



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"SÍNTESIS DE DERIVADOS FENÓLICOS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA"**

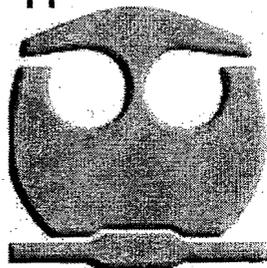
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LÓPEZ SANDOVAL FERNANDO



D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

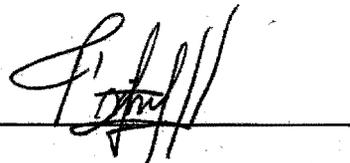
JURADO ASIGNADO

Presidente PROF. Guillermina Yazmín Arellano Salazar
Vocal PROF. Francisco Hernández Luis
Secretario PROF. Elena Guadalupe Ramírez López
1 er. Suplente PROF. Héctor García Ortega
2 do. Suplente PROF. Ehecatl Luis David Paleo González

El sitio donde se desarrollo el tema fue en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DE TESIS

DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS



SUSTENTANTE

LÓPEZ SANDOVAL FERNANDO



AGRADECIMIENTOS

A María de la Luz Sandoval Reyes, Fernando López Cruz:

GRACIAS por ser mis guías, formarme día con día, impulsarme a seguir adelante cuando la situación era difícil, por el apoyo que siempre recibí de su parte pero sobre todo por que siempre fueron mi ejemplo a seguir y gracias a ustedes soy profesionista.

A Minerva Paulina López Sandoval:

Por ser mas que mi hermana y compartir conmigo las alegrías y sin sabores que la vida nos ha dado juntos, sabes que siempre tendrás mi apoyo y mi cariño.

A mi familia:

A todos muchas gracias, por que siempre han sido un pilar donde se que puedo apoyarme, ustedes me han ayudado a crecer, les agradezco todas sus muestras de cariño y aportaciones para que esto se hiciera realidad. Todos forman una gran parte de mi vida, gracias por compartir la suya conmigo.

A mi novia Gabriela Hernández Pérez:

Por tolerar todas esas veces que no podía estar contigo, debido al tiempo que demandaba mi carrera, por aguantar mi estrés pero sobre todo, por que siempre me has apoyado y me has tendido tu mano cuando la he necesitado. Gracias por entrar en mi vida TAMO.

A mi asesor Dr. Francisco Hernández Luis:

Por haberme dado la oportunidad de crecer y aprender en su grupo de trabajo, por las enseñanzas y su disposición hacía mí que ayudaron a que este proyecto llegara a su culminación.

A mis amigos:

Por que con su compañía las clases eran más ligeras, las desveladas soportables, supe lo que es en realidad un equipo y forje amistades que tendré siempre presentes. A ti amigo gracias por todo lo que compartiste, siempre me enseñaste algo y tu compañía realmente es diferente. QFB challenge everything.

A mis compañeros del Laboratorio 122:

A todos sin excepción alguna por brindarme su amistad y orientarme cuando lo necesite, por hacer más ameno el tiempo que pasaba en el laboratorio pero más gracias aun por incluirme en la familia del laboratorio 122. Gracias Cesar por toda la ayuda que me brindaste cuando la necesite, sobre todo por tu amistad y compañerismo. Que mi amistad con todos perdure muchos años.

Gracias al Dr. Rafael Castillo Bocanegra y a la Mtra. Alicia Hernández Campos, por su asesoría y consejos en la realización de esta tesis.

Al Dr. Benjamín Noguera Torres de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por colaborar con esta tesis llevando a cabo las pruebas biológicas.

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

A la Dirección General del Personal Académico UNAM por el apoyo recibido para la compra de reactivos y materias primas dentro del proyecto **PAPIIT-UNAM IN210809**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales y Nuria Esturau Escofet);

Espectrometría de Masas (Georgina Artemisa Duarte Lisci, Margarita Guzmán Villanueva); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco), Análisis elemental (Nayeli López Balbiaux).

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser mi **segunda casa.**

ÍNDICE GENERAL

| | PAGINA |
|--|--------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| <i>Enfermedad de Chagas</i> | 2 |
| <i>Derivados fenólicos como anti-infecciosos</i> | 4 |
| <i>Híbridos moleculares</i> | 5 |
| <i>Dianas para la búsqueda de antiparasitarios</i> | 7 |
| <i>Dihidrofolato reductasa (DHFR) e inhibidores</i> | 8 |
| <i>Pteridín reductasa (PTR) e inhibidores</i> | 12 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 17 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 17 |
| METODOLOGÍA | 18 |
| <i>Compuestos Propuestos</i> | 18 |
| <i>Ruta Sintética</i> | 18 |
| <i>Síntesis del Intermediario para el Compuesto 1</i> | 20 |
| <i>Síntesis del Compuesto 1</i> | 20 |
| <i>Síntesis del Compuesto 2</i> | 21 |
| <i>Síntesis del Intermediario para el Compuesto 3</i> | 21 |
| <i>Síntesis del Compuesto 3</i> | 22 |
| <i>Evaluación Biológica</i> | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| <i>Parte Sintética</i> | 23 |
| <i>Parte Biológica</i> | 27 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS | 30 |
| <i>Caracterización espectroscópica de los compuestos obtenidos</i> | 30 |
| <i>Caracterización del Intermediario para el Compuesto 1</i> | 30 |
| <i>Caracterización del Compuesto 1</i> | 31 |
| <i>Caracterización del Compuesto 2</i> | 33 |
| <i>Caracterización del Intermediario para el Compuesto 3</i> | 34 |
| <i>Caracterización del Compuesto 3</i> | 35 |
| <i>Pruebas Biológicas</i> | 37 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |
| APÉNDICE I | 43 |
| APÉNDICE II | 49 |
| APÉNDICE III | 52 |

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, la leishmaniosis y la enfermedad del sueño son infecciones parasitarias mediadas por vector que causan 550,000 muertes cada año, según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹. Estos padecimientos son ocasionados por los protozoarios *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma brucei*, respectivamente. Por el impacto que estas enfermedades tienen en la salud pública, desde hace más de veinte años se desarrollaron e introdujeron a la clínica fármacos para poder erradicarlas. Sin embargo, los resultados no fueron del todo satisfactorios por el comportamiento biológico de los parásitos y por los problemas de toxicidad que los compuestos ocasionaron a los pacientes. A pesar de ello, actualmente se siguen utilizando debido a que prácticamente ya no se introdujeron nuevos fármacos en las décadas posteriores. Una de las causas de esta situación es que estas enfermedades son endémicas de países con bajo desarrollo económico, lo cual no incentiva a las grandes industrias farmacéuticas a invertir en investigación para combatirlas. Por ello, actualmente surge la necesidad de buscar moléculas que presenten actividad antiparasitaria contra uno o todos los protozoarios antes mencionados ¹.

En este contexto se desarrolló el presente trabajo de tesis cuyo objetivo fue la síntesis de conjugados de 2,4,6-triaminquinazolina con porciones fenólicas con el propósito de contar con moléculas que fueran activas contra *T. cruzi*. El conocimiento generado por este trabajo servirá a nuestro grupo de investigación a diseñar nuevas moléculas con mayor potencia antiparasitaria.

2. ANTECEDENTES

Debido a que las enfermedades parasitarias tropicales son endémicas y prevalecen en países de bajos y medianos ingresos económicos, no son de importancia para las empresas farmacéuticas. Tres de estas enfermedades son: la tripanosomiasis, la leishmaniasis y la enfermedad del sueño, mismas que son consideradas importantes y requieren atención de primera línea por la Organización Mundial de la Salud debido a las características que presentan (Tabla 1) ¹. En este trabajo nos enfocamos a la enfermedad de Chagas únicamente.

Tabla 1. Características de las enfermedades tropicales y fármacos disponibles.

| Enfermedad | Prevalencia global (millones) | Población en riesgo (millones) | Regiones con mayor predominancia | Manifestaciones clínicas | Fármacos empleados | Desventajas de los fármacos actuales |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--|---|---|---|
| Enfermedad de Chagas | 8-9 | 25 | América Latina y Caribe | Cardiomiopatía, Megacolon y Megaesófago | Nifurtimox y benznidazol | Pobre eficiencia, resistencia y toxicidad |
| Tripanosomiasis Africana | 300,000 | 60 | África sub-Sáharica | Mal del sueño | suramina, pentamidina, melarsoprol, eflornitina | Toxicidad y resistencia |
| Leishmaniasis | 12 millones | 350 | India, Asia del sur, América Latina, Caribe, África sub-Sáharica y área mediterránea | Infección cutánea, mucocutánea y visceral | amfotericina B, pentamidina, miltefosina, paromomicina. | Toxicidad y resistencia. |

2.1 Enfermedad de Chagas

Esta enfermedad es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al humano por un vector, insecto hematófago principalmente de las especies *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, o por transfusión sanguínea y a través de la placenta ^{2,3}. La enfermedad de Chagas es endémica de regiones rurales y se extiende

desde el norte de México hasta Argentina.⁴ Este padecimiento afecta de 8 a 9 millones de personas y pone en riesgo de infección a más de 35 millones.² Clínicamente la enfermedad se divide en dos etapas: la aguda en donde no hay síntomas, pero se presenta intensa multiplicación de parásitos en tejidos (amastigotes) y elevada parasitemia (presencia de parásitos en sangre, tripomastigotes) y la crónica donde ocurren lesiones irreversibles en el corazón y en el tracto gastrointestinal^{6, 4}.

T. cruzi es un protozoario flagelado perteneciente a la familia de tripanosomatidos y a la orden kinetoplastida³. Su ciclo de vida comienza cuando una chinche —chinche besucona— succiona sangre de animales o de personas infectadas. Dentro de la chinche el parásito presenta tres transformaciones o estadios: el primero en el estómago (esferomastigote); el segundo en el intestino (epimastigote) donde se reproduce rápidamente por división binaria y el tercero en el torrente sanguíneo (tripomastigotes), los cuales pueden infectar a otros animales o personas cuando la chinche nuevamente succiona sangre y defeca en la piel del nuevo hospedero⁵. Al frotar con las manos estas deyecciones se contamina la lesión, u otras lesiones adyacentes. El parásito también puede llegar a la conjuntiva humana al ser depositado por el insecto, en la hendidura de los párpados, o por las manos contaminadas de la persona⁵. Una vez que el protozoario entra al cuerpo del hospedero, la infección continúa cuando se interna en los macrófagos, los cuales se encuentran en la dermis y en tejidos subcutáneos⁷. En estas células, *T. cruzi* se transforma en amastigote, se reproduce a gran velocidad por división binaria y nuevamente se diferencia en tripomastigote, los cuales al ser demasiados revientan el macrófago y de esta forma pueden ingresar a espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, en donde infectarán a otras células, principalmente cardíacas, del músculo liso y del sistema esquelético, repitiendo el ciclo de infección. Los tripomastigotes aparecen en sangre aproximadamente después de 7 a 14 días de iniciada la infección.

En algunos países de Sudamérica como Uruguay, Chile, Brasil y Argentina, la chinche transmisora está bajo control gracias a medidas sanitarias que se han tomado como alternativa para combatir esta enfermedad ⁴. Para ayudar a las personas que ya están infectadas, se introdujeron en el mercado, hace más de veinte años, dos fármacos: el nifurtimox (Lampit® Bayer) y el benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche) (Figura 1) ⁴. Ambos fármacos se pueden usar en la fase aguda de la enfermedad y tiene una buena respuesta logrando más de un 80% de cura parasitológica (resultado negativo en todas las pruebas de detección parasitológicas y serológicas). Estos fármacos actúan mediante la producción de radicales libres y aprovechan la ineficiencia del *T. cruzi* para eliminar estas especies químicas ⁴. Sin embargo, debido a su mecanismo de acción, también tiene efectos secundarios importantes como anorexia, vómito y diarrea. En los últimos años se han estudiado otros compuestos que pueden funcionar como anti-chagásicos por ejemplo ketoconazol y terbinafina ¹.

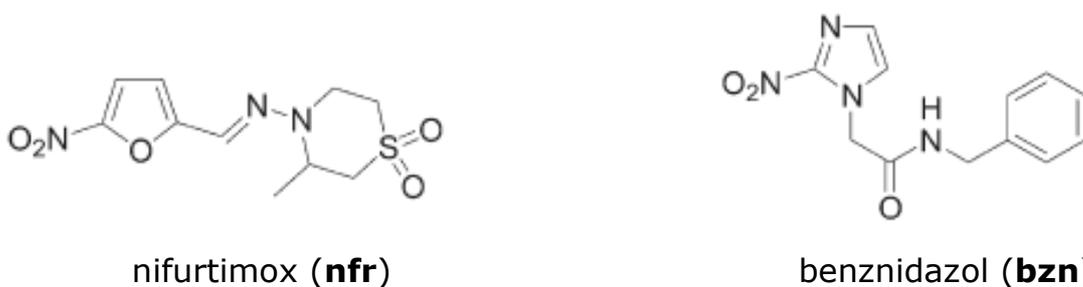


Fig. 1 Fármacos empleados para tratar la enfermedad de Chagas

2.2 Derivados fenólicos como anti-infecciosos

Los fenoles sustituidos en el núcleo bencénico son antisépticos que actúan desnaturalizando las proteínas cuando se encuentran a concentraciones bajas. La potencia del fenol se incrementa a medida que aumenta el número de sustituyentes y la longitud de sus moléculas. Asimismo, la introducción de grupos nitro y halógenos también hace crecer la potencia antiséptica. El fenol fue uno de los

primeros antisépticos descritos, pero actualmente es poco utilizado por su gran toxicidad y su poder irritante, por ello se considera un desinfectante de uso limitado. Posee gran número de derivados: alquilfenoles (cresol, xilenol, timol), fenoles clorados (clorofenol, cloroxilenol), bisfenoles (triclosan, hexaclorofeno), nitrofenoles, polifenoles, etc. ⁸. Algunos de ellos como el hexaclorofeno (Figura 2) se utilizan en medicina veterinaria como antiparasitarios, su actividad intrínseca lo hace ser una porción estructural para usarla en el inicio de búsqueda de compuestos antiinfecciosos.

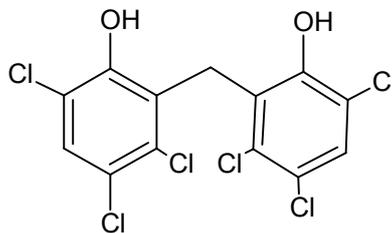


Fig. 2 Hexaclorofeno (antihelmíntico de uso veterinario)

2.3 Híbridos moleculares

Dentro de la Química Farmacéutica, hay diferentes herramientas que nos ayudan en el diseño de nuevos fármacos, una de ellas son las moléculas híbridas. Un híbrido se define como una entidad química con dos o más dominios estructurales, los cuales tiene diferentes funciones biológicas. Cuando los dominios estructurales son iguales la molécula se denomina "gemelo" y cuando son diferentes se le llama estrictamente "híbrido" (Figura 3).

El diseñar híbridos tiene ventajas sobre otro tipo de herramientas o recursos de administración de principios activos, como las mezclas de fármacos. Al administrar un fármaco híbrido es más fácil determinar su biodisponibilidad en comparación a la de una mezcla de fármacos. Es más sencillo determinar la farmacocinética y farmacodinamia de una sola molécula, que de todas las que se emplean en una terapia combinada. Es más factible optimizar una molécula para incrementar su biodisponibilidad; otro factor importante, es que se evitan las interacciones fármaco-fármaco, las cuales pueden afectar la

biodisponibilidad de uno o de ambos e incluso pueden llegar a tener interacciones que generen otras especies químicas y comprometer la función biológica de los principios activos.

Por su forma de acción los híbridos se clasifican en tres tipos (Figura 4), tipo A ambos dominios estructurales actúan sobre un mismo sitio receptor de una diana determinada, en el tipo B los dominios estructurales actúan en dianas independientes y en el tipo C los dominios ejercen su acción en sitios diferentes de una misma diana.

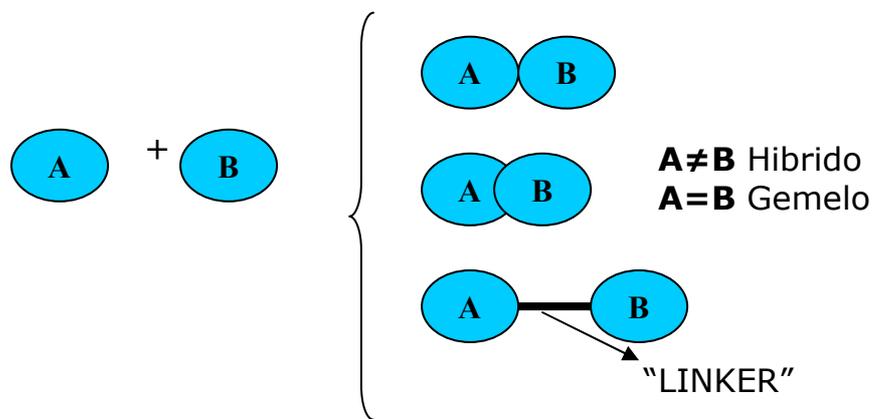
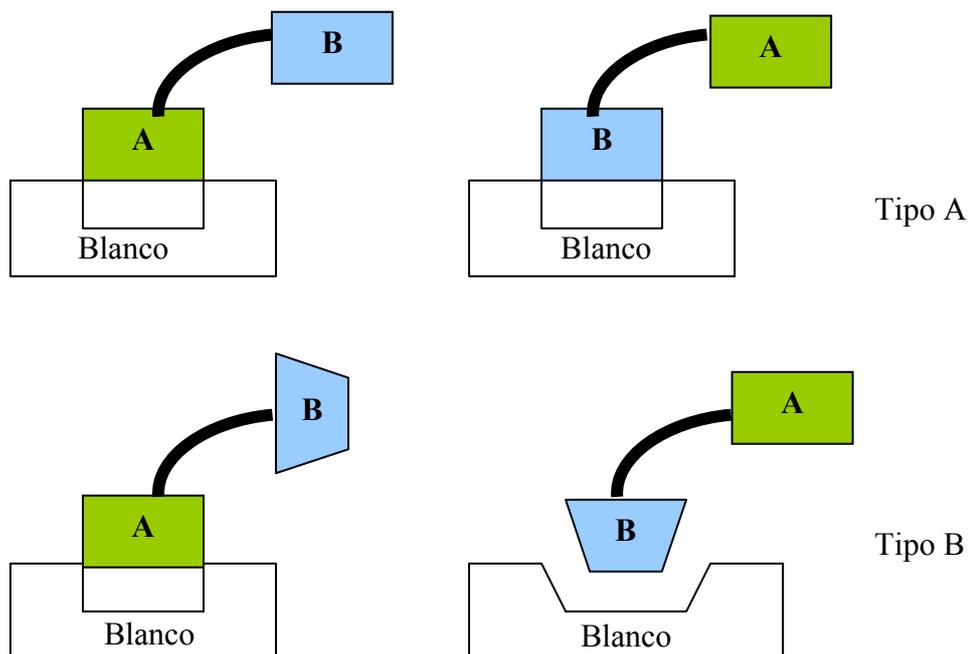


Fig. 3 Diferencia entre híbrido y gemelo



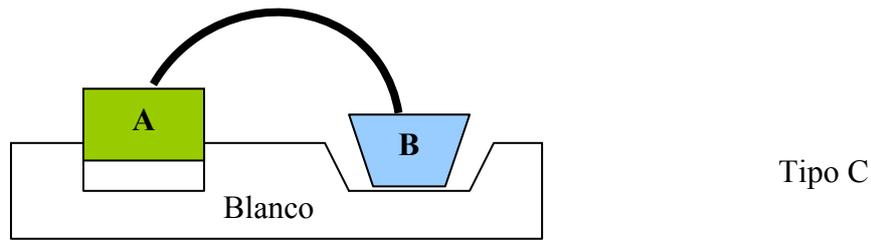


Fig. 4 Clasificación de híbridos

2.4. Dianas para la búsqueda de antiparasitarios

El combatir a las enfermedades parasitarias con eficacia, ha llevado a los investigadores a estudiar de manera muy escrupulosa a los protozoarios, para conocer a detalle su bioquímica y fisiología; esto con el objetivo de encontrar rutas biosintéticas y blancos terapéuticos que sólo se presenten en los protozoarios o que tengan una diferencia significativa con los que existen en los humanos y así incrementar la selectividad y eficacia de los posibles fármacos.

El conocimiento que se ha generado en los últimos años, sobre la bioquímica de *T. cruzi*, ha permitido que se consideren varias rutas metabólicas o macromoléculas como dianas (blancos) para inhibición biológica. Con ello se espera comprometer la vida del parásito sin afectar la del huésped. Entre las nuevas dianas se encuentran:

- La dihidrofolato reductasa
- La pteridín reductasa
- La cisteínproteasa
- La biosíntesis de esteroides
- El metabolismo de pirofosfatos
- La captación y metabolismo de bases púricas y pirimídicas
- La cadena de transferencia de electrones
- La maquinaria para la replicación del DNA cinetoplástico
- La síntesis de carbohidratos

En este trabajo se seleccionaron a las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y la pteridín reductasa (PTR) para abordar el posible descubrimiento de inhibidores. Estas enzimas participan en la síntesis

del folato, pieza clave en la biosíntesis de ADN y mediante mutantes que carecen de estas enzimas, se demostró que son vitales para el parásito. Con esto se puede validar que son blancos factibles para el descubrimiento de nuevos fármacos ^{1, 4}.

2.4.1 Dihidrofolato reductasa (DHFR) e inhibidores.

La DHFR es una enzima que se encuentra en las células eucariontes, donde tiene un papel importante en el metabolismo del folato y en la producción de timidina, debido a que la timidina es un precursor en la biosíntesis del ADN, al inhibir su producción consecuentemente habrá déficit del ADN ³. De manera más detallada la DHFR reduce el ácido dihidrofólico al ácido tetrahidrofólico (Figura 5). Es una enzima NADPH dependiente y el sitio de unión del ácido dihidrofólico está muy cerca al de este cofactor. A diferencia de la enzima que se encuentra en los humanos, la DHFR de los parásitos se encuentra en forma de un dímero ligada a la enzima timidilato sintasa (TS).

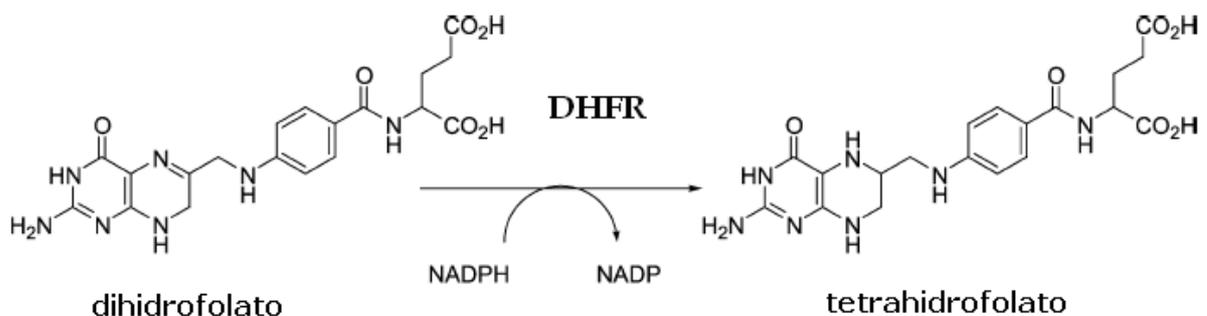


Fig. 5 Reducción del ácido dihidrofólico por la DHFR

Se han publicado diferentes estudios sobre el desarrollo de inhibidores para la DHFR, los cuales se han empleado para tratar diferentes padecimientos como el cáncer, la artritis, infecciones bacterianas e infecciones parasitarias. Algunos de los fármacos utilizados en el tratamiento de estos padecimientos son: piritamina (antipalúdico), trimetoprim (antibacterial), cicloguanilo (antipalúdico discontinuado) y metotrexato (antineoplásico, antiartrítico y activo contra *T. cruzi*) (Figura 6). Estos fármacos tienen una desventaja fundamental, no son específicos e inhiben tanto a la DHFR del agente

patógeno como a la del hospedero por lo que a concentraciones terapéuticas se manifiestan efectos tóxicos.

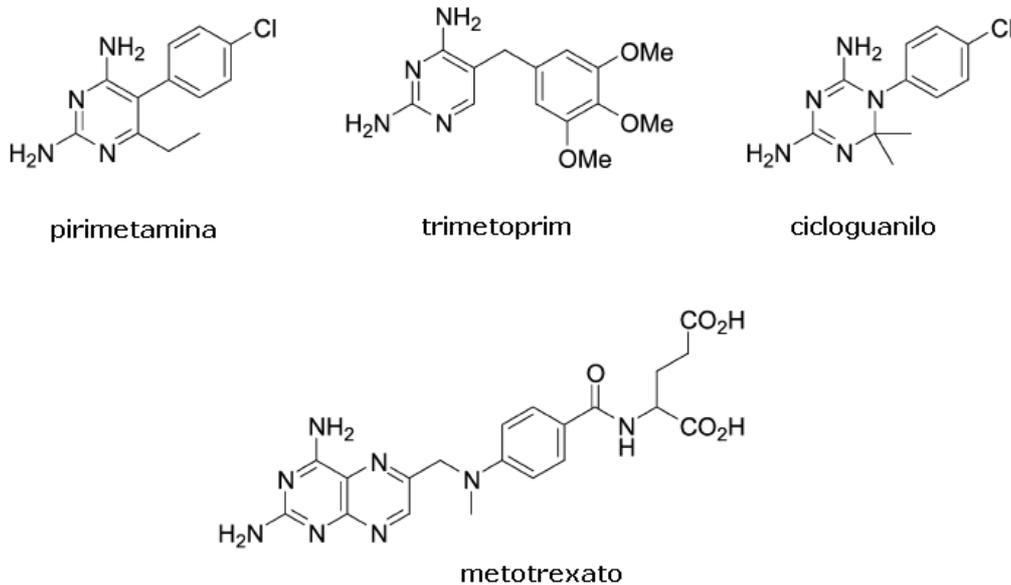


Fig. 6 Inhibidores de dihidrofolato reductasa

Por ello se han buscado inhibidores con mayor selectividad, de los cuales resaltan derivados de la 2,4-diaminopirimidina, 2,4-diaminopteridinas y 2,4-diamino[1,4]dioxino[2,3-*d*]pirimidina. Requiere mención especial la 2,4,6-triaminquinazolina (TAQ) por la selectividad hacia células neoplásicas (Figura 7) ³.

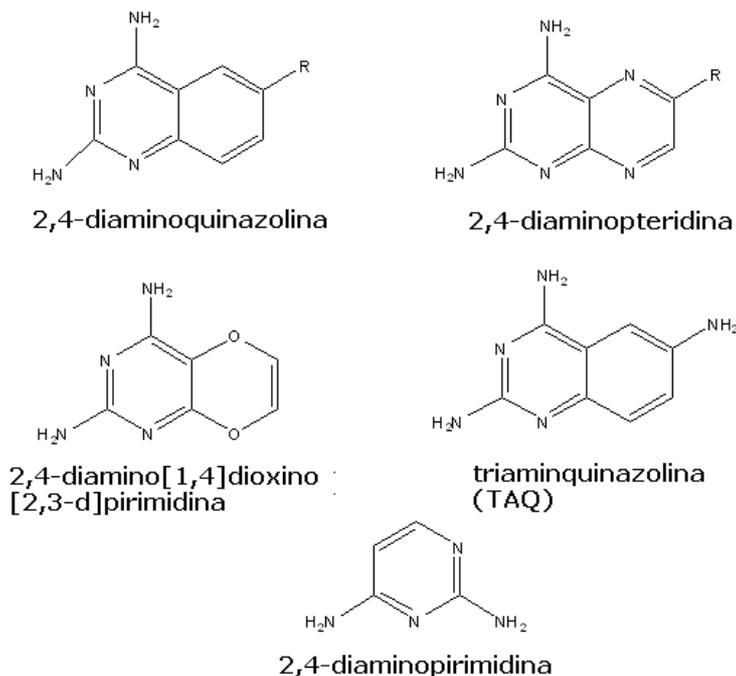


Fig. 7 Inhibidores de DHFR con mayor selectividad

En el caso de inhibidores de la DHFR para parásitos, uno de los trabajos más importantes es de Sirawaraporn *et al* quienes reportaron el hallazgo de inhibidores selectivos pero poco potentes contra *T. cruzi*, *L. donovani* y *L. major* (Figura 8, CE₅₀: concentración a la cual un compuesto produce un efecto terapéutico en el 50% de la muestra) ¹⁴.

A partir de este comunicado muchos grupos se dieron a la tarea de optimizar la actividad antiparasitaria y la selectividad de los compuestos reportados. Entre estos trabajos podemos citar el realizado por Coombs *et al.*, quienes sintetizaron y evaluaron derivados de 2,4-diaminopirimidinas 5-substituidas contra promastigotes de *L. mexicana*, que inhibieron a la DHFR de este protozoario con una CI₅₀ entre 0.2-2 μM (CI₅₀: concentración inhibitoria media).

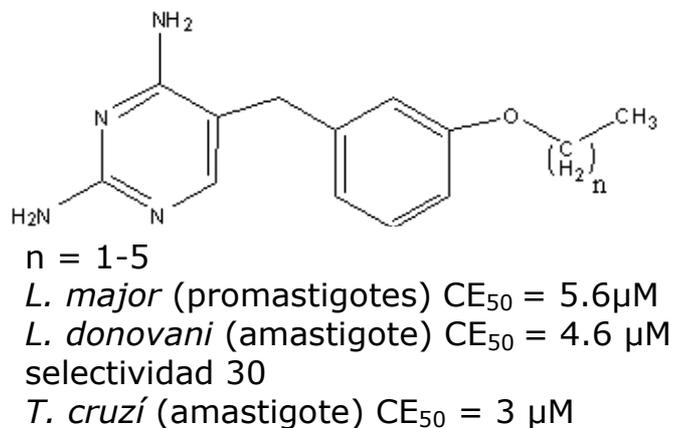


Fig. 8 Inhibidor reportado por Sirawaraporn *et al*

Chowdhury *et al* realizó una evaluación, asistida por computadora, del acoplamiento de estos compuestos con la enzima de interés, encontrando que para poder obtener una inhibición efectiva, el sustituyente alquílico en posición 6, debe tener una longitud de 4 a 6 átomos de carbono. Con base en estos estudios llegaron a la conclusión de que esta cadena es la que le puede conferir a los compuestos mayor selectividad por la enzima de *T. cruzi* que por la del huésped¹⁵. Esta selectividad proviene de la interacción de la

cadena alquílica con el aminoácido fenilalanina 88 (Phe 88) del sitio activo de la enzima de *T. cruzi*. En la enzima humana este aminoácido no se encuentra y su lugar es ocupado por la asparagina 64 (Asn 64) la cual no favorece la interacción. Con este estudio se demostró que se podían diseñar compuestos con selectividad y actividad biológica eficaz contra *T. cruzi*. (Figura 9).

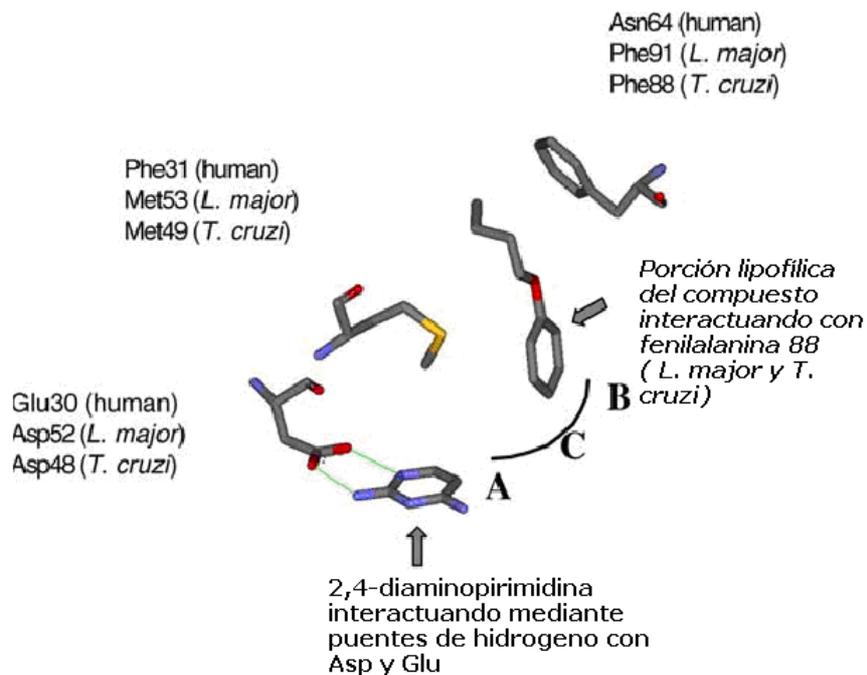


Fig. 9 Diferencias en el sitio activo de DHFR entre humano y *T. cruzi*

Con la intención de buscar otros inhibidores de la DHFR Berman *et al* sintetizaron y evaluaron, compuestos derivados de 2,4-diaminoquinazolina (Figura 10) contra DHFR aislada de promastigotes de *L. mexicana*, en donde mostraron tener una actividad moderada, estos compuestos mostraron ser muy potentes contra amastigotes de *L. major* cultivados en macrófagos humanos ($CE_{50} = 0.04-25$ nM) y un amplio índice terapéutico comparando con la CT_{50} (CT_{50} = concentración efectiva de un compuesto para matar el 50 % de las células del hospedero) en macrófagos no infectados ¹⁶.

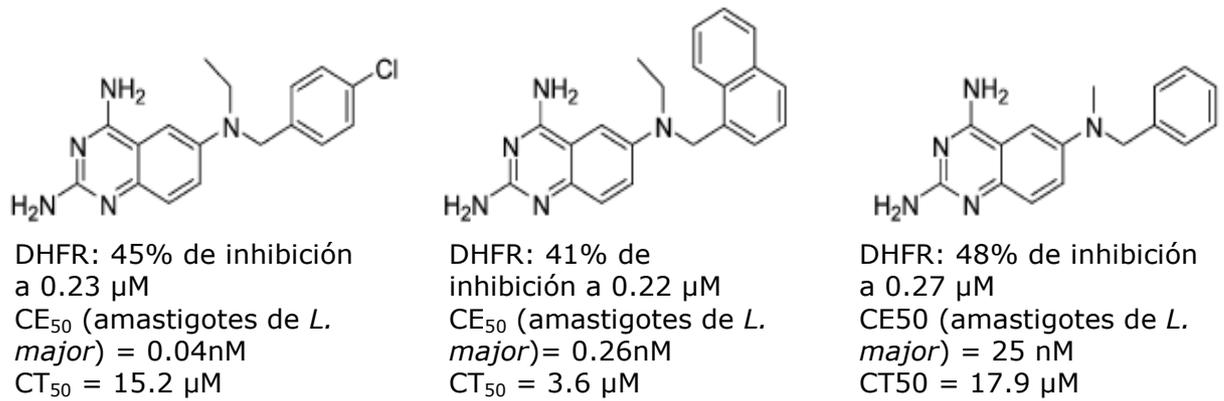


Fig. 10 Derivados de 2,4-diaminoquinazolina reportados por Berman et al.

Hardy *et al* analizaron una serie de quinazolininas, pirimidinas y pteridinas contra DHFR de *L. major* y de humano, así también se probaron contra promastigotes del mismo parasito. Este estudio mostró una relación directa entre la inhibición de la DHFR y la actividad antiparasitaria contra el estadio de promastigote, de tal forma que si el compuesto muestra una buena inhibición de la enzima, será activo contra el parasito y viceversa; algunos de estos compuestos mostraron niveles aceptables de selectividad para la enzima de *L. major* sobre la enzima humana, los compuestos más activos de este trabajo fueron quinazolininas y pirimidinas (Figura 11)¹⁸.

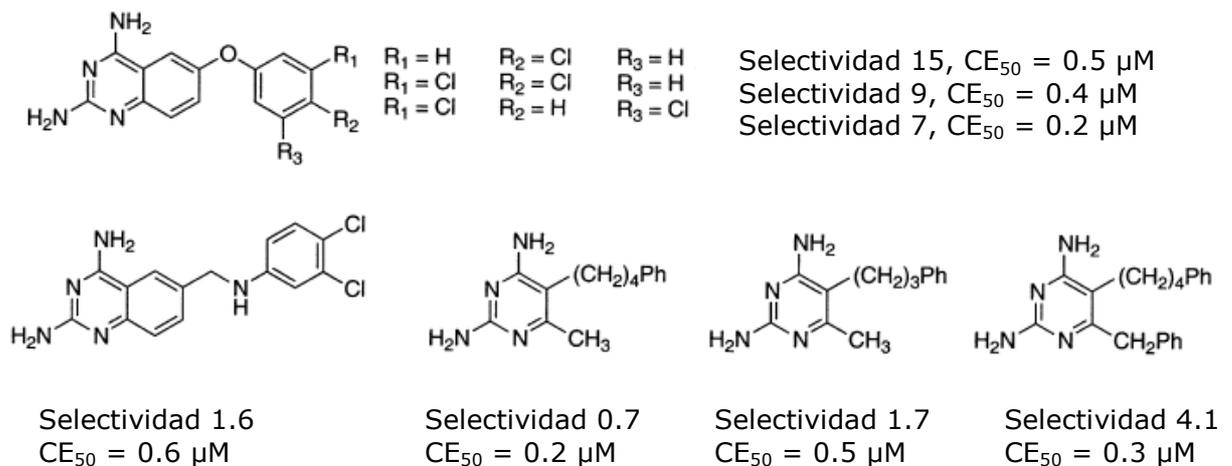


Fig. 11 derivados de quinazolinina y pirimidina que mostraron buena actividad contra promastigotes de *L. major*

En este sentido, otro trabajo realizado por Khabnadideh *et al* incluyó a otras quinazolininas y las evaluó contra amastigotes de *L. donovani*, amastigotes de *T. cruzi* y tripomastigotes de *T. brucei (rhodesiense)* (Figura 12)¹⁹. Lo sobresaliente de este trabajo, es que utilizó herramientas de modelado molecular para diseñar sus estructuras evaluadas como inhibidores selectivos para *L. donovani*, *T. brucei rhodesiense* y para *T. cruzi*.

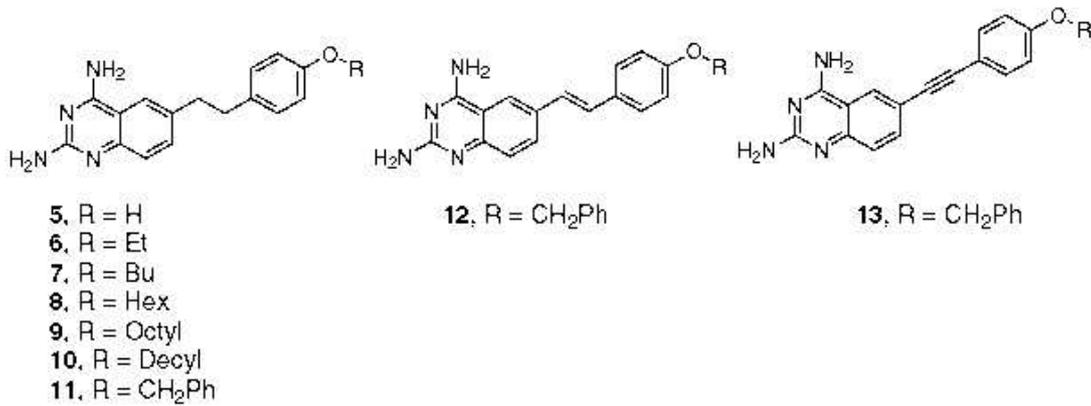
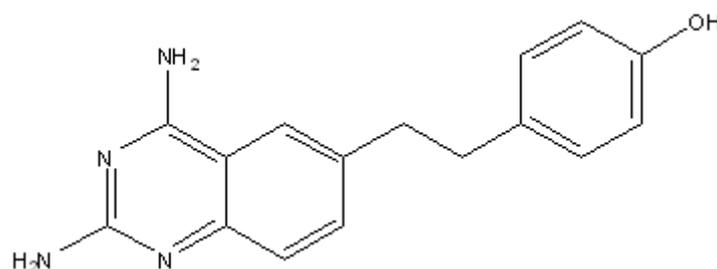


Fig. 12 Derivados de 2,4-diaminoquinazolina reportados por Khabnadideh *et al*

En el trabajo citado anteriormente se encuentra el derivado donde R = H, el cual mostró la mayor actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* y *T. brucei rhodesiense*, a pesar de no tener una cadena alquílica como sustituyente sino un grupo fenólico (Figura 13)¹⁹.



T. brucei rhodesiense CI₅₀ = 0.54μM selectividad 12
T. cruzi CI₅₀ = 0.078μM selectividad 8
L. donovani CI₅₀ = 79μM selectividad 0.01

Fig. 13 Derivado fenólico de quinazolinina con actividad sobresaliente.

2.4.2 Pteridín reductasa (PTR) e inhibidores.

La enzima pteridín reductasa (PTR), está muy relacionada con la DHFR. Ambas son oxido-reductasas, NADPH dependientes sólo que la PTR tiene como sustrato principal la biopterina la cual es reducida a dihidrobiopterina y sucesivamente a tetrahidrobiopterina (Figura 14). De manera natural la PTR reduce aproximadamente el 10 % del folato pero en condiciones en las cuales la DHFR se encuentra inhibida, la PTR se sobre expresa y puede abastecer del folato necesario para la supervivencia del parásito.

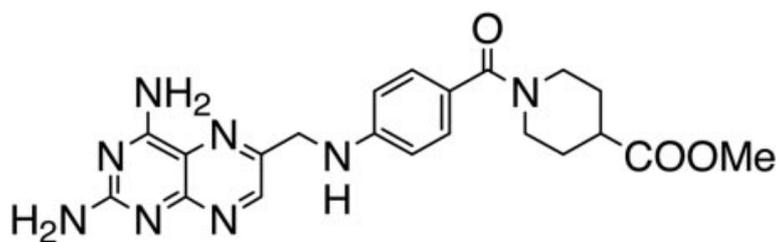
Lo anterior nos muestra la posibilidad de que a pesar de tener un inhibidor muy eficaz contra DHFR, es necesario inhibir a PTR, si es que se quiere tener éxito en el tratamiento de enfermedades parasitarias causadas por parásitos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, ya que es en los únicos en los que se ha encontrado esta enzima²⁰. Debido al mecanismo de compensación entre DHFR y PTR, además de que hay similitud estructural entre sus sustratos, es factible que el sitio activo sea muy similar y por lo tanto se pueden diseñar moléculas que inhiban ambas enzimas. Otro aspecto importante a señalar es que ambas enzimas se encuentran expresadas en los estadios de tripomastigote y amastigote, por lo que los fármacos que inhiban a ambas, pueden ser usados tanto en la etapa aguda como en la etapa crónica de la enfermedad.



Fig. 14 Función biológica de la Pteridín reductasa

Los trabajos que se enfocan al diseño y síntesis de inhibidores para la pteridín reductasa son escasos debido a que no está muy difundida la existencia de esta enzima. Uno de los pocos trabajos que resulta muy interesante es el realizado por Cavazzuti *et al.* En este trabajo se

evaluaron 440 compuestos relacionados con el folato, los cuales originalmente fueron diseñados como antineoplásicos. A dichos compuestos se les aplicaron diferentes pruebas, basadas en criterios que son importantes para tener una buena actividad inhibitoria y selectividad por las enzimas parasitarias. Los compuestos que cumplieron con dichos requerimientos se probaron contra los parásitos y de estos sólo nueve mostraron resultados alentadores. De esta última selección solo uno (Figura 15), mostró la mayor inhibición y selectividad para la PTR de *L. major*. Este trabajo nos muestra que se pueden sintetizar compuestos que inhiben a la PTR y a la DHFR con mayor afinidad para el parásito que para las enzimas humanas ²⁰.



T. cruzi $K_i = 7\mu\text{M}$ (PTR1)
L. major $K_i = 0.1\mu\text{M}$ (PTR1)
L. major $K_i = 4\mu\text{M}$ (DHFR)

Fig. 15 Inhibidor de PTR reportado por Cavazzuti *et al*

Con esto en mente, en nuestro grupo de investigación se propusieron estructuras análogas a las reportadas por Khabnadideh *et al*, las cuales tiene diferentes modificaciones (Figura 16) ¹⁹. La primera es el "linker", ya que se utiliza un grupo amino que reemplaza a un metileno, la segunda modificación consta de una sustitución en el fenol, al colocar un metoxilo y la tercera modificación es cambiar de posición el hidroxilo del fenol. Todo esto con el fin de explorar si se conservaba o mejoraba la actividad tripanocida de dichos compuestos. A dichos derivados se les practicó el mismo estudio de acoplamiento molecular (Figura 17). Estos estudios arrojaron que los derivados propuestos se unen al sitio activo de la DHFR, favorablemente.

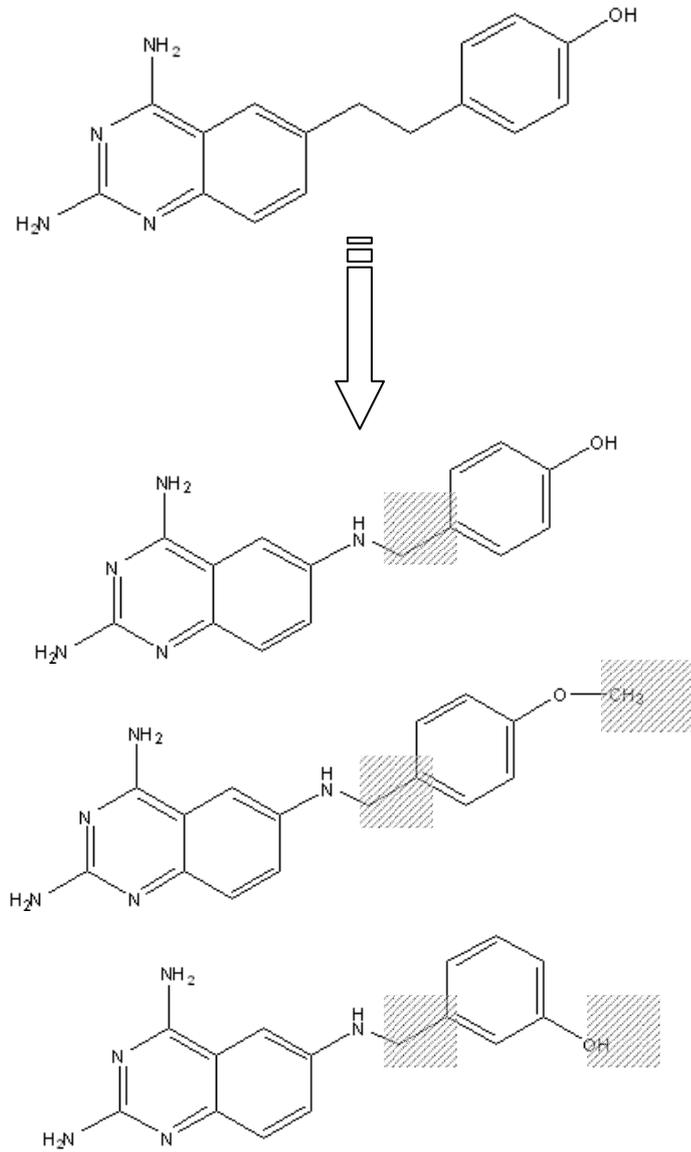


Fig. 16 Estructuras de interés en el estudio de antiprotozoarios

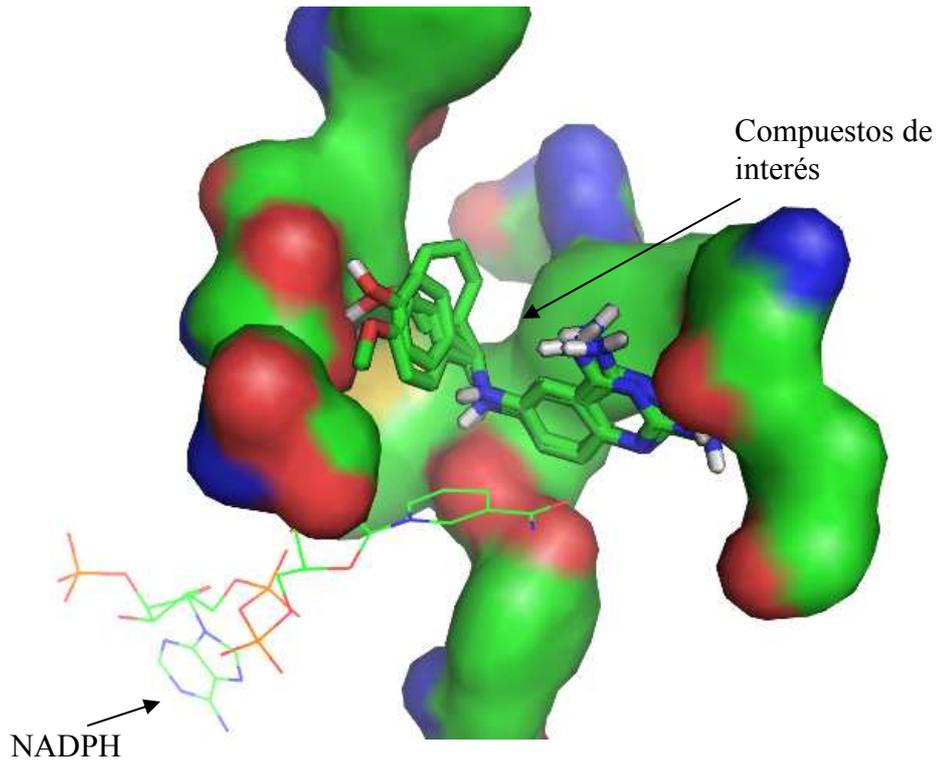


Fig. 17 Acoplamiento molecular de compuestos de interés

Tabla 2. Datos teóricos relevantes para las estructuras de interés.

| Estructura | Momento dipolar (d) | Kd (pM)/ ΔG (Kcal/mol) |
|------------|---------------------|--------------------------------|
| | 3.5347 | 334.12 / -12.93 |
| | 2.9035 | 315.17 / -12.97 |
| | 3.2721 | 332.29 / -12.93 |

Con estas evidencias que nos brindan los estudios computacionales, queda abierta la posibilidad, de encontrar y caracterizar nuevas moléculas con actividad antiprotozoaria.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Las moléculas que por estudios computacionales de acoplamiento molecular se diseñan como inhibidores de la dehidrofolato reductasa de *Trypanoma cruzi* podrán presentar actividad contra este protozooario?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Dado que la dihidrofolato reductasa es una enzima vital para *Trypanosoma cruzi*, si se tienen compuestos que puedan inhibirla, entonces, éstos podrán presentar actividad antiprotozoaria contra este parásito.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis de tres compuestos diseñados como inhibidores de la dihidrofolato reductasa de *T. cruzi*.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Sintetizar los compuestos de interés y sus intermediarios.
- 2) Caracterizar estructuralmente los productos obtenidos así como los intermediarios.

Enviar a evaluación tripanocida *in vitro* los compuestos obtenidos.

5 METODOLOGÍA

5.1 Compuestos Propuestos.

Con base en lo expuesto anteriormente se propusieron los compuestos **1**, **2** y **3** (Fig 18). Estas sustancias presentan en su diseño dos porciones estructurales de probada acción antimicrobiana: el fenol y la quinazolina; unidos por un conector (aminometileno). En el caso de la porción fenólica tenemos variaciones estructurales como la posición del hidroxilo y la metilación del mismo.

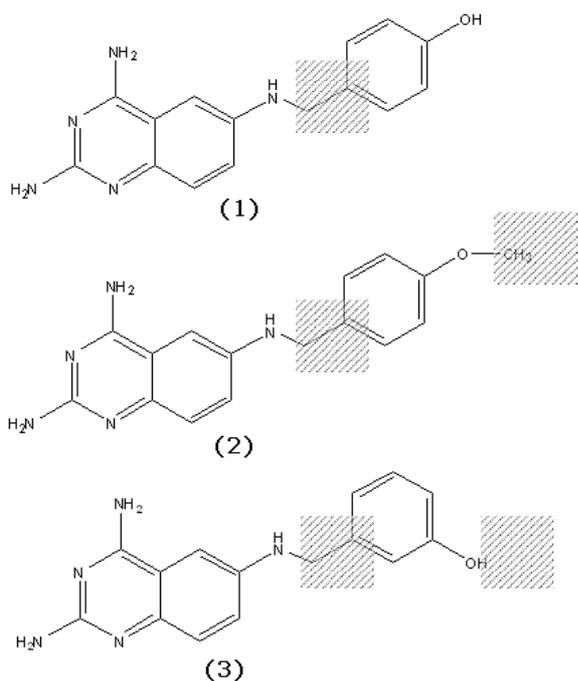
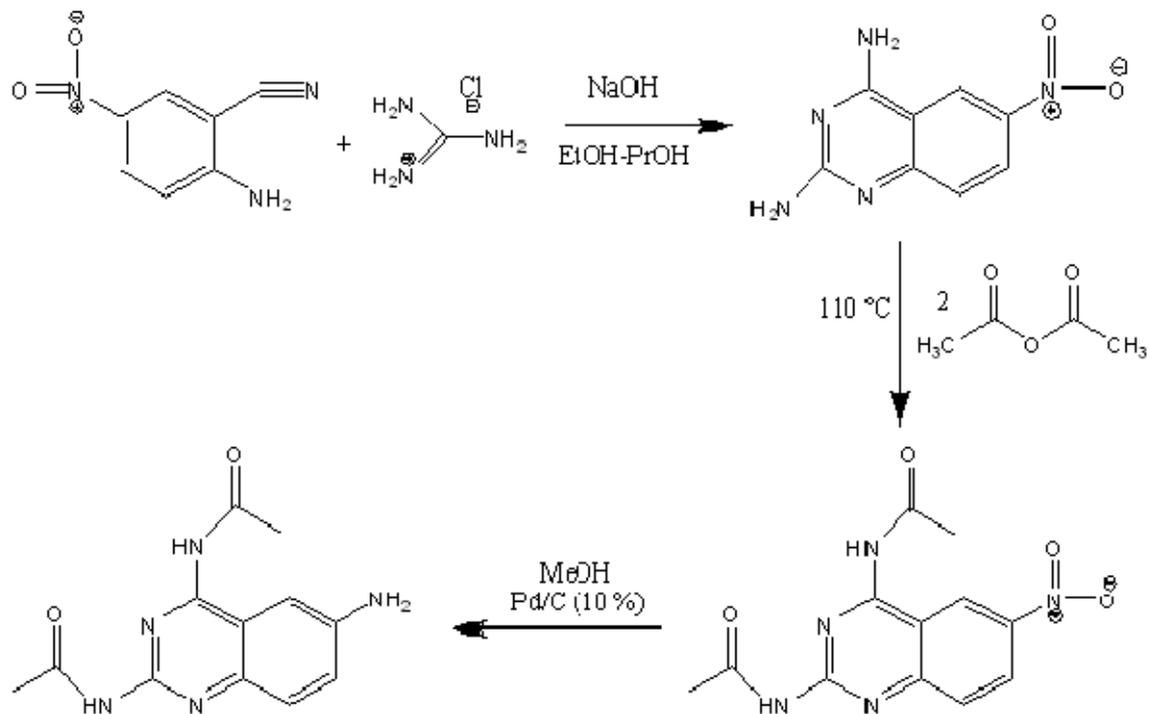


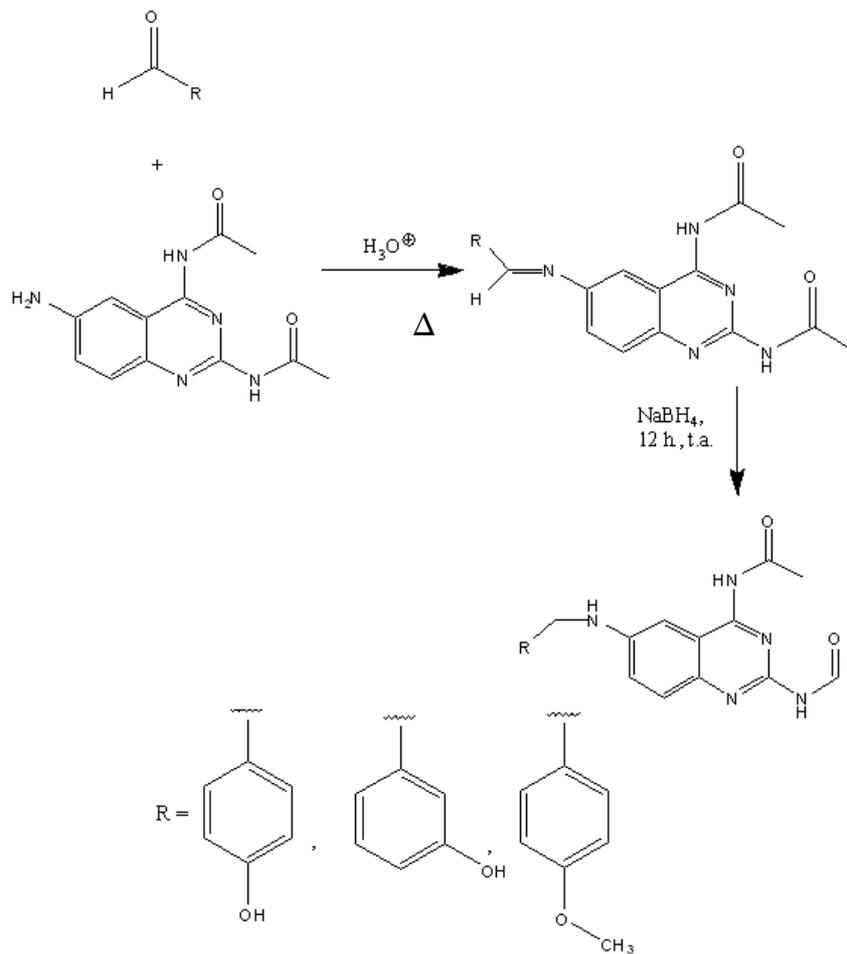
Fig. 18 Compuestos propuestos

5.3 Ruta sintética.

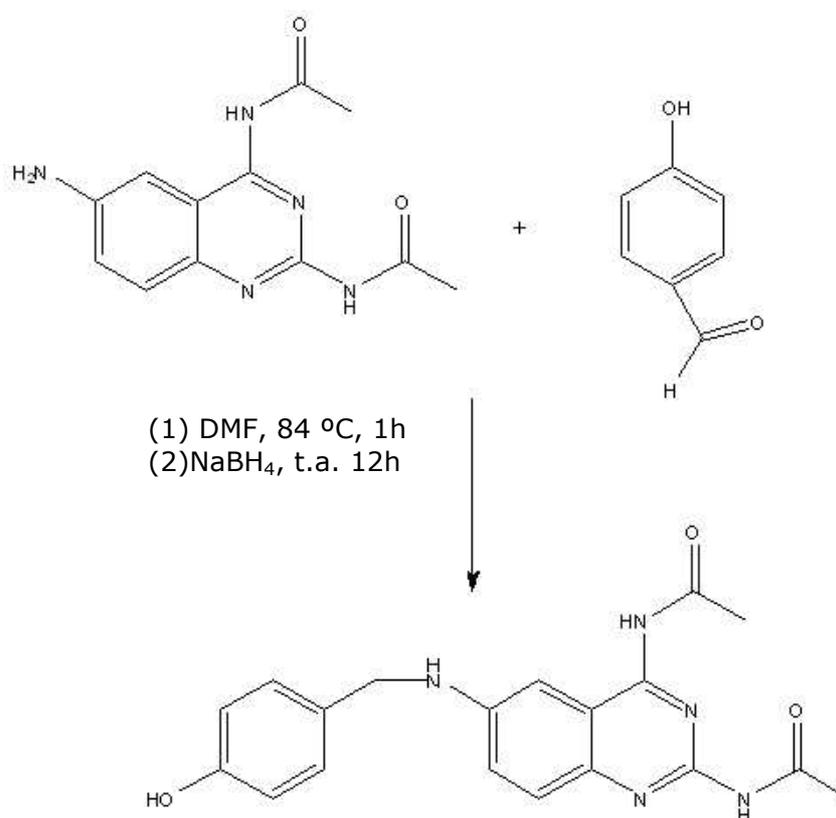
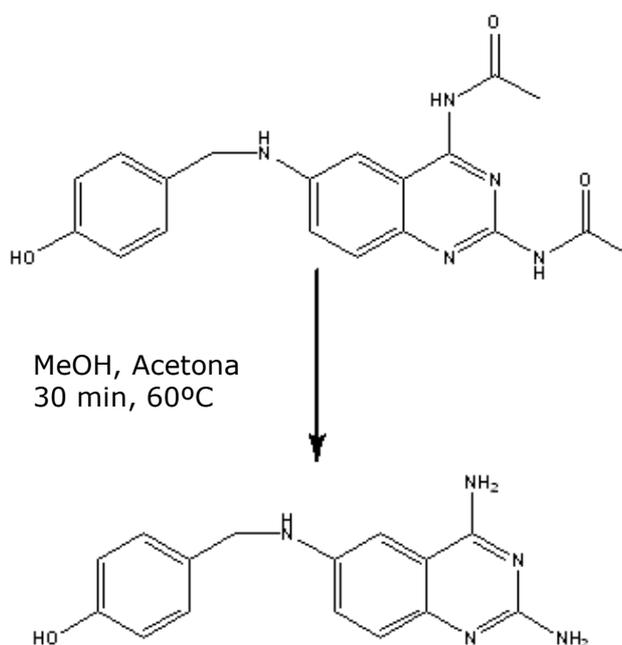
Para poder obtener los compuestos **1**, **2** y **3** primero se sintetizó la porción de quinazolina mediante un proceso previamente estudiado en nuestro grupo de investigación (Esquema 1). Los derivados hidroxibenzaldehídos se obtuvieron de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich). La vía de acoplamiento de ambas porciones fue una aminación reductiva con borohidruro de sodio.

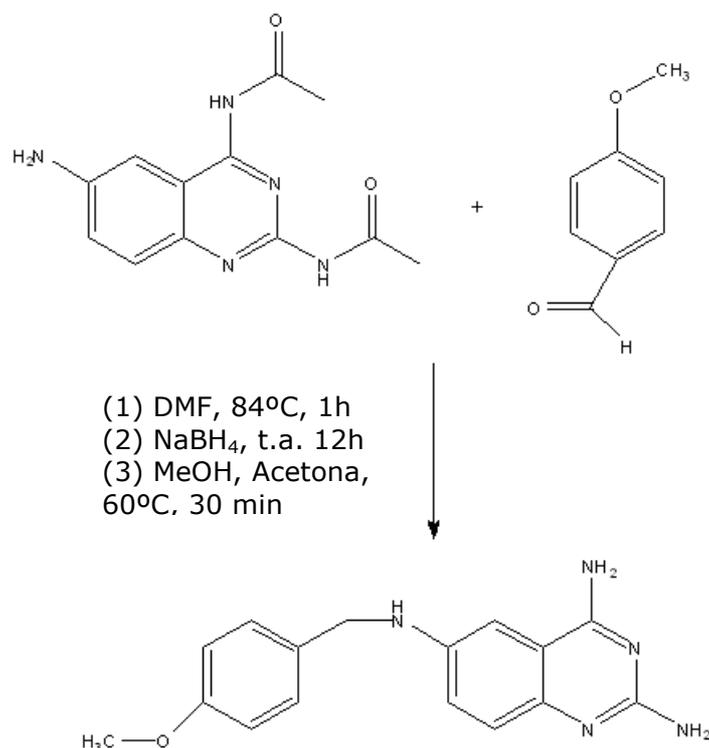


Esquema 1. Síntesis del núcleo de quinazolina.

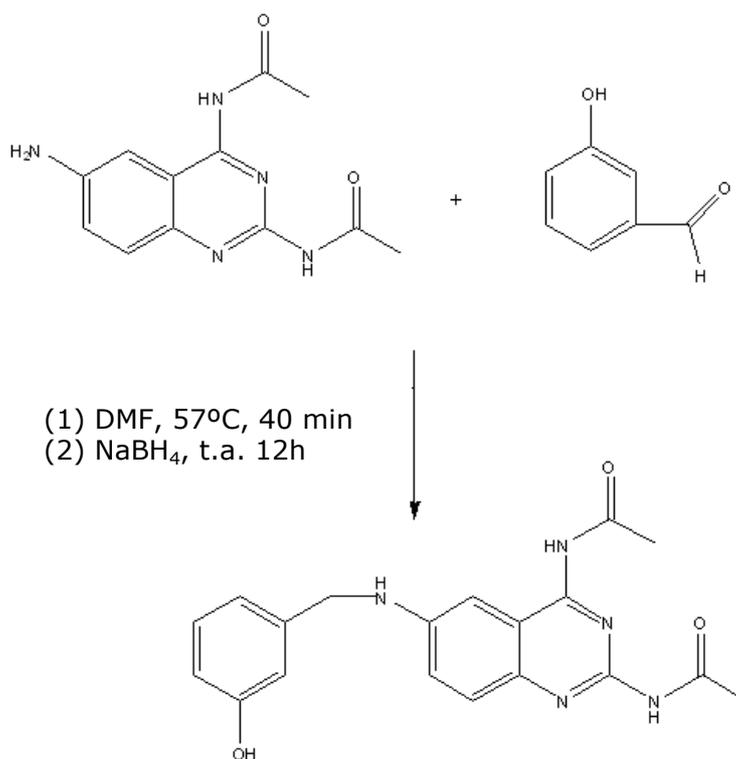


Esquema 2. Ruta general de síntesis.

5.3.1 Síntesis del intermediario para el compuesto **1**Esquema 3. Síntesis de *N*-[2-(acetilamino)-6-[4-hidroxi-benzaldehído]quinazolina-4-il]acetamida5.3.2 Síntesis del compuesto **1**Esquema 4. Síntesis de *N*⁶-(4-hidroxi-benzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**1**)

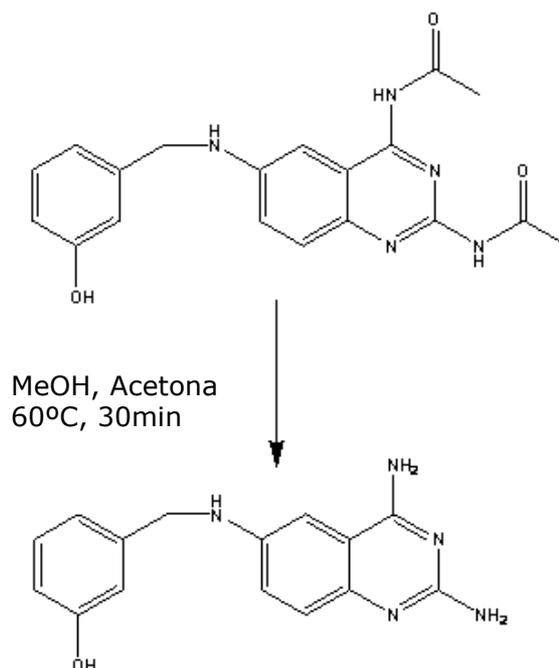
5.3.3 Síntesis del compuesto **2**

Esquema 5. Síntesis de *N*⁶-(4-metoxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**2**)

5.3.4 Síntesis del intermediario para el compuesto **3**

Esquema 6. Síntesis de *N*-[2-(acetilamino)-6-[3-hidroxi-benzaldehído]quinazolina-4-il]acetamida

5.3.5 Síntesis del compuesto **3**



Esquema 7. Síntesis de *N*⁶-(3-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**3**)

5.4 Evaluación biológica

La parte experimental correspondiente a este apartado fue realizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) a cargo del Dr. Benjamín Noguera Torres.

- Se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio de la ENCB-IPN.
- Se utilizaron los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepas NINOA e INC-5 del Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN
- Como controles positivos se utilizaron los fármacos nifurtimox (Lampit, Bayer) y benznidazol (Rochagan, Roche) adquiridos comercialmente.

Los resultados de los estudios *in vitro* se obtuvieron al exponer los tripomastigotes a diferentes concentraciones. Se contabilizaron los parásitos que sobrevivieron a la acción de los compuestos y al comparar con un blanco el cual contiene parásitos únicamente, se obtuvo el porcentaje de lisis. Con estos valores se calculó la

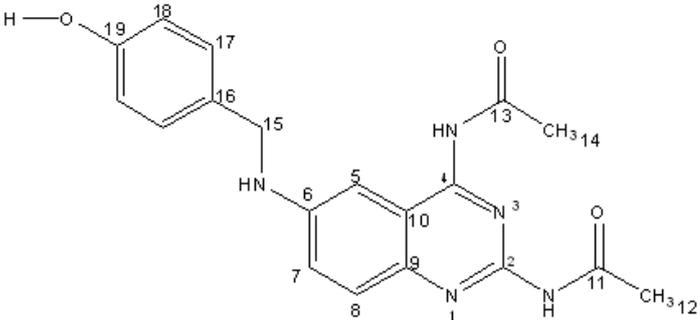
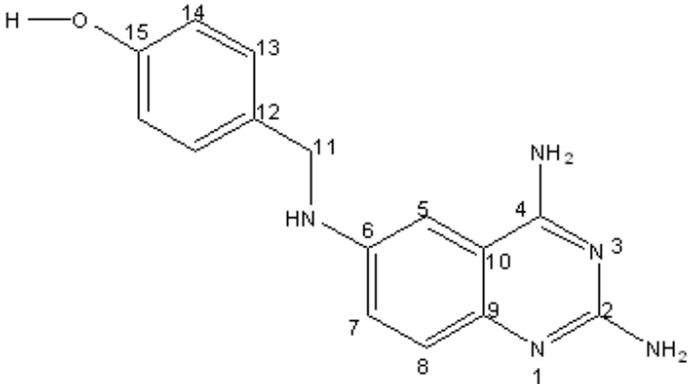
concentración inhibitoria media (CI₅₀) de cada uno de los compuestos con una regresión lineal simple.

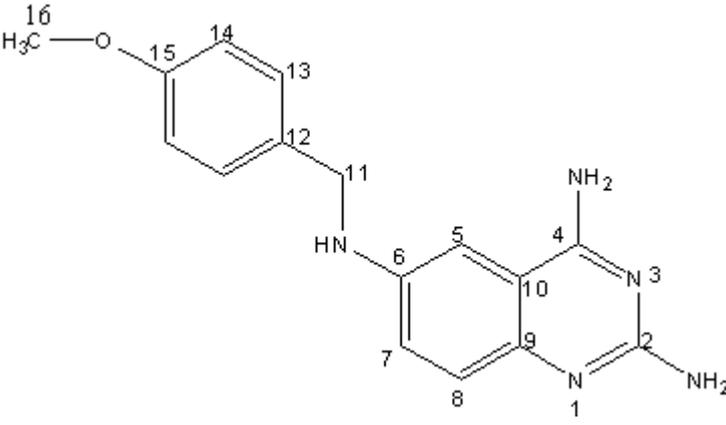
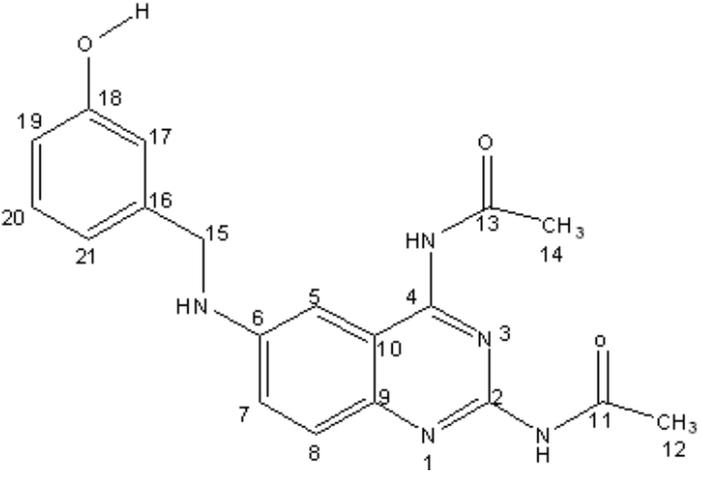
6. RESULTADOS*6.1 Parte Sintética*

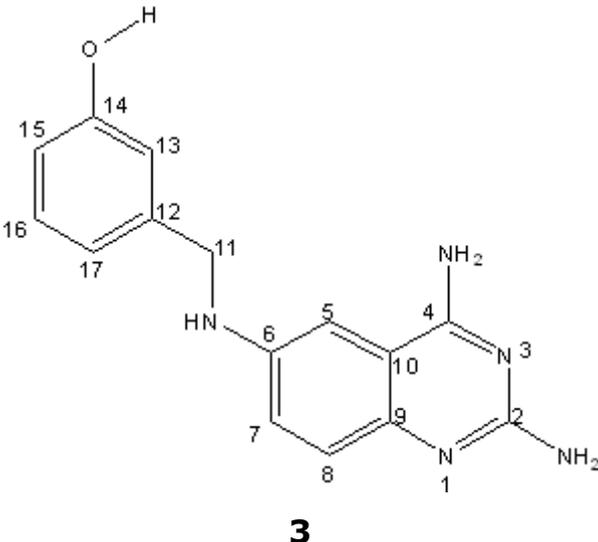
Tabla 3. Características Generales de los Compuestos e Intermediarios Obtenidos

| Compuesto | R.f. | Sistema | pf. °C | Aspecto y Color | Rendimiento de la reacción (%) |
|------------------------|------|---------|---------|-----------------|--------------------------------|
| Intermediario 1 | 0.62 | I | 115-117 | Polvo amarillo | 49.9 |
| 1 | 0.65 | II | 192 | Polvo amarillo | 79.0 |
| 2 | 0.73 | I | 152-153 | Polvo amarillo | 40.0 |
| Intermediario 3 | 0.66 | I | 127 | Polvo amarillo | 58.7 |
| 3 | 0.70 | II | 218 | Polvo amarillo | 80.0 |

Tabla 4. Caracterización Espectroscópica de los Compuestos obtenidos y sus Intermediarios.

| COMPUESTO | Características espectroscópicas |
|--|---|
|  <p style="text-align: center;">Intermediario 1</p> | <p>EM-[FAB(+)] m/z = 366</p> <p>IR-pastilla KBr (cm⁻¹): 3424 (N-H y O-H), 1627 (C=O), 1476 y 1516 (C=C Ar)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆) ppm: 10.23[(H₂), s, 1H], 10.53[(H₄), s, 1H], 7.07[(H₅), s a, 1H], 6.57[(H₆), s a, 1H], 7.39[(H₇), s a, 2H], 7.46[(H₈), s.a., 2H], 2.44[(H₁₂), s, 3H], 2.18[(H₁₄), s, 3H], 4.28[(H_{15a}, 15b), d, J = 4 Hz, 2H], 6.73[(H₁₇), sa, 2H], 7.21[(H₁₈), s a, 2H], 9.39[(H₁₉), s a, 1H]</p> |
|  <p style="text-align: center;">1</p> | <p>EM-[FAB(+)] m/z = 282</p> <p>IR-pastilla KBr (cm⁻¹): 3355 (O-H), 3206 (N-H), 1626 (C-N), 1466 y 1568 (C=C Ar).</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆) ppm: 5.51 [(H₂), s a, 2H], 7.03[(H_{4,8}), s.a., 3H], 6.96[(H_{5,7}), s a, 2H], 5.70[(H₆), s a, 1H], 4.13[(H_{11a}, 11b), d, J = 4 Hz, 2H], 6.72[(H₁₃), d, J = 8 Hz</p> |

| | |
|---|---|
| | <p>2H], 7.22[(H₁₄), d, J= 8 Hz,2H], 9.23[(H₁₅), s a, 1H]</p> |
|  <p style="text-align: center;">2</p> | <p>EM-[FAB(+)] m/z = 296</p> <p>IR-pastilla KBr (cm⁻¹): 3450 y 3328 (N-H), 1639 (C-N), 1469 y 1563 (C=C Ar), 1243 (C-O-C)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆) ppm: 5.90 [(H₂), s, 2H], 7.05[(H_{4,5}), s a, 3H], 5.97[(H₆), s a, 1H], 7.23[(H₇), d, J= 12 Hz,1H], 7.30[(H₈), s a, 1H], 4.21[(H_{11a, 11b}), d, J= 8 Hz, 2H], 6.87[(H₁₃), d, J = 8 Hz 2H], 7.35[(H₁₄), d, J= 8 Hz,2H], 3.71[(H₁₆), s, 3H]</p> |
|  <p style="text-align: center;">Intermediario 3</p> | <p>EM-[FAB(+)] m/z = 366</p> <p>IR-pastilla KBr (cm⁻¹): 3341(N-H y O-H), 1668 y 1627 (C=O), 1483 y 1590 (C=C Ar)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆) ppm: 10.20[(H₂), s, 1H], 10.46[(H₄), s, 1H], 7.03[(H₅), d, J= 4 Hz, 1H], 6.63[(H₆), s a, 1H], 7.39[(H₇), dd, J₁= 4 Hz, J₂=10 Hz, 1H], 7.48[(H₈), d, J= 12 Hz,1H], 2.18[(H₁₂), s, 3H], 2.44[(H₁₄), s, 3H], 4.30[(H_{15a, 15b}), d, J= 4 Hz, 2H], 6.65[(H₁₇), s a, 1H], 9.36[(H₁₈), s a, 1H],</p> |

| | |
|--|---|
| | 6.83[(H ₁₉), s a, 1H], 7.13[(H ₂₀), t, J= 8 Hz,1H], 6.81[(H ₂₁), s a, 1H] |
|  <p style="text-align: center;">3</p> | EM-[FAB(+)] m/z = 282 IR-pastilla KBr (cm ⁻¹): 3337 (O-H), 30203 (N-H), 1628 (C-N) , 1487 y 1588 (C=C Ar) RMN ¹ H (DMSO-d ₆) ppm: 5.61[(H ₂), s, 2H], 7.04[(H _{4,7,8}),s a, 3H], 6.95[(H ₅),s,1H], 5.91[(H ₆), t, J= 5.56 Hz, 1H], 4.18[(H _{11a, 11b}), d, J= 5.58 Hz, 2H], 6.81[(H ₁₃), s, 1H], 9.50[(H ₁₄), s a, 1H], 6.83[(H ₁₅), s, 1H], 7.11[(H ₁₆), t.,1H], 6.61[(H ₁₇), d, J= 8 Hz,1H] |

s a: señal ancha, s: singulete, t: triplete, d: doblete, dd: doble de dobles,

6.4 Parte Biológica.

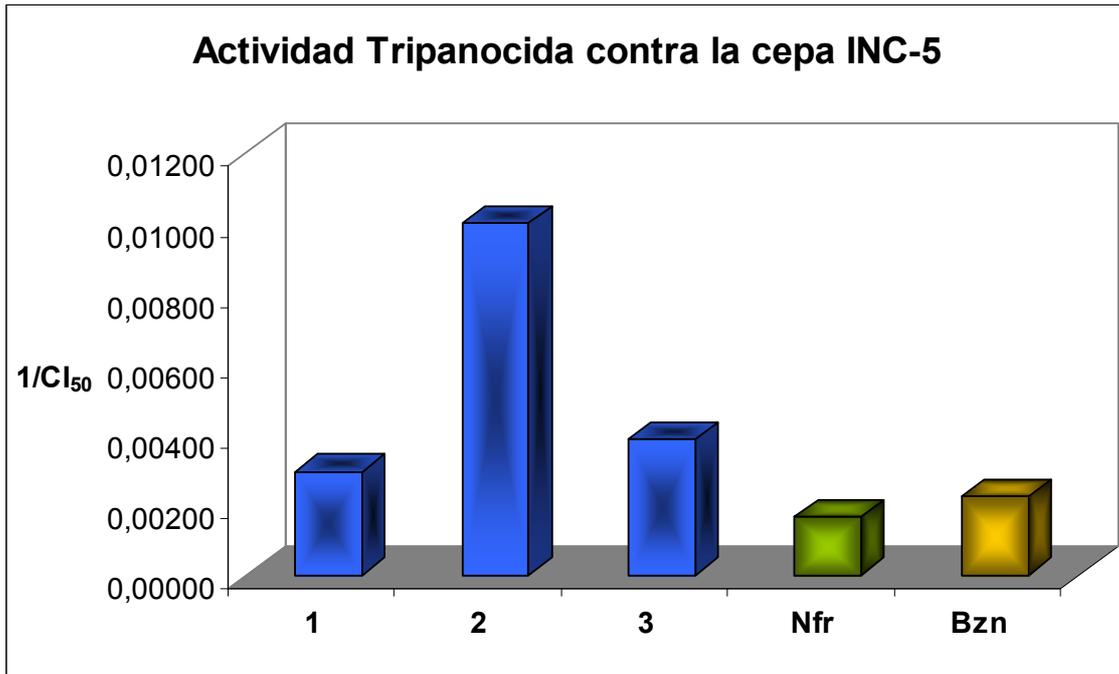
Los compuestos obtenidos y sus intermediarios se probaron contra *T. cruzi*, de las cepas NINOA e INC-5, para visualizar los resultados, se grafico el inverso de la CI₅₀ (μM) y se utilizaron como controles el **Nfr** y **Bzn**.

Tabla 5. CI_{50} contra *T. cruzi* cepa INC-5.

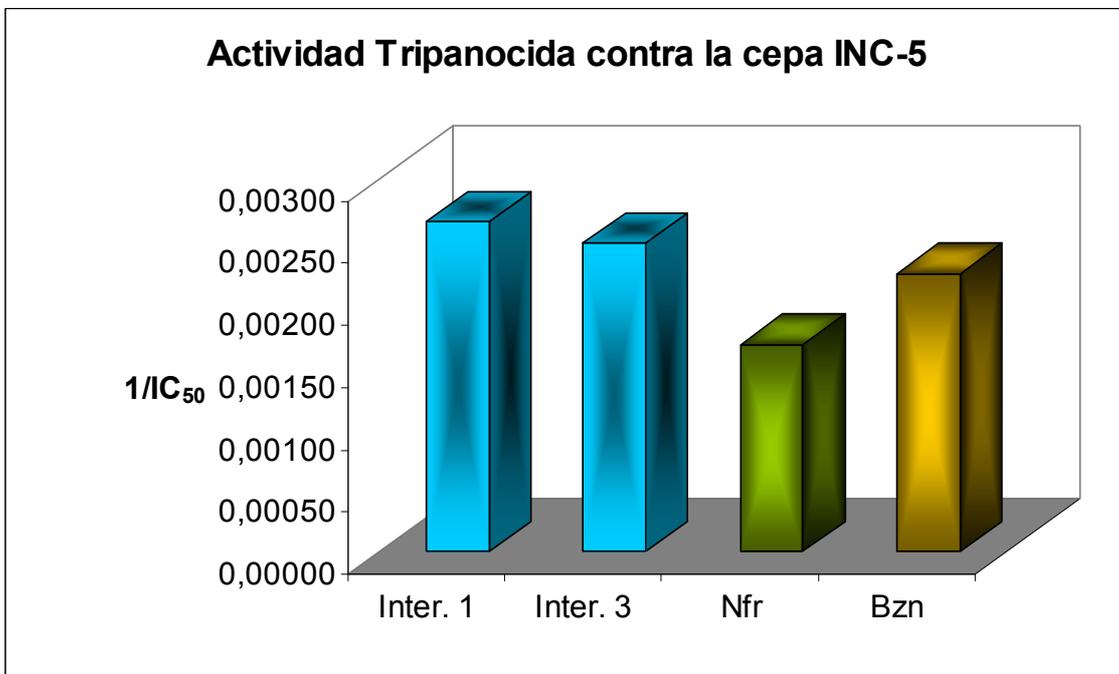
| Compuesto | CI_{50} (μM) | $1/CI_{50}$ (μM^{-1}) |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 | 338.96 | 0.00295 |
| 2 | 99.76 | 0.01002 |
| 3 | 258.06 | 0.00388 |
| Intermediario 1 | 377.06 | 0.00265 |
| Intermediario 3 | 402.38 | 0.00249 |
| Nfr | 600.00 | 0.00203 |
| Bzn | 447.00 | 0.00167 |

Tabla 6. CI_{50} contra *T. cruzi* cepa NINOA.

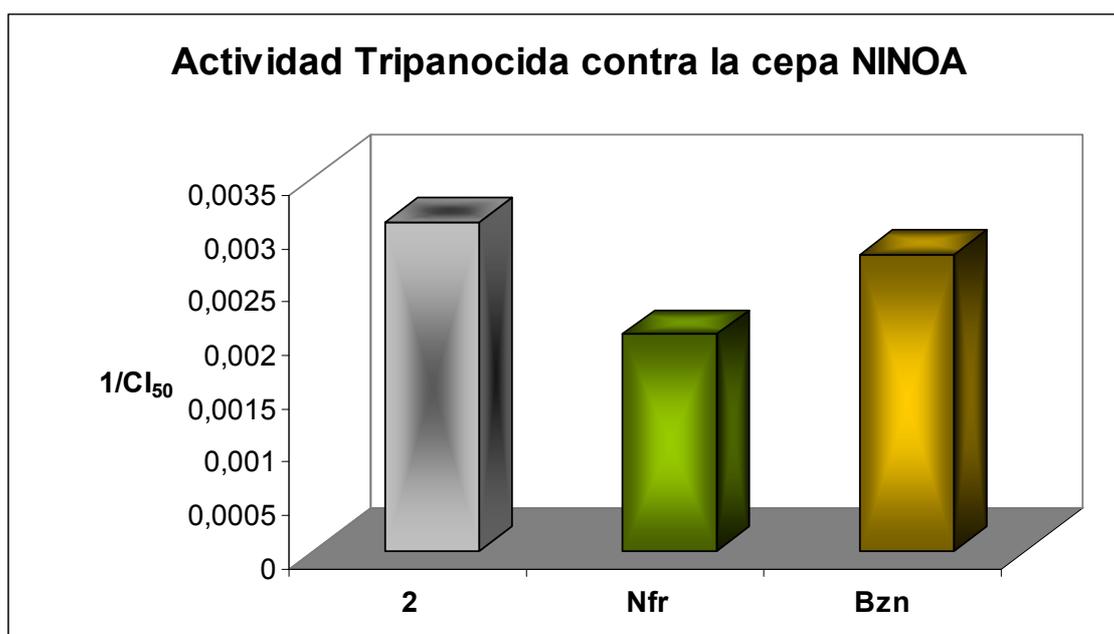
| Compuesto | CI_{50} (μM) | $1/CI_{50}$ (μM^{-1}) |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 | >402.38 | <0.00248 |
| 2 | 324.98 | 0.00308 |
| 3 | >402.38 | <0.00248 |
| Intermediario 1 | >402.38 | <0.00248 |
| Intermediario 3 | >402.38 | <0.00248 |
| Nfr | 493.00 | 0.00252 |
| Bzn | 360.00 | 0.00203 |



Gráfica 1. Actividad Tripanocida de los compuestos propuestos



Gráfica 2. Actividad tripanocida de los intermediarios aislados



Gráfica 3. Antiparasitario contra *T. cruzi* cepa NINOA

7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Caracterización espectroscópica de los compuestos obtenidos

7.1.1 Caracterización del Intermediario para el compuesto 1

Después de realizar la purificación de este compuesto, se envió a registrar el espectro de masas (FAB), infrarrojo y resonancia magnética nuclear protónica. El espectro de masas nos reveló un ión molecular con $m/z = 366$, que corresponde al peso molecular esperado; en este caso el ión molecular tiene una baja abundancia relativa. Se presentaron los fragmentos de $m/z = 324$, correspondiente a la pérdida de un acetilo y $m/z = 282$ correspondiente a la pérdida de ambos acetilos, y los fragmentos correspondientes a las dos porciones que conforman la molécula, ($m/z = 176$ y $m/z = 109$); es importante señalar que este último fragmento no se aprecia bien debido a que se opaca por la matriz (figura 19). En el espectro de infrarrojo se tienen las siguientes vibraciones características: 3424 cm^{-1} vibración ancha de N-H, empalmada con la vibración de O-H; a 1627 cm^{-1} la vibración de C=O de los acetilos; a 1516 cm^{-1} se presentan las vibraciones de C=C del anillo aromático. Con estas vibraciones se confirma la existencia de los principales grupos funcionales. Para el espectro de RMN- ^1H se pueden apreciar las siguientes señales: a 10.53 y 10.23 ppm se muestran dos singuletes que integran para un protón cada uno, los cuales representan a los hidrógenos de la amida en el anillo de quinazolina; a 9.39 ppm se muestra una señal ancha la cual representa al hidrógeno del hidroxilo fenólico; a 7.46 y 7.39 ppm se presentan señales anchas que representan el acoplamiento de los protones H_7 y H_8 del núcleo de quinazolina; a 7.21 ppm se muestra una señal ancha que representa al hidrógeno H_{18} , debido al acoplamiento de dos protones equivalentes en el anillo aromático del fenol, empalmado en esta señal a 7.07 ppm se encuentra representado por una señal ancha, el protón H_5 del anillo de quinazolina, a 6.73 y 6.57 ppm se encuentran empalmadas, lo que debería ser un doblete de los protones H_{17} equivalentes en el anillo aromático y la señal correspondiente al protón H_6 de la amina en el "linker"; a 4.28 ppm se observa un doblete con una constante de acoplamiento $J = 4\text{ Hz}$ que representa el acoplamiento de los protones del metilo con el protón de la

amina, ubicados en el "linker"; por último, a 2.44 y 2.18 ppm se muestran dos singuletes, los cuales integran para tres protones, cada uno, esto debido a que los hidrógenos H₁₂ y H₁₄ de los acetilos son equivalentes. Con todo esto se corrobora la estructura de este intermediario.

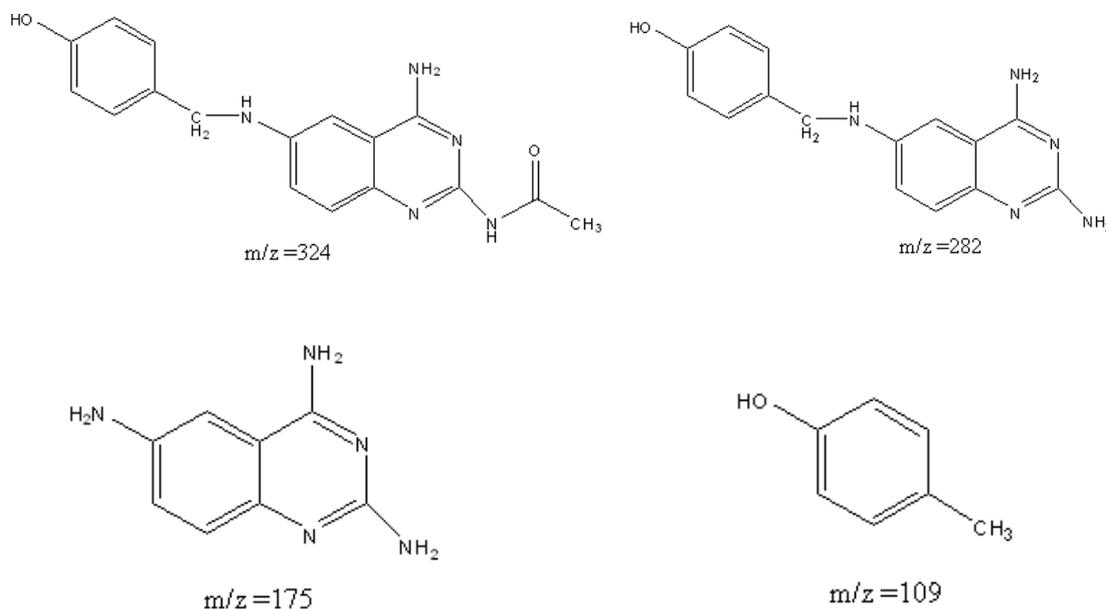
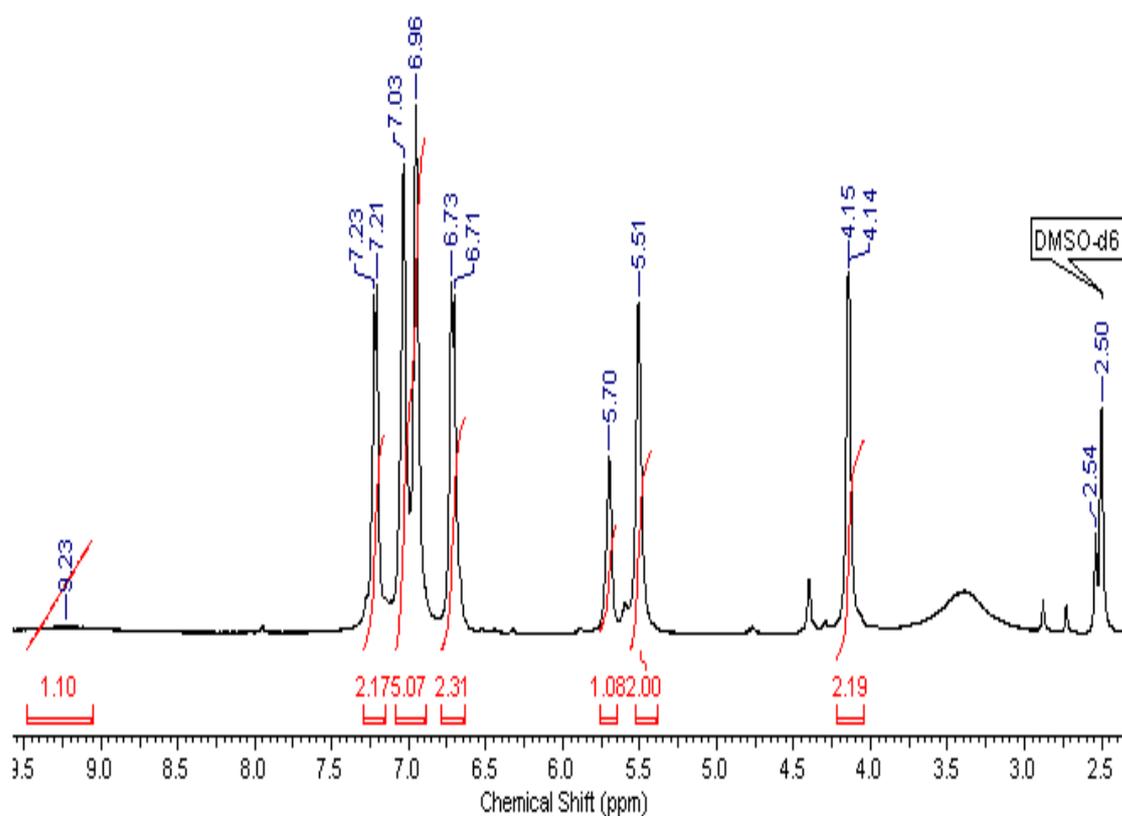


Fig. 19 Principales fragmentos del intermediario 1

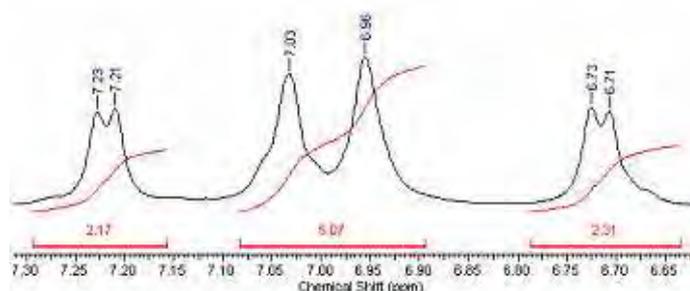
7.1.2 Caracterización del compuesto **1**

Una vez que se obtuvo el compuesto se envió a registro de espectros de masas, infrarrojo y resonancia magnética protónica. En el espectro de masas se obtuvo un ión molecular de $m/z = 282$, lo que confirma la existencia de la molécula esperada con una abundancia relativa cercana al 75%. Para el espectro de infrarrojo se muestran las siguientes vibraciones características de la molécula: 3355 cm^{-1} banda ancha característica del hidroxilo fenólico, 3206 cm^{-1} vibración de N-H, 1626 cm^{-1} vibración C-N, 1466 cm^{-1} y 1568 cm^{-1} vibraciones de C=C evidentes del anillo aromático. En el caso del espectro de RMN-¹H, se observan las siguientes señales: a 9.23 ppm, se observa una señal ancha debido al hidrogeno H₁₅ del hidroxilo. A 7.22 ppm se observa un doblete de los protones H₁₄, con una J= 8 Hz y equivalente a dos protones; en 7.03 ppm los protones H_{4,8} se encuentran representados por una señal ancha que abarca los hidrógenos de la amina y un hidrógeno del anillo de quinazolina; a 6.96 ppm los hidrógenos H_{5,7} de la quinazolina presentan una señal ancha; a 6.72 ppm los hidrógenos H₁₃ equivalentes en el anillo aromático, muestran un doblete

con $J = 8$ Hz; a 5.70 ppm esta el hidrógeno H_6 de la amina que forma el "linker"; en 5.51 ppm se encuentran los hidrógenos H_2 de la amina de quinazolina; a 4.13 ppm los hidrógenos $H_{11a, 11b}$ son los del metileno que se acoplaron con el hidrógeno de la amina en la posición 6 del anillo de quinazolina, por ello se presenta un doblete con $J = 4$ Hz. Con esto se corrobora que la estructura, correspondiente al compuesto de interés y por lo tanto se confirma su obtención.



(a)

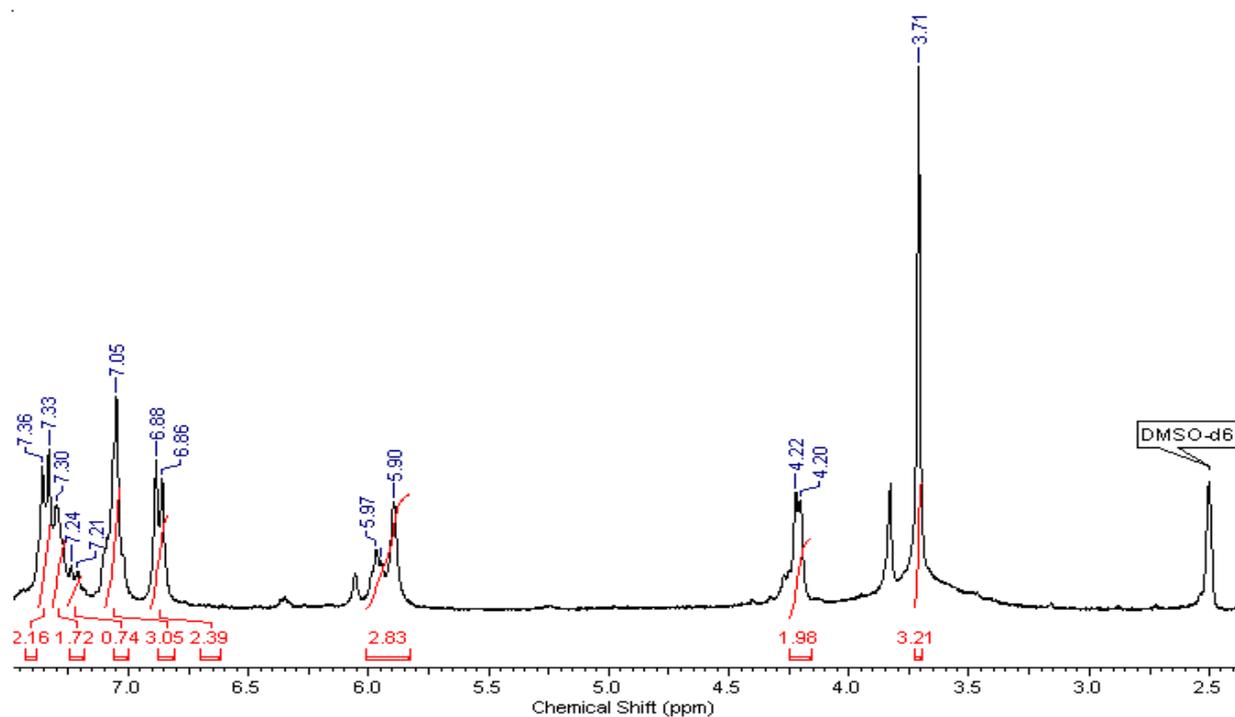


(b)

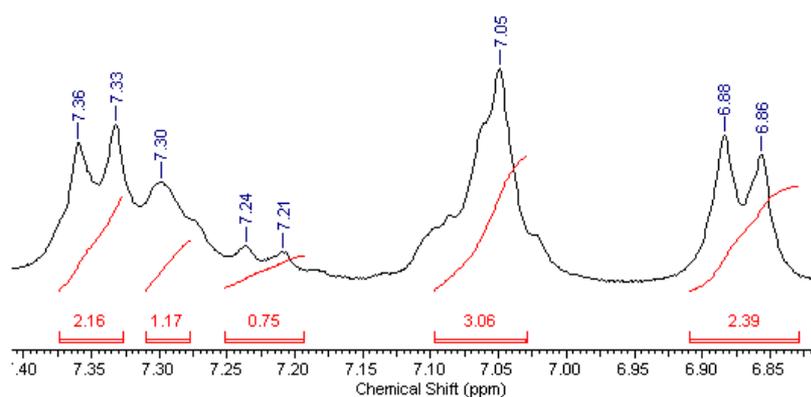
Fig. 20 (a) Asignación de la señales en RMN para compuesto **1** y (b) ampliación

7.1.3 Caracterización del compuesto **2**

La espectrometría de masas mostró el ión molecular con $m/z = 296$, con una abundancia relativa cercana al 100%, el cual corresponde con el peso del compuesto de interés. El espectro de infrarrojo mostró las siguientes señales que ayudan a identificar la estructura: 3450 cm^{-1} y 3328 cm^{-1} corresponden a la vibración de N-H; 1639 cm^{-1} C-N, 1469 cm^{-1} y 1563 cm^{-1} vibración C=C de sistema aromático; 1243 cm^{-1} C-O-C del metoxilo. La espectroscopía de RMN- ^1H muestra: a 7.35 ppm un doblete de los protones H_{14} , del anillo aromático con una constante de acoplamiento $J=8\text{ Hz}$, a 7.30 ppm se muestra como señal ancha, el hidrogeno H_8 de quinazolina, en 7.23 ppm se observa un doblete debido a que se acoplan, el protón H_7 y el protón H_8 del anillo de quinazolina, con una $J= 12\text{ Hz}$, a 7.05 ppm, se muestra una señal ancha debido a que se empalman las señales de los hidrógenos H_5 de la quinazolina y H_4 de la amina unida al núcleo de quinazolina; a 6.87 ppm los protones H_{13} del anillo aromático se registran como un doblete, con $J = 8\text{ Hz}$; en 5.97 ppm, se observa una señal ancha del hidrogeno H_6 de la amina constituyente del "linker"; en 5.90 ppm se encuentra un singulete correspondiente a los hidrógenos H_2 de una de las aminas del anillo de quinazolina; a 4.21 ppm se encuentra un doblete correspondiente a los hidrógenos $\text{H}_{11a, 11b}$ del metileno, con una $J= 8\text{ Hz}$; a 3.71 ppm se registró un singulete que corresponde a los protones H_{16} del metoxilo. Esto nos confirmó que el compuesto que se obtuvo corresponde a la estructura esperada.



(a)



(b)

Fig. 21 (a) Espectro de RMN-¹H para el compuesto **2** y (b) ampliación de zona central

7.1.4 Caracterización del intermediario para el compuesto 3

La espectrometría de masas por el método de FAB, nos reveló un ión molecular con $m/z = 366$, el cual corresponde al intermediario. Para la espectroscopía de infrarrojo se muestran las siguientes señales: 3341 cm^{-1} vibraciones N-H y O-H; 1668 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} vibraciones de C=O, 1483 cm^{-1} y 1590 cm^{-1} correspondientes a la vibración C=C de sistema aromático. La RMN-¹H mostró las siguientes señales: a 10.46 ppm el hidrógeno H₄ y 10.20 ppm el hidrógeno H₂ se muestran como singuletes

anchos; a 9.36 ppm el hidrógeno H₁₈ del hidroxilo se observa como una señal ancha; a 7.48 ppm el hidrógeno H₈ se muestra como un doblete debido al acoplamiento con el protón H₇, con una J= 12 Hz; en 7.39 ppm el hidrógeno H₇ aparece como un doble de dobles, debido a su acoplamiento con el hidrogeno 5 y el hidrógeno 8 con J_{H5}= 4 Hz y J_{H8} =10 Hz, respectivamente; con un desplazamiento de 7.13 ppm el hidrogeno H₂₀ se observa como un triplete debido al acoplamiento con los hidrógenos H₁₉ y H₂₁ del anillo aromático con una J= 8 Hz; a 7.03 ppm el hidrogeno H₅, muestra un doblete debido a que se acopla con el hidrogeno H₇, con una J= 4 Hz; a 6.83 ppm, se encuentra una señal ancha del protón H₁₉, del anillo aromático; en 6.81 ppm el hidrógeno H₂₁, se observa como una señal ancha; a 6.65 ppm se observa el protón H₁₇, como otra señal ancha, esto confirma la presencia del sistema aromático; en 6.63 ppm hay una señal ancha debido al protón H₆, de la amina que forma el "linker"; a un desplazamiento de 4.30 ppm los hidrógenos H_{15a}, _{15b}, del metileno se observan como un doblete, debido a que se acoplan con el hidrógeno de la amina, con una J= 4; a 2.44 ppm y 2.18 ppm se encuentran los hidrógenos H₁₄ y H₁₂, respectivamente, que corresponden a los acetilos. Con esto se confirma la estructura de el compuesto de interés.

7.1.5 Caracterización del compuesto **3**

La espectrometría de masa por el método de FAB, nos mostró un ión molecular de m/z = 282, con una abundancia relativa cercana al 100%, este dato corresponde al peso del compuesto buscado. Para el espectro de infrarrojo se observan las siguientes señales características: 3337 cm⁻¹ señal ancha de O-H, 3203 cm⁻¹ señal de vibración N-H, 1628 cm⁻¹ correspondiente a al vibración de C-N, 1487 cm⁻¹ y 1588 cm⁻¹ debido a las vibraciones de C=C para aromáticos. La resonancia magnética nuclear de protón presenta las siguientes señales: a 9.50 ppm se observa una señal ancha del hidrogeno H₁₄ correspondiente al hidroxilo; a 7.11 ppm hay un triplete que corresponde al hidrogeno H₁₆, del anillo fenólico; a 7.04 ppm se observa una señal ancha que incorpora a los hidrógenos H₇ y H₈ del núcleo de quinazolina y los hidrógenos H₄ de una de la aminas; en 6.95

ppm, se ve un singulete del hidrogeno H₅ de quinazolina; en 6.83 ppm y 6.81 ppm se encuentran singuletes, de los protones H₁₅ y H₁₃, correspondientes a la porción aromática; a 6.61 ppm se observa un doblete debido al hidrógeno H₁₇ que se acopla con el protón H₁₆ con una J = 8 Hz; con un desplazamiento químico de 5.91 ppm se aprecia un triplete con una J = 5.56 Hz, del hidrógeno H₆ de la amina que forma el "linker"; a 5.61 ppm se registró un singulete debido a los hidrógenos equivalentes H₂, de la amina libre en la posición 2 de quinazolina; a 4.18 ppm se observa un doblete con una J = 5.58 Hz debido a los hidrógenos H_{11a}, H_{11b}, del metileno en el "linker". Con esto se corrobora la estructura esperada para el compuesto **3**.

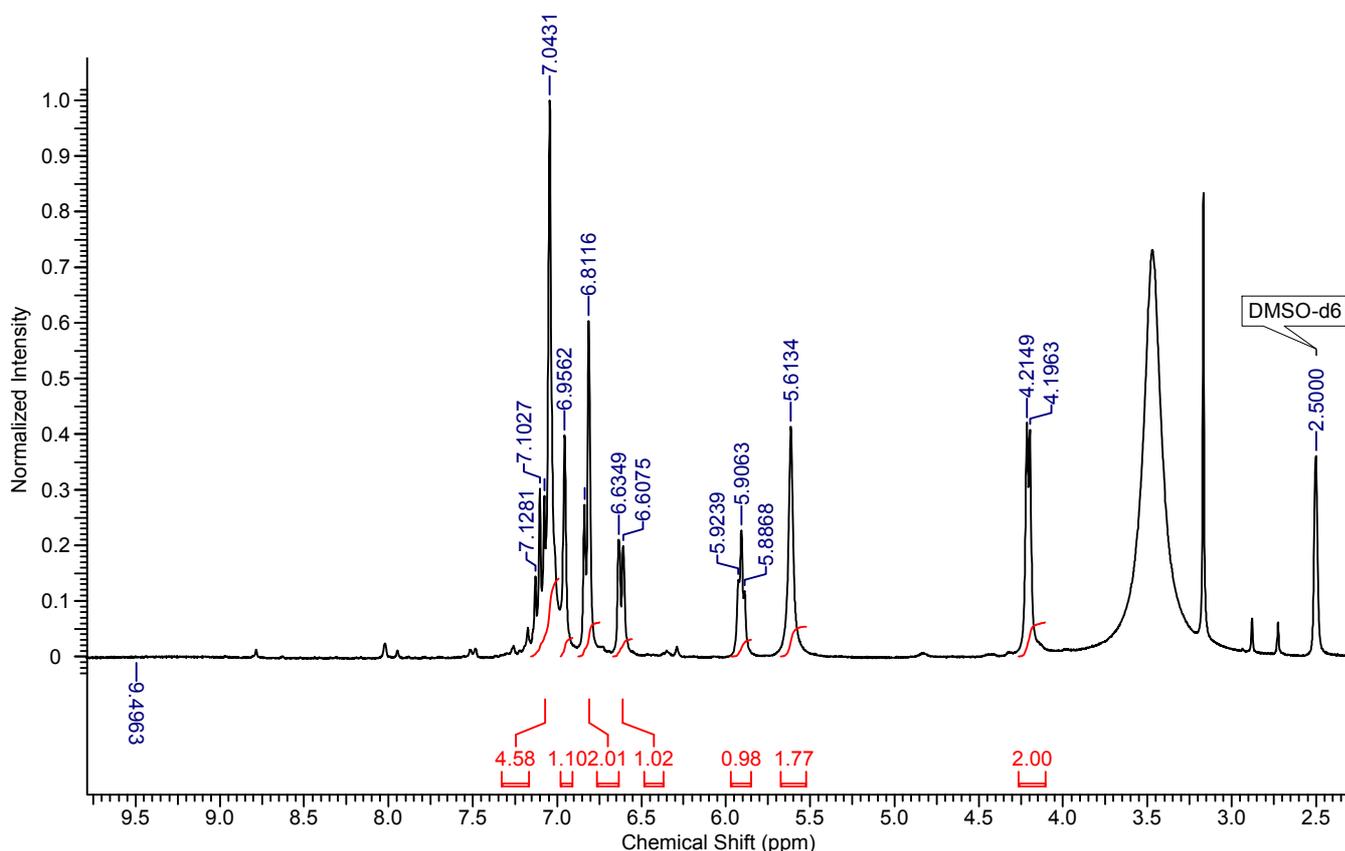


Fig 22. Espectro de RMN ¹H para el compuesto 3.

7.2 Pruebas Biológicas.

Como se puede apreciar en las gráficas, el compuesto que se propuso como análogo, de la estructura reportada por Khabnadideh *et al*, no es el que conserva la mejor actividad antiparasitaria, ya que el derivado que

tiene el metoxilo **2** supera, tanto a los controles (**Nfr** y **Bzn**) como a **1** (Gráfica 1). De la misma forma, el compuesto **3**, el cual tiene el hidroxilo en la posición meta, muestra un incremento en la actividad tripanocida, con relación a **1** (Gráfica 1). Por otro lado, se probaron los intermediarios obtenidos, los cuales al compararlos con los controles, mostraron una actividad antiparasitaria aceptable; se observó que mantienen la tendencia en la que el **intermediario 1** es ligeramente más activo que el **intermediario 3** (Gráfica 2). Se observa la tendencia, que sitúa al compuesto **1**, como el menos activo, seguido del compuesto **3** y por ultimo el compuesto **2**, el cual tiene la mayor actividad antiparasitaria (Gráfica 1). Este comportamiento se mostró sólo para la cepa INC-5. Para la cepa NINOA, la mayoría de los compuestos no mostraron un buen efecto antiparasitario, excepto el compuesto **2** (Gráfica 3), el cual presentó una $CI_{50} = 324.98 \mu M$, superando a los controles.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este proyecto se exploró la actividad tripanocida de los compuestos **1**, **2** y **3**, diseñados por estudios de acoplamiento molecular como inhibidores de la dihidrofolato reductasa. Con el estudio computacional de esta enzima y apoyándonos en la literatura, se corroboró cómo interactúa dicho compuesto con el sitio activo de la DHFR; esto nos permitió proponer dichas modificaciones, buscando que los compuestos sólo inhibieran o interactuaran con la DHFR del *T. cruzi*, ya que los mamíferos, entre ellos los humanos; poseen la misma enzima con diferencias pequeñas pero significativas y que permiten darle selectividad a los compuestos.

Una vez que establecimos nuestro objetivo, se propuso la ruta de síntesis la cual aprovechó la experiencia en la síntesis de quinazolina que se tiene dentro de nuestro grupo de trabajo. Para posteriormente realizar una aminación reductiva para poder obtener los compuestos propuestos. Para esto, primeramente se protegieron las aminas de las posiciones 2 y 4 de la triamínquinazolina y se obtuvieron los correspondientes intermediarios acetilados. Para poder obtener los compuestos de interés se tuvo que llevar a cabo una aminación reductiva, que consiste en una serie de reacciones las cuales involucran la formación de una imina en medio ácido y la posterior reducción de la misma. Posteriormente se desprotegieron las aminas de la triamínquinazolina. Después se procedió a la purificación de los compuestos de interés así como de los intermediarios, en este punto no se definió una técnica particular ya que se probaron diferentes métodos entre los cuales se encuentran: cromatografía en columna abierta, cromatografía flash, recristalización por par de disolventes, extracción, etc. Sólo se evaluaron los compuestos que se lograron aislar, esto debido a que para el compuesto **2**, el intermediario se presentaba en bajos rendimientos y para optimizar la obtención del mismo sin el aislamiento, se decidió realizar las dos reacciones consecutivamente.

Para la parte biológica se utilizaron las cepas NINOA e INC-5, aisladas en México. La primera se aisló de un caso agudo en Oaxaca, la segunda se aisló de un caso crónico en una comunidad de Guanajuato. Cabe mencionar

que estas cepas muestran baja sensibilidad al **Nfr** y **Bzn**, fármacos que se emplean actualmente en la quimioterapia para la enfermedad de Chagas. De ahí la importancia de usar estas cepas en la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios. A pesar de que los **intermediarios 1 y 3** no se sometieron al estudio de acoplamiento molecular, se evaluaron *in vitro* debido a la insolubilidad acuosa de los compuestos **1, 2 y 3**.

Como se puede observar en las graficas 1 y 3 el compuesto **2** mostró actividad contra ambas cepas; es importante destacar que se muestra una correlación entre los datos teóricos arrojados por el acoplamiento molecular (docking), en particular el momento dipolar y la actividad biológica de este compuesto.

Una posible razón de su actividad puede deberse al momento dipolar de 2.9035 d que posee **2**, el cual es menor comparado con los otros compuestos evaluados en este trabajo. Con base en trabajos previos, dentro de nuestro grupo de investigación se señaló que los compuestos con momento dipolar cercano a 3 d, tienen buena afinidad por la DHFR. Esto nos indica que el momento dipolar puede jugar un papel importante en la actividad biológica del compuesto. Retomando los resultados teóricos del acoplamiento molecular (Tabla 2) en donde los compuestos muestran una K_d (constante de disociación) y una ΔG (energía de unión) que de manera teórica indican que tan afín es el ligando por el receptor, en mi caso los compuestos poseen una K_d y ΔG que apuntan a que estos tendrán una buena interacción con la DHFR de *T. cruzi*, sin embargo debido a que son muy similares no me proporciona una razón para la diferencia de actividad biológica en mis compuestos, teóricamente lo único que proporciona una diferencia significativa, es el momento dipolar, ya que este parámetro señala la misma tendencia que se observa en los resultados *in Vitro*, esto podría justificar el comportamiento en la actividad mostrada por los compuestos, debido a un mejor acomodo en el sitio activo y a su vez una mayor interacción con el mismo; por ello a pesar de que todos los

compuestos tienen actividad tripanocida aceptable, sólo uno de ellos destaca.

Finalmente:

- ✓ Se realizó la síntesis y caracterización espectroscópica de los compuestos propuestos y sus intermediarios.
- ✓ Se acepta la hipótesis planteada, sustentándola en los resultados de la evaluación biológica para los compuestos obtenidos.
- ✓ En la parte química, se concluye que la metodología seguida fue apropiada, ya que nos permitió obtener los compuestos en un rendimiento moderado.
- ✓ Al evaluar la actividad biológica de los compuestos obtenidos, el líder es el **compuesto 2**, ya que muestra mejor actividad tripanocida que los controles y que el resto de los compuestos sintetizados.
- ✓ Observamos que hay que tomar en consideración más factores que la afinidad por una enzima (K_d y ΔG), para poder decir que un compuesto será activo.
- ✓ Los compuestos diseñados, teóricamente mostraban la misma actividad biológica basada en la afinidad por la enzima, pero las variaciones estructurales pueden influir en la actividad antiparasitaria.
- ✓ Cambiar la posición del hidroxilo no produce una gran variación de la actividad biológica, lo cual ocurre al introducir el metoxilo.
- ✓ Este trabajo no termina con los resultados que se presentan ya que los compuestos que se obtuvieron se pueden optimizar, a tal grado que pueden llegar a ser buenos candidatos para tratar la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalli, A., Bolognesi, M.L. **Journal of Medicinal Chemistry** DOI: 10.1021/jm9004835
2. www.who.int/tdr
3. Gilbert, H. I. **Biochimica Biophysica Acta** (2002) 1587; 249-257
4. Urbina, J. A., Docampo, R. **Trends in Parasitology** (2003) 19; 495-501
5. Tyler, K., Engman, D.M. **Journal of Parasitology** (2002) 31; 472-481.
6. Botero, D., Restrepo, M. **Human Parasitosis** (2003), 4^a ed., Corporation for Biologycals Research `s. 213
7. Lanzer, M., Gross, U., Moll, H **Parasitology Today** (1997) 13; 1-3
8. Gonzáles, L.B. **OFFARM** (2003) 22; 64-70
9. Kompis, I.M., Islam, K., Then, R.L., **Chemical Review** (2005) 105; 593-620
10. Satish, P., Ramachandra, R., Avadhesha, S., Namita, S. **Molecular and Cellular Biochemistry** (2003); 253: 55-63
11. William, S.G. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists** (1969) 20; 173-184
12. Still W.C., Kahn M., Mitra A. **Journal of Organic Chemistry** (1978) 43; 2923-2925
13. Aviva, G. **Pesticides and You Beyond Pesticides/National Coalition Against the Misuse of Pesticides** (2004) 24; 12-17
14. Sirawaraporn, W., Sertsrivanxhi, R., Booth, R.G., Hansch, C., Neal, R. A., Santi, D.V. **Molecular Biochemical Parasitology** (1988) 31; 79
15. Chowdhury, S.F., Villamor, V.B., Guerrero, R.H., Leal, I., Brun, R., Croft, S.L., Goodman, J.M., Maes, L., Riuz-Perez, L.M., Pacanowska, D.G., Gilbert, I.H. **Journal of Medicinal Chemistry** (1999) 42; 4300-4312

16. Berman, J.D., King, M., Edwards, N. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** (1989) 33; 1860-1863
17. Zocchetto, F., Martin, A.C.R., Laskowski, R.A., Thornton, J.M., Gilbert, I.H. **Journal Computer Aided Molecular Design** (1998) 12; 241-257.
18. Hardy, L.W., Matthews, W., Nare, B., Beverley, S.M. **Experimental Parasitology** (1997) 87; 157-169
19. Khabnadideh, S., Pez, D., Musso, A., Brun, R., Ruiz-Pérez, L.M., Pacanowska, D.G., Gilbert, H.I. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** (2005) 13; 2637-2649
20. Cavazzuti, A., Paglietti, G., Hunter, W.N., Gamarro, F., Piras, S., Loriga, M., Alleca, S., Corona, P., McLuskey, P., Tulloch, L., Gibellini, F., Ferrari, S., Costi, M.P. **PNAS** (2008) 105; 1448-1453
21. Mendoza, M.C. Tesis de Maestría. Síntesis, evaluación biológica y estudios in silico de moléculas diseñadas como híbridos contra Trypanosoma cruzi. UNAM. 2009
22. Base de datos, CHAGMEX, <http://unibio.unam.mx/chagmex/>, (Accesado agosto 2009)
23. Technical Report Series About Neglected tropical diseases, Geneva: World Health Organization; 2002, http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index6.html (Accesado agosto 2009)
24. <http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview> (Accesado agosto 2009)
25. Magallon, G.E. **Acta Tropical** (2006) 97; 331-338
26. Mottier, L., Alvarez, L., Ceballos, L., Lanusse, C. **Experimental Parasitology** (2006) 113; 49-57
27. Chowdhury, S.F., Lucrezia, R., Guerrero, R.H., Brun, C.R., Goodman, J., Ruiz-Perez, L., Pacanowska, D.G., Gilbert, I.H. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** (2001) 11; 977-980
28. White, N.J., Olliaro, P.L. **Parasitology Today** (1996) 12; 399-401

29. Boiani, L., Aguirre, G., Gonzalez, M., Cerecetto, H., Chidichimo, A., Cazzulo, J., Bertinaria, M., Guglielmo, S. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** (2008) 16; 7900–7907
30. Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M., Bendig, M. **Drug Discovery/ Nature Reviews** (2005) 4; 727-740

APÉNDICE I PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

-Para la evaporación del solvente a presión reducida se utilizó un rotaevaporador marca Buchi modelo R-114 con baño acoplado a bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V47-6528DX, enfriador marca VWR WScientific modelo 1107 y bomba de vacío marca Vacubrand modelo PC610 con regulador de vacío integrado.

-Para la determinación de puntos de fusión se utilizó un Fisher marca BÜCHI modelo B-540 con capilares de vidrio.

-La hidrogenación catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación Marca PARR modelo 3916 EG adaptado a un tanque de hidrógeno de la casa INFRA.

-La determinación de los espectros de Masas, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación) Facultad de Química UNAM.

- ❖ RMN (SOLUCION-DMSO). Marca Varian, Modelo BNMRS-400 MHZ.
- ❖ IR-PASTILLA(KBr). Marca Perkin-Elmer, Modelo Spectrum RXI.
- ❖ EM. FAB. Bombardeo con iones de Cesio. Temperatura de la cámara: menor a 50°C. Detección de iones: Positivos. Marca: Thermo-Electrón. Modelo DFS (Double Focus Sector). Analizador másico: Doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa).

Cromatografía.

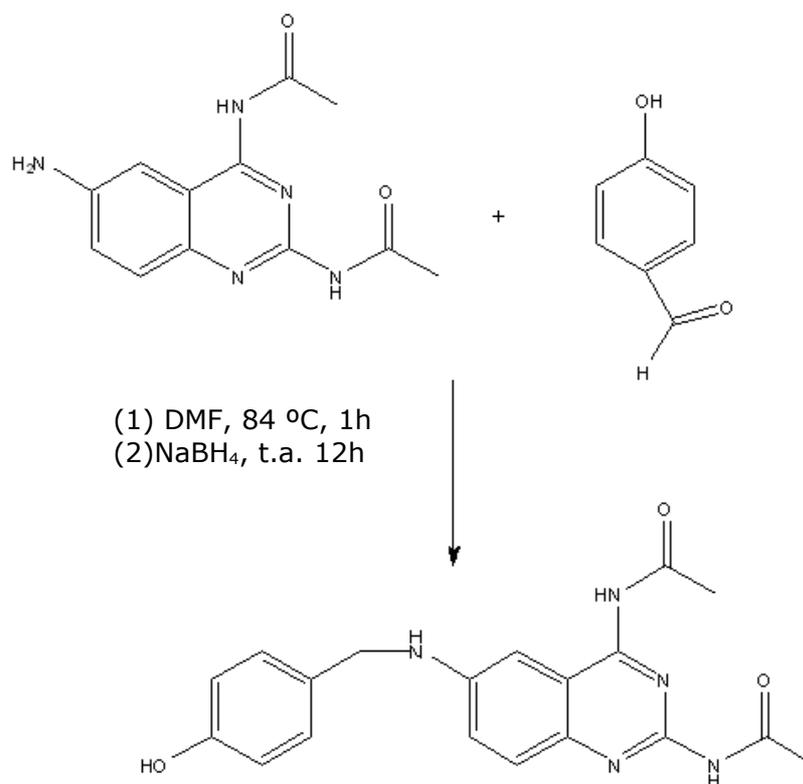
Para el monitoreo de las reacciones así como para verificar la pureza de los productos se utilizó cromatografía en capa fina.

Sistemas de elución.

| Tipo de Sistema. | Composición. |
|------------------|----------------------------------|
| Sistema I | CHCl ₃ , MeOH (80:20) |
| Sistema II | CHCl ₃ , MeOH (70:30) |
| Sistema III | CHCl ₃ , MeOH (90:10) |
| Sistema IV | CHCl ₃ , MeOH (95:5) |

Síntesis de Síntesis de *N*-[2-(acetilamino)-6-[4-hidroxibenzaldehído]quinazolina-4-il]acetamida

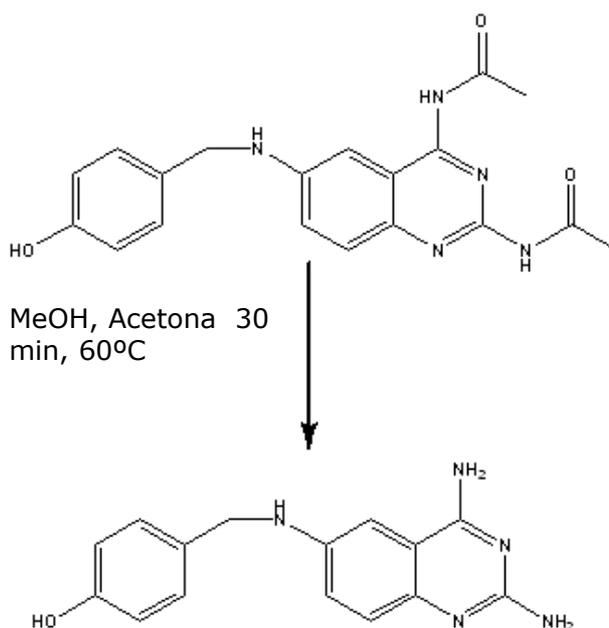
APÉNDICE I PARTE EXPERIMENTAL



En un matraz bola de 50 mL, equipado con una columna vigreux, agitación magnética, atmósfera de N₂ y parrilla de calentamiento, se colocaron 0.2935g (0.001132 mol) de N, N'-(6-aminoquinazolina-2,4-il) diacetamida, con 0.1829g (0.001497 mol) de 4-hidroxibenzaldehído, 1.5 mL de DMF y una gota de ácido acético burbujeado de nitrógeno. Toda la mezcla se llevó a una temperatura de 84 °C por una hora. Al termino de la reacción se procedió a colocar 0.0845 g (0.002233 mol) de NaBH₄, para la adición se mantuvo en un baño de hielo la reacción y con agitación vigorosa se agregó lentamente el borohidruro de sodio, al termino de la misma se dejo la reacción a temperatura ambiente por 12 horas. Al finalizar se evapora la DMF con el rotaevaporador y se adiciona agua fría y se deja con agitación vigorosa por 20 min, después se filtra al vacío el precipitado obtenido y se lava repetidas veces con agua de hielo. Para la purificación se prepara una columna abierta, en la cual se emplea cloroformo como primera fase móvil, después se utiliza un gradiente de polaridad con cloroformo:metanol (99:1 y 98:2), el polvo obtenido después de evaporar la fase móvil se lava repetidas veces con éter. Se obtuvieron

0.2065 g (0.0005657 mol) de **(Intermediario 1)**, 49.9% de rendimiento, R.f. 0.62 sistema I, p.f. 115 -117 °C.

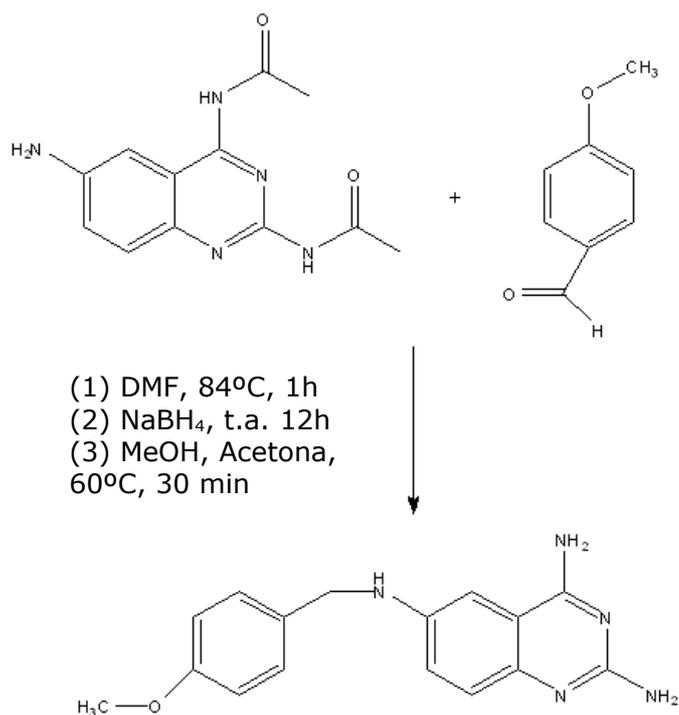
Síntesis de N⁶-(4-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina **1**.



En un matraz de 50 mL provisto de una columna vigreux, parrilla de calentamiento, atmósfera de N₂ y agitación magnética, se adicionan 0.1033g (0.0002830 mol) del **(intermediario 1)**, 20 mL de metanol y se calentó a 60 °C por 30 min. Al termino se evapora el metanol con ayuda de un rotaevaporador y se adiciona agua fría. El precipitado formado se filtra al vacío y se lava varias veces con éter. Se obtuvieron 0.0816g (0.0002904 mol) de un polvo amarillo (**compuesto 1**), con 79 % de rendimiento, R.f. de 0.65, sistema II, p.f. 192 °C.

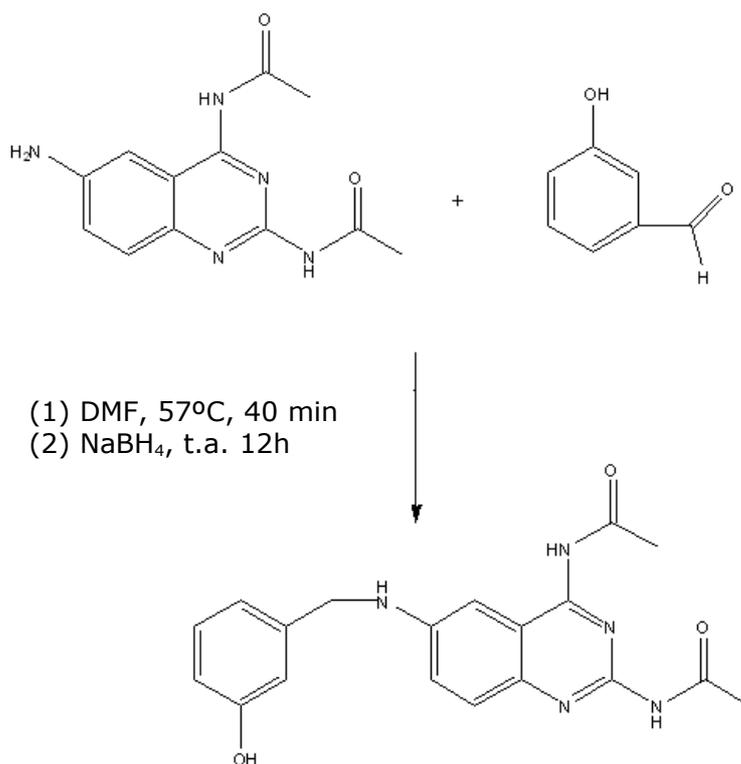
Síntesis de Síntesis de N⁶-(4-metoxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina **2**.

APÉNDICE I PARTE EXPERIMENTAL



En un matraz bola de 50 mL, equipado con columna vogreaux, parrilla de calentamiento, agitación magnética y atmósfera de N₂, se colocan 0.5205g (0.002007 mol) de N, N'-(6-aminoquinazolina-2,4-il) diacetamida, junto con 0.3289g (0.002416 mol) de 4-metoxibenzaldehído, 1.5 mL de DMF y finalmente se agrega una gota de ácido acético previamente burbujeado con N₂, esta mezcla se calienta a 84 °C por una hora. Al finalizar se realiza la reducción con 0.1519g (0.004015 mol) de borohidruro de sodio, la adición se realiza en un baño de hielo y al termino de ésta se deja 12 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo se evaporo la DMF con ayuda del rotaevaporador, se adiciona agua fría y se agita vigorosamente por 20 min, el precipitado se filtra al vacío después se adiciona a otro matraz bola de 50 mL con el mismo equipo que el primero y se le vertien 20 mL de metanol; posteriormente se calienta hasta 60 °C por 30 min. Al concluir el tiempo se evapora el metanol en el rotaevaporador y se agrega agua fría, el precipitado se filtra al vacío y se lava repetidas veces con éter. Se obtuvieron 0.2905g (0.0009847 mol) de un polvo amarillo (**compuesto 2**), con 40% de rendimiento, R.f. de 0.73 sistema I y p.f. 152.1-153.1 °C.

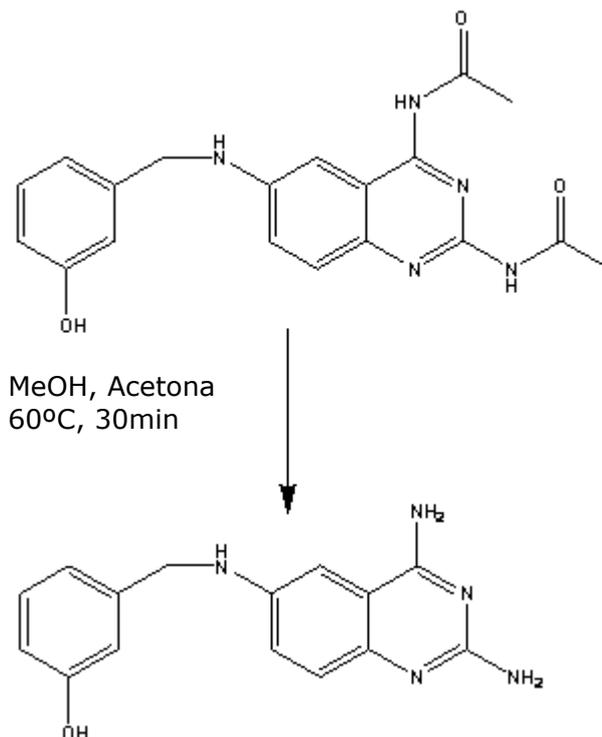
Síntesis de N-[2-(acetilamino)-6-[3-hidroxibenzaldehído]quinazolina-4-il]acetamida



En un matraz de bola de 50 mL, provisto de una columna vigreux y en atmósfera de N₂, se colocan 0.4996g (0.001928 mol) de N, N'-(6-aminoquinazolina-2,4-il) diacetamida, con 0.2633g (0.002156 mol) de 3-hidroxibenzaldehído, seguido de la adición de 1.5 mL de DMF. Al final se vierte una gota del ácido acético, es muy importante que éste se burbujee de N₂ antes de adicionarlo a la mezcla de reacción, la cual se pone en agitación magnética y a una temperatura de 57 °C durante 30 min. Después se lleva a cabo la reducción de la imina, para ello se adicionan 0.1463 g (0.003867 mol) de NaBH₄, esta adición se debe hacer en un baño de hielo, al termino, se deja a temperatura ambiente por una noche. Al concluir este tiempo se evapora la DMF con el rotaevaporador, se adiciona una solución saturada y fría de NaHCO₃, el precipitado amarillo se filtra y se lava con agua de hielo repetidas veces. Para su purificación se realizo una columna flash en la cual se usa primero cloroformo, con éste se lavó la columna tres veces, después se empleó una fase cloroformo:acetona 80:20. Se obtuvieron 0.4134g (0.001133 mol) de polvo amarillo

(Intermediario 3), rendimiento de 58.73%, R.f. 0.66, sistema I, p.f. 127 °C

Síntesis de N⁶-(3-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6- triamina **3**.



Se coloca en un matraz bola de 50 mL, al cual se le adaptan una columna vigreux, agitación magnética, parrilla de calentamiento y bajo atmósfera de N₂, 0.2 g (0.0005474 mol) del **intermediario 3**, se adicionan 20 mL de metanol y se lleva a una temperatura de 60 °C por 30 min. Al termino de este tiempo se evapora el metanol restante en el rotaevaporador y se adiciona agua de hielo, se filtra al vacío y el polvo obtenido se lava con éter repetidas veces. Se obtuvieron 0.1585 g (0.0005640 mol) de polvo amarillo (**compuesto 3**), con 80% de rendimiento, R.f. 0.7 sistema II, p.f. 218.5 °C.

APÉNDICE II. Pruebas Biológicas

La parte experimental correspondiente a este apartado fue realizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) a cargo del Dr. Benjamín Noguera Torres.

- Se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio de la ENCB-IPN.
- Se utilizó la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi* y el aislado INC-5 del Departamento de Parasitología de la ENCB.

Estas cepas se mantienen de tres formas:

- a) Medio de cultivo bifásico (base agar sangre con 10% de sangre de carnero y fase líquida BHI) y en BHI modificado (adicionado con solución de Lock, Hemina y SFB) con la finalidad de mantener las cepas en fase de epimastigotes.
- b) En triatomas infectados los cuales se alimentaron de ratones con la finalidad de obtener e infectar a estos con tripomastigotes metacíclicos.
- c) En ratones CD1 haciendo pases para mantener el parásito en la fase de tripomastigote sanguíneo.

Compuestos

- Cristal Violeta como control positivo
- Nifurtimox (LAMPIT, BAYER) y Benznidazol (ROCHAGAN, ROCHE) como los fármacos de referencia.
- Una serie de derivados sintetizados en esta tesis.

Métodos evaluación *in Vitro*

Obtención de tripomastigotes sanguíneos

Se obtuvo sangre por punción cardíaca de ratones infectados con la cepa NINOA y el aislado INC-5 con parasitemias altas (más de 4×10^6 parásitos/mL), utilizando HEPARINA como anticoagulante y solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) estéril para diluir la sangre a una concentración final de 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos/mL.

Para evaluar la probable actividad tripanocida de los compuestos se utilizó la sangre infectada con tripomastigotes a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL, donde 195 μ L fueron incubados con 5 μ L de los fármacos

(para una concentración final de 100, 50, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto). La incubación fue realizada en microplacas de 96 pozos a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Después de las 24 horas de incubación la reducción en el número de tripomastigotes (lisis parasitaria) se determinó usando el método de Pizzi. Los compuestos fueron disueltos en DMSO, la concentración final del solvente nunca excedió de 2.5%, una concentración no tóxica a parásitos ni células mamíferas.

Se determinó la concentración que causa el 100% de lisis de parásitos (CL100) para la cepa NINOA con cristal violeta, a través de un gradiente de concentraciones finales en placa que fueron desde 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con lo que se determinó que el control positivo fuera de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cristal violeta (causó el 100% de lisis) y el control de reactivos DMSO al 2.5% como concentración final en cada pozo, ambos controles fueron usados en todos los experimentos que se hicieron por triplicado para cada cepa y fármaco.

Cuenta de parásitos por el método de Pizzi

Se colectaron 5 μL de sangre de los ratones infectados haciendo un pequeño corte de la vena caudal, la sangre se depositó en un portaobjetos y se distribuyó uniformemente en el área del cubreobjetos. Se contaron 25 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40x, para el conteo se tomó en cuenta el número de campos posibles que se pudieran contar en esta área.

Determinación del porcentaje de lisis

Tomando en cuenta la cantidad de tripomastigotes sanguíneos presentes en el control negativo (sangre infectada sin fármaco) se determinó el porcentaje de lisis en función de la cantidad de parásitos que sobrevivieron en presencia del fármaco.

Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación in vitro y obtención del porcentaje de parásitos dañados

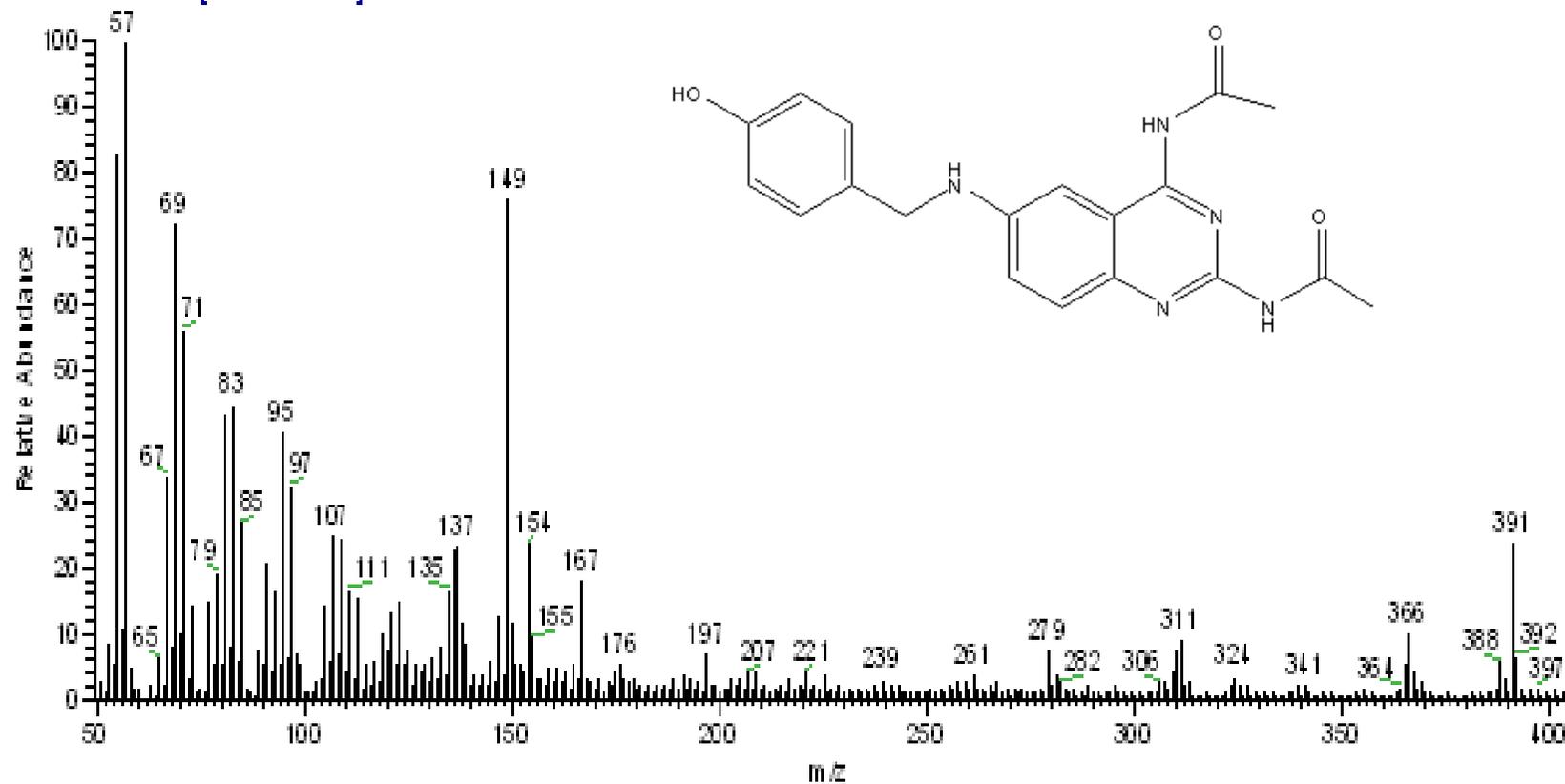
Después de la evaluación *in vitro* se realizaron extendidos de la sangre tratada (3 por cada tratamiento para la concentración de mejor actividad).

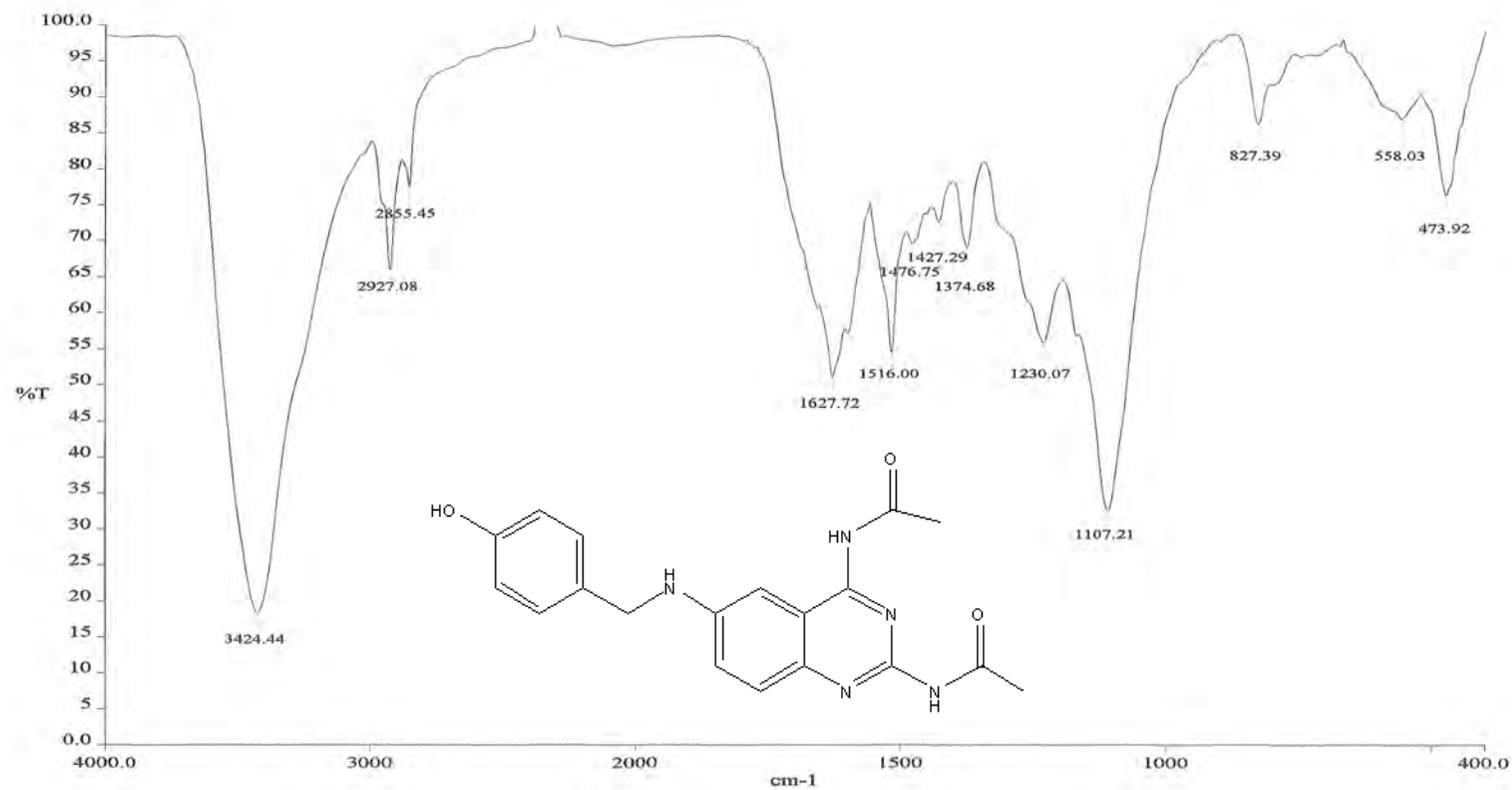
Estas extensiones se tiñeron con Giemsa (1:10) durante 30 minutos y posteriormente se observaron al microscopio a 100x para observar si hubo alteraciones morfológicas en los parásitos. Se contaron los tripomastigotes sanguíneos que presentaron algún daño citológico y se determinó el porcentaje de parásitos dañados.

APÉNDICE III ESPECTROS

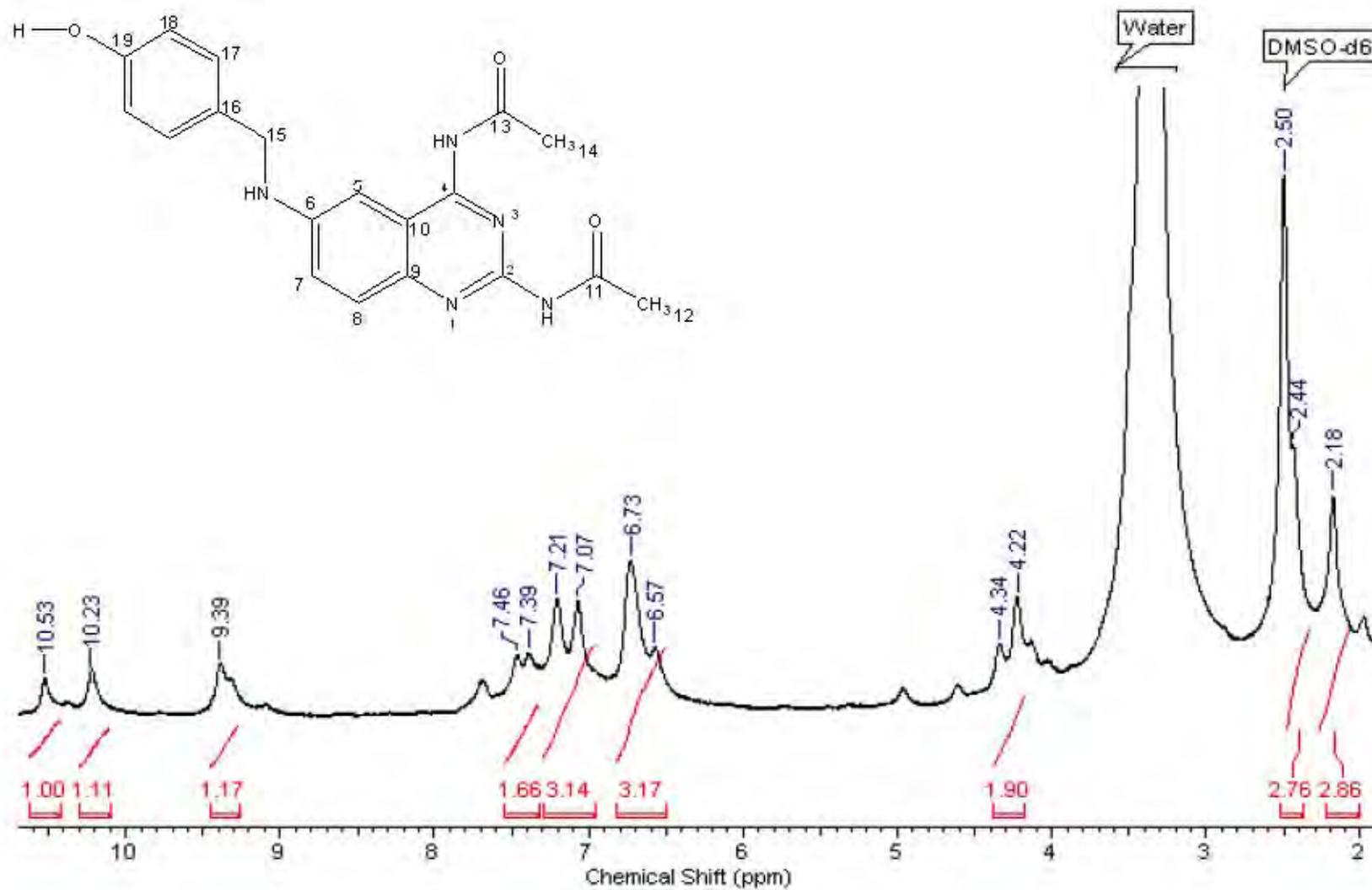
OT3426_1#1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.16E7
T: +c FAB Fullms [49.50-1000.50]

Intermediario 1

Espectro 1. Espectro de masas de de *N*-[2-(acetilamino)-6-[4-hidroxibenzaldehido]quinazolina-4-il]acetamida.



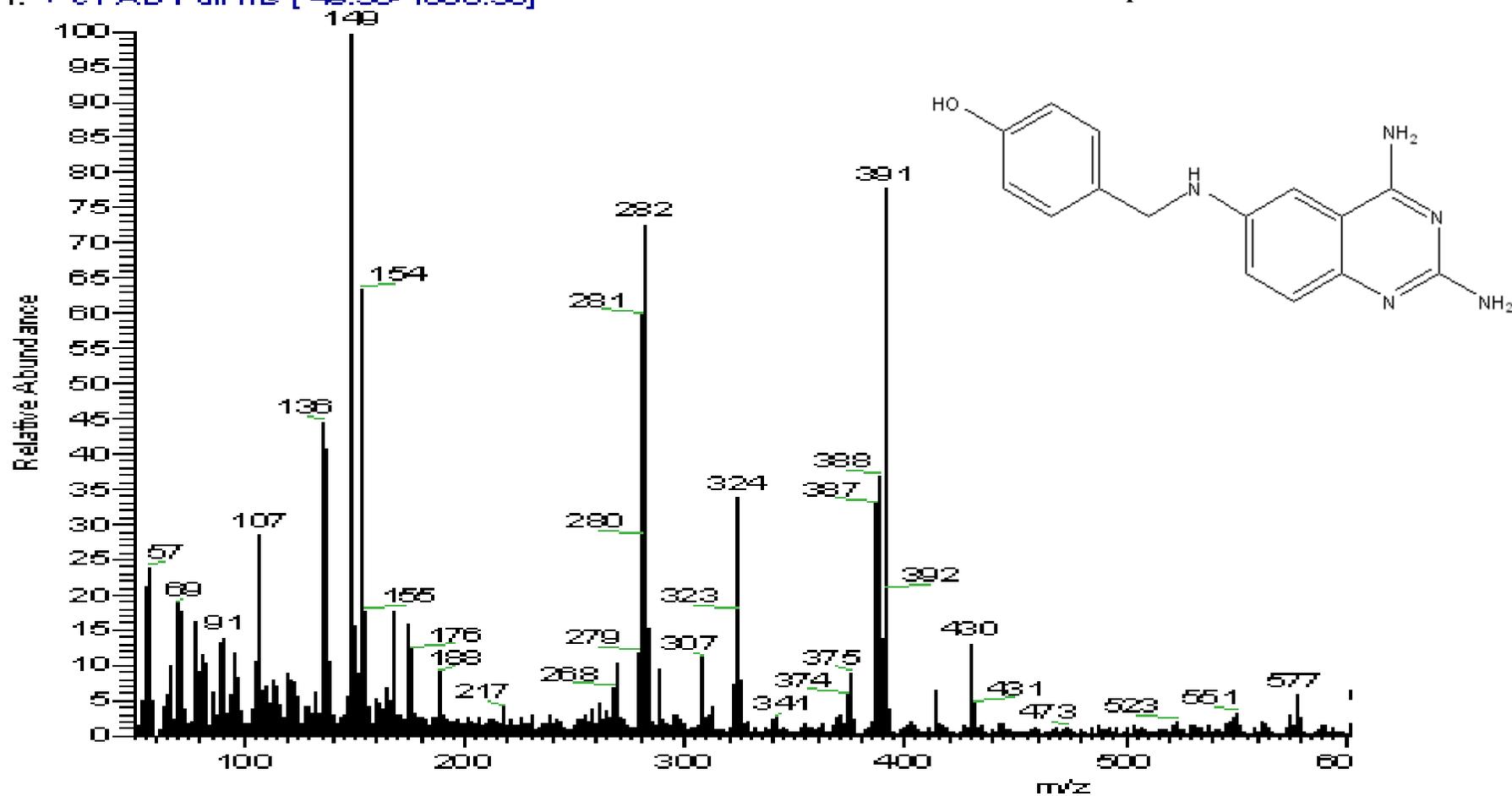
Espectro 2. Espectro de IR de *N*-[2-(acetilamino)-6-[4-hidroxibenzaldehido]quinazolina-4-il]acetamida.

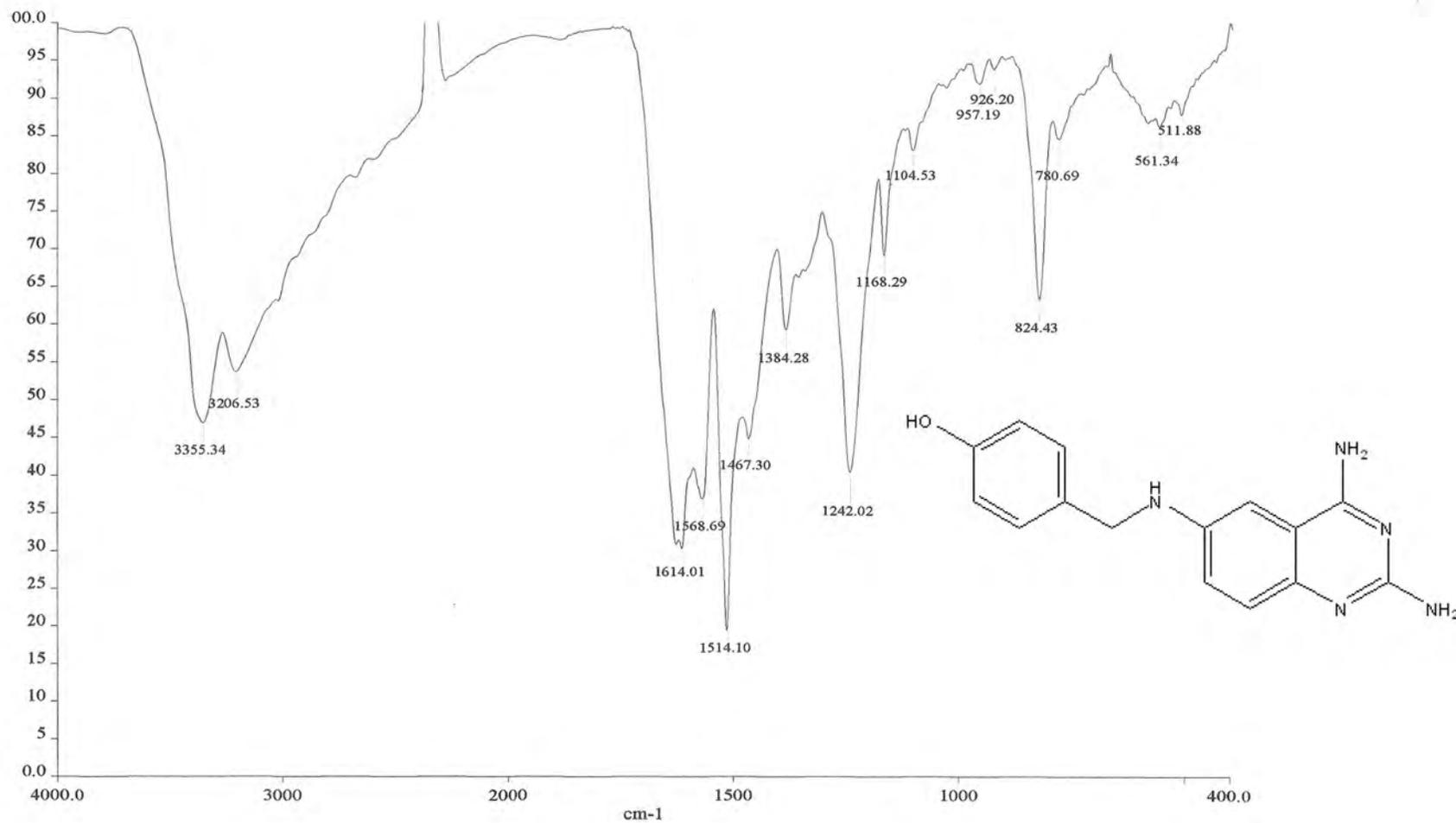


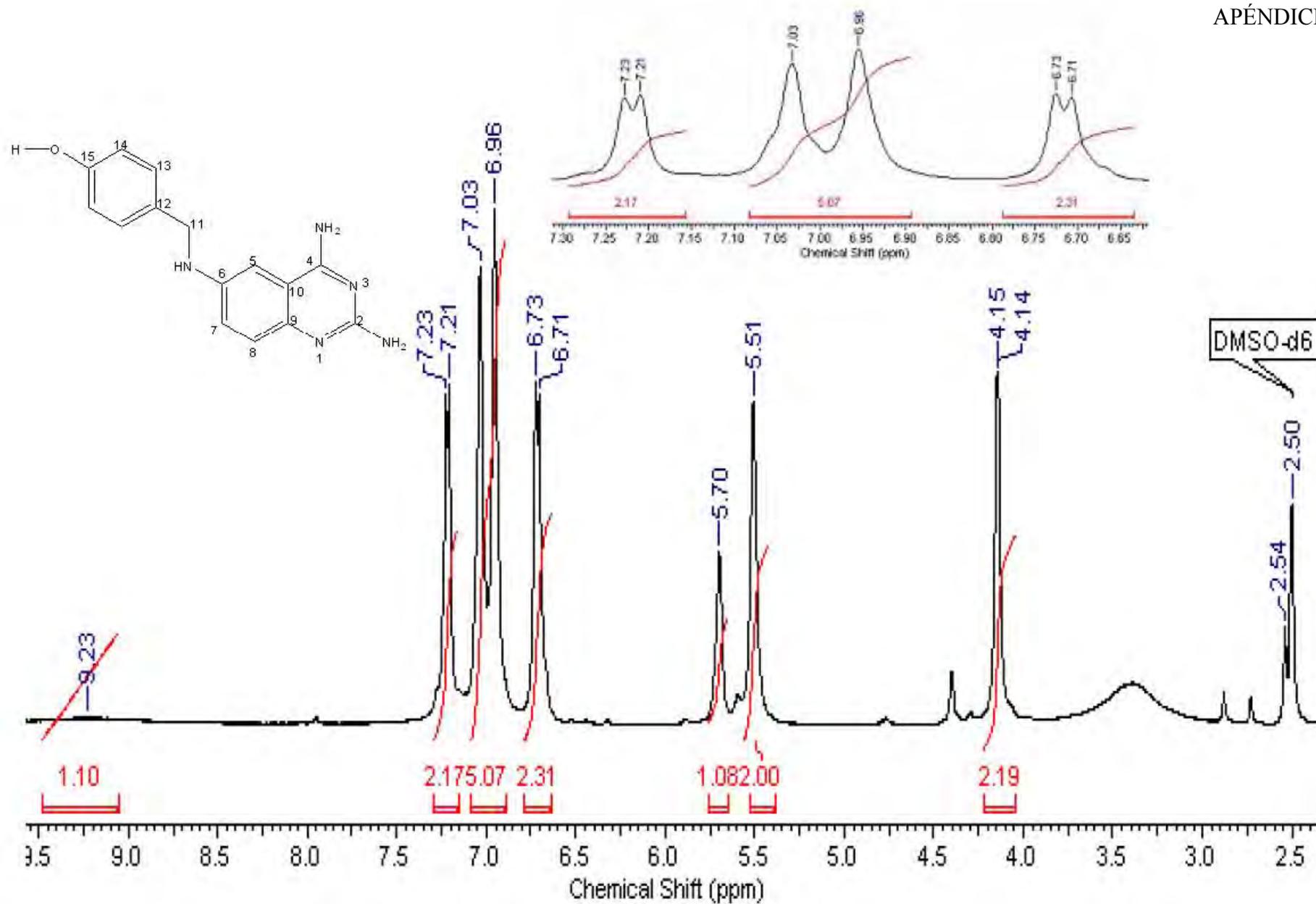
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H de *N*-[2-(acetilamino)-6-[4-hidroxibenzaldehido]quinazolina-4-il]acetamida.

OT3341_1#1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.46E6
T: + e FAB Full ms [49.50- 1000.50]

Compuesto 1

Espectro 4. Espectro de masa de N⁶-(4-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**1**).

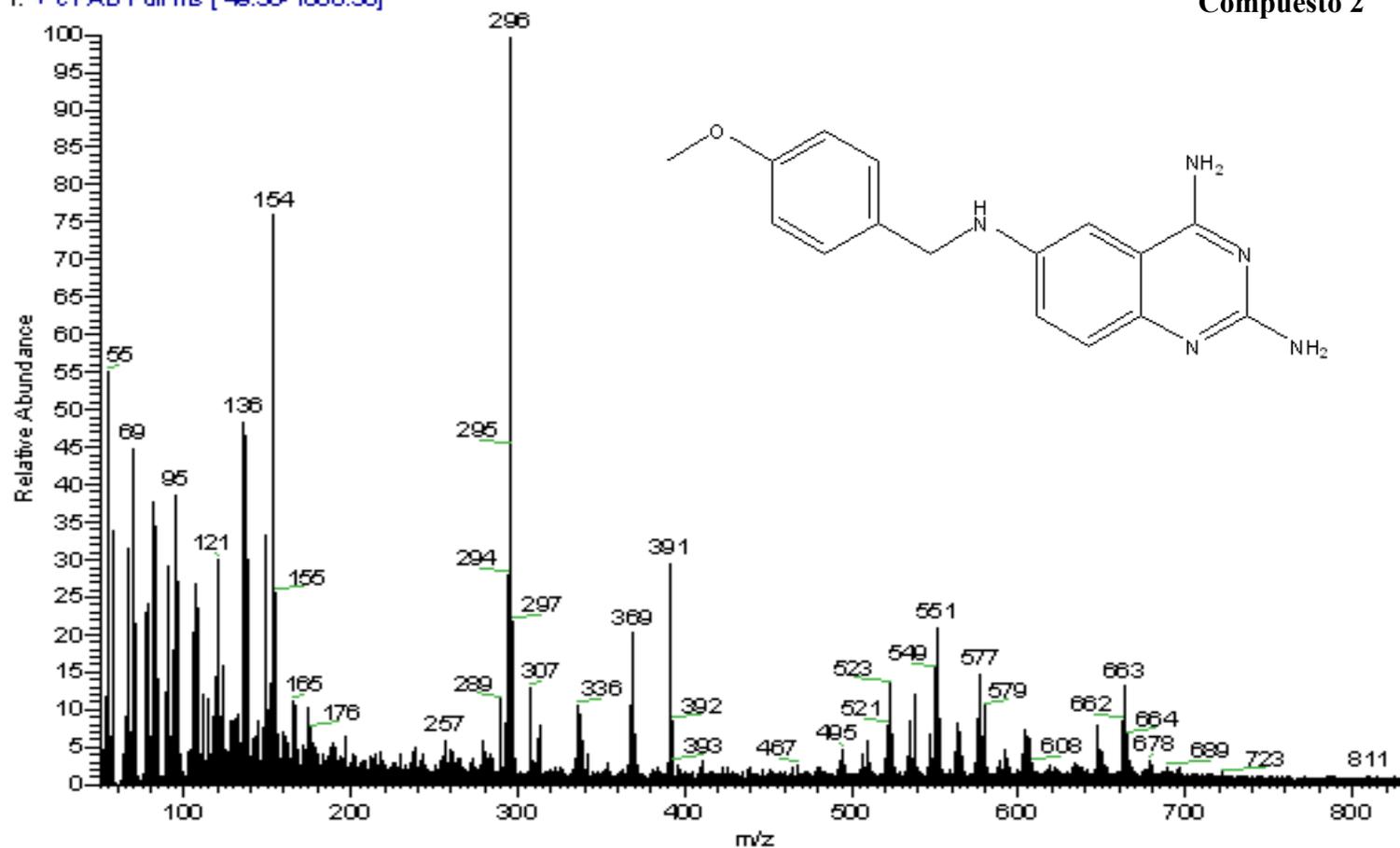
Espectro 5. Espectro de IR de N^6 -(4-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**1**).



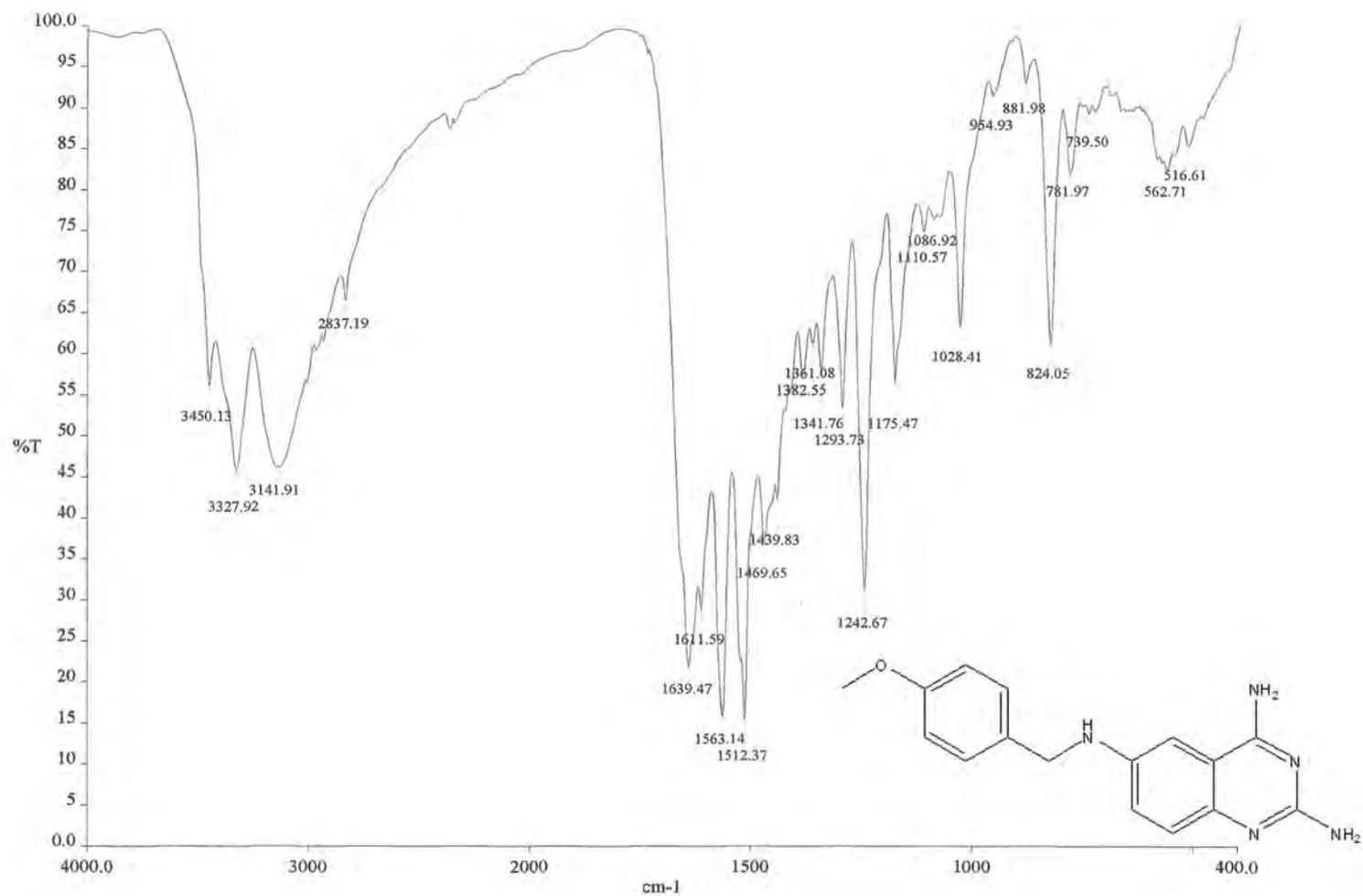
Espectro 6. Espectro de RMN ^1H de N^6 -(4-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**1**).

OT3342 2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.58E6
T: + c FAB Full ms [49.50- 1000.50]

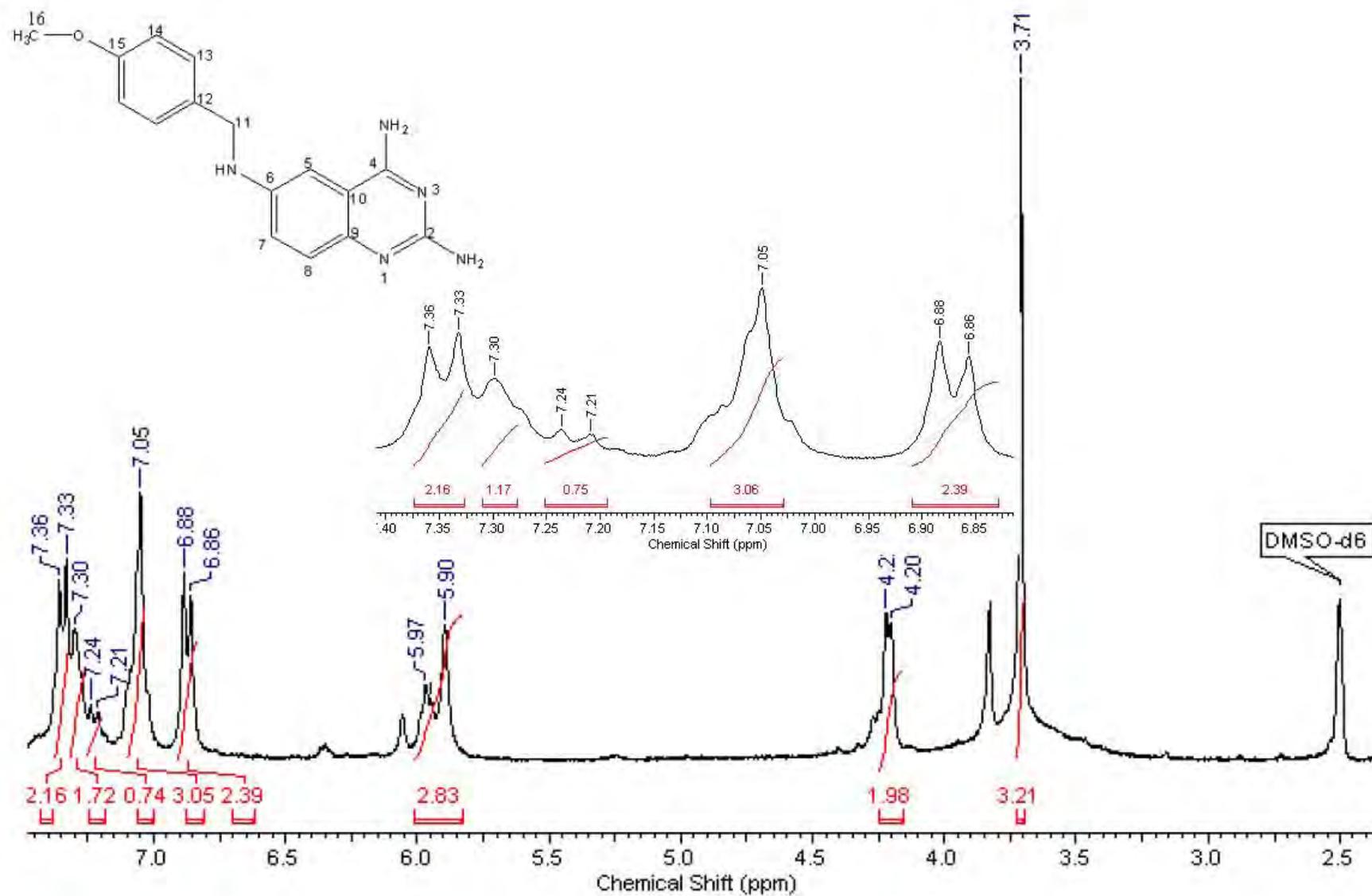
Compuesto 2



Espectro 7. Espectro de masas de N^6 -(4-metoxibenxaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**2**).



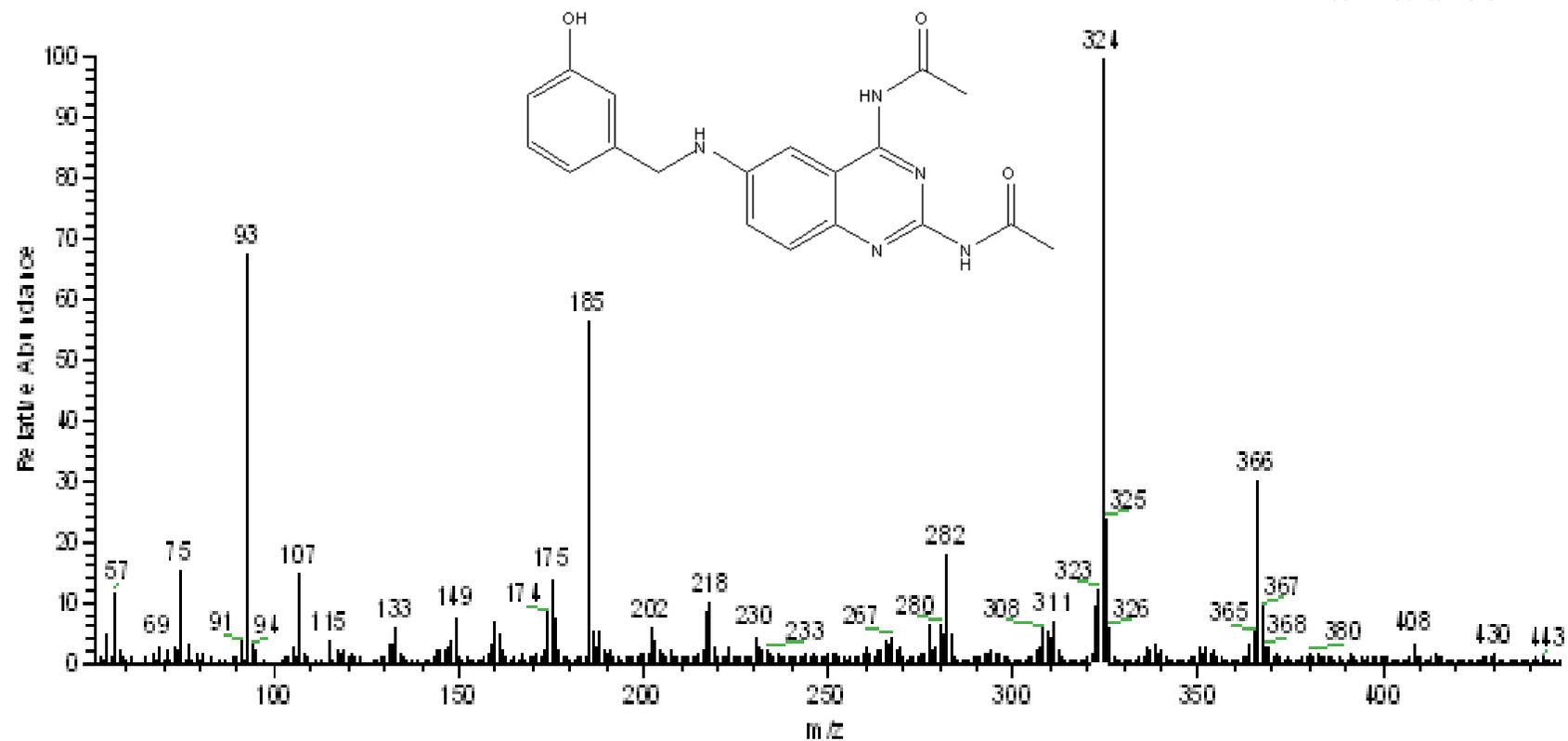
Espectro 8. espectro de IR de *N*⁶-(4-metoxibenxaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**2**).



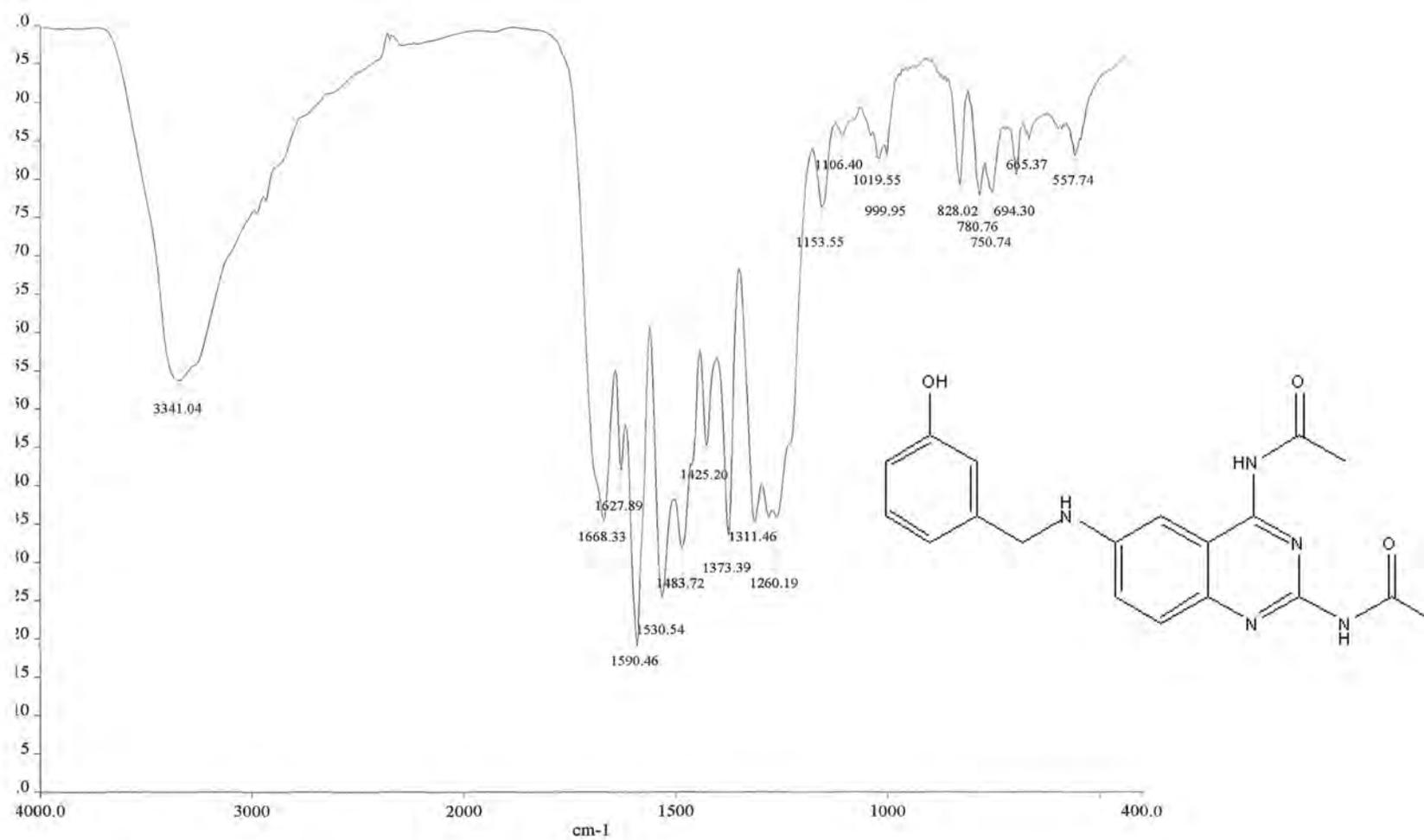
Espectro 9. Espectro de RMN ^1H de N^6 -(4-metoxibenxaldehído)quinazolina-2,4,6-triamina (**2**).

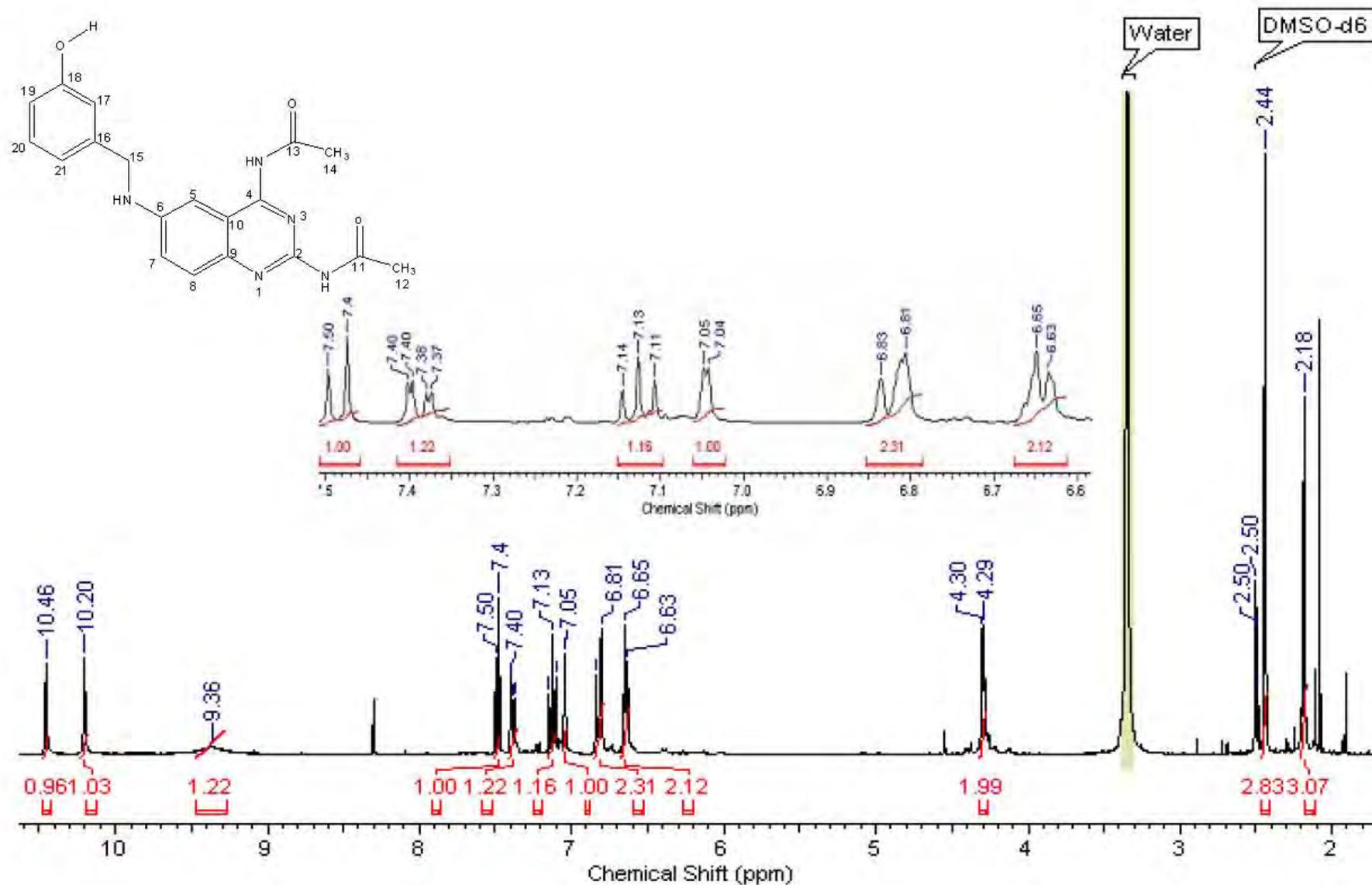
OT3425_1#1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.24E5
T: +c F&B Fullms [49.50-1000.50]

Intermediario 3



Espectro 10. Espectro de masas de *N*-[2-(acetilamino)-6-[3-hidroxibenzaldehído]quinazolina-4-il]acetamida.

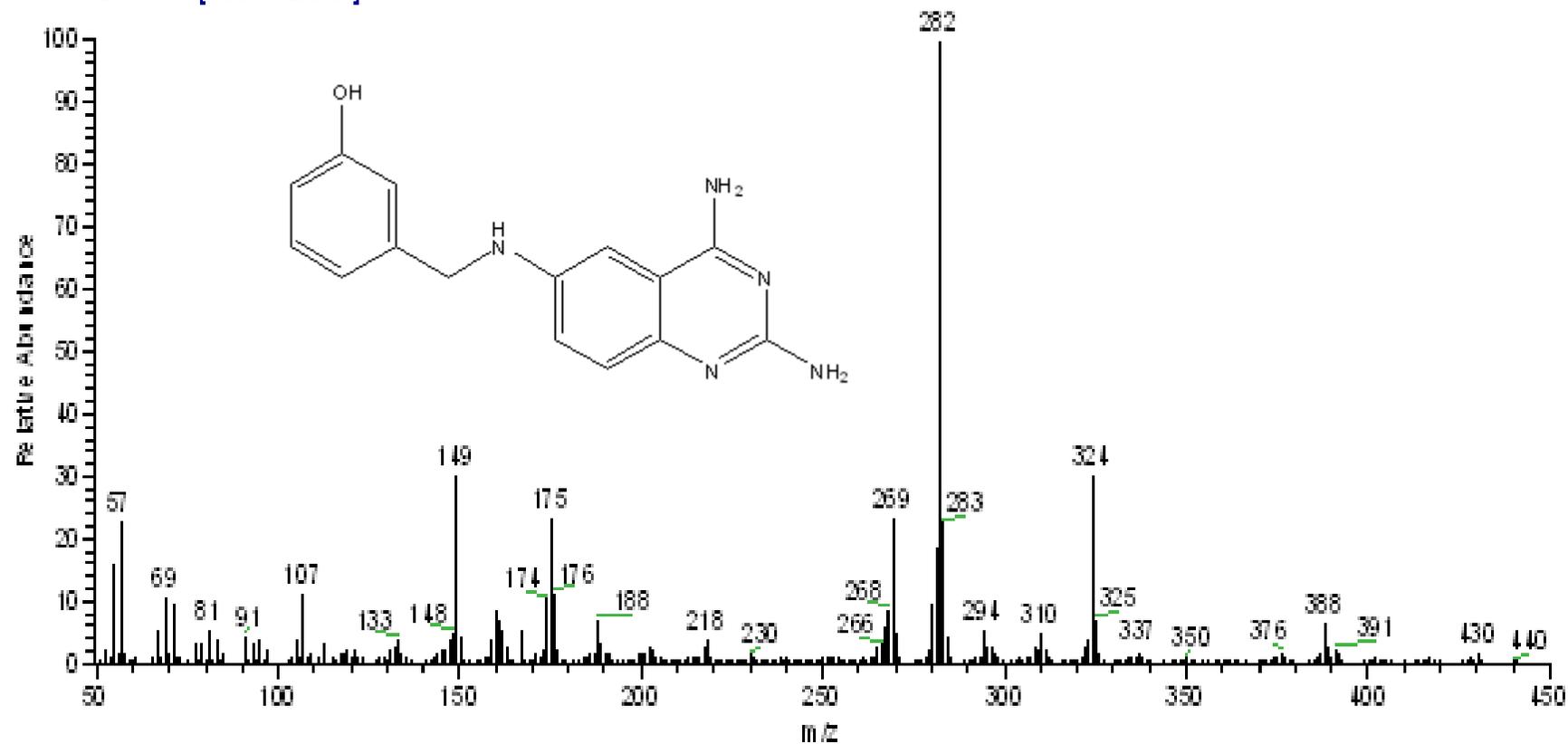
Espectro 11. Espectro de IR de *N*-[2-(acetilamino)-6-[3-hidroxibenzaldehido]quinazolina-4-il]acetamida.



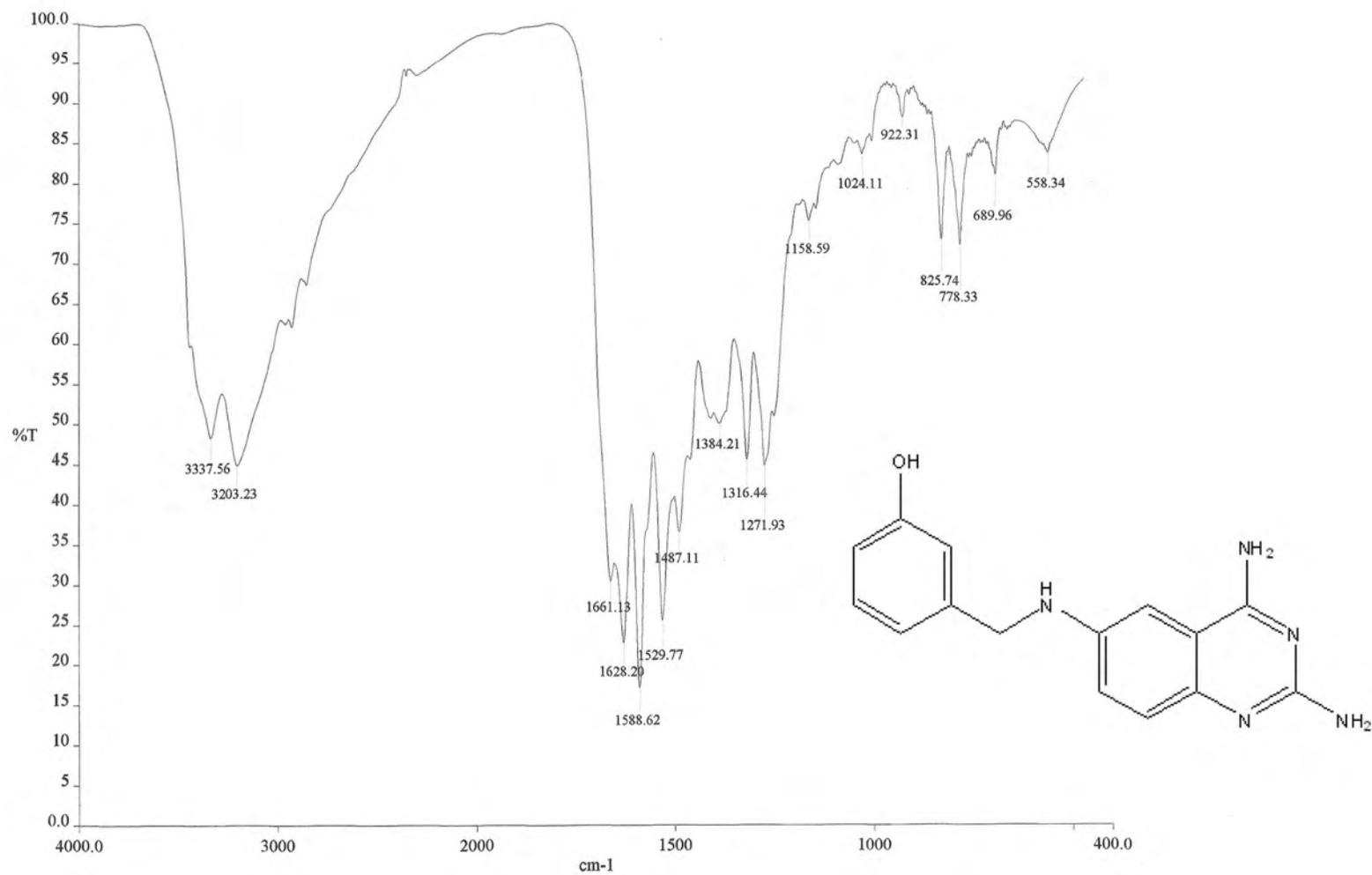
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H de *N*-[2-(acetilamino)-6-[3-hidroxibenzaldehido]quinazolina-4-il]acetamida.

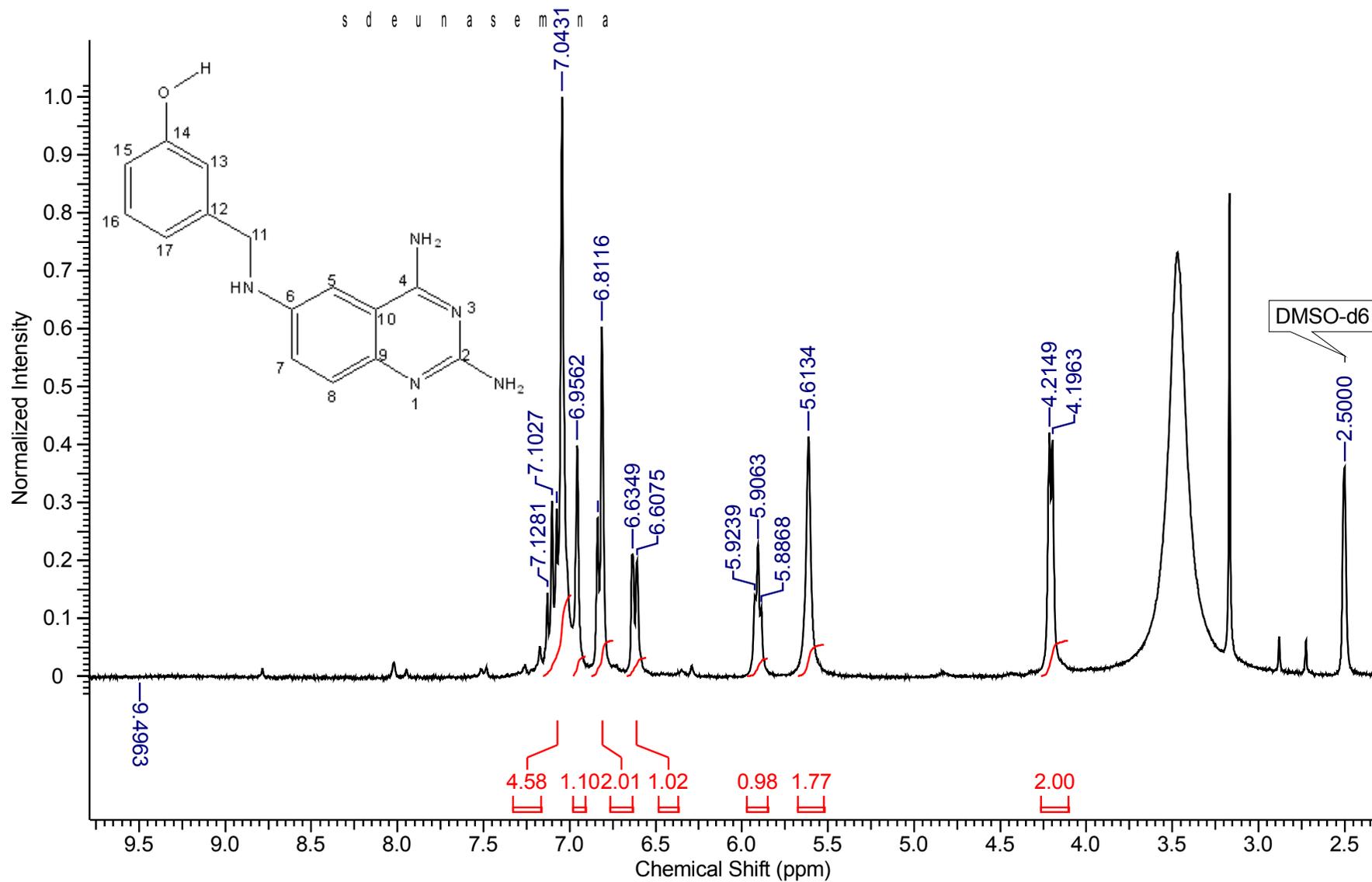
Compuesto 3

OT3424 1#1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.49E7
T: +e FÄB Fullms [49.50-1000.50]



Espectro 13. Espectro de masas de N^6 -(3-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6- triamina (**3**).

Espectro 14. Espectro de IR de *N*⁶-(3-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6- triamina (**3**).



Espectro 15. Espectro de RMN ^1H de N^6 -(3-hidroxibenzaldehído)quinazolina-2,4,6- triamina (**3**).