan el complejo inhibidor-CP, unión reversible a la enzima y presencia de agrupamientos protonables capaces de establecer interacciones electrostáticas con aminoácidos que sustentan una carga negativa.

7. Materiales y Métodos

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Química. Aspectos Generales

Los reactivos de origen comercial se utilizaron sin purificación previa, excepto que se especifique. Los disolventes fueron destilados antes de usarse. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por CCF. Se utilizó sílica gel con indicador U.V. en placas de poliéster. Los cromatogramas se revelaron por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta a 254 nm, revelado con reactivo de Brady [2,4-dinitrofenilhidracina] o asperjado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico:anisaldehído (95:4:1) (v:v:v) y posterior quemado. Para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel (Merck, 60-230 mesh) o alúmina neutra (Merck, 70-230 mesh). Los espectros de resonancia magnética nuclear, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, se realizaron a 303 K en un equipo BRUKER DPX400 (400 MHz), utilizando los disolventes deuterados que se indican en cada caso y empleando tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). Las multiplicidades se designan como: **s** singulete, **d** doblete, **t** triplete, **c** cuarteto, **m** multiplete, **sa** señal ancha. Las secuencias de pulsos utilizadas para los experimentos HMQC, HMBC y NOE son las establecidas por defecto en el software del equipo. Para los experimentos de NOE diferencial se utilizó un tiempo de mezclado de 250 ms. Los espectros de masas (MS) se realizaron en un espectrómetro de masa HEWLETT PACKARD MSD 5973 o LC/MSD-Serie 100 utilizando impacto electrónico (IE) o ionización por electrospray (ESI), respectivamente. Los espectros infrarrojo fueron realizados en un equipo Perkin-Elmer 1310, utilizando pastillas de KBr. Los microanálisis se realizaron con un instrumento Fisons EA 1108 CHNS-O. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100 y no fueron corregidos.

7.2. Preparación de *N*-óxido de 5(6)-metilbenzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 1¹

Una mezcla de 5.75 g de KOH (103 mmol) y 100 mL de etanol se calienta bajo agitación durante 15 minutos hasta observar disolución del sólido. Se deja enfriar y se agrega 5-metil-2-nitroanilina (12.5 g, 82.4 mmol). Posteriormente se agregan a 0 °C, durante un lapso de 10 minutos, 135 mL de NaOCl (40 g Cl₂/L). El producto se

⁽¹⁾Mallory, F.B. Benzofurazan Oxide. *Org. Syn.* **1957**, Coll. Vol. *4*, 74.

filtra y se lava con EP obteniéndose un sólido amarillo el cual, comparado con un patrón, se corresponde con el producto (89 %).

7.3. Preparación de *N*-óxido de 5(6)-(bromometil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 2²

A 10 g (66.7 mmol) de **1** en 200 mL de CCl₄ se agrega peróxido de dibenzoilo (0.32 g, 1.33 mmol) y *N*-bromosuccinimida (13.0 g, 73.4 mmol). La mezcla se agita a reflujo durante 7 h, se filtra y se destila el disolvente a presión reducida. El crudo se recrystaliza de EP:AcOEt 98:2, obteniéndose un sólido blanco (60 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 4.46 (s, 2H), 7.12-7.40 (sa, 3H).

7.4. Preparación de hidrazonas³

Procedimiento general. A una disolución acuosa de AcONa (1.4 eq) y la hidrazida correspondiente (0.7 eq) se agrega lentamente una disolución etanólica del aldehído correspondiente (1 eq). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado se filtra y se lava sucesivamente con H₂O, EtOH y Et₂O.

Semicarbazona de 2-hidroxibenzaldehído, 3. Sólido blanco (55 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 6.37 (s, 2H), 6.84 (m, 2H), 7.18 (dd, 1H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 8.0 Hz), 7.74 (d, 1H, ³J= 7.6 Hz), 8.15 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 10.16 (s, 1H).

Amidinohidrazona de 2-hidroxibenzaldehído, 4. Sólido blanco (60 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.52 (s, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.83 (m, 2H), 7.14 (dd, 1H, ³J₁= 6.8 Hz, ³J₂= 8.2 Hz), 7.34 (d, 1H, ³J= 8.2 Hz), 8.19 (s, 1H).

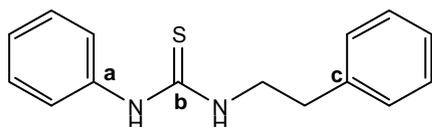
Tiosemicarbazona de 4-hidroxibenzaldehído, 5. Sólido blanco (35 %). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 6.79 (d, 2H, ³J= 8.4 Hz), 7.61 (d, 2H, ³J= 8.4 Hz), 7.80 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 11.20 (s, 1H).

² Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizábal, F.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Morello, A.; Repetto, Y.; Maya, J. D. Novel benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as antichagasic agents: Chemical and biological studies. *Letts. Drugs Des. Dis.* **2005**, *2*, 294-301.

³ Aggarwal, N.; Mishra, P. Synthesis and evaluation of 4-substituted semicarbazones of levulinic acid for anticonvulsant activity. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **2005**, *6B*, 617-621.

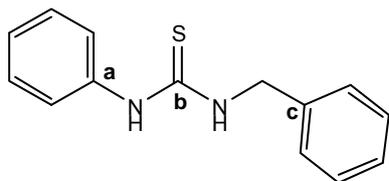
7.5. Preparación de tioureas⁴

Procedimiento general. A una solución de la amina correspondiente (1 eq) en DMF (1 mL/mol de amina) se agrega a 0 °C fenilisotiocianato (1 eq). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12-24 h. Se agrega HCl (10 %) y se extrae con AcOEt (3 × 50 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se reduce el volumen de disolvente a presión reducida. El precipitado se filtra y se lava con EP.



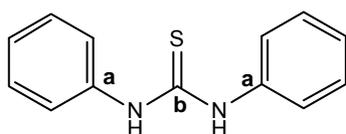
N-phenil-N'-feniltiourea, 6. Sólido blanco (61 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2.94 (t, 2H, ³J= 6.8 Hz), 3.91 (t, 2H, ³J= 6.8 Hz), 7.02 (d, 2H, ³J=7.2 Hz), 7.17 (d, 2H, ³J=6.8 Hz), 7.24 (m, 2H), 7.32 (m, 4H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 34.8 [CH₂], 46.4 [CH₂], 125.2 [Ar], 126.7 [Ar], 127.4 [Ar], 128.8 [Ar], 130.2 [Ar], 135.6 [Ca], 138.3 [Cc], 180.0 [Cb].



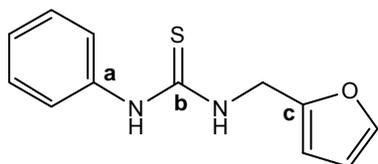
N-bencil-N'-feniltiourea, 7. Sólido beige (65 %).

¹H-NMR (acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 4.90 (d, 2H, ³J= 5.6 Hz), 7.23 (d, 2H, ³J= 7.6 Hz), 7.34 (m, 6H), 7.43 (dd, 2H, ³J₁= 8.00 Hz, ³J₂= 7.6 Hz, ⁴J= 2.0 Hz). **¹³C-NMR** (acetona-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 49.5 [CH₂], 125.4 [Ar], 127.5 [Ar], 127.7 [Ar], 127.8 [Ar], 128.9 [Ar], 130.2 [Ar], 135.8 [Ca], 137.2 [Cc], 181.3 [Cb].



N,N'-difeniltiourea, 8. Sólido beige (63 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.32 (m, 2H), 7.43 (m, 8H), 8.25 (sa, 1H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 125.4 [Ar], 127.3 [Ar], 129.7 [Ar], 136.9 [Ca], 161.6 [Cb].

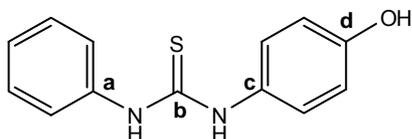


N-fenil-N'-furltiourea, 9. Sólido beige (90 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 4.88 (d, 2H, ³J= 3.6 Hz), 6.33 (m, 2H), 7.23 (dd, 2H, ³J= 8.4 Hz, ⁴J= 1.2 Hz), 7.33 (m, 2H), 7.44 (dt, 2H, ³J₁= 8.4 Hz, ³J₂= 6.4 Hz).

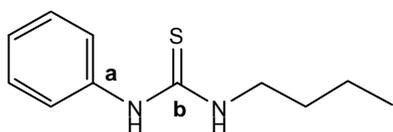
¹⁴⁾ Lee, J.; Lee, J.; Kang, M.; Shin, M.; Kim, J.-M.; Kang, S.-U.; Lim, J.-O.; Choi, H.-K.; Suh, Y.-G.; Park, H.-G.; Oh, U.; Kim, H.-D.; Park, Y.-H.; Ha, H.-J.; Kim, Y.-H.; Toth, A.; Wang, Y.; Tran, R.; Pearce, L.V.; Lundberg, D.J.; Blumberg, P.M. *N*-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-*N'*-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues: Novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3116-3126.

Hz, $^4J_1 = 1.6$ Hz, $^4J_2 = 2.0$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 42.1 (CH_2), 108.2 (Ar), 110.5 (Ar), 121.1 (Ar), 125.2 (Ar), 127.5 (Ar), 129.1 (Ar), 130.3 (Ar), 135.9 (Ca), 142.4 (Ar), 150.2 (Cc), 180.7 (Cb).



N-fenil-N'-(4-hidroxifenil)tiourea, 10. Sólido blanco (33 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 6.89 (m, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.12 (dd, 1H, $^3J = 8.4$

Hz, $^4J = 1.2$ Hz), 7.42 (m, 3H), 7.73 (dd, 1H, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz), 7.93 (dd, 1H, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz), 8.25 (sa, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 116.1 (Ar), 121.1 (Ar), 123.6 (Ar), 124.8 (Ar), 127.7 (Cc), 128.0 (Ar), 129.4 (Ar), 137.6 (Ca), 157.7 (Cd), 207.5 (Cb).

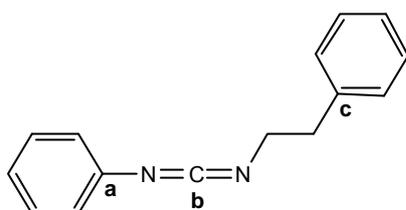


N-butil-N'-feniltiourea, 11. Sólido blanco (88 %). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 1.00 (t, 3H, $^3J = 7.2$ Hz), 1.40 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 3.47 (m, 1H),

3.59 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 7.12 (dd, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz), 7.34 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ (ppm): 14.0 (CH_3), 20.2 (CH_2), 30.9 (CH_2), 44.6 (CH_2), 121.5 (Ar), 124.5 (Ar), 129.0 (Ar), 139.2 (Ca), 179.1 (Cb).

7.6. Preparación de carbodiimidas⁵

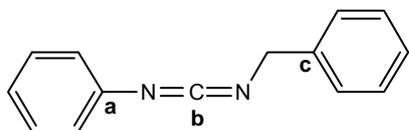
Procedimiento general. A una solución de la tiourea correspondiente (1 eq) en CH_2Cl_2 (10 mL/mmol de tiourea) se agrega DIPEA (3 eq) y 2-cloro-N-metilpiridinio (1.7 eq). La mezcla se agita a temperatura ambiente hasta observar desaparición de la tiourea por CCF (SiO_2 , EP:AE 6:4). El precipitado que se forma se filtra sobre SiO_2 y se lava con EP:AE, 8:2. El filtrado se concentra a presión reducida obteniéndose la carbodiimida correspondiente.



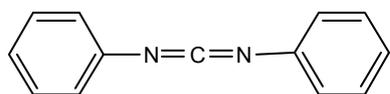
N-fenil-N'-fenilcarbodiimida, 12. Aceite amarillo (95 %). $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 3.01 (t, 2H, $^3J = 6.8$ Hz), 3.76 (t, 2H, $^3J = 6.8$ Hz), 6.87 (dd, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz), 8.00 (m, 1H),

⁵⁾ Tassoni, E.; Giannesi, F.; Bruneti, T.; Pessotto, P.; Renzulli, M.; Travagli, M.; Rajamáki, S.; Prati, S.; Dottori, S.; Corelli, F.; Cabri, W.; Carminati, P.; Botta, M. Novel substituted aminoalkylguanidines as potential antihyperglycemic and food intake-reducing agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3073-3076.

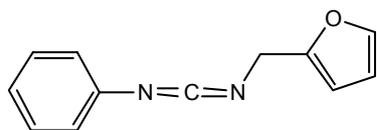
7.31 [m, 7H]. ¹³C-NMR [acetona-*d*₆, 100 MHz] δ (ppm): 37.2 [CH₂], 47.5 [CH₂], 123.0 [Ar], 124.7 [Ar], 126.4 [Ar], 128.5 [Ar], 129.0 [Ar], 129.3 [Ar], 135.8 [Cb], 138.8 [Cc], 141.0 [Ca].



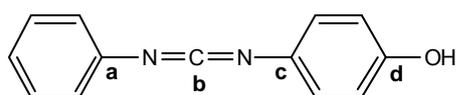
N-bencil-N'-fenilcarbodiimida, 13. Aceite marrón [85 %]. ¹H-NMR [acetona-*d*₆, 400 MHz] δ (ppm): 4.67 [s, 2H], 7.03 [dd, 2H, ³J= 8.2 Hz, ⁴J₁= 1.2 Hz, ⁴J₂= 0.8 Hz], 7.13 [t, 1H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 7.6 Hz], 7.32 [m, 3H], 7.41 [t, 2H, ³J₁= 8.0 Hz, ³J₂= 6.8 Hz], 7.47 [d, 2H, ³J= 6.8 Hz]. ¹³C-NMR [acetona-*d*₆, 100 MHz] δ (ppm): 49.9 [CH₂], 123.4 [Ar], 124.8 [Ar], 127.6 [Ar], 127.7 [Ar], 128.7 [Ar], 129.4 [Ar], 137.1 [Cb], 138.4 [Cc], 140.4 [Ca].



N,N'-difenilcarbodiimida, 14. Aceite marrón [40 %]. ¹H-NMR [acetona-*d*₆, 400 MHz] δ (ppm): 7.24 [m, 6H], 7.41 [m, 4H].



N-fenil-N'-furalcarbodiimida, 15. Aceite amarillo [64 %]. ¹H-NMR [CDCl₃, 400 MHz] δ (ppm): 4.53 [s, 2H], 6.34 [dd, 1H, ³J= 3.2 Hz, ⁴J= 0.8 Hz], 6.38 [dd, 1H, ³J= 3.2 Hz, ³J= 1.8 Hz], 7.06 [m, 3H], 7.31 [dd, 2H, ³J= 6.2 Hz, ⁴J= 1.6 Hz], 7.42 [dd, 1H, ³J= 1.8 Hz, ⁴J= 0.8 Hz].

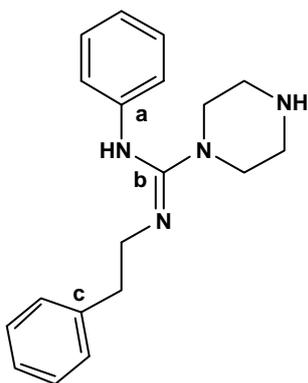


N-fenil-N'-(4-hidroxifenil)carbodiimida, 16. Aceite amarillo [31 %]. ¹H-NMR [CDCl₃, 400 MHz] δ (ppm): 6.73 [td, 2H, ³J= 6.8 Hz, ⁴J= 1.6 Hz], 7.29 [m, 4H], 7.52 [d, 2H, ³J= 8.0 Hz], 8.05 [dd, 2H, ³J= 6.2 Hz, ⁴J= 1.2 Hz]. ¹³C-NMR [CDCl₃, 100 MHz] δ (ppm): 112.4 [Ar], 118.2 [Cb], 124.0 [Ar], 125.8 [Ar], 128.5 [Cc], 129.7 [Ar], 133.8 [Ar], 135.1 [Ar], 138.4 [Cd], 141.8 [Ca].

7.7. Preparación de carboxamidinas⁵

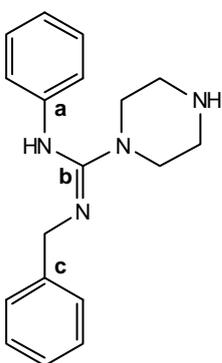
Procedimiento general. A una solución de la carbodiimida correspondiente (1 eq) en tolueno (10 mL/mmól de carbodiimida) se agrega 1-*tert*-butoxicarbonil)piperazina (1 eq). La mezcla se agita a 50 °C hasta observar desaparición de los reactivos por CCF (SiO₂, CH₂Cl₂:MeOH 9:1). Se evapora el tolueno a presión reducida y el producto

obtenido se utiliza en la siguiente etapa sin purificación. A una solución del producto anterior (1 eq) en CH_2Cl_2 (10 mL/mmol de carboxamidina) se agrega TFA (11 eq) y se agita a temperatura ambiente hasta observar desaparición del reactivo por CCF (SiO_2 , CH_2Cl_2 :MeOH 9:1). Se agrega solución saturada de NaHCO_3 y se extrae con CH_2Cl_2 (2 × 50 mL). La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto desprotegido.



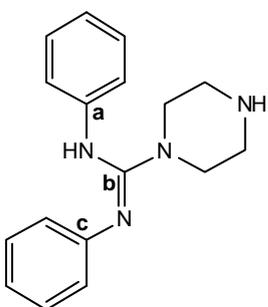
[Ca], 155.4 [Cb].

N-phenyl-N'-phenylpiperazine-1-carboxamide, 26. Aceite amarillo (96 %). $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.77 [m, 6H], 3.08 [t, 4H, $^3J=4.8$ Hz], 3.30 [t, 2H, $^3J_1=7.2$ Hz, $^3J_2=7.6$ Hz], 6.76 [dd, 2H, $^3J=8.4$ Hz, $^4J=1.2$ Hz], 6.84 [tt, 1H, $^3J_1=7.2$ Hz, $^3J_2=7.6$ Hz, $^4J=1.2$ Hz], 7.18 [m, 5H], 7.26 [m, 2H]. $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 36.3 [CH_2], 45.7 [CH_2], 48.9 [CH_2], 120.3 [Ar], 121.8 [Ar], 126.02 [Ar], 128.3 [Ar], 128.7 [Ar], 139.6 [Cc], 150.6



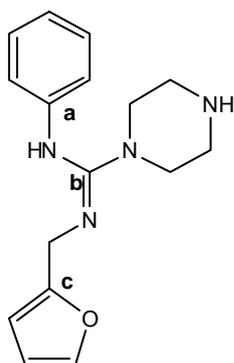
[Ar], 128.2 [Ar], 128.7 [Ar], 140.3 [Cc], 150.0 [Ca], 155.1 [Cb].

N-benzyl-N'-phenylpiperazine-1-carboxamide, 27. Aceite marrón (100 %). $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.79 [t, 4H, $^3J=4.8$ Hz], 3.18 [t, 4H, $^3J=4.8$ Hz], 4.31 [s, 2H], 6.73 [dd, 2H, $^3J=8.4$ Hz, $^4J_1=1.2$ Hz, $^4J_2=0.8$ Hz], 6.83 [t, 1H, $^3J_1=8.4$ Hz, $^3J_2=7.0$ Hz], 7.16 [t, 2H, $^3J_1=8.0$ Hz], 7.31 [dd, 5H, $^3J=5.6$ Hz, $^4J_1=2.8$ Hz, $^4J_2=0.8$ Hz]. $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 45.6 [CH_2], 47.9 [CH_2], 49.0 [CH_2], 120.6 [Ar], 121.6 [Ar], 126.8 [Ar], 127.6



[CH_2], 120.0 [Cc], 121.0 [Ar], 128.8 [Ar], 146.5 [Ca], 150.3 [Cb].

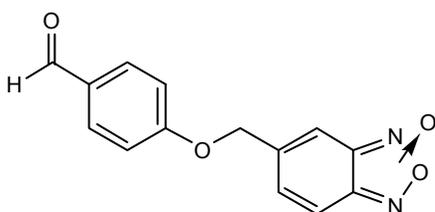
N,N'-diphenylpiperazine-1-carboxamide, 28. Sólido beige (78 %). $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.80 [t, 4H, $^3J_1=5.2$ Hz, $^3J_2=4.8$ Hz], 3.30 [t, 4H, $^3J_1=5.2$ Hz, $^3J_2=4.8$ Hz], 6.86 [ddd, 2H, $^3J_1=6.8$ Hz, $^3J_2=8.0$ Hz, $^4J_1=1.2$ Hz, $^4J_2=0.8$ Hz], 6.93 [d, 3H, $^3J=7.7$ Hz], 7.17 [dd, 5H, $^3J=7.8$ Hz, $^4J=1.2$ Hz]. $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 45.3 [CH_2], 45.8



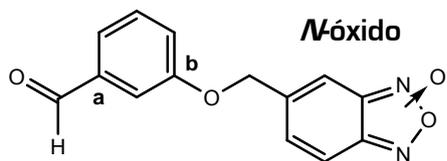
N-fenil-N'-furilpiperazina-1-carboxamida, 29. Aceite marrón (87 %). $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.80 (t, 4H, $^3J_1=5.2$ Hz, $^3J_2=4.8$ Hz), 3.17 (t, 4H, $^3J_1=5.2$ Hz, $^3J_2=4.8$ Hz), 4.23 (s, 2H), 6.22 (dd, 1H, $^3J=3.2$ Hz, $^4J=0.8$ Hz), 6.36 (dd, 1H, $^3J_1=3.2$ Hz, $^3J_2=1.8$ Hz), 6.72 (d, 2H, $^3J=7.2$ Hz), 6.85 (t, 1H, $^3J=7.2$ Hz), 7.17 (t, 2H, $^3J_1=7.6$ Hz, $^3J_2=8.0$ Hz), 7.47 (dd, 1H, $^3J=1.8$ Hz, $^4J=0.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 41.3 [CH₂], 45.6 [CH₂], 48.9 [CH₂], 106.7 [Ar], 110.3 [Ar], 120.6 [Ar], 121.4 [Ar], 128.8 [Ar], 141.8 [Ar], 149.8 [Ca], 153.5 [Cc], 154.9 [Cb].

7.8. Preparación de 5(6)-(O-aril)benzofuroxanos

Procedimiento general para la preparación de los derivados 17 y 18⁶. A una solución del hidroxibenzaldehído correspondiente (1 eq) en CH₃CN seco (5 mL/mmól de aldehído), se agrega K₂CO₃ (1 eq.) y 5(6)-bromometilbenzofuroxano (1 eq.). La mezcla se agita a TA bajo atmósfera de N₂ y se sigue por CCF (Al₂O₃, EP:AcOEt 7:3) hasta observar desaparición de los reactivos. Se destila el disolvente a presión reducida, se agrega H₂O y se extrae con AcOEt (3 x 50 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a vacío obteniéndose los productos deseados.



N-óxido de 5(6)-(4-formilfeniloximetil)benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol, 17. Sólido amarillo (70 %) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.41 (s, 2H), 7.30 (dd, 2H, $^3J=6.8$ Hz, $^4J=1.6$ Hz), 7.42-7.83 (sa, 3H), 7.94 (dd, 2H, $^3J=7.0$ Hz, $^4J=2.0$ Hz), 9.94 (s, 1H).

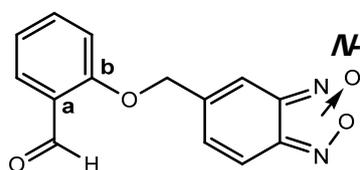


N-óxido de 5(6)-(3-formilfeniloximetil)benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol, 18. Sólido amarillo (80 %). PF: 145.8 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.16 (s, 2H), 7.31 (m, 1H), 7.36-7.69 (sa, 3H), 7.49 (s, 1H), 7.53 (d, 1H, $^3J=7.6$ Hz), 7.55 (t, 1H, $^4J_1=2.0$ Hz, $^4J_2=1.2$ Hz), 10.0 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 68.7

⁶ Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, M.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Campillo, N.E.; Páez, J.A.; Castro, A.; Krauth-Siegel, L.; Davies, C.; Basombrio, M.A.; González, M.; Cerecetto, H. *In vivo* anti-Chagas vinylthio, vinylsulfanyl and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6004-6015.

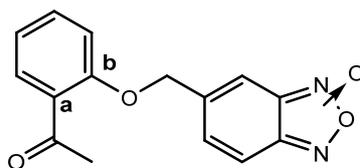
[CH₂], 112.4 [Ar], 122.2 [Ar], 124.9 [Ar], 130.5 [Ar], 137.9 [Ca], 158.4 [Cb], 191.8 [CHO]. **MS (EI)**, *m/z* [abundancia, %]: 270 (M⁺, 2), 254 (10), 149 (19), 133 (76), 121 (15), 77 (27). [Encontrado: C, 61.9; H, 3.5; N, 10.2. C₁₄H₁₀N₂O₄ requiere C, 62.2; H, 3.7; N, 10.4].

Procedimiento general para la preparación de los derivados 19 y 20. Una mezcla de 5(6)-bromometilbenzofuroxano [1 eq], 2-hidroxibenzaldehído ó 2-hidroxiacetofenona [1.2 eq.] y TBAI [0.1 eq.] se somete a radiación de microondas (300 W) durante 1.30 minutos. La mezcla se deja enfriar, se agrega H₂O y se extrae con AcOEt (4 x 50 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a vacío. El crudo se purifica por CC (SiO₂ flash, EP:AcOEt 7:3).



N-óxido de 5(6)-(2-formilfeniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 19. Sólido amarillo (65 %), **PF:** 145.8 °C, desc. **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.37 (s, 2H),

7.15 (t, 1H, ³J= 7.5), 7.33 (d, 1H, J= 8.4 Hz), 7.69 (t, 1H, ³J₁= 8.6 Hz, ³J₂= 7.4 Hz), 7.57-7.77 (sa, 3H), 7.76 (d, 1H, J= 7.5 Hz), 10.5 (s, 1H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 69.5 [CH₂], 114.8 [Ar], 122.2 [Ar], 125.5 [Ca], 129.3 [Ar], 137.2 [Ar], 160.7 [Cb], 190.2 [CHO]. **MS (EI)**, *m/z* [abundancia, %]: 270 (M⁺, 2), 253 (30), 149 (100), 133 (49), 121 (38), 105 (11), 89 (47), 77 (12). [Encontrado: C, 62.0; H, 3.3; N, 10.1. C₁₄H₁₀N₂O₄ requiere C, 62.2; H, 3.7; N, 10.4].

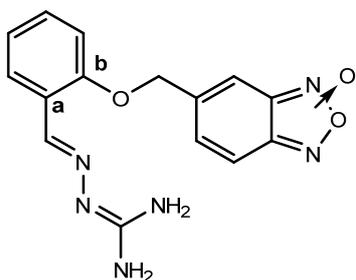


N-óxido de 5(6)-(2-acetilfeniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 20. Sólido amarillo (32 %), **PF:** 125.7-126.4 °C. **¹H-NMR** (acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.59 (s, 3H),

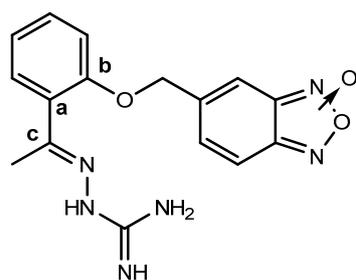
5.41 (s, 2H), 7.09 (dt, 1H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 7.8 Hz, ⁴J₁= 0.8 Hz, ⁴J₂= 0.4 Hz), 7.29 (d, 1H, J= 8.4 Hz), 7.54 (m, 1H), 7.58-7.68 (sa, 3H), 7.71 (dd, 1H, ³J= 7.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz). **¹³C-NMR** (acetona-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 31.1 [CH₃], 69.2 [CH₂], 113.4 [Ar], 121.1 [Ar], 128.9 [Ca], 130.0 [Ar], 133.5 [Ar], 157.3 [Cb], 198.1 [C=O]. **MS (ESI)**, *m/z*: 307 (M + Na⁺). [Encontrado: C, 63.7; H, 4.2; N, 9.5. C₁₅H₁₂N₂O₄ requiere C, 63.4; H, 4.2; N, 9.8].

7.9. Preparación de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona.

Procedimiento general para la preparación de los derivados 31a, 32b y 32c. A una solución del reactivo carbonílico correspondiente (**18** ó **20**, 1 eq.), en etanol seco (50 mL/mmol de reactivo carbonílico, se agrega bicarbonato de aminoguanidina (1 eq) y AcONa (2eq). La mezcla se agita a TA bajo atmósfera de nitrógeno hasta observar desaparición del aldehído por CCF (SiO₂, EP:AcOEt 6:4). El precipitado se filtra y se lava con etanol.

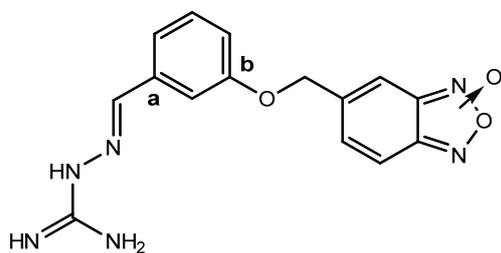


Nóxico de 5(6)-(2-amidinohidrazonofeniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 32b. Sólido amarillo (77 %), **PF:** 212.2 °C, desc. **¹H-NMR** (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 5.23 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 5.89 (s, 2H), 6.97 (t, 1H, ³J₁= 7.6 Hz, ³J₂= 7.2 Hz), 7.12 (t, 1H, ³J₁= 8.4 Hz, ³J₂= 9.2 Hz), 7.27 (t, 1H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 8.0 Hz), 7.49-7.78 (sa, 3H), 8.00 (d, 1H, ³J= 7.6 Hz), 8.39 (s, 1H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 69.2 [CH₂], 113.2 [C], 113.7 [Ar], 122.0 [Ar], 126.3 [Ca], 126.5 [Ar], 129.8 [Ar], 139.0 [CH], 156.0 [Cb], 161.3 [C-NH₂]. **MS (EI)**, *m/z* (abundancia, %): 326 (M⁺, 5), 310 (23), 252 (14), 237(9), 221 (11), 177 (34), 161 (82), 133 (41), 119 (64), 107(28), 73 (100). (Encontrado: C, 55.3; H, 4.6; N, 25.3. C₁₅H₁₄N₆O₃ requiere C, 55.2; H, 4.3; N, 25.7).



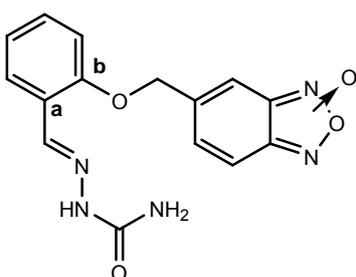
Nóxico de 5(6)-(2-metamidinohidrazonofeniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 32c. Sólido beige (67 %), **PF:** 129.0 °C, desc. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.56 (s, 3H), 5.32 (s, 2H), 7.08 (t, 3H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 7.6 Hz), 7.27 (d, 1H, ³J= 8.4 Hz), 7.52-7.89 (sa, 3H), 7.57 (dt, 1H, ³J₁= 7.2 Hz, ³J₂= 8.4Hz, ⁴J= 2.0 Hz), 7.65 (dd, 1H, ³J= 7.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 40.2 [CH₃], 69.2 [CH₂], 114.1 [Ar], 121.5 [Ar], 128.6 [Ca], 130.2 [Ar], 134.3 [Ar], 155.8 [C=NH], 157.2 [Cb], 167.2 [Cc]. **MS (EI)**, *m/z* (abundancia, %): 267 (M⁺ -NH₂CNHNHNH, 54), 250 (7), 205 (9), 149 (61), 133 (100), 121 (50), 103 (21), 89 (48), 77 (26). **IR** (KBr) ν(cm⁻¹): 3355, 3129, 3045,

2907, 1668, 1591, 1539, 1491, 1356, 1300, 1111, 774, 616. [Encontrado: C, 56.3; H, 5.0; N, 24.6. $C_{16}H_{16}N_6O_3$ requiere C, 56.5; H, 4.7; N, 24.7].

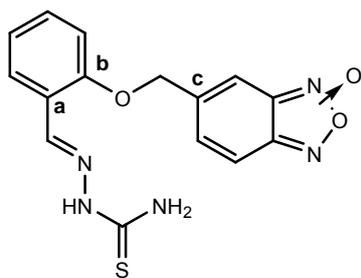


Nóxido de **5(6)-(3-amidinohidrazonofeniloximetil)benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol, 31a**. Sólido beige (85 %), **PF**: 155.2 °C, desc. **1H -RMN** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 5.23 (s, 2H), 7.15 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.46-7.89 (sa, 3H), 7.67 (s, 1H), 8.09 (s, 1H). **^{13}C -NMR** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 68.4 (CH₂), 113.1 (Ar), 117.9 (Ar), 121.9 (Ar), 130.4 (Ar), 147.0 (CH), 135.3 (Ca), 155.7 (C=NH), 158.7 (Cb). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 326 (M⁺, 5), 310 (7), 252 (10), 237(9), 221 (12), 177 (26), 161 (75), 133 (46), 119 (60), 107(30), 73 (100). [Encontrado: C, 54.9; H, 4.0; N, 25.4. $C_{15}H_{14}N_6O_3$ requiere C, 55.2; H, 4.3; N, 25.7].

Procedimiento general para la preparación de los derivados 32a, 32d-f, 31b-c y 30a-b. A una solución del reactivo carbonílico correspondiente (**17-19**) (1 eq) en EtOH seco (50 mL/mmol de reactivo carbonílico) se agrega ácido acético (0.1 %) y tiosemicarbazida, *N*-feniltiosemicarbazida, *N*-aliltiosemicarbazida o hidrocloreuro de semicarbazida (1 eq.). La mezcla se agita a TA bajo atmósfera de N₂ hasta observar desaparición del aldehído por CCF (SiO₂, EP:AcOEt 6:4). El precipitado se filtra y se lava con EtOH.

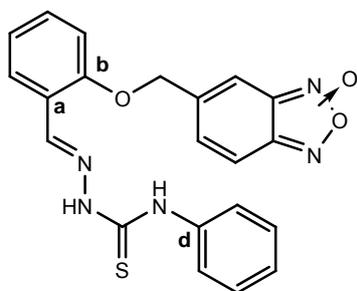


Nóxido de **5(6)-(2-semicarbazonofeniloximetil)benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol, 32a**. Sólido beige (56 %), **PF**: 237.6 °C, desc. **1H -NMR** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 5.26 (s, 2H), 6.44 (s, 2H), 7.02 (t, 1H, $^3J_1 = 7.2$ Hz, $^3J_2 = 7.6$ Hz), 7.17 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.36 (t, 1H, $^3J_1 = 8.6$ Hz, $^3J_2 = 7.6$ Hz), 7.48-7.83 (sa, 3H), 7.49 (s, 1H), 8.04 (d, 1H, $^3J_1 = 7.2$ Hz), 8.36 (s, 1H), 10.32 (s, 1H). **^{13}C -NMR** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 69.3 (CH₂), 114.0 (Ar), 122.2 (Ar), 124.3 (Ca), 126.6 (Ar), 131.2 (Ar), 135.6 (CH), 156.5 (Cb), 157.6 (C=O). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 311 (M⁺ - 16, 5), 252 (13), 237 (69), 221 (10), 133 (100), 121 (26), 107 (11). [Encontrado: C, 54.8; H, 3.8; N, 21.1. $C_{15}H_{13}N_5O_4$ requiere C, 55.0; H, 4.0; N, 21.4].



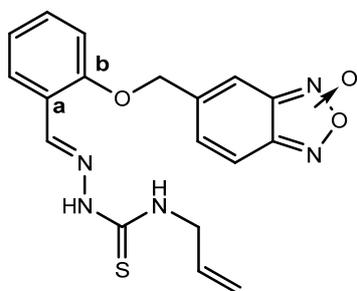
Nóxido de 5(6)-(2-tiosemicarbazonofeniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-

oxadiazol, **32d**. Sólido amarillo (79 %), **PF**: 215.0 °C, desc. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 5.27 (s, 2H), 7.03 (dd, 1H, ³J₁ = 7.6 Hz, ³J₂ = 7.4 Hz), 7.20 (d, 1H, ³J₁ = 8.4 Hz), 7.42 (dd, 1H, ³J₁ = 7.4 Hz, ³J₂ = 8.2 Hz), 7.49-7.79 (sa, 3H), 7.96 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, ³J = 7.6 Hz), 8.62 (s, 1H), 11.5 (s, 1H). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 69.3 (CH₂), 114.0 (Ar), 122.2 (Ar), 123.6 (Ca), 127.1 (Ar), 132.2 (Ar), 138.9 (CH), 157.1 (Cb), 163.2 (Cc), 178.7 (C=S). **MS (EI)**, *m/z* (abundancia, %): 327 (M⁺ - 16, 12), 311 (2), 269 (12), 252 (21), 237 (26), 151 (36), 133 (100), 121 (39), 103 (26). (Encontrado: C, 52.2; H, 3.5; N, 20.1. C₁₅H₁₃N₅O₃S requiere C, 52.5; H, 3.8; N, 20.4).



Nóxido de 5(6)-(2-(*N*-feniltiosemicarbazono)feniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-

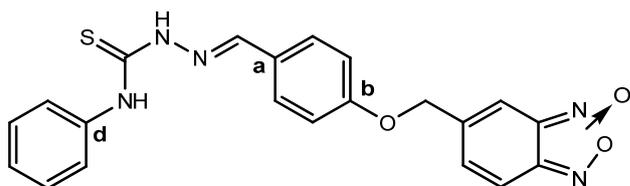
oxadiazol, **32e**. Sólido beige (84 %), **PF**: 164.3 °C, desc. **¹H-RMN** (MeOH-*d*₄, 400 MHz) δ (ppm): 5.38 (s, 2H), 7.08 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz), 7.20 (t, 1H, ³J₁ = 7.6 Hz, ³J₂ = 7.2 Hz), 7.27 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.37 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.46 (dt, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.52-7.72 (sa, 3H), 7.77 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz), 8.20 (dd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 8.86 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 10.7 (s, 1H). **¹³C-NMR** (MeOH-*d*₄, 100 MHz) δ (ppm): 69.4 (CH₂), 113.5 (Ar), 122.0 (Ar), 123.4 (Ca), 125.1 (Ar), 125.5 (Ar), 127.0 (Ar), 128.5 (Ar), 131.8 (Ar), 138.7, (CH), 139.4 (Cd), 157.4 (Cb), 176.9 (C=S). **MS (EI)**, *m/z* (abundancia, %): 419 (M⁺, 0.2), 401 (10), 268 (19), 252 (17), 237 (44), 151 (33), 133 (94), 119 (29), 93 (100). (Encontrado: C, 60.3; H, 4.4; N, 16.4. C₂₁H₁₇N₅O₃S requiere C, 60.1; H, 4.1; N, 16.7).



Nóxido de 5(6)-(2-(*N*-aliltiosemicarbazono)feniloximetil)benzo[1,2-*c*]1,2,5-

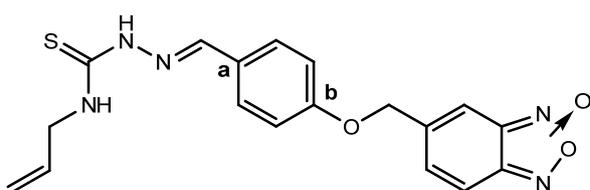
oxadiazol, **32f**. Sólido beige (73 %), **PF**: 191.4 °C, desc. **¹H-RMN** (MeOH-*d*₄, 400 MHz) δ (ppm): 4.36 (m, 2H), 5.11 (dd, 1H, ²J_{gem} = 1.6 Hz, ³J_{cis} = 10.0 Hz), 5.23 (dd, 1H, ²J_{gem} = 1.6 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz), 5.36 (s, 2H), 6.00 (m, 1H), 7.05 (t, 1H, ³J = 7.6 Hz), 7.24 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz), 7.43 (dt, 1H, ³J₁ = 7.2 Hz, ³J₂ = 8.4 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.56-7.78 (sa, 3H), 8.06 (dd, 1H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 8.38

(s, 1H), 8.77 (s, 1H), 10.5 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 100 MHz) δ (ppm): 45.9 (CH₂), 69.3 (CH₂), 113.5 (Ar), 115.6 (C=C), 121.9 (Ar), 123.6 (Ca), 126.5 (Ar), 131.7 (Ar), 135.2 (C=C), 138.0, (CH), 157.2 (Cb), 176.7 (C=S). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 383 (M⁺, 0.3), 366 (5), 268 (19), 254 (21), 237 (10), 133 (36), 115 (100). [Encontrado: C, 56.1; H, 4.3; N, 17.9. C₁₈H₁₇N₅O₃S requiere C, 56.4; H, 4.5; N, 18.3].



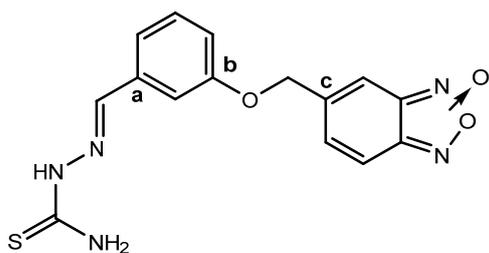
Nóxido de **5(6)-[4-(N-phenylthiosemicarbazone)feniloximetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 30a**. Sólido amarillo (51 %), **PF**: 180.0 °C, desc. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 ,

400 MHz) δ (ppm): 5.26 (s, 2H), 7.13 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.21 (t, 1H, $^3J_1 = 7.6$ Hz, $^3J_2 = 7.2$ Hz), 7.37 (t, 2H, $^3J_1 = 7.6$ Hz, $^3J_2 = 8.4$ Hz), 7.56 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz), 7.60-7.84 (bs, 3H), 7.89 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 8.11 (s, 1H), 10.1 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 68.5 (CH₂), 115.5 (Ar), 125.7 (Ar), 126.3 (Ar), 127.7 (Ca), 128.5 (Ar), 129.8 (Ar), 139.6 (Cd), 143.1 (CH), 159.8 (Cb), 176.1 (C=S). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 401 (M⁺ - 18, 13), 268 (17), 252 (21), 237 (40), 151 (33), 133 (100), 119 (39), 93 (90). **IR** (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3246, 3141, 1689, 1600, 1539, 1369, 1247, 851, 743, 576. [Encontrado: C, 59.9; H, 3.9; N, 16.5. C₂₁H₁₇N₅O₃S requiere C, 60.1; H, 4.1; N, 16.7].

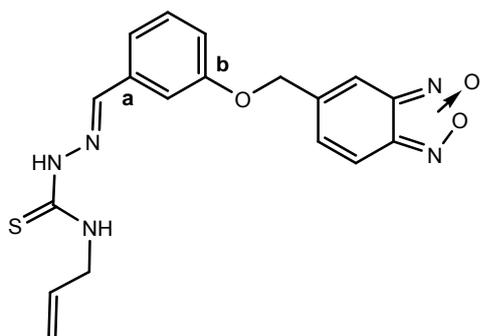


Nóxido de **5(6)-[4-(N-allylthiosemicarbazone)feniloximetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 30b**. Sólido beige (73 %), **PF**: 176.7 °C, desc. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 ,

400 MHz) δ (ppm): 4.21 (t, 2H, $^3J_1 = 5.2$ Hz, $^3J_2 = 5.6$ Hz), 5.10 (dd, 1H, $^2J_{\text{gem}} = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{cis}} = 10.2$ Hz), 5.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{gem}} = 1.6$ Hz, $^3J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz), 5.25 (s, 2H), 5.91 (m, 1H), 7.11 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.42-7.68 (sa, 3H), 7.79 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz), 8.02 (s, 1H), 8.65 (t, 1H, $^3J = 6.0$ Hz), 11.4 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 46.2 (CH₂), 69.6 (CH₂), 115.5 (Ar), 115.9 (C=C), 127.9 (Ca), 129.4 (Ar), 135.6 (C=C), 142.2, (CH), 159.6 (Cb), 177.4 (C=S). **MS (ESI)**, m/z : 429 (M⁺ + 2Na⁺). **IR** (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3300, 3185, 3008, 2914, 1603, 1536, 1418, 1236, 1174, 1039, 927, 852, 743, 574. [Encontrado: C, 56.6; H, 4.1; N, 18.0. C₁₈H₁₇N₅O₃S requiere C, 56.4; H, 4.5; N, 18.3].



Nóxico de 5(6)-[3-tiosemicarbazonofeniloximetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 31b. Sólido beige (91 %), **PF:** 188.7 °C, desc. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 5.24 (s, 2H), 7.10 (d, 1H, ³J= 7.6 Hz), 7.34 (m, 2H), 7.45-7.85 (sa, 3H), 7.62 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 11.5 (s, 1H). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 68.6 [CH₂], 112.5 [Ar], 117.3 [Ar], 121.7 [Ar], 130.4 [Ar], 136.2 [Ca], 142.3 [CH], 158.6 [Cb], 162.8 [Cc], 178.5 [C=S]. **MS (EI)**, *m/z* [abundancia, %]: 327 [M⁺ - 16, 8], 311 [3], 269 [10], 252 [21], 237 [25], 151 [30], 133 [100], 121 [39], 103 [20]. **IR** (KBr) ν (cm⁻¹): 3441, 3293, 3163, 3025, 1586, 1538, 1279, 1059, 941, 859, 790, 689. [Encontrado: C, 52.5; H, 3.6; N, 20.2. C₁₅H₁₃N₅O₃S requiere C, 52.5; H, 3.8; N, 20.4].

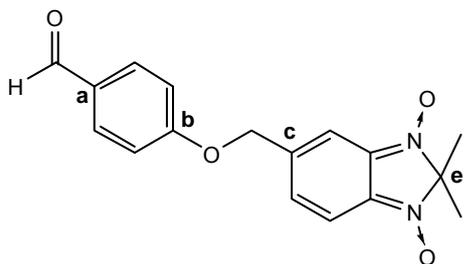


Nóxico de 5(6)-[3-(N⁴-aliltiosemicarbazono)feniloximetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 31c. Sólido beige (80 %), **PF:** 149.6 °C, desc. **¹H-RMN** (DMSO-*d*₆), 400 MHz) δ (ppm): 4.23 (t, 2H, ³J₁= 4.8 Hz, ³J₂= 5.2 Hz), 5.10 (dd, 1H, ²J_{gem}= 1.2 Hz, ³J_{cis}= 12 Hz), 5.16 (dd, 1H, ²J_{gem}= 1.2 Hz, ³J_{trans}= 18 Hz), 5.24 (s, 2H), 5.93 (m, 1H), 7.12 (d, 1H, ³J= 6.8 Hz), 7.38 (d, 2H, ³J= 6.8 Hz), 7.44-7.88 (sa, 3H), 7.56 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.74 (t, 1H, ³J= 5.2 Hz), 11.6 (s, 1H). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 46.2 [CH₂], 68.6 [CH₂], 113.5 [Ar], 116.0 [C=C], 116.6 [Ar], 121.3 [Ar], 130.4 [Ar], 135.5 [C=C], 136.2 [Ca], 142.2, [CH], 158.6 [Cb], 177.7 [C=S]. **MS (ESI)**, *m/z*: 429 [M⁺ + 2Na⁺]. **IR** (KBr) ν (cm⁻¹): 3379, 3163, 3003, 1628, 1595, 1543, 1267, 1153, 1055, 943, 857, 789, 684 [Encontrado: C, 56.4; H, 4.9; N, 18.1. C₁₈H₁₇N₅O₃S requiere C, 56.4; H, 4.5; N, 18.3].

7.10. Preparación de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo agrupamientos amidinohidrazona, tio- y semicarbazona

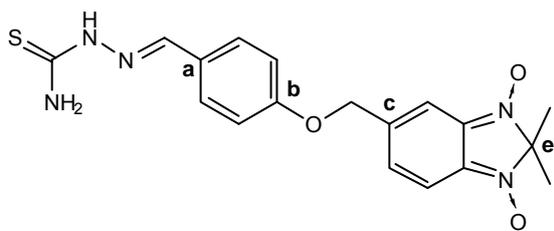
A una solución del benzofuroxano correspondiente (**IV**, **V**, **17**, **18**, **20**, **30a**, **30b**, **31b**, **32a-32e**, 1 eq) en THF seco (20 mL/mmol de benzofuroxano) se agrega 2-nitropopano (1.2 ó 2.4 eq) y piperidina (1.2 ó 2.4 eq.). La mezcla se agita a TA bajo

atmósfera de N_2 durante 24-72 h. Se destila el disolvente a vacío y el crudo se purifica por CCF preparativa (Al_2O_3 , EP:AcOEt 6:4).



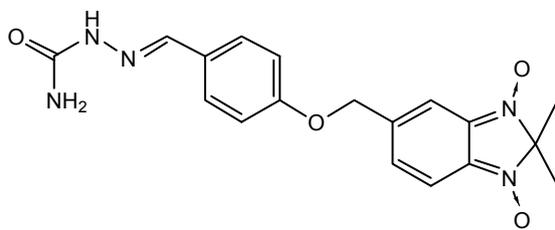
1,3-dióxido de 5-(4-formilfeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 37. Sólido bordó (15 %). **PF:** 139.4-139.9 °C. **1H -RMN** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 5.19 (s, 2H), 7.10 (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 7.28 (m, 4H), 7.93 (d,

2H, $^3J = 8.8$ Hz), 9.94 (s, 1H). **^{13}C -RMN** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.5 (CH_3), 68.6 (CH_2), 97.0 (Ce), 112.9 (Ar), 115.2 (Ar), 115.8 (Ar), 130.2 (Ar), 130.8 (Ar), 131.7 (Ar), 135.8 (Ca), 139.9 (Cc), 163.1 (Cb), 190.4 (CHO). **MS**, m/z (abundancia, %): 312 (M^+ , 37), 296 (40), 191 (32), 175 (61), 144 (52), 133 (100), 121 (7). [Encontrado: C, 65.5; H, 5.1; N, 8.9. $C_{17}H_{16}N_2O_4$ requiere C, 65.4; H, 5.2; N, 9.0].



1,3-dióxido de 5-(4-tiosemicarbazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 38b. Sólido bordó (34 %), **PF:** 122.2-123.0 °C. **1H -RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 1.57 (s,

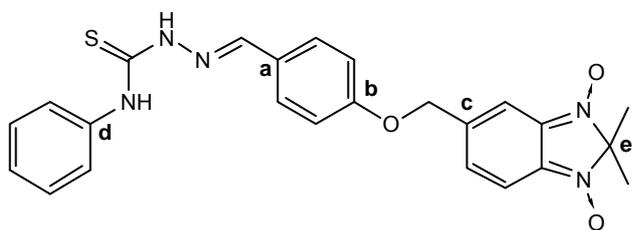
6H), 5.06 (s, 2H), 7.07 (m, 3H), 7.27 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.77 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.91 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 11.31 (s, 1H). **^{13}C -RMN** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 24.5 (CH_3), 68.8 (CH_2), 97.6 (Ce), 113.5 (Ar), 115.9 (Ar), 116.6 (Ar), 128.3 (Ar), 129.8 (Ar), 131.7 (Ar), 136.4 (Ca), 141.5 (Cc), 142.9 (CH), 160.0 (Cb), 178.6 (C=S). **MS**, m/z (abundancia, %): 354 ($M^+ - 31$, 9), 333 (10), 322 (15), 195 (39), 149 (70), 131 (37), 121 (74), 57 (100). [Encontrado: C, 55.8; H, 4.9; N, 18.0. $C_{18}H_{19}N_5O_3S$ requiere C, 56.1; H, 5.0; N, 18.2].



1,3-dióxido de 5-(4-semicarbazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 38c. Sólido bordó (6 %), **PF:** 123.3-124.1 °C. **1H -RMN** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.57 (s, 6H), 5.05

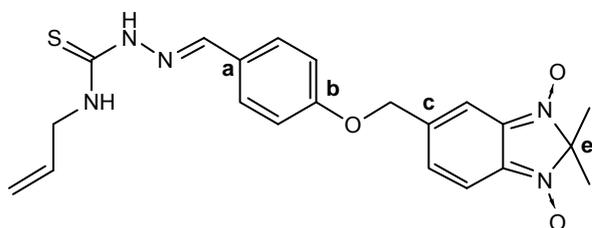
(s, 2H), 6.39 (s, 2H), 7.04 (m, 3H), 7.26 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.68 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.80 (s, 1H), 10.08 (s, 1H). 369 (M^+ , 6), 336 (16), 279 (20), 237 (44), 175 (38),

145 [73], 133 [100]. [Encontrado: C, 58.2; H, 4.9; N, 18.9. $C_{18}H_{19}N_5O_4$ requiere C, 58.5; H, 5.2; N, 19.0].



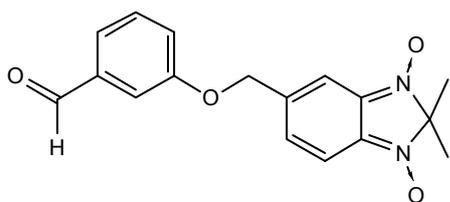
1,3-dióxido de 5-[4-(*N*-feniltiosemicarbazono)]feniloximetil]-2,2-dimetil-2*H*-benzimidazol, 38d.
Sólido bordó [13 %], **PF:** 118.3-119.2 °C. **¹H-RMN** [acetona-*d*₆, 400

MHz] δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 5.12 (s, 2H), 7.08 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz), 7.14 (dd, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J_1 = 2.0$ Hz, $^4J_2 = 1.6$ Hz), 7.22 (t, 2H, $J^{3,1} = 9.0$ Hz, $^3J_2 = 11$ Hz), 7.29 (s, 1H), 7.37 (t, 2H, $J^{3,1} = 7.6$ Hz, $^3J_2 = 8.0$ Hz), 7.76 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz), 7.86 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 8.23 (s, 1H). **¹³C-RMN** [acetona-*d*₆, 100 MHz] δ (ppm): 23.5 [CH₃], 68.3 [CH₂], 96.9 [Ce], 112.7 [Ar], 115.1 [Ar], 115.7 [Ar], 124.6 [Ar], 125.0 [Ar], 128.1 [Ar], 129.2 [Ar], 130.2 [Ar], 135.8 [Ca], 139.6 [Cd], 140.4 [Cc], 142.4 [CH], 159.9 [Cb], 176.6 [C=S]. **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 412 (M⁺ - 49, 5), 283 (3), 271 (20), 207 (10), 177 (5), 145 (100), 135 (27), 93 (52). [Encontrado: C, 62.2; H, 5.2; N, 14.9. $C_{24}H_{23}N_5O_3S$ requiere C, 62.5; H, 5.0; N, 15.2].

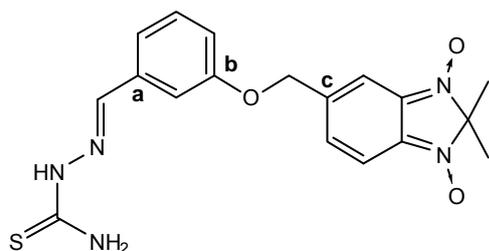


1,3-dióxido de 5-[4-(*N*-aliltiosemicarbazono)]feniloximetil]-2,2-dimetil-2*H*-benzimidazol, 38e.
Sólido bordó [31 %], **PF:** 121.2-122.1 °C. **¹H-RMN** [acetona-*d*₆, 400

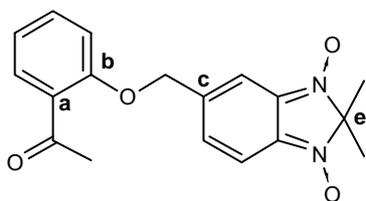
MHz] δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 4.35 (t, 2H, $^3J_1 = 4.6$ Hz, $^3J_2 = 5.0$ Hz), 5.10 (s, 2H), 5.11 (dd, 1H, $J_{gem} = 1.6$ Hz, $J_{cis} = 10.0$ Hz), 5.22 (dd, 1H, $J_{gem} = 1.6$ Hz, $J_{trans} = 17.2$ Hz), 5.98 (m, 1H), 6.90 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.11 (dd, 2H, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz), 7.23 (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 7.63 (d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz), 7.76 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz), 8.15 (s, 1H). **¹³C-NMR** [acetona-*d*₆, 100 MHz] δ (ppm): 23.5 [CH₃], 46.0 [CH₂], 68.3 [CH₂], 96.9 [Ce], 112.7 [Ar], 115.1 [Ar], 115.6 [C=C], 115.7 [Ar], 125.9 [Ar], 127.7 [Ca], 128.8 [Ar], 128.9 [Ar], 130.2 [Ar], 134.9 [C=C], 140.3 [Cc], 142.4 [CH], 159.8 [Cb], 176.7 [C=S]. **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 396 (M⁺ - 29, 4), 333 (10), 278 (17), 249 (3), 219 (15), 193 (12), 149 (62), 131 (36), 57 (100). **IR** (KBr) ν (cm⁻¹): 3503, 2934, 2855, 1606, 1510, 1452, 1402, 1351, 1233, 1169, 1097, 950, 820. [Encontrado: C, 59.1; H, 5.1; N, 16.2. $C_{21}H_{23}N_5O_3S$ requiere C, 59.3; H, 5.4; N, 16.5].



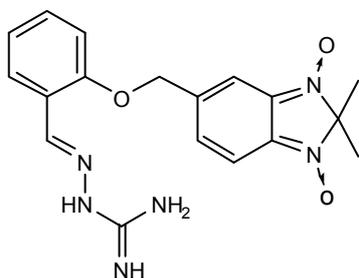
1,3-dióxido de 5-(3-formilfeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 39. Sólido bordó (7 %), **PF:** 129.5-130.7 °C. **MS (EI),** m/z (abundancia, %): 312 (M^+ , 27), 296 (53), 265 (5), 191 (30), 175 (85), 144 (76), 133 (100), 121 (12). (Encontrado: C, 65.2; H, 4.8; N, 8.7. $C_{17}H_{16}N_2O_4$ requiere C, 65.4; H, 5.2; N, 9.0).



1,3-dióxido de 5-(3-tiosemicarbazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 40b. Sólido bordó (20 %). **PF:** 116.4-117.2 °C. **1H -NMR** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 5.09 (s, 2H), 7.08 (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 7.13 (m, 1H), 7.24 (2, 1H, $^3J = 9.6$), 7.39 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 10.5 (s, 1H). **^{13}C -NMR** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.5 (CH_3), 68.6 (CH_2), 96.9 (Ce), 112.5 (Ar), 112.6 (Ar), 115.7 (Ar), 116.7 (Ar), 121.1 (Ar), 130.0 (Ar), 130.2 (Ar), 136.0 (Ca), 140.5 (Cc), 142.1 (CH), 158.7 (Cb), 178.7 (C=S). **MS (EI),** m/z (abundancia, %): 354 ($M^+ - 31$, 6), 333 (13), 195 (29), 177 (8), 149 (100), 131 (10), 121 (32), 57 (11). (Encontrado: C, 56.0; H, 5.0; N, 17.8. $C_{24}H_{23}N_5O_3S$ requiere C, 56.1; H, 5.0; N, 18.2).

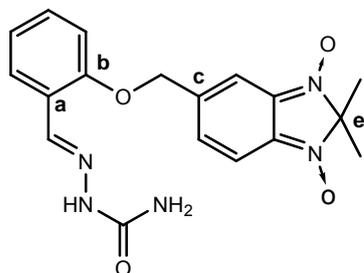


1,3-dióxido de 5-(2-acetilfeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 41. Sólido bordó (8 %), **PF:** 112.5-113.4 °C. **1H -NMR** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 1.57 (s, 3H), 5.64 (s, 2H), 6.73 (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 7.30 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 7.43 (t, 1H, $^3J_1 = 6.2$, $^3J_2 = 7.4$), 7.55 (dd, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J_1 = 6.0$ Hz, $^4J_2 = 4.4$ Hz), 7.87 (s, 1H), 7.93 (d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz). **^{13}C -NMR** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.6 (CH_3), 68.5 (CH_2), 96.7 (Ce), 112.2 (Ar), 113.2 (Ar), 116.1 (Ar), 121.3 (Ar), 123.9 (Ar), 128.7 (Ca), 130.7 (Ar), 136.2 (Ar), 140.6 (Cc), 157.4 (Cb), 198.0 (C=O). (Encontrado: C, 65.9; H, 5.4; N, 8.4. $C_{18}H_{18}N_2O_4$ requiere C, 66.2; H, 5.6; N, 8.6).



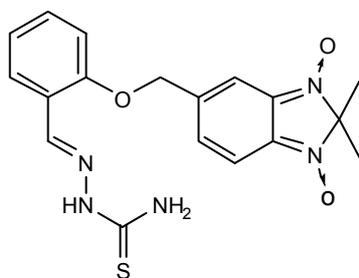
1,3-dióxido de 5-(2-amidinohidrazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 42a. Sólido bordó (22 %), **PF:** 125.7-126.6 °C. **1H -RMN** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 5.24 (s, 2H), 7.16 (m,

2H), 7.25 [d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz], 7.34 [m, 2H], 7.67 [dt, 1H, $J^3_1 = 7.6$ Hz, $J^3_2 = 8.2$ Hz, $^4J_1 = 1.6$ Hz, $^4J_2 = 2.0$ Hz], 7.81 [dd, 1H, $J^3 = 7.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz], 7.97 [bs, 4H], 10.6 [s, 1H]. **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 354 ($M^+ - 14$, 7), 296 (18), 278 (24), 175 (77), 145 (83), 133 (84), 121 (100), 69 (91). (Encontrado: C, 58.6; H, 5.2; N, 22.7. $C_{18}H_{20}N_6O_3$ requiere C, 58.7; H, 5.5; N, 22.8).



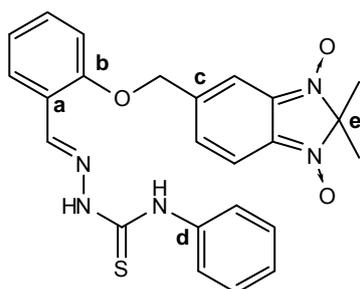
1,3-dióxido de 5-(2-semicarbazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 42b. Sólido bordó (10 %), **PF:** 125.5-126.3 °C. **1H -RMN** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.63 [s, 6H], 5.13 [s, 2H], 6.91 [d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz], 7.24 [d, 2H, $^3J_1 = 8.0$ Hz],

7.32 [s, 1H], 7.45 [d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz], 8.04 [dd, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz], 8.50 [s, 1H]. **^{13}C -NMR** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.0 [CH_3], 68.9 [CH_2], 96.6 [Ce], 112.3 [Ar], 116.0 [Ar], 121.1 [Ar], 124.1 [Ca], 125.3 [Ar], 129.3 [Ar], 130.0 [Ar], 136.0 [CH], 140.6 [Cc], 141.8 [Ar], 156.2 [Cb], 158.0 [C=O]. **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 369 (M^+ , 3), 336 (11), 279 (18), 237 (44), 175 (47), 145 (100), 133 (59). (Encontrado: C, 58.4; H, 5.0; N, 18.8. $C_{18}H_{19}N_5O_4$ requiere C, 58.5; H, 5.2; N, 19.0).



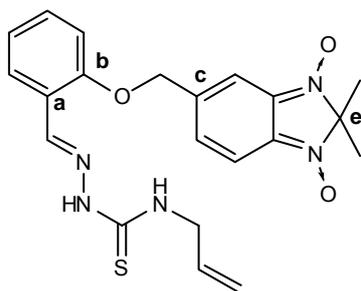
1,3-dióxido de 5-(2-tiosemicarbazonofeniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 42c. Sólido bordó (30 %), **PF:** 124.5-125.8 °C. **1H -RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 1.63 [s, 6H], 5.15 [s, 2H], 7.04 [s, 2H], 7.12 [d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz], 7.22 [m, 2H], 7.40 [m, 3H], 7.98 [s, 1H], 8.11 [s, 2H], 8.76 [s, 1H]. **MS (EI)**, m/z (abundancia,

%) : 354 ($M^+ - 31$, 5), 333 (25), 195 (7), 177 (7), 149 (85), 131 (20), 121 (100), 57 (69). (Encontrado: C, 55.7; H, 4.7; N, 18.3. $C_{18}H_{19}N_5O_3S$ requiere C, 56.1; H, 5.0; N, 18.2).



1,3-dióxido de 5-(2-(N-feniltiosemicarbazono)feniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 42d. Sólido bordó (14 %), **PF:** 122.8-123.3 °C. **1H -RMN** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 [s, 6H], 5.17 [s, 2H], 7.19 [m, 1H], 7.24 [m, 5H], 7.36 [t,

2H, $^3J_1 = 7.6$ Hz, $^3J_2 = 8.0$ Hz), 7.44 (m, 1H), 7.78 (d, 2H, $J^3_1 = 8.0$ Hz), 8.20 (dt, 1H, $^3J_1 = 7.2$ Hz, $^3J_2 = 8.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz), 8.88 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 10.9 (s, 1H). **$^{13}\text{C-RMN}$** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.1 (CH₃), 68.9 (CH₂), 97.6 (Ce), 112.6 (Ar), 113.0 (Ar), 115.7 (Ar), 121.5 (Ar), 122.9 (Ca), 124.6 (Ar), 125.1 (Ar), 126.5 (Ar), 128.1 (Ar), 128.7 (Ar), 130.3 (Ar), 131.1 (Ar), 131.6 (Ar), 138.3, (CH), 139.4 (Cd), 140.2 (Cc), 157.2 (Cb), 176.8 (C=S). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 412 (M⁺ - 49, 13), 283 (5), 271 (16), 207 (2), 177 (12), 145 (100), 135 (21), 93 (49). (Encontrado: C, 62.3; H, 4.8; N, 15.0. C₂₄H₂₃N₅O₃S requiere C, 62.5; H, 5.0; N, 15.2).

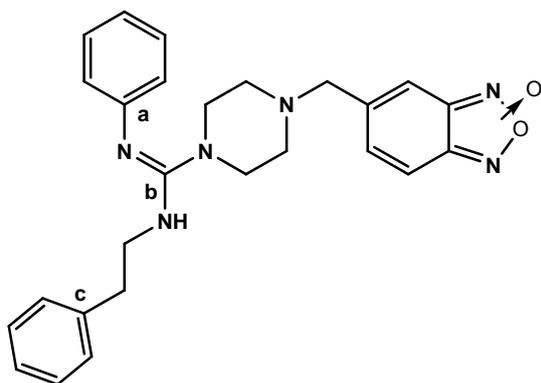


1,3-dióxido de 5-(2-(N-allylthiosemicarbazono)feniloximetil)-2,2-dimetil-2H-benzimidazol, 42e. Sólido bordó (20 %), **PF:** 114.7-115.0 °C. **$^1\text{H-RMN}$** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.62 (s, 6H), 4.37 (t, 2H, $^3J = 5.6$ Hz), 5.11 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 1.6$ Hz, $J_{\text{cis}} = 10.0$ Hz), 5.14 (s, 2H), 5.24 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 1.6$

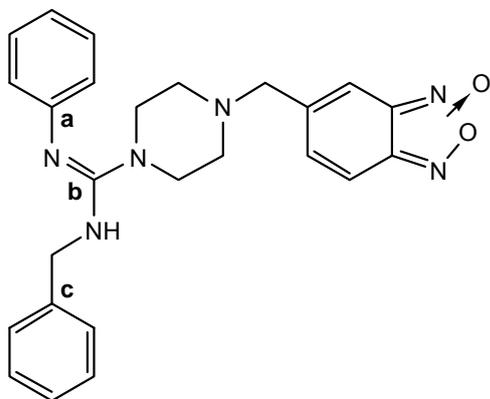
Hz, $J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz), 6.00 (m, 1H), 7.03 (t, 1H, $J^3_1 = 7.2$ Hz, $J^3_2 = 8.0$ Hz), 7.12 (d, 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 7.21 (dd, 2H, $^3J = 11.8$ Hz, $^4J = 3.6$ Hz), 7.31 (s, 1H), 7.41 (dt, 1H, $J^3_1 = 7.6$ Hz, $J^3_2 = 8.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz), 8.04 (dd, 1H, $J^3 = 8.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz), 8.37 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 10.6 (s, 1H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 23.9 (CH₃), 45.1 (CH₂), 69.4 (CH₂), 97.3 (Ce), 113.1 (Ar), 113.5 (Ar), 115.6 (C=H₂), 116.1 (Ar), 121.8 (Ar), 123.7 (Ar), 126.51 (Ca), 130.7 (Ar), 131.6 (Ar), 135.2 (H_iC=R), 138.0 (CH), 140.7 (Cc), 157.30 (Cb), 176.6 (C=S). **MS (EI)**, m/z (abundancia, %): 396 (M⁺ - 29, 3), 333 (8), 278 (15), 249 (5), 219 (10), 193 (10), 149 (57), 131 (35), 57 (100). (Encontrado: C, 58.9; H, 5.2; N, 16.1. C₂₄H₂₃N₅O₃S requiere C, 59.3; H, 5.4; N, 16.5).

7.11. Preparación de compuestos híbridos derivados de benzofuroxano conteniendo agrupamientos carboxamidina.

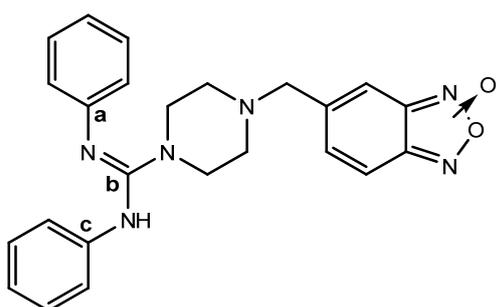
A una solución de 5(6)-bromometilbenzofuroxano (1 eq) en CH₃CN (25 mL/mmol de bromuro), se agrega la carboxamidina correspondiente (1.4 eq) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica por CC (SiO₂, primer fase EP:AE, 6:4, segunda fase CH₂Cl₂:MeOH, 9:1).



5(6)-[4-(*N*-fenil-*N'*-fenilamidino)piperazin-1-ilmetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 33. Sólido marrón (77 %), **PF:** 116.2 °C, desc. **¹H-NMR** (acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.59 [t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz], 3.06 [t, 2H, $^3J_1=6.8$ Hz, $^3J_2=7.2$ Hz], 3.56 [t, 4H, $^3J=4.8$ Hz], 3.64 [s, 2H], 3.69 [t, 2H, $^3J_1=6.8$ Hz, $^3J_2=7.2$ Hz], 7.14 [dd, 2H, $^3J=8.4$ Hz, $^4J=0.8$ Hz], 7.19-7.26 [sa, 3H], 7.22 [m, 2H], 7.31 [d, 4H, $^3J=4.4$ Hz], 7.40 [t, 2H, $^3J=7.6$ Hz, $^4J=0.8$ Hz]. **¹³C-NMR** (acetona-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 35.1 [CH₂], 45.8 [CH₂], 48.3 [CH₂], 51.9 [CH₂], 60.9 [CH₂], 121.4 [Ar], 125.2 [Ca], 126.6 [Ar], 128.6 [Ar], 129.0 [Ar], 129.6 [Ar], 138.3 [Cc], 155.2 [Cb]. **MS (ESI)**, m/z : 457 [M⁺ + H⁺]. **IR** (KBr) ν (cm⁻¹): 3433, 2917, 1622, 1592, 1534, 1487, 1247, 1137, 1000, 853, 751, 699. [Encontrado: C, 68.5; H, 6.16; N, 18.1. C₂₄H₂₄N₆O₂ requiere C, 68.4; H, 6.18; N, 18.4].

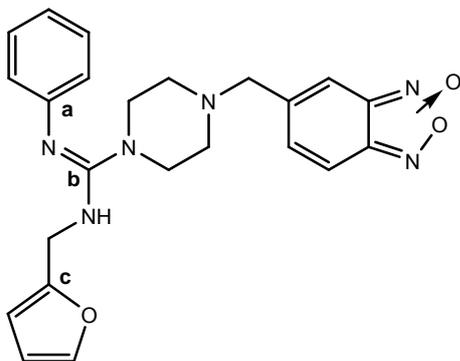


N-óxido de 5(6)-[4-(*N*-bencil-*N'*-fenilamidino)piperazin-1-ilmetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 34. Sólido beige (98 %), **PF:** 164.2 °C, desc. **¹H-NMR** (acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.66 [t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz], 3.67 [s, 2H], 3.70 [t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz], 4.70 [s, 2H], 7.20 [t, 3H, $^3J=7.8$ Hz, $^4J=2.4$ Hz], 7.28-7.50 [sa, 3H], 7.33 [m, 5H], 7.59 [d, 2H, $^3J=6.8$ Hz]. **¹³C-NMR** (acetona-*d*₆, 100 MHz) δ (ppm): 47.0 [CH₂], 48.5 [CH₂], 51.9 [CH₂], 60.9 [CH₂], 121.6 [Ar], 125.3 [Ca], 127.8 [Ar], 128.0 [Ar], 128.6 [Ar], 129.2 [Ar], 129.5 [Ar], 137.8 [Cc], 155.3 [Cb]. **MS (ESI)**, m/z : 443 [M⁺ + H⁺]. [Encontrado: C, 67.6; H, 5.90; N, 18.8. C₂₄H₂₄N₆O₂ requiere C, 67.9; H, 5.92; N, 19.0].



5(6)-[4-(*N,N'*-difenilamidino)piperazin-1-ilmetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 35. Aceite marrón (42 %). **¹H-NMR** (acetona-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 2.57 [t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz], 3.46 [t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz]

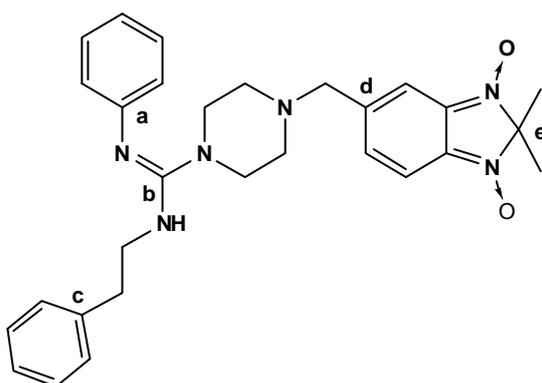
Hz), 3.64 (s, 2H), 6.92 (t, 2H, $^3J=7.2$ Hz), 7.00 (d, 4H, $^3J=8.0$ Hz), 7.22 (dd, 4H, $^3J=7.2$ Hz, $^4J=1.2$ Hz), 7.45-7.60 (sa, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 46.9 (CH₂), 52.2 (CH₂), 61.4 (CH₂), 120.4 (Ar), 122.2 (Ar), 125.6 (Ca), 128.2 (Ar), 128.9 (Ar), 151.0 (Cc), 154.6 (Cb). **MS (ESI)**, m/z : 429 (M⁺ + H⁺). (Encontrado: C, 67.1; H, 5.62; N, 19.8. C₂₄H₂₄N₆O₂ requiere C, 67.3; H, 5.65; N, 19.6).



Nóxico de 5(6)-[4-(*N*-fenil-*N'*-furilamidino)piperazin-1-ilmetil]benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol, 36. Sólido beige (52 %), **PF**: 152.2-153.0 °C. $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 2.64 (t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz), 3.63 (t, 4H, $^3J_1=4.8$ Hz, $^3J_2=5.2$ Hz), 3.65 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 6.34 (dd, 1H, $^3J=3.2$ Hz, $^3J=1.8$ Hz), 7.42-7.57 (sa, 3H), 6.40 (d, 1H, $^3J=3.2$ Hz), 7.18 (m, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.51 (dd, 1H, $^3J=1.8$ Hz, $^4J=0.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 40.6 (CH₂), 48.3 (CH₂), 51.9 (CH₂), 60.98 (CH₂), 108.6 (Ar), 110.5 (Ar), 121.5 (Ar), 124.9 (Ca), 129.0 (Ar), 129.5 (Ar), 142.8 (Ar), 150.1 (Cc), 155.3 (Cb). **MS (ESI)**, m/z : 433 (M⁺ + H⁺). (Encontrado: C, 64.1; H, 5.60; N, 19.2. C₂₃H₂₄N₆O₃ requiere C, 63.9; H, 5.59; N, 19.4).

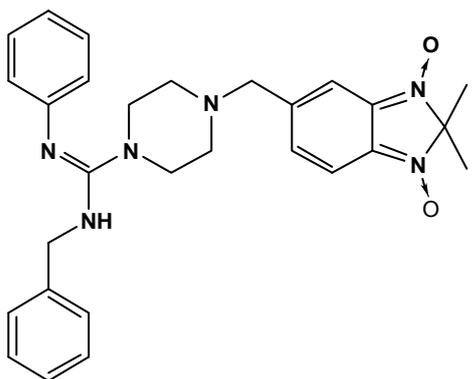
7.12. Preparación de compuestos híbridos derivados de 1,3-dióxido de benzimidazol conteniendo agrupamientos carboxamidina

A una solución del benzofuroxano correspondiente (**33-36**, 1 eq) en THF seco (50 mL/ mmol de benzofuroxano) se agrega 2-nitropopano (1.2 eq.) y piperidina (1.2 eq.). La mezcla se agita a TA bajo atmósfera de N₂ durante 24-72 h. Se destila el disolvente a vacío y el crudo se purifica por CCF preparativa (Al₂O₃, EP:AcOEt 6:4).

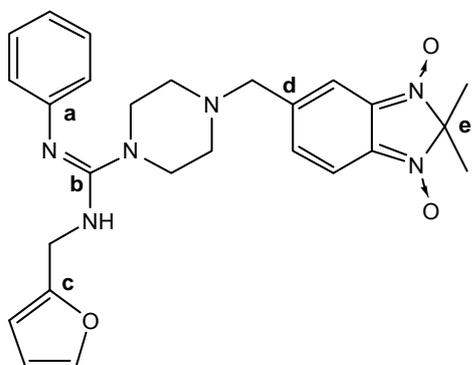


1,3-dióxido de 5-[4-(*N*-fenetil-*N'*-fenilamidino)piperazin-1-ilmetil]-2,2-dimetil-2*H*benzimidazol, 43. Sólido bordó (20 %), **PF**: 105.3 °C, desc. $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.64 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 2.44 (t, 2H, $^3J=7.2$ Hz), 2.62 (sa, 4H), 3.50 (sa, 4H),

3.57 [t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz], 3.69 [s, 2H], 7.17 [t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz], 7.23 [d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz], 7.33 [m, 5H], 7.37 [t, 2H, $^3J = 8.0$ Hz], 7.62 [d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz], 7.83 [s, 1H], 7.89 [d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz]. **$^{13}\text{C-NMR}$** (acetona- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 24.4 [CH₃], 29.0 [CH₂], 47.5 [CH₂], 51.7 [CH₂], 60.7 [CH₂], 60.8 [CH₂], 96.7 [Ce], 113.6 [Ar], 115.6 [Ar], 120.8 [Ar], 124.4 [Ar], 126.1 [Ar], 128.8 [Ar], 125.1 [Ca], 134.3 [Ar], 138.3 [Cc], 143.2 [Cd], 160.0 [Cb]. **MS (ESI)**, m/z : 441 ($M^+ - 57$). [Encontrado: C, 70.0; H, 6.89; N, 16.9. C₂₉H₃₄N₆O₂ requiere C, 69.8; H, 6.87; N, 16.8].



1,3-dióxido de 5-[4-(*N*-bencil-*N'*-fenilamidino)piperazin-1-ilmetil]-2,2-dimetil-2*H*-benzimidazol, 44. Sólido bordó (34 %), **PF**: 120.4 °C, desc. **$^1\text{H-NMR}$** (acetona- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 1.60 [m, 6H], 2.69 [sa, 4H], 3.72 [sa, 4H], 3.74 [s, 2H], 4.71 [s, 2H], 7.20 [t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz], 7.32 [m, 6H], 7.45 [d, 2H, $^3J = 6.4$ Hz], 7.63 [d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz], 7.85 [s, 1H], 7.91 [d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz]. **MS (ESI)**, m/z : 427 ($M^+ - 57$). [Encontrado: C, 69.3; H, 69.6; N, 17.1. C₂₈H₃₂N₆O₂ requiere C, 69.4; H, 6.66; N, 17.3].



1,3-dióxido de 5-[4-(*N*-fenil-*N'*-furilamidino)piperazin-1-ilmetil]-2,2-dimetil-2*H*-benzimidazol, 45. Sólido bordó (40 %), **PF**: 118.5-119.0 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.70 [s, 6H], 2.56 [sa, 4H], 3.46 [sa, 4H], 3.59 [s, 2H], 4.81 [s, 2H], 6.32 [s, 1H], 6.43 [s, 1H], 6.88 [d, 1H, $^3J = 8.8$ Hz], 7.19 [m, 2H], 7.37 [m, 4H], 7.67 [s, 1H], 7.78 [d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz]. **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 24.2 [CH₃], 41.9 [CH₂], 48.0 [CH₂], 51.6 [CH₂], 61.2 [CH₂], 97.2 [Ce], 109.4 [Ar], 110.8 [Ar], 113.9 [Ar], 114.4 [Ar], 115.7 [Ar], 116.3 [Ar], 120.8 [Ar], 125.7 [Ar], 125.5 [Ca], 129.9 [Ar], 141.4 [Cd], 142.6 [Ar], 149.5 [Cc], 159.6 [Cb]. **MS (ESI)**, m/z : 417 ($M^+ - 57^+$). [Encontrado: C, 65.6; H, 6.36; N, 17.6. C₂₆H₃₀N₆O₃ requiere C, 65.8; H, 6.37; N, 17.7].

7.13. Evaluación biológica frente a *Trypanosoma cruzi*

Todos los compuestos se ensayaron *in vitro* frente a *T. cruzi* sobre la forma epimastigota, cepa Tulahuen 2, la cual se cultiva a 28 °C en un medio BHI (Brain-Heart-Infusion)-triptosa, axénico, suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Se parte de células de un cultivo de 5-7 días (fase exponencial), las que se inoculan con 50 mL de medio de cultivo fresco dando una concentración inicial de 2×10^6 células/mL. El crecimiento del parásito es seguido durante 5 días por medidas de absorbancia del cultivo a 590 nm, proporcional al número de células presentes. Previo a la inoculación, se incorpora al medio una cantidad preestablecida de cada producto a ensayar disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca excede el 1 % y se utiliza un blanco (ausencia de producto) con 1 % de DMSO. Los productos se incorporan al medio a 25 μ M y se utiliza Nifurtimox como fármaco de referencia. El porcentaje de inhibición de crecimiento (%Inh) del parásito se evalúa comparando con el blanco (cultivo control) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%Inh = \left(1 - \left[\frac{A_p - A_{0p}}{A_c - A_{0c}}\right]\right) \times 100$$

donde A_p es la absorbancia del cultivo con el producto al día 5, A_{0p} es la absorbancia del cultivo con el producto al día 0, A_c es la absorbancia del cultivo control al día 5 y A_{0c} es la absorbancia del cultivo control al día 0. Para determinar los valores de IC_{50} (concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50 %) se sigue el crecimiento del parásito en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del correspondiente compuesto y el valor se extrae de la curva dosis-respuesta (%Inh vs. Log concentración). Los experimentos se realizan por triplicado.

7.14. Ensayo de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos

Macrófagos murinos J774 (1×10^3 células/pocillo) se siembran en microplacas de 96 pocillos con 200 μ L de medio RPMI 16430 suplementado con 20 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células se mantienen por 24 h en una atmósfera húmeda de 5 % CO_2 /95 % aire a 37 °C y posteriormente son expuestas a los compuestos (100-400 μ M) por 48 h. Pasado este tiempo, las células se lavan con amortiguador fosfato salino (PBS) y se incuban a 37 °C con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, 0.4 mg/mL) por 3h. El método involucra la

conversión de MTT a formazan, coloreado, por las células vivas. Los cristales de formazan se disuelven en DMSO (180 μL) y se mide la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresan como IC_{50} . Cada IC_{50} es el resultado de tres experimentos diferentes.

7.15. Ensayo de lisis de eritrocitos humanos

Una solución de citrato de sodio (3.8 %) conteniendo sangre humana se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se remueve el sobrenadante y los eritrocitos se resuspenden en PBS, pH 7.2, enfriado en hielo. Las células se centrifugan nuevamente a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Este procedimiento se repite dos veces más para asegurar la remoción de cualquier resto de hemoglobina libre. Una vez removido el sobrenadante luego del último lavado, las células se resuspenden en PBS para obtener una solución al 2 % peso/volumen de glóbulos rojos. Los compuestos se disuelven en DMSO y se colocan 7.2 μL en 400 μL de PBS. La solución de PBS conteniendo los compuestos a evaluar (concentración final 50, 100 y 200 μM), PBS (control negativo) o Anfo B (concentración final 1.5 μM) se agrega a 400 μL de solución de glóbulos rojos en diez tubos de microcentrífuga para cada concentración y se incuban por 24 h a 37 °C. Como control positivo (100 % de hemólisis) se utiliza agua MiliQ conteniendo 7.2 μL de DMSO. Luego de la incubación, se centrifugan los tubos y se recupera el sobrenadante. La liberación de hemoglobina se determina a partir de la absorbancia del sobrenadante a 405 nm usando un lector de placas EL 301 MICROWELL STRIP. Los resultados son expresados como cantidad de hemoglobina liberada como porcentaje del total teniendo en cuenta la absorción del compuesto a la longitud de onda en que se realiza la determinación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Hemólisis} = \left[(A_1 - A_0) / A_{1\text{agua}} \right] \times 100$$

Donde A_1 es la absorbancia a 405 nm del compuesto a estudiar luego de 24 h de incubación, A_0 es la absorbancia a 405 nm del compuesto a estudiar previo a la incubación y $A_{1\text{agua}}$ es la absorbancia del control positivo luego de 24 h de incubación. Los experimentos se realizan por quintuplicado.

7.16. Purificación de cruzipaina⁷

La enzima se purificó a partir de epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. Los parásitos se cultivan a 28 °C con agitación en medio de cultivo BHI-triptosa, se cosechan a 7000 rpm (Sorvall, rotor SS34) durante 10 minutos a 4 °C, se lavan dos veces con una solución de sacarosa 0.25 M y KCl 5 mM y luego de descartar el último lavado se congela el *pellet* (10.3 g de parásitos) a -20 °C durante 48 h. La ruptura de los epimastigotas se lleva a cabo mediante tres ciclos de congelado a -20 °C y descongelado. Se agregan 26 mL (2.5 mL/g parásitos) de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, conteniendo NaCl 150 mM (TBS) y el homogeneizado se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El *pellet* se lava con 26 mL de la misma solución, se centrifuga nuevamente y los sobrenadantes se combinan y se vuelven a centrifugar a 16.000 rpm durante 45 minutos a 4 °C. Se conserva el sobrenadante (extracto libre de células) y el *pellet* se descarta.

Al sobrenadante obtenido (50 mL) se agregan 5 mM (concentración final) de CaCl₂, MgCl₂ and MnCl₂, se centrifuga a 15.000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se siembra en una columna empacada con resina de afinidad (ConA-Sefarosa, 3 mL), equilibrada con 100 mL de amortiguador 1 (TBS conteniendo CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂ 3 mM). El procedimiento se repite tres veces a 4 °C. Posteriormente la columna se lava exhaustivamente con amortiguador 1 (200 mL), se aplican 5 mL de buffer 1 conteniendo α -metil D-manósido 0.5 M (amortiguador 2) y se equilibra bajo agitación durante 1 h a 37 °C. La elución de CP se realiza a 37 °C utilizando 25 mL de amortiguador 2 preincubado a la misma temperatura. El percolado se dializa (bolsas de diálisis Thomas Scientific 3787-D22, M.W. cutoff 12-14.000 Da) durante toda la noche (dos cambios) contra 4 L de TBS.

La solución dializada se filtra a través de un filtro de 0.22 μ m, se aplica en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 utilizando amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6 y se analiza por HPLC en un equipo pH/C-900 ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech, en las siguientes condiciones: flujo 1 mL/min y gradiente de elución 0-0.3 NaCl aplicando un paso isocrático a 0.18 y 0.3 M durante 20 minutos. Como amortiguador de elución se utiliza Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, conteniendo NaCl

⁷ Cazzulo, J.J.; Couso, R.; Raimondi, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *33*, 33-42.

1M. Se recogen fracciones de 0.5 mL y la elución se controla midiendo la absorbancia a 280 nm.

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

7.17. Ensayo de inhibición de cruzipaína⁸

Se incuba cruzipaína (6 μ M) en una mezcla de reacción conteniendo (concentración final en 100 μ L) PBS, pH 7.4, o amortiguador acetato de sodio, pH 5.3, 50 mM, DTT 5 mM y 25, 50 ó 100 μ M del compuesto a estudiar durante 5 minutos a TA. Posteriormente, se agrega el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC (K_M = 1.8 μ M) para obtener una concentración final de 10 μ M y se controla el aumento en la fluorescencia (excitación 380 nm y emisión 460 nm) durante 10 minutos a TA en un espectrofotómetro y espectrofluorímetro Varioskan (Thermo, Waltham, MA). Los compuestos se agregan disueltos en DMSO y el control (100 % de actividad enzimática) contiene la misma concentración de disolvente. La concentración de DMSO nunca excede el 10 %. Como compuesto de referencia se utilizó el inhibidor mbet. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. Para estudiar la inhibición no específica se realizaron los ensayos en presencia del detergente no iónico Triton X-100. Una solución del detergente 0.02 % v/v se prepara en el momento en PBS o amortiguador acetato 100 mM (pH 7.4 y 5.3, respectivamente) y se agregan 50 μ L de esta solución para obtener una concentración final de detergente de 0.01 %. Dicha concentración fue evaluada previamente y mostró no interferir con la actividad enzimática.

7.18. Estudios de la interacción ligando-cruzipaína por RMN

Todos los compuestos se preparan a una concentración stock de 23 mM en DMSO- d_6 de la cual se colocan 40 μ L en 660 μ L de PBS pH 7.4 o pH 5.3 en D₂O. La

⁸ Zanatta, N.; Amaral, S.S.; dos Santos, J.M.; de Mello, D.L.; Fernandes, L. Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P.; Andricopulo, A.D.; Borchhardt, D.M. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(*N*-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10236-10243.

concentración final del compuesto es 1.3 mM. Se midió la concentración de CP usando el método de Lowry: 1.467 mg/mL, 357 μ M. Para tener una proporción 1:260 de CP:compuesto se toman 5 μ L de CP y se colocan en el tubo de RMN que previamente contenía el compuesto a ensayar (V_f 700 μ L). Se registran los espectros de RMN del compuesto aislado y en presencia de la enzima. La secuencia de pulsos usada para medir el tiempo de relajación longitudinal (T1) de los hidrógenos del compuesto fue la inversión/recuperación: [$d_1 - (180^\circ)_x - d_2 - (90^\circ)_x - \text{adquisición}$] $_n^a$. La duración del pulso de 90° se ajustó para cada compuesto, con el primer intervalo de tiempo $d_1 = 10$ s (tiempo de inversión de la señal) y el segundo intervalo de tiempo d_2 variando de 62 ms a 32 s (tiempo de recuperación de la señal) para $n=10$, siendo n el número de intervalos de tiempo utilizados. Los espectros fueron realizados con un número de adquisiciones (*scans*) de 16 a excepción del compuesto III, para el cual se emplearon 64. La supresión de la señal de agua se hizo por presaturación. El tiempo total de los experimentos varió entre 25 y 100 minutos

Los experimentos bidimensionales de orden de difusión (2D-DOSY) fueron realizados con 64 adquisiciones, a excepción del compuesto III, para el cual se emplearon 128 adquisiciones para cada paso de gradiente. Se utilizó un gradiente lineal de 15 pasos entre 1.79 y 44.7 Gcm^{-1} , un tiempo de difusión (Δ) de 100 ms y una duración del pulso de gradiente de 2 ms (δ). La supresión de la señal de agua se realizó con Watergate. El tiempo total de los experimentos varió entre 60 y 130 minutos.

Los espectros de diferencia en la transferencia de saturación (DTS) fueron realizados utilizando 256 adquisiciones y una saturación selectiva de las señales de la proteína a -0.5 ppm (20 ppm para el espectro de referencia). La adquisición de los espectros se realizó usando una serie de 60 pulsos Gaussianos espaciados 50 ms, lo que da un tiempo de saturación total de 3.0 s, con un tiempo entre pulsos de 0.1 ms. La diferencia entre los espectros en y fuera de resonancia fue realizada por ciclaje de fase (*phase cycling*). La supresión de la señal de agua se realizó con Watergate. El tiempo total de cada experimento fue de 16 minutos.

Todos los espectros fueron realizados con una ventana espectral de 7022 Hz (12 a -2.0 ppm) a 25 $^\circ\text{C}$ en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian Innova 500.

^(a) Rule, G.S.; Hitchens, T.K. Fundamentals of protein NMR spectroscopy en *Focus on Structural Biology*, Kaptein, R. Ed. 2006, 5, Springer, Netherlands, p. 337.

7.19. Estudios teóricos

Las estructuras de los ligandos fueron construídas con distancias y ángulos estándar utilizando el programa Spartan '08 V1.2.0¹⁰. La optimización de geometría se realizó en solución mediante el método continuo SM8¹¹ utilizando, según el caso, el disolvente empleado en la reacción o en los estudios de RMN. Se utilizó el método de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con el funcional híbrido B3LYP y un conjunto de base 6-31G*.

7.20. Estudios de reconocimiento molecular (*docking*)

Las estructuras de los ligandos fueron construídas con distancias de enlace y ángulos estándar utilizando el programa Sybyl 8.1¹². En todos los casos se utilizó el campo de fuerza y las cargas MMFF94¹³ para la optimización de geometría, utilizando el algoritmo de búsqueda Gradiente Conjugado con un gradiente de convergencia <0.001 kcal/mol. Las amindinohidrazonas de la *Serie I* se modelaron con el grupo guanidino cargado positivamente y en el caso de las arilguanidinas de la *Serie II* a ambos nitrógenos del ciclo piperazina se les asignó una carga positiva. Los ligandos estudiados fueron superpuestos al inhibidor presente en la estructura tridimensional de cruzipaina usada como referencia [código PDB: 1f29]¹⁴ pero sin establecer ningún enlace covalente con la enzima. Se minimizó la energía del complejo ligando-receptor usando el campo de fuerza MMFF94 siguiendo el protocolo descrito para la optimización del ligando pero con un gradiente de convergencia <0.1 kcal/mol. Estos complejos se utilizaron como entrada para los estudios de *docking*, realizados empleando el módulo Flexidock implementado en el programa Sybyl 8.1. Flexidock realiza *docking* flexible de ligandos que admiten diferentes conformaciones tomando en cuenta la flexibilidad de la proteína. Flexidock considera interacciones de Van der

¹⁰ Spartan'04, Wavefunction, Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612, USA.

¹¹ Marenich, A.V.; Olson, R.M.; Kelly, C.P.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Self-consistent reaction field model for aqueous and nonaqueous solutions based on accurate polarized partial charges. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 2011-2033.

¹² Sybyl 8.1, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144, USA, **2008**.

¹³ Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.

¹⁴ Brinen, L.S.; Hansell, E.; Cheng, J.; Roush, W.R.; McKerrow, J.H.; Fletterick, R.J. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. *Structure* **2000**, *8*, 831 - 840.

Waals, electrostáticas, torsionales y estéricas en base al campo de fuerza Tripos¹⁵ y utiliza un algoritmo genético para determinar la mejor conformación del ligando. Los algoritmos genéticos se basan en la teoría evolutiva Darwiniana en el sentido de que es un proceso iterativo donde aquellas conformaciones moleculares que presentan interacciones más favorables tendrán más posibilidades de reproducirse en generaciones futuras¹⁶. En el estudio fueron considerados flexibles el ligando y los residuos de la proteína presentes en un radio de 6 Å alrededor del ligando. El resto de la proteína se consideró rígido. Para cada complejo se realizaron 3 corridas de *docking* flexible utilizando los parámetros incluidos por defecto en el programa y el número máximo (lmax) y mínimo de iteraciones (lmin) se determinó según las siguientes ecuaciones:

$$lmax = [N^{\circ} \text{ de enlaces que rotan en la proteína} + N^{\circ} \text{ de enlaces que rotan en el ligando} + 6] \times 1000$$

$$lmin = [N^{\circ} \text{ de enlaces que rotan en la proteína} + N^{\circ} \text{ de enlaces que rotan en el ligando} + 6] \times 500$$

De este modo, se obtienen una serie de complejos los cuales se someten a un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el método de agrupamiento promedio¹⁷, a fin de seleccionar las mejores estructuras teniendo en cuenta la energía y la distancia de fragmentos del ligando a residuos clave localizados en el sitio activo de la enzima. Se refinan las estructuras seleccionadas mediante una nueva optimización de geometría utilizando un gradiente de convergencia <0.01 kcal/mol. El estudio de las interacciones ligando-proteína de los complejos obtenidos se realizó con el programa LPC¹⁸ y las constantes de disociación y energías libres de unión se calcularon usando el programa STC¹⁹.

¹⁵⁾ Clark, M.; Cramer, R.D. III, Van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 982–1012.

¹⁶⁾ Judson, R. Genetic algorithms and their use in chemistry en *Reviews in Computational Chemistry*, Lipkowitz, K.B y Boyds, D.B. Eds. **1997**, *10*, VCH, New York, pp. 1-73.

¹⁷⁾ Johnson, R.A.; Wichern, D.W. Applied multivariate statistical analysis. **2002**, 5ª Ed., Prentice Hall Inc., Nueva Jersey, pp. 668-692.

¹⁸⁾ Sovolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.E.; Abola, E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 327-332.

¹⁹⁾ Lavigne, P.; Bagu, J.R.; Boyko, R.; Willard, L.; Holmes, C.F.B.; Sykes, B.D. Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 252-264.