

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

“SÍNTESIS Y EVALUACION BIOLÓGICA PRELIMINAR *IN VITRO* DE DERIVADOS DE 2-ARILBENZOTIAZOL”.

*Trabajo Especial de Grado presentado ante la
ilustre Universidad Central de Venezuela, por el
Br. Edgar Enmanuel Aponte Caraballo, para
optar al título de Licenciado en Química.*

Caracas, 09 de Julio del 2018.

Yo Profesor Jaime Charris, Investigador del Laboratorio De Síntesis Orgánica de la Facultad De Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora Lola De Lima investigadora del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente trabajo especial de grado, titulado:

"SÍNTESIS Y EVALUACION BIOLÓGICA PRELIMINAR *IN VITRO* DE DERIVADOS DE 2-ARILBENZOTIAZOL".

Que presenta el Br. Edgar Enmanuel Aponte Caraballo, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en la Unidad de Síntesis de Medicamentos de la Facultad De Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016, 2017 y 2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 09 de Julio del 2018.



Dr. Jaime Charris



MSc. Lola De Lima

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como
Integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado:

**"SÍNTESIS Y EVALUACION BIOLÓGICA PRELIMINAR *IN VITRO* DE DERIVADOS DE
2-ARILBENZOTIAZOL".**

Que presenta el Br. Edgar Enmanuel Aponte Caraballo, certificamos que este trabajo
cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el
título de Licenciado en Química.



Dr. Jaime Charris (Director)



MSc. Lola De Lima (Directora)



Dra. María Rodríguez (Jurado)



Dra. Beth Díaz (Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Iború, Ibóya, Ibosheshe. Primeramente agradezco a DIOS, a los Oshas, Orishas y mis ancestros quienes con su sabiduría e irradiación espiritual, aunado por supuesto a mi esfuerzo propio, fueron catalizadores para éste y cada uno de los triunfos en mi vida.

A mi Madre, quien desde tiempos inmemoriales, siempre tuvo la intención única de garantizar mi cuidado, enseñanza, atención, protección y resguardo. Siempre atenta y dispuesta a escuchar y saber dar un consejo acertado en el momento que más lo necesité. Esa que jamás exigió de mí, sino que diera siempre lo mejor sin importar los resultados. Esa que sacrificó todo, por siempre darme la mejor educación, tanto en lo académico como a nivel humano. A mi madre tengo mucho que agradecer, la vida la tengo por ella y a ella le dedico este triunfo.

A mi padre, quien a pesar de jamás haber podido llegar a aulas universitarias, siempre se vio en total disposición de escuchar mis conversaciones científicas, puesto que es el vivo ejemplo de que la inteligencia del ser humano no tiene límites, me lo demostró muchísimas veces y estoy orgulloso de tenerlo como padre, a pesar de cualquier error, pues al final de este largo transitar por el plano terrenal, nuestra condición de seres humanos, nos da pie a que cometamos muchos errores, siempre siendo la mejor opción, enmendarlos, aceptarlos y proseguir.

A mi novia, María González, pilar fundamental de mi crecimiento en lo académico, personal y muchos otros aspectos. Me enseñó a ver el mundo desde otra perspectiva, permitiéndome ser una persona más ordenada y responsable en todos los aspectos. Me demostró lo que significa lealtad y amor, y me enseñó que cuando se quiere, no hay obstáculo alguno que nos detenga, puesto que somos lo que queremos. Te amo.

A mi tutora en Ciencias, profesora Lola, quien me apoyó cada vez que lo necesité. A la Unidad de Síntesis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia, en mi eternamente amada UCV, liderada por mi tutor el Dr. Jaime Charris, a quien siempre agradeceré todo el apoyo proporcionado, al igual que su siempre oportuno conocimiento. Gracias a la Profesora Grisela Lobo por su sabiduría y buen humor, y al resto de la unidad siempre los recordaré.

A mi familia, mi hermano y demás compañeros, siempre gracias.

ÍNDICE GENERAL

1.-RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.- <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	4
2.1.1.- MORFOLOGÍA.	6
2.1.2.- CICLO DE VIDA.	7
2.1.3.- PATOGÉNESIS.	8
2.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS.	9
2.3.- TRATAMIENTO.	14
2.3.1.- MECANISMO DE ACCIÓN.	15
2.3.2.- EFECTOS ADVERSOS.	17
2.4.- POSIBLES BLANCOS TERAPEUTICOS.	18
2.4.1.- INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL.	18
2.4.2.- INHIBICIÓN DEL METABOLISMO DEL PIROFOSFATO.	20
2.4.3.- INHIBIDORES DE LA CRUZIPAÍNA.	21
2.4.4.- INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS Y EL METABOLISMO DE LA TRIPANOTIONA. .	22
2.4.5.- INHIBIDORES DE LA CAPTACIÓN DE PURINAS.	24
2.4.6.- INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANS-SIALIDASA.	25
2.5. -NUEVAS PROPUESTAS EN LA SÍNTESIS DE ANTICHAGÁSICOS.	25
3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	27
3.1.- ANTECEDENTES.....	27
3.2.- JUSTIFICACIÓN.....	40
4.- OBJETIVOS.	41
4.1- OBJETIVO GENERAL.	41
4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5.-PARTE EXPERIMENTAL.	42

5.1.- CONSIDERACIONES GENERALES.	42
5.2.- SÍNTESIS ORGÁNICA.	43
5.3.- METODOLOGÍA DE SÍNTESIS.	45
5.3.1.- SÍNTESIS DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZOL-6-CARBONITRILO (23).	45
5.3.2.- SÍNTESIS DE ÁCIDO 4-AMINO-3-MERCAPTOBENZÓICO (24).	46
5.3.3.- PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS 2-ARIL- BENZOTIAZOL-6 CARBOXÍLICOS (25a-25k).	47
5.4.- METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	56
6.-RESULTADOS Y DISCUSIONES.	57
6.1.-SECCIÓN QUÍMICA.	57
6.2.- SECCIÓN BIOLÓGICA.	75
6.2.1.- ACTIVIDAD ANTICHAGÁSICA.	75
7.-CONCLUSIONES.	77
8.-RECOMENDACIONES.	78
9.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	79

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%: Porcentaje.

°C: Grado Centígrado

C: Carbono

CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50.

cm⁻¹: Centímetros recíprocos

δ: Desplazamiento químico

d: Doblete

dd: Doblete de doblete

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado

g: Gramos

h: Horas

H: Hidrógeno

Hz: Hertz

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento

KBr: Bromuro de potasio

Kg: Kilogramo

***m*:** Multiplete

MHz: Megahertz

µg: Microgramo

mg: Miligramo

µM: Micromolar

min: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetro

MTT: Método del brumoro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

N₂: Nitrógeno

NO₂: Nitro.

nm: Nanómetro

O₂: Oxígeno

OMe: Metoxi.

OMS: Organización Mundial de la Salud

pf: Punto de fusión

ppm: Partes por millón

RMN¹H: Resonancia Magnética Nuclear de protones

RMN¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de carbonos

s: Singlete

sa: Singlete ancho.

S: Azufre

t: Triplete

t.a.: Temperatura ambiente

TLC: Cromatografía de capa fina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo.....	3
Figura 2.- <i>T. cruzi</i> en el torrente sanguíneo visto con microscopía electrónica..	5
Figura 3.- Morfologías de <i>T. cruzi</i> , a) Forma amastigote; b) Forma epimastigote; c) Forma tripomastigote. 1: kinetoplasto; 2: Núcleo; 3: Flagelo.....	5
Figura 4.- Ciclo de vida del Trypanosoma Cruzi.....	8
Figura 5.- Signo de Romaña.....	10
Figura 6.- Manifestaciones clínicas cardíacas y digestivas durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.....	11
Figura 7.- Fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	13
Figura 8.- Nitrofuranos antichagásicos.....	14
Figura 9.- Posibles vías metabólicas nitrorreductivas para nifurtimox y benznidazol.....	16
Figura 10.- Algunos triazoles inhibidores de la síntesis del ergosterol como potenciales agentes antichagásicos.....	18

Figura 11.- Estructura de bisfosfonatos con actividad específica frente a T. cruzi.....	20
Figura 12.- Estructura del K777.....	21
Figura 13.- Tioridazina y Clomipramine, inhibidores del metabolismo de la tripanotona.....	22
Figura 14.- Estructura del allopurinol.....	23
Figura 15.- Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de benzotiazol.....	58
Figura 16.- Síntesis del bis-(2-nitro-4-carboxifenil)-disulfuro.....	58
Figura 17.- Síntesis del clorhidrato del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico.....	59
Figura 18.- Síntesis del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico.....	60
Figura 19.- Mecanismo propuesto para la formación del núcleo de 2-amino-benzotiazol.....	61
Figura 20.- Estructuras de resonancia presentes en el 4-aminobenzonitrilo y en el ácido-4-amino-benzoico.....	61
Figura 21.- Estructura general y numeración del compuesto 25b	64
Figura 22.- Estructura general y numeración del compuesto 25i	70

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.- Síntesis general para los compuestos **25a-25k**.....44

Esquema 2.- Paso de MTT a formazán con el uso de succinato deshidrogenasa.....75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Derivados del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico.....63

Tabla 2.- Concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de los compuestos **25a-25k** como antichagásicos.....76

ÍNDICE DE ESPECTROS.

Espectro 1.- Espectro de IR del compuesto 25b	65
Espectro 2.- Espectro RMN ^1H de 25b y su ampliación.....	67
Espectro 3.- Espectro RMN ^{13}C de 25b	69
Espectro 4.- Espectro de IR del compuesto 25i	71
Espectro 5.- Espectro RMN ^1H de 25i y su ampliación.....	72
Espectro 6.- Espectro RMN ^{13}C de 25i y su ampliación.....	74

1.-RESUMEN

En el siguiente trabajo de investigación se propuso la síntesis de una serie de derivados del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **25a-25k**, y la evaluación *in vitro* de la potencial actividad antichagásica de los mismos frente a una cepa de tripanosoma.

El proceso sintético abarcó tres pasos lineales, donde el primero involucró la formación del intermediario 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo **23**, después de dos etapas se obtuvo el amino-tiol deseado, ácido 4-amino-3-mercaptopbenzoico **24**. Este último se acopló mediante una reacción de condensación con diversos benzaldehídos metoxilados y nitrados, en nitrobenceno como solvente y agente oxidante, bajo reflujo por 12 h para generar los derivados finales **25a-25k**. Los compuestos obtenidos fueron purificados mediante cristalización y lavados con diversos solventes.

Todos los compuestos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos como IR, RMN¹H y RMN¹³C.

La evaluación de la posible actividad antichagásica se realizó de acuerdo a protocolos reportados *in vitro* mediante el ensayo de MTT, obteniéndose que los compuestos **25a** y **25b**, fueron activos, con una IC₅₀=54.46 μM y IC₅₀=51.92 μM respectivamente, destacándose el compuesto **25b** con una actividad por encima del compuesto BZ.

2.- INTRODUCCIÓN.

El esfuerzo durante los últimos años de diversas ramas de la ciencia ha permitido el estudio y la comprensión de la composición química de compuestos importantes presentes en animales, plantas y minerales con características medicinales para el ser humano, permitiendo de esta manera identificar, aislar, sintetizar y desarrollar una gran cantidad de compuestos químicos, muchos de los cuales, tienen el propósito de mantener la salud de animales y humanos. El esfuerzo por lograr este objetivo ha sido un gran impulso en los últimos tiempos para los químicos, químicos medicinales, farmacéuticos, biólogos y médicos para investigar y desarrollar fármacos que posean actividad biológica representativa, para la cura de enfermedades que han marcado la vida de tantos seres humanos.

Una de estas enfermedades es la tripanosomiasis americana, conocida en el ser humano como enfermedad de Chagas, y esta es considerada como el tercer padecimiento infeccioso/parasitario más frecuente en Latinoamérica. La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) reporta que la enfermedad de Chagas afecta entre 16-18 millones de personas y además que 100 millones, es decir el 25% de la población de América Latina, está en riesgo de adquirirla ^[1].

Esta es una enfermedad potencialmente mortal, la cual es causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de un insecto triatomíneo conocido en Venezuela como el chipo. La infección también se puede transmitir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita (donde la madre infecta a su hijo) y órganos donados, aunque estos modos de transmisión son menos frecuentes.

Los síntomas pueden ser fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico en la fase aguda y trastornos cardíacos y alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas en la fase crónica. Con el

paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco ^[1].

Esta enfermedad se caracteriza por ser del medio rural tropical en América Latina, donde es un grave problema de salud pública por su carácter de evolución crónica. El parásito fue descrito por primera vez en 1909 por Carlos Chagas en Brasil, y en 1919 Tejera-París realiza la comprobación parasitológica de la enfermedad en Venezuela, tanto en el vector como en el humano ^[2,3].

En Venezuela Añez y col. ^[4], reportaron un 11% de seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cerca de 4.000 muestras analizadas en 75 localidades endémicas de 10 estados del territorio nacional, siendo el 8,5% de éstas pertenecientes a niños entre 0 a 10 años. Estudios realizados en los estados centro-occidentales y nor-orientales han mostrado prevalencias entre el 11,2% y 16,3%, con una distribución por estados de: 12,6% a 30,8% en Cojedes; 22,8% a 25,7% en Barinas; 11% a 23,8% en Trujillo; 19,4% en Portuguesa; 7,3% a 14% en Mérida; 7,8% en Yaracuy; 1,5% a 2,9% en Falcón, detectándose un 2,08% de casos agudos entre los seropositivos ^[5]. Asimismo, al analizar pacientes referidos a centros de salud con diagnóstico presuntivo de enfermedad de Chagas, se apreciaron frecuencias entre 44,6% y 64,8% de casos agudos también entre los seropositivos. En el período enero 2006 marzo 2007, fueron detectados un total de 9 casos agudos provenientes de los estados Barinas: 7 y Trujillo: 2, de los cuales 2 (22,2%) resultaron casos fatales.

Por lo general, estos insectos viven en las grietas y huecos de las paredes y los tejados de las casas mal construidas en las zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana.

En general, pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, y defecan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces o la orina hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta ^[6].

T. cruzi también se puede transmitir:

- por alimentos contaminados con el parásito; por ejemplo, por el contacto con heces u orina de triatomíneo;
- por la transfusión de sangre infectada;
- por la transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto;
- por el trasplante de órganos provenientes de una persona infectada.

La enfermedad es endémica en 21 países de Latinoamérica (Figura 1), incrementándose el número de afectados también en zonas no endémicas, que incluyen países desarrollados como Australia, Canadá, Japón, España y los Estados Unidos, esto debido al alto índice de migración de individuos latinos afectados con la enfermedad [7].



Figura 1.- Distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo (Modificado) [7].

2.1.- TRYPANOSOMA CRUZI.

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito protozooario hemoflagelado perteneciente al orden

de los *quinetoplástidos*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum* y grupo *Stercoraria* ^[8, 9]. Tal y como se aprecia en la (figura 2).

El género *Trypanosoma* incluye otras especies causantes de importantes enfermedades humanas y animales como *Trypanosoma brucei*, cuyas subespecies *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* causan la tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño. *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* y *Trypanosoma equinum* causan importantes enfermedades en animales ^[10].

El género *Trypanosoma* fue dividido en dos grupos en función del comportamiento del parásito en el insecto vector. Por un lado, el grupo *Stercoraria*, que incluye a los tripanosomas que sufren su desarrollo en el intestino del insecto vector y las formas infectantes son liberadas junto a las heces. A este grupo pertenece *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo se denominó *Salivaria*, que incluye todos aquellos tripanosomas que inicialmente se desarrollan en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y ocupan las glándulas salivales. Las formas infectantes son inoculadas con la saliva tras la picadura. A este grupo pertenecen *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*. Debido a la gran complejidad en el comportamiento biológico de los tripanosomátidos del género *Trypanosoma* se crearon subgéneros. *T. cruzi* pertenece al subgénero *Schizotrypanum*, donde están incluidos otros tripanosomas como *T. dionisii*, *T. vespertilionis* y *T. myoti*. Todos se caracterizan por presentar un ciclo de vida similar ^[11].



Figura 2.- *T. cruzi* en el torrente sanguíneo visto con microscopía electrónica ^[9]

2.1.1.- MORFOLOGÍA.

Las poblaciones de *T. cruzi* circulan en la naturaleza entre el insecto vector y los reservorios mamíferos, incluido el hombre. A lo largo de su ciclo vital sufren alteraciones morfológicas y bioquímicas para adaptarse al medio en el que se encuentran. Las diferentes morfologías que adquiere *T. cruzi* se clasifican en función de su aspecto general, de la manera en que el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras celulares: el núcleo y el kinetoplasto (identificadas como 1 y 2 en la Figura 2). Así, como se muestra en la Figura 2, *T. cruzi* adquiere 3 morfologías diferentes principales durante su ciclo de vida:

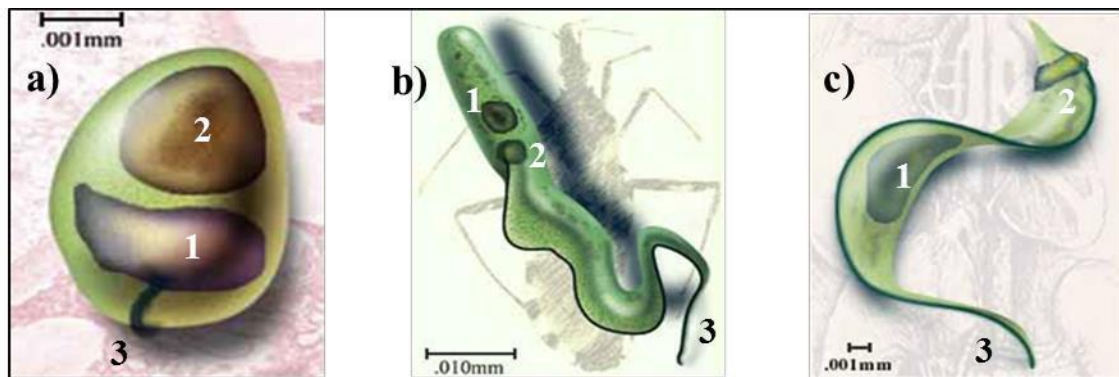


Figura 3.- Morfologías de *T. cruzi*, a) Forma amastigote; b) Forma epimastigote; c) Forma tripomastigote. 1: kinetoplasto; 2: Núcleo; 3: Flagelo [8].

Amastigote: Se trata de una forma esférica u ovalada de unas 2 μm de diámetro. Posee un núcleo voluminoso y un kinetoplasto del que nace un flagelo corto que no sale al exterior. Es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas.

Epimastigote: En esta fase *T. cruzi* adquiere una morfología fusiforme y una longitud de unas 20 μm . El núcleo es grande y el kinetoplasto se sitúa delante o al nivel del núcleo. A partir de él nace una membrana ondulante corta que acaba en un flagelo libre. Presenta una elevada movilidad. Es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los vectores invertebrados y en medios de cultivo.

Tripomastigote: Presenta una morfología fusiforme y mide aproximadamente 20 μm de longitud. Presenta un gran núcleo central vesiculado y un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo. Del kinetoplasto surge una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo del parásito y emerge como un flagelo libre en la parte anterior del cuerpo. En función del tejido que colonicen se distingue entre:

- Tripomastigote sanguíneo: Es la forma que aparece en la sangre de los vertebrados infectados. Es capaz de infectar células y no puede replicarse.

- Tripomastigote metacíclico: Es la forma que aparece en la luz intestinal y posteriormente en las heces del insecto vector y es la que se transmite al hospedador vertebrado [8].

2.1.2.- CICLO DE VIDA.

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando un triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes circulantes; éstos pasan a los intestinos del triatomino, se transforman en epimastigotes, se multiplican por fisión binaria longitudinal y a los pocos días se encuentran como tripomastigotes metacíclicos en la porción distal del intestino del insecto. Cuando el vector infectado se alimenta, puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre y defecar sobre la piel o mucosas del mamífero; de esta manera deposita junto con su excremento tripomastigotes metacíclicos infectantes. Cuando el insecto arrastra con sus patas la materia fecal, se introducen los tripomastigotes metacíclicos por la laceración inducida por la probóscide del insecto al alimentarse; también es posible que el mismo hospedador se infecte a sí mismo al llevar las eyecciones a la piel, hacia alguna mucosa o a la conjuntiva ocular.

Los tripomastigotes metacíclicos, una vez dentro del mamífero y después de pasar la barrera de la piel, mucosas o conjuntiva ocular se introducen en las células del tejido celular cercano al sitio de penetración, en donde se transforman en amastigotes. Ahí se multiplican por fisión binaria y alcanzan la circulación sanguínea cuando su elevado número causa la muerte y destrucción de la célula infectada; también se ha

demostrado su diferencia intracelular a la forma de tripomastigote, y se ha sugerido su salida de la célula sin causarle daño inmediato.

Después de llegar al torrente sanguíneo, los amastigotes pueden infectar nuevas células o transformarse rápidamente en tripomastigotes sanguíneos y diseminarse por vía hematológica por todo el organismo, en donde pueden invadir casi cualquier célula. El ciclo biológico se completa cuando un triatómino se alimenta de un mamífero infectado y adquiere al parásito [8]. La infección de *T. cruzi* persiste en el organismo humano durante toda la vida [12].

A continuación se presenta (figura 4) una imagen ilustrativa del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*:

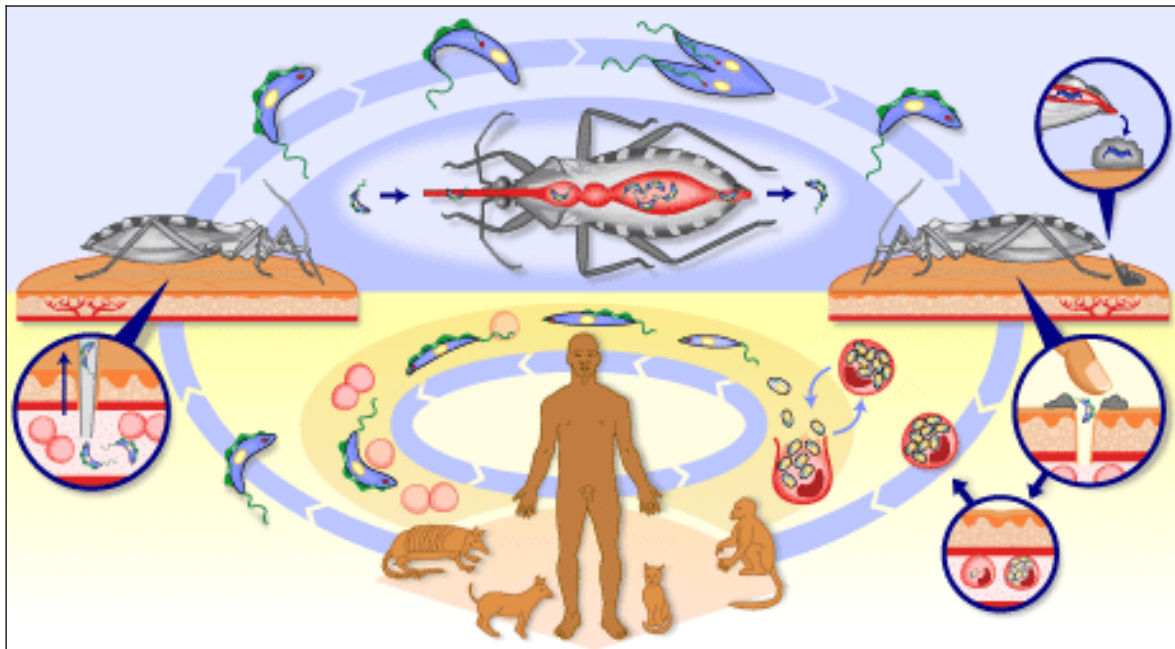


Figura 4.- Ciclo de vida del *Trypanosoma Cruzii* [13].

2.1.3.- PATOGÉNESIS.

Una vez que el parásito penetra las células circundantes al sitio de la infección, y completa uno o varios ciclos de replicación intracelular, pasa al torrente sanguíneo en donde puede alcanzar diversas células del hospedero, como las del bazo, hígado, y músculo cardíaco. También puede establecer un primer sitio de contacto con

macrófagos y fagocitarse. El *T. cruzi* evade este primer contacto con la respuesta inmunitaria, escapa de la vacuola fagocítica y se replica en el citoplasma de los macrófagos. La resistencia a la infección por parte del hospedador puede ser de varios tipos. La respuesta celular está mediada por macrófagos activados y por neutrófilos y eosinófilos a través de anticuerpos. La reacción humoral incluye la lisis del parásito a través de la activación de la vía alterna de la cascada del complemento mediada por inmunoglobulinas del tipo IgG. Sin embargo, la fase de tripomastigote del parásito presenta un sistema enzimático membranoso capaz de contrarrestar esta respuesta e inhibir la convertasa de C₃ si no se satura. Se han descrito factores de resistencia a la infección propios del hospedador, como son los niveles séricos de hierro, que pueden tener implicaciones en la virulencia de las cepas, y la presencia de lipoproteínas de alta densidad, que pueden interferir con el proceso de infección. Se han propuesto diversas teorías para explicar la patogénesis de las lesiones en la enfermedad de Chagas. La teoría de la persistencia del parásito (teoría de daño directo), postula que las lesiones podrían ser una consecuencia directa de la ruptura mecánica de la célula del hospedador parasitada y su subsiguiente inflamación. La teoría autoinmune atribuye las lesiones chagásicas al rechazo de las células libres de parásitos por los linfocitos del hospedero. La teoría neurogénica asume que el daño del parásito se observa principalmente en las células del sistema parasimpático que inerva los órganos afectados [8,11].

2.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

En cuanto a las manifestaciones clínicas observadas durante la enfermedad de Chagas, es importante destacar que estas dependerán de múltiples factores. Estos factores se pueden dividir en:

-Factores parasitarios, como la cantidad de parásitos en su forma infectiva (tripomastigotes) inoculados en el momento de la infección y el linaje genético al que

pertenezca el parásito, el cual, le aportará una mayor o menor virulencia y una mayor tendencia por unos órganos que por otros.

-Factores de la persona infectada, como su estado nutricional, edad y el estado de su sistema inmunológico, el cual puede estar afectado por la presencia de otras enfermedades como el SIDA o por la toma de medicamentos inmunosupresores ^[14].

Las principales manifestaciones clínicas en las diferentes etapas de la enfermedad serían:

Fase Aguda: En la mayoría de los individuos, con independencia del mecanismo de transmisión, la fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, hecho que seguramente se deba a la baja carga parasitaria. Cuando existe una sintomatología, ésta incluye síntomas generales e inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, somnolencia, calambres, diarrea, problemas respiratorios y edema, que muchas veces son tratados como un proceso febril común sin la sospecha de Enfermedad de Chagas. Además puede aparecer un agrandamiento del hígado, bazo y ganglios linfáticos y en el caso de la transmisión vectorial, los signos típicos en la zona de entrada del parásito a través de la piel (chagoma) o a través de la membrana mucosa ocular (signo de romaña, Figura 5). En el electrocardiograma pueden verse taquicardia sinusal, bloqueo atrioventricular de primer grado, etc. Una radiografía de torax puede mostrar cardiomegalia en diferentes grados. En niños infectados congénitamente, los síntomas más comunes que pueden aparecer desde el nacimiento o unas semanas después del parto, incluyen un bajo tono muscular, fiebre, hepatoesplenomegalia y anemia. Otras manifestaciones observadas incluyen nacimientos prematuros y bajo peso al nacer. Manifestaciones más serias como miocarditis, meningoencefalitis y neumonitis son poco comunes pero presentan un alto riesgo de muerte asociado en pacientes con inmunosupresión o en niños menores de 6 años ^[15,16].



Figura 5.- Signo de romaña ^[15]

Fase crónica: La evolución clínica de la fase crónica de la Enfermedad de Chagas puede oscilar entre la ausencia de signos y síntomas de enfermedad (forma indeterminada) hasta una enfermedad severa y una muerte prematura (forma determinada). Las manifestaciones clínicas de esta fase están relacionadas con el compromiso patológico del corazón, esófago, colon o una combinación de ambos, y se agrupan en tres formas principales: cardíaca, digestiva y cardiodigestiva.

La forma digestiva se observa casi exclusivamente en países al sur de la cuenca del Amazonas (principalmente Argentina, Brasil, Chile y Bolivia). Esta distribución geográfica se debe a la distribución de las diferentes cepas parasitarias. La disfunción gastrointestinal (principalmente mega-esófago, megacolon o ambos) se desarrolla en aproximadamente el 10-15% de los pacientes infectados crónicamente. El mega-esófago causa disfagia con odinofagia, combinado con dolor epigástrico, regurgitación, una excesiva segregación de saliva, y una malnutrición en los casos más severos. El megacolon a menudo afecta al segmento sigmoideo, al recto o al colon descendente, o una combinación, y produce un estreñimiento prolongado, una hinchazón abdominal, y ocasionalmente obstrucción del intestino grueso debido a fecaloma o vólvulo sigmoideo (Figura 6). Los pacientes con mega-esófago poseen una mayor probabilidad de sufrir cáncer de esófago ^[17].

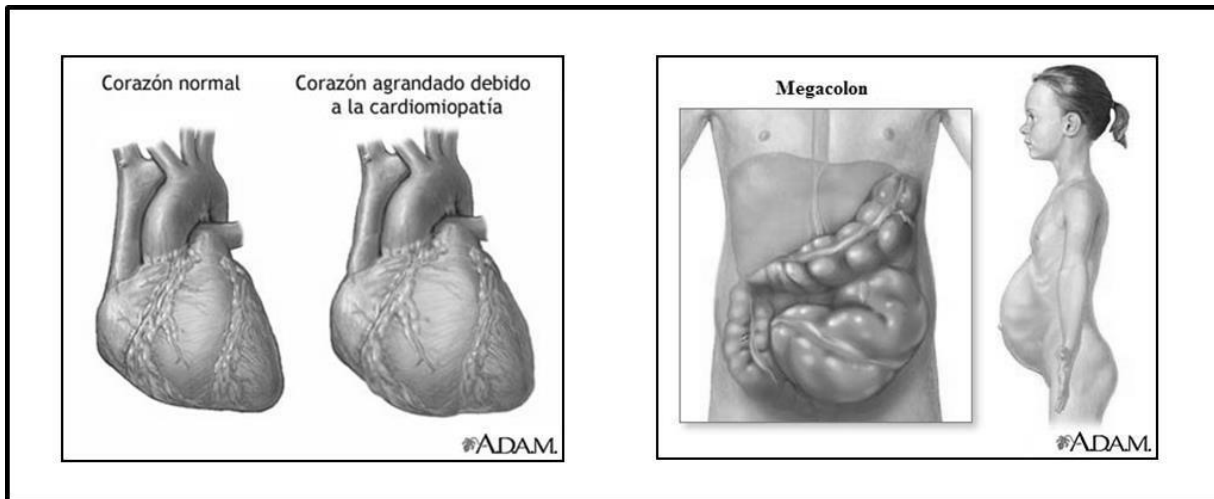


Figura 6.- Manifestaciones clínicas cardíacas y digestivas durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas ^[17].

La forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas crónica. Se desarrolla en el 20-30% de los individuos y típicamente produce anomalías del sistema de conducción eléctrica, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, fallos cardíacos, tromboembolismo y puede provocar muerte súbita. Las anomalías más comunes observadas en el ECG incluyen bloqueo de la rama derecha y bloque fascicular anterior izquierdo. La muerte súbita es la principal causa de muerte en pacientes con EC, provocando cerca de los 2/3 de las muertes por Chagas. Le sigue el fallo cardíaco refractario (25-30%) y el tromboembolismo (10-15%). La muerte súbita puede aparecer en pacientes asintomáticos y está asociada con una taquicardia ventricular y fibrilación o más raramente, con un bloqueo atrioventricular completo (Figura 6) ^[17].

Individuos con SIDA o en tratamiento con inmunosupresores pueden experimentar una exacerbación de la fase crónica de la infección, que conlleva un incremento de la parasitemia y de la replicación intracelular del parásito. Fiebre, miocarditis, paniculitis y lesiones en la piel son comunes en pacientes infectados tras un trasplante de un órgano

o médula ósea, mientras que en pacientes con SIDA las manifestaciones más comunes son la meningoencefalitis y lesiones del sistema nervioso central.

2.3.- TRATAMIENTO.

A pesar de haber transcurrido más de cien años desde la definición de la enfermedad por el Dr. Carlos Chagas (1909), todavía no se dispone de una vacuna ni de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad.

Dos fármacos (nifurtimox y benznidazol), fueron introducidos a finales de 1970 y son tripanocidas contra las formas de tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* [18,19].

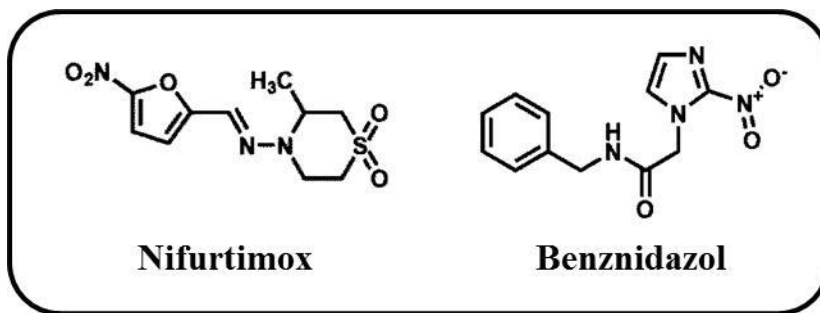


Figura 7.- Fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En la actualidad, estos dos derivados de nitroheterociclos poseen un uso clínico aceptado, nifurtimox (Nfx, Lampit®, Bayer) y benznidazole (Bnz, Rochagan®, Radanil®, Roche), mostrados en la Figura 7. En el caso del benznidazol, Roche transfirió el proceso de fabricación al Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco (LEFEPE) debido a los problemas para satisfacer la demanda de medicamento entre la población. Ambos fármacos no están aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) [20,21].

La actividad anti-*T. cruzi* de ambos fármacos fue descubierta empíricamente hace más de cinco décadas y remplazaron a nitrofuranos anteriormente utilizados como la furadantina, la nitrofurazona y la furaladona, menos activos como agentes tripanocidas. La estructura de los mismos se aprecia en la Figura 8.

La efectividad de estos fármacos, es mejor para las formas extracelulares de *T. cruzi* presentes en la fase aguda, que para las intracelulares que causan la enfermedad crónica [18].

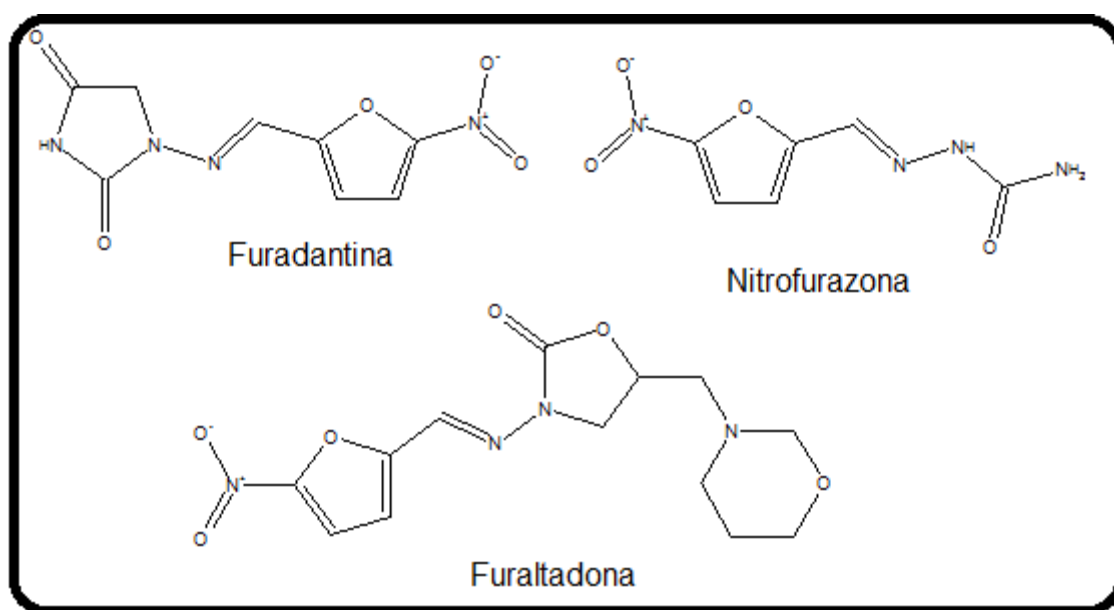


Figura 8.- Nitrofuranos antichagásicos.

2.3.1.- MECANISMO DE ACCIÓN.

La acción tripanocida del nifurtimox (Nif); un nitrofurano, proviene de su capacidad de sufrir una reducción parcial del anión radical nitro seguido de una autooxidación para regenerar en nitrofurano y formar el radical superóxido y otras especies de oxígeno reactivas, como peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. La enzima tripanosomal responsable de la reducción próxima inicial no ha sido definida, pero se implica a la tripanotión reductasa. Esta reacción no solo resulta en la formación de productos electrofílicos, sino que también bloquea la reducción de la forma disulfuro del tripanotión a su forma biológicamente activa ditiol. Además, el *T. cruzi* parece ser deficiente en defensas enzimáticas contra las especies reactivas de oxígeno. La reacción de los radicales libres con las macromoléculas celulares daña las células, lo

cual incluye en ello peroxidación de lípidos y daño de la membrana, inactivación de enzimas, daño al DNA y mutagénesis. El nifurtimox también puede dañar los tejidos de mamíferos, por formación de radicales y ciclos redox.

El mecanismo de acción del benznidazol (Benz); un nitroimidazol, necesita igualmente de la transferencia de un electrón, que ocurre en la célula. Después de lo anterior, los radicales aniónicos nitro generados forman enlaces covalentes u otras interacciones de intermediarios de la nitrorreducción con componentes del parásito, o uniéndose a DNA, lípidos y proteínas, lo cual culmina en el daño que destruye los parásitos ^[14,19]

2.3.2- EFECTOS ADVERSOS.

Los efectos tóxicos de los nitrocompuestos y de nifurtimox y benznidazol en particular, se producen por los metabolitos generados durante la nitrorreducción, los cuales son producidos por una reacción enzimática en el grupo nitro generando radicales como nitroanion ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) e hidronitróxido ($\text{RNHO}^{\cdot}$) para nifurtimox y benznidazol, respectivamente [12,18]. El proceso general nitrorreductivo de ambos compuestos se muestra en la figura 9.

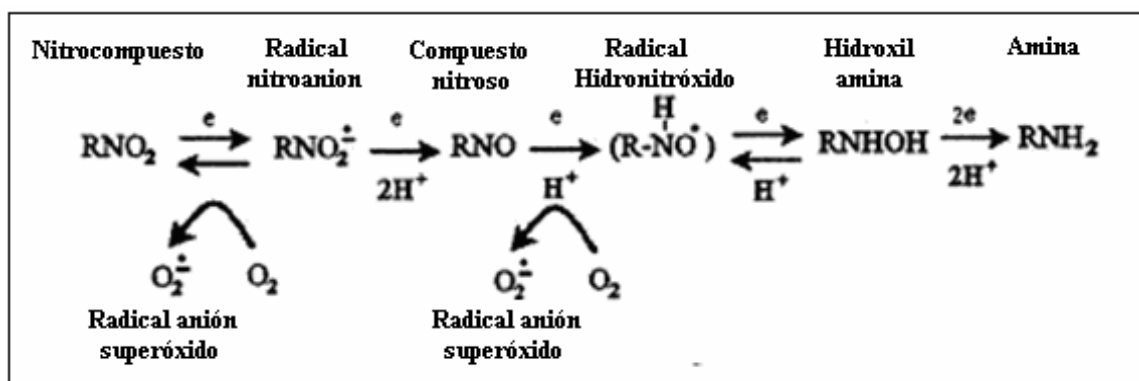


Figura 9.- Posibles vías metabólicas nitrorreductoras para nifurtimox y benznidazol. La nitrorreducción de ambos compuestos resulta en la activación, en lugar de su detoxificación. Modificado [18].

La toxicidad del fármaco afecta al parásito y también a cualquier otra célula del cuerpo humano. La reducción del grupo nitro aumenta el potencial mutagénico debido a que los radicales libres se unen a las dobles cadenas de DNA. Por los problemas con la toxicidad, el fármaco preferido es el benznidazol. Ambos aminoran la parasitemia, la morbilidad y la mortalidad causadas por la enfermedad aguda de Chagas [19].

Los efectos colaterales más frecuentes con el tratamiento con nifurtimox son anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad o sueño, manifestaciones digestivas como náusea, vómito, ocasionalmente cólicos intestinales y diarrea. Las

reacciones adversas con benznidazol se pueden clasificar en tres grupos:

1) síntomas de hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas, fiebre generalizada, linfadenopatía, dolor muscular y articular; 2) depresión de médula ósea, púrpura trombocitopénica y agranulocitosis, la manifestación más severa; y 3) polineuropatías, parestesia y polineuritis de nervios periféricos [22].

El uso de nitroderivados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda ha tenido limitado éxito. Los resultados de diversas investigaciones sugieren que el tratamiento con fármacos de nitroderivados no previenen el inicio de lesiones en los órganos afectados. Sin embargo, el empleo de estos fármacos para el tratamiento de las infecciones crónicas disminuye los síntomas clínicos [23].

2.4.- POSIBLES BLANCOS TERAPEUTICOS.

Los fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, nifurtimox y benznidazol, cuya actividad anti-*T. cruzi* se descubrió empíricamente, tienen marcada diferencia en la eficacia en sus dos fases y frecuentemente presentan efectos colaterales fatales, por lo que resulta necesario el desarrollo de fármacos efectivos y específicos para el tratamiento de ambas fases de esta enfermedad [24]. Los avances en el estudio de la bioquímica básica de *T. cruzi* han permitido la identificación de posibles blancos para la quimioterapia antichagásica, entre los que se incluyen:

2.4.1.- INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL.

T. cruzi requiere, para su viabilidad celular y proliferación en sus diferentes estadíos vitales, de esteroides endógenos específicos que forman parte de su membrana celular. El principal esteroide presente en *T. cruzi* es el ergosterol. El parásito no es capaz de utilizar los esteroides producidos por células mamíferas, como el colesterol, por lo que debe sintetizar sus propios esteroides a través de una ruta que presenta diferencias con respecto a la mamífera. Por lo tanto, la ruta de biosíntesis del ergosterol, que implica a un elevado número de enzimas, es una diana adecuada y específica para el diseño de moléculas activas. Existen inhibidores de la biosíntesis del ergosterol comercialmente

disponibles para el tratamiento de otras infecciones, como ketoconazol, itraconazol o terbinafina. Estos derivados de imidazol no poseen suficiente potencia como para eliminar al parásito de animales o humanos infectados crónicamente. Sin embargo, en los últimos años nuevos derivados del triazol han demostrado (en modelos de ratón), ser potentes inhibidores selectivos de una de las enzimas de la ruta biosintética del ergosterol.^[25-27]. Algunos ejemplos son D0870 (Zenca Pharmaceuticals), posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute) y Tak-187 (Takeda Chemical Company) (Figura 10).

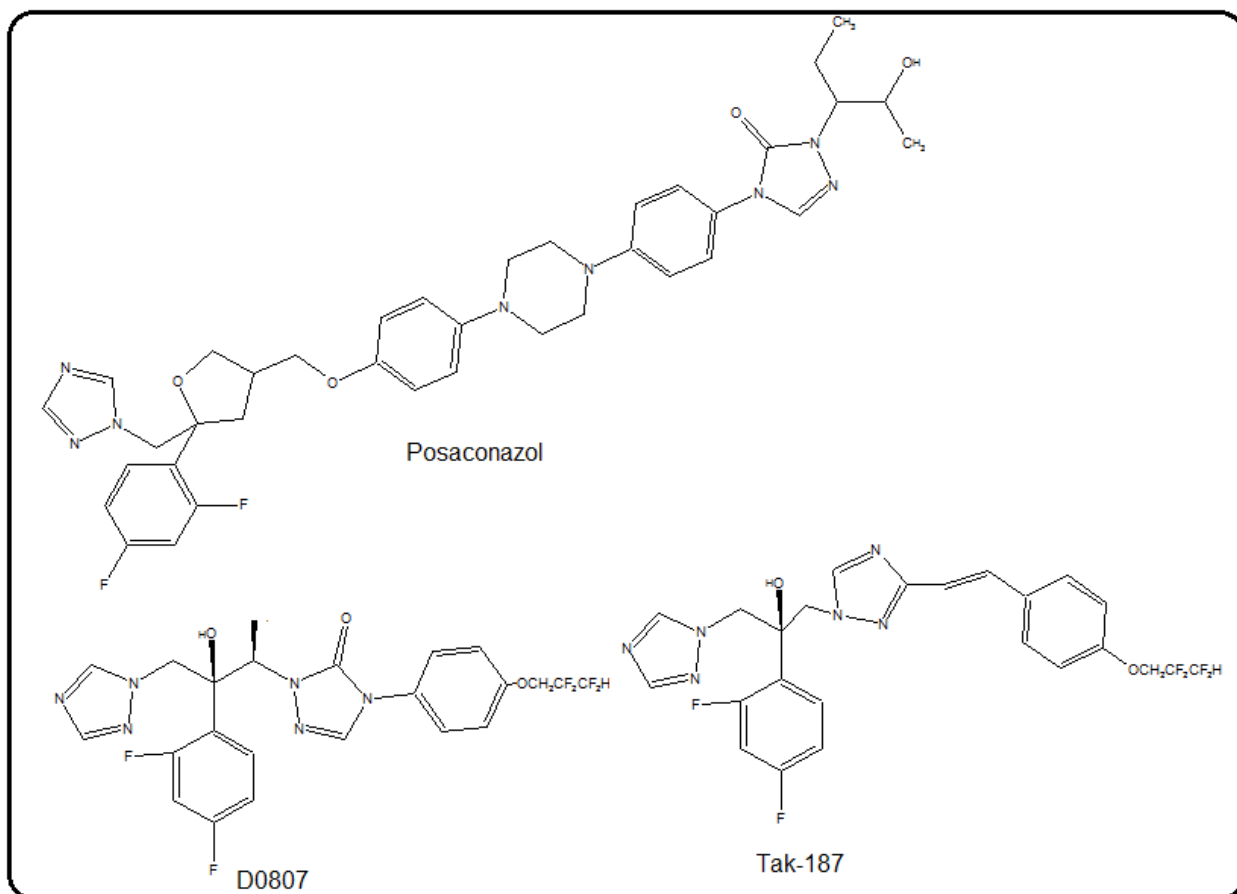


Figura 10.- Algunos triazoles inhibidores de la síntesis del ergosterol como potenciales agentes antichagásicos. Modificado ^[28].

2.4.2.- INHIBICIÓN DEL METABOLISMO DEL PIROFOSFATO.

Los tripanosomátidos poseen unos orgánulos celulares específicos, denominados acidocalcisosomas, que se encargan del almacenamiento de polifosfatos de cadena corta, como el pirofosfato, y cationes divalentes como calcio y magnesio. El pirofosfato está involucrado en la respuesta de *T. cruzi* al estrés ambiental, en la osmoregulación y en la transducción de energía. La captación y liberación de calcio a través de la membrana del acidocalcisoma está regulada por diferentes mecanismos que incluyen una Ca^{2+} -ATPasa, un intercambiador de Na^+/H^+ , bombas de H^+ dependientes de ATP y pirofosfatasas [29].

Los bisfosfonatos (utilizados en el tratamiento de la osteoporosis, Figura 11), son análogos metabólicamente inertes del pirofosfato, que se han ensayado en ratones ya que se acumulan en el acidocalcisoma del parásito, y pueden inhibir la acción de enzimas involucradas en el metabolismo del pirofosfato como la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS), la escualeno sintasa o pirofosfatasas de bombas de protones.

Se realizaron ensayos con *N*-alquil-bisfosfonatos, análogos del pirofosfato, que eran utilizados en el tratamiento de trastornos de resorción ósea y que se sabía que inhibían específicamente la FPPS. Mostraron una alta selectividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a *T. cruzi*. Sin embargo, ensayos en ratones utilizando risedronato, un fármaco inhibidor de la FPPS utilizado para la desorción ósea, no produjo curación. Esto lleva a considerar a estos compuestos utilizados en la osteoporosis como líderes para el diseño de nuevos compuestos activos frente a *T. cruzi* [30,31].

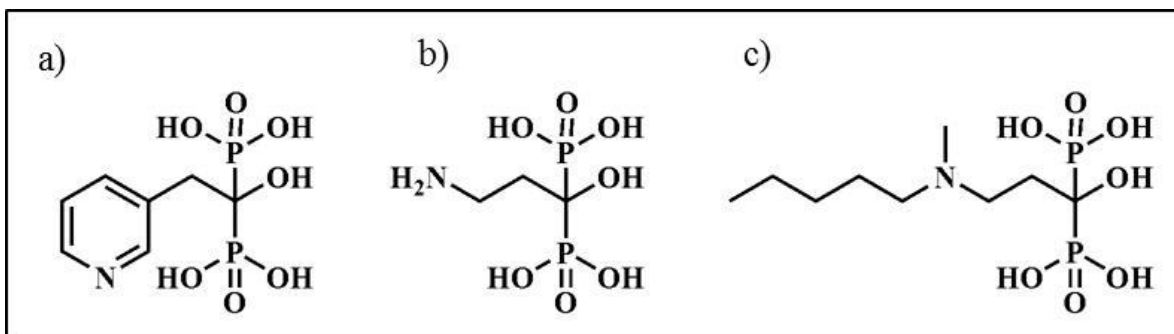


Figura 11.- Estructura de bisfosfonatos con actividad específica frente a *T. cruzi*. a) risedronato; b) pamidronato; c) ibandronato.

2.4.3.- INHIBIDORES DE LA CRUZIPAÍNA.

La cruzipaína o cruzaina es la principal cisteína proteasa de *T. cruzi*. Se localiza principalmente en los lisosomas y su concentración es más elevada en la forma epimastigote del parásito. La cruzipaína actúa principalmente en la digestión de proteínas, tanto exógenas como endógenas, en los lisosomas, en la protección contra la respuesta inmune del hospedador y en el proceso de invasión de la célula mamífera por parte de la forma tripomastigote. También participa en las etapas de diferenciación del ciclo vital del parásito. Estas importantes funciones la convierten en una diana perfecta para el diseño de nuevos compuestos anti-*T. cruzi*.

Existen inhibidores selectivos de esta proteasa que bloquean la proliferación de epimastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares y además son capaces de detener, *in vitro*, el ciclo vital del parásito en el punto en el que los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos. De esta forma, se obtuvieron buenos resultados en modelos de ratón, donde se observó una importante reducción de la parasitemia y un fuerte aumento del tiempo de supervivencia ^[24,32].

En 2002, el instituto One World Health y el National Institutes of Health de Estados Unidos de Norte América, iniciaron el desarrollo de la vinilsulfona K777 (**Figura 12**) como nuevo tratamiento antichagásico ^[33,34]. Sin embargo, en 2005 el desarrollo se tuvo que detener ya que se detectó hepatotoxicidad y su síntesis era muy complicada como para llevar a cabo un escalado. Actualmente K777 sigue siendo estudiado por el National Institute of

Allergy and Infectious Diseases (NIAID, www.niaid.nih.gov) y se está planteando el escalado y estudios en fase clínica I en humanos.

En los últimos años se han identificado nuevas moléculas con grupos tiosemicarbazona con actividad inhibitoria frente a cruzipaina.

Recientemente, han sido identificadas una serie de nuevas quinoxalinas-*N*-acilhidrazonas inhibitoras de cruzipaina pero que todavía están en los primeros pasos de desarrollo. [35]

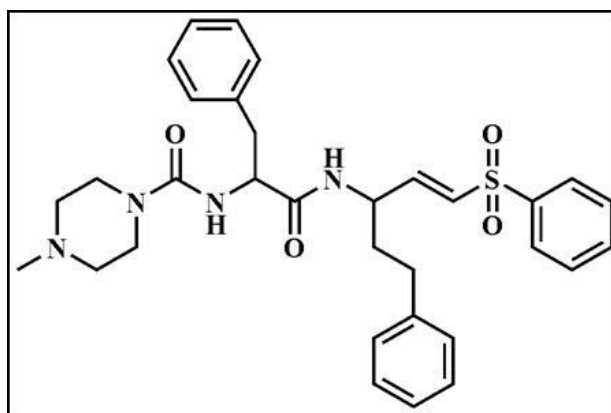


Figura 12.- Estructura del K777.

2.4.4.- INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS Y EL METABOLISMO DE LA TRIPANOTONA.

Otra ruta bioquímica específica identificada en protozoos quinetoplástidos es la síntesis y el metabolismo redox de la tripanotona (N_1, N_8 -bis (glutathionil)-espermidina). La tripanotona cumple funciones similares a las del glutatión de mamíferos ya que participa en reacciones redox dependientes de NADPH para regular el balance tiol-redox y enfrentarse a especies reactivas de oxígeno. Las enzimas involucradas en esta ruta representan una diana terapéutica muy interesante y muchos grupos de investigación están trabajando sobre ellas [36,37]. La estructura tridimensional de enzimas como tripanotona reductasa y tripanotona sintasa ha sido determinada por cristalografía de rayos X [38].

En los últimos años se han identificado muchos grupos de moléculas inhibidoras de tripanotona reductasa que han resultado activas *in vitro*, sin embargo, muy pocos estudios demuestran actividad selectiva *in vivo*. Esto ocurre por ejemplo con la tioridazina (Figura 13), que muestra inhibición de tripanotona reductasa y actividad tripanocida *in vitro*, pero en modelos *in vivo* no mostró ningún tipo de cura parasitológica.

Otro ejemplo es el clomipramine (Novartis) (Figura 13), un antidepresivo tricíclico con actividad inhibitoria sobre tripanotona reductasa y calmodulina. Es efectivo en cuanto al aumento de supervivencia y prevención de daños miocárdicos en modelos de ratón, sin embargo, el mecanismo molecular de acción no está claro por lo que no se puede concluir que se deba a una inhibición específica de la tripanotona reductasa.

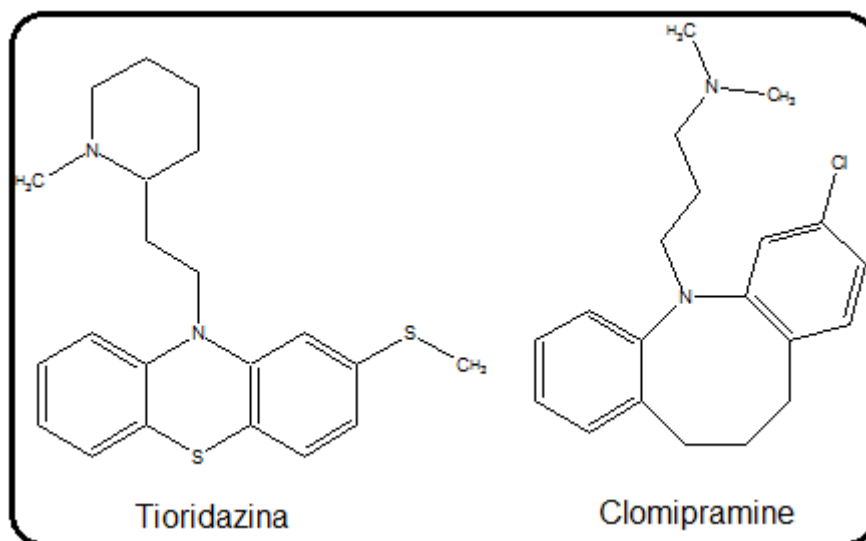


Figura 13.- Tioridazina y Clomipramine, inhibidores del metabolismo de la tripanotona.

2.4.5.- INHIBIDORES DE LA CAPTACIÓN DE PURINAS.

Los parásitos tripanosomátidos son incapaces de sintetizar purinas de novo, por lo tanto, deben captarlas del medio donde se encuentren, ya sea el medio de cultivo o el hospedador. Una vez captadas las incorporan al metabolismo de sus ácidos nucleicos. En esta ruta metabólica se ha conseguido identificar y validar una diana terapéutica, la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). El fármaco más estudiado como inhibidor de esta vía es el allopurinol (Figura 14), usado desde hace muchos años para el tratamiento de la gota. En tripanosomátidos el allopurinol actúa a modo de análogo de purinas, el cual es incorporado por la HGPRT al ADN del parásito, causando una interrupción de la síntesis de ARN y proteínas ^[36]. Se demostró la actividad del allopurinol en modelos de ratón en fase aguda de la enfermedad, mostrando diferente susceptibilidad por parte de diferentes cepas de *T. cruzi*. Sin embargo, los ensayos en humanos no han demostrado los efectos terapéuticos del allopurinol. A raíz de la obtención de la estructura cristalina de la enzima HGPRT se diseñaron nuevos inhibidores de la enzima pero que no dieron ningún tipo de actividad en ensayos sobre amastigotes intracelulares en un cultivo de macrófagos de ratón.

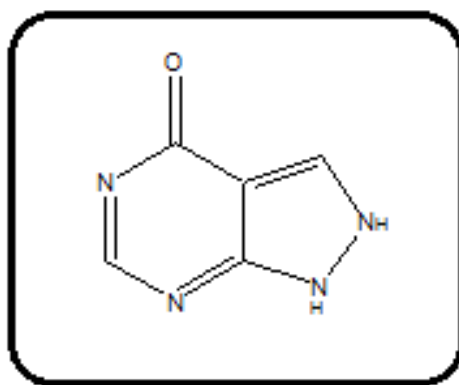


Figura 14.- Estructura del allopurinol.

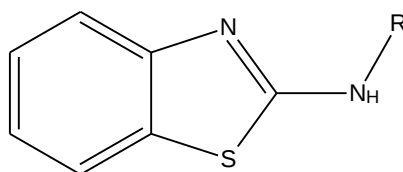
2.4.6.- INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANS-SIALIDASA.

La trans-sialidasa (TS) es una enzima que se encuentra en la superficie celular de *T. cruzi* que tiene un papel determinante en la patogenicidad del parásito. Su función es la de catalizar la transferencia de las glicoproteínas y glicolípidos presentes en circulación y en los tejidos del hospedador hacia mucinas aceptoras en la superficie del parásito en estado tripomastigote. Dado que la TS cumple un papel fundamental en el ciclo de vida del parásito y es una proteína específica de la familia *Trypanosomatidae*, se trata de una diana terapéutica de gran interés para el desarrollo de nuevas quimioterapias e inmunoterapias [39]. Fruto de este interés han sido identificados numerosos inhibidores de la trans-sialidasa de *T. cruzi* [40-42].

2.5. -NUEVAS PROPUESTAS EN LA SÍNTESIS DE ANTICHAGÁSICOS.

En la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, se han identificado diversos grupos de fármacos con actividad contra *T. cruzi*, dentro de los cuales se puede mencionar a los alquilisofosfolípidos (alps), derivados de tiazidina, diamidinas aromáticas, dinitroanilinas, derivados nitroimidazoles, dialquilaminas, derivados de indazol [8].

Sin embargo, es importante destacar que existe un tipo de molécula orgánica heterocíclica como lo es el caso de los benzotiazoles **21**, que han dado resultados importantes en el descubrimiento de nuevos agentes antichagásicos [43]. Nuestro grupo de investigación ha sintetizado esta familia de compuestos obteniéndose resultados importantes y amplia gama de actividad biológica ante diversas patologías, no sólo como antichagásicos, sino también como antitumoral, anticonvulsivo, antagonista del calcio, antibacterial y tranquilizante [51].



21

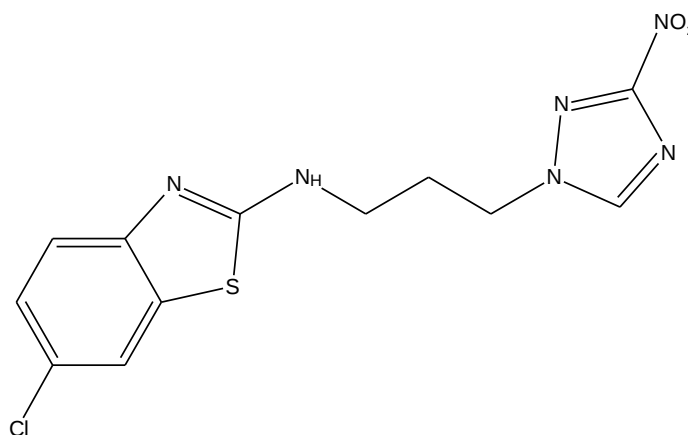
R: Diversos nitroimidazoles.

Tomando en consideración la estructura de esta familia de compuestos y basándonos en las modificaciones moleculares que surgen a partir de la síntesis planificada como una estrategia químico-medicinal eficaz en el diseño de fármacos, se llevó a cabo la modificación, modificando los sustituyentes en posición 2 del benzotiazol (grupo amino unido al grupo R), por grupos arilo-metoxis y nitro sustituidos, con el propósito de evaluar, cómo este tipo de sustituyentes modulan el potencial antichagásico en dichos compuestos. Por tal motivo se propuso la síntesis de una serie de derivados de 2-arilbenzotiazol con el fin de que estos compuestos fueran evaluados *in vitro* contra una cepa de Trypanosoma, agente causante del mal de Chagas.

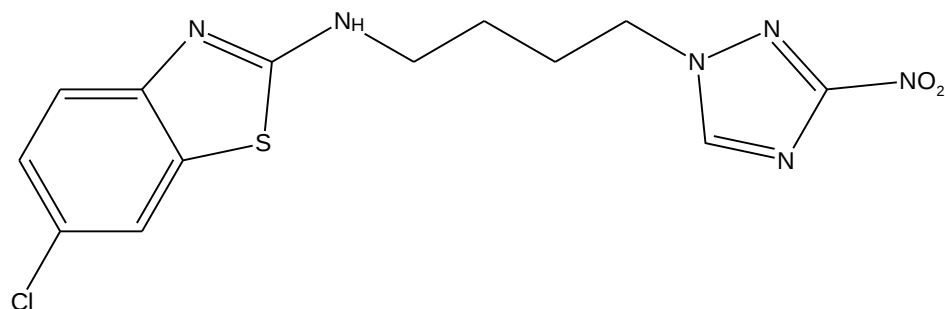
3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1.- ANTECEDENTES.

- En 2013 Papadopoulou y col. ^[43], reportaron la síntesis y evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de una serie de derivados de benzotiazoles con el fin de evaluar su potencial en contra del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. La síntesis de los compuestos se basó en la reacción de sustitución nucleófila aromática entre los respectivos 2-Cloro-1,3-benzotiazol con las respectivas nitro (triazol/imidazol) alquilaminas, con buenos rendimientos. Las condiciones de reacción que utilizaron fueron el 1-propanol como medio de reacción bajo reflujo por un tiempo entre 16 a 24 h. De los compuestos que preparó el equipo de investigación, casi todos presentaron actividad biológica de moderada a alta (tomando como criterio un $CI_{50} < 0.5 \mu M$ y otros catalogados como moderadamente activos ($CI_{50} = < 0.5-6.0 \mu M$), sin embargo se destacaron los compuestos **1** y **2** siendo activos y selectivos en contra del parásito *Trypanosoma cruzi*, y presentando un $CI_{50} = 0.059 \mu M$ y $0.142 \mu M$, respectivamente.

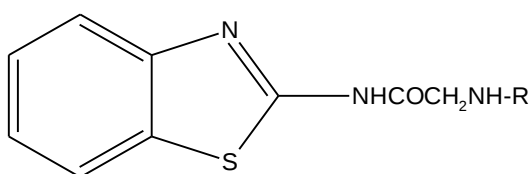


1

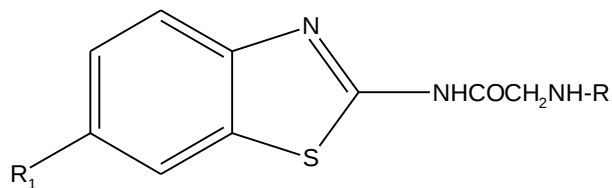


2

- En 2015 Bhausahab y col. ^[44], llevaron a cabo la síntesis y evaluación de la actividad antifúngica de una serie de derivados de benzotiazoles. Inicialmente al 2-aminobenzotiazol lo convirtieron en los derivados sustituidos en la posición 6 del 2-aminobenzotiazol mediante una reacción de nitración y bromación para formar el 6-nitro-2-aminobenzotiazol y el 6-bromo-2-aminobenzotiazol respectivamente. Los derivados fueron tratados posteriormente con cloruro de cloroacetilo para formar los derivados de cloroacetamido del benzotiazol. Los productos los trataron con diversas aminas aromáticas y heterocíclicas formándose finalmente los compuestos del tipo **3** y **4**. El equipo observó que de los compuestos sintetizados, aquellos que poseían grupos atractores de densidad electrónica como los grupos nitro (-NO₂) en posición 6 y -Cl o -F en posición 3 de la amina aromática, presentaron actividad moderada como antifúngico, en comparación con los otros compuestos sintetizados.



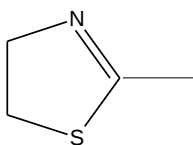
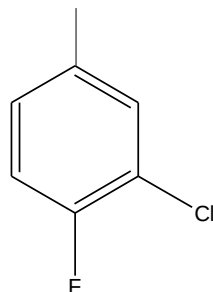
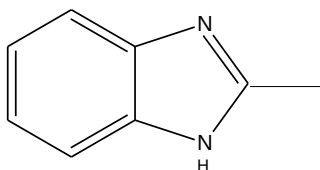
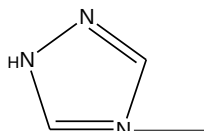
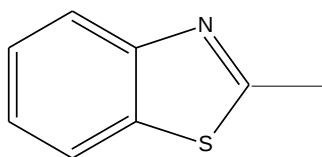
3



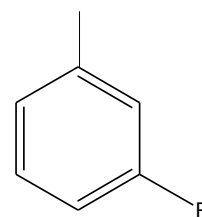
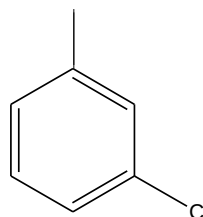
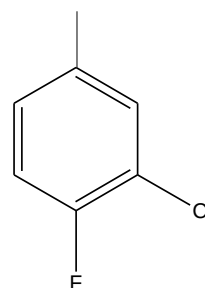
4

R₁= Br, NO₂.

Presentando como sustituyentes R los compuestos siguientes:



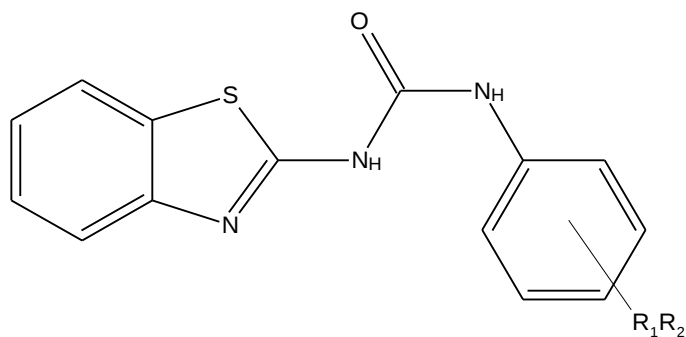
R (3)



R (4)

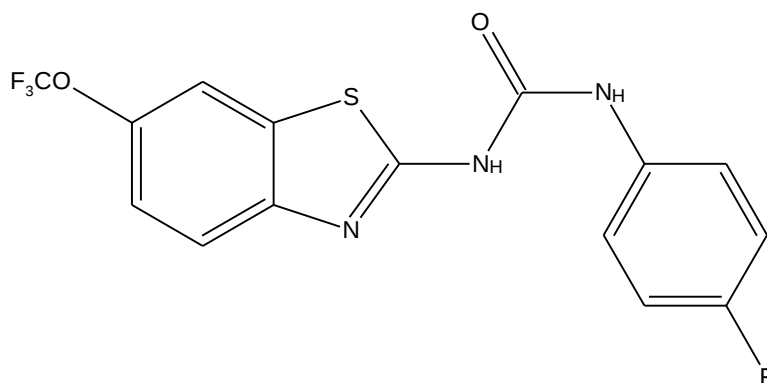
- En 2012 Caputo y col. ^[45], sintetizaron y evaluaron la actividad biológica como anticáncer de dos grupos de derivados de benzotiazoles conteniendo en el carbono 2 un grupo arilamida o arilurea. La síntesis de los derivados, la llevó a cabo para los compuestos unidos a la amida mediante la conjugación de benzotiazoles 2-amino-6-sustituidos, soportando en los carbonos 7 u 8 diversos cloruros de acilo, esto en condiciones básicas. En cuanto a los compuestos unidos a la urea, estos fueron obtenidos mediante la reacción de las anilinas respectivas con diversos aril-isocianatos en diclorometano seco a temperatura ambiente. Los 6-sustituidos-2-aminobenzotiazoles fueron a su vez, obtenidos a partir del comercialmente disponible p-metoxi o p-trifluorometoxianilina. Los compuestos de tipo **5** fueron seleccionados y evaluados *in vitro* como anticáncer a través de un ensayo con líneas celulares de tumor humano. Los compuestos **6** y **7** presentaron actividad anticáncer representativa, especialmente el compuesto **7**. Cabe destacar que todos los

compuestos fueron sometidos a un ensayo preliminar *in vitro* como potencial inhibidor de la enzima activadora de ubiquitina (E1), sin obtenerse actividad biológica relevante en este ensayo.

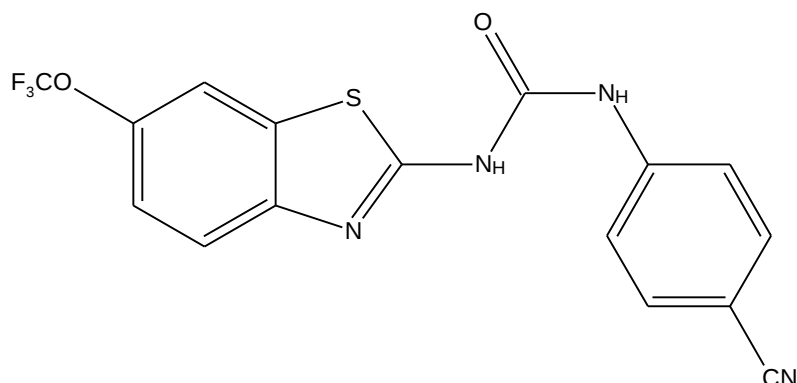


5

R₁: OCH₃, OCF₃; **R₂:** 4-F, 2-F, 4-OCH₃, 4-CN; **R₃:** H, 6F.

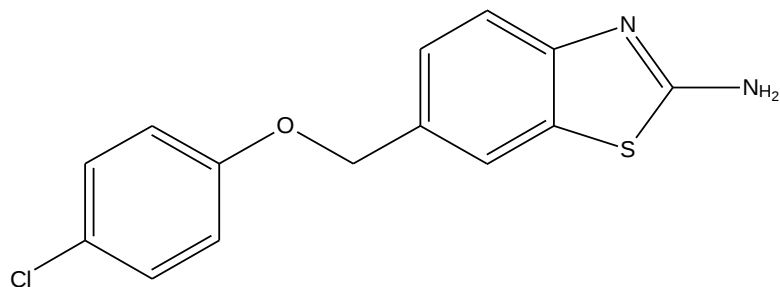


6

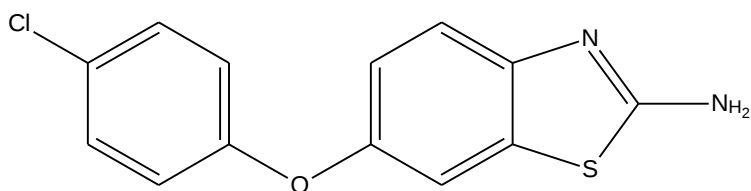


7

- En 2013 Catalano y col. ^[46], hicieron referencia a la síntesis y caracterización de una serie de derivados de 6-sustituidos-2-aminobenzotiazoles y su evaluación *in vitro* como potenciales agentes antimicrobianos. La síntesis la llevaron a cabo, haciendo reaccionar alcoholes arílicos y alquílicos con 4-nitrofenol bajo condiciones de Mitsunobu, para generar los derivados nitrados, los cuales fueron reducidos mediante hidrogenación catalítica posteriormente para generar las respectivas anilinas. Respecto a los derivados 2-aminobenzotiazoles, estos fueron obtenidos vía tiocianación de las respectivas anilinas. En esta reacción el tiocinato de amonio y el bromo se utilizaron para generar el tiocianogeno *in situ*. Casi todos los compuestos presentaron buena actividad antifúngica, evaluados en contra de las especies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 4-8 mg/mL. En particular, los compuestos **8 y 9**.

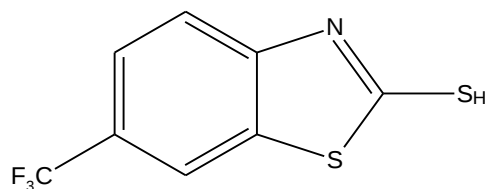


8

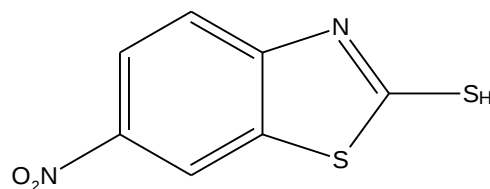


9

- En 2009 Franchini y col. ^[47], reportaron la síntesis y evaluación de la potencial actividad antimicrobiana de una serie de derivados de 2-mercapto-1,3-benzotiazoles. La síntesis de estos últimos la llevaron a cabo haciendo reaccionar las respectivas anilinas con etil xantato de potasio en DMF obteniendo los 6-sustituidos-2-tiol-1,3-benzotiazoles. Estos últimos fueron tratados con bromuro de bencilo y K₂CO₃ obteniéndose los derivados de los 6-sustituidos-2-benciltio-1,3-benzotiazoles con buenos rendimientos. Para identificar los compuestos con perfil antimicrobiano, los evaluaron *in vitro* ante diversas bacterias del tipo Gram positivo y Gram negativo, donde los compuestos **10** y **11** mostraron actividad antimicrobiana representativa con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 3.12 µg/mL contra el *Staphylococcus aureus* y 25 lg/mL contra el *Escherichia coli*.

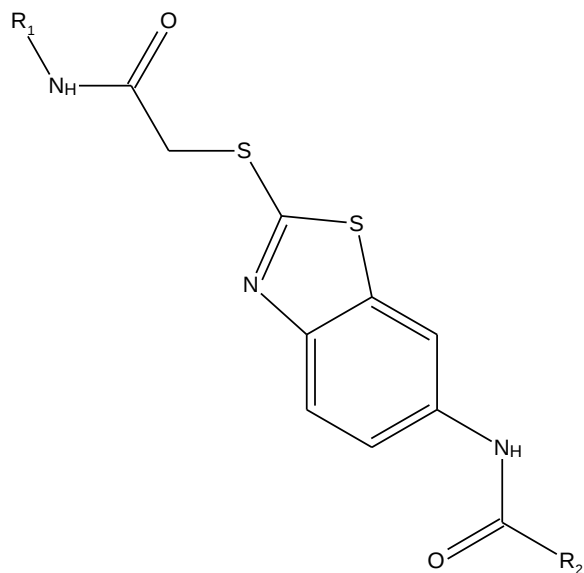


10



11

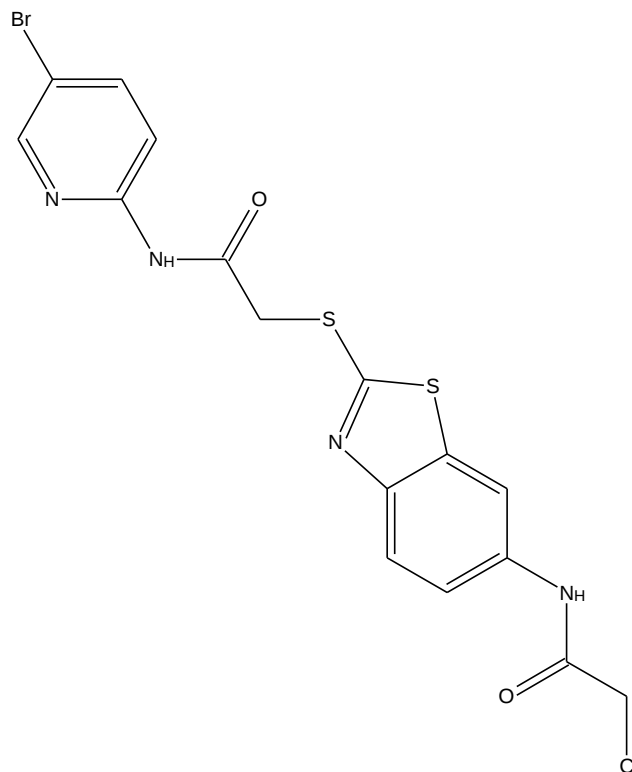
- En 2012 Shi y col. ^[48], llevaron a cabo la síntesis y evaluación *in vitro* como potencial agente anticáncer de una serie de derivados del benzotiazol-2-tiol. La síntesis la llevaron a cabo inicialmente haciendo reaccionar aminas comercialmente disponibles con el cloruro de 2-cloroacetilo en presencia de carbonato de potasio como base y usando como medio de reacción diclorometano para generar los primeros intermediarios. Estos los hicieron reaccionar posteriormente con el 6-aminobenzotiazol-2-tiol y trietilamina usando como medio THF bajo reflujo, formándose los segundos intermediarios. Estos últimos, finalmente reaccionaron con el cloruro de 3-cloropropilo, bromuro de 2-bromoacetilo, cloruro de 2-cloroacetilo y cloruro de 2-metoxibenzoilo usando como base trietilamina formándose los productos finales de tipo **12**. Los compuestos sintetizados los evaluaron frente diversas líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, mostrando una actividad inhibitoria potente el compuesto **13**, con un CI_{50} = 44 nM en la línea celular SKRB-3, en la SW620 un CI_{50} = 4.3 nM, en la A549 un CI_{50} = 44 nM) y en la HepG2 un CI_{50} = 48 nM y se encontró que este compuesto induce apoptosis en las células cancerígenas HepG2.



12

R₁: bencil, 2-piridinil, 5-cloro-2- piridinil, 5-bromo-2-piridinil, 5-metil-2- piridinil, 3- piridinil, 2-cloro-4- piridinil, 2-cloro-4-metil-3- piridinil, 2 pirimidinil- 2 tiazolil.

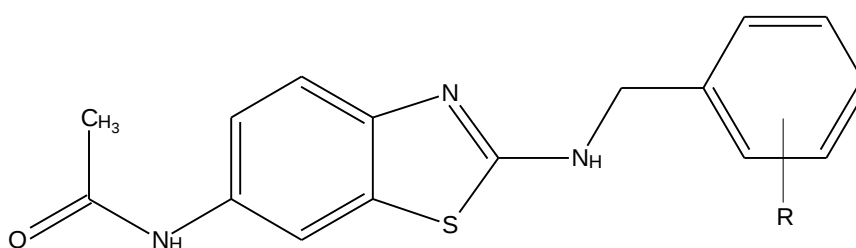
R₂: Bromoetil, cloroetil, 2-metoxifenil, clorometil.



13

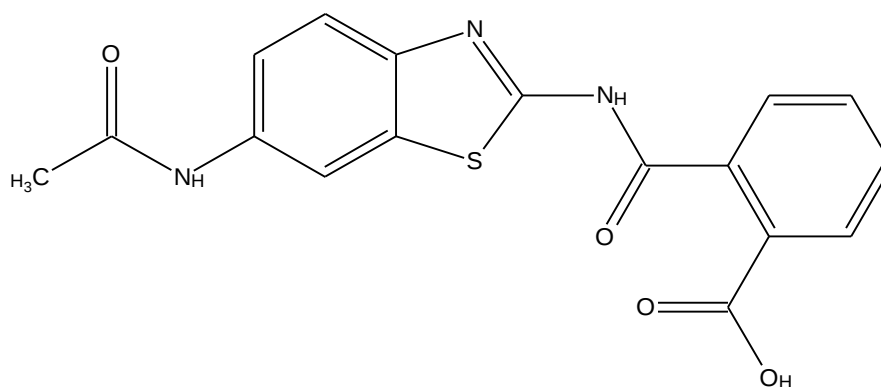
- En 2014 Verma y col. ^[49], sintetizaron y caracterizaron una serie de derivados de benzotiazoles con el fin de evaluar su potencial actividad antiinflamatoria y analgésica. En el primer paso de la síntesis, llevaron a cabo la preparación del intermediario N-(2-aminobenzo[d]tiazol-6-il) acetamida partiendo de la p-aminoacetanilida en presencia de tiocianato de potasio en medio ácido (ácido acético) y una solución de bromo con agitación durante 2h. Una vez formado el intermediario N-(2-aminobenzo[d]tiazol-6-il) acetamida, procedieron a la síntesis de las bases de Schiff, compuestos tipo **14**, haciendo reaccionar el intermediario anteriormente mencionado con diversos aldehídos aromáticos sustituidos mediante una reacción de condensación, esto en medio ácido (ácido acético) por 10 h. Por otro lado, llevaron a cabo la síntesis de derivados del tipo Ácido 2-(6-aminobenzo[d]tiazol-2-ilcarbamoyl) benzoico haciendo reaccionar el intermediario N-(2-aminobenzo[d]tiazol-6-il) acetamida con anhídrido

ftálico para así formar el producto final **15**. De los derivados sintetizados, este último **15**, presentó un porcentaje representativo de actividad biológica (un porcentaje de actividad analgésica del 75.34%), comparándose con la aspirina, que presento un porcentaje de 84,33%. Por otro lado, presentó un porcentaje de actividad antiinflamatoria de 70,5% comparándose con el 76,92% que presentó el acetaminofen.



R: p-Cloro, p-Metoxi, 3-Nitro, p-Metil.

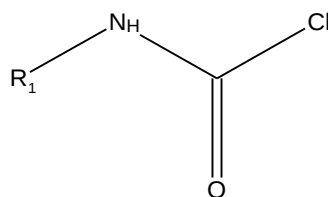
14



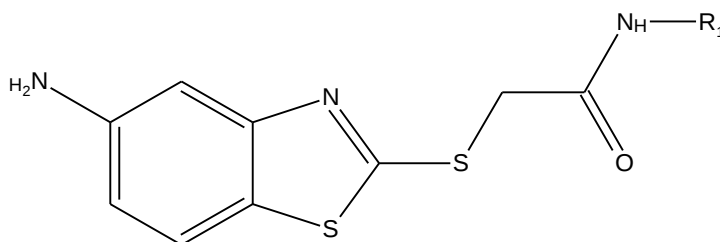
15

- En 2011 Wang y col. ^[50], llevaron a cabo la síntesis y caracterización de una serie de derivados del benzotiazol-2-tiol y su evaluación *in vitro* como antitumoral. La síntesis de los primeros intermediarios **16**, la llevaron a cabo usando cloruro de 2-cloroacetilo, K₂CO₃ y usando como medio de reacción el diclorometano bajo reflujo por 4h. Este

producto en un segundo paso reaccionó con el 5-amino-1,3-benzotiazol-2-tiol en acetona, K_2CO_3 bajo reflujo, formándose el segundo intermediario **17**. El último paso dio lugar a los productos finales **18**, éstos se formaron por la reacción de los intermediarios **17** con cloruro de benzoilo/ cloruro de 4-clorobenzoilo, cloruro de 2-metoxibenzoilo/ cloruro de 2-nitrobenzoilo y cloruro de acetilo/ cloruro de 2-cloroacetilo, esto usando como base $NaHCO_3$ y como medio de reacción diclorometano por 4-26 h a temperatura ambiente. De los derivados preparados, el compuesto **19** y **20** presentaron buena actividad antitumoral frente a diversas líneas celulares de cáncer humano, con valores de CI_{50} en el rango micromolar; considerando también que el compuesto **20** indujo apoptosis en las células cancerígenas HepG2.

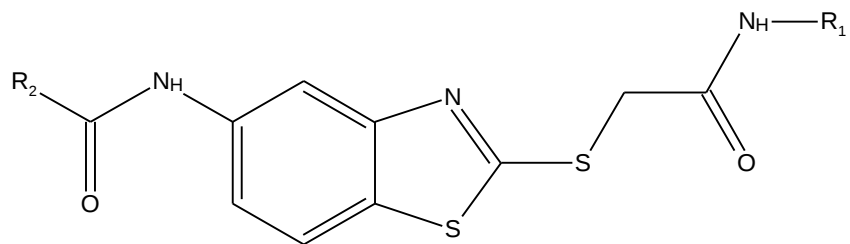


16



17

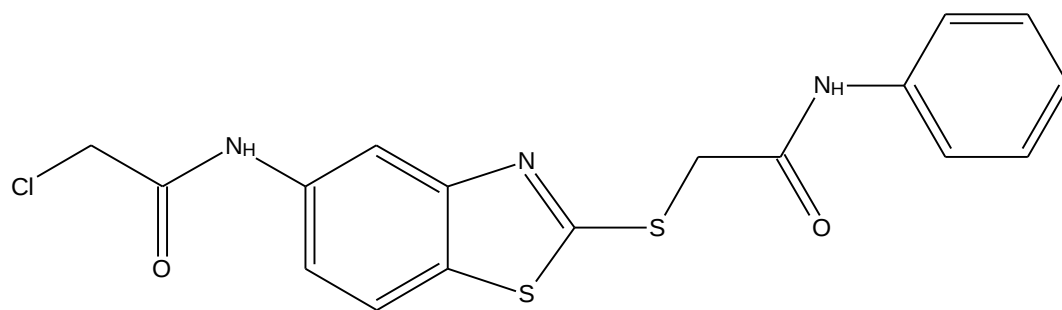
R₁: Fenil, 4-Clorofenil, H, 4-metoxifenil.



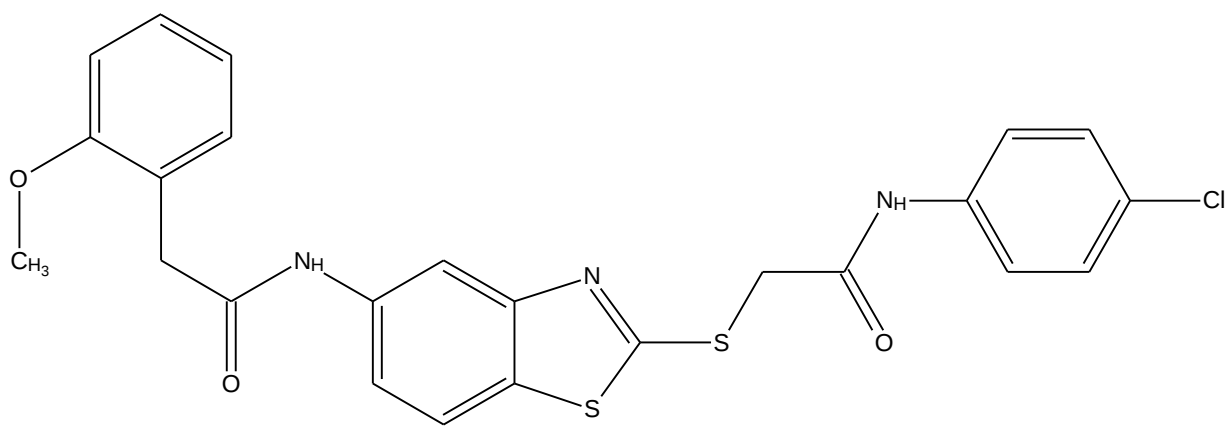
R₁: Fenil, 4-Clorofenil, H, 4-metoxifenil.

R₂: Fenil, 4-Clorofenil, 4-nitrofenil, 2-metoxifenil, metil, clorometil.

18

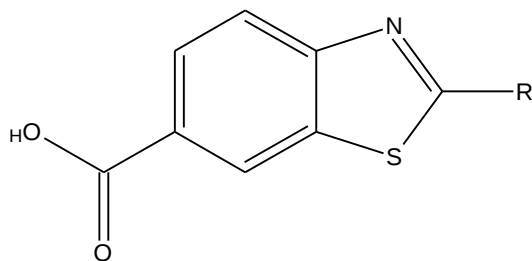


19



20

- En 2006 Charris y Col. ^[51], llevaron a cabo la síntesis de una serie de derivados del ácido 2-sustituido-benzotiazol-6-carboxílico, estableciendo una ruta sintética en donde se utilizó el nitrobenceno como agente oxidante. La propuesta se basó en una metodología simple, pero a la vez eficiente que permite la conversión de sustratos deficientes o ricos en electrones en los correspondientes derivados del ácido 2-sustituido-benzotiazol-6-carboxílico. La síntesis de los compuestos abarca tres pasos lineales, en donde primero partieron del 4-aminobenzonitrilo en presencia de NH_4SCN y Br_2 para producir el 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo, posteriormente este intermediario lo hicieron reaccionar con KOH al 30%, y luego acidificaron con HCl para formar el ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico. Este último lo hicieron reaccionar mediante una reacción de condensación con diversos aldehídos heterocíclicos, en nitrobenceno como solvente y agente oxidante, para generar los derivados finales **25**. Este protocolo es complementario a las metodologías existentes para la preparación de benzotiazoles, en donde la mayoría fracasa cuando sustratos deficientes de electrones como el ácido-4-amino-3-mercaptobenzoico y aldehído son usados. Esta especie activa ha presentado diversidad de actividades biológicas, tal como antibacterial, antitumoral, antagonista del calcio, anticonvulsivo, antiparasitario y como tranquilizante.



R: Diversos sustituyentes heterocíclicos.

25

3.2.- JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años, debido a los masivos movimientos migratorios, la enfermedad de Chagas está comenzando a ser una preocupación de salud pública en varios países por la aparición de la transmisión no vectorial a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, alimentaria y transmisión congénita. Las medidas de prevención y control de la transmisión, llevadas a cabo en los últimos años mediante iniciativas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) y diferentes gobiernos latinoamericanos, han aportado interesantes resultados en cuanto a la disminución de los niveles de transmisión. Sin embargo, en cuanto al tratamiento de la enfermedad, sólo 2 fármacos, nifurtimox y benznidazol, han sido comercializados desde los años 60 hasta la actualidad. Las abundantes limitaciones que presentan estos fármacos han llevado a la prohibición de su uso en muchos países y ponen de manifiesto la imperante necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad [52,53]. Bajo la premisa de diseñar y desarrollar nuevos fármacos con posible actividad antichagásica, y con los antecedentes expuestos anteriormente, se propuso la síntesis de una serie de derivados del 2-arilbenzotiazol y la evaluación de su actividad *in vitro* contra una cepa de Trypanosoma, causante del mal de Chagas, como un aporte en el diseño y síntesis de nuevas estructuras orgánicas contra esta enfermedad.

4.- OBJETIVOS.

4.1- OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar y evaluar *in vitro* diversos derivados de 2-arilbenzotiazol.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar el intermediario 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo **(23)**
- Sintetizar el intermediario ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico. **(24)**
- Sintetizar los derivados ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **(25a-25k)**
- Caracterizar cada uno de los compuestos obtenidos mediante diferentes técnicas espectroscópicas como IR y RMN.
- Evaluar el potencial antichagásico *in vitro* de los compuestos en contra de una cepa de Tripanosoma.

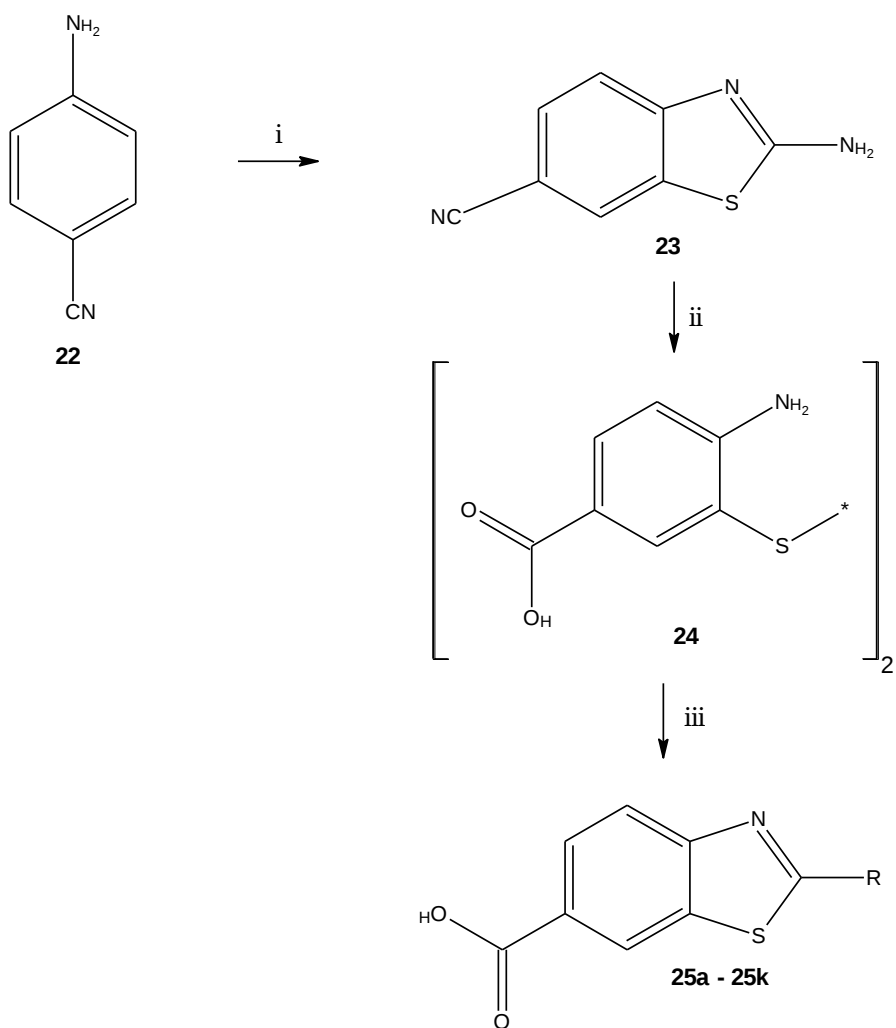
5.-PARTE EXPERIMENTAL.

5.1.- CONSIDERACIONES GENERALES.

- Los espectros de IR fueron tomados en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470, empleando pastillas de KBr. La absorbancia es reportada en cm^{-1} .
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , fueron tomados en un espectrómetro JEOL ECLIPSE 270 (270 MHz). Se empleó como solvente DMSO-d_6 . Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en partes por millón (ppm), empleando como patrón interno trazas de DMSO. En cada caso se indicó los desplazamientos químicos (δ) en la escala parte por millón (ppm), el valor de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) y la asignación estructural de las mismas; las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad de las señales fueron: singlete (s), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd) y multiplete (m).
- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos.
- El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatofolios de sílica gel marca Merck tipo 60F25H, de un espesor de capa de 0,2 mm. El análisis de las placas se hizo mediante una lámpara de UV de 254/365 nm.
- La purificación de los compuestos se realizó mediante cristalización y lavados con solventes según fue el caso; se indicó el disolvente empleado.

5.2.- SÍNTESIS ORGÁNICA.

En este T.E.G se propuso la síntesis de una serie de derivados del 2-arilbenzotiazol. La síntesis de los compuestos abarcó tres pasos lineales, en donde primero se partió del 4-aminobenzonitrilo (**22**) en presencia de NH_4SCN y Br_2 disueltos en AcOH glacial, a temperatura ambiente (**i**) produciéndose el 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo (**23**), posteriormente este intermediario se hizo reaccionar con KOH al 30% bajo reflujo y luego se acidificó con HCl (**ii**) para formar el ácido 4-amino-3-mercaptopbenzoico (**24**). Este último se hizo reaccionar mediante una reacción de condensación con diversos benzaldehídos metoxilados y nitrados, en nitrobenceno como solvente y agente oxidante, bajo reflujo por 12 h (**iii**) para generar los derivados finales **25a-25k**. A continuación se presenta el esquema de síntesis propuesto.

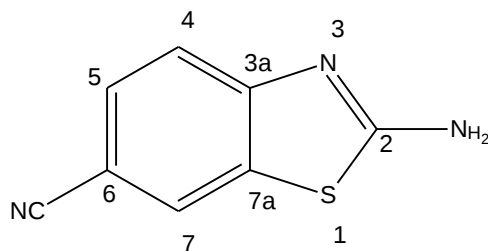


R: o-metoxifenil; p-metoxifenil; m-metoxifenil; 3,4,5-trimetoxifenil; 2,4,6-trimetoxifenil; 3,4-dimetoxifenil; 3,5-dimetoxifenil, o-nitrofenil, p-nitrofenil, m-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil.

Esquema 1.- Síntesis general para los compuestos **25a-25k**.

5.3.- METODOLOGÍA DE SÍNTESIS.

5.3.1.- SÍNTESIS DE 2-AMINO-1,3-BENZOTIAZOL-6-CARBONITRILO (23).

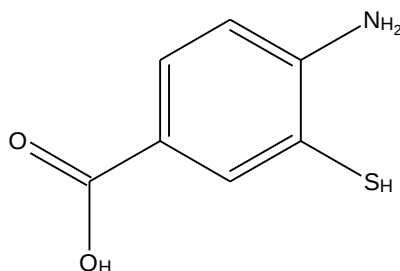


En un balón de fondo redondo, provisto de un embudo de adición y de agitación magnética se colocaron 10 mmol de 4-aminobenzonitrilo, 20 mmol de tiocianato de amonio, disueltos en ácido acético glacial. Mediante el uso de un embudo de adición, se agregaron 20 mmol de bromo disueltos en ácido acético glacial. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 3h. Se añadió agua destilada, el precipitado obtenido se filtró y descartó. A la solución resultante se le agregó carbonato de sodio hasta la aparición de un precipitado, el cual se filtró, secó y recristalizó en etanol, obteniendo el 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo.

Rendimiento: 82 %. **P.f.:** 208-210 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3392, 3296, 2208, 1622.

RMN ^1H , DMSO-d_6 , δ ppm: 7.41 (d, 1H, H_4 , $J=8.41$ Hz); 7.61 (dd, 1H, H_5 $J_1=1.60$ Hz, $J_2=8.41$ Hz); 8.05 (s, 2H, NH_2); 8.18 (d, 1H, H_7 , $J=1.60$ Hz).

5.3.2.- SÍNTESIS DE ÁCIDO 4-AMINO-3-MERCAPTOBENZÓICO (24).

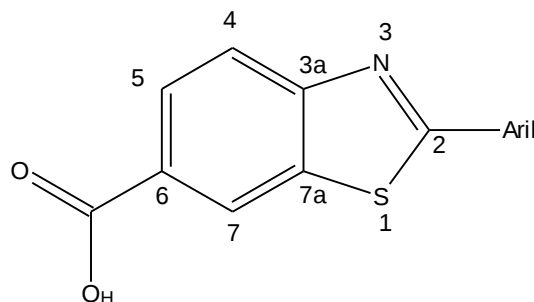


En un balón de fondo redondo, provisto de refrigerante y agitación magnética se colocaron 15 mmol de 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo **23** y 30 mL de hidróxido de potasio al 30%, se procedió a calentar bajo reflujo durante 72 h. Finalizada la reacción, se colocó el balón en un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico concentrado hasta la aparición de un precipitado. Este se filtró y recrystalizó en etanol.

Rendimiento: 76 %. **P.f.:** 290 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3504, 3408, 2640, 1676, 1606.

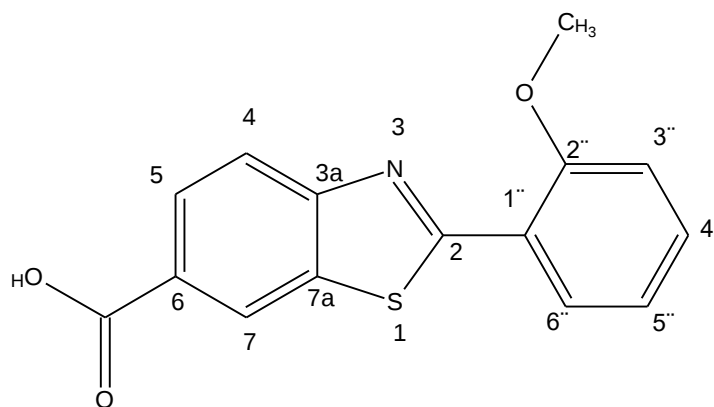
RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 6.72 (d, 1H, H_5 , $J=8.35$ Hz); 7.56 (d, 1H, H_2 , $J=1.86$ Hz); 7.62 (dd, 1H, H_6 , $J_1=1.86$ Hz, $J_2=8.35$ Hz); 11.90 (sa, 1H, OH). **RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm:** 114.4; 115.4; 118.0; 133.3; 138.6; 154.1; 167.1 (C=O).

5.3.3.- PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS 2-ARIL-BENZOTIAZOL-6 CARBOXÍLICOS (25a-25k).



En un balón de fondo redondo, provisto de un refrigerante y de agitación magnética se colocaron 0.6 mmol del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico y 0.6 mmol del aldehído correspondiente en nitrobenceno, se procedió a refluxar la mezcla por 12 h, finalizada la reacción se añadió heptano lentamente, entonces el precipitado resultante se filtró y se lavó con éter etílico, obteniéndose de esta forma los compuestos deseados.

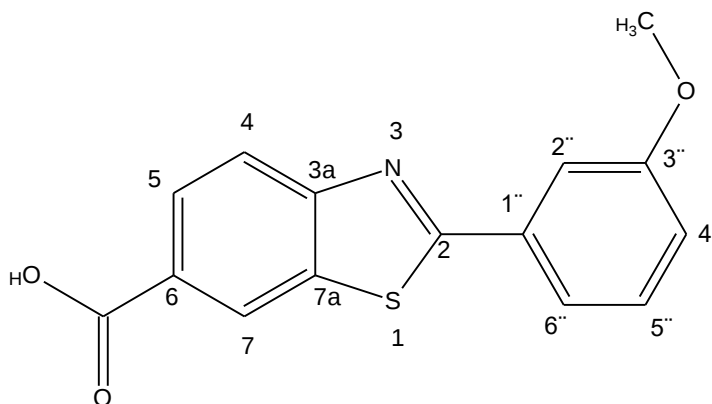
5.3.3.1.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(2-METOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25a.



Sólido crema. **Rendimiento:** 79 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1683, 1597, 1498, 1328.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3.86 (s, 3H, OCH_3); 7.16 (d, 1H, $\text{H}_{3'}$ $J=7.41$ Hz); 7.43 (m, 2H, $\text{H}_{4',5'}$); 7.90 (d, 1H, $\text{H}_{6'}$, $J=7.44$ Hz); 8.12 (dd, 1H, H_5 , $J_1=1.36$ Hz, $J_2=8.56$ Hz); 8.23 (d, 1H, H_4 , $J=8.56$ Hz); 8.75 (d, 1H, H_7 , $J=1.36$ Hz), 12.58 (sa, 1H, OH).

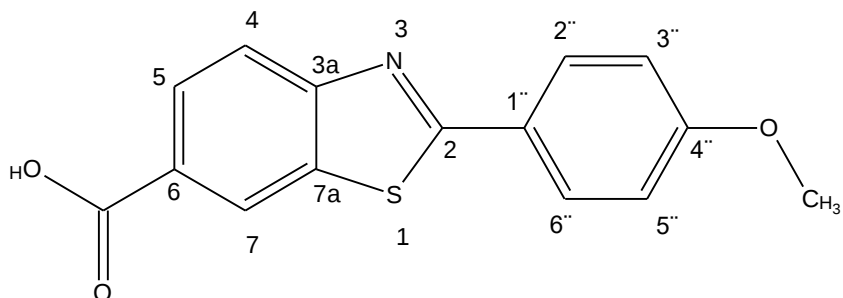
5.3.3.2.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3-METOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25b.



Sólido gris. **Rendimiento:** 73 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1688, 1590, 1477, 1327.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3.88 (s, 3H, OCH_3); 7.19 (dd, 1H, $\text{H}_{6'}$ $J_1=1.49$ Hz, $J_2=7.13$ Hz); 7.51 (t, 1H, $\text{H}_{5'}$, $J=8.01$ Hz); 7.64 (d, 1H, $\text{H}_{2'}$, $J=1.49$ Hz); 7.68 (d, 1H, $\text{H}_{4'}$, $J=8.01$ Hz); 8.08 (dd, 1H, H_5 , $J_1=1.19$ Hz, $J_2=8.63$ Hz); 8.13 (d, 1H, H_4 , $J=5.64$ Hz); 8.75 (d, 1H, H_7 , $J=1.19$ Hz); 13.09 (sa, 1H, OH). **RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm:** 55.9; 112.3; 118.6; 120.5; 123.1; 124.5; 127.9; 128.2; 131.1; 134.3; 134.9; 156.6; 160.2; 167.3; 171.1.

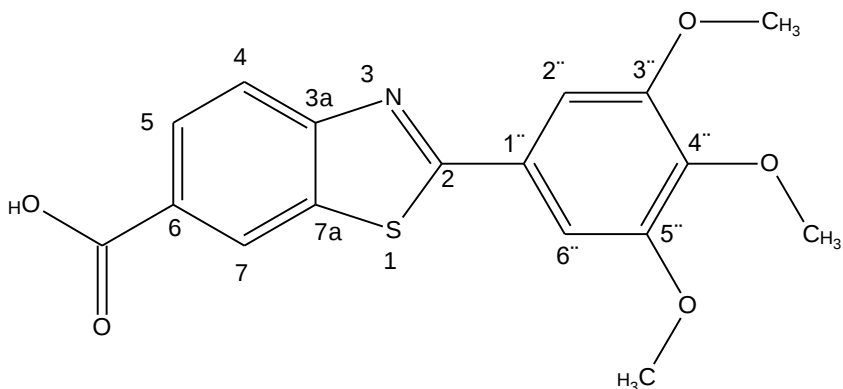
5.3.3.3.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(4-METOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25c.



Sólido crema. **Rendimiento:** 79 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1686, 1594, 1478, 1418.

RMN ^1H , DMSO-d_6 , δ ppm: 3.87 (s, 3H, OCH_3); 7.13 (d, 1H, $\text{H}_{3'',5''}$ $J=8.76$ Hz); 8.06-8.08 (m, 4H, Ar) ; 8.70 (d, 1H, H_7 , $J=1.81$ Hz); 12.80 (sa, 1H, OH).

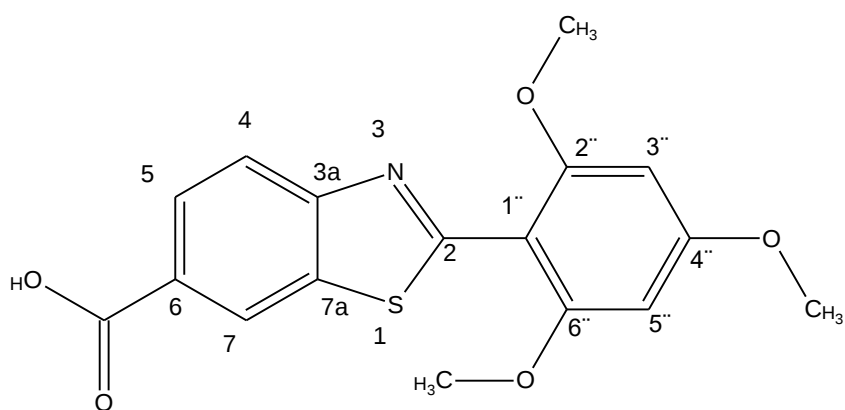
5.3.3.4.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3,4,5-TRIMETOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25d.



Sólido marrón. **Rendimiento:** 36 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1685., 1586, 1479., 1330.

RMN ^1H , DMSO d_6 , δ ppm: 3.83 (s, 3H, OCH_3); 3.99 (s, 6H, 2 x OCH_3); 7.44 (s, 2H, $\text{H}_{2''}$, $6''$); 7.45-8.34 (m, 2H, Ar); 8.85 (s, 1H, H_7), 12.87 (sa, 1H, OH).

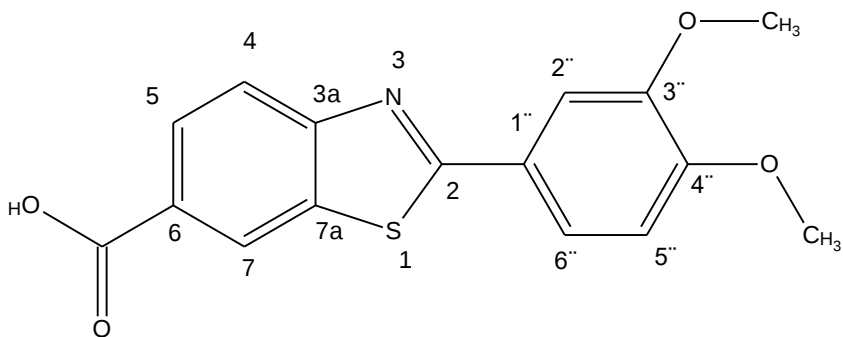
5.3.3.5.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25e.



Sólido naranja. **Rendimiento:** 32 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1702, 1611, 1462, 1378.

RMN ^1H , DMSO d_6 , δ ppm: 3.69 (s, 3H, OCH_3); 3.81 (s, 6H, 2 x OCH_3); 6.32 (s, 2H, $\text{H}_{3''}$, $5''$); 7.63-8.19 (m, 2H, Ar) ; 8.62 (s, 1H, H_7), 12.34 (sa, 1H, OH).

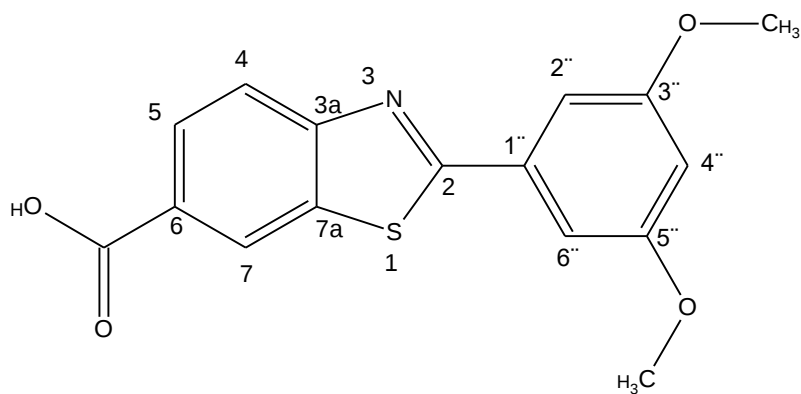
5.3.3.6.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25f.



Sólido marrón. **Rendimiento:** 40 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1680, 1590, 1476, 1259.

RMN ^1H , DMSO_{d_6} , δ ppm: 3.89 (s, 3H, OCH_3); 3.92 (s, 3H, OCH_3); 7.20-7.44 (m, 2H, Ar $^{\cdot}$); 7.71-8.09 (m, 3H, Ar); 8.75 (s, 1H, H_7), 12.39 (sa, 1H, OH).

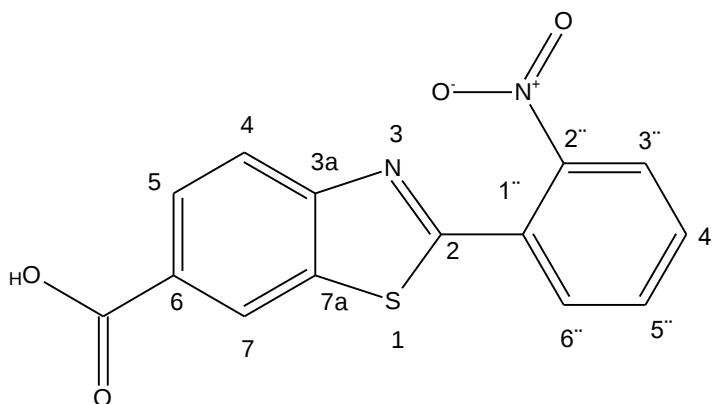
5.3.3.7.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3,5-DIMETOXIFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25g.



Sólido gris. **Rendimiento:** 42 %. **P.f.:** > 300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1688, 1604, 1456, 1327.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3.96 (s, 6H, 2 x OCH_3); 6.76-6.91(s, 2H, $\text{H}_{2'',6''}$); 7.24 (s, 1H, H_4); 7.83-8.13 (m, 1H, H_5), 8.18 (d, 1H, H_4 , $J = 7.16$ Hz), 8.78 (s, 1H, H_7) 12.45 (sa, 1H, OH).

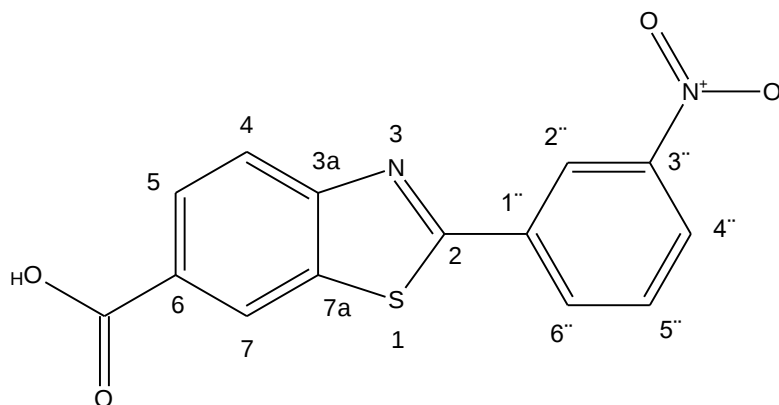
5.3.3.8.-SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(2-NITROFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25h.



Sólido negro. **Rendimiento:** 45%. **P.f.:** 250°C. IR (KBr, cm^{-1}): 1673, 1600, 1517, 1350.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 7.83-7.93 (m, 2H, Ar); 8.11 (m, 3H, Ar); 8.02 (dd, 1H, H_5 , $J_1 = 1.73$ Hz, $J_2 = 7.01$ Hz); 8.86 (s, 1H, H_7); 13.13 (sa, 1H, OH).

5.3.3.9.-SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3-NITROFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25i.

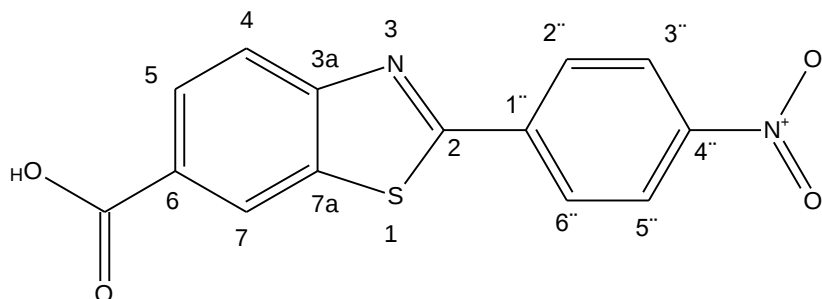


Sólido marrón .**Rendimiento:** 43 %. **P.f.:** 290°C. IR (KBr, cm^{-1}): 1678, 1599, 1519, 1346.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 7.89 (t, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J=8.24$ Hz); 8.09 (dd, 1H, $\text{H}_{6''}$ $J_1=4.35$ Hz , $J_2=8.67$ Hz); 8.18 (d, 1H, $\text{H}_{4''}$, $J=8.67$ Hz) ; 8.42 (dd, 1H, $\text{H}_{5'}$, $J_1=1.92$ Hz, $J_2=7.83$ Hz); 8.50 (d, 1H, H_4 , $J=7.83$ Hz); 8.81 (m, 2H, H_7 , $2''$,); 13.23 (sa, 1H, OH).

RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 121.9; 123.7; 123.84; 125.3; 126.6; 128.35; 128.4; 131.9; 134.2; 134.4; 135.5; 148.9; 156.5; 168.9.

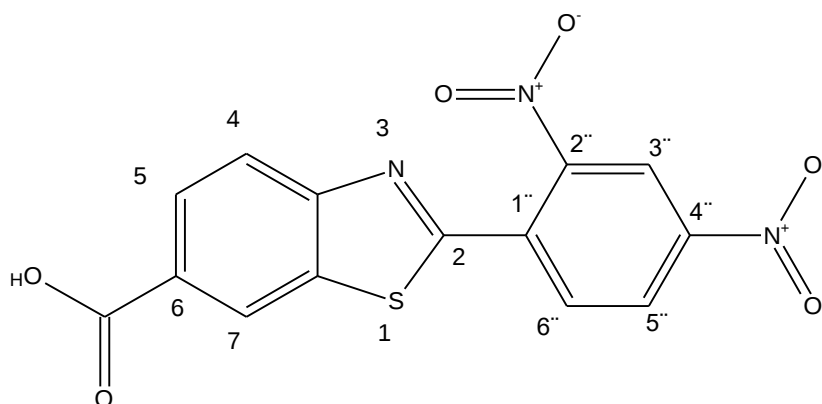
5.3.3.10.-SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(4-NITROFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25j.



Sólido amarillo. **Rendimiento:** 55 %. **P.f.:** >300 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 1689, 1598, 1520, 1342.

RMN ^1H , DMSO d_6 , δ ppm: 8.13 (dd, 1H, H_5 $J_1=1.70$ Hz, $J_2=8.36$ Hz); 8.21 (d, 1H, H_4 $J=8.36$ Hz); 8.38-8.44 (m, 4H, $\text{H}_{2'',3'',5'',6''}$); 8.86 (d, 1H, H_7 , $J=1.70$ Hz); 13.10 (sa, 1H, OH).

5.3.3.11.- SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(2,4-DINITROFENIL)-BENZOTIAZOL-6-CARBOXILICO 25k.



Solido crema. **Rendimiento:** 56 %. **P.f.:** >300°C. IR (KBr, cm^{-1}): 1678, 1553, 1350.

RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 8.13 (dd, 1H, $\text{H}_{5''}$ $J_1=0.9$ Hz , $J_2= 8.44$ Hz); 8.17 (d, 1H, $\text{H}_{6''}$, $J=8.44$ Hz) ; 8.32 (d, 1H, H_4 , $J=8.44$ Hz); 8.65 (dd, 1H, H_5 , $J_1= 1.84$ Hz, $J_2= 8.44$ Hz); 8.91-8.92 (m, 1H, $\text{H}_{3''}$, 7); 13.09 (sa, 1H, OH).

RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 120.7; 124.0; 125.4; 127.9; 128.4; 129.4; 131.5; 134.1; 136.3; 148.8; 149.3; 156.1; 164.6; 167.2.

5.4.- METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los ensayos biológicos fueron llevados a cabo mediante estimaciones con MTT en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), en la Ciudad de Caracas, Venezuela.

Se llevó a cabo la evaluación preliminar del efecto citotóxico de compuestos derivados de 2-arilbenzotiazol, sobre la viabilidad de epimastigotes de *trypanosoma cruzi* y para este fin, estos se dispusieron en placas de 96 pozos, 5×10^5 epimastigotes por pozo y se incubaron a 29 °C por 24 horas. Posteriormente, se agregaron los compuestos a evaluar, disueltos en DMSO (0,1% final), a una concentración única de 50 μ M más un control sin droga (control negativo). Para seleccionar aquellos compuestos activos sobre los parásitos, se incubaron durante 72 horas luego de agregados los compuestos a evaluar y posteriormente se agregó el MTT (3 mg/mL), disuelto en agua destilada, incubándose por 4 horas en oscuridad. Finalmente se procedió a lisar las células con isopropanol ácido y la placa se leyó en un espectrofotómetro a 570 nm.

6.-RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1.-SECCIÓN QUÍMICA.

La estrategia diseñada para la síntesis total de los derivados planteados **25a-25k**, se fundamentó en un procedimiento que abarcó 3 pasos lineales, con el fin de obtener como resultado 11 compuestos finales; en el diseño de estos derivados se incorporó uno o varios grupos metoxi, sobre la base de que este grupo funcional proporciona altas propiedades electrónicas-lipofílicas, además de simular la estructura del ácido gálico que está presente en un gran número de compuestos orgánicos de uso clínico, que presentan diversas actividades biológicas, queriéndose evaluar en este caso su potencial como antichagásico, todo esto de acuerdo con los reportes encontrados en la literatura ^[54,55]. Por otro lado, se incorporaron grupos nitro, en este caso fueron uno o dos unidades, conociéndose de este grupo que posee una singular combinación de propiedades, ya que presenta una fuerte atracción de electrones, es pequeño, polar y puede formar puentes de hidrógeno. Adicionalmente, puede ser bioactivado por reducciones enzimáticas dando especies reactivas, siendo en muchos casos estas especies las causantes de los efectos biológicos de dicho grupo ^[56]. De igual forma, se reporta que compuestos que presenten grupos nitro son muy eficaces contra parásitos; esta eficacia está influenciada por el tiempo que tarda el grupo nitro en llevar a cabo la reducción a su forma amina, ya que si el proceso se llevara a cabo de forma lenta, la acción tóxica contra el parásito no sería representativa ^[57].

Por otra parte, en cuanto al estudio retrosintético realizado sobre las moléculas deseadas (**figura 15**) reveló la necesidad del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico, el cual al momento del inicio de este proyecto, no era disponible comercialmente. En este sentido, se planteó la síntesis de este intermediario a partir del 4-aminobenzonitrilo.

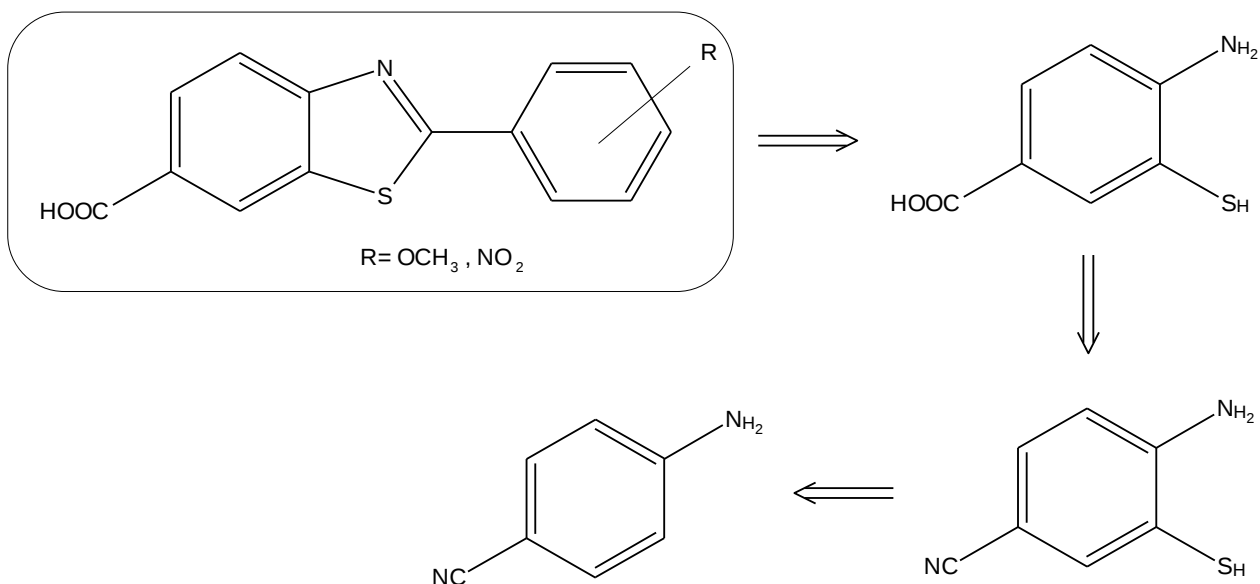


Figura 15.- Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de benzotiazol.

En la literatura, ya existen reportes de la síntesis de este compuesto. En 1955 Havlik y col ^[58]. Describe la síntesis del bis-(2-nitro-4-carboxifenil)-disulfuro:

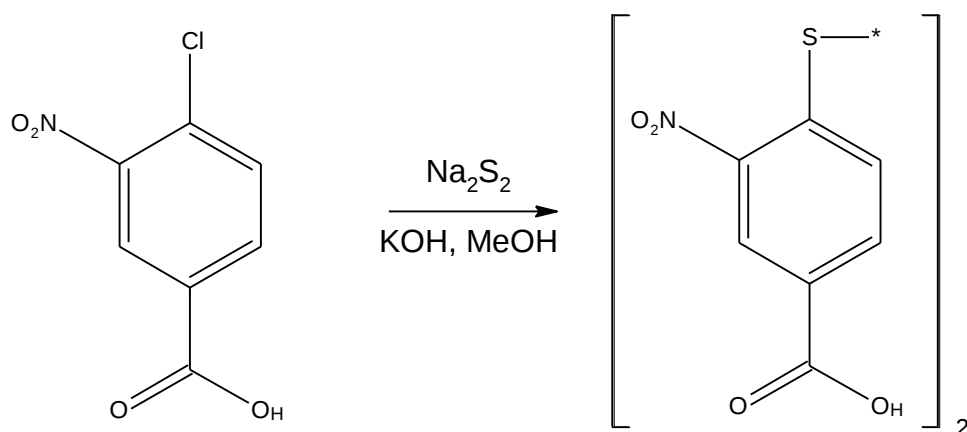


Figura 16.- Síntesis del bis-(2-nitro-4-carboxifenil)-disulfuro. Havlik y col ^[58].

El bis-(2-nitro-4-carboxifenil)-disulfuro, sometido a condiciones de reducción puede ser precursor del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico, sin embargo, el proceso para la obtención del disulfuro reportado por Havlik origina rendimientos en el orden del 47% involucrando dos etapas. En 1997 Matsuoka y col ^[59], reportan la síntesis del clorhidrato del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico, mediante un procedimiento que implica la formación de un derivado de 2-amino-benzotiazol, el cual al ser hidrolizado en medio básico, origina el amino-tiol, correspondiente en dos pasos de síntesis, con un rendimiento total de un 22%:

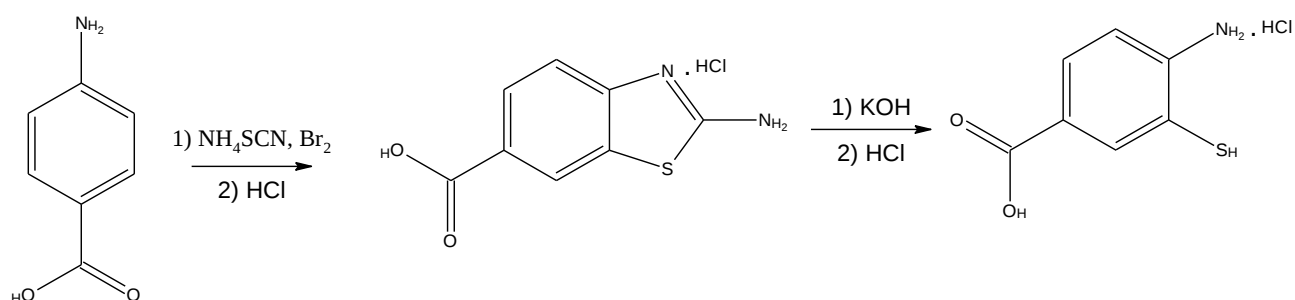


Figura 17.- Síntesis del clorhidrato del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico. Matsuoka y col ^[59].

En este sentido, el grupo de investigación de la Unidad de Síntesis de medicamentos de la Facultad de Farmacia, UCV, al cual pertenezco, hizo referencia a la síntesis de 2-amino-benzotiazoles sustituidos en posición seis ^[60], mediante un procedimiento análogo al empleado por Matsuoka. En base a esta experiencia se empleó este método para la preparación del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico, utilizando como material de partida el 4-amino-benzonitrilo. **(Figura 18)**

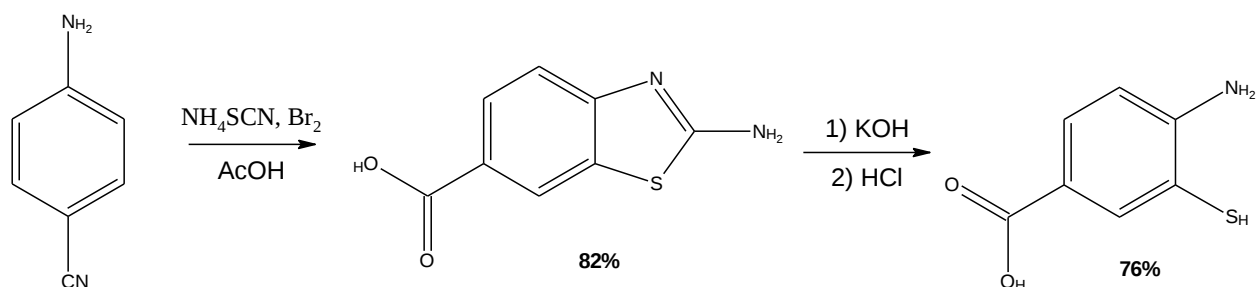


Figura 18.- Síntesis del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico.

Después de dos etapas se obtuvo, el amino-tiol deseado, con un rendimiento total de 62%, tres veces superior al reportado en la literatura por parte de Matzuoka y col ^[59].

Es importante destacar, que en el segundo paso de la ruta de síntesis se llevan a cabo simultáneamente, tanto la hidrólisis del 2-amino-benzotiazol, como la del nitrilo presente en la estructura. La hidrólisis del nitrilo fue corroborada por IR, al desaparecer la señal presente en el material de partida a 2208 cm^{-1} .

Observando el mecanismo propuesto para la formación del amino-benzotiazol (**Figura 19**) podemos sugerir una explicación para el incremento del rendimiento de nuestra síntesis en comparación con la reportada con Matsuoka y col ^[59].

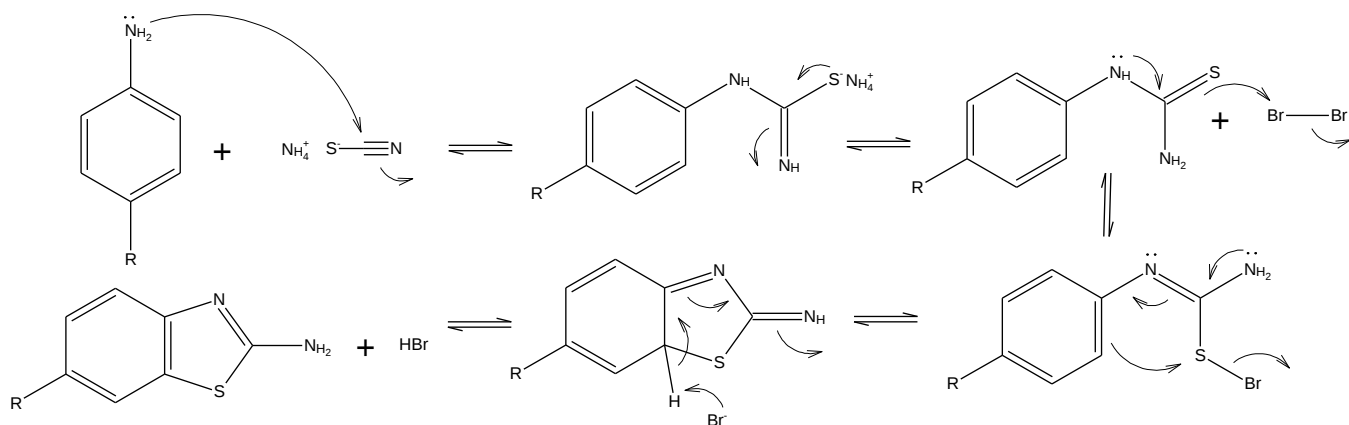


Figura 19.- Mecanismo propuesto para la formación del núcleo de 2-amino-benzotiazol. Camacho, J ^[61].

El primer paso involucra el ataque del par de electrones libres por parte del nitrógeno de la anilina al carbono del isotiocianato de amonio; cuando R es un grupo $-\text{COOH}$, este par de electrones está comprometido por resonancia en mayor grado que cuando R es un grupo CN, debido en parte a la mayor electronegatividad que posee el átomo de oxígeno (3,44 Pauling), en comparación con el átomo de nitrógeno (3,04 Pauling).

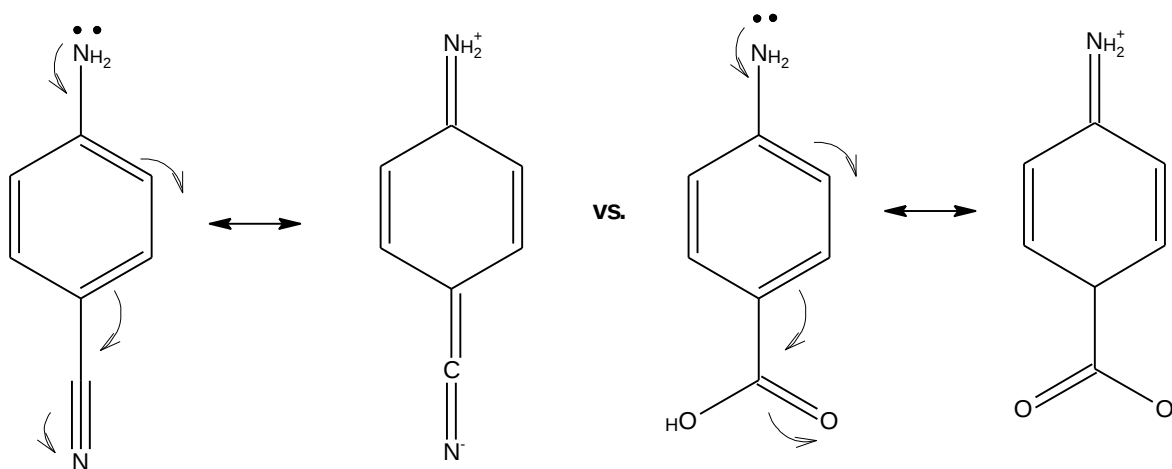


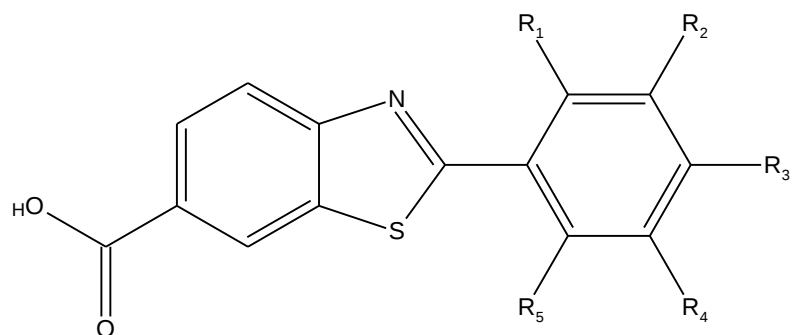
Figura 20.- Estructuras de resonancia presentes en el 4-aminobenzonitrilo y en el ácido-4-amino-benzoico.

Estas consideraciones concuerdan con los rendimientos en la preparación del ácido 4-aminomercaptobenzoico [59].

El diseño total de todos los compuestos sintetizados se realizó con la intención de aportar a la búsqueda de nuevos compuestos activos contra la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, además de que puedan actuar como profármacos, herramienta eficaz, altamente utilizada en Química Medicinal para aumentar la potencia de los fármacos y superar inconvenientes asociados a la formulación y administración de los mismos.

Es importante destacar que existen muy pocos derivados del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico reportados en la literatura. En base a lo anterior y en vista de la eficacia del método empleado en esta investigación para la síntesis de los compuestos de este tipo, se procedió a la síntesis de esta familia de compuestos **25a-25k**, en los cuales el grupo aril representa un anillo fenílico portador tanto de grupos donadores de densidad electrónica (-OCH₃) como de grupos atractores de densidad electrónica (-NO₂), obteniéndose los compuestos deseados con rendimientos que oscilaron entre 32-79 %. Con este resultado quedo demostrada la versatilidad de la metodología sintética llevada a cabo. Las moléculas obtenidas se reportan a continuación en la **tabla 1**.

Tabla 1.- Derivados del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
25a	OCH ₃	H	H	H	H
25b	H	H	OCH ₃	H	H
25c	H	OCH ₃	H	H	H
25d	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
25e	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃
25f	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
25g	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
25h	NO ₂	H	H	H	H
25i	H	H	NO ₂	H	H
25j	H	NO ₂	H	H	H
25k	NO ₂	H	NO ₂	H	H

Las estructuras de los derivados **25a-25k** fueron establecidas de mediante el análisis de los espectros IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C (para algunos derivados).

Para la discusión espectroscópica de la serie, se seleccionó como modelo el compuesto ácido-2-(3-metoxi)-benzotiazol-6-carboxílico (**25b**), así como también el ácido-2-(3-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico (**25i**), el resto de las estructuras presenta señales características en cada espectro, que depende del patrón de sustitución.

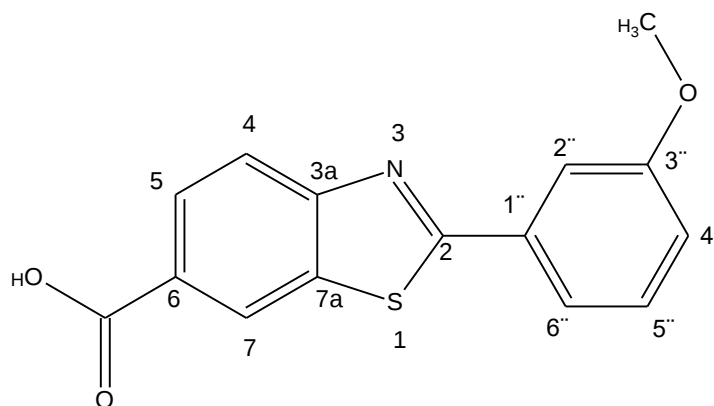
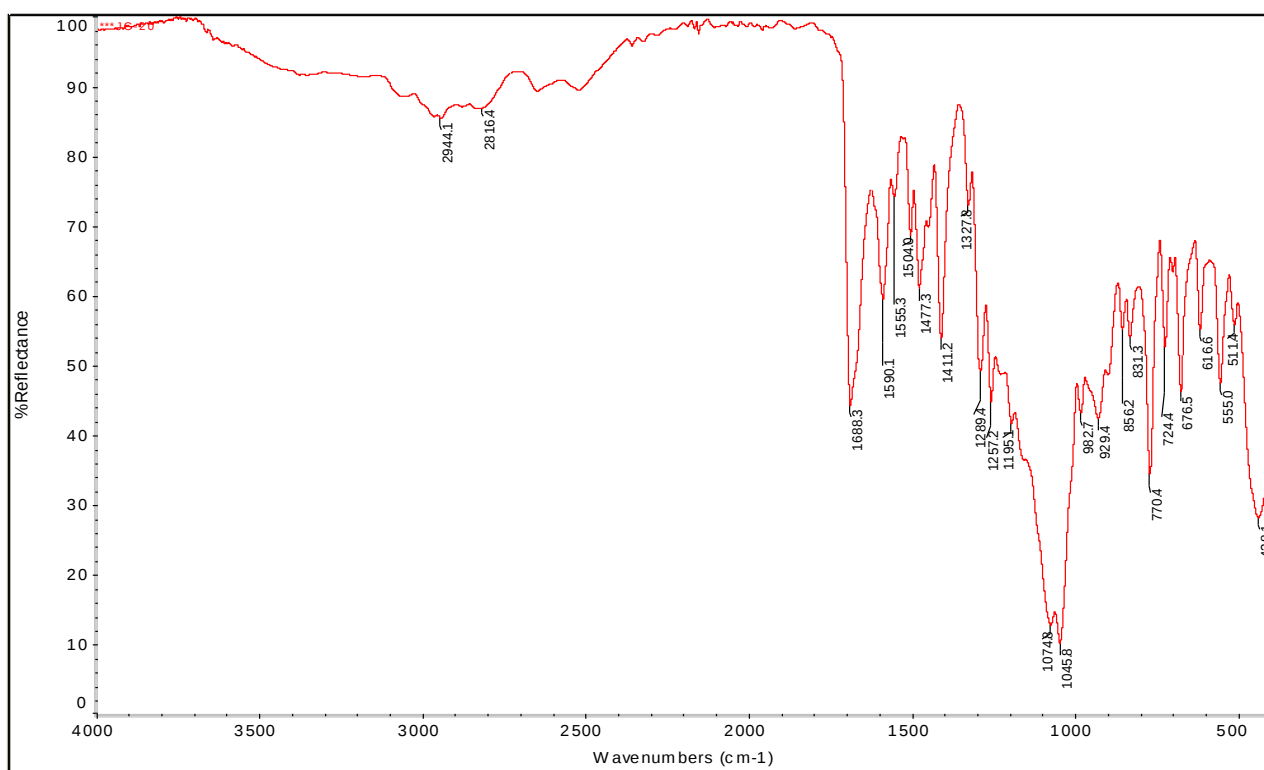


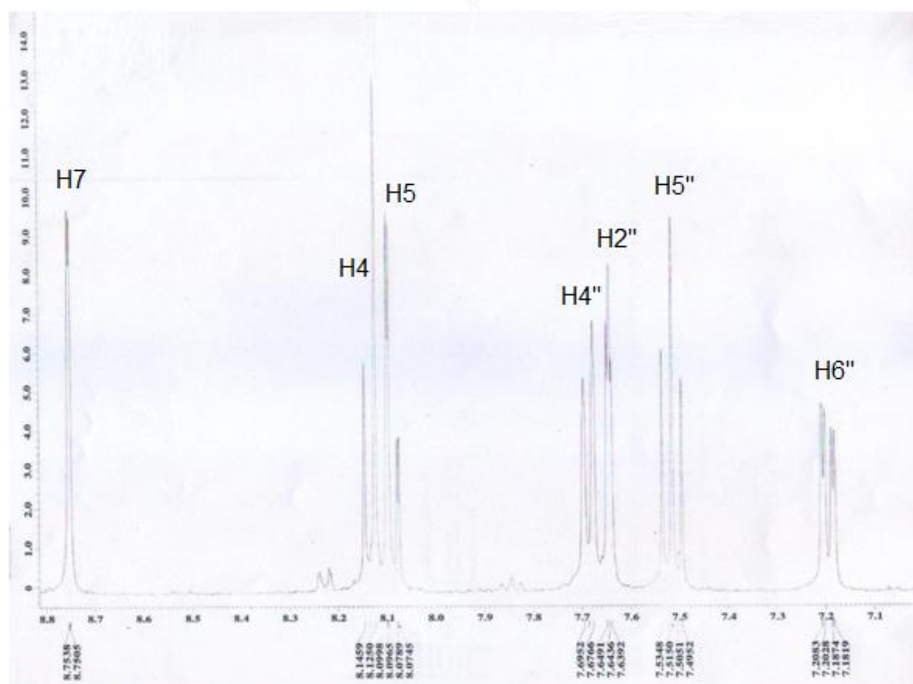
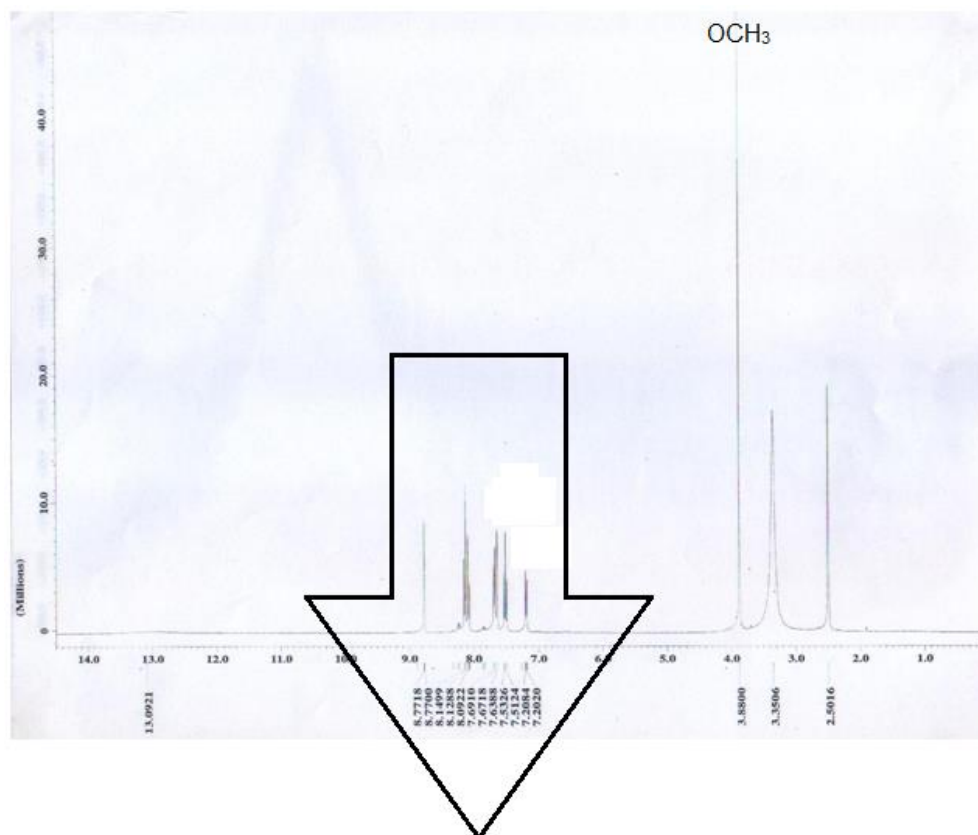
Figura 21.- Estructura general y numeración del compuesto **25b**.

En el análisis del espectro IR del compuesto **25b** (espectro1), se observan las bandas entre 1590 y 1504 cm^{-1} , características de la tensión -C=C- de los compuestos aromáticos derivados de benceno. En 1688 cm^{-1} se observa la banda característica del estiramiento C=O del grupo carboxilo y en el intervalo 2944-2816 cm^{-1} , se pueden identificar otras bandas que carecen de importancia práctica.



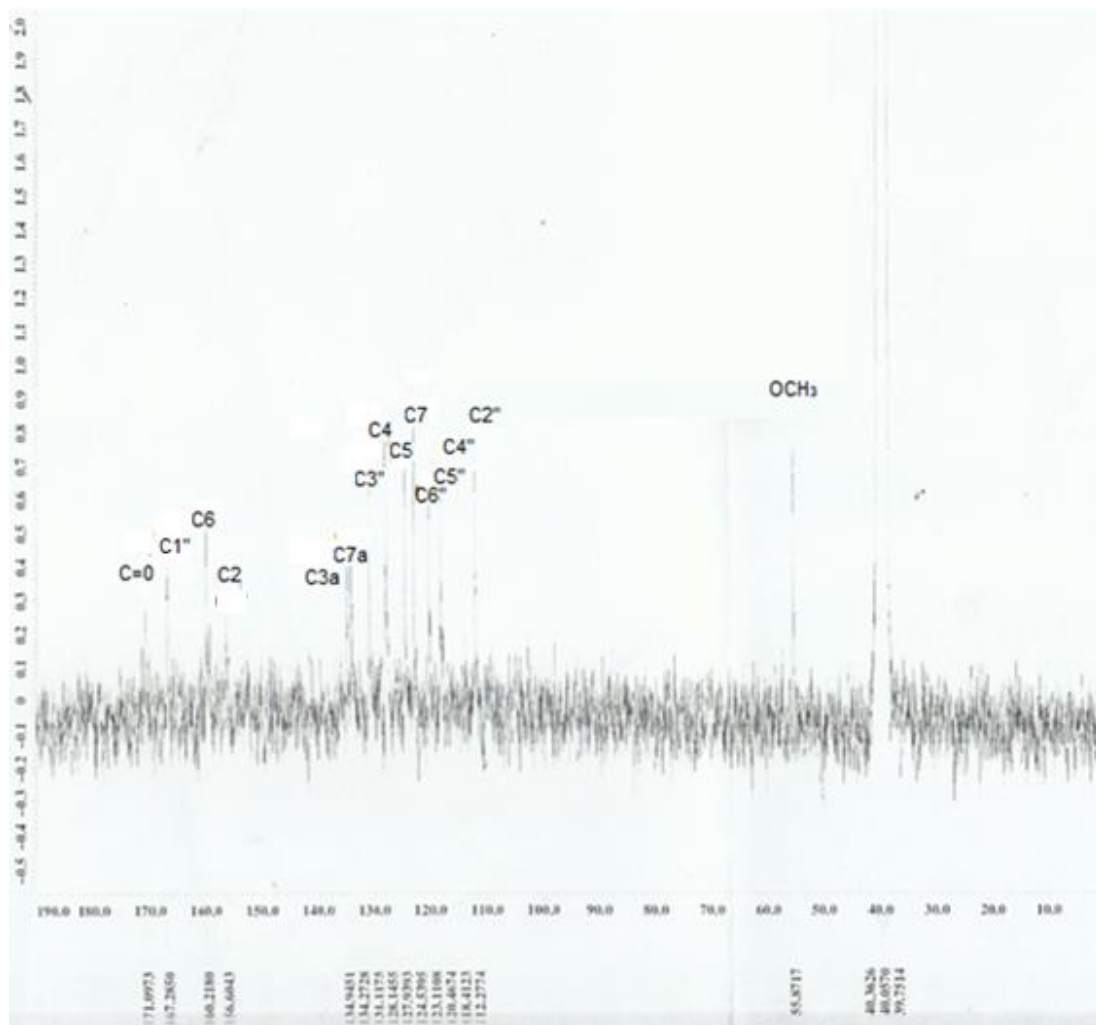
Espectro 1.- Espectro de IR del compuesto **25b**.

En el espectro RMN ^1H , (DMSO_{d6} , 270 MHz) (Espectro 2), se identifican las siguientes señales. Comenzando a campo alto; se aprecia un singlete en 3.88 ppm que integra para 3 protones correspondientes al grupo metoxi (OCH_3). Seguidamente se observa un doblete de doblete en 7.19 ppm que integra para un protón (H_6''), con una constante de acoplamiento meta y orto $J_{6''-4''} = 1.49 \text{ Hz}$ y $J_{6''-5''} = 7.13 \text{ Hz}$ respectivamente. Avanzando se encuentra en 7.51 ppm un triplete que integra para un protón (H_5''), con una constante de acoplamiento orto $J_{\text{H}_5''-\text{H}_6''} = 8.01 \text{ Hz}$. Luego a 7.64 Hz se aprecia un doblete que integra para un protón (H_2''), con una constante de acoplamiento meta $J_{\text{H}_2''-\text{H}_4''} = 1.49 \text{ Hz}$. Seguidamente en 7.68 ppm se observa un doblete que integra para un protón (H_4''), con una constante de acoplamiento orto $J_{\text{H}_4''-\text{H}_5''} = 5.02 \text{ Hz}$ y más adelante se aprecia en 8.08 ppm un doblete de doblete que integra para un protón (H_5), con una constante de acoplamiento orto y meta $J_{\text{H}_5-\text{H}_4} = 6.83 \text{ Hz}$ y $J_{\text{H}_5-\text{H}_7} = 1.19 \text{ Hz}$ respectivamente. Por otro lado se aprecia en 8.13 ppm un doblete que integra para un protón (H_4), con una constante de acoplamiento orto $J_{4-5} = 5.64 \text{ Hz}$. Luego en 8.75 ppm se aprecia un doblete que integra para un protón (H_7), con una constante de acoplamiento meta $J_{7-5} = 1.19 \text{ Hz}$. Finalmente a 13.09 ppm se aprecia como un singlete ancho asignado al protón del grupo hidroxilo del grupo carboxilo.



Espectro 2.- Espectro RMN ^1H de **25b** y su ampliación.

En lo referente al espectro RMN ^{13}C , (DMSO-d_6 , 67.9 MHz)(Espectro 3), se observan las señales características de los 15 carbonos de la estructura **25b**, correspondientes a 1 carbono metílico del grupo metoxi, 7 carbonos metínicos de la zona aromática, 6 que son carbonos cuaternarios y 1 señal correspondiente al carbono carbonílico. Comenzando a campo alto se aprecia a 55.9 ppm la señal correspondiente al carbono del grupo metoxi, luego se aprecia dentro de la zona aromática una serie de señales, comenzando a 112.3 ppm con la señal correspondiente al carbono ($\text{C}2''$), luego a 118.6 ppm la señal del carbono ($\text{C}4''$), se tiene la señal a 120.5 ppm para el carbono ($\text{C}5''$), se presenta a 123.1 ppm la señal correspondiente al carbono ($\text{C}6''$), también se encontró la señal a 124.5 ppm para el carbono ($\text{C}7$), luego la señal en 127.9 ppm fué asignada al carbono ($\text{C}5$). Las señales comprendidas entre 128.2-134.9 ppm fueron asignadas a los carbonos ($\text{C}3''$, $\text{C}4$, $\text{C}7\text{a}$ y $\text{C}3\text{a}$), respectivamente. A campo bajo, se apreciaron las señales siguientes, comenzando por 156.6 160.2 167.3 que fueron asignadas a los carbonos ($\text{C}2$, $\text{C}6$ y $\text{C}1''$), respectivamente. Finalmente se aprecia a 171.1 ppm el carbono carboxílico ($\text{C}=\text{O}$).



Espectro 3.- Espectro RMN ^{13}C de **25b**.

Para continuar la discusión espectroscópica de la serie, se describió el otro compuesto seleccionado, ácido-2-(3-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico (**25i**).

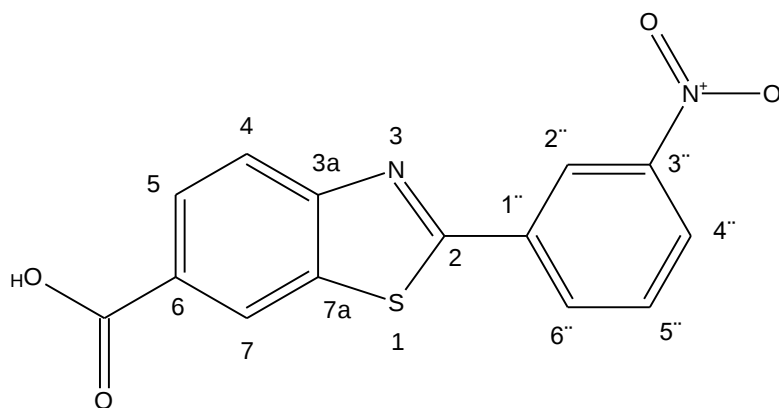
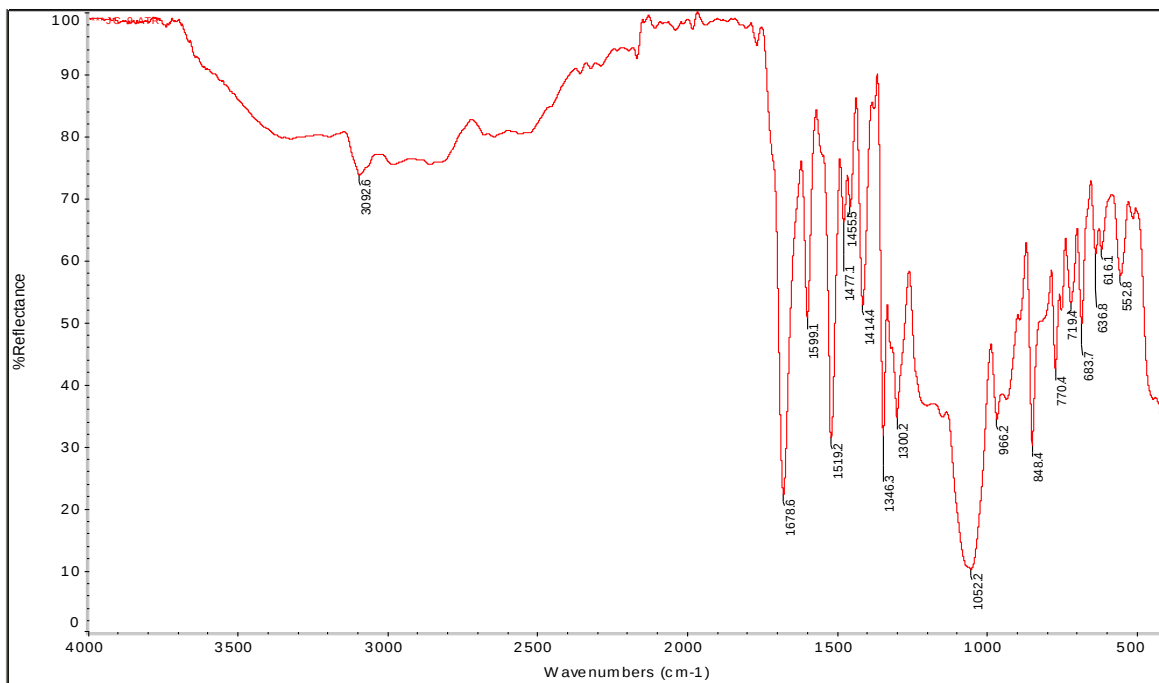


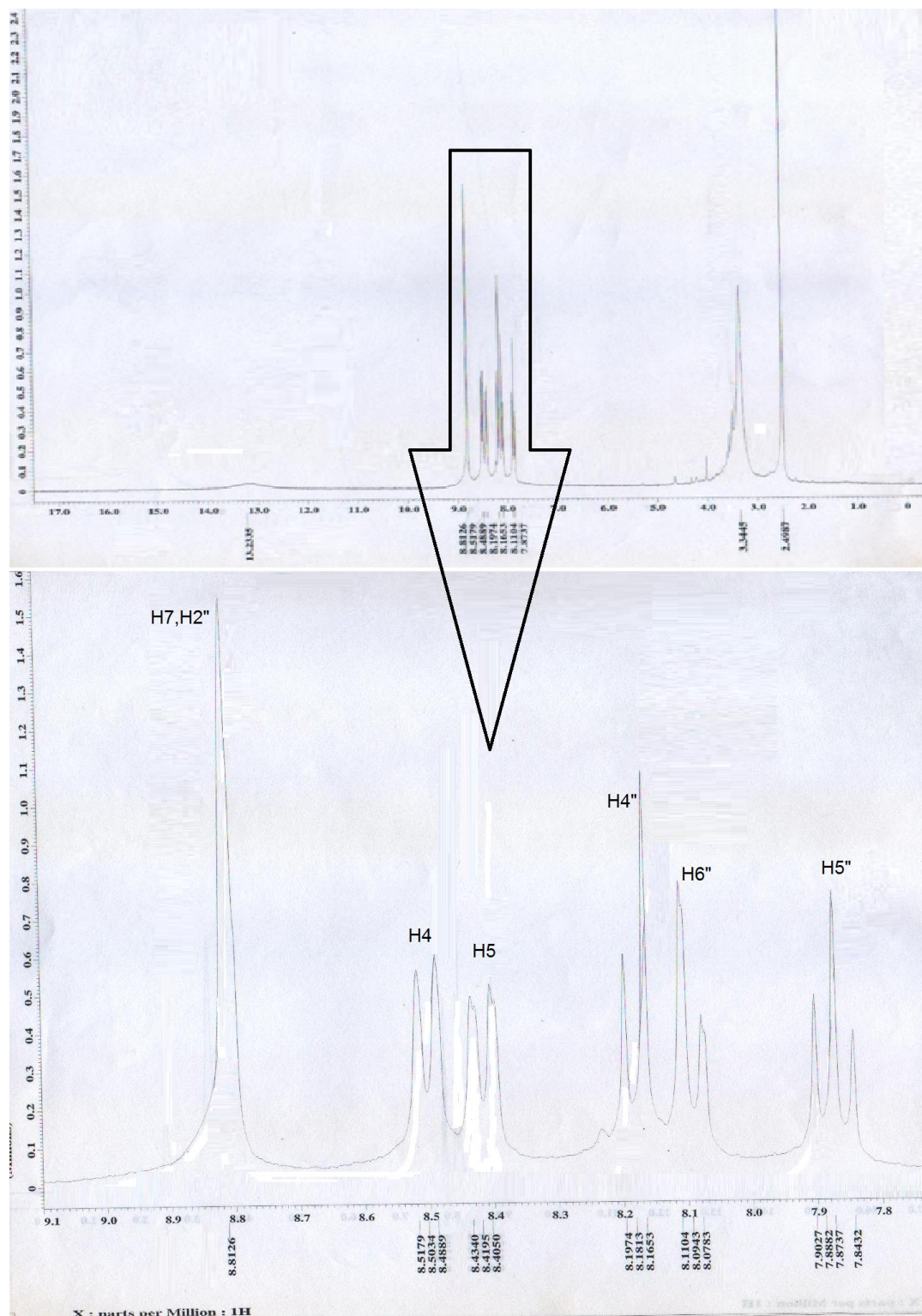
Figura 22.- Estructura general y numeración del compuesto **25i**.

En el análisis del espectro IR del compuesto **25i** (espectro 4), se observan las bandas entre 1599 cm^{-1} y 1519 cm^{-1} , características de la tensión -C=C- de los compuestos aromáticos derivados de benceno. En 1678 cm^{-1} se observa la banda característica del estiramiento C=O del grupo carboxilo y otras bandas que carecen de importancia práctica.



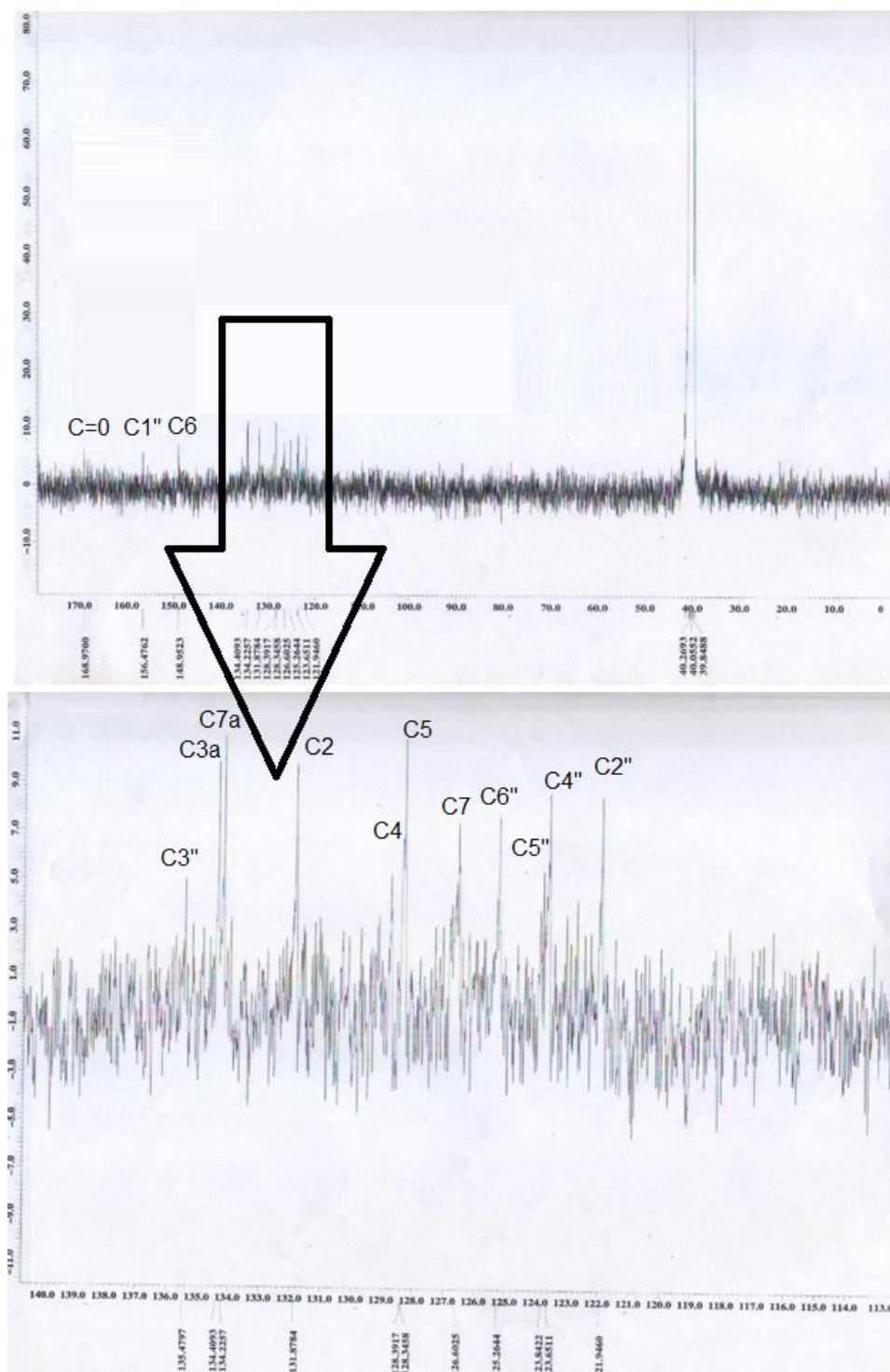
Espectro 4.- Espectro de IR del compuesto **25i**.

En el espectro RMN ^1H , (DMSO-d_6 , 270 MHz) (Espectro 5), se identifican las siguientes señales. Comenzando a campo bajo; se aprecia un triplete en 7.89 ppm que integra para un protón (H_5''), con una constante de acoplamiento orto $J_{\text{H}_5''-\text{H}_6''}= 8.24$ Hz. Seguidamente se observa un doblete de doblete en 8.09 ppm que integra para un protón (H_6''), con una constante de acoplamiento meta y orto $J_{6''-4''}= 4.35$ Hz y $J_{6''-5''}= 8.67$ Hz respectivamente. Después se aprecia en 8.18 ppm un doblete que integra para un protón (H_4''), con una constante de acoplamiento orto $J_{\text{H}_4''-\text{H}_5''}= 8.67$ Hz. Avanzando se encuentra en 8.42 ppm un doblete de doblete que integra para un protón (H_5), con una constante de acoplamiento meta y orto $J_{\text{H}_5-\text{H}_7}= 3.92$ Hz y $J_{\text{H}_5-\text{H}_4}= 7.83$ Hz, respectivamente. Luego a 8.50 ppm se aprecia un doblete que integra para un protón (H_4), con una constante de acoplamiento meta $J_{\text{H}_4-\text{H}_5}= 7.83$ Hz. En 8.81 ppm se aprecia un multiplete, que integra para dos protones (H_7 , H_2'') y finalmente en 13.23 ppm se aprecia como un singlete ancho, el protón correspondiente al grupo hidroxilo del grupo carboxilo.



Espectro 5.- Espectro RMN ^1H de **25i** y su ampliación.

En lo referente al espectro RMN ^{13}C , ($\text{DMSO-}d_6$, 67.9 MHz)(Espectro 6), se observan las señales características de los 14 carbonos de la estructura **25i**, correspondientes a 7 carbonos metínicos de la zona aromática, 6 que son carbonos cuaternarios y 1 señal correspondiente al carbono carbonílico. Comenzando dentro de la zona aromática, se aprecian una serie de señales, donde se tiene a 121.9 ppm la señal correspondiente al carbono ($\text{C}2''$), luego a 123.7 ppm la señal del carbono ($\text{C}4''$) y más adelante a 123.8 ppm ($\text{C}5''$). También se tiene una señal a 125.3 ppm para el carbono ($\text{C}6''$), seguidamente a 126.6 ppm una señal asignada al carbono ($\text{C}7$), luego la señal encontrada a 128.4 ppm para el carbono ($\text{C}5$). Las señales comprendidas entre 128.4-134.4 ppm fueron asignadas a los carbonos ($\text{C}4$, $\text{C}2$, $\text{C}7a$ y $\text{C}3a$), respectivamente. A campo bajo, se apreciaron las señales siguientes, comenzando por 135,5 ppm, 148.9 ppm, 156.5 ppm que fueron asignadas a los carbonos ($\text{C}3''$, $\text{C}6$ y $\text{C}1''$), respectivamente. Finalmente se aprecia a 167.29 ppm el carbono carboxílico (C=O).



Espectro 6.- Espectro RMN ^{13}C de **25i** y su ampliación.

6.2.- SECCIÓN BIOLÓGICA.

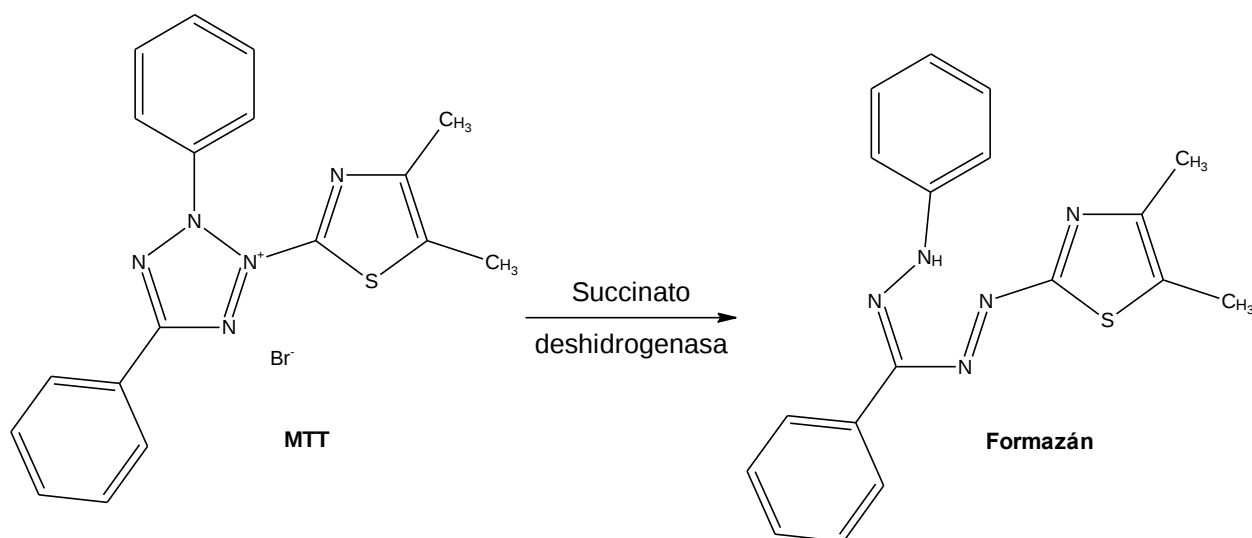
6.2.1.- ACTIVIDAD ANTICHAGÁSICA.

ESTIMACIONES CON MTT.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán) (**esquema 2**), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

Este método es comúnmente utilizado en la búsqueda de fármacos con actividad antichagásica y otras patologías, es rápido, eficiente y permite el estudio del efecto citotóxico de esta familia de compuestos. Se realizó el estudio sobre la viabilidad de epimastigotes de tripanosoma cruzi. Los resultados expresan el efecto que ejercen los diferentes compuestos en el estudio sobre el crecimiento o proliferación celular y se expresa en términos de CI_{50} .

En este sentido, a continuación se muestra en la **tabla 2**, los resultados obtenidos como antichagásicos, los derivados **25a–25k**.



Esquema 2.- Paso de MTT a formazán con el uso de Succinato deshidrogenasa ^[62].

Tabla 2.- Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los compuestos **25a-25k** como antichagásicos sobre epimastigotes de *tripanosoma cruzi*.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)
Control negativo	100
Benznidazol (BZ)	48.12
25^a	51.92
25b	45.46
25c	>60
25d	>60
25e	>100
25f	>60
25g	>60
25h	>60
25i	>60
25 j	>60
25K	>60

Fueron evaluados 11 compuestos **25a-25k**, reportándose los resultados para el ensayo de citotoxicidad, presentándose como se puede apreciar, mayor sensibilidad por parte de los epimastigotes de *tripanosoma cruzi* frente a los compuestos **25b** y **25a**, con una CI₅₀=45.46 μM y CI₅₀=51.92 μM respectivamente, destacándose el compuesto **25b** con una actividad por encima del compuesto BZ. El resto de los compuestos presentó actividad poco representativa con un CI₅₀ > 60 μM, en todos los casos.

7.-CONCLUSIONES

- Se sintetizaron 11 derivados del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **25a-25k**, con rendimientos que oscilaron entre 32-79 %, mediante una sustitución nucleófila aromática como paso final.
- Se estableció una ruta sintética en donde se utilizó el nitrobenzeno como agente oxidante.
- La eficiencia del método permitió la purificación de los compuestos empleando cristalización y lavados con solventes.
- La caracterización de todos los compuestos del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **25a-25k**, se llevó a cabo mediante métodos espectroscópicos como IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C (para algunos derivados).
- Los compuestos **25b** y **25a**, presentaron buena actividad antichagásica *in vitro* con $\text{CI}_{50}=45.46\ \mu\text{M}$ y $\text{CI}_{50}=51.92\ \mu\text{M}$ respectivamente.

8.-RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas biológicas sobre formas promastigotes de la enfermedad de Chagas, así como frente a otras patologías, para los compuestos del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **25a- 25k**, como por ejemplo su actividad anticáncer.
- Plantear para los compuestos del tipo ácido-2-aril-1,3-benzotiazol-6-carboxílico **25a- 25k**, la adición de otros tipos de sustituyentes en posición arílica como heterociclos con el propósito de evaluar, cómo este tipo de sustituyentes modulan el potencial antichagásico en dichos compuestos.

9.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Miles, M.; Feliciangeli, M y Rojas de Arias, A. American tripanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Brit Med J*. 326, (2003), 1444-1448.
- [2] Moncayo, A. Chagas disease. *Trop Dis Res*. (1993), 67-75.
- [3] Tejera-París, E. La tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Gac Méd Caracas*. 26, (1919), 104-108.
- [4] Añez, N.; Crisante, G y Rojas,A.;. Update on Chagas Disease in Venezuela. A Review *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99, (2004), 781-787.
- [5] Añez, N.; Crisante, G.; Rojas,A.; Díaz, N.; Añez-Rojas, N.; Carrasco,H.;... Bonfante, R. La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*. 43, (2003), 45-57.
- [6] Organización Mundial de la Salud, O. M. S(s.f.). [Revisado el 1 de Febrero del 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- [7] Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) [Consultado el 13 de febrero del 2017] Disponible en: <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>
- [8] Torres, E. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-*N* óxido de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Navarra. Pamplona, España, (2013).

- [9] Instituto Oswaldo Cruz. [Revisado el 1 de Febrero del 2017]. Disponible en: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>.
- [10] Fiocruz. [Revisado el 8 de febrero del 2017]. Disponible en: <http://www.fiocruz.br/chagas>.
- [11] Teixeira, A. R.; Hecht, M. M.; Guimaro, M. C.; Sousa, A. O.; Nitz, N.: "Pathogenesis of chagas disease": parasite persistence and autoimmunity". *Clin Microbiol Rev.* 24, (2011), 592-630.
- [12] Teixeira, A.; Nascimento, R y Sturm, NR.(2006). Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 5, (2006), 463-491.
- [13] Organización Mundial de la Salud, O. M. S(s.f.). [consultado el 13 de febrero del 2017]. Disponible en: www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm
- [14] Urbina, J. Chemotherapy of Chagas Disease. *Curr Pharm Des.* 8, (2002), 287-295.
- [15] WordPress. [Revisado el 8 de febrero del 2017]. Disponible en: <https://areyesmed406.wordpress.com/>
- [16] Coura, J y Borges-Pereira, J.: Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, (2010), 5-13.
- [17] Animated Dissection of Anatomy for Medicine, A.D.A.M. [Revisado el 8 de febrero del 2017]. Disponible en: <http://eclinicalworks.adam.com>

- [18] Castro, J.; Montalto de Mecca, M. y Bartel, LA. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 25, (2006) ,471-479
- [19] Brunton LL.; Lazo, J y Parker K. Goodman and Gilman Las bases farmacológicas de la Terapéutica (Onceava edición). 2006. México:Mc. Graw-Hill.
- [20] Urbina, J y Docampo, R.: "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances". *Trends Parasitol*. 19, (2003), 495-501.
- [21] Urbina, J. A.: "Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches". *Acta Trop*. 115, (2010), 55-68.
- [22] Rodrigues, C y de Castro, S. A critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97, (2002), 3-24
- [23] Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 1, (2001), 92-100.
- [24] Laboratorios Silanes SA; Red Iberoamericana de Investigación, Desarrollo e Innovación de Medicamentos Anti-Chagas. Coordinadores: Cerecetto. H; González, M.: "Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana". México, Febrero, 2012.
- [25] Urbina, J. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des*, 8, (2002), 287-295.
- [26] Urbina, J. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr Opin Infect Dis*. 14, (2001), 733-741.

- [27] Urbina, J. Chemotherapy of Chagas disease: the how and the why. *J Mol Med.* 77, (1999), 332-338.
- [28] Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) [Consultado el 12 de febrero del 2017]
Disponible en: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>
- [29] Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P y Moreno, S. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Rev. Microbiol.* 3, (2005), 251-261.
- [30] Garzoni, L.; Caldera, A.; Meirelles, N.; de Castro, S.; Docampo, R.; Meints, G...Urbina, J. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 23, (2004), 273-285.
- [31] Bouzahzah, B.; Jelicks, L ; Morris, S ; Weiss, L y Tanowitz, H. B.: Risedronate in the treatment of Murine Chagas' disease. *Parasitol Res.* 96, (2005), 184-187.
- [32] Cazzulo, J. Cruzipain, major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: sequence and genomic organization of the codifying genes. *Medicina (B Aires)*, 1999, 59 Suppl 2, 7-10.
- [33] Doyle, P.; Zhou, Y.; Engel, J y McKerrow, J. H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, (2007), 3932-3939.
- [34] Barr, S.; Warner, K.; Kornreic, B.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L y McKerrow, J. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, (2005), 5160-5161.

- [35] Romeiro, N.; Aguirre, G.; Hernandez, P.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Aldana, I.;... Lima, L.: "Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates". *Bioorg Med Chem.* 17, (2009), 641-652.
- [36] Paulino, M.; Iribarne, F.; Dubin, M.; Aguilera-Morales, S.; Tapia, O y Stoppani, A. The chemotherapy of chagas disease: an overview. *Mini Rev Med Chem.* 5, (2005), 499-519.
- [37] Fairlamb, A y Cerami, A.: Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 46 (1992), 695-729.
- [38] Schmidt, A. y Krauth-Siegel, R. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem.* 2, (2002), 1239-1259.
- [39] Neres, J.; Bryce, R. y Douglas, K. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease". *Drug Dis Tod.* 13, (2008), 110-117.
- [40] Neres, J.; Brewer, M.; Ratier, L.; Botti, H.; Buschiazzi, A.; Edwards, P.; Douglas, K.. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase from in silico screening. *Bioorg Med Chem Lett.* 19, (2009), 589-596.
- [41] Kim, J.; Ryu, H.; Shim, J.; Park, K y Withers, S. Development of new and selective *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors from sulfonamide chalcones and their derivatives. *ChemBioChem.* 10, (2009), 2475-2479.
- [42] Buchini, S.; Buschiazzi, A. y Withers, S. A new generation of specific *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors. *Angew Chem Int Ed.* 47, (2008), 2700-2703.

- [43] Papadopoulou, M.; Bloomer, W.; Rosenzweig, H.; Kaiser, M.; Chatelain, E.; Loset, J. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents. *Bioorg Med Chem.* 21, (2013), 6600–6607.
- [44] Bhausahab, D.; Vinayak, G y Balkrishna, M. Synthesis and Evaluation of Antifungal Activity of Benzothiazole Derivatives. *Ijppr Human.* 3, (2015), 112-124.
- [45] Caputo, R.; Calabro, M.; Micale, N.; Schimmer, A.; Ali, M.; Zappala, M y Grasso, S. Synthesis of benzothiazole derivatives and their biological evaluation as anticancer agents. *Med Chem Res.* 21, (2012), 2644–2651.
- [46] Catalano, A.; Carocci, A.; Defrenza, I.; Muraglia, M.; Carrieri, A.; Van Bambeke, F.; Franchini, C. 2-Aminobenzothiazole derivatives: Search for new antifungal agents. *Eur J Med Chem.* 64, (2013), 357-364.
- [47] Franchini, C.; Muraglia, M.; Corbo, F.; Florio, M.; Di Mola, A.; Rosato, A.;...Vitali, C. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Mercapto-1,3-benzothiazole Derivatives with Potential Antimicrobial Activity. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 342, (2009), 605 – 613.
- [48] Shi, X.; Wang, Z.; Xia, Y.; Ye, T.; Deng, M.; Xu, Y.; Y, Wei, Y y Yu, L. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Benzothiazole-2-thiol Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Molecules.* 17, (2012), 3933-3944
- [49] Verma, A.; Martin, A y Kumar, A. Synthesis, Characterization and evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic activity of Benzothiazole derivatives. *Indian J Pharm Biol Res.* 3, (2014), 84-89.
- [50] Wang, Z.; Shi, X.; Jia Wang, J.; Zhou, T.; Xu, Y.; Huang, T.; Wei, Y. Synthesis, structure–activity relationships and preliminary antitumor evaluation of benzothiazole-2-

thiol derivatives as novel apoptosis inducers. *Bioorg Med Chem Lett.* 21, (2011), 1097–1101.

[51] Charris, J.; Camacho, J.; Ferrer, R.; Lobo, G.; Barazarte, A.; Gamboa, N.; Rodrigues, J y Lopez, S. A convenient route to 2-substituted benzothiazole-6-carboxylic acids using nitrobenzene as oxidant. *J Chem Res.* (2006), 769-770.

[52] Organización Panamericana de la Salud. [Consultado el 07 de Febrero del 2017] Disponible en: www.paho.org.

[53] Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee (2000: Brasilia, Brasil). Technical report series no 905. Geneva: World Health Organization. [Consultado el 7 de diciembre del 2016] Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>.

[54] C. Lin.; S. Singh.; P.Chu, R.Dempcy y J.Schmidt. Interaction of tubulin with potent natural and synthetic analogues of antimicrobial agent combretastatin, a structure-activity study. *Mol Pharmacol.* 34 (1988) 200-208.

[55] Boiani, M y Gonzalez, M. Imidazole and Benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. *Mini-Rev Med Chem.* 5, (2005), 409.

[56] Menendez, J.C y Avedaño, C. Optimización de un prototipo. Correlaciones cualitativas estructuras químicas – actividad biológica. En introducción a la química farmacéutica. 2da edición. McGraw-Hill/ Interamericana de España. 2001. Pag: 930.

[57] Docampo, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interactions.* 70, (1990), 1-27.

- [58] Havlik, A. J.; Kharasch, N. Derivatives of sulfenic acids. XIX. Synthesis and characterization of 2-nitro-4-carboxybenzenesulfonyl chloride. *J Am Chem Soc.* 77, (1955), 1150-1152.
- [59] Matsuoka, H.; Ohi, N.; Mihara, M.; Suzuki, H.; Miyamoto, K.; Maruyama, N.;... Kuroki, T. Antirheumatic agents: novels methotrexate derivatives bearing a benzoxazibe or benzothiazine moiety. *J. Med. Chem.* 40, (1997), 105-111.
- [60] López, S. Síntesis de derivados de fenotiazin-4-ona con potencial actividad antimalárica "in vitro" sobre *P. falciparum* [Tesis Doctoral]. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 1996.
- [61] Camacho, J. Síntesis de 5-nitrofuranos y tiofenos relacionados, como agentes antimaláricos.[Tesis Doctoral]. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 2008.
- [62] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol methods.* 65, (1983) 55-63.