



Universidad
de Navarra

Facultad de Farmacia

Diseño, síntesis y evaluación
biológica de nuevos derivados
de 1,4-di-*N* óxido de
quinoxalina como potenciales
agentes antichagásicos

Enrique Torres Pastor



Universidad
de Navarra

Facultad de Farmacia

Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos
derivados de 1,4-di-*N* óxido de quinoxalina como
potenciales agentes antichagásicos

Memoria presentada por D. Enrique Torres Pastor para aspirar al
grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en la
Unidad I+D de Medicamentos (CIFA) y autorizo su presentación ante el
Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 24 de mayo de 2013.

Dr. Ignacio Aldana Moraza

Este trabajo ha sido desarrollado en la Unidad de I+D de Medicamentos del Centro de Investigación de Farmacobiología Aplicada (C.I.F.A.) de la Universidad de Navarra dentro del proyecto de Enfermedades Parasitarias, Chagas promovido por el Instituto de Salud Tropical Universidad de Navarra (ISTUN).

El desarrollo del trabajo presentado en esta memoria ha sido posible gracias a la financiación recibida a través de la “Ayuda para la Formación de Tecnólogos” concedida por el Gobierno de Navarra y la “Ayuda al personal Investigador en Formación” concedida por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

A mis padres,
A mi hermano,
A mi hermanica

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo.

A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra, por financiar mi periodo de investigación y apoyar el desarrollo de nuevos investigadores.

Al Dr. Antonio Monge, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y poder aprender de su amplia experiencia. Por sus consejos y su visión humana del mundo de la investigación de nuevos fármacos.

Al Dr. Ignacio Aldana, por su apoyo y ayuda en todo momento en que la he necesitado.

A la Dra. Silvia Pérez Silanes, por su cercanía, colaboración, apoyo, consejos y gran ayuda en la realización de este trabajo de investigación, muchas gracias.

Al grupo de trabajo del Dr. Hugo Cerecetto y la Dra. Mercedes González, por llevar a cabo la evaluación biológica *in vitro* de todos los nuevos compuestos sintetizados y a pesar de la distancia, estar siempre cerca para resolver cualquier duda en la discusión de los resultados. Sin su colaboración la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Al Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Ciencias de la Salud de Universidad Nacional de Asunción, por llevar a cabo la evaluación biológica *in vivo* de los nuevos derivados presentados.

Al Dr. Philip Crawford por llevar a cabo los estudios electroquímicos y por su ayuda en la interpretación de los resultados.

Al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra, por su colaboración en la evaluación de la toxicidad de los compuestos presentados y permitirme trabajar y aprender en su laboratorio. En especial a Celia Goñi y las Dras. Leire Arbillaga y Amaia Azqueta por guiarme y enseñarme a realizar los ensayos de mutagenicidad y hacerme recordar ese biólogo que llevo dentro.

A Elsa, compañera, amiga y un apoyo inestimable en la realización de este trabajo de investigación. Sin su desinteresada ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por todo lo que me has enseñado y por lo buena compañera que has sido.

A Carmen Elizalde, por contagiarme su espíritu de trabajo, su alegría y su dinamismo. Por los buenos ratos que hemos pasado y la ayuda ofrecida en todo momento, muchas gracias.

A todos los compañeros que han compartido muchas horas de laboratorio a mi lado y que han creado un ambiente de trabajo óptimo para llevar a cabo esta investigación, gracias. En especial a mis compañeros “quinoxalineros”, Beatriz Solano y Raquel Villar, mis mentoras, por

introducirme en el mundo de la química de las quinoxalinas. Asun, por sus consejos, su capacidad de trabajo y su sonrisa contagiosa. Laura, que pese a su corta estancia la química fue inmediata, por ser una gran amiga además de una gran compañera y ayudarme mucho a que siguiera adelante en los malos momentos, muchas gracias.

A mis amigos de la cuadrilla, por estar siempre ahí y ayudarme en los momentos de estrés vividos en estos años.

A Paula, por su apoyo y cariño durante todos estos años. Por apoyarme en todo momento y ayudarme a centrarme cuando el rumbo se volvía incierto. Por todo lo vivido y aprendido contigo, gracias.

A Mery, por su amor en estos últimos duros meses, por estar a mi lado, apoyarme y devolverme una felicidad que había perdido, gracias.

A mi familia, por comprender el camino elegido y apoyarme en todo momento.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A.....	Absorbancia
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
AMCHA.....	Iniciativa de la Región Amazónica
BFX.....	Benzofuroxano
BNZ.....	Benznidazol
BTH.....	Benzotiadiazol
CCF.....	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
%Cit.....	Porcentaje de Citotoxicidad
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
¹³ C-RMN.....	Resonancia magnética nuclear de carbobo
DO.....	Densidad óptica
DTM.....	Dosis Tóxica Mínima
EC.....	Enfermedad de Chagas
ETD.....	Enfermedades Tropicales Desatendidas
Fc.....	Ferroceno
FDA.....	Food and Drug Administration
HGPRT.....	Hipoxantina Guanina Fosforibosil Transferasa
FM.....	Fórmula molecular
FNT- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
FMN.....	Flavin mononucleótido
FPPS.....	Farnesil Pirofosfato Sintasa
HAI.....	Hemaglutinación Indirecta
Hz.....	Herzios
¹ H-RMN.....	Resonancia magnética nuclear de protón
IFI.....	Inmunofluorescencia Indirecta
INCOSUR.....	Iniciativa del Cono Sur
%INH.....	Porcentaje de inhibición
IFN- γ	Interferón gamma
IL-12.....	Interlequina 12
IPA.....	Iniciativa del Pacto Andino
IPCA.....	Iniciativa de los Países de Centroamérica
IR.....	Espectroscopia de Infrarrojo
J.....	Constante de acoplamiento
Nfx.....	Nifurtimox
NIAID.....	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NADPH.....	Nicotinamida Adenina Dinucleótico Fosfato
<i>N,N</i> -DMF.....	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
OECD.....	Organización para la Cooperación y Dsarrollo Económico
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
OPS.....	Organización Panamericana de la Salud

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
P_f	Punto de fusión
PM	Peso molecular
Ppm	Partes por millón
REE	Resonancia de Espin Electrónico
RIDIMEDCHAG	Red Iberoamericana de Investigación, Desarrollo e Innovación de Medicamentos Anti-Chagas
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAM	Síntesis Asistida por Microondas
SAR	Relaciones Estructura-Actividad
SNAr	Sustitución Nucleofílica Aromática
TBAP	Perclorato de tetrabutilamonio
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietilamina
TS	Trans-sialidasa
UV	Ultravioleta
W	Vatios
Δ	Desplazamiento químico
V	Número de onda
λ	Longitud de onda

Índice

I. ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	3
1. Definición	5
2. Historia de la Enfermedad de Chagas.....	6
3. Enfermedad de Chagas, enfermedad desatendida	7
4. Transmisión de la Enfermedad de Chagas al ser humano	8
4.1. Transmisión vectorial	8
4.2. Transmisión no vectorial:.....	9
5. Epidemiología.....	10
5.1 Enfermedad de Chagas en países endémicos.....	11
5.2 Iniciativas para el control de la Enfermedad de Chagas.....	13
5.3 Enfermedad de Chagas en países no-endémicos:.....	16
5.4 Enfermedad de Chagas en España.....	17
6. Etiología de la Enfermedad de Chagas:	17
6.1 Agente causante: <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
6.1.1. Estructura celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
6.1.2. Morfología	19
6.1.3. Diversidad genética.....	21
6.1.4. Ciclo de vida.....	21
7. Patogénesis.....	24
7.1. Fases, formas y evolución clínica.....	24
7.2. Patogénesis y mecanismos patofisiológicos.....	25
8. Manifestaciones clínicas.....	27
9. Diagnóstico	29
9.1. Diagnóstico durante la etapa aguda de la enfermedad.....	29
9.1.1. Métodos parasitológicos directos	29
9.1.2 Métodos parasitológicos indirectos	30
9.1.3 Serología	30

9.1.4 PCR.....	31
9.2 Diagnóstico durante la etapa crónica de la enfermedad.....	31
10. Tratamiento de la enfermedad.....	32
10.1. Limitaciones del tratamiento actual.....	33
10.2. Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazole.....	34
11. Diseño de nuevos fármacos frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	36
11.1. Dianas moleculares estudiadas en <i>T. cruzi</i>	36
11.1.1. Inhibición de la biosíntesis del ergosterol.....	37
11.1.2. Inhibición del metabolismo del pirofosfato.....	38
11.1.3. Inhibidores de la cruzipaína.....	39
11.1.4. Inhibidores de la síntesis y el metabolismo de la tripanotona.....	39
11.1.5. Inhibidores de la captación de purinas.....	40
11.1.6. Inhibidores de la actividad de la trans-sialidasa.....	41
11.2. Situación actual del desarrollo de fármacos antichagásicos.....	41
12. Vacuna frente a la enfermedad de Chagas.....	42
II. QUINOXALINAS Y CHAGAS.....	45
13. Quinoxalina, molécula con un amplio espectro de actividades biológicas.....	47
14. Quinoxalinas y enfermedades olvidadas.....	49
14.1. Quinoxalinas y enfermedad de Chagas, búsqueda de nuevos derivados con actividad antichagásica llevada a cabo por el grupo de trabajo.....	52
14.2. Resumen de las relaciones estructura-actividad observadas.....	58
15. Flúor y química médica.....	60
III. HIPÓTESIS.....	65
IV. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	69
16. Revisión bibliográfica y de resultados previos: estado del arte.....	71
17. Diseño de nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido.....	71
17.1. Diseño de las series iniciales.....	71
17.2. Modificaciones propuestas a partir de las series iniciales diseñadas.....	73

17.2.1. Reducción de quinoxalinas 1,4-di- <i>N</i> -óxido	73
17.2.2. Modificación de la posición R ₃ del anillo de quinoxalina	73
17.2.3. Ampliación del estudio de las posiciones R ₆ y R ₇	73
17.2.4. Ampliación del estudio de la posición R ₂	74
18. Síntesis de los compuestos diseñados. Optimización de los métodos de síntesis.	75
19. Caracterización de los compuestos sintetizados.....	76
20. Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los nuevos compuestos sintetizados frente a <i>T. cruzi</i>.....	76
21. Estudio de las relaciones estructura-actividad biológica de los nuevos derivados de quinoxalina evaluados frente a <i>T. cruzi</i>.....	76
22. Evaluación de la toxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos evaluados.....	76
23. Estudio de las posibles relaciones entre la estructura química y los resultados de toxicidad obtenidos.....	77
24. Evaluación biológica <i>in vivo</i> de los nuevos derivados sintetizados.....	77
25. Estudio del posible mecanismo de acción de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-<i>N</i>-óxido presentados.....	77
25.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido sintetizados.....	77
25.2. Estudios biológicos de mecanismo de acción de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido sintetizados.....	77
26. Estudio de las posibles relaciones estructura-comportamiento electroquímico y comportamiento electroquímico-actividad anti-<i>T. cruzi</i>.....	78
27. Búsqueda de nuevos líderes y diseño de futuros planes de trabajo.....	78
V. SÍNTESIS QUÍMICA	81
27. Esquema general de síntesis.....	83
28. Química de los benzofuroxanos.....	83
28.1. Síntesis de benzofuroxanos.....	84
28.1.1. Síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa	84
28.1.2. Síntesis de benzofuroxanos a partir de azidas.....	85

28.2. Isómeros de posición en la síntesis de benzofuroxanos 5(6)-monosustituidos	87
29. Química de las β-cetoamidas	87
29.1. Síntesis de los intermedios de la serie 3 (INT3.1 y INT3.2)	87
30. Química de los derivados de 1,4-di-<i>N</i>-óxido de quinoxalina	88
30.1. Reacción de Beirut. Síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido (series 1, 3, 4 y 5).....	89
30.1.1. Reacción de Beirut convencional. Síntesis de las series 1, 4, 5 y compuesto 7.1 90	
30.1.2. Síntesis orgánica asistida por microondas. Síntesis de las series 1, 3 y 5.....	91
30.2. Isómeros de posición en las quinoxalinas 6(7)-monosustituidas	93
31. Sustitución nucleofílica aromática. Síntesis de los derivados de la serie 6.....	94
32. Reducción de quinoxalinas 1,4-di-<i>N</i>-óxido: obtención de los derivados de la serie 2 y el compuesto 6.17	95
VI.EXPERIMENTACIÓN QUÍMICA	99
33. Materiales y reactivos.....	101
34. Métodos generales de síntesis.....	103
34.1. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido pertenecientes a la serie 1	103
34.1.1. Método Ia: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido mediante el método convencional (1.2, 1.7-1.11, 1.17, 1.23 y 1.24).....	103
34.1.2. Método Ib-1: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido mediante el método de síntesis asistido por microondas (1.2, 1.7-1.12, 1.14, 1.15, 1.17 y 1.23-1.26).....	104
34.1.3. Método Ib-2: Método general de síntesis de los derivados (1.27-1.34).....	104
34.2. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-(piperazina-1-carbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido pertenecientes a la serie 3.....	105
34.2.1. Método IIIa. Procedimiento general de síntesis de los INT3.....	105
34.2.2. Método IIIb. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-(piperazina-1-carbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido (Compuestos 3.1 y 3.2):.....	105

34.3. Método IV. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-benzoil-3-difluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido pertenecientes a la serie 4 (Compuestos 4.1-4.6).....	106
34.4. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido pertenecientes a la serie 5.....	107
34.4.1. Método Va: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido mediante el método convencional (Compuestos 5.1-5.18).....	107
34.4.2. Método Vb: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido mediante el método de síntesis asistido por microondas (Compuestos 5.6-5.8, 5.10-5.12 y 5.14-5.17).....	108
34.5. Procedimiento general de síntesis del derivado 7.1.....	108
34.6. Métodos generales de síntesis de los derivados de la serie 6.....	108
34.6.1. Método VIa. Procedimiento general de síntesis de los compuestos 6.1-6.6.....	109
34.6.2. Método VIb. Procedimiento general de síntesis del derivado 6.7.....	109
34.6.3. Método VIc. Procedimiento general de síntesis de los derivados 6.8-6.16.....	110
34.7. Método II. Procedimiento general de síntesis de los derivados de la serie 2 y del compuesto 6.17.....	110
VII. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	113
35. Evaluación biológica <i>in vitro</i> anti-<i>Trypanosoma cruzi</i>.....	115
35.1. Evaluación biológica <i>in vitro</i> frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i>	115
35.2. Evaluación biológica <i>in vitro</i> frente a la forma epimastigote del clon CL Brener y las cepas Y y Colombiana de <i>T. cruzi</i>	116
35.3. Evaluación biológica <i>in vitro</i> frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener de <i>T. cruzi</i>	116
36. Citotoxicidad frente a células mamíferas.....	117
36.1. Principio del ensayo.....	117
36.2. Método experimental.....	118
37. Evaluación de la mutagenicidad: Test de Ames.....	119

37.1. Principio del ensayo	119
37.2. Método experimental	120
38. Evaluación biológica <i>in vivo</i> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	123
VIII. ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN	125
39. Estudio electroquímico	127
40. Estudios biológicos de mecanismo de acción	127
40.1. Efecto sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales	128
40.2. Estudio por RMN- ¹ H de los metabolitos excretados	128
IX. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	131
X. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE SÍNTESIS	165
41. Reacción de Beirut.....	167
41.1. Síntesis de los derivados de quinoxalina de las series 1 y 5.....	167
41.1.1. Comparativa de los métodos de síntesis utilizados: Convencional vs microondas	168
41.2. Optimización de la síntesis del compuesto 7.1	170
42. Sustitución nucleofílica aromática. Síntesis de los derivados de la serie 6.....	171
XI. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	175
43. Resonancia magnética nuclear de ¹ H. Acoplamiento protón-flúor	177
44. Resonancia magnética nuclear de ¹³ C. Acoplamiento carbono-flúor	180
45. Determinación estructural de los derivados de la serie 6.....	182
XI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA FRENTE A <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>.....	187
46. Resultados y discusión de actividad biológica frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	189
46.1. Actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> . Relaciones estructura-actividad biológica.....	189
46.2. Actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la forma epimastigote del clon CL Brener y de las cepas Y y Colombiana.....	202
46.3. Actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener.....	203

XIII. TOXICIDAD.....	205
47. Resultados y discusión de citotoxicidad frente a células mamíferas	207
48. Resultados y discusión del ensayo de mutagenicidad	208
48.1. Relaciones estructura-mutagenicidad.....	209
XIV. ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i>.....	213
49. Actividad biológica <i>in vivo</i> en modelos de ratón de enfermedad de Chagas aguda.....	215
XV. ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN.....	219
50. Resultados y discusión del estudio electroquímico.....	221
50.1. Comportamiento electroquímico.....	221
50.2. Relación entre la estructura química y el potencial de reducción.....	224
50.3. Relación entre el comportamiento electroquímico y la actividad actichagásica.....	227
51. Resultados y discusión de los estudios biológicos de mecanismo de acción	230
51.1. Estudio de actividad inhibitoria sobre deshidrogenasas mitocondriales.....	230
51.2. Estudio de los metabolitos excretados por <i>T. cruzi</i>	232
Conclusiones.....	237
Referencias bibliográficas	243
Índice de Figuras	263
Índice de tablas.....	269
Anexo.....	
.....26973	

INTRODUCCIÓN

I. ENFERMEDAD DE CHAGAS

1. Definición

La enfermedad de Chagas (EC) o Tripanosomiasis Humana Americana es una parasitosis crónica causada por el protozoo parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual, es transmitido naturalmente por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*.¹

Se trata de una compleja zoonosis que incluye más de 180 especies de vertebrados de diferentes órdenes, tanto domésticos como salvajes como posibles hospedadores, y diferentes especies de insectos triatominos vectores. Dado que el ser humano es un huésped ocasional, sin importancia para el mantenimiento del parásito en la naturaleza, su erradicación es muy complicada.²

La EC pertenece al grupo de enfermedades tropicales desatendidas u olvidadas. Se trata de la principal enfermedad parasitaria del continente americano, afectando a países desde Méjico hasta Argentina. Las estimaciones más recientes indican que la EC afecta a entre 7 y 8 millones de personas y unos 100 millones de personas estarían en riesgo de contraer la enfermedad, provocando anualmente cerca de 13.000 muertes. La enfermedad produce además grandes pérdidas socioeconómicas en las regiones endémicas debido a las elevadas tasas de morbilidad sobre la población activa.³

En los últimos años, debido a los masivos movimientos migratorios, la EC está comenzando a ser una preocupación de salud pública en países no endémicos por la aparición de la transmisión no vectorial a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y transmisión congénita.

En el ser humano la enfermedad presenta 2 fases diferentes, una fase aguda y una fase crónica. En función de la evolución que siga la fase crónica se distingue entre la forma indeterminada o asintomática y la forma determinada de la fase crónica con las manifestaciones clínicas características de la enfermedad.

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.⁴

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, sólo 2 fármacos, Nifurtimox y Benznidazole, 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 activos para el tratamiento de la EC.^{1,4}

2. Historia de la Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis humana americana ha existido naturalmente en el continente americano como una enfermedad enzoótica durante millones de años en el continente americano. La enfermedad ha sido transmitida a través de múltiples especies de vectores triatominos a los mamíferos silvestres durante casi 10 millones de años. El ser humano llegó al continente americano hace entre 26.000 y 12.000 años. Poco a poco fue ocupando zonas naturales donde la enfermedad estaba establecida. El auge de la agricultura y la domesticación de animales, que comenzó hace unos 10.000 años, fomentaron la posibilidad de infección en el hombre, pasando a convertirse en una antropozoonosis en la que el hombre era infectado accidentalmente.

Momias encontradas en Chile y Perú que datan de hace unos 9000 años mostraron restos de ADN de *T. cruzi*. Además, se han encontrado evidencias de la presencia de *Triatoma infestans* en viviendas de la época precolombina, lo que indica que el principal vector de la enfermedad fue gradualmente incorporándose en el ambiente doméstico.

A partir de la colonización del continente americano por parte de los españoles y portugueses durante los siglos XV y XVI se produjo la mayor propagación doméstica de *Triatoma infestans* debido a la intensa deforestación llevada a cabo por la expansión de la agricultura y la ganadería. En el siglo XVI Fray Ferdinando de Lizarraga describió la presencia y los hábitos del insecto vector, *Triatoma infestans*, en Bolivia. En el siglo XIX, Darwin también realizó descripciones acerca del comportamiento del insecto vector en Argentina. Incluso hay numerosas teorías que proponen que el propio Charles Darwin falleció debido a la EC.

Esta ocupación progresiva de los ecotopos de los insectos triatominos provocaron que éstos perdieran su fuente alimenticia primaria, sangre de pequeños vertebrados silvestres. Poco a poco se fueron adaptando al ambiente humano y se establecieron en las viviendas humanas donde comenzaron a alimentarse de la sangre de los animales domésticos y del ser humano. De esta manera se estableció un nuevo ciclo de infección, convirtiéndose la EC en una zoonosis.

El estudio de la EC en el mundo de la medicina es relativamente reciente. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas (1879-1934) (**Figura 1**), médico que trabajaba en el Instituto Bacteriológico de Manquinhos de Rio de Janeiro, Brasil. En el curso de una campaña antimalárica previa al tendido de la vía férrea del Ferrocarril Central del Brasil en el Noreste del Estado de Minas Gerais, el Dr. Chagas supo de la existencia de un insecto hematófago, llamado "barbeiro" por los naturales de la región, que habitaba en las chozas de barro y paja de la zona y atacaba al hombre durante la noche. Trabajando en la localidad de Lassance, a orillas del río Bicudo, capturó y analizó estos insectos, identificándolos como *Conorhinus megistus*, actualmente denominados como *Panstrongylus megistus*.

Al analizarlos más detalladamente halló que el intestino posterior estaba poblado de parásitos que supuso formas intermediarias de un tripanosoma. Tras esta observación, se puso en contacto con el Dr. Oswaldo Cruz, a quien envió varios ejemplares del insecto, quien hizo picar con ellos



Figura 1. Carlos Chagas.

Fuente: <http://www.bvschagas.coc.fiocruz.br>

a un ejemplar de mono de la especie *Callitrix penicillata*. Pasados veinte o treinta días desde la picadura, observaron en la sangre periférica del mono tripanosomas en gran número, con una morfología distinta a cualquier especie conocida del género *Trypanosoma*. El Dr. Chagas llamó entonces a este microorganismo flagelado *Trypanosoma cruzi*, en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz.

El trabajo del Dr. Chagas fue especial en la historia de la medicina, por ser el único investigador que pudo describir por completo una enfermedad infecciosa, es decir, el patógeno, su vector

y hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología.⁵⁻⁹

3. Enfermedad de Chagas, enfermedad desatendida

La EC, según indica la OMS, pertenece al grupo de enfermedades conocidas como enfermedades tropicales desatendidas u olvidadas (ETD).³ Las ETD son un grupo de enfermedades tropicales infecciosas crónicas y debilitantes, entre las que se incluyen el dengue, la malaria, la leishmaniasis, la enfermedad del sueño y la filariasis entre otras, para las cuales las intervenciones de salud e I+D son inadecuadas a sus necesidades. La mayoría de ellas son enfermedades parasitarias en las que el parásito es transmitido por un insecto vector. Afectan a un billón de personas en todo el mundo, fundamentalmente gente que vive bajo el umbral de la pobreza en países en vías de desarrollo. En los últimos años, estas enfermedades han conseguido salir del anonimato en el que estaban sumidas y su control y eliminación se han asumido como una prioridad para conseguir una reducción sostenible de la pobreza y poder cumplir los objetivos del Desarrollo del Milenio de las Naciones Unidas.¹⁰⁻¹³

4. Transmisión de la Enfermedad de Chagas al ser humano

La transmisión de la EC al ser humano puede darse a través de diferentes mecanismos que se pueden clasificar en mecanismos de transmisión vectoriales y mecanismos de transmisión no vectoriales.

4.1. Transmisión vectorial

La transmisión de *T. cruzi* a través de la picadura del insecto vector es el mecanismo de transmisión más importante, ya que el 80% de los nuevos casos de infección se dan a través de este mecanismo. La transmisión es llevada a cabo por chinches hematófagas de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Han sido identificadas más de 130 especies de chinches capaces de transmitir el parásito, las cuales muestran una distribución geográfica específica a lo largo del continente Americano (**Figura 3**). Sin embargo, de todas las especies identificadas, sólo unas pocas son importantes en la transmisión del parásito al hombre. Las tres especies más significativas en la infección humana son *Triatoma infestans* (**Figura 2**), *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, todas ellas endémicas del continente americano.



Figura 2. *Triatoma infestans*. Fuente:

<http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases>

La característica que distingue a estas especies es que han evolucionado para adaptarse al ambiente doméstico, principalmente en construcciones de zonas rurales empobrecidas.

Históricamente, *Triatoma infestans* ha sido el vector más importante, y el principal vector en las regiones endémicas sub-amazónicas. *R. prolixus* ha sido identificado principalmente en el norte de Sudamérica y en América central y *T. dimidiata* ocupa regiones similares al anterior, pero también se extiende hasta regiones de Méjico (**Figura 3**).^{14,15}

El insecto triatomino suele ocupar grietas y hendiduras de las construcciones de adobe de las zonas rurales empobrecidas y durante la noche, las personas son picadas mientras duermen. El insecto, preferiblemente se alimenta de sangre de la mucosa oral, nasal o conjuntival, aunque también pueden alimentarse sobre piel intacta. En la zona de la picadura deposita sus heces, las cuales contienen el parásito. El parásito, a través de la lesión provocada en la piel o a través de las mucosas penetrará en el organismo, normalmente ayudado por el rascado involuntario por parte de la persona infectada, y provoca la infección.^{16,17}

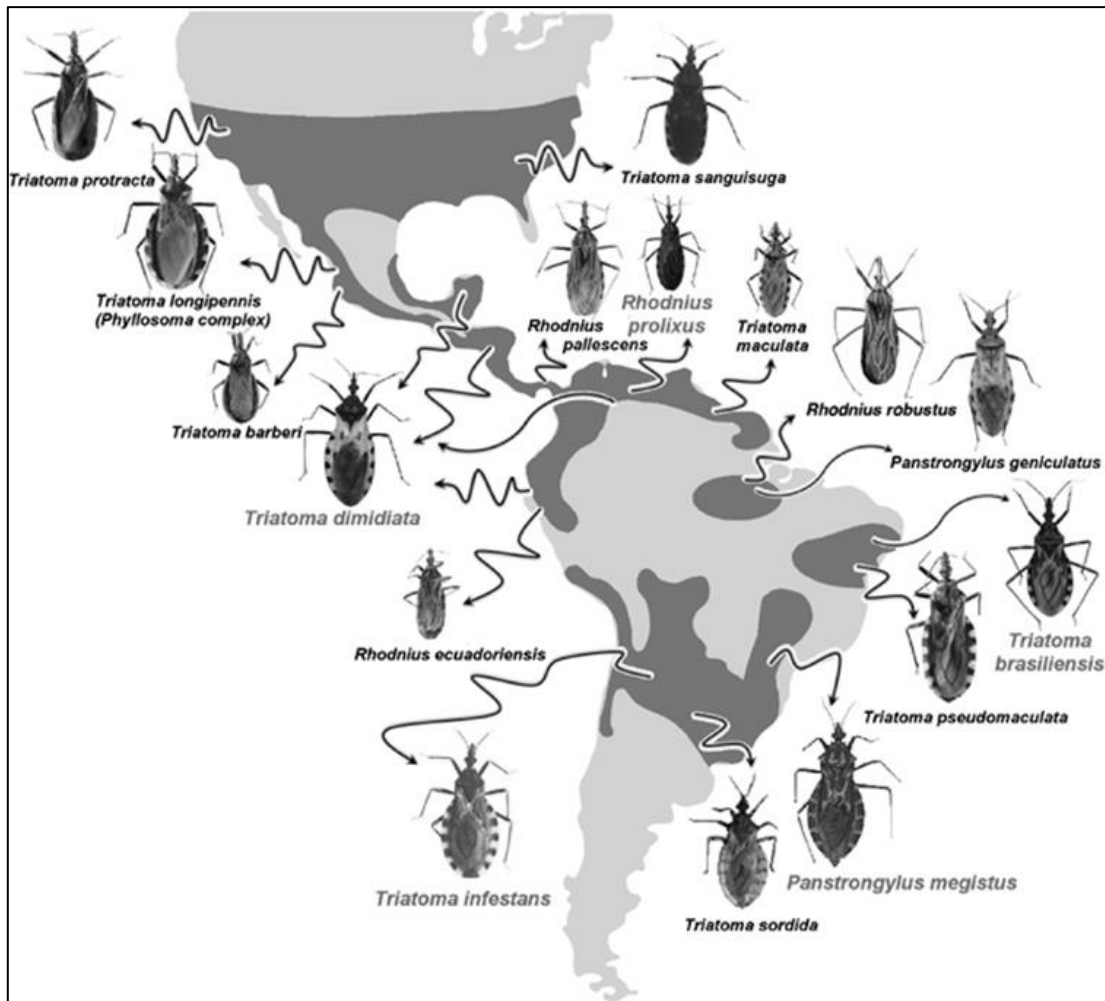


Figura 3. Distribución geográfica de los principales triatomíneos vectores de la EC Fuente: Heredity (2012) 108, 190–202; doi:10.1038/hdy.2011.71.14

4.2. Transmisión no vectorial:

La transmisión de la EC sin la participación del insecto vector también es muy importante. Esto implica que esta enfermedad tenga una importancia cada vez mayor en países no endémicos donde no se encuentra el insecto vector. Los principales mecanismos de transmisión en orden de importancia son los siguientes:

Transfusiones de sangre y trasplantes de órganos provenientes de donantes infectados crónicamente:

La probabilidad de adquirir la infección tras una transfusión de sangre contaminada es del 10-20% y depende de numerosos factores. Se convirtió en la principal fuente de transmisión en regiones urbanas de países endémicos y en los países no endémicos, aunque su incidencia en los últimos años ha disminuido mucho debido a los estrictos controles impuestos sobre los bancos de sangre. La transmisión por trasplantes de órganos tiene una menor incidencia, ya que, para que ocurra, en los órganos donados deben haber células hospedadoras que contengan la forma amastigote de *T. cruzi*, la cual, tras el trasplante evolucionará hasta la forma infectiva.¹⁸⁻²¹

Transmisión congénita de la madre infectada al feto:

La transmisión tiene lugar por vía transplacentaria y puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad materna y en cualquier periodo de la gestación, siendo más probable en el último trimestre de embarazo y durante el parto. La existencia de la transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido bien caracterizada por diferentes investigadores en países endémicos y numerosos estudios mostraron que entre el 1 y el 10% de los recién nacidos con madres con infección crónica también mostraron la infección.^{22,23} Esta variación se debe a diferentes factores que todavía no son bien conocidos, pero presumiblemente se piensa que pueden estar implicados el grado de parasitemia en la madre, la cepa parasitaria implicada, el estado inmunológico de la madre y factores placentarios. Este modo de transmisión ha adquirido importancia en los países no endémicos debido a los flujos migratorios.

Transmisión oral:

La transmisión oral puede darse por la ingestión de alimentos altamente contaminados conteniendo el parásito o excrementos del insecto vector. Se trata de un mecanismo de transmisión esporádico y circunstancial que aparece en forma de brotes que afectan a un número escaso de personas en lugares determinados. Clínicamente se manifiesta de diferente modo al resto de mecanismos de transmisión, presentando una infección aguda severa que provoca una miocarditis grave. El grado de mortalidad es muy elevado, principalmente en niños.²⁴

Dentro de la transmisión oral se incluye también la infección de lactantes por la presencia del parásito en la leche materna. Se han detectado parásitos en leche humana de madres con infección aguda y han sido descritos diferentes casos de este tipo de transmisión.²⁵

Transmisión por accidentes de laboratorio:

El cultivo de la forma infectiva de *T. cruzi* en laboratorio es sencillo, lo cual implica la posibilidad de infección a través del contacto con las mucosas o pequeñas heridas en la piel. Este mecanismo de transmisión puede darse también por contacto con heces infectadas de triatomíneos o con sangre proveniente de personas infectadas.²⁶

5. Epidemiología

La EC ocupa la sexta posición en cuanto a las enfermedades tropicales con una mayor carga global a nivel mundial. Como se observa en el mapa de la **Figura 4**, la EC es endémica en 21 países del continente americano, abarcando desde Méjico hasta la zona sur de Argentina, ya que es donde únicamente se encuentra el insecto vector. Históricamente, la enfermedad se limitaba a estas regiones, sin embargo, los cambios demográficos producidos por los movimientos migratorios en las últimas décadas han hecho que la enfermedad se haya extendido hasta países no-endémicos de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía.

Los datos epidemiológicos de la enfermedad varían en función de la fuente consultada, pero las estimaciones más recientes indican que el número de infectados a nivel mundial se encuentra entre 7 y 8 millones de personas, causando más de 12.000 muertes anuales. El número de nuevos infectados cada año supera los 40.000 individuos y se estima que unos 100 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección.^{27,28}



Figura 4. Distribución mundial de afectados por la enfermedad de Chagas. Fuente: Rassi Jr A. et al., Chagas disease, Lancet, 2010.

Para tener una visión más real de la epidemiología de la enfermedad a nivel mundial típicamente se divide el estudio entre países endémicos y países no-endémicos.

5.1 Enfermedad de Chagas en países endémicos

Como se ha indicado anteriormente la EC es endémica en 21 países del continente americano, siendo un grave problema de salud pública y provocando un elevado impacto social y económico en las regiones afectadas por su elevada carga de morbilidad. La enfermedad está estrechamente asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, por ello, las regiones más afectadas son las zonas rurales empobrecidas y los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades.

En las zonas rurales el impacto de la transmisión vectorial es muy elevado. La ocupación de los ecotopos del insecto vector ha provocado que éstos se hayan adaptado al ambiente humano y se hayan domiciliado. La domiciliación está favorecida por las típicas construcciones de adobe y caña utilizadas en estas zonas rurales.

En los alrededores de las grandes ciudades la incidencia de la enfermedad también es elevada, ya que, buscando nuevas oportunidades, muchas personas migran desde zonas rurales hacia las ciudades. Un porcentaje de estas personas presenta la enfermedad, adquiriendo

importancia la transmisión congénita y por transfusiones de sangre infectada. La transmisión vectorial en este caso es menor.

Tabla 1. Estimación de afectados por la enfermedad de Chagas en países endémicos llevada a cabo por la PAHO en los años 1980-1985 y 2005. Fuente:^{3,4,27}.

	1980-1985		2005	
	Individuos infectados	Individuos en riesgo de infección	Individuos infectados	Individuos en riesgo de infección
Iniciativa del Cono Sur (iniciada en 1991)				
Argentina	2.640.000 (10,0%)	23%	1.600.000 (4,1%)	19%
Bolivia	1.300.000 (24,0%)	32%	620.000 (6,8%)	35%
Brasil	6.180.000 (4,2%)	32%	1.900.000 (1,0%)	12%
Chile	1.460.000 (16,9%)	63%	160.200 (1,0%)	5%
Paraguay	397.000 (21,4%)	31%	150.000 (2,5%)	58%
Uruguay	37.000 (3,4%)	33%	21.700 (0,7%)	19%
Iniciativa del Pacto Andino (iniciada en 1997)				
Colombia	900.000 (30,0%)	11%	436.000 (1,0%)	11%
Ecuador	30.000 (10,7%)	41%	230.000 (1,7%)	47%
Perú	621.000 (9,8%)	39%	192.000 (0,7%)	12%
Venezuela	1.200.000 (3,0%)	72%	310.000 (1,2%)	18%
Iniciativa de América Central (iniciada en 1997)				
Belice	--	--	2.000 (0,7%)	50%
Costa Rica	130.000 (11,7%)	45%	23.000 (0,5%)	23%
El Salvador	900.000 (20,0%)	45%	232.000 (3,4%)	39%
Guatemala	1.100.000 (16,6%)	57%	250.000 (2,0%)	17%
Honduras	300.000 (15,2%)	47%	220.000 (3,1%)	49%
Nicaragua	--	--	58.600 (1,1%)	25%
Panamá	200.000 (17,7%)	47%	21.000 (1,0%)	31%
Méjico	--	--	1.100.000	28%
Total	17.395.000 (4,3%)	25%	7.694.500 (1,4%)	20%

Como muestra la **Tabla 1**, estimaciones de la PAHO realizadas en el año 2005 indicaban que el número de infectados rondaba los 7.600.000 con una prevalencia entre la población total del 1,4%, siendo Bolivia y Argentina, con una prevalencia de la infección cercana al 7% y del 4,1%, respectivamente, los países más afectados. También muestran una elevada prevalencia Paraguay, Honduras, Guatemala y El Salvador. Caben destacar también Brasil y Méjico, que aun mostrando una menor prevalencia (1%), el número de afectados es superior a 1.000.000 de individuos debido a su elevado número de habitantes. Además del número de infectados, es

preocupante el elevadísimo número de personas en riesgo de adquirir la infección, rondando el 50% de la población en varios países como Paraguay, Ecuador, Belice y Honduras. A nivel global el porcentaje de individuos en riesgo de infección en las regiones endémicas sería del 20%, lo que significa una cifra de 109 millones de personas.

A pesar de lo alarmantes que son estos datos, como se indica en la **Tabla 1**, la reducción en la prevalencia de la enfermedad y el número de afectados en los últimos 20 años ha sido muy significativa. En los años 80 la EC afectaba a más de 17 millones de personas, mientras que esa cifra se redujo a 7,6 millones en el año 2005. Otros avances conseguidos fueron una importante reducción en el número de nuevos casos anuales, pasando de 700.000 en 1990 a 41.200 en el año 2005 y en el número de fallecimientos por año, de unas 50.000 personas en los años 80 a las 12.500 personas fallecidas en 2005.

Esta importante reducción se ha conseguido principalmente por la aplicación de programas de prevención, control y educación a través de diferentes iniciativas llevadas a cabo por los países afectados y la OPS.^{10,29-32}

5.2 Iniciativas para el control de la Enfermedad de Chagas

Las iniciativas para el control de la EC se fijaron 3 principales objetivos:

1. Interrumpir la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi*:

Los programas de control vectorial de la EC, al tratarse de una zoonosis compleja con un gran número de reservorios implicados, sólo pueden estar dirigidos hacia la disminución de las poblaciones de insectos triatomíneos vectores en el ambiente doméstico y peridoméstico, pero no a la erradicación. La lucha anti-vectorial con insecticidas es eficaz (**Figura 5**) y se ha comprobado que interrumpe la transmisión de manera muy importante.

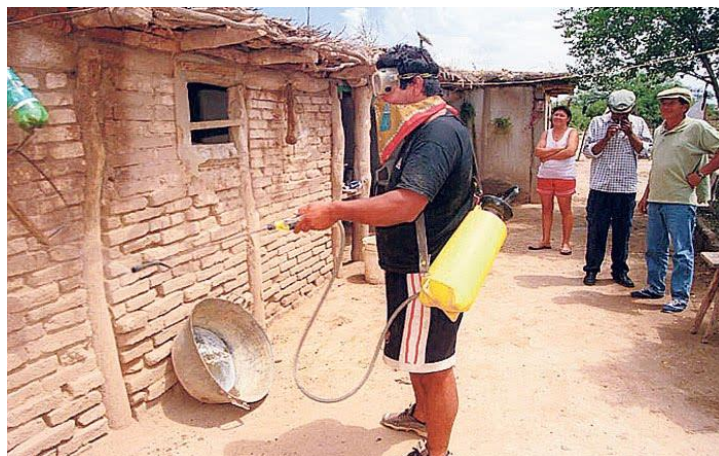


Figura 5. Tratamiento con insecticidas en una vivienda rural típica de las zonas endémicas.

Fuente: www.losandes.com

Esta lucha se debe continuar con un severo plan de vigilancia para evitar reinfestaciones y un plan educacional.

2. Evitar la transmisión transfusional y a través de trasplantes de órganos:

Los índices de seropositividad, según datos de la OMS, a menudo superan el 20% en zonas altamente endémicas y, en algunos casos, llega a cifras de hasta el 63% en áreas hiperendémicas de Bolivia. La estrategia a seguir es realizar un muestreo exhaustivo de los bancos de sangre y de los potenciales donantes mediante métodos de diagnóstico rápido. Lo mismo ocurriría con los donantes de órganos.

3. Desarrollo efectivo de métodos de diagnóstico, manejo y vigilancia de la enfermedad de Chagas:

La OMS lanzó una nueva estrategia en julio de 2009 para crear una Red Mundial para la Eliminación del Chagas. Esta estrategia se centró en seleccionar una prueba efectiva de diagnóstico para cribar y diagnosticar la infección, establecer sistemas que prevengan la transmisión a través de transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos y fortalecer los sistemas de vigilancia existentes.^{10,31,32}

Entre las iniciativas promovidas en la década de los 90 en los países endémicos destacan principalmente: la Iniciativa del Cono Sur, la Iniciativa del Pacto Andino, la Iniciativa de América Central y la Iniciativa de la Región Amazónica.

Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR): Fue creada en 1991 para eliminar la transmisión vectorial provocada por los principales vectores domiciliados de esta región, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* y *Panstrongylus megistus*, y para eliminar la transmisión transfusional mediante el cribado de todos los bancos de sangre y donantes. La Iniciativa fue altamente satisfactoria ya que Uruguay fue declarado libre de transmisión en 1997; Chile, en 1999; y en Brasil en el año 2006. En Argentina y Paraguay todavía queda trabajo por hacer.²⁹

Iniciativa del Pacto Andino (IPA): Fue puesto en marcha oficialmente en 1997 por Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. El objetivo era acabar con la transmisión vectorial (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata* y *Rhodnius ecuadoriensis*) y desarrollar un sistema de cribado efectivo entre los donantes de sangre. Los avances en cuanto a la transmisión transfusional fueron muy significativos, sin embargo, la eliminación de la transmisión vectorial ha tenido menos éxito que la obtenida por el Pacto del Cono Sur, ya que, a excepción de Venezuela, los programas nacionales de eliminación de vectores no han sido bien desarrollados.

Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA): Desarrollada desde 1999 por Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Méjico, Nicaragua y Panamá. En cuanto a la transmisión vectorial se han obtenido muy buenos resultados, habiendo certificado la eliminación de la transmisión de la enfermedad a través de *R. prolixus* en Guatemala, Honduras y Nicaragua. Los esfuerzos están más centrados ahora en la eliminación del vector secundario, *T. dimidiata*. El porcentaje de sangre donada testada para comprobar que esté libre de *T. cruzi* es muy cercano al 100%.

Iniciativa de la Región Amazónica (AMCHA): Creada en 2004 y coordinada por la OPS, ha centrado sus esfuerzos en el tratamiento inmediato de los nuevos casos de infección en esta región.

Tras estos años de actividades de control por parte de las Iniciativas para el Control de la EC se ha conseguido una interrupción de la transmisión en muchas regiones del continente americano (**Figura 6**). Además, la mejora en la calidad de vida de la gente en zonas rurales ha sido muy importante, así como la educación acerca de la enfermedad, punto fundamental a la hora de reducir la transmisión. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados, siguen habiendo importantes desafíos ya que la transmisión sigue dándose en muchos países, e incluso puede estar aumentando en países como Argentina, Venezuela y regiones amazónicas. Además, en cuanto a la transmisión a través de transfusiones sanguíneas, los programas y metodologías de cribado en los bancos de sangre no han alcanzado un nivel de seguridad aceptable en Bolivia, Ecuador, Perú, Costa Rica y Méjico.^{29,31-34}

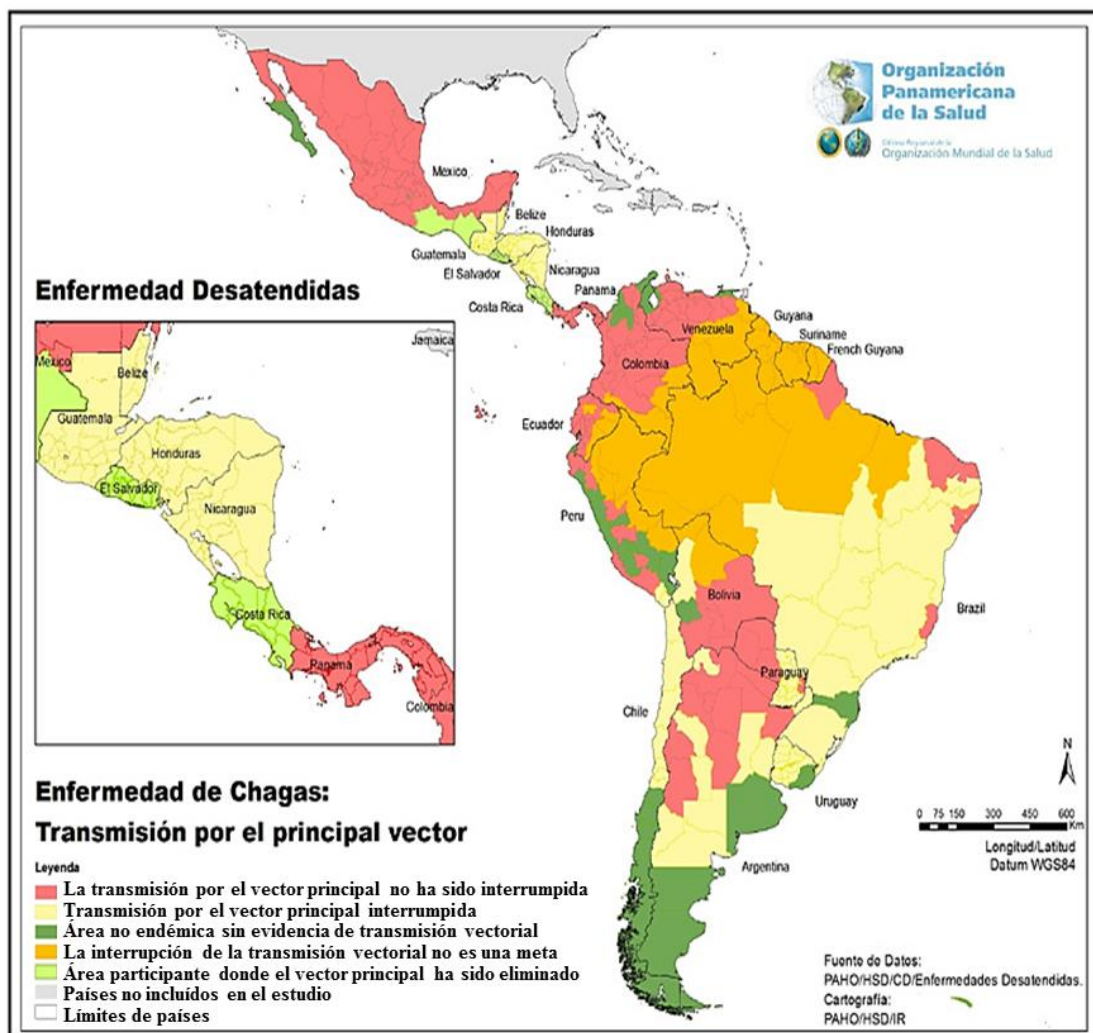


Figura 6. Estado del control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, 2011.

Fuente: PAHO/HSD/CD/Enfermedades Desatendidas.

5.3 Enfermedad de Chagas en países no-endémicos:

En los últimos años, debido a los cambios en los patrones migratorios mundiales, se ha producido una importante internacionalización de la EC. El aumento en el número de emigrantes provenientes de países endémicos del continente americano junto con el carácter persistente de la infección, ya que la mayoría de los infectados presenta un largo periodo asintomático, han permitido la aparición de la infección en países no-endémicos.^{35,36}

T. cruzi viaja hasta estos países en el organismo de inmigrantes infectados. Ante la inexistencia del insecto vector en países no-endémicos, los únicos mecanismos de transmisión de la infección serán no-vectoriales, principalmente transmisión congénita y a través de transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos provenientes de personas infectadas.³⁷

La EC importada se ha convertido en un nuevo problema socioeconómico, epidemiológico y de salud pública en una gran cantidad de países no-endémicos. Los principales destinos de los emigrantes, tanto legales como ilegales, provenientes de países latinoamericanos endémicos son países de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía. Destaca principalmente Estados Unidos, donde residen millones de inmigrantes latinoamericanos. A partir de los años 90 comenzó a producirse un movimiento migratorio desde Latinoamérica hacia Europa, principalmente estimulado por las nuevas oportunidades creadas a partir de la formación de la Unión Europea. A partir del año 2000 esta migración aumentó en gran medida, llegando en 2005 a superar los 2 millones de inmigrantes. Los principales países receptores fueron Francia, Italia, Portugal y, sobretodo, España. Otros países receptores importantes son Canadá, Suiza, Japón, países asiáticos emergentes y Australia.^{34,35,38-43}

En la **Tabla 2** se muestran datos de migración y estimaciones de prevalencia de infectados en los principales países afectados por la EC importada.

Tabla 2. Estimación de datos de migración y prevalencia de inmigrantes infectados en diferentes regiones mundiales entre 1999 y 2008.³⁸

País o Región	Número de inmigrantes	Inmigrantes infectados con <i>T. cruzi</i> estimados	Año del estudio
EEUU	16.689.172	325.671 (2%)	2007
España	1.678.711	86.948 (5,2%)	2008
Europa ^a	483.000	14.010 (2,9%)	1999-2005
Canadá	156.960	5.530 (3,5%)	2006
Australia	80.522	3.088 (3,8%)	2006

^aPaíses de la Unión Europea excepto España.

Los datos presentados en la **Tabla 2** se corresponden a estimaciones aproximadas, sin embargo, reflejan muy claramente la propagación de la enfermedad a nivel mundial, convirtiéndose en un nuevo problema de salud pública en muchos países no-endémicos.

5.4 Enfermedad de Chagas en España

Los casos clínicos de EC registrados en España hasta finales del siglo XX eran muy escasos. Este hecho está en concordancia con la inexistencia de transmisión vectorial autóctona, los escasos o nulos casos de infección en viajeros que visitan países endémicos, y principalmente, con la baja tasa de inmigración que se había dado hasta ese momento.⁴⁴

Sin embargo, a partir del año 2000 se produjo un aumento exponencial en el número de inmigrantes, de los cuales, más de la tercera parte provenían de Latinoamérica. Entre los años 2001 y 2005 se produjo un aumento de 5 veces en el número de inmigrantes, pasando de 446.000 en 2001 a 2.090.695 en 2008 siendo Ecuador, Argentina, Bolivia y Perú los principales países de origen.⁴⁵ Este aumento en el número de inmigrantes ha convertido a España en el país no-endémico en el que se registra una mayor incidencia de EC importada, constituyendo un nuevo problema de salud pública en nuestro país. Al tratarse de una enfermedad que no es de declaración obligatoria la mayor parte de los contagios se han dado por transfusiones de sangre y trasplantes de órganos provenientes de personas infectadas.³⁵

Debido a la alta tasa de emigración, en el año 2005 se emitió un Real decreto en el que se obligaba a excluir o testar la sangre u órganos donados por personas nacidas en países endémicos, hijos de mujeres nacidas en estos países o donantes con un historial de haber residido o haber sido transfundidos en países endémicos.⁴⁶

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas estimaciones del número de personas infectadas residentes en España. Sin embargo, debido a los cambios de los patrones migratorios, la diferente seroprevalencia en función del país de origen y la difícil detección de las diferentes fases crónicas de la enfermedad, la estimación es complicada. Tomando los datos estimados por diferentes grupos de trabajo el número de personas infectadas residentes en España rondaría los 53.000 casos.^{35,38,47-50}

6. Etiología de la Enfermedad de Chagas:

6.1 Agente causante: *Trypanosoma cruzi*

La EC o tripanosomiasis humana americana está causada por *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario hemoflagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum* y grupo *Stercoraria*.

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 brucei*, *Trypanosoma equiperdum* y *Trypanosoma equinum* causan importantes enfermedades en animales.⁵¹

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*, en el cual también están incluidos otros tripanosomas como *T. dionisii*, *T. vespertilionis* y *T. myoti*. Todos se caracterizan por presentar un ciclo de vida similar.

51,52

6.1.1. Estructura celular de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un organismo unicelular eucariota, por lo tanto, posee un núcleo asociado a la membrana nuclear, membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Sin embargo, al igual que otros miembros del orden *kinetoplástida*, *T. cruzi* posee una serie de estructuras celulares particulares (**Figura 7**). *T. cruzi* posee una única mitocondria, cuyo ADN se encuentra en el interior de una estructura suborgánular muy característica denominada kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto está formado por una red interconectada de cientos de moléculas circulares de ADN, los minicírculos y los maxicírculos.⁵¹

En *T. cruzi*, como en la mayoría de tripanosomátidos, la glucólisis ocurre fundamentalmente en orgánulos especializados en forma de vesículas que contienen enzimas glucolíticas y rodeadas de membrana denominados glicosomas. Además, posee orgánulos especializados en el almacenamiento, como los acidocalcisomas, donde almacena cationes, y el reservosoma, en el que almacena macromoléculas que toma del medio y que serán empleadas en el proceso de diferenciación de la forma epimastigote a la forma tripomastigote.⁵³⁻⁵⁶

T. cruzi presenta un citoesqueleto peculiar, ya que éste debe ser capaz de dirigir enormes cambios morfológicos y el crecimiento y movilidad del flagelo. El citoesqueleto está formado principalmente por microtúbulos que se encuentran distribuidos por toda la célula inmediatamente después de la membrana plasmática, por ello, se denominan subpeliculares. Están formados por la proteína tubulina, y se encuentran interconectados entre sí y con la membrana plasmática, lo cual, confiere al parásito una gran resistencia mecánica, a cambios de temperatura e incluso a fármacos.⁵¹

T. cruzi se caracteriza por poseer un único flagelo muy característico que varía de longitud, desde 20 μm hasta menos de 2 μm , en las diferentes etapas del ciclo vital del parásito. El flagelo está rodeado por una membrana especial que es rica en esteroides y esfingolípidos y se sujeta por un cuerpo basal y probasal que se encuentra en el interior de la célula. En la zona en la que el

flagelo penetra a la célula se forma una invaginación entre la membrana plasmática pelicular y la membrana flagelar que se conoce como bolsillo flagelar. Esta zona es rica en receptores y se piensa que es muy importante en el tráfico vesicular y la captación de nutrientes. Cerca de este bolsillo flagelar aparece otra pequeña invaginación denominada citostoma, común en otros grupos de protozoos, y que está implicada en la captación de nutrientes.^{28,51,54,56,57}

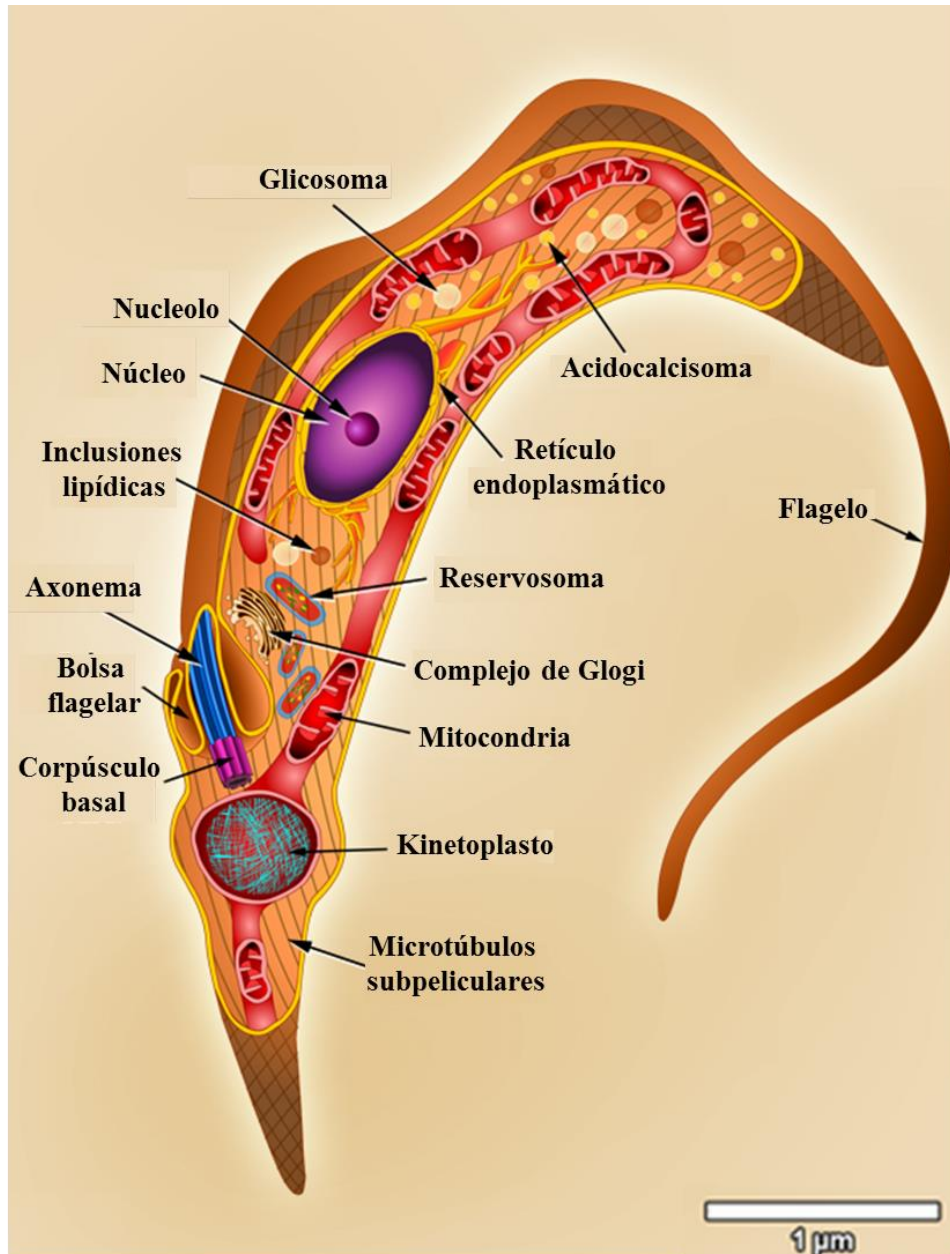


Figura 7. Estructura celular de la forma tripomastigote de *T. cruzi*. Fuente: Teixeira et al. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749 (modificado)⁵⁸.

6.1.2. 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 8**). Así, como se muestra en la **Figura 8**, *T. cruzi* adquiere 3 morfologías diferentes principales durante su ciclo de vida:

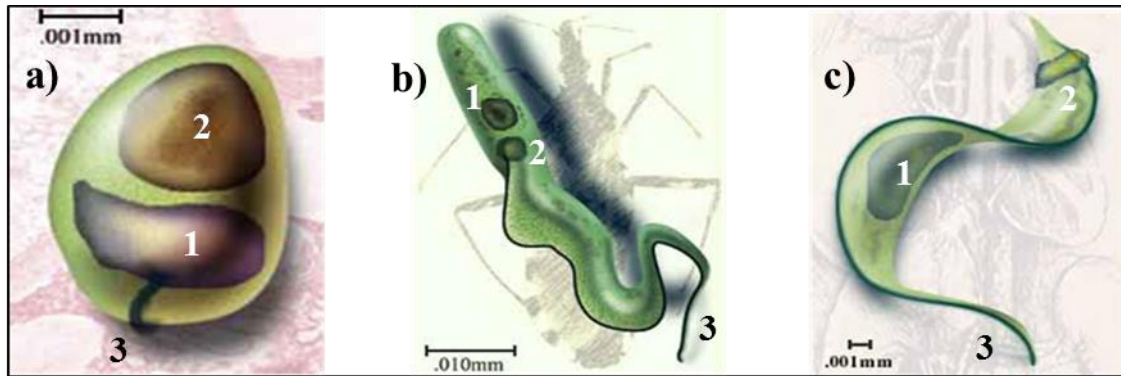


Figura 8. Morfologías de *T. cruzi*, a) Forma amastigote; b) Forma epimastigote; c) Forma tripomastigote. 1: kinetoplasto; 2: Núcleo; 3: Flagelo.

Amastigote: Se trata de una forma esférica u ovalada de unas $2 \mu\text{m}$ 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 $20 \mu\text{m}$. 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 $20 \mu\text{m}$ 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.

6.1.3. Diversidad genética

En el año 2005 se publicó la secuencia completa del genoma de *T. cruzi*.⁵⁹ La secuenciación mostró que el genoma posee un tamaño de 60,4 Mb con más de 22.000 genes codificantes de proteínas, casi la mitad de ellas desconocidas todavía. A lo largo de los años se fue viendo como *T. cruzi* mostraba grandes diferencias en cuanto a la severidad y el tipo de manifestaciones clínicas en diferentes regiones del continente americano. Numerosos estudios sobre proteínas y marcadores genéticos han mostrado que *T. cruzi* presentaba una gran heterogeneidad genética.⁶⁰ De esta manera, en 1999, tras una reunión entre los mayores expertos mundiales, el taxón *T. cruzi* se dividió en dos linajes, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II.

T. cruzi I predomina en el ciclo de transmisión selvático, es menos resistente a los fármacos antichagásicos y está principalmente asociado a la enfermedad en países al norte del Amazonas.

T. cruzi II está más presente en el ambiente doméstico de países del cono sur. Presenta una resistencia a fármacos más elevada y en cuanto a las manifestaciones clínicas, este linaje se ha asociado al daño tisular causado por la EC. *T. cruzi* II se dividió a su vez en diferentes subtipos IIa, IIb, IIc, IId y IIe.^{59,61}

En 2006 se publicó la existencia del linaje *T. cruzi* III y finalmente se re-clasificó el taxón en seis grupos diferenciados,⁶² TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, en función de características geográficas y ecológicas, del ciclo de transmisión y de las manifestaciones de la enfermedad que provocan.⁶³⁻⁶⁵

6.1.4. Ciclo de vida

T. cruzi, al igual que otros miembros del género *Trypanosoma*, se caracteriza por necesitar dos hospedadores, uno vertebrado, donde establece la infección, y uno invertebrado, que actúa como vector de transmisión, para completar su ciclo vital. Dentro de los tripanosomátidos, *T. cruzi* presenta uno de los ciclos de vida más complejos, el cual, implica diferentes etapas de diferenciación celular en los hospedadores vertebrados e invertebrados. Estas etapas de diferenciación celular variarán en función del ambiente en que se encuentre el parásito, si el hospedador es mamífero o insecto, y en función de si el parásito va a ocupar un espacio extracelular, como la circulación sanguínea, o un espacio intracelular.^{28,66}

El reservorio natural de *T. cruzi* es una amplia variedad de mamíferos marsupiales y placentarios autóctonos del continente Americano, los cuales, han co-evolucionado con el parásito durante millones de años. La infección es transmitida por insectos hematófagos triatominos de la familia *Reduviidae*.

Se distinguen dos tipos de ciclo biológico en función del nicho ecológico ocupado por el vector y el hospedador vertebrado. El ciclo selvático, entre los insectos vectores silvestres y mamíferos vertebrados salvajes, y el ciclo doméstico, entre insectos vectores domiciliados y los seres humanos y animales domésticos. Los dos ciclos pueden interferir cuando ratas, ratones,

murciélagos, zarigüeyas e insectos vectores infectados migran a zonas ocupadas por el hombre.⁶⁰ La aparición de la enfermedad en el hombre es el resultado de la invasión de los ecotopos naturales, lo que ha permitido el establecimiento del vector en las viviendas humanas de los medios rurales y por tanto, el hombre ha pasado a ser un reservorio más en el ciclo vital natural de *T. cruzi*.⁶⁷

Como se muestra en la **Figura 9**, los insectos vectores se infectan cuando se alimentan de sangre periférica de un mamífero infectado (1). En la sangre periférica de los hospedadores mamíferos se encuentran formas tripomastigotes y amastigotes del parásito (3). La población de tripomastigotes presente en esta fase del ciclo está formada por una mezcla pleomórfica de dos morfologías que generalmente se describen como “esbelto” y “ancho”. Por lo tanto, las chinches vectores adquieren una población pleomórfica de tripomastigotes circulantes y hasta un 10% de formas amastigotes tras alimentarse de la sangre de un mamífero infectado (2, 3).⁶⁷⁻⁷⁰

Cuando estos parásitos llegan hasta el estómago del insecto, muchos de ellos son lisados. Los parásitos supervivientes pasan entonces hasta el intestino medio del insecto vector. En pocos días, los tripomastigotes se diferencian a la forma amastigote. Una vez formados los amastigotes, en primer lugar prolongan su flagelo para convertirse en esferomastigotes, los cuales se alargan posteriormente y se transforman en epimastigotes (3). Estos epimastigotes continúan alargándose hasta que los nutrientes provenientes de la ingesta de sangre se acaban. Los epimastigotes migran entonces hacia el intestino medio posterior del insecto donde se dividen intensamente (4) y atacan, mediante su flagelo, a través de una interacción hidrofóbica, la cutícula cérica de las células del intestino medio posterior. Este proceso de adhesión parece ser importante para desencadenar el proceso de diferenciación de la forma epimastigote hasta la forma tripomastigote metacíclica, altamente infectiva.⁷¹ Este proceso se denomina metacicloogénesis (5). Estos tripomastigotes metacíclicos (7), tras desprenderse de la cutícula del intestino, son excretados con las heces y la orina del insecto en la zona donde se ha producido la picadura (6). De este modo, finaliza el ciclo biológico del parásito en el insecto vector y comienza el ciclo en el ser humano.⁶⁷

Los tripomastigotes metacíclicos tienen la capacidad de infectar a un amplio espectro de células nucleadas cercanas al sitio de infección, tanto fagocíticas como no fagocíticas (ejm.: fibroblastos, macrófagos y células epiteliales) (8). Los tripomastigotes metacíclicos invaden la célula a través de un proceso de reconocimiento específico entre el parásito y la célula del hospedador con la participación de un alto número de moléculas parasitarias, entre ellas la cruzipaina y la trans-sialidasa, y filamentos de actina de la célula hospedadora, formando una vacuola parasitófora donde el tripomastigote metacíclico comienza a diferenciarse a la forma amastigote (9).⁷²⁻⁷⁴ Los amastigotes lisan la membrana de la vacuola por mediación de enzimas lisosomales y pasan a ocupar el citoplasma celular donde termina la diferenciación (10).

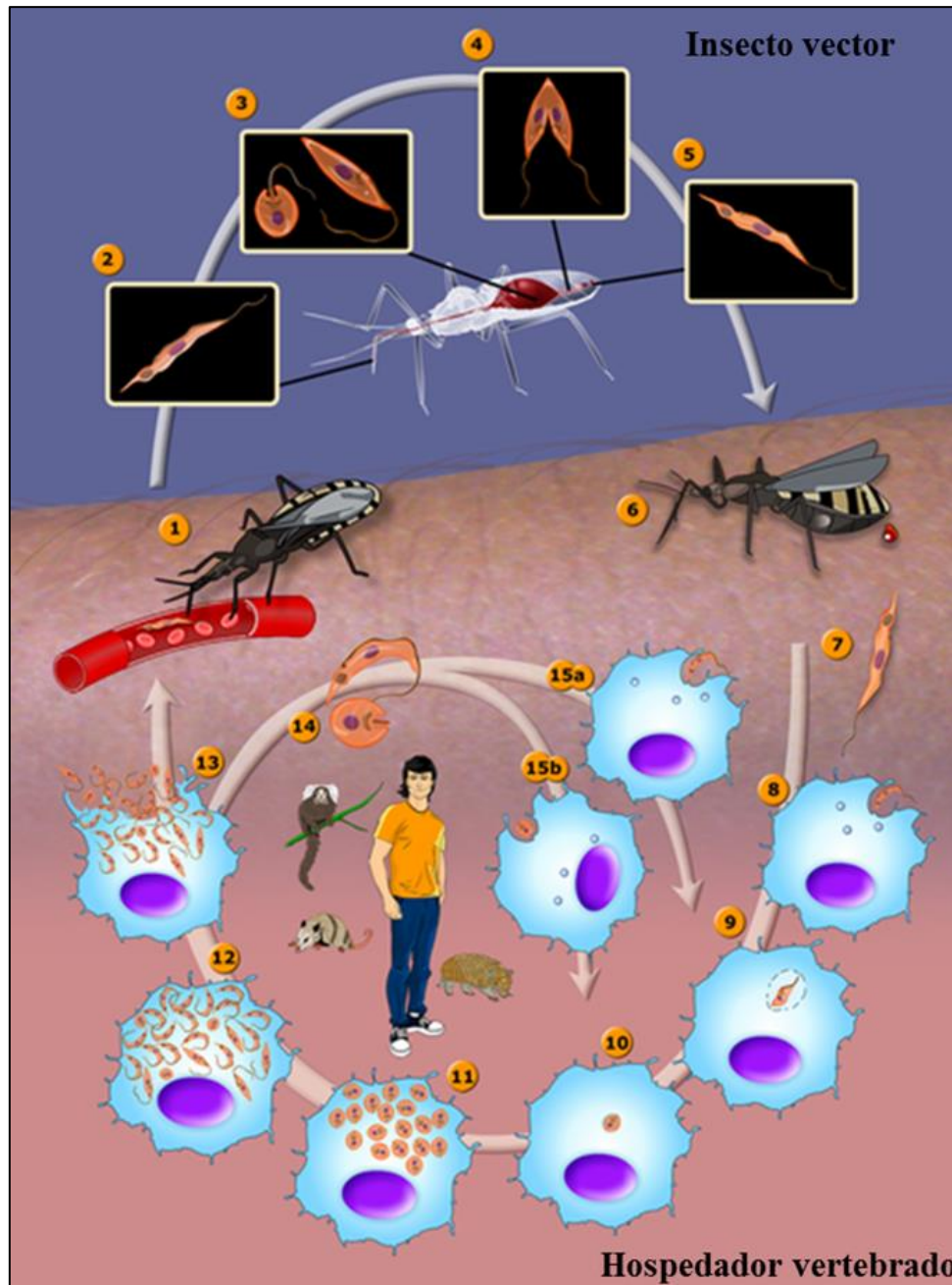


Figura 9. Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Teixeira et al. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749 (modificado)⁵⁸.

Los amastigotes proliferan por fisión binaria en el citoplasma formándose un pseudoquiste (11).^{75,76} Cuando la cantidad de amastigotes en el interior celular es muy elevada, éstos continúan con el ciclo biológico y se diferenciarán de nuevo hasta la fase de tripomastigote (12). Esta forma tripomastigote es liberada por la rotura de la célula y puede invadir las células adyacentes o pasar a la circulación sanguínea o linfática e invadir otras regiones del organismo, principalmente bazo, hígado y músculo cardíaco (13, 14, 15a). Extracelularmente, estos tripomastigotes pueden diferenciarse hasta amastigotes que también pueden llevar a cabo la infección de macrófagos (15b). Esta mezcla morfológica presente en la circulación sanguínea puede ser ingerida por un

insecto triatomino que pique a la persona infectada (14). De esta forma el ciclo biológico de *T. cruzi* se completaría y volvería a comenzar.^{58,66,67,72}

7. Patogénesis

7.1. Fases, formas y evolución clínica

Tras la transmisión de *T. cruzi* comienza la fase aguda de la infección, la cual, como se resume en la **Figura 10**, puede seguir una evolución clínica muy variable. Esta fase suele tener una duración de entre 4 y 8 semanas y en general no muestra síntomas característicos y puede confundirse con una sintomatología gripal al presentarse como una enfermedad febril autolimitada. Los síntomas aparecen 1 ó 2 semanas después de la transmisión vectorial, o tras varios meses si la infección se produce por una transfusión de sangre contaminada. El tratamiento con BNZ durante esta fase de la enfermedad es efectivo y previene la aparición de las manifestaciones crónicas de la enfermedad en un alto porcentaje de casos. Entre el 5 y el 10% de los infectados sintomáticos pueden morir durante la fase aguda si se produce una miocarditis severa, una meningoencefalitis, o una combinación de ambas. Sin embargo, en general las manifestaciones clínicas de la fase aguda se resuelven espontáneamente en cerca del 90% de los individuos infectados, incluso en ausencia de tratamiento con fármacos tripanocidas.

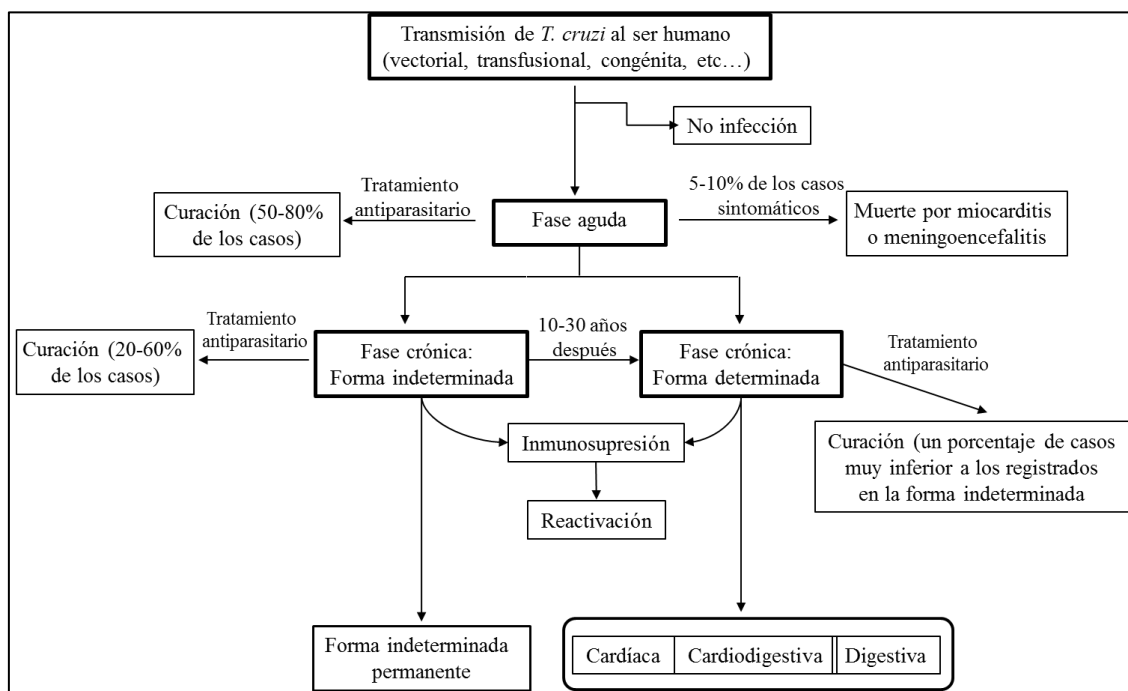


Figura 10. Cuadro resumen de la patogénesis de la Enfermedad de Chagas. Fuente: Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.: "Chagas disease". *Lancet*, 2010, 375, 1388-1402, (modificado).²⁸

Entre el 60 y el 70% de los pacientes que sobreviven a la fase aguda presentarán la forma indeterminada de la EC crónica y nunca llegarán a desarrollar las manifestaciones clínicas propias de la EC. Los pacientes que presentan la forma indeterminada muestran una serología positiva

para anticuerpos frente a *T. cruzi*, un electrocardiograma normal y un examen radiológico de los órganos diana de la enfermedad (corazón, esófago y colon) normal.^{28,52,60,77-79}

Entre el 30-40% de los infectados desarrollarán, generalmente 10-30 años después de la infección inicial, la forma determinada de la EC crónica. Durante esta fase pueden verse afectados los órganos diana de la enfermedad, lo cual se manifiesta clínicamente como una afección cardíaca, digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva.

En pacientes infectados crónicamente que se encuentren inmunológicamente deprimidos puede producirse una reactivación de la EC. Esta reactivación se observa principalmente en pacientes que muestren una co-infección con VIH o aquellos que reciban fármacos inmunosupresores.⁸⁰

7.2. Patogénesis y mecanismos patofisiológicos

La EC es una enfermedad parasitaria y esto implica una relación singular entre el parásito, *T. cruzi*, y el hospedador. *T. cruzi* depende de su hospedador para su continuidad como especie, por lo que ha co-evolucionado con éste y ha conseguido desarrollar mecanismos para evadir las diferentes respuestas inmunitarias. De esta manera, consigue perpetuarse en su organismo para seguir transmitiéndose a otros hospedadores. *T. cruzi* es capaz de permanecer muchos años en el organismo infectado causando el menor daño posible e incluso aportando una cierta inmunidad al hospedador, la cual, mantendrá generalmente la enfermedad equilibrada.

El daño sufrido por los tejidos y órganos durante la infección aguda causada por *T. cruzi* está provocado por el propio parásito y por la respuesta inmunoinflamatoria que sufre el hospedador por la presencia del parásito. Varios estudios de modelos experimentales de infección por *T. cruzi* han sugerido que una fuerte respuesta inmune T-helper-1, tanto de linfocitos CD4 como CD8, y caracterizada por la producción de citoquinas específicas como IFN- γ , FNT- α , e IL-12 es importante para el control del parasitismo. En contraste, la producción de IL-10 y el TGF- β están relacionados con la replicación parasitaria mediante la inhibición de la actividad tripanocida ejercida por los macrófagos.^{81,82} La respuesta inmune T-helper-1 tiene una función protectora principalmente a través de la formación de óxido nítrico, el cual ejerce una acción tripanocida importante.

Durante la fase crónica de la infección, el equilibrio entre la contención del parásito mediante la respuesta inmune y el daño inflamatorio sufrido por los tejidos del hospedador probablemente determina el curso de la enfermedad hacia la forma indeterminada o la forma determinada. Si la respuesta inmunológica es ineficiente, o incluso conduce a un daño en los tejidos, tanto la carga parasitaria como la inflamación inmuno-mediada incrementan.⁸³ Por el contrario, una respuesta inmune satisfactoria, en la cual, la carga parasitaria disminuye y las consecuencias inflamatorias se mantienen a un nivel mínimo, da como resultado una reducción del daño en los tejidos.

La patogénesis observada durante la fase crónica de la enfermedad no está completamente esclarecida y existen diversas teorías no excluyentes entre sí que intentan explicar las lesiones observadas en los pacientes afectados por la EC.⁸⁴ Estas discrepancias acerca del principal fenómeno causante de los daños observados durante la EC vienen determinadas en gran medida por el elevado periodo de tiempo (10-30 años) necesario para ver las manifestaciones más acusadas de la fase crónica de la enfermedad, lo cual complica en gran medida su estudio y seguimiento. Las tres teorías fundamentales defendidas por diferentes autores son:

-Teoría de la persistencia del parásito.

-Tería autoinmune.

-Teoría neurogénica.

La idea de que la persistencia del parásito es necesaria para el desarrollo de la enfermedad está muy aceptada actualmente.^{85,86} Durante años no se le dio una importancia crucial debido a que estudios en pacientes fallecidos por EC crónica por afectación cardíaca no mostraron presencia parasitaria en cortes histológicos de corazón. Sin embargo, estudios más recientes mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas, anticuerpos monoclonales frente a antígenos de *T. cruzi* y PCR han mostrado una relación entre la presencia de antígenos parasitarios y los focos de inflamación.⁸⁷ Sin embargo, no existe una certeza completa de si el daño tisular es causado principalmente por factores parasitarios directos (lisis celular por multiplicación del parásito), o si es desencadenado indirectamente por una inmunopatología asociada a la presencia del parásito o incluso por un mecanismo autoinmune.

En algunos pacientes y en modelos animales se han observado mecanismos de autoinmunidad, los cuales, podrían surgir por diferentes mecanismos como una activación policlonal, una imitación molecular por parte de antígenos del parásito o epitopos crípticos compartidos por el hospedador y el parásito.⁸⁸ Estudios experimentales mostraron que linfocitos de conejos infectados con *T. cruzi* producen una destrucción de células cardíacas embrionarias libres de parásitos en 2 horas, mientras que linfocitos no inmunizados requerían unas 72 horas. Además, los linfocitos inmunes destruían también las neuronas del intestino grueso de conejo y las miofibrillas y las neuronas del sistema nervioso parasimpático. Esto indicaba que los ataques inmunológicos eran órgano-específicos. Estos resultados indicaban que los linfocitos inmunocompetentes de los conejos infectados poseían una capacidad preformada para destruir rápidamente la célula diana. Sin embargo, al intentar crear una respuesta autoinmune similar a la observada en los enfermos de chagas inoculando antígenos de *T. cruzi* en conejos sanos, solo se obtuvieron pequeños infiltrados de linfocitos en el corazón, resultados muy alejados a los observados en conejos infectados con *T. cruzi*. Además, el establecimiento de la infección crónica por *T. cruzi* está relacionado con una depresión generalizada de la respuesta de las células T.

La llamada teoría neurogénica surgió en base a la demostración de una intensa despoblación neuronal cardíaca y una destrucción de los ganglios autonómicos intramurales que

afecta a esófago, colon o a ambos. Defiende que el trastorno del sistema parasimpático permite una hiperactividad simpática. Algunos autores achacaron esta despoblación neuronal a la acción de una neurotoxina procedente de nidos parasitarios, sin embargo nunca ha sido demostrada. Esta teoría presenta numerosas objeciones conceptuales y experimentales, las cuales incluyen la sutileza y variabilidad de la denervación cardíaca en pacientes con afectación cardíaca chagásica, la ausencia de correlación entre la denervación parasimpática y el grado de disfunción miocárdica, y el hecho de que la denervación parasimpática también se puede observar durante la fase temprana de la enfermedad.

Estas discrepancias observadas en las tres teorías ponen de manifiesto que todavía es necesario un conocimiento más profundo de la patogénesis con la que cursa la EC

8. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas observadas durante la EC 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.⁷⁹

Las principales manifestaciones clínicas en las diferentes etapas de la EC 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



Figura 11. Signo de Romaña. Fuente: areyesmed406.wordpress

veces son tratados como un proceso febril común sin la sospecha de EC. 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 11**). 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.

Fase crónica: La evolución clínica de la fase crónica de la EC 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, y produce un estreñimiento prolongado, una hinchazón abdominal, y ocasionalmente obstrucción del intestino grueso debido a fecaloma o vólvulo sigmoideo (**Figura 12**). Los pacientes con mega-esófago poseen una mayor probabilidad de sufrir cáncer de esófago.

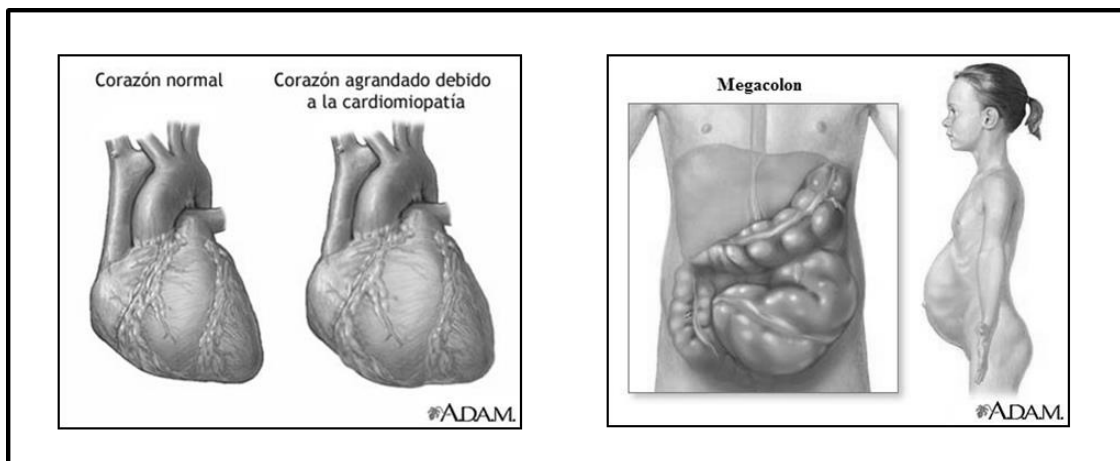


Figura 12. Manifestaciones clínicas cardíacas y digestivas durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Fuente: ADAM

La forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la EC 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 12**).

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.

9. Diagnóstico^{30,89,90}

El diagnóstico de la EC se apoya, como ocurre con otras enfermedades infecciosas, en datos clínicos, datos epidemiológicos y datos de laboratorio. En cuanto a los métodos de diagnóstico empleados en el laboratorio, éstos dependerán de la fase de la enfermedad que se sospeche sufra el paciente. La variación en la parasitemia y la respuesta inmunológica que se observan entre la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad harán que el método de elección varíe.

Durante la fase aguda de la enfermedad y en casos de reactivación en pacientes inmunodeprimidos la parasitemia es elevada, por lo tanto, los métodos de diagnóstico de primera elección serán los estudios parasitológicos. Estos métodos se basan en la búsqueda y visualización directa del parásito. En las etapas latente y crónica la presencia del parásito en la circulación sanguínea es muy escasa, de modo que los métodos empleados serán principalmente serológicos.

9.1. Diagnóstico durante la etapa aguda de la enfermedad

Los métodos de elección cuando existe la sospecha clínica o epidemiológica de infección aguda persiguen la detección directa del parásito en sangre. Existen diferentes métodos que variarán en su especificidad, sensibilidad y dificultad técnica. Los métodos más utilizados son los siguientes:

9.1.1. Métodos parasitológicos directos

-Examen directo: Se busca detectar la presencia del parásito en un frotis de gota gruesa de sangre periférica (**Figura 13**) o líquido cefalorraquídeo. Si se observa su presencia a través del microscopio el diagnóstico queda confirmado, ya que la especificidad es del 100% y no es necesario realizar más pruebas. Sin embargo, la sensibilidad es baja ya que puede dar

frecuentemente falsos negativos, debido a que el resultado depende del tamaño de la gota y del grado de parasitemia presente en ese momento.

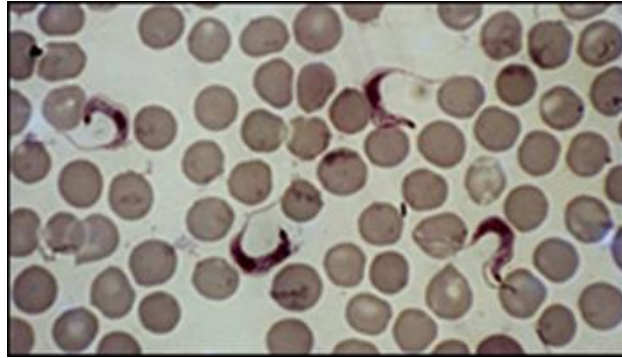


Figura 13. Forma tripomastigote de *T. cruzi* detectada en un frotis de sangre. Fuente: Coura J.R. Chagas disease: a new worldwide challenge Nature Junio 2010.

-Técnicas de concentración: Cuando el parásito no es fácilmente visible o cuando no se dispone de una cantidad elevada de sangre, como en recién nacidos, se utilizan las técnicas de concentración. Dependerán del volumen de sangre utilizado y de la concentración parasitaria. Destacan dos métodos:

-Método de Strout: Este método concentra los parásitos mediante sucesivas centrifugaciones tras dejar coagular una muestra de sangre de unos 3 mL. La especificidad es del 100% y la sensibilidad es del 95 %.

-Microhematocrito: Este método es recomendado en los recién nacidos, por la escasa cantidad de sangre utilizada. La sangre es extraída por capilaridad, mediante punción digital o plantar en tubos de microhematocrito heparinizados para evitar la coagulación. Posteriormente son sometidos a centrifugación en una microcentrífuga, quedando los parásitos en la capa de leucocitos. Posee una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95 %.

9.1.2 Métodos parasitológicos indirectos

-Hemocultivo: Consiste en la siembra de sangre venosa en un medio apropiado en busca de crecimiento parasitario. Por su baja sensibilidad (40 %), elevado tiempo necesario y escaso crecimiento del parásito no tiene utilidad en la práctica clínica.

-Xenodiagnóstico: En el xenodiagnóstico el individuo a diagnosticar es expuesto a un vector no infectado criado en el laboratorio. Posteriormente el insecto vector es examinado en busca de la presencia de *T. cruzi*. Se usa raramente en la fase aguda de la enfermedad.

9.1.3 Serología

Se puede utilizar como segunda opción si los exámenes parasitológicos negativos se repiten pero la sospecha clínica es muy elevada. En la etapa aguda la capacidad de identificar anticuerpos

se registra a partir de la cuarta semana de la infección. Habitualmente se suelen examinar respuestas IgM.

9.1.4 PCR

En los últimos años la detección de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una alternativa muy prometedora.⁹¹ Las dianas más utilizadas para detectar la presencia del parásito son el minicírculo del ADN del kinetoplasto y la secuencia repetida del ADN satélite. Este método posee una sensibilidad muy elevada y permite la detección de parásitos en la fase aguda, en los tejidos en la etapa crónica y en la transmisión congénita. Además el límite de detección es muy bajo, incluso un solo parásito, y es un método rápido y práctico en comparación con pruebas parasitológicas como el hemocultivo o el xenodiagnóstico. La PCR puede ser útil para detectar la presencia del parásito, calcular la carga parasitaria y hacer un seguimiento de un tratamiento determinado en un paciente. El inconveniente de este método de diagnóstico es que no se encuentra totalmente estandarizado y se han detectado resultados controvertidos en forma de falsos positivos. Su uso en países endémicos como rutina diagnóstica no está extendido y se utiliza principalmente en laboratorios de investigación especializados. Actualmente se están centrando los esfuerzos en lograr una puesta a punto y una estandarización correcta del método, ya que, dadas sus características debería llegar a ser el método de elección más efectivo en el futuro tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

9.2 Diagnóstico durante la etapa crónica de la enfermedad

Durante la fase crónica de la enfermedad la presencia de *T. cruzi* en sangre es transitoria, por lo que los métodos de detección directa del parásito en sangre ofrecen una sensibilidad muy baja. Pueden ser utilizados los métodos parasitológicos de hemocultivo y xenodiagnóstico, pero a pesar de presentar buena especificidad, su sensibilidad es inferior al 50%. El diagnóstico fundamentalmente se basará en métodos serológicos para la detección de anticuerpos circulantes frente a *T. cruzi*. Durante la etapa crónica predomina la respuesta de inmunoglobulinas de tipo G (IgG).

Los principales métodos serológicos utilizados son:

-Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se destaca su utilización para screening por su alta sensibilidad (97,6-100%) y especificidad (96,5-99,6%) y es actualmente el método de diagnóstico más difundido. Se utilizan kits comerciales que llevan incorporados extractos totales de *T. cruzi* y antígenos de membrana o antígenos recombinantes. Permite la detección de anticuerpos IgG frente al parásito.

-Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Presenta una sensibilidad del 98,2% en esta etapa, y su especificidad es del 98,0 %.

-Hemaglutinación indirecta (HAI): Se considera una técnica sencilla con limitaciones operativas y baja sensibilidad y especificidad (88%; 59-76%).

-Western blot: Presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97,3%.

-Ensayo de radioinmunoprecipitación: Sensibilidad y especificidad del 100% pero escasamente empleado.

-Inmunoblot recombinante: Sensibilidad del 98,2% y especificidad del 99,6%.

Empleando péptidos sintéticos se han comercializado kits de diagnóstico rápido en forma de tiras inmunocromatográficas y aglutinación en tarjeta, que en apenas 15 minutos muestran el resultado.

Debido a que ningún ensayo serológico asequible alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, la OMS recomienda utilizar al menos 2 técnicas serológicas convencionales de diferente principio, como IFI y ELISA por ejemplo, y con diferente antígeno para confirmar la infección. En caso de discrepancias se recomienda emplear una tercera técnica.

El método diagnóstico ideal para la EC todavía no existe, pero debiera de cumplir los siguientes requisitos:

- Fácil de realizar en un único paso.
- Rápido.
- Barato.
- No requerir equipamiento especial ni reactivos refrigerados.
- Sensibilidad y especificidad del 100%.

10. Tratamiento de la enfermedad

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.

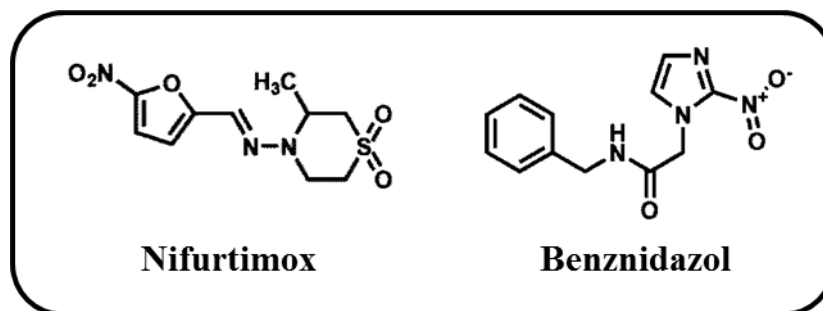


Figura 14. Fármacos utilizados en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas

En la actualidad, sólo 2 fármacos derivados de nitroheterociclos poseen un uso clínico aceptado, Nifurtimox (Nfx, Lampit®, Bayer) y Benznidazole (Bnz, Rochagan®, Radanil®, Roche), mostrados en la **Figura 14**. En el caso del Bnz, 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).^{53,54,92,93}

La actividad anti-*T. cruzi* de ambos fármacos fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas y remplazaron a nitrofuranos anteriormente utilizados como la furadantina, la nitrofurazona y la furaltadona, menos activos como agentes tripanocidas.

10.1. Limitaciones del tratamiento actual

Nfx y Bnz presentan una serie de importantes limitaciones y efectos secundarios que no son aceptables desde un punto de vista terapéutico y que demuestran su ineficacia.^{53,54,92,93} Los principales problemas que presentan estos fármacos son:

- **Efectos secundarios:**

Tanto el Nfx como el Bnz producen efectos adversos sobre los pacientes tratados. Las manifestaciones secundarias pueden incluir pérdida de peso, náuseas, vómitos, prurito, neuropatía periférica, leucopenia y neurotoxicidad, entre otras, en el caso del Nfx; en el caso del Bnz pueden presentarse edemas, fiebre, prurito, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica, dolores musculares y articulares. Ambos fármacos no deben ser administrados a mujeres embarazadas, por su potencial teratogénico, y a personas con insuficiencia renal o hepática. También ha sido comprobada su actividad carcinogénica.

- **Actividad:**

La particularidad de la patogénesis de la enfermedad complica en gran medida encontrar tratamientos totalmente eficaces frente a las diferentes fases de la enfermedad. El tratamiento con Nfx y Bnz se considera activo en la fase aguda de la enfermedad, principalmente en pacientes menores de 18 años, alcanzando un nivel de curación cercano al 80% en niños y cercano al 100% en recién nacidos en casos de transmisión congénita. Sin embargo, en la fase crónica de la enfermedad, con un historial de infección superior a 10 años, su eficacia disminuye mucho. En este caso, el tratamiento se recomienda en pacientes con una edad entre 19 y 50 años que todavía no han experimentado las manifestaciones de la fase crónica de la enfermedad. En pacientes de más edad la eficacia no ha sido probada y, debido a los problemas asociados al tratamiento, éste se considera opcional. Cuando los pacientes crónicos presentan un daño coronario severo o un cuadro de megaesófago avanzado el tratamiento con estos fármacos no se recomienda. De todas formas, Bnz parece mostrar un mejor comportamiento que Nfx en la fase crónica de la enfermedad, sin llegar a curar totalmente. Pacientes crónicos tratados con Bnz mostraron una menor incidencia de problemas cardíacos y un menor deterioro de su situación

clínica. Este hecho puede explicarse por la reducción del número de parásitos en los tejidos infectados, lo cual conllevaría un proceso inflamatorio menos acusado.

- **Dosificación:**

La dosificación del tratamiento con estos fármacos es complicada si se tienen en cuenta las características sociales de los afectados y la dificultad que tienen para acceder al tratamiento. En el caso del Nfx, se requieren periodos de tratamiento de 90 días, con una dosis de 8-10 mg/kg/día. En el tratamiento con Bnz se debe tomar una dosis de 5 mg/kg/día durante 30-60 días en caso de infección aguda. Si se trata de una reactivación de la infección crónica, el tratamiento requerido puede durar más de 5 meses. Estos largos periodos de tratamiento dificultan que los tratamientos se completen.

- **Aparición de resistencias:**

Los efectos terapéuticos de Nfx y Bnz en la infección chagásica presentan diferencias importantes, lo que se puede explicar, en parte, por la existencia de cepas de *T. cruzi* con una susceptibilidad diferente a los fármacos, o lo que es lo mismo, con resistencia a los fármacos. Además, el difícil seguimiento del tratamiento y su prematura detención también contribuye a la aparición de parásitos resistentes. Las diferentes respuestas de *T. cruzi* a los fármacos sugieren la existencia de diferencias moleculares entre las diferentes cepas del parásito. Entre estas propiedades moleculares se encuentran las dependientes de isoenzimas y de los marcadores genéticos. La diversidad genética de *T. cruzi* y su diferente distribución geográfica provoca que el tratamiento muestre una diferente eficacia en función del lugar de origen de la persona afectada.

Estas importantes limitaciones ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando para obtener nuevos fármacos más eficaces y específicos frente a la EC.

10.2. Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazole

A pesar de utilizarse desde hace más de 40 años, el mecanismo de acción mediante el cual Nfx y Bnz causan daño sobre el parásito sigue siendo un tema de discusión y su conocimiento es todavía insuficiente.⁹⁴ Históricamente, se aceptó que Nfx y Bnz actúan como pro-fármacos que deben ser activadas *in vivo* por un proceso enzimático de bio-reducción del grupo nitro. Esta nitro-reducción conllevaría la formación de especies reactivas de oxígeno y/o metabolitos electrofílicos que causarían el daño sobre el parásito. Estos mecanismos se apoyaban en la creencia de que *T. cruzi* era un organismo deficiente en cuanto a sistemas defensivos frente al estrés oxidativo.⁹⁵

En el caso del Nfx, el proceso comenzaría con una reducción, vía un electrón, catalizada por nitroreductasas de tipo II sobre el grupo nitro de las moléculas de tipo R-NO₂, produciendo un radical nitro-anión intermedio (R-NO₂[•]). En presencia de oxígeno, este radical sufriría un ciclo que genera aniones superóxido y regeneraría la molécula. El anión superóxido sufriría entonces una reacción de dismutación, catalizada por una superóxido dismutasa, que generaría O₂ y H₂O₂. El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno formados, en presencia de Fe³⁺,

formarían el potente radical hidroxilo (OH^{\bullet}) a través de la reacción de Habber-Weiss. Esta generación de radicales libres en forma de especies reactivas de oxígeno conllevaría a un estrés oxidativo que, junto con la acción dañina directa provocada por el radical OH^{\bullet} sobre lípidos, proteínas y ADN, produciría el daño sobre el parásito.⁹⁶⁻⁹⁸

A diferencia del Nfx, el mecanismo tripanomicida propuesto para el Bnz no dependería de especies reactivas de oxígeno. En experimentos realizados para determinar el mecanismo de acción no se observó la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 a concentraciones de Bnz que producían inhibición del crecimiento de epismastigotes. Lo que se propuso es que los metabolitos reducidos electrofílicos del BNZ son los responsables de su efecto tripanomicida por uniones covalentes a macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.^{97,99} Otros estudios indicaron que el Bnz es capaz de potenciar la fagocitosis, incrementar la muerte de *T. cruzi* por la acción del Interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) e inhibir la NADH-fumarato reductasa del parásito.^{100,101}

Nuevos estudios llevados a cabo en los últimos años han conducido a discutir los mecanismos de acción históricamente propuestos para Nfx y Bnz y la capacidad del parásito para enfrentarse al estrés oxidativo. Recientemente, se han identificado dos nuevas enzimas parasitarias capaces de llevar a cabo la reducción de Nfx y Bnz en un proceso mediado por dos electrones. La primera de ellas es la denominada Old Yellow Enzyme, una prostaglandina $\text{F}_2\alpha$ sintasa cuya actividad oxidoreductasa tiene lugar únicamente en condiciones anaerobias y su acción no forma especies reactivas de oxígeno. La otra enzima identificada es una Nitroreductasa de tipo I que utiliza flavín mononucleótido (FMN) como cofactor, de localización mitocondrial, y que es capaz de reducir el grupo nitro de Nfx y Bnz, además de otros muchos compuestos con estructura relacionada, generando un intermedio nitroso que rápidamente sufre una nueva reducción para dar el derivado de hidroxilamina. Empleando líneas de *T. cruzi* con niveles alterados de esta enzima se demostró una clara conexión entre esta actividad nitroreductasa y la activación del Nfx.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Este proceso no requiere la participación de oxígeno y, por lo tanto, no se forman especies reactivas de oxígeno. El intermedio hidroxilamina puede ser transformado posteriormente en tres productos finales correspondientes a la forma amina, que se piensa que es inerte, cationes nitronio, capaces de dañar el ADN, y nitrilos saturados e insaturados de cadena abierta por la rotura del anillo de furano, tóxicos para *T. cruzi*.¹⁰⁵

La acción del Nfx mediante la producción de especies reactivas de oxígeno se apoyaba también en la creencia de que *T. cruzi* era un organismo con sistemas de defensa deficientes frente al estrés oxidativo. Sin embargo, los avances en el conocimiento bioquímico de *T. cruzi* en los últimos años han llevado a la conclusión de que los tripanosomas presentan un complejo y efectivo sistema para luchar frente al estrés oxidativo.

El sistema antioxidante de *T. cruzi* está formado por una serie de enzimas y moléculas con actividad redox no enzimática que se encuentran distribuidas en el retículo endoplasmático, glicosomas, mitocondria y citosol. El donador de electrones final para todos los sistemas

enzimáticos que intervienen en la detoxificación en el NADPH. Las moléculas reducibles participantes en los sistemas redox de detoxificación son la tripanotona, glutatión, ascorbato y triparedoxina.^{106,107}

A diferencia con todos los eucariotas, los tripanosomátidos carecen de catalasa (excepto *Crithidia fasciculata*) y glutatión peroxidasa. La ausencia de metabolismo de H₂O₂ glutatión-dependiente fue considerada durante mucho tiempo como una diana en el diseño de compuestos anti-*T. cruzi* a través del incremento de las concentraciones basales de H₂O₂ intracelulares. Sin embargo, recientemente, se han identificado 5 peroxidasa en *T. cruzi*, las cuales son capaces de detoxificar eficazmente H₂O₂, hidroperóxidos orgánicos de cadena corta y peroxinitrito. Al igual que en eucariotas superiores, la eliminación de O₂^{•-} en *T. cruzi* está basada en la actividad de superóxido dismutasas, con la diferencia de que las de *T. cruzi* pertenecen a las que poseen Fe como cofactor, un grupo restringido a protozoos, procariotas y plantas.^{95,105,106,108}

Estos nuevos hallazgos parecen indicar que el proceso de bio-reducción mediado por nitroreductasas de tipo I es importante en la activación de este tipo de compuestos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual Nfx y Bnz desarrollan el daño sobre el parásito necesita una mayor profundización, ya que, la teoría del estrés oxidativo, debido al buen sistema defensivo que el parásito posee, no parece explicar la actividad observada en su totalidad.

11. Diseño de nuevos fármacos frente a *Trypanosoma cruzi*

Los puntos tratados en el apartado anterior ponen de manifiesto la urgente necesidad de obtener nuevas moléculas activas frente al parásito y que presenten menos limitaciones que los actualmente utilizados.

En los últimos años se ha producido un importantísimo avance en el conocimiento de la bioquímica y la biología molecular y celular de *T. cruzi*. Este conocimiento, junto a la secuenciación completa del genoma de *T. cruzi* en el año 2005, ha permitido identificar una serie de dianas moleculares y rutas metabólicas específicas de *T. cruzi* susceptibles de ser atacadas por nuevas moléculas. Sin embargo, el diseño de nuevos fármacos sigue siendo complejo y requiere la colaboración multidisciplinar de diferentes grupos especializados.¹⁰⁹

El diseño racional de nuevos fármacos o la utilización de estructuras conocidas con diferente uso a partir de este conocimiento, ha proporcionado compuestos prometedores que se encuentran en diferentes fases de desarrollo.

11.1. Dianas moleculares estudiadas en *T. cruzi*

Las principales dianas moleculares y rutas metabólicas susceptibles de ser inhibidas, junto a los compuestos más prometedores se describen a continuación.

11.1.1. Inhibición de la biosíntesis del ergosterol

T. cruzi requiere, para su viabilidad celular y proliferación en sus diferentes estadios vitales, 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 la esteroide-C14 α -demetilasa, una enzima de la ruta biosintética del ergosterol.¹¹⁰⁻¹¹² Algunos ejemplos son D0870 (Zeneca Pharmaceuticals), Posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute) y Tak-187 (Takeda Chemical Company) (**Figura 15**). El posaconazol ha sido aceptado como agente antimicótico en Estados Unidos, Europa y Australia, por lo que se sería factible probarlo en pacientes con la EC y actualmente se encuentra en fase II de desarrollo clínico.¹¹³⁻¹¹⁵

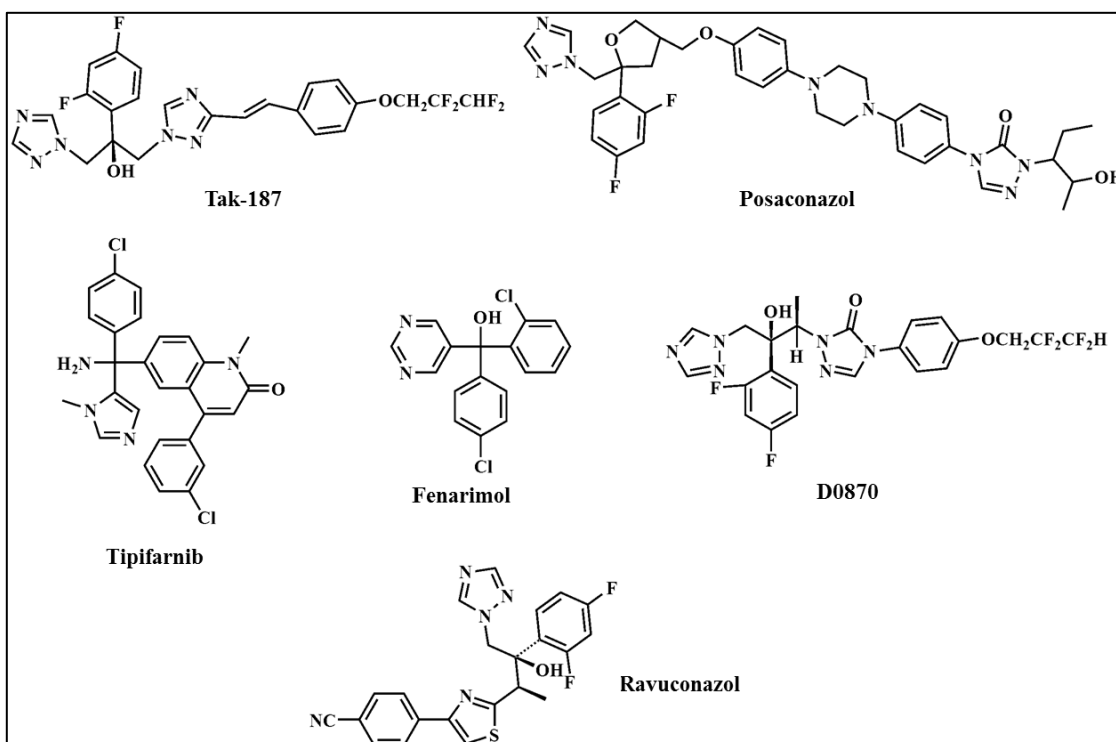


Figura 15. Nuevos triazoles inhibidores selectivos de la esteroide-C14 α -demetilasa más interesantes como potenciales agentes antichagásicos.

Otro compuesto que presenta resultados prometedores es el Tipifarnib (Johnson & Johnson) (**Figura 15**), un compuesto que se encuentra en ensayos clínicos de fase III como agente antitumoral y que se ha visto que presenta una actividad *in vitro* anti-*T. cruzi* muy elevada. Derivados del fenarimol también han mostrado una buena actividad inhibitoria sobre la esteroil-C14 α -demetilasa y se encuentran en desarrollos preclínicos. Cabe destacar otro derivado del triazol, el ravuconazol (**Figura 15**), ya que actualmente se encuentra en ensayos clínicos el compuesto E1224 (EISAI Farmacéutica S.A.), una prodroga del ravuconazol.¹¹⁶

11.1.2. Inhibición del metabolismo del pirofosfato

Los tripanosomátidos poseen unos orgánulos celulares específicos, denominados acidocalcisomas, 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 Ca²⁺-ATPasa, un intercambiador de Na⁺/H⁺, bombas de H⁺ dependientes de ATP y pirofosfatasas.¹¹⁷

Los bisfosfonatos (utilizados en el tratamiento de la osteoporosis, **Figura 16**) 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.^{118,119} Esto lleva a considerar a estos compuestos utilizados en la osteoporosis como líderes para el diseño de nuevos compuestos activos frente a *T. cruzi*.^{54,111,112}

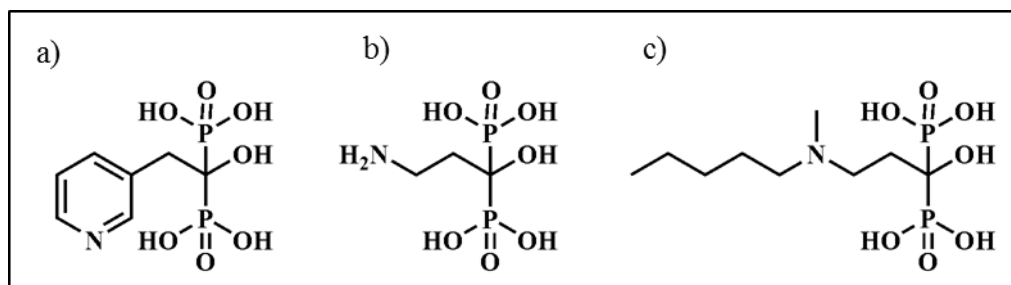


Figura 16. Estructura de bisfosfonatos con actividad específica frente a *T. cruzi*. a) Risedronato; b) Pamidronato; c) Ibandronato.

11.1.3. Inhibidores de la cruzipaina

La cruzipaina 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 cruzipaina 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

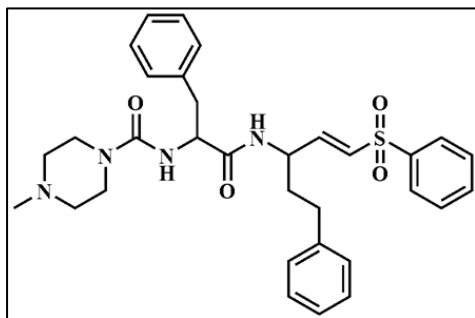


Figura 17. Estructura de K777, potente inhibidor de la cruzipaina.

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.^{30,53,54,120}

En 2002, el instituto One World Health y los National Institutes of Health de Estados Unidos iniciaron el desarrollo de la vinilsulfona K777 (**Figura 17**) como nuevo tratamiento antichagásico.^{121,122} 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.¹²³

11.1.4. Inhibidores de la síntesis y el metabolismo de la tripanotona

Otra ruta bioquímica específica identificada en protozoos quinetopláctidos es la síntesis y el metabolismo redox de la tripanotona (N_1, N_8 -bis (glutacionil)-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.^{30,124,125} La estructura tridimensional

de enzimas como tripanotona reductasa y tripanotona sintasa ha sido determinada por cristalografía de rayos X.¹²⁶

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 18**), 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 18**), 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.

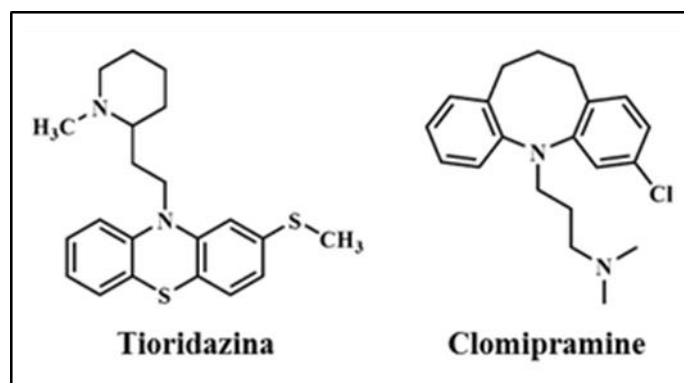


Figura 18. Tioridazina y Clomipramine, inhibidores del metabolismo de la tripanotona.

Los estudios de inhibidores específicos se encuentra actualmente en pleno progreso y su profundización es muy importante, ya que ha quedado demostrado que la ruta de síntesis y metabolismo de la tripanotona es esencial para la supervivencia del parásito.

11.1.5. 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 huésped. Una vez captadas las incorporan al metabolismo de sus ácidos nucleicos. En esta ruta metabólica se

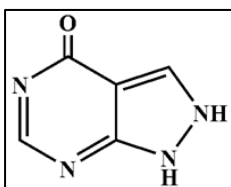


Figura 19. Estructura del allopurinol.

ha conseguido identificar y validar una diana terapéutica, la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT)⁵³. El fármaco más estudiado como inhibidor de esta vía es el allopurinol (**Figura 19**), 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.¹²⁴ 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.

11.1.6. 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 huésped 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.^{54,127} Fruto de este interés han sido identificados numerosos inhibidores de la trans-sialidasa de *T. cruzi*.¹²⁸⁻¹³⁰

11.2. Situación actual del desarrollo de fármacos antichagásicos^{116,131}

A pesar de todo el conocimiento que se posee y la multitud de nuevos compuestos prometedores sintetizados, la realidad es que el desarrollo de nuevos fármacos es escaso y como se resume en la **Figura 20** sólo unos pocos candidatos han llegado hasta las fases clínicas de desarrollo. Por el momento, el máximo desarrollo lo ha alcanzado una nueva dosificación del benznidazol para el tratamiento de la enfermedad en niños menores de 2 años, que ya se utiliza con éxito en pacientes y se está llevando a cabo su seguimiento en fase IV de desarrollo clínico en Argentina, en el Hospital General de Niños Ricardo Gutiérrez y en el Hospital de Niños Doctor Héctor Quintana con la colaboración de la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi) y de la organización privada LAT Research.

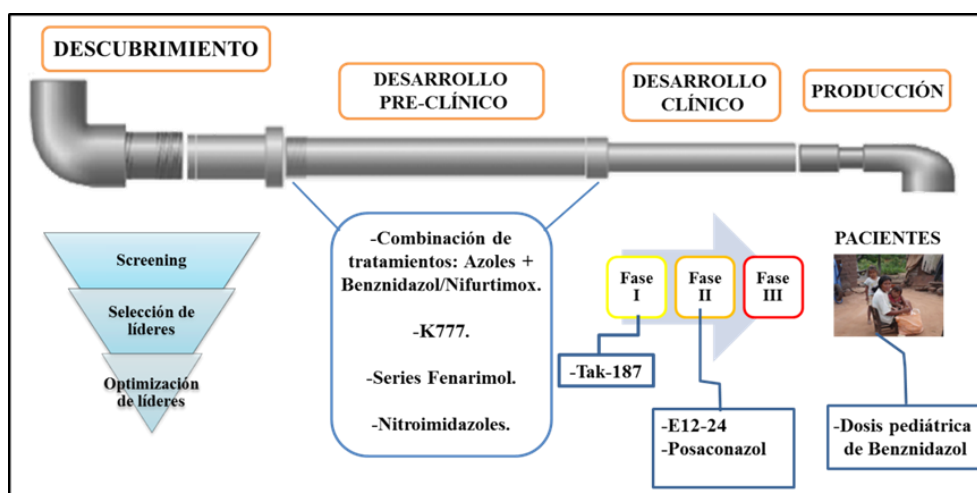


Figura 20. Desarrollo de nuevos fármacos frente a la enfermedad de Chagas.

Los compuestos más prometedores como nuevos agentes antichagásicos son E1224, un tratamiento combinado de Posaconazol y Beznidazol, y Tak-187, todos ellos derivados de triazol inhibidores selectivos de la esterol-C14 α -demetilasa.

-E1224: El Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRESIB) junto a la Plataforma de Tratamiento Integral de Pacientes con Chagas, dentro del proyecto colaborativo con el "Colectivo de Estudios Aplicados y Desarrollo Social" (CEADES), la Universidad Mayor San Simón y la Universidad Autónoma San Misael Caracho, en Bolivia, están llevando a cabo ensayos clínicos de fase II desde 2011 en Bolivia, en coordinación con la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi). El proyecto está financiado por la fundación Wellcome Trust.¹³² (<http://www.isglobal.org/-/clinical-trial-of-new-drug-for-chronic-chagas-disease>).

-Posaconazol: Ha llegado hasta ensayos clínicos de fase II, desarrollados en la Unidad de Medicina Tropical e Internacional del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, dentro del Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de Salud (PROSICS). Actualmente, también se encuentra en periodo de reclutamiento en Argentina, Chile, Colombia y Méjico para llevar a cabo ensayos de fase II para evaluar su actividad frente a la fase crónica asintomática bajo la supervisión de Merck Sharp & Dohme y la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina.

-Tak-187: Se ha completado la fase I de desarrollo clínico.

12. Vacuna frente a la enfermedad de Chagas

En las regiones del continente Americano donde la transmisión vectorial de *T. cruzi* tiene una elevada incidencia, ésta no es fácil de erradicar mediante el uso de insecticidas. En esta situación, ante la falta de otra medida de prevención, los habitantes de estas regiones están condenados a contraer la EC. Si a esto le sumamos la ineficacia de los tratamientos comerciales disponibles, estos individuos no tienen forma de prevenir ni de tratar la enfermedad. Ante este panorama, el desarrollo de una vacuna contra la infección podría ser una estrategia muy eficaz para reducir la incidencia de la EC.

El esfuerzo por desarrollar una vacuna eficaz para humanos frente a la EC todavía no ha dado resultados satisfactorios. La hipótesis del componente autoinmune de la enfermedad durante su fase crónica y la falta de financiación frenaron durante mucho tiempo el estudio en este campo. Además, debido al éxito de las medidas de control, numerosos grupos, piensan que es más conveniente invertir los esfuerzos en la búsqueda de nuevos agentes inmunoterapéuticos para evitar la infección de animales domésticos o peridomésticos, potenciales reservorios de *T. cruzi*, y de esta manera frenar esa vía de transmisión.¹³³ De hecho, recientemente se ha creado una vacuna que parece proteger eficazmente a los animales domésticos de la infección con *T. cruzi*.¹³⁴

Una vacuna eficaz para el hombre frente a la infección por *T. cruzi* debe cumplir 4 requisitos básicos:

1-La vacuna debe conferir una esterilidad total. Esta protección total se exige por las características de la fase crónica de la enfermedad, ya que la presencia de un bajo número de parásitos es capaz de provocar graves problemas en diferentes órganos.

2-Debido a la variabilidad genética de *T. cruzi*, la vacuna debe ser eficaz frente a los diferentes linajes del parásito.

3-La vacuna no debe provocar una respuesta autoinmune. En el caso de la EC este aspecto se debe tener en cuenta, ya que, es posible que fracciones y antígenos de *T. cruzi* induzcan manifestaciones de la fase crónica de la enfermedad sin haber infección.

4-La vacuna debe ser eficaz en modelos animales experimentales con un comportamiento patogénico y una respuesta inmune similar a la del hombre. El modelo universalmente adoptado fue el murino, sin embargo, se ha demostrado que se queda muy limitado por el diferente comportamiento que presenta frente a *T. cruzi* con respecto al hombre.

Las diferentes estrategias seguidas en la búsqueda de una vacuna eficaz en el hombre incluyen:

-Inducción de protección mediante inmunizaciones previas. Para ello se han utilizado antígenos atenuados provenientes de cultivos de la forma no patogénica de *T. cruzi* presente en el insecto, cepas de *T. cruzi* atenuadas por radiación, fracciones subcelulares y antígenos celulares y de la superficie celular, purificados de *T. cruzi* u otros tripanosomátidos. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios en cuanto a la reducción de la mortalidad y la carga parasitaria.¹³⁵

-En los últimos años, las vacunas de ADN han abierto un nuevo campo de investigación. Se ha demostrado que vacunas de ADN, creadas mediante la inserción de genes de superficie de *T. cruzi* en un plásmido, estimulan la inmunidad de tipo 1, produciendo una protección total contra cepas virulentas de *T. cruzi* y en principio son capaces de inmunizar al individuo vacunado durante toda su vida.¹³⁶⁻¹³⁹

-Uso de fragmentos antigénicos de proteínas conocidas de *T. cruzi*. Se empleó el dominio N-terminal de cruzipáina con el que se consiguió redirigir la respuesta inmune del huésped para mejorar la protección frente a la infección por *T. cruzi*. La enzima trans-sialidasa también ha demostrado ser útil para la inmunización de animales.^{140,141}

II. QUINOXALINAS Y CHAGAS

13. Quinoxalina, molécula con un amplio espectro de actividades biológicas

Las quinoxalinas, también denominadas 1,4-benzodiazinas, son biciclos aromáticos que presentan dos nitrógenos en las posiciones 1 y 4 (**Figura 21**). Los derivados de quinoxalina son estructuras con un amplio rango de actividades biológicas y su interés en el campo de la química médica continúa en progreso.

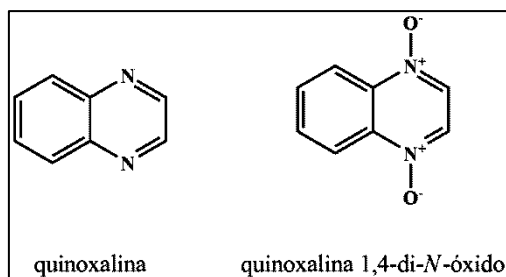


Figura 21. Estructura de la quinoxalina y la quinoxalina 1,4-di-N-óxido

Se han descrito multitud de derivados de quinoxalina con actividades biológicas interesantes como agentes anticancerosos,¹⁴²⁻¹⁴⁸ antituberculosos,^{145-147,149-153} antitrombóticos,^{154,155} analgésicos,¹⁵⁴⁻¹⁵⁹ antiinflamatorios o antioxidantes.^{160,161} En las **Figuras 22** y **23** se muestran derivados de quinoxalina estudiados por diferentes grupos de investigación y que han mostrado buenas actividades biológicas en diferentes enfermedades.

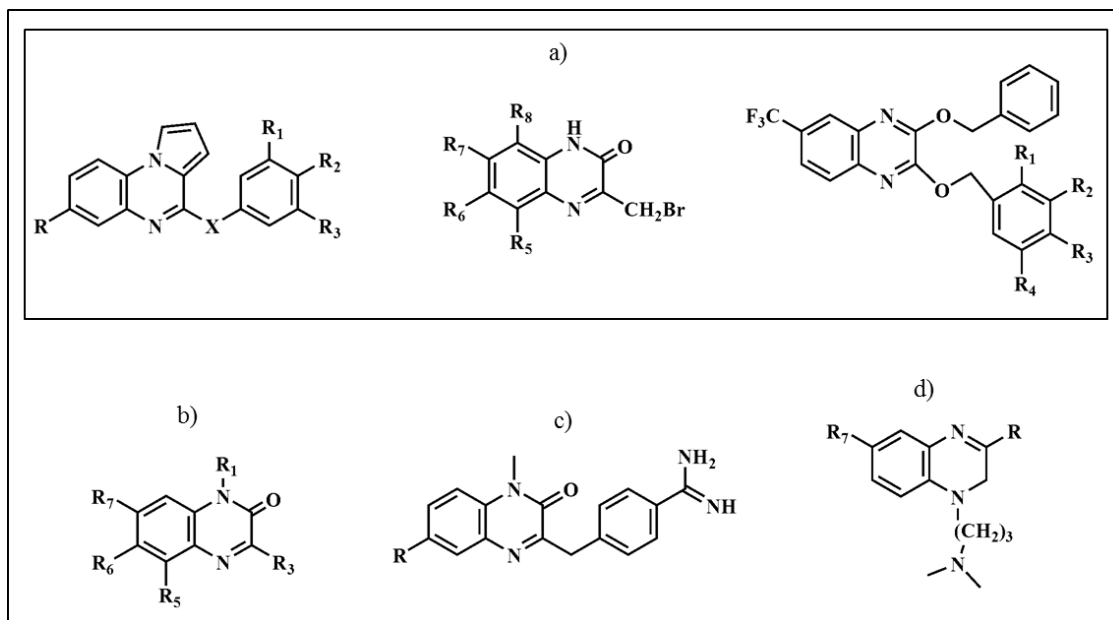


Figura 22. Estructura de derivados de quinoxalina con actividades biológicas: a) anticancerosa; b) antituberculosa; c) antitrombótica; d) analgésica.

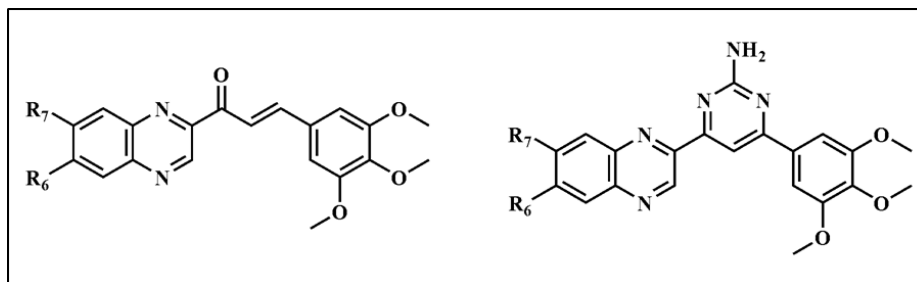


Figura 23. Derivados de quinoxalina con actividad antiinflamatoria y antioxidante.

También se han publicado muchos artículos en los que derivados de quinoxalina, como las quinoxalinonas, se estudian como agentes con actividad sobre el sistema nervioso central (**Figura 24**).¹⁶²⁻¹⁶⁵

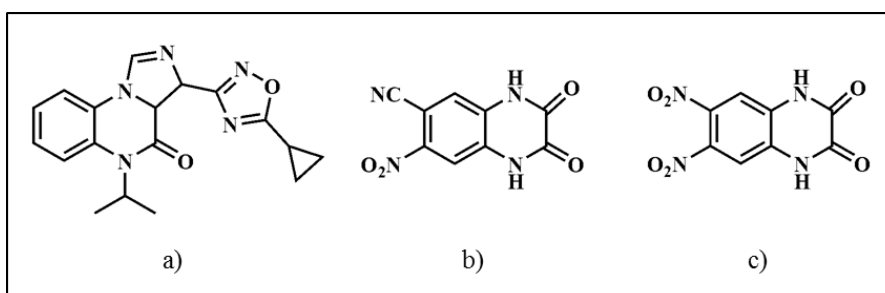


Figura 24. a) Estructura de una quinoxalinona tricíclica con actividad ansiolítica; b) Estructura de derivados de quinoxalinona que poseen actividad inhibitoria sobre los receptores AMPA.

También se han publicado diversos derivados de quinoxalina como potenciales agentes antivirales. Alguno de estos compuestos posee actividad inhibitoria frente al enzima transcriptasa inversa de VIH-1, como es el caso del compuesto representado en la **Figura 25**.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

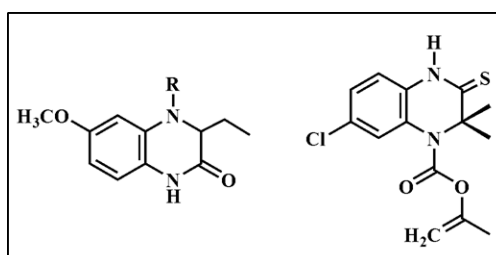


Figura 25. Derivados de quinoxalina que han mostrado actividad como inhibidores de la Transcriptasa Inversa de VIH-1.

La oxidación de ambos nitrógenos del anillo de quinoxalina para la obtención de los derivados de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido (**Figura 26**), amplía el espectro de actividades biológicas observadas.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Existe una extensa bibliografía que describe como derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido presentan una mayor actividad que sus respectivos análogos reducidos. Además, se asocian con importantes actividades anticancerosas,^{172,173} anticandida^{153,174-176} y antibacterianas.^{152,174,177-179}

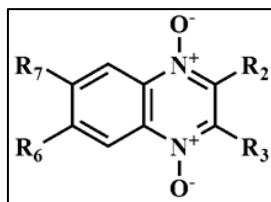


Figura 26. Estructura general de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido.

Desde los años 40 es conocida la actividad antibacteriana de los derivados di-oxidados y mono-oxidados frente a muchas bacterias Gram (+) y Gram (-). Comercialmente, derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido como Carbadox (a), Olaquinox (b) y Mequinox (c) (Tabla 3) se han utilizado a concentraciones subterapéuticas como potenciadores del crecimiento animal en aditivos nutritivos por su actividad antibacteriana.^{178,180-183}

Tabla 3. Derivados de quinoxalina con actividad antibiótica.

DERIVADO DE QUINOXALINA	ACTIVIDAD
	Activo frente a <i>Trichomonas vaginalis</i> y <i>Candida albicans</i>
a)	Aditivo en piensos animales y actividad antibacteriana
b)	Aditivo en piensos animales y actividad antibacteriana
c)	Aditivo en piensos animales y actividad antibacteriana

Nuestro grupo ha descrito ampliamente derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido con una actividad selectiva frente a células hipóxicas que forman parte de tumores sólidos (Figura 27).¹⁸⁴⁻

191

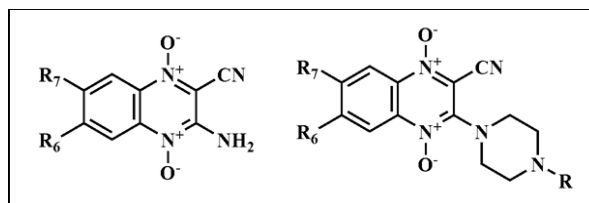


Figura 27. Derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido que presentan actividad citotóxica selectiva sobre células hipóxicas.

14. Quinoxalinas y enfermedades olvidadas

Como se ha comentado, la enfermedad de Chagas pertenece al denominado grupo de enfermedades olvidadas. El anillo de quinoxalina se ha descrito como un bioisómero de

estructuras como la quinoleína, naftaleno, benzotiofeno, pirazina y piridina (**Figura 28**), de actividad conocida frente a este tipo de enfermedades infecciosas. La quinoleína posee una importante actividad antibiótica y es la base de potentes agentes antimaláricos como la cloroquina y la mefloquina. La pirazina es la base de agentes antituberculosos como la pirazinamida. La isoniazida es un potente antituberculoso. Estos ejemplos demuestran que nos encontramos ante un tipo de estructuras con una potencial actividad en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas olvidadas.^{170,192}

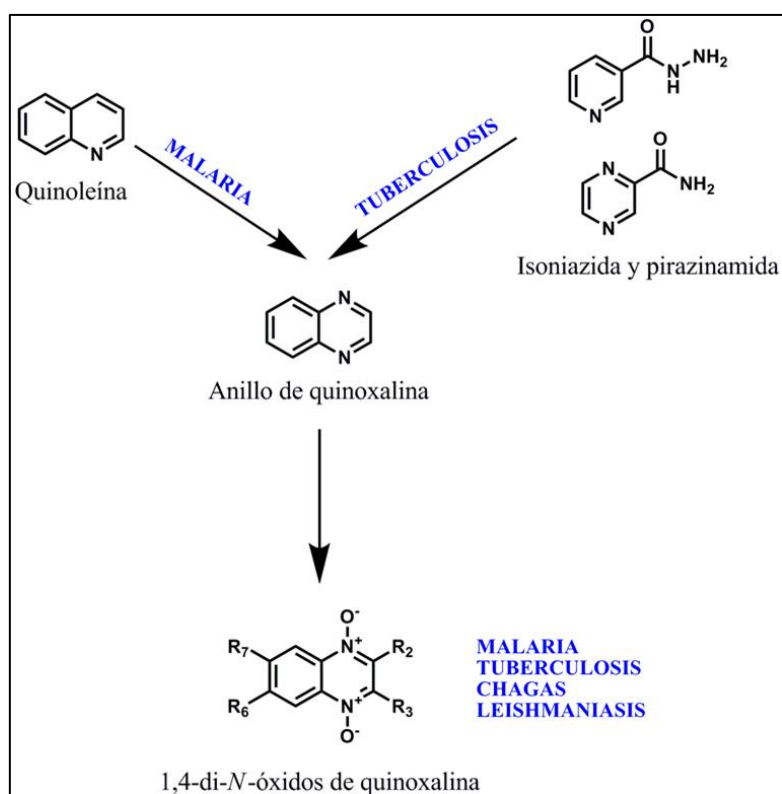


Figura 28. Quinoxalinas y sus principales bioisómeros activos en enfermedades olvidadas.

Desde hace años nuestro grupo de investigación está trabajando en la búsqueda de nuevas estructuras activas frente a este grupo de enfermedades mediante métodos de síntesis sencillos y económicamente viables y empleando como estructura base la quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. Como resultado de diversos proyectos de investigación, el grupo de trabajo ha sintetizado diferentes series de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, con una gran variedad de sustituyentes en las posiciones 2, 3, 6 y 7, obteniendo estructuras con interesantes actividades *in vitro* en tuberculosis,¹⁹³⁻²⁰⁵ malaria,²⁰⁶⁻²¹⁴ enfermedad de Chagas^{123,215-218} y leishmaniasis.^{211,212,219,220} En la posición 2, el grupo de trabajo ha sintetizado principalmente derivados que presentan grupos carbonitrilo, cetona, éster y amida. Los sustituyentes más habitualmente introducidos en la posición 3 son el grupo metilo, fenilo, piperazina y trifluorometilo. En las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina se introducen tanto grupos electrodonantes (metilo y metoxi) como grupos electrotrayentes (cloro, flúor y trifluorometilo).

En las **Figuras 29, 30 y 31** se muestran algunos de los derivados más interesantes obtenidos por el grupo en los diferentes proyectos desarrollados dentro del marco de las enfermedades olvidadas.

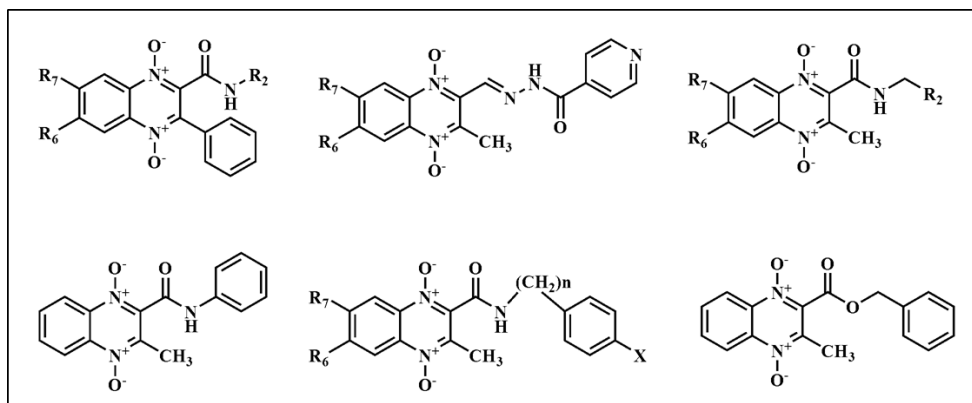


Figura 29. Compuestos sintetizados por nuestro grupo con actividad *in vitro* frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

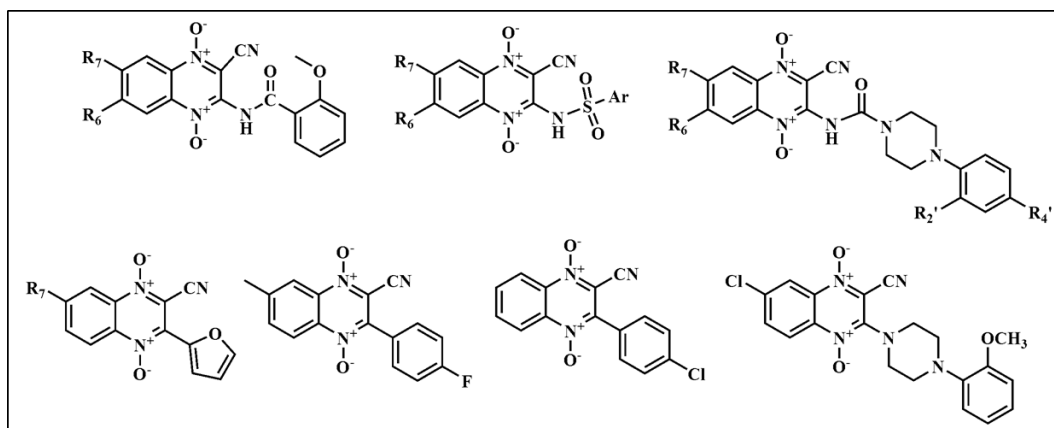


Figura 30. Compuestos sintetizados por nuestro grupo como potenciales agentes antimaláricos.

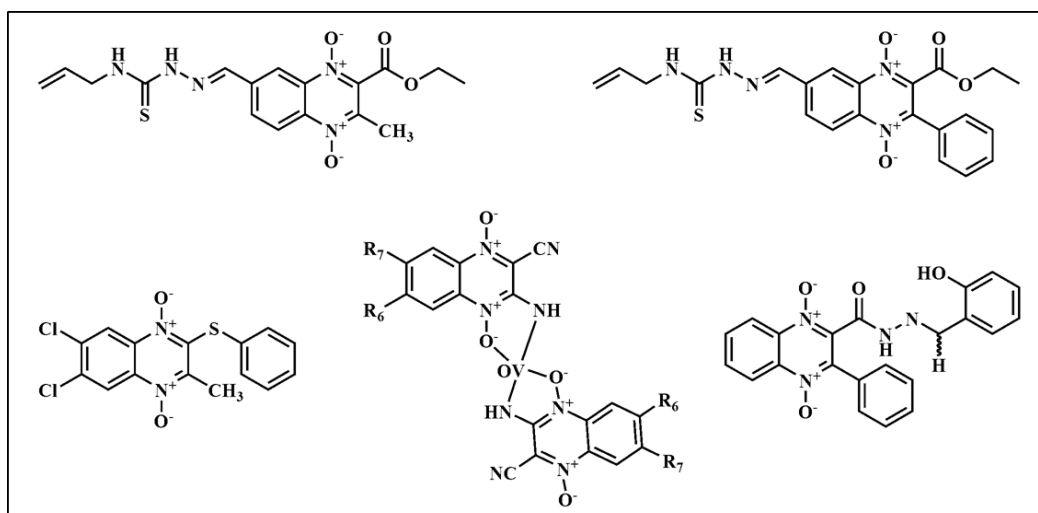


Figura 31. Algunos derivados de quinoxalinas publicadas con interesantes resultados de actividad frente a *T. cruzi*.

14.1. Quinoxalinas y enfermedad de Chagas, búsqueda de nuevos derivados con actividad antichagásica llevada a cabo por el grupo de trabajo

En los últimos años el grupo de investigación en colaboración con el grupo del Dr. Cerecetto y la Dra. Mercedes González de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), ha apostado por el diseño, síntesis y evaluación biológica de múltiples derivados de quinoxalinas como posibles agentes antichagásicos formando parte de la Red Iberoamericana de Investigación, Desarrollo e Innovación de Medicamentos Anti-Chagas (RIDIMEDCHAG). El grupo colaborador de la Universidad de la República cuenta con una amplia experiencia en el diseño y síntesis de nuevas estructuras *N*-oxidadas como potenciales agentes con actividad frente a *T. cruzi*.^{95,169,221-247}

Gracias a la colaboración establecida, diferentes series de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido han sido sintetizados y evaluados por el grupo y el grupo del Dr. Cerecetto como potenciales agentes antichagásicos durante los últimos años. La información adquirida gracias a la evaluación de una alta variabilidad de estructuras ha permitido llevar a cabo un estudio de relación estructura-actividad (SAR). Gracias a este estudio se establecieron una serie de requerimientos estructurales importantes para la actividad antichagásica, lo cual, llevó a establecer una estructura base líder sobre la que se basa el trabajo presentado.

En las **Tablas 4-10** se presentan clasificados por estructura los 106 derivados de quinoxalina evaluados frente a *T. cruzi* por el grupo desde el año 1999. Se muestran los diferentes sustituyentes presentados por los derivados y los valores de porcentaje de inhibición del crecimiento a una concentración de 25 micromolar (%INH 25 (μ M)) y la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en el caso de los compuestos más activos. Los 106 compuestos evaluados frente a *T. cruzi* fueron previamente diseñados y evaluados por nuestro grupo frente a diferentes enfermedades.^{186,187,189,190,196,198,200-203,205-207,209,217,218,248-251}

Como se muestra en las **Tablas 4, 5, 6 y 7**, un total de 62 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido que poseían el grupo carbonitrilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina fueron evaluados *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Los derivados presentaban diferentes sustituyentes en la posición 3 del anillo de quinoxalina:

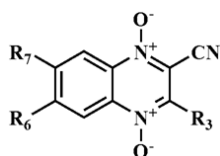
- Aminas primarias, secundarias o cíclicas (**Tabla 4**).
- Amidas unidas a furilo o tienilo sin sustituir o sustituidos por el grupo nitro (**Tabla 5**).
- Grupo furilo o tienilo (**Tabla 6**).
- Grupo fenilo sin sustituir o sustituido en posición *para* por átomos electroatrayentes (**Tabla 7**).

En las posiciones R₆ y/o R₇ los derivados presentaban sustituyentes electrodonantes (CH₃ y CH₃O), electroatrayentes (Cl, F y CF₃), o no presentaban sustituyentes (diH).

Se observó que los compuestos sustituidos por aminas y amidas en la posición 3 del anillo de quinoxalina (**Tablas 4 y 5**) mostraron malos resultados de actividad *in vitro* frente a *T. cruzi*, a excepción de los compuestos **14, 16 y 22**.

El compuesto **14** (**Tabla 4**) fue claramente el más activo de su serie, y éste, se diferencia del resto de compuestos de su serie por la presencia de una fenilpiperazina sustituida en posición 3 por un grupo trifluorometilo. Se observó que el compuesto **12**, análogo al compuesto **14** pero presentando una fenilpiperazina sustituida por un grupo nitro en posición *para*, presentaba una actividad prácticamente nula frente a *T. cruzi*. La misma observación se podía extraer de los compuestos **10, 11 y 13** de la **tabla 1**, que también presentaban fenilpiperazinas sustituidas en posición *para* por grupos nitro y que mostraban una baja actividad biológica frente al parásito.

Tabla 4. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-N-óxido **1-16**.



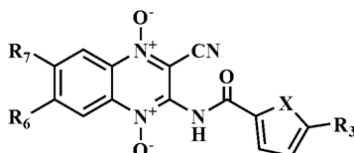
Comp.	R ₃	R ₆	R ₇	%INH (25 μM)	%INH (5 μM)
1	NH ₂	H	H	25	-
2	NH ₂	H	CH ₃	5	-
3	NH ₂	H	R-CONHN=CH-	11	-
4	NH ₂	H	R-CONHN=CH-	20	-
5	NH ₂	H	R-CONHN=CH-	19	.
6		H	Cl	16	-
7		CH ₃	CH ₃	1	-
8		H	Cl	63	-
9		H	Cl	19	-
10		H	OCH ₃	19	-
11		CH ₃	CH ₃	0	-
12		H	Cl	3	-
13		Cl	OCH ₃	6	-
14		H	Cl	94	100
15		H	Cl	33	-
16		H	Cl	100	20

El compuesto activo **22** (**Tabla 5**) presentaba un grupo amida unido a un anillo tienilo sin sustituir. El grupo tienilo, en comparación con el análogo **26**, que posee el anillo furilo, parece contribuir positivamente en la actividad biológica. Los resultados mostrados en la **Tabla 5** parecen indicar que, de manera similar a lo observado en los derivados de la **Tabla 4**, la introducción de un grupo nitro conduce, en general, a una disminución de la actividad frente a *T.*

cruzi. Esta disminución se acentúa en el caso del compuesto **36**, cuya actividad frente a *T. cruzi*, en comparación con la de los compuestos análogos **22** y **26**, disminuye de forma clara.

Los compuestos más activos mostrados en las **tablas 4 y 5** (Compuestos **14, 16 y 22**) comparten la presencia de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R₆/R₇ del anillo de quinoxalina, Cl/H, Cl/H y F/F respectivamente.

Tabla 5. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido **17-39**.



Comp.	X	R ₃	R ₆	R ₇	% INH (25 μM)	Cl ₅₀ (μM)
17	S	H	H	H	19,01	-
18	S	H	H	OCH ₃	15,11	-
19	S	H	H	CH ₃	16,37	-
20	S	H	CH ₃	CH ₃	13,55	-
21	S	H	H	F	27,48	31,8
22	S	H	F	F	92,4	10,8
23	O	H	H	H	3,11	-
24	O	H	Cl	Cl	31,61	31,8
25	O	H	H	CH ₃	11,59	-
26	O	H	H	F	19,83	-
27	O	H	H	OCH ₃	9,48	-
28	O	H	F	F	53,12	19,2
29	O	H	CH ₃	CH ₃	13,06	-
30	S	NO ₂	H	H	0	-
31	S	NO ₂	H	CH ₃	11,40	-
32	S	NO ₂	CH ₃	CH ₃	36,40	14,9
33	S	NO ₂	H	Cl	15,04	-
34	S	NO ₂	Cl	Cl	29,79	15,9
35	S	NO ₂	H	F	2,49	-
36	S	NO ₂	F	F	9,20	-
37	O	NO ₂	H	H	0	-
38	O	NO ₂	H	CH ₃	0	-
39	O	NO ₂	CH ₃	CH ₃	0	-

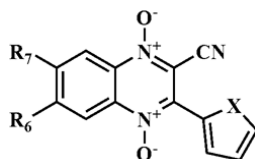
Los compuestos presentados en la **Tabla 6** mostraron buenos resultados de actividad frente a *T. cruzi*, mostrando porcentajes de inhibición del 100% en 5 de los 11 derivados evaluados.

Al comparar los compuestos análogos **40 vs 46, 42 vs 47, 43 vs 48 y 45 vs 50** se observaba que los derivados con un grupo tienilo unido a la posición 3 mostraban una mejor actividad que los sustituidos por furilo.

Los compuestos que presentaban una mayor actividad (**44-46, 48-50**) poseían sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R₆ y/o R₇ del anillo de quinoxalina, corroborando los resultados observados en las series anteriores.

Al comparar los resultados obtenidos en estos compuestos en los que el heterociclo se encuentra directamente sustituido sobre el anillo de quinoxalina con los compuestos análogos de la **Tabla 5**, que presentaban un grupo amida entre el heterociclo y el anillo de quinoxalina, por ejemplo, compuesto **26** vs **45**, **25** vs **42**, **17** vs **46** y **21** vs **50**, se observa como la incorporación del grupo amida afecta negativamente a la actividad frente a *T. cruzi*, disminuyendo en gran medida la actividad.

Tabla 6. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido **40-50**.



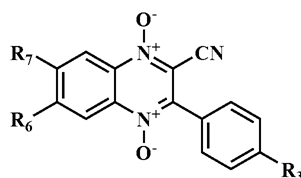
Comp.	X	R ₆	R ₇	%INH (25 μM)	Cl ₅₀ (μM)
40	O	H	H	46,3	25
41	O	H	OCH ₃	33,4	>25
42	O	H	CH ₃	68,5	18,1
43	O	H	Cl	64,5	18,9
44	O	H	CF ₃	100	12,5
45	O	H	F	83,4	14,9
46	S	H	H	100	12,7
47	S	H	CH ₃	74,3	14,8
48	S	H	Cl	100	7,1
49	S	H	CF ₃	100	7,8
50	S	H	F	100	13,0

Los compuestos que se muestran en la **Tabla 7** presentaron una elevada actividad biológica *in vitro* frente a *T. cruzi*. Todos ellos poseían sustituyentes electroatrayentes, o bien en las posiciones R₆ y/o R₇ o unidos en posición *para* al fenilo de la posición 3 del anillo de quinoxalina o en ambas.

Los compuestos más activos (**54**, **60** y **62**) presentaban un grupo electroatrayente (-Cl ó -OCF₃) unido en posición *para* al fenilo de la posición 3. Los sustituyentes que presentaban en las posiciones R₆ y/o R₇ variaban más en su carácter electrónico, presentando elevada actividad el derivado sustituido por el grupo electrodonante metoxilo (**60**) y los sustituidos por el grupo electroatrayente trifluorometilo (**54** y **62**).

Lo más llamativo de los compuestos que presentan una mayor actividad biológica era la presencia en todos ellos del grupo -CF₃, bien fuera en la posición R₇, sustituido en el fenilo de la posición 3 (-OCF₃) o en ambas posiciones.

Tabla 7. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido **51-62**.

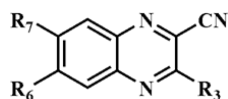


Comp.	R ₃	R ₆	R ₇	%INH (25 μM)	Cl ₅₀ (μM)
51	H	H	F	89,4	15,4
52	H	H	CF ₃	100	15,1
53	Cl	H	F	85,4	13,4
54	Cl	H	CF ₃	100	9,2
55	F	H	H	82,8	15,2
56	F	H	CH ₃ O	84,2	14,6
57	F	H	F	63,8	14,4
58	F	H	CF ₃	100	14,9
59	OCF ₃	H	H	100	14,5
60	OCF ₃	H	OCH ₃	100	8,2
61	OCF ₃	H	F	80,2	13,1
62	OCF ₃	H	CF ₃	100	9,2

En la evaluación de nuevos derivados con el grupo carbonitrilo en la posición 2 frente a *T. cruzi* fueron incluidos también derivados de quinoxalina di-reducidos (Tabla 8). Se evaluaron compuestos con un sustituyente electroatrayente (Cl) (compuestos 63 y 64) o un sustituyente electrodonante (NH₂) (compuesto 65) en la posición 3 del anillo de quinoxalina. El compuesto 65 fue totalmente inactivo frente al parásito, sin embargo, se observó que la presencia de un sustituyente electroatrayente en esa posición proporcionaba actividad frente al parásito. Esta actividad, como se observa al comparar los resultados obtenidos para los compuestos 63 y 64, era potenciada por la presencia de más sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R₆ y/o R₇ del anillo de quinoxalina.

Estos resultados mostraron que los compuestos reducidos podían ser también interesantes en la búsqueda de nuevos agentes frente a *T. cruzi*. El papel de los *N*-óxidos en la actividad biológica no pudo ser determinado por la falta de resultados que permitieran una comparación más amplia entre productos 1,4-di-*N*-oxidados y di-reducidos.

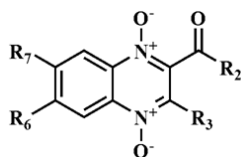
Tabla 8. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina 63-64.



Comp.	R ₃	R ₆	R ₇	%INH (25 μM)	%INH (5 μM)
63	Cl	H	Cl	100	94
64	Cl	CH ₃	CH ₃	81	4
65	NH ₂	H	CH ₃	0	-

Nuestro grupo de trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Cerecetto llevó a cabo también la evaluación de 34 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido que presentaban un grupo carbonilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina en lugar de un grupo carbonitrilo (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-carbonilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido **66-100**.



Comp.	R ₂	R ₃	R ₆	R ₇	%INH (25 μM)	Cl ₅₀ (μM)
66	-CH ₃	CH ₃	H	H	29	-
67	-CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2	-
68	-CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	60	-
69	-CH ₃	CH ₃	H	F	22	-
70	-CH ₃	CH ₃	F	F	100	0,4
71	-OCH ₃	CH ₃	H	H	24	-
72	-OCH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	11	-
73	-OCH ₃	CH ₃	Cl	Cl	66	-
74	-OCH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1	-
75	-OCH ₂ CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	32	-
76	-NH-C(CH ₃) ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	0	-
77	-NH-C(CH ₃) ₃	CH ₃	Cl	Cl	28	-
78	-NH-C ₆ H ₅	CH ₃	H	H	10	-
79	-NH-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃	16	-
80	-NH-C ₆ H ₅	CH ₃	Cl	Cl	61	-
81	-NH-C ₆ H ₄ -(o)-CH ₃	CH ₃	H	H	21	-
82	-NH-C ₆ H ₄ -(o)-CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	12	-
83	-NH-C ₆ H ₄ -(o)-CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	49	-
84		CH ₃	CH ₃	CH ₃	0	-
85		CH ₃	Cl	Cl	47	-
86		CH ₃	CH ₃	CH ₃	1	-
87	-C ₆ H ₅	CH ₃	H	H	19	-
88	-C ₆ H ₅	CH ₃	H	CH ₃ O	9	-
89	-C ₆ H ₅	CH ₃	H	CH ₃	8	-
90	-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1	-
91	-C ₆ H ₅	CH ₃	H	Cl	33	-
92	-C ₆ H ₅	CH ₃	Cl	Cl	91	-
93	-C ₆ H ₅	CH ₃	F	F	92	<5,0
94	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	Cl	Cl	99,2	11,3
95	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	H	H	28,8	-
96	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	10,4	-
97	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	H	OCH ₃	0	-
98	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	H	CH ₃	13,5	-
99	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	H	Cl	87,6	12,5
100	-OCH ₂ CH ₃	-C ₆ H ₅	F	F	100	-

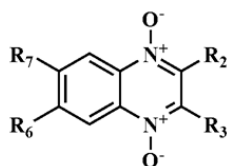
Los derivados evaluados presentaban un grupo cetona, un grupo éster o un grupo amida en posición 2 y un grupo CH₃ o Ph en la posición 3 del anillo de quinoxalina. En las posiciones R₆ y/o R₇ poseían sustituyentes electroatrayentes, como Cl y F, sustituyentes electrodonantes

como CH₃ y CH₃O, además de los derivados sin sustituir. Sólo 6 de los 34 compuestos (**70**, **92**, **93**, **94**, **99** y **100**) presentaron actividad *in vitro* y todos ellos presentaban sustituyentes electroatrayentes (Cl/Cl, Cl/H y F/F) en las posiciones R₆ y R₇.

Los resultados indicaron que un sustituyente de tipo amida en la posición 2 del anillo de quinoxalina (compuestos **76-86**) provocaba una disminución de la actividad anti-*T. cruzi* como se observó al comparar los compuestos análogos **80** y **92**.

Los compuestos mostrados en la **Tabla 10** no presentaban grupo carbonilo y se observó que la actividad frente al parásito era prácticamente nula, excepto en el derivado **107**, donde la sustitución del grupo carbonilo por un azufre no afecta a la actividad e incluso mejora ligeramente la actividad mostrada por su análogo **92** (**Tabla 9**). Se observó una importante disminución al comparar la actividad mostrada por los compuestos análogos **91** y **92** (**Tabla 9**) vs **104** y **101** (**Tabla 10**). Estos datos parecían indicar que la presencia del grupo carbonilo tenía influencia en la actividad *in vitro*, probablemente relacionada con la importante disminución de solubilidad observada al eliminar este grupo.

Tabla 10. Resultados de actividad biológica *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* obtenidos por nuestro grupo para los derivados de quinoxalina-1,4-di-*N*-óxido **101-107**.



Comp.	R ₂	R ₃	R ₆	R ₇	% INH 25 (μM)	Cl ₅₀ (μM)
101	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-CH ₃	Cl	Cl	23	-
102	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-CH ₃	H	H	0	-
103	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-CH ₃	CH ₃	CH ₃	0	-
104	-CH ₂ -C ₆ H ₅	-CH ₃	H	Cl	0	-
105	-CH ₃	-CH ₃	Ph(CH ₂) ₂ NHCONHN=CH-	H	17	-
106	-CH ₃	-CH ₃	CH ₃ OCONHN=CH-	H	28	-
107	-S-Ph	-CH ₃	Cl	Cl	93	6,5

14.2. Resumen de las relaciones estructura-actividad observadas

El estudio de los resultados biológicos obtenidos a lo largo de los últimos años permitió establecer una serie de importantes relaciones entre la estructura de los derivados de quinoxalina evaluados y la actividad biológica mostrada. Dividiendo la estructura de la quinoxalina en los 4 puntos estudiados, **R₂**, **R₃**, **R₆/R₇** y ***N*-óxido** se extrajeron las relaciones de estructura-actividad que se muestran en la **Figura 32**. Se observa como las posiciones más determinantes a la hora de modular la actividad biológica frente a *T. cruzi* parecen ser las posiciones **R₃**, **R₆** y **R₇**.

- La presencia de sustituyentes electroatrayentes (Cl, F y CF₃) en las posiciones **R₆** y/o **R₇** tiene un efecto claramente potenciador de la actividad biológica frente a *T. cruzi*. En cada serie evaluada los compuestos sustituidos por estos grupos presentaron los mejores valores de actividad. Por otro lado, la incorporación de sustituyentes electrodonantes en estas posiciones conduce a una disminución de la actividad.

- Los resultados observados indican que la posición **R₃** tiene un papel muy importante en la actividad frente a *T. cruzi*. Los derivados con sustituyentes electroatrayentes *para*-sustituidos sobre un fenilo ofrecen buenos resultados de actividad independientemente de los sustituyentes empleados en las posiciones **R₆** y **R₇**, mientras que derivados sustituidos con grupos con un grupo metilo o fenilo en **R₃** requieren la presencia de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones **R₆** y/o **R₇** para mostrar una buena actividad *in vitro* frente al parásito. Además, se observa como la introducción de un grupo amino o un grupo amida en esta posición parece disminuir la actividad biológica de los derivados evaluados, aunque ante la falta de este tipo de derivados sustituidos por flúor en las posiciones **R₆** y **R₇** no permite extraer una conclusión firme. La unión de un cloro directamente al anillo de quinoxalina en esta posición ofrece buenos resultados de actividad incluso en ausencia de los grupos *N*-óxido. Este dato indica la importancia de tener en cuenta también los compuestos reducidos en la función *N*-óxido.

- En cuanto a los sustituyentes empleados en la posición **R₂**, la presencia de un grupo carbonilo entre el anillo de quinoxalina y el sustituyente **R₂** empleado parece tener una influencia muy positiva en la actividad si lo comparamos con la actividad presentada por los derivados sin grupo carbonilo, sustituidos por bencilo o metilo. Esta influencia positiva se observa cuando el grupo funcional introducido es cetona o éster. Sin embargo, los compuestos evaluados con un grupo amida en esta posición presentan mala actividad. La presencia del grupo CN en esta posición no parece tener una influencia determinante y la actividad de los derivados que lo poseen parece venir marcada más por los sustituyentes empleados en las otras posiciones del anillo de quinoxalina. El sustituyente empleado en **R₂**, unido al grupo carbonilo, no parece tener una influencia importante sobre la actividad por sí mismo, ya que series evaluadas con un mismo sustituyente en **R₂** presentan mala o buena actividad en función de los sustituyentes empleados en **R₃** y **R₆/R₇**.

- De modo generalizado se observa como los derivados de quinoxalina evaluados que poseen un grupo **NO₂** en su estructura presentan una mala actividad antichagásica, indicando la influencia negativa que este grupo parece tener sobre la actividad presentada por este tipo de derivados.

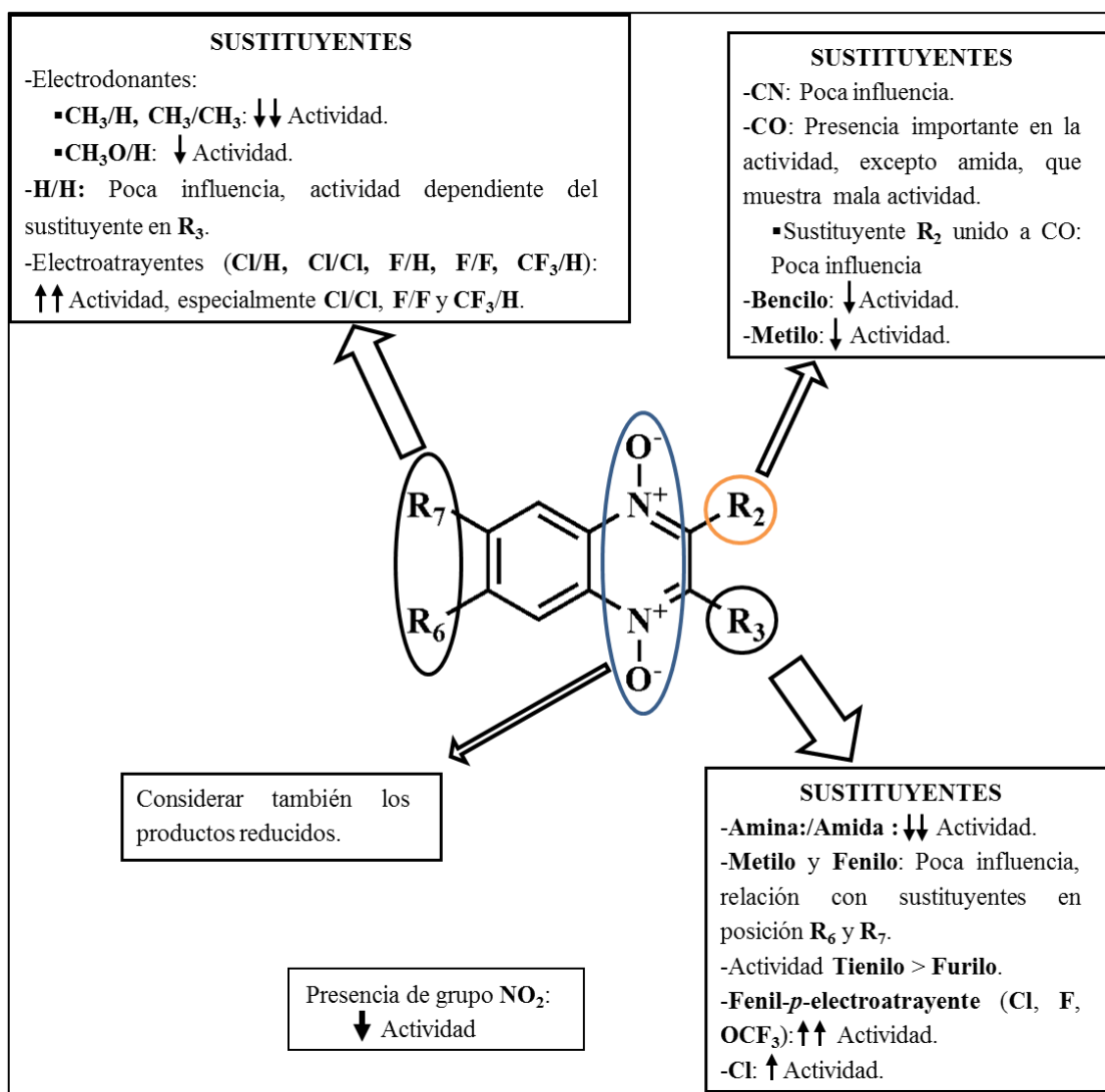


Figura 32. Resumen de las relaciones estructura-actividad biológica *in vitro* extraídas de la revisión de los derivados de quinoxalina evaluados por nuestro grupo.

15. Flúor y química médica

Las relaciones estructura-actividad biológica obtenidas tras la revisión mostraron la importancia que parecía tener la presencia de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R₃ y R₆ y/o R₇ en la actividad biológica de los derivados evaluados. Para estudiar como podían influir este tipo de sustituyentes, en especial F y OCF₃ se realizó una revisión bibliográfica acerca de nuevas estrategias para la obtención de nuevos líderes en la cual se comprobó como la sustitución de hidrógenos por flúor es una estrategia ampliamente utilizada en la búsqueda de nuevos compuestos líderes con un mejor comportamiento biológico.

Existe una extensa base bibliográfica que indica como la presencia de átomos de flúor puede modificar y modular de manera radical las propiedades físico-químicas de los compuestos orgánicos en los que es introducido modificando su comportamiento biológico. El interés en química médica por los compuestos fluorados ha aumentado mucho en los últimos años. Sirva

como dato que entre el 20 y el 25% de las moléculas farmacéuticas comercializadas contienen uno o más átomos de flúor^{252,253}, entre las que destacan la Fluoxetina (Prozac), Atovarstatina (Lipitor) y Risperidona, algunos de los fármacos clásicos más comercializados de la historia, y las nuevas moléculas Efarivenz o derivados del ácido shikímico.²⁵⁴⁻²⁵⁹

Los principales efectos que se asocian a la introducción de flúor en moléculas orgánicas serían:

- Un aumento de la lipofilicidad, especialmente en compuestos aromáticos.
- La introducción de flúor puede alterar de manera considerable las preferencias conformacionales de una molécula por interacciones electrostáticas.
- Por su efecto inductivo, el flúor puede afectar a los nitrógenos adyacentes reduciendo la basicidad de las aminas, lo cual aporta a la molécula un carácter más neutro aumentando su biodisponibilidad y permeabilidad a través de membranas.
- El flúor puede aumentar la estabilidad metabólica de la nueva molécula ya que actúa como grupo protector frente al ataque enzimático llevado a cabo por el sistema citocromo P450.
- La presencia de flúor es capaz de aumentar la solubilidad en agua.
- La introducción de flúor puede alterar de manera crucial el modo de unión a dianas moleculares.

Existen múltiples hipótesis que intentan explicar el mecanismo de acción por el cual se produce un cambio de comportamiento tan importante tras la introducción de átomos de flúor, sin embargo, no hay un consenso al respecto. Se considera que el flúor no es un buen aceptor de puentes de hidrógeno por la baja capacidad de polarización de sus electrones de los orbitales *s* y *p*. La explicación más generalizada defiende que la elevada electronegatividad del flúor (es el elemento más electronegativo de la tabla periódica) convierte al enlace C-F en altamente polarizado ($C\delta^+-F\delta^-$), aportándole un carácter iónico. Esta alta polaridad hace que pueda sufrir fuertes interacciones electrostáticas específicas con otros dipolos o átomos cargados cercanos y favorecer la interacción entre un ligando y una diana en un centro activo de proteínas.^{260,261}

HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

III. HIPÓTESIS

Se proponen los derivados del sistema quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido con un grupo carbonilo sustituido en posición 2 y un grupo trifluorometilo en posición 3 como potentes agentes anti-*T.cruzi* (Figura 33).

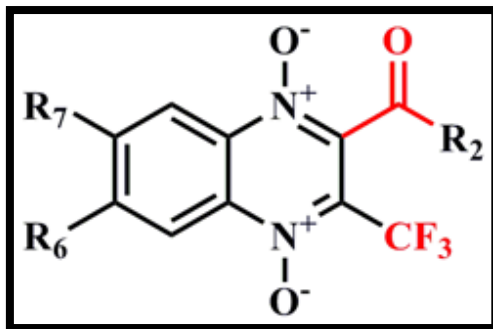


Figura 33. Estructura base del trabajo presentado.

IV. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es el diseño y síntesis de nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido que curen la enfermedad de Chagas. La estrategia seguida para llegar a cumplir este objetivo final se componía de las siguientes etapas de trabajo:

16. Revisión bibliográfica y de resultados previos: estado del arte.

Se propone una extensa revisión bibliográfica sobre la problemática de la enfermedad de Chagas, situación epidemiológica, tratamiento y las nuevas líneas de investigación en la búsqueda de nuevos agentes antichagásicos. Además, se propone como punto de partida una revisión de los resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo para extraer relaciones estructura-actividad que ayuden en el diseño de los nuevos derivados de quinoxalina. La información más importante extraída de esta revisión se presenta en el apartado 14.2 de la introducción de este trabajo.

17. Diseño de nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido.

17.1. Diseño de las series iniciales

A partir de las relaciones estructura-actividad establecidas tras la revisión de los resultados obtenidos por el grupo de trabajo durante los últimos años se propone como punto de partida la selección de los derivados **1.1-1.7** pertenecientes a la **serie 1** de la biblioteca de compuestos del grupo de trabajo y su evaluación biológica frente a *T. cruzi*. Los buenos resultados obtenidos parecían confirmar la hipótesis de trabajo planteada, por lo que se propone en primer lugar el diseño de nuevas series de derivados de quinoxalina introduciendo una alta variabilidad de sustituyentes en las posiciones R₂, R₆ y R₇ del anillo de quinoxalina a partir de la estructura básica establecida (**Figura 33**).

En el diseño de las nuevas series **1**, **3** y **5** se seguirá la siguiente estrategia:

1- Se decide mantener constante el grupo -CF₃ en posición 3, debido a los excelentes resultados mostrados por los nuevos derivados tras la introducción de este sustituyente.

2- Todos los nuevos derivados diseñados inicialmente mantendrán los grupos 1,4-di-*N*-óxido en base a buenos resultados obtenidos previamente por los derivados que poseían estos grupos.

3- Las nuevas series se diseñan manteniendo constante el grupo carbonilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina. Pese a la buena actividad mostrada por derivados con el grupo -CN en posición 2 (**Tablas 6 y 7**), se desecha la idea de incluir en el diseño este tipo de derivados debido a los indicios de toxicidad asociada a este grupo previamente observados por el equipo de trabajo.^{200,201} Además, la aparente escasa influencia que el sustituyente empleado en esta posición parecía presentar sobre la actividad *in vitro* y la mayor dificultad a la hora de trabajar con ellos por su escasa solubilidad justifican esta decisión.

Mantener el grupo carbonilo permite introducir una amplia variedad de sustituyentes en la posición R_2 mediante métodos de síntesis sencillos y reactivos comerciales disponibles en nuestro laboratorio y asequibles económicamente. Como se indica en la **Figura 34** las **series 1, 3 y 5** se diseñan utilizando diferentes grupos funcionales en esta posición, cetona- R_2 , amida- R_2 y éster- R_2 , pero siempre manteniendo el grupo carbonilo unido directamente al anillo de quinoxalina. Las modificaciones diseñadas para el sustituyente R_2 consisten en la introducción de una alta variabilidad de estructuras que se pueden clasificar en grupos alifáticos de diferente longitud y grado de ramificación, anillos aromáticos no sustituidos o sustituidos en posición *para* y anillos heteroarómicos.

Este diseño puede aportar una valiosa información que permitirá llevar a cabo un estudio de las relaciones estructura-actividad de la posición 2.

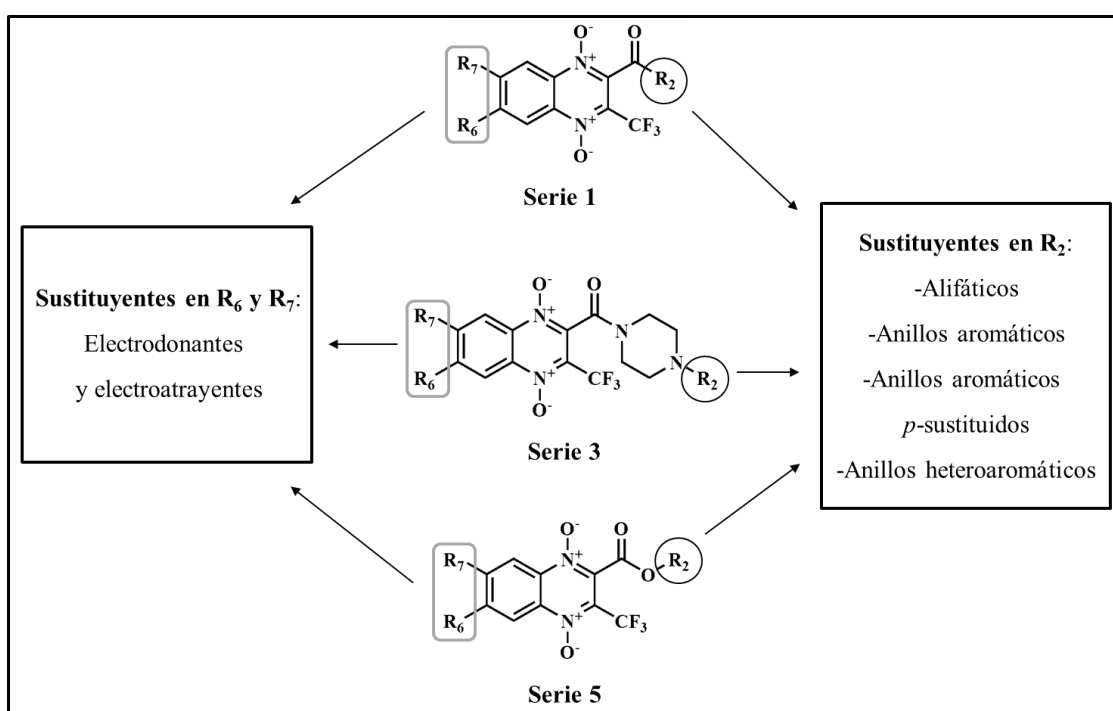


Figura 34. Diseño planteado para las series 1, 3 y 5 presentadas en este trabajo.

En el plan diseñado se utilizan benzofuroxanos (BFXs) con diferentes sustituyentes en sus posiciones R_6 y/o R_7 como reactivos de partida. Estos sustituyentes serán los que estén presentes en el producto final sintetizado. Se decide emplear un total de 9 tipos de BFXs con diferentes sustituyentes en estas posiciones además del BFX sin sustituir. Los sustituyentes empleados se dividen en 2 clases:

- Sustituyentes electrodonantes, que incluyen grupos metoxilo y metilo.
- Sustituyentes electroatrayentes: cloro, flúor y grupo trifluorometilo.

17.2. Modificaciones propuestas a partir de las series iniciales diseñadas

17.2.1. Reducción de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido

Para estudiar la influencia de la presencia de los grupos *N*-óxido en la actividad mostrada por los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido frente a *T. cruzi* se diseña la **serie 2**. Se decide llevar a cabo la reducción de los grupos *N*-óxido de alguno de los compuestos previamente evaluados.

17.2.2. Modificación de la posición R₃ del anillo de quinoxalina

Para profundizar en el estudio sobre la influencia del grupo -CF₃ en la actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* se diseña la **serie 4 (Figura 35)**, una serie de compuestos en los que se sustituye el grupo -CF₃ de la posición R₃ por un grupo -CHF₂.

Al igual que en las series anteriores la variabilidad de sustituyentes se introduce en las posiciones R₆ y R₇ y el plan diseñado es igual al de las series iniciales 1, 3 y 5, utilizando los mismos sustituyentes electrodonantes y electroatrayentes (CH₃O, CH₃, Cl y F) y el derivado sin sustituir.

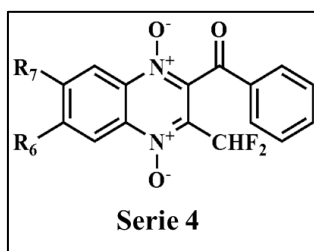


Figura 35. Estructura general de los derivados pertenecientes a la serie 4 presentada en este trabajo.

17.2.3. Ampliación del estudio de las posiciones R₆ y R₇

Para cumplir este objetivo se diseña la **serie 6**, en la que se busca aumentar la variabilidad de sustituyentes en las posiciones R₆ y R₇ mediante un método sencillo introduciendo grupos biológicamente interesantes. Se decidió introducir diferentes derivados de aminas heterocíclicas alifáticas empleando una sustitución nucleofílica aromática.

Como se muestra en la **Figura 36**, el diseño de esta serie se basa en la similitud estructural con las fluoroquinolonas. La variabilidad estructural que presentan las fluoroquinolonas es muy elevada, pero con respecto a las posiciones tratadas en este punto presentan una amina heterocíclica de diferentes tipos en la posición R₇ y un átomo de flúor unido a la posición R₆.

Basar la estrategia de diseño de la **serie 6** en este tipo de estructuras se apoya en 2 puntos principales:

-Tras observar la importancia de la presencia de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R₆ y/o R₇ se planteó el diseño de nuevos derivados que mostraran una mayor

variabilidad de sustituyentes en estas posiciones pero manteniendo un grupo electroatrayente directamente unido al anillo de quinoxalina, análogamente a lo observado en los diferentes derivados de fluoroquinolonas, que presentan un átomo de flúor en posición R_6 .

-Las fluoroquinolonas son un importante grupo de antibióticos de amplio espectro con una conocida actividad frente a patógenos intracelulares. Tras una revisión bibliográfica se comprueba que diferentes derivados de fluoroquinolonas han mostrado actividades interesantes frente a diferentes protozoos tripanosomátidos parásitos, entre ellos, *T. cruzi*.²⁶²⁻²⁶⁵

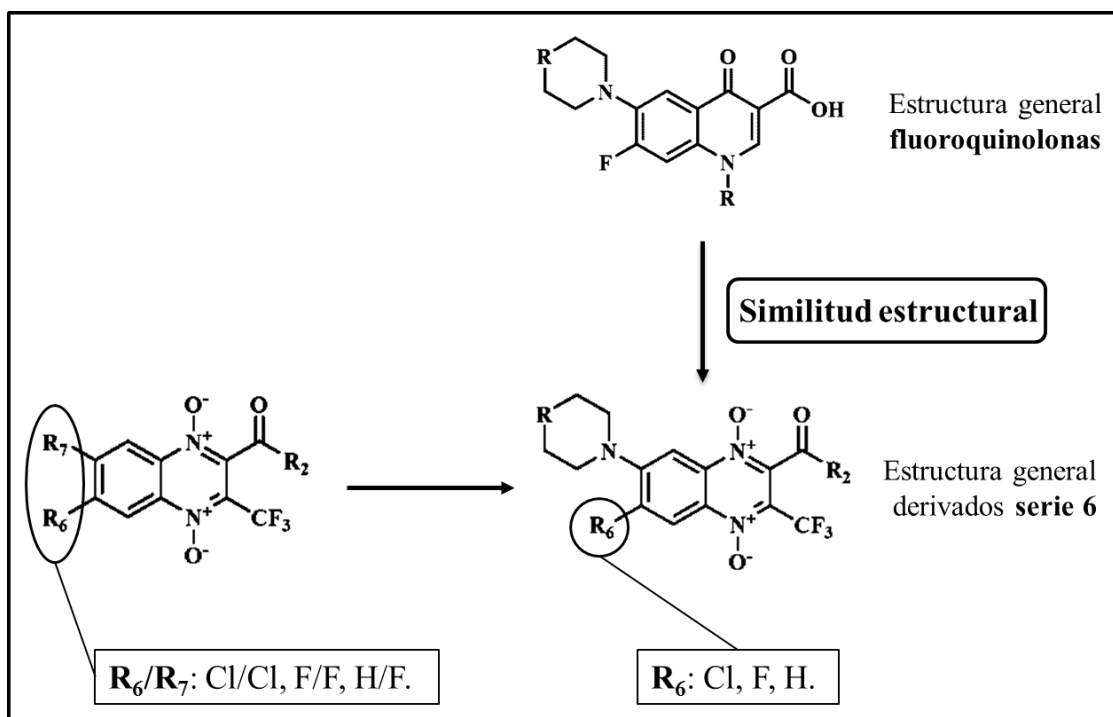


Figura 36. Diseño planteado para los derivados de la serie 6.

17.2.4. Ampliación del estudio de la posición R_2

Para corroborar la importancia de la presencia del grupo carbonilo en posición 2 observada en la revisión de los resultados antichagásicos mostrada en la introducción se diseña el compuesto **7.1** (Figura 37). La evaluación de este derivado se consideró necesaria ya que todos los datos disponibles pertenecen a derivados sustituidos con el grupo metilo en posición 3 y no se conoce en qué grado el grupo trifluorometilo puede afectar a la actividad biológica en ausencia del grupo carbonilo en posición 2.

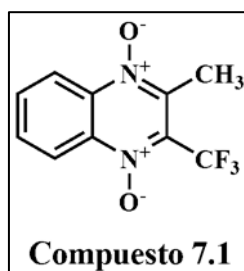


Figura 37. Estructura del compuesto 7.1.

18. Síntesis de los compuestos diseñados. Optimización de los métodos de síntesis.

Considerando la idiosincrasia de las comunidades más afectadas por la EC y la urgente necesidad de nuevas alternativas terapéuticas, en el presente trabajo se propone como objetivo la obtención de nuevos derivados de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos mediante rutas sintéticas simples y a partir de reactivos comerciales asequibles económicamente.

Como se muestra en la **Figura 38**, los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido serán sintetizados utilizando la reacción de Beirut (**series 1, 3, 4, 5, 6** y compuesto **7.1**), una reacción sencilla y de un solo paso que permite introducir una elevada variabilidad de sustituyentes en las posiciones de interés (R_2 , R_3 , R_6 y R_7).

Debido a los descensos de rendimientos y aumentos de tiempos de reacción observados previamente por nuestro grupo al trabajar con derivados trifluorometilados con respecto a sus bioisómeros metilados, uno de los objetivos que se plantean es la optimización del método de síntesis mediante la utilización de la síntesis orgánica asistida por microondas aplicada a la reacción de Beirut.

A partir de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sintetizados (**serie 1**) se propone como objetivo aumentar la variabilidad de los nuevos derivados mediante reacciones sencillas como son la reducción de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido (**serie 2**) y la sustitución nucleófila aromática a partir de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido de la **serie 1** sustituidos por átomos halógenos en las posiciones R_6 y/o R_7 (**serie 6**) (**Figura 38**).

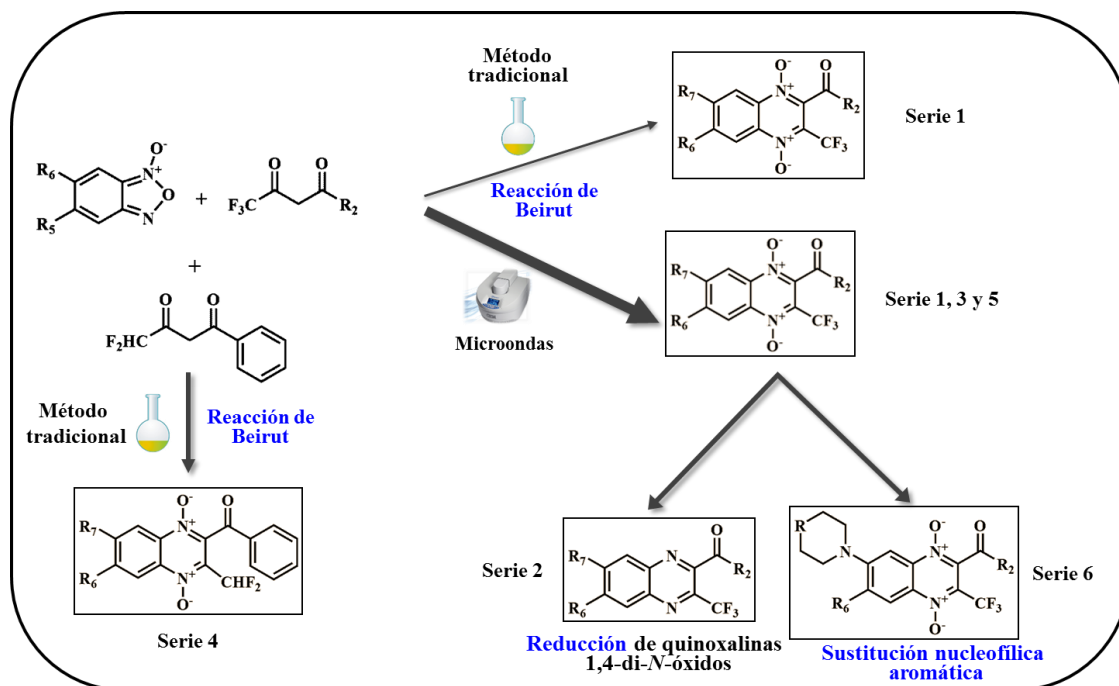


Figura 38. Plan de trabajo establecido para llevar a cabo la síntesis de los nuevos derivados de quinoxalina.

19. Caracterización de los compuestos sintetizados

Todos los compuestos sintetizados serán químicamente caracterizados mediante determinación del punto de fusión, espectroscopia de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y microanálisis elemental (CHN), como se muestra en los capítulos de material y métodos y caracterización de los compuestos.

20. Evaluación biológica *in vitro* de los nuevos compuestos sintetizados frente a *T. cruzi*

La evaluación biológica *in vitro* de los nuevos derivados de quinoxalina sintetizados será llevada a cabo por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), dirigido por el Dr. Hugo Cerecetto y la Dra. Mercedes González.

Todos los nuevos derivados sintetizados serán evaluados biológicamente *in vitro* frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Serán evaluados tanto el porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito a una concentración de 25 μ M (%INH) como la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Además, se evaluará la actividad biológica *in vitro* de un grupo de derivados frente a la forma epimastigote de otras cepas de *T. cruzi* (clon CL Brener, cepa Y y cepa Colombiana) y frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener.

21. Estudio de las relaciones estructura-actividad biológica de los nuevos derivados de quinoxalina evaluados frente a *T. cruzi*

Una vez obtenidos los resultados de actividad biológica se llevará a cabo un estudio de las relaciones observadas entre la estructura química de los nuevos derivados sintetizados y los resultados de actividad biológica obtenidos.

22. Evaluación de la toxicidad *in vitro* de los compuestos evaluados

La toxicidad *in vitro* de un grupo seleccionado de los nuevos derivados sintetizados será estudiada a dos niveles:

-Se llevará a cabo la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* sobre células mamíferas utilizando el ensayo MTT, el cual nos permitirá calcular el índice de selectividad que los nuevos derivados muestran frente a *T. cruzi*.

-Se realizará el ensayo preliminar de mutagenicidad en *Salmonella* (test de Ames) para evaluar la toxicidad *in vitro* a nivel del ADN.

La evaluación de la citotoxicidad y la mutagenicidad de los nuevos derivados sintetizados será realizada por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay),

y personalmente en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra, Pamplona, España.

23. Estudio de las posibles relaciones entre la estructura química y los resultados de toxicidad obtenidos

Se llevará a cabo un estudio de las relaciones observadas entre la estructura química de los nuevos derivados y los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con el objetivo de determinar los requerimientos estructurales para la obtención de compuestos con una menor toxicidad.

24. Evaluación biológica *in vivo* de los nuevos derivados sintetizados

La evaluación biológica *in vivo* de los nuevos derivados de quinoxalina sintetizados será realizada en el Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Ciencias de la Salud de Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Se utilizará un modelo de ratón para infección aguda por *T. cruzi*.

25. Estudio del posible mecanismo de acción de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido presentados

25.1. Evaluación del comportamiento electroquímico de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sintetizados

Un grupo de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a las **series 1 y 5** presentados en este trabajo, junto a un grupo de compuestos análogos a éstos, previamente sintetizados por nuestro grupo de trabajo, serán seleccionados con el objetivo de estudiar el comportamiento electroquímico de esta familia de heterociclos y la obtención de información sobre el mecanismo de acción. Se medirá el potencial de reducción de los grupos *N*-óxido en los diferentes compuestos ensayados utilizando la voltametría cíclica.

Los estudios electroquímicos se llevarán a cabo en el Departamento de Química de la Southeast Missouri State University a través de un proyecto de colaboración con el Dr. Philip W. Crawford.

25.2. Estudios biológicos de mecanismo de acción de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sintetizados

Con el objetivo de conocer el posible mecanismo de acción por el cual los nuevos derivados producen daño sobre *T. cruzi* se estudiará la capacidad inhibitoria de un grupo de derivados pertenecientes a la **serie 1** sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales. Además, se estudiarán los posibles cambios en rutas metabólicas del parásito inducidos tras el tratamiento con un derivado de la **serie 1**.

El ensayo será llevado a cabo por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

26. Estudio de las posibles relaciones estructura-comportamiento electroquímico y comportamiento electroquímico-actividad anti-*T. cruzi*

La relación entre el potencial de reducción de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido y su estructura se estudiará con el objetivo de obtener información acerca del posible mecanismo de acción de estos compuestos como agentes antichagásicos. Asimismo se intentarán buscar relaciones entre el comportamiento electroquímico y la actividad antichagásica mostrada por los diferentes derivados de quinoxalina estudiados.

27. Búsqueda de nuevos líderes y diseño de futuros planes de trabajo

El estudio conjunto de los resultados biológicos de actividad y toxicidad *in vitro*, los datos electroquímicos y la estructura química de los derivados, dará lugar a la selección de nuevos compuestos líderes y la definición futuros planes de trabajo apoyados en una continua revisión bibliográfica.

MATERIAL Y MÉTODOS

V. SÍNTESIS QUÍMICA

27. Esquema general de síntesis

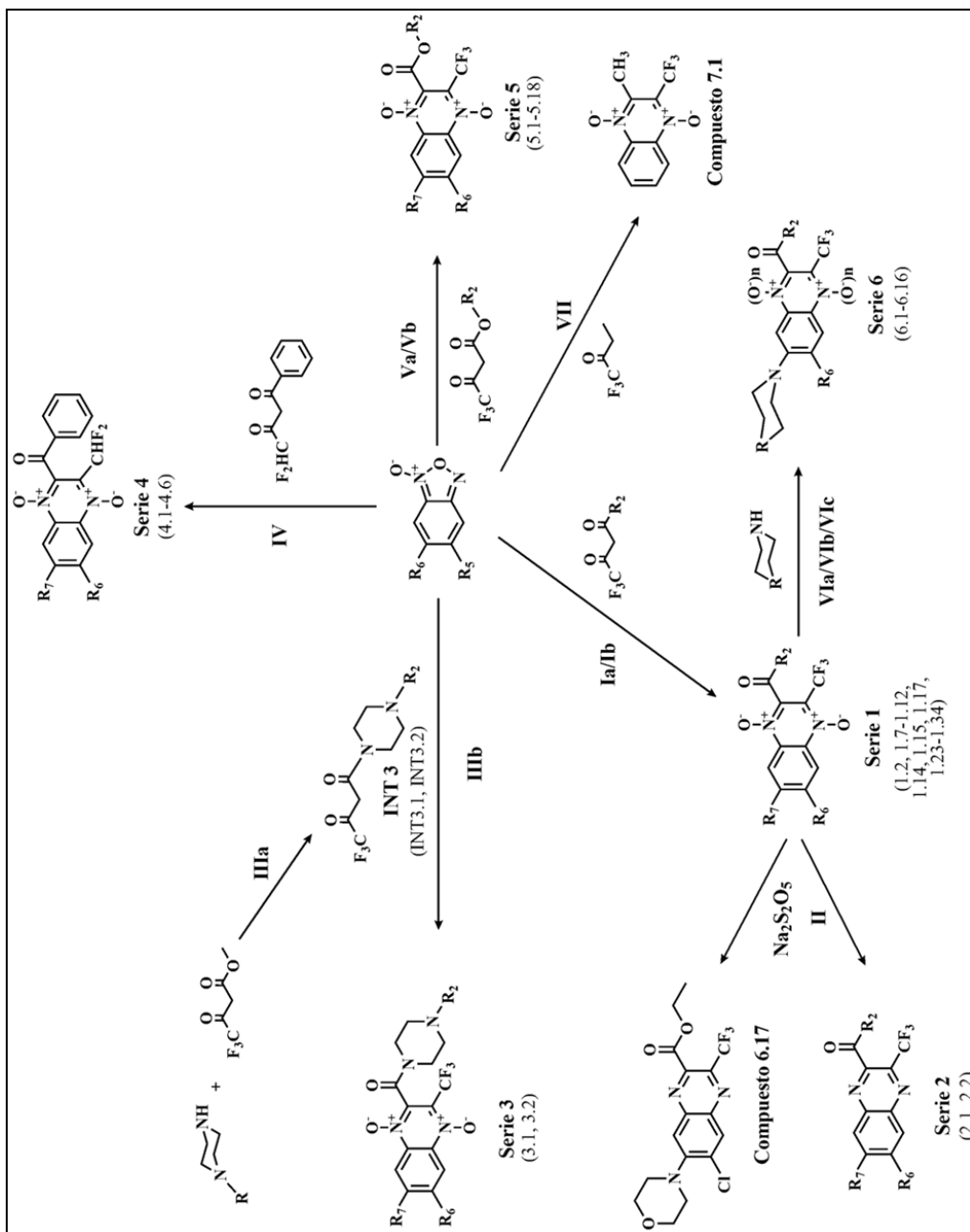


Figura 39. Esquema general de síntesis

Ia: Cloroformo seco, trietilamina. **Ib:** Tolueno, trietilamina, microondas. **II:** Acetato de etilo/metanol, 65°C. **IIIa:** 2-hidroxipiridina, N₂ gas, 169°C. **IIIb:** Tolueno, trietilamina, microondas. **IV:** Acetona, KF/Al₂O₃ 40%. **V:** Tolueno, trietilamina, microondas. **VIa:** Acetona, K₂CO₃. **VIb:** Tolueno, trietilamina, microondas. **VIc:** N,N-dimetilformamida, reflujo. **VIIa:** Acetonitrilo, DBU, 50°C. **VIIb:** Acetonitrilo, trietilamina.

28. Química de los benzofuroxanos

28.1. Síntesis de benzofuroxanos

Como se indica en la **Tabla 11**, en este trabajo se utilizaron 9 benzofuroxanos (BFXs) con diferentes sustituyentes en las posiciones R_5 y/o R_6 . Dado que cuatro de los BFXs utilizados estaban disponibles comercialmente, se llevó a cabo la síntesis de los cinco BFXs no comerciales.

Tabla 11. BFXs utilizados en la síntesis de los compuestos de este trabajo.

Comerciales R_5/R_6	Método 1 R_5/R_6	Método 2 R_5/R_6
H/H	CH ₃ /CH ₃	F/F
H/OCH ₃	Cl/Cl	H/CF ₃
H/CH ₃	F/H	
H/Cl		

Para ello, se utilizaron dos métodos de síntesis diferentes en función de los sustituyentes que presentaban en las posiciones R_5 y/o R_6 (**Tabla 11**). Los BFXs con sustituyentes F/H, Cl/Cl y CH₃/CH₃ en las posiciones R_5/R_6 fueron sintetizados mediante una ciclación oxidativa a partir de la 2-nitroanilina comercial correspondiente. Los BFXs sustituidos por F/F y CF₃/H en las posiciones R_5/R_6 fueron sintetizados a partir de la 2-nitrofenilazida correspondiente.

28.1.1. Síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa

La síntesis de BFXs por este método consiste en una ciclación oxidativa a baja temperatura de la 2-nitroanilina correspondiente utilizando hipoclorito sódico (NaClO) como oxidante y *N,N*-dimetilformamida (*N,N*-DMF) como disolvente (**Figura 40**).

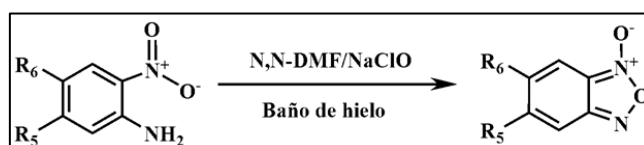


Figura 40. Síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa.

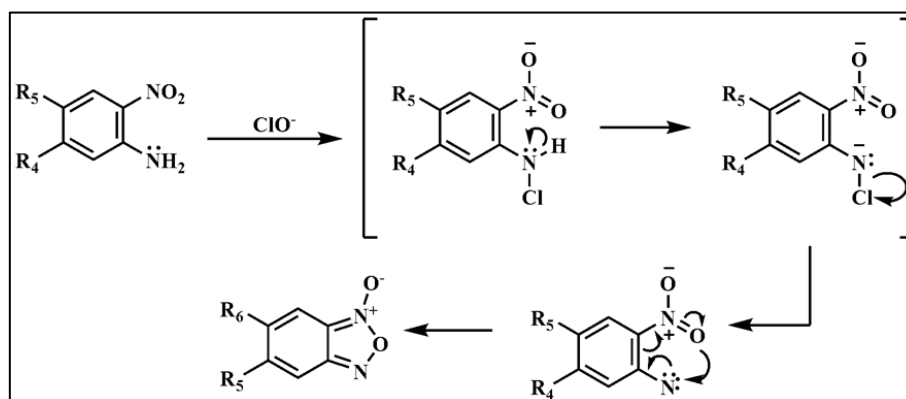


Figura 41. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de BFX mediante ciclación de *o*-nitroanilina.

Esta ciclación oxidativa parece tener lugar por un mecanismo que involucra la formación de un anión *N*-cloronitroanilina intermedio, el cual posteriormente se descompone a un intermedio nitreno que sufrirá la ciclación dando lugar a la formación del BFX correspondiente (**Figura 41**). Este paso es fácilmente reconocible por la generación transitoria de un fuerte color rojo-púrpura producido durante la oxidación de hipoclorito.^{266,267}

28.1.2. Síntesis de benzofuroxanos a partir de azidas

Para sintetizar los BFXs con sustituyentes F/F y CF₃/H se utilizó el método de pirólisis o descomposición térmica de *o*-nitrofenilazidas,^{266,268,269} que se describe en la **Figura 42**.

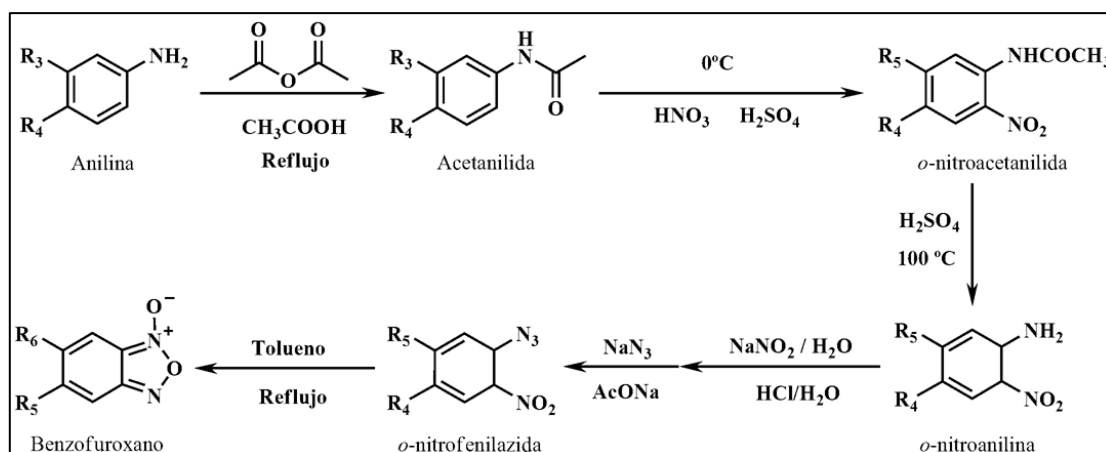


Figura 42. Síntesis de los BFXs con sustituyentes F/F y CF₃/H en posiciones R5/R6.

En el caso del BFX sustituido por el grupo trifluorometilo, el proceso de síntesis comienza a partir de la *o*-nitroanilina, ya que es disponible comercialmente. Para la síntesis del BFX sustituido por dos átomos de flúor hay que seguir el esquema de la **Figura 42** completo.

Se parte de la anilina comercial adecuada y se protege el grupo amino con anhídrido acético. Seguidamente, se realiza la nitración de la acetanilida mediante una sustitución electrofílica aromática, utilizando una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico como agente nitrante.

El mecanismo propuesto para la sustitución electrofílica se muestra en la **Figura 43**. En una primera etapa el ácido sulfúrico protona el hidroxilo del ácido nítrico, produciéndose la salida de una molécula de agua y originándose de este modo el ión nitronio, que posee una gran reactividad, por lo que ataca fácilmente a la nube π del benceno formándose el compuesto esperado, 2-nitroacetanilida (83, 83).

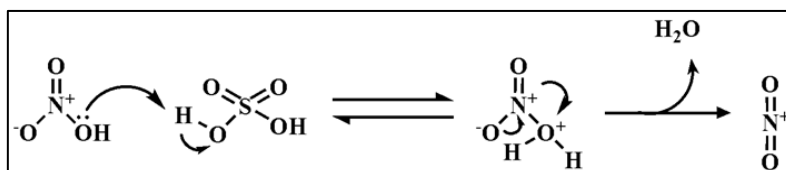


Figura 43. Formación del ion nitronio.

A continuación, se lleva a cabo la desprotección de la *o*-nitroacetanilida mediante una hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico, generándose la *o*-nitroanilina correspondiente. Ésta se trata con nitrito sódico, formándose una sal de diazonio (**Figura 44**). En este paso es muy importante el control de la temperatura ya que este intermedio es estable sólo a 0-5°C. En un primer paso, se forma el ión nitroso (NO^+) *in situ* a partir de nitrito sódico. Este ión posee una alta reactividad y ataca al par de electrones libres del nitrógeno de la *o*-nitroanilina, produciéndose la deshidratación de la amina para formar la correspondiente sal de diazonio.²⁷⁰

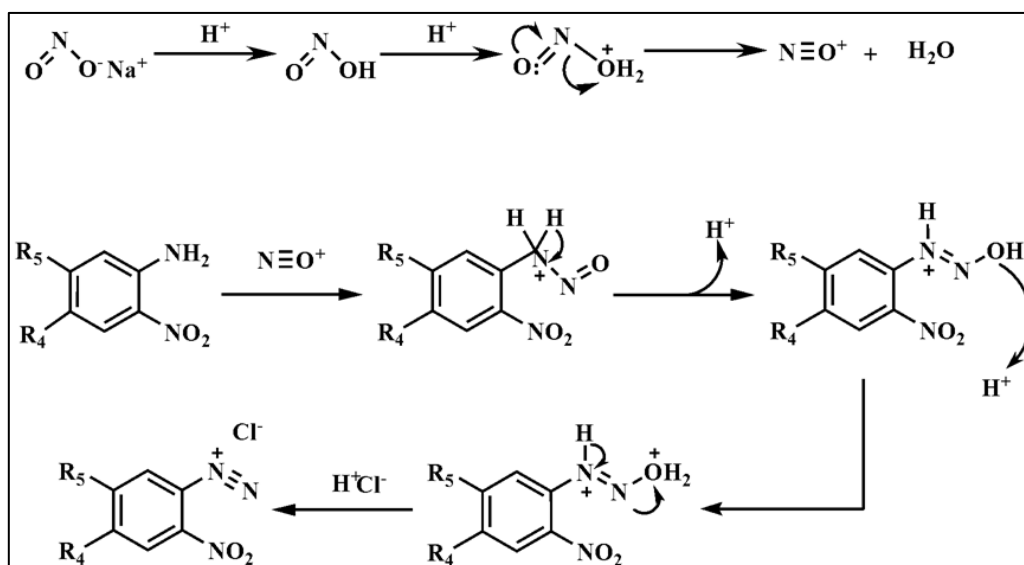


Figura 44. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de la sal de diazonio.

Una vez obtenida la sal de diazonio, ésta se trata con azida sódica. El mecanismo de reacción más probable es la formación de un aducto inestable que se descompone en nitrógeno gas, en forma de vapores naranjas, y en la *o*-nitrofenilazida correspondiente (**Figura 45**).²⁷⁰

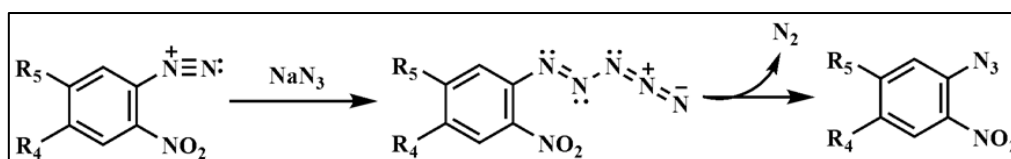


Figura 45. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de *o*-nitrofenilazida.

Finalmente, se realiza un tratamiento térmico de la *o*-nitrofenilazida, originando un intermedio nitreno, fruto de la pirólisis de la azida. Este intermedio, por su carácter electrófilo, es susceptible de ser atacado intramolecularmente por el grupo nitro situado en posición *orto*. La posterior reordenación electrónica permite la obtención del BFX correspondiente (**Figura 46**).²⁶⁸

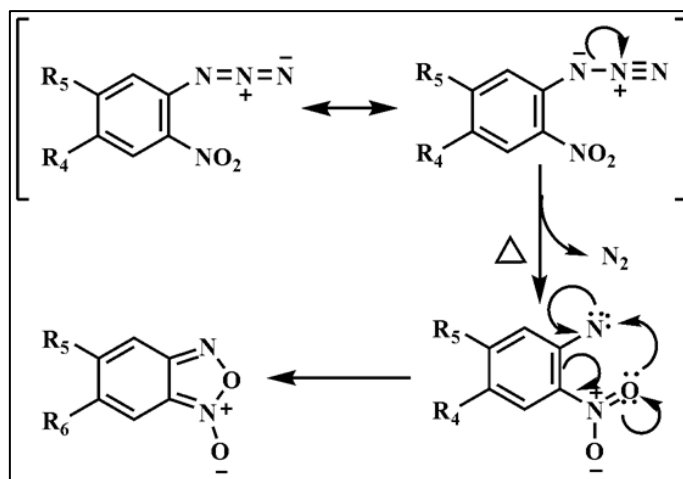


Figura 46. Mecanismo de reacción propuesto para la ciclación final del benzofuroxano.

28.2. Isómeros de posición en la síntesis de benzofuroxanos 5(6)-monosustituídos

La interconversión de dos BFXs isoméricos en solución es uno de los rasgos más importantes y característicos de la química de estos compuestos. El tautomerismo de los BFXs ha sido objeto de numerosas publicaciones y ha sido ampliamente estudiado mediante métodos de RMN multinuclear, los cuales posibilitaron establecer que el equilibrio entre isómeros ocurría a través de un intermedio *o*-dinitrosobenceno (Figura 47).

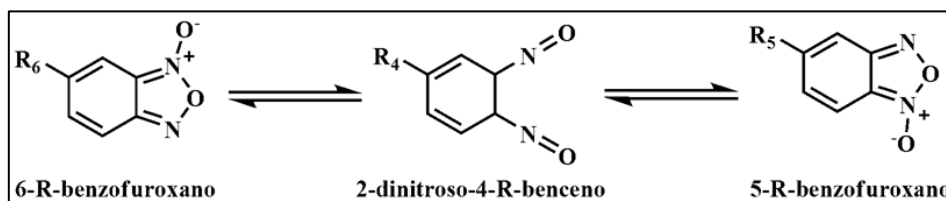


Figura 47. Equilibrio de isómeros en BFX-5(6) monosustituídos.

Las constantes de equilibrio en la isomerización de los BFX's son determinadas por una combinación de factores que dependen de los sustituyentes y la forma en que son capaces de interactuar con las dos posiciones del anillo heterocíclico. El equilibrio de los 5(6)-benzofuroxanos sustituidos debe estar sujeto a efectos electrónicos y no a efectos estéricos. Algunos autores han sugerido que sustituyentes electroatrayentes, como NO_2 , COOH y CN , favorecerían la estabilidad del isómero R_5 -sustituído, y los sustituyentes electrodonantes, como CH_3 y OCH_3 , favorecen la formación del isómero R_6 -sustituído.^{250,266,268,269,271-273}

29. Química de las β -cetoamidas

29.1. Síntesis de los intermedios de la serie 3 (INT3.1 y INT3.2)

La síntesis de las β -cetoamidas intermedias utilizadas en la síntesis los compuestos de la serie 3 se llevó a cabo mediante la condensación entre el 4,4,4-trifluoroacetoacetato y la

piperazina correspondiente utilizando 2-hidroxi-piridina como catalizador (**Figura 48**). La reacción se realizó bajo atmósfera de N_2 para asegurar unas condiciones de máxima ausencia de humedad.

En el caso del **INT3** sintetizado a partir de la 4-clorofenilpiperazina se requirió un tratamiento previo de la piperazina de partida con una disolución saturada de hidróxido sódico para obtener la 4-clorofenilpiperazina en su forma de base libre, ya que se comercializa en forma de clorhidrato.

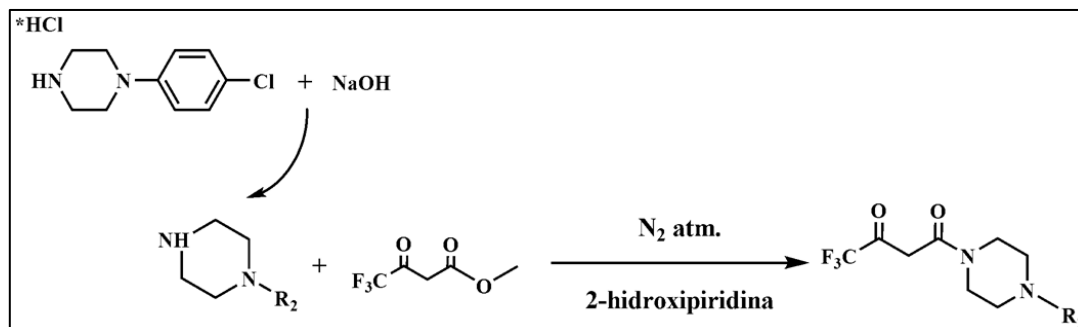


Figura 48. Esquema de síntesis empleado en la obtención de los intermedios de la serie 3 (**INT3**).

Se ha propuesto que la reacción, como se muestra en la **Figura 49**, ocurre a través de un mecanismo que implica la formación de un intermedio cíclico (ciclo espiránico). En primer lugar, la 2-hidroxi-piridina ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del éster de partida, formándose un intermedio **A** que es estabilizado por puentes de hidrógeno. La piperazina ataca a este intermedio generándose un nuevo intermedio **B**, estabilizado también por puentes de hidrógeno, el cual, tras un reordenamiento electrónico, da lugar al producto buscado.^{248,274}

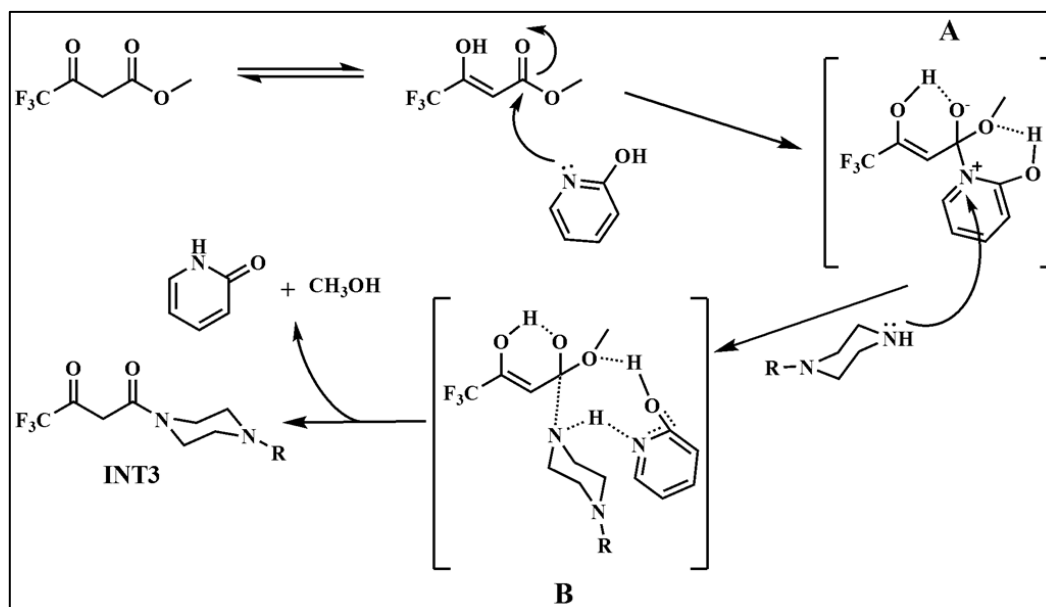


Figura 49. Mecanismo de reacción propuesto.

El producto intermedio (**INT3**) obtenido tras esta reacción presentaba una cantidad muy elevada de productos secundarios que dificultaba en gran medida su purificación. Por esta razón,

se decidió utilizarlo sin purificar. Intermedios análogos presentando un grupo metilo en lugar de un grupo trifluorometilo, sintetizados previamente por nuestro grupo,^{248,250} poseían un rendimiento más elevado y unos perfiles de reacción más limpios. Esta observación parece indicar la clara influencia que presenta el grupo trifluorometilo sobre la reactividad de los compuestos.

30. Química de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina

30.1. Reacción de Beirut. Síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (series 1, 3, 4 y 5)

La síntesis de los compuestos de las series 1, 3, 4 y 5 se llevó a cabo mediante la reacción de Beirut. Esta reacción fue descrita por primera vez en 1965 por dos investigadores, M. Haddadin y C. Issidorides, de la Universidad Americana de Beirut, ciudad a la que debe su nombre.^{266,270,275,276}

Antes de 1965, los métodos generales para obtener derivados de quinoxalina di-*N*-óxido se basaban en la ciclación de un precursor adecuado para dar el producto di-*N*-oxidado o en la oxidación directa de la quinoxalina correspondiente. Estos procedimientos, generalmente, eran problemáticos por la formación de mezclas de productos mono y di-*N*-oxidados, por la posible oxidación total del producto y, en muchas ocasiones, no se disponía del precursor adecuado. Su descubrimiento supuso un gran avance en el desarrollo de la síntesis de compuestos aromáticos *N*-oxidados, de gran interés en química médica, ya que se trataba de un método de síntesis de un solo paso que implicaba la condensación entre BFXs y enaminas, **Figura 50**.

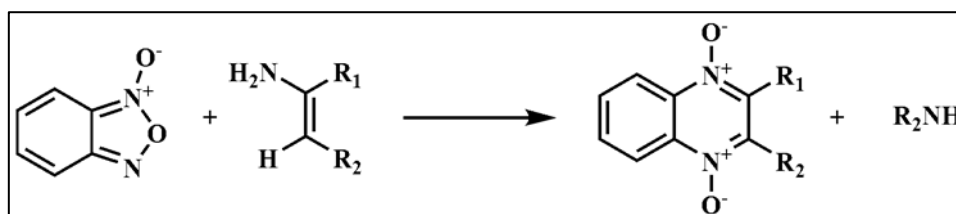


Figura 50. Reacción de Beirut descrita por M. Haddadin y C. Issidorides.

Sin embargo, además de esta primera definición, la reacción de Beirut engloba a toda reacción en la que un BFX es condensado con un derivado carbonílico, principalmente β -cetoésteres, β -dicetonas y β -cetocarboxamidas, en presencia de una base, con o sin la formación de las enaminas correspondientes.²⁷⁵

El mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido mediante la reacción de Beirut se muestra en la **Figura 51**.

En primer lugar actuaría la base condensante añadida en la reacción. Ésta es capaz de arrancar un protón del α -metileno del reactivo dicarbonílico, formándose un carbanión. Este carbanión atacará nucleofílicamente al nitrógeno positivo del BFX. Posteriormente, promovido por el nitrógeno nucleofílico del intermedio formado en el primer paso, se produce un nuevo

ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico. Tras esto, se produce un reordenamiento electrónico que conlleva la pérdida de una molécula de agua y da lugar a la formación del correspondiente derivado de quinoxalina-1,4-di-*N*-óxido.

Por la presencia de grupos funcionales de diferente reactividad en las posiciones R_2 y R_3 del reactivo dicarbonílico la reacción es quimioselectiva.^{275,277,278}

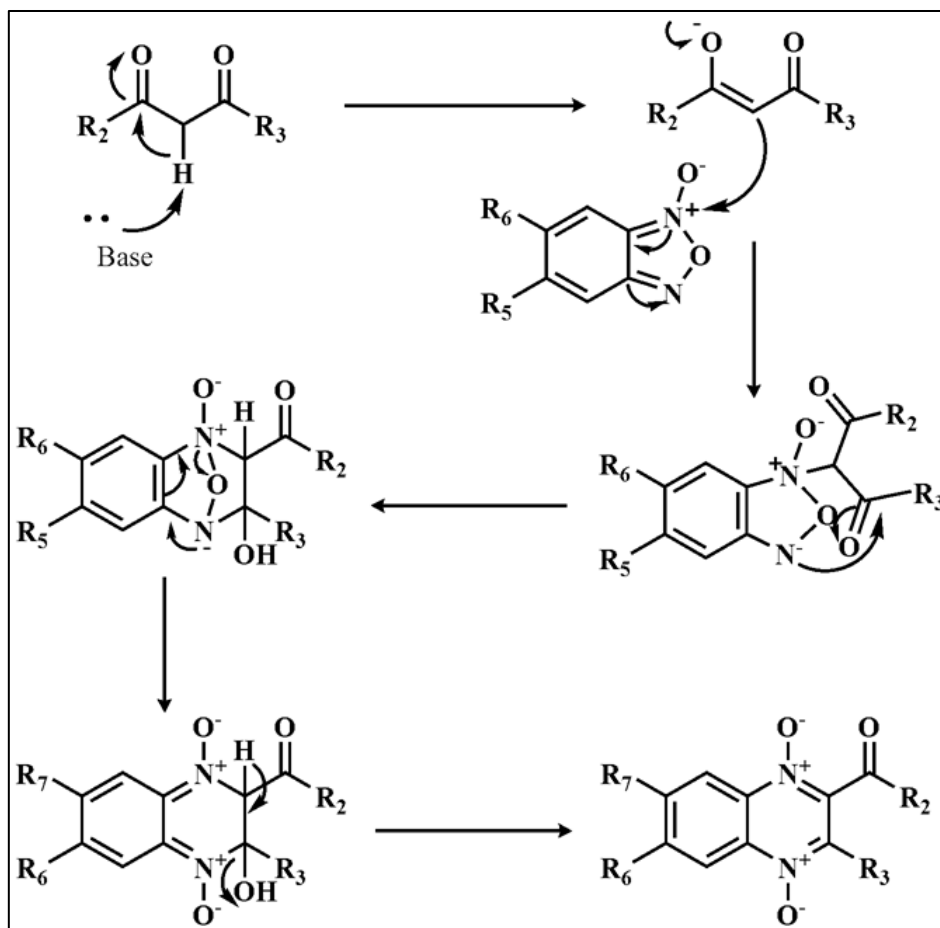


Figura 51. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los compuestos de las series 1, 3, 4 y 5 a través de la reacción de Beirut.

30.1.1. Reacción de Beirut convencional. Síntesis de las series 1, 4, 5 y compuesto 7.1

Existen diferentes procedimientos sintéticos convencionales para llevar a cabo la reacción de Beirut, los cuales, se diferenciarán principalmente en el tipo de base condensante y en el disolvente de reacción empleados. Estos diferentes métodos vendrán determinados generalmente por el tipo de compuesto carbonílico que se pretenda condensar con el correspondiente BFX.

Tradicionalmente, el grupo de trabajo ha realizado la reacción de Beirut utilizando los métodos que se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Métodos de síntesis convencionales utilizados por el grupo investigador para llevar a cabo la reacción de Beirut. ^aTemperatura ambiente.

Derivado carbonílico	Base	Disolvente	T ^a /Tiempo
β -dicetona	Trietilamina	Cloroformo seco	T ^a amb ^a /1-5 días
β -dicetona	KF/Alúmina 40%	Acetona	T ^a amb ^a /14-24 horas
β -cetoéster	K ₂ CO ₃	Acetona	T ^a amb ^a /1-7 días
β -cetoéster	Tamiz molecular	-	90°C/1 hora
β -cetocarboxamida	Etanolamina/CaCl ₂	Metanol	T ^a amb ^a /1-48 horas
β -cetocarboxamida	Morfolina	Cloroformo seco	T ^a amb ^a /48 horas
2-butanona	Trietilamina/Pirrolidina	-	0-5°C/20 minutos

Los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a las **series 1, 4 y 5** y el compuesto **7.1** han sido sintetizados mediante métodos de síntesis convencionales siguiendo el esquema mostrado en las **Figura 52 y 53**, respectivamente.

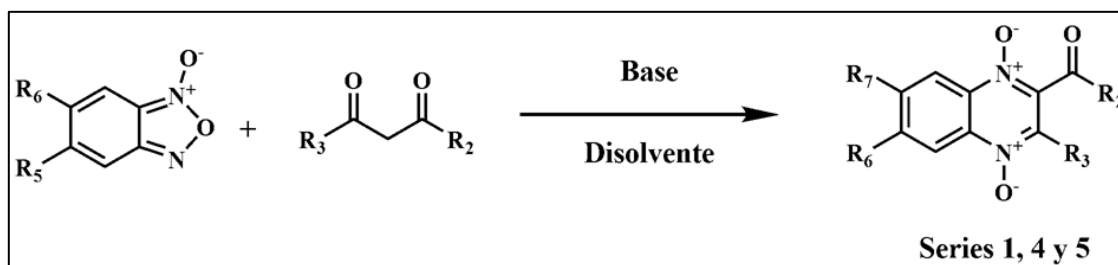


Figura 52. Esquema general de síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a las series 1, 4 y 5 mediante la reacción de Beirut convencional.

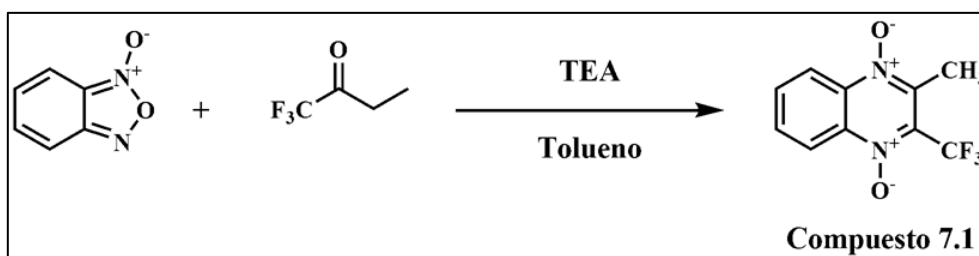


Figura 53. Esquema general de síntesis del compuesto 7.1 mediante la reacción de Beirut convencional.

30.1.2. Síntesis orgánica asistida por microondas. Síntesis de las series 1, 3 y 5

La síntesis de compuestos pertenecientes a las **series 1 y 5** presentados en este trabajo mediante la reacción de Beirut convencional ofrecía importantes limitaciones en cuanto a tiempos de reacción, rendimientos y dificultad de purificación. Por ello, con el objetivo de optimizar la síntesis de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido mediante la reacción de Beirut, ha sido utilizada la síntesis orgánica asistida por microondas (SAM).

La SAM es una técnica en auge en la química médica y que ha sufrido un gran desarrollo en los últimos 20 años.

Los primeros trabajos sobre la utilidad de la energía microondas en la aceleración de la velocidad de reacciones químicas fueron publicados en 1986 por Giguere y Gedye. Desde entonces, el avance en el número de investigaciones ha sido muy importante, pasando de 200 publicaciones en el año 1995 a cerca de 3000 en el 2006. Las mejoras técnicas de los aparatos



Figura 54. Aparato microondas empleado en este trabajo.

microondas (**Figura 54**) han hecho posible monitorizar totalmente las condiciones de reacción, consiguiéndose de esta forma una comparabilidad y reproducibilidad muy eficaz de las reacciones químicas. La importancia adquirida por esta técnica en el mundo de la química médica es muy relevante.²⁷⁹⁻²⁸³

En las reacciones llevadas a cabo en microondas, la radiación, como se muestra en la **Figura 55**, incide directamente sobre las moléculas presentes en la reacción consiguiendo un calentamiento uniforme por un efecto dieléctrico. A este efecto se

le denomina efecto térmico de la radiación microondas y muchos autores indican que es el único responsable de las características mostradas por la síntesis en microondas. Sin embargo, existe controversia acerca del efecto de la energía microondas sobre las moléculas participantes en la reacción química, y diferentes autores defienden la existencia también de un efecto no térmico provocado por el campo eléctrico generado, el cual conduciría a una disminución de la energía de activación en las reacciones por un mecanismo polar, pasando del estado fundamental al estado de transición.²⁸¹⁻²⁸⁷

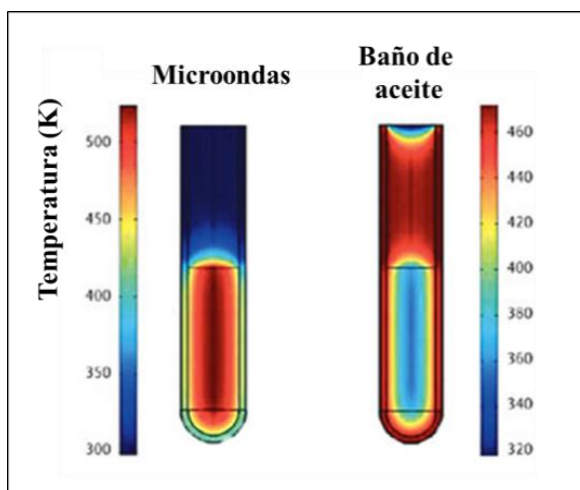


Figura 55. Calentamiento de la reacción por microondas y mediante baño de aceite.

A la hora de plantear la optimización del método de síntesis se pensó en la utilización de la síntesis asistida por microondas por las ventajas teóricas que ofrece:

- Calentamiento uniforme, ya que se da una transferencia directa de energía a todo el volumen de la muestra.
- Disminución significativa de los tiempos de reacción.
- Aumento de los rendimientos.
- Mayor grado de pureza del producto de reacción. Al aumentarse la velocidad de reacción se evita la posible descomposición del producto que se está formando y se disminuye el número de reacciones colaterales que dan lugar a la formación de productos secundarios.

- Simplificación del método experimental.
- Tecnología emergente y sostenible. El calentamiento por microondas es energéticamente más eficiente que el calentamiento clásico ya que se trata de un calentamiento molecular directo. Además la cantidad de disolvente empleada se reduce considerablemente, lo que conlleva una menor cantidad de residuos generados.

La significativa reducción en los tiempos de reacción, el aumento de rendimientos y la progresión limpia de la reacción permiten una optimización más rápida de los métodos de síntesis y la obtención de una librería extensa de compuestos en menos tiempo, con la importancia que esto tiene en la búsqueda de nuevos líderes activos.

Mediante el uso de la SAM se ha conseguido optimizar el método de síntesis de derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido a través de la reacción de Beirut. Este nuevo método de síntesis (**Figura 56**) ha sido empleado para la síntesis de los compuestos pertenecientes a las **series 1, 3 y 5**.

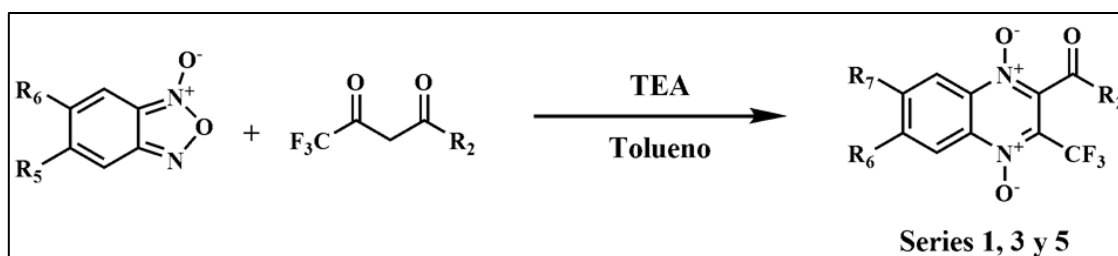


Figura 56. Esquema general de síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a las series 1, 3 y 5 empleando la SAM aplicada a la reacción de Beirut.

Las condiciones de reacción aplicadas (potencia, temperatura y tiempo), mostradas en el apartado 34 de métodos generales de síntesis, variaban para cada serie. Además, dentro de cada serie las condiciones de reacción se muestran como un rango de valores ya que se modificaron en función de los sustituyentes que presentara el BFX de partida. Los derivados con sustituyentes electrodonantes (CH₃ o CH₃O) en las posiciones R₆ y/o R₇ del anillo de quinoxalina requerían tiempos de reacción más elevados y condiciones de mayor temperatura y potencia que los derivados con sustituyentes electroatrayentes (Cl, F y CF₃).

Para comprobar las ventajas ofrecidas por este nuevo método de síntesis con respecto a la síntesis convencional se sintetizaron por duplicado, utilizando ambos métodos de síntesis, varios derivados pertenecientes a las **series 1 y 5**. La comparación en cuanto a rendimientos y tiempos de reacción obtenidos se muestran en la sección 41 de resultados y discusión.

30.2. Isómeros de posición en las quinoxalinas 6(7)-monosustituidas

La existencia de isómeros de posición es observada también en el caso de las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido sustituidas asimétricamente. Cuando la reacción de Beirut es llevada a cabo empleando BFXx mono-sustituidos, se obtiene una mezcla de isómeros de posición de la

correspondiente quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. El grado de regioespecificidad de la reacción depende de la naturaleza de los sustituyentes. Cuando el sustituyente es un grupo metoxilo, se ha observado que únicamente se obtiene uno de los isómeros posibles, mientras que cuando los sustituyentes empleados son halógenos, metilo o trifluorometilo, se observa una mezcla de isómeros. La proporción de cada isómero está relacionada con la naturaleza del sustituyente empleado y con el método sintético utilizado; sin embargo, de acuerdo con estudios previos, en todos los casos el isómero más abundante se corresponde con el derivado sustituido en la posición 7 del anillo de quinoxalina y coincide con el obtenido en los compuestos presentados en este trabajo.^{185,250,288}

31. Sustitución nucleofílica aromática. Síntesis de los derivados de la serie 6

Para realizar la síntesis de los derivados de la **serie 6** se utilizó una sustitución nucleofílica aromática (S_NAr) utilizando como reactivos intermedios de partida compuestos de la **serie 1** (**INT1**), todos ellos conteniendo cloro o flúor en las posiciones R_6 y/o R_7 del anillo de quinoxalina. A partir de estos intermedios, se llevó a cabo una S_NAr sobre los átomos de cloro o flúor de las posiciones R_6 y/o R_7 del anillo de quinoxalina utilizando diferentes tipos de aminas heterocíclicas como nucleófilo.

El mecanismo propuesto para la reacción, mostrado en la **Figura 57**, constaría de 2 etapas y se denomina mecanismo de adición-eliminación, también denominado por otros autores como desplazamiento bimolecular.²⁸⁹

-Primera etapa:

Conlleva el ataque del nucleófilo, en este caso la amina heterocíclica, sobre el carbono que presenta el sustituyente halógeno (Cl o F). Tras este ataque se rompe la aromaticidad del anillo generándose un carbanión intermediario estabilizado por resonancia y que se denomina complejo Meisenheimer. El complejo de Meisenheimer consta de 3 formas resonantes cargadas negativamente. Se forma un nuevo enlace C-Nu, donde el carbono pasa de una estructura plana (sp^2) a una estructura tetraédrica (sp^3). Esta etapa determina la velocidad de la reacción, siendo mucho más lenta que la segunda etapa.

-Segunda etapa:

Se produce la salida del átomo halógeno. El carbanión intermedio experimenta la eliminación del halogenuro con la consiguiente recuperación de la aromaticidad y obteniéndose el producto sustituido.

El proceso de optimización del método de síntesis empleado en la obtención de los derivados de la **serie 6** se discute en el apartado 42 de resultados y discusión.

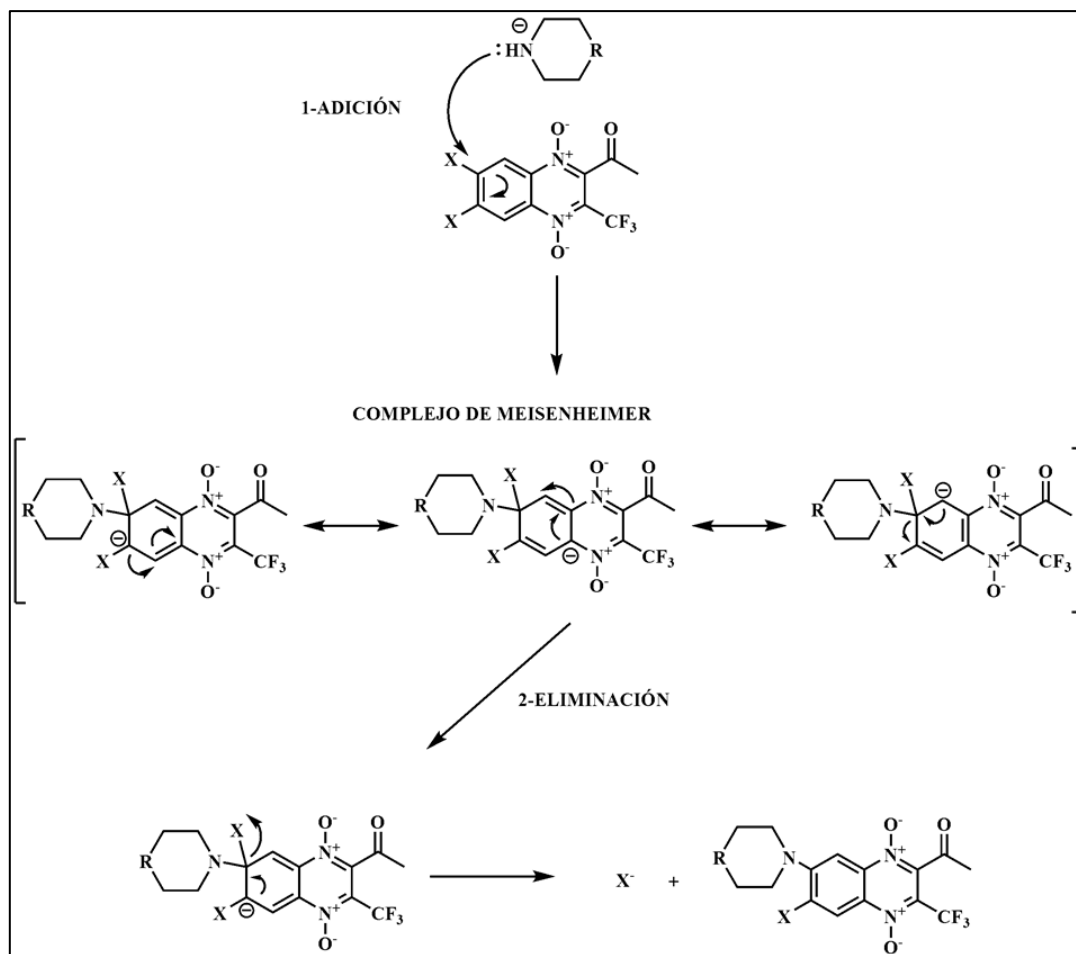


Figura 57. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los derivados de la serie 6 utilizando sustitución nucleofílica aromática.

32. Reducción de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido: obtención de los derivados de la serie 2 y el compuesto 6.17

Los compuestos de la **serie 2** y el compuesto **6.17** fueron obtenidos, como se muestra en la **Figura 58**, mediante la reducción de los grupos *N*-óxido a partir de derivados di-*N*-óxido de la **serie 1** y de la **serie 6**, respectivamente, utilizando ditionito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como agente reductor.

A la hora de llevar a cabo la reacción es muy importante controlar el tiempo de reacción, ya que anteriormente, el grupo observó que una exposición prolongada al agente reductor, ditionito sódico en este caso, podía provocar una reducción del grupo carbonilo en posición 2 y una aparición de productos secundarios que imposibilitaran la purificación y aislamiento del producto buscado. El tiempo necesario para una correcta reducción en este tipo de compuestos se estableció en 10-15 minutos, en función de la naturaleza de los sustituyentes presentes en las posiciones R_6 y/o R_7 del anillo de quinoxalina. Los compuestos con sustituyentes electroatrayentes reaccionan más rápidamente que los compuestos con sustituyentes electrodonantes, posiblemente por la potenciación de la polaridad del enlace *N*-óxido

provocada por los átomos electroatrayentes. Este aumento de polaridad provoca una mayor facilidad de rotura del enlace *N*-óxido.²⁸⁸

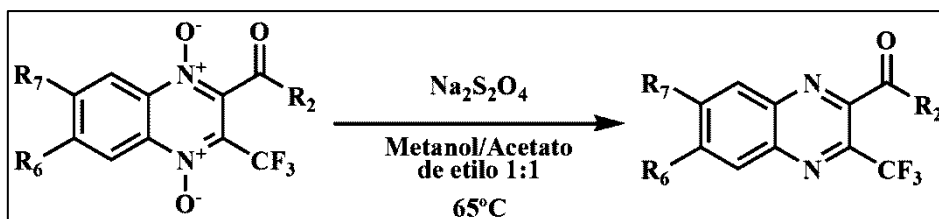


Figura 58. Esquema general de síntesis utilizado en la obtención de los derivados de la serie 2 y del derivado 6.17.

Si la reducción ocurre correctamente es fácilmente detectable a través de espectroscopia de infrarrojo ya que el pico de fuerte absorción correspondiente al enlace *N*-óxido (1350-1320 cm⁻¹) desaparece.

El mecanismo de reacción no está claramente establecido pero se propone que transcurre como se muestra en la **Figura 59**. Ocurriría a través de dos pasos, primero se produciría el ataque nucleofílico del ditionito sódico sobre la posición 3 del anillo de quinoxalina. Se cree que la afinidad del ditionito sódico es superior por centros electrófilos, por ello, se propone que la primera posición atacada sea la posición 3, donde se encuentra el grupo trifluorometilo, altamente electrófilo. El intermedio resultante del ataque nucleofílico perdería un grupo SO₂ formándose un anión sulfinato que finalmente se descompondría para dar el producto mono-reducido. En un segundo paso se daría el ataque del ditionito sódico sobre la posición 2 del anillo de quinoxalina dando como resultado el derivado de quinoxalina final.^{290,291}

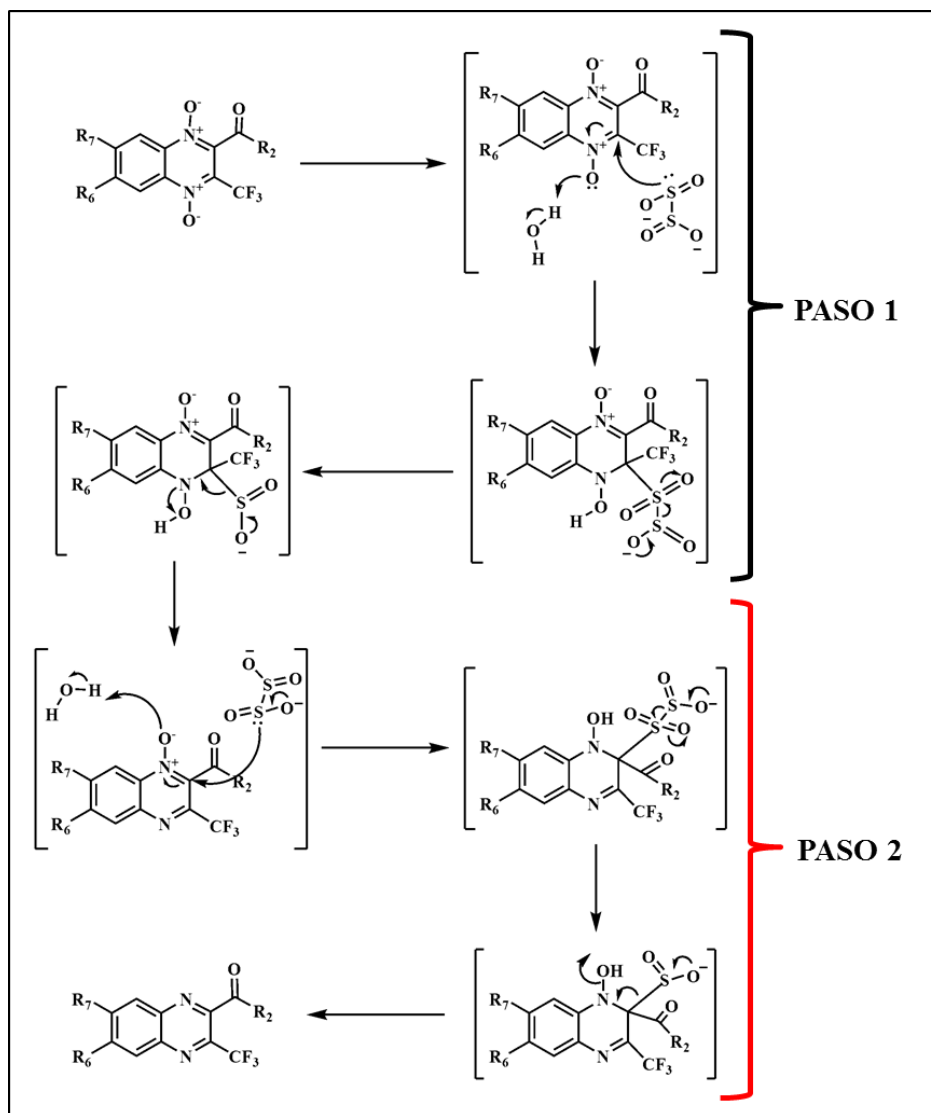


Figura 59. Mecanismo de reacción propuesto para la reducción de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina.

VI. EXPERIMENTACIÓN QUÍMICA

33. Materiales y reactivos

Reactivos

Todos los reactivos y disolventes comerciales han sido adquiridos de: Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid), Merck (Darmstadt, Alemania), Scharlau (FEROSA, Barcelona, España), Panreac Química S.A. (Montcada i Reixac, Barcelona, España), Acros Organics (Janssen Pharmaceuticaaan, Geel, Bélgica) y Lancaster (Bischheim-Estrasburgo, Francia).

Síntesis asistida por microondas

Para la síntesis de muchos de los compuestos presentados se ha utilizado el equipo microondas Discover SP System (CEM Corporation), utilizando el software Synergy™. Las reacciones se han llevado a cabo en envases especiales de 35 ml (compañía CEM) con un sistema especial (IntelliVent Technology) para poder realizarlas a alta presión bajo radiación microondas.

Todos los compuestos sintetizados han sido estructuralmente caracterizados mediante punto de fusión, cromatografía en capa fina (CCF), infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y microanálisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno CHN).

Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo han sido realizados en un aparato Nicolet Nexus FTIR (Thermo, Madison, EE.UU.), con el programa informático OMNIC 6.0, utilizando pastillas de bromuro potásico (KBr) para las muestras sólidas. Los números de onda se expresan en cm⁻¹ y la intensidad de las bandas se describe de la siguiente manera: mf (señal muy intensa), f (señal intensa), m (señal media) y d (señal débil).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H)

Los experimentos de RMN han sido obtenidos en un aparato Bruker 400 Ultrashield™ (400 MHz), utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los disolventes empleados en la preparación de las muestras fueron cloroformo deuterado (CDCl₃) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) en función del compuesto a analizar. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y el valor de las constantes de acoplamiento se expresa en Herzios (Hz). La multiplicidad de las señales se representa mediante las siguientes abreviaturas: s (singlete), sa (singlete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), ddd (doble doblete desdoblado), t (triplete), tt (triple triplete) y m (multiplete).

Análisis elemental (C, H, N)

Los microanálisis elementales fueron realizados en un analizador elemental CHN-900 (Leco, Tres Cantos, España) a partir de muestras secadas al vacío. Los resultados analíticos para el C, H y N estuvieron dentro del límite ±0,4 respecto a los valores teóricos calculados.

Puntos de fusión (Pf)

Los puntos de fusión de los productos descritos han sido determinados en un equipo Mettler FP82 + FP80 (Greifense, Suiza) y no han sido corregidos. La temperatura de fusión se muestra en grados centígrados (°C).

Cromatografía

- Las cromatografías en capa fina (TLC) se han desarrollado sobre gel de sílice de 0,2 mm de espesor (ALLUGRAM SIL G/UV254, ref. 818133, Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG., Düren, Alemania). El revelado de las placas se ha realizado bajo luz ultravioleta de 254 y 365 nm.
- Las cromatografías en columna (CC) se han desarrollado en columnas de vidrio empaquetadas con gel de sílice de 0,040-0,063 mm de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania).

34. Métodos generales de síntesis

34.1. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a la serie 1

La síntesis de los compuestos pertenecientes a la **serie 1** se llevó a cabo empleando la reacción de Beirut. Para ello se utilizaron tres métodos de síntesis diferentes, un método convencional (**la**) y dos métodos asistidos por microondas (**lb-1** y **lb-2**) tal y como se indica en la **Tabla 13**. La síntesis de los compuestos **1.2**, **1.7-1.12**, **1.14**, **1.15**, **1.17**, **1.23** y **1.24** mediante el método convencional fue previamente publicada por el grupo de trabajo,^{185,210} pero para su evaluación biológica frente a *T. cruzi* tuvieron que ser re-sintetizados.

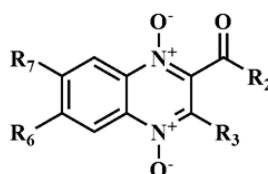


Tabla 13. Compuestos pertenecientes a la **serie 1**.

Comp.	R ₇ /R ₆	R ₂	Método	Comp.	R ₇ /R ₆	R ₂	Método
1.2	CH ₃ O/H		la y lb-1	1.24	F/F	-C(CH ₃) ₃	la y lb-1
1.7	F/F		la y lb-1	1.25	H/H		lb-1
1.8	H/H		la y lb-1	1.26	F/F		lb-1
1.9	F/F		la y lb-1	1.27	H/H		lb-2
1.10	H/H		la y lb-1	1.28	CH ₃ O/H		lb-2
1.11	F/F		la y lb-1	1.29	CH ₃ /H		lb-2
1.12	CF ₃ /H		lb-1	1.30	CH ₃ /CH ₃		lb-2
1.14	H/H		lb-1	1.31	Cl/H		lb-2
1.15	F/F		lb-1	1.32	Cl/Cl		lb-2
1.17	F/F	-CH ₃	la y lb-1	1.33	F/H		lb-2
1.23	H/H	-C(CH ₃) ₃	la y lb-1	1.34	F/F		lb-2

34.1.1. Método la: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido mediante el método convencional (1.2, 1.7-1.11, 1.17, 1.23 y 1.24)

En un matraz de 100 mL se disuelve el BFX correspondiente (2,4 mmol) en 35 mL de cloroformo seco. Una vez disuelto se añaden 10,6 mmol de la 4,4,4-trifluorometil- β -dicetona correspondiente (5,05 mmol). La mezcla de reacción se enfría a 0-5°C colocándola sobre hielo y entonces se añade 1 mL de TEA gota a gota. La reacción se mantiene en agitación y protegida de

la luz durante 1-5 días a temperatura ambiente. La formación de producto se comprueba mediante CCF utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. En ese momento se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un aceite marrón que se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Las fracciones de interés recogidas de la columna se evaporan a presión reducida y el aceite obtenido se precipita y se lava con éter etílico.

34.1.2. Método Ib-1: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-oxo-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido mediante el método de síntesis asistido por microondas (1.2, 1.7-1.12, 1.14, 1.15, 1.17 y 1.23-1.26)

En un recipiente de reacción de microondas de 35 mL se disuelve con agitación magnética vigorosa el BFX correspondiente (10 mmol) en 15 mL de tolueno. Una vez disuelto, se coloca el tubo sobre hielo y se añade 4,4,4-trifluorometil- β -dicetona correspondiente (15 mmol) gota a gota. Finalmente, se añaden 1,5 mL de TEA, también gota a gota, y se coloca el tapón al recipiente de microondas. Se mantiene en agitación 15 minutos.

La mezcla de reacción se coloca entonces en el microondas y es sometido al método optimizado:

-Potencia: 70 W. -Tiempo: 45-60 minutos. -Temperatura: 70-80°C.

Una vez completado el tiempo de reacción, la formación de producto se comprueba mediante CCF utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. La mezcla de reacción se coloca en un matraz de 50 mL y se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Las fracciones de interés obtenidas de la columna se evaporan a presión reducida y el sólido amarillo obtenido se filtra a vacío y se lava con éter etílico.

34.1.3. Método Ib-2: Método general de síntesis de los derivados (1.27-1.34)

En un tubo de microondas se disuelven 2,94 mmol del BFX de partida correspondiente en 15 mL de tolueno. Una vez disuelto, bajo agitación magnética vigorosa, se enfría la reacción sobre hielo y se añaden 3,63 mmol del reactivo comercial 1,1,1-trifluorometil-4-fluorofenil-2,4-butanodiona. Finalmente, se añaden a la mezcla de reacción 1,5 mL de TEA gota a gota. Una vez añadido se coloca el tubo de reacción en el microondas y se somete al método optimizado durante siete tandas repetidas:

Potencia: 50 W. -Temperatura: 80°C. -Tiempo: 15 minutos. X 7

En cada tanda de reacción aplicada se sigue la evolución de la reacción mediante CCF utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Una vez comprobada la formación de producto, se traspa la mezcla de reacción a un matraz de 50 mL y se elimina el disolvente bajo presión reducida. El

aceite obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando CH_2Cl_2 como eluyente. Se elimina el disolvente de las fracciones de interés bajo presión reducida y el sólido amarillo obtenido se filtra a vacío y se lava con éter dietílico.

34.2. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-(piperazina-1-carbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a la serie 3

La síntesis de los derivados **3.1** y **3.2** (Tabla 15) de la **serie 3** incluía dos pasos, la obtención del **INT3** (Tabla 14) y la condensación entre el **INT3** y el BFX correspondiente.

34.2.1. Método IIIa. Procedimiento general de síntesis de los INT3

1-Desprotección de la 4-clorofenilpiperazina:

En el caso del **INT3.2** fue necesario desproteger previamente la 4-clorofenilpiperazina de partida ya que se comercializaba en forma de clorhidrato. Para ello, sobre una disolución saturada de NaOH (100 mL) se añaden 22 mmol de 1-(4-clorofenil) piperazina hidrocloreto 95%. Se mantiene 10 minutos en agitación y para obtener la base libre se realiza una extracción con acetato de etilo. Se recoge la fase de acetato de etilo, se seca con Na_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se filtra a vacío y se lava con éter dietílico frío.

2-Método general de síntesis de los INT3.1 y INT3.2:

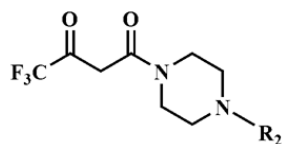


Tabla 14. Intermedios de la serie 3.

Compuesto	R ₂
INT3.1	
INT3.2	

Sobre un matraz de 250 mL de 3 bocas se añaden, en agitación magnética, 35,8 mmol de 4,4,4-trifluoroacetoacetato de metilo y 86,5 mmol de la correspondiente piperazina. Seguidamente se adicionan 26,8 mmol de 2-hidroxipiridina. La mezcla de reacción se calienta sobre un baño de aceite a 169°C y se mantiene durante 5 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez transcurrido el tiempo se quita el baño de aceite y se deja enfriar la reacción hasta los 60-70°C. Alcanzada esa temperatura se añade agua caliente (60°C) sobre la mezcla de reacción y se coloca en agitación 15 minutos. La suspensión resultante se extrae con CH_2Cl_2 , se eliminan las trazas de agua de la fase orgánica utilizando Na_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida. El

aceite obtenido se utiliza como **INT3** en la siguiente reacción sin una purificación completa.

34.2.2. Método IIIb. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-(piperazina-1-carbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuestos 3.1 y 3.2):

En un recipiente de reacción de microondas se disuelven 2,8 mmol del BFX correspondiente en 20 mL de tolueno y se añaden 5,7 mmol del **INT3** correspondiente. El recipiente de reacción se enfría sobre hielo y se añaden entonces 1,5 mL de TEA gota a gota. La solución se mantiene 10 minutos en agitación magnética a temperatura ambiente. Pasado el

tiempo, se coloca el recipiente en el microondas y se aplica el método optimizado, que muestra los siguientes parámetros:

-Potencia: 50 W. -Temperatura: 90°C. -Tiempo: 105 minutos.

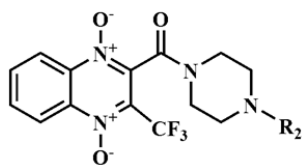


Tabla 15. Compuestos de la serie 5.

Compuesto	R ₂
3.1	
3.2	

La formación de producto se comprueba mediante CCF utilizando tolueno/dioxano (9/1) como fase móvil. Se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor y el aceite obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (9/1) como eluyente. Se elimina, a presión reducida, el disolvente de las fracciones de interés obtenidas de la columna y el aceite amarillo obtenido se precipita con éter dietílico y se filtra a vacío.

34.3. Método IV. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-benzoil-3-difluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a la serie 4 (Compuestos 4.1-4.6)

La síntesis de los compuestos de la serie 4 (Tabla 16) se llevó a cabo utilizando la reacción de Beirut mediante un método convencional empleado por el grupo, el cual proporcionó buenos resultados en cuanto a rendimientos de reacción y facilidad del procedimiento de purificación.

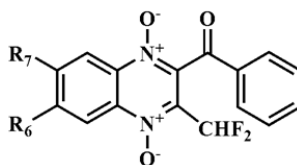


Tabla 16. Compuestos de la serie 4.

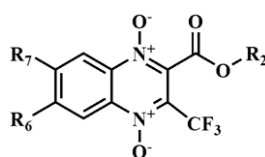
Compuesto	R ₇ /R ₆
4.1	H/H
4.2	CH ₃ O/H
4.3	CH ₃ /H
4.4	Cl/H
4.5	Cl/Cl
4.6	F/H

En un matraz de 250 mL se disuelve el BFX correspondiente (5,05 mmol) en 40 mL de acetona. Una vez disuelto se añaden 6,56 mmol de fluoruro de potasio soportado sobre alúmina 40% (KF/Al₂O₃ 40%) y finalmente se añade la 1-fenil-4,4-difluoro-1,3-butanodiona (5,05 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se mantiene en agitación y protegida de la luz durante 14-24 horas a temperatura ambiente. La formación de producto se comprueba mediante CCF utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. La purificación del producto se lleva a cabo mediante la filtración de la mezcla de la reacción para eliminar el KF/Al₂O₃ 40%. Posteriormente se elimina el disolvente de la fase orgánica, obtenida tras el filtrado, en el rotavapor. El aceite obtenido se disuelve en CH₂Cl₂ y se lava con agua. Tras el lavado, se recoge la fase orgánica, se seca con Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido precipita utilizando una mezcla de n-hexano y metanol. Finalmente el precipitado amarillo obtenido se lava con éter dietílico.

34.4. Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido pertenecientes a la serie 5

Los compuestos pertenecientes a la **serie 5**, como se muestra en la **Tabla 17**, se obtuvieron utilizando la reacción de Beirut empleando 2 métodos de síntesis, el método convencional empleado por el grupo (**Va**) y un nuevo método de síntesis asistida por microondas (**Vb**). Los derivados **5.6-5.8**, **5.10-5.12** y **5.14-5.17** se sintetizaron por duplicado empleando ambos métodos de síntesis.

Tabla 17. Estructura y métodos empleados en la síntesis de los derivados de la **serie 5**.



Comp.	R ₇ /R ₆	R ₂	Método	Comp.	R ₇ /R ₆	R ₂	Método
5.1	H/H	-CH ₃	Va	5.10	H/H	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.2	CH ₃ O/H	-CH ₃	Va	5.11	CH ₃ O/H	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.3	CH ₃ /H	-CH ₃	Va	5.12	CH ₃ /H	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.4	CH ₃ /CH ₃	-CH ₃	Va	5.13	CH ₃ /CH ₃	-CH ₂ CH ₃	Va
5.5	Cl/H	-CH ₃	Va	5.14	Cl/H	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.6	Cl/Cl	-CH ₃	Va y Vb	5.15	Cl/Cl	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.7	F/H	-CH ₃	Va y Vb	5.16	F/H	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.8	F/F	-CH ₃	Va y Vb	5.17	F/F	-CH ₂ CH ₃	Va y Vb
5.9	CF ₃ /H	-CH ₃	Va	5.18	CF ₃ /H	-CH ₂ CH ₃	Va

34.4.1. Método Va: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido mediante el método convencional (Compuestos 5.1-5.18).

En un matraz de 250 mL se disuelve el BFX correspondiente (10 mmol) en 25 mL de acetona y se coloca sobre hielo para que la disolución se enfríe. Una vez fría, se añade gota a gota el 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etilo (15 mmol). Finalmente, se añade el K₂CO₃ (20 mmol), que actuará como catalizador de la reacción. La mezcla de reacción se coloca en agitación magnética vigorosa y a temperatura ambiente durante 1-7 días, dependiendo de los sustituyentes que presente el BFX. El seguimiento de la reacción se realiza mediante CCF utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. La reacción a medida que avanza va tomando una coloración naranja-rojiza. La finalización de la reacción se comprueba mediante CCF. En ese momento se elimina el disolvente a presión reducida y al sólido obtenido se le añade CH₂Cl₂ y se lava con agua para eliminar el K₂CO₃. Tras el lavado se recoge la fase orgánica, se seca con Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite marrón obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Las fracciones de interés

recogidas de la columna se evaporan a presión reducida y el sólido amarillo obtenido se filtra a vacío y se lava con éter etílico.

34.4.2. Método Vb: Procedimiento general de síntesis de los derivados de 2-carboxilato-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido mediante el método de síntesis asistido por microondas (Compuestos 5.6-5.8, 5.10-5.12 y 5.14-5.17)

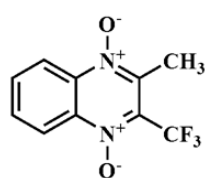
En un recipiente de reacción de microondas de 35 mL se disuelve en agitación magnética vigorosa el BFX correspondiente (10 mmol) en 15 mL de tolueno. Una vez disuelto, se coloca el tubo sobre hielo y se añade el 4,4,4-trifluoroacetato (15 mmol) gota a gota. Finalmente se añaden 1,5 mL de TEA, también gota a gota, y se coloca el tapón al recipiente de microondas.

La mezcla de reacción se coloca entonces en el microondas y es sometido al método optimizado:

-Potencia: 60 W. -Tiempo: 40-60 minutos. -Temperatura: 70°C.

Una vez completado el tiempo de reacción, la formación de producto se comprueba mediante CCF utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. La mezcla de reacción se coloca en un matraz de 50 mL y se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Las fracciones de interés recogidas de la columna se evaporan a presión reducida y el sólido amarillo obtenido se filtra a vacío y se lava con éter etílico.

34.5. Procedimiento general de síntesis del derivado 7.1



-Método VII: En un matraz de 100 mL se disuelve el BFX correspondiente (12 mmol) en 15 mL de tolueno bajo agitación magnética vigorosa. Una vez disuelto se añaden gota a gota 20 mmol de 1,1,1-trifluoro-2-butanona y 5 mL de TEA. La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 20-30 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (8/2) como fase móvil. Finalmente, se elimina el disolvente de la reacción a presión reducida en el rotavapor y el aceite obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando tolueno/dioxano (8/2) como eluyente. El sólido obtenido se filtra a vacío y se lava con éter etílico.

34.6. Métodos generales de síntesis de los derivados de la serie 6

Los compuestos de la **serie 6** (Tablas 18, 19 y 20) se obtuvieron empleando una SNAr que se llevó a cabo a través de tres métodos de síntesis diferentes (**Vla**, **Vlb** y **Vlc**).

34.6.1. Método VIa. Procedimiento general de síntesis de los compuestos 6.1-6.6

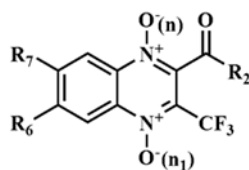
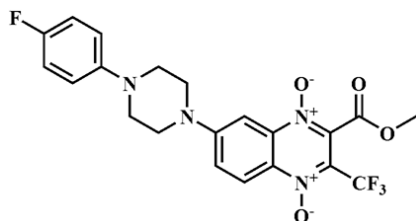


Tabla 18. Compuestos de la serie 6, método VIa.

Compuesto	n	n ₁	R ₂	R ₆	R ₇
6.1	0	1	-OCH ₂ CH ₃	-Cl	
6.2	1	1		-Cl	
6.3	0	1		-Cl	
6.4	1	1	-CH(CH ₃) ₂	-N(CH ₃) ₂	
6.5	1	1	-CH(CH ₃) ₂		
6.6	1	1	-CH ₃	-F	

En un matraz de 50 mL se disuelven 1,01 mmol de **INT1** en 20 mL de *N,N*-dimetilformamida en agitación magnética. Una vez disuelto se adicionan 2 mmol de la amina cíclica secundaria correspondiente. La reacción se coloca en agitación a reflujo durante 1-2 horas. La reacción se sigue mediante CCF utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (8/2) como fase móvil. Tras comprobar la formación de producto, se quita el reflujo y se deja enfriar a temperatura ambiente. Tras esto se añaden 20 mL de una mezcla de hielo y agua. Tras la adición precipita un sólido que se filtra a vacío y se purifica por diferentes procedimientos en función del compuesto.

34.6.2. Método VIb. Procedimiento general de síntesis del derivado 6.7



En un matraz de 50 mL se disuelven con agitación magnética vigorosa 0,94 mmol del **INT1** en 15 mL de acetonitrilo. Una vez disuelto se añade 1 mmol de DBU. Tras la adición del DBU se procede a añadir el derivado de piperazina. Una vez añadidos los reactivos, se coloca la reacción sobre un baño de aceite a 50°C. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (7/3) como fase móvil. Transcurrida una hora se da una importante formación de producto así que la reacción se da por finalizada. Se deja enfriar la reacción a temperatura ambiente y se adiciona hielo y agua. Se mantiene en agitación con agua durante una noche y el precipitado obtenido se filtra a vacío y una vez seco se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (7/3) como eluyente. El sólido obtenido de la columna se purifica completamente mediante un lavado con una mezcla de éter etílico/metanol (1/1).

34.6.3. Método VIc. Procedimiento general de síntesis de los derivados 6.8-6.16

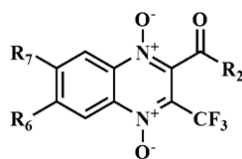


Tabla 19. Compuestos de la serie 6, método VIc.

Compuesto	R ₂	R ₆	R ₇
6.8	-CH ₃	-F	
6.9	-CH ₃		
6.10	-CH ₃	-F	
6.11	-CH ₃		
6.12	-CH ₃	-F	
6.13	-CH ₃		
6.14	-CH ₃	-F	
6.15	-CH ₃	-F	
6.16	-CH ₃	-F	

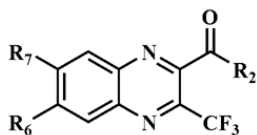
En un matraz de 50 mL se disuelven en agitación magnética 1,01 mmol del INT1 en 15 mL de acetonitrilo. Una vez disuelto se añaden 2 mmol de la amina cíclica secundaria correspondiente y 1,5 mL de TEA. La reacción cambia de color tras finalizar la adición y se mantiene en agitación a temperatura ambiente. La reacción se sigue mediante CCF utilizando una mezcla de tolueno/dioxano (8/2) como fase móvil. Tras 1 hora en agitación el consumo de reactivos es total. Se detiene la agitación y se añaden 20 mL de hielo y agua. Tras la adición se obtiene un abundante precipitado que se filtra a vacío. El sólido obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de tolueno/dioxano, en diferente proporción en función del producto final, como eluyente.

34.7. Método II. Procedimiento general de síntesis de los derivados de la serie 2 y del compuesto 6.17

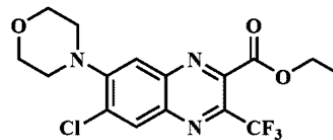
En un matraz de 100 mL se disuelve, bajo agitación magnética vigorosa, 1 mmol del derivado de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido utilizando una mezcla de metanol/acetato de etilo 1/1 (20-30 mL) como disolvente. Una vez disuelta se coloca sobre un baño de agua y se calienta a 65°C. Una vez alcanzada la temperatura se añaden lentamente 6 mmol de ditionito sódico disueltos en 10-15 mL de agua. Una vez adicionado se quita la reacción del baño de agua a 65°C y se deja en agitación durante 5-10 minutos. Pasado el tiempo se elimina el disolvente orgánico a presión reducida en el rotavapor. Se obtiene un aceite blanquecino y un sólido blanco al que se le añade hielo y agua

para conseguir una mayor cantidad de sólido precipitado. El sólido obtenido se filtra a vacío y se purifica mediante cromatografía en columna utilizando CH_2Cl_2 como eluyente.


Tabla 20. Compuestos de la **serie 2**.



Serie 2



Compuesto 6.16

Compuesto	R ₆ /R ₇	R ₂
2.1	H/H	-CH(CH ₃) ₃
2.2	H/H	

VII. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

35. Evaluación biológica *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi*

La evaluación biológica *in vitro* de los nuevos derivados de quinoxalina frente a diferentes cepas y formas de *Trypanosoma cruzi* presentados en este trabajo ha sido realizada por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

35.1. Evaluación biológica *in vitro* frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*

Epimastigotes de la cepa *Tulahuen 2* de *T. cruzi* se cultivan en un medio axénico (BHI-triptosa) según el método previamente descrito,^{208,217,218,244,246,247,292} suplementado con suero bovino fetal al 5%. Las células se mantienen en cultivo durante 10 días y cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria, se inoculan en 50 mL de medio de cultivo fresco para obtener una concentración inicial de 1×10^6 células/mL. El crecimiento celular se sigue diariamente midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm. Antes de la inoculación, el medio fresco se suplementa con una cantidad dada del compuesto a ensayar disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca excede el 0,4%. Como control negativo se utiliza DMSO a una concentración de 0,4%. Concentraciones de DMSO inferiores al 1% se ha comprobado que no causan ningún efecto sobre la forma epimastigote de *T. cruzi*, por ello se elige como control negativo.

El porcentaje de inhibición (%INH) se calcula mediante la fórmula:

$$\%INH = \{1 - (A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})\} \times 100$$

donde,

A_p es la absorbancia a 600 nm del cultivo que contiene la quinoxalina medida en el día 5.

A_{0p} es la absorbancia 600 nm del cultivo que contiene la quinoxalina medida a tiempo 0, justo después de la adición del inóculo de células.

A_c es la absorbancia a 600 nm del cultivo en el quinto día de crecimiento en ausencia de la quinoxalina, control negativo.

A_{0c} es la absorbancia a 600 nm del cultivo sin quinoxalina a tiempo 0.

Para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), el crecimiento parasitario se sigue en ausencia (control negativo) y en presencia de concentraciones crecientes del derivado de quinoxalina evaluado correspondiente. Al quinto día, la absorbancia del cultivo se mide y se relaciona con la medida en el control negativo. El valor de CI₅₀ se toma como la concentración de compuesto necesaria para reducir la absorbancia en una proporción del 50%. Como fármaco de referencia se emplea el Nfx.

35.2. Evaluación biológica *in vitro* frente a la forma epimastigote del clon CL Brener y las cepas Y y Colombiana de *T. cruzi*

Formas epimastigotes de las cepas CL Brener, Y y Colombiana de *T. cruzi* se cultivan mediante el método descrito previamente para la cepa Tulahuen 2.^{244,246,247,292} Se emplean para ello placas de 24 pocillos. Cada pocillo se llena con 1 mL de la cepa parasitaria correspondiente durante su fase de crecimiento exponencial en el medio de cultivo correspondiente. Diferentes concentraciones de los compuestos estudiados se disuelven en DMSO y se añaden a cada pocillo, donde se mantiene en incubación durante 2 días. Pasado el tiempo las células se lavan dos veces con PBS-glucosa (5,5 mM) y se resuspenden en 200 μ L de PBS-glucosa. A continuación, se toman 100 μ L de la suspensión y se añaden 0,4 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich). Una vez añadido se incuba a 28 °C durante 4 horas. Pasado el tiempo se lleva a cabo la lisis de las células empleando SDS-isopropanol (1:5) y las densidades ópticas se miden a 610 nm. Cada concentración se ensaya por triplicado y en cada test se emplean 6 controles de crecimiento.

Los porcentajes de citotoxicidad (%Cit) se determinan empleando la siguiente fórmula:

$$\%Cit = [100 - (DOd - DOdm)/(DOc - DOcm)] \times 100, \text{ donde,}$$

DOd es la media de la DO595 de los pocillos con parásitos y diferentes concentraciones de los compuestos.

DOdm es la media de la DO595 de los pocillos con diferentes concentraciones de los compuestos en el medio.

DOc es el control de crecimiento.

DOcm es la media de la DO595 de los pocillos que contienen sólo medio.

Como fármaco de referencia se emplea Nfx (Lampit). La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se toma como la concentración necesaria para reducir la absorbancia un 50% y se calcula en un ensayo de dosis-respuesta empleando concentraciones entre 1 y 50 μ M.

35.3. Evaluación biológica *in vitro* frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener de *T. cruzi*

Los productos fueron evaluados *in vitro* en la forma tripomastigote de *T. cruzi* (clon CL Brener) siguiendo una metodología descrita previamente.^{236,240} Para obtener la forma tripomastigote sanguínea se emplean ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. La sangre se obtiene a los 7 días de infección mediante una punción cardíaca empleando citrato sódico al 3,8% como anticoagulante en una relación 7:3 sangre/anticoagulante. La parasitemia en los ratones infectados oscila entre 1×10^5 y 5×10^5 parásitos/mL. Los compuestos a ensayar se disuelven en la menor cantidad posible de DMSO y se añaden sobre PBS hasta obtener una concentración final de 100 y 250 μ g/mL. Se toman alícuotas de 10 μ L de cada solución por triplicado y se mezclan en

una microplaca con 100 μL de la sangre infectada extraída que contiene una concentración cercana a 10^6 parásitos/mL. La sangre infectada y la sangre infectada conteniendo cristal violeta (250 $\mu\text{g/mL}$) se emplean como controles. Las placas se mantienen en agitación durante 10 minutos a temperatura y seguidamente se colocan a 4°C durante 24 horas. Cada solución se examina microscópicamente (microscopio Olympus BH2) para llevar a cabo el recuento parasitario. La actividad, expresada como porcentaje de reducción parasitaria, se compara con la mostrada por el compuesto control, cristal violeta.

36. Citotoxicidad frente a células mamíferas

36.1. Principio del ensayo

En el momento de evaluar un compuesto en busca de una actividad específica, como en este caso en busca de actividad frente a *T. cruzi*, es fundamental llevar a cabo ensayos citotóxicos cuantificables como complemento a los ensayos *in vitro* sobre las diferentes formas parasitarias para poder asegurar que la actividad observada es selectiva frente al parásito.

Para la medición de la viabilidad celular se empleó el ensayo colorimétrico del MTT, método desarrollado por *Mosmann* en 1983²⁹³ y modificado en 1986 por *Francois Denizot y Rita Lang*.²⁹⁴ El método se basa, como se muestra en la **Figura 60**, en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para dar el producto insoluble formazán, un compuesto de color morado. El MTT añadido al cultivo celular es captado por las células y reducido a su forma insoluble formazán, el cual queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y esta cantidad es cuantificable gracias al cambio de coloración del amarillo del MTT al morado del formazán mediante la medición de la absorbancia a 595 nm.

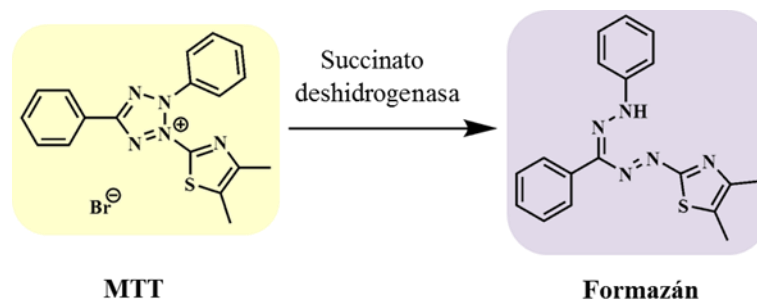


Figura 60. Reducción del MTT a formazán llevada a cabo por la succinato deshidrogenasa.

Este ensayo permite la obtención del índice de selectividad (IS), que consiste en la relación entre la CI_{50} del compuesto estudiado sobre las células mamíferas utilizadas y la CI_{50} obtenida frente a *T. cruzi*. Este parámetro indica en qué medida el compuesto es activo sobre el parásito, pero no sobre las células mamíferas.

En noviembre del 2008, se celebró un simposio sobre “Modelos experimentales en la búsqueda de fármacos y desarrollo para la enfermedad de Chagas” en la ciudad de Río de

Janeiro, donde el Programa de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Enfermedad de Chagas (PIDC/Fiocruz) y la *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi) propusieron una metodología secuencial de cribado que permitiera el rápido ensayo de compuestos y su avance hacia ensayos clínicos.²⁹⁵ Uno de los pasos de este proceso de selección es hallar el *IS in vitro*, sin embargo no existe un consenso sobre el valor de corte óptimo. Algunos autores como Nwaka y Hudson proponen que éste debe ser mayor o igual a 50 para que el nuevo compuesto pueda avanzar al siguiente paso de evaluación, para otros este valor puede ser más bajo.^{30,296}

36.2. Método experimental

Debido a los buenos resultados de actividad biológica *in vitro* frente a *T. cruzi* obtenidos se decidió llevar a cabo la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* frente a células mamíferas. El ensayo fue llevado a cabo por el Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias-Facultad de Química de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

Para realizar la evaluación de la citotoxicidad se sigue un método previamente empleado por el grupo colaborador en el que se utiliza la línea celular de macrófagos murinos J-774 (ATCC, Estados Unidos), que se mantiene mediante pases en medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene L-glutamina 4 mM y está suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado por calor y antibióticos al 1% (10.000 U/mL de penicilina y 10.000 Ig/mL de estreptomina). Las células J-774 se siembran (1×10^5 células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos con 200 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 20% inactivado por calor. Las células se dejan 48 horas adhiriéndose a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. Pasado ese tiempo, las células se exponen a los compuestos (100,0-400,0 μ M) durante otras 48 horas. Tras esto, se evalúa la viabilidad celular midiendo la reducción del MTT (Sigma Aldrich), dependiente de enzimas mitocondriales, a formazán. Para ello, se añade MTT a las células hasta una concentración de 0,4 mg/mL y se incuban a 37°C durante 3 horas. Tras eliminar el medio, los cristales de formazán formados se disuelven en DMSO (180 μ L) y se mide la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas. Los porcentajes de citotoxicidad (%Cit) se determinan como:

$$\%Cit = \{100 - (DO_d - DO_{dm}) / (DO_c - DO_{cm})\} \times 100, \text{ donde,}$$

DO_d es la media de la DO_{595} de los pocillos con macrófagos y diferentes concentraciones de los compuestos.

DO_{dm} es la media de la DO_{595} de los pocillos con diferentes concentraciones de los compuestos en el medio utilizado en el sistema.

DO_c es la mostrada por el control de crecimiento.

DO_{cm} es la media de la DO_{595} de los pocillos que solo contiene medio.

Los resultados se expresan como CI_{50} , que es la concentración de compuesto necesaria para reducir el 50% de la absorbancia a 595 nm del control. Todas las CI_{50} son la media de 3 experimentos diferentes. Los índices de selectividad (*IS*) se expresan como el cociente entre la CI_{50} obtenida en macrófagos y la CI_{50} obtenida en *T. cruzi* (cepa *Tulahuen 2*).^{230,243,297}

37. Evaluación de la mutagenicidad: Test de Ames

37.1. Principio del ensayo

Para evaluar la mutagenicidad de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sintetizados se lleva a cabo el ensayo preliminar de mutagenicidad en *Salmonella* o test de Ames, un estudio inicial especialmente diseñado para detectar mutagénesis inducida por un amplio abanico de agentes químicos.²⁹⁸ A través de los años su valor ha sido reconocido por la comunidad científica, por empresas y agencias gubernamentales.

Para realizar el test de Ames se pueden emplear diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, todas ellas auxotróficas para la histidina y especialmente diseñadas para ser sensibles a mutágenos químicos.

Cuando las cepas de *S. typhimurium* empleadas en el ensayo se cultivan en una placa de agar con medio mínimo conteniendo trazas de histidina, únicamente aquellas bacterias que hayan sufrido la reversión de su mutación serán capaces de formar colonias. El número de colonias revertientes por placa debido a mutaciones inducidas espontáneamente es relativamente constante. Sin embargo, cuando un mutágeno es añadido a la placa, el número de colonias revertientes por placa se incrementa, generalmente observando una relación dosis-respuesta.

El test de mutagenicidad de Ames ha evolucionado con el paso de los años y ha conducido a la selección de mutantes que son altamente sensibles a la reversión por una gran variedad de mutágenos químicos por la presencia de mutaciones y alteraciones genéticas adicionales.^{299,300} Las más comunes son:

- Deleción en la región *uvrB-bio*, lo cual aporta una hipersensibilidad a la acción de diferentes mutágenos por afectar al sistema de reparación por escisión y hace que la bacteria sea auxotrófica para la biotina.

- Mutación *rfa* que afecta a la capa de lipopolisacárido y aumenta la permeabilidad a productos químicos voluminosos.

- La introducción del plásmido *pKM101* en las cepas TA1535 y TA1538 de *S. typhimurium* da como resultado las cepas isogénicas TA100 y TA98 y las cepas TA97, TA102 y TA104. El plásmido *pKM101* potencia la mutagénesis por productos químicos y luz UV. El plásmido confiere además resistencia a la ampicilina, lo cual es un marcador conveniente.

Debido a que muchos carcinógenos permanecen inactivos hasta que son enzimáticamente transformados en metabolitos electrófilos capaces de unirse covalentemente al ADN y producir mutaciones, se evalúa el efecto del producto en ausencia y presencia de activación metabólica. Dado que las bacterias empleadas en el ensayo carecen de los sistemas enzimáticos necesarios para la metabolización de xenobióticos se introduce en el ensayo un sistema exógeno de metabolización enzimática para intentar reproducir lo que pudiera ocurrir en el hombre. Se realizan ensayos en paralelo con fracción S9 y sin fracción S9 para poder detectar la acción directa de los compuestos cuya mutagenicidad podría ser disminuida o aumentada tras metabolizarse. La fracción S9 de hígado de rata es comúnmente utilizada. Contiene la fracción

microsomal y citosólica y posee principalmente enzimas del sistema citocromo P-450, las cuales están involucradas en el metabolismo de fármacos.^{299,301-303}

Existen diferentes metodologías para llevar a cabo la evaluación de la mutagenicidad que han ido evolucionando a lo largo de los años. En 1966, Ames y Whitfield propusieron el estudio de la mutagenicidad de compuestos químicos utilizando el test de la gota, previamente utilizado por Szybalski e Iyer para el estudio de la mutagenicidad en cepas de *E. coli*.³⁰⁴ En 1973, Ames y colaboradores desarrollaron el método de incorporación directa en placa, más sensible y cuantitativo que el test de la gota.²⁹⁸ El procedimiento consiste en la adición del buffer o la mezcla S9, las bacterias histidina dependientes y el compuesto a ensayar sobre 2 mL de agar conteniendo trazas de biotina e histidina (0,05 mM de cada una), el cual se vierte sobre la placa de agar mínimo de glucosa. Se mantiene en incubación a 37°C durante 48 h. Pasado este tiempo se cuentan las colonias revertientes.

A lo largo de los años, diferentes investigadores han ido introduciendo modificaciones al método estándar de incorporación en placa que han incrementado la sensibilidad del test y ha permitido el análisis de una gran variedad de compuestos químicos, incluyendo gases y compuestos volátiles. Una de estas modificaciones es el ensayo de preincubación, donde las bacterias empleadas en el ensayo son expuestas al producto químico estudiado durante un corto periodo de tiempo en un pequeño volumen (0,5 mL) de buffer o mezcla S9 previamente a ser añadido a las placas de agar de medio mínimo de glucosa suplementado con trazas de histidina. Se piensa que este método es más sensible que el método de incorporación directa en placa ya que los posibles metabolitos mutagénicos de corto tiempo de vida tienen una mayor posibilidad de reaccionar con las bacterias en el pequeño volumen de preincubación empleado y, porque además, el volumen efectivo de la mezcla S9 en el volumen de preincubación es mayor que en la placa.³⁰⁵⁻³⁰⁷

37.2. Método experimental

La evaluación de la mutagenicidad de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido **1.7**, **1.17** y **A.7** ha sido realizada por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), empleando el método de incorporación directa en placa.

La evaluación de la mutagenicidad de los derivados **5.1-5.18** ha sido realizada personalmente en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra, empleando para ello el ensayo de mutagenicidad con preincubación. En este apartado sólo será detallado el protocolo seguido para la realización del ensayo de mutagenicidad con preincubación.

El ensayo ha sido realizado utilizando la estirpe TA98 de *Salmonella typhimurium* adquirida de Moltox, Inc.

Se emplearon placas de Petri estériles de 90 mm, Comercial médica y de laboratorio, S.L. Para el cultivo de las bacterias empleadas en el ensayo se ha empleado el caldo nutritivo N°2 obtenido de Oxoid S.A..

Como sistema exógeno de metabolización enzimática se ha empleado la fracción S9 y consiste en un homogenado de hígado de rata inducido con Aroclor 1254, que ha sido adquirido comercialmente de Trinova Biochem GMBH Moltox, Giessen, Alemania. La nicotinamida adenina dinucleótico fosfato (NADPH) adquirida de Sigma Aldrich S.A. se ha usado como cofactor de las enzimas presentes en la fracción S9.

El ensayo de mutagenicidad en *Salmonella*, test de Ames, se desarrolla de acuerdo al método descrito por Maron y Ames en 1983 y siguiendo la directriz 471 (Test de mutación reversa en bacterias) de la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico),³⁰⁸ empleando únicamente la cepa TA98 de *S. typhimurium* His⁻. Previamente se determina la solubilidad de los compuestos a ensayar en una mezcla de DMSO y PBS con el fin de conocer la concentración máxima de producto que puede ser evaluada en el ensayo de toxicidad. Seguidamente, se determina la dosis tóxica mínima (DTM) sobre la cepa bacteriana utilizada en el ensayo (*S. typhimurium* His⁻, cepa TA98) para todos los productos estudiados. La DTM determinada es utilizada como la dosis máxima de partida. Para llevar a cabo el ensayo se prepara una suspensión bacteriana de 2×10^9 *S. typhimurium*/mL. Ambos ensayos se llevan a cabo tanto en ausencia como en presencia de la fracción S9 como sistema de metabolización enzimática externa.

Para realizar el ensayo de preincubación sin activación metabólica se mezcla en los tubos de ensayo:

- 50 μ L de la disolución de compuesto a ensayar
- 500 μ L de PBS (0,1 M, pH 7,4)
- 100 μ L de suspensión bacteriana

Cada compuesto se ensaya por triplicado a 5 dosis diferentes, comenzando por la dosis más alta, que se corresponde con la DTM, seguido por 4 dosis decrecientes, cada una de ellas 1/3 de la anterior (1/3 DTM, 1/6 DTM, 1/9 DTM y 1/12 DTM). Una vez agitada la mezcla de cada compuesto, se incuba durante 60 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, se añaden sobre la mezcla 2 mL de agar fundido suplementado con trazas de histidina y biotina (0,05 mM de cada una), se agita inmediatamente vigorosamente y se vierte la mezcla sobre placas con agar mínimo de glucosa.

El ensayo con activación metabólica, representado en la **Figura 63**, se realiza siguiendo el mismo procedimiento, pero reemplazando los 500 μ L de PBS de la mezcla inicial por 500 μ L de la mezcla S9 (10%, v/v S9, NADP 4,7 mM, d-glucosa-6-fosfato 6 mM, MgCl₂ 19 mM, KCl 36 mM, buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4).

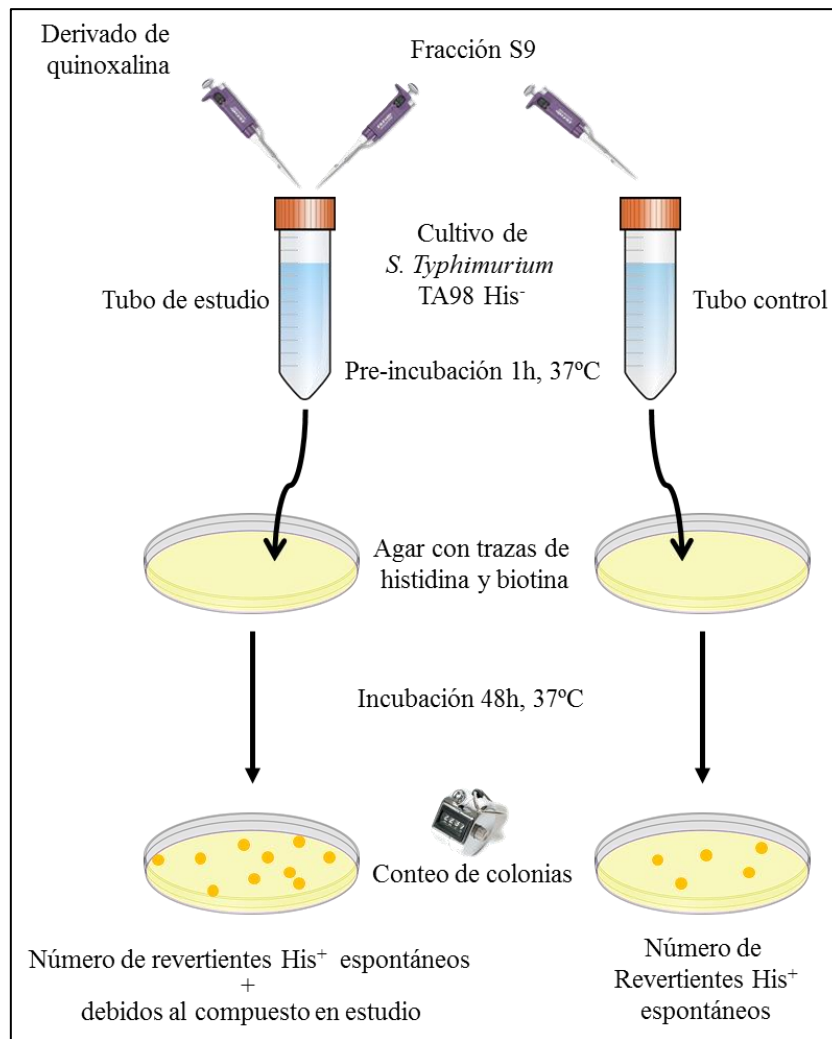


Figura 61. Procedimiento experimental empleado para llevar a cabo el ensayo de mutagenicidad.

Se muestra el ejemplo para el ensayo con activación metabólica de un compuesto.

Los controles utilizados en el ensayo son:

-**Control negativo**, en el cual se añade el disolvente, DMSO, sin compuesto. Este control proporciona el número de bacterias que sufren mutaciones espontáneas sin presencia de producto.

-Se utilizan dos compuestos con actividad mutagénica conocida como **control positivo**. La 4-o-nitrofenilendiamina se emplea en el ensayo sin activación metabólica y el 2-aminofluoreno en el ensayo con activación metabólica.

-Se realiza también un **control de bacterias** para comprobar que éstas desarrollan un crecimiento normal.

-**Control de fenotipo** para confirmar que se está trabajando con la cepa bacteriana correcta, TA98 en este caso. Sobre la placa preparada se añaden una gota de ampicilina, una gota de tetraciclina y una gota de cristal violeta. Una parte de la placa se somete a luz UV. La estirpe TA98 cumple las siguientes características: Ampicilina resistente, tetraciclina sensible, cristal violeta sensible y UV sensible.

Una vez solidificado el agar, las placas se incuban en posición invertida en estufa a 37°C durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se sacan del incubador y se cuenta manualmente el número de colonias histidina revertientes. Los resultados se expresan como la media de los tres experimentos junto a la desviación estándar.

Todos los datos obtenidos son analizados utilizando la modified 2-fold rule, por la cual una respuesta se considera positiva si la media de la respuesta para dos dosis consecutivas supera en dos veces a la frecuencia de mutación espontánea³⁰⁹. En este caso, un compuesto se considera mutagénico cuando el número de colonias revertientes contadas en dos dosis consecutivas supera al doble de las contadas en el control negativo observándose una relación dosis-respuesta.

38. Evaluación biológica *in vivo* frente a *Trypanosoma cruzi*

La evaluación biológica preliminar *in vivo* de dos de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido presentados en este trabajo se llevó a cabo en modelos de ratón para enfermedad de Chagas en fase aguda. Los ensayos han sido realizados en el Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Ciencias de la Salud de Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Los ensayos se realizan utilizando ratones BALB/c o ratones SWISS albino machos (30 días de vida y 25-30 g) criados en condiciones específicas libres de patógenos (SPF). Los ratones se infectan con 10³ tripomastigotes sanguíneos (clon CLBrenner o cepa Y, dependiendo del experimento) mediante una inyección intraperitoneal. Un grupo de diez animales se utiliza como control sin tratar, empleándose PBS, y tres grupos de ocho animales se tratan con los dos derivados de quinoxalina y con el fármaco de referencia empleado, Bnz, repectivamente. La primera determinación de la parasitemia se realiza 5 días después de la infección (semana 1), y el tratamiento se inicia 7 días más tarde. Los compuestos se administran oralmente como soluciones acuosas en PBS durante diez días a 10, 30 o 50 (mg/kg pc)/día para el derivado de quinoxalina **1.7**, 10 (mg/kg pc)/días para el derivado de quinoxalina **1.17**, y 50 (mg/kg pc)/día para el Bnz.

La parasitemia en el grupo control y en los ratones tratados se determina a partir de sangre venosa de la cola una vez por semana tras la primera administración durante un periodo de 60 días. La tasa de mortalidad se registra cada semana.

Todos los sueros obtenidos tras la centrifugación de la sangre extraída a los ratones infectados se analizan dos veces mediante ELISA a los 30, 60 o 90 días tras la infección. Para realizar el ELISA se emplea un kit específico para la enfermedad de Chagas (Chagas test, IICS, Asunción, Paraguay) siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (IICS Production Department, Asunción, Paraguay).²³⁶ Los valores de densidad óptica se obtuvieron en un lector de placas de ELISA (Titerek, Unistan, I). La comparación de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* entre los diferentes grupos experimentales se realiza empleando el test de Wilcoxon.

Los protocolos experimentales con animales fueron evaluados y supervisados por el Comité de Ética de Paraguay para investigaciones científicas y la investigación se adhirió a los Principios de Protección de Animales de Laboratorio.³¹⁰

VIII. ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN

39. Estudio electroquímico

Los estudios electroquímicos fueron llevados a cabo por el grupo de trabajo del Dr. Philip W. Crawford del Departamento de Química de la Southeast Missouri State University a través de un proyecto de colaboración.

La dimetilformamida (DMF) empleada como disolvente fue obtenida comercialmente de Fisher Scientific. El Perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) y el Ferroceno se obtuvieron de Aldrich Chemical Company. Todos los reactivos fueron obtenidos en la máxima pureza disponible y fueron utilizados sin una purificación adicional.

Los experimentos de voltametría cíclica se llevaron a cabo en un analizador voltamétrico modelo CHI Instruments 630. La célula electroquímica consistía en un electrodo de trabajo formado por un disco de platino (1,6 mm de diámetro), un electrodo auxiliar formado por un alambre de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgNO₃ (0,1 M en acetonitrilo). La desoxigenación de todas las soluciones se efectúa haciendo pasar una corriente suave y constante de nitrógeno previamente purificada a través de la solución durante 15 minutos y manteniendo una atmósfera de gas inerte sobre la solución durante el experimento.

El ferroceno (Fc) fue utilizado como sistema redox interno de referencia para explicar las variaciones diarias en los potenciales del electrodo de referencia y el líquido de contacto. El ferroceno (1 mM) fue añadido a cada solución después de completar cada medición voltamétrica del derivado de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiado.³¹¹

Todas las soluciones de trabajo contenían una concentración de 1 mM de la quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiada correspondiente y 0,10 M de TBAP como electrolito de soporte.

Las velocidades de barrido empleadas fueron desde 50 mV/s hasta 1000 mV/s.

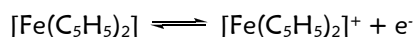
Los potenciales de semionda ($E_{1/2}$) fueron calculados como la media entre los potenciales de pico catódico y anódico,³¹² de manera que se calcularon empleando la siguiente ecuación:

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$$

La diferencia en los potenciales de pico se calculó como $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$.

Todos los potenciales se presentan en comparación al par redox ferroceno/ferricinio (Fc/Fc⁺), por ejemplo,

$$E_{pc, SRE} - E_{1/2, Fc/Fc^+} \text{ or } E_{1/2, SRE} - E_{1/2, Fc/Fc^+}$$



Los potenciales de semi-onda ($E_{1/2}$) para el ferroceno variaron de -0,0095 V a 0,0485 V durante el desarrollo del estudio.

40. Estudios biológicos de mecanismo de acción

Para estudiar el posible mecanismo de acción anti-*T. cruzi* de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido se evaluaron los efectos que producían sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales y los posibles cambios en los metabolitos excretados por los parásitos tras el tratamiento con los compuestos seleccionados. El ensayo fue realizado por el

Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

40.1. Efecto sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales

El ensayo se lleva a cabo en placas de 24 pocillos. En cada pocillo se siembran 1×10^6 epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) en 500 μL de medio. Los compuestos estudiados son añadidos a cada pocillo a una concentración de 20 μM . Como control se utilizan dos pocillos con parásitos que no son tratados con los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. El cultivo se incuba a 28°C. A los diferentes tiempos de incubación los epimastigotes son contados y se lleva a cabo el método colorimétrico del MTT, donde la sal de tetrazolio es convertida en formazán, compuesto morado insoluble en agua. Para llevar a cabo este ensayo se añaden a cada pocillo 50 μL de una solución que contiene 5 mg/mL de MTT en PBS y se incuban durante 4 horas. La reacción se detiene añadiendo 500 μL de isopropanol ácido (0,4 mL de HCl 10N en 100 mL de isopropanol). La absorbancia se mide a 570 nm. Bajo las condiciones empleadas los compuestos no interfieren con la mezcla de reacción. El porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales (Pmdh (%)) en los diferentes pocillos tratados con los derivados de quinoxalina se determina en comparación con el control de parásitos sin tratar, que se toma como el 100%.

40.2. Estudio por RMN- ^1H de los metabolitos excretados

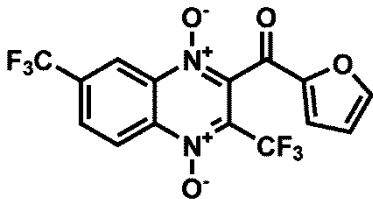
Se añade el derivado de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiado (5 μM) sobre un cultivo de *T. cruzi* (cepa Y) y se mantiene durante dos días. Como control inhibidor de la respiración en tripomastigotes se utiliza benzotiadiazol (BTH). Pasado el tiempo se recogen 5 mL del cultivo tratado con el compuesto correspondiente. Los 5 mL recogidos se centrifugan a 1500 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido es descartado y el sobrenadante libre de parásitos se guarda a -20°C hasta su uso. Antes de la medición de los metabolitos se añaden 0,1 mL de DMF (10 mM), como estándar interno, y 0,1 mL de agua deuterada (D_2O) sobre 0,3 mL de sobrenadante. El espectro de RMN- ^1H se registra suprimiendo la señal del agua en tubos para RMN de 5 mm. Los desplazamientos químicos empleados para identificar los respectivos metabolitos se confirman mediante la adición de cada metabolito analizado al sobrenadante estudiado y mediante el estudio de una solución control que contiene 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada metabolito en buffer fosfato (pH 7,4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

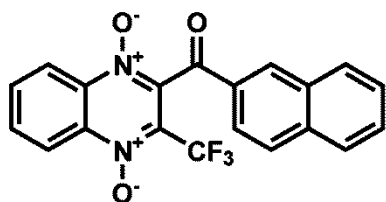
IX. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

En esta sección se muestra la caracterización estructural de los compuestos presentados en este trabajo. La descripción de los 57 nuevos compuestos finales presentados incluye la siguiente información: nombre químico, código del compuesto, fórmula molecular, peso molecular, punto de fusión, aspecto, rendimiento, espectroscopía de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y análisis elemental. En el caso de los compuestos que presentan isómeros de posición sólo se describe la RMN-¹H del isómero en proporción mayoritaria. Además se incluye la **tabla 21**, en la que se indica el código del compuesto, fórmula molecular, peso molecular, espectroscopía de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y análisis elemental de los 9 productos re-sintetizados pertenecientes a la **serie 1** previamente sintetizados por el grupo de trabajo.

2-(2-Furoil)-3,7-di(trifluorometil)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 1.12)

	<p>Fórmula molecular: C₁₅H₆N₂O₄F₆ P.M.: 392,21 g/mol Punto de fusión: 198-199°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 10%</p>
<p>IR (KBr): 3122 (d, νC-H Ar), 1668 (f, νC=O), 1362 (d, νN-óxido), 1265 (m, νC-O), 1148(m, νC-F) cm⁻¹.</p>	
<p>¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,91 (s, 1H, H₈); 8,84 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 9,0 Hz); 8,18 (dd, 1H, H₆, J₆₋₅ = 9,0 Hz, J₆₋₈ = 1,7 Hz); 7,66 (dd, 1H, H₃, J₃₋₅ = 0,6 Hz, J₃₋₄ = 1,6 Hz); 7,53 (dd, 1H, H_{5'}, J_{5'-3'} = 0,5 Hz, J_{5'-4'} = 3,7 Hz); 6,73 (dd, 1H, H₄, J₄₋₃ = 1,7 Hz, J₄₋₅ = 3,7 Hz).</p>	
<p>Análisis elemental:</p>	<p>%C %H %N</p>
<p>Calculado</p>	<p>45,93 1,54 7,14</p>
<p>Hallado</p>	<p>46,06 1,77 6,67</p>

2-(2-Naftoil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.14)

Fórmula molecular: $C_{20}H_{11}N_2O_3F_3$

P.M.: 384,31 g/mol.

Punto de fusión: 186-187°C

Aspecto: Sólido amarillo.

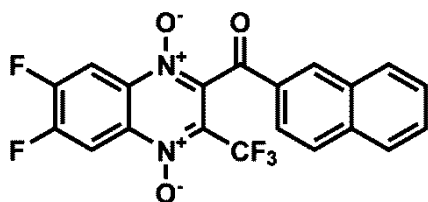
Rendimiento: 2%

IR (KBr): 3119 (d, ν C-H Ar), 1665 (f, ν C=O), 1356 (d, ν N-óxido), 1175 (m, ν C-F) cm^{-1} . 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,77-8,74 (m, 1H, H_5); 8,64-8,61 (m, 1H, H_8); 8,32 (s, 1H, H_{17}), 8,04 (m, 4H, $H_6 + H_7$ y $H_5' + H_8'$); 7,94-7,92 (m, 2H, $H_6' + H_7'$); 7,70-7,66 (m, 1H, H_3'); 7,60-7,56 (m, 1H, H_4').

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	62,51	2,89	7,29
Hallado	62,53	3,32	7,05

6,7-Difluoro-2-(2-naftoil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.15)

Fórmula molecular: $C_{20}H_9N_2O_3F_5$

P.M.: 420,29 g/mol

Punto de fusión: 118-119°C

Aspecto: Sólido amarillo.

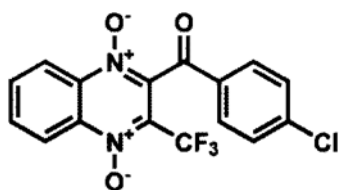
Rendimiento: 21%

IR (KBr): 3058 (d, ν C-H Ar), 1689 (f, ν C=O), 1350 (d, ν N-óxido), 1178 (m, ν C-F) cm^{-1} . 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,53 (dd, 1H, H_5 , $J_{5-F6} = 9,1$ Hz, $J_{5-F7} = 7,1$ Hz); 8,41 (dd, 1H, H_8 , $J_{8-F6} = 7,1$ Hz, $J_{8-F7} = 9,0$ Hz); 8,28 (s, 1H, H_{17}), 8,02-8,00 (m, 2H, $H_5' + H_8'$); 7,95-7,91 (m, 2H, $H_6' + H_7'$); 7,70-7,66 (m, 1H, H_3'); 7,61-7,57 (m, 1H, H_4').

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	57,15	2,16	6,67
Hallado	57,00	2,48	6,49

2-(4-Clorobenzoil)-3-trifluorometilquinoxaline 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.25)



Fórmula molecular: $C_{16}H_8N_2O_3F_3Cl$

P.M.: 368,69 g/mol

Punto de fusión: 168-169°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 6%

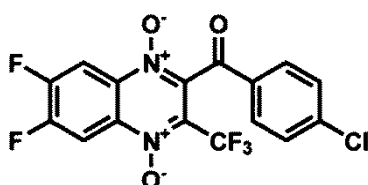
IR (KBr): 3100 (w, ν C-H Ar), 1689 (s, ν C=O), 1351 (s, ν N-óxido), 1162 (s, ν C-F), 909 (w, ν Ar-Cl) cm^{-1} .

1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,73-8,70 (m, 1H, H_5); 8,61-8,58 (m, 1H, H_8); 8,04-8,02 (m, 2H, $H_6 + H_7$); 7,86 (d, 2H, $H_2' + H_6'$, $J_{2'-3'} = 8,7$ Hz); 7,54 (d, 2H, $H_3' + H_5'$, $J_{3'-2'} = 8,7$ Hz).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	52,12	2,19	7,60
Hallado	51,78	2,08	7,39

2-(4-Clorobenzoil)-6,7-difluoro-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-N-óxido (Compuesto 1.26)



Fórmula molecular: $C_{16}H_6N_2O_3F_5Cl$

P.M.: 404,68 g/mol

Punto de fusión: 186-188°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 8,6%

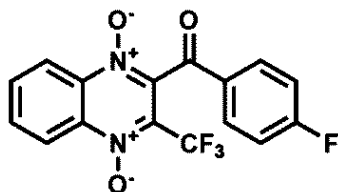
IR (KBr): 3065 (w, ν C-H Ar), 1698 (s, ν C=O), 1353 (s, ν N-óxido), 1176 (s, ν C-F), 910 (w, ν Ar-Cl) cm^{-1} .

1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,51 (dd, 1H, H_5 , $J_{5-F6} = 9,1$ Hz, $J_{5-F7} = 7,2$ Hz); 8,39 (dd, 1H, H_8 , $J_{8-F7} = 9,0$ Hz, $J_{8-F6} = 7,1$ Hz); 7,83 (d, 2H, $H_2' + H_6'$, $J_{2'-3'} = 8,6$ Hz); 7,55 (d, 2H, $H_3' + H_5'$, $J_{3'-2'} = 8,6$ Hz).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	47,49	1,49	6,92
Hallado	47,50	1,71	6,72

2-(4-Fluorobenzoyl)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 1.27)



Fórmula molecular: C₁₆H₈N₂O₃F₄

P.M.: 352,24 g/mol

Punto de fusión: 167-168°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 7%

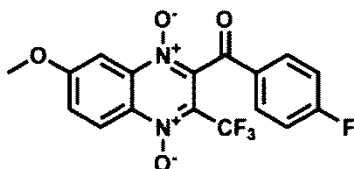
IR (KBr): 3110 (d, ν C-H Ar), 1690 (f, ν C=O), 1357 (f, ν N-oxide), 1154 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,73-8,70 (m, 1H, H₅); 8,61-8,58 (m, 1H, H₈); 8,03 (m, 2H, H₆ + H₇); 7,97-7,93 (m, 2H, H₂ + H₆); 7,26-7,22 (m, 2H, H₃ + H₅).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	54,56	2,29	7,95
Hallado	54,74	2,28	7,69

2-(4-Fluorobenzoyl)-7-metoxi-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 1.28)



Fórmula molecular: C₁₇H₁₀N₂O₄F₄

P.M.: 382,27 g/mol

Punto de fusión: 200-202°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 5%

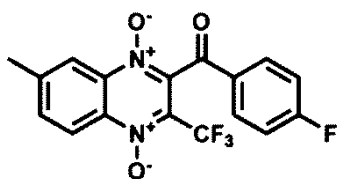
IR (KBr): 3077 (d, ν C-H Ar), 1691 (f, ν C=O), 1350 (f, ν N-oxide), 1163 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,59 (d, 1H, H₅, $J_{5,6} = 9,5$ Hz); 7,96-7,92 (m, 2H, H₂ + H₆); 7,86 (d, 1H, H₈, $J_{8,6} = 2,4$ Hz); 7,57 (dd, 1H, H₆, $J_{6,8} = 2,2$ Hz, $J_{6,5} = 9,4$ Hz); 7,26-7,21 (m, 2H, H₃ + H₅); 4,04 (s, 3H, -OCH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	53,41	2,64	7,33
Hallado	53,15	2,71	7,26

2-(4-Fluorobenzoyl)-7-metil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.29)



Fórmula molecular: $C_{17}H_{10}N_2O_3F_4$

P.M.: 366,27 g/mol

Punto de fusión: 181-184°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 2%

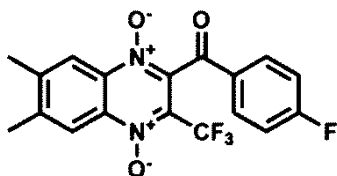
IR (KBr): 3087 (d, ν C-H Ar), 1692 (f, ν C=O), 1353 (f, ν N-oxide), 1158 (f, ν C-F) cm^{-1} .

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,59 (d, 1H, H_5 , $J_{5-6} = 8,2$ Hz); 8,37 (s, 1H, H_8); 7,95-7,92 (m, 2H, $H_2 + H_6$); 7,82 (d, 1H, H_6 , $J_{6-5} = 8,5$ Hz); 7,25-7,21 (m, 2H, $H_3 + H_5$); 2,68 (s, 3H, CH_3).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	55,75	2,75	7,65
Hallado	55,52	3,00	7,53

2-(4-Fluorobenzoyl)-6,7-dimetil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.30)



Fórmula molecular: $C_{18}H_{12}N_2O_3F_4$

P.M.: 380,29 g/mol

Punto de fusión: 198-199°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 3%

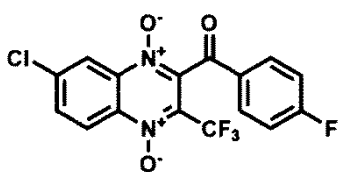
IR (KBr): 3056 (d, ν C-H Ar), 1689 (f, ν C=O), 1339 (f, ν N⁺-O⁻), 1177 (f, ν C-F) cm^{-1} .

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ ppm: 8,44 (s, 1H, H_5); 8,33 (s, 1H, H_8); 7,95-7,91 (m, 2H, $H_2 + H_6$); 7,25-7,20 (m, 2H, $H_3 + H_5$); 2,60 (s, 3H, CH_3); 2,57 (s, 3H, CH_3).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	49,18	2,86	11,47
Hallado	49,37	2,96	11,34

7-Cloro-2-(4-fluorobenzoil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.31)



Fórmula molecular: C₁₆H₇N₂O₃F₄Cl

P.M.: 386,68 g/mol

Punto de fusión: 152-154°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 9%

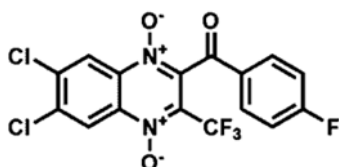
IR (KBr): 3076 (d, ν C-H Ar), 1691 (f, ν C=O), 1346 (f, ν N-oxide), 1177 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,65 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,1$ Hz); 8,58 (d, 1H, H₈, $J_{8-6} = 1,9$ Hz); 7,95-7,91 (m, 3H, H₆ y H_{2'} + H_{6'}); 7,26-7,22 (m, 2H, H_{2'} + H_{6'}).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	49,70	1,82	7,24
Hallado	49,29	1,77	7,37

6,7-Dicloro-2-(4-fluorobenzoil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.32)



Fórmula molecular: C₁₆H₆N₂O₃F₄Cl₂

P.M.: 421,13 g/mol

Punto de fusión: 197-199°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 5%

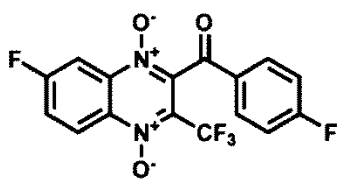
IR (KBr): 3093 (d, ν C-H Ar), 1687 (f, ν C=O), 1332 (f, ν N-oxide), 1174 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,80 (s, 1H, H₅); 8,68 (s, 1H, H₈); 7,94-7,90 (m, 2H, H_{2'} + H_{6'}); 7,27-7,22 (m, 2H, H_{3'} + H_{5'}).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	45,63	1,44	6,65
Hallado	45,38	1,70	6,62

7-Fluoro-2-(4-fluorobenzoyl)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.33)



Fórmula molecular: C₁₆H₇N₂O₃F₅

P.M.: 370,23 g/mol

Punto de fusión: 177-178°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 9%

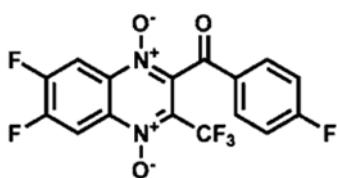
IR (KBr): 3104 (d, ν C-H Ar), 1690 (f, ν C=O), 1353 (f, ν N-oxide), 1154 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,75 (dd, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,5$ Hz, $J_{5-F} = 4,8$ Hz); 8,24 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F} = 8,0$ Hz, $J_{8-6} = 2,7$ Hz); 7,95-7,92 (m, 2H, H₂ + H₆); 7,75 (ddd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,7$ Hz, $J_{6-F} = 7,1$ Hz, $J_{6-8} = 2,6$ Hz); 7,26-7,22 (m, 2H, H₃ + H₅).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	51,91	1,91	7,57
Hallado	51,66	2,12	7,49

6,7-Difluoro-2-(4-fluorobenzoyl)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 1.34)



Fórmula molecular: C₁₆H₆N₂O₃F₆

P.M.: 388,22 g/mol

Punto de fusión: 173-175°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 17%

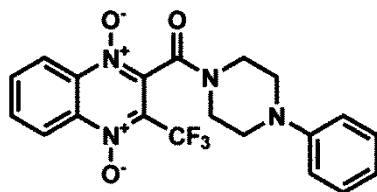
IR (KBr): 3065 (d, ν C-H Ar), 1697 (f, ν C=O), 1352 (f, ν N-oxide), 1176 (f, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,51 (dd, 1H, H₅, $J_{5-F7} = 7,1$ Hz, $J_{5-F6} = 9,1$ Hz); 8,39 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F6} = 7,2$ Hz, $J_{8-F7} = 9,1$ Hz); 7,94-7,91 (m, 2H, H₂ + H₆); 7,27-7,23 (m, 2H, H₃ + H₅).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	49,50	1,56	7,22
Hallado	49,19	2,04	7,09

2-(4-Fenilpiperazina-1-carbonil)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 3.1)

Fórmula molecular: C₂₀H₁₇N₄O₃F₃

P.M.: 418,37 g/mol

Punto de fusión: 209-210°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 7%

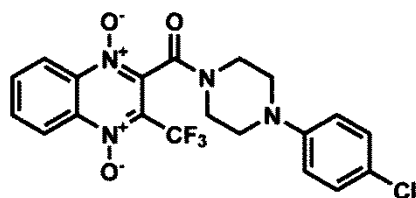
IR (KBr): 3453 (w, ν C-H Ar), 1655 (s, ν C=O), 1444 (m, ν C-N amida), 1356 (s, ν N-óxido), 1236 (m, ν C-N Ar-amina), 1153 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,68-8,66 (m, 1H, H₈); 8,64-8,62 (m, 1H, H₅); 8,04-7,96 (m, 2H, H₆ + H₇); 7,32 (dd, 2H, H_{3'} + H_{5'}, $J_{3':2'}$ = 8,9 Hz, $J_{3':4'}$ = 7,1 Hz); 6,98-6,95 (m, 3H, H_{2'} + H_{4'} + H_{6'}); 4,04-4,00 (m, 2H, CH₂-piperazina); 3,60-3,15 (m, 6H, 3xCH₂-piperazina).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	57,42	4,10	13,39
Hallado	57,46	4,11	13,36

2-[4-(4-Clorofenil) piperazina-1-carbonil]-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 3.2)

Fórmula molecular: C₂₀H₁₆ N₄O₃F₃Cl

P.M.: 452,81 g/mol

Punto de fusión: 227-228°C

Aspecto: Sólido amarillo.

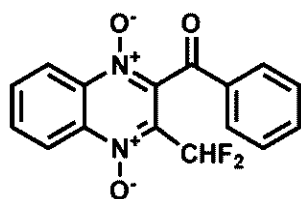
Rendimiento: 6%

IR (KBr): 3440 (w, ν C-H Ar), 1654 (s, ν C=O), 1498 (m, ν C-N amida), 1357 (s, ν N-óxido), 1236 (m, ν C-N Ar-amine), 1157 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,68 (dd, 1H, H₅, $J_{5:6}$ = 8,1 Hz, $J_{5:7}$ = 1,4 Hz); 8,63 (dd, 1H, H₈, $J_{8:7}$ = 8,1 Hz, $J_{8:6}$ = 1,7 Hz); 8,04-7,97 (m, 2H, H₆ + H₇); 7,26 (d, 2H, H_{2'} + H_{6'}, $J_{2':3'}$ = 8,6 Hz); 6,88 (d, 2H, H_{3'} + H_{5'}, $J_{3':2'}$ = 8,6 Hz); 4,09-3,93 (m, 2H, CH₂-piperazina); 3,59-3,12 (m, 6H, 3xCH₂-piperazina).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	53,05	3,56	12,37
Hallado	52,90	3,40	12,22

2-Benzoil-3-difluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.1)Fórmula molecular: C₁₆H₁₀N₂O₃F₂

P.M.: 316,26 g/mol

Punto de fusión: 196,9-201,5°C

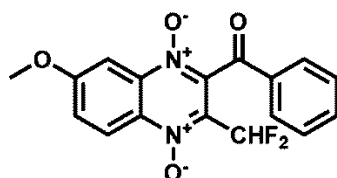
Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 9%

IR (KBr): 3199 (d, C-H Ar), 1638 (f, C=O), 1340 (f, *N*-óxido), 1232 (m, C-O), 1044 (m, C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,71-8,69 (m, 1H, H₅); 8,63-8,61 (m, 1H, H₈); 8,01-7,99 (m, 2H, H₆ + H₇); 7,92 (dd, 2H, H₂ + H₆, J₂₋₃ = 8,4 Hz, J₂₋₄ = 1,24 Hz); 7,69 (tt, 1H, H₄, J₄₋₃ = 7,4 Hz, J₄₋₂ = 1,2 Hz); 7,54 (m, 2H, H₃+H₅); 7,36 (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,3 Hz).

Análisis elemental:		%C	%H	%N
Calculado		60,75	3,16	8,86
Hallado		60,75	3,60	8,52

2-Benzoil-3-difluorometil-7-metoxiquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.2)Fórmula molecular: C₁₇H₁₂N₂O₄F₂

P.M.: 346,28 g/mol

Punto de fusión: 187,2-188,8°C

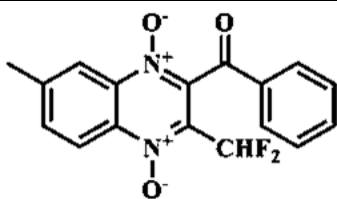
Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 5,6%

IR (KBr): 3111 (d, νC-H Ar), 1685 (f, νC=O), 1343 (f, νN-óxido), 1239 (m, νC-O), 1042 (m, νC-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm : 8,58 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 9,5 Hz); 7,93-7,90 (m, 2H, H₂ + H₆); 7,89 (d, 1H, H₈, J₈₋₆ = 2,7 Hz); 7,68 (td, 1H, H₄, J₄₋₃ = 7,4 Hz, J₄₋₂ = 1,7 Hz); 7,59-7,52 (m, 3H, H₆-QX + H₃ + H₅); 7,35 (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,4 Hz); 4,03 (s, 3H, -OCH₃).

Análisis elemental:		%C	%H	%N
Calculado		58,95	3,46	8,09
Hallado		58,78	3,50	7,96

2-Benzoil-3-difluorometil-7-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.3)Fórmula molecular: C₁₇H₁₂N₂O₃F₂

P.M.: 330,29 g/mol

Punto de fusión: 175,8-177,5°C

Aspecto: Sólido amarillo.

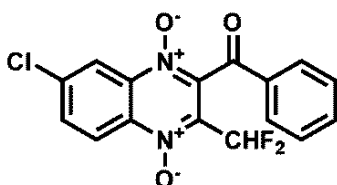
Rendimiento: 3%.

IR (KBr): 3064 (d, νC-H Ar), 1683 (f, νC=O), 1340 (f, νN-óxido), 1044 (m, νC-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,58 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 8,8 Hz); 8,39 (d, 1H, H₈, J₈₋₆ = 1,0 Hz); 7,91 (dd, 2H, H₂ + H₆, J₂₋₄ = 1,2 Hz, J₂₋₃ = 8,3 Hz); 7,81 (dd, 1H, H₆, J₆₋₈ = 1,4 Hz, J₆₋₅ = 8,8 Hz); 7,70-7,66 (m, 1H, H₄); 7,55-7,52 (m, 2H, H₃ + H₅); 7,35 (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,4 Hz); 2,67 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	61,82	3,66	8,48
Hallado	61,65	4,00	8,08

2-Benzoil-7-cloro-3-difluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.4)Fórmula molecular: C₁₆H₉N₂O₃F₂Cl

P.M.: 350,70 g/mol

Punto de fusión: 210,4-211,5°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 45%.

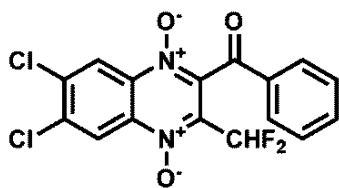
IR (KBr): 3083 (d, νC-H Ar), 1679 (f, νC=O), 1333 (f, νN-óxido), 1239 (m, νC-O), 1045 (m, νC-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,64 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 9,2 Hz); 8,60 (d, 1H, H₈, J₈₋₆ = 2,1 Hz); 7,93-7,89 (m, 3H, H₆ + H₂ + H₆); 7,70 (td, 1H, H₄, J₄₋₃ = 7,2 Hz, J₄₋₂ = 1,2 Hz); 7,55 (m, 2H, H₃ + H₅); 7,32 (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,3 Hz).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	54,78	2,57	7,99
Hallado	54,54	2,83	7,96

2-Benzoil-6,7-dicloro-3-difluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.5)



Fórmula molecular: C₁₆H₈N₂O₃F₂Cl₂

P.M.: 385,15 g/mol

Punto de fusión: 214,6-215,3°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 52,3%.

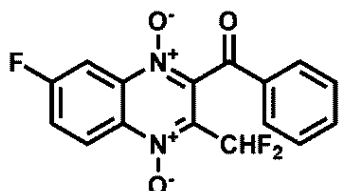
IR (KBr): 3090 (d, ν C-H Ar), 1681 (f, ν C=O), 1324 (f, ν N-óxido), 1245 (f, ν C-O), 1051 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,78 (s, 1H, H₅); 8,70 (s, 1H, H₈); 7,89 (dd, 2H, H₂' + H₆', J_{2'-3'} = 8,4 Hz, J_{2'-4'} = 1,2 Hz); 7,70 (td, 1H, H₄', J_{4'-3'} = 7,4 Hz, J_{4'-2'} = 1,2 Hz); 7,56-7,52 (m, 2H, H₃' + H₅'); 7,30 (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,2 Hz).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	49,87	2,08	7,27
Hallado	49,94	2,13	6,98

2-Benzoil-3-difluorometil-7-fluoroquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 4.6)



Fórmula molecular: C₁₆H₉N₂O₃F₃

P.M.: 334,25 g/mol

Punto de fusión: 196,9-199,3°C

Aspecto: Sólido amarillo.

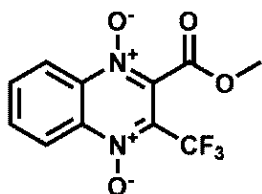
Rendimiento: 8,9%

IR (KBr): 3077 (d, ν C-H Ar), 1675 (f, ν C=O), 1338 (f, ν N-óxido), 1219 (m, ν C-O), 1046 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,74 (dd, 1H, H₅, J₅₋₆ = 9,5 Hz, J_{5-F} = 4,9 Hz); 8,26 (dd, 1H, H₈, J_{8-F} = 8,1 Hz, J₈₋₆ = 2,6 Hz); 7,91 (dd, 2H, H₂' + H₆', J_{2'-3'} = 8,2 Hz, J_{2'-4'} = 1,1 Hz); 7,75-7,68 (m, 2H, H₆' + H₄'); 7,55 (t, 2H, H₃' + H₅', J_{3'-2'} = 7,8 Hz) (t, 1H, CHF₂, J_{H-F} = 52,3 Hz).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	57,48	2,69	8,38
Hallado	57,82	2,89	8,18

2-Metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 5.1)Fórmula molecular: C₁₁H₇N₂O₄F₃

P.M.: 218,18 g/mol

Punto de fusión: 132-133°C

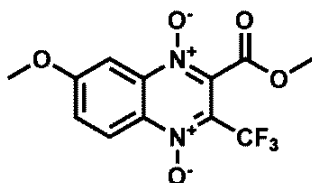
Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 3%

IR (KBr): 3108 (d, ν C-H Ar), 1748 (f, ν C=O), 1364 (f, ν N-óxido), 1163 (m, ν C-F) cm⁻¹.¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,63-8,57 (m, 2H, H₅ + H₈); 7,97-8,04 (m, 2H, H₆ + H₇); 4,12 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	45,85	2,45	9,72
Hallado	45,98	2,34	9,55

7-Metoxi-2-metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 5.2)Fórmula molecular: C₁₂H₉N₂O₅F₃

P.M.: 318,21 g/mol

Punto de fusión: 145-146°C

Aspecto: Sólido amarillo.

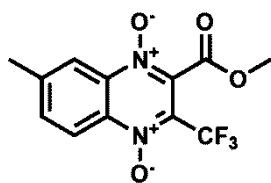
Rendimiento: 4%

IR (KBr): 3085 (d, ν C-H Ar), 1740 (f, ν C=O), 1354 (f, ν N-óxido), 1267 (m, ν C-O), 1147 (m, ν CF₃) cm⁻¹.¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,54 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,3$ Hz); 7,88 (d, 1H, H₈, $J_{8-6} = 2,3$ Hz); 7,54 (dd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,3$ Hz, $J_{6-8} = 2,6$ Hz); 4,11 (s, 3H, CH₃-O-CO-); 4,06 (s, 3H, CH₃O).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	45,28	2,83	8,80
Hallado	45,18	2,90	8,86

7-Metil-2-metoxycarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.3)



Fórmula molecular: C₁₂H₉N₂O₄F₃

P.M.: 302,21 g/mol

Punto de fusión: 127-128°C

Aspecto: Sólido amarillo.

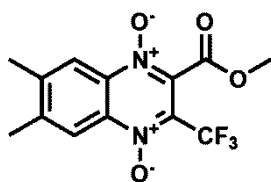
Rendimiento: 8%

IR (KBr): 3105 (d, ν C-H Ar), 1735 (f, ν C=O), 1355 (f, ν N-óxido), 1274 (m, ν C-O), 1152 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,54 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 8,6$ Hz); 8,40 (s, 1H, H₈); 7,79 (d, 1H, H₆, $J_{6-5} = 8,6$ Hz); 4,10 (s, 3H, CH₃O); 2,67 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	47,69	3,00
Hallado	47,49	3,07	9,13

6,7-Dimetil-2-metoxycarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.4)



Fórmula molecular: C₁₃H₁₁N₂O₄F₃

P.M.: 316,23 g/mol

Punto de fusión: 171-172°C

Aspecto: Sólido amarillo.

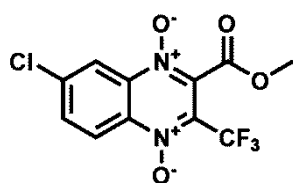
Rendimiento: 4%

IR (KBr): 3090 (d, ν C-H Ar), 1756 (f, ν C=O), 1343 (f, ν N-óxido), 1268 (m, ν C-O), 1174 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,38 (s, 1H, H₅); 8,35 (s, 1H, H₈); 4,10 (s, 3H, CH₃O); 2,57 (s, 6H, 2xCH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	49,38	3,51
Hallado	48,99	3,20	8,17

7-Cloro-2-metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.5)



Fórmula molecular: C₁₁H₆N₂O₄F₃Cl

P.M.: 322,62 g/mol

Punto de fusión: 172-173°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 22%

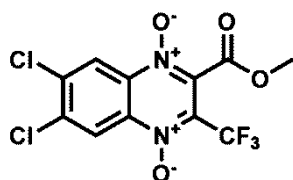
IR (KBr): 3069 (d, ν C-H Ar), 1742 (f, ν C=O), 1349 (f, ν N-óxido), 1267 (m, ν C-O), 1163 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,58 (d, 1H, H₈, $J_{8,6} = 2,0$ Hz); 8,57 (d, 1H, H₅, $J_{5,6} = 8,9$ Hz); 7,90 (dd, 1H, H₆, $J_{6,5} = 9,3$ Hz, $J_{6,8} = 2,0$ Hz); 4,00 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	40,95	1,87	8,68
Hallado	41,03	1,88	8,58

6,7-Dicloro-2-metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.6)



Fórmula molecular: C₁₁H₅N₂O₄F₃Cl₂

P.M.: 357,07 g/mol

Punto de fusión: 178-179°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 4%

IR (KBr): 3177 (d, ν C-H Ar), 1756 (f, ν C=O), 1339 (f, ν N-óxido), 1278 (m, ν C-O), 1169 (m, ν C-F) cm⁻¹.

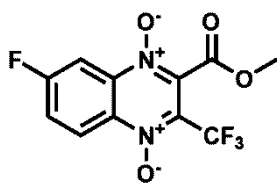
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,74 (s, 1H, H₅); 8,71 (s, 1H, H₈); 4,10 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	36,97	1,4	7,84
Hallado	36,66	1,38	7,72

7-Fluoro-2-metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido

(Compuesto 5.7)

Fórmula molecular: C₁₁H₆N₂O₄F₄

P.M.: 306,17 g/mol

Punto de fusión: 123-124°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 25%

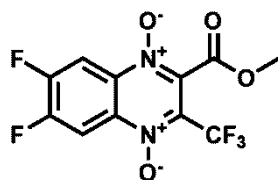
IR (KBr): 3077 (d, ν C-H Ar), 1756 (f, ν C=O), 1340 (f, ν N-óxido), 1278 (m, ν C-O), 1168 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,69 (dd, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,6$, $J_{5-F} = 4,9$ Hz); 8,28 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F} = 8,0$ Hz, $J_{8-6} = 2,7$ Hz); 7,72 (ddd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,7$ Hz, $J_{6-F} = 7,2$ Hz, $J_{6-8} = 2,7$ Hz); 4,12 (d, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	43,15	1,98
Hallado	43,18	1,84	8,85

6,7-Difluoro-2-metoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido

(Compuesto 5.8)

Fórmula molecular: C₁₁H₅N₂O₄F₅

P.M.: 324,16 g/mol

Punto de fusión: 172-173°C

Aspecto: Sólido amarillo.

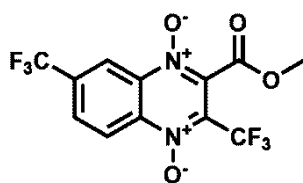
Rendimiento: 4%

IR (KBr): 3066 (d, ν C-H Ar), 1750 (f, ν C=O), 1356 (f, ν N-óxido), 1252 (m, ν C-O), 1187 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,47-8,39 (m, 2H, H₅ + H₈); 4,12 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	40,70	1,55
Hallado	40,79	1,35	8,54

2-Metoxicarbonil-3,7-di(trifluorometil)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.9)



Fórmula molecular: C₁₂H₆N₂O₄F₆

P.M.: 356,18 g/mol

Punto de fusión: 138-139°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 2%

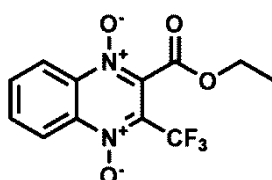
IR (KBr): 3108 (d, ν C-H Ar), 1755 (f, ν C=O), 1351 (f, ν N-óxido), 1267 (m, ν C-O), 1170 (m, ν Ar-CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,92 (d, 1H, H₈, $J_{8-6} = 1,8$ Hz); 8,80 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,0$ Hz); 8,18 (dd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,0$ Hz, $J_{6-8} = 1,7$ Hz); 4,12 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	40,45	1,68	7,86
Hallado	40,82	1,75	7,73

2-Etoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 5.10)



Fórmula molecular: C₁₂H₉N₂O₄F₃

P.M.: 302 g/mol

Punto de fusión: 131-132 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 1% / 8%

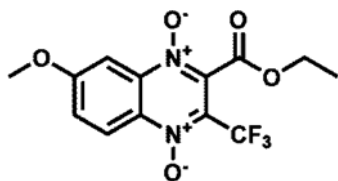
IR (KBr): 3106 (d, ν C-H Ar), 1744 f, ν C=O), 1360 (f, ν N-óxido), 1264 (m, ν C-O), 1154 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,66-8,62 (m, 2H, H₅ + H₈); 7,97-8,03 (m, 2H, H₆ + H₇); 4,59 (q, 2H, CH₂); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	47,69	3,00	9,27
Hallado	47,49	3,07	9,13

2-Etoxicarbonil-7-metoxi-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.11)



Fórmula molecular: C₁₃H₁₁N₂O₅F₃

P.M.: 332,2 g/mol

Punto de fusión: 142-143,5°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 1% / 4%

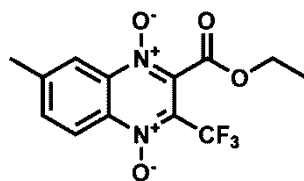
IR (KBr): 3087 (d, ν C-H Ar), 1742 (f, ν C=O), 1356 (f, ν N-óxido), 1263 (m, ν C-O), 1143 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,54 (d, 1H, H₅, J_{5-6} = 9,5 Hz); 7,89 (d, 1H, H₈, J_{8-6} = 2,6 Hz); 7,53 (dd, 1H, H₆, J_{6-5} = 9,5 Hz, J_{6-8} = 2,7 Hz); 4,59 (q, 2H, CH₂); 4,05 (s, 3H, CH₃O); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	46,98	3,31	8,43
Hallado	46,83	3,24	8,14

2-Etoxicarbonil-7-metil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.12)



Fórmula molecular: C₁₃H₁₀N₂O₄F₃

P.M.: 315,2 g/mol

Punto de fusión: 150-151 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 1% / 4%

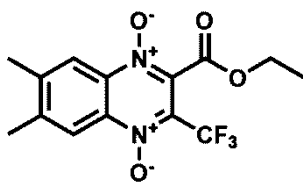
IR (KBr): 3096 (d, ν C-H Ar), 1743 (f, ν C=O), 1352 (f, ν N-óxido), 1271 (m, ν C-O), 1153 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,53 (d, 1H, H₅, J_{5-6} = 8,8 Hz); 8,41 (s, 1H, H₈); 7,78 (dd, 1H, H₆, J_{6-5} = 8,9 Hz, J_{6-8} = 1,4 Hz); 4,58 (q, 2H, CH₂); 2,67 (s, 3H, CH₃); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	49,36	3,48	8,86
Hallado	49,22	3,38	8,79

2-Etoxicarbonil-6,7-dimetil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.13)



Fórmula molecular: C₁₄H₁₃N₂O₄F₃

P.M.: 330,2 g/mol

Punto de fusión: 182-183 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

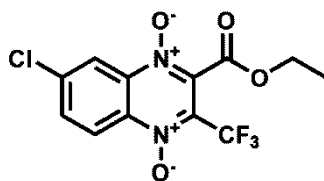
Rendimiento: 1%

IR (KBr): 3068 (d, ν C-H Ar), 1749 (f, ν C=O), 1356 (f, ν N-óxido), 1270 (m, ν C-O), 1175 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,39 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 8,8$ Hz); 8,36 (s, 1H, H₈); 4,58 (q, 2H, CH₂); 2,57 (s, 6H, 2xCH₃); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	50,90	3,93
Hallado	51,09	3,91	8,24

7-Cloro-2-etoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.14)



Fórmula molecular: C₁₂H₈N₂O₄F₃Cl

P.M.: 336,5 g/mol

Punto de fusión: 137-138 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

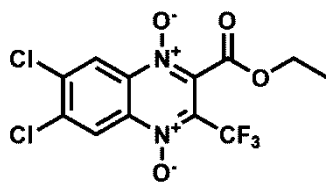
Rendimiento: 8%/21%

IR (KBr): 3071 (d, ν C-H Ar), 1749 (f, ν C=O), 1355 (f, ν N-óxido), 1267 (m, ν C-O), 1161 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,61 (d, 1H, H₈, $J_{8-6} = 2,1$ Hz); 8,59 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,2$ Hz); 7,90 (dd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,2$ Hz, $J_{6-8} = 2,1$ Hz); 4,59 (q, 2H, CH₂); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	42,79	2,37
Hallado	42,61	2,28	8,20

6,7-Dicloro-2-etoxicarbonil-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.15)

Fórmula molecular: C₁₂H₇N₂O₄F₃Cl₂

P.M.: 371 g/mol

Punto de fusión: 175-177 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 3% / 31%

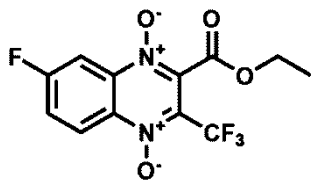
IR (KBr): 3081 (m, ν C-H Ar), 1755 (f, ν C=O), 1342 (f, ν N-óxido), 1269 (m, ν C-O), 1171 (m, ν CF₃), 1022 (s, ν Ar-Cl) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,74 (s, 1H, H₅); 8,72 (s, 1H, H₈); 4,58 (q, 2H, CH₂); 1,46 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	38,81	1,88	7,54
Hallado	38,67	1,87	7,39

2-Etoxicarbonil-7-fluoro-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.16)

Fórmula molecular: C₁₂H₈N₂O₄F₄

P.M.: 320 g/mol

Punto de fusión: 130-131 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 1% / 22%

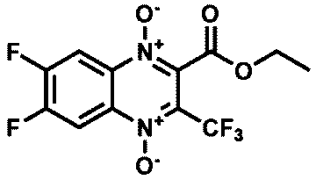
IR (KBr): 3119 (d, ν C-H Ar), 1750 (f, ν C=O), 1359 (f, ν N-óxido), 1267 (m, ν C-O), 1171 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,69 (dd, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,4$ Hz, $J_{5-F} = 4,8$ Hz); 8,28 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F} = 8,0$ Hz, $J_{8-6} = 2,6$ Hz); 7,72 (ddd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,7$ Hz, $J_{6-F} = 7,2$ Hz, $J_{6-8} = 2,6$ Hz); 4,59 (q, 2H, CH₂); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	45,0	2,5	8,75
Hallado	45,0	2,41	8,63

2-Etoxicarbonil-6,7-difluoro-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 5.17)

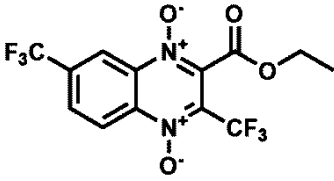
	Fórmula molecular: C ₁₂ H ₇ N ₂ O ₄ F ₅ P.M.: 338,1 g/mol Punto de fusión: 162-163 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 10%/17%
---	--

IR (KBr): 3048 (d, ν C-H Ar), 1745 (f, ν C=O), 1354 (f, ν N-óxido), 1253 (m, ν C-O), 1182 (m, ν CF₃) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,46 (dd, 1H, H₅, $J_{5-F6} = 6,3$ Hz, $J_{5-F7} = 4,3$ Hz); 8,43 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F7} = 6,4$ Hz, $J_{8-F6} = 4,3$ Hz); 4,58 (q, 2 H, CH₂); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:		%C	%H	%N
		Calculado	42,60	2,07
	Hallado	42,59	1,97	8,16

2-Etoxicarbonil-3,7-di(trifluorometil)quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 5.18)

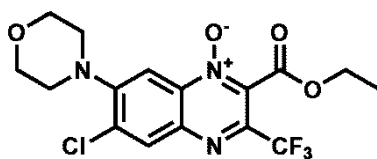
	Fórmula molecular: C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₄ F ₆ P.M.: 370 g/mol Punto de fusión: 112-113 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 2%
---	---

IR (KBr): 3112 (d, ν C-H Ar), 1750 (f, ν C=O), 1350 (f, ν N-óxido), 1268 (m, ν C-O), 1159 (m, ν CF₃), 1118 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,93 (s, 1H, H₈); 8,79 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,0$ Hz); 8,16 (dd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,0$ Hz, $J_{6-8} = 1,4$ Hz); 4,60 (q, 2H, CH₂); 1,47 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:		%C	%H	%N
		Calculado	42,16	2,16
	Hallado	42,21	1,96	7,49

6-Cloro-2-etoxicarbonil-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina-1-*N*-óxido
(Compuesto 6.1)



Fórmula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₄F₃Cl

P.M.: 405,76 g/mol

Punto de fusión: 152-153°C

Aspecto: Sólido amarillo.

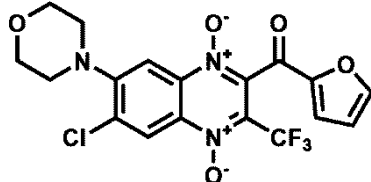
Rendimiento: 36%

IR (KBr): 2975 (d, νC-H Ar), 1748 (f, νC=O), 1439 (f, νC-N), 1369 (m, νN-óxido), 1177 (m, νC-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,27 (s, 1 H, H₅); 7,98 (s, 1H, H₈); 4,59 (q, 2H, CH₂); 3,97-3,95 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina); 3,33-3,31 (m, 4H, 2xCH₂-N-morfolina); 1,46 (t, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	47,34	3,69
Hallado	47,29	3,63	10,58

6-Cloro-2-furoil-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.2)



Fórmula molecular: C₁₈H₁₃N₃O₅F₃Cl

P.M.: 443,76 g/mol

Punto de fusión: 225-226 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

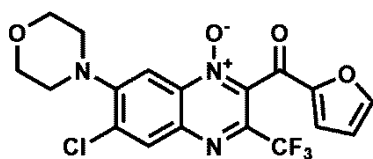
Rendimiento: 12%

IR (KBr): 3127 (d, νC-H Ar), 1667 (f, νC=O), 1442 (f, νC-N), 1360 (f, νN-óxido), 1171 (m, νC-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,67 (s, 1H, H₅), 7,95 (s, 1H, H₈); 7,65 (d, 1H, H_{5'}, J_{5'-4'} = 1,5 Hz); 7,48 (d, 1H, H_{3'}, J_{3-4'} = 3,6 Hz); 6,70 (dd, 1H, H_{4'}, J_{4'-3'} = 3,6 Hz, J_{4'-5'} = 1,5 Hz); 3,95-3,93 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina); 3,34-3,31 (m, 4H, 2xCH₂-N-morfolina).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	48,70	2,93
Hallado	48,32	3,39	9,04

6-Cloro-2-furoil-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1- *N*-óxido
(Compuesto 6.3)



Fórmula molecular: C₁₈H₁₃N₃O₄F₃Cl

P.M.: 427,76 g/mol

Punto de fusión: 218-219 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 14%

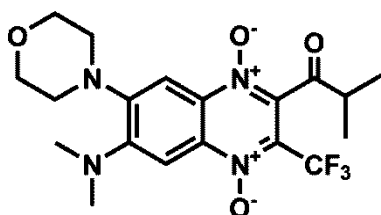
IR (KBr): 3127 (d, ν C-H Ar), 1656 (f, ν C=O), 1466 (f, ν C-N), 1362 (d, ν N-óxido), 1176 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,32 (s, 1H, H₅); 7,98 (s, 1H, H₈); 7,63 (s, 1H, H_{5'}); 7,41 (d, 1H, H_{3'}, $J_{3'-4'} = 3,7$ Hz); 6,68 (dd, 1H, H_{4'}, $J_{4-5'} = 0,9$ Hz, $J_{4'-3'} = 3,1$ Hz); 3,97-3,94 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina), 3,33-3,31 (m, 4H, 2xCH₂-N-morfolina).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	50,52	3,04	9,82
Hallado	50,26	3,29	9,58

6-Dimetilamino-2-isobutil-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.4)



Fórmula molecular: C₁₉H₂₃N₄O₄F₃

P.M.: 428,41 g/mol

Punto de fusión: 152-153°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 36%

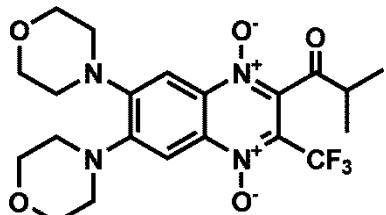
IR (KBr): 2970 (d, ν C-H Ar), 1716 (f, ν C=O), 1462 (f, ν C-N), 1354 (f, ν N-óxido), 1163 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,82 (s, 1H, H₅); 7,77 (s, 1H, H₈); 3,95-3,93 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina); 3,35-3,33 (m, 4H, 2xCH₂-N-morfolina); 3,20-3,13 (m, 1H, CH); 3,06 (s, 6H, (CH₃)₂-CH); 1,33 (s, 3H, CH₃-N); 1,31 (s, 3H, CH₃-N).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	53,27	5,37	13,08
Hallado	53,25	5,73	12,89

2-Isobutil-6,7-dimorfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.5)

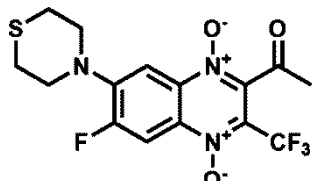
	Fórmula molecular: C ₂₁ H ₂₅ N ₄ O ₅ F ₃ P.M.: 470,44 g/mol Punto de fusión: 200-201°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 18%
---	---

IR (KBr): 2945 (d, ν C-H Ar), 1710 (f, ν C=O), 1468 (f, ν C-N), 1358 (f, ν N-óxido), 1117 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,92 (s, 1H, H₅); 7,82 (s, 1H, H₈); 3,99-3,84 (m, 8H, 4xCH₂-O-morfolina); 3,43-3,39 (m, 8H, 4xCH₂-N-morfolina); 3,20-3,09 (m, 1H, CH); 1,32 (s, 6H, 2xCH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	53,61	5,31
Hallado	53,80	5,39	11,81

2-Acetil-6-fluoro-7-tiomorfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.6)

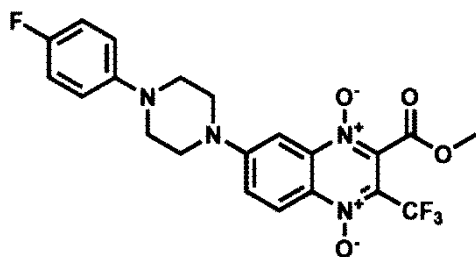
	Fórmula molecular: C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₃ F ₃ S P.M.: 391,34 g/mol Punto de fusión: 215-216°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 17%
---	---

IR (KBr): 2919 (d, ν C-H Ar), 1728 (f, ν C=O), 1488 (f, ν C-N), 1357 (f, ν N-óxido), 1186 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,20 (d, 1H, H₅, $J_{5-F} = 12,7$ Hz); 7,81 (d, 1H, H₈, $J_{8-F} = 8,0$ Hz); 3,76-3,74 (m, 4H, 2xCH₂-N-tiomorfolina); 2,87-2,85 (m, 4H, 2xCH₂-S-tiomorfolina); 2,70 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	46,03	3,32
Hallado	46,18	3,71	10,60

2-Metoxicarbonil-7-[4-(4-fluorofenil)-piperazin-1-il]-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.7)



Fórmula molecular: C₂₁H₁₈N₄O₄F₄

P.M.: 466,39 g/mol

Punto de fusión: 185-186 °C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 47%

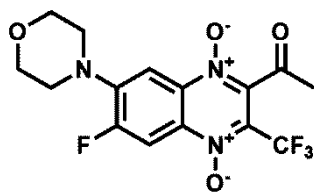
IR (KBr): 2955 (d, ν C-H Ar), 1747 (f, ν C=O), 1477 (f, ν C-N), 1338 (f, ν N-óxido), 1142 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,45 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,7$ Hz); 7,67 (d, 1H, H₈, $J_{8-6} = 2,6$ Hz); 7,56 (dd, 1H, H₆, $J_{6-5} = 9,7$ Hz, $J_{6-8} = 2,7$ Hz); 7,04-7,00 (m, 2H, H_{3'} + H_{5'}); 6,97-6,93 (m, 2H, H_{2'} + H_{6'}); 4,09 (s, 3H, CH₃); 3,76-3,73 (m, 4H, 2xCH₂-piperazina); 3,33-3,30 (m, 4H, 2xCH₂-piperazina).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	54,07	3,86	12,01
Hallado	53,84	4,17	11,93

2-Acetil-6-fluoro-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.8)



Fórmula molecular: C₁₅H₁₃N₃O₄F₃

P.M.: 375,28 g/mol

Punto de fusión: 198-200°C

Aspecto: Sólido amarillo.

Rendimiento: 5%

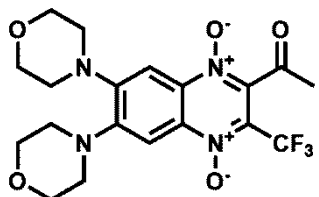
IR (KBr): 2859 (d, ν C-H Ar), 1729 (f, ν C=O), 1478 (f, ν C-N), 1364 (f, ν N-óxido), 1164 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,24 (d, 1H, H₅, $J_{5-F} = 13,2$ Hz); 7,69 (d, 1H, H₈, $J_{8-F} = 8,1$ Hz); 3,81-3,79 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina); 3,37-3,35 (m, 4H, 2xCH₂-N-morfolina); 2,59 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:

	%C	%H	%N
Calculado	48,01	3,49	11,20
Hallado	48,01	3,98	10,76

2-Acetil-6,7-dimorfolino-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.9)

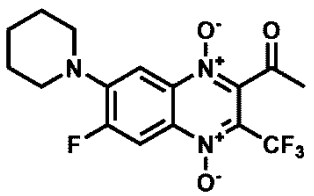
	Fórmula molecular: C ₁₉ H ₂₁ N ₄ O ₅ F ₃ P.M.: 442,39 g/mol Punto de fusión: 212-213°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 1%
---	--

IR (KBr):

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,70 (s, 1H, H₅), 7,63 (s, 1H, H₈); 3,85-3,78 (m, 8H, 4xCH₂-O-morfolina); 3,42-3,37 (m, 2H, CH₂-N-morfolina); 3,30-3,25 (m, 6H, 3xCH₂-N-morfolina); 2,59 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	51,58	4,78
Hallado	51,39	4,84	12,27

2-Acetil-6-fluoro-7-(piperidin-1-il)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.10)

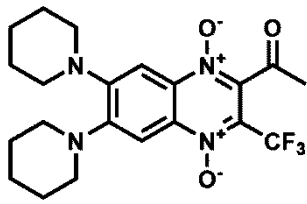
	Fórmula molecular: C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃ F ₄ P.M.: 373,30g/mol Punto de fusión: 176-177 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 20%
---	---

IR (KBr): 2939 (d, νC-H Ar), 1730 (f, νC=O), 1484 (f, νC-N), 1358 (f, νN-óxido), 1164 (m, νC-F) cm⁻¹.

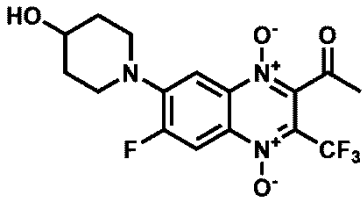
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,19 (d, 1H, H₅, J_{5-F} = 13,3 Hz); 7,64 (d, 1H, H₈, J_{8-F} = 8,0 Hz); 3,39-3,32 (m, 4H, 2xCH₂-N-piperidina); 2,59 (s, 3H, CH₃); 1,73-1,67 (m, 4H, 2xCH₂-CH₂-N-piperidina); 1,66-1,59 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-N-piperidina).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
	Calculado	51,47	4,02
Hallado	51,39	4,03	11,22

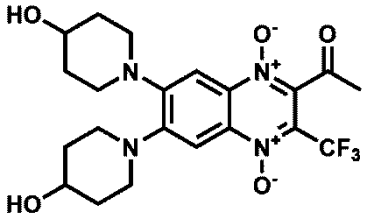
2-Acetil-6,7-di(piperidin-1-il)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido
(Compuesto 6.11)

	Fórmula molecular: C ₂₁ H ₂₅ N ₄ O ₃ F ₃ P.M.: 438,44 g/mol Punto de fusión: 178-179 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 18%												
IR (KBr): 2940 (f, ν C-H Ar), 1734 (f, ν C=O), 1469 (f, ν C-N), 1357 (f, ν N-óxido), 1164 (m, ν C-F) cm ⁻¹ .													
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,66 (s, 1H, H ₅); 7,60 (s, 1H, H ₈); 3,33-3,29 (m, 4H, 4xCH-N-piperidina); 3,28-3,21 (m, 4H, 4xCH-N-piperidina); 2,58 (s, 3H, CH ₃); 1,76-1,68 (m, 8H, 4xCH ₂ -CH ₂ -N-piperidina); 1,65-1,58 (m, 4H, 2xCH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N-piperidina).													
Análisis elemental:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>%C</th> <th>%H</th> <th>%N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calculado</td> <td>57,53</td> <td>5,70</td> <td>12,78</td> </tr> <tr> <td>Hallado</td> <td>57,57</td> <td>5,69</td> <td>12,72</td> </tr> </tbody> </table>		%C	%H	%N	Calculado	57,53	5,70	12,78	Hallado	57,57	5,69	12,72
	%C	%H	%N										
Calculado	57,53	5,70	12,78										
Hallado	57,57	5,69	12,72										

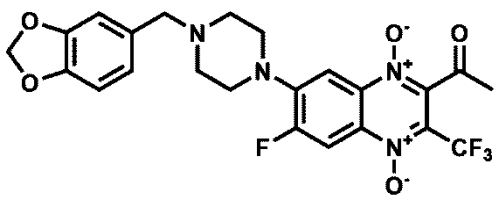
2-Acetil-6-fluoro-7-(4-hidroxipiperidin-1-il)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.12)

	Fórmula molecular: C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₄ F ₄ P.M.: 389,30g/mol Punto de fusión: 173-174 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 21%												
IR (KBr): 3373 (d, ν OH), 2922 (d, ν C-H Ar), 1729 (f, ν C=O), 1488 (f, ν C-N), 1331 (f, ν N-óxido), 1160 (m, ν C-F) cm ⁻¹ .													
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,19 (d, 1H, H ₅ , $J_{5,F} = 13,2$ Hz.); 7,65 (d, 1H, H ₈ , $J_{8,F} = 8,2$ Hz); 4,85 (d, 1H, OH, $J_{OH-CH} = 4,1$ Hz); 3,79-3,72 (m, 1H, CH); 3,64-3,59 (m, 2H, 2xCH-N-piperidina); 3,21-3,15 (m, 2H, 2xCH-N-piperidina); 2,59 (s, 3H, CH ₃); 1,93-1,89 (m, 2H, 2xCH-CH-OH); 1,60-1,51 (m, 2H, 2xCH-CH-OH).													
Análisis elemental:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>%C</th> <th>%H</th> <th>%N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calculado</td> <td>49,35</td> <td>3,85</td> <td>10,79</td> </tr> <tr> <td>Hallado</td> <td>49,02</td> <td>4,04</td> <td>10,40</td> </tr> </tbody> </table>		%C	%H	%N	Calculado	49,35	3,85	10,79	Hallado	49,02	4,04	10,40
	%C	%H	%N										
Calculado	49,35	3,85	10,79										
Hallado	49,02	4,04	10,40										

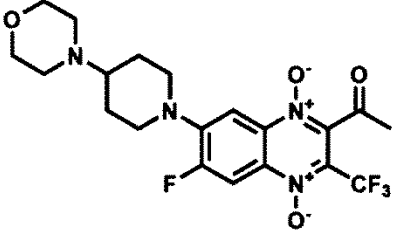
**2-Acetil-6,7-di(4-hidroxipiperidin-1-il)-3-trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-
óxido (Compuesto 6.13)**

	<p>Fórmula molecular: C₂₁H₂₅N₄O₅F₃ P.M.: 470,44 g/mol Punto de fusión: 201-202 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 12%</p>												
<p>IR (KBr): 3443 (m, νOH), 2932 (d, νC-H Ar), 1730 (f, νC=O), 1470 (f, νC-N), 1365 (f, νN-óxido), 1194 (m, νC-F) cm⁻¹.</p>													
<p>¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,67 (s, 1H, H₅), 7,61 (s, 1H, H₈); 4,84 (d, 2H, 2xOH, J_{OH-CH} = 4,0 Hz); 3,74-3,64 (m, 6H, 2xCH-OH + 4xCH-N-piperidina); 2,98-2,87 (m, 4H, 4xCH-N-piperidina); 2,58 (s, 3H, CH₃); 1,96-1,93 (m, 4H, 4xCH-CH-OH); 1,63-1,55 (m, 4H, 4xCH-CH-OH).</p>													
Análisis elemental:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>%C</th> <th>%H</th> <th>%N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calculado</td> <td>53,61</td> <td>5,61</td> <td>11,91</td> </tr> <tr> <td>Hallado</td> <td>53,29</td> <td>5,63</td> <td>11,68</td> </tr> </tbody> </table>		%C	%H	%N	Calculado	53,61	5,61	11,91	Hallado	53,29	5,63	11,68
	%C	%H	%N										
Calculado	53,61	5,61	11,91										
Hallado	53,29	5,63	11,68										

**2-Acetil-6-fluoro-7-[4-(3,4-metilendioxi-bencil)-piperazin-1-il]-3-
trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.14)**

	<p>Fórmula molecular: C₂₃H₂₀N₄O₅F₄ P.M.: 508,42 g/mol Punto de fusión: 149-150 °C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 27%</p>												
<p>IR (KBr): 2816 (d, νC-H Ar), 1733 (f, νC=O), 1481 (f, νC-N), 1364 (f, νN-óxido), 1168 (m, νC-F) cm⁻¹.</p>													
<p>¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,21 (d, 1H, H₅, J_{5-F} = 13,0 Hz); 7,66 (d, 1H, H₈, J_{8-F} = 8,0 Hz); 6,90 (s, 1H, H₂); 6,87 (d, 1H, H₆, J₆₋₅ = 7,9 Hz); 6,79 (d, 1H, H_{5'}, J_{5'-6'} = 8,0 Hz); 6,00 (s, 2H, O-CH₂-O); 3,47 (s, 2H, CH₂-N); 3,38-3,36 (m, 4H, 2xCH₂-N-Quinoxalina); 2,59 (s, 3H, CH₃); 2,58-2,54 (m, 4H, 2xCH₂-N-CH).</p>													
Análisis elemental:	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>%C</th> <th>%H</th> <th>%N</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calculado</td> <td>54,33</td> <td>3,93</td> <td>11,02</td> </tr> <tr> <td>Hallado</td> <td>54,17</td> <td>4,24</td> <td>10,87</td> </tr> </tbody> </table>		%C	%H	%N	Calculado	54,33	3,93	11,02	Hallado	54,17	4,24	10,87
	%C	%H	%N										
Calculado	54,33	3,93	11,02										
Hallado	54,17	4,24	10,87										

**2-Acetil-6-fluoro-7-(4-morfolino-piperidin-1-il)-3-(trifluorometil)quinoxalina
1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.15)**

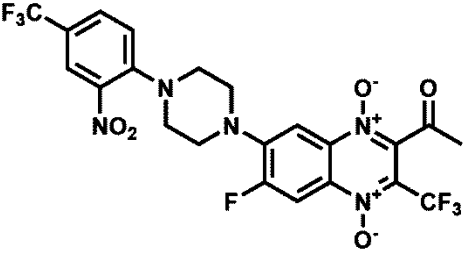
	<p>Fórmula molecular: C₂₀H₂₂N₄O₄F₄</p> <p>P.M.: 458,41 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 198-199°C</p> <p>Aspecto: Sólido amarillo.</p> <p>Rendimiento: 64%</p>
---	---

IR (KBr): 2958 (d, ν C-H Ar), 1732 (f, ν C=O), 1478 (f, ν C-N), 1362 (f, ν N-óxido), 1168 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,20 (d, 1H, H₅, J_{5-F} = 13,1 Hz); 7,66 (d, 1H, H₈, J_{8-F} = 8,0 Hz); 3,82-3,75 (m, 2H, 2xCH-N-piperidina); 3,60-3,56 (m, 4H, 2xCH₂-O-morfolina); 3,06-3,00 (m, 2H, 2xCH-N-piperidina); 2,59 (s, 3H, CH₃); 2,52-2,46 (m, 4H, CH₂-N-morfolina); 2,46-2,41 (m, 1H, CH-N); 1,97-1,93 (m, 2H, 2xCH-CH-piperidina); 1,62-1,52 (m, 2H, 2xCH-CH-piperidina).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
Calculado	52,40	4,80	12,22
Hallado	52,21	4,95	11,94

**2-Acetil-6-fluoro-7-[4-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)-piperazin-1-il]-3-
trifluorometilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 6.16)**

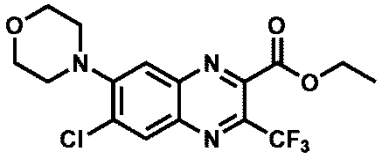
	<p>Fórmula molecular: C₂₂H₁₆N₅O₅F₇</p> <p>P.M.: 563,38 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 234-235 °C</p> <p>Aspecto: Sólido amarillo.</p> <p>Rendimiento: 30%</p>
---	--

IR (KBr): 3074 (d, ν C-H Ar), 1721 (f, ν C=O), 1475 (f, ν C-N), 1366 (f, ν N-óxido), 1326 (f, ν NO₂), 1170 (m, ν C-F) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,25 (d, 1H, H₅, J_{5-F} = 13,0 Hz); 8,21 (d, 1H, H₃, J_{3-5} = 1,3 Hz); 7,92 (dd, 1H, H₅, J_{5-3} = 1,6 Hz, J_{5-6} = 8,6 Hz); 7,67 (d, 1H, H₈, J_{508-F} = 8,1 Hz); 7,51 (d, 1H, H₆, J_{6-5} = 8,7 Hz); 3,61-3,54 (m, 4H, 2xCH₂-N-2-nitro-4-trifluorometilfenilo); 3,43-3,39 (m, 4H, 2xCH₂-N-Quinoxalina); 2,60 (s, 3H, CH₃).

Análisis elemental:	%C	%H	%N
Calculado	46,89	2,84	12,43
Hallado	47,01	3,19	12,32

6-Cloro-2-etoxicarbonil-7-morfolino-3-trifluorometilquinoxalina (Compuesto 6.17)

	Fórmula molecular: C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃ F ₃ Cl P.M.: 389,76 g/mol Punto de fusión: 92-93°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 43%			
	IR (KBr): 2985 (d, ν C-H Ar), 1742 (f, ν C=O), 1469 (f, ν C-N), 1183 (m, ν C-F) cm ⁻¹ . ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,29 (s, 1H, H ₅); 7,70 (s, 1H, H ₈); 4,58 (q, 2H, CH ₂); 3,98-3,96 (m, 4H, 2xCH ₂ -O-morfolina); 3,31-3,28 (m, 4H, 2xCH ₂ -N-morfolina); 1,48 (t, 3H, CH ₃).			
Análisis elemental:		%C	%H	%N
	Calculado	49,31	3,88	10,78
	Hallado	49,23	3,57	10,92

2-Metil-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-*N*-óxido (Compuesto 7.1)

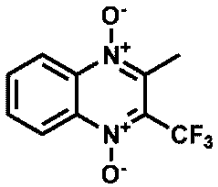
	Fórmula molecular: C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂ F ₃ P.M.: 244,17 g/mol Punto de fusión: 131-132°C Aspecto: Sólido amarillo. Rendimiento: 20%			
	IR (KBr): 3110 (d, ν C-H Ar), 1352 (f, ν N-óxido), 1147 (m, ν C-F). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,51 (t, 2H, H ₅ + H ₈ , J_{5-6} = 9,1 Hz); 8,08-8,03 (m, 1H, H ₆); 8,01-7,97 (m, 1H, H ₇); 2,70 (dd, 3H, CH ₃ , $J_{CH3-CF3}$ = 6,1 Hz, $J_{CH3-CF3}$ = 3,1 Hz).			
Análisis elemental:		%C	%H	%N
	Calculado	49,18	2,86	11,47
	Hallado	49,37	2,96	11,34

Tabla 21. Caracterización de los productos re-sintetizados seleccionados para su evaluación *in vitro*.

Comp.	Caracterización
1.2	<p>Fórmula molecular: C₁₇H₁₁N₂O₄F₃ P.M.: 364,28 g/mol. IR (KBr): 3077 (d, νC-H Ar), 1659 (f, νC=O), 1339 (f, νN-óxido), 1177 (m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,60 (d, 1H, H₅, $J_{5-6} = 9,5$ Hz); 7,91 (d, 2H, H₂ + H₆); 7,87 (d, 1H, H₈, $J_{8-5} = 2,5$ Hz); 7,71 (dt, 2H, H₃ + H₅); 7,57 (dd, 1H, H₄, $J_{4-2;6} = 1,2$ Hz, $J_{4-3;5} = 8,1$ Hz); 7,55 (m, 1H, H₆). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 56,05%; H: 3,04%; N: 7,69%. Hallado: C: 55,50%; H: 2,97%; N: 7,48%.</p>
1.7	<p>Fórmula molecular: C₁₆H₇N₂O₃F₅ P.M.: 370,23 g/mol. IR (KBr): 3061 (d, νC-H Ar), 1687 (f, νC=O), 1354 (f, νN-óxido), 1181 (m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,52 (dd, 1H, H₅, $J_{5-F7} = 7,1$ Hz, $J_{5-F6} = 9,1$ Hz); 8,40 (dd, 1H, H₈, $J_{8-F6} = 7,1$ Hz, $J_{8-F7} = 9,1$ Hz); 7,89 (dd, 2H, H₂ + H₃); 7,73 (t, 1H, H₄); 7,58 (t, 2H, H₃ + H₅). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 51,91%; H: 1,91%; N: 7,57%. Hallado: C: 51,99%; H: 1,97%; N: 7,43%.</p>
1.8	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₇N₂O₃F₅S P.M.: 340,28 g/mol. IR (KBr): 3103 (d, νC-H Ar), 1653 (f, νC=O), 1361(f, νN-óxido), 1185 (m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,61 (dd, 1H, J = 1,4 Hz, J = 8,6 Hz.); 8,33 (dd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 8,4 Hz); 8,03 (ddd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 6,8 Hz, J = 8,3 Hz.); 7,96 (ddd, 1H, J = 1,3 Hz, J = 7,0 Hz, J = 8,4 Hz.); 7,86 (dd, 1H, J = 1,1 Hz, J = 4,9 Hz.); 7,52 (dd, 1H, J = 0,7 Hz, J = 3,8 Hz.); 7,18 (m, 1H). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 49,42%; H: 2,07%; N: 16,75%. Hallado: C: 49,14%; H: 2,08%; N: 7,83%.</p>
1.9	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₅N₂O₃F₅S P.M.: 376,26 g/mol. IR (KBr): 3070 (d, νC-H Ar), 1665 (f, νC=O), 1341 (d, νN-óxido), 1184 (m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,50 (ddd, 1H, H₈, J = 2,5 Hz, J = 7,2 Hz, J = 9,5 Hz.); 8,41 (ddd, 1H, H₅); 7,90 (m, 1H, H₃); 7,60 (m, 1H, H₅), 7,22 (td, 1H, H₄). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 44,69%; H: 1,34%; N: 25,25%. Hallado: C: 44,29%; H: 1,38%; N: 7,34%..</p>
1.10	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₇N₂O₄F₃ P.M.: 324,21g/mol. IR (KBr): 3116 (d, νC-H Ar), 1670 (f, νC=O), 1349 (d, νN-óxido), 1148 (m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 7,68 (dd, 1H, J = 0,7 Hz, J = 1,6 Hz); 7,63 (dd, 1H, J = 0,7 Hz, J = 1,6 Hz); 7,56 (d, 1H, J = 1,4 Hz); 7,33 (dd, 1H, J = 0,7 Hz, J = 3,6 Hz); 7,29 (dd, 1H, J = 0,8 Hz, J = 3,6 Hz); 6,61 (ddd, 2H,); 4,40 (s, 2H); 1,59 (s, 3H). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 51,86%; H: 2,18%; N: 8,64%. Hallado: C: 51,76%; H: 2,27%; N: 8,52%.</p>
1.11	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₅N₂O₄F₅ P.M.: 360,19g/mol. IR (KBr): 3127 (d, νC-H Ar), 1665 (f, νC=O), 1357 (d, νN-óxido), 1206 (m, νC-O), 1159(m, νC-F) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,50 (dd, 1H, H₈, J = 7,1 Hz); 8,41 (dd, 1H, H₅, $J_{5-6} = 7,1$ Hz); 7,66 (dd, 1H, H₃, $J_{3-4} = 1,5$ Hz); 7,51 (dd, 1H, H₅, $J_{5-4} = 3,7$ Hz); 6,73 (dd, 1H, H₄, $J_{4-3} = 1,6$ Hz, $J_{5-4} = 3,6$ Hz). Análisis elemental CHN: Calculado: C: 46,68%; H: 1,40%; N: 7,78%. Hallado: C: 46,38%; H: 1,71%; N: 7,39%.</p>
1.17	<p>Fórmula molecular: C₁₁H₅N₂O₃F₅ P.M.: 308,16 g/mol. IR (KBr): 3061 (d, νC-H Ar), 1736 (f, νC=O), 1351 (d, νN-óxido), 1168 (m, νC-F) cm⁻¹.</p>

	<p>¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,46 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 9,2 Hz); 8,41 (dd, 1H, J = 7,1 Hz, J = 9,1 Hz); 2,71 (s, 3H).</p> <p>Análisis elemental CHN: Calculado: C: 42,87%; H: 1,64%; N: 9,09%. Hallado: C: 42,93%; H: 1,63%; N: 9,01%</p>
1.23	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₁₃N₂O₃F₃ P.M.: 314,26g/mol.</p> <p>IR (KBr): 2975 (d, νC-H Ar), 1712 (f, νC=O), 1352 (d, νN-óxido), 1162 (m, νC-F) cm⁻¹.</p> <p>¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,66 (dd, 1H, J = 1,7 Hz, J = 8,2 Hz); 8,59 (dd, 1H, J = 1,6 Hz, 8,30 Hz); 7,99 (m, 2H); 1,41 (s, 9H).</p> <p>Análisis elemental CHN: Calculado: C: 53,51%; H: 4,17%; N: 8,91%. Hallado: C: 53,42%; H: 4,07%; N: 8,72%.</p>
1.24	<p>Fórmula molecular: C₁₄H₁₁N₂O₃F₅ P.M.: 350,24 g/mol.</p> <p>IR (KBr): 2983 (d, νC-H Ar), 1709(f, νC=O), 1348 (d, νN-óxido), 1157 (m, νC-F) cm⁻¹.</p> <p>¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ ppm: 8,45 (dd, 1H, H₅, J = 7,1 Hz, J = 9,1 Hz); 8,40 (dd, 1H, H₈, J = 7,1 Hz, J = 9,1 Hz); 1,41 (s, 9H, 3xCH₃).</p> <p>Análisis elemental CHN: Calculado: C: 48,01%; H: 3,17%; N: 8,00%. Hallado: C: 47,95%; H: 3,57%; N: 8,08%.</p>

X. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE SÍNTESIS

41. Reacción de Beirut

41.1. Síntesis de los derivados de quinoxalina de las series 1 y 5

Como se indica en la **Figura 64**, a la hora de llevar a cabo la síntesis mediante el método convencional de los derivados de la **series 1 y 5** se encontraron importantes limitaciones, como los bajos rendimientos obtenidos, los elevados tiempos de reacción requeridos y la compleja purificación por la elevada cantidad de subproductos.

Como se ha comentado en el apartado 30 de material y métodos, teniendo en cuenta estas limitaciones se optó por optimizar un nuevo método de síntesis empleando la SAM (**Figura 62**).

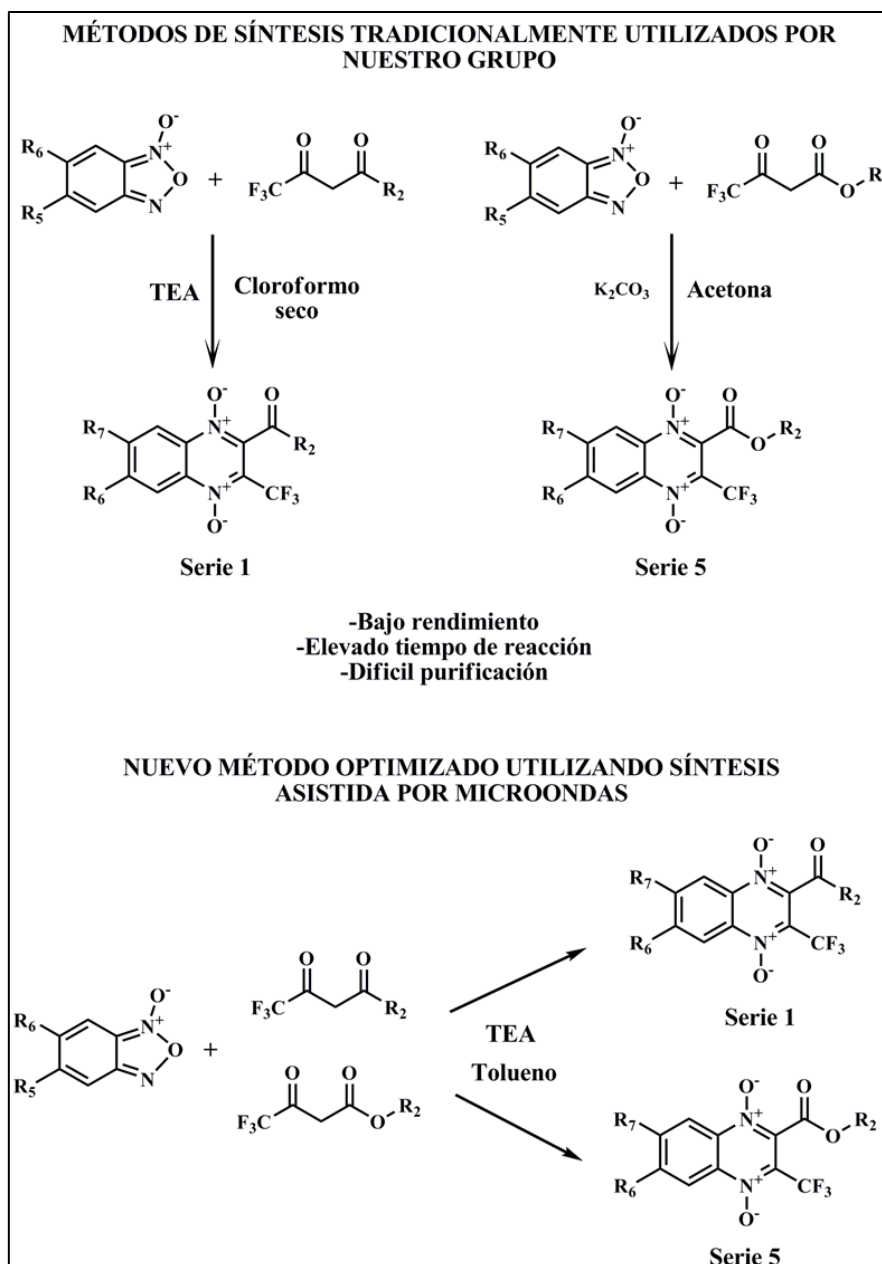


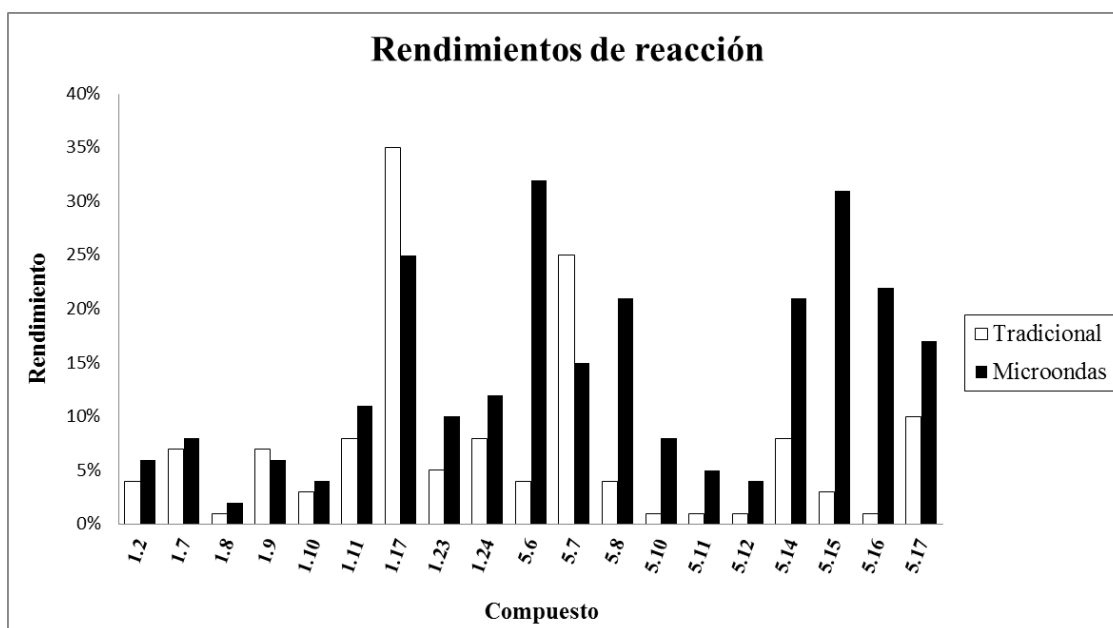
Figura 62. Nueva estrategia de síntesis para los derivados de las **series 1 y 5**.

41.1.1. Comparativa de los métodos de síntesis utilizados: Convencional vs microondas

Para determinar si los métodos de SAM (**Ib-1** y **Vb**) ofrecían las ventajas buscadas, se llevó a cabo una comparación de ambos métodos teniendo en cuenta los dos parámetros de mayor interés, rendimientos y tiempos de reacción. Para ello, se sintetizaron por duplicado un total de 19 compuestos, 9 pertenecientes a la **serie 1** (**1.2**, **1.7-1.11**, **1.17**, **1.23** y **1.24**) y 10 pertenecientes a la **serie 5** (**5.6-5.8**, **5.10-5.12** y **5.14-5.17**).

Rendimientos de reacción

Como se muestra en la **Gráfica 1**, la utilización del método de SAM proporcionó un incremento de los rendimientos de reacción en 16 de los 19 compuestos re-sintetizados. El aumento más destacable se observó en el compuesto **5.16**, donde el rendimiento se incrementó en más de 20 veces, pasando de obtener un 1% de rendimiento mediante el método convencional a un 22% gracias al método en microondas. También destacan las mejoras obtenidas en los compuestos **5.6**, **5.10** y **5.15**, en los que se aumentó el rendimiento de reacción en más de 8 veces.



Gráfica 1. Comparación de los rendimientos de reacción obtenidos mediante el método convencional (**Ia/Va**) y el nuevo método en microondas (**Ib-1/Vb**).

Los resultados observados indican que la mejoría en los rendimientos obtenidos mediante el uso del microondas es superior en los derivados de la **serie 5** que en los derivados de la **serie 1**, posiblemente por la diferencia estructural localizada en la posición 2 (**serie 1**: cetona- **serie 5**: éster) y por el perfeccionamiento del método de síntesis de la **serie 5**, ya que se disponía de una mayor experiencia cuando se llevó a cabo.

Además los resultados indican, más claramente en los datos para la **serie 5**, que los derivados con sustituyentes halogenados en las posiciones R_6 y/o R_7 del anillo de quinoxalina

muestran un mejor rendimiento mediante el método en microondas que los que no poseen este tipo de sustituyentes.

Este aumento de rendimiento observado es también atribuible a la simplificación del método de purificación del producto final. Además, el nuevo método permitió reducir en gran medida la cantidad de disolvente empleada, con las ventajas económicas y medioambientales que puede suponer a gran escala.

Tiempos de reacción

Otro parámetro que se perseguía mejorar era el tiempo de reacción, ya que en general mediante los métodos convencionales (**Ia/Va**) se requerían tiempos elevados de reacción que llegaban incluso a los 7 días. Como se muestra en la **Tabla 22**, los nuevos métodos de síntesis en microondas (**Ib-1/Vb**) permitieron una importante reducción de estos tiempos, pasando de horas y días a escasamente una hora de reacción, con el importante avance que esto supone. Valga de ejemplo el compuesto **5.12**, cuya síntesis mediante el método **Va** requirió 7 días y mediante el nuevo método **Vb** se consiguió reducir a 52 minutos, lo cual supone una disminución de casi 200 veces en el tiempo de reacción.

Esta gran reducción en los tiempos de reacción supone, sin duda alguna, una ventaja crucial del nuevo método de síntesis en microondas frente al anterior método de síntesis empleado.

Tabla 22. Comparación de los tiempos de reacción obtenidos mediante el método tradicional (**Ia/Va**) y el nuevo método en microondas (**Ib/Vb**).

COMPUESTO	TIEMPO DE REACCIÓN	
	Método Convencional (Ia/Va)	Método Microondas (Ib/Vb)
1.2	1-5 días	60 min
1.7	24 horas	45 min
1.8	1-5 días	60 min
1.9	56 horas	50 min
1.10	1-5 días	60 min
1.11	5 días	55 min
1.17	3 días	60 min
1.23	1-5 días	60 min
1.24	3 días	50 min
5.6	1 día	50 min
5.7	2 día	50 min
5.8	1 día	60 min
5.10	3 días	50 min
5.11	4 días	70 min
5.12	7 días	52 min
5.14	1 día	65 min
5.15	1 día	65 min
5.16	15 horas	50 min
5.17	1 día	50 min

41.2. Optimización de la síntesis del compuesto 7.1

Nuestro grupo de trabajo tenía una amplia experiencia en la síntesis de este tipo de compuestos pero poseyendo un grupo metilo en ambas posiciones, R₂ y R₃, del anillo de quinoxalina. El método de síntesis que se empleaba para obtener este tipo de compuestos se muestra en la **Figura 63**. La base condensante empleada en esta reacción actuaba también como disolvente. Cuando se empleaban BFXs con sustituyentes electrodonantes (CH₃ o CH₃O) o sin sustituir, únicamente se empleaba pirrolidina, sin embargo, cuando se partía de BFXs con sustituyentes electroatrayentes (Cl, F o CF₃) se empleaba una mezcla de TEA y pirrolidina, disminuyendo la cantidad de pirrolidina, con el fin de evitar una violenta reacción que degradaba los reactivos de reacción.

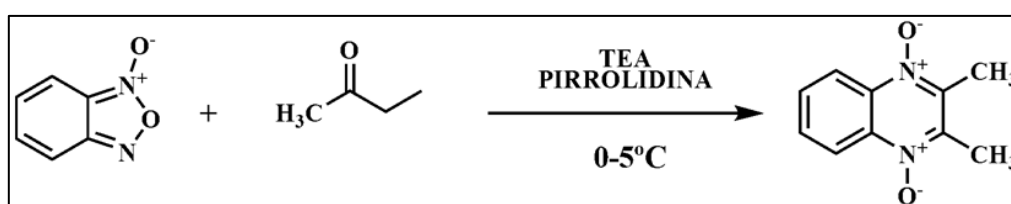


Figura 63. Esquema de síntesis utilizado para la obtención de los compuestos análogos al 7.1.

Para llevar a cabo la síntesis del compuesto **7.1** se utilizó este método de síntesis, sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados ya que la reacción mostraba una elevada cantidad de subproductos y el producto final no se pudo aislar. Se pensó, que al igual que ocurría con los BFXs sustituidos por átomos halógenos, la presencia del grupo trifluorometilo en la butanona de partida provocaba que la utilización de TEA y pirrolidina conducía a un desarrollo muy agresivo de la reacción con la consiguiente aparición de múltiples subproductos.

Debido a esto se decidió eliminar la pirrolidina de la reacción y se decidió añadir tolueno como disolvente de reacción, como se indica en la **Figura 64**. El nuevo método optimizado, **método VII**, permitió obtener el compuesto **7.1** en un buen rendimiento.

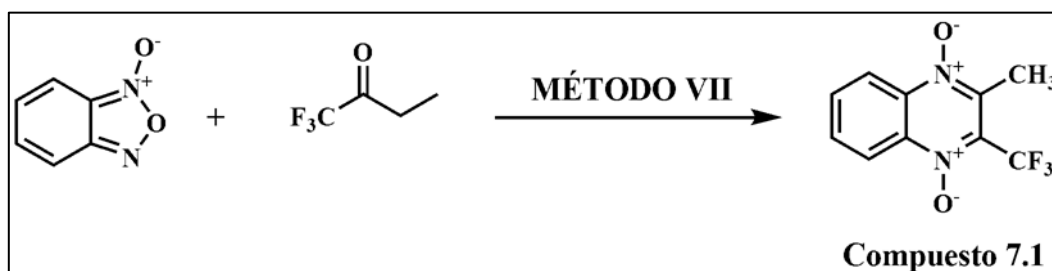


Figura 64. Esquema de síntesis del compuesto 7.1 utilizando el método de síntesis optimizado VII: TEA, tolueno, T^a amba/20-30 horas.

42. Sustitución nucleofílica aromática. Síntesis de los derivados de la serie 6

La síntesis de los compuestos pertenecientes a la **serie 6** se optimizó experimentalmente modificando las condiciones de reacción en base a los resultados obtenidos y a la información bibliográfica consultada.

Como se resume en la **Figura 65**, el método de síntesis se optimizó a través de tres modificaciones experimentales a partir del método empleado inicialmente.

El método de elección inicial para llevar a cabo la sustitución nucleofílica consistió en el uso de *N,N*-DMF a reflujo como disolvente de reacción utilizando como intermedios de partida (**INT1**) derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sustituidos por cloro en las posiciones R₆ y R₇ del anillo de quinoxalina. Mediante este método se sintetizaron los compuestos **6.1**, **6.2** y **6.3**. Como se muestra en la **Figura 65**, la reacción dio lugar a una mezcla del producto buscado, di-*N*-oxidado y su análogo mono-reducido, probablemente, debido al elevado tiempo de reacción y a la elevada temperatura necesaria. El producto de interés, el derivado di-*N*-oxidado, ofrecía un menor rendimiento que el análogo mono-reducido y además, la mezcla de productos obtenida dificultaba en gran medida la purificación debido a la semejanza estructural.

Pese a que ya se conocía con anterioridad que el flúor era un mejor grupo saliente que el cloro en este tipo de reacciones, se decidió emplear en primer lugar intermedios sustituidos por cloro por una cuestión de simplicidad sintética de los intermedios y un menor coste de reactivos. Sin embargo, los resultados obtenidos comentados en el párrafo anterior obligaron a llevar a cabo la **1ª modificación** del método de síntesis. Se decidió continuar la síntesis utilizando las mismas condiciones de reacción pero empleando como intermedios de partida (**INT1**) derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sustituidos por flúor en las posiciones R₆ y R₇. Esta modificación permitió disminuir el tiempo de reacción con respecto a los intermedios clorados. Esta disminución del tiempo está relacionada con la gran capacidad electroatrayente del flúor, que hace más positivo al carbono al que está unido, por lo tanto, será más fácilmente atacable por el nucleófilo^{289,313,314}. Además, se evitó el problema de la aparición de mezcla de productos mono-reducidos y di-reducidos. De esta forma se obtuvieron los derivados **6.4**, **6.5** y **6.6**. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados, ya que únicamente el compuesto **6.6** se correspondía con el derivado mono-sustituido buscado. Al caracterizar el producto **6.4** se comprobó que el producto se había mono-sustituido con la amina heterocíclica, pero el flúor de la otra posición se había sustituido por la *N,N*-DMF, disolvente de la reacción, probablemente por la elevada temperatura utilizada en este método de síntesis. El producto **6.5** se correspondió con el derivado di-sustituido por la amina heterocíclica. Este hecho, junto con la dificultad encontrada en la purificación debido a la elevada cantidad de subproductos formados hizo necesario buscar un nuevo método de síntesis.

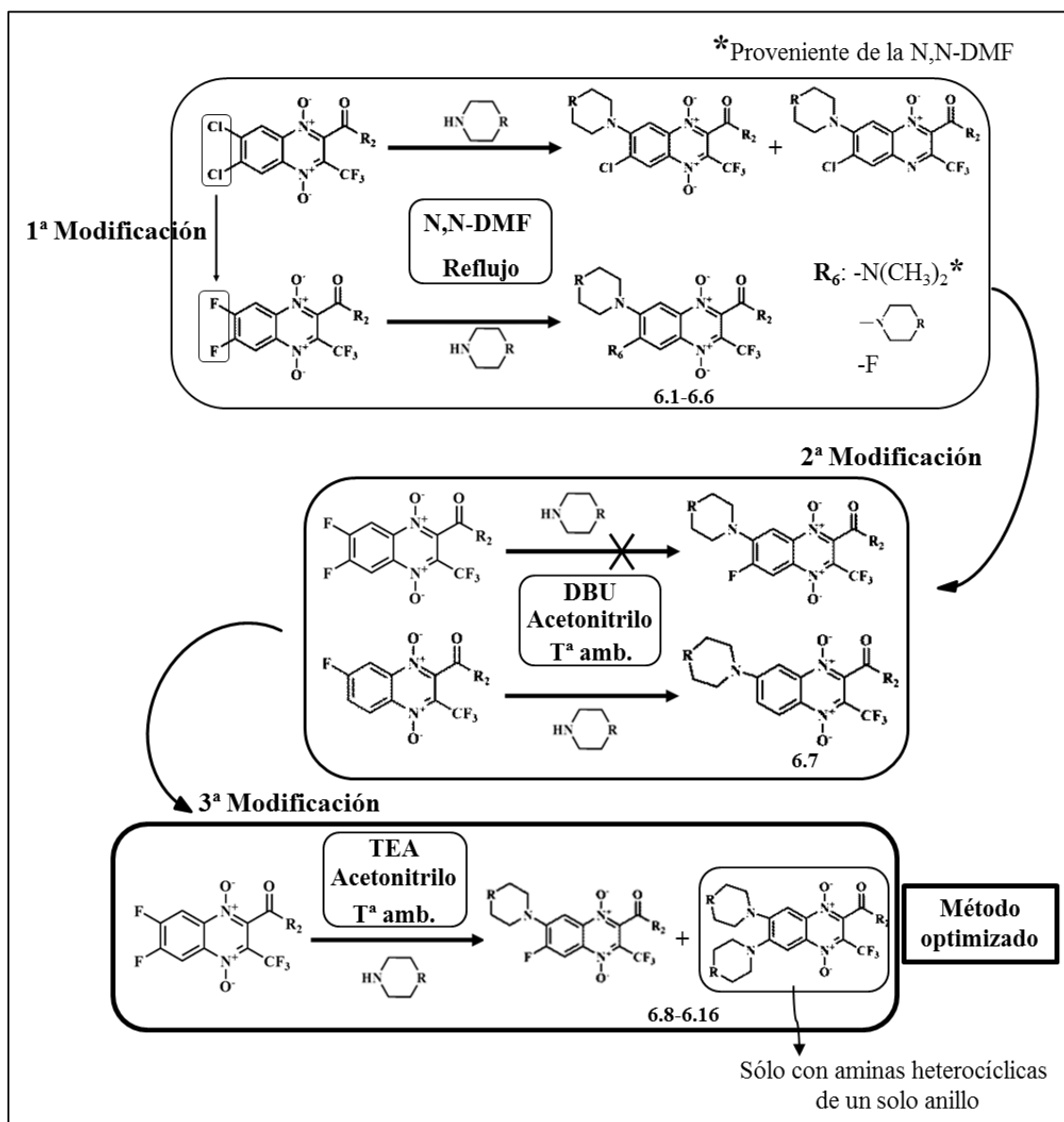


Figura 65. Proceso de optimización del método de síntesis empleado en la obtención de los derivados de la serie 6.

Tras una nueva revisión bibliográfica se comprobó que la presencia de una base podía facilitar en gran medida la sustitución nucleofílica aromática y permitía realizar la reacción a temperatura ambiente. Además, se decidió modificar el disolvente, *N,N*-DMF, por otro disolvente también polar aprótico, en este caso acetonitrilo.³¹⁵⁻³¹⁹ Se decidió llevar a cabo la **2ª modificación**, empleando como disolvente acetonitrilo y 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-en (DBU) como base catalizadora, a temperatura ambiente (**Figura 65**). El método de síntesis utilizado no ofreció buenos resultados cuando se emplearon intermedios sustituidos por flúor en las posiciones R_6 y R_7 del anillo de quinoxalina. La reacción se dio de manera instantánea y violenta y el derivado de quinoxalina se degradó. Utilizando este método sólo se consiguió obtener el producto **6.7**, el cual se sintetizaba a partir de un **INT1** sustituido únicamente por un

flúor en la posición Ra del anillo de quinoxalina. El DBU es una base muy fuerte y se propone que sea esta la razón de la violenta reacción observada que degradaba la quinoxalina.

Se sabe que la presencia de un flúor en posición *orto* con respecto al flúor que sufre el ataque nucleofílico tiene un efecto muy activante. Esto podría explicar que la reacción se diera en productos sustituidos con un flúor y no en los sustituidos con flúor en las posiciones R₆ y R₇ del anillo de quinoxalina.^{289,313,314}

Esto llevó a introducir la **3ª modificación** del método de síntesis. Se decidió utilizar el mismo disolvente, acetonitrilo, y una base catalizadora más débil que el DBU. Se eligió la trietilamina (TEA). Gracias a este nuevo método se obtuvieron los productos **6.8-6.16**. En todas las reacciones llevadas a cabo por este método se obtuvo el derivado mono-sustituido de interés en buen rendimiento. Además, se obtuvieron los derivados di-sustituidos cuando la amina heterocíclica utilizada presentaba un solo anillo. Cuando se utilizaron aminas con dos anillos la di-sustitución no se obtuvo, posiblemente por un impedimento estérico. Este nuevo método ofreció muy buenos resultados en cuanto a rendimientos, tiempos de reacción y facilidad de purificación.

XI. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

43. Resonancia magnética nuclear de ^1H . Acoplamiento protón-flúor

En espectros de RMN- ^1H de moléculas orgánicas normalmente sólo se observarán los acoplamientos entre protones. Sin embargo, en moléculas que posean otros núcleos con momento magnético se podrán observar acoplamientos adicionales.

De todos los núcleos que son capaces de acoplarse con los protones los más importantes desde un punto de vista práctico son el flúor (^{19}F) y el fósforo (^{31}P). Esta importancia se debe a dos razones principales, su elevada abundancia natural (100%) y su valor de número cuántico de espín (1/2).

Todos los compuestos presentados en este trabajo se caracterizan por la presencia de ^{19}F en diferentes posiciones de su estructura, lo que provoca acoplamiento adicionales ^1H - ^{19}F muy característicos en todas las moléculas.

Debido a esta característica espectrocópica peculiar presentada por los compuestos de este trabajo a continuación se muestran algunos ejemplos representativos de los acoplamientos que provoca el ^{19}F sobre los protones vecinos cuando se encuentra sustituido en diferentes posiciones del anillo de quinoxalina.

Ejemplo 1: Compuesto mono-sustituido con flúor en la posición 7 del anillo de quinoxalina.

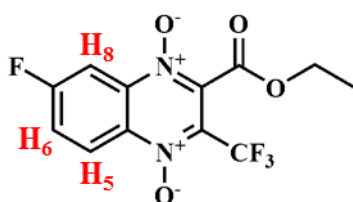


Figura 66. Compuesto 5.16

En este ejemplo (compuesto **5.16**, **Figura 66**) se muestran los acoplamientos ^{19}F - ^1H que se observan en todas las moléculas que presentan un átomo de flúor unido a la posición 7 del anillo de quinoxalina. El flúor en esta posición provoca un desdoblamiento de las señales correspondientes a los protones **H₅**, **H₆** y **H₈** mostrando constantes de acoplamiento (J) características. En la **Figura**

67 se muestra el espectro de RMN- ^1H ampliado en las posiciones correspondientes a los protones comentados. Estudiando los protones por separado se observa lo siguiente:

-H₅: La señal correspondiente a este protón se corresponde con un doble doblete que muestra dos constantes de acoplamiento. Una J con el protón vecinal **H₆** ($J_{5-6} = 9,4$ Hz) observada en todos los compuestos mono-sustituidos y una J con el ^{19}F de la posición 7 con un valor de 4,8 Hz. Este valor es característico entre un ^1H y un ^{19}F a una distancia de 4 enlaces.

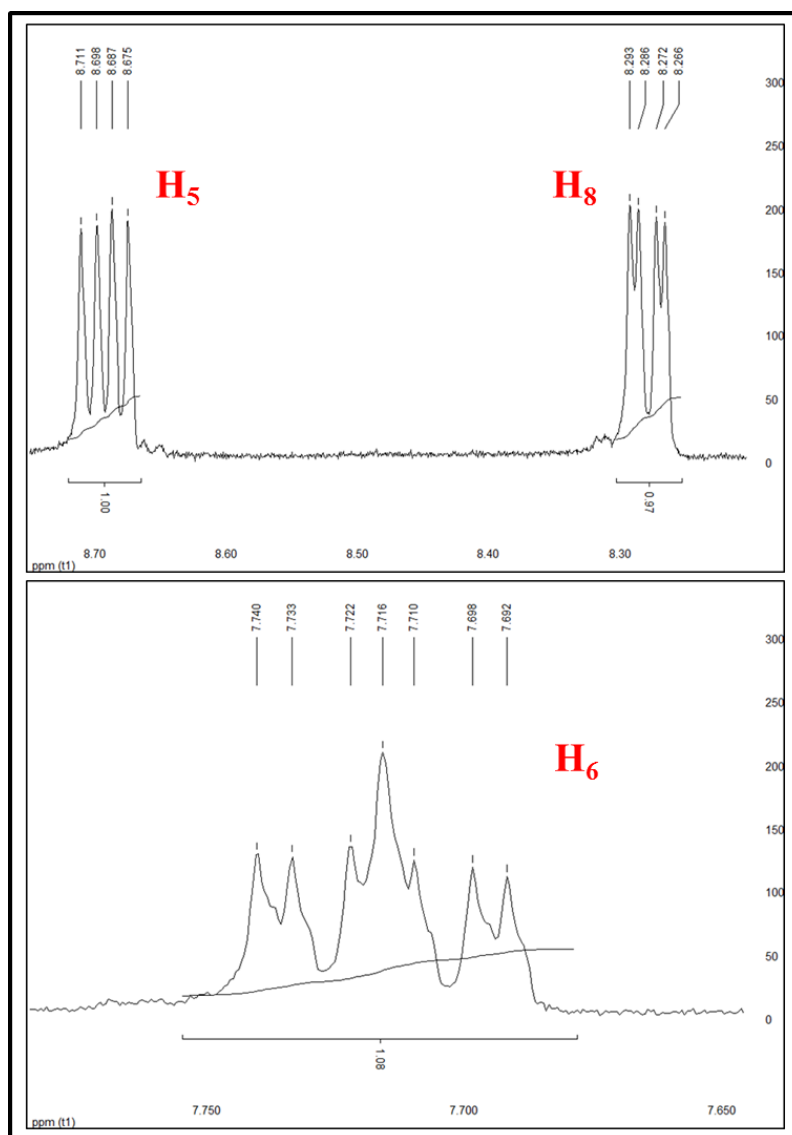


Figura 67. Espectro de RMN-1H del derivado 5.16. Se muestran las señales correspondientes a los protones H₅, H₆ y H₈.

-H₈: Al igual que en el caso de **H₅**, la señal se corresponde con un doblete presente presentando dos J s. En este caso la J de mayor intensidad es debida al acoplamiento con el **¹⁹F** situados a 3 enlaces de distancia ($J_{8-F} = 8,0$ Hz). La J con **H₆** muestra un valor de 2,6 Hz.

-H₆: Al recibir la influencia de **H₅**, **H₈** y del **¹⁹F** la señal obtenida para **H₆** es un doblete desdoblado que muestra 3 J s ($J_{6-8} = 2,6$ Hz, $J_{6-F} = 7,2$ Hz y $J_{6-5} = 9,7$ Hz). Se observa que la J con el **¹⁹F**, a pesar de estar a una distancia de tres enlaces como en el caso de **H₈**, presenta una intensidad menor ($J_{8-F} = 8,0$ Hz vs $J_{6-F} = 7,2$ Hz), lo que parece indicar que el flúor de la posición 7 está más cerca de **H₈** que de **H₆**.

Ejemplo 2: Compuesto di-sustituido con flúor en las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina.



Figura 68. Compuesto 1.17.

En la **Figura 69** se muestra el espectro de RMN- ^1H obtenido para el compuesto **1.17** (**Figura 68**) ampliado en la posición de las señales correspondientes a los protones **H₅** y **H₈**. La señal obtenida para cada protón se corresponde con un doblete debido al acoplamiento con los dos átomos de flúor. Compuestos di-sustituidos por otros átomos como Cl o CH₃ presentados en este trabajo muestran dos singletes como señales características de

H₅ y **H₈**.

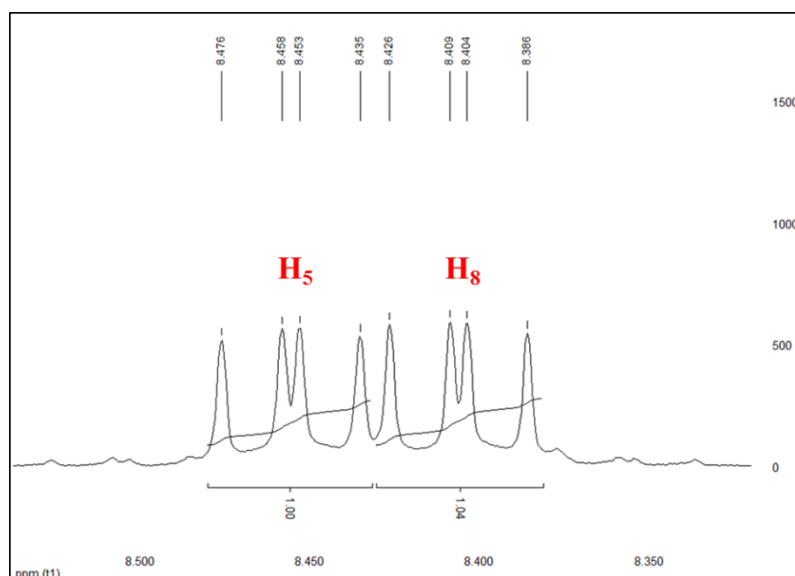


Figura 69. Espectro de RMN- ^1H del derivado 1.17. Se muestran las señales correspondientes a los protones H₅ y H₈.

El desdoblamiento de las señales obtenidas para ambos protones se debe únicamente a acoplamientos ^1H - ^{19}F ya que la distancia existente entre **H₅** y **H₈** impide un acoplamiento entre ellos. Las *J*s obtenidas, idénticas para ambos protones, mostraron un valor de 7,1 Hz con el flúor a cuatro enlaces de distancia y 9,2 Hz a tres enlaces de distancia.

Ejemplo 3: Compuesto sustituido por el grupo difluorometilo (CHF₂) en la posición 2 del anillo de quinoxalina.

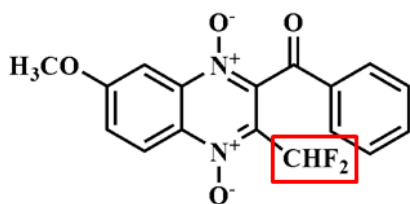


Figura 70. Compuesto 4.2.

En este ejemplo se muestra la señal obtenida para el protón del grupo CHF₂ presente en los derivados de la **serie 4** de este trabajo. Se muestra el espectro de RMN- ^1H obtenido para el compuesto **4.2** (**Figura 70**) ampliado en la zona del protón de interés (**Figura 71**).

La señal para este protón es muy peculiar e inconfundible con otros protones de la molécula ya que se corresponde con un triplete muy amplio (7,48-7,21 ppm) debido al intenso acoplamiento ^1H - ^{19}F . El triplete obtenido muestra una J de 52,4 Hz, valor característico entre un protón y un flúor situados a dos enlaces de distancia.

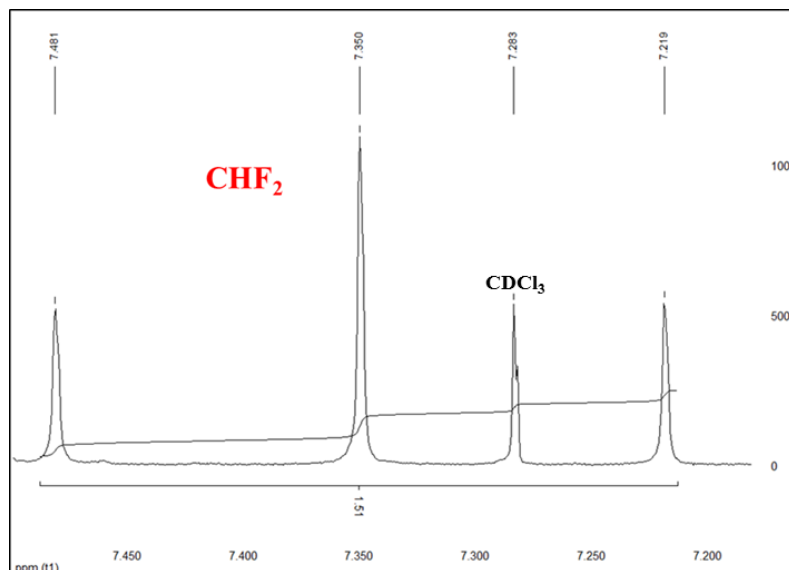


Figura 71. Espectro de RMN- ^1H del derivado 4.2. Señal correspondiente al H del grupo CHF_2 de la posición 2.

44. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Acoplamientos carbono-flúor

Al igual que ocurre en los espectros de RMN- ^1H las señales correspondientes a los carbonos obtenidas en el espectro de RMN- ^{13}C desacoplado se desdoblan por el acoplamiento por el flúor.

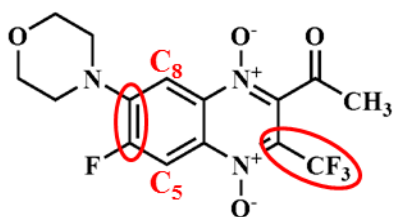


Figura 72. Compuesto 6.8.

A la hora de llevar a cabo el estudio de la sustitución de las posiciones 6 y 7 de los compuestos de la **serie 6** explicado en el punto anterior se realizó también un estudio de RMN- ^{13}C desacoplado. El estudio se llevó a cabo utilizando el compuesto **6.8** (**Figura 72**). El espectro obtenido permitió estudiar los acoplamientos característicos entre los carbonos de la molécula y el flúor presente tanto en la posición 6 del anillo de quinoxalina como en el grupo trifluorometilo de la posición 3.

A continuación se muestran ampliados los espectros correspondientes a los **C₅** y **C₈** (**Figura 73**), **C₆** y **C₇** (**Figura 74**), y **C₃** y **CF₃** (**Figura 75**).

-Carbonos 5 y 8:

Como se muestra en la **Figura 73** la señal para ambos carbonos, debido a la cercanía del flúor sustituido en la posición 6 del anillo de quinoxalina, se encuentra desdoblada obteniéndose un doblete para cada carbono. Los dos dobletes obtenidos son claramente diferenciables entre sí por las diferentes constantes de acoplamiento mostradas. El **C₅** se encuentra a una distancia de

dos enlaces del átomo de flúor, mostrando una $J_{C5-F} = 29,2$ Hz. El doblete correspondiente al C_8 muestra una J de 4,7 Hz ya que en este caso la distancia es de 3 enlaces.

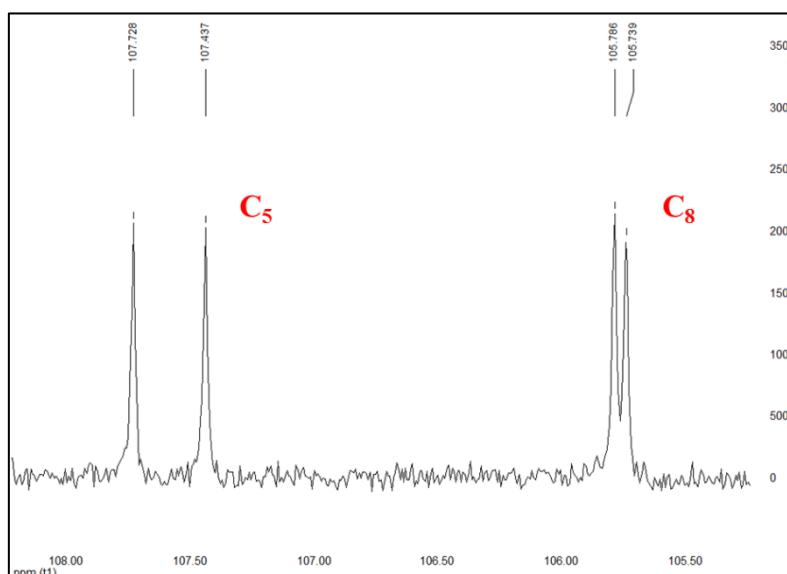


Figura 73. Espectro de RMN-13C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C_5 y al C_8 .

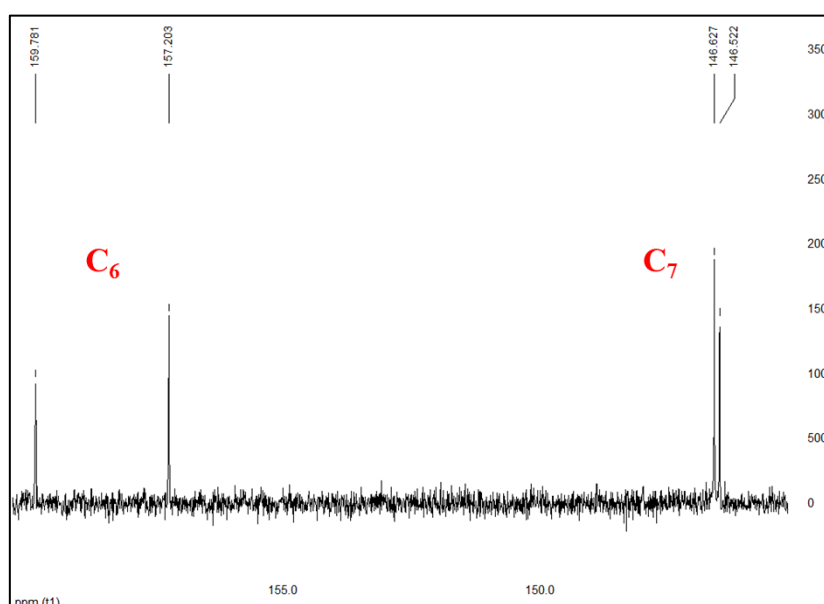


Figura 74. Espectro de RMN-13C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C_6 y al C_7 .

-Carbonos 6 y 7:

Las señales obtenidas para los carbonos 6 y 7 (**Figura 74**), al igual que lo observado en los carbonos 5 y 8, se correspondieron con dos dobletes. El C_6 , directamente unido al átomo de flúor presenta una constante de acoplamiento de 259,3 Hz, valor típico entre un carbono y el

átomo de flúor al que está unido directamente. El C_7 muestra una constante de acoplamiento con el flúor de 10,6 Hz, un valor claramente inferior a la obtenida entre el C_5 y el F pese a estar también a 2 enlaces de distancia del flúor.

-Carbono 3 y grupo CF_3 :

En la **Figura 75** se muestran las señales obtenidas para el carbono de la posición 3 del anillo de quinoxalina y para el carbono del grupo trifluorometilo. El espectro se muestra muy ampliado ya que las señales son débiles y difíciles de detectar dentro del espectro, característica habitual en el espectro de RMN- ^{13}C desacoplado de moléculas que poseen el grupo trifluorometilo. Ambos carbonos se observan como cuadrupletes por la influencia de los tres átomos de flúor pero claramente diferenciables por las J s mostradas.

El C_3 se encuentra directamente unido al grupo trifluorometilo, por lo que recibe la influencia de los 3 átomos de flúor a dos enlaces de distancia. Esto se observa en las constantes de acoplamiento obtenidas, $J_{C_3-F} = 34$ Hz, valor típico entre un carbono y un flúor separados por dos enlaces.

El carbono perteneciente al grupo CF_3 está directamente unido al flúor por lo que, como ocurría en el C_6 , las constantes de acoplamiento muestran una intensidad muy superior, $J_{C-F} = 273,2$ Hz.

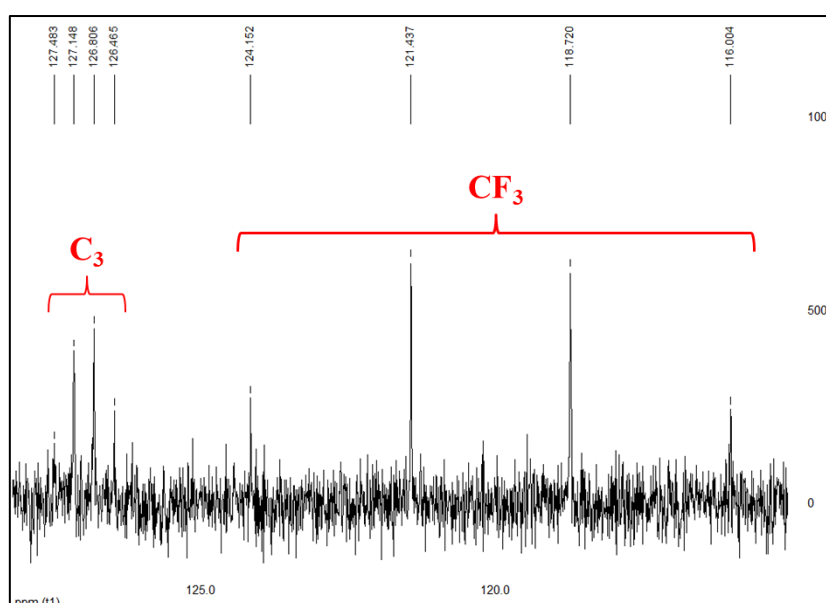


Figura 75. Espectro de RMN- ^{13}C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C_3 y grupo CF_3 .

45. Determinación estructural de los derivados de la serie 6

Como se ha comentado en la sección de material y métodos los derivados **6.8-6.16** de la **serie 6** se sintetizaron utilizando una SNAr en la que se emplearon como intermedios de partida derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido sustituidos por flúor en las posiciones 6 y 7 del anillo de

quinoxalina. Estos intermedios se hicieron reaccionar con diferentes tipos de aminas heterocíclicas en presencia de acetonitrilo y TEA. Como resultado de la reacción se obtuvo un producto mono-sustituido por la amina heterocíclica en uno de los átomos halógenos y en el caso de las aminas heterocíclicas con un solo anillo se obtuvo además el producto di-sustituido.

La obtención de un único producto mono-sustituido indicaba que la sustitución nucleofílica se daba preferentemente en una de las dos posiciones halogenadas, 6 o 7. Para identificar cual de los dos isómeros se obtenía se realizó un estudio mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) utilizando para ello el compuesto **6.8**, cuya síntesis se muestra en la **Figura 76**. Se muestra como en la reacción también se obtuvo el derivado di-sustituido **6.9**.

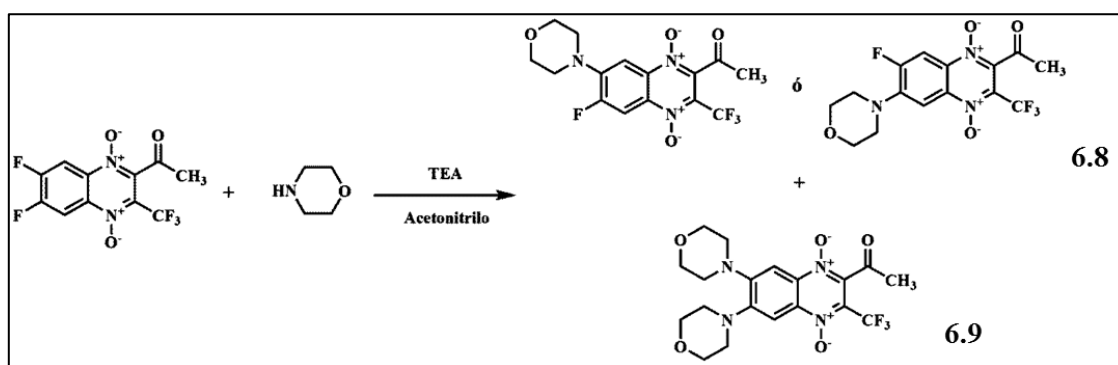


Figura 76. Síntesis de los compuestos **6.8** y **6.9**.

La RMN- ^1H del compuesto **6.8** se muestra en la **Figura 77**. El espectro de la parte superior de la **Figura** se corresponde con la parte aromática de la molécula, formada por dos señales correspondientes a los 2 protones del anillo de quinoxalina, H^{I} y H^{II} . El espectro de la parte inferior de la **Figura** se corresponde con la parte alifática de la molécula formada por los 8 protones del anillo de morfolina y por el grupo metilo de la posición 2 de la molécula.

Las señales pertenecientes a los dos protones del espectro de la zona aromática aparecen como dobletes debido al acoplamiento que sufren con el flúor unido al anillo de quinoxalina. Analizando ambas señales se comprueba como presentan dos constantes de acoplamiento (J) diferentes. El doblete correspondiente a H^{I} muestra una J de 13,2 Hz y el correspondiente a H^{II} presenta una J de 8,1 Hz.

Estos datos indican que H^{I} es el protón más cercano al flúor por presentar la mayor constante de acoplamiento con éste. La RMN- ^1H nos informa de que efectivamente nos encontramos ante el producto mono-sustituido, sin embargo, no nos ofrece la información necesaria para determinar en qué posición se ha producido la sustitución debido al similar entorno molecular que presentan H^{I} y H^{II} .

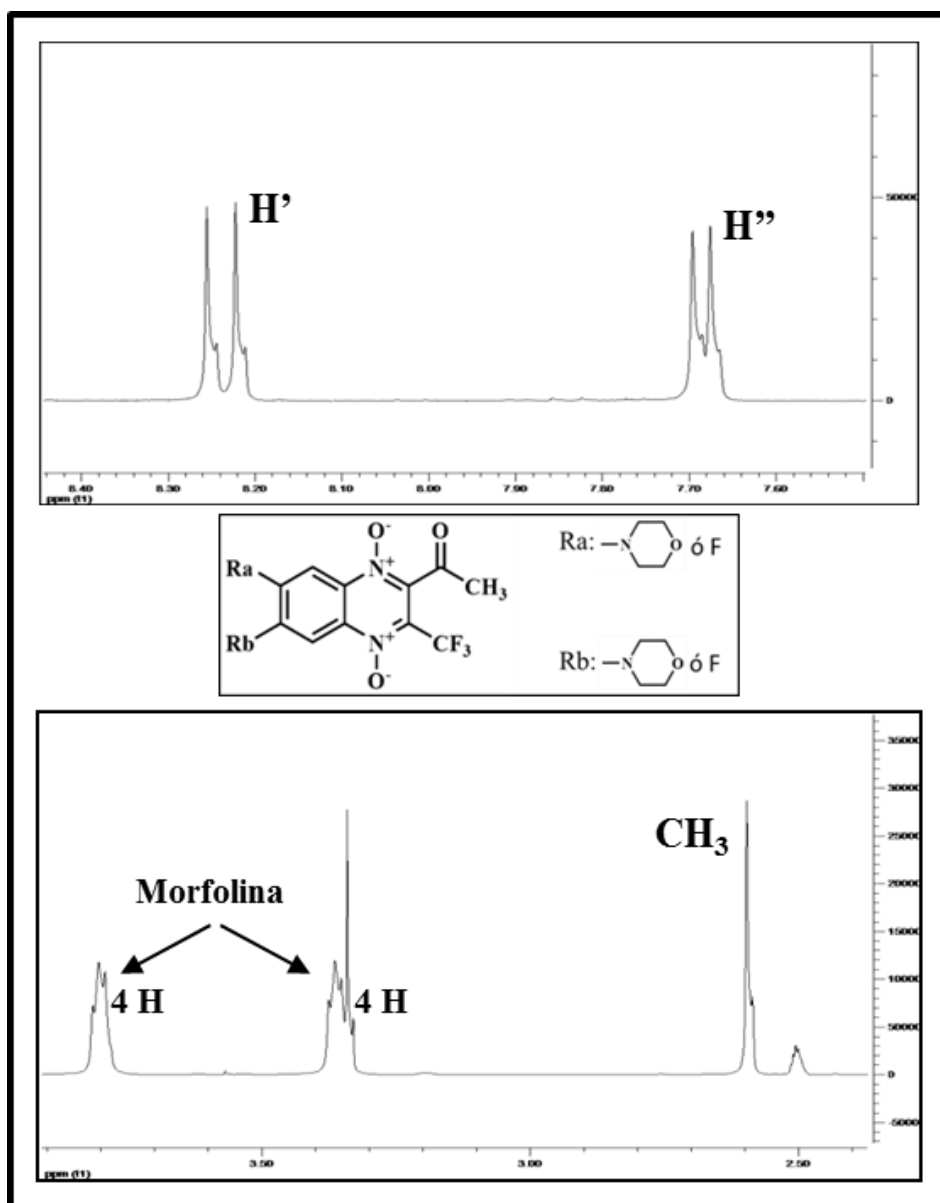


Figura 77. RMN-1H del compuesto 6.8: δ ppm: 8,24 (d, 1H, H', $J_{H'-F} = 13,2$ Hz); 7,69 (d, 1H, H'', $J_{H''-F} = 8,1$ Hz); 3,80 (m, 4H, CH₂, morfolina); 3,37 (m, 4H, CH₂, morfolina); 2,59 (s, 3H, CH₃).

Para determinar la estructura exacta del compuesto mono-sustituido obtenido se utilizó el experimento NOESY, un estudio de resonancia bidimensional de acoplamiento entre protones a larga distancia. El objetivo de este estudio era identificar la posición, 5 u 8 en el anillo de quinoxalina, que ocupan H' y H'' en función del acoplamiento con el grupo metilo de la posición 2 del anillo de quinoxalina. Esta información, debido a las diferentes constantes de acoplamiento que presentan H' y H'' indicaría en qué posición se encuentra el átomo de flúor y permitiría determinar la estructura exacta de la molécula.

En la **Figura 78** se muestra, ampliado en las regiones de interés, el espectro obtenido en el NOESY.

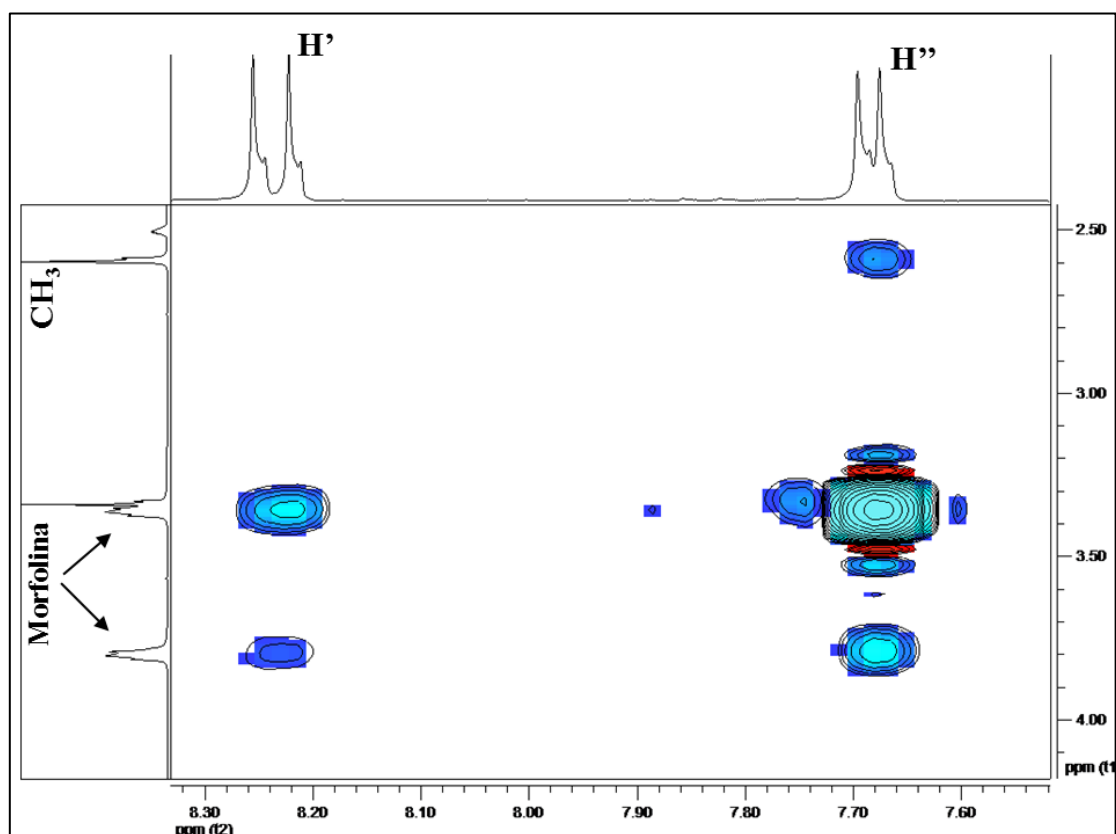


Figura 78. Espectro obtenido en el experimento NOESY realizado sobre el compuesto 6.8.

El resultado obtenido en el espectro indica que existe un acoplamiento entre H'' y el grupo CH_3 de la posición 2. Este acoplamiento no se observa entre H' y CH_3 . Este resultado indicó que el protón H'' es el más cercano al grupo CH_3 , por lo tanto, se trataría del protón de la posición 8 del anillo de quinoxalina. Teniendo en cuenta que H'' presenta una constante de acoplamiento más pequeña con el flúor que H' , esto significa que el flúor se encuentra en la posición 6 del anillo de quinoxalina.

Para corroborar el resultado observado se llevó a cabo un estudio utilizando el software Hyperchem profesional 8.0, el cual permitió obtener gráficamente la conformación de más baja energía, por lo tanto la más estable. De esta manera se obtuvo la conformación geométrica mostrada en la **Figura 79**. La conformación obtenida indica como el grupo carbonilo presenta una rotación que aproxima el grupo CH_3 de la posición 2 al hidrógeno de la posición 8 del anillo de quinoxalina. Esta estructura está en concordancia con el resultado observado en el NOESY, que muestra un acoplamiento entre H_8 y CH_3 .

Por lo tanto, se puede concluir que la sustitución se está dando de manera preferente en el flúor de la posición 7 del anillo de quinoxalina obteniéndose el derivado mono-sustituido indicado en la **Figura 80**.

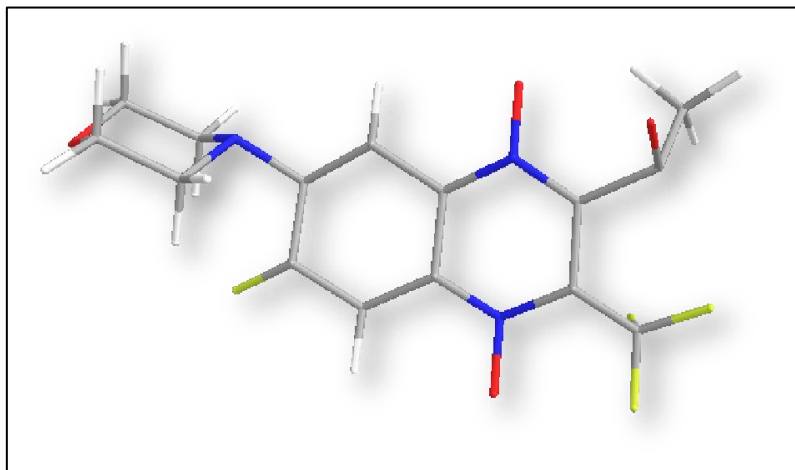


Figura 79. Conformación de más baja energía de la molécula en estudio obtenida utilizando Hyperchem profesional 8.0.

El estudio no se llevó a cabo para todos los derivados pero por las similitudes entre el método de síntesis y la estructura de los intermedios de partida empleados en la síntesis de los derivados de la **serie 6** se propone que el mecanismo de sustitución haya sido el mismo.

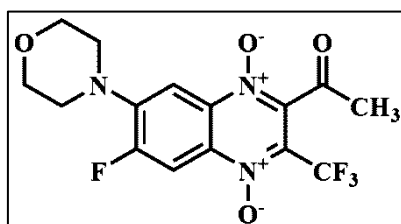


Figura 80. Estructura del derivado 6.8 obtenido.

XI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA FRENTE A
TRYPANOSOMA CRUZI

46. Resultados y discusión de actividad biológica *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi*

La actividad biológica *in vitro* de los nuevos derivados presentados en este trabajo ha sido evaluada por el Grupo de Química Medicinal del Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) dirigido por el Dr. Hugo Cerecetto y la Dra. Mercedes González.

Todos los derivados de quinoxalina presentados en este trabajo fueron evaluados biológicamente *in vitro* frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Un grupo de compuestos pertenecientes a la **serie 1** han sido evaluados también frente a las formas epimastigote del clon CL Brener de *T. cruzi* y las cepas parcialmente resistentes a los compuestos de referencia Nfx y Bnz, cepa Y y cepa Colombiana. Además, se ha llevado a cabo la evaluación biológica *in vitro* de dos compuestos pertenecientes a la **serie 1** frente a la forma tripomastigote del clon CL brener de *T. cruzi*.

46.1. Actividad biológica *in vitro* frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Relaciones estructura-actividad biológica

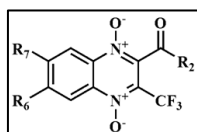
En las **tablas 22-32** se muestran los sustituyentes que presenta cada derivado de quinoxalina evaluado, los resultados de porcentaje de inhibición a una concentración de 25 μM (% INH 25 μM) y la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) obtenidas para cada serie de nuevos derivados de quinoxalina sintetizados y para el producto de referencia Nfx frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. La discusión de los resultados obtenidos se realiza tomando como referencia los datos presentados por el Nfx. Los compuestos más activos obtenidos en cada serie se muestran coloreados en gris.

Como se muestra en la **Tabla 23**, un total de 34 compuestos pertenecientes a la **serie 1** fueron evaluados biológicamente obteniéndose muy buenos resultados. Los derivados **1.1-1.11** y **1.16-1.24** pertenecientes a esta serie habían sido sintetizados previamente en otros proyectos del grupo.^{186,210,248,250} Tomando como referencia la CI_{50} que presenta el Nifurtimox sobre la cepa Tulahuen 2 (7,7 μM), se observa que 31 de los 34 compuestos ensayados muestran un valor de CI_{50} inferior. Dentro de los buenos resultados de actividad *in vitro* mostrados por los compuestos de la **serie 1** destacan los compuestos **1.1**, **1.7**, **1.17**, **1.18** y **1.19** como los más activos. Todos ellos presentan un 100% de inhibición del crecimiento de *T. cruzi* y valores de CI_{50} inferiores a 1 μM .

El compuesto **1.17** presenta un valor de CI_{50} de 0,39 μM , 20 veces más potente que el fármaco de referencia Nifurtimox.

Tabla 23. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la serie

1.



Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	% INH 25 μM ^a	CI ₅₀ (μM) ^b
1.1	-H	-H		100	0,9
1.2	-H	-OCH ₃		98	3,5
1.3	-H	-CH ₃		99	1,3
1.4	-CH ₃	-CH ₃		72	1,4
1.5	-H	-Cl		90	3,0
1.6	-Cl	-Cl		100	2,4
1.7	-F	-F		100	0,7
1.8	-H	-H		100	1,1
1.9	-F	-F		100	2,8
1.10	-H	-H		100	2,4
1.11	-F	-F		100	2,5
1.12	-H	-CF ₃		100	5,0
1.13	-CF ₃	-H		100	4,8
1.14	-H	-H		100	1,4
1.15	-F	-F		100	3,9
1.16	-H	-H	-CH ₃	100	3,0
1.17	-F	-F	-CH ₃	100	0,39
1.18	-Cl	-Cl	-CH ₂ CH ₃	100	0,78
1.19	-F	-F	-CH ₂ CH ₃	100	0,5
1.20	-H	-H	-CH(CH ₃) ₂	100	≥25
1.21	-Cl	-Cl	-CH(CH ₃) ₂	100	1,4
1.22	-F	-F	-CH(CH ₃) ₂	23	-
1.23	-H	-H	-C(CH ₃) ₃	26	-
1.24	-F	-F	-C(CH ₃) ₃	100	4,9
1.25	-H	-H		100	1,6
1.26	-F	-F		100	2,5
1.27	-H	-H		88,8	1,9
1.28	-H	-OCH ₃		89,1	4,3
1.29	-H	-CH ₃		86,1	2,3
1.30	-CH ₃	-CH ₃		89,6	2,2
1.31	-H	-Cl		86,1	1,0
1.32	-Cl	-Cl		89,3	1,3

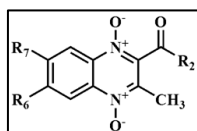
Tabla 23 (continuación). Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie 1**.








Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	% INH 25 μM ^a	CI ₅₀ (μM) ^b
1.33	-H	-F		95,6	1,1
1.34	-F	-F		91,8	0,6
Nfx				100	7,7

^aPorcentaje de inhibición del crecimiento. Inhibición sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* a una concentración de 25 μM. Los resultados son el valor medio de 3 experimentos con una desviación estándar menor al 10%.

^bConcentración inhibitoria 50. Los resultados son el valor medio de 3 experimentos con una desviación estándar menor al 10%.

Dados los buenos resultados mostrados por los derivados con un grupo *p*-clorofenilo en la posición 2 (**1.25**, **1.26**) previamente evaluados y la importancia que parece presentar la presencia de flúor en la actividad biológica, se decidió completar la **serie 1** con los derivados **1.27-1.34**, todos ellos sustituidos por un grupo *p*-fluorofenilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina. Todos ellos muestran valores de % INH (88-95%) algo inferiores al Nfx (100%), sin embargo, todos ellos mejoran el valor de CI₅₀ del fármaco de referencia de manera importante. Los compuestos **1.31-1.34**, sustituidos por Cl o F en las posiciones R₆ y/o R₇, presentaron los mejores valores de CI₅₀.

Tabla 24. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos análogos previamente sintetizados en el grupo.^{203,248,250}

Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	%INH 25 μM	IC ₅₀ (μM)
A.1	H	H		19	-
A.2	H	CH ₃ O		9	-
A.3	H	CH ₃		8	-
A.4	CH ₃	CH ₃		1	-
A.5	H	Cl		33	-
A.6	Cl	Cl		91	-
A.7	F	F		92	<5,0
A.16	H	H	-CH ₃	29	-
A.17	F	F	-CH ₃	100	0,4
Nfx				100	7,7

La amplia variedad de sustituyentes presentados por los compuestos de la **serie 1** permitió establecer una serie de relaciones estructura-actividad biológica. Las principales observaciones fueron:

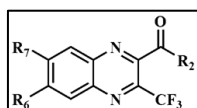
-La presencia del grupo trifluorometilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina parece jugar un papel muy importante en la actividad biológica *in vitro* frente a *T. cruzi*. Esto se observa al comparar los resultados mostrados por los compuestos de la **serie 1** (Tabla 23) con los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo para compuestos análogos que presentaban el grupo metilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina (Tabla 24). Al comparar la actividad mostrada por los compuestos **1.1-1.7** y **A.1-A.7** se comprueba como la presencia del grupo trifluorometilo proporciona un gran aumento de la actividad biológica *in vitro*. Lo mismo ocurre al comparar los derivados **1.16-1.17** con sus análogos metilados **A.16-A.17**.


-En cuanto a las posiciones R₆ y R₇, parece corroborarse la observación planteada en la revisión previa de resultados anteriores, siendo los compuestos que presentan sustituyentes electroatrayentes y los no sustituidos los que muestran una mayor actividad biológica. Cuatro de los cinco compuestos más activos (**1.7**, **1.17**, **1.18** y **1.19**) están sustituidos por cloro o flúor en posiciones R₆ y R₇. Sin embargo, la escasez de compuestos en la **serie 1** con sustituyentes electrodonantes en estas posiciones no permite sacar unas relaciones estructura-actividad determinantes en cuanto a estas posiciones.

-La posición 2 del anillo de quinoxalina se sustituyó con una gran variedad de grupos de diferente naturaleza química: anillos aromáticos, anillos heteroaromáticos, anillos aromáticos sustituidos en posición *para* y sustituyentes alifáticos. No se observa una influencia determinante entre el sustituyente utilizado en esta posición y la actividad biológica observada. Lo que si se observa es que los compuestos que presentan grupos isopropilo y tert-butilo muestran una menor actividad, aunque sería necesaria una mayor variedad de compuestos para establecer conclusiones.

Tabla 25. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie 2**.

2.



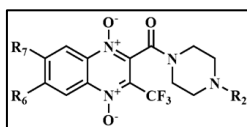
Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	% INH 25 μM	CI ₅₀ (μM)
2.1	-H	-H	-C(CH ₃) ₃	43	-
2.2	-H	-H		49	-
Nfx				100	7,7

Para estudiar la importancia de la presencia de los grupos *N*-óxido en la actividad se sintetizaron y evaluaron *in vitro* los compuestos **2.1** y **2.2** pertenecientes a la **serie 2** (Tabla 24). Estos compuestos son análogos al derivado **1.1**, muy activo frente al parásito, y al derivado **1.23**, poco activo frente al parásito, de la **serie 1**. Ambos compuestos presentan un bajo porcentaje de

inhibición, por lo que su CI_{50} no fue calculada. Destaca el resultado obtenido en el compuesto **2.2** (% INH = 49%), ya que su análogo di-*N*-óxido, el compuesto **1.1**, se encuentra entre los compuestos con mayor actividad *in vitro* (% INH = 100%, CI_{50} = 0,9 μ M). Este dato parece indicar que los grupos *N*-óxido están jugando un papel en la actividad biológica *in vitro* frente a *T. cruzi* mostrada por este tipo de derivados.

Tabla 26. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie 3**.

3.



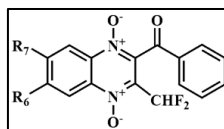
Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	% INH 25 μ M	CI_{50} (μ M)
3.1	-H	-H		100	0,79
3.2	-H	-H		100	0,76
Nfx				100	7,7

Los compuestos **3.1** y **3.2** de la **serie 3** se caracterizan por presentar en la posición 2 un anillo de piperazina unido a un anillo aromático. Ambos derivados presentaron una excelente actividad *in vitro* mostrando un valor de CI_{50} diez veces inferior al presentado por el Nifurtimox (**Tabla 26**).

Comparando la actividad de los derivados **3.1** y **3.2** con los derivados análogos **1.25** y **1.1** pertenecientes a la **serie 1**, se observa que la presencia del anillo de piperazina mejora ligeramente los valores de actividad *in vitro*. En resultados previos (sección 14.1) se obtuvieron malos resultados de actividad para todos los derivados con un grupo amida en posición R₂ y un grupo metilo en posición R₃. Los resultados obtenidos para los derivados **3.1** y **3.2** parecen indicar como la introducción del grupo CF₃ provoca una gran mejora de la actividad frente a *T. cruzi*.

Tabla 27. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie 4**.

4.



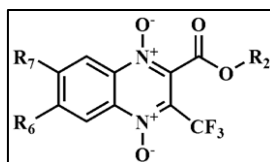
Comp.	R ₆	R ₇	% INH 25 μ M	IC_{50} (μ M)
4.1	-H	-H	35,8	>25
4.2	-H	-OCH ₃	100	10,0
4.3	-H	-CH ₃	50,8	>25
4.4	-H	-Cl	100	6,4
4.5	-Cl	-Cl	100	4,7
4.6	-H	-F	100	6,3
Nfx			100	7,7

Los compuestos de la **serie 4** (Tabla 27), análogos a los compuestos de la **serie 1** (Tabla 22), se caracterizan por presentar un grupo difluorometilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina. El diseño y síntesis de esta serie permitió profundizar en el conocimiento de la importancia del grupo trifluorometilo en la actividad biológica.

Los compuestos **4.4**, **4.5** y **4.6** muestran una mejor actividad *in vitro* que el fármaco de referencia Nfx, sin embargo, al comparar su actividad con los compuestos análogos **1.1**, **1.2**, **1.3**, **1.5** y **1.6**, con un grupo trifluorometilo en la posición 3, se observa como muestran valores de IC_{50} más elevados. Estos resultados parecen indicar que la eliminación de un átomo de flúor conduce a una disminución de la actividad biológica *in vitro*.

Los compuestos de la **serie 5** se encuentran sustituidos por un grupo éster en la posición 2 del anillo de quinoxalina (Tabla 28). Se estudió la influencia de la sustitución del grupo cetona de la posición 2 por un grupo éster. Dieciséis de los 18 compuestos ensayados presentaron una mejor actividad *in vitro* que el fármaco de referencia, destacando los compuestos **5.5**, **5.8**, **5.14**, **5.17** y **5.18** como los más activos, especialmente el derivado **5.17**, 18 veces más activo *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 que el Nfx. Todos ellos poseen sustituyentes electroatrayentes en las posiciones R_6 y/o R_7 del anillo de quinoxalina.

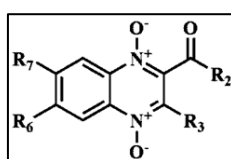
Tabla 28. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie 5**.



Comp.	R_6	R_7	R_2	% INH 25 μ M	$IC_{50}(\mu$ M)
5.1	-H	-H	-CH ₃	100	2,6
5.2	-H	-OCH ₃	-CH ₃	86,6	4,6
5.3	-H	-CH ₃	-CH ₃	96,1	13,7
5.4	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	91,6	5,0
5.5	-H	-Cl	-CH ₃	100	1,8
5.6	-Cl	-Cl	-CH ₃	100	10,8
5.7	-H	-F	-CH ₃	100	3,5
5.8	-F	-F	-CH ₃	100	1,5
5.9	-H	-CF ₃	-CH ₃	100	5,0
5.10	-H	-H	-CH ₂ CH ₃	100	4,0
5.11	-H	-OCH ₃	-CH ₂ CH ₃	100	4,8
5.12	-H	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	100	4,8
5.13	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	87,5	7,6
5.14	-H	-Cl	-CH ₂ CH ₃	100	1,8
5.15	-Cl	-Cl	-CH ₂ CH ₃	100	2,9
5.16	-H	-F	-CH ₂ CH ₃	100	3,3
5.17	-F	-F	-CH ₂ CH ₃	100	0,43
5.18	-H	-CF ₃	-CH ₂ CH ₃	100	0,96
Nfx				100	7,7

Comparando la actividad de los derivados de la **serie 5** con los derivados relacionados mostrados en la **tabla 29** se pueden extraer una serie de relaciones estructura-actividad. Se observa como los nuevos derivados de la **serie 5** muestran una actividad biológica muy superior a la presentada por los ésteres con un grupo metilo o fenilo en la posición 3 (Compuestos **A-E, L-O, Tabla 29**) excepto en los análogos **J, K** y **P**, que están di-sustituidos por cloro ó flúor en las posiciones 6 y 7 y que también muestran una elevada actividad. Esta observación indica que la influencia del grupo trifluorometilo de la posición 3 en más decisiva en los derivados con sustituyentes electrodonantes en las posiciones 6 y/o 7 que en los derivados di-sustituidos con sustituyentes electroatrayentes, especialmente flúor.

Tabla 29. Estructura y resultados biológicos *in vitro* de los compuestos análogos a los derivados de la **serie 5**.



Comp.	-R ₂	-R ₃	-R ₆	-R ₇	% INH 25μM	CI ₅₀ (μM)
A	-OCH ₂ CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	1.0	N. D. ^c
B	-OCH ₂ CH ₃	-CH ₃	-Cl	-Cl	32.0	N. D. ^c
C	-OCH ₃	-CH ₃	-Cl	-Cl	66.0	N. D. ^c
D	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	10.0	N. D. ^c
E	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-H	24.0	N. D. ^c
F	-CH ₃	-CH ₃	-Cl	-Cl	60.0	N. D. ^c
G	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	2.0	N. D. ^c
H	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	29.0	N. D. ^c
J	-CH ₃	-CH ₃	-F	-F	100.0	0.4
K	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-Cl	-Cl	99.0	11.3
L	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-CH ₃	-CH ₃	10.0	N. D. ^c
M	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-H	-H	28.0	N. D. ^c
N	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-H	-CH ₃	13.0	N. D. ^c
O	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-H	-CH ₃ O	0.0	N. D. ^c
P	-OCH ₂ CH ₃	-Ph	-F	-F	100.0	3.3
Q	-CH ₂ CH ₃	-CF ₃	-Cl	-Cl	100.0	0.78
R	-CH ₂ CH ₃	-CF ₃	-F	-F	100.0	0.5
S	-CH ₃	-CF ₃	-H	-H	100.0	3.0
T	-CH ₃	-CF ₃	-F	-F	100.0	0.39

Con respecto a la posición 2, los derivados sustituidos con un éster de etilo (**5.10-5.18**) mejoran ligeramente los resultados ofrecidos por los derivados sustituidos por un éster de metilo (**5.1-5.9**), a excepción de los derivados sustituidos por el grupo metoxilo, di-metilo y el derivado sin sustituir.

En la **Figura 81** se resumen las principales relaciones estructura-actividad observadas tras la evaluación de las **serie 1, 2, 3, 4, 5** y compuesto **7.1** presentados en este trabajo. Los resultados observados muestran como la introducción del grupo CF₃ en posición 3 combinado con la presencia de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina y un

grupo carbonilo directamente unido a la posición 2 ofrecen los mejores resultados de actividad frente a *T. cruzi*.

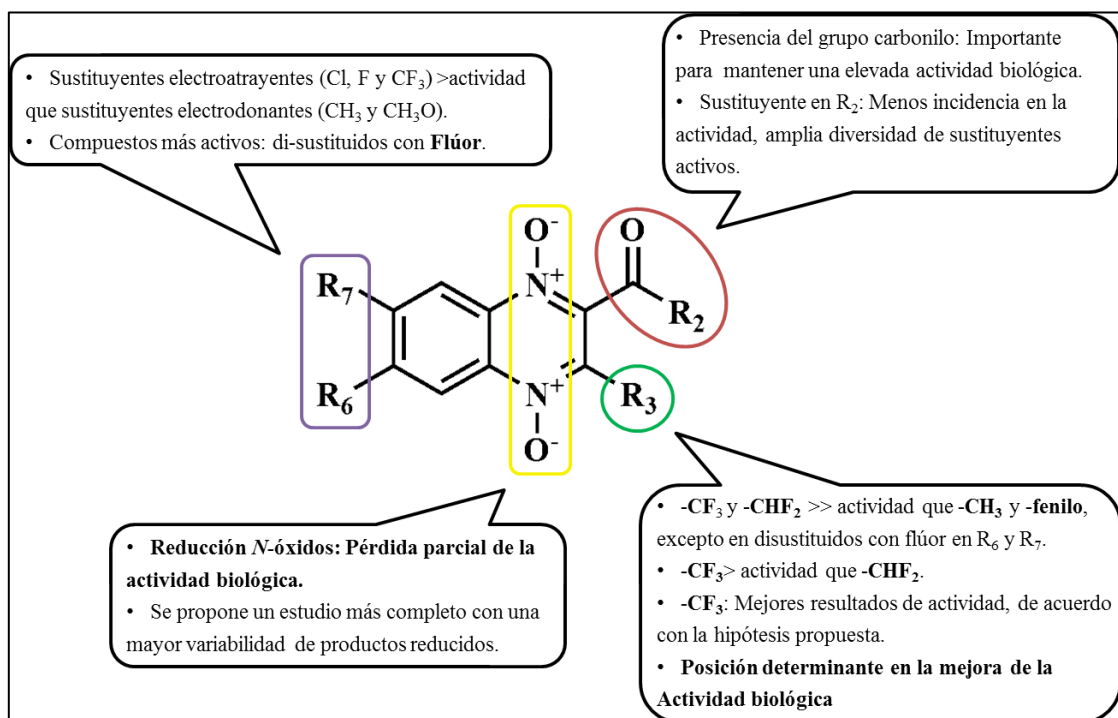


Figura 81. Resumen de las principales relaciones estructura-actividad obtenidas para los derivados pertenecientes a las **series 1, 2, 3, 4, 5** y para el compuesto **7.1**.

Para profundizar en las relaciones estructura-actividad biológica *in vitro* se diseñó la **serie 6**, formada por los derivados mono-sustituídos o di-sustituídos por aminas heterocíclicas alifáticas de diferentes tipos en las posiciones R₆ y/o R₇ presentados en las **tablas 30-32**.

Esta serie está constituida por tres grupos de compuestos en función de la oxidación de los grupos N-óxido:

-**Grupo 1:** Derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido mono-sustituídos o di-sustituídos por aminas heterocíclicas (**6.1-6.13, tabla 30**).

-**Grupo 2:** Derivados de quinoxalina 1-N-óxido mono-sustituídos por aminas heterocíclicas (**6.14-6.15, tabla 31**).

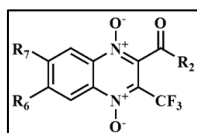
-**Grupo 3:** Derivado de quinoxalina mono-sustituído por amina cíclica (**6.16, tabla 32**).

Los compuestos mono-sustituídos con aminas heterocíclicas presentan un sustituyente electroatrayente (Cl o F) en la posición R₆ del anillo de quinoxalina, excepto los derivados **6.10** y **6.13**, que presentan un grupo N,N-dimetil y ningún sustituyente, respectivamente, en esta posición.

A nivel global, nueve de los 16 compuestos que conforman la **serie 6** presentan mejores valores de CI_{50} que el fármaco de referencia Nifurtimox. Todos ellos pertenecen al grupo 1, derivados 1,4-di-*N*-oxidados. Destacan los compuestos **6.5**, **6.6**, **6.9** y **6.12** como los más activos.

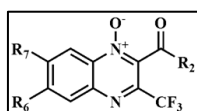
Tabla 30. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos de la **serie**

6.

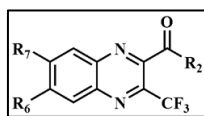


Comp.	R6	R7	R ₂	% INH 25 μ M	CI ₅₀ (μ M)
6.1	-F		-CH ₃	83,4	2,0
6.2	-F		-CH ₃	100	6,4
6.3	-F		-CH ₃	84,9	6,3
6.4			-CH ₃	15,7	>25
6.5	-F		-CH ₃	96,9	2,6
6.6			-CH ₃	100	2,3
6.7	-F		-CH ₃	93,4	5,3
6.8	-F		-CH ₃	42,3	>25
6.9	-F		-CH ₃	97,1	1,6
6.10	-N(CH ₃) ₂		-CH(CH ₃) ₂	86,0	10,7
6.11			-CH(CH ₃) ₂	66,3	17,0
6.12	-Cl			100	1,0
6.13	-H		-O-CH ₃	97,4	6,9
Nfx				100	7,7

Tabla 31. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondientes a los compuestos mono-reducidos de la **serie 6**.



Comp.	R6	R7	R ₂	% INH 25 μ M	CI ₅₀ (μ M)
6.14	-Cl		-O-CH ₂ CH ₃	54,6	>25
6.15	-Cl			91,7	12,1
Nfx				100	7,7

Tabla 32. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondiente al compuesto di-reducido de la **serie 6**.

Comp.	R ₆	R ₇	R ₂	% INH 25μM	Cl ₅₀ (μM)
6.17	-Cl		-O-CH ₂ CH ₃	74,9	8,5
Nfx				100	7,7

Dada la elevada variabilidad estructural que presentan los derivados de la **serie 6** la discusión de las relaciones estructura-actividad se realiza a diferentes niveles:

-Influencia de los grupos *N*-óxido:

Como se ha comentado, todos los derivados de la **serie 6** que presentan una mejor actividad biológica *in vitro* pertenecen al grupo 1 (**Tabla 30**), derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. Estos datos parecen indicar la influencia positiva de la presencia de los grupos *N*-óxido, sin embargo, dado el escaso número de derivados pertenecientes a los grupos 2 y 3 no se pueden extraer conclusiones definitivas.

Al comparar el derivado **6.12** del grupo 1 (compuesto más activo de la **serie 6**) con su compuesto análogo **6.15** perteneciente al grupo 2 (**Tabla 31**) se observa como la reducción de uno de los grupos *N*-óxido conlleva una disminución de la actividad *in vitro* frente a *T. cruzi*, 100%/ 1,0 μM vs 91,7%/12,1 μM.

Otro dato observado que no permite sacar conclusiones claras en cuanto a la influencia de los grupos *N*-óxido en los derivados de la **serie 6** es la actividad mostrada por el derivado **6.14** perteneciente al grupo 2 (**Tabla 31**) y la mostrada por su compuesto análogo reducido **6.16** perteneciente al grupo 3 (**Tabla 32**). Los resultados muestran que la reducción total de los grupos *N*-óxido no conlleva una pérdida de actividad biológica *in vitro* e incluso el derivado **6.16**, di-reducido, presenta una mejor actividad *in vitro* que el compuesto mono-reducido **6.14**.

-Influencia de los sustituyentes introducidos en las posiciones R₆ y/o R₇:

La influencia sobre la actividad biológica que presentan los sustituyentes de las posiciones R₆ y/o R₇ se estudian a 3 niveles:

1-Mono-sustituidos vs di-sustituidos por aminas heterocíclicas:

Ambos tipos de derivados sólo fueron obtenidos en los derivados presentados en la **Tabla 30**, todos ellos di-*N*-oxidados. De los 3 derivados di-sustituidos evaluados, **6.4**, **6.6** y **6.11**, únicamente el derivado **6.6** mostró una buena actividad *in vitro*. Los derivados **6.4** y **6.11** son dos de los tres derivados que mostraron una peor actividad frente al parásito en esta serie. Al comparar sus actividades con sus respectivos análogos mono-sustituidos se observa lo siguiente:

- **6.3 vs 6.4 y 6.10 vs 6.11:** La introducción de una segunda amina cíclica conlleva una importante pérdida de la actividad biológica, pasando de valores de % INH y CI_{50} de 84,9%/6,3 μM y 86,0%/10,7 μM para los compuesto **6.3** y **6.10** a valores de 15,7%/>25 μM y 66,3%/17,0 μM para los derivados di-sustituídos **6.4** y **6.11**.
- **6.5 vs 6.6:** En este caso no se observa disminución de la actividad *in vitro* al introducir la segunda amina cíclica, e incluso, el derivado di-sustituído **6.6** presenta una muy buena y ligeramente superior actividad *in vitro* al derivado mono-sustituído **6.5**.

Los resultados observados muestran que la actividad de los derivados mono-sustituídos presentan una mayor actividad *in vitro* que los derivados di-sustituídos, aunque esta actividad, observando el resultado ofrecido por el derivado **6.6**, parece depender más del tipo de amina cíclica empleada que de la mono-sustitución y di-sustitución con ésta amina.

2-Influencia del tipo de amina cíclica utilizada:

Para la sustitución de las posiciones R_6 y/o R_7 de los derivados de la **serie 6** se emplearon 7 aminas heterocíclicas alifáticas diferentes.

A primera vista el resultado más destacable es el ofrecido por el derivado **6.8**, que presenta una *N*-[2-Nitro-4-(trifluorometil)fenil]-piperazina en la posición R_7 . Es claramente el compuesto mono-sustituído con una menor actividad, lo cual confirma los resultados previamente observados, indicados en la sección 14.1, en los que se vió como la introducción del grupo nitro conducía a una importante disminución de la actividad biológica *in vitro*. Esta observación se confirma al ver los resultados mostrados por los otros dos compuestos sustituidos por derivados de piperazina, **6.9** y **6.13**, ya que ambos muestran una buena actividad *in vitro* superior al fármaco de referencia.

También es destacable el resultado ofrecido por los derivados **6.3** y **6.4**, mono y di-sustituído respectivamente, que poseen una piperidina que presenta un grupo -OH sustituido en posición *para*. Comparando la actividad *in vitro* mostrada por estos derivados con la mostrada por los derivados análogos **6.5** y **6.6**, sustituidos por piperidina pero sin presentar el grupo -OH, se observa como la introducción del grupo -OH produce una disminución de la actividad *in vitro*. Esta disminución es clarísima en el derivado di-sustituído ya que, el derivado **6.4** (15,7%/>25 μM) es claramente el menos activo de todos los derivados evaluados de la **serie 6**, sin embargo, el derivado análogo **6.6** (100%/2,3 μM) es uno de los compuestos más activos.

El derivado sustituido por tiomorfolina (**6.1**) muestra una buena actividad *in vitro* con un valor de CI_{50} de 2,0 μM , tres veces inferior al valor mostrado por su análogo sustituido con morfolina (**6.2**, 6,4 μM), sin embargo muestra un menor %INH, 83,4% frente a 100%.

3-Influencia del sustituyente introducido en la posición R_6 :

Todos los derivados mono-sustituídos, excepto los derivados **6.10** y **6.13**, presentan sustituyentes electroatrayentes (Cl o F) en esta posición. La discusión estructura-actividad para el sustituyente empleado en esta posición no es concluyente ya que no se puede llevar a cabo una comparación entre compuestos análogos por la variabilidad presentada en el resto de posiciones. Los resultados obtenidos indican que ambos átomos halógenos presentan un buen y similar comportamiento. El derivado **6.13**, no sustituido en esta posición, muestra una buena actividad. El resultado del derivado **6.10** muestra que la sustitución con *N,N*-dimetil no aporta una buena actividad y ésta disminuye con respecto a los derivados que presentan sustituyentes halógenos.

4-Influencia del sustituyente de la posición 2 del anillo de quinoxalina:

La variabilidad de sustituyentes introducida en esta posición no es muy elevada ya que 9 de los 16 compuestos presentan el grupo acetilo. Nuevamente no se observa una relación entre los sustituyentes introducidos en esta posición y la actividad mostrada por los diferentes derivados.

La evaluación biológica de la **serie 6** ha aportado interesantes relaciones estructura-actividad biológica y abre una nueva vía de trabajo que ofrece muchas alternativas debido a la gran variedad de aminas heterocíclicas asequibles económicamente disponibles en el mercado.

En la **Figura 82** se resumen los resultados observados más interesantes y se proponen futuras líneas de trabajo en cuanto a la síntesis y búsqueda de nuevas estructuras líderes. Se propone el aumentar la variabilidad de derivados 1,4-di-*N*-oxidados introduciendo nuevas aminas heterocíclicas y manteniendo Cl o F en la posición R₆ del anillo de quinoxalina.

También se propone un estudio más profundo de los derivados di-reducidos intentando reducir los derivados di-*N*-oxidados obtenidos ya que parecen mostrar actividad y el método de síntesis es sencillo. El hecho de que estos derivados reducidos mostraran actividad podría ofrecer una importante información a la hora de plantearse el mecanismo de acción de los nuevos derivados. Los derivados mono-reducidos no se proponen para futuros planes debido a que no se han obtenido por un método de síntesis descrito, sino que se obtuvieron inesperadamente al intentar obtener el derivado di-*N*-oxidado.

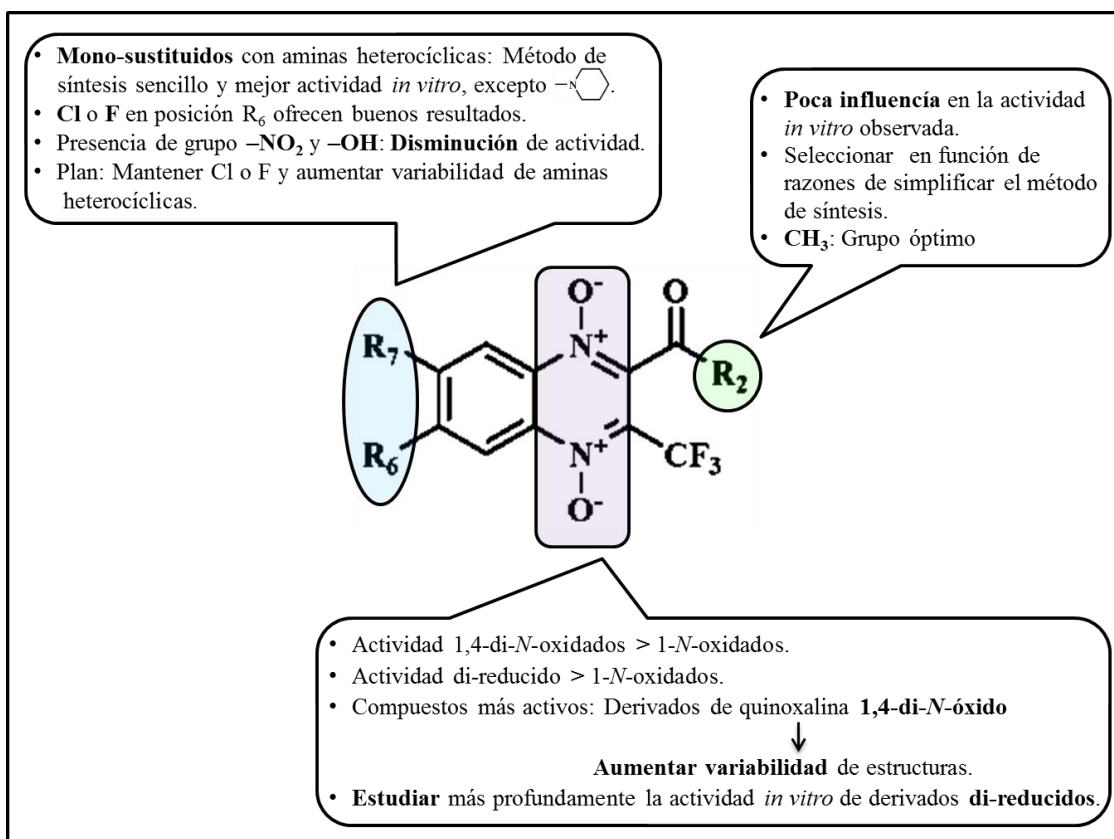
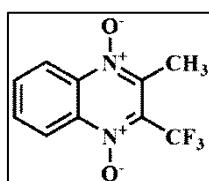


Figura 82. Resumen de relaciones estructura-actividad biológica *in vitro* observadas y futuras líneas de diseño de nuevos derivados propuestas para los derivados de la **serie 6**.

Tabla 33. Estructura y resultados biológicos *in vitro* correspondiente al compuesto **7.1**.



Comp.	% INH 25 μ M	Cl ₅₀ (μ M)
7.1	74,9	12,3
Nfx	100	7,7

El compuesto **7.1**, caracterizado por no presentar grupo carbonilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina, presentó una actividad moderada inferior al fármaco de referencia (**Tabla 33**). Los resultados obtenidos permitieron comprobar la influencia del grupo carbonilo al comparar los resultados ofrecidos por el compuesto análogo **1.16**. El compuesto **1.16** (**Tabla 22**) presenta un grupo acetilo en la posición 2 del anillo de quinoxalina y muestra un % INH del 100% y una Cl₅₀ de 3,0 μ M. Estos datos parecen indicar que la presencia del grupo carbonilo tiene una influencia importante en la actividad biológica *in vitro* mostrada por este tipo de derivados.

46.2. Actividad biológica *in vitro* frente a la forma epimastigote del clon CL Brener y de las cepas Y y Colombiana

Para llevar a cabo la evaluación biológica *in vitro* frente a estas cepas de *T. cruzi* se seleccionaron 7 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido en función de su variabilidad estructural y de los diferentes resultados de actividad *in vitro* mostrados frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Los derivados evaluados mostraban una elevada variabilidad de sustituyentes en las posiciones 2, 3, 6 y 7 del anillo de quinoxalina. La estructura y los resultados biológicos *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* se muestran en la **Tabla 34**. Los compuestos seleccionados incluían cinco derivados con una elevada actividad frente a la cepa Tulahuen 2 (derivados **P1**, **93**, **94**, **1.1** y **1.7**) y dos derivados con una baja actividad frente a esta cepa (derivados **71** y **78**). Los derivados de 3-trifluorometil quinoxalina 1,4 di-*N*-óxido **1.1** y **1.7** pertenecen a la **serie 1** de los compuestos presentados en este trabajo. Los compuestos 71, 78, 93 y 94 fueron previamente publicados en otros proyectos del grupo de trabajo.^{196,203,207,250} El compuesto **P1** fue previamente publicado por el grupo del Dr. Cerecetto.²¹⁸

Tabla 34. Estructura y resultados de actividad *in vitro* frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* de los compuestos seleccionados para el ensayo frente a otras cepas de *T. cruzi*.

Comp	R ₂	R ₃	R ₆ /R ₇	^a %INH/CI ₅₀ (Tulahuen 2)
P1	-S-Ph	-CH ₃	Cl/Cl	93,0/6,5
93	-CO-Ph	-CH ₃	F/F	92,0/<0,5
94	-COO-CH ₂ CH ₃	-Ph	Cl/Cl	99,2/11,3
1.1	-CO-Ph	-CF ₃	H/H	100,0/0,9
1.7	-CO-Ph	-CF ₃	F/F	100,0/0,9
71	-COO-CH ₃	-CH ₃	H/H	24,0/-
78	-CO-NH-Ph	-CH ₃	H/H	10,0/-
Nfx				100/7,7

^aPorcentaje de inhibición a 25 μ M/concentración inhibitoria 50 frente a la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*.

Se determinaron, empleando el ensayo del MTT, tanto el porcentaje de citotoxicidad (%Cit) como la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) frente al clon CL Brener y frente a las cepas Y y Colombiana, parcialmente resistentes *in vivo* a Nfx y Bnz. Los resultados obtenidos para los siete derivados de quinoxalina seleccionados y para el fármaco de referencia Nfx se muestran en la **Tabla 35**. Se observa como los derivados **P1**, **93**, **94**, **1.1** y **1.7** presentan una elevada actividad *in vitro*, mostrando %Cit cercanos al 100% frente a las tres nuevas cepas de *T. cruzi* empleadas, todos ellos superiores a los presentados por el Nfx. Los derivados **P1**, **1.1** y **1.7** muestran los mejores resultados en las 3 cepas evaluadas, mejorando los valores presentados por el fármaco de referencia. Por otro lado, los derivados **71** y **78** muestran una baja actividad *in vitro*, principalmente sobre la cepa Y de *T. cruzi*, donde no se observa citotoxicidad sobre la forma epimastigote. Los resultados obtenidos mantienen el perfil de actividad *in vitro* obtenido frente a la cepa Tulahuen 2 ya que los compuestos con elevada actividad frente a esta cepa (**P1**, **93**, **94**,

1.1 y 1.7), también muestran elevada actividad frente a las nuevas cepas empleadas. El mismo fenómeno se observa en los compuestos con baja actividad **71** y **78**.

Tabla 35. Resultados de porcentaje de citotoxicidad y concentración inhibitoria 50 obtenidos para los derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido seleccionados y el fármaco de referencia Nfx.

Comp	Clon CL Brener		Cepa Y		Cepa Colombiana	
	%Cit ^a	CI ₅₀ (µM) ^b	%Cit	CI ₅₀ (µM)	%Cit	CI ₅₀ (µM)
P1	98,0	<1,0	100,0	2,9	100,0	1,7
93	92,0	16,2	89,0	18,3	98,0	4,5
94	94,0	16,4	100,0	7,1	100,0	-
1.1	97,0	3,1	100,0	4,0	100,0	-
1.7	96,0	1,1	100,0	1,8	100,0	-
71	59,0	-	0,0	-	60,0	-
78	32,0	-	0,0	-	24,0	-
Nfx ^c	90,0	4,9	80,0	9,7	87,0	3,4

^aPorcentaje de citotoxicidad a una concentración de 25 µM. ^bLos resultados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10% en todos los casos.

^cEvaluado a una concentración de 10 µM.

46.3. Actividad biológica *in vitro* frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener

Los derivados **1.7** y **1.17** (*serie 1*) fueron evaluados frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener de *T. cruzi*. En la **Tabla 36** se muestran los porcentajes de reducción parasitaria contabilizados mediante el uso de microcopio. El cristal violeta se utiliza como compuesto de referencia. Tanto el derivado **1.7** como el **1.17** muestran una actividad significativa frente a esta forma parasitaria, mostrando un 84 y un 80% de inhibición respectivamente a una concentración de 250 µg/mL. El derivado **1.7** fue evaluado también a 100 µg/mL mostrando un 63% de inhibición parasitaria. Ambos derivados presentan una menor actividad que el cristal violeta, fármaco de referencia empleado en el ensayo.

Tabla 36. Actividad biológica *in vitro* frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener.

Compuesto	% INH ^a
1.7	84 (63) ^b
1.17	80
CV ^c	100

^aPorcentaje de reducción parasitaria a una concentración de compuesto de 250 µg/mL. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10% en todos los casos.^bEl valor en paréntesis es el porcentaje de reducción empleando 100 µg/mL de compuesto.^cCristal violeta.

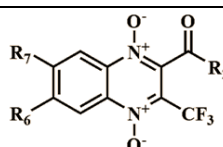





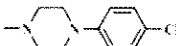
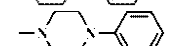
XIII. TOXICIDAD

47. Resultados y discusión de citotoxicidad frente a células mamíferas

Los resultados de citotoxicidad *in vitro* obtenidos para 24 de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido presentados en este trabajo se muestran en la **Tabla 37**. Se muestran los valores de CI_{50} obtenidos sobre la línea celular de macrófagos murinos J-744 tras 48 horas de incubación empleando el ensayo del MTT. Además, se muestran los índices de selectividad (IS), calculados como el cociente entre la CI_{50} sobre los macrófagos y la CI_{50} sobre la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* previamente obtenida. Además se muestran los datos para el Nfx.

Se observa como los compuestos **1.17**, **3.2**, **1.7** y **3.1** presentaron los mejores IS frente al parásito, destacando el compuesto **1.17** con un IS de 27,2. En general, según los resultados parece que los derivados de las **series 1** y **3** parecen mostrar una menor citotoxicidad sobre la línea celular empleada en el ensayo y unos mejores valores de IS que los derivados pertenecientes a la **serie 5**. Sin embargo, ninguno de los compuestos mejoró el valor ofrecido por el fármaco de referencia Nfx (IS = 41,0), por lo que se deberá profundizar en la búsqueda de modificaciones estructurales que permitan mejorar estos valores de selectividad frente al parásito.

Tabla 37. Estructura y resultados obtenidos (CI_{50} e IS) en el ensayo de citotoxicidad frente a la línea celular de macrófagos murinos J-744.

					
Comp.	-R ₂	-R ₆	-R ₇	CI_{50} (μM) ^a	IS ^b
1.7		-F	-F	8,0	11,4
1.8		-H	-H	4,7	4,3
1.10		-H	-H	7,1	3,0
1.14		-H	-H	7,9	5,5
1.16	-CH ₃	-H	-H	8,5	2,8
1.17	-CH ₃	-F	-F	10,6	27,2
1.22	-CH(CH ₃) ₂	-F	-F	11,4	<0,5
1.23	-C(CH ₃) ₃	-H	-H	8,7	<0,6
1.24	-C(CH ₃) ₃	-F	-F	16,2	<0,3
1.25		-H	-H	8,5	5,3
3.1		-H	-H	8,2	10,4
3.2		-H	-H	9,5	12,5
5.1	-OCH ₃	-H	-H	19,0	7,3
5.3	-OCH ₃	-H	-CH ₃	4,0	0,3
5.4	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₃	4,0	0,8
5.6	-OCH ₃	-Cl	-Cl	0,5	< 0,1
5.7	-OCH ₃	-H	-F	2,5	0,7
5.9	-OCH ₃	-H	-CF ₃	4,0	0,8
5.10	-OCH ₂ CH ₃	-H	-H	4,0	1,0
5.11	-OCH ₂ CH ₃	-H	-CH ₃ O	6,0	1,2

Continuación **Tabla 37.**

Comp.	-R ₂	-R ₆	-R ₇	CI ₅₀ (μM) ^a	IS ^b
5.12	-OCH ₂ CH ₃	-H	-CH ₃	7,0	1,4
5.13	-OCH ₂ CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	4,0	0,5
5.16	-OCH ₂ CH ₃	-H	-F	0,5	0,1
5.17	-OCH ₂ CH ₃	-F	-F	4,0	9,3
Nifurtimox^c				316,0	41,0

^aCI₅₀: concentración (en μM) que inhibe el 50% del crecimiento de macrófagos murinos de la línea J-774 tras 48 horas de incubación. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con una DE menor al 10% en todos los casos.

^bIS: Índice de Selectividad, obtenido del cociente entre la CI₅₀ obtenida en macrófagos y la CI₅₀ obtenida sobre la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*.

^cDatos obtenidos de *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, *15* (7), 2768-81.

48. Resultados y discusión del ensayo de mutagenicidad

Los resultados de mutagenicidad de los derivados **1.7**, **1.17**, **A.7** y **5.1-5.18** obtenidos sobre la cepa TA98 de *S. typhimurium*, con y sin activación metabólica, se muestran en la **Tabla 39**. Se incluye además la **Tabla 38**, que muestra la estructura de los compuestos evaluados. La dosis máxima utilizada en cada compuesto se obtuvo en los estudios previos de solubilidad y toxicidad. Un compuesto se considera mutagénico para las condiciones de ensayo empleadas si el número de colonias revertientes para dos concentraciones consecutivas es el doble o superior a las observadas en el control negativo y una relación dosis-respuesta es observada.³⁰⁹ En la **Figura 83** se muestran las curvas de dosis-respuesta para tres de los compuestos estudiados.

En función de los resultados de mutagenicidad obtenidos sobre la cepa TA98 de *S. typhimurium*, los veintiún derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiados se pueden dividir en tres grupos:

- Compuestos no mutagénicos en ambas condiciones experimentales empleadas, sin y con activación metabólica. Cinco de los veintiún compuestos estudiados (**1.7**, **1.17**, **5.9**, **5.15** y **5.18**) no mostraron mutagenicidad en las condiciones del sistema experimental empleado.
- Compuestos mutagénicos en el ensayo sin activación metabólica y no mutagénicos en el ensayo con activación metabólica. Once de los veintiún compuestos empleados en el ensayo (**5.1**, **5.5-5.8**, **5.10**, **5.12-5.14**, **5.16** y **5.17**) parecían experimentar una desactivación de su potencial mutagénico al introducir en el sistema de ensayo la fracción S9.
- Compuestos mutagénicos en ambas condiciones experimentales empleadas, sin y con activación metabólica. Un total de cinco compuestos (**A.7**, **5.2-5.4** y **5.11**) resultaron ser mutagénicos en ambas condiciones de ensayo empleadas.

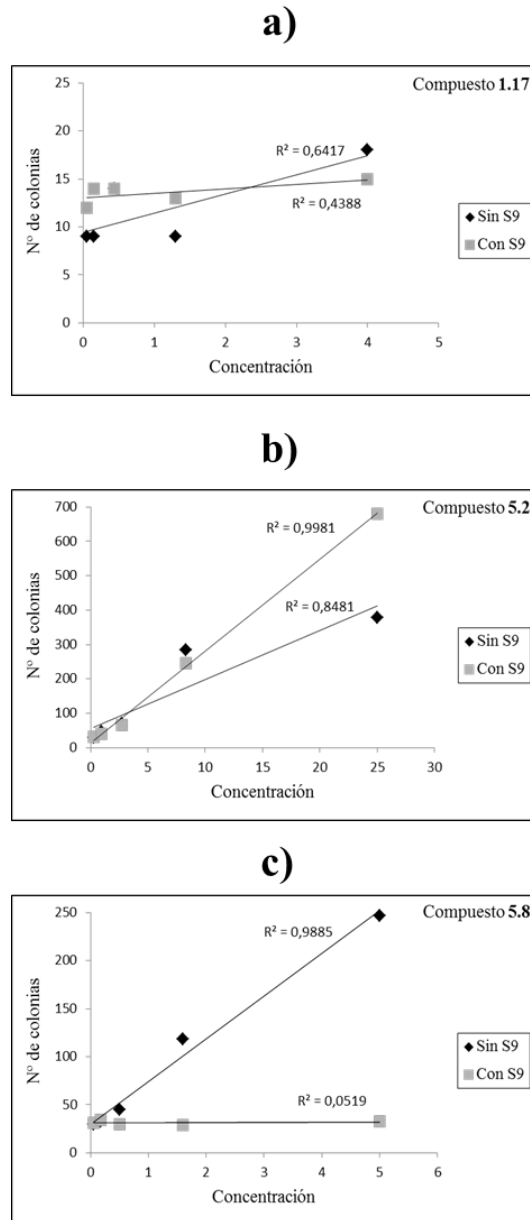


Figura 83. Curvas dosis-respuesta para tres de los compuestos estudiados. Se representa el número de colonias revertientes para cada concentración de producto estudiada ($\mu\text{g}/\text{placa}$). a) Compuesto **1.17**, no mutagénico en ambas condiciones de ensayo (-S9 y +S9). b) Compuesto **5.2**, mutagénico en ambas condiciones de ensayo (-S9 y +S9) c) Compuesto **5.8**, mutagénico en el ensayo sin activación metabólica y no mutagénico con activación metabólica.

48.1. Relaciones estructura-mutagenicidad

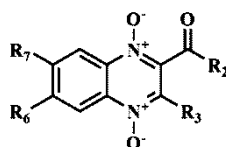
Los resultados obtenidos en el test de Ames muestran una relación entre la estructura de los compuestos (**Tabla 38**) y los resultados obtenidos en el ensayo de mutagenicidad (**Tabla 39**).

Los dos derivados pertenecientes a la **serie 1, 1.7 y 1.17**, no mostraron mutagenicidad en el ensayo realizado. Sin embargo, el derivado **A.7**, análogo al compuesto **1.17** pero presentando un grupo metilo unido a la posición 3 del anillo de quinoxalina presenta una elevada

mutagenicidad. Este resultado parece indicar como la presencia del grupo trifluorometilo previene de algún modo la aparición de mutagenicidad en este tipo de compuestos.

En los derivados pertenecientes a la **serie 5** también se puede observar una relación estructura-mutagenicidad. Se observa una influencia de los sustituyentes de las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina. De esta forma, se observa que los compuestos **5.2-5.4** y **5.11**, mutagénicos en ambas condiciones de ensayo, -S9 y +S9, presentan sustituyentes electrodonantes (CH_3O y CH_3) en las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina; mientras que los derivados no mutagénicos en ambas condiciones de ensayo, **5.9**, **5.15** y **5.18**, poseen sustituyentes electroatrayentes (Cl y CF_3) en estas posiciones.

Tabla 38. Estructura de los derivados de quinoxalina 1,4 di-*N*-óxido estudiados en el ensayo de mutagenicidad.



Comp.	R ₃	R ₇ /R ₆	R ₂	Comp.	R ₃	R ₇ /R ₆	R ₂
A.7	-CH ₃	F/F	-CH ₃	5.9	-CF ₃	CF ₃ /H	-OCH ₃
1.7	-CF ₃	F/F	-Ph	5.10	-CF ₃	H/H	-OCH ₂ CH ₃
1.17	-CF ₃	F/F	-CH ₃	5.11	-CF ₃	CH ₃ O/H	-OCH ₂ CH ₃
5.1	-CF ₃	H/H	-OCH ₃	5.12	-CF ₃	CH ₃ /H	-OCH ₂ CH ₃
5.2	-CF ₃	CH ₃ O/H	-OCH ₃	5.13	-CF ₃	CH ₃ /CH ₃	-OCH ₂ CH ₃
5.3	-CF ₃	CH ₃ /H	-OCH ₃	5.14	-CF ₃	Cl/H	-OCH ₂ CH ₃
5.4	-CF ₃	CH ₃ /CH ₃	-OCH ₃	5.15	-CF ₃	Cl/Cl	-OCH ₂ CH ₃
5.5	-CF ₃	Cl/H	-OCH ₃	5.16	-CF ₃	F/H	-OCH ₂ CH ₃
5.6	-CF ₃	Cl/Cl	-OCH ₃	5.17	-CF ₃	F/F	-OCH ₂ CH ₃
5.7	-CF ₃	F/H	-OCH ₃	5.18	-CF ₃	CF ₃ /H	-OCH ₂ CH ₃
5.8	-CF ₃	F/F	-OCH ₃				

El tercer grupo de compuestos, mutagénicos en el ensayo sin activación metabólica y no mutagénicos con activación metabólica, está formado por once de los veintidós derivados. La desaparición de la mutagenicidad observada al introducir la fracción S9 en el sistema experimental es altamente significativa en alguno de ellos. Por ejemplo, en el compuesto **5.8**, se obtiene un número de colonias revertientes 9 veces mayor al control negativo a la máxima dosis ensayada sin activación metabólica, mientras que no se observa un incremento respecto al control en el ensayo con activación metabólica. De todos los derivados que muestran este comportamiento, son los derivados que presentan sustituyentes electroatrayentes (Cl y F) en las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina (**5.5**, **5.6**, **5.7**, **5.8**, **5.14**, **5.16** y **5.17**) los que muestran una desaparición de la mutagenicidad más evidente. Los derivados **5.11**, **5.12** y **5.13**, que presentan sustituyentes electrodonantes en las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina, muestran también una importante disminución de la mutagenicidad en el ensayo con activación

metabólica, pero al observar los resultados que muestran a la dosis máxima evaluada dejan entrever el comienzo de aparición de mutagenicidad, por lo que su resultado es más difícil de tratar y ofrece más dudas a la hora de decidir sobre su potencial mutagenicidad.

Tabla 39. Resultados de mutagenicidad para los dos sistemas experimentales empleados (-S9 y +S9) en el test de Ames.

Comp.	D ^a	N. R. ^b		Comp.	D ^a	N. R.		Comp.	D ^a	N. R.	
		-S9	+S9			-S9	+S9			-S9	+S9
1.7 (-) ^d	0,0	14±6	19±4	1.17 (-)	0,0	12±1	9±2	A.7 (+)	0,0	13±3	12±1
	0,05	22±8	20±4		0,05	9±1	12±3		0,2	29±7	21±3
	0,5	22±1	15±1		0,15	9±1	14±1		0,6	97±10	34±1
	1,5	20±4	20±2		0,44	14±3	14±1		1,7	245±10	97±2
	5,0	27±4	20±4		1,3	9±1	13±3		5,0	348±10	178±5
	15,0	35±14	21±4	4,0	18±5	15±3	15,0	270±4	236±14		
5.1 (+) [*]	0,0	27±7	28±7	5.7 (+) [*]	0,0	27±7	28±7	5.13 (+) [*]	0,0	29±1	30±7
	0,06	17±4	17±3		0,3	15±7	22±7		0,06	25±4	32±3
	0,18	25±5	25±5		0,92	20±4	22±9		0,18	40±14	37±9
	0,5	33±8	30±9		2,7	39±15	27±7		0,5	57±2	45±5
	1,6	118±11	45±2		8,3	115±5	27±4		1,6	174±12	38±1
	5	227±79	84±15	25	158±28	41±11	12,5	352±11	71±10		
5.2 (+) ^e	0,0	29±1	28±4	5.8 (+) [*]	0,0	29±1	28±4	5.14 (+) [*]	0,0	13±2	19±3
	0,3	29±4	31±4		0,06	30±9	31±3		0,06	14±4	14±4
	0,92	47±8	41±2		0,18	33±2	34±9		0,18	11±3	16±4
	2,7	70±6	66±6		0,5	45±1	30±5		0,5	20±1	14±4
	8,3	285±10	245±15		1,6	118±17	29±7		1,6	31±4	16±6
	25	379±31	680±17	5	247±34	33±3	5	55±11	15±4		
5.3 (+)	0,0	13±2	19±3	5.9 (-)	0,0	27±7	28±8	5.15 (-)	0,0	29±1	29±1
	0,06	15±1	15±4		0,06	25±4	25±2		0,06	29±1	30±7
	0,18	21±2	13±1		0,18	23±3	26±11		0,18	27±5	31±13
	0,5	26±11	16±1		0,5	24±2	25±9		0,5	29±1	27±3
	1,6	79±9	29±5		1,6	24±5	20±6		1,6	32±4	25±4
	5	136±24	100±8	5	25±1	41±15	5	37±1	34±7		
5.4 (+)	0,0	13±2	19±3	5.10 (+) [*]	0,0	29±1	28±4	5.16 (+) [*]	0,0	27±7	28±8
	0,61	10±1	18±2		0,06	32±1	31±7		0,06	16±1	24±1
	1,85	18±12	19±4		0,18	31±12	36±4		0,18	24±7	23±5
	5,5	22±6	16±1		0,5	45±4	29±5		0,5	42±2	28±5
	16,6	53±8	74±11		1,6	109±8	27±2		1,6	80±9	30±5
	50	73±12	260±23	5	237±6	44±5	5	152±43	25±5		
5.5 (+) [*]	0,0	27±7	28±8	5.11 (+)	0,0	27±7	28±8	5.17 (+) [*]	0,0	13±2	19±3
	1,2 x10 ⁻³	19±1	22±2		0,3	15±1	24±3		0,06	13±3	17±2
	3,7 x10 ⁻³	21±5	20±1		0,92	25±2	25±10		0,18	10±5	17±2
	0,011	20±1	24±3		2,7	40±9	30±5		0,5	16±7	21±1
	0,033	40±8	24±4		8,3	133±20	36±1		1,6	33±2	18±3
	5	109±17	33±4	25	188±51	169±24	5	64±6	21±4		
5.6 (+) [*]	0,0	13±2	19±3	5.12 (+) [*]	0,0	29±1	28±4	5.18 (-)	0,0	29±1	30±7
	0,012	17±7	17±1		0,3	33±12	38±7		0,06	25±3	39±2
	0,037	27±1	22±9		0,92	56±5	36±4		0,18	33±5	35±3
	0,11	14±7	29±14		2,7	90±1	41±3		0,5	31±8	32±7
	0,33	26±2	17±4		8,3	287±28	42±6		1,6	39±10	37±4
	1	39±11	19±4	25	352±3	71±18	12,5	39±7	32±7		
Nfx ^c (+)	0,0	21±4	31±10	^a D: Dosis, expresado en µg/placa. ^b N.R.: Número de colonias revertientes. ^c Datos tomados de <i>Toxicology letters</i> 2009 , 190 (2), 140-9. ^d (-): No mutagénico. ^e (+): Mutagénico. *Mutagénico en el ensayo sin S9 y no mutagénico en el ensayo con S9.							
	0,5	29±6	37±5								
	1,0	43±17	39±18								
	3,0	62±2	53±9								
	10,0	144±11	64±6								
	30,0	117±17	139±11								

La disminución y desaparición de la actividad mutagénica observada en la gran mayoría de los compuestos al realizar el ensayo con activación metabólica parece indicar una metabolización de los compuestos hacia metabolitos no mutagénicos. Diferentes trabajos llevados a cabo sobre derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido y compuestos relacionados indicaron que la toxicidad de este tipo de compuestos dependía del metabolismo que sufren. Numerosos estudios de metabolización realizados sobre quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido comercializadas como carbadox, alaquinox y mequinox han demostrado como este tipo de derivados sufren un proceso de reducción de los grupos *N*-óxido por reductasas como carbonil reductasas y NADPH-citocromo P450 reductasas, donde el NADPH se considera esencial para que la reacción tenga lugar. Este proceso de metabolización conduce a la reducción de los grupos *N*-óxido, y esto se ha relacionado con una disminución de la capacidad mutagénica.³²⁰⁻³²⁵ El hecho de que la quinoxalina haya resultado no mutagénica en trabajos llevados a cabo por otros grupos apoyaría esta teoría.³²⁵ La disminución de la mutagenicidad, hasta la desaparición observada en el caso de los derivados con grupos electroatrayentes en las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina, podría estar relacionado con un proceso de reducción de los grupos *N*-óxido llevado a cabo por enzimas reductasas presentes en la fracción S9. Si esto es así, este proceso de reducción parece darse con mayor facilidad en los derivados con sustituyentes electroatrayentes, lo cual estaría en concordancia con los resultados observados en el estudio electroquímico.

XIV. ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*

49. Actividad biológica *in vivo* en modelos de ratón de enfermedad de Chagas aguda

Dados los buenos resultados de actividad *in vitro* obtenidos, los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido **1.7** y **1.17** fueron seleccionados para su estudio preliminar *in vivo* en modelos murinos de infección aguda por *T. cruzi*. Como fármaco de referencia con actividad *in vivo* se utilizó el Bnz. Se realizaron tres experimentos diferentes:

-Experimento 1: Se utilizaron ratones macho Swiss infectados con tripomastigotes del clon CLBrener, comenzando el ensayo 10 días después de la infección mediante la administración oral de cada compuesto (10 ó 50 (mg/kg pc)/día para el derivado **1.7** y 50 (mg/kg pc)/día para el Bnz), durante 10 días.

-Experimento 2: También se emplearon ratones macho Swiss pero en este caso fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. El derivado **1.7** se administró a 10 ó 30 (mg/kg pc)/día y el derivado **1.17** se incluyó en el estudio a una dosis de 10 (mg/kg pc)/día.

-Experimento 3: Se emplearon ratones macho BALB/c infectados con tripomastigotes del clon CL Brener. Los derivados **1.7** y **1.17**, y el Bnz se administraron oralmente a dosis de 10, 10 y 50 (mg/kg pc)/día, respectivamente.

La actividad *in vivo* se evaluó teniendo en cuenta tres parámetros, la pasasitemia semanal (**Figura 84**), los porcentajes de supervivencia animal (**Tabla 40**), y los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* a los 30, 60 ó 90 días tras la infección (**Figura 85**).

Los derivados **1.7** y **1.17** analizados *in vivo* presentan un comportamiento relevante. En cuanto al porcentaje de supervivencia, en los 3 experimentos los animales tratados con el compuesto **1.7** presentan los mejores datos de supervivencia al final de los ensayos (**Tabla 40**).

Tabla 40. Porcentajes de supervivencia de los ratones empleados en los diferentes programas de tratamiento de los experimentos realizados.

Experimento	Tratamiento	Dosis (mg/gk pc)/día	Porcentaje de supervivencia (%) ^a
1	PBS	-	100
	Bnz	50	100
	1.7	10	100
		50	100
2	PBS	-	75
	Bnz	50	87,5
	1.7	10	100
		30	87,5
	1.17	10	62,5
3	PBS	-	100
	Bnz	50	75
	1.7	10	100
	1.17	10	100

^aAl final del estudio, día 90.

En los experimentos llevados a cabo con ratones Swiss infectados con el clon CL Brener de *T. cruzi* (**experimento 1**), los estudios sanguíneos mostraron que el compuesto **1.7**, a una dosis 5 veces inferior que la empleada de Bnz, mostraba un perfil biológico particular, desplazando el primer pico de máxima parasitemia 10 días con respecto al control y no observándose el segundo pico de parasitemia, que en el caso de los ratones no tratados y los tratados con Bnz se observaba en el día 53 del ensayo (**Figura 84, a**). En los días en los que se realizaron los análisis, el número de tripomastigotes en los ratones tratados con el derivado **1.7** fueron inferiores a los observados en los controles sin tratar (**Figura 84, a**).

De acuerdo al **experimento 3**, se observa como el tratamiento de ratones BALB/c infectados con el clon CL Brener con el derivado **1.17** ofrece claramente un mejor perfil de parasitemia que los tratados con el derivado **1.7** (**Figura 84, c**). El derivado **1.17** produce una reducción de la parasitemia a partir del día 18 de infección sin volver a mostrar ningún pico más de parasitemia, mientras que el derivado **1.7** muestra un nuevo pico máximo en el día 45. Estos resultados estaban de acuerdo con los valores de anticuerpos anti-*T. cruzi* observados, donde el derivado **1.17** mostró resultados inferiores que el derivado **1.7** a los 30 y 90 días de infección (**Experimento 3, Figura 85**). La supervivencia de los animales fue del 100% durante el ensayo para ambos derivados de quinoxalina.

En los experimentos llevados a cabo en ratones Swiss infectados con tripomastigotes de la cepa Y (**experimento 2, Figura 84, b**), el estudio sanguíneo mostró que el número de tripomastigotes en los animales tratados con el derivado **1.7** fue ligeramente inferior, a ambas dosis, al número de parásitos en los ratones no tratados, mientras que en los animales tratados con el derivado **1.17** el perfil de parasitemia no mejoró. Estos resultados parecen estar en concordancia con los porcentajes de supervivencia animal observados en los ratones infectados con la cepa Y (**Tabla 39, experimento 2**), donde se observa que los ratones tratados con el derivado **1.17** muestran un 62,5% de supervivencia frente al 100% y 87,5% observado en los ratones tratados con el derivado **1.7** a 10 y 30 (mg/kg pc)/día, respectivamente. Por otro lado, ambos derivados de quinoxalina evitan un segundo máximo de parasitemia en sangre, muy ligero, observado en los animales tratados con Bnz en el día 55 de ensayo.

En cuanto a los niveles de anticuerpos (**Figura 85**), no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados en el día 90 de infección. Sin embargo, los niveles de anticuerpos para el derivado **1.7**, para ambas dosis administradas, y para el Bnz fueron inferiores a los valores en los animales infectados (línea superior de las gráficas, **Figura 85**).

Ambos derivados estudiados parecen mostrar una cierta actividad *in vivo* disminuyendo la parasitemia pero es necesario llevar a cabo más ensayos a diferentes dosis, con diferentes rutas de administración y en combinación con otros fármacos para poder sacar más conclusiones.

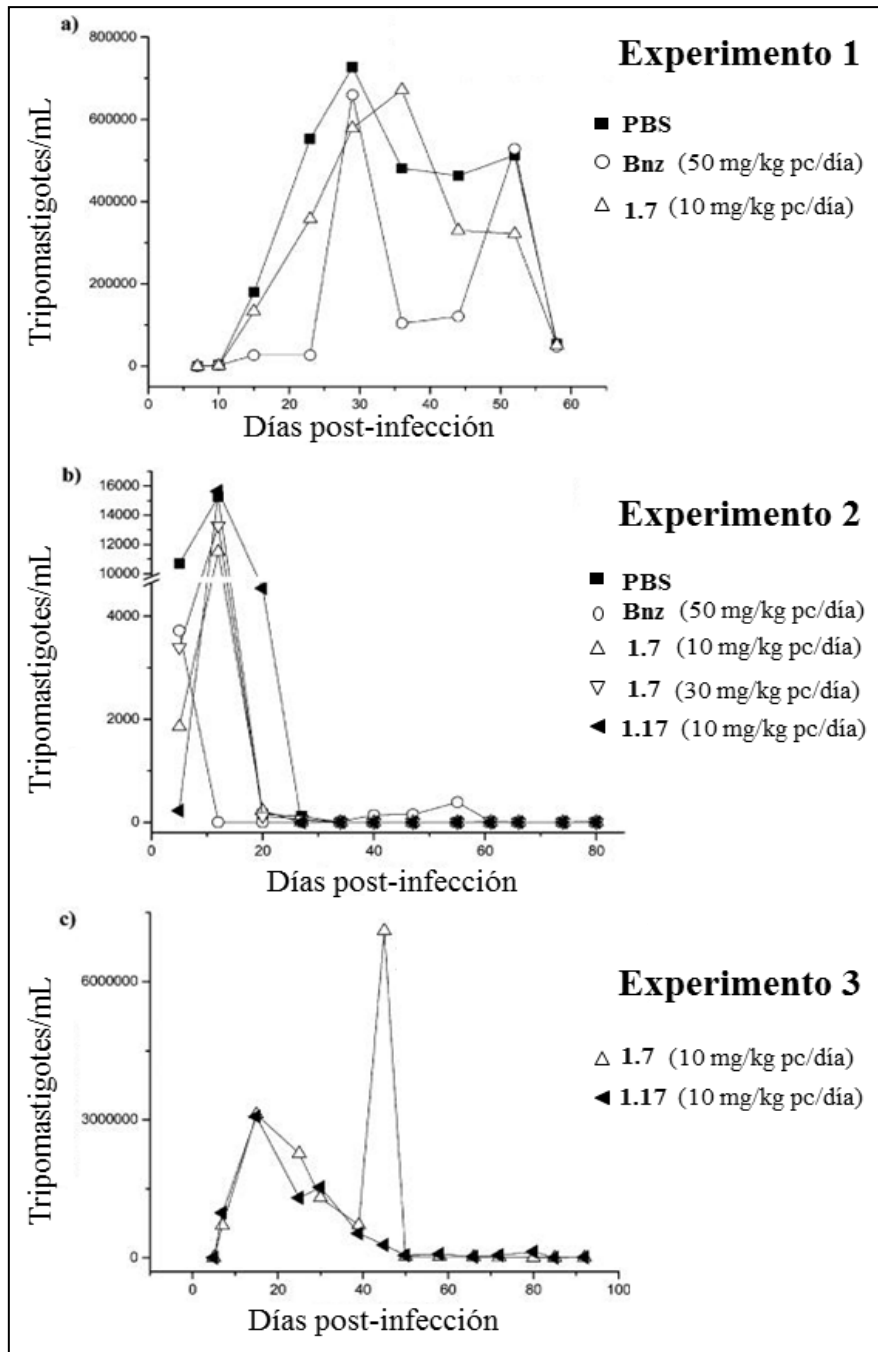


Figura 84. Niveles de parasitemia en los ratones tratados con 50 (mg/kg pc)/día de Bnz (O), 10 (mg/kg pc)/día del derivado 1.7 (△), 30 (mg/kg pc)/día del derivado 1.7 (▽), 10 (mg/kg pc)/día del derivado 1.17 (◄), y grupo no tratado (■): a) experimento 1 (clon CL-Brener); b) experimento 2 (cepa Y); c) experimento 3 (clon CL-Brener).

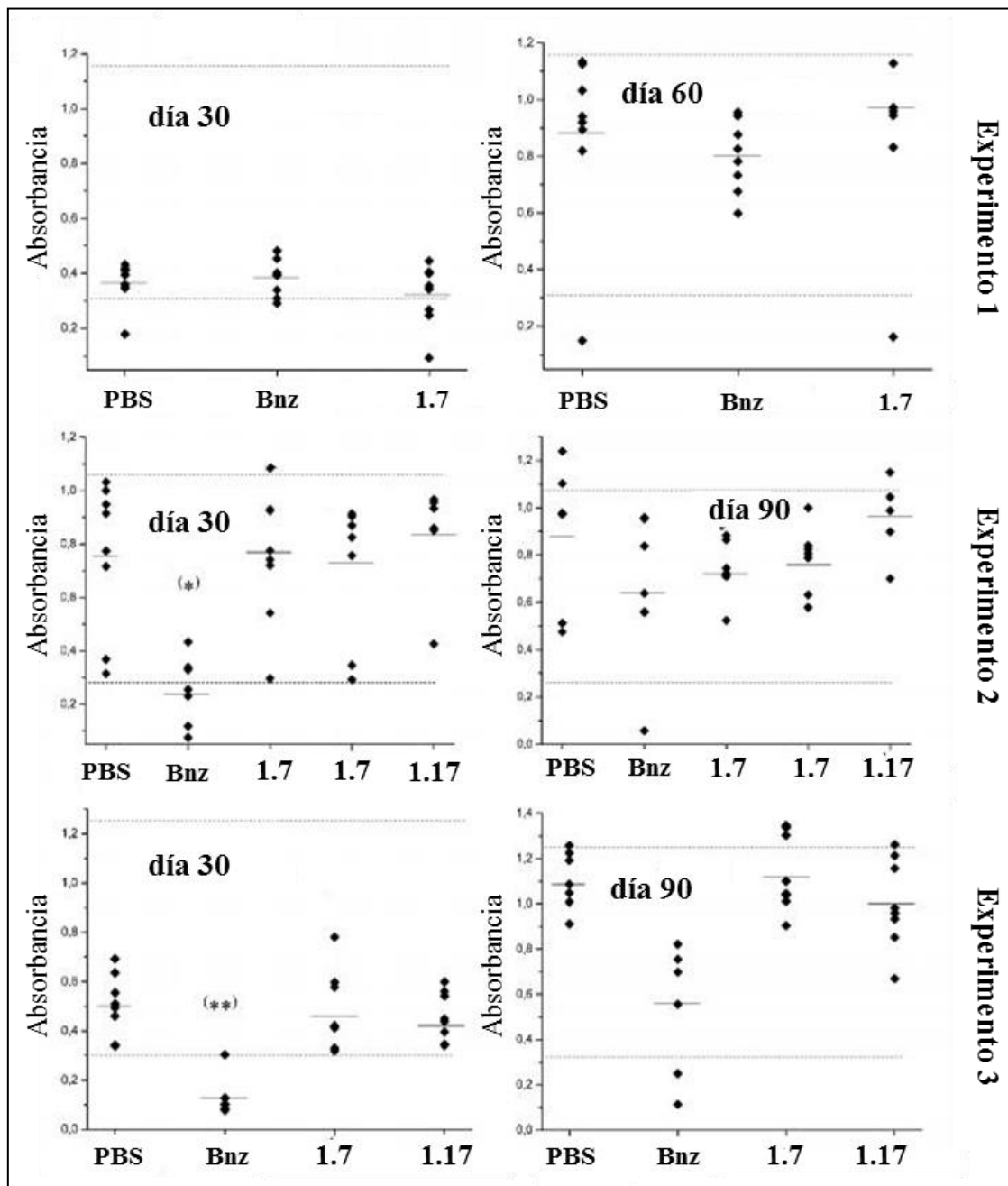


Figura 85. Ejemplos de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los diferentes programas de tratamiento. Las líneas superiores de las gráficas representan los niveles de anticuerpos para los animales infectados, y las líneas inferiores representan los niveles de anticuerpos para los animales sanos: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Las dosis empleadas para cada experimento se indican al comienzo de este apartado.

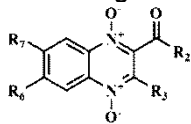
XV. ESTUDIOS DE MECANISMO DE ACCIÓN

50. Resultados y discusión del estudio electroquímico

50.1. Comportamiento electroquímico

Un total de 32 derivados presentados en este trabajo fueron seleccionados, de acuerdo a su variedad estructural y diversidad de resultados de actividad *in vitro*, para ser sometidos a un estudio electroquímico. Además, se incluyeron en el estudio 8 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido análogos a los compuestos presentados en este trabajo pero con un grupo metilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina, previamente publicados por nuestro grupo.^{202,203} El objetivo del estudio planteado fue el de establecer el potencial de reducción presentado por los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido seleccionados y asociarlo con su posible capacidad para sufrir un proceso de bioreducción que condujera a la formación de metabolitos electrófilos y especies reactivas de oxígeno que pudieran participar en el mecanismo de acción como agentes antichagásicos. Las propiedades redox de los compuestos elegidos fueron estudiadas empleando la voltametría cíclica utilizando DMF como disolvente y TBAP como electrolito soporte. Las estructuras de los derivados estudiados y los resultados electroquímicos obtenidos se muestran en la **Tabla 41**. En las **Figuras 86** y **87** se muestran 2 voltagramas representativos obtenidos para dos de los compuestos estudiados. Todas las reducciones fueron controladas por difusión, según lo indicado por las funciones de corriente constantes a diferentes velocidades de barrido.^{312,326}

Tabla 41. Estructura y datos de voltametría cíclica de los derivados evaluados.

Estructura general				Voltametría cíclica									
				Onda 1								Onda 2	
Comp	cR ₂	R ₃	R ₆ /R ₇	E _{pc1} (V)	E _{pa1} (V)	E _{1/2} (V)	i _{pc1} (μA)	i _{pa1} (μA)	i _{pa} /i _{pc}	ΔE _p (mV)	E _{pc2} (V)	i _{pc2} (μA)	
A.1	Ph	CH ₃	H/H	-1,581	-1,512	-1,546	4,23	2,84	0,67	69	-2,016	4,18	
A.2	Ph	CH ₃	H/CH ₃ O	-1,610	-1,535	-1,573	7,77	5,32	0,69	72	-1,952	9,72	
A.3	Ph	CH ₃	H/CH ₃	-1,613	-1,548	-1,580	3,91	2,83	0,722	65	-2,039	4,27	
A.7	Ph	CH ₃	F/F	-1,478	-1,407	-1,442	3,18	2,38	0,75	71	-1,918	3,96	
A.17	Me	CH ₃	F/F	-1,454	-1,382	-1,418	4,58	3,31	0,72	72	-1,988	4,86	
1.1	Ph	CF ₃	H/H	-1,341	-1,275	-1,308	4,33	4,00	0,93	66	-2,071	9,06	
1.2	Ph	CF ₃	H/CH ₃ O	-1,407	-1,326	-1,366	6,27	5,26	0,84	81	-2,23 ^(hb)	-	
1.3	Ph	CF ₃	H/CH ₃	-1,376	-1,311	-1,344	2,79	2,25	0,80	65	-2,06 ^(hb)	-	
1.7	Ph	CF ₃	F/F	-1,223	-1,154	-1,188	4,37	3,79	0,87	69	-1,919	8,89	
1.9	Tienil	CF ₃	F/F	-1,226	-1,154	-1,190	2,83	2,24	0,79	72	-1,898	5,76	
1.11	Furil	CF ₃	F/F	-1,219	-1,148	-1,183	3,91	3,56	0,91	71	-1,921	8,28	
1.15	Naftil	CF ₃	F/F	-1,232	-1,159	-1,196	3,97	3,53	0,89	73	-1,923	8,62	
1.17	Me	CF ₃	F/F	-1,213	-1,144	-1,179	4,13	3,42	0,83	69	-1,923	5,75	
1.18	Et	CF ₃	Cl/Cl	-1,126	-1,061	-1,093	3,60	3,25	0,90	65	-1,846	3,56	
1.22	i-prop	CF ₃	F/F	-1,219	-1,143	-1,181	3,14	1,37	0,44	76	-1,908	3,71	
1.24	t-but	CF ₃	F/F	-1,214	-1,139	-1,176	4,05	3,71	0,92	75	-1,960	5,06	
1.26	Cl-Ph	CF ₃	F/F	-1,213	-1,140	-1,176	3,16	2,95	0,93	73	-1,915	7,08	
3.1	Cl-Ph-pipe	CF ₃	H/H	-1,374	-1,308	-1,341	3,88	2,51	0,65	66	-2,064	4,45	
3.2	Ph-pipe	CF ₃	H/H	-1,382	-1,316	-1,349	3,71	3,14	0,85	66	-2,113	3,73	
4.1	Ph	CHF ₂	H/H	-1,434	-1,365	-1,400	4,69	4,14	0,88	69	-1,99 ^(hb)	-	
4.2	Ph	CHF ₂	H/CH ₃ O	-1,493	-1,424	-1,458	4,03	3,92	0,97	69	-1,99 ^(hb)	-	
4.4	Ph	CHF ₂	H/Cl	-1,325	-1,257	-1,291	4,25	3,92	0,92	68	-1,975	11,04	

Continuación **Tabla 41**.

Comp	R_2	R_3	R_6/R_7	E_{pc1} (V)	E_{pa1} (V)	$E_{1/2}$ (V)	i_{pc1} (μA)	i_{pa1} (μA)	i_{pa}/i_{pc}	ΔE_p (mV)	E_{pc2} (V)	i_{pc2} (μA)
4.5	Ph	CHF ₂	Cl/Cl	-1,225	-1,153	-1,189	5,18	2,66	0,51	72	-1,872	6,48
4.6	Ph	CHF ₂	H/F	-1,370	-1,298	-1,334	4,63	3,54	0,76	72	-1,974	8,77
B.1	O-Et	CH ₃	CH ₃ /CH ₃	-1,709	-1,645	-1,677	3,03	1,64	0,54	64	-2,272	3,12
B.12	O-Et	CH ₃	Cl/Cl	-1,403	-1,336	-1,370	3,19	2,87	0,90	67	-1,954	2,98
B.6	O-Me	CH ₃	Cl/Cl	-1,399	-1,333	-1,366	2,96	2,69	0,91	66	-1,934	3,14
5.1	O-Me	CF ₃	H/H	-1,346	-1,279	-1,313	3,16	2,61	0,82	67	-2,099	4,62
5.4	O-Me	CF ₃	CH ₃ /CH ₃	-1,392	-1,326	-1,359	3,60	3,41	0,95	66	-2,11	3,71
5.6	O-Me	CF ₃	Cl/Cl	-1,109	-1,042	-1,076	3,82	3,06	0,80	67	-1,799	3,30
5.7	O-Me	CF ₃	H/F	-1,243	-1,179	-1,211	4,40	3,04	0,69	64	-1,994	4,10
5.8	O-Me	CF ₃	F/F	-1,193	-1,126	-1,160	3,97	3,37	0,85	67	-1,916	4,66
5.9	O-Me	CF ₃	H/CF ₃	-1,117	-1,045	-1,081	3,31	2,78	0,84	72	-1,872	3,92
5.10	O-Et	CF ₃	H/H	-1,312	-1,251	-1,281	3,41	2,56	0,75	61	-2,12	5,55
5.11	O-Et	CF ₃	H/CH ₃ O	-1,389	-1,325	-1,357	3,79	2,96	0,78	64	-2,282	4,04
5.12	O-Et	CF ₃	H/CH ₃	-1,357	-1,291	-1,324	4,68	4,39	0,94	66	-2,209	5,03
5.14	O-Et	CF ₃	H/Cl	-1,208	-1,141	-1,174	3,88	3,21	0,83	67	-1,967	5,56
5.15	O-Et	CF ₃	Cl/Cl	-1,113	-1,049	-1,081	4,24	3,69	0,87	64	-1,784	3,82
5.16	O-Et	CF ₃	H/F	-1,248	-1,184	-1,216	4,51	3,69	0,82	64	-1,997	3,45
5.17	O-Et	CF ₃	F/F	-1,194	-1,127	-1,161	4,14	3,07	0,74	67	-1,911	4,62

^aSustrato, 1,0 mM; TBAP, 0,10 M; DMF; electrodo de trabajo de Pt; Ag/AgNO₃ como electrodo de referencia; electrodo auxiliar de alambre de Pt; 100 mV/s; temperatura ambiente; E vs (Fc/Fc⁺)/V; las corrientes se indican en μA . ^{hb} = hombro. El pico aparece como un hombro, está mal definido. ^cLos grupos sustituidos en esta posición se han nombrado de manera diferente por un problema de espacio: Me = CH₃, Et = CH₂CH₃, i-prop = CH(CH₃)₂, t-but = C(CH₃)₃, Ph = fenilo y pipe = piperazina.

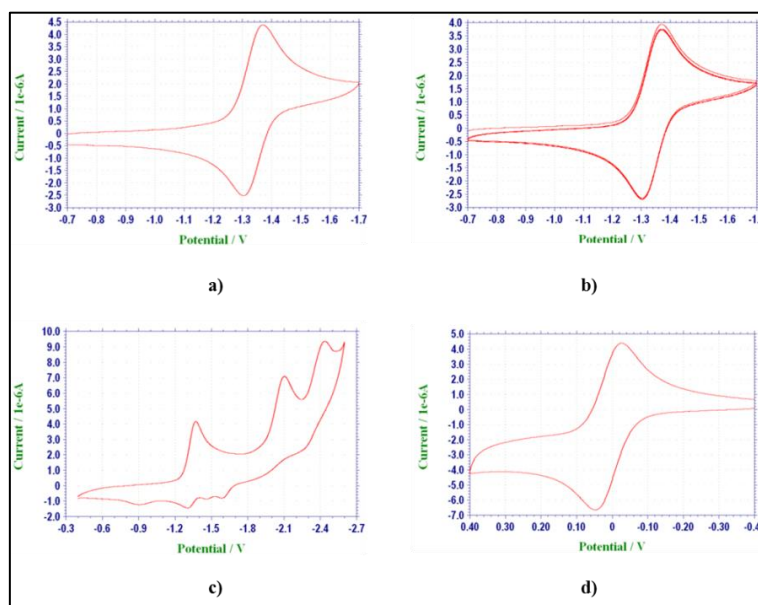


Figura 86. Voltamogramas cíclicos obtenidos en la reducción del compuesto 3.2 en DMF a 0,1 V/s (E vs (Ag/AgNO₃)/V): a) Un solo barrido entre -0,7 y -1,7 V, b) múltiples barridos entre -0,7 y -1,7 V, y c) un solo barrido entre -0,4 y -2,6 V. d) Voltamograma cíclico para el par redox del ferroceno, empleado como referencia para la determinación de los picos de potencial.

Para todas las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido estudiadas la primera onda voltamétrica observada durante la reducción fue reversible o cuasi-reversible (**Figura 86 a** y **Figura 87 a**) con potenciales de pico, E_{pc1} , que oscilaron entre -1,109 y -1,709 V (vs Fc/Fc⁺). Los valores para este par redox de ΔE_p se encontraban entre 61 y 81 mV a 0,1 V/s y los valores de $E_{pc}-E_{1/2}$ calculados se situaron entre -30,5 y -40,5 mV a 0,1 V/s. Para un proceso reversible, los valores teóricos esperados para la transferencia de un electrón serían de 59 mV para ΔE_p y -28,5 mV para $E_{pc}-E_{1/2}$. La cercanía a los valores teóricos observada en los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiados parece confirmar que el proceso de reducción implica la transferencia de un electrón.³²⁷

Los cocientes i_{pa}/i_{pc} calculados para la primera onda voltamétrica fueron cercanos a la unidad independiente de la velocidad de barrido empleada para todos los compuestos excepto **1.22**, **4.5** y **B.1** ($i_{pa}/i_{pc} = 0,44$, $0,52$ y $0,54$ respectivamente), indicando la ausencia de cinética u otras complicaciones tras la reducción para la inmensa mayoría de los compuestos.³²⁶ Los valores de i_{pa}/i_{pc} cercanos a la unidad indicaban que el radical anión formado tras este primer proceso de reducción era razonablemente estable en la escala de tiempo y las condiciones empleadas en el experimento. Esto se veía apoyado mediante múltiples ciclos de la primera onda voltamétrica, los cuales no mostraron cambios en la reversibilidad del proceso. (**Figura 86 b** y **Figura 87 b**).

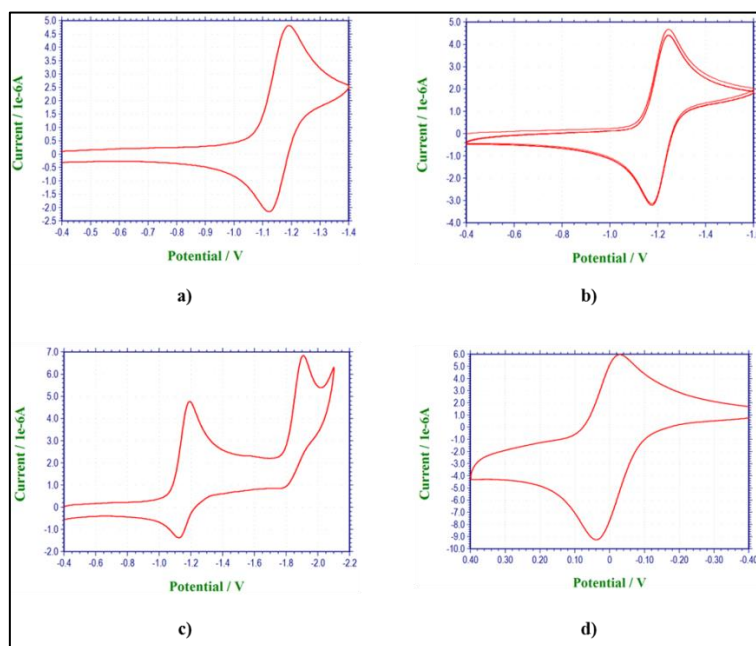


Figura 87. Voltamogramas cíclicos obtenidos en la reducción del compuesto 5.17 en DMF a 0,1 V/s (E vs (Ag/AgNO₃)/V): a) Un solo barrido entre -0,4 y -1,4 V, b) múltiples barridos entre -0,4 y -1,4 V, y c) un solo barrido entre -0,4 y -2,1 V. d) Voltamograma cíclico para el par redox del ferroceno, empleado como referencia para la determinación de los picos de potencial.

Se observó una segunda onda voltamétrica irreversible para todos los derivados a potenciales entre -1,7 y -2,3 V (**Figura 86 c** y **Figura 87 c**). Este proceso mostró valores de i_{pc} que fueron similares a los observados en la primera onda de reducción, indicando que es probable

que un electrón participe en este proceso. Por ello, se piensa que esta segunda onda es indicativa de otro proceso de reducción que implica a un electrón y que ofrecería la forma dianión.³²⁸

Se observó una tercera onda voltamétrica a potenciales más negativos de -2,1 V para todos los compuestos estudiados. En algunos casos, la segunda y tercera onda voltamétrica aparecían muy próximas entre sí, por lo que se observaba como un hombro de la otra. No obstante, la segunda y la tercera onda voltamétrica no se estudiaron en mayor profundidad.

50.2. Relación entre la estructura química y el potencial de reducción

Los datos presentados en la **Tabla 42** permite también llevar a cabo el estudio de la posible influencia de la estructura en el potencial de reducción de la primera onda voltamétrica. Muchos de los compuestos estudiados son análogos entre sí, presentando una modificación que puede afectar a las posiciones 6 y/o 7 (sin sustituir, sustituyente electrodonante o sustituyente electroatrayente), a la posición 3 (CH₃, CHF₂ o CF₃) o a la posición 2 del anillo de quinoxalina. La presencia de estos análogos en el estudio permitirá comprobar en qué medida el E_{1/2} se ve afectado por la estructura.

Los efectos de la incorporación de un grupo electroatrayente (Cl, F, CHF₂ y CF₃) o un grupo electrodonante (CH₃ y CH₃O) en el anillo de quinoxalina han sido estudiados en trabajos previos.³²⁹ Un potencial de reducción menos negativo se asocia con una mayor facilidad de reducción, por lo tanto aquellos sustituyentes que aporten un desplazamiento positivo del E_{1/2} se piensa que favorecerán una reducción *in vivo* más sencilla del derivado de quinoxalina 1,4-di-N-óxido correspondiente.

Influencia de los sustituyentes de las posiciones 6 y 7

Comparando los resultados obtenidos para los diferentes análogos presentados en la **Tabla 42** se comprueba como la sustitución de un hidrógeno de la posición 7 del anillo de quinoxalina por un grupo electroatrayente (Cl, F o CF₃) causa un desplazamiento positivo en el potencial de reducción, lo cual facilitará el proceso de reducción. Este efecto se observa claramente por ejemplo al realizar la comparación entre los compuestos **5.1** vs **5.7** vs **5.9**, donde la sustitución del hidrógeno por un átomo de F o por un grupo CF₃ resulta en un desplazamiento positivo del potencial de reducción de 102 mV y 232 mV respectivamente. El mismo efecto se observa al comparar los compuestos **5.10** vs **5.14** vs **5.16** (+107 mV y +65 mV) y **4.1** vs **4.4** vs **4.6** (+109 mV y +66 mV).

La sustitución de esta misma posición con grupos electrodonantes como CH₃ y CH₃O tiene un efecto contrario, provocando un desplazamiento negativo en el potencial de reducción y, por lo tanto, haciendo más complicada la reducción. Por ejemplo, la sustitución del átomo de hidrógeno de la posición 7 del compuesto **1.1** por un grupo CH₃O en el derivado **1.2** y por un grupo CH₃ en el derivado **1.3** resultó en unos desplazamientos negativos del E_{1/2} de -43 mV y -76

mV, respectivamente. Estos resultados se comprueban también al comparar los derivados **4.1** vs **4.2** y los derivados **5.10** vs **5.11** vs **5.12**.

Además, de acuerdo con lo observado en estudios previos, se observa como la incorporación de un segundo sustituyente electroatrayente (Cl o F) en la posición 6 del anillo de quinoxalina potencia el desplazamiento positivo observado del potencial de reducción. Este efecto se observa al comparar por ejemplo los compuestos análogos **5.1** vs **5.7** vs **5.8** (6,7-H vs 7-F vs 6,7-F). La incorporación de un átomo de F en la posición 7 provoca un desplazamiento del $E_{1/2}$ de +102 mV respecto al obtenido en el compuesto sin sustituir, mientras que la introducción de un segundo átomo de F conlleva un desplazamiento de +153 mV. El mismo efecto se observa cuando se introduce Cl en la estructura, por ejemplo, en los compuestos **4.1** vs **4.4** vs **4.5**, obteniéndose desplazamientos de +109 mV y +211 mV respectivamente. El mismo resultado se obtiene al comparar **5.10** vs **5.14** vs **5.15** y **5.10** vs **5.16** vs **5.17**.

Influencia del sustituyente de la posición 3

La utilización de compuestos sustituidos por el grupo CH_3 en la posición 3 del anillo de quinoxalina en el estudio electroquímico ayudó a comprobar que efecto tenía sobre el $E_{1/2}$ la sustitución de esta posición por el grupo CF_3 y el grupo CHF_2 . Los resultados obtenidos indican como la sustitución del grupo CH_3 por el grupo CF_3 tiene un efecto muy importante sobre el $E_{1/2}$ provocando desplazamientos positivos de más de 200 mV. La sustitución del grupo CH_3 por el grupo CHF_2 también provoca un desplazamiento positivo del $E_{1/2}$ pero menos marcado que en el caso del CF_3 . Sirva como ejemplo la comparación de **A.1** vs **4.1** vs **1.1**, donde se observa un desplazamiento de +146 mV al introducir el grupo CHF_2 y de +238 mV en el caso del derivado sustituido por el grupo CF_3 en la posición 3. El mismo efecto se observa al comparar **A.2** vs **4.2** vs **1.2**, **A.3** vs **1.3**, **A.7** vs **1.7**, **A.17** vs **1.17**, **B.1** vs **5.10**, **B.12** vs **5.15** y **B.6** vs **5.6**.

Influencia del sustituyente de la posición 2

La influencia de los sustituyentes introducidos en la posición 2 sobre el potencial parece ser poco significativo en comparación con los sustituyentes introducidos en las posiciones 3, 6 y 7, presumiblemente, debido a la distancia hasta el sitio de reducción.

Los resultados obtenidos concuerdan con la facilitación de la reducción de quinoxalinas por una carga positiva en el sitio de reducción, de acuerdo con trabajos previos.³²⁹⁻³³² Como se muestra en la **Figura 88**, los potenciales de reducción para los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido análogos estudiados en general se ajustan a la ecuación modificada de Hammett, $\Delta E_{1/2} = \rho_{\pi R} \sigma_x$ (coeficientes de correlación entre de 0,98 y 0,99), donde σ_x es la constante del efecto electrónico aportado por cada sustituyente (polar e inductivo) tomada como el promedio de la suma de σ_{m-x} y σ_{p-x} (**Tabla 42**) y ρ es la constante de reacción.³³⁰ Para los derivados de quinoxalina sustituidos en el anillo de benceno se recomienda el uso de $(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$.³³³

Tabla 42. Constantes de Hammett para los diferentes sustituyentes empleados en las posiciones 3, 6 y 7 del anillo de quinoxalina^a.

Comp.	R ₆ / R ₇	σ_{p-x}	σ_{m-x}	$(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$	R ₃	σ_{p-x}	σ_{m-x}	$(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$	$\sum(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$
A.1	H/H	0	0	0	CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	-0,12
A.3	H/CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	-0,24
A.7	F/F	0,12	0,68	0,4	CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	0,28
A.2	H/CH ₃ O	-0,27	0,12	-0,075	CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	-0,195
1.1	H/H	0	0	0	CF ₃	0,54	0,43	0,485	0,485
1.3	H/CH ₃	-0,17	-0,07	-0,12	CF ₃	0,54	0,43	0,485	0,365
1.2	H/CH ₃ O	-0,27	0,12	-0,075	CF ₃	0,54	0,43	0,485	0,41
1.7	F/F	0,12	0,68	0,4	CF ₃	0,54	0,43	0,485	0,885
4.1	H/H	0	0	0	CHF ₂	0,32	0,29	0,305	0,305
4.2	H/CH ₃ O	-0,27	0,12	-0,075	CHF ₂	0,32	0,29	0,305	0,23
4.4	H/Cl	0,23	0,37	0,3	CHF ₂	0,32	0,29	0,305	0,605
4.5	Cl/Cl	0,46	0,74	0,6	CHF ₂	0,32	0,29	0,305	0,905
4.6	H/F	0,06	0,34	0,2	CHF ₂	0,32	0,29	0,305	0,505

^aLos valores de las constantes de Hammett se obtuvieron de la referencia.³³⁰

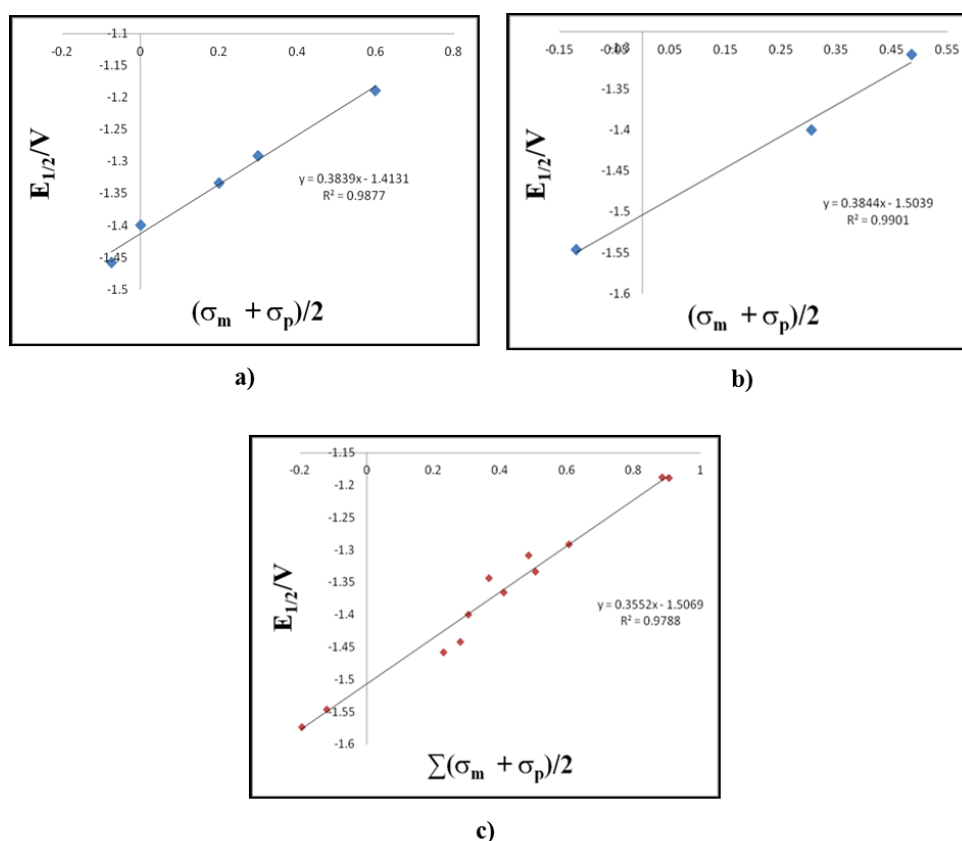


Figura 88. Gráfica de a) potencial de reducción ($E_{1/2}$ vs F_c/F_{c+}) frente a $(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$ para los sustituyentes de las posiciones 6 y 7 en los compuestos **4.1**, **4.2**, **4.4** y **4.5**; b) potencial de reducción ($E_{1/2}$ vs F_c/F_{c+}) frente a $(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$ para el sustituyente de la posición 3 en los compuestos **A.1**, **1.1** y **4.1**; c) potencial de reducción ($E_{1/2}$ vs F_c/F_{c+}) frente a $\sum(\sigma_{m-x} + \sigma_{p-x})/2$

para los sustituyentes de las posiciones 6 y 7 y de la posición 3 en los compuestos **A.1**, **A.2**, **A.3**, **A.7**, **1.1**, **1.2**, **1.3**, **1.7**, **4.1**, **4.2**, **4.4**, **4.5** y **4.6**.

50.3. Relación entre el comportamiento electroquímico y la actividad antichagásica

Con respecto al mecanismo como agentes antichagásico, los heterociclos di-*N*-óxidos se espera que sufran una reducción vía un electrón para formar un anión radical (**Figura 89**).^{173,184,334-341} De hecho, trabajos electroquímicos previos confirmaron mediante Resonancia de espín electrónico (REE) que la reducción de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido implica al grupo nitrona para formar el anión radical.³²⁷ La reducción electroquímica de las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido en sistemas de solventes apróticos ha sido publicada previamente.^{173,327-329,331,332,334} En la mayoría de los casos, una primera onda de reducción reversible atribuida a la reducción de uno de los grupos *N*-óxido se ha descrito en DMF. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio. Para los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiados, la reducción electroquímica en DMF es también consistente con la reducción de la función *N*-óxido para formar un anión radical.

La segunda onda voltamétrica de reducción observada podría ser debida a la formación del dianión. La irreversibilidad de esta onda voltamétrica podría ser debido a una reacción química posterior, por ejemplo siguiendo un mecanismo EEC (Electroquímico-Electroquímico-Químico).

La tercera onda voltamétrica observada podría deberse a la reducción del grupo carbonilo de la posición 2 del anillo de quinoxalina.

Kaye y Stonehill señalaron que una objeción a esta teoría es el hecho de que algunos potenciales observados son muy negativos, aunque numerosos trabajos indican que el potencial de reducción *in vivo* podría ser mejor que *in vitro*, y es sabido que los *N*-óxido sufren una bio-reducción.³⁴²⁻³⁴⁴

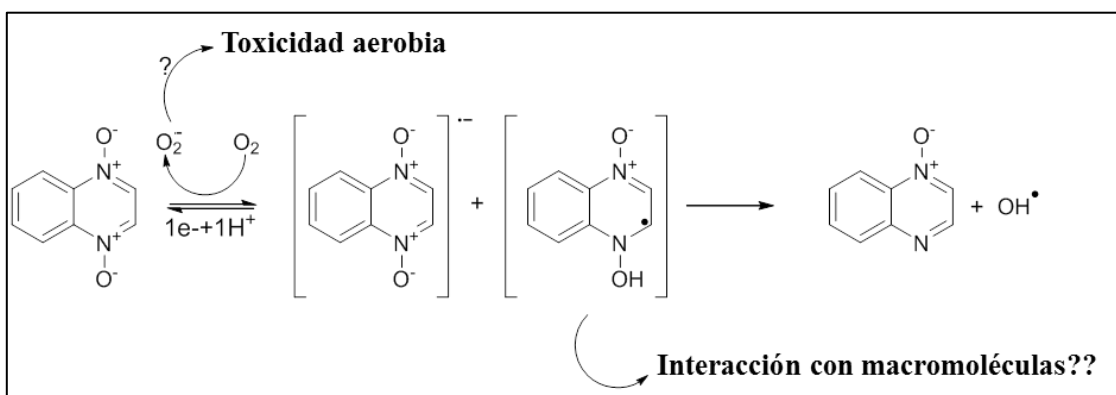


Figura 89. Mecanismo de acción propuesto.

Los datos obtenidos sugieren una posible relación entre el potencial de reducción y la actividad antichagásica. Dentro de esta relación diferentes etapas en el mecanismo de acción de estos compuestos frente a la *T. cruzi* deberían ser consideradas. En este sentido, en la primera etapa la quinoxalina di-*N*-óxido podría ser activada a través de un proceso de bio-reducción para formar un radical anión reactivo, el cual podría conducir más adelante hasta el ión superóxido u otras especies reactivas de oxígeno tóxicas, o a interacciones directas con macromoléculas en una etapa posterior. Si este mecanismo ocurre para estos compuestos, el proceso de activación por bio-reducción generalmente se esperaría que fuese más sencillo para aquellos compuestos más fácilmente reducibles, o lo que es lo mismo para aquellos compuestos que muestran potenciales de reducción menos negativos.

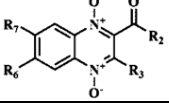
Observando los resultados que se muestran en la **Tabla 43** se puede apreciar como los cuatro compuestos que presentan una menor actividad frente a *T. cruzi*, compuestos **A.1**, **A.2**, **A.3** y **B.1**, son a su vez los compuestos con valores de $E_{1/2}$ más negativos, por debajo de -1,5 V (vs Fc/Fc⁺). Cabe destacar el compuesto **B.1** por ser el menos activo de todos los compuestos presentados (%INH = 1%) y mostrar con claridad el valor de $E_{1/2}$ más negativo (-1,677 V).

El análisis de los resultados obtenidos para los compuestos con una buena actividad frente a *T. cruzi* ofrece más problemas ya que las actividades mostradas por la mayoría de los compuestos presentados eran similares y muy elevadas. Este hecho impidió observar una correlación directa entre su actividad antichagásica y el potencial de reducción al graficarlos juntos. Sin embargo, sí se observa claramente como la gran mayoría de los compuestos más activos presentan potenciales de reducción menos negativos que -1,3 V. Este hecho podría indicar que existe un potencial umbral para que se produzca una bio-reducción en estos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido. Esto podría explicar la aparente falta de una correlación absoluta entre la actividad y el potencial de reducción. Aquellos compuestos con potenciales por encima del límite se esperaría que tengan una mejor actividad frente a *T. cruzi*, mientras que aquellos que caen por debajo del umbral tendrían actividades menores, dependiendo directamente de la facilidad con que sufren la reducción.

Sin embargo, el hecho de que existan algunas excepciones en los datos, como en los compuestos **1.22**, **1.24** y **A.17** por ejemplo, indican que los resultados electroquímicos tienen que ser interpretados con cautela. Como se ha comentado, estos estudios pueden ayudar a clarificar alguna etapa, pero otros factores además de la bio-reducción deben ser considerados en el mecanismo de acción global. Además de la bio-reducción, factores como la solubilidad, lipofilia, metabolismo, difusión, permeabilidad de membrana, estereoquímica, absorción, el sitio de unión, además de otros muchos deben ser considerados cuando se intenta determinar el mecanismo de acción *in vivo* de los compuestos antichagásicos. De todas formas, los resultados de este estudio parecen sugerir que la participación de un proceso de transferencia de carga en el

mecanismo de acción de estos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido frente a *T. cruzi* es factible.

Tabla 43. Estructura, datos de voltametría cíclica y resultados de actividad *in vitro* anti-*T. cruzi* de los derivados de quinoxalina estudiados.

Comp.				Voltametría cíclica			Actividad anti- <i>T. cruzi</i>	
	-R ₂	-R ₃	R ₆ /R ₇	E _{pc1}	E _{pc2}	E _{1/2} (V)	%INH ^a	CI ₅₀ (μM) ^b
A.1	Ph	CH ₃	H/H	-1,581	-2,016	-1,546	19	>25
A.2	Ph	CH ₃	H/CH ₃ O	-1,610	-1,952	-1,574	9	°N.R.
A.3	Ph	CH ₃	H/CH ₃	-1,613	-2,039	-1,580	8	>25
A.7	Ph	CH ₃	F/F	-1,478	-1,918	-1,442	92	4,2
A.17	Me	CH ₃	F/F	-1,454	-1,988	-1,418	100	0,4
1.1	Ph	CF ₃	H/H	-1,341	-2,071	-1,308	100	0,9
1.2	Ph	CF ₃	H/CH ₃ O	-1,407	-2,23 (hb)	-1,407	98	N.R.
1.3	Ph	CF ₃	H/CH ₃	-1,376	-2,06 (hb)	-1,344	99	1,3
1.7	Ph	CF ₃	F/F	-1,223	-1,919	-1,188	100	0,7
1.9	Tienil	CF ₃	F/F	-1,226	-1,898	-1,190	100	2,8
1.11	Furil	CF ₃	F/F	-1,219	-1,921	-1,183	100	5,2
1.15	Naftil	CF ₃	F/F	-1,232	-1,923	-1,196	100	3,9
1.17	Me	CF ₃	F/F	-1,213	-1,923	-1,179	100	0,39
1.18	Et	CF ₃	Cl/Cl	-1,126	-1,846	-1,093	100	0,78
1.22	i-prop	CF ₃	F/F	-1,219	-1,908	-1,180	23	>25
1.24	t-but	CF ₃	F/F	-1,214	-1,960	-1,176	30	4,9
1.26	Cl-Ph	CF ₃	F/F	-1,213	-1,915	-1,176	100	2,5
3.1	Cl-Ph-pipe	CF ₃	H/H	-1,374	-2,064	-1,341	100	0,79
3.2	Ph-pipe	CF ₃	H/H	-1,382	-2,113	-1,348	100	0,76
4.1	Ph	CHF ₂	H/H	-1,434	-1,99 (hb)	-1,400	36	>25
4.2	Ph	CHF ₂	H/CH ₃ O	-1,493	-1,99 (hb)	-1,458	100	10
4.4	Ph	CHF ₂	H/Cl	-1,325	-1,975	-1,291	100	6,4
4.5	Ph	CHF ₂	Cl/Cl	-1,225	-1,872	-1,189	100	4,7
4.6	Ph	CHF ₂	H/F	-1,370	-1,974	-1,334	100	6,3
B1	O-Et	-CH ₃	CH ₃ /CH ₃	-1,709	-2,272	-1,677	1	N.R.
B.12	O-Et	-CH ₃	Cl/Cl	-1,403	-1,954	-1,370	32	N.R.
B.6	O-Me	-CH ₃	Cl/Cl	-1,399	-1,934	-1,366	66	N.R.
5.3	O-Me	-CF ₃	H/H	-1,346	-2,099	-1,313	96,1	13,7
5.4	O-Me	-CF ₃	CH ₃ /CH ₃	-1,392	-2,11	-1,359	91,6	5,0
5.6	O-Me	-CF ₃	Cl/Cl	-1,109	-1,799	-1,076	100	10,8
5.7	O-Me	-CF ₃	H/F	-1,243	-1,994	-1,211	100	3,5
5.8	O-Me	-CF ₃	F/F	-1,193	-1,916	-1,160	100	1,5
5.9	O-Me	-CF ₃	H/CF ₃	-1,117	-1,872	-1,081	100	5,0
5.10	O-Et	-CF ₃	H/H	-1,312	-2,12	-1,281	100	4,0
5.11	O-Et	-CF ₃	H/CH ₃ O	-1,389	-2,282	-1,357	100	4,8
5.12	O-Et	-CF ₃	H/CH ₃	-1,357	-2,209	-1,324	100	4,8
5.14	O-Et	-CF ₃	H/Cl	-1,208	-1,967	-1,174	100	1,8
5.15	O-Et	-CF ₃	Cl/Cl	-1,113	-1,784	-1,081	100	2,9
5.16	O-Et	-CF ₃	H/F	-1,248	-1,997	-1,216	100	3,3
5.17	O-Et	-CF ₃	F/F	-1,194	-1,911	-1,161	100	0,4
Nfx							100	7,7

^aPorcentaje de inhibición del crecimiento a 25 μM. ^bCI₅₀: concentración inhibitoria 50 (μM) ^cNo realizado.

51. Resultados y discusión de los estudios biológicos de mecanismo de acción

51.1. Estudio de actividad inhibitoria sobre deshidrogenasas mitocondriales

Es bien conocido que muchos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido son especies químicas que sufren un proceso de bioreducción en condiciones de hipoxia para producir OH[•] y metabolitos reducidos¹⁸⁴. Debido a esto, se propuso la idea de que estos nuevos derivados pudieran ejercer daño sobre el parásito a través de la producción de especies radicales que afectaran al metabolismo redox.^{218,239,345} En un intento de investigar el modo en que estas quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido actúan sobre los parásitos, se estudió el efecto sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales, enzimas directamente relacionadas con el metabolismo redox del parásito. Recientemente, se demostró que estas enzimas podrían estar envueltas en el mecanismo de acción de heterociclos que contenían grupos *N*-óxido, como furoxanos y benzofuroxanos, de estructura muy relacionada con las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido.^{95,242} El porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales con respecto al control no tratado se determinó empleando el ensayo colorimétrico del MTT a tiempos muy cortos, no superiores a 240 minutos de incubación, un procedimiento descrito para el parásito leishmania.³⁴⁶ En el ensayo se estudiaron 4 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, seleccionados por su variabilidad estructural y elevada actividad frente a *T. cruzi*. Los compuestos evaluados fueron el compuesto **P1**, previamente publicado,²¹⁸ y que se eligió por su elevada actividad y diferencia estructural con los nuevos derivados sintetizados presentados en este trabajo, y tres nuevos derivados que presentan el grupo trifluorometilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina (Compuestos **1.7**, **1.1** y **1.17**). Además, se introdujo en el ensayo el fármaco de referencia Nfx. La estructura de los derivados evaluados se muestra en la **Tabla 44**.

Tabla 44. Estructura de los derivados de quinoxalina 1,4 di-*N*-óxido estudiados.

Compuesto	R ₂	R ₃	R ₆ /R ₇
P1	-S-Ph	CH ₃	Cl/Cl
1.1	-CO-Ph	CF ₃	H/H
1.7	-CO-Ph	CF ₃	F/F
1.17	-CO-CH ₃	CF ₃	F/F

Los resultados obtenidos en el ensayo para los 4 compuestos y el Nfx se muestran en la **Figura 90 a)**, donde se representa el porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales

(Pmdh (%)) en los diferentes tiempos de incubación (30, 60, 90 y 120 minutos) con respecto al control sin tratar que se toma como el 100 % de actividad.

Observando la gráfica mostrada en la **Figura 90 a)** y los datos de la **tabla 45** se ve como los 4 derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido estudiados producen una disminución de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales de una forma dependiente con el tiempo de incubación, al contrario de lo que ocurre con el control no tratado. Se observa claramente como el Nfx no afecta a la actividad de deshidrogenasas mitocondriales ya que la actividad se mantiene en el 100 % a 60, 90 y 120 minutos. Dentro de los derivados de quinoxalina, se observa como es el compuesto **P1** el que produce una mayor disminución de la actividad, alcanzando casi un 70 % a los 90 minutos de incubación, seguido por los derivados **1.7** y **1.17**, que muestran resultados similares entre sí, y finalmente el compuesto **1.1**, que es el que provoca una menor disminución, apenas un 20% al máximo tiempo de incubación.

La inhibición observada sobre las deshidrogenasas mitocondriales no se correlaciona bien con la potencia mostrada por los compuestos estudiados frente al parásito *in vitro*. Esto se observa al comparar los resultados de actividad frente al parásito y los porcentajes de inhibición de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales obtenidos, como se muestra en la **Tabla 45**.

Tabla 45. Datos de porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales y actividad *in vitro*.

Compuesto	^a Pmdh (%) 120 min	Actividad <i>in vitro</i>	
		% INH (25 μ M) ^b	CI ₅₀ (μ M) ^c
P1	30	93,0	6,5
1.1	80	100	0,9
1.7	40	100	0,7
1.17	45	100	0,39
Nfx	100	100	7,7

^aPorcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales.

^bPorcentaje de inhibición del crecimiento. Inhibición sobre la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* a una concentración de 25 μ M. Los resultados son el valor medio de 3 experimentos con una desviación estándar menor al 10%.

^cConcentración inhibitoria 50. Los resultados son el valor medio de 3 experimentos con una desviación estándar menor al 10%.

Al comparar los compuestos **P1** y **1.1** se observa que la importante diferencia en los resultados de inhibición de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales no tiene un efecto directo sobre la actividad *in vitro* mostrada frente al parásito. Estos resultados parecen indicar que efectivamente los nuevos derivados afectan a la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, sin embargo, otros fenómenos deben estar también involucrados en el modo de acción de esta familia de compuestos.

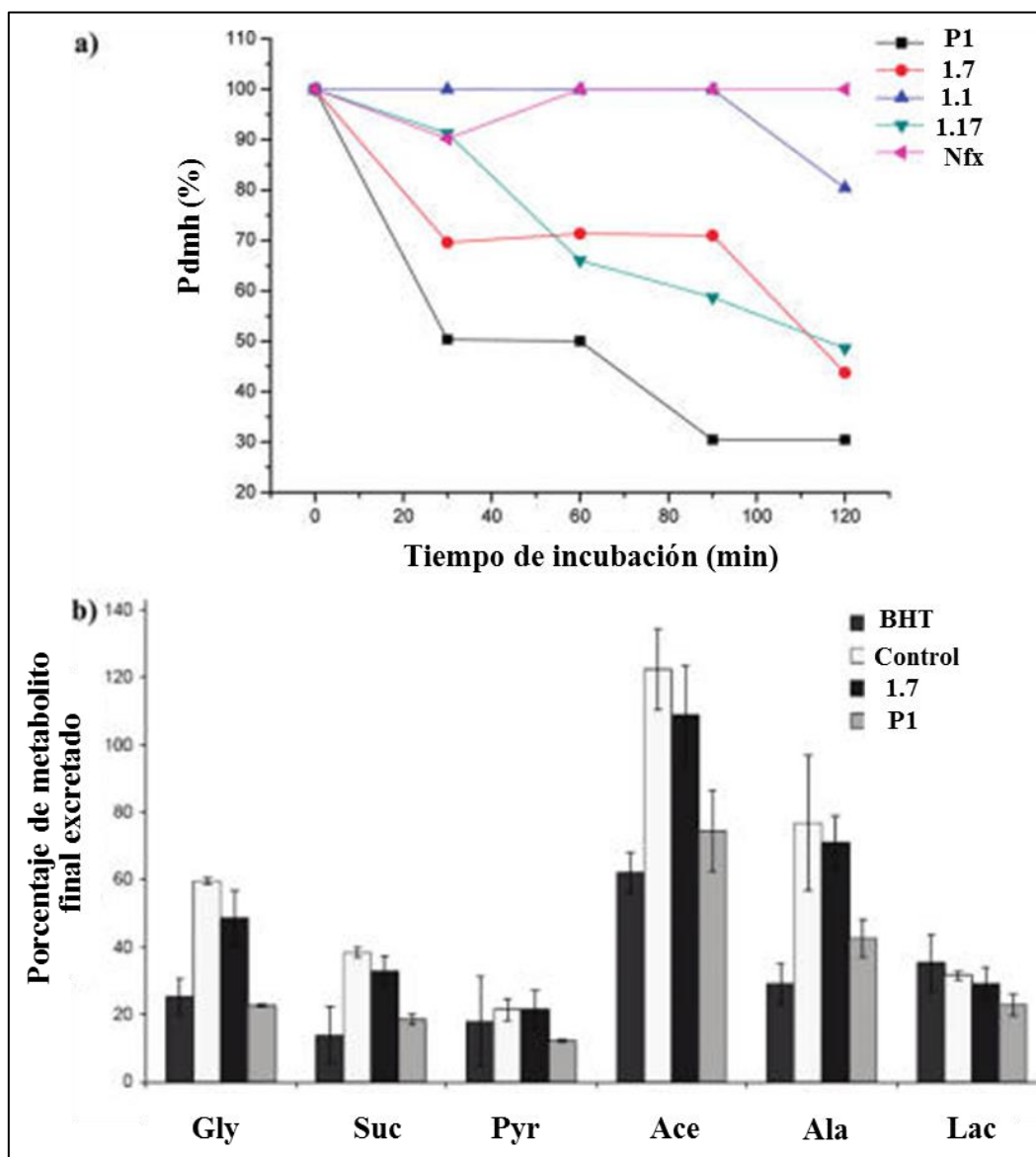


Figura 90. a) Variación del porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales (Pdmh(%)) producido por los diferentes compuestos a los diferentes tiempos de exposición sobre epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* en comparación con el control no tratado (100%); b) Porcentaje de metabolitos finales excretados al medio tras el tratamiento con los diferentes compuestos, expresado respecto a la DMF,³⁴⁷ medido en epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*.

51.2. Estudio de los metabolitos excretados por *T. cruzi*

Con el objetivo de estudiar los posibles cambios en las rutas bioquímicas promovidos por los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, se estudiaron las posibles modificaciones en el patrón de metabolitos excretados por los parásitos en cultivo, empleando para su identificación la espectroscopía de RMN-¹H. Este tipo de estudios ha sido comprobado que son una herramienta útil en la elucidación del mecanismo de acción.^{242,348-350} Para ello se compararon los espectros de RMN-¹H del medio de los parásitos tratados con los derivados de quinoxalina con los no tratados utilizados como control negativo. El estudio se centró en los cambios de las sales

excretadas de los ácidos carboxílicos lactato (Lac), acetato (Ace), piruvato (Pyr) y succinato (Suc), y los aminoácidos alanina (Ala) y glicina (Gly), por ser los metabolitos modificados más relevantes. En la **Figura 90 b)** se muestran los cambios en la cantidad de metabolito final excretado al medio en el control negativo sin tratamiento, en los parásitos tratados con los derivados de quinoxalina **P1** y **1.7**, y en el control positivo, parásitos tratados con BHT, un inhibidor de la respiración mitocondrial. Ambos compuestos estudiados (**P1** y **1.7**) mostraron, como se ha visto en el punto anterior, grandes efectos sobre las deshidrogenasas mitocondriales desde el comienzo de la incubación.

Los resultados obtenidos (**Figura 90 b)**) muestran como el compuesto **P1** promueve una mayor disminución en las concentraciones de los metabolitos finales estudiados que el derivado **1.7**. Los bajos niveles de ace y suc excretados en el caso de parásitos tratados con el compuesto **P1** comparado con los niveles obtenidos con el compuesto **1.7** podría ser debido a que el compuesto **P1** es un mejor inhibidor de deshidrogenasas mitocondriales, ya que la succinato deshidrogenasa y la fumarato reductasa mitocondriales son complejos enzimáticos muy homólogos, por lo tanto, muchos inhibidores de succinato deshidrogenasa podrían inhibir a su vez a la fumarato reductasa. El escaso efecto observado para el derivado **1.7** no explica la elevada actividad *in vitro* que posee, por lo tanto serán necesario más estudios para profundizar en el mecanismo de acción por el cual este tipo de derivados presentan una elevada actividad frente a *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Esta memoria recoge el trabajo de diseño, síntesis y caracterización de cincuenta y siete nuevos derivados de 2-difluorometilquinoxalina y 3-trifluorometilquinoxalina. Se presentan también los resultados de actividad biológica *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* obtenidos para un total de setenta y nueve derivados de quinoxalina y una revisión de los resultados de actividad *in vitro* obtenidos por el grupo de trabajo desde el año 1.999 para una gran variedad de derivados de quinoxalina. La evaluación biológica *in vitro* ha sido realizada por el Grupo de Química Medicinal de la Universidad de la República de Montevideo.

A su vez, se relizaron estudios de mutagenicidad, citotoxicidad y ensayos preliminares *in vivo* de una selección de los nuevos derivados presentados. Estos estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Navarra, en el Grupo de Química Medicinal de la Universidad de la República y en el Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción, respectivamente.

Se incluyen estudios de mecanismo de acción, tanto biológicos, desarrollados por el Grupo de Química Medicinal de la Universidad de la República, como electroquímicos, realizados a través de una colaboración con el Departamento de Química de la Southeast Missouri State University.

El desarrollo de este proyecto de investigación ha dado lugar a tres artículos científicos.

El trabajo descrito en esta memoria ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha optimizado un método de síntesis de quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido a través de la reacción de Beirut gracias a la utilización de la síntesis asistida por microondas. El nuevo método optimizado ha ofrecido importantes ventajas, destacando el aumento en los rendimientos y la disminución de los tiempos de reacción.

2. Se ha puesto a punto un método sintético para llevar a cabo una sustitución nucleofílica aromática sobre los átomos de flúor de las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina empleando aminas heterocíclicas como nucleófilo el cual ha ofrecido buenos rendimientos en cortos tiempos de reacción.

3. Gracias al estudio de los acoplamientos de protones a larga distancia mediante un experimento NOESY se ha conseguido comprobar que la sustitución nucleofílica aromática de los derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido disustituidos por átomos halógenos en las posiciones 6 y 7 se da preferentemente en la posición 7, obteniéndose el derivado 7-sustituido en proporción mayoritaria.

4. Más del 90% de los derivados evaluados frente a la forma epimastigote de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* han mostrado un valor de CI_{50} inferior al fármaco de referencia Nifurtimox. Los derivados **1.1**, **1.7**, **1.17**, **1.18**, **1.19**, **1.31**, **1.34**, **3.1**, **3.2**, **5.17**, **5.18** y **6.12** han sido identificados como los más activos frente a esta cepa mostrando valores de $CI_{50} \leq a 1 \mu M$.

5. Los resultados de actividad *in vitro* obtenidos han permitido establecer una serie de relaciones estructura-actividad. La presencia de sustituyentes electroatrayentes, en especial el grupo trifluorometilo en la posición 3 del anillo de quinoxalina se establece como determinante para la actividad anti-*T. cruzi in vitro*, mejorando considerablemente los resultados previamente obtenidos por el grupo. Estos datos confirman la hipótesis de trabajo planteada.

Los resultados obtenidos indican que la sustitución de las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina por un grupo electroatrayente potencia la actividad anti-*T. cruzi*.

Con respecto a la posición 2 del anillo de quinoxalina, la presencia del grupo carbonilo se considera importante para la actividad anti-*T. cruzi*. En base a la alta variabilidad de sustituyentes unidos al grupo carbonilo presentada por los derivados más activos, el tipo de sustituyente empleado en esta posición no se considera determinante para la actividad frente a *Trypanosoma cruzi*.

Los grupos *N*-óxido han demostrado ser importantes en la actividad, pero los buenos resultados ofrecidos por derivados reducidos de la **serie 6** y la implicación que este grupo puede tener en los índices de selectividad obtenidos lleva a proponer como objetivo el profundizar en el estudio de la actividad biológica de nuevos derivados reducidos en esta posición.

6. Los derivados **1.1** y **1.7** han mostrado una actividad *in vitro* frente a las formas epimastigotes del clon CL Brener y las cepas Y y Colombiana de *T. cruzi* superior al fármaco de referencia Nifurtimox. Además, el derivado **1.7** presenta un elevado porcentaje de inhibición frente a la forma tripomastigote del clon CL Brener de *T. cruzi*.

7. Los derivados **1.17**, **3.2**, **1.7** y **3.1** han mostrado, respectivamente, los mejores índices de selectividad frente al parásito tras la evaluación de la citotoxicidad frente a la línea celular de macrófagos murinos J-744, si bien, los resultados indican que la citotoxicidad mostrada por los nuevos derivados presentados es un parámetro que debe ser mejorado.

8. En la evaluación de la mutagenicidad llevada a cabo con veinte de los nuevos derivados presentados, los derivados **1.7**, **1.17**, **5.9**, **5.15** y **5.18** no han mostrado mutagenicidad en las condiciones de ensayo empleadas. Los resultados obtenidos muestran una relación entre la estructura de los nuevos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido evaluados y los resultados de mutagenicidad obtenidos. Todos los derivados con sustituyentes electroatrayentes en las posiciones 6 y/o 7 del anillo de quinoxalina o no sustituidos en esas posiciones han resultado no mutagénicos o su mutagenicidad desaparecía tras su metabolización, mientras que los derivados con sustituyentes electrodonantes presentan una elevada mutagenicidad. El grupo trifluorometilo de la posición 3 del anillo de quinoxalina parece ser importante en la prevención de la aparición de mutagenicidad.

9. Los estudios electroquímicos han demostrado que la introducción de sustituyentes electroatrayentes en las posiciones 3, 6 y 7 del anillo de quinoxalina conduce a potenciales de reducción menos negativos y facilitan la bio-reducción de los compuestos. La relación encontrada entre el comportamiento electroquímico y la actividad antichagásica de los compuestos

corroborar la hipótesis de que este tipo de derivados puedan ser activados por un proceso de bio-reducción generando especies más activas.

10. Los estudios de mecanismo de acción llevados a cabo con los derivados **1.1**, **1.7** y **1.17** mostraron que los tres compuestos poseían actividad inhibitoria sobre deshidrogenasas mitocondriales, sin embargo, esta no explica completamente su elevada actividad biológica *in vitro*. Se identificaron los metabolitos finales excretados por los parásitos tras el tratamiento con el derivado **1.7** no observándose modificaciones significativas en las rutas metabólicas estudiadas con respecto al control.

11. Los derivados **1.7** y **1.17** mostraron un buen comportamiento en los ensayos *in vivo* en un modelo de ratón de infección aguda con *T. cruzi*. Ambos derivados mostraron elevados valores de supervivencia animal al final del estudio e hicieron desaparecer el segundo pico de máxima parasitemia observado tras el tratamiento con el fármaco de referencia Benznidazol. Los resultados obtenidos hacen que se propongan para una mayor profundización de los estudios *in vivo*.

12. En base a los prometedores resultados, se propone el compuesto **1.17** para su profundización en estudios de actividad biológica y como compuesto líder para la optimización de la estructura.

REFERENCIAS

Referencias

- (1) <http://www.PAHO.org>
- (2) Noireau, F.; Diosque, P.; Jansen, A. M.: "*Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts". *Veterinary research*, **2009**, *40*, 26.
- (3) World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva, Switzerland, **2008**. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>
- (4) Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee (2000: Brasilia, Brasil). Technical report series n° 905. Geneva: World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>.
- (5) Fernandes, A.; Iñiguez, A. M.; Lima, V. S.; Souza, S. M.; Ferreira, L. F.; Vicente, A. C.; Jansen, A. M.: "Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruacu Valley, Minas Gerais, Brazil". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2008**, *103*, 514-6.
- (6) Araujo, A.; Jansen, A. M.; Reinhard, K.; Ferreira, L. F.: "Paleoparasitology of Chagas disease, a review". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104* Suppl 1, 9-16.
- (7) Moncayo, A.: "Commentary: the lucid reasoning of Carlos Chagas". *International journal of epidemiology*, **2008**, *37*, 695-6.
- (8) Moncayo, A.: "Carlos Chagas: biographical sketch". *Acta tropica*, **2010**, *115*, 1-4.
- (9) Coura, J. R.; Dias, J. C.: "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104* Suppl 1, 31-40.
- (10) Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E.; Franco-Paredes, C.; Ault, S. K.; Periago, M. R.: "The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination". *PLoS neglected tropical diseases*, **2008**, *2*, e300.
- (11) Sachs, J. D.; McArthur, J. W.: "The Millennium Project: a plan for meeting the Millennium Development Goals". *Lancet*, **2005**, *365*, 347-53.
- (12) Franco-Paredes, C.; Von, A.; Hidron, A.; Rodriguez-Morales, A. J.; Tellez, I.; Barragan, M.; Jones, D.; Naquira, C. G.; Mendez, J.: "Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America". *BMC international health and human rights*, **2007**, *7*, 7.
- (13) First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, **2010**. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
- (14) Gourbiere, S.; Dorn, P.; Tripet, F.; Dumonteil, E.: "Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control". *Heredity* **2012**, *108*, 190-202.
- (15) Miles, M. A.; Feliciangeli, M. D.; de Arias, A. R.: "American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies". *BMJ*, **2003**, *326*, 1444-1448.
- (16) Argolo, A. M.; Félix M.; Pacheco, R.; Costa, J.: "*La enfermedad de Chagas y sus principales vectores en Brasil*". Fundação Oswaldo Cruz. Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC). Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, Brasil, **2008**. Disponible at: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/media/VersionenEspanol.pdf
- (17) Reporte sobre la enfermedad de Chagas, Grupo de trabajo científico 17–20 de abril de 2005 - Actualizado en julio de **2007** - Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/en/>.
- (18) Wendel, S.: "Transfusion transmitted Chagas disease: is it really under control?". *Acta tropica* **2010**, *115*, 28-34.
- (19) Schmunis, G. A.: "Risk of Chagas disease through transfusions in the Americans". *Medicina (B Aires)*, **1999**, *59* Suppl 2, 125-34.

- (20) Schmunis, G. A.: Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1999**, *94 Suppl 1*, 93-101.
- (21) Kirchhoff, L. V.; Paredes, P.; Lomeli-Guerrero, A.; Paredes-Espinoza, M.; Ron-Guerrero, C. S.; Delgado-Mejia, M.; Pena-Munoz, J. G.: Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion*, **2006**, *46*, 298-304.
- (22) Torrico, F.; Alonso-Vega, C.; Suarez, E.; Rodriguez, P.; Torrico, M. C.; Dramaix, M.; Truyens, C.; Carlier, Y.: "Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **2004**, *70*, 201-9.
- (23) Jercic, M. I.; Mercado, R.; Villarroel, R.: "Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic". *Journal of clinical microbiology*, **2010**, *48*, 3824-6.
- (24) Toso, A.; Vial, F.; Galant, N.: "Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral". *Rev Med Chile*, **2011**, *139*, 258-266.
- (25) Ferreira C. S., M. P., Amato Neto V., Cruz R.: "Technical report pasteurization of human milk to prevent transmission of chagas disease". *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **2001**, *43*, 161-162.
- (26) Herwaldt, B. L.: "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures". *Clinical microbiology reviews*, **2001**, *14*, 659-88, table of contents.
- (27) Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. (Documento OPS/HDM/CD/425.06.). Washington (DC), EUA. Washington (DC): OPS; **2006**.
- (28) Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.: "Chagas disease". *Lancet*, **2010**, *375*, 1388-1402.
- (29) Moncayo, A.; Silveira, A. C.: "Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104 Suppl 1*, 17-30.
- (30) 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**.
- (31) www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr36/en/index.html.
- (32) Reithinger, R.; Tarleton, R. L.; Urbina, J. A.; Kitron, U.; Gürtler, R. E.: "Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap". *BMJ*, **2009** *338*, b1283.
- (33) Martins-Melo, F. R.; Alencar, C. H.; Ramos, A. N., Jr.; Heukelbach, J.: "Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007". *PLoS neglected tropical diseases*, **2012**, *6*, e1508.
- (34) Kirchhoff, L. V.: "Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease)". *Advances in parasitology*, **2011**, *75*, 1-18.
- (35) Schmunis, G. A.: "Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2007**, *102 Suppl 1*, 75-85.
- (36) Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M. J.: "Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries". *Acta tropica*, **2010**, *115*, 22-7.
- (37) Coura, J. R.; Viñas, P. A.: "Chagas disease: a new worldwide challenge". *Nature*, **2010**, *465*, S6-7.
- (38) Schmunis, G. A.; Yadon, Z. E.: "Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem". *Acta tropica*, **2010**, *115*, 14-21.
- (39) Bern, C.; Montgomery, S. P.: "An estimate of the burden of Chagas disease in the United States". *Clin Infect Dis.*, **2009**, *49 (5)*: e52-e54.

- (40) Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M. J.; Montgomery, S. P.: "Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States". *Clinical microbiology reviews*, **2011**, *24*, 655-681.
- (41) Milei, J.; Guerri-Guttenberg, R. A.; Grana, D. R.; Storino, R.: "Prognostic impact of Chagas disease in the United States". *American heart journal*, **2009**, *157*, 22-29.
- (42) Guerri-Guttenberg, R. A.; Grana, D. R.; Ambrosio, G.; Milei, J.: "Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared!". *European heart journal*, **2008**, *29*, 2587-2591.
- (43) Guerri-Guttenberg, R. A.; Di Girolamo, C.; Ciannamio, A.; Milei, J.: "Migration flow and imported diseases: chronic chagasic cardiomyopathy". *Giornale italiano di cardiologia*, **2009**, *10*, 234-240.
- (44) Pérez-Arellano, J.L.: "Enfermedad de Chagas en España". *Revista Clínica Española*, **2012**, *212*, 344-346.
- (45) Enfermedad de Chagas y donación de sangre. Coordinadora: Dra. Rosario Arrieta Gallastegui, Secretaría General de Sanidad, Ministerio de Sanidad y Política Social, Gobierno de España. Obtenido en: <http://www.msps.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/informeChagasJulio09.pdf>
- (46) Ministerio de Sanidad y Política Social, Gobierno de España. Disponible en: <http://www.msps.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/promocion/migracion/docs/enfermedadChagas.pdf>, A. a.
- (47) Muñoz, J.; Gomez i Prat, J.; Gallego, M.; Gimeno, F.; Trevino, B.; Lopez-Chejade, P.; Ribera, O.; Molina, L.; Sanz, S.; Pinazo, M. J.; Riera, C.; Posada, E. J.; Sanz, G.; Portus, M.; Gascon, J.: "Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain)". *Acta tropica*, **2009**, *111*, 51-55.
- (48) Muñoz, J.; Coll, O.; Juncosa, T.; Verges, M.; del Pino, M.; Fumado, V.; Bosch, J.; Posada, E. J.; Hernandez, S.; Fisa, R.; Boguna, J. M.; Gallego, M.; Sanz, S.; Portus, M.; Gascon, J.: "Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain". *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **2009**, *48*, 1736-1740.
- (49) Paricio-Talayero, J. M.; Benlloch-Muncharaz, M. J.; Collar-del-Castillo, J. I.; Rubio-Soriano, A.; Serrat-Perez, C.; Magraner-Egea, J.; Landa-Rivera, L.; Sanchez-Palomares, M.; Beseler-Soto, B.; Santos-Serrano, L.; Ferriol-Camacho, M.; Mut-Buigues, J.; Tomas-Vila, M.; del Carmen Alonso-Jimenez, M.; Dominguez-Marquez, V.; Igual-Adell, R.: "Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, **2008**, *26*, 609-613.
- (50) Navarro, M.; Norman, F. F.; Perez-Molina, J. A.; Lopez-Velez, R.: "Benznidazole shortage makes chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: data from Spain". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **2012**, *87*, 489-90.
- (51) <http://www.fiocruz.br/chagas>.
- (52) Teixeira, A. R.; Hecht, M. M.; Guimaro, M. C.; Sousa, A. O.; Nitz, N.: "Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity". *Clinical microbiology reviews*, **2011**, *24*, 592-630.
- (53) Urbina, J. A.; Docampo, R.: "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances". *Trends in parasitology*, **2003**, *19*, 495-501.
- (54) Urbina, J. A.: "Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches". *Acta tropica*, **2010**, *115*, 55-68.
- (55) De Souza, W.: "Structural organization of *Trypanosoma cruzi*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104 Suppl 1*, 89-100.
- (56) De Souza, W.: "Cell biology of *Trypanosoma cruzi*". *International review of cytology*, **1984**, *86*, 197-283.

- (57) De Souza, W.: "Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*". *Current pharmaceutical design*, **2002**, *8*, 269-285.
- (58) Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; de Souza, W.: "Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease". *PLoS neglected tropical diseases*, **2012**, *6*, e1749.
- (59) El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B.: "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease". *Science*, **2005**, *309*, 409-415.
- (60) Teixeira, A. R.; Nascimento, R. J.; Sturm, N. R.: "Evolution and pathology in chagas disease, a review". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2006**, *101*, 463-91.
- (61) Di Noia, J. M.; Buscaglia, C. A.; De Marchi, C. R.; Almeida, I. C.; Frasch, A. C.: "A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage". *The Journal of experimental medicine*, **2002**, *195*, 401-13.
- (62) De Freitas, J. M.; Augusto-Pinto, L.; Pimenta, J. R.; Bastos-Rodrigues, L.; Goncalves, V. F.; Teixeira, S. M.; Chiari, E.; Junqueira, A. C.; Fernandes, O.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Pena, S. D.: "Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*". *PLoS pathogens*, **2006**, *2*, e24.
- (63) Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; Second Satellite, M.: "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104*, 1051-1054.
- (64) Risso, M. G.; Sartor, P. A.; Burgos, J. M.; Briceno, L.; Rodriguez, E. M.; Guhl, F.; Chavez, O. T.; Espinoza, B.; Monteon, V. M.; Russomando, G.; Schijman, A. G.; Bottasso, O. A.; Leguizamon, M. S.: "Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **2011**, *84*, 78-84.
- (65) Clayton, J.: "The promise of *T. cruzi* genomics". *Nature*, **2010**, *465*, S16-17.
- (66) Brener, Z.: "Life cycle of *Trypanosoma cruzi*". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **1971**, *13*, 171-178.
- (67) Tyler, K. M.; Engman, D. M.: "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited". *International journal for parasitology*, **2001**, *31*, 472-81.
- (68) Ley, V.; Andrews, N. W.; Robbins, E. S.; Nussenzweig, V.: "Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells". *The Journal of experimental medicine*, **1988**, *168*, 649-659.
- (69) Fernandes, M. C.; Andrews, N. W.: "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence". *FEMS microbiology reviews*, **2012**, *36*, 734-47.
- (70) Andrews, N. W.; Robbins, E.; Ley, V.; Nussenzweig, V.: "Stage-specific surface antigens during the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi*: developmentally regulated expression of a glycosyl-phosphatidylinositol anchored glycoprotein of amastigotes". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1988**, *83 Suppl 1*, 561-572.

- (71) Kleffmann, T.; Schmidt, J.; Schaub, G. A.: "Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis". *The Journal of eukaryotic microbiology*, **1998**, *45*, 548-555.
- (72) Burleigh, B. A. and Andrews, N. W.: "The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells". *Annu. Rev. Microbiol.*, **1995**, *49*, 175-200.
- (73) Yoshida, N.; Cortez, M.: "*Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process". *Sub-cellular biochemistry*, **2008**, *47*, 82-91.
- (74) Rosestolato, C. T.; Dutra Jda, M.; De Souza, W.; de Carvalho, T. M.: "Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells". *Cell structure and function*, **2002**, *27*, 91-98.
- (75) Dvorak, J. A.; Howe, C. L.: "The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells *in vitro*". *The Journal of protozoology*, **1976**, *23*, 534-537.
- (76) Andrews, N. W.: "Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm". *Biological research*, **1993**, *26*, 65-67.
- (77) Prata, A.: "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease". *The Lancet infectious diseases*, **2001**, *1*, 92-100.
- (78) Dutra, W. O.; Gollob, K. J.: "Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease". *Current opinion in infectious diseases*, **2008**, *21*, 287-92.
- (79) Coura, J. R.; Borges-Pereira, J.: "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review". *Acta tropica*, **2010**, *115*, 5-13.
- (80) Braz, L. M.; Amato Neto, V.; Okay, T. S.: "Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **2008**, *50*, 65-66.
- (81) Andrade, Z. A.: "Immunopathology of Chagas disease". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1999**, *94 Suppl 1*, 71-80.
- (82) Aliberti, J. C.; Cardoso, M. A.; Martins, G. A.; Gazzinelli, R. T.; Vieira, L. Q.; Silva, J. S.: "Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes". *Infection and immunity*, **1996**, *64*, 1961-1967.
- (83) Tarleton, R. L.; Sun, J.; Zhang, L.; Postan, M.: "Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease". *Infection and immunity*, **1994**, *62*, 1820-1829.
- (84) Tarleton, R. L.; Zhang, L.: "Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?". *Parasitology today*, **1999**, *15*, 94-99.
- (85) Zhang, L.; Tarleton, R. L.: "Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease". *The Journal of infectious diseases*, **1999**, *180*, 480-486.
- (86) Tarleton, R. L.: "Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease". *International journal for parasitology*, **2001**, *31*, 550-554.
- (87) Benvenuti, L. A.; Roggerio, A.; Freitas, H. F.; Mansur, A. J.; Fiorelli, A.; Higuchi, M. L.: "Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis". *Annals of tropical medicine and parasitology*, **2008**, *102*, 481-487.
- (88) Abel, L. C. J.; Kalil, J.; Cunha-Neto, E.: "Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin". *Braz J Med Biol Res*, **1997**, *30*, 1305-1308.
- (89) Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud/Fundación Oswaldo Cruz: Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Rio de Janeiro, Brasil, **1998**. Disponible en: <http://cidbimena.desastres.hn/filemgmt/files/tratamientochagas.pdf>
- (90) Carod-Artal, F. J.; Gascon, J.: "Chagas disease and stroke". *Lancet neurology*, **2010**, *9*, 533-542.

- (91) Piron, M.; Fisa, R.; Casamitjana, N.; Lopez-Chejade, P.; Puig, L.; Verges, M.; Gascon, J.; Gomez i Prat, J.; Portus, M.; Sauleda, S.: "Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples". *Acta tropica*, **2007**, *103*, 195-200.
- (92) Rodrigues Coura, J.; de Castro, S. L.: "A critical review on Chagas disease chemotherapy". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2002**, *97*, 3-24.
- (93) Moncayo, M. D.: "Cien años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas". *Infectio.*, **2009**, *13*, 243-245.
- (94) Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M.: "Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets". *Expert reviews in molecular medicine*, **2009**, *11*, e31.
- (95) Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernandez, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Denicola, A.: "Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?" *Biochemical pharmacology*, **2010**, *79*, 1736-1745.
- (96) Temperton, N. J.; Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Kelly, J. M.: "Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole". *Molecular and biochemical parasitology*, **1998**, *96*, 167-176.
- (97) Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vasquez, P.; Ferreira, J.; Faundez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A.: "Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host". *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, **2007**, *146*, 601-620.
- (98) Mason, R. P.; Holtzman, J. L.: "The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase". *Biochemical and biophysical research communications*, **1975**, *67*, 1267-1274.
- (99) Diaz de Toranzo, E. G.; Castro, J. A.; Franke de Cazzulo, B. M.; Cazzulo, J. J.: "Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*". *Experientia* **1988**, *44*, 880-881.
- (100) Turens, J. F.; Watts, B. P., Jr.; Zhong, L.; Docampo, R.: "Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives". *Molecular and biochemical parasitology*, **1996**, *82*, 125-9.
- (101) Romanha, A. J.; Alves, R. O.; Murta, S. M.; Silva, J. S.; Ropert, C.; Gazzinelli, R. T.: "Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure". *The Journal of infectious diseases*, **2002**, *186*, 823-828.
- (102) Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Horn, D.; Kelly, J. M.; Cheeseman, I.: "A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, *105*, 5022-5027.
- (103) Wilkinson, S. R.; Bot, C.; Kelly, J. M.; Hall, B. S.: "Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives". *Current topics in medicinal chemistry*, **2011**, *11*, 2072-2084.
- (104) Kubata, B. K.; Kabututu, Z.; Nozaki, T.; Munday, C. J.; Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Lazarus, M.; Maruyama, T.; Martin, S. K.; Duszynko, M.; Urade, Y.: "A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*". *The Journal of experimental medicine*, **2002**, *196*, 1241-1251.
- (105) Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R.: "Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites". *The Journal of biological chemistry*, **2011**, *286*, 13088-13095.
- (106) Piacenza, L.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Radi, R.: "Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection". *Current opinion in microbiology*, **2009**, *12*, 415-421.
- (107) Finzi, J. K.; Chiavegatto, C. W.; Corat, K. F.; Lopez, J. A.; Cabrera, O. G.; Mielniczki-Pereira, A. A.; Colli, W.; Alves, M. J.; Gadelha, F. R.: "*Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide". *Molecular and biochemical parasitology*, **2004**, *133*, 37-43.

- (108) Hall, B. S.; Wilkinson, S. R.: "Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2012**, *56*, 115-123.
- (109) Campillo, N. E.; González-Naranjo, P.; Páez, J. A.: "Presente y futuro en el descubrimiento de fármacos para la Enfermedad de Chagas". *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **2011**, 34-61.
- (110) Urbina, J. A.: "Chemotherapy of Chagas disease". *Current pharmaceutical design*, **2002**, *8*, 287-295.
- (111) Urbina, J. A.: "Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments". *Current opinion in infectious diseases*, **2001**, *14*, 733-741.
- (112) Urbina, J. A.: "Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why". *Journal of molecular medicine*, **1999**, *77*, 332-338.
- (113) Ferraz, M. L.; Gazzinelli, R. T.; Alves, R. O.; Urbina, J. A.; Romanha, A. J.: "Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection".
- (114) Ferraz, M. L.; Gazzinelli, R. T.; Alves, R. O.; Urbina, J. A.; Romanha, A. J.: "The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2007**, *51*, 1359-1364.
- (115) Courtney, R.; Pai, S.; Laughlin, M.; Lim, J.; Batra, V.: "Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2003**, *47*, 2788-2795.
- (116) Disponible en: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>
- (117) Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S. N.: "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man". *Nature reviews. Microbiology*, **2005**, *3*, 251-261.
- (118) Garzoni, L. R.; Caldera, A.; Meirelles Mde, N.; de Castro, S. L.; Docampo, R.; Meints, G. A.; Oldfield, E.; Urbina, J. A.: "Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*". *International journal of antimicrobial agents*, **2004**, *23*, 273-285.
- (119) Bouzahzah, B.; Jelicks, L. A.; Morris, S. A.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B.: "Risedronate in the treatment of Murine Chagas' disease". *Parasitology research*, **2005**, *96*, 184-187.
- (120) Cazzulo, J. 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.
- (121) Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.: "A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2007**, *51*, 3932-3939.
- (122) Barr, S. C.; Warner, K. L.; Kornreic, B. G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J. H.: "A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2005**, *49*, 5160-5161.
- (123) Romeiro, N. C.; Aguirre, G.; Hernandez, P.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Aldana, I.; Perez-Silanes, S.; Monge, A.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.: "Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2009**, *17*, 641-652.
- (124) Paulino, M.; Iribarne, F.; Dubin, M.; Aguilera-Morales, S.; Tapia, O.; Stoppani, A. O.: "The chemotherapy of chagas' disease: an overview". *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2005**, *5*, 499-519.
- (125) Fairlamb, A. H.; Cerami, A.: "Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida". *Annual review of microbiology*, **1992**, *46*, 695-729.
- (126) Schmidt, A.; Krauth-Siegel, R. L.: "Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development". *Current topics in medicinal chemistry*, **2002**, *2*, 1239-1259.

- (127) Neres, J.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T.: "Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease". *Drug discovery today*, **2008**, *13*, 110-117.
- (128) Neres, J.; Brewer, M. L.; Ratier, L.; Botti, H.; Buschiazzi, A.; Edwards, P. N.; Mortenson, P. N.; Charlton, M. H.; Alzari, P. M.; Frasch, A. C.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T.: "Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase from in silico screening". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2009**, *19*, 589-596.
- (129) Kim, J. H.; Ryu, H. W.; Shim, J. H.; Park, K. H.; Withers, S. G.: "Development of new and selective *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors from sulfonamide chalcones and their derivatives". *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **2009**, *10*, 2475-2479.
- (130) Buchini, S.; Buschiazzi, A.; Withers, S. G.: "A new generation of specific *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors". *Angewandte Chemie*, **2008**, *47*, 2700-2703.
- (131) <http://www.clinicaltrials.gov>.
- (132) <http://www.isglobal.org/-/clinical-trial-of-new-drug-for-chronic-chagas-disease>.
- (133) Parodi, C.; Padilla, A. M.; Basombrio, M. A.: "Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104 Suppl 1*, 288-294.
- (134) Basso, B.; Castro, I.; Introini, V.; Gil, P.; Truyens, C.; Moretti, E.: "Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Vaccine*, **2007**, *25*, 3855-3858.
- (135) Camargo, E. P.: "Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2009**, *104 Suppl 1*, 275-280.
- (136) Wizel, B.; Garg, N.; Tarleton, R. L.: "Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection". *Infection and immunity*, **1998**, *66*, 5073-5081.
- (137) Sanchez-Burgos, G.; Mezquita-Vega, R. G.; Escobedo-Ortegon, J.; Ramirez-Sierra, M. J.; Arjona-Torres, A.; Ouaiissi, A.; Rodrigues, M. M.; Dumonteil, E.: "Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice". *FEMS immunology and medical microbiology*, **2007**, *50*, 333-341.
- (138) Machado, A. V.; Cardoso, J. E.; Claser, C.; Rodrigues, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Bruna-Romero, O.: "Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase". *Human gene therapy*, **2006**, *17*, 898-908.
- (139) Costa, F.; Franchin, G.; Pereira-Chioccola, V. L.; Ribeiro, M.; Schenkman, S.; Rodrigues, M. M.: "Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice". *Vaccine*, **1998**, *16*, 768-774.
- (140) Giddings, O. K.; Eickhoff, C. S.; Sullivan, N. L.; Hoft, D. F.: "Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges". *Infection and immunity*, **2010**, *78*, 1333-1338.
- (141) Cazorla, S. I.; Frank, F. M.; Becker, P. D.; Arnaiz, M.; Mirkin, G. A.; Corral, R. S.; Guzman, C. A.; Malchiodi, E. L.: "Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection". *The Journal of infectious diseases*, **2010**, *202*, 136-144.
- (142) Carta, A.; Loriga, M.; Piras, S.; Paglietti, G.; La Colla, P.; Busonera, B.; Collu, G.; Loddo, R.: "Synthesis of variously substituted 3-phenoxyethyl quinoxalin-2-ones and quinoxalines capable to potentiate in vitro the antiproliferative activity of anticancer drugs in multi-drug resistant cell lines". *Medicinal chemistry*, **2006**, *2*, 113-122.
- (143) Alleca, S.; Corona, P.; Loriga, M.; Paglietti, G.; Loddo, R.; Mascia, V.; Busonera, B.; La Colla, P.: "Quinoxaline chemistry. Part 16. 4-substituted anilino and 4-substituted phenoxyethyl pyrrolo[1,2-a]quinoxalines and N-[4-(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino and hydroxymethyl]benzoyl glutamates. Synthesis and evaluation of in vitro biological activity". *Farmaco*, **2003**, *58*, 639-650.

- (144) Waring, M. B.-H., T.; Kotchevar, A.; Ramdani, A.; Touzani, T.; Elkadiri, S.; Hakkou, A.; Bouakka, M.; Ellis, T.: "2,3-Bifunctionalized quinoxalines: synthesis, DNA interactions and evaluation of anticancer, anti-tuberculosis and antifungal activity." *Molecules*, **2002**, *7*, 641-656.
- (145) Sanna, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Zanetti, S.; Sechi, L.: "Preparation and biological evaluation of 6/7-trifluoromethyl(nitro)-, 6,7-difluoro-3-alkyl (aryl)-substituted-quinoxalin-2-ones". Part 3.
- (146) Sanna, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Zanetti, S.; Sechi, L.: "Synthesis of substituted 2-ethoxycarbonyl- and 2-carboxyquinoxalin-3-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity". *Farmaco*, **1998**, *53*, 455-461.
- (147) Sanna, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Zanetti, S.; Sechi, L.: "Synthesis of 3,6,7-substituted-quinoxalin-2-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity". Part 2. *Farmaco*, **1999**, *54*, 161-168.
- (148) Corona, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Vitale, G.; Paglietti, G.: "Synthesis and in vitro antitumor activity of new quinoxaline derivatives2. *European journal of medicinal chemistry*, **2009**, *44*, 1579-1591.
- (149) Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C.: "Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazine and quinoxaline derivatives". *Journal of medicinal chemistry*, **2002**, *45*, 5604-5606.
- (150) Carta, A.; Piras, S.; Loriga, G.; Paglietti, G.: "Chemistry, biological properties and SAR analysis of quinoxalinones". *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2006**, *6*, 1179-1200.
- (151) Carta, A.; Loriga, M.; Zanetti, S.; Sechi, L. A.: "Quinoxalin-2-ones. Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3-halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety". *Farmaco*, **2003**, *58*, 1251-1255.
- (152) Carta, A.; Sanna, P.; Loriga, M.; Setzu, M. G.; La, C. P.; Loddo, R.: "Synthesis and evaluation for biological activity of 3-alkyl and 3-halogenoalkyl-quinoxalin-2-ones variously substituted". Part 4. *Farmaco*, **2002**, *57*, 19-25.
- (153) Carta, A.; Paglietti, G.; Rahbar Nikookar, M. E.; Sanna, P.; Sechi, L.; Zanetti, S.: "Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with in vitro antimycobacterial and anticandida activity". *European journal of medicinal chemistry*, **2002**, *37*, 355-366.
- (154) Willardsen, J. A.; Dudley, D. A.; Cody, W. L.; Chi, L.; McClanahan, T. B.; Mertz, T. E.; Potoczak, R. E.; Narasimhan, L. S.; Holland, D. R.; Rapundalo, S. T.; Edmunds, J. J.: "Design, synthesis, and biological activity of potent and selective inhibitors of blood coagulation factor Xa". *Journal of medicinal chemistry*, **2004**, *47*, 4089-4099.
- (155) Ries, U. J.; Pripke, H. W.; Huel, N. H.; Handschuh, S.; Mihm, G.; Stassen, J. M.; Wienen, W.; Nar, H.: "Heterocyclic thrombin inhibitors. Part 2: quinoxalinone derivatives as novel, potent antithrombotic agents". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2003**, *13*, 2297-2302.
- (156) Gomtsyan, A.; Bayburt, E. K.; Schmidt, R. G.; Zheng, G. Z.; Perner, R. J.; Didomenico, S.; Koenig, J. R.; Turner, S.; Jinkerson, T.; Drizin, I.; Hannick, S. M.; Macri, B. S.; McDonald, H. A.; Honore, P.; Wismer, C. T.; Marsh, K. C.; Wetter, J.; Stewart, K. D.; Oie, T.; Jarvis, M. F.; Surowy, C. S.; Faltynek, C. R.; Lee, C. H.: "Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain: structure-activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinazoline, phthalazine, quinoxaline, and cinnoline moieties". *Journal of medicinal chemistry*, **2005**, *48*, 744-752.
- (157) Manca, P.; Peana, A.; Savelli, F.; Mulé, A.; Pirisino, G.: "Antispasmodic activity of tert-aminoalkyl derivatives of 3-benzyl-, 3-benzylaza- and 3-benzyl diazaquinoxalinones". *Il Farmaco; edizione scientifica*, **1992**, *47*, 519-522.
- (158) Mule, A.; Pirisino, G.; Manca, P.; Satta, M.; Peana, A.; Savelli, F.: "Tert-aminoalkyl derivatives of quinoxalinones, aza- and diazaquinoxalinones with analgesic activity". *Il Farmaco; edizione scientifica*, **1988**, *43*, 613-618.
- (159) Abu-Hashem, A. A.; Gouda, M. A.; Badria, F. A.: "Synthesis of some new pyrimido[2',1':2,3]thiazolo[4,5-b]quinoxaline derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents". *European journal of medicinal chemistry*, **2010**, *45*, 1976-1981.
- (160) Burguete, A.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Ancizu, S.; Villar, R.; Solano, B.; Moreno, E.; Torres, E.; Perez, S.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis and biological evaluation of new

- quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-inflammatory agents". *Chemical biology & drug design*, **2011**, *77*, 255-267.
- (161) Burguete, A.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Villar, R.; Vicente, E.; Solano, B.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2007**, *17*, 6439-6443.
- (162) Olayiwola, G.; Obafemi, C. A.; Taiwo, F. O.: "Synthesis and neuropharmacological activity of some quinoxalinone derivatives". *African Journal of Biotechnology*, **2007**, *6*, 777-786.
- (163) Tang, A. H.; Franklin, S. R.; Himes, C. S.; Ho, P. M.: "Behavioral effects of U-78875, a quinoxalinone anxiolytic with potent benzodiazepine antagonist activity". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **1991**, *259*, 248-254.
- (164) von Voigtlander, P. F.; Collin, R. J.; Watien, F.; Christensen, A.; Jensen, L. H.; Honoré, T.: "The discovery of panadiplon, a benzodiazepine antagonist anxiolytic". *Pharmacologist*, **1990**, *32*, 136.
- (165) Honore, T.; Davies, S. N.; Drejer, J.; Fletcher, E. J.; Jacobsen, P.; Lodge, D.; Nielsen, F. E.: "Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists". *Science*, **1988**, *241*, 701-703.
- (166) Patel, M.; Mc Hugh, R. J.; Cordova, B. C.; Klabe, R. M.; Erickson-Viitanen, S.; Trainor, G. L.; Rodgers, J. D.: "Synthesis and evaluation of quinoxalinones as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2000**, *10*, 1729-1731.
- (167) Kleim, J. P.; Winters, M.; Dunkler, A.; Suarez, J. R.; Riess, G.; Winkler, I.; Balzarini, J.; Oette, D.; Merigan, T. C.: "Antiviral activity of the human immunodeficiency virus type 1-specific nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor HBY 097 alone and in combination with zidovudine in a phase II study. HBY 097/2001 Study Group". *The Journal of infectious diseases*, **1999**, *179*, 709-713.
- (168) Kleim, J. P.; Bender, R.; Billhardt, U. M.; Meichsner, C.; Riess, G.; Rosner, M.; Winkler, I.; Paessens, A.: "Activity of a novel quinoxaline derivative against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and viral replication". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1993**, *37*, 1659-1664.
- (169) González, M.; Cerecetto, H.; Monge, A.: "Quinoxaline 1,4-Dioxide and Phenazine 5,10-Dioxide. Chemistry and Biology". *Top Heterocycl Chem*, **2007**, *11*, 179-211.
- (170) Vicente E.; Villar R.; Solano B.; Burguete A.; Ancizu S.; Pérez-Silanes S.; Aldana I.; Monge A.: "Derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina y enfermedades olvidadas". *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **2007** *73*, 927-945.
- (171) Carta, A.; Corona, P.; Loriga, M.: "Quinoxaline 1,4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities". *Current medicinal chemistry*, **2005**, *12*, 2259-2272.
- (172) Amin, K. M.; Ismail, M. M.; Noaman, E.; Soliman, D. H.; Ammar, Y. A.: New quinoxaline 1,4-di-N-oxides. Part 1: Hypoxia-selective cytotoxins and anticancer agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*, 6917-23.
- (173) Ganley, B.; Chowdhury, G.; Bhansali, J.; Daniels, J. S.; Gates, K. S.: Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-N-oxide. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2001**, *9*, 2395-401.
- (174) Carta, A.; Loriga, M.; Paglietti, G.; Mattana, A.; Fiori, P. L.; Mollicotti, P.; Sechi, L.; Zanetti, S.: Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. *European journal of medicinal chemistry* **2004**, *39*, 195-203.
- (175) Loriga, M. N., A.; Paglietti, G.; Fadda, G.; Zanetti, S.: 2-Phenyl-6(7)-R-substituted quinoxalines N-oxides. Synthesis, structure elucidation and antimicrobial activity. . *European journal of medicinal chemistry* **1990**, *25*, 527-532.

- (176) Glazer, E., Chappel, L. : "Pyridoquinoxaline N-oxides. 1. A new class of antitrichomonal agents." *Journal of medicinal chemistry* **1982**, *25*, 766-769.
- (177) Kurt, L. Ulrich, E.; inventors. 2-isothiuronium-methyl-3-carboxylic acid amido-quinoxaline-1,4-di-N-N-oxide halides as antibacterial agents and pharmaceutical compositions comprising said oxides. DE1967F053669 19671004. **1972** 67-10-04.
- (178) Cronin, T. Richardson, K.; inventors. Hydroxyalkyl esters of quinoxaline di-N-oxide-2-carboxylic acid. US19710135792 19710420; US19700020841 19700318. **1974**
- (179) Coulthard, C. E.; Hale, L. J.: "The treatment of experimental bacillary infections of mice with quinoxaline 1,4 di-N-oxide". *British journal of pharmacology and chemotherapy*, **1955**, *10*, 394-396.
- (180) Deel, P.; inventor. Process for the preparation of new derivatives of quinoxaline di-N-oxide, and their use as supplementary-feed agent having a growth-promoting action. CH19720013032 19720905. **1977**.
- (181) Lepant, M. Laruelle, C.; inventors. New quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives, process for their preparation and their use in human and veterinary therapeutics. FR19850000777 19850121. **1986**.
- (182) Pfrirter, H. P.; Halter, H. M.; Jucker, H.; Bickel, H.: "Effect of feeding quinoxaline derivatives on the growth and metabolism of pigs". *Zeitschrift fur Tierphysiologie, Tierernahrung und Futtermittelkunde*, **1978**, *40*, 191-203.
- (183) Hennessey, T. D.; Edwards, J. R.: "Antibacterial properties of quindoxin: a new growth-promoting agent". *The Veterinary record*, **1972**, *90*, 187-191.
- (184) Junnotula, V.; Rajapakse, A.; Arbillaga, L.; de Cerain, A. L.; Solano, B.; Villar, R.; Monge, A.; Gates, K. S.: "DNA strand cleaving properties and hypoxia-selective cytotoxicity of 7-chloro-2-thienylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-dioxide". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2010**, *18*, 3125-3132.
- (185) Solano, B.; Junnotula, V.; Marin, A.; Villar, R.; Burguete, A.; Vicente, E.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Dutta, S.; Sarkar, U.; Gates, K. S.: "Synthesis and biological evaluation of new 2-arylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives and their reduced analogues". *Journal of medicinal chemistry*, **2007**, *50*, 5485-5492.
- (186) Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2004**, *12*, 3711-3721.
- (187) Ortega, M. A.; Moranco, M. J.; Martinez-Crespo, F. J.; Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Lopez de Cerain, A.; Monge, A.: "New quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxic-cytotoxic agents". *European journal of medicinal chemistry*, **2000**, *35*, 21-30.
- (188) Monge, A. P., J. A.; González, M.; Martinez-Crespo, F. J.; López de Cerain, A.; Sainz, Y.; Narro, S.; Barker, A. J.; Hamilton, E.: "New Hypoxia-Selective Cytotoxins Derived from Quinoxaline 1,4-Dioxides". *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1995**, *32*, 1213-1217.
- (189) Monge, A.; Palop, J. A.; Lopez de Cerain, A.; Senador, V.; Martinez-Crespo, F. J.; Sainz, Y.; Narro, S.; Garcia, E.; de Miguel, C.; Gonzalez, M.: "Hypoxia-selective agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides". *Journal of medicinal chemistry*, **1995**, *38*, 1786-1792.
- (190) Monge, A.; Martinez-Crespo, F. J.; Lopez de Cerain, A.; Palop, J. A.; Narro, S.; Senador, V.; Marin, A.; Sainz, Y.; Gonzalez, M.; Hamilton, E.: "Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides". *Journal of medicinal chemistry*, **1995**, *38*, 4488-4494.
- (191) Torre, M. H.; Gambino, D.; Araujo, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Lavaggi, M. L.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Vega, A. M.; Abram, U.; Costa-Filho, A. J.: "Novel Cu(II) quinoxaline N1,N4-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins". *European journal of medicinal chemistry*, **2005**, *40*, 473-480.
- (192) Lima, L. M.; Barreiro, E. J.: "Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design". *Current medicinal chemistry*, **2005**, *12*, 23-49.

- (193) Torres, E.; Moreno, E.; Ancizu, S.; Barea, C.; Galiano, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Perez-Silanes, S.: "New 1,4-di-N-oxide-quinoxaline-2-ylmethylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2011**, *21*, 3699-3703.
- (194) Moreno, E.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Torres, E.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives". *European journal of medicinal chemistry*, **2010**, *45*, 4418-4426.
- (195) Ancizu, S.; Moreno, E.; Solano, B.; Villar, R.; Burguete, A.; Torres, E.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.: "New 3-methylquinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2010**, *18*, 2713-2719.
- (196) Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2003**, *11*, 2149-2156.
- (197) Villar, R.; Vicente, E.; Solano, B.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Maddry, J. A.; Lenaerts, A. J.; Franzblau, S. G.; Cho, S. H.; Monge, A.; Goldman, R. C.: "In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide". *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **2008**, *62*, 547-554.
- (198) Vicente, E.; Villar, R.; Burguete, A.; Solano, B.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Maddry, J. A.; Lenaerts, A. J.; Franzblau, S. G.; Cho, S. H.; Monge, A.; Goldman, R. C.: "Efficacy of quinoxaline-2-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives in experimental tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2008**, *52*, 3321-3326.
- (199) Vicente, E.; Perez-Silanes, S.; Lima, L. M.; Ancizu, S.; Burguete, A.; Solano, B.; Villar, R.; Aldana, I.; Monge, A.: "Selective activity against Mycobacterium tuberculosis of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides2". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2009**, *17*, 385-389.
- (200) Ortega, M. A.; Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A.: "Anti-Mycobacterium tuberculosis agents derived from quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide". *Arzneimittel-Forschung*, **2002**, *52*, 113-119.
- (201) Ortega, M. A.; Montoya, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Tirapu, I.; Aldana, I.; Monge, A.: "Antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives". *Die Pharmazie*, **2001**, *56*, 205-207.
- (202) Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents". *Journal of medicinal chemistry*, **2005**, *48*, 2019-2025.
- (203) Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A.: "Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents". *European journal of medicinal chemistry*, **2003**, *38*, 791-800.
- (204) Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Martinez-Crespo, F. J.; Ortega, M. A.; Lopez de Cerain, A.; Monge, A.: "New quinoxaline 1,4-di-N-oxides for treatment of tuberculosis2". *Arzneimittel-Forschung*, **1999**, *49*, 55-59.
- (205) Ortega, M. A.; Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Lopez De Cerain, A.; Monge, A.: "Synthesis and antituberculosis activity of new 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides". *Die Pharmazie*, **1999**,
- (206) Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A.; Maurel, S.; Deharo, E.; Jullian, V.; Sauvain, M.: "Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives". *Arzneimittel-Forschung*, **2005**, *55*, 754-761.
- (207) Vicente, E.; Lima, L. M.; Bongard, E.; Charnaud, S.; Villar, R.; Solano, B.; Burguete, A.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Vivas, L.; Monge, A.: "Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents". *European journal of medicinal chemistry*, **2008**, *43*, 1903-1910.
- (208) Vicente, E.; Duchowicz, P. R.; Ortiz Edel, V.; Monge, A.; Castro, E. A.: "Exploring 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxides activities against neglected diseases with QSAR". *Chemical biology & drug design*, **2010**, *76*, 59-69.

- (209) Vicente, E.; Charnaud, S.; Bongard, E.; Villar, R.; Burguete, A.; Solano, B.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Vivas, L.; Monge, A.: "Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives". *Molecules*, **2008**, *13*, 69-77.
- (210) Marin, A.; Moreira Lima, L.; Solano, B.; Vicente, E.; Perez Silanes, S.; Maurel, S.; Sauvain, M.; Aldana, I.; Monge, A.; Deharo, E.: "Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives". *Experimental parasitology*, **2008**, *118*, 25-31.
- (211) Barea, C.; Pabon, A.; Galiano, S.; Perez-Silanes, S.; Gonzalez, G.; Deyssard, C.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I.: "Antiplasmodial and leishmanicidal activities of 2-cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) quinoxaline 1,4-dioxide derivatives". *Molecules*, **2012**, *17*, 9451-
- (212) Barea, C.; Pabon, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Perez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I.: "New salicylamide and sulfonamide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide with antileishmanial and antimalarial activities". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2011**, *21*, 4498-4502.
- (213) Zarranz, B. J., A.; Lima, L. M.; Aldana, I.; Monge, A.; Maurel, S.; Sauvain, M. : "Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-N-oxide derivatives". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2006** *42*, 357-361.
- (214) Aldana, I. O., M. A.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Monge, A.; Deharo, E. : "Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-N-oxide derivatives". *Die Pharmazie*, **2002**, *58*, 68-69.
- (215) Vicente, E.; Duchowicz, P. R.; Benitez, D.; Castro, E. A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Monge, A.: "Anti-T. cruzi activities and QSAR studies of 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile di-N-oxides". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2010**, *20*, 4831-4835.
- (216) Urquiola, C.; Vieites, M.; Aguirre, G.; Marin, A.; Solano, B.; Arrambide, G.; Noblia, P.; Lavaggi, M. L.; Torre, M. H.; Gonzalez, M.; Monge, A.; Gambino, D.; Cerecetto, H.: "Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N1,N4-dioxide derivatives by complexation with vanadium". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2006**, *14*, 5503-5509.
- (217) Ancizu, S.; Moreno, E.; Torres, E.; Burguete, A.; Perez-Silanes, S.; Benitez, D.; Villar, R.; Solano, B.; Marin, A.; Aldana, I.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Monge, A.: "Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxidequinoxalin-2-yl)amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs". *Molecules*, **2009**, *14*, 2256-2272.
- (218) Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Alfaro, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Ortega, M. A.; Aldana, I.; Monge-Vega, A.: "Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2004**, *14*, 3835-3839.
- (219) Burguete, A.; Estevez, Y.; Castillo, D.; Gonzalez, G.; Villar, R.; Solano, B.; Vicente, E.; Silanes, S. P.; Aldana, I.; Monge, A.; Sauvain, M.; Deharo, E.: "Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2008**, *103*, 778-780.
- (220) Estevez, Y.; Quiliano, M.; Burguete, A.; Cabanillas, B.; Zimic, M.; Malaga, E.; Verastegui, M.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Castillo, D.; Deharo, E.: "Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives". *Experimental parasitology*, **2011**, *127*, 745-751.
- (221) Rodriguez, J.; Gerpe, A.; Aguirre, G.; Kemmerling, U.; Piro, O. E.; Aran, V. J.; Maya, J. D.; Olea-Azar, C.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies". *European journal of medicinal chemistry*, **2009**, *44*, 1545-1553.
- (222) Hernandez, P.; Rojas, R.; Gilman, R. H.; Sauvain, M.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates". *European journal of medicinal chemistry*, **2013**, *59*, 64-74.
- (223) Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Quinoxaline derivatives: a patent review (2006--present)". *Expert opinion on therapeutic patents*, **2012**, *22*, 1289-1302.

- (224) Castro, D.; Boiani, L.; Benitez, D.; Hernandez, P.; Merlino, A.; Gil, C.; Olea-Azar, C.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Porcal, W.: "Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies". *European journal of medicinal chemistry*, **2009**, *44*, 5055-5065.
- (225) Boiani, M.; Boiani, L.; Merlino, A.; Hernandez, P.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies". *European journal of medicinal chemistry*, **2009**, *44*, 4426-4433.
- (226) Boiani, L.; Gerpe, A.; Aran, V. J.; Torres de Ortiz, S.; Serna, E.; Vera de Bilbao, N.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Maya, J. D.; Morello, J. A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "In vitro and in vivo antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles". *European journal of medicinal chemistry*, **2009**, *44*, 1034-1040.
- (227) Aravena, C. M.; Olea, A. C.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Maya, J. D.; Rodriguez-Becerra, J.: "Potent 5-nitrofuran derivatives inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: electrochemical, spectroscopic and biological studies". *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **2011**, *79*, 312-319.
- (228) Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Mendizabal, F.; Otero, L.; Gambino, D.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs". *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **2005**, *61*, 2933-2938.
- (229) Porcal, W.; Hernandez, P.; Boiani, M.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Campillo, N. E.; Paez, J. A.; Castro, A.; Krauth-Siegel, R. L.; Davies, C.; Basombrio, M. A.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "In vivo anti-Chagas vinylthio-, vinylsulfanyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives". *Journal of medicinal chemistry*, **2007**, *50*, 6004-6015.
- (230) Porcal, W.; Hernandez, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Olea-Azar, C.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2008**, *16*, 6995-7004.
- (231) Porcal, W.; Hernandez, P.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Merlino, A.; Ferreira, A.; Maio, R. D.; Castro, A.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2007**, *15*, 2768-2781.
- (232) Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizabal, F.; Briones, R.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Risso, M.; Gonzalez, M.; Porcal, W.: "Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,2,5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs". *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **2003**, *59*, 69-74.
- (233) Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; Gonzalez, M.; Aran, V. J.; Rigol, C.; Opazo, L.: "ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity". *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **2006**, *63*, 36-42.
- (234) Lavaggi, M. L.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Orelli, L.; Garcia, B.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "Pyrimido[1,2-a]quinoxaline 6-oxide and phenazine 5,10-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*". *European journal of medicinal chemistry*, **2008**, *43*, 1737-1741.
- (235) Gerpe, A.; Odreman-Nunez, I.; Draper, P.; Boiani, L.; Urbina, J. A.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Heteroallyl-containing 5-nitrofurans as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2008**, *16*, 569-577.
- (236) Gerpe, A.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Piro, O. E.; Aran, V. J.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Monge, A.; Rojas, M. A.; Yaluff, G.: "Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2006**, *14*, 3467-3480.
- (237) Cerecetto, H.; Porcal, W.: "Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments". *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2005**, *5*, 57-71.

- (238) Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "Anti-T. cruzi agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds". *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2008**, *8*, 1355-1383.
- (239) Boiani, M.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gasteiger, J.: "Modeling anti-Trypanosoma cruzi activity of N-oxide containing heterocycles". *Journal of chemical information and modeling*, **2008**, *48*, 213-219.
- (240) Boiani, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Torres de Ortiz, S.; Serna, E.; Vera de Bilbao, N.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Vega, C.; Rolan, M.; Gomez-Barrio, A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents". *Journal of medicinal chemistry*, **2006**, *49*, 3215-3224.
- (241) Boiani, L.; Davies, C.; Arredondo, C.; Porcal, W.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Boiani, M.; Pacheco, J. P.; Basombrio, M. A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "In vivo studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease". *European journal of medicinal chemistry*, **2008**, *43*, 2229-2237.
- (242) Boiani, L.; Aguirre, G.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Bertinaria, M.; Guglielmo, S.: "Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: mechanism of action studies". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2008**, *16*, 7900-7907.
- (243) Aran, V. J.; Ochoa, C.; Boiani, L.; Buccino, P.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; Gonzalez, M.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Gomez-Barrio, A.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.: "Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2005**, *13*, 3197-3207.
- (244) Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Porcal, W.; Seoane, G.; Ortega, M. A.; Aldana, I.; Monge, A.; Denicola, A.: "Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships". Part II. *Archiv der Pharmazie*, **2002**, *335*, 15-21.
- (245) Aguirre, G.; Cabrera, E.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Seoane, G.; Duffaut, A.; Denicola, A.; Gil, M. J.; Martinez-Merino, V.: "Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design". *European journal of medicinal chemistry*, **2004**, *39*, 421-431.
- (246) Aguirre, G.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; Gonzalez, M.; Sainz, Y. F.; Denicola, A.; De Ocariz, C. O.; Nogal, J. J.; Montero, D.; Escario, J. A.: "Novel antiprotozoal products: imidazole and benzimidazole N-oxide derivatives and related compounds". *Archiv der Pharmazie*, **2004**, *337*, 259-270.
- (247) Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Sant'Anna, C. M.; Barreiro, E. J.: "New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth: quantitative structure-activity relationship studies". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2005**, *13*, 6336-6346.
- (248) Jaso, A.: "Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N-óxido de 2-carbonil quinoxalina y quinoxalina-2-carbonitrilo como agentes antituberculosos". *Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra*, **2004**.
- (249) Cerecetto, H.; Dias, E.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Pacce, S.; Saenz, P.; Seoane, G.; Suescun, L.; Momburu, A.; Fernandez, G.; Lema, M.; Villalba, J.: "Synthesis and herbicidal activity of N-oxide derivatives". *Journal of agricultural and food chemistry*, **2000**, *48*, 2995-3002.
- (250) Zarranz, B.: "Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina como agentes antituberculosos". *Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra*, **2004**.
- (251) Lima, L.; M. Zarranz, B.; Marin, A.; Solano, B.; Vicente, E.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.: "Comparative use of solvent-free KF-Al₂O₃ and K₂CO₃ in acetone in the synthesis of quinoxaline 1,4-dioxide derivatives designed as antimalarial drug candidates²". *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2005**, *42*, 1381-1385.
- (252) Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V.: "Fluorine in medicinal chemistry".

- (253) Hagmann, W. K.: "The many roles for fluorine in medicinal chemistry". *Journal of medicinal chemistry*, **2008**, *51*, 4359-4369.
- (254) Shah, P.; Westwell, A. D.: "The role of fluorine in medicinal chemistry". *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **2007**, *22*, 527-540.
- (255) López, S. E.; Romero, Á.: "Grupo trifluorometilo: un sustituyente importante en química medicinal". *Revista Facultad de Farmacia*, **2011**, *74*.
- (256) Ramachandran, P. V.: "Welcome to 'fluorine in medicinal chemistry". *Future medicinal chemistry*, **2009**, *1*, 771-772.
- (257) Muller, K.; Faeh, C.; Diederich, F.: "Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition". *Science*, **2007**, *317*, 1881-1886.
- (258) Kirk, K. L.: "Selective fluorination in drug design and development: an overview of biochemical rationales". *Current topics in medicinal chemistry*, **2006**, *6*, 1447-1456.
- (259) Bonnet-Delpon, D.: "Fluorine, an essential element for medicinal chemistry". *Annales pharmaceutiques francaises*, **2008**, *66*, 56-59.
- (260) O'Hagan, D.: "Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond". *Chemical Society reviews*, **2008**, *37*, 308-319.
- (261) Gakh, A. A.; Burnett, M.: "Extreme modulation properties of aromatic fluorine". *Journal of fluorine chemistry*, **2011**, *132*, 88-93.
- (262) Nenortas, E.; Kulikowicz, T.; Burri, C.; Shapiro, T. A.: "Antitrypanosomal activities of fluoroquinolones with pyrrolidinyl substitutions". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2003**, *47*, 3015-3017.
- (263) Nenortas, E.; Burri, C.; Shapiro, T. A.: "Antitrypanosomal activity of fluoroquinolones". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1999**, *43*, 2066-2068.
- (264) Ma, X.; Zhou, W.; Brun, R.: "Synthesis, in vitro antitrypanosomal and antibacterial activity of phenoxy, phenylthio or benzyloxy substituted quinolones". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2009**, *19*, 986-989.
- (265) Keiser, J.; Burri, C.: "Evaluation of quinolone derivatives for antitrypanosomal activity". *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **2001**, *6*, 369-389.
- (266) Gasco, A., Boulton, J. : "Furoxans and benzofuroxans". *Advances in Heterocyclic Chemistry*, **1981**, *29*, 251-340.
- (267) Dyall, L. K.: "Oxydative cyclizations. VII. Cyclization of 2-substituted anilines with alkaline hypohalite". *Australian Journal of Chemistry*, **1984**, *35*, 2013-2026.
- (268) Leyva, S. C., V.; Leyva, E. : "Synthesis of novel fluorobenzofuroxans by oxidation of anilines and thermal cyclization of arylazides.". *Journal of fluorine chemistry*, **2003**, *121*, 171-175.
- (269) Kotovskaya, S. K. R., S. A.; Charushin, V. N.; Kodess, M. I.; Chupakhin, O. N. : "5(6)-Fluoro-6(5)-R-benzofuroxans: synthesis and NMR ¹H, ¹³C and ¹⁹F studies". *Journal of fluorine chemistry*, **2004**, *125*, 421-428.
- (270) Carey, F. A.; Sundberg, R. J.: *Aromatic Substitution Reactions. Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and Synthesis. 5th ed. Springer* **2007**.
- (271) Haddadin, M. A., G.; Issidorides, C. : "Synthesis and photolysis of some substituted quinoxaline di-N-oxides". *Journal of Organic Chemistry*, **1971**, *36*, 514-518.
- (272) Cmoch, P. W., J. W.; Stefaniak, L.; Webb, G. A. : "An NMR study and ab initio molecular orbital calculation of substituted benzofuroxans and the salt of 4,6-dinitrobenzofuroxan". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1999**, *55*, 2207-2214.
- (273) Chaykovsky, M., Adolph, H. G. : "Substituent effects in the conversion of azido- and diazotrinitrobenzenes to benzofuroxans and difuroxans". *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1991**, *28*, 1491-1495.

- (274) Swain, C. G., Brown, J. F.: "Concerted Displacement Reactions. VIII. Polyfunctional Catalysis". *Journal of the American Chemical Society*, **1952**, *74*, 2538-2543.
- (275) Haddadin, M., Issidorides, C. : "The Beirut Reaction". *Heterocycles*, **1993**, *35*, 1503-1523.
- (276) Haddadin, M., Issidorides, C. : "Enamines with isobenzofuroxan: a novel synthesis of quinoxaline-di-N-oxides". *Tetrahedron Letters*, **1965**, *36*, 3253-3256.
- (277) Haddadin, M. T., M.; Jarrar, A.; Issidorides, C. : "Reaction of benzofurazan oxide with unsymmetrical 1,3-diketones; Steric and polar effects". *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 719-724.
- (278) Türker, L.; Dura, E.: "A queer product of the Beirut reaction with dimedone-AM1 analysis". *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **2002**, *593*, 143-147.
- (279) Wathey, B.; Tierney, J.; Lidstrom, P.; Westman, J.: "The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery". *Drug discovery today*, **2002**, *7*, 373-380.
- (280) Mavandadi, F.; Pilotti, A.: "The impact of microwave-assisted organic synthesis in drug discovery". *Drug discovery today*, **2006**, *11*, 165-174.
- (281) Mavandadi, F.; Lidstrom, P.: "Microwave - assisted chemistry in drug discovery". *Current topics in medicinal chemistry*, **2004**, *4*, 773-792.
- (282) Larhed, M.; Hallberg, A.: "Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery". *Drug discovery today*, **2001**, *6*, 406-416.
- (283) Kappe, C. O.; Dallinger, D.: "The impact of microwave synthesis on drug discovery". *Nature reviews. Drug discovery*, **2006**, *5*, 51-63.
- (284) Thostenson, E. T.; Chou, T. W.: "Microwave processing: fundamentals and applications". *Composites:Part A*, **1999**, *30*, 1055-1071.
- (285) Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J.: "Microwave assisted organic synthesis-a review". *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9225-9283.
- (286) de la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A.: "Review on non-thermal effects of microwave irradiation in organic synthesis". *The Journal of microwave power and electromagnetic energy : a publication of the International Microwave Power Institute*, **2007**, *41*, 44-64.
- (287) de la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A.: "Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects". *Chemical Society reviews*, **2005**, *34*, 164-178.
- (288) Burguete., A.: "Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de quinoxalina y 1,4-di-N-óxido de quinoxalina con aplicación en diferentes áreas terapéuticas". *Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra*; **2010**.
- (289) Morrison, R. T.; Boyd, R. N.: "Morrison y Boyd Química Orgánica"; Quinta edición ed.: México, **1998**.
- (290) Rayes, S. T.: "Some novel derivatives of quinoxaline 1,4-dioxides and phenazine 7,12-dioxides". American University of Beirut, **2010**.
- (291) Haddadin, M. J.; Zhar, G. E.; Rawdah. T. N.; Chelhot, N. C.; Issidorides, C. H.: "Deoxygenation of quinoxaline N-oxides and related compounds". *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 659-666.
- (292) Caterina, M. C.; Perillo, I. A.; Boiani, L.; Pezaroglo, H.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Salerno, A.: "Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2008**, *16*, 2226-2234.
- (293) Mosmann, T.: "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of immunological methods*, **1983**, *65*, 55-63.
- (294) Denizot, F.; Lang, R.: "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". *Journal of immunological methods*, **1986**, *89*, 271-277.
- (295) Romanha, A. J.; Castro, S. L.; Soeiro Mde, N.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares,

- M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degrave, W.; Andrade Zde, A.: "In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2010**, *105*, 233-238.
- (296) Nwaka, S.; Hudson, A.: "Innovative lead discovery strategies for tropical diseases". *Nature reviews. Drug discovery*, **2006**, *5*, 941-955.
- (297) Gerpe, A.; Alvarez, G.; Benitez, D.; Boiani, L.; Quiroga, M.; Hernandez, P.; Sortino, M.; Zacchino, S.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2009**, *17*, 7500-7509.
- (298) Ames, B. N.; McCann, J.; Yamasaki, E.: "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test". *Mutation research*, **1975**, *31*, 347-364.
- (299) Mortelmans, K.; Zeiger, E.: "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay". *Mutation research*, **2000**, *455*, 29-60.
- (300) Maron, D. M.; Ames, B. N.: "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test". *Mutation research*, **1983**, *113*, 173-215.
- (301) Hakura, A.; Shimada, H.; Nakajima, M.; Sui, H.; Kitamoto, S.; Suzuki, S.; Satoh, T.: "Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds". *Mutagenesis*, **2005**, *20*, 217-228.
- (302) Guengerich, F. P.: "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity". *The AAPS journal*, **2006**, *8*, E101-111.
- (303) Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Hernandez, P.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Monge, A.; de Cerain, A. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.: "Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-T. cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction". *Toxicology letters*, **2009**, *190*, 140-149.
- (304) Iyer, V. N.; Szybalski, W.: "Mutagenic effect of azaserine in relation to azaserine resistance in Escherichia coli". *Science*, **1959**, *129*, 839-840.
- (305) Zeiger, E.; Anderson, B.; Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W.: "Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals". *Environmental mutagenesis*, **1987**, *9 Suppl 9*, 61-109.
- (306) Zeiger, E.; Anderson, B.; Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.: Salmonella mutagenicity tests: IV. "Results from the testing of 300 chemicals". *Environmental and molecular mutagenesis*, **1988**, *11 Suppl 12*, 1-157.
- (307) Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W.; Zeiger, E.: "Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals". *Environmental mutagenesis*, **1983**, *5 Suppl 1*, 3-49.
- (308) www.oecd-ilibrary.org/test-no-471-bacterial-reverse-mutation
- (309) Chu, K. C.; Patel, K. M.; Lin, A. H.; Tarone, R. E.; Linhart, M. S.; Dunkel, V. C.: "Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays". *Mutation research*, **1981**, *85*, 119-132.
- (310) Morton, D. B.; Griffiths, P. H.: "Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animal and a hypothesis for assessment". *Vet. Rec.*, **1985**, *116*, 431-436.
- (311) Gritzner, G.; Kuta, J.: "Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents". *Pure and Applied Chemistry*, **1984**, *56*, 461-466.
- (312) Rieger, P. H.: Electrochemistry. edition, n., Ed.; Chapman and Hall: New York, **1994**.
- (313) Charushin, V.N.; Mokrushina, G. A.; Tkachev, A.V.: "Nucleophilic substitutions in 6,7-difluoroquinolines". *Journal of fluorine chemistry*, **2001**, *107*, 71-80.
- (314) Chambers R. D. , M. P. A., Sandford G., Williams D. L. H.: "Mechanisms of reactions of halogenated compounds Part 7. Effects of fluorine and other groups as substituents on nucleophilic aromatic substitution". *Journal of fluorine chemistry*, **2008**, *129*, 998-1002.

- (315) Parks, E. L.; Sandford, G.; Yufit, D. S.; Howard J. A. K.; Christopher J. A.; Miller D.D.: "Synthesis of tetrahydropyrido- and pyrido-[10,20:1,2]imidazo[4,5-b]pyrazine derivatives". *Journal of fluorine chemistry*, **2010**, *131*, 1086-1090.
- (316) Huang, X.; Zhang, A.; Chen, D.; Jia, Z.; Li, X.: "4-Substituted 4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)piperidine: novel C7 moieties of fluoroquinolones as antibacterial agents". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2010**, *20*, 2859-2863.
- (317) Ford E.; Brewster, A.; Jones, G.; Bailey, J.; Sumner, N.: "Regioselective substitution of 2,3-dichloro-6-amino-quinoxaline". *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 3197-3198.
- (318) Dang, Z.; Yang, Y.; Ji, R.; Zhang, S.: "Synthesis and antibacterial activity of novel fluoroquinolones containing substituted piperidines". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2007**, *17*, 4523-4526.
- (319) Bessard, Y.; a. Crettaz, R.: "Rate acceleration of Nucleophilic Substitution of 2-Chloro-4,6-dimethoxypyrimidine by sulfinate catalysis". *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 4739-4745.
- (320) Suter, W.; Rosselet, A.; Knusel, F.: "Mode of action of quindoxin and substituted quinoxaline-di-N-oxides on Escherichia coli". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1978**, *13*, 770-783.
- (321) Skeggs, H. R.; Berglund, R. M.; VandenHeuvel, W. J.; Mrozik, H.; Wislocki, P. G.; Wolf, F. J.: "Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test". *Mutation research*, **1984**, *136*, 1-8.
- (322) Shan, Q.; Liu, Y.; He, L.; Ding, H.; Huang, X.; Yang, F.; Li, Y.; Zeng, Z.: "Metabolism of mequindox and its metabolites identification in chickens using LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry". *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **2012**, *881-882*, 96-106.
- (323) Liu, Z. Y.; Tao, Y. F.; Chen, D. M.; Wang, X.; Yuan, Z. H.: "Identification of carbadox metabolites formed by liver microsomes from rats, pigs and chickens using high-performance liquid chromatography combined with hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry". *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **2011**, *25*, 341-348.
- (324) Liu, Z. Y.; Huang, L. L.; Chen, D. M.; Yuan, Z. H.: "Metabolism of mequindox in liver microsomes of rats, chicken and pigs". *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **2010**, *24*, 909-918.
- (325) Beutin, L.; Preller, E.; Kowalski, B.: "Mutagenicity of quindoxin, its metabolites, and two substituted quinoxaline-di-N-oxides". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1981**, *20*, 336-43.
- (326) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. New York; Wiley **2001**.
- (327) Miyazaki, H. M., Y.; Kubota, T. : "Cyclic Voltammetry of Aromatic Amine N-Oxides in Nonaqueous Solvents and the Stability of the Free Radicals Produced.". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1981**, *54*, 3850-3853.
- (328) Barqawi, K. R.; Atfah, M. A.: "A cyclic voltammetric study of some quinoxaline di-N-oxides and quinoxalines in acetonitrile: substituent effect on the cathodic reduction". *Electrochimica Acta*, **1987**, *32*, 597-599.
- (329) Moreno, E.; Pérez-Silanes, S.; Gouravaram, S.; Macharam, A.; Ancizu, S.; Torres, E.; Aldana, I.; Monge, A.; Crawford, P. W.: "1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and anti-tuberculosis activity". *Electrochimica Acta*, **2011**, *56*, 3270-3275.
- (330) Zuman, P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*; New York, **1967**.
- (331) Crawford, P. W.; Scamehorn, R. G.; Hollstein, U.; Ryan, M. D.; Kovacic, P.: "Cyclic voltammetry of phenazines and quinoxalines including mono- and di-N-oxides. Relation to structure and antimicrobial activity". *Chemico-biological interactions*, **1986**, *60*, 67-84.

- (332) Ames, J. R.; Houghtaling, M. A.; Terrian, D. L.: "Cyclic voltammetry of some quinoxaline di-N-oxides and quinoxalines in dimethylformamide". *Electrochimica Acta*, **1992**, *37*, 1433-1436.
- (333) Strier, M. P., Cavagnol, J. C. : "The Polarography of Quinoxaline. II.1 6-Substituted Derivatives 2". *Journal of the American Chemical Society*, **1958**, *80*, 1565-1568.
- (334) Ryan, M. D.; Scamehorn, R. G.; Kovacic, P.: "Charge transfer in the mechanism of drug action involving quinoxaline di-N-oxides". *Journal of pharmaceutical sciences*, **1985**, *74*, 492-495.
- (335) Priyadarsini, K. I.; Dennis, M. F.; Naylor, M. A.; Stratford, M. R. L.; Wardman, P.: "Free Radical Intermediates in the Reduction of Quinoxaline N-oxide Antitumor Drugs: Redox and Prototropic Reactions." *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*, 5648-5654.
- (336) Kovacic, P.: *Kemija u Industriji* **1984**, *33*, 473-492.
- (337) Gomes, J. R. B.; Ribeiro da Silva, M. D. M. C; Ribeiro da Silva, M. A. V.: "Quinoxaline-1,4-dioxide: substituent effects on the N-O bond dissociation enthalpy". *Chemical Physics Letters*, **2006**, *429*, 18-22.
- (338) Yin, J.; Glaser, R.; Gates, K. S.: "On the reaction mechanism of tirapazamine reduction chemistry: unimolecular N-OH homolysis, stepwise dehydration, or triazene ring-opening". *Chemical research in toxicology*, **2012**, *25*, 634-645.
- (339) Yin, J.; Glaser, R.; Gates, K. S.: "Electron and spin-density analysis of tirapazamine reduction chemistry". *Chemical research in toxicology*, **2012**, *25*, 620-633.
- (340) Chowdhury, G.; Sarkar, U.; Pullen, S.; Wilson, W. R.; Rajapakse, A.; Fuchs-Knotts, T.; Gates, K. S.: "DNA strand cleavage by the phenazine di-N-oxide natural product myxin under both aerobic and anaerobic conditions". *Chemical research in toxicology*, **2012**, *25*, 197-206.
- (341) Brown, J. M.: "SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours". *British journal of cancer*, **1993**, *67*, 1163-1170.
- (342) Elwell, J. H.; Siim, B. G.; Evans, J. W.; Brown, J. M.: "Adaptation of human tumor cells to tirapazamine under aerobic conditions: implications of increased antioxidant enzyme activity to mechanism of aerobic cytotoxicity". *Biochemical pharmacology*, **1997**, *54*, 249-257.
- (343) Cerecetto, H.; Gonzalez, M.: "N-oxides as hypoxia selective cytotoxins". *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2001**, *1*, 219-231.
- (344) Ames, J. R. R., M. D.; Kovacic, P.: "Mechanism of antibacterial action: Electron transfer and oxy radicals.". *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, **1986**, *2*, 377-391.
- (345) Vicente, E.; Duchowicz, P. R.; Castro, E. A.; Monge, A.: "QSAR analysis for quinoxaline-2-carboxylate 1,4-di-N-oxides as anti-mycobacterial agents". *Journal of molecular graphics & modelling*, **2009**, *28*, 28-36.
- (346) Maarouf, M.; de Kouchkovsky, Y.; Brown, S.; Petit, P. X.; Robert-Gero, M.: "In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of Leishmania". *Experimental cell research*, **1997**, *232*, 339-348.
- (347) Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V.: "Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy". *Analytica chimica acta*, **2007**, *585*, 110-119.
- (348) Sanchez-Moreno, M.; Fernandez-Becerra, M. C.; Castilla-Calvente, J. J.; Osuna, A.: "Metabolic studies by ¹H NMR of different forms of Trypanosoma cruzi as obtained by 'in vitro' culture". *FEMS microbiology letters*, **1995**, *133*, 119-25.
- (349) Mesa-Valle, C. M.; Castilla-Calvente, J.; Sanchez-Moreno, M.; Moraleda-Lindez, V.; Barbe, J.; Osuna, A.: "Activity and mode of action of acridine compounds against Leishmania donovani". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1996**, *40*, 684-690.
- (350) Fernández-Ramos, C. L., F.; Fernández-Becerra, C.; Osuna, A.; Jankevicius, S. I.; Jankevicius, V.; Rosales, M. J.; Sanchez-Moreno, M. : "Biochemical characterisation of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil". *FEMS Microbiol. Lett.*, **1999**, *170*, 343-348.

Índice de Figuras

Figura 1. Carlos Chagas. Fuente: http://www.bvschagas.coc.fiocruz.br	7
Figura 2. <i>Triatoma infestans</i> . Fuente: http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases	8
Figura 3. Distribución geográfica de los principales vectores triatominos vectores de la EC Fuente: Heredity (2012) 108, 190–202; doi:10.1038/hdy.2011.71.14.....	9
Figura 4. Distribución mundial de afectados por la enfermedad de Chagas. Fuente: Rassi Jr A. et al., Chagas disease, Lancet, 2010.	11
Figura 5. Tratamiento con insecticidas en una vivienda rural típica de las zonas endémicas. Fuente: www.losandes.com	13
Figura 6. Estado del control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, 2011. Fuente: PAHO/HSD/CD/Enfermedades Desatendidas.	15
Figura 7. Estructura celular de la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i> . Fuente: Teixeira et al. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749 (modificado) ⁵⁸	19
Figura 8. Morfologías de <i>T. cruzi</i> , a) Forma amastigote; b) Forma epimastigote; c) Forma tripomastigote. 1: kinetoplasto; 2: Núcleo; 3: Flagelo.	20
Figura 9. Ciclo vital de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fuente: Teixeira et al. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749 (modificado).	23
Figura 10. Cuadro resumen de la patogénesis de la Enfermedad de Chagas. Fuente: Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.: "Chagas disease". Lancet, 2010, 375, 1388-1402, (modificado). ²⁸ ...	24
Figura 11. Signo de Romaña. Fuente: areyesmed406.wordpress	27
Figura 12. Manifestaciones clínicas cardíacas y digestivas durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Fuente: ADAM.....	28
Figura 13. Forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i> detectada en un frotis de sangre. Fuente: Coura J.R. Chagas disease: a new worldwide challenge Nature Junio 2010.	30
Figura 14. Fármacos utilizados en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.....	32
Figura 15. Nuevos triazoles inhibidores selectivos de la esterol-C14 α -demetilasa más interesantes como potenciales agentes antichagásicos.	37
Figura 16. Estructura de bisfosfonatos con actividad específica frente a <i>T. cruzi</i> . a) Risedronato; b) Pamidronato; c) Ibandronato.....	38
Figura 17. Estructura de K777, potente inhibidor de la cruzipaína.	39
Figura 18. Tioridazina y Clomipramine, inhibidores del metabolismo de la tripanotona.	40
Figura 19. Estructura del allopurinol.....	40

Figura 20. Desarrollo de nuevos fármacos frente a la enfermedad de Chagas.	41
Figura 21. Estructura de la quinoxalina y la quinoxalina 1,4-di-N-óxido	47
Figura 22. Estructura de derivados de quinoxalina con actividades biológicas: a) anticancerosa; b) antituberculosa; c) antitrombótica; d) analgésica.....	47
Figura 23. Derivados de quinoxalina con actividad antiinflamatoria y antioxidante.	48
Figura 24. a) Estructura de una quinoxalinona tricíclica con actividad ansiolítica; b) Estructura de derivados de quinoxalinona que poseen actividad inhibitoria sobre los receptores AMPA.	48
Figura 25. Derivados de quinoxalina que han mostrado actividad como inhibidores de la Transcriptasa Inversa de VIH-1.	48
Figura 26. Estructura general de los derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido.	49
Figura 27. Derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido que presentan actividad citotóxica selectiva sobre células hipóxicas.....	49
Figura 28. Quinoxalinas y sus principales bioisómeros activos en enfermedades olvidadas.	50
Figura 29. Compuestos sintetizados por nuestro grupo con actividad <i>in vitro</i> frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51
Figura 30. Compuestos sintetizados por nuestro grupo como potenciales agentes antimaláricos.	51
Figura 31. Algunos derivados de quinoxalinas publicadas con interesantes resultados de actividad frente a <i>T. cruzi</i>	51
Figura 32. Resumen de las relaciones estructura-actividad biológica <i>in vitro</i> extraídas de la revisión de los derivados de quinoxalina evaluados por nuestro grupo.....	60
Figura 33. Estructura base del trabajo presentado.	67
Figura 34. Diseño planteado para las series 1, 3 y 5 presentadas en este trabajo.	72
Figura 35. Estructura general de los derivados pertenecientes a la serie 4 presentada en este trabajo.....	73
Figura 36. Diseño planteado para los derivados de la serie 6.	74
Figura 37. Estructura del compuesto 7.1.	74
Figura 38. Plan de trabajo establecido para llevar a cabo la síntesis de los nuevos derivados de quinoxalina.	75
Figura 39. Esquema general de síntesis	83
Figura 40. Síntesis de benzofuroxanos mediante ciclación oxidativa.	84
Figura 41. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de BFX mediante.....	84

ciclación de o-nitroanilina.....	84
Figura 42. Síntesis de los BFXs con sustituyentes F/F y CF ₃ /H en posiciones R5/R6.	85
Figura 43. Formación del ion nitronio.	85
Figura 44. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de la sal de diazonio.	86
Figura 45. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de o-nitrofenilazida.	86
Figura 46. Mecanismo de reacción propuesto para la ciclación final del benzofuroxano.....	87
Figura 47. Equilibrio de isómeros en BFX-5(6) monosustituídos.	87
Figura 48. Esquema de síntesis empleado en la obtención de los intermedios de la serie 3 (INT3).	88
Figura 49. Mecanismo de reacción propuesto.....	88
Figura 50. Reacción de Beirut descrita por M. Haddadin y C. Issidorides.	89
Figura 51. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los compuestos de las series 1, 3, 4 y 5 a través de la reacción de Beirut.	90
Figura 52. Esquema general de síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido pertenecientes a las series 1, 4 y 5 mediante la reacción de Beirut convencional.....	91
Figura 53. Esquema general de síntesis del compuesto 7.1 mediante la reacción de Beirut convencional.	91
Figura 54. Aparato microondas empleado en este trabajo.	92
Figura 55. Calentamiento de la reacción por microondas y mediante baño de aceite.....	92
Figura 56. Esquema general de síntesis de los derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido pertenecientes a las series 1, 3 y 5 empleando la SAM aplicada a la reacción de Beirut.	93
Figura 57. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los derivados de la serie 6 utilizando sustitución nucleofílica aromática.	95
Figura 58. Esquema general de síntesis utilizado en la obtención de los derivados de la serie 2 y del derivado 6.17.....	96
Figura 59. Mecanismo de reacción propuesto para la reducción de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina.	97
Figura 60. Reducción del MTT a formazán llevada a cabo por la succinato deshidrogenasa.....	117
Figura 61. Procedimiento experimental empleado para llevar a cabo el ensayo de mutagenicidad. Se muestra el ejemplo para el ensayo con activación metabólica de un compuesto.	122
Figura 62. Nueva estrategia de síntesis para los derivados de las series 1 y 5.	167

Figura 63. Esquema de síntesis utilizado para la obtención de los compuestos análogos al 7.1.	170
Figura 64. Esquema de síntesis del compuesto 7.1 utilizando el método de síntesis optimizado VII: TEA, tolueno, T ^a amba/20-30 horas.	170
Figura 65. Proceso de optimización del método de síntesis empleado en la obtención de los derivados de la serie 6.	172
Figura 66. Compuesto 5.16.	177
Figura 67. Espectro de RMN-1H del derivado 5.16. Se muestran las señales correspondientes a los protones H5, H6 y H8.	178
Figura 68. Compuesto 1.17.	179
Figura 69. Espectro de RMN-1H del derivado 1.17. Se muestran las señales correspondientes a los protones H5 y H8.	179
Figura 70. Compuesto 4.2.	179
Figura 71. Espectro de RMN-1H del derivado 4.2. Señal correspondiente al H del grupo CHF ₂ de la posición 2.	180
Figura 72. Compuesto 6.8.	180
Figura 73. Espectro de RMN-13C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C5 y al C8.	181
Figura 74. Espectro de RMN-13C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C6 y al C7.	181
Figura 75. Espectro de RMN-13C desacoplado del derivado 6.8. Señales correspondientes al C3 y grupo CF ₃ .	182
Figura 76. Síntesis de los compuestos 6.8 y 6.9.	183
Figura 77. RMN-1H del compuesto 6.8: δ ppm: 8,24 (d, 1H, H', JH'-F = 13,2 Hz); 7,69 (d, 1H, H'', JH''-F = 8,1 Hz); 3,80 (m, 4H, CH ₂ , morfolina); 3,37 (m, 4H, CH ₂ , morfolina); 2,59 (s, 3H, CH ₃).	184
Figura 78. Espectro obtenido en el experimento NOESY realizado sobre el compuesto 6.8.	185
Figura 79. Conformación de más baja energía de la molécula en estudio obtenida utilizando Hyperchem profesional 8.0.	186
Figura 80. Estructura del derivado 6.8 obtenido.	186
Figura 81. Resumen de las principales relaciones estructura-actividad obtenidas para los derivados pertenecientes a las series 1, 2, 3, 4, 5 y para el compuesto 7.1.	196

- Figura 82.** Resumen de relaciones estructura-actividad biológica *in vitro* observadas y futuras líneas de diseño de nuevos derivados propuestas para los derivados de la serie 6. 201
- Figura 83.** Curvas dosis-respuesta para tres de los compuestos estudiados. Se representa el número de colonias revertientes para cada concentración de producto estudiada ($\mu\text{g/placa}$). a) Compuesto 1.17, no mutagénico en ambas condiciones de ensayo (-S9 y +S9). b) Compuesto 5.2, mutagénico en ambas condiciones de ensayo (-S9 y +S9) c) Compuesto 5.8, mutagénico en el ensayo sin activación metabólica y no mutagénico con activación metabólica.209
- Figura 84.** Niveles de parasitemia en los ratones tratados con 50 (mg/kg pc)/día de Bnz (O), 10 (mg/kg pc)/día del derivado 1.7 (Δ), 30 (mg/kg pc)/día del derivado 1.7 (∇), 10 (mg/kg pc)/día del derivado 1.17 (\blacktriangleleft), y grupo no tratado (\blacksquare): a) experimento 1 (clon CL-Brener); b) experimento 2 (cepa Y); c) experimento 3 (clon CL-Brener). 217
- Figura 85.** Ejemplos de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los diferentes programas de tratamiento. Las líneas superiores de las gráficas representan los niveles de anticuerpos para los animales infectados, y las líneas inferiores representan los niveles de anticuerpos para los animales sanos: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Las dosis empleadas para cada experimento se indican al comienzo de este apartado. 218
- Figura 86.** Voltamogramas cíclicos obtenidos en la reducción del compuesto 3.2 en DMF a 0,1 V/s (E vs (Ag/AgNO₃)/V): a) Un solo barrido entre -0,7 y -1,7 V, b) múltiples barridos entre -0,7 y -1,7 V, y c) un solo barrido entre -0,4 y -2,6 V. d) Voltamograma cíclico para el par redox del ferroceno, empleado como referencia para la determinación de los picos de potencial.222
- Figura 87.** Voltamogramas cíclicos obtenidos en la reducción del compuesto 5.17 en DMF a 0,1 V/s (E vs (Ag/AgNO₃)/V): a) Un solo barrido entre -0,4 y -1,4 V, b) múltiples barridos entre -0,4 y -1,4 V, y c) un solo barrido entre -0,4 y -2,1 V. d) Voltamograma cíclico para el par redox del ferroceno, empleado como referencia para la determinación de los picos de potencial.223
- Figura 88.** Gráfica de a) potencial de reducción (E1/2 vs Fc/Fc+) frente a $(\sigma_{\text{m-x}} + \sigma_{\text{p-x}})/2$ para los sustituyentes de las posiciones 6 y 7 en los compuestos 4.1, 4.2, 4.4 y 4.5; b) potencial de reducción (E1/2 vs Fc/Fc+) frente a $(\sigma_{\text{m-x}} + \sigma_{\text{p-x}})/2$ para el sustituyente de la posición 3 en los compuestos A.1, 1.1 y 4.1; c) potencial de reducción (E1/2 vs Fc/Fc+) frente a $\sum(\sigma_{\text{m-x}} + \sigma_{\text{p-x}})/2$ para los sustituyentes de las posiciones 6 y 7 y de la posición 3 en los compuestos A.1, A.2, A.3, A.7, 1.1, 1.2, 1.3, 1.7, 4.1, 4.2, 4.4, 4.5 y 4.6.226
- Figura 89.** Mecanismo de acción propuesto.227
- Figura 90.** a) Variación del porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales (Pdmh(%)) producido por los diferentes compuestos a los diferentes tiempos de exposición sobre epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* en comparación con el control no tratado (100%); b) Porcentaje de metabolitos finales excretados al medio tras el tratamiento con los diferentes

compuestos, expresado respecto a la DMF,³⁴⁷ medido en epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*.
.....**232**

Índice de tablas

Tabla 1. Estimación de afectados por la enfermedad de Chagas en países endémicos llevada a cabo por la PAHO en los años 1980-1985 y 2005. Fuente: ^{3,4,27}	12
Tabla 2. Estimación de datos de migración y prevalencia de inmigrantes infectados en diferentes regiones mundiales entre 1999 y 2008. ³⁸	16
Tabla 3. Derivados de quinoxalina con actividad antibiótica.....	49
Tabla 4. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-N-óxido 1-16.	53
Tabla 5. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-N-óxido 17-39. .	54
Tabla 6. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-N-óxido 40-50...	55
Tabla 7. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina-1,4-di-N-óxido 51-62. ..	55
Tabla 8. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-cianoquinoxalina 63-64.	56
Tabla 9. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de 2-carbonilquinoxalina-1,4-di-N-óxido 66-100.	57
Tabla 10. Resultados de actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> obtenidos por nuestro grupo para los derivados de quinoxalina-1,4-di-N-óxido 101-107.	58
Tabla 11. BFXs utilizados en la síntesis de los compuestos de este trabajo.	84
Tabla 12. Métodos de síntesis convencionales utilizados por el grupo investigador para llevar a cabo la reacción de Beirut. ^a Temperatura ambiente.....	91
Tabla 13. Compuestos pertenecientes a la serie 1.....	103
Tabla 14. Intermedios de la serie 3.	105
Tabla 15. Compuestos de la serie 5.	106
Tabla 16. Compuestos de la serie 4.	106
Tabla 17. Estructura y métodos empleados en la síntesis de los derivados de la serie 5.	107
Tabla 18. Compuestos de la serie 6, método VIa.....	109
Tabla 19. Compuestos de la serie 6, método VIc.	110
Tabla 20. Compuestos de la serie 2.	111

Tabla 21. Caracterización de los productos re-sintetizados seleccionados para su evaluación <i>in vitro</i>	162
Tabla 22. Comparación de los tiempos de reacción obtenidos mediante el método tradicional (Ia/Va) y el nuevo método en microondas (Ib/Vb).....	169
Tabla 23. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 1.....	190
Tabla 24. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos análogos previamente sintetizados en el grupo. ^{203,248,250}	191
Tabla 25. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 2.	192
Tabla 26. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 3.	193
Tabla 27. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 4.	193
Tabla 28. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 5.	194
Tabla 29. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> de los compuestos análogos a los derivados de la serie 5.....	195
Tabla 30. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos de la serie 6.	197
Tabla 31. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondientes a los compuestos mono-reducidos de la serie 6.....	197
Tabla 32. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondiente al compuesto di-reducido de la serie 6.	198
Tabla 33. Estructura y resultados biológicos <i>in vitro</i> correspondiente al compuesto 7.1.....	201
Tabla 34. Estructura y resultados de actividad <i>in vitro</i> frente a la cepa Tulahuen 2 de <i>T. cruzi</i> de los compuestos seleccionados para el ensayo frente a otras cepas de <i>T. cruzi</i>	202
Tabla 35. Resultados de porcentaje de citotoxicidad y concentración inhibitoria 50 obtenidos para los derivados de quinoxalina 1,4-di-N-óxido seleccionados y el fármaco de referencia Nfx.	203
Tabla 36. Actividad biológica <i>in vitro</i> frente a la forma tripomastigote del clon CI Brener.....	203
Tabla 37. Estructura y resultados obtenidos (CI ₅₀ e IS) en el ensayo de citotoxicidad frente a la línea celular de macrófagos murinos J-744.	207

Tabla 38. Estructura de los derivados de quinoxalina 1,4 di- <i>N</i> -óxido estudiados en el ensayo de mutagenicidad.	210
Tabla 39. Resultados de mutagenicidad para los dos sistemas experimentales empleados (-S9 y +S9) en el test de Ames.	211
Tabla 40. Porcentajes de supervivencia de los ratones empleados en los diferentes programas de tratamiento de los experimentos realizados.....	215
Tabla 41. Estructura y datos de voltametría cíclica de los derivados evaluados.....	221
Tabla 42. Constantes de Hammett para los diferentes sustituyentes empleados en las posiciones 3, 6 y 7 del anillo de quinoxalina ^a	226
Tabla 43. Estructura, datos de voltametría cíclica y resultados de actividad <i>in vitro</i> anti- <i>T. cruzi</i> de los derivados de quinoxalina estudiados.	229
Tabla 44. Estructura de los derivados de quinoxalina 1,4 di- <i>N</i> -óxido estudiados.	230
Tabla 45. Datos de porcentaje de actividad de deshidrogenasas mitocondriales y actividad <i>in vitro</i>	231

ANEXOS
