

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

1

SINTESIS Y ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE
ANALOGOS DE NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)**
P R E S E N T A :
Q.F.B. JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA

2004



MEXICO, D.F.

2001



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 **Dr. Raymundo Cruz Almanza**

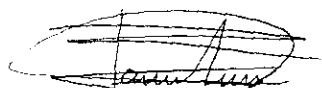
Vocal **Dra. Julieta Rubio Lightbourn**

Secretario **Dr. Rafael Castillo Bocanegra**

1er. Suplente **M. en C. José Manuel Méndez Stivalet**

2o. Suplente **Dr. Andrés Navarrete Castro**

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 208 de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química y en el Departamento de Toxicología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



Q.F.B. Javier Alfredo Carballo Perea
Sustentante



Dra. Rocío Pozas Horcasitas
Director de tesis

DEDICO ESTE TRABAJO:

♥ A dos personas muy especiales en mi vida, mi padre Méd. Cirujano Carlos Carballo Casanova, guía imprescindible en mi vida y modelo a seguir, mi madre Xochitl Perea Gallegos, por la felicidad de ser fruto de su cariño, esfuerzo y cuidado. A los dos que son el motivo de mis logros, siempre los llevaré presentes en mi corazón. Agradezco el apoyo, comprensión y confianza depositados en mí.

♥ A mis hermanos: Carlos, Leticia, Arturo y Raúl, quienes han sido inspiración de mis metas en la vida y porque hemos aprendido juntos a compartir los momentos buenos y difíciles. Siempre los tendré presentes.

♥ A mi cuñada Gudelia Delgado y a mi sobrino Víctor Manuel Carballo Delgado.

♥ A mis abuelitos: Andrés Carballo Orozco, Manuela Casanova Piñón, Francisco Perea Moctezuma, con cariño y respeto. Siempre los llevo conmigo, sé que desde el cielo me están guiando. A mi abuelita Ernestina Gallegos Gallegos quien como una bendición aún esta conmigo.

♥ A toda mi familia con cariño y respeto porque me han brindado su apoyo y confianza.

♥ A Patty, con mucho cariño y de manera muy especial, porque me ha alentado en los momentos más difíciles y me ha brindado su apoyo y confianza de manera incondicional.

♥ Al Sr. Luis Melchor, su esposa Sra. Catalina Macías y a Paulo Cesar, por brindarme siempre su amistad, aprecio y confianza.

♥ A la Dra. Rocío Pozas Horcasitas y el M. en C. Lino Joel Reyes Trejo quienes me han brindado una amistad valiosa y apoyo moral.

♥ Al Q.F.B. Miguel Razo Aguilera por su amistad y apoyo.

♥ A todos mis compañeros del Laboratorio 208 del Departamento de Química Orgánica, de la División de Estudios de Postgrado, de la Facultad de Química, UNAM.

♥ A la Familia Sauri Palma, que siempre me han brindado su amistad y apoyo incondicional por muchos años.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	
3.1 TRIPANOSOMIASIS AMERICANA	5
3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	6
3.3 VECTORES Y RESERVORIOS	7
3.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
3.5 CICLO BIOLÓGICO	13
3.6 PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA	14
3.7 DIAGNÓSTICO	15
3.8 TRATAMIENTO	16
3.9 COMPUESTOS PROBADOS CONTRA <i>Trypanosoma cruzi</i>	
3.9.1 PRODUCTOS NATURALES	17
3.9.2 PRODUCTOS SINTÉTICOS	18
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	
5.1 OBJETIVO GENERAL	26
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26
VI. METODOLOGÍA	
6.1 PARTE QUÍMICA	
6.1.1 OBTENCIÓN DEL ÁCIDO 5-NITRO-2-FURILACRÍLICO	27
6.1.2 OBTENCIÓN DE LA AMIDA	27
6.2 PARTE BIOLÓGICA	
6.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	29
6.2.2 CURVA DE CRECIMIENTO	29
6.2.3 BIOENSAYO	
6.2.3.1 PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN DMSO	30
6.2.3.2 PRUEBA DE TOXICIDAD DE DMSO SOBRE <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
6.2.3.3 ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LOS COMPUESTOS	30
VII. RESULTADOS	
7.1 PARTE QUÍMICA	32
7.2 PARTE BIOLÓGICA	
7.2.1 CURVA DE CRECIMIENTO	43
7.2.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	43
7.2.3 PRUEBAS DE TOXICIDAD	43
7.2.4 ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LOS COMPUESTOS	48
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	59
X. BIBLIOGRAFÍA	60



I. RESUMEN



I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) es causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, es una parasitosis ligada a la pobreza constituyendo un problema de salud pública por afectar de 16-18 millones de personas desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina, y se estima que existen de 50,000 a 100,000 individuos infectados en Estados Unidos, posiblemente inmigrantes.

Actualmente no se cuenta con fármacos quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Chagas. El Nifurtimox, único medicamento usado para esta parasitosis que además es tóxico para el hospedero, no produjo las ganancias esperadas y lo retiraron del mercado.

Este trabajo es un esfuerzo por contribuir a resolver el problema con el diseño de nuevas moléculas que ofrezcan una alternativa para la cura de esta enfermedad, por lo que se sintetizó una serie de ocho amidas α,β -insaturadas análogas a Nifurtimox y Benznidazol, seis de ellas contienen un grupo nitro en su estructura. Los rendimientos varían del 67 al 95%.

Todos los compuestos fueron caracterizados por espectroscopía de RMN- ^1H , IR, UV y por EM.

La actividad de los ocho compuestos fue evaluada "in vitro" en cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a las concentraciones de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ en 1×10^6 células/ml. Se usó Nifurtimox como control positivo, el cual se extrajo del producto comercial Lampit de Bayer Argentina S.A.

Los resultados muestran que los dos compuestos que no contienen grupo nitro son los menos activos a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

A la menor concentración probada de 1 $\mu\text{g/ml}$ los compuestos con grupo nitro *N*-Isobutil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (1), *N*-Bencil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (2), *N*-(4-Clorobencil)-3-(5-nitro-2-fenil)-2E-propenamida (3) y *N*-(3,4-Metilendioxibencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (6) causaron mayor inhibición de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* que el Nifurtimox.

I. ABSTRACT

Chagas's disease (American Tripanosomiasis) caused by hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* is a parasitosis associated with poverty and constitutes a public health problem by affecting between 16 and 18 million people from southern United States to southern Argentina, some reports estimate that 50,000 to 100,000 individuals are infected in United States.

At present no suitable chemotherapeutic agents are available for either the treatment or the prevention of Chagas's disease because Nifurtimox, the only drug effective for clinical treatment, was retired from the market.

This work is an effort to solve the problem designing new molecules that offer an alternative for the cure of this disease

For this, a series of eight α,β -insaturated amides structurally related to Nifurtimox and Benznidazol were synthesized, six of them have a nitro group. The reaction yields were from 67% to 95%.

All compounds were spectroscopically characterized.

Activity of eight compounds was evaluated in *Trypanosoma. cruzi* epimastigotes culture. The concentrations were 100, 10, and 1 $\mu\text{g/ml}$ in 1×10^6 cells/ml. Nifurtimox was extracted from the commercial product Lampit of BAYER Argentina S.A. and used as a positive control.

Results show that the two compounds without nitro group are less active at the 100 $\mu\text{g/ml}$ concentration.

At 1 $\mu\text{g/ml}$, minimal concentration evaluated, the nitro compounds *N*-Isobutyl-3-(5-nitro-2-furyl)-2E-propenamide (1), *N*-Benzyl-3-(5-nitro-2-furyl)-2E-propenamide (2), *N*-(4-Chlorobenzyl)-3-(5-nitro-2-phenyl)-2E-propenamide (3) and *N*-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-2E-propenamide (6) show more activity against *Trypanosoma cruzi* than Nifurtimox.



II. INTRODUCCIÓN



II. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad causada por *Trypanosoma cruzi* originaria y exclusiva de dicho continente. Su distribución geográfica comprende desde el sur de los Estados Unidos de América, donde se han registrado casos autóctonos, hasta la provincia de Río Negro, en el sur de Argentina.^[1]

Seguramente aquejó al americano precolombino, pero los datos más antiguos sobre ella se remontan apenas al siglo XVI, cuando los cronistas españoles describieron en sus "Relaciones" la existencia de la enfermedad desde Nueva España hasta el sur de Argentina. Cabe la posibilidad de que hubiese sido conocida por los nativos de las áreas endémicas antes del descubrimiento de América, particularmente en Brasil, donde los colonizadores portugueses sufrieron la enfermedad denominada "Mal de bicho", relacionado con megaesófago. Sin embargo, el padecimiento no fue reconocido como tal hasta 1909, cuando la describió Carlos Chagas. En México la primera publicación sobre casos humanos de Tripanosomiasis Americana fue hecha por Mazzotti en 1940.^[2]

Hasta hace poco tiempo era difícil evaluar el problema de salud que origina, pero en la actualidad hay medios adecuados, como las pruebas serológicas y la electrocardiografía, que vuelven relativamente sencillo el diagnóstico. Así, se han podido efectuar estudios de importancia; por ejemplo, en diferentes investigaciones hechas en las regiones rurales de Venezuela la prueba serológica fue positiva en 4,525 individuos de un total de 10,000. Basándose en este resultado y en la

procedencia de las muestras tomadas, Pifano^[3,4] calculó que en 1973 había en ese país 1,200,000 enfermos de tripanosomiasis o sea el 10% de la población general al conocer el número de habitantes de la áreas rurales.

Se calculó que en Argentina existen 3,000,000 de infectados o sea el 10% de una población total cercana a los 30,000,000 de habitantes, de los infectados un 25 a 30 % sufren lesiones cardíacas.^[5,6]

Se cree que en Brasil hay 4,500,000 personas infectadas,^[6] pero según Prata^[7] y colaboradores, entre 6,000,000 y 9,000,000 de brasileños están infectados con *Trypanosoma cruzi*.

De acuerdo a la OMS,^[8] en la actualidad existen aproximadamente 18 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* y al menos 90 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad por habitar en zonas endémicas.

En cuanto a México, Velasco Castrejón^[9] calculó alrededor de 3,000,000 de personas infectadas con base en los resultados de las encuestas seroepidemiológicas realizadas por su grupo en poblaciones campesinas de áreas endémicas, pero sugiere que las cifras sean revisadas, ya que de acuerdo con los trabajos de Goldsmith^[9] y colaboradores la cifra es de 3,850,000.

Es importante señalar que los enfermos chagásicos asintomáticos^[10] pueden ser agentes de diseminación de la enfermedad por mecanismos distintos

a los naturales, Por ejemplo, por transfusión de sangre, ya que en nuestro país no está reglamentada esta prueba.

La enfermedad de Chagas no es rara en México,^[10] pero su diagnóstico aún lo es, y hay varias razones para eso: en primer lugar las características de la población afectada, que tienen poco acceso a servicios de salud pública; el desconocimiento de la historia natural de la enfermedad, de las condiciones habituales de diagnóstico clínico y el pobre uso de los métodos para el diagnóstico parasitológico y/o

serológico para confirmar su presencia complican la situación.

Considerando la importancia de esta enfermedad, es importante la erradicación y/o control de la misma, una estrategia podría ser el uso de fármacos.

En esta tesis se contribuye a la solución del problema a través del diseño, síntesis y actividad tripanocida de análogos de Nifurtimox y Benznidazol.

III. ANTECEDENTES

III. ANTECEDENTES

3.1 TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas; es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi* que afecta al hombre así como a otros mamíferos, causando lesiones cardíacas y de otros órganos, que provocan invalidez e incluso la muerte.^[11,12]

Fue descubierta por el investigador brasileño Carlos Chagas en 1909, durante su estancia en Minas Gerais, lugar a donde se le comisionó a dirigir una campaña para el control de la malaria.^[13]

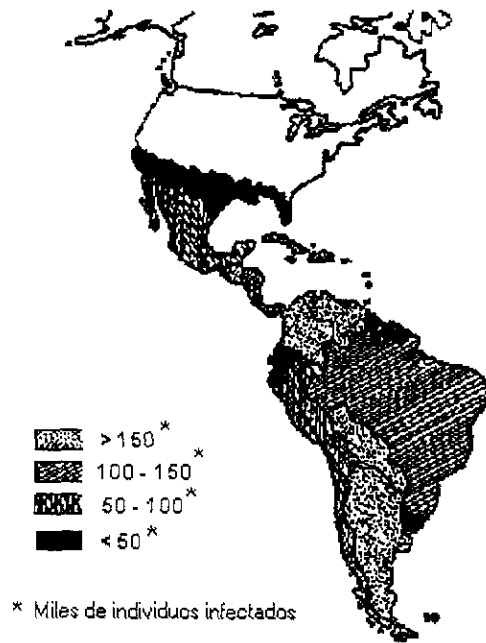
La secuencia de los eventos en la investigación de Carlos Chagas es única,^[9,13] ya que primero encontró al vector, un artrópodo hematófago que llamó su atención por la magnitud con que infestaba las paredes de las viviendas rurales. Él sabía que muchas especies de artrópodos son vectores de enfermedades humanas, por lo que decidió estudiar a este insecto en el laboratorio. Analizando las heces del insecto encontró gran contenido de parásitos flagelados móviles, que lo hizo pensar en la posibilidad de que se tratara de una fase intermedia de un hemoparásito. Varios ejemplares del vector fueron alimentados con sangre de animales de laboratorio,^[9] y al cabo de unas 3 semanas Oswaldo Cruz, maestro de Carlos Chagas, analizó la sangre de los animales hospederos encontrando parásitos como los que abundaban en las heces del insecto. Chagas continuó con sus estudios reportando más tarde el primer caso en que los parásitos se encontraban en humanos.^[9, 13] Sin embargo, la

enfermedad ya se conocía mucho tiempo atrás en toda América Latina,^[13] las crónicas de los colonizadores citan el ataque del que fueron víctimas los misioneros, por unos insectos como cucarachillas, cuyas picaduras les producían comezón e hinchazón.^[9]

En una revisión de 1995 de la Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas) por Michael L. Chance,^[14] enfatiza que un método efectivo de transmisión, además de las heces fecales del insecto, es la transfusión de sangre. La vigilancia de la transmisión por transfusión es de prioridad en cualquier programa de control; la investigación en donadores de sangre es obligatoria en Argentina, Brasil, Chile, Honduras, Uruguay y Venezuela.^[14] Menciona que otra ruta de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es el transplante de órganos e incluso la ingesta de los insectos, costumbre en algunos estados de México. Este mismo autor hace mención de la gravedad de este padecimiento en el continente Americano.

Actualmente, de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS),^[8] la tripanosomiasis es una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en salud pública, ya que existen aproximadamente 18 millones de personas infectadas y más de 90 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad por habitar en zonas endémicas, siendo considerada como una enfermedad de la pobreza.

3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA



La Enfermedad de Chagas existe únicamente en América, encontrándose en las regiones tropicales y subtropicales, desde el sur de los Estados Unidos pasando por México y Centroamérica hasta Argentina. [15]

UBICACION DE CASOS HUMANOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (Gay, 1991)



En México se considera como área endémica a todo el territorio que se encuentra entre los 0 y los 2200 m sobre el nivel del mar, lo que significa dos terceras partes del territorio nacional. [12]

LOS VECTORES Y RESERVORIOS

Originalmente la parasitosis por *Trypanosoma* animal era únicamente una infección de mamíferos silvestres,¹⁴ pero a medida que el hombre invadió los ecosistemas naturales, los vectores se fueron adaptando a la vida humana, lo cual permitió la infección de animales domésticos y posteriormente del hombre. El vector es un insecto hemiptero perteneciente a la familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae,¹⁵ que está ampliamente distribuido en todo el continente americano, encontrándose especialmente en las zonas tropicales y subtropicales,¹⁶ en México está presente en todos los estados de la República, predominando en las costas del Pacífico y centro del país.¹⁷

Dentro de los géneros de importancia epidemiológica en relación a la enfermedad de Chagas destacan *Triatoma phyllorhina*,¹⁸⁻²¹ conocido comúnmente como "chinche" que tiene una amplia distribución en Sudamérica, considerándose el vector principal en Argentina, Bolivia, Uruguay y Chile; *Triatoma protracta*,²²⁻²⁴ es una especie importante en Colombia, Ecuador, Venezuela, y gran parte de América Central; *Triatoma magnum* conocido como "carroeta",²⁵⁻²⁷ es el insecto en el que Carlos Chagas descubrió la *Trypanosoma cruzi* y es el vector principal en el sudeste de Brasil, mientras que en el norte lo es *Triatoma corduliger* y *Triatoma sordida*.²⁸⁻³⁰

Las especies mexicanas³¹ de mayor importancia son: *Triatoma protracta*, *Triatoma rubrum*, *Triatoma crassipennis*, *Triatoma phyllorhina*, *Triatoma longipennis* y *Triatoma protracta*, dependiendo de estado de la República en que se encuentren estos

insectos se crucean con diferentes nombres,³² por ejemplo en lengua Maya se les llama "P'ok", otros nombres que comúnmente se les asigna son: chinche de Compostela, Chalga, chinche huasteco, chinche casucera, chinche viajadora.

Los triatomíneos³³⁻³⁵ se caracterizan por tener un cuerpo aplanado de color pardo o negro, con colores brillantes alrededor del abdomen que varían desde el amarillo hasta el rojo dependiendo de la especie, su cabeza es larga de forma cónica donde se ubica la proboscis de tres segmentos que cuando no está en actividad se dobla bajo la cabeza, su longitud varía de 1.5 a 6.5 cm y aunque poseen un par de alas, son pocas las especies que pueden volar.

Habitan³⁶⁻³⁷ en el campo debajo de piedras, en cuevas o en las madrigueras de roedores; también en las casas, principalmente las construidas con materiales como bambú, palma, paja, bajareque, adobe y madera, que proporcionan guaridas adecuadas donde se ocultan durante el día.



Casa construida de palma y adobe.

Todas las etapas de desarrollo de estos insectos son hematófagas,³⁸⁻⁴⁰ por lo que en las noches son muy activos, salen de sus nidos volando o corriendo con gran agilidad, logrando recorrer grandes distancias, hasta acercarse a las

personas bovinas o a los animales para alimentarse con su sangre.



Triatomus en pared de adobe.

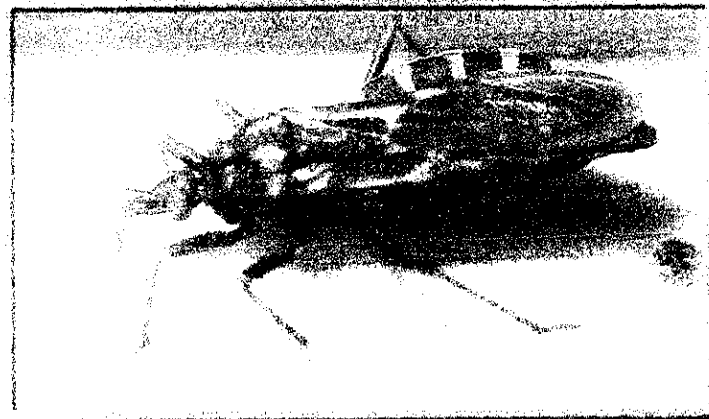
Se tiene conocimiento de que diversos mamíferos tanto silvestres como domésticos son hospederos de *Trypanosoma cruzi* y actúan como reservorios de la infección^{8,11,12}. La parasitosis de animales silvestres resulta importante en el mantenimiento de la enzootia chagásica silvestre en la que participan armadillos, zorras, marsupiales, marigüetas ranas, ratones y chiguas. En el ciclo vital doméstico de la transmisión parasitaria, el humano es el reservorio principal⁸ sin embargo, se ha encontrado que los animales domésticos más importantes en este sentido son: el perro y el gato.¹³ Aunque en países como Bolivia y Perú, el cobayo es uno de

los principales reservorios domésticos,¹⁴ ya que su crianza se realiza dentro de las viviendas para después emplearlo como fuente de alimento en tanto que las vacas, cabras, cerdos y vacallos no representan un caso importante.⁸

Se tiene conocimiento de que los pollos y las gallinas no son susceptibles de infección, mientras que las cabras, así como algunas especies de roedores, son capaces de eliminar al paso de cierto tiempo.⁸

En 1966 Maximo Cortés y colaboradores¹⁵ realizaron un estudio en Cuernavaca, Morelos (México) con el fin de conocer la frecuencia de triatominos infectados con *Trypanosoma cruzi*. De 1,060 capturados, 1,035 ejemplares fueron *Triatomus pallidipennis* y 25 de *Triatoma horni*, en los que encontraron protozoarios flagelados en un 88% y 70% respectivamente¹⁵ que posteriormente confirmaron que se trataba de *Trypanosoma cruzi*. Con estos resultados los autores comentan la necesidad de fomentar el estudio sobre la enfermedad de Chagas en las zonas urbanas y suburbanas así como incrementar la información a la población sobre los métodos de prevención de esta parasitosis.

VECTOR (*Triatoma*)



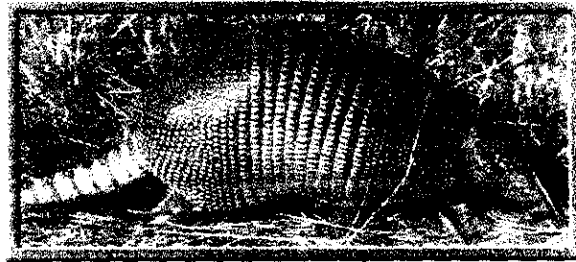
RESERVORIOS



PERRO



ZORRO



ARMADILLO



RATA

3.4 *Trypanosoma cruzi*

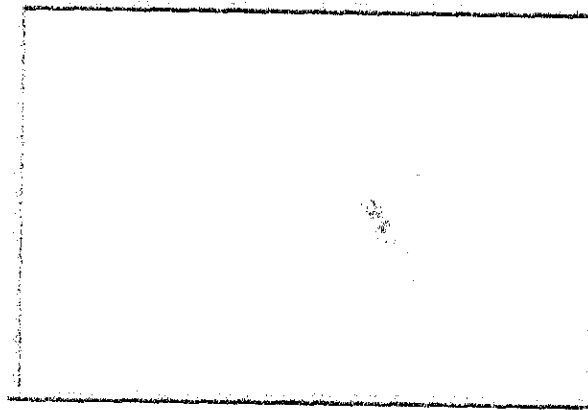


Fig. 1

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Fig. 1), que pertenece al grupo de los astromonadeos¹⁰. Pese a su forma infectiva se desarrolla en el tracto digestivo del vector, cuyas heces infectan a los huéspedes vertebrados; dentro de estos últimos, el parásito logra multiplicarse por medio de fases intracelulares, hecho que lo ha clasificado dentro del subgénero *Nobilia* *permaria*.

Cuadro No. 1.¹¹

Trypanosoma posee organelos semejantes a los de las células eucariotas como: núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, ribosomas, mitocondriosomas que contienen oxidasa; sin embargo, su actividad es significativamente más baja que la mostrada en células de mamíferos, por estar en menor concentración.

Siendo un flageladino, presenta

aspectos específicos que caracterizan a este grupo como tener una sola mitocóndria sublar que contiene al cinetoplasto, donde se localiza del 20-25 % de su ADN total. Tanto el tamaño como la forma y la posición relativa al núcleo del cinetoplasto varía en los diferentes estadios de desarrollo, consistiendo en cuerpo paracasal y bifurcación, del que emerge el flagelo, organelo de locomoción y de adhesión; e través de una invaginación especializada llamada bolsa flagelar por medio de la cual toma por pinocitosis sustancias del medio externo.

Cuadro No. 1

Clasificación Taxonómica
Reino: Animalia
Subreino: Protozoa
Phylum: Sarcodina
Subphylum: Mastigophora
Orden: Kinetoplastida
Familia: Trypanosomatidae
Género: <i>Trypanosoma</i>
Especie: <i>cruzi</i>

La presencia de un citoesqueleto bajo la membrana plasmática no sólo cumple la función de proporcionar rigidez, sino que participa en procesos de diferenciación celular, motilidad y migración a tejidos. Curiosamente la bolsa flagelar carece de citoesqueleto.

Trypanosoma cruzi tiene dos fases en su ciclo vital, una en el hombre o en hospederos reservorios y otra en el vector; es un organismo pleomórfico cuyos estadios se diferencian por su tamaño, forma, posición del cinetoplasto en relación con el núcleo.

Los cambios morfológicos que presenta son tres: **Tripomastigote:** De aspecto fusiforme, mide aproximadamente 20μ de largo, su cinetoplasto se encuentra en la parte terminal del parásito y posterior al núcleo, de donde se origina el flagelo, que se prolonga por el borde de una delgada membrana ondulante para terminar saliendo por el extremo anterior del cuerpo como flagelo libre.

Existen dos tipos de Tripomastigote: el sanguíneo o procíclico que circula en la sangre del hospedero mamífero y el metacíclico localizado en el intestino de los triatóminos, y aunque no se multiplican son formas infectivas.

Amastigote (Fig. 2): Estadio esférico de 4μ de diámetro, que por microscopía electrónica muestra un pequeño flagelo que no emerge fuera de la membrana plasmática, es la forma del parásito que se multiplica dentro de las células del hospedero. También es infectiva.

Epimastigote: También de aspecto fusiforme y de 20μ de largo,

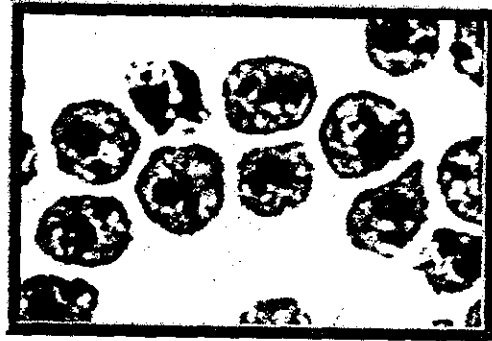


Fig. 2 Amastigotes

muestra al cinetoplasto por delante del núcleo, flagelo y una corta membrana ondulante. Corresponde al estadio de multiplicación del parásito en el intestino del insecto, siendo la forma predominante que se observa en los medios de cultivo, y no es infectiva.

Monteón V.^[20] y colaboradores comentan que la adhesión entre el fagocito y tripanosoma inicia la fase tisular, evento central en la patogenia. Así, estos autores reportan en 1992 el estudio del comportamiento de una cepa mexicana, Ninoa, usando una mezcla de las diferentes fases de *T. cruzi* obtenidos de medios de cultivos acelulares que asemejan las condiciones naturales. Encontraron que la adhesión entre macrófagos murinos y epimastigotes y/o tripomastigotes, se produjo desde los primeros 30 minutos de interacción y progresó a lo largo del periodo de observación (Fig. 3). No encontraron diferencias relacionadas con la fase del parásito.

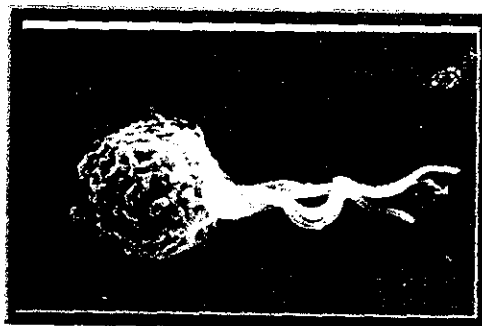


Fig. 3 Epimastigote y tripomastigote adheridos a un macrófago por la parte posterior.

En 1976 Docampo y colaboradores, realizaron estudios sobre epimastigotes, hallando actividad baja de peroxidasas, contenidas en peroxisomas, y ninguna de catalasa.^[21] Posteriormente Boveris y Docampo^[22] en 1980 reportaron que los epimastigotes de *T. cruzi* están poco dotados para detoxificarse de peróxido de hidrógeno, ya que observaron la ausencia de catalasa y glutatión peroxidasa.

Un año después Boveris y Stoppani^[23] obtuvieron información al respecto de que un millón de epimastigotes de *T. cruzi* homogenizados generan 3.4 pmoles H_2O_2 /min que es una cantidad diminuta, además la adición de NADH o NADPH incrementa la producción de H_2O_2 , en un factor de 3 y 5 respectivamente,

siendo la membrana mitocondrial el principal generador en el epimastigote.

Denicola y colaboradores en 1993,^[24] realizaron estudios sobre la toxicidad "in vitro" del anión peroxinitrito en epimastigotes de *T. cruzi*, en donde encontraron que una concentración de 50 μM disminuye la motilidad en un 70% de las células en 30 minutos, determinando que el 50% de inhibición de crecimiento es producido a una concentración de 500 μM , observando cambios morfológicos a medida que transcurre el tiempo. Mediante un esquema estos autores proponen los eventos que ocurren dentro del macrófago activado por un epimastigote de *T. cruzi* (Fig 4).

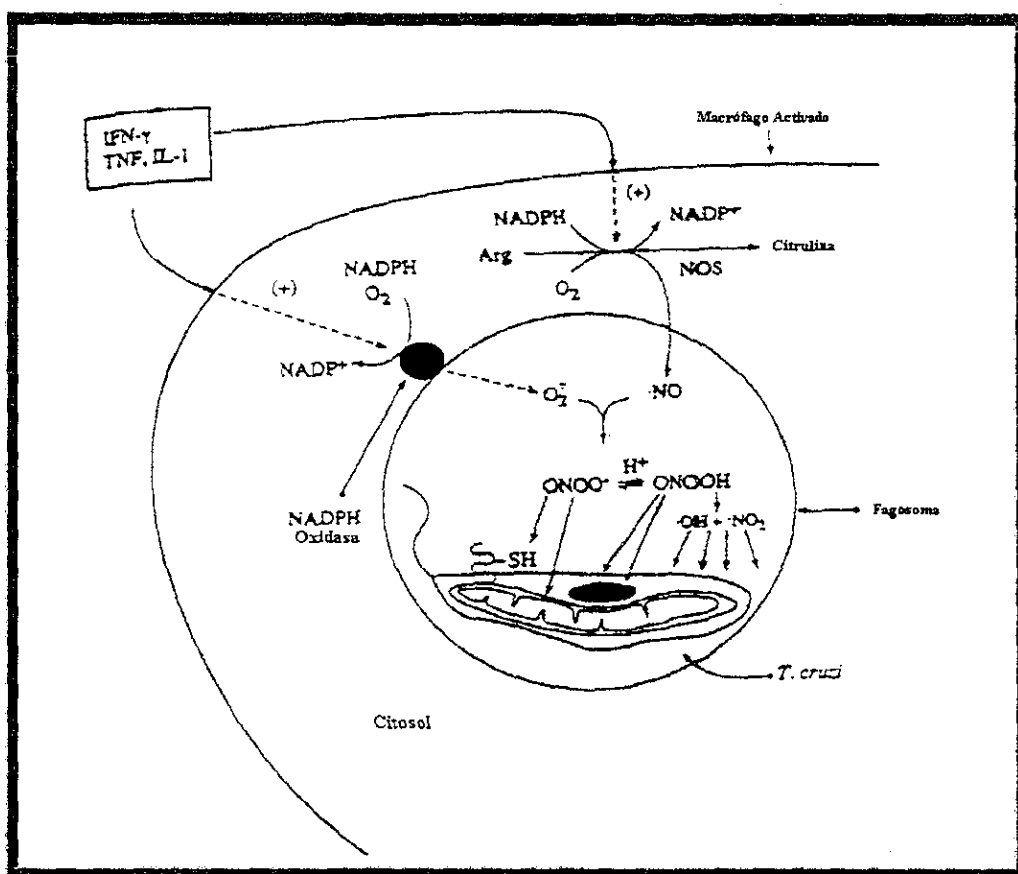


Fig. 4 Macrófago activado por un epimastigote de *T. cruzi*. IFN- γ = interferón γ , TNF= factor necrosis de tumoral, IL-1= interleucina 1, NOS (óxido nítrico sintetasa), Arg.= arginina.

Rubbo y Denicola en 1994,^[25] identificaron dos blancos claves intracelulares del peroxinitrito en epimastigotes de *T. cruzi*, que fueron: succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa. Estas dos enzimas juegan un papel importante en el metabolismo energético del parásito y fue inactivada por peroxinitrito a 20 μM y 280 μM respectivamente, quedando dentro de las concentraciones fisiológicas (estimado en un fagolisosoma de 500 $\mu\text{M}/\text{min}$ ^[25]).

3.5 CICLO BIOLÓGICO

En los tejidos de un mamífero parasitado, que puede ser el hombre o algún otro, se encuentran amastigotes que se reproducen dentro de la célula de tejidos musculares como el cardíaco (B), intestino (C) o esquelético (D) quedando libres al estallarlas. En el torrente sanguíneo se convierte en una forma móvil llamado tripomastigote procíclico o sanguíneo (6 y 7), ambas formas parasitan nuevamente otras células. Durante este periodo puede alimentarse el triatomino libre del parásito y llevarse en la sangre los tripomastigotes que se transforman a epimastigote (1-3) en el intestino medio, reproduciéndose por fisión binaria

longitudinal, estos mismos migran a la parte final del intestino y se transforman a tripomastigote metacíclico (4) que es altamente infectivo, esta última fase aparece entre 15 y 60 días después de la hematofagia y se prolonga durante varios meses o bien el resto de su vida.^[12]

Posteriormente, este vector se alimenta en otra persona y simultáneamente defeca, dejando la deyección con parásitos (tripomastigote metacíclico) (4) y al frotarse el huésped, rompe la piel y permite la entrada de los parásitos al torrente sanguíneo al ponerlos en contacto con la herida hecha por la probóscide del insecto^[12, 26].

El parásito puede invadir células de tejido muscular, células nerviosas o macrófagos transformándose en amastigote, reproduciéndose dentro de la célula hasta que la rompen, quedando libres y ellos mismos o transformados en tripomastigotes sanguíneos, pueden invadir otras células o ser ingeridos al alimentarse el triatómino de este mamífero, cerrándose así el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Fig. 5).^[12, 26]

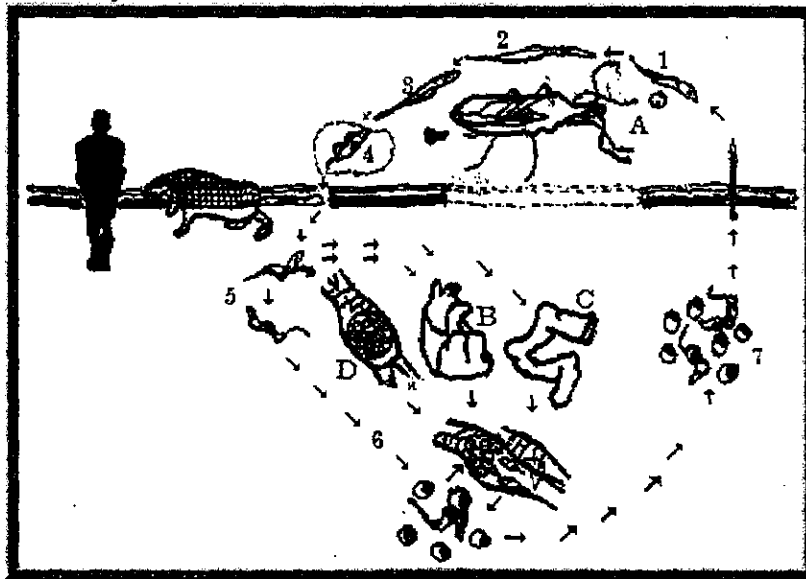


Fig. 5 Ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedero vertebrado y en el insecto.

3.1 PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA

El parásito afecta al huésped de diferentes maneras, entre las más importantes tenemos la destrucción de las células del sistema reticuloendotelial y de otros tejidos, por el crecimiento y multiplicación del flagelado. Koberle¹² señala la producción de una irritación crónica en la miocarditis cragárica, así como la producción de "megacardio" (megacardio, megaesófago y megacolon principalmente). Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos como corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc. Produciendo lesiones y cuadros clínicos diversos.¹³

La penetración de *T. cruzi* en el organismo sigue un periodo de incubación que suele durar entre 4 y 14 días, tiempo en el que los parásitos sufren las transformaciones que ya se mencionaron y se introducen en las células, empezando a ejercer los mecanismos patogénicos. Por lo general, la enfermedad se divide en 3 fases:¹⁴ aguda, indeterminada y crónica.

Fase aguda^{15, 16} La infección puede tener un curso desde asintomático y una enfermedad grave y fatal, afecta sobre todo a los niños y se caracteriza con fiebre alta, intermitente o continua. En cerca de 50% de los niños aparece un edema de los párpados llamado signo de Romaña (Fig. 6), relacionado con la hinchazón de entrada. El edema palpebral está acompañado de conjuntivitis y adenopatía regional. En otros lugares de la cara o del cuerpo pueden presentarse lesiones cutáneas (Chagomas), semejantes a furúnculos, relacionadas con la puerta de entrada y acompañadas siempre por adenopatía regional. En cerca de 25% de los pacientes no se

observan lesiones que indiquen la puerta de entrada. Los ganglios linfáticos, e. bazo, hígado y corazón se encuentran aumentados de tamaño. Generalmente va acompañado de neurosíndrom, alteraciones psíquicas y en ocasiones presentan signos de encefalomalitis o de meningoencefalitis. La muerte sobreviene en un lapso de dos a cuatro semanas o la enfermedad pasa a la fase crónica.



Fig. 6 Signo de Romaña

Fase indeterminada^{17, 18} La mayoría de los casos agudos de la Enfermedad de Chagas se transforman en un periodo de entre 2 a 6 meses a un estado subagudo y de este a un estado crónico asintomático, comúnmente llamado fase indeterminada. Alrededor del 40% de los casos serológicamente positivos, pero sin manifestaciones clínicas (cardíacas, digestivas o nerviosas), o de alteraciones electrocardiográficas y radiológicas, se clasifican bajo este grupo cuando sólo se ven en a cabo exámenes de rutina.

Fase crónica^{19, 20} Se presenta en un 10 a 30 % de los individuos infectados, en general de 10 a 15 años después de la fase aguda, y la cardiopatía chagásica (Fig. 7) es la forma más común e importante. En varias áreas endémicas de América Latina se observa una forma digestiva de

La infección chagásica, que consiste en visceromegalias, especialmente en megacardio y megacolon (Fig. 8). Con mucha frecuencia se presentan formas maníacas y glandulares.

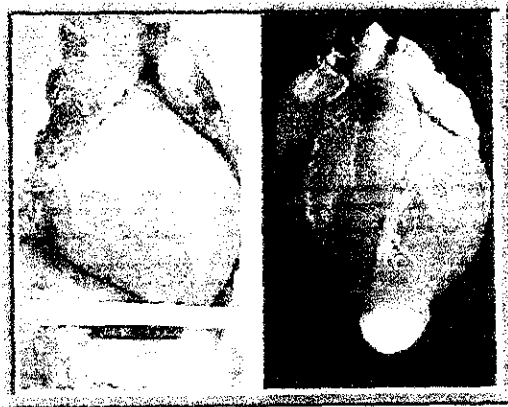


Fig. 7 Megacardio



Fig. 8 Megacolon

3.º DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede hacerse mediante la combinación de datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.^(1, 2)

La más fuerte evidencia clínica y epidemiológica que debe tomarse en cuenta es la procedencia del enfermo, se le interroga de posibles estancias en zonas endémicas, ya que los signos y síntomas (Romaña-Chagoma, de inoculación, adenopatías, fiebre, etc.)

muchas veces pasan inadvertidas y las manifestaciones clínicas en la etapa crónica, en ocasiones varían 10 años o más en aparecer.

El diagnóstico de laboratorio para determinar la presencia del parásito se efectúa mediante exámenes parasitológicos directos e indirectos. Los tripanosomas se encuentran en sangre circulante, particularmente durante la etapa aguda de la infección, momento en el que se pueden detectar mediante los siguientes métodos:^(1, 2)

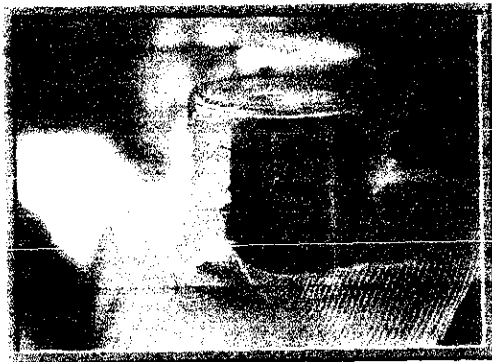
Examen directo de sangre: Se pondrá una gota de sangre sobre un portaobjetos, un cubreobjetos, se observa directamente al microscopio en fresco. Es recomendable hacer frotis y tinción para determinar las características morfológicas y vitales del parásito.

Hemocultivo: Se emplean medios de cultivos especiales como el Novy, Nicolle, Mc-Neal (NNM) u otros, que sirven para que se desarrollen tripanosomas. En éstos se pondrá sangre obtenida por punción venosa y en cantidad de 1 a 5 ml. Se emplea con buenos resultados en la etapa final de la fase aguda.

Inoculación de animales de laboratorio: Generalmente se usa el ratón blanco de laboratorio (*Rattus norvegicus*), es muy susceptible a la infección por *T. cruzi* con lo que al inocular sangre del paciente sospechoso de tripanosomiasis, por vía intraperitoneal al ratón, los tripanosomas se desarrollarán en éste y se podrán detectar unos 10 días después de la inoculación en la sangre de los ratones inoculados.

Metodiagnóstico: Se emplean vectores libres de infección criados en el laboratorio (*Triatominae*). Los cuales se depositan en recipientes con cubierta de

mil de nylon y se colocan sobre el antebrazo del paciente, esto permite que los triatóminos piquen y chupen sangre a satisfacción, se dejan más o menos una hora. Una vez que se corroboró que los triatóminos se alimentaron con sangre del paciente, se retiran del antebrazo. Posteriormente se observarán sus defecaciones del triatómino al microscopio a los 10, 20, 30 días permitiendo observar tripomastigotes metacíclicos. Este método se debe aplicar por igual en la etapa aguda y en la crónica de la infección.



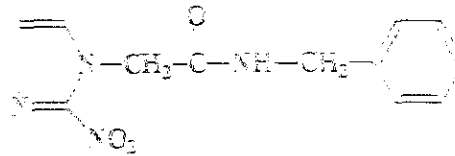
Xenodiagnóstico

Examen inmunológico: Se realiza para poner de manifiesto anticuerpos contra *T. cruzi* en el supuesto paciente. Las pruebas más utilizadas en este método son: fijación de complemento (FC), hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y se emplean en la fase crónica del padecimiento, cuando es muy difícil detectar a los tripomastigotes.

3.8 TRATAMIENTO

Los dos fármacos que se han empleado con mayor frecuencia y mejores resultados en la terapéutica contra la enfermedad de Chagas son el Benznidazol y el Nifurtimox.

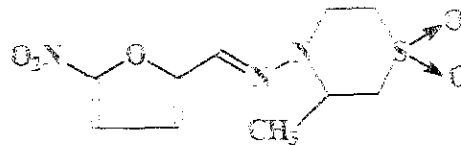
BENZNIDAZOL (Radanil, Rochagan)
 Fórmula: $C_7H_8N_4O_2$
 P.M. 260.3 g



El Benznidazol, es un derivado del 2-nitroimidazol, se reporta que presenta actividad tripomastigocida efectiva únicamente en un 30% a 70% cuando se usa durante la fase aguda, en cambio es mucho menos activo en la fase crónica.^[9,16]

Es un polvo de color amarillo claro relativamente insoluble en agua. La dosis recomendada es: 5 mg/Kg día durante 30 días por vía oral.^[9,17]

NIFURTIMOX (Bayer 2502, Lampit)
 Fórmula: $C_{10}H_{13}N_3O_2S$
 P.M. 287.3 g



Este fármaco es un derivado del nitrofurano, es empleado en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Es un polvo de color amarillo, relativamente insoluble en agua. El fármaco es administrado por vía oral y tolerado más por los niños que por los adultos. En Sudamérica el Nifurtimox comenzó a utilizarse en la década de los años sesentas por lo que existe mayor experiencia en su posología, es la siguiente:
 Niños: 15-20 mg Kg día por 90 días
 Adolescentes: 12-15 mg Kg día por 90 días

Adultos: debido a la gran intolerancia que estos manifiestan hacia el Nifurtimox, el tratamiento se inicia con 5 mg Kg día y cada dos semanas se aumentan 1 a 2 mg Kg día hasta alcanzar, al cabo de 60 días la dosis de 10 mg Kg día que debe sostenerse por otros 30 días.^[9,17]

Por otra parte Docampo R. y Stoppani A.^[28] proponen que el Nifurtimox, induce en *T. cruzi* un incremento en la velocidad respiratoria y una liberación de H₂O₂ en las células por medio del siguiente mecanismo de acción (Fig.9).

razón por la que este compuesto es efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

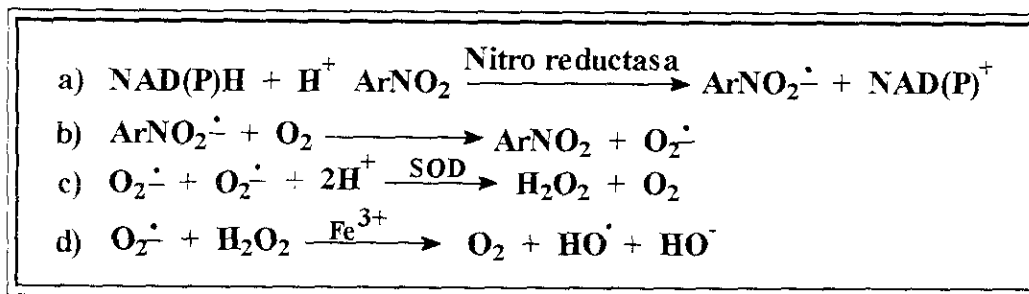


Fig. 9 Mecanismo de acción tripanocida del Nifurtimox, en el que se observa la generación de derivados tóxicos de oxígeno.

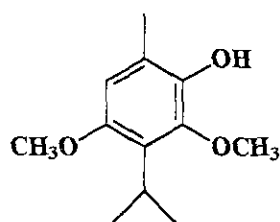
La primera reacción (a) que se presenta en este mecanismo, es la reducción del grupo nitro de los nitrofuranos por NADPH como donador de electrones en presencia de nitro reductasa formando, como primer producto, el anión radical nitrofurano $\text{ArNO}_2^{\cdot-}$.

Bajo condiciones aeróbicas (b), el ión radical nitrofurano se oxida rápidamente por medio de oxígeno molecular para formar el anión radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$. En la reacción (c) se ilustra la producción de peróxido de hidrógeno H₂O₂, a partir de dos aniones radical superóxido en presencia de protones y superóxido dismutasa (SOD). A través de la reacción de un anión radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) catalizada con Fe³⁺ (d) se produce el radical libre hidroxilo HO[·], especie reactiva sumamente tóxica.

3.9 COMPUESTOS PROBADOS CONTRA *Trypanosoma cruzi*

3.9.1 PRODUCTOS NATURALES

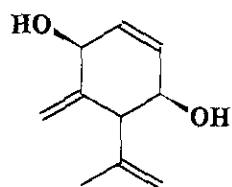
En 1991 Hocquemiller^[29] y colaboradores reportan el aislamiento de un nuevo compuesto del extracto de éter de petróleo de *Oxandra espiptana* al que llamaron espiptanol. Éste fué probado en 20 cepas tipificadas de *Trypanosoma cruzi*, observándose variaciones importantes en su actividad. En las cepas Tulahuen, A99CL7, R107, TeCL2 el espiptanol mostró una IC₉₀ de 50 µg, en cambio en las cepas 9280CL1, M6241CL6 y A98CL5 no hubo actividad.



Espiptanol

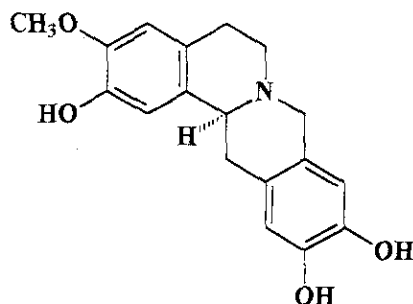
Del herbáceo *Piqueria trinervia*, con usos en la medicina tradicional en México como antipirético, antimalarial y antirreumático, se aisló un compuesto monoterpénico llamado Piquerol A. Estudios "in vitro" mostraron que producía inhibición de la germinación y del crecimiento de plantas; así también

resultó ser moluscocida y acaricida, lo que alentó a Castro^[30] y colaboradores a realizar un estudio “*in vitro*” sobre epimastigotes de *T. cruzi* aislados del triatoma originario del poblado de La Cruz, Jalisco, los cuales fueron cultivados en un medio líquido de infusión de hígado-triptosa, suplementado al 10 % con suero fetal bovino, mostrando al cuarto día un 50% de inhibición de crecimiento con respecto al control, a una concentración de 100 µg/ml.



Piquerol A

De la corteza de *Annona spinescens*, de la familia de las Magnoliales que crece en las costas del este de Brasil, Emerson^[31] y colaboradores reporta en 1996 el estudio fitoquímico de la planta, encontrando un nuevo alcaloide denominado pesoina y su actividad “*in vitro*” en tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* aislados de ratón Balb/c de siete días de infectado. El resultado del bioensayo mostró que el alcaloide provocó el 55% de lisis a las 24 hr de incubación a 4 °C a una concentración de 250 µg/ml.

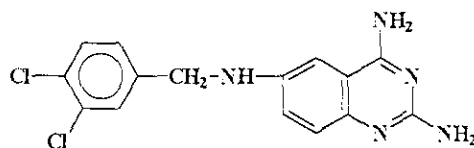


Pesoina

Silvia Sepúlveda^[32] publicó una revisión en 1996, donde menciona una amplia variedad de sustancias aisladas de productos naturales, que presentan actividad contra *Trypanosoma cruzi* y señala que en muchos casos se desconoce el mecanismo de acción de las sustancias.

3.9.2 PRODUCTOS SINTÉTICOS

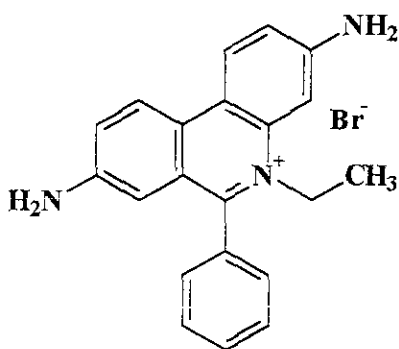
Thompson^[33] y colaboradores en 1969 publicaron la actividad de la [2,4-diamino-6-(3,4-diclorobenzilamino) quinazolina] (PAM 1392) como un nuevo fármaco potencial contra la infección de *Trypanosoma cruzi*. El bioensayo “*in vitro*” consistió en probar el PAM 1392 en cultivos de células libre y en cultivos con células de embrión de pollo que fueron incubados a 32 °C; en el primer experimento probaron las concentraciones de 25, 6.25, 1.56, 0.39, 0.098 µg/ml, encontrado una actividad del 100% en las primeras dos concentraciones, sin embargo la de 25 µg/ml fue citotóxico para las células de embrión de pollo, por lo que el intervalo de concentraciones del segundo experimento fue de 6.25-1.56 µg/ml, en este intervalo el compuesto mostró inhibición en el crecimiento extracelular, la invasión celular y en la multiplicación intracelular.



PAM 1392

En 1970 G. Riou^[34] probó el bromuro de etidio, que es ampliamente usado contra la tripanosomiasis del ganado en África, administrado intramuscularmente en una única dosis de 1 mg/Kg. También se probó en humanos contra infección de

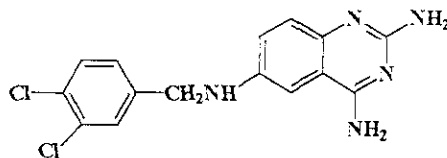
T. gambiense resultando ser moderadamente efectivo. Su trabajo consistió en reportar las observaciones de las ultra estructuras de *Trypanosoma cruzi* con exposición a bromuro de etidio por 48 hr "in vitro" a concentraciones de 0.5 y 20 µg/ml. Observaron en el microscopio electrónico que a la mayor concentración ocasionó severas alteraciones en el núcleo y el cinetoplasto, a nivel del ADN.



Bromuro de etidio

Davoll^[35] y colaboradores mencionan que en varios reportes de quinazolininas, análogos del ácido fólico presentan fuerte actividad inhibitoria contra timidilato sintetasa y dihidrofólico reductasa de mamíferos o bacterias, pero que estos compuestos no presentan actividad antiparasitaria a excepción del 2,4-diamino-6-[(3,4-diclorobencil)amino]quinazolina que mostró actividad contra *Plasmodium berghei* en ratón, *P. gallinaceum* en pollo y *P. knowlesi* en mono rhesus. Esta sustancia mostró buena actividad contra *T. cruzi* en cultivos de células de embrión de pollo y en ratón. Así se sintetizaron varios análogos, de los cuales veintiocho resultaron tener actividad contra *T. cruzi* en cultivos de células de embrión de pollo a las 48 hr, en un intervalo de 0.39 a 6.25 µg/ml, siendo no tóxico para las células de embrión de pollo y seis de estos

compuestos administrados continuamente en la dieta del ratón infectado con *T. cruzi* por 14 días incrementaron el tiempo de vida media en el ratón, en un intervalo de 5 a 25 días, pero no hubo un efecto de cura. Sin embargo, ninguno de los compuestos probados en los dos bioensayos fueron más activos que el 2,4-diamino-6-[(3,4-diclorobencil)amino]quinazolina.

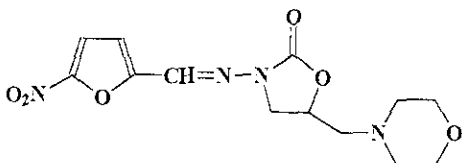
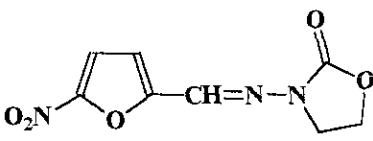
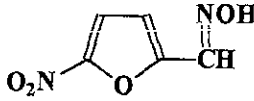
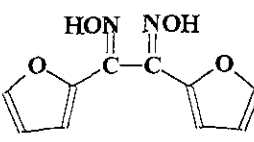
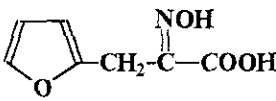
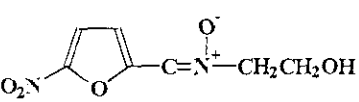
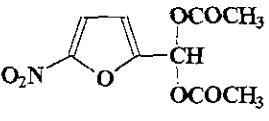
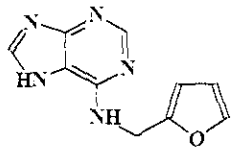
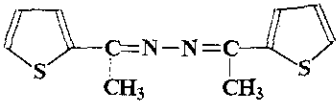


2,4-Diamino-6-[(3,4-diclorobencil)amino]quinazolina

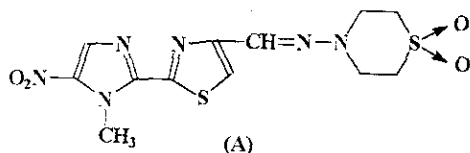
Con los antecedentes^[36] de la actividad mostrada por varios nitrofuranos contra *Trypanosoma cruzi*, incluyendo el Nifurtimox, Freeman^[36] y colaboradores formularon la hipótesis de que los nitrofuranos son prometedores agentes quimioterapéuticos contra la enfermedad de Chagas. Su trabajo consistió en probar la toxicidad, en células de riñón de mono verde, de setenta y ocho diferentes heterociclos, en los que incluyó el furano, 1,2-isoxazol, piridina, pirrol y tiofeno; también probaron la actividad tripanocida "in vitro" sobre un inóculo de 2×10^4 tripomastigotes/ml, de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* (Brasil, Corpus Christi, Tulahuen), a una concentración de 20 µg/ml, excepto los derivados de tiofeno que resultaron más tóxicos a la células de riñón, por lo que se probaron a 10 µg/ml, incubándose a 33 °C por 24 hr; durante este periodo se tomaron muestras cada dos horas para determinar el porcentaje de la pérdida de motilidad. Los resultados mostraron que cuarenta y ocho compuestos tuvieron una efectividad del 75-100% de inmovilización en las tres cepas; sin

embargo, sólo 29 de ellos fueron inofensivos a las células de riñón del mono verde, y de estos últimos sólo 9 presentaron el 100% de efectividad. Estos compuestos (**Tabla 1**) pueden proveer las bases para construir nuevas moléculas activas contra varias cepas de *T. cruzi*. Freeman y col. comentan que la

característica estructural de los nitrofuranos activos es el grupo nitrofurfurilideno unido a un átomo de nitrógeno. El compuesto **1** se usa en terapia antibacteriana en gatos, los compuestos **2** y **3** se usan en terapia tópica antiprotozoaria (*Trichomona*) en gatos.

TABLA 1. Los nueve compuestos que tuvieron el 100% de actividad.	
Nombre	Fórmula
1 5-Morfolinometil-3-(5-nitrofurfurilidenamino)-2-oxazolidinona (Furaltadona)	
2 3-(5-nitrofurfurilidenamino)-2-oxazolidinona (Furazolidona)	
3 5-Nitro-2-furaldoxima (Nifuroxima)	
4 α -furildioxima (Di-2-furaniletanodiona dioxima)	
5 Ácido 3-(2-furil)-2-oximinopropiónico	
6 N-(2-hidroxietil)-(5-nitrofuril)nitrona	
7 Diacetato de 5-Nitrofurfurilideno	
8 Ribósido de 6-furfurilaminopurina (Cinetina)	
9 Cetazina de 2-acetiltiofeno	

En 1972 Neville^[37] y colaboradores sintetizaron derivados de 2-(5-nitro-2-furil, tiazolil y 1-metilimidazolil)tiazoles y probaron la actividad en ratones infectados con tres cepas de *T. cruzi* (BHC, "Perú" y "Y"), los compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal a las dosis de 100, 50, 25, 10, 5 mg/Kg y por vía oral a las dosis de 200, 100, 50, 25, 10 y 5 mg/Kg. La media de sobrevivencia de ratones no tratados fue de 14(±1) días y los resultados de los ratones tratados con las sustancias a diferentes dosis los reportaron como el incremento en días a la media de sobrevivencia. Observaron que el orden decreciente de la actividad en base a los sustituyentes en la molécula es como sigue: 1-Metil-5-nitroimidazolil > 5-Nitro-2-furil > 5-Nitro-2-tienil > 5-Nitro-2-tiazolil. El compuesto 4-[[[2-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-4-tiazolil] metileno]amino]-1,1-dióxido-4-tiomorfolina (A) fue más activo que el Nifurtimox contra las tres cepas como se muestra en la **Tabla 2**.



Cepa	Comp	25 mg/Kg	10 mg/Kg	5 mg/Kg
"Y"	A	60 días	60 días	37 días
	Nif.	40 días	8 días	0 días
"Peru"	A	60 días	60 días	35 días
	Nif.	60 días	60 días	0 días
BHC	A	22 días	12 días	4 días
	Nif.	6.5 días	5.5 días	3 días

Además, sugieren que las características estructurales que son necesarios para una mayor actividad son: del lado del ciclo de la hidrazona, el anillo debe ser de seis miembros y "X" un heteroátomo (**Fig. 10**). Sin embargo, comentan que estos cambios pueden afectar los parámetros fisicoquímicos de la molécula.

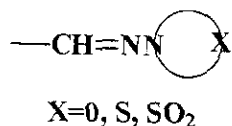


Fig. 10

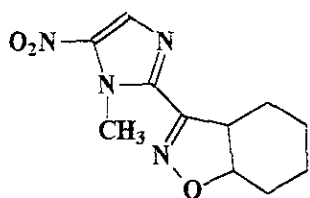
Ávila^[38] y colaboradores probaron la actividad "in vitro" del Alopurinol en cinco cepas (cuatro venezolanas y una brasileña) de epimastigotes de *T. cruzi* con un inóculo de 0.5×10^6 células/ml a concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10, 20 y 40 µg/ml, hallando la concentración óptima inhibitoria de 3 µg/ml en las cinco cepas. Además mostraron el efecto tripanostático, haciendo crecer los epimastigotes del experimento en medios de cultivos nuevos libre del fármaco, resultando positivo el ensayo. También realizaron pruebas en ratones, en donde encontraron que las dosis óptimas fueron de 32 y 64 mg/Kg/día por 10 días, el efecto fue caracterizado por una marcada disminución de la parasitemia y el incremento en días (310 días) de la supervivencia a la media de los ratones infectados no tratados (14 días).



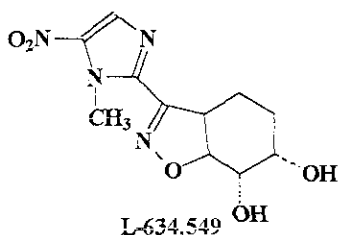
Alopurinol

Murray^[39] y colaboradores probaron dos compuestos del tipo 2-sustituidos-5-nitroimidazoles (MK436, L634,549), el bioensayo lo realizaron en cultivos de 3×10^4 fibroblastos humanos/cámara, después de 4 días de incubación a 37 °C con 5% CO₂, las células fueron infectadas con una cepa "Y" de *T. cruzi* a una concentración de 5×10^5 tripomastigotes/cámara. Las concentraciones probadas de los compuestos fueron de 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 y 1 µg/ml disueltos en una concentración final de DMSO al 1% y usando como control positivo al Nifurtimox. La actividad mostrada del MK-436 contra amastigotes fue a una concentración de 25 µg/ml y L634,549 mostró actividad a

2 $\mu\text{g/ml}$. Ninguno de los compuestos causaron daño morfológico a las células huésped a las concentraciones más altas (250 $\mu\text{g/ml}$). En contraste, el Nifurtimox, fue activo a 2 $\mu\text{g/ml}$, ocasionó daño significativo a la célula huésped a 100 $\mu\text{g/ml}$.

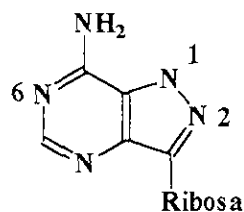


MK-436

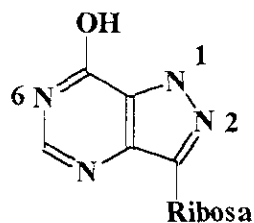


L-634,549

En 1987, Ávila^[40] y colaboradores probaron "in vitro" e "in vivo" 42 diferentes pirazol(3,4-d) y 12 (4,3-d)pirimidina. Seis pirazol(3,4-d)pirimidinas mostraron actividad inhibitoria contra la forma epimastigote, siendo el más activo el 4-aminopirazol(3,4-d)pirimidina, inclusive con respecto al 4-hidroxipirazol(3,4-d)pirimidina (alopurinol). Ninguno de estos compuestos fue activo contra la forma tripomastigote aislada de sangre, sugiriendo que hay diferencias bioquímicas. De la serie de doce compuestos, los que presentaron actividad contra las formas epimastigote y la tripomastigote fueron el 7-amino-3- β -D-ribofuranosilpirazol-(4,3-d)pirimidina (Formicina A) que fue dos veces más activo que el 7-Hidroxi-3- β -D-ribofuranosilpirazol-(4,3-d)pirimidina (Formicina B); sin embargo, cuando se probaron sobre ratones infectados con *T. cruzi*, sólo Formicina B presentó actividad significativa.

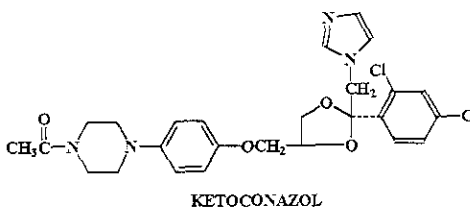


Formicina A



Formicina B

Los derivados de azoles son potentes agentes antimicóticos,^[41] los cuales actúan bloqueando la biosíntesis de ergosterol. También se ha reportado de la actividad que tienen estos compuestos contra *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*, en este último parásito el ketonazol mostró actividad a 1 μM a las 120 h. Por lo que Urbina^[41] y colaboradores demostraron que el tratamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con el antimicótico ketoconazol produce alteraciones en la composición y propiedades de la membrana plasmática principalmente en las propiedades de la permeabilidad pasiva y fue confirmada por los resultados del estudio en células control y tratadas; en estas últimas se incrementó la velocidad de liberación de L-glucosa, y que esta alteración es la causa primaria de la pérdida de la viabilidad celular.

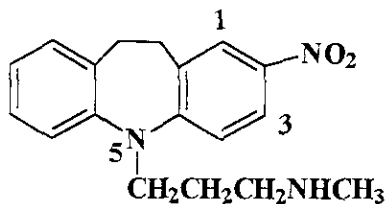


KETOCONAZOL

Goad^[42] y colaboradores en 1989 probaron azoles antimicóticos como el Itraconazol, Fluconazol y Ketoconazol, en los tres estadios de *T. cruzi*: epimastigotes en medios de cultivos, tripomastigotes y

amastigotes en cultivo de células de pulmón humano. Los resultados mostraron que el compuesto más activo fue el ketoconazol en los tres estadios, eliminando los amastigotes del cultivo celular de pulmón en un periodo de tres semanas, a una concentración de 5 ng/ml concentración que se puede alcanzar en suero humano. Estos autores encontraron una disminución en la cantidad normal de esteroides como ergosterol, y un aumento de los precursores 14 α -metil esteroides como el lanosterol, por lo que proponen que ésta sea la causa de la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* por ketoconazol.

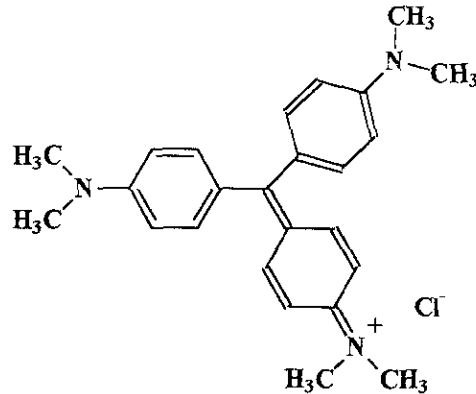
En 1989 Doyle^[43] y Weinbach reportaron la actividad de la imipramina y tres análogos sustituido en la posición 2 ó 3 (3-Cloroimipramina, 2-Nitroimipramina, 2-Nitrodesmetilimipramina), contra dos cepas de epimastigotes (SX10/4, M/88) a una concentración de 10⁶ de parásitos/ml de *T. cruzi*. El 2-Nitrodesmetilimipramina resultó ser el más activo teniendo una CI₅₀ de 7 y 4 μ M para las cepas SX10/4, M/88. Proponen que este compuesto puede utilizarse para prevenir la enfermedad de Chagas en la transfusión de sangre y como agente terapéutico. Sugieren que la actividad de los compuestos tricíclicos, es la interacción con la membrana de *Trypanosoma cruzi* por la marcada alteración observada en la morfología del parásito. También observaron que la adición de grupos electroatrayentes en la posición 2, 3 de la imipramina aumentó la actividad, ya que esta última fue la menos activa.



2-Nitrodesmetilimipramina

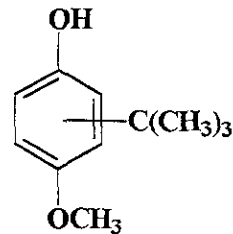
Moreno^[44] y colaboradores probaron la actividad inhibitoria del cristal violeta sobre la tripanonona reductasa de *Trypanosoma cruzi* que es una flavoproteína presente en los

Trypanosomatidos. La mayor actividad de esta enzima se encuentra en amastigotes, siendo menor en tripomastigotes y en epimastigotes. Los resultados mostraron que el cristal violeta tuvo potente actividad inhibitoria "in vitro", pero no fue capaz de reducir el nivel total de la enzima reducida en células de amastigote.



Cristal violeta

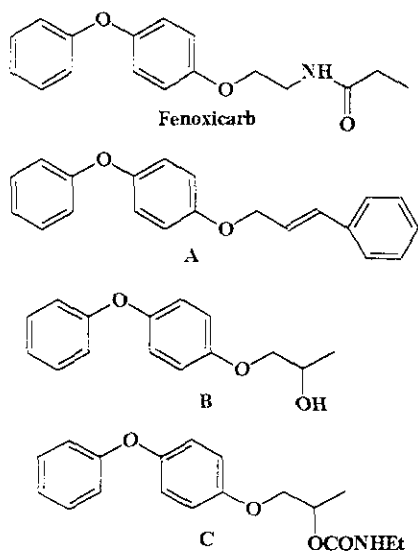
Aldunate^[45] y colaboradores realizaron la prueba de la actividad tripanocida de 2(3)-ter-Butil-4-hidroxianisol (BHA) usado como un antioxidante en alimentos, contra cepas de la forma epimastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. Las concentraciones empleadas fueron entre 0.1 y 1 mM en el que mostró inhibición de crecimiento y consumo de oxígeno en epimastigote y tripomastigote. Menciona que puede servir en el futuro para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión de sangre y también como un posible fármaco tripanocida.



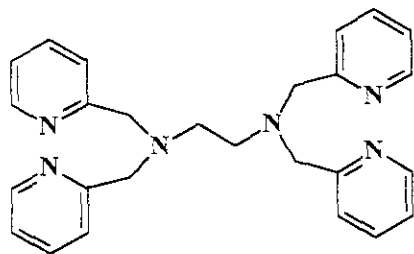
2(3)-ter-Butil-4-hidroxianisol

Schwartzapel^[46] y colaboradores sintetizaron diecinueve compuestos

estructuralmente relacionados con (3-etil[2-(4-fenoxifenoxi)etil]carbamato (Fenoxicarb) que se emplea como regulador de crecimiento de insectos, y probaron el efecto de inhibición sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$, resultando tres compuestos los más activos de este experimento, el 4-Fenoxifenil (E)-3-fenilprop-2-en-1-il éter A, (RS)-1-(4-fenoxifenoxi)propan-2-ol B, (RS)-1-(4-fenoxifenoxi)propan-2-il-*N*-etilcarbamato C.

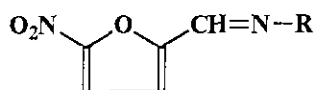


También se ha probado la actividad inhibitoria “*in vitro*” de diversas estructuras de agentes quelantes^[47] en la cepa “Y” de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Todos los compuestos fueron evaluados a 5 $\mu\text{g/ml}$ por 72 hr. El compuesto más activo fue el *N,N,N',N'*-Tetra(2-piridilmetil)etil diamina. Observaron que la introducción de grupos polares adicionales iónicos o no iónicos en las moléculas, generalmente resulta en una pérdida de la actividad tripanocida.



N,N,N',N'-Tetra(2-piridilmetil)etil diamina

Mester y colaboradores^[48] realizaron la síntesis de diez nuevos análogos del Nifurtimox y probaron su actividad “*in vitro*” en epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ utilizando el Nifurtimox como control positivo, obteniendo los datos a las 24, 48 y 72 hr. Los resultados mostraron que tres (Fig. 10) de los diez compuestos probados fueron los más activos, incluso que el Nifurtimox. Presentaron el 100 % de inhibición a las concentraciones de 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 24, 48 y 72 hr.



R= 3,4-bis(metil)-1,2,4-triazol-4-il

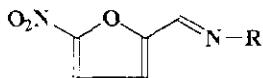
R= 1-metil-3-metil-1,2,4-triazol-4-il-5-ona

R= 4,6-difenilpiridin-1-il-2-one

Fig. 10 Análogos de Nifurtimox más activos

Posteriormente estos mismos autores^[49] realizaron un estudio de relación estructura-actividad tripanocida a partir de los datos del reporte antes mencionado. Las propiedades de las moléculas que consideraron para este estudio fue el coeficiente de partición y el índice de conectividad, los cuales no tuvieron una buena correlación con la actividad de una manera individual, pero considerando los dos parámetros si obtuvieron buena correlación con la actividad ($r=0.94$).

En otro reporte^[50] estos mismos autores correlacionaron la actividad de los análogos de Nifurtimox (Fig. 10) con su potencial formal de reducción, que nos proporciona importantes datos sobre la posibilidad de transferir un electrón “*in vivo*”. Encontraron una buena correlación si dejaban fuera al Nifurtimox (Fig. 11). Proponen que esto es debido a que los análogos poseen un heterociclo aromático en la parte del nitrógeno del grupo imina, mientras que el Nifurtimox tiene un anillo saturado.



- I 3,5-bis(metil)io-1,2,4-triazol-4-il
- II 1,2,4-triazol-1-il
- III pirazol-1-il
- IV benzimidazol-1-il
- V benzotriazol-1-il
- VI 1-metil-3-metilio-5-tioa-1,2,4-triazol-4-il
- VII indazol-1-il
- VIII 1,2,4-triazol-4-il

Fig. 10 Análogos de Nifurtimox.

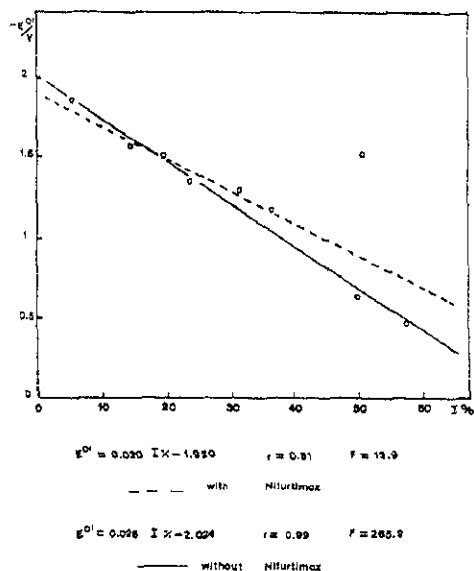
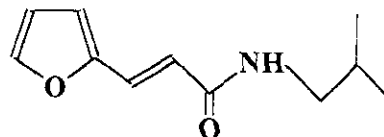


Fig. 11 Correlación de la actividad y el potencial formal de ocho análogos de Nifurtimox.

Por otra parte, se tiene conocimiento de que las amidas α,β -insaturadas poseen una variedad de actividades biológicas, [51, 52, 53, 54, 55], dentro de las que se encuentran la actividad bactericida [56] y esquistosomicida [56] como las que presenta la *N*-(2-metilpropil)-3-(2-furil)-2E-propenamida. Sin embargo estas estructuras no se han probado contra *Trypanosoma cruzi*.



N-(2-metilpropil)-3-(2-furil)-2E-propenamida.

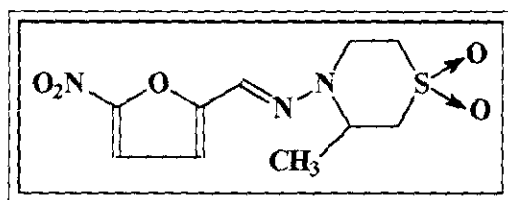
IV. HIPÓTESIS

Y

V. OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS

Considerando que varios autores señalan que: 1.- que *Trypanosoma cruzi* tiene un sistema deficiente en enzimas consumidoras de H_2O_2 (tripanotiona reductasa).^[21, 22] 2.- que la actividad tripanocida del Nifurtimox se debe justamente a su capacidad de generar H_2O_2 , tóxico para el parásito, y 3 que Mester^[48] sintetizó trece análogos de Nifurtimox (Fig. 12), algunos de los cuales tuvieron mayor actividad tripanocida que el mismo Nifurtimox. Podemos suponer que la presencia del grupo 5-nitrofurano es la responsable de la actividad contra *Trypanosoma cruzi*.



Nifurtimox

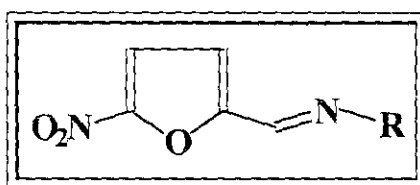


Fig. 12 Análogos de Nifurtimox sintetizados por Mester.

Además, si se considera la actividad esquistosomicida mostrada por las amidas α,β -insaturadas en varios sistemas biológicos,^[51, 52, 53, 54, 55, 56] es probable que la combinación con estas estructuras contribuya positivamente en la actividad tripanocida.

Con base en estos antecedentes la hipótesis de este trabajo plantea que, 5-nitrofuranos que contengan amidas α,β -insaturadas presentarán actividad contra *Trypanosoma cruzi*.

V. OBJETIVO

5.1 Objetivo General:

Sintetizar una serie de ocho compuestos análogos a Nifurtimox y Benznidazol y evaluar su actividad tripanocida.

5.2 Objetivos Particulares:

- Sintetizar y caracterizar los ocho análogos a Nifurtimox y Benznidazol.
- Evaluar la actividad en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a 100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$, utilizando la cepa "Y" aislada de humano, en Sao Paulo, Brasil. Además de obtener información de parámetros observables (crecimiento, muerte, movilidad y morfología) de la actividad tripanocida de los compuestos.

VI. METODOLOGÍA

VI. METODOLOGÍA

La metodología consta de dos partes: a) Química (síntesis) dirigida por la Dra. Rocío Pozas Horcasitas del Depto. de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM y b) Biológica (bioensayo de la actividad tripanocida) asesorada por la Dra. Julieta Rubio Lightbourn del Depto. de Genética y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas,

6.1 PARTE QUÍMICA:

6.1.1 Obtención del ácido 5-nitro-2-furilacrílico.^[57, 58]

Un matraz redondo de tres bocas y 50 ml de capacidad, provisto de un refrigerante en posición de reflujo con trampa de humedad, un adaptador con termómetro y embudo de adición, se colocó en baño de hielo seco-metanol. Dentro de este sistema se preparó una mezcla de 11.6 ml de anhídrido acético (0.1217 moles) y 5.7 ml de ácido nítrico fumante (0.1222 moles), agregado lentamente y con agitación constante, que se prolongó por 15 minutos después de terminada la adición. Posteriormente se adicionó gota a gota una solución de 3 g (0.0217 moles) de ácido 2-furilacrílico disuelto en 4.1 ml (0.043 moles) de anhídrido acético, manteniendo la temperatura de -5 a -15 °C.

Una vez terminada la adición, se dejó 15 minutos más con agitación. Transcurrido este tiempo, el precipitado formado (ácido nitrofurilacrílico) se filtró al vacío y se lavó con agua helada hasta pH neutro. Finalmente se purificó por recristalización en metanol, se determinó el punto de fusión y se caracterizó por espectroscopía.

6.1.2 Obtención de la amida.^[59]

En un matraz de fondo redondo, de una boca y de 50 ml de capacidad,

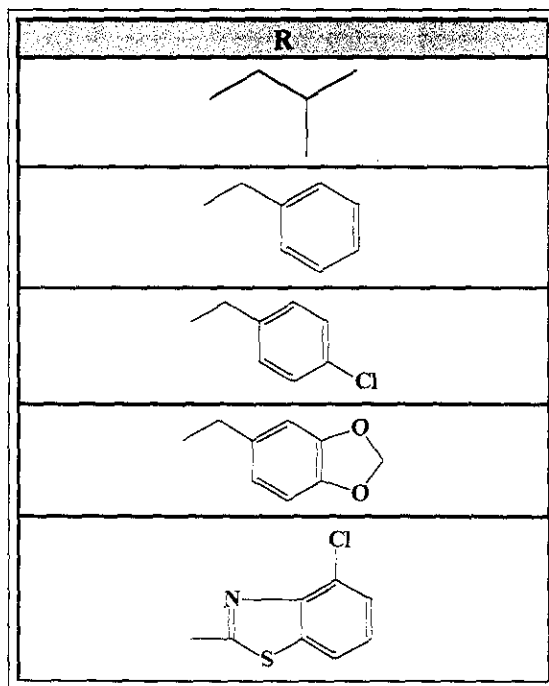
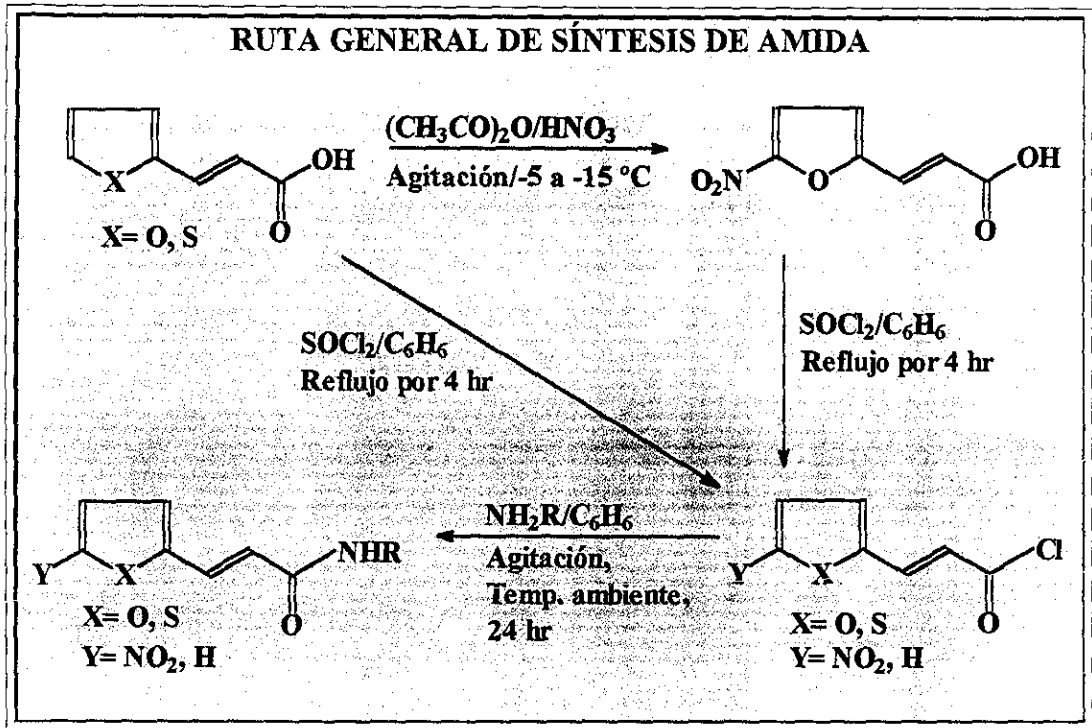
equipado con refrigerante en posición de reflujo con trampa de humedad, todo en condiciones anhidras, se colocó 2.0 g (0.0109 moles) de ácido 5-nitro-2-furilacrílico en 15 ml de benceno anhidro, luego se adicionaron 1.22 ml (0.01635 moles) de cloruro de tionilo. La reacción se mantuvo a reflujo en baño María de 60 a 70 °C y con agitación durante 4 horas.

El equipo de reflujo se modificó para realizar una destilación a presión reducida, operación que se repitió tres veces adicionando benceno anhidro cada vez.

El cloruro de ácido obtenido no se aisló, procediéndose inmediatamente a la obtención de la amida, para lo cual se colocó el matraz con la trampa de humedad en un baño de hielo y se adicionó lentamente la amina previamente disuelta en benceno seco, en una relación de 3 moles de amina por 1 mol de cloruro de ácido. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente con agitación constante por 24 horas. Al cabo de este tiempo se evaporó el disolvente en rotavapor; el sólido obtenido se disolvió en acetato de etilo y se colocó en un embudo de separación donde se lavó con una solución de ácido clorhídrico al 10 %, seguida de un lavado con una solución de bicarbonato de sodio al 10 %, finalizando con agua hasta pH neutro. Después se procedió a secar con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el acetato de etilo. La

purificación se realizó por cromatografía en columna con hexano-acetato de etilo 60:30, se cristalizó de hexano-acetato de etilo. Al sólido obtenido se le determinó el punto de fusión y sus

constantes espectroscópicas de IR, EM, RMN- ^1H , ^{13}C y UV. Una vez identificados los compuestos se realizó el bioensayo.



6.2 PARTE BIOLÓGICA:

6.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de *Trypanosoma cruzi*

En este estudio se utilizó la cepa "Y" aislada de humano, en Sao Paulo, Brasil.

Medio de cultivo

Medio LIT (Liver Infusion Tryptose)

Composición:

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Glucosa	2.0 g
Triptosa	5.0 g
Infusión de hígado	5.0 g
Hemina	0.025 g
Suero fetal bovino (inactivado)	100 ml
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml

Los componentes se disolvieron en agua bidestilada, excepto el suero y la hemina. El pH de la disolución se ajustó a 7.2. Posteriormente esta disolución se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lb/in² (1.1 Kg/cm²) durante 25 minutos.

Una vez frío, la hemina y el suero fueron adicionados en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar.

Hemina

Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en una mezcla de trietanolamina-agua desionizada 1:1. Se esterilizó con un filtro NALGENE 0.45 µm en una campana de flujo laminar.

Solución PBS

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua bidestilada	1000 ml

Los componentes se disolvieron en agua bidestilada, y se ajustó el pH a 7.2. Se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y a una presión de 15 lb/in² (1.1 Kg/cm²) durante 25 minutos.

Solución fijadora

Se preparó una solución de formaldehído al 10 % en PBS.

Mantenimiento de la cepa

Los microorganismos se mantuvieron en 5 ml de medio LIT estéril, contenido en frascos FALCON de 25 ml a 28 °C y subcultivados cada tercer día.

6.2.2 CURVA DE CRECIMIENTO.

Para determinar el efecto de los compuestos en el crecimiento de *Trypanosoma cruzi* se procedió a establecer la curva de crecimiento normal de la cepa. Se tomaron células de un cultivo de 3 días. La concentración inicial de microorganismos fue 5 x 10⁶ cél/ml contenida en 4 ml de medio de cultivo LIT, en tubos PYREX de 14 ml con tapón de rosca e incubados a 28 °C.

El conteo se hizo con una dilución de 1:10 (450 µl de formaldehído y 50 µl de cultivo). De esta dilución se tomaron 10 µl con una

micropipeta (GILSON) y se depositó en la cámara de Neubauer.

La cuenta se realiza utilizando los 16 cuadros localizados sobre las diagonales de la cámara (Fig. 13).

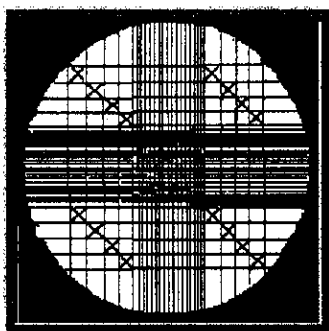


Fig. 13 Cámara de Neubauer

El No. total de células presentes en un mililitro de cultivo se obtiene mediante la fórmula:

$$N = n \times 10 \times 1000 \times fd$$

donde:

n = No. de células contadas

fd = Factor de dilución

Al mismo tiempo del conteo se hicieron lecturas de los cultivos en un espectrofotómetro a 580 nm. El ensayo se hizo por triplicado diariamente (cada 24 hr)

6.2.3 BIOENSAYO^[48]

6.2.3.1 Prueba de solubilidad en DMSO.

Como se requería de medios de cultivo de base acuosa fue necesario realizar pruebas de solubilidad de los compuestos debido a que estos no son solubles en agua. La prueba se realizó con DMSO, un disolvente probado y recomendado, para este tipo de problema.

La prueba consistió en encontrar la mínima cantidad de disolvente que solubilice los compuestos a 100µg/ml

(concentración máxima de compuesto propuesta para la evaluación biológica) en soluciones al 5, 2, 1 y 0.5 % de DMSO en medio LIT, siendo el volumen total de 1ml colocado en viales para ser incubados a 28 °C durante 96 hr; tiempo de duración del experimento. Cada 24 hr se examinó la aparición de cristales.

6.2.3.2 Prueba de toxicidad de DMSO sobre *Trypanosoma cruzi*.

Para determinar la concentración adecuada de DMSO que permitiera disolver los compuestos activos en el medio LIT sin afectar el crecimiento de *T. cruzi*, se realizaron ensayos con diversas concentraciones de dicho disolvente.

Para este ensayo se tomaron células de un cultivo tres días; se inició con una concentración de 5×10^6 cel/ml, en 4 ml de medio LIT, en tubos PYREX con tapón de rosca de 14 ml e incubados a 28 °C. El DMSO se adicionó a estos cultivos, y se probaron las siguientes concentraciones: 5%, 2% y 1%.

Para contar con un patrón de comparación que permitiera evaluar el efecto del disolvente se realizó paralelamente una prueba control con el medio de cultivo LIT y la misma concentración de células, pero sin DMSO. El ensayo se realizó por triplicado, diariamente se hizo conteo y la lectura a 580 nm para observar su comportamiento.

6.2.3.3 Actividad tripanocida de los compuestos

Los ensayos se realizaron con inóculos a una concentración de 5×10^6 cél/ml provenientes de un cultivo de tres días en 4 ml de LIT, en tubos PYREX

con tapón de rosca de 14 ml e incubados a 28 °C. Se eligió el tercer día porque en éste el cultivo se presenta en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, lo cual significa que los microorganismos se encuentran en condiciones óptimas de desarrollo, es decir:

- 1) En esta fase se sintetiza nuevo material celular.
- 2) La masa aumenta exponencialmente.

Se probaron los compuestos del 1-8 a las concentraciones: 100, 10 y 1 µg/ml. Se usó como control positivo el Nifurtimox a las mismas concentraciones.

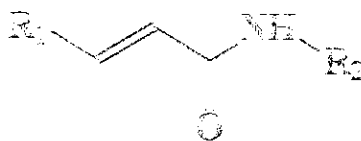
Los ensayos se realizaron por triplicado, con controles de cultivo en LIT y cultivo en LIT + 1% de DMSO; se leyó la absorbancia de los tubos en un espectrofotómetro a 580 nm y se observó cada 24 horas durante 4 días la morfología de los parásitos en un microscopio invertido.

Para determinar el efecto tripanocida de los compuestos, se tomaron en cuenta los parámetros observables en los microorganismos en cultivo como son: motilidad, morfología, formación de rosetas y porcentaje de inhibición de crecimiento o de lisis de los microorganismos en cultivo, dependiendo de la actividad de los compuestos.

VII. RESULTADOS

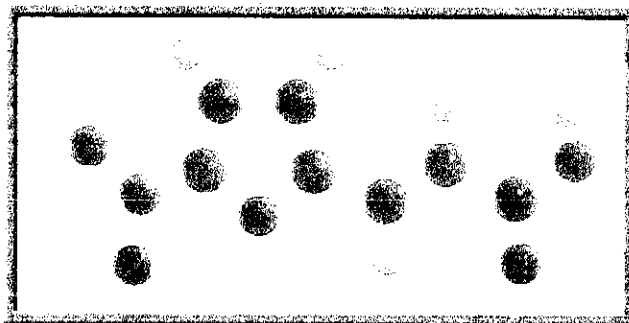
VII. RESULTADOS

Química

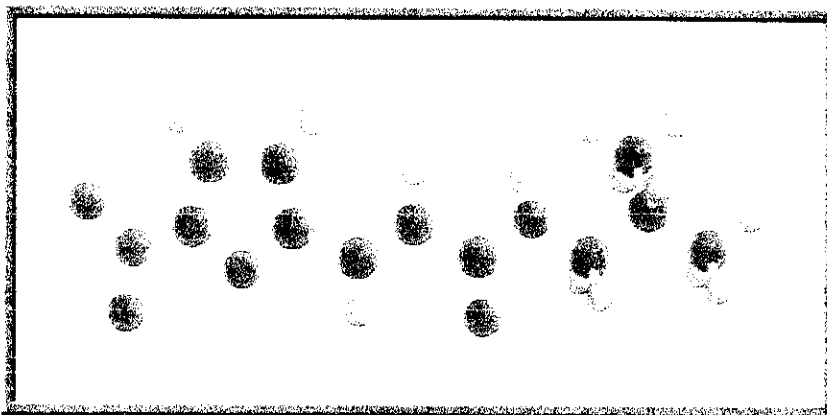


Comp. No.	R1	R2	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (hr)		Punto de fusión (°C)
				Etapa 1: Nitración	Etapa 2: Formación de la amida	
				Etapa 1	Etapa 2	
1			67.5	1	24	124-125
2			89.0	1	24	177-178
3			85.0	1	24	163-164
4			94.0	0	24	146-147
5			95.0	0	24	135-136
6			88.5	1	24	147-148
7			91.0	0	24	153-154
8			82.0	1	24	186-187

0 Materia prima adquirida comercialmente, que no se sometió a la etapa 1 de la síntesis.



Nombre:	Ácido-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenóico
Fórmula:	$C_7H_5NO_4$
Peso Molecular:	183.02
P.F.(°C):	234-235
Aspecto Físico:	Cristales amarillos
IR (ν máx cm^{-1}):	3149.64 (furano) 3071.62 (C-H insaturado) 3000 (-OH de COOH) 1677.18 (-C=O de -COOH) 1510.15, 1349.86 (-NO ₂) 976.13 (trans olefínico)
RMN (δ ppm):	7.44, 6.49 (dd, 2H, J=15.94, trans olefínico) 7.73, 7.26 (dd, 2H, J=3.86, furano) 12.84 (una banda ancha y baja, 1H, -OH)
Ion Molecular:	183



Comp. 1

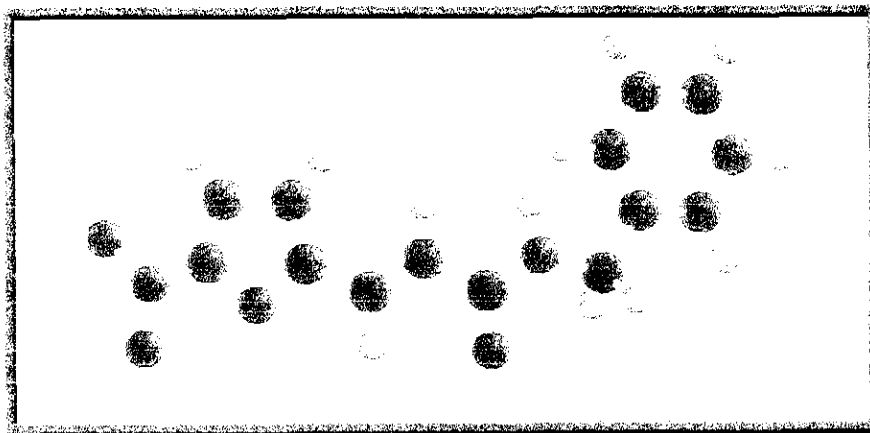
Nombre: N-isobutil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{11}H_{14}N_2O_4$
 Peso Molecular: 238.07
 P.F.(°C): 124-125
 Aspecto Físico: Cristales amarillos

IR (ν máx cm^{-1}):
 3270.0 (N-H)
 3162.65 (Furano)
 3085.94 (C-H insaturado)
 2967.34 (C-H saturado)
 1664.75 (-C=O de -CONH-)
 1516.85, 1348.65 (-NO₂)
 1156.78, 1130.35 (isobutil)
 979.48 (trans olefínico)

RMN (δ ppm):
 7.4, 6.67 (dd, 2H, J=15.38, trans olefínico)
 7.34, 6.69 (dd, 2H, J=3.7, furano)
 6.11 (s, 1H, banda ancha y baja, -NH-)
 3.24 (t, 2H, -CH₂-)
 1.85 (m, 1H, -CH-)
 0.95 (d, 6H, 2(-CH₃))

UV (λ máx nm): 347.8

Ion Molecular: 238



Comp. 2

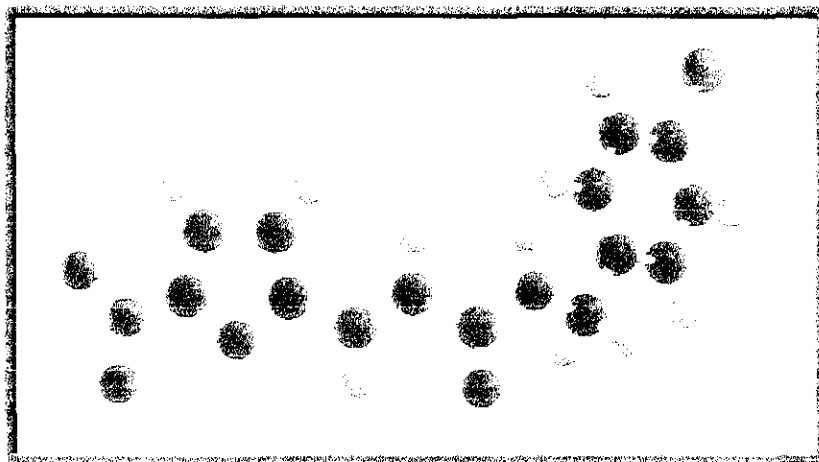
Nombre: N-bencil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{14}H_{12}N_2O_4$
 Peso Molecular: 272.10
 P.F.(°C): 177-178
 Aspecto Físico: Polvo cristalino amarillo

IR (ν máx cm^{-1}):
 3250.33 (N-H)
 3158.15 (Furano)
 3081.83 (C-H insaturado)
 2921.77 (C-H saturado)
 1666.55 (C=O)
 1513.09, 1356.0 (NO_2)
 969.97 (trans olefínico)

RMN (δ ppm):
 7.44, 6.66 (dd, 2H, $J=15.5$, trans olefínico)
 7.32, 6.68 (dd, 2H, $J=3.8$, furano)
 7.31 (m, 5H, aromático)
 6.11 (s, 1H, banda baja y ancha, N-H)
 4.57 (d, 2H, $-CH_2-$)

UV (λ máx nm) 355.65

Ión Molecular: 272



Comp. 3

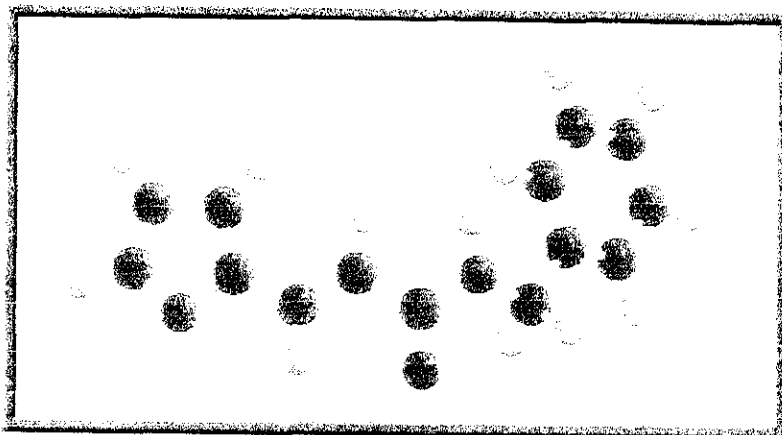
Nombre: N-(4-Clorobencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{14}H_{11}N_2O_4Cl$
 Peso Molecular: 306.55
 P.F.(°C): 163-164
 Aspecto físico: Polvo cristalino amarillo

IR (ν máx cm^{-1}):
 3254.13 (N-H)
 3153.84 (furano)
 3062.41 (C-H insaturado)
 2923.27 (C-H saturado)
 1654.25 (C=O)
 1520.7, 1346.38 (NO_2)

RMN (δ ppm):
 7.37, 6.66 (dd, 2H, $J=15.3$, trans olefínico)
 7.27, 6.65 (dd, 2H, $J=3.7$, furano)
 7.26 (m, 4H, aromático)
 6.55 (1H, banda ancha y baja, -NH-)
 4.50 (d, 2H, -CH₂-)

UV (λ máx nm): 347.66

Ion Molecular: 306



Comp. 4

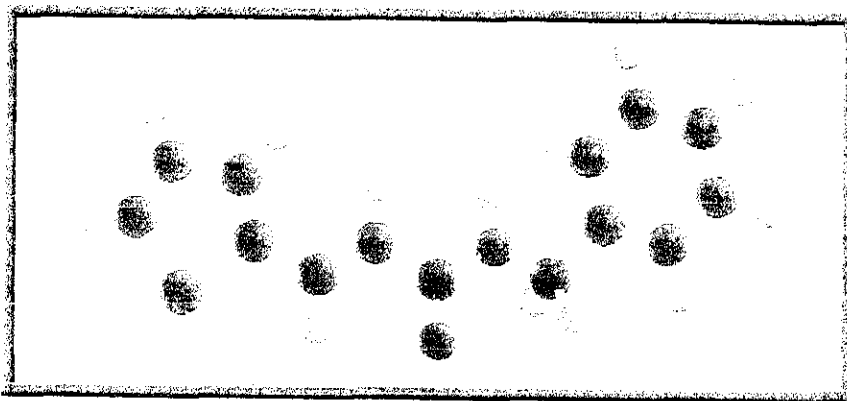
Nombre: N-bencil-3-(2-furil)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{14}H_{13}NO_2$
 Peso Molecular: 227.12
 P.F.(°C): 146-147
 Aspecto físico: Cristales amarillo claro

IR (ν máx cm^{-1}):
 3257.64 (N-H)
 3065.46 (C-H insaturado)
 2928 (C-H saturado)
 1654.85 (C=O)
 974.18 (trans olefínico)

RMN (δ ppm):
 7.46, 6.32 (dd, 2H, $J=15.35$, trans olefínico)
 7.29 (m, 5H, aromático)
 7.30, 6.54, 6.41 (3d, 3H, furano)
 6.0 (s, 1H, banda ancha y baja, -NH-)
 4.54 (d, 2H, -CH₂-)

UV (λ máx nm): 298.31

Ión Molecular: 227



Comp. 5

Nombre:	N-bencil-3-(2-tio)-2E-propenamida
Fórmula:	$C_{14}H_{13}NOS$
Peso Molecular:	243.19
P.F.(°C):	135-136
Aspecto físico:	Cristales amarillo claro

IR (ν máx cm^{-1})	3247.48 (N-H)
	3100, 697.13 (Tiofeno)
	3070.83 (C-H insaturado)
	2960 (C-H saturado)
	1648.16 (C=O)
	973.62 (trans olefínico)

RMN (δ ppm).	7.46, 6.92 (dd, 2H, $J=16.15$, trans olefínico)
	7.29 (m, 5H, aromático)
	7.75, 7.25, 7.10 (3d, 3H, tiofeno)
	6.78 (s, 1H, banda ancha y baja, -NH-)
	4.55 (d, 2H, -CH ₂ -)

UV (λ máx nm):	306.37
----------------	--------

ión Molecular:	243
----------------	-----



Comp. 6

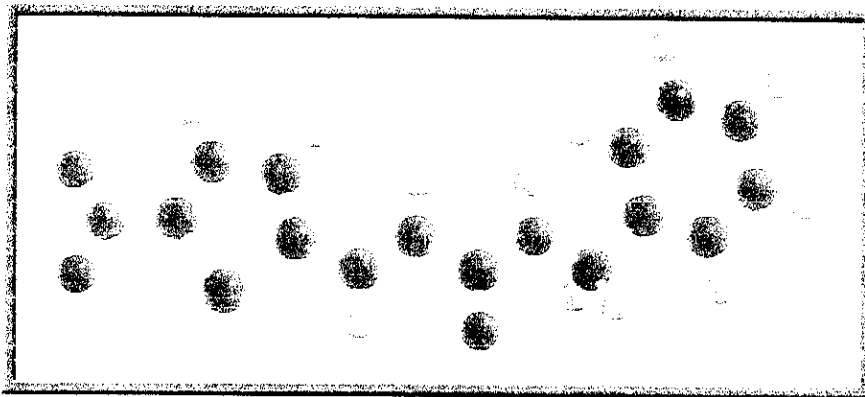
Nombre: N-piperonii-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{15}H_{15}N_2O_5$
 Peso Molecular: 316.09
 P.F.(°C): 147-148
 Aspecto físico: cristales amarillos

IR (ν máx cm^{-1}):
 3273.31 (N-H)
 3153.84 (furano)
 3109.40 (C-H insaturado)
 2923.27 (C-H saturado)
 1653.41 (C=O)
 1511.88, 1347.51 (NO_2)

RMN (δ ppm):
 7.37, 6.66 (dd, 2H, J= 15.3, trans olefínico)
 7.27, 6.65 (m, 2H, J=3.7, furano)
 7.45, 6.80 (dd, 2H, J=3.0 aromático) y 6.10 (s, 1H, aromático)
 6.55 (1H, banda ancha y baja, -NH-)
 5.95 (s, 2H, -CH₂-)
 4.45 (d, 2H, -CH₂-)

UV (λ máx nm): 348.72

Ión Molecular: 316



Comp. 7

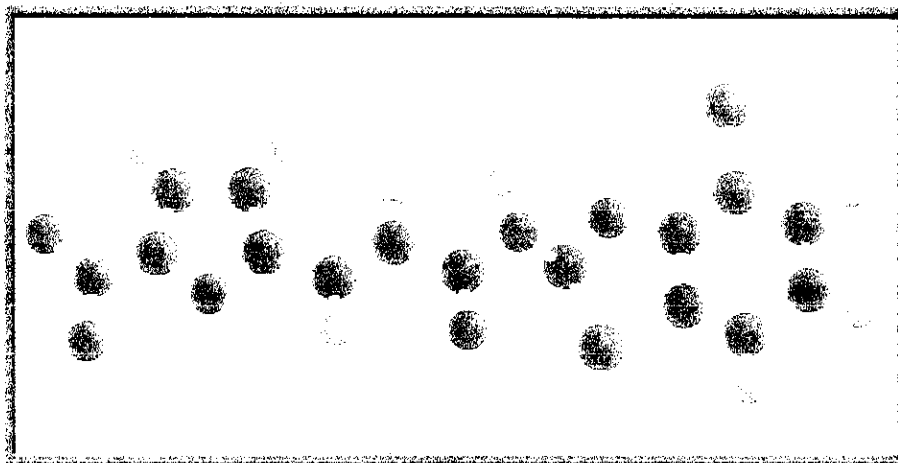
Nombre: N-bencil-3-(5-nitro-2-tiol)-2E-propenamida
 Fórmula: $C_{14}H_{12}N_2O_3S$
 Peso Molecular: 288.17
 P.F.(°C): 153-154
 Aspecto físico: cristales amarillos

IR (ν máx cm^{-1}):
 3257.18 (N-H)
 3113.77 (tiofeno)
 3078.54 (C-H insaturado)
 2917.87 (C-H saturado)
 1664.91 (C=O)
 1532.17, 1341.00 (NO_2)

RMN (δ ppm):
 7.46, 6.45 (dd, 2H, $J=15.3$, trans olefínico)
 7.80, 7.05 (m, 2H, $J=3.4$, tiol)
 7.28 (m, 5H, aromático)
 6.10 (1H, banda ancha y baja, -NH-)
 4.50 (d, 2H, - CH_2 -)

UV (λ máx nm): 357.74

ión Molecular: 288



Comp. 8

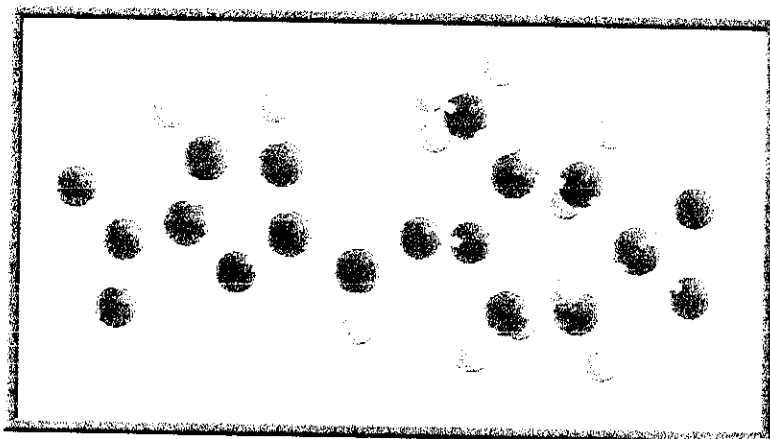
Nombre: *N*-(4-Cloro-2-benzotiazol)-3-(5-nitro-2-furil)-2*E*-propenamida
 Fórmula: $C_{12}H_8ClN_3O_4S$
 Peso Molecular: 349.61
 P.F.(°C): 186-187
 Aspecto físico: cristales amarillos

IR (ν máx cm^{-1}):
 3466.57 (N-H)
 3226.71 (Furano)
 3053.91 (C-H insaturado)
 2928.56 (C-H saturado)
 1646.00 (C=O)
 1536.57, 1348.37 (NO_2)

RMN (δ ppm):
 7.46, 6.45 (dd, 2H, $J=16.3$, trans olefínico)
 7.30 (m, 3H, aromático)
 7.40, 6.95 (m, 2H, $J=3.7$, furano)
 6.05 (1H, banda ancha y baja, -NH-)

UV (λ máx nm): 266.76

Ion Molecular: 349



Nifurtimox

Nombre: 3-Metil-N-[(5-nitro-2-furanil)metilen]-1,1-dióxido-4-tiomorfolinamina
 Fórmula: $C_{10}H_{13}N_5O_5S$
 Peso Molecular: 287,29
 P.F.(°C): 179-180
 Aspecto Físico: Polvo cristalino amarillo

IR (ν máx cm^{-1}): 3434 (C-N)
 3128 (Furano)
 2987 (C-H insaturado)
 2928 (C-H saturado)
 1656 (C=N)
 1509, 1330 (NO_2)
 1124, 674 ($-SO_2$)

RMN (δ ppm): 7.49 (s, 1H, N=CH)
 7.32, 6.66 (dd, 2H, J=3.8, furano)
 4.20-2.70 (m, 6H, heterociclo de seis miembros)
 1.46 (d, 3H, $-CH_3$)

UV (λ máx nm): 272.0

Ión Molecular: 287

7.2 PARTE BIOLÓGICA

7.2.1 Curva de crecimiento.

Se observó que la cepa “Y” describe una curva de crecimiento que se divide en dos fases: la logarítmica en la que predominan los epimastigotes de un 95-99% y la estacionaria con un 70% de epimastigotes y un 30% de tripomastigotes.

En la **gráfica 1** se muestra la curva de crecimiento de la cepa “Y” por el método por conteo en cámara de Neubauer en la que se observan dos fases: la logarítmica y la estacionaria. Estas dos fases de la curva de crecimiento también se observan al utilizar el método espectrofotométrico presentado en la **gráfica 2**.

En la **gráfica 3** se presenta la relación de siete días entre la absorbancia y número de células.

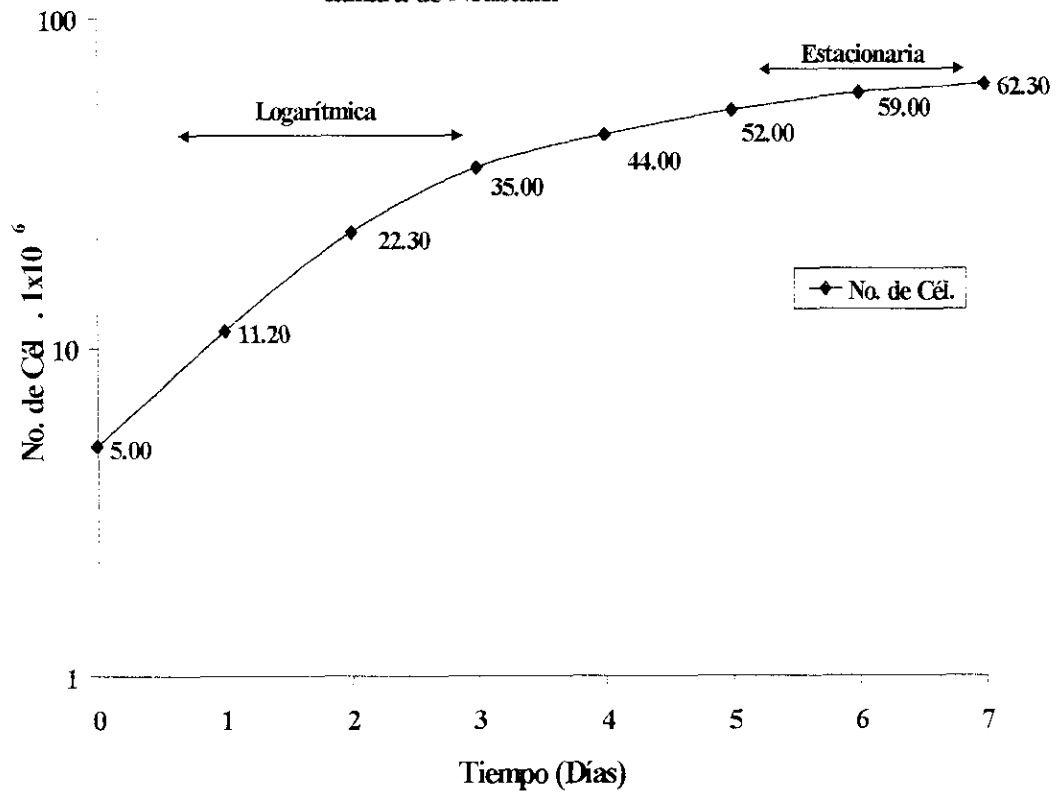
7.2.2 Pruebas de solubilidad.

La solubilidad de los compuestos se probó a 100µg/ml (concentración máxima propuesta para la evaluación biológica) en soluciones al 5, 2, 1 y 0.5 % de DMSO en medio LIT, éstas se incubaron a 28 °C durante 96 hr observándose la ausencia de cristales a partir de una concentración del 1% de DMSO.

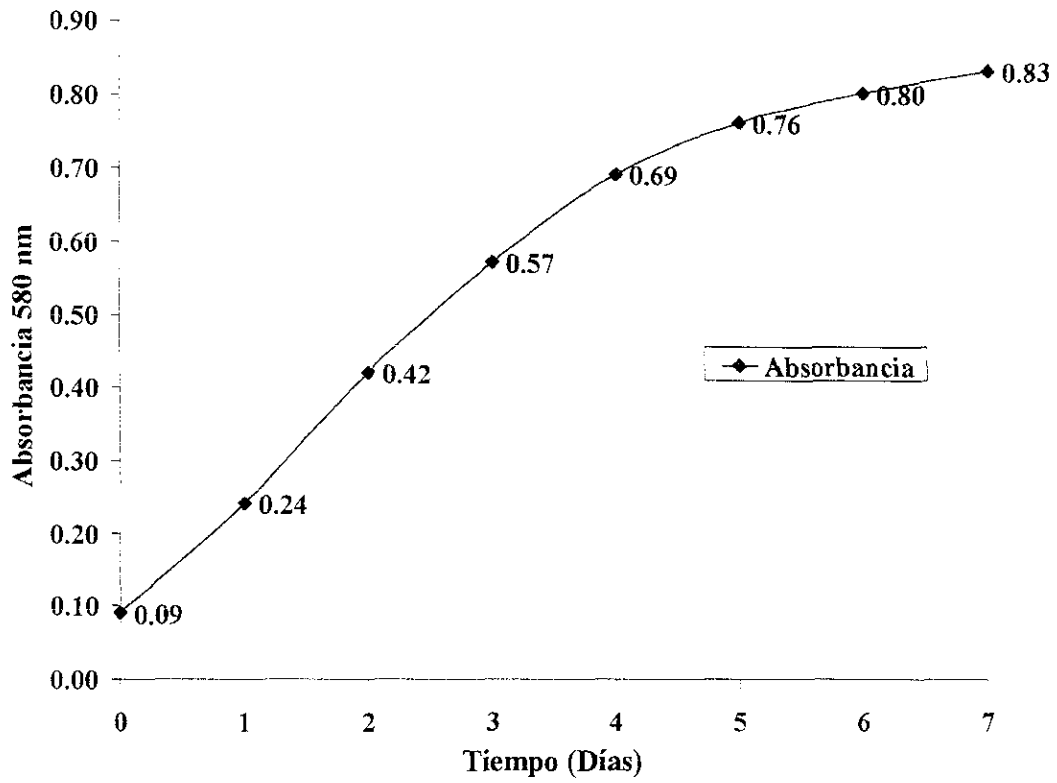
7.2.3 Prueba de toxicidad

En la **gráfica 4**, se presentan cuatro curvas de crecimiento en medio LIT y tres de ellas con 5, 2 y 1 % de DMSO, concentraciones a las que no cristalizó los compuestos a evaluar la actividad tripanocida; se observó que la curva de crecimiento a la concentración del 1% de DMSO, es semejante a la curva de crecimiento control del parásito.

GRÁFICA 1: Curva de crecimiento por método por conteo en cámara de Neubauer



GRÁFICA 2: Curva de crecimiento por método espectrofotométrico



GRÁFICA 3: Curva de crecimiento por extrapolación del método por conteo en cámara de Neubauer y espectrofotométrico

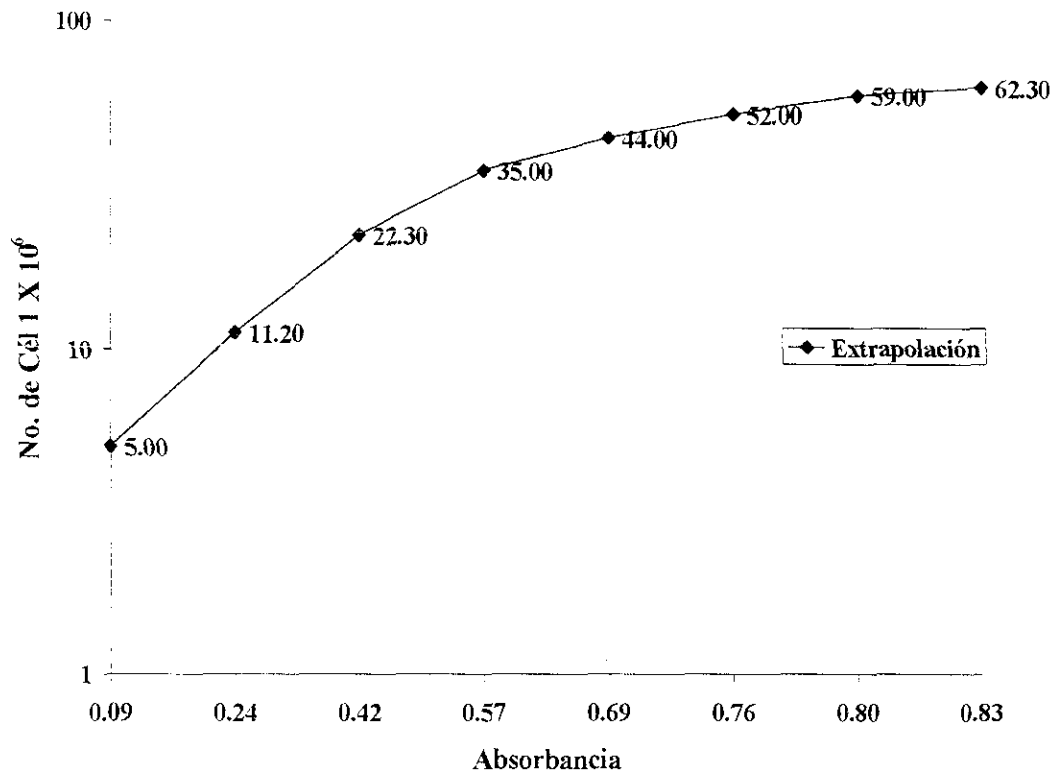
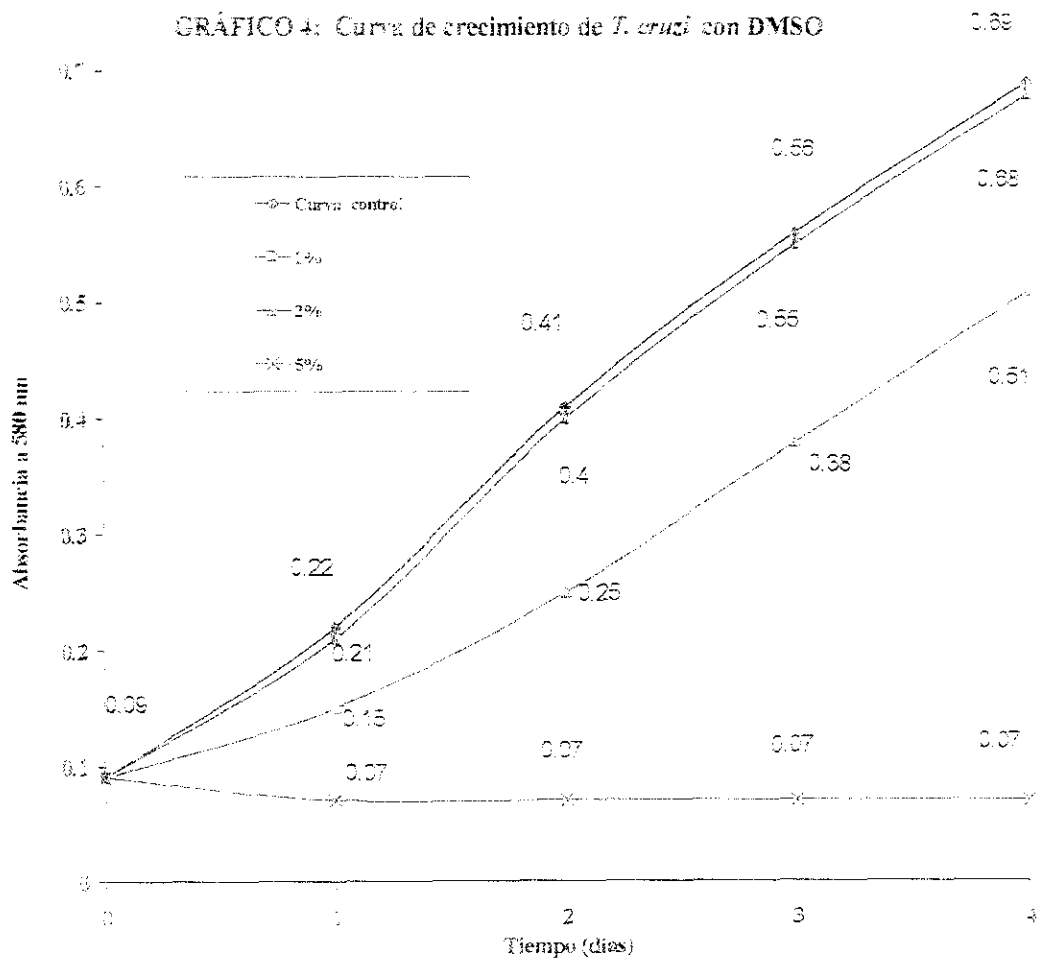


GRÁFICO 4: Curva de crecimiento de *T. cruzi* con DMSO



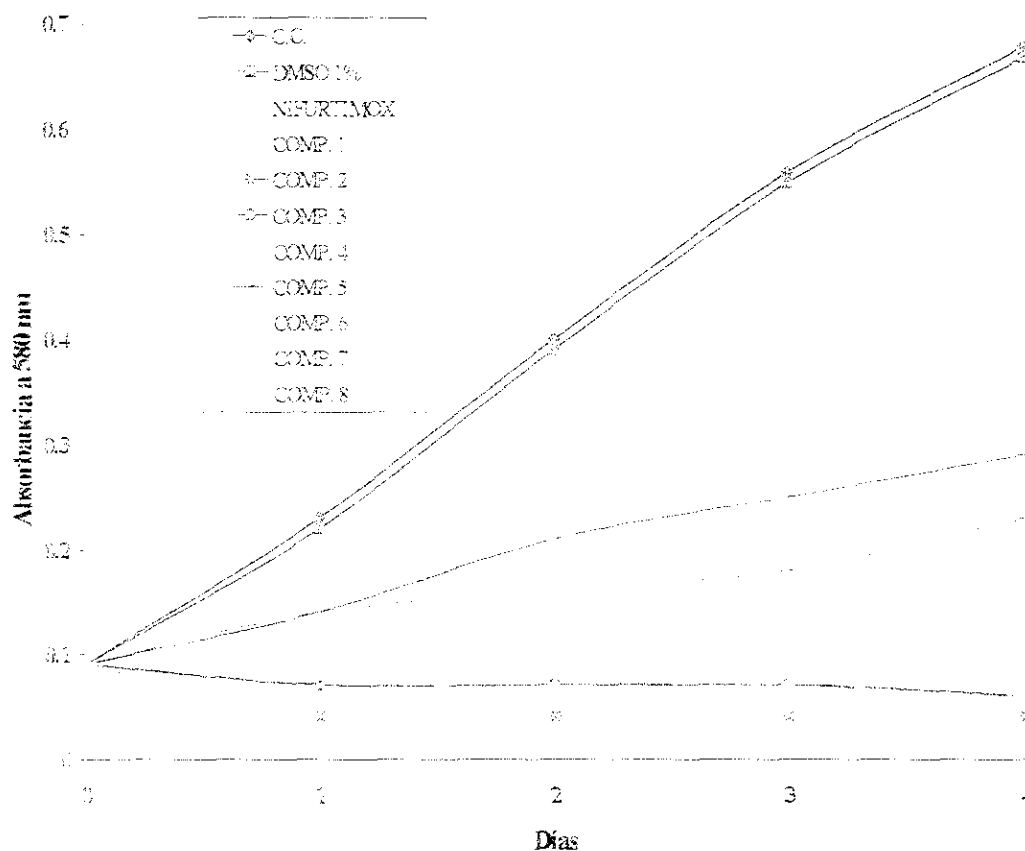
7.2.4 ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LOS COMPUESTOS

La actividad tripanocida de los compuestos sintetizados a las concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ se muestran en las gráficas 5, 6 y 7 respectivamente.

Lecturas de absorbancia a 580 nm de las curvas de crecimiento de los compuestos a 100 $\mu\text{g/ml}$.

COMPUESTOS	DÍAS					OBSERVACIONES
	0	1	2	3	4	
C.C.	0.09	0.23	0.40	0.56	0.68	Vivas, buena motilidad
DMSO 1%	0.09	0.22	0.39	0.55	0.67	Vivas, buena motilidad
Nifurtimox	0.09	0.09	0.07	0.05	0.05	Muertas, pocas células
Compuesto 1	0.09	0.04	0.04	0.04	0.04	Muertas, lisadas
Compuesto 2	0.09	0.04	0.04	0.04	0.04	Muertas, lisadas
Compuesto 3	0.09	0.07	0.07	0.07	0.06	Muertas, lisadas
Compuesto 4	0.09	0.14	0.16	0.18	0.23	Pocas vivas, buen movimiento
Compuesto 5	0.09	0.14	0.21	0.25	0.29	Pocas vivas, buen movimiento
Compuesto 6	0.09	0.04	0.04	0.04	0.4	Muertas, lisadas
Compuesto 7	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07	Muertas, pocas células
Compuesto 8	0.09	0.08	0.06	0.05	0.05	Muertas, pocas células

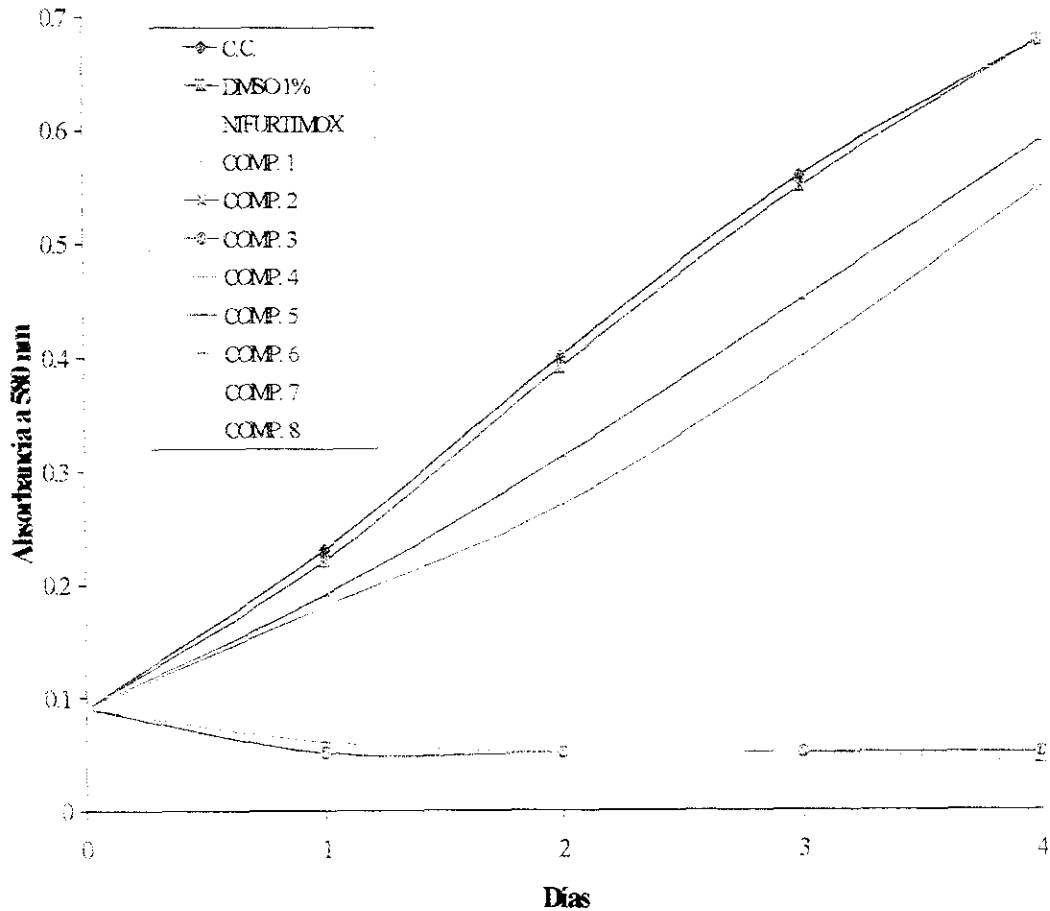
GRÁFICA 5: Crecimiento de *T. cruzi* por los compuestos a 100 $\mu\text{g/ml}$



Lecturas de absorbancia a 580 nm de las curvas de crecimiento de los compuestos a 10 µg/ml.

COMPUESTOS	DÍAS					OBSERVACIONES A las 24 hr
	0	1	2	3	4	
C.C.	0.09	0.23	0.40	0.56	0.68	Vivas, buena motilidad
DMSO 1%	0.09	0.22	0.39	0.55	0.68	Vivas, buena motilidad
Nifurtimox	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	Muertas, pocas células
Compuesto 1	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	Muertas, completas y lisadas
Compuesto 2	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	Muertas, completas y lisadas
Compuesto 3	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	Muertas, completas y lisadas
Compuesto 4	0.09	0.18	0.27	0.40	0.55	Muchas vivas, buen movimiento
Compuesto 5	0.09	0.19	0.31	0.45	0.59	Muchas vivas, buen movimiento
Compuesto 6	0.09	0.06	0.05	0.05	0.04	Muertas, completas y lisadas
Compuesto 7	0.09	0.16	0.21	0.26	0.30	Vivas, buena motilidad, rosetas
Compuesto 8	0.09	0.18	0.23	0.28	0.34	Vivas, buena motilidad, rosetas

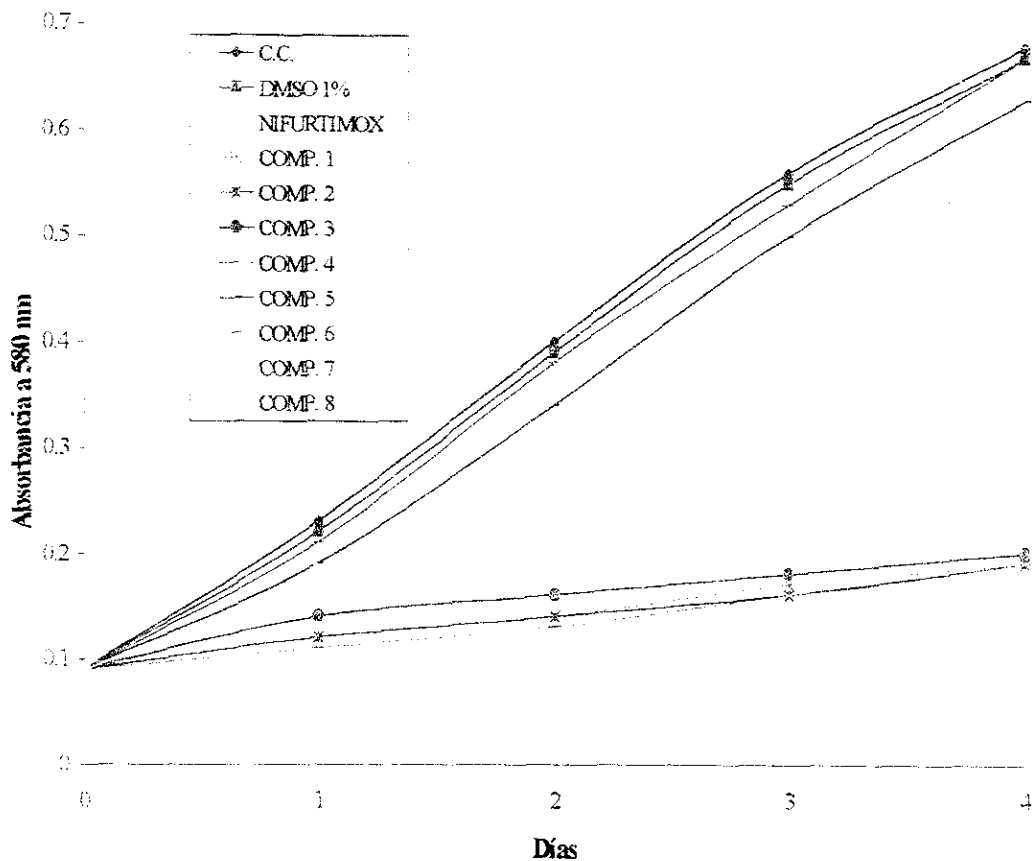
GRÁFICA 6: Crecimiento de *T. cruzi* por los compuestos a 10 µg/ml



Lecturas de absorbancia a 580 nm de las curvas de crecimiento de los compuestos a 1 $\mu\text{g/ml}$.

COMPUESTOS	DÍAS					OBSERVACIONES A las 24 hr
	0	1	2	3	4	
C.C.	0.09	0.23	0.40	0.56	0.68	Vivas, buena motilidad
DMSO 1%	0.09	0.22	0.39	0.55	0.68	Vivas, buena motilidad
Nifurtimox	0.09	0.19	0.32	0.45	0.59	Vivas, buena motilidad
Compuesto 1	0.09	0.12	0.14	0.17	0.19	Vivas, pocas células, buena motilidad
Compuesto 2	0.09	0.12	0.14	0.16	0.19	Vivas, pocas células, buena motilidad
Compuesto 3	0.09	0.14	0.16	0.18	0.20	Vivas, pocas células, buena motilidad
Compuesto 4	0.09	0.21	0.38	0.53	0.67	Vivas, buena motilidad
Compuesto 5	0.09	0.19	0.34	0.50	0.63	Vivas, buena motilidad
Compuesto 6	0.09	0.11	0.13	0.16	0.19	Vivas, pocas células, buena motilidad
Compuesto 7	0.09	0.16	0.30	0.42	0.59	Vivas, buena motilidad
Compuesto 8	0.09	0.17	0.31	0.43	0.60	Vivas, buena motilidad

GRÁFICA 7: Crecimiento de *T. cruzi* por los compuestos a 1 $\mu\text{g/ml}$

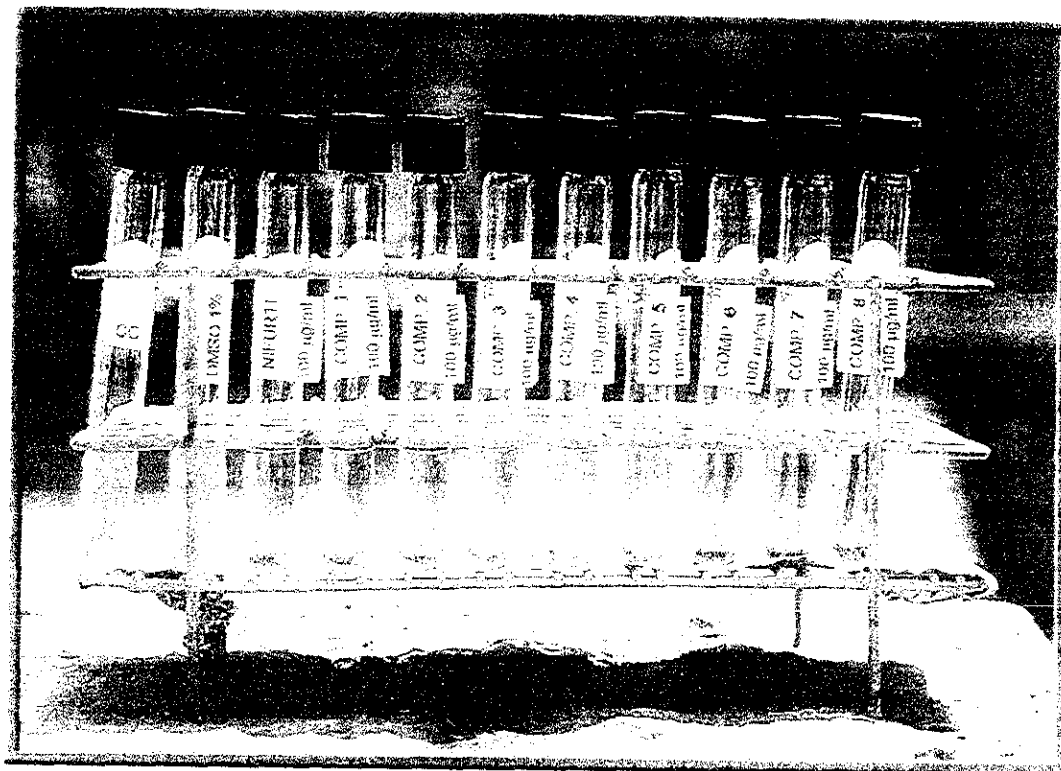


PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DÍA 1 (24 hr)			
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
C.C.	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0
NIFURTIMOX	100	100	17.39
COMP. 1	100	100	47.83
COMP. 2	100	100	47.83
COMP. 3	100	100	39.13
COMP. 4	39.13	21.74	8.7
COMP. 5	39.13	17.39	17.39
COMP. 6	100	100	52.17
COMP. 7	100	30.44	30.44
COMP. 8	100	21.74	26.09

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DÍA 2 (48 hr)			
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
C.C.	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0
NIFURTIMOX	100	100	20.0
COMP. 1	100	100	65.0
COMP. 2	100	100	65.0
COMP. 3	100	100	60.0
COMP. 4	60	32.5	5.0
COMP. 5	47.5	22.5	15.0
COMP. 6	100	100	67.5
COMP. 7	100	47.5	25.0
COMP. 8	100	42.5	22.5

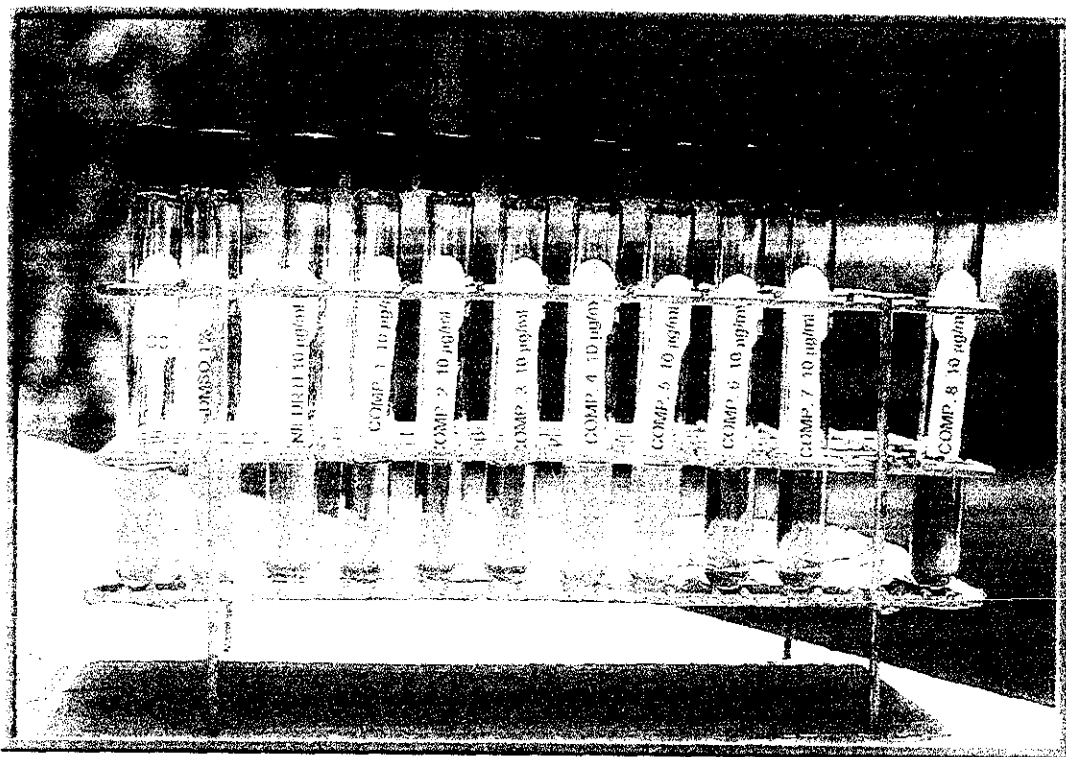
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DÍA 3 (72 hr)			
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
C.C.	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0
NIFURTIMOX	100	100	19.64
COMP. 1	100	100	69.64
COMP. 2	100	100	71.43
COMP. 3	100	100	67.86
COMP. 4	67.86	28.57	5.36
COMP. 5	55.36	19.64	10.72
COMP. 6	100	100	71.43
COMP. 7	100	53.57	25.0
COMP. 8	100	50.0	23.22

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DÍA 4 (96 hr)			
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
C.C.	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0
NIFURTIMOX	100	100	13.24
COMP. 1	100	100	72.06
COMP. 2	100	100	72.06
COMP. 3	100	100	70.59
COMP. 4	66.18	19.12	1.47
COMP. 5	57.35	13.24	7.35
COMP. 6	100	100	72.06
COMP. 7	100	55.88	13.24
COMP. 8	100	50.0	11.77



En esta foto tomada en el cuarto día del experimento se observa, de izquierda a derecha: el crecimiento normal de epimastigotes de *T. cruzi* en medio LIT (C.C.), curva de crecimiento con DMSO al 1%, y a la concentración de 100 µg/ml: Nifurimox (NIFURTI), compuesto 1 (COMP. 1), compuesto 2 (COMP. 2), compuesto 3 (COMP. 3), compuesto 4 (COMP. 4), compuesto 5 (COMP. 5), compuesto 7 (COMP. 7), compuesto 8 (COMP. 8).

Note los cambios de turbidez en relación directa con el crecimiento de *T. cruzi*.



En esta foto tomada en el cuarto día del experimento se observa, de izquierda a derecha, el crecimiento normal de epimastigotes de *T. cruzi* en medio LIT (C.C.), curva de crecimiento con DMSO al 1%, y a la concentración de 10 µg/ml Nifurtimox (NIFURTE), compuesto 1 (COMP. 1), compuesto 2 (COMP. 2), compuesto 3 (COMP. 3), compuesto 4 (COMP. 4), compuesto 5 (COMP. 5), compuesto 7 (COMP. 7), compuesto 8 (COMP. 8).

Note los cambios de turbidez en relación directa con el crecimiento de *T. cruzi*.

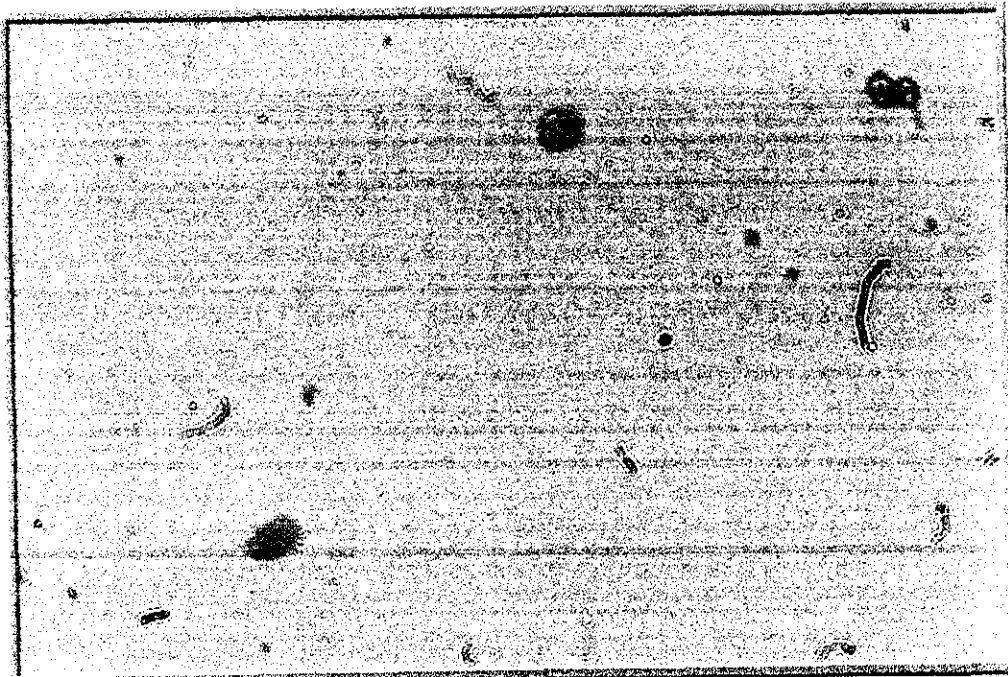


En esta foto tomada en el cuarto día del experimento se observa, de izquierda a derecha: el crecimiento normal de epimastigotes de *T. cruzi* en medio LIT (C.C.), curva de crecimiento con DMSO al 1%, y a la concentración de 1 µg/ml Nifurtimox (NIFURTI), compuesto 1 (COMP. 1), compuesto 2 (COMP. 2), compuesto 3 (COMP. 3), compuesto 4 (COMP. 4), compuesto 5 (COMP. 5), compuesto 7 (COMP. 7), compuesto 8 (COMP. 8).

Nota los cambios de turbidez en relación directa con el crecimiento de *T. cruzi*.

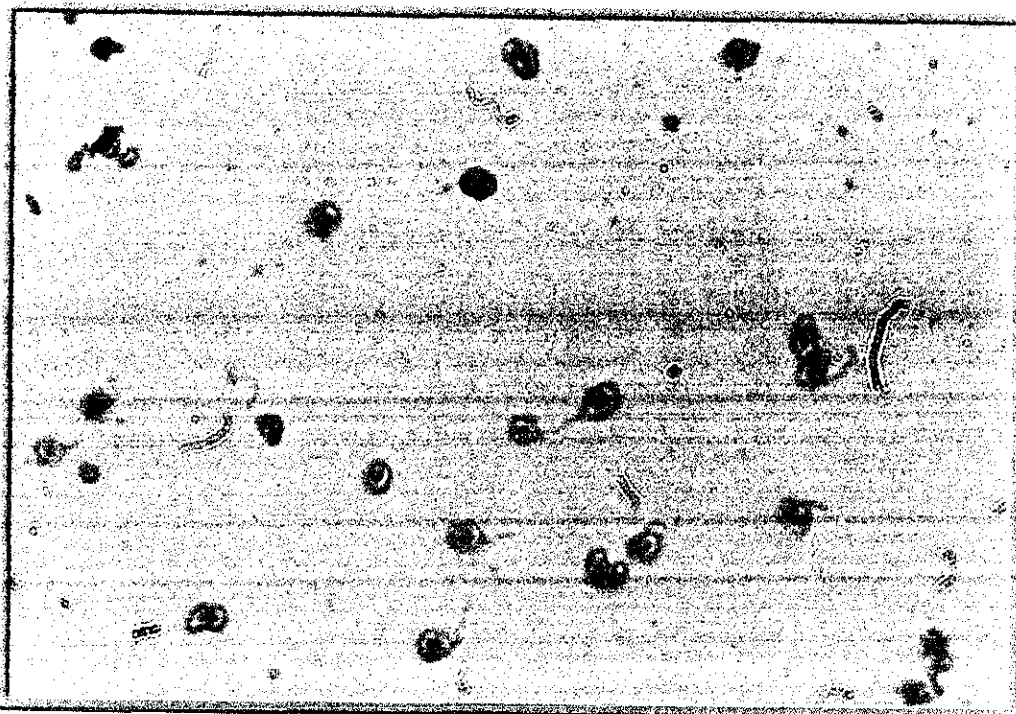


VISTA AL MICROSCOPIO A SECO FUERTE DE LA CURVA NORMAL DE CRECIMIENTO
A LAS 24 hr.

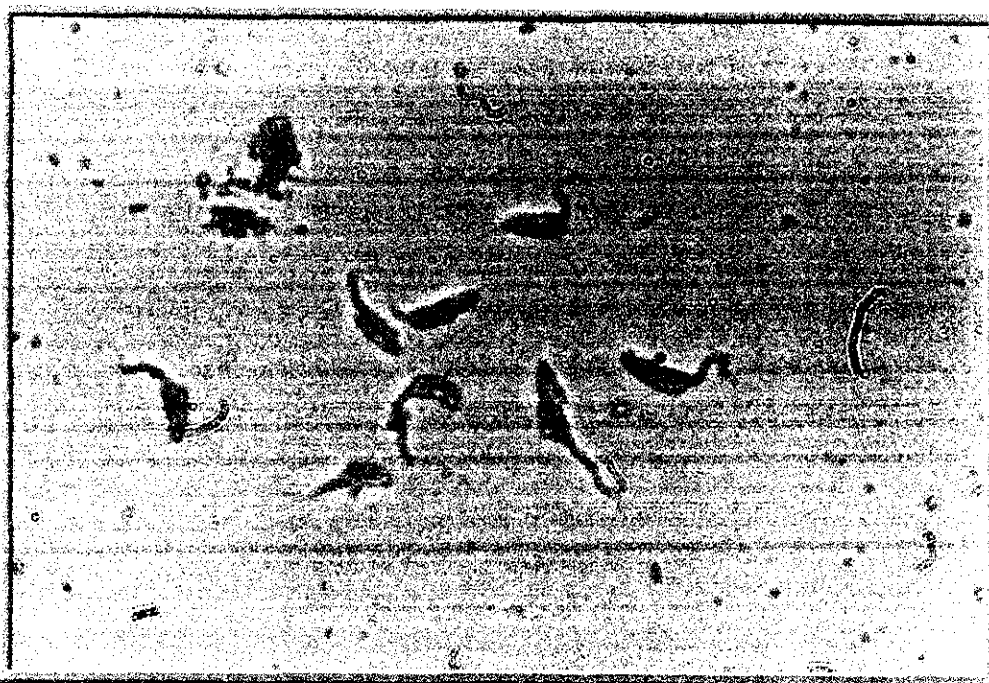


VISTA AL MICROSCOPIO A SECO FUERTE DEL BIOENSAYO CON EL COMPUESTO 1
UNA CONCENTRACION DE 100 µg/ml A LAS 24 hr.

En la foto superior se muestra la morfología de epimastigotes y la cantidad de parásitos de la curva de crecimiento en medio LIT a las 24 hr, en contraste, la foto inferior visto a seco fuerte en el microscopio nos muestra los cambios morfológicos de *Trypanosoma evansi*, además de la cantidad de parásitos.



VISTA AL MICROSCOPIO A SECO FUERTE DEL BIOENSAYO CON EL COMUESTO 1 A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 µg/ml A LAS 24 hr.



VISTA AL MICROSCOPIO A SECO FUERTE DEL BIOENSAYO CON EL COMUESTO 1 A UNA CONCENTRACIÓN DE 1 µg/ml A LAS 24 hr.

En estas dos fotos se muestra como al disminuir la concentración del compuesto 1 se afecta en menor grado la morfología y la cantidad de los epimarigotes del *Trypanosoma brucei*. Los parásitos que estuvieron en contacto con el compuesto 1 a una concentración de 10 µg/ml estaban muertos, mientras que los del 1 µg/ml estaban vivos y poseían un movimiento normal.



VIII. DISCUSIÓN



VIII. DISCUSIÓN

En la síntesis del ácido 5-nitrofurilacrílico el rendimiento de la nitración fue del 47%, que supera al 40 % reportado en la literatura, la temperatura se mantuvo a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora después de haber mezclado todos los componentes involucrados, ya que si se aumentaba esta temperatura disminuía el rendimiento y se dificultaba su purificación.

Con respecto a la síntesis de la amida es importante mencionar que un punto crítico es la destilación del exceso de cloruro de tionilo con benceno anhidro, ya que si se evapora a sequedad el benceno anhidro, se obtiene un producto muy oscuro que hace difícil su cristalización por par de disolventes, y en ese caso se tiene que pasar el compuesto por una columna empacada antes de la cristalización.

Los espectros de RMN- ^1H , infrarrojo y masas muestran señales que confirman la estructura de los compuestos.

Para realizar el ensayo tripanocida, se eligió el método espectrofotométrico por considerar que se introducen menos errores de manipulación que con el método por conteo en cámara de Neubauer, siendo más confiables los resultados obtenidos.

El Nifurtimox y los compuestos sintetizados se evaluaron a las concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ por ser las recomendadas en la literatura para la determinación de la actividad tripanocida.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encuentra que todos los compuestos sintetizados y Nifurtimox presentan intrínseca contra

Trypanosoma cruzi a 100 $\mu\text{g/ml}$ observándose una disminución en el crecimiento del parásito en comparación con la curva normal del mismo.

En el caso de los compuestos con grupo nitro y el Nifurtimox a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ la actividad tripanocida es del 100%.

Al comparar los compuestos sin grupo nitro se observa que presentó mayor actividad el compuesto *N*-bencil-3-(2-furil)-2E-propenamida (4) que contiene el anillo heterocíclico furano con un 66.18 % de inhibición de crecimiento a las 96 hr, con respecto a un 57.35 % del *N*-Bencil-3-(2-tiol)-2E-propenamida (5) que contiene al grupo tiofeno.

A la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, los compuestos no nitrados (4) y (5) presentaron poca inhibición de crecimiento siendo ésta de 21.74 % y 17.39 % respectivamente a las 24 hr.

De los compuestos nitrados probados a 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 hr que presentaron actividad tripanocida del 100% fueron el Nifurtimox y los compuestos *N*-Isobutil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (1), *N*-Bencil-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (2), *N*-(4-Clorobencil)-3-(5-nitro-2-fenil)-2E-propenamida (3) y *N*-(3,4-Metilendioxi-bencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (6). Mientras que los compuestos *N*-Bencil-3-(5-nitro-2-tiol)-2E-propenamida (7) y *N*-2-(4-Clorobenzotiazolil)-3-(5-nitro-2-furil)-2E-propenamida (8) sólo presentaron un 30.44 % y 21.74 % de inhibición de crecimiento a las 24 hr respectivamente.

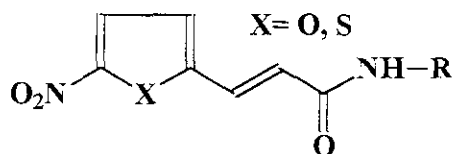
A la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 hr Nifurtimox presentó un 17.39

% de inhibición de crecimiento siendo más activos los compuestos *N*-Isobutil-3-(5-nitro-2-furil)-2*E*-propenamida (1), *N*-Bencil-3-(5-nitro-2-furil)-2*E*-propenamida (2), *N*-(4-Clorobencil)-3-(5-nitro-2-fenil)-2*E*-propenamida (3) y *N*-(3,4-Metilendioxi-bencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2*E*-propenamida (6) con porcentajes de inhibición del 47.83%, 47.83%, 39.13% y 52.17% respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos, se observa que las moléculas con grupo furano presentaron mayor actividad que las que contienen tiofeno.

Además, el grupo nitro es indispensable para la actividad, lo que se corrobora con la hipótesis de la actividad de estos compuestos sintetizados.

De acuerdo a lo antes mencionado, la estructura base en este grupo de compuestos sería:



El grupo R de lado del nitrógeno de la amida, parece estar relacionado con cambios más finos en la actividad de los compuestos.

Es importante mencionar que las células muertas presentes en las muestras extraídas de los tubos del experimento, no conservan su morfología normal, al ser observadas al microscopio, este hecho sugeriría que estos compuestos pudieran estar afectando la membrana del epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, aunque en este momento no se pueden sacar conclusiones definitivas y sería necesario un estudio a fondo en este sentido.

X. BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Guerra F. J. *Trop Med Hyg* (1954) **73** 105-118.
- 2.- Mazzotti L. *Gac. Med. México* (1940) **70** 417-420.
- 3.- Pifano F. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.* (1973) **5** 171-184.
- 4.- Pifano F. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.* (1973) **5** 185-192.
- 5.- OMS/OPS. *Bol. Of Sant. Panam.* (1974) **77** 141-158.
- 6.- Pinto Dias J.C. *Diálogo Médico* (Buenos Aires) (1980) **6** 6-21.
- 7.- Prata A. *Bol. OPS* (1974) **76** 141-158.
- 8.- OMS(Organización Mundial de la Salud). *Control de la Enfermedad de Chagas.* (1991) 1-102.
- 9.- Velasco C.O. *La Enfermedad de Chagas.* Secretaría de Salud, INDRE, México. (1991) **8** 1-56.
- 10.- Reyes P. *Enfermedad de Chagas en México.* *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* (1984) **54** 1-2.
- 11.- Acha P.N. and Szyfres B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales.* 2ª Edición, Organización Panamericana de la Salud. (1989) **503**:590-600
- 12.- Tay Z.J. y Velasco C. O. *Parasitología Médica.* 5ª Edición, Edit. Méndez Cervantes. (1991) 109-133
- 13.- Tizard I. *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis.* CRC Press, Inc. (1985) 145-194
- 14.- Michael L. C. and David H. Molyneux. *The Human Trypanosomiasis (sleeping sickness and Chagas disease).* *Current Opinion in Infectious Diseases* (1995) **8**, 328-335.
- 15.- Kirchhoff L.V. *The New England Journal of Medicine.* (1993) **329**(9), 639-644
- 16.- Martínez B.M. *Manual de Parasitología Médica.* 2ª Edición, Edit. La Prensa Médica Mexicana. (1979) 382-386.
- 17.- Tay Z.J. y Velasco C. O. *Parasitología Médica.* 5ª Edición, Edit. Méndez Cervantes. (1991) 421-423.
- 18.- Chester B.P. and Clifton J.R. *Parasitología Clínica.* 2ª Edición, Edit. Salvat.(1992) 671-675.
- 19.- Cortés-Jiménez, M.; B. Noguera-Torres; R. Alejandro-Aguilar; L. Isita-Tornell & E. Ramírez-Moreno. *Frequency of Triatomines Infected with Trypanosoma cruzi Collected in Cuernavaca City, Morelos, México.* *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* (1996) **38**, 115-119.
- 20.- Monteón V.M., V. Nekrassov, A. Zepeda, A. Aranda & P.A. Reyes. *Interacción de una mezcla de epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de un aislamiento mexicano de Trypanosoma cruzi con macrófagos murinos.* *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* (1992) **34**: 43-48.
- 21.- R. Docampo, J. F. De Boiso and A. O. M. Stoppani. *Localization of Peroxidase Activity in Trypanosoma cruzi Microbodies.* *Experienta* (1976) **32**, 972-975
- 22.- A. Boveris, Roberto Docampo, and Andrés O. M. Stoppani. *Deficient Metabolic Utilization of Hydrogen Peroxide in Trypanosoma cruzi.* *Biochem. J.* (1980) **188**, 643-648.
- 23.- A. Boveris and A. O. M. Stoppani. *Hydrogen peroxide generation in Trypanosoma cruzi.* *Experienta* (1977) **33**, 1306-1308.
- 24.- Ana Denicola, Homero Rubbo, Daniel Rodríguez and Rafael Radi. *Peroxynitrite-Mediated Cytotoxicity to Trypanosoma cruzi.* *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1993) **304**, 279-286.

- 25.- Homero Rubbo, Ana Denicola and Rafael Radi. *Peroxyntirite Inactivates Thiol-Containing Enzymes of Trypanosoma cruzi Energetic Metabolism and Inhibits Cell Respiration*. Archives of Biochemistry and Biophysics. (1994) **308**, 96-102.
- 26.- Rodríguez, R.R.; Lane, E. J. *Chelaing Agent Inhibition of Trypanosoma cruzi Epimastigotes In Vitro*. Journal of Inorganic Biochemistry (1995) **60**, 277-288.
- 27.- John A. Jernigan and Richard D. Pearson. *Chemotherapy of Leishmaniasis, Chagas' disease and African trypanosomiasis*. Current Opinion in Infectious Diseases (1993) **6**, 794-802.
- 28.- Roberto Docampo and Andres O. M. Stoppani. *Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Induced by Nifurtimox in Trypanosoma cruzi*. Archives of Biochemistry and Biophysics. (1979) **197**(1) 317-321.
- 29.- Hocquemiller, R.; Cortés, D.; Arango, G.; Myint, H. and Cavé, A. *Isolement et synthese de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire*. Journal Of Natual Products. (1991) **54** 445-452.
- 30.- Castro C., Jiménez M., and González-De La Parra M. *Inhibitory Effect of Piquerol A on the Growth of Epimastigotes of Trypanosoma cruzi*. Planta Medica (1992) **58** 281-282.
- 31.- Emerson F., Queiroz F. and C. Pesseine and Spinosine, *Two Catecholic Berbines from Annona spinescens*. Journal of Natural Products (1996) **59** (4) 438-440.
- 32.- Sepúlveda S. and Cassels B. *Plant Metabolites Active against Trypanosoma cruzi*. Planta Medica (1996) **62** 98-105.
- 33.- Thompson P., Bayles A., and Olszewski B. PAM 1392 [2,4-do-6-(3,4-dichlorobenzylamino) Quinazoline]. Experimental Parasitology (1969) **25**, 32-49.
- 34.- Riou G. and Delain E. *Ultrastructural alterations of the nucieus and the kinetoplast of Trypanosoma cruzi exposed to ethidium bromide*. Biochemical Pharmacology (1970) **19** 2521-2522.
- 35.- Davoll J., Jonson A. M. and Davies H. J. 2,4-Diamino-6-[[aralkyl and (heterocyclic)methyl]amino}quinazolines, a Novel Class of Antimetabolites of Interest in Drug-Resistant Malaria and Chagas Disease. Journal of Medicinal Chemistry (1972) **15**(8) 812-826.
- 36.- Freeman F., Wilson P. and Kazan B. *Trypanosoma cruzi: Antimicrobial Activity and Strain Differentiating Properties of Some Five and Six-Membered Heterocyclic Compounds on Trypomastigotes*. Experimental Parasitology (1975) **38**, 181-190.
- 37.- Neville M. and Verge J. *2-(5-Nitro-2-furyl-, thiazolyl-, and 1-methylimidazolyl-)thiazoles*. Journal of Medicinal Chemistry (1997) **20**(7) 946-949.
- 38.- Avila J. L. and Avila, A. *Trypanosoma cruzi: Allopurinol in the Treatment of Mice with Experimental Acute Chagas Disease*. Experimental Parasitology (1981) **51**, 204-208.
- 39.- Murray P. K., Habbersett M. C. and Meurer R. D. *Trypanosoma cruzi: Efficacy of the 2-Substituted-5-nitroimidazoles, MK-436 and L634,549, in Tissue Culture and Mice*. Am. J. Trop. Med. Hyg. (1983) **32**(6) 1242-1250.
- 40.- Avila J. L., Polegre M. A. and Robins R. K. *Biological Actino of Pyrazolopyrimidine Derivatives against Trypanosoma cruzi. Studies In vitro and In vivo*. Comp. Biochem. Physiol. (1987) **86C**(1) 49-54.
- 41.- Urbina J. A., Vivas J., Ramos H., Larralde G., Aguilar Z. and Avilán L. *Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranas from Trypanosoma cruzi epimatigotes grown in the presence of ketoconazole*. Molecular and Biochemical Parasitology (1988) **30** 185-196
- 42.- Goad J. L., Berens L. R., Marr J. J., Beach D. H. and Holz G. G. *The activity of ketoconazole and other azoles against Trypanosoma cruzi: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro*. Molecular and Biochemical Parasitology (1989) **32** 179-190.

- 43.- Doley Patricia S. and Weinbach Eugene C. *The Activity of Tricyclic Antidepressant Drugs against Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology (1989) **68** 230-234.
- 44.- Moreno S. N. J., Carnieri E. G. S., Docampo R. *Inhibition of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase by crystal violet*. Molecular and Biochemical Parasitology (1994) **67** 313-320.
- 45.- Aldunate J., Ojeda J. M., Repetto Y., Letelier M. E. and Spencer P. *Trypanosoma cruzi: trypanocidal effect of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) on several strains of epimastigote and trypomastigote forms*. Comp. Biochem. Physiol. (1994) **109C**(2) 119-127.
- 46.- Schwartzapel A. J., Fichera L., Esteva M., Rodríguez J. B. and Gros E. G. *Design, Synthesis, and anti-Trypanosoma cruzi Evaluation of a New Class of Cell-Growth Inhibitors Structurally Related to Fenoxycarb*. Helvetica Chimica Acta (1995) **78** 1207-1213.
- 47.- Rodríguez R. R., Lane J. E., Carter C. E., Bogitsh B. J. Singh P. K., Zimmerman J. J. and Jones M. M. *Chelating Agent Inhibition of Trypanosoma cruzi Epimastigotes In Vitro*. Journal of Inorganic Biochemistry (1995) **60** 277-288.
- 48.- Mester B. and Elguero J. *Activity Trypanosoma cruzi of New Analogues of Nifurtimox*. Arch. Pharm. (weinheim) (1987) **320** 115-120.
- 49.- Mester B., Hikichi N., Hansz M., and Blumenfeld de Paulino M. *Quantitative Structure Activity Relationships of 5-Nitrofurans Derivatives*. Chromatographia (1990) **30** (3) 191-194.
- 50.- Cerecetto H., Mester B., Onetto S., Seoane G., González M. and Zinola F. *Formal Potentials of New Analogues of Nifurtimox: Relationship to Activity*. IL FARMACO (1992) **47** (9) 1207-1213.
- 51.- Shuyu, W. and Renli, L. *Chemical Abstracts* (1986) **105** 218297k.
- 52.- Xiao-Hui, Z. and Renli, L. *Chemical Abstracts* (1980) **93** 142676u.
- 53.- Grivsky, E. *Chemical Abstracts* (1983) **98** 16431a.
- 54.- Kamikawa, T. *Chemical Abstracts* (1980) **93** 46396g.
- 55.- Kubo, I., and Matsumoto, T. *Experientia* (1984) **40** 340.
- 56.- Abdel-Rahman, M. O. *Chemical Abstracts* (1969) **70** 114894v.
- 57.- Gilman H. and Wright F.G. *Nitrofurfural and nitrofurylacrylic acid*. Journal of the American Chemical Society. (1930) **52** 2550-2554.
- 58.- Abdel-Rahman M.O., Aboul-Enein M.N. and Tadros W.M. *Synthesis of some furan derivatives of anticipated schistosomicidal and bactericidal activity*. J. Chem. U.A.R. (1969) **12** (1) 69-75.
- 59.- Elliott M. and Farnham A.W. *Pestic. Sci.* (1987) **18** 191.