

SÍNTESIS DE NUEVAS SULFONAMIDAS ANTIPARASITARIAS

Synthesis of New Antiparasitic Sulfonamides

Estrella Palmira TRICÁS 

María Cristina SANZ* 

Raquel ÁLVAREZ* 

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área de Química Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. C. Lic. Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca

* Correo-e: cristina.scuesta@usal.es, raquelalvarez@usal.es

RESUMEN: La leishmaniasis y tripanosomiasis (Enfermedad de Chagas y del Sueño), son zoonosis causadas por tripanosomátidos flagelados con elevada similitud filogenética, incluidas dentro de las enfermedades tropicales desatendidas. Por ello, la búsqueda de nuevos fármacos es fundamental. Este trabajo se centra en el diseño, síntesis y evaluación de compuestos que se unen a la tubulina parasitaria en el dominio de la colchicina. Los parásitos presentan diferentes sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión a la colchicina con respecto a los mamíferos, lo que permite diseñar ligandos específicos que actúen frente a la tubulina parasitaria sin afectar al huésped. A partir de ligandos que han demostrado su potencial citotóxico frente a líneas tumorales, y las diferencias en el sitio de la colchicina, se ha desarrollado una familia de sulfonamidas diarílicas, que combinan un anillo de *p*-metoxifenilo con un anillo fenílico que incorpora sustituyentes polares como ácidos carboxílicos, ésteres o amidas en posición *meta*. Para la síntesis de los 18 compuestos obtenidos, se han realizado cinco tipos de reacciones diferentes y métodos de aislamiento y purificación determinados. Todos han sido caracterizados por resonancia magnética nuclear y espectroscopía de masas de alta resolución y han sido enviados para su ensayo frente a *Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei*.

Palabras clave: Leishmaniasis; tripanosomiasis; tubulina; colchicina; sulfonamidas; antimitóticos.

ABSTRACT: Leishmaniasis and trypanosomiasis (Chagas disease and Sleeping Sickness) are zoonotic diseases caused by flagellated trypanosomatids with high phylogenetic similarity, classified as neglected tropical diseases. Therefore, the search for new drugs is essential. This study focuses on the design, synthesis, and evaluation of compounds that bind to parasitic tubulin at the colchicine domain. Parasites exhibit different amino acid substitutions in the colchicine-binding site compared to mammals, allowing for the design of specific ligands that target parasitic tubulin without affecting the host. Based on ligands that have demonstrated cytotoxic potential against tumor cell lines and considering the differences in the colchicine-binding site, a family of diaryl sulfonamides has been developed. These compounds combine a *p*-methoxyphenyl ring with a phenyl ring incorporating polar substituents such as carboxylic acids, esters, or amides at *meta* position. For the synthesis of the 18 obtained compounds, five different types of reactions and specific isolation and purification methods were performed. Nuclear magnetic resonance and high resolution mass spectra has been made for compounds characterization. Additionally, these compounds have been sent for testing against *Leishmania infantum* and *Trypanosoma brucei*.

Keywords: leishmaniasis; trypanosomiasis; tubulin; colchicine; sulfonamides; antimitotics.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis y tripanosomiasis (Enfermedad de Chagas/Enfermedad del Sueño) son enfermedades parasitarias (zoonosis) causadas por tripanosomátidos flagelados con elevada similitud filogenética (Nodarse *et al.*, 2021), incluidas dentro de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) que presentan una elevada prevalencia, especialmente en los países menos desarrollados (Werner, 2014).

Esto se refleja en la limitada disponibilidad de arsenal terapéutico. En leishmaniasis, los fármacos existentes (antimoniales pentavalentes) por sí solos no son capaces de eliminar el parásito del organismo y es necesario que el paciente sea inmunocompetente para su total recuperación (OMS, 2023). En la Enfermedad de Chagas, el tratamiento con benznidazol y nifurtimox únicamente es eficaz en la fase aguda de la enfermedad, presentando resistencias cuando el paciente evoluciona a la fase crónica (OMS, 2024), al igual que en la Enfermedad del Sueño (OMS, 2023). Por tanto, la búsqueda de nuevos fármacos es fundamental.

El grupo de investigación se centra en el diseño, síntesis y evaluación de ligandos de unión a tubulina en el dominio de la colchicina, diana muy estudiada para la síntesis de compuestos antitumorales. La tubulina es una proteína clave en la formación de los microtúbulos del huso mitótico durante la división celular

(Vicente-Blázquez *et al.*, 2019), y en la formación de cilios y flagelos en parásitos (Solter *et al.*, 2012). A pesar de ser una proteína altamente conservada, la tubulina parasitaria presenta diferentes sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión de la colchicina con respecto a los mamíferos (Luis *et al.*, 2013). Esto permite el diseño de ligandos que actúen selectivamente sin afectar al huésped.

La inclusión de un grupo sulfonamida aumenta la polaridad de los compuestos, favorece sus propiedades fisicoquímicas y ofrece una versatilidad que presenta ventajas en las interacciones de los ligandos con la diana (Vicente-Blázquez *et al.*, 2021). Antecedentes del grupo de investigación han demostrado que ligandos diarílicos unidos por un grupo sulfonamida pueden unirse al sitio de la colchicina en tubulina y su actividad antitumoral o antiparasitaria puede modularse variando los sustituyentes de los anillos aromáticos (González *et al.*, 2021).

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Tomando como base ligandos A-C que han demostrado potencial citotóxico frente a líneas tumorales humanas (Vicente-Blázquez *et al.*, 2021) y las diferencias en el sitio de la colchicina de la tubulina en *Leishmania spp* y *Trypanosoma spp* (Luis *et al.*, 2013), para este trabajo se plantea la síntesis de una nueva familia de sulfonamidas diarílicas que combinan un anillo de *p*-metoxifenilo con un anillo fenílico que incorpora sustituyentes polares como ácidos carboxílicos, ésteres o amidas en posición *meta*. (Figura 1)

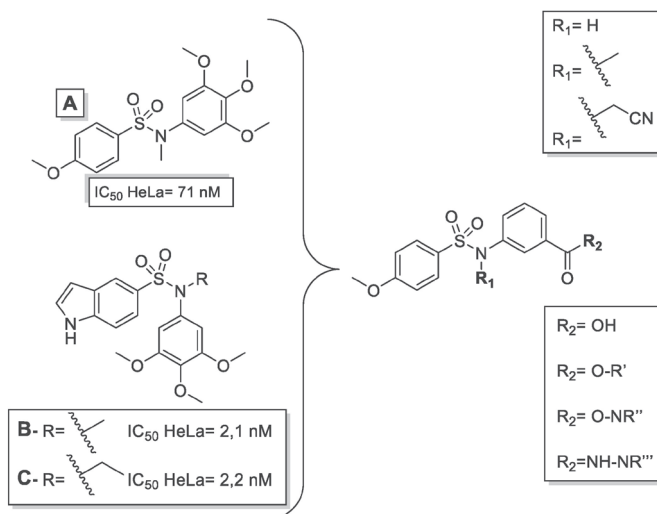


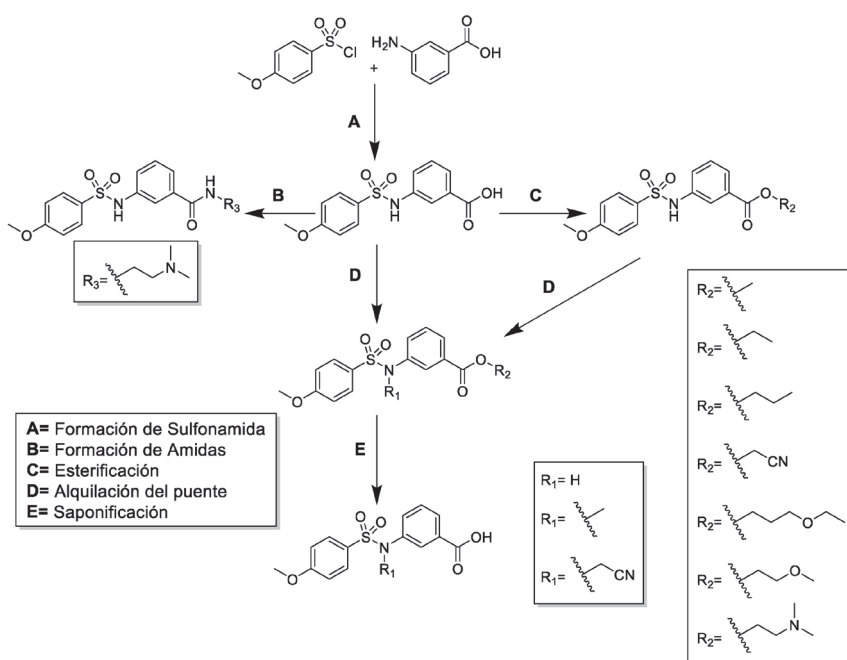
FIGURA 1. Ligandos de tubulina A-C y compuestos objetivo de este trabajo.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es la síntesis, purificación y caracterización de los compuestos objetivo para posteriormente ensayarlos como agentes antileishmánicos y antitripanosómicos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Síntesis química y aislamiento

Para la síntesis de los compuestos se sigue el esquema sintético mostrado en la Figura 2, empleando 5 tipos de reacciones (A-E), descritas a continuación:



La Cromatografía en Capa Fina (CCF) es una técnica analítica basada en la separación de compuestos en una fase estacionaria (formada por un soporte de aluminio y sílice), mediante una fase móvil líquida (diferentes disolventes). Las diferentes velocidades de elución dependen de la polaridad y del tamaño (Vallejo-Rosero et al., 2021). Se visualiza en presencia de luz UV a 360 nm.

Cuando no queda material de partida, se vierte sobre hielo y ácido clorhídrico (HCl) 2N, formándose un precipitado que corresponde al producto, que se filtra con embudo Büchner.

Las aguas madre se extraen con acetato de etilo (AcOEt) a fin de recuperar el máximo producto posible. Con la fase orgánica, se realiza el proceso habitual que consiste en: lavar hasta pH neutro, secar con sulfato sódico, filtrar y evaporar el disolvente a vacío con el rotavapor.

B) Formación de amidas

El material de partida disuelto en diclorometano se hace reaccionar con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (2,3 equivalentes), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (0,6 equivalentes) y *N,N*-dimetiletilendiamina (1 equivalente). La reacción se realiza en microondas durante 45 minutos a 85°C. El seguimiento de la reacción se lleva a cabo a través de CCF.

Para el aislamiento, se realiza una extracción líquido-líquido a pH básico (pH 8-9) con AcOEt, seguido del proceso habitual.

C) Formación de éster

C) 1. Esterificación de Fisher (medio ácido)

Se ha realizado la esterificación de los ácidos carboxílicos con diferentes alcoholes en medio ácido. Para ello, se disuelve el material de partida en el alcohol seleccionado (actúa como reactivo y disolvente), se adicionan 2 mL de HCl concentrado y se deja en agitación, variando la temperatura en función del alcohol empleado.

Una vez finalizada la reacción, se vierte sobre hielo y bicarbonato. El aislamiento se lleva a cabo mediante extracción líquido-líquido a pH neutro, con diclorometano y con AcOEt. Una vez aislada la fase orgánica, se realiza el proceso habitual.

C) 2. Esterificación en medio básico

El material de partida previamente disuelto en diclorometano se hace reaccionar con el alcohol seleccionado (1,2 equivalentes), DMAP (0,8 equivalentes) y EDC (2,3 equivalentes). Se lleva a cabo en microondas, a 88°C, durante 90 minutos.

Una vez finalizada la reacción, se lava con ácido y, después del proceso habitual, se cristaliza en diclorometano/hexano. Las aguas madre, se extraen a pH neutro con diclorometano y, después, con AcOEt, seguido del proceso habitual. Se repitió el proceso de cristalización tres veces.

D) Alquilación del nitrógeno de la sulfonamida del puente

Se disuelve el material de partida en acetonitrilo, se adiciona carbonato de cesio (1,3 equivalentes) como base para sustraer el hidrógeno unido al nitrógeno de la sulfonamida y, a continuación, se adiciona un exceso del derivado halogenado correspondiente (ioduro de metilo o 2-cloroacetonitrilo). Una vez finalizada la reacción, se evapora el acetonitrilo y se realiza una extracción líquido-líquido con AcOEt, seguida del proceso habitual.

E) Saponificación

Para esta reacción de hidrólisis en medio básico se han utilizado diferentes bases en función del tipo de éster que se quería hidrolizar:

- Hidrólisis del éster metílico. Se disuelve el éster en metanol y se adicionan 200-300 mg de NaOH. Se deja reaccionar 5 días a temperatura ambiente y agitación. Se sigue la evolución de la reacción a través de CCF y del pH para asegurar la basicidad.

Transcurrido ese tiempo, se vierte sobre hielo y HCl 2N, formándose un precipitado que se filtra en embudo Büchner. Las aguas madre se extraen con AcOEt y se realiza el proceso habitual, obteniendo el resto de producto objetivo.

- Hidrólisis del éster cianometílico. Se disuelve el éster en agua/acetona en proporción 1:1 y se adicionan 200 mg de NaHCO₃. Se deja reaccionar 5 días a temperatura ambiente y agitación.

El seguimiento y aislamiento de esta reacción es equivalente a la hidrólisis de éster metílico previamente descrita.

Las técnicas empleadas para el aislamiento del producto una vez finalizada la reacción han sido:

- a) Precipitación y filtración al vacío: Al formarse un precipitado, éste se filtra empleando un embudo Büchner, al que se le coloca papel de filtro, acoplado a un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío, facilitando la filtración y el secado del sólido.
- b) Extracción Líquido-Líquido: Técnica empleada para separar o aislar el producto de la reacción en función del carácter ácido, básico o neutro del mismo, empleando disolventes inmiscibles con el agua y soluciones acuosas ácidas y/o básicas. (Aguado, 2015)

Las técnicas de purificación empleadas en este trabajo han sido:

- a) **Cristalización:** Se fundamenta en la diferente solubilidad en caliente y frío de un compuesto sólido en un determinado disolvente. Para conseguir la formación de los cristales, es necesario sobresaturar la disolución. (Seguí, 2023)

Para ello, se disuelve el soluto en la mínima cantidad de disolvente posible, mientras se calienta y se somete a agitación suave. Una vez disuelto en su totalidad, se deja enfriar. Al disminuir la temperatura, disminuye la solubilidad, favoreciendo la sobresaturación y, por tanto, la cristalización.

- b) **Cromatografía en Columna (CC):** Se basa en la separación de los compuestos en función de su diferente adsorción a una fase estacionaria (gel de sílice) en base a su diferente tamaño y polaridad.

Esta técnica se lleva a cabo en una columna de vidrio, donde se introduce la muestra con los compuestos a separar adsorbidos en sílice gruesa. (Ruíz, 2020).

A medida que se añade eluyente (ej: AcOEt/hexano en diferente proporción), los compuestos descienden en función de la afinidad por la fase estacionaria, recolectándose en tubos de ensayo. Los menos afines, (menos polares) llegarán antes al extremo final de la columna. Una vez recolectadas las diferentes fracciones, se evapora el disolvente en el rotavapor y se analizan los componentes obtenidos.

3.2. Identificación

La caracterización de los productos sintetizados se lleva a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Protón (^1H) y de Carbono (^{13}C), Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) e Infrarrojo (IR).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se han sintetizado un total de 18 compuestos. (Figura 3)

A continuación, se exponen los resultados más relevantes de cada tipo de reacción:

4.1. Formación del puente de sulfonamida

Esta reacción se llevó a cabo para la obtención del compuesto **1**, a partir del cual se sintetizan el resto de los compuestos, por lo que se realizó repetidas veces, todas con rendimientos cuantitativos (>95%). La presencia de piridina aporta el medio básico necesario para que se produzca la reacción eficazmente.

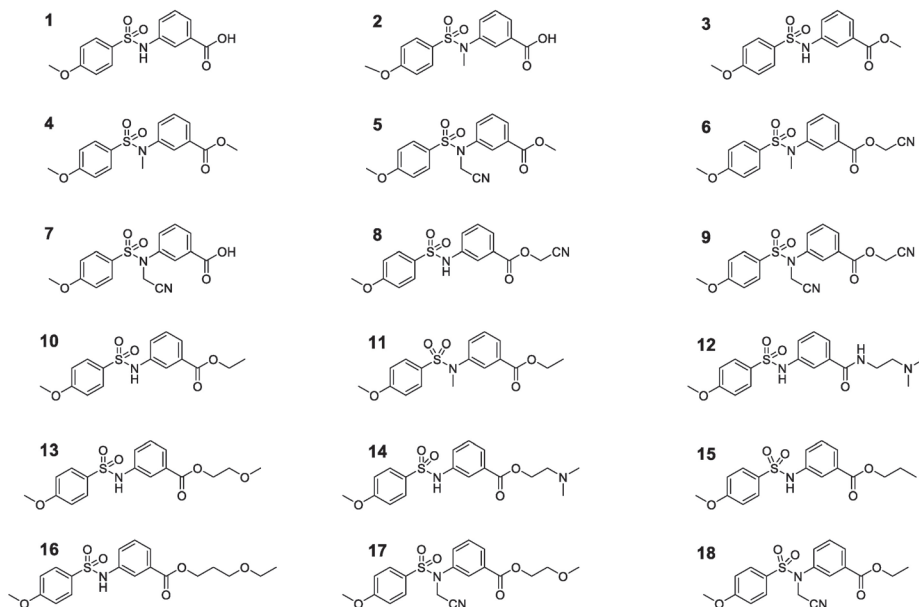


FIGURA 3. Estructura de los compuestos finales.

4.2. Formación de amidas

Se obtuvo un rendimiento del 70% del compuesto **12**, empleando un derivado de carbodiimida como grupo activante del ácido carboxílico.

4.3. Formación de ésteres

4.3.1. Esterificación de Fisher (medio ácido)

Para las reacciones de esterificación en medio ácido se emplearon diferentes condiciones en función del compuesto a obtener. Para los compuestos **3** y **5**, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante 3 días y con rendimientos del 87% y 50%, respectivamente. Por otro lado, los compuestos **14**, **15** y **16** fueron calentados a una temperatura de 150 °C, durante 14 días, obteniendo rendimientos del 40%, 53% y 47%, respectivamente. La confirmación de la formación de los compuestos se realiza mediante RMN ^1H y ^{13}C , donde se observan señales características de cada cadena en la zona alifática.

4.3.2. Esterificación en medio básico

Estas reacciones se llevaron a cabo para la obtención de los compuestos **13** y **14**, con rendimientos de 45% y 93%, respectivamente. El rendimiento de **14** es tan elevado por presentar impurezas de DMAP que no se consiguieron eliminar.

4.4. *Alquilación del nitrógeno de la sulfonamida del puente*

4.4.1. *Introducción de un grupo metilo.* Una vez disuelto el compuesto **1** y adicionada la base (según el método D), se adiciona CH₃I (4 equivalentes) y se deja reaccionar durante 3 días a temperatura ambiente y agitación.

En CCF se observan dos manchas, obteniendo dos productos de reacción, compuesto monosustituido (**3**) y disustituido (**4**). Se realiza una CC con Diclorometano/Hexano en proporción 9:1 como eluyente para la separación de ambos. Se obtuvo un rendimiento de los compuestos **3** y **4** del 38% y 34%, respectivamente.

La reacción se repitió para obtener únicamente el compuesto disustituido (83%) para posteriormente saponificar y obtener el compuesto **2**. Además, el rendimiento obtenido en la transformación de **8** en **6** y de **10** en **11**, fue del 86% en ambos.

4.4.2. *Introducción de un grupo acetonitrilo.* Una vez disuelto el compuesto **1** y adicionada la base, se añade cloroacetonitrilo (4 equivalentes) y se deja reaccionar a temperatura ambiente y agitación durante 5 días. (Control por CCF hasta finalización).

Como en el caso anterior, se observan dos compuestos: El monosustituido (**8**) y el disustituido (**9**). Se realiza una CC para la separación de ambos compuestos, utilizando como eluyentes diclorometano y AcOEt. Se obtuvieron los compuestos **8** y **9** con rendimientos del 11% y 20%, respectivamente. Además, se repitió la reacción para obtener mayor cantidad del compuesto **9** (94%).

El rendimiento obtenido en los compuestos **5**, **17** y **18** fue cuantitativo. Adicionalmente, el compuesto **17** se purificó mediante cristalización (7%).

4.5. *Hidrolisis básica (Saponificación)*

Siguiendo las condiciones descritas de estas reacciones se obtuvieron los compuestos **2** y **7**, con rendimiento cuantitativo y del 78%, respectivamente.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo me ha permitido conocer y aplicar las diferentes técnicas de síntesis y aislamiento empleadas en química orgánica, así como optimizar reacciones

mediante microondas y aprender a identificar y analizar los compuestos espectroscópicamente.

La metodología propuesta ha permitido sintetizar, purificar y caracterizar una nueva familia de 18 diarilsulfonamidas que combinan un anillo de *p*-metoxifenilo con fenilo diferentemente sustituido en posición *meta*.

Los 18 compuestos han sido enviados para su ensayo frente a *Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado Bernal R. Tema 20. Extracción líquido-líquido [Internet]. Universidad de Burgos. Departamento De Química. Área De Química Inorgánica; 2015.
- González M, Ovejero-Sánchez M, Vicente-Blázquez A, Medarde M, González-Sarmiento R, Peláez R. Los estudios de metoxi y bromo en N-(5-metoxifenil) metoxibencenosulfonamidas revelan compuestos citotóxicos potentes, especialmente contra la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7. *Journal Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2021;36(1):1029–47. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1925265>
- Luis L, Serrano ML, Hidalgo M, Mendoza-León A. Comparative analyses of the β -tubulin gene and molecular modeling reveal molecular insight into the colchicine resistance in kinetoplastids organisms. *Biomed Res Int*. 2013;843748. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/843748>.
- Nodarse J, Álvarez A, Van Der Auwera G, Dujardin J, Requena J, Deborggraeve S, Büscher P, et al. Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia *Trypanosomatidae* basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. *Anales De La Academia De Ciencias De Cuba* 2021;11(1):2–15.
- Organización Mundial De La Salud (OMS). Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) [Internet] 2024. [Citado el 10 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Organización Mundial De La Salud (OMS). Leishmaniasis [Internet]. 2023 [Citado el 10 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Organización Mundial De La Salud (OMS). Tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño) [Internet]. 2023. [Citado el 11 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
- Ruíz Benítez. Cromatografía en capa fina y en columna [Internet]. Ediciones Universidad Simón Bolívar. Facultad Ciencias Básicas Y Biomédicas. 2020.
- Seguí Gil L. La cristalización como operación de recuperación o purificación. Departamento De Tecnología De Alimentos. Universidad Politécnica De Valencia. 2023.

- Solter LF, Becnel JJ., Vávra J. Research methods for entomopathogenic microsporidia and other protists. En: Lacey LA, editor. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Second Edition). Academic Press, 2012;329-371.
- Vallejo-Rosero Y, Barrios-Correa L, Anaya-Gil J. La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*, 2021;35(2):19-25.
- Vicente-Blázquez A, González M, Álvarez R, del Mazo S, Medarde M, Peláez R. Antitubulin sulfonamides: The successful combination of an established drug class and a multifaceted target. *Medicinal Research Reviews*. Rev. 2019;39(3):775–830. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/med.21547>
- Vicente-Blázquez A, González M, Medarde M, Mollinedo F, Peláez R. Nuevos derivados de indolsulfonamida dirigidos al sitio colchicina de la tubulina: síntesis, actividad antitumoral, relaciones estructura-actividad y modelado molecular. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2021;36(1):2025–44. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1975277>
- Werner Apt B. Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014;25(3):485–528. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70065-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70065-3)