



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

**“Síntesis, evaluación biológica y análisis espectrométrico de  
los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan-2-il)metilen]-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil  
hidrazona en enfermedad de Chagas.”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA**

**Q.F.B. Karla E. Sánchez Montes**



**TUTOR: Dr. Eduardo Cortés Cortés**

**México DF**

**(2006)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Jurado asignado:**

Presidente: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

Vocal: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez.

Secretario: Dr. Benjamín Nogueta Torres.

1er suplente: Dr. Rubén Trinidad Sánchez Obregón

2do suplente: Dr. René Miranda Ruvalcaba

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 1-2, Instituto de Química, UNAM.

Asesor

---

Dr. Eduardo Cortés Cortés

Sustentante:

---

Q.F.B. Karla E. Sánchez Montes.



El presente trabajo se realizó en el área de investigación en síntesis orgánica heterocíclica y espectrometría de masas en el Instituto de Química de la U.N.A.M con apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), como parte del proyecto IN-225503, bajo la dirección del Dr. Eduardo Cortés Cortés.



## AGRADECIMIENTOS

*La gratitud es el sentimiento mas  
dulce que conmueve el alma.  
Máximo Gómez*

A *mis padres*, quienes con su cariño y comprensión siempre me han ayudado a seguir adelante y me han motivado para alcanzar mis metas.

A *mis hermanos*, por su ayuda, así como por los buenos momentos que hemos vivido juntos y por permitirme compartir sus ilusiones.

A la *familia Montes Cortés*, por todo el afecto, la confianza brindada, y el saber que en cualquier momento, siempre puedo contar con ellos.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos (que desfilaron) por lab. 1-2, por compartir aunque un breve espacio de tiempo parte de su vida, y por mucho o poco que sea algo me llevo de ellos.

A *Sandra*, que más que una compañera es una buena amiga, de la cual he aprendido mucho, así como también por todas las locuras que hicimos y los buenos o malos momentos que pasamos.

Se agradece la valiosa colaboración para la realización de las pruebas biológicas al:

- a) Dr. Víctor Monteon Padilla, Q.F.B. Floribeth León Pérez, adscritos al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), U.A.C, Campeche.
- b) Dr. Benjamín Noguera Torres, M. en C. Adrián Márquez Navarro; adscritos al Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

Lamentablemente en momentos como este siempre habrá omisiones involuntarias, pero sepan todos que guardo con profunda gratitud toda la colaboración brindada.

**A todos muchas gracias**

*A la memoria de Eduardo M. C.*



## ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	4
II. MARCO TEORICO .....	7
III. ANTECEDENTES	
3.1. Tripanosomiasis americana .....	10
3.2. Epidemiología y enfermedad de Chagas en México .....	10
3.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	
3.3.1 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
3.3.2 Ciclo evolutivo de <i>T.cruzi</i> .....	12
3.3.3 Ciclo de transmisión de <i>T.cruzi</i> .....	14
3.4. Ciclo de vida de <i>T.cruzi</i>	
3.4.1 Intravectorial .....	15
3.4.2 En reservorio vertebrado .....	15
3.5. Vías de transmisión	
3.5.1 Transmisión vectorial .....	17
3.5.2 Transmisión transfusional .....	17
3.5.3 Transmisión congénita .....	19
3.6. Manifestaciones clínicas .....	19
3.7. Diagnostico	
3.7.1 Métodos parasitológicos .....	21
3.8. Tratamiento .....	22
3.8.1 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol .....	23
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	26
V. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1 Parte química .....	28
5.2. Parte biológica .....	31



## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Parte química

#### - Características físicas y

rendimientos de ambas series IIIa y IIIb ..... 35

- Análisis de I.R. .... 37

- Análisis de R.M.N. .... 40

- Análisis de E.M-I.E ..... 48

- Discusión de los mecanismos de fragmentación..... 51

### 6.2 Parte Biológica

#### - Evaluación de ambas series IIIa y IIIb en epimastigotes y

tripomastigotes sanguíneos ..... 63

#### - Evaluación de compuestos IIIa, 1-10 en tripomastigotes

sanguíneos ..... 66

VII. CONCLUSIONES ..... 72

VIII. BIBLIOGRAFÍA. .... 75

IX. ANEXOS ..... 78



## RESUMEN

El *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico causal de la enfermedad de Chagas, la cual es endémica a través de toda Latinoamérica. Sin embargo desde su descubrimiento ( hace mas de 90 años), aún no existe un tratamiento eficiente para combatirla. Los dos únicos fármacos utilizados son el Nifurtimox y Benznidazol. Ambos pueden reducir los síntomas y la mortalidad en la fase aguda de la enfermedad, pero no son lo suficientemente efectivos en obtener una cura parasitologica o prevenir la fase crónica; además de ser altamente tóxicos.

En este trabajo se presenta la síntesis de dos series de compuestos, provenientes de la fenilhidrazona: la serie IIIa, 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)metilen]-2-(o-;p-R<sub>2</sub>)fenilhidrazona y la serie IIIb, 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan-2-il)metilen]-2-(o-;p-R<sub>2</sub>)fenilhidrazona.

Los compuestos se caracterizaron por sus constantes físicas, utilizando como herramienta principal para su identificación la Espectrometría de Masas, mediante la elucidación de mecanismos y patrones generales de fragmentación de los derivados obtenidos. También se emplearon técnicas espectroscópicas de: Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y de Infrarrojo.

Se evaluaron *in vitro* los derivados de ambas series (IIIa y IIIb) en diferentes cepas de *T. cruzi*, así como en dos distintos estadios del parásito; algunos compuestos mostraron una alta actividad tripanocida en comparación con los fármacos de referencia (Nifurtimox, Lampit<sup>®</sup> y Benznidazol, Radanil<sup>®</sup>). De igual manera se notó una marcada diferencia de sensibilidad entre las cepas utilizadas para este estudio, siendo la cepa **INC-5** la más sensible a los compuestos evaluados.



## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas' disease, which is endemic throughout Latin America. Nevertheless from its discovery (more than 90 years ago), neither efficient treatment exists yet. The only used drugs are the Nifurtimox and Benznidazol. Both can reduce the symptoms and mortality in the acute phase of the disease, but they are not sufficiently effective for a parasitical cure or to prevent the chronic phase; in addition both drugs are highly toxic.

In this work the synthesis of two series of compounds was obtained, as derivative from the phenylhydrazone is presented: serie IIIa, 2-[(o-;p-R<sub>2</sub>)phenyl]-1-[(5-R<sub>1</sub>-thiophen-2-yl)methylene]hydrazone and the serie IIIb, 2-[(o-;p-R<sub>2</sub>)phenyl]-1-[(5-R<sub>1</sub>-furan-2-yl)methylene]hydrazone.

Compounds were characterized by their physical constants, using as important technical the Mass Spectrometry, for its identification, by means of the elucidation of mechanisms and patterns of fragmentation of the all derivatives obtained. Also the use of spectroscopic techniques such as <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance of and Infrared spectrophotometry were used.

Derivatives of both series (IIIa and IIIb) on different strains of *T. cruzi* were evaluated *in vitro*, as well as in two different stages of the parasite (epimastigotes y tripomastigotes); some compounds showed a high anti-*trypanosoma cruzi* activity in comparison to reference drugs (Nifurtimox, Lampit® and Benznidazol, Radanil®). *T. cruzi* strains used have a noticeable difference of sensibilities to the difference compounds bioassays in this study and was observed the INC-5 strain is the most sensibilities at the bioassays compounds.



## I. INTRODUCCIÓN

El mal de Chagas es la enfermedad parasitaria de mayor importancia en América Latina, debido a su amplia distribución geográfica, elevada prevalencia y gran impacto sobre la salud pública. Es una enfermedad autóctona de América, producida por un protozooario hemoflagelado: *Trypanosoma cruzi*, y transmitida al hombre habitualmente por un insecto triatomino de la familia *Reduviidae*; en México se conoce como la chinche hocicona.<sup>1</sup>

Este síndrome presenta tres fases clínicas y sólo la fase aguda, que dura de 3 a 6 meses, es curable. Entre 30-40% de los infectados progresan a la etapa crónica de la enfermedad, y en un periodo de entre 5 a 20 años después de haber adquirido la infección, desarrollan enfermedad cardiovascular (Miocardiopatía Chagásica). La esperanza de vida para estos casos crónicos se reduce de 5 a 10 años de vida, una vez que se logra el diagnóstico clínico.<sup>2</sup>

En México se informaron los primeros casos de Miocardiopatía Chagásica, en 1965. Para 1978 se informaron cinco casos de esta enfermedad, incluyendo uno agudo, confirmados por su estudio serológico y colectados en menos de un año en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". En el lapso de 1944 a 1977 no habían sido reconocidos más de dos casos. Desde entonces se han estudiado más casos de la enfermedad de Chagas, en individuos entre la 4ª y 6ª década de vida, campesinos con miocardiopatía dilatada o bloqueo aurículo-ventricular completo, ambas lesiones son irreversibles.

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Brasil, todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz y adecuada para todas las formas clínicas de la enfermedad. Se puede decir que el *Trypanosoma cruzi*, ha desafiado todos los intentos para su eliminación, pues los medicamentos utilizados actualmente, como el Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>) y el Benznidazol (Radanil<sup>®</sup>) son de relativa eficacia. De igual manera, tampoco existen fármacos o vacunas para prevenir la enfermedad.



Se ha aceptado que la enfermedad de Chagas existe en México y puede ser un problema de salud de primera importancia. Sin embargo como se trata de una enfermedad que afecta principalmente a la población rural, no suele haber ni la información suficiente entre el personal de salud, ni métodos accesibles que permitan el diagnóstico parasitológico y serológico en la fase aguda, que además es la única donde los fármacos actuales pueden tener utilidad. La creciente migración interna en el país hace suponer que en las áreas urbanas se reconocerán más casos de Chagasicos crónicos y que habrá un numero importante de infectados asintomaticos, potencialmente transmisores de la enfermedad a través de la donación de sangre. Aún el individuo asintomático puede tener parasitemia esporádica y no se hace estudio serológico de los donadores ni se dispone de métodos tripanosomicidas en el banco de sangre.

Es necesario un fuerte apoyo continuó por parte de las autoridades de salud y de académicos para enriquecer nuestro conocimiento sobre la mencionada enfermedad de Chagas en México y desarrollar programas eficaces de control.

Este trabajo pretende contribuir a la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para la enfermedad de Chagas, mediante la síntesis de los derivados de la fenilhidrazona , que prometen ser buenos agentes tripanocidas, así como el análisis espectrométrico de masas





## II. MARCO TEORICO

En 1950 Fray Reginaldo de Lizárraga, sacerdote misionero, hace la primera descripción sobre insectos redúvidos y sus hábitos hematófagos nocturnos, con los que tuvo contacto en sus viajes de inspección por Argentina.

En 1908 el gobierno brasileño mandó construir un ferrocarril entre las ciudades de Belem y Río de Janeiro, pero la obra se vio interrumpida en Minas Gerais por un brote severo de malaria en Lassance. En esa ocasión resultaron afectados varios trabajadores y se comisionó al Dr. Carlos Chagas para estudiar el problema.

Después de trabajar por algún tiempo, observó la presencia de insectos hematófagos que llamaban la atención por su forma de picar y los denominó como barberios o insectos besucones. El Dr. Chagas consideró la posibilidad de que tales insectos podían transmitir algún tipo de agente patógeno al humano o a otros vertebrados, e investigando encontró parásitos flagelados parecidos a *Crithidia* en la luz intestinal. Intrigado por el hecho de que el parásito constituyese una etapa evolutiva de *trypanosoma minasense* (descrito un año antes), lo aisló e inoculó en marmosetas.<sup>3</sup>

Una vez analizados los flagelados, pudo determinar con sorpresa, que se trataba de una especie diferente a *Trypanosoma minasense*. El parásito recién descubierto fue llamado *Schizotrypanum cruzi* (*Trypanosoma cruzi*), como un homenaje a su maestro Oswaldo Cruz. Chagas regresó a Lassance con el objetivo de conocer los posibles huéspedes y después de estudiar a humanos y animales vertebrados, diagnosticó por primera vez la tripanosomiasis, en una niña de dos años. Había examinado a la niña anteriormente sin encontrarle parásitos, pero en esa ocasión sí los observó, sugiriendo una etapa aguda de la nueva enfermedad. En estudios seriados, encontró que los flagelos desaparecían conforme los síntomas de la enfermedad disminuían y con esto propuso la existencia de una fase crónica.

Sus descubrimientos fueron publicados en el primer volumen de las Memorias do Instituto Oswaldo Cruz en agosto de 1909, el artículo se llamó: “ Nova tripanozomiasse humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n.sp, agente etiologico de nova entidade morbida do homen”.



En este trabajo el investigador Carlos Chagas, describe el agente, los vectores, los signos clínicos en el hombre y la de reservorios animales de la nueva enfermedad, así como el ciclo biológico del parásito en el tracto digestivo del vector invertebrado y su cultivo en agar-sangre.<sup>4</sup>

Después del descubrimiento, Carlos Chagas recibió varios premios, grados y distinciones, como por ejemplo: Miembro Extraordinario de la Academia Brasileña de Medicina, entre otro. Este éxito provocó una abierta oposición, que culminó en 1916, con la negación de Rudolf Kraus del Instituto Bacteriológico Argentino argumentando el haber encontrado insectos infectados, pero no casos de humanos con la enfermedad en el Chaco Argentino y relacionó la enfermedad con el bocio y el cretinismo. No es sino hasta el 6 de diciembre de 1924 cuando la comisión académica encargada del caso, decidió a favor de Chagas, sin embargo, este episodio ya había tenido un efecto devastador y la enfermedad de Chagas se olvidó durante 20 años.

Afortunadamente, el asunto se revirtió en años posteriores con el redescubrimiento de la enfermedad de Chagas, que se debió principalmente al trabajo del médico Salvador Mazza en Argentina, quién describió más de mil casos en las regiones donde Kraus había buscado 20 años antes.

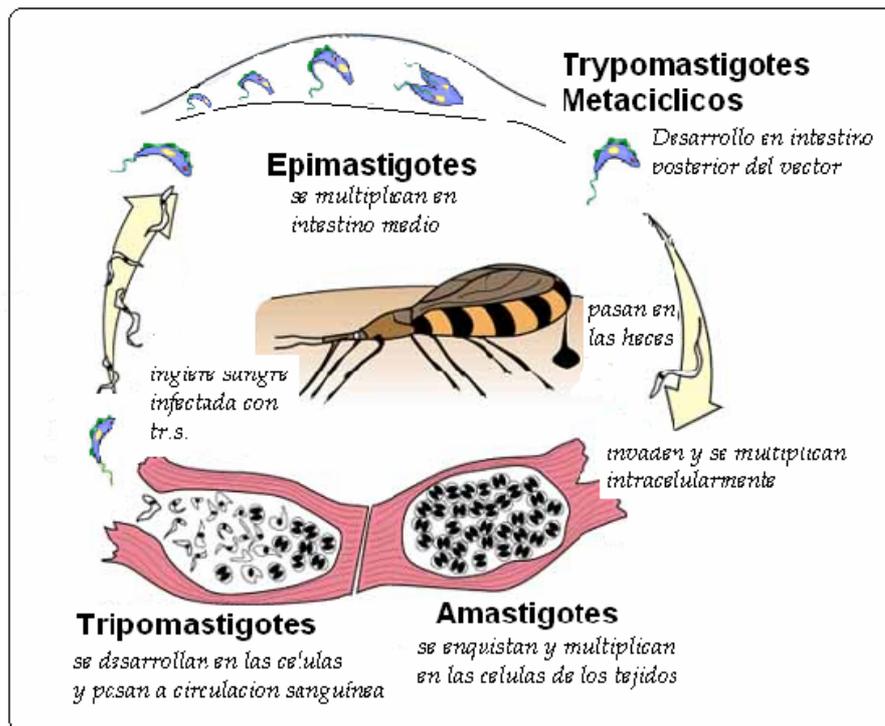
Es en México hasta 1920 que Hoffman señala el posible papel del *Triatoma dimidiata* como transmisor de *T. cruzi*. Transcurrieron ocho años hasta la publicación del hallazgo de los primeros triatóminos naturalmente infectados con el flagelado y los primeros casos humanos con la enfermedad aparecieron en 1939.<sup>5</sup>



Seguido por el acortamiento del flagelo y los cambios en la estructura del cinetoplasto, que parecen ser los responsables de la ruptura de la célula hospedera, con la liberación subsiguiente de cientos de tripomastigotes al espacio intercelular. Los datos disponibles sugieren que todas esas formas son capaces de invadir nuevas células en el mismo sitio donde fueron liberadas, o salir al torrente circulatorio y distribuirse por todo el organismo, o ser succionados por un vector, completándose así el ciclo de vida del parásito.<sup>14,15</sup> (Figura 2)

### 3.5 VÍAS DE TRANSMISIÓN

Además de la vía vectorial (que representa del 80 al 90 % de transmisión), existen la transmisión transfusional (5-20 %) y la vía congénita (0.5-8 %). Las otras vías de transmisión son excepcionales (accidental, transplante de órganos, otros vectores, lactogénica, etc) y no representan una importancia significativa en términos de salud pública.



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. (tomada de *the kiss of death*, University of Texas at Arlington 1998)



### 3.5.1 Transmisión vectorial

De acuerdo a los estudios entomológicos de los vectores triatominos hay 130 especies reconocidas, agrupadas en 15 géneros de triatominos y de los cuales algunos se han encontrado infectados naturalmente por *T. cruzi*.

México es considerado como el país hispanoamericano con mayor número de especies de triatominos. Se han analizado en zonas de riesgo, lo cual permite la estratificación de transmisión según las especies de vectores presentes, que para las entidades del golfo de México y del Istmo de Tehuantepec hacia el Sur parte de los estados de San Luis P., Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Yucatán, Campeche y Quintana Roo, resulta sin complejidad, por la presencia de una sola especie *T. dimidiata*. **(Figura 3)**

Las especies mexicanas de mayor importancia médica son: *Rodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata*. Se estima que el complejo *phyllosoma* es responsable del 67%, *T. barberi* del 3%, *T. dimidiata* del 21%, *T. gerstaeckeri* del 7%, y el resto de las especies del 2%.<sup>16,17</sup>

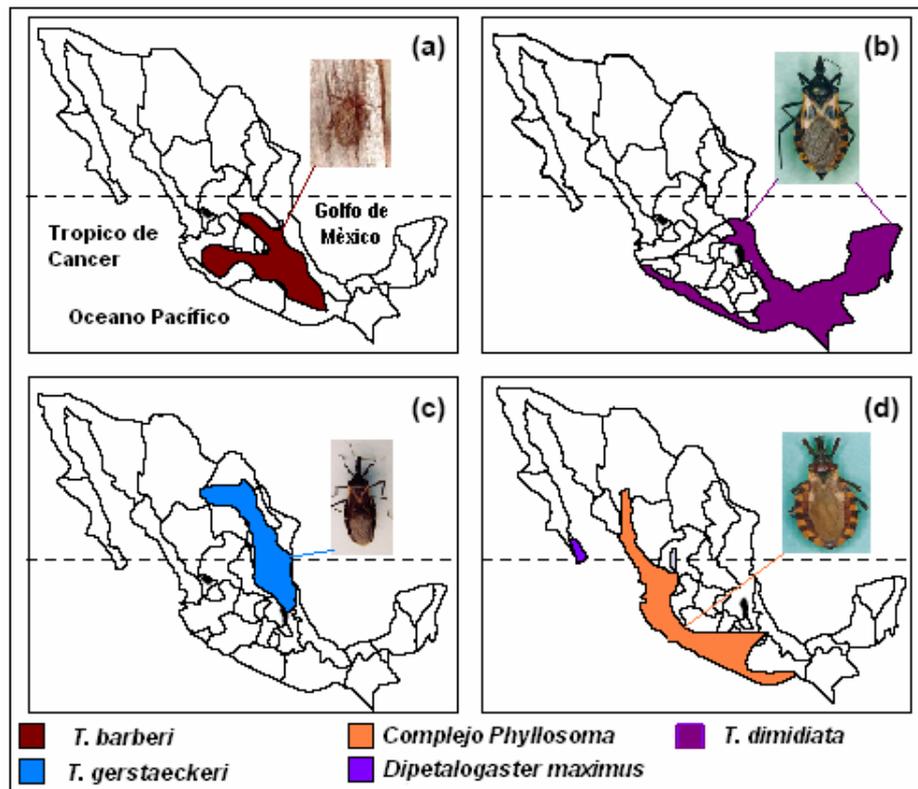
### 3.5.2 Transmisión transfusional

Las dificultades económicas en América Latina han estimulado la emigración a zonas urbanas en las seis últimas décadas.

Actualmente, en la mayoría de los países, las ciudades tienen el 60% de la población. La emigración de las zonas rurales a urbanas si bien reduce el número de personas expuestas al vector infectado, aumenta la probabilidad de transmisión por transfusión. En cuanto no se descarte la sangre de donadores contaminados, existirá la probabilidad de transmitir la enfermedad por esta vía, siendo los más expuestos los individuos poli transfundidos, tales como hemofílicos y los que reciben diálisis.



Afortunadamente, sólo una parte (12-25%) de los que reciben transfusión con sangre infectada, contraen la enfermedad. Por otro lado, la infección transfusional, se ha convertido en un serio problema en los países desarrollados (donde no hay transmisión vectorial) debido a las decenas de millones de latino-americanos que emigra a estos países.<sup>18,19</sup>



**Figura 3.** Distribución geográfica de las especie más importantes: (a) zona infestada por *Triatoma barberi*, (b) por *Triatoma dimidiata*, (c) por *Triatoma gerstaeckeri*, (d) complejo *Phyllosoma* y *Dipetalogaster maximus*. Tomada de *TRENDS in Parasitology* Vol.17 2001



### 3.5.3 Transmisión congénita

Constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas. Este tipo de transmisión parece depender de factores ligados al parásito y al hospedador. Ocurre cuando el *T. cruzi*, al igual que atraviesa las mucosas, penetra el epitelio trofoblástico. Con una población seropositiva de 1'768,376 individuos, y tasas de población femenina entre 15 y 49 años de 29% para áreas urbanas y suburbanas y un 25% para áreas rurales. Se estima que hay actualmente 472'393 mujeres en edad fértil seropositivas para *T. cruzi*.<sup>20</sup>

### 3.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La enfermedad transcurre inicialmente con una elevada parasitemia (fase aguda), la cual es limitada por la respuesta inmune del hospedero. Una vez superada esta etapa, los individuos infectados pasan por un período sin sintomatología clínica, llamada **fase indeterminada o asintomática**. Los pacientes en esta fase crónica presentan niveles subpatentes de parasitemia, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico parasitológico. Aproximadamente el 70 % de los pacientes asintomáticos permanece así durante toda su vida. Sin embargo, un 30 % de ellos después de permanecer por años asintomáticos, desarrollan lenta, pero progresivamente, una miocardiopatía, que es la patología que se observa en nuestro país. Al sur de nuestro continente, además de las alteraciones cardiológicas, se puede observar un síndrome de dilatación de vísceras, siendo las más frecuentes las dilataciones de colon y/o esófago, conocidas por el desarrollo de megaesófago o megacolon.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían según la etapa de la infección. La **fase aguda** puede presentarse con o sin sintomatología. Cuando esta se hace evidente, puede ser muy variada, con signos de entrada como el de Mazza-romaña, o Chagoma de inoculación, además de manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades. En esta etapa, las manifestaciones clínicas son más frecuentemente observadas en niños, donde la enfermedad puede ser mortal. En el adulto se pueden presentar casos de mortalidad, pero con mayor frecuencia puede pasar desapercibida o presentarse en forma moderada.



En esta fase, las formas tripomastigotes pueden ser detectados en sangre, debido a los elevados niveles de parasitemia que se presentan, los cuales son controlados posteriormente por la respuesta inmune.

Esta respuesta no erradica completamente al parásito, manteniéndose una parasitemia subpatente durante toda la vida del hospedador. Una vez superada la etapa aguda, los individuos infectados pasan por un período sin sintomatología clínica, llamada **fase indeterminada o asintomática**.

Aproximadamente el 70 % de los pacientes infectados permanece así durante toda su vida, conviviendo con el parásito, sin desarrollar daños importantes en sus tejidos. La seroreactividad para *T. cruzi* es lo único que diferencia clínicamente a un paciente asintomático de un individuo normal, ante la falta de evidencias de daños importantes en tejido cardíaco y/o digestivo. De estos pacientes aproximadamente un 30 % de ellos, después de permanecer por un tiempo asintomático, desarrollan la fase sintomática o **Miocardipatía Chagásica (fase crónica)**. Esta fase es de evolución lenta, generalmente entre 10 y 20 años, entre el final de la fase aguda y el establecimiento de las lesiones cardíacas. Este período se caracteriza por la evolución lenta y por el predominio del daño cardíaco (en nuestro país), lo que origina la llamada miocardipatía chagásica crónica. Los problemas cardíacos son los más serios y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón y con trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón; produciendo insuficiencia cardíaca y facilita la generación de tromboembolias. Sin embargo, la enfermedad chagásica gastrointestinal es común al sur del Amazonas, pero rara en México y en Centroamérica.<sup>21</sup>

### 3.7 DIAGNÓSTICO

La vía más específica para el diagnóstico es la detección o visualización del parásito en sangre, a través de examen directo. Sin embargo, el diagnóstico parasitológico es difícil, por lo que rutinariamente se realiza el diagnóstico serológico.

A continuación brevemente se presentan las técnicas empleadas para el diagnóstico parasitológico (directos e indirectos) y los métodos serológicos.



### **3.7.1 Métodos parasitológicos**

#### **a) Métodos directos**

Las técnicas que se describen a continuación, presentan niveles de sensibilidad variables que dependen del nivel de parasitemia que presenten los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad. Con elevados niveles de parasitemia, los métodos directos presentan suficiente sensibilidad para garantizar el diagnóstico parasitológico. Sin embargo, el paciente durante la fase aguda, puede presentar niveles de parasitemia no tan elevados. Se recomienda el empleo de métodos que concentren la muestra para tratar de incrementar la posibilidad de observar el parásito en sangre.

Estos métodos pierden considerablemente la sensibilidad, cuando se ensayan en pacientes que se encuentran en la fase crónica, por lo que se recomienda el uso de métodos parasitológicos indirectos para poder realizar el diagnóstico. A continuación se describen algunas de las técnicas empleadas para el diagnóstico parasitológico directo o indirecto.

- **Examen de sangre al fresco**

Este método se realiza cuando se sospecha de un paciente que se encuentra en fase aguda. Con esta técnica se pretende visualizar la presencia de parásitos móviles circulantes en la sangre del paciente. La sensibilidad durante el pico de parasitemia, en la fase aguda, es menor al 50%, para un solo examen y debe ser repetido varias veces para diferentes muestras de sangre de un mismo paciente, con el objeto de aumentar su sensibilidad.

- **Extendido coloreado**

Con este método se pretende identificar morfológicamente la especie de Trypanosoma. Este procedimiento se realiza cuando el examen al fresco resulta positivo.

#### **b) Métodos indirectos**



- **Xenodiagnóstico**

Consiste en la demostración de la presencia de *T. cruzi* en el hospedador intermediario, previamente alimentado con sangre del paciente sospechoso. Este método permite amplificar el número de parásitos que se encontraban presentes en la sangre, debido a la fácil multiplicación del parásito dentro del vector. Para realizarlo, se usan ninfas de triatominos no infectados. Con el fin de constatar la presencia del protozoario dentro del vector, se analiza el contenido intestinal de los triatominos alimentados con sangre del paciente. El análisis debe realizarse entre 30 y 45 días después de la ingestión. En las mejores condiciones se ha reportado que la sensibilidad del método, durante la fase crónica podría alcanzar el 60%.

- **Hemocultivo**

Consiste en colocar muestras de sangre del paciente, en tubos con medio de cultivo. Las muestras son revisadas a los 20, 30 y 45 días, buscando formas epimastigotes. En la fase aguda, su sensibilidad podría alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar mas fácilmente cepas del parásito.

- **Inoculación en animales sensibles**

Se usa principalmente el ratón o el cobayo, a los cuales se les inoculara sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con una porción de la “capa blanca”. El período de observación es variable, de 3 a 4 semanas. Se buscan los parásitos en la sangre de animales por el método del examen al fresco y luego por el extendido coloreado.<sup>22</sup>

### **3.8 TRATAMIENTO**

Hasta el momento, los únicos fármacos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son nitrofuranos (Nifurtimox, Bayer, recientemente discontinuado, **Figura 4**) y nitroimidazoles (Benznidazol, Roche, **Figura 4**).



Ambos compuestos fueron introducidos empíricamente en las décadas de los 60 y 70 del siglo pasado. Hoy en día se conoce que actúan por la vía de generación de radicales libres, a lo cual los parásitos tripanosomatídeos son particularmente sensibles por su limitada capacidad de detoxificación .

La experiencia de varias décadas ha demostrado que ambos fármacos tienen una actividad significativa en la fase aguda de la enfermedad (hasta un 80% de éxito terapéutico), aunque su eficacia varía según la región geográfica de procedencia del paciente. La mayor limitación de los nitrofuranos y nitroimidazoles en la terapia específica de la enfermedad de Chagas, es su muy limitada eficacia en pacientes en su fase crónica (indeterminada o sintomática), que actualmente es la manifestación clínica

más frecuente en Latinoamérica. En estos pacientes el porcentaje de fracasos terapéuticos con Benznidazol es típicamente  $\geq 80\%$  .La actividad de este tipo de compuestos en pacientes en fase aguda y su muy limitada eficacia en la fase crónica ha sido confirmada recientemente en dos recientes estudios, en donde se evaluó ,la carga parasitaria en pacientes crónicos tratados con Nifurtimox y Benznidazol y no tratados, encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, otro estudio realizado indica que el tratamiento con Benznidazol en pacientes crónicos, aunque incapaz de inducir cura parasitológica, conlleva a una significativa reducción en la ocurrencia de cambios electrocardiográficos y a una menor frecuencia de deterioro de la condición clínica de los pacientes.<sup>23,24</sup>

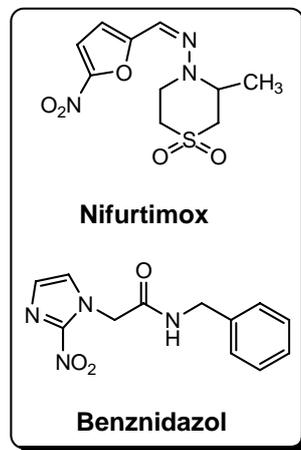
### **3.8.1 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol.**

El Nifurtimox y el Benznidazol, actúan sobre el genoma del *T. cruzi*. Ambos inhiben la síntesis de DNA, del RNA y de las proteínas. También, aceleran la degradación de esas macromoléculas. El aislamiento del DNA nuclear o cinetoplasto de tripanosomas incubados con Nifurtimox o Benznidazol permite comprobar rupturas en las cadenas nucleotídicas del DNA.



El Nifurtimox y el Benznidazol pueden ejercer su toxicidad por varios mecanismos como:

- (a) Acción directa del radical nitroanión sobre las moléculas susceptibles, entre ellas el DNA;
- (b) Generación de radicales libres del oxígeno, que con el Nifurtimox sería el agente citotóxico principal.
- (c) Producción por reducción de moléculas reactivas (los derivados nitroso e hidroxilamina) cuya citotoxicidad es conocida.
- (d) Inhibición directa de las enzimas como la topoisomerasa, encargadas de mantener la integridad del DNA.<sup>25</sup>



**Figura 4.** Fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Otros enfoques promisorios incluyen inhibidores de la cruzipaina (una proteasa dependiente de cisteína, esencial para la supervivencia del *T.cruzi*). Inhibidores del metabolismo del tripanotión (análogo del glutatión, sólo presente en tripanosomatídeos). Inhibidores de la biosíntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos (captura y metabolismo de purinas), así como del metabolismo de polifosfatos, e inositol en este parásito.



### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Tripanosomiasis Americana

Es una enfermedad parasitaria causada por un hemoflagelado, el *Schyzotrypanum cruzi* (*Trypanosoma cruzi*) que es transmitido al hombre por las deyecciones de triatomíneos vectores hematófagos de hábitos nocturnos. La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario patógeno *Trypanosoma cruzi* es una antrozoosis que constituye la mayor carga parasitaria del continente Americano: hay 16-18 millones de personas ya infectadas en América Latina y cerca de 100 millones (25% de la población del subcontinente) expuestas al riesgo de infección. Se ha estimado que esta dolencia parasitaria es responsable de la pérdida de aproximadamente 3 millones de años laborables efectivos por morbilidad y 50,000 muertes cada año. La enfermedad indígena de América, fue descrita en Brasil en 1909 por Carlos Chagas y reconocida en nuestro país por primera vez en 1940, cuando Mazzotti informó de los primeros casos en el estado de Oaxaca.<sup>6</sup>

#### 3.2 Epidemiología y enfermedad de Chagas en México.

Se estima un total de entre 16 y 18 millones de personas infectadas en 18 países de Latinoamérica. Se pueden evidenciar diferencias importantes entre los países latinoamericanos, por ejemplo, en Bolivia aproximadamente el 20% de la población está infectada, esto es cerca de 1.2 millones de personas. En Brasil, el porcentaje de la población infectada es del 1.3%, lo que significa aproximadamente 5 millones de personas.

Argentina, Honduras, Paraguay y el Salvador presentan porcentajes entre el 5% y el 10% de la población infectada con la enfermedad, mientras que el porcentaje en Chile, Colombia, Ecuador y Venezuela está entre el 1% y el 5%. Otros países como México y Nicaragua presentan un porcentaje de infección menor al 1%.

En Estados Unidos, la infección se encuentra más frecuentemente asociada a inmigrantes de México, Centro América y América del Sur.



Se estima que existe en Estados Unidos entre 100 mil y 675 mil inmigrantes latinoamericanos infectados con el mal de Chagas.<sup>7</sup>

La enfermedad de Chagas tiene alta prevalencia en zonas rurales tropicales y subtropicales, generalmente en zonas con altitud sobre el nivel del mar por debajo de 1380 m, donde prosperan las más de 100 especies de insectos vectores *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*.

En México, durante 25 años se consideró que la enfermedad de Chagas era exótica, con casos aislados de la forma inicial parasistémica y por razones desconocidas no había Chagásicos crónicos con cardiopatía irreversible, a pesar de las observaciones clínicas aisladas, no confirmadas, de posibles miocardiopatías dilatadas de origen Chagásico.<sup>8</sup>

Descrita por primera vez en 1949, esta enfermedad se distribuye en prácticamente todos los estados de la República Mexicana. Aunque de importancia epidemiológica, según lo indica la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) realizada en 1990, parece estar situados en el sureste mexicano particularmente en Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Guerrero. Sin embargo, la detección de los casos agudos no corresponde exactamente con la distribución serológica antes mencionada, ya que estados como Yucatán Jalisco y Zacatecas, que son algunos de los que poseen el mayor número de casos descritos, mostraron seroprevalencias muy bajas. Hasta 1990 se tenían identificados aproximadamente 300 casos agudos y un número similar de pacientes con cardiopatía Chagásica crónica.<sup>9</sup>

### **3.3 Trypanosoma cruzi**

#### **3.3.1 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.**

La clasificación sistemática de estos parásitos es la siguiente:

- Reino: Protozoa.
- Phylum: Euglenozoa.
- Clase: Kinetoplastida.
- Orden: Tripanosomatida.
- Género: Tripanosoma.



Otros esquemas consideran que el Orden es Kinetoplastida y la familia es Trypanosomatidae. Los Kinetoplastida son flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar, normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto que corresponde a una condensación de DNA localizado en el interior de una única mitocondria que está ramificada por todo el cuerpo del parásito. Otras estructuras características de estos organismos son organelos especializados, tipo peroxisomas, conocidos como glicosomas y la presencia de microtúbulos subpeliculares.

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género trypanosoma se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado *stercoraria*, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado *salivaria*, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*.<sup>10</sup>

### 3.3.2 Ciclo Evolutivo de *Trypanosoma cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células (esférica, periforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral), se definen las siguientes formas evolutivas para los tripanosomatideos (**Figura 1**)

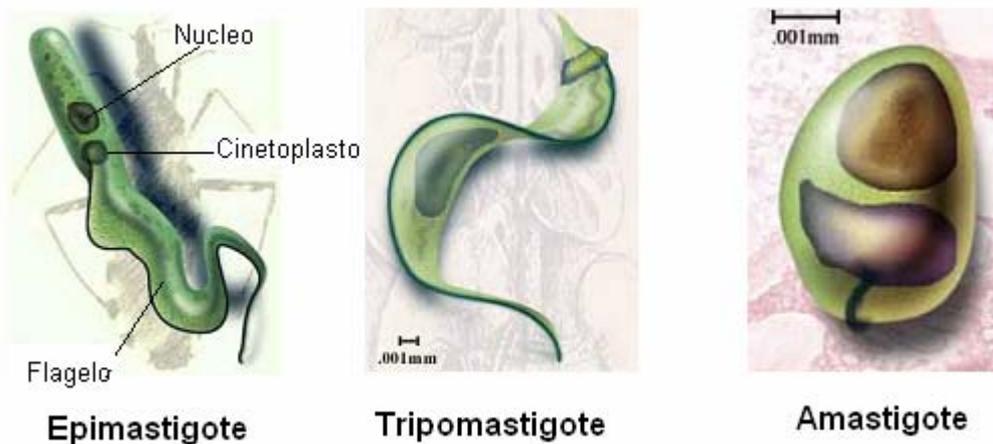
**Epimastigote:** (20 a 40  $\mu\text{m}$  x 2 a 5  $\mu\text{m}$  ) forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto, dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector



y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Es también la forma de más fácil cultivo “*in vitro*”

**Amastigote:** (con un diámetro 2 - 4  $\mu\text{m}$ ) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.

**Tripomastigote:** (20 a 25  $\mu\text{m}$  x 2 a 4  $\mu\text{m}$ ) forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado, carece de capacidad replicativa. También se puede encontrar una forma llamada esferoamastigota (en el estómago del insecto vector y en determinadas situaciones experimentales *in vitro*).<sup>11</sup>



**Figura1.** Esquemas representativos de los estadios de *Trypanosoma cruzi* (tomada de: *the kiss of death, University of Texas at Arlington 1998*)



### 3.3.3 Ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi*.

La principal vía de transmisión del *Trypanosoma cruzi* entre sus hospedadores es la transmisión vectorial (a través del vector), en la cual se pueden distinguir tres importantes ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico.

**Ciclo silvestre:** De naturaleza eminentemente zoonótica, donde el protozooario circula, desde hace millones de años, entre vectores y reservorios silvestres a lo largo de la mayor parte del continente americano. Los ecotopos (ecosistemas) primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónica y atlántica.

La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud y humedad de características fauno florísticas y de la disponibilidad de alimentos. En este contexto se encuentra en toda América, albergándose el parásito, en mamíferos de medio y pequeño tamaño y así como en los insectos vectores.

**Ciclo doméstico:** La enfermedad de Chagas corresponde a una situación mucho más reciente en el contexto histórico, definido por factores antroponóticos y haciendo del hombre uno de los últimos reservorios naturales de *T. cruzi*. En el ciclo doméstico el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando el parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y países no endémicos.

**Ciclo peridoméstico:** en este ciclo intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las residencias y los triatomas silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento. Este ciclo sirve de unión a los ciclos silvestre y doméstico.<sup>12</sup>



### 3.4 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

#### 3.4.1 Intravectorial

El ciclo biológico de *T. cruzi* con el hospedador invertebrado, se inicia cuando la sangre de animales infectados es ingerida por el insecto. En el tracto intestinal, las formas tripomastigotes se transforman a esferomastigotes y epimastigotes, que se dividen por fisión celular. Algunos epimastigotes migran a la parte terminal del intestino y a los túbulos de Malpighi. Por una adhesión al epitelio intestinal medio y posterior, los epimastigotes son transformados en tripomastigotes metacíclicos.

La metaciclogénesis es activada por adenil ciclasa presente en la membrana plasmática de los epimastigotes. También se ha considerado que la orina del insecto, descargada en el saco rectal, vía túbulos de Malpighi, estimula la metaciclogénesis. El AMPc presente en la orina puede ser uno de los factores de la estimulación. El ciclo de vida intravectorial de *T. cruzi* se completa en aproximadamente de 2 a 4 semanas.<sup>13</sup>

#### 3.4.2 En reservorio vertebrado.

El ciclo evolutivo del *T. cruzi*, en el hospedero vertebrado, comienza cuando las formas tripomastigotes y epimastigotes son eliminadas en las heces y en la orina del insecto vector y son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado. Las formas tripomastigotes pueden, potencialmente infectar todas las células nucleadas.

Por su parte, los epimastigotes que se encuentren en el área son fagocitados por células con capacidad fagocítica, y son rápidamente digeridos. Después de penetrar en la célula hospedera, las formas tripomastigotes pueden ser encontradas en el interior de una vacuola, llamada vacuola parasitófora; donde los organelos del sistema lisosomal de la célula hospedera se aproximan a la vacuola y se funden con ella incorporando sus membranas a la membrana de dicha vacuola y descargando su contenido al interior de la misma que se torna ácida. Así se lleva a cabo la diferenciación de las formas de tripomastigote hacia la forma amastigote, la cual se inicia con el cambio hacia una forma redondeada, que hace que el flagelo quede todo asociado al cuerpo.



## IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPOTESIS

La síntesis y evaluación *in vitro* de los derivados fenilhidrazínicos en diferentes cepas de *T. cruzi*., permitirá determinar la diferenciación entre cepas, así como la sensibilidad y variabilidad de las mismas a los compuestos evaluados y con ello contribuir al diseño de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas.

Para confirmar esta hipótesis, los objetivos trazados fueron los siguientes:

### OBJETIVOS

- Desarrollar una ruta de síntesis para la obtención de nuevos derivados de 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]-metileno]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona. R<sub>1</sub>= H, NO<sub>2</sub> y R<sub>2</sub>= (*o*-; *p*-)Br, Cl, F, NO<sub>2</sub>; H
- Caracterizar los nuevos derivados por medio de técnicas espectrométricas, como : Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear (de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y estudios bidimensionales) e Infrarrojo.
- Evaluar *in vitro* la actividad trypanocida de los derivados de 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]-metileno]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona en epimastigotes y tripomastidotes sanguíneos de la cepa CI-Brener y NINOA, respectivamente de *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar *in vitro* la actividad trypanocida de los derivados 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)-metileno]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona en tripomastigotes sanguíneos de dos diferentes cepas (NINOA y INC-5) de *Trypanosoma cruzi*.



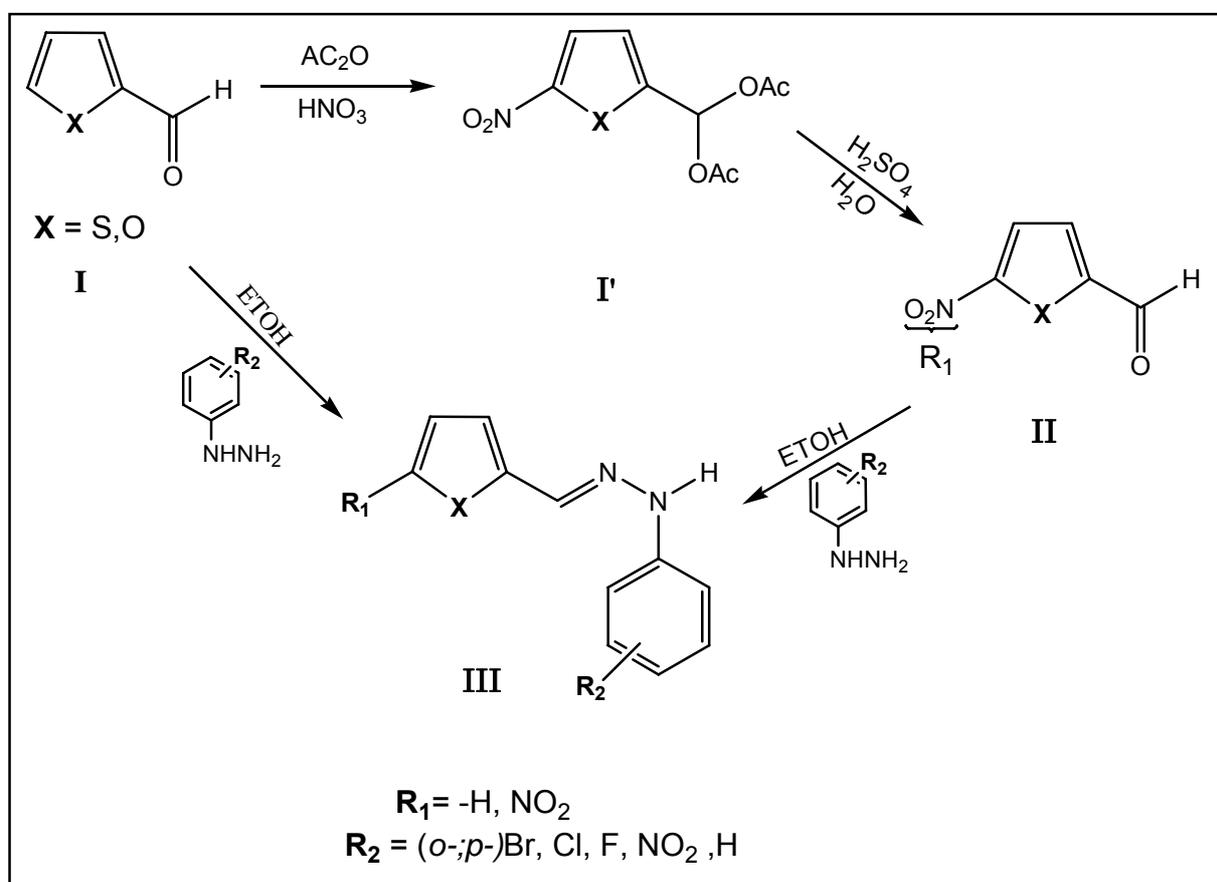
*V. PARTE*  
*EXPERIMENTAL*

## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Parte química

Este trabajo se divide en dos partes. Primero, la parte química que comprende el método sintético de los 19 derivados de la 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]-metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona, efectuándose por medio de una ruta sintética de tres pasos, de acuerdo a la **Figura 5**.

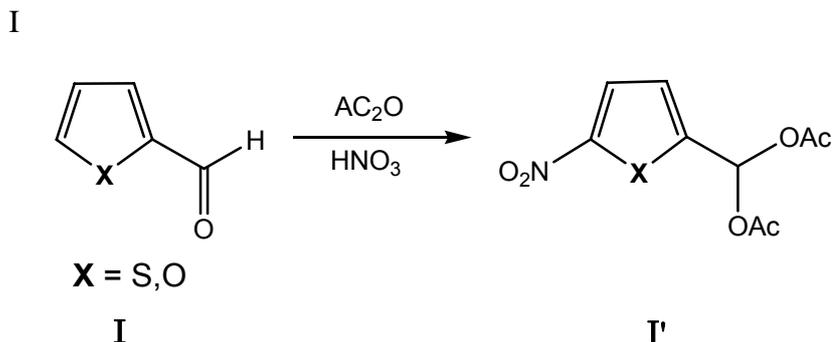
La segunda parte, la parte biológica, describe las pruebas de actividad antichagásica a que fueron sometidos los compuestos obtenidos.



**Figura 5.** Ruta general de síntesis de los derivados de 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona

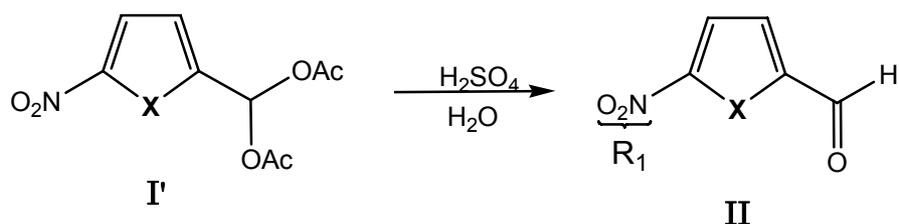


## Obtención del 1-[5-nitro(tiofen-; furan)-2-il]diacetato.



En un matraz de dos bocas provisto de agitación magnética y refrigerante, se coloca 7.1 mmol del respectivo carboxaldehído ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{OS}$  y  $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$ ), disuelto en 1.4 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ ; la mezcla de reacción es enfriada a una temperatura de  $-5^\circ\text{C}$ , y enseguida se adiciona gota a gota una mezcla de 0.8ml (19.0 mmol) de ácido nítrico en 4.7 ml (0.05 mol) de anhídrido acético; se deja a temperatura ambiente durante cinco horas y al término de este tiempo se coloca el matraz en hielo y se adiciona agua fría hasta obtener un precipitado el cual se filtra y seca, Se obtiene el compuesto correspondiente (I'), con rendimiento del 75 %, y punto de fusión no corregido.

## Obtención de 5-nitro(tiofen-;furan)-2-carbaldehído

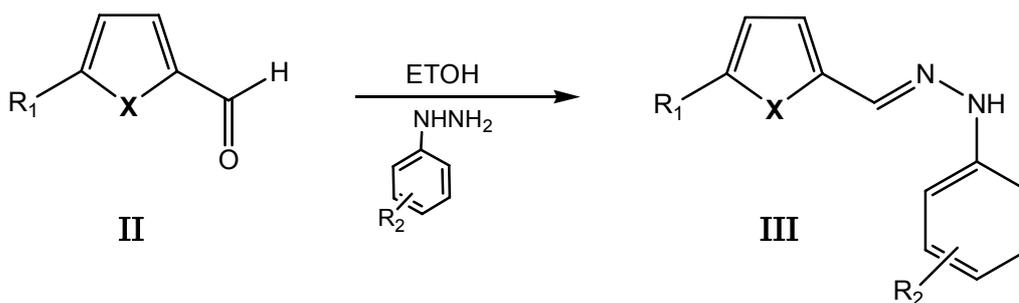


En un matraz de dos bocas, provisto de agitación magnética y sistema de reflujo se colocan 7.1 mmol del diacetato correspondiente (I'), al cual se le adicionan 3.0 ml de agua y 0.6 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La mezcla se calienta en baño de vapor durante tres horas y al



término, se enfría en baño de hielo, para obtener un precipitado el cual se filtra y recristaliza con una mezcla de EtOH/Eter. Se obtiene el derivado (II) [(5-nitro-2-tiofenaldehído (IIa) y 5-nitro-furfuraldehído (IIb)]. Con un rendimiento del 50%.

### Obtención del 1-[[[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]-metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona



IIIa, cuando X= S

IIIb, cuando X= O

R<sub>1</sub>= H, NO<sub>2</sub>

R<sub>2</sub> = (*o*-; *p*-)Br, Cl, F, NO<sub>2</sub>

Se disuelven 9.0 mmol del carboxaldehído correspondiente (II, R<sub>1</sub>= H, NO<sub>2</sub>) en 50 ml de EtOH y con agitación constante se agregan 9.0 mmol del hidrato de hidrazina [R<sub>2</sub>= (*o*-; *p*-)Cl, Br, NO<sub>2</sub>, F; H] correspondiente, previamente disueltos en la cantidad necesaria de agua destilada. Al terminar la adición; la mezcla se deja reposar por espacio de 30 minutos, el precipitado obtenido se filtra, se lava con EtOH tibio y agua; se deja seca. Los productos se obtuvieron con rendimientos entre el 50 y el 96%, con punto de fusión, no corregido, los datos completos se presentan en las tablas 1 y 2.



## 5.1 Parte biológica

Para determinar la actividad trypanocida de los compuestos se realizaron ensayos *in vitro* con epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.

**- Evaluación *in vitro* de los derivados 1-[[5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]-metilen}-2-[o-; p-R<sub>2</sub>]fenil hidrazona en epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*.**

### Material biológico

Para el ensayo con epimastigotes se utilizó la cepa CI-Brener (Brasileña) estándar y para los tripomastigotes sanguíneos se utilizó la cepa NINOA aislada de un caso humano agudo de Oaxaca.

### Técnica

Los ensayos para determinar la posible actividad tripanocida de los compuestos se llevan a cabo en dos etapas.

- *Primera Etapa:* Se utiliza un cernimiento con epimastigotes de cultivo. En un placa de cultivo celular se coloca lo siguiente: medio LIT (infusión de hígado triptosada) a un volumen final de 300  $\mu$ L, epimastigotes (500,000 parásitos por pozo la cuenta se realiza en un hematocitómetro) y finalmente se añaden los compuestos a la concentración requerida (82  $\mu$ g/mL-332  $\mu$ g/mL) previamente se pesan y se diluyen en etanol. En esta prueba el disolvente alcanza una concentración final de 0.3 %, es decir 1  $\mu$ L de la solución en 300  $\mu$ L del medio. A continuación la placa se cubre, se coloca en la cámara de humedad y se incuba a 4°C por 24 hrs.

En cada ensayo se colocan dos blancos: uno que contiene parásitos con medio de cultivo y otro con parásitos, medio de cultivo y disolvente sin el compuesto. Se agrega también, para prueba de control positivo violeta de genciana a una concentración de 100  $\mu$ g/mL. Todos los ensayos se corren por duplicado y la cuenta de parásitos se realiza en un hematocitómetro.



- *Segunda etapa*: Los compuestos que muestran una actividad importante en la etapa anteriormente descrita, se prueban entonces en un ensayo también *in vitro* pero utilizando, la forma de tripomastigote sanguíneo. Esta técnica es similar a la anterior siendo la única diferencia, que en este ensayo se emplea medio RPMI en lugar de LIT. Los parásitos se obtiene de la sangre de ratones infectados y la cantidad que se utiliza es de 50,000 por pozo.



## - Evaluación *in vitro* de los compuestos 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)-metilen]-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona en tripomastigotes sanguíneos de *T.cruzi*.

### ■ Material biológico

Para el ensayo con tripomastigotes sanguíneos se utilizaron las cepas INC-5, procedente del estado de Guanajuato y la cepa NINOA del estado de Oaxaca, ambas provenientes de pacientes humanos en fase crónica. Los tripomastigotes metacíclicos fueron inoculados vía intraperitoneal a los ratones.

### ■ Técnica<sup>26</sup>

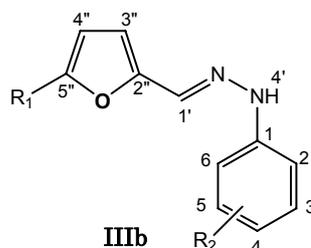
Se utilizaron ratonas Cd1 de 20 a 25 g de peso, las cuales fueron inoculados con  $1 \times 10^4$  de tripomastigotes sanguíneos (Tr.s), de las Cepas INC-5 y NINOA en fase crónica de la enfermedad de Chagas. Posteriormente la sangre infectada es obtenida por punción cardíaca en el pico máximo de parasitemia ( $4 \times 10^6$  Tr.s) de los animales, siendo diluida con solución salina fisiológica estéril (SSF). Las evaluaciones se realizan en placas con 96 pozos. A cada uno de los pozos se le agrega 195  $\mu$ l de la sangre infectada ( $2 \times 10^6$  parásitos /ml), y se incorporará 5  $\mu$ l de la solución de los compuestos a evaluar disueltos en DMSO, con una concentración final de 500  $\mu$ g/ml.

Las placas se mantienen a 4°C por 24 h. y la concentración de parásitos se evalúa por el método de Pizzi usando un microscopio óptico a 40 X. La reducción de la concentración del parásito (lisis del parásito) se determina por comparación con los parásitos sin tratar.

El control positivo a la lisis de los protozoarios es el cristal violeta (7.5  $\mu$ g/ml), se utiliza como control para el disolvente DMSO (2.5% v/v DMSO). Se determina el efecto del Radanil<sup>®</sup>, y Lampit<sup>®</sup> como fármacos de referencia para los compuestos evaluados. Se realizan los experimentos por triplicado.



**Tabla 10.** Abundancia relativa de los fragmentos mas importantes de los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona



Porcentaje de abundancia relativa (%)									
R <sub>1</sub>	H				NO <sub>2</sub>				
R <sub>2</sub>									
Fragmentos m/z	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H
M <sup>+</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
[M+2] <sup>+</sup> (*)	96.8	32.5	****	****	97.5	33.7	****	****	****
M-1 <sup>+</sup>	2.5	4.3	1.2	5.6	1.3	****	****	****	2.0
[M-17] <sup>+</sup>	****	****	****	****	4.3	6.3	****	3.2	5.6
[M-29] <sup>+</sup>	9.3	12.5	****	13.7	****	****	****	****	****
[M-47] <sup>+</sup>	****	****	****	****	****	1.2	****	5.1	4.4
[M-68] <sup>+</sup>	2.5	4.3	****	2.5	****	****	****	****	****
[M-74] <sup>+</sup>	****	****	****	****	1.2	2.5	****	5.7	5.6
[M-R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.8	2.5	2.0	****	****	****	****	****	****
[M-(C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O+R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	2.5	3.7	****	5.0	3.1	7.5	****	12.7	11.8
[91+R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	32.5	42.5	2.5	21.8	32.5	47.5	10.6	35.6	27.5
[M-(46+R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	****	****	****	****	10.0	5.0	2.0	4.4	****
[76+R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	9.3	12.5	****	10.6	14.4	18.1	****	16.0	22.5
[M-(91+R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	10.6	6.3	7.5	****	****	1.2	5.0	****	3.7
[M-(75+R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	2.0	3.1	****	****	14.4	8.7	6.8	2.5	****
[65+R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	8.1	25	****	14.4	5.6	21.2	****	28.6	18.1
91	33.7	5.6	6.2	13.1	22.0	5.0	6.2	****	4.3
63	12.0	6.2	6.2	7.0	5.6	3.7	5	****	2.0
75	6.2	6.8	2.0	****	3.1	5.6	****	3.2	****
39	13.7	12.5	17.5	5.6	2.5	1.2	7.0	2.5	5.6

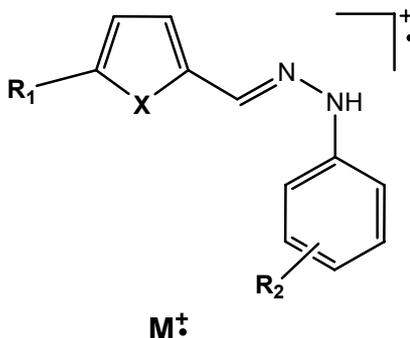
(\*) Contribución isotópica de Br y Cl



**- Discusión de los Mecanismos Generales de Fragmentación para los compuestos de las series IIIa, 1-10 y IIIb, 1-9.**

**1. Ion Molecular**

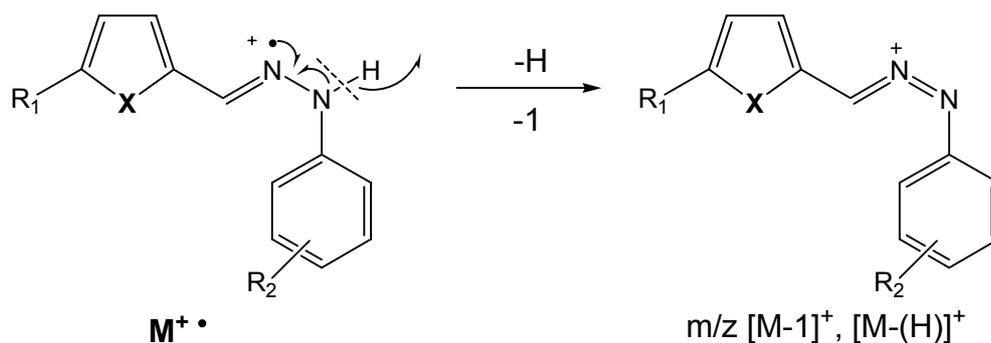
El ion molecular  $M^+$ , se presenta como pico base en la mayoría de los derivados 1-[[[(5- $R_1$ -tiofen-; furan)-2-il]metilen]-2-(*o*-; *p*- $R_2$ )fenil hidrazona, para ambas series, con una abundancia relativa del 96 al 100%, con lo cual se confirma su estabilidad como radical iónico, existiendo una relación de abundancias de  $[M+2]^+$  con respecto al ion molecular correspondiente a la esperada, debido a la contribución isotópica por la presencia de los átomos -Br y -Cl en la molécula de origen. Ver Esquema No.1



**Esquema No.1**

**2. Formación del fragmento  $m/z$   $[M-1]^+$ ,  $[M-(H)]^+$**

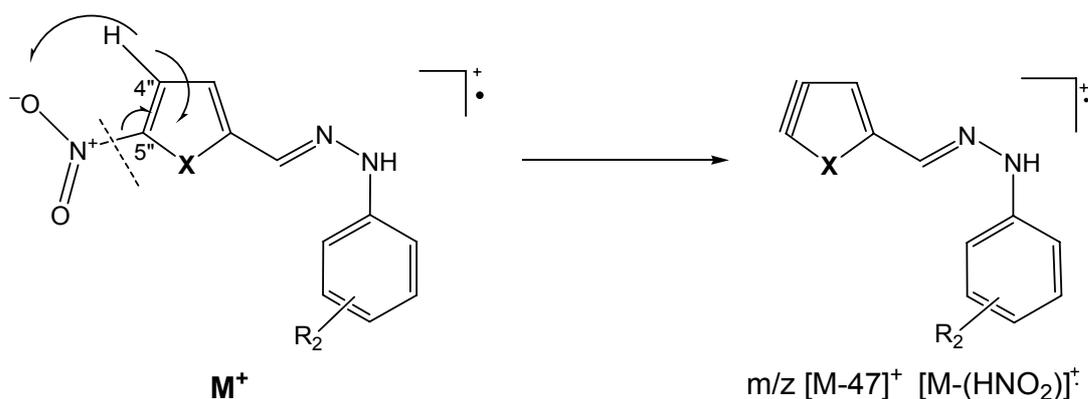
El fragmento de  $m/z$   $[M-1]^+$  se origina en ambas series a partir del ion molecular, debido a la pérdida del hidrógeno imínico, dando origen al Ion de  $m/z$   $[M-1]^+$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No.2.



**Esquema No.2**

### 3. Formación del fragmento $m/z [M-47]^+$ ; $[M-(HNO_2)]^+$

El fragmento de  $m/z [M-47]^+$  se origina en ambas series a partir del ion molecular, sólo cuando  $R_1 = NO_2$ ; este se obtiene a cabo mediante la ruptura homolítica del enlace entre el grupo nitro y el carbono 5'' ( $NO_2-C_{5''}$ ) y la transposición del hidrógeno vecino al carbono 5'', para dar lugar a la eliminación ácido nitroso ( $-HNO_2$ ) y la generación de un triple enlace entre los  $C_{4''}-C_{5''}$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No.3.

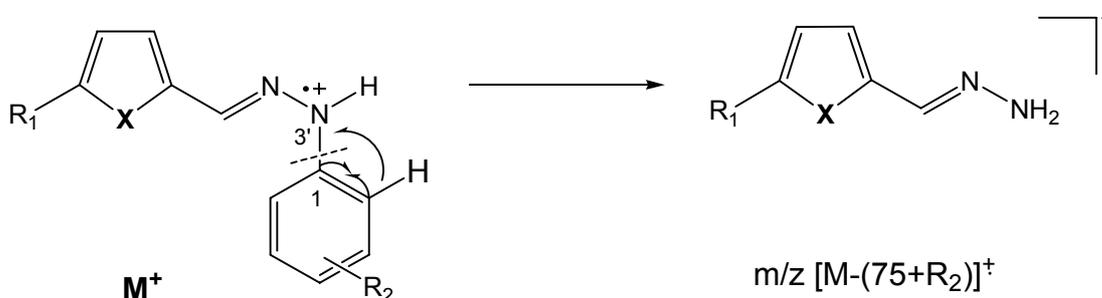


**Esquema No.3**



#### 4. Formación del fragmento $m/z [M-(75+R_2)]^+$

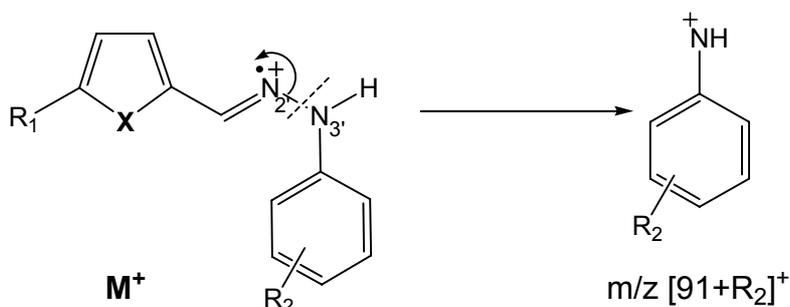
Este fragmento de  $m/z [M-(75+R_2)]^+$  se origina de igual manera en ambas series a partir del ion molecular, mediante una ruptura homolítica entre el enlace del nitrógeno 3' y el carbono 1 ( $N_{3'}-C_1$ ), y la transposición de un hidrógeno del anillo aromático que se elimina de la molécula. El mecanismo de fragmentación propuesto se presenta en el Esquema No. 4.



Esquema No.4

#### 5. Formación de los fragmentos $m/z [91+R_2]^+$

El fragmento de  $m/z [91+R_2]^+$  se origina a partir del ion molecular mediante una ruptura homolítica en el enlace hidrazínico ( $N_2-N_{3'}$ ), donde el nitrógeno 3' queda cargado positivamente, generando así el Ion de  $m/z [91+R_2]^+$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No 5.

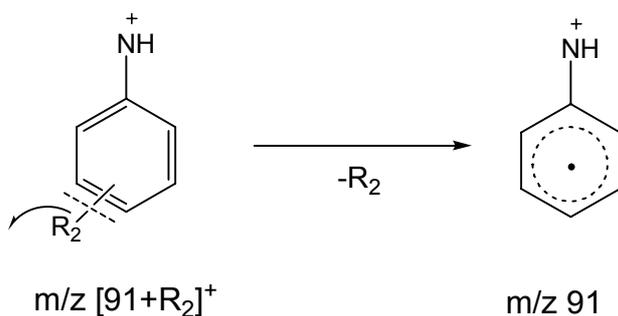


Esquema No.5



## 6. Formación del fragmento m/z 91.

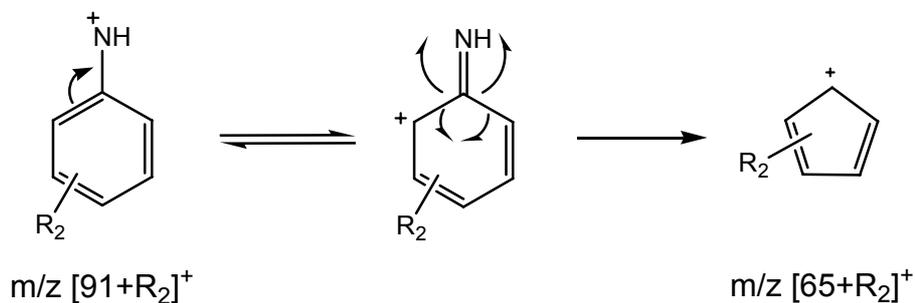
El fragmento de m/z 91 se origina a partir del fragmento m/z  $[91+R_2]^+$  por la pérdida del sustituyente ( $-R_2$ ), generando el Ion de m/z 91. El mecanismo de fragmentación propuesto se presenta en el Esquema 6.



Esquema No.6

## 7. Formación del fragmento m/z $[64+R_2]^+$

El fragmento de m/z  $[64+R_2]^+$  se origina a partir del ion de m/z  $[91+R_2]^+$  mediante la pérdida de ácido cianhídrico ( $-HCN$ ), originando un radical cationico de estructura cíclica. El mecanismo de fragmentación propuesto se observa en el Esquema 7.

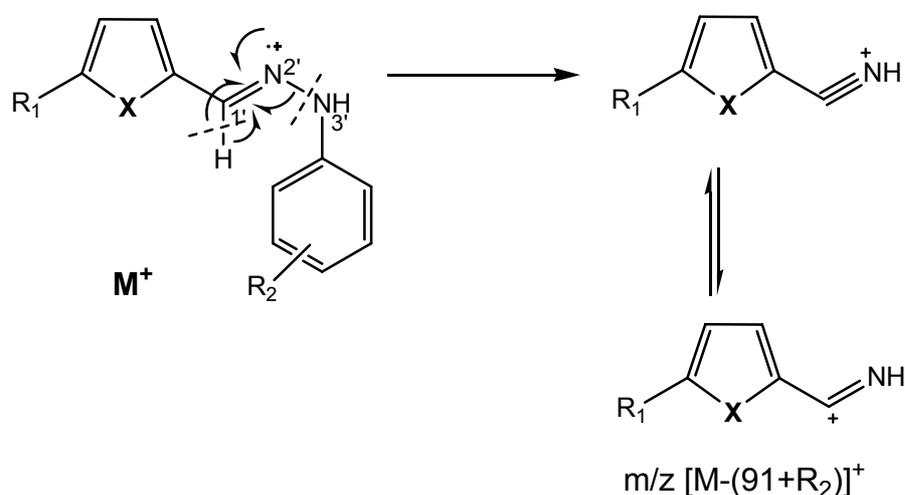


Esquema No. 7



## 8. Formación del fragmento $m/z [M-(91+R_2)]^+$

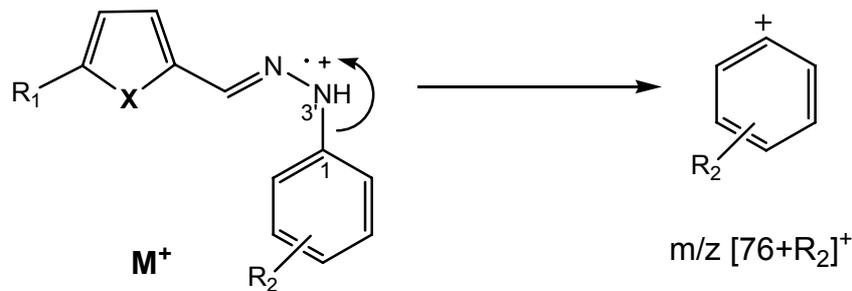
La formación de dicho fragmento, en ambas series, se origina a partir del ion molecular por una ruptura homolítica entre el enlace del nitrógeno-2' y nitrógeno-3' ( $N_{2'}-N_{3'}$ ), y la transposición de un hidrógeno vecino al  $N_{2'}$ , generando un radical catiónico de  $m/z [M-(91+R_2)]^+$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No. 8.



Esquema No 8.

## 9. Formación del fragmento $m/z [76+R_2]^+$

Este fragmento se origina en ambas series a partir del ion molecular por una ruptura homolítica entre el enlace del nitrógeno-3' y el carbono-1 ( $N_{3'}-C_1$ ), dando origen al ion  $m/z [76+R_2]^+$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se presenta en el Esquema No.9.

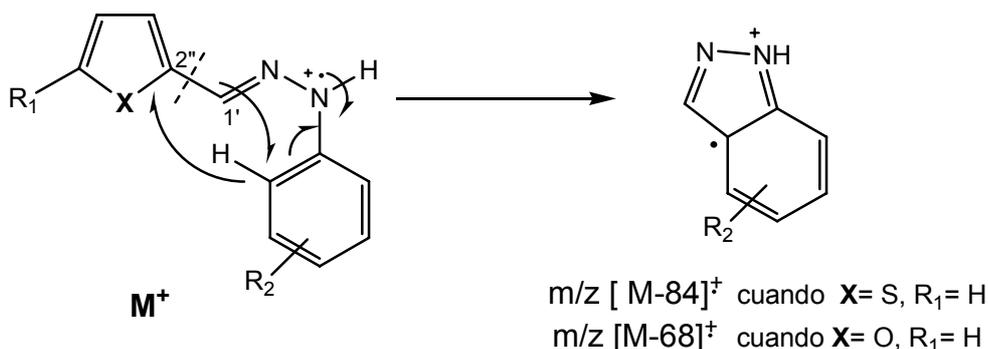


Esquema No.9



### 10. Formación de los fragmentos $m/z$ $[M-84]^+$ ; $[M-(C_4H_4S)]^+$ ; $[M-68]^+$ ; $[M-(C_4H_4O)]^+$

La formación de los iones  $m/z$   $[M-84]^+$  y  $[M-68]^+$  se originan a partir del ion molecular, sólo cuando  $R_1 = H$ , en ambas series (IIIa y IIIb), llevándose a cabo una ruptura homolítica entre el enlace de  $C_{2''}-C_{1''}$  y la transposición de un hidrógeno del anillo aromático eliminado, volviéndose a ciclar la molécula y dando origen a los iones mencionados. El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No 10.

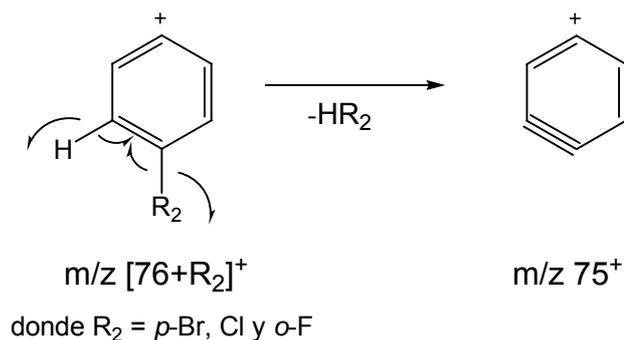


Esquema No 10

### 11. Formación del fragmento $m/z$ 75

Dicho fragmento se origina en ambas series, sólo cuando  $R_2 = p\text{-Br}$ ,  $\text{Cl}$  y  $o\text{-F}$  y es a partir del ion  $m/z$   $[76+R_2]^+$ , que se observa la pérdida del fragmento  $(-HR_2)$ ,

generándose el ion de  $m/z$  75. Se propone el mecanismo de fragmentación en el Esquema No11.



**Esquema No.11**

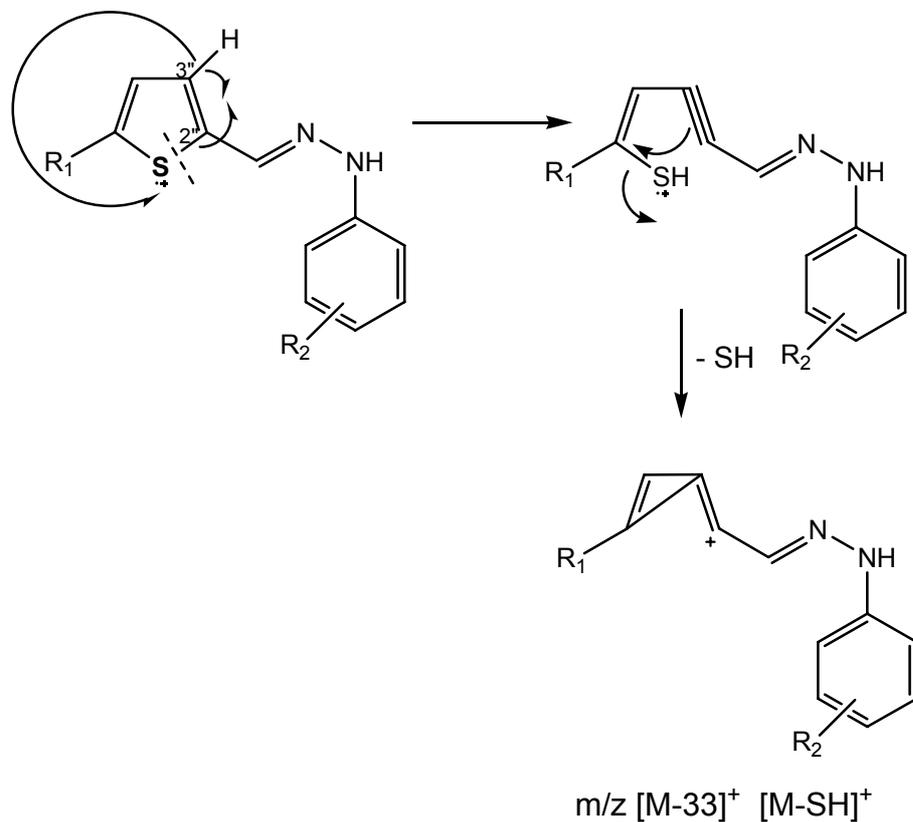


### **Fragmentos particulares:**

- *Formación de fragmentos cuando  $X = S$ ;  $R_1 = H, NO_2$*

### **12. Formación del fragmento $m/z [M-33]^+$ ; $[M-(SH)]^+$**

El fragmento de  $m/z [M-33]^+$  se origina a partir del ion molecular, al transponerse un hidrógeno del anillo heteroaromático ( $C_3$ ) y la ruptura  $\beta$  al heteroátomo ( $C_2-S$ ), para posteriormente volverse a ciclar y eliminar  $-SH$  y dar origen a un radical cationico de  $m/z [M-33]^+$ . Se propone mecanismo de fragmentación en el Esquema No.12 .



**Esquema No.12**

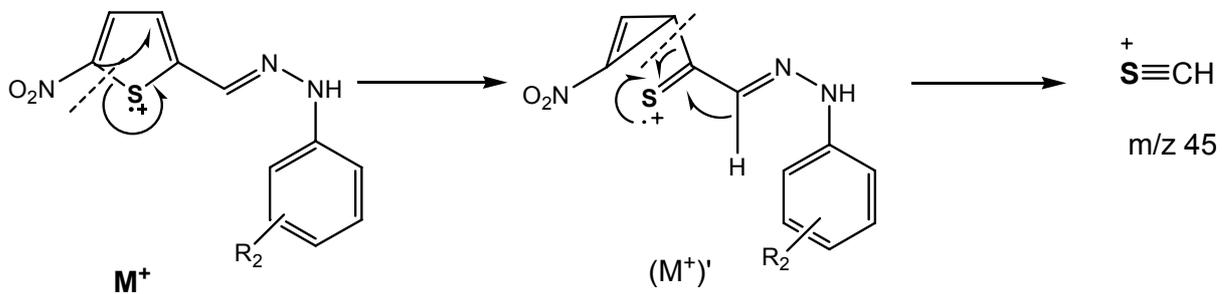


### 13. Formación del fragmento m/z 45

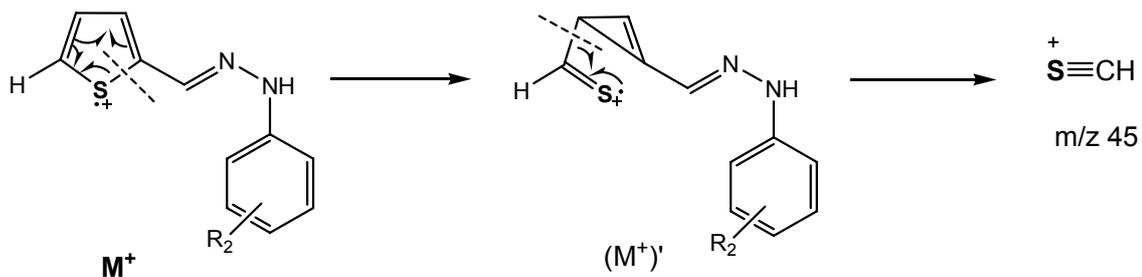
El ion de m/z 45 se genera a partir de la ruptura homolítica entre el enlace del C<sub>5</sub>'-S y la ciclación del mismo, dando un intermediario (M<sup>+</sup>)', en el cual posteriormente se llevará a cabo una ruptura del hidrógeno β con respecto al nitrógeno (N<sub>2</sub>'), dándonos así el fragmento mencionado. Cuando R<sub>1</sub>= NO<sub>2</sub> se sigue el mecanismo de fragmentación

propuesto en el inciso a) y cuando  $R_1 = H$  se sigue el mecanismo del inciso b), ambos mecanismos de fragmentación se muestran en el Esquema No 13.

a)



b)



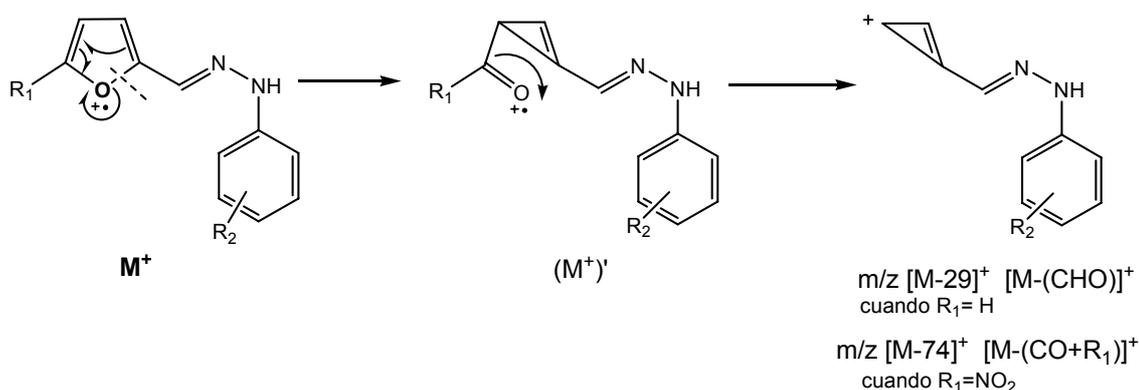
Esquema No.13



➤ Formación de fragmentos cuando  $X = O$ ,  $R_1 = H$ ,  $NO_2$

#### 14. Formación de los fragmentos $m/z$ $[M-29]^+$ ; $[M-(CHO)]^+$ y $[M-74]^+$ ; $[M-(CO+NO_2)]^+$

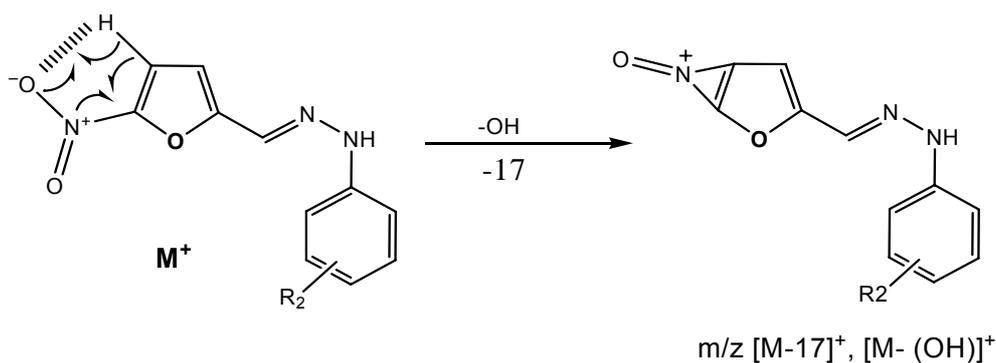
Los iones de  $m/z$   $[M-29]^+$  y  $[M-74]^+$ , se generan a partir del ion molecular, cuando  $R_1 = H$  y  $NO_2$ , respectivamente; se puede observar la ruptura  $\alpha$  al heteroatomo ( $C_2-O$ ), volviéndose a ciclar la molécula para obtener los fragmentos con  $m/z$   $[M-29]^+$  y  $[M-74]^+$ . El mecanismo de fragmentación propuesto se ilustra en el Esquema No.14.



Esquema No.14

#### 15. Formación del fragmento $m/z$ $[M-17]^+$ ; $[M-(OH)]^+$

El ion de  $m/z$   $[M-17]^+$  se genera a partir del ion molecular, sólo cuando  $R_1 = NO_2$  se verifica la pérdida del hidroxilo ( $-OH$ ), dando lugar al ion de  $m/z$   $[M-17]^+$ . El mecanismo de fragmentación se propone en el Esquema No.15

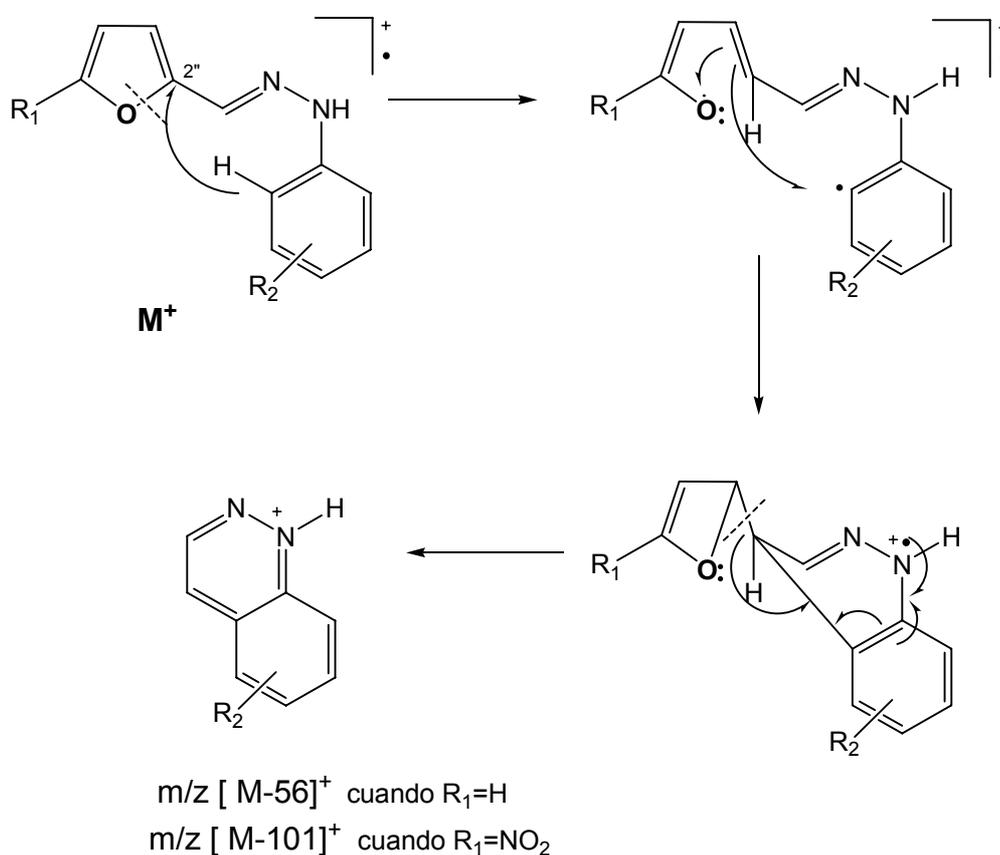


Esquema No.15



## 16. Formación de los fragmentos $m/z$ $[M-56]^+$ , $[M-(C_3H_4O)]^+$ y $[M-101]^+$ , $[M-(C_3H_3ONO_2)]^+$

Estos fragmentos se generan a partir del ion molecular, cuando el sustituyente es  $R_1 = H$  y  $NO_2$ , respectivamente, y son debidos a una ruptura  $\alpha$  al heteroátomo ( $C_2''-O$ ) y a la pérdida de un hidrógeno del anillo aromático, volviéndose a ciclar nuevamente la molécula para así obtener los iones de  $m/z$   $[M-56]^+$ ,  $[M-101]^+$ , respectivamente. El mecanismo de fragmentación propuesto se propone en el Esquema No.16.

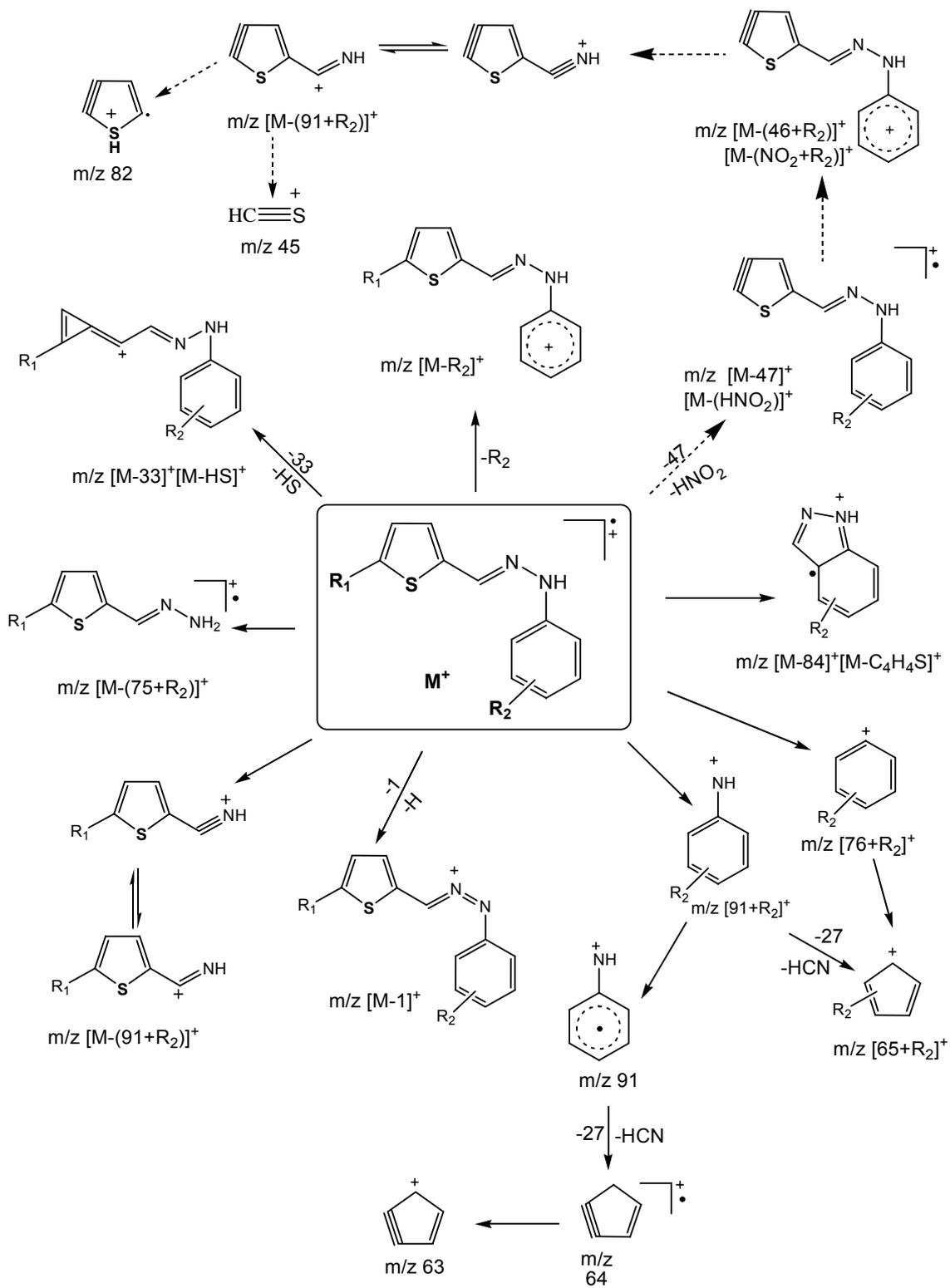


Esquema No.16



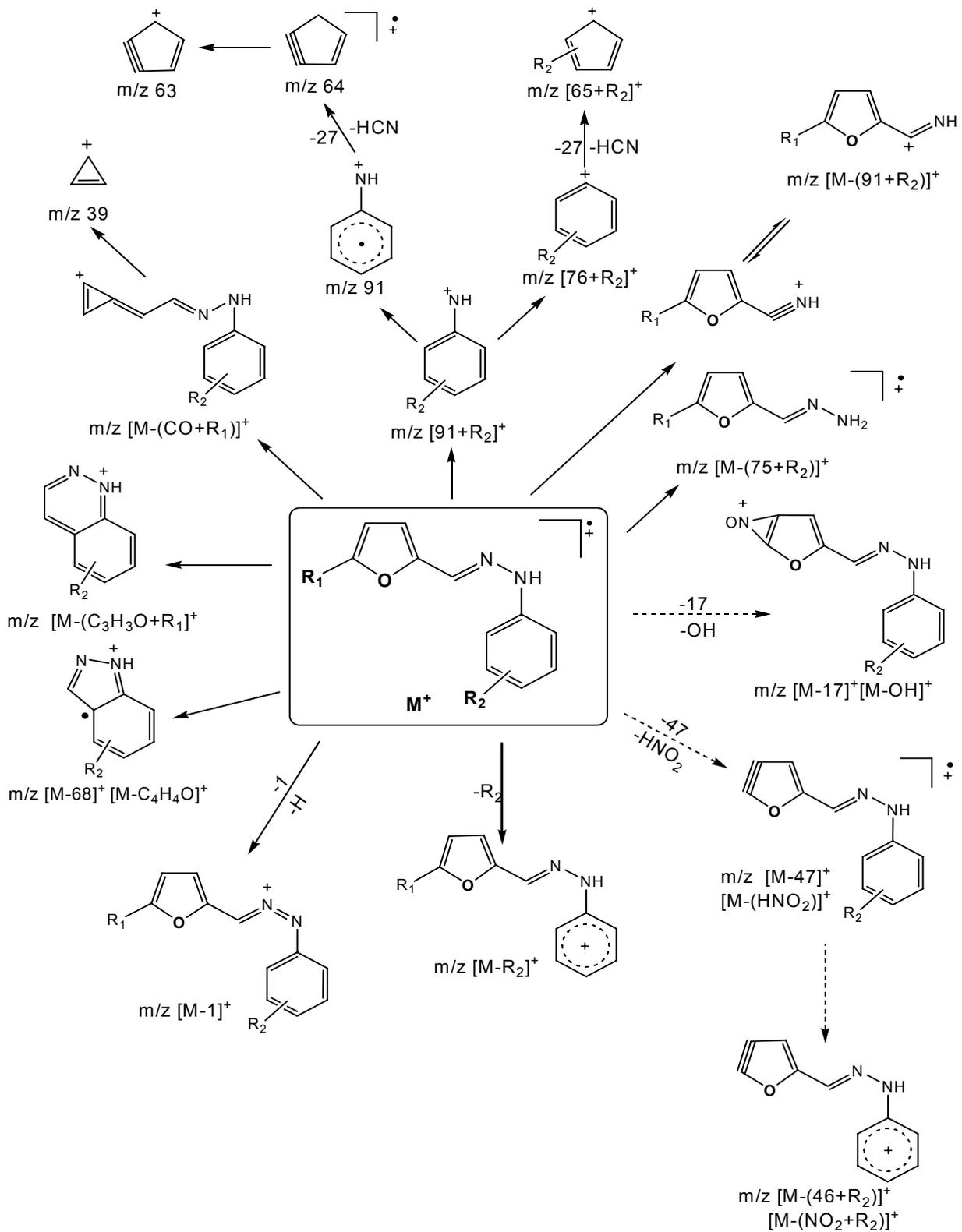
---

**Patrón General de Fragmentación para los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)metilen]-  
2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona.**





**Patrón General de Fragmentación para los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan-2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona.**





## 6.2 Resultados de la parte biológica:

### - Ensayos de sensibilidad de epimastigotes, en la cepa CI-Brener de *T.cruzi* de los compuestos serie III a (1-10) y serie III b (1-9).

Debido a la relativa facilidad con la que se pueden cultivar los epimastigotes y su sensibilidad a la acción de los fármacos, hacen un modelo excelente para evaluar la actividad de los compuestos sintetizados. Como se ilustra en las Tablas 11 y 12 a los compuestos que presentaron un porcentaje menor del 50 %, así como a los derivados con una mejor actividad **IIIa-4, IIIa-5, IIIb-1, IIIb-2 y IIIb-4**; estos compuestos no contienen en su estructura molecular el grupo nitro, a diferencia de los derivados IIIa 6-10 y IIIb 6-9, los cuales no presentan una buena actividad, lo cual nos sugiere que la actividad probablemente no este asociada al grupo nitro, tal vez se deba a la presencia de grupos electroattractores en el anillo aromático.

Se observa que los compuestos de la serie IIIa presentan actividad tripanocida a concentraciones menores (166 g/ml), en contraste con los compuestos de la serie IIIb en donde se tuvo que manejar dos concentraciones debido a que algunos compuestos, presentaron problemas de solubilidad.

Sorprendentemente, los compuestos **IIIa-5 y IIIb-4** que no poseen ni sustituyentes halogenados, ni grupo nitro en su estructura, resultan ser muy activos, por lo que el comportamiento de estos difiere de los otros compuestos de la serie.

En la Tabla 13 se reportan a los cinco compuestos reevaluados a concentraciones menores, con el fin de observar si aun poseen actividad a concentraciones menores de los cuales es importante destacar a **IIIa-5 y IIIb-2** los cuales presentaron actividad a concentraciones pequeñas de 16 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente.



**Tabla 11.** Ensayo de sensibilidad de epimastigotes de *T. cruzi* para los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona. (**Serie IIIa, 1-10**)

R <sub>1</sub>	H					NO <sub>2</sub>				
R <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H
Compuesto	III a-1	III a-2	III a-3	III a-4	III a-5	III a-6	III a-7	III a-8	III a-9	III a-10
Concentración µg/mL	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166
Crecimiento %	87	89	70	<b>0</b>	<b>0</b>	48	29	91	43	55

**Tabla 12.** Ensayo de sensibilidad de epimastigotes de *T. cruzi* para los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan-2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona. (**Serie IIIb, 1-9**)

R <sub>1</sub>	H				NO <sub>2</sub>				
R <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H
Compuesto	III b-1	III b-2	III b-3	III b-4	III b-5	III b-6	III b-7	III b-8	III b-9
Concentración µg/mL	333	166	166	333	333	166	166	333	333
Crecimiento %	<b>0</b>	<b>0</b>	65	<b>0</b>	57	66	61	63	9.3

Los compuestos que presentaron una importante efectividad contra los epimastigotes (III a-4, III a-5, III b-1, III b-2 y III b-4) fueron re-evaluados a concentraciones menores. Los resultados se presentan en la Tabla 13.



**Tabla 13.** Ensayo de sensibilidad de epimastigotes de *T.Cruzi* a concentraciones menores de los compuestos, III a -4, III a-5, III b-1, III b-2 y III b-5.

% Crecimiento				
Concentración µg/mL	166	16	1.6	0.16
Compuesto				
III a-4	0	80	100	100
III a-5	0	<b>25</b>	82	100
Concentración µg/mL	333	200	100	50
Compuesto				
III b-1	0	0	2.6	19.7
III b-2	0	0	<b>0</b>	<b>6.9</b>
III b-4	0	0	2.9	30.5

**- Ensayos de sensibilidad de tripomastigotes sanguíneos, en la Cepa NINOA de *T.cruzi* de los compuestos III a -4, III a-5, III b-1, III b-2 y III b-5.**

Los compuestos anteriores fueron también ensayados con tripomastigotes sanguíneos, los resultados se exhiben en la Tabla 14.

De donde sólo los compuestos **IIIa-4 y IIIa-5** siguen presentando una buena actividad, al ser ensayados con tripomastigotes sanguíneos, de la Cepa NINOA de *T.cruzi*; en contraste con los compuestos de la serie b (IIIb-2 y IIIb-4 ) que solo presentaron un efecto parcial sobre estos mismos.



**Tabla 14.** Ensayo de sensibilidad de tripomastigotes sanguíneos de *T.Cruzi* de los compuestos, III a -4, III a-5, III b-1, III b-2 y III b-4.

Compuesto	III a-4	III a-5	III b-1	III b-2	III b-4
Concentración µg/mL	166	166	333	333	333
Crecimiento %	6.25	6.25	100	51	45

**- Ensayos de lisis de tripomastigotes, en las cepas INC-5 y NINOA de *T.cruzi* de los compuestos serie III a (1-10)**

En la Tablas 15 y 16, así como en las figuras 6 y 7 se indican los resultados de la prueba tripanocida *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* de los compuestos sintetizados además del Nifurtimox y Benznidazol como fármacos de referencia.

En estos datos notamos que a la concentración de 125 µg/ml existe un menor numero de compuestos con una actividad superior a los dos fármacos de referencia. sin embargo para una concentración de 62 µg/ml se encuentra un índice mayor de compuestos ( IIIa-1, IIIa- 3, IIIa- 4, IIIa- 5, IIIa- 6, IIIa- 7 y IIIa- 10) con mayor actividad a la de los fármacos de referencia, es importante notar que los compuestos de la serie IIIa presentan una mejor respuesta biológica que el fármaco de uso clínico Benznidazol, este comportamiento de los compuestos fue evaluado en la cepa INC-5 de *T. cruzi*.

Para el caso de la cepa NINOA, notamos que el compuesto IIIa-1 resultó tener una mayor actividad que el Benznidazol y Nifurtimox, aunque sólo en las concentraciones mayores (125 µg/ml y 62 µg/ml )como se puede observar en la Tabla 16.

Se hace notar que los tripomastigotes de la Cepa INC-5 son más sensibles a lisis con la mayoría de los compuestos sintetizados, en contraste con la Cepa NINOA en donde sólo un compuesto fue encontrado activo.



**Tabla 15.** Lisis de tripomastigotes sanguíneos de *T.cruzi* de los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-

tiofen-

% Lisis de tripomastigotes sanguíneos de <i>T.cruzi</i> Concentración µg/ml
--

2-

il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona, utilizando la **Cepa INC-5**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	125	62	31	15
III a-1	H	<i>p</i> -Br	<b>58</b>	<b>38</b>	23	<b>36</b>
III a-2		<i>p</i> -Cl	34	10	2	<b>26</b>
III a-3		<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	45	37	28	8
III a-4		<i>o</i> -F	44	<b>40</b>	32	0
III a-5		H	42	37	21	<b>25</b>
III a-6	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	<b>54</b>	<b>40</b>	<b>42</b>	19
III a-7		<i>p</i> -Cl	52	<b>41</b>	32	1
III a-8		<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	36	25	13	17
III a-9		<i>o</i> -F	21	17	6	<b>21</b>
III a-10		H	50	<b>40</b>	63	11
Benznidazol			35	24	10	8
Nifurtimox			51	36	30	18

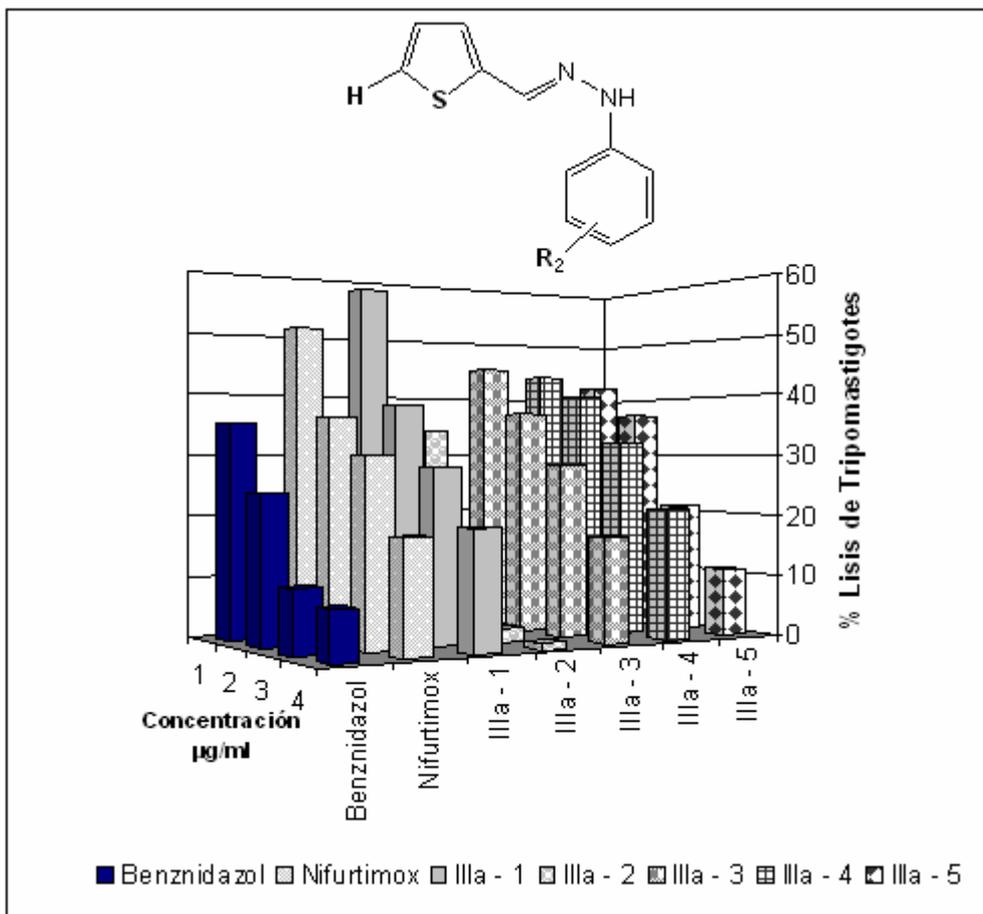


% Lisis de tripomastigotes sanguíneos de <i>T.cruzi</i> .						
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Concentración µg /ml			
			125	62	31	15
III a-1	H	p-Br	85	65	43	20
III a-2		p-Cl	66	51	40	30
III a-3		o-NO <sub>2</sub>	56	29	15	8
III a-4		o-F	52	30	19	0
III a-5		H	33	27	15	7
III a-6	o-NO <sub>2</sub>	p-Br	22	16	10	5
III a-7		p-Cl	25	16	10	0
III a-8		o-NO <sub>2</sub>	41	25	13	8
III a-9		o-F	30	20	13	0
III a-10		H	38	32	24	22
Benznidazol			68	52	48	40
Nifurtimox			74	67	49	36

**Tabla 16.** Lisis de tripomastigotes sanguíneos de *T.cruzi* de los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)metileno]-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)Fenilhidrazona, utilizando la

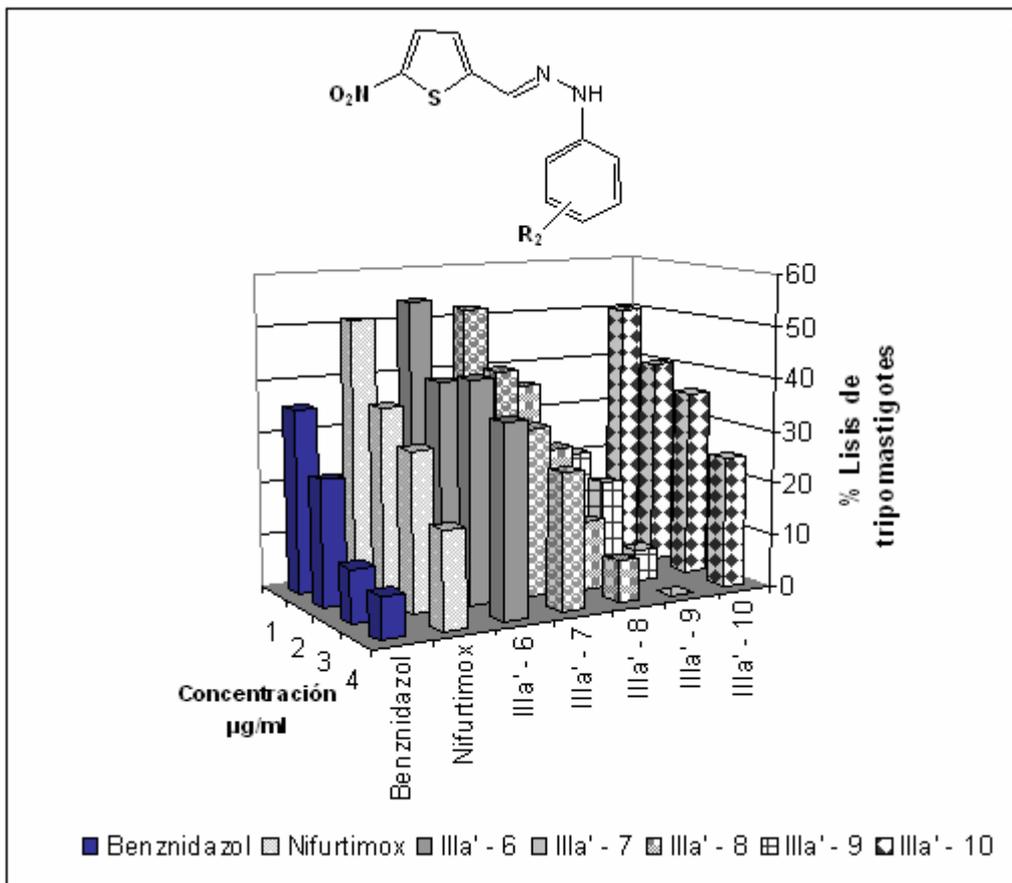
**Cepa NINOA.**





**Figura 6.** Grafico de la evaluación de los derivados **IIIa 1-5** en tripomastigotes sanguíneos de la cepa **INC-5** de *Trypanosoma cruzi*.  
 Nota la concentración: 1 = 125, 2= 62, 3= 31, 4= 15 µg/mL





**Figura 7.** Grafico de la evaluación de los derivados **IIIa 6-10** en tripomastigotes sanguíneos de la cepa **INC-5** de *Trypanosoma cruzi*.  
 Nota la concentración: 1 = 125, 2= 62, 3= 31, 4= 15 µg/mL

## *VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*



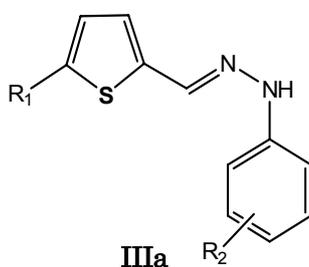
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Parte Química.

- Rendimientos y características físicas de los compuestos obtenidos:

Se obtuvieron 19 derivados de fenilhidrazona totales de ambas series la IIIa y la IIIb. A continuación se presentan los datos de las características físicas y rendimientos en las tablas 1 y 2.

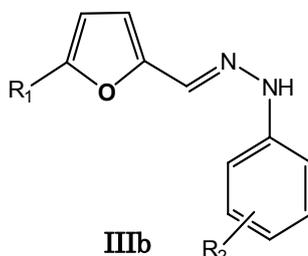
**Tabla 1.** Rendimientos y aspecto físico de los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen-2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona. (Serie IIIa,1-10)



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Peso molecular g/mol	Características Físicas	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
III a-1	H	<i>p</i> -Br	280	Sólido amarillo	133-135	92
III a-2		<i>p</i> -Cl	236	Sólido amarillo	125-127	85
III a-3		<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	247	Sólido naranja	98-101	55
III a-4		<i>o</i> -F	220	Sólido café	80-83	53
III a-5		H	202	Sólido café	130-132	75
III a-6	NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	323	Escamas café	167-170	84
III a-7		<i>p</i> -Cl	279	Sólido café rojizo	115-117	99
III a-8		<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	290	Sólido naranja	165-168	50
III a-9		<i>o</i> -F	265	Sólido rojo	123-125	52
III a-10		H	247	Sólido café	170-173	88



**Tabla 2.** Rendimiento y aspecto físico de los derivados de 1-[(5- $R_1$ -furan-2-il)metilen]-2-( $o$ -;  $p$ - $R_2$ )fenil hidrazona. (Serie III,b 1-9)



Compuesto	$R_1$	$R_2$	Peso molecular g/mol	Características Físicas	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
III b-1	H	$p$ -Br	264	Sólido café	60-58	75
III b-2		$p$ -Cl	220	Sólido café	75-77	87
III b-3		$o$ -NO <sub>2</sub>	231	Escamas rojas	115-117	50
III b-4		H	186	Escamas amarillas	78-80	82
III b-5	NO <sub>2</sub>	$p$ -Br	307	Sólido rojo	195-198	63
III b-6		$p$ -Cl	263	Sólido rojo	193-195	72
III b-7		$o$ -NO <sub>2</sub>	274	Sólido naranja	205-208	64
III b-8		$o$ -F	249	Sólido naranja	127-129	95
III b-10		H	231	Sólido rojo	185-187	95

Los compuestos obtenidos fueron analizados por medio de: Espectrofotometría de absorción de infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para los núcleos  $H^1$  y  $C^{13}$  y Espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), que a continuación se describen:



### - Análisis de Espectroscopia de Infrarrojo (I.R.):

Los espectros de Infrarrojo se determinaron en el equipo Perkin Elmer 283-B, empleando la técnica de disolución en cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

El estudio por espectroscopia de infrarrojo, de los derivados identificados como serie IIIa y la serie IIIb, presenta vibraciones moleculares características de ambas series, salvo sus respectivas excepciones, cuando en  $R_1$  tenemos el grupo  $\text{NO}_2$ , tenemos las siguientes bandas :

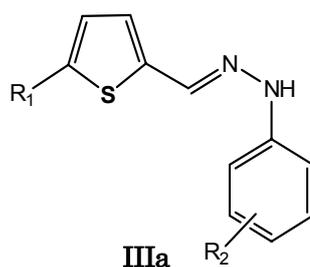
◆ En la zona de  $1570\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$  se notan dos bandas agudas de intensidad media que corresponden a vibraciones asimétricas  $\nu_{\text{as}}\text{NO}_2$  de carácter aromático así como también en  $1330\text{-}1290\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las señales simétricas  $\nu_{\text{sim}}\text{NO}_2$ .

◆ Para los compuestos de la serie IIIb ( $X=\text{O}$ ), se observa la banda en la zona de  $1028\text{-}1000\text{ cm}$  que corresponde a vibración de tensión de C-O-C del esqueleto aromático

Las principales bandas características de estos compuestos, se presentan en las Tablas 3 y 4.



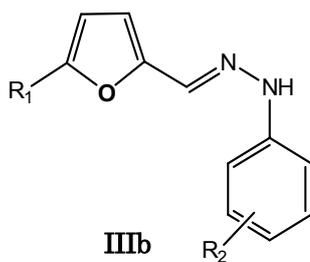
**Tabla 3.** Vibraciones moleculares características de los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona.



Compuestos		Vibraciones moleculares (cm <sup>-1</sup> )								
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	N-H	C-H	C=N	C=C	C-NO <sub>2</sub> as.	C-NO <sub>2</sub> sim	C-NO <sub>2</sub>	C-N	C=C-H
H	<i>p</i> -Br	3343	3080	1592	1529	****	****	****	1254	853
	<i>p</i> -Cl	3343	3100	1601	1531	****	****	****	1270	850
	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	3309	3080	1615	1576	1496 1440	1326	1236	1143	856
	<i>o</i> -F	3336	3100	1603	1566	****	****	****	1255	882
	H	3342	3061	1602	1531	****	****	****	1134	852
NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	3338	3080	1596	1570	1513 1482	1330	1261	1151	885
	<i>p</i> -Cl	3338	3100	1603	1569	1514 1485	1331	1362	1154	884
	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	3290	3098	1613	1570	1522 1492	1328	1278	1143	878
	<i>o</i> -F	3352	3110	1624	1571	1525 1477	1329	1291	1143	887
	H	3356	3076	1623	1594	1533 1462	1292	1291	1128	908



**Tabla 4.** Vibraciones moleculares características de los derivados 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona



Compuestos		Vibraciones moleculares (cm <sup>-1</sup> )									
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	N-H	C-H	C=N	C=C	C-NO <sub>2as.</sub>	C-NO <sub>2sim</sub>	C-NO <sub>2</sub>	C-N	C-O-C	C=C-H
H	<i>p</i> -Br	3318	3029	1592	1553	****	****	****	1255	1069	819
	<i>p</i> -Cl	3310	3054	1599	1551	****	****	****	1254	1091	815
	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	3287	3051	1619	1575	1505	1270	1218	1270	1094	802
	H	3318	3027	1601	1515	****	****	****	1261	1009	816
NO <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	3307	3033	1601	1565	1486	1361	1261	1201	1022	816
	<i>p</i> -Cl	3307	3129	1596	1564	1464	1362	1364	1202	1020	819
	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	3304	3080	1615	1577	1491	1347	1278	1206	1145	963
	<i>o</i> -F	3349	3082	1624	1579	1481	1356	1291	1200	1142	970
	H	3334	3081	1595	1569	1426	1479	1357	1291	1203	1149
						1443					



### - Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

Los estudios de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, además de los experimentos bidimensionales se realizaron en un equipo Varian modelo Unity 300 operado a 300 MHz para el caso de <sup>1</sup>H y a 75 MHz para <sup>13</sup>C, empleando Dimetilsulfoxido como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno.

Para la alta resolución de los espectros de resonancia se empleó un equipo Varian modelo Inova 500 operado a 500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C de igual manera se

emplea Dimetilsulfoxido como disolvente para todos los compuestos y tetrametilsilano como estándar interno.

- El estudio de RMN  $^1\text{H}$ , nos ayudo a identificar los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento que caracterizan a ambas series (IIIa y IIIb) de compuestos. Se observa la presencia de sistemas AA'BB' para aquellos cuyo sustituyente en  $\text{R}_2$  esta se encuentra en posición "para", en el anillo aromático mientras que para la posición "orto" se observan doble de doble y doble de triples para los hidrógenos aromáticos y estos a su vez se ven afectados (dobleteados) cuando  $\text{R}_2$  es Fluor.
- Cabe mencionar que la interacción de los protones  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_3$  se ve modificada con respecto al heteroatomo, (sea  $\text{X}=\text{O},\text{S}$ ) y esto es debido a que el anillo de tiofeno está más tensionado que el del furano en donde hay mayor movimiento de los protones.
- Para el caso de los compuestos di-nitrados de ambas series, ambos presentan mezcla de isómeros y con el paso del tiempo tienden a dar su forma más estable, lo cual fue confirmado con el estudio de COSY y NOESY, para los compuestos IIIa-3 y IIIb-3.



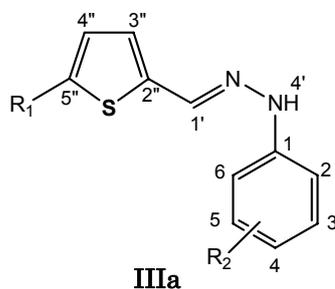
Los resultados se presentan en las Tablas 5, (para  $^1\text{H}$ , de la serie IIIa) y 7 (para  $^1\text{H}$  de la serie IIIb), respectivamente.

Con ayuda del estudio de  $^{13}\text{C}$  y HETCOR se confirman los desplazamientos químicos característicos de los derivados de ambas series (IIIa y IIIb) de los compuesto sintetizados, de los cuales cabe señalar la presencia de las constantes de acoplamiento

en aquellos compuestos en donde  $R_2$  es Fluor; la recopilación de estos datos se presentan en las tablas 6 (de  $^{13}\text{C}$ , serie IIIa) y 8 (de  $^{13}\text{C}$ , serie IIIb) respectivamente.



**Tabla 5.** Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  y constantes de acoplamiento “ $J$ ” (Hz) de los derivados de 1-[(5- $R_1$ -tiofen- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*- $R_2$ )fenil



hidrazona



Continuación. Tabla 5. Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) de RMN  $^1\text{H}$  y constantes de acoplamiento “J” (Hz) de los derivados de 1-[(5- $\text{R}_1$ -tiofen-2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*- $\text{R}_2$ )fenil hidrazona.

<b>Desplazamientos químicos “<math>\delta</math>” (ppm) y constantes de acoplamiento “J” (Hz)</b>										
$\text{R}_1$	H					$\text{NO}_2$				
$\text{R}_2$	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> - $\text{NO}_2$	<i>o</i> -F	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> - $\text{NO}_2$	<i>o</i> -F	H
Proton Num.										
2	AA'BB' $\delta=6.90$ $J_{\text{H}}=8.8$	AA'BB' $\delta=7.20$ $J_{\text{H}}=7.4$	****	****	dd $\delta=6.98$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.4$	AA'BB' $\delta=7.02$ $J_{\text{H}}=9.0$	AA'BB' $\delta=7.07$ $J_{\text{H}}=9.0$	****	****	dd, $\delta=7.08$ $J_{\text{H}}=1.0, 8.5$
3	AA'BB' $\delta=7.30$ $J_{\text{H}}=8.8$	AA'BB' $\delta=6.90$ $J_{\text{H}}=7.0$	dd $\delta=8.08$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.4$	dd $\delta=7.12$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.0$ $J_{\text{F}}=9.5$	dt $\delta=7.21$ $J_{\text{H}}=1.8, 7.2$	AA'BB' $\delta=7.41$ $J_{\text{H}}=9.0$	AA'BB' $\delta=7.28$ $J_{\text{H}}=9.0$	dd $\delta=8.10$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.7$	dd $\delta=7.19$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.4$ $J_{\text{F}}=9.6$	dt, $\delta=7.24$ $J_{\text{H}}=1.8, 8.1$
4	****	****	dt $\delta=6.88$ $J_{\text{H}}=1.2, 8.4$	dt $\delta=6.74$ $J_{\text{H}}=1.5, 7.5$ $J_{\text{F}}=5.0$	dt $\delta=6.73$ $J_{\text{H}}=1.5, 7.5$	****	****	dt, $\delta=6.99$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.7$	dt $\delta=6.87$ $J_{\text{H}}=1.5, 7.5$ $J_{\text{F}}=5.1$	dt, $\delta=6.85$ $J_{\text{H}}=1.2, 8.4$
5	AA'BB' $\delta=7.30$ $J_{\text{H}}=8.8$	AA'BB' $\delta=6.90$ $J_{\text{H}}=7.0$	dt $\delta=7.61$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.4$	dt, $\delta=7.09$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.5$	dt, $\delta=7.21$ $J_{\text{H}}=1.8, 7.2$	AA'BB' $\delta=7.41$ $J_{\text{H}}=9.0$	AA'BB' $\delta=7.28$ $J_{\text{H}}=9.0$	dt, $\delta=7.60$ $J_{\text{H}}=1.8, 8.7$	dt $\delta=7.14$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.5$	dt, $\delta=7.24$ $J_{\text{H}}=1.8, 8.1$
6	AA'BB' $\delta=6.90$ $J_{\text{H}}=8.8$	AA'BB' $\delta=7.20$ $J_{\text{H}}=7.4$	dd $\delta=7.89$ $J_{\text{H}}=1.2, 8.5$	dd $\delta=7.37$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.5$ $J_{\text{F}}=7.1$	dd $\delta=6.98$ $J_{\text{H}}=1.2, 8.7$	AA'BB' $\delta=7.02$ $J_{\text{H}}=9.0$	AA'BB' $\delta=7.07$ $J_{\text{H}}=9.0$	dd $\delta=7.90$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.7$	dd $\delta=7.45$ $J_{\text{H}}=1.5, 8.1$ $J_{\text{F}}=7.2$	dd $\delta=7.08$ $J_{\text{H}}=1.2, 8.5$

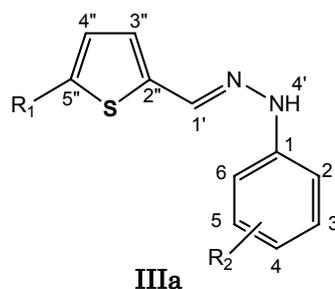
**Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) y constantes de acoplamiento "J" (Hz)**

R <sub>1</sub>	H					NO <sub>2</sub>				
	Proton Num	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F
1'	s $\delta=8.06$	s $\delta=8.06$	s $\delta=8.41$	s $\delta=8.30$	s $\delta=8.05$	s $\delta=8.01$	s $\delta=8.00$	s $\delta=8.50$	s $\delta=8.25$	s $\delta=8.00$
4'	s $\delta=10.43$ (b)	s $\delta=10.40$ (b)	s $\delta=10.35$ (b)	s $\delta=10.22$ (b)	s $\delta=11.28$ (b)	s $\delta=11.15$ (b)	s $\delta=11.14$ (b)	s $\delta=11.40$ (b)	s $\delta=11.00$ (b)	s $\delta=11.07$ (b)
3"	dd $\delta=7.20$ $J_H=1.1,$ 3.6	dd $\delta=7.20$ $J_H=1.2,$ 4.5	dd $\delta=7.33$ $J_H=1.2,$ 3.9,	dd $\delta=7.22$ $J_H=1.0,$ 3.5	dd $\delta=7.21$ $J_H=2.0,$ 7.2	d $\delta=7.29$ $J_H=4.8$	d $\delta=7.29$ $J_H=4.5$	d $\delta=7.91$ $J_H=4.5$	d $\delta=7.30$ $J_H=4.5$	d $\delta=7.25$ $J_H=4.2$
4"	dd $\delta=7.00$ $J_H=3.5,$ 5.0	dd $\delta=7.00$ $J_H=3.6,$ 5.0	dd $\delta=7.12$ $J_H=3.9,$ 5.1	dd $\delta=7.06$ $J_H=3.2,$ 5.2	dd $\delta=6.98$ $J_H=3.6,$ 5.1	d $\delta=8.03$ $J_H=4.5$	d $\delta=8.03$ $J_H=4.5$	d $\delta=7.20$ $J_H=4.2$	d $\delta=8.00$ $J_H=4.2$	d $\delta=8.03$ $J_H=4.5$
5"	dt $\delta=7.46$ $J_H=1.1,$ 6.8	dt $\delta=7.45$ $J_H=1.0,$ 5.0	dt $\delta=7.62$ $J_H=1.1,$ 5.1	dt $\delta=7.48$ $J_H=1.0,$ 5.0	dt $\delta=7.43$ $J_H=1.2,$ 5.1	****	****	****	****	****

NOTA: dd= doble de dobles, dt= dobles de triples, s= singulete, b= ancho del pico, intercambiable con D<sub>2</sub>O (broad), J<sub>H</sub>= constante de acoplamiento de H en MHz, J<sub>F</sub>= constante de acoplamiento de F en MHz. La numeración de la molécula es solo para asignar las posiciones de las señales de los protones.



**Tabla 6.** Desplazamientos químicos " $\delta$ " (ppm) de RMN <sup>13</sup>C y constantes de acoplamiento "J" (Hz) de los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona

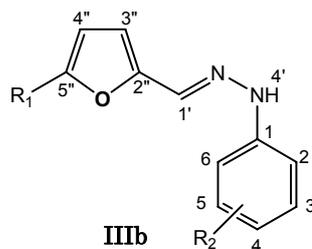


<b>Desplazamientos químicos “<math>\delta</math>” (ppm) y constantes de acoplamiento “J” (Hz)</b>										
<b>R<sub>1</sub></b>	<b>H</b>					<b>NO<sub>2</sub></b>				
<b>R<sub>2</sub></b>	p-Br	p-Cl	o-NO <sub>2</sub>	o-F	H	p-Br	p-Cl	o-NO <sub>2</sub>	o-F	H
<b>Carbono Núm.</b>										
<b>C<sub>1</sub></b>	140.42	140.46	140.34	133.15 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =10.0	140.89	143.08	142.68	139.91	148.50 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =9.17	143.70
<b>C<sub>2</sub></b>	113.70	113.18	140.56	140.56	111.83	114.58	114.11	131.67	131.92	112.69
<b>C<sub>3</sub></b>	131.57	128.75	125.70	114.96 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =17.40	129.06	131.96	129.12	135.84	115.31 <sup>2</sup> J <sub>F</sub> =17.47	129.29
<b>C<sub>4</sub></b>	109.43	121.89	118.16	118.57 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =7.29	118.70	111.52	123.82	119.15	120.44 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =7.41	120.51
<b>C<sub>5</sub></b>	131.57	128.75	131.63	124.95 <sup>4</sup> J <sub>F</sub> =2.76	129.06	131.96	129.12	137.15	125.17 <sup>4</sup> J <sub>F</sub> =2.76	129.29
<b>C<sub>6</sub></b>	113.70	113.18	115.71	113.60 <sup>3</sup> J <sub>F</sub> =3.7	111.83	114.58	114.11	116.01	114.28	112.69
<b>C<sub>1'</sub></b>	132.86	132.76	140.34	134.69	131.95	130.36	130.24	125.35	132.02	129.37
<b>C<sub>2'</sub></b>	144.22	143.85	141.84	149.99	144.97	148.25	148.22	146.70	149.24	147.91
<b>C<sub>3'</sub></b>	126.84	126.79	129.79	127.19	126.48	125.67	125.59	127.15	125.86	125.14
<b>C<sub>4'</sub></b>	127.41	127.41	128.13	127.59	127.50	131.01	131.00	129.79	130.93	131.09
<b>C<sub>5'</sub></b>	125.91	125.87	126.45	126.27	125.65	149.40	149.44	150.07	150.38	149.95

*Nota:* J<sub>F</sub> = Constante de acoplamiento para el enlace C-F en Hz .La numeración de la molécula es sólo para asignar las posiciones de las señales de los carbonos.



**Tabla 7.** Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) de RMN <sup>1</sup>H y constantes de acoplamiento “J” (Hz) de los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-furan- 2-il)metilen]-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona

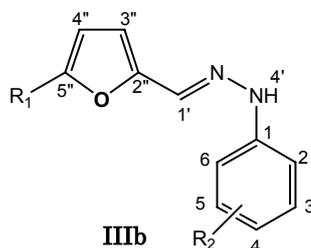


**Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) y constantes de acoplamiento "J" (Hz)**

R <sub>1</sub>	H				NO <sub>2</sub>				
R <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H
Protón Núm.									
2	AA'BB' $\delta=6.94$ $J_H=7.0$	AA'BB' $\delta=6.99$ $J_H=7.0$	****	dd $\delta=6.99$ $J_H=1.2, 8.7$	AA'BB' $\delta=7.04$ $J_H=8.9$	AA'BB' $\delta=7.10$ $J_H=9.0$	****	****	dd, $\delta=7.11$ $J_H=1.0, 8.5$
3	AA'BB' $\delta=7.34$ $J_H=7.0$	AA'BB' $\delta=7.22$ $J_H=7.0$	dd $\delta=7.85$ $J_H=1.2, 8.7$	dt $\delta=7.19$ $J_H=1.5, 7.2$	AA'BB' $\delta=7.42$ $J_H=8.9$	AA'BB' $\delta=7.30$ $J_H=8.5$	dd $\delta=8.10$ $J_H=1.4, 8.5$	dd $\delta=7.21$ $J_H=1.2, 8.4$ $J_F^1=9.6$	dt, $\delta=7.27$ $J_H=1.8, 8.7$
4	****	****	dt $\delta=6.89$ $J_H=1.2, 8.4$	dt $\delta=6.73$ $J_H=1.2, 8.4$	****	****	dt $\delta=7.03$ $J_H=1.3, 8.5$	dt $\delta=6.4$ $J_H=1.5, 7.5$ $J_F^2=4.8$	dt, $\delta=6.86$ $J_H=1.2, 8.5$
5	AA'BB' $\delta=7.34$ $J_H=7.0$	AA'BB' $\delta=7.22$ $J_H=7.0$	dt $\delta=7.63$ $J_H=1.8, 8.7$	dt $\delta=7.19$ $J_H=1.5, 7.2$	AA'BB' $\delta=7.42$ $J_H=8.9$	AA'BB' $\delta=7.30$ $J_H=8.5$	dt $\delta=7.69$ $J_H=1.5, 8.5$	dt $\delta=7.19$ $J_H=1.2, 8.1$	dt, $\delta=7.27$ $J_H=1.8, 8.7$
6	AA'BB' $\delta=6.94$ $J_H=7.0$	AA'BB' $\delta=6.99$ $J_H=7.0$	dd $\delta=7.82$ $J_H=1.2, 6.3$	dd $\delta=6.99$ $J_H=1.2, 8.7$	AA'BB' $\delta=7.04$ $J_H=8.9$	AA'BB' $\delta=7.10$ $J_H=9.0$	dd $\delta=7.89$ $J_H=1.1, 8.6$	dd $\delta=7.49$ $J_H=1.5, 8.4$ $J_F=7.2$	dd $\delta=7.11$ $J_H=1.8, 8.7$



Continuación Tabla 7. Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) de RMN y constantes de acoplamiento “ $J$ ” (MHz) de los derivados de 1-[(5- $R_1$ -furan-2-il)metilen]-2-( $o$ -;  $p$ - $R_2$ )fenil hidrazona.

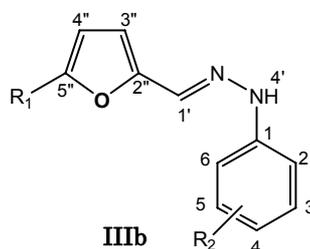


Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) y constantes de acoplamiento “ $J$ ” (Hz)									
$R_1$	H				NO <sub>2</sub>				
$R_2$	$p$ -Br	$p$ -Cl	$o$ -NO <sub>2</sub>	H	$p$ -Br	$p$ -Cl	$o$ -NO <sub>2</sub>	$o$ -F	H
Proton Num.									
1'	s $\delta$ = 7.76	s $\delta$ = 7.77	s $\delta$ = 8.42	s $\delta$ = 7.87	s $\delta$ = 7.87	s $\delta$ = 7.78	s $\delta$ = 8.48	s $\delta$ = 8.04	s $\delta$ = 7.77
4'	s $\delta$ =10.42 (b)	s $\delta$ =10.41 (b)	s $\delta$ =11.17 (b)	s $\delta$ =11.21 (b)	s $\delta$ =11.21 (b)	s $\delta$ =11.20 (b)	s $\delta$ =11.54 (b)	s $\delta$ =11.04 (b)	s $\delta$ =11.12 (b)
3''	d $\delta$ =6.65 $J_H$ = 3.3	d $\delta$ =6.66 $J_H$ = 3.3	d $\delta$ =6.85 $J_H$ = 3.6	d $\delta$ =7.01 $J_H$ = 4.0	d $\delta$ =7.01 $J_H$ = 4.0	d $\delta$ =7.02 $J_H$ = 4.0	d $\delta$ =7.19 $J_H$ = 3.9	d $\delta$ =7.06 $J_H$ = 3.9	d $\delta$ =6.99 $J_H$ = 4.2
4''	dd $\delta$ =6.55 $J_H$ = 1.8, 3.6	dd $\delta$ =6.54 $J_H$ = 1.8, 3.4	dd $\delta$ =6.63 $J_H$ = 1.8, 3.3	dd $\delta$ =7.75 $J_H$ = 3.7	d $\delta$ =7.75 $J_H$ = 3.7	d $\delta$ =7.75 $J_H$ = 4.0	d $\delta$ =7.77 $J_H$ = 3.9	d $\delta$ =7.76 $J_H$ = 3.9	d $\delta$ =7.75 $J_H$ = 3.9
5''	d $\delta$ =7.69 $J_H$ = 1.8	d $\delta$ =7.69 $J_H$ = 1.7	d $\delta$ =8.08 $J_H$ = 1.2	d $\delta$ =7.68 $J_H$ = 1.8	****	****	****	****	****

NOTA: dd= doble de dobles, dt= dobles de triples, s= singulete, **b**= broad (ancho intercambiable con D<sub>2</sub>O),  $J_H$ = constante de acoplamiento de H en Hz,  $J_F$ = constante de acoplamiento de F en Hz La numeración de la molécula es solo para asignar las posiciones de las señales de los protones.



**Tabla 8.** Desplazamientos químicos “ $\delta$ ” (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  y constantes de acoplamiento “ $J$ ” (Hz) de los derivados de 1-[(5- $R_1$ -furan-2-il)metilén]-2-( $o$ -;  $p$ - $R_2$ )fenil hidrazona.



Desplazamiento químico “ $\delta$ ” (ppm) y constantes de acoplamiento “ $J$ ” (Hz)									
$R_1$	H				$\text{NO}_2$				
$R_2$	$p$ -Br	$p$ -Cl	$o$ - $\text{NO}_2$	H	$p$ -Br	$p$ -Cl	$o$ - $\text{NO}_2$	$o$ -F	H
Carbono Num.									
$C_1$	144.36	143.95	141.14	145.03	143.08	142.75	139.85	131.96 $^2J_F=8.82$	143.75
$C_2$	113.83	113.29	130.76	111.87	114.63	114.20	136.32	147.84	112.76
$C_3$	131.59	128.78	115.86	129.03	131.83	129.10	125.49	115.32 $^2J_F=17.57$	129.28
$C_4$	115.21	121.97	118.18	118.73	111.52	123.88	119.62	120.52 $^3J_F=6.56$	120.57
$C_5$	131.59	128.78	136.29	129.03	131.83	129.10	136.09	125.15 $^4J_F=3.31$	129.28
$C_6$	113.83	113.29	144.77	111.87	114.63	114.20	116.14	114.36 $^3J_F=2.18$	112.76
$C_{1'}$	128.07	127.96	135.14	127.17	124.86	127.80	131.99	126.64	123.92
$C_{2''}$	150.49	150.50	149.69	157.77	150.91	150.97	151.47	151.03	150.87
$C_{3''}$	109.49	109.19	112.48	108.75	111.11	111.26	113.25	111.39	110.78
$C_{4''}$	111.84	111.72	112.18	111.78	115.67	115.72	114.85	115.63	115.91
$C_{5''}$	143.36	143.21	125.62	143.05	153.93	154.02	152.45	153.90	154.45

*Nota:*  $J_F$  = Constante de acoplamiento para el enlace C-F en Hz La numeración de la molécula es solo para asignar las posiciones de las señales de los carbon



### 6.1.5 Análisis de Espectrometría de masas (por impacto electrónico, EM-IE)

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de Masas JEOL modelo JMS-AX505HA, así como los espectros de Disociación Inducida por Colisión (CID), para caracterizar los mecanismos y patrones de fragmentación, empleando la técnica de ionización por impacto electrónico a 70eV.

➤ El análisis de los Espectros de Masas de los compuestos sintetizados y clasificados como serie IIIa y serie IIIb presentan fragmentos característicos, (Tablas 9 y 10), manifestandose un patrón general de fragmentación muy similar en ambas series, salvo algunas excepciones, las cuales serán discutidas como casos particulares.

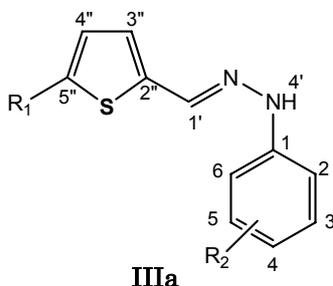
➤ Los espectros CID (3.2.1,3.2.2 y 3.2.3) realizados para los principales iones del espectro de masas del compuesto IIIa-1 ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = p\text{-Br}$ ), indica que existen tres procesos primarios por destacar. Del espectro CID obtenido para el molecular (Espectro 3.2.1) se puede establecer que los iones hijos producidos unimolecularmente a partir de  $m/z = 280$ , involucra las pérdidas siguientes:  $m/z [M-84]^+$   $m/z [91+R_2]^+$   $m/z 91$ , principalmente.

➤ El ion  $m/z 122$ , como se puede apreciar en el espectro CID (Espectro 3.2.2) da origen a los iones secundarios, como  $m/z [65+R_2]^+$ ,  $m/z 63$ , se observa que el  $m/z 91$  también es generado a partir del ion molecular. De igual manera a partir del ion  $m/z 110$ , se obtienen principalmente los iones:  $m/z 82$ , 45 y 39.

Las observaciones anteriores permiten definir con mayor objetividad la ruta de fragmentación que siguen estas dos series de compuestos, las cuales se discuten a continuación.



**Tabla 9.** Abundancia relativa de los fragmentos mas importantes de los derivados de 1-[(5-R<sub>1</sub>-tiofen- 2-il)metilen]-2-(*o*-; *p*-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona.



Porcentaje de abundancia relativa (%)										
R <sub>1</sub>	H					NO <sub>2</sub>				
R <sub>2</sub>	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H	<i>p</i> -Br	<i>p</i> -Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<i>o</i> -F	H
Fragmentos m/z										
M <sup>+</sup>	98.7	100	100	100	100	97.5	100	100	100	100
[M+2] <sup>+</sup> (*)	100	37.1	6.3	9.4	5.6	100	39.0	6.4	5.6	5.6
[M-1] <sup>+</sup>	3.1	3.2	****	7.6	6.9	1.2	2.1	****	2.0	3.1
[M-33] <sup>+</sup>	2.0	2.5	****	2.5	3.1	****	3.5	2.1	****	2.0
[M-R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.16	3.1	****	2.0		2.0	****	9.9	****	****
[M-84] <sup>+</sup>	****	****	****	****	****	6.3	7.5	****	12.6	6.3
[91+R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	39.2	42.1	1.2	52.2	20.1	45.5	45.4	****	47.2	43.3
[M-(46+ R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	****	****	****	****	****	5.0	4.2	3.5	2.0	****
[76+ R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	****	5.6	****	9.4	5.3	6.3	9.3	****	13.2	****
[M-(91+ R <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	12.6	11.3	11.1		5.0	6.5	2.1	3.5	****	2.0
[65+R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	7.5	23.7	11.3	44.6	12.5	5.8	14.1	2.1	30.2	20.1
83	4.4	2.5	3.1	47.7	2.0	****	****	****	****	****
82	****	****	****	****	****	2.5	2.1	4.3	3.7	3.7
91	32.0	5.6	4.4	2.5	30.8	20.8	3.5	5.6	****	12.5
63	10.7	6.9	6.2	4.4	1.2	4.4	2.8	4.2	2.0	2.5
75	5.0	5.6	****	4.4	****	****	3.5	****	3.1	16.9
45	4.4	3.7	4.4	5.6	2.0	2.5	2.1	4.2	3.7	3.7
39	15.8	12.5	18.8	17.6	5.6	2.0	1.0	3.5	2.5	6.3

(\*) Contribución isotópica de Br, Cl y S

## *VII. CONCLUSIONES*



## VII. CONCLUSIONES

La integración de los resultados obtenidos y los conocimientos acumulados durante la realización del presente proyecto, permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló una estrategia y metodología para la obtención de 19 derivados 1-[[5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]metilen}-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona (serie IIIa y serie IIIb), la cual integra una ruta de síntesis que comprende tres pasos.
- La obtención de los derivados 1-[[5-R<sub>1</sub>-tiofen-; furan)-2-il]metilen}-2-(o-; p-R<sub>2</sub>)fenil hidrazona ( series IIIa y IIIb), permitió determinar su análisis estructural por técnicas espectroscópicas de : Infrarrojo (I.R.), Resonancia Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y análisis bidimensional) y Espectrometría de Masas, de alta y baja resolución, así como experimentos de CID (Disociación Inducida por Colisión).
- Mediante el análisis de espectrometría de masas, y mediante Disociación Inducida por Colisión (CID), se proponen los mecanismos de fragmentación y se establecen los Patrones Generales de Fragmentación, que siguen ambas series (IIIa y IIIb), de los nuevos derivados, y en su mayoría, presentan el mismo patrón de fragmentación.
- Algunos de los derivados de fenilhidrazona sintetizados mostraron tener actividad como agentes tripanocidas.
- De ambas series de compuestos evaluados IIIa y IIIb, se destaca la importante actividad de los compuestos IIIa-4 y IIIa-5 en epimastigotes, de Cepa CI-Brener así como en tripomastigotes sanguíneos, de Cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*. Esto representa un futuro promisorio para investigaciones relacionadas con estos derivados.



- De los derivados de la serie IIIa, se destacan los compuestos IIIa-1, IIIa- 3, IIIa- 4, IIIa- 5, IIIa- 6, IIIa- 7 y IIIa- 10 los cuales presentaron una apreciable actividad superior sobre los fármacos de referencia (Nifurtimox y Benznidazol), lo cual los convierte en candidatos promisorios para realizar futuras investigaciones.
  
- Se encontraron grandes diferencias en la susceptibilidad intrínseca de las cepas de *T. cruzi*, utilizadas para el estudio *in vitro* y al ser sometidas con los derivados de fenilhidrazona, notando que la cepa mas susceptible a dichos compuestos es la cepa INC-5.
  
- La sensibilidad de las cepas utilizadas en esta investigación (INC-5, CI-Brener y NINOA) probablemente no este sujeta a la presencia del grupo NO<sub>2</sub> en la molécula, pero si a la presencia de grupos electro donadores sobre el anillo.

## *VIII. BIBLIOGRAFIA*



## VIII. BIBIOLGRAFIA

- 1.- Cárdenas, S.J.; Mazariego, A. M.; Rutilla, P.F.; Monteón, P.V. Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en pacientes con cardiopatía dilatada. *Rev.Med IMSS*, 2003, **41**(3), 111-114.
- 2.- Vallejo, M.A.; Reyes, P.A. Tripanosomiasis Americana. Un problema socioeconómico en México? *Archivos del Instituto de Cardiología de México*, 1996, **66**, 95-97.
- 3.- Coutinho, M.; Freire, J.O.; Pinto Dias, J.C. The noble enigma: Chagas Nominations for the Nobel Prize. *Parasitology today*, 2000, **16**(9), 361-362.
- 4.- Morel, C.M. Chagas Disease, from discovery to control and beyond: History; Myths and Lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999, **94**(1), 3-16.
- 5.- Mazotti, L. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med. México*, 1939, 417-423.
- 6.- Mott K.E. American Tripanosomiasis en "Infectious Diseases" Editor P.D. Hoeprich, Harper & Row Publishers. N.Y., 1972, p. 1065.
- 7.- WHO Progress 1995-1996: Thirteenth programme report on the UNDP/World Bank/WHO special programme for Research and Training Tropical Diseases, 1997; 112-113.
- 8.- Biagi, F.F.; Arce-Gómez: Los dos primeros casos de miocarditis Chagásica comprobados en México. *Archivos Instituto de Cardiología de México*, 1965, **35**, 611.
- 9.- Tapia-Conyer, R.; Gutiérrez, G.; Sepúlveda, J. Metodología de la Encuesta Nacional Seroepidemiologica. *Salud Publica de México*, 1992, **34**(2), 119-254.
- 10.- Rodríguez, M. E.; Briceño, L.; Chiurillo, M.A.; Campos, Y. Tripanosomiasis Americana, Aspectos teóricos. En: Curso Latinoamérica sobre Enfermedades Infecciosas, 2004, Oct. 25- Nov. 12; Caracas, Venezuela.
- 11.- Ibidem ?
- 12.- Urbina, J.A. Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Posible?, Is it Relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999, **94**, Sup. 1, 349-355.
- 13.- Garcia E., Azambuja P. Development and interactions of *T.cruzi*, within the insect vector. *Parasitology Today* 1991,**7**, 240-244.
- 14.- González P. M., Romero P., Goldenberg. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators simulate *T.cruzi* differentiation. *Exp. Parasitologl.* 1988, **66**, 205-212.



- 15.- Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez M., *Parasitologia Medica*, 5<sup>a</sup> ed. México, Méndez Cervantes; 1991, p. 112-122.
- 16.- Zárate, L.G.; Zárate, R.J. A Checklist of the Triatominae (Hemiptera:Reduvidae). *International Journal of Entomology*. 1995, **27**,102-12.
- 17.- Vidal, A. V.; Ibáñez, B. S.; Martínez, C. C. Infección Natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociado a la vivienda humana en México. *Salud Publica de México*. 2000, **42**, 496-503.
- 18.- Goldsmith, R.S.; Kagan, I.G.; Zárate, L.; Reyes, G. M.; Cedeño, F. J. Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. *Boletín Sanitaria Panamericana*. 1979, **58**, 715-720.
- 19.- Reyes, P.A.; Monteón, V.M.; Hernandez, B.N. The risk or transfusion, transmission of Chagas disease in Mexico, City. *Transfusion*. 1999, **40**, 613.
- 20.- Rodríguez M.E., Op. Cit.
- 21.- Imber, P.J.; Figueroa, G.A.; Gomes, G.J. Tripanosomiasis Americana o "mal de Chagas" otra enfermedad de la pobreza. *Elementos*. 2003, **49**, 13-21
- 22.- Moraes, S. H.; Bordin, J. Strategies for prevention of transfusión Associated Chagas disease. *Trans Med Rev*. 1996, **10**, 161-17.
- 23.- Docampo, R. Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs. *Chem- Biol Interactions*. 1990, **73**, 1-27.
- 24.- Viotti, R; Vigliano, C; Armenti, H; Segura, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994, **127**, 151-162.
- 25.- Fairlam, A. Future prospect for Chagas' disease chemotherapy. *Medicina*. 1999, **59**(2), 179-187.
- 26.- (a) Urbina, J.A. et al. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative ur-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000,**44**, 2498-2502. (b) Oliveira, Renata B. et al. In vitro evaluation of the Activity of aromatic nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003, **98**,1-4.